

Podrobný obsah

Kapitola 1 První seznámení s buňkami

Buňky pod mikroskopem	1	Všechny dnešní buňky se zřejmě vyvinuly ze stejného předka	21
Vynález světelného mikroskopu vedl k objevu buněk	2	Bakterie jsou nejmenší a nejjednodušší buňky	22
Buňky, orgány a dokonce molekuly lze pozorovat pod mikroskopem	3	Molekulární biologové se zaměřili na <i>E. coli</i>	25
Eukaryontní buňka	9	<i>Giardia</i> může představovat přechodný stav v evoluci eukaryontních buněk	25
Jádro je informačním centrem buňky	9	Pekařská kvasinka je obyčejnou eukaryontní buňkou	26
Mitochondrie získávají energii z potravy	10	Jednobuněčné organismy mohou být velké, složité a dravé: Prvoci	27
Chloroplasty zachycují energii ze slunečního světla	12	<i>Arabidopsis</i> byla vybrána z 300 000 druhů jako modelová rostlina	28
Vnitřní membrány vytvářejí vnitrobuněčné oddíly s různými funkcemi	13	Svět živočichů reprezentují moucha, červ, myš a člověk	29
Cytosol je koncentrovaný vodný gel malých a velkých molekul	15	Buňky stejného mnohobuněčného organismu se mohou značně lišit	31
Cytoskelet zodpovídá za buněčné pohyby	16	Základní shrnutí	34
Jednotnost a rozdílnost buněk	17	Otázky	35
Buňky se značně liší svým tvarem a funkcí	19		
Všechny živé buňky mají podobný chemický základ	21		

Kapitola 2 Chemické složení buňky

Chemické vazby	37	Molekuly v buňkách	52
Buňky jsou složeny jen z několika druhů atomů	38	Buňky jsou vytvořeny ze sloučenin uhlíku	52
Vnější elektrony určují reaktivitu atomů	39	Buňky obsahují čtyři hlavní skupiny malých organických molekul	52
Iontové vazby vznikají ziskem nebo ztrátou elektronů	42	Sacharidy jsou zdrojem energie pro buňky a tvoří podjednotky polysacharidů	53
Kovalentní vazby vznikají sdílením elektronů	43	Mastné kyseliny jsou složkami buněčných membrán	55
Existují různé typy kovalentních vazeb	45	Aminokyseliny jsou podjednotkami proteinů	60
Voda je nejhojnější látkou v buňkách	48	Nukleotidy jsou podjednotkami DNA a RNA	64
Některé polární molekuly tvoří ve vodě kyseliny a zásady	49	Makromolekuly obsahují specifické sekvence podjednotek	65

Nekovalentní vazby určují přesný tvar makromolekuly	69	Základní shrnutí	73
Nekovalentní vazby umožňují makromolekule vázat další vybrané molekuly	72	Otázky	74

Kapitola 3 Energie, katalýza a biosyntéza

Katalýza a využití energie buňkami	79	Aktivované nosičové molekuly a biosyntéza	94
Biologický pořádek je umožňován uvolňováním tepelné energie z buněk	79	Tvorba aktivovaného nosiče je spřažena s energeticky výhodnou reakcí	95
Fotosyntetické organismy využívají sluneční světlo k syntéze organických molekul	82	ATP je nejčastěji užívanou nosičovou molekulou	96
Buňky získávají energii oxidací organických molekul	83	Energie uložená v ATP se často využívá ke spojení dvou molekul	97
Oxidace a redukce zahrnuje přenosy elektronů	84	NADH a NADPH jsou důležité přenašeče elektronů	98
Enzymy obcházejí bariéry, které brání průběhu chemických reakcí	85	V buňkách existuje mnoho dalších aktivovaných přenašečových molekul	100
Jak enzymy nacházejí své substráty: důležitost rychlé difuze	86	Syntéza biologických polymerů vyžaduje přísun energie	103
Změna volné energie při reakci určuje, zda reakce může proběhnout	89	Základní shrnutí	105
Na ΔG má vliv koncentrace reaktantů	89	Otázky	105
Pro následné reakce se hodnoty ΔG° sčítají	93		

Kapitola 4 Jak buňky získávají energii z potravy

Odbourání cukrů a tuků	108	Transport elektronů pohání syntézu ATP ve většině buněk	124
Molekuly potravy jsou odbourávány ve třech fázích a dávají tak vzniknout ATP	108	Ukládání a využití potravy	125
Glykolýza je ústřední dráhou tvorby ATP	110	Organismy ukládají molekuly potravy ve speciálních zásobárnách	125
Fermentace umožňuje produkci ATP za nepřítomnosti kyslíku	114	Mnoho biosyntetických drah začíná glykolýzou nebo citrátovým cyklem	127
Glykolýza je příkladem enzymového spřažení oxidace s ukládáním energie	114	Metabolismus je organizován a regulován	128
Cukry i tuky se odbourávají na acetyl-CoA v mitochondriích	118	Základní shrnutí	129
Cykly kyseliny citronové vytváří NADH oxidací acetylových skupin na CO_2	119	Otázky	130

Kapitola 5 Proteiny: struktura a funkce

Tvar a struktura proteinů	134	Proteiny se skládají do celé řady komplikovaných tvarů	140
Tvar proteinu je dán pořadím jeho aminokyselin	134	Běžnými strukturními motivy jsou α -šroubovice a β -struktura	141
Proteiny se skládají do konformace s nejnižší energií	139	Proteiny mají několik různých úrovní organizace	145

Jen několik z mnoha možných polypeptidových řetězců bude užitečných	147	Lysozym ilustruje práci enzymu	167
Proteiny lze rozdělit do rodin	147	Účinnost enzymu vyjadřují konstanty v_{lim} a K_m	169
Molekuly větších proteinů často obsahují více než jeden polypeptidový řetězec	148	Pevně vázané malé molekuly přidávají proteinům další funkce	171
Proteiny se mohou sdružovat do vláken, listů či kuliček	149	Katalytická aktivita enzymů je regulována	172
Šroubovice je běžným motivem v biologických strukturách	152	Allosterické enzymy mají dvě vazebná místa, která interagují	173
Některé druhy proteinů mají podobu dlouhých vláken	152	Konformační změna může být vyvolána fosforylací proteinu	174
Extracelulární proteiny jsou často stabilizovány kovalentním zesíťováním	154	Proteiny vázající GTP mohou podstupovat rozsáhlé konformační změny	176
Jak proteiny pracují	154	Motorové proteiny generují rozsáhlé pohyby v buňce	176
Proteiny se vážou k jiným molekulám	155	Proteiny často vytvářejí velké komplexy, které fungují jako proteinové stroje	178
Vazebná místa protilátek jsou zvláště rozmanitá	156	Základní shrnutí	179
Měřítkem pevnosti vazby je rovnovážná konstanta	157	Otázky	180
Enzymy jsou mocné a vysoce specifické katalyzátory	167		

Kapitola 6 DNA

Struktura a funkce DNA	184	Oprava DNA	197
Geny jsou tvořeny DNA	184	Změny v DNA jsou příčinou mutací	198
DNA je složena ze dvou komplementárních řetězců nukleotidů	185	Systém opravy chybného párování bází napravuje chyby, které unikly replikačnímu aparátu	200
Struktura DNA umožňuje zachování dědičnosti	188	DNA v buňkách podléhá kontinuálnímu poškozování	201
Replikace DNA	189	Stabilita genů je závislá na opravách DNA	202
Syntéza DNA začíná v replikačních počátcích	190	Díky vysoké přesnosti, s jakou je DNA uchovávána, mají blízkce příbuzné druhy proteiny s velmi podobnými sekvencemi	205
K syntéze DNA dochází v replikačních vidličkách	191	Základní shrnutí	206
Replikační vidlička je asymetrická	193	Otázky	207
DNA-polymeráza opravuje své chyby	194		
Oligoribonukleotidy jsou používány jako primery pro syntézu DNA	194		
Proteiny v replikační vidličce tvoří replikační aparát	196		

Kapitola 7 Od DNA k proteinu

Od DNA k RNA	212	Signály v DNA říkají RNA-polymeráze, kde má začít a kde skončit přepis	216
Části DNA jsou přepisovány do RNA	212	Eukaryontní RNA podléhají v jádře úpravám	218
Transkripce vzniká RNA komplementární k jednomu řetězci DNA	213	Eukaryontní geny jsou přerušovány nekódujícími sekvencemi	219
V buňce vzniká několik typů RNA	215		

Introny jsou z RNA odstraněny sestřihem	220	Proteiny jsou syntetizovány na polyribosomech	232
Molekuly RNA jsou v buňce nakonec degradovány	223	Přísně regulovaná degradace proteinů umožňuje buňce určovat množství každého proteinu	233
Prapůvodní buňky pravděpodobně obsahovaly ve svých genech introny	223	Je třeba mnoha kroků, než z DNA vznikne protein	234
Od RNA k proteinu	224	RNA a původ života	235
mRNA je dekodována po trojicích nukleotidů	225	Jednoduché biologické molekuly mohly vzniknout za prebiotických podmínek	235
Molekuly tRNA přiřazují aminokyseliny ke kodonům v mRNA	226	RNA může uchovávat informaci i katalyzovat chemické reakce	237
Specifické enzymy připojují správné aminokyseliny k jejich tRNA	227	RNA v evoluci pravděpodobně předcházela DNA	239
mRNA je dekodována na ribosomech	229	Základní shrnutí	240
Kodony v mRNA signalizují, kde má začít a kde skončit syntéza proteinu	231	Otázky	241

Kapitola 8 Chromosomy a regulace genů

Struktura eukaryontních chromosomů	246	Represory vypínají geny a aktivátory je zapínají	261
Eukaryontní DNA je sbalena do chromosomů	246	Iniciace transkripce u eukaryot je komplexní proces	263
Stav chromosomů se mění během buněčného cyklu	247	Eukaryontní RNA-polymeráza vyžaduje obecné transkripční faktory	264
Specializované sekvence DNA zajišťují účinnou replikaci chromosomů	249	Eukaryontní regulační proteiny kontrolují expresi genu ze značné vzdálenosti	265
Nukleosomy jsou základní strukturní jednotky chromatinu	250	Sbalení promotorové DNA do nukleosomu může ovlivňovat iniciaci transkripce	266
DNA v chromosomech je kondenzována na několika úrovních	252	Eukaryontní geny jsou regulovány kombinacemi proteinů	267
Interfázové chromosomy obsahují kondenzované i rozvolněné formy chromatinu	253	Expresí různých genů může být řízena jedním proteinem	268
Polohový efekt, ovlivňující genovou expresi, odhalil odlišnosti v kondenzaci interfázových chromosomů	256	Kombinační kontrola může dát vznik různým buněčným typům	269
Interfázové chromosomy jsou v jádře organizovány	256	V dceřiných buňkách mohou být exprimovány stejné geny jako v mateřské buňce	271
Regulace genů	257	Tvorba celého orgánu může být spuštěna jedním regulačním proteinem	273
Buňky regulují expresi svých genů	258	Základní shrnutí	274
Transkripce je regulována proteiny, které se vážou na regulační sekvence DNA	259	Otázky	275

Kapitola 9 Genetická rozmanitost

Genetická rozmanitost u bakterií	278	Bakteriální buňky mohou získávat geny od jiných bakterií	281
Rychlé dělení bakterií znamená, že se mutace objeví v krátké době	279	Bakteriální geny mohou být přenášeny procesem zvaným bakteriální konjugace	282
Mutace u bakterií mohou být selektovány změnou podmínek prostředí	280	Bakterie mohou přijímat DNA ze svého okolí	284

Mezi dvěma molekulami DNA s obdobnou nukleotidovou sekvencí může probíhat homologní rekombinace	285	Viry jsou plně mobilní genetické elementy, které mohou opustit buňky	297
Bakteriální viry mohou přenášet geny mezi bakteriemi	288	Retroviry obracejí normální tok genetické informace	300
Transponovatelné elementy vytvářejí genetickou rozmanitost	289	Retroviry, které získaly hostitelské geny, mohou měnit buňky v nádorové	302
Zdroje genetických změn v eukaryontních genomech	291	Pohlavní rozmnožování a reorganizace genů	304
Náhodnými duplikacemi DNA vznikají rodiny příbuzných genů	292	Pohlavní rozmnožování udílí organismům výhody v konkurenčním, nepředvídatelně se měnícím prostředí	304
Geny kódující nové proteiny mohou být vytvořeny rekombinací exonů	293	Pro pohlavní rozmnožování je třeba diploidních i haploidních buněk	305
Velká část DNA mnohobuněčných eukaryot je tvořena opakujícími se nekódujícími sekvencemi	294	V procesu meiozy jsou haploidní buňky tvořeny z diploidních	306
Přibližně 10 % lidského genomu je tvořeno dvěma rodinami transponovatelných sekvencí	295	Meiozou se vytváří velká genetická rozmanitost	307
Evoluce genomů byla urychlena transponovatelnými elementy	296	Základní shrnutí	309
		Otázky	310

Kapitola 10 DNA-technologie

Jak se molekuly DNA analyzují	315	Lidské geny se izolují klonováním DNA	327
Restrikční endonukleázy štěpí DNA ve specifických místech	315	Knihovny cDNA reprezentují mRNA vznikající v určité tkáni	329
Gelová elektroforéza dělí fragmenty DNA podle velikosti	317	Hybridizace umožňuje identifikaci i vzdáleně příbuzných genů	331
Stanovení nukleotidové sekvence DNA	320	Polymerázovou řetězovou reakcí lze amplifikovat vybrané sekvence DNA	332
Hybridizace nuleových kyselin	320	Genové inženýrství	335
Hybridizace DNA umožňuje prenatalní diagnostiku genetických chorob	321	Je možné vytvořit zcela nové molekuly DNA	
Hybridizací in situ lze určit polohu sekvencí nukleových kyselin v buňkách nebo na chromosomech	323	Klonováním DNA můžeme získat vzácné buněčné proteiny ve velkém množství	337
Klonování DNA	324	RNA může vznikat transkripcí in vitro	338
DNA-ligáza spojuje dva fragmenty za vzniku rekombinantní molekuly DNA	325	Mutantní organismy nejlépe odrážejí funkci studovaného genu	339
Bakteriální plasmidy mohou být využity pro klonování DNA	326	Transgenní živočichové obsahují geneticky pozměněné geny	340
		Základní shrnutí	342
		Otázky	343

Kapitola 11 Struktura membrán

Lipidová dvojná vrstva	348	Polypeptidový řetězec obvykle prochází dvojnou vrstvou jako α -šroubovice	358
Membránové lipidy tvoří ve vodě dvojnou vrstvu	349	Membránové proteiny mohou být solubilizovány detergentem a přečištěny	360
Lipidová vrstva je dvourozměrnou tekutinou	352	Úplná struktura je známa jen u několika málo membránových proteinů	361
Tekutost lipidové dvojnou vrstvy závisí na jejím složení	353	Plasmatická membrána je zesílena buněčným kortexem	362
Lipidová dvojná vrstva je asymetrická	354	Povrch buněk je vybaven pláštěm sacharidů	364
Asymetrie lipidů se rodí uvnitř buňky	355	Buňky mohou omezit pohyb membránových proteinů	365
Lipidové dvojnou vrstvy jsou nepropustné pro nenabitě molekuly i pro ionty	356	Základní shrnutí	368
Membránové proteiny	357	Otázky	368
Membránové proteiny asociují s lipidovou dvojnou vrstvou různými způsoby	358		

Kapitola 12 Přenos látek přes membrány

Koncentrace iontů uvnitř buňky a v jejím okolí se mohou značně lišit	372	Iontové kanály a membránový potenciál	385
Přenašečové proteiny a jejich funkce	373	Iontové kanály jsou iontově selektivní a uzavíratelné	386
Rozpuštěné látky se přes membránu dostávají aktivním nebo pasivním transportem	375	Iontové kanály se náhodně otevírají a zavírají	388
Pasivní transport může být poháněn jak koncentračním gradientem tak elektrickými silami	375	Iontové kanály uzavíratelné napětím reagují na změny membránového potenciálu	389
Aktivní transport pohání rozpuštěné látky proti gradientu jejich (elektro)chemického potenciálu	377	Membránový potenciál je řízen propustností membrány pro specifické ionty	391
Živočišné buňky využívají k odstraňování Na^+ energii hydrolyzy ATP	378	Iontové kanály a signalizace v nervových buňkách	394
Na^+/K^+ -ATPáza je poháněna přechodnou adicí fosforylové skupiny	379	Akční potenciály přispívají k rychlé komunikaci na dlouhé vzdálenosti	394
Živočišné buňky využívají k pohonu aktivního transportu živin gradient Na^+	380	Akční potenciály jsou obvykle zprostředkovány sodnými kanály ovládanými napětím	395
Sodno-draselná pumpa pomáhá udržovat osmotickou rovnováhu v živočišných buňkách	381	Napětím ovládané Ca^{2+} -kanály přeměňují v nervových zakončeních elektrické signály v chemické	397
Koncentrace Ca^{2+} uvnitř buňky jsou udržovány nízké s pomocí Ca^{2+} -pump	383	Chemicky regulované kanály v cílových buňkách převádějí chemické signály zpět do elektrické podoby	398
Gradient H^+ se využívá k pohonu membránového transportu u rostlin, hub a bakterií	384	Neurony dostávají jak excitační tak inhibiční podněty	400
		Synaptické spoje nám umožňují myslet, jednat a vzpomínat	401
		Základní shrnutí	404
		Otázky	405

Kapitola 13 Získávání energie v mitochondriích a chloroplastech

Buňky získávají většinu své energie mechanismem vázaným na membrány	409	Protony jsou čerpány přes membránu třemi dýchacími enzymovými komplexy	427
Mitochondrie a oxidační fosforylace	410	Dýchání je obdivuhodně účinné	429
Mitochondrie obsahuje dva membránové oddíly	411	Chloroplasty a fotosyntéza	430
Vysokoenergetické elektrony jsou generovány v cyklu kyseliny citronové	413	Chloroplasty připomínají mitochondrie, ale obsahují jeden oddíl navíc	430
Elektrony jsou přenášeny v řetězci proteinů ve vnitřní membráně mitochondrie	414	Chloroplasty zachycují energii slunečního světla a s její pomocí vážou uhlík	432
Přenos elektronů dává vznik protonovému gradientu přes membránu	415	Excitované molekuly chlorofylu fungují jako nálevka a svádějí energii do reakčního centra	433
Protonový gradient pohání syntézu ATP	417	Světelná energie pohání syntézu ATP a NADPH	434
Sprážený transport přes vnitřní mitochondriální membránu je poháněn gradientem elektrochemického potenciálu protonů	419	Fixace uhlíku je katalyzována ribulosabisfosfátkarboxylázou	436
Protonové gradienty vytvářejí většinu buněčného ATP	419	Fixací uhlíku v chloroplastech se tvoří sacharosa a škrob	438
Rychlá přeměna ADP na ATP v mitochondriích udržuje v buňce vysoký poměr ATP:ADP	421	Genetický aparát mitochondrií a chloroplastů odráží jejich prokaryontní původ	438
Elektrontransportní řetězce a čerpání elektronů	421	Naši jednobuněční předkové	439
Protony se snadno pohybují v důsledku přenosu elektronů	422	Sekvence RNA vydávají svědectví o průběhu evoluce	439
Redoxní potenciál je měřítkem elektronové afinity	422	Dávné buňky zřejmě vznikly v horkém prostředí	440
Přenosem elektronů se uvolňuje velké množství energie	423	<i>Methanococcus</i> žije v temnotě a živí se pouze anorganickými látkami	441
Kovy vázané na proteiny tvoří nejrůznější přenašeče elektronů	425	Základní shrnutí	443
		Otázky	444

Kapitola 14 Vnitrobuněčné oddíly a transport

Membránové organely	448	Při vstupu do mitochondrií a chloroplastů se proteiny rozvinou	457
Eukaryontní buňky obsahují základní sadu membránových organel	449	Proteiny vstupují do endoplasmatického retikula už během své syntézy	458
Membránové organely se vyvíjely různými cestami	450	Rozpustné proteiny se uvolňují do lumen ER	459
Třídění proteinů	452	Iniciační a terminační signál určují uspořádání transmembránového proteinu v dvojně vrstvě lipidů	461
Proteiny se dostávají do organel třemi mechanismy	453	Vezikulární transport	462
Adresová sekvence směřuje proteiny do správného oddílu	453	Transportní váčky přepravují rozpustné proteiny a membrány mezi jednotlivými oddíly buňky	462
Proteiny vstupují do jádra jadernými póry	454		

Pučení váčků je poháněno skládáním proteinového pláště	463	Specializované fagocytotické buňky pohlcují velké částice	472
Specifita navádění váčků k jejich cílům závisí na SNARE-proteinech	464	Kapaliny a makromolekuly jsou přijímány pinocytozou	473
Sekreční dráhy	466	Endocytoza zprostředkovaná receptory poskytuje specifickou cestu do živočišných buněk	474
Většina proteinů je kovalentně modifikována v ER	467	Endocytované makromolekuly jsou tříděny v endosomech	475
Kvalita proteinů je zajištěna kontrolou při výstupu z ER	468	Lyzosomy jsou základními místy vnitro-buněčného trávení	476
Proteiny jsou dále chemicky upravovány a tříděny v Golgiho aparátu	469	Základní shrnutí	478
Sekreční proteiny se z buňky uvolňují exocytozou	470	Otázky	479
Endocytotické dráhy	472		

Kapitola 15 Komunikace mezi buňkami

Obecné principy buněčné signalizace	482	Některé G-proteiny regulují iontové kanály	495
Signály mohou působit na dlouhou nebo krátkou vzdálenost	482	Některé G-proteiny aktivují enzymy vázané v membráně	496
Každá buňka odpovídá na omezený soubor signálů	484	Dráha cyklického AMP může aktivovat enzymy a zapínat geny	497
Receptory předávají signály po vnitrobuněčných signálních drahách	486	Dráha přes fosfolipázu C vede ke vzrůstu hladiny Ca ²⁺ uvnitř buňky	499
Některé signální molekuly mohou prostupovat plasmatickou membránou	488	Ca ²⁺ -signál spouští řadu biologických dějů	501
Oxid dusnatý může vstupovat do buněk a aktivovat enzymy přímo	489	Signální kaskády uvnitř buňky mohou být velmi rychlé, citlivé a přízpůsobivé: fotoreceptory v oční sítnici	502
Existují tři hlavní třídy receptorů na povrchu buněk	490	Receptory spojené s enzymy	504
Receptory spojené s iontovými kanály převádějí chemické signály na elektrické	491	Aktivované receptorové tyrosinkinázy vytvářejí komplex intracelulárních signálních proteinů	505
Signální kaskády uvnitř buňky fungují jako řada molekulových přepínačů	492	Receptorové tyrosinkinázy aktivují GTP-vázající protein Ras	506
Receptory spojené s G-proteiny	493	Sítě proteinkináz integrují informace pro řízení složitě chování buněk	508
Stimulace receptorů spojených s G-proteiny aktivuje G-proteinové podjednotky	493	Základní shrnutí	510
		Otázky	511

Kapitola 16 Cytoskelet

Střední filamenta	514	Mikrotubuly	518
Střední filamenta jsou pevná a odolná	515	Mikrotubuly jsou duté trubice se strukturně odlišnými konci	519
Díky středním filamentům jsou buňky odolné vůči mechanickému namáhání	515	Mikrotubuly udržuje rovnováha mezi jejich růstem a rozpadem	519
		Centrosom je v živočišných buňkách hlavním centrem, které organizuje mikrotubuly	520

Rostoucí mikrotubuly vykazují dynamickou nestabilitu	521	Řada proteinů se váže k aktinu a mění jeho vlastnosti	532
Mikrotubuly organizují vnitřek buňky	523	Většina eukaryontních buněk má pod plasmatickou membránou buněčný kortex	533
Molekulové motory pohánějí vnitrobuněčný transport	524	Pohyb buňky závisí na aktinu	533
Orgány se pohybují podél mikrotubulů	525	Aktin se spojuje s myosinem a vytváří kontraktilní struktury	536
Řasinky a bičíky obsahují stabilní mikrotubuly, jimiž pohybuje dynein	527	Během svalového stahu se aktinová vlákna posunují proti myosinovým vláknům	538
Aktinová vlákna	529	Svalový stah je zapínán náhlým vzrůstem koncentrace Ca^{2+}	539
Aktinová vlákna jsou tenká a pružná	530	Základní shrnutí	543
Mechanismus polymerace aktinu a tubulinu je podobný	530	Otázky	544

Kapitola 17 Buněčné dělení

Přehled buněčného cyklu	549	Cytokineze	560
Eukaryontní buněčný cyklus je rozdělen do čtyř fází	549	Mitotické vřeténko určuje rovinu dělení cytoplasmy	560
Cytoskelet se účastní mitozy i cytokineze	551	Kontraktilní prstenec živočišných buněk je tvořen aktinem a myosinem	561
Některé orgány se v průběhu mitozy dělí	551	Cytokineze u rostlinných buněk zahrnuje tvorbu nové buněčné stěny	562
Mitoza	552	Meioza	563
Mitotické vřeténko se začíná skládat v profázi	552	Homologní chromosomy se v průběhu meiozy rozcházejí	563
Chromosomy se připojují na mitotické vřeténko v prometafázi	553	V meioze dochází ke dvěma buněčným dělením místo jednoho	564
V metafázi se chromosomy řadí v ekvatoriální rovině vřeténka	557	Základní shrnutí	567
K segregaci dceřiných chromosomů dochází v anafázi	557	Otázky	568
Jaderný obal znovu vzniká v telofázi	559		

Kapitola 18 Kontrola buněčného cyklu a buněčná smrt

Systém regulace buněčného cyklu	572	Různé komplexy cyklin-Cdk spouštějí různé kroky buněčného cyklu	578
Centrální regulační systém spouští hlavní procesy buněčného cyklu	572	Buněčný cyklus může být zastaven v G_1 -fázi Cdk-inhibičními proteiny	579
Systém regulace buněčného cyklu je založen na cyklicky aktivovaných proteinkinázách	574	Buňky mohou odbourat svůj regulační systém a uniknout tak z buněčného cyklu	581
MPF je komplex cyklin-Cdk, který kontroluje vstup do M-fáze	575	Regulace počtu buněk u mnoho buněčných organismů	582
Cyklin-dependentní proteinkinázy jsou regulovány akumulací a degradací cyklinu	576	Buněčná proliferace je závislá na signálech od ostatních buněk	582
Aktivita Cdk-kináz je dále regulována jejich fosforylací a defosforylací	577		

Živočišné buňky mají vnitřně limitovaný počet buněčných dělení, kterými mohou projít	584	Rakovinné buňky se neřídí regulačními signály buněčného dělení a přežívání, pocházejícími z buněčného společenství	587
Živočišné buňky vyžadují signály od okolních buněk, aby se vyhnuly programované buněčné smrti	584	Základní shrnutí	589
Programovaná buněčná smrt je realizována intracelulární proteolytickou kaskádou	586	Otázky	590

Kapitola 19 Tkáně

Extracelulární matrix a pojivové tkáně	594	Udržování a obnova tkáně a její dezintegrace při rakovině	613
Rostlinné buňky mají pevné vnější stěny	595	Různé tkáně jsou obnovovány různou rychlostí	615
Vláknina celulózy udílí rostlinné buněčné stěně její pevnost v tahu	596	Kmenové buňky neustále produkují terminálně diferencované buňky	615
Pojivové tkáně živočichů jsou převážně tvořeny extracelulární matrix	600	Mutace v jedné dělicí se buňce mohou způsobit narušení normální kontroly této buňky i jejího potomstva	618
Kolagen poskytuje pojivovým tkáním živočichů pevnost v tahu	600	Rakovina je následkem mutace a přirozeného výběru v populaci buněk, které tvoří tělo	619
Buňky uspořádávají kolagen, který secernují	602	Pro vznik rakoviny je třeba akumulace mutací	620
Integriny spojují matrix vně buňky s cytoskeletem uvnitř buňky	603	Vývoj	621
Gely z polysacharidů a proteinů vyplňují prostory a zajišťují odolnost vůči tlaku	604	Programovaný pohyb buněk vytváří plán těla živočichů	622
Epitely a mezibuněčné spoje	605	Buňky zapínají odlišné sady genů podle své polohy a historie	622
Epitely jsou polarizovány a spočívají na bazální membráně	606	Difuzní signály mohou buňkám poskytnout polohovou informaci	624
Těsné spoje zaručují epitelu nepropustnost a oddělují jeho apikální a bazální povrch	607	Studie drosofilů poskytly klíč k porozumění vývoji obratlovců	626
Spoje propojené s cytoskeletem pevně vážou epiteliální buňky navzájem a připojují je k bazální membráně	609	Podobné geny jsou využívány v celé živočišné říši, aby poskytovaly buňkám vnitřní záznam o jejich poloze	627
Mezerové spoje umožňují výměnu iontů a malých molekul mezi buňkami	612	Základní shrnutí	628
		Otázky	629

1 První seznámení s buňkami

Všechna živá stvoření se skládají z buněk - malých, membránou ohraničených jednotek naplněných koncentrovaným vodným roztokem chemických sloučenin a vybavených mimořádnou schopností vytvářet kopie sebe samých růstem a dělením. Nejjednodušší formou života jsou izolované buňky. Vyšší organismy, jako jsme my sami, jsou společenstvími buněk odvozených růstem a dělením od jedné zakládající buňky. Jsou to rozsáhlá buněčná města, jejichž jednotliví obyvatelé plní specifické funkce a jsou řízeni důmyslnými komunikačními systémy.

Zatímco buňky mohou být složkami větších živých organismů, nic menšího než buňka nemůže být skutečně nazváno živým. Například viry obsahují některé stejné typy molekul jako buňky, ale nemají schopnost reprodukovat se vlastním úsilím. Kopírují se, jen když parazitují na reprodukčním aparátu buněk, do nichž pronikly. Buňky jsou proto základními jednotkami života, a je to právě buněčná biologie, ke které se musíme obrátit pro odpověď na otázku, co je to život a jak funguje.

V této kapitole si nejprve všimneme, jak se dají buňky pozorovat a co uvidíme, když se do nich podíváme. Potom si prohlédneme celou řadu tvarů, kterých mohou buňky nabývat, a také podnikneme první exkurzi do chemického aparátu, který je všem buňkám společný.

Buňky pod mikroskopem

Buňky jsou malé a prvním praktickým problémem v buněčné biologii je jejich pozorování. Vynález mikroskopu v 17. století učinil buňky poprvé viditelnými a ještě o staletí později všechno, co bylo o buňkách známo, bylo objeveno za použití tohoto jednoduchého přístroje. Světelný mikroskop představuje dodnes pro buněčné biology základní součást vybavení. Ale ačkoli tyto přístroje nyní zahrnují mnoho důmyslných vylepšení, samy vlastnosti světla určují hranici jemnosti detailu, který lze takto pozorovat. Elektronový mikroskop, vynalezený ve 30. letech 20. století, se dostává za tuto hranici díky svazkům elektronů, které nahrazují svazky světla v osvětlovacím zdroji, a tak výrazně zvětšují naši schopnost vidět jemné detaily buněk; dokonce činí

BUŇKY POD MIKROSKOPEM

- Vynález světelného mikroskopu vedl k objevu buněk
- Buňky, orgány a dokonce molekuly lze pozorovat pod mikroskopem

EUKARYONTNÍ BUŇKA

- Jádro je informačním centrem buňky
- Mitochondrie získávají energii z potravy
- Chloroplasty zachycují energii ze slunečního světla
- Vnitřní membrány tvoří vnitrobuněčné oddíly s různými funkcemi
- Cytosol je koncentrovaný vodný gel malých a velkých molekul
- Cytoskelet zodpovídá za buněčné pohyby

JEDNOTNOST A ROZDÍLNOST BUNĚK

- Buňky se značně liší svým tvarem a funkcí
- Všechny živé buňky mají podobný chemický základ
- Všechny dnešní buňky se zřejmě vyvinuly ze stejného předka
- Bakterie jsou nejmenší a nejjednodušší buňky
- Molekulární biologové se zaměřili na *E. coli*
- *Giardia* může představovat přechodný stav v evoluci eukaryontních buněk
- Pekařská kvasinka je obyčejnou eukaryontní buňkou
- Jednobuněčné organismy mohou být velké, složité a dravé: Prvoci
- *Arabidopsis* byla vybrána z 300 000 druhů jako modelová rostlina
- Svět živočichů reprezentují moucha, červ, myš a člověk
- Buňky stejného mnohobuněčného organismu se mohou značně lišit

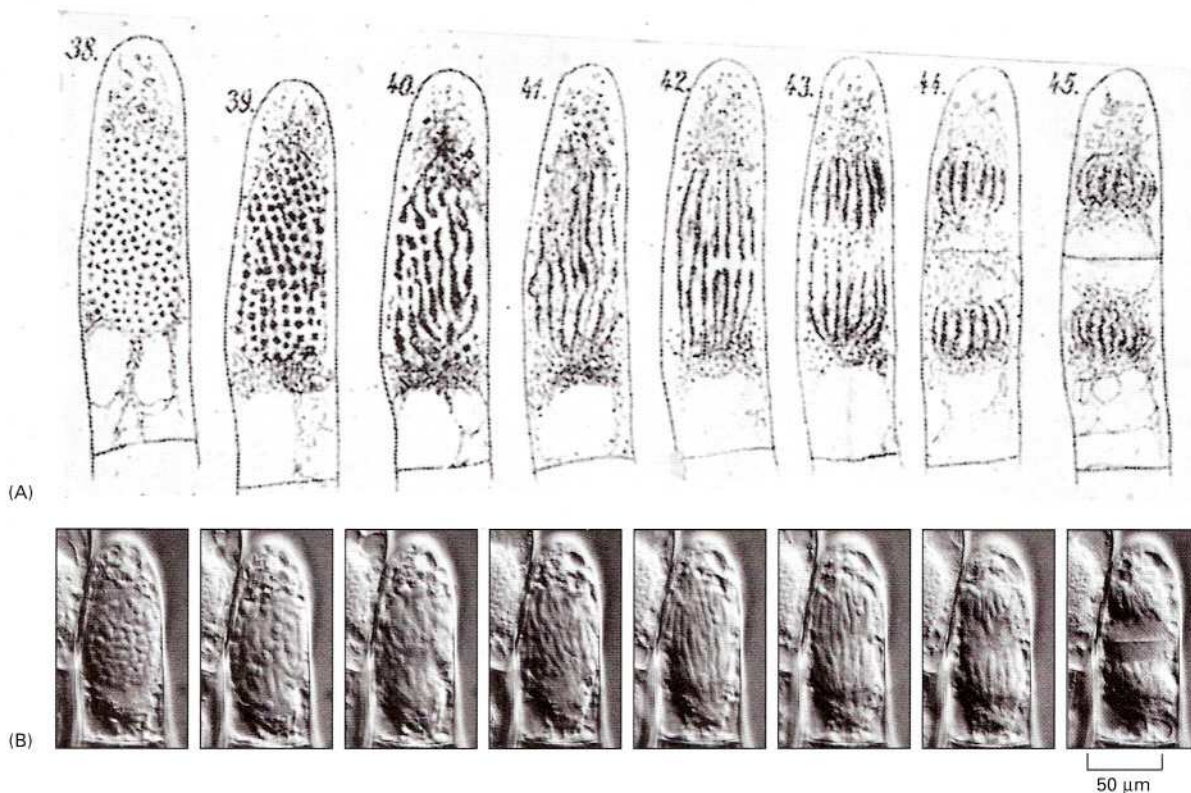
viditelnými některé větší molekuly. Přehled základních typů mikroskopie používaných ke zkoumání buněk je uveden v panelu 1-1 (strana 4-5).

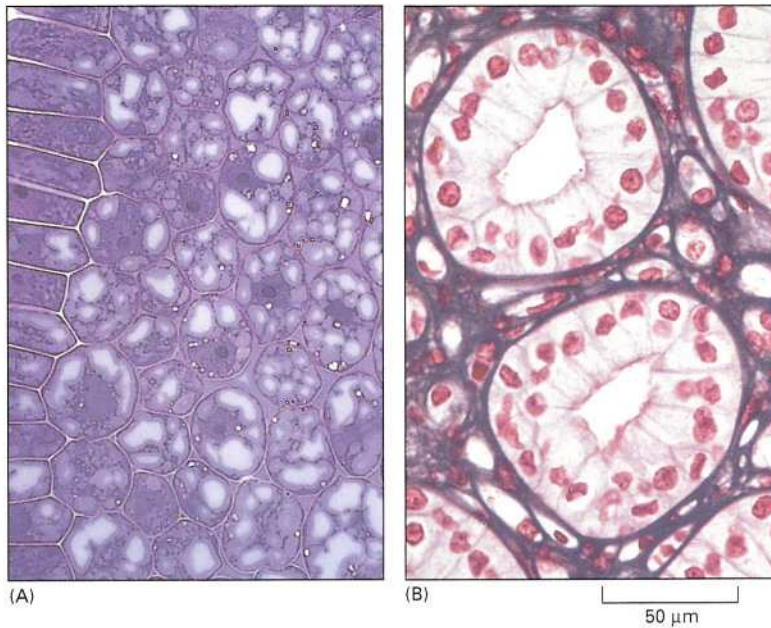
Vynález světelného mikroskopu vedl k objevu buněk

Vývoj světelného mikroskopu závisel na pokroku ve výrobě skleněných čoček. V 17. století byly čočky zdokonaleny do té míry, že se daly použít k sestavení jednoduchých mikroskopů, a v roce 1665 Robert Hooke informoval královskou společnost v Londýně, že zkoumal kus korku a všiml si, že je složen z malých komůrek, které nazval buňky. Jméno „buňka“ se ujalo, i když struktury, které Hooke popsal, byly jen buněčné stěny, které zůstaly po odumření živých buněk uvnitř. Později byli Hooke a někteří z jeho současníků schopni pozorovat i živé buňky.

Po dalších téměř 200 let zůstal světelný mikroskop exotickým přístrojem dostupným jen několika bohatým jedincům. Teprve v 19. století se ho začalo široce používat k pozorování živých buněk. Vznik buněčné biologie jako samostatné vědy byl postupným procesem, ke kterému přispělo mnoho jednotlivců, ale jehož oficiální zrození podle všeho ohlásily dvě publikace: jedna, jejímž autorem byl botanik Matthias Schleiden, v roce 1838, a druhá, kterou napsal zoolog Theodor Schwann, v roce 1839. V těchto člancích autoři popsalí výsledky systematického výzkumu rostlinných a živočišných tkání světelným mikroskopem a ukázali, že buňky jsou univerzálními stavebními jednotkami všech živých tkání. Jejich práce a práce dalších mikroskopiků 19. století (např. J. E. Purkyně) pomalu vedly k přesvědčení, že všechny živé buňky vznikají dělením existujících buněk (obr. 1-1). Tato doktrina se někdy nazývá buněčná teorie. Tvzení,

Obrázek 1-1 První obrázky buněk. (A) Kresby živé rostlinné buňky (vlasová buňka z květiny *Tradescantia*), jejíž rozdělení na dvě dceřiné buňky během 2,5 h pozoroval v r. 1880 Eduard Strasburger. (B) Srovnatelná živá buňka fotografovaná nedávno pod moderním světelným mikroskopem (tzv. Nomarského technika).





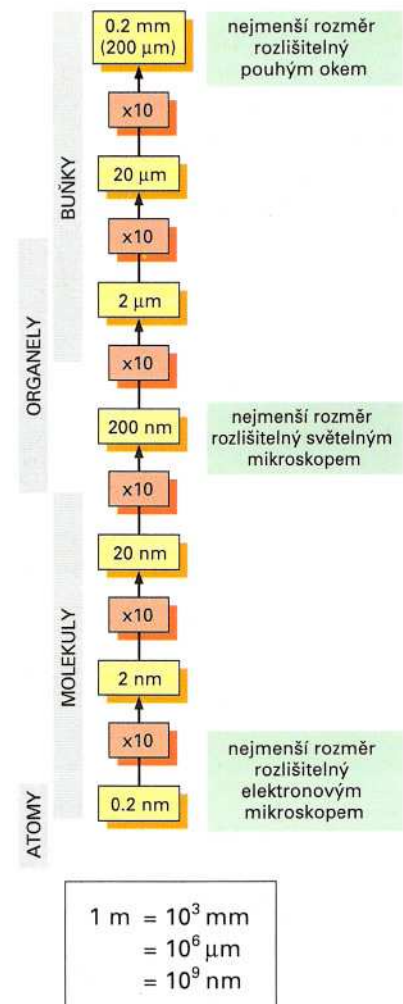
Obrázek 1-2 Buňky v rostlinných a živočišných tkáních. (A) Buňky ve špičce kořene rostliny, každá obklopena buněčnou stěnou, (obarveno červeně). (B) Buňky v močových sběrných kanálcích ledvin. Každý kanálek se skládá z těsně sbalených buněk (s jádry obarvenými červeně), které tvoří prstenec. Tento prstenec je obklopen extracelulární matrix obarvenou fialově.

že živé organismy nevznikají samovolně, ale jsou vytvářeny již existujícími organismy, bylo nakonec potvrzeno pokusy, které provedl v 60. letech 19. století Louis Pasteur.

Pravidlo, že buňky vznikají jen z dříve existujících buněk a dědí jejich vlastnosti, je základem celé biologie a dává předmětu unikátní nádech jedinečnosti. V tomto odvětví vědy jsou otázky týkající se přítomnosti nevyhnutelně spjaty s otázkami o minulosti. Abychom porozuměli tomu, proč se buňky a organismy dnešních dnů chovají tak, jak se chovají, potřebujeme pochopit jejich historii, celou cestu zpět napříč generacemi až do mlhavých počátků prvních buněk na Zemi. Darwinova teorie evoluce, publikovaná v r. 1859, poskytla klíčový pohled, který činí tuto historii přístupnou našemu chápání. Ukázala totiž, jak náhodné změny a přírodní výběr mohou být motory vzniku organismu s novými vlastnostmi. Jak probereme později v této kapitole, teorie evoluce vysvětluje vznik různorodosti mezi organismy, které sdílejí společného předka. V kombinaci s buněčnou teorií vede evoluční teorie k pohledu na celý život od jeho počátků až do dnešních dnů jako na jeden velký vývojový strom jednotlivých buněk. Ačkoli se tato knížka především zabývá tím, jak buňky fungují nyní, setkáme se opakovaně s tématem evoluce.

Buňky, organely a dokonce molekuly lze pozorovat pod mikroskopem

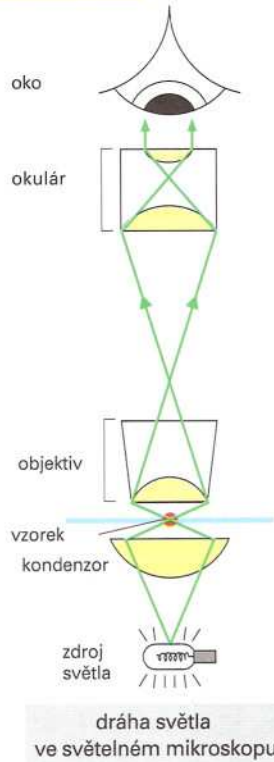
Jestliže odříznete tenoučký plátek vhodné rostlinné či živočišné tkáně a umístíte ho pod světelný mikroskop, uvidíte, že tkáň je rozdělena do tisíců malých buněk, které mohou být buď těsně jedna u druhé nebo oddělené materiálem známým jako extracelulární matrix (obr. 1–2). Každá buňka má obvykle 5 až 20 mikrometrů v průměru (obr. 1–3). Pokud jste se snažili udržet svůj vzorek ve správných podmínkách, uvidíte, že buňky vykazují znaky života: uvnitř nich se hýbou částice a pokud pozorujete trpělivě, můžete vidět, jak buňka pomalu mění svůj tvar a dělí se vedví (viz obr. 1–1).



Obrázek 1-3 Velikosti buněk a jejich částí s uvedením jednotek, ve kterých se tyto velikosti měří.

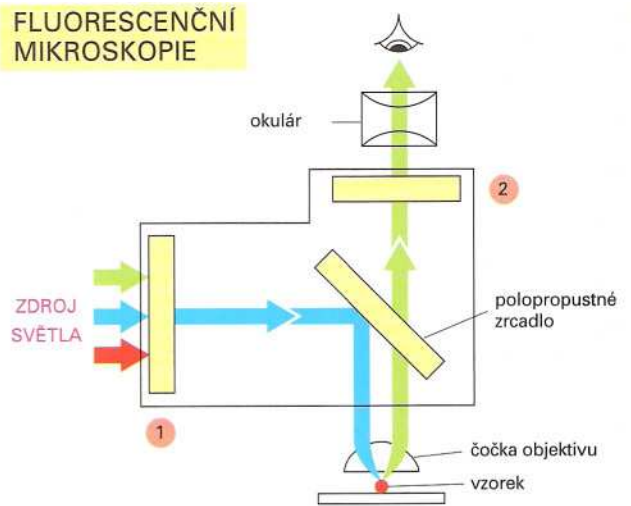


SVĚTELNÝ MIKROSKOP



Světelný mikroskop umožňuje zvětšit obraz buněk až tisíckrát a rozlišit detaily až na úrovni 0,2 μm (tady je omezení dáno vlnovou povahou světla, nikoliv kvalitou použitých čoček). Pro znázornění buněk ve světelném mikroskopu je třeba tří věcí. Za prvé je třeba soustředit světlo na vzorek pomocí kondenzoru. Za druhé, je třeba vzorek dobře připravit tak, aby jím mohlo procházet světlo. Za třetí, je třeba použít vhodné kombinace čoček (v okuláru i objektivu), tak aby se obraz vzorku zaostřil na úrovni oka.

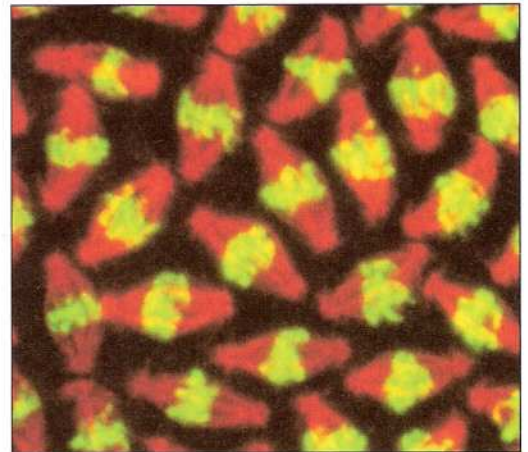
FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE



Fluorescenční barviva používaná pro barvení buněk se mohou detegovat fluorescenčním mikroskopem. Ten se podobá běžnému optickému mikroskopu s tím rozdílem, že světlo vstupující do mikroskopu musí projít dvěma filtry. První z nich (1), umístěný před vzorkem, propouští pouze světlo takové vlnové délky, která excituje dané fluorescenční barvivo. Druhý pak (2) tyto vlnové délky nepropouští a je průchodný pouze pro světlo vznikající fluorescencí barviva. Obarvené předměty se pak jeví jako jasně zářící objekty na tmném pozadí.

FLUORESCENČNÍ SONDY

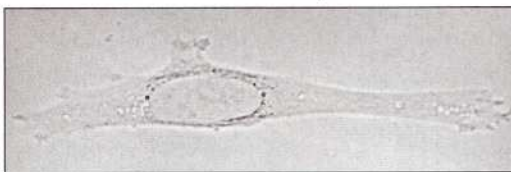
Dělící se buňky ve fluorescenčním mikroskopu po obarvení fluorescenčním barvivem.



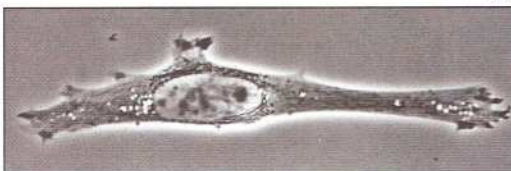
Fluorescenční barviva absorbují světlo určité vlnové délky a vyzařují světlo jiné, větší vlnové délky. Některá taková barviva se specificky vážou na určité molekuly v buňkách, a tak je lze pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu. Příkladem je barvivo specifické pro DNA (na obrázku zeleně). Jiná barviva lze navázat na molekuly protilátek, které pak slouží jako vysoce specifická a široce použitelná barviva, jež se vážou selektivně jen na určité makromolekuly - ty je pak možno pozorovat, jak jsou v buňce rozloženy. Na obrázku nahoře je určitý protein mikrotubulů zbarven červeně fluoreskující protilátkou.

TŘI DRUHY SVĚTELNÉ MIKROSKOPIE

Tři obrázky těže neobarvené živočišné buňky v tkáňové kultuře. (A) Pozorování v prostém jasném poli. Daleko více struktur lze pozorovat při použití komplexního optického systému, jakým je například fázový kontrast (B) a diferenciální interferenční mikroskopie (C). Tyto systémy využívají rozdílů v dráze, kterou světlo urazí při průchodu objekty o různém indexu lomu. Všechny tři fotografie lze získat na téměř mikroskopu pouhou výměnou optických komponent.



(A)



(B)

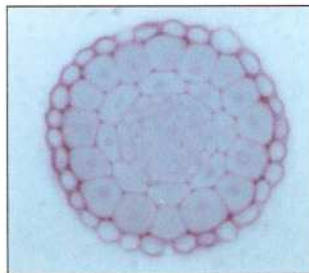


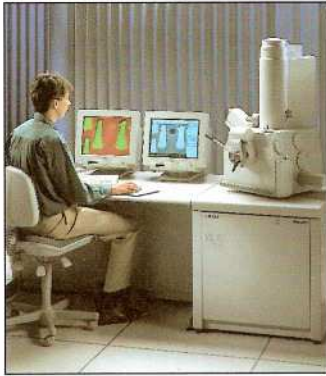
(C)

50 μm

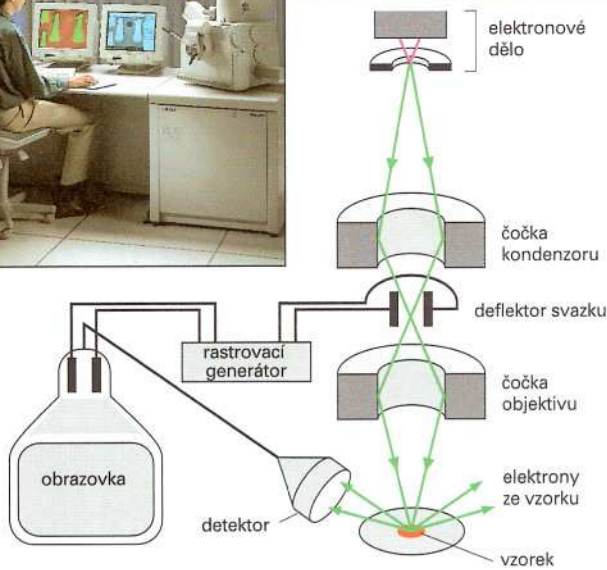
TENKÉ ŘEZY

Většina tkání je příliš velká a tlustá, než aby bylo možno je pozorovat přímo v mikroskopu. Proto se často chemicky fixují a řežou na tenké plátky čili řezy. Tyto řezy lze pak připevnit na mikroskopické sklíčko a obarvit tak, aby vynikly určité složky přítomné v tkáni. Napravo je obarvený řez špičkou rostlinného kořene.

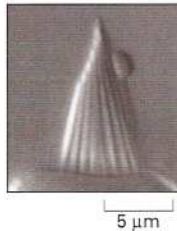
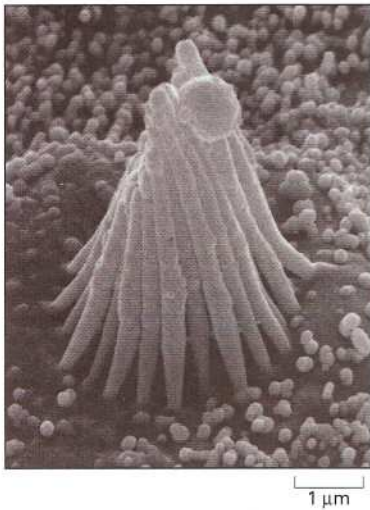




RASTROVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

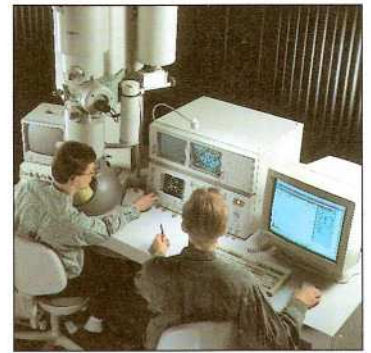
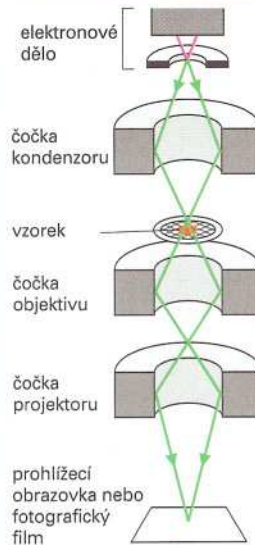


V rastrovacím elektronovém mikroskopu (SEM - podle scanning electron microscopy) se vzorek pokryje tenoučkou vrstvou těžkého kovu a pak se po něm přejíždí svazkem elektronů, zaostřeným pomocí elektromagnetického vinutí na vzorek. Toto vinutí tady funguje jako čočka. Množství elektronů rozptýlených nebo vyražených ze vzorku po dopadu svazku elektronů na jednotlivé body povrchového "rastru" se měří detektorem a je využíváno pro regulaci intenzity následných bodů obrazu, promítaného na obrazovku. Mikroskop vytváří pozoruhodné trojrozměrné obrazy objektů s velkou hloubkou ostroty a s rozlišením mezi 3 a 20 nm.



Obrázek z rastrovacího elektronového mikroskopu znázorňuje stereocilia, která vyrůstají z vláskové buňky vnitřního ucha (vlevo). Pro srovnání je na obrázku nahoře ukázána tato struktura ve světleném mikroskopu při maximálním rozlišení.

TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE



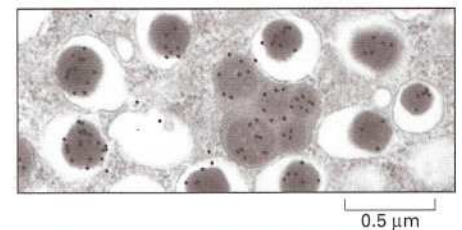
Elektronová mikrofotografie (dole) ukazuje malou oblast buňky varlete. Tkáň tu byla chemicky fixována, zabudována do plastického materiálu a rozkrájena na ultratenké řezy, které byly pak obarveny solemi uranu a olova, aby byly pak vloženy do vakuové komůrky mikroskopu.

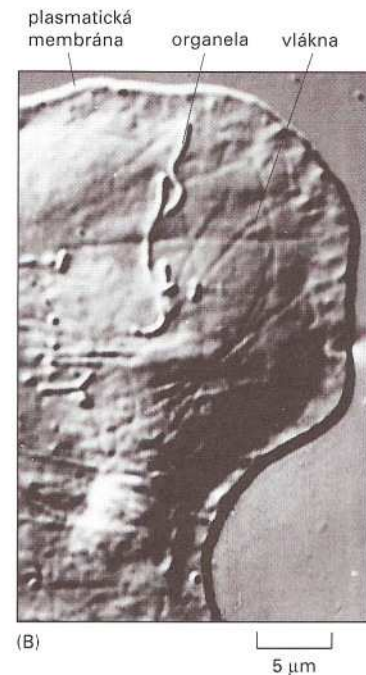
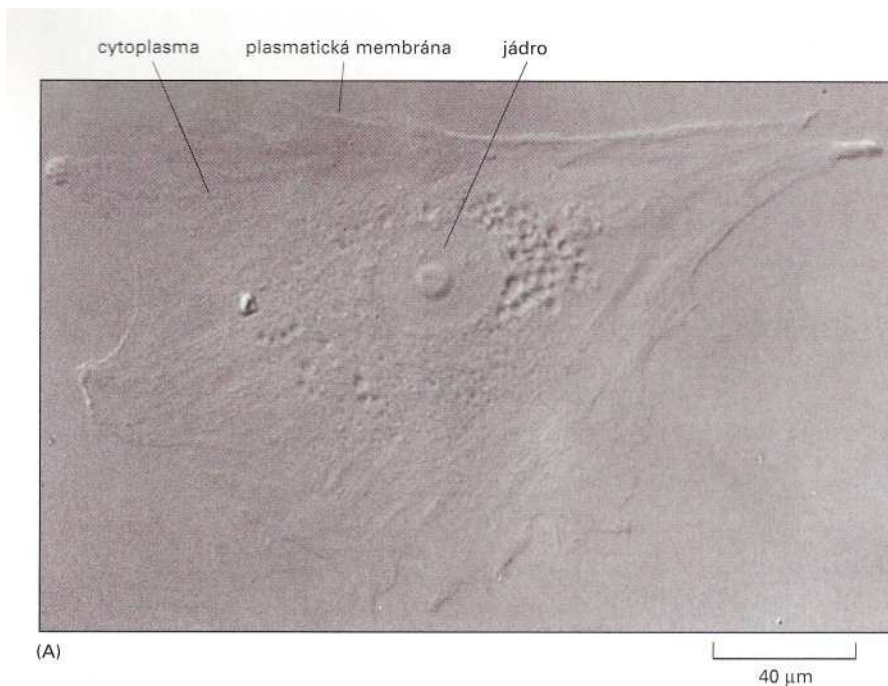


Transmisní elektronový mikroskop (TEM) je v podstatě podobný převrácenému světelnému mikroskopu, ale využívá svazku elektronů místo světelného paprsku a magnetických vinutí místo optických skleněných čoček k zaostření. Vzorek umístěný ve vakuu musí být velmi tenký. Kontrastu se obvykle dosahuje použitím elektrondensních kontrastních látek, obsahujících těžké kovy, jež místně absorbují nebo rozptylují elektrony, čímž se odstraňují ze svazku při jeho průchodu vzorkem. Užitečné zvětšení TEM je až milionkrát a rozlišení u biologických vzorků je okolo 2 nm.

ZLATEM OZNAČENÉ VZORKY

Stejně jako se fluorescenční barviva vážou na vybrané molekuly s cílem detegovat specifické molekuly ve světleném mikroskopu, nepatrná zrnka zlata lze připojit na určité molekuly k pozorování jiných molekul v elektronovém mikroskopu. Obvykle se protilátky o známé specifitě navážou na elektrondensní koloidní zrnka zlata (o průměru 5-20 nm) a použije se jich pak k označení ultratenkých řezů buňkou či tkání v procesu zvaném elektronová mikroskopie se značením koloidním zlatem. Zlatá zrnka se projeví v zorném poli jako drobné černé tečky. Napravo je ukázka z pankreatické buňky produkující insulin, kde se zlatem označené protilátky proti insulinu objevují v buněčných organelách.





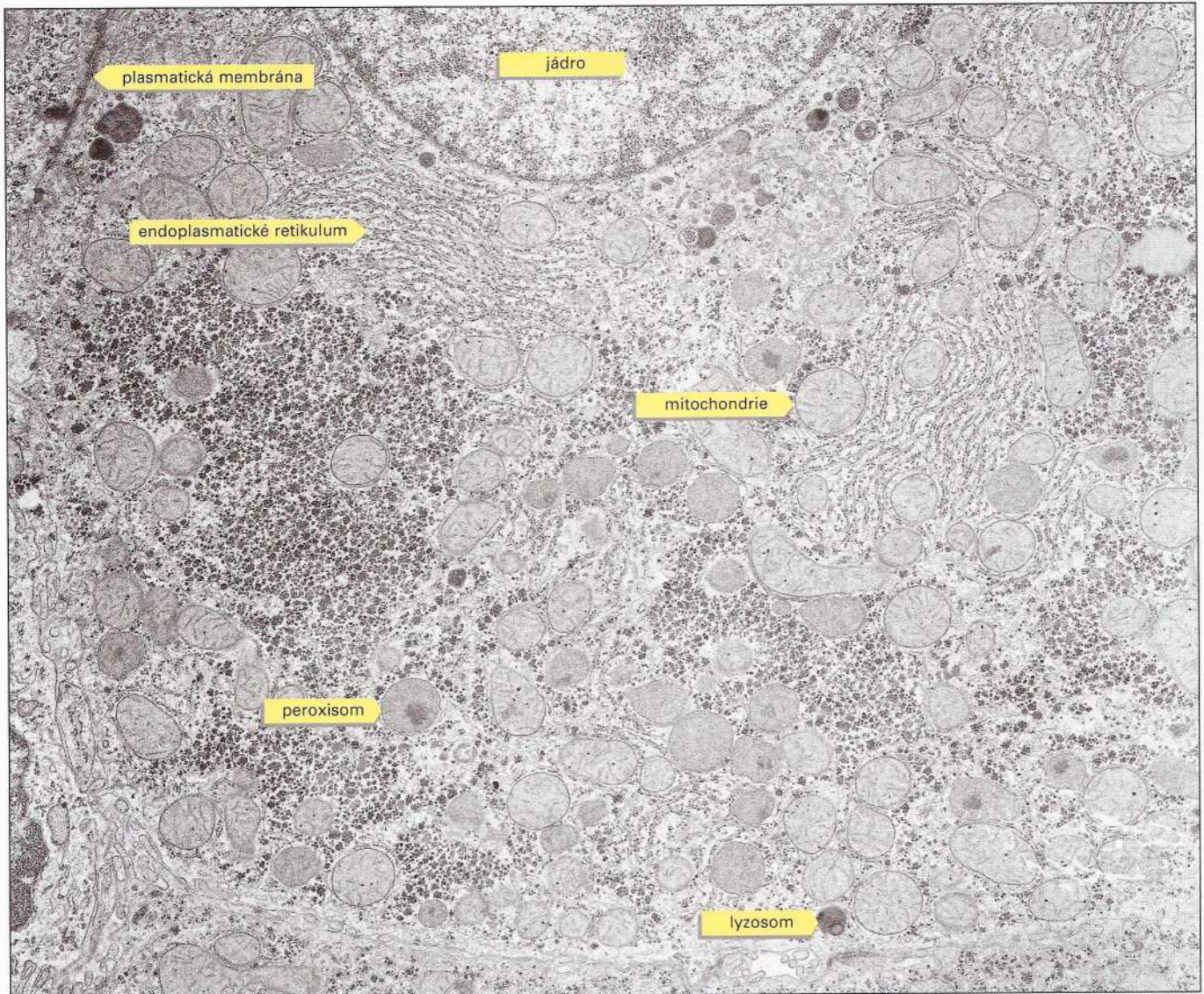
Spatřit vnitřní strukturu buňky je těžší, a to nejen proto, že její části jsou malé, ale také proto, že jsou průhledné a většinou bezbarvé. Jednou možností je obarvit buňky barvivy, která různě barví různé buněčné složky (viz obr. 1–2). Alternativní možností je využití skutečnosti, že se jednotlivé složky buňky od sebe navzájem nepatrně liší v indexu lomu (tak jako se sklo liší od vody) a tyto malé rozdíly jsou patrné při použití optických triků (panel 1–1, strana 4–5). Dnes může být mikroskopický obrázek dále zesílen elektronickou cestou.

Takto zkoumaná buňka vykazuje různou anatomii (obr. 1–4). Má ostře definovanou hranici, což ukazuje na přítomnost membrány, do které je uzavřena. Uprostřed dominuje velké okrouhlé tělíčko – jádro. Okolo jádra se nachází průhledná látka, která vyplňuje zbytek buňky – cytoplasma, která je na první pohled naplněna směsí rozmanitých drobných objektů. S dobrým světelným mikroskopem je možné začít rozlišovat specifické složky v cytoplasmě (obr. 1–4B) a zařadit je, ale detaily menší než 0,2 μ m (asi polovina vlnové délky viditelného světla) nelze rozlišit.

Pro větší zvětšení je nutné se obrátit k elektronovému mikroskopu, který může odhalit detaily o velikosti několika nanometrů (viz obr. 1–3). To vyžaduje pečlivou přípravu. I pro světelnou mikroskopii je obvykle třeba tkáň fixovat (tj. nechat prostoupit reaktivním roztokem), zpevnit zalitím do vosku nebo pryskyřice, nařezat na tenké plátky a obarvit. Pro elektronovou mikroskopii jsou vyžadovány podobné postupy, ale řezy musí být mnohem tenčí a nelze si prohlížet živé vlhké buňky. Když jsou však vzorky nařezány, obarveny a umístěny do elektronového mikroskopu, velká část směsi buněčných komponent se ukáže jako různé organely, které je nyní možné vidět v mnohem větším detailu než při použití světelného mikroskopu. Lze spatřit jemnou membránu silnou asi 5 nm, která uzavírá buňku, a podobné membrány, které tvoří hranice mnoha organel uvnitř buňky (obr. 1–5A a B). Vnější membrána se nazývá plasmatická membrána, zatímco membrány obklopující organely se nazývají vnitrobuněčné membrány. Elektronovým mikroskopem je v buňce možné vidět dokonce i jednot-

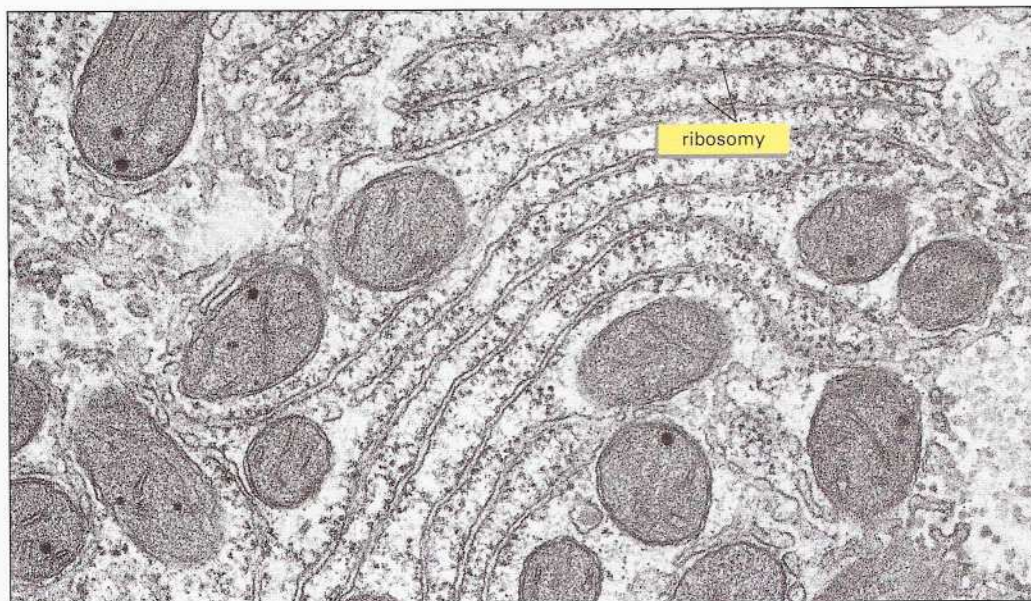
Obrázek 1-4 Živá buňka pozorovaná pod světelným mikroskopem; lze vidět jádro a cytoplasma. (A) Ve světelném mikroskopu byla vyfotografována buňka odebraná z lidské kůže a rostoucí ve tkáňové kultuře. V cytoplasmě lze rozeznat vlákna a organely. (B) Detail části buňky čolka rostoucí v kultuře. Videozáběr při velkém zvětšení byl zesílen počítačem; lze vidět četné organely a vlákna.

Obrázek 1-5 (na protější stránce) Jemná struktura buňky pozorované transmisním elektronovým mikroskopem. (A) Ultratenký řez ukazující nesmírné množství detailů. Některé složky, o kterých bude v této kapitole řeč, jsou označeny a určeny velikostí a tvarem. (B) Malý úsek cytoplasmy při větším zvětšení. Nejmenšími jasně viditelnými strukturami jsou ribosomy, z nichž každý se skládá z 80-90 různých velkých molekul. (C) Vzorek DNA izolované z buňky dokazuje, že velké molekuly lze spatřit elektronovým mikroskopem.



(A)

2 μ m



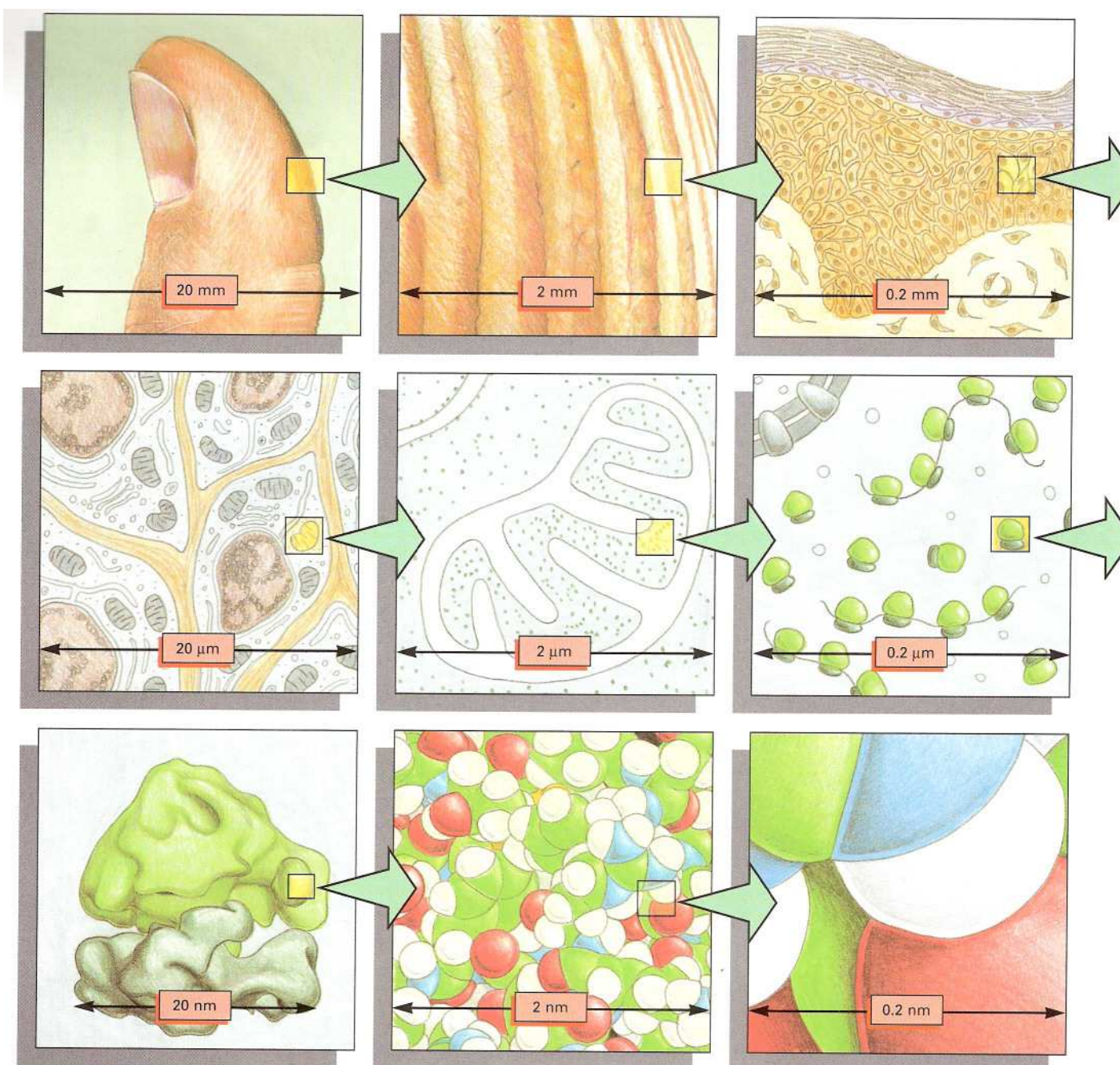
(B)

2 μ m



(C)

200 nm



livé velké molekuly (obr. 1–5C). Elektronové mikroskopy používané k prohlížení tenkých řezů tkání jsou známé jako transmisní elektronové mikroskopy. Další typ elektronové mikroskopie – skenovací neboli rastrovací elektronová mikroskopie – se používá k prohlížení povrchových detailů buněk a dalších struktur (viz panel 1–1, str. 4-5). Ani s použitím nejsilnějších elektronových mikroskopů však není možné vidět jednotlivé atomy, které tvoří molekuly. (Poznámka překladatele: Často už je však možné spatřit ve speciálních mikroskopech i částice složené z pouhých 8 atomů zlata, které se používají k označení některých struktur v buňce, nebo dokonce jednotlivé atomy těžkých kovů.)

Obrázek 1-6 Názorné srovnání velikostí živých buněk a atomů. Každá následující kresba ukazuje výřez z předchozího obrázku zvětšený desetkrát: od palce přes buňky kůže až po ribosom a nakonec shluk atomů tvořících jednu z mnoha molekul proteinu v našich tělech. Detaily molekulární struktury, které jsou ukázány na posledních dvou kresbách, leží mimo možnosti elektronového mikroskopu.

Eukaryontní buňka

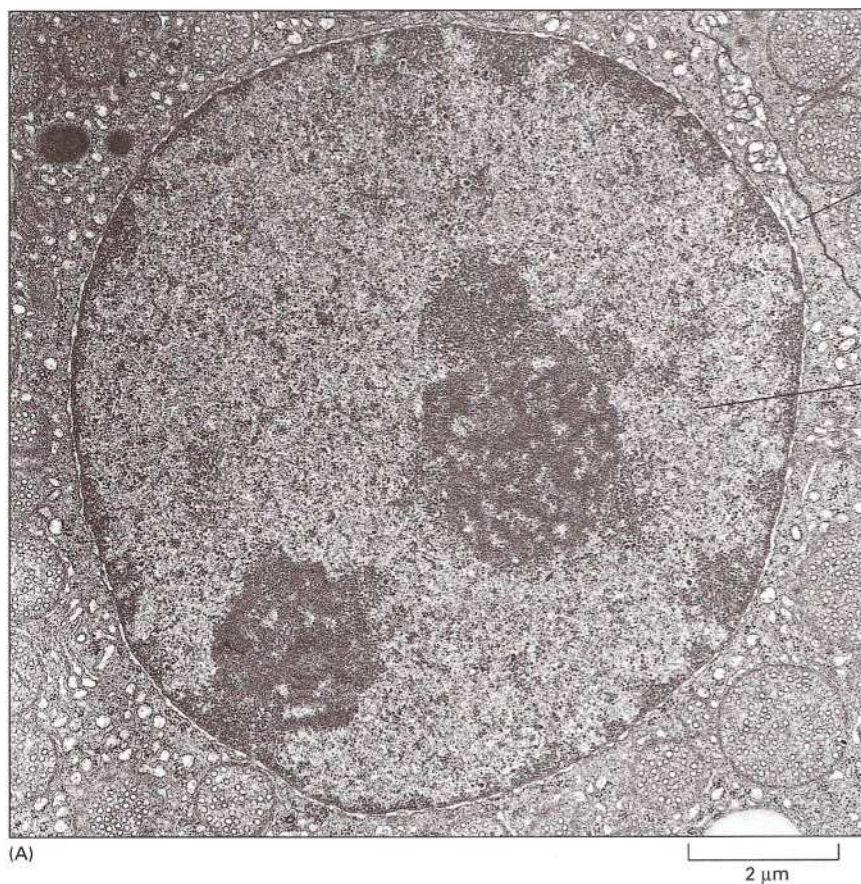
Ne všechny buňky obsahují stejné organely ve stejných poměrech. Příslušníci jedné rozsáhlé a evolučně velmi staré třídy buněk – bakterie – v podstatě neobsahují žádné organely, dokonce ani jádro. Přítomnost nebo nepřítomnost jádra se používá jako základ pro jednoduché, ale základní třídění všech živých organismů. Ty organismy, jejichž buňky obsahují jádro, se nazývají eukaryota (z řeckých slov *eu* = opravdu a *karyon* = jádro). Organismy, jejichž buňky jádro neobsahují, se nazývají prokaryota (ze slova *pro* = před). Termíny bakterie a prokaryota se obecně (byť ne zcela správně) používají jako synonyma. Většina prokaryot žije jako jednobuněčné organismy, ale některé z nich tvoří řetězce, shluky nebo jiné organizované vícebuněčné struktury. Všechny složitější mnohobuněčné organismy včetně rostlin, živočichů a hub se skládají z eukaryontních buněk. Mnoho jednobuněčných organismů od různých druhů kvasinek až po měňavky je rovněž eukaryontních (obr. 1–7). Přítomnost jádra jde téměř vždy ruku v ruce s přítomností celé řady dalších organel. Nyní se podíváme na hlavní organely nacházející se v eukaryontních buňkách.

Jádro je informačním centrem buňky

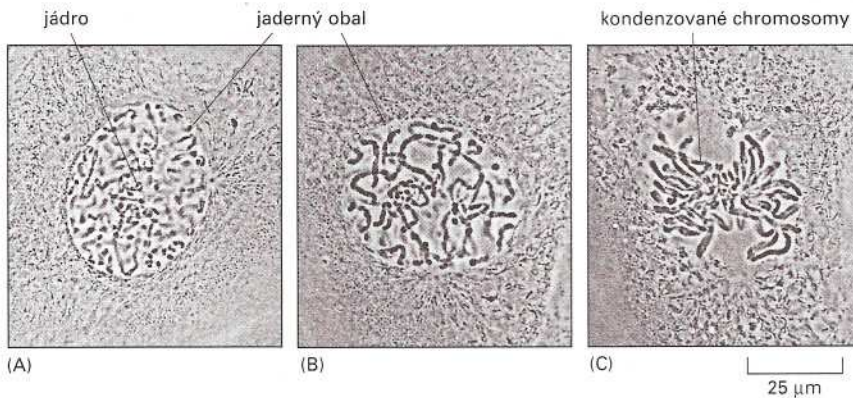
Jádro je obvykle nejdůležitější organelou v eukaryontní buňce. (obr. 1–8). Je uzavřeno do dvou soustředných membrán, které tvoří obal jádra, a obsahuje velmi dlouhé polymery molekul DNA, které kódu-



Obrázek 1-7 Buňky kvasinek pozorované ve světelném mikroskopu. Zde ukázaný druh představuje buňky, díky kterým kyne těsto a hroznová šťáva se mění ve víno. Množí se pučením a následným asymetrickým dělením na velkou a malou (dceřinou) buňku.



Obrázek 1-8 Jádro. (A) Tuto organelu, obsahující většinu DNA eukaryontní buňky, je zde vidět v tenkém řezu savčí buňky zkoumané elektronovým mikroskopem. Jednotlivé chromosomy nejsou vidět, protože DNA je v tomto stadiu růstu buňky rozptýlena v jádře jako tenká vlákna. (B) Na tomto schematickém obrázku typické živočišné buňky je ukázána rozsáhlá soustava membránových organel: jádro je zbarveno *hnědě*, jaderný obal je *zelený* a cytoplasma (vnitřek buňky kromě jádra) je *bílá*.



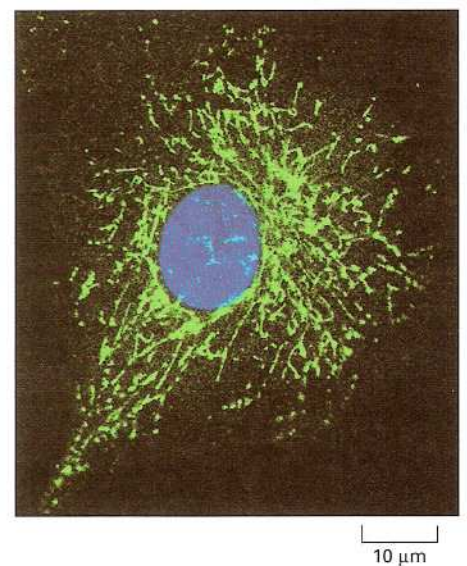
Obrázek 1-9 Chromosomy v buňce, která se bude dělit. Když se buňka připravuje k dělení, DNA kondenzuje do vláknitých chromosomů, které lze rozlišit ve světelném mikroskopu. Fotografie ukazují tři po sobě následující kroky tohoto děje v buňce z plic čolka, pěstované v tkáňové kultuře.

jí genetické určení organismu. Tyto obrovské molekuly lze jednotlivě pozorovat ve světelném mikroskopu jako chromosomy, když se stanou kompaktnějšími v době, kdy se buňka připravuje k dělení na dvě dceřiné buňky (obr. 1–9). DNA funguje jako sklad genetické informace také v prokaryontních buňkách; tyto buňky však nemají DNA uzavřenou v jaderném obalu.

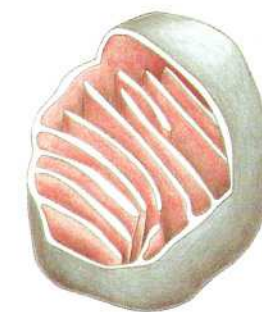
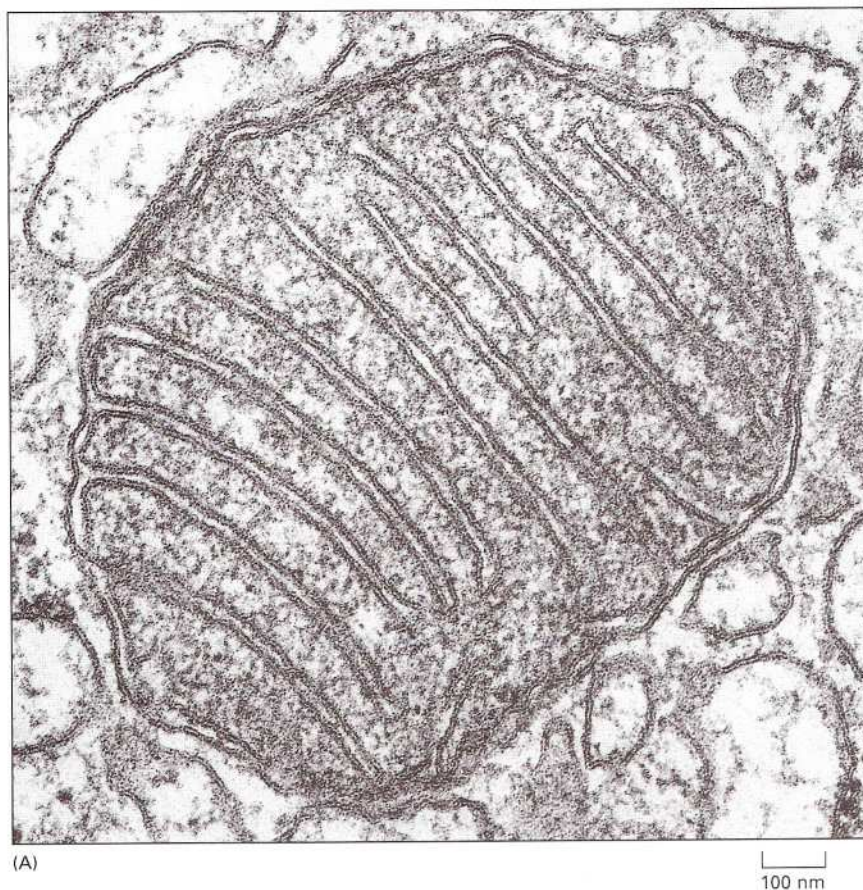
Dlouho předtím, než byla sama DNA identifikována jako genetický materiál, napověděla pečlivá pozorování ve světelném mikroskopu, že chromosomy jsou nosiči genetické informace. Ve všech buňkách u všech jednotlivců stejného pohlaví daného druhu byly pozorovány stejné sady chromosomů (8 chromosomů u mouchy, 46 u člověka, 104 u kapra), které se na pohled lišily svým tvarem a velikostí od chromosomů ostatních druhů. Navíc bylo pozorováno, že při dělení buňky na dvě dceřiné buňky nebo při vzniku a pozdější fúzi vajíčka a spermie za vzniku nového jedince pohlavní reprodukci, odpovídalo umístění chromosomů přesně pravidlům pro přenos dědičných vlastností. Tato pravidla objevil v 19. století Gregor Mendel. Například vajíčko i spermie přispívají polovinou chromosomů do nového organismu, a tak zajišťují stejný podíl otce a matky na vlastnostech nového jedince.

Mitochondrie získávají energii z potravy

Mitochondrie patří k nejnápadnějším organelám v cytoplasmě a jsou přítomny prakticky ve všech eukaryontních buňkách (obr. 1–10). Při pozorování v elektronovém mikroskopu mají velmi rozmanitou strukturu: každá mitochondrie vypadá jako uzenka nebo červ, je jeden až několik μm dlouhá a je uzavřena dvěma oddělenými membránami. Vnitřní membrána je zprohýbána a její záhyby směřují do vnitřku mitochondrie. Mitochondrie obsahují svou vlastní DNA a rozmnožují se dělením. V mnoha ohledech se podobají bakteriím a všeobecně se předpokládá, že se vyvinuly z bakterií, které byly pohlceny nějakým předkem dnešních eukaryontních buněk (obr. 1–12). Samotné pozorování pod mikroskopem nám ukazuje jen velmi málo z toho, co mitochondrie dělají. Jejich funkce byla objevena až po rozbití buněk a získání mitochondrií odstředěním směsi buněčných fragmentů. U přečištěných mitochondrií byly provedeny chemické testy, aby se zjistilo, které chemické procesy v nich probíhají. Tyto testy prozradily, že mitochondrie jsou

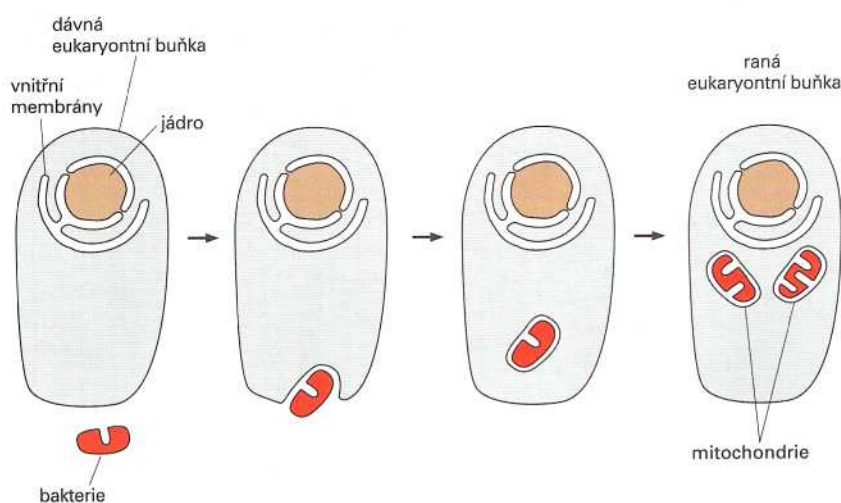


Obrázek 1-10 Mitochondrie pozorované světelným mikroskopem. Tyto organely jsou generátory energie, které téměř ve všech eukaryontních buňkách oxidují molekuly živin za vzniku užitečné chemické energie. Ve svých tvarech se mitochondrie dosti liší; v této kultivované savčí buňce jsou obarveny zeleně fluorescenčním barvivem a vypadají jako červi. Jádro je obarveno modře.



Obrázek 1-11 Mitochondrie pozorovaná elektronovým mikroskopem.

(A) Příčný řez. (B) Trojrozměrné znázornění uspořádání mitochondriálních membrán. Všimněte si hladké vnější membrány a značně zprohýbané vnitřní membrány. Tato vnitřní membrána obsahuje většinu proteinů zodpovědných za buněčnou respiraci čili dýchání; je výrazně poskládaná, aby poskytla pro tyto děje dostatečný povrch. (C) Ve schematické buňce je vnitřní prostor mitochondrie obarven.



Obrázek 1-12 Původ mitochondrie.

Bylo prokázáno, že tyto orgány mají svůj původ v bakteriích pohlčených dávnou eukaryotní buňkou, které v této buňce přežily a vytvořily s ní symbiotický vztah.

generátory chemické energie pro buňku. Získávají energii z oxidace molekul potravy, například cukrů, a produkují základní chemické palivo adenosin trifosfát (ATP), což je „benzín“, který je potřebný pro pohon většiny buněčných aktivit. Protože mitochondrie při své činnosti spotřebovává kyslík a uvolňuje oxid uhličitý, je celý proces nazýván buněčná respirace neboli dýchání. Bez mitochondrií by živočichové ani rostliny nebyli schopni získávat kyslík k maximálnímu využití energie z molekul potravy, kterou přijímají. Organismy, které mohou tímto způsobem kyslík využít, včetně všech rostlin a živočichů, jsou aerobní. Malý počet eukaryotních organismů (stejně jako mnoho prokaryot) není schopen žít v prostředí obsahujícím kyslík. Tyto organismy jsou anaerobní a postrádají mitochondrie.

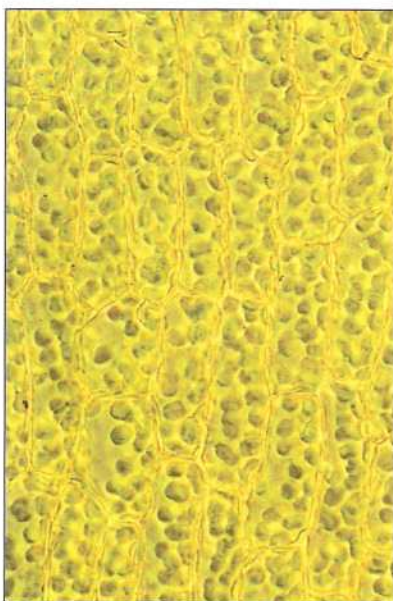
Chloroplasty zachycují energii ze slunečního světla

Chloroplasty se nacházejí jen v buňkách rostlin, řas a některých prvoků; nikdy ne v buňkách živočichů a hub. Jsou to velké zelené orgány, které mají mnohem složitější strukturu než mitochondrie: Ke dvěma obalovým membránám přistupují navíc stohy membrány uvnitř organely, které obsahují zelené barvivo chlorofyl (obr.1–13). Pokud je rostlina chována ve tmě, její zelená barva se ztrácí. Když je umístěna zpět na světlo, zelená barva se jí vrátí. To napovídá, že chlorofyl a chloroplasty, které ho obsahují, jsou klíčovými prvky pro zvláštní vztah, který mají rostliny a řasy ke světlu. Ale jaký je to vztah?

Živočichové i rostliny potřebují energii k životu, k růstu a k reprodukci. Živočichové mohou využívat jen chemickou energii získanou požíváním produktů ostatních živých organismů. Ale rostliny mohou získávat svou energii přímo ze slunečního světla, a právě chloroplasty jsou orgány, které jim to umožňují. Z hlediska života na Zemi plní chloroplasty ještě mnohem důležitější úlohu než mitochondrie. Provádějí fotosyntézu – to znamená, že zachycují

Otázka 1-1 Podívejte se na obrázek 1-12. Proč má mitochondrie jak vnější tak vnitřní membránu? Která z obou membrán by měla z hlediska evoluce pocházet z buněčné membrány dávné eukaryotní buňky? Na snímku mitochondrie z elektronového mikroskopu na obrázku 1-11A ukažte, ve kterém prostoru se nachází mitochondriální DNA, neboli který prostor odpovídá cytosolu bakterie pohlcené původní eukaryotní buňkou z obrázku 1-12.

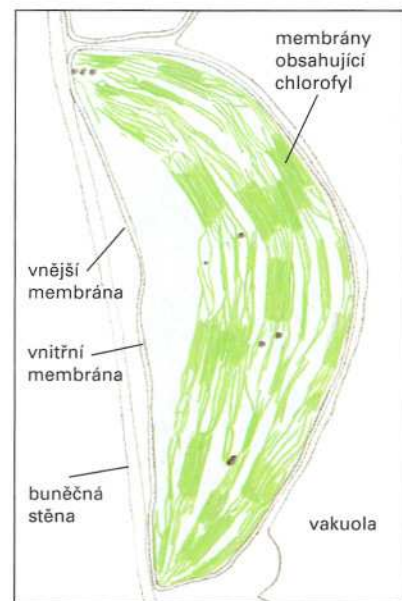
Obrázek 1-13 Chloroplasty. Tyto orgány zachycují v rostlinných buňkách energii slunečního světla. (A) Listové buňky v mechu pozorované ve světelném mikroskopu; lze vidět zelené chloroplasty. (B) Elektronmikroskopický snímek chloroplastu z listu trávy; je vidět soustavu vnitřních membrán. Zploštělé membránové váčky obsahují chlorofyl a jsou uspořádány do stohů. (C) Instruktivní kresba podle (B).



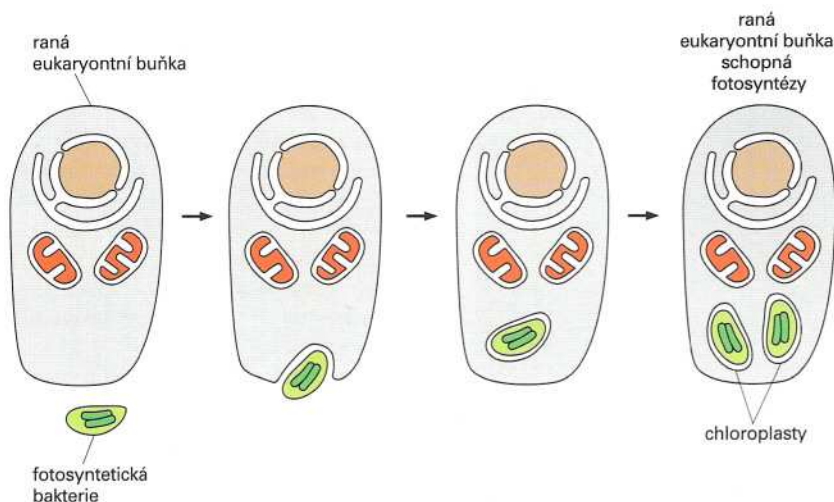
(A)



(B)



(C)



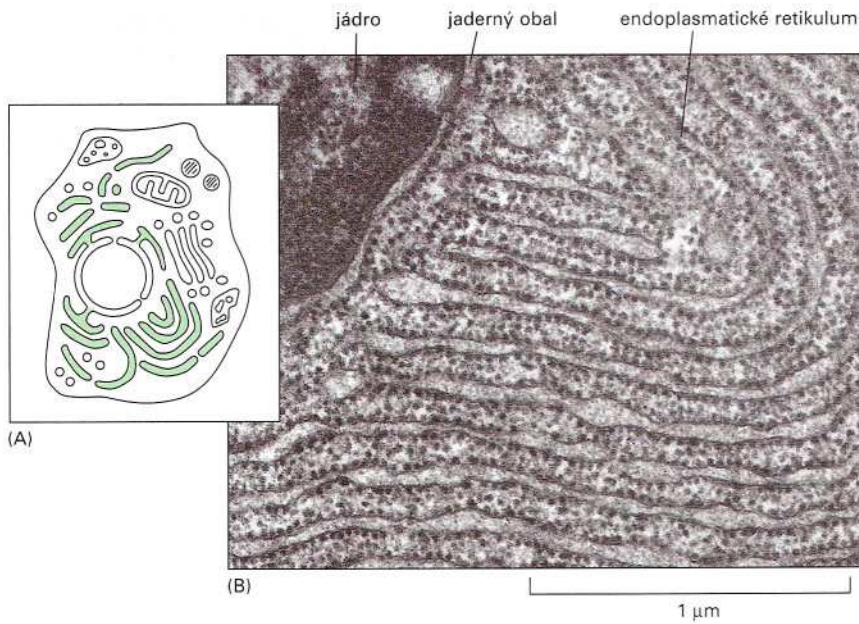
Obrázek 1-14 Původ chloroplastů. Chloroplasty mají zřejmě podobný původ jako mitochondrie – fotosyntetizující bakterie byla pohlcena ranou eukaryontní buňkou, která již obsahovala mitochondrie; i zde se vyvinul symbiotický vztah.

energii slunečního světla v molekulách chlorofylu a využívají ji k výrobě energeticky bohatých molekul sacharidů. Při tomto procesu uvolňují kyslík jako vedlejší produkt. Buňky rostlin, podobně jako buňky živočichů, potom mohou v případě potřeby uloženou chemickou energii uvolnit oxidací těchto sacharidů za použití svých mitochondrií. Chloroplasty vytvářejí jak molekuly potravy tak kyslík, který využívají všechny mitochondrie. Podobně jako mitochondrie i chloroplasty obsahují svou vlastní DNA, rozmnožují se dělením a předpokládá se, že se vyvinuly z bakterií, v tomto případě ze sinic, které byly nějakým způsobem pohlceny ranou eukaryontní buňkou (viz obr. 1–14). To podle všeho vedlo k symbiotickému vztahu, ve kterém si hostitelská eukaryontní buňka a pohlcené sinice vzájemně pomáhaly v přežití a reprodukci.

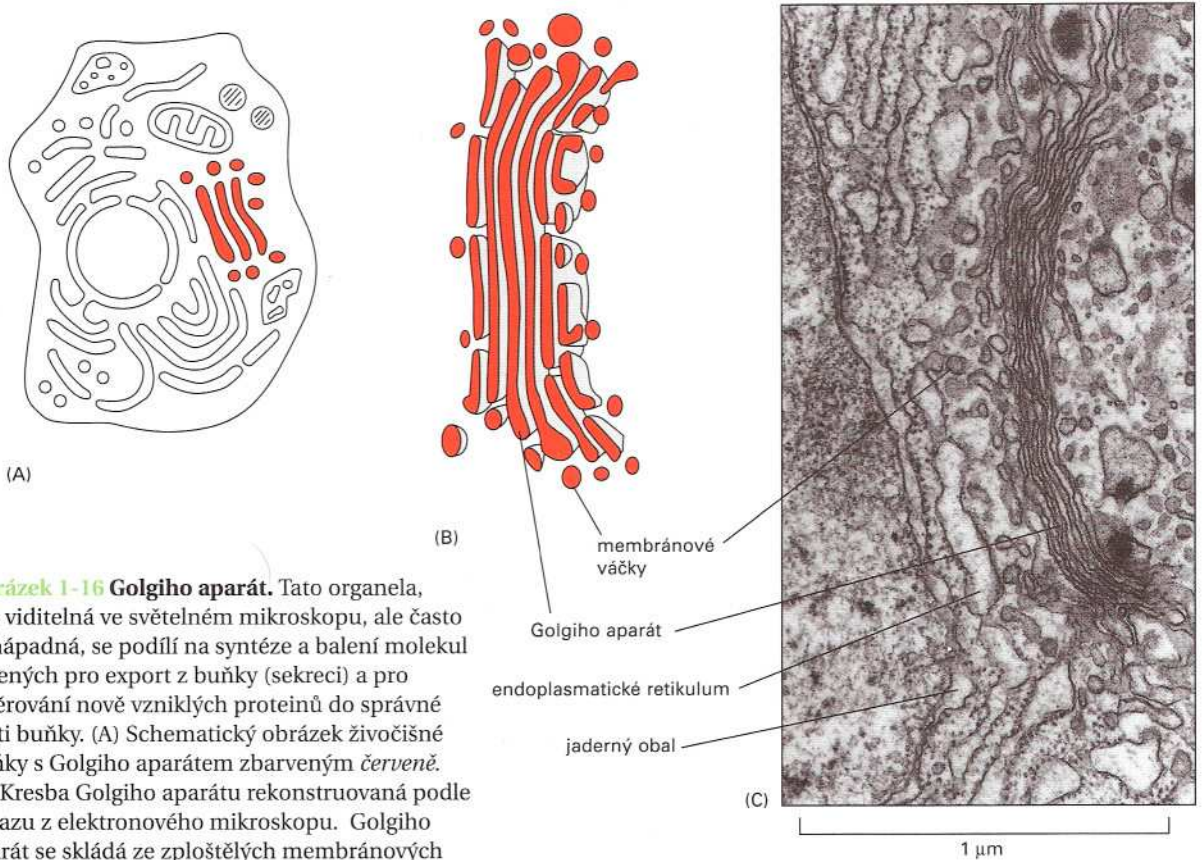
Vnitřní membrány tvoří vnitrobuněčné oddíly s různými funkcemi

Jádra, mitochondrie a chloroplasty nejsou jedinými membránou ohraničenými organelami uvnitř eukaryontních buněk. Cytoplasma obsahuje celou řadu dalších organel, z nichž většina je uzavřena v jediné membráně, která plní řadu různých funkcí. Mnoho z nich souvisí s potřebou buňky importovat suroviny a exportovat vyrobené látky a vedlejší produkty. V buňkách, které se specializují na sekreci proteinů, jsou některé organely enormně zvětšené; jiné jsou zvláště hojné v buňkách specializovaných na trávení cizích tělísek atd.

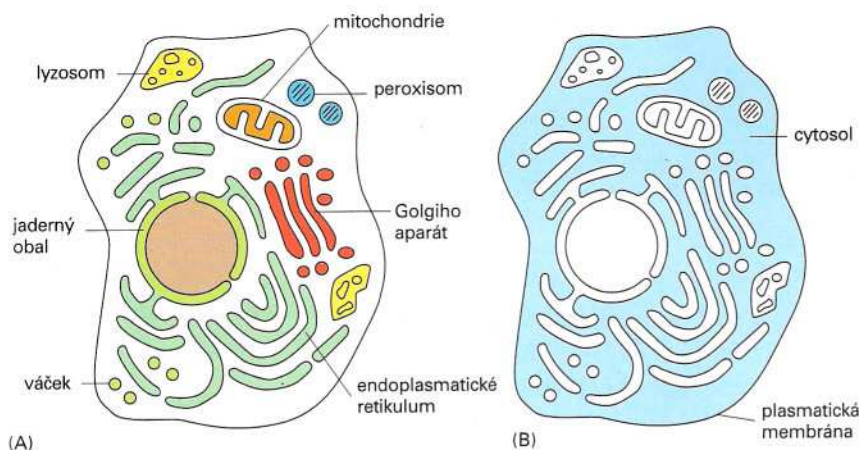
Nepravidelný labyrint buněčných prostorů uzavřených membránou se nazývá endoplasmatické retikulum (ER) (obr. 1–15) a je místem vzniku většiny složek buněčné membrány i materiálů určených pro export z buňky. Stohy zploštělých membránových váčků tvoří Golgiho aparát (obr. 1–16), který přijímá a často mění molekuly vyrobené v endoplasmatickém retikulu a poté je směřuje do okolí buňky nebo do různých jiných jejích částí. Lyzosomy jsou malé nepravidelné organely, ve kterých probíhá vnitrobuněčné trávení. Uvolňují živiny z částic potravy a odbourávají nežádoucí molekuly pro recyklaci nebo vyloučení. Peroxisomy jsou malé membránou



Obrázek 1-15 Endoplasmatické retikulum (ER). (A) Schematický obrázek živočišné buňky; endoplasmatické retikulum je nakresleno zeleně. (B) Elektronmikroskopický snímek tenkého řezu savčí buňky, na kterém je vidět drsné endoplasmatické retikulum. Všimněte si, že ER plynule přechází v membránu jaderného obalu. Černé částice, jimiž je posázena většina ER, jsou ribosomy, v nichž se uskutečňuje syntéza proteinů.



Obrázek 1-16 Golgiho aparát. Tato organela, zde viditelná ve světelném mikroskopu, ale často nenápadná, se podílí na syntéze a balení molekul určených pro export z buňky (sekreci) a pro směrování nově vzniklých proteinů do správné části buňky. (A) Schematický obrázek živočišné buňky s Golgiho aparátem zbarveným červeně. (B) Kresba Golgiho aparátu rekonstruovaná podle obrazu z elektronového mikroskopu. Golgiho aparát se skládá ze zploštělých membránových váček poskládaných do stohů, z nichž se odškrucují malé váčky. Na této kresbě vidíme jen jeden stoh membrán, ale v každé buňce jich může být několik. (C) Na tomto snímku z elektronového mikroskopu je Golgiho aparát z typické živočišné buňky.



Obrázek 1-17 Vnitřní membrány a cytosol. (A) V eukaryontních buňkách existuje řada membránových oddílů, z nichž každý se specializuje na zvláštní funkci. (B) Zbytek buňky kromě těchto organel se nazývá cytosol a je místem mnoha životně důležitých buněčných aktivit.

ohraničené váčky, které poskytují svůj obsah reakcím, v nichž se odbourává nebezpečný peroxid vodíku. Membrány také tvoří mnoho různých váčků zapojených do transportu látek od jedné membránou ohraničené organely ke druhé. Celý tento systém spojených organel je znázorněn na obrázku 1-17A.

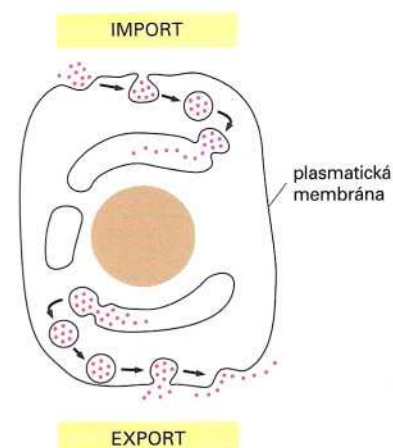
Mezi endoplasmatickým retikulem, Golgiho aparátem, lyzosomy a vnějškem buňky probíhá stálá výměna materiálu. Tato výměna je zprostředkována malými váčky, které se odškrucují od membrány jedné organely a fúzí s membránou organely jiné. Z povrchu buňky se například vchlipují části plasmatické membrány dovnitř a odškrucují se za tvorby váčků, které do buňky přinášejí materiál z vnějšího prostředí (obr. 1-18). Tyto váčky nakonec zpravidla fúzí čili splývají s lyzosomy, kde je zachycený materiál tráven. Tímto způsobem mohou živočišné buňky pohltit značně velké cizí částice nebo dokonce celé cizí buňky. Běžnou aktivitou buněk je také opačný proces, při kterém váčky z vnitřního prostředí buňky fúzí s plasmatickou membránou a uvolňují svůj obsah do vnějšího prostředí (obr. 1-18).

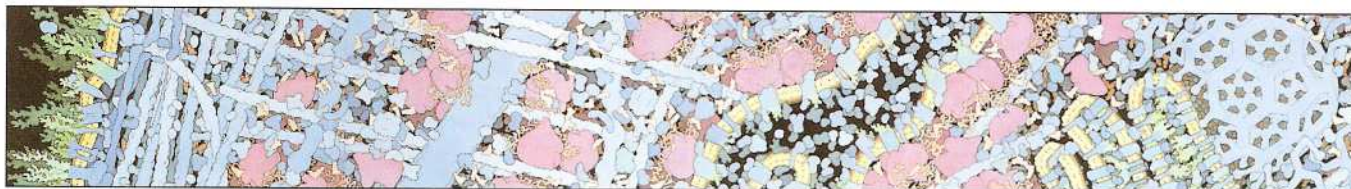
Otázka 1-2 Zkuste promyslet, proč bylo pro eukaryontní buňky výhodné vyvinout důmyslné systémy vnitřních membrán, které jim umožňují import látek z okolí, jak je ukázáno na obrázku 1-18.

Cytosol je koncentrovaný vodný gel malých a velkých molekul.

Kdybychom z eukaryontní buňky stáhli plasmatickou membránu a potom odstranili všechny membránou ohraničené organely včetně mitochondrií a chloroplastů, měli bychom před sebou cytosol (obr. 1-17b). Ve většině buněk tvoří cytosol zdaleka největší oddíl, a v bakteriích je to dokonce jediný buněčný oddíl. Obsahuje velké množství velkých i malých molekul natěsnaných tak blízko k sobě,

Obrázek 1-18 Import a export. Buňka může vnášet materiály z vnějšího prostředí tak, že je pohltí do váčků, které se potom odškrtní z plasmatické membrány. Váčky nakonec fúzí s lyzosomy, v nichž probíhá vnitrobuněčné trávení. Při opačném ději buňka exportuje materiály syntetizované v intracelulárních oddílech. Tyto materiály jsou uloženy v intracelulárních váčcích a při jejich fúzi s plasmatickou membránou se uvolňují do vnějšího prostředí.





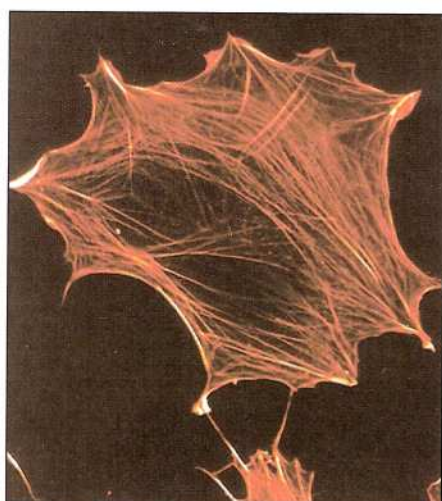
že se chová mnohem více jako vodný gel než jako roztok (obr. 1–19). Cytosol je místem mnoha chemických reakcí, které jsou základem existence buňky. První kroky odbourávání molekul potravy se odehrávají v cytosolu, a zde také dochází k jednomu z klíčových dějů v buňce – syntéze proteinů. Jemné molekulové stroje, které vyrábějí proteiny, je vidět v elektronovém mikroskopu jako malé částice v cytosolu: říká se jim ribosomy (viz obr. 1–5B a 1–15B).

Obrázek 1-19 Cytosol. Tato schematická kresba založená na známých velikostech a koncentracích molekul v cytosolu ukazuje, jaká je v cytosolu tláčenice. Panorama začíná úplně vlevo na povrchu buňky, pokračuje přes endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát a mitochondrii a končí úplně vpravo (na následující stránce) v jádře.

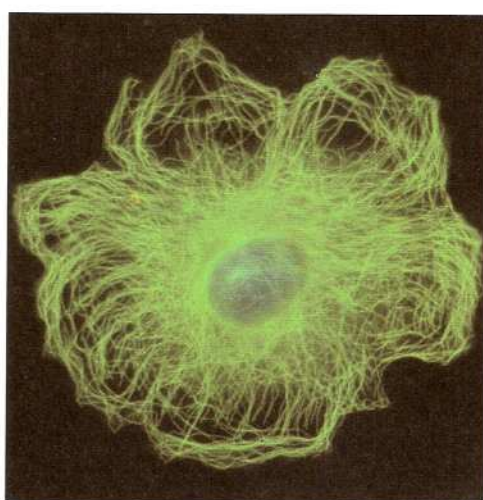
Cytoskelet zodpovídá za buněčné pohyby

Cytosol není jen směsí chemikálií bez jakékoliv struktury. V elektronovém mikroskopu můžeme vidět, že eukaryotní buňky jsou na rozdíl od bakterií protkány dlouhými jemnými vlákny proteinu. Často lze spatřit, že filamenta jsou ukotvena jedním koncem v plasmatické membráně nebo že se rozbíhají z ústředního místa v sousedství jádra. Tato soustava vláken se jmenuje cytoskelet (obr. 1–20). Nejjemnějšími vlákny jsou aktinová mikrofilamenta, která jsou přítomna ve všech eukaryotních buňkách, ale ve zvláště velkém počtu se vyskytují uvnitř svalových buněk, kde slouží jako část soustrojí účastnícího se svalového stahu. Nejtlustší vlákna se nazývají mikrotubuly, protože mají tvar dutých trubiček. V dělicích se buňkách se organizují do výrazných útvarů, kde pomáhají táhnout zdvojené chromosomy do opačných směrů a rozdělit je rovnoměrně mezi dvě dceřiné buňky (obr. 1–21). Přechod mezi tloušťkou aktinových filament a mikrotubulů tvoří intermediární filamenta,

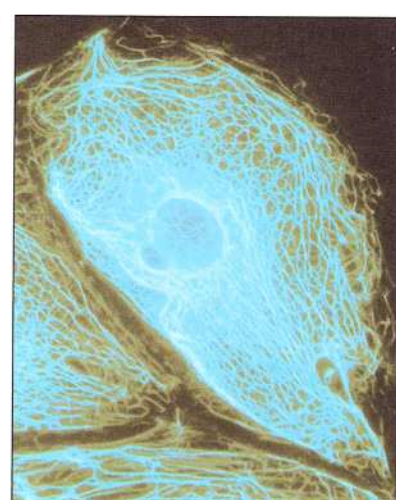
Obrázek 1-20 Cytoskelet. Proteínová vlákna poskytují všem eukaryotním buňkám vnitřní síť, která jim pomáhá organizovat vnitřní aktivity a je základním zařízením pro pohyb buňky a změny jejího tvaru. Zde jsou ukázána aktinová filamenta (A), mikrotubuly (B) a intermediární filamenta (C) v buňkách z tkáňové kultury. Různé typy vláken jsou označeny různými fluorescenčními barvami.



(A)

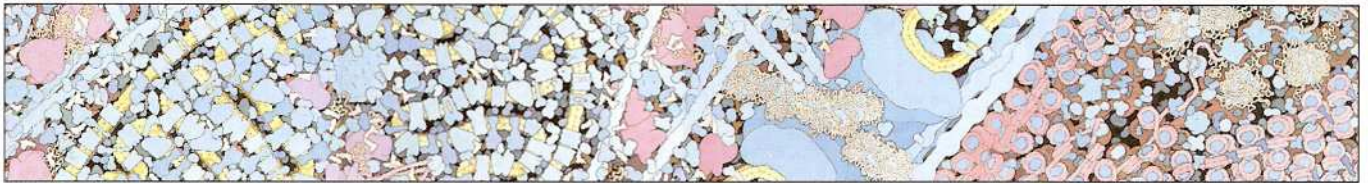


(B)



(C)

50 μm



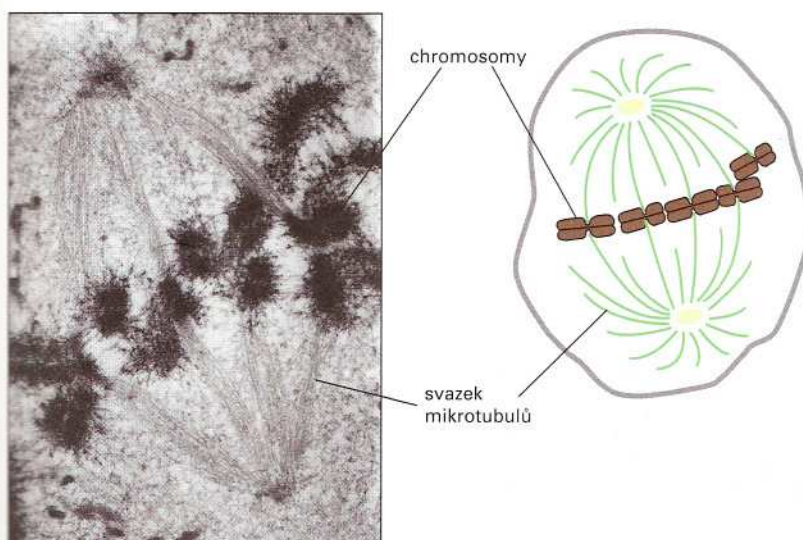
kteřá slouží k mechanickému posílení buňky. Tyto tři typy filament spolu s ostatními proteiny, které se k nim pojí, tvoří soustavu trámů, nosníků, lan a motorů, která dodává buňce její mechanickou pevnost, ovlivňuje její tvar a pohání a řídí její pohyby. Protože tento aparát ovládá jak vnitřní organizaci buňky tak její vnější vlastnosti, je důležitý jak pro rostlinnou buňku umístěnou uvnitř pevné stěny, tak pro živočišnou buňku, která volně plave nebo leze. Například v rostlinné buňce jsou organely jako mitochondrie poháněny ve stálém toku ve vnitřním prostředí buňky po cytoskeletálních „kolejích“ a jak živočišné tak rostlinné buňky závisejí na cytoskeletu v období dělení jejich vnitřního obsahu do dvou dceřiných buněk.

Panel 1–2 na následující straně shrnuje rozdíly mezi živočišnými, rostlinnými a bakteriálními buňkami a tabulka 1–1 na straně 19 uvádí některé důležité letopočty z objevování buněk a jejich organel.

Otázka 1-3 Proberte relativní výhody a nevýhody elektronové a světelné mikroskopie. Jak byste nejlépe zviditelnili (a) živou buňku kůže, (b) mitochondrii kvasinky, (c) bakterii a (d) mikrotubulus?

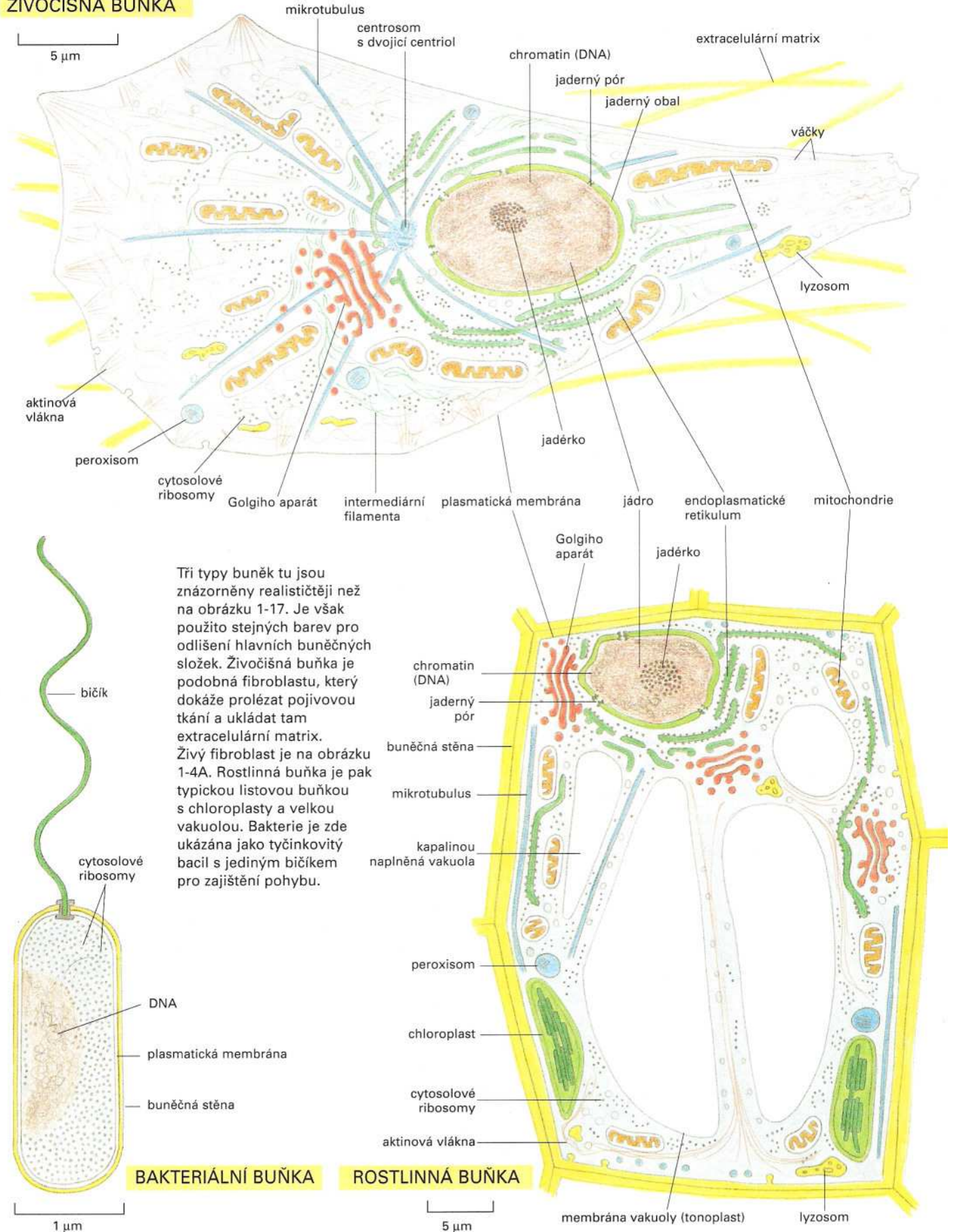
Jednotnost a rozdílnost buněk

Buněční biologové často mluví o buňce bez určení nějaké specifické buňky, jako by všechny buňky byly stejné. Ale buňky, jak už jsme si všimli, nejsou všechny stejné – ve skutečnosti se značně liší. Podle odhadů existuje ve světě nejméně 10 milionů organismů, podle některých odhadů snad 100 milionů. Než se ponoříme hlouběji do buněčné biologie, musíme si uvědomit jedno: kolik společného mají buňky těchto druhů: bakterie a motýl, růže a delfín. Jak se od sebe liší?



Obrázek 1-21 Mikrotubuly v dělicí se buňce. Když se buňka dělí, její jaderný obal se rozpadá a její DNA kondenzuje do párů viditelných chromosomů, které jsou mikrotubuly taženy k opačným pólům buňky. Mikrotubuly vyrůstají z ohnisek na opačných koncích dělicí se buňky.

ŽIVOČIŠNÁ BUŇKA



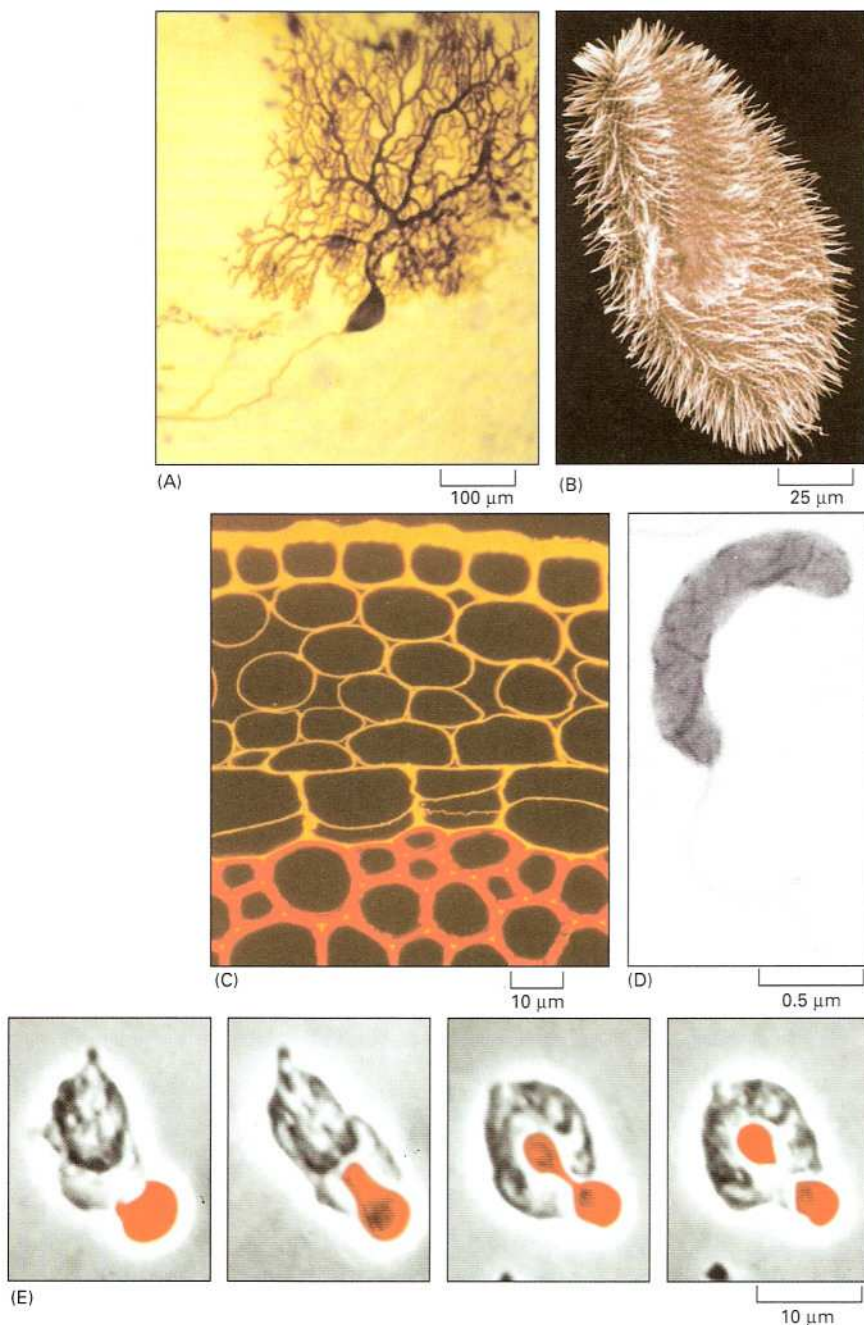
Tabulka 1-1 Významná data v mikroskopii buněk

- 1655 **Hooke** použil jednoduchý mikroskop k popisu pórů v řezu korku. Tyto póry nazval "buňky".
- 1674 **Leeuwenhoek** ohlásil svůj objev prvoků. Bakterie poprvé uviděl o devět let později.
- 1833 **Brown** zveřejnil svá mikroskopická pozorování orchidejí a jasně popsal buněčné jádro.
- 1838 **Schleiden** a **Schwann** navrhli buněčnou teorii s tím, že buňka s jádrem je univerzálním stavebním kamenem rostlinných a živočišných tkání.
- 1857 **Kölliker** popsal mitochondrie ve svalových buňkách.
- 1879 **Flemming** velmi jasně popsal chování chromosomů v živočišných buňkách během mitózy.
- 1881 **Cajal** a další histologové vyvinuli barvicí techniky, které odkryly strukturu nervových buněk a organizaci nervové tkáně.
- 1898 **Golgi** při barvení buněk dusičnanem stříbrným jako první uviděl a popsal Golgiho aparát.
- 1902 **Boveri** pozoroval chování chromosomů během pohlavního rozmnožování a určil jejich vztah k dědičnosti.
- 1952 **Palade**, **Porter** a **Sjöstrand** vyvinuli techniky elektronové mikroskopie, které umožnily poprvé spatřit řadu struktur uvnitř buňky. Při jednom z prvních použití těchto technik **Huxley** ukázal, že svaly obsahují svazky proteinových vláken – první důkaz existence cytoskeletu.
- 1957 **Robertson** popsal dvojnou vrstvu buněčné membrány spatřené poprvé v elektronovém mikroskopu.
-

Buňky se značně liší svým tvarem a funkcí

Začněme velikostí. Bakteriální buňka, řekněme *Lactobacillus* v kousku sýra, je jen několik mikrometrů dlouhá. Žabí vajíčko, které je také jedinou buňkou, má průměr asi jeden milimetr. Kdybychom je zvětšili tak, aby *Lactobacillus* byl velký jako člověk, bylo by žabí vejce velké jako osm fotbalových hřišť.

Stejným způsobem se buňky liší ve svých tvarech a pohybech. Podívejme se na galerii buněk z obrázku 1–22. Typická nervová buňka ve vašem mozku je enormně protažena; vysílá elektrické signály jemným cytoplasmatickým vláknem, které je 10 000krát delší, než je tlusté, a dělí se do stovek větví. *Paramecium* v kapce rybníční vody vypadá jako ponorka a je pokryté desítkami tisíc brv neboli cílů – vlasům podobných výběžků, jejichž vlnivé údery pohánějí buňku vpřed za současného otáčení. Buňka v povrchovém pletivu rostliny je přisedlým nepohyblivým hranolem, který kolem sebe vytváří tuhý obal z celulosy s vnějším nepromokavým pláštěm z vosku. Bakterie *Bdellovibrio* je torpédem ve tvaru uzenky, které je poháněno rotujícím bičíkem připojeným k jeho zádi a fungujícím jako vrtule. Neutrofil nebo makrofág v těle živočicha se plazí tkáněmi jako améba (měňavka), která se stále přelévá do nových tvarů a pohlcuje zbytky buněk, cizí mikroorganismy a mrtvé či umírající buňky.



Obrázek 1-22 Několik příkladů rozmanitých buněčných tvarů a velikostí. (A) Nervová buňka z části mozku zvané mozeček, která ovládá pohyb. Tato buňka je obrovským rozvětveným stromem výběžků, jimiž přijímá signály od 100 000 jiných nervových buněk. (B) *Paramecium*. Tento prvok plave s pomocí brv pokrývajících jeho povrch. (C) Řez stonkem mladé rostliny, v němž je celulóza obarvena oranžově a lignin červeně. Vnější vrstva buněk se nachází v horní části obrázku. (D) Drobná bakterie *Bdellovibrio bacteriovorus* s jediným bičíkem na konci. Tato bakterie napadá, zabíjí a požírá jiné, větší bakterie. (E) Lidská bílá krvinka (neutrofil) se přibližuje k červené krvince a pohlcuje ji.

Některé buňky jsou oděny jen tenkou plasmatickou membránou, jiné si vytvářejí vnější plášť slizu, staví okolo sebe tuhé buněčné stěny nebo se obklopují tvrdou mineralizovanou extracelulární matrix podobně jako buňky kostí.

Buňky se také značně liší ve svých chemických požadavcích a aktivitách. Některé vyžadují k životu kyslík, pro jiné je to smrtelný jed. Některým stačí jako potrava jen o málo víc než sluneční světlo, vzduch a voda, jiné potřebují určitou směs molekul produkovanou jinými buňkami. Některé vypadají jako specializované továrny na výrobu zvláštních látek, jako jsou hormony, tuk, škrob, latex nebo barviva. Některé jsou motory, jako například svaly, které přeměňují pali-

vo na mechanickou práci, nebo elektrickými generátory, jakými jsou buňky speciálního orgánu elektrického úhoře.

Některé specializace pozmění buňku natolik, že ztratí jakoukoli možnost se množit. Taková specializace by neměla žádný smysl u druhů buněk, které žijí osamoceným životem. V mnohobuněčném organismu však toto rozdělení buněk umožňuje některým buňkám specializaci v extrémním měřítku pro zvláštní úkoly, na druhé straně je však činí závislými v základních požadavcích na okolních buňkách. Dokonce nejzákladnější potřeba ze všech – předání genetické instrukce další generaci – je svěřena specializovaným buňkám, vajíčku a spermii.

Všechny živé buňky mají podobný chemický základ

Nehledě na mimořádnou rozdílnost rostlin a živočichů si lidé od nepaměti uvědomovali, že tyto organismy mají něco společného – něco, co jim všem dává právo nazývat se živými. S vynálezem mikroskopu vyšlo najevo, že rostliny a živočichové jsou soubory buněk a že jednotlivé buňky jsou živé. Ale zatímco bylo poměrně snadné rozpoznat život, zůstávalo značně obtížným určit, co mají všechny živé předměty společného. Učebnice se snažily definovat život abstraktními obecnými pojmy.

Díky objevům biochemie a molekulární biologie se tento problém odstranil velmi působivou formou. Nyní víme, že všechny živé organismy na naší planetě jsou si podobné nejen v abstraktním smyslu, tj. že všechny rostou, množí se, přeměňují energii z jedné formy na jinou atd., ale v udivující míře známe i detaily jejich chemie. Ve všech organismech je genetická informace – geny – uložena v molekulách DNA, zapsána stejným chemickým kódem, vytvořena ze stejných stavebních bloků, překládána stejným chemickým aparátem a duplikována stejnou cestou, aby se tyto organismy mohly reprodukovat. DNA řídí produkci obrovského množství proteinů, které určují chování buňky, slouží jako konstrukční materiály, chemické katalyzátory, molekulární motory atd. V každé živé bytosti se spojuje stejných 20 aminokyselin za vzniku proteinů. Tyto podjednotky se však spojují v různých pořadích, a tak určují různé chemické vlastnosti proteinových molekul, stejně jako různá pořadí písmen dávají vznik různým slovům. Tak posloužil stejný základní biochemický aparát při vytvoření celé palety živých organismů (obr. 1–23).

Všechny dnešní buňky se zřejmě vyvinuly ze stejného předka

Buňka se množí zdvojením své DNA a následným dělením. Přitom se do každé z dceřiných buněk dostane po jedné z obou kopií DNA. Proto děti vypadají jako rodiče. Kopírování není vždy dokonalé a instrukce jsou někdy zkomolené. Proto se děti nikdy nepodobají rodičům úplně přesně. Změny DNA neboli mutace mohou vést k potomstvu, které je změněno k horšímu – například má menší schopnost přežít a rozmnožování – nebo k lepšímu, tedy s lepšími schopnostmi přežít a rozmnožování. Změny mohou být také neutrální povahy – rozdílné, ale zaručující stejnou životaschopnost. Boj o přežití první změny vyřazuje, druhé upřednostňuje a třetí toleruje. Všichni potomci, kteří v další generaci přežijí,



(A)



(B)



(C)



(D)

Obrázek 1-23 Bakterie, motýl, růže a delfin. Všechny tyto živé organismy jsou tvořeny buňkami, které mají podobný chemický základ a fungují na stejných principech.

zdědí změněné instrukce, kterým vděčí za svou existenci. Navíc genetické „karty“ mohou být zamíchány cestou pohlavního rozmnožování, kde dvě buňky stejného druhu fúzí, společně přispějí svou DNA, a umožní tak následující generaci sdílet genetické instrukce v nových kombinacích.

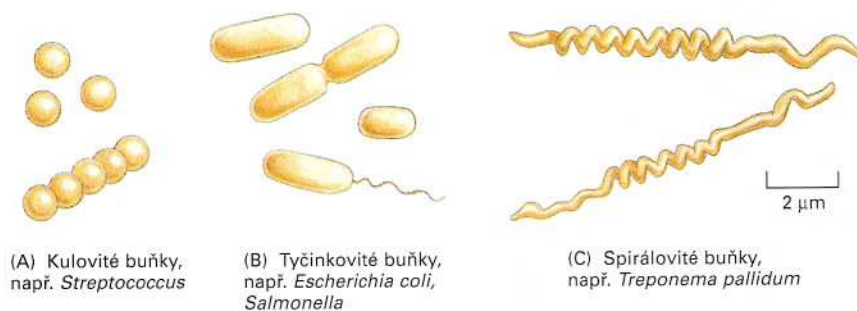
Tyto jednoduché principy změny a výběru, používané opakovaně po tisíce milionů generací buněk, jsou základem evoluce, procesu, ve kterém se živé druhy postupně mění a přizpůsobují svému okolí stále důmyslnějším způsobem. Evoluce nabízí překvapující ale přesvědčivé vysvětlení toho, proč jsou si dnešní buňky ve svých základech tak podobné: všechny zdědily své genetické instrukce po jedné společné předchůdkyni. Odhaduje se, že tato původní buňka existovala asi před 3,5–3,8 miliardami let, a musíme předpokládat, že obsahovala prototyp univerzálního aparátu dnešního pozemského života. Mutacemi se její potomci postupně rozdělili, aby zaplnili každý kout Země živými bytostmi, využívající možnosti tohoto aparátu nekonečně mnoha způsoby.

Bakterie jsou nejmenší a nejjednodušší buňky

Mezi dnešními buňkami mají bakterie nejjednodušší strukturu a nejvíce se přibližují ukázce života v jeho nezákladnější variantě. Jsou to obvykle kulové, okrouhlé nebo spirálovité buňky několik mikrometrů dlouhé (obrázek 1–24). Často mají tuhý ochranný plášť zvaný buněčná stěna, pod níž cytoplasmatická membrána uzavírá jediný oddíl

Otázka 1-4 Mutace jsou chyby v DNA, které mění genetický plán původní generace. Představte si továrnu na boty. Očekávali byste, že chyby (tj. nechtěné změny) v kopírování návrhu obuvi povedou ke zlepšení vyráběných bot? Vysvětlete svou odpověď.

Obrázek 1-24 Tvary a velikosti bakterií. Na kresbě jsou ukázány ve skutečném poměru typické bakterie kulového, tyčinkového a spirálového tvaru. Zde nakreslené spirálovité buňky způsobují syfilis.



obsahující cytoplasmu včetně DNA. V elektronovém mikroskopu obvykle vypadá vnitřek takové buňky jako matrice s proměnlivým vzorkem bez jakékoli viditelné uspořádané vnitřní struktury (obr. 1–25).

Bakterie jsou obvykle malé a rychle se množí přehrádečným dělením. Za optimálních podmínek a dostatku potravy se bakterie tímto způsobem může rozdělit za 20 minut, a za méně než 11 hodin tak může dát opakovaným dělením vzniknout pětimiliardovému potomstvu (což je přibližný počet lidí na Zemi). Díky svým velkým počtům a vysoké rychlosti růstu se mohou společenství bakterií rychle vyvíjet a rychle získávat schopnost využívat nové zdroje potravin nebo odolnost proti antibiotikům.

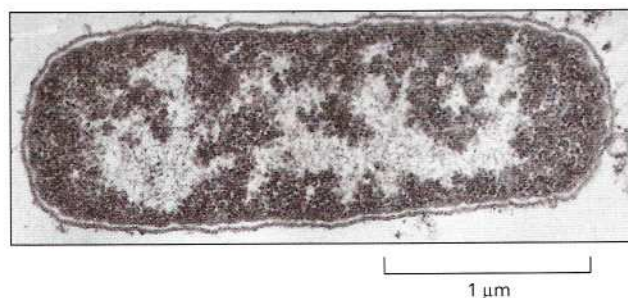
Svým tvarem a strukturou se bakterie se mohou zdát omezené, ale po chemické stránce představují nejrozmanitější a nejdůmyslnější třídu buněk. Využívají nesmírné množství lokalit, od horkých jezírek sopečného bahna až po vnitřní prostředí jiných živých buněk, a co do počtu mnohonásobně převyšují ostatní živé organismy. Některé jsou aerobní a používají kyslík k oxidaci molekul živin, jiné jsou anaerobní a straní se prostředí bohatého na kyslík, který by je otrávil. Eukaryontní mitochondrie se podle všeho vyvinuly z aerobní bakterie, která začala žít uvnitř předka dnešních eukaryontních buněk (viz obr. 1–12). Proto můžeme chápat náš vlastní aerobní metabolismus jako výsledek aktivity bakteriálních buněk.

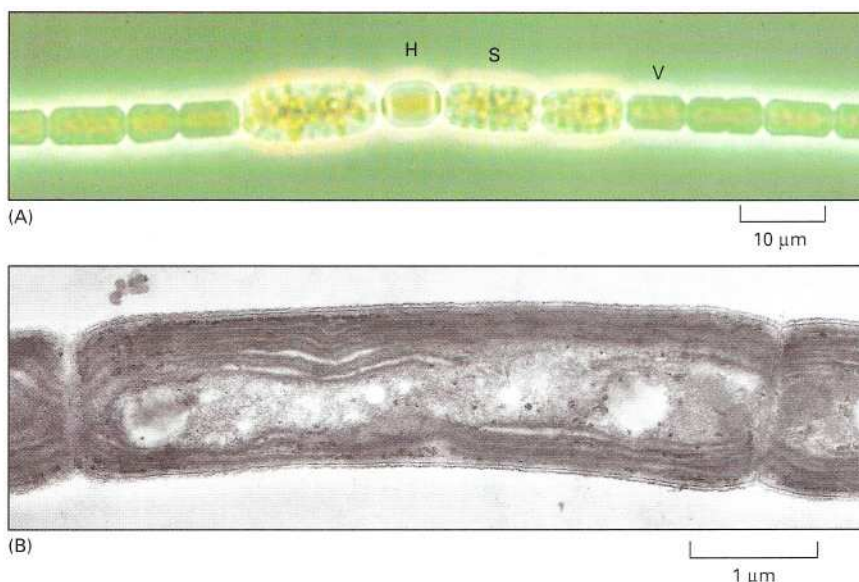
Skutečně jakýkoli organický materiál, od dřeva až po ropu, může být využit jako potrava tím či oním druhem bakterií. Co je ještě zajímavější, existují bakterie, které mohou žít pouze na anorganických látkách; svůj uhlík získávají z CO_2 v atmosféře, svůj dusík z atmosférického N_2 a kyslík, vodík, síru a fosfor získávají ze vzduchu, vody a minerálů. Některé bakteriální buňky, stejně jako buňky rostlinné, fotosyntetizují a získávají potřebnou energii pro biosyntézu ze

Poznámka k biologickým názvům:

Druhy žijících organismů jsou oficiálně určeny dvěma latinskými slovy, obvykle tištěnými kurzivou, podobně jako lidé mají jméno a příjmení. Rod (*Escherichia*, což odpovídá příjmení) se uvádí jako první; druhý termín (*coli*) určuje specifický druh patřící k danému rodu. Při opakování se může rod psát zkráceně (*E. coli*) nebo se může vynechat druh (takže často mluvíme o mouše *Drosophila* nebo česky drosophila a myslíme tím *Drosophila melanogaster*).

Obrázek 1-25 Bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*). Elektronmikroskopický snímek podélného řezu; DNA je soustředěna ve slabě obarvené oblasti.





Obrázek 1-26 Dva typy fotosyntetických bakterií. (A) Sinice *Anabaena cylindrica* pozorovaná ve světelném mikroskopu. Tyto prokaryotní buňky tvoří dlouhá mnohobuněčná vlákna, v nichž specializované buňky (označené H) fixují dusík (to znamená, že zachycují N_2 ze vzduchu a začleňují ho do organických sloučenin), zatímco ostatní buňky jsou fotosyntetické a fixují CO_2 (V), nebo vytvářejí odolné spóry (S). (B) Elektronmikroskopický snímek bakterie *Phormidium laminosum*. Jsou tu vidět vnitřní membrány, kde probíhá fotosyntéza.

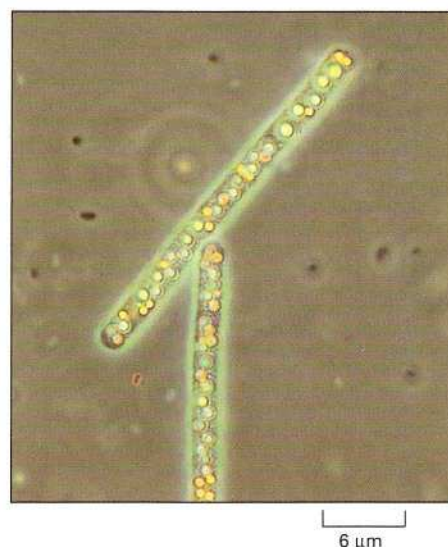
Otázka 1-5 Bakterie má hmotnost asi 10^{-12} g a může se dělit každých 20 minut. Pokud by si jediná bakterie udržela toto tempo dělení, za jak dlouho by se hmotnost bakterií rovnala hmotnosti Země (6×10^{24} kg)? Porovnejte s tímto výsledkem skutečnost, že bakterie se vyvinuly před 3,5 miliardami let a od té doby se dělí. Vysvětlete zdánlivý paradox. (Počet buněk N v kultuře za čas t je popsán rovnicí $N = N_0 \times 2^{t/G}$, kde N_0 je počet buněk v čase nula a G je generační doba.)

slunečního světla (obr. 1–26). Jiné bakteriální buňky získávají tuto energii z chemických reakcí anorganických látek v příslušném prostředí (obr. 1–27). V každém případě takové bakterie hrají jedinečnou a základní roli v ekonomii života na Zemi: ostatní organismy závisejí na sloučeninách, které tyto buňky vytvoří z anorganických materiálů.

Rostliny jsou zvláštní výjimkou: mohou zachycovat energii ze slunečního světla a uhlík ze vzdušného CO_2 . Ale bez pomoci bakterií rostliny nedovedou zachycovat N_2 ze vzduchu; v tomto smyslu i ony závisejí na bakteriích. Jak jsme se už dříve zmínili, je téměř jisté, že organely v rostlinných buňkách, které mohou provádět fotosyntézu – chloroplasty, se vyvinuly z fotosyntetické bakterie, která našla domov v cytoplasmě budoucí rostlinné buňky (viz obr. 1–14).

Tradičně byly všechny bakterie řazeny do jedné velké skupiny. Molekulová studia však prozrazují, že ve skupině prokaryot je hluboký příkop, který ji dělí na dvě odlišné říše – Eubacteria a Archaeobacteria. (nověji Eubacteria a Archaea). Je pozoruhodné, že na molekulové úrovni se příslušníci těchto dvou skupin od sebe natolik liší, že dokonce zástupci archeobakterií jsou bližší člověku než pravé bakterii. Většina bakterií známých z každodenního života, jak druhy přítomné v půdě tak ty, kvůli kterým někdy onemocníme, jsou eubakterie. Archeobakterie se obvykle nacházejí v prostředí nepřátelském ostatním buňkám: existují druhy, které žijí v koncentrovaném roztoku soli, v horkých kyselých sopečných vřídlech, v bezvzdušných hlubinách mořských usazenin, v kalu čistíren splašků a v kyselém bezkyslíkatém prostředí žaludku krávy, kde odbourávají celulosu a vytvářejí plyn methan. Mnohá tato prostředí připomínají drsné podmínky, které existovaly na Zemi v době, kdy se ještě před uvolněním kyslíku do atmosféry vyvinuly živé organismy .

Obrázek 1-27 Klouzavá sirá bakterie. *Beggiatoa*, která žije v sírném prostředí, získává svou energii oxidací H_2S a může fixovat uhlík dokonce ve tmě. Všimněte si žlutých usazenin síry uvnitř buněk.



Molekulární biologové se zaměřili na *E. coli*

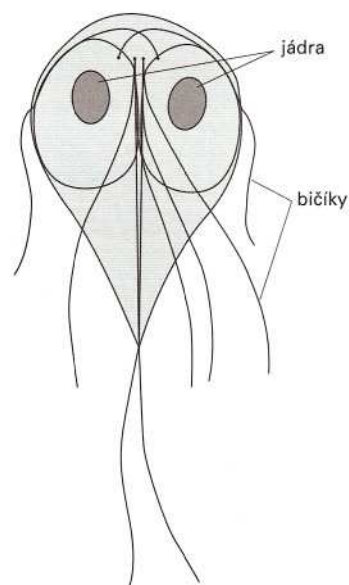
Protože jsou živé organismy tak složité, dostáváme se do pozoruhodné situace – čím více toho poznáme o jednom určitém druhu, tím přitažlivějším objektem studia se pro nás stává. Každý objev přináší nové otázky a poskytuje nové nástroje pro jejich řešení ve vztahu ke zvolenému organismu. Z tohoto důvodu se velká společenství biologů oddala studiu stejného organismu. Z celého světa bakterií se stal středem zájmu molekulární biologie především jeden druh: *Escherichia coli*, zkráceně *E. coli* (viz obr. 1–25). Tato malá tyčinkovitá eubakteriální buňka normálně žije ve střevě lidí a ostatních obratlovců; lze ji však pěstovat na jednoduché směsi živin v kultivační nádobě. *E. coli* se umí přizpůsobit různým chemickým podmínkám ve svém prostředí a rychle se množí. Její genetické instrukce jsou obsaženy v jediné molekule DNA a představují informaci asi o 4000 různých druhů proteinů. Pro srovnání, lidská buňka obsahuje 600krát více DNA, která kóduje 50 000–100 000 druhů proteinů.

Na molekulární úrovni rozumíme fungování *E. coli* mnohem komplexněji než fungování jakéhokoli jiného živého organismu. Většina našich znalostí základních mechanismů života, jakými jsou replikace DNA či dekodování genetické informace, pochází ze studia *E. coli*. Následný výzkum potvrdil, že v našich vlastních buňkách se tyto základní děje odehrávají stejným způsobem jako v buňkách *E. coli*.

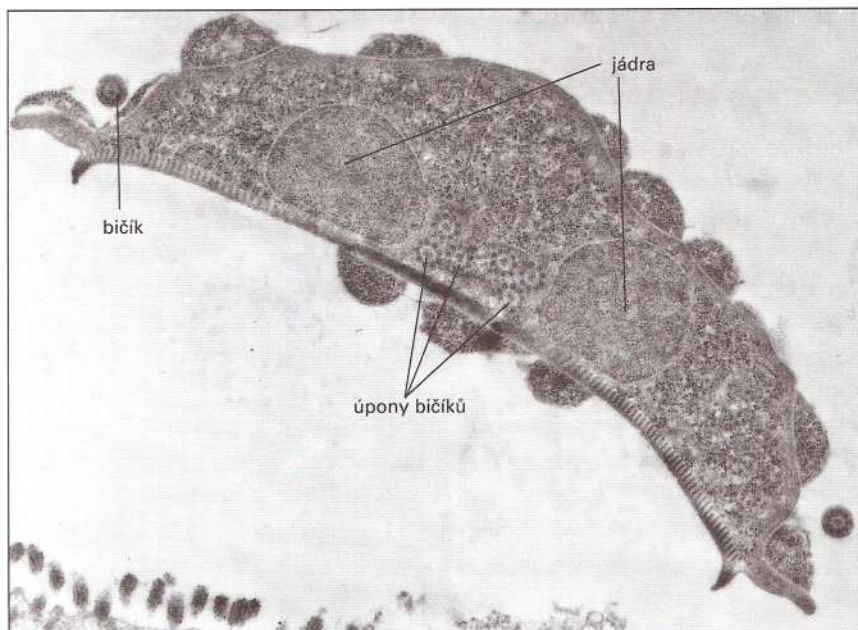
Giardia může představovat přechodný stav v evoluci eukaryontních buněk

Podle definice mají eukaryontní buňky (například ty, z nichž se skládá naše tělo) svou DNA uzavřenou ve zvláštní části buňky – v jádře, okolo něhož je dvojitá membrána. Jak jsme viděli, obsahují tyto buňky celou řadu dalších zařízení, která je odlišují od bakterií – např. cytoskelet, mitochondrie a další organely.

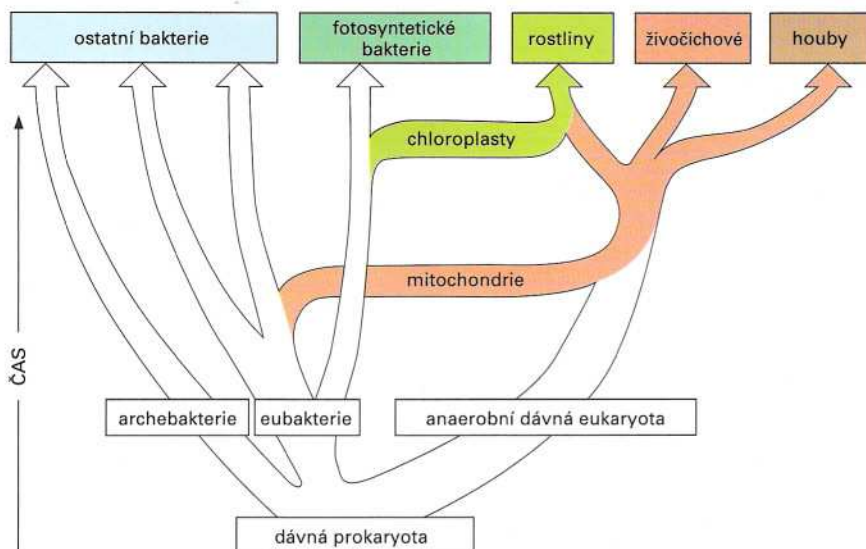
Obrázek 1-28 Jednobuněčný parazitní organismus *Giardia*. (A) Kresba podle pozorování ve světelném mikroskopu. (B) Elektronmikroskopický snímek příčného řezu širokým zploštělým tělem buňky. *Giardia* je považována za jeden z nejjednodušších druhů eukaryontních buněk. Má dvě identická jádra a cytoskelet, neobsahuje však žádné mitochondrie ani chloroplasty a žádné detegovatelné endoplasmatické retikulum ani Golgiho aparát.



(A)



(B)



Obrázek 1-29 Evoluční počátky dnešních eukaryot. Eukaryontní, eubakteriální a archebakteriální řady se oddělily již v rané fázi evoluce života na Zemi. Mnohem později získala eukaryota mitochondrie a ještě později se u části eukaryot objevily chloroplasty. Mitochondrie v buňkách živočichů, rostlin a hub se v mnoha ohledech liší, a tak se má za to, že byly buňkami získány v několika endosymbiotických událostech..

Eukaryota (zvaná také Eucarya), eubakterie (Bacteria) a archebakterie (Archaea) se musely oddělit již ve velmi raném období historie života na Zemi (viz Kap. 13). Není tedy s podivem, že eukaryota nezískala všechny své odlišující znaky v jednom okamžiku. Některé z kroků v evoluci eukaryot můžeme odhalit srovnáním dnes žijících eukaryontních druhů navzájem a s bakteriemi. Z tohoto pohledu je velmi zajímavým organismem *Giardia*. Toto podivně vyhlížející jednobuněčné stvoření (obr. 1–28) žije anaerobně jako parazit ve střevě a může lidem způsobit onemocnění. Zdá se, že jde o druh živočíšné fosilie, která představuje mezistupeň ve vývoji eukaryontních buněk. Zejména proto, že nemá žádné mitochondrie ani chloroplasty.

Eukaryontní buňky jako *Giardia*, které mohou žít bez kyslíku, napovídají, že původní eukaryontní buňka vznikla před obohacením pozemské atmosféry kyslíkem. Z toho vidíme, že jádro a cytoskelet se vyvinuly ještě před tím, než eukaryontní buňka získala mitochondrie či chloroplasty (obr. 1–29).

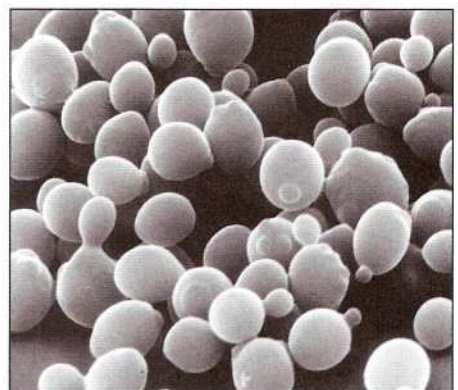
Pekařská kvasinka je obyčejnou eukaryontní buňkou

Nejprve jsme se věnovali eukaryotům, neboť sami mezi eukaryota patříme. Práce s lidskými buňkami je však složitá a obtížná, a pokud chceme porozumět základům eukaryontní buněčné biologie, je mnohem snazší soustředit se na druh, který je – podobně jako *E. coli* – jednoduchý, odolný a rychle se reprodukuje. Populární volbou minimálního modelu eukaryontní buňky jsou kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (obr. 1–30) – stejný organismus, jaký používají pivovarníci, vinaři a pekaři.

S. cerevisiae je malá jednobuněčná houba, a proto má z pohledu dnešních znalostí právě tak blízko živočichům jako rostlinám. Podobně jako jiné houby má i ona tuhou buněčnou stěnu, je

Obrázek 1-30 Snímek buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v rastrovacím elektronovém mikroskopu. Snímek stejného druhu buněk ze světelného mikroskopu je ukázán na obrázku 1-7.

Otázka 1-6 *Giardia* má jádro, ale žádné mitochondrie, a je pokládána za přechodný stav v evoluci eukaryontních buněk. Tento argument by se však dal obrátit a říci, že se *Giardia* mohla vyvinout z eukaryontních buněk, které ztratily své mitochondrie, protože je v anaerobním prostředí nepotřebovaly. Jaké další argumenty či důkazy by podpořily předchozí interpretaci?



10 μm

poměrně nepohyblivá a vlastní mitochondrie, nikoli však chloroplasty. Při dostatku potravy se množí téměř stejně rychle jako bakterie. Protože její jádro obsahuje jen 2,5krát více DNA než *E. coli*, je také dobrým objektem pro genetickou analýzu. Genetické a biochemické studie na kvasinkách měly zásadní význam pro pochopení mnoha základních mechanismů v eukaryontních buňkách včetně cyklu buněčného dělení (řetězce dějů, při nichž se jádro a všechny ostatní části buňky zdvojí a rozdělí za vzniku dvou nových buněk).

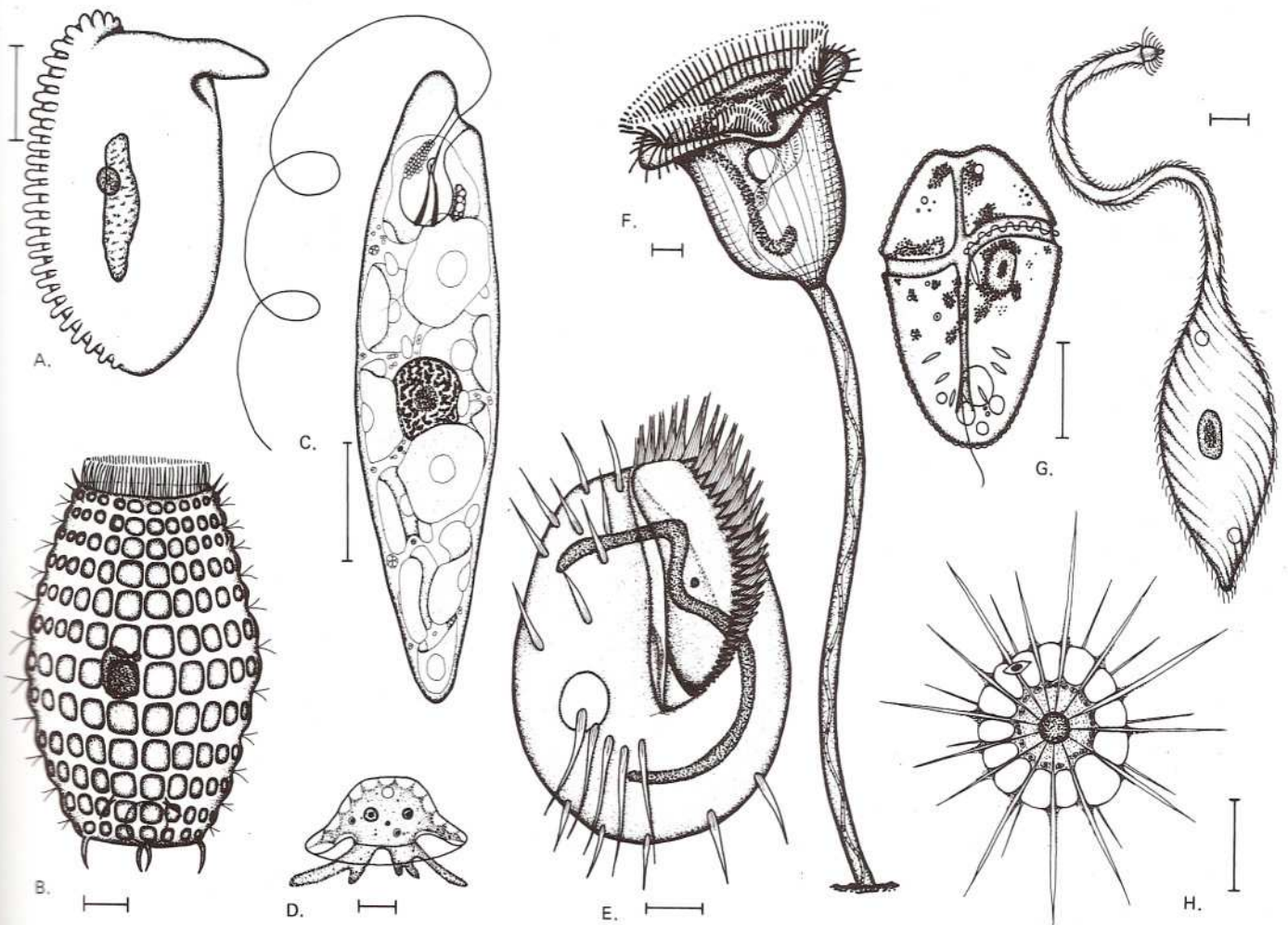
Jednobuněčné organismy mohou být velké, složité a dravé: Prvoci

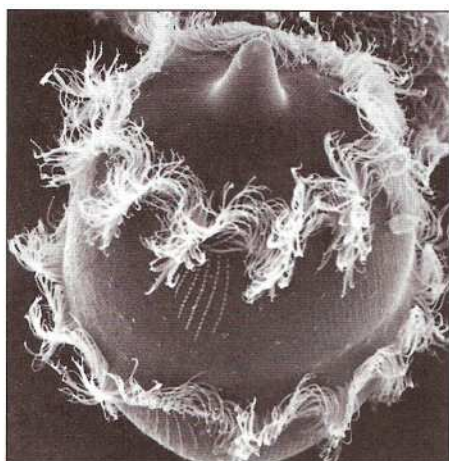
Kvasinky jsou malé, jednoduché a neškodné buňky, které se živí cukrem, vylučují alkohol a oxid uhličitý. Existuje však obrovská plejáda dalších volně žijících jednobuněčných eukaryot a mnohé z nich mají naprosto odlišné vlastnosti. Jednobuněčné organismy známé jako prvoci (protozoa) zahrnují jedny z nejsložitějších a ve smyslu odpovídajícím jejich mikrosvětlu nejdravějších známých buněk. Obrázek 1–31 nám představuje malou ukázkou z nepřeberného množství tvarů prvoků, jejichž chování je právě tak rozmanité: mohou fotosyntetizovat nebo se živit živočišnou potravou, mohou

Otázka 1-7 Váš soused věnoval 20 dolarů na výzkum rakoviny a zděsil se, když se dozvěděl, že jeho peníze byly použity na studium pivovarských kvasinek. Jak byste mohli ulehčit jeho myslí?

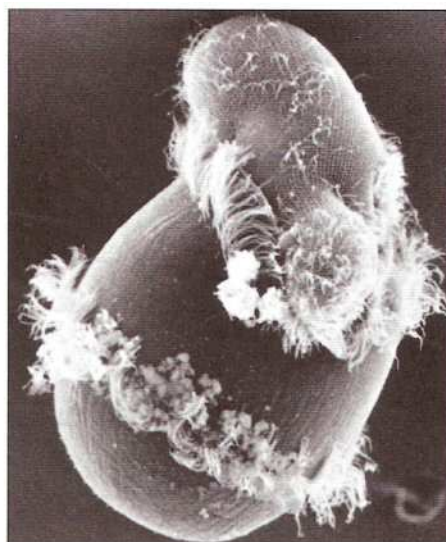
Obrázek 1-31 Sbírnka prvoků, která ilustruje nesmírnou různorodost uvnitř této třídy jednobuněčných organismů.

Tito prvoci jsou nakresleni v různém měřítku, ale u každé kresby se nachází úsečka představující 10 μm. Organismy (A), (B), (E), (F) a (I) jsou obrvenky, (C) je krásnoočko, (D) je měňavka, (G) je obrněnka a (H) je slunivka.





100 μm



Obrázek 1-32 Jeden prvok pojídá druhého. Elektronmikroskopický snímek vlevo ukazuje samotné *Didinium* s jeho prstenci tepajících brv a „chobotem“ na vrcholku; na obrázku vpravo je vidět, jak *Didinium* pohlcuje jiného obrveného prvoka.

být pohybliví nebo přisedlí. Anatomie jejich buněk je často velice propracovaná a zahrnuje například struktury jako citlivé štětiny, fotoreceptory, pohyblivé brvy, stonkovité výrůstky, obdobu úst, žahadla a kontraktilní svazky podobné svalům. Ačkoli jsou všichni prvoci samostatnými buňkami, mohou být rafinovaní a rozmanití jako řada mnohobuněčných organismů. Malou ukázkou nám poskytuje následující příklad.

Didinium je velký masožravý prvok o průměru asi 150 μm – asi 10krát větší než je obvyklá lidská buňka. Má kulovité tělo obklopené dvěma prstenci brv a jeho přední konec je plochý s výjimkou výstupku podobného chobotu (obr. 1–32). *Didinium* s pomocí brv velmi rychle plave. Když se setká s vhodnou kořistí, obvykle jiným druhem prvoka, uvolní ze svého „chobotu“ množství malých paralyzujících šipek. Potom se přiblíží těsně k napadené buňce a pozře ji, přičemž se obrátí jako dutý míč a pohltní svou oběť, která je téměř stejně velká jako útočník sám.

***Arabidopsis* byla vybrána z 300 000 druhů jako modelová rostlina**

Velké mnohobuněčné organismy, které vidíme okolo sebe – květiny, stromy a zvířata – se zdají být úžasně rozmanité, ale ve svých evolučních počátcích jsou si mnohem bližší a mají mnohem podobnější základní buněčnou biologii než velké množství mikroskopických jednobuněčných organismů. Zatímco bakterie a eukaryota se rozdělily před více než dvěma miliardami let, oddělily se rostliny, živočichové a houby teprve před jednou a půl miliardou let, ryby a savci jen asi před 400 miliony let a různé druhy kvetoucích rostlin před méně než 200 miliony let.

Úzký evoluční vztah mezi všemi kvetoucími rostlinami znamená, že můžeme proniknout do buněčné a molekulární biologie kvetoucích rostlin tak, že se při detailní analýze zaměříme jen na několik vhodných druhů. Z několika set tisíc kvetoucích rostlin sou-

Obrázek 1-33 *Arabidopsis thaliana*, běžný huseníček rolní.

Tento drobný plevel se stal oblíbeným organismem rostlinných molekulárních a vývojových biologů.

časného světa padla volba molekulárních biologů nedávno na drobnou rostlinu – huseníček rolní čili *Arabidopsis thaliana* (obr. 1–33), který lze pěstovat doma a jehož každá rostlina dá do 8 až 10 týdnů život několikatisícovému potomstvu. *Arabidopsis* má ve srovnání s kvasinkami jen třikrát více DNA na buňku a my začínáme chápat, jak genetická instrukce nesená přítomnou nukleovou kyselinou umožňuje buňkám spolupracovat při vytváření této typické kvetoucí rostliny.

Svět živočichů reprezentují moucha, červ, myš a člověk

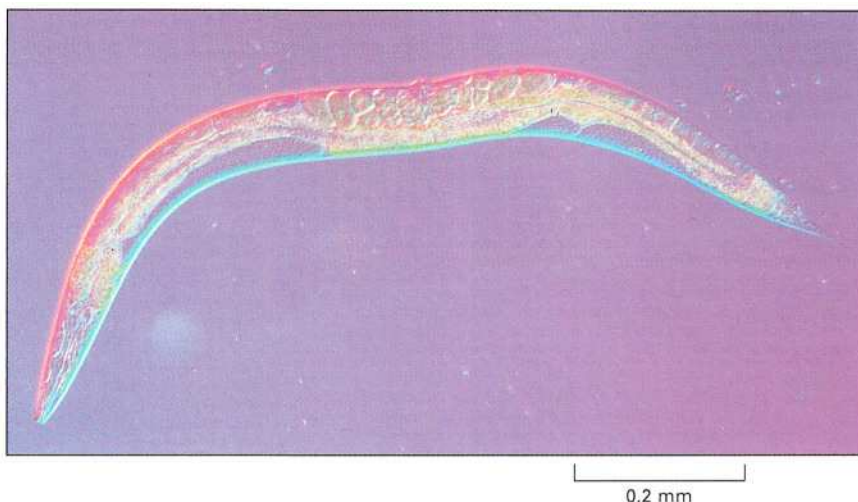
Mnohobuněční živočichové tvoří většinu z dosud pojmenovaných druhů živých organismů, a většinu živočišných druhů tvoří hmyz. Proto je správné, že právě hmyz – konkrétně malá moucha octomilka (*Drosophila melanogaster*, obr. 1–34) – zaujímá ústřední místo v biologickém výzkumu. Na genetickou výbavu drosofilu byl podniknut soustředěný útok, přičemž zvláštní pozornost byla věnována jejímu embryonálnímu a larválnímu vývoji. Díky této práci s drosofilou alespoň začínáme podrobně chápat nejpodivuhodnější děje z života buněk: jak se jediné oplodněné vajíčko (zygota) vyvine v mnohobuněčný organismus obsahující obrovský počet buněk různých typů, uspořádaných přesně předvídatelným způsobem. Tvar dospělé mouchy – její hlava, tělo, nohy, křídla a oči – je určen geny v zygotě, které jsou kopírovány a přenášeny do každé buňky v těle. Tyto geny určují chování každé buňky při sociálních interakcích s jejími sestrami a sestřenicemi, a tak mají vliv na struktury, které buňka vytváří. Drosofila více než kterýkoli jiný organismus ukázala, jak sledovat řetěz příčin a následků od genetických instruk-



Obrázek 1-34 *Drosophila melanogaster*.

Molekulárně genetická studia této mušky poskytla klíč k pochopení toho, jak se živočichové vyvíjejí.





Obrázek 1-35 *Caenorhabditis elegans*.

Tato malá hlístice žije v půdě. Její vývoj od oplodněného vajíčka (1 buňka) až po 959 buněk dospělého těla byl prozkoumán s neobyčejnou pozorností a nyní je známa velká část genetických mechanismů, které tento vývoj řídí. Většina jednotlivců tohoto druhu jsou hermafroditi, produkující jak vajíčka tak spermie.

cí zakódovaných v DNA až po strukturu dospělého mnohobuněčného jedince.

Dalším široce studovaným organismem, menším a jednodušším než drosophila, je hlístice *Caenorhabditis elegans* (obr. 1–35), neškodná příbuzná háďátek, která napadají úrodu. Toto stvoření se vyvíjí s přesností hodiněk z oplodněného vajíčka v dospělého jedince, který obsahuje přesně 959 somatických buněk (a proměnlivý počet vajíček a spermií), a my máme nyní k dispozici přesný popis pořadí dějů, kterými k tomu dochází – jak se buňky dělí, pohybují a specializují podle přesných a předvídatelných pravidel.

Druhým extrémem jsou savci, kteří ve svých dospělých tělech mají desetkrát více genů než drosophila a miliardkrát více buněk. Ke studiu savčí genetiky, vývoje, imunologie a buněčné biologie se jako modelový organismus již dlouho používá myš. Nové techniky dodaly tomuto výzkumu ještě větší důležitost. Dnes je možné vypěstovat myši s libovolně provedenými mutacemi jakéhokoli genu nebo se zavedenými uměle zkonstruovanými geny. Tak je možné testovat, co daný gen potřebuje a jak funguje.

Poslední, ale nikoli nejmenší v této řadě modelových organismů je sám člověk. Výzkum v buněčné biologii je významně podporován zájmem medicíny a velká část toho, co známe, pochází ze studia lidských buněk. Lidské bytosti nelze studovat stejně jako mouchu, červa nebo myš, ale lidskou buňku lze studovat v kultivační misce. Lékařská databáze lidských buněk je nezměrná a ačkoli jsou přirozené mutace jakéhokoli genu vzácné, genetickému inženýrství jsou známy následky mutací v tisících různých genů.

Rozsah naší neznalosti je však stále ještě skličující. Když si představíme složitost savčího těla, mohli bychom se vzdát vší naděje už na samotné pochopení toho, jak DNA v buňce oplodněného vajíčka myši přiměje tuto buňku vytvořit myš nebo jak DNA v buňce lidského vajíčka řídí vývoj člověka. Objevy molekulární biologie nám však přinesly naději ve skutečnosti, že savčí geny mají blízké protějšky v *Caenorhabditis elegans* a v *Drosophila melanogaster*, které podle všeho plní podobné funkce. Všichni máme společný evoluční počátek a pod povrchem těla se zdá, že sdílíme stejné molekulární mechanismy (obr. 1–36). Mouchy, červi, myši a lidé tak poskytují klíč k pochopení obecných principů stavby živočišného organismu.



Obrázek 1-36 Různé žijící druhy sdílejí tytéž genetické mechanismy. Lidské dítě i myš na obrázku mají stejnou bílou skvrnu na čele; oba mají poškozený stejný gen (zvaný *kit*), který je potřebný pro vývoj a udržování pigmentových buněk.

Buňky stejného mnohobuněčného organismu se mohou značně lišit

Buňky v těle jakéhokoli živočicha nebo rostliny jsou mimořádně rozdílné. (Panel 1–3, str. 32–33). Tukové buňky, buňky kůže, kostí a nervové buňky se zdají tak nepodobné, jak jen nějaké buňky mohou být. Všechny tyto diferencované typy buněk však vznikly během embryonálního vývoje z jediné buňky oplodněného vajíčka a všechny obsahují stejné kopie DNA daného druhu. Ještě jednou: z určitého hlediska se buňky zdají být nesmírně odlišné, z jiného hlediska jsou naopak podivuhodně stejné. U mnohobuněčného organismu leží vysvětlení ve způsobu, jakým jednotlivé buňky využívají své genetické instrukce. Různé buňky aktivují různé geny v závislosti na podnětech, které tyto buňky a jejich předchůdci dostali ze svého okolí.

Uvidíme, že DNA není pouhým nákupním seznamem molekul, které musí každá buňka mít, a že buňka není pouhým souborem položek uvedených na takovém seznamu. Každá buňka se spíše chová jako víceúčelový stroj s čidly pro příjem vnějších signálů, s počítačem k ovládnutí řady různých činností a s mnoha megabyty genetické informace dostupné v DNA. Dokonce i jednoduchá samotná buňka jako *E. coli* nebo kvasinka využívá svou genetickou informaci podobně regulovaným způsobem. Žijící, rostoucí a rozmnožující se buňka je vskutku zázračný stroj. Ve zbytku této knihy se pokusíme vysvětlit, jak funguje.

TYPY BUNĚK

V lidském těle existuje na 200 druhů buněk. Jsou uspořádány do různých typů tkání, například

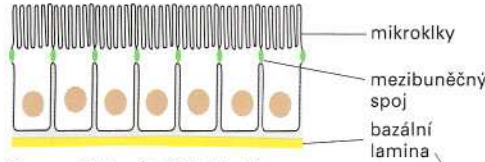
- epitel
- pojivová tkáň
- sval
- nervová tkáň

Většina tkání obsahuje více typů buněk.

EPITEL

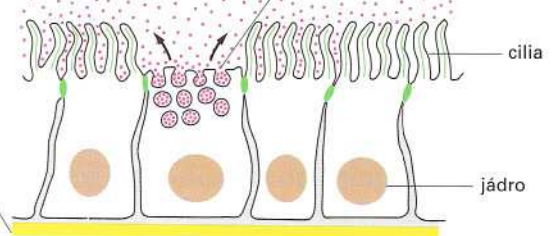
Epiteliální buňky tvoří souvislé buněčné vrstvy, tzv. epitel, který pokrývá některé vnější a většinu vnitřních povrchů těla. Existuje řada specializovaných epitelů.

Absorpční buňky nesou na svém volném povrchu vláskovité výběžky zvané mikrokilky, kterými se výrazně zvyšuje absorpční plocha tkáně.



Sousedící epiteliální buňky jsou navzájem spojeny různými typy spojů, které dodávají tkáni mechanickou pevnost a zároveň znemožňují pohyb malých molekul mezi jednotlivými buňkami

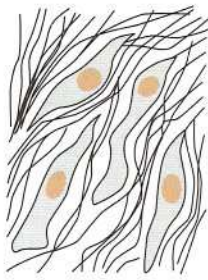
Řasinkový epitel obsahuje buňky, které nesou na volném povrchu řasinky, jež se synchronně vlní a při tom přenášejí různé látky, například hlen, určitým směrem po povrchu epitelu.



Sekreční buňky se vyskytují ve většině epiteliálních vrstev. Tyto buňky produkují různé látky a vylučují je na povrch epitelu.

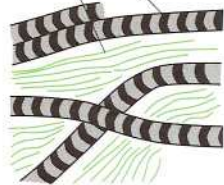
POJIVOVÁ TKÁŇ

Prostory mezi orgány a tkáněmi jsou vyplněny pojivovou tkání, což je v podstatě síť tuhých proteinových vláken uložených v polysacharidovém gelu. Tato **extracelulární matrix** je vylučována hlavně **fibroblasty**.



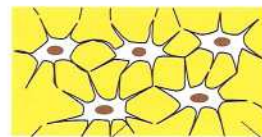
fibroblasty ve volné pojivové tkáni

Dva hlavní druhy mimobuněčných (extracelulárních) proteinových vláken: **kolagen** a **elastin**.



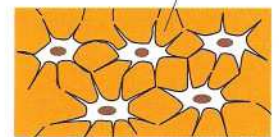
Kosti jsou vytvářeny buňkami zvanými **osteoblasty**. Ty vylučují extracelulární matrix, v níž jsou uloženy krystalky fosforečnanu vápenatého.

Vápenaté soli jsou ukládány v extracelulární matrix.

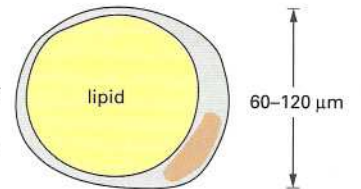


osteoblasty propojené buněčnými výběžky

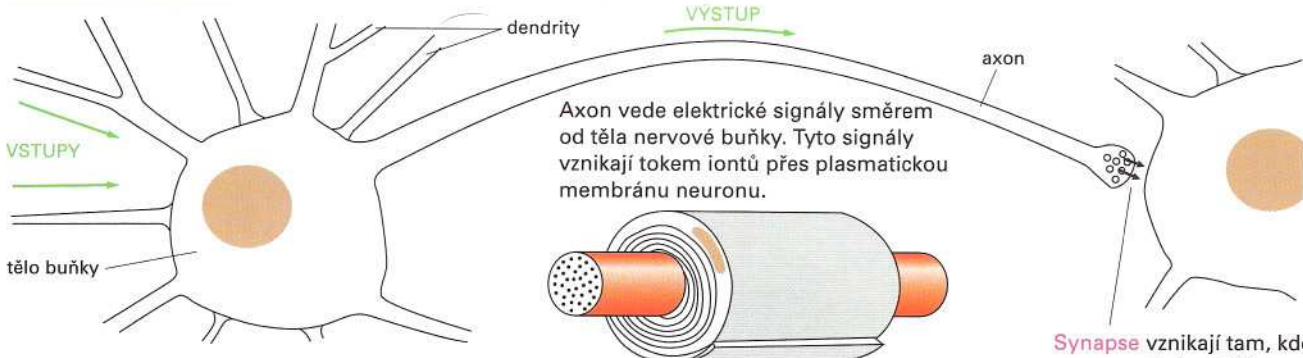
extracelulární matrix



Tukové (čili adiposní) buňky patří k největším buňkám v těle a zodpovídají za tvorbu a skladování tuků. Jádro i cytoplazma jsou tu vytlačeny ke krajům buňky velkou tukovou kapkou.



NERVOVÁ TKÁŇ

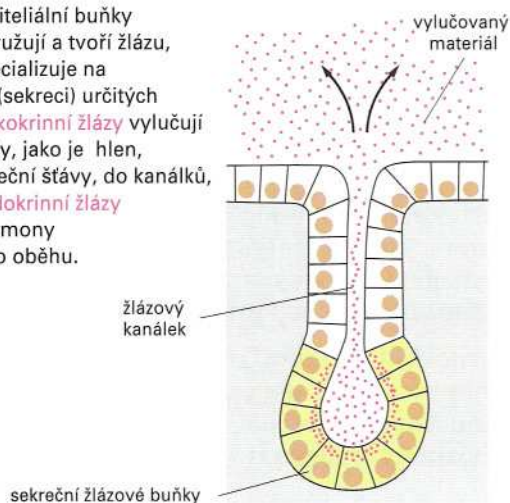


Nervové buňky čili **neurony** se specializují na komunikaci. Mozek a mícha jsou tvořeny hustou sítí neuronů uložených mezi podpůrnými **gliovými buňkami**.

Specializované gliové buňky obalují axon mnohavrstevnou membránovou pochvou.

Synapse vznikají tam, kde se neuron stýká s dalším neuronem nebo se svalovou buňkou. Přes synaptickou štěrbinu přecházejí chemické signály k dalšímu neuronu nebo ke svalové buňce.

Sekreční epiteliální buňky se často sdružují a tvoří žlázu, která se specializuje na vylučování (sekreci) určitých látek. Tak **exokrinní žlázy** vylučují své produkty, jako je hlen, slzy a žaludeční šťávy, do kanálků, zatímco **endokrinní žlázy** vylučují hormony do krevního oběhu.

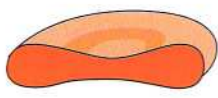


KREV

Erythrocyty (červené krvinky) jsou velmi malé buňky, které u savců neobsahují ani jádro ani vnitrobuněčné membrány. Zralé erythrocyty jsou naplněny hemoglobinem, což je bílkovina vázající kyslík.



1 mL krve obsahuje 5 miliard erythrocytů

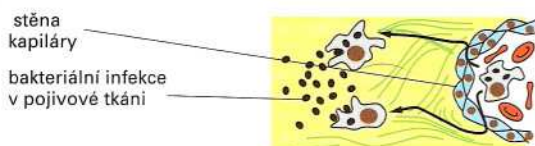


jejich obvyklý tvar je bikonkávní kotouček

Leukocyty (bílé krvinky) chrání proti infekci. Krev obsahuje přibližně jeden leukocyt na 100 erythrocytů. Ačkoliv jsou leukocyty součástí krevního oběhu, mohou procházet stěnami krevních kapilár a působit pak v okolní tkáni. Leukocytů je celá řada druhů, mezi nimi

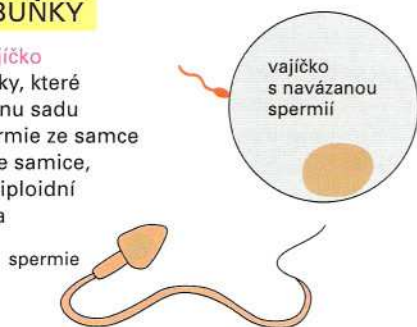
lymfocyty, zodpovědné za imunitní odpověď, mezi jiným tvorbu protilátek

makrofágy a neutrofilů, které se pohybují k místu infekce a tam pohlcují bakterie a rozbité buňky.



ZÁRODEČNÉ BUŇKY

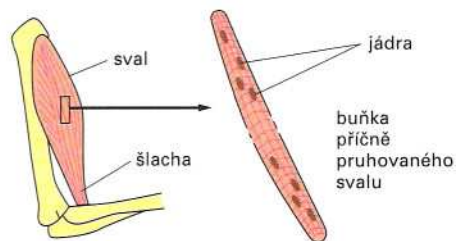
Jak **spermie** tak **vajíčko** jsou haploidní buňky, které obsahují pouze jednu sadu chromosomů. Spermie ze samce fúzuje s vajíčkem ze samice, které pak vytváří diploidní organismus mnoha následnými buněčnými děleními.



SVAL

Svalové buňky vykonávají práci svým stahem. U obratlovců se vyskytují tři druhy svalových buněk.

Kosterní sval - ten pohybuje klouby svým rychlým a mohutným stahem. Každý sval je svazkem svalových vláken, každé z nichž je ohromnou buňkou s mnoha jádry.



Hladký sval - ten je přítomen v zažívacím traktu, močovém měchýři a v cévách. Je složen ze štíhlých protáhlých, nepruhovaných buněk, každá z nichž obsahuje jediné jádro.

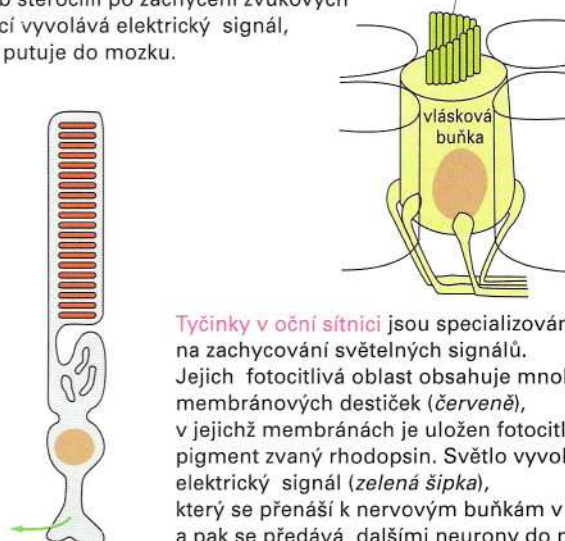


Srdeční sval - jeho rysy leží mezi hladkým a příčně pruhovaným svaem. Sousedící buňky jsou spojeny elektrickými spoji, které zaručují synchronní práci svalu.

SMYSLOVÉ BUŇKY

Pozoruhodně specializované buňky v těle jsou zodpovědné za příjem vnějších signálů. **Vlásokové buňky** vnitřního ucha jsou primárními detektory zvuku. Jsou to modifikované epiteliální buňky, které nesou na jedné straně speciální mikrokly zvané stereocilia. Pohyb stereocilií po zachycení zvukových vibrací vyvolává elektrický signál, který putuje do mozku.

Stereocilia jsou velmi tuhé výrůstky, protože jsou zpevněna aktinovými vlákny.



Tyčinky v oční sítnici jsou specializovány na zachycování světelných signálů. Jejich fotocitlivá oblast obsahuje mnoho membránových destiček (**červeně**), v jejichž membránách je uložen fotocitlivý pigment zvaný rhodopsin. Světlo vyvolá elektrický signál (**zelená šipka**), který se přenáší k nervovým buňkám v oku a pak se předává dalšími neurony do mozku.

Základní shrnutí

- Buňky jsou základními jednotkami života.
- Buňky živočišných a rostlinných tkání jsou obvykle 5-20 μm velké a lze je pozorovat ve světelném mikroskopu, který také ukáže některé jejich vnitřní části neboli organely.
- Elektronový mikroskop umožňuje spatřit menší organely a dokonce jednotlivé molekuly, ale vzorky vyžadují náročnou přípravu a nemohou být pozorovány živé.
- Nejdůležitější organelou ve většině rostlinných a živočišných buněk je jádro. To obsahuje genetickou informaci organismu uloženou ve struktuře molekuly DNA. Zbytek obsahu buňky mimo jádro tvoří cytoplazma.
- Cytoplazma rostlinných a živočišných buněk obsahuje celou řadu dalších membránových organel se zvláštními chemickými funkcemi. K těmto organelám patří mitochondrie, které zabezpečují oxidaci molekul potravy, a chloroplasty v rostlinných buňkách, které uskutečňují fotosyntézu.
- Zbývající intracelulární kompartment (vnitrobuněčný oddíl) kromě membránových organel se nazývá cytosol. Obsahuje koncentrovanou směs velkých i malých molekul, které se účastní mnoha nezbytných biochemických dějů.
- V cytosolu se rozprostírá soustava proteinových vláken zvaná cytoskelet. Tato soustava ovládá tvar a pohyb buňky a umožňuje organelám a molekulám přesun z jednoho místa v cytoplasmě na druhé.
- Má se za to, že všechny dnešní buňky se vyvinuly ze stejné prabuňky, která existovala před více než třemi miliardami let.
- Všechny buňky obsahují DNA jako místo uložení genetické informace a využívají ji k řízení syntézy proteinů. Všechny buňky vytvářejí své DNA a proteiny ze stejných dvou malých souborů stavebních bloků.
- Bakterie, nejjednodušší z dnešních žijících organismů, jsou prokaryota: ačkoli obsahují DNA, chybí jim jádro a ostatní organely. Právě bakterie nejvíce připomínají prapůvodní buňku.
- Různé druhy bakterií se liší ve svých chemických schopnostech a obývají podivuhodně širokou škálu lokalit. Rozeznáváme dvě základní vývojové skupiny: eubakterie a archebakterie.
- Eukaryontní buňky vlastní jádro. Pravděpodobně se vyvinuly v řadě stadií z buněk více podobných bakteriím. Důležitým krokem se zdá být získání mitochondrií, ve formě pohlcených bakterií žijících v symbioze s velkými anaerobními buňkami.
- Volně žijící jednobuněčné eukaryontní organismy zahrnují některé z nejsložitějších známých eukaryontních buněk a jsou schopné plavat, pářit se, lovit a požírat potravu
- Jiné typy eukaryontních buněk spolupracují a utvářejí velké složité mnohobuněčné organismy, jakými jsme i my sami. Takové organismy se skládají z miliard až bilionů buněk.
- Biologové si zvolili malý počet organismů za střed intenzivního výzkumu. Mezi tyto organismy patří bakterie *E. coli*, pekařské kvasinky, hlístice, moucha, drobná rostlina, myš a sám člověk.
- Buňky v mnohobuněčném organismu se mohou značně lišit jedna od druhé, ačkoli obsahují tutéž DNA. Je to tím, že využívají selektivně různé části své genetické informace podle podmětů z jejich okolí.

Klíčová slova

	cytoskelet	chromosom	nanometr
bakterie	cytosol	jádro	organela
buňka	eukaryota	mikrometr	prokaryota
cytoplazma	evoluce	mikroskop	prvok
	chloroplast	mitochondrie	

2 Chemické složení buňky

Na první pohled je těžké přijmout fakt, že živí tvorové jsou pouze chemickými soustavami. Neuvěřitelná pestrost jejich tvarů, jejich viditelně účelové jednání i jejich schopnost růstu a reprodukce jako by je vyjímaly ze světa pevných látek, kapalin a plynů, které chemie obvykle popisuje. Ještě před koncem devatenáctého století se všeobecně věřilo, že živočichové obsahují životní sílu, *vis vitalis*, která je zodpovědná za jejich rozdílné vlastnosti.

Nyní víme, že v živých organismech není nic, co by odporovalo chemickým a fyzikálním zákonům. Chemie života však opravdu představuje zvláštní oblast. Za prvé, je založena hlavně na sloučeninách uhlíku; části chemie zabývající se těmito sloučeninami se říká *organická chemie*. Za druhé, spočívá téměř výlučně v chemických reakcích, které probíhají ve vodném roztoku a v poměrně úzkém rozmezí teplot obvyklých pro Zemi. Za třetí, chemie života je nesmírně složitá: dokonce i chemie té nejjednodušší buňky je mnohem složitější než jakákoli jiná známá chemická soustava. A konečně, tato oblast chemie je ovládána a řízena obrovskými *polymerními molekulami* - chemickými jednotkami spojenými do řetězce, jejichž jedinečné vlastnosti umožňují buňkám a organismům růst, množit se a dělat všechny ostatní věci, které jsou typické pro život.

Chemické vazby

Látka ve smyslu hmoty je tvořena různými kombinacemi *prvků* - substancí jako vodík nebo uhlík, které nelze chemickou cestou rozštěpit nebo přeměnit v jiné látky. Nejmenší částicí prvku, která si ještě uchovává jeho typické chemické vlastnosti, je *atom*. Avšak vlastnosti jiných látek než čistých prvků - včetně stavebních materiálů živých buněk závisí na způsobu, jakým jsou jejich atomy spojeny dohromady do *molekul*. Abychom pochopili, jak jsou z neživé hmoty utvořeny živé organismy, potřebujeme vědět, jak vznikají chemické vazby, které drží atomy v molekulách pohromadě.

CHEMICKÉ VAZBY

- Buňky jsou složeny jen z několika druhů atomů.
- Vnější elektrony určují reaktivitu atomů
- Iontové vazby vznikají získem nebo ztrátou elektronů.
- Kovalentní vazby vznikají sdílením elektronů.
- Existují různé typy kovalentních vazeb.
- Voda je nejhojnější látkou v buňkách.
- Některé polární molekuly tvoří ve vodě kyseliny a zásady.

MOLEKULY V BUŇKÁCH

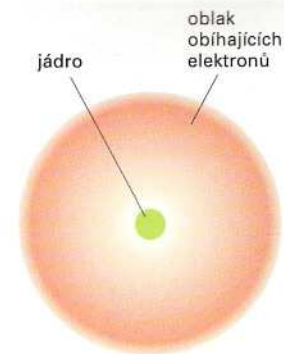
- Buňky jsou vytvořeny ze sloučenin uhlíku.
- Buňky obsahují čtyři hlavní skupiny malých organických molekul.
- Sacharidy jsou zdrojem energie pro buňky a tvoří podjednotky polysacharidů.
- Mastné kyseliny jsou složkami buněčných membrán.
- Aminokyseliny jsou podjednotkami proteinů.
- Nukleotidy jsou podjednotkami DNA a RNA.
- Makromolekuly obsahují specifické sekvence podjednotek.
- Nekovalentní vazby určují přesný tvar makromolekuly.
- Nekovalentní vazby umožňují makromolekule vázat další vybrané molekuly.

Buňky jsou složeny jen z několika druhů atomů

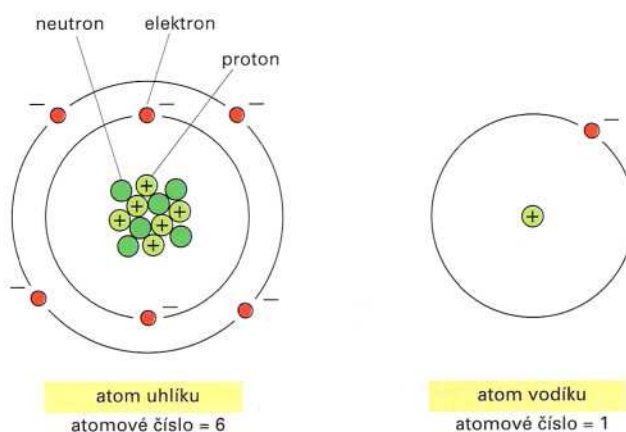
Každý **atom** má svůj střed a kladně nabitě masivní jádro, které je v jisté vzdálenosti obklopeno oblakem záporně nabitých **elektronů** (obr. 2-1). Tyto elektrony jsou na svých drahách udržovány elektrostatickými přitažlivými silami jádra. Jádro se skládá ze dvou druhů subatomárních částic: **protonů**, které jsou kladně nabitě, a **neutronů**, které jsou elektricky neutrální. Počet protonů v atomovém jádře udává *atomové číslo*. Atom vodíku má jádro složené z jediného protonu - proto je vodík s atomovým číslem 1 nejlehčím prvkem. Atom uhlíku má ve svém atomovém jádře šest protonů a atomové číslo 6 (obr. 2-2). Každý proton nese elektrický náboj, který je přesně stejně velký jako náboj elektronu, ale má opačné znaménko. Protože je atom jako celek elektricky neutrální, je počet záporně nabitých elektronů obklopujících jádro stejný jako počet kladně nabitých protonů v jádře. Počet elektronů v atomu je tedy stejný jako atomové číslo. Atomové číslo je stejné pro všechny atomy daného prvku a určuje chemické vlastnosti prvku, jak brzy uvidíme.

Neutrony jsou nenabitě subatomární částice s přibližně stejnou hmotností jako protony. Přispívají ke strukturní stabilitě jádra: je-li jich příliš málo nebo příliš mnoho, jádro se může radioaktivně štěpit. Neutrony však nemění chemické vlastnosti prvku. Prvek tak může existovat v několika fyzikálně rozlišitelných, ale chemicky identických formách zvaných *izotopy*, přičemž každý izotop má jiný počet neutronů, ale všechny izotopy téhož prvku mají stejný počet protonů. V přírodě se vyskytují četné izotopy všech prvků, dokonce i těch nestabilních. Například, zatímco většina uhlíku se na Zemi vyskytuje jako stabilní izotop ^{12}C s šesti protony a šesti neutrony, existují také malá množství dalšího stabilního izotopu ^{13}C a malá množství nestabilního izotopu, radioaktivního ^{14}C , jehož atomy mají šest protonů a osm neutronů. Uhlík ^{14}C pomalu podléhá radioaktivnímu rozpadu, na němž je založena metoda určování stáří organického materiálu v archeologii.

Atomová hmotnost prvku nebo **molekulová hmotnost** sloučeniny je poměrná hmotnost atomu nebo molekuly vzhledem k atomu vodíku. V podstatě se rovná počtu protonů a neutronů v atomu či molekule, protože elektrony jsou mnohem lehčí a k celkové hmotnosti téměř nepřispívají. Hlavní izotop uhlíku má tedy atomovou *hmotnost* 12, zatímco nestabilní izotop, o kterém jsme před chvílí mluvili, má atomovou hmotnost asi 14. Hmotnost atomu nebo molekuly se často



Obrázek 2-1 Schematický pohled na atom. Husté kladně nabitě jádro obsahuje většinu hmotnosti atomu. Mnohem lehčí záporně nabitě elektrony se rychle pohybují okolo jádra podle zákonů kvantové mechaniky. Elektrony jsou znázorněny jako spojité oblak; neexistuje žádný způsob, jak předpovědět, kde přesně se bude elektron v daném okamžiku nacházet. Hustota stínování oblaku ukazuje pravděpodobnost, s jakou nalezneme elektron v daném místě. Průměr elektronového oblaku sahá od 0,1 nm u vodíku až k 0,4 nm u atomů s vyššími atomovými čísly. Jádro je mnohem menší: např. u uhlíku asi 2×10^{-5} nm.



Obrázek 2-2 Schematické znázornění atomu uhlíku a atomu vodíku. Na rozdíl od obrázku 2-1 jsou zde elektrony ukázány jako oddělené částice. Jádro každého atomu kromě vodíku se skládá z kladně nabitých protonů a z elektricky neutrálních neutronů. Počet elektronů v atomu se rovná počtu protonů (atomovému číslu), takže atom nemá žádný výsledný náboj. Soustředné černé kružnice znázorňují velmi schematicky dráhy elektronů. Neutrony, protony a elektrony jsou ve skutečnosti ve srovnání s celým atomem zanedbatelně malé; na tomto obrázku jsou značně zvětšeny.

uvádí v *daltonech*, přičemž jeden dalton je jednotka atomové hmotnosti; přibližně se rovná hmotnosti vodíkového atomu.

Atomy jsou tak malé, že jejich velikost si lze jen stěží představit. Jeden atom uhlíku má průměr asi 0,2 nm; to znamená, že na jeden milimetr by se jich vešlo asi 5 milionů vedle sebe. Jeden proton či neutron váží přibližně $1/(6 \times 10^{23})$ gramu, takže jeden gram vodíku obsahuje 6×10^{23} atomů. Toto obrovské číslo (6×10^{23} , zvané **Avogadrova konstanta**) je hlavním měřítkem pro vztah mezi běžnými počty a množstvími každodenního života a počty ze světa jednotlivých atomů a molekul. Má-li látka molekulovou hmotnost M , bude mít 6×10^{23} molekul této látky hmotnost M gramů. Toto množství se nazývá jeden *mol* nebo jedna *grammolekula* látky (obr. 2-3).

V přírodě se vyskytuje 92 prvků*, které se navzájem liší počtem protonů a elektronů v atomech. Živé organismy jsou však tvořeny jen malým výběrem z těchto prvků, z nichž čtyři - uhlík (C), vodík (H), dusík (N) a kyslík (O) - tvoří až 96,5 % hmotnosti organismu. Toto složení se značně liší od neživého anorganického prostředí (obr. 2-4) a svědčí o odlišném typu chemie. Nejběžnější prvky živých organismů s některými atomovými charakteristikami jsou uvedeny v tabulce 2-1.

**Poznámka překladatele:* Toto není zcela správné. Ze 112 prvků dnes známých se v přírodě vyskytuje 94, ale pouze 85 v množství větším než $1:10^{15}$. Celkem je známo 81 neradioaktivních prvků.

Vnější elektrony určují reaktivitu atomů

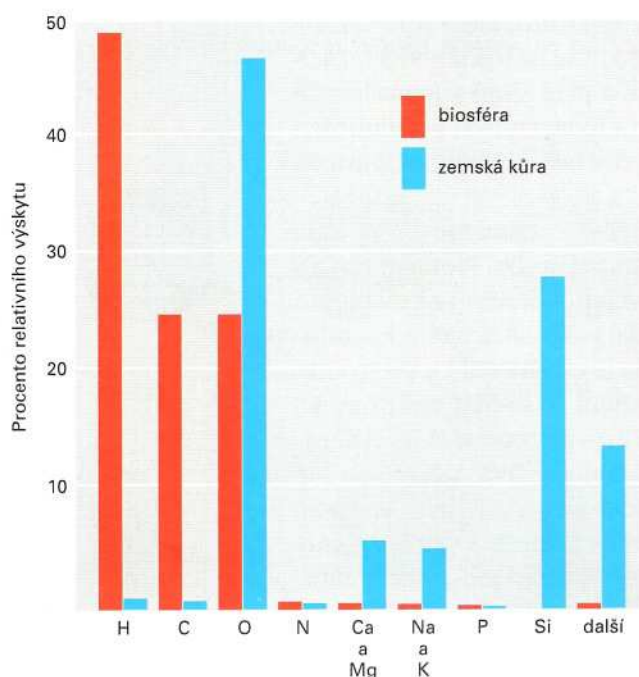
Abychom pochopili, jak se atomy spojují dohromady za vzniku molekul, které tvoří živé organismy, musíme věnovat zvláštní pozornost jejich elektronům. Protony a neutrony jsou v jádru těsně spojeny a vyměňují si partnery jen při extrémních podmínkách, například během radioaktivního rozpadu nebo uvnitř Slunce či jaderného reaktoru. V živých tkáních dochází jen k přeskupování elektronů. Tyto elektrony tvoří vnější části

1 mol znamená M gramů látky, přičemž M je její molekulová hmotnost. Toto množství obsahuje 6×10^{23} molekul dané látky.

1 mol uhlíku má hmotnost 12 g
1 mol glukosy má hmotnost 180 g
1 mol chloridu sodného má hmotnost 58 g

Molární roztoky mají koncentraci 1 mol látky v 1 litru roztoku. Například molární roztok (1 M) glukosy má koncentraci 180 g/L, zatímco milimolární roztok (1 mM) má koncentraci 180 mg/L.

Obrázek 2-3 Moly a molární roztoky.



Obrázek 2-4 Zastoupení některých chemických prvků v neživém světě (zemská kůra) ve srovnání s jejich zastoupením ve tkáních živočichů. Zastoupení každého prvku je vyjádřeno v procentech z celkového počtu atomů přítomných ve vzorku. Tak například téměř 50 % atomů v živých organismech tvoří atomy vodíku. Tento přehled nebere v úvahu mineralizované tkáně, jako jsou kosti a zuby, protože obsahují velká množství anorganických solí vápníku a fosforu. Poměrné zastoupení prvků je podobné ve všech živých organismech.

Běžné prvky v živých organismech

Prvek	Protony	Neutrony	Elektrony	Atomové číslo	Atomová hmotnost
Vodík H	1	0	1	1	1
Uhlík C	6	6	6	6	12
Dusík N	7	7	7	7	14
Kyslík O	8	8	8	8	16

Méně běžné prvky

Prvek	Protony	Neutrony	Elektrony	Atomové číslo	Atomová hmotnost
Sodík Na	11	12	11	11	23
Hořčík Mg	12	12	12	12	24
Fosfor P	15	16	15	15	31
Síra S	16	16	16	16	32
Chlor Cl	17	18	17	17	35
Draslík K	19	20	19	19	39
Vápník Ca	20	20	20	20	40

Tabulka 2-1 Atomové charakteristiky nejběžnějších prvků v živých tkáních.

Čtyři prvky uvedené v *modré* části tabulky představují 96,5 % hmotnosti lidského těla; prvky uvedené v *zelené* části tabulky představují každý asi 0,1-1,5 %. Atomová čísla rovná počtu protonů v každém jádře jednoznačně definují každý prvek. Atomová hmotnost, která je přibližně součtem protonů a neutronů v jádře, se může měnit ve skupině izotopů stejného prvku, jak je zdůrazněno v textu. Atomové hmotnosti uvedené v této tabulce přísluší nejběžnějším izotopům každého z prvků.

atomů a určují chemická pravidla, podle nichž se atomy spojují za vzniku molekul.

Elektrony jsou v neustálém pohybu okolo jádra, ale pohyby v tomto mikroskopickém měřítku se řídí jinými zákony než pohyby, na které jsme zvyklí z každodenního života. Podle těchto zákonů mohou elektrony v určitém atomu existovat jen v určitých nespojitých stavech pohybu – zhruba řečeno, mohou se pohybovat jen po určitých drahách. Platí také, že na dráze – orbitu – určitého typu se může pohybovat jen omezený počet elektronů (tzv. *elektronová slupka*). Elektrony, které jsou v průměru nejbliže kladně nabitému jádru, jsou k němu přitahovány nejsilněji a zaujímají vnitřní těsně vázanou slupku. Tato slupka (označovaná K) může obsahovat maximálně dva elektrony. Druhá slupka (označovaná L) se nachází dále od jádra a její elektrony jsou vázány méně pevně. Tato druhá slupka může pojmout až osm elektronů, a to ve dvou podslupkách (*s* s 2 a *p* s 6 elektrony). Třetí slupka (označovaná M) obsahuje elektrony, které jsou vázány ještě volněji; ta může pojmout až 18 elektronů, a to ve třech podslupkách (*s*, *p* a *d* s maximálně 10 elektrony). Čtvrtá a pátá slupka (označované N a O) mohou každá pojmout 32 elektronů, a to ve čtyřech podslupkách (*s*, *p*, *d* a *f* s maximálně 14 elektrony). Atomy s více než čtyřmi slupkami jsou v biologických molekulách velmi vzácné.

Uspořádání elektronů v atomu je nejstálější, pokud jsou elektrony maximálně pevně vázané, tj. když obsazují vnitřní slupky. Proto – s jistými výjimkami u větších atomů – elektrony obsazují v atomu nejprve první slupku, potom druhou atd., až nakonec slupku vnější. Atom se zcela zaplněnou vnější slupkou nebo vnější podslupkou je zvláště stálý, a proto chemicky nereaktivní (inertní). Příklady jsou helium se dvěma elektrony 1s, neon se dvěma elektrony 1s, dvěma 2s a šesti 2p a argon se dvěma elektrony 1s, dvěma 2s, šesti 2p, dvěma 3s a šesti 3p; ve všech případech jde o inertní plyny. Naopak vodík, který má jen jeden elektron a tudíž jen zcela zaplněnou slupku, je vysoce reaktivní. Podobně i všechny ostatní atomy v živých organismech mají jen částečně zaplněnou vnější elektronovou slupku, a proto jsou schopné spolu reagovat za vzniku molekul (obr. 2-5).

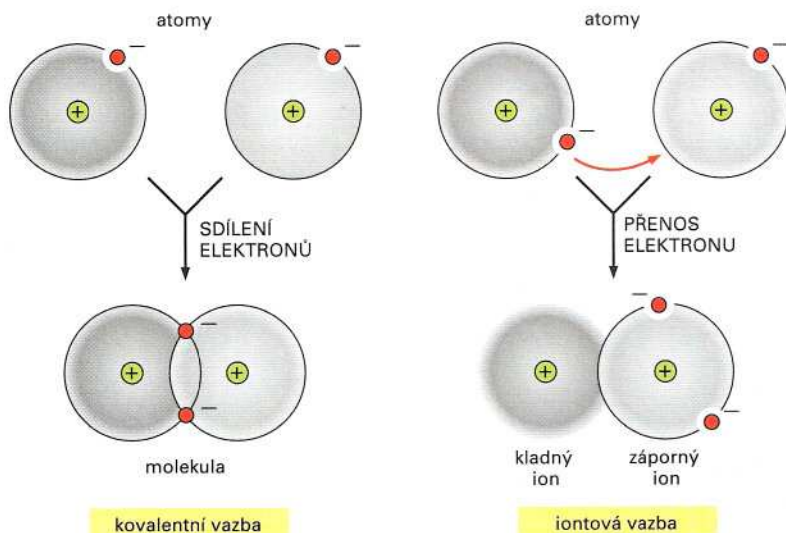
Protože nezaplňovaná elektronová slupka je méně stabilní než slupka zaplněná, mají atomy s neúplnými vnějšími slupkami silný sklon intera-

Prvek	energetická hladina (slupka)			
	I	II	III	IV
1 vodík	•			
2 helium	••			
6 uhlík	••	••••		
7 dusík	••	•••••		
8 kyslík	••	••••••		
10 neon	••	••••••		
11 sodík	••	••••••••	•	
12 hořčík	••	••••••••	••	
15 fosfor	••	••••••••	•••••	
16 síra	••	••••••••	••••••	
17 chlor	••	••••••••	•••••••	
18 argon	••	••••••••	••••••••	
19 draslík	••	••••••••	••••••••	•
20 vápník	••	••••••••	••••••••	••

Obrázek 2-5 Zaplněné a nezaplňené slupky v atomech některých běžných prvků. Všechny prvky, které se běžně nacházejí v živých organismech, mají nezaplňené vnější slupky (červeně), a proto se mohou účastnit chemických reakcí s jinými atomy. Pro srovnání jsou ukázány některé prvky se zcela zaplněnými vnějšími podslupkami (žlutě); tyto prvky se chemických reakcí neúčastní.

govat s ostatními atomy tak, aby se získáním nebo ztrátou patřičného počtu elektronů dostaly do stavu se zaplněnou vnější slupkou. Této výměny elektronů může být dosaženo buď přenosem elektronů z jednoho atomu na druhý nebo sdílením elektronů dvěma atomy. Tyto dvě strategie dávají vznik dvěma typům chemické vazby mezi atomy: Pokud jeden atom daruje elektrony druhému, vzniká *iontová vazba*, zatímco pokud dva atomy elektronový pár sdílejí, vzniká *kovalentní vazba* (obr. 2-6). Často je pár elektronů sdílen nestejně s částečným posunem k jednomu atomu; toto vnitřní uspořádání vede k *polární kovalentní vazbě*, jak uvidíme později.

Atom vodíku, který potřebuje k doplnění své elektronové slupky jen jeden další elektron, sdílí obvykle tento elektron s dalším atomem za vzniku kovalentní vazby; v mnoha případech je tato vazba polární. Další nejběžnější prvky v živých buňkách – C, N a O s neúplnou druhou slupkou a P a S s neúplnou třetí slupkou (viz obr. 2-5) – sdílejí elektrony a dosahují zaplnění vnější slupky osmi elektronů vytvořením několika kovalentních vazeb. Počet elektronů, které musí atom získat nebo ztratit (sdílením či přesunem), aby dosáhl zaplněné vnější slupky, se nazývá *vaznost (valence)*.



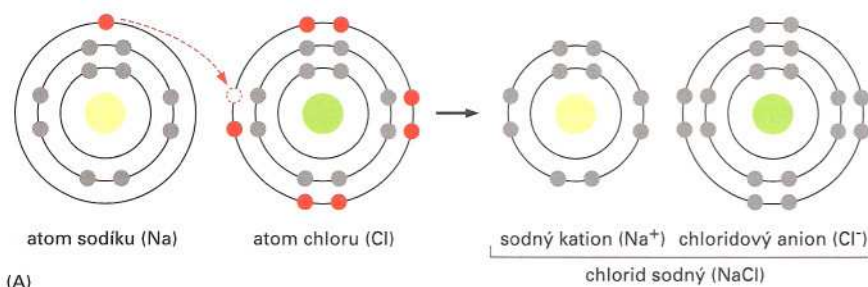
Obrázek 2-6 Srovnání kovalentní a iontové vazby. Atomy mohou vzájemnou interakcí dosáhnout stálejšího uspořádání vnějších elektronových slupek. Iontová vazba vzniká při přenosu elektronů z jednoho atomu na druhý. Kovalentní vazba vzniká, pokud atomy některé elektrony sdílejí. Tyto dva příklady představují extrémní situace; častěji vznikají kovalentní vazby s částečným přesunem elektronů (nestejně sdílení elektronů), což vede k polární kovalentní vazbě (viz obrázek 3-11).

Klíčová role vnější elektronové slupky v určení chemických vlastností prvku znamená, že při seřazení prvků podle jejich atomových čísel budeme opakovaně nacházet prvky s podobnými vlastnostmi: například prvek s neúplnou druhou slupkou, která obsahuje jeden elektron, se bude chovat do značné míry podobně jako prvek, v jehož atomu je druhá slupka zcela zaplněná a ve třetí slupce se nalézá jeden elektron. Například všechny kovy mají neúplné vnější slupky s jedním nebo několika málo elektrony, zatímco inertní plyny mají vnější slupky zaplněné, jak jsme právě viděli.

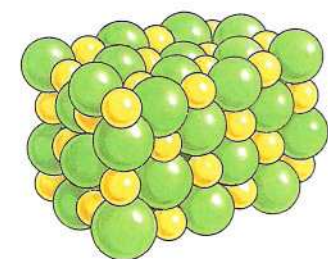
Iontové vazby vznikají získkem nebo ztrátou elektronů

Iontové vazby vytvářejí nejčastěji atomy, které mají jeden nebo dva elektrony navíc ke zcela zaplněné vnější slupce, nebo atomy, kterým do úplného zaplnění vnější slupky jeden nebo dva elektrony chybí. Tyto atomy mohou často dosáhnout zcela zaplněné vnější slupky mnohem snadněji zachycením nebo odevzdáním patřičného počtu elektronů než jejich sdílením. Například na obrázku 2-5 můžeme vidět, že atom sodíku (Na) s atomovým číslem 11 se může dostat do stavu se zcela zaplněnou vnější slupkou tak, že se zbaví jediného elektronu z dráhy vnější ke druhé slupce. Naopak atom chloru (Cl) s atomovým číslem 17 může doplnit svou vnější elektronovou slupku zachycením jednoho elektronu. Když se tedy setká atom Na s atomem Cl, elektron může přeskocit z Na na Cl a oba atomy se tak dostanou do stavu se zcela zaplněnou vnější slupkou. Dítětem z tohoto sňatku mezi měkkým a mimořádně reaktivním kovem sodíkem a jedovatým zeleným plynem chlorem je kuchyňská sůl NaCl.

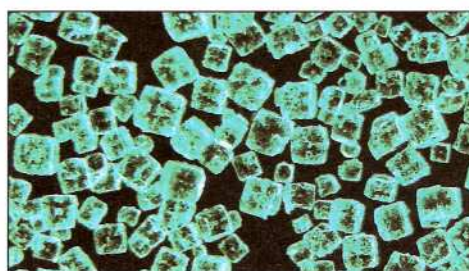
Když elektron přeskochí z Na na Cl, stanou se z obou atomů elektricky nabití **ionty**. Atom Na, který ztratil elektron, má teď o jeden elektron méně, než je protonů v jádře, a proto nese jeden kladný náboj (Na^+). Atom chloru, který elektron získal, má teď o jeden elektron více, než je protonů v jeho jádře, a proto nese jeden záporný náboj (Cl^-).



(A)



(B)



(C)

1 mm

Otázka 2-1 Atom uhlíku obsahuje šest protonů a šest neutronů.

- Jaké je jeho atomové číslo a atomová hmotnost?
- Kolik má elektronů?
- Kolik elektronů navíc musí přijmout, aby zcela zaplnil svou vnější slupku? Jak to ovlivňuje chemické chování uhlíku?
- Uhlík s atomovou hmotností 14 je radioaktivní. Jak se svou strukturou liší od neradioaktivního uhlíku? Jak tento rozdíl ovlivňuje jeho chemické chování?

Obrázek 2-7 Chlorid sodný: příklad vzniku iontové vazby. (A) Atom sodíku (Na) reaguje s atomem chloru (Cl). Je znázorněno umístění elektronů každého atomu v jejich různých energetických hladinách. Elektrony v chemicky reaktivních (neúplně zaplněných) slupkách jsou nakresleny červeně. Reakce probíhá za přenosu nepárového elektronu ze sodíku na chlor za vzniku dvou elektricky nabitých atomů neboli iontů, z nichž každý obsahuje ve své vnější slupce kompletní sadu elektronů. Oba ionty s opačnými náboji drží pohromadě elektrostatickým přitahováním. (B) Produkt reakce mezi sodíkem a chlorem, krystalický chlorid sodný, se skládá ze sodíkových a chloridových iontů složených do těsné mřížky, ve které jsou jejich náboje přesně vyrovnány. (C) Barevná fotografie krystalů chloridu sodného.

Kovalentní a nekovalentní vazby

Druh vazby	Délka (nm)	Pevnost vazby (kJ/mol)	
		ve vakuu	ve vodě
Kovalentní	0,15	376	376
Nekovalentní: iontová	0,25	334	13
vodíková	0,30	17	4
van der Waalsova (na 1 atom)	0,35	0,4	0,4

Tabulka 2-2 Kovalentní a nekovalentní chemické vazby. Síla vazby se měří jako energie potřebná k přerušení této vazby v joulech na mol (viz definici těchto jednotek ve Slovníčku). Délka vodíkového můstku X...H...X je vzdálenost mezi dvěma nevodíkovými atomy (X). Uvedené délky a síly vazeb jsou přibližné, protože přesné hodnoty závisejí na zúčastněných atomech. Různé typy nekovalentních vazeb jsou popsány dále v této kapitole (viz panel 2-7, str. 70-71).

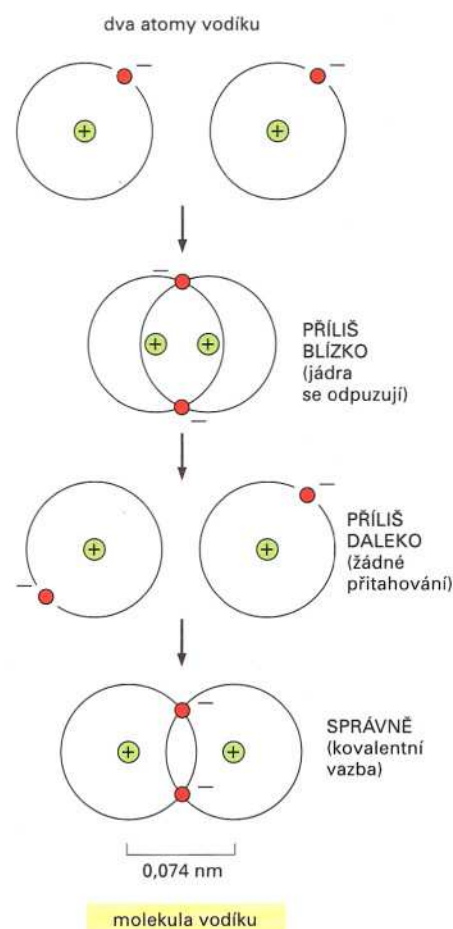
Kladně nabité ionty se jmenují *kationty*, záporně nabité ionty *anionty*. Ionty lze dále dělit podle toho, kolik elektronů získaly nebo ztratily. Sodík a draslík (K) mohou ztratit jeden elektron a vytvořit kationty s jedním kladným nábojem (Na^+ a K^+), zatímco hořčík a vápník mohou ztratit dva elektrony a vytvořit kationty se dvěma kladnými náboji (Mg^{2+} a Ca^{2+}).

Díky svým opačným nábojům se ionty Na^+ a Cl^- vzájemně přitahují a drží tak pohromadě **iontovou vazbou**. Krystal kuchyňské soli obsahuje astronomický počet Na^+ a Cl^- (asi 2×10^{10} iontů každého druhu na jeden milimetrový úsek krystalu). Tyto ionty jsou uspořádány do přesné trojrozměrné mřížky a jejich opačné náboje jsou přesně vyrovnány (obr. 2-7). Látky jako NaCl, které drží pohromadě jen iontovou vazbou, se obvykle nazývají *solí*. Iontové vazby jsou jen jedním z několika druhů *nekovalentních vazeb*, které mohou mezi atomy existovat. Později se v této kapitole setkáme s dalším typem nekovalentní vazby, vodíkovým můstkem. Díky příznivému vzájemnému působení vodních molekul a iontů je mnoho solí včetně NaCl značně rozpustných ve vodě za disociace na jednotlivé ionty (např. Na^+ a Cl^-), přičemž každý ion je potom obklopen molekulami vody. Proto je ve vodě značně omezena síla vodíkových můstků mezi dvěma molekulami. Toto omezení se však netýká kovalentních vazeb (tabulka 2-2).

Kovalentní vazby vznikají sdílením elektronů

Všechny vlastnosti buňky závisí na molekulách, které tato buňka obsahuje. **Molekula** je souborem atomů, které jsou drženy pohromadě kovalentními vazbami; v těchto vazbách jsou elektrony spíše sdíleny než přemísťovány mezi atomy. Sdílené elektrony zaplňují vnější slupky v obou atomech. V nejjednodušší možné molekule – molekule vodíku (H_2) – sdílejí dva atomy H, z nichž každý má jediný elektron, dva elektrony, což je počet potřebný k zaplnění první slupky. Sdílené elektrony tvoří oblak záporného náboje, který je nejhustší mezi dvěma kladně nabitými jádry a pomáhá je udržet pohromadě proti síle, kterou se

Obrázek 2-8 Molekula vodíku – jednoduchý příklad vzniku kovalentní vazby. Každý izolovaný vodíkový atom má jediný elektron, takže jeho první elektronová slupka je zaplněna neúplně. Při dostatečném přiblížení jsou dva atomy schopny sdílet dva elektrony, přičemž sdílené elektrony se pohybují po nových drahách kolem obou jader. Kovalentní vazba mezi dvěma atomy má svou danou délku. Pokud se atomy dostanou blíže, budou se kladně nabitá jádra navzájem odpuzovat. Pokud se atomy příliš vzdálí, nebudou už schopny účinně sdílet elektrony.

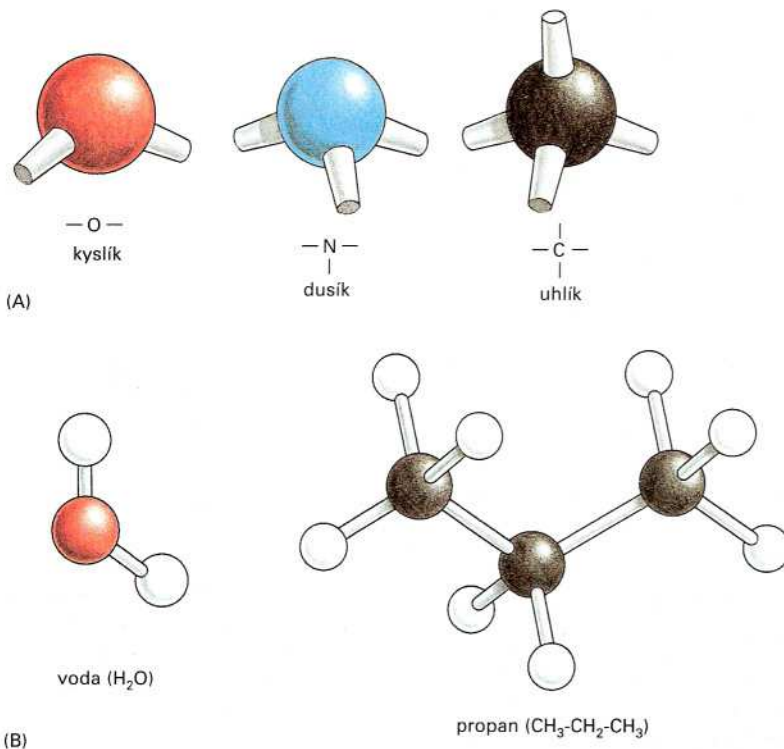


stejně nabitá jádra navzájem odpuzují a bez sdílených elektronů by se jedno jádro od druhého vzdálilo. Při charakteristické vzdálenosti jader, zvané *délka vazby*, jsou přitažlivé a odpuzivé síly v rovnováze (obr. 2-8).

Další důležitou vlastností vazby, ať už kovalentní nebo nekovalentní, je její síla nebo pevnost. Ta se měří množstvím energie, kterou je třeba do vazby dodat, aby došlo k jejímu rozštěpení. Tato energie se obvykle vyjadřuje v kilojoulech na mol (kJ/mol), přičemž 1 kilojoule je množství energie odpovídající síle 1000 newtonů působící po dráze 1m. Typické energie a délky hlavních tříd chemických vazeb jsou uvedeny v tabulce 2-2. Jinou jednotkou používanou k měření energie je kalorie, přičemž $1 \text{ J} = 0,239 \text{ cal}$.

Abychom získali lepší představu o síle vazby, je užitečné srovnat ji s průměrnou energií nárazů jiných molekul z okolí (tedy s tepelnou energií). Typické kovalentní vazby mají energii asi 100krát větší; jsou tedy odolné vůči tepelnému štěpení a rozpadají se jen při specifických chemických reakcích s jinými atomy či molekulami. Tvorba a štěpení kovalentních vazeb jsou násilné jevy a v buňce jsou řízeny zvláštními katalyzátory – *enzymy*. Nekovalentní vazby jsou zpravidla mnohem slabší; později uvidíme, že jsou v buňce velmi užitečné v mnoha situacích, při kterých potřebují molekuly k plnění svých funkcí rychle asociovat a disociovat.

Zatímco atom H může vytvářet jen jedinou kovalentní vazbu, jiné běžné atomy, které tvoří kovalentní vazby v buňkách, jich mohou tvořit více. Jde o atomy O, N, S a P a samozřejmě i o nejdůležitější atomy uhlíku C. Vnější slupka těchto atomů tedy může „ubytovat“ až osm elektronů; tyto atomy tvoří kovalentní vazby s počtem atomů odpovídajícím počtu elektronů ve vnější slupce. Kyslík s šesti elektrony ve své vnější slupce je nejstálejší, když získá další dva elektrony sdílením



Obrázek 2-9 Uspořádání kovalentních vazeb. (A) Prostorové uspořádání kovalentních vazeb, které může vytvářet kyslík, dusík a uhlík. (B) Molekuly utvořené z těchto atomů mají přesnou trojrozměrnou strukturu určenou vazebnými úhly a délkami vazeb pro každý kovalentní spoj, jak je zde ukázáno pro případ vody a propanu. Například molekula vody má tvar písmene V s úhlem blízkým 109° .

s jinými atomy, a proto vytváří až dvě kovalentní vazby. Dusík s pěti vnějšími elektrony tvoří až tři kovalentní vazby, zatímco uhlík se čtyřmi vnějšími elektrony tvoří až čtyři kovalentní vazby sdílením čtyř párů elektronů (viz obr. 2-5).

Když atom vytvoří kovalentní vazby s několika ostatními atomy, mají tyto násobné vazby přesně danou orientaci v prostoru vzhledem k ostatním atomům. Tato orientace odráží orientaci drah sdílených elektronů. Pro kovalentní vazby mezi více atomy jsou proto charakteristické specifické *vazebné úhly, délky a energie* (obr. 2-9). Například čtyři kovalentní vazby, které mohou vznikat okolo atomu uhlíku, jsou uspořádány tak, že směřují do rohů pravidelného čtyřstěnu. Přesná orientace kovalentních vazeb je základem pro trojrozměrné uspořádání organických molekul.

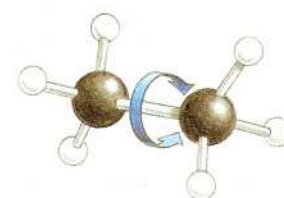
Existují různé typy kovalentních vazeb

Většina kovalentních vazeb představuje sdílení dvou elektronů, z nichž každý byl darován jedním ze zúčastněných atomů. Takovým vazbám se říká *jednoduché vazby*. Některé kovalentní vazby však zahrnují sdílení více než jednoho páru elektronů. Může například docházet ke sdílení čtyř elektronů, přičemž z každého ze zúčastněných atomů pocházejí dva elektrony; takové vazbě se říká *dvojná vazba*. Dvojná vazba jsou kratší a pevnější než vazby jednoduché a mají charakteristický vliv na trojrozměrné uspořádání molekul, které je obsahují. Jednoduchá kovalentní vazba mezi dvěma atomy obecně umožňuje otáčení jedné části molekuly vůči druhé okolo osy vazby. Dvojná vazba takové rotaci brání a představuje více rigidní (tuhé) a méně flexibilní uspořádání atomů (obr. 2-10 a panel 2-1, str. 46-47).

Některé molekuly obsahují soubor vazeb, které sdílejí elektrony, a proto mají hybridní charakter přechodného stavu mezi jednoduchými a dvojnými vazbami. Například vysoce stabilní molekula benzen obsahuje kruh šesti uhlíkových atomů se stejným rozložením vazebných elektronů (ačkoli je benzen často znázorňován se střídajícím se pořadím jednoduchých a dvojných vazeb, jak je ukázáno na panelu 2-1).

Pokud jsou jednoduchou kovalentní vazbou spojeny atomy různých prvků, přitahují většinou tyto dva atomy sdílené elektrony různou měrou. Například atomy O a N ve srovnání s atomem C přitahují elektrony poměrně silně, zatímco atom H přitahuje elektrony poměrně slabě. Podle definice je **polární** struktura (v elektrickém významu) taková, která má kladný náboj soustředěný na jednom konci (kladný pól) a záporný náboj na druhém konci (záporný pól). Proto se kovalentní vazby s tímto nesteromerným sdílením elektronů jmenují polární vazby, jak jsme se zmínili už dříve (obr. 2-11). Například kovalentní vazba mezi kyslíkem a vodíkem, O–H, nebo mezi dusíkem a vodíkem, N–H, je polární, zatímco vazba mezi uhlíkem a vodíkem, C–H, představuje elektrony přitahované daleko více stejnoměrně oběma atomy a je poměrně nepolární.

Polární kovalentní vazby jsou v biologii nanejvýš důležité, neboť umožňují molekulám vzájemné působení prostřednictvím elektrických sil. Každá velká molekula s mnoha polárními skupinami bude mít na svém povrchu místa s částečným kladným a záporným nábo-



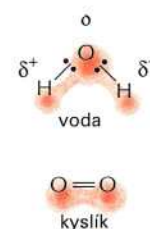
(A) ethan



(B) ethen

Obrázek 2-10 Srovnání jednoduché a dvojná vazby mezi dvěma uhlíky.

(A) Molekula ethanu s jedinou kovalentní vazbou mezi dvěma atomy uhlíku je příkladem čtyřstěnného uspořádání jednoduchých kovalentních vazeb tvořených uhlíkem. Každá z obou skupin CH_3 , spojených kovalentní vazbou, se může libovolně otáčet vzhledem ke druhé skupině okolo osy vazby. (B) Dvojná vazba mezi atomy uhlíku v molekule ethenu (ethylen) změnila uspořádání vazeb u atomů uhlíku a způsobila, že všechny zúčastněné atomy leží v jedné rovině. Dvojná vazba brání otáčení skupin CH_2 .

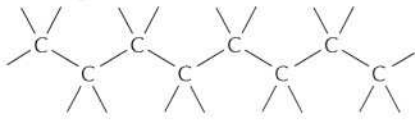


Obrázek 2-11 Polární kovalentní vazby.

Rozdělení elektronů v polární molekule vody (H_2O) a nepolární molekule kyslíku (O_2) (δ^+ = částečný kladný náboj, δ^- = částečný záporný náboj).

UHLÍKATÉ KOSTRY

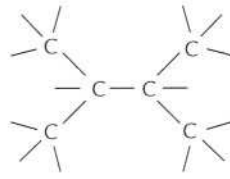
Uhlík hraje jedinečnou úlohu v buňce, protože dokáže tvořit pevné kovalentní vazby s dalšími atomy uhlíku a tvořit tak řetězce atomů.



zkrácené značení



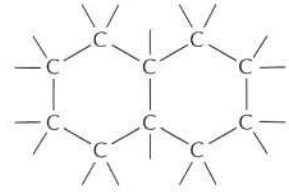
větvené řetězce



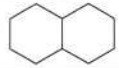
zkrácené značení



kruhy



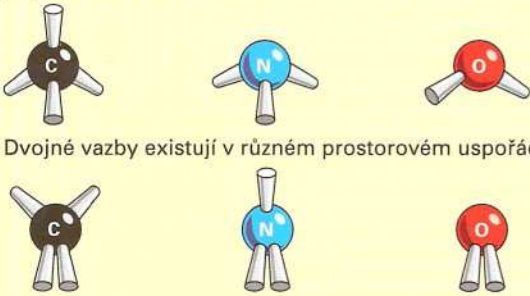
zkrácené značení



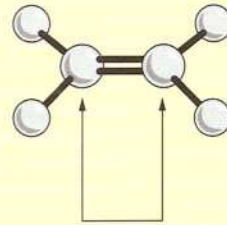
KOVALENTNÍ VAZBY

Kovalentní vazba se vytváří, jestliže se dva atomy dostanou do vzájemné blízkosti a sdílejí jeden nebo více elektronů. Při jednoduché vazbě se sdílí po jednom elektronu z každého atomu, při dvojně vazbě se sdílejí celkem čtyři elektrony.

Každý atom může tvořit určitý počet kovalentních vazeb v definovaném prostorovém uspořádání. Například uhlík vytváří čtyři jednoduché vazby uspořádané v čtyřstěnu, zatímco dusík tvoří tři jednoduché vazby a kyslík dvě, jak je to naznačeno dole.



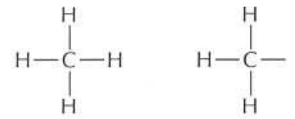
Dvojně vazby existují v různém prostorovém uspořádání.



Atomy spojené dvěma nebo více kovalentními vazbami se nemohou volně otáčet okolo společné osy. Toto omezení má významný vliv na trojrozměrný tvar mnoha makromolekul.

SLOUČENINY S VAZBOU C-H

Uhlík a vodík tvoří společně množství stabilních sloučenin, jež nazýváme uhlovodíky. Jsou to nepolární látky, které netvoří vodíkové můstky a jsou nerozpustné ve vodě.



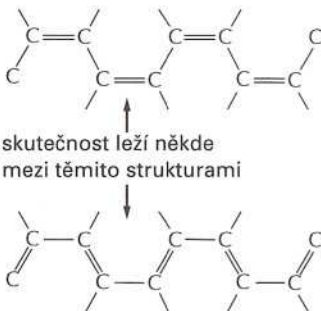
methan

methylová skupina

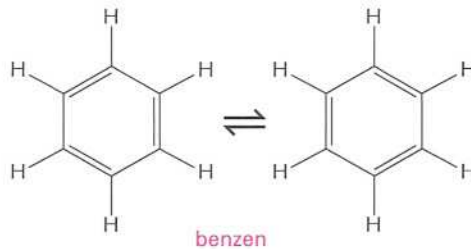
KONJUGOVANÉ DVOJNÉ VAZBY

Řetězec uhlíkových atomů může obsahovat dvojně vazby. Jestliže se vyskytují střídavě s vazbami jednoduchými, vazebné elektrony se pohybují uvnitř celé molekuly a stabilizují ji. Říká se tomu rezonance.

Konjugované dvojně vazby v kruhu tvoří velice pevnou a stabilní strukturu.

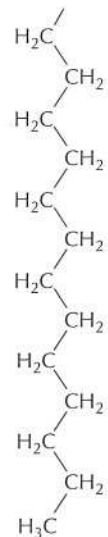


skutečnost leží někde mezi těmito strukturami



benzen

možno značit též jako

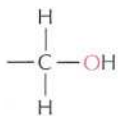


část uhlovodíkového konce molekuly mastné kyseliny

SLOUČENINY S VAZBOU C-O

Mnoho biologických molekul obsahuje uhlíkové atomy vázané na kyslík. Například

alkohol

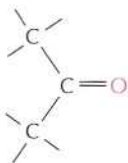


Skupině $-\text{OH}$ se říká **hydroxylová**.

aldehyd

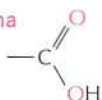


keton



Skupině $\text{C}=\text{O}$ se říká **karbonylová**.

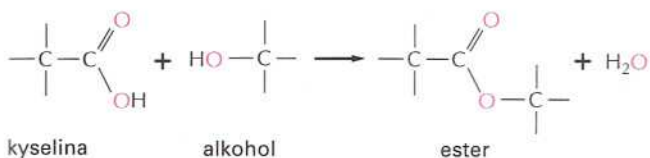
karboxylová kyselina



Skupině $-\text{COOH}$ se říká **karboxylová**.
Ve vodě ztrácí ion H^+ za tvorby aniontu $-\text{COO}^-$.

estery

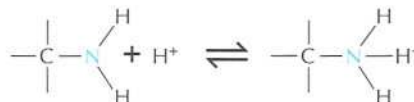
estery se tvoří kombinací kyseliny a alkoholu



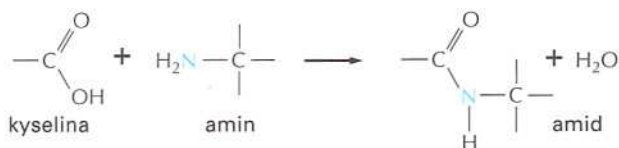
SLOUČENINY SE SKUPINOU C-N

Aminy a amidy jsou dva důležité příklady sloučenin obsahujících uhlík vázaný na dusík.

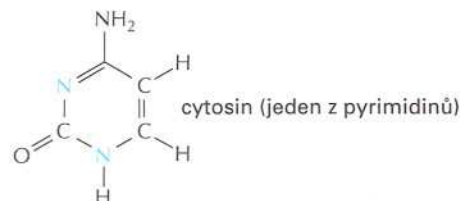
Aminy se ve vodě slučují s kationtem H^+ a získávají tak kladný náboj.



Amidy se tvoří při reakci kyseliny s aminem. Na rozdíl od aminů nenesou amidy ve vodě elektrický náboj. Příkladem je peptidová vazba, která spojuje aminokyseliny v proteinu.

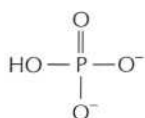


Dusík se také vyskytuje v cyklických sloučeninách, jako například v purinech a pyrimidinech, které jsou složkami nukleových kyselin.

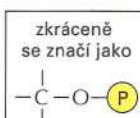
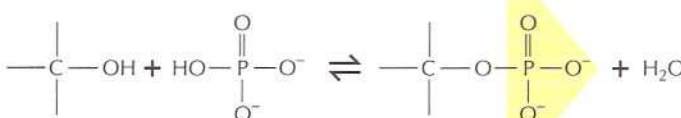


FOSFÁTY

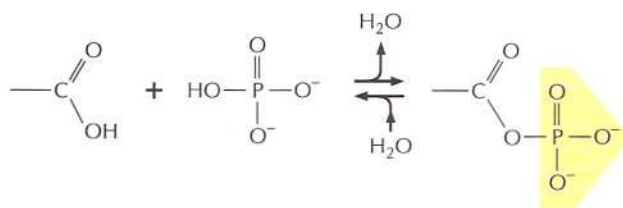
Anorganický fosfát je stabilní ion vznikající z fosforečné kyseliny H_3PO_4 . Označuje se zkráceně jako P_i .



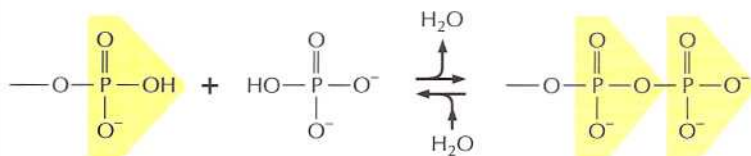
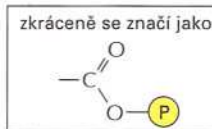
Fosforečné estery vznikají vazbou fosfátu a volné hydroxylové skupiny. Často jsou fosforečné skupiny tímto způsobem připojeny k proteinům.



Spojením fosfátu a karboxylové skupiny nebo dalších fosforečných skupin vznikají anhydridy kyselin.



acylfosfátová vazba (karboxyl-fosforečný kyselý anhydrid) s vysokým obsahem energie se vyskytuje v různých metabolitech



fosfoanhydrid je typem vazby s vysokým obsahem energie nalézáné v ATP



jem. Když se taková molekula setká s jinou molekulou s komplementární sadou nábojů, budou se tyto dvě molekuly navzájem přitahovat slabými nekovalentními iontovými silami, které budou připomínat dříve probírané vazby v NaCl (obr. 2-12), ale budou slabší. Vytvoří-li se takto mezi dvěma povrchy dostatečný počet slabých nekovalentních vazeb, přilnou povrchy specificky k sobě navzájem, jak je popsáno dále v této kapitole.

Otázka 2-2 Přemýšlejte, zda je správné následující tvrzení: „Iontovou vazbu si lze v zásadě představit jako velmi polární kovalentní vazbu. Polární kovalentní vazby potom spadají kamsi do spektra, na jehož jednom konci jsou nepolární kovalentní vazby a na druhém konci vazby iontové.“

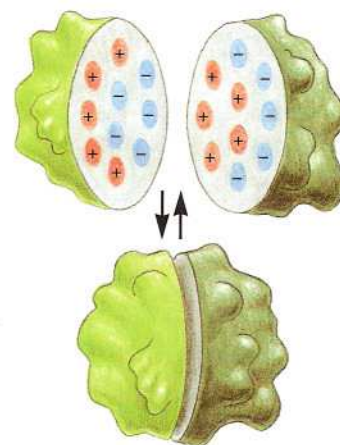
Voda je nejhojnější látkou v buňkách

Voda představuje 70 % hmotnosti buňky a většina reakcí uvnitř buňky se odehrává ve vodném prostředí. Život na Zemi začal v oceánu a v podmínkách, ve kterých původní prostředí vtisklo stálou pečeť chemii živých tvorů. Život je proto zcela závislý na vlastnostech vody (panel 2-2, str. 50-51).

V každé molekule vody (H_2O) jsou dva atomy H spojeny s atomem O kovalentními vazbami. Tyto vazby jsou značně polární, neboť O silně přitahuje elektrony, zatímco H je přitahuje jen slabě. Proto jsou v molekule vody elektrony rozděleny nerovnoměrně, s převahou kladného náboje na dvou atomech H a záporného náboje na atomu O (viz obr. 2-11 a panel 2-2). Když se kladně nabitá část molekuly vody (tj. jeden z jejích atomů H) dostane do blízkosti záporně nabitě oblastí jiné molekuly vody (tedy O), elektrické přitahování mezi nimi vyústí ve slabou vazbu zvanou **vodíkový můstek**. Tyto můstky jsou mnohem slabší než kovalentní vazby a snadno se štěpí náhodným tepelným pohybem díky tepelné energii molekul, takže každý vodíkový můstek existuje jen velmi krátkou dobu. Společný efekt mnoha slabých vazeb však rozhodně není zanedbatelný. Každá molekula vody může svými dvěma atomy H vytvářet vodíkové můstky se dvěma dalšími molekulami vody; tak se tvoří síť, v níž neustále vznikají a zanikají vodíkové můstky (panel 2-2). Jen díky těmto vodíkovým můstkům, které udržují molekuly vody pohromadě, je voda za pokojové teploty kapalinou s vysokým bodem varu a velkým povrchovým napětím, a nikoli plynem.

Obecně může vodíkový můstek vznikat vždy, když se kladně nabitý H držený v jedné molekule polární kovalentní vazbou přiblíží k záporně nabitému atomu (obvykle kyslíku či dusíku), který patří k jiné molekule. Vodíkové vazby se také mohou vyskytovat mezi různými částmi jedné velké molekuly, kde často pomáhají udržovat stabilitu struktury. Patří do rodiny slabých nekovalentních vazeb, které rozhodujícím způsobem pomáhají velkým molekulám skládat se do přesně dané struktury a selektivně se vázat k jiným molekulám, jak probereme později v této kapitole.

Molekuly, které obsahují polární vazby a které mohou tvořit vodíkové můstky s vodou, například alkoholy, se ve vodě ochotně rozpouštějí. Jak jsme se už dříve zmínili, molekuly nesoucí kladný nebo záporný náboj (ionty) interagují ochotně s vodou. Takovým molekulám se říká *hydrofilní*, což znamená, že milují vodu. Do této kategorie nutně spadá velká část molekul ve vodném prostředí buňky včetně sacharidů, DNA, RNA a většiny proteinů. *Hydrofobní* (vody se bojící) molekuly nenesou naproti tomu žádný náboj a tvoří jen velmi málo vodíkových můstků nebo vůbec žádné; takové molekuly se ve vodě nerozpouštějí. Důležitým příkladem jsou uhlovodíky (viz panel 2-1,



Obrázek 2-12 Proteiny se mohou navzájem vázat komplementárními náboji na svém povrchu.

str. 46-47). V těchto molekulách jsou atomy H kovalentně spojeny s atomy C převážně nepolární vazbou. Protože atomy H nemají prakticky žádný výsledný kladný náboj, nemohou se účastnit žádných vodíkových můstků s ostatními molekulami. To činí uhlovodíky jako celek hydrofobními. Tato vlastnost je využita v buňkách, jejichž membrány jsou sestaveny z molekul s dlouhými uhlovodíkovými řetězci, jak uvidíme v kapitole 11.

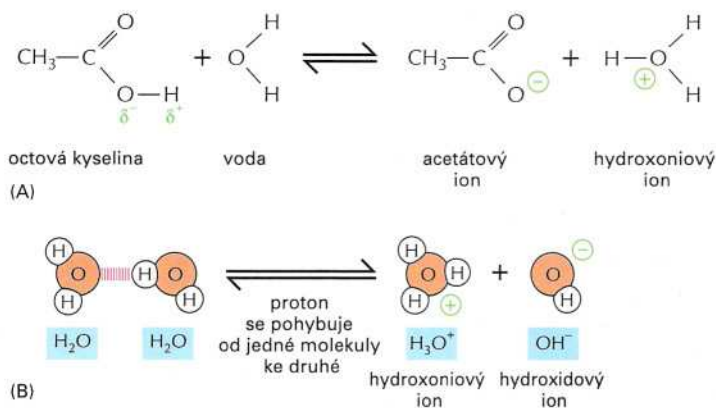
Otázka 2-3 Najděte chybu, pokud existuje, v následujícím tvrzení: „Při rozpuštění NaCl ve vodě se budou molekuly vody nejbližší iontům snažit orientovat se přednostně tak, aby jejich kyslíkové atomy byly u sodíkových iontů a co nejdále od iontů chloridových.“ Vysvětlete svou odpověď.

Některé polární molekuly tvoří ve vodě kyseliny a zásady

Při rozpouštění molekul s vysoce polární vazbou mezi vodíkem a jiným atomem ve vodě dochází k jedné z nejjednodušších chemických reakcí; tato reakce má však pro buňky hluboký význam. Vodíkový atom v takové molekule předal téměř úplně svůj elektron druhému atomu, a tak se vlastně vyskytuje jen jako holé vodíkové jádro, jinými slovy jako *proton* (H^+). Je-li polární molekula obklopena molekulami vody, je proton přitahován k částečnému zápornému náboji na atomu O sousední molekuly vody a může disociovat od svého původního partnera a přidružit se k atomu kyslíku molekuly vody za vzniku **hydroxoniového iontu** (H_3O^+) (obr. 2-13A). Velmi ochotně probíhá i opačná reakce, takže si můžeme představit rovnovážný stav, při němž miliardy protonů neustále přeskakují z jedné molekuly v roztoku na druhou.

Látky, které při rozpouštění ve vodě uvolňují proton za vzniku H_3O^+ , se nazývají **kyseliny**. Čím vyšší je koncentrace H_3O^+ , tím je roztok kyslejší. Ionty H_3O^+ jsou přítomny i v čisté vodě – v koncentraci 10^{-7} M, jako výsledek pohybu protonů od jedné molekuly vody ke druhé (obr. 2-13B). Podle tradice se koncentrace H_3O^+ obvykle uvádí jako koncentrace H^+ , ačkoli je většina iontů H^+ v roztoku přítomna jako H_3O^+ . Abychom se vyhnuli používání nepraktických čísel, vyjadřujeme koncentraci H^+ s pomocí logaritmického měřítka zvaného **stupnice pH**, které je vidět na panelu 2-2 (str. 50-51). Čistá voda má pH 7,0. (*Poznámka překladatele:* To je přesně pravda jen při 25 °C a 101 325 Pa.)

Protože se proton z hydroxoniového iontu může snadno dostat k mnoha molekulám v buňkách, a tak měnit jejich charakter, musí být koncentrace H_3O^+ (kyselost) v buňce přísně regulována. Molekuly, které mohou odevzdávat protony, tak budou činit tím ochotněji, čím bude koncentrace H_3O^+ v roztoku nižší, zatímco při vysoké koncentraci H_3O^+ v roztoku budou mít tyto molekuly snahu si své protony udržet.

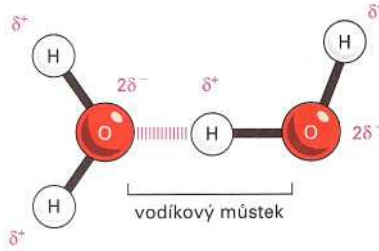


Obrázek 2-13 Kyseliny ve vodě. (A) Reakce, která probíhá při rozpouštění kyseliny octové ve vodě. (B) Molekuly vody si stále navzájem vyměňují protony za tvorby hydroxoniových a hydroxidových iontů. Tyto ionty se rychle spojují za vzniku molekul vody.

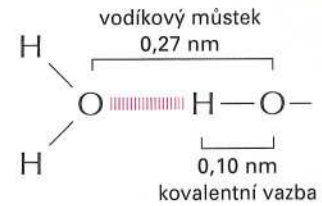
VODÍKOVÝ MŮSTEK

Díky své polarizaci se dvě sousedící molekuly vody mohou spojit tzv. **vodíkovým můstkem**. Vodíkové můstky představují mnohem slabší vazbu, než je kovalentní (přibližně 1/20).

Vodíkové můstky jsou nejpevnější, jestliže vodíkový atom leží na přímce spolu s ostatními dvěma atomy.

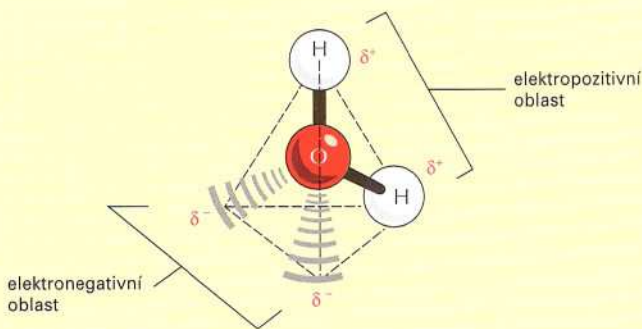


délka vazby



VODA

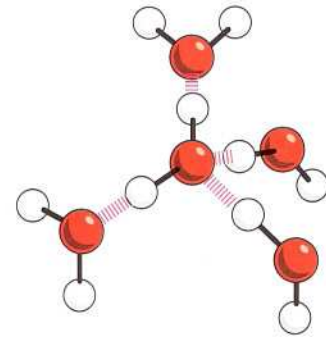
Dva atomy spojené kovalentní vazbou mohou vykazovat různou přitažlivost vůči elektronům takové vazby. V takovém případě hovoříme o **vazbě polární**, kdy jeden konec je nabit poněkud záporně (δ^-), druhý pak poněkud kladně (δ^+).



Ačkoliv má molekula vody jako celek nulový elektrický náboj (obsahuje stejný počet elektronů a protonů), jsou elektrony rozmístěny asymetricky, čímž vzniká polární molekula. Jádro kyslíkového atomu přitahuje elektrony od vodíkových jader, čímž se atomy vodíku stávají nepatrně kladně nabitě. Nadbytek elektronů v oblasti atomu kyslíku pak tvoří slabě negativní oblast v místech dalších dvou imaginárních vrcholů čtyřstěnu.

STRUKTURA VODY

Molekuly vody se spojují přechodně do mřížky vázané vodíkovými atomy. I při 37 °C je až 15 % molekul vody spojeno se čtyřmi ostatními do struktury oscilujících shluků.



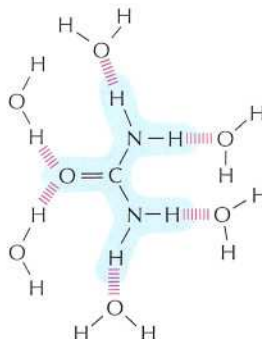
Kohezní povaha vody je zodpovědná za mnoho jejích nečekaných vlastností, jako je vysoké povrchové napětí, specifické teplo a teplo vypařování.

HYDROFILNÍ MOLEKULY

Látky, které se dobře rozpouštějí ve vodě, se nazývají **hydrofilní**. Jsou složeny z iontů nebo polárních molekul, které přitahují molekuly vody vlivem elektrických nábojů. Molekuly vody obklopují ionty nebo polární molekuly na povrchu pevného tělesa a převádějí je do roztoku.



Iontové sloučeniny, jako například chlorid sodný, se rozpouštějí, protože molekuly vody jsou přitahovány ke kladnému (Na^+) nebo zápornému (Cl^-) náboji toho kterého iontu.

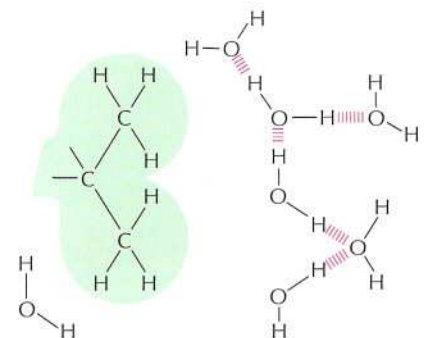


Polární látky, jako například močovina, se rozpouštějí proto, že jejich molekuly vytvářejí vodíkové můstky s okolními molekulami vody.

HYDROFOBNÍ MOLEKULY

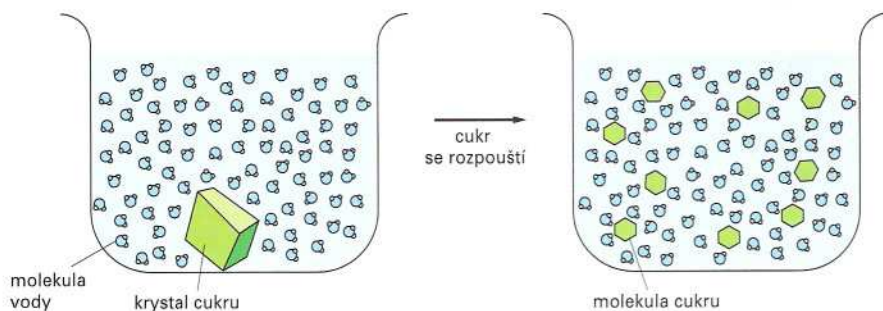
Molekuly obsahující převahu nepolárních vazeb jsou obvykle nerozpustné ve vodě a nazývají se **hydrofobní**. To platí zejména pro uhlovodíky, které obsahují více vazeb.

Molekuly vody nejsou k takovým molekulám přitahovány, a proto nemají tendenci je obklopotat a přivádět do roztoku.



VODA JAKO ROZPOUŠTĚDLO

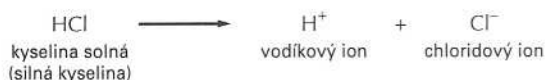
Mnoho známých látek, například běžný cukr, se **rozpouští** ve vodě. To znamená, že molekuly takové látky jsou od sebe odděleny tím, že je obklopují molekuly vody.



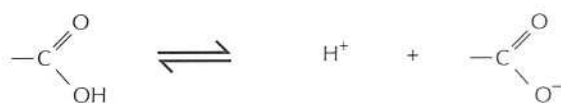
Jestliže se nějaká látka rozpustí v kapalině, hovoříme o **roztoku**. Rozpuštěná látka (v našem případě cukr) se nazývá **solut**, kapalina, která cukr rozpustila (v našem případě voda) se nazývá **solvent** čili rozpouštědlo. Voda je výborným rozpouštědlem pro řadu látek, protože obsahuje polární vazby.

KYSELINY

Látky, které do roztoku uvolňují vodíkové ionty, se nazývají **kyseliny**



Mnoho kyselin významných pro buňku je pouze částečně disociováno a nazývají se proto **slabé kyseliny** - například organické kyseliny s karboxylovou skupinou -COOH, která disociuje pouze částečně.

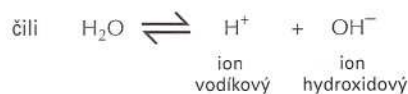
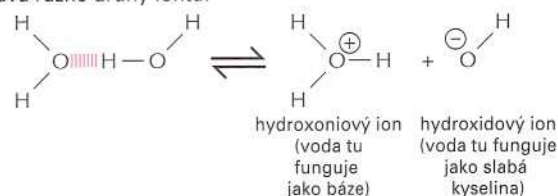


(slabá kyselina)

Všimněte si, že tu jde o vratnou reakci.

VÝMĚNA VODÍKOVÝCH IONTŮ

Kladně nabitě ionty vodíku (H^+) se mohou spontánně přemísťovat z jedné molekuly vody na druhou a vytvářet tak dva různé druhy iontů.



Protože jde o vratný proces, pohybují se ionty vodíku neustále mezi jednotlivými molekulami vody. Čistá voda tak obsahuje stálou koncentraci vodíkových i hydroxidových iontů, rovnou 0,1 mmol/L.

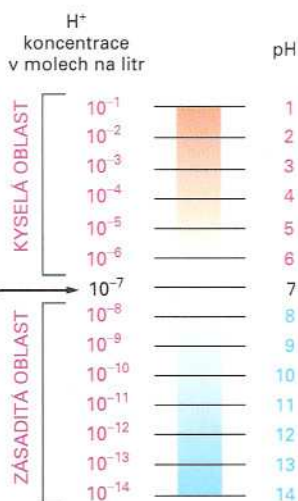
pH

Kyselost roztoku je dána koncentrací iontů H^+ . Pro jednoduchost tu používáme stupnice pH, kde

$$\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$$

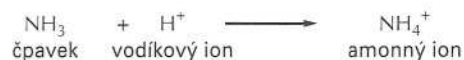
Pro čistou vodu platí

$$[\text{H}^+] = 10^{-7} \text{ v molech na liter}$$

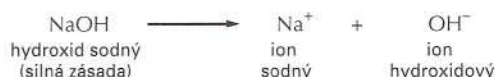


ZÁSADY

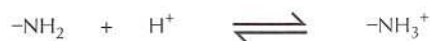
Látky, které snižují počet vodíkových iontů v roztoku, se nazývají **zásady** čili **báze**. Některé z nich, například čpavek, se přímo slučují s vodíkovými ionty.



Jiné zásady, například hydroxid sodný NaOH, snižují množství vodíkových iontů nepřímo, přičemž se vznikající ionty OH^- slučují s H^+ za tvorby molekul vody.



Mnoho zásad v buňkách je pouze částečně disociováno a říká se jim **slabé zásady** nebo **báze**. To platí o sloučeninách obsahujících aminoskupinu ($-\text{NH}_2$), která projevuje slabou tendenci k reverzibilnímu přijetí H^+ z molekuly vody, čímž se zvyšuje množství volných iontů $-\text{OH}^-$.



Opakem kyseliny je **zásada**. Je-li kyselinou podle definice látka, která odevzdává protony do roztoku a tak zvyšuje koncentraci H_3O^+ , vznikajících adicí protonů k molekulám vody, je podle stejné definice zásadou látka, která zvyšuje koncentraci hydroxidových iontů, které vznikají odebráním protonu z molekuly vody. Tak například hydroxid sodný (NaOH) je zásaditý (používá se i termín *alkalický*), protože ve vodném roztoku disociuje za vzniku iontů Na^+ a OH^- . Další skupinou zásad zvláště důležitých pro živé buňky jsou látky obsahující skupiny NH_2 . Tyto skupiny mohou vytvářet OH^- z vody odebráním protonu: $-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow -\text{NH}_3^+ + \text{OH}^-$.

Protože ionty OH^- a H_3O^+ se spojují za vzniku dvou molekul vody, vyvolá vzrůst koncentrace OH^- pokles koncentrace H_3O^+ a naopak. Čistá voda obsahuje stejně nízké koncentrace obou iontů (10^{-7} M), a proto není ani kyselá ani zásaditá, nýbrž *neutrální* a má pH 7,0. Uvnitř buňky je udržováno pH blízké neutrální hodnotě.

Otázka 2-4

- A. Existují nějaké ionty H_3O^+ v čisté vodě při neutrálním pH (tedy při pH = 7,0)?
- B. Pokud existují, jaký je při neutrálním pH podíl iontů H_3O^+ a molekul vody? (Nápověda: molekulová hmotnost vody je 18 a jeden litr vody má hmotnost 1 kg.)

Molekuly v buňkách

Poté, co jsme se podívali, jak se atomy spojují do malých molekul a jak se tyto molekuly chovají ve vodném prostředí, prozkoumáme nyní hlavní třídy malých molekul nacházejících se v buňkách a jejich biologickou úlohu. Uvidíme, že několik málo základních kategorií molekul vytvořených z hrstky různých prvků stojí u zrodu celého neobyčejného bohatství tvarů a projevů živých organismů.

Buňky jsou vytvořeny ze sloučenin uhlíku

Když odhlédneme od vody, je základem téměř všech molekul v buňce uhlík. Uhlík nad jiné prvky vyniká svou schopností tvořit dlouhé molekuly; křemík v této schopnosti zaujímá jen vzdálené druhé místo. Díky tomu, že je malý a že má ve vnější slupce čtyři elektrony a čtyři prázdná místa, může atom uhlíku vytvářet čtyři kovalentní vazby s jinými atomy. Co je však nejdůležitější, jeden atom uhlíku se může spojit s jiným uhlíkovým atomem vysoce stabilní kovalentní vazbou C-C za vzniku řetězců a kruhů, a tak může uhlík vytvářet velké a složité molekuly bez jakéhokoli omezení velikosti (viz panel 2-1, str. 46-47). Malé i velké sloučeniny uhlíku vytvářené buňkami se nazývají *organické molekuly*.

Jistá spojení atomů, jako třeba methyl ($-\text{CH}_3$), hydroxyl ($-\text{OH}$), karboxyl ($-\text{COOH}$), karbonyl ($-\text{C}=\text{O}$), fosforyl ($-\text{PO}_3^{2-}$) a aminoskupina ($-\text{NH}_2$) se v organických molekulách vyskytují opakovaně. Každá z těchto skupin má odlišné chemické a fyzikální vlastnosti, které ovlivňují chování molekuly obsahující tuto skupinu. Nejběžnější **chemické skupiny** a některé jejich vlastnosti jsou shrnuty v panelu 2-1.

Buňky obsahují čtyři hlavní skupiny malých organických molekul

Malé organické molekuly v buňce jsou sloučeninami uhlíku s molekulovými hmotnostmi od 100 do 1000, které obsahují až 30 uhlíkových atomů. Obvykle se nacházejí volně v roztoku v cytoplasmě a mají ty nejrozmanitější osudy. Některé z nich jsou použity jako *monomer-*

Tabulka 2-3 Přibližné chemické složení bakteriální buňky

	Procento z celkové hmotnosti	Počet druhů každého typu molekuly
Voda	70	1
Anorganické ionty	1	20
Cukry a prekursory	1	250
Aminokyseliny a prekursory	0,4	100
Nukleotidy a prekursory	0,4	100
Mastné kyseliny a prekursory	1	50
Jiné malé molekuly	0,2	≈300
Makromolekuly (proteiny, nukleové kyseliny a polysacharidy)	26	≈3000

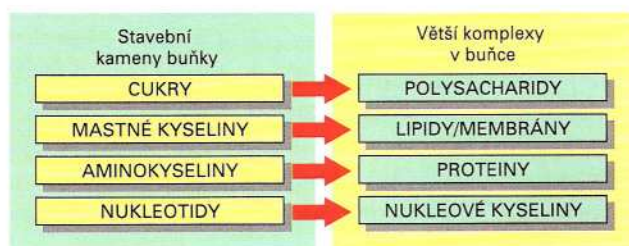
ní podjednotky při stavbě obrovských polymerních *makromolekul* buňky – bílkovin, nukleových kyselin a velkých polysacharidů. Jiné slouží jako zdroje energie a jsou odbourávány a přeměňovány v malé molekuly v labyrintu vnitrobuněčných metabolických drah. Mnoho malých molekul má v buňce více než jednu úlohu – například slouží jako možné podjednotky makromolekul i jako zdroj energie. Malých organických molekul je méně než organických makromolekul; představují jen asi jednu desetinu celkové hmotnosti organického materiálu v buňce (tabulka 2-3). Zhruba lze odhadnout, že v typické buňce může být asi tisíc různých druhů těchto malých molekul.

Všechny organické molekuly jsou syntetizovány ze stejného souboru jednoduchých sloučenin a zase se na tyto sloučeniny odbourávají. Jejich syntéza i odbourání probíhají v řadě chemických reakcí, které jsou prostorově vymezeny a probíhají podle přesných pravidel. Následkem toho jsou sloučeniny v buňce chemicky příbuzné a většinu z nich lze zařadit do několika málo odlišných chemických tříd. Buňky obsahují čtyři hlavní třídy malých organických molekul: *sacharidy*, *mastné kyseliny*, *aminokyseliny* a *nukleotidy* (obr. 2-14). Ačkoli mnoho sloučenin přítomných v buňkách do těchto kategorií nespadá, přispívají tyto čtyři rodiny malých organických molekul společně s makromolekulami vytvořenými jejich spojením do dlouhých řetězců velkou částí k hmotnosti buňky (viz tabulku 2-3).

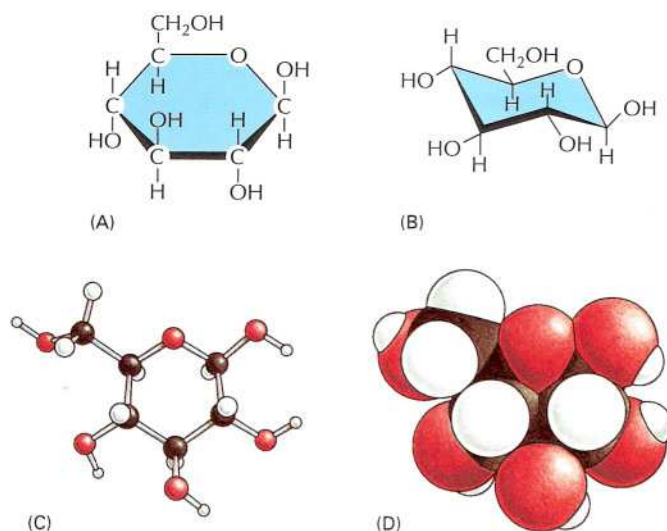
Sacharidy jsou zdrojem energie pro buňky a tvoří podjednotky polysacharidů

Nejjednodušší **cukry** – *monosacharidy* – jsou sloučeniny s obecným vzorcem $(\text{CH}_2\text{O})_n$, kde n je obvykle 3, 4, 5, 6 nebo 7. Cukrům a od nich odvozeným sloučeninám se díky tomuto jednoduchému vzorci dříve říkalo také *uhlovodany*. Například glukosa má vzorec $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (obr. 2-

Otázka 2-5 Podívejte se krátce na kuličkový a kalotový model molekuly glukosy na obrázku 2-15C a D. Všimněte si, že na každém z obrázků jsou vodíkové atomy jinak veliké. Měli bychom se omluvit za chybu, které se dopustil ilustrátor? Vysvětlete svou odpověď.



Obrázek 2-14 Čtyři hlavní skupiny malých organických molekul v buňkách. Tvoří monomerní stavební bloky či podjednotky pro většinu makromolekul a další komplexy v buňce. Některé z nich jsou i zdroji energie, jako například cukry a mastné kyseliny.



Obrázek 2-15 Struktura jednoduchého cukru glukosy. Molekulu lze znázornit několika způsoby. Ve strukturálních vzorcích ukázaných v částech (A) a (B) jsou atomy zakresleny jako chemické značky spojené dohromady *plnými čarami*, které představují kovalentní vazby. *Zesílené čáry* se používají k vyznačení roviny sacharidového kruhu a ke zvýraznění poloh skupin -OH a -H, které se nacházejí mimo rovinu kruhu. (B) Schematické znázornění trojrozměrné struktury glukosy a dalších podobných cukrů. (C) Kuličkový model, na kterém je ukázáno trojrozměrné uspořádání atomů v prostoru. Rozdílně zbarvené kuličky představují různé atomy a spoje mezi nimi znázorňují kovalentní vazby. (D) Kalotový model, který vedle prostorového uspořádání atomů ukazuje i jejich vzájemnou velikost a povrchové kontury molekuly. Atomy v částech (C) a (D) jsou zbarveny následovně: H bíle, C černě, O červeně. To je běžné barevné označení těchto atomů a bude používáno v celé této knize.

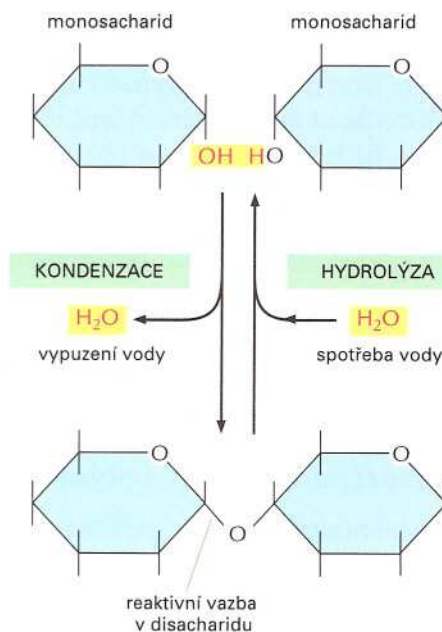
15 a panel 2-3, str. 56-57). Vzorec však neurčuje molekulu úplně přesně: tentýž soubor uhlíků, vodíků a kyslíků lze spojit kovalentními vazbami celou řadou způsobů a vytvořit tak sloučeniny naprosto odlišných tvarů. Jak je ukázáno v panelu 2-3 (str. 56-57), může se například glukosa přeměnit v jiný cukr – mannosu nebo galaktosu – pouhou změnou orientace specifické skupiny -OH vzhledem ke zbytku molekuly. Každý z těchto cukrů může navíc existovat v jedné ze dvou forem D a L, které jsou navzájem svými zrcadlovými obrazy. Molekuly se stejným sumárním vzorcem ale odlišnou strukturou se jmenují *izomery* a molekulám, které jsou navzájem zrcadlovými obrazy, se říká *optické izomery*. Izomery jsou mezi organickými molekulami obecně značně rozšířené a mají hlavní úlohu při vytváření nesmírného množství různých cukrů.

Monosacharidy se spojují dohromady kovalentními vazbami za vzniku větších sacharidů. Dva monosacharidy spojené dohromady tvoří disacharid, jakým je např. sacharosa složená z glukosové a fruktosové podjednotky. Větší sacharidové polymery sahají od *oligosacharidů* (trisacharidy, tetrasacharidy atd.) až k obrovským *polysacharidům*, které mohou obsahovat tisíce sacharidových jednotek. Přehled struktur a chemie cukrů je uveden v panelu 2-3.

Způsob, jakým se cukry spojují dohromady, ilustruje některé obecné vlastnosti biochemické tvorby vazeb. Vazba vzniká mezi dvěma skupinami -OH dvou sacharidových molekul **kondenzační** reakcí, v níž je při vzniku vazby vypuzena molekula vody. Vazby vytvořené všemi druhy takových kondenzačních reakcí mohou být přerušeny obráceným procesem zvaným **hydrolýza**, na který se spotřebuje molekula vody (obr. 2-16).

Protože každý monosacharid má několik volných hydroxylových skupin, které mohou vytvořit vazbu s jiným monosacharidem (nebo s nějakou jinou sloučeninou), mohou být cukerné polymery rozvětvené a počet možných polysacharidových struktur je nesmírně velký. Proto je určení uspořádání cukerných jednotek v polysacharidu mnohem složitější úlohou než stanovení pořadí nukleotidů v DNA, kde je každá jednotka spojena s následující přesně stejným způsobem.

Monosacharid *glukosa* hraje hlavní roli jako energetický zdroj pro buňku. V řadě reakcí se odbourává na další molekuly a uvolňuje ener-



Obrázek 2-16 Reakce dvou monosacharidů za vzniku disacharidu. Tato reakce patří do obecné kategorie reakcí zvaných *kondenzace*, ve kterých se dvě molekuly spojí dohromady za ztráty molekuly vody. Opačná reakce, ve které se voda přidává, se nazývá *hydrolýza*.

gii, kterou může buňka využít k užitečné práci, jak si vysvětlíme ve 4. kapitole. Buňky využívají jednoduché polysacharidy složené jen z glukosových jednotek jako dlouhodobé zásobárny energie. U živočichů plní tuto úlohu *glykogen* (viz panel 2-3, str. 56-57), u rostlin *škrob*.

Cukry se neúčastní jen vytváření a skladování chemické energie. Mohou být například použity k tvorbě mechanických podpěr. Nejhojnější organická sloučenina na Zemi – *celulosa* v buněčných stěnách rostlin – je polysacharidem glukosy. Jinou mimořádně hojnou organickou látkou je *chitin* ve vnějších kostrách hmyzu a v buněčných stěnách hub. I on je polysacharidem – v tomto případě lineárním polymerem cukerného derivátu zvaného N-acetylglukosamin (viz panel 2-3). Polysacharidy různých dalších druhů představují hlavní složky slizu, hlenu a chrupavek.

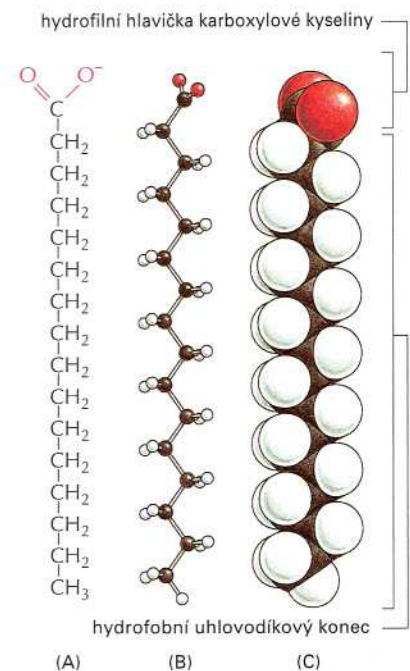
Menší polysacharidy se mohou kovalentně spojovat s proteiny za vzniku glykoproteinů a s lipidy za vzniku *glykolipidů* (panel 2-4, str. 58-59), které se nacházejí v buněčné membráně. Tyto řetězce na vnější straně buňky mohou být selektivně rozpoznávány jinými buňkami. Malé rozdíly ve struktuře cukrů na povrchu buněk u různých lidí jsou např. molekulárním základem pro hlavní lidské krevní skupiny.

Mastné kyseliny jsou složkami buněčných membrán

Molekula mastné kyseliny, například *palmitové kyseliny* (obrázek 2-17 a panel 2-4), má dvě chemicky odlišné oblasti. Jednou z nich je dlouhý uhlovodíkový řetězec, který je hydrofobní a chemicky není příliš reaktivní. Druhou oblastí je karboxylová skupina (-COOH), která se chová jako kyselina (karboxylová kyselina): v roztoku se vyskytuje v iontové formě (-COO⁻), je mimořádně hydrofilní a chemicky reaktivní. Téměř všechny molekuly mastných kyselin v buňce jsou svými karboxylovými skupinami spojeny s jinými molekulami (viz panel 2-4).

Uhlovodíkový konec kyseliny palmitové je *nasycený*: neobsahuje žádnou dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku a nese maximální možný počet vodíků. Jiné mastné kyseliny, jako například olejová kyselina, obsahují *nenasycené* konce s jednou nebo více dvojnými vazbami. Dvojně vazby vytvářejí v molekulách strukturní nepravidelnosti a ovlivňují jejich schopnost sbalit se v pevnou látku. Právě díky tomuto jevu pozorujeme rozdíl mezi tvrdým (nasyceným) a měkkým (nenasyceným) margarinem. Mnoho mastných kyselin nacházejících se v buňkách se liší jen délkou svého uhlovodíkového konce a počtem a polohou dvojných vazeb mezi uhlíky (viz panel 2-4).

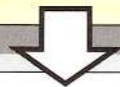
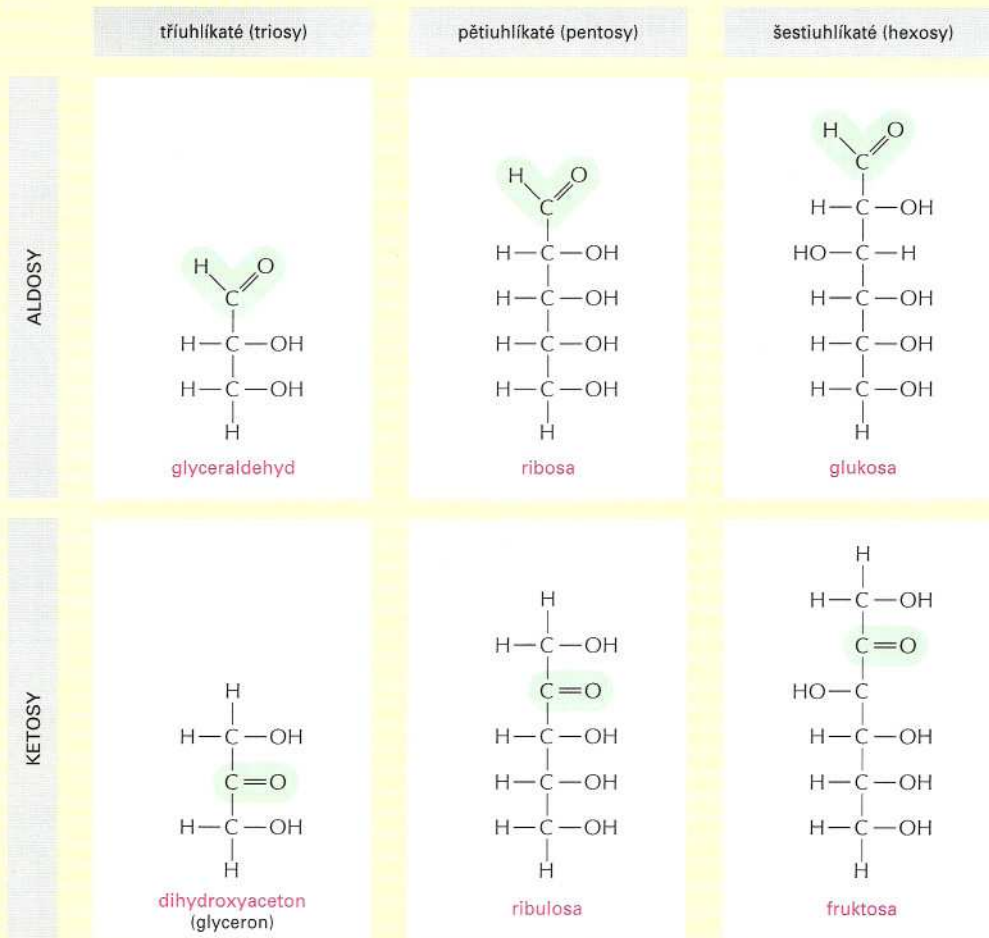
Mastné kyseliny slouží v buňkách jako koncentrované zásoby potravy, které při odbourání poskytují na jednotku hmotnosti asi šestkrát více využitelné energie než glukosa. Jsou uskladněny v cytoplasmě mnohých buněk ve formě kapeček molekul *triacylglycerolů*, skládajících se ze tří řetězců mastných kyselin připojených k molekule glycerolu (viz panel 2-4). Tyto molekuly představují živočišné tuky, které se vyskytují v masě, másle a smetaně, a rostlinné oleje jako kukuřičný olej a olivový olej. Je-li třeba dodat energii, mastné kyseliny jsou uvolněny z triacylglycerolů a odbourány na dvojuhlíkové jednotky. Tyto dvojuhlíkové jednotky jsou stejné jako jednotky vzniklé odbouráním glukosy a vstupují do stejných „reakcí na výrobu energie“, jak uvidíme v Kapitole 4.



Obrázek 2-17 Mastná kyselina. Mastná kyselina se skládá z hydrofobního uhlovodíkového řetězce, ke kterému je připojena hydrofilní skupina karboxylové kyseliny. Na tomto obrázku je palmitová kyselina. Různé mastné kyseliny se liší svými uhlovodíkovými řetězci. (A) Strukturní vzorec. Karboxylová skupina je uvedena v ionizované formě. (B) Kuličkový model. (C) Kalotový model.

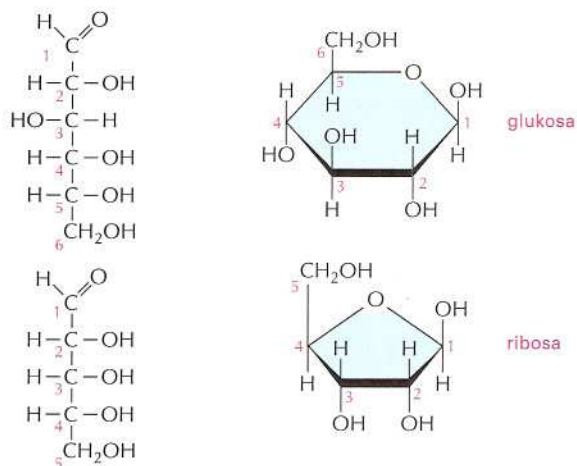
MONOSACHARIDY

Monosacharidy mají obvykle sumární vzorec $(\text{CH}_2\text{O})_n$, kde n může být 3-8, a obsahují dvě nebo více hydroxylových skupin. Buď se v nich vyskytuje aldehydová skupina $\text{HC}=\text{O}$ a nazývají se aldosity, nebo ketonová (oxo) skupina $=\text{C}=\text{O}$ a nazývají se ketosy.



CYKLIZACE

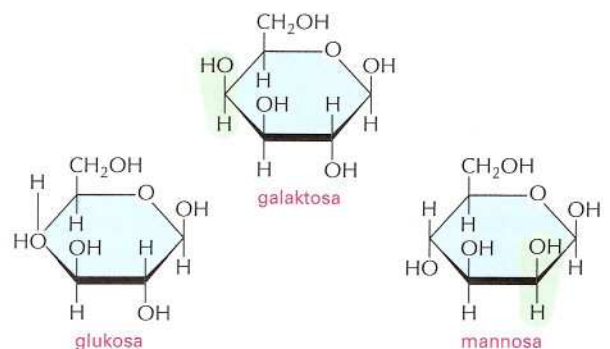
Ve vodném roztoku má aldehydová nebo ketonová skupina v molekule cukru tendenci reagovat s hydroxylovou skupinou téže molekuly, čímž se vytváří cyklická struktura.



Všimněte si číslování uhlíkových atomů.

IZOMERY

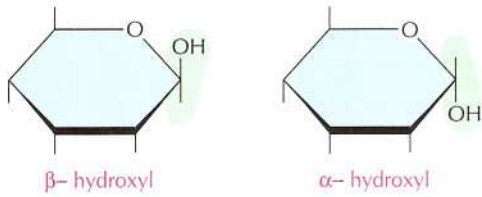
Mnoho monosacharidů se liší pouze v prostorovém uspořádání atomů; to znamená, že jsou to **izomery**. Například, glukosa, manna a galaktosa mají stejný sumární vzorec $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Liší se od sebe v uspořádání hydroxylových skupin okolo jednoho nebo dvou atomů uhlíku.



Tyto drobné rozdíly nemění příliš chemické vlastnosti jednotlivých cukrů, ale při enzymových reakcích a interakcích s různými proteiny se tyto cukry chovají velmi odlišně.

α- a β- VAZBY

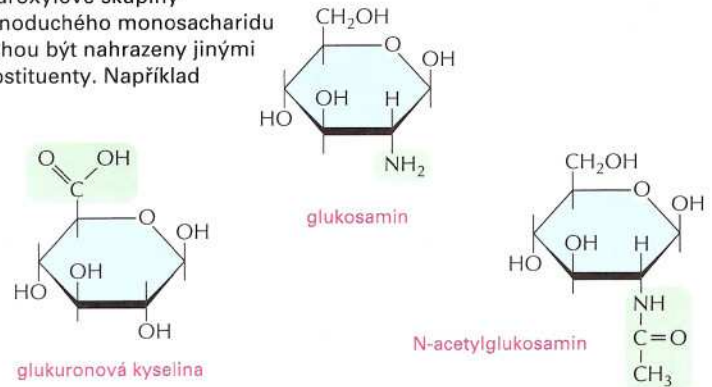
Hydroxylová skupina na atomu uhlíku, který nese aldehydovou nebo ketonovou skupinu, se může snadno pohybovat z jedné polohy do druhé. Tyto polohy se nazývají α a β.



Jakmile se však molekuly cukru spojí, zůstává α- nebo β-poloha fixována.

DERIVÁTY CUKRŮ

Hydroxylové skupiny jednoduchého monosacharidu mohou být nahrazeny jinými substituenty. Například



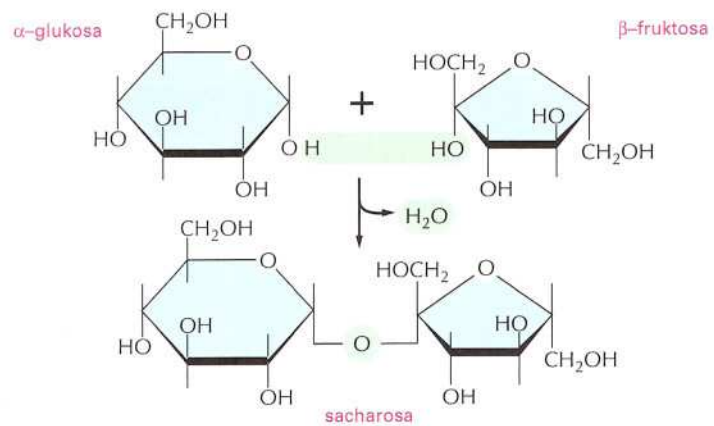
DISACHARIDY

Uhlíkový atom, který nese aldehydovou nebo ketonovou skupinu, může reagovat s jakýmkoli dalším monosacharidem za tvorby **disacharidu**.

Tři běžné disacharidy jsou

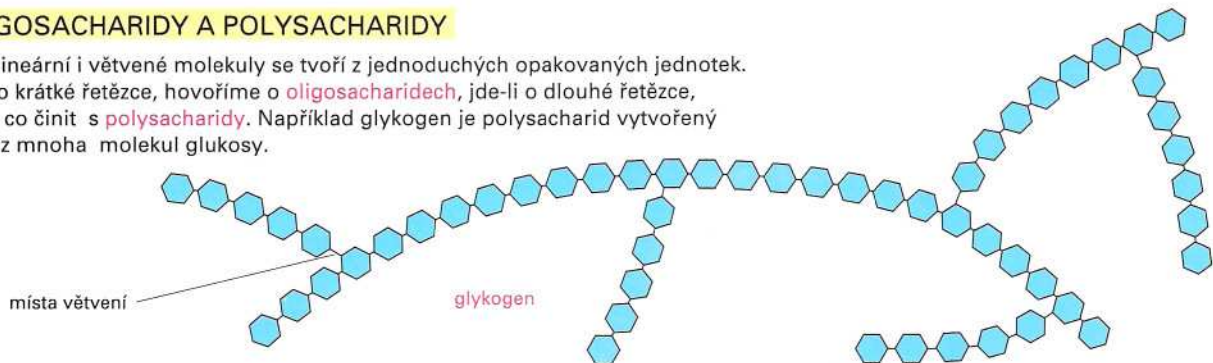
- maltosa (glukosa + glukosa)
- laktosa (galaktosa + glukosa)
- sacharosa (glukosa + fruktosa)

Vpravo je ukázána tvorba sacharosy



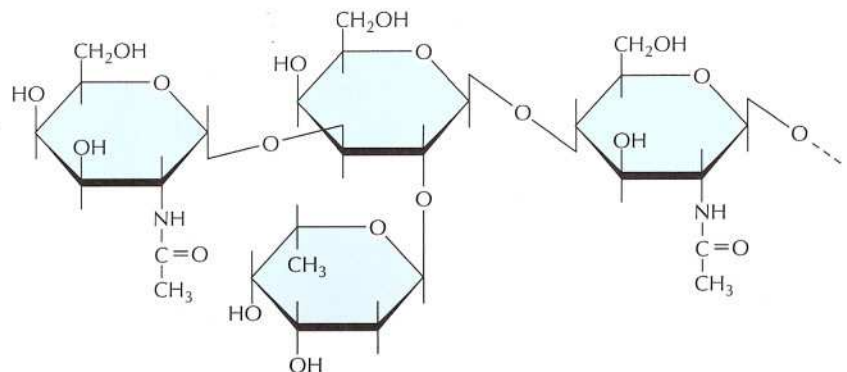
OLIGOSACHARIDY A POLYSACHARIDY

Velké lineární i větvené molekuly se tvoří z jednoduchých opakovaných jednotek. Jde-li o krátké řetězce, hovoříme o **oligosacharidech**, jde-li o dlouhé řetězce, máme co činit s **polysacharidy**. Například glykogen je polysacharid vytvořený pouze z mnoha molekul glukosy.



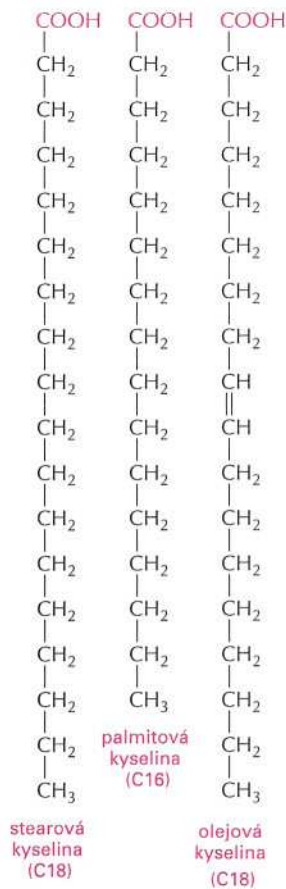
KOMPLEXNÍ OLIGOSACHARIDY

V mnoha případech se ve složených cukrech neopakují tytéž jednotky - je tu řada možností kombinace různých monosacharidů. Takové komplexní oligosacharidy se obvykle vyskytují ve vazbě na lipidy nebo proteiny. Příkladem je oligosacharid, který je vázán na povrchu buňky a určuje jednu ze specifických krevních skupin.

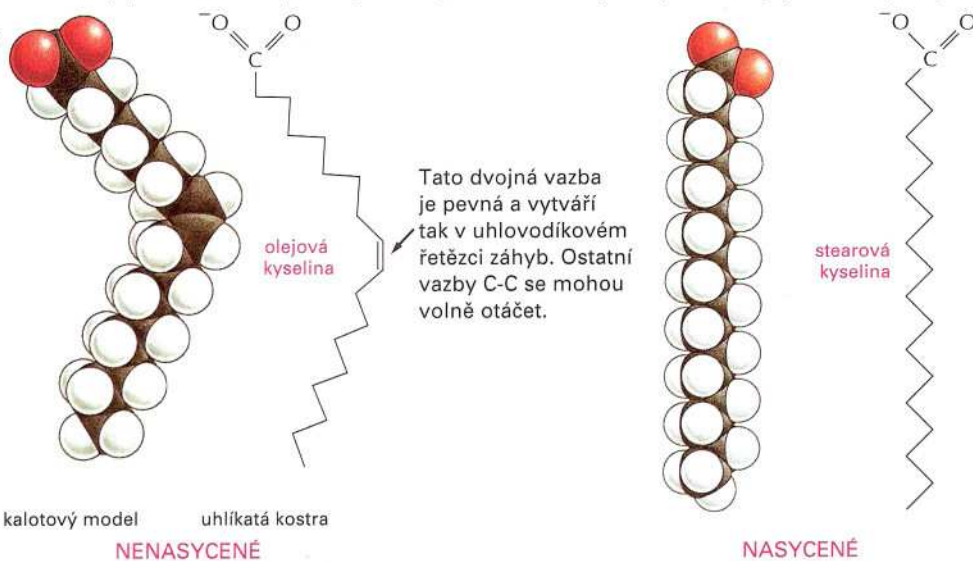


BĚŽNÉ MASTNÉ KYSELINY

Toto jsou karboxylové kyseliny s dlouhými uhlovodíkovými konci

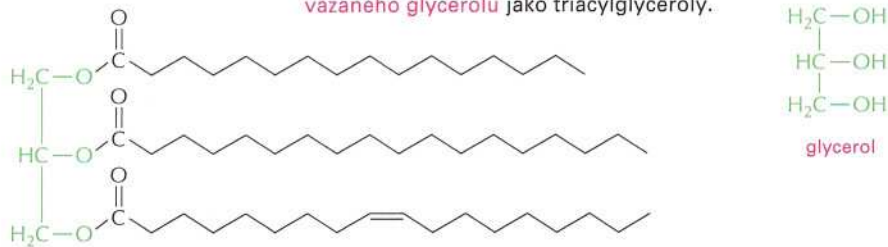


Stovky různých mastných kyselin se vyskytují v přírodě. Některé z nich obsahují jednu nebo více dvojných vazeb a nazýváme je **nenasyčené**. Mastné kyseliny bez dvojných vazeb jsou pak **nasyčené**.



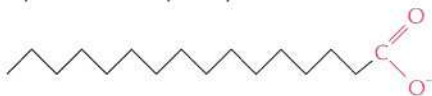
TRIACYLGLYCEROLY

Mastné kyseliny se ukládají jako energetická rezerva (tuky a oleje) ve formě estericky vázaného glycerolu jako triacylglyceroly.



KARBOXYLOVÁ SKUPINA

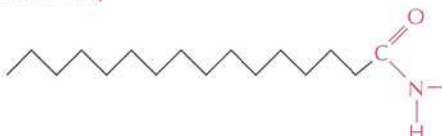
Ve volné formě je karboxylová skupina mastné kyseliny ionizována.



Obvykle je však vázána s dalšími skupinami a tvoří **estery**

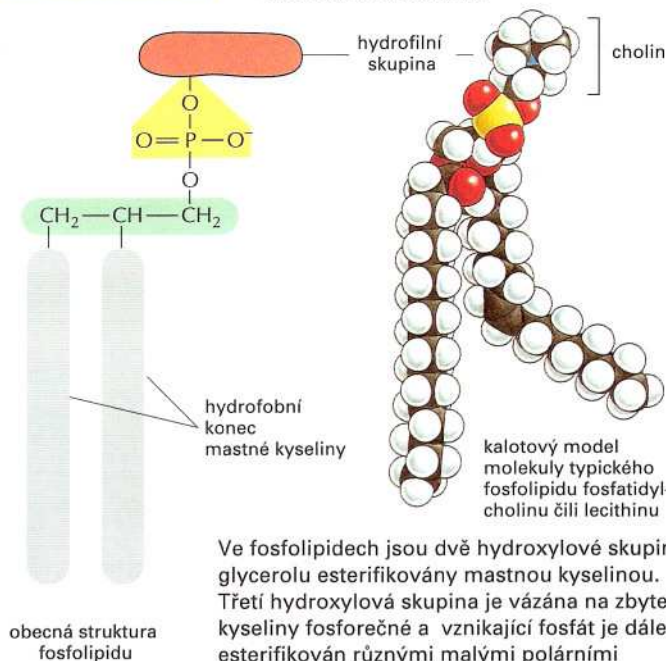


nebo **amidy**



FOSFOLIPIDY

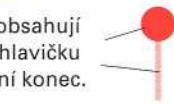
Fosfolipidy jsou hlavní složkou buněčných membrán.



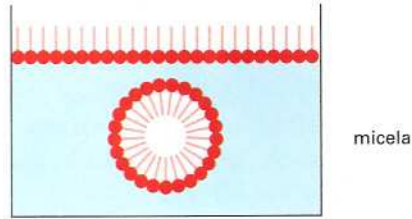
Ve fosfolipidech jsou dvě hydroxylové skupiny glycerolu esterifikovány mastnou kyselinou. Třetí hydroxylová skupina je vázána na zbytek kyseliny fosforečné a vznikající fosfát je dále esterifikován různými malými polárními molekulami, často obsahujícími skupinu —OH.

LIPIDOVÉ AGREGÁTY

Mastné kyseliny obsahují polární hydrofilní hlavičku a hydrofobní nepolární konec.



Ve vodě tvoří povrchovou vrstvu nebo drobné micely

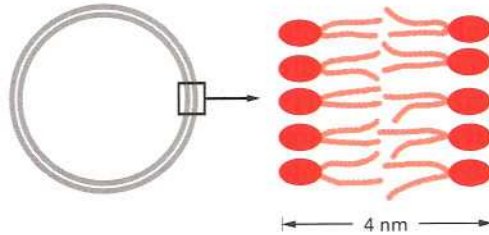


Jejich deriváty pak mohou tvořit větší agregáty udržované pohromadě hydrofobní interakcí.

Triacylglyceroly tvoří velké kulovité kapénky v buněčné cytoplasmě,

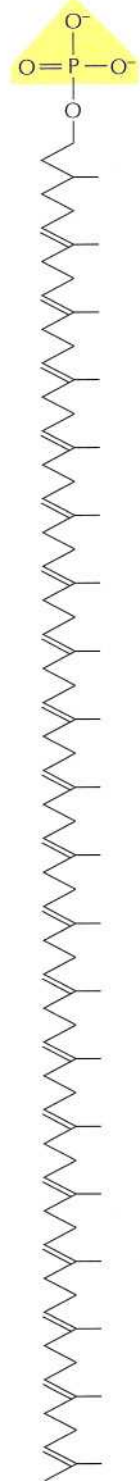


Fosfolipidy a **glykolipidy** tvoří uzavřené dvojné vrstvy, které jsou základem buněčných membrán.



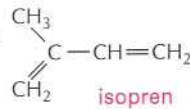
POLYISOPRENOIDY

polymery isoprenu s dlouhým řetězcem



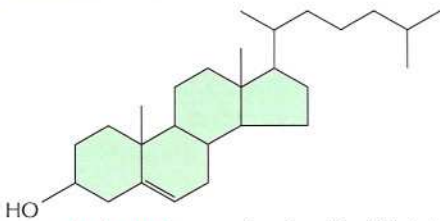
DALŠÍ LIPIDY

Lipidy jsou definovány jako ve vodě nerozpustné molekuly, které se však rozpouštějí v organických rozpouštědlech. Dva běžné typy lipidů jsou vedle fosfolipidů a glykolipidů steroidy a isoprenoidy, složené z isoprenových jednotek.

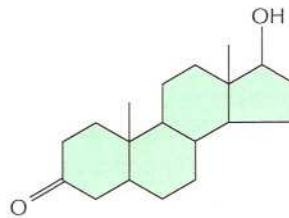


STEROIDY

Steroidy obsahují jednotnou polycyklickou strukturu.



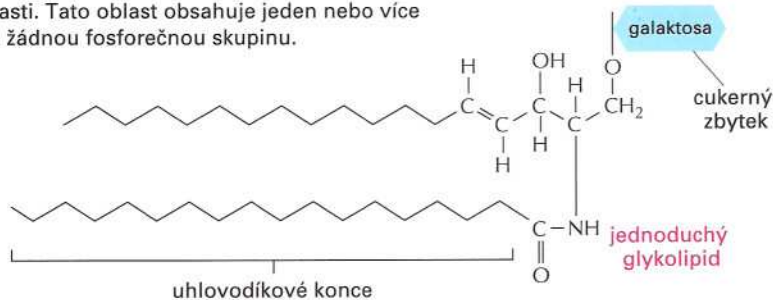
cholesterol se vyskytuje v živočišných membránách



testosteron je mužský pohlavní hormon

GLYKOLIPIDY

Podobně jako fosfolipidy jsou tyto látky složeny z hydrofobní oblasti, obsahující dva dlouhé uhlovodíkové řetězce, a z polární oblasti. Tato oblast obsahuje jeden nebo více zbytků cukrů a žádnou fosforečnou skupinu.



dolicholfosfát, který je používán v buňkách pro přenos aktivovaných cukrů při membránové syntéze glykoproteinů a některých polysacharidů

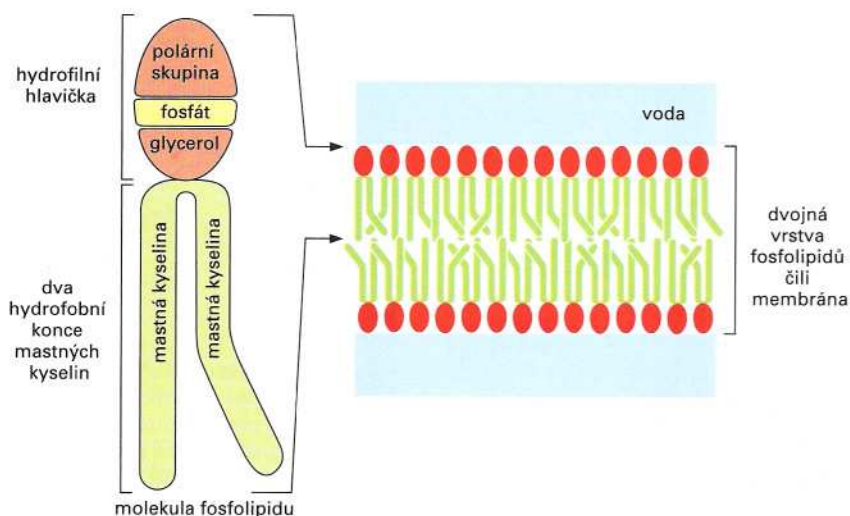
Mastné kyseliny a jejich deriváty, jako např. triacylglyceroly, jsou příklady *lipidů*. Tato třída biologických molekul je volně definovanou sbírkou sloučenin, jejichž obecnými vlastnostmi jsou nerozpustnost ve vodě a rozpustnost v tucích a v organických rozpouštědlech, jako např. v benzenu. Lipidy obvykle obsahují dlouhé uhlovodíkové řetězce, jako v mastných kyselinách a *isoprenoidech*, nebo několik spojených kruhů, jako ve *steroidech* (viz panel 2-4, str. 58-59).

Nejdůležitější funkcí mastných kyselin v buňkách je výstavba buněčných membrán. Tyto tenké vrstvy uzavírají všechny buňky a obklopují jejich vnitřní orgány. Jsou složeny z velké části z *fosfolipidů*, což jsou malé molekuly postavené podobně jako triacylglyceroly hlavně z mastných kyselin a glycerolu. Na rozdíl od triacylglycerolů je však ve fosfolipidech glycerol spojen pouze se dvěma řetězci mastných kyselin. „Třetí“ místo glycerolu je spojeno s hydrofilní fosfátovou skupinou, která je pak připojena k malé hydrofilní složce, již je například cholin (viz panel 2-4). Každá molekula fosfolipidu má proto hydrofobní konec složený ze dvou řetězců mastných kyselin a hydrofilní hlavičku v místě fosfátové skupiny. Proto se fosfolipidy svými fyzikálními a chemickými vlastnostmi liší od triacylglycerolů, které jsou převážně hydrofobní. Molekuly jako fosfolipidy, které mají jak hydrofobní tak hydrofilní oblasti, se nazývají *amfipatické* nebo *amfifilní* (tedy milující oba typy sloučenin, polární i nepolární).

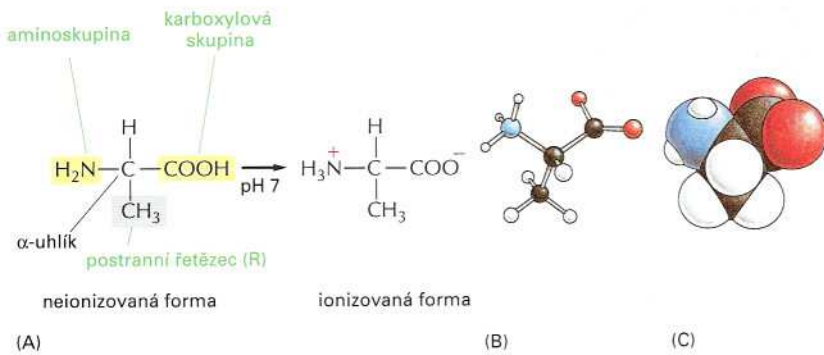
Membránotvorné vlastnosti fosfolipidů plynou z jejich amfipatické povahy. Na hladině vody vytvoří fosfolipidy jednovrstevný film molekul s hydrofobními konci obrácenými do vzduchu a hydrofilními hlavičkami v přímém kontaktu s vodou. Dvě takové vrstvy molekul se mohou ve vodě spojit způsobem „pata k patě“ a vytvořit fosfolipidový sendvič neboli *lipidovou dvojnou vrstvu*, která je základem struktury všech buněčných membrán (obr. 2-18) (probírá se v Kapitole 11).

Aminokyseliny jsou podjednotkami proteinů

Aminokyseliny představují různé třídy molekul s jedinou společnou vlastností: všechny vlastní karboxylovou a aminovou skupinu, přičemž obě skupiny jsou připojeny k jednomu uhlíkovému atomu zvanému uhlík alfa (obr. 2-19). Chemická různorodost spočívá v postran-



Obrázek 2-18 Struktura fosfolipidů a jejich orientace v membráně. Ve vodním prostředí se hydrofobní konce fosfolipidů seskupují, aby vytěsnily vodu, a vzniká dvojná vrstva s hydrofilními hlavičkami fosfolipidů obrácenými do vodního prostředí.



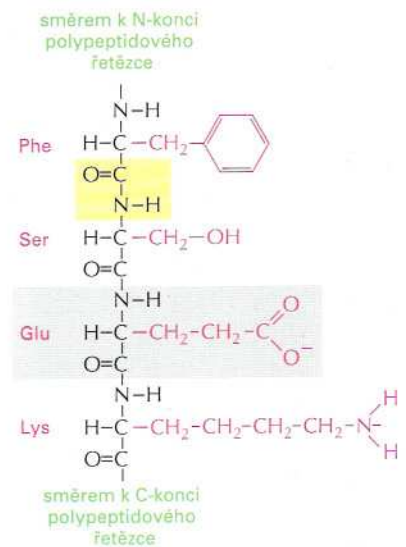
Obrázek 2-19 Aminokyselina alanin. (A) V buňce, kde je pH blízké 7, existují volné aminokyseliny v ionizované formě. Když se však zařadí do polypeptidového řetězce, náboje aminoskupiny a karboxylu zmizí. (B) Kuličkový model a (C) kalotový model alaninu (H bíle, C černě, O červeně, N modře).

ním řetězci, který je také připojen k uhlíku alfa. Důležitost aminokyselin pro buňku plyne z jejich role při tvorbě **proteinů**, což jsou polymery aminokyselin spojených způsobem „hlava k patě“ do dlouhého řetězce, který je potom poskládán do trojrozměrné struktury jedinečné pro každý protein. Kovalentní vazba mezi dvěma sousedními aminokyselinami se jmenuje *peptidová vazba*; řetězec aminokyselin je známý také jako *polypeptid* (obr. 2-20). Nehledě na specifické aminokyseliny, z nichž je sestaven, má polypeptid na jednom konci aminoskupinu ($-\text{NH}_2$) (jeho *N-konec*) a na druhém konci karboxylovou skupinu ($-\text{COOH}$) (jeho *C-konec*). To dodává peptidu určitou směrovou vlastnost – strukturní polaritu (jako protiklad polarity elektrické).

V proteinech se běžně nachází jednadvacet druhů aminokyselin; každá má jinou velikost postranního řetězce připojeného k uhlíku (panel 2-5, str. 62-63). Tato skupina 21 aminokyselin se vyskytuje napříč všemi proteiny od bakterií přes rostliny až k živočichům. Jak došlo k výběru právě těchto jednadvaceti aminokyselin, je jedním z tajemství, která obklopují vývoj života na Zemi; neexistuje žádný zřejmý chemický důvod, proč by stejně dobře nemohly posloužit jiné aminokyseliny. Jakmile však byla tato volba provedena a ustálila se, nelze ji změnit, neboť na ní závisí příliš mnoho.

Podobně jako cukry existují i aminokyseliny s výjimkou glycinu jako optické izomery, ve formách D a L (viz panel 2-5). V proteinech však byly zatím nalezeny jen formy L (ačkoli D-aminokyseliny se vyskytují jako části bakteriálních stěn a v některých antibiotikách). Původ tohoto výlučného použití L-aminokyselin při tvorbě proteinů je dalším tajemstvím evoluce.

Chemická rozmanitost, kterou tyto aminokyseliny skýtají, je životně důležitá pro funkce proteinů. Pět z 21 aminokyselin má postranní řetězce, které mohou v roztoku tvořit ionty, a tedy mohou nést náboj. Ostatní postranní řetězce zůstávají nenabitě; některé jsou polární a hydrofilní, jiné nepolární a hydrofobní (viz panel 2-5; v panelu chybí selenocystein Sec, v němž je atom S cysteinu nahrazen atomem Se). Jak probereme v Kapitole 5, jsou souborné vlastnosti postranních řetězců aminokyselin základem všech rozmanitých a rafinovaných funkcí proteinů.



Obrázek 2-20 Malá část molekuly proteinu. Čtyři zde ukázané aminokyselinové zbytky jsou spojeny třemi peptidovými vazbami; jedna z nich je zvýrazněna žlutě. Jedna z aminokyselin je šedě stínována. Postranní řetězce aminokyselin jsou vypsány červeně. Oba konce polypeptidového řetězce se navzájem liší. Na jednom konci je aminoskupina (N-konec), na druhém konci je karboxylová skupina (C-konec).

Otázka 2-6 Proč jsou podle vás pro tvorbu proteinů využívány jen L-aminokyseliny a ne náhodná směs forem L a D od každé aminokyseliny?

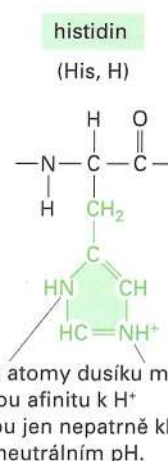
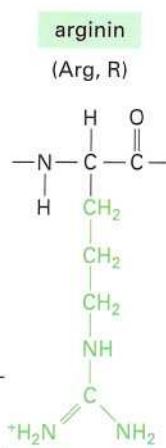
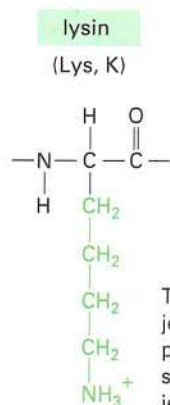
RODINY AMINOKYSELIN

Běžné aminokyseliny můžeme rozdělit do skupin podle toho, zda jejich postranní řetězec je

kyselý
zásaditý
nenabitý polární
nepolární

Následujících 20 aminokyselin je označeno třípísmenným a jednopísmenným symbolem, například alanin = Ala = A.

ZÁSADITÉ POSTRANNÍ ŘETĚZCE

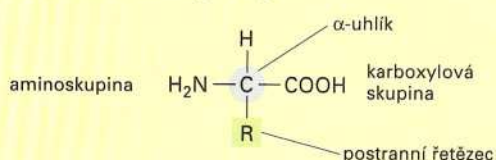


Tato skupina je velmi bazická, protože její struktura je stabilizována rezonancí.

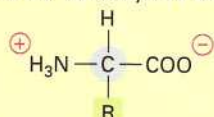
Tyto atomy dusíku mají poměrně nízkou afinitu k H⁺ a jsou jen nepatrně kladné při neutrálním pH.

AMINOKYSELINA

Obecný vzorec aminokyselin je

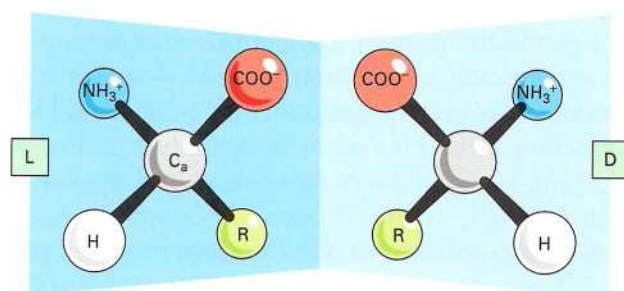


R je obecně jeden z postranních řetězců. Při neutrálním pH jsou jak aminoskupina tak karboxylová skupina ionizovány.



OPTICKÉ ISOMERY

α-Uhlík je tu asymetrický, což umožňuje existenci dvou zrcadlových struktur aminokyseliny (s výjimkou glycinu), které se nazývají D- a L-isomery.

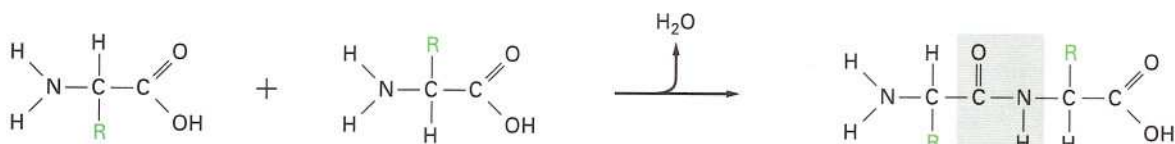


Proteiny obsahují výlučně L-aminokyseliny.

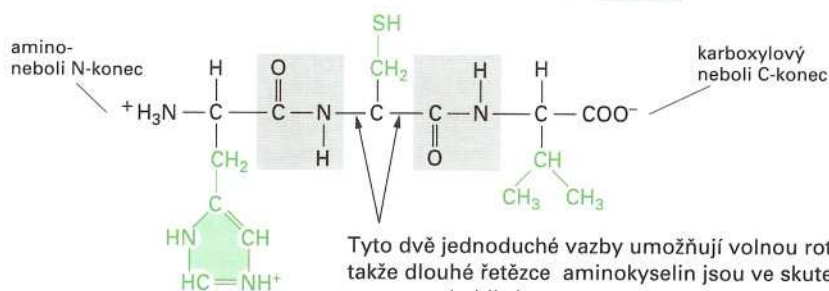
PEPTIDOVÁ VAZBA

Aminokyseliny jsou běžně pospojovány amidovou vazbou, který se nazývá peptidová.

Peptidová vazba. Čtyři atomy na šedém pozadí tvoří velmi pevnou planární strukturu bez jakékoli rotace kolem vazby C-N.

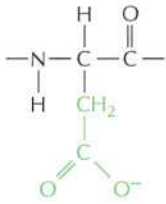


Proteiny jsou dlouhé polymery složené z různých aminokyselin spojených peptidovou vazbou a vždy se popisují s N-koncem vlevo. Ukázaná sekvence tripeptidu (vpravo) je His-Cys-Val.

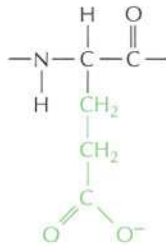


KYSELÉ POSTRANNÍ ŘETĚZCE

asparagová kyselina
(Asp, D)

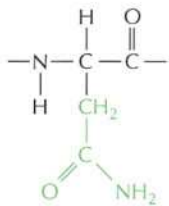


glutamová kyselina
(Glu, E)

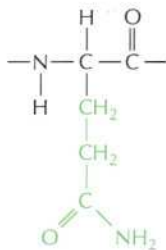


NENABITÉ POLÁRNÍ POSTRANNÍ ŘETĚZCE

asparagin
(Asn, N)

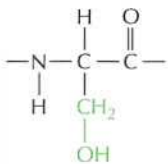


glutamin
(Gln, a Q)

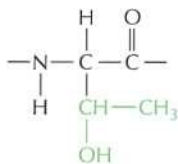


Ačkoli při neutrálním pH není amidový dusík nabitý, je polární.

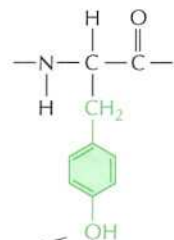
serin
(Ser, S)



threonin
(Thr, T)



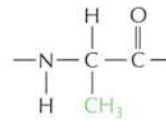
tyrosin
(Tyr, Y)



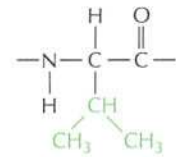
Hydroxylová skupina je polární

NEPOLÁRNÍ POSTRANNÍ ŘETĚZCE

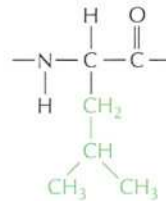
alanin
(Ala, A)



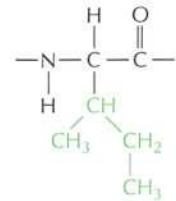
valin
(Val, V)



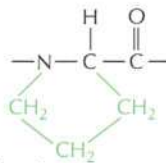
leucin
(Leu, L)



isoleucin
(Ile, I)

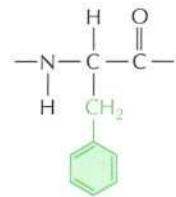


prolin
(Pro, P)

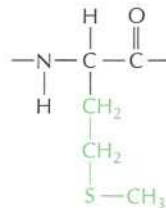


ve skutečnosti jde o imino-skupinu

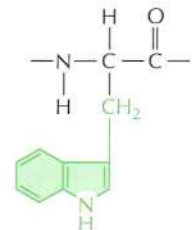
fenylalanin
(Phe, F)



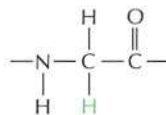
methionin
(Met, M)



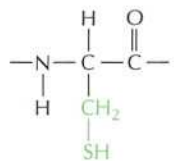
tryptofan
(Trp, W)



glycin
(Gly, G)

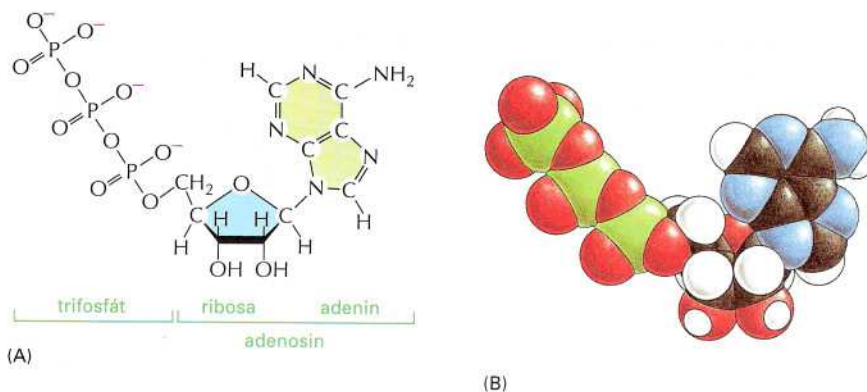


cystein
(Cys, C)



Disulfidové můstky se mohou tvořit mezi vzdálenými zbytky cysteinu.



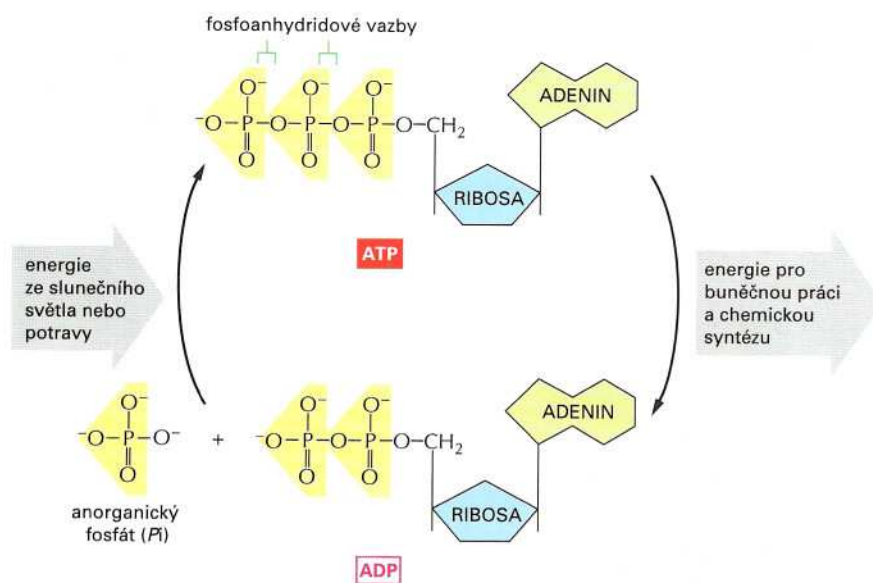


Obrázek 2-21 Chemická struktura adenosinotrifosfátu (ATP). (A) Strukturální vzorec. (B) Kalotový model. V části (B) jsou barvy atomů následující: C černě, N modře, H bíle, O červeně a P zeleně.

Nukleotidy jsou podjednotkami DNA a RNA

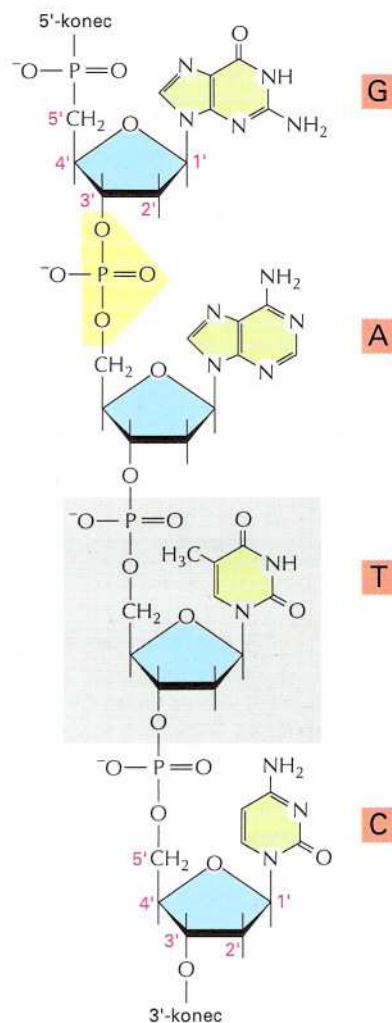
Nukleotid je molekula složená z kruhu obsahujícího dusík a z pětiuhlíkatého cukru. Tímto cukrem je buď ribosa nebo 2-deoxyribosa, která nese jednu či více fosfátových skupin (panel 2-6, str. 66-67). Nukleotidy obsahující ribosu jsou známy jako ribonukleotidy, zatímco nukleotidy obsahující deoxyribosu jsou známy jako deoxyribonukleotidy. Kruhům obsahujícím dusík se z historických důvodů obecně říká *báze*: v kyselém prostředí může každý z nich vázat H^+ (proton), a tak zvyšovat koncentraci iontů OH^- ve vodném roztoku. Mezi různými bázemi existuje značná podobnost. *Cytosin (C)*, *thymin (T)* a *uracil (U)* se nazývají *pyrimidiny*, protože jsou všechny odvozeny od šestičlenného pyrimidinového kruhu; *guanin (G)* a *adenin (A)* jsou *purinové* složky s druhým kruhem s pěti členy, který fúzoval s šestičlenným kruhem. Každý nukleotid se nazývá podle báze, kterou obsahuje (viz panel 2-6).

Nukleotidy mohou zastávat úlohu krátkodobých přenašečů chemické energie. Především ribonukleotid **adenosinotrifosfát** čili ATP (obr. 2-21) se účastní přenosu energie ve stovkách buněčných reakcí. ATP vzniká v reakcích, které jsou poháněny energií uvolněnou oxidačním odbouráním potravy. Jeho tři původně fosfátové skupiny jsou spojeny v řadě dvěma *fosfoanhydridovými vazbami* (viz panel 2-6), jejichž přerušení uvolňuje velké množství užitečné energie. Zvláště



Obrázek 2-22 Molekula ATP slouží v buňkách jako přenašeč energie. Energeticky náročná (endergonická) tvorba ATP z ADP a z anorganického fosfátu je spřažena s exergonickou oxidací potravy (v živočišných buňkách, houbách a některých bakteriích) nebo se zachycováním světla v buňkách rostlin a v některých bakteriích. Hydrolýza tohoto ATP zpět na ADP a anorganický fosfát poskytuje energii k pohonu mnoha reakcí v buňce.

Obrázek 2-23 Krátký úsek jednoho z vláken molekuly deoxyribonukleové kyseliny (DNA) se všemi čtyřmi nukleotidovými zbytky. Jedna z fosfodiesterových vazeb, které spojují sousední nukleotidové zbytky, je zvýrazněna žlutě, a jeden z nukleotidů je uzavřen do šedého rámečku. Nukleotidy jsou spojeny dohromady fosfodiesterovou vazbou mezi specifickými uhlíkovými atomy ribosy – atomy 5' a 3'. Z tohoto důvodu bude mít polynukleotidový řetězec na svém 5'-konci volnou fosfátovou skupinu a na 3'-konci polynukleotidu bude volná hydroxylová skupina. Lineární sekvence nukleotidových zbytků v polynukleotidovém řetězci se obvykle zapisuje zkráceně jednopísmenným kódem a čte se vždy od konce 5'. Sekvence v uvedeném příkladu je G-A-T-C.



koncová fosfátová skupina se často hydrolyticky odštěpuje, přičemž často přenáší fosfát na jiné molekuly a uvolňuje energii, která pohání endogenní biosyntetické reakce po celé buňce (obr. 2-22). Jiné deriváty nukleotidů slouží jako přenašeče dalších chemických skupin, jak bude popsáno v Kapitole 3.

Základní úlohou nukleotidů v buňce je však uložení a opětné vyvolání biologické informace. Nukleotidy slouží jako stavební bloky pro konstrukci *nukleových kyselin* - dlouhých polymerů, ve kterých jsou nukleotidové podjednotky kovalentně spojeny prostřednictvím *fosfodiesterové vazby* mezi fosfátovou skupinou připojenou k cukru jednoho nukleotidu a hydroxylovou skupinou cukru z následujícího nukleotidu. Řetězce nukleových kyselin jsou syntetizovány z energeticky bohatých nukleosidtrifosfátů kondenzační reakcí, při níž se během tvorby fosfodiesterové vazby uvolňuje anorganický difosfát.

Existují dva hlavní druhy nukleových kyselin, které se liší typem cukru ve své sacharido-fosfátové páteři. Ty, které obsahují cukr *ribosu*, jsou známy jako **ribonukleové kyseliny** neboli *RNA* (*ribonucleic acid*) a zahrnují báze A, G, C a U. Ty nukleové kyseliny, jejichž sacharido-fosfátová páteř obsahuje *deoxyribosu* (ve které je hydroxyl v poloze 2' ribosy nahrazen vodíkem, viz panel 2-6), jsou známy jako **deoxyribonukleové kyseliny** neboli *DNA* (*deoxyribonucleic acid*) a obsahují báze A, G, C a T (T je chemicky podobný U v RNA) (obr. 2-23). RNA se v buňkách obvykle vyskytuje jako malý polynukleotidový řetězec, zatímco DNA existuje téměř vždy jako dvouvláknová molekula složená ze dvou polynukleotidových řetězců, přičemž tyto řetězce mají vůči sobě opačný směr (jsou antiparalelní) a drží pohromadě vodíkovými můstky mezi bázemi obou řetězců.

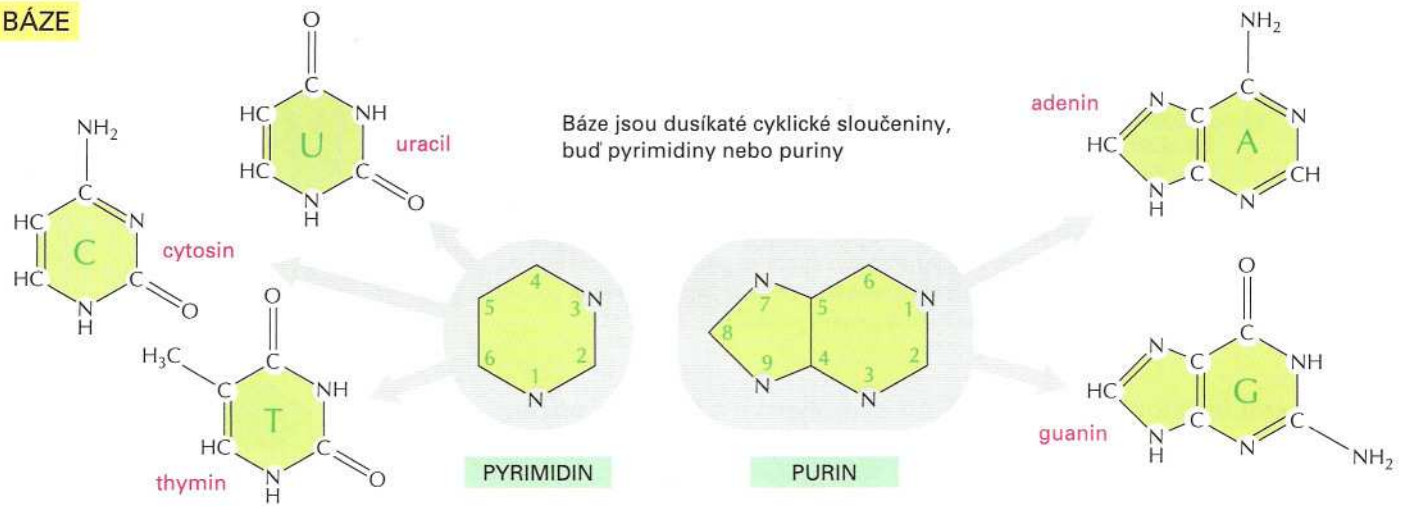
Lineární pořadí nukleotidů v DNA či v RNA kóduje genetickou informaci buňky. Schopnost bází v různých nukleových kyselinách rozpoznávat jiné báze a utvářet s nimi páry pomocí vodíkových můstků (*párování bází*; vždy G s C a A s T nebo U) je základem dědičnosti a evoluce a je vysvětlena v kapitolách 7 a 8.

Makromolekuly obsahují specifické sekvence podjednotek

Z hlediska hmotnosti jsou makromolekuly zdaleka nejhojnějšími uhlíkatými molekulami v živé buňce (obr. 2-24). Jsou základními stavebními bloky, z nichž je konstruována buňka, a také složkami, které propůjčují živým věcem nejrůznější vlastnosti. Makromolekuly v buňkách jsou polymery vzniklé pouhým kovalentním spojením malých organických molekul (zvaných *monomery* či *podjednotky*) do dlouhých řetězců (obr. 2-25). Mají však řadu neočekávaných vlastností,

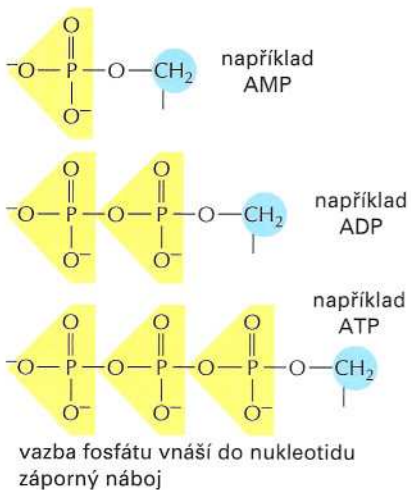
Otázka 2-7 Co se myslí „polaritou“ polypeptidového řetězce a „polaritou“ chemické vazby? Jak se tyto dva významy liší?

BÁZE



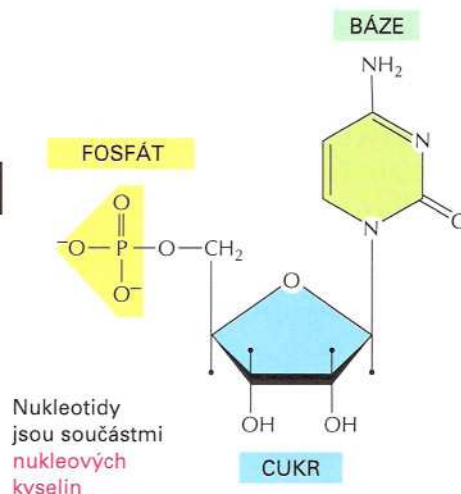
FOSFÁTY

Fosfáty jsou obvykle připojeny k hydroxylové skupině na uhlíku C5 ribosy nebo deoxyribosy. Běžné jsou mono-, di- a trifosfáty.



NUKLEOTIDY

Nukleotid se skládá z dusíkaté báze, pětiuhlíkatého cukerného zbytku a jedné nebo více fosforylových skupin.



ZÁKLADNÍ VAZBY CUKRŮ

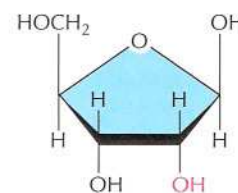


CUKRY

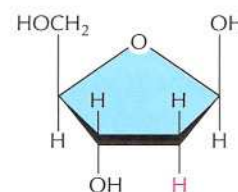
PENTOSA
pětiuhlíkatý cukr

Každý číslovaný atom uhlíku v cukerném zbytku v nukleotidu se označuje znakem pro stopu ('), tedy 5'; česky se říká "pět s čárkou".

vyskytují se dva druhy



D-ribosa
v ribonukleových kyselinách



2-deoxy-D-ribosa
v deoxyribonukleových kyselinách

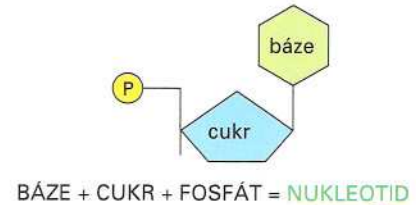
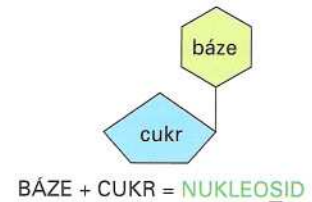
NÁZVOSLOVÍ

Názvy mohou být matoucí, ale zkratky jsou jasné.

BÁZE	NUKLEOSID	ZKRATKA
adenin	adenosin	A
guanin	guanosin	G
cytosin	cytidin	C
uracil	uridin	U
thymin	thymidin	T

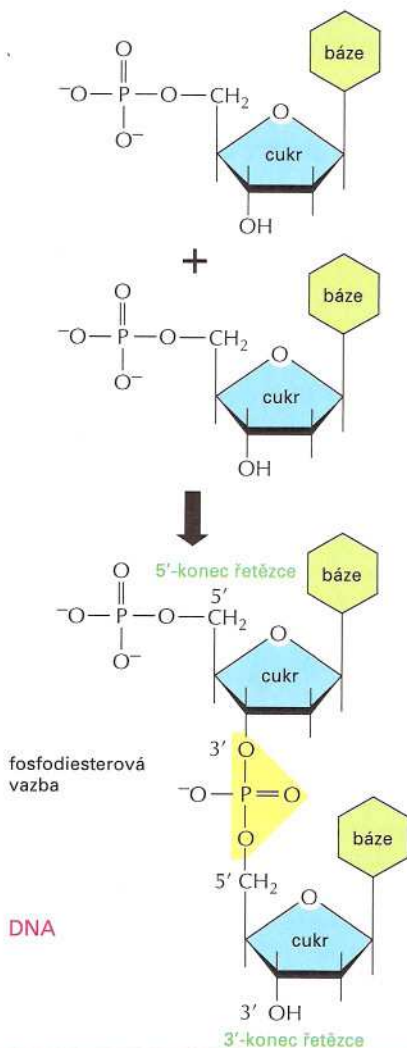
Nukleotidy se zkracují třemi velkými písmeny. Uvedme několik příkladů:

AMP = adenosinmonofosfát
 dAMP = deoxyadenosinmonofosfát
 UDP = uridindifosfát
 ATP = adenosintrifosfát



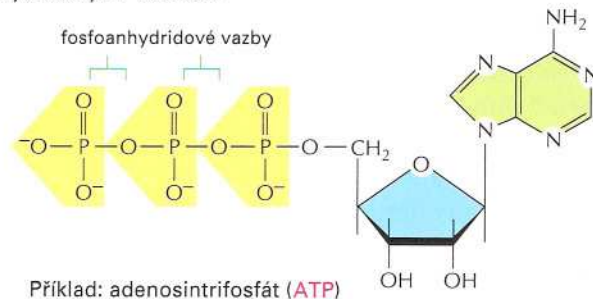
NUKLEOVÉ KYSELINY

Nukleotidy jsou navzájem spojeny **fosfodiesterovou vazbou** mezi uhlíky 5' a 3', a tvoří tak nukleovou kyselinu. Lineární sled nukleotidů v řetězci nukleové kyseliny se obvykle nazývá sekvence a označuje se jednopísmenným kódem, například A-G-C-T-T-A-C-A, s 5'-koncelem vlevo.

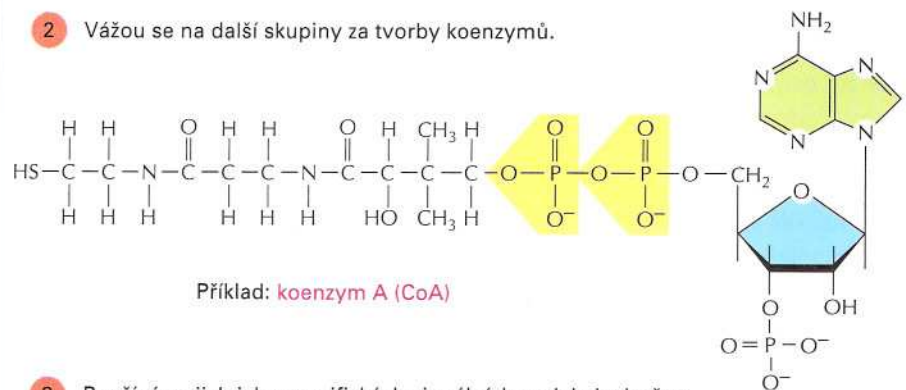


NUKLEOTIDY PLNÍ MNOHO DALŠÍCH FUNKCÍ

- 1 Přenášejí chemickou energii ve svých snadno hydrolyzovatelných fosfoanhydridových vazbách.

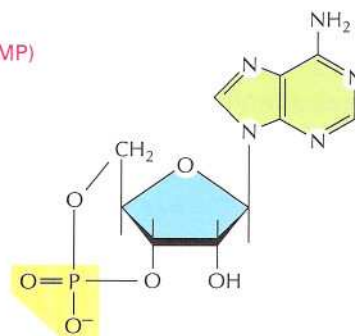


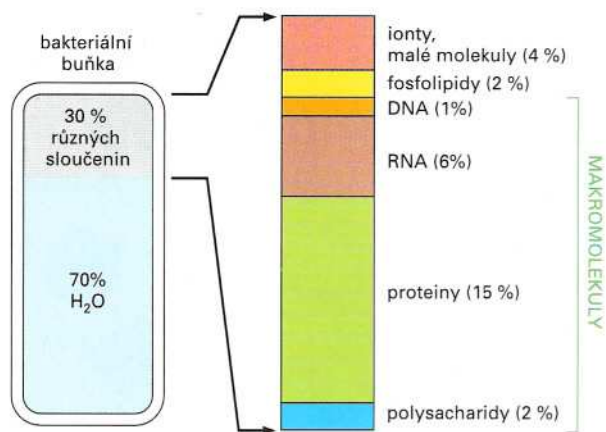
- 2 Váží se na další skupiny za tvorby koenzymů.



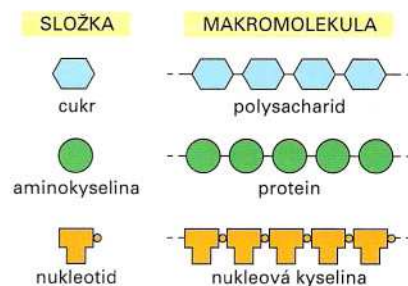
- 3 Používá se jich jako specifických signálních molekul v buňce.

Příklad: cyklický AMP (cAMP)





Obrázek 2-24 Makromolekuly jsou v buňkách hojně zastoupeny. Obrázek ukazuje přibližné složení bakteriální buňky. Složení živočišné buňky je podobné (viz také Tabulka 2-3, str. 53).

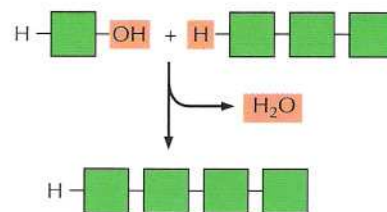


Obrázek 2-25 Tři skupiny makromolekul. Každá z těchto makromolekul je vytvořena z malých molekul spojených kovalentními vazbami.

kteří nelze předvídat jen podle jejich jednoduchých složek. Například molekuly DNA a RNA (nukleové kyseliny) skladují genetickou informaci a předávají ji dále.

Proteiny jsou zvláště rozmanité a v buňkách plní tisíce funkcí. Mnoho proteinů funguje jako enzymy a katalyzuje potřebné reakce v buňce: například všechny reakce, při nichž buňky získávají energii z potravy, jsou katalyzovány enzymy na bázi proteinů a v chloroplastech rostlin sídlí enzym zvaný ribulosobifosfátcarboxyláza, který přeměňuje CO_2 na sacharidy. Další proteiny jsou zapotřebí ke stavbě strukturních komponent, např. tubulinu – proteinu, který se sám spojuje do dlouhých útvarů zvaných mikrotubuly (viz obr. 1-20). Dalším příkladem jsou histony – proteiny, které spojují jednotlivé smyčky DNA, a tak pomáhají jejímu kompaktnímu uložení v chromosomech. Ještě další proteiny fungují jako molekulární motory, které převádějí energii v pohyb jako v případě myosinu ve svalu. Proteiny mohou mít i celou řadu dalších funkcí a my řadu z nich v této knize postupně prozkoumáme. Zde probereme některé obecné principy makromolekulární chemie, díky kterým jsou takové funkce možné.

Ačkoli se přidávání podjednotek k polymerům proteinů, nukleových kyselin a polysacharidů v detailech po chemické stránce liší, mají tyto reakce důležité společné znaky. Každý polymer roste přidáváním monomerů ke konci řetězce *kondenzační reakcí*, v níž se při každém přidání nového monomeru uvolní molekula vody (obr. 2-26; viz též obr. 2-16). Ve všech případech jsou tyto reakce katalyzovány enzymy, které zajišťují přidávání monomerů jen vhodného typu. Postupná polymerace monomerů do dlouhého řetězce představuje jednoduchý způsob, jak vyrobit velkou a složitou molekulu, neboť podjednotky jsou přidávány ve stejné reakci mnohokrát stejným souborem enzymů. V tomto smyslu celý děj připomíná práci stroje v továrně – kromě jedné důležité věci. Kromě několika polysacharidů jsou makromolekuly sestaveny ze souboru podjednotek, které se navzájem jen málo liší. Příkladem je 21 aminokyselin, z nichž jsou vytvořeny proteiny (viz panel 2-5, str. 62-63). Nejdůležitějším faktem však je, že podjednotky se do polymerových řetězců nepřidávají náhodně, nýbrž v přesně daném pořadí – vzniká přesná **sekvence** těchto podjednotek v polymeru.



Obrázek 2-26 Obecná reakce vzniku makromolekuly. V kondenzační reakci se při přidání každé podjednotky k rostoucímu konci polymeru uvolní molekula vody. Obrácená reakce – odbourání všech tří typů polymerů – nastává za spotřeby molekul vody z okolí (hydrolyza).

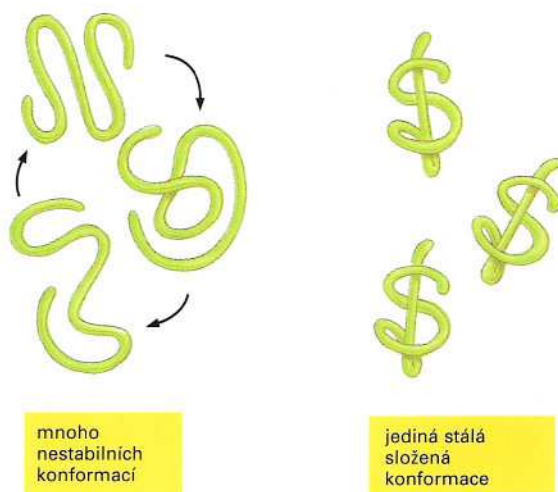
Mechanismy, které určují sekvenci u polymerů v buňce, jsou probírány v kapitolách 6 a 7. Tyto mechanismy hrají v biologii ústřední roli, neboť biologická funkce proteinů, nukleových kyselin a mnoha polysacharidů je zcela závislá na každé jednotlivé sekvenci podjednotek v lineárním řetězci. Možnost záměny pořadí podjednotek je základem nesmírné rozmanitosti polymerních molekul, které tak mohou vzniknout. Tak pro řetězec proteinu o 200 aminokyselinách existuje 21^{200} možných kombinací ($21 \times 21 \times 21 \times 21 \dots$ násobeno dvěštkrát), zatímco pro molekulu DNA dlouhou 10 000 nukleotidů (což je mezi jinými DNA poměrně malá molekula) se 4 různými nukleotidy existuje $4^{10\,000}$ různých možností, což je zcela nepředstavitelný počet. Kdyby se $4^{10\,000}$ molekul DNA položilo vedle sebe (nikoli za sebou), zabraly by vzdálenost přibližně 15 průměrů známého vesmíru. Proto musí být sled polymeračních reakcí podřízen citlivému ovládnutí, které přesně určuje, která podjednotka má být přidána jako další k rostoucímu polymeru.

Otázka 2-9 Existuje celá řada různých, chemicky odlišných způsobů, jak spojit malé molekuly do polymerů. Například ethen s malými molekulami $\text{CH}=\text{CH}$ se obchodně využívá k výrobě plastického polyethylenu ($\dots\text{-CH-CH-CH-CH-CH-CH}\dots$). Jednotlivé podjednotky tří hlavních tříd biologických makromolekul jsou však všechny spojovány podobným reakčním mechanismem, tj. kondenzační reakcí za uvolnění vody. Můžete odhadnout, jaký prospěch přináší právě tato chemická cesta a proč mohla být vybrána během evolučního procesu?

Nekovalentní vazby určují přesný tvar makromolekuly

Většina jednoduchých kovalentních vazeb v makromolekule umožňuje otáčení spojených atomů, takže řetězec polymeru je značně ohebný. V podstatě to makromolekule umožňuje nabývat téměř neomezeného počtu tvarů neboli **konformací** podle toho, jak se řetězec polymeru náhodně ohýbá a stáčí vlivem tepelné energie. Tvar většiny biologických molekul je však dosti přesně vymezen díky slabším **nekovalentním vazbám**, které se tvoří mezi různými částmi molekuly. Pokud tyto slabší **nekovalentní** vazby vzniknou v dostatečném počtu, zabrání náhodným pohybům a polymerový řetězec potom může upřednostňovat jednu určitou konformaci danou lineární sekvencí monomerů v polymeru. Všechny molekuly proteinů a mnoho malých molekul RNA, které byly nalezeny v buňkách, se skutečně skládalo do těsného uspořádání tímto způsobem (obr. 2-27).

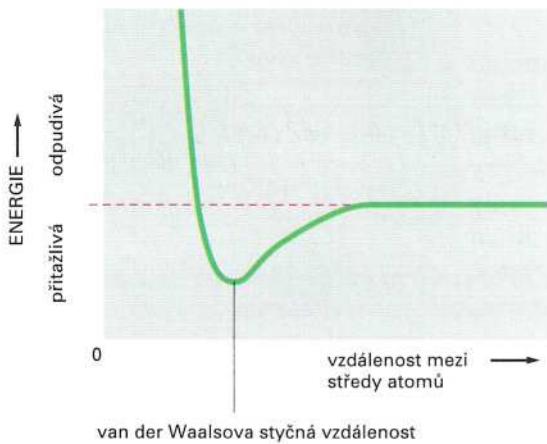
Nekovalentní vazby důležité v biologických molekulách zahrnují dva druhy vazeb popsané dříve v této kapitole – iontové vazby a vodíkové můstky. Třetím typem slabých vazeb jsou *van der Waalovy síly*, což je elektrostatické přitahování vyvolané fluktuací elektrického náboje, ke které dochází, jakmile se dva atomy přiblíží na velmi krátkou vzdálenost. Všechny tyto nekovalentní síly jsou popsány v panelu 2-7 (str. 70-71).



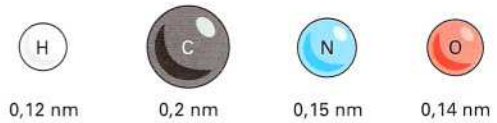
Obrázek 2-27 Většina proteinů a mnoho molekul RNA se skládá do své **jediné stálé konformace**. Při přerušení slabých vazeb udržujících tuto stálou konformaci se molekula stane ohebným řetězcem, který nemá žádnou biologickou hodnotu.

VAN DER WAALSOVY SÍLY

Na velmi krátké vzdálenosti vykazují kterékoli dva atomy slabou vazebnou interakci díky pohyblivým elektrickým nábojům. Pokud se však atomy dostanou do velmi těsné blízkosti, velmi silně se odpuzují.



Každý atom má svůj charakteristický „rozměr“, tzv. **van der Waalsův poloměr**; kontaktní vzdálenost mezi dvěma atomy je součtem jejich van der Waalsových poloměrů.



Dva atomy se přitahují van der Waalsovou silou až do vzdálenosti dané jejich van der Waalsovými poloměry. I když tyto interakce mohou být jednotlivě velmi slabé, **van der Waalsova přitažlivost** se může stát významnou silou, jestliže se dva povrchy makromolekul dostanou do těsného kontaktu.

SLABÉ CHEMICKÉ VAZBY

Organické molekuly mohou interagovat s jinými molekulami nekovalentními vazbami, působícími na krátkou vzdálenost.

slabá vazba

Slabé chemické vazby reprezentují přibližně 5 % silné kovalentní vazby. Jsou však dostatečně silné, jestliže se jich účastní více najednou.

VODÍKOVÉ MŮSTKY

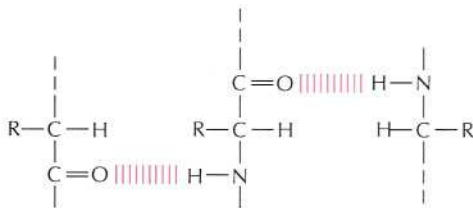
Jak už bylo popsáno v panelu 2-2, **vodíkové vazby** či **můstky** se tvoří, jestliže se atom vodíku dostane mezi dva elektroaktivní atomy (obvykle kyslík nebo dusík).

Vodíkové můstky jsou nejpevnější, jestliže jsou všechny tři atomy v jedné linii.

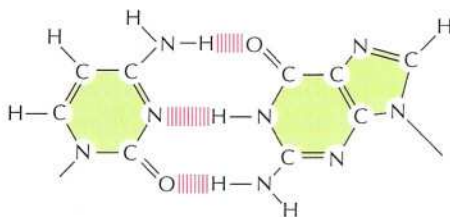


Příklady nacházíme v makromolekulách:

aminokyseliny v polypeptidových řetězcích

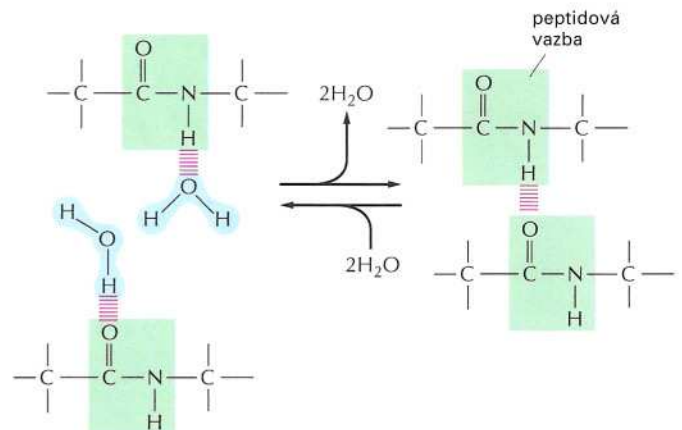


dvě báze, G a C, v DNA nebo v RNA

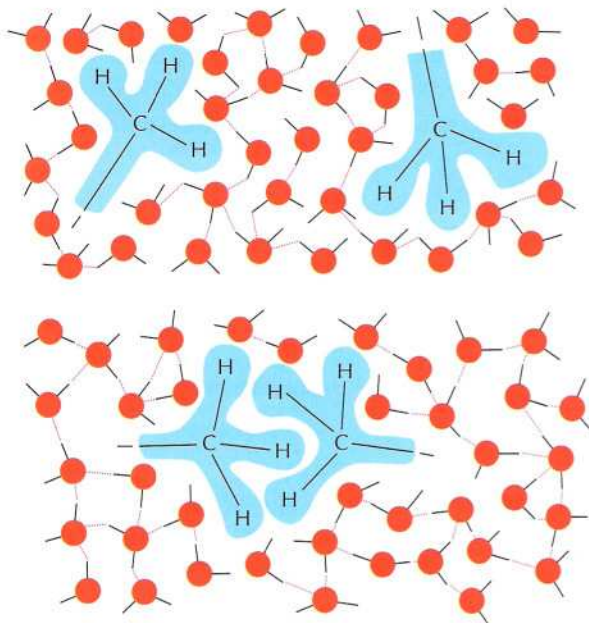


VODÍKOVÉ MŮSTKY VE VODĚ

Kterékoli molekuly, jež jsou schopny tvořit vodíkové můstky samy se sebou, to mohou činit i s molekulami vody. Díky této soutěži s molekulami vody jsou vodíkové můstky mezi dvěma molekulami rozpuštěnými ve vodě poměrně slabé.



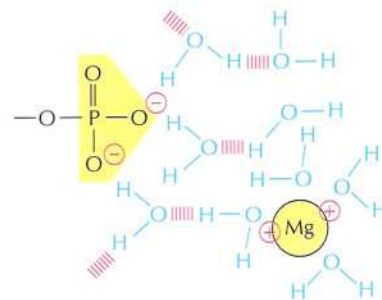
HYDROFOBNÍ INTERAKCE



Voda nutí hydrofobní skupiny, aby se navzájem spojovaly a minimalizovaly tak kontakt s vodou. Hydrofobní skupiny, které jsou tak k sobě tlačeny, jsou vlastně odpuzovány nemožností interakce s okolím; přesto se této „přitažlivostí“ často říká hydrofobní interakce.

IONTOVÉ VAZBY VE VODNÝCH ROZTOCÍCH

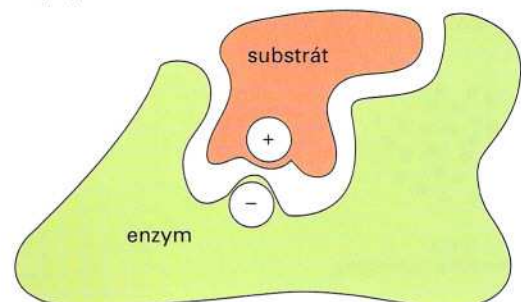
Nabitě skupiny jsou chráněny svými interakcemi s vodou. Proto jsou iontové vazby ve vodě velmi slabé.



Podobně se další ionty v roztoku shlukují kolem nabitých skupin a dále oslabují iontové vazby.

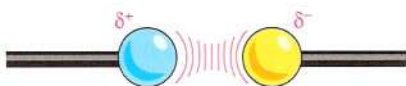


Přes oslabení vodou a solemi jsou iontové vazby velmi důležité v biologických systémech. Enzym, který váže kladně nabitý substrát, má často ve vazebném místě záporně nabitě aminokyselinové zbytky.



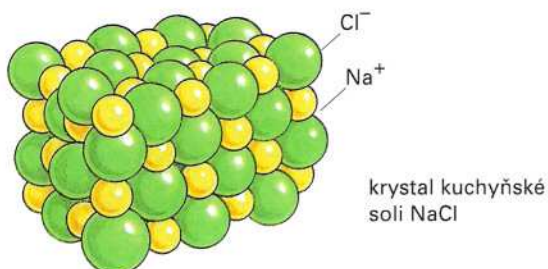
IONTOVÉ VAZBY

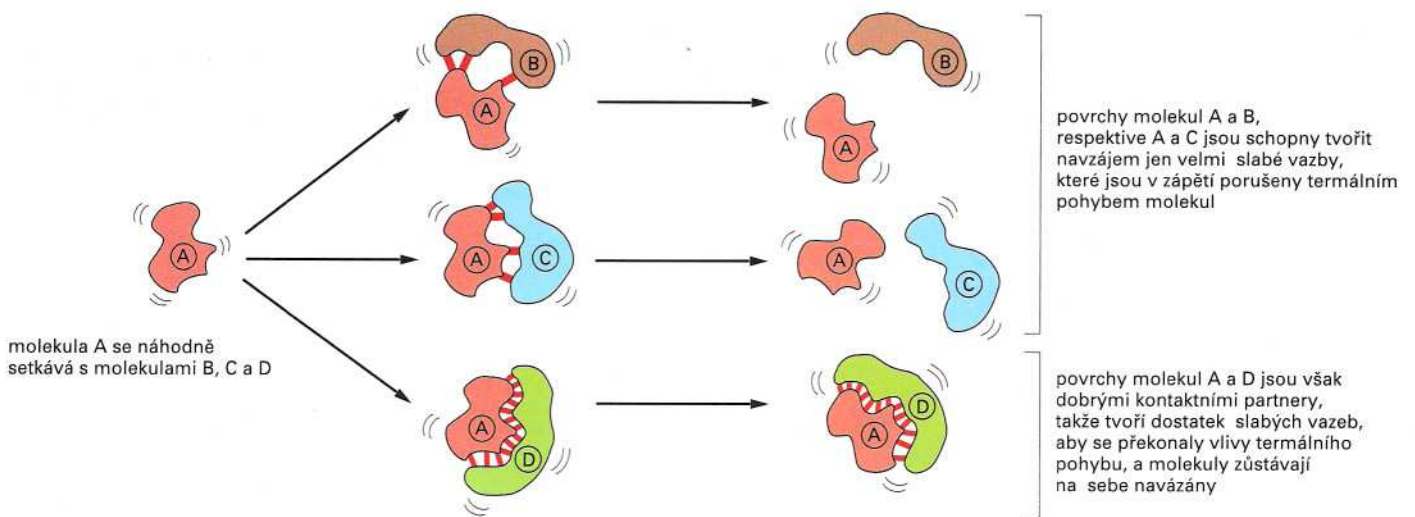
Iontové interakce se vyskytují mezi plně nabitými skupinami (iontová vazba) nebo skupinami s částečným nábojem.



Přitažlivá síla mezi dvěma náboji, δ^+ a δ^- , se prudce zmenšuje se vzdáleností mezi nimi.

V nepřítomnosti vody jsou iontové interakce velmi silné. Zodpovídají za pevnost takových nerostů, jako je mramor nebo achát.





Obrázek 2-28 Jak nekovalentní vazby zprostředkovávají interakce mezi makromolekulami.

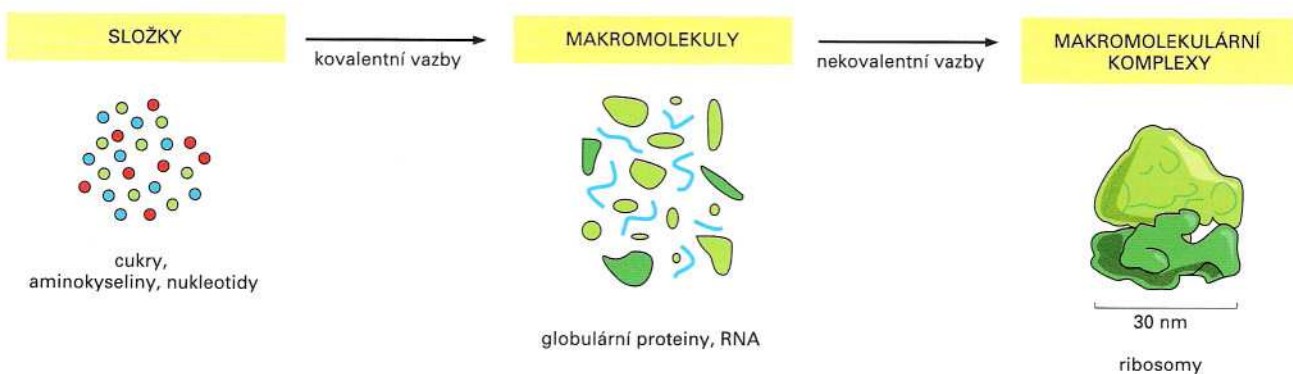
Další nekovalentní síla vzniká díky trojrozměrné struktuře vody, která udržuje hydrofobní skupiny pohromadě, aby neutralizovala jejich rušivý vliv na síť vodních molekul pospojovanou vodíkovými můstky (viz panel 2-7 a panel 2-2, str. 50-51). Toto vytlačování z vodného roztoku dává vznik čtvrtému druhu slabé nekovalentní vazby, zvané *hydrofobní interakce*. Tato interakce udržuje pohromadě fosfolipidové molekuly v membránách buněk a udílí také molekulám většiny proteinů soudržný globulární tvar.

Nekovalentní vazby umožňují molekule vázat další vybrané molekuly

Ačkoli jsou jednotlivé nekovalentní vazby velmi slabé (viz tabulku 2-2, str. 43), mohou se sdružovat a být zdrojem silného přitahování mezi molekulami, pokud se tyto molekuly k sobě hodí jako ruka a rukavice a dostanou se k sobě dostatečně blízko, aby mezi nimi mohlo vzniknout mnoho nekovalentních vazeb (viz panel 2-7, str. 70-71). Tento způsob molekulové interakce přispívá k velké specifitě vazeb makromolekul k ostatním molekulám, neboť kontakt v mnoha bodech, který je pro silnou vazbu potřebný, umožňuje molekulám vybrat si pomocí slabých vazeb vhodného partnera z mnoha tisíc molekul přítomných v buňce. Síla vzájemného přitahování navíc závisí na počtu nekovalentních vazeb, takže je možná interakce velmi značné síly.

Vazby tohoto druhu jsou základem veškeré biologické katalýzy, protože umožňují proteinům fungovat jako enzymy. Nekovalentní vazby mohou také stabilizovat asociaci dvou různých makromolekul, pokud se jejich

Obrázek 2-29 Malé molekuly, proteiny a ribosomy nakreslené v přibližném měřítku. Ribosomy jsou částí aparátu, který buňka používá k výrobě proteinů. Každý ribosom je složen asi z 90 makromolekul (proteiny a molekuly RNA).



povrchy dostatečně přiblíží (obr. 2-28). Tyto vazby tak umožňují použití makromolekul jako stavebních bloků při tvorbě větších struktur. Například proteiny se často vážou do multiproteinových komplexů a vytvářejí důmyslné stroje s mnoha pohyblivými částmi, které plní tak složité úkoly, jakými jsou například replikace DNA a syntéza proteinů (obr. 2-29).

Otázka 2-9 Proč nemohou být k zajištění většiny interakcí makromolekul místo nekovalentních vazeb použity vazby kovalentní?

Základní shrnutí

- Živé buňky se řídí stejnými chemickými a fyzikálními zákony jako neživé věci. Stejně jako všechny ostatní formy látky jsou i ony složeny z atomů, které jsou nejmenšími jednotkami chemických prvků.
- Atomy jsou vytvořeny z malých částic. Jádro atomu obsahuje kladně nabitě protony a elektricky neutrální neutrony. Jádro je obklopeno oblačkem záporně nabitých elektronů.
- Počet elektronů v atomu je stejný jako počet protonů v jádře. Jádra různých izotopů stejného prvku obsahují stejný počet protonů ale různý počet neutronů.
- Živé buňky obsahují jen malý počet prvků, z nichž šest (C, H, N, O, P, S) představuje 99 % jejich hmotnosti.
- Chemické vlastnosti atomu jsou určeny počtem a uspořádáním jeho elektronů. Atom je nejstálejší, když jsou všechny jeho elektrony na svých nejnižších energetických hladinách a když je každá elektronová slupka zcela zaplněna elektrony.
- Chemické vazby mezi atomy vznikají, když se elektrony pohybují od jednoho atomu ke druhému ve snaze dosáhnout stabilnějšího uspořádání. Shluky dvou nebo více atomů držných pohromadě chemickými vazbami jsou známé jako molekuly.
- Když elektron přeskočí z jednoho atomu na druhý, vzniknou dva ionty s opačným nábojem. Vzájemným přitahováním takových nabitých atomů vznikají iontové vazby.
- Kovalentní vazba vzniká při sdílení páru elektronů dvěma sousedními atomy. Jsou-li sdíleny dva páry elektronů, vzniká dvojná vazba.
- Živé organismy obsahují charakteristický a omezený soubor malých uhlíkatých molekul, které jsou v podstatě stejné pro všechny živé druhy. Hlavními kategoriemi těchto látek jsou cukry, mastné kyseliny, aminokyseliny a nukleotidy.
- Cukry jsou pro buňky prvotním zdrojem energie a mohou být zabudovány do polysacharidů jako zásoba energie.
- Mastné kyseliny jsou také důležité pro ukládání energie, ale jejich základní funkcí je tvorba buněčných membrán.
- Polymery skládající se z aminokyselin jsou základem pozoruhodně rozmanitých molekul známých jako proteiny.
- Nukleotidy hrají ústřední roli v přenosu energie a jsou podjednotkami informačních makromolekul RNA a DNA.
- Makromolekuly jsou ve své velikosti a složitosti přechodem mezi malými molekulami a buněčnými organelami.
- Makromolekuly vznikají jako polymery opakovanou kondenzační reakcí. Jejich neobyčejná rozmanitost pramení ze skutečnosti, že každý druh makromolekuly má vlastní jedinečnou sekvenci (pořadí) podjednotek.
- Mezi různými oblastmi makromolekuly vznikají slabé nekovalentní vazby. Ty mohou přimět makromolekulu poskládat se do svého jedinečného trojrozměrného tvaru, jak je to nejlépe vidět u proteinů.

Klíčové pojmy

aminokyselina

atom

atomová hmotnost

ATP

Avogadrova konstanta

báze

DNA

elektron

hydrolýza

hydroxoniový ion

chemická skupina

chemická vazba

ion

iontová vazba

kondenzace

konformace

kovalentní vazba

kyselina

mastná kyselina

molekula

molekulová hmotnost

nekovalentní vazba

nukleotid

pH

polární

protein

proton

RNA

sacharid, cukr

sekvence

vodíkový můstek

3 Energie, katalýza a biosyntéza

Živé tvory téměř zázračně odlišuje od neživé hmoty především jedna vlastnost: vytvářejí a udržují pořádek ve světě, který spěje k čím dál většímu chaosu. Při tvorbě tohoto pořádku musí buňky v živém organismu provádět nikdy nekončící proud chemických reakcí. V některých z těchto reakcí se dělí či pozměňují malé organické molekuly jako aminokyseliny, cukry, nukleotidy a lipidy, aby poskytly celou řadu dalších malých molekul, jež buňka potřebuje. V jiných reakcích se tyto malé molekuly používají při výstavbě nesmírně rozmanité škály proteinů, nukleových kyselin a dalších makromolekul, které obdařují živé systémy jejich rozdílnými vlastnostmi. Na každou buňku se můžeme dívat jako na malou chemickou továrnu, kde se každou sekundu odehrává mnoho tisíc chemických reakcí.

K provádění chemických reakcí pro udržení své vlastní existence potřebuje živý organismus nejen zdroj atomů ve formě molekul živin, ale také zdroj energie. Jak atomy tak energie musí nakonec pocházet z neživého prostředí. V této kapitole probereme, jak buňky získávají energii a jak tuto energii a atomy ze svého okolí používají k vytváření pořádku na molekulární úrovni, který umožňuje život.

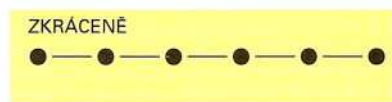
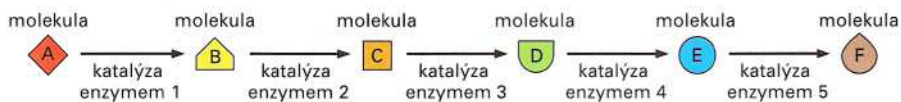
Chemické reakce prováděné buňkou by normálně probíhaly jen při teplotách značně vyšších než uvnitř buňky. Proto každá reakce vyžaduje specifické zvýšení chemické reaktivity. Tento požadavek má zásadní význam, neboť umožňuje buňce ovládat každou chemickou reakci. Buňka ovládá reakce prostřednictvím *enzymů*, z nichž každý urychluje (*katalyzuje*) jen jednu určitou reakci z mnoha možných cest, které reagující molekula může nastoupit. Enzymově katalyzované reakce jsou spojeny za sebou, takže produkt jedné reakce může být výchozí látkou neboli *substrátem* pro reakci následující (obr. 3-1). Tyto dlouhé lineární reakční dráhy se navzájem spojují a vytvářejí labyrint vzájemně propojených reakcí, které buňce umožňují přežít, růst a rozmnožovat se (obr. 3-2).

KATALÝZA A VYUŽITÍ ENERGIE BUŇKAMI

- Biologický pořádek je umožňován uvolňováním tepelné energie z buněk
- Fotosyntetické organismy využívají sluneční světlo k syntéze organických molekul
- Buňky získávají energii oxidací organických molekul
- Oxidace a redukce zahrnuje přenosy elektronů
- Enzymy obcházejí bariéry, které brání průběhu chemických reakcí
- Jak enzymy nacházejí své substráty: důležitost rychlé difuze
- Změna volné energie při reakci určuje, zda reakce může proběhnout
- Na ΔG má vliv koncentrace reaktantů
- Pro následné reakce se hodnoty ΔG° sčítají

AKTIVOVANÉ NOSIČOVÉ MOLEKULY A BIOSYNTÉZA

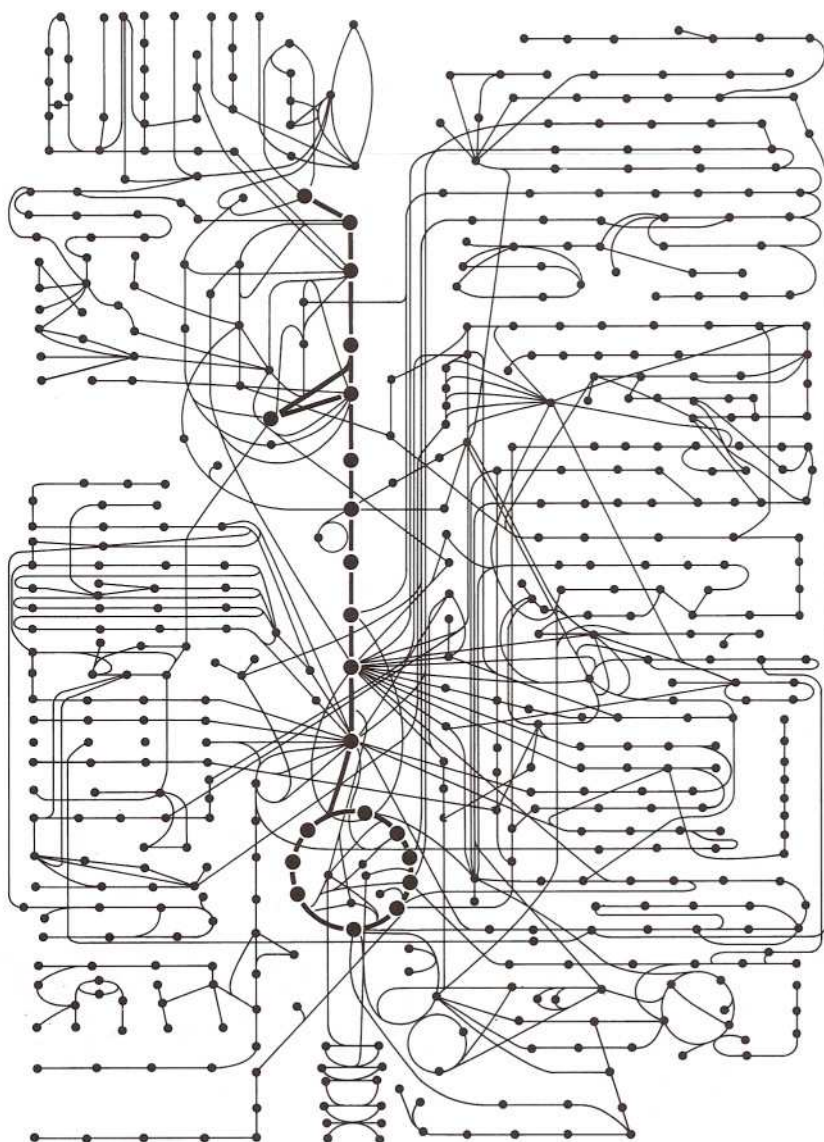
- Tvorba aktivovaného nosiče je spřažena s energeticky výhodnou reakcí
- ATP je nejčastěji užívanou nosičovou molekulou
- Energie uložená v ATP se často využívá ke spojení dvou molekul
- NADH a NADPH jsou důležité přenašeče elektronů
- V buňkách existuje mnoho dalších aktivovaných přenašečových molekul
- Syntéza biologických polymerů vyžaduje přísun energie



V buňkách se vyskytují dva opačné proudy chemických reakcí. (1) *Katabolické* dráhy odbourávají živiny na menší molekuly a při tom vytvářejí užitečnou formu energie pro buňku a některé z malých molekul, které buňka potřebuje jako stavební kameny. (2) *Anabolické* čili *biosyntetické* dráhy používají energii získanou organismem v katabolismu k pohonu syntézy mnoha jiných malých molekul, které tvoří buňku. Společně se oba soubory reakcí označují jako **metabolismus** buňky (obr. 3-3).

Mnoho z těchto reakcí spadá do předmětu *biochemie* a my se jimi nemusíme zabývat. Obecné principy, podle nichž buňky získávají energii ze svého okolí a používají ji k vytváření pořádku, jsou však v buněčné biologii ústředním tématem. V této kapitole jsou tyto principy vyloženy, přičemž na jejím počátku probereme, proč je k udržování živých organismů zapotřebí neustálý přísun energie.

Obrázek 3-1 Jak soubor enzymově katalyzovaných reakcí vytváří metabolickou dráhu. Každý enzym katalyzuje jednu určitou reakci a sám ji opouští nezměněn. V tomto příkladu soubor enzymů působících za sebou mění molekulu A v molekulu F a vytváří metabolickou dráhu.



Obrázek 3-2 Některé z metabolických drah a jejich vzájemná propojení v typické buňce. Na schématu je ukázáno asi 500 běžných metabolických reakcí; každá molekula je v metabolické dráze znázorněna plným kroužkem podobně jako ve žlutém poli na obrázku 3-1.

Obrázek 3-3 Schematické znázornění vztahu mezi katabolickými a anabolickými drahami v metabolismu. Protože se velká část energie uložené v chemických vazbách rozptýlí jako teplo, je hmotnost potravy, kterou potřebuje každý organismus čerpající všechnu svou energii z katabolismu, mnohem větší než hmotnost molekul, které mohou být vytvořeny v anabolismu.

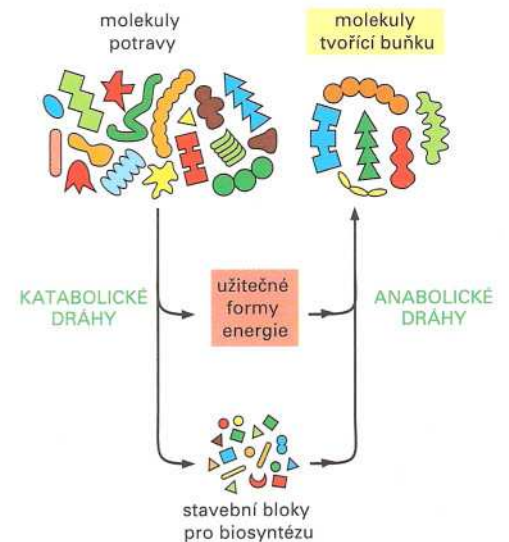
Katalýza a využití energie buňkami

Neživé věci dříve či později dopustí vlastní přechod do stavu chaosu: stavba se rozpadá a mrtvé organismy se rozkládají. Naproti tomu živé buňky nejenže udržují pořádek na každé úrovni, ale dokonce ho samy vytvářejí: od makroskopické stavby motýla či květiny až po uspořádání atomů v molekulách, z nichž se tyto organismy skládají (obr. 3-4). Život může mít tuto vlastnost díky důmyslným buněčným mechanismům, které získávají energii z okolí a převádějí ji na formy, které může buňka využívat k neustálému vytváření biologického pořádku.

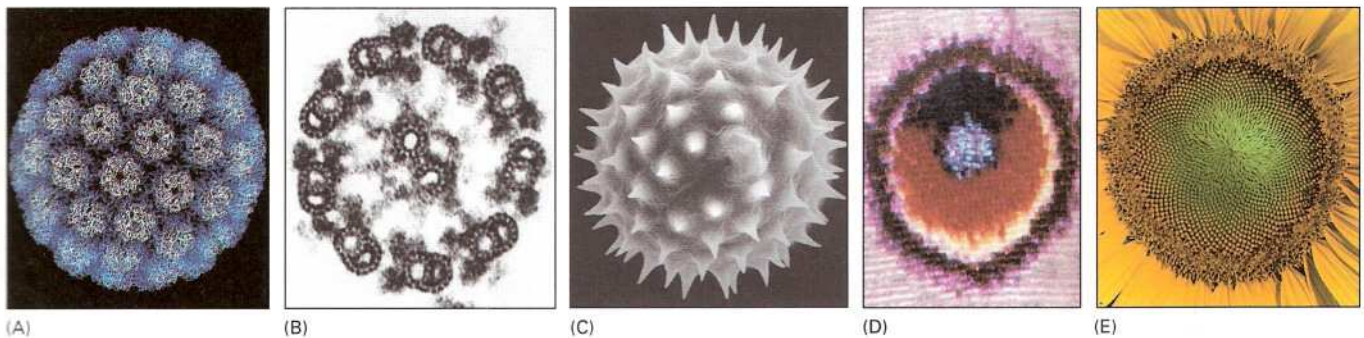
Biologický pořádek je umožňován uvolňováním tepelné energie z buněk

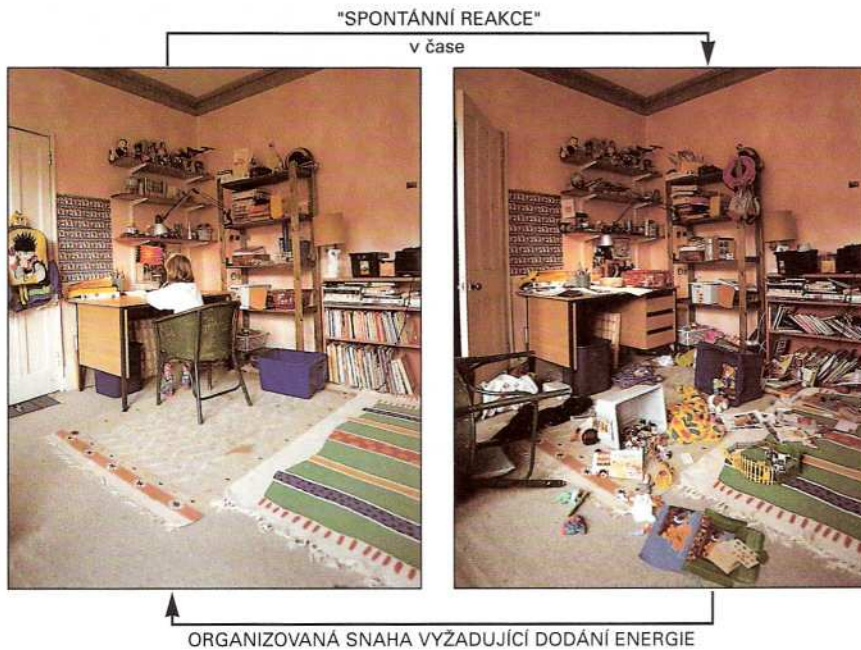
Všeobecná snaha věcí směřovat k chaosu je vyjádřena v jednom ze základních zákonů fyziky. Tím je *druhá věta termodynamiky*, která říká, že ve vesmíru nebo jakékoli izolované soustavě (soustava látky či látek, která je zcela izolována od okolního vesmíru) může neuspořádanost jen vzrůstat. Tento zákon má tak hluboké důsledky pro všechny živé tvory, že stojí za to si ho formulovat několika různými způsoby.

Druhou větu termodynamiky si můžeme představit například v pojmech pravděpodobnosti a prohlásit, že soustavy se budou samovolně měnit směrem k nejpravděpodobnějšímu uspořádání. Když vezmeme krabici se 100 mincemi, které všechny leží na téže straně, povede řada jevů působících změnu uspořádání těchto mincí postupně ke stavu „hlava“ u 50 mincí a „orel“ u dalších 50 mincí. Důvod je prostý: existuje obrovské množství uspořádání jednotlivých mincí ve směsi s poměrem 50:50, ale jen jedno možné uspořádání, při kterém zůstává u všech mincí „hlava“. Směs 50:50 je proto pravděpodobnější a my říkáme, že je více „neuspořádaná“. Ze stejného důvodu pozorujeme, že v našem životním prostoru vzrůstá neuspořádanost bez toho, abychom na to záměrně vynaložili nějaké úsilí. Pohyb soustavy směrem k větší neuspořádanosti je *samovolný děj*, k jehož obrácení je třeba opakovaného úsilí (obr. 3-5).



Obrázek 3-4 Uspořádanost v biologických strukturách. Na všech úrovních organizace v živých organismech lze najít dobře definované a krásné prostorové vzory. Podle rostoucí velikosti: (A) molekuly proteinu v plášti viru, (B) pravidelné uspořádání mikrotubulů pozorované v příčném řezu ocáskem spermie, (C) povrchové kontury pylového zrna, (D) křídlo motýla fotografované z bezprostřední blízkosti. Vzorek je tvořen šupinkami, přičemž každá šupinka je produktem jedné buňky. (E) spirálovité pole semen, utvořené milióny buněk, v květu slunečnice.

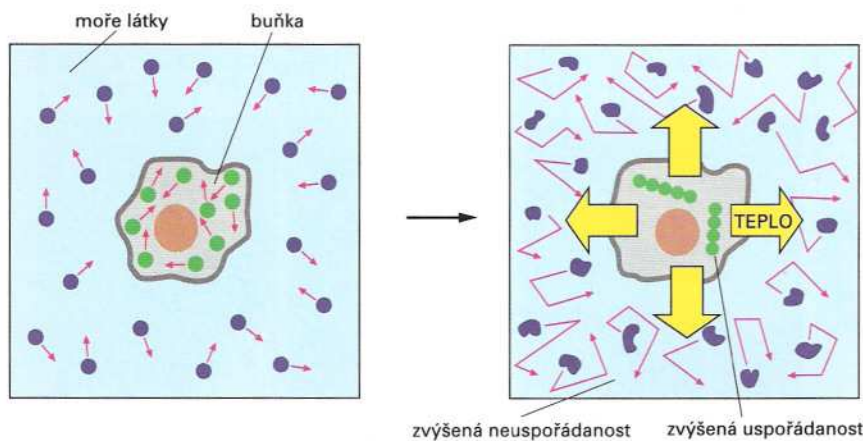




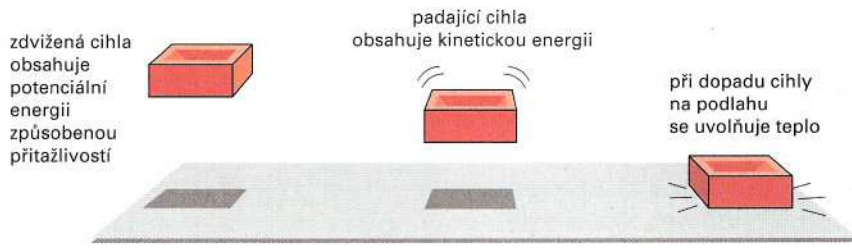
Obrázek 3-5 Každodenní ukázka samovolného vzniku nepořádku. Zvrácení tohoto pohybu směrem k nepořádku vyžaduje záměrné úsilí a dodání energie; rozhodně není spontánní. Podle druhého zákona termodynamiky si můžeme být jisti, že potřebný lidský zákrok uvolní do okolí dost tepelné energie, která více než vyrovná opětné uspořádání věcí v místnosti.

Množství nepořádku v soustavě lze měřit. Veličinou, kterou používáme k měření této neuspořádanosti, je **entropie** soustavy: čím větší je neuspořádanost soustavy, tím větší je její entropie. Třetí možností, jak vyjádřit druhou větu termodynamiky, je rčení, že soustavy se samovolně mění směrem k vyšší entropii.

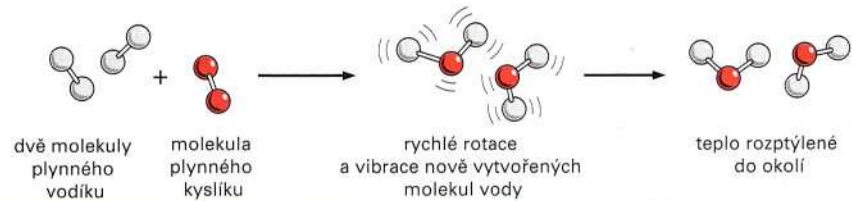
Živé buňky při své snaze přežít a při svém rozmnožování a utváření složitých organismů vytvářejí pořádek, a tak by se mohlo zdát, že vzdorují druhému zákonu termodynamiky. Jak je to možné? Odpověď je prostá: buňka není izolovanou soustavou. Bere si energii z okolí v podobě potravy nebo fotonů slunečního světla, případně – jako některé chemosyntetické bakterie – ze samotných anorganických molekul, a potom používá tuto energii k vytváření pořádku uvnitř sebe samé. V průběhu chemických reakcí vedoucích k vyšší uspořádanosti se část energie používané buňkou mění v teplo. Toto teplo se rozptyluje do okolí buňky a zvyšuje v něm neuspořádanost, takže celková entropie buňky a okolí vzrůstá přesně tak, jak to vyžadují zákony fyziky.



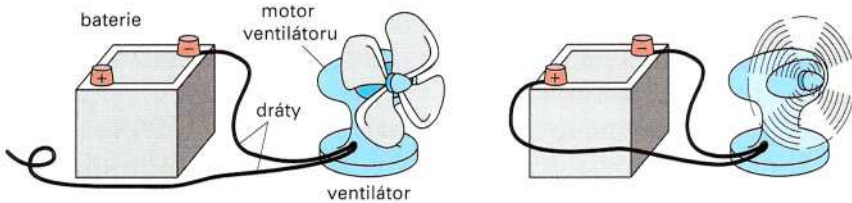
Obrázek 3-6 Jednoduchá termodynamická analýza živé buňky. Na obrázku vlevo jsou molekuly v buňce i v okolním vesmíru (moře hmoty) nakresleny v poměrně neuspořádaném stavu. Na obrázku vpravo buňka přijala energii z molekul potravy a uvolnila teplo reakcí, která uspořádá molekuly obsažené v buňce. Protože teplo zvyšuje neuspořádanost v okolí buňky (znázorněna klikatými šipkami a deformovanými molekulami, které ilustrují tepelný pohyb), je růstem a dělením buňky splněna druhá věta termodynamiky, která říká, že množství neuspořádanosti ve vesmíru musí neustále vzrůstat.



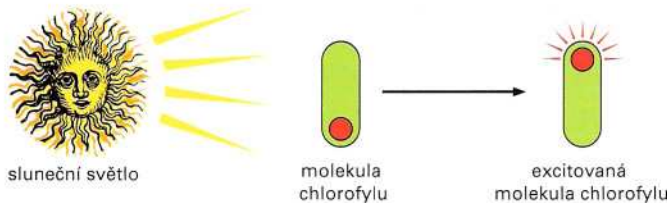
potenciální energie daná polohou → kinetická energie → tepelná energie



energie chemické vazby v H_2 a O_2 → rychlý pohyb molekul H_2O → tepelná energie



energie chemických vazeb → elektrická energie → kinetická energie



elektromagnetická (světelná) energie → energie chemické vazby

Obrázek 3-7 Několik vzájemných přeměn známých forem energie. Všechny formy energie lze v podstatě převádět jednu v druhou. Při těchto dějích se celkové množství energie zachovává; můžeme tedy například z hmotnosti cihly v první části obrázku a z výšky, ve které se nachází, přesně předpovědět, kolik tepla se uvolní při jejím nárazu na podlahu. Ve druhém příkladu si všimněte, že velké množství chemické energie uvolněné při vzniku vody se na počátku přemění na velmi rychlý tepelný pohyb obou nových vodných molekul; srážkami s ostatními molekulami se však tato energie téměř okamžitě rovnoměrně rozptýlí do okolí (přenos tepla) a nové molekuly se tak stanou neodlišitelné od ostatních.

Abyste pochopili principy, jimiž se tyto změny energie řídí, představte si buňku v moři látky představující okolní svět. Během svého života a růstu buňka vytváří vnitřní pořádek na účet moře, neboť při své výrobě molekul a jejich skládání do buněčných struktur uvolňuje tepelnou energii. Teplo je nejneuspořádanější formou energie – náhodnými srážkami molekul. Když buňka uvolní teplo do moře, vzroste intenzita pohybů molekul v moři (tepelný pohyb), a tak se zvýší náhodnost neboli neuspořádanost moře. Druhý zákon termodynamiky je tak splněn, neboť vzrůst uspořádanosti uvnitř buňky je více než vyrovnán větším poklesem uspořádanosti (vzrůstem entropie) v okolním moři látky (obr. 3-6).

Odkud pochází teplo uvolněné buňkou? Tady se setkáváme s dalším důležitým zákonem termodynamiky. *První věta termodynamiky* říká, že energie může přecházet z jedné formy do jiné, ale nelze ji vytvořit ani zničit. Některé formy energie jsou znázorněny na obráz-

ku 3-7. Výsledkem chemických reakcí uvnitř buňky je změna rozložení energie do různých forem, ale – jak nám říká první zákon termodynamiky – celkové množství energie musí být stále stejné.

Buňka nemůže mít žádný užitek z tepelné energie, kterou uvolní, pokud nespřáhne reakce uvolňující teplo s ději, při kterých vzniká vyšší uspořádanost. Právě spřažení produkce tepla a růstu uspořádanosti je to, co odlišuje metabolismus buňky od ne hospodárného spalování paliva v ohni. Později si v této kapitole ukážeme, jak takové spřažení reakcí funguje. Prozatím postačí, když si uvědomíme, že spřažení „spalování“ potravy a vytváření biologického pořádku je nezbytné, mají-li být buňky schopné vytvářet a udržovat ostrůvek pořádku uprostřed světa, který směřuje k čím dál většímu chaosu.

Fotosyntetické organismy využívají sluneční světlo k syntéze organických molekul

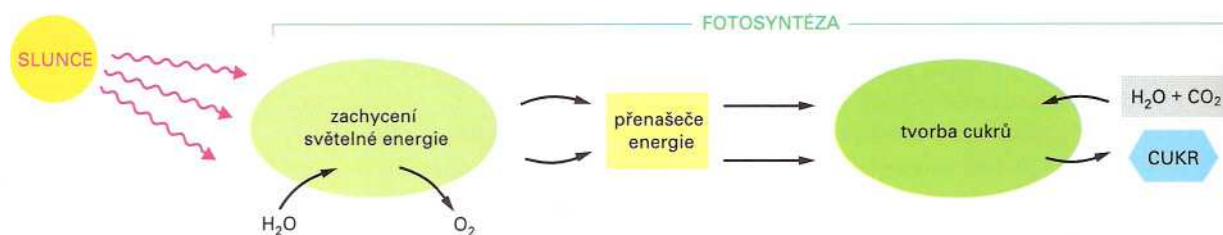
Všichni živočichové využívají k životu energii uloženou v chemických vazbách vytvořených jinými organismy, které požívají. Molekuly potravy živočichům poskytují také atomy, které potřebují k tvorbě nové živé hmoty. Někteří živočichové svou potravu získávají pozřením jiných. Na konci živočišného potravního řetězce jsou však takoví, kteří se živí rostlinami; ty zachycují energii přímo ze slunečního světla. Výsledkem je, že energie užívaná živočišnými buňkami je odvozena přímo ze Slunce (obr. 3-8).

Sluneční energie vstupuje do živého světa prostřednictvím **fotosyntézy** v rostlinách a ve fotosyntetických bakteriích. Fotosyntéza umožňuje elektromagnetické energii slunečního světla změnit se v energii chemických vazeb v buňce. Rostliny mohou získávat všechny potřebné atomy z anorganických zdrojů: uhlík z atmosférického oxidu uhličitého, dusík z amoniaku a dusičnanů v půdě, další potřebné prvky v malých množstvích z anorganických solí v půdě. Rostliny používají energii získanou ze slunečního světla k zabudování těchto atomů do cukrů, aminokyselin, nukleotidů a mastných kyselin. Tyto malé molekuly jsou potom začleňovány do proteinů, nukleových kyselin, polysacharidů a lipidů, které tvoří rostliny. Všechny tyto látky slouží jako molekuly potravy v případě, že jsou rostliny později pozřeny.

Reakce fotosyntézy se odehrávají ve dvou fázích (obr. 3-9). V první fázi je energie ze slunečního světla zachycena a přechodně uskladněna jako energie chemických vazeb ve speciálních malých molekulách, které slouží jako přenašeče energie a reaktivních chemických skupin. (Tyto aktivované nosičové molekuly probereme



Obrázek 3-8 Zářivá energie slunečního světla. Světlo zachycené v rostlinách a některých organismech fotosyntézou je prvotním zdrojem veškeré energie pro lidské bytosti a ostatní živočichy.

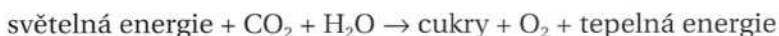


Obrázek 3-9 Fotosyntéza Dvě fáze fotosyntézy. Nosiče energie vytvořené v první fázi jsou dvě molekuly, které brzy probereme podrobněji: ATP a NADPH.

později.) V tomto prvním stadiu je jako vedlejší produkt rozpadu vody uvolňován molekulový kyslík (plynný O₂).

Ve druhém stadiu jsou využívány molekuly, které slouží jako nosiče energie – pomáhají pohánět proces *fixace uhlíku*, při kterém jsou vyráběny cukry z plynného oxidu uhličitého (CO₂) a vody (H₂O). Přitom skýtají užitečný zdroj uložené energie chemických vazeb a materiálů – jak pro samotné rostliny tak pro živočichy, kteří se jimi budou živit. Eleganční mechanismy, na kterých spočívají tyto dvě fáze fotosyntézy, popíšeme v Kapitole 13.

Čistý výsledek celé fotosyntézy, alespoň u zelených rostlin, může být jednoduše shrnut v rovnici



Vyrobených cukrů se potom použije jako zdroje energie chemických vazeb a zdroje materiálů pro přípravu mnoha jiných malých organických molekul, které jsou pro rostlinnou buňku nepostradatelné.

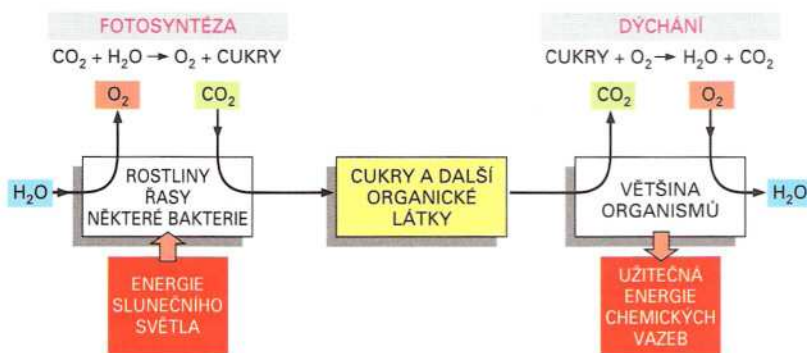
Otázka 3-1 Zamyslete se nad rovnicí světelná energie + CO₂ + H₂O → cukry + O₂. Očekávali byste, že tuto reakci bude provádět jediný enzym? Proč se při této reakci vytváří také teplo? Vysvětlete své odpovědi.

Buňky získávají energii oxidací organických molekul

Všechny živočišné a rostlinné buňky jsou poháněny chemickou energií uloženou v chemických vazbách organických molekul, ať už jsou to cukry syntetizované rostlinami jako živina pro rostliny samotné nebo směs velkých a malých molekul potravy, kterou pozřel živočich. V tělech rostlin i živočichů je energie z molekul potravy získávána postupnou oxidací neboli řízeným spalováním.

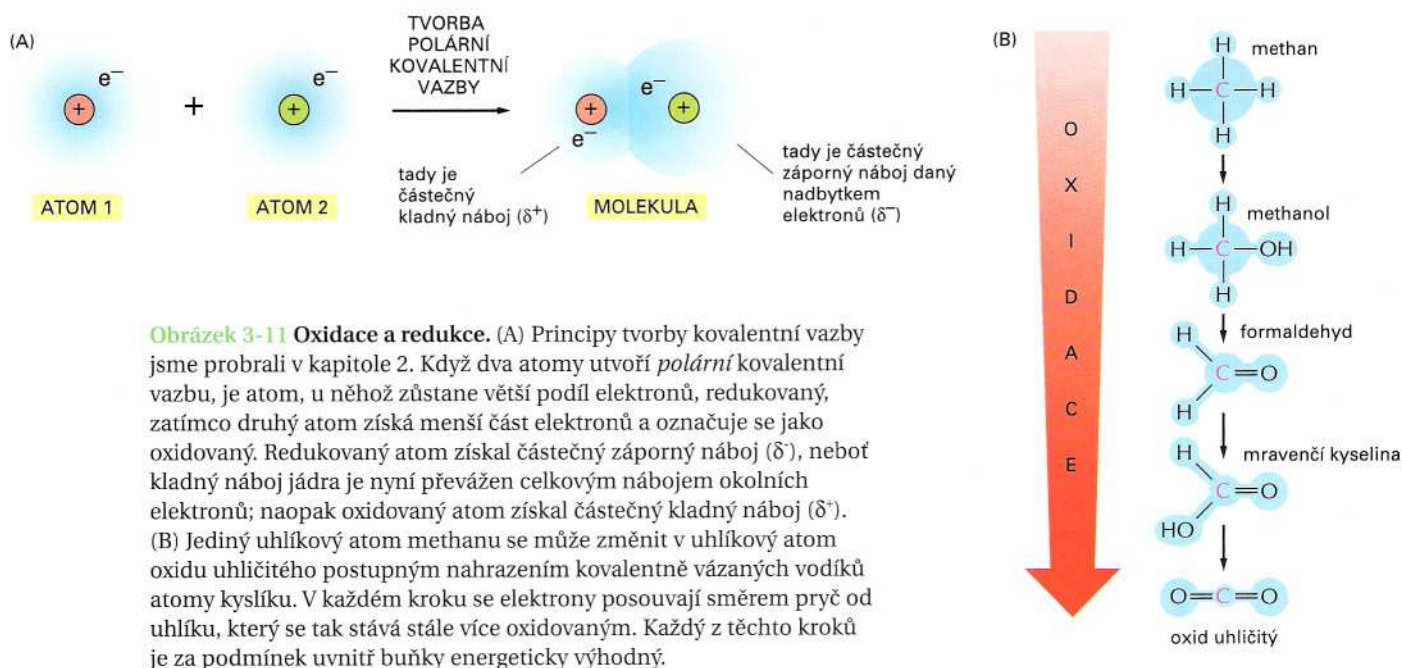
Zemská atmosféra obsahuje velký podíl kyslíku, v jehož přítomnosti je energeticky nejstálější formou uhlíku CO₂ a nejstálější formou vodíku H₂O. Buňka je proto schopna získávat energii z cukrů či jiných organických molekul tak, že umožní slučování jejich atomů uhlíku a vodíku s kyslíkem za vzniku CO₂ a H₂O. Tomuto ději se říká **respirace (dýchání)**.

Fotosyntéza a respirace jsou komplementární (vzájemně se doplňující) děje (obr. 3-10). To znamená, že ne všechny výměny mezi rostlinami a živočichy jsou jednosměrné. Rostliny, živočichové a bakterie na této planetě existovali vedle sebe tak dlouho, že se někteří z nich stali přirozenou součástí životního prostředí jiných organismů. A některé molekuly CO₂, jež jsou dnes fixovány do organických molekul při fotosyntéze v zeleném listu, byly včera uvolněny do atmosféry při dýchání živočicha nebo houby či bakterie rozkládající mrtvou organickou látku. Vidíme tedy, že využití uhlíku tvoří obrovský cyklus,



Obrázek 3-10 Fotosyntéza a dýchání jako komplementární děje v živém světě.

Fotosyntéza využívá slunečního světla k tvorbě cukrů a jiných organických molekul. Tyto molekuly naopak slouží jako potrava pro jiné organismy. Mnoho z těchto organismů dýchá; při dýchání se využívá O₂ k tvorbě CO₂ ze stejných atomů uhlíku, které byly přijaty jako CO₂ a přeměněny fotosyntézou v cukry. Dýchající organismy přitom získávají chemickou energii, kterou potřebují k životu. První buňky na Zemi zřejmě nebyly schopny fotosyntézy ani dýchání. Fotosyntéza však na Zemi musela dýchání předcházet, neboť existují přesvědčivé důkazy, že k obohacení atmosféry kyslíkem v míře dostatečné k dýchání bylo zapotřebí několika miliard let. (Dnes O₂ představuje asi 20 % zemské atmosféry.)



kteřý zahrnuje *biosféru* (všechny živé organismy na Zemi) jako celek a překračuje hranice mezi jednotlivými organismy. Podobně se pohybují mezi živým a neživým světem atomy dusíku, fosforu a síry v cyklech, které postihují rostliny, živočichy, houby a bakterie.

Oxidace a redukce zahrnuje přenosy elektronů

Buňka neoxiduje organické molekuly v jednom kroku, jak se to děje při spalování organického materiálu v ohni. S využitím enzymových katalyzátorů nechává metabolismus molekuly procházet velkým počtem reakcí, které jen zřídka zahrnují přímou adici kyslíku. Dříve než se podíváme na některé z těchto reakcí a jejich účel, musíme si vysvětlit, co přesně znamená proces oxidace.

Oxidace ve výše užitém smyslu slova neznamena pouze adici atomů kyslíku. Obecněji se toto označení vztahuje na každou reakci, ve které jsou elektrony přenášeny od jednoho atomu k druhému. Oxidace se tedy týká odstranění elektronů, zatímco **redukce**, která je opakem oxidace, se vztahuje na jejich adici. Tak například kation Fe^{2+} se oxiduje, když ztratí elektron a změní se v Fe^{3+} , a atom chloru se redukuje, pokud získá elektron navíc a stane se aniontem Cl^- . Protože se celkový počet elektronů během chemické reakce nemění (neztrácí se ani nepřibývají), probíhají oxidace a redukce vždy současně: získá-li v reakci jedna molekula elektron (redukce), druhá molekula elektron ztratí (oxidace). Je-li například molekula cukru oxidována na CO_2 a H_2O , získávají molekuly O_2 zúčastněné v reakci při tvorbě vody elektrony, a proto se říká, že dochází k jejich redukci.

Termíny „oxidace“ a „redukce“ se používají, i pokud dochází jen k částečnému posunu elektronů mezi atomy spojenými kovalentní vazbou (obr. 3-11A). Když je například atom uhlíku kovalentně vázán k atomu se silnou elektronovou afinitou, třeba ke kyslíku, chloru či síře, vzdává se více než „polovičního“ podílu elektronů a tvoří *polární* kova-

lentní vazbu. Kladný náboj uhlíkového jádra je o něco větší než záporný náboj jeho elektronů; atom proto získává částečně kladný náboj a říká se, že je oxidovaný. Naopak atom uhlíku ve vazbě C-H má o něco více než „poloviční podíl elektronů“, a proto se říká, že je redukován (obr. 3-11B).

Pokud molekula v buňce získá elektron (e^-), často získá současně i proton (H^+) (protony jsou volně dostupné ve vodě). Čistým výsledkem je v tomto případě adice vodíkového atomu k molekule

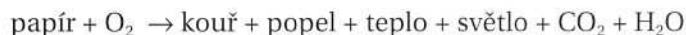


Ačkoli v ději figuruje proton plus elektron (místo samotného elektronu), jsou *hydrogenační* reakce považovány za redukce, a naopak, *dehydrogenační* reakce jsou oxidacemi. Je zvláště snadné určit, zda u organické molekuly dochází k oxidaci či redukci: pokud počet vazeb C-H vzrůstá, jde o redukci, zatímco při snižování počtu vazeb C-H jde o oxidaci.

Buňky využívají enzymů ke katalýze oxidace organických molekul v malých krocích v řadě reakcí, což umožňuje získat co nejvíce využitelné energie. Nyní si potřebujeme vysvětlit, jak enzymy pracují a některá omezení týkající se jejich činnosti.

Enzymy obcházejí bariéry, které brání průběhu chemických reakcí

Podívejme se na reakci

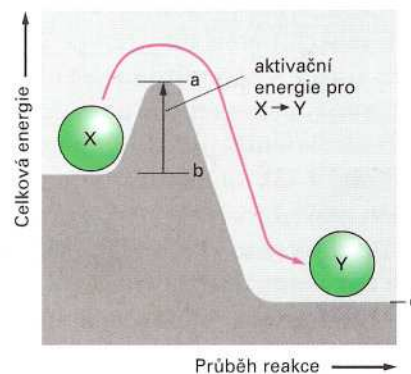


Papír ochotně shoří a uvolní do atmosféry energii ve formě tepla a světla, vodní páru a plynný oxid uhličitý, ale kouř a popel se nikdy samovolně nesloučí s těmito molekulami z ohřáté atmosféry a nesloží se zpět do papíru. Když papír shoří, jeho chemická energie se rozptýlí jako teplo – neztratí se z vesmíru, protože energie nemůže být vytvořena nebo zničena, ale nenávratně se rozptýlí do chaotických náhodných tepelných pohybů molekul. Za stejný čas se atomy a molekuly papíru rozptýlí a zavládne mezi nimi značný chaos. Řečeno slovy termodynamiky, dojde ke ztrátě *volné energie*, tj. energie, kterou lze získat a využít k práci či pohonu chemických reakcí. Tato ztráta odráží ztrátu pořádku ve způsobu, jakým byly energie a molekuly uloženy v papíru. Volnou energii si zakrátko probereme podrobně, ale základní princip je dostatečně jasný intuitivně: chemické reakce probíhají jen tím směrem, který vede ke ztrátě volné energie. Jinými slovy: samovolným směrem je pro každou reakci směr „z kopce“. Reakce směrem „z kopce“ se často označuje jako *energeticky výhodná*.

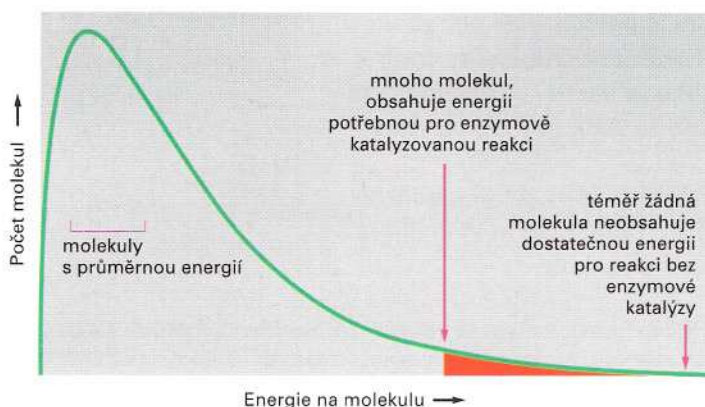
Ačkoli jsou za normálních podmínek energeticky téměř nejvýhodnějšími formami uhlíku a vodíku CO_2 a H_2O , nemizí živý organismus v obláčku kouře a z knihy ve vašich rukou nevyšlehnou plameny. Je tomu tak proto, že jak molekuly v živém organismu tak molekuly v knize jsou v poměrně stálém stavu a nemohou přejít do stavu o nižší energii bez toho, aby jim byla nějaká energie nejprve dodána. Jinými slovy, k chemické reakci vedoucí k ještě stálejšímu stavu potřebuje molekula **aktivační energii** – „výkop“ přes energetickou bariéru (obr. 3-12). Má-li hořet kniha, je k tomu zapotřebí aktivační energie v podobě tepla zapálené sirky. Molekulám ve vodném roztoku uvnitř buňky je obvykle tento

Otázka 3-2 V kterých z následujících reakcí podstupuje červený atom oxidaci?

- A. $Na \rightarrow Na^+$ (atom Na \rightarrow ion Na^+)
- B. $Cl \rightarrow Cl^-$ (atom Cl \rightarrow ion Cl^-)
- C. $CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3CHO$ (ethanol \rightarrow acetaldehyd)
- D. $CH_3CHO \rightarrow CH_3COOH$ (acetaldehyd \rightarrow octová kyselina)
- E. $CH=CH \rightarrow CH_3CH_3$ (ethen \rightarrow ethan)



Obrázek 3-12 Princip aktivační energie. Sloučenina X je ve stabilním stavu a k její přeměně ve sloučeninu Y je zapotřebí energie, ačkoli se Y nachází na nižší energetické úrovni než X. Proto se tato přeměna neuskuteční, dokud sloučenina X nezíská dostatečné množství aktivační energie (*energie a minus energie b*) ze svého okolí, aby mohla podstoupit přeměnu ve sloučeninu Y. Tato energie může být získána z neobvykle energetické srážky s jinými molekulami. Pro obrácenou reakci $Y \rightarrow X$ musí být aktivační energie mnohem větší (*energie a minus energie c*); proto bude tato zpětná reakce probíhat mnohem méně často. Aktivační energie jsou vždy kladné, avšak všimněte si, že celková změna energie pro energeticky výhodnou reakci $X \rightarrow Y$ je *energie c minus energie b*, tedy záporné číslo.



Obrázek 3-13 Snížení aktivační energie značně zvyšuje pravděpodobnost reakce. V populaci identických molekul substrátu budou mít tyto molekuly různou energii, která je v každém okamžiku rozložena tak, jak je ukázáno v grafu. Změny energie pocházejí ze srážek s okolními molekulami; díky těmto srážkám se molekuly substrátu otřásají, vibrují a otáčejí se. U molekuly, která má podstoupit chemickou reakci, musí její energie přesáhnout aktivační energii této reakce. U biologických molekul se to téměř nikdy nestává bez enzymové katalýzy. Dokonce i když reakci katalyzuje enzym, musí molekuly substrátu přimět k reakci zvláště energická srážka.

„výkop“ ušetřen neobvykle energickými náhodnými srážkami s okolními molekulami – srážkami, jejichž prudkost vzrůstá s rostoucí teplotou prostředí.

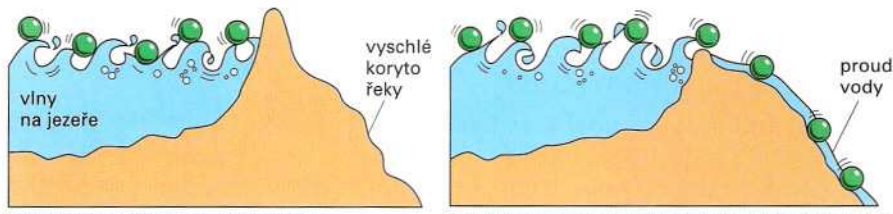
V živých buňkách pomáhá molekulám v překonání energetické bariéry zvláštní třída proteinů, tzv. **enzymy**. Každý enzym pevně váže jednu nebo dvě molekuly **substrátu** a drží je způsobem, kterým je jakoby možno obejít energetickou bariéru určité chemické reakce, kterou mohou vázané substráty podstoupit. Látka, která je toho schopna, se nazývá **katalyzátor**. Katalyzátory zvyšují rychlost chemických reakcí, neboť díky jim představuje mnohem větší podíl náhodných srážek s okolními molekulami dostatečný impuls pro substráty k překonání energetické bariéry, jak je vidět na obrázku 3-13. Enzymy patří mezi nejúčinnější známé katalyzátory; často urychlují reakce až 10^{14} krát, a tak umožňují děje, které by jinak za normálních teplot vůbec neprobíhaly.

Enzymy jsou také vysoce selektivní. Každý enzym obvykle katalyzuje jen jednu určitou reakci – jinými slovy, selektivně snižuje aktivační energii jen jedné z několika možných chemických reakcí, které by mohly vázané molekuly substrátu podstoupit. Tímto způsobem enzymy vedou každou z mnoha různých molekul v buňce podél její specifické reakční dráhy (obr. 3-14).

Úspěch živých organismů tkví ve schopnosti buňky vytvářet enzymy mnoha typů, každý s přesně určenými vlastnostmi. Každý enzym má jedinečný tvar s *aktivním místem* – kapsou či žlábkem v enzymu, kam se hodí jen určité substráty (obr. 3-15). Jako jiné katalyzátory zůstávají i enzymy po reakci nezměněny a mohou opět plnit svou funkci. Až podrobně prozkoumáme strukturu molekul proteinů, probereme v Kapitole 5 obšírněji, jak enzymy pracují.

Jak enzymy nacházejí své substráty: důležitost rychlé difuze

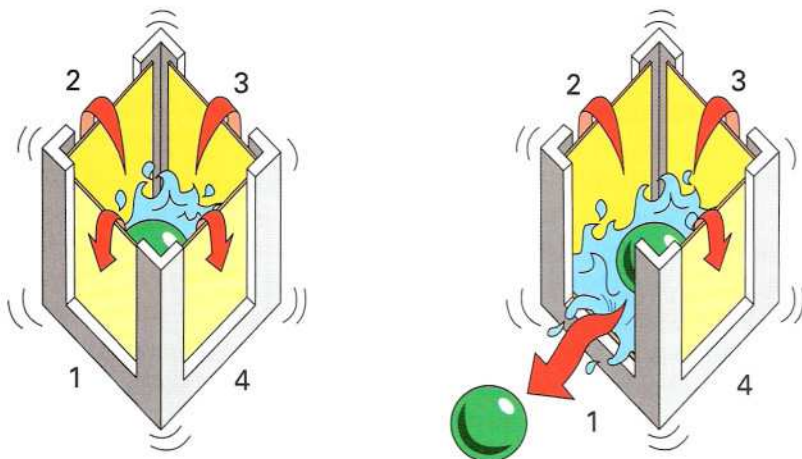
Typický enzym každou sekundu katalyzuje reakci asi tisíce molekul substrátu; to znamená, že musí být schopen navázat novou molekulu substrátu ve zlomku milisekundy. Ale jak enzymy tak jejich substráty jsou v buňce přítomny v poměrně malých množstvích. Jak se mohou tak rychle najít? Rychlé navázání je možné díky nesmírně rychlým pohybům na úrovni molekul. Tepelná energie soustavy udržuje molekuly ve stálém pohybu, a proto velmi důkladně „propátrají“ a procestují prostor



nekatalyzovaná reakce - vlny nejsou schopny překonat hráz

katalyzovaná reakce - vlny se často převálí přes hráz

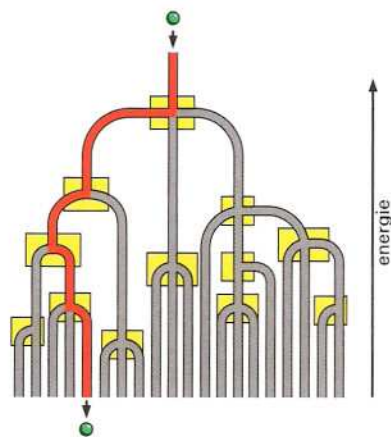
(A)



(B) bez katalýzy

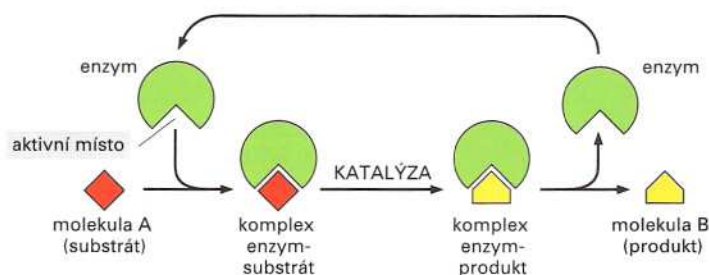
s enzymovou katalýzou reakce 1

(C)



Obrázek 3-14 Analogie plovoucího míče pro enzymovou katalýzu. (A) Snížená hráz představuje enzymovou katalýzu. Každý zelený míček představuje možný substrát enzymu (sloučenina X), který poskakuje nahoru a dolů po hladině energie díky neustálým vlnám (analogie k bombardování substrátu tepelnými srážkami s okolními molekulami vody). Podstatné snížení hráze (aktivační energie) umožní energeticky výhodný pohyb míčku (substrátu) z kopce. (B) Čtyři stěny krabice představují bariéry aktivační energie pro čtyři různé chemické reakce, které jsou všechny energeticky výhodné, neboť jejich produkty leží na nižší energetické úrovni než substráty. U skříňky vlevo neprobíhá žádná reakce, protože ani největší vlny nejsou s to překonat některou z energetických bariér. U skříňky vpravo snižuje enzymová katalýza aktivační energii jen pro reakci číslo 1; nárazy vln umožní průchod molekuly jen přes tuto energetickou bariéru, což vyvolá reakci číslo 1. (C) Rozvětvená řeka s řadou hrází (žluté rámečky) slouží k ilustraci toho, jak série enzymově katalyzovaných reakcí určuje přesnou reakční dráhu, kterou sleduje každá molekula uvnitř buňky.

uvnitř buňky; tomuto jevu se říká **difuze**. Takto se každá molekula v buňce každou sekundu sráží s obrovským počtem jiných molekul. Jak se molekuly v kapalině srážejí a odrážejí, pohybuje se jednotlivá molekula nejprve jedním směrem a potom jiným, z vnějšího pohledu po *náhodné dráze* (obr. 3-16). Při takové „procházce“ je průměrná vzdálenost každé molekuly od startu přímo úměrná druhé odmocnině spotře-



Obrázek 3-15 Jak enzymy pracují. Každý enzym má aktivní místo, ke kterému se váže jedna nebo dvě molekuly substrátu a vzniká komplex enzym-substrát. Reakce probíhá v aktivním místě za vzniku komplexu enzym-produkt. Produkt je potom uvolněn a enzym může vázat další molekuly substrátu.

bovaného času: molekule tedy zabere průměrně 1 sekundu, než se dostane 1 μm od startu (vzdušnou čarou), čtyři sekundy potřebuje molekula k „odcestování“ do vzdálenosti 2 μm od startu, 10 sekund k tomu, aby se dostala 10 μm od startu atd.

Uvnitř buňky je skutečně pořádná tlačenička (obr. 3-17). Pokusy s fluorescenčními barvivy a dalšími značenými molekulami vstříknutými do buňky však ukázaly, že malé organické molekuly difundují vodným gelem téměř tak rychle jako ve vodě. Malé organické molekule zabere difuze do vzdálenosti 10 μm v průměru jen jednu pětinu sekundy. Difuze proto pro malé molekuly představuje účinný způsob pohybu na krátké vzdálenosti v buňce.

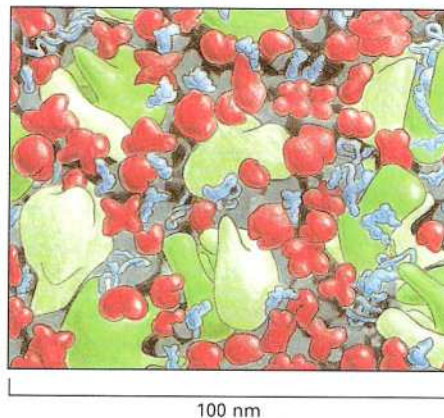


Obrázek 3-16 Náhodný pohyb. Molekuly v roztoku se pohybují náhodným způsobem díky neustálým srážkám s okolními molekulami. Tento pohyb umožňuje malým molekulám rychle difundovat z jednoho místa buňky do druhého.

Protože se enzymy ve srovnání se substráty pohybují mnohem pomaleji, můžeme je v prvním přiblížení považovat za nehybné. Frekvence setkání každé molekuly enzymu se svým substrátem bude záviset na koncentraci molekul substrátu. Například některé hojné substráty se vyskytují v koncentracích 0,5 mM. Protože čistá voda má koncentraci 55,5 M, vyskytuje se v buňce jen jedna molekula takového substrátu na asi 10^5 molekul vody. Nehledě na to je aktivní místo enzymové molekuly, které tento substrát váže, během každé sekundy bombardováno asi 500 000 náhodných srážek s molekulami substrátu. (Pro substrát s desetkrát nižší koncentrací tento počet srážek poklesne na 50 000/s atd.) Náhodné setkání vhodného povrchu enzymu s molekulou substrátu vede ihned k utvoření reaktivního komplexu enzym-substrát. Nyní může dojít velmi rychle k reakci s přerušением kovalentní vazby či vytvořením vazby nové. Při nadšení, které v nás zanechává rychlost pohybu molekul a jejich reakcí, se už rychlosti enzymové katalýzy tak obdivuhodné nezdají.

Otázka 3-3 Enzym karbonátdehydratáza je jedním z nejrychlejších známých enzymů. Katalyzuje hydrataci CO_2 na HCO_3^- ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). Rychlá přeměna CO_2 na mnohem rozpustnější hydrogenkarbonátový ion (HCO_3^-) je velmi důležitá pro účinný transport CO_2 v krevním řečišti - z tkání, kde CO_2 vzniká při dýchání, do plic, odkud je vydechován. Karbonátdehydratáza urychluje reakci 10^7 krát a při své mezní rychlosti hydratuje 10^5 molekul CO_2 za sekundu. Čím je podle vás ohraničena rychlost enzymu? Načrtněte podobný diagram, jako je na obrázku 3-13, a ukažte, které části vašeho diagramu bylo připsáno 10^7 násobné urychlení reakce.

Jakmile se substrát srazí s enzymem a správně se přimkne k jeho aktivnímu místu, utvoří mezi sebou mnoho slabých vazeb, které přetrvávají až do chvíle, kdy náhodné tepelné pohyby přimějí molekuly opět disociovat. Obecně lze říci, že čím pevnější je vazba substrátu k enzymu, tím pomaleji obě molekuly opět disociují. Nemají-li však srazivší se molekuly dostatečně komplementární povrchy, vytvoří se jen málo nekovalentních vazeb a jejich celková energie je zanedbatelná ve srovnání s energií tepelného pohybu. V tomto případě molekuly od sebe disociují stejně rychle, jako asociovaly (viz obr. 2-28). To brání nesprávným a nechtěným asociacím náhodných molekul, např. enzymu a nevhodného substrátu.



Obrázek 3-17 Struktura cytoplasmy. Kresba je přibližná podle skutečných poměrů velikosti a zdůrazňuje přeplněnost cytoplasmy. Jsou ukázány jen makromolekuly: ribonukleové kyseliny jsou znázorněny modře, ribosomy zeleně a proteiny červeně. Enzymy a jiné makromolekuly difundují v cytoplasmě poměrně pomalu hlavně kvůli interakcím s mnoha dalšími makromolekulami; naopak malé molekuly difundují téměř tak rychle jako ve vodě.

Změna volné energie při reakci určuje, zda reakce může proběhnout

Nyní musíme učinit krátkou odbočku do základů chemie. Buňky jsou chemické soustavy, které se musí řídit všemi chemickými a fyzikálními zákony. Ačkoli enzymy reakce urychlují, nemohou samy o sobě způsobit průběh reakcí, které jsou energeticky nevýhodné. Přirovnáme-li chemickou reakci k vodnímu toku, nemohou enzymy samy o sobě přimět vodu, aby tekla do kopce. Buňky však právě tohle musí dělat při svém růstu a dělení: musí stavět vysoce uspořádané a energeticky bohaté molekuly z molekul malých a jednoduchých. Uvidíme, že tato věc se daří díky enzymům, které obstarávají *spřažení* energeticky výhodných reakcí, při nichž se uvolňuje energie a teplo, s energeticky nevýhodnými reakcemi, které budují biologický pořádek.

Dříve než prozkoumáme, jak se takového *spřažení* dosahuje, musíme věnovat větší pozornost termínu „energeticky výhodné“. Podle druhé věty termodynamiky může chemická reakce probíhat samovolně, jen pokud je jejím výsledkem čistý vzrůst neuspořádanosti vesmíru (viz obr. 3-6). Neuspořádanost vzrůstá, je-li užitečná energie, kterou lze získat a využít k práci, rozptýlena ve formě tepla. Měřítka pro takový vzrůst neuspořádanosti může být pohodlněji vyjádřeno jako veličina zvaná **volná energie** soustavy, G . Hodnota G je pro nás zajímavá jen pokud se soustava mění, takže lze určit *změnu* G označovanou jako ΔG (delta G). Předpokládejme, že předmětem našeho zájmu je soustava molekul. Díky způsobu kterým je ΔG definována, vyjadřuje změna volné energie neuspořádanost, která ve vesmíru vznikla při reakci těchto molekul. *Energeticky výhodné reakce* jsou podle definice ty, při nichž se snižuje volná energie soustavy, neboli jinými slovy, které mají *negativní* ΔG a zvyšují neuspořádanost vesmíru (obr. 3-18).

Známým příkladem energeticky výhodného děje v makroskopickém měřítku je „reakce“, při níž se uvolní stlačená pružina, která přitom předá svou elastickou energii do okolí; mikroskopickým příkladem je rozpouštění soli ve vodě. Naopak *energeticky nevýhodnými reakcemi* s *kladnou* ΔG jsou takové reakce, při nichž se například dvě aminokyseliny spojují dohromady za vzniku peptidové vazby, a tak zvyšují uspořádanost vesmíru. Proto tyto reakce probíhají jen tehdy, jsou-li *spřaženy* s druhou reakcí s tak velkou zápornou ΔG , že ΔG celkového děje je záporná (obr. 3-19). Tyto pojmy s příklady jsou shrnuty v panelu 3-1 (str. 90-91).

Na ΔG má vliv koncentrace reaktantů

Jak jsme právě popsali, bude reakce $A \rightleftharpoons B$ probíhat ve směru $A \rightarrow B$, pokud je s tím spojená negativní ΔG , právě tak jako se stlačená pružina po odstranění tlaku uvolní a odevzdá svou uloženou energii do okolí jako teplo. Při chemické reakci však ΔG závisí nejen na energii uložené v každé jednotlivé molekule, ale také na koncentraci molekul v reakční směsi. Vzpomeňte si, že ΔG ukazuje, o kolik neuspořádanější – čili pravděpodobnější – bude stav vesmíru po reakci. Vzpomeneme-li si na náš příklad s mincemi, je velmi pravděpodobné, že se při otřásání krabicí s mincemi jedna mince obrátí z „hlavy“ na „orla“, pokud



ENERGETICKY VÝHODNÁ REAKCE

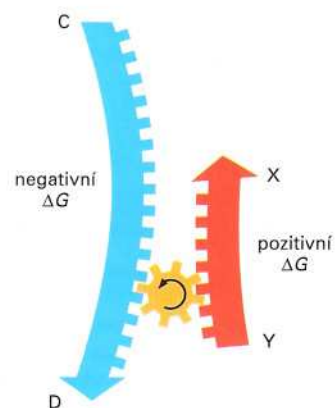
Tato reakce může proběhnout samovolně.



ENERGETICKY NEVÝHODNÁ REAKCE

Tato reakce může proběhnout pouze, je-li spřažena s jinou, energeticky výhodnou reakcí.

Obrázek 3-18 Rozdíl mezi energeticky výhodnými a energeticky nevýhodnými reakcemi.



Energeticky nevýhodná reakce $Y \rightarrow X$ je poháněna energeticky výhodnou reakcí $C \rightarrow D$, protože celková změna volné energie obou spřažených reakcí je menší než nula.

Obrázek 3-19 Jak *spřažení* reakcí může ovládat energeticky nepříznivou reakci.

VOLNÁ ENERGIE

Molekuly v živé buňce jsou vybaveny energií díky svým vibracím, rotacím a podélnému pohybu a díky energii uložené v jejich chemických vazbách.



Volná energie (G) představuje energii molekuly, která by se dala využít pro užitečnou práci při konstantní teplotě, jakou lze předpokládat u většiny buněk. G se měří v kilojoulech na mol (dříve se používalo jednotky kilocalorie) platí, že

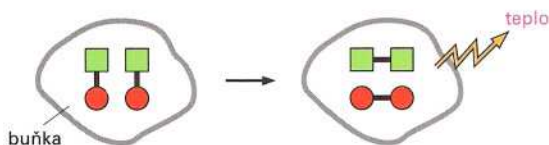
$$1 \text{ kJ} = 0.239 \text{ kcal}$$

$$1 \text{ kcal} = 4.18 \text{ kJ}$$

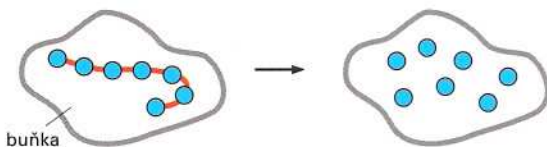
REAKCE ZPŮSOBUJÍ NEUSPOŘÁDANOST

Představme si chemickou reakci probíhající v izolované buňce při konstantní teplotě a objemu. Tato reakce vede k neuspořádanosti dvěma způsoby.

- 1 Změny ve vazebné energii reagujících molekul obvykle uvolňují teplo, které zvyšuje neuspořádanost okolí.

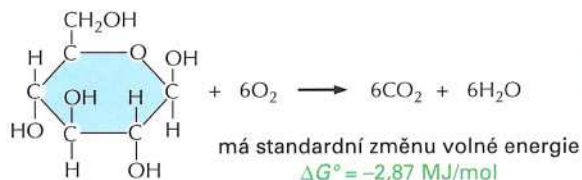


- 2 Reakce může snižovat uspořádanost reagujících molekul například tím, že štěpí dlouhý řetězec molekul, nebo tím, že narušuje interakce, které zabraňují rotaci chemických vazeb.



REAKČNÍ RYCHLOST

Hovoříme-li o spontánní reakci, neuvažujeme o době jejího průběhu čili rychlosti. Reakce doprovázená negativní změnou volné energie (ΔG) nemusí nutně probíhat rychle. Tak například spálení glukosy kyslíkem



Avšak přes tuto ohromně příznivou změnu volné energie nemusí reakce proběhnout po celá staletí, pokud nejsou k dispozici enzymy, které by ji urychlily. Naopak jsou enzymy schopny urychlit průběh reakce, aniž by měnily její ΔG .

ΔG

Změna volné energie doprovázející reakci se označuje ΔG , kde Δ znamená rozdíl. Tak pro reakci



$$\Delta G = (\text{volná energie } C+D) - (\text{volná energie } A+B)$$

ΔG se definuje tak, že je mírou změny neuspořádanosti způsobené reakcí, tedy změny uvnitř buňky plus vně buňky díky uvolněnému teplu.

ΔG je v biochemii užitečná, protože je mírou toho, jak daleko od rovnováhy se daná reakce nachází. Tak reakce



je charakterizována vysokou zápornou ΔG , protože v buňkách se nalézá daleko od rovnováhy, neboť se v buňkách stále vyrábí nové ATP. Jakkmile však buňka zemře, většina jejího ATP se hydrolyzuje, až se dosáhne rovnováhy, kdy $\Delta G = 0$. V tomto bodě probíhá dopředná i zpětná reakce stejně rychle, takže nedochází k žádné celkové změně.

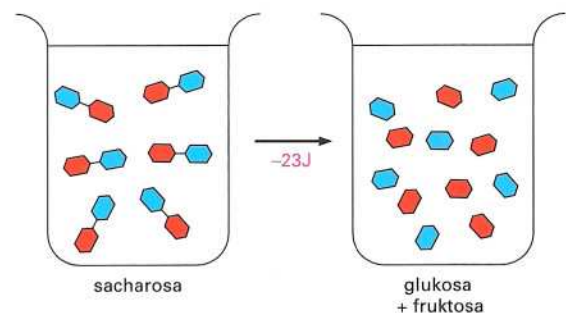
SPONTÁNNÍ REAKCE

Podle druhého zákona termodynamiky víme, že neuspořádanost vesmíru musí vzrůstat (viz str. 79). Změna volné energie ΔG je mírou změny v uspořádanosti způsobené reakcí a definujeme ji tak, že ΔG je záporná, jestliže neuspořádanost vzrůstá.

Jinými slovy, chemická reakce probíhající spontánně musí mít zápornou ΔG .

$$G_{\text{produkty}} - G_{\text{reaktanty}} = \Delta G < 0$$

PŘÍKLAD: Rozdíl volné energie 100 mL 10 mM roztoku sacharosy a 100 mL roztoku 10 mM glukosy + 10 mM fruktosy je -23 J . Proto může hydrolyza (sacharosa \rightarrow glukosa + fruktosa) probíhat samovolně čili spontánně.



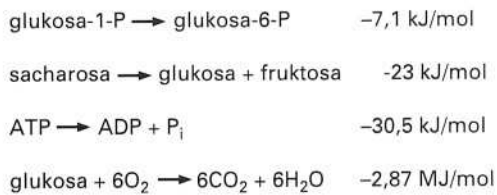
Naopak opačná reakce (glukosa + fruktosa \rightarrow sacharosa), jejíž ΔG je $+23 \text{ J}$, nemůže probíhat, pokud reakci nespřáhneme s jinou, exergonickou reakcí (viz str. 89).

PŘEDVÍDÁNÍ PRŮBĚHU REAKCE

Abychom určili výsledek reakce, zda bude probíhat doprava nebo doleva, kde se zastaví, atd., je třeba znát změnu její **standardní energie** (ΔG°). Tato hodnota představuje zisk nebo ztrátu volné energie při reakci jednoho molu reaktantu na jeden mol produktu za standardních podmínek, tedy při koncentraci 1 M a při pH 7.

ΔG° pro některé reakce

Hybná síla

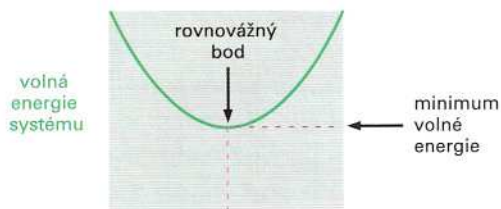


CHEMICKÁ ROVNOVÁHA

Existuje pevný vztah mezi standardní změnou volné energie reakce, ΔG° , a její rovnovážnou konstantou K . Tak reverzibilní reakce



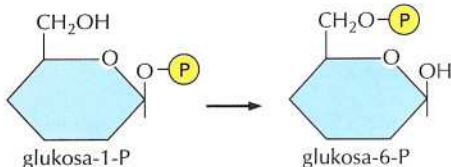
bude probíhat tak dlouho, dokud se poměr koncentrací $[B]/[A]$ nevyrovná K . Tehdy dosáhne volná energie systému svého minima.



$$\Delta G^\circ = -5,68 \text{ kJ/mol} \log_{10} K$$

$$K = 10^{-\Delta G^\circ / 5,68}$$

Například reakce



má $\Delta G^\circ = -7,27$ kJ/mol. Proto bude rovnovážná konstanta rovna $K = 10^{7,27/5,68} = 10^{1,28} = 19$ a reakce dosáhne rovnováhy při poměru $[glukosa-6-P]/[glukosa-1-P] = 19$

SPŘAŽENÉ REAKCE

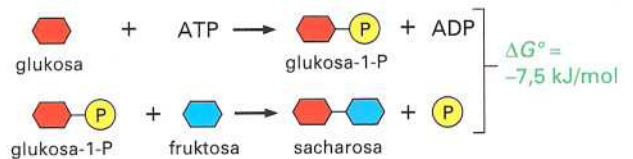
Reakce lze spřáhnout, jestliže sdílejí alespoň jeden společný intermediát. V našem případě je výsledná změna volné energie prostě součtem jednotlivých hodnot ΔG° . Reakce, která má nevýhodnou, tedy kladnou, změnu volné energie je tedy poháněna reakcí s absolutně větší zápornou změnou volné energie.

JEDNODUCHÁ REAKCE



ČISTÝ VÝSLEDEK: reakce neproběhne

SPŘAŽENÁ REAKCE



ČISTÝ VÝSLEDEK: sacharosa se vytvoří v reakci poháněné hydrolýzou ATP

MAKROERGNÍ VAZBY

Jednou z nejběžnějších reakcí v buňce je **hydrolýza**, při níž se kovalentní vazba štěpí za adice vody.



ΔG° této reakce se někdy nazývá vazebná energie. Látky jako acetylfosfát a ATP jsou definovány vysoce negativní hodnotou ΔG° a obsahem tzv. makroergních vazeb.

	ΔG° (kJ/mol)
acetyl $P_i \rightarrow$ acetát + P_i	-43,1
ATP \rightarrow ADP + P_i	-30,5
glukosa-6-P \rightarrow glukosa + P_i	-13,8

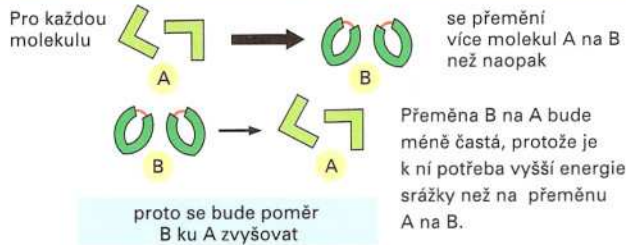
(Pro jednoduchost byla v rovnicích vynechána voda.)

REAKCE

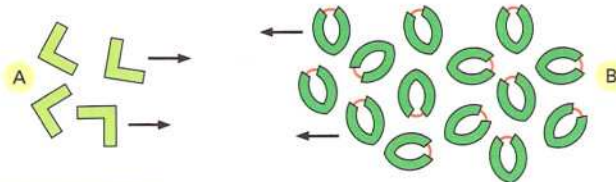


Tvorba B je energeticky výhodná, avšak díky termálnímu bombardování se bude vždycky něco B přeměňovat na A a naopak.

VYJDĚME Z NESTEJNÉHO POČTU MOLEKUL A A B



NAKONEC se vytvoří tolik molekul B, že to bude stačit ke kompenzaci pomalé přeměny B → A. Tehdy se dosáhne rovnováhy.



V ROVNOVÁŽE je počet molekul A přeměňovaných na molekuly B za danou časovou jednotku stejný jako počet opačných přeměn, takže poměr $[A]/[B]$ bude konstantní.

Obrázek 3-20 Chemická rovnováha. Když reakce dosáhne rovnováhy, jsou toky reagujících molekul jedním i druhým směrem stejně velké.

krabice obsahuje 90 „hlav“ a 10 „orlů“, ale je to méně pravděpodobné, pokud krabice obsahuje 10 „hlav“ a 90 „orlů“. Ze zcela stejného důvodu bude při vratné (reversibilní) reakci $A \rightleftharpoons B$ velký přebytek A oproti B podporovat průběh reakce ve směru $A \rightarrow B$; bude tedy existovat více molekul A podstupujících reakci $A \rightarrow B$ než molekul B podstupujících reakci $B \rightarrow A$. Proto se ΔG stává tím zápornější pro přechod $A \rightarrow B$ (a tím kladnější pro přechod $B \rightarrow A$), čím více vzrůstá poměr A k B.

Jak velký rozdíl koncentrace je třeba k vyrovnání daného poklesu energie chemické vazby (a současného uvolnění tepla)? Odpověď není jasná intuitivně, ale lze ji zjistit z termodynamické analýzy, která umožní oddělit část změny volné energie závislou na koncentraci od části ΔG , která na koncentraci nezávisí. ΔG dané reakce lze přitom psát jako součet dvou částí: první část, zvaná *standardní změna volné energie*, ΔG° , závisí na vnitřních vlastnostech reagujících molekul, zatímco druhá část závisí na jejich koncentracích. Pro jednoduchou reakci $A \rightarrow B$ při 37°C platí:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln ([B]/[A])$$

kde ΔG je v kilojoulech na mol, $[A]$ a $[B]$ označují koncentrace látek A a B a \ln je přirozený logaritmus; je třeba připomenout, že $\ln A = 2,303 \log A$. R je plynová konstanta rovná $8,3145 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ a T je absolutní teplota v kelvinech.

Všimněte si, že při stejné molární koncentraci A a B je $\Delta G = \Delta G^\circ$ (protože $\ln 1 = 0$). Jak asi správně tušíte, ΔG je tím zápornější, čím je poměr B ku A menší (přirozený logaritmus čísel menších než 1 je záporný).

Tabulka 3-1 Vztah mezi změnou volné energie a rovnovážnou konstantou

rovnovážná konstanta	volná energie
$\frac{[B]}{[A]} = K$ (litr/mol)	látka B minus volná energie látky A [kJ/mol]
10^5	-29,7
10^4	-23,7
10^3	-17,9
10^2	-11,7
10	-5,85
1	0
10^{-1}	5,85
10^{-2}	11,7
10^{-3}	17,9
10^{-4}	23,7
10^{-5}	29,7

Hodnoty rovnovážné konstanty byly vypočteny pro jednoduchou chemickou reakci $A \rightleftharpoons B$ s použitím rovnice v textu.

ΔG° je zde uvedena v kilojoulech na mol při 37 °C (4,184 kJ = 1 kcal). Jak je vysvětleno v textu, ΔG° představuje rozdíl volných energií výchozích látek a produktů při standardních podmínkách (když jsou všechny složky přítomny v koncentraci 1,0 mol/litr).

Z této tabulky vidíme, že při příznivé změně volné energie -18 kJ/mol pro přechod $A \rightarrow B$ bude ve stavu B tisíckrát více molekul než ve stavu A.

Když koncentrační efekt právě vyrovnává impuls, který reakci uděluje ΔG° , je dosaženo **chemické rovnováhy**. V takovém případě nedochází k žádné výsledné změně volné energie, která by reakci poháněla v tom či onom směru (obr. 3-20) Platí zde, že $\Delta G = 0$, a z předchozí rovnice dostáváme pro [A] a [B] vztah

$$-RT \ln ([B]/[A]) = \Delta G^\circ.$$

což znamená, že při 37 °C nastává chemická rovnováha, když (vyjádřeno v kJ/mol)

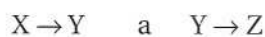
$$[B]/[A] = e^{-\Delta G^\circ / 2,578}$$

Tabulka 3-1 ukazuje, jak rovnovážný poměr A ku B (vyjádřený jako rovnovážná konstanta K) závisí na hodnotě ΔG° .

Je důležité si uvědomit, že když enzym (nebo jakýkoli katalyzátor) snižuje potřebnou aktivační energii pro reakci $A \rightarrow B$, snižuje stejným způsobem také aktivační energii pro reakci $B \rightarrow A$ (viz obr. 3-12). Enzym tedy urychlí reakce směrem doprava i doleva stejně a rovnovážný bod reakce a ΔG° zůstanou nedotčeny (obr. 3-21).

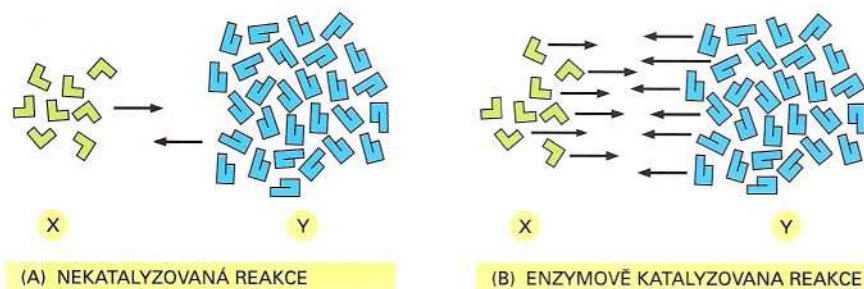
Pro následné reakce se hodnoty ΔG° sčítají

Průběh většiny reakcí může být předpovězen kvantitativně. Byla vytvořena velká sbírka termodynamických údajů, které umožňují vypočítat standardní změny volné energie ΔG° pro většinu důležitých metabolických reakcí v buňce. Celková změna volné energie v metabolické dráze je potom součtem změn volné energie pro každý z dílčích kroků této dráhy. Podívejte se například na dvě následné reakce



pro které jsou hodnoty $\Delta G^\circ +20,9$ a $-54,4$ kJ/mol. (Vzpomeňte si, že mol je 6×10^{23} molekul látky.) Pokud tyto dvě reakce poběží za sebou, bude ΔG° celkové reakce 33,5 kJ/mol. Energeticky nevýhodná reakce $X \rightarrow Y$, která nepoběží spontánně, může být poháněna energeticky výhodnou reakcí $Y \rightarrow Z$ za předpokladu, že tato reakce bude následovat po reakci první. Je třeba si uvědomit, že určité množství Y vznikne z X i v energeticky nevýhodné reakci a je okamžitě použito pro reakci $Y \rightarrow Z$.

Buňky tedy mohou vyvolat energeticky nepříznivou reakci $X \rightarrow Y$, pokud je enzym katalyzující tuto reakci doplněn druhým enzymem, který katalyzuje energeticky *výhodnou* reakci $Y \rightarrow Z$. Ve výsledném efektu bude reakce $Y \rightarrow Z$ působit jako „čerpadlo“, které řídí přeměnu všech molekul X v molekuly Y a z nich v molekuly Z (obr. 3-22). Například několik z reakcí dlouhé dráhy, ve které se mění cukry v CO_2



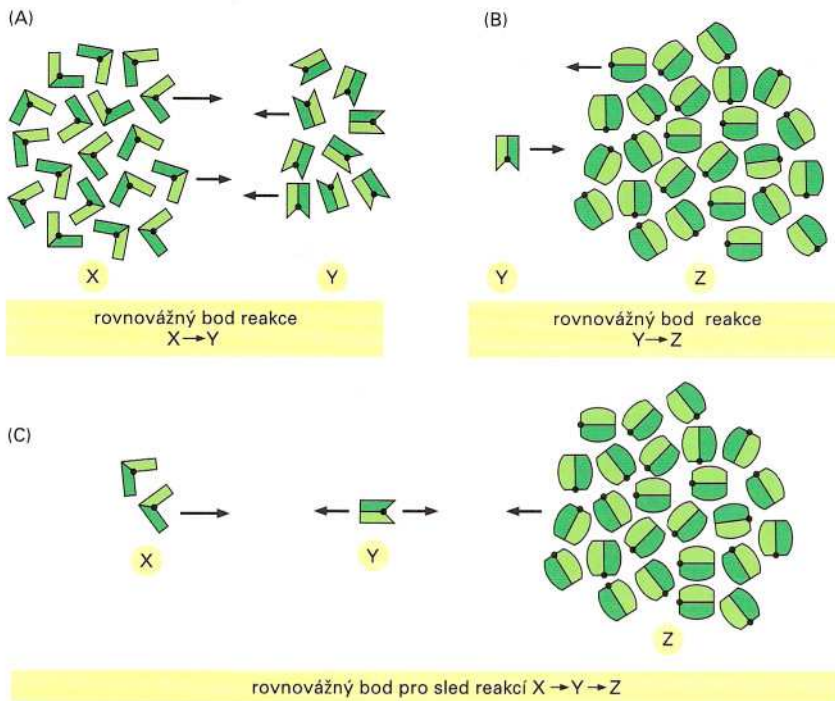
(A) NEKATALYZOVANÁ REAKCE

(B) ENZYMOVĚ KATALYZOVANÁ REAKCE

Otázka 3-4 Zamyslete se nad analogií otřásající se krabice s mincemi, která je popsána v textu. Reakce překlápění mincí, při které padne hlava (H) nebo orel (O), je popsána rovnicí $H = O$.

- A. Jaké jsou ΔG a ΔG° v této analogii?
- B. Co odpovídá teplotě, při které reakce probíhá? Co odpovídá aktivační energii reakce? Představte si, že máte „enzym“ zvaný otřásáča, který tuto reakci katalyzuje. Jaký by mohl být účinek otřásáča a co by, mechanicky vzato, mohla otřásáča dělat v této analogii?

Obrázek 3-21 Enzymy nemohou posouvat chemickou rovnováhu reakcí. Enzymy, podobně jako jiné katalyzátory, urychlují reakci stejně v obou směrech. Proto je u katalyzované i nekatalyzované reakce počet molekul podstupujících změnu $X \rightarrow Y$ stejný jako počet molekul reagujících ve směru $Y \rightarrow X$, když je poměr počtu molekul Y k počtu molekul X 3,5:1. Jinými slovy, obě reakce dosahují rovnováhy v témže bodě.



Obrázek 3-22 Jak může být energeticky nevýhodná reakce poháněna následující druhou reakcí. (A) V rovnováze se vyskytují molekuly X v dvakrát větším počtu než molekuly Y, neboť stavu X přísluší nižší energie než stavu Y. (B) V rovnováze existuje 25krát více molekul Z než Y, protože molekuly Z mají mnohem menší energii než molekuly Y. (C) Jsou-li reakce v (A) a (B) spřaženy, budou se téměř všechny molekuly X měnit na molekuly Z.

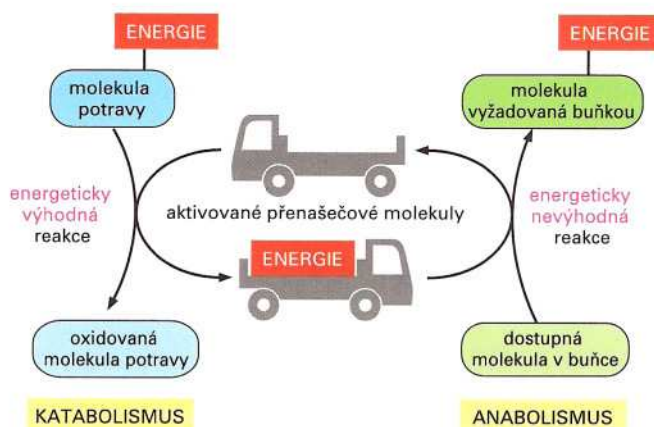
a H_2O , je energeticky nevýhodných. Reaktanty však přesto spějí po této dráze ke svému cíli, neboť celková ΔG° pro sled po sobě jdoucích reakcí má značně zápornou hodnotu.

Vytvoření řady následných reakcí se však často z mnoha důvodů nehodí. Často je požadovanou drahou pouhá reakce $X \rightarrow Y$ bez další přeměny Y v nějaký jiný produkt. Naštěstí existují další obecné způsoby, jak využít enzymy ke spřažení reakcí. Tyto způsoby jsou hlavním námětem další části textu.

Otázka 3-5 Podívejte se pozorně na obrázek 3-22. Načrtněte energetický diagram podobný grafu na obrázku 3-12 pro obě jednotlivé reakce a pro spojené reakce. Ukažte v grafu standardní změny energie pro reakce $X \rightarrow Y$, $Y \rightarrow Z$ a $X \rightarrow Z$. Ukažte, jak by diagram změnily enzymy katalyzující tyto reakce.

Aktivované nosičové molekuly a biosyntéza

Energie uvolněná při oxidaci molekul potravy musí být přechodně uskladněna do doby, než může být odeslána do místa výroby jiných malých organických molekul nebo větších a složitějších molekul, které buňka potřebuje. Ve většině případů se uchovává jako energie chemické vazby v malém souboru aktivovaných „nosičových molekul“, které



Obrázek 3-23 Přenos energie a úloha aktivovaných přenašečů v metabolismu. Tím, že slouží jako přepravci energie, plní molekuly aktivovaných přenašečů svou funkci prostředníka, který spojuje reakce odbourávání molekul potravy a uvolňování energie (*katabolismus*) s biosyntézou malých a velkých organických molekul, která vyžaduje energii (*anabolismus*).

obsahují jednu či více energeticky bohatých vazeb. Tyto molekuly rychle difundují buňkou a přitom přenášejí svou vazebnou energii z místa jejího vytvoření do oblastí, kde je tato energie využita pro biosyntézu a další nezbytné aktivity buňky (obr. 3-23).

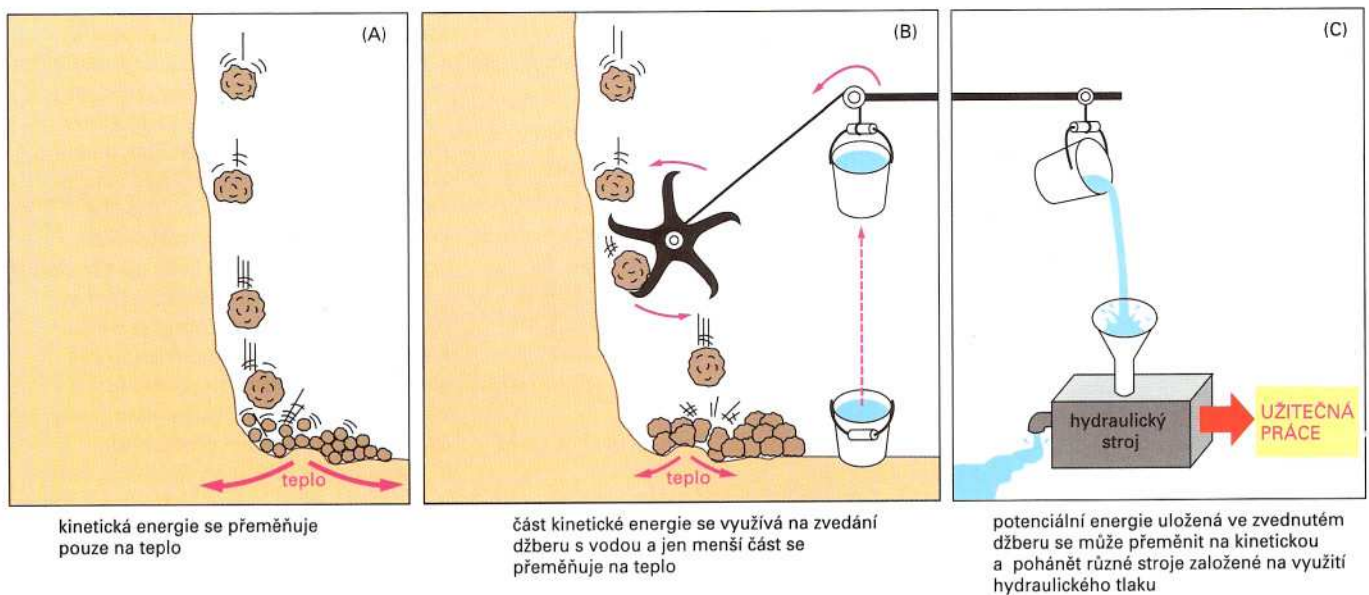
Aktivované přenašeče skladují energii ve snadno směnitelné formě: buď jako chemickou skupinu, která se ochotně přenáší, nebo jako elektrony s vysokým obsahem energie. Mohou tak být v biosyntetických reakcích zároveň zdrojem energie i chemických skupin. Z historických důvodů se tyto molekuly někdy uvádějí jako *koenzymy*. Nejdůležitější z aktivovaných molekul jsou ATP a dvě blízké příbuzné molekuly NADH a NADPH. Uvidíme, že buňky používají aktivované nosičové molekuly jako peníze, jimiž platí za reakce, které by jinak neproběhly.

Tvorba aktivovaného nosiče je spřažena s energeticky výhodnou reakcí

Při oxidaci paliva (např. glukosy) v buňce enzymově katalyzované reakce zajistí, že se velká část volné energie uvolněné během oxidace zachytí v chemicky užitečné formě a nerozptýlí se v podobě tepla. Toho se dosahuje prostřednictvím **spřažené reakce**, v níž se energeticky výhodné reakce užívá k pohonu reakce energeticky nevýhodné, která vytvoří aktivovanou nosičovou molekulu nebo zajistí jiné užitečné uložení energie. Mechanismy spřažení vyžadují enzymy a jsou nepostradatelné pro všechny energetické transakce v buňce.

Podstata spřažených reakcí je ilustrována mechanickou analogií na obr. 3-24, ve které je příznivá chemická reakce představována kusy horniny padajícími ze skály. Energie padajících kamenů by se normálně rozptýlila jako teplo, které by vzniklo třením při dopadech kamenů na zem (podívejte se na situaci s padající cihlou na obr. 3-7). Při pečlivém návrhu by však část této energie mohla pohánět lopatkové kolo, které by zdvihalo vědro vody (obr. 3-24B). Protože kameny mohou dopadnout na zem až poté, co uvedou do pohybu lopatkové kolo, říkáme, že energeticky výhodná reakce padání kamenů byla přímo *spřažena* s energeticky nevýhodnou reakcí zdvihání vědra s vodou. Všimněte

Obrázek 3-24 Mechanický model ilustrující příklad spřažených chemických reakcí. Samovolná reakce v části (A) by mohla sloužit jako analogie přímé oxidace glukosy na CO_2 a H_2O , která produkuje jen teplo. V (B) je tato reakce spřažena s druhou reakcí; tato druhá reakce by mohla sloužit jako analogie pro syntézu molekul aktivovaných přenašečů. Energie produkovaná v (B) je v mnohem užitečnější formě a může být použita k pohonu jinak energeticky nevýhodných reakcí (C).



si, že díky tomu, že se část energie v (B) využije k práci, dopadají kameny na zem menší rychlostí než v (A) a jen méně energie se rozptýlí v podobě tepla.

Přesně stejný děj probíhá v buňkách, kde enzymy hrají roli analogickou našemu lopatkovému kolu. Mechanismy, probírané v Kapitole 4, spřahují energeticky výhodnou reakci, třeba oxidaci potravy, s energeticky nevýhodnou reakcí, například s tvorbou aktivované nosičové molekuly. V důsledku toho se množství tepla uvolněné při oxidaci sníží přesně o energii, která je uložena v energeticky bohatých kovalentních vazbách aktivované nosičové molekuly. Aktivovaná nosičová molekula naopak získává příděl energie v množství, které stačí k pohonu chemické reakce na jiném místě v buňce.

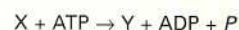
ATP je nejčastěji užívanou nosičovou molekulou

Nejdůležitějším a nejvšestrannějším aktivovaným nosičem v buňce je ATP (adenosin-5-trifosfát). Podobně jako může být energie zvednutí vědra vody na obrázku 3-24B použita k pohonu celé řady hydraulických strojů, slouží ATP jako pohodlná a všestranná energetická rezerva či měna k pohonu mnoha chemických reakcí v buňkách. Jak je ukázáno na obrázku 3-25, vzniká ATP v energeticky nevýhodné fosforylační reakci, ve které je k ADP přidána fosfátová skupina. Je-li třeba, odevzdá ATP svůj energetický balíček při energeticky výhodné hydrolyze na ADP. Znovu vzniklý ADP je potom dostupný pro další kolo fosforylační reakce, v níž vzniká ATP.

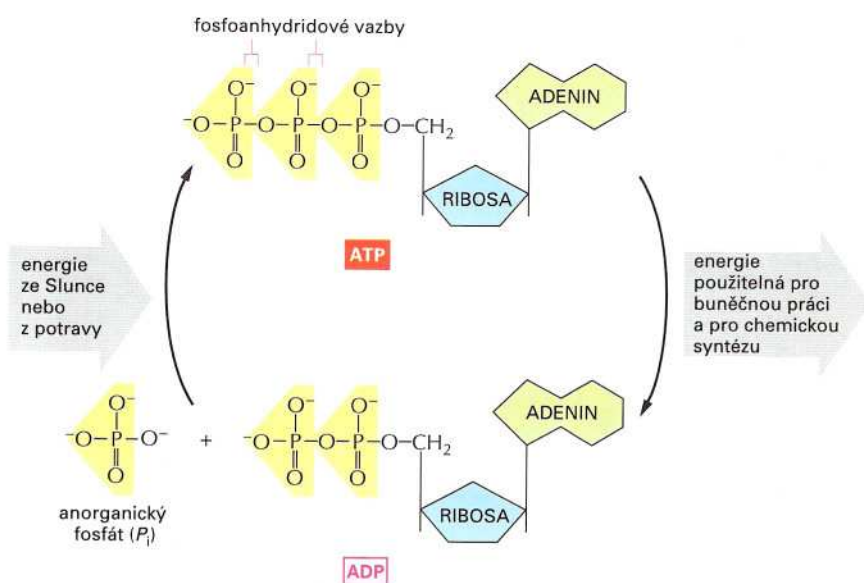
Energeticky výhodná reakce hydrolyzy ATP je spřažena s mnoha jinak nevýhodnými reakcemi, v nichž se syntetizují další molekuly. S několika takovými reakcemi se setkáme později v této kapitole. Mnoho z nich zahrnuje přenos terminální fosfo-skupiny v ATP na jinou molekulu, jak nám ilustruje fosforylační reakce na obrázku 3-26.

ATP je nejhojnějším aktivním nosičem v buňkách. Jedním z mnoha příkladů jeho využití je dodávka energie pumpám, které přeppravují látky do buňky i z buňky (Kapitola 12). Pohání také molekulo-

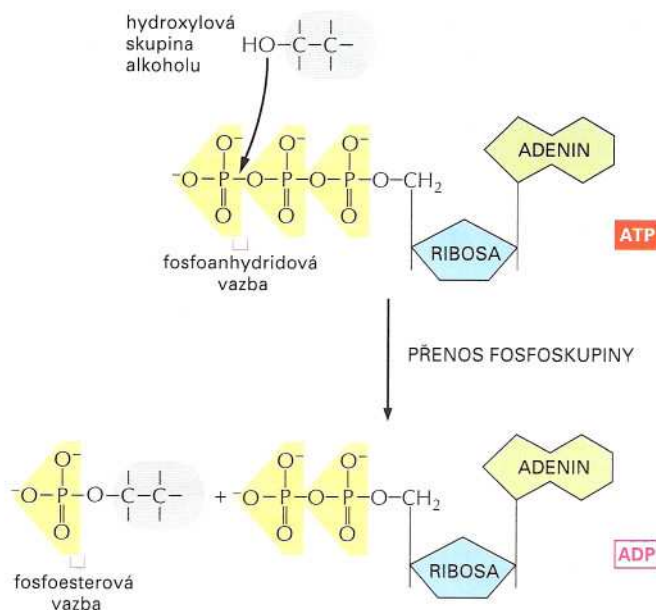
Otázka 3-6 Použijte obrázku 3-24B k ilustraci následující reakce poháněné hydrolyzou ATP:



- A. Která molekula či molekuly by mohly být v tomto případě analogické (a) hornině na vrcholu skály, (b) úlomkům rozbité horniny na úpatí skály (c) vědru v jeho nejvyšším bodě, (d) vědru na zemi?
- B. Co by mohlo být analogické (a) kusům horniny dopadajícím na zem bez lopatkového kola na obrázku 3-24A a (b) hydraulickému stroji na obrázku 3-24C?



Obrázek 3-25 Vzájemná přeměna ATP a ADP. Poslední dvě fosforylové skupiny drží se zbytkem molekuly pohromadě fosfoanhydridovými vazbami s vysokým obsahem energie a ochotně se přenášejí. Po přidání vody k ATP může vzniknout ADP a (P_i). Tato hydrolyza koncového fosfátu ATP poskytne 46-54 kJ využitelné energie na mol reagujícího ATP. Značně záporná ΔG° této reakce má několik příčin. Uvolnění koncové fosfátové skupiny odstraní energeticky nevýhodné odpuzování mezi sousedními zápornými náboji a uvolněný ion anorganického fosfátu (P_i) je stabilizován rezonancí a energeticky výhodnou tvorbou vodíkových můstků s molekulami vody. Tvorba ATP z ADP a P_i představuje obrácenou hydrolyzu a vyžaduje spřažení této energeticky nevýhodné reakce s jinou reakcí, která je energeticky výhodnější.



Obrázek 3-26 Příklad reakce přenosu fosfoanhydridové vazby. Protože se energeticky bohatá fosfoanhydridová vazba v ATP převádí na vazbu fosfoesterovou, je tato reakce energeticky výhodná a má značně zápornou ΔG° . Reakce tohoto typu jsou zahrnuty v syntéze fosfolipidů a v prvních krocích odbourávání cukrů.

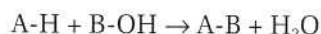
Otázka 3-7 Fosfoanhydridová vazba s vysokým obsahem energie, která v ATP vznikla při kondenzaci dvou fosfátových skupin, má ΔG° 30,5 kJ/mol. Hydrolyza této vazby uvolní 46-54 kJ využitelné energie na 1 mol ATP. Jak je to možné? Proč je podle vás místo přesné hodnoty ΔG° udáno rozmezí energií?

vě motory, které umožňují stahování svalových buněk a transport materiálů z jednoho konce dlouhého axonu nervové buňky na druhý (Kapitola 16).

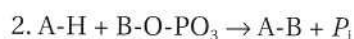
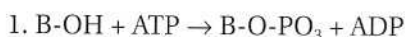
Energie uložená v ATP se často využívá ke spojení dvou molekul

Už jsme si všimli jednoho způsobu, kterým lze energeticky výhodnou reakci spřáhnout s energeticky nevýhodnou reakcí $X \rightarrow Y$ a umožnit tak její průběh. V tomto schématu druhý enzym katalyzuje energeticky výhodnou reakci $Y \rightarrow Z$ a vtahuje do děje reakci přeměny X na Y (viz obr. 3-22). Je-li však požadovaným produktem Y a nikoli Z , nelze tento mechanismus využít.

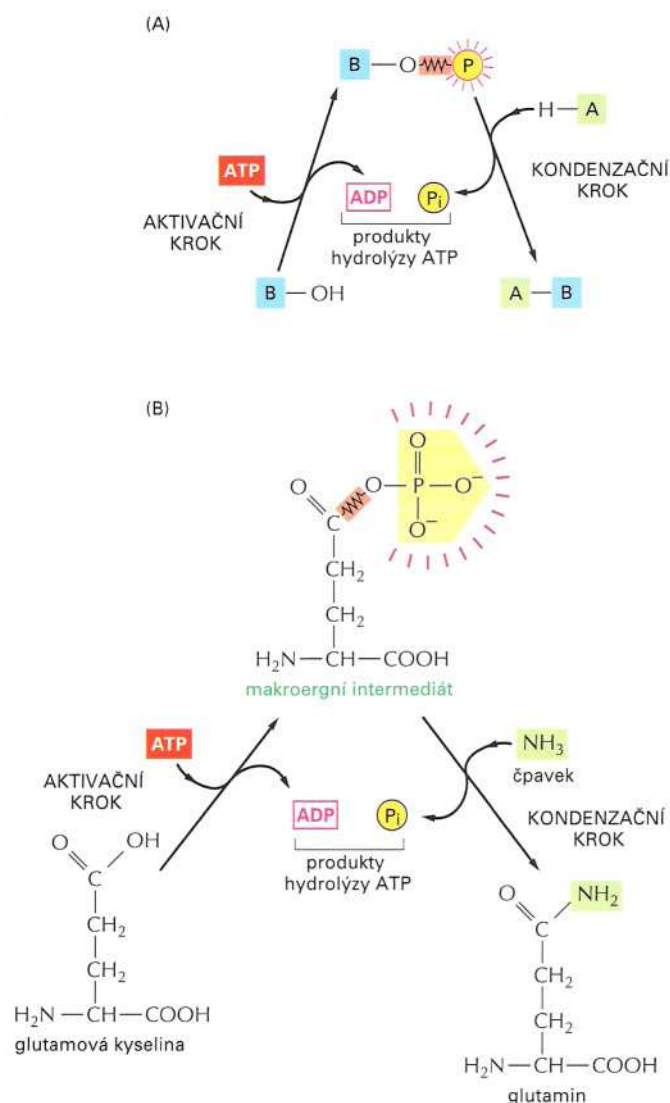
Častým typem reakce potřebné pro biosyntézu je spojení dvou molekul A a B za vzniku $A-B$ v energeticky nevýhodné kondenzační reakci



Pro vznik $A-B$ z $A-H$ a $B-OH$ existuje nepřímá dráha spřážená s hydrolyzou ATP, která reakci pohání. V tomto případě se energie z hydrolyzy ATP použije nejprve k přeměně $B-OH$ na meziprodukt s vysokým obsahem energie. Tato sloučenina potom reaguje přímo s $A-H$ za vzniku $A-B$. Nejjednodušší možný mechanismus zahrnuje přenos fosforu z ATP na $B-OH$ za vzniku $B-O-PO_3$, přičemž se reakce skládá z pouhých dvou kroků:



Kondenzační reakce, která je sama o sobě energeticky nepříznivá, je v enzymově katalyzované reakční dráze poháněna přímým spřážením s hydrolyzou ATP (obrázek 3-27A).

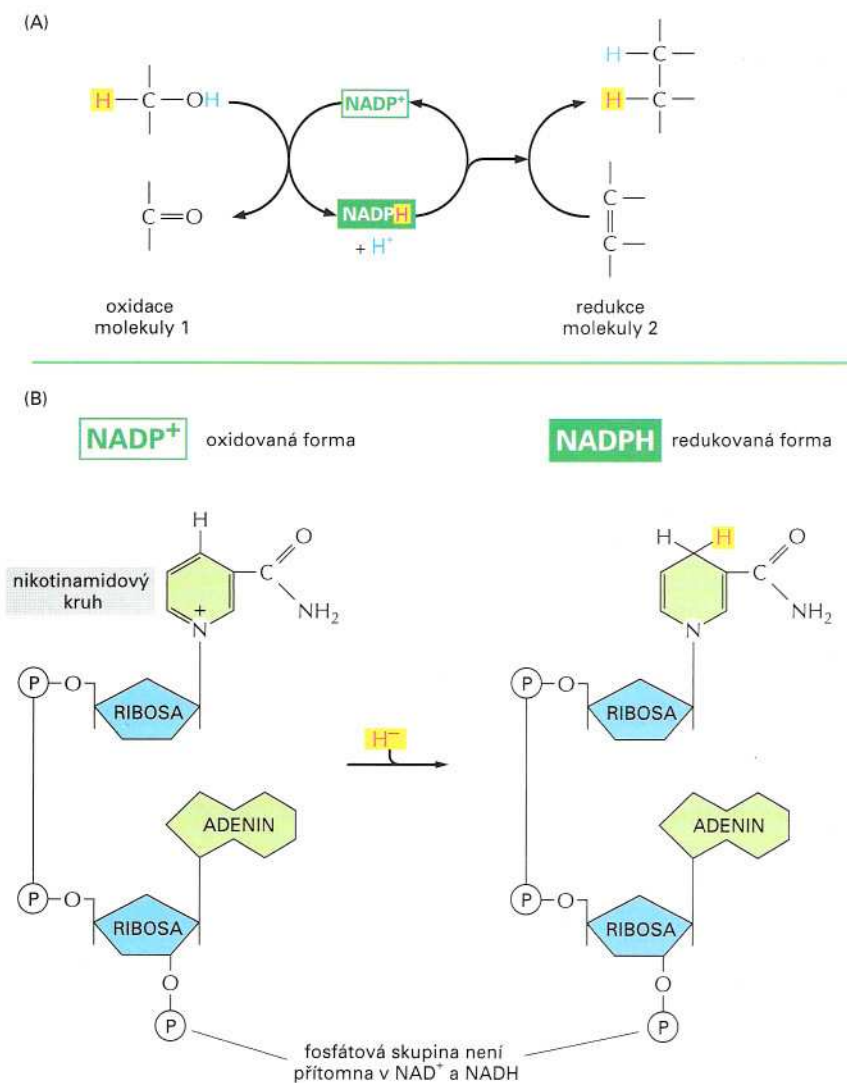


Obrázek 3-27 Příklad energeticky nevýhodné biosyntetické reakce, kterou pohání hydrolýza ATP. (A) Schematické znázornění tvorby A-B v kondenzační reakci popsané v textu. (B) Biosyntéza glutaminu. Kyselina glutamová je nejprve převedena na fosforylovaný meziprodukt s vysokým obsahem energie (který odpovídá sloučenině B-O-PO₃ popsané v textu). Tento meziprodukt potom reaguje s amoniakem (odpovídajícím sloučenině A-H) za vzniku glutaminu. V tomto případě se oba kroky odehrávají na povrchu stejného enzymu *glutaminsyntázy*. Všimněte si, že aminokyseliny jsou pro větší názornost uvedeny ve svých neiontových formách.

Biosyntetická reakce přesně tohoto typu se uplatňuje při syntéze aminokyseliny glutaminu, jak je ukázáno na obrázku 3-27B. Brzy uvidíme, že velmi podobné (ale složitější) mechanismy jsou využívány k produkci téměř všech velkých molekul v buňce.

NADH a NADPH jsou důležité přenašeče elektronů

Další molekuly aktivovaných přenašečů se účastní oxidačně-redukčních reakcí a jsou obecně částí spřažených reakcí v buňkách. Tyto aktivované přenašeče se zaměřují na vysokoenergetické elektrony a atomy vodíku. Nejdůležitějšími z nich jsou NAD⁺ (nikotinamidadenin dinukleotid) a blízkce příbuzný NADP⁺ (nikotinamidadenin dinukleotidfosfát). Později prozkoumáme některé reakce, jichž se tyto látky účastní. NAD⁺ a NADP⁺ získávají při své přeměně na NADH (*redukovaný* nikotinamidadenin dinukleotid) a NADPH (*redukovaný* nikotinamidadenin dinukleotidfosfát) každý po „balíčku energie“, který odpovídá dvěma vysokoenergetickým elektronům a protonu (H⁺). Na tyto molekuly lze tedy pohlížet i jako na přenašeče vodíkových iontů (H⁺ a dva elektrony, neboli H⁻).

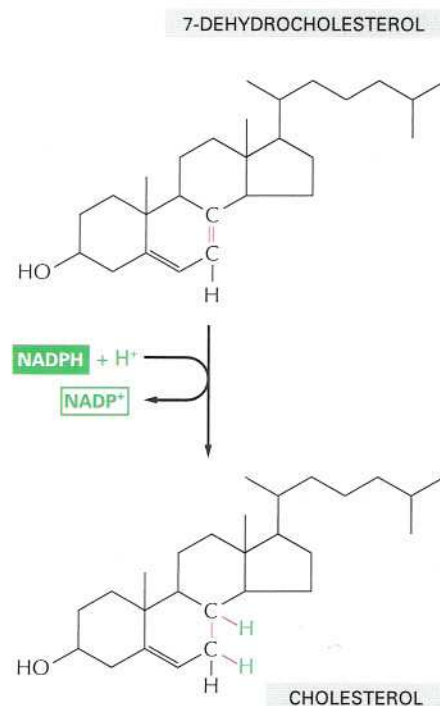


Obrázek 3-28 NADPH, důležitý přenašeč elektronů. (A) NADPH se tvoří v reakcích obecného typu ukázaných vlevo, ve kterých se ze substrátu odstraní dva vodíkové atomy. Oxidovaná forma nosičové molekuly, NADP⁺, získá jeden vodíkový atom a jeden elektron (hydridový ion), zatímco proton (H⁺) z druhého atomu H je uvolněn do roztoku. Protože NADPH drží svůj hydridový ion vysokoenergetickou vazbou, může se tento přidat hydridový ion snadno přenést na jiné molekuly, jak je ukázáno vpravo. (B) Struktura NADP⁺ a NADPH. Část molekuly NADP⁺, známá jako nikotinamidový kruh, přijímá dva elektrony společně s protonem (ekvivalent hydridového iontu H⁻) a vytváří NADPH. Molekuly NAD⁺ a NADH mají stejnou strukturu jako NADP⁺ a NADPH, jen s tím rozdílem, že oběma z nich chybí ukázaná fosfátová skupina.

Podobně jako ATP je i NADPH aktivovaným nosičem, jenž se účastní mnoha důležitých biosyntetických reakcí, které by jinak byly energeticky nevýhodné. NADPH je produkován podle obecného schématu ukázaného na obrázku 3-28. Ve zvláštní sadě energeticky výhodných katabolických reakcí se z molekuly substrátu odstraní vodíkový atom H a dva elektrony a přidají se k nikotinamidovému kruhu NADP⁺; tak vznikne NADPH. Jde o typickou oxidačně-redukční reakci: substrát je oxidován a NADP⁺ je redukován.

NADPH ochotně odevzdává získaný hydridový ion v následných oxidačně-redukčních reakcích, neboť kruh může bez tohoto iontu dosáhnout stabilnějšího uspořádání elektronů. V této následné reakci, vytvářející NADP⁺, je to NADPH, který se oxiduje, zatímco substrát je redukován. NADPH ochotně odevzdává svůj hydridový ion jiným molekulám ze stejného důvodu jako ATP ochotně přenáší zbytek kyseliny fosforečné: v obou případech je přenos doprovázen uvolněním velkého

Obrázek 3-29 Závěrečná fáze jedné z biochemických cest vedoucích k cholesterolu. Jako u mnoha jiných biosyntetických reakcí se redukce vazby C=C dosahuje přenosem hydridového iontu z nosičové molekuly NADPH a protonu (H⁺) z roztoku.



Tabulka 3-2 Některé aktivované přenašečové molekuly s širokým uplatněním v metabolismu

Aktivovaný přenašeč	Přenášená skupina
ATP	fosfátová skupina
NADH, NADPH, FADH ₂	elektrony a atomy vodíku
acetyl CoA	acetylová skupina
karboxylovaný biotin	karboxylová skupina
S-adenosylmethionin	methylová skupina
uridindifosfoglukosa	glukosa

množství volné energie. Příklad využití NADPH v biosyntéze je ukázán na obrázku 3-29.

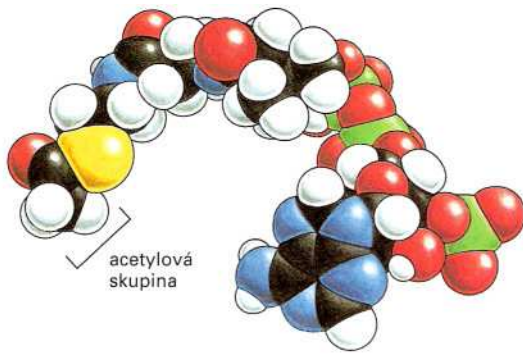
Rozdíl jednoho zbytku kyseliny fosforečné nemá podstatný vliv na schopnosti přenosu elektronů u NADPH ve srovnání s NADH, ale je velmi důležitý při jejich rozdílných rolích. Fosfátová skupina, kterou má NADPH navíc, je daleko od oblasti účastnící se přenosu elektronů (viz obr. 3-28B) a nemá žádný vliv na reakci přenosu. Dává však molekule NADPH ve srovnání s NADH poněkud odlišný tvar, a proto se NADH a NADPH vážou k odlišným skupinám enzymů. Tyto dva různé typy nosičů se tedy používají k přenosu elektronů (nebo hydridových iontů) do různých míst určení.

K čemu je dobrá taková dělba práce? Odpověď spočívá v potřebě regulovat nezávisle dva typy reakcí s přenosem elektronu. NADPH spolupracuje především s enzymy, které katalyzují anabolické reakce, a dodává elektrony s vysokým obsahem energie pro syntézu energeticky bohatých biologických molekul. Naopak NADH hraje zvláštní úlohu jako intermediát v katabolickém systému reakcí, které vytvářejí ATP oxidací molekul potravy, jak se probírá v Kapitole 4. Tvorba NADH z NAD⁺ a NADPH z NADP⁺ probíhá různými cestami, které jsou nezávisle regulovány, takže buňka může nastavit dodávání elektronů pro oba protichůdné účely. Uvnitř buňky je udržován vysoký poměr NAD⁺ k NADH, zatímco poměr NADP⁺ k NADPH je udržován nízký. To poskytuje velké množství NAD⁺ jako oxidačního činidla a velké množství NADPH jako činidla redukčního – přesně tak, jak to vyžadují jejich zvláštní úlohy v katabolismu a anabolismu.

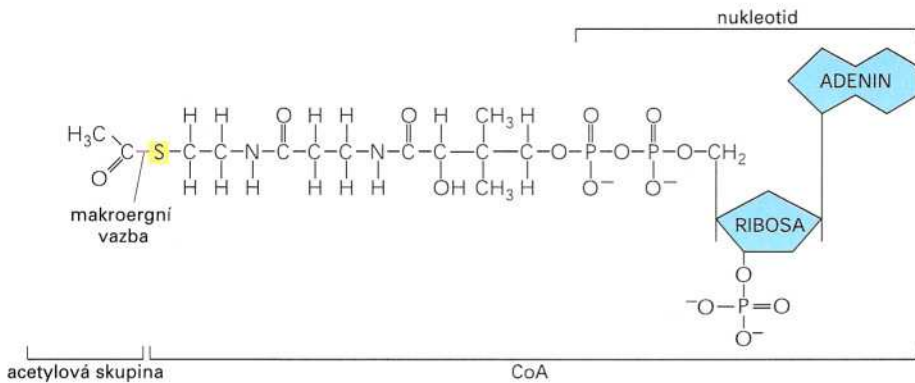
V buňkách existuje mnoho dalších aktivovaných přenašečových molekul

Existuje celá řada dalších aktivovaných přenašečů, které přebírají a přenášejí chemickou skupinu v reaktivní energeticky bohaté vazbě (tabulka 3-2). Například koenzym A přenáší ve vysoce reaktivní vazbě acetylovou skupinu a je v této formě znám jako acetyl-CoA (acetylkoenzym A). Struktura acetylkoenzymu A je ukázána na obrázku 3-30; při biosyntéze větších molekul přidává acetyl-CoA dvě uhlíkové jednotky.

V acetyl-CoA a v dalších přenašečových molekulách v tabulce 3-2 představuje přenášená skupina jen malou část molekuly. Zbytek je tvořen velkou organickou částí, která slouží jako pohodlná „rukojeť“, která

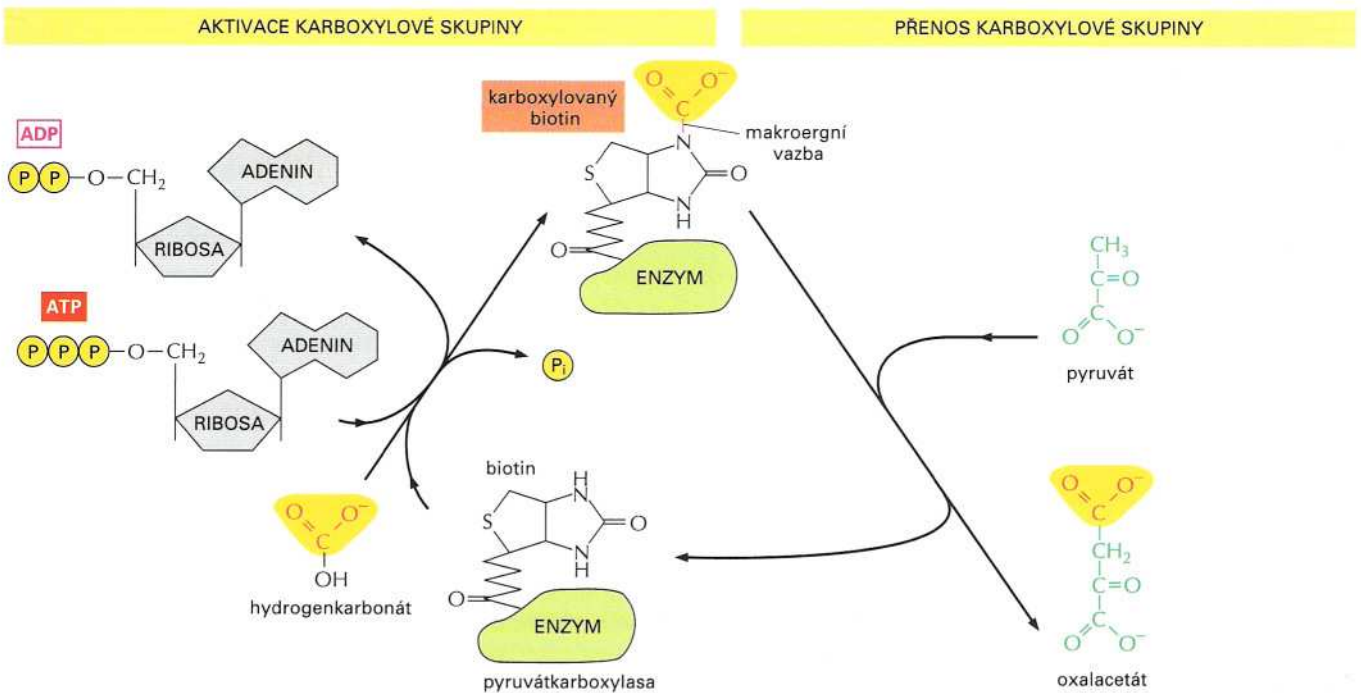


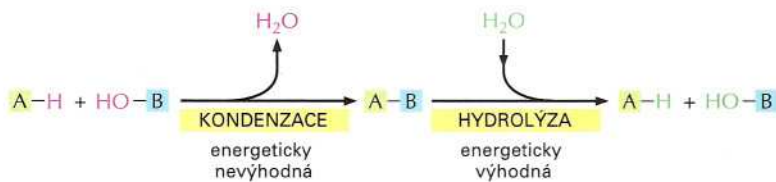
Obrázek 3-30 Struktura molekuly důležitého aktivovaného nosiče acetyl-CoA. Nad strukturou je ukázaný prostorový model. Atom síry (žlutě) tvoří thioesterový můstek k acetátu. Protože se jedná o vazbu s vysokým obsahem energie, která velké množství této energie uvolňuje při hydrolýze, přenáší se acetylová skupina ochotně na jiné molekuly.



Obrázek 3-31 Přenos karboxylové skupiny za použití aktivované přenašečové molekuly. Karboxylovaného biotinu používá enzym *pyruvátkarboxyláza* k přenosu karboxylové skupiny při tvorbě oxalacetátu, molekuly potřebné pro cyklus kyseliny citronové. Karboxylovou skupinu v této reakci přijímá pyruvát; jiné enzymy využívají biotin k přenosu karboxylové skupiny na jiné akceptorové molekuly. Všimněte si, že syntéza karboxylovaného biotinu vyžaduje energii pocházející z ATP – to je obecnou vlastností mnoha aktivovaných nosičů.

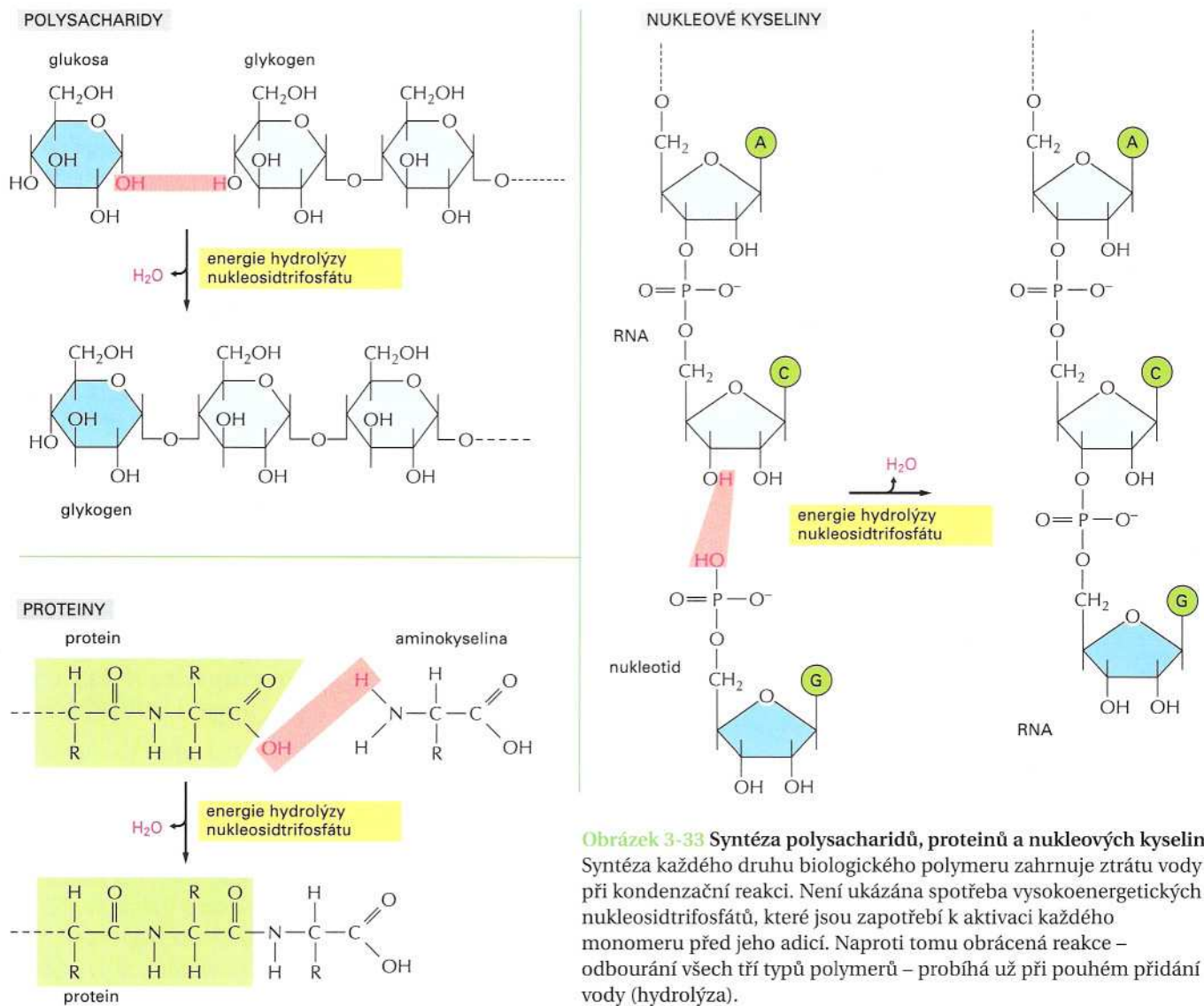
specifickému enzymu usnadňuje nalezení nosičové molekuly. Stejně jako u acetyl-CoA obsahuje tato rukojetová část velmi často nukleotid; tato zvláštní skutečnost je možná evolučním pozůstatkem. Má se za to, že hlavními katalyzátory pro první formy života na Zemi byly molekuly RNA (nebo jejich blízké příbuzné) a že proteiny vznikly až v dalším stadiu evoluce (viz Kapitola 7). To svádí k závěru, že mnoho dnes známých přenašečových molekul má svůj původ v raném světě ribonukleových kyselin, kde mohla být jejich nukleotidová část užitečná pro vazbu těchto molekul k enzymům na bázi RNA.



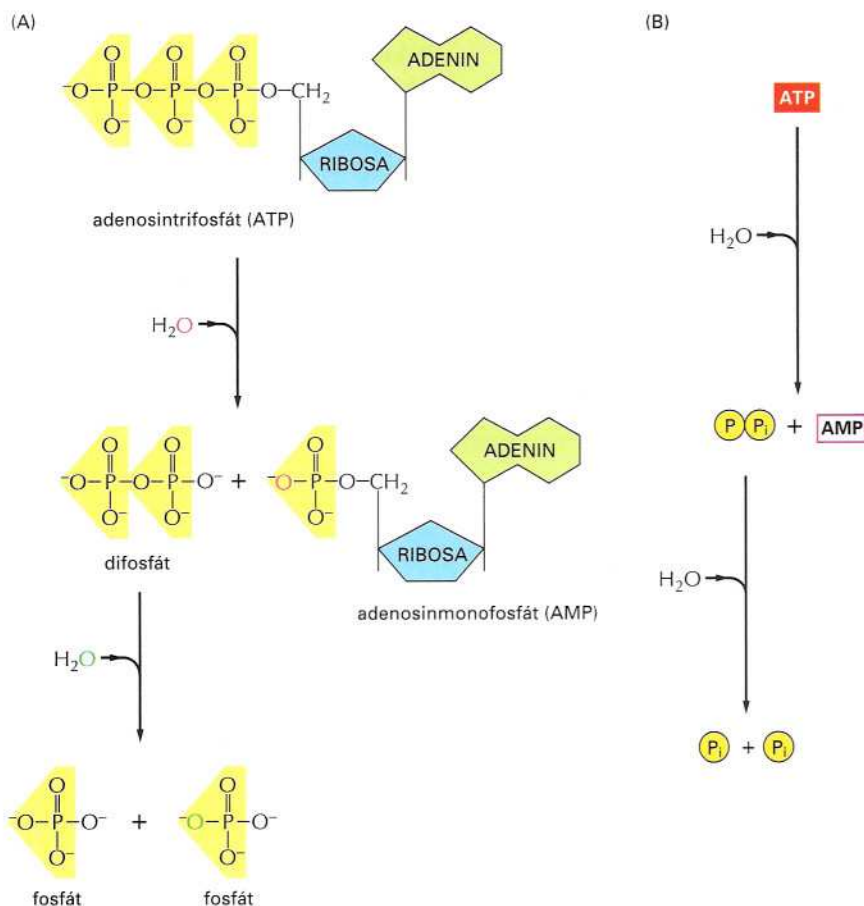


Obrázek 3-32 Kondenzace a hydrolyza jako opačné reakce. Makromolekuly v buňce jsou polymery, které vznikají z podjednotek (neboli monomerů) kondenzační reakcí a odbourávají se hydrolyzou. Všechny kondenzační reakce jsou energeticky nevýhodné.

Příklady typu přenosových reakcí katalyzovaných aktivovanými nosičovými molekulami ATP (přenos fosfátové skupiny) a NADPH (přenos elektronů a vodíku) byly ukázány na obrázcích 3-26 a 3-29. Další reakce mohou zahrnovat přenos methylu, karboxylu a glukosového zbytku pro účely biosyntézy. Aktivované nosiče obvykle vznikají v reakcích spřažených s hydrolyzou ATP (obrázek 3-31). Proto energie, která jejich skupinám umožňuje použití v biosyntéze, nakonec pochází z katabolických reakcí, které vytvářejí ATP. Podobné děje probíhají při syntéze makromolekul v buňce – nukleových kyselin, proteinů a polysacharidů, které probereme později.



Obrázek 3-33 Syntéza polysacharidů, proteinů a nukleových kyselin. Syntéza každého druhu biologického polymeru zahrnuje ztrátu vody při kondenzační reakci. Není ukázána potřeba vysokoenergetických nukleosidtrifosfátů, které jsou zapotřebí k aktivaci každého monomeru před jeho adicí. Naproti tomu obrácená reakce – odbourání všech tří typů polymerů – probíhá už při pouhém přidání vody (hydrolyza).



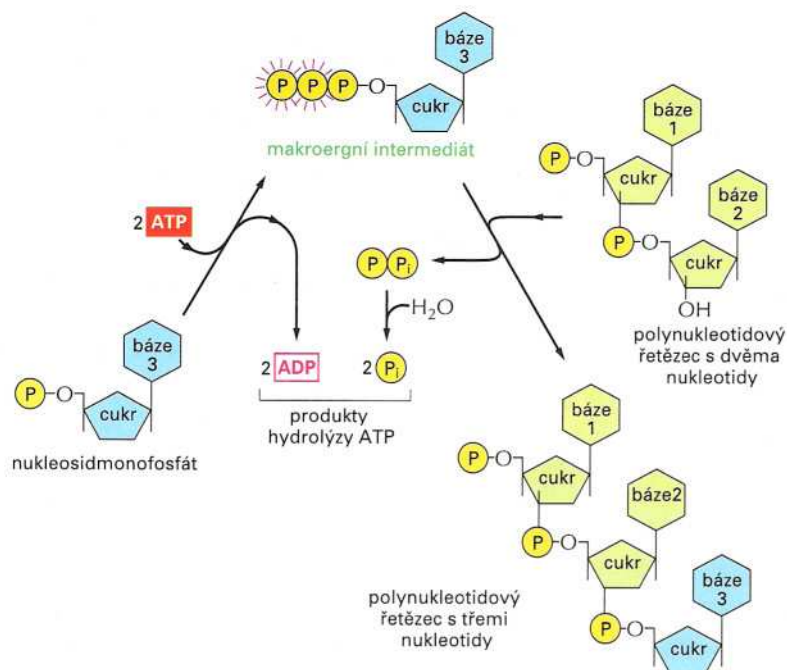
Obrázek 3-34 Alternativní dráha pro hydrolýzu ATP, v níž se nejprve vytvoří difosfát, který posléze hydrolyzuje. Tato dráha uvolňuje dvakrát více energie než reakce ukázaná dříve na obrázku 3-25. (A) Ve dvou následných hydrolytických reakcích zůstanou kyslíkové atomy ze zúčastněných se molekul vody vázány v produktech, ale vodíkové atomy disociují za vzniku volných vodíkových iontů H⁺. (B) Celková reakce ukázaná v souhrnné podobě.

Syntéza biologických polymerů vyžaduje přísun energie

Makromolekuly buňky tvoří naprostou většinu její suché hmotnosti, tedy hmotnosti, do níž se nepočítá voda. Tyto molekuly jsou vytvořeny z podjednotek (monomerů), spojených v *kondenzační* reakci, v níž byly ze dvou reagujících látek odstraněny části molekuly vody OH a H. Z toho plyne, že obrácená reakce – odbourání všech tří typů polymerů, se děje enzymově katalyzovanou adicí vody (*hydrolýza*). Tato hydrolytická reakce je energeticky výhodná, zatímco biosyntetické reakce vyžadují přísun energie a jsou mnohem složitější (obr. 3-32).

Nukleové kyseliny (DNA a RNA), proteiny a polysacharidy jsou polymery vzniklé opakovanou adicí *podjednotek* (zvaných také monomery) k jednomu konci rostoucího řetězce. Způsob syntézy každého z těchto typů molekul je načrtnut na obrázku 3-33. Jak je vidět, závisí kondenzační krok v každém z těchto případů na energii z hydrolýzy nukleosidtrifosfátu. S výjimkou nukleových kyselin nezůstávají ve výsledných molekulách žádné fosfátové skupiny. Které reakce uvolňují energii z hydrolýzy ATP spřažené se syntézou polymerů?

Pro každý typ makromolekuly existuje enzymově katalyzovaná dráha, která připomíná dříve probíranou dráhu syntézy aminokyseliny glutaminu (viz obr. 3-27). Princip je zcela shodný, neboť skupina OH určená k odstranění se nejprve aktivuje zapojením do vysokoe-



Obrázek 3-35 Syntéza polynukleotidu, RNA nebo DNA, je mnohastupňovým dějem poháněným hydrolyzou ATP. V prvním kroku je nukleosidmonofosfát aktivován postupným přenosem koncových fosforylových skupin z molekul ATP. Vysokoenergetický meziprodukt - nukleosidtrifosfát - existuje volný v roztoku, dokud nezreaguje s rostoucím koncem řetězce RNA nebo DNA za uvolnění difosfátu. Hydrolyza poslední sloučeniny na anorganický fosfát je energeticky velmi výhodná a podporuje celkovou reakci ve směru syntézy polynukleotidu.

nergetické vazby s druhou molekulou. Skutečné mechanismy používané ke spřažení hydrolyzy ATP se syntézou proteinů a polysacharidů jsou však složitější než mechanismy spřažení použité u syntézy glutaminu; konečnou vysokoenergetickou vazbu, která je v kondenzačním kroku přerušena, vytváří řada intermediátů s vysokým obsahem energie (jak se probírá v Kapitole 7 u syntézy proteinů).

Pro to, do jaké míry může daný aktivovaný nosič řídit biosyntézu, existují určitá omezení. ΔG hydrolyzy ATP na ADP a anorganický fosfát (P_i) závisí na koncentracích všech reaktantů, avšak za obvyklých podmínek v buňce činí -45 až -55 kJ/mol. Tato hydrolytická reakce se dá v zásadě použít k pohonu energeticky nevýhodné reakce s ΔG řekněme $+42$ kJ/mol za předpokladu, že je dostupná vhodná reakční dráha. Pro některé biosyntetické reakce však ani -55 kJ/mol nemusí stačit. V tomto případě může být dráha hydrolyzy ATP změněna, takže nejprve vzniká AMP a difosfát (PP_i), který potom sám v dalším kroku hydrolyzuje (obr. 3-34). Celkový děj umožňuje úhrnnou změnu volné energie asi -110 kJ/mol. Na obrázku 3-35 je ukázána důležitá biosyntetická reakce poháněná tímto způsobem – syntéza nukleové kyseliny (polynukleotidu).

Otázka 3-8 Která z následujících reakcí bude probíhat jen ve spřažení s druhou, energeticky výhodnou reakcí?

- A. $\text{glukosa} + \text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
- B. $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glukosa} + \text{O}_2$
- C. nukleosidtrifosfáty \rightarrow DNA
- D. nukleotidové báze \rightarrow nukleosidtrifosfáty
- E. $\text{ADP} + \text{P} \rightarrow \text{ATP}$

Základní shrnutí

- Buňky jsou schopny existence díky stálému přísunu energie. Část této energie se využívá k provádění základních funkcí, jakými jsou údržba, růst a reprodukce, a zbytek se ztratí v podobě tepla.
- Prvotním zdrojem energie pro většinu živých organismů je Slunce. Rostliny a fotosyntetické bakterie používají sluneční energii k vytváření organických molekul z oxidu uhličitého. Živočiškové získávají potravu požíváním rostlin nebo jiných živočichů, kteří se živí rostlinami.
- Velká většina z mnoha stovek chemických reakcí probíhajících v buňce je specificky katalyzována enzymem. Různé enzymy pracují ve velkých počtech za sebou a utvářejí reakční řetězce zvané metabolické dráhy. Každá z těchto drah plní v buňce svou specifickou funkci.
- Katabolické reakce odbourávají molekuly potravy v oxidačních drahách a uvolňují energii. Anabolické reakce vytvářejí mnoho složitých molekul, které buňka potřebuje, a vyžadují přísun energie. Stavební bloky i energie potřebná pro anabolické reakce se v živočišných buňkách získávají při katabolismu.
- Enzymy katalyzují reakce tak, že se vážou k určitým molekulám substrátu způsobem, který snižuje

- Mohou probíhat jen takové chemické reakce, které zvyšují celkové množství neuspořádanosti ve vesmíru. Změna volné energie při reakci ΔG je měřítkem této neuspořádanosti a musí být menší než nula, aby reakce proběhla.
- Změna volné energie ΔG při chemické reakci závisí na koncentracích reagujících molekul a lze ji z těchto koncentrací vypočítat, pokud je známa rovnovážná konstanta reakce (K) nebo pokud jsou známy standardní změny volné energie ΔG° reaktantů.
- Vytvořením reakční dráhy, která spřahuje energeticky výhodnou reakci s energeticky nevýhodnou, umožní enzymy průběh jinak nemožných reakcí.
- V těchto případech spřažení hraje ústřední roli malá skupina molekul aktivovaných nosičů, zvláště ATP, NADH a NADPH. ATP přenáší vysokoenergeticky vázané fosforylové skupiny, zatímco NADH a NADPH přenášejí vysokoenergetické elektrony.
- Molekuly potravy poskytují uhlíkaté kostry k tvorbě větších molekul. Kovalentní vazby těchto větších molekul obvykle vznikají v reakcích spřažených s energeticky výhodnými změnami vazeb v molekulách aktivovaných přenašečů jako ATP a NADPH.

Klíčové pojmy

acetylkoenzym A
ADP, ATP
aktivační energie
aktivovaný nosič
difuze

dýchání
entropie
enzymy
fotosyntéza
 ΔG , ΔG°
katalyzátor

metabolismus
NAD⁺, NADH
NADP⁺, NADPH
oxidace
redukce
respirace

rovnováha
spřažená reakce
substrát
volná energie

4 Jak buňky získávají energii z potravy

Buňky vyžadují neustálý přísun energie pro tvorbu a udržování biologického pořádku, který je činí živými. Tato energie pochází z energie chemických vazeb v molekulách potravy, jež pro buňku představují základní pohonnou hmotu.

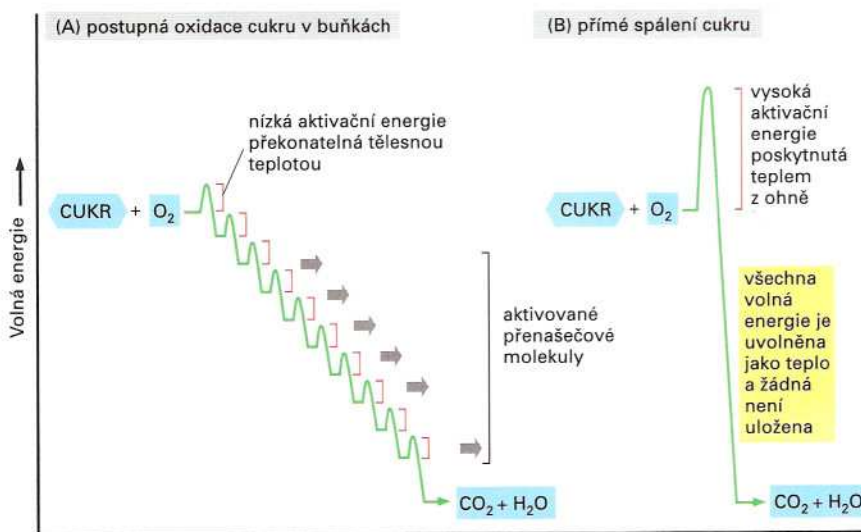
Zvláště důležitými molekulami tohoto paliva jsou cukry. Rostliny vytvářejí své vlastní cukry fotosyntézou, zatímco živočichové získávají cukry i další molekuly, jako například škrob, po jídání ostatních organismů. Proces oxidace cukrů a tvorby energie je však u rostlin a živočichů velmi podobný. Obecný princip, kterým se celý proces řídí, je ukázán na obrázku 4-1. Užitečná energie pochází z chemických vazeb v cukru a uvolní se při jeho oxidaci na CO_2 a H_2O . Tato energie je uložena ve formě vysokoenergetických chemických vazeb v molekulách aktivovaných nosičů, jako jsou například ATP a NADPH, které naopak slouží jako přenosné zdroje chemických skupin a elektronů pro potřeby biosyntézy (viz Kapitola 3). Molekuly aktivovaných nosičů přenášejí balíček energie či potřebnou chemickou skupinu

ODBOURÁNÍ CUKRŮ A TUKŮ

- Molekuly potravy jsou odbourávány ve třech fázích a dávají tak vzniknout ATP
- Glykolýza je ústřední dráhou tvorby ATP
- Fermentace umožňuje produkci ATP za nepřítomnosti kyslíku
- Glykolýza je příkladem enzymového spřažení oxidace s ukládáním energie
- Cukry i tuky se odbourávají na acetyl-CoA v mitochondriích
- Cyklus kyseliny citronové vytváří NADH oxidací acetylových skupin na CO_2
- Transport elektronů pohání syntézu ATP ve většině buněk

UKLÁDÁNÍ A ZUŽITKOVÁNÍ POTRAVY

- Organismy ukládají molekuly potravy ve speciálních zásobárnách
- Mnoho biosyntetických drah začíná glykolýzou nebo citrátovým cyklem
- Metabolismus je organizován a regulován



Obrázek 4-1 Schematické znázornění řízené postupné oxidace cukru v buňce ve srovnání s normálním spálením.

V buňce enzymy katalyzují oxidaci cestou malých kroků, v nichž se volná energie přenáší v přiměřeně velkých dávkách na přenašečové molekuly – nejčastěji na ATP a NADH. V každém kroku ovládá enzym reakci snížením bariéry aktivační energie, kterou musí reakce nejprve překonat. Celková volná energie uvolněná při reakci je pro (A) i (B) přesně stejná.

vhodné velikosti v jednostupňové, enzymem katalyzované reakci biosyntetické dráhy. Při jednostupňové oxidaci molekuly paliva, jakým je glukosa, se uvolní mnohem větší množství energie, než by mohla molekula jakéhokoli aktivovaného přenašeče pojmout. Proto místo toho používají buňky enzymy k oxidaci molekul potravy v pečlivě regulovaném sledu reakcí: molekula glukosy se odbourává postupně a vydává svou energii aktivovaným přenašečovým molekulám po malých dávkách ve spřažených reakcích (viz obr. 3-23). Tímto způsobem je velká část energie uvolněné při oxidaci glukosy uložena a je dostupná pro pozdější užitečnou práci v buňce.

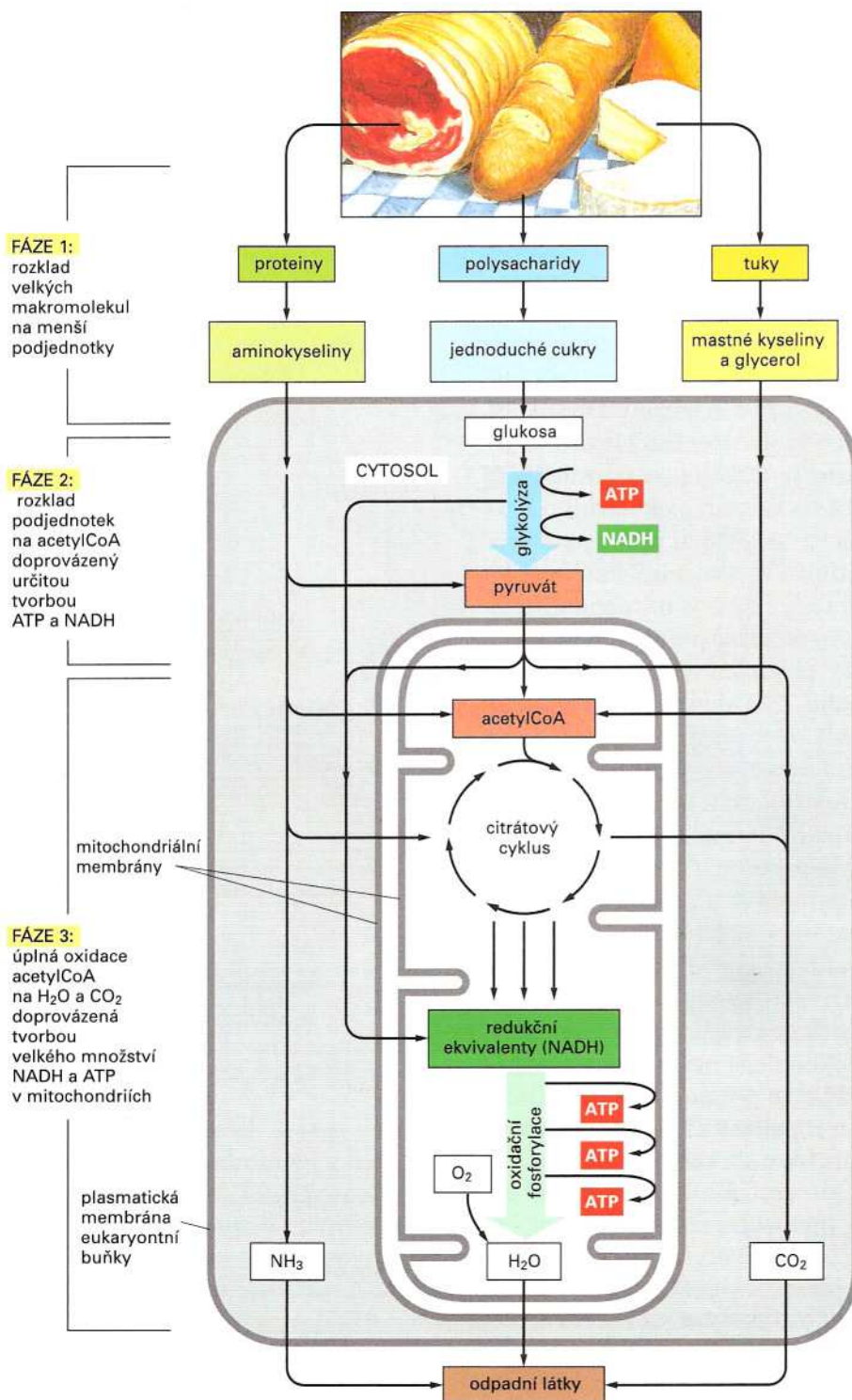
V této kapitole budeme sledovat hlavní kroky v odbourání neboli katabolismu cukrů a ukážeme si, jak umožňují vznik ATP, NADH a ostatních molekul aktivovaných přenašečů v živočišných buňkách. Zaměříme se na odbourání glukosy, protože právě tato reakce hraje hlavní roli v produkci energie u většiny živočišných buněk. Navíc se velmi podobná dráha vyskytuje u rostlin, hub a mnoha bakterií. Jiné molekuly, jako mastné kyseliny a proteiny, mohou také sloužit jako zdroje energie, pokud jsou soustředěny ve vhodných enzymových drahách.

Odbourání cukrů a tuků

Živočišné buňky vytvářejí ATP dvěma způsoby. Prvním z nich je řada enzymově katalyzovaných reakcí v cytosolu, která končí částečnou oxidací molekul potravy. Druhý děj se odehrává v mitochondriích a k výrobě ATP využívá energii aktivovaných přenašečových molekul. Mechanismus tohoto druhého děje je podrobně popsán v Kapitole 13. Zde se zaměříme na sled reakcí, při nichž se molekuly potravy částečně oxidují za vzniku ATP a aktivovaných přenašečových molekul potřebných pro získávání energie v mitochondriích.

Molekuly potravy jsou odbourávány ve třech fázích a dávají tak vzniknout ATP

Než mohou naše buňky využít proteiny, lipidy a polysacharidy, tvořící většinu potravy, kterou přijímáme, musí je odbourat na malé molekuly. Ty pak mohou sloužit jako zdroj energie nebo jako stavební bloky pro jiné molekuly. Reakce odbourání musí působit na molekuly potravy přijaté z vnějšku, nikoli však na makromolekuly uvnitř našich vlastních buněk. První fází enzymového odbourání molekul potravy je proto *trávení*, které probíhá buď v našich střevech vně buněk nebo ve specializovaných organelách uvnitř buněk – lyzosomech. (Membrána okolo lyzosomu udržuje jeho trávicí enzymy oddělené od cytosolu; viz Kapitola 14.) Velké polymerní molekuly z potravy jsou při trávení působením enzymů odbourány na své monomerní podjednotky: proteiny na aminokyseliny, polysacharidy na monomerní cukry a tuky na mastné kyseliny a glycerol. Po natrávení makromolekul vstupují malé organické molekuly odvozené z potravy do cytosolu buňky, kde začíná jejich postupná oxidace. Jak je ukázáno na obrázku 4-2, probíhá oxidace v buněčném katabolismu v dalších dvou fázích: fáze 2 začíná v cytosolu a končí v mitochondriích, zatímco třetí fáze se odehrává jen v mitochondriích.



Obrázek 4-2 Zjednodušený diagram tří fází buněčného metabolismu, které v živočišných buňkách vedou od potravy k celé řadě produktů. Tato řada reakcí vytváří ATP, který je potom využíván k pohonu biosyntetických reakcí a dalších energií vyžadujících dějů v buňce. Fáze 1 probíhá mimo buňky. Fáze 2 probíhá hlavně v cytosolu, kromě posledního kroku přeměny pyruvátu na acetylové skupiny v acetylkoenzymu A, jenž se odehrává v mitochondriích. Fáze 3 probíhá v mitochondriích.

Ve druhé fázi přeměňuje řetězec reakcí zvaný *glykolyza* každou molekulu glukosy na dvě menší molekuly pyruvátu. Ostatní cukry se mění na pyruvát podobně po svém převedení na jeden z cukerných meziproduktů v této glykolytické dráze. Během tvorby pyruvátu vznikají dva typy aktivovaných přenašečových molekul - ATP a NADH. Pyruvát potom přechází z cytosolu do mitochondrií. Tam je každá molekula pyruvátu převedena na CO_2 a dvouuhlíkovou acetylovou skupinu, která se připojí ke koenzymu A (CoA). Vznikne acetyl-CoA, další z molekul aktivovaných přenašečů probíraných

v Kapitole 3 (viz obrázek 3-30). Velká množství acetyl-CoA se tvoří také při postupném odbourání a oxidaci mastných kyselin odvozených z tuků, které jsou přenášeny v krevním řečišti, dostávají se do buněk jako mastné kyseliny a potom jsou ve formě acylů předávány do mitochondrií k výrobě acetyl-CoA.

Třetí fáze oxidačního odbourání molekul potravy se celá odehrává v mitochondriích. Acetylová skupina v acetyl-CoA je s koenzymem A spojena vazbou s vysokým obsahem energie, a proto se snadno přenáší na jiné molekuly. Po svém přenosu na čtyřuhlíkovou molekulu oxalacetátu vstupuje acetylová skupina do sledu reakcí zvaného *cyklus kyseliny citronové*. Brzy si ukážeme, jak je acetylová skupina v těchto reakcích oxidována na CO₂ za současné tvorby velkého množství přenašeče elektronů, NADH. Nakonec elektrony s vysokým obsahem energie z NADH procházejí řetězcem přenosu elektronů ve vnitřní mitochondriální membráně, kde se energie uvolňovaná při tomto pochodu používá k výrobě ATP za spotřeby molekulárního kyslíku (O₂). Právě v těchto posledních krocích se zachytí většina energie uvolněné při oxidaci a použije se k produkci většiny buněčného ATP.

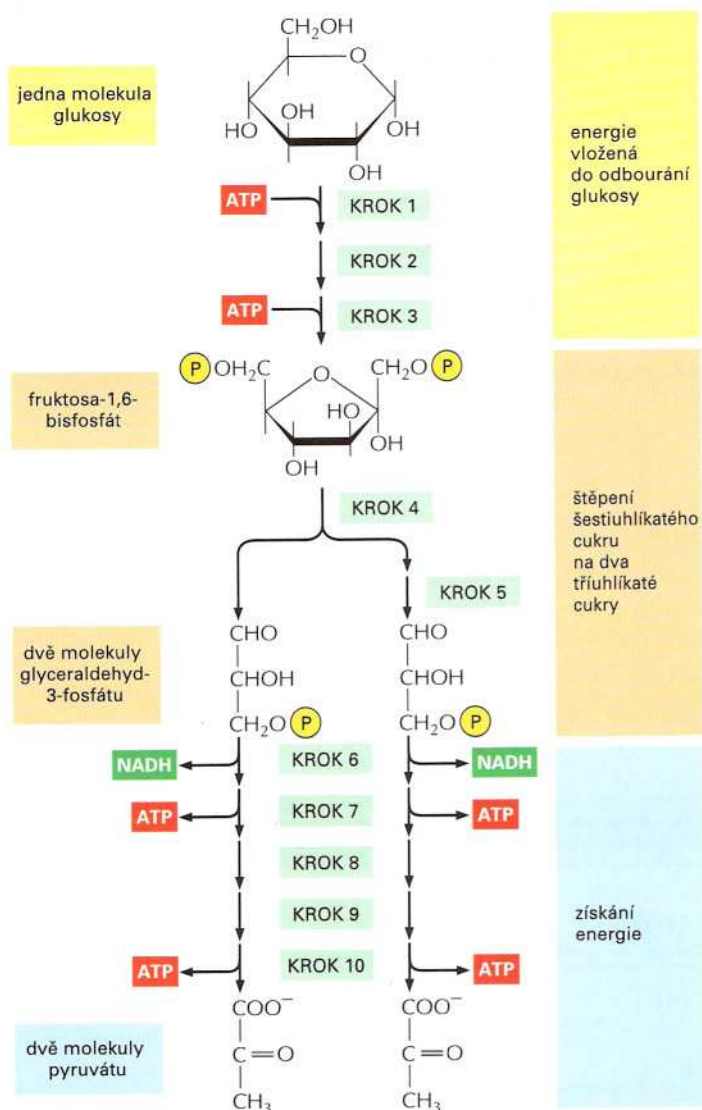
Protože energie k pohonu syntézy ATP v mitochondriích nakonec pochází z oxidačního odbourání molekul potravy, je fosforylace ADP na ATP, která je poháněna elektronovým transportem v mitochondriích, známa jako *oxidační fosforylace*. Podivuhodné děje, které se během oxidační fosforylace odehrávají ve vnitřní mitochondriální membráně, jsou hlavním námětem Kapitoly 13.

Energie získaná při odbourání tuků a cukrů je tak během produkce ATP rozdělena do balíčků chemické energie, které mohou být pohodlně použity kdekoli v buňce. V typické buňce se v každém okamžiku nachází zhruba 10⁹ molekul ATP v roztoku a v mnoha buňkách je všechen tento ATP odbourán a nahrazen novým během 1–2 minut.

V celkovém pohledu je téměř polovina energie, kterou lze teoreticky získat z oxidace glukosy či mastných kyselin na H₂O a CO₂, zachycena a použita k pohonu energeticky nevýhodné reakce $P_i + ADP \rightarrow ATP$. (O kolik je tento systém dokonalejší než moderní spalovací motor, například v autě, který nedokáže přeměnit na užitečnou práci více než 20 % dostupné energie z paliva!) Zbytek energie se v buňkách uvolňuje jako teplo, a tak zahřívá naše tělo.

Glykolýza je ústřední dráhou tvorby ATP

Nejdůležitější částí druhé fáze odbourání molekul potravy je odbourání glukosy ve sledu reakcí známém jako **glykolýza** – z řeckého *glykos*, cukr, a *lysis*, štěpení. Glykolýza vytváří ATP bez účasti molekulárního kyslíku (plynného O₂). Probíhá v cytosolu většiny buněk včetně mnoha anaerobních organismů (těch, které mohou žít bez využívání molekulárního kyslíku). Glykolýza se pravděpodobně vyvinula v rané historii života – před tím, než fotosyntetické organismy uvolnily do atmosféry kyslík. Během glykolýzy je molekula glukosy se šesti uhlíky převedena na dvě molekuly *pyruvátu*, z nichž každá obsahuje tři atomy uhlíku. K pohonu těchto prvních kroků se na každou molekulu glukosy spotřebují dvě molekuly ATP, ale v pozdějších krocích se získají čtyři molekuly ATP. Konečným výsledkem glykolýzy je tedy čistý zisk dvou molekul ATP na každou odbouranou molekulu glukosy.



Obrázek 4-3 Schéma glykolýzy. Každý z 10 kroků je katalyzován jiným enzymem. Všimněte si, že krok 4 štěpí šestiuhlíkatý cukr na dva tříuhlíkaté cukry, takže se počet molekul pro další stadia zdvojnásobí. Krokem 6 začíná v glykolýze tvorba zásobní energie; výsledkem je syntéza molekul ATP a NADH (viz také panel 4-1, str. 112-113).

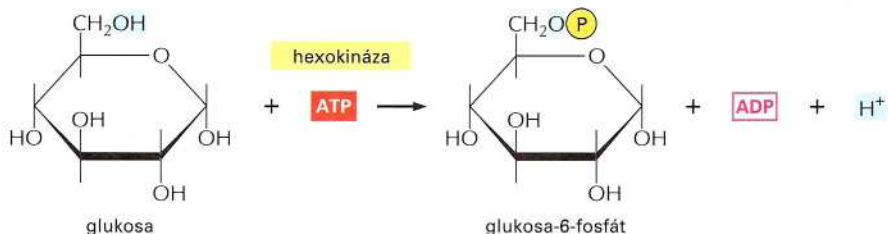
Glykolytická dráha je v základním přehledu ukázána na obrázku 4-3 a podrobněji v panelu 4-1 (str.112-113). Glykolýza zahrnuje sled 10 oddělených reakcí, z nichž každá vede k odlišnému cukernému *intermediátu* (meziprojektu) a je katalyzována odlišným enzymem. Podobně jako většina ostatních enzymů mají i tyto enzymy zakončení *áza* (například isomeráza a dehydrogenáza), přičemž jejich názvy ukazují na typ katalyzované reakce.

Ačkoli se glykolýzy neúčastní žádný molekulární kyslík, probíhá při ní oxidace: z některých uhlíků pocházejících z glukosy NAD^+ odstraní elektrony a redukuje se na NADH. Postupný průběh tohoto děje umožňuje uvolňovat energii z oxidace po malých balíčcích, takže se velká část této energie může uložit do nosičových molekul a nerozptýlí se jako teplo (viz obr. 4-1). Tak část energie uvolněné při oxidaci pohání přímou syntézu molekul ATP z ADP a P_i a část zůstává uložena v elektronech s vysokým obsahem energie, které přenáší NADH.

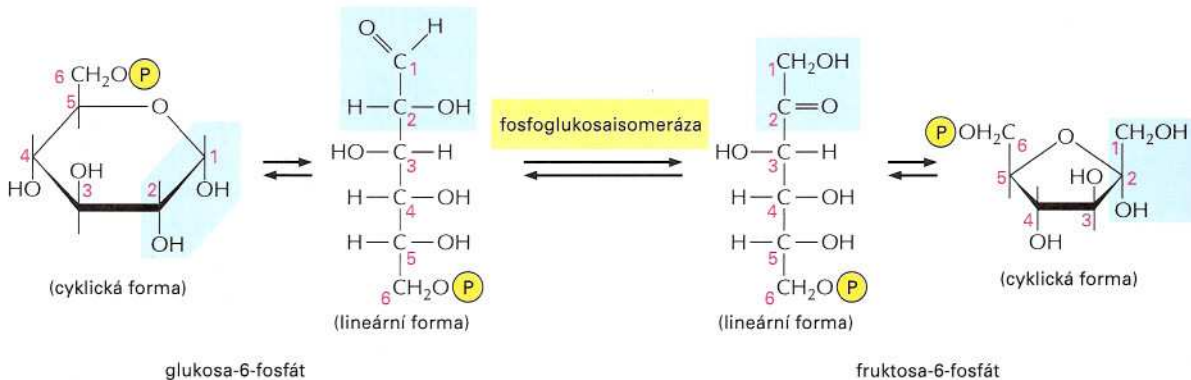
V glykolýze vznikají dvě molekuly NADH na jednu molekulu glukosy. V aerobních organismech (jež k životu vyžadují molekulární kyslík) odevzdávají tyto molekuly NADH své elektrony do řetězce transportu elektronů popsaného v Kapitole 13. Tyto elektrony pro-

V každém kroku je ta část molekuly, v níž dochází ke změně, označena modrým pozadím a jméno enzymu, který danou reakci katalyzuje, se objevuje na žlutém pozadí.

Krok 1 Glukosa je fosforylována ATP za tvorby cukerného fosfátu. Záporný náboj fosforečného zbytku zaručuje, že tento intermediát neunikne buněčnou membránou do prostředí.



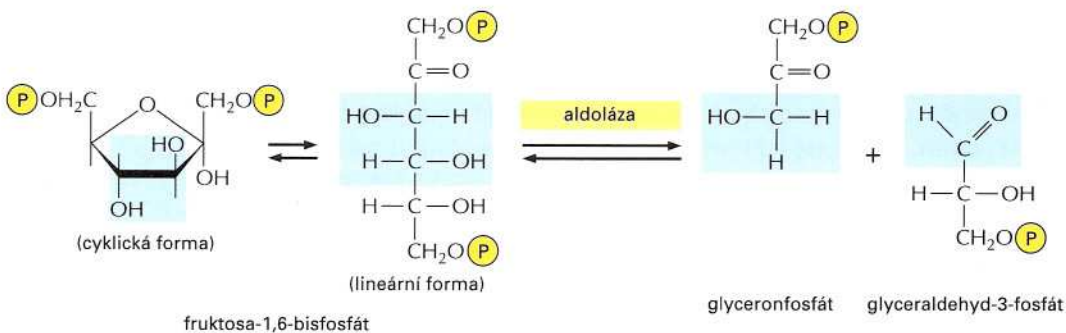
Krok 2 Vratná přeměna struktury (izomerace) přenesla karbonylový kyslík z C₁ na C₂, čímž se vytvoří z aldosy ketosa (viz panel 2-3).



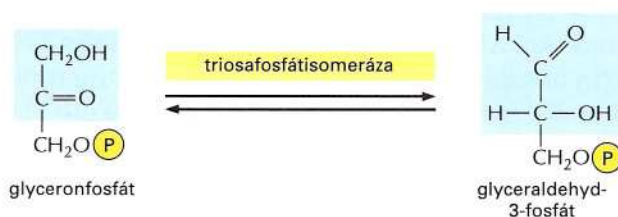
Krok 3 Nově vytvořená hydroxylová skupina na C₁ je fosforylována ATP v přípravě na tvorbu tříuhlíkatých cukerných fosfátů. V této fázi je regulován vstup cukrů do glykolýzy enzymem fosfofruktokinázou.



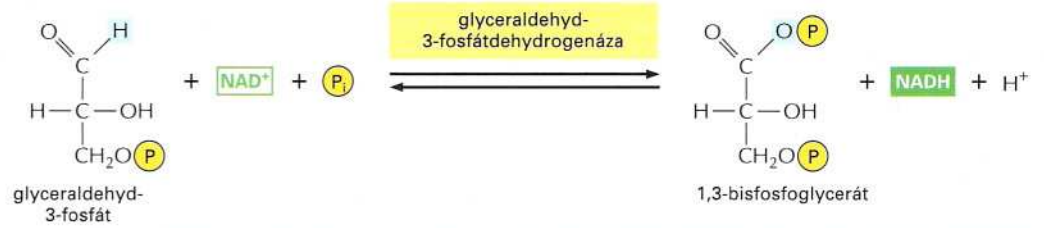
Krok 4 Šestiuhlíkatý cukr se štěpí na dva cukry tříuhlíkaté. Pouze glyceraldehyd-3-fosfát však může pokračovat přímo v glykolýze.



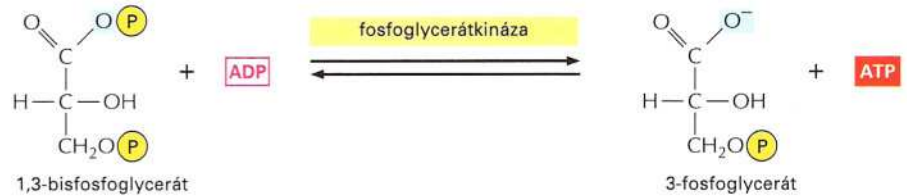
Krok 5 Druhý produkt aldolázové reakce je glyceraldehyd-3-fosfát, který je izomerován za tvorby glyceraldehyd-3-fosfátu.



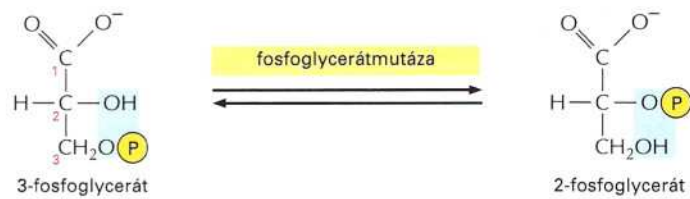
Krok 6 Dvě molekuly glyceraldehyd-3-fosfátu se oxidují. Začíná tady energii produkující fáze glykolýzy za tvorby NADH a další makroergní fosfoanhydridové vazby (viz obr. 4-5).



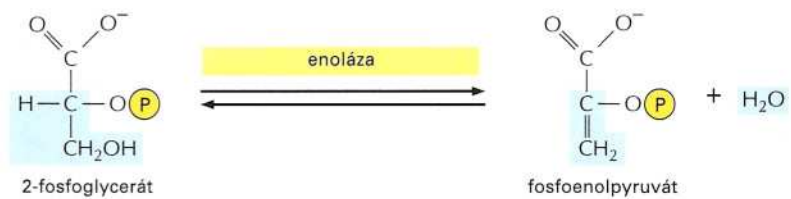
Krok 7 Přenos makroergní fosfátové skupiny, vzniklé v 6. kroku, na ADP vede k tvorbě ATP.



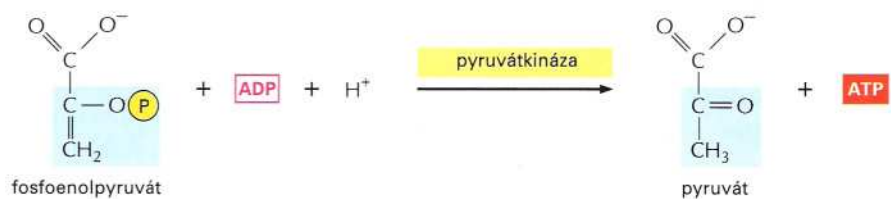
Krok 8 Zbývající fosfoesterová vazba v 3-fosfoglycerátu, která vykazuje poměrně nízkou volnou energii hydrolýzy, je přesunuta z C3 na C2 za tvorby 2-fosfoglycerátu.



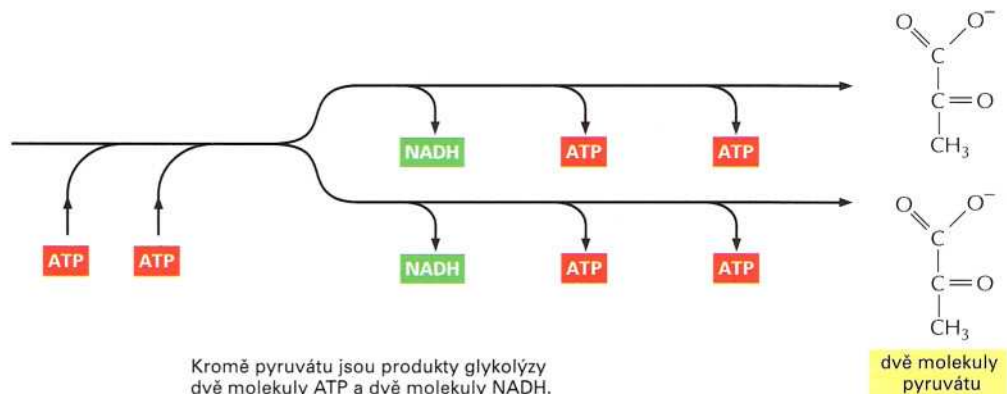
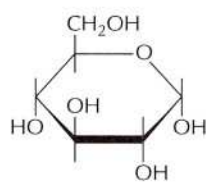
Krok 9 Odstranění vody z 2-fosfoglycerátu vytváří novou makroergní fosfoenolovou vazbu.



Krok 10 Přenos makroergní fosfátové skupiny vytvořené v 9. kroku na ADP vede k ATP, čímž je glykolýza ukončena.



ČISTÝ VÝTĚŽEK GLYKOLÝZY



cházejí transportním řetězcem až k molekulárnímu kyslíku a spolu s ním a protony vytvářejí vodu; NAD^+ vzniklý z NADH je znovu použit pro glykolýzu (viz krok 6 v panelu 4-1, str. 113).

Fermentace umožňuje produkci ATP za nepřítomnosti kyslíku

Ve většině živočišných a rostlinných buněk je glykolýza pouhou předehrou ke třetí a závěrečné fázi odbourání molekul potravy. V tomto případě je pyruvát vytvořený v posledním kroku druhé fáze rychle přenášen do mitochondrií, kde se mění na CO_2 a acetyl-CoA, který je potom úplně oxidován na CO_2 a H_2O . Avšak pro mnoho anaerobních organismů, které nemohou využít molekulární kyslík a mohou růst a dělit se bez něj, je glykolýza základním zdrojem buněčného ATP. To platí i pro některé živočišné tkáně, například pro kosterní svaly, které mohou fungovat i při omezené zásobě molekulárního kyslíku. Při těchto anaerobních podmínkách zůstávají pyruvát a NADH v cytosolu. Pyruvát je převáděn na produkty, které jsou z buňky vylučovány, např. na ethanol a CO_2 u kvasinek používaných při výrobě piva a chleba, nebo na laktát ve svaly. Při tomto ději odevzdává NADH své elektrony a mění se zpět na NAD^+ . Tato regenerace NAD^+ je potřebná pro udržování reakcí glykolýzy (obr. 4-4).

Anaerobní dráhy získávání energie podobné této dráze se nazývají **fermentace**. Studie komerčně důležitých fermentačních procesů prováděné na kvasinkách byly velkým přínosem pro počátky biochemie. Práce 19. století vedly v roce 1896 k překvapujícímu zjištění, že tyto děje lze studovat i vně buněk, v buněčných extraktech. Tento revoluční objev nakonec umožnil oddělit a studovat zvláště každou z jednotlivých reakcí fermentačního procesu. Poskládání kusých poznatků do kompletní glykolytické dráhy ve 30. letech 20. století bylo hlavním úspěchem biochemie, po němž rychle následovalo rozpoznání ústřední role ATP v buněčných dějích. Většinu základních pojmů probíraných v této kapitole tedy chápeme už více než 50 let.

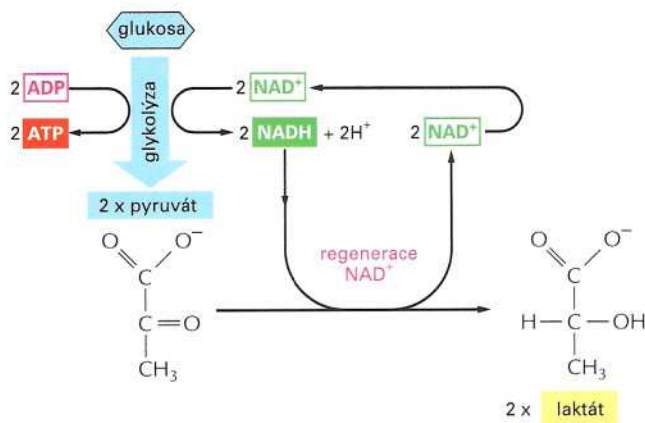
Glykolýza je příkladem enzymového spřažení oxidace s ukládáním energie

V předchozím textu jsme použili analogii „lopatkového kola“ k vysvětlení, jak buňky získávají užitečnou energii oxidací organických molekul a jak s využitím enzymů spřahují energeticky nevýhodné reakce s reakcemi energeticky výhodnými (viz obr. 3-24). Úlohu lopatkového kola v naší analogii hrají enzymy a my se nyní vrátíme k předchozímu probíranému kroku glykolýzy, abychom si přesně ukázali výskyt spřažených reakcí.

Dvě ústřední reakce glykolýzy (kroky 6 a 7 v panelu 4-1, str. 113) převádějí tříuhlíkový cukerný intermediát glyceraldehyd-3-fosfát (aldehyd) na 3-fosfoglycerát. To zahrnuje dvoustupňovou oxidaci aldehydové skupiny na skupinu karboxylovou. Celková reakce uvolňuje dost volné energie k přeměně molekuly ADP na ATP a přenosu dvou elektronů z aldehydu na NAD^+ za vzniku NADH , přičemž ještě zbude dost tepla k ohřátí okolí. To činí celkovou reakci energeticky výhodnou (ΔG° celkové reakce je $-12,54 \text{ kJ/mol}$).

Otázka 4-1 Na první pohled se fermentace zdá být možnou přídavnou reakcí glykolýzy. Vysvětlete, proč buňky rostoucí bez přítomnosti kyslíku nemohou jednoduše vylučovat pyruvát jako odpadní produkt. Které látky pocházející z glukosy by se hromadily v buňkách neschopných vytvářet fermentací laktát nebo ethanol?

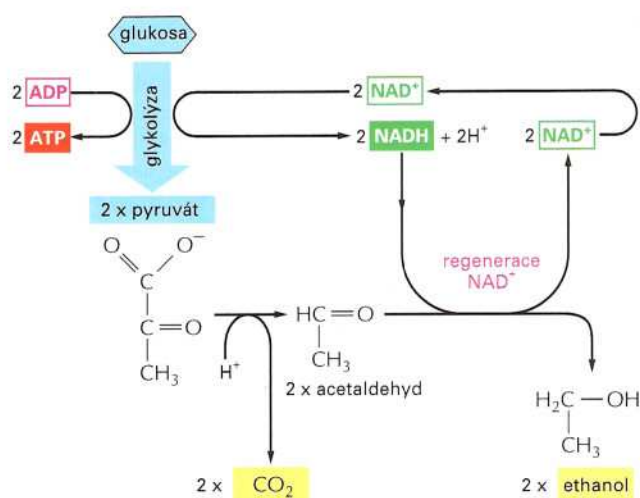
(A) FERMENTACE VEDOUcí KE VZNIKU LAKTÁTU



Obrázek 4-4 Anaerobní odbourání

pyruvátu. (A) Například při nedostatečném množství kyslíku ve svalové buňce procházející mohutnou kontrakcí je pyruvát vytvořený při glykolýze převeden na laktát. Tato reakce obnovuje NAD^+ spotřebovaný v kroku 6 glykolýzy, ale v celé dráze se získá mnohem méně energie než při úplné oxidaci. (B) V některých organismech, které mohou růst anaerobně, například v kvasinkách, je pyruvát přes acetaldehyd převáděn na oxid uhličitý a ethanol. Tato dráha opět regeneruje z NADH původní NAD^+ , který je potřebný k pokračování glykolýzy. (A) i (B) jsou příklady fermentace.

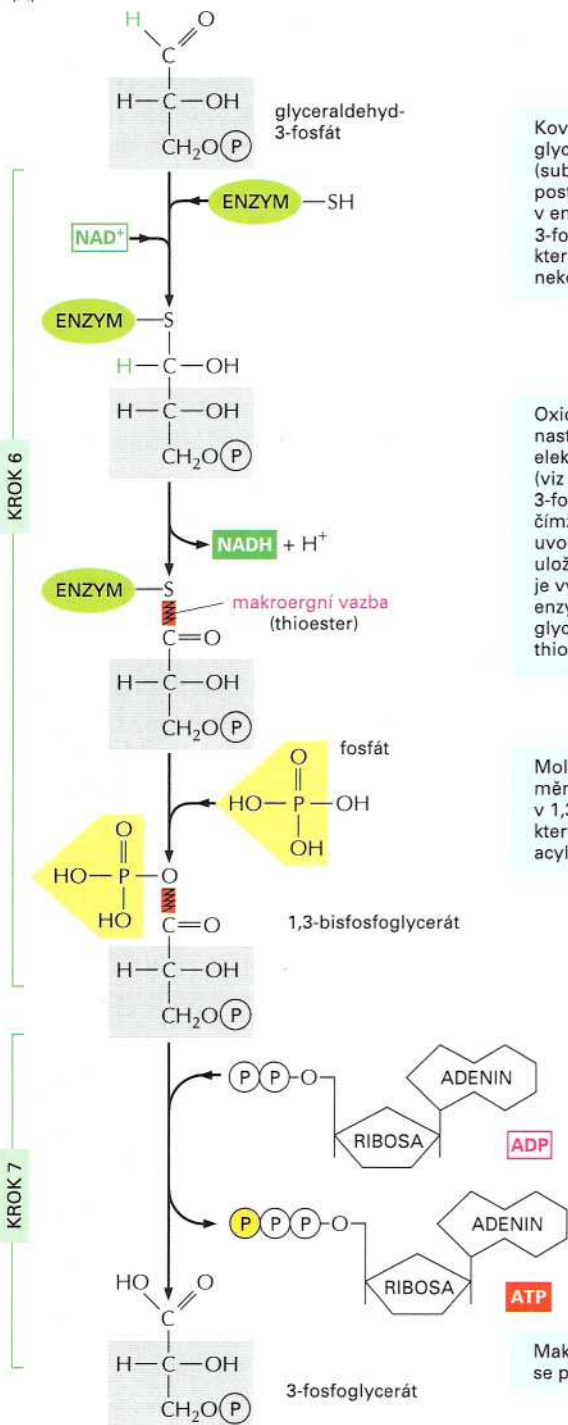
(B) FERMENTACE VEDOUcí KE VZNIKU ETHANOLU A CO_2



Cesta, která vede k tomuto znamenitému výkonu, je načrt-nuta na obrázku 4-5. Ukázané chemické reakce jsou přesně vedeny dvěma enzymy, k nimž jsou cukerné intermediáty pevně vázány. Jak je vidět na obrázku, váže se první enzym (*glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza*) krátkodobě svou reaktivní skupinou $-\text{SH}$ k aldehydu a v této vazbě katalyzuje jeho oxidaci. Reaktivní vazba enzym-substrát je potom vytěsněna anorganickým fosfátem za vzniku vysokoenergetického fosfátového intermediátu, který se z vazby k enzymu uvolní. Tento intermediát se váže ke druhému enzymu (*fosfoglycerátkináze*), který katalyzuje energeticky výhodný přenos právě vytvořeného fosfátu s vysokým obsahem energie na ADP za vzniku ATP a ukončení oxidace aldehydu na karboxylovou kyselinu (viz obr. 4-5).

Probrali jsme tuto oxidaci poněkud podrobněji, neboť nám skýtá dobrý příklad enzymem zprostředkovaného ukládání energie cestou spřažených reakcí (obr. 4-6). Tyto reakce (kroky 6 a 7) jsou jedinými reakcemi glykolýzy, v nichž vzniká fosfátová vazba s vysokým obsahem energie přímo z anorganického fosfátu. Jako takové přispívají k čistému výtěžku dvěma molekulami ATP a dvěma molekulami NADH na molekulu glukosy (viz panel 4-1, str. 112-113).

(A)

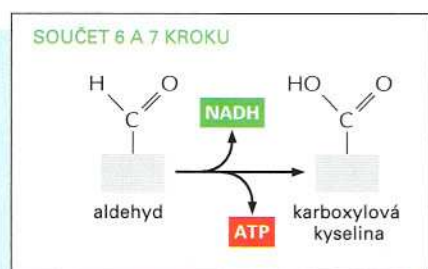


Kovalentní vazba vzniká mezi glyceraldehyd-3-fosfátem (substrátem) a SH-skupinou postranního řetězce cysteinu v enzymu glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáze, která kromě toho váže nekovalentně NAD⁺.

Oxidace glyceraldehyd-3-fosfátu nastává díky přenosu dvou elektronů a vodíkového atomu (viz obr. 3-28) z glyceraldehyd-3-fosfátu na navázaný NAD⁺, čímž vzniká NADH. Část energie uvolněné oxidací aldehydu je tak uložena v NADH, zatímco část je využita pro přeměnu vazby enzymu a jeho substrátu glyceraldehyd-3-fosfátu na thioesterovou vazbu makroergní.

Molekula anorganického fosfátu mění makroergní vazbu na vazbu v 1,3-bisfosfoglycerátu, který pak obsahuje makroergní acylanhydridovou vazbu.

(B)



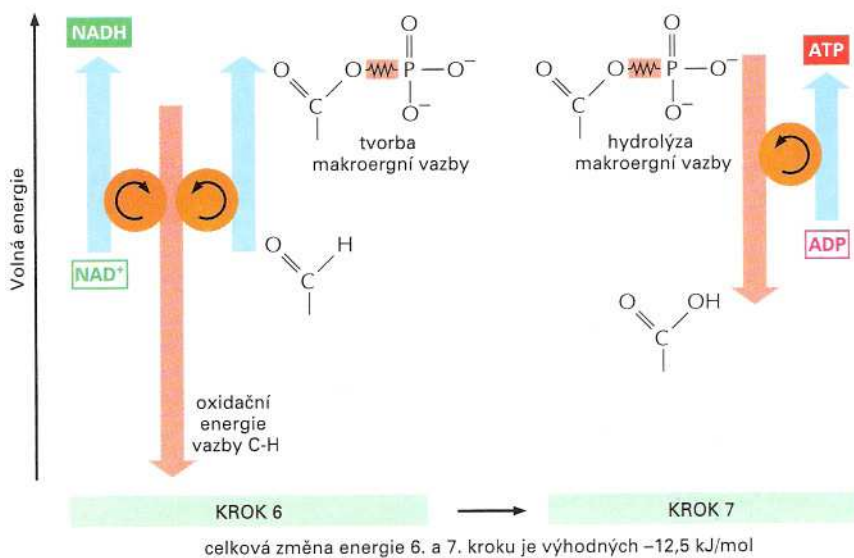
Většina volné energie oxidace je uložena v aktivovaných nosičích ATP a NADH.

Obrázek 4-5 Ukládání energie v krocích 6

a 7 glykolýzy. V těchto krocích oxidace

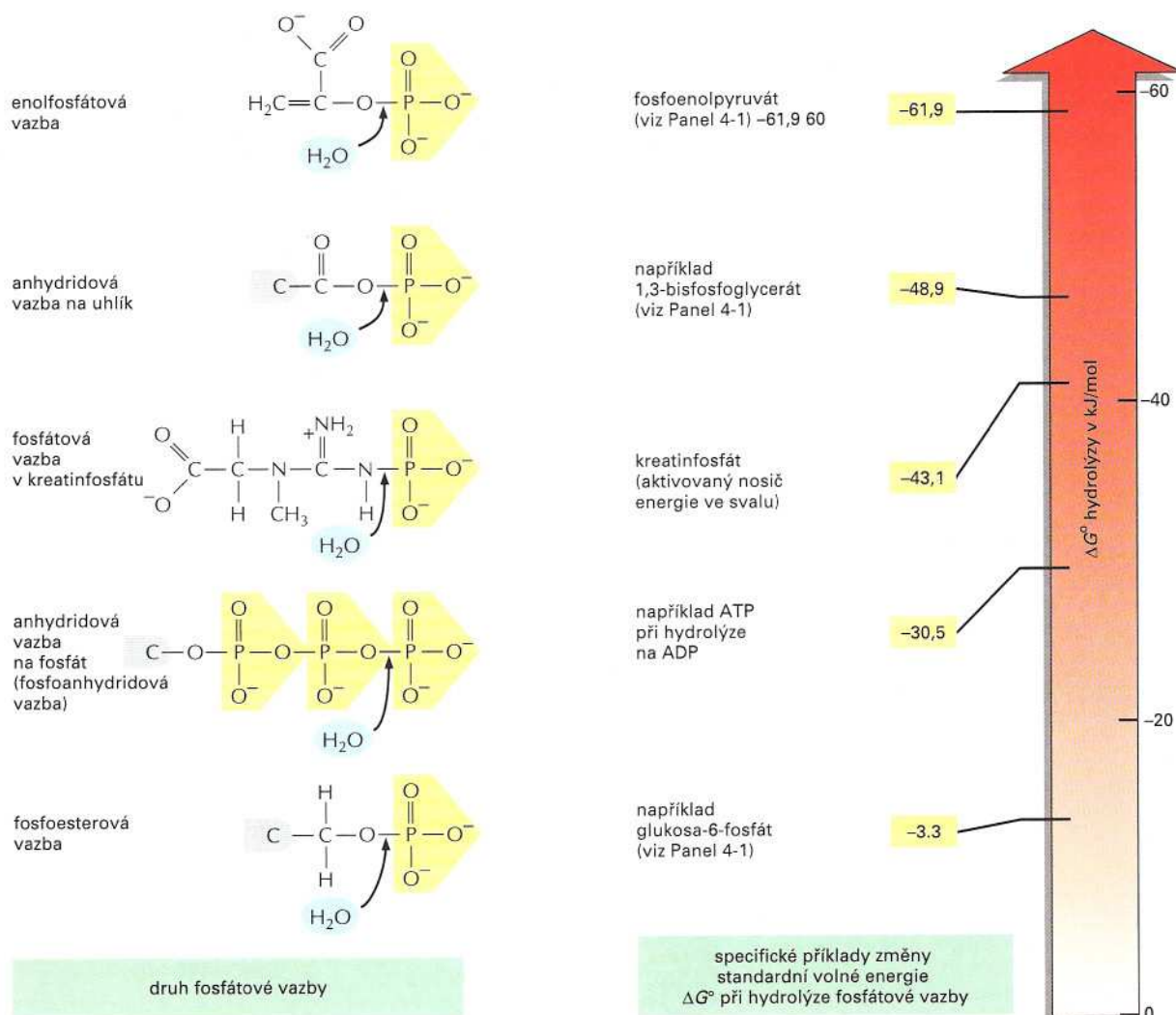
aldehydu na karboxylovou kyselinu je spřažena tvorba ATP a NADH. (A) Krok 6 začíná vytvořením kovalentní vazby mezi substrátem (glyceraldehyd-3-fosfát) a skupinou -SH exponovanou na povrchu enzymu (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy). Enzym potom katalyzuje přenos vodíku (jako hydridového iontu, tedy protonu a dvou elektronů) z navázaného glyceraldehyd-3-fosfátu na molekulu NAD. Část energie uvolněné při této oxidaci se využije k tvorbě molekuly NADH a část je použita k převedení původní vazby mezi enzymem a jeho substrátem na thioesterovou vazbu s vysokým obsahem energie (vyznačena červeně). Molekula anorganického fosfátu potom vytěsni enzym z této vazby a utvoří vysokoenergetickou vazbu cukr-fosfát (ukázána červeně). V tomto bodu enzym nejenže uložil energii do NADH, ale také spřáhl energeticky výhodnou oxidaci aldehydu s energeticky nevýhodnou tvorbou vysokoenergetické fosfátové vazby. Druhá reakce je poháněna první, a tak funguje jako „lopatkové kolo“, které převádí energii na obrázku 3-24.

V reakčním kroku 7 se právě vytvořená molekula 1,3-bisfosfoglycerátu váže ke druhému enzymu fosfoglycerátkináze. Reaktivní fosfát je přenesen na ADP za vzniku molekuly ATP a volné karboxylové skupiny na oxidovaném cukru. (B) Souhrn celkové chemické změny v reakcích 6 a 7.



Obrázek 4-6 Schematický pohled na spřažené reakce tvorby NADH a ATP v šestém a sedmém kroku glykolýzy. Energie z oxidace vazby C-H pohání jak tvorbu NADH, tak tvorbu fosfátové vazby s vysokým obsahem energie. Přerušení vysokoenergetické vazby pak pohání tvorbu ATP.

Obrázek 4-7 (dole) Energie některých fosfátových vazeb. Přenos fosforylové skupiny je energeticky výhodný, pokud je standardní změna volné energie (ΔG°) pro hydrolyzu fosfátové vazby v molekule 1 zápornější než pro hydrolyzu fosfátové vazby v molekule 2. Tak například fosforylová skupina se snadno přenáší z 1,3-bisfosfoglycerátu na ADP za vzniku ATP. Všimněte si, že hydrolytickou reakci lze považovat za přenos fosforylové skupiny na vodu.



Jak jsme právě viděli, může ATP ochotně vznikat přímo z molekuly ADP, pokud jsou vytvořeny reakční intermediáty s fosfátovými vazbami o vyšším obsahu energie, než mají tyto vazby v ATP. Fosfátové vazby mohou být uspořádány podle obsahu energie tak, že srovnáme standardní změnu volné energie (ΔG°) pro přerušení každé vazby při hydrolýze; obrázek 4-7 srovnává vysokoenergetické fosfoanhydridové vazby v ATP s některými jinými fosfátovými vazbami, které se tvoří během hydrolýzy.

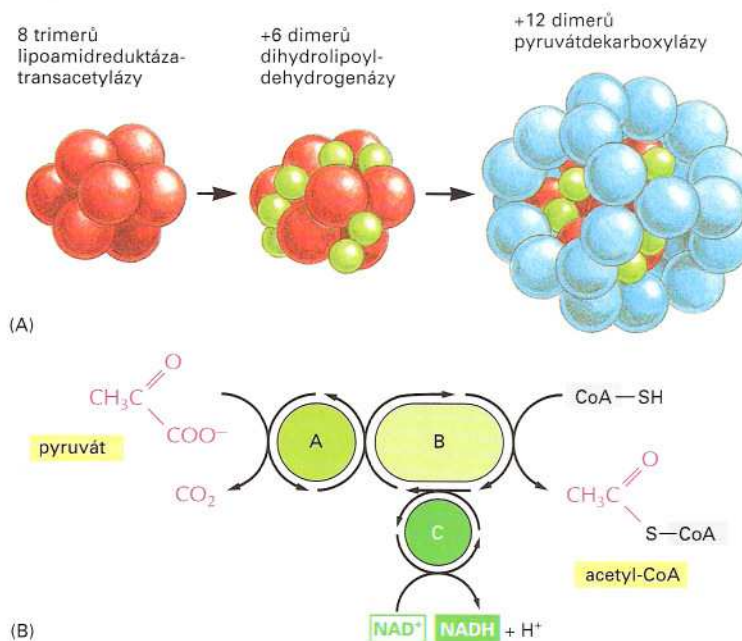
Cukry i tuky se odbourávají na acetyl-CoA v mitochondriích

Teď pokročíme a probereme 3. fázi katabolismu, děj vyžadující mnoho molekulárního kyslíku (plynného O_2). Protože se má za to, že kyslík se v pozemské atmosféře začal vyskytovat ve větším množství teprve před jednou až dvěma miliardami let, zatímco první projevy života se na Zemi vyskytly už před 3,8 miliardami let, je využití O_2 v reakcích, které budeme probírat, poměrně novou záležitostí. Naopak mechanismus tvorby ATP na obrázku 4-5 kyslík nevyžaduje a pochody příbuzné tomuto elegantnímu páru spřažených reakcí mohly vzniknout již ve velmi rané historii života na Zemi.

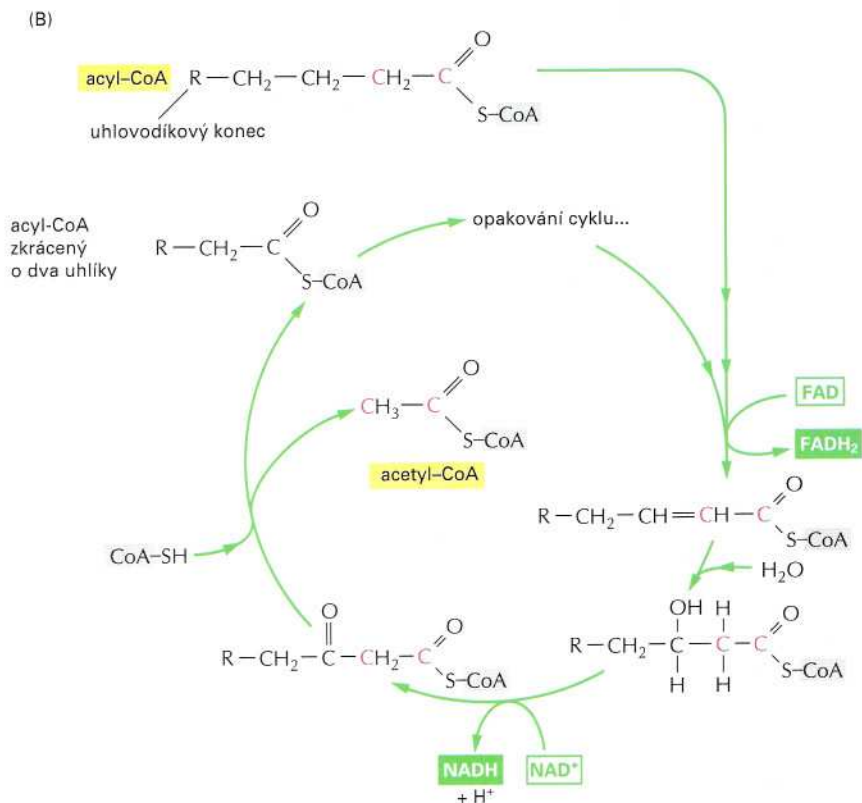
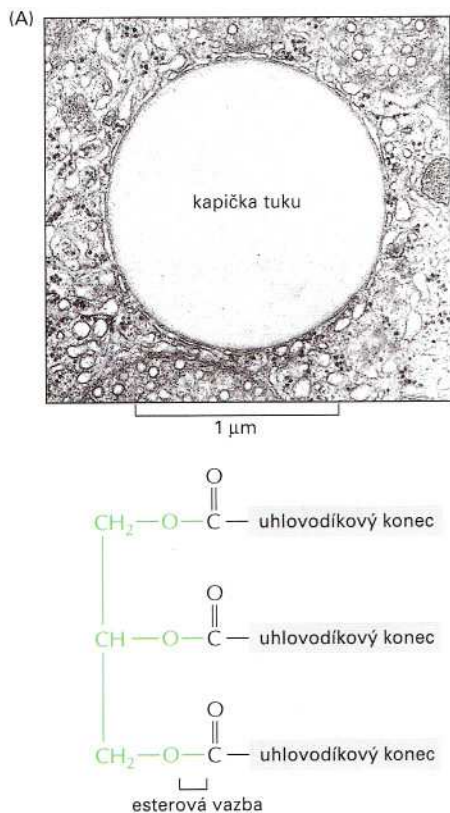
V aerobním metabolismu je pyruvát, vzniklý v glykolýze, rychle dekarboxylován obrovským komplexem tří enzymů, zvaným *pyruvátdehydrogenasový komplex*. Produkty dekarboxylace pyruvátu jsou CO_2 (vedlejší produkt) a acetyl-CoA. Tříenzymový komplex je umístěn v mitochondriích eukaryontních buněk a jeho struktura a způsob práce jsou načrtnuty na obrázku 4-8.

Enzymy, které odbourávají mastné kyseliny pocházející z tuků, podobně produkují acetyl-CoA v mitochondriích. Každá molekula mastné kyseliny se (jako aktivovaná molekula acyl-CoA) zcela odbourává v cyklu reakcí, které při každé otáčce cyklu zkrátí molekulu na jejím karboxylovém konci o dva uhlíky a vytvoří jednu

Otázka 4-2 Arseničnan či arsenát (AsO_4^{3-}) je velmi podobný fosfátu (PO_4^{3-}) a nachází použití jako alternativní substrát v mnoha reakcích vyžadujících přítomnost fosfátu. Na rozdíl od fosfátu je však anhydridová vazba mezi arsenátem a uhlíkem velmi brzy rozložena vodou. Když toto víte, objasněte, proč je arseničnan oblíbenou látkou vrahů, ale nehodí se pro buňky. Formulujte své vysvětlení v souvislosti s obrázkem 4-6.



Obrázek 4-8 Oxidace pyruvátu na acetyl-CoA a CO_2 . Struktura pyruvátdehydrogenasového komplexu, který obsahuje 60 polypeptidových řetězců. Tento komplex je příkladem velkého multienzymového komplexu, v kterém je reakční meziprodukt předáván přímo od jednoho enzymu druhému. V eukaryontních buňkách se nachází v mitochondriích. (B) Reakce, které provádí pyruvátdehydrogenasový komplex. Komplex přeměňuje v mitochondriální matrix pyruvát na acetyl-CoA; při této reakci se tvoří také NADH. A, B a C jsou tři enzymy pyruvátdekarboxyláza, lipoamidreduktáza-transacetyláza, a dihydrolipoyldehydrogenáza.



molekulu acetyl-CoA. V tomto ději vzniká také jedna molekula NADH a jedna molekula FADH₂ (obr. 4-9).

Cukry a tuky jsou hlavními zdroji energie pro většinu nefotosyntetických organismů včetně člověka. Většina užitečné energie, která může být získána oxidací obou typů potravy, však zůstává uložena v molekulách acetyl-CoA, vzniklých dvěma typy reakcí, které jsme právě popsali. Cyklus kyseliny citronové, v němž je acetylová skupina v acetyl-CoA oxidována na CO₂ a H₂O, je proto středem energetického metabolismu aerobních organismů. V eukaryotech se všechny tyto reakce odehrávají v mitochondriích. Do těchto organel jsou pyruvát a mastné kyseliny přenášeny za účelem tvorby acetyl-CoA (obr. 4-10). Neměli bychom tedy být překvapeni zjištěním, že mitochondrie jsou místem produkce většiny ATP v živočišných buňkách. Naopak aerobní bakterie provádějí všechny své reakce v jediném oddílu, v cytosolu, a v něm také v těchto buňkách probíhá cyklus kyseliny citronové.

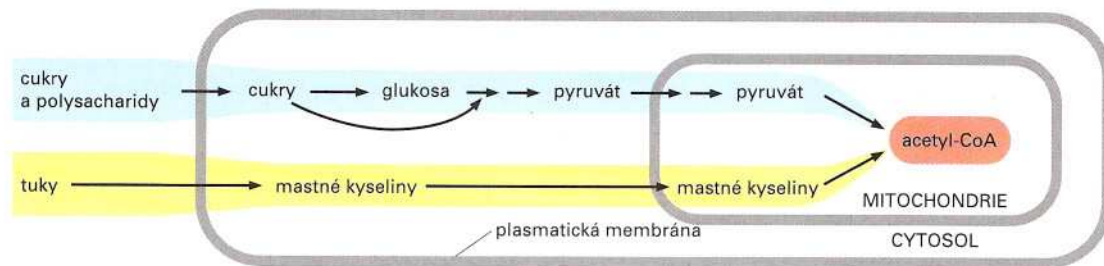
Cyklus kyseliny citronové vytváří NADH oxidací acetylových skupin na CO₂

V devatenáctém století si biologové povšimli, že v nepřítomnosti vzduchu (anaerobní podmínky) produkují buňky kyselinu mléčnou (například ve svalu) nebo ethanol (například kvasinky), zatímco za přítomnosti kyslíku (aerobní podmínky) spotřebovávají O₂ a produkují CO₂ a H₂O. Intenzivní snaha určit dráhy aerobního metabolismu se nakonec zaměřila na oxidaci pyruvátu a vedla v roce 1937 k objevu **cyklu kyseliny citronové**, známého také jako *citrátový cyklus*, *cyklus trikarboxylových kyselin* či *Krebsův cyklus*. Cyklus kyseliny citronové

Obrázek 4-9 Oxidace mastných kyselin na acetyl-CoA.

(A) Elektronmikroskopický snímek lipidové kapénky v cytoplasmě (nahore) a struktura tuků (dole). Tuky jsou triacylglyceroly. Glycerolová část, ke které jsou esterovými vazbami připojeny tři mastné kyseliny, je zde vyznačena zeleně. Tuky jsou nerozpustné ve vodě a tvoří velké lipidové kapénky ve specializovaných tukových buňkách (zvaných adipocyty), v nichž jsou uloženy. (B) Cyklus oxidace mastných kyselin. Cyklus je katalyzován řadou čtyř enzymů v mitochondrii. Každá otáčka cyklu zkracuje uhlíkový řetězec mastné kyseliny o dva uhlíky (ukázány modře) a vytvoří jednu molekulu acetyl-CoA a po jedné molekule NADH a FADH₂.

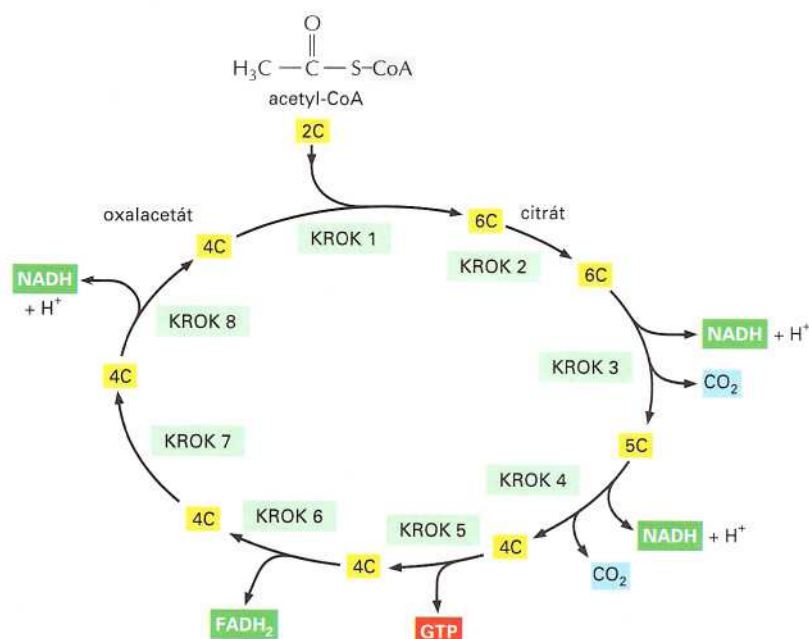
Otázka 4-3 Mnoho katabolických a anabolických pochodů je založeno na reakcích, které jsou si podobné, ale probíhají v opačném směru, jako například hydrolýza a kondenzace popsané v obrázku 3-32. To platí i pro odbourání a syntézu mastných kyselin. Když uvážíte, co víte o mechanismu odbourání mastných kyselin na obrázku 4-9, budete u mastných kyselin v buňkách očekávat spíše sudý nebo lichý počet uhlíkových atomů?



Obrázek 4-10 Obecné dráhy tvorby acetyl-CoA z cukrů a tuků. Mitochondrie v eukaryontní buňce jsou místem tvorby acetyl-CoA z obou typů hlavních molekul potravy. Jsou proto místem, kde probíhá většina oxidačních reakcí buňky, a kde vzniká většina buněčného ATP.

přispívá asi dvěma třetinami k celkové oxidaci uhlíkatých sloučenin ve většině buněk a jeho hlavními koncovými produkty jsou CO_2 a elektrony s vysokým obsahem energie ve formě NADH. CO_2 se uvolňuje jako vedlejší produkt, zatímco vysokoenergetické elektrony z NADH jsou předávány do elektrontransportního řetězce vázaného na membránu, kde se nakonec spojují s polovinou O_2 a dvěma protony H^+ na vodu H_2O . Ačkoli sám cyklus kyseliny citronové O_2 nevyužívá, vyžaduje ho, aby se mohl stále opakovat, neboť neexistuje žádná jiná cesta, kterou by se NADH mohl účinně zbavovat svých elektronů a regenerovat se na NAD^+ , který je nutný k udržení chodu cyklu.

Cyklus kyseliny citronové, který se u eukaryontních buněk odehrává v mitochondriích, vede k úplné oxidaci uhlíkových atomů v acetylových skupinách v acetyl-CoA a převádí je na CO_2 . Acetylová skupina se neoxiduje přímo. Místo toho se přenáší z acetyl-CoA na větší čtyřuhlíkovou molekulu oxalacetátu za vzniku šestiuhlíkové trikarboxylové kyseliny – *kyseliny citronové*, podle níž se jmenuje následující cyklus reakcí. Kyselina citronová je potom postupně oxidována a energie z této oxidace je využita k produkci vysokoenergetických přenašečových molekul přibližně stejným způsobem, jaký jsme popsali u glykolýzy. Řetězec osmi reakcí tvoří cyklus, neboť koncový



Čistý výsledek: Jednou otočkou cyklu vznikají tři molekuly NADH, po jedné molekule GTP a FADH_2 a dvě molekuly CO_2

Obrázek 4-11 Jednoduchý přehled citrátového cyklu. Reakce acetyl-CoA s oxalacetátem zahajuje cyklus vytvořením kyseliny citronové. V každé otočce cyklu vzniknou dvě molekuly CO_2 jako vedlejší produkt a tři molekuly NADH, jedna molekula GTP a jedna molekula FADH_2 . Počet uhlíkových atomů v každém z meziproduktů je uveden ve žlutém políčku.

oxalacetát je regenerován a vstupuje do nové otáčky cyklu, jak je ukázáno na obrázku 4-11.

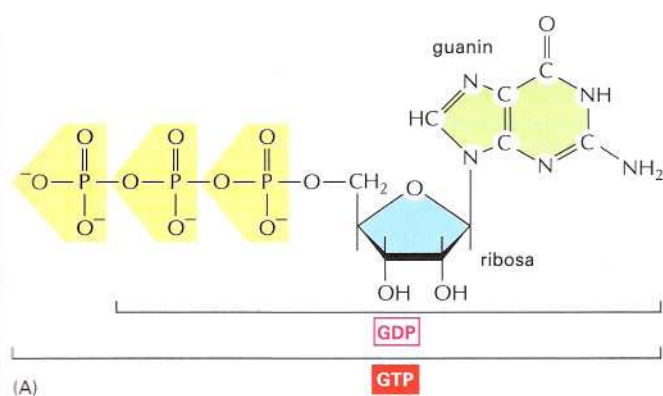
Zatím jsme probírali pouze jeden ze tří typů přenašečových molekul, které produkuje citrátový cyklus: pár NAD^+ - NADH . Každá otáčka cyklu vytváří navíc ke třem molekulám NADH také jednu molekulu FADH_2 (redukovaný flavinadenindinukleotid) z FAD a jednu molekulu ribonukleotidu GTP (guanosintrifosfát) z GDP . Struktury těchto molekul jsou ukázány na obrázku 4-12. GTP je blíže příbuzný ATP a přenáší svou koncovou fosforylovou skupinu na ADP za vzniku jedné molekuly ATP v každém cyklu. FADH_2 je podobně jako NADH nosičem vysokoenergetických elektronů a vodíku. Jak brzy probereme, energie uložená v reaktivních vysokoenergetických elektronech v NADH a FADH_2 se následně využívá k tvorbě ATP *oxidační fosforylací*, jediným krokem v oxidačním katabolismu potravy, který přímo vyžaduje plynný kyslík (O_2).

Celý citrátový cyklus je představen v panelu 4-2 (str. 122-123). Kyslíkové atomy potřebné k tvorbě CO_2 z acetylových skupin vstupujících do citrátového cyklu nepocházejí z plynného kyslíku, nýbrž z vody. Jak je v panelu ukázáno, štěpí se v každém cyklu tři molekuly vody a kyslíkové atomy některých z nich jsou nakonec využity k produkci CO_2 .

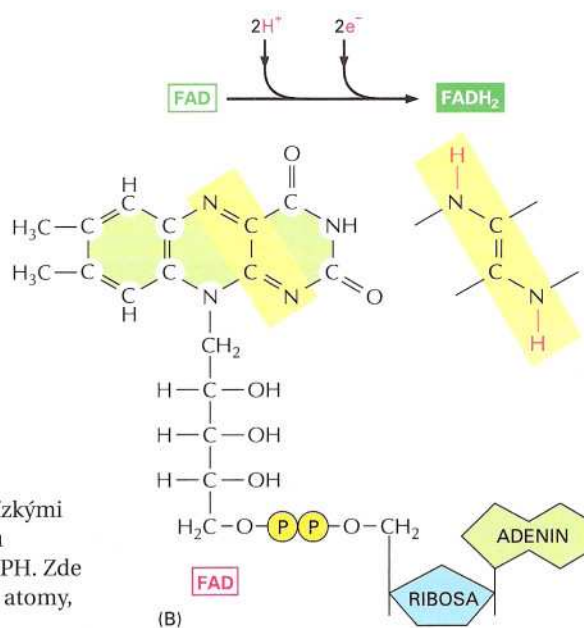
Kromě pyruvátu a mastných kyselin přecházejí z cytosolu do mitochondrií také některé aminokyseliny, které se tam mění na acetyl-CoA nebo na některý z meziproduktů citrátového cyklu (viz obr. 4-2). V eukaryontních buňkách je tedy mitochondrie centrálou, do které se sbíhají všechny procesy získávání energie, ať už začínají cukry, tuky nebo proteiny.

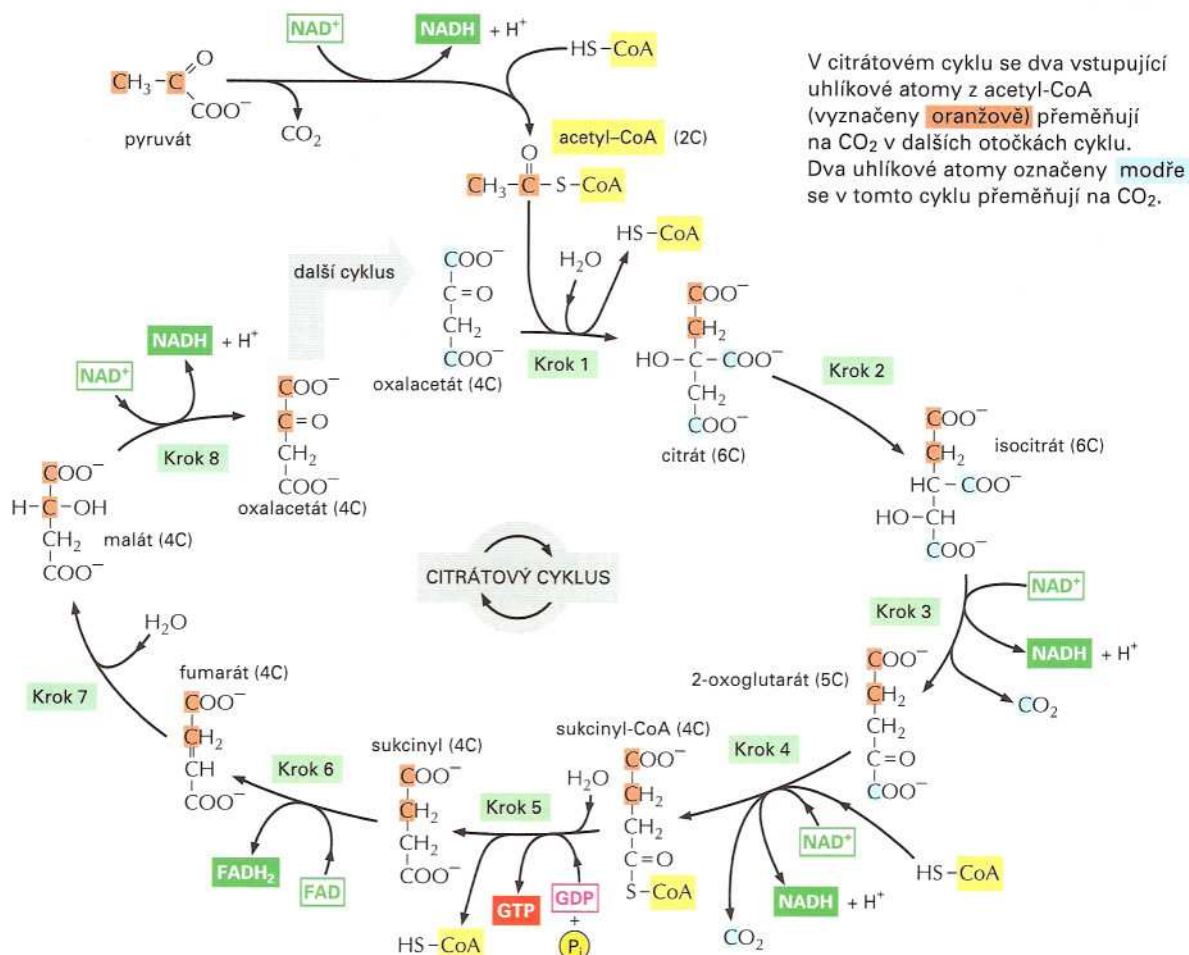
Cyklus kyseliny citrónové funguje také jako startovní bod pro důležité biosyntetické reakce, neboť vytváří životně důležité uhlíkaté meziprodukty, jako například *oxalacetát* a *2-oxoglutarát*. Tyto látky vytvářené katabolismem se přenášejí z mitochondrie zpět do cytosolu, kde slouží v anabolických reakcích jako prekursor pro syntézu mnoha nepostradatelných molekul, například aminokyselin.

Otázka 4-4 Podívejte se na chemické reakce rozebrané v panelu 4-2 (str. 122-123). Proč je podle vás užitečné spojit acetylovou skupinu nejprve s jinou uhlíkatou kostrou, např. s oxalacetátem, před úplnou oxidací obou uhlíků na CO_2 ?



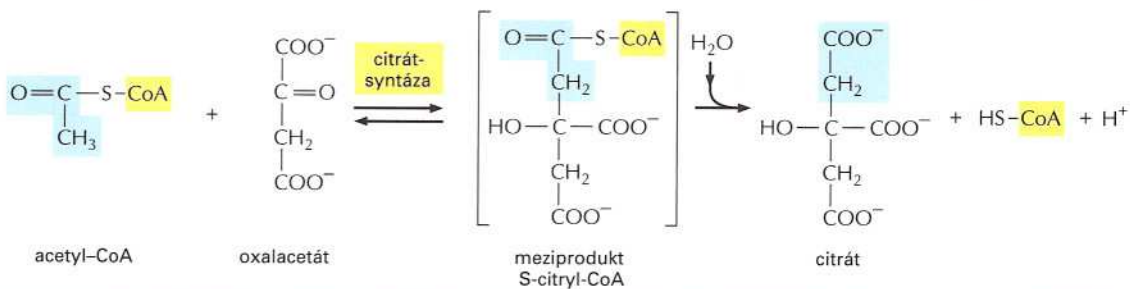
Obrázek 4-12 Struktura GTP a FADH_2 . (A) GTP a GDP jsou blízkými příbuznými ATP a ADP . (B) FADH_2 je přenašečem iontů vodíku a vysokoenergetických elektronů, podobně jako NADH a NADPH . Zde je uveden ve své oxidované formě (FAD) se žlutě vyznačenými atomy, které nesou vodík.



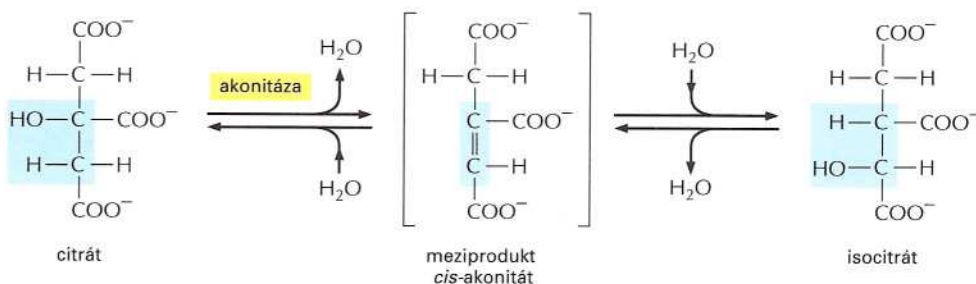


Osm výše uvedených kroků je rozvedeno detailně níže. V každém kroku je ta část molekuly, v níž dochází ke změně, vyznačena modře a název katalyzujícího enzymu je na žlutém pozadí.

Krok 1 Po odstranění protonu ze skupiny -CH₃ acetyl-CoA vytváří záporně nabitá skupina CH₂ vazbu s karbonylovým uhlíkem oxalacetátu. Následující hydrolytické odštěpení CoA žene reakci rychle kupředu.

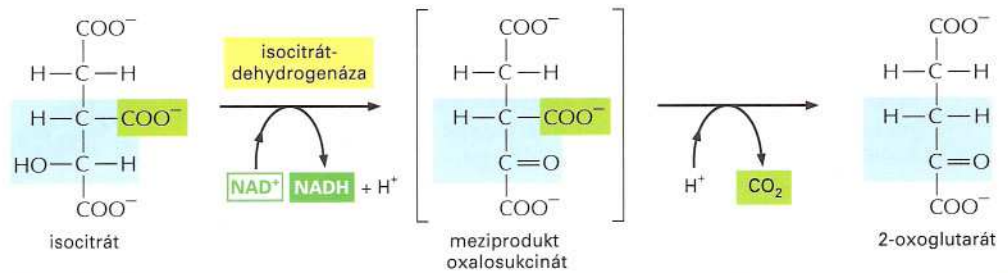


Krok 2 Izomerace, při níž je voda nejdříve odstraněna a pak opět přidána, přenáší hydroxylovou skupinu z jednoho atomu uhlíku na sousední C.

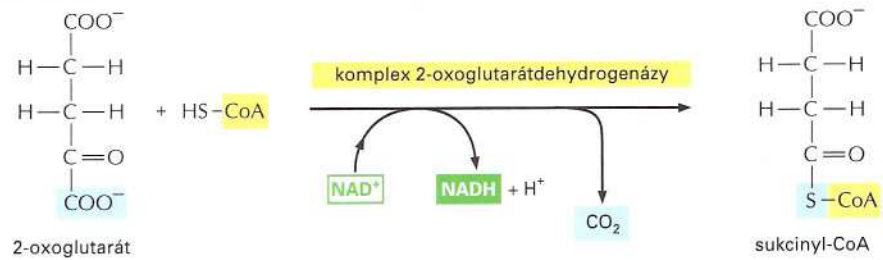


Krok 3

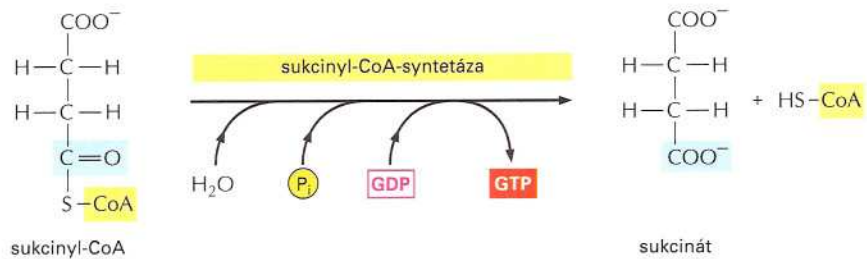
V prvním ze čtyř oxidačních kroků cyklu se přemění uhlík nesoucí hydroxylovou skupinu na karbonylovou skupinu. Bezprostřední produkt je nestálý a uvolňuje CO_2 , dokud je vázán na enzym.

**Krok 4**

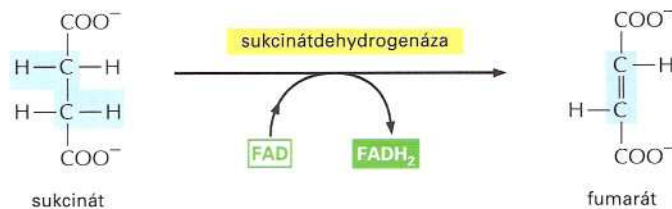
Komplex 2-oxoglutarátdehydrogenázy se velice podobá velkému enzymovému komplexu, který přeměňuje pyruvát na acetyl-CoA (pyruvátdehydrogenáza). Katalyzuje též oxidaci, kterou se tvoří NADH , CO_2 a makroergní thioester vázaný na koenzym A.

**Krok 5**

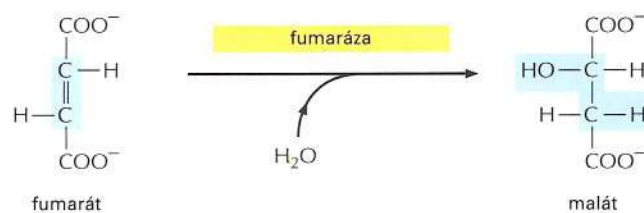
Molekula fosfátu z roztoku nahradí CoA a vytvoří tak makroergní fosfátovou vazbu se sukcinátem. Fosforečná skupina se pak přemístí na GDP za tvorby GTP (v bakteriích a rostlinách místo GDP zastává ADP).

**Krok 6**

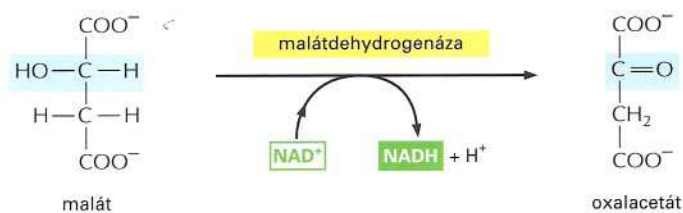
Ve třetím oxidačním kroku cyklu je FAD redukován dvěma atomy H ze sukcinátu.

**Krok 7**

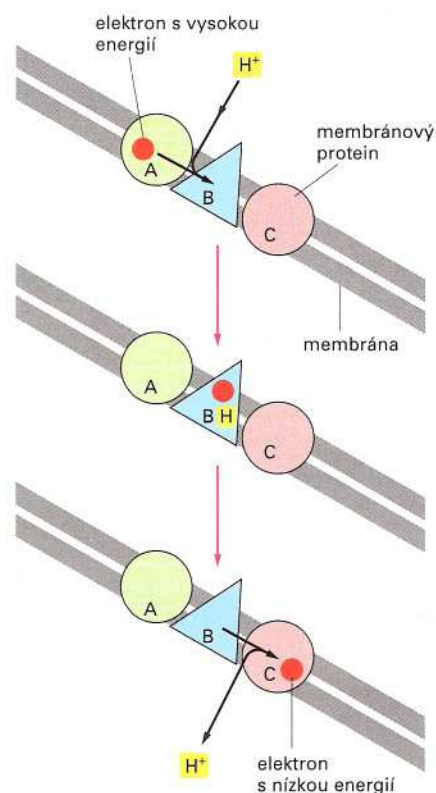
Adice vody k fumarátu zavádí hydroxylovou skupinu do sousedství karbonylového uhlíku.

**Krok 8**

V posledním ze čtyř oxidačních kroků cyklu se uhlík s hydroxylovou skupinou přeměňuje na karbonylovou skupinu. Při tom se regeneruje oxalacetát potřebný pro první krok dalšího cyklu.



Obrázek 4-13 Reakce elektrontransportního řetězce vytvářejí gradient koncentrace H^+ napříč membránou. Vysokoenergetický elektron (pocházející třeba z oxidace metabolitu) přechází postupně přes přenašeče A, B a C do stavu s nižší energií. V tomto diagramu je nosič B uspořádán v membráně takovým způsobem, že při průchodu elektronu odebírá H^+ z jednoho místa a uvolňuje ho jinde. Výsledkem je gradient koncentrace H^+ . Tento gradient představuje formu uložené energie, která je zachycována jinými membránovými proteiny a pohání tvorbu ATP, jak se rozebírá v kapitole 13.



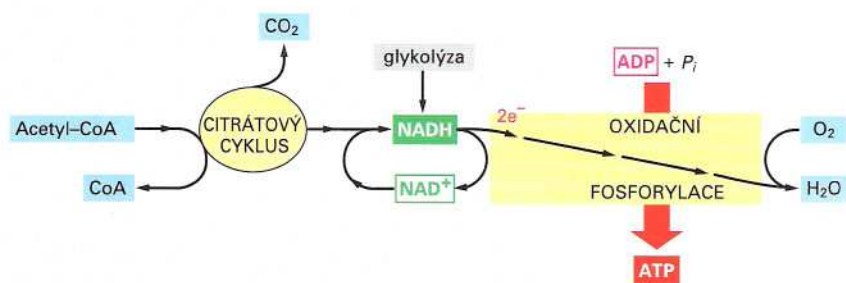
Transport elektronů pohání syntézu ATP ve většině buněk

Většina energie molekul potravy se uvoňuje až v posledním kroku jejich odbourání. V tomto závěrečném dějství elektronové nosiče NADH a $FADH_2$ přenášejí elektrony, které získaly při oxidaci jiných molekul, do řetězce enzymů fungujících v transportu elektronů, který je umístěn ve vnitřní membráně mitochondrie (viz str. 414). Při svém průchodu řetězcem specializovaných akceptorových a donorových molekul elektrony postupně odevzdávají svou energii. Uvolněná energie je použita k pohonu transportu iontů H^+ přes membránu z vnitřního oddílu mitochondrie do vnějšího prostředí (obr. 4-13). Přitom se vytváří gradient jejich koncentrace. Tento gradient slouží jako zdroj energie, podobně jako baterie, kterou jsme zapojili k pohonu řady energeticky nevýhodných reakcí. Nejdůležitější z těchto reakcí je tvorba ATP fosforylací ADP.

Na konci této série přenosů jsou elektrony předány molekule plynného kyslíku (O_2), které difundovaly do mitochondrií, za současné adice protonů z okolního roztoku a následného vzniku molekul vody. Elektrony nyní dosáhly své nejnižší energetické hladiny, a tím byla získána všechna dostupná energie z oxidace molekul potravy. Tento děj, zvaný *oxidační fosforylace*, se odehrává také v plasmatické membráně bakterií. Jako jeden z nejzajímavějších výsledků buněčné evoluce bude ústředním námětem Kapitoly 13.

V souhrnu buňka úplnou oxidací jedné molekuly glukosy na CO_2 a H_2O získá asi 30 molekul ATP. Naproti tomu v samotné glykolýze se při spotřebě jedné molekuly glukosy vytvoří jen dvě molekuly ATP.

Otázka 4-5 Co je chybné v následujícím výroku (pokud vůbec něco chybné je)? „Kyslík spotřebovaný během oxidace glukosy v živočišných buňkách se jako část CO_2 vrací do atmosféry.“ Jak byste svou odpověď podpořili experimentálně?



Obrázek 4-14 Poslední stadia oxidace molekul potravy. Molekuly NADH a $FADH_2$ (není ukázán) produkované v cyklu kyseliny citronové odevzdávají elektrony, které jsou případně využity k redukci plynného kyslíku na vodu. Velká část energie uvolněné během důmyslného transportu elektronů ve vnitřní mitochondriální membráně (nebo v cytoplasmatické membráně bakterií) se zachytí a slouží k pohonu syntézy ATP.

Ukládání a zužitkování potravy

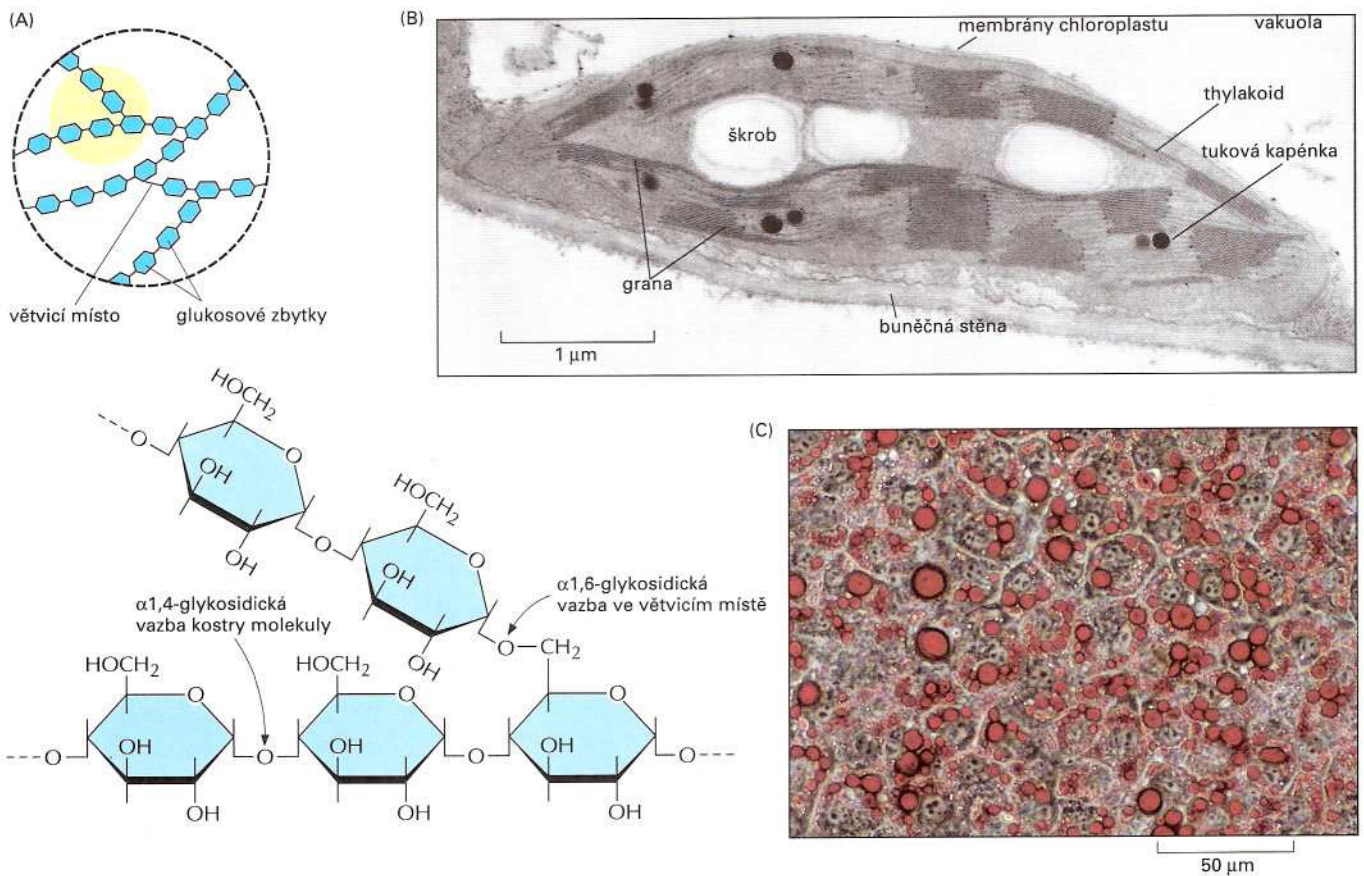
Organismy ukládají molekuly potravy ve speciálních zásobárnách

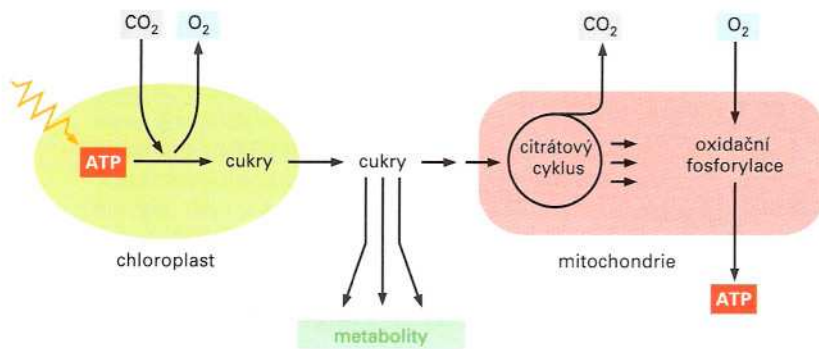
Všechny organismy potřebují neustále obnovovat své zásoby ATP, mají-li si ve svých buňkách udržet biologický pořádek. Živočiškové však mají k potravě jen občasný přístup a rostliny musí přežít noc bez slunečního světla, bez možnosti fotosyntetické tvorby cukru.

K vyrovnání dlouhých období půstu si živočiškové ukládají potravu uvnitř buněk. Masné kyseliny jsou ukládány jako tukové kapénky složené z triacylglycerolů nerozpustných ve vodě, a to hlavně ve specializovaných tukových buňkách (obr. 4-9A). Cukr se ukládá jako glukosové podjednotky ve velkém rozvětveném polysacharidu zvaném **glykogen** (obr. 4-15). Ten je přítomen v podobě malých granulí v cytoplasmě mnoha buněk včetně buněk jaterních a svalových. Syntéza a odbourání glykogenu jsou rychle regulovány podle potřeby. Je-li zapotřebí více ATP, než může vzniknout z molekul potravy přenášených krevním řečištěm, odbourávají buňky glykogen v reakci, při níž vzniká glukosa-1-fosfát; ten potom vstupuje do glykolýzy.

Kvantitativně vzato je **tuk** mnohem důležitější zásobou energie než glykogen, neboť oxidací jednoho gramu tuku se uvolní více než dvakrát více energie než při oxidaci jednoho gramu glykogenu. Kromě toho

Obrázek 4-15 Ukládání cukrů a tuků v živočišných a rostlinných buňkách. (A) Struktura škrobu a glykogenu. Oba jsou zásobní polymery sacharidu glukosy a liší se jen v počtu větvení (oblast zvýrazněná žlutě je dole ukázána ve zvětšení). V glykogenu je mnohem více rozvětvení než ve škrobu. (B) Tenký řez chloroplastem rostlinné buňky. Je vidět granule škrobu a lipidové kapénky, které se nahromadily jako výsledek zde probíhající biosyntézy. (C) Tukové kapénky (obarveny červeně) se začínají hromadit ve vyvíjejících se tukových buňkách.



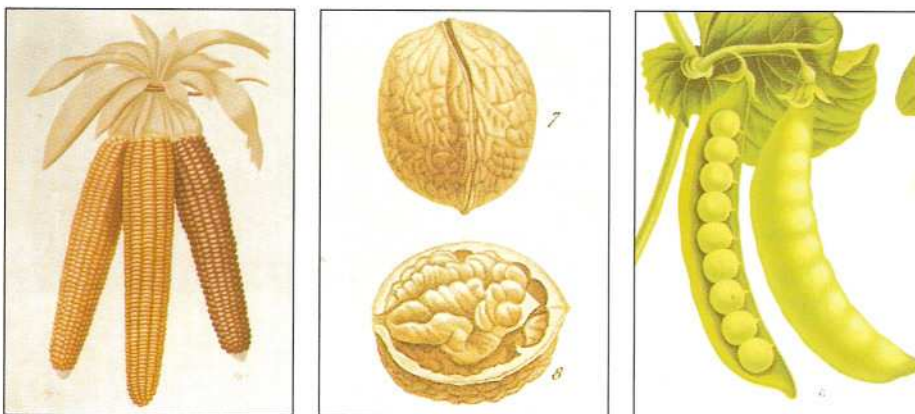


Obrázek 4-16 V rostlinách chloroplasty a mitochondrie spolupracují a zásobují buňky metabolity a ATP.

váže glykogen na rozdíl od tuku velká množství vody; proto je k uložení stejného množství energie potřeba šestkrát větší hmotnost glykogenu ve srovnání s tukem. Průměrný dospělý člověk si v glykogenu ukládá zásoby energie jen asi na jeden den, zatímco v tuku až na celý měsíc. Pokud bychom si měli svou energii ukládat hlavně ve formě glykogenu, musela by mít naše těla asi o 30 kg větší hmotnost.

Většina našeho tuku je uložena v tukové tkáni, z které se podle potřeby tuk uvolňuje do krevního řečiště a je využíván ostatními buňkami. Po určité době půstu potřeba tuku vzrůstá; dokonce i normální hladovění přes noc vede k mobilizaci tuku, takže ráno většina acetyl-CoA vstupujícího do cyklu kyseliny citronové pochází z glukosy z potravy a jakýkoli přebytek glukosy je využit k doplnění spotřebovaných zásob glykogenu či k syntéze tuků. (Protože živočišné buňky ochotně mění cukry na tuky, nemohou převádět mastné kyseliny na cukry.)

Rostliny vytvářejí NADPH a ATP fotosynteticky. Tento důležitý děj se odehrává ve specializované organelle, zvané *chloroplast*, která je od zbytku rostlinné buňky izolována membránou nepropustnou pro molekuly obou aktivovaných přenašečů. Navíc rostlina obsahuje řadu jiných buněk, které – jako třeba buňky kořenů – postrádají chloroplasty, a proto nemohou vytvářet své vlastní cukry ani ATP. Proto většina rostlinné produkce ATP závisí na exportu cukrů z chloroplastů do mitochondrií, které se nacházejí ve všech buňkách rostliny. Většina ATP, který rostlina potřebuje, se syntetizuje v těchto mitochondriích a z nich se dostává do zbytku rostlinné buňky. Přitom se využívají přesně stejné dráhy oxidačního odbourání cukrů jako u nefotosyntetických organismů (obr. 4-16).



Obrázek 4-17 Některá rostlinná semena, která slouží jako důležitá potrava pro lidi. Kukuřice, ořechy a hrášek obsahují bohaté zásoby škrobu a tuku, které poskytují mladému embryu rostliny energii a stavební kameny pro biosyntézu.

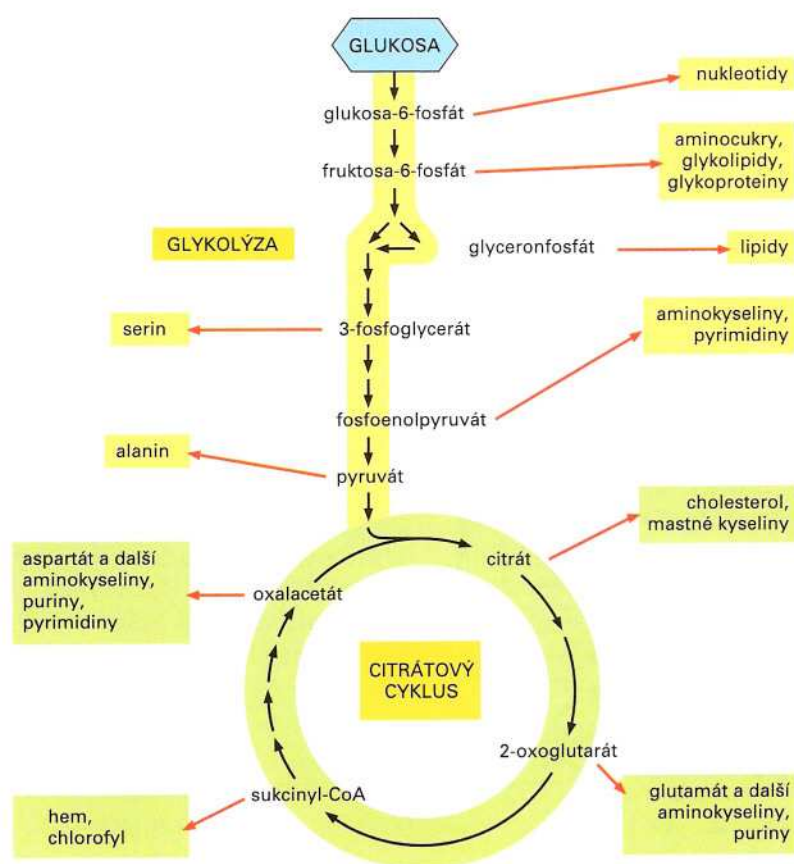
Při zvýšené fotosyntetické aktivitě během dne chloroplasty převádějí část vytvořených cukrů na tuky a na **škrob**, což je polymer glukosy analogický živočišnému glykogenu. Tuky jsou v rostlinách stejně jako u živočichů tvořeny triacylglyceroly a liší se pouze typy převládajících mastných kyselin. Tuk i škrob se ukládají v chloroplastech jako zásoby, kterých lze využít jako zdroje energie ve tmě (obr. 4-15B).

Embrya uvnitř semen rostlin musí žít z uložených zásob energie dlouhou dobu, než dospějí do stadia, kdy mohou využívat energii slunečního světla. Proto semena rostlin často obsahují zvláště velká množství tuků a škrobu, díky čemuž jsou hlavním zdrojem potravy živočichů včetně člověka (obr. 4-17).

Otázka 4-6 Podívejte se na strukturu cukrů a mastných kyselin a podejte intuitivní vysvětlení, proč se při oxidaci cukru získá jen asi polovina energie ve srovnání s oxidací ekvivalentní suché hmotnosti mastné kyseliny.

Mnoho biosyntetických drah začíná glykolýzou nebo citrátovým cyklem

Katabolismus vytváří jak energii pro buňku tak stavební kameny, z nichž je složena většina jiných molekul buňky (viz obr. 3-3). Dosud jsme zdůrazňovali hlavně vytváření chemické energie a mnohem méně tvorbu výchozího materiálu pro biosyntézu. Avšak mnoho meziproductů z glykolýzy či cyklu kyseliny citronové je rovněž odčerpáváno jinými enzymy, které z nich vytvářejí aminokyseliny, nukleotidy, lipidy a jiné malé organické molekuly potřebné pro buňku. Jistý pojem o složitosti tohoto děje lze získat pohledem na obrázek 4-18, který ukazuje některé z odboček z ústředních katabolických reakcí do biosyntézy.



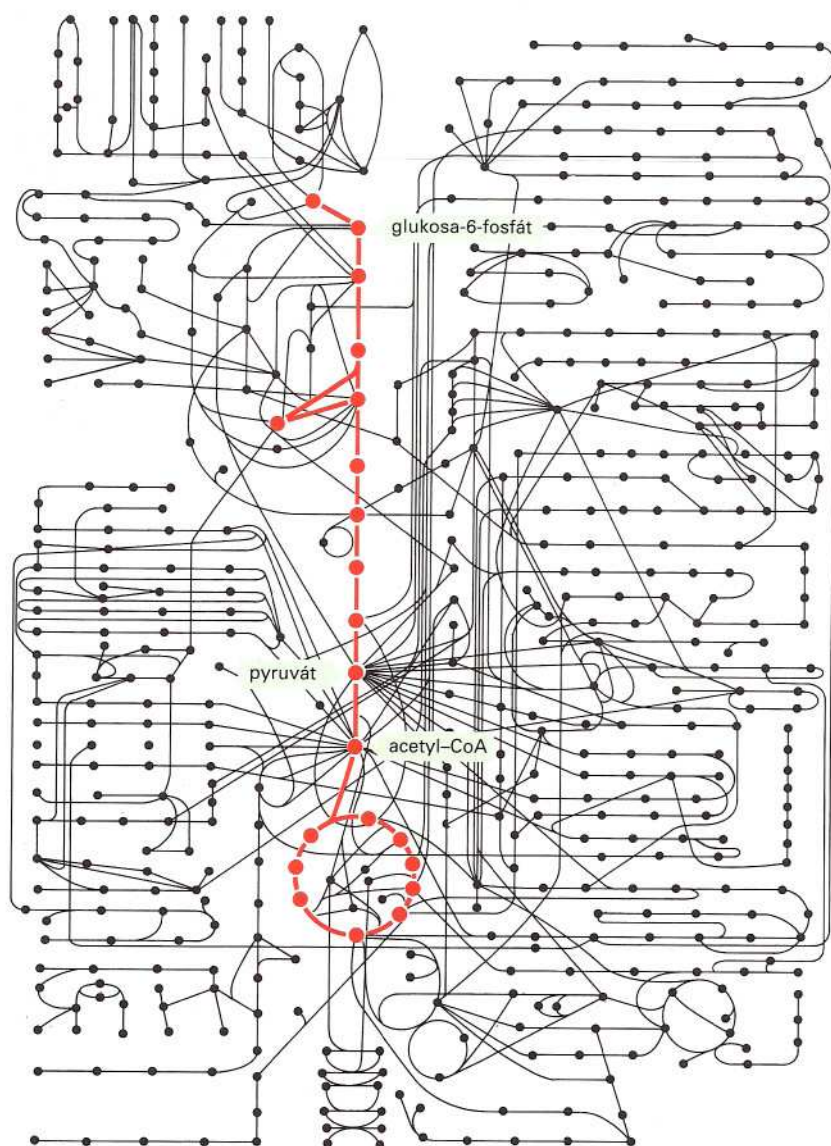
Obrázek 4-18 Glykolýza a cyklus kyseliny citronové poskytují výchozí látky pro syntézu mnoha důležitých biologických molekul. Aminokyseliny, nukleotidy, lipidy, cukry a další molekuly – ukázané zde jako produkty – naopak slouží jako výchozí látky pro mnoho makromolekul buňky. Každá **černá šipka** v tomto diagramu označuje jednotlivou enzymem katalyzovanou reakci; **červené šipky** obecně představují dráhy s mnoha kroky, které jsou zapotřebí k tvorbě uvedených produktů.

Existence tak velkého množství rozvětvených drah v buňce vyžaduje pečlivé řízení každé větve, jak probereme později.

Metabolismus je organizován a regulován

Důmyslnost buňky jako chemického stroje si lze uvědomit při pohledu na obrázek 4-19, který je mapou představující jen některé z enzymových drah v buňce. Na mapě jsou červeně vyznačeny glykolýza a cyklus kyseliny citronové. Je zřejmé, že naše diskuse o buněčném metabolismu se týkala jen nepatrné části chemie buňky.

Všechny tyto reakce se odehrávají v buňce, která má průměr obvykle méně než 10-100 μm , a každá z nich vyžaduje jiný enzym. Jak je vidět z obrázku 4-19, stejná molekula může být často součástí mnoha různých drah. Například pyruvát je substrátem pro půl tuctu či více různých enzymů, z nichž každý ho mění odlišným způsobem. Jeden enzym převádí pyruvát na acetyl-CoA, jiný na oxalacetát, třetí enzym mění pyruvát na aminokyselinu alanin, čtvrtý na kyselinu mléčnou (laktát),



Obrázek 4-19 Glykolýza a cyklus kyseliny citronové jsou středem metabolismu.

Na obrázku je schematicky znázorněno asi 500 metabolických reakcí v typické buňce, přičemž glykolýza a citrátový cyklus jsou vyznačeny červeně. Ostatní reakce buď vedou do těchto dvou ústředních drah – a přinášejí s sebou malé molekuly k odbourání za produkce tepla, nebo vedou pryč a poskytují uhlíkaté sloučeniny pro účely biosyntézy.

atd. Všechny tyto reakce soutěží o stejnou molekulu pyruvátu a ve stejné době probíhají podobné soutěže o tisíce jiných malých molekul. Mohlo by se zdát, že celá soustava musí být tak jemně vyladěná, že jakýkoli malý zásah, například dočasná změna příjmu potravy, by mohl být osudným.

Ve skutečnosti je metabolická rovnováha buňky obdivuhodně stálá. Kdykoli je rovnováha porušena, snaží se buňka dostat zpět do původního stavu. Buňka se může přizpůsobit a fungovat i během hladovění či nemoci. Mutace různých druhů mohou poškodit nebo eliminovat jednotlivé dráhy, a přesto buňka přežívá, pokud jsou splněny některé základní požadavky. Je toho schopna díky vypracované síti *řídících mechanismů*, která reguluje rychlosti všech svých reakcí. Tyto řídící mechanismy spočívají v pozoruhodné schopnosti proteinů měnit svůj tvar a své chemické chování – a tak se dát regulovat – v odpověď na změny ve vnějším prostředí. V další kapitole probereme principy tvorby tak velkých molekul, jako jsou proteiny, a chemický základ jejich regulace.

Otázka 4-7 Cyklická reakční dráha vyžaduje regeneraci startovního materiálu a jeho dostupnost na konci každého cyklu. Pokud se sloučeniny cyklu kyseliny citronové odčerpávají jako stavební bloky používané v celé řadě metabolických reakcí, proč cyklus kyseliny citronové jednoduše nepřestane existovat?

Základní shrnutí

- Glukosa a další molekuly potravy jsou odbourávány řízenou postupnou oxidací a poskytují chemickou energii ve formě ATP a NADH.
- V odbourávání molekul potravy lze rozlišit tři fáze: glykolýzu (která probíhá v cytosolu), cyklus kyseliny citronové (v mitochondriální matrix) a oxidační fosforylaci (na vnitřní mitochondriální membráně).
- Reakce glykolýzy odbourávají šestiuhlíkatý cukr glukosu na dvě molekuly tříuhlíkatého pyruvátu za současné tvorby malého počtu molekul ATP a NADH.
- Za přítomnosti kyslíku je pyruvát převáděn na acetyl-CoA a CO₂. Cyklus kyseliny citronové potom převádí acetylovou skupinu v acetyl-CoA na CO₂ a H₂O. V eukaryontních buňkách probíhají tyto reakce v mitochondriích. Velká část energie uvolněná při této oxidaci je ukládána v podobě vysokoenergetických elektronů v nosičích NADH a FADH₂.
 - Dalším velkým zdrojem energie v potravě je tuk. Mastné kyseliny, které se z tuků uvolňují, jsou přenášeny do mitochondrií a oxidovány na molekuly acetyl-CoA. Tyto molekuly acetyl-CoA se dále oxidují v cyklu kyseliny citronové podobně jako acetyl-CoA pocházející z pyruvátu.
- NADH a FADH₂ odevzdávají elektrony, které nesou, do elektrontransportního řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně, kde se využívá série přenosů elektronů k pohonu tvorby ATP. Většina energie zachycená během odbourávání molekul potravy se získá v procesu oxidační fosforylace (která je popsána v Kapitole 13)
- Buňky uskladňují molekuly potravy ve zvláštních zásobárnách. Glukosové podjednotky jsou uloženy jako glykogen u živočichů a jako škrob u rostlin; jak živočichové tak rostliny ukládají potravu jako tuky. Potravní zásobárny vytvářené rostlinami jsou hlavními zdroji potravin pro živočichy včetně člověka.
- Molekuly přijaté jako potrava jsou využity nejen jako zdroj metabolické energie, ale také jako suroviny pro biosyntézu. Mnoho meziproductů glykolýzy a cyklu kyseliny citronové představuje startovní body drah, které vedou k syntéze proteinů, nukleových kyselin a dalších specializovaných molekul buňky.
- Mnoho tisíc různých reakcí, které v buňce současně probíhají, je přesně sladěno, což buňce umožňuje přizpůsobit se vnějšímu prostředí a fungovat ve velmi široké škále vnějších podmínek.

Klíčová slova

acetyl-CoA	elektrontransportní řetězec	glukosa	oxidační fosforylace
ADP, ATP	FAD, FADH ₂	glykogen	pyruvát
cyklus kyseliny citronové	fermentace	glykolýza	škrob
	GDP, GTP	NAD ⁺ , NADH	tuk

5 Proteiny: struktura a funkce

Proteiny čili bílkoviny tvoří většinu suché hmotnosti buňky. Když se na buňku díváme mikroskopem nebo zkoumáme její biochemickou či elektrickou aktivitu, pozorujeme hlavně proteiny. Ty však nejsou pouhými stavebními kameny, z nichž je buňka vytvořena; obstarávají také většinu buněčných funkcí. Například enzymy v buňce poskytují složité molekulární povrchy, které uvádějí do pohybu řadu chemických reakcí buňky. Proteiny zanořené v plasmatické membráně tvoří kanály a pumpy, které řídí průchod malých molekul do buňky a z buňky. Některé proteiny přenášejí zprávy od jedné buňky k druhé, zatímco jiné slouží jako integrátory signálu, které předávají soubory signálů z plasmatické membrány do jádra jednotlivých buněk. Ještě další proteiny slouží jako drobné molekulové stroje s pohyblivými částmi: například *kinesin* posouvá organely cytoplasmou, zatímco *topoizomeráza* umí rozmotat zauzlované molekuly DNA. Jiné specializované proteiny fungují jako protilátky, jedy, hormony, protimrazové molekuly, elastická vlákna, provazy či zdroje luminiscence. Dříve než budeme moci doufat, že pochopíme práci genů, stahování svalů, vedení elektřiny v nervových buňkách či to, jak se vyvíjejí embrya nebo jak fungují naše těla, musíme porozumět proteinům. Některé významné objevy, které přispěly k našemu dnešnímu chápání proteinů, jsou uvedeny v tabulce 5-1.

Četnost funkcí, které proteiny zajišťují (panel 5-1, str. 135), pramení z obrovského počtu různých tvarů, kterých mohou v prostoru nabývat: funkce sleduje strukturu. Takže začneme náš popis těchto pozoruhodných makromolekul tím, že probereme jejich trojrozměrnou strukturu a vlastnosti, které jim tato struktura propůjčuje. Ve druhé polovině kapitoly se podíváme, jak proteiny pracují – jak enzymy katalyzují chemické reakce, jak proteiny fungují jako molekulární přepínače a jak proteiny generují souvislý pohyb. V této kapitole jsou také na třech samostatných panelech na stranách 160-165 popsány techniky rozbíjení buněk, čištění proteinů z těchto buněk a určování jejich struktury.

TVAR A STRUKTURA PROTEINŮ

- Tvar proteinu je dán pořadím jeho aminokyselin
- Proteiny se skládají do konformace s nejnižší energií
- Proteiny se skládají do celé řady komplikovaných tvarů
- Běžnými strukturními motivy jsou α -šroubovice a β -struktura
- Proteiny mají několik různých úrovní organizace
- Jen několik z mnoha možných polypeptidových řetězců bude užitečných
- Proteiny lze rozdělit do rodin
- Molekuly větších proteinů často obsahují více než jeden polypeptidový řetězec
- Proteiny se mohou sdružovat do vláken, listů nebo kuliček
- Šroubovice je běžným motivem v biologických strukturách
- Některé druhy proteinů mají podobu dlouhých vláken
- Extracelulární proteiny jsou často stabilizovány kovalentním zesíťováním

JAK PROTEINY PRACUJÍ

- Proteiny se vážou k jiným molekulám
- Vazebná místa protilátek jsou zvláště rozmanitá
- Měřítkem pevnosti vazby je rovnovážná konstanta
- Enzymy jsou mocné a vysoce specifické katalyzátory
- Lysozym ilustruje práci enzymu
- Účinnost enzymu vyjadřují konstanty v_{lim} a K_m
- Pevně vázané malé molekuly přidávají proteinům další funkce
- Katalytická aktivita enzymů je regulována
- Allosterické enzymy mají dvě vazebná místa, která interagují
- Konformační změna může být vyvolána fosforylací proteinu
- Proteiny vázající GTP mohou podstupovat rozsáhlé konformační změny
- Motorové proteiny generují rozsáhlé pohyby v buňce
- Proteiny často vytvářejí velké komplexy, které fungují jako proteinové stroje

Tabulka 5-1 Historické mezníky v našem porozumění proteinům

- 1838 **Berzelius** navrhl pro složité organické sloučeniny bohaté na dusík, nalézané v buňkách živočichů a rostlin, název „protein“ (řecky *proteios* = první).
- 1819-1904 Byla objevena většina z 21 aminokyselin, které se nacházejí v proteinech.
- 1864 **Hoppe-Seyler** krystaloval a pojmenoval protein hemoglobin.
- 1894 **Fischer** navrhl pro interakce enzymu a substrátu analogii „zámek-klíč“.
- 1897 **Buchnerové** prokázali, že bezbuněčné extrakty z droždí mohou zkvašovat cukr na oxid uhličitý a ethanol, a tak položili základy enzymologie.
- 1926 **Sumner** vykryštoval ureázu v čisté formě a ukázal, že proteiny mohou mít katalytickou schopnost enzymů; **Svedberg** vyvinul první analytickou ultracentrifugu a použil ji k odhadu molekulové hmotnosti hemoglobinu.
- 1933 **Tiselius** zavedl elektroforézu jako metodu pro dělení proteinů v roztoku.
- 1934 **Bernal a Crowfoot** provedli první podrobnou rentgenovou difrakci ve vzorcích proteinů, získaných z krystalů enzymu pepsinu.
- 1942 **Martin a Synge** vyvinuli chromatografii – techniku, která se nyní široce používá k dělení proteinů.
- 1951 **Pauling a Corey** navrhli strukturu šroubovicového uspořádání řetězce L-aminokyselin – α -šroubovici – a strukturu β -listu. Obě tyto struktury byly později nalezeny v mnoha proteinech.
- 1955 **Sanger** dokončil analýzu aminokyselinové sekvence insulínu – prvního proteinu, jehož pořadí aminokyselin bylo stanoveno.
- 1956 **Ingram** získal první proteinové „otisky prstů“ a ukázal, že hemoglobin ze srpkovitých buněk se od normálního hemoglobinu liší v jediné aminokyselině.
- 1960 **Kendrew** popsal první podrobnou strukturu proteinu (vorvaní myoglobin) s rozlišením 0,2 nm, a **Perutz** navrhl s menším rozlišením strukturu hemoglobinu.
- 1963 **Monod, Jacob a Changeux** rozpoznali, že mnoho enzymů je regulováno allosterickými změnami své konformace.
-

Tvar a struktura proteinů

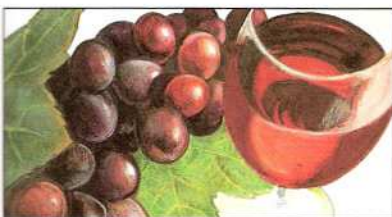
Struktura a chemie jednotlivých proteinů se vyvinula a doladila během miliard let evoluce. Proto snad není překvapením, že z chemického hlediska jsou proteiny nejsložitější a funkčně nejdůmyslnější známé molekuly. Začneme tím, že se podíváme, jak poloha jednotlivých aminokyselin v dlouhém řetězci proteinu přesně určuje jeho trojrozměrný tvar. Pochopení struktury proteinu na atomární úrovni nám pak umožní popsat, jak přesný tvar proteinu naopak určuje jeho funkci.

Tvar proteinu je dán pořadím jeho aminokyselin

Vzpomeňte si, že podle Kapitoly 2 existuje v proteinech 21 různých aminokyselin, z nichž každá má jiné chemické vlastnosti. Molekula **proteinu** je tvořena dlouhým řetězcem těchto aminokyselin spojených se svými sousedy kovalentní peptidovou vazbou (obr. 5-1).

ENZYM

Funkce: Katalýza rozpadu a tvorby kovalentních vazeb.



Příklady: Živé buňky obsahují tisíce různých enzymů, z nichž každý katalyzuje jednu určitou reakci. Například tryptofansyntetáza je zapojena do syntézy tryptofanu; pepsin odbourává v žaludku proteiny z potravy; ribulosabisfosfátcarboxyláza pomáhá v rostlinách při přeměně oxidu uhličitého na cukry; DNA-polymeráza syntetizuje DNA; proteinkináza váže fosfátovou skupinu na protein.

STRUKTURNÍ PROTEIN

Funkce: Poskytuje mechanickou oporu buňkám a tkáním.



Příklady: Mimo buňky jsou kolagen a elastin běžné složky extracelulární matrix a tvoří vlákna ve šlachách a vazivě. Uvnitř buněk tvoří tubulin dlouhá pevná vlákna a aktin se vyskytuje jako drobná vlákna podporující plasmatickou membránu; α -keratin tvoří vlákna zpevňující epitelální buňky a je základní složkou vlasů, nehtů a rohů.

TRANSPORTNÍ PROTEIN

Funkce: Přenáší malé molekuly a ionty.



Příklady: V krevním oběhu přenáší serumalbumin lipidy, hemoglobin je nosičem kyslíku a transferrin přenáší železo. Mnoho proteinů uložených v membránách přenáší ionty a malé molekuly přes membrány. Například bakteriální protein bakteriorhodopsin je aktivován světlem, aby transportoval ionty H^+ z buněk; přenašeč glukosy přenáší glukosy v erythrocytech, jaterních a mnoha dalších buňkách; Ca^{2+} -pumpa přenáší vápenaté ionty ve svalové buňce z cytosolu do sarkoplasmatického retikula, kde se ukládají.

POHYBOVÝ PROTEIN

Funkce: Je původcem pohybu buněk a tkání.



Příklady: Myosin v kosterním svalu umožňuje pohyb živočichů; kinesin interaguje s mikrotubuly, aby pohyboval organelami uvnitř buňky; dynein umožňuje pohyb eukaryotních bičků a řasinek.

ZÁSOBNÍ PROTEIN

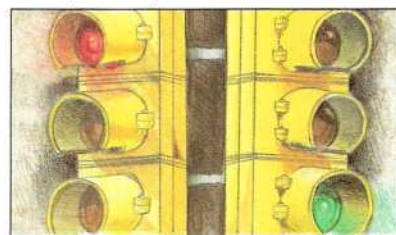
Funkce: Skladuje malé molekuly nebo ionty.



Příklady: Železo se ukládá v játrech tím, že se váže na malý protein zvaný ferritin; ovalbumin ve vaječném bílku se využívá jako zdroj aminokyselin ve vyvíjejícím se ptáčím embryu; kasein v mléce je zdrojem aminokyselin pro novorozené živočichy.

SIGNÁLNÍ PROTEIN

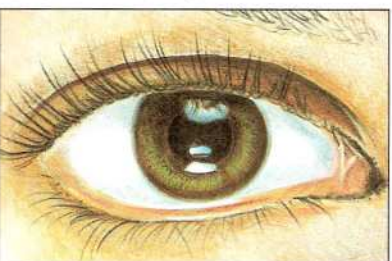
Funkce: Přenáší informační signály z buňky do buňky.



Příklady: Mnoho hormonů a růstových faktorů, jsou proteiny. Insulin je malý protein, který reguluje hladinu glukosy v krvi; netrin přitahuje rostoucí nervové buňky určitým směrem ve vyvíjejícím se embryu; nervový růstový faktor (NGF) stimuluje některé typy nervových buněk k růstu axonů; epidermální růstový faktor (EGF) stimuluje růst a dělení epitelálních buněk.

RECEPTOROVÝ PROTEIN

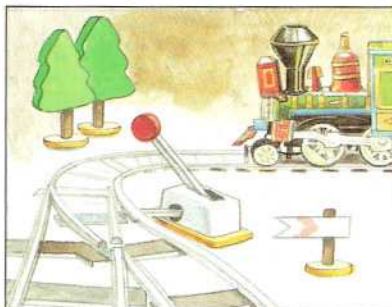
Funkce: V buňkách detekuje chemické a fyzikální signály a předává je k zpracování buňce.



Příklady: Rhodopsin v oční sítnici zachycuje světlo; acetylcholinový receptor v membráně svalové buňky přijímá signály ze zakončení neuronu; insulinový receptor umožňuje jaterní buňce reagovat na hormon insulin tím, že buňka importuje glukosu; adrenergní receptor v srdečním svalu zvyšuje tepovou frekvenci při navázání adrenalinu.

REGULAČNÍ PROTEIN V GENOVÉ EXPRESI

Funkce: Váže se na DNA a spouští nebo vypíná transkripci.



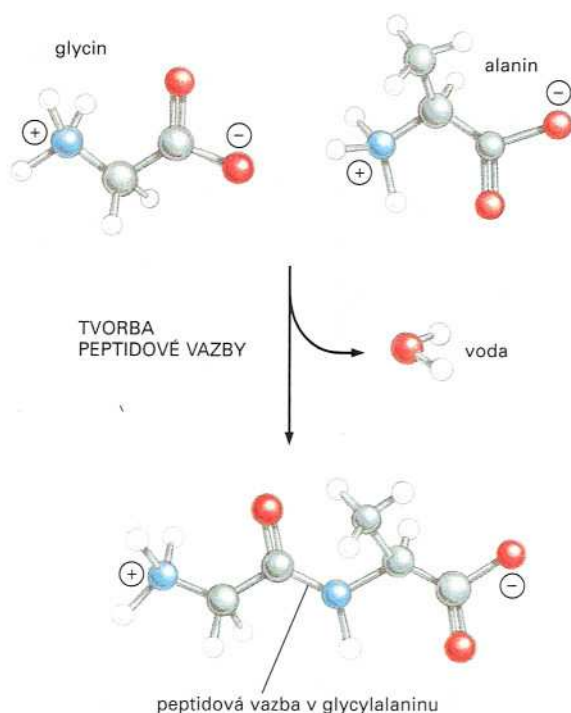
Příklady: Laktosový represor v bakteriích „zamyká“ geny pro enzymy, které odbourávají laktosu; mnoho homeodomenových proteinů působí jako genetické spínače, které regulují vývoj mnohobuněčných organismů.

PROTEINY SE ZVLÁŠTNÍM POSLÁNÍM

Funkce: Velmi rozmanitá



Příklady: Organismy syntetizují proteiny s vysoce specializovanými vlastnostmi. Tak protimrazové proteiny arktických a antarktických ryb chrání jejich krev před zmrazením; zelený fluoreskující protein určitých medúz vysílá zelené světlo; monellin, protein nacházející se v jedné africké rostlině, je nesmírně sladký; mušle a další mořští živočichové vylučují adhezni proteiny, kterými se pevně přichycují ke kamenitému podkladu.

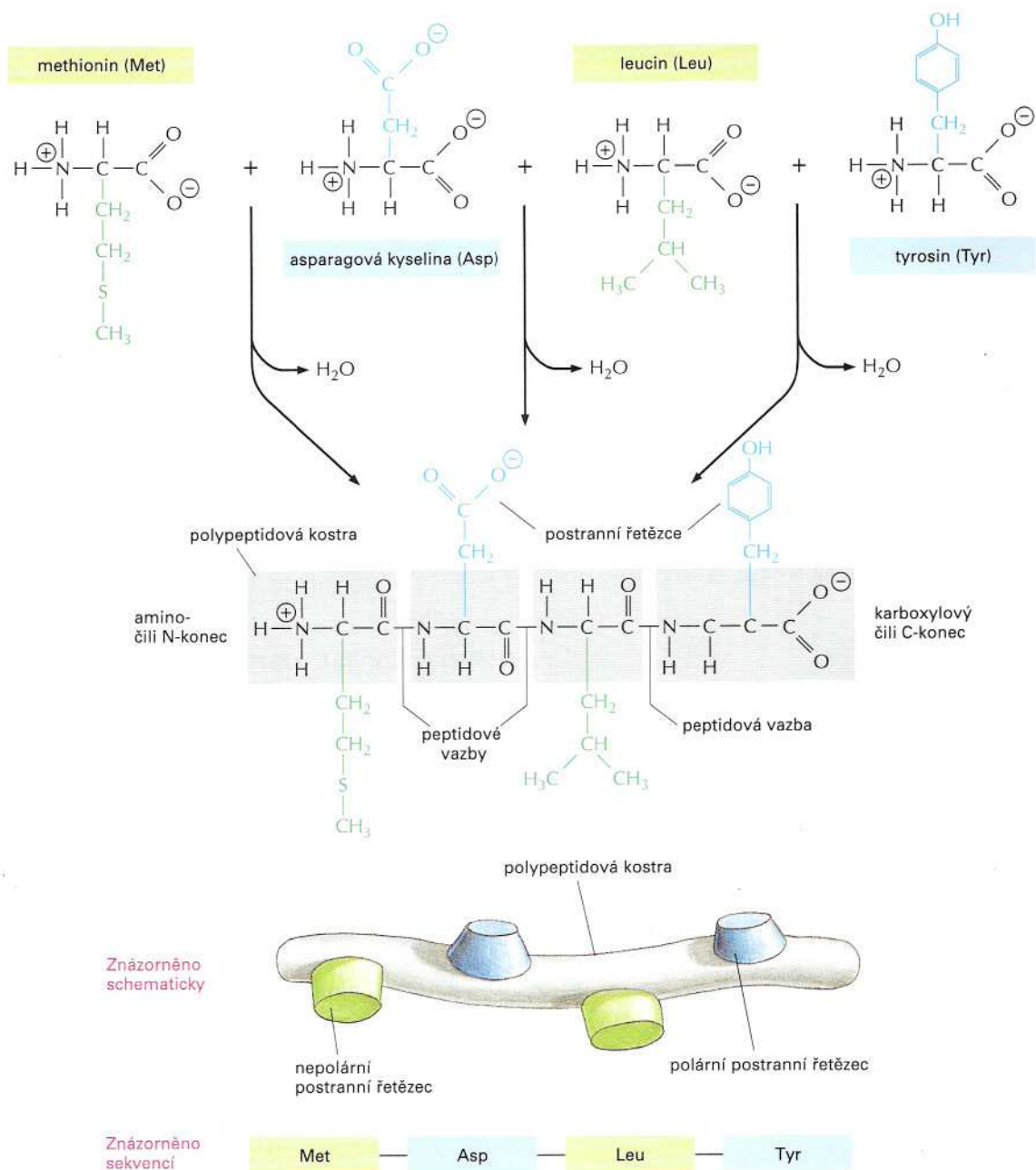


Obrázek 5-1 Peptidová vazba. Tato kovalentní vazba vzniká, když atom uhlíku z karboxylové skupiny jedné aminokyseliny sdílí elektrony s dusíkovým atomem (*modrý*) z aminoskupiny druhé aminokyseliny. Při této reakci se uvolní voda.

Opakující se pořadí atomů podél řetězce se nazývá **polypeptidová kostra**. K tomuto řetězci jsou připojeny **postranní řetězce** různých aminokyselin – tyto části aminokyselin se neúčastní peptidové vazby, zato však propůjčují každé aminokyselině její jedinečné vlastnosti (obr. 5-2). Některé z těchto postranních řetězců jsou nepolární a hydrofobní („bojící se vody“), jiné jsou záporně či kladně nabitě, některé jsou reaktivní a jiné spíše netečné atd. Struktura a vlastnosti 20 dříve známých aminokyselin jsou uvedeny v panelu 2-5 (str. 62-63) a se svými zkratkami také v obrázku 5-3. Každý typ proteinu má jedinečné pořadí aminokyselin, které je u všech molekul tohoto proteinu stejné. Je známo mnoho tisíc různých druhů proteinů, přičemž každý z nich má svou zvláštní aminokyselinovou sekvenci (pořadí aminokyselin).

Mnoho kovalentních vazeb v dlouhém řetězci aminokyselin umožňuje volné otáčení atomů kolem těchto vazeb, takže se polypeptidová kostra může v podstatě skládat nekonečně mnoha způsoby. Každý poskládaný řetězec bude stabilizován mnoha různými soubory *nekovalentních vazeb*, tvořených jak atomy v polypeptidové kostře tak atomy postranních řetězců aminokyselin. Těmito slabými vazbami jsou *vodíkové můstky*, *iontové vazby* a *van der Waalovy síly*, které jsou popsány v Kapitole 2 (viz panel 2-7, str. 70-71). Jednotlivé nekovalentní vazby jsou ve srovnání s kovalentními vazbami slabé, takže k udržení dvou řetězců pohromadě je zapotřebí mnoha nekovalentních vazeb. Stabilita každého poskládaného tvaru bude proto záviset na celkové síle velkého počtu takových vazeb (obr. 5-4).

Ještě čtvrtá slabá interakce hraje významnou úlohu při určování tvaru proteinu. Jak je popsáno v Kapitole 2, vládne ve vodném prostředí snaha udržet hydrofobní molekuly včetně nepolárních postranních řetězců některých aminokyselin pohromadě, aby se minimalizovaly jejich rušivé vlivy na síť vodíkových můstků mezi



molekulami vody (viz str. 48 a panel 2-2, str. 50-51). Proto je důležitým faktorem určujícím skládání každého proteinu rozložení jeho polárních a nepolárních aminokyselin. Nepolární (hydrofobní) postranní řetězce v proteinu, které patří takovým aminokyselinám jako fenylalaninu, leucinu, valinu a tryptofanu, se snaží shlukovat se uvnitř molekuly (stejně jako se malé hydrofobní kapky oleje slévají v jednu větší kapku). To jim umožní vyhnout se kontaktu s vodou, která je uvnitř buňky obklopuje. Naopak polární postranní řetězce, například u argininu, glutaminu a histidinu, se snaží zdržovat se na povrchu molekuly, kde mohou vytvářet vodíkové můstky s molekulami vody a dalších polárních látek (obr. 5-5). Aminokyseliny skryté uvnitř proteinu obvykle vytvářejí vodíkové můstky s ostatními polárními aminokyselinami nebo s polypeptidovou kostrou (obr. 5-6).

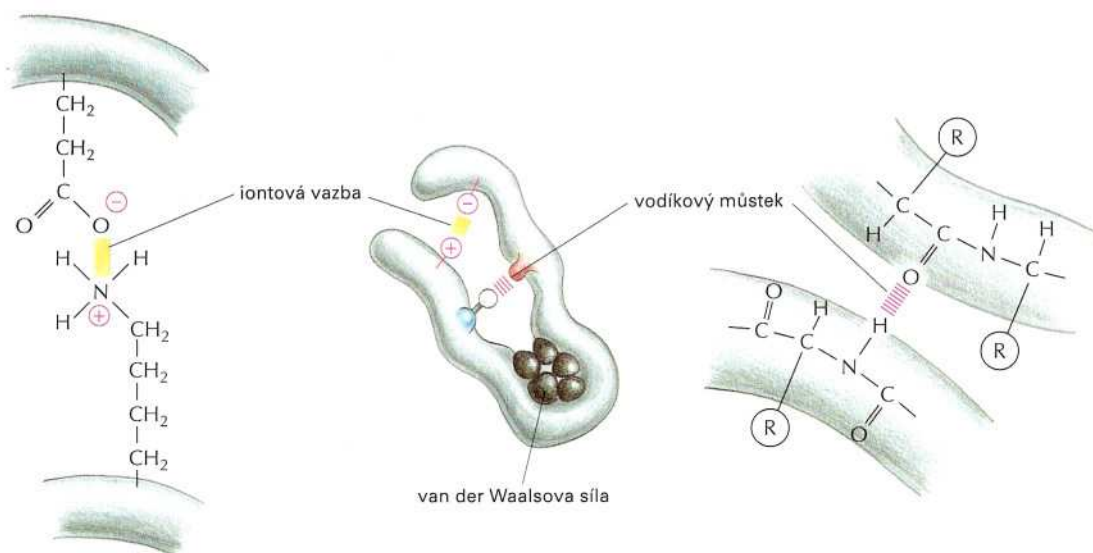
Obrázek 5-2 Proteiny se skládají z polypeptidové kostry, ke které jsou připojeny postranní řetězce. Každý typ proteinu je jedinečný svou sekvencí a počtem aminokyselin; právě pořadí chemicky různých postranních řetězců odlišuje jeden protein od druhého. Konce polypeptidového řetězce se navzájem chemicky liší: konec, který nese volnou aminoskupinu (NH_3^+ , také se píše jako NH_2) se nazývá aminový konec nebo N-konec, zatímco konec nesoucí volnou karboxylovou skupinu (COO^- ; píše se také COOH) se nazývá karboxylový konec nebo C-konec. Sekvence aminokyselin proteinu se vždy uvádí ve směru od N- k C-konci a čte se zleva doprava.

AMINOKYSELINA	POSTRANNÍ ŘETĚZEC	AMINOKYSELINA	POSTRANNÍ ŘETĚZEC
Asparagová kys.	Asp D negativní	Alanin	Ala A nepolární
Glutamová kys.	Glu E negativní	Glycin	Gly G nepolární
Arginin	Arg R pozitivní	Valin	Val V nepolární
Lysin	Lys K pozitivní	Leucin	Leu L nepolární
Histidin	His H pozitivní	Isoleucin	Ile I nepolární
Asparagin	Asn N polární bez náboje	Prolin	Pro P nepolární
Glutamin	Gln Q polární bez náboje	Fenylalanin	Phe F nepolární
Serin	Ser S polární bez náboje	Methionin	Met M nepolární
Threonin	Thr T polární bez náboje	Tryptofan	Trp W nepolární
Tyrosin	Tyr Y polární bez náboje	Cystein	Cys C nepolární
		Selenocystein	Sec U nepolární

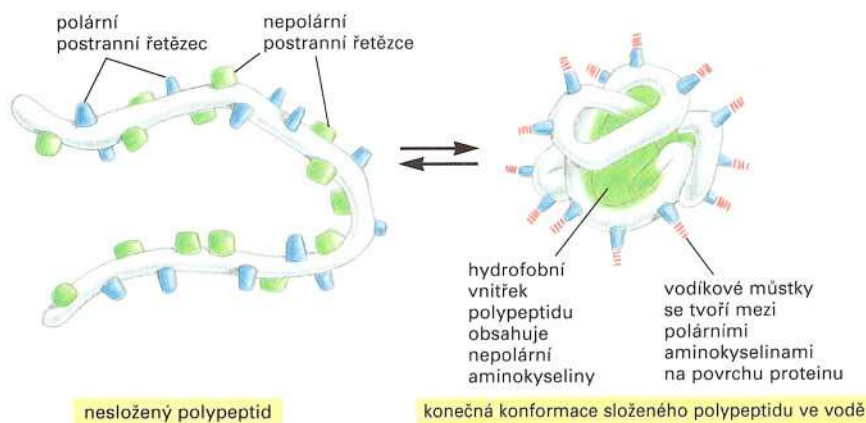
POLÁRNÍ AMINOKYSELINY

NEPOLÁRNÍ AMINOKYSELINY

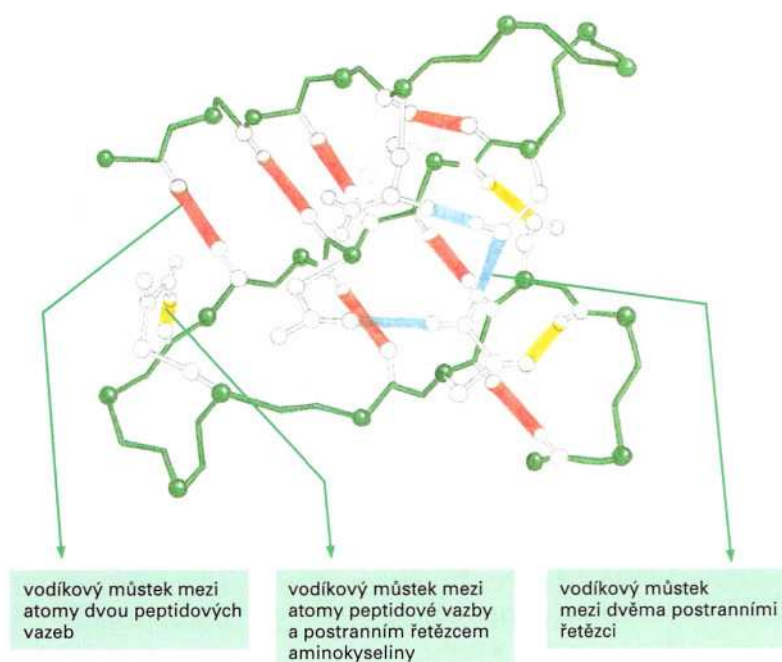
Obrázek 5-3 21 různých aminokyselin, které se nacházejí v proteinech. Jsou uvedeny jak třípísmenné, tak jednopísmenné symboly. Jak je patrné, existuje takřka stejný počet polárních a nepolárních postranních řetězců - viz Panel 2-5 (str. 62-63).



Obrázek 5-4 Tři typy nekovalentních vazeb, které napomáhají skládání proteinu. Ačkoli jsou jednotlivé vazby tohoto typu slabé, může se jich spojit mnoho dohromady a vytvořit silné vazebné uspořádání, jak je ukázáno v tomto příkladu. R je obecné označení pro postranní řetězec.



Obrázek 5-5 Jak se protein skládá do kompaktní konformace. Postranní řetězce polárních aminokyselin se snaží zdržovat se pohromadě na vnější straně proteinu, kde mohou interagovat s vodou. Naproti tomu nepolární aminokyselinové řetězce jsou ukryty uvnitř a tvoří sblazený hydrofobní vnitřek s atomy, které se vyhýbají vodě. V této nanejvýš schematické kresbě obsahuje protein jen něco kolem 30 aminokyselin.



Obrázek 5-6 Vodíkové můstky v molekule proteinu. Velká množství vodíkových vazeb vznikají mezi sousedními oblastmi polypeptidového řetězce a pomáhají stabilizovat jeho trojrozměrnou strukturu. Znázorněný protein je částí enzymu lysozimu a vodíkové můstky mezi třemi různými páry partnerů byly různě zbarveny.

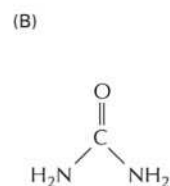
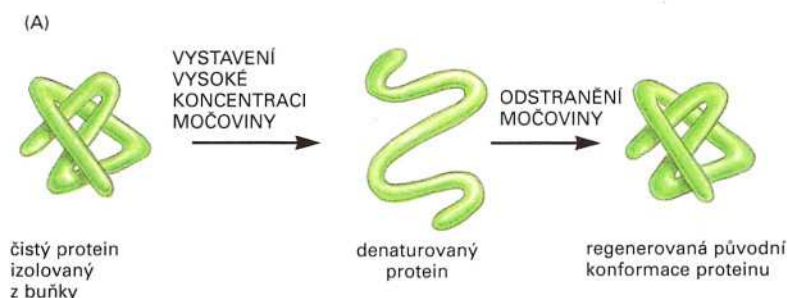
Proteiny se skládají do konformace s nejnižší energií

Každý druh proteinu má svou vlastní trojrozměrnou strukturu, která je určena pořadím aminokyselin v jeho řetězci. Konečná složená struktura neboli **konformace**, které každý peptid nabývá, je určena energetickými aspekty – obecně snahou dosáhnout stavu s co nejmenším obsahem volné energie. Skládání proteinů bylo studováno v laboratoři s použitím vysoce purifikovaných (přečištěných) proteinů. Protein je možno rozvinout neboli *denaturovat* s pomocí jistých rozpouštědel, která přeruší nekovalentní vazby držící složený protein pohromadě. To převede protein na volně ohebný polypeptidový řetězec, který zcela ztratil svou přirozenou podobu. Po odstranění denaturačního rozpouštědla se protein často spontánně svine zpět do své přirozené podoby; říkáme, že *renaturuje* do své původní konformace (obr. 5-7). To ukazuje, že veškerá informace potřebná k určení trojrozměrného tvaru proteinu, je obsažena v charakteru jeho aminokyselin a jejich pořadí v polypeptidovém řetězci.

Každý protein se normálně skládá do své jediné stálé konformace. Tato konformace se však vždy poněkud změní, když protein interaguje s ostatními molekulami v buňce. Tato změna je často klíčová pro funkci proteinu, jak uvidíme později v této kapitole.

Ačkoli se proteinový řetězec může složit do své správné podoby bez vnější pomoci, pomáhají skládání proteinů v živých buňkách zvláštní proteiny zvané *molekulární chaperony* [vyslov šaperony].

Obrázek 5-7 Znovusložení denaturovaného proteinu. (A) Tento pokus ukazuje, že konformace proteinu je určena pouze jeho aminokyselinovou sekvencí. (B) Struktura močoviny, která je velmi rozpustná ve vodě a ve vysokých koncentracích rozplétá proteiny (když připadá jedna molekula močoviny asi na šest molekul vody).



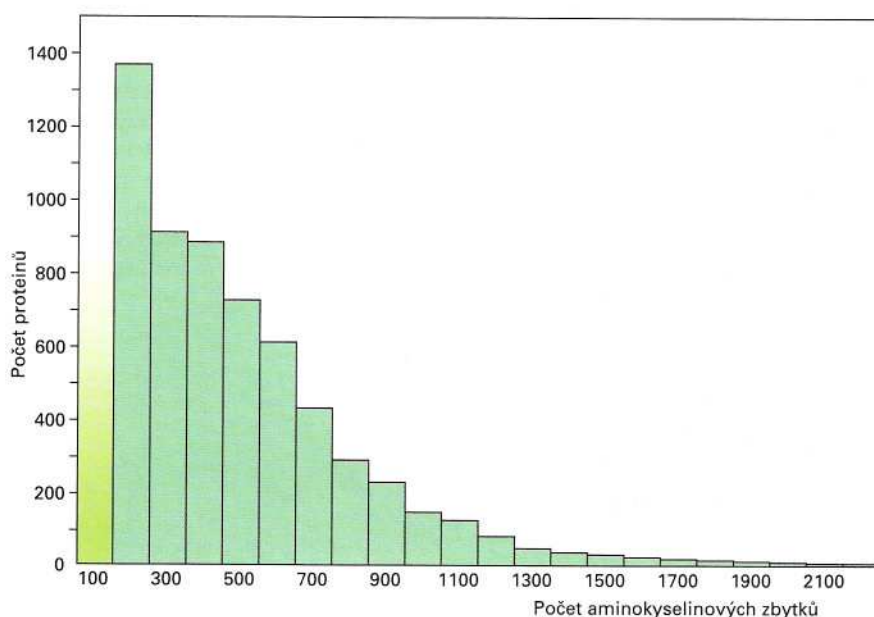
Tyto proteiny se vážou k částečně složeným řetězcům a udržují je v rozvinuté formě při pohybu cytoplasmou a přes jednotlivé buněčné membrány. Chaperony jsou v podmínkách přeplněné cytoplasmy (viz obr. 3-17) životně důležité, neboť chrání nově syntetizované proteinové řetězce před asociací s nesprávnými partnery. Konečná trojrozměrná podoba proteinu je pak specifikována pořadím jeho aminokyselin.

Proteiny se skládají do celé řady komplikovaných tvarů

Jak jsme popsali v panelech 5-4, 5-5 a 5-6 (str. 160-165), byly vyvinuty techniky umožňující rozbití buněk, vyčištění jednotlivých proteinů a přesné určení pořadí aminokyselin v těchto purifikovaných proteinech. Toto pořadí je známo jako **sekvence aminokyselin** neboli **primární struktura**. Mnoho let se sekvenování proteinů provádělo přímou analýzou proteinových aminokyselin. Prvním proteinem, jehož sekvence byla určena, je insulin; jeho sekvence byla zveřejněna v roce 1955. Vývoj rychlých metod pro sekvenaci DNA (viz kap. 10) nyní umožňuje mnohem snadnější *nepřímou sekvenaci* proteinů určením pořadí nukleotidů v DNA, která kóduje daný protein, a převedením tohoto pořadí na aminokyselinovou sekvenci s využitím genetického kódu (viz Kapitulu 7). Tímto způsobem už byly stanoveny sekvence desítek tisíc proteinů. Tyto proteiny svou velikostí sahají od peptidů o 30 aminokyselinách až po proteiny s 10 000 a více aminokyselinami. Většina proteinů však obsahuje 50–2000 aminokyselinových zbytků (obr. 5-8).

Veškerá informace potřebná ke složení proteinu je uložena v jeho aminokyselinové sekvenci. Ještě jsme se však nenaučili, jak tuto informaci číst a předpovídat z ní detailní trojrozměrnou konformaci proteinu, tedy uspořádání všech jeho atomů v prostoru. V současnosti můžeme určit způsob skládání proteinu jen experimentálně s využitím buď rentgenových paprsků nebo nukleární magnetické rezonance. Tyto metody budou popsány v panelu 5-6 (str. 164-165). Zatím bylo těmito technikami analyzováno více než 1000 proteinů. Každý z nich má jedinečnou trojrozměrnou konformaci tak složitou

Otázka 5-1 Močovina použitá v pokusu na obrázku 5-7 je molekulou, která ruší vodíkové můstky mezi molekulami vody. Proč by mohla vysoká koncentrace močoviny rozplétat proteiny?



Obrázek 5-8 Velikosti proteinů. Proteiny nalézané v buňce jsou nejrůznější velikosti. Typická bakteriální buňka obsahuje asi 1000 různých proteinů, zatímco lidská buňka jich podle všeho má asi 10 000. Diagram proteinů kódovaných několika chromosomy v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* ukazuje počet předpovězených proteinů různé velikosti. Tato informace byla získána při analýze nukleotidové sekvence genomu organismu; nedávno byla získána sekvence celé DNA této malé eukaryotní buňky. Počet malých proteinů, zvláště těch se 100 a méně aminokyselinami, nemůže být z technických důvodů přesně určen přímo ze samotné nukleotidové sekvence.

a nepravidelnou, že detailní popis struktury většiny proteinů by si vyžádal celou kapitolu.

Abychom ukázali, jak jsou proteiny konstruovány, začneme s neobvykle malým proteinem a pokusíme se objasnit jeho strukturu. Strukturu proteinu lze znázornit několika způsoby, z nichž každý zdůrazňuje jeho určité vlastnosti. Panel 5-2 (str. 142-143) ukazuje čtyři různá znázornění proteinu Hpr, transportního proteinu, který usnadňuje přenos cukru do bakteriálních buněk. Celková struktura řetězce 88 aminokyselin je ukázána jako polypeptidová kostra (A), jako stužkový model (B), jako drátový model zahrnující postranní řetězce aminokyselin (C) a jako kalotový model (D). Každý ze tří vodorovných řádků ukazuje protein v jiné orientaci a barvy v obrázku umožňují sledovat polypeptidový řetězec od N-konce (*fialový*) k jeho C-konci (*červený*).

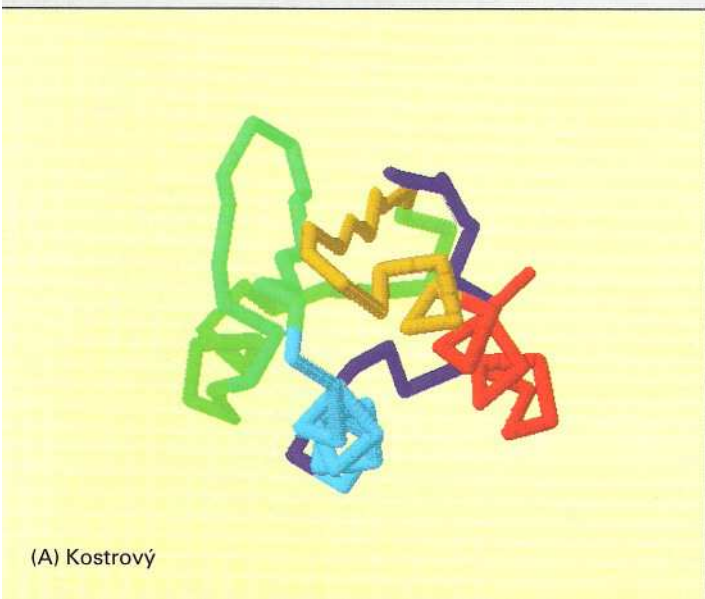
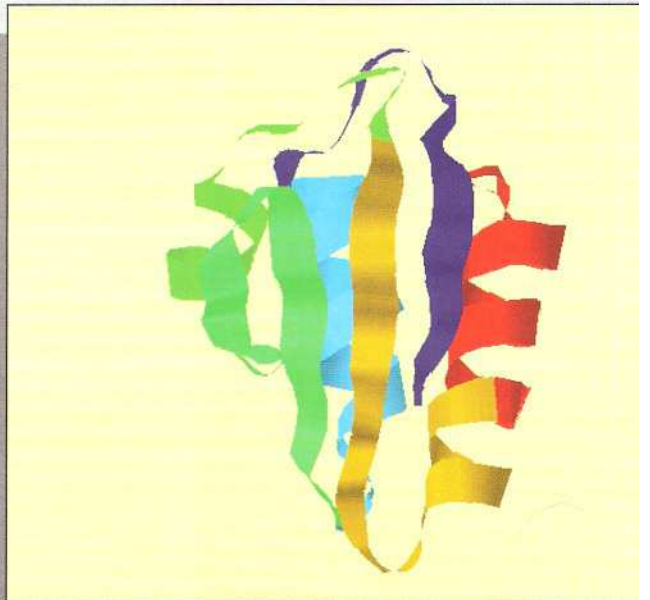
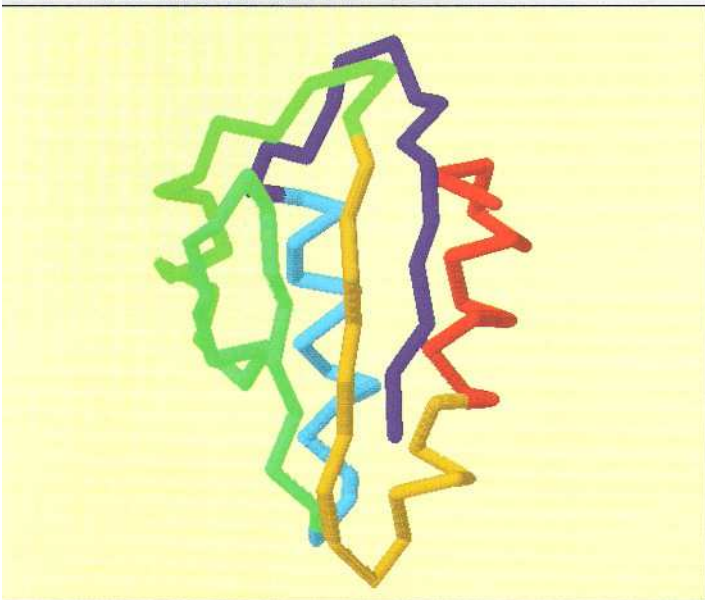
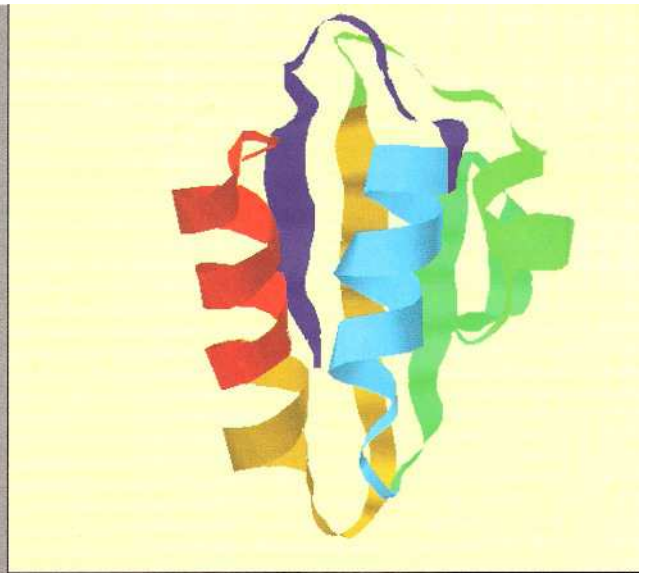
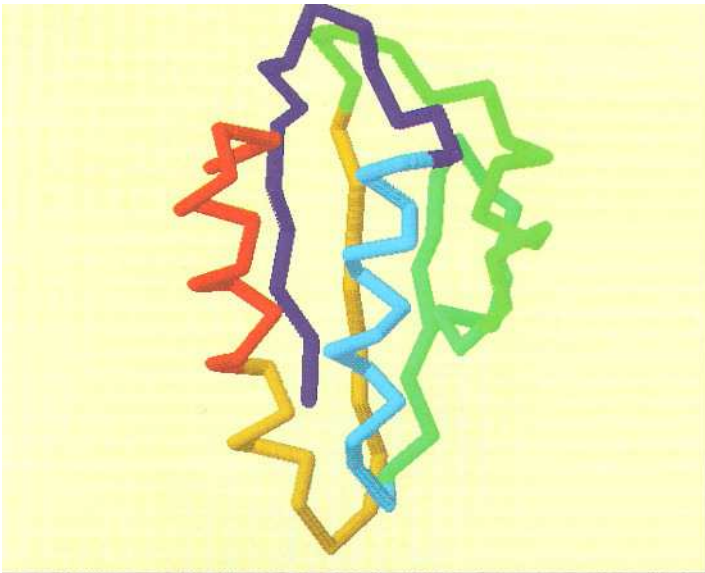
Panel 5-2 ukazuje, že konformace proteinu je obdivuhodně složitá dokonce i u tak malého proteinu, jakým je Hpr. Určení struktury proteinu však může usnadnit poznatek, že těmto konformacím přísluší několik strukturních motivů, jak dále uvidíme.

Běžnými strukturními motivy jsou α -šroubovice a β -struktura

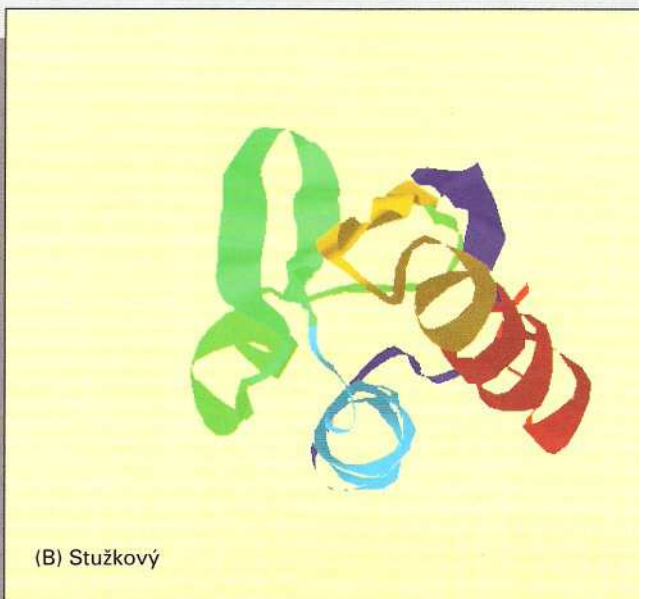
Při srovnávání trojrozměrných struktur mnoha různých proteinů vychází najevo, že přes jedinečnost celkové konformace každého proteinu lze v nich obvykle najít dva základní modely skládání. Oba druhy byly objeveny asi před 50 lety při studiu vlasů a hedvábí. Prvním z nich byla α -šroubovice (α -helix), nalezená v proteinu zvaném α -keratin, který se hojně vyskytuje v kůži a v jejích derivátech – vlasech, nehtech a rozích. Ve stejném roce jako α -šroubovice byl objeven druhý typ, tzv. β -struktura neboli **struktura skládaného listu**, a to v proteinu *fibroinu*, který je hlavní složkou hedvábí. Tyto dva typy jsou zvláště běžné, neboť plynou z vodíkových můstků mezi skupinami N-H a C=O v kostře polypeptidu a nezahrnují postranní řetězce aminokyselin. Mohou být tedy tvořeny různými aminokyselinovými sekvencemi. V každém případě proteiny nabývají pravidelné opakující se konformace. Tyto dvě konformace, stejně jako zkratky, kterých se používá k jejich zápisu ve stužkových modelech proteinů, jsou uvedeny na obrázku 5-9.

Jádra mnoha proteinů obsahují rozsáhlé oblasti β -struktury. Jak je ukázáno na obrázku 5-10, mohou se tyto skládané listy tvořit buď ze sousedících polypeptidových řetězců, které mají stejnou orientaci (tj. jsou paralelní) nebo z řetězců, které se skládají jako papír poskládaný do harmoniky, přičemž každý úsek má vzhledem ke svým nejbližším sousedům opačnou orientaci (antiparalelní řetězce). Oba typy β -struktury tvoří velmi rigidní útvar držený pohromadě vodíkovými můstky, které spojují peptidové vazby v sousedních řetězcích (viz obr. 5-9D).

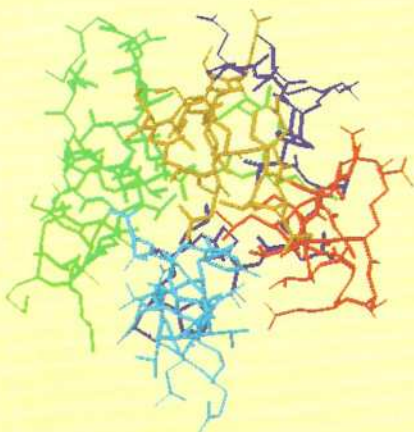
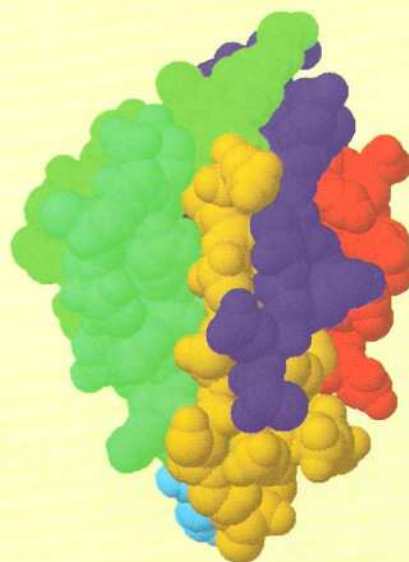
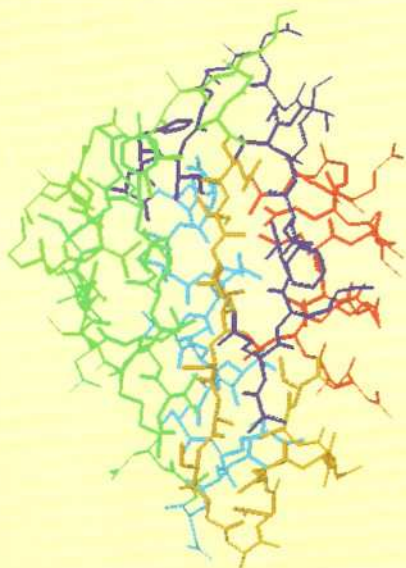
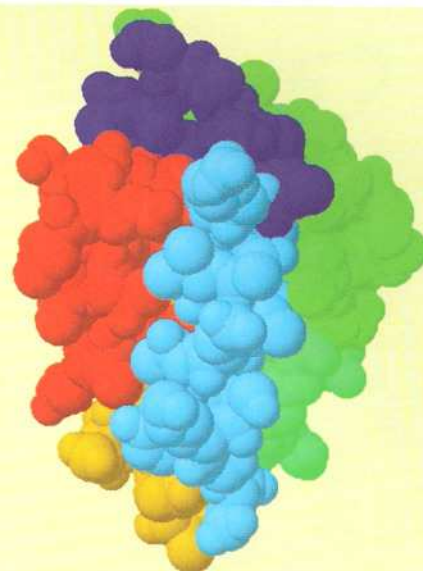
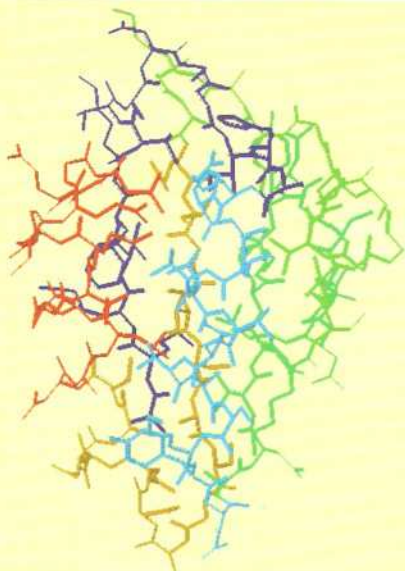
α -Helix vzniká, když se jednoduchý polypeptidový řetězec ovíjí kolem sebe sama a tvoří tuhý (rigidní) válec. Vodíkový můstek vzniká mezi každou čtvrtou peptidovou vazbou a spojuje skupinu C=O jedné peptidové vazby se skupinou N-H jiné peptidové vazby (viz obr. 5-9A). To dává vznik pravidelné šroubovici s 3,6 aminokyselinovými zbytky na jednu otáčku. Všimněte si, že ukázkový protein z panelu 5-2 obsahuje jak α -šroubovici tak skládaný list β .



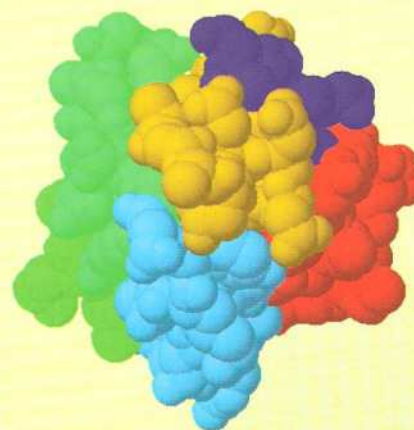
(A) Kostrový



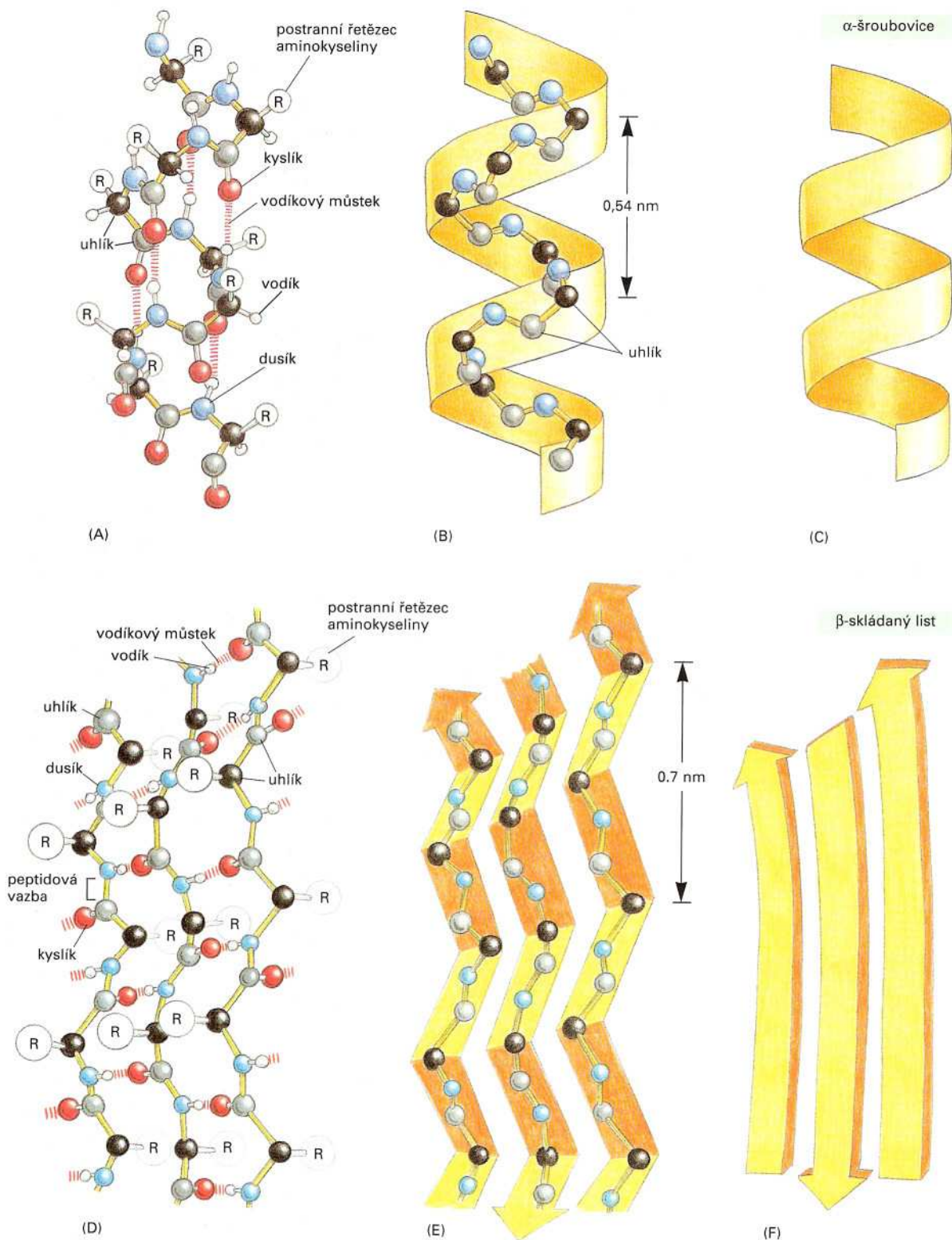
(B) Stužkový



(C) Drátový



(D) Kalotový



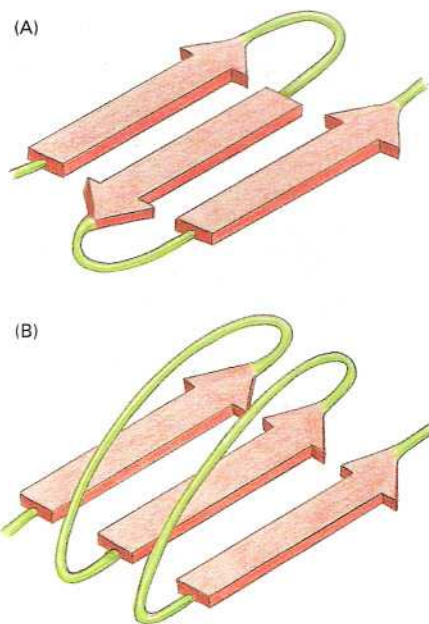
Obrázek 5-9 Pravidelné uspořádání polypeptidové kostry pozorované v α -šroubovici a v β -listu. (A), (B) a (C) ukazují α -šroubovici, ve které je skupina N-H každé peptidové vazby spojena vodíkovým můstkem se skupinou C=O následující peptidové vazby, která se nachází o čtyři peptidové vazby dále v témže řetězci. (D), (E) a (F) ukazují β -list; v tomto příkladu mají sousední peptidové řetězce opačný směr (jsou antiparalelní). Jednotlivé polypeptidové řetězce (vlákna) v β -listu drží pohromadě vodíkové můstky mezi peptidovými vazbami v různých vláknech; postranní řetězce aminokyselin v každém vlákně směřují střídavě nad a pod rovinu listu. (A) a (D) ukazují všechny atomy polypeptidové kostry, ale postranní řetězce aminokyselin jsou pro jednoduchost označeny jako R. Naproti tomu (B) a (E) ukazují jen atomy kostry, zatímco na (C) a (F) je vidět zkratkovité symboly, které se používají k vyjádření α -šroubovice a β -listu ve stužkových kresbách proteinů (viz Panel 5-2B, str. 142).

Krátké úseky α -šroubovice jsou zvláště hojné v proteinech umístěných v buněčných membránách, jako jsou transportní proteiny a receptory. V Kapitole 11 uvidíme, že tyto úseky transmembránového proteinu, které přetínají lipidovou dvojnou vrstvu, jí obvykle procházejí jako α -šroubovice složené hlavně z aminokyselin s nepolárními postranními řetězci. Polypeptidová kostra, která je hydrofilní, je pospojována vodíkovými můstky v α -šroubovici a stíněna před hydrofobním lipidovým prostředím membrány svými vyčnívajícími nepolárními postranními řetězci (viz obr. 11-24).

Některé páry α -šroubovic se ovíjejí okolo sebe navzájem a utvářejí zvláště stabilní strukturu, známou jako **svinuté klubko**. Tato struktura vzniká, mají-li dvě α -šroubovice většinu svých nepolárních (hydrofobních) postranních řetězců na jedné straně, takže se mohou ovíjet jedna okolo druhé, přičemž jejich nepolární strany jsou obráceny dovnitř (viz obr. 5-11). Dlouhé tyčinkovité úseky svinutého klubka tvoří strukturní síť proteinů protáhlého tvaru. Příklady jsou α -keratin, který tvoří intracelulární vlákna zesilující vnější vrstvu kůže a jejich výběžků, a molekuly myosinu odpovědné za kontrakci svalu (viz Kapitolu 16).

Proteiny mají několik různých úrovní organizace

Dokonce i molekula malého proteinu je tvořena tisíci atomů spojených přesně orientovanými kovalentními a nekovalentními vazbami a je velmi těžké vizualizovat takovou složitou strukturu bez zvláštních nástrojů. Z tohoto důvodu se užívají různé grafické a počítačem podporované techniky.

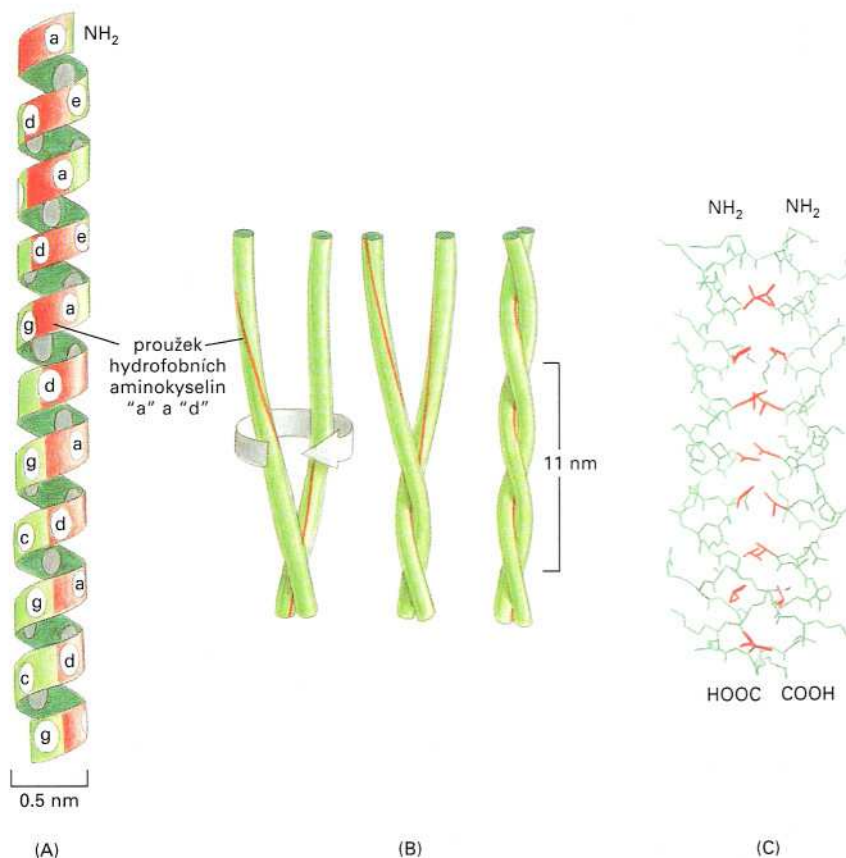


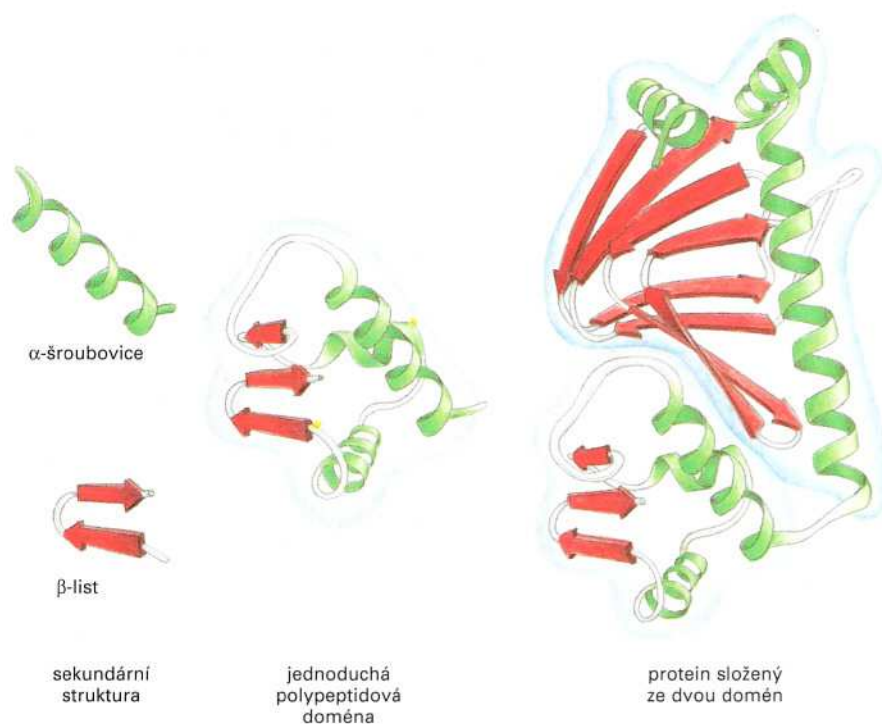
Obrázek 5-10 Dva typy struktury β -listu. (A) Antiparalelní β -list (viz obrázek 5-9D). (B) Paralelní β -list. Obě tyto struktury jsou v proteinech běžné.

Otázka 5-2 Vzpomeňte si, že postranní řetězce, které čnějí z každé polypeptidové kostry v β -listu, směřují střídavě nad a pod rovinu listu (viz obr. 5-9D), a zamyslete se nad následující proteinovou sekvencí: Leu-Lys-Val-Asp-Ile-Ser-Leu-Arg-Leu-Lys-Ile-Arg-Phe-Glu. Myslíte, že v případě inkorporace do β -listu bude tato sekvence něčím pozoruhodná? Můžete odhadnout, jak by mohl být tento β -list v proteinu uspořádán? (Nápověda: podívejte se na vlastnosti aminokyselin uvedené na obrázku 5-3.)

Obrázek 5-11 Struktura svinutého klubka.

V části (A) vidíme jedinou α -šroubovici, ve které jsou postranní řetězce po sobě jdoucích aminokyselin označeny vždy po sedmi jako „abcdeřg“ (zdola nahoru). Aminokyseliny „a“ a „d“ v takové sekvenci leží na povrchu válce blízko u sebe a tvoří „pásek“ (označen červeně), který se pozvolna vine okolo α -šroubovice. Proteiny, které tvoří svinuté klubko, mají nepolární aminokyseliny v polohách „a“ a „d“. Následkem toho se mohou dvě α -šroubovice ovíjet okolo sebe navzájem, jak je vidět na obrázku (B), přičemž nepolární postranní řetězce jedné α -šroubovice interagují s nepolárními postranními řetězci druhé šroubovice; postranní řetězce hydrofilnějších aminokyselin zůstávají obráceny do vodního prostředí. (C) Atomární struktura svinutého klubka určená rentgenovou krystalografií. Červené postranní řetězce jsou nepolární.



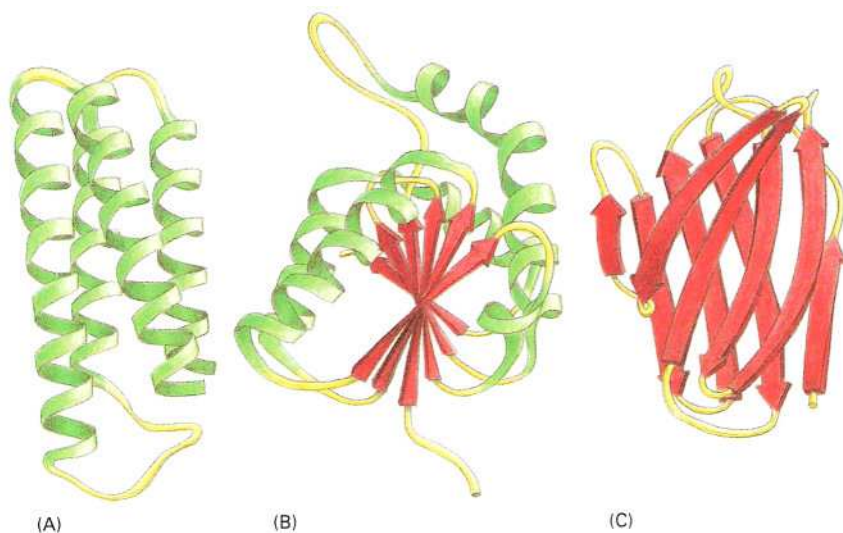


Obrázek 5-12 Vztah mezi proteinovými doménami a dalšími strukturními prvky. Prvky sekundární struktury jako α -šroubovice a β -list se sbalují do stabilních globulárních prvků zvaných domény. Molekula typického proteinu sestává z více domén, přičemž jednotlivé domény jsou mezi sebou spojeny často poměrně nestrukturovanými úseky polypeptidového řetězce. Stuhkový diagram vpravo je regulační protein CAP bakteriálního genu s jednou velkou (modře) a jednou malou (šedivě) doménou.

Zabýváme-li se strukturou proteinů, je užitečné rozlišovat různé úrovně organizace. Sekvence aminokyselin je *primární strukturou* proteinu. Ty části polypeptidového řetězce, které tvoří α -šroubovice a skládané listy β , představují *sekundární strukturu* proteinu. Trojrozměrná konformace tvořená polypeptidovým řetězcem se někdy uvádí jako *terciární struktura*, a je-li daný protein tvořen více než jedním polypeptidovým řetězcem, potom se celková struktura označuje jako *kvarterní struktura*.

Studium konformace, funkce a evoluce proteinů také prozradilo důležitost další organizační jednotky, která se liší od jednotek dosud popsaných. Touto jednotkou je **proteinová doména**, která je tvořena libovolnou částí polypeptidového řetězce, jenž se může nezávisle svinout do kompaktní stálé struktury. Doména obvykle obsahuje 50 až 350 aminokyselin a je modulární jednotkou, z níž jsou vytvořeny všechny větší proteiny (obr. 5-12) – někdy se tato struktura nazývá *suprasekundární*. Různé domény proteinu jsou obvykle spojeny s různými funkcemi. Například protein vyobrazený na obr. 5-12 je *katabolitem aktivovaný protein* (CAP, catabolite activator protein), který se u bakterií používá k zapojení a vypojení genů. CAP má dvě domény: malá doména se váže k DNA, zatímco velká doména váže cyklický AMP, vnitrobuněčnou signální molekulu. Když velká doména váže cyklický AMP, způsobí to konformační změnu v proteinu; tato změna umožní malé doméně vázat se ke specifické sekvenci DNA a zapojit sousední geny.

Molekula malého proteinu jako Hpr obsahuje pouze jedinou doménu (viz panel 5-2, str. 142-143). Větší proteiny mohou obsahovat až několik tuctů domén, které jsou obvykle spojeny poměrně nečleněným úsekem polypeptidového řetězce. Stuhkové modely tří různě organizovaných domén jsou ukázány na obrázku 5-13.



Obrázek 5-13 Stužkové modely tří různých proteinových domén. (A) Cytochrom b_{562} , protein s jedinou doménou, který se účastní přenosu elektronů v mitochondriích. Tento protein se skládá téměř výlučně z α -šroubovic. (B) NAD-vázací doména enzymu laktátdehydrogenázy, která je tvořena směsí α -šroubovic a β -listů. (C) Variabilní doména lehkého řetězce imunoglobulinu, která představuje sendvič dvou β -listů. V těchto příkladech jsou α -šroubovice naznačeny zeleně, zatímco vlákna uspořádaná do β -listů jsou vyznačena červenými šipkami. Všimněte si, že polypeptidový řetězec obecně prochází celou doménou tam a zpět a tvoří ostré otáčky jen na povrchu proteinu. Vyčnívající smyčkové úseky (žlutě) často tvoří vazebná místa pro další molekuly.

Jen několik z mnoha možných polypeptidových řetězců bude užitečných

Teoreticky se dá sestavit obrovský počet různých polypeptidových řetězců. Protože každá z 21 aminokyselin je chemicky odlišná a může se v podstatě vyskytovat na kterémkoli místě v proteinovém řetězci, existuje $21 \times 21 \times 21 \times 21 = 194\,481$ různých polypeptidových řetězců složených ze čtyř aminokyselin, tedy 21^n různých polypeptidových řetězců složených z n aminokyselin. V případě typického proteinu sestaveného asi ze 300 aminokyselin by se teoreticky dalo sestavit více než 21^{300} (tedy 10^{397}) různých polypeptidových řetězců.

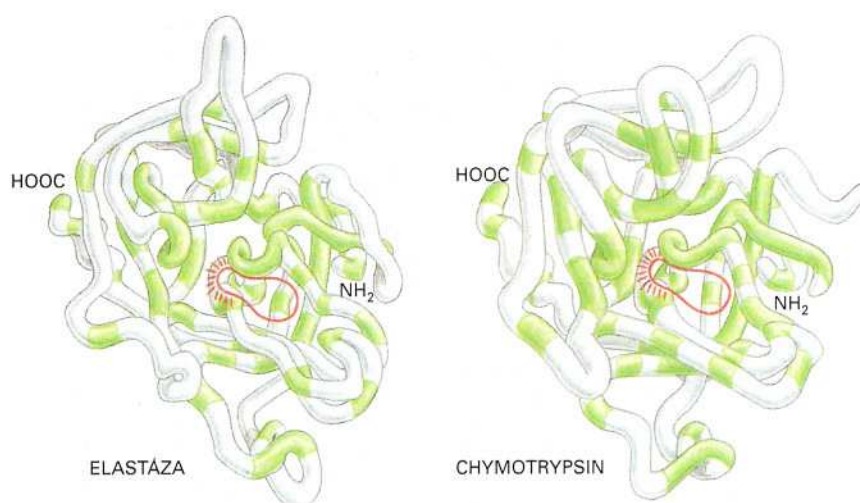
Jen velmi malá část tohoto nepředstavitelně velkého počtu polypeptidových řetězců by přijala jedinou stálou trojrozměrnou konformaci. Velká většina jednotlivých proteinových molekul by měla mnoho různých konformací o zhruba stejné stabilitě, přičemž každá konformace by měla odlišné chemické vlastnosti. Proč tedy mají všechny proteiny přítomné v buňkách jedinečné a stabilní konformace? Vysvětlení spočívá ve skutečnosti, že protein s mnoha různými konformacemi a proměnnými vlastnostmi by nebyl z biologického pohledu užitečný. Takové proteiny by byly brzy vyřazeny přírodní selekcí během dlouhého procesu pokusů a omylů, na kterém spočívá buněčná evoluce (viz Kapitola 9).

Díky přírodnímu výběru je nejen aminokyselinová sekvence dnešních proteinů extrémně stálá, ale také jejich konformace má přesně ty chemické vlastnosti, které proteiny potřebují ke své zvláštní katalytické či strukturální funkci v buňce. Proteiny jsou sestaveny tak přesně, že pouhá záměna několika atomů v jedné aminokyselině může porušit strukturu proteinu a tím vyvolat ztrátu jeho funkce s katastrofálními důsledky.

Otázka 5-3 Náhodné mutace jen velmi zřídka vedou k takovým změnám v proteinu, které zvýší jeho užitečnost pro buňku, ale během evoluce se užitečné mutace selektují. Protože jsou tyto změny řídké, existuje na každou užitečnou mutaci bezpočet změn, které nevedly k žádnému zlepšení nebo poskytly inaktivní proteiny. Proč potom buňky neobsahují miliony neužitečných proteinů?

Proteiny lze rozdělit do rodin

Jakmile se vyvinul protein, který se složil do stálé konformace s užitečnými vlastnostmi, mohla být jeho struktura v průběhu evoluce lehce pozměněna a přizpůsobena novým funkcím. Víme, že se to děje poměrně často, neboť mnoho dnešních proteinů lze rozdělit do skupin či rodin, přičemž každý člen téže rodiny má aminokyselinov-



Obrázek 5-14 Srovnání konformací dvou serinových proteáz. Konformace kostry elastasy a chymotrypsinu. Ačkoli se v obou polypeptidových řetězcích shodují jen zeleně označené aminokyseliny, jsou si obě konformace podobné téměř všude. Aktivní místo každého enzymu je červeně zakroužkováno; zde mohou peptidové vazby sloužit jako místo pro vazbu substrátu a jeho následné hydrolytické štěpení. Serinové proteázy mají své jméno od aminokyseliny serinu, jejíž postranní řetězec je částí aktivního místa každého z těchto enzymů a přímo se účastní reakce štěpení.

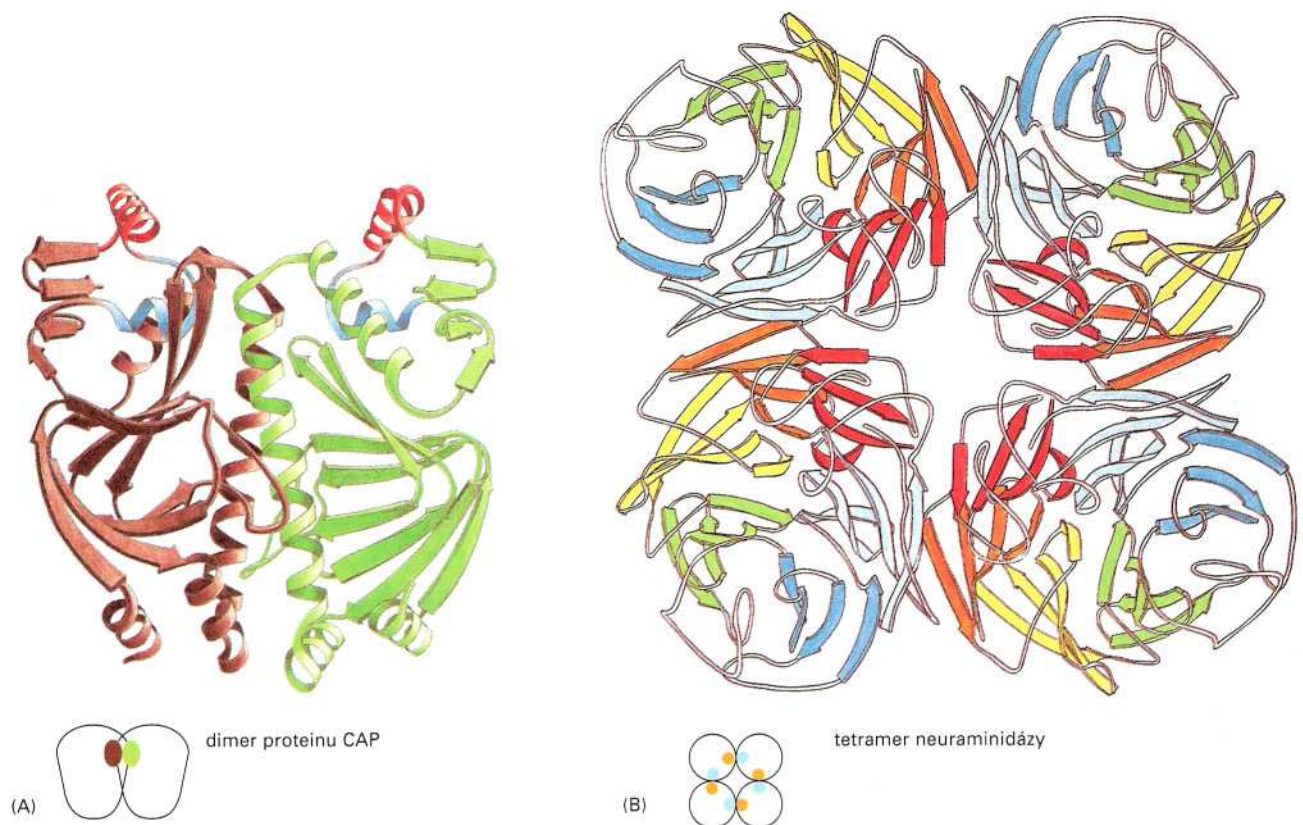
vou sekvenci a trojrozměrnou konformaci, která blízce připomíná všechny ostatní členy této skupiny.

Zamyslete se například nad *serinovými proteázami*. To je skupina proteolytických enzymů (štěpících proteiny), která zahrnuje trávicí enzymy chymotrypsin, trypsin a elastázu, a některé enzymy účastnící se srážení krve. Porovnáme-li dva z těchto enzymů, zjistíme, že dlouhé úseky jejich aminokyselinových sekvencí jsou téměř shodné. Podobnost jejich trojrozměrných konformací je ještě nápadnější: většina drobných záhybů a otoček jejich polypeptidových řetězců, které jsou několik set aminokyselin dlouhé, je skutečně stejná (obr. 5-14). Přesto mají různé serinové proteázy odlišné enzymové aktivity; každá štěpí jiné proteiny či peptidové vazby mezi různými typy aminokyselin. Každá proto plní v organismu jinou funkci.

Molekuly větších proteinů často obsahují více než jeden polypeptidový řetězec

Stejně slabé nekovalentní vazby, které umožňují skládání proteinu do specifické konformace, také umožňují proteinům vázat se navzájem za vzniku větších buněčných struktur. Každá oblast povrchu proteinu, která interaguje s jinou molekulou prostřednictvím souboru nekovalentních vazeb, se nazývá *vazebné místo*. Protein může obsahovat vazebná místa pro celou řadu velkých a malých molekul. Pokud vazebné místo rozpozná povrch druhého proteinu, může těsná vazba mezi dvěma poskládanými polypeptidovými řetězci vést ke vzniku větší proteinové molekuly s přesně definovaným uspořádáním. Každý polypeptidový řetězec v takovém proteinu se nazývá **podjednotka** proteinu.

V nejjednodušším případě se vážou dva identické složené polypeptidové řetězce v uspořádání „hlava k hlavě“ za vzniku symetrického komplexu dvou proteinových podjednotek (zvanému *dimer*), který drží pohromadě interakcemi mezi dvěma identickými vazebnými místy. Dříve probíraný protein CAP je vlastně dimerním proteinem v bakteriální buňce (obr. 5-15A), který vznikl ze dvou identických kopií proteinové podjednotky ukázané dříve na obrázku 5-12. V buňkách se běžně nachází mnoho jiných symetrických proteinových komplexů sestavených z více kopií jediného polypeptidového řetězce. Například enzym *neuraminidáza* je tvořen kruhem čtyř identických proteinových podjednotek (obr. 5-15B).



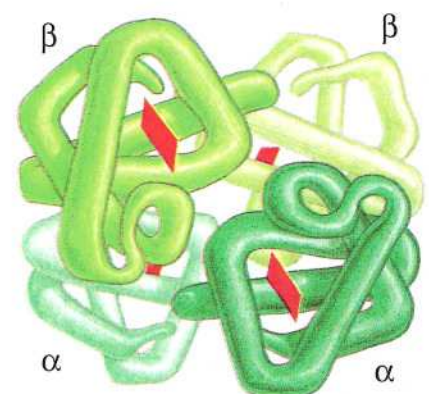
Ostatní proteiny obsahují dva nebo více různých typů polypeptidových řetězců. *Hemoglobin* – protein, který přenáší kyslík v červených krvinkách, je dobře známým příkladem (obr. 5-16). Obsahuje dvě identické podjednotky α -globinu a dvě identické podjednotky β -globinu, umístěné symetricky. V buňkách je takových proteinů s více podjednotkami mnoho a mohou být značně velké. Obr. 5-17 nám ukazuje vzorek proteinů, jejichž přesné struktury jsou známy, a srovnává velikosti a tvary několika větších proteinů s poměrně malými proteiny, které jsme předtím představili jako modely.

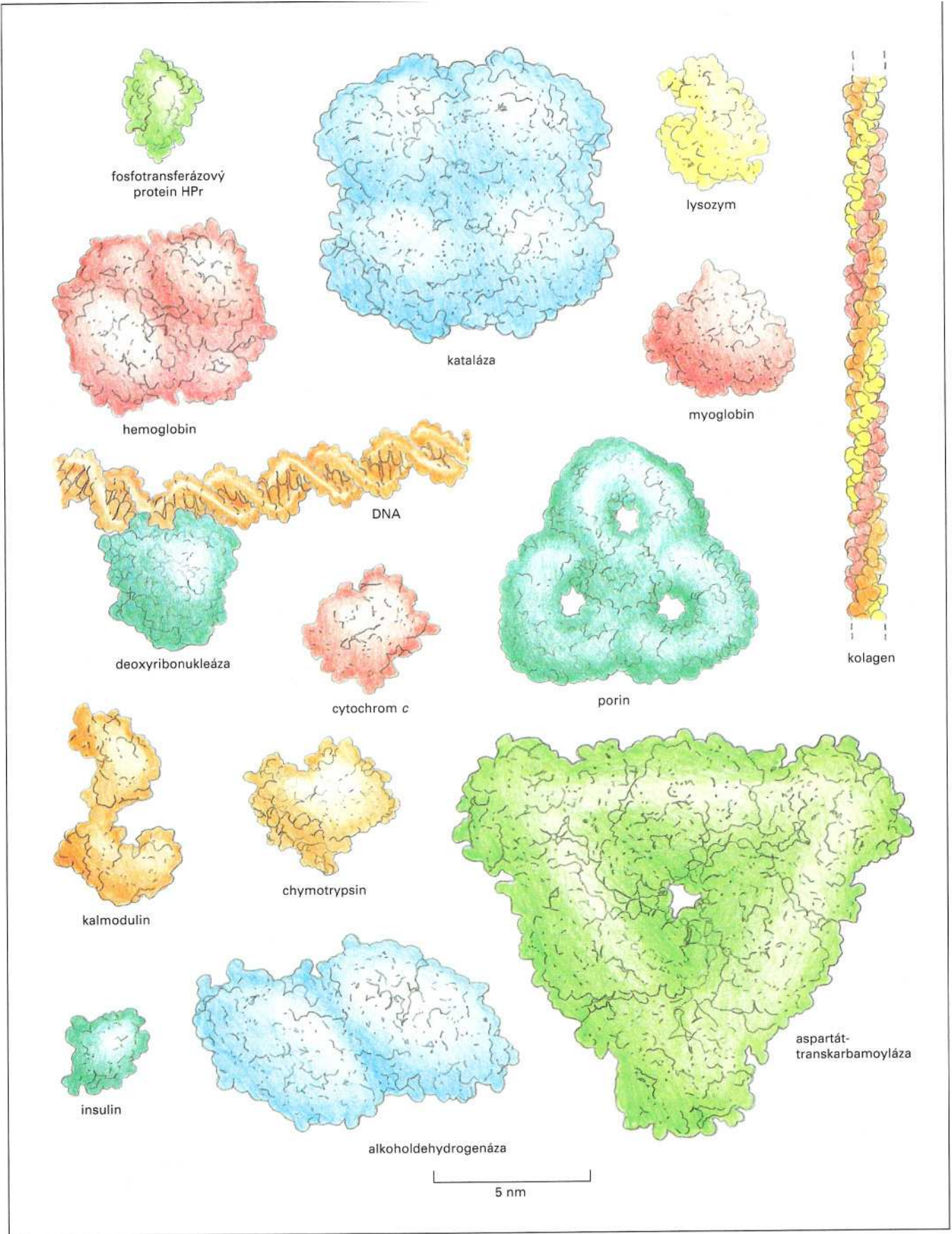
Proteiny se mohou sdružovat do vláken, listů či kuliček

Proteiny mohou tvořit dokonce ještě větší komplexy, než jsme zatím probrali. Nejjednodušším případem je řetězec identických proteinových molekul, který vznikne, pokud je vazebné místo proteinu komplementární s jiným místem na povrchu téhož proteinu. Jak se probírá na straně 152, protože je každý protein vázán ke svému sousedu identickým způsobem, budou molekuly často uspořádány do *šroubovice*, která může narůstat do nekonečna (obr. 5-18). Tento typ uspořádání může být základem dlouhého proteinového vlákna - *filamenta*. Například aktinové filamentum je dlouhou šroubovicovou strukturou tvořenou mnoha molekulami proteinu aktinu (obr. 5-19). Aktin se

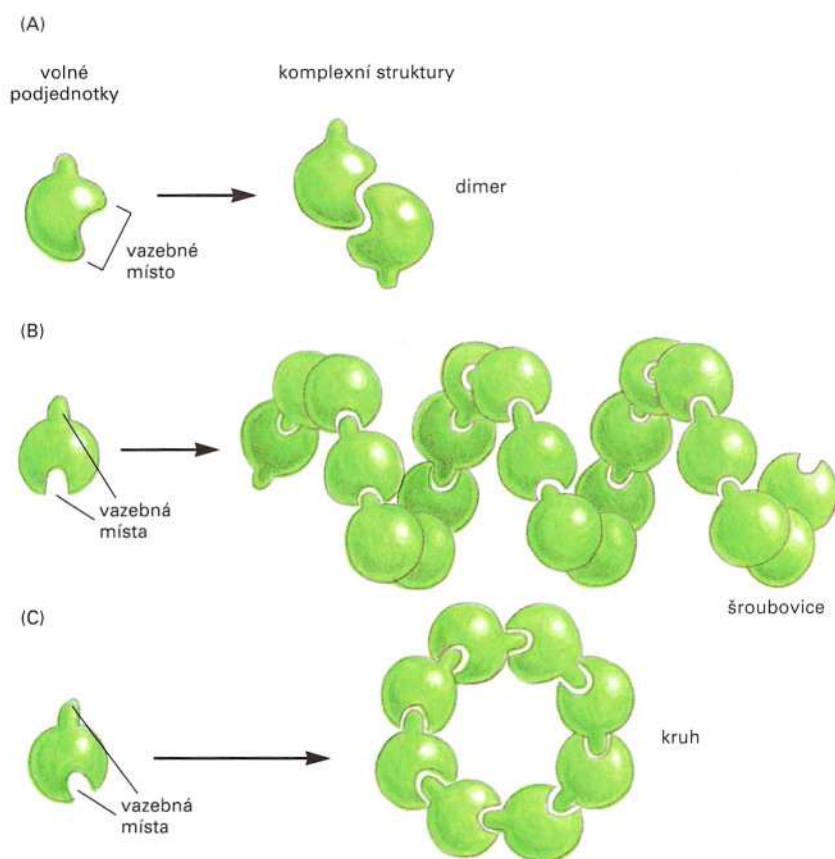
Obrázek 5-15 Řada proteinových molekul obsahuje násobné kopie jediné proteinové podjednotky. (A) Symetrický dimer. Protein CAP se vyskytuje jako komplex dvou identických polypeptidových řetězců (viz také obr. 5-12). (B) Symetrický tetramer. Enzym neuraminidáza existuje jako kruh čtyř identických polypeptidových řetězců. U (A) i (B) je pod strukturou uvedeno malé schéma, které ukazuje, jak opakované použití téže vazebné interakce vytváří strukturu.

Obrázek 5-16 Protein tvořený symetrickým souborem dvou různých podjednotek. Hemoglobin se hojně vyskytuje v červených krvinkách; obsahuje dvě kopie α -globinu a dvě kopie β -globinu. Každý z těchto čtyř polypeptidových řetězců obsahuje molekulu hemu (*červený obdélník*), kde se váže kyslík (O_2). Každá molekula hemoglobinu v krvi tedy váže čtyři molekuly kyslíku.





Obrázek 5-17 (na protější straně) Sběrka proteinových molekul jako ukázka různých velikostí a tvarů. Všechny proteiny jsou znázorněny jako prostorové modely ve stejném měřítku. V levém horním rohu je protein Hpr přenášející fosforylovou skupinu, který byl podrobně ukázán na panelu 5-2 (str. 142-143).



Obrázek 5-18 Soubory proteinů. (A) Protein s jedním vazebným místem může tvořit dimer s jiným identickým proteinem. (B) Identické proteiny se dvěma vazebnými místy často tvoří dlouhá šroubovitá vlákna. (C) Jsou-li dvě vazebná místa uložena ve vhodných polohách, utvoří proteinové podjednotky místo šroubovice uzavřený kruh.

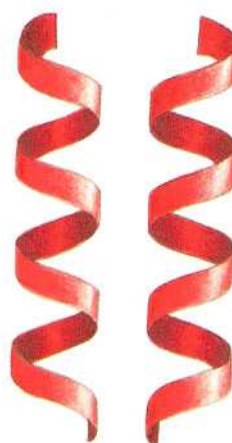
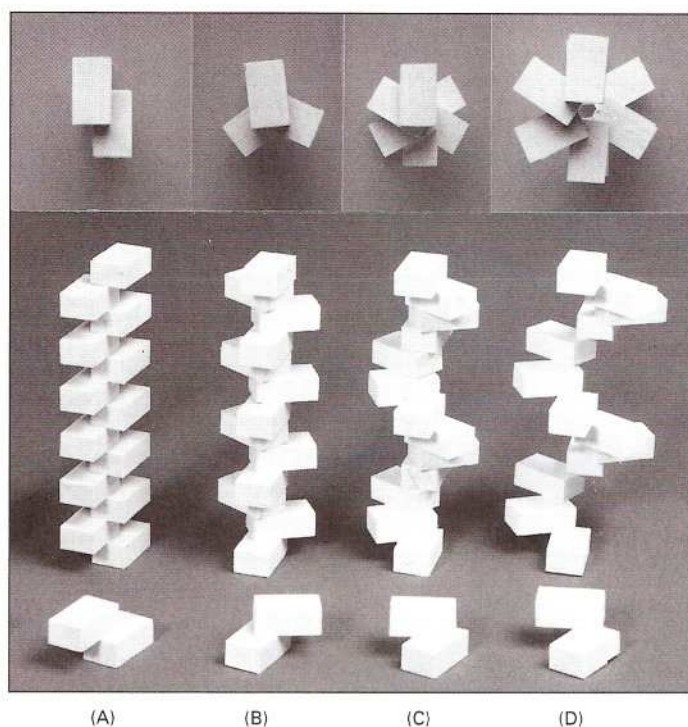
hojně vyskytuje v eukaryontních buňkách, kde tvoří jeden z hlavních systémů vláken cytoskeletu (Kapitola 16). Další soubory proteinů se spojují buď do rozsáhlých listů nebo trubiček, jako u mikrotubulů v cytoskeletu, nebo vytvářejí kulové obaly podobné kleci, jako proteinové pláště virových částic.

Mnoho velkých útvarů, jako jsou viry či ribosomy, je sestaveno ze směsi jednoho či více druhů proteinu a z molekul RNA či DNA. Všechny tyto struktury mohou být izolovány v čisté formě a disociovány na makromolekuly, které je tvoří. Často je možno smíchat izolované složky opět dohromady a sledovat, jak se samovolně spojují do původní struktury. To ukazuje, že veškerá informace potřebná pro složení složitých struktur je obsažena v samotných makromolekulách. Pokusy tohoto typu ukazují, že mnoho buněčných struktur má samoorganizační schopnost: jsou-li produkovány potřebné proteiny, budou se tvořit příslušné struktury.

aktinová šroubovice



Obrázek 5-19 Aktinové vlákno. Šroubovitý svazek proteinových molekul v sobě často zahrnuje tisíce molekul proteinu a táhne se v buňce na vzdálenost mikrometrů.



(E)

Obrázek 5-20 Některé vlastnosti

šroubovice. (A-D) Šroubovice vzniká, pokud se řada podjednotek váže jedna k druhé pravidelným způsobem. V dolní části obrázku je ukázána interakce mezi dvěma podjednotkami; za nimi je šroubovice jako výsledek takových vazeb. Tyto šroubovice obsahují dvě (A), tři (B) a šest (C a D) podjednotek na závit. V horní části jsou jednotlivé šroubovice v pohledu shora. Všimněte si, že šroubovice v (D) zaujímá více prostoru než (C), ačkoli má stejný počet podjednotek na závit. (E) Šroubovice může být buď pravotočivá nebo levotočivá. Pro srovnání je užitečné si vzpomenout na standardní kovové šrouby, které se zašroubovávají po směru hodinových ručiček a jsou pravotočivé. Všimněte si, že šroubovice si při obrácení „hlavou dolů“ zachová svůj smysl otáčení.

Šroubovice je běžným motivem v biologických strukturách

Jak jsme viděli, jsou biologické struktury často tvořeny spojením velmi podobných podjednotek, například aminokyselin nebo molekul proteinů, do dlouhých řetězců s opakujícím se motivem. Jsou-li všechny podjednotky identické, hodí se často sousedící podjednotky k sobě jen jediným způsobem, přičemž zaujímají polohu s nejmenším obsahem volné energie připadající na spoj mezi nimi. V tomto případě zaujímá každá podjednotka přesně stejnou polohu vzhledem ke svým sousedům, takže podjednotka 3 se k podjednotce 2 připojí přesně stejným způsobem, jako podjednotka 2 k podjednotce 1 atd. Protože jen velmi zřídka dochází ke spojování podjednotek do přímky, vyústí takové spojování obvykle ve šroubovici - pravidelnou strukturu, která připomíná spirálovité schodiště, jak je ukázáno na obrázku 5-20. V závislosti na smyslu otáčení se šroubovici říká levotočivá nebo pravotočivá (obr. 5-20E). Otáčivost se nezmění, pokud šroubovici otočíme vzhůru nohama, ale je obrácená u odrazu šroubovice v zrcadle.

Šroubovice se v biologických strukturách vyskytují běžně, ať už jde o malé molekuly kovalentně spojené dohromady (např. aminokyseliny v α -šroubovici) nebo o velké proteinové molekuly, které jsou spojeny nekovalentními silami (například molekuly aktinu v aktinových vláknech). To není překvapující. Šroubovice není výjimečnou strukturou. Je tvořena prostým spojením mnoha podobných podjednotek s přísně opakovanou polohou předchozí podjednotky k následující.

Některé druhy proteinů mají podobu dlouhých vláken

Většina proteinů, které jsme zatím probírali, jsou **globulární proteiny**, v nichž se polypeptidový řetězec skládá do kompaktního tvaru

jako míč s nepravidelným povrchem. Většina enzymů jsou globulární proteiny: ačkoli je řada z nich velkých a složitých, s mnoha podjednotkami, většina má vcelku kulovitý tvar (viz obr. 5-17). Naopak, jiné proteiny plní v buňkách úlohy, které vyžadují, aby molekula proteinu obsáhla velkou vzdálenost. Tyto proteiny mají poměrně jednoduchou podlouhlou trojrozměrnou strukturu a obecně se uvádějí jako **fibrilární proteiny**.

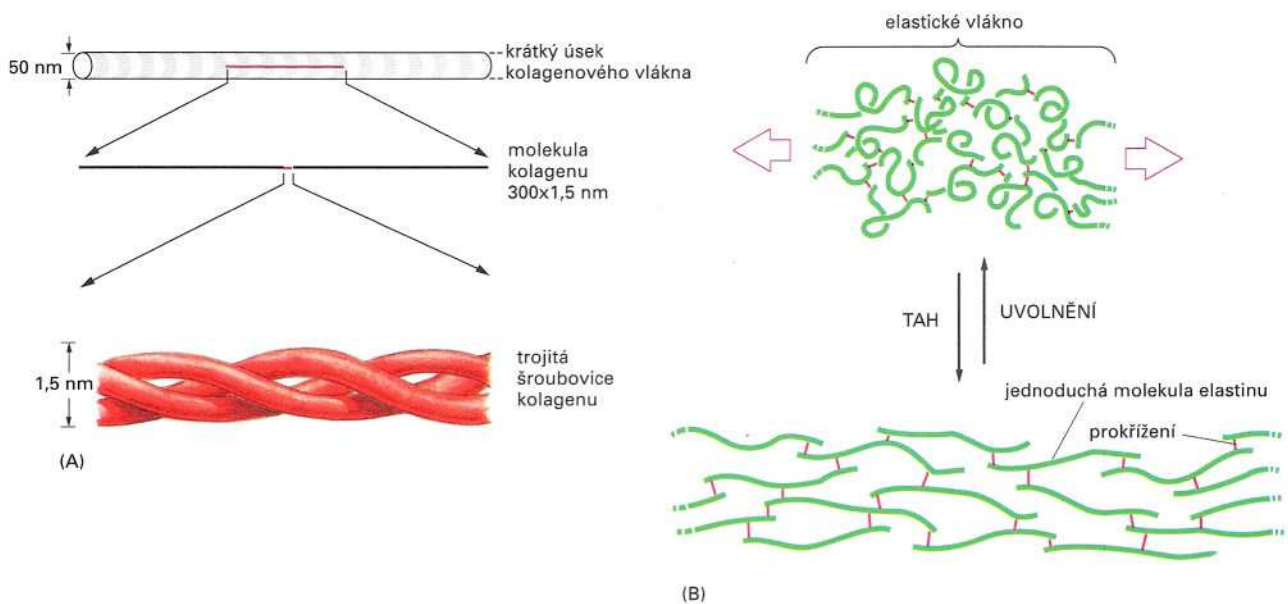
Jedna velká třída vnitrobuněčných fibrilárních proteinů připomíná α -keratin, s kterým jsme se setkali dříve. Molekula α -keratinu je dimerem dvou identických podjednotek, přičemž dlouhé α -šroubovice každé podjednotky tvoří svinuté klubko (viz obr. 5-11). Tato třída proteinů tvoří jednu složku cytoskeletu. Oblasti svinutého klubka jsou na obou koncích opatřeny globulárními doménami s vazebnými místy. To molekulám této třídy umožňuje asociovat do provazovitých *intermediárních filament*, která tvoří strukturální lešení pro vnitřek buňky (viz Kapitulu 16). Keratinová vlákna jsou extrémně stálá: „dlouhověké“ struktury jako vlasy, rohy a nehty jsou složeny hlavně z tohoto proteinu.

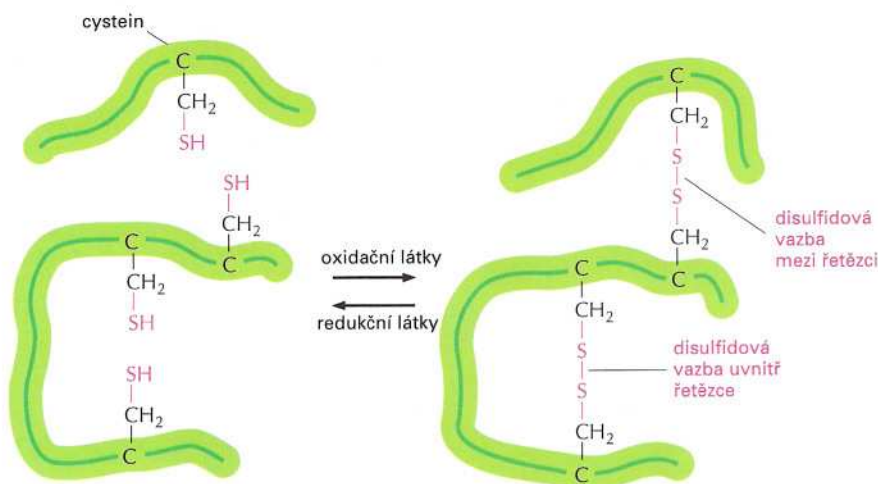
Fibrilární proteiny jsou zvláště hojné vně buňky, kde tvoří gelovitou *extracelulární matrix*, která pomáhá shromažďování buněk a jejich vzájemné vazbě při vzniku tkání. Tyto proteiny jsou vylučovány buňkami do okolí, kde se obvykle spojují do listů nebo do dlouhých vláken. *Kolagen* je nejhojnější z těchto vláknitých proteinů v živočišných tkáních. Molekula kolagenu se skládá ze tří dlouhých polypeptidových řetězců, z nichž každý obsahuje v každé třetí poloze nepolární aminokyselinu glycin. Tato pravidelná struktura umožňuje vzájemné ovíjení řetězců za vzniku dlouhé pravidelné trojitě šroubovice (obr. 5-21A). Mnoho kolagenových molekul se potom váže k ostatním buď ze strany nebo spojením konců; přitom vznikají rozsáhlé překrývající se sítě a výjimečně silná kolagenová vlákna, která drží tkáň pohromadě, jak je popsáno v Kapitole 19.

Úplným protikladem kolagenu je jiný protein v extracelulární matrix – *elastin*. Molekuly elastinu jsou tvořeny poměrně volnými a nečleněnými polypeptidovými řetězci, které jsou kovalentně spoje-

Obrázek 5-21 Kolagen a elastin. (A)

Kolagen je trojitá šroubovice tvořená třemi dlouhými proteinovými řetězci, které se vinou okolo sebe navzájem. Mnoho dlouhých kolagenových molekul je v extracelulárním prostoru zesítováno a tvoří neelastická kolagenová vlákna, které mají pevnost v tahu srovnatelnou s ocelí. Proužky na kolagenovém vlákně jsou důsledkem opakujícího se uspořádání kolagenových molekul ve vlákně. (B) Polypeptidové řetězce elastinu jsou navzájem zesítovány a tvoří elastická vlákna podobná gumě. Je-li vlákno vystaveno napětí, rozvine se každá elastinová molekula do své volnější konformace, a jakmile napětí poleví, zaujmou molekuly původní uspořádání.





Obrázek 5-22 Disulfidové můstky. Tento diagram ukazuje, jak vznikají kovalentní disulfidové vazby mezi postranními řetězci sousedních cysteinů. Tyto síťové vazby mohou spojovat buď dvě části téhož polypeptidového řetězce nebo dva různé polypeptidové řetězce. Protože energie potřebná ke štěpení jedné kovalentní vazby je mnohem větší než energie potřebná k přerušení celého souboru nekovalentních vazeb (viz tabulku 2-2 na str. 43), je disulfidová vazba hlavním stabilizačním prvkem proteinu.

ny do elastické síťoviny. Výsledná elastická vlákna umožňují kůži a ostatním tkáním, jako jsou tepny a plíce, natahovat se a stahovat, aniž by se roztrhly. Jak je znázorněno na obrázku 5-21B, je příčinou elasticity schopnost jednotlivých molekul proteinu vratně se při napětí rozvíjet.

Extracelulární proteiny jsou často stabilizovány kovalentním zesíťováním

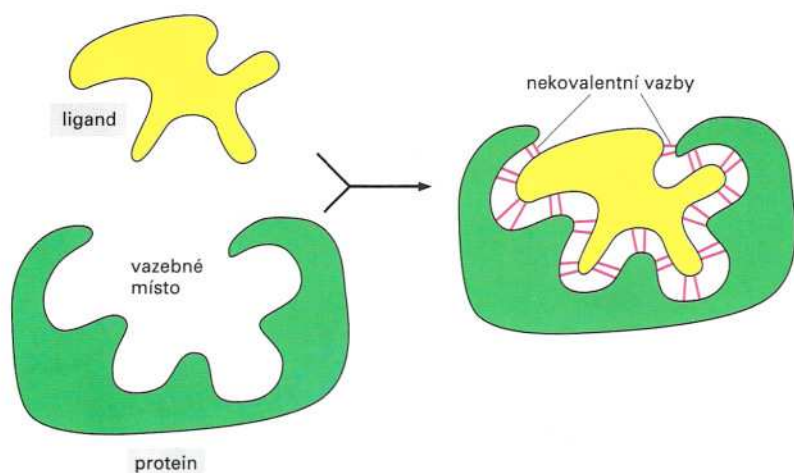
Mnoho proteinových molekul je buď připojeno k vnějšímu plasmatické membrány nebo vylučováno jako část extracelulární matrix. Všechny takové proteiny jsou přímo vystaveny podmínkám vně buňky. Aby si lépe udržely svou strukturu, jsou polypeptidové řetězce v takových proteinech často stabilizovány kovalentním zesíťováním. Tyto spoje mohou buď vázat dohromady dvě aminokyseliny stejného proteinu, nebo spojovat různé polypeptidové řetězce do proteinu s více podjednotkami. Nejběžnějším způsobem zesíťování jsou **disulfidové můstky**. Tyto můstky (také zvané *vazby S-S*) se tvoří při exportu proteinů ven z buněk. Jejich tvorbu katalyzuje endoplasmatické retikulum speciálním enzymem, který spojuje dvě skupiny -SH cysteinových postranních řetězců, jež ve složeném proteinu sousedí (obr. 5-22). Disulfidové můstky nemění konformaci proteinu, ale naopak působí jako atomární svorky, které posilují nejvýhodnější konformaci proteinu. Například lysozym - enzym v slzách, který rozpouští buněčné stěny bakterií - si udržuje svou antibakteriální aktivitu po dlouhý čas, neboť je stabilizován takovými síťovými spoji.

Disulfidové můstky se obecně nedokážou tvořit v cytosolu, kde vysoká koncentrace redukčních činidel převádí tyto můstky zpět na cysteinové skupiny -SH. Zdá se, že proteiny v poměrně příznivém vnitřním prostředí buňky takovou oporu nepotřebují.

Jak proteiny pracují

Viděli jsme, že každý typ proteinu se skládá z přesné sekvence aminokyselin, která mu umožňuje složení do osobitého trojrozměrného tvaru neboli konformace. Díky svým různým aminokyselinovým sekvencím nabývají proteiny různých konformací – každá z nich má

Otázka 5-4 Vlasy jsou z velké části složeny z vláken proteinu keratinu. Jednotlivá keratinová vlákna jsou navzájem kovalentně spojena („zesíťována“) mnoha disulfidovými můstky. Pokud ošetříme kučeravé vlasy mírným redukčním činidlem, které přeruší část síťových spojů, natáhneme je a potom je oxidujeme, zůstanou rovné. Nakreslete obrázek, který ilustruje různé stavy tohoto chemického a mechanického procesu na molekulární úrovni, přičemž se zaměřte na disulfidové můstky. Co by se podle vás stalo, pokud bychom na vlasy působili silným redukčním činidlem, které by přerušilo všechny disulfidové vazby?



Obrázek 5-23 Vazba proteinu k jiné molekule je vysoce selektivní. K pevné vazbě proteinu k jiné molekule (*ligandu*) je zapotřebí mnoha slabých spojů. Ligand se proto musí přesně hodit do vazebného místa proteinu, jako ruka do rukavice, aby se mohla mezi proteinem a ligandem vytvořit řada nekovalentních vazeb.

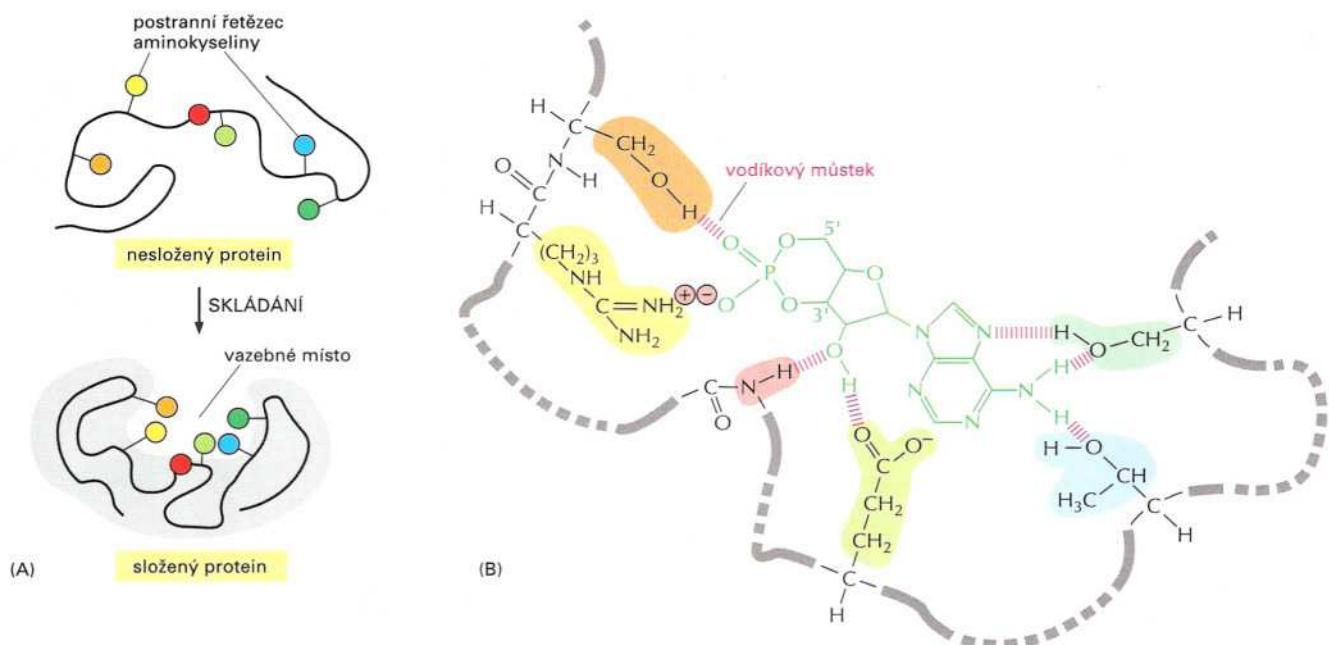
jedinečnou povrchovou topografií chemických skupin. A právě z konformace pramení funkce každého proteinu (viz panel 5-1, str. 135). Nyní si musíme všimnout základní otázky, a to jak proteiny plní své funkce. V této části kapitoly si vysvětlíme, jak se proteiny vážou k ostatním vybraným molekulám a jak jejich aktivita závisí na takové vazbě. Uvidíme, že schopnost vázat jiné molekuly umožňuje proteinům působit jako katalyzátory, signální receptory a drobné motory. Příklady, které zde uvedeme, v žádném případě nevyčerpávají rozsáhlý funkční repertoár proteinů. Speciální funkce mnoha proteinů, s kterými se setkáte dále v této knize, jsou založeny na podobných principech.

Proteiny se vážou k jiným molekulám

Biologické vlastnosti molekuly proteinu závisí na její fyzikální interakci s jinými molekulami. Tak například protilátky se vážou k virům či bakteriím jako signál k obraně těla, enzym hexokináza váže glukosu a ATP a poté katalyzuje reakci mezi nimi, aktinové molekuly se vážou jedna k druhé a tvoří aktinová vlákna, atd. Všechny proteiny se buď lepší nebo *vážou* na jiné molekuly. V některých případech je tato vazba velmi pevná, v jiných má jen krátké trvání. Vazba však umožňuje velkou *specifitu* v tom smyslu, že každá proteinová molekula může vázat jen několik málo z mnoha tisíců různých molekul, se kterými se setkává. Je-li vázanou látkou ion, malá molekula či makromolekula, ve všech případech se jí říká **ligand** příslušného proteinu (latinsky *ligare*, vázat).

Schopnost proteinu selektivně a s velkou afinitou se vázat k ligandu pramení z vytváření souboru slabých nekovalentních vazeb – vodíkových můstků, iontových vazeb a van der Waalsových sil plus příznivých hydrofobních interakcí (viz panel 2-7, str. 70-71). Každá jednotlivá vazba je slabá, takže účinná interakce vyžaduje současnou tvorbu mnoha těchto slabých vazeb. To je možné, jen pokud se povrchové kontury molekuly ligandu velmi blízce shodnou s proteinem podobně jako ruka s rukavicí (obr. 5-23).

Oblast proteinu, která asociuje s ligandem, je známa jako **vazebné místo** a obvykle se skládá z dutiny v povrchu proteinu, která je tvořena zvláštním uspořádáním aminokyselin. Tyto aminokyseliny patří k navzájem vzdáleným oblastem proteinu, které se dostávají k sobě,



Obrázek 5-24 Vazebné místo proteinu. (A) Skládání polypeptidového řetězce obvykle vede k vytvoření štěrbin nebo dutiny na povrchu proteinu. Tato štěrba obsahuje soubor aminokyselinových postranních řetězců, které jsou rozmístěny tak, že mohou vytvářet nekovalentní vazby jen s určitými ligandy. (B) Celkový pohled na aktuální vazebné místo s vodíkovými vazbami a iontovými interakcemi mezi proteinem a jeho ligandem (v tomto příkladu je navázaným ligandem cyklický AMP).

když protein zaujme svou trojrozměrnou konformaci (obr. 5-24). Další oblasti povrchu často poskytují vazebná místa pro různé ligandy, které regulují aktivitu proteinu, jak uvidíme později. Ještě další části proteinu mohou být zapotřebí k navedení proteinu do správného místa v buňce – například hydrofobní α -šroubovice proteinů přetínajících membránu jim umožňuje průnik do lipidové dvojné vrstvy buněčné membrány (viz Kapitolu 11).

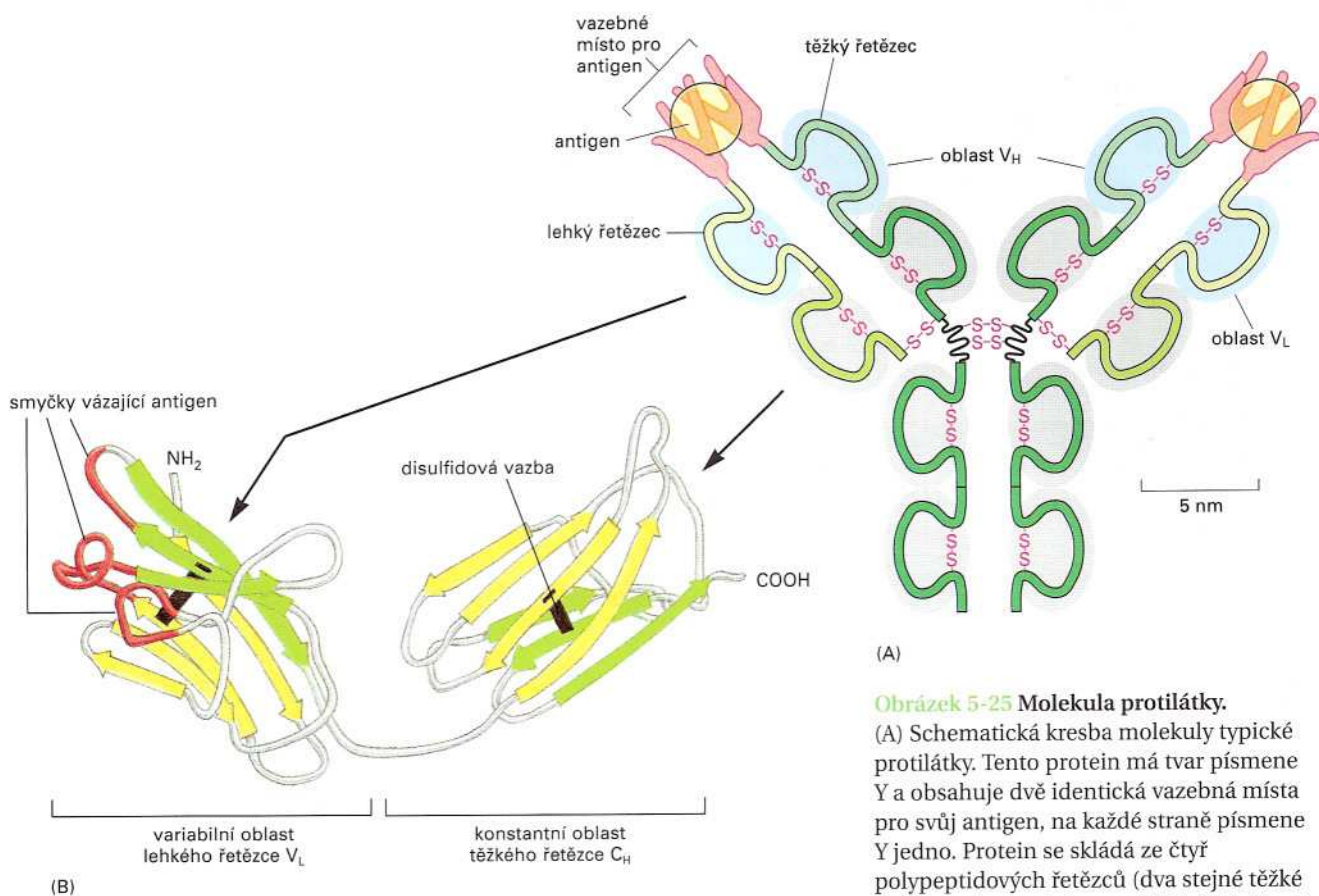
Ačkoli atomy skryté uvnitř proteinu nemají žádný přímý kontakt s ligandem, poskytují nezbytné lešení, které dává povrchu jeho obrysy a chemické vlastnosti. Dokonce i malá změna aminokyselin uvnitř proteinové molekuly často změní její trojrozměrnou strukturu a zneemožní proteinu správně fungovat.

V Kapitole 3 jsme viděli, že molekuly se v buňce setkávají často díky svým nepřetržitým náhodným pohybům způsobeným tepelnou energií. Hodí-li se k sobě povrchy srazivších se molekul jen málo, vznikne jen málo nekovalentních vazeb a tyto dvě molekuly od sebe disociují stejně rychle, jako se přiblížily. To brání nesprávným asociacím, které by mohly mít nežádoucí účinky. Druhým extrémem je vznik mnoha nekovalentních vazeb; takové spojení může trvat velmi dlouho (viz obr. 2-28). Silné interakce se v buňce vyskytují vždy, když biologická funkce vyžaduje dlouhodobé pevné spojení molekul, například když se skupina makromolekul spojí, aby vytvořila buněčnou strukturu, jakou je ribosom.

Vazebná místa protilátek jsou zvláště rozmanitá

Všechny proteiny musí vázat specifické ligandy, aby mohly plnit své funkce. Tato vazebná kapacita se podle všeho nejvíce vyvinula ve skupině protilátek, neboť naše těla mají schopnost produkovat protilátky, z nichž každá se váže k určité molekule.

Protilátky či imunoglobuliny jsou proteiny vytvářené imunitním systémem v odpověď na cizí molekuly, jakými jsou například molekuly na povrchu pronikajícího mikroorganismu. Každá protilátka se



(A)

Obrázek 5-25 Molekula protilátky.

(A) Schematická kresba molekuly typické protilátky. Tento protein má tvar písmene Y a obsahuje dvě identická vazebná místa pro svůj antigen, na každé straně písmene Y jedno. Protein se skládá ze čtyř polypeptidových řetězců (dva stejné těžké řetězce a dva stejné a menší lehké řetězce) držených pohromadě disulfidovými vazbami. Každý řetězec je složen z několika odlišných domén, které jsou zde vyznačeny *modře* nebo *šedě*. Vazebné místo pro antigen je v oblasti styku variabilní domény těžkého řetězce (V_H) a variabilní domény lehkého řetězce (V_L). Právě tyto domény se u různých protilátek nejvíce liší ve své sekvenci a struktuře. (B) Stuhčková kresba lehkého řetězce ukazuje části domény V_L , nejvíce zapojené do vazby s antigenem, *červeně*; tyto části fungují jako prstům podobné smyčky, které uchopí každou molekulu antigenu v (A).

váže extrémně pevně ke specifické cílové molekule, a tak buď přímo inaktivuje svůj cíl, nebo ho označí pro následnou destrukci. Protilátky rozpoznávají své cíle (zvané **antigeny**) s pozoruhodnou specifitou. Protože potenciálně existují miliardy různých antigenů či imunogenů, s kterými se můžeme setkat, musí být naše těla schopna vytvářet miliardy různých protilátek.

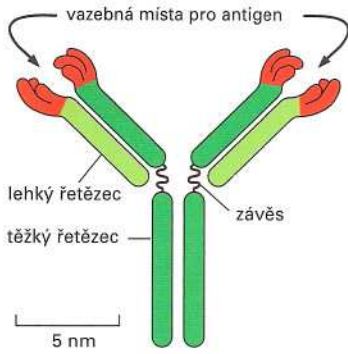
Molekuly protilátek mají tvar písmene Y se dvěma stejnými vazebnými místy, z nichž každé je komplementární k malému úseku na povrchu molekuly antigenu. Podrobný průzkum těchto vazebných míst pro antigeny prozrazuje, že jsou tvořena několika smyčkami polypeptidového řetězce, který vystupuje od konců páru blízce sousedících proteinových domén (obr. 5-25). Pořadí aminokyselin v těchto smyčkách může být změněno mutací, přičemž základní struktura protilátky se nezmění. Obrovské rozmanitosti vazebných míst pro antigeny může být dosaženo změnou pouhé délky a aminokyselinové sekvence smyček; tak vzniká rozsáhlá řada různých protilátek.

Smyčky tohoto druhu jsou ideální pro zachycování jiných molekul. Umožňují velkému počtu chemických skupin obklopit ligand, takže se k němu protein může vázat mnoha slabými vazbami. Z tohoto důvodu se protilátky často používají k vytvoření vazebných míst pro ligand v proteinech. Vlastnosti protilátek jsou shrnuty v panelu 5-3 (str. 158-159).

Měřítkem pevnosti vazby je rovnovážná konstanta

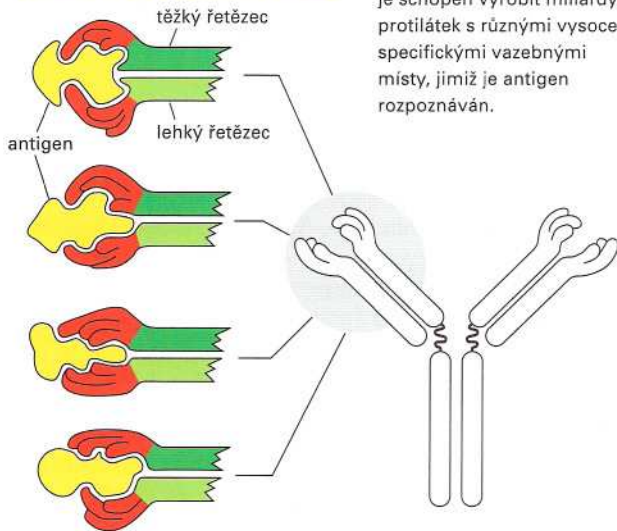
Různé protilátky se vážou ke svým ligandům různě pevně; tuto pevnost lze přímo měřit. Představte si například situaci, ve které se popu-

MOLEKULA PROTILÁTKY



Protilátky jsou proteiny, které se vážou velmi pevně k antigenu. U obratlovců se tvoří jako obranný mechanismus proti infekci. Každá molekula protilátky je složena ze dvou identických lehkých a ze dvou identických těžkých řetězců, tj. obě vazebná místa pro antigen jsou identická.

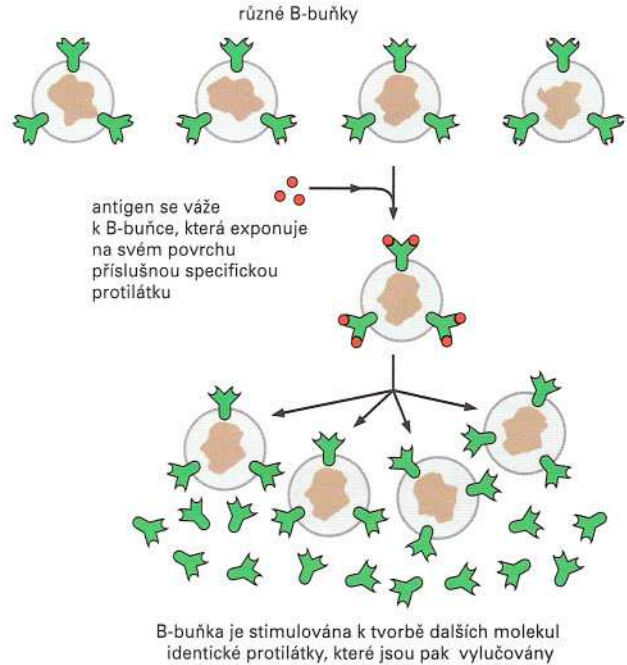
SPECIFITA PROTILÁTEK



Každý živočišný jedinec je schopen vyrobit miliardy protilátek s různými vysoce specifickými vazebnými místy, jimiž je antigen rozpoznáván.

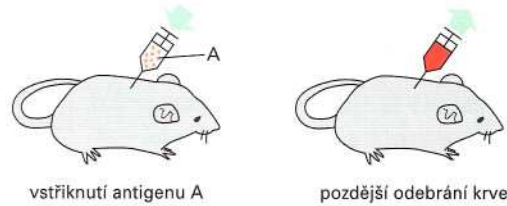
B-BUŇKY

Protilátky jsou v těle vyráběny zvláštní třídou bílých krvinek, tzv. B-lymfocyty. Každý klidový B-lymfocyt má na povrchu určitý typ v membráně vázané protilátky, která slouží jako receptor pro rozeznání specifického antigenu. Jakmile se antigen naváže na tento receptor, B-buňka je stimulována k dělení a tvorbě a sekreci této protilátky, která zachytí na povrchu antigen.

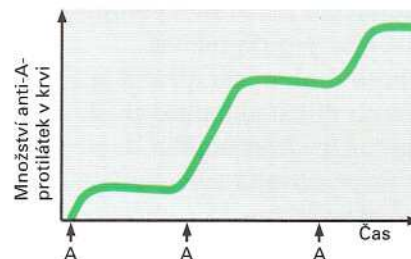


PRODUKCE PROTILÁTEK V LABORATORNÍCH ZVÍŘATECH

Protilátky lze vyrábět v laboratoři tak, že se zvířeti vstříkne antigen A (používá se myši, králíků, ovcí a koz).

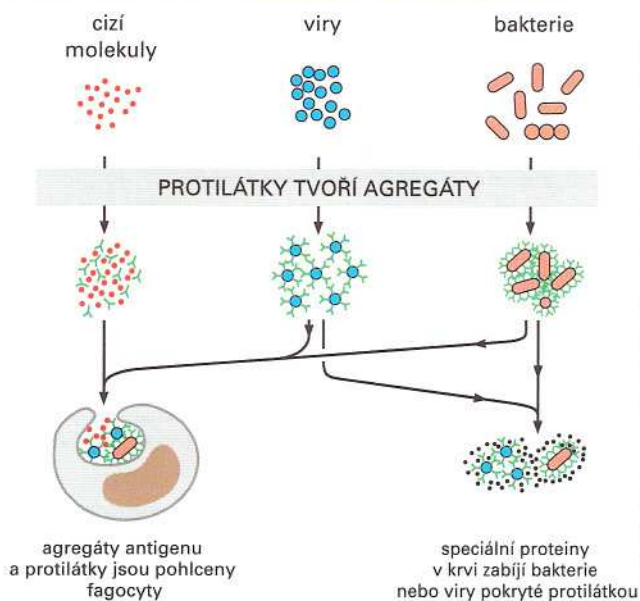


Opakované injekce téhož antigenu v intervalech několika týdnů stimulují specifické B-buňky k tvorbě a sekreci velkého množství anti-A-protilátek do krevního oběhu.



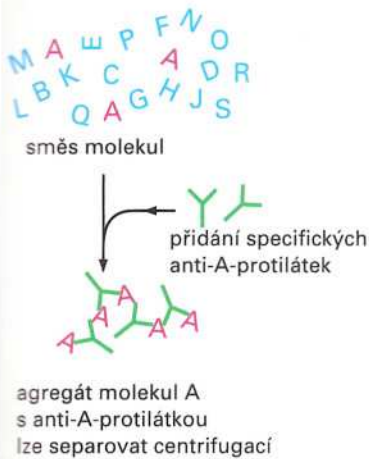
Protože se injekcí antigenu A stimuluje mnoho různých B-buněk, bude v krvi přítomna řada protilátek proti A, každá z nich bude vázat antigen A poněkud odlišně.

PROTILÁTKY NÁS CHRÁNÍ PROTI INFEKCI

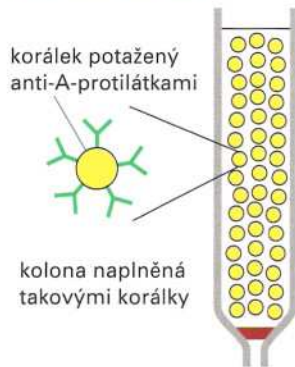


PROTILÁTKAMI LZE PŘEČIŠŤOVAT MOLEKULY

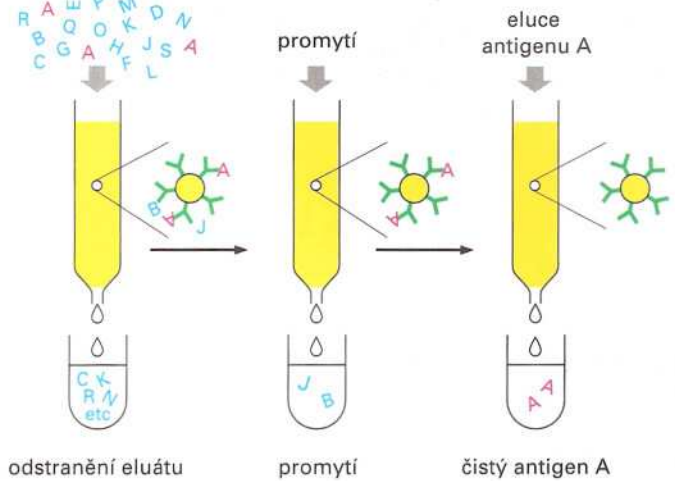
IMUNOPRECIPITACE



IMUNOAFINITNÍ SLOUPCOVÁ CHROMATOGRRAFIE



antigen A a nežádoucí molekuly

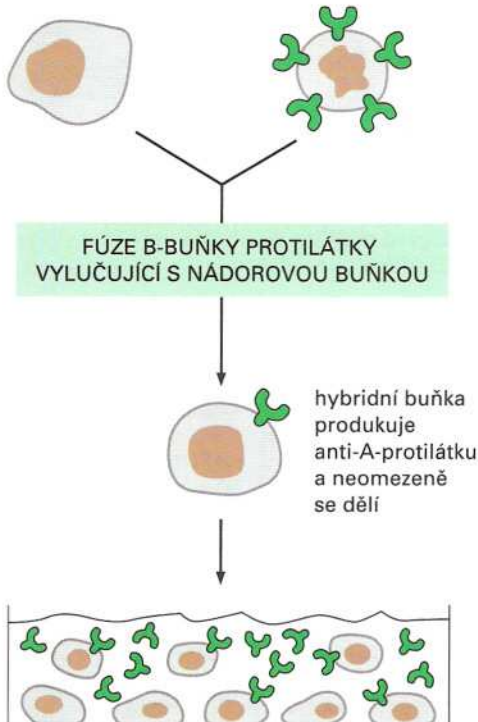


MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

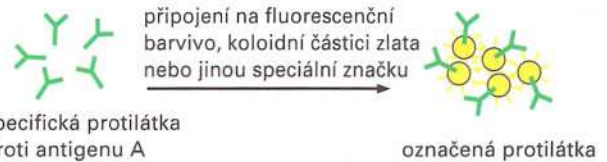
Velká množství jediného typu protilátky lze získat tak, že fúzujeme B-lymfocyt (získaný ze zvířete po injekci antigenu A) s nádorovou B-bunkou. Výsledná hybridní buňka se nekonečně množí a vylučuje anti-A-protilátky jediného typu.

nádorová buňka z tkáňové kultury se neustále dělí, avšak neprodukuje protilátku

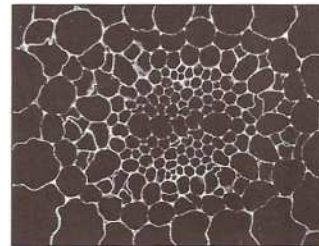
B-buňka ze zvířete injikovaného antigenem A produkuje anti-A-protilátky, ale dělí se jen omezenou dobu



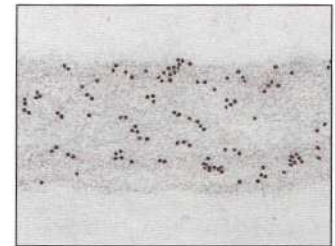
POUŽITÍ PROTILÁTEK JAKO MOLEKULÁRNÍCH ZNAČEK



Mikroskopická detekce



Fluoreskující protilátka váže antigen A ve tkáni a lze ji detegovat ve světelném mikroskopu. Antigenem je tu pektin v rostlinných buňkách.

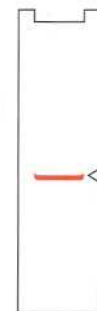


Zlatem označená protilátka se váže na antigen A ve tkáni a lze ji odhalit v elektronovém mikroskopu. Antigenem je opět pektin ve stěně rostlinné buňky.

Biochemická detekce

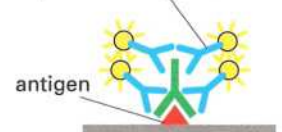


antigen A se oddělí od ostatních molekul elektroforézou



inkubace se značenými protilátkami, které vážou antigen A, umožní určení polohy antigenu v gelu

označená druhá protilátka (modře) se váže na první protilátku (zeleně)



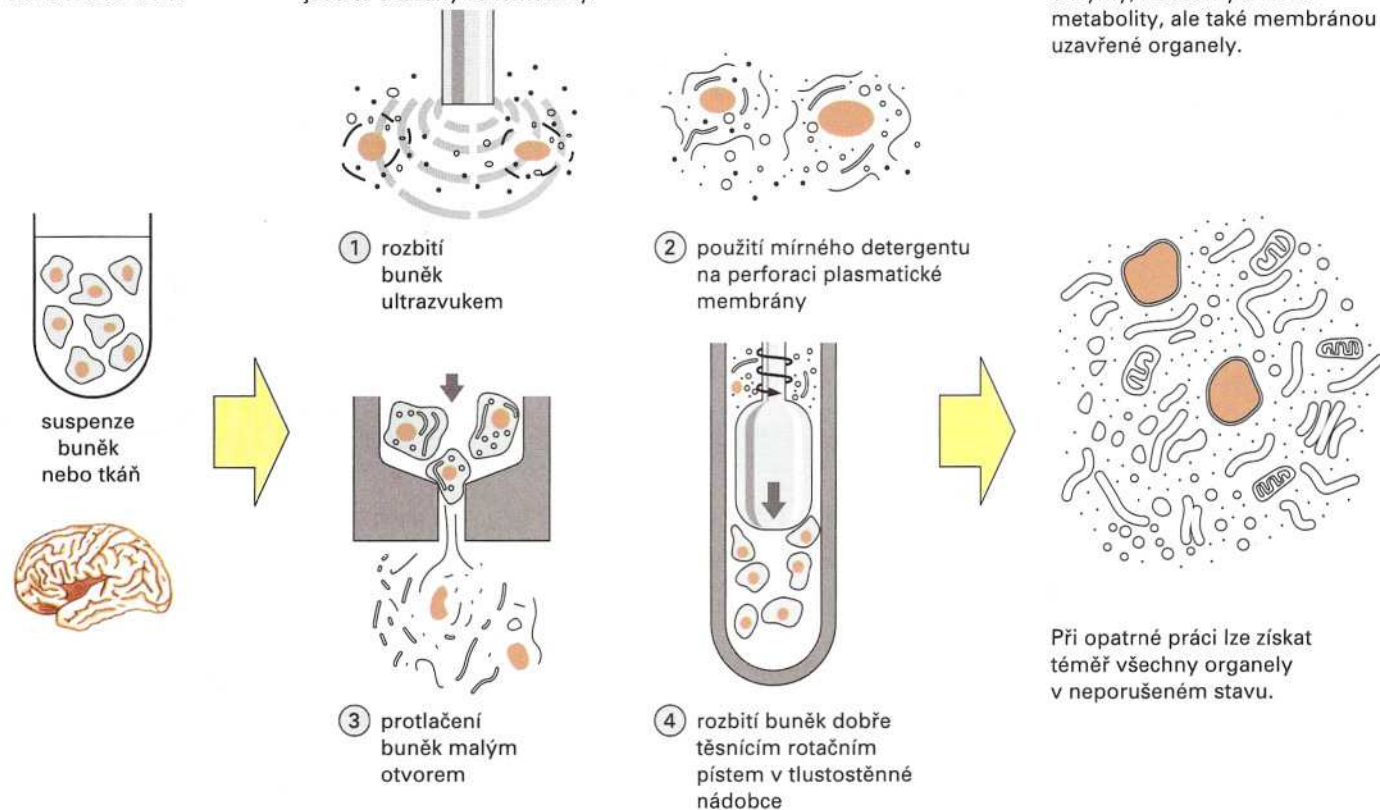
Poznámka: Ve všech případech lze citlivost výrazně zvýšit použitím několika vrstev protilátek. Takový sendvič umožňuje odkrytí i nepatrných množství molekul antigenu.

ROZBÍJENÍ BUNĚK A TKÁNÍ

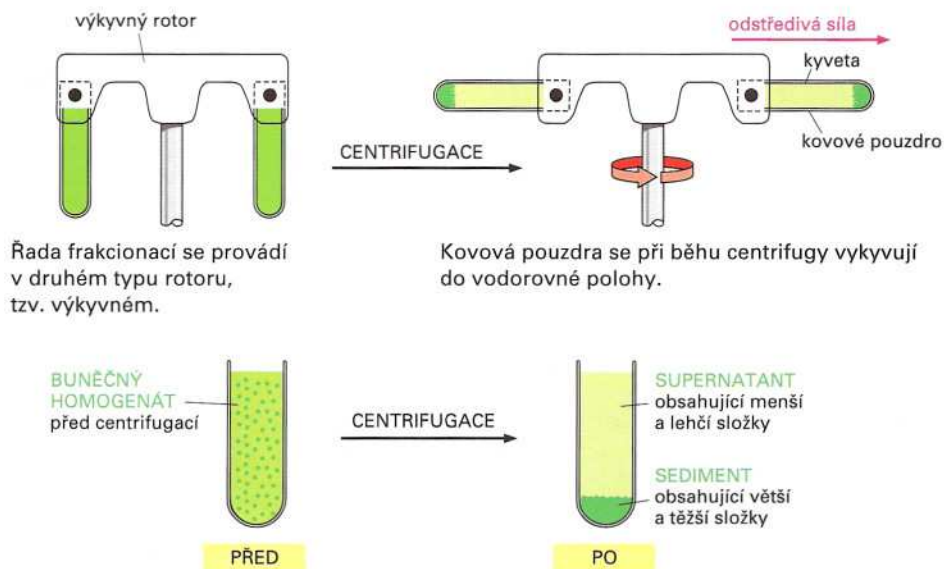
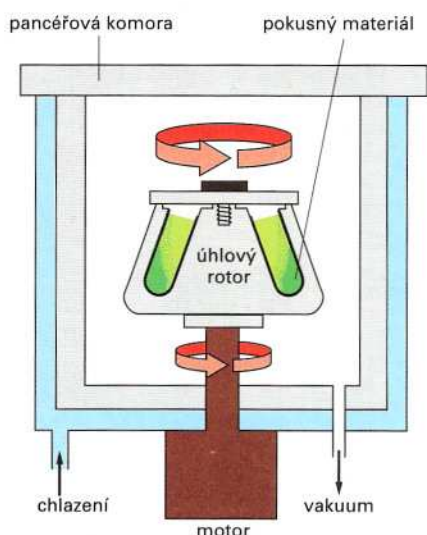
Prvním krokem purifikace většiny proteinů je rozbití buněk nebo tkáně

Použitím jemných mechanických postupů, zvaných homogenizace, lze perforovat plasmatické membrány buněk, takže se z buněk uvolní jejich obsah. Používané čtyři metody jsou tu ukázány schematicky.

Vznikající hustý homogenát nebo extrakt obsahuje větší i menší molekuly z cytosolu, jako jsou enzymy, ribosomy a různé metabolity, ale také membránou uzavřené organely.



CENTRIFUGA



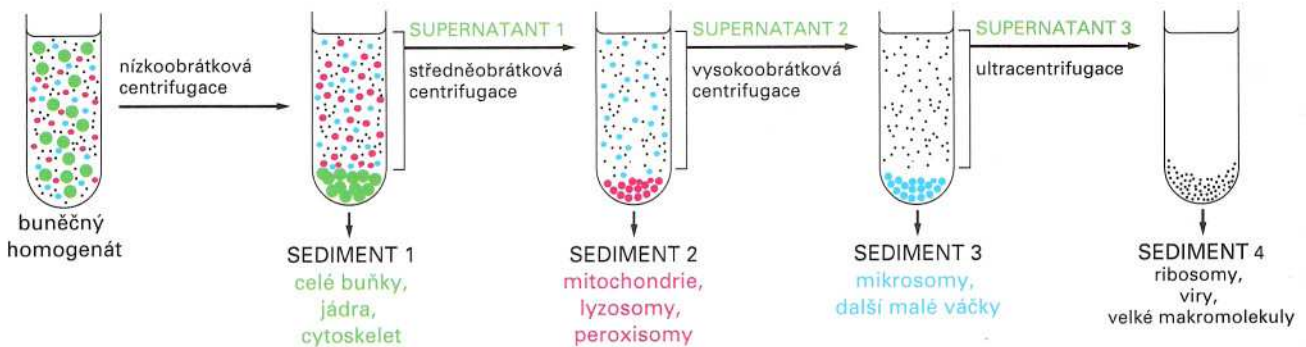
Centrifugace je nejběžnější postup, jakým se separuje buněčný homogenát na různé frakce. Homogenát je vložen do centrifugačních kyvet a centrifuguje se při vysoké rychlosti ve speciální rychloběžné centrifuze nebo ultracentrifuze. Současné ultracentrifugy dosahují až 100 000 otáček za minutu a zrychlení až 600 000násobku zemské gravitace.

Při takových rychlostech je třeba prostor centrifugy chladit a evakuovat, aby se homogenát nezahřival třením o vzduch. Centrifuga je uložena v pancéřovém krytu, protože nevyvážený rotor se může roztrhnout s explozivním účinkem na okolí. V úhlovém rotoru lze odstřeďovat větší objemy kapaliny, avšak sediment se tam tvoří méně homogenně.

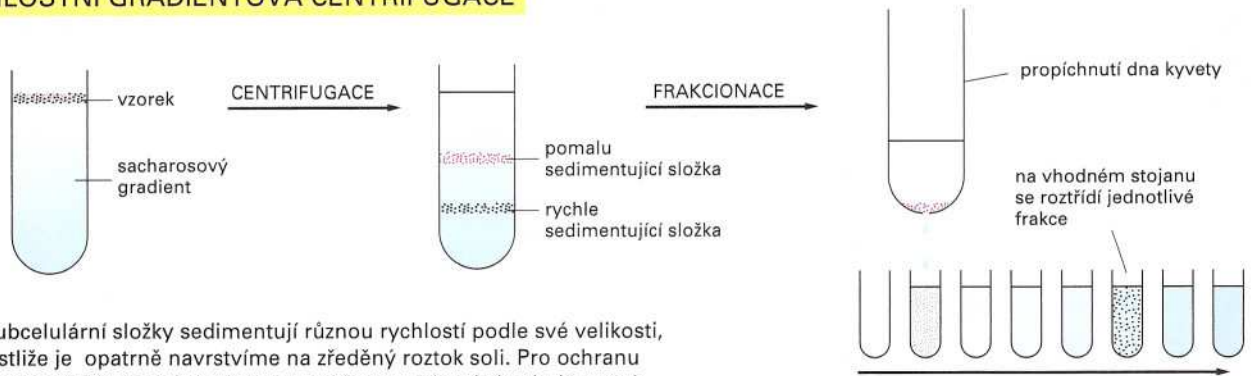
FRAKČNÍ CENTRIFUGACE

Opakovaná centrifugace při stále vyšších rychlostech umožní frakcionaci homogenátu na různé složky.

Centrifugace oddělí buněčné složky podle hustoty a velikosti. Větší a těžší komponenty jsou méně zdržovány interakcí s molekulami vody a pohybují se rychleji. Tvoří na dně kyvetky sediment, zatímco lehčí a menší složky zůstávají v suspenzi, které se říká supernatant.



RYCHLOSTNÍ GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE



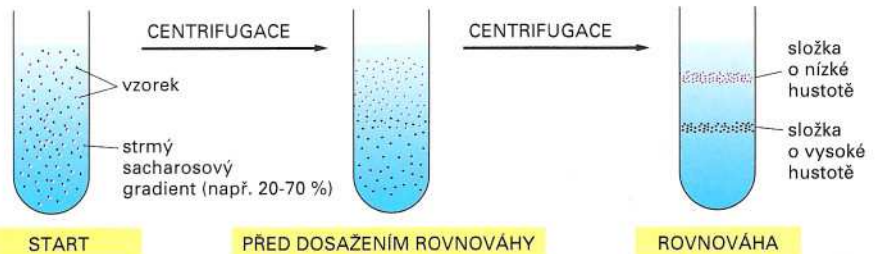
Subcelulární složky sedimentují různou rychlostí podle své velikosti, jestliže je opatrně navrstvíme na zředěný roztok soli. Pro ochranu sedimentujících složek proti konvekčnímu mísení obsahuje roztok mírný gradient sacharosu, kde se koncentrace zvyšuje směrem ke dnu. Obvykle jde o 5-20 % sacharosu. Při průchodu takovým gradientem se jednotlivé složky buněk po určité době rozdělí do zřetelných pásů, které lze odděleně sbírat.

Po skončení centrifugace lze jednotlivé frakce sbírat po opatrném propíchnutí dna kyvetky, jak je ukázáno nahoře.

ROVNOVÁŽNÁ SEDIMENTACE

Ultracentrifugace lze též použít pro rozdělení složek extraktu na základě jejich **vznášivosti**, bez ohledu na jejich rozměr nebo tvar. Vzorek se obvykle navrství na strmý gradient sacharosu nebo chloridu cesného, popřípadě smísí homogenně s gradientem. Každá subcelulární složka se pohybuje v gradientu tak daleko, až se dostane do vrstvy odpovídající její vznášivosti. Vzniká tak často řada pásů, při čemž se ty nejbližší ke dnu kyvetky vyznačují největší hustotou nebo nejmenší vznášivostí. Těto metodě se někdy říká **centrifugace v hustotním gradientu**.

Vzorek je smísen s gradientem.

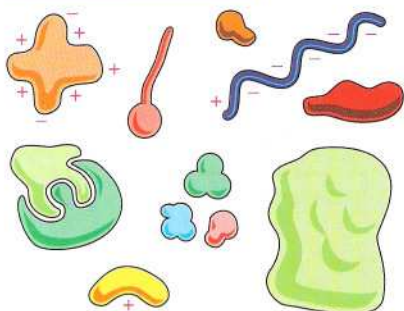


v rovnováze se jednotlivé složky nacházejí v hloubce odpovídající jejich hustotě

Uvádíme příklad sacharosového gradientu. Lze však připravit hustší gradienty, například z roztoku CsCl, které se užívají zejména pro dělení DNA a RNA.

Pruhy v gradientu lze sebrat podobně jako nahoře po propíchnutí dna kyvetky.

DĚLENÍ PROTEINŮ



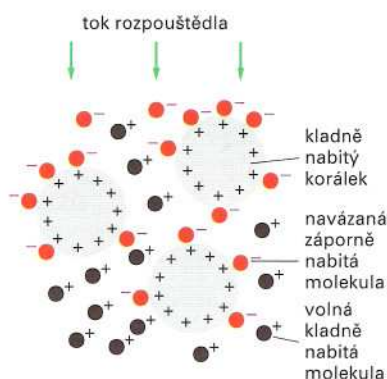
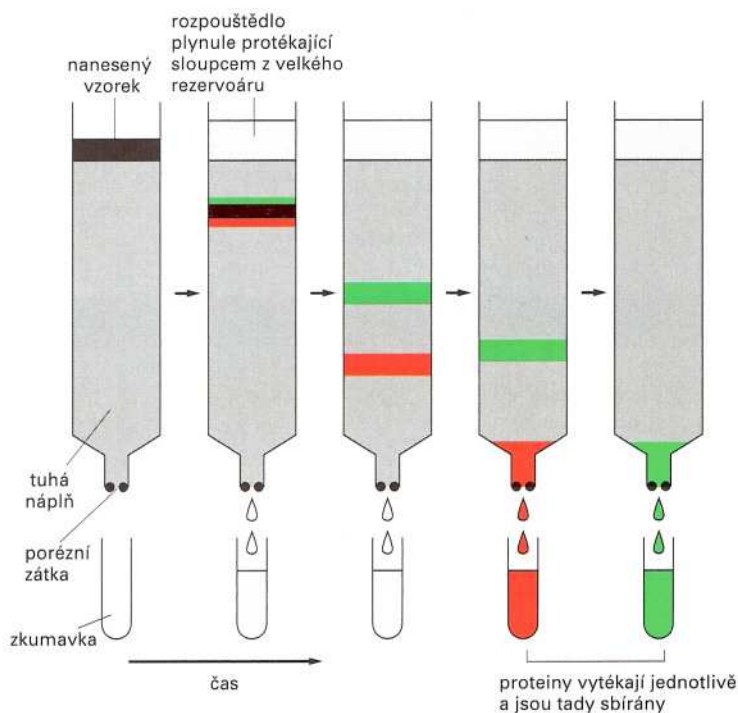
Proteiny jsou velmi rozmanité co do velikosti, tvaru, náboje, hydrofobnosti a afinity k dalším molekulám. Všechny těchto vlastností lze využít k jejich rozdělení, aby bylo možno je studovat izolovaně.

TŘI DRUHY CHROMATOGRRAFIE

Pro sloupcovou chromatografii lze použít různých náplní, které jsou uloženy v koloně ve formě malých kuliček či korálek. Typický postup purifikace proteinu může zahrnovat všechny tři způsoby, o nichž je řeč níže, takže se dosáhne například 10000násobného přečištění.

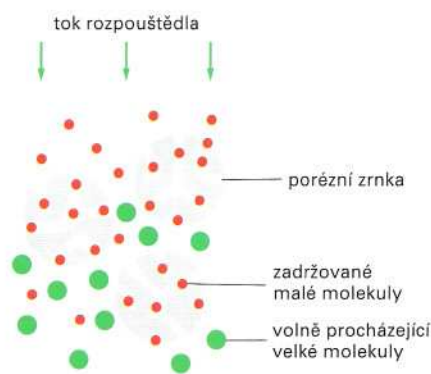
SLOUPCOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Proteiny se často dělí **sloupcovou chromatografií**. Směs proteinů v roztoku se pomalu nalévá na horní část válcové kolony naplněné propustnou pevnou maticí ponořenou do rozpouštědla. Pak se větší množství rozpouštědla nechá protékat sloupcem. Protože jsou různé proteiny různě zadržovány interakcí s náplní kolony, lze je odděleně sbírat při výtoku z kolony. Podle toho, jaké náplně použijeme, můžeme proteiny dělit podle velikosti nebo podle schopnosti vázat se na určité chemické skupiny náplně.



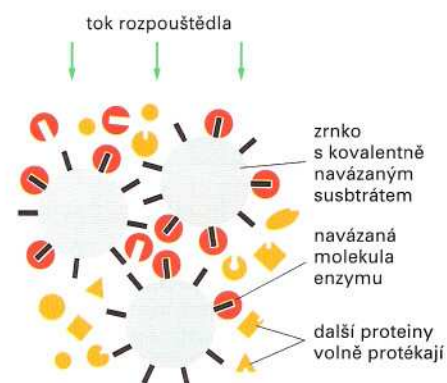
(A) IONTOMĚNIČOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Kolony jsou naplněny iontoměničím s navázanými kladnými nebo zápornými náboji tak, aby zadržovaly proteiny s opačnou polaritou. Vazba mezi proteinem a náplní kolony závisí na pH a iontové síle roztoku, který kolonou protéká. Ty lze regulovat tak, aby se dosáhlo účinné separace.



(B) GELOVÁ CHROMATOGRRAFIE

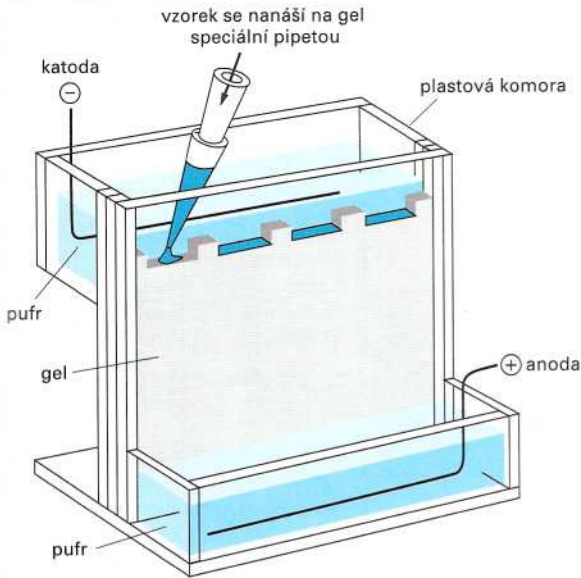
Při gelové filtraci se dělí proteiny podle velikosti. Náplň se tady skládá z porézni zrnok, kdy malé molekuly proteinů mohou vstupovat do pórů, a jsou tak zadržovány v postupu kolonou. Proteiny, které jsou větší a nemohou pronikat do porézni zrnok, procházejí kolonou rychleji.



(C) AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

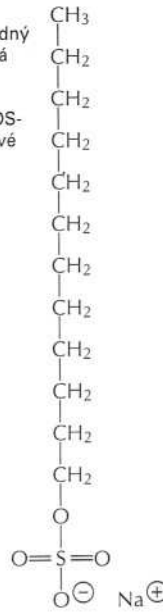
Kolony pro afinitní chromatografii obsahují náplň, která je kovalentně vázána k molekulám, jež specificky reagují se studovaným proteinem (např. protilátkou nebo substrátem enzymu). Proteiny specificky navázané v koloně lze pak uvolnit změnou pH nebo koncentrace solného roztoku, kterým se kolona promývá. Proteiny pak získáme zcela čisté.

GELOVÁ ELEKTROFORÉZA



Jestliže aplikujeme elektrické pole na roztok obsahující molekuly proteinů, tyto molekuly se budou v poli pohybovat směrem a rychlostí, určenými jejich nábojem a velikostí. To je základem techniky nazývané **elektroforéza**.

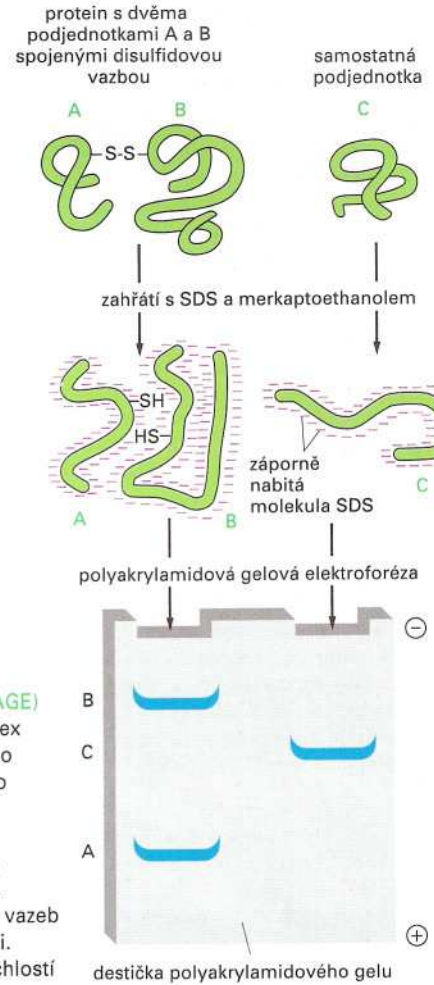
detergent dodecylsulfát sodný (SDS) se používá pro solubilizaci proteinů, které se pak dělí v SDS-polyakrylamidové gelové elektroforéze



SDS

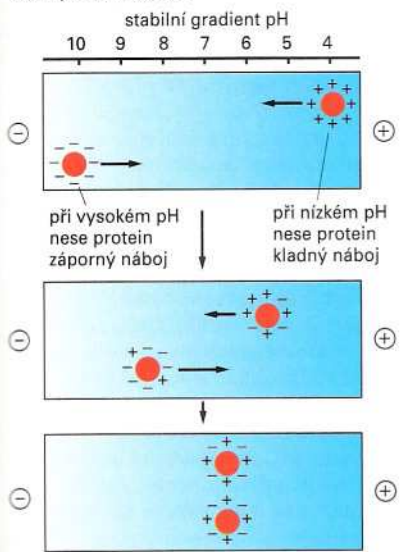
SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Jednotlivé polypeptidové řetězce tvoří komplex se záporně nabitými molekulami SDS, a proto se v gelu pohybují ve formě záporně nabitého komplexu SDS-protein destičkou porézního polyakrylamidového gelu. Přístroj používaný pro tuto techniku je znázorněn vlevo nahoře. Redukční činidlo, například merkaptoethanol, se často přidává pro přerušení disulfidových vazeb uvnitř proteinu nebo mezi dvěma molekulami. Za těchto podmínek se proteiny pohybují rychlostí odpovídající jejich molekulové hmotnosti.



IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

Každý protein je charakterizován svým **izoelektrickým bodem**, což je pH, při kterém protein nese žádný výsledný elektrický náboj. V tomto bodě se nebude pohybovat v elektrickém poli. Při **izoelektrické fokusaci** se proteiny dělí elektroforézou v tenké trubičce s polyakrylamidovým gelem, v níž je vytvořen gradient pH ze směsi speciálních pufrů. Každý protein se pohybuje až do vzdálenosti, která odpovídá jeho isoelektrickému bodu, a tam setrvává.

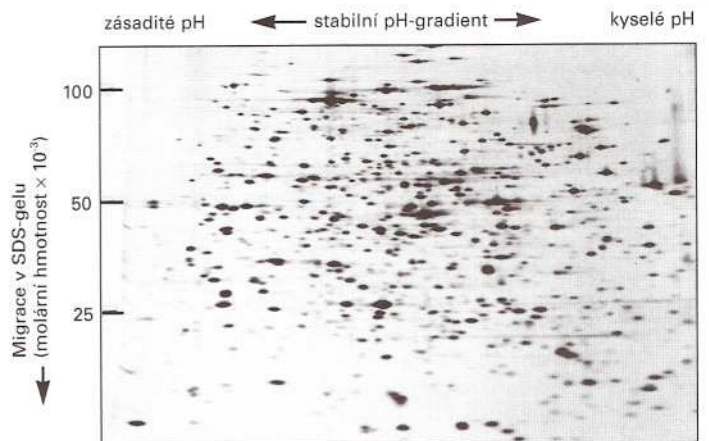


Protein v naší ukázce má isoelektrický bod při pH 6,5

DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU

Komplexní směsi proteinů nelze řádně rozdělit jednorozměrnou elektroforézou. Užívá se proto **varianty dvourozměrné**, s poněkud odlišným uspořádáním v každém směru, čímž lze rozdělit přes tisíc proteinů na jediném gelu. Nejdříve se nativní proteiny dělí na úzkém pásu gelu na základě svého elektrického náboje isoelektrickou fokusací. V dalším postupu se pásek gelu umístí na desku gelu a zapojí se elektrické pole jako v SDS-PAGE ve směru kolmém na směr isoelektrické fokusace. Každý protein se pak pohybuje na své jedinečné místo na gelové ploše.

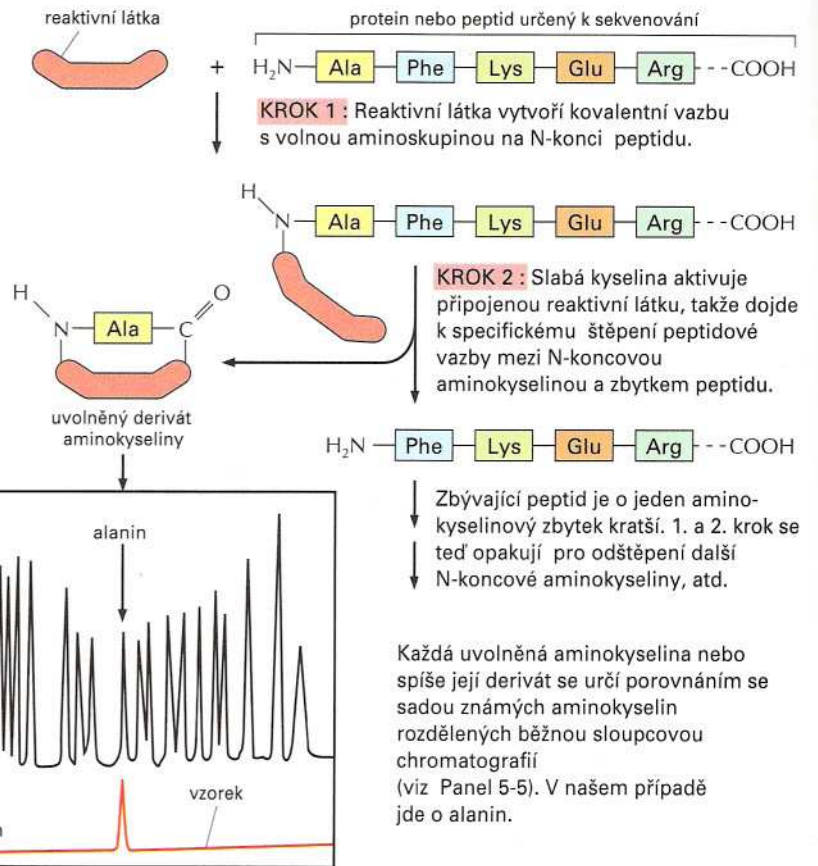
Všechny proteiny buňky bakterie *Escherichia coli* jsou rozděleny na tomto dvourozměrném gelu, na němž každá skvrna odpovídá jinému polypeptidu. Nejdříve byl vzorek rozdělen isoelektrickou fokusací zleva doprava a pak elektroforézou podle své hmotnosti shora dolů.



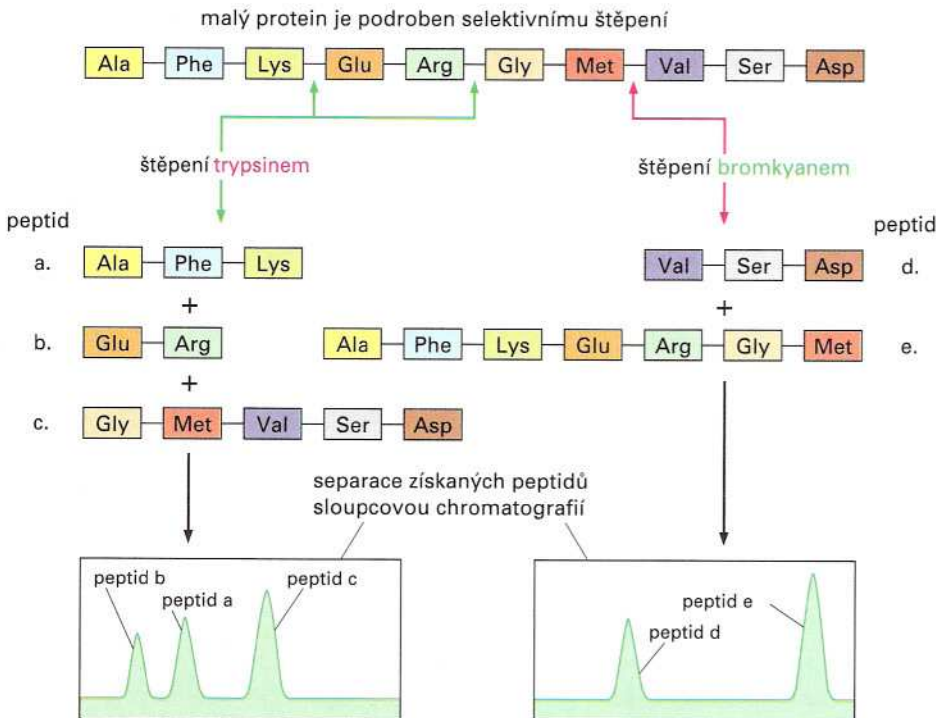
SEKVENCE AMINOKYSELIN V PROTEINECH

Před určením trojrozměrné struktury proteinu je třeba znát jeho primární strukturu, tedy sekvenci aminokyselin v polypeptidovém řetězci. To se provádí opakovaním série chemických reakcí (kroky 1 a 2, vpravo), kterými se určí N-koncová aminokyselina po svém odštěpení. Opakující se povaha těchto postupů přímo vyžaduje automatizaci a dnes jsou komerčně k dispozici přístroje zvané **sekvenátory** pro určení sledu aminokyselin v polypeptidu. I s velmi malými vzorky, jako je například jedna ze skvrn na dvourozměrném polyakrylamidovém gelu na Panelu 5-5, lze získat přesnou N-terminální sekvenci desítek aminokyselin přes noc.

Peptidy delší než 50 aminokyselin však nelze sekvenovat dostatečně spolehlivě. Nadto často zjišťujeme, že N-terminální aminokyselina je chemicky blokována, takže analýzu nelze ani zahájit. K odstranění těchto nesnází je třeba polypeptid nejprve rozštěpit na menší fragmenty.



SELEKTIVNÍ ŠTĚPENÍ PROTEINU

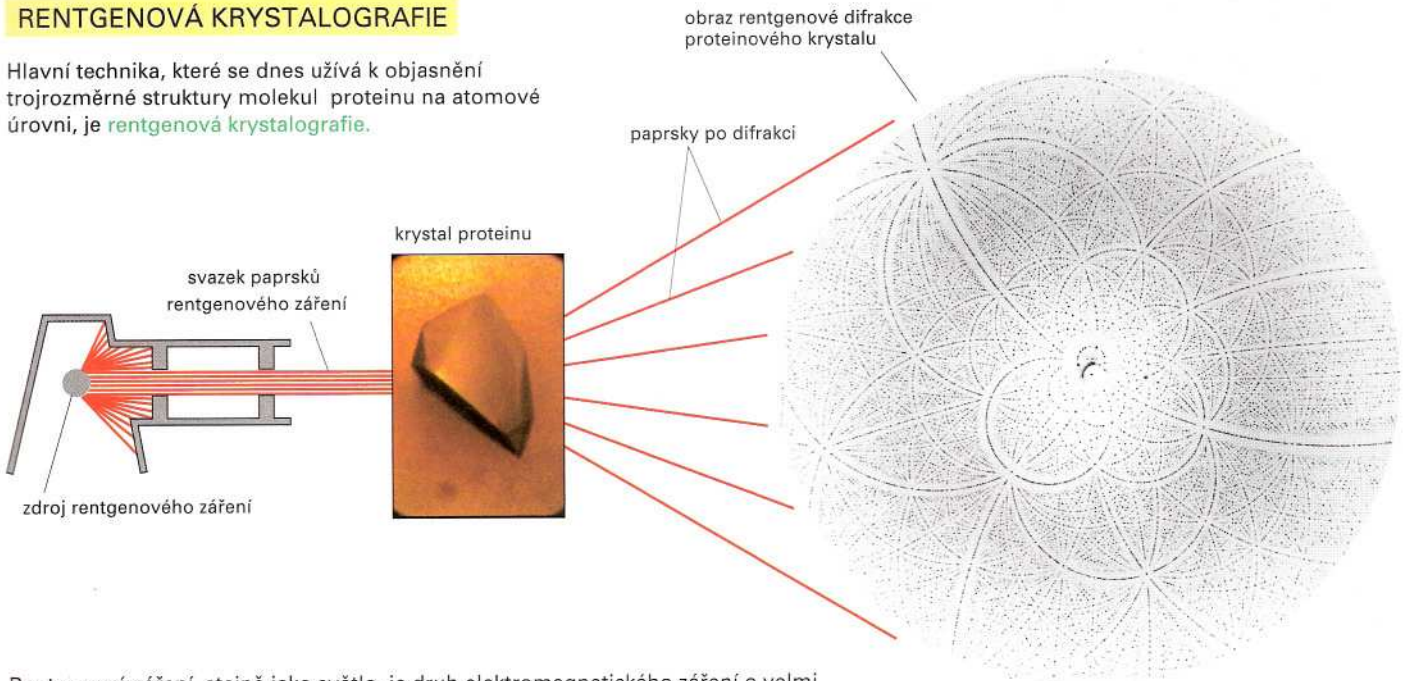


Selektivní štěpení proteinu dává vzniknout sadě peptidových fragmentů. Proteolytické enzymy a chemická činidla dovolují štěpit protein mezi specifickými zbytky aminokyselin. Enzym **trypsin** štěpí na karboxylové straně zbytků lysinu nebo argininu, zatímco **bromokyan** štěpí peptidové vazby vedle methioninu. Působením těchto činidel většinou vzniká několik poměrně velkých peptidů. Ty se pak dají separovat různými technikami, a poskytují tak diagnostickou mapu toho kterého proteinu. Sekvence peptidů získaných různými technikami se překrývají a umožňují tak odvodit poměrně pracně celou sekvenci proteinu.

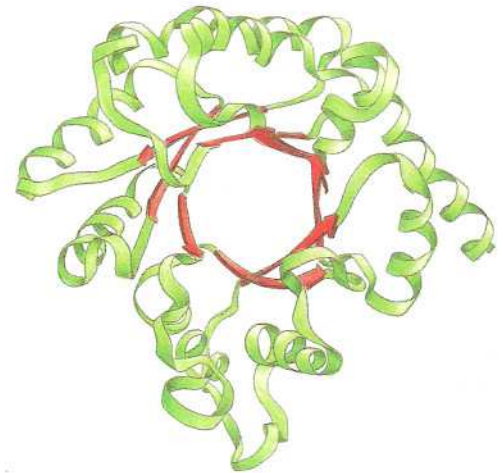
Známe-li sekvenci pouhých dvaceti aminokyselinových zbytků, můžeme sestavit odpovídající DNA, takže lze klonovat příslušný gen (viz obr. 10-17). Jakmile známe sekvenci genu nebo odpovídající cDNA, můžeme stanovit sekvenci zbývajících aminokyselin v proteinu podle genetického kódu. Většina proteinů se dnes sekvenuje tímto nepřímým způsobem.

RENTGENOVÁ KRISTALOGRAFIE

Hlavní technika, které se dnes užívá k objasnění trojrozměrné struktury molekul proteinu na atomové úrovni, je **rentgenová krystalografie**.

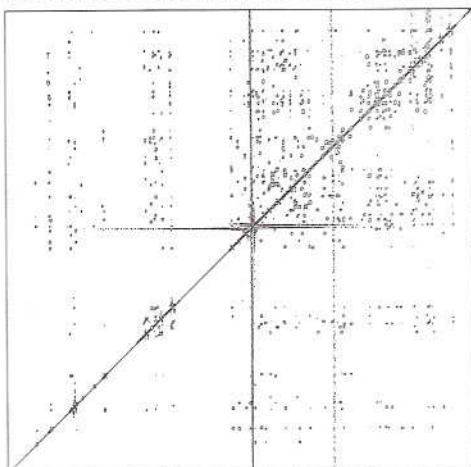


Rentgenové záření, stejně jako světlo, je druh elektromagnetického záření o velmi malé vlnové délce. Jestliže zaměříme svazek paralelních rentgenových paprsků na dobře vyvinutý krystal čistého proteinu, některé paprsky budou rozptýleny určitým způsobem atomy v krystalu. Rozptýlené paprsky se budou zesilovat v definovaných bodech a projeví se jako určitý obrazec difrakčních skvrn na vhodném detektoru. Poloha a intenzita skvrn v obrazci obsahuje informaci o poloze atomů v krystalu proteinu, z kterého obrazec vznikl. Počítačem lze tuto informaci zpracovat do trojrozměrné mapy hustoty elektronů v proteinu, což spolu se známou sekvencí slouží k sestavení atomového modelu. Kompletní atomový model se často těžko interpretuje, a tak se často užívají zjednodušené verze, na nichž jsou znázorněny pouze významné strukturální vlastnosti (viz Panel 5-2). Zde znázorněn protein je ribulosabisfosfátkarboxyláza, která je základním enzymem pro fixaci CO₂ při fotosyntéze (α -šroubovice jsou vyznačeny zeleně, β -listy červeně).

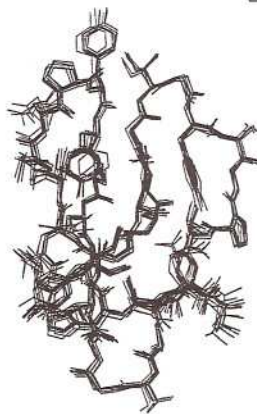


NMR-SPEKTROSKOPIE

Spektroskopie založená na údajích jaderné magnetické rezonance (NMR podle *nuclear magnetic resonance*) se v minulosti používala pro analýzu struktury malých molekul, ale nyní je stále více užívána pro stanovení struktury malých proteinů nebo jejich domén. Metoda vyžaduje pouze malé množství koncentrovaného roztoku proteinu.

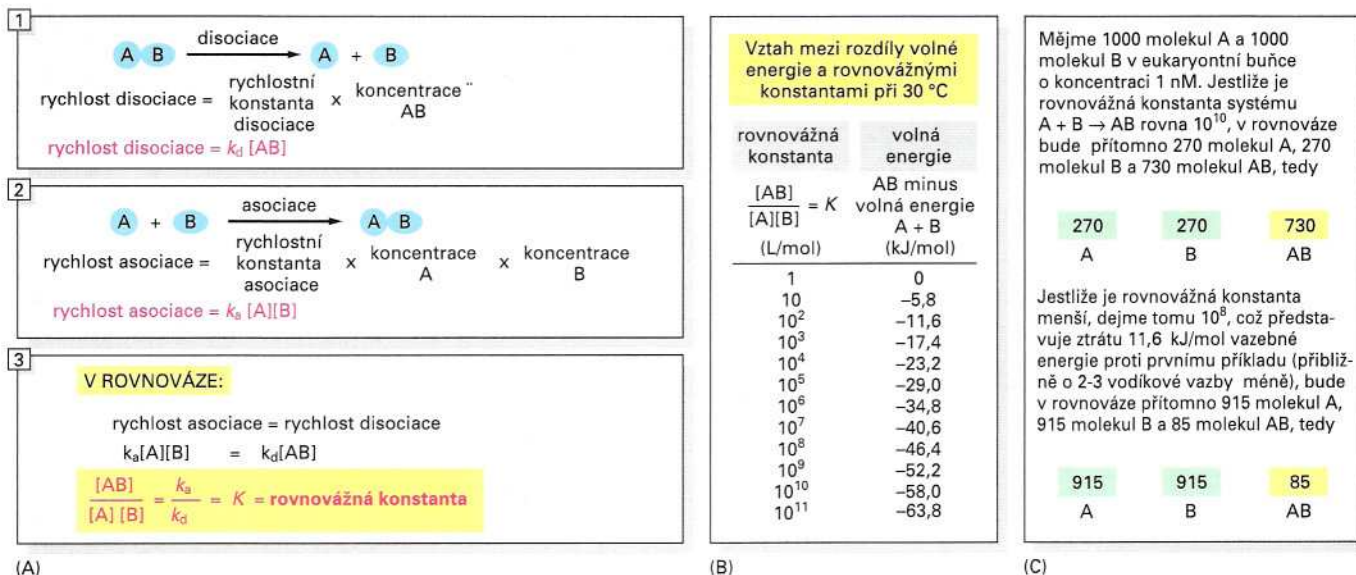


(A)



(B)

Roztok se umístí do silného magnetického pole, kde je vystaven pulzům rádiové frekvence. Signály z atomových jader vodíku v různých aminokyselinách lze identifikovat a určit tak vzdálenosti mezi interagujícími páry vodíkových atomů. Tím poskytuje NMR-spektroskopie informace o vzdálenostech mezi různými částmi proteinové molekuly. Srovnáním této informace se znalostí sekvence aminokyselin lze odvodit trojrozměrnou strukturu proteinu. Tato metoda se však hodí pouze pro práci s proteiny do molekulové hmotnosti 20 kDa. V části (A) je naznačeno dvourozměrné NMR-spektrum odvozené z karboxylového konce enzymu celulózy. Skvrny představují interakce mezi sousedními atomy H. Výsledná struktura odpovídající rozmístění skvrn je v části (B).



Obrázek 5-26 Vztah vazebných energií k rovnovážné konstantě. (A) Rovnováha mezi molekulami A a B a komplexem AB je udržována díky vyvážení opačných reakcí ukázaných v (1) a (2). Molekuly A a B se ke své reakci musí srazit, a rychlost reakce je proto úměrná součinu jejich jednotlivých koncentrací $[A] \times [B]$, kde hranaté závorky $[\]$ znamenají koncentraci. Jak je ukázáno v části (3), je poměr rychlostních konstant pro asociaci a disociaci roven rovnovážné konstantě reakce (K). (B) Rovnovážná konstanta pro reakci (3) platí pro děj $A + B \rightleftharpoons AB$ a čím větší je její hodnota, tím silněji se A a B vážou. Na každých 5,8 kJ/mol rozdílu volné energie se rovnovážná konstanta změní 10krát (viz také tabulku 3-1, str. 92). (C) Příklad ilustrující dramatický efekt přítomnosti a absence několika slabých vazeb v biologickém kontextu.

lace stejných molekul protilátky náhle setká s populací ligandů difundujících kapalinou kolem nich. Často se stane, že některý ligand narazí do vazebného místa protilátky a utvoří komplex protilátka-ligand. Populace komplexů ligand-protilátka proto poroste, ale ne do nekonečna. S postupem času se stane významným opačný proces, při kterém se jednotlivé komplexy budou rozpadat díky tepelným pohybům. Každá populace protilátek a antigenů nakonec dosáhne ustáleného stavu neboli **rovnováhy**, při níž se počet vazeb utvořených za sekundu (asociace) přesně rovná počtu disociací komplexů na jednotlivé složky (viz také obr. 3-20).

Koncentrace ligandu, protilátky a komplexu protilátka-antigen poskytují pohodlné měřítko pevnosti vazby, zvané **rovnovážná konstanta** (K) (obr. 5-26). Rovnovážná konstanta roste s rostoucí pevností vazby mezi dvěma molekulami (díky rostoucímu počtu nekovalentních vazeb), což odráží vzrůst rozdílu volné energie mezi vázaným a volným stavem (obr. 5-26B). Dokonce i změna několika nekovalentních vazeb může mít velký účinek na vazebnou interakci, jak je znázorněno v příkladu na obrázku 5-26C.

Použili jsme případ protilátky vážající se ke svému ligandu, abychom ilustrovali účinek vazebné síly na rovnovážný stav, ale stejná pravidla platí pro všechny proteiny a jejich ligandy. Mnoho proteinů

patří mezi enzymy; to znamená, že se nejprve vážou ke svým ligandům a potom v těchto molekulách přeruší nebo vytvoří kovalentní vazby.

Enzymy jsou mocné a vysoce specifické katalyzátory

Pro mnoho proteinů je vazba k jiné molekule vším, co dělají. Molekula protilátky se potřebuje pouze vázat ke své cílové bakterii či k viru a její funkce je tak splněna; aktinová molekula potřebuje pouze asociovat s jinými aktinovými molekulami a utvořit vlákno. Existují však proteiny, pro které je vazba k ligandu pouze nutným prvním krokem v jejich funkci. To je případ velké a velmi důležité třídy proteinů zvaných **enzymy**. Jak je popsáno v Kapitole 3, enzymy jsou pozoruhodné molekuly, které řídí všechny chemické přeměny probíhající v buňkách. Vážou se k jednomu nebo více ligandům, zvaným **substráty**, a přeměňují je v chemicky modifikované **produkty**. Tuto činnost enzymy neustále opakují s udivující rychlostí. Enzymy urychlují reakce často až milionkrát a více, aniž by se samy měnily. Fungují tedy jako *katalyzátory*, které buňkám umožňují vytvářet či rušit kovalentní vazby podle potřeby. Právě katalýza uspořádaného souboru chemických reakcí enzymy je to, co vytváří a udržuje buňku a umožňuje život.

Enzymy lze roztrždit podle funkce do několika skupin (tabulka 5-2). Každý druh enzymu je vysoce specifický a katalyzuje pouze jediný druh reakce. Tak například *hexokináza* přidává fosforylovou skupinu k D-glukose, ale zcela ignoruje její optický izomer L-glukosu; enzym srážení krve *thrombin* štěpí jeden typ krevního proteinu mezi určitým argininem a sousedním glycinem a nikde jinde, atd. Jak bylo podrobně probráno v kapitolách 3 a 4, pracují enzymy ve skupinách, přičemž produkt jednoho enzymu se stává substrátem enzymu dalšího. Výsledkem je důmyslná síť metabolických drah, která zásobuje buňku energií a vytváří mnoho velkých a malých molekul, které buňka potřebuje (viz obr. 3-2).

Lysozym ilustruje práci enzymu

Abychom si vysvětlili, jak enzymy katalyzují chemické reakce, použijeme jako příklad enzym, který působí jako přírodní antibiotikum ve vaječném bílku, slinách, slzách a ostatních sekretech. Lysozym je enzym, který katalyzuje štěpení polysacharidových řetězců v buněčných stěnách bakterií. Protože je bakteriální stěna díky osmotickým silám vystavena tlaku, způsobí rozštěpení i malého počtu polysacharidových řetězců její prasknutí a rozpad buňky. Lysozym je velmi malý a stálý protein, který lze snadno izolovat ve velkých množstvích. Z tohoto důvodu byl intenzivně studován a stal se prvním enzymem, jehož struktura byla detailně prozkoumána metodami rentgenové krystalografie (panel 5-6, str. 164-165).

Reakce katalyzovaná lysozymem je hydrolýzou: molekula vody se přidává k jediné vazbě mezi dvěma sousedními cukernými skupinami v polysacharidovém řetězci, přičemž způsobí přerušování vazby (viz obr. 3-32). Reakce je energeticky výhodná, neboť volná energie porušeného polysacharidového řetězce je menší než volná energie řetěz-

Otázka 5-5 Protein A se váže k proteinu B za vzniku komplexu AB. Buňka obsahuje rovnovážnou směs proteinu A o koncentraci 1 μM , proteinu B o koncentraci 1 μM a proteinu AB (který vznikl z A a B) také o koncentraci 1 μM .

- S přihlédnutím k obrázku 5-26 vypočítejte rovnovážnou konstantu pro reakci $A + B \rightleftharpoons AB$.
- Jak by vypadala rovnovážná konstanta, pokud by A, B a AB byly v rovnováze přítomny v daleko nižší koncentraci, a to asi 1 nM?
- Kolik dalších vodíkových můstků by bylo zapotřebí k udržení A a B v této malé koncentraci tak, že by se zhruba stejné množství molekul nacházelo v komplexu AB? (Vzpomeňte si, že každý vodíkový můstek přispívá asi 4,2 kJ/mol.)

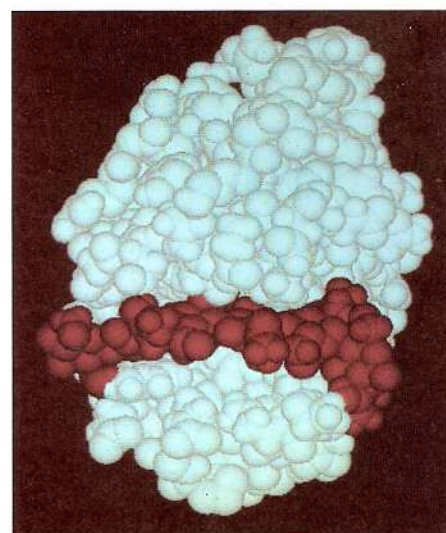
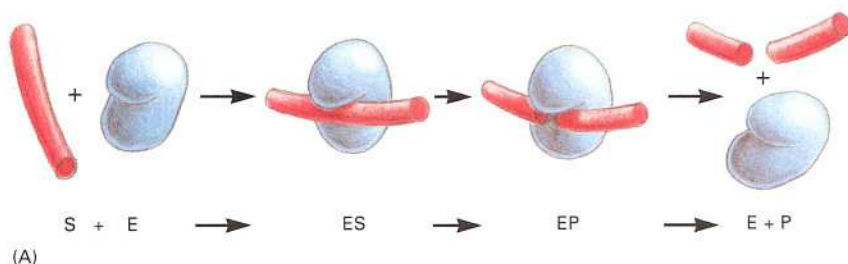
Otázka 5-6 Vysvětlete, jak může enzym (například hexokináza zmíněná v textu) rozlišit substráty (zde D-glukosu) od jejich optických izomerů (zde L-glukosu). (Nápověda: Vzpomeňte si, že atom uhlíku tvoří čtyři jednoduché vazby, které směřují do vrcholů trojbokého jehlanu, a že optické izomery jsou navzájem zrcadlovými obrazy, nakreslete si substrát jako jednoduchý čtyřstěn se čtyřmi různými rohy a potom si nakreslete jeho zrcadlový obraz. S využitím této kresby ukažte, proč se může v načrtnutém aktivním místě enzymu vázat jen jeden optický izomer.)

Tabulka 5-2 Některé běžné typy enzymů

DRUH ENZYMU	KATALYZOVANÁ REAKCE	
HYDROLÁZY	Obecný název pro enzymy, které katalyzují hydrolytické štěpení.	Název enzymů obvykle končí příponou "-áza". Výjimkou jsou některé enzymy jako pepsin, trypsin, thrombin, lysozym a další, které byly objeveny a pojmenovány ještě před obecným přijetím konvence o názvech enzymů na konci 19. století. Obecný název enzymu obvykle udává substrát nebo produkt a reakci, kterou enzym katalyzuje. Například citrát syntáza katalyzuje syntézu citrátu adicí acetylkoenzymu A na oxalacetát
NUKLEÁZY	Odbourávají nukleové kyseliny hydrolýzou vazeb mezi nukleotidy.	
PROTEÁZY	Odbourávají proteiny hydrolýzou vazeb mezi aminokyselinami.	
SYNTÁZY	Obecný název pro enzymy, které syntetizují molekuly v anabolických reakcích, kdy kondenzují dvě malé molekuly.	
IZOMERÁZY	Katalyzují přeskupení vazeb v rámci jedné molekuly.	
POLYMERÁZY	Katalyzují polymerační reakce, například syntézu.	
KINÁZY	Katalyzují připojování fosforylových skupin k molekulám. Proteinové kinasy tvoří důležitou skupinu kinas, které připojují fosforylové skupiny k proteinům.	
FOSFATÁZY	Katalyzují hydrolytické odstranění fosforylové skupiny z molekuly.	
OXIDOREDUKTÁZY	Obecný název pro enzymy, které katalyzují reakce, v nichž se jedna molekula oxiduje, zatímco se jiná redukuje. Enzymy tohoto typu se často nazývají <i>oxidázy</i> , <i>reduktázy</i> a <i>dehydrogenázy</i>	
ADENOSINTRI-FOSFATÁZY	Hydrolyzují ATP. ATPázovou aktivitu spojenou se získáváním energie má jako část své funkce celá řada proteinů, například motorové proteiny jako <i>myosin</i> nebo membránové transportní proteiny jako třeba <i>sodno-draselná pumpa</i> .	

ce neporušeného. Volný čistý polysacharid však může spočívat ve vodě roky bez toho, aby nějakým detegovatelným způsobem hydrolyzoval. Je tomu tak díky energetické bariéře, kterou musí reakce překonat a která se probírala v Kapitole 3 (viz obr. 3-12). Aby narážející molekula vody přerušila vazbu spojující dva cukry, musí být polysacharidová molekula zvláštním způsobem zkroucena – musí se nacházet v **přechodném (tranzitním) stavu**, ve kterém mají atomy kolem vazby změněné uspořádání a elektrony v nich jsou jinak rozděleny. Aby se toho dosáhlo, musí být reakci dodáno velké množství *aktivační energie*. Ve vodném roztoku při pokojové teplotě energie srážek téměř nikdy nepřevyšuje aktivační energii. Proto hydrolyza probíhá velmi pomalu, pokud vůbec probíhá.

V této situaci zasahuje enzym. Jako všechny enzymy má i lysozym na svém povrchu zvláštní vazebné místo, zvané **aktivní místo**, které přesně odpovídá povrchovým obrysům molekuly jeho substrátu. V tomto místě probíhá katalýza chemické reakce. Protože substrátem lysozymu je polymer, představuje aktivní místo lysozymu dlouhý žlábek, který najednou pojme šest spojených cukerných zbytků. Jakmile se polysacharid váže za vzniku komplexu enzym-substrát, rozštěpí enzym vazby v polysacharidu tak, že přidá po jedné molekule vody ke každé vazbě cukr-cukr. Výsledné řetězce jsou potom rychle uvolněny a enzym je připraven k dalším opakováním této reakce (obr. 5-27).



(B)

Obrázek 5-27 Náčrtek reakce katalyzované lysozymem. (A) Schematický pohled na enzym lysozym (označený jako E), který katalyzuje štěpení polysacharidového řetězce, jenž je jeho substrátem (označen jako S). Enzym se nejprve váže k řetězci a vytváří komplex enzym-substrát (ES); poté katalyzuje štěpení specifické kovalentní vazby v kostře polysacharidu a vytváří komplex enzym-produkt (EP), který rychle disociuje. Enzym uvolní řetězec (produkt P) ze svého sevření, a tím může být k dispozici pro další molekulu substrátu. (B) Prostorový model lysozymové molekuly vázané ke krátkému úseku polysacharidového řetězce před štěpením.

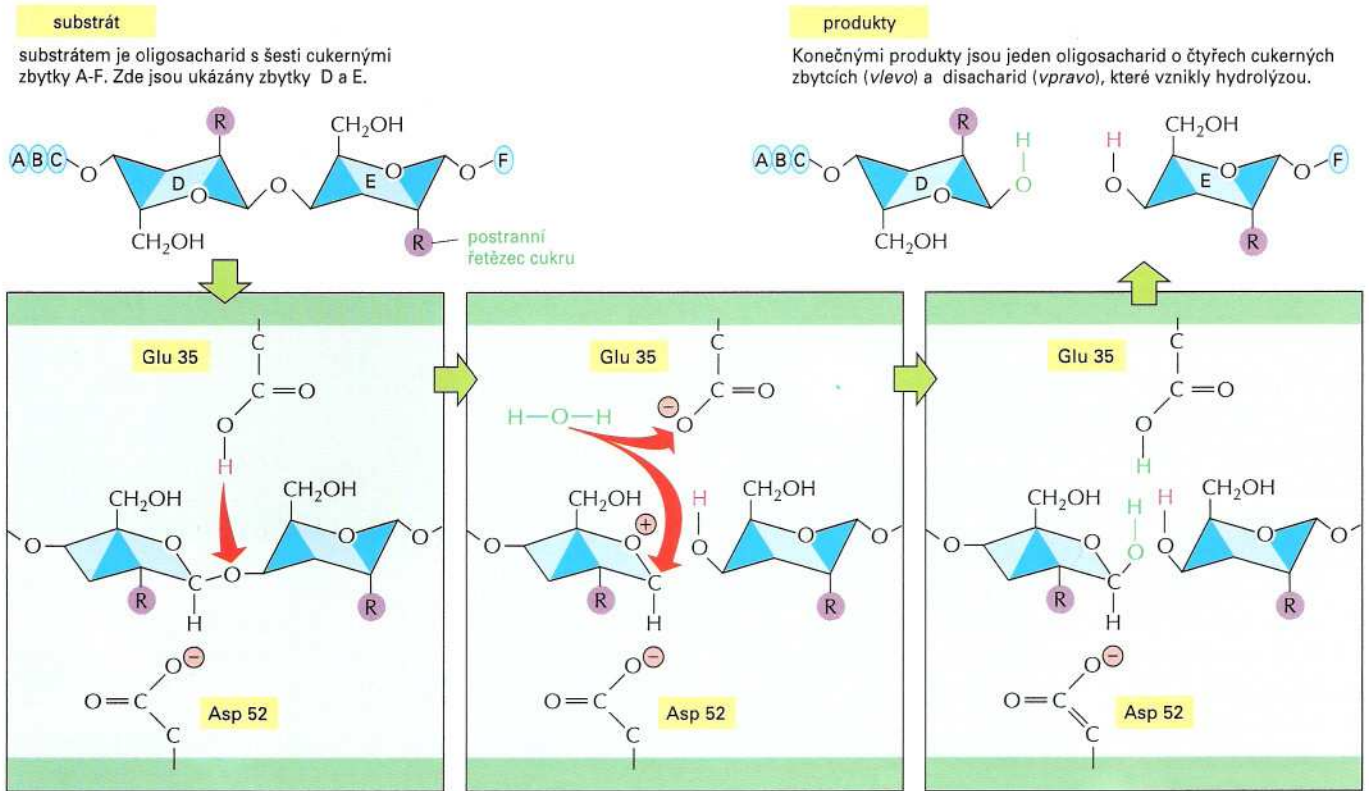
Chemický základ vazby lysozymu k substrátu je stejný jako pro vazbu protilátek - utváření velkého množství nekovalentních vazeb. Lysozym však drží svůj polysacharidový substrát zvláštním způsobem, při němž je jeden ze dvou cukrů, mezi nimiž má být vazba přerušena, zkroucen do stavu, který se liší od jeho normální nejstabilnější konformace. Vazba určená k přerušení je také držena blízko dvou aminokyselin s kyselými postranními řetězci: glutamové kyseliny a kyseliny asparagové v aktivním místě.

V mikroprostředí aktivního místa lysozymu jsou přitom vytvořeny takové podmínky, které značně snižují aktivační energii potřebnou k uskutečnění hydrolýzy. Obrázek 5-28 ukazuje jednotlivé fáze této enzymové reakce. Enzym nejprve vyvolá v substrátu napětí, když ohne některé důležité vazby, které se účastní chemické reakce, takže tvar substrátu značně připomíná vysokoenergetický přechodný stav v polovině reakční dráhy. V druhé části přesně umístěný kyselý postranní řetězec kyseliny glutamové urychlí hydrolýzu tím, že poskytne vysokou koncentraci acidizujících iontů H^+ , i když je pH okolí neutrální. Ve třetí fázi záporně nabitá kyselina glutamová dále stabilizuje kladně nabitý přechodný stav. Celková chemická reakce od počátečního navázání polysacharidu na povrch enzymu až po konečné uvolnění rozštěpených řetězců proto probíhá mnohámiliónkrát rychleji než v nepřítomnosti enzymu.

Podobné mechanismy používají ostatní enzymy ke snížení aktivační energie a k urychlení reakcí, které katalyzují. V reakcích, které zahrnují více než dva reaktanty, působí aktivní místa jako matrice, které posouvají substráty k sobě ve správné orientaci pro reakci, která se má mezi nimi odehrát (obr. 5-29A). Jak jsme viděli u lysozymu, obsahuje aktivní místo enzymu přesně umístěné atomy, které urychlují reakci s použitím nabitých skupin a mění rozdělení elektronů v substrátech (obr. 5-29B). Vazba k enzymu mění také trojrozměrný tvar substrátu, když ohýbá vazby tak, aby substrát maximálně přiblížila specifickému přechodnému stavu (obr. 5-29C). Mnoho enzymů se reakce účastní tak, že na krátkou dobu vytvoří kovalentní vazbu mezi substrátem a postranním řetězcem enzymu. Následující kroky reakce vracejí postranní řetězec do původního stavu, takže enzym zůstává po reakci nezměněn (viz obr. 4-5).

Účinnost enzymu vyjadřují konstanty v_{lim} a K_m

Ably mohly katalyzovat reakci, musí enzymy nejprve navázat své substráty. Substráty potom procházejí reakcí za vzniku molekul produktů, které v počáteční fázi zůstávají vázány k enzymu. Nakonec je produkt uvolněn a vzdálí se, přičemž ponechává enzym volný k vazbě následující molekuly substrátu a katalýze další reakce



V komplexu enzym-substrát (ES) tlačí enzym substrát do napjaté konformace, kdy Glu-35 je v takové poloze, že funguje jako kyselina, která napadá sousední vazbu cukr-cukr tím, že jí předává proton H^+ .

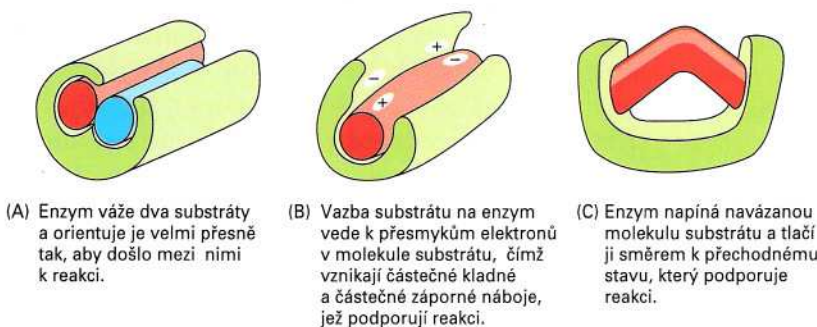
Toto je nestálý přechodový stav, kdy cukr D nese kladný náboj. Napětí na cukru D a nedaleký záporný náboj na Asp-52 meziproduktu stabilizují a výrazně snižují jeho energii na povrchu enzymu.

Rychlá adice vody (zeleně) dokončí hydrolyzu a regeneruje protonovanou formu Glu-35 za tvorby komplexu enzym-produkt (EP).

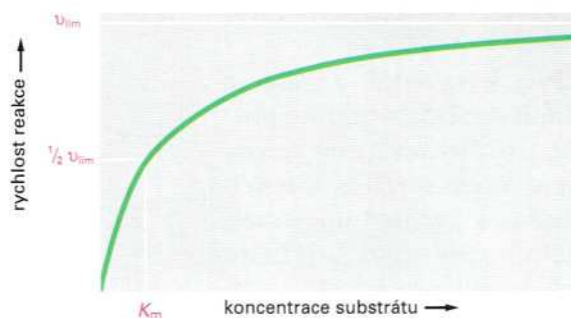
(viz obr. 5-27A). Rychlosti těchto různých kroků se široce mění od enzymu k enzymu a dají se měřit při smíchání vyčištěných enzymů a substrátů v přesně definovaných podmínkách.

Jestliže koncentraci substrátu postupně zvyšujeme z velmi nízké hodnoty, roste zpočátku lineárně koncentrace komplexu enzym-substrát, a tím i rychlost tvorby produktu, a to přímo úměrně ke koncentraci substrátu. Avšak tím, jak je stále více molekul enzymu obsazeno substrátem, tento vzrůst rychlosti vrcholí, až při velmi vysoké koncentraci substrátu dosáhne limitní hodnoty V_{lim} . V tomto bodu jsou všechny enzymové molekuly ve vzorku plně obsazeny substrátem a rychlost tvorby produktu závisí jen na rychlosti zpracování substrátových molekul enzymem. U mnoha enzymů se toto

Obrázek 5-28 Děje v aktivním místě lysozymu. Kresby vlevo a vpravo nahoře ukazují volné molekuly substrátu a produktu, zatímco další tři kresby ukazují tři po sobě následující kroky v aktivním místě enzymu. Všimněte si změny konformace cukru D v komplexu enzym-substrát; tento cukr získává v nestálém přechodném stavu kladný náboj.



Obrázek 5-29 Některé obecné vlastnosti enzymové katalýzy. (A) Udržování substrátů pohromadě v přesném uspořádání. (B) Stabilizace reakčních meziproduktů pomocí náboje. (C) Zvýšení rychlosti vlastní reakce změnou vazebných úhlů v substrátu.



Obrázek 5-30 Enzymová kinetika.

Rychlost enzymové reakce (v) vzrůstá s rostoucí koncentrací substrátu až k mezní (limitní) hodnotě (v_{lim}). V tom okamžiku jsou všechna vazebná místa pro substrát na molekulách enzymu obsazena a rychlost reakce je omezena rychlostí katalytického děje na povrchu enzymu. Pro většinu enzymů je koncentrace substrátu, při níž se dosáhne poloviny mezní reakční rychlosti (K_m) přímým měřítkem pevnosti vazby substrátu k enzymu, přičemž vysoká hodnota K_m odpovídá slabé vazbě.

číslo přeměny pohybuje okolo 1000 molekul substrátu za sekundu, ale jsou známa i čísla přeměny mezi 1 a 10 000.

Koncentrace substrátu potřebná k účinné práci enzymu se často měří odlišným parametrem K_m , zvaným Michaelisova konstanta, což je koncentrace substrátu, při které enzym pracuje na polovinu své limitní rychlosti ($0,5 v_{\text{lim}}$) (obr. 5-30). Obecně platí, že nízká hodnota K_m ukazuje, že substrát se váže k enzymu velmi pevně, a vysoká hodnota K_m odpovídá slabé vazbě.

Pevně vázané malé molekuly přidávají proteinům další funkce

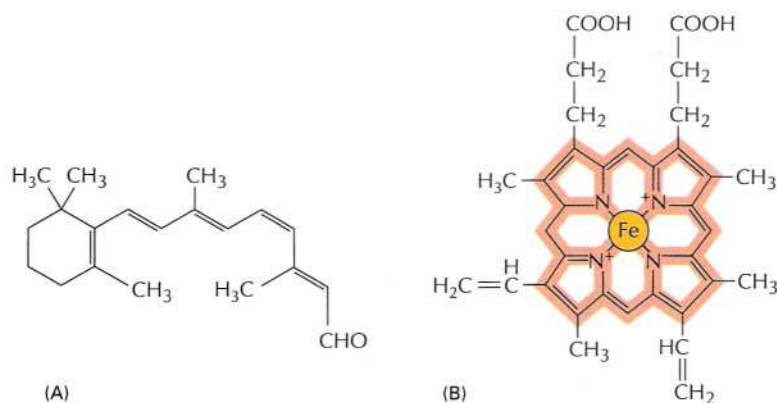
Ačkoli jsme zdůrazňovali různorodost proteinů jako řetězců aminokyselin, které plní různé funkce, v mnoha případech samotné aminokyseliny nestačí. Stejně jako lidé používají různé nástroje, aby zesílili a rozšířili schopnosti svých rukou, používají často proteiny malé nebílkovinné molekuly k výkonu svých funkcí, které by byly obtížné či dokonce neproveditelné s použitím pouhých aminokyselin. Tak signální receptorový protein *rhodopsin*, což je pigment citlivý na světlo, produkovaný tyčinkami v oční sítnici, deteguje světlo s pomocí malé molekuly *retinalu* zanořené do tohoto proteinu (obr. 5-31A). Retinal mění po absorpci fotonu svůj tvar a tato změna je zesílena proteinem, aby spustila kaskádu enzymových reakcí, které nakonec vedou k přenosu elektrického signálu do mozku.

Dalším příkladem proteinu, který obsahuje nebílkovinnou část, je hemoglobin (viz obr. 5-16). Molekula hemoglobinu nese čtyři *hemové* skupiny – kruhové molekuly, z nichž každá obsahuje jeden ústřední atom železa (obr. 5-31B). Hem dodává hemoglobinu a krvi jejich červenou barvu. Vratnou vazbou k plynnému kyslíku přes atom

Otázka 5-7 Křivku z obrázku 5-30 popisuje jednoduchá rovnice:

$$v = v_{\text{lim}} [S/(S+K_m)]$$

Této rovnici se říká rovnice Michaelise a Mentenové podle vědců, kteří ji poprvé použili k popisu enzymových reakcí. Můžete se sami přesvědčit, že vlastnosti popsané kvalitativně v učebnici jsou přesně reprezentovány touto rovnicí? Zvláště se zamyslete nad možným zjednodušením rovnice, pokud je (A) koncentrace substrátu S mnohem nižší než K_m , (B) koncentrace substrátu S rovna K_m a (C) koncentrace substrátu S mnohem vyšší než K_m .



Obrázek 5-31 Retinal a hem. (A) Struktura retinalu, světlocitlivé molekuly připojené k rhodopsinu v oční sítnici. (B) Struktura hemové skupiny: uhlíkatý hemový kruh je zde nakreslen červeně a atom železa v jeho centru oranžově. Hemová skupina je vázána v každém ze čtyř polypeptidových řetězců v hemoglobinu – proteinu, který přenáší kyslík a jehož strukturu jsme viděli na obrázku 5-16.

železa hem umožňuje hemoglobinu vázat kyslík v plicích a uvolňovat ho v tkáních.

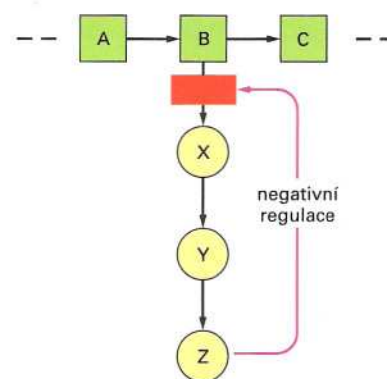
Někdy jsou tyto malé molekuly spojeny kovalentně a stále se svým proteinem, přičemž se stávají nedílnou součástí samotné proteinové molekuly. V Kapitole 11 uvidíme, že proteiny jsou někdy zakotveny v membránách pomocí kovalentně vázaných lipidových molekul. A membránové proteiny vystavené na povrchu buňky, stejně jako proteiny vylučované do extracelulárního prostředí, jsou často modifikovány kovalentním připojením cukrů a oligosacharidů.

Často je s aktivním místem enzymu pevně spojena malá molekula nebo atom kovu, který enzymu pomáhá v jeho katalytické funkci. Například *karboxypeptidáza*, enzym štěpící polypeptidové řetězce, nese ve svém aktivním místě pevně vázaný zinečnatý ion. Když karboxypeptidáza štěpí peptidovou vazbu, zinečnatý ion utváří přechodnou vazbu s jedním atomem substrátu, a tak napomáhá hydrolytické reakci. V jiných enzymech slouží k podobným účelům malá organická molekula. Příkladem je *biotin*, který se nachází v enzymech přenášejících karboxylovou skupinu (-COOH) z jedné molekuly na druhou (viz obr. 3-31). Biotin se této reakce účastní tvorbou kovalentní vazby ke skupině -COOH, která se má přenést, protože se pro tuto úlohu hodí mnohem lépe než kterákoli z aminokyselin používaných k výstavbě proteinů. Protože ho člověk nemůže syntetizovat a musí ho přijímat v malých množstvích v potravě, je biotin *vitaminem*. Další vitaminy jsou podobně potřebné k vytváření malých molekul, které jsou nezbytnými složkami našich proteinů. Například vitamin A je v potravě potřebný k produkci retinalu, světlocitlivé součásti rhodopsinu.

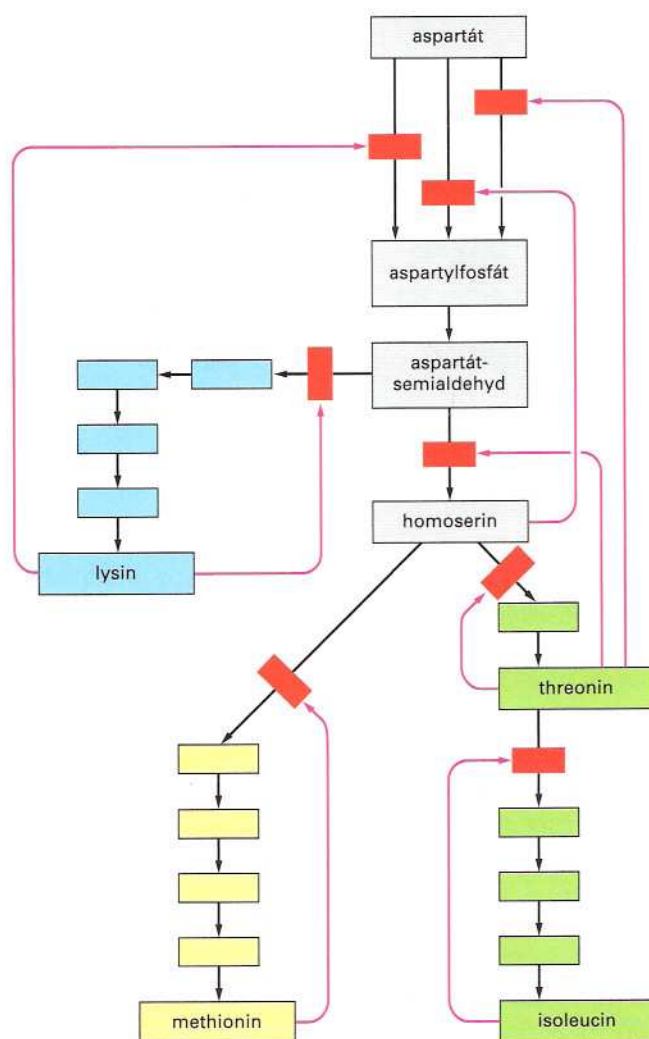
Katalytická aktivita enzymů je regulována

Živá buňka obsahuje tisíce enzymů, z nichž mnohé fungují ve stejné době v téměř malém objemu cytosolu. Svou katalýzou enzymy vytvářejí složitou síť metabolických drah, z nichž každá je složena z řetězce chemických reakcí, v nichž se produkt jednoho enzymu stává substrátem pro enzym další. V tomto labyrintu drah existuje mnoho rozvětvení, kde různé enzymy soutěží o tentýž substrát. Tento systém je tak složitý (viz obr. 3-2), že je zapotřebí řady kontrolních mechanismů, které určují, kdy a jak rychle bude každá reakce probíhat.

Regulace se odehrává na mnoha úrovních. Na jedné úrovni buňka reguluje množství vytvořených molekul enzymu regulací exprese genu, který tento enzym kóduje (probírá se v Kapitole 8). Na jiné úrovni buňka řídí enzymovou aktivitu umístěním souborů enzymů do různých oddílů, které jsou uzavřeny do odlišných membrán (probírá se v kapitolách 13 a 14). Nejrychlejším a nejrozšířenějším procesem, který vyladí reakci, je vazba jiné než substrátové molekuly k enzymu – do nějakého speciálního regulačního místa mimo aktivní místo, čímž se změní rychlost, jakou enzym mění své substráty na produkty. Při **zpětnovazebné inhibici** je enzym působící v prvních krocích reakční dráhy inhibován pozdějším produktem téže dráhy. Kdykoli se tedy začnou hromadit velká množství konečného produktu, váže se tento produkt na první enzym a zpomaluje jeho katalytickou činnost. Tím omezuje další vstup substrátu do této reakční dráhy (obr. 5-32). Křížovatky a rozvětvení jsou obvykle více-



Obrázek 5-32 Zpětnovazebná inhibice jedině biosyntetické dráhy. Konečný produkt Z inhibuje první enzym, který ho jako jediný syntetizuje, a tak reguluje svou vlastní koncentraci v buňce. To je příkladem negativní regulace.



Obrázek 5-33 Násobná zpětnovazebná **inhibice**. V tomto příkladu, který ukazuje biosyntetické dráhy pro čtyři různé aminokyseliny v bakteriích, značí červené šipky polohy, v kterých produkty provádějí zpětnovazebnou inhibici enzymů. Každá aminokyselina reguluje první enzym, který je specifický pro její vlastní syntézu, a tím reguluje svou vlastní koncentraci a vyhýbá se zbytečné tvorbě meziproduktů. Produkty mohou také odděleně inhibovat počáteční sled reakcí společný pro všechny syntézy; v tomto případě tři různé enzymy katalyzují počáteční reakci a každý z nich je inhibován jiným produktem.

násobně regulovány různými konečnými produkty, z nichž každý se snaží regulovat svou vlastní syntézu (obr. 5-33). Zpětnovazebná inhibice může fungovat téměř okamžitě a je vratná.

Zpětnovazebná inhibice je příkladem *záporné regulace*: brání enzymu v činnosti. Enzymy mohou být také podřízeny *kladné regulaci*, ve které je enzymová aktivita spíše stimulována regulační molekulou než vypínána. Kladná regulace se vyskytuje v situacích, kdy produkt v jedné větvi metabolického bludiště stimuluje aktivitu enzymu v jiné dráze. Příkladem je hromadění ADP, které aktivuje několik enzymů zapojených do oxidace molekul cukru, a tak stimuluje buňku k převedení více ADP na ATP.

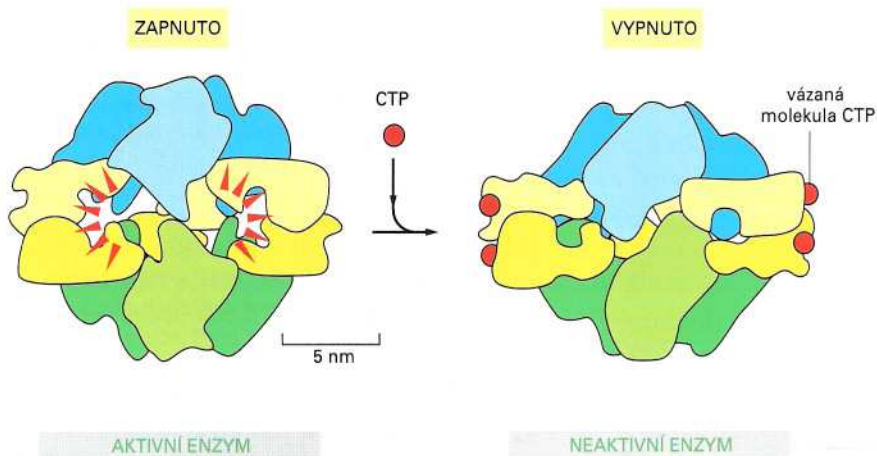
Allosterické enzymy mají dvě vazebná místa, která interagují

Základní vlastností zpětnovazebné inhibice, která byla pro její objevitele záhadou, je to, že regulační molekula má často zcela jiný tvar než substrát enzymu. Když byla tato forma regulace v 60. letech objevena, byla nazvána *allosterie* (z řeckého *allos* = jiný a *stereos* = tuhý či podoba). S dalším poznáváním zpětnovazebné inhibice se zjistilo, že mnoho enzymů musí mít na svém povrchu nejméně dvě vazebná

Otázka 5-8 Zamyslete se nad obrázkem 5-32. Co se stane, když místo uvedené zpětné vazby

- zpětnovazebná inhibice z bodu Z ovlivní jen krok $B \rightarrow C$?
- zpětnovazebná inhibice z bodu Z ovlivní jen krok $Y \rightarrow Z$?
- Z je pozitivním regulátorem kroku $B \rightarrow X$?
- Z je pozitivním regulátorem kroku $B \rightarrow C$?

U každého případu proberte, nakolik užitečná by tato regulační schémata byla pro buňku.



Obrázek 5-34 Konformační změna vyvolaná zpětnovazebnou inhibicí. Enzymem používaným v prvních studiích allosterických regulací byla aspartáttranskarbamoyláza z *E. coli*. Tento velký enzym složený z mnoha podjednotek (viz obr. 5-17) katalyzuje důležitou reakci, která začíná syntézu pyrimidinových kruhů nukleotidů C, U a T. Jeden z posledních produktů v této dráze, cytidintrifosfát (CTP), se váže k enzymu a vypíná ho, když je CTP dostatek. Tento diagram ukazuje konformační změnu, ke které dochází, když je enzym odpojen vazbou CTP.

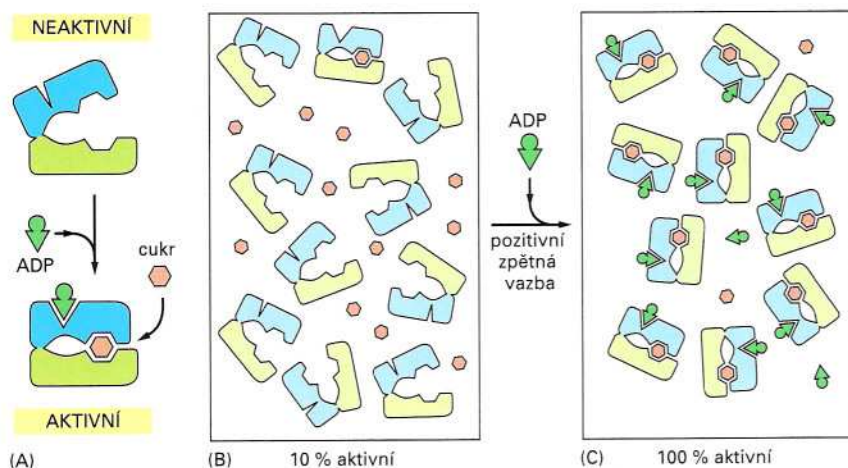
místa: aktivní místo, které rozpoznává substrát, a druhé místo, které rozpoznává regulační molekulu. Tato dvě místa musí „komunikovat“ způsobem, který umožňuje ovlivňování katalytických dějů v aktivním místě navázáním regulační molekuly v jejím odděleném místě na povrchu enzymu.

Nyní je známo, že interakce mezi oddělenými místy na proteinové molekule závisí na *konformační změně* proteinu: vazba v jednom místě způsobí malou změnu způsobu složení proteinu. Mnoho enzymů má dvě konformace, které se liší aktivitou, přičemž každou z nich stabilizuje vazba s jinými ligandy. Během zpětnovazebné inhibice například vazba inhibitoru na jednom místě v proteinu vyvolá změnu proteinové konformace, při které je aktivní místo, nacházející se jinde v proteinu, vyřazeno z funkce (obr. 5-34).

Mnoho proteinových molekul, pokud ne všechny, je **allosterických**: mohou nabývat dvou nebo více nepatrně odlišných konformací a jejich aktivita se může měnit při přechodu z jedné konformace do druhé. To platí nejen pro enzymy, ale také pro mnoho ostatních proteinů, včetně receptorů, strukturních proteinů a proteinových motorů. Protože se každá konformace bude vyznačovat poněkud jinými povrchovými obrysy, může se vazebné místo pro jeden nebo více ligandů snadno měnit. Specifický ligand bude upřednostňovat konformaci, která ho váže nejsilněji, a v dostatečně vysoké koncentraci může „přepnout“ protein z jedné konformace do druhé (obr. 5-35).

Konformační změna může být vyvolána fosforylací proteinu

Právě jsme viděli, že funkce mnoha allosterických proteinů je regulována navázáním malé molekuly. Druhou možností, kterou eukaryotní buňky hojně využívají k regulaci funkce proteinů, je kovalentní navázání fosforylové skupiny k postrannímu řetězci některé z aminokyselin proteinu. Protože každá fosforylová skupina nese dva negativní náboje, může enzymově katalyzovaná adice fosforylové skupiny k proteinu vyvolat značné konformační změny, například tím, že přitahuje shluk kladně nabitých postranních řetězců aminokyselin. Odstranění fosforylové skupiny druhým enzymem vrací protein do jeho původní konformace a obnovuje jeho původní aktivitu.



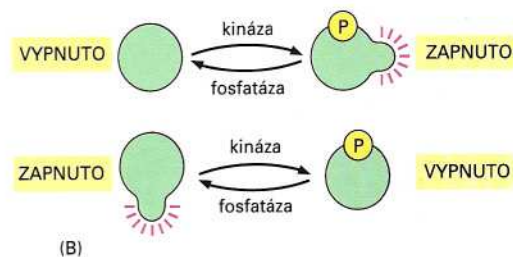
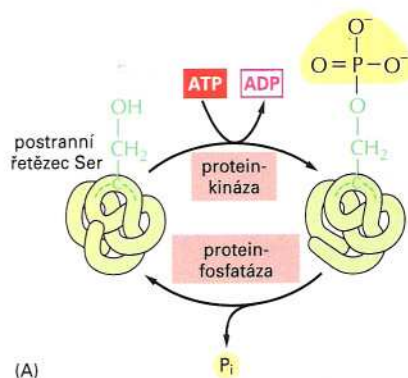
Obrázek 5-35 Jak je rovnováha mezi dvěma konformacemi proteinu ovlivněna navázáním ligandu. Tento schematický diagram ukazuje hypotetický enzym, ve kterém vzrůst koncentrace molekul ADP (červené klíny) působí vzrůst rychlosti oxidace cukerných molekul (červené šestiúhelníky). (A) Tento hypotetický enzym je allostericky regulován. Mohl by například katalyzovat krok limitující rychlost v glykolýze nebo v citrátovém cyklu, neboť akumulace ADP zpětně ovlivní tyto enzymy a přiměje je urychlit odbourání cukrů; tím vzroste produkce ATP z ADP. (B) Není-li přítomen ADP, nabude jen malý podíl molekul spontánně aktivní (uzavřené) konformace; většina zůstane v inaktivní (otevřené) konformaci. (C) Protože se ADP může vázat jen k proteinu v jeho uzavřené konformaci, snižuje přidání ADP energii uzavřené konformace, čímž způsobí přepnutí téměř všech molekul enzymu do aktivní formy.

Tato vratná **fosforylace proteinu** reguluje aktivitu mnoha různých typů proteinů v eukaryontních buňkách; z přibližně 10 000 proteinů v typické savčí buňce je podle všeho více než třetina někdy fosforylována. Adice fosforylových skupin a jejich odstranění ze specifických proteinů je často odpovědí na signály, které charakterizují nějakou změnu stavu buňky. Tímto způsobem je například načasován komplikovaný sled událostí spojených s dělením eukaryontní buňky (Kapitola 18), a mnoho signálů vytvářených hormony a nervovými mediátory se přenáší z plasmatické membrány do jádra kaskádou fosforylačních reakcí v molekulách různých proteinů (Kapitola 15).

Fosforylace proteinů zahrnuje enzymově katalyzovaný přenos koncové fosforylové skupiny ATP na hydroxylovou skupinu v postranním řetězci serinu, threoninu nebo tyrosinu v proteinu. Tuto reakci katalyzuje **proteinkináza**, zatímco opačnou reakci, tedy odstranění fosforylové skupiny neboli *defosforylaci*, katalyzuje **proteinfosfatáza** (obr. 5-36). Buňka obsahuje stovky různých proteinkináz, z nichž každá zodpovídá za fosforylaci určitého proteinu nebo skupiny proteinů. Existuje také mnoho různých proteinfosfatáz; některé z nich jsou vysoce specifické a odstraňují fosforylové skupiny jen z jednoho nebo několika málo proteinů, jiné působí v široké proteinové oblasti. Stav momentální fosforylace proteinu, a tím i jeho aktivity, závisí na poměru aktivit proteinových kináz a fosfatáz, které na tuto molekulu působí.

U mnoha proteinů se fosforylová skupina neustále přidává k určitému postrannímu řetězci a poté se odstraňuje. Fosforylační

Obrázek 5-36 Fosforylace proteinu. Mnoho tisíc proteinů v typické eukaryontní buňce je modifikováno kovalentní adicí fosforylové skupiny. (A) Obecná reakce na tomto obrázku ukazuje přenos fosforylové skupiny z ATP na postranní řetězec aminokyseliny v cílovém proteinu proteinkinázou. Odstranění fosforylové skupiny katalyzuje druhý enzym, proteinfosfatáza. V tomto příkladu se fosforyl přidává k postrannímu řetězci serinu; v jiných případech se fosforyl připojí ke skupině -OH proteinového threoninu nebo tyrosinu. (B) Fosforylace proteinu proteinkinázou může buď zvýšit nebo snížit aktivitu proteinu v závislosti na místě fosforylace a na struktuře proteinu.



cykly tohoto druhu umožňují proteinům rychlé přepínání z jednoho stavu do druhého, neboť čím rychleji se cyklus „otáčí“, tím rychleji se může měnit koncentrace fosforylovaného proteinu v odpověď na náhlý podnět, který mění jeho fosforylační poměr. Energie k pohonu tohoto cyklu pochází z volné energie hydrolýzy ATP, jehož jedna molekula se spotřebuje při každé otáčce cyklu.

Proteiny vázající GTP mohou podstupovat rozsáhlé konformační změny

Ztráta fosforylové skupiny vede také k rozsáhlým konformačním změnám u významné třídy intracelulárních proteinů – u **proteinů vázajících GTP**. Aktivita těchto proteinů je regulována navázáním nukleotidu: buď guanosintrifosfátu (GTP) nebo guanosindifosfátu (GDP). Obecně je u takových proteinů aktivní konformace s navázaným GTP; protein sám potom hydrolyzuje tento GTP na GDP a fosfát a přechází do inaktivní konformace. Aktivní konformace se znovu dosáhne oddělením GDP a následným připojením další molekuly GTP (obr. 5-37).

Velká skupina těchto proteinů vázajících GTP funguje v buňkách jako molekulární přepínače. Uvolnění GDP a jeho nahrazení GTP, které molekulu „zapne“, je často odpovědí na vnější signál, který buňka přijala. Proteiny vázající GTP se často vážou k jiným proteinyvým molekulám, aby regulovaly aktivitu enzymů. Jejich klíčovou roli ve vnitrobuněčných signalizačních drahách probereme v Kapitole 15. Na tomto místě se podíváme na obecný mechanismus jejich fungování u bakteriálního elongačního faktoru EF-Tu, malého GTP-vázajícího proteinu, který pomáhá při vazbě molekul tRNA na ribosomy během syntézy proteinu.

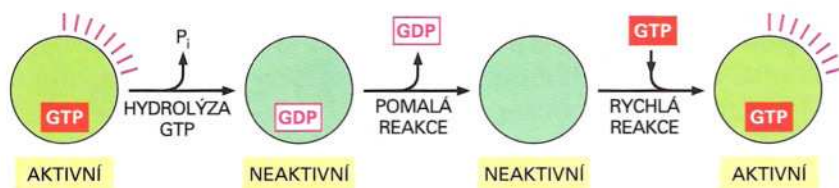
Rozbor trojrozměrné struktury EF-Tu prozradil, jak může allosterický přechod vyvolaný připojením či ztrátou fosforylové skupiny na navázaném guaninovém nukleotidu způsobit značnou změnu tvaru proteinu vázajícího GTP. Obrázek 5-38 ukazuje, jak je ztráta jediné fosforylové skupiny, která na počátku způsobila jen nepatrný pohyb asi o 0,1 nm ve vazebném místě, proteinem zesílena a vytváří pohyb asi 50krát větší. Významné konformační změny tohoto typu jsou také základem pro skutečně velké pohyby, vytvářené proteiny, které probereme v následující části.

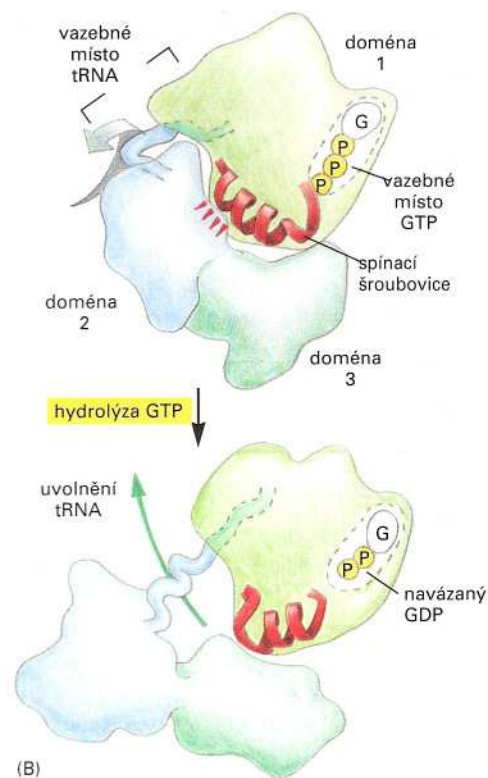
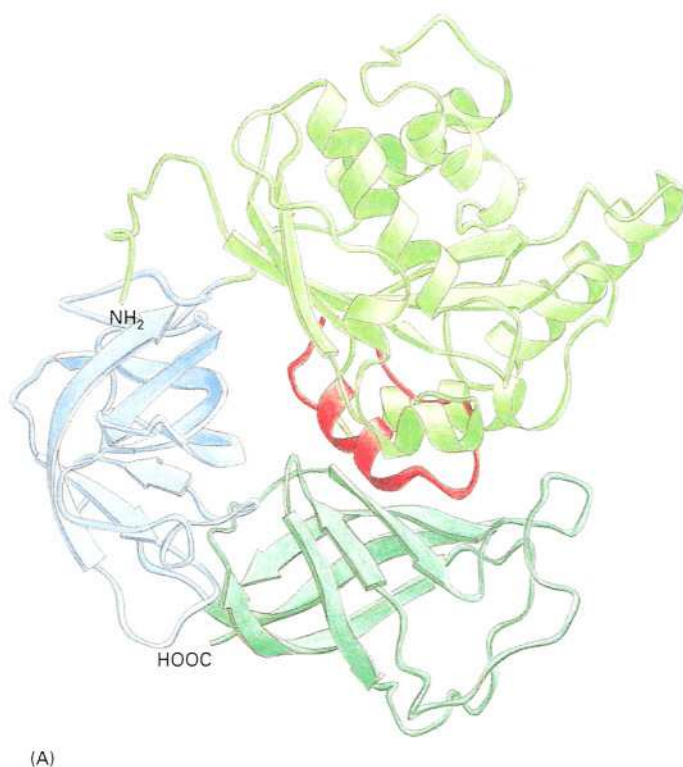
Otázka 5-9 Vysvětlete, jak lze fosforylaci nebo navázání nukleotidu využít k regulaci proteinové aktivity. V čem vidíte výhody každé z obou forem regulace?

Motorové proteiny generují rozsáhlé pohyby v buňce

Viděli jsme, jak konformační změny v proteinech hrají ústřední roli v regulaci enzymů a při buněčné signalizaci. Nyní probereme, jak tyto změny umožňují proteinům, jejichž hlavní funkcí je pohybovat jinými molekulami (**motorovým proteinům**), vytvářet síly zodpověd-

Obrázek 5-37 Proteiny vázající GTP tvoří molekulární přepínače. Aktivita proteinů vázajících GTP obecně vyžaduje přítomnost pevně vázané molekuly GTP („zapnuto“). Hydrolýzou této molekuly GTP vzniká GDP a anorganický fosfát (P_i), a protein zaujme jinou, neaktivní konformaci („vypnuto“). Jak je zde ukázáno, znovunastavení přepínače vyžaduje uvolnění vázaného GDP. To je pomalý krok, který může být značně zrychlen specifickými signály. Jakmile se GDP uvolní, rychle se znovu naváže molekula GTP.





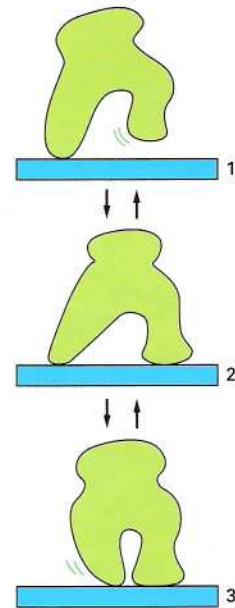
né za svalový stah a za rozsáhlé pohyby buněk. Motorové proteiny také pohánějí menší intracelulární pohyby: pomáhají pohybovat chromosomy k opačným koncům buňky během mitózy (Kapitola 17), posouvají orgány po molekulárních „kolejích“ uvnitř buňky (Kapitola 16) a pohybují enzymy podél vlákna DNA během syntézy nové molekuly DNA (Kapitola 6). Pochopení funkce těchto proteinů jako molekul s pohyblivými částmi je proto nezbytné pro porozumění molekulárnímu základu chování buněk.

Jak se konformačních změn proteinů využívá k vytváření pravidelných pohybů v buňce? Pokud například od proteinu požadujeme, aby se pohyboval podél úzkého vlákna, jakým je třeba molekula DNA, protein se tohoto úkolu může zhostit pomocí řady konformačních změn, jak nám ukazuje obrázek 5-39. Pokud však tyto změny nic nenutí probíhat v pravidelném pořadí, jsou dokonale vratné a protein se náhodně potuluje podél vlákna tam a zpět. Protože při pohybu určitým směrem koná protein práci, je podle zákonů termodynamiky (viz Kapitolu 3) nutné využít k tomuto pohybu volnou energii z nějakého jiného zdroje (jinak by bylo možné protein používat jako *perpetuum mobile* – stroj věčného pohybu). Proto bez vnějšího zdroje energie může protein vykonávat jen náhodné pohyby.

Jak se tedy dají konformační změny přimět k průběhu jen v jednom směru? K zajištění jednosměrného průběhu celého cyklu stačí provádět alespoň jednu konformační změnu nevratným způsobem. U většiny proteinů, které jsou schopny jednosměrné „chůze“ na dlouhé vzdálenosti, se toho dosahuje spřažením jedné z konformačních změn s hydrolyzou molekuly ATP vázané na protein. Tento mechanismus se podobá právě probranému ději, při kterém jsou allosterické prostorové změny řízeny hydrolyzou GTP. Protože se při hydrolyze ATP (nebo GTP) uvolňuje velké množství volné energie, je

Obrázek 5-38 Velká konformační změna je odpovědí na hydrolyzu nukleotidů. (A) Elongační faktor EF-Tu. (B) Hydrolyza navázaného GTP v EF-Tu vyvolá jen nepatrnou změnu polohy aminokyselin ve vazebném místě pro nukleotidy (posun jen o několik průměrů vodíkového atomu). Tato malá změna je však zvětšena konformačními změnami uvnitř proteinu a vede k mnohem většímu pohybu. Hydrolyza GTP uvolní intramolekulární vazbu jako „západka“ (červené čárky v horním diagramu). To umožní doménám 2 a 3 volně otáčení a rotaci přibližně o 90° směrem k čtenáři. Výsledkem je velká změna tvaru, která umožní uvolnit tRNA, kterou protein pevně držel, a pokračovat v syntéze proteinu na ribosomu.

Obrázek 5-39 Allosterický „kráčejší“ protein. Ačkoli mu jeho tři různé konformace umožňují náhodný pohyb po vlákně, ke kterému je poután, nemůže se tento protein pohybovat spořádaně jedním směrem.

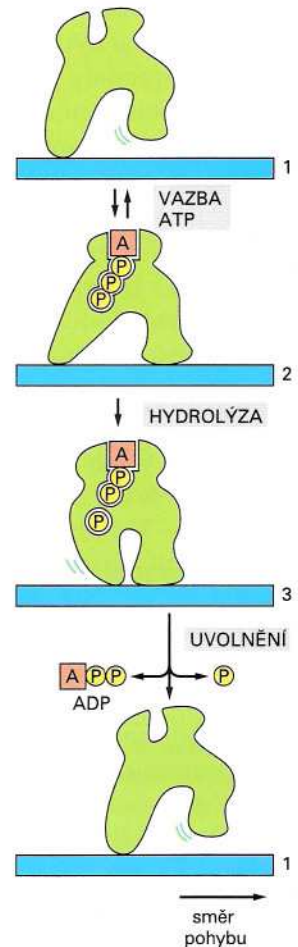


velmi nepravděpodobné, že by protein s navázaným nukleotidem podstoupil opačnou konformační změnu nutnou pro pohyb zpět, neboť by k tomu potřeboval také obrátit směr hydrolyzy ATP a zajistit jeho tvorbu z molekul fosfátu a ADP.

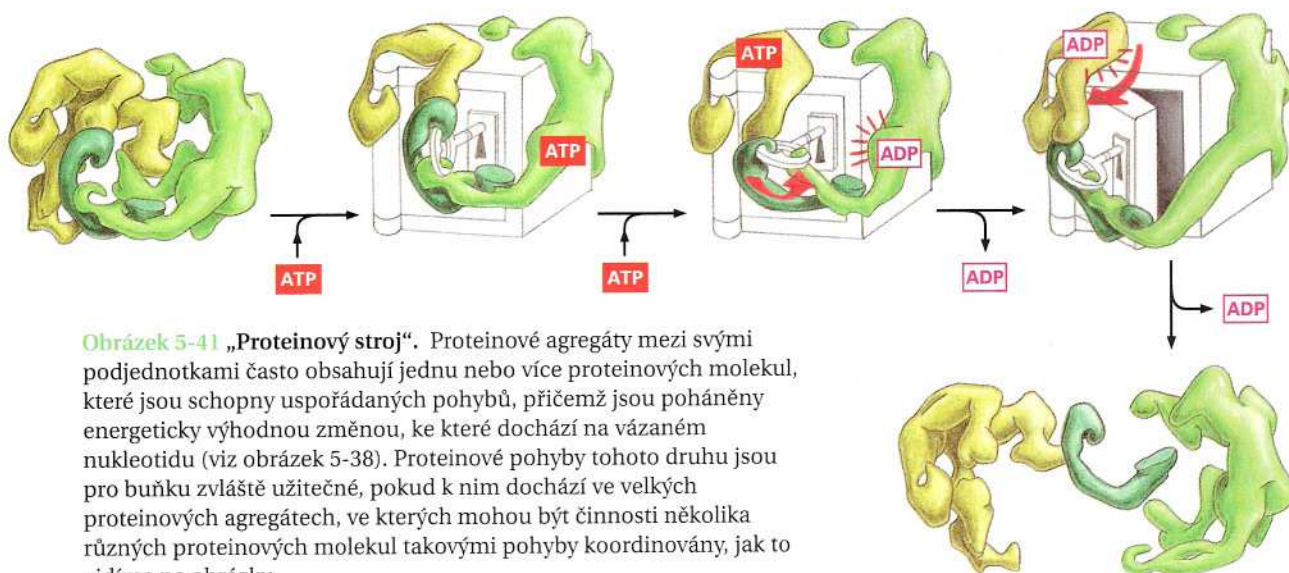
Ve značně zjednodušeném modelu na obrázku 5-40 se motorový protein při navázání přepne z konformace 1 do konformace 2. Navázaný ATP je potom hydrolyzován za vzniku ADP a anorganického fosfátu (P_i), což vyvolá změnu z konformace 2 na konformaci 3. Nakonec uvolnění navázaných molekul ADP a P_i vrátí protein zpět do konformace 1. Protože přechod 2→3 je poháněn energií uvolněnou při hydrolyze ATP, je tento sled konformačních změn prakticky nevratný. Celý cyklus tedy bude probíhat jen v jednom směru, a tak přiměje molekulu proteinu v našem příkladu k plynulé „chůzi“ směrem doprava. Tímto obecným způsobem vytváří směrový pohyb mnoho motorových proteinů včetně svalového proteinu *myosinu*, který „běží“ podél aktinových filament, aby tak generoval svalový tah (Kapitola 16), a *kinesinu* - proteinu, který se podílí na pohybu chromosomů při mitóze (Kapitola 17). Takové pohyby mohou být značně rychlé: některé z motorových proteinů zahrnutých v replikaci DNA se pohybují podél vlákna DNA rychlostí až 1000 nukleotidů za sekundu.

Proteiny často vytvářejí velké komplexy, které fungují jako proteinové stroje

Jak pokračujeme od malých proteinů tvořených jedinou doménou k velkým proteinům složeným z mnoha podjednotek, jsou funkce těchto molekul stále důmyslnější. Nejzajímavější úkoly však plní velké proteinové útvary složené z mnoha proteinových molekul. Nyní, když je možné rekonstruovat biologické děje v bezbuněčném prostředí v laboratoři, je jasné, že každý ústřední děj v buňce, jako např. replikace DNA, syntéza proteinů, pučení vajíček či signalizace přes membránu, je katalyzován vysoce uspořádanou soustavou deseti či více vzájemně spojených proteinů. V takových **proteinových strojích** pohání hydrolyza vázaných nukleosidtrifosfátů (ATP nebo GTP) uspořádaný sled konformačních změn v některých z jednotlivých proteinových podjednotek, a tak umožňuje souboru proteinů koordinovaný pohyb. Tímto způsobem mohou být enzymy dopravovány přímo do míst, kde jsou zapotřebí k provedení další ze sledu reakcí. Příkladem je syntéza proteinu na ribosomu (Kapitola 7) nebo replikace DNA, kde se velký multiproteinový komplex rychle pohybuje podél DNA. Jednoduchá mechanická analogie je znázorněna na obrázku 5-41.



Obrázek 5-40 Allosterický motorový protein. Pravidelné přecházení od jedné konformace ke druhé a potom ke třetí je poháněno hydrolyzou navázané molekuly ATP. Protože je jeden z těchto přechodů spážen s hydrolyzou ATP, je celý cyklus ve své podstatě nevratný. Opakováním cyklu se protein stále pohybuje po vlákně směrem doprava.



Obrázek 5-41 „Proteinový stroj“. Proteinové agregáty mezi svými podjednotkami často obsahují jednu nebo více proteinových molekul, které jsou schopny uspořádaných pohybů, přičemž jsou poháněny energeticky výhodnou změnou, ke které dochází na vázaném nukleotidu (viz obrázek 5-38). Proteinové pohyby tohoto druhu jsou pro buňku zvláště užitečné, pokud k nim dochází ve velkých proteinových agregátech, ve kterých mohou být činnosti několika různých proteinových molekul takovými pohyby koordinovány, jak to vidíme na obrázku.

Buňky vyvinuly proteinové stroje ze stejného důvodu, z jakého lidé vyvinuli mechanické a elektronické stroje: aby zastaly téměř každou práci. Úkony, které jsou prostorově a časově sladěny v propojených dějích, jsou mnohem účinnější, než při pouhém používání jednoho nástroje za druhým.

Otázka 5-10 Vysvětlete, proč mají enzymy na obrázku velkou výhodu v tom, že na otevření trezoru pracují společně, místo aby jeden za druhým každý provedl svůj díl práce.

Základní shrnutí

- Živé buňky obsahují nesmírně rozmanitý soubor proteinových molekul, z nichž každá je tvořena lineárním řetězcem vzájemně spojených aminokyselin.
- Každý typ proteinu má jedinečné pořadí aminokyselin, které určuje jeho trojrozměrnou strukturu a biologickou aktivitu.
- Svinutá struktura proteinu je stabilizována nekvalentními interakcemi mezi různými částmi polypeptidového řetězce.
- Vodíkové vazby mezi sousedními oblastmi polypeptidové kostry mohou dát vznik pravidelným strukturním typům, jako jsou α -šroubovice a β -listy.
- Strukturu mnoha proteinů lze dále dělit na malé globulární oblasti s kompaktní trojrozměrnou strukturou, známé jako proteinové domény.
- Biologická funkce proteinu závisí na detailních chemických vlastnostech jeho povrchu a na způsobu jeho vazby k jiným molekulám zvaným ligandy.
- Enzymy jsou proteiny, které se nejprve pevně vážou k jiným molekulám, zvaným substráty, a poté katalyzují vytváření či štěpení kovalentních vazeb v těchto molekulách.
- V aktivním místě enzymu zaujímají postranní řetězce aminokyselin složeného proteinu přesnou polohu, takže mohou podpořit vznik vysokoenergetického přechodného stavu, do kterého se musí substráty dostat, aby mohly reagovat.
- Trojrozměrná struktura mnoha proteinů se vyvinula tak, že navázání malé molekuly může vyvolat významnou změnu ve tvaru proteinu.
- Mnohé enzymy jsou allosterické proteiny, které mohou existovat ve dvou konformacích lišících se svou katalytickou aktivitou. Takové enzymy mohou být „zapnuty“ nebo „vypnuty“ navázáním ligandu, který se váže k určitým regulačním místům a stabilizuje tak aktivní nebo neaktivní konformaci.
- Aktivita většiny enzymů v buňce je přísně regulována. Jedním z nejběžnějších způsobů regulace je inhibice zpětnou vazbou, při které je enzym v metabolické dráze inhibován vazbou k některému z konečných produktů této dráhy.
- Mnoho tisíc proteinů v typické eukaryotní buňce je regulováno buď v cyklu fosforylace a defosforylace nebo navázáním a hydrolýzou GTP s pomocí partnerského proteinu vázajícího GTP.

- Hydrolýza ATP na ADP motorovými proteiny generuje v buňce směrové pohyby.

Edited by Foxit PDF Editor

Copyright (c) by Foxit Software Company, 2004
For Evaluation Only.

řeny sou-
u konfor-
mační změny sladěny k plnění složitých buněč-
ných funkcí.

Klíčová slova

α -šroubovice, α -helix	disulfidový můstek	obrat	rovnováha
β -list	enzym	podjednotka	rovnovážná konstanta
aktivní místo	fibrilární protein	polypeptidová kostra	sekundární struktura
allosterický	fosforylace proteinu	postranní řetězec	substrát
aminokyselinová sekvence	globulární protein	protein	svinuté klubko
antigen	helix	protein vázající GTP	šroubovice
číslo přeměny	K_m	proteinová doména	tranzitní (přechodový) stav
	konformace	proteinfosfatáza	vazebné místo
	ligand	proteinkináza	zpětnovazebná inhibice
	motorový protein	protilátka	v_{lim}

6 DNA

Život závisí na schopnosti buněk uchovávat, třídit a překládat genetickou informaci, která je potřebná k vytvoření a udržení živého organismu. Při buněčném dělení přechází tato *dědičná* informace z mateřské buňky do dceřiné a u organismů je přenášena z generace na generaci pohlavními buňkami (gametami). Tato informace je uložena v každé živé buňce v podobě genů – základních jednotek, které určují vlastnosti jak jednotlivce, tak celého druhu.

Od počátku dvacátého století, kdy vznikla genetika jako věda, se vědci ptají, z jakého materiálu jsou geny vytvořeny. V průběhu života organismu je genetická informace milionkrát kopírována a přenášena z buňky do buňky bez zásadních změn. Co by to mohlo být za molekulu, která by byla schopná takového přesného a téměř neomezeného kopírování a zároveň by mohla řídit vývoj organismu i každodenní život buňky? Jaký druh instrukcí genetická informace obsahuje? Jak jsou tyto instrukce fyzicky organizovány, že tak obrovské množství informací potřebných pro vývoj a udržení i těch nejjednodušších organismů může být uloženo i v tak malém prostoru buňky?

Některé z těchto otázek byly zodpovězeny ve čtyřicátých letech tohoto století, kdy bylo ze studií na jednoduchých houbách odvozeno, že genetická informace obsahuje instrukce převážně pro tvorbu proteinů. Proteiny jsou makromolekuly, které provádějí většinu buněčných funkcí: slouží jako stavební kameny buněčných struktur (Kapitola 5); mohou fungovat jako enzymy, které katalyzují buněčné chemické reakce (Kapitola 3); regulují genovou expresi (Kapitola 8); umožňují buněčný pohyb (Kapitola 16) a vzájemnou komunikaci (Kapitola 15). Vlastnosti a funkce buněk jsou tedy převážně určovány proteiny. Pokud se ohlédneme zpět, je těžké si představit, jaké další instrukce by mohly být v genetické informaci zakódovány. Dalším významným pokrokem učiněným ve čtyřicátých letech byla identifikace pravděpodobného nosiče genetické informace

STRUKTURA A FUNKCE DNA

- Geny jsou tvořeny DNA
- DNA je složena ze dvou komplementárních řetězců nukleotidů
- Struktura DNA umožňuje zachování dědičnosti

REPLIKACE DNA

- Syntéza DNA začíná v replikačních počátcích
- K syntéze DNA dochází v replikačních vidličkách
- Replikační vidlička je asymetrická
- DNA-polymeráza opravuje své chyby
- Oligoribonukleotidy jsou používány jako primery pro syntézu DNA
- Proteiny v replikační vidličku tvoří replikační aparát

OPRAVA DNA

- Změny v DNA jsou příčinou mutací
- Systém opravy chybného párování bází napravuje chyby, které unikly replikačnímu aparátu
- DNA v buňkách podléhá kontinuálnímu poškozování
- Stabilita genů je závislá na reparaci DNA
- Díky vysoké přesnosti, s jakou je DNA uchovávána, mají blízké příbuzné druhy proteiny s velmi podobnými sekvencemi

– **deoxyribonukleové kyseliny (DNA)**. Ale mechanismus, jímž je dědičná informace kopírována pro přenos z buňky do buňky, a jak mohou být proteiny určeny instrukcemi v DNA, zůstal tajemstvím až do roku 1953, kdy James Watson a Francis Crick určili strukturu DNA. Struktura okamžitě vyřešila problém, jak je DNA kopírována neboli *replikována*, a poskytla první vodítko k pochopení toho, jak molekula DNA může kódovat instrukce pro tvorbu proteinů. V této kapitole se zaměříme na otázku, jak struktura DNA umožňuje věrnou replikaci a uchování genetických instrukcí, a krátce si vysvětlíme, jak DNA kóduje informaci pro specifické proteiny. Detaily tohoto *genetického kódu* a funkce translačního aparátu budou probrány v následující kapitole.

Množství informací uložených v buněčné DNA je obrovské. Uvidíme, že každá buňka obsahuje kromě aparátu pro přesné kopírování této informace také specializované enzymy pro opravu poškozené DNA. Přestože existují mechanismy, které ochraňují genetické instrukce před chybami při kopírování a náhodnými poškozeními, mohou se v DNA objevit trvalé změny neboli *mutace*. Příležitostně mohou mutace daný organismus i zvýhodnit: například mohou udělit bakteriím odolnost vůči antibiotikům, ke kterým byly dříve citlivé. Akumulace změn v DNA po miliony let vyústila v rozmanitost genetického materiálu, která vedla k vzájemnému odlišení druhů. To umožnilo vznik menších odlišností mezi jednotlivci stejného druhu, což můžeme vidět u lidí i jiných živočichů (obr. 6-1). Většina mutací je však škodlivá; u lidí jsou zodpovědné za stovky vrozených chorob. Mutace, které se objevují v tělních buňkách v průběhu života, mohou způsobit různé choroby, hlavně mnoho typů rakoviny. Je otázkou, zda by bez buněčných systémů, které neustále hlídají a opravují poškozenou DNA, mohl život vůbec existovat.



Obrázek 6-1 Rodinná fotografie ilustrující přenos genetické informace z jedné generace na druhou. Všechny tři děti se podobají sobě navzájem i svým rodičům mnohem více než jiným lidem, protože zdědily své geny od svých rodičů. Kočka se v mnoha znacích podobá člověku, ale během milionů let evoluce, kdy došlo k oddělení obou druhů, se nahromadily u obou genetické změny, které z nich učinily druhy zcela odlišné. Kuře je ještě mnohem vzdálenější druh.

Struktura a funkce DNA

Na počátku dvacátého století bylo zjištěno, že geny se nacházejí na *chromosomech* – nitkovitých útvarech v jádře eukaryotní buňky, které je možno pozorovat na počátku buněčného dělení (obr. 6-2). Biochemické analýzy později prokázaly, že se chromosomy skládají z DNA a proteinů. Protože byla DNA považována za chemicky relativně jednoduchou molekulu, předpokládalo se, že jsou geny tvořeny proteiny, které vykazují mnohem větší chemickou rozmanitost. Role proteinů v rámci chromosomů bude podrobně probrána v Kapitole 8. Nyní si ukážeme, že navzdory chemické jednoduchosti je DNA ideální materiál pro tvorbu genů. Geny každé buňky na Zemi jsou tvořeny DNA a experimenty zkoumající vztah mezi DNA a geny byly prováděny na velkém množství organismů.

Geny jsou tvořeny DNA

První důkazy, že geny jsou tvořeny DNA, pocházejí z roku 1944, kdy bylo prokázáno, že přidání purifikované DNA k bakteriím

může změnit jejich vlastnosti a že tyto vlastnosti jsou předávány na další generace (obr. 6-3). Skutečnost, že DNA je genetický materiál, je dnes naprosto samozřejmá, a tak je těžké si představit, jaké úsilí bylo zapotřebí k tomuto poznání.

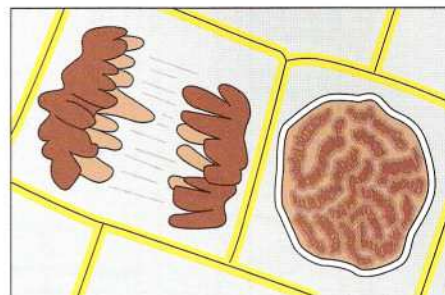
DNA je složena ze dvou komplementárních řetězců nukleotidů

Ve čtyřicátých letech biologové považovali DNA za genetický materiál jen s velkými výhradami kvůli její chemické jednoduchosti. Podle nich byla DNA jednoduše dlouhý polymer složený pouze ze čtyř typů podjednotek, které jsou si navzájem velmi podobné. Na počátku padesátých let byla DNA poprvé podrobena analýze rentgenovými paprsky - technice schopné určit trojrozměrnou atomovou strukturu molekuly (viz panel 5-5, str. 162-163). Výsledky prvních analýz ukázaly, že DNA je tvořena dvěma vlákny stočenými do šroubovice. Rozpoznání dvouvláknové struktury mělo zásadní význam pro sestavení strukturního modelu DNA v roce 1953. Po jeho navržení Watsonem a Crickem utichly pochyby o schopnosti DNA kódovat genetickou informaci a replikovat se.

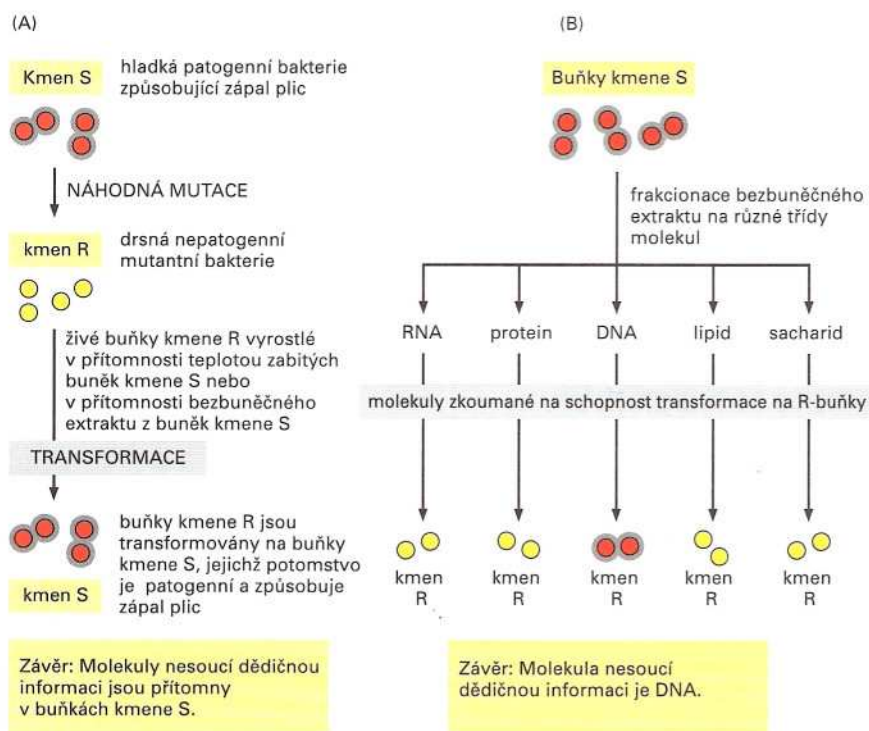
Molekula DNA se skládá ze dvou dlouhých polynukleotidových vláken složených ze čtyř typů nukleotidových podjednotek. Obě tato vlákna jsou nazývána *řetězce DNA* nebo *vlákna DNA* a jsou vzájemně spojena *vodíkovými můstky* (viz panel 2-7, str. 70-71) mezi bázemi nukleotidů (obr. 6-4). Nukleotidy jsou tvořeny pětiuhlíkovým sacharidem, na nějž jsou navázány dusíkatá báze a jedna



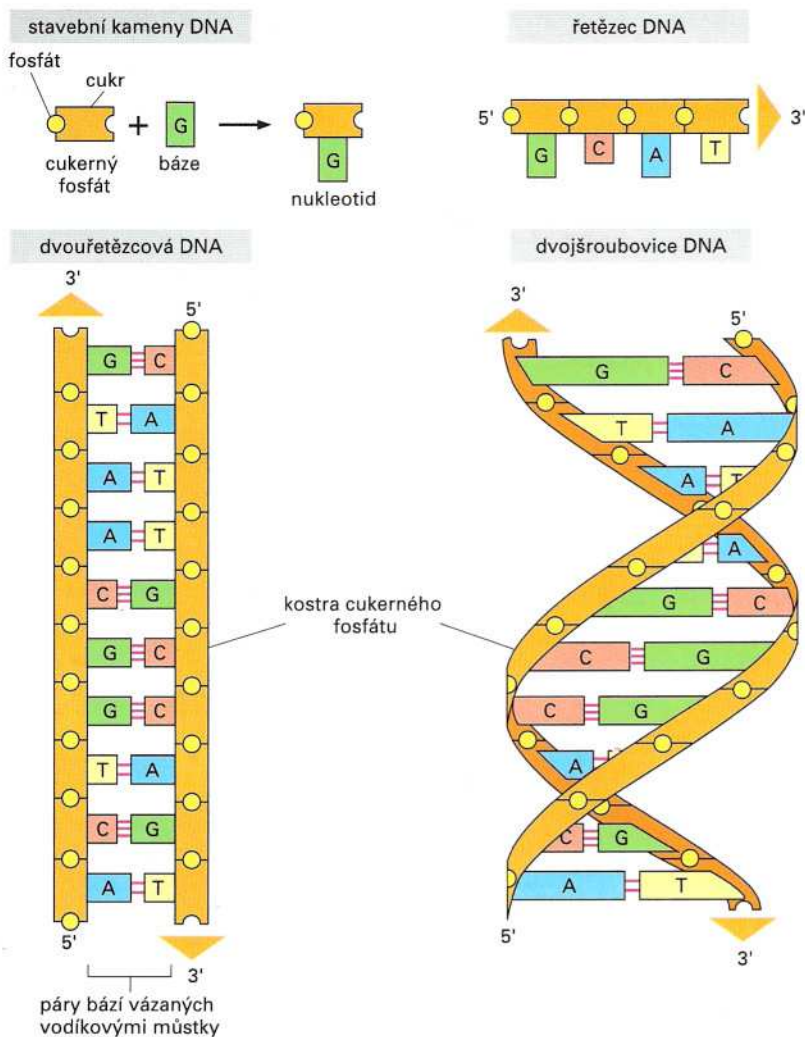
dělící se buňka nedělící se buňka



Obrázek 6-2 DNA v buňkách. Horní panel ukazuje dvě sousední rostlinné buňky ve světelném mikroskopu. DNA byla obarvena fluorescenční barvou (DAPI), která se na ni specificky váže. DNA je uspořádána v chromosomech, které se ve světelném mikroskopu stávají viditelnými jako jednotlivé struktury pouze na začátku buněčného dělení, kdy dochází k jejich kondenzaci (vlevo). Nedělící se buňka vpravo obsahuje stejné chromosomy, ale ty nemohou být rozlišeny díky fázi buněčného cyklu, ve kterém se buňka nachází, protože jejich struktura je mnohem více rozvolněná. Obě fotografie jsou schematicky překresleny na spodním panelu.



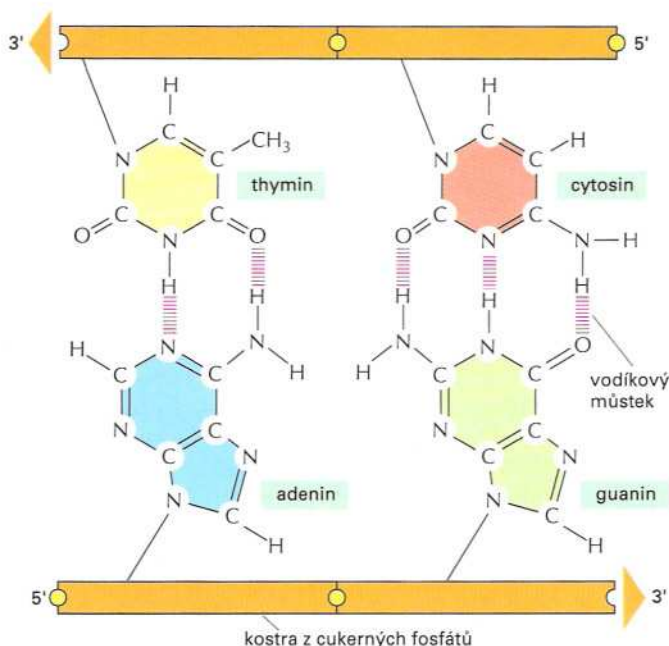
Obrázek 6-3 DNA je genetický materiál - experimentální důkaz. Dva blízké příbuzné kmeny bakterie *Streptococcus pneumoniae* se při pozorování v mikroskopu navzájem liší vzhledem a svou patogenitou: kmen s hladkým povrchem (S) způsobuje myším po injekci smrt, druhý kmen s drsným povrchem (R) letální není. Experiment A ukazuje, že cosi z kmene S je schopné změnit (nebo transformovat) R-kmen na S-kmen a že tato změna je přenesena na další generace. V experimentu B bylo určeno, která složka bakterií je za to zodpovědná.



Obrázek 6-4 DNA a její stavební podjednotky. DNA je tvořena čtyřmi typy nukleotidů, které jsou kovalentně spojeny v polynukleotidovém řetězci s cukr-fosfátovou páteří, ze které vyčnívají jednotlivé báze adenin, thymin, cytosin a guanin. Molekulu DNA tvoří dva polynukleotidové řetězce, které jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky mezi páry bází. Šipky na řetězcích DNA označují jejich polaritu, obě vlákna jsou vůči sobě antiparalelní. Vlevo dole je schematicky nakreslena DNA jako dvě rovná vlákna, vpravo dole je v podobě dvojšroubovice (přirozená konformace).

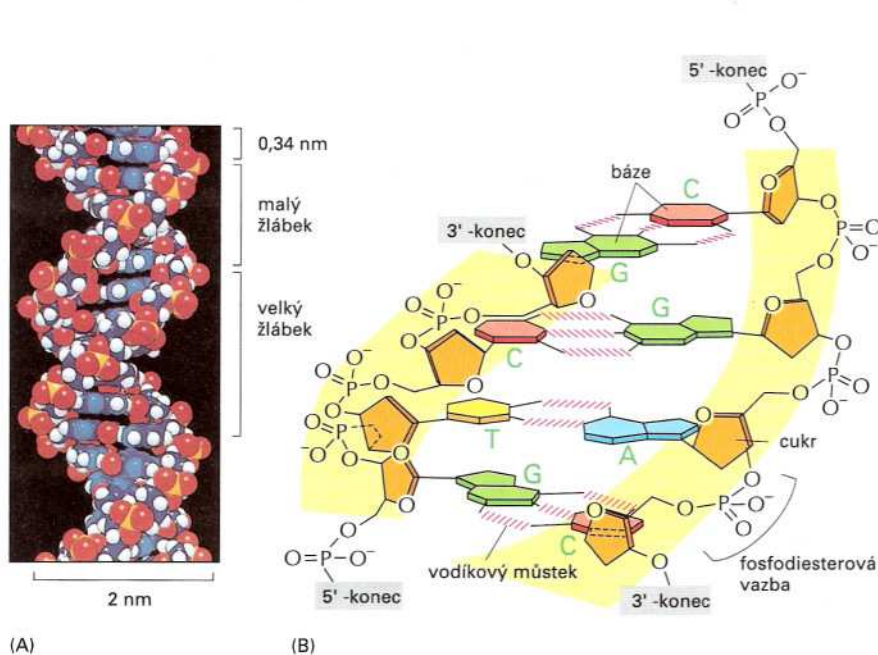
nebo více fosfátových skupin (viz Kapitola 2, panel 2-6, str. 66-67). V případě nukleotidů v DNA je oním sacharidem deoxyribosa s jednou navázanou fosfátovou skupinou (proto je nazývána deoxyribonukleovou kyselinou) a báze může být *adenin* (A), *cytosin* (C), *guanin* (G) nebo *thymin* (T). Nukleotidy jsou spojeny v řetězec kovalentními vazbami mezi sacharidy a fosfáty, které tak tvoří „kosturu“ ze dvou střídajících se částí – cukr-fosfát-cukr-fosfát... (obr. 6-4). Protože se podjednotky DNA liší pouze bázemi, můžeme si polynukleotidový řetězec představit jako náhrdelník ze čtyř druhů korálků (čtyři báze A, C, G a T). Tytéž symboly (A, C, G a T) jsou obvykle používány k zaznamenávání čtyř různých nukleotidů – bází s navázaným sacharidem a fosfátovou skupinou.

Způsob, jakým jsou nukleotidy spojeny, dává řetězci DNA polaritu. Pokud si představíme na každém nukleotidu výčnělek místo fosfátu, a jamku, do které výčnělek zapadá, místo cukru (viz obr. 6-4), mohou se nukleotidy spojovat jen jedním, a to orientovaným způsobem. Navíc jsou oba konce řetězce snadno odlišitelné, neboť na jednom konci je výčnělek a na druhém jamka. Díky této polaritě řetězce DNA je konvenčně jeden konec označován jako 3' (končí -OH skupinou sacharidu) a druhý jako 5' (končí fosfátovou skupinou).



Obrázek 6-5 Komplementární páry bází ve dvoušroubovici DNA. Tvar a chemická struktura bází umožňují efektivní tvorbu vodíkových můstků pouze mezi A-T a G-C, kde se atomy schopné tvořit vodíkové můstky (viz panel 2-1, str. 46-47) dostanou blízko sebe bez narušení struktury dvoušroubovice. Mezi A a T vznikají dva vodíkové můstky, mezi guaninem a cytosinem tři. Báze se mohou párovat jen v případě, že jsou oba řetězce vůči sobě antiparalelní.

Oba polynukleotidové řetězce jsou v **dvojšroubovici** DNA drženy pohromadě vodíkovými můstky mezi bázemi různých řetězců. Všechny báze se proto musí nacházet uvnitř dvojšroubovice s cukrofosfátovou páteří vně (obr. 6-4). Báze se však nepárují náhodně: adenin se váže s thyminem a guanin s cytosinem (obr. 6-5). V obou případech se větší bicyklická báze (purin, viz Kapitola 2) páruje s monocyklickou (pyrimidin). Toto *komplementární párování bází* umožňuje **párům bází** zaujmout energeticky nejvýhodnější konformaci v rámci dvojšroubovice. V tomto uspořádání mají oba páry bází podobnou šířku, která umožňuje udržení stabilní vzdálenosti cukr-fosfátové kostry obou řetězců podél celé délky



Obrázek 6-6 Dvojšroubovice DNA. (A) Prostorový model jeden a půl otáčky dvojšroubovice DNA. Obtočení dvou řetězců kolem sebe vytváří na dvojšroubovici dva žlábků. Jak je označeno na obrázku, širšímu se říká větší nebo vnější žlábek, užšímu pak menší nebo vnitřní žlábek. (B) Krátký úsek dvojšroubovice při pohledu ze strany. Jsou zde nakresleny čtyři páry nukleotidů. Nukleotidy jsou spojeny navzájem fosfodiesterovými vazbami mezi 3'-hydroxylovou skupinou (-OH) jednoho sacharidu a 5'-fosfátovou skupinou (-P) druhého sacharidu. Proto má každý polynukleotidový řetězec chemickou polaritu, to znamená, že oba konce vláknů jsou chemicky odlišné. Na 3'-konci je volná skupina -OH na uhlíku 3 v sacharidové kostře; na 5'-konci je volná fosfátová skupina připojená na 5'-uhlík sacharidu.

molekuly DNA. Navíc se obě cukr-fosfátové kostry navzájem obtáčí kolem sebe a tvoří již zmíněnou dvojšroubovici (obr. 6-6).

Obě báze se mohou spolu párovat ve dvojšroubovici jen v případě, že jsou oba řetězce vůči sobě **antiparalelní**, to znamená, že polarita jednoho řetězce je opačná k polaritě druhého řetězce DNA (viz obr. 6-4). Z párování bází vyplývá, že první řetězec DNA molekuly obsahuje sekvenci nukleotidů, která je přesně **komplementární** k nukleotidové sekvenci druhého, partnerského řetězce. To má základní význam pro kopírování DNA, jak si ukážeme v následující části této kapitoly (str. 189-198).

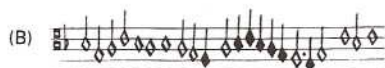
Struktura DNA umožňuje zachování dědičnosti

Geny jsou nositeli biologické informace, která je velice přesně předávána z generace na generaci během buněčného dělení. Proto bylo nutné uvažovat o tom, jak může být informace specifikující daný organismus zakódována v chemické struktuře a jak může být přesně kopírována. Popsání struktury DNA bylo přelomem v biologii dvacátého století, neboť vyřešilo oba tyto problémy na molekulární úrovni. Nejprve se pokusíme odpovědět na první otázku - jak je genetická informace zapsána ve struktuře DNA.

Informace kódovaná ve struktuře DNA je dána pořadím (sekvencí) nukleotidů v řetězci. Každá báze - A, C, G, a T - může být považována za jedno písmeno čtyřpísmenné abecedy, která je používána k zapsání biologické informace do struktury DNA (obr. 6-7). Organismy se navzájem liší sekvencemi nukleotidů, a tím i biologickou informací. Ale jak je nukleotidová abeceda používána k zapsání informace a jak je tato informace čtena?

Již před objevením struktury DNA bylo známo, že geny obsahují instrukce pro tvorbu proteinů (obr. 6-8). DNA musí tedy nějakým způsobem proteiny kódovat. Toto poznání vedlo ke snadnějšímu porozumění tohoto problému díky chemickým vlastnostem proteinů. Vlastnosti bílkovin, které jsou zodpovědné za jejich biologickou funkci, jsou totiž dány jejich trojrozměrnou strukturou, která vychází z jejich aminokyselinové sekvence (viz Kapitola 5). Lineární sekvence nukleotidů v DNA musí být tedy překládána nějakým způsobem do lineární sekvence aminokyselin v proteinu. Objevení vztahu mezi čtyřpísmennou nukleotidovou abecedou DNA a jednadvacetipísmennou aminokyselinovou abecedou bílko-

(A) molekulární biologie je...



(C) - . - . - . - . - . - .

(D) 细胞生物学乐趣无穷

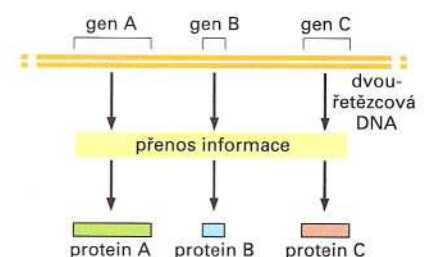
(E) TTCGAGCGACCTAACCTATAG

Obrázek 6-7 Příklady lineárních zpráv.

Shora dolů jsou informace zapsány česky, notovým zápisem, Morseovou abecedou, čínsky a nukleotidovou sekvencí DNA.

Otázka 6-1

- Nukleotidová sekvence jednoho řetězce je 5'-GGATTTTGTCCACA-ATCA-3'. Jaká je sekvence komplementárního řetězce?
- Genom určité bakterie obsahuje 13 % adeninu. Jaký je procentuální obsah zbylých nukleotidů?
- Kolik možných nukleotidových sekvencí lze sestavit pro N-nukleotidů dlouhou molekulu, jestliže je (a) jednořetězcová nebo (b) dvouřetězcová?
- Předpokládejte, že máte metodu, kterou můžete nastěpit DNA ve specifické sekvenci. Jak dlouhá (v průměru) musí být tato rozpoznávaná sekvence, aby byl bakteriální genom o velikosti 3×10^6 nukleotidových párů rozštěpen právě jednou? Jak se bude odpověď lišit pro živočišný genom o délce 3×10^9 nukleotidových párů?



Obrázek 6-8 Každý gen obsahuje informaci pro tvorbu proteinu.

Obrázek 6-9 Nukleotidová sekvence lidského genu pro β -globin.

Tento gen nese informaci pro aminokyselinovou sekvenci jedné ze dvou podjednotek hemoglobinové molekuly, která je přenašečem kyslíku v krvi. Odlišný gen pro β -globin nese informaci pro druhý typ podjednotky (celkově se molekula hemoglobinu skládá ze čtyř podjednotek, po dvou od každého typu). Je zde zapsán pouze jeden ze dvou řetězců DNA genu pro β -globin, druhý je k němu přesně komplementární. Sekvence je čtena zleva doprava a od shora dolů. Barevně označené úseky DNA znázorňují tři sekvence, které jsou překládány do aminokyselinové sekvence β -globinu. V Kapitole 7 si ukážeme, jak jsou tyto tři sekvence v buňce spojeny, tak aby mohly dát vznik celému β -globinu.

```
CCCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCA
ATCTACTCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAG
CCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAG
CCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACAC
AACTGTGTTCACTAGCAACTCAAACAGACA
CCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGT
CTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGA
ACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGG
GCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGT
TTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTG
GAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATA
GGCACTGACTCTCTGCTGCCTATTGGTCTAT
TTTCCCACCCTTAGGCTGTGGTGGTCTAC
CCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTT
GGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATG
GGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAG
AAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTG
GCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGTGAGCTGCACCTGTGACAAG
CTGCACGTGGATCCTGAGAACCTCAGGGTG
AGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCC
CCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCAT
AGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTT
AGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCA
GTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTC
TTTTATTTGCTGTTTCATAACAATTGTTTC
TTTTGTTTAATCTTCTTTCTTTTTTTTTT
CTTCTCCGCAATTTTACTATTTACTTTAA
TGCCCTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAA
TATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAA
AAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATT
ACTATTTGGAATATATGTGTCTTATTTGC
ATATTCATAACTCTCCCTACTTTATTTCTT
TTATTTTAAATTGATACATAATCATTATAC
ATATTTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAA
TATGTGTACACATATTGACCAATCAGGGT
AATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCT
TTCTTCTTTAATATACTTTTTTGTTTATC
TTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTC
TTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCAT
GCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAG
TGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAAT
ATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAA
ATTGTAACCTGATGTAAGAGGTTTCATATTG
CTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCT
TGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTG
GATTTATCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTT
GCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTC
CCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTG
TGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATT
CACCCACACAGTGCAGGCTGCCTATCAGAA
AGTGGTGGCTGGTGGGTAATGCCCTGGC
CCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTCTTGC
TGTCCAATTTCTATTTAAAGGTTCCCTTGTT
CCCTAAGTCCAACCTACTAACTGGGGGATA
TTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATCTG
CCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAA
TGATGTATTTAAATTTCTGAATATTTT
ACTAAAAAGGGAATGTGGGAGGTCAGTGCA
TTTAAACATAAAGAAATGATGAGCTGTTT
AAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAAA
CTCCATGAAAGAAGGTGAGGCTGCAACCAG
CTAATGCACATTGGCAACAGCCCTGATGC
CTATGCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGAT
TCTTGTAGAGGCTTGATTTGCAGGTTAAAG
TTTTGCTATGCTGATTTTACATTACTTAT
TGTTTTAGCTGTCCATGAATGTCTTTTC
```

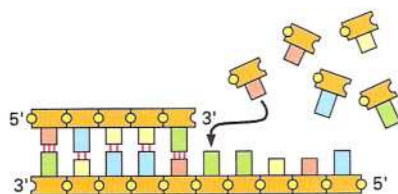
vin trvalo více než deset let od návržení dvojšroubovicové struktury DNA. Jaký mechanismus buňky používají pro překlad nukleotidové sekvence do aminokyselinové sekvence proteinu si vysvětlíme v Kapitole 7. Většina genů je tvořena poměrně krátkými úseky DNA, které kódují jednotlivé proteiny – pro překlad do proteinu je využívána jen menší část genu, převažující nekódující oblasti určují, kdy a v jakém množství bude daná bílkovina syntetizována. *Regulační oblasti* a jak fungují, si popíšeme v Kapitole 8.

Kompletní genetická informace organismu se nazývá **genom** (tento termín je také používán pro DNA, která tuto informaci obsahuje). Celkové množství DNA v buňce je ohromující: typická lidská buňka obsahuje DNA o délce přibližně jeden metr (3×10^9 nukleotidů). Nukleotidová sekvence malého lidského genu, pokud ji zapíšeme ve čtyřpísmenné nukleotidové abecedě, zabírá čtvrtinu stránky (obr. 6-9), zatímco kompletní nukleotidová sekvence lidského genomu by zabrala více než 1 000 knih o stejné velikosti jako je tato.

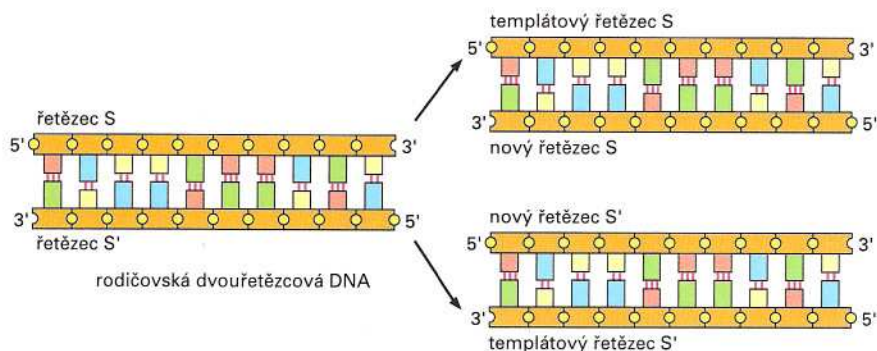
Během dělení musí buňka zkopírovat celý svůj genom, aby obě dceřiné buňky nesly stejnou informaci: struktura DNA umožňuje poměrně snadné vysvětlení, jak k jejímu kopírování dochází.

Replikace DNA

Protože oba řetězce obsahují sekvence nukleotidů, které jsou navzájem přesně komplementární, mohou obě vlákna sloužit jako **templát** (matrice, předloha) pro syntézu nového komplementárního řetězce (obr. 6-10). Jinými slovy, pokud si jeden řetězec označíme jako S a druhý jako S', může řetězec S sloužit jako templát pro syn-



Obrázek 6-10 DNA řetězec jako templát. Přednostní párování mezi nukleotidy (A s T a G s C) dovoluje každému řetězci fungovat jako templát pro syntézu komplementárního vlákna.



Obrázek 6-11 DNA jako templát pro vlastní duplikaci. Protože se každý adenin efektivně páruje jen s thyminem a guanin s cytosinem, může každý řetězec určovat strukturu komplementárního vlákna a dvojšroubovice může být přesně zkopírována.

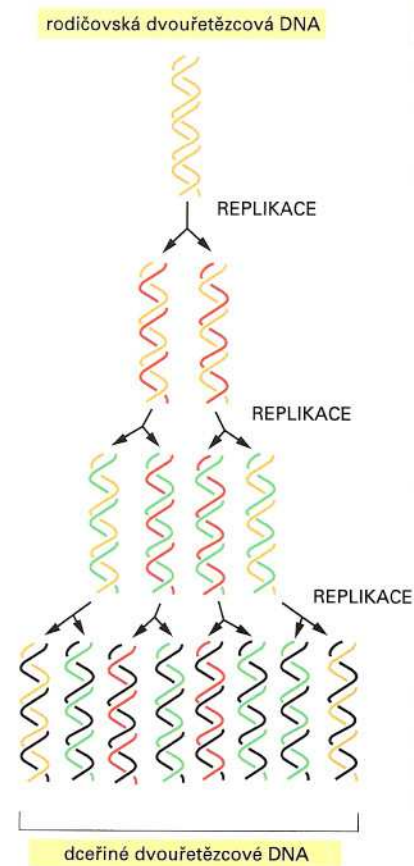
tézu nového S'-vlákna, zatímco S' jako templát pro nové vlákno S (obr. 6-11). Proto může být genetická informace přesně zkopírována jednoduchým procesem, při kterém dochází k oddělení vláken S a S' a každé pak slouží jako templát pro syntézu nového komplementárního řetězce, stejného jako jeho dřívější partner.

Schopnost obou vláken fungovat jako templát pro syntézu komplementárního vlákna umožňuje buňce kopírovat neboli *replikovat* své geny před rozdělením na dvě dceřiné buňky. Přesto zde vzniká otázka, jak může buňka zkopírovat miliardy párů nukleotidů před každým rozdělením. Kopírování musí být velice rychlé a přesné: během 8 hodin dokáže živočišná buňka zkopírovat celý svůj genom průměrně s jednou či dvěma chybami. Tuto práci provádí soubor proteinů, který dohromady vytváří replikační aparát. **Replikace DNA** dává vznik dvěma novým dvojšroubovicím, které pocházejí z mateřského helixu - obě jsou kromě vzácných chyb jejími věrnými kopiemi (obr. 6-11). Protože oba mateřské řetězce slouží jako templáty pro jedno nové vlákno, je každá dceřiná dvojšroubovice tvořena jedním původním a jedním nově vytvořeným vláknem (obr. 6-12).

Syntéza DNA začíná v replikačních počátcích

Dvojšroubovice DNA je za normálních podmínek velice stabilní, oba řetězce jsou pevně spojeny mnoha vodíkovými můstky mezi bázemi (obr. 6-4). K oddělení vláken dochází až při teplotě kolem 100 °C, a to jen díky dodané dostatečně vysoké tepelné energii. Pokud má však řetězec DNA fungovat jako templát, musí být oba řetězce odděleny, aby se jejich nukleotidy mohly párovat s nukleotidy připojovanými do nového vlákna (obr. 6-10). Celý proces replikace začínají iniciační proteiny, které se vážou na DNA a rozvíjejí její dvojšroubovicovou strukturu přerušováním vodíkových můstků (obr. 6-13). Ačkoliv vodíkové můstky udílejí dvojšroubovici vysokou stabilitu, energie jednoho můstku je velice malá (Kapitola 2). Proto separace krátkého úseku DNA nevyžaduje velký přísun energie a může k ní docházet za pomoci těchto iniciačních proteinů i za normální teploty.

Místům, kde je struktura dvojšroubovice DNA nejdříve narušena, se říká **replikační počátky** (obr. 6-13) a jsou určeny speciální nukleotidovou sekvencí. V jednoduchých buňkách, jako jsou bakterie nebo kvasinky, jsou tyto replikační počátky určeny přibližně 100 páry bází. Tato místa jsou tvořena specifickými sekvencemi

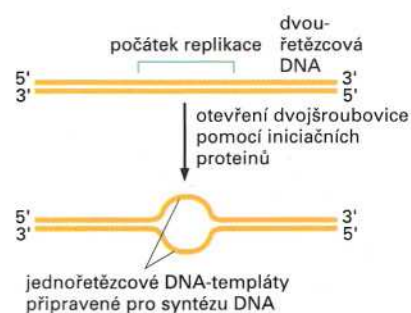


Obrázek 6-12 Replikace DNA. V každém kole replikace jsou oba řetězce použity jako templáty pro syntézu komplementárního vlákna. Původní řetězec tedy zůstává neporušený po mnoho generací. Replikace DNA je „semikonzervativní“, protože každá dceřiná dvojšroubovice je složena z jednoho mateřského a jednoho nově nasyntetizovaného vlákna.

nukleotidů, které jsou jednak rozpoznávány iniciačními proteiny a navíc zde snadno dochází k oddělení obou řetězců. Na obr. 6-5 jsme viděli, že A se páruje s T dvěma vodíkovými můstky oproti G-C-páru, který je držen pohromadě třemi můstky. Proto se v replikačních počátcích typicky vyskytují sekvence s vysokým obsahem adeninu a thyminu, které lze relativně snadno rozpojit.

Bakteriální genom, který je obvykle tvořen jednou kruhovou molekulou o délce několika milionů bází, má jediný replikační počátek. Na rozdíl od bakterií lze v mnohem větším lidském genomu najít zhruba 10 000 takovýchto počátků. Jejich velký počet umožňuje lidské buňce zreplikovat veškerou DNA během relativně krátké doby.

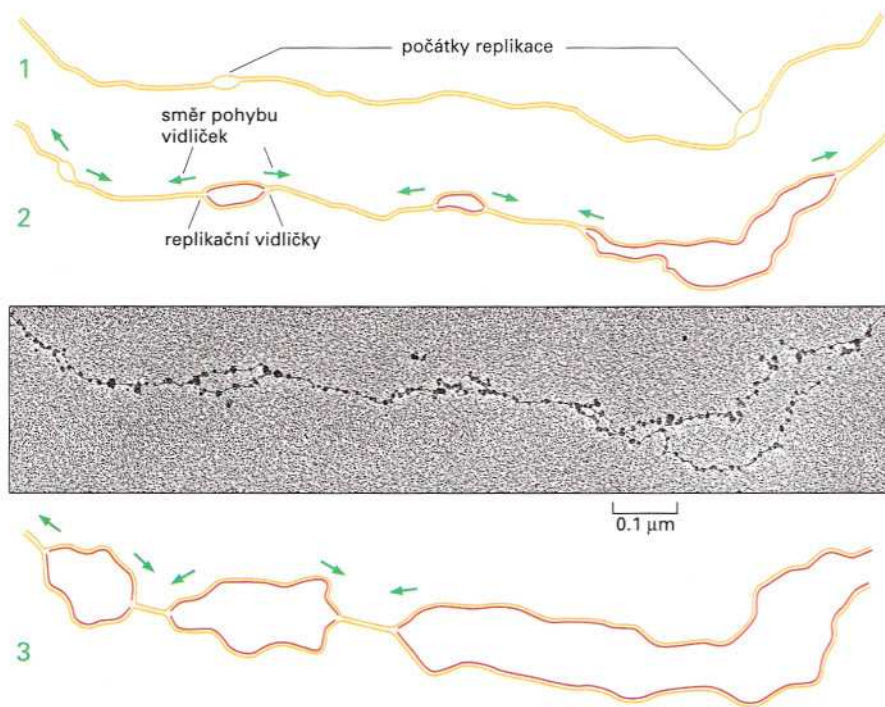
Jakmile jsou iniciační proteiny navázány na DNA a otevřou dvojšroubovicovou strukturu, váže se na replikační počátek skupina proteinů, které spolupracují při syntéze nového vlákna DNA. Funkci jednotlivých proteinů v tomto replikačním aparátu si stručně popíšeme později.



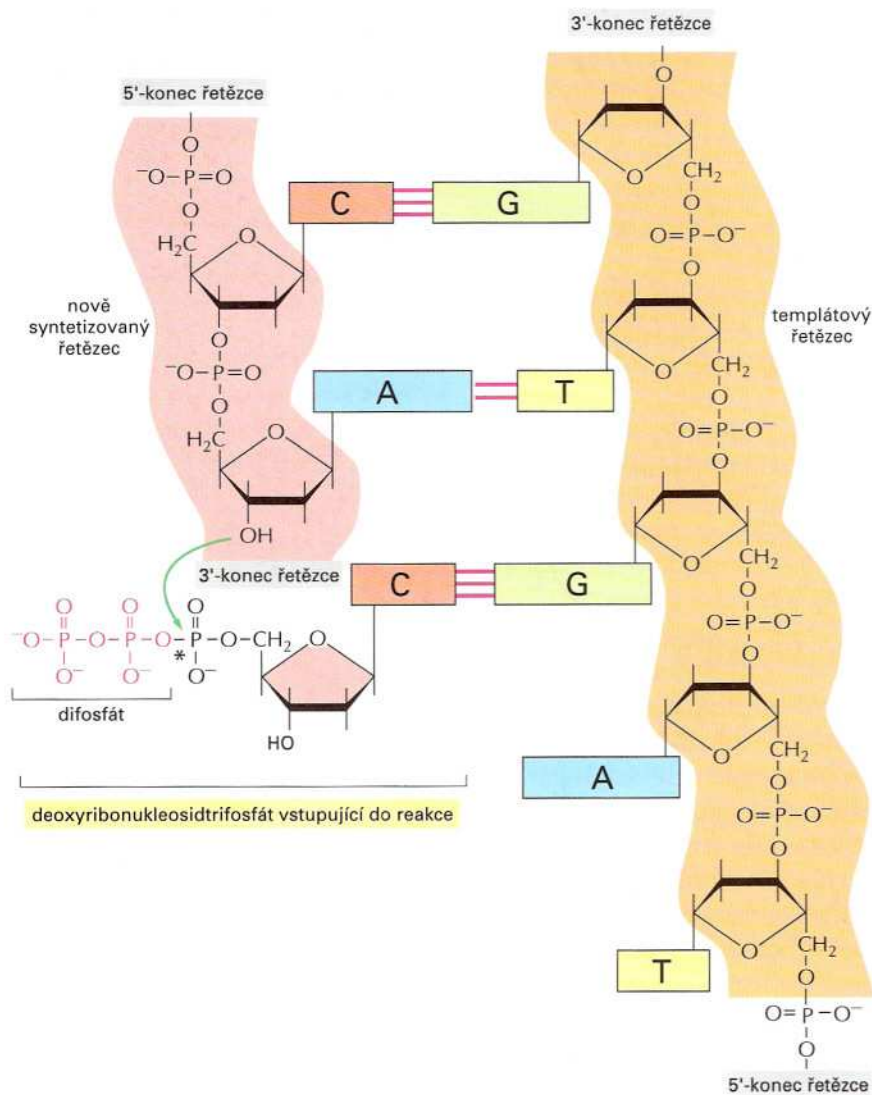
Obrázek 6-13 Rozvolnění dvojšroubovicové struktury v počátku replikace. Iniciační proteiny replikace rozpoznávají sekvenci specifickou pro replikační počátek a lokálně oddálí oba řetězce. Vzniklé jednořetězcové úseky DNA mohou být využity jako templát pro kopírování DNA.

K syntéze DNA dochází v replikačních vidličkách

Molekulu DNA lze pozorovat v elektronovém mikroskopu. Pro začátky replikace jsou typické útvary ve tvaru Y (obr. 6-14), které se nazývají **replikační vidličky**. V těchto replikačních vidličkách jsou navázány proteiny replikačního aparátu, které se pohybují ve směru replikace a rozvíjejí dvojšroubovicovou strukturu za současné syntézy nového řetězce. V jednom replikačním počátku se vytvoří dvě vidličky, které se pohybují směrem od sebe, a proto je replikace bakteriálního i eukaryontního chromosomu nazývána *obousměrná*. Vidlice se pohybují velice rychle – zhruba 1 000 nukleotidů za sekundu u bakterií a 100 nukleotidů za sekundu u člověka. (Pozn. překladatele: pohyb replikačních vidliček je třeba chápat



Obrázek 6-14 Replikační vidličky se pohybují směrem od sebe, replikace začíná u eukaryontních buněk na mnoha místech. Fotografie z elektronového mikroskopu ukazující replikaci DNA v časném embryu drosofil. Částice viditelné podél DNA jsou nukleosomy, struktury vyskytující se v eukaryontních chromosomech. Kolem jejich proteinového jádra je DNA několikrát obtočena (podrobněji si je popíšeme v Kapitole 8). Na obrázcích (1), (2) a (3) jsou zachyceny tytéž úseky DNA, jak se mohou jevit v různých stadiích replikace na fotografii z elektronového mikroskopu. Žluté čáry označují původní řetězce DNA, červené čáry pak nově nasyntetizovanou DNA.



Obrázek 6-15 Syntéza DNA. Přidání nukleotidu na 3'-hydroxylový konec polynukleotidového řetězce je základní reakcí syntézy DNA, nový řetězec je proto syntetizován ve směru 5'→3'. Párování bází mezi volným nukleotidem a nukleotidem v templátovém řetězci zaručuje zařazení správného nukleotidu do nově vznikajícího vlákna (viz obr. 6-10). Přidání nukleotidů do rostoucího DNA řetězce katalyzuje enzym DNA-polymeráza. Nukleotidy vstupují do reakce jako trifosfáty. Přerušením fosfoanhydridové vazby (označena hvězdičkou) v přidávaném nukleosidtrifosfátu se uvolní velké množství energie, které je využito pro polymerační reakci.

jako relativní posun vidliček vzhledem k DNA; existuje řada důkazů, že replikační komplexy mohou být pevně vázány k jaderným strukturám. Při replikaci pak je DNA nejspíše protahována těmito komplexy, takže se ve skutečnosti může pohybovat DNA vůči vidličkám.)

Nejdůležitějším enzymem replikačního aparátu je **DNA-polymeráza**, která syntetizuje nové vlákno DNA podle původního řetězce. Tento enzym katalyzuje připojování nukleotidů na 3'-konec rostoucího řetězce DNA, kdy je vytvářena fosfodiesterová vazba mezi skupinou 3'-OH řetězce a 5'-fosfátovou skupinou přidávaného nukleotidu (obr. 6-15). Nukleotidy vstupují do reakce jako energeticky bohaté nukleosidtrifosfáty a dodávají energii polymerační reakci. Energie uvolněná hydrolýzou jedné fosfodiesterové vazby v nukleosidtrifosfátu je dostatečná pro kondenzační reakci, při které se váže nukleotidový monomer do nově syntetizovaného řetězce za současného uvolnění difosfátu (PP_i). DNA-polymeráza využívá hydrolýzou uvolněnou energii k polymerační reakci. Difosfát je dále hydrolyzován na anorganické fosfáty (P_i), což zaručuje naprostou nevratnost polymerační reakce (viz obr. 3-35).

Otázka 6-2 Podívejte se pozorně na fotografii z elektronového mikroskopu na obr. 6-14.

- Podle měřítka odhadněte délku řetězců DNA mezi replikačními vidličkami. Označte si replikační vidličky zleva doprava čísly. Jak dlouho bude trvat, než se spojí vidlička 4 a 5, respektive 7 a 8? Vzdálenost mezi bázemi v DNA je 0,34 nm, eukaryontní replikační vidlička se pohybuje rychlostí okolo 100 nukleotidů za sekundu. Pro tuto otázku zanedbejte nukleosomovou strukturu viditelnou na obr. 6-14 a považujte DNA za plně rozvinutou.
- Genom drosofilky má velikost přibližně $1,8 \times 10^8$ nukleotidových párů. Jaká část z celkové DNA této mušky je na fotografii?

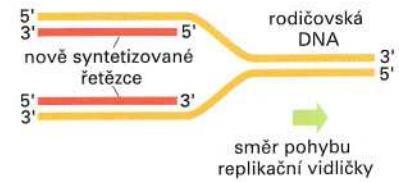
DNA-polymeráza se neodděluje od DNA po každém přidání nukleotidu, ale zůstává navázána na DNA a během polymerace se podél ní pohybuje. K DNA je připojena pomocí speciálního proteinu, který si popíšeme později.

Replikační vidlička je asymetrická

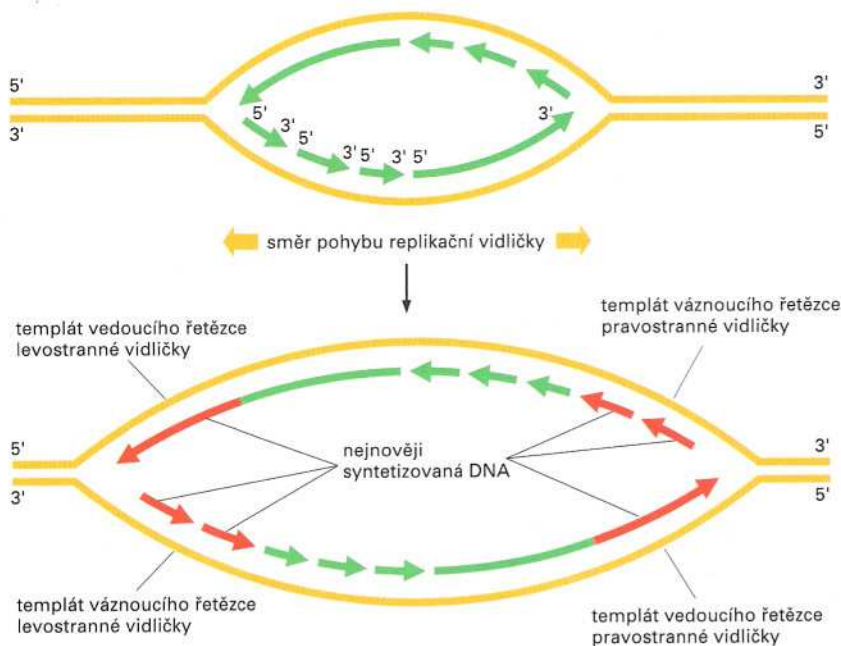
Jelikož je DNA syntetizována pouze ve směru $5' \rightarrow 3'$, nastává v replikační vidličce určitý problém. Na obr. 6-4 jsme viděli, že cukr-fosfátová kostra dává oběma řetězcům ve dvojrůbavici polaritu a že obě vlákna jsou navzájem v opačné orientaci. Důsledkem toho je replikační vidlička asymetrická – jeden nový řetězec v replikační vidličce je syntetizován podle templátu ve směru $3' \rightarrow 5'$ a druhý podle templátu ve směru $5' \rightarrow 3'$ (obr. 6-16). Oba řetězce však zdánlivě rostou směrem, jakým se pohybuje replikační vidlice, a tak se zdá, že první vlákno je syntetizováno ve směru $5' \rightarrow 3'$ a druhé $3' \rightarrow 5'$.

DNA-polymeráza, jak již bylo řečeno dříve, však může katalyzovat růst řetězce DNA pouze v jednom směru: přidává nové podjednotky jen na jeho $3'$ -konec (viz obr. 6-15). To řeší syntézu nového vlákna podle $3' \rightarrow 5'$ templátu, avšak zůstává problém kopírování podle $5' \rightarrow 3'$ templátu, protože neexistuje DNA-polymeráza, která by dokázala prodlužovat $5'$ -konec DNA. V tomto směru roste DNA *diskontinuálně*, to znamená, že jsou ve směru $5' \rightarrow 3'$ syntetizovány krátké úseky DNA, které jsou následně spojovány v kontinuální řetězec (obr. 6-17). Výsledkem je pak dojem skokového růstu vlákna ve směru $3' \rightarrow 5'$, přestože je i toto vlákno syntetizováno ve směru $5' \rightarrow 3'$. Řetězec DNA, který je tvořen kontinuálně (ve směru $5' \rightarrow 3'$), se nazývá **vedoucí řetězec**; druhé vlákno, syntetizované diskontinuálně, se nazývá **opožďující se** nebo **vážnouch řetězec**.

Ačkoliv se replikační vidlice prokaryontních a eukaryontních buněk v některých detailech liší, obě jsou tvořeny vedoucím

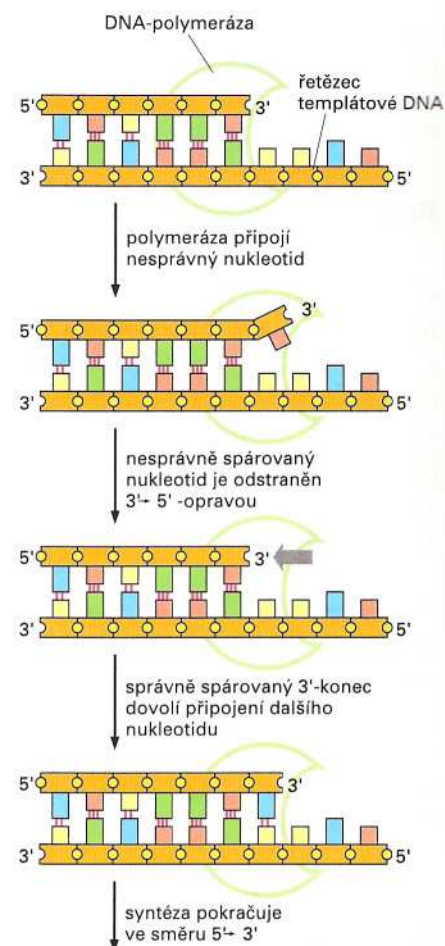


Obrázek 6-16 Polarita DNA-řetězců v replikační vidličce.



Obrázek 6-17 Asymetričnost replikační vidličky. Protože oba nové řetězce jsou syntetizovány ve směru $5' \rightarrow 3'$, DNA opožďujícího se řetězce musí být syntetizována jako série krátkých úseků DNA, které jsou později spojovány do souvislého vlákna. Horní obrázek ukazuje pohyb dvou replikačních vidliček směrem od sebe; dolní obrázek pak ukazuje tytéž replikační vidličky o chvíli později. DNA-polymeráza musí na opožďujícím se vlákne syntetizovat krátké Okazakiho fragmenty ve směru $5' \rightarrow 3'$ a po vytvoření fragmentu se posune v opačném směru podle templátového řetězce, aby mohla začít syntetizovat další Okazakiho fragment.

Obrázek 6-18 Korektorská aktivita DNA-polymerázy během replikace. Jakmile je do nově vznikajícího vlákna začleněn nesprávný nukleotid, DNA-polymeráza ho odstraní a nahradí správným nukleotidem. Teprve potom může pokračovat v další syntéze DNA.



Otázka 6-3 DNA-opravné enzymy preferenčně opravují nepárující se nukleotidy v nově syntetizovaném řetězci podle původního DNA-řetězce. Jestliže by byly nepárující nukleotidy opravovány bez ohledu na to, ve kterém vlákne se nacházejí, snižovalo by to replikační chybu? Vysvětlete svoji odpověď.

a vážnoucím vláknem, a to díky existenci DNA-polymeras syntetizujících DNA pouze ve směru 5'→3'. Nejprve si popíšeme další obecné vlastnosti DNA-polymerázy a později se vrátíme k syntéze vážnoucího řetězce.

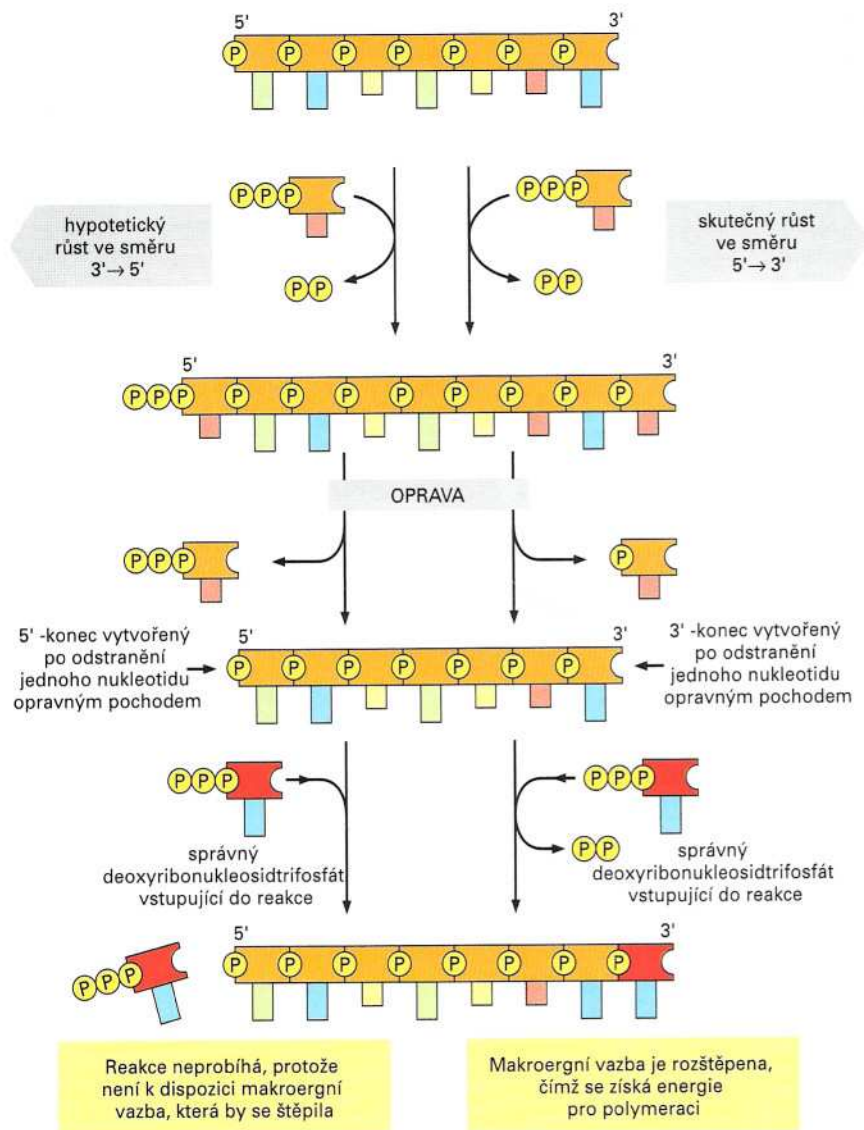
DNA-polymeráza opravuje své chyby

DNA-polymeráza je velice přesně pracující enzym, který udělá průměrně jednu chybu na 10^7 zreplikovaných párů bází. Tento počet chyb je velice nízký oproti očekávání založeném na prostém párování bází. Typicky se párují A-T a G-C, ale mohou se párovat například i G-T a A-C, avšak tyto interakce jsou mnohem méně stabilní. K atypickému párování dochází relativně často a pokud by nebylo opravováno, hromadily by se v buňce mutace, které by mohly vést i k její smrti. Hromadné fixaci mutací v genomu je zabráněno opravnou funkcí samotné DNA-polymerázy. DNA-polymeráza katalyzuje tedy nejen syntézu DNA, ale má i opravnou funkci nazývanou **korektura** (proofreading). Před přidáním nového nukleotidu do řetězce DNA-polymeráza zkontroluje, zda se předcházející nukleotid správně páruje s nukleotidem v templátu. Pokud ano, přidá další nukleotid, pokud ne, DNA-polymeráza sama odstraní nepárující se nukleotid rozštěpením fosfodiesterové vazby a přidá jiný nukleotid (obr. 6-18). DNA-polymeráza má tedy dvě základní funkce: 5'→3' polymerační a 3'→5' nukleázovou aktivitu (štěpící nukleové kyseliny).

Korektorská funkce DNA-polymerázy vysvětluje, proč může být DNA syntetizována jen ve směru 5'→3'. Jak je ukázáno na obr. 6-19, hypotetická DNA-polymeráza, která by uměla syntetizovat DNA ve směru 3'→5', by nemohla mít opravnou funkci – pokud by odstranila nesprávně spárovaný nukleotid, vznikl by 5'-konec, který nelze dále nastavovat. Pokud má tedy DNA-polymeráza fungovat jako samoopravující se enzym, který odstraňuje chyby udělané během pohybu po DNA, může mít jen 5'→3' polymerázovou aktivitu.

Oligoribonukleotidy jsou používány jako primery pro syntézu DNA

Ukázali jsme si, že přesnost replikace závisí na DNA-polymeráze, která přidává další nukleotid až po kontrole správného párování předcházejících bází. Protože však DNA-polymeráza může připojit nový nukleotid pouze ke spárovaným nukleotidům ve dvojšroubovici, nedokáže začít syntetizovat nové vlákno. Musí tedy existovat jiný enzym, který by dokázal spojit dva volné nukleotidy a začal tak syntetizovat zcela nové vlákno podle jednořetězcové DNA. Tento enzym však netvoří DNA, ale krátký úsek jí podobné nukleové kyseliny – RNA (**ribonukleová kyselina**). Tyto úseky dlouhé přibližně deset nukleotidů se párují s templátovým řetězcem a poskytují svůj 3'-konec jako začátek pro DNA-polymerázu. Slouží tedy jako *primer*



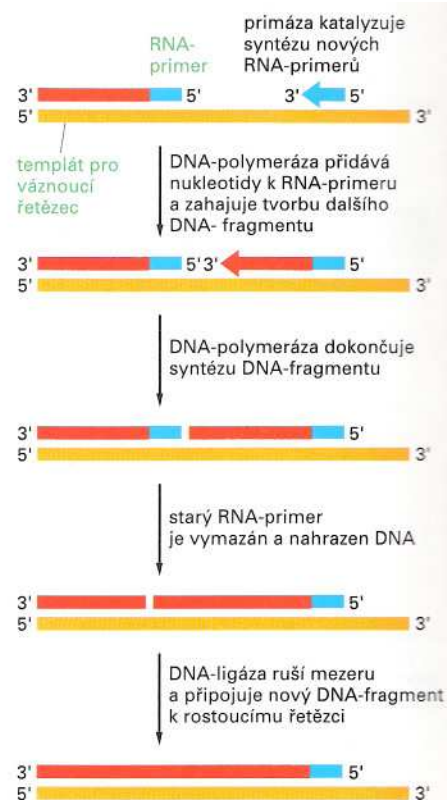
Obrázek 6-19 Proč musí DNA vznikat ve směru 5'→3'. Růst řetězce ve směru 5'→3' (vpravo) umožňuje růst řetězce i po odstranění chybně začleněného nukleotidu (viz obr. 6-18). Oproti tomu by korektura při hypotetické polymeraci ve směru 3'→5' (vlevo) blokovala další prodlužování řetězce. Pro zjednodušení je zobrazen pouze jeden řetězec.

pro syntézu DNA a enzym, který ho tvoří, se nazývá *primáza*. Řetězec RNA je chemicky velice podobný jednovláknové DNA, je však tvořen ribonukleotidy místo deoxyribonukleotidy, ve kterých je sacharid deoxyribosa nahrazen ribosou. Dalším rozdílem je záměna thyminu uracilem (U) (viz panel 2-6, str. 55-67), který se také může párovat s adeninem. RNA-primer je tedy syntetizován podle templátu na základě komplementarity bází stejně jako DNA.

Při syntéze vedoucího řetězce je třeba pouze jeden RNA-primer; jakmile v replikačním počátku vznikne, DNA-polymeráza je schopná ho kontinuálně prodlužovat. Syntéza opoždujícího se řetězce je však diskontinuální a vyžaduje neustále tvorbu RNA-primerů (obr. 6-17). Jakmile se replikační vidlice posune a uvolní se nový úsek nespárovaných nukleotidů, je na něm vytvořen nový RNA-primer. DNA-polymeráza pak přidává deoxyribonukleotidy na 3'-konec RNA-primeru a prodlužuje řetězec DNA, dokud nenarazí na další primer (obr. 6-20).

Pro vytvoření souvislého vlákna DNA z opoždujícího se řetězce tvořeného mnoha oddělenými úseky (které se podle svého objevite-

Obrázek 6-20 Syntéza fragmentů opožďujícího se řetězce. U eukaryot je na každých zhruba 200 nukleotidů opožďujícího se řetězce vytvořen jeden RNA-primer. Jeho délka je přibližně 10 nukleotidů. U bakterií, například *E. coli*, mají primery délku okolo 5 nukleotidů a Okazakiho fragmenty přibližně 1 000 nukleotidů. Primery jsou později rozloženy nukleázou, která dokáže rozpoznat RNA v duplexu DNA/RNA a degradovat ji. Tím vzniká v řetězci mezera, která je dosyntetizována DNA-opravnou polymerázou, která má také korektorskou aktivitu. Jednotlivé fragmenty jsou nakonec spojeny DNA-ligázou, která katalyzuje vznik fosfodiesterové vazby mezi skupinou 3'-OH jednoho fragmentu a skupinou 5'-P následujícího.



le nazývají *Okazakiho fragmenty*) jsou nutné tři enzymy. Je třeba odstranit RNA-primery *nukleázou*, nahradit je DNA, což provádí *opravná DNA-polymeráza*, a v konečné fázi je nutné spojit všechny úseky dohromady *DNA-ligázou*. DNA-ligáza dokáže spojit 5'-fosfátový konec prvního úseku s 3'-hydroxylovým koncem dalšího úseku (obr. 6-20). Podrobněji si o těchto enzymech povíme v části kapitoly nazvané *Oprava DNA*.

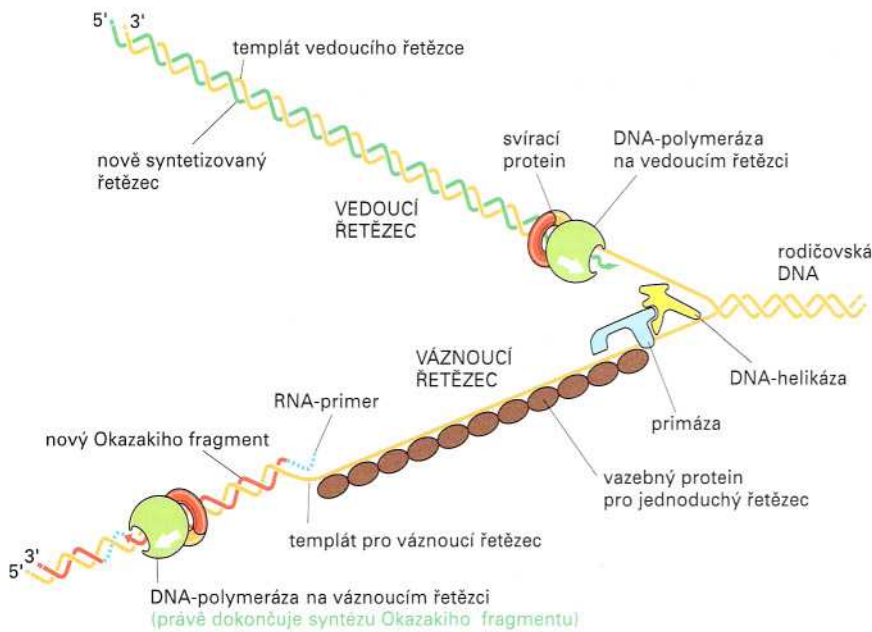
Protože primáza nemá schopnost provádět korekce, může sice začít syntetizovat nový řetězec, ale v primerech vzniká mnoho chyb. Protože jsou však primery tvořeny RNA místo DNA, jsou určeny k degradaci a chyby v nich nehrají žádnou roli pro přesné zachování genetické informace. Jak již bylo zmíněno výše, je RNA nahrazena deoxyribonukleovou kyselinou v procesu katalyzovaném opravnou DNA-polymerázou, která má stejně jako replikační DNA-polymeráza korektorskou schopnost. Replikační aparát je tedy schopen nejen začít syntézu nového vlákna DNA, ale zajistit i přesnost kopírování templátu.

Proteiny v replikační vidličce tvoří replikační aparát

Replikace DNA vyžaduje spolupráci několika druhů enzymů. Již jsme mluvili o DNA-polymeráze a primáze, teď si povíme více o proteinech, které se s nimi podílejí na tvorbě replikačního aparátu, jenž umožňuje vznik a posun replikační vidličky a syntézu nové DNA. (Ačkoliv se zdá, že by se proteiny účastnící se odbourávání RNA-primeru a jeho nahrazení – DNA-nukleáza, reparační polymeráza a ligáza – měly také nacházet v replikačním aparátu, zatím to nebylo prokázáno.)

Jednou ze základních složek replikačního aparátu je *helikáza*, která využívá energii z hydrolýzy ATP k pohybu podél DNA a současnému rozvíjení dvojšroubovicové struktury (obr. 6-21). Dvojšroubovice DNA musí být rozvinuta nejen na počátku replikace, ale její rigidní struktura musí být i nadále rozvolňována, aby DNA mohla sloužit jako jednořetězcový templát pro DNA-polymerázu. Dalšími bílkovinami nutnými pro replikaci jsou proteiny vázající se na jednovláknovou DNA, tzv. *SSB-proteiny* (z anglického *single-strand binding proteins*), které ochraňují jednořetězcovou DNA uvolněnou helikázou před znovuspárováním. *Svírací protein* (anglicky: *sliding clamp*) je další součástí replikačního aparátu. Tento protein pevně váže DNA-polymerázu na templát, na opožďujícím

Otázka 6-4 Diskutujte o následujícím tvrzení: "Primáza je nedbalý enzym, který dělá mnoho chyb. Nakonec jsou RNA-primery nahrazeny DNA, která je syntetizována s mnohem větší přesností. To je plynutí, mnohem efektivnější by bylo, kdyby DNA-polymeráza rovnou nasyntetizovala přesnou kopii původního vlákna."



Obrázek 6-21 Proteiny v replikační vidličce. V replikační vidličce se nacházejí dvě molekuly DNA-polymerázy; jedna syntetizuje vedoucí řetězec, druhá váznoucí řetězec. Obě jsou přidržovány na DNA prstencovitým svíracím proteinem, který umožňuje DNA-polymeráze skluz po vlákně DNA. DNA-helikáza využívá energii hydrolyzy ATP ke svému pohybu za současného oddělování mateřských řetězců. Proteiny vázající se na jednořetězcovou DNA zabraňují odděleným vláknům znovu se spojit. Na jednořetězcovou DNA se váže primáza a za ní polymeráza. Pro zjednodušení ukazuje obrázek jednotlivé proteiny samostatně, v buňce jsou všechny spojeny do velkého replikačního aparátu, jak je ukázáno na obr. 6-22.

se řetězci ji navíc uvolňuje po dokončení syntézy každého Okazakiho fragmentu. Spínací protein má tvar prstence, který obevymká DNA a pohybuje se podél ní i s navázanou DNA-polymerázou ve směru replikace (obr. 6-21).

Předpokládá se, že většina proteinů, které spolupracují na syntéze DNA, tvoří jeden velký multimerní komplex, který se jako celek pohybuje podél DNA a umožňuje syntézu DNA na obou vlákních současně. Energii celému procesu dodává hydrolyza nukleosidtrifosfátů. Detailní struktura replikačního aparátu není dosud přesně známa, její předpokládaná podoba je zobrazena na obr. 6-22.

Naše znalosti o replikaci DNA jsou poměrně komplexní oproti jiným procesům probíhajícím v buňce; přesto i zde zůstává mnoho nejasností. Například není přesně známo, jak je polymeráza syntetizující vedoucí řetězec spojena s polymerázou syntetizující opožďující se řetězec za současné synchronizace replikace na obou řetězcích. Ačkoliv je poměrně dobře prozkoumán začátek replikace u bakterií, u člověka je informací o iniciaci replikace zatím málo.

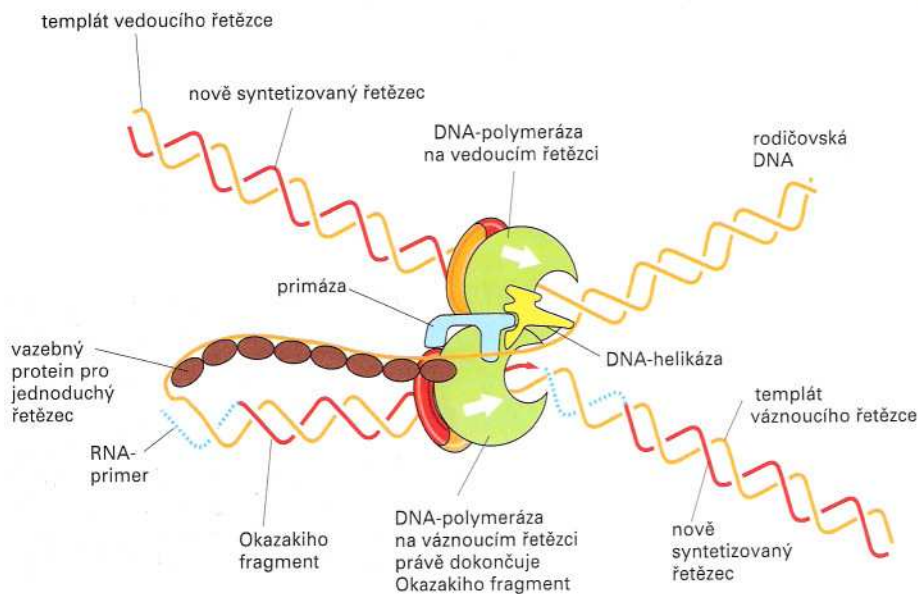
Vzhledem k požadavku na přesnost a ukončení replikace před rozdělením buňky není překvapující, že si buňky vyvinuly mechanismy, kterými dokáží rozpoznat dokončení replikace a opravit chyby vzniklé nejen v jejím průběhu, ale i náhodná poškození DNA způsobená například zářením nebo chemickými látkami. Více si o opravě DNA povíme v následující části této kapitoly.

Oprava DNA

Rozmanitost živých organismů a jejich úspěch v osídlování většiny zemského povrchu závisí na genetických změnách akumulovaných během milionů let, neboť ty dovolily organismům přizpůsobit se měnícím se podmínkám a osídlit nové typy životního prostředí. Přesto pokud uvažujeme z krátkodobého hlediska

Otázka 6-5 Gen, který kóduje jeden z proteinů podílejících se na replikaci, byl inaktivován mutací. I přes absenci tohoto proteinu se buňka snaží do poslední chvíle DNA replikovat. Jaký bude konečný produkt replikace DNA, pokud tímto inaktivovaným proteinem bude:

- DNA-polymeráza
- DNA-ligáza
- svírací protein pro DNA-polymerázu
- nukleáza odstraňující RNA-primery
- DNA-helikáza
- primáza



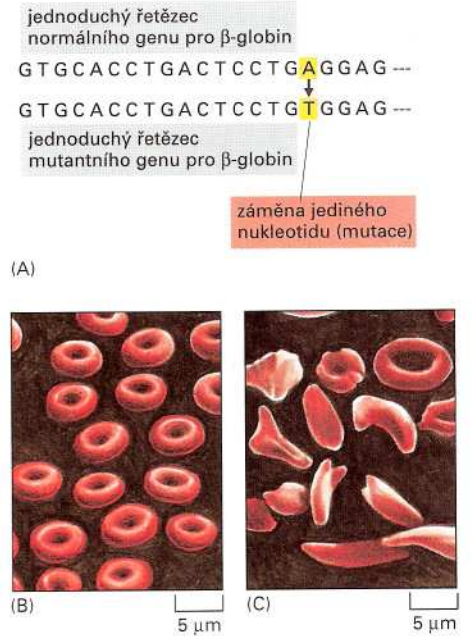
Obrázek 6-22 Model replikační vidličky. Tento obrázek ukazuje současný názor na uspořádání proteinů v pohybující se replikační vidličce. Struktura z obr. 6-21 byla změněna tím, že opožďující se vlákno bylo stočeno tak, aby DNA-polymeráza syntetizující tento řetězec mohla být v kontaktu s DNA-polymerázou syntetizující vedoucí vlákno. Sbalení navíc přiblíží 3'-konec dokončeného Okazakiho fragmentu k začátku nového fragmentu (porovnejte s obr. 6-21). Protože je DNA-polymeráza syntetizující opožďující se řetězec spojena se zbytkem replikačního aparátu, může být využita pro syntézu všech Okazakiho fragmentů, protože po dosyntetizování jednoho fragmentu se snadno přesune k blízkému RNA-primeru a začne syntetizovat nový fragment.

a z hlediska jednotlivce, jsou mutace ve většině případů škodlivé, obzvláště u mnohobuněčných organismů, kde jsou více pravděpodobné takové genetické změny, které narušují komplexitu organismu, jeho vývoj nebo fyziologii. Pro život a rozmnožování je tedy důležitá genetická stabilita. Této stability je dosahováno nejen vysokou přesností replikace, ale také opravami náhodně vzniklých mutací, ke kterým v genomu neustále dochází. Většina změn v DNA je pouze dočasná, protože jsou okamžitě opravovány procesem souhrnně nazývaným **reparace (oprava) DNA**.

Změny v DNA jsou příčinou mutací

Jen vzácně udělají replikace nebo opravné mechanismy chybu, která umožní zafixování změny v DNA. Tato trvalá změna se nazývá **mutace** a může mít dalekosáhlé následky. Mutace v jediném nukleotidovém páru může být příčinou zániku celého organismu, pokud k ní dojde v životně důležitém úseku DNA. Například u lidí je kyslík v krvi vázán na protein hemoglobin; sekvence nukleotidů kódující aminokyselinovou sekvenci jednoho ze dvou typů řetězců molekuly hemoglobinu (β -globinu) je na obr. 6-9. Stabilní záměna jednoho nukleotidového páru za jiný může způsobit tvorbu nesprávné aminokyselinové sekvence β -globinu. Protože struktura i aktivita proteinu závisí na jeho aminokyselinové sekvenci, protein se změněnou primární sekvencí může fungovat hůře nebo vůbec ne. Mutace postihující jeden nukleotidový pár je zodpovědná za vznik choroby nazývané *srpková anemie* (obr. 6-23). Hemoglobin srpkových buněk je méně rozpustný než jeho normální forma a tvoří vláknité sraženiny, které určují typický tvar těchto červených krvinek. Díky němu jsou buňky křehčí a rychle se v krevním řečišti

Obrázek 6-23 Mutace odpovědná za vznik genetické choroby srpkové anemie. Kompletní nukleotidová sekvence β -globinového genu je na obr. 6-9. Její krátký úsek z počátku genu je zapsán v (A). Změnou (mutací) jednoho nukleotidu dochází ke vzniku pozměněné formy proteinu, kde je kyselina glutamová v šesté pozici nahrazena valinem. (Celý β -globinový protein je tvořen 146 aminokyselinami.) Člověk má dvě kopie každého genu (jeden od každého z rodičů); pokud je tato mutace pouze v jednom β -globinovém genu, neprojeví se tato změna fenotypicky, protože správný gen kompenzuje poškozenou kopii. Avšak u člověka, který má obě kopie genu takto poškozené, se projeví srpková anemie. Normální červené krvinky jsou na fotografii (B), erythrocyty pacienta se srpkovou anemií na fotografii (C).

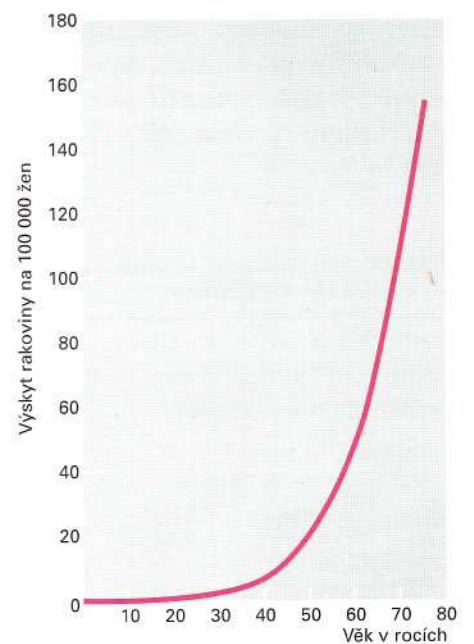


poškozují; proto pacienti s touto chorobou mají menší počet červených krvinek (obr. 6-23C). Jejich deficit pak způsobuje slabost, závratě a bolesti hlavy a může ohrožovat i život člověka.

Příklad srpkové anemie, která patří mezi dědičné choroby, ukazuje význam ochrany *zárodečných buněk* před mutacemi. Mutace v jedné zárodečné buňce je totiž přenesena do všech buněk mnohobuněčného organismu, který z ní vznikne, i do všech zárodečných buněk tohoto organismu. Přesto je důležitá ochrana i ostatních (*somatických*) buněk mnohobuněčného organismu. Změny nukleotidových sekvencí v somatických buňkách totiž mohou dát vznik buněčné variantě, která je schopná nekontrolovaně se množit na úkor ostatních buněk. V extrémním případě dochází k nekontrolované buněčné proliferaci známé jako rakovina. Toto onemocnění, zodpovídající za 30% úmrtí v Evropě a Severní Americe, je způsobeno postupným hromaděním změn vzniklých náhodnými mutacemi v DNA somatických buněk (obr. 6-24). Desetinásobné zvýšení mutační frekvence by tedy bylo příčinou katastrofálního nárůstu rakoviny díky urychlení vzniku variant somatických buněk.

Na závěr můžeme konstatovat, že vysoká přesnost, s jakou je DNA replikována a udržována, je důležitá jak pro zárodečné buňky, které přenášejí geny na další generaci, tak pro somatické buňky, které tvoří pečlivě regulovaný mnohobuněčný celek. Nemůžeme

Obrázek 6-24 Výskyt rakoviny jako funkce věku. Počet nově diagnostikovaných případů rakoviny tlustého stěva u žen v Anglii a Walesu za jeden rok je vyneseno jako funkce věku, kdy byla tato choroba u ženy diagnostikována. Přestože DNA v buňce podléhá neustálým změnám, které se hromadí a jsou přenášeny do dceřiných buněk, šance, že se buňka stane karcinogenní, se prudce zvyšuje s věkem. Rychlost vzestupu ukazuje, že vznik tohoto druhu rakoviny vzrůstá jako šestá mocnina věku, z čehož lze usuzovat, že ke vzniku rakoviny tlustého stěva vede až zhruba šest náhodných mutací v genech, které regulují růst buněk tlustého stěva.



být tedy překvapeni, že všechny buňky uplatňují celou řadu mechanismů, které snižují množství mutací v jejich DNA.

Systém opravy chybného párování bází napravuje chyby, které unikly replikačnímu aparátu

V první části této kapitoly jsme viděli, jak je DNA-polymeráza schopná kontrolovat sama sebe. Přesto jí některé chyby uniknou a ve dvojšroubovici zůstanou dva nesprávně se párující nukleotidy. V buňce je však ještě jeden systém, který dokáže nesprávně se párující nukleotidy odhalit a opravit je, tzv. *oprava chybného párování bází* (anglicky: *DNA mismatch repair*). Replikační aparát udělá zhruba jednu chybu na 10^7 zkopírovaných nukleotidů, 99% z nich je pak ještě odstraněno opravou chybného párování bází, což zvyšuje přesnost replikace na jednu chybu na 10^9 zkopírovaných nukleotidů. Pravděpodobnost chyby je tedy velmi nízká v porovnání s množstvím chyb, které vidíme kolem sebe (tab. 6-1).

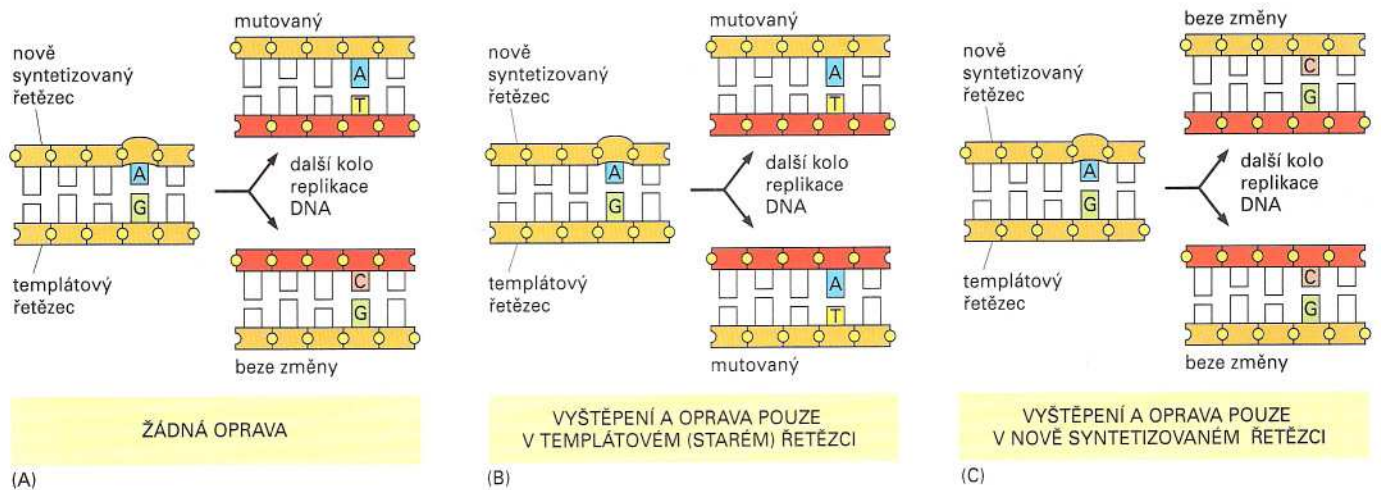
Kdykoliv udělá replikační aparát chybu, zanechá za sebou špatně se párující nukleotidy. Pokud nejsou opraveny, dojde k zafixování této mutace v příštím kole replikace (obr. 6-25A). Proteiny komplexu pro opravu chybného párování bází jsou schopné tyto nukleotidy rozpoznat, odstranit v tomto místě jeden ze řetězců DNA a znovu ho nasyntetizovat (obr. 6-26). Aby oprava byla efektivní, musí systém opravy chybného párování bází rozpoznat a opravit nově nasyntetizovaný řetězec, jinak dojde k zafixování mutace místo její opravy (obr. 6-25).

Jak tento systém rozliší oba řetězce, není u eukaryot zatím přesně známo. Existují určité důkazy, že oba nově replikované řetězce – vedoucí i váznuocí – jsou častěji poškozeny zlomy a zdá se, že tyto zlomy signalizují opravnému systému, které vlákno má opravit (obr. 6-26).

Důležitost systému opravy chybného párování bází byla poznána teprve nedávno, když bylo objeveno, že dědičná predispozice k některým rakovinám (speciálně k některým typům střevních rakovin) je způsobena mutacemi v genu pro tvorbu jednoho z proteinů tohoto systému. Člověk dědí dvě kopie tohoto genu (každou

Tabulka 6-1 Chybovost

Včasné doručení zásilek v USA místní poštovní službou	13 zpožděných zásilek na 100 balíčků
Letištní odbavovací systém	1 ztracené zavazadlo ze 200
Profesionální písarka se 120 úhozy za minutu	1 chyba na 250 znaků
Jízda autem v USA	1 mrtvý na 10^4 lidí za rok
DNA replikace (bez opravy chybného párování)	1 chyba na 10^7 zkopírovaných nukleotidů
DNA replikace (po opravě chybného párování)	1 chyba na 10^9 zkopírovaných nukleotidů



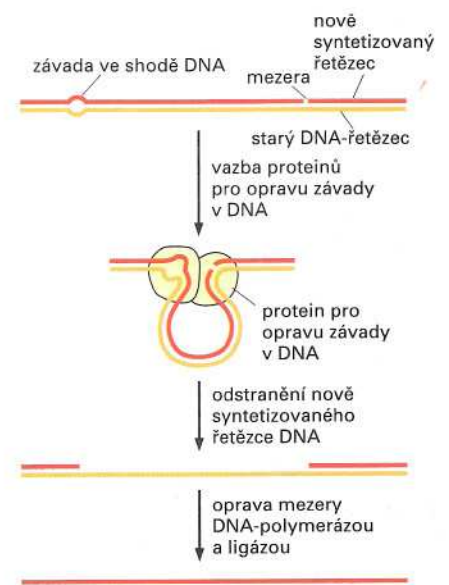
od jiného rodiče) a ti, kteří mají poškozenou jednu kopii, nemají žádné problémy. Pokud dojde k poškození i druhé kopie genu, rychle se vytvoří nový buněčný klon, který ve vysoké míře hromadí mutace. Protože většina kancerů je způsobena hromaděním mutací (obr. 6-24), buňky s defektním systémem opravy chybného párování bází mají mnohem větší šanci přeměnit se na karcinogenní. Proto jedinec, který zdědil poškozený gen pro opravu chybného párování bází, má značnou náchylnost k rakovině.

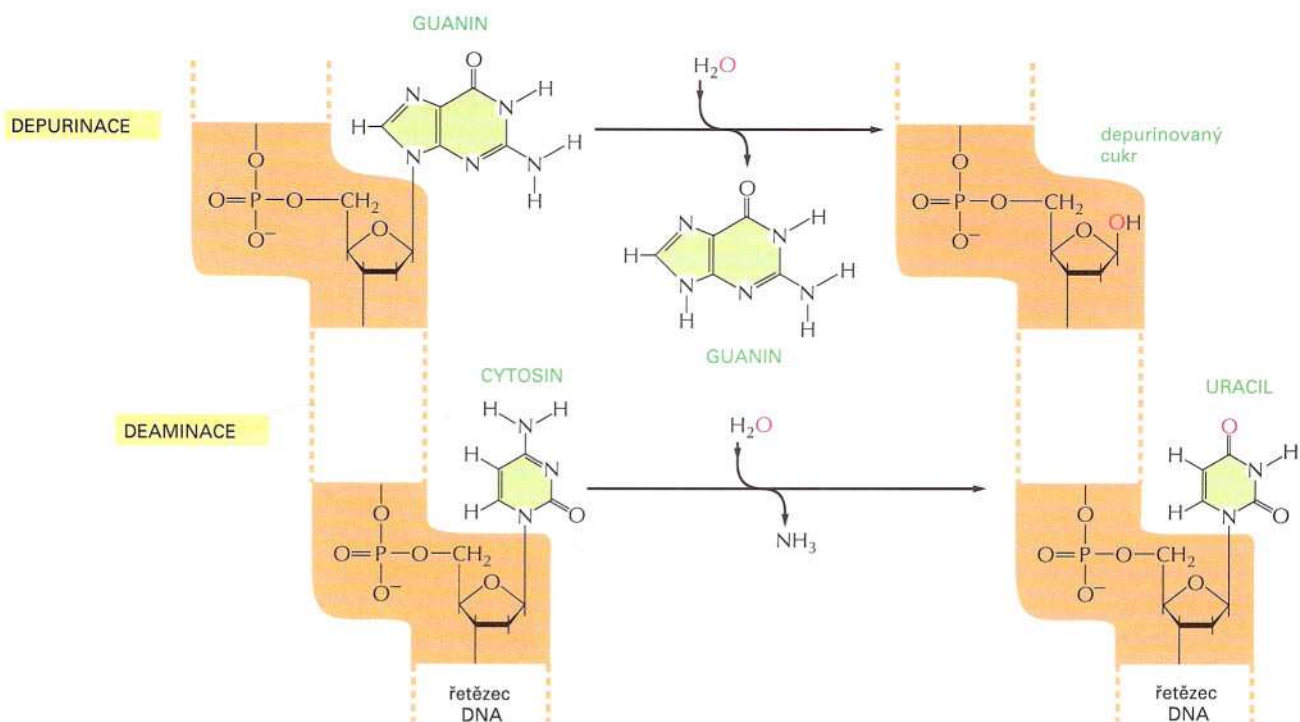
DNA v buňkách podléhá kontinuálnímu poškozování

Vzácné chyby vznikající při replikaci mohou být opraveny systémem opravy chybného párování bází. Avšak existují i další způsoby, jak může docházet k poškozování DNA, a proto musí existovat i jiné možnosti pro jejich opravu. Stejně jako každá jiná molekula v buňce i DNA se účastní srážek s ostatními molekulami. Častým výsledkem těchto srážek jsou chemické změny ve struktuře DNA. Například během doby potřebné k přečtení této věty dojde ke ztrátě 10^{12} purinů (A a G) z DNA ve všech buňkách lidského těla spontánní reakcí nazývanou *depurinace* (obr. 6-27). Depurinace nepoškozuje fosfodiesterovou páteř DNA, ale dává vznik mezerám podobným chybějícím zubům. Další významnou změnou ve struktuře DNA je samovolná ztráta aminoskupiny (*deaminace*) cytosinu,

Obrázek 6-25 Chybné párování bází v DNA a jeho oprava. (A) Jestliže nesprávné párování bází není opraveno před dalším kolem replikace, je tato mutace zafixována v jedné ze dvou dceřiných molekul DNA. (B) Pokud je nesprávné párování bází opraveno podle nově syntetizovaného řetězce, obě molekuly po dalším kole replikace ponese tuto mutaci. (C) Jestliže je nesprávné párování bází opraveno podle původního řetězce, nedojde k zafixování mutace po další replikaci ani v jedné z dceřiných molekul. Toto schéma je v buňce využíváno pro opravu nepárujících se nukleotidů v DNA, jak je dále ukázáno na obr. 6-26.

Obrázek 6-26 Mechanismus opravy chybného párování bází u eukaryot. Nepárující se nukleotidy v dvojšroubovici narušují její strukturu; tato deformace je rozpoznána opravnými enzymy, které pak odstraní nově vzniklou DNA. Mezera je zaplněna opravnou DNA-polymerázou a jednotlivé úseky jsou spojeny DNA-ligázou. Jak je ukázáno na obrázku, zlomy v nově syntetizované DNA jsou zřejmě signálem pro odlišení od původního vlákna. Zlomy se běžně vyskytují v opoždujícím se řetězci (viz obr. 6-17), ale můžeme je najít i ve vedoucím vlákne, ačkoliv jsou zde mnohem méně časté. Zlomy jsou po replikaci rychle odstraněny (viz obr. 6-20), proto musí být tento opravný systém velice rychlý.





Obrázek 6-27 Depurinace a deaminace. Tyto dvě reakce jsou dvěma nejčastějšími spontánními reakcemi, které způsobují poškození DNA v buňce. Depurinace má za následek uvolnění guaninu (jako zde na obrázku) nebo adeninu z molekuly DNA. Hlavní typ deaminace (na obrázku) vede k přeměně cytosinu na uracil, ale i ostatní báze mohou být poškozeny deaminací. Oba typy reakcí probíhají u dvoušroubovicové DNA, pro zjednodušení je nakreslen jen jeden řetězec.

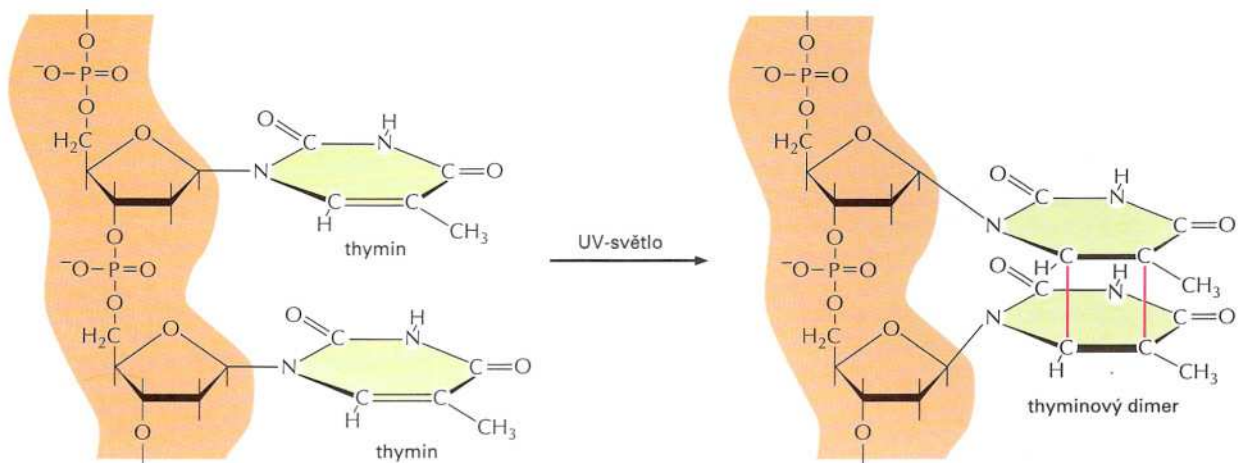
Otázka 6-6 Diskutujte o následujícím tvrzení: „DNA-opravné enzymy, které opravují poškození vzniklá deaminací a depurinací, musí přednostně rozpoznávat tato poškození v nově syntetizovaném řetězci.“

kteřá vede ke vzniku uracilu (obr. 6-27). Také některé chemicky reaktivní vedlejší produkty metabolismu mohou příležitostně reagovat s bázemi v DNA a pozměňovat je natolik, že se mohou nesprávně párovat. Ultrafialové záření ve slunečních paprscích také poškozuje DNA a je příčinou kovalentního spojení dvou sousedních pyrimidinových bází, jak je ukázáno na obr. 6-28 na příkladu thyminového dimeru.

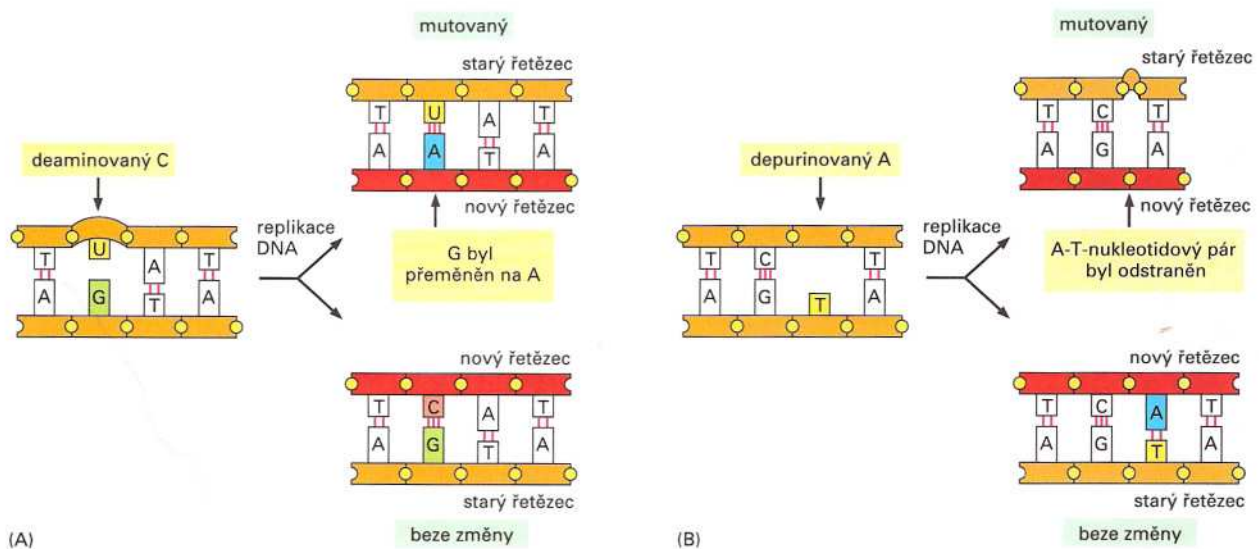
To jsme si vyjmenovali pouze několik chemických změn, které mohou nastat v naší DNA. Kdyby neexistovaly reparační systémy, mnoho z těchto změn by vedlo k nahrazení jednoho nukleotidového páru za jiný jako výsledek nesprávného párování při replikaci (obr. 6-29A) nebo delecí jednoho nebo několika nukleotidových párů po skončení replikace (obr. 6-29B). Některé typy poškození (například thyminové dimery) často zastavují replikační aparát na poškozeném místě. Všechny typy těchto poškození, pokud by zůstaly neopravené, by měly pro organismus katastrofální následky.

Stabilita genů je závislá na opravách DNA

Ačkoliv během každého dne dochází v DNA lidské buňky k tisícům náhodných chemických změn, převážná většina je odstraněna opravou DNA. V buňce existuje celá řada opravných mechanismů a každý z nich je katalyzován jinou sadou enzymů. Většina mechanismů je závislá na existenci dvou kopií genetické informace; každá je na jednom z párujících se vláken dvojšroubovice DNA. Jestliže dojde k poškození jednoho řetězce, není informace nenávratně ztracena, ale lze ji znovu obnovit podle komplementárního vlákna. Při většině změn vznikají struktury, které se



Obrázek 6-28 Poškození DNA ultrafialovým zářením. Ozářením DNA UV-světlem může dojít ke spojení dvou sousedních thyminových bází kovalentními vazbami za tvorby thyminového dimeru. V buňkách pokožky, které byly vystaveny slunečnímu záření, se vyskytuje převážně tento typ poškození DNA.



Obrázek 6-29 Chemická modifikace nukleotidů dává vznik mutacím. (A) Deaminace cytosinu, pokud zůstane neopravena, vede po replikaci k substituci jedné báze jinou. Jak bylo ukázáno na obr. 6-27, deaminace cytosinu vede ke vzniku uracilu. Uracil se liší od cytosinu vazebnou schopností, protože se přednostně páruje s adeninem. Při replikaci je tedy proti uracilu v nově syntetizovaném vlákně zařazen adenin. (B) Depurinace, pokud není opravena, může vést ke ztrátě nukleotidového páru. Jestliže replikační aparát při replikaci narazí na chybějící purinovou bázi, může přeskočit na další nukleotid a dát tak vznik jednonukleotidové delecí v nově syntetizovaném vlákně.

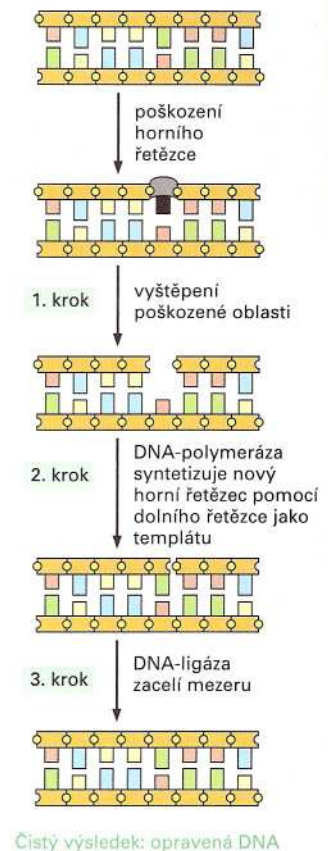
Obrázek 6-30 Základní mechanismus opravy DNA. Většina typů opravných systémů používá tři následující kroky: vystřížení (krok 1), resyntéza DNA (krok 2) a ligace (krok 3). V kroku 1 je poškozený úsek odstraněn jednou z řady specifických nukleáz, které dokážou rozpoznat různé typy poškození; v krocích 2 a 3 je vystřížený úsek DNA znovu nasyntetizován opravnou DNA-polymerázou a fragmenty jsou spojeny DNA-ligázou za využití energie hydrolyzy ATP. Některé typy poškození DNA (například deaminace cytosinu; obr. 6-27) vyžadují nahrazení jediného nukleotidu, jak je ukázáno na obrázku. Pro opravu jiných poškození, například thyminových dimerů (viz obr. 6-28), je nutné rozložit delší úsek DNA, obvykle 10-20 nukleotidů.

v nepoškozené DNA nevyskytují; proto lze snadno odlišit, který z řetězců je chybný. Základní postup pro opravu DNA je schematicky nakreslen na obr. 6-30. Obecný princip zahrnuje tři kroky:

1. Poškozená DNA je rozeznána a odstraněna jedním z různých typů nukleas, která přeruší kovalentní vazbu spojující chybné nukleotidy se zbytkem DNA a odstraní je za vzniku krátké mezery v poškozeném řetězci v dané oblasti.
2. Opravná DNA-polymeráza se naváže na volný 3'-hydroxylový konec DNA a vyplní vzniklou mezeru podle komplementárního vlákna obsahujícího původní informaci. Ačkoliv se opravná DNA-polymeráza liší od té, která replikuje DNA, obě syntetizují DNA stejným způsobem. Například také prodlužuje řetězec ve směru 5'→3' a má stejnou korektorskou aktivitu, která zajišťuje přesnost opravy. V mnoha buňkách je pro opravu poškozených řetězců využíván stejný enzym, který dokončuje syntézu opoždujícího se vlákna po odstranění RNA-primerů při replikaci (viz obr. 6-20)
3. Jakmile opravná DNA-polymeráza zaplní mezeru, je ještě třeba spojit nově nasyntetizovaný řetězec s původním vláknem. To je funkcí DNA-ligázy, která se také podílí na spojování jednotlivých úseků opoždujícího se řetězce při replikaci.

Kroky 2 a 3 jsou přibližně stejné pro většinu DNA-opravných systémů včetně systému opravy chybného párování bází. Největší rozdíly můžeme najít v kroku 1, kdy dochází k odstranění různých poškození specializovanými enzymy.

Význam opravných procesů je značný, jak naznačuje množství druhů opravných enzymů v buňce. Jednobuněčné organismy (například kvasinky) obsahují více než 50 různých proteinů, které se uplatňují při opravných procesech, ještě více se jich předpokládá u člověka. Význam opravných systémů je patrný zvláště při jejich poškození. Například lidé trpící genetickou chorobou nazývanou *xeroderma pigmentosum* nemohou opravovat thyminové dimery (viz obr. 6-28), protože zdědili defektní gen pro jeden z proteinů tohoto opravného systému. U takových lidí se vyvíjejí kožní léze, eventuálně i rakovina kůže, a to díky akumulaci thyminových dimerů vzniklých v buňkách vystavených slunečnímu záření.





VELRYBA	GTGTGGTCTCGTGATCAAAGGCGAAAGGTGGCTCTAGAGAATCCC
ČLOVĚK	GTGTGGTCTCGCGATCAGAGCGCAAGATGGCTCTAGAGAATCCC

Obrázek 6-31 Porovnání části genu určujícího pohlaví mezi dvěma odlišnými organismy. Ačkoliv mají stavbu těla značně odlišnou, lidé i velryby jsou tvořeni ze stejných proteinů. Navzdory času, který uplynul od doby, kdy došlo k oddělení obou druhů, jsou si nukleotidové sekvence mnoha genů velryby a člověka velice podobné. Sekvence části genu kódujícího protein, který určuje samčí pohlaví u člověka a velryby, jsou napsány nad sebou, shodné nukleotidy jsou označeny zeleně.

Díky vysoké přesnosti, s jakou je DNA uchovávána, mají blízce příbuzné druhy proteiny s velmi podobnými sekvencemi

V této kapitole jsme měli možnost vidět, že DNA je replikována se značnou přesností a že náhodné změny, které by mohly být zafixovány v DNA, jsou velice úspěšně opravovány. Díky opravným mechanismům se změny v DNA hromadí během evoluce jen velmi pomalu. Samozřejmě je rychlost evolučních změn v DNA také ovlivněna přírodním výběrem – chyby v DNA, které jsou pro daný organismus nevýhodné, jsou z populace eliminovány buď smrtí jedince nebo jeho neplodností. Mechanismus replikace i reparace je však velice přesný i bez selekčního tlaku – na mnoha místech DNA, kde by změna bází neměla žádný vliv na zdatnost organismu, je DNA zachována v nezměněné podobě více než desítky milionů let. Například člověk a šimpanz, ačkoliv k oddělení obou druhů došlo před pěti miliony let, mají z 98% shodné sekvence DNA. Pokud srovnáme člověka s velrybou, oba druhy mají chromosomy s velice příbuznými sekvencemi DNA, a proteiny, které jsou jimi kódovány, mají takřka identické sekvence (obr. 6-31). Proto je v genomu člověka a příbuzných druhů zapsána genetická informace z dávné minulosti – informace delší a detailnější než kterákoli kniha. Díky vysoké přesnosti replikace a reparace DNA je tato informace po stove miliónů let sotva znatelně pozměněna.

Otázka 6-7 Předpokládejte mutaci ovlivňující enzym, který je nutný pro opravu DNA poškozenou ztrátou purinových bází. Poškození tohoto enzymu vede k akumulaci zhruba 5 000 mutací v DNA každé buňky denně. Průměrný rozdíl v sekvenci DNA mezi člověkem a šimpanzem je 1%. Jak dlouho vám bude trvat, než se změníte v opici? Co je chybného na tomto tvrzení?

Základní shrnutí

- Život závisí na stabilním a kompaktním uchování genetické informace.
- Genetická informace je uložena v dlouhé molekule DNA, která se skládá z lineární sekvence nukleotidů adeninu, thyminu, guaninu a cytosinu.
- Molekula DNA je tvořena dvoušroubovicí, která se skládá ze dvou komplementárních řetězců nukleotidů. Oba řetězce jsou spojeny vodíkovými můstky mezi G a C, a A a T.
- Každý řetězec DNA má díky střídání cukrů a fosfátů ve své kostře chemickou polaritu. Obě vlákna jsou vůči sobě antiparalelní – v opačné orientaci.
- Každý z obou řetězců může být templátem pro syntézu komplementárního vlákna. Oba řetězce tedy nesou stejnou informaci.
- Molekula DNA je duplikována (replikována) syntézou nového komplementárního řetězce ke každému původnímu řetězci dvojšroubovice. Proces replikace DNA, ve kterém vznikají dvě identické molekuly z jedné původní, umožňuje přenos genetické informace z mateřské buňky do dceřiné.
- Během replikace jsou od sebe oba původní řetězce oddělovány tak, že vytvoří jednu nebo více replikačních vidlic ve tvaru Y. Enzym DNA-polymeráza, umístěný v replikační vidličce, syntetizuje podle obou vláken nové řetězce, a tvoří proto dvě nové dvojšroubovice.
- DNA-polymeráza replikuje DNA s vysokou přesností, dělá méně než jednu chybu na 10^7 replikovaných bází. Tato přesnost je umožněna tím, že DNA-polymeráza umí odstranit své vlastní chyby během pohybu podél DNA.
- Protože DNA-polymeráza může syntetizovat DNA pouze v jednom směru, jen jeden řetězec v replikační vidličce (vedoucí) může vznikat kontinuálně. Tvorba opožďujícího se řetězce je nespojitý proces, nejprve vznikají krátké fragmenty DNA, které jsou později spojeny DNA-ligázou v nepřerušené vlákno.
- Korektorská aktivita DNA-polymerázy jí neumožňuje začít syntézu nového řetězce DNA. Syntézu nového vlákna DNA začíná RNA-polymeráza nazývaná primáza, která vytváří krátké úseky RNA (primery), jež jsou později rozloženy a nahrazeny DNA.
- Replikace DNA vyžaduje spolupráci mnoha enzymů, které dohromady tvoří replikační aparát. Replikační aparát je umístěn v replikační vidličce.
- Chyby vzniklé během replikace a chemické reakce poškozující nukleotidy v DNA způsobují změny v nukleotidové sekvenci DNA. Pokud nejsou tyto změny efektivně opraveny, dávají vznik mutacím, které mohou být osudné pro daný organismus. Genetická informace může být stabilně uchovávána ve struktuře DNA díky existenci mnoha opravných systémů, které kontinuálně kontrolují DNA a opravují replikační chyby a poškozené nukleotidy. DNA může být snadno opravena díky své dvouvláknové struktuře, kdy je nepoškozený řetězec využit jako templát pro opravu druhého vlákna.
- Vzácné replikační chyby, které uniknou replikačnímu aparátu, jsou opraveny systémem opravujícím chybné párování bází, který kontroluje nově vznikající DNA a opravuje ji. Výsledná přesnost replikace po této opravě je jedna chyba na 10^9 zkopírovaných nukleotidů.
- Poškození DNA způsobené chemickými reakcemi a ultrafialovým zářením je opravováno různými enzymy, které jsou schopny rozpoznat poškozené vlákno a vystříhnout krátký úsek DNA obsahující chybu. Chybějící DNA je dosyntetizována opravnou DNA-polymerázou, která používá nepoškozený řetězec jako templát. DNA-ligáza pak spojí jednotlivé úseky dohromady.

Klíčová slova

antiparalelní DNA	dvojšroubovice gen genom	mutace opožďující se řetězec oprava DNA pár bází	replikační počátek replikační vidlička RNA
DNA-polymeráza	komplementarita korektura	replikace DNA	templát vedoucí řetězec

7 Od DNA k proteinu

Jakmile byla na začátku padesátých let objevena struktura DNA (deoxyribonukleová kyselina), bylo stále jasnější, že dědičná informace je v buňce uložena v sekvenci nukleotidů DNA. V Kapitole 6 jsme si řekli, jak je tato informace přenášena z generace na generaci v nezměněné formě při replikaci DNA. Ale jak buňky dekódují a využívají tuto informaci? Jak vůbec může být nějaká informace zapsána pouhými čtyřmi „písmeny“ – čtyřmi různými nukleotidy v DNA – a navíc ještě u tak odlišných druhů jako je bakterie, octomilka nebo člověk? Musíme se ještě mnoho naučit o tom, jak je informace uložena v genech i těch nejjednodušších jednobuněčných organismů, natož pak o tom, jak se vyvíjí mnohobuněčný organismus, jako jsme my. Jak je v DNA zapsána informace a jak je čtena, už ale víme.

Ještě před identifikací genetického kódu bylo známo, že DNA nějakým způsobem řídí vznik proteinů. Proteiny jsou jednou ze základních složek buněk, u kterých určují nejen jejich strukturu, ale i jejich funkce. V předcházejících kapitolách jsme poznali několik z tisíců různých proteinů, které si buňka vyrábí. V Kapitole 5 jsme se dozvěděli, že vlastnosti a funkce proteinu jsou dány lineárním pořadím jeho stavebních kamenů - tedy aminokyselinovou *sekvencí*, která také určuje, jak bude daný protein sbalen do funkční konformace. Genetická informace obsažená v DNA proto nějakým způsobem musí určovat aminokyselinovou sekvenci proteinu. V této kapitole si vysvětlíme, jak k tomu přesně dochází.

DNA neřídí syntézu bílkovin sama jako taková, ale spíše se podobá manažerovi, který rozděljuje různé úkoly týmu pracovníků. Jestliže buňka potřebuje nějaký konkrétní protein, je nukleotidová sekvence v patřičné oblasti dlouhé molekuly DNA v chromosomu nejprve zkopírována do jiného druhu nukleové kyseliny – RNA (ribonukleová kyselina). Tato RNA je přímo využívána jako templát pro tvorbu proteinů. Mnoho tisíc těchto přeměn DNA na proteiny se odehrává každou sekundu v každé buňce našeho těla. Genetická informace je tedy předávána z DNA do RNA a následně z RNA do

OD DNA K RNA

- Části DNA jsou přepisovány do RNA
- Transkripce vzniká RNA komplementární k jednomu řetězci DNA
- V buňce vzniká několik typů RNA
- Signály v DNA říkají RNA-polymeráze, kde má začít a kde skončit přepis
- Eukaryontní RNA podléhají v jádře úpravám
- Eukaryontní geny jsou přerušeny nekódujícími sekvencemi
- Introny jsou z RNA odstraněny sestřihem
- Molekuly RNA jsou v buňce nakonec degradovány
- Prapůvodní buňky pravděpodobně obsahovaly ve svých genech introny

OD RNA K PROTEINU

- mRNA je dekódována po trojicích nukleotidů
- Molekuly tRNA přiřazují aminokyseliny ke kodonům v mRNA
- Specifické enzymy připojují správné aminokyseliny k jejich tRNA
- mRNA je dekódována na ribosomech
- Kodony v mRNA signalizují, kde má začít a kde skončit syntéza proteinu
- Proteiny jsou syntetizovány na polyribosomech
- Přísně regulovaná degradace proteinů umožňuje buňce určovat množství každého proteinu
- Je třeba mnoha kroků, než z DNA vznikne protein

RNA A PŮVOD ŽIVOTA

- Jednoduché biologické molekuly mohly vzniknout za prebiotických podmínek
- RNA může uchovávat informaci i katalyzovat chemické reakce
- RNA pravděpodobně v evoluci předcházela DNA

proteinu (obr. 7-1). Všechny typy buněk, od bakterií až po člověka, přeměňují genetickou informaci tímto způsobem – tento princip je tak obecný, že byl nazván *ústředním dogmatem* molekulární biologie.

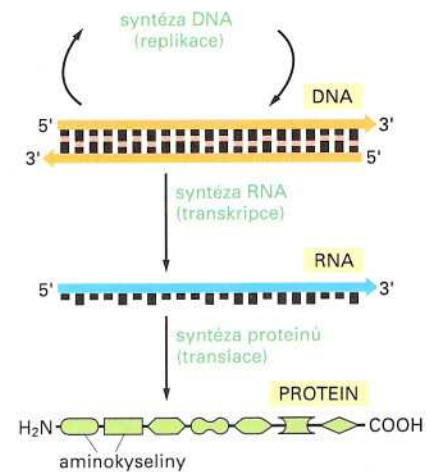
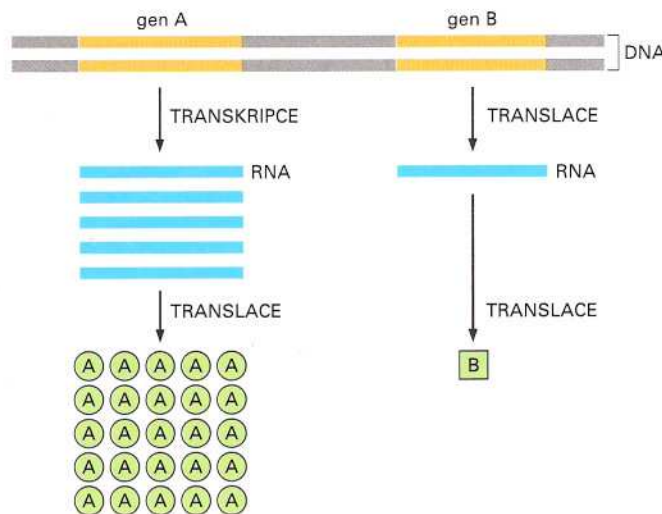
V této kapitole si vysvětlíme mechanismus, kterým buňky přepisují DNA do RNA (procesem nazývaným *transkripce*) a jak využívají informaci zapsanou v RNA k syntéze proteinů (tento proces se nazývá *translace*). Na konci této kapitoly se zamyslíme, jak mohlo současné schéma uchování genetické informace, transkripce a translace vzniknout z jednodušších systémů na počátku buněčné evoluce.

Od DNA k RNA

Transkripce (přepis) a translace (překlad) jsou procesy, kterými buňka realizuje své genetické instrukce - své *geny*. Podle jednoho genu může vzniknout mnoho kopií RNA a jedna RNA může dát vznik několika identickým molekulám proteinu. Protože v buňce bývá jen jedna kopie genu na haploidní genom, tato amplifikace umožňuje buňce nasyntetizovat požadované množství proteinu mnohem rychleji, než kdyby DNA byla sama templátem pro syntézu proteinů. Každý gen může být přepsán a přeložen s různou účinností, což umožňuje buňce nasyntetizovat velmi odlišná množství různých proteinů (obr. 7-2). Navíc, jak uvidíme v Kapitole 8, může buňka regulovat expresi každého genu podle okamžité potřeby. V této části si povíme něco o tvorbě RNA, prvním kroku genové exprese.

Části DNA jsou přepisovány do RNA

Prvním krokem pro uplatnění genetické informace v buňce je přepsání části nukleotidové sekvence DNA – genu – do nukleotidové sekvence RNA. Tento proces se nazývá **transkripce** (přepis), protože informace, ačkoliv je kopírována do jiné chemické formy, je stále zapsána stejným způsobem, totiž nukleotidy. Stejně jako DNA



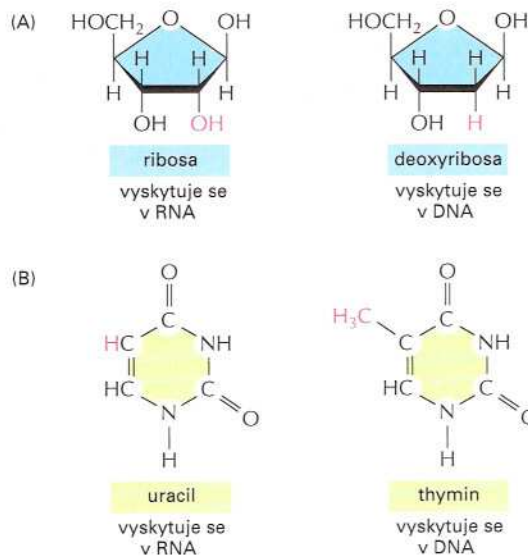
Obrázek 7-1 Od DNA k proteinu.

Tok genetické informace má ve všech živých buňkách směr od DNA do RNA (transkripce) a od RNA do proteinu (translace).

Otázka 7-1 Pouvažujte o termínu „ústřední dogma“, který má vyjadřovat tok genetické informace od DNA přes RNA k proteinu. Je vhodné použít slovo „dogma“ ve vědeckém kontextu?

Obrázek 7-2 Geny mohou být exprimovány s různou účinností.

Gen A je přepisován i překládán mnohem účinněji než gen B. V buňce je tedy mnohem větší množství proteinu A než proteinu B.



Obrázek 7-3 Chemická struktura RNA. (A) RNA obsahuje cukr ribosu, která se liší od deoxyribosy v DNA přítomností jedné hydroxylové skupiny navíc. (B) V RNA je báze thymin nahrazena uracilem, kterému oproti thyminu chybí jedna methylová skupina. (C) Krátký úsek RNA. Chemické spojení mezi nukleotidy je stejné v RNA i v DNA.

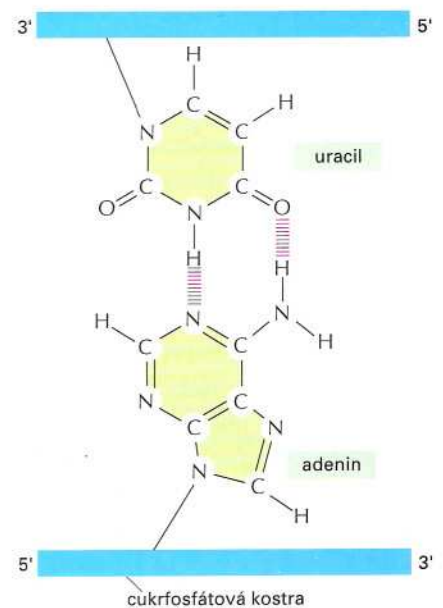
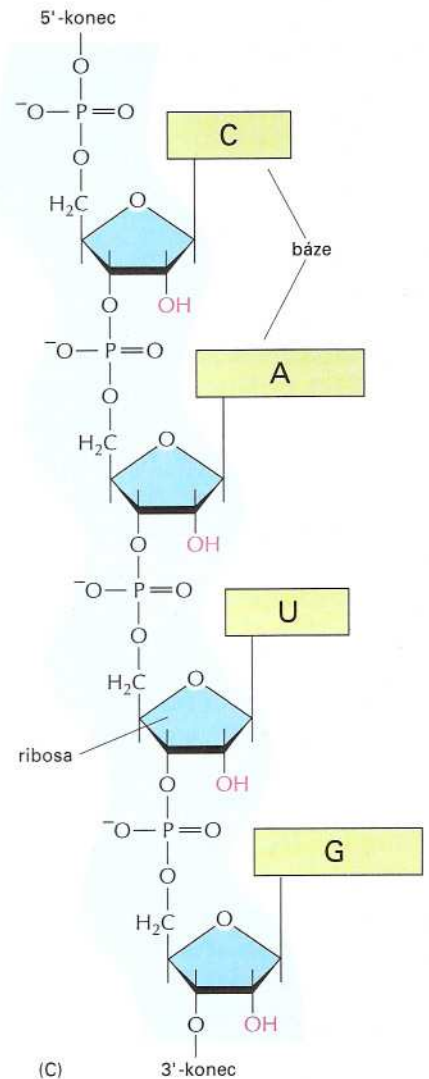
je RNA lineární polymer složený ze čtyř typů podjednotek spojených navzájem fosfodiesterovými vazbami (obr. 7-3). RNA se liší od DNA ve dvou aspektech: (1) nukleotidy v RNA se nazývají *ribonukleotidy*, protože cukernou složkou je ribosa (proto *ribonukleová* kyselina) místo deoxyribosy; (2) v RNA se také vyskytují báze adenin (A), cytosin (C) a guanin (G), ale thymin (T) je nahrazen uracilem (U). Protože se U stejně jako T páruje vodíkovými můstky s A (obr. 7-4), platí párování nukleotidů popsané pro DNA v Kapitole 6 i pro RNA.

Navzdory těmto malým chemickým odlišnostem se DNA a RNA velice liší celkovou strukturou. Zatímco se DNA v buňce vyskytuje vždy jako dvojšroubovice (s výjimkou některých virů), RNA je jednořetězcová molekula, která se na základě párování bází může sbalit do různých tvarů podobně jako polypeptidový řetězec do konečného tvaru bílkoviny (obr. 7-5). Jak uvidíme později v této kapitole, schopnost sbalit se do komplexní trojrozměrné struktury umožňuje RNA i jiné funkce, kromě přenosu informace z DNA do proteinu. Funkcí DNA je pouze uchovávání genetické informace, RNA však může mít i strukturní, popřípadě katalytickou funkci.

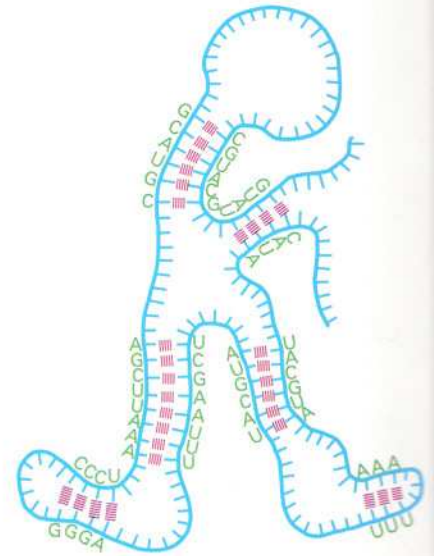
Transkripce vzniká RNA komplementární k jednomu řetězci DNA

Veškerá RNA v buňce vzniká transkripce, procesem, který se v některých krocích podobá replikaci DNA (viz Kapitola 6). Transkripce začíná rozvolněním krátkého úseku dvojšroubovice

Obrázek 7-4 Uracil se páruje s adeninem. Uracil má stejné vazebné schopnosti jako thymin, proto nukleotidový pár A-U připomíná pár A-T (viz obr. 6-5).



Obrázek 7-5 V rámci jedné molekuly RNA se mohou tvořit nukleotidové páry. RNA je jednořetězcová molekula, ale často obsahuje úseky, které se mohou párovat s komplementárními sekvencemi nacházejícími se na jiném místě téže molekuly. To umožňuje RNA sbalit se do trojrozměrné struktury, která je určena její nukleotidovou sekvencí.



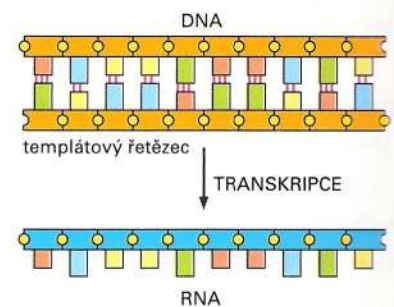
DNA, jeden z řetězců pak slouží jako templát pro syntézu RNA. Stejně jako při replikaci DNA je i nukleotidová sekvence RNA určena komplementárním párováním bází. Jestliže se volný ribonukleotid páruje s deoxyribonukleotidem v řetězci DNA, který slouží jako templát, je kovalentně připojen k rostoucímu řetězci RNA v enzymově katalyzované reakci. Řetězec RNA vznikající transkripcí – *transkript* – je tedy postupně prodlužován a má stejnou sekvenci jako vlákno DNA, které je komplementární k templátovému řetězci DNA (obr. 7-6).

Transkripce se však liší od replikace v několika zásadních rysech. Oproti nově vznikající DNA nezůstává RNA spojena s templátovou DNA vodíkovými můstky. Místo toho dochází hned za místem, kde byl přidán ribonukleotid, k obnovení dvojšroubovicové struktury DNA a vytěsnění vlákna RNA. Proto jsou molekuly RNA jednovláknové. Vzhledem k tomu, že dochází k přepisu pouze malé části DNA, jsou molekuly RNA mnohem kratší než DNA. Zatímco DNA lidského chromosomu má délku více než 250 milionů párů bází, většina molekul RNA je tvořena několika málo tisíci nukleotidy a mnoho z nich je ještě kratších.

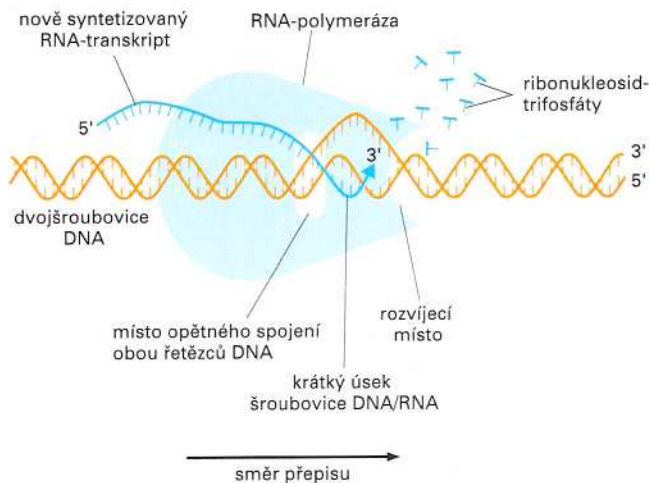
Enzymy, které přepisují DNA do RNA, se nazývají **RNA-polymerázy**. Stejně jako DNA-polymerázy, které katalyzují replikaci (viz Kapitola 6), katalyzují RNA-polymerázy vznik fosfodiesterové vazby, která spojuje jednotlivé nukleotidy a vytváří tak cukr-fosfátovou kostru RNA. RNA-polymeráza se pohybuje krok za krokem po DNA, rozvíjí před sebou její dvojšroubovicovou strukturu a uvolňuje tak vlákno pro komplementární párování s volnými ribonukleotidy. Také RNA je syntetizována ve směru 5' → 3' (obr. 7-7), pro její syntézu jsou však využívány ribonukleosidtrifosfáty (ATP, UTP, GTP a CTP) a energie pocházející z jejich hydrolýzy (viz obr. 6-15).

Téměř okamžité uvolňování RNA z templátového řetězce během syntézy umožňuje vznik mnoha kopií RNA podle DNA jednoho genu, protože další RNA kopie začíná vznikat obvykle před dokončením syntézy první RNA (obr. 7-8). Transkripce genu o střední velikosti (zhruba 1 500 nukleotidových párů) jednou RNA-polymerázou trvá přibližně 50 sekund a na tomto úseku může být navázáno až 15 RNA-polymeras. To znamená, že během jedné hodiny může vzniknout až tisíc transkriptů jednoho genu. U většiny genů je však množství transkriptů mnohem menší.

Ačkoliv RNA-polymeráza katalyzuje v podstatě stejnou chemickou reakci jako DNA-polymeráza, jsou zde některé podstatné odlišnosti. Za prvé, RNA-polymeráza katalyzuje spojení ribonukleotidů místo deoxyribonukleotidů. Za druhé, RNA-polymeráza postrádá *korektorskou* schopnost – před přidáním dalšího nukleotidu do řetězce RNA nekontroluje, zda se předcházející nukleotid správně páruje (viz obr. 6-18), a proto může RNA-polymeráza začít



Obrázek 7-6 Transkripce vzniká RNA, která je komplementární k jednomu z řetězců DNA.



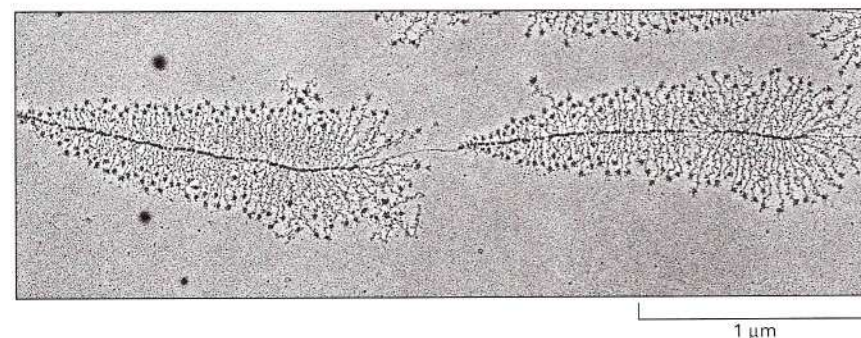
Obrázek 7-7 DNA je transkribována enzymem RNA-polymerázou. RNA-polymeráza (světle modrá) se pohybuje krok za krokem podél DNA za současného rozvíjení dvojšroubovice DNA a přidávání jednotlivých ribonukleotidů (malá T) k rostoucímu řetězci RNA v polymeračním místě. Za polymerázou se obě vlákna DNA opět spojí a vytěsní nasyntetizovanou RNA. Krátký úsek hybridní RNA/DNA dvojšroubovice vzniká tedy pouze přechodně, RNA je jednořetězcovou komplementární kopií jednoho ze dvou řetězců DNA. Substrátem pro reakci jsou nukleotidy ve formě ribonukleosidtrifosfátů (ATP, UTP, CTP a GTP) a pro polymerační reakci je využita energie uvolněná jejich hydrolýzou (viz obr. 6-15).

syntetizovat nový RNA řetězec bez potřeby primeru. V tom, že RNA-polymeráza postrádá tuto sebeopravnou funkci, se odráží i fakt, že transkripce není a nemusí být tak přesná jako replikace DNA, protože RNA není určena k trvalému uchovávání genetické informace v buňkách. RNA-polymeráza udělá průměrně jednu chybu na 10^4 přepsaných nukleotidů (pro porovnání DNA-polymeráza jednu na 10^7 nukleotidů).

V buňce vzniká několik typů RNA

Většina genů v buňce kóduje aminokyselinovou sekvenci proteinů a molekuly RNA vzniklé transkripcí těchto genů jsou společně nazývány **informační** nebo **mediátorová RNA (mRNA)**, z anglického *messenger RNA* a jejich zásadní funkcí je řídit vznik proteinu. Konečným produktem jiných genů je samotná RNA (Tabulka 7-1). V dalších částech této kapitoly uvidíme, že tato neinformační RNA, stejně jako proteiny, má v buňce strukturní a enzymovou úlohu a hraje důležitou roli při překladačném procesu. **Ribosomální RNA (rRNA)** tvoří jádro ribosomů, na kterých je mRNA překládána do proteinu. **Transferová RNA (tRNA)** je adaptorem, který vybírá správné aminokyseliny a umísťuje je do správného místa na ribosomu, aby mohly být začleněny do rostoucího aminokyselinového řetězce.

Zatímco jsou molekuly DNA obvykle velmi dlouhé a nesou informace pro mnoho tisíc různých proteinů, molekuly RNA jsou mnohem kratší a obsahují informaci jen z malé části DNA. U euka-



Obrázek 7-8 Transkripce dvou genů zachycená na snímku z elektronového mikroskopu. Na fotografii je vidět mnoho molekul RNA-polymerázy, jak současně transkribují dva sousední geny. Molekuly RNA-polymerázy zde vypadají jako tečky podél DNA s připojenými jemnými vlákny nově syntetizované RNA. Na tomto obrázku jsou zachyceny přepisované geny pro ribosomální RNA (rRNA). Tato RNA není překládána do proteinu, ale je přímo využita pro stavbu ribosomů, na kterých probíhá translace. Částice viditelné na 5'-konci všech rRNA transkriptů (volné konce) jsou pravděpodobně tvořící se ribosomy.

Tabulka 7-1 Typy RNA v buňce

Typ RNA	Funkce
mRNA	kódování proteinů
rRNA	součást ribosomů, účast na proteosyntéze
tRNA	adaptor mezi mRNA a aminokyselinou při proteosyntéze
malé RNA	účast na sestřihu pre-mRNA, transportu proteinů do ER a jiných buněčných procesech

ryot zpravidla obsahuje každá mRNA informaci přepsanou z jediného genu, u bakterií je často několik sousedních genů přepsáno do jedné mRNA, která pak nese informaci pro několik různých proteinů.

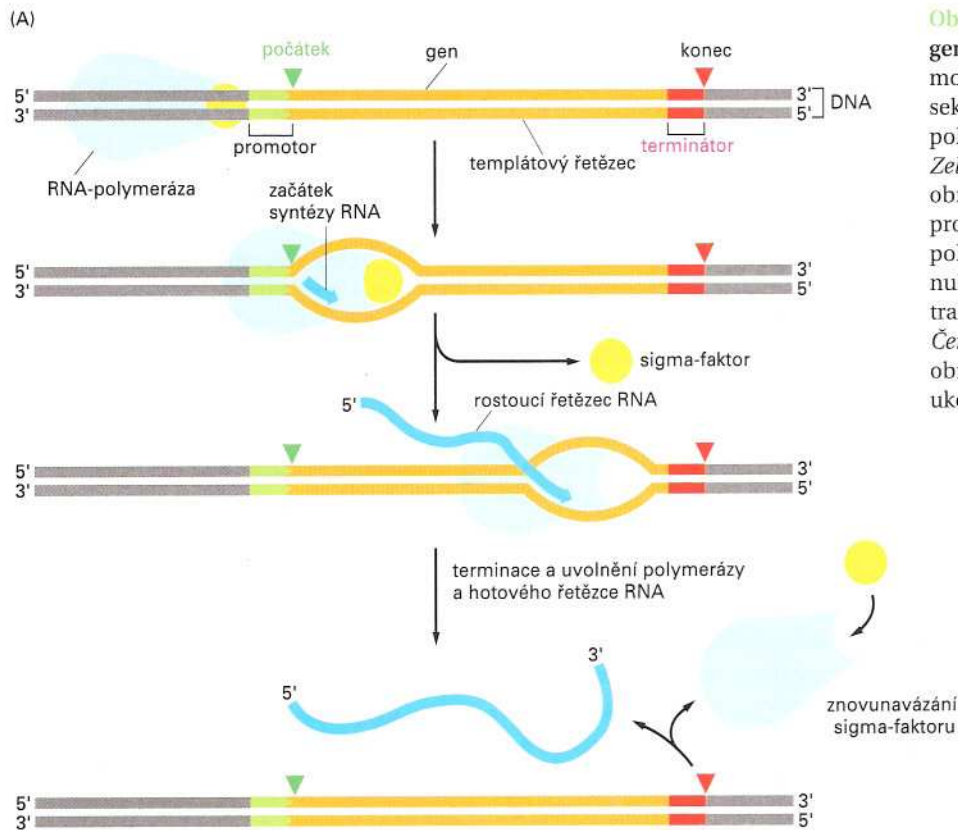
Signály v DNA říkají RNA-polymeráze, kde má začít a kde skončit přepis

Před začátkem transkripce musí RNA-polymeráza přesně rozeznat začátek genu a navázat se na toto místo. Způsob, jakým RNA-polymeráza poznává začátek transkripce, se liší mezi prokaryoty (bakterie) a eukaryoty. Protože je situace u bakterií jednodušší, ukážeme si nejprve na nich, jak transkripce začíná, a k eukaryotům se vrátíme v další části této kapitoly. Iniclace (začátek) transkripce je velmi zajímavý proces, protože hlavně na této úrovni buňka reguluje, který protein a v jakém množství je nutno nasyntetizovat.

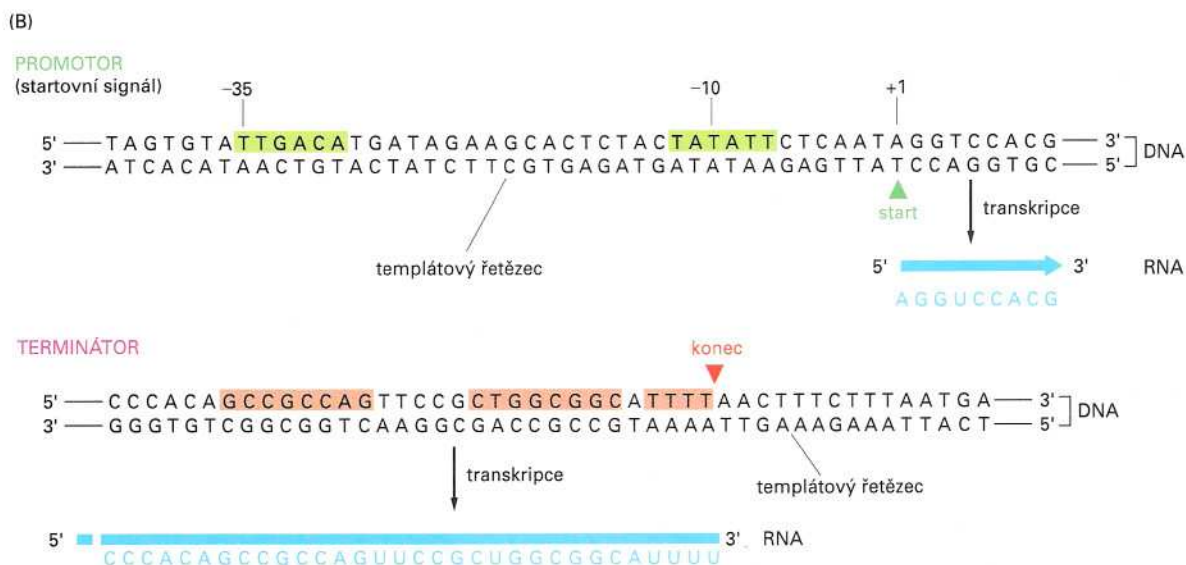
U bakterií má RNA-polymeráza snahu slabě se vázat na molekulu DNA, kdykoliv se s ní náhodně setká a potom se po ní rychle pohybuje skluzem. Jakmile RNA-polymeráza rozpozná v DNA sekvenci tzv. **promotoru**, která obsahuje informaci o začátku transkripce, pevně se naváže na tento úsek. RNA-polymeráza dokáže rozpoznat začátek transkripce, ačkoliv je DNA ve dvojšroubovicové formě, a to vytvořením několika specifických kontaktů s částmi bází, které jsou exponovány vně helixu.

Jakmile se RNA-polymeráza pevně naváže na promotor, rozvolní před sebou strukturu dvojšroubovice a vytvoří tak krátké jednořetězcové úseky DNA (obr. 7-9A). Jedno z vláken je pak templátem pro komplementární párování bází a RNA-polymeráza spojí první dva ribonukleotidy nového řetězce RNA. K jeho prodlužování dochází do té doby, než RNA-polymeráza narazí na druhý signál v DNA, tzv. terminátor, kde se zastaví a odpoutá se od templátu DNA i řetězce RNA (obr. 7-9B).

Za rozpoznání promotorové sekvence v bakteriální DNA je primárně zodpovědná podjednotka RNA-polymerázy nazývaná *sigma-faktor*. Jakmile se polymeráza naváže na promotor a nasyntetizuje vlákno dlouhé přibližně 10 nukleotidů, je sigma-faktor uvolněn a RNA-polymeráza se může pohybovat ve směru transkripce a pokračovat v syntéze RNA. Po uvolnění z DNA na sekvenci terminátoru RNA-polymeráza reasociuje s volným sigma-fakto-

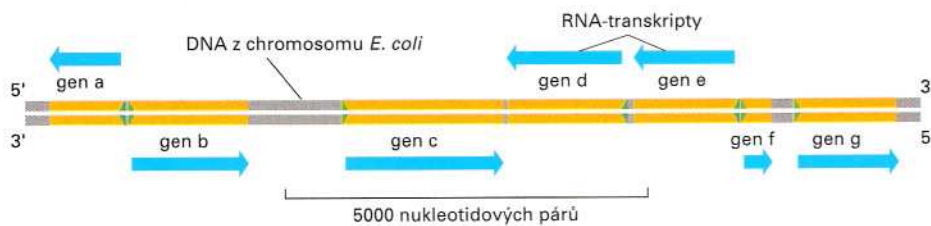


Obrázek 7-9 Transkripce bakteriálního genu RNA-polymerázou. (A) Syntéza molekuly RNA v bakterii. (B) Nukleotidové sekvence, které signalizují RNA-polymeráze začátek a konec transkripce. Zeleně označená oblast v horní části obrázku (B) představuje sekvenci promotoru, který je rozpoznáván RNA-polymerázou. Číslice udávají polohu nukleotidů vzhledem k prvnímu transkribovanému nukleotidu (+1). Červeně označená oblast ve spodní části obrázku (B) je sekvence signalizující ukončení transkripce.



rem a znovu hledá promotor, na který by se mohla pevně navázat a začít přepisovat.

Protože je DNA dvouvláknová, mohou teoreticky vznikat přepisem jednoho genu dvě různé molekuly RNA. Promotor je však asymetrický, a proto váže taktéž asymetrickou molekulu RNA-polymerázy jen v jednom směru; ta se po navázání může pohybovat jen jedním směrem a přepisovat správné vlákno DNA ve směru 5'→3'.



Obrázek 7-10 Směry transkripce genů v krátkém úseku bakteriálního chromosomu. Některé geny jsou transkribovány podle jednoho vlákna, zatímco jiné podle druhého řetězce DNA. Směr transkripce je dán promotorem na začátku každého genu (zelené šipky). Na tomto obrázku je nakresleno zhruba 0,2% (10 000 párů bází) chromosomu *E. coli*. Geny transkribované zleva doprava používají spodní vlákno jako templát, pro geny prepisované opačným směrem je templátem horní řetězec (viz obr. 7-9).

Směr transkripce vzhledem k celému chromosomu se liší gen od genu (obr. 7-10).

Požadavek pevné vazby RNA-polymerázy na DNA před začátkem transkripce umožňuje přesnou kontrolu, které sekvence mají být prepisovány – jsou to pouze ty, před kterými se nachází promotor. Tak je zajištěno, aby se prepisovaly do RNA pouze genové sekvence. U bakterií mají geny tendenci ležet blízko sebe, takže je mezi nimi jen krátký úsek netranskribované oblasti. Ale v rostlinné i živočišné DNA (včetně lidské) jsou geny daleko od sebe, není výjimkou až 100 000 nepřepisovaných nukleotidových párů mezi nimi. Transkripce všech těchto úseků by buňku velice zatěžovala a byla by pro ni plýtváním, neboť zatím nebylo prokázáno, že by tato DNA obsahovala nějaké genetické instrukce. (Pozn. překladatele: Popsaný děj předpokládá, že se transkribující RNA-polymeráza pohybuje podél DNA. Existují ale důkazy, že transkripční komplexy mohou být v jádru upevněny k nukleoskeletu, takže DNA je během transkripce protahována těmito komplexy; viz též Kapitulu 8.)

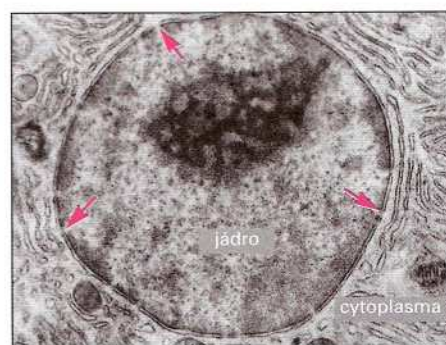
Otázka 7-3 Může být RNA-polymeráza podílející se na transkripci využita pro syntézu RNA-primerů při replikaci (viz Kapitola 6)?

Eukaryontní RNA podléhá v jádře úpravám

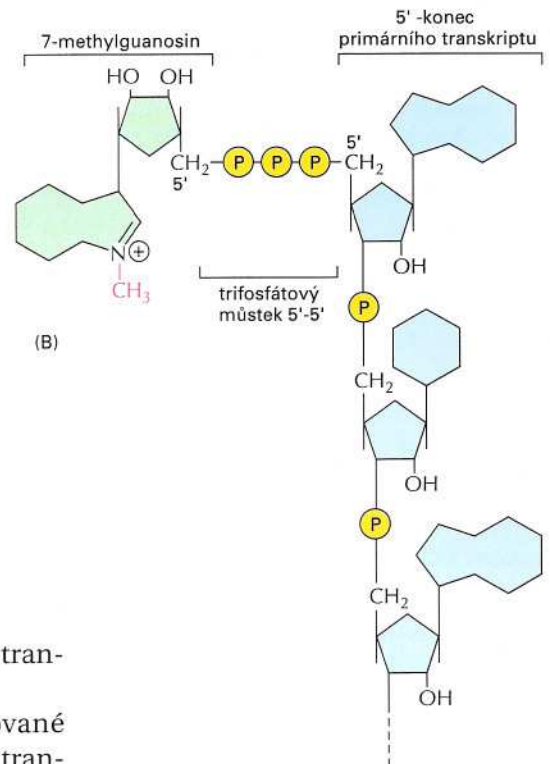
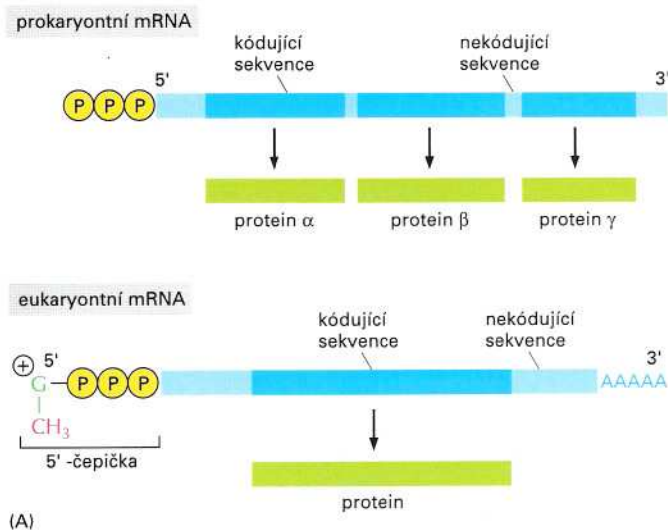
Ačkoliv způsob, jakým je DNA prepisována do RNA, je stejný u všech organismů, další úpravy, které RNA podstupuje před svým použitím, se velice liší mezi bakteriemi a eukaryoty. Bakteriální DNA se nachází přímo v cytoplasmě, která obsahuje i ribosomy, na nichž probíhá syntéza proteinů. Jakmile se v průběhu transkripce objeví volný 5'-konec RNA, ihned na něj nasedají ribosomy a začíná proteosyntéza. Oproti tomu u eukaryot je DNA uzavřena v jádře. K transkripci tedy musí dojít v jádře, ale ribosomy se nacházejí pouze v cytoplasmě. Proto před tím, než může být RNA přeložena do aminokyselinové sekvence, musí být transportována z jádra do cytoplasmy malými póry v jaderné membráně (obr. 7-11). Před opuštěním jádra však RNA podléhá několika **posttranskripčním úpravám** (anglicky RNA processing). U eukaryot tedy transkripce vzniká tzv. **primární transkript** (neboli heterogenní jaderná RNA, hnRNA) – RNA, která ještě nebyla nijak upravena.

Transkripty jsou v jádře dále upravovány různými způsoby. Dvě základní úpravy, kterým podléhá jen budoucí mRNA, jsou **přidání čepičky** (anglicky: RNA capping) a **polyadenylace** (obr. 7-12):

1. Přidání čepičky je modifikace 5'-konce primárního transkriptu, tj. konce, který je syntetizován jako první. V této reakci je na 5'-konec navázán atypický nukleotid – guaninový nukleotid s navázanou methylovou skupinou. K tomuto procesu dochá-



Obrázek 7-11 Řez jádrem jaterní buňky zachycující jaderné póry (šipky). Molekuly mRNA vznikají v jádře a musí být nejprve transportovány póry v jaderné membráně do cytoplasmy, aby mohly být překládány.



Obrázek 7-12 Porovnání struktur prokaryontní a eukaryontní mRNA. (A) 5'- a 3'-konce bakteriální mRNA nejsou nijak modifikované, tvoří je první a poslední nukleotid transkribovaný RNA-polymerázou. Odpovídající konce u eukaryontní mRNA vznikají přidáním 5'-čepičky a odštěpením 3'-konce primárního transkriptu, který je nahrazen přidáním několika adeninů (poly(A) konec). Obrázek ukazuje ještě další rozdíl mezi prokaryontní a eukaryontní mRNA: bakteriální mRNA může obsahovat informaci pro syntézu několika různých proteinů, zatímco eukaryontní mRNA kóduje takřka vždy jediný protein. (B) Struktura čepičky na 5'-konci eukaryontní mRNA. Pověšimněte si neobvyklé 5'-5' vazby mezi 7-methylguanosem čepičky a zbytkem RNA. Mnoho eukaryontních mRNA má ještě další modifikaci na 5'-konci: metylovou skupinu na 2'-OH skupině ribosy druhého nukleotidu (není nakresleno).

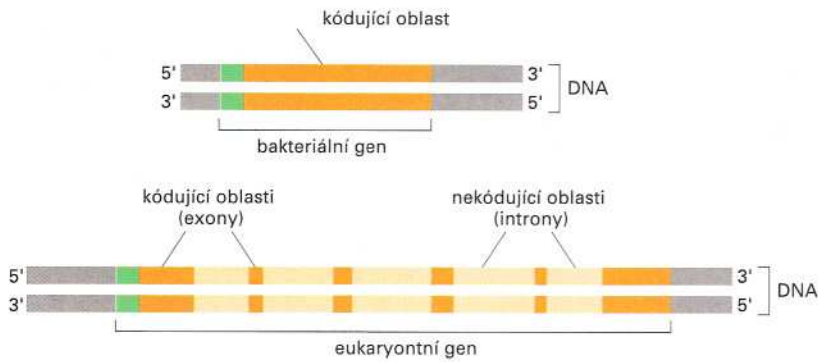
zí obvykle kotranskripčně, tedy ještě před dokončením transkripce celého genu.

2. K polyadenylaci dochází u většiny nově transkribované mRNA, a to na 3'-konci. Na rozdíl od bakterií, jejichž transkripty končí v místě, kde skončila syntézu RNA-polymeráza, je 3'-konec většiny eukaryontních mRNA nejdříve naštěpen ve specifickém místě nukleázou a pak druhý enzym přidá na nově vytvořený konec RNA-sekvenci složenou pouze z adeninů (*poly(A)-konec*). Poly(A)-konec je obvykle několik stovek nukleotidů dlouhý.

Tyto dvě modifikace konců mRNA – čepička a poly(A) – pravděpodobně stabilizují molekulu RNA a pomáhají při jejím transportu z jádra do cytoplasmy. Později jsou také využity aparátem syntetizujícím proteiny jako signál, že daná mRNA má oba konce a informace, kterou kóduje, je kompletní.

Eukaryontní geny jsou přerušovány nekódujícími sekvencemi

Většina eukaryontních RNA podléhá kromě přidání čepičky a polyadenylace ještě další úpravě. Tento krok posttranskripčních úprav je mnohem radikálnější než první dvě úpravy a je důsledkem překvapivého způsobu uspořádání eukaryontních genů. V sedmdesátých letech byli buněční biologové studující transkripci v eukaryontních buňkách značně překvapeni vlastnostmi eukaryontní RNA v jádře, protože se velmi lišily od vlastností bakteriální mRNA. Zjistili, že jaderná RNA, která by mohla být díky guanosenové čepičce a poly(A) konci považována za budoucí mRNA, je v cytoplasmě mnohem kratší, ačkoliv má stále na svých koncích čepičku i poly(A) konec. Navíc pouze 5 % z RNA, která v jádře vznikla, se nakonec dostalo do cytoplasmy. To vypadalo nejen jako zbytečné plýtvání, ale navíc i velmi záhadně: jak se mohou ztratit prostřední úseky molekuly RNA?



Obrázek 7-13 Porovnání bakteriálního a eukaryontního genu. Bakteriální gen je tvořen nepřerušovanou sekvencí nukleotidů, která je přeložena do proteinu. Jiná situace je u většiny eukaryontních genů, které jsou tvořeny kódujícími sekvencemi (*exony*) přerušovanými nekódujícími úseky (*introny*). Promotory jsou označeny zeleně.

Odpověď přišla v roce 1977, kdy bylo zjištěno, že uspořádání eukaryontních genů je naprosto odlišné od uspořádání genů bakteriálních. U bakterií je většina proteinů kódována nepřerušovaným úsekem DNA, který je přepsán do RNA a ta slouží bez dalších úprav jako templát pro syntézu proteinů. Většina eukaryontních genů má však kódující sekvenci přerušovanou sekvencemi, které nejsou překládány do proteinů. Tyto nekódující sekvence se nazývají **introny** (obr. 7-13). Úseky kódujících sekvencí, tzv. **exony**, bývají mnohem kratší než introny. Kódující sekvence je tedy jen malým zlomkem délky celého genu. Většina intronů má velikost 80-10 000 nukleotidů, ale existují i introny delší (obr. 7-14).

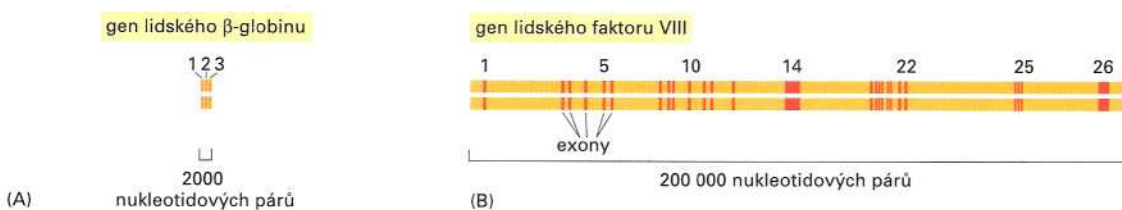
Introny jsou z RNA odstraněny sestřihem

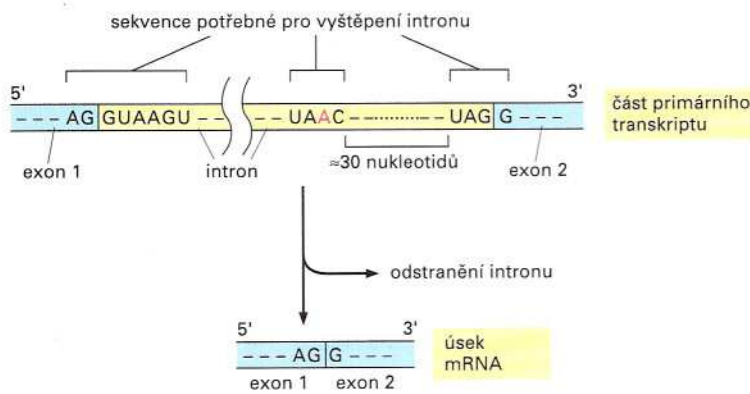
Pro vznik mRNA v eukaryontní buňce je nejdříve nutná transkripce celého genu – exonů i intronů – do primárního transkriptu. Po přidání čepičky a poly(A) konce, ale před opuštěním jádra, jsou všechny introny vystřiženy a exony spojeny dohromady. Výsledkem je mnohem kratší molekula RNA, která obsahuje nepřerušovanou kódující sekvenci. Jakmile je tento krok, nazývaný **sestřih RNA** (anglicky: RNA splicing), dokončen, může být mRNA transportována do cytoplasmy a tam překládána na proteiny.

Ale jak buňka pozná, kterou část primárního transkriptu má odstranit? Na rozdíl od kódující sekvence se zdá, že většina sekvence intronu není důležitá. Ačkoliv je mezi různými introny určitá malá sekvencní podobnost, pouze několik málo nukleotidů určuje, že právě tato sekvence má být z RNA odstraněna. Tyto rozhodující nukleotidy se nacházejí na koncích intronu nebo v jejich blízkosti a jsou stejné nebo velmi podobné pro všechny introny (obr. 7-15).

Introny jsou odstraňovány enzymy, které jsou na rozdíl od většiny ostatních enzymů složeny z proteinů a RNA. Tyto sestřihové

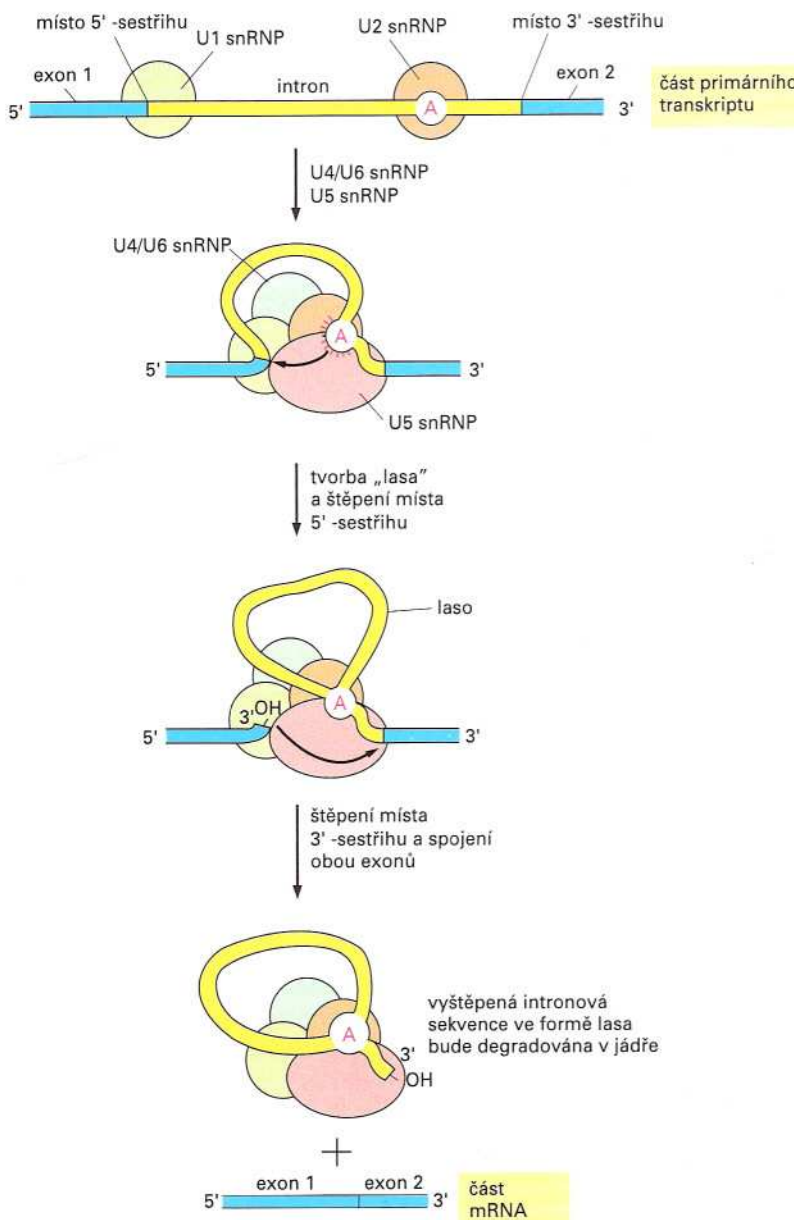
Obrázek 7-14 Struktura dvou lidských genů ukazující uspořádání exonů a intronů. (A) Nukleotidová sekvence celého β -globinového genu, který kóduje jednu z podjednotek hemoglobinu, byla na obrázku 6-9. Jak je naznačeno zde, celá sekvence je tvořena třemi exony. (B) Gen pro faktor VIII kóduje protein (faktor VIII), který se účastní srážení krve. Mutace v tomto velkém genu je zodpovědná za nejčastější formu hemofilie. Jak je zde nakresleno, celý gen obsahuje 26 exonů.





Obrázek 7-15 Nukleotidové sekvence určující začátek a konec intronu.

Tři nukleotidové sekvence jsou nutné pro rozpoznání a vyštěpení intronu, zbývající části intronu mohou obsahovat libovolné sekvence nukleotidů. Specifické sekvence jsou rozpoznávány snRNP částicemi, které rozštěpí exon-intronové hranice a spojí sousední exony. Červeně označený adenin je místem uzavření lasovité smyčky (viz obr. 7-16), nachází se obvykle přibližně 30 nukleotidů před 3'-konce intronu.



Obrázek 7-16 Mechanismus sestříhu RNA.

Sestříh RNA je katalyzován několika snRNP (barevné kroužky) a dalšími proteiny (nejsou nakresleny). Jednou z funkcí komplexu snRNP částic (tzv. sestříhový komplex, anglicky: spliceosome) je přiblížení obou konců intronů tak, aby mohla reakce proběhnout. Po navázání všech snRNP atakuje specifický adenin intronu (červeně označený) 5'-sestříhové místo a rozštěpí v tomto místě cukr-fosfátovou kostru RNA. Uvolněný 5'-konec intronu je kovalentně navázán na tento adenin za vzniku smyčky neboli *lasovité struktury* (viz obr. 7-17). Volný 3'-konec prvního exonu pak reaguje se začátkem druhého exonu, rozštěpí intron-exonové spojení a je kovalentně spojen s 5'-konce druhého exonu. Výsledkem celého sestříhu je spojení dvou sousedních exonů do jedné kódující sekvence za současného uvolnění intronu v lasovité podobě. Intron je později odbourán.

Obrázek 7-17 Struktura rozvětvené RNA, která vzniká při sestřihu.

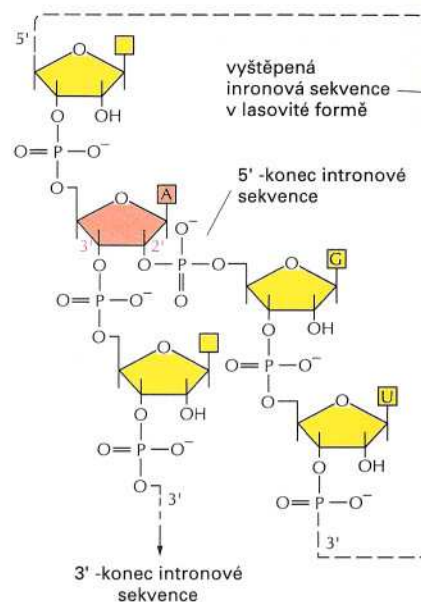
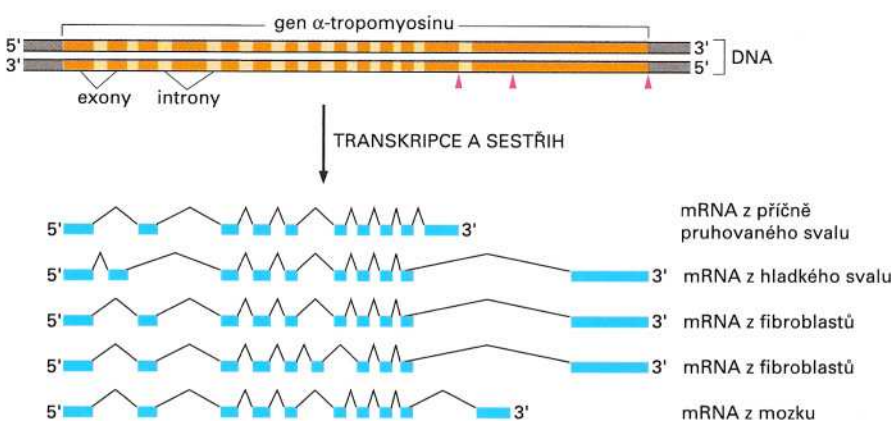
Nukleotid označený červeně je adenin z obrázků 7-15 a 7-16. Rozvětvení vzniká kovalentním spojením 5'-konce intronu s 2'-OH skupinou tohoto adeninu. Rozvětvení řetězce zůstává konečnou součástí vyštěpeného intronu a je příčinou jeho lasovité struktury (viz obr. 7-16).

enzymy se nazývají **malé jaderné ribonukleoproteinové částice (snRNP)**; z anglického small nuclear ribonucleoprotein particles). U každého intronu se vytvoří komplex složený z několika druhů těchto snRNP a umožní vystřížení intronu a spojení dvou sousedních exonových úseků. Intron je sestřihem uvolněn ve formě „lasovité struktury“ (obr. 7-16 a 7-17). Jednou z rolí RNA v snRNP je na základě párování bází rozpoznat začátek intronu a místo uzavření lasovité struktury (obr. 7-16). Po navázání na tato místa se snRNP spojí do jednoho komplexu a přiblíží tím oba konce intronu k sobě. Ačkoliv snRNP hrají při sestřihu hlavní úlohu, pro sestřih jsou nezbytné také některé další proteiny.

Intron-exonové uspořádání genů se na první pohled může zdát zbytečným plýtváním, ale v konečném efektu má pozitivní důsledky. Pravděpodobně bylo toto uspořádání genů důležité v počátečních stadiích evoluce, protože mohlo urychlit vznik nových, užitečných proteinů. Přítomnost intronů v DNA umožňuje s mnohem větší pravděpodobností rekombinaci mezi exony, jak si vysvětlíme v Kapitole 9. To znamená, že geny pro nové proteiny mohly vznikat rychleji použitím částí již preexistujících genů, podobně jako můžeme postavit nový typ stroje z již ověřených funkčních součástek. Vskutku mnoho proteinů dnešních buněk připomíná slepenec složený ze sady několika stejných kousků nazývaných *proteinové domény* (viz Kapitola 5).

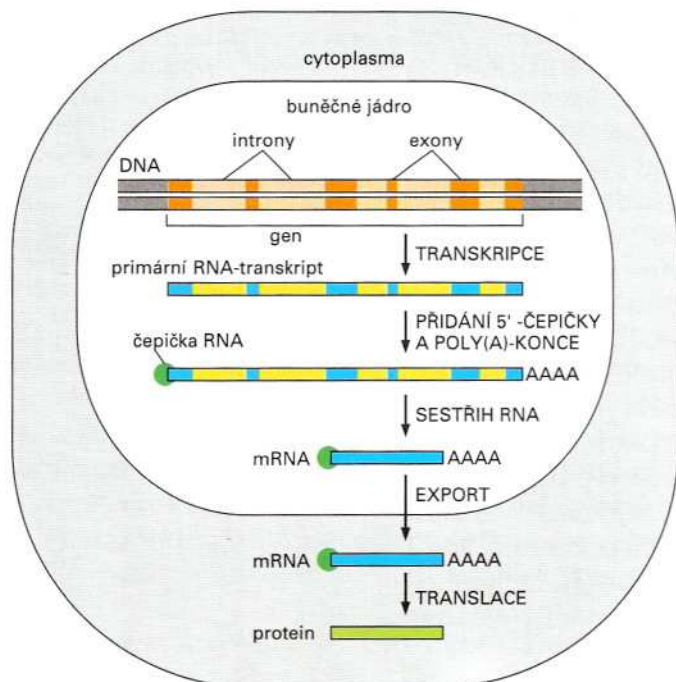
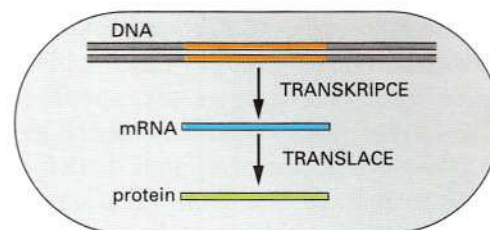
Sestřih RNA přináší eukaryotům ještě jednu výhodu. Primární transkript mnoha eukaryontních genů může být sestřihem různými způsoby podle buněčného typu nebo vývojového stadia. Výsledkem tohoto tzv. *alternativního sestřihu* je několik různých mRNA. Z jednoho genu tak může tímto procesem vznikat několik různých proteinů (obr. 7-18).

Nakonec se tedy zdá, že sestřih RNA a intron-exonové uspořádání genů není plýtváním, ale že ještě dále zvyšuje již tak velký kódující potenciál eukaryontního genomu.



Obrázek 7-18 Alternativní sestřih α -tropomyosinového genu u krys.

α -Tropomyosin je fibrilární protein (viz obr. 5-11), který reguluje kontrakci ve svalových buňkách. Jeho role v ostatních druzích buněk není zatím zcela objasněna. Podle nukleotidové sekvence DNA vzniká primární transkript, který může být sestřihem různými způsoby, jak je naznačeno na obrázku, a dát tak vznik různým molekulám mRNA a tím i rozličným typům proteinů. Určitý druh sestřihu je typický pro určitý buněčný typ. Například α -tropomyosin vznikající v příčně pruhovaném svalu se liší od α -tropomyosinu v hladkém svalstvu. Šipky v horní části obrázku reprezentují místa, kde může dojít ke štěpení a přidání poly(A) konce.

(A) EUKARYOTA**(B) PROKARYOTA**

Obrázek 7-19 Souhrn procesů vedoucích od genu k proteinu. Konečné množství proteinu v buňce závisí na účinnosti všech jednotlivých kroků podílejících se na vzniku proteinu a na rychlosti degradace mRNA i proteinu samotného. (A) V eukaryontních buňkách vzniká transkripční molekula primárního transkriptu, která obsahuje exonové a intronové sekvence. Oba její konce jsou modifikovány a introny jsou vyštěpeny v enzymově katalyzovaném sestřihu. Výsledná mRNA je transportována z jádra do cytoplasmy, kde je překládána. Ačkoliv jsou jednotlivé kroky nakresleny tak, že probíhají jeden za druhým, většina se jich odehrává současně. Například přidání čepičky i sestřih probíhají již před dokončením transkripce. (B) U prokaryot je vznik mRNA značně jednodušší. 5'-Konec molekuly vzniká iniciací transkripce, 3'-konec mRNA je určen místem terminace. Protože prokaryotní buňky nemají jádro a transkripce i translace probíhají v jednom oddílu, translace často začíná před dokončením syntézy mRNA.

Molekuly RNA jsou v buňce nakonec degradovány

Protože RNA může být překládána opakovaně, ovlivňuje délka života mRNA v buňce množství proteinu, které z ní může být přeloženo (viz obr. 7-2). Každá molekula RNA je nakonec degradována na jednotlivé nukleotidy, ale doba existence se mezi jednotlivými druhy mRNA liší v závislosti na její nukleotidové sekvenci a buněčném typu. Většina mRNA v bakteriích je velice rychle odbourána, typickou dobou života mRNA jsou přibližně tři minuty. Eukaryotní mRNA existuje obvykle mnohem déle. Některé mRNA, například pro β -globin, jsou degradovány až po více než 10 hodinách, jiné už po 30 minutách. Tyto odlišné doby života jsou signalizovány nukleotidovými sekvencemi v RNA samotné, většinou v části nazývané 3'-nepřekládaná oblast, která se nachází mezi 3'-koncem kódující sekvence a poly(A)-koncem. Odlišná délka existence různých RNA pomáhá buňce regulovat množství jednotlivých vznikajících proteinů. Obecně řečeno, proteiny syntetizované ve velkých množstvích (například β -globin), jsou překládány z RNA s dlouhým poločasem života, zatímco proteiny potřebné pouze v malém množství nebo proteiny, jejichž množství je třeba rychle regulovat podle různých signálů, mají RNA s velmi krátkou dobou života.

Prapůvodní buňky pravděpodobně obsahovaly ve svých genech introny

Jak už jsme si v této kapitole popsali, pro využití genetické informace musí buňka nejdříve přepsat DNA do RNA specifickou RNA-polymerázou, a to na základě komplementárního párování

bází – tento proces transkripce je naprosto univerzální. Ale osud výsledného transkriptu (u eukaryot primárního transkriptu) se značně liší mezi eukaryoty a prokaryoty (obr. 7-19). Může to vypadat záhadně, že navzdory mnoha podobnostem při vzniku RNA se může vyskytnout něco tak specifického, jako je sestřih RNA. Objevení intronů v eukaryotních genech bylo pro biologie značně překvapivé, protože jejich dosavadní znalosti pocházely jen ze studií prokaryot. Jak mohla taková odlišnost vůbec vzniknout? Již jsme si v této kapitole ukázali, že sestřih RNA dává organismům některé výhody v evoluci a v možnosti kontrolovat genovou expresi. Ovšem za tuto výhodu eukaryotní buňky platí větším genomem a jeho náročnější údržbou. Podle jednoho tvrzení obsahovala prapůvodní buňka – společný předchůdce prokaryot a eukaryot – introny, které byly ztraceny u prokaryot během další evoluce. Prokaryota se obvykle rozmnožují velmi rychle, a proto výhoda malého genomu (dovolujícího rychlejší replikaci) může být jedním z faktorů, který byl příčinou postupného vymizení intronů u bakterií. Souhlasně s touto teorií i nižší eukaryota, která se také rychle rozmnožují (například některé kvasinky), mají mnohem méně intronů, které jsou velice krátké v porovnání s ostatními eukaryoty.

V této části kapitoly jsme poznali, že konečným produktem některých genů je RNA jako taková, například RNA přítomná v snRNP. Mohli bychom uvést mnohem více příkladů RNA, které fungují jako strukturní i katalytické součásti buňky, ale většina genů v buňce kóduje RNA určenou pro syntézu proteinů. V následující části se dozvíme něco o tom, jak je informace přechodně uložena do mRNA překládána do aminokyselinové sekvence proteinu.

Od RNA k proteinu

Na konci padesátých let biologové přijali teorii, že informace uložená v DNA je nejprve přepsána do RNA a pak přeložena do proteinu. Sporem však zůstávalo, jak je lineární sekvence nukleotidů RNA převedena do lineární sekvence chemicky zcela odlišných podjednotek proteinů – aminokyselin. Tato záhada byla v té době jednou z největších. Byl zde kryptogram, který vymyslela sama příroda a který po více než třech miliardách let může být rozřešen jedním z produktů evoluce – člověkem! Postupně krok za krokem byl rozšifrován nejen kód, ale z kousků byly poskládány i hlavní rysy procesu, kterým buňky vytvářejí proteiny.

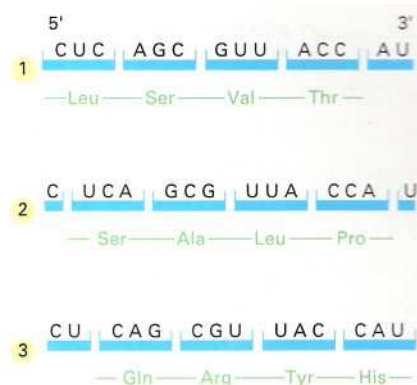
Otázka 7-4 Aníž byste se podívali zpátky, nakreslete schéma základních kroků sestřihu. Označte spojení exonů a intronů v primárním transkriptu, snRNP, vystřižený intron a hotovou mRNA. Během sestřihu katalyzuje tentýž komplex snRNP jak štěpení v první exon-intronové hranici, tak následně spojení dvou sousedních exonů. Co by se mohlo stát, kdyby obě reakce byly katalyzovány enzymy, které by nebyly asociovány v jednom komplexu?

Obrázek 7-20 Genetický kód. Standardní jednopísmenné symboly aminokyselin jsou uvedeny pod jejich třípísmennými symboly (celý název a struktura viz panel 2-5, str. 62-63). Podle konvence je 5'-konec nukleotidové sekvence vždy zapisován vlevo. Většina aminokyselin je kódována více než jedním kodonem, lze zde nalézt i určité pravidelnosti ve struktuře kodonů pro jednu aminokyselinu. Kodony pro stejnou aminokyselinu mají obvykle na první a druhé pozici stejný nukleotid a liší se pouze třetím nukleotidem. Tři kodony nespécifikují žádnou aminokyselinu, místo toho mají roli terminačních kodonů (stop-kodony), které signalizují konec kódující sekvence. Jeden kodon, AUG, funguje jednak jako iniciační kodon (signalizuje začátek translace) a také jako kodon, ke kterému je přiřazen methionin. Další kodon, UGA, funguje buď jako terminační nebo kóduje selenocystein.

GCA	AGA																							
GCC	AGG																							
GCG	CGA																							
GCC	CGC																							
GCG	CGG	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGA		AUA															
GCU	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGC	CAC	AUC															
							GGG	CAU	AUU	CUA														
							GGU		CUU	CUC	AAA													
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	stop				
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V					

Obrázek 7-21 Tři možné čtecí rámce při proteosyntéze.

Při translaci nukleotidové sekvence (*modrá*) do aminokyselinové (*zelená*) je nukleotidová sekvence mRNA čtena z 5'-konce po trojicích nukleotidů. Táž sekvence mRNA může tedy kódovat tři různé aminokyselinové sekvence podle toho, od kterého nukleotidu translace začne. Ve skutečnosti pouze jeden čtecí rámec kóduje protein.



Otázka 7-5 Genetický kód byl rozluštěn na základě experimentů, kdy byly pro translaci použity polynukleotidy z opakujících se sekvencí místo mRNA. Ve zkumavce byly navozeny určité podmínky, které umožnily ribosomům začít proteosyntézu kdekoli na RNA, to znamená bez potřeby iniciačního kodonu, který je nezbytný v živých buňkách. Jestliže byly jako templaty použity polynukleotidy (1) UUUUUU-UU..., (2) AUAUAUAUAU..., (3) AUCAUCAUC..., vznik jakého polypeptidu byste očekávali v jednotlivých případech? (Použijte genetický kód na obr. 7-20.)

mRNA je dekódována po trojicích nukleotidů

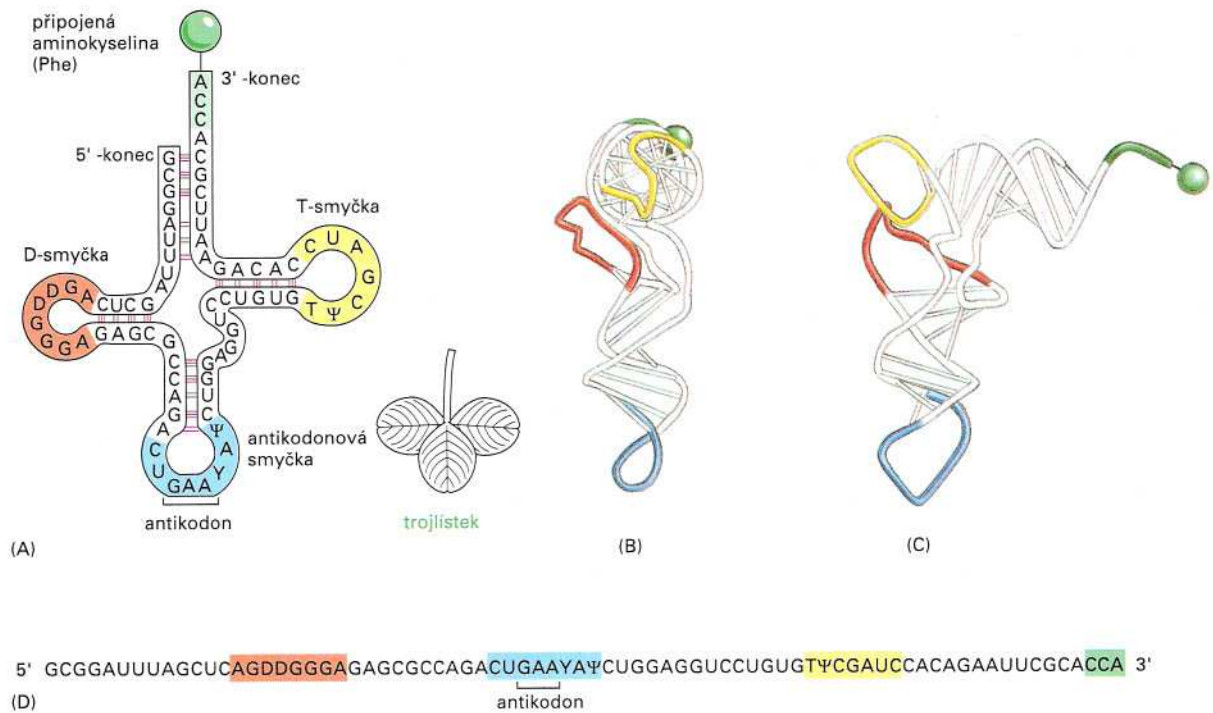
Jakmile vznikne funkční mRNA, informace v ní obsažená může být ihned použita pro syntézu proteinu. Transkripce jako přenos informace je poměrně snadno představitelná, protože DNA a RNA jsou si strukturně i chemicky podobné a RNA může vznikat podle DNA na základě komplementárního párování bází. Jak termín *transkripce* napovídá, můžeme ho jednoduše připodobnit k přepisu rukou psaného textu například na psacím stroji. Jazyk sám, ani forma informace tímto přepisem nebyly změněny a navíc symboly použité pro její zapsání jsou si značně podobné.

Na rozdíl od transkripce je konverze informace uložené v RNA do proteinové sekvence, kdy je tato informace **přeložena** do jiného jazyka, který používá zcela odlišné písmo. Zatímco RNA tvoří pouhé čtyři střídající se nukleotidy, proteiny tvoří jedenadvacet různých aminokyselin. Nemůže tedy docházet k přenosu informace z jednoho nukleotidu na jednu aminokyselinu. Pravidla, kterými se řídí prostřednictvím mRNA přenos z nukleotidové sekvence DNA do aminokyselinové, jsou definována jako **genetický kód**. Tento kód byl rozluštěn na počátku šedesátých let dvacátého století.

Sekvence nukleotidů RNA je postupně čtena ne jako jednotlivé báze, ale jako jejich trojice. Protože RNA je lineární polymer složený ze čtyř podjednotek, spojením tří nukleotidů lze vytvořit $4 \times 4 \times 4 = 64$ kombinace: AAA, AUA, AUG, ... V proteinech se však vyskytuje obvykle pouze jedenadvacet aminokyselin. Buď tedy některé trojice nemají přiřazenou žádnou aminokyselinu, nebo může být skupina několika tripletů přeložena jako stejná aminokyselina. Jak je ukázáno na obr. 7-20, druhá možnost se ukázala jako správná. Každá skupina tří nukleotidů RNA se nazývá **kodon** a určuje jednu aminokyselinu.

Genetický kód je univerzální pro všechny dnes žijící organismy. V dnešní době už sice víme o existenci několika málo odchylek, ale nalézáme je většinou v mitochondriích. Vzhledem k tomu, že mitochondrie mají svůj vlastní transkripční i translační aparát zcela nezávislý na zbytku buňky (viz Kapitola 13), mohly se tyto malé odchylky od univerzálního genetického kódu snadno vyvinout a udržet během evoluce.

V principu může být RNA překládána ve všech třech **čtecích rámcích** podle toho, u kterého nukleotidu translace začne (obr. 7-21). Avšak jen v jednom čtecím rámci vzniká požadovaný protein. Později si ukážeme, jak si buňka umí vybrat ten jediný správný ze tří čtecích rámců.



Molekuly tRNA přiřazují aminokyseliny ke kodonům v mRNA

Kodony v mRNA nerozpoznávají přímo aminokyseliny, které specifikují. To znamená, že se skupina tří nukleotidů neváže přímo na danou aminokyselinu. Translace mRNA do proteinu závisí na adaptorových molekulách, které jsou schopny jednou částí molekuly rozpoznat a spárovat se s kodonem v mRNA a jinou částí vázat aminokyselinu. Tyto adaptory tvoří skupina malých RNA nazývaných společně **transferové RNA (tRNA)**. Všechny tRNA mají délku kolem 80 nukleotidů.

Již dříve jsme si ukázali, že se molekuly RNA balí do trojrozměrné struktury vytvářením párů bází mezi různými oblastmi téže molekuly (viz obr. 7-5). Jestliže jsou spárované úseky dostatečně dlouhé, mohou vytvořit dvojšroubovicovou strukturu podobně jako DNA. Molekuly tRNA jsou toho názornou ukázkou. Hned čtyři krátké úseky tvoří dvojšroubovice a pokud si schematicky nakreslíme tRNA, bude vypadat jako jetelový trojlístek (obr. 7-22A). Například sekvence 5'-GCUC-3' v jedné části molekuly RNA se bude relativně silně párovat se sekvencí 5'-GAGC-3' v jiné oblasti téže molekuly. Trojlístek podléhá ještě dalšímu sbalení a vytváří konečnou strukturu ve tvaru písmene L, která je udržována také na základě vodíkových můstků mezi různými částmi molekuly (obr. 7-22).

Pro funkci tRNA při syntéze proteinů jsou nezbytné dvě oblasti nespárovaných nukleotidů, které se nacházejí na koncích L tvaru molekuly. Jedna z těchto oblastí se nazývá **antikodon**, což jsou tři nukleotidy komplementární ke kodonu v mRNA. Druhou oblastí je krátký jednořetězcový 3'-konec molekuly, na který je navázána aminokyselina specifická pro danou tRNA.

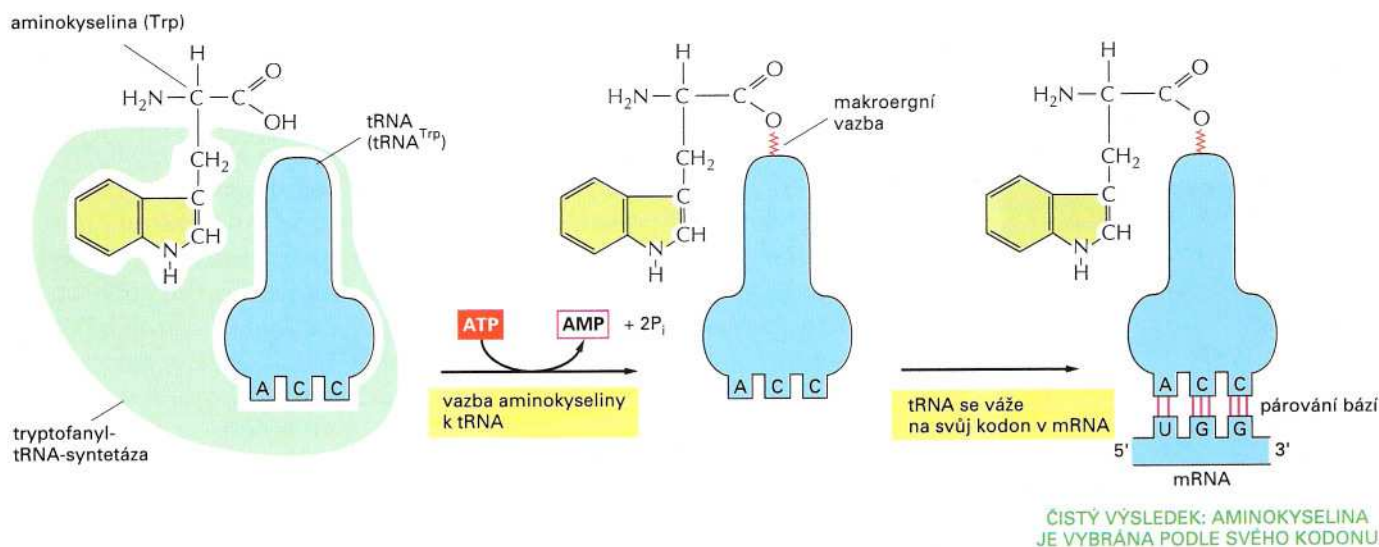
Obrázek 7-22 Molekula tRNA. Na sérii těchto obrázků je zachycena různými způsoby tRNA specifická pro fenylalanin (Phe). (A) Struktura jetelového listu používaná pro demonstraci komplementárního párování bází (červené čáry), které vytváří dvojšroubovicové úseky. Antikodon je sekvence tří nukleotidů, které se párují s kodonem v mRNA. Aminokyselina, určená daným kodon/antikodonovým párem, je připojena na 3'-konec tRNA. Molekuly tRNA často obsahují atypické báze, které vznikají chemickou modifikací hotové tRNA. Báze označené jako Ψ (pseudouridin) a D (dihydrouridin) jsou odvozeny od uracilu. (B) a (C) Skutečný L-tvar tRNA podle rentgenostrukturní analýzy (X-ray diffraction). (D) Lineární nukleotidová sekvence tRNA, barevně označené sekvence odpovídají úsekům na obrázcích A, B a C.

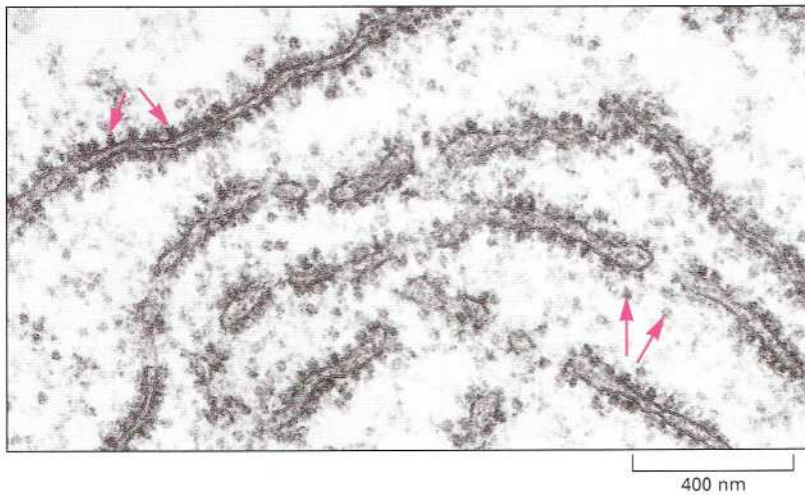
V předcházející části jsme viděli, že genetický kód je redundantní, to znamená, že několik různých kodonů může určovat jednu aminokyselinu (viz obr. 7-20). Z této redundance vyplývá, že buď existuje pro mnoho aminokyselin více tRNA s různými antikodony, nebo se některé antikodony tRNA mohou párovat s více než jedním kodonem v mRNA. Ve skutečnosti jsou obě možnosti správné. Pro některé aminokyseliny existuje více tRNA, na které se mohou vázat, a některým tRNA jejich struktura umožňuje vázat se na více kodonů. To je možné díky tomu, že se sice první dva nukleotidy kodonu přesně párují s posledními nukleotidy antikodonu, ale zbývající nukleotidový pár se může párovat méně stabilním způsobem – využívá pro svou stabilizaci jiné vodíkové můstky. Toto tzv. *kolísavé párování bází* (anglicky: wobble) vysvětluje, proč se mnoho alternativních kodonů pro jednu aminokyselinu liší pouze posledním nukleotidem (viz obr. 7-20). Kolísavé párování bází umožňuje přiřadit 21 aminokyselin 61 smysluplným kodonům pomocí minimálního počtu 31 tRNA molekul. Přesný počet druhů tRNA se však liší druh od druhu.

Specifické enzymy připojují správné aminokyseliny k jejich tRNA

Ukázali jsme si, že si buňka vytváří mnoho druhů tRNA, aby mohla přeložit nukleotidovou sekvenci do proteinu (*poznámka překladače*: v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* je celkem 276 genů pro tRNA!). Nyní se musíme zeptat, jak každá tRNA dokáže navázat tu svoji jedinou správnou aminokyselinu. Rozpoznání a připojení správné aminokyseliny je funkcí enzymů nazývaných **aminoacyl-tRNA-syntetázy**. Každá buňka má dvacet různých syntetáz, pro každou aminokyselinu jednu; jedna váže glycin na všechny tRNA, které rozpoznávají všechny kodony pro glycin, druhá váže alanin na všechny tRNA, které rozpoznávají kodon pro alanin atd. Specifické nukleotidy v obou ramenech, antikodonovém i vázajícím

Obrázek 7-23 Genetický kód je překládán díky dvěma po sobě následujícím adaptorům. Prvním adaptorem je aminoacyl-tRNA-syntetáza, která umožňuje kovalentní navázání příslušné aminokyseliny k její specifické tRNA. Druhým adaptorem je tRNA, jejíž antikodon se páruje s kodonem v mRNA. Chyba v jednom z těchto kroků má za následek začlenění chybné aminokyseliny do polypeptidového řetězce. Na tomto obrázku je tryptofan (Trp) přiřazen kodonu UGG v mRNA.

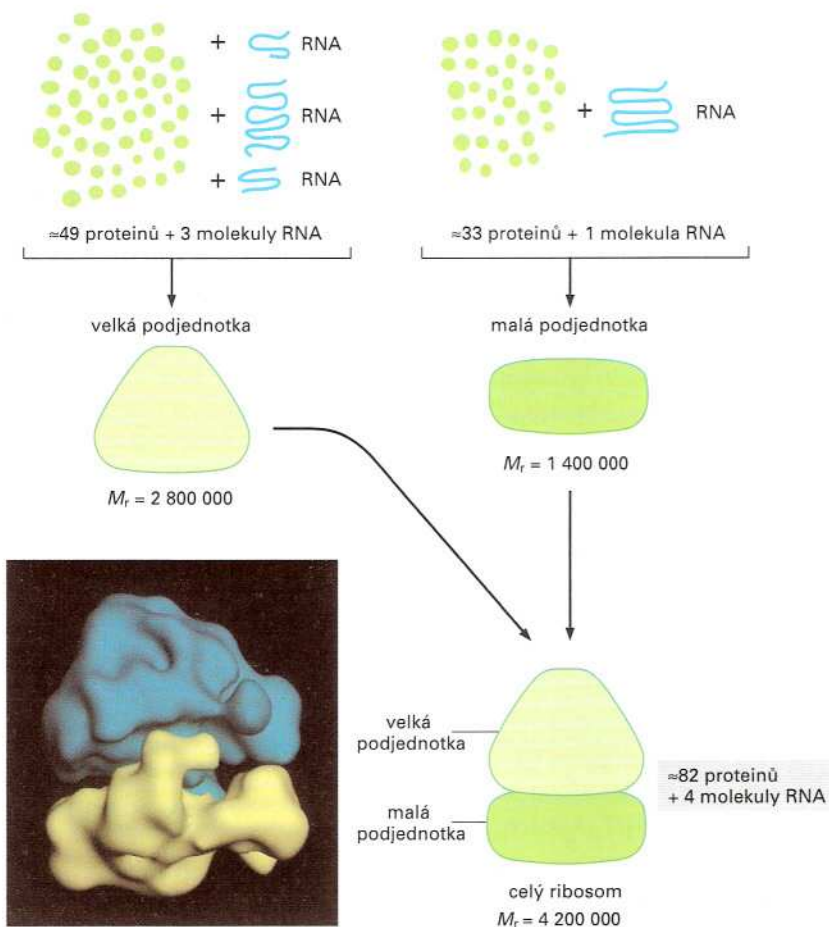




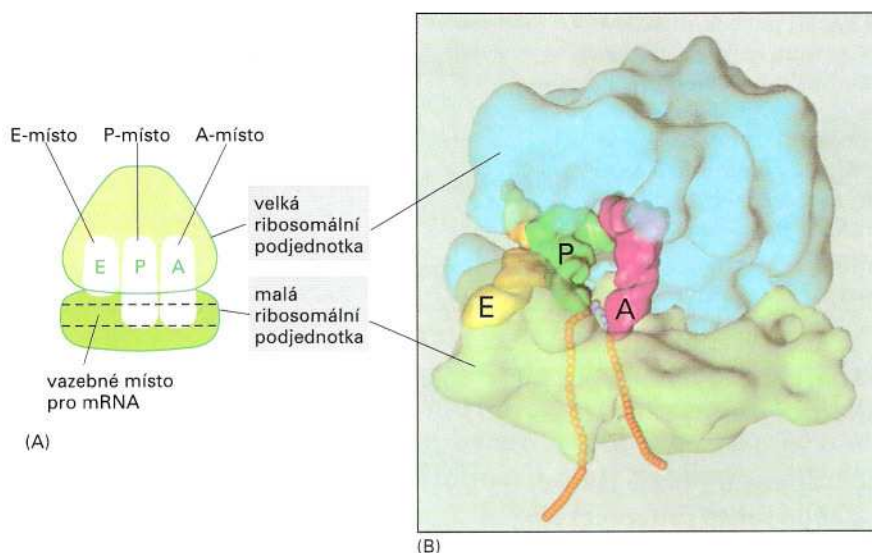
Obrázek 7-24 Ribosomy v cytoplasmě eukaryontní buňky. Tato fotografie z elektronového mikroskopu ukazuje tenký řez malou částí cytoplasmy. Ribosomy vypadají jako černé tečky (červené šipky). Některé jsou volně v cytoplasmě, jiné jsou navázány na membránu endoplasmatického retikula.

aminokyselinu, umožňují rozpoznání každé tRNA vlastní aminoacyl-tRNA-syntetázou. Aminoacyl-tRNA-syntetázy jsou v dekodujícím procesu stejně důležité jako tRNA, protože pouze za účasti obou dvou může být ke kodonu přiřazena správná aminokyselina (obr. 7-23).

Reakce katalyzovaná aminoacyl-tRNA-syntetázou je v buňce jednou z mnoha, které vyžadují dodání energie hydrolýzou ATP (viz obr. 3-27); při této reakci je energie využita pro tvorbu vysokoener-



Obrázek 7-25 Komponenty eukaryontního ribosomu. Kompletní trojrozměrná struktura ribosomu není dosud přesně známa, hrubý tvar prokaryontního ribosomu, který je podobný eukaryontnímu, byl určen elektronovou mikroskopií a je ukázán vlevo dole. Velká podjednotka je znázorněna modře, malá žlutě.



Obrázek 7-26 Vazebná místa pro RNA na ribosomu. Každý ribosom má jedno vazebné místo pro mRNA a tři vazebná místa pro tRNA – A-, P- a E-místo (zkratky z anglického aminoacyl-tRNA, peptidyl-tRNA a exit sites). (A) Schematický model ribosomu, který budeme používat i v následujících obrázcích. (B) Model prokaryontního ribosomu, který zobrazuje mRNA (oranžové kuličky) a pozici tRNA v A-místě (růžově), tRNA v P-místě (zeleně) a tRNA v E-místě (žlutě). Na tomto modelu je velká ribosomální podjednotka světle modrá, malá podjednotka světle zelená. Ačkoliv jsou zde zachyceny tRNA ve všech třech místech, ve skutečnosti jsou během proteosyntézy obsazena maximálně dvě místa pro tRNA najednou (viz 7-27).

getické vazby mezi tRNA a aminokyselinou. Tato energie je později využita pro tvorbu kovalentní vazby mezi rostoucím polypeptidovým řetězcem a nově přidávanou aminokyselinou.

mRNA je dekódována na ribosomech

Rozpoznání kodonu antikodonem tRNA je závislé na stejném komplementárním párování bází, jaké je využíváno při replikaci nebo transkripci. Pro rychlou a přesnou translaci mRNA do proteinu je však zapotřebí velkého mnohapodjednotkového komplexu, který se pohybuje podél mRNA, zachytává komplementární molekuly tRNA, drží je ve správné pozici a spojuje na nich navázané aminokyseliny do rostoucího proteinového řetězce. Tento komplex tvořený dvěma podjednotkami se nazývá **ribosom** a je složen z více než 50 druhů proteinů (souhrnně nazývaných *ribosomální proteiny*) a několika druhů RNA (**ribosomální RNA, rRNA**). Typická buňka má v cytoplasmě miliony ribosomů (obr. 7-24). U eukaryot vznikají ribosomální podjednotky v jádře asociací nově transkribovaných rRNA s ribosomálními proteiny, které byly transportovány do jádra z cytoplasmy. Jednotlivé podjednotky jsou pak transportovány zpět do cytoplasmy, kde se účastní proteosyntézy.

Eukaryontní a prokaryontní ribosomy jsou si velmi podobné tvarem i funkcí. Oba jsou složeny z malé a velké podjednotky, které se spojují do velkého útvaru s hmotností několika milionů daltonů (obr. 7-25) (pro porovnání průměrný protein má hmotnost kolem 40 000 daltonů). Malá podjednotka zodpovídá za nasednutí tRNA na kodony mRNA, velká katalyzuje vznik peptidové vazby mezi aminokyselinou a polypeptidovým řetězcem (viz Kapitola 2). Obě podjednotky se spojují na molekule mRNA obvykle blízko jejího 5'-konce a zahajují syntézu proteinu. Ribosom se pohybuje podél mRNA, překládá nukleotidovou sekvenci do aminokyselinové za použití tRNA jako adaptorů a po dosyntetizování proteinu se obě

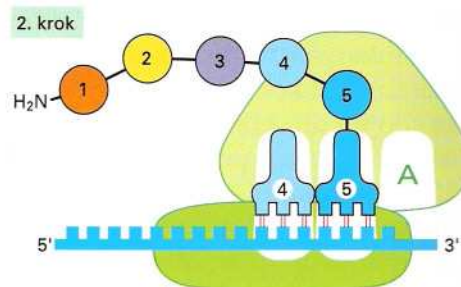
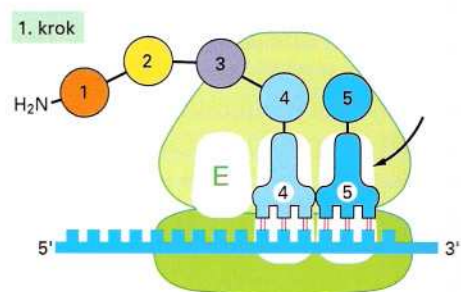
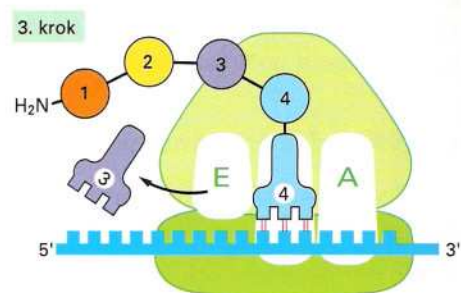
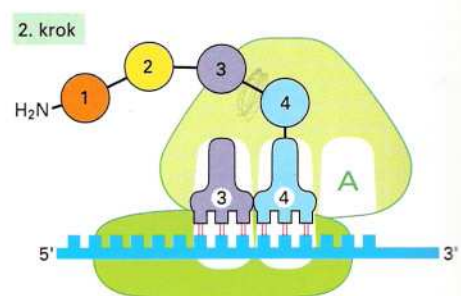
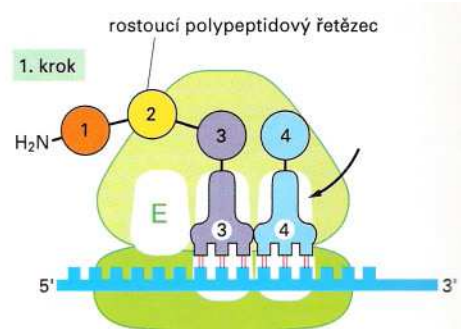
Obrázek 7-27 Translace molekuly mRNA. Při proteosyntéze je neustále opakován tříkrokový cyklus. V prvním kroku je aminoacyl-tRNA navázána do A-místa na ribosomu, ve druhém kroku vzniká nová peptidická vazba. Ve třetím kroku se malá podjednotka posune o tři nukleotidy podél mRNA, čímž se uvolní tRNA bez navázané aminokyseliny z E-místa a tRNA z A-místa se přesune do P-místa. Do volného A-místa se může okamžitě vázat další tRNA s připojenou aminokyselinou. Jak je znázorněno, mRNA je překládána ve směru 5'→3' a nejdříve vzniká N-konec proteinu.

podjednotky opět oddělí. Ribosomy pracují velmi efektivně: v eukaryontní buňce jeden ribosom přidá k rostoucímu řetězci dvě aminokyseliny za sekundu, bakteriální ribosomy jsou ještě asi desetkrát rychlejší.

Dále musíme vyřešit otázku, jak je koordinován pohyb ribosomu po mRNA. Ribosom obsahuje čtyři vazebná místa pro molekuly RNA: jedno pro mRNA a tři (nazývaná A-místo, P-místo a E-místo) pro tRNA. Molekuly tRNA jsou pevně drženy v A- a P-místech pouze tehdy, jestliže se antikodon páruje s kodonem v mRNA. Obě místa jsou tak blízko sebe, že jsou v nich navázány tRNA rozpoznávající sousední kodony (obr. 7-26).

Jakmile je syntéza proteinu zahájena, je každá další aminokyselina přidávána stejným způsobem. Při popisu elongace (prodlužování řetězce) vyjdeme ze situace, kdy je v P-místě navázána tRNA s rostoucím polypeptidovým řetězcem (obr. 7-27, krok 1). tRNA nesoucí další aminokyselinu v řetězci se váže do prázdného ribosomálního A-místa, a to na základě párování bází mezi kodonem exponovaným v A-místě a antikodonem tRNA. V kroku 2 je karboxylový konec polypeptidového řetězce odštěpen od tRNA v P-místě (přerušením vysoce energetické vazby mezi tRNA a aminokyselinou) a spojen peptidovou vazbou s volnou aminoskupinou aminokyseliny v A-místě. Tato centrální reakce proteosyntézy je katalyzována *peptidyltransferázovou* aktivitou, která je součástí ribosomu. Předpokládá se, že katalytickou částí ribosomu je v tomto případě spíše některá z rRNA ve velké podjednotce než některý z jejích proteinů. Jak je ukázáno na obrázku, peptidyltransferázová reakce je pravděpodobně doprovázena posunem malé podjednotky s navázanou mRNA vzhledem k velké podjednotce. Posun přemístí tRNA původně navázané v P- a A-místech do E-místa, respektive P-místa na velké podjednotce. V kroku 3 se malá podjednotka posune přesně o tři nukleotidy vpřed a dostane se do původní polohy vůči velké podjednotce. V tomto kroku dochází k uvolnění tRNA z E-místa. Celý cyklus všech tří kroků je opakován při každém přidávání nové aminokyseliny do polypeptidového řetězce, dokud ribosom nenarazí na stop-kodon. Polypeptidový řetězec roste směrem od N-konce k C-konci.

Otázka 7-6 Následující sekvence DNA byla použita jako templát pro syntézu mRNA a potom přeložena do proteinu: 5'-T-T-A-A-C-G-G-C-T-T-T-T-T-T-C-3'. Která aminokyselina bude na karboxylovém a která na amino-konci polypeptidu? Předpokládejte, že mRNA nepotřebuje pro translaci iniciační kodon.



Obrázek 7-28 Iniclace proteosyntézy u eukaryot.
Po zahájení proteosyntézy je řetězec prodlužován podle schématu na obr. 7-27.

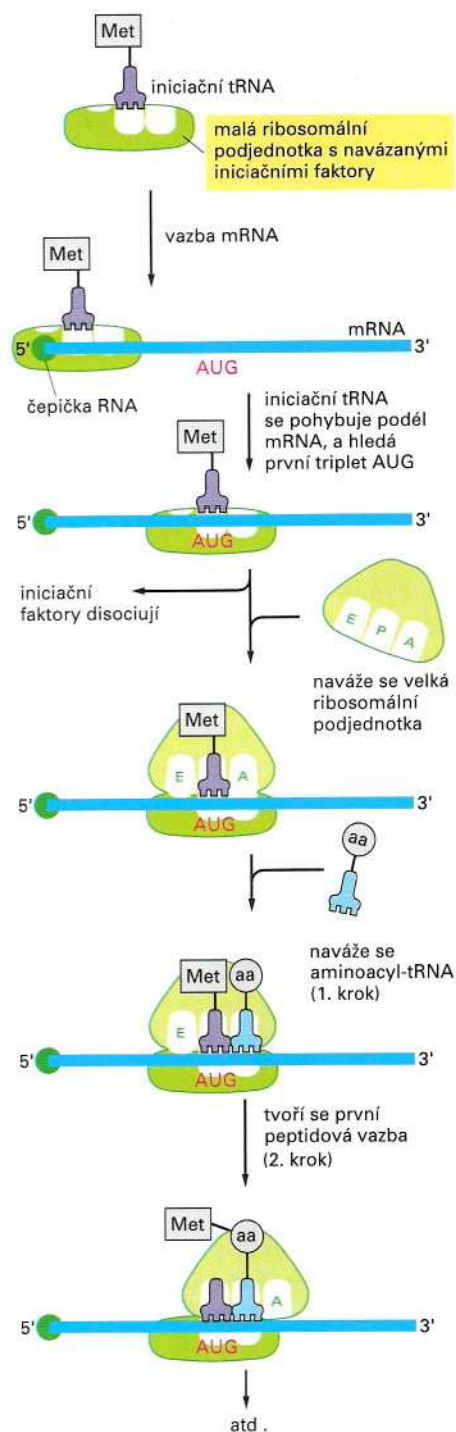
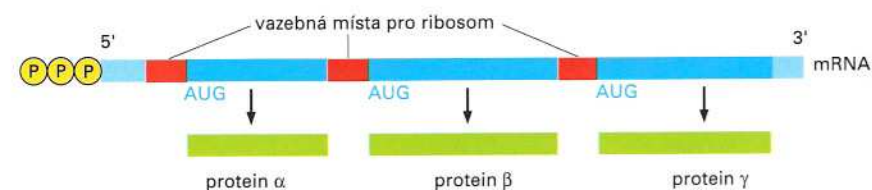
Kodony v mRNA signalizují, kde má začít a kde skončit syntéza proteinu

Místo, kde proteosyntéza na mRNA začne, je kritické, protože rozhoduje o čtecím rámcí, ve kterém bude celá mRNA přečtena. Změna ve čtení o jeden nukleotid je naprosto fatální, neboť každá další aminokyselina bude chybně zařazena a vznikne nefunkční protein (viz obr. 7-21). Iniciační krok je také velmi důležitý z hlediska kontroly množství syntetizovaného proteinu – jakmile translace začne, už nemůže být přerušena, protože zde není žádný další regulační krok.

Translace mRNA začíná na iniciačním kodonu AUG a pro iniciaci je třeba speciální tRNA. Tato **iniciační tRNA** má vždy na sobě navázaný methionin (u bakterií formylmethionin), proto každý nově nasyntetizovaný protein začíná na N-konci, který je syntetizován jako první, touto aminokyselinou. Methionin je později obvykle ze struktury proteinu odstraněn specifickou proteázou. Iniciační tRNA se liší od tRNA, na kterou se normálně váže methionin.

U eukaryot je iniciační tRNA s navázaným methioninem připojena k malé ribosomální podjednotce za asistence několika proteinů – **iniciačních faktorů** (obr. 7-28). Iniciační tRNA je jediná ze všech tRNA v buňce, která je schopná se pevně vázat na malou podjednotku. Po jejím navázání se malá podjednotka váže na 5'-konec mRNA, který je rozpoznán podle čepičky na konci (viz obr. 7-12B), a začne se pohybovat podél mRNA ve směru 5'→3' a hledat první kodon AUG, který je rozpoznán antikodonem iniciační tRNA. Jakmile ho nalezne, odpoutá se od malé ribosomální podjednotky několik iniciačních faktorů, což umožní připojení velké ribosomální podjednotky. Protože se iniciační tRNA váže rovnou do P-místa, může prodlužování (elongace) ihned začít navázáním druhé tRNA s aminokyselinou do A-místa (viz obr. 7-28).

Výběr start-kodonu u bakterií je odlišný. Bakteriální mRNA nemá na svém 5'-konci čepičku, která by ribosomu signalizovala, od kterého místa má začít hledat iniciační kodon. Místo toho mají několik nukleotidů před kodonem AUG signální sekvenci (šest nukleotidů dlouhou) pro navázání ribosomu. Díky ní se mohou prokaryontní ribosomy (na rozdíl od eukaryontních) vázat na iniciační kodony i uprostřed mRNA; stačí, pokud je před nimi ve vhodné vzdálenosti umístěna signální sekvence pro vazbu ribosomu. Proto mohou prokaryontní mRNA být polycistronní; to zna-



Obrázek 7-29 Struktura typické prokaryontní mRNA. Na rozdíl od eukaryontních ribosomů, které rozeznávají 5'-čepičku, nasedají prokaryontní ribosomy na vazebná místa pro ribosomy, která se mohou nacházet i uvnitř molekuly mRNA. To umožňuje bakteriím syntetizovat více druhů proteinů z jedné mRNA.

Obrázek 7-30 Konečná fáze proteosyntézy. Navázání terminačních faktorů na terminační kodon ukončuje translaci. Kompletní protein je uvolněn z ribosomu, který disociuje na jednotlivé podjednotky.

mená, že z jedné mRNA může být přeloženo několik proteinů (obr. 7-29). Eukaryontní mRNA obvykle nesou informaci jen pro jediný protein.

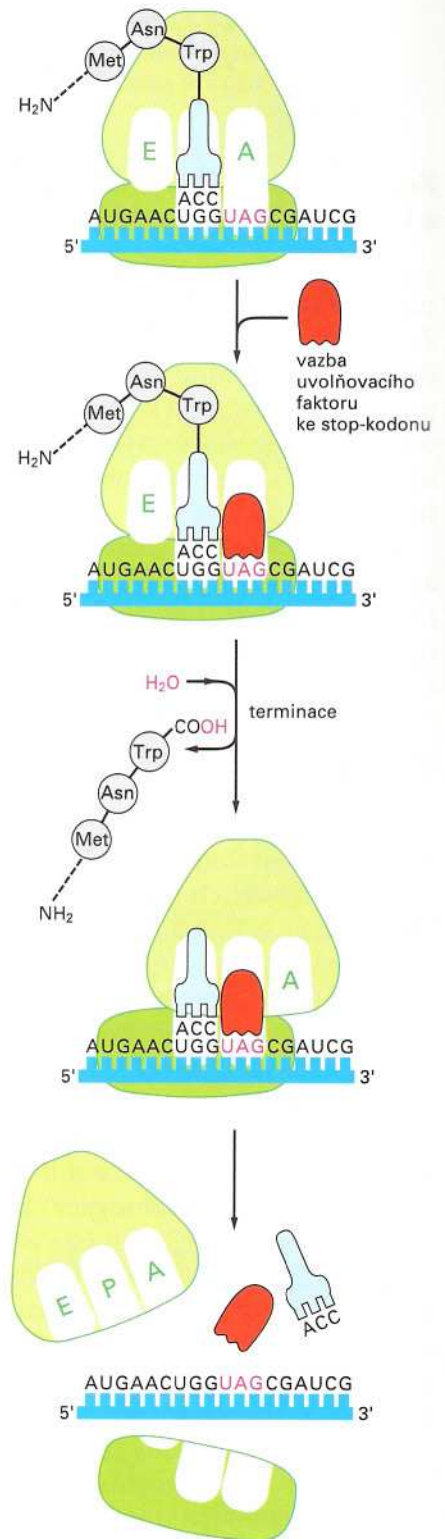
Konec proteinu je signalizován přítomností jednoho ze tří *terminačních* neboli *stop-kodonů* UAA, UAG, nebo UGA (viz obr. 7-20). Tyto kodony nejsou rozpoznávány žádnou tRNA, není jim tedy přiřazena žádná aminokyselina a signalizují konec translace (*Poznámka překladatele*: kodon UGA slouží též jako určující pro syntézu selenocysteinu, pokud se vyskytuje v sousedství určitých nukleotidů). Místo tRNA se na stop-kodon v A-místě vážou proteiny zvané *terminační faktory*, které mění aktivitu peptidyltransferázy tak, že místo aminokyseliny použije molekulu vody pro uvolnění karboxylového konce hotového polypeptidového řetězce z tRNA v P-místě (obr. 7-30). Vzhledem k tomu, že celý protein byl vázán k ribosomu jen díky této vazbě s tRNA, dojde k jeho uvolnění do cytoplasmy. Po skončení proteosyntézy je mRNA odpojena od ribosomu a dojde k disociaci obou podjednotek ribosomu, které se mohou navázat na jinou molekulu mRNA a začít novou translaci.

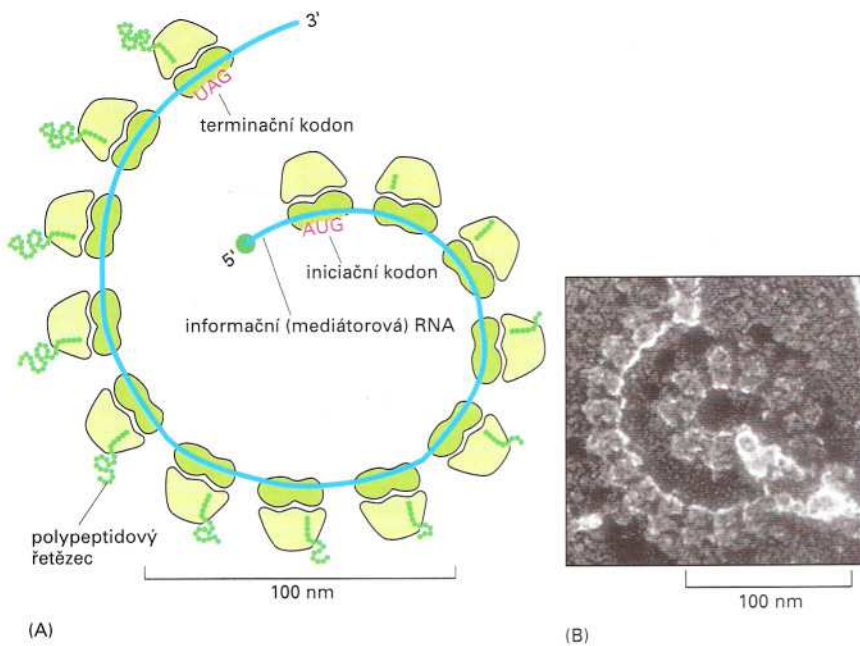
V Kapitole 5 jsme si řekli, že většina proteinů se může spontánně sbalit do trojrozměrné struktury a že většina z nich začíná s tímto procesem již během syntézy na ribosomu. Některé proteiny však vyžadují přítomnost tzv. molekulárních chaperonů ([šaperon]; doprovod) (viz str. 139), aby jim pomohly vytvořit si správnou konformaci. Takové proteiny jsou molekulárními chaperony rozpoznány již během svého vzniku na ribosomu a s jejich pomocí jsou správně konformovány tak, jak se postupně prodlužují.

Proteiny jsou syntetizovány na polyribosomech

Syntéza většiny proteinů trvá 20 sekund až několik minut. Ačkoliv je tato doba velice krátká, dochází ještě k dalšímu urychlení syntézy proteinů tím, že na jedné mRNA současně pracuje několik ribosomů. Nový ribosom nasedá na 5'-konec mRNA ihned, jakmile se předcházející posune o tolik, že se má nově příchozí ribosom na co navázat. Proto jsou obvykle molekuly mRNA nacházeny ve formě *polyribosomů* (také často zkráceně *polysomů*), kdy jsou jednotlivé ribosomy od sebe vzdálené přibližně 80 nukleotidů (obr. 7-31). Díky mnohanásobné iniciaci tedy může být nasyntetizováno mnohem více proteinů, než kdyby další ribosom mohl nasednout na mRNA až potom, co první dokončil syntézu celého proteinu.

Polysomy můžeme najít u prokaryot i eukaryot, ale bakterie mohou urychlit syntézu bílkovin ještě více. Protože bakteriální mRNA nepodléhá dalším úpravám a je také fyzicky přístupná ribosomům už v době, kdy je transkribována, translace začíná hned poté, co se objeví začátek mRNA. Ribosomy tedy těsně následují RNA-polymerázu, která před nimi tvoří mRNA.





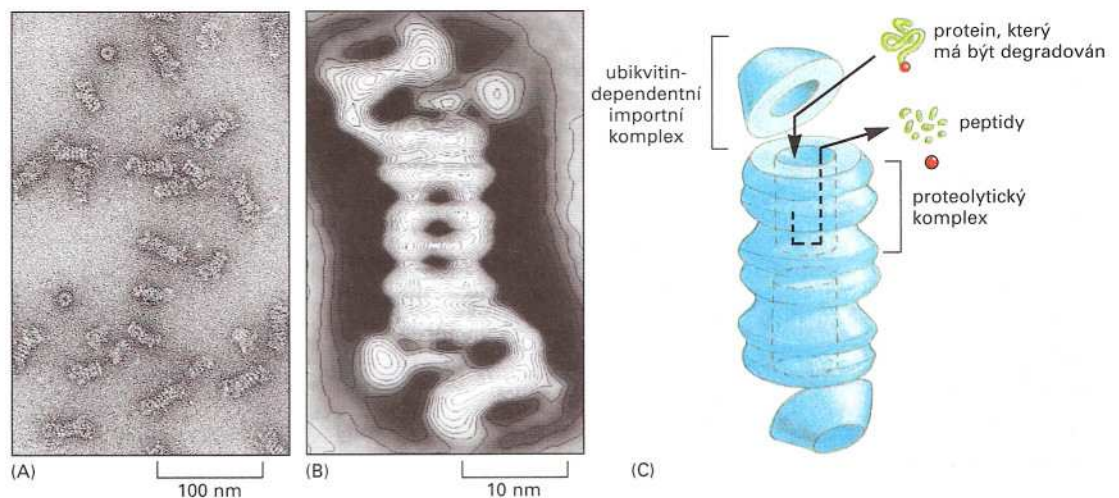
Obrázek 7-31 Polyribosom. (A) Schematická kresba ilustrující, jak může několik ribosomů současně překládat jednu molekulu mRNA. (B) Fotografie z elektronového mikroskopu zachycující polyribosom z eukaryontní buňky.

Přísně regulovaná degradace proteinů umožňuje buňce určovat množství každého proteinu

Množství proteinu v buňce závisí nejen na tom, jak rychle jsou nové molekuly tvořeny, ale i na době jejich života. Degradace proteinu na aminokyseliny je tedy další cestou, jak regulovat množství proteinu v buňce v určitém okamžiku. Doba života různých proteinů se velmi liší. Strukturální proteiny, které jsou součástí nějaké relativně trvalé tkáně, například kosti nebo svaly, mohou existovat několik měsíců i roků, zatímco jiné proteiny, například metabolické enzymy nebo proteiny regulující buněčný cyklus, existují jen několik dní, hodin nebo sekund. Otázkou je, jak buňka dokáže přesně regulovat dobu života různých proteinů.

V buňkách existují specializované dráhy, kterými enzymově degradují bílkoviny na aminokyseliny (tento proces se nazývá *proteolýza*). Enzymy, které štěpí proteiny nejprve na krátké peptidy a později na jednotlivé aminokyseliny, se společně nazývají

Obrázek 7-32 Proteasomy degradují nežádoucí proteiny v buňce. (A) Na fotografii z elektronového mikroskopu je vidět velké množství obarvených proteasomů. V cytoplasmě se nachází velké množství proteasomů, které mohou fungovat jako odpadní nádoby pro proteiny, jejichž výskyt v buňce je nežádoucí. (B) Hrubý model trojrozměrné struktury kompletního proteasomu sestavený na základě počítačového zpracování mnoha fotografií z elektronového mikroskopu. (C) Schéma proteasomového komplexu. Červená část proteinu určeného k degradaci představuje připojený ubiquitin. V proteasomu je ubiquitin odštěpen a může být recyklován.



proteázy a štěpí (hydrolyzují) peptidovou vazbu mezi aminokyselinami (viz panel 2-5, str. 62-63). Jednou z jejich funkcí je rychle degradovat ty proteiny, které mají existovat jen krátce. Druhou funkcí je rozpoznat a degradovat takové proteiny, které jsou poškozené nebo chybně sbalené. V této kapitole se zmiňujeme pouze o degradaci bílkovin v cytosolu, další důležité dráhy degradace proteinů existují u eukaryontních buněk v jiných oddílech (kompartimentech), například v lyzosomech (Kapitola 14).

Většina proteinů je v buňce degradována ve specializovaných komplexech proteolytických enzymů – **proteasomech**. Proteasomy jsou tělíška, která obsahují centrální dutinu, do níž vyčnívají aktivní místa proteas. Dutinu uzavírají z obou stran velké proteinové komplexy složené z nejméně deseti různých proteinových podjednotek (obr. 7-32). Tyto „zátky“ pravděpodobně vážou proteiny určené k degradaci a vtahují je dovnitř dutiny proteasomu, kde jsou rozloženy na krátké peptidy, které jsou následně uvolněny do cytoplasmy. Toto uspořádání má svůj smysl, neboť tímto způsobem se dostanou k proteasám jen ty proteiny, které mají být degradovány.

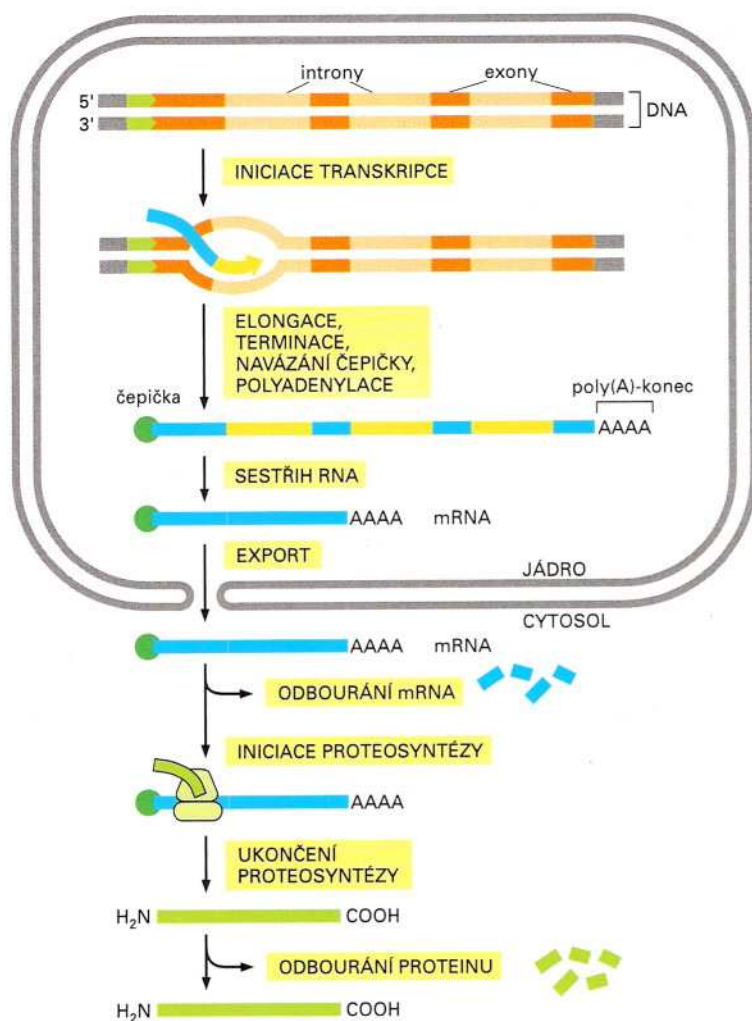
Zbývá tedy vyřešit otázku, jak jsou tyto proteiny vybírány. Proteasomy degradují především takové proteiny, na kterých je kovalentně navázán malý protein *ubikvitin*. Ten je k proteinům určeným pro degradaci vázán specifickými enzymy a takto ubikvitinované proteiny jsou rozpoznávány pravděpodobně jedním z proteinů zátky proteasomu.

Proteiny určené k rychlé degradaci mají často ve své primární struktuře krátkou signální sekvenci, která označuje tento protein jako substrát pro ubikvitinaci a následnou rychlou degradaci proteasomem. Denaturované, chybně sbalené proteiny nebo proteiny obsahující oxidované nebo jinak atypické aminokyseliny jsou také rozpoznávány a degradovány touto ubikvitin-dependentní dráhou. Enzymy, které vážou ubikvitin na tyto proteiny, pravděpodobně rozpoznávají signály, které se dostanou na povrch proteinu v důsledku jeho chybného sbalení nebo chemického poškození. Příkladem mohou být aminokyselinové sekvence nebo konformační motivy, které jsou normálně skryté a nepřístupné.

Je třeba mnoha kroků, než z DNA vznikne protein

Viděli jsme, že je třeba mnoha typů chemických reakcí, než na základě informace obsažené v genu vznikne protein (obr. 7-33). Konečné množství proteinu v buňce tedy záleží na účinnosti každého kroku, který se na vzniku bílkoviny podílí. V příští kapitole si ukážeme, jaké má buňka možnosti měnit množství konkrétního proteinu podle své potřeby. V principu mohou být všechny kroky na obr. 7-33 v buňce regulovány, ale v příští kapitole si ukážeme, že nejčastějším způsobem regulace exprese buněčných genů je iniciace transkripce.

Transkripce a translace jsou dva univerzální procesy, na kterých spočívá celý život. Jakmile však začali biologové uvažovat, jak mohl přenos informace z DNA do proteinu vůbec vzniknout, došli k některým neočekávaným závěrům.



Obrázek 7-33 Syntéza proteinu v eukaryontní buňce. Celkové množství každého proteinu v eukaryontní buňce závisí na účinnosti každého kroku, který se účastní jeho tvorby i odbourání. Ačkoliv jsou všechny kroky nakresleny tak, že probíhají jeden za druhým, mnoho z nich se odehrává současně. Například sestřih RNA začíná už před jejím dosyntetizováním.

RNA a původ života

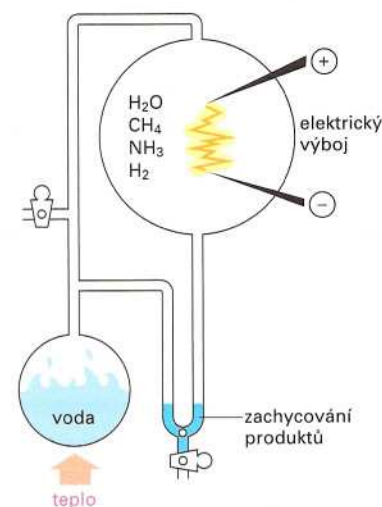
Abychom plně porozuměli procesům probíhajícím v dnes žijících buňkách, musíme uvažovat i o tom, jak mohly vzniknout během evoluce. Nejvýzývavější a nejzákladnější problémy se týkají exprese dědičné informace, která dnes vyžaduje existenci komplexního aparátu a přenos informace uložené v DNA přes RNA do proteinů. Jak mohl tento aparát vzniknout? Evoluční důkazy naznačují, že se události, které vedly ke vzniku prvních živých buněk, pravděpodobně odvíjely od RNA a DNA s proteiny vznikla až později. RNA je schopná fungovat samostatně – může v ní být uložena informace jako v DNA a navíc může katalyzovat specifické chemické reakce a tvořit makromolekulární struktury jako proteiny.

Jednoduché biologické molekuly mohly vzniknout za prebiotických podmínek

Jednoduché organické molekuly vznikly na Zemi pravděpodobně spontánně během první miliardy let její existence, tedy více než před čtyřmi miliardami let (obr. 7-34). Podmínky, které v oné době existovaly na Zemi, jsou dodnes předmětem diskuse. Byl zemský povrch zpočátku roztavený? Vyskytoval se v atmosféře amoniak



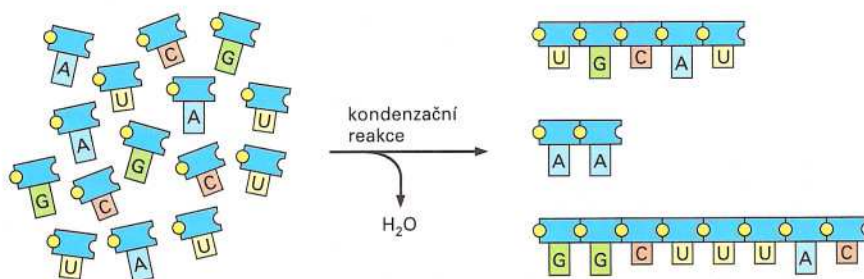
(A)



(B)

nebo metan? Obecně je přijímána myšlenka, že Země byla v té době velice bouřlivá planeta s vulkanickými erupcemi, blesky a přívalovými lijáky. Bylo zde málo (pokud vůbec nějaký) volného kyslíku a žádná ozonová vrstva, která by absorbovala ultrafialové záření ze Slunce. Záření díky fotochemické reakci mohlo napomáhat tvorbě reaktivních molekul v atmosféře. Dnes je vznik jednoduchých organických molekul simulován v laboratoři, kdy je směs plynů předpokládaných v prapůvodní atmosféře zahřívána v přítomnosti vody a kdy je energie dané směsi dodávána elektrickými výboji (obr. 7-34). Při těchto pokusech vzniká většina hlavních druhů malých organických molekul, které se vyskytují v buňce, například *aminokyseliny*, *cukry*, *puriny* a *pyrimidiny*, které jsou nutné pro vznik *nukleotidů*. Ačkoliv tyto experimenty nemohou přesně reprodukovat rané podmínky na Zemi, jasně z nich vyplývá, že vznik organických molekul je překvapivě snadný. Vyvíjející se Země měla značné výhody proti lidským experimentům; byla obrovská a mohlo tedy na ní panovat velké množství rozličných podmínek. Navíc měla mnohem více času - stovky milionů let. Za těchto okolností vypadá velmi pravděpodobně, že se mnoho jednoduchých organických molekul, vyskytujících se v dnešních buňkách, mohlo akumulovat ve stejném čase a na stejném místě ve vysokých koncentracích.

Obrázek 7-34 Vznik organických molekul. (A) Výboj při blesku. Masivní uvolnění elektrické energie při úderech blesku bylo pravděpodobně zdrojem energie pro prebiotickou syntézu organických sloučenin na Zemi. (B) Typický experiment, ve kterém jsou simulovány podmínky panující dříve na Zemi. Voda je zahřívána v uzavřené aparatuře obsahující metan (CH_4), amoniak (NH_3) a vodík (H_2), o kterých se předpokládá, že byly hojně zastoupeny v atmosféře Země před čtyřmi miliardami let. Přes plynnou fázi jsou vedeny elektrické výboje, organické sloučeniny jsou zachycovány v trubici ve tvaru U.



Obrázek 7-35 Vznik polynukleotidů. Nukleotidy mohou spontánně polymerovat v kondenzační reakci za ztráty vody (viz obr. 2-26 a 3-33). Produktem je směs polynukleotidů o náhodné délce a sekvenci. Zde je zachycena polymerace čtyř nukleotidů vyskytujících se v RNA (A, U, C a G).

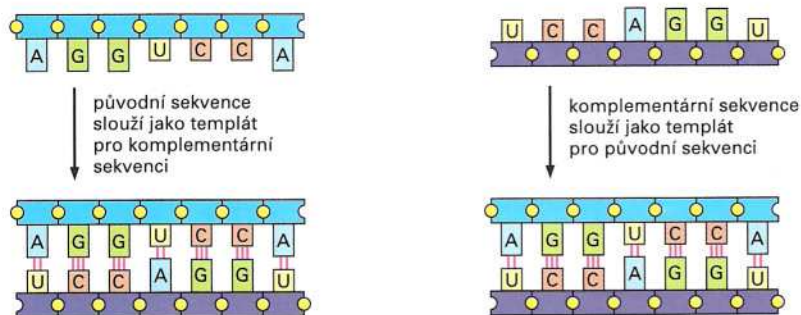
Uvažuje se o tom, že mohlo dojít k náhodnému spojení několika jednoduchých organických molekul, jako například nukleotidů, do polymeru. Navzdory nadbytku vody na Zemi, která by mohla silně posunovat rovnováhu reakce směrem k hydrolyze místo ke kondenzaci (reakce, která spojuje nukleotidy dohromady; Kapitola 2 a 3), polynukleotidy mohly vznikat v suchých organických usazeních ve vyschlých částech Země. Jedna ze současných teorií předpokládá, že tyto reakce mohly urychlovat anorganické katalyzátory. V laboratorních podmínkách, které mohou opomíjet tyto okolnosti, také dochází ke vzniku polynukleotidů o různé délce a o náhodné sekvenci (obr. 7-35). Jakmile je jednou polymer vytvořen, může principiálně ovlivňovat následné chemické reakce jako katalyzátor.

Vznik života vyžaduje molekulu, která by alespoň částečně měla jednu zásadní vlastnost: schopnost katalyzovat reakci, která by vedla, přímo nebo nepřímo, k samoreprodukci. Katalyzátory, které by toho byly schopné, by mohly jednou náhodou vzniknout a dále by se již udržovaly a množily samy na vrub jiných substancí. Tímto způsobem by mohly vznikat stále větší a větší komplexy organických monomerů a polymerů, které by spolupracovaly na tvorbě molekul stejného typu za použití jiných jednoduchých molekul z prostředí. Takovýto **autokatalytický** systém by měl mít některé vlastnosti, které předpokládáme pro živou hmotu: měl by obsahovat nenáhodný výběr molekul; měl by mít tendenci se množit; měl by soutěžit s podobnými systémy, které využívají stejný stavební materiál, a pokud jim chybí stavební materiál nebo se vyskytují v teplotách, které by narušovaly rovnováhu reakcí, mělo by docházet k jejich rozpadu směrem k chemické rovnováze a jejich "smrti".

Ale které molekuly mají tyto autokatalytické vlastnosti? V dnešních buňkách jsou univerzálními katalyzátory polypeptidy, které nabývají různých trojrozměrných struktur s mnoha reaktivními místy. Ačkoliv jsou proteiny univerzální coby katalyzátory, zatím nebyl objeven žádný způsob, jak by se mohly proteiny samy množit. Polynukleotidy toho všeho byly schopné, přestože ne tak dobře, jak to známe z dnes žijících buněk.

RNA může uchovávat informaci i katalyzovat chemické reakce

Není těžké si představit, že ve směsi molekul v prebiotických podmínkách mohly neustále vznikat polynukleotidy. Pro vývoj života však musely být schopné samy se replikovat. Viděli jsme, že komplementární párování nukleotidů umožňuje řetězci DNA určit sekvenci komplementárního polynukleotidu, který může zpětně



Obrázek 7-36 Replikace molekuly RNA.

V prvním kroku funguje molekula RNA jako templát pro syntézu molekuly, která je k ní komplementární. Ve druhém kroku je nově vzniklá RNA využita jako templát pro syntézu vlákna se stejnou sekvencí, jakou měl původní templát. Vzhledem k tomu, že každá templátová molekula může dát vznik mnoha komplementárním kopiím, dojde k namnožení původní sekvence.

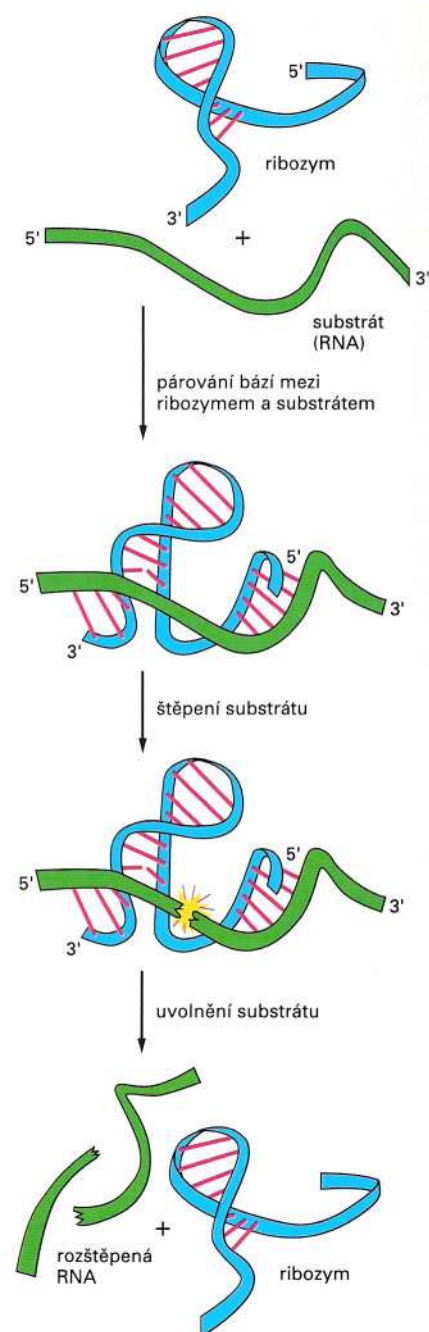
Obrázek 7-37 Ribozym. Tato jednoduchá molekula RNA katalyzuje štěpení druhé molekuly RNA ve specifickém místě. Ribozymy lze nalézt ve větších RNA–genomech, nazývaných viroidy, které infikují rostliny. Štěpení, které se přirozeně odehrává na stejné molekule RNA, která obsahuje ribozym, je součástí replikace genomové RNA. Tato katalýza vyžaduje přítomnost hořčičnatého iontu (není zakreslen), který je navázán blízko štěpeného místa.

specifikovat sekvenci původního řetězce, což umožňuje rozmnožení původního vlákna (obr. 7-36). RNA může být také templátem pro syntézu komplementárního vlákna RNA, jak lze dodnes pozorovat u některých virů, například viru chřipky, kde je RNA primárním genetickým materiálem (viz Kapitola 9).

Ale syntéza polynukleotidů procesem založeným na párování nukleotidů vyžaduje katalyzátory, které by urychlovaly polymerační reakci: bez katalyzátorů by byla polymerace velmi pomalá, chybná a nedostatečná. Dnes je polymerace nukleotidů urychlována proteinovými enzymy, jako jsou DNA- a RNA-polymerázy. Ale jak mohla být katalyzována v prebiotických podmínkách, kdy neexistovaly proteiny s vhodnou specifitou? Odpověď na tuto otázku se začala rýsovat v roce 1982, kdy bylo objeveno, že RNA je také schopná fungovat jako katalyzátor. V této kapitole jsme si už jeden takový případ ukázali – je to pravděpodobně RNA, která má při translaci peptidyltransferázovou funkci. Unikátní schopnosti RNA fungovat jako informační molekula i jako katalyzátor jí snad umožnily sehrát klíčovou roli při vzniku života.

V dnešních buňkách je RNA syntetizována jako jednořetězcová molekula, ve které však může docházet k párování bází v rámci jednoho řetězce (viz obr. 7-5). Toto párování bází spolu s ostatními vodíkovými můstky v molekule umožňuje sbalení každé RNA podle její sekvence. Sbalení do trojrozměrné konformace dává každé molekule pro ni specifický tvar.

Viděli jsme, že proteinové enzymy jsou schopné katalyzovat biochemické reakce, a to díky povrchům se specifickými tvary a chemickými vlastnostmi, na kterých může daný substrát reagovat

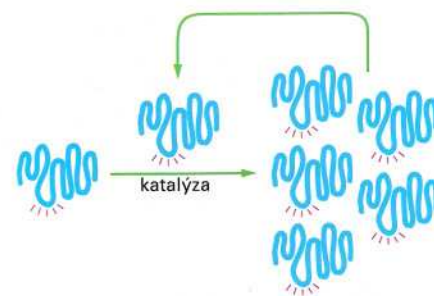


Tabulka 7-2 Biochemické reakce, které mohou být katalyzovány ribozymy

Aktivita	Ribozym
štěpení RNA, ligace RNA	samosestřihující se RNA
štěpení DNA	samosestřihující se RNA
vznik peptidové vazby při proteosyntéze	ribosomální RNA (?)
ligace DNA	<i>in vitro</i> připravené RNA
sestřih RNA	RNA v sestřihovém komplexu, samosestřihující se RNA
polymerace RNA	<i>in vitro</i> připravené RNA
fosforylace RNA	<i>in vitro</i> připravené RNA
aminoacylace RNA	<i>in vitro</i> připravené RNA
alkylace RNA	<i>in vitro</i> připravené RNA
izomerace (rotace vazby C-C)	<i>in vitro</i> připravené RNA

(Kapitola 5). Obdobným způsobem může RNA se stejně specifickými povrchy fungovat jako enzym (obr. 7-37), ačkoliv skutečnost, že je složena pouze ze čtyř nukleotidů, limituje rozsah chemických reakcí, které může katalyzovat, a její katalytickou účinnost v porovnání s proteiny. Přesto bylo objeveno poměrně značné množství druhů reakcí, které je RNA schopná katalyzovat v přírodě nebo laboratoři (tabulka 7-2). RNA s katalytickými vlastnostmi jsou souhrnně nazývány **ribozimy**. V dnešní době existuje relativně málo katalytických RNA, většinou byly jejich funkce převzaty proteiny. Přesto procesy, ve kterých mají katalytické RNA významnou roli, patří mezi naprosto základní v expresi genetické informace - zvláště pak jejich podíl na sestřihu nebo translaci.

RNA má tedy všechny potřebné vlastnosti, aby mohla katalyzovat svoji vlastní syntézu (obr. 7-38), a předpokládá se, že se mohla podílet na vzniku prapůvodních buněk. Ačkoliv samoreplikující se systém RNA molekul nebyl v přírodě nalezen, mnoho vědců je přesvědčeno, že by mohl být zkonstruován v laboratorních podmínkách. Přestože takovýto pokus by nebyl důkazem, že samoreplikující se molekuly RNA byly počátkem života na Zemi, lze připustit, že by tento scénář vzniku života mohl být opodstatněný.



Obrázek 7-38 Molekula RNA, která dokáže katalyzovat svoji vlastní syntézu. Tento hypotetický proces vyžaduje katalýzu v obou krocích z obr. 7-36. Červeně jsou označena aktivní místa RNA enzymů.

RNA v evoluci pravděpodobně předcházela DNA

První buňky na Zemi byly pravděpodobně mnohem méně komplexní a méně úspěšné v rozmnožování i v porovnání s dnešními nejjednoduššími buňkami, protože RNA-katalyzátory jsou mnohem méně výkonné než proteiny. Pravděpodobně se skládaly z jednoduché membrány a samoreplikujících se molekul spolu s několika dalšími složkami, které buňky využívaly jako stavební materiál a zdroj energie pro replikaci. Jestliže jsou předchozí spekulace o RNA správné, dřívější buňky se značně lišily od dnešních, a to hlavně uložením dědičné informace (v RNA místo dnešní DNA).

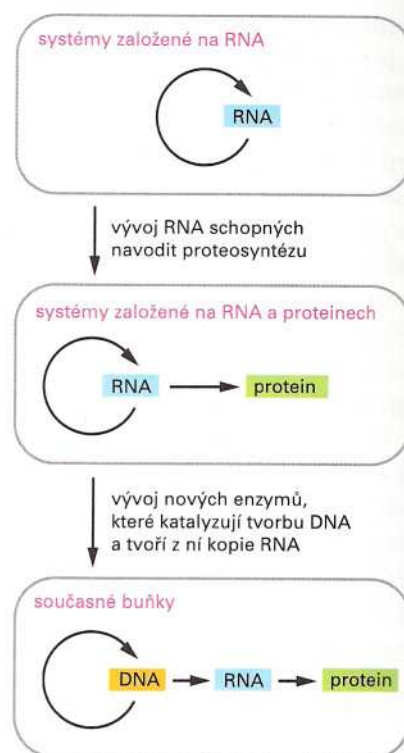
Důkazy, že RNA vznikla evolučně dříve než DNA, mohou být nalezeny v chemických odlišnostech mezi nimi. Ribosa (viz obr. 7-3), podobně jako glukosa a další jednoduché uhlovodíky, se mohla snadno vytvořit z formaldehydu (HCHO), který je jedním z produktů vznikajících v pokusech simulujících dřívější podmínky na Zemi. Deoxyribosu je mnohem těžší vyrobit, v dnešních buňkách vzniká díky proteinům z ribosy, a proto se předpokládá, že ribosa musela v buňkách předcházet deoxyribosy. Předpokládá se, že se DNA objevila až později, ale ukázala se vhodnější pro stabilní uložení dědičné informace než RNA. Deoxyribosa činí cukr-fosfátovou páteř nukleových kyselin mnohem stabilnější, DNA je tedy chemicky odolnější, a proto se mohou bez zlomů udržet i delší řetězce.

Další odlišností mezi RNA a DNA jsou dvojšroubovicová struktura a použití thyminu v DNA místo uracilu v RNA – obojí dále přispívá k chemické stabilitě DNA, hlavně díky možnosti opravovat chyby (v předcházející kapitole jsme si ukázali, že poškozené nukleotidy mohou být opraveny podle druhého řetězce). Jednou z velice častých změn v DNA i RNA je spontánní ztráta aminoskupin z bází (deaminace), která mění jak bázi samotnou, tak její možnost párovat se (viz obr. 6-27 a 6-29). Při nutnosti chránit svoji genetickou informaci je pochopitelné, že vznikly systémy schopné opravo-

Obrázek 7-39 Hypotéza, podle které RNA předcházela v evoluci DNA i proteinům. V prapůvodních buňkách měly molekuly RNA genetickou, strukturální i katalytickou funkci. DNA později převzala úlohu uchování genetické informace a proteiny se staly hlavními buněčnými katalyzátory. RNA dnes funguje jako prostředník při syntéze proteinů a ponechala si některé katalytické funkce.

vat tato poškození. Naneštěstí je produktem deaminace cytosinu právě uracil, který se přirozeně vyskytuje v RNA, což by zabraňovalo rozpoznání této mutace v RNA opravnými enzymy a došlo by k trvalému zafixování této změny. V DNA je však uracil nahrazen thyminem, a proto je uracil vzniklý deaminací cytosinu snadno nalezen a opraven.

V souhrnu vedly důkazy, které jsme uvedli výše, k teorii, že RNA v evoluci předcházela DNA. Toto stadium buněčné evoluce bývá nazýváno *svět RNA*. S postupem času se prapůvodní buňky dále vyvíjely a předpokládá se, že mnoho funkcí RNA bylo postupně převzato lépe přizpůsobenými molekulami, které byly schopné lépe plnit danou funkci. DNA se stala hlavní molekulou uchováající genetickou informaci a proteiny převzaly roli katalyzátorů. RNA se pak stala prostředníkem mezi DNA a proteiny (obr. 7-39). S nástupem DNA se staly buňky mnohem komplexnější, mohly nést a uchovávat větší množství genetické informace, než to bylo možné v RNA. Posun k proteinům jako katalyzátorům a stavebním jednotkám vedl také k rozšíření buněčných možností, ať už urychlení a rozšíření spektra katalyzovaných biochemických reakcí, nebo k jejich širšímu použití jako stavebního materiálu. Obojí pak umožnilo buňkám dát vznik velké rozmanitosti struktur i funkcí, jak můžeme vidět v dnešním světě.



Otázka 7-7 Diskutujte o následujícím tvrzení: "Během evoluce života na Zemi byla RNA zbavena výsady prvního samoreplikuující se katalyzátoru. V současnosti funguje jako posel při předávání informace DNA do proteinu."

Základní shrnutí

- Genetická informace je v buňkách přenášena z DNA přes RNA do proteinů. Konverze genetické informace z DNA do RNA a odtud do proteinu se nazývá genová exprese.
- Pro vyjádření genetické informace uložené v DNA je nukleotidová sekvence nejprve přepsána do RNA. Transkripce je katalyzována enzymem RNA-polymerázou. V nukleotidové sekvenci DNA je zapsáno, kde má transkripce začít a kde má skončit.
- RNA se v některých aspektech liší od DNA. Obsahuje cukr ribosu místo deoxyribosy a bázi uracil (U) místo thyminu (T). RNA je v buňce syntetizována jako jednovláknová molekula, která se často balí do trojrozměrné struktury.

- V buňkách vzniká několik různých typů RNA – informační (mediátorová, mRNA), ve které jsou uloženy informace pro syntézu proteinu; ribosomální (rRNA), která je součástí ribosomů, a transferová (tRNA), která má funkci adaptoru při proteosyntéze.
- V eukaryontní DNA je většina genů tvořena velkým počtem krátkých kódujících úseků (exonů) oddělených delšími nekódujícími oblastmi (introny).
- Při transkripci eukaryontních genů jsou do primárního transkriptu přepsány exony i introny.
- Introny jsou z primárního transkriptu odstraněny v buněčném jádru procesem nazývaným sestřih RNA. V reakci katalyzované malými ribonukleotidovými částicemi (snRNP) jsou introny vystřiženy a sousední exony jsou spojeny. Hotová mRNA je transportována do cytoplasmy.

- Translace nukleotidové sekvence mRNA do proteinu se odehrává v cytoplasmě na velkých ribonukleoproteinových částicích nazývaných ribosomy. Ty nasedají na začátek mRNA a pohybují se směrem k jejímu 3'-konci za současné syntézy proteinu.
- Nukleotidová sekvence mRNA je čtena po trojicích nukleotidů (kodonech); každý kodon má přiřazenu jednu aminokyselinu.
- Přiřazení aminokyseliny k určitému kodonu je dáno genetickým kódem. Kombinací čtyř různých nukleotidů můžeme získat 64 odlišných kodonů. Většinu aminokyselin určuje více než jeden kodon.
- tRNA fungují jako adaptory při proteosyntéze. Enzymy nazývané aminoacyl-tRNA-syntetázy připojují správné aminokyseliny k daným tRNA. Každá tRNA obsahuje sekvenci tří nukleotidů nazývanou antikodon, která se páruje s kodonem v mRNA na základě komplementárního párování bází.
- Proteosyntéza začíná v místě, kde ribosom nalezne v mRNA iniciační kodon (AUG), a vyžaduje přítomnost proteinů souhrnně nazývaných iniciační faktory. Kompletní protein je uvolněn z ribosomu, pokud se ribosom zastaví na jednom z terminačních kodonů (UAA, UGA, UAG).

- katalyzováno molekulou rRNA ve velké podjednotce ribosomu.
- Degradace proteinů v buňce je pečlivě regulována. Některé proteiny jsou odbourávány v cytoplasmě velkým proteinovým komplexem – proteasomem.
- Z našich znalostí dnešních buněk a molekul, které obsahují, usuzujeme, že evoluce života začala RNA molekulami, které mohly katalyzovat svoji vlastní replikaci.
- Předpokládá se, že během evoluce došlo k nahrazení RNA stabilnější dvoušroubovicovou DNA, která umožnila uložení většího množství informace. Katalytické a strukturální funkce RNA převzaly proteiny.
- Tok informace v dnešních buňkách je DNA → RNA → protein, s RNA jako prostředníkem při přenosu informace z DNA do proteinu. Některé důležité reakce jsou však stále katalyzovány RNA, což připomíná existenci prapůvodního světa založeného na RNA.

Klíčová slova

aminoacyl-tRNA-
syntetáza
antikodon
autokatalytický
kodon
exon

genetický kód
iniciační faktor
iniciační tRNA
intron
mRNA
primární transkript
promotor

proteáza
proteasom
proteolýza
čtecí rámec
ribosom
ribozym
polymeráza

tRNA
úpravy RNA
sestřih RNA
rRNA
snRNP
transkripce
translace

8 Chromosomy a regulace genů

DNA každého organismu kóduje veškerou RNA a proteiny, které jsou zapotřebí pro vznik jeho buněk. Kompletní popis sekvence DNA organismu – ať již několika milionů nukleotidů u bakterií, nebo několika miliard nukleotidů u lidské buňky – nám však neumožní rekonstruovat daný organismus, stejně jako seznam anglických slov ve slovníku nám neumožní rekonstruovat Shakespearovu hru. Potřebujeme vědět, jak jsou elementy v sekvenci DNA – geny – používány. I nejjednodušší jednobuněčná bakterie používá své geny různě, zapínáním a vypínáním genů může syntetizovat různé enzymy podle nutričních zdrojů v prostředí.

U mnohobuněčných rostlin a živočichů je **genová exprese** pod mnohem propracovanější kontrolou. Během vývoje embrya vzniká z oplozeného vajíčka mnoho typů buněk, které se značně liší ve struktuře i funkci. Odlišnosti mezi savčím neuronem a lymfocytom jsou tak velké, že si lze jen těžko představit, že by mohly obsahovat stejnou DNA (obr. 8-1). Z tohoto důvodu a také proto, že buňky dospělého organismu jen zřídka mění své vlastnosti, vědci nejprve předpokládali, že během diferenciaci dochází k selektivní ztrátě určitých genů a tím že se buňky specializují. Nyní už víme, že téměř všechny buňky mnohobuněčného organismu obsahují stejný genom. Buněčná diferenciaci je výsledkem změn v expresi jednotlivých genů.

Stovky různých buněčných typů provádějí řadu specializovaných funkcí, a to v závislosti na genech, které jsou v daném buněčném typu aktivní. Tak například v α -buňkách pankreatu se tvoří proteinový hormon insulin, zatímco β -buňky syntetizují hormon glukagon; lymfocyty imunitního systému jako jediné buňky v těle vytvářejí protilátky, zatímco jediné ve vyvíjejících se červených krvinkách vzniká hemoglobin. Rozdíly mezi neuronem, lymfocytom, pankreatickou buňkou a erytrocytem jsou založeny na přesné kontrole exprese genů. V každém případě buňka využívá jen několik z celkového počtu genů.

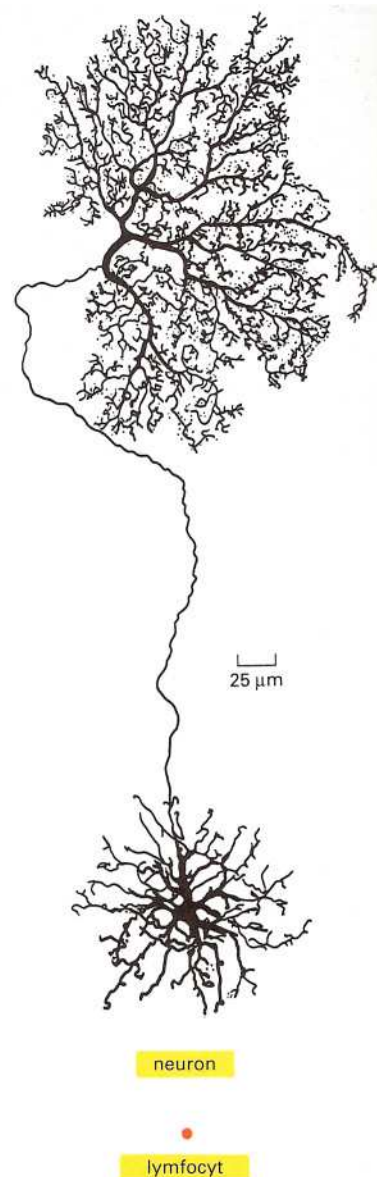
STRUKTURA EUKARYONTNÍCH CHROMOSOMŮ

- Eukaryontní DNA je sbalena do chromosomů
- Stav chromosomů se mění během buněčného cyklu
- Specializované sekvence DNA zajišťují účinnou replikaci chromosomů
- Nukleozomy jsou základní strukturní jednotkou chromatinu
- DNA v chromosomech je kondenzována na několika úrovních
- Interfázové chromosomy obsahují kondenzované i rozvolněné formy chromatinu
- Polohové efekty, ovlivňující genovou expresi, odhalily odlišnosti v kondenzaci interfázových chromosomů
- Interfázové chromosomy jsou v jádře organizovány

REGULACE GENŮ

- Buňky regulují expresi svých genů
- Transkripce je regulována proteiny, které se vážou na regulační sekvence DNA
- Represory vypínají geny a aktivátory je zapínají
- Iniciační transkripce u eukaryot je komplexní proces
- Eukaryontní RNA-polymeráza vyžaduje obecné transkripční faktory
- Eukaryontní regulační proteiny kontrolují expresi genu ze značné vzdálenosti
- Sbalení promotorové DNA do nukleosomu může ovlivňovat iniciační transkripce
- Eukaryontní geny jsou regulovány kombinacemi proteinů
- Expresi různých genů může být řízena jedním proteinem
- Kombinační kontrola může dát vznik různým buněčným typům
- V dceřiných buňkách mohou být exprimovány stejné geny jako v mateřské buňce
- Tvorba celého orgánu může být spuštěna jedním regulačním proteinem

Obrázek 8-1 Savčí neuron a lymfocyt. Dlouhé rozvětvené výběžky tohoto neuronu ze sítnice umožňují přijímání elektrického signálu z mnoha buněk a jeho přenos do velkého počtu jiných sousedních buněk. Lymfocyt je bílá krvinka, která se volně pohybuje po těle a podílí se na imunitní odpovědi organismu při infekci. Obě buňky obsahují stejný genom, ale exprimují různé RNA a proteiny.



Pro zapsání veškerých informací nutných pro vznik jednobuněčné bakterie je potřeba velkého množství DNA, natož pak pro vývoj mnohobuněčného organismu. To s sebou nese problém, jak by měla být DNA sbalena, aby byla v jádře snadno přístupná. V eukaryontních buňkách jsou enormně dlouhé molekuly DNA asociovány se specifickými proteiny a sbaleny do *chromosomů*, které se do jádra snadno vejdou a mohou být jednoduše rozděleny do dceřiných buněk v průběhu buněčného dělení. Sbalení musí být vysoce uspořádané, aby geny v DNA byly snadno přístupné pro replikaci i transkripci.

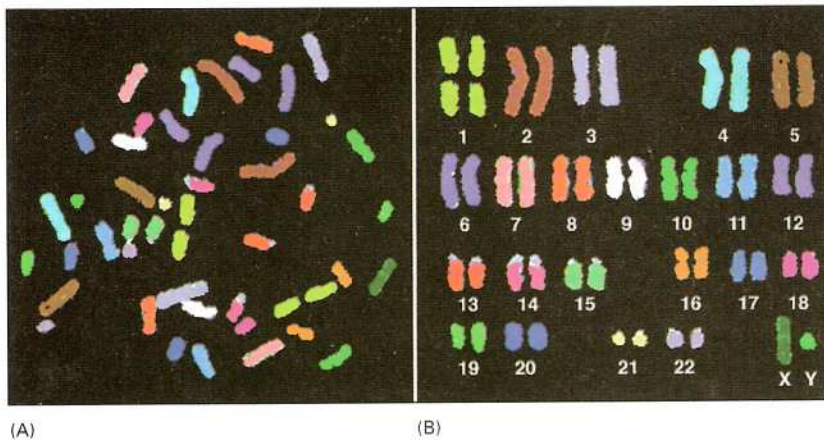
Na začátku této kapitoly si popíšeme, jak je DNA spiralizována v eukaryontních chromosomech a jak se mění struktura těchto chromosomů v různých fázích buněčného cyklu. V druhé části kapitoly si vysvětlíme hlavní způsoby regulace genové exprese u bakterií a eukaryontních buněk. Ačkoliv oba druhy buněk využívají některé stejné mechanismy, eukaryontní buňky mají díky komplexnější struktuře chromosomů i další možnosti regulace, které u prokaryot nenalezneme.

Struktura eukaryontních chromosomů

Jádro typické lidské buňky má průměr přibližně 5-8 μm a obsahuje DNA o délce asi *dvou metrů* – to je srovnatelné s tenisovým míčkem, který obsahuje 20 km extrémně jemné nitě. V této části si ukážeme, jak je úkol sbalení DNA závislý na specializovaných proteinech, které se na DNA vážou a sbalují ji. Tím vytvářejí sérii klubíček a smyček, které představují vyšší úroveň organizace, a zabraňují DNA nevratně se zamotat. Překvapující je, že DNA je sbalena takovým způsobem, který jí umožňuje interakce se všemi enzymy a jinými proteiny potřebnými pro její transkripci, replikaci a reparaci.

Eukaryontní DNA je sbalena do chromosomů

U eukaryot, jako jsme my, je DNA v jádru rozdělena mezi sadu různých *chromosomů*. Každý chromosom se skládá z jedné dlouhé lineární molekuly DNA, na kterou jsou navázány proteiny, jež umožňují svinutí tenkého vlákna DNA do kompaktnější struktury. Komplex DNA a proteinů se nazývá *chromatin* (z řeckého *chroma* - „barva“, díky jeho barvitelnosti). Mnoho proteinů asociovaných s DNA napomáhá jejímu sbalení, ale na DNA jsou taktéž navázány



Obrázek 8-2 Lidské chromosomy. Mužské chromosomy byly izolovány z právě se dělící buňky (buňky v mitoze), a proto jsou vysoce kompaktní. Každý chromosom byl obarven různou barvou pro jednoznačnou identifikaci ve světelném mikroskopu. Obarvení chromosomů bylo dosaženo přidáním sady lidských molekul DNA, na které byly navázány kombinace různých fluorescenčních barev. Fragments DNA odvozené od chromosomu 1 byly označeny jednou barvou, fragmenty odvozené od chromosomu 2 jinou barvou atd. Protože označená DNA se může párovat, neboli hybridizovat, pouze s chromosomem, ze kterého pochází (viz Kapitola 10), má každý chromosom jinou barvu. V těchto experimentech jsou chromosomy denaturovány - řetězce DNA jsou od sebe odděleny - což umožňuje párování mezi jednořetězcovou označenou DNA a relativně intaktním chromosomem. (A) Chromosomy uvolněné z lyzované buňky. (B) Stejně chromosomy uměle seřazené do párů podle pořadí, tomuto uspořádání se říká karyotyp.

proteiny, které se podílejí na genové expresi, replikaci a opravě DNA.

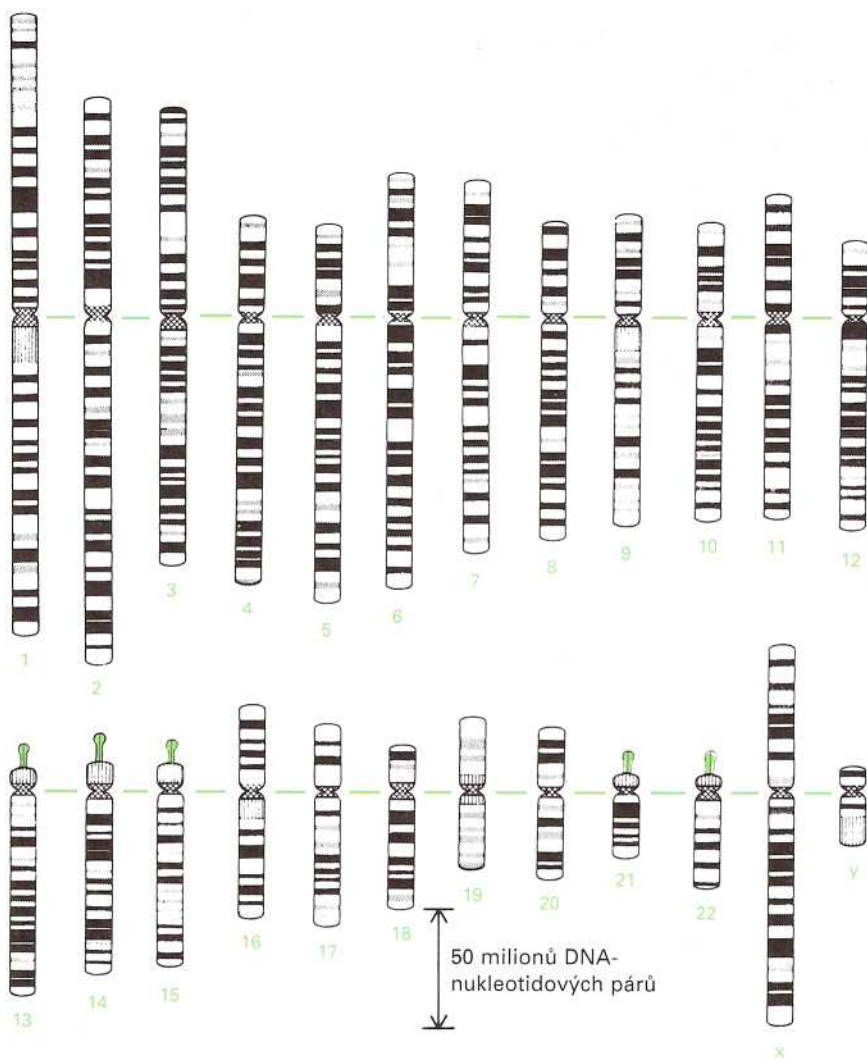
Bakterie mají obvykle všechny svoje geny na jedné cirkulární molekule DNA, na které jsou též navázány proteiny (ovšem jiné než u eukaryot) podílející se na sbalení DNA. Tato cirkulární molekula DNA je často nazývána bakteriální "chromosom", přestože nemá tutéž strukturu jako eukaryontní chromosomy a o jeho sbalení není zatím mnoho známo. Proto se v této kapitole zcela zaměříme na eukaryontní chromosom.

Všechny lidské buňky (kromě zárodečných) obsahují dvě kopie každého chromosomu, jednu od matky a druhou od otce; mateřské (maternální) a otcovské (paternální) chromosomy jednoho páru se nazývají *homologní chromosomy*. Jediným nehomologním párem jsou u samců pohlavní chromosomy, kdy se dědí *Y-chromosom* po otci a *X-chromosom* po matce. Na obr. 8-2 je ukázáno, jak může být *hybridizace DNA* (popsaná v Kapitole 10) využita pro identifikaci jednotlivých párů chromosomů pomocí různých barev. Běžně používaným způsobem, jak rozlišit jeden chromosom od druhého, je obarvit je nějakou sloučeninou, která se přednostně váže na určitý typ sekvencí DNA. Tyto barvy převážně rozlišují sekvence bohaté na A-T páry od sekvencí s vysokým obsahem nukleotidů G-C, na každém chromosomu se pak objevují specifické proužky (obr. 8-3), podle kterých lze jednotlivé chromosomy identifikovat a určit jejich počet. Pokud je nějaká část chromosomu ztracena nebo přesunuta na jiný chromosom, lze tuto změnu rozpoznat na základě změny specifického proužkování. Cytogenetici používají tuto metodu k detekci chromosomálních abnormalit, které jsou spojeny s některými vrozenými vadami nebo určitými druhy rakoviny.

Otázka 8-1 Ve dvojšroubovici DNA jsou sousední nukleotidové páry od sebe vzdáleny 0,34 nm. Podle obr. 8-3 odhadněte délku lidského chromosomu 1 v rozvinutém stavu. Jestliže je reálná délka chromosomu 1 v mitoze přibližně 10 μm , jaký je stupeň kondenzace DNA v tomto buněčném stadiu?

Stav chromosomů se mění během buněčného cyklu

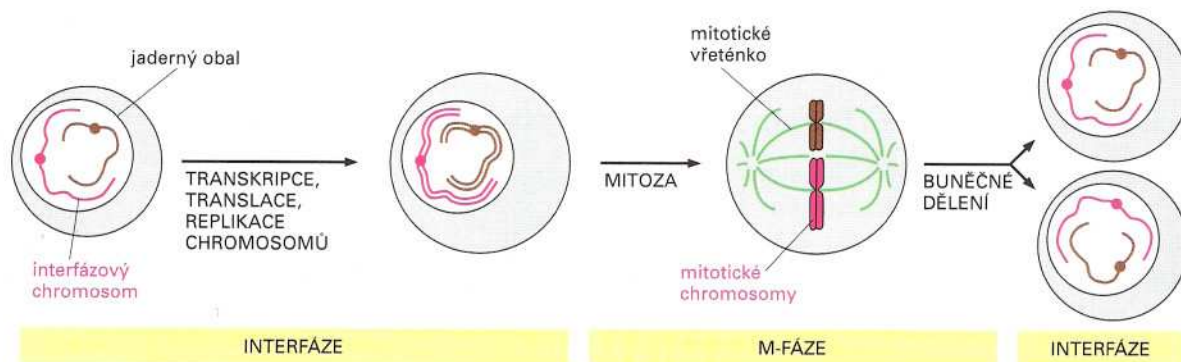
Chromosomy jsou téměř vždy kresleny tak, jak je ukázáno na obr. 8-2 a 8-3; v tomto kondenzovaném stavu se však vyskytují jen v malé části buněčného cyklu, a to v době buněčného dělení. Obvykle jsou chromosomy značně rozvolněné a vypadají jako dlouhá, tenká, vzájemně propletená vlákna, která je velmi nesnadné rozlišit ve světelném mikroskopu.



Obrázek 8-3 Proužkování lidských chromosomů. Chromosomy od 1 do 22 jsou očíslovány podle přibližné velikosti. Typická lidská somatická buňka (to znamená jiná než zárodečná) obsahuje každý chromosom dvakrát a navíc dva pohlavní chromosomy – ženy mají dva chromosomy X; muži jeden chromosom X a jeden Y. Chromosomy používané pro toto mapování jsou barveny v časném stadiu mitózy, kdy jsou vysoce kondenzovány. *Vodorovná čára* ukazuje pozici centromery, která se jeví jako zaškrbení mitotických chromosomů; *výčnělky* na chromosomech 13, 14, 15, 21 a 22 obsahují geny pro velké ribosomální RNA. Toto proužkování bylo získáno barvením chromosomů podle Giemsy, čímž se zbarví tmavě oblasti s vysokým obsahem párů A-T.

Obrázek 8-4 Zjednodušené schéma eukaryontního buněčného cyklu. Během interfáze buňka transkribuje své geny a syntetizuje proteiny. V průběhu interfáze dochází také k replikaci DNA a k duplikaci chromosomů. Po ukočení replikace DNA může buňka vstoupit do *M-fáze*, kdy se odehrává mitóza. V mitóze dochází k rozdělení jádra; během něho jsou chromosomy kondenzovány, rozpadá se jaderná membrána a z mikrotubulů a dalších proteinů vzniká mitotické vřeténko. Kondenzované chromosomy jsou připojeny na mitotické vřeténko a kompletní sady chromosomů jsou taženy k opačným pólům buňky. Pak se kolem každé sady chromosomů znovu vytváří jaderná membrána a v závěrečné fázi mitózy se buňka rozdělí na dvě dceřiné.

Stupeň kondenzace se tedy liší podle stadia buněčného cyklu, o kterém se více dozvíme v Kapitole 18 a který je krátce zachycen na obr. 8-4. Nyní nás zajímají jen dvě stadia buněčného cyklu: *mitóza*, ve které jsou zreplikované kondenzované chromosomy rozděleny do dvou dceřiných buněk, a *interfáze*, kdy mají chromosomy mnohem rozvolněnější strukturu. Vysoce kondenzované chromosomy v dělicích se buňkách bývají nazývány **mitotické chromosomy**, my se budeme více zabývat chromosomy v jejich obvyklejším stavu – *interfázovými chromosomy*.

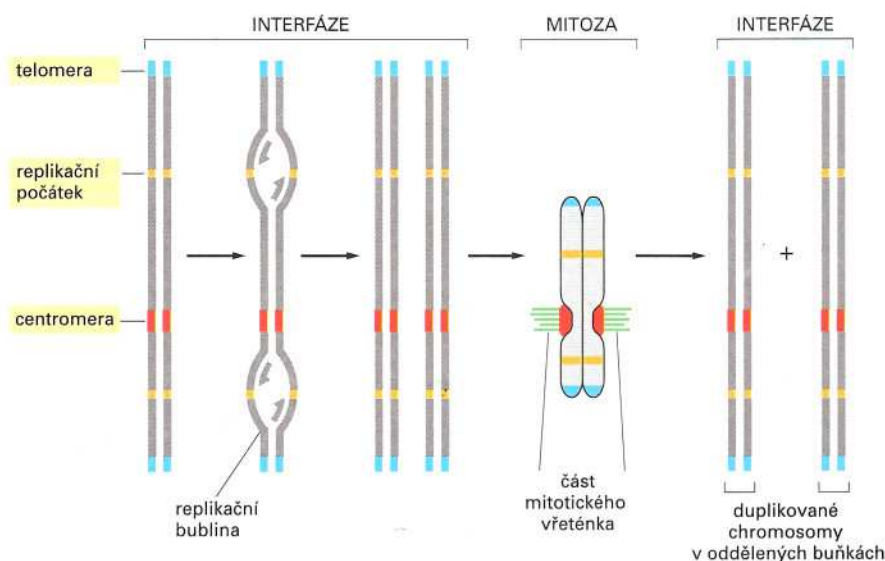


Kondenzovaný stav mitotických chromosomů je velice důležitý při buněčném dělení, kdy umožňuje snadné oddělení zduplikovaných chromosomů. V Kapitole 17 si povíme více o jejich rozdělení do obou dceřiných buněk za asistence *mitotického vřeténka* (obr. 8-4), které je tvořeno z mikrotubulů a dalších proteinů. Pro navázání na dělicí vřeténko musí mít každý chromosom speciální sekvenci, která zajišťuje správný rozchod chromosomů do dceřiných buněk, tak aby v každé byla kompletní sada chromosomů. Sekvenci, která umožňuje chromosomům vázat se na mitotické vřeténko, si popíšeme v následující části, pak se zmíníme o proteinech, které umožňují sbalení DNA.

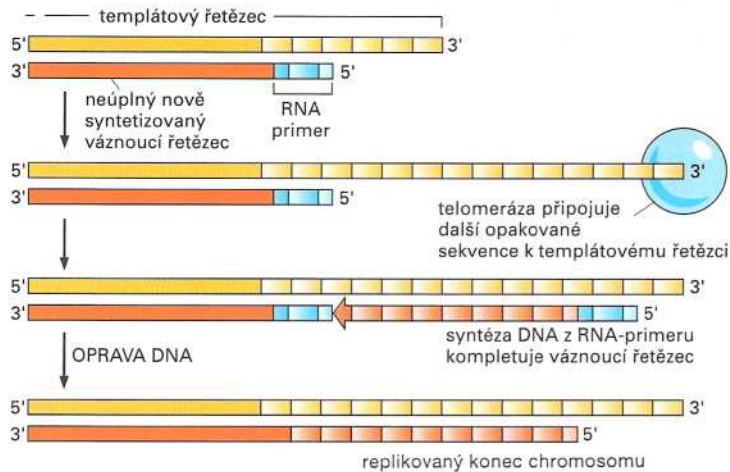
Specializované sekvence DNA zajišťují účinnou replikaci chromosomů

Chromosomy fungují jako samostatné strukturální jednotky; například každý chromosom se musí samostatně zreplikovat a jeho kopie musí být rozděleny do obou dceřiných buněk. Tyto základní funkce jsou kontrolovány třemi typy specializovaných sekvencí, které lze najít ve všech eukaryontních chromosomech (obr. 8-5). Jedním typem nukleotidových sekvencí jsou **replikační počátky**, ve kterých začíná duplikace DNA (viz Kapitola 6). Většina eukaryontních chromosomů obsahuje více replikačních počátků, které umožňují rychlou replikaci celého chromosomu. Druhým typem sekvencí jsou **centromery**, které zajišťují rozchod replikovaných chromosomů do dceřiných buněk při buněčném dělení. Během mitózy vzniká na centromere proteinový komplex nazývaný *kinetochor*, který váže duplikované chromosomy na dělicí vřeténko a umožňuje jim tak v dalším kroku oddělit se od sebe (viz Kapitola 17; *poznámka předkladatele*: nyní víme, že kinetochory jsou přítomny i v interfázových chromosomech).

Třetí specializovanou sekvencí jsou **telomery**, které se nacházejí na obou koncích chromosomů. Telomery obsahují repetitivní nukleotidové sekvence, které umožňují replikaci konců chromosomů.



Obrázek 8-5 Tři sekvenci DNA, které zajišťují replikaci a segregaci eukaryontních chromosomů v mitóze. Každý chromosom má mnoho počátků replikace, jednu centromeru a dvě telomery. Zde jsou schematicky zachyceny události, kterými prochází eukaryontní chromosom během buněčného cyklu. V interfázi dochází k replikaci DNA. V mitóze se přichycují zduplikované chromosomy díky centromere na mitotické vřeténko, které zajišťuje správný rozchod jednotlivých chromosomů do dceřiných buněk. Centromera také pomáhá držet u sebe duplikované chromosomy do doby, než jsou připraveny se rozejít.



Obrázek 8-6 Dokončení syntézy DNA na koncích (telomerách) chromosomů. Na jednom řetězci DNA ve dvojitřroubovici je syntéza nového vlákna diskontinuální (viz Kapitola 6). Řetězec, který je syntetizován diskontinuálně, se nazývá opožďující se nebo váznoucí. (Pro zjednodušení schématu není nakreslen druhý replikující se řetězec DNA.) Při syntéze opožďujícího se řetězce vyžaduje replikační aparát pro nasazení na DNA přítomnost určité délky templátové DNA za sekvencí, která má být kopírována. U lineární molekuly se syntéza opožďujícího se vlákna zastaví před koncem templátu. Avšak enzym telomeráza přidává na konec templátového vlákna sérii opakování určité sekvence a tím umožní DNA-polymeráze dosyntetizovat opožďující se řetězec, jak je ukázáno na obrázku. U člověka má přidávaná repetice sekvenci GGGTTA. Telomeráza obsahuje krátký úsek RNA, který je komplementární k repetitivní sekvenci DNA; tato RNA je templátem pro telomerázu při syntéze telomerové DNA.

Existence těchto specializovaných sekvencí je nezbytná, neboť DNA-polymeráza může syntetizovat DNA pouze ve směru 5'→3' (jak jsme viděli v Kapitole 6), což komplikuje dosyntetizování opožďujícího se řetězce. Opožďující se řetězec vzniká ve formě jednotlivých fragmentů, které vznikají prodlužováním RNA-primerů, jež jsou později nahrazeny DNA. Primery však nemohou vznikat na samotném konci chromosomů, proto by při každém kole replikace docházelo ke ztrátám koncových oblastí.

Bakterie řeší problém dosyntetizování konců DNA cirkulárním chromosomem, eukaryota ho vyřešila speciálními sekvencemi na koncích chromosomů a existencí enzymu *telomerázy*. Telomeráza přidává mnoho kopií stejné sekvence na konec chromosomů, čímž vzniká templát pro dosyntetizování opožďujícího řetězce (obr. 8-6). Telomery mají ještě jednu funkci: repetice telomerových sekvencí spolu s přilehlými oblastmi vytvářejí strukturu, která chrání chromosom před činností DNA-nukleáz, které přednostně degradují konce molekul DNA.

Potom, co jsme si popsali všechny tři typy specializovaných sekvencí chromosomu, se můžeme vrátit k otázce kondenzace dlouhých molekul DNA pomocí proteinů, která buňce umožňuje snadnou manipulaci s DNA.

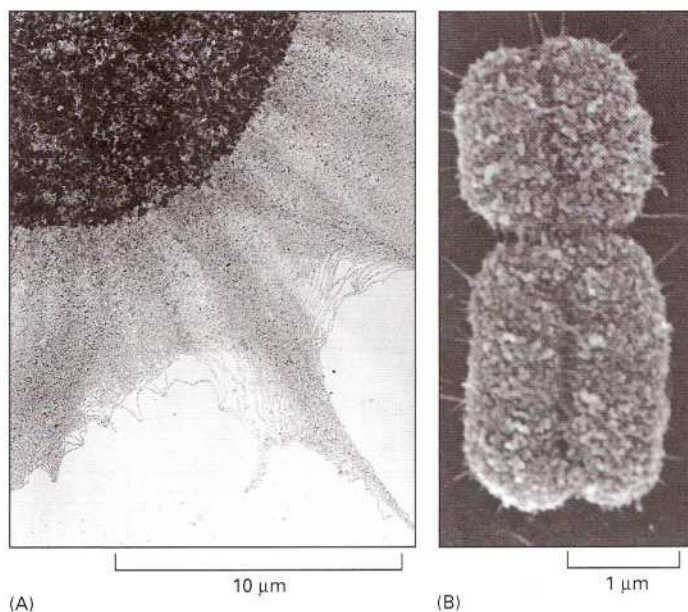
Nukleosomy jsou základní strukturní jednotky chromatinu

Jak již bylo řečeno, komplex DNA a proteinů, které tvoří chromosom, se nazývá **chromatin**. Podle fáze buněčného cyklu se mění jeho stav – v interfázi je rozvolněný, což umožňuje přístup proteinů potřebných pro expresi genů nebo replikaci (Kapitoly 6 a 7) k DNA. Před vstupem do mitózy dochází k dalšímu postupnému sbalování chromatinu, kterým vznikají vysoce kondenzované mitotické chromosomy (obr. 8-7). V mitotických chromosomech se nachází již replikovaná DNA a transkripce je během mitózy zastavena. Schopnost eukaryontních buněk měnit stupeň kondenzace chromatinu je využívána jako jeden z mechanismů pro kontrolu genové exprese, jak si ukážeme později. Předtím si však musíme vysvětlit, jak vůbec ke sbalení DNA dochází.

Otázka 8-2 Popište důsledky, které by pro eukaryontní chromosom měly následující okolnosti:

- chromosom by měl pouze jeden počátek replikace: přesně uprostřed chromosomu na jednom konci chromosomu
- chromosom by postrádal jednu nebo obě telomery
- chromosom by neměl centromeru.

Předpokládejte délku chromosomu 150 milionů nukleotidových párů (typická velikost živočišných chromosomů) a rychlost replikace v živočišných buňkách 100 nukleotidů za sekundu.

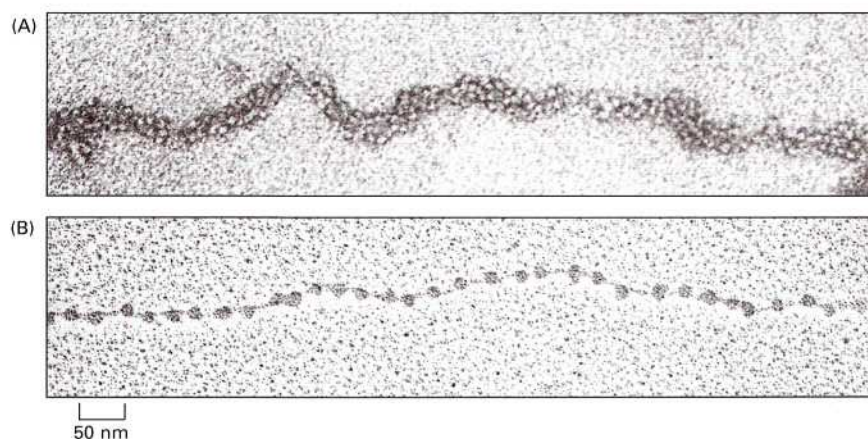


Obrázek 8-7 Porovnání rozvolněné struktury interfázního chromatinu s chromatinem mitotického chromosomu. (A) Fotografie z elektronového mikroskopu zachycující extrémně tenká vlákna chromatinu uvolněného z lyzovaného interfázního jádra. (B) Fotografie mitotického chromosomu z rastrovacího elektronového mikroskopu. Zdvojený chromosom, ve kterém jsou ještě oba nové chromosomy drženy pohromadě (viz obr. 8-5), zaškrčení chromosomu naznačuje polohu centromery. Fotografie mají různé měřítko.

Základní jednotka kondenzace chromatinu, **nukleosom**, byla objevena v roce 1974. Pokud opatrně porušíme membránu interfázního jádra a podíváme se na jeho obsah v elektronovém mikroskopu, většina chromatinu bude ve formě vláken o průměru 30 nm (obr. 8-8A). Jestliže tento chromatin ještě rozvolníme, uvidíme sérii „korálek na niti“ (obr. 8-8B). Onou nití je vlákno DNA a každý korálek představuje jádro nukleosomové částice, které je tvořeno z proteinů, kolem nichž je DNA téměř dvakrát obtočena.

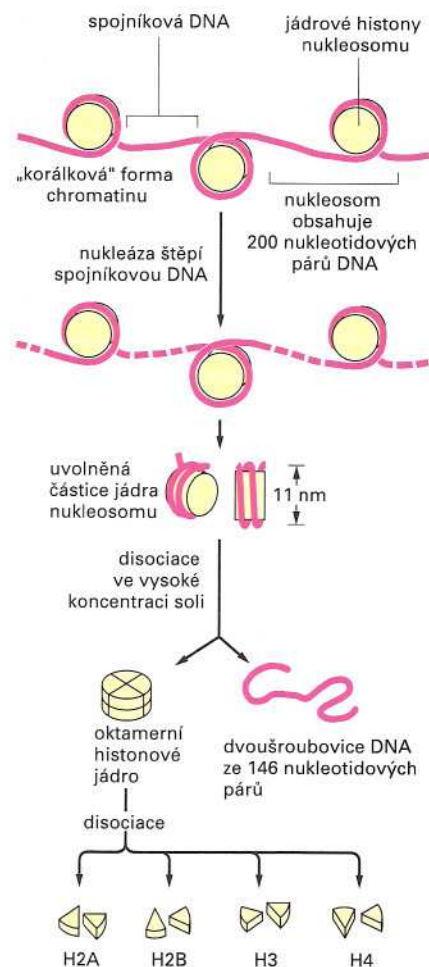
Struktura nukleosomu byla zjištěna naštěpením rozvinutého chromatinu specifickou nukleázou, která rozštěpila DNA mezi jednotlivými nukleosomy. Jádro nukleosomu je tvořeno komplexem osmi **histonů** – po dvou molekulách histonů H2A, H2B, H3 a H4 - a dvojřetězcové DNA o délce přibližně 146 nukleotidových párů. Histonový oktamer tvoří proteinové jádro nukleosomu, kolem kterého je DNA obtočena (obr. 8-9).

Termín nukleosom odpovídá nukleosomovému jádru a sousednímu spojovacímu úseku DNA. Omotání DNA kolem nukleosomů zkrátí molekulu DNA přibližně na jednu třetinu její původní délky a je prvním stupněm kondenzace DNA.



Obrázek 8-8 Nukleosomy na snímku z elektronového mikroskopu. (A) Chromatin izolovaný přímo z interfázních jader vypadá v elektronovém mikroskopu jako 30 nm silné vlákno. (B) Toto vlákno bylo experimentálně ještě nataženo („dekondenzováno“) a ukazuje nukleosomovou strukturu chromatinu.

Obrázek 8-9 Struktura nukleosomu. Nukleosom je tvořen proteinovým jádrem z osmi histonových molekul. Jak je nakresleno, jádra nukleosomů jsou uvolněna z chromatinu rozštěpením spojovací DNA-nukleázou – enzymem štěpícím DNA. (Nukleáza může degradovat volnou DNA, ale nemá přístup k DNA obtočené kolem nukleosomu.) Po oddělení proteinového jádra nukleosomu může být stanovena délka DNA, která byla kolem něj obtočena. 146 nukleotidových párů je dostatečná délka pro dvě neúplné otáčky kolem histonového jádra.



Histony jsou malé proteiny s vysokým obsahem kladně nabitých aminokyselin (lysin a arginin). Tyto pozitivní náboje umožňují pevné navázání histonů na negativně nabitou cukr-fosfátovou kostru DNA bez ohledu na nukleotidovou sekvenci. Nukleosomy jsou od sebe vzdáleny přibližně 200 nukleotidových párů (146 nukleotidových párů je omotáno kolem jádra nukleosomu a průměrně 50 nukleotidových párů spojuje sousední jádra nukleosomů). Histonů je v buňce značné množství (kolem 60 milionů molekul od každého typu v jedné buňce) a jejich celková hmotnost je přibližně stejná jako DNA samotné.

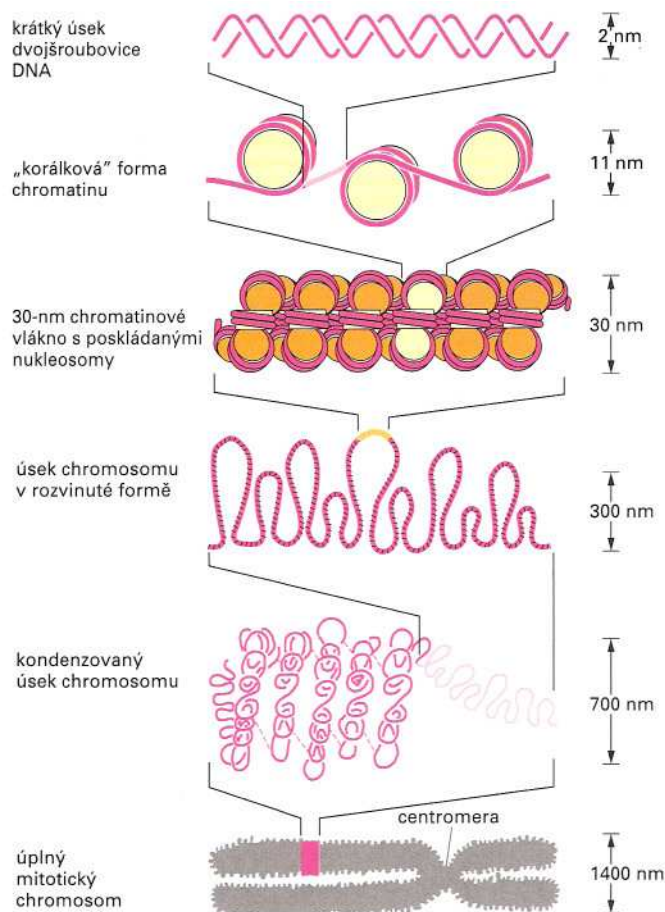
Histony jádra nukleosomu jsou evolučně nejvíce konzervované proteiny u eukaryot: například rozdíl mezi histonem H4 u skotu a hrachu je pouze ve dvou aminokyselinách. Nedávno byly histony objeveny i u archebakterií, fylogenetické říši odlišné od rostlin, živočichů i bakterií (viz Kapitoly 1 a 13). Tato extrémní evoluční konzervovanost odráží životně nezbytnou roli histonů při formování chromatinu.

DNA v chromosomech je kondenzována na několika úrovních

V živých buňkách se chromatin jen zřídka vyskytuje ve formě koráleků na niti z obr. 8-8B. Ve skutečnosti jsou nukleosomy těsně přiloženy k sobě a vytvářejí kompaktnější strukturu – 30-nm vlákno (viz obr. 8-8A). Za kondenzaci nukleosomů do 30-nm vlákna je zodpovědný pátý druh histonu nazývaný histon H1, který drží sousední nukleosomy u sebe v pravidelně se opakujícím uspořádání. Jeho struktura je zachycena spolu s vyššími stupni kondenzace na obr. 8-10.

Víme, že 30-nm vlákno může být ještě dále sbalováno do více kondenzovaných struktur. Viděli jsme vysoce kondenzovanou strukturu mitotických chromosomů, ale jak tato struktura vzniká z 30-nm vlákna? To zatím není ještě přesně známo, ale předpokládá se, že 30-nm vlákno je dále organizováno do smyček připojených k centrální ose (obr. 8-10 a 8-11). Toto vlákno tvořené smyčkami podléhá minimálně jedné další úrovni kondenzace při vzniku mitotických chromosomů (viz obr. 8-10).

Vysoká kondenzace chromatinu v mitoze má vážné důsledky pro transkripci genů: jak se stávají chromosomy více kompaktnější, transkripce je zablokována, neboť RNA-polymeráza a ostatní proteiny nutné pro transkripci se nemohou navázat na DNA. Nyní si povíme, čím jsou si mitotické a interfázni chromosomy, na kterých může probíhat transkripce, podobné.



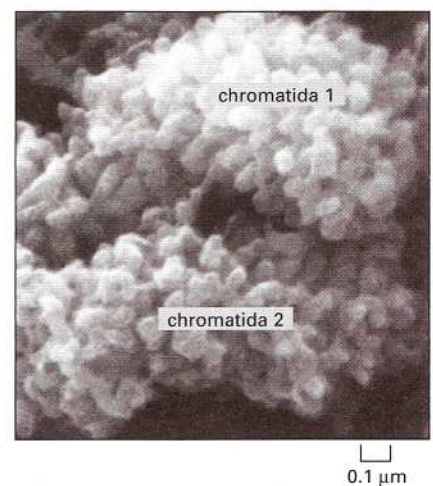
Čistý výsledek: Každá molekula DNA je zabalena do mitotického chromosomu tak, že je 50 000krát kratší než v rozvinuté formě.

Obrázek 8-10 Úrovně kondenzace chromatinu. Tento obrázek zachycuje předpokládané stupně kondenzace DNA vedoucí až ke struktuře vysoce kondenzovaných mitotických chromosomů. Sbalení samotné DNA do nukleosomů je nejlépe prostudovaný stupeň kondenzace. Zbývající úrovně jsou více či méně spekulativní.

Interfázové chromosomy obsahují kondenzované i rozvolněné formy chromatinu

Jakmile se dceřiné buňky po mitoze oddělí, znovu se vytvoří jaderná membrána, mitotické chromosomy se mění v rozvolněnější interfázové chromosomy (viz obr. 8-4). K dekonenzaci chromatinu nedochází ve všech oblastech chromosomu stejně; lze nalézt oblasti s vyšší kondenzací, jinde pak rozvolněnější úseky a je pravděpodobné, že v rámci jednoho interfázového chromosomu se vyskytují všechny stupně kondenzace, znázorněné na obr. 8-10. Obecně řečeno, oblasti chromosomu, které jsou transkribovány, mají rozvolněnější strukturu; nepřepisované oblasti jsou mnohem kondenzovanější, proto se v detailní struktuře jednotlivé chromosomy liší

Obrázek 8-11 Oblast konce typického mitotického chromosomu na fotografii z rastrovacího elektronového mikroskopu. Všechny kulovité výčnělky pravděpodobně představují konec jednotlivých smyček chromatinu. Chromosom na této fotografii již byl zduplikován, ale oba nově vzniklé chromosomy (také nazývané chromatidy) jsou spolu ještě spojeny (viz obr. 8-7B). Konce obou chromosomů jsou na této fotografii snadno rozlišitelné.

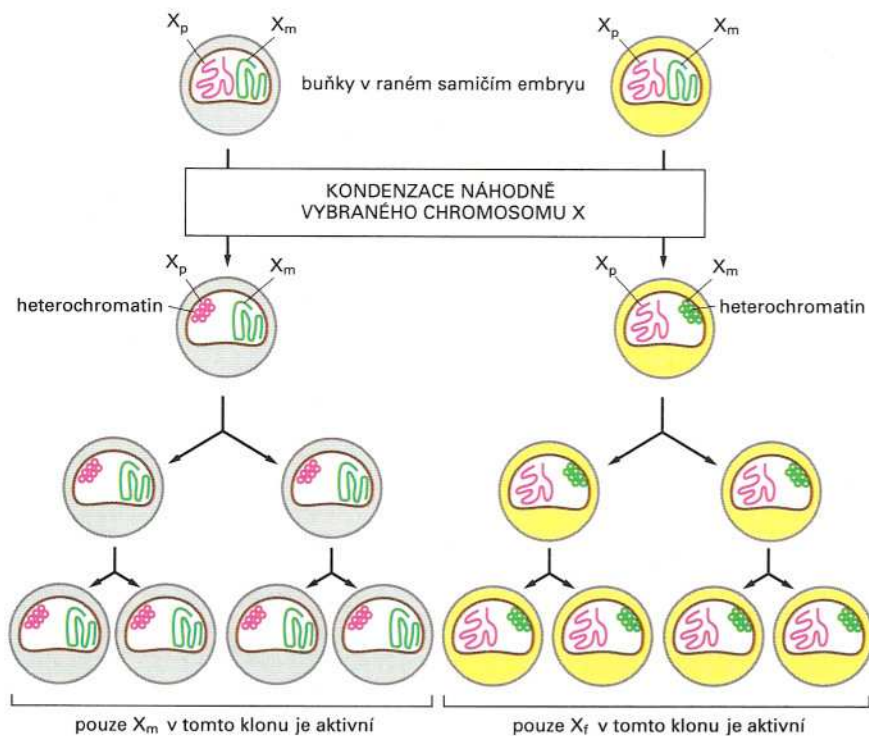


mezi jednotlivými buněčnými typy v závislosti na tom, které geny jsou v nich přepisovány.

Nejvíce kondenzovaná forma chromatinu je nazývána **heterochromatin** (z řeckého *heteros*, odlišný). Poprvé byl heterochromatin pozorován světelným mikroskopem na počátku třicátých let tohoto století jako přesně definované, silně se barvící oblasti chromatinu. Heterochromatin tvoří obvykle více než 10 % interfázního chromosomu a v savčích buňkách ho můžeme většinou nalézt v okolí centromer a na koncích chromosomů. Podobně jako mitotický chromatin je i heterochromatin transkripčně inaktivní. Jak si ukážeme v další části, normálně aktivní geny, pokud se dostanou do heterochromatinové oblasti, se stanou inaktivními pravděpodobně díky tomu, že se také stanou součástí kondenzované DNA.

Snad nejnápadnější příklad heterochromatinu v interfázových buňkách lze nalézt u chromosomů X samic savců. Samičí buňky obsahují dva chromosomy X, zatímco samčí buňky jeden chromosom X a jeden Y. Pravděpodobně proto, že by dvojnásobné množství produktů X-chromosomů bylo letální, jeden z obou X-chromosomů je ve všech samičích buňkách trvale inaktivován: na počátku embryonálního vývoje dochází náhodně ke kondenzaci jednoho nebo druhého X-chromosomu. V dalších buněčných generacích je vždy kondenzován stejný X-chromosom jako v původní buňce, ze které tato populace buněk vznikla (obr. 8-12).

Zbytek interfázního chromatinu, který je v různém stupni kondenzace, je nazýván *euchromatin* (z řeckého *eu* - pravý nebo normální). V typické diferencované eukaryontní buňce je zhruba 10 % chromatinu aktivně přepisováno nebo ve stavu snadno přístupném transkripci; tomuto chromatinu se říká aktivní a je nejméně kondenzovanou formou chromatinu v interfázových chromosomech.



Obrázek 8-12 Inaktivace X-chromosomu.

Buňky časného savčího samičího embrya obsahují dva chromosomy X, jeden od matky (X_m) a druhý od otce (X_p). V časném stadiu vývoje je v každé buňce, a to zřejmě náhodně, jeden z chromosomů X kondenzován až na úroveň heterochromatinu. Po každém následujícím buněčném dělení zůstává kondenzovaný stejný chromosom X jako v mateřské buňce. U myši dochází k inaktivaci chromosomu X mezi třetím až šestým dnem vývoje. U člověka se X-inaktivace odehrává také ve velmi časném stadiu vývoje před jakoukoliv vývojovou diferenciací buněk. Samičí organismus je tedy mozaikou buněk s neaktivním maternálním nebo paternálním X-chromosomem. Ve většině tkání a orgánů bývá přibližně polovina buněk jednoho typu a druhá polovina druhého typu.

Zatím není jasné, která z úrovní kondenzace na obr. 8-10 nejlépe vystihuje strukturu aktivního chromatinu. Určitě je tvořen nukleosomy a přinejmenším část je ve formě rozvolněného 30 nm vlákná. Zbytek interfázového chromosomu je více kondenzován a ačkoliv není tak sbalen jako heterochromatin, je relativně těžko transkribovatelný.

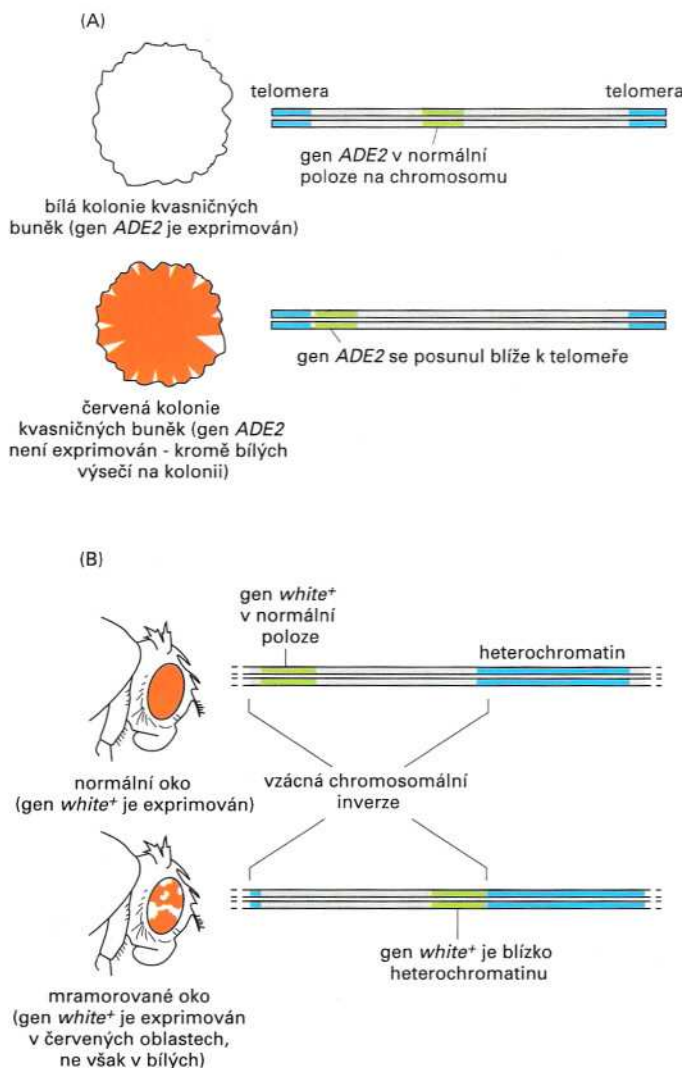
Je zajímavé, že nukleosomy nebrzdí RNA-polymerázu v činnosti, jakmile začne DNA přepisovat. Dokonce i bakteriální RNA-polymeráza, která se *in vivo* nesetká s nukleosomy, může DNA na nukleosomách přepisovat. Z toho vyplývá, že nukleosomy netvoří pro polymerázu žádnou překážku. Obdobně DNA, která je replikována, je ve formě nukleosomů (viz fotografie replikující se DNA na obr. 6-14). Nevíme přesně, co se v obou konkrétních případech děje, předpokládá se však částečné oddělení DNA od histonového jádra ve chvíli, kdy tudy prochází polymeráza, a po jejím průchodu zřejmě dojde k obnovení nukleosomové struktury.

Otázka 8-3 Mutace v určitém genu na chromosomu X vede k barvosleposti. Všichni muži nesoucí mutovaný gen jsou barvoslepi. Většina žen s mutantní formou genu barvy vidí, ale pouze s nižším rozlišením, a to zřejmě proto, že jsou čípky (buňky obsahující barevné fotoreceptory) od sebe více vzdálené, než je tomu v normální sítnici. Můžete to nějak vysvětlit? Jestliže je žena barvoslepá, co můžete říci o jejím otci a matce? Vysvětlíte svoji odpověď.

Obrázek 8-13 Polohový efekt ovlivňující genovou expresi.

(A) Pokud je kvasinkový gen *ADE2* ve své obvyklé pozici na chromosomu, je exprimován ve všech buňkách. Jestliže je přesunut do blízkosti telomery, o které se předpokládá, že je vysoce kondenzována, dojde k zastavení exprese tohoto genu ve většině buněk této populace. Gen *ADE2* kóduje jeden z enzymů biosyntetické dráhy adeninu a pokud je tento gen inaktivní, dochází v buňce k hromadění červeného pigmentu. Proto je kolonie, ve které dochází k expresi tohoto genu, bílá; zablokování syntézy proteinu *ADE2* vede ke zčervenání kolonie. Bílé oblasti kolem červené kolonie jsou známkou spontánní reaktivace genu *ADE2*, pravděpodobně jako výsledek dědičné změny ve stupni kondenzace chromatinu v blízkosti genu *ADE2* v těchto buňkách.

(B) Vliv polohového efektu můžeme také snadno pozorovat u genu *white* u drosofil. Gen *white* kontroluje tvorbu pigmentu oka a byl pojmenován podle mutace, která ho jako první identifikovala. Drosofila s normálním genem *white* (*white*⁺) produkuje pigment, který její oči zbarvuje červeně. Jestliže je tento gen mutovaný a inaktivovaný, tato drosofila (*white*⁻) nedokáže pigment syntetizovat a má bílé oči. Pokud byl normální *white*⁺ gen přesunut do oblasti blízko heterochromatinu, drosofila měla oči skvrnité – s bílými a červenými sektory. Bílé oblasti představují buňky, ve kterých byl gen *white*⁺ inaktivován rozšířením heterochromatinu, v červených úsecích byl tento gen normálně exprimován. Skvrnitost očí je důsledkem neúplné inaktivace genu heterochromatinem. Podobně jako u kvasinek, přítomnost velkých bíle a červeně zbarvených oblastí nasvědčuje dědičnosti transkripční aktivity genu.



Polohový efekt, ovlivňující genovou expresi, odhalil odlišnosti v kondenzaci interfázových chromosomů

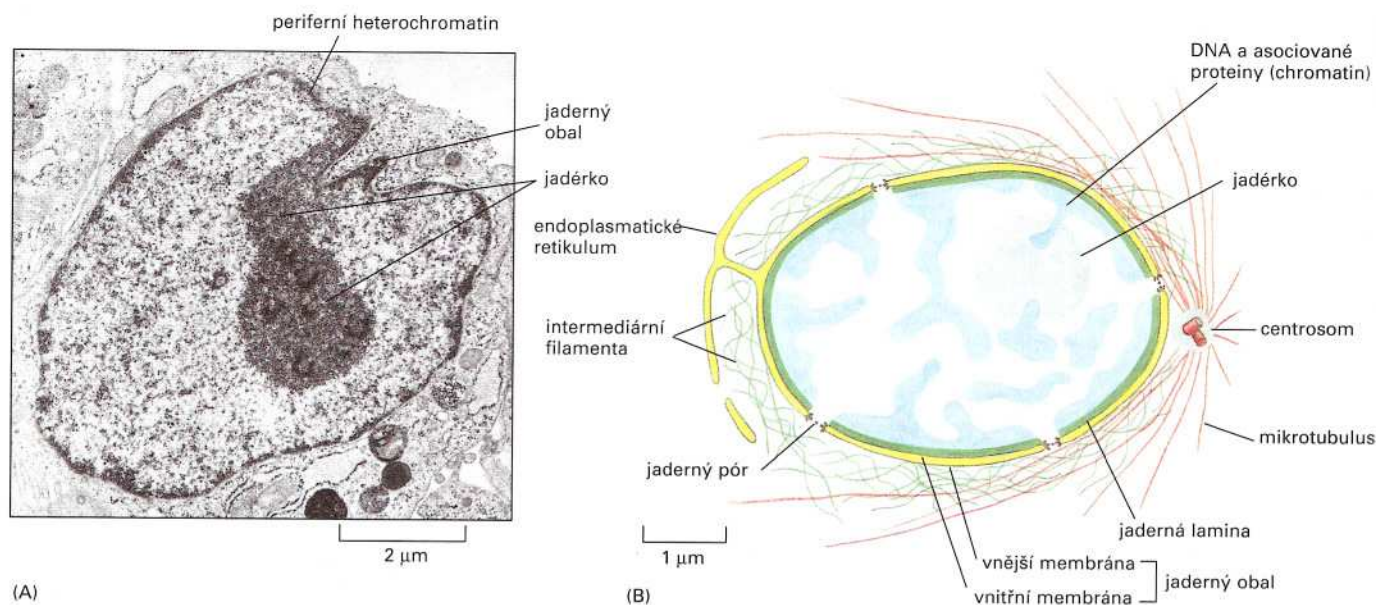
Důkazy o nestejněm kondenzaci interfázových chromosomů vzešly z experimentů, ve kterých byla pozorována odlišná exprese téhož genu v závislosti na poloze v chromosomu. Odlišnosti v expresi genu v závislosti na poloze tohoto genu v genomu se nazývají **polohový efekt**. Polohový efekt byl pozorován například u kvasinek nebo drosofilů – u organismů, které mohou být geneticky manipulovány v laboratoři (obr. 8-13). Vlastnosti chromatinu, které jsou příčinou polohového efektu, zatím nejsou dobře prostudovány. Předpokládá se však, že oblasti s více kondenzovaným chromatinem, jako například heterochromatin, se mohou rozšiřovat podél chromosomů a zabránit tak navázání RNA-polymerázy a dalších proteinů potřebných pro transkripci určitého genu.

Interfázové chromosomy jsou v jádře organizovány

Navzdory skutečnosti, že jsou interfázové chromosomy mnohem delší a tenčí než mitotické, předpokládá se jejich vysoká organizovanost uvnitř jádra. Jádro je ohraničeno *jadernou membránou* tvořenou dvěma koncentrickými membránami. Na jadernou membránu navazují dvě sítě proteinových vláken (filament) (viz Kapitola 16): jednu je *jaderná lamina*, která vytváří tenkou podpůrnou síť z vnitřní strany jaderné membrány; druhá, mnohem méně uspořádaná síť, obklopuje jadernou membránu z vnější strany (obr. 8-14). Prostupnost jaderné membrány je zajištěna jadernými póry, jimiž jsou aktivně přenášeny vybrané molekuly z a do cytoplasmy. Například mRNA je transportována do cytoplasmy, zatímco jaderné proteiny, jako jsou histony, jsou importovány do jádra.

Uvnitř jádra není jen náhodná směs DNA, RNA a proteinů. Každý interfázový chromosom se pravděpodobně nachází v konkrétním místě jádra, takže jednotlivé chromosomy nejsou navzájem

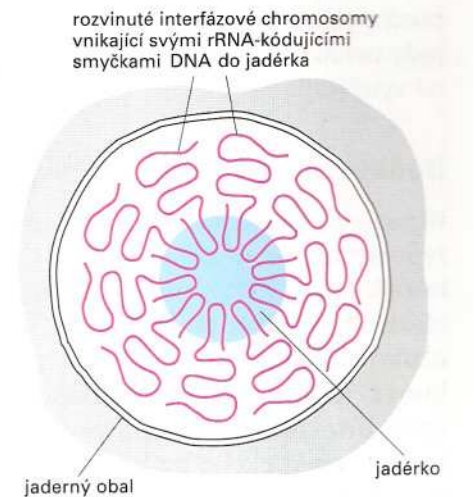
Obrázek 8-14 Interfázové jádro. (A) Tenký řez jádrem lidského fibroblastu na fotografii z elektronového mikroskopu. Jádro je obklopeno jaderným obalem ze dvou membrán přerušovaných jadernými póry. Uvnitř jádra se nachází chromatin (roztrošené tmavší skvrny) s heterochromatinem (*tmavě zbarvený*) lokalizovaným převážně na periferii jádra, bezprostředně pod jadernou membránou. Tmavě zbarvená oblast uvnitř jádra je *jadérko*. (B) Schematický příčný řez typickým buněčným jádrem. Jaderný obal je tvořen dvěma membránami, vnější je pokračováním endoplasmatického retikula. Dvě sítě cytoskeletálních filament (*zeleně*) mechanicky podpírají jaderný obal; z vnitřní strany je to vrstva *jaderné laminy*, která se nachází na celé vnitřní ploše jaderného obalu. *Jadérko* (*šedě*) je místem syntézy ribosomální RNA.



Obrázek 8-15 **Jadérko.** Schematický pohled na jadérko (nukleolus) ukazuje smyčky chromatinu obsahujícího rRNA geny, které se nacházejí na 10 různých interfázních chromosomech (viz výčnělky na chromosomech na obr. 8-3).

propleteny. Předpokládá se, že na této organizaci se alespoň menší měrou podílí vazba určitých částí chromosomů na jadernou membránu nebo laminu.

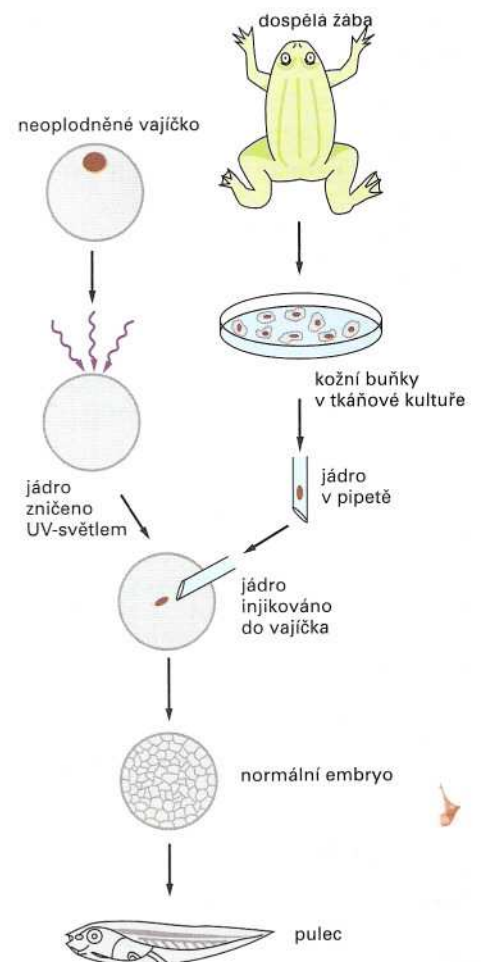
Nejnápadnějším příkladem organizace chromosomů v interfázovém jádře je **jadérko (nukleolus)**, nejzřetelnější struktura interfázového jádra pozorovatelná ve světelném mikroskopu. V této oblasti jádra dochází ke spojení částí různých chromosomů, ve kterých se nacházejí geny pro ribosomální RNA (obr. 8-15). V jadérku jsou transkribovány geny pro ribosomální RNA a jsou zde také z proteinů importovaných z cytoplasmy sestavovány ribosomální podjednotky. Ty jsou pak transportovány zpět do cytoplasmy jadernými póry.



Regulace genů

Již jsme si vysvětlili, jak je DNA v jádře eukaryontní buňky organizována a nyní se tedy můžeme vrátit k otázce, jak buňka rozhoduje o tom, které z mnoha tisíců genů bude exprimovat. Regulace exprese je důležitý problém hlavně u mnohobuněčných organismů, protože z původně jedné buňky se diferencuje mnoho různých buněčných typů, jako jsou svalové, nervové, krevní a mnohé další typy buněk vyskytující se v dospělém organismu (viz panel 1-3, str. 32-33). Příčinou této **diferenciace** je akumulace odlišných druhů RNA a proteinů, protože buňky exprimují odlišné sady genů.

Jak jsme zdůraznili na začátku této kapitoly, buňky obvykle mění expresi genů, aniž by nějakým způsobem změnilly jejich nukleotidovou sekvenci. Jak můžeme toto tvrdit? Kdyby byla DNA nevratně pozměňována během vývoje, chromosomy diferencovaných buněk by nebyly schopné dát vznik celému organismu. Pro testování této hypotézy bylo injikováno jádro buňky pokožky dospělé žáby do žabího oocyty, jehož jádro bylo předtím odstraněno (obr. 8-16). Příkladně v několika případech došlo k normálnímu vývoji vajíčka, z čehož vyplývá, že transplantované jádro z pokožkové buňky nemohlo ztratit žádnou nezbytnou sekvenci DNA. (*Poznámka překladatele:* Nyní existují obdobné důkazy i u savců s použitím jader buněk embryí nebo i dospělého organismu; tento postup je označován jako klonování.) Podobné závěry mohou být vyvozeny z experimentů s rostlinami: například z jediné buňky mrkve může být zregenerována celá dospělá rostlina. Tyto experimenty dokazují, že DNA i ve specializovaných buněčných typech obsahuje celou sadu infor-



Obrázek 8-16 Jádro diferencované buňky z pokožky dospělé žáby stále obsahuje veškeré informace nutné pro vznik celého pulce. Podobný experiment byl nedávno proveden u ovce.

mací potřebných pro vznik nového organismu. Buňky organismu se tedy neliší tím, že obsahují různé geny, ale tím, že stejné geny odlišně využívají.

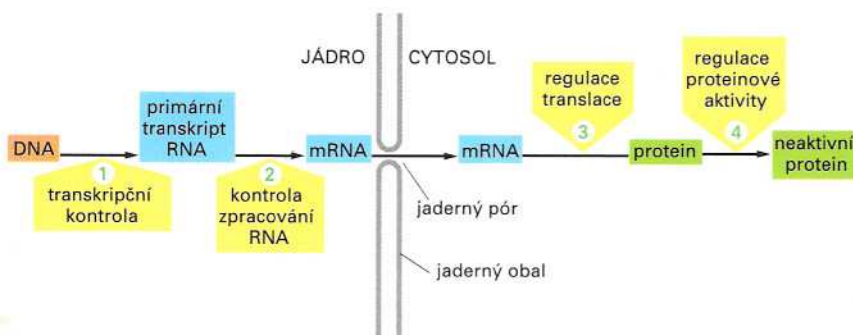
Buňky regulují expresi svých genů

Rozsah, v jakém se může lišit exprese konkrétního genu v různých typech buněk, je nejlépe patrný z porovnání proteinového složení buněk jater, srdce, mozku a jiných pomocí dvourozměrné gelové elektroforézy (viz panel 5-5, str. 162-163). Experimenty podobného druhu dokazují, že mnoho proteinů je společných všem druhům buněk mnohobuněčného organismu. Jsou jimi například hlavní strukturální proteiny cytoskeletu a chromosomů, základní proteiny endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu, ribosomální proteiny a enzymy glykolýzy a jiných základních metabolických drah; tyto univerzální proteiny jsou často nazývány *provozní proteiny* (anglicky: *housekeeping proteins*) a geny, které je kódují, jsou pak označovány jako *provozní geny* (anglicky: *housekeeping genes*). Každá diferencovaná buňka produkuje ještě další specializované proteiny, které jsou zodpovědné za její specifické vlastnosti. U savců je například hemoglobin syntetizován v retikulocytech – buňkách, ze kterých se vyvinou červené krvinky, ale nevzniká v jiných typech buněk.

Většina proteinů v buňce je produkována v tak malém množství, že nemohou být detegovány pomocí gelové elektroforézy. Jejich mRNA však může být zjištěna pomocí mnohem citlivějších metod (viz Kapitola 10), i když je přítomna v minimálním množství. Podle odhadů je v diferencované savčí buňce syntetizováno přibližně 10 000 různých mRNA a tedy i proteinů z přibližně 60 000 genů. Exprese různých sad genů v každém buněčném typu má za následek velké odlišnosti ve velikosti, tvaru, vlastnostech a funkcích diferencovaných buněk.

Jak je však kontrola genové exprese realizována? V Kapitole 7 jsme si ukázali, že k přenosu informace z DNA do proteinu je třeba mnoha kroků a každý z nich může být principiálně regulován. Buňka tedy může kontrolovat syntézu proteinů na úrovni: (1) transkripce – kdy a jak často je gen přepisován, (2) sestřihu a dalších úprav primárního transkriptu, (3) translace – výběrem mRNA, která bude překládána nebo (4) aktivace nebo inaktivace vzniklých proteinů (obr. 8-17).

Ačkoliv jsou známy konkrétní příklady regulace v každém kroku uvedeném na obr. 8-17, u většiny genů převažuje regulace na úrovni transkripce (krok 1). To má svůj smysl, neboť buňka nesyntetizuje



Obrázek 8-17 Čtyři kroky, ve kterých může být k regulována exprese eukaryontních genů. Jsou známy konkrétní příklady regulace ve všech krocích, avšak nejčastějším místem regulace genů je krok 1 – přepis sekvence DNA do RNA.

nepotřebné intermediáty genové exprese. Ve zbytku této kapitoly se tedy zaměříme na DNA a proteiny, které určují, které geny budou přepisovány do RNA.

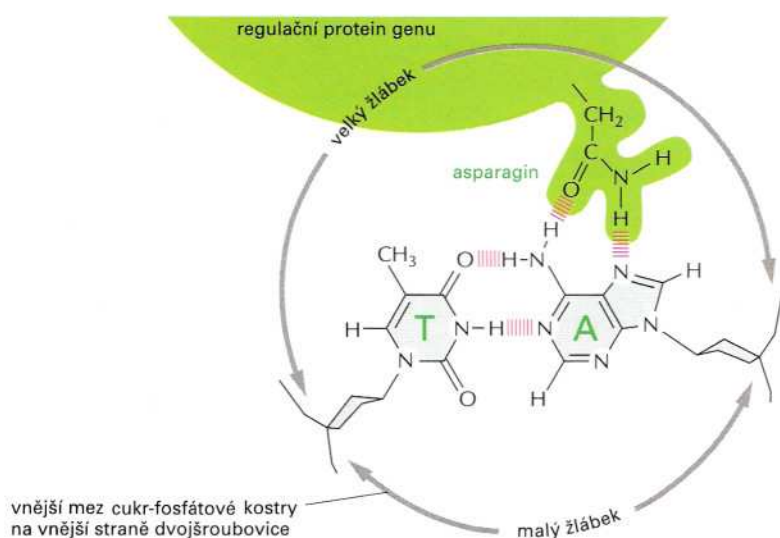
Transkripce je regulována proteiny, které se vážou na regulační sekvence DNA

Při transkripci je nejčastějším regulovaným krokem její iniciace. V Kapitole 7 jsme si ukázali, že na oblast promotoru nasedá RNA-polymeráza a že tato oblast navíc určuje směr transkripce. Promotor bakteriálních i eukaryontních genů zahrnuje *iniciační místo*, ve kterém transkripce začíná, a sekvenci přibližně 50 nukleotidů před tímto místem (proti směru transkripce). Tato sekvence je nutná pro navázání RNA-polymerázy na promotor. Kromě promotoru mají téměř všechny geny – bakteriální i eukaryontní – **regulační sekvence**, které řídí zapínání a vypínání genu. Zda bude gen exprimován nebo ne závisí na různých faktorech jako jsou například typ buňky, její okolí, stáří či extracelulární signály.

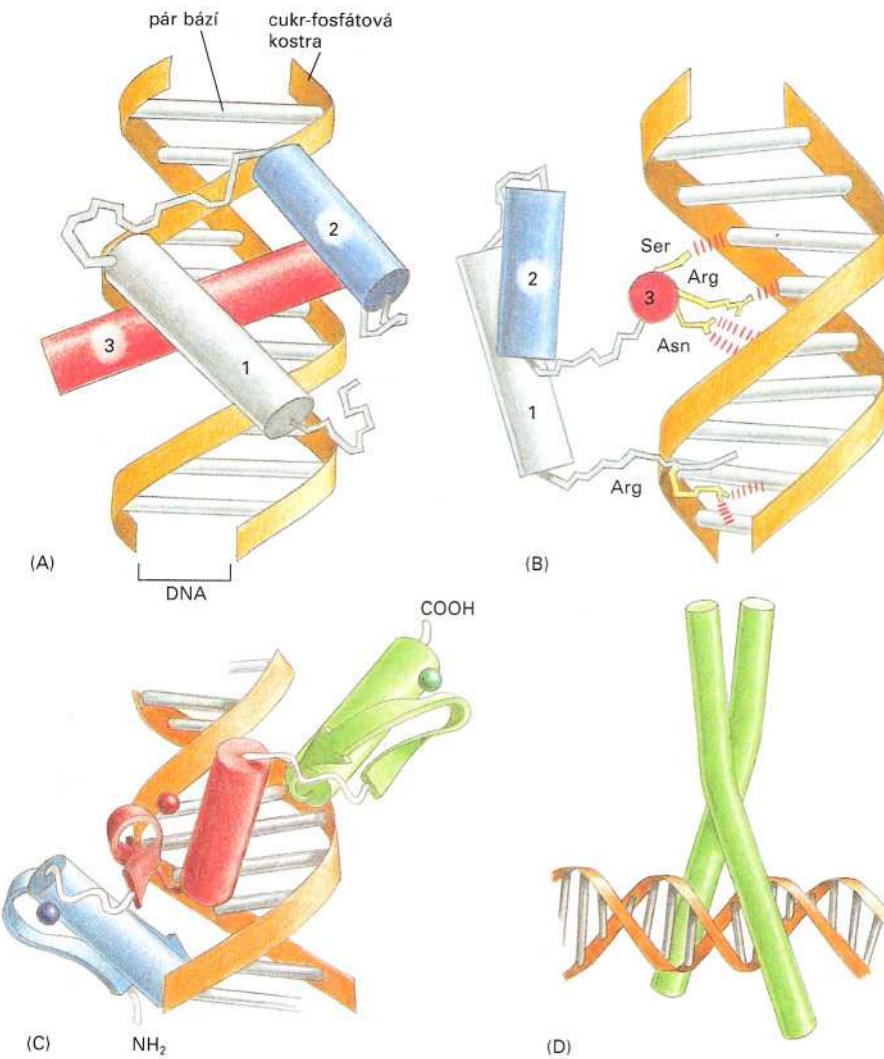
Některé regulační sekvence jsou dlouhé jen 10 nukleotidů a pouze zapínají expresi genu na podnět jednoho signálu. Tyto krátké regulační sekvence převažují u prokaryot. Jiné jsou naopak velmi dlouhé, i více než 10 000 nukleotidových párů; ty můžeme nalézt především u eukaryot. Dlouhé regulační sekvence mohou odpovídat na řadu různých signálů, ze kterých je tvořena odpověď, jak často má docházet k iniciaci transkripce.

Regulační sekvence však nemohou pracovat samostatně. Aby měly nějaký efekt, musí být rozpoznány **regulačními proteiny**, které se vážou na DNA. Pouze kombinace regulačních sekvencí v DNA a proteinů, které je rozpoznávají, zaručuje kontrolu iniciace transkripce. Byly identifikovány stovky regulačních sekvencí, každá rozpoznávaná jedním nebo větším množstvím regulačních proteinů.

Proteiny mohou rozpoznávat určité sekvence DNA díky svým povrchům, které se pevně vážou na určité specifické rysy konkrétního úseku dvojšroubovice DNA. Tvar dvojšroubovice závisí na nukleotidové sekvenci v dané oblasti, a proto mohou různé regulační



Obrázek 8-18 Vazba regulačního proteinu na DNA. Pro zjednodušení je ukázán kontakt mezi proteinem a pouze jediným párem bází v DNA. Obvykle je interakce proteinu s DNA založena na 10-20 podobných kontaktech, každý s jinou aminokyselinou. Každé spojení významně přispívá k zesílení vazby proteinu na DNA.



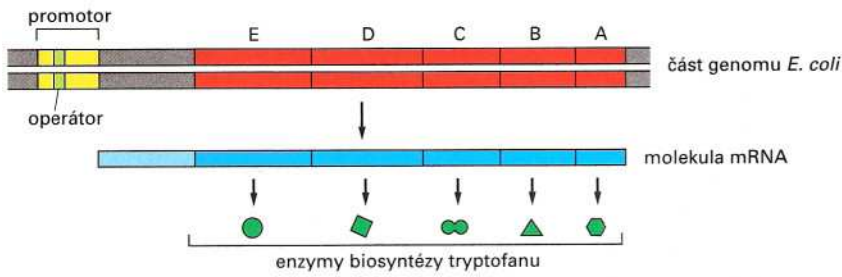
Obrázek 8-19 DNA-vazebné motivy proteinů. (A) Pohled zředu a (B) boční pohled na *homeodoménu* - strukturní motiv mnoha DNA-vazebných proteinů. Homeodoména je tvořena třemi spojenými α -šroubovicemi, které jsou zachyceny jako různobarevné válečky. Za většinu kontaktů mezi proteinem a DNA zodpovídá šroubovice označená číslem 3, na obrázku B je zachycena z boku. Asparagin (Asp) v této šroubovici rozpoznává adenin, jak je zachyceno na obr. 8-18. (C) Motiv *zinkového prstu* je tvořen α -šroubovicí a β -skládaným listem (*ohnutá šipka*), které jsou spojeny atomem zinku (*kulička*). Obvykle je několik zinkových prstů kovalentně spojeno tak, aby mohly α -helixy rozpoznávat báze ve větším žlábků dvojšroubovice DNA. Tento obrázek ukazuje tři spojené zinkové prsty. (D) Motiv *leucinového zipu*. Tento DNA-vazebný motiv vzniká spojením dvou α -šroubovic nacházejících se na dvou různých molekulách proteinů. Proteiny s leucinovým zipem se proto vážou na DNA jako dimery a svírají DNA mezi sebou.

Tyto tři motivy můžeme nalézt u regulačních proteinů snad všech eukaryontních organismů, kde kontrolují expresi tisíců různých genů. Každý motiv vytváří mnohonásobné kontakty s DNA. Pro zjednodušení byly zachyceny jen vodíkové můstky na obrázku (B), na obrázcích (C) a (D) není nakreslen žádný konkrétní kontakt. Názvy „homeodoména“, „zinkový prst“ a „leucinový zip“ pocházejí z historické terminologie a podle dnešních znalostí jsou nepřesné.

proteiny rozpoznávat odlišné nukleotidové sekvence. Většina proteinů se váže do velkého žlábků dvojšroubovice DNA (viz obr. 6-6), kde vytváří řadu kontaktů s páry bází. Proteiny se mohou spojovat s bázemi pomocí vodíkových můstků, iontových vazeb a hydrofobních interakcí, obvykle bez přerušení vodíkových můstků spojujících obě báze (obr. 8-18). Ačkoliv jsou jednotlivé kontakty slabé, obvykle vzniká mezi oběma molekulami přibližně 20 kontaktů, které jsou dohromady dostatečně specifické a pevné; interakce protein-DNA patří mezi vůbec nejpevnější a nejspecifičtější molekulární interakce známé v biologii.

Ačkoliv je každá interakce protein-DNA v detailech unikátní, mnoho proteinů podílejících se na regulaci genů obsahuje jeden z několika značně stabilních konformačních motivů. Tyto motivy se vážou do velkého žlábků dvojšroubovice DNA a tvoří pevné interakce s krátkým úsekem DNA. Struktura některých z těchto *DNA-vazebných motivů* je zachycena na obr. 8-19. Ve všech případech se α -helix proteinu váže do velkého žlábků DNA. Velice často se DNA-vazebné proteiny připojují na DNA v párech (dimerech). Dimerizace přibližně zdvojnásobí plochu kontaktu s DNA, čímž dojde ke zvýšení jak pevnosti vazby, tak její specifity. Protože se

Otázka 8-4 Vysvětlete, jak se mohou DNA-vazebné proteiny vázat na dvouřetězcovou molekulu DNA, aniž by přerušovaly vodíkové můstky, které spojují báze. Ukažte, jak může protein rozlišit pár A-T od páru G-C. Nakreslete možné kontakty způsobem zachyceným na obr. 8-18 a určete, které druhy nekovalentních vazeb (vodíkové můstky, iontové vazby nebo hydrofobní interakce, viz panel 2-1, str. 46-47) mohou vznikat. Není třeba specifikovat konkrétní aminokyseliny, struktura všech párů bází je na obr. 6-5.



mohou párovat i různé druhy proteinů, může být rozpoznáváno značné množství sekvencí relativně malým počtem regulačních proteinů.

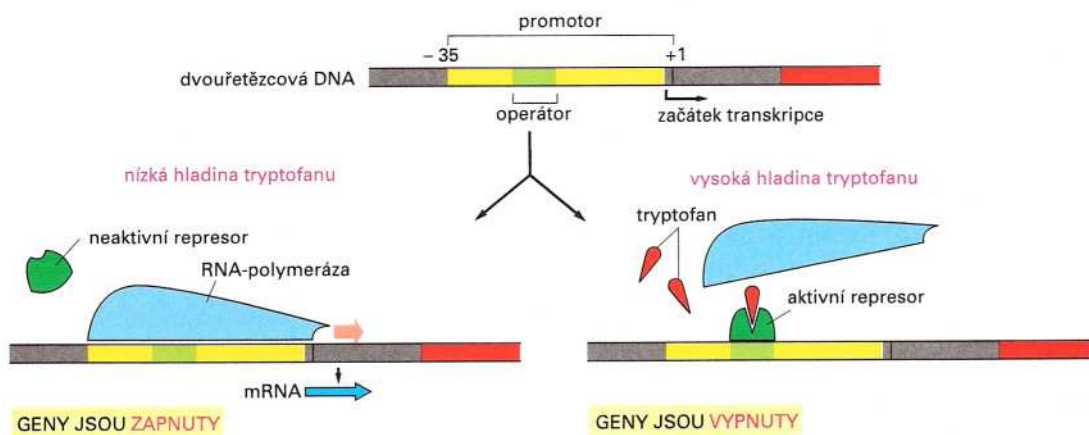
Represory vypínají geny a aktivátory je zapínají

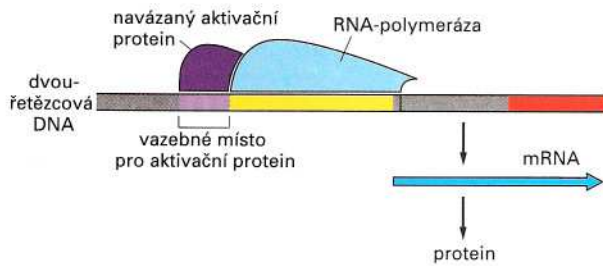
Nejjednodušším a nejlépe prostudovaným příkladem regulace genů je kontrola genové exprese u bakterií a jejich virů. Genom bakterie *E. coli* tvoří jedna cirkulární molekula DNA o délce přibližně $4,6 \times 10^6$ nukleotidových párů, která kóduje kolem 4 000 druhů proteinů, ale v každém okamžiku je syntetizována pouze malá část z nich. *E. coli* reguluje expresi mnoha svých genů podle nutričního zdroje v okolním prostředí. Například všech pět genů *E. coli* z metabolické dráhy pro syntézu tryptofanu je organizováno v jedné skupině na chromosomu. Tyto geny jsou transkribovány z jediného promotoru jako dlouhá molekula mRNA, ze které jsou překládány všechny proteiny této dráhy (obr. 8-20). Geny uspořádané stejným způsobem a přepisované do jedné mRNA se nazývají *operony*. Operony se velice často vyskytují u prokaryot, nikdy je však nenajdeme u eukaryot, u kterých jsou geny regulovány individuálně. Pokud je tryptofan přítomen v okolí bakterie a je transportován do buňky, nejsou enzymy pro jeho syntézu potřebné a celý operon je vypnut. K této situaci dochází například u bakterií, žijících ve střevě savců krátce po přijetí potravy obsahující proteiny.

Regulace tryptofanového operonu je dnes velice detailně prozkoumána. Uvnitř promotoru je krátká sekvence (15 nukleotidů), která je rozpoznávána regulačním proteinem. Pokud je regulační protein navázán na tuto sekvenci nazývanou *operátor*, zabraňuje

Obrázek 8-20 Skupina bakteriálních genů přepisovaná z jednoho promotoru. Každý z těchto pěti genů kóduje jiný enzym biosyntetické dráhy aminokyseliny tryptofanu. Jsou přepisovány do jediné molekuly RNA, což umožňuje koordinovanou expresi všech genů. Skupiny genů transkribované do jedné molekuly RNA jsou běžné u prokaryot a jsou nazývány *operony*. Exprese tryptofanového operonu ukázaného zde je kontrolována regulační sekvencí zvanou *operátor*, která se nachází uvnitř promotoru.

Obrázek 8-21 Kontrola exprese genu pomocí represorového proteinu. Jestliže je koncentrace tryptofanu uvnitř buňky nízká, tryptofanový represor nenaváže molekulu tryptofanu. Bez ní nedokáže nasednout na svoji regulační sekvenci – operátor (*zeleně*) uvnitř promotoru (*žlutě*), což umožní RNA-polymeráze rozpoznat promotor a začít transkribovat všech pět genů tryptofanového operonu (*vlevo*). Pokud je hladina tryptofanu vysoká, naváže se tato aminokyselina na represor, kterému tím umožní nasednout na operátorovou sekvenci. Svoji přítomností fyzicky brání RNA-polymeráze ve vazbě na promotor (*vpravo*). Kdykoliv poklesne koncentrace volného tryptofanu v buňce, tryptofan se uvolní z represoru, ten se odpoutá od DNA a transkripce těchto genů může začít (viz také obr. 8-20).





Obrázek 8-22 Kontrola genové exprese pomocí aktivátorového proteinu. Aktivátor po nasednutí na regulační sekvenci DNA pomáhá RNA-polymeráze při iniciaci transkripce. Bez aktivátoru (žlutě) je transkripce z tohoto promotoru neúčinná. U bakterií je navázání aktivátorového proteinu na DNA kontrolováno jeho interakcí s nějakým metabolitem nebo jinou malou molekulou. Například bakteriální aktivátorový protein CAP musí před vazbou na DNA navázat molekulu cyklického AMP (cAMP); protein CAP spouští transkripci genů jako odpověď na zvýšenou intracelulární koncentraci cAMP.

RNA-polymeráze nasednout na promotor a transkribovat geny tryptofanového operonu. Tento regulační protein se nazývá tryptofanový represor a je velice důvtipně regulován: tryptofanový represor se může vázat na DNA pouze tehdy, když má na sobě navázáno několik molekul tryptofanu (obr. 8-21).

Tryptofanový represor je allosterický protein – navázání tryptofanu způsobuje změnu v trojrozměrné struktuře proteinu, který se nyní může vázat na operátor v DNA. Pokud je koncentrace tryptofanu v buňce nízká, tryptofan se z represoru uvolní, dojde ke změně konformace proteinu, jeho uvolnění z DNA a transkripci všech genů tryptofanového operonu. Represor je tedy jednoduchým regulátorem, který spouští nebo zastavuje syntézu biosyntetických enzymů podle koncentrace konečného produktu dráhy, kterou dané enzymy katalyzují.

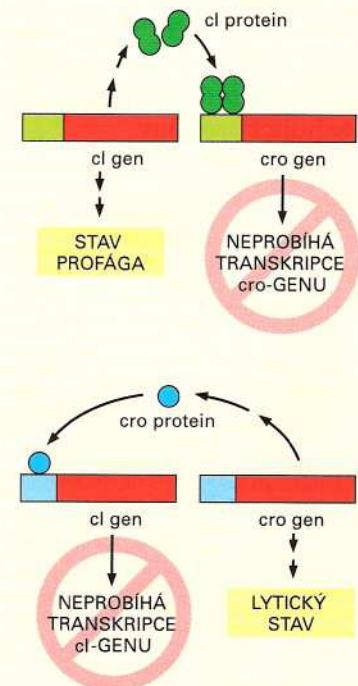
Bakterie může velice rychle odpovídat na zvýšení koncentrace tryptofanu, protože tryptofanový represor je v buňce vždy přítomný. Gen, který ho kóduje, je neustále s nízkou účinností přepisován, což zajišťuje stálou nízkou hladinu tohoto proteinu v buňce. Tato neregulovaná exprese genu je známa jako *konstitutivní* exprese.

Represor, jak jeho název napovídá, je protein, který zastavuje transkripci genů neboli ji *reprimuje*. Jiné bakteriální proteiny mají opačnou roli, navozují transkripci určitých genů, jinými slovy ji *aktivují*. Tyto **aktivátory** jsou třeba pro transkripci z promotorů, které jen slabě vážou RNA-polymerázu (na rozdíl od tryptofanového promotoru). Slabě fungující promotory se po navázání aktivátoru stávají plně funkčními, protože aktivátor se naváže v blízkosti promotoru a pomáhá RNA-polymeráze iniciovat transkripci (obr. 8-22).

Podobně jako u represoru je schopnost aktivátoru vázat se na DNA často ovlivňována jeho interakcí s druhou molekulou. Například na bakteriální aktivátorový protein CAP se nejdříve musí navázat cyklický AMP a až potom se může CAP vázat na DNA. Geny

Otázka 8-5 Virus napadající bakterie (bakteriální viry se nazývají bakteriofágy) se může replikovat dvěma způsoby. Ve stadiu profága je virus integrován do bakteriálního chromosomu a je kopírován zároveň s ním, a tak předáván z generace na generaci. V lytickém stadiu je virová DNA uvolněna z bakteriálního chromosomu a mnohokrát se replikuje uvnitř buňky. Virová DNA pak dává vznik pláštovým proteinům viru, které spolu s replikovanou DNA vytvoří mnoho nových virových partiкул, které jsou uvolněny z bakteriální buňky. Tato dvě stabilní stadia jsou kontrolována dvěma regulačními proteiny - *cI* („c jedna“) a *cro*, které jsou kódovány virem. Ve stadiu profága je exprimován protein *cI*, v lytickém naopak protein *cro*. Kromě regulace exprese jiných genů je protein *cI* represorem transkripce genu *cro* a ten zase zpětně reprimuje syntézu proteinu *cI* (obr. Q8-5). Pokud je bakterie obsahující fága v profágovém stadiu krátce ozářena UV světlem, dojde k degradaci proteinu *cI*.

- Co se nyní stane?
- Bude tato změna revertována po vypnutí UV světla?
- Proč asi se tento mechanismus vyvinul?



Obr. Q8-5

aktivované proteinem CAP jsou spouštěny jako odpověď na zvýšenou koncentraci cAMP v buňce, která signalizuje vyčerpání glukosy – preferovaného zdroje uhlíku – v okolí; výsledkem je syntéza enzymů, které umožňují využití jiných sacharidů z okolí.

Iniciace transkripce u eukaryot je komplexní proces

Regulace genů u bakterií je jedním z příkladů v biologii často pozorované hospodárnosti a jednoduchosti. U eukaryot je gen transkribován jako odpověď na mnoho různých signálů a jeho regulace musí být proto mnohem komplexnější.

Iniciace transkripce u eukaryot se od bakterií liší ve čtyřech zásadních bodech.

1. První odlišnost spočívá v RNA-polymeráze samotné. Zatímco bakterie mají jednu RNA-polymerázu, eukaryota mají tři – RNA-polymerázu I, RNA-polymerázu II a RNA-polymerázu III, přičemž každá polymeráza transkribuje odlišný typ genů. RNA-polymerázy I a III přepisují geny pro transferové RNA, ribosomální RNA a malé RNA, které mají v buňce strukturální úlohu (Tabulka 8-1). RNA-polymeráza II transkribuje naprostou většinu eukaryontních genů – všechny, které kódují proteiny. Naše následující diskuse se tedy zaměří na RNA-polymerázu II.
2. Zatímco bakteriální RNA-polymeráza je schopna zahájit transkripci bez pomoci jiných proteinů, jak jsme viděli na příkladu tryptofanového operonu (viz obr. 8-21), eukaryontní RNA-polymerázy vyžadují přítomnost dalších proteinů. Tyto obecné transkripční faktory se vážou na promotor spolu s polymerázou a pomáhají jí při iniciaci transkripce.
3. Dalším rozdílem u eukaryot je možnost ovlivňovat iniciaci transkripce pomocí regulačních proteinů (represorů a aktivátorů), které jsou navázány na DNA i několik tisíc nukleotidů daleko od promotoru. To umožňuje regulaci jednoho promotoru mnoha regulačními sekvencemi rozptýlenými v DNA. U bakterií jsou geny kontrolovány jednou regulační sekvencí, která se obvykle nachází velice blízko promotoru (viz obr. 8-21 a 8-22).
4. Posledním, ale ne nejmenším, rozdílem je, že k iniciaci transkripce u eukaryot musí dojít na DNA sbalené do nukleosomů a v mnohem kompaktnějším chromatinu.

Nyní se zastavíme u posledních tří rysů eukaryontní regulace genů.

Tabulka 8-1 Tři eukaryontní RNA-polymerázy

Typ polymerázy	Přepisované geny
RNA-polymeráza I	většina rRNA-genů
RNA-polymeráza II	všechny geny kódující proteiny, některé geny pro malé RNA (např. přítomné v komplexu sestříhu)
RNA-polymeráza III	geny pro tRNA, gen pro 5S-rRNA, geny pro některé malé strukturální RNA

Eukaryontní RNA-polymeráza vyžaduje obecné transkripční faktory

Na počátku všeho bylo poznání, že purifikovaná eukaryontní RNA-polymeráza II, na rozdíl od bakteriální, není schopná začít transkribovat geny *in vitro*. Při hledání příčin byly objeveny **obecné transkripční faktory**, které pravděpodobně pomáhají RNA-polymeráze v nasednutí na promotor, oddělení obou řetězců DNA a po iniciaci transkripce i v jejím uvolnění z promotoru, aby mohlo začít prodlužování RNA.

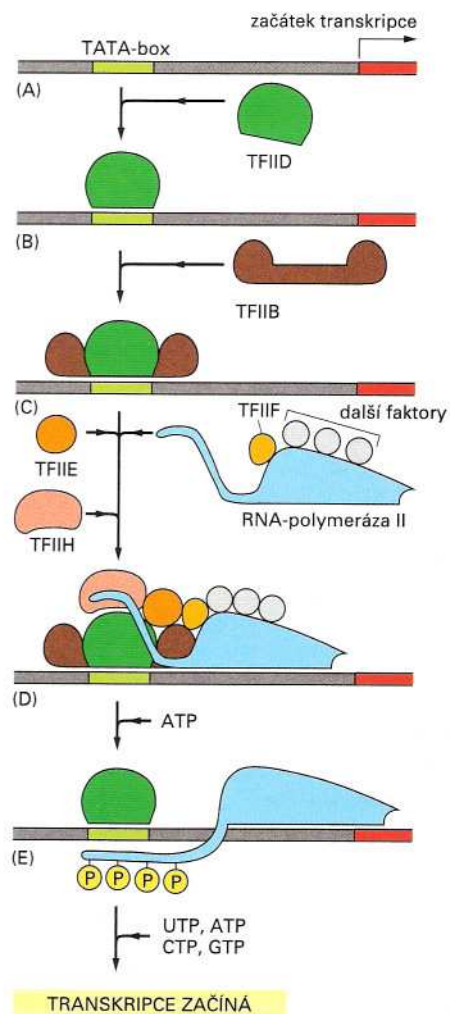
Pojem „obecné“ odráží fakt, že tyto transkripční faktory rozpoznávají všechny promotory přepisované RNA-polymerázou II. Tím se liší od represorů a aktivátorů u bakterií, které nasedají pouze na sekvence několika málo promotorů, a také od eukaryontních regulačních proteinů, o kterých budeme mluvit později a které ovlivňují expresi také jen malého počtu genů.

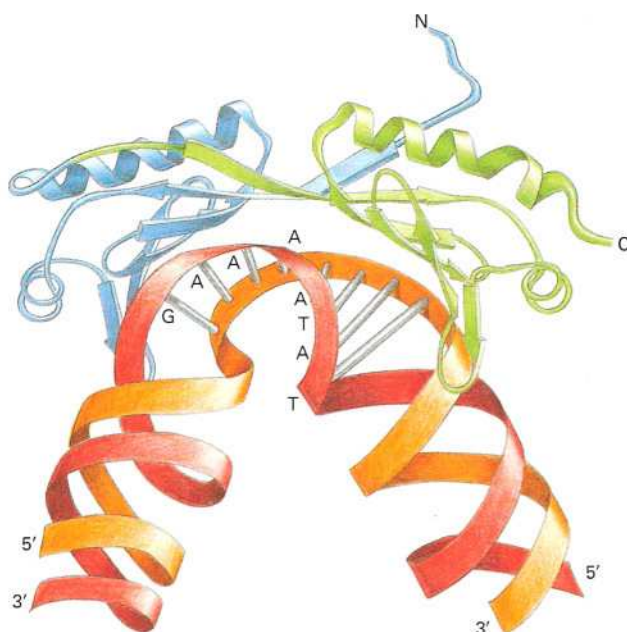
Na obr. 8-23 je zobrazen model uspořádání obecných transkripčních faktorů na promotoru pro RNA-polymerázu II. Vznik celého komplexu na promotoru začíná rozpoznáním krátké sekvence DNA tvořené převážně nukleotidy A a T (nazývané **TATA-box**) obecným transkripčním faktorem TFIID. Navázání TFIID na TATA box způsobí dramatický lokální ohyb DNA (obr. 8-24), což umožní nasednutí ostatních transkripčních faktorů na promotor. TATA-box je klíčovou součástí téměř všech promotorů pro RNA-polymerázu II a nachází se obvykle 25 nukleotidů před iniciačním místem transkripce. Jakmile se naváže první transkripční faktor na toto místo v promotoru, dojde k navázání dalších transkripčních faktorů a vzniku kompletního *transkripčního iniciačního komplexu*.

Aby se RNA-polymeráza II mohla navázat na promotor, potřebuje k tomu iniciační komplex. Ten by jí však bránil v prodlužování řetězce RNA, proto musí být RNA-polymeráza II z tohoto komplexu uvolněna. Klíčovým krokem při tomto uvolnění je připojení fosfátových skupin na RNA-polymerázu II, katalyzované transkripčním

Obrázek 8-23 Inicie transkripce eukaryontních genů RNA-polymerázou II. Aby mohla RNA-polymeráza II začít transkribovat, potřebuje k tomu celou řadu transkripčních faktorů (nazývané TFIIA, TFIIB, atd.). (A) Promotor obsahuje sekvenci nazývanou TATA-box, která se nachází přibližně 25 nukleotidových párů před místem iniciace transkripce. (B) Sekvenci TATA-boxu rozpoznává a váže se na ni transkripční faktor TFIID, který umožní nasednutí TFIIB ve své blízkosti (C). Pro zjednodušení zde není zachyceno ohnutí DNA způsobené navázáním TFIID (viz obr. 8-24). (D) Zbylé transkripční faktory a RNA-polymeráza nasedají na promotor. (E) Transkripční faktor TFIIF za použití ATP fosforyluje RNA-polymerázu II, což změní její konformaci, dojde k jejímu uvolnění z iniciačního komplexu a RNA-polymeráza II tak může začít transkribovat. Jak je ukázáno na obrázku, místem fosforylace je dlouhý polypeptid, který vyčnívá z molekuly RNA-polymerázy.

Přesné pořadí, v jakém jednotlivé transkripční faktory nasedají na promotor, není s jistotou známo. Jeden z modelů vychází též z možnosti, že všechny transkripční faktory vytvářejí komplex s RNA-polymerázou II mimo DNA, na kterou se později tento komplex naváže v jediném kroku. Obecné transkripční faktory jsou v evoluci velmi konzervované; v některých biochemických experimentech mohou být některé z lidských faktorů nahrazeny odpovídajícím faktorem pocházejícím z mnohem jednodušších kvasinek.





Obrázek 8-24 Trojrozměrná struktura TBP navázaného na TATA-box. TBP (TATA-vazebný protein) je podjednotkou obecného transkripčního faktoru TFIID, který je zodpovědný za rozpoznání a navázání se na sekvenci TATA-boxu v DNA (červeně). Unikátní ohnutí způsobené proteinem TBP – dvě smyčky dvojšroubovice oddělené částečně rozvinutou DNA – může sloužit jako označení promotorové sekvence pro další obecné transkripční faktory. TBP tvoří jeden polypeptidový řetězec sbalený do dvou velice si podobných domén (modře a zeleně).

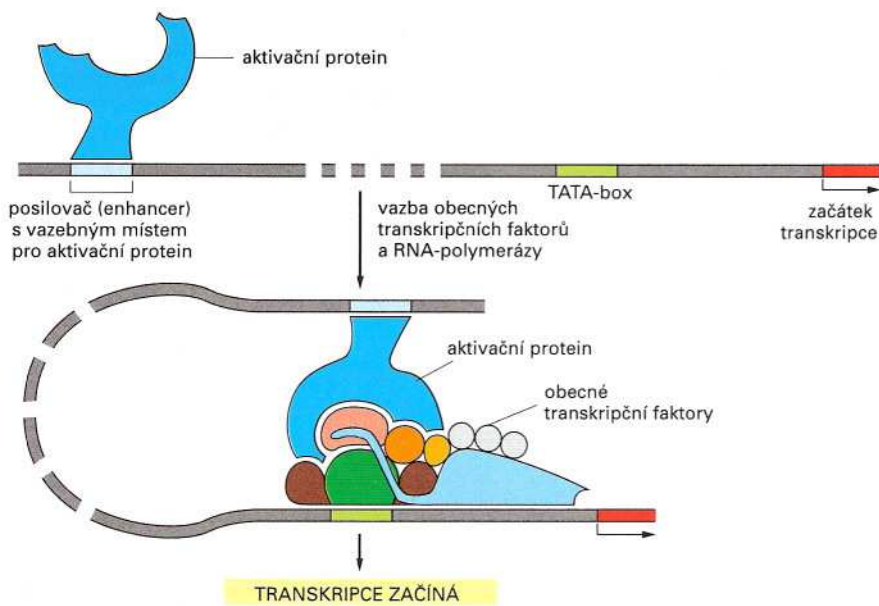
faktorem TFIID, jehož jedna podjednotka má kinasovou aktivitu (viz obr. 8-23E). Fosforylace pravděpodobně usnadňuje RNA-polymeráze uvolnit se z iniciačního komplexu a zahájit transkripci. Obecné transkripční faktory jsou pak uvolněny z promotoru a mohou být využity pro iniciaci transkripce na jiném promotoru.

Eukaryontní regulační proteiny kontrolují expresi genu ze značné vzdálenosti

Viděli jsme, že bakterie používají regulační proteiny (aktivátory a represory) pro regulaci exprese svých genů. Eukaryontní buňky používají stejnou základní strategii. Ačkoliv mohou eukaryontní obecné transkripční faktory společně s RNA-polymerázou iniciovat transkripci *in vitro* (viz obr. 8-23), uvnitř buňky je iniciace transkripce za přítomnosti pouze těchto proteinů neúčinná. Téměř všechny eukaryontní promotory vyžadují přítomnost dalších aktivačních proteinů, které pomáhají uspořádání obecných transkripčních faktorů a RNA-polymerázy do iniciačního komplexu.

Místa v DNA, na která se vážou eukaryontní aktivátory, byly původně pojmenovány jako zesilovače (*enhancer*), protože jejich přítomnost výrazně zvyšuje transkripci. V roce 1979 biologové došli k překvapujícímu zjištění, že tyto aktivační proteiny mohou být navázány tisíce nukleotidových párů daleko od promotoru. Navíc mohou eukaryontní aktivátory ovlivňovat expresi genu nezávisle na tom, zda se nacházejí před nebo až za genem. Jak mohou enhancerové sekvence a proteiny na ně navázané fungovat na tak velkou vzdálenost? Jak mohou komunikovat s promotorem?

Bylo navrženo mnoho modelů pro „fungování na dálku“, nejjednodušší z nich se zdá být aplikovatelný na většinu případů. O DNA mezi zesilovačem a promotorem se předpokládá, že se stáčí do smyčky a dovoluje tak kontakt mezi aktivátorovým proteinem na enhance-ru a RNA-polymerázou nebo jedním z obecných transkripčních



Obrázek 8-25 Model pro aktivaci genů na dálku u eukaryot. V tomto příkladu nemohou obecné transkripční faktory a RNA-polymeráza účinně vytvořit iniciační komplex; v tom jim pomáhá regulační protein navázaný na enhanceru v okolí tohoto promotoru. Ohnutí DNA umožňuje kontakt mezi regulačním proteinem navázaným na enhanceru a transkripčním komplexem na promotoru. Přerušovaná čára v části DNA vyjadřuje variabilní vzdálenost mezi enhancerem a počátkem transkripce, která může být až desítky tisíc nukleotidových párů.

faktorů navázaných na promotoru (obr. 8-25). DNA tedy funguje jako nosné vlákno umožňující interakci proteinů navázaných několik tisíc nukleotidových párů od sebe.

Eukaryontní regulační proteiny navázané na vzdálených regulačních sekvencích mohou zvyšovat nebo snižovat aktivitu RNA-polymerázy navázané na promotoru. Jedním způsobem, jak mohou regulovat transkripci, je ovlivňovat uspořádávání transkripčního iniciačního komplexu. Aktivátory usnadňují jeho vznik, zatímco represory mohou jeho vznik zpomalovat nebo blokovat.

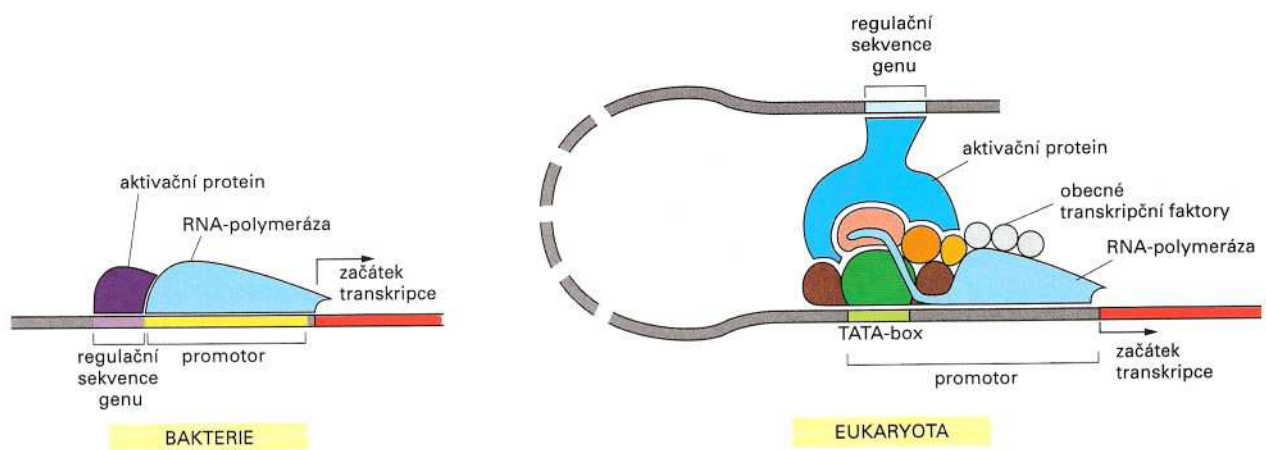
Na obr. 8-26 je znázorněna regulace genů u prokaryot a eukaryot. V obou případech mohou regulační proteiny kontrolovat expresi genu pozitivně i negativně – pomáhat nebo zabraňovat nasednutí a aktivitě RNA-polymerázy na promotoru. Eukaryontní regulační proteiny se vážou na regulační sekvence, které jsou ekvivalentní operátorům a aktivátor-vazebným sekvencím u bakterií, ale obvykle se nacházejí ve značné vzdálenosti od promotoru.

Sbalení promotorové DNA do nukleosomu může ovlivňovat iniciaci transkripce

K iniciaci transkripce v eukaryontních buňkách musí docházet i na DNA kondenzované do chromatinu. Je DNA v nukleosomové podobě přístupná pro regulační proteiny, obecné transkripční faktory a RNA-polymerázu? Jak může sbalení DNA ovlivňovat iniciaci transkripce?

V úvodu této kapitoly jsme si objasnili, že geny, které jsou transkribovány, se sice nacházejí v rozvolněné formě chromatinu, ale i tato forma chromatinu má stále nukleosomovou strukturu. Přítomnost nukleosomů obecně neovlivňuje elongační krok transkripce, protože RNA-polymeráza se může pohybovat po nukleosomech a dočasně narušovat jejich strukturu. Pokud je však promotor sbalen do nukleosomů, je iniciace transkripce zablokována, protože nukleosomy zřejmě zabraňují nasednutí transkripčních faktorů nebo RNA-polymerázy na DNA.

Otázka 8-6 Některé regulační proteiny (nepopsané v této kapitole) při vazbě na DNA způsobují ohnutí dvoušroubovice do ostrého úhlu. Tyto „ohýbací proteiny“ mohou ovlivňovat iniciaci transkripce, aniž by se vážaly na RNA-polymerázu, některý z obecných transkripčních proteinů nebo na jiný regulační protein. Můžete vysvětlit, jaký mohou mít tyto proteiny vliv na transkripci? Nakreslete schéma, které by znázorňovalo vaše vysvětlení.



Obrázek 8-26 Shrnutí odlišností mechanismů aktivace genů u bakterií a eukaryot. Navíc je eukaryontní DNA sbalena do nukleosomů (není zakresleno).

Nukleosomy jsou podél DNA rozmístěny v pravidelných intervalech s nízkou sekvencí specifitou, proto je jejich výskyt v oblasti promotoru pravděpodobný. Pro transkripční aktivaci genu musí být tyto nukleosomy odstraněny, ale jak k tomu dochází není zatím přesně známo. Je možné, že má buňka specializované proteiny, které odstraňují nukleosomy z promotorových oblastí a umožňují tak nasednutí transkripčních faktorů. Druhou možností je chemická modifikace histonů v okolí promotorů, která by destabilizovala nukleosomy před iniciací transkripce.

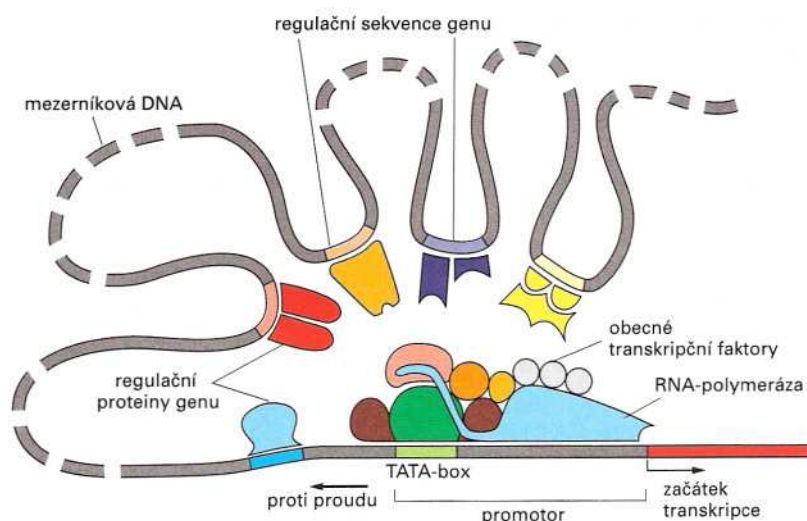
Nukleosomy vytvořené na regulačních sekvencích by mohly také interferovat s expresí genu, a to tak, že by bránily vazbě regulačních proteinů. Přesto se zdá, že k tomu vždy nedochází. Existují důkazy, že se některé regulační sekvence vyskytují v oblastech DNA bez nukleosomů; některé regulační proteiny ale jsou pravděpodobně schopné vázat se na DNA i v nukleosomech; snad při tom nukleosomy destabilizují a částečně narušují.

Vztah mezi strukturou chromatinu a iniciací transkripce je zatím na počátku plného pochopení. Zatím je známo, že buňky si vyvinuly několik strategií zajišťujících iniciaci transkripce na DNA sbalené do nukleosomů. Další faktem je, že kondenzované formy chromatinu (například v mitotických chromosomech, inaktivním X-chromosomu a oblastech heterochromatinu v interfázních jádrech) nemohou být transkribovány. Předpokládá se, že chromatin v této formě je příliš kondenzován, a proto regulační proteiny, obecné transkripční faktory a RNA-polymeráza nemají volný přístup k rozpoznávaným sekvencím. Proteiny zodpovědné za zvyšování kompaktnosti DNA jsou teprve objeveny.

V další části budeme diskutovat o regulaci typických eukaryontních genů kombinacemi aktivátorových a represorových proteinů.

Eukaryontní geny jsou regulovány kombinacemi proteinů

Protože jsou eukaryontní regulační proteiny navázané na DNA schopné kontrolovat transkripci i na poměrně velké vzdálenosti, mohou být eukaryontní regulační sekvence umístěny v dlouhých úsecích v okolí regulovaného genu. U živočichů ani rostlin není neobvyklé najít regulační sekvence genu i v tak velkém úseku jako je 50 000 nukleotidových párů; většina této sekvence má pouze roli mezerníku a není rozpoznávána žádným regulačním proteinem.



Obrázek 8-27 Regulační sekvence typického eukaryontního genu. Sekvence, na které dochází k uspořádání obecných transkripčních faktorů a RNA-polymerázy do iniciačního komplexu, se nazývá *promotor*. Nejdůležitějším rysem promotorů genů přepisovaných RNA-polymerázou II je TATA-box, který je prvním rozpoznávaným místem promotoru při uspořádávání transkripčních faktorů do iniciačního komplexu (viz obr. 8-23). Místo, ve kterém začíná RNA-polymeráza přepisovat gen, leží obvykle 25 nukleotidových párů za TATA-boxem. Regulační sekvence genu slouží jako vazebná místa pro regulační proteiny, které ovlivňují účinnost iniciace transkripce. Regulační sekvence se mohou nacházet přímo před promotorem, daleko od něj, nebo dokonce i za genem. Ohnutí DNA umožňuje interakci regulačních proteinů navázaných na těchto vzdálených sekvencích s proteiny na promotoru.

Zatímco obecné transkripční faktory jsou nezbytné pro transkripci všech genů přepisovaných RNA-polymerázou II, regulační proteiny a poloha jimi rozpoznávaných regulačních sekvencí vzhledem k promotoru se liší gen od genu. Obvykle dochází ke kombinaci vlivu několika regulačních proteinů, která určuje celkovou účinnost iniciace transkripce. Zatím však nebyl detailně prostudován vliv jednotlivých regulačních proteinů a jejich kombinací na celkovou účinnost iniciace transkripce.

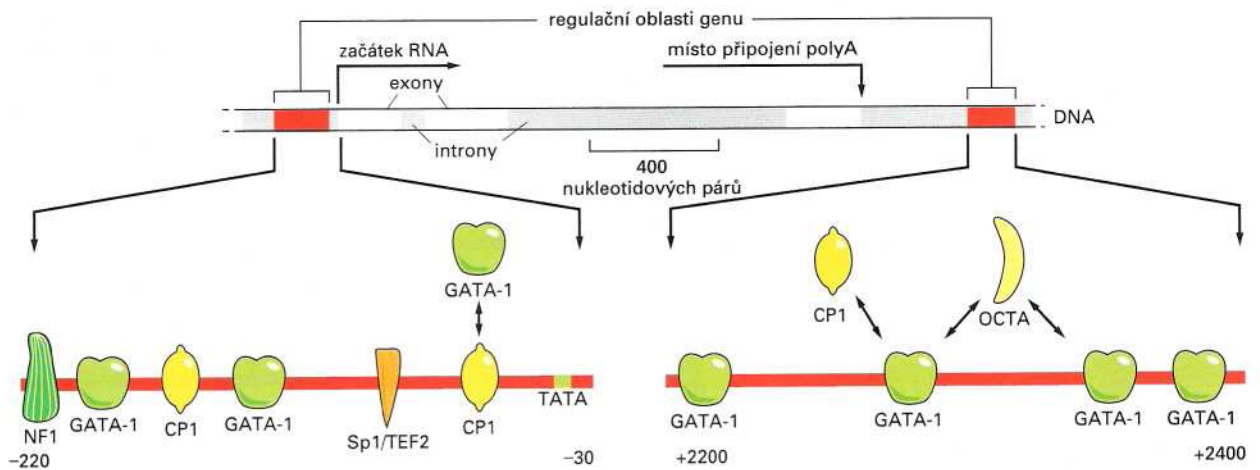
Dosud jsme o regulačních proteinech mluvili jako o funkčně samostatných jednotkách, které mohou individuálně spouštět nebo blokovat expresi genu. Tato představa se plně uplatňuje u mnoha bakteriálních represorů a aktivátorů, většina eukaryontních regulačních proteinů je však součástí komplexu regulačních proteinů, jehož všechny části jsou nezbytné pro expresi daného genu ve správné buňce ve správný čas a v požadovaném množství jako odpověď na konkrétní podmínky.

Pojem **kombinační kontrola** odráží způsob, jak spolupracují skupiny proteinů při regulaci exprese konkrétního genu. Na obr. 8-27 lze vidět mnoho různých regulačních proteinů navázaných na regulační sekvence, které ovlivňují iniciaci transkripce u eukaryot. Většina eukaryontních genů má kontrolní oblasti, které obsahují mnoho vazebných míst pro pozitivní i negativní regulační proteiny. Regulační oblast lidského genu pro β -globin je schematicky zachycena na obr. 8-28. Objasnění molekulárního mechanismu spolupráce všech regulačních proteinů při určení konečné úrovně exprese genu je však zatím jen na počátku pochopení.

Expese různých genů může být řízena jedním proteinem

Prokaryota i eukaryota musí být schopná nejen zapínat a vypínat expresi jednotlivých genů, ale také koordinovat expresi různých genů. Například pokud eukaryontní buňka dostane signál k dělení, dojde ke spuštění exprese mnoha do té doby zablokovaných genů a tím k událostem vedoucím k buněčnému dělení (viz Kapitola 15). Jedním způsobem, jak koordinovat expresi různých genů, je u bakterií jejich spojení do jednoho operonu kontrolovaného jedním promotorem (viz obr. 8-20). Tento způsob však není použitelný u eukaryot, která regulují svoje geny individuálně. Jak tedy eukaryota koordinují expresi různých genů?

Jestliže eukaryontní buňky používají několik regulačních proteinů ke kontrole každého genu, jak mohou rychle a rozhodně kontrolovat expresi celé skupiny genů? Ačkoliv je kontrola genové exprese kombinační, může jediný regulační protein mít rozhodující vliv na



Obrázek 8-28 Model kontroly exprese lidského β -globinového genu. Schéma ukazuje některé regulační proteiny, o kterých se předpokládá, že kontrolují expresi tohoto genu během vývoje červených krvinek. Některé regulační proteiny se vyskytují v mnoha typech buněk (například CP1), jiné jsou specifické pro několik málo typů buněk (GATA-1), mezi něž patří i prekursorové buňky červených krvinek. O těchto specifických regulačních proteinech se předpokládá, že se podílejí na specifitě exprese β -globinového genu v budoucích erytrocytech. Jak je naznačeno obousměrnými šipkami, několik vazebných míst pro protein GATA-1 se překrývá s vazebnými místy pro jiné proteiny; předpokládá se, že navázání GATA-1 zabraňuje vazbě jiným regulačním proteinům.

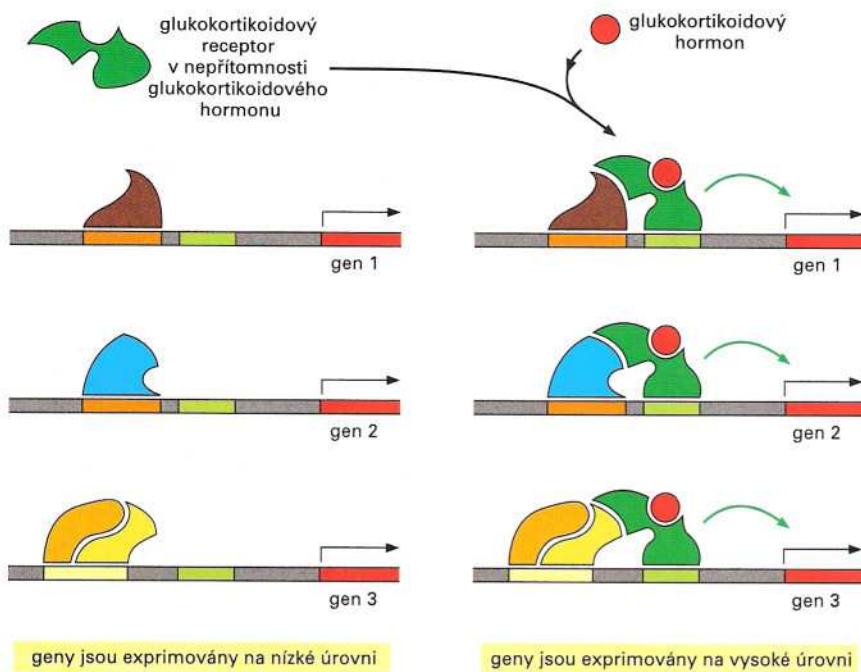
zapnutí nebo vypnutí konkrétního genu, a to pouhým doplněním kombinace proteinů potřebné ke spuštění či zablokování transkripce daného genu. Můžeme to připodobnit k nastavení poslední číslice u kombinačních zámků: zámek se otevře jen v případě, že byla předtím správně nastavena ostatní čísla. Stejně jako může jedna koncová číslice otevřít celou řadu zámků doplněním různých kombinací čísel, může tentýž protein doplnit kombinaci regulačních proteinů na různých genech. Jestliže několik genů obsahuje sekvenci rozpoznávanou stejným regulačním proteinem, může tento protein regulovat expresi každého z těchto genů.

Příkladem lidského proteinu schopného řídit expresi několika různých genů je *glukokortikoidový receptor*. Tento regulační protein je schopný vázat se na DNA až po vytvoření komplexu s molekulou glukokortikoidního steroidního hormonu (kortisolu; viz Tabulka 15-1, str. 485). Kortisol je vylučován během hladovění a intenzivní fyzické aktivity a mezi jinými funkcemi stimuluje jaterní buňky k syntéze glukosy z aminokyselin a jiných malých molekul. Jako odpověď na glukokortikoidní hormon zvyšují jaterní buňky expresi mnoha různých genů, například genu pro enzym tyrosinaminotransferázu, který se účastní přeměny tyrosinu na glukosu. Všechny tyto geny jsou regulovány navázáním komplexu hormon-glukokortikoidový receptor na regulační místo genu. Po regeneraci organismu a vymizení kortisolu se vrací exprese těchto genů na normální hladinu. Tímto způsobem může jediný regulační protein kontrolovat expresi mnoha různých genů najednou (obr. 8-29).

Kombinační kontrola může dát vznik různým buněčným typům

Možnost zapínat a vypínat expresi mnoha různých genů pomocí jediného proteinu však není užitečná jen pro každodenní regulaci buněčných funkcí, ale je také jedním z prostředků pro diferenciaci buněk během embryonálního vývoje.

Názorný příklad efektu jediného regulačního proteinu na diferenciaci pochází ze studií vývoje svalových buněk. Buňky kosterních

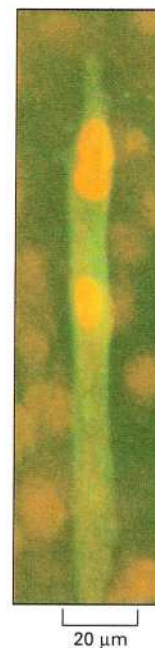


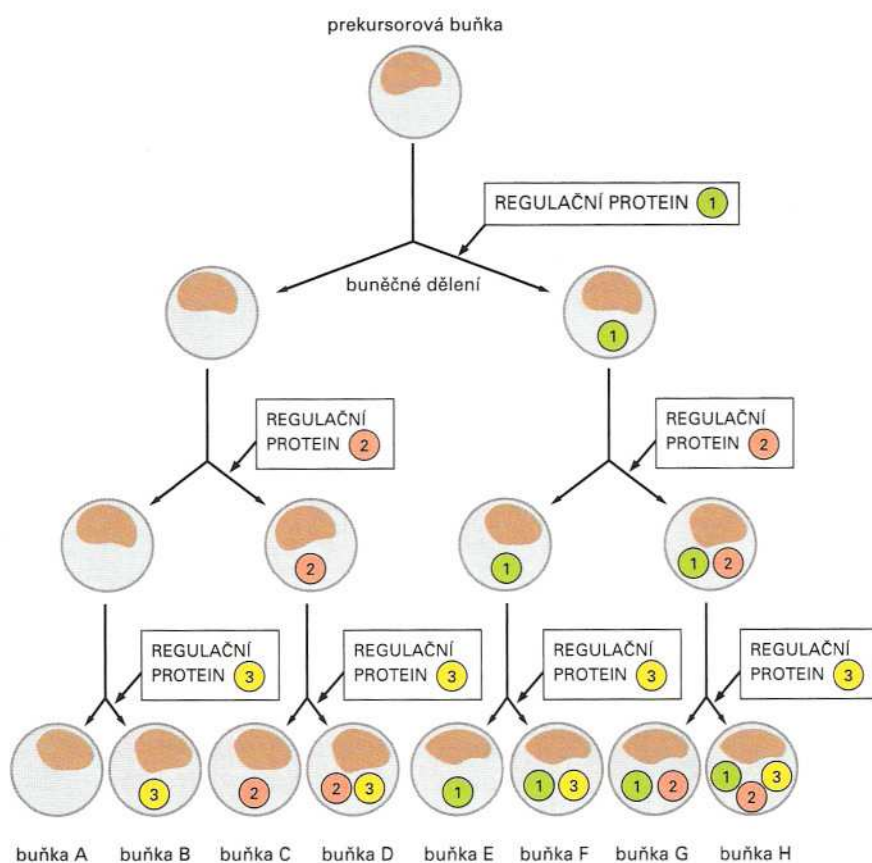
Obrázek 8-29 Jediný regulační protein může koordinovat expresi několika odlišných genů. Vše si ukážeme na příkladu glukokortikoidového receptoru. Vlevo je nakresleno několik genů, které mají na svých regulačních sekvencích navázány různé regulační proteiny. Přesto nejsou tyto proteiny dostačující pro účinnou transkripci těchto genů. Vpravo je zachycen efekt přidání jediného regulačního proteinu – glukokortikoidového receptoru v komplexu s glukokortikoidním hormonem – který se váže na svoji regulační oblast ve všech genech. Glukokortikoidový receptor doplní kombinaci regulačních proteinů nutných pro účinnou iniciaci transkripce a všechny geny jsou najednou spuštěny jako odpověď na glukokortikoidní hormon.

svalů savců tvoří vysoce charakteristický buněčný typ, obvykle se skládající z obrovských buněk, které vznikají fúzí svalových prekursorových buněk – *myoblastů* (a proto obsahují velké množství jader). Terminálně diferencovaná svalová buňka se liší od jiných buněk produkcí velkého množství charakteristických proteinů, jako jsou aktin a myosin, které tvoří kontraktilní aparát (viz Kapitola 16), receptorové proteiny a proteiny iontových kanálů buněčné membrány, které umožňují nervovou stimulaci svalu. Expresí genů pro tyto svalově specifické proteiny je spuštěna koordinovaně se začátkem fúze myoblastů. Studie svalových buněk diferencujících se v tkáňových kulturách umožnily identifikaci klíčových regulačních proteinů exprimovaných pouze v budoucích svalových buňkách, kde řídí expresi genů specifických pro svalové buňky a jsou tedy nezbytné pro jejich diferenciaci. Tyto proteiny aktivují transkripci těchto genů vazbou na jejich regulační sekvence.

Klíčové regulační proteiny mohou přeměnit nesvalovou buňku ve svalovou aktivací genů, které jsou typické pro diferencující se svalové buňky. Pokud je jeden z těchto genů – MyoD – zaveden do fibroblastů odvozených od kožní pojivové tkáně a exprimován, fibroblasty se začínají chovat jako myoblasty a začínají fúzovat za vzniku buněk podobných svalovým. Dramatický efekt exprese genu MyoD můžeme vidět na obr. 8-30. Vše nasvědčuje tomu, že fibroblasty, které jsou odvozeny ze stejného druhu embryonálních buněk jako

Obrázek 8-30 Efekt exprese proteinu MyoD ve fibroblastech. Jak je ukázáno na této fotografii z fluorescenčního mikroskopu, fibroblasty z pokožky kuřecího embrya mohou být přeměněny na svalové buňky indukci exprese genu *myoD*. Fibroblasty, ve kterých vznikl regulační protein MyoD, splývají za vzniku podlouhlých mnohojaderných buněk podobných svalovým, které jsou obarveny zeleně díky protilátkám rozpoznávajícím svalově specifické proteiny. Fibroblasty, které neexprimují gen *myoD*, jsou stěží rozpoznatelné na pozadí.





Obrázek 8-31 Význam kombinační kontroly genů pro buněčnou diferenciaci. Hypotetické schéma ilustruje, jak může kombinace několika málo regulačních proteinů vytvořit během vývoje organismu mnoho různých buněčných typů. V tomto jednoduchém schématu je po každém buněčném dělení syntetizován nový regulační protein (*kroužek s číslem*). Opakováním tohoto jednoduchého pravidla vznikne díky pouhým třem regulačním proteinům osm různých buněčných typů (A-H). Každý z těchto hypotetických buněčných typů bude exprimovat různé geny, které budou určeny kombinací regulačních proteinů přítomných v buňce.

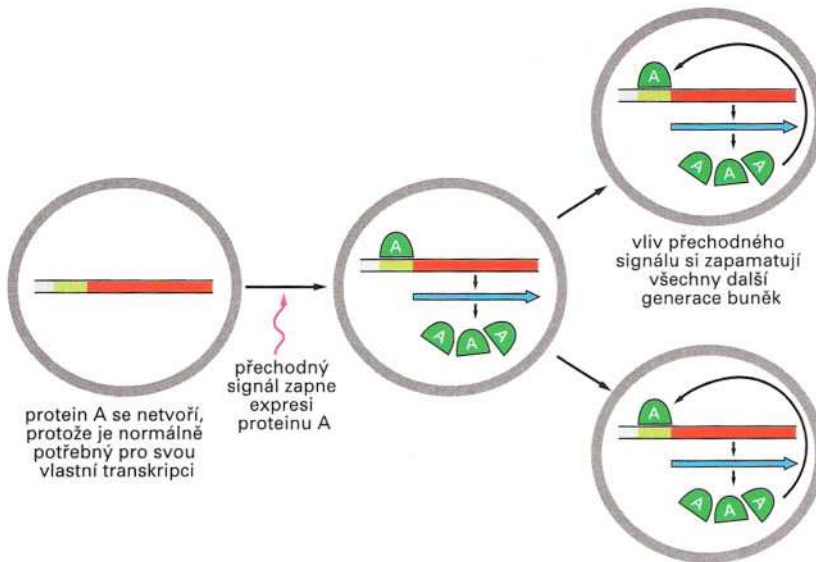
svalové buňky, exprimují všechny ostatní potřebné regulační proteiny nutné pro kombinační kontrolu svalově specifických genů. Přidání proteinu MyoD doplní specifickou kombinaci regulačních proteinů, která určuje diferenciaci ve svalovou buňku. Jiné buněčné typy nemohou být přeměněny na svalové buňky expresí MyoD; tyto buňky pravděpodobně neobsahují všechny požadované regulační proteiny.

Jak může vést akumulace různých regulačních proteinů k diferenciaci různých buněčných typů je schematicky zachyceno na obr. 8-31. Tento obrázek také ukazuje, jak může omezené množství regulačních proteinů díky kombinatorní kontrole a sdíleným regulačním sekvencím regulovat expresi mnohem většího počtu genů.

Konverze jednoho buněčného typu (fibroblasty) na jiný (svalové buňky) expresí jediného regulačního proteinu podtrhuje význam jednoho z nejdůležitějších principů diskutovaných v této kapitole: výrazné odlišnosti mezi buněčnými typy, jako je velikost, tvar a funkce, vznikají odlišností v genové expresi.

V dceřiných buňkách mohou být exprimovány stejné geny jako v mateřské buňce

Ačkoliv musí být všechny buňky, bakteriální i eukaryontní, schopné regulovat expresi svých genů, u mnohobuněčných organismů se musel vyvinout mechanismus pro vznik a udržení různých buněčných typů. Jakmile se jednou buňka v mnohobuněčném organismu diferencuje, zůstává obvykle diferencovaná a pokud je schopna se dělit, všechny její dceřiné buňky budou stejného typu. Některé vyso-



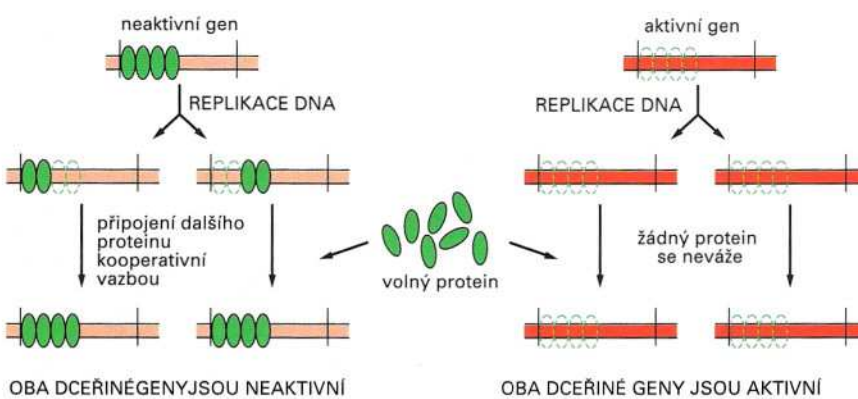
Obrázek 8-32 Pozitivní zpětná vazba může být základem buněčné paměti. Protein A je regulační protein, který aktivuje svoji vlastní transkripci. Všechny dceřiné buňky pocházející z jedné původní buňky si budou "pamatovat", že tato mateřská buňka byla kdysi vystavena přechodnému signálu, který způsobil expresi genu A.

ce specializované buňky, jako například buňky kosterního svalu nebo neurony, se po diferenciaci již nikdy nerozdělí. Existuje však celá řada buněčných typů, jako jsou fibroblasty, buňky hladkého svalstva a jaterní buňky (hepatocyty), které se během života organismu mnohonásobně dělí. Všechny tyto buněčné typy dávají vznik pouze stejnému typu buněk, ze kterého pocházejí: buňky hladkého svalstva nemohou dát nikdy vznik hepatocytům a ty zase fibroblastům.

To znamená, že změny v genové expresi, které vedou k diferenciaci, si buňky musí pamatovat a předávat dalším generacím, na rozdíl od okamžitých změn v genové expresi, které se běžně odehrávají v bakteriálních i eukaryontních buňkách. Například v buňce na obr. 8-31 došlo k expresi regulačního proteinu, který, jakmile byl jednou aktivován, bude exprimován ve všech jejích dceřiných buňkách. Jak je toho dosaženo?

Buňky mají několik možností, jak zajistit, aby dceřiné buňky byly stejného typu jako mateřská. Jedním z nejjednodušších mechanismů je **pozitivní zpětná vazba**, kdy klíčový regulační protein kromě jiných genů specifických pro určité buněčné typy stimuluje transkripci svého vlastního genu (obr. 8-32). Tímto způsobem je regulován například již dříve zmíněný gen MyoD. Dalším mechanismem pro předávání instrukcí mezi generacemi buněk je kondenzace stej-

Obrázek 8-33 Obecné schéma, které by mohlo vysvětlovat přímou dědičnost stavu genové exprese v průběhu replikace DNA. V tomto hypotetickém modelu je část chromosomálních proteinů kooperativně navázaných na DNA přenesena přímo z mateřské dvošroubovice (vlevo nahoře) na obě dceřiné molekuly DNA. Proteiny navázané na dceřiných dvošroubovicích pomáhají navázání proteinů stejného druhu, takže dojde k obnovení původního stavu. Protože je vazba kooperativní a tohoto proteinu je v buňce málo, dceřiné molekuly, které vznikly podle DNA bez navázaných proteinů (vpravo nahoře), nebudou tyto proteiny vázat.



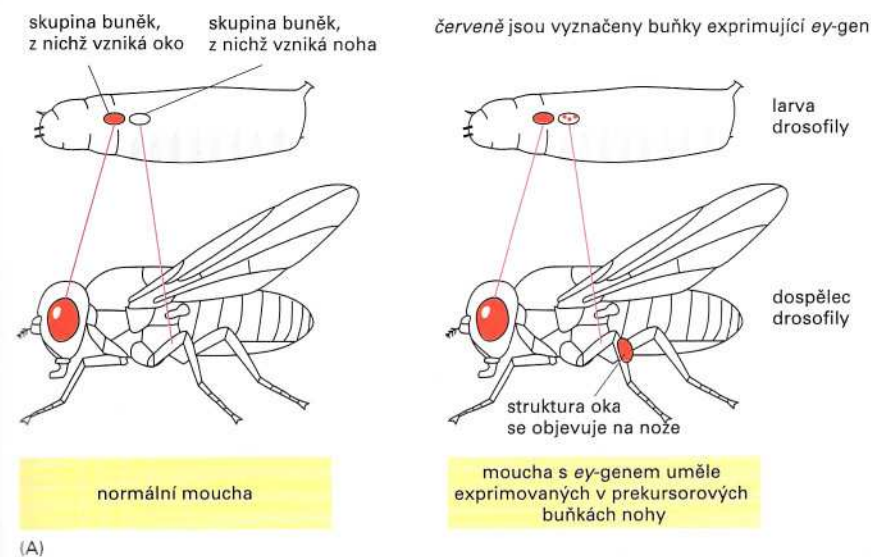
ných sekvencí DNA do heterochromatinové struktury po replikaci a rozdělení buňky. Konkrétní příklad jsme viděli na obr. 8-12, kdy je stejný X-chromosom inaktivován v mnoha buněčných generacích. Molekulární mechanismus mezigeneračního přenosu heterochromatinových struktur není zatím detailně prozkoumán, předpokládá se však hypotéza zachycená na obr. 8-33.

Tvorba celého orgánu může být spuštěna jedním regulačním proteinem

Ukázali jsme si, že ačkoliv je kombinatorní kontrola běžná u eukaryontních genů, jediný regulační protein, pokud doplní vhodnou kombinaci proteinů, může být rozhodující pro spuštění nebo vypnutí celé skupiny genů a tím může přeměnit jeden buněčný typ v druhý. Zajímavé zjištění přinesly studie zabývající se vznikem oka u drosofil, myši a člověka. Zde rozhoduje jediný regulační protein – Ey u drosofil, Pax-6 u obratlovců – o vývoji oka. Pokud je protein Ey exprimován ve vhodném buněčném typu, může spustit tvorbu nikoliv pouze určitého typu buněk, ale celého orgánu (oka) složeného z různých druhů buněk, které jsou navíc správně prostorově organizovány.

Nejlepší důkazy o funkci proteinu Ey pocházejí z pokusů s drosofilou, kdy byla v časném vývoji navozena exprese genu *ey* v buňkách, ze kterých normálně vznikají nohy. Abnormální exprese Ey genu v tomto případě způsobuje vznik oka uprostřed nohy (obr. 8-34). Oko drosofil je složeno z tisíců buněk a způsob, jak protein Ey koordinuje vznik různých typů buněk, není zatím jasné. Pravděpodobně tento protein přímo kontroluje expresi mnoha dalších genů vazbou na jejich regulační sekvence. Některé z nich jsou také regulační geny, které pak kontrolují expresi dalších genů. Jediný regulační protein, Ey, tak aktivuje celou kaskádu regulačních genů, jejímž výsledkem je vznik organizované skupiny mnoha buněčných typů. Na základě aplikace tohoto příkladu na jednotlivé části si tedy můžeme představit vznik celého organismu.

Obrázek 8-34 Expese genu *ey* v prekursorových buňkách nohy drosofil spouští vývoj oka na noze. (A) Zjednodušené schéma ukazující výsledek normální exprese genu *ey* v larvě drosofil (vlevo) a uměle navozené exprese téhož genu v buňkách, ze kterých vznikají během vývoje larvy nohy (vpravo). (B) Fotografie abnormální nohy s okem.



(B)

Základní shrnutí

- Genetický materiál eukaryotní buňky je uložen v chromosomech. Každý z chromosomů je tvořen jedinou dlouhou molekulou DNA, která obsahuje velké množství genů.
- DNA v chromosomu obsahuje kromě genů i mnoho replikačních počátků, jednu centromeru a dvě telomery. Tyto sekvence zajišťují účinnou replikaci a správné rozdělení chromosomů mezi dceřiné buňky.
- Chromosomy eukaryotních buněk jsou tvořeny DNA a na ni pevně navázanými specializovanými proteiny o přibližně stejné celkové hmotnosti jako DNA. Tyto proteiny balí DNA do kompaktnější formy, aby se vešla do buněčného jádra. Komplex DNA a proteinů v chromosomu se nazývá chromatin.
- Část proteinů asociovaných s DNA jsou histony, které umožňují sbalení DNA do opakujících se DNA-proteinových částic nazývaných nukleosomy.
- Nukleosomy jsou dále pomocí histonu H1 kondenzovány do 30-nm vlákna. Toto vlákno může být dále stáčeno a kondenzováno.
- Některé formy chromatinu jsou natolik kondenzované, že geny v této DNA nemohou být transkribovány. K tomu dochází například u všech genů během buněčného dělení (mitozy), kdy jsou chromosomy vysoce kondenzovány.
- Specifické oblasti chromosomu (heterochromatin) jsou vysoce kondenzovány a jsou inaktivní i v nedělících se buňkách. Geny uměle přesunuté do těchto oblastí se pak často stávají neaktivními.
- Typická eukaryotní buňka exprimuje jen část svých genů, různé typy buněk v mnohobuněčném organismu vznikají expresí odlišných genů během diference.
- Ačkoliv mohou být principiálně všechny kroky genové exprese regulovány, nejdůležitějším kontrolním bodem pro expresi většiny genů je iniciace transkripce.
- Transkripce jednotlivých genů je v buňce zapínána a vypínána pomocí regulačních proteinů. Ty se dokážou vázat na krátké, tzv. regulační sekvence DNA.
- Ačkoliv každý regulační protein má unikátní vlastnosti, většina z nich se váže na DNA pomocí malého počtu společných strukturních motivů. Aminokyselinové složení sekvence, která je do tohoto strukturního motivu sbalena, je rozhodující pro rozpoznání cílové sekvence na DNA.
- RNA-polymeráza se váže na DNA a iniciuje transkripci v místě nazývaném promotor.
- U bakterií se obvykle regulační proteiny vážou na regulační sekvence v blízkosti vazebného místa pro RNA-polymerázu a aktivují tím nebo blokují transkripci genu. U eukaryot jsou regulační sekvence často vzdáleny od promotoru několik tisíc nukleotidových párů.
- Pro iniciaci transkripce u eukaryot je nutná vazba obecných transkripčních faktorů na promotor a vznik jejich uspořádaného komplexu, který umožňuje transkripci DNA RNA-polymerázou. Eukaryotní regulační proteiny pravděpodobně ovlivňují vznik tohoto komplexu – aktivátory ho urychlují, represory ho zpomalují nebo mu brání.
- U eukaryot je exprese genu obvykle kontrolována kombinací několika regulačních proteinů.
- U mnohobuněčných rostlin a živočichů zajišťuje syntéza různých regulačních proteinů v různých buňkách expresi genů typických pro tento buněčný typ.
- Jediný regulační protein, pokud je exprimován ve vhodné prekursorové buňce, může spustit vznik specializovaného buněčného typu nebo i celého orgánu.

Klíčová slova

aktivátor	diference	histon	regulační
centromera	genová exprese	mitotický chromosom	sekvence DNA
chromatin	obecné transkripční	jadérko	replikační počátek
chromosom	faktory	nukleosom	represor
kombinatorní kontrola	regulační proteiny	poziční efekt	TATA-box
	heterochromatin	pozitivní zpětná vazba	telomera

9 Genetická rozmanitost

V předcházejících třech kapitolách jsme si ukázali, jak je informace potřebná k výstavbě a udržování živých organismů uložena v nukleotidové sekvenci DNA a jak je přesně replikována a nezměněná přenášena do dceřiné buňky. Přesto DNA podléhá mutacím. V každé velké skupině lidí se od sebe jednotlivci liší ve velkém množství dědičných znaků, jako jsou barva očí, kůže, vlasů, výška, postava atd. Obecně jejich genomy neobsahují přesně tytéž nukleotidové sekvence. Navíc velká rozmanitost života okolo nás - např. rostliny, hmyz, savci - vznikla díky změnám v DNA, které se akumulují 3,5 miliardy let od doby, kdy se na Zemi objevila první buňka.

V nejširším smyslu slova je pojmem *genetická rozmanitost* společně označována rozmanitost genomů, které daly na Zemi vzniknout odlišným jedincům. Zahrnujeme sem jak malé rozdíly mezi genomy příslušníků téhož druhu, tak mnohem větší odlišnosti mezi genomy různých druhů. V této kapitole se zamyslíme nad tím, jak se genomy mění v průběhu evoluce. Evoluce upřednostňovala takové systémy, kde byly genetické změny nejen možné, ale přímo nevyhnutelné. Různorodost mechanismů vytvářejících tyto změny nás přesvědčuje o tom, že to bylo a je výhodné pro udržení života na měnící se Zemi.

Vlastním zdrojem všech genetických rozdílů jsou změny v DNA (mutace), které pozměňují její nukleotidovou sekvenci a mění tak její informační obsah. Některé z nich zahrnují malé změny v nukleotidové sekvenci DNA vzniklé například chybou při replikaci a opravě DNA (viz Kapitola 6), jiné jsou naopak mnohem zásadnější a vedou k velkým genomovým přestavbám. Mezi tyto změny zahrnujeme rozsáhlé reorganizace nukleotidových sekvencí, duplikace jednotlivých genů nebo i větších částí genomu, delece části genomu, translokace části jednoho chromosomu na druhý a jiné. Tyto rozsáhlé reorganizace probíhají díky množství různých procesů, například *rekombinace DNA* nebo za účasti virů či *mobilních genetických elementů*, které se mohou přemísťovat v rámci DNA.

GENETICKÁ ROZMANITOST U BAKTERIÍ

- Rychlé dělení bakterií znamená, že se mutace objeví v krátké době
- Mutace u bakterií mohou být selektovány změnou podmínek prostředí
- Bakteriální buňky mohou získávat geny od jiných bakterií
- Bakteriální geny mohou být přenášeny procesem zvaným bakteriální konjugace
- Bakterie mohou přijímat DNA ze svého okolí
- Mezi dvěma molekulami DNA s obdobnou nukleotidovou sekvencí může probíhat homologní rekombinace
- Bakteriální viry mohou přenášet geny mezi bakteriemi
- Transponovatelné elementy vytvářejí genetickou rozmanitost

ZDROJE GENETICKÝCH ZMĚN V EUKARYONTNÍCH GENOMECH

- Náhodnými duplikacemi DNA vznikají rodiny příbuzných genů
- Geny kódující nové proteiny mohou být vytvořeny rekombinací exonů
- Velká část DNA mnohobuněčných eukaryot je tvořena opakujícími se nekódujícími sekvencemi
- Přibližně 10% lidského genomu je tvořeno dvěma rodinami transponovatelných sekvencí
- Evoluce genomů byla urychlena transponovatelnými elementy
- Viry jsou plně mobilní genetické elementy, které mohou opustit buňky
- Retroviry obrazejí normální tok genetické informace
- Retroviry, které získaly hostitelské geny, mohou měnit buňky v nádorové

POHLAVNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ A REORGANIZACE GENŮ

- Pohlavní rozmnožování udílí organismům výhody v konkurenčním, nepředvídatelně se měnícím prostředí
- Pro pohlavní rozmnožování je třeba diploidních i haploidních buněk
- V procesu meiozy vznikají haploidní buňky z diploidních
- Meiozou se vytváří velká genetická rozmanitost

Zdrojem genetických změn nejsou pouze mutace. U pohlavně se rozmnožujících organismů jsou genetické odlišnosti mezi jednotlivci způsobeny hlavně reorganizací genů v nové kombinace v rámci genofondu druhu. Mutace i reorganizace genů jako významné zdroje genetických změn si probereme v této kapitole.

Na začátku si vysvětlíme genetickou rozmanitost u bakterií. Bakterie nepatří pouze mezi geneticky nejjednodušší a nejrychleji se množící buňky, ale také mezi organismy nejintenzivněji studované. Proto jsme mnohem blíže k úplnému pochopení životního cyklu u bakterií než u jiných organismů. Přestože jsou bakterie geneticky velice jednoduché, můžeme u nich najít téměř všechny mechanismy, které dávají vznik genetické rozmanitosti, jak se o tom přesvědčíme v této kapitole. Tento úvod do bakteriální genetiky nám bude zároveň sloužit i jako úvod k vysvětlení role bakterií, jejich plasmidů a virů v revoluční *technologii rekombinantní DNA*, která je tématem Kapitoly 10.

V druhé části této kapitoly se podíváme na některé z hlavních způsobů evoluce a diverzifikace eukaryontních genomů. Nakonec obrátíme svoji pozornost k *meioze* a genetické rekombinaci, které jsou hlavním zdrojem genetických odlišností mezi jednotlivci u pohlavně se rozmnožujících organismů.

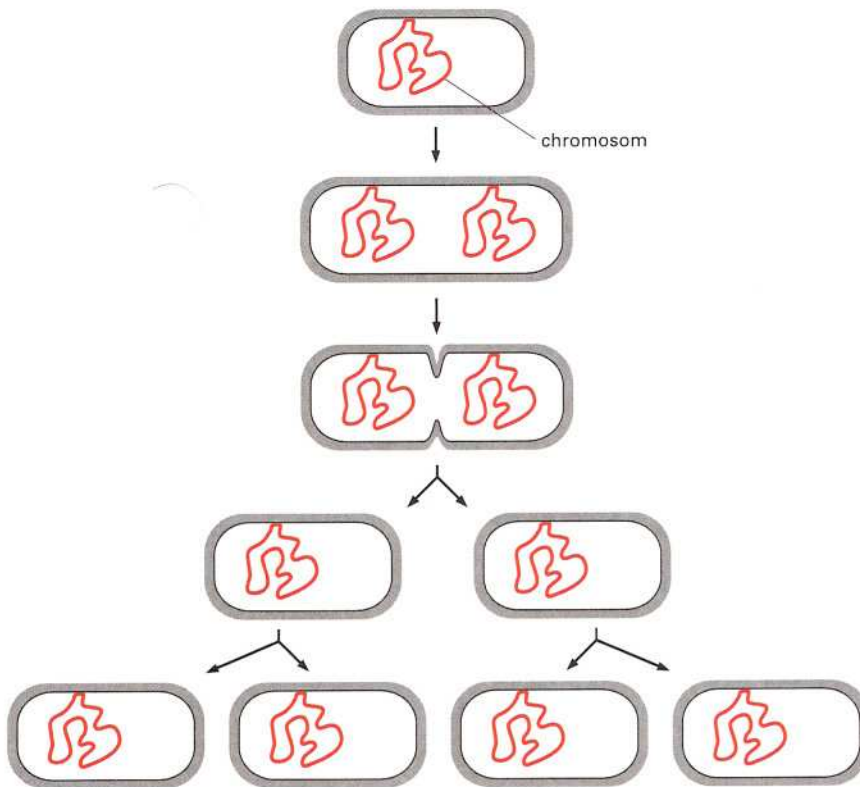
Genetická rozmanitost u bakterií

Escherichia coli – zkráceně *E. coli* – je bakterie žijící v symbioze s člověkem a jinými savci. Miliardy *E. coli* žijí v našem tlustém střevě, kde se živí látkami, které nebyly v žaludku a tenkém střevě stráveny a absorbovány. Pro svoji vlastní potřebu si syntetizují aminokyseliny a vitaminy, z nichž některé jsou vstřebávány do krevního oběhu a využívány naším tělem. Tak jsou pro nás tyto bakterie například hlavním zdrojem vitamínu K.

Rozšířenost *E. coli*, snadnost, s jakou roste na nejrůznějších nutričních zdrojích, a její rychlé dělení vedly k tomu, že si jí všimli bakteriologové a brzy se stala modelovým experimentálním organismem. Další výhodou při studiu bakterií, jako je *E. coli*, je přítomnost pouze jedné kopie genomu – jsou tedy *haploidní*. Na rozdíl od nich nesou *diploidní* organismy (jako je člověk) dvě kopie genomu v každé buňce (kromě gamet, o kterých budeme mluvit později v této kapitole). Pokud je bakteriální gen zmutován, jsou často výsledkem detegovatelné dědičné změny ve vlastnostech (*fenotypu*) bakterií. Na druhé straně mutace u diploidních organismů neznamenají nutně změnu fenotypu, protože každá buňka obsahuje také nezmutovanou kopii stejného genu, která často kompenzuje efekt zmutovaného genu.

Mnoho ze základních principů molekulární biologie probíraných v Kapitolách 6, 7 a 8 bylo objeveno u *E. coli* a dnes, po století výzkumů, víme o fungování *E. coli* mnohem více než o jiných organismech. Poslouží nám to jako vhodný úvod k základním mechanismům vytvářejících genetickou variabilitu a zároveň nám to ukáže, jak prostředí působí selekčními tlaky, které se podílejí na této variabilitě a způsobují evoluční změny.

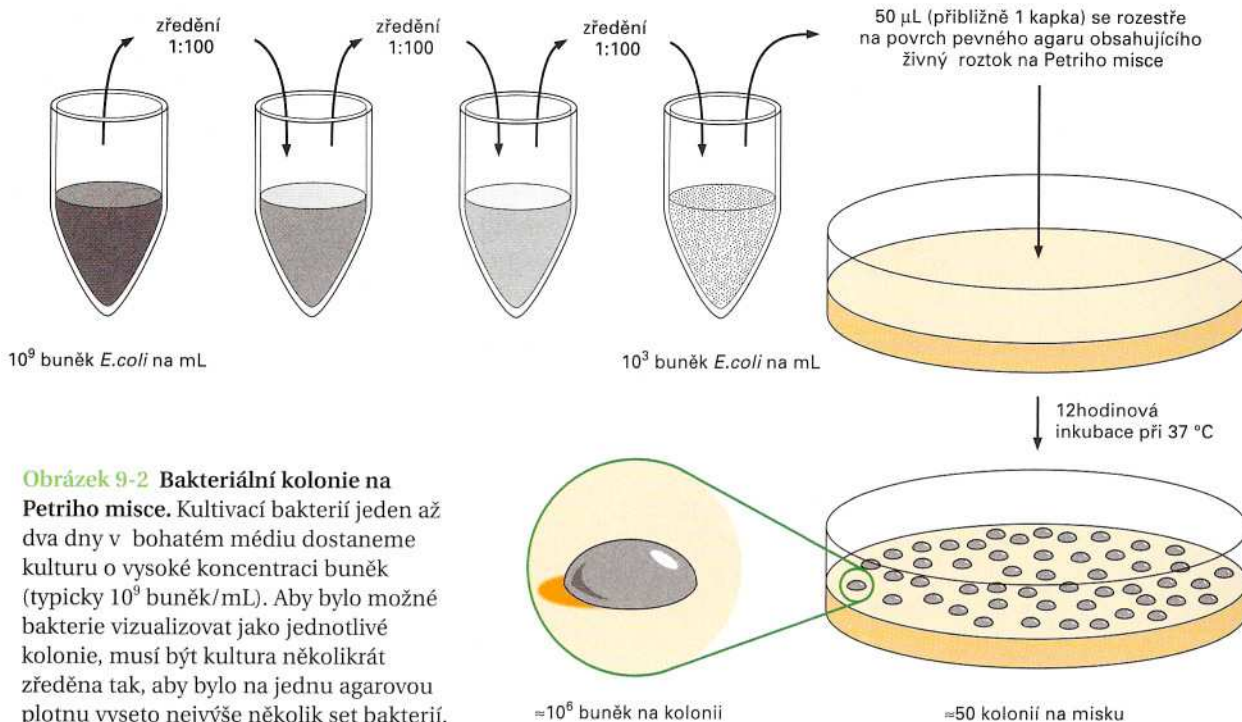
Obrázek 9-1 Dělení bakteriálních buněk. Rozdělení jedné bakterie na dvě trvá při ideálních růstových podmínkách 20-25 minut.



Rychlé dělení bakterií znamená, že se mutace objeví v krátké době

Bakterie jako *E. coli* se množí nepohlavně jednoduchým dělením. DNA je replikována a segregována do opačných konců rostoucí bakterie, pak se bakterie rozdělí na dvě dceřiné buňky a v případě, že nedošlo k chybám při replikaci, obsahuje každá dceřiná buňka stejný genom jako buňka mateřská (obr. 9-1). V médiu, používaném v laboratoři, které obsahuje mnoho aminokyselin, cukrů a solí, se *E. coli* množí rychle. Pokud je kultura dobře provzdušňována a teplota udržována okolo teploty lidského těla (37 °C), populace buněk *E. coli* se v takovém médiu zdvojnásobí každých 20-25 minut. Za méně než jeden den je jedna *E. coli* schopna vyprodukovat více „potomků“, než je lidí na Zemi. Samotná bakterie je příliš malá na to, aby byla vidět pouhým okem; pokud však roste na pevném povrchu, vytvoří potomstvo jedné buňky ohraničenou kolonií snadno viditelnou pouhým okem. K tvorbě tuhého gelu se používá agar, inertní polysacharid získávaný z mořských řas. Aby ho bylo možno použít jako kultivačního média pro bakterie, je nutné ho rozvařit, smíchat s živným bujónem, nalít do Petriho misek a nechat ztuhnout. Kapka naředěné bakteriální suspenze je pak rozetřena po povrchu misky a pokud je koncentrace buněk v suspenzi dostatečně nízká, z jednotlivých bakterií vyrostou od sebe dobře odlišitelné kruhové kolonie tvořené z přibližně 10^6 buněk (obr. 9-2). Bakterie pak mohou být vypíchnuty z jednotlivých kolonií a pro kultivaci použity pro další studie.

Genom *E. coli* je tvořen kruhovou molekulou DNA o velikosti 4-5 milionů nukleotidových párů, které kódují kolem 3 000 různých



Obrázek 9-2 Bakteriální kolonie na Petriho misce. Kultivaci bakterií jeden až dva dny v bohatém médiu dostaneme kulturu o vysoké koncentraci buněk (typicky 10^9 buněk/mL). Aby bylo možné bakterie vizualizovat jako jednotlivé kolonie, musí být kultura několikrát zředěna tak, aby bylo na jednu agarovou plotnu vyseto nejvýše několik set bakterií.

proteinů. Ačkoliv je replikace DNA velice přesná, není úplně bez chyby. V Kapitole 6 jsme viděli, že při každé replikaci DNA existuje malá pravděpodobnost ($\approx 1/10^9$), že určitý nukleotid bude chybně zkopírován a unikne mechanismu opravy chybného párování bází. Přestože je tato pravděpodobnost velice nízká, díky rychlému dělení *E. coli* může experimentátor velice rychle získat velkou populaci buněk, u kterých se objevilo velké množství chyb.

Mutace u bakterií mohou být selektovány změnou podmínek prostředí

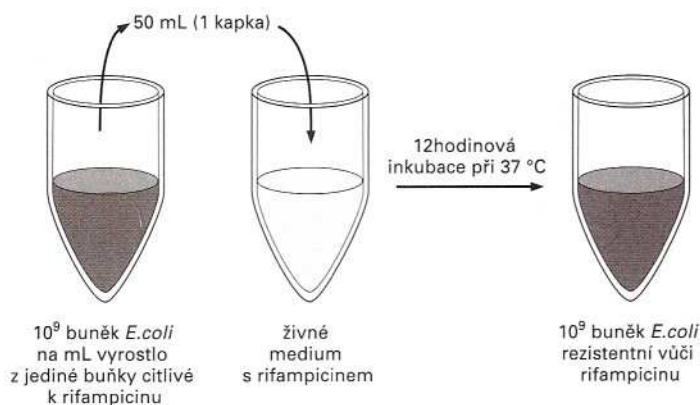
Aby bylo možno detegovat a izolovat bakterii s mutací, musí být mutantní bakterie rozpoznána a oddělena od převažující populace nezmutovaných bakterií. Například normální buňka *E. coli* je usmrcena antibiotikem rifampicinem. Molekuly tohoto antibiotika se uvnitř buňky pevně vážou na molekuly RNA-polymerázy a brání jim přepisovat DNA do RNA. Ve svém důsledku je blokována syntéza nových proteinů a bakterie hyne. Přesto velká populace *E. coli* (10^9 buněk v několika mililitrech rychle rostoucí kultury) pravděpodobně obsahuje několik buněk, které jsou k rifampicinu rezistentní. V takových buňkách byl gen pro RNA-polymerázu v průběhu replikace DNA zmutován, a to tak, že nyní kóduje RNA-polymerázu odolnou vůči rifampicinu a schopnou transkripce i v přítomnosti tohoto antibiotika. Pokud je do rostoucí kultury *E. coli* přidán rifampicin, téměř všechny buňky zahynou kromě těch několika málo rifampicin-rezistentních mutantů už v kultuře přítomných. Ty pak mohou během několika hodin v kultuře převládnout (obr. 9-3).

Tento laboratorní příklad výtečně demonstruje principy genetické rozmanitosti a přírodního výběru jako odpovědi na podmínky

Otázka 9-1 Ve vašich mikrobiologických praktikách jste přidali k bakteriální kultuře chemickou látku, která způsobuje mutace. Pokud chcete studovat jednotlivé mutantní kmeny, potřebujete si připravit populace bakterií pocházející z jediné mutované buňky. Váš instruktor vám řekl, abyste rozetřeli 50 μ L z vaší bakteriální kultury (která obsahuje 1 000 buněk/mL) na agarové plotny (jak je ukázáno na obr. 9-2) tak, abyste získali bakteriální kolonie vyrostlé z individuálních mutovaných buněk. Pak budou buňky z jednotlivých kolonií předkontrolovány, zda nesou požadovanou mutaci.

Asistent vyučujícího (starší student známý svými časově úspornými metodami) vám navrhne, abyste jednoduše vzali vždy 1 μ L z chemicky ošetřené bakteriální kultury a každý vzorek dali do samostatné zkumavky. Tyto vzorky pak mohou být jednoduše rozředěny čerstvým kultivačním médiem a inkubovány při 37 °C. A máte velké množství nezávislých kultur, každou pocházející z jedné buňky. Prostě přeskočte ten nudný výsev na plotny!

Přijmete jeho radu – nebo je to důvod, proč stále neukončil své studium? Vysvětlete svoji odpověď.



Obrázek 9-3 Mutace a přírodní výběr v populaci bakterií. Pokud jsou bakterie v kultuře vystaveny novým podmínkám (např. přítomnosti antibiotika rifampicinu), několik málo mutantů schopných lépe přežít (mutantů rezistentních k rifampicinu) se bude množit a převládnu v populaci.

prostředí. Za prvé, vzácné a náhodné replikační chyby jsou zdrojem genetické variability; v kultuře 10⁹ buněk *E. coli* jsou miliony mutantních buněk, jejichž genom se liší od genomu původní buňky, ale rifampicin-rezistentní mutanti jsou pouze jedním druhem z mnoha různých variant přítomných v kultuře. (Obecně lze říci, že v populaci existuje od každého genu tisíce různých forem.) Za druhé, pod selekčním tlakem (jako je přítomnost rifampicinu v uvedeném příkladu) bude každý jedinec lépe vybavený pro přežití (v našem případě rifampicin-rezistentní buňky) proliferovat a nakonec může v populaci převážit.

Tak je v každé velké populaci bakterií kromě převládajícího genetického typu také celá řada mutantů, která poskytuje bohatý zdroj genetických variant. Také velká populace rifampicin-rezistentních *E. coli*, která teď v kultuře dominuje, obsahuje fond variant a pokud dojde opět ke změně podmínek, převládne v kultuře nový genetický typ, který byl selekčně zvýhodněn. Skutečnost, že replikace DNA neprobíhá naprosto bezchybně, tedy umožňuje populaci *E. coli* rychle se geneticky adaptovat na změny ve svém prostředí.

Pokud nedochází ke změnám prostředí, je nepravděpodobné, že by mutanty v populaci převládly. Je to dáno tím, že mezi mutacemi, které umožňují bakteriím přežít, je mnoho takových, které se fenotypicky neprojeví, některé z nich mohou být i částečně škodlivé. Například rifampicin-rezistentní mutanty *E. coli* jsou často méně tolerantní k extrémním teplotám než *E. coli* divokého typu a v konečném důsledku by to vedlo k jejich vymizení z populace, pokud by byl rifampicin z média odstraněn.

Bakteriální buňky mohou získávat geny od jiných bakterií

Přestože jsou replikační chyby pro genetickou adaptabilitu *E. coli* důležité, není to jediný způsob, jak může tato bakterie svůj genom měnit. Ačkoliv je u rostlin a živočichů dlouhou dobu znám mechanismus mísení genů různých jedinců při pohlavním rozmnožování, teprve v padesátých letech bylo objeveno, že také nepohlavně se množící bakterie vlastní mechanismy, které umožňují přenos genů mezi různými jedinci v populaci.

Přenos genů z jedné bakterie do druhé může být experimentálně demonstrován prostým smícháním bakteriálních

Otázka 9-2 Gen *LacY* u *E. coli* kóduje protein, který transportuje cukr laktosu z vnějšího prostředí do buňky, kde je rozložena a použita jako zdroj energie. *E. coli*, která má nefunkční mutovaný gen *lacY*, nemůže růst na médiu, kde je laktosa jediným zdrojem energie. Jestliže je 10⁹ *lacY* mutantních buněk *E. coli* vyseto na agar s laktosou jako jediným zdrojem energie, naroste přibližně 50 kolonií.

- Jak je možné, že tyto kolonie vyrostou?
- Pokud je tento experiment zopakován s *lacY*-mutantní *E. coli*, která má navíc mutaci inaktivovaný systém opravy chybného párování bází (viz Kapitola 6), vyroste 3 000 kolonií. Můžete navrhnout nějaké vysvětlení pro toto zvýšení?

kmenů s odlišnými genetickými vlastnostmi. Jeden laboratorní kmen *E. coli* není například schopen produkovat aminokyselinu leucin, protože nese inaktivující mutaci v genu, který kóduje jeden z enzymů potřebných k syntéze této aminokyseliny. Jiný kmen *E. coli* nese mutaci v jiném genu, který je nezbytný pro tvorbu methioninu a nemůže tedy růst v médiu, ve kterém methionin chybí.

Pokud jsou tyto dva kmeny *E. coli* smíchány a ponechány společně několik hodin a potom přemístěny do média, které neobsahuje ani leucin ani methionin, můžeme přesto v tomto médiu nalézt velké množství rychle rostoucích bakterií. Tyto bakterie reprezentují nový kmen *E. coli*, který je schopen syntetizovat jak leucin, tak methionin, a růst v médiu bez těchto aminokyselin. Tento nový bakteriální kmen se objevuje s pravděpodobností vyšší, než by se dalo očekávat pouze na základě mutací vzniklých replikačními chybami. Místo toho obsahuje genom nového bakteriálního kmene normální gen pro syntézu leucinu z jednoho kmene a normální gen pro syntézu methioninu z druhého kmene.

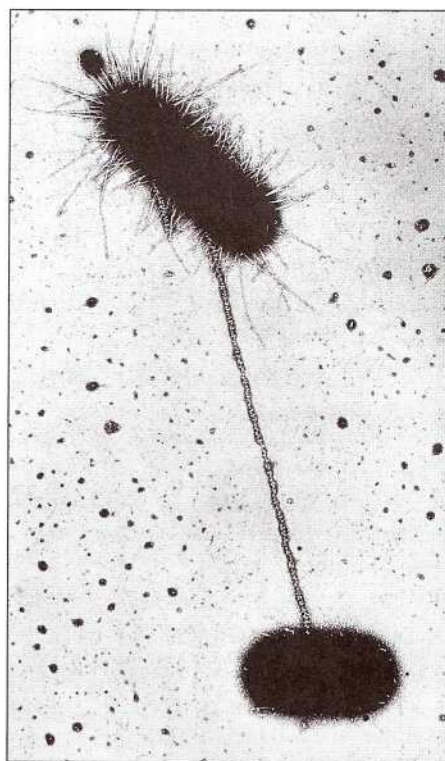
Jak si ukážeme ve větších detailech v následujících odstavcích, k tomuto genetickému mísení dochází přenosem DNA z jedné bakterie do druhé, kde je potom část genomu recipienta nahrazena odpovídajícím genem z přenesené DNA. Výměna probíhá procesem rekombinace DNA, ke kterému může dojít mezi jakýmkoli dvěma molekulami DNA s obdobnou sekvencí. Přenos genů a následná rekombinace poskytují bakteriím mocný nástroj pro adaptaci na měnící se podmínky svého prostředí díky využití rozmanitosti již existující v populaci.

Bakteriální geny mohou být přenášeny procesem zvaným bakteriální konjugace

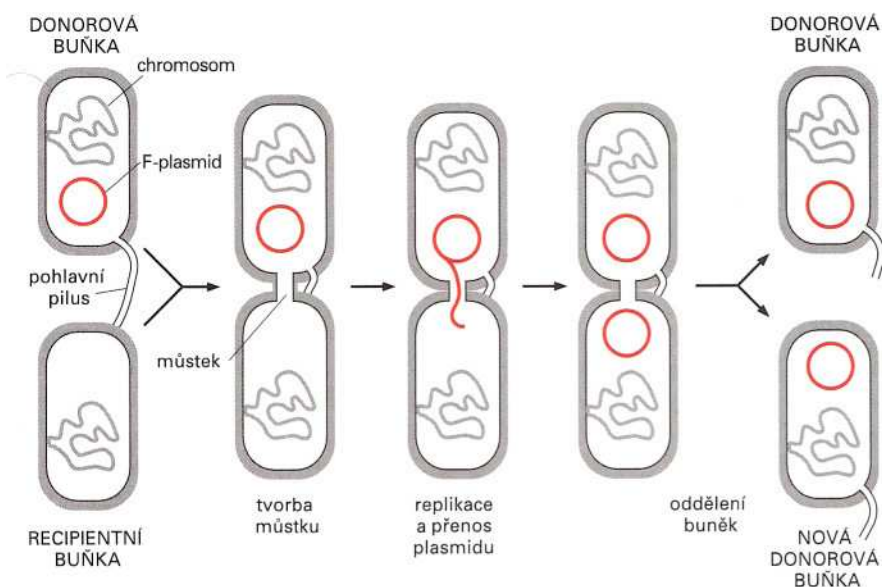
Geny mohou být přenášeny z jedné bakterie do druhé několika různými způsoby. Jeden z nich je přímý přenos DNA z buňky do buňky během **bakteriální konjugace**. Ne všechny bakterie v populaci mohou iniciovat konjugaci a přenos genů. Tato schopnost je dána geny přítomnými na bakteriálních **plasmidech**, malých, dvouřetězcových molekulách DNA, které jsou odděleny od velkého bakteriálního chromosomu. Plasmidy mají svůj vlastní replikační počátek, který jim umožňuje replikovat se nezávisle na bakteriálním chromosomu. Plasmidů existuje mnoho různých typů a vyskytují se u mnoha různých bakteriálních druhů, ale pouze některé jsou schopny iniciovat konjugaci a přenos DNA. Plasmid, který iniciuje konjugaci u *E. coli*, je označován jako *F-plasmid* (z anglického *fertility plasmid*).

Konjugace může probíhat pouze mezi bakteriemi, z nichž jedna má ve své buňce F-plasmid a druhá ne. Když se bakterie nesoucí F-plasmid (*donor*) setká s bakterií bez tohoto plasmidu (*recipientem*), vytvoří se mezi nimi cytoplasmatický můstek. DNA F-plasmidu je replikována a přenesena můstkem z donora do recipienta (obr. 9-4, 9-5 a 9-6). Můstek je potom přerušen a obě bakterie, které nyní nesou F-plasmid, mohou působit jako donor při další konjugaci. F-plasmid je pro konjugaci nezbytný, protože jeho geny kódují některé proteiny potřebné k vytvoření můstku a přenosu DNA.

Obrázek 9-4 Snímek z elektronového mikroskopu ukazující dvě bakteriální buňky při konjugaci. Donorová buňka (nahore) je s recipientní buňkou spojena pohlavním pílím (viz první část obr. 9-5). Pro lepší viditelnost byl sex-pilus podélně označen viry, které se na něj specificky vážou.



1 μm

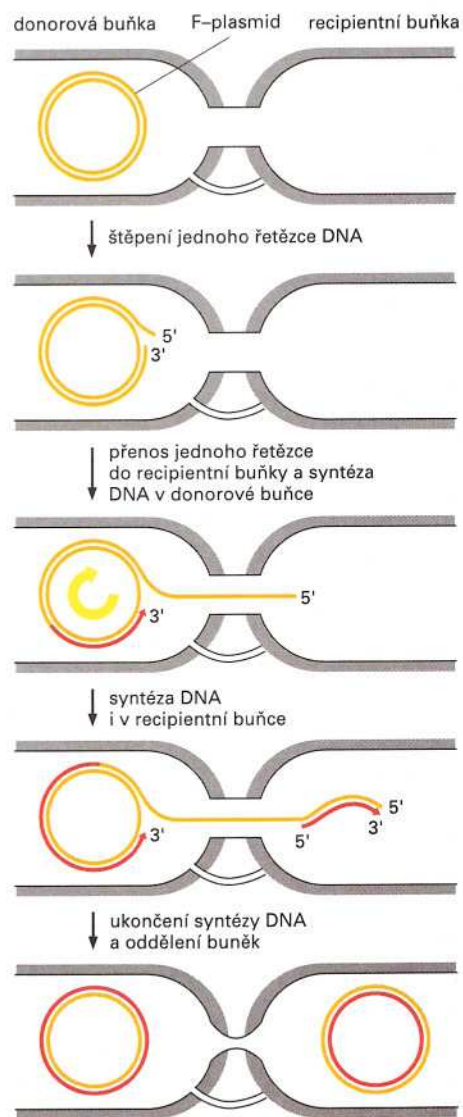


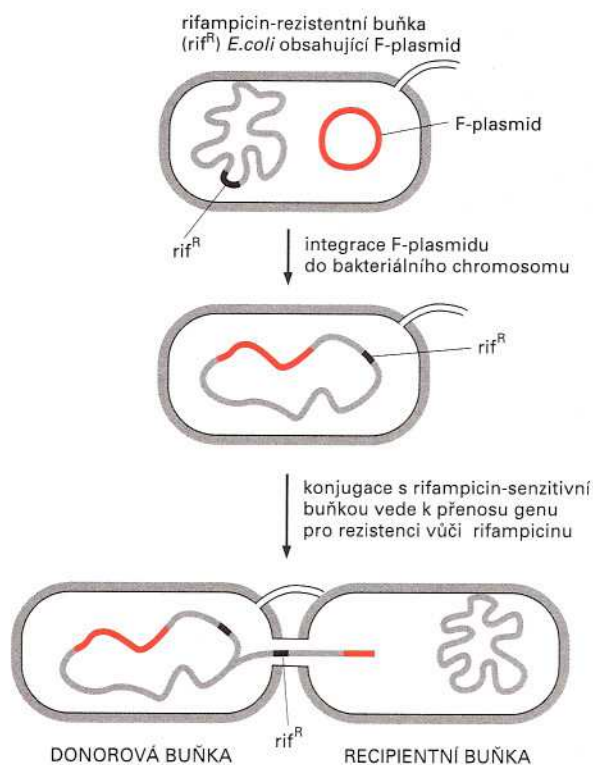
Obrázek 9-5 Schematické znázornění bakteriální konjugace. Zřetelný přívěsek u donorové buňky vlevo je pohlavní pilus, který slouží k přichycení donora k recipientovi. DNA je přenášena cytoplasmatickým můstkem, který se vytváří po přichycení. Obě bakterie se oddělují poté, co je kopie plasmidu přenesena do recipientní buňky. Bakteriální genom i F-plasmid jsou tvořeny dvojšroubovicovou DNA, pro přehlednost jsou zde zobrazeny jednoduchou čarou. Neobvyklá forma replikujícího se plasmidu je označována jako valivá kružnice a podrobněji je popsána na obr. 9-6.

Přenos F-plasmidu z jedné bakterie do druhé je sice příkladem jedné z nejjednodušších cest přenosu genů mezi jednotlivci, ale je sám o sobě omezený a bezvýznamný co se týče vytváření genetické variability. Tímto způsobem je přenášén pouze malý počet genů přítomných na plasmidu, z nichž většina je navíc spojena s konjugací. Přesto se může F-plasmid příležitostně stát integrální součástí bakteriálního chromosomu, a to typem rekombinace označovaným jako *integrace*, která bude probrána později. I v tomto stavu je F-plasmid schopen iniciovat konjugaci a přenos sebe sama z jedné buňky do druhé. V tomto případě však s sebou může přenášet i velkou část bakteriálního chromosomu, protože jsou obě molekuly DNA kovalentně spojeny (obr. 9-7). Tímto způsobem může tedy být přenesen potenciálně jakýkoliv gen z donorové bakterie do recipientní.

Přenos genů zvyšuje genetickou variabilitu, a tak i adaptabilitu bakterií. Jedním z nejlepších příkladů bylo plošné zavedení používání antibiotik, jako je například penicilin. Při jejich použití byly bakterie vystaveny intenzivnímu selekčnímu tlaku a brzy se objevily bakterie rezistentní k většině běžných antibiotik. Tak například téměř jedna třetina nových klinických izolátů bakterie *Neisseria gonorrhoeae*, původce kapavky u člověka, je rezistentní k penicilinu. Výsledkem je, že penicilin již nestojí na prvním místě při léčbě této choroby. Analýzou bakterií rezistentních k antibiotikům bylo zjištěno, že nesou plasmidy (podobné F-plasmidu), které kódují proteiny schopné antibiotika inaktivovat. Jelikož mohou být tyto plasmidy přenášeny konjugací z jedné bakterie do druhé, rychle se

Obrázek 9-6 Syntéza a přenos DNA F-plasmidu mechanismem valivé kružnice. Jedno vlákno plasmidové DNA je rozštěpeno a jeden z jeho konců je transportován cytoplasmatickým můstkem do recipientní buňky. Současně začíná syntéza DNA na obnaženém řetězci, který zůstal v donorové buňce, a vytváří se nové vlákno DNA (červeně). V průběhu celého procesu se donorový plasmid otáčí, jak je naznačeno žlutou šipkou. Jakmile vstoupí jednoduchý řetězec DNA do recipientní buňky, začíná syntéza komplementárního řetězce (červeně).



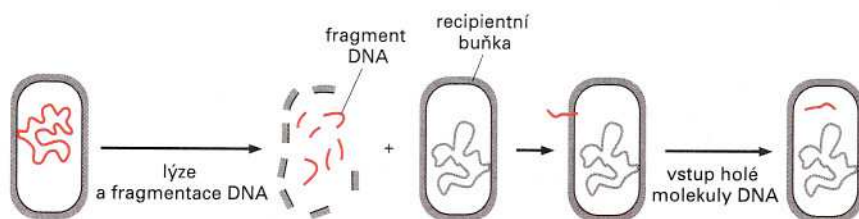


Obrázek 9-7 Přenos bakteriálních chromosomálních genů F-plasmidem. Po integraci F-plasmidu do chromosomu donorové buňky může začít přenos plasmidové DNA i přilehlé DNA bakteriálního chromosomu, a to replikačním mechanismem otáčející se kružnice, který začíná v místě na plasmidové DNA (viz obr. 9-6). Pro zjednodušení je dvouřetězcová DNA zobrazena jednoduchou čarou. Pouze výjimečně je přenesena celá kopie bakteriálního chromosomu. Konjugace je obvykle přerušena rozbitím cytoplasmatického můstku dříve, než je přenos dokončen, proto je při každé konjugaci přeneseno pouze několik bakteriálních genů.

šíří a brzy se velká část bakteriální populace stává rezistentní k těmto látkám. Dnes je známo mnoho různých plasmidů izolovaných z bakterií a ačkoliv často způsobují vážné problémy lékařům, na druhé straně poskytují vědcům velmi cenný nástroj pro výzkum. Plasmidy jsou například běžně používány v mnoha aplikacích genového inženýrství, jak si ukážeme v Kapitole 10.

Bakterie mohou přijímat DNA ze svého okolí

Ačkoliv je bakteriální konjugace patrně hlavní cestou přenosu genů u *E. coli*, u některých jiných bakteriálních druhů, jako je například půdní bakterie *Bacillus subtilis*, je upřednostňován jiný mechanismus přenosu genů, označovaný jako **transformace**. Tyto bakterie zachycují molekuly DNA přítomné v jejich okolí (DNA pocházející z jiných mrtvých a rozbitých bakterií) a transportují je přes svoji buněčnou membránu dovnitř buňky (obr. 9-8). Tato DNA je pak často rekombinací začleněna do genomu. Název „transformace“ pochází z prvních pozorování tohoto jevu, kdy se zdálo, že se jeden bakteriální kmen transformoval v jiný. Transformace jednoho bakteriálního kmene purifikovanou DNA z jiného kmene také poskytla jeden z prvních důkazů, že DNA skutečně představuje genetický materiál (viz obr. 6-3).



Obrázek 9-8 Bakteriální transformace. Některé bakterie mohou přijímat malé fragmenty DNA pocházející z mrtvých bakteriálních buněk. Když se donorová DNA nachází uvnitř buňky, může se stát částí genomu recipienta díky procesu homologní rekombinace, jak je ukázáno na obr. 9-13.

V přírodní bakteriální populaci pochází DNA pro transformaci z mrtvých bakterií, které uvolnily svůj obsah (včetně DNA) do prostředí. Nevýhodou transformace jako způsobu výměny genetického materiálu je vystavení holé DNA (DNA bez normálně navázaných chromosomálních proteinů) extracelulárnímu prostředí, které často obsahuje nukleázy a další látky poškozující DNA. Na rozdíl od transformace je DNA při bakteriální konjugaci chráněna a nikdy neopustí intracelulární prostředí.

Bakteriální transformace má velký význam pro laboratorní praxi. Pro experimentátora je velkou výhodou, že může použít tento způsob pro jakoukoliv holou DNA, ne tedy pouze pro DNA ze stejného bakteriálního druhu. *E. coli* normálně nepoužívá transformaci jako hlavní cestu genetické výměny, ale v laboratoři k tomu může být určitým způsobem přinucena. Jak uvidíme v Kapitole 10, umožňuje to vědcům jednoduše studovat DNA složitých organismů včetně člověka.

Mezi dvěma molekulami DNA s obdobnou nukleotidovou sekvencí může probíhat homologní rekombinace

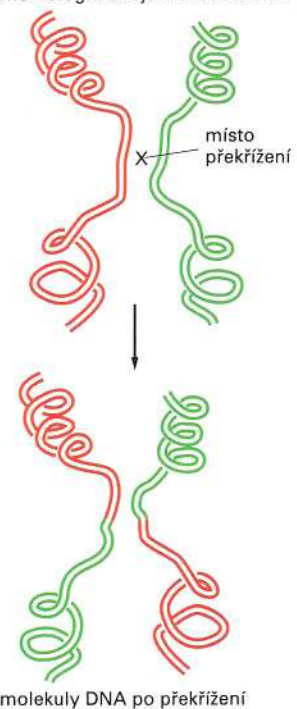
Když se do bakteriální buňky dostane nová molekula DNA – ať už díky transformaci nebo bakteriální konjugaci – může se s ní stát několik věcí. Pokud se jedná o plasmid, jako je třeba F-plasmid, může se v novém hostiteli nezávisle replikovat a může být přenášen na potomstvo při bakteriálním dělení. Pokud se nová DNA nemůže replikovat, protože postrádá replikační počátek, může být přenášena na bakteriální potomstvo pouze v případě, když se stane součástí bakteriálního chromosomu, jinak velice rychle vymizí z bakteriální populace v průběhu dělení. Nejdůležitější způsob, jakým je DNA začleněna do bakteriálního genomu, se nazývá **homologní rekombinace**.

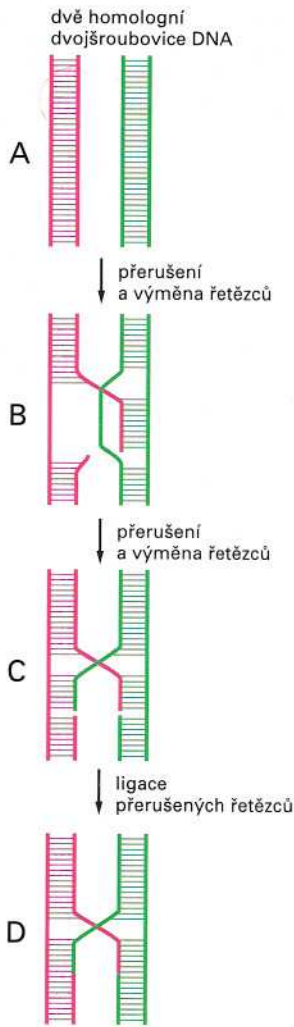
Homologní rekombinace je známa u všech organismů a může k ní docházet mezi dvěma molekulami dvojšroubovicové DNA, které mají oblasti s podobnou nukleotidovou sekvencí. Ačkoliv není mechanismus homologní rekombinace ještě zcela prostudován, následující rysy popsané u bakterií jsou patrně společné pro všechny homologní rekombinace:

1. Dvě molekuly dvojšroubovicové DNA, které mají úseky s velmi podobnou (homologní) sekvencí, se uspořádají tak, že se tyto homologní oblasti dostanou k sobě. Potom se mohou oba řetězce překřížit (crossing-over). Při této složité reakci jsou oba řetězce přerušeny a volné konce jsou znovu spojeny s konci druhé molekuly. Jsou tak opět vytvořeny dvě dvojšroubovice, z nichž každá je tvořena úseky z obou původních molekul DNA (obr. 9-9).
2. Místo, kde dojde k výměně (tam, kde se červená dvojšroubovice spojuje se zelenou na obr. 9-9), se může nalézat kdekoli v homologní oblasti obou molekul DNA, které se účastní rekombinace.

Obrázek 9-9 Homologní rekombinace. Překřížením (crossing-overem), rozštěpením a znovuspojením dvou homologních dvojšroubovic DNA jsou opět vytvořeny dvě molekuly DNA. Přestože musí mít obě původní molekuly DNA obdobnou nukleotidovou sekvenci, aby se mohly překřížit, sekvence nemusí být zcela identické. Tak se rekombinací mohou vytvářet molekuly DNA s novou nukleotidovou sekvencí.

dvě homologní dvojšroubovice DNA





Obrázek 9-10 Tvorba Hollidayovy struktury při homologní rekombinaci. (A) Dvě molekuly DNA s obdobnou nukleotidovou sekvencí se uspořádají vedle sebe. (B) Jeden z řetězců je přerušen a páruje se s komplementárním vláknem druhé dvojšroubovice DNA. (C) Vytěsněné vlákno je přerušeno a páruje se opět s komplementárním vláknem druhého helixu, takže dojde k překřížení obou vláken. (D) Zlomy jsou spojeny DNA-ligázou a je tak vytvořena struktura ze dvou překřížených a dvou nepřekřížených vláken. Existuje několik cest, kterými může dojít k vytvoření Hollidayova meziproduktu. Na obrázku je naznačena pouze jedna.

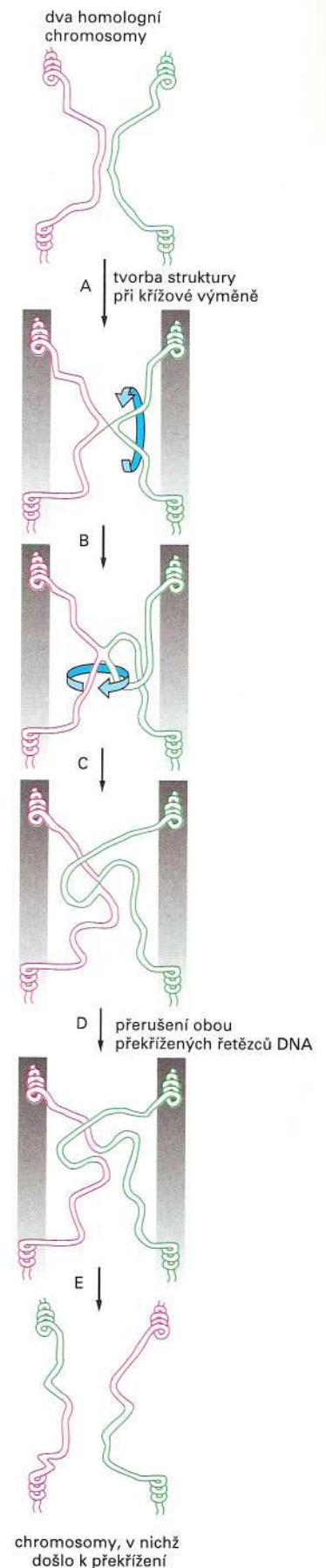
dvě molekuly DNA spojené křížovou výměnou řetězců

Obrázek 9-11 Rotace bodu překřížení. V části A je vytvořen bod překřížení, jak je popsáno na obr. 9-10. Pokud by nedošlo k rotaci (také nazývané izomerizace), rozštěpením obou řetězců by došlo k ukončení výměny řetězců a rekombinace by nenastala. Pokud dojde k rotaci (části B a C), rozštěpením překřížených řetězců se vytvoří dvě molekuly DNA, které si vyměnily kusy sekvencí (části D a E).

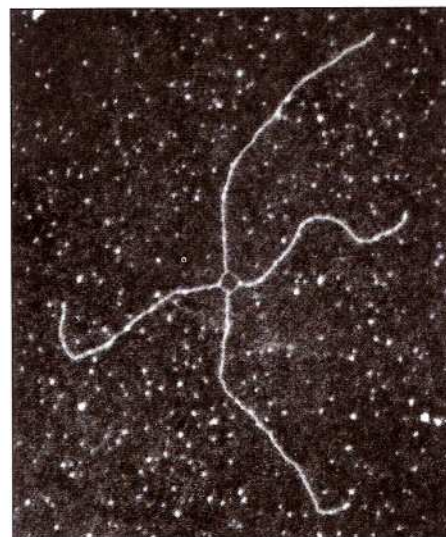
3. V místě výměny nedochází k žádným změnám v nukleotidové sekvenci, rozštěpení a znovuspojení probíhá velice přesně – není ztracen ani přidán jediný nukleotid.

Homologní rekombinace je zahájena rozštěpením jednoho řetězce DNA u jedné z dvojšroubovic. Rozštěpený řetězec se odvíjí z dvojšroubovice a včleňuje se do druhé molekuly DNA, která se také lokálně rozvíjí. Tak je umožněno, že se invadující řetězec může párovat s komplementárním vláknem (obr. 9-10B). To je první krok při crossing-overu. U vytěsněného vlákna dojde ke zlomu a překřížení, při kterém se vlákno páruje s komplementárním řetězcem druhé molekuly DNA (obr. 9-10C). Přerušení v řetězcích DNA jsou pak spojena tak, že jsou obě molekuly DNA fyzicky drženy překřížením jedním ze svých řetězců (obr. 9-10D). Tento důležitý krok při homologní rekombinaci se označuje jako *mezivláknová výměna* nebo *Hollidayův spoj*.

Aby mohlo dojít k oddělení obou separátních molekul DNA, musí se rozštěpit překřížené řetězce. Pokud by však byly rozštěpeny ve stavu ukázaném na obr. 9-10D, uvolněné molekuly DNA by se při-



Obrázek 9-12 Hollidayova struktura na snímku z elektronového mikroskopu. Tento obrázek odpovídá struktuře na obr. 9-11B.

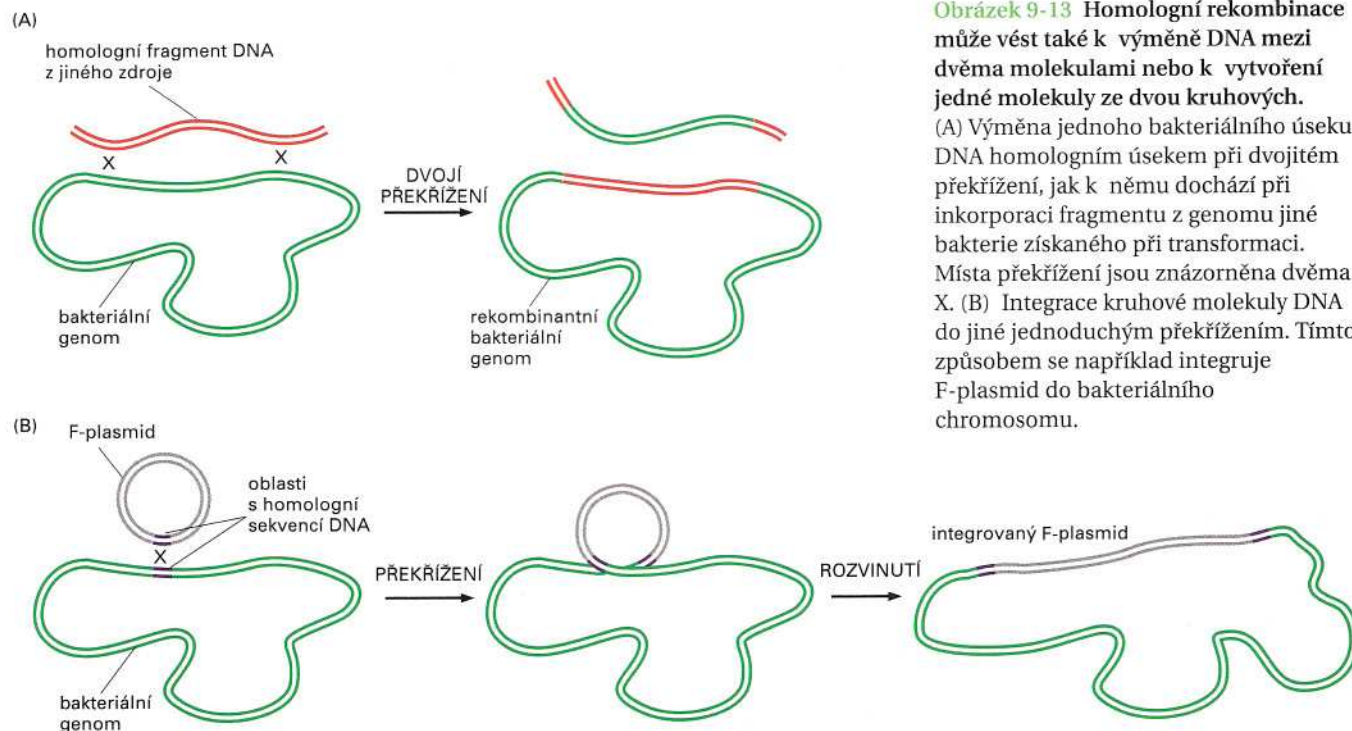


liš nelišily od původních molekul DNA. Celá struktura však může projít celou sérií různých rotačních pohybů, takže se původně nepřekřížené řetězce mohou překřížit a naopak (obr. 9-11B a C, obr. 9-12). Pokud však dojde k rozštěpení řetězců po rotaci (obr. 9-11D), je část každé z původních dvojšroubovic spojena s částí z druhé dvojšroubovice. Jinými slovy, dvě molekuly DNA se překřížily a vytvořily se tak dvě nové nukleotidové sekvence (obr. 9-11E).

Jak je ukázáno na obr. 9-13A, dvě takové výměny mohou jednoduše vést k záměně dlouhých bakteriálních úseků DNA homologními, ale ne zcela identickými fragmenty DNA z jiného zdroje. Takovýto dvojitý crossing-over může vést k trvalé inkorporaci segmentu DNA do bakteriálního genomu, ať již pochází z bakteriální konjugace (viz obr. 9-7) nebo je získán transformací (viz obr. 9-8).

Integrace F-plasmidu do bakteriálního chromosomu (viz obr. 9-7) také probíhá mechanismem homologní rekombinace. F-plasmid obsahuje krátké úseky DNA, které jsou sekvenčně velice podobné úsekům na bakteriálním chromosomu. Homologní rekombinace v jednom takovém místě postačuje k tomu, aby se cirkulární F-plasmid integroval do kruhového bakteriálního chromosomu (viz obr. 9-13B).

Celý proces homologní rekombinace vyžaduje speciální proteiny na rozštěpení DNA, proteiny zajišťující výměnu řetězců a rozštěpení Hollidayova spoje. Přestože jsou tyto rekombinační enzymy dobře charakterizovány u bakterií, u eukaryotních buněk stojíme teprve na začátku jejich poznání.

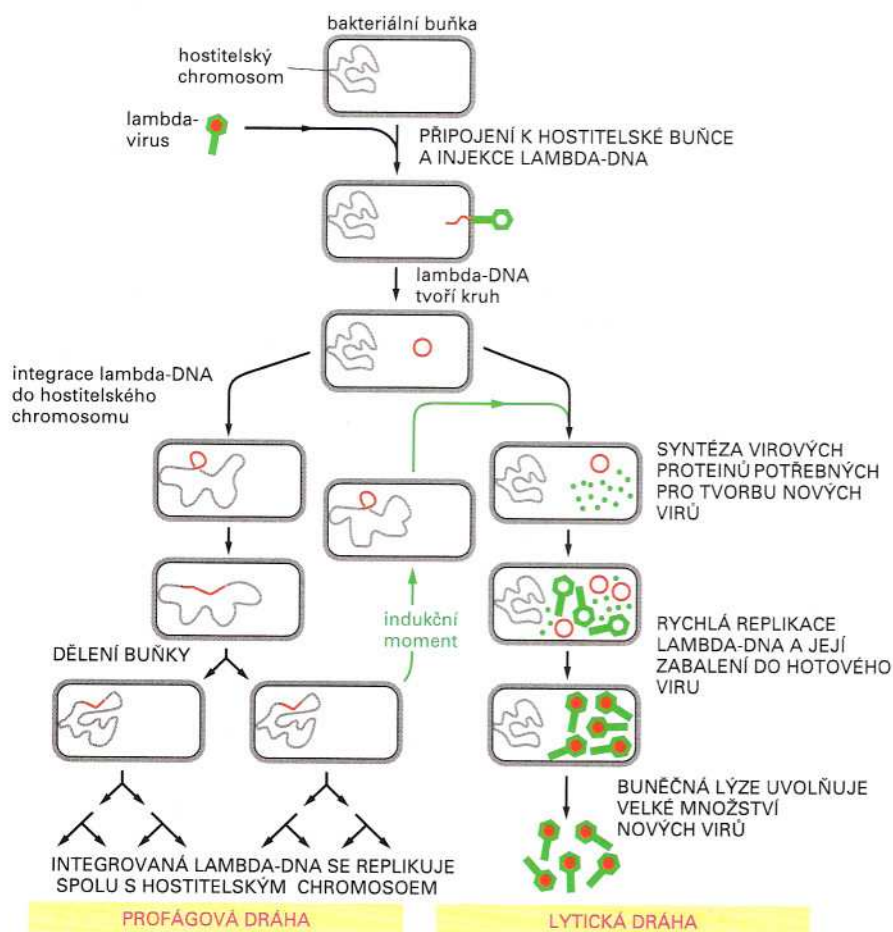
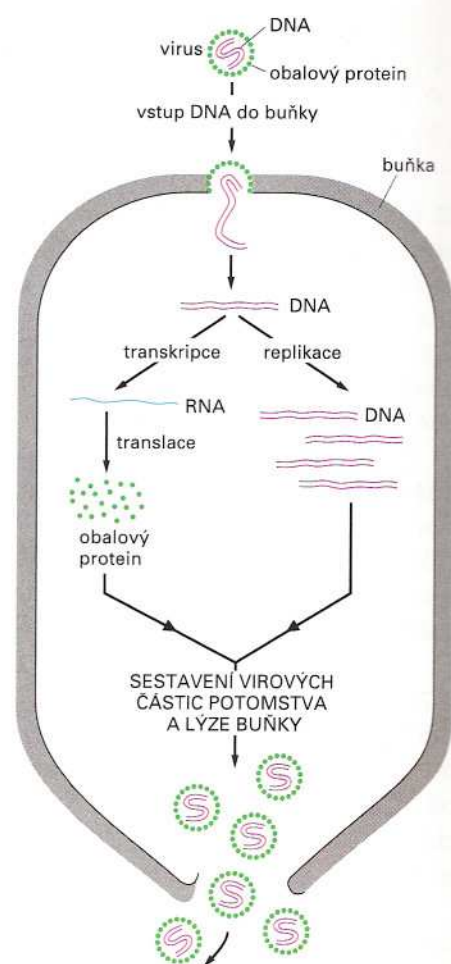


Obrázek 9-13 Homologní rekombinace může vést také k výměně DNA mezi dvěma molekulami nebo k vytvoření jedné molekuly ze dvou kruhových. (A) Výměna jednoho bakteriálního úseku DNA homologním úsekem při dvojitém překřížení, jak k němu dochází při inkorporaci fragmentu z genomu jiné bakterie získaného při transformaci. Místa překřížení jsou znázorněna dvěma X. (B) Integrace kruhové molekuly DNA do jiného jednoduchým překřížením. Tímto způsobem se například integruje F-plasmid do bakteriálního chromosomu.

Obrázek 9-14 Životní cyklus hypotetického viru. Pro ilustraci je nakreslen jednoduchý virus, který obsahuje malou dvouřetězcovou molekulu DNA, která kóduje jeden typ virového obalového proteinu. Žádný známý virus není tak jednoduchý. Aby mohlo dojít k replikaci, musí virus vstoupit do buňky. Pak následuje mnohonásobná replikace virové DNA a zároveň jsou některé molekuly DNA přepisovány do RNA a překládány na obalové proteiny. Nové virové částice se vytvářejí spontánním uspořádáním obalových proteinů a DNA do typického tvaru.

Bakteriální viry mohou přenášet geny mezi bakteriemi

Třetí cesta přenosu genů mezi bakteriemi probíhá pomocí virů. Později se v této kapitole budeme zabývat viry, které infikují savčí buňky. Zde se zaměříme na viry, jež napadají bakteriální buňky – bakteriofágy. Bakteriofágy se množí uvnitř bakteriálních buněk a podrobují si buněčný biochemický aparát, který využívají pro tvorbu nových kopií svého genomu a k syntéze proteinů virového obalu (obr. 9-14). Reprodukce virů je většinou pro napadené buňky letální. Výsledkem infekce je rozpad buněk (lýze) a uvolnění virového potomstva do okolí, kde může infikovat sousední buňky. Existují však i bakteriofágy, které se po vstupu do buňky nemnoží a neprodukuje velké množství virových částic. Tyto bakteriofágy místo toho vstupují do latentní fáze, při které je jejich genom sice v buňce přítomen, ale v inaktivním stavu, takže nedochází k tvorbě virového potomstva.

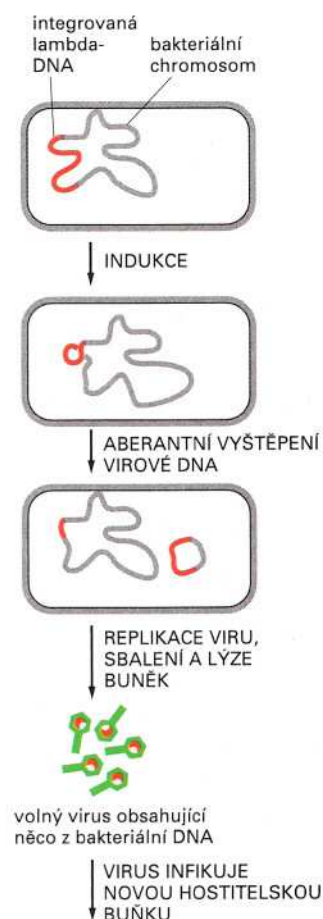


Obrázek 9-15 Životní cyklus bakteriofága lambda. Genom bakteriofága lambda je tvořen lineární dvouřetězcovou DNA dlouhou přibližně 50 000 nukleotidů, která kóduje zhruba 50-60 různých proteinů. Když DNA λ -fága vstoupí do buňky, její konce se spojí a vzniká jedna kruhová molekula. Bakteriofág se může v *E. coli* množit buď lyticky, kdy dochází k destrukci buňky, nebo může vstoupit do latentního stavu jako profág (po integraci do hostitelského genomu). Pokud dojde k poškození buňky, která nese profága, dojde k jeho aktivaci, uvolnění z chromosomu a je nastartována lytická fáze (zelené šipky). Integrace a uvolnění DNA-fága z bakteriálního chromosomu probíhá místně specifickou rekombinací.

Nejlépe prostudovaným příkladem takového viru je bakteriofág lambda (λ), jehož genom tvoří malá dvouřetězcová molekula DNA. Když λ -bakteriofág infikuje buňky *E. coli*, může dojít k pomnožení a tvorbě několika set nových virů, které jsou z bakterií uvolněny při lýzi. Tento proces se nazývá *lytická infekce*. Vzácněji se DNA lambdy integruje do cirkulárního chromosomu hostitelské bakterie (obr. 9-15). Integrovaná DNA lambdy se označuje jako *profág* a je přítomna v bakteriálním chromosomu, aniž by se jakýmkoliv způsobem projevovала na bakteriálním fenotypu. Infikovaná bakterie se normálně dělí a přenáší tak DNA lambdy na své potomstvo. V takovémto případě je genom lambdy mnohokrát replikován bez jakéhokoliv poškození hostitelské buňky. V případě negativního vlivu prostředí, jako je třeba vystavení buněk ultrafialovému záření, je genom lambdy aktivován a opouští hostitelský chromosom. Tím také začíná lytická fáze virové replikace. Integrovaná virová DNA tedy nemusí zahynout s poškozenou hostitelskou buňkou, ale má šanci uniknout v podobě virových částic.

Genom lambdy neobsahuje žádné rozsáhlé oblasti podobné genomové bakteriální sekvenci, a tak se nemůže integrovat do chromosomu homologní rekombinací, ale místo toho využívá mechanismus **místně specifické rekombinace**. Pro tento účel si virus kóduje speciální rekombinační enzym, který se nazývá *integráza*. Tento enzym rozeznává jednak specifickou sekvenci v bakteriálním chromosomu, jednak určitou sekvenci ve svém virovém genomu. Přibližuje tyto sekvence k sobě a poté katalyzuje rozštěpení obou DNA a jejich opětovné spojení tak, že je virový genom integrován do bakteriálního chromosomu. Při vyštěpení DNA lambdy z bakteriálního chromosomu probíhá celá reakce obráceně.

Při excizi z hostitelského chromosomu je občas DNA lambdy vystřižena nepřesně a místo části své vlastní DNA nese kus přilehlé chromosomální DNA. Tato bakteriální DNA bude zabalena do virových částic společně s DNA lambdy (obr. 9-16). Pokud takový modifikovaný lambda virus infikuje novou bakterii, kromě své vlastní DNA vnáší do buňky i DNA odvozenou od předcházejícího hostitele. Tato bakteriální DNA se může stát součástí nového hostitelského chromosomu jedním z několika možných způsobů. Pokud se vstupující virus integruje do hostitelského chromosomu, přenášená DNA se přirozeně stane součástí bakteriálního chromosomu společně s virovým genomem. V případě, že vstupující virus nepoškozuje buňku, může se přenášená bakteriální DNA stát trvalou součástí hostitelského chromosomu homologní rekombinací, jak je ukázáno na obr. 9-13A. Tento proces se nazývá **transdukce** a představuje další způsob, jak mohou být geny přenášeny z jedné bakterie do druhé. Jak uvidíme později, také některé viry napadající savčí buňky mohou přenášet chromosomální geny mechanismem transdukce.

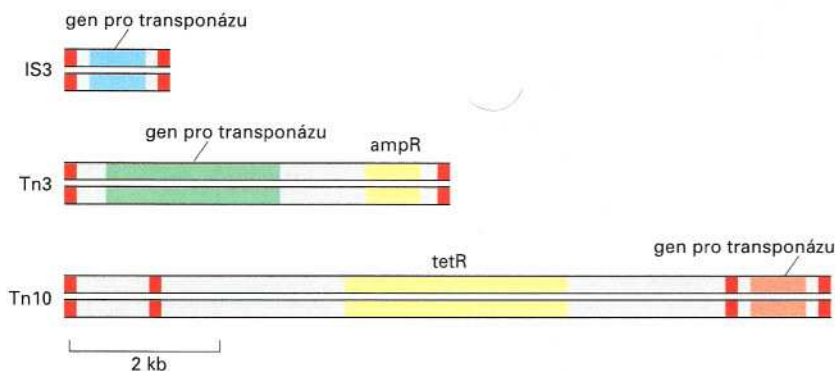


Obrázek 9-16 Přenos DNA z jedné bakterie do druhé transdukcí. Při excizi DNA λ -fága z bakteriálního chromosomu dochází občas k jejímu nepřesnému vystřižení a místo části virového genomu je do virových částic zabalena i část hostitelské DNA, která se nachází v blízkosti místa integrace. Když takové viry infikují novou buňku, mohou ji buď lyzovat, nebo do ni vnést DNA z původní bakterie v případě, že virus buňku nepoškozuje. Nově vnesená DNA se může stát součástí hostitelského chromosomu buď integrací spolu s virovým genomem nebo homologní rekombinací.

Otázka 9-3 Když se vytváří profág, bakteriofág lambda se vždy integruje do stejného místa v bakteriálním chromosomu. Jak tato skutečnost ovlivňuje spektrum bakteriálních genů, které mohou být zabaleny do virových částic (viz obr. 9-16)?

Transponovatelné elementy vytvářejí genetickou rozmanitost

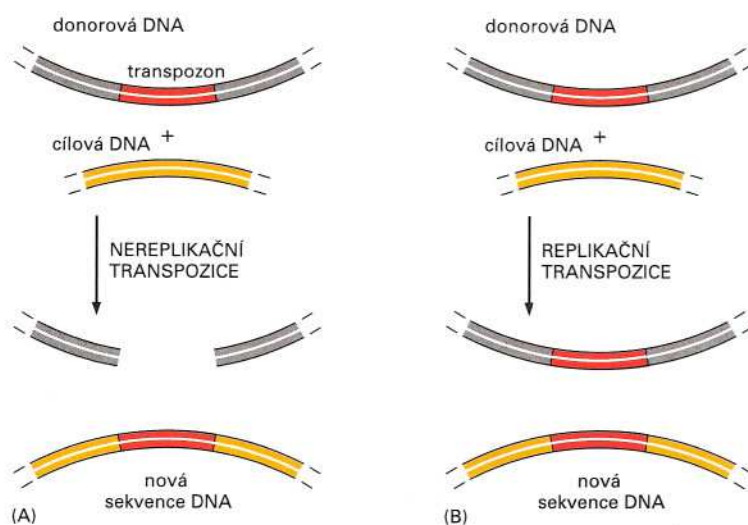
Mnoho bakteriálních genomů obsahuje úseky DNA nazývané **transponovatelné elementy** (nebo transpozony), které se mohou **transpozicí** přemisťovat v rámci genomu z jednoho místa na druhé, a jsou tak důležitým zdrojem genetické rozmanitosti. Jejich velikost



Obrázek 9-17 Ukázka tří typů z mnoha známých transpozonů nalezených u bakterií. Každý transpozon obsahuje gen kódující transponázu. Tento enzym způsobuje přerušení a znovuspojení DNA - nezbytné reakce pro přesun transpozonu. Každý transpozon také nese sekvence DNA (označené červeně), které jsou rozeznávány transponázou kódovanou daným elementem, i tyto sekvence jsou pro přesun transpozonu nezbytné. Navíc některé transpozony nesou geny, které kódují enzymy inaktivující antibiotika jako je ampicilin (ampR) nebo tetracyklin (tetR). U Tn10 se předpokládá, že vznikl náhodně připojením dvou krátkých transpozonů na každou stranu genu pro tetracyklinovou rezistenci.

se pohybuje od několika stovek po desítky tisíc párů bází (obr. 9-17). Běžný laboratorní kmen *E. coli* obsahuje 10-20 různých transpozonů na buňku, mnohé z nich ve více kopiích na genom. Transpozony se v rámci hostitelské DNA pohybují díky speciálním rekombinačním enzymům (*transponázám*) kódovaným transponovatelnými elementy (obr. 9-18), a tak můžeme tyto elementy považovat za malé parazity skryté v chromosomech buněk. Přesto však tyto mobilní elementy poskytují bakteriím množství výhod. Některé z nich například obsahují transkripční promotory a když se přemístí do blízkosti genu, mohou způsobit odlišnou úroveň jeho exprese nebo navodit expresi v jiných podmínkách, než je tomu obvykle.

Transpozony přítomné v mnoha kopiích také umožňují přeuspořádání bakteriálního genomu při homologní rekombinaci mezi transpozony. Tak například k integraci F-plasmidu do genomu *E. coli* dochází díky homologní rekombinaci mezi transpozony umístěnými na F-plasmidu a v genomové DNA. A konečně některé transpozony také obsahují geny pro rezistenci vůči různým antibiotikům (viz obr. 9-17). Transpozony se mohou přemístit z bakteriálního genomu do plasmidu a ten může být následně přenesen konjugací do další bakterie. Toto je patrně hlavní způsob vzniku plasmidů nesoucích odolnost proti lékům u mnoha klinicky důležitých bakterií. Mobilní genetické elementy existují také u eukaryontních organismů (ve skutečnosti byly objeveny u kukuřice v padesátých letech tohoto století) a budou probírány později v této kapitole.



Obrázek 9-18 Dva mechanismy, kterými se přemísťují bakteriální transpozony.

Donorová a cílová DNA může být součástí stejné molekuly (např. bakteriální genom), nebo se může jednat o odlišné molekuly (např. bakteriální genom a plasmid). (A) Při nereplikační transpozici je transpozon vystřížen z donorové DNA a včleněn do cílové DNA, donorová molekula zůstává rozštěpená. (Donorová DNA může být opravena různými způsoby, často však při reparaci dochází k delecím nebo k přeskupení donorové molekuly.) (B) V případě replikační transpozice je transpozon zkopírován replikací DNA. Konečnými produkty jsou nezměněná donorová molekula a cílová molekula s vloženým transpozonem. Obecně platí, že se určitý typ transpozonu přemísťuje pouze jedním z uvedených mechanismů. Přestože oba mechanismy mají mnoho společných rysů, pouze několik transpozonů může využívat oba dva způsoby transpozice.

Ačkoliv je bakteriální DNA kopírována a přenášena s vysokou přesností na další generaci, nachází se genom bakterií ve stavu neustálé pomalé proměny. Akumulují se mutace, geny jsou přenášeny z jedné bakterie do druhé, virové genomy se přemísťují dovnitř a ven z buňky a transponovatelné elementy mění svou pozici. Většina změn je pro bakterii škodlivých a tyto bakterie jsou rychle z populace eliminovány. Když však se bakterie dostávají z jednoho prostředí do druhého, jsou vystaveny novým selekčním tlakům. Pak jsou tyto zdroje genetické rozmanitosti důležité pro vznik lépe adaptovaných jedinců, kteří se mohou stát v populaci dominantními. Tento proces má dalekosáhlé následky v medicíně, neboť umožňuje bakteriím způsobujícím choroby stát se rezistentními na mnohá antibiotika vyvinutá v průběhu dvacátého století.

Je jasné, že genetická adaptabilita je základní vlastností bakterií a je třeba s ní počítat při navrhování nových strategií pro léčbu infekčních chorob. V následující části této kapitoly se zaměříme na eukaryontní buňky a zjistíme, že i u nich lze najít mnoho stejných mechanismů vytváření genetické rozmanitosti a že tyto mechanismy mají zásadní vliv na evoluci všeho živého na naší planetě.

Zdroje genetických změn v eukaryontních genomech

Ukázali jsme si, že se prokaryota a eukaryota shodují v mnoha genetických znacích – používání stejného genetického kódu, stejných základních mechanismů transkripce a translace a používání stejných základních strategií DNA replikace a reparace. V této kapitole si ukážeme, jak uspořádání genetické informace v eukaryontním genomu přispívá ke genetické rozmanitosti eukaryontních organismů.

Jak již bylo krátce řečeno v Kapitole 7, bakteriální genom je ve srovnání s eukaryontním velice úsporně uspořádán. Na bakteriálním chromosomu leží geny blízko sebe s relativně krátkými mezi-genovými sekvencemi a introny jsou velice vzácné. Naproti tomu typický savčí genom obsahuje velké množství na první pohled nedůležité DNA, která tvoří introny (viz Kapitola 7) a mnoho další DNA, která se nachází mezi geny (mezerníky). Velká část této mezerníkové DNA je tvořena různými typy repetitivních sekvencí DNA, které mají podobné vlastnosti jako bakteriální transpozony probírané dříve. Ačkoliv se zdá, že žádná z těchto DNA nekóduje pro organismus nic přínosného, jejich přítomnost má dalekosáhlé důsledky, jak se o tom dále přesvědčíme. Proč se tato DNA udržela v savčím genomu? Bakterie a jednoduché jednobuněčné eukaryontní organismy (jako například kvasinka) jsou obvykle pod silným selekčním tlakem a snaží se proto dělit tak rychle, jak to jen umožňují nutriční podmínky prostředí. Proto je pro ně velmi výhodné minimalizovat nadbytečnou DNA, protože replikace DNA je energeticky i materiálově náročná. U větších buněk, zvláště pokud jsou součástí mnohobuněčného organismu, dochází k buněčnému dělení méně často a živiny většinou nejsou limitujícím faktorem. Proto také selekční tlak na eliminaci nedůležité DNA není tak veliký. To je považováno

za jeden z důvodů, proč mohlo dojít u vyšších eukaryot k akumulaci takovýchto sekvencí v genomu.

Další odlišností eukaryontních genomů od bakteriálních je přítomnost velkého množství *genových duplikací*, které vznikly v průběhu evoluce. To vedlo k vytvoření mnoha velkých rodin příbuzných genů. V savčím haploidním genomu (tj. pouze v jedné sadě chromosomů daného jedince) existuje pro většinu proteinů více genů a každý gen kóduje poněkud odlišnou variantu proteinu; některé geny kódují méně příbuzné proteiny, které mohou mít i odlišnou funkci.

A konečně buňky eukaryontních organismů jsou diploidní (kromě pohlavních buněk), což znamená, že s výjimkou genů umístěných na pohlavních chromosomech jsou v buňce přítomny dvě kopie každého genu. Tyto kopie nemusí být stejné. Principiálně to znamená, že lidé mohou mít dvě alternativní formy (**alely**) téhož genu. Tak například lidé, kteří mají jeden normální gen pro β -globin a druhý pro β -globin srpkových buněk jsou odolnější proti malárii, než lidé se dvěma normálními β -globinovými alelami. „Genová zásobárna“ (genofond) – sbírka všech alel každého genu přítomných u daného druhu jako celku – je v lidské populaci opravdu rozsáhlá.

Většina historie genetických změn je v genomech dnešních organismů zaznamenána a při pečlivém studiu jejich DNA sekvencí může být rozluštna. Stovky milionů nukleotidů z různých organismů již byly sekvenovány a nyní začínáme poznávat, jak se jednotlivé geny a celé genomy vyvinuly v průběhu dvou miliard let od doby, kdy se na Zemi objevila první eukaryontní buňka. Příležitostné změny, které se odehrávají v dnešních chromosomech, poskytují další vodítko k pochopení mechanismů, které vytvářely evoluční změny v minulosti.

V této části se zaměříme na mechanismy způsobující genetické změny u mnohobuněčných eukaryot, v jejichž rozsáhlých a komplexních genomech jsou zaznamenány minulé události. U pohlavně se rozmnožujících organismů, jako jsme my, se změny, které budeme probírat, objevují u všech diploidních buněk včetně somatických buněk těla. Ale pouze změny, které se odehrají v diploidních prekursorech pohlavních buněk, mohou být děděny a přeneseny na další generaci.

Náhodnými duplikacemi DNA vznikají rodiny příbuzných genů

Jak jsme se již zmínili, eukaryontní genomy obsahují mnoho rodin příbuzných genů. Tak například různé formy aktinu, který je součástí kontraktálního aparátu svalové buňky a také cytoskeletu (viz Kapitola 16), jsou exprimovány v různých typech svalových a nesvalových buněk; různé opsiny, proteiny schopné detegovat světlo o různých vlnových délkách, jsou exprimovány v různých buňkách sítnice; odlišné kolagenové geny jsou exprimovány v odlišných pojivových tkáních atd.

Jednou z nejlépe prostudovaných *genových rodin* je β -globinová rodina genů. V lidském genomu je obsaženo celkem pět β -globinových genů. Tyto geny kódují β -podjednotku různých hemoglobinů syntetizovaných v různých obdobích embryonálního, fetálního a dospělého věku. Tyto hemoglobiny se nepatrně liší ve své

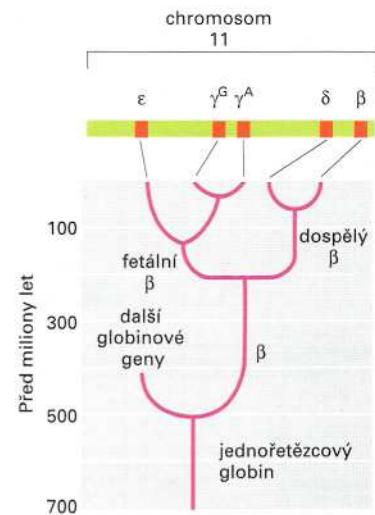
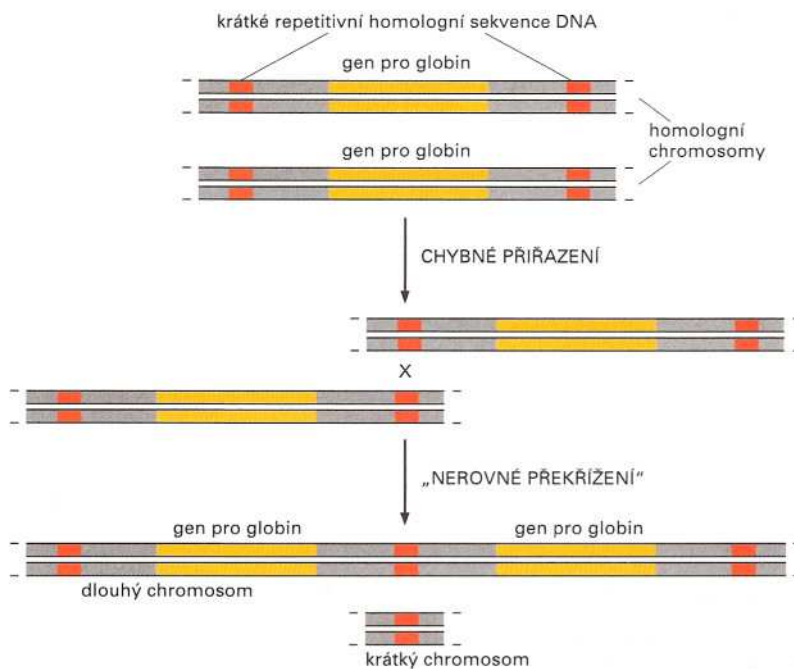
Obrázek 9-19 Evoluce β -globinové rodiny genů u živočichů. Původní gen β -globinu byl duplikován a postupně vznikala vyobrazená rodina β -globinových genů, stejně jako ostatní β -globinové geny (β -globinová rodina). (Molekuly hemoglobinu jsou tvořeny ze dvou α - a dvou β -řetězců.) Schéma bylo vypracováno na základě porovnávání β -globinových genů u mnoha různých organismů. Tak například nukleotidové sekvence γ^G a γ^A genů (exprimovány v embryonálním vývoji) jsou si vzájemně mnohem podobnější, než při porovnání s β -genem, exprimovaným v dospělosti.

schopnosti vázat a uvolňovat kyslík a nejlépe se uplatňují právě v takovém stadiu vývoje, ve kterém jsou exprimovány. Exprese všech těchto genů je nezávisle regulována tak, že určitý hemoglobin je exprimován pouze ve vyhrazeném období vývoje a pouze v buňkách, které dávají vznik červeným krvinkám.

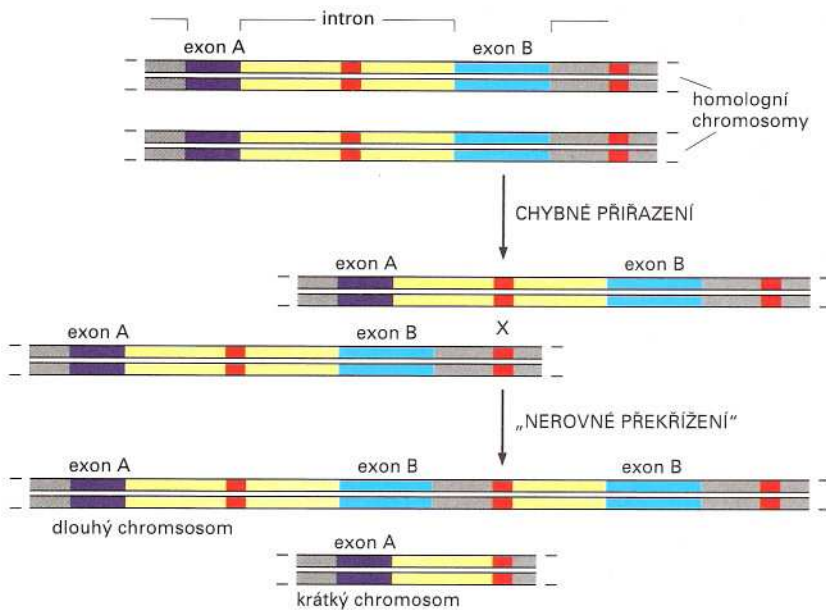
Porovnáním sekvencí β -globinových genů a jejich uspořádání u různých organismů bylo možno velmi podrobně rekonstruovat evoluci této genové rodiny. Tato genová rodina se vytvořila opakovanými genovými duplikacemi a následnými mutacemi původního genu u prapředka obratlovců (obr. 9-19). A jak k takovým duplikacím dochází? Předpokládá se, že se jedná o výsledek vzácné rekombinace mezi dvěma homologními chromosomy, která vede k inkorporaci jedné kopie genu navíc do jednoho z chromosomů (obr. 9-20). Pokud je již gen duplikován, následnými homologními rekombinacemi se mohou odstraňovat nebo vytvářet další kopie genu.

Geny kódující nové proteiny mohou být vytvořeny rekombinací exonů

V průběhu evoluce byly nové geny vytvořeny také díky duplikaci krátkých úseků DNA, které kódovaly proteinovou doménu. Mnoho eukaryotních proteinů je tvořeno řadou opakujících se podobných a ohraničených jednotek s určitou proteinovou strukturou nebo proteinovými doménami. Mezi takové proteiny patří například imunoglobuliny (obr. 5-25), albuminy a řada filamentár-



Obrázek 9-20 K duplikaci genů dochází nerovným překřížením. U páru homologních chromosomů v zárodečné linii prekursorových buněk dochází k rekombinaci v červeně označených krátkých sekvencích, které se opakují na obou chromosomech. V některých případech se předpokládá, že se jedná o transpozony, které jsou v lidském genomu přítomny ve velkém počtu kopií. Po nerovném překřížení obsahuje delší chromosom dvě kopie globinového genu. Nezávislé mutace v každém z genů, které se objevují v následujících generacích, vedou k rozrůznění (diverzifikaci) těchto genů. (Protože kratší chromosom postrádá kopii globinového genu, jedinci, kteří tento chromosom zdědí, budou patrně z populace eliminováni.)

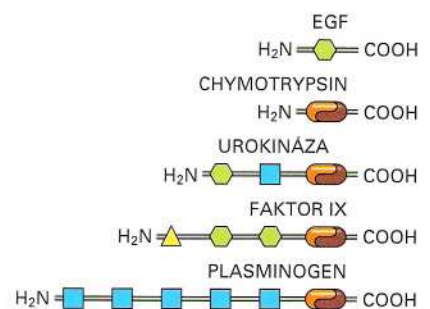


Obrázek 9-21 Duplikace exonů nerovným překřížením. Uvedené schéma je téměř shodné s obr. 9-20 s tím rozdílem, že jsou duplikovány spíše exony v rámci genu než celý gen. mRNA původního genu obsahuje dva exony, A a B. Po duplikaci bude mRNA z delšího chromosomu obsahovat tři exony, A, B a B. Protože jsou po duplikaci exony znovuspojovány v oblastech intronů s neporušenými sestřihovými sekvencemi, modifikovaná nukleotidová sekvence v místě spoje může být jednoduše po transkripci vystřižena a vznikne normální funkční mRNA.

ních proteinů jako jsou třeba kolageny. Tyto proteiny jsou kódovány geny, které se vyvinuly opakovanými duplikacemi jedné původní sekvence DNA. U takovýchto genů jsou zpravidla jednotlivé proteinové domény kódovány oddělenými exony.

Předpokládá se, že evoluce nových proteinů tímto způsobem byla velmi usnadněna uspořádáním eukaryotních kódujících sekvencí, do sérií relativně krátkých exonů které jsou odděleny dlouhými nekódujícími introny (viz obr. 7-13). K duplikacím, nezbytným pro vytvoření jednoho genu s opakujícími se sekvencemi, může dojít nerovným překřížením kdekoli v oblasti dlouhých intronů na obou stranách exonu kódujícího proteinovou doménu (obr. 9-21). Pokud by zde žádné introny nebyly, v původním genu by se nacházelo jen velmi málo míst, v kterých by mohlo dojít k rekombinační výměně mezi homologními chromosomy a duplikaci domény bez jejího poškození. Proto introny velmi zvyšují pravděpodobnost, že po duplikaci DNA dojde k vytvoření genu kódujícího funkční protein.

Ze stejných důvodů přítomnost intronů výrazně zvyšuje pravděpodobnost, že se po náhodné rekombinaci vytvoří funkční hybridní gen spojením dvou původně oddělených exonů, které kódují zcela odlišné proteinové domény. Řada současných proteinů vznikla pravděpodobně takovou rekombinací, neboť jsou tvořeny mnoha různými proteinovými doménami, z nichž se mnohé vyskytují i u jiných bílkovin (obr. 9-22). Tento evoluční proces se nazývá **přeskupování exonů** (exon shuffling). Předpokládá se, že všechny proteiny kódované lidským genomem (kolem 60 000) vznikly přeskupením pouze několika tisíc odlišných exonů, z nichž každý kódoval proteinovou doménu z 30–50 aminokyselin.



Obrázek 9-22 Příklady přeskupování exonů. Každý symbol představuje odlišnou rodinu proteinových domén. Tyto domény se spojily za sebe a vytvořily tak větší proteiny, které jsou známy pod jinými jmény.

Velká část DNA mnohobuněčných eukaryot je tvořena opakujícími se nekódujícími sekvencemi

Genom mnohobuněčných eukaryot neobsahuje pouze introny, ale také na první pohled nedůležité sekvence DNA. Mnoho z nich nekóduje žádné proteiny a nejsou ani transkribovány.

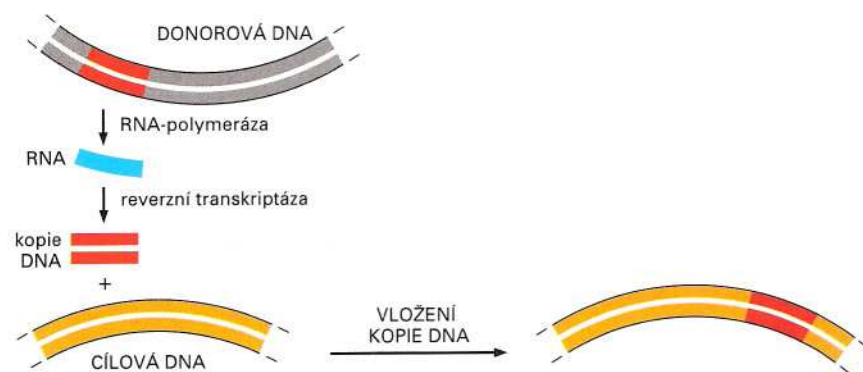
V lidském genomu je přibližně 70% celkové DNA tvořeno takzvanými jedinečnými sekvencemi DNA. Sem zahrnujeme DNA, která kóduje proteiny a většinu typů RNA a také introny. Zbývajících 30% obsahuje nukleotidové sekvence, které se v genomu mnohokrát opakují. Většina z této tzv. repetitivní DNA nekóduje proteiny a lze ji rozdělit do dvou typů. Přibližně jedna třetina je tvořena vysoce repetitivními krátkými sekvencemi, které vytvářejí série oblastí repetitivní DNA, známé jako *satelitní DNA*. Jejich funkce není zatím známa, ale jsou shluknuty převážně v oblasti centromer a na koncích chromosomů. Přesné uspořádání satelitních DNA (tj. množství různých typů a počet repetitivních v každém bloku) se velmi liší mezi jednotlivci stejného druhu.

Zbývající repetitivní sekvence DNA jsou tvořeny mnohem komplexnějšími opakovanými sekvencemi a jsou roztroušeny po celém genomu. U lidí je většina z těchto DNA odvozena od několika typů transponovatelných sekvencí DNA, které jsou podobné transpozonomům v bakteriálním genomu a které jsou mnohonásobně zmnoženy. Přestože všechny genomy doposud studovaných mnohobuněčných eukaryot obsahují transponovatelné elementy, DNA primátů a lidí je v tomto ohledu neobvyklá. V jejich genomu převažují dva typy transponovatelných elementů, které se však značně rozšířily, jak uvidíme později.

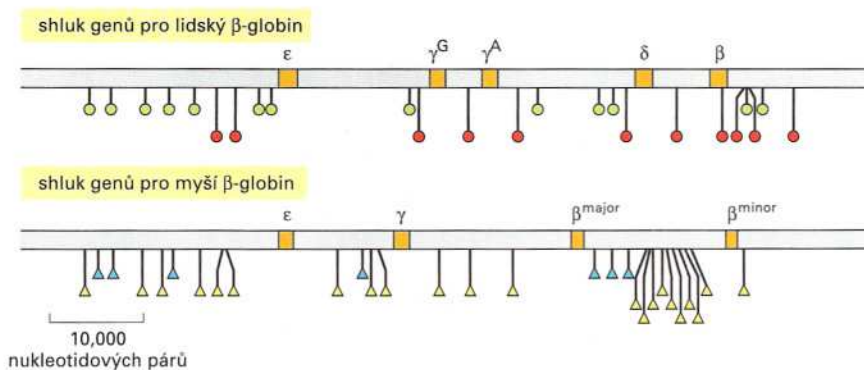
Přibližně 10 % lidského genomu je tvořeno dvěma rodinami transponovatelných sekvencí

Transponovatelné DNA elementy jsou pravděpodobně přítomny ve všech eukaryontních genomech; navíc můžeme rozlišit mnoho typů těchto elementů. Některé se pohybují z místa na místo v rámci chromosomu mechanismem vystřížení a integrace, jak bylo popsáno dříve u bakteriálních transpozonů (viz obr. 9-18A). Tímto typem transponovatelných elementů se již nebudeme zabývat. Mnoho dalších eukaryontních transpozonů se nepohybuje ve formě DNA, ale pomocí RNA intermediátů. Tyto sekvence se nazývají **retrotranspozony** a doposud byly popsány pouze u eukaryot.

Příkladem lidského retrotranspozonu je *L1-transponovatelný element* neboli *LINE-1* – často se opakující sekvence, která tvoří přibližně 4% celkové DNA lidského genomu. Při transpozici je LINE-1 DNA nejprve transkribována do RNA buněčnou RNA-polymerázou. Enzym *reverzní transkriptáza*, speciální DNA-polymeráza, která jako templátu využívá RNA, vytvoří podle RNA opět kopii DNA. Tato



Obrázek 9-23 Přemístování eukaryontních retrotranspozonů. Tyto transponovatelné elementy jsou nejprve přepsány do meziproductu v podobě RNA a posléze zpět do DNA. DNA-kopie se potom znovu integruje do cílového místa. Cílové místo může být na stejné nebo jiné molekule DNA. Protože tento mechanismus je podobný mechanismu replikace jedné třídy virů, které se označují jako retroviry (obr. 9-30), nazývají se tyto transponovatelné elementy retrotranspozony.



Obrázek 9-24 Porovnání lokalizace transponovatelných elementů v β-globinovém shluku genů u myši a člověka. Tento úsek lidského genomu obsahuje pět funkčních β-globinu podobných genů (viz obr. 9-19), zatímco stejná oblast myšičího genomu obsahuje pouze čtyři geny. Pozice lidských Alu-sekvencí je vyznačena zelenými kroužky a lidských L1 elementů červenými kroužky. Myšičí genom obsahuje odlišné transponovatelné elementy: pozice B1 elementů (obdoba lidských Alu-sekvencí) je vyznačena modrými trojúhelníčky a poloha myšičích L1 elementů (obdoba lidských L1) žlutými trojúhelníčky. Protože jsou sekvence transponovatelných elementů i jejich pozice ve skupině β-globinových genů u myši a člověka různé, usuzujeme z toho, že k jejich akumulaci v savčích genomech došlo relativně nedávno v evoluční historii.

reverzní transkriptáza je kódována LINE-1. Kopie DNA se potom může integrovat do dalšího místa v genomu (obr. 9-23). Ještě v mnohem větším množství se v genomu vyskytují *Alu-sekvence*, které jsou velmi krátké (kolem 300 nukleotidů); jsou přítomny v 500 000 kopiích na haploidní genom a představují tak 5% lidské DNA. V průměru se tedy vyskytuje jedna kopie na 5 000 nukleotidů. Pouze některé z *Alu-sekvencí* mohou být ještě i dnes přepisovány do RNA. Tato RNA může být za vzácných okolností zkopírována zpět do DNA použitím nějaké reverzní transkriptázy.

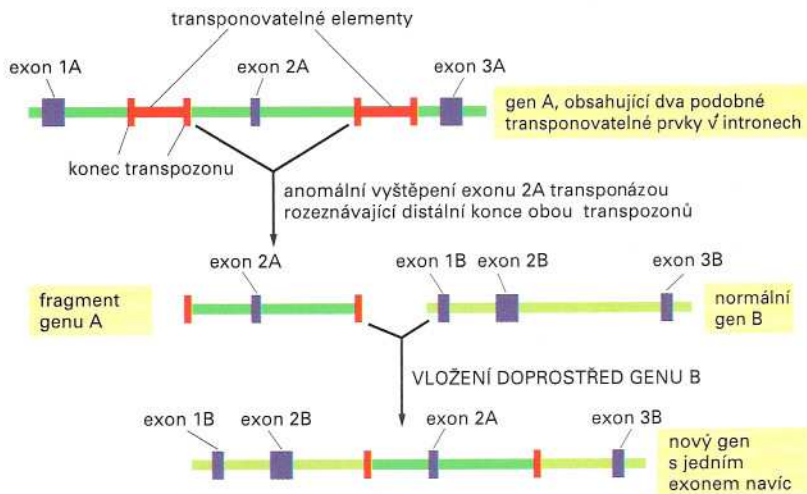
Porovnáním sekvence a umístění L1 a *Alu*-podobných elementů u různých savců vědci dospěli k závěru, že u primátů došlo k vysokému zmnožení těchto sekvencí teprve nedávno v evoluci (obr. 9-24). Je těžké si představit, že takovéto velmi početné sekvence rozmístěné na různých místech genomu nemají žádný větší efekt na sousední geny. Za kolik našich jedinečných lidských vlastností vděčíme těmto parazitickým elementům?

Evoluce genomů byla urychlena transponovatelnými elementy

Transponovatelné elementy a zejména ty, které se vyskytují v genomu v mnoha kopiích, poskytují příležitost k reorganizaci genomu, protože mohou sloužit jako cílová místa pro homologní rekombinaci. Tímto způsobem se například vysvětluje vznik shluku β-globinových genů, kdy k duplikacím jediného původního genu pravděpodobně došlo homologními rekombinacemi mezi *Alu*-podobnými sekvencemi (označeny červeně na obr. 9-20). Přesto mají transpozony v evoluci genomů mnohem bezprostřednější úlohu. Při svém přemísťování transponovatelné elementy také příležitostně přesunují nebo reorganizují okolní sekvence DNA hostitelského genomu. Když se například dva transponovatelné elementy, které jsou rozeznávány stejnou transponázou, začlení dostatečně blízko sebe, může být přenesena na jiné místo v genomu také DNA nacházející se mezi nimi (viz příklad u bakterií na obr. 9-17). U eukaryontních genomů je to zvláště účinný způsob přesunu exonů (další příklad přeskupování exonů), kterým vznikají nové geny reorganizací existujících exonů (obr. 9-25).

Začlenění transponovatelného elementu do kódující sekvence genu nebo do jeho regulační oblasti je poměrně častou příčinou spontánních mutací u některých organismů. Pokud se transpozony integrují přímo do kódující sekvence, mohou gen poškodit a způsobit

Otázka 9-4 Mnoho transponovatelných elementů se pohybuje v genomu replikativním mechanismem, jak bylo ukázáno na obr. 9-18A a 9-23, a tak se po každé transpozici zvyšuje jejich množství v genomu. Přestože jsou tyto transpozice vzácné, některé elementy se vyskytují v genomu ve velkém počtu kopií. Co podle vás zabraňuje transponovatelným elementům, aby se ve svém hostitelském genomu přemnožily?



Obrázek 9-25 Příklad přeskupování exonů způsobeného transponovatelnými elementy. Když se do chromosomu integrují dva transponovatelné elementy stejného typu (červená DNA) dostatečně blízko sebe, při transpozici může příležitostně dojít k využití konců dvou odlišných elementů (namísto konců stejného elementu) a k přesunu chromosomální DNA mezi nimi na nové místo v chromosomu. Protože jsou introny v porovnání s exony velké, je častým výsledkem transpozice zobrazené začlenění exonu do již existujícího intronu.

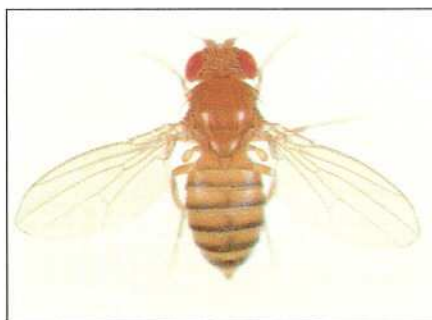
bit tak inserční mutaci, která znemožní genu kódovat funkční protein. Příkladem mohou být mutace v genu pro faktor VIII způsobující hemofilii – značné množství z nich je způsobeno právě insercemi transponovatelných elementů do tohoto genu.

Evolučně nejdůležitější jsou inserce transpozónů do regulačních oblastí. Ty způsobují poškození nebo přidání krátkých regulačních sekvencí popsaných v Kapitole 8 (viz obr. 8-27), což má dramatický efekt na genovou expresi (obr. 9-26). Transponovatelné elementy tak mohou být významným zdrojem mutací a díky jejich přítomnosti je DNA v chromosomech méně stabilní, než se původně předpokládalo. Stručně řečeno, transpozony jsou zdrojem genetické rozmanitosti a pravděpodobně byly příčinou mnoha důležitých změn genomů v průběhu evoluce.

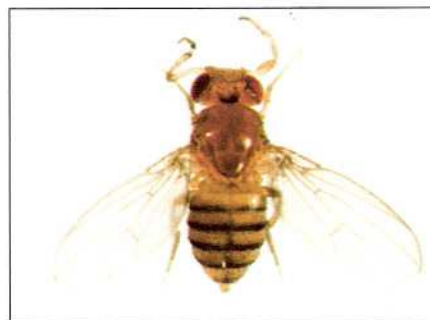
Jak uvidíme dále, o mobilních genetických elementech, jako jsou transpozony a plasmidy (které lze také najít u některých eukaryontních buněk), se uvažuje jako o předchůdcích virů, které je možno považovat za plně mobilní genetické elementy, neboť se mohou nezávisle pohybovat mezi buňkami.

Viry jsou plně mobilní genetické elementy, které mohou opouštět buňky

Viry byly poprvé zjištěny jako agens, způsobující choroby, jež díky svým malým rozměrům procházelo i velmi jemnými filtry, které zabraňovaly průchodu i těch nejmenších buněk. Dnes již víme, že viry jsou v podstatě geny obklopené ochranným obalem. Jak jsme si



(A)



(B)

Obrázek 9-26 Změna struktury těla u octomilky způsobená mutací. Octomilka (*Drosophila melanogaster*) na obrázku vlevo je normální, u mouchy vpravo jsou tykadla přeměněna na nohy. Ačkoliv tato změna není pro mušku výhodná, ukazuje nám to, jak reorganizace DNA způsobené transponovatelnými elementy může způsobit dramatickou změnu v organismu.

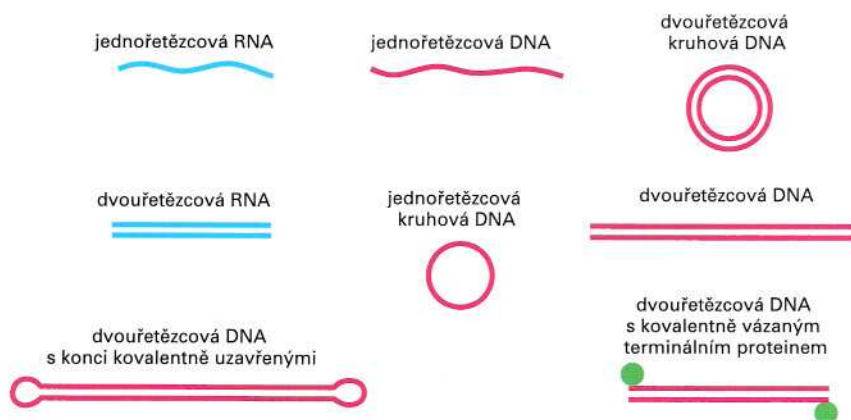
Tabulka 9-1 Viry způsobující lidské nemoci

Virus	Typ genomu	Choroba
Herpes-simplex virus	dsDNA	opakující se opary
Virus Epstein-Barrové (EBV)	dsDNA	infekční mononukleóza
Virus varicella zoster	dsDNA	plané neštovice a pásový opar
Virus neštovic	dsDNA	neštovice
Virus hepatitidy B	část ssDNA, část dsDNA	sérová žloutenka
Virus lidské imunodeficiency (HIV)	ssRNA	syndrom získaného selhání imunity (AIDS)
Virus chřipky typu A	ssRNA	respirační choroby, chřipka
Poliovirus	ssRNA	dětská obrna
Rhinovirus	ssRNA	běžné nachlazení
Virus hepatitidy A	ssRNA	infekční žloutenka
Virus hepatitidy C	ssRNA	žloutenky jiného typu než A a B
Virus žluté zimnice	ssRNA	žlutá zimnice
Virus vztekliny	ssRNA	vzteklina
Virus příušnic	ssRNA	příušnice
Virus spalniček	ssRNA	spalničky

*dsDNA, dvouřetězcová DNA; ssDNA, jednořetězcová DNA; ssRNA, jednořetězcová RNA.

ukázali dříve v této kapitole (viz obr. 9-14), viry musí vstoupit do buňky, kde využívají buněčného aparátu k expresi svých genů, k replikaci svých genomů a k vlastnímu zabalení do nově vytvořených ochranných obalů. Reprodukce virů je sama o sobě pro buňky často letální; v mnoha případech totiž dochází k rozrušení buňky (lýzi) a k uvolnění virového potomstva, které pak může napadat sousední buňky. Mnoho z klinických symptomů je způsobeno právě lytickým efektem virů. Například opary vznikající působením viru herpes simplex nebo puchýřky způsobené virem planých neštovic jsou místy, kde dochází k lokální smrti kožních buněk. Přestože první objevené viry napadaly savčí buňky, dnes je známo i mnoho jiných druhů virů. Některé napadají rostliny, jiné mají za hostitele bakterie, jak jsme viděli v předešlých odstavcích této kapitoly.

Virový genom může být tvořen jednořetězcovou nebo dvouřetězcovou DNA nebo RNA (tabulka 9-1 a obr. 9-27). Množství DNA nebo RNA, které může být zabaleno do proteinového obalu, je limi-



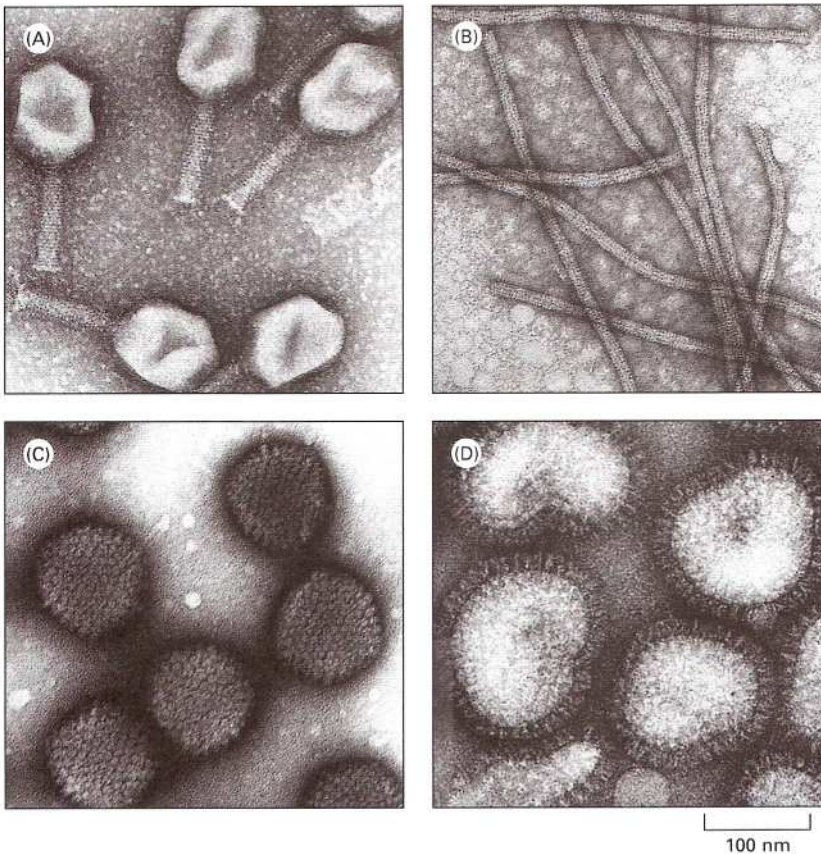
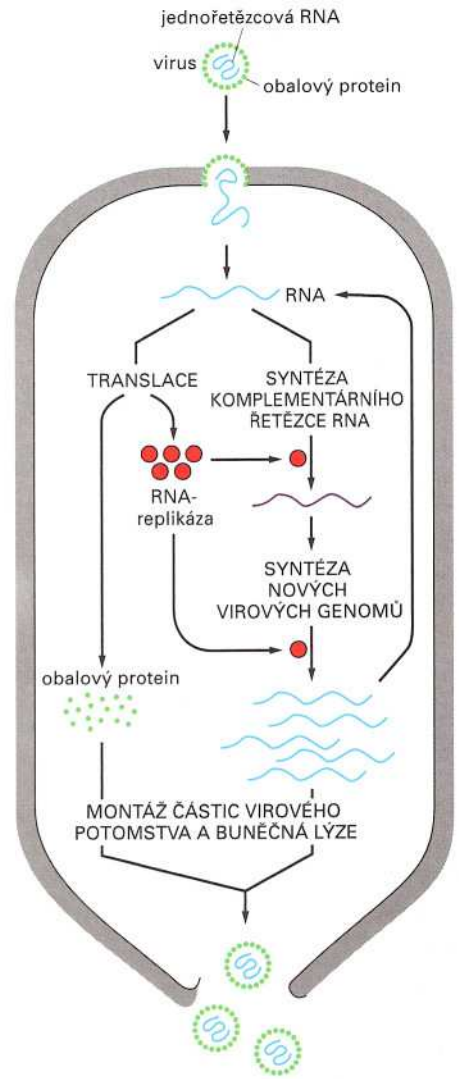
Obrázek 9-27 Schematické znázornění několika typů virových genomů. Nejmenší viry obsahují pouze několik genů a jejich genom může být tvořen jak RNA, tak DNA. Největší viry obsahují několik set genů a jejich genom je tvořen dvouřetězcovou DNA. Příklady různých typů virů: *jednořetězcové RNA-viry* – virus tabákové mozaiky, bakteriofág R17, poliovirus; *dvouřetězcové RNA-viry* – reovirus; *jednořetězcové DNA-viry* – parvovirus; *jednořetězcové cirkulární DNA-viry* – bakteriofágy M13 a X174; *dvouřetězcové cirkulární DNA-viry* – SV40 a polyomaviry; *dvouřetězcové DNA-viry* – bakteriofág T4, herpesvirus; *dvouřetězcové DNA-viry s kovalentně navázaným terminálním proteinem* – adenovirus; *dvouřetězcové DNA-viry s kovalentně navázaným terminálním proteinem* – poxvirus. Zvláštní konce (stejně jako kruhové formy) přítomné u některých virových genomů řeší problémy replikace posledních několika nukleotidů na konci řetězce DNA (viz obr. 8-6).

Obrázek 9-28 Životní cyklus jednořetězcového RNA viru. Jak je zjednodušeně ukázáno, virový genom může být překládán hostitelskými ribosomy, čímž vznikají virové proteiny. Červené kroužky: RNA-dependentní RNA-polymeráza (RNA-replikáza); zelené kroužky: obalové proteiny. K vytváření nových genomů používá replikáza jako vzor komplementární řetězec RNA. Pro srovnání je životní cyklus zjednodušeného DNA viru zachycen na obr. 9-14.

továno a je příliš malé na to, aby kódovalo spektrum proteinů nezbytných pro replikaci i těch nejjednodušších virů. Viry se proto chovají jako paraziti a mohou se reprodukovat pouze uvnitř živých buněk, kde jsou schopny využívat celý buněčný biochemický aparát. Typické virové genomy kódují virové plášťové proteiny a také bílkoviny, které umožňují hostitelským enzymům rozpoznat a využít replikační počátek viru a replikovat tak jejich genom. Viry, které mají genom tvořený RNA, musí mít navíc zakódován enzym RNA-replikázu, který je potřebný k replikaci jejich genomu (obr. 9-28).

Nejjednodušší viry jsou tvořeny proteinovým pláštěm složeným z mnoha kopií jednoho polypeptidového řetězce, který obaluje malý genom obsahující pouze tři geny. Složitější viry mají větší genomy tvořené až několika sty genů a jsou obaleny komplikovaným obalem složeným z mnoha různých proteinů (obr. 9-29).

I ty největší viry jsou však značně závislé na biosyntetických funkcích hostitelské buňky; žádný z dosud známých virů například nevytváří své vlastní ribosomy a nedokáže syntetizovat ATP, který je potřebný pro replikaci DNA. Z toho vyplývá, že se buňky musely vyvinout před viry. Předchůdci prvních virů byly pravděpodobně



Obrázek 9-29 Obaly virů. Tyto snímky z elektronového mikroskopu ukazují virové částice ve stejném měřítku. (A) Bakteriofág *T4*, veliký DNA-virus, který infikuje buňky *E. coli*. DNA je uložena v hlavě bakteriofága a válcovitým ocasem je injikována do bakterií. (B) *X virus brambor*, rostlinný virus, který obsahuje RNA-genom. (C) *Adenovirus*, DNA-virus, který infikuje lidské buňky. (D) *Virus chřipky*, veliký živočišný RNA-virus, jehož proteinová kapsida je ještě obalena lipidovým dvourvrstevným obalem. Špičky vyčnívající z obalu jsou virové proteiny, které jsou zanořeny v membránové dvojné vrstvě.

malé fragmenty DNA, které získaly schopnost replikovat se nezávisle na chromosomech hostitelské buňky. Nejbližšími příbuznými dnešních virů jsou pravděpodobně plasmidy a transpozony. Na rozdíl od virů však tyto elementy nevytvářejí proteinové obaly a nemohou se tedy volně přemisťovat mezi buňkami.

Pokud přijmeme hypotézu naznačenou v Kapitole 7, že genetická informace prvních buněk byla uložena v RNA, pak se první viry mohly vyvinout z RNA-plasmidů po získání genu kódujícího protein, který se mohl sestavovat do virového obalu. Virová RNA s proteinovým pláštěm pak mohla opustit buňku a hledat si nového hostitele.

Retroviry obračejí normální tok genetické informace

Přestože mají bakteriální a eukaryontní viry mnoho společného, jedna důležitá třída virů – **retroviry** – byla nalezena pouze u eukaryontních buněk. V mnoha vlastnostech se retroviry podobají retrotranspozonům, které byly probírány dříve. Klíčovým znakem u obou těchto genetických elementů je krok, při němž je DNA syntetizována podle předlohy RNA (pojem *retro* označuje opačný tok genetické informace vzhledem k centrálnímu dogmatu). Enzym, který tento krok provádí, se nazývá *reverzní transkriptáza* a je kódována retrovirovým genomem (což je jednořetězcová RNA). V každé virové části je kromě RNA zabaleno také několik molekul tohoto enzymu.

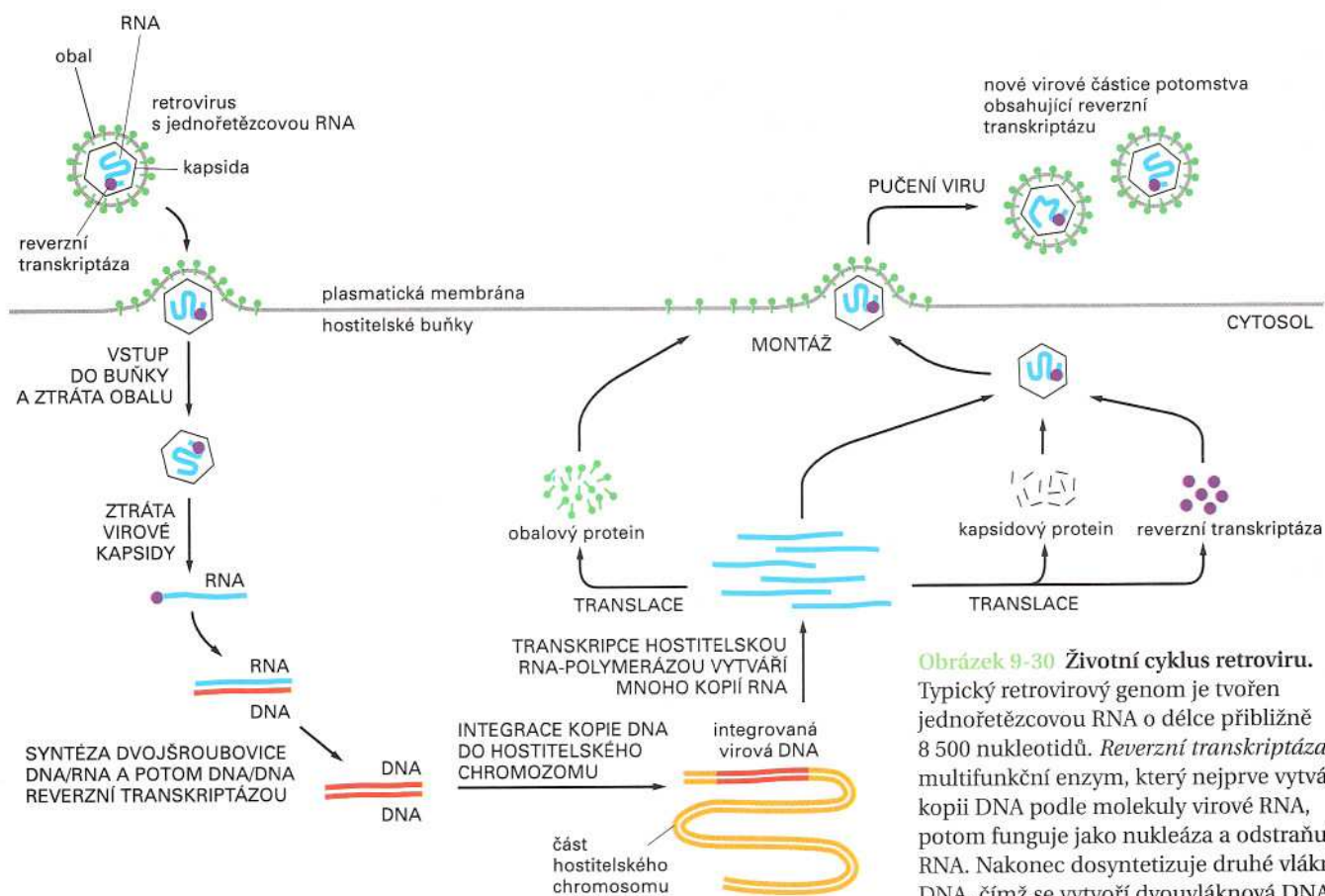
Životní cyklus retrovirů je ukázán na obr. 9-30. Když jednořetězcová genomová RNA retroviru vstoupí do buňky, reverzní transkriptáza podle ní vytvoří komplementární vlákno DNA, čímž vznikne hybridní dvojšroubovice DNA/RNA. Vlákno RNA je pak odstraněno a reverzní transkriptáza, která může jako předlohu používat jak RNA, tak DNA, dosyntetizuje komplementární vlákno; tak je vytvořena dvojšroubovicová DNA. Tato DNA se pak integruje do náhodného místa v hostitelském genomu pomocí virem kódovaného enzymu – integrázy. V této fázi, která se podobá začlenění λ -fága do bakteriálního genomu (viz obr. 9-15), je virus latentní: při každém rozdělení hostitelské buňky je kopie integrovaného virového genomu přenášena na dceřiné buňky.

Dalším krokem při replikaci retroviru, který se může odehrát až dlouhou dobu po integraci do hostitelského chromosomu, je transkripce integrované virové DNA hostitelskými RNA-polymerázami, které tak vytvoří velké množství jednořetězcových molekul RNA identických s původním infekčním genomem. Tyto RNA jsou pak překládány hostitelskými ribosomy na proteiny kapsidy, obalové bílkoviny a reverzní transkriptázu, ze kterých se spolu s genomovou RNA sestaví nové virové částice.

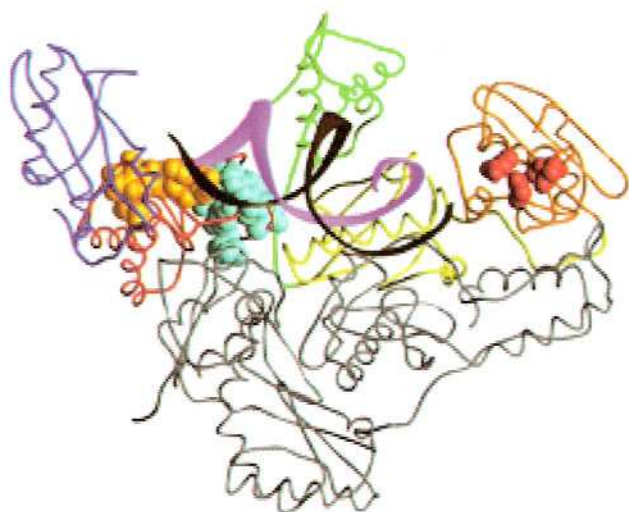
Virus lidské imunodeficiency (HIV), který je původcem AIDS, je také retrovirus. Jako u ostatních retrovirů může genom HIV latentně přetrvávat jako DNA-provirus integrovaný v chromosomu infikované buňky. Schopnost viru ukrývat se v hostitelské buňce komplikuje všechny pokusy o léčbu infekce antivirovými látkami. Proto se jedním z hlavních cílů vývoje nových látek proti AIDS stala reverzní transkriptáza tohoto viru, neboť lidské buňky tento druh enzymu nevyužívají (obr. 9-31).

Protože se některé transponovatelné elementy pohybují v genomu pomocí RNA intermediátů a replikují se obdobným způsobem

Otázka 9-5 Genomy některých jednořetězcových RNA-virů mohou sloužit jako informační RNA, která může být okamžitě po vstupu do buňky překládána na hostitelských ribosomech do proteinu (viz obr. 9-28). Genomy jiných jednořetězcových RNA-virů jsou komplementární k mRNA, z kterých musí být virové proteiny syntetizovány. Těmto virům se říká negativní RNA-viry. Jaké změny musíte provést na obrázku 9-28, abyste mohli vysvětlit životní cyklus této třídy RNA-virů?



Obrázek 9-30 Životní cyklus retroviru. Typický retroviróvý genom je tvořen jednořetězcovou RNA o délce přibližně 8 500 nukleotidů. *Reverzní transkriptáza* je multifunkční enzym, který nejprve vytváří kopii DNA podle molekuly virové RNA, potom funguje jako nukleáza a odstraňuje RNA. Nakonec dosyntetizuje druhé vlákno DNA, čímž se vytvoří dvouvláknová DNA kopie RNA-genomu. Integraci této DNA do hostitelského chromosomu provádí virový enzym integráza; integrace je nezbytná pro zahájení syntézy nových virových molekul RNA hostitelskými RNA-polymerázami. Retroviry jsou příkladem *obalených virů*, protože kromě proteinové kapsidy je jejich povrch ještě chráněn vnější lipidovou dvouvrstevnou membránou. V obalu jsou přítomny proteiny, které viru umožňují vázat se na buněčný povrch a vstupovat do buněk. Když viry opouštějí buňku, získávají lipidový obal vypučením z plasmatické membrány, přičemž si část této membrány odnášejí s sebou. K infekci buněk dochází opačným procesem, než je pučení.



Obrázek 9-31 Struktura reverzní transkriptázy HIV a místa, kam se vážou inhibitory. Enzym se skládá ze dvou podjednotek, jedna je zachycena šedě a druhá v několika barvách, které označují jednotlivé strukturální domény podjednotky. DNA, kterou enzym syntetizuje, je nakreslena *purpurově* a řetězec templátu (což může být jak DNA, tak i RNA), je *tmavě hnědý*. Vazebné místo pro deoxyribonukleosidtrifosáty je ukázáno *zlatě*, do tohoto místa se váže jedna skupina používaných inhibitorů (včetně AZT a ddC), které jsou tímto enzymem inkorporovány do prodlužujícího se řetězce a způsobují tak jeho terminaci (viz obr. 10-5). Vazebné místo pro jinou třídu inhibitorů reverzní transkriptázy (jako je třeba nevirapin) je nakresleno *tyrkysově*. Tato třída inhibitorů způsobuje malé změny v konformaci reverzní transkriptázy a zabraňuje tak účinné syntéze DNA. Reverzní transkriptáza HIV také obsahuje doménu, ve které dochází k degradaci RNA v duplexu RNA/DNA, vytvářenému v průběhu životního cyklu viru (viz obr. 9-30). Aktivní místo pro tuto činnost enzymu je rovněž cílem pro vývoj účinných inhibitorů; je označeno *červeně*.

jako retroviry (viz obr. 9-23), předpokládá se, že retroviry vznikly právě z takovýchto retrotranspozonů, když před dlouhou dobou získaly geny kódující obalové proteiny a další bílkoviny potřebné k tvorbě virových částic. RNA–intermediát pak mohl být zabalen do virové částice a mohl opustit buňku.

Viry, které mají schopnost integrovat se do hostitelské DNA obdobně jako transpozony, jsou potenciálními zdroji genetických změn z důvodů uvedených dříve (str. 296-297). Stejně jako bakteriofág lambda i retroviry mohou získat části sekvence hostitelské DNA a přenášet je (jako RNA-kopie) do nového hostitele (viz obr. 9-16). Protože mnoho virů může infikovat více než jeden druh, mohou principiálně přenášet geny z jednoho druhu na druhý. Jak je patrné z genomů dnes žijících organismů, sehrál tento druh genetického přenosu také svou úlohu v evoluci.

V následující části uvidíme, že právě schopnost retrovirů získat hostitelské geny poskytla velmi důležité vodítko vědcům, kteří studují příčiny vzniku rakoviny.

Retroviry, které získaly hostitelské geny, mohou měnit normální buňky v nádorové

Retroviry nejsou zajímavé pouze pro svůj neobvyklý způsob replikace, ale také kvůli centrální úloze, kterou sehrály při výzkumu vzniku rakoviny. Byly to právě retroviry, které přispěly k poznání, že většina druhů rakoviny vzniká mutacemi v malém počtu buněčných genů (viz Kapitola 19). U lidí je sice velmi málo případů rakoviny způsobeno retrovirovou infekcí, ale u některých živočichů jsou tyto viry hlavní příčinou vzniku rakoviny.

Viry způsobující rakovinu jsou známy jako **transformační viry** a byly objeveny před osmdesáti lety u kuřat, u kterých způsobují *sarkomy* (nádory pojivové tkáně). Virus byl pojmenován po svém objeviteli Peytonu Rousovi jako virus Rousova sarkomu a patří mezi retroviry. Jak může virus způsobit rakovinu? S příchodem technik pro analýzu DNA se ukázalo, že virus Rousova sarkomu získal jeden z genů svého kuřecího hostitele (obr. 9-32). Tento gen označovaný jako *src* (vyslovujete „sark“) je pro samotný virus nepodstatný, ale má dalekosáhlé následky pro buňky infikované tímto virem. Sám o sobě je totiž odpovědný za schopnost viru způsobovat rakovinu.

Virový gen *src* je příkladem **onkogenů**, které způsobují transformaci normálních buněk v nádorové. V kuřecím genomu kóduje normální gen *src* proteinkinázu (viz Kapitola 5), která kontroluje buněčné dělení. Virový gen *src* však není zcela identický s normálním buněčným genem (tzv. **protoonkogenem**) a právě tento rozdíl je odpovědný za schopnost genu vyvolávat rakovinu. Předchůdce viru Rousova sarkomu získal tento gen z kuřecího genomu, došlo v něm ke změně a výsledkem je rozdíl v několika aminokyselinách mezi virovou proteinkinázou a normálním enzymem v kuřecích

Otázka 9-6 Reverzní transkriptáza nemá schopnost opravného čtení při syntéze DNA podle RNA templátu. Popřemýšlejte o následcích, jaké to může mít pro léčbu AIDS.

Obrázek 9-32 Genom viru Rousova sarkomu – retroviru způsobujícího rakovinu u infikovaných kuřat. Genom je tvořen jednořetězcovou RNA a geny, které nese, jsou zobrazeny na obrázku. Gen *gag* kóduje protein, z kterého po rozštěpení vzniká několik menších proteinů, které tvoří kapsidu (viz obr. 9-30). Gen *pol* kóduje protein, z kterého po rozštěpení vzniká reverzní transkriptáza a integráza, která je zodpovědná za integraci virového genomu (v podobě dvouřetězcové DNA) do hostitelského genomu. Gen *env* kóduje obalové proteiny. Gen *src* je modifikovaný buněčný gen, který virus náhodně získal z hostitelské buňky, kterou kdysi infikoval. Přenos hostitelských genů retroviru v principu připomíná transdukcii bakteriálních genů bakteriofágy (viz obr. 9-16).



Tabulka 9-2 Některé z onkogenů, které byly původně identifikovány u retrovirů a které způsobují přeměnu normálních buněk v nádorové

Onkogen	Funkce protoonkogenů	Zdroj viru	Nádory způsobené virem
<i>abl</i>	Tyr-specifická proteinkináza	myš	pre-B-lymfocytární leukemie
<i>erb-B</i>	receptor epidermálního růstového faktoru (EGF)	kočka	sarkomy
<i>fes</i>	Tyr-specifická proteinkináza	kuře	erytroleukemie; fibrosarkomy
<i>fms</i>	receptor faktoru stimulujícího makrofágové kolonie (M-CSF)	kočka/kuře	sarkomy
<i>fos, jun</i>	asociují spolu a regulují genovou expresi	myš/kuře	osteosarkomy fibrosarkomy
<i>myc</i>	regulátor genové exprese	kuře	sarkomy; myelocytomatozní karcinomy
<i>raf</i>	Ser/Thr-specifická proteinkináza	kuře/myš	sarkomy
<i>H-ras</i>	GTP-vázající protein	potkan	sarkomy; erytroleukemie
<i>rel</i>	regulátor genové exprese	krocan	retikuloendotelioza
<i>sis</i>	růstový faktor odvozený od krevních destiček, B-řetězec	opice	sarkomy
<i>src</i>	Tyr-specifická proteinkináza	kuře	sarkomy

Protoonkogeny *fos, jun, myc* a *rel* jsou proteiny normálně lokalizované v buněčném jádře, kde řídí expresi genů. Protoonkogeny *erb-B* a *fms* kódují proteiny vnější buněčné membrány, jež přijímají signály z okolí a přenášejí je dovnitř buňky (viz Kapitola 15). Protoonkogeny *abl, fes, ras, raf* a *src* kódují proteiny lokalizované v cytoplasmě, kde jsou součástí signálních drah (Kapitola 15). Protoonkogen *sis* kóduje protein určený k sekreci, který poskytuje jiným buňkám signál k dělení.

buňkách. Tato malá změna postačuje k tomu, aby tento enzym unikl buněčné kontrole a stal se hyperaktivním. Buňky, které expri-mují virový *src*, se pak nekontrolovaně dělí a mohou vytvořit nádor.

Jiné transformující viry získaly odlišné buněčné geny (tabulka 9-2). Ke každému z těchto virových onkogenů byl nalezen jeho odpovídající normální protoonkogen, a tak bylo možno identifikovat mnoho genů, které se podílejí na kontrole buněčného dělení. Když byly tyto základní protoonkogeny objeveny u člověka, ukázalo se, že mnoho druhů rakoviny je způsobeno mutacemi právě v těchto genech. Jak si vysvětlíme v Kapitole 19, ke vzniku rakoviny u lidí je potřeba, aby se v buňce nahromadilo několik mutací (viz také obr. 6-24). Nyní již víme, že mnoho z těchto mutací postihuje protoonkogeny a mění je v onkogeny.

Většina protoonkogenů kóduje proteiny, které se podílejí na regulaci chování buněk v rámci celého těla (viz Kapitolu 19). Tak například diferencované buňky často přijímají od okolních buněk signály, které jim přikazují zastavit buněčné dělení. A právě mutace v některých protoonkogenech způsobují, že buňky na tyto signály nereagují a nekontrolovaně se množí. Mnoho poznatků o rakovině člověka vzešlo ze studia onkogenů, které byly poprvé objeveny v retrovirech.

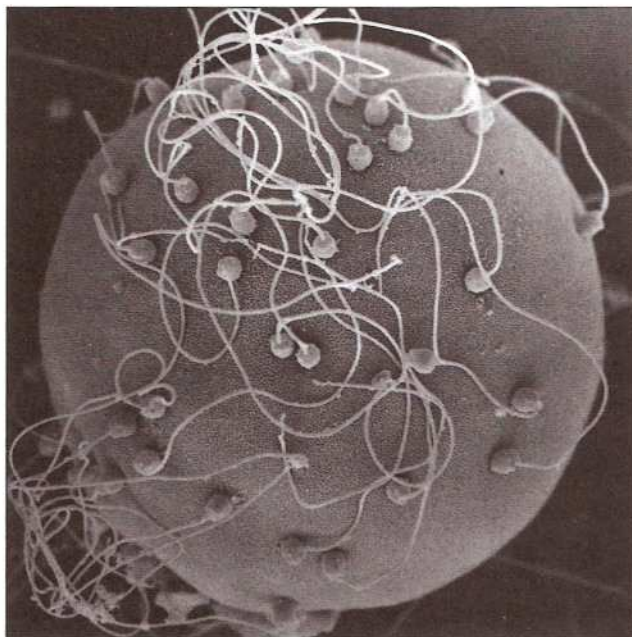
Doposud jsme se v této kapitole setkali s tím, že změny v genu poskytovaly buňkám bohatý zdroj genetické rozmanitosti, což je předpokad pro působení přírodního výběru. K akumulacím mutací dochází díky chybám při replikaci, transpozonům, které se v genu přemísťují z místa na místo, a virům, které při přesunech z buňky do buňky s sebou občas přenášejí i kus hostitelského genu. V závěrečné části si ukážeme, jak pohlavní rozmnožování poskytuje životu na naší planetě další zdroj genetické rozmanitosti.

Pohlavní rozmnožování a reorganizace genů

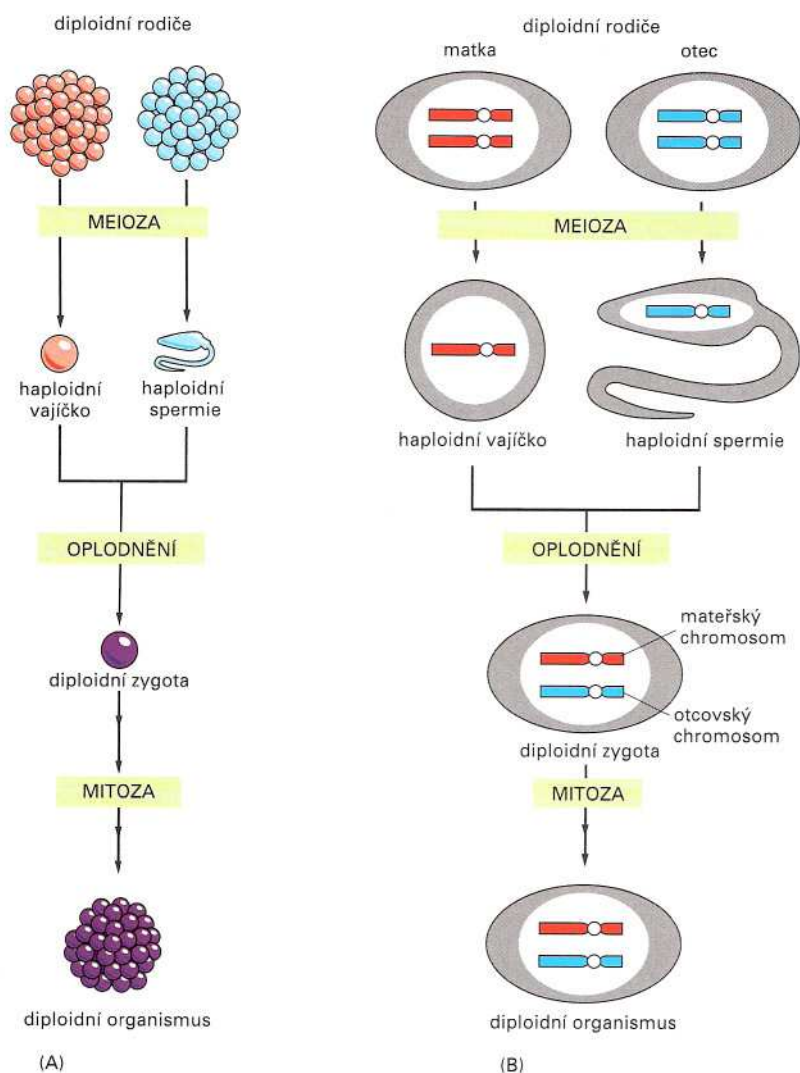
Mnoho organismů se může rozmnožovat nepohlavně: bakterie a jiné jednobuněčné organismy například jednoduchým buněčným dělením. Mnoho rostlin se také rozmnožuje nepohlavně; vytvářejí odnože, které se později oddělují od mateřského organismu a rostou nezávisle. Příklady nalezneme i v živočišné říši – někteří červi mohou být rozděleni na dvě části, načež každé doroste chybějící část. Nepohlavní rozmnožování je jednoduché a přímé, vzniklé potomstvo je obvykle geneticky shodné s rodičovským organismem. Na druhé straně při pohlavním rozmnožování dochází k mísení genomů dvou jedinců a vzniklé potomstvo se geneticky liší jak mezi sebou navzájem, tak od rodičů. Tento způsob rozmnožování má zřejmé výhody, a proto si ho osvojila naprostá většina rostlin a živočichů.

Pohlavní rozmnožování udílí organismům výhody v konkurenčním, nepředvídatelně se měnícím prostředí

Sytém pohlavního rozmnožování je velmi propracovaný a je na něj vynakládáno mnoho zdrojů organismu. Jaký přináší užitek a proč se vyvinul? Pokud dochází k mísení genů, je nové potomstvo u pohlavně se rozmnožujících organismů nepředvídatelně rozdílné a jejich genomy mohou stejnou měrou odrážet jak změny k lepšímu, tak k horšímu. Proč by potom měli mít pohlavně se rozmnožující organismy konkurenční výhodu nad organismy rozmnožujícími se asexuálně? Tento problém stále znepokojuje populační genetiky, ale podle uznávaných závěrů se zdá, že promíchání genů při pohlavním rozmnožování pomáhá druhům přežít v nepředvídatelně se měnícím prostředí. Pokud rodiče produkují mnoho potomstva s velkým množstvím genetických kombinací, zvyšuje se šance, že alespoň jeden z nich bude mít kombinaci genů nezbytnou pro přežití.



Obrázek 9-33 Obrázek z řádkovacího elektronového mikroskopu ukazuje vajíčko mlže s navázanými spermii na povrchu.



Obrázek 9-34 Haploidní a diploidní fáze pohlavního rozmnožování. (A) Diploidní buňky eukaryotních organismů proliferují, a vytváří tak mnohobuněčný organismus; pouze gamety (vajíčko a spermie) jsou haploidní. (B) Při pohlavním rozmnožování se chromosomy uspořádávají do nových kombinací. Například v lidské gametě je 23 chromosomů. Pro zjednodušení je v každé gametě nakreslen pouze jeden chromosom.

Pro pohlavní rozmnožování je třeba diploidních i haploidních buněk

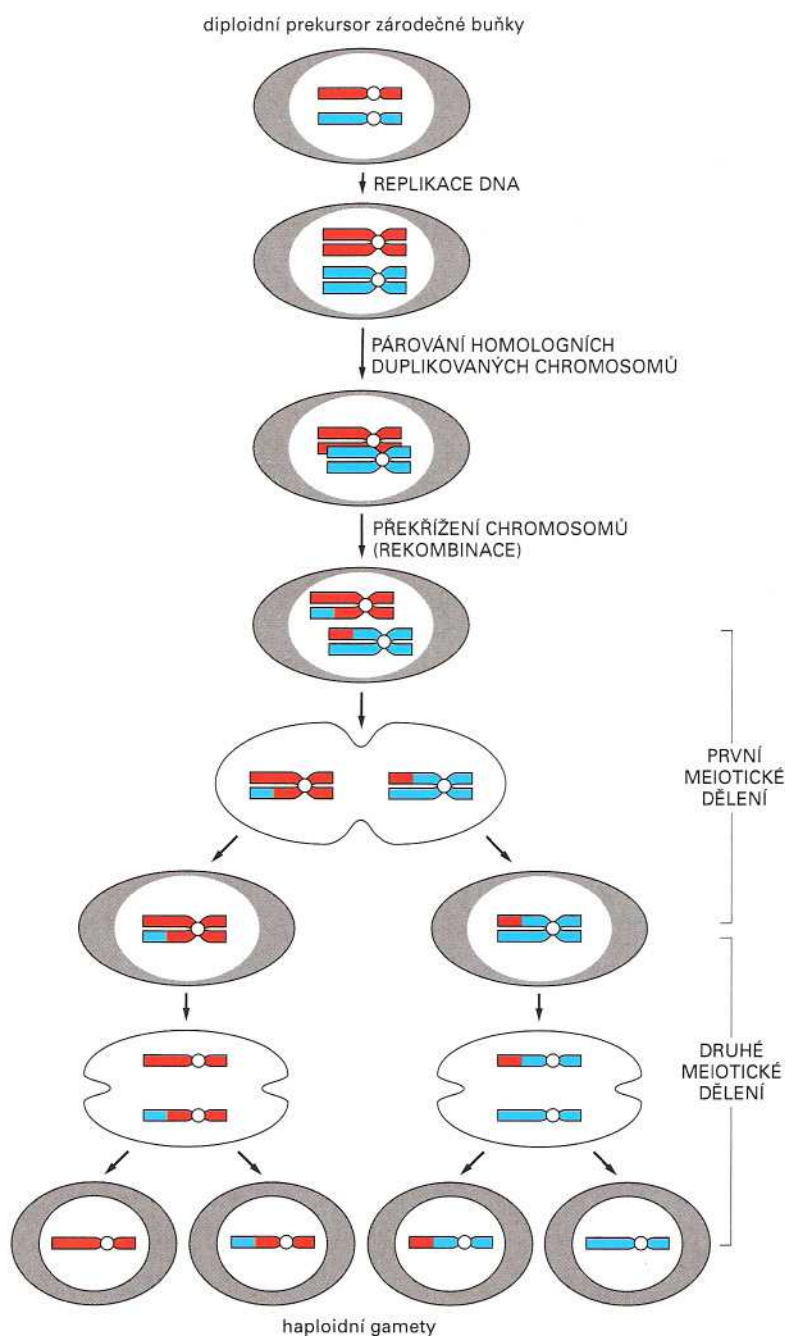
Pohlavní rozmnožování probíhá u diploidních organismů, jejichž buňky obsahují dvě sady chromosomů – jednu zděděnou po matce, druhou po otci. Každá diploidní buňka tedy nese dvě kopie každého genu (kromě genů přítomných na pohlavním chromosomu samců, které jsou v buňce pouze v jedné kopii) a jak již bylo probráno dříve, není nutné, aby obě kopie genu byly zcela stejné. Navíc se každý gen vyskytuje v mnoha variantách přítomných v genofondu druhu, a tak pohlavní rozmnožování zajišťuje, že jsou neustále zkoušeny nové a nové kombinace genů.

Na rozdíl od ostatních buněk diploidního organismu jsou buňky účastníci se pohlavního rozmnožování – **zárodečné buňky** neboli *gamety* – haploidní: to znamená, že obsahují pouze jednu sadu chromosomů. Zpravidla jsou produkovány dva druhy gamet. U živočichů je jedna zárodečná buňka veliká a nepohyblivá a označuje se jako **vajíčko**, druhá je malá a pohyblivá a nazývá se **spermie** (obr. 9-33). Tyto haploidní zárodečné buňky vznikají z diploidních buněk speciálním buněčným dělením, které se nazývá *meioza* (obr. 9-34). Během meiozy se chromosomy ze dvou sad náhodně rozdělí, čímž

vznikne nová kombinace v obou sadách chromosomů. Haploidní gamety potom fúzí a vytvářejí diploidní buňku (oplozené vajíčko neboli *zygotu*) s novou kombinací chromosomů. Takto vzniklá zygota se dále vyvíjí v nového jedince se sadou chromosomů odlišnou od obou rodičů. Tímto cyklem – diploidie, meioza, haploidie a buněčná fúze – je stará kombinace genů zrušena a utvořena nová.

V procesu meiozy jsou haploidní buňky tvořeny z diploidních

Jak je popsáno v Kapitole 17, při *mitoze* duplikují diploidní buňky přesně obě sady chromosomů a přenášejí obě kompletní sady do obou dceřiných buněk. Při tvorbě zárodečných buněk je tomu jinak, protože se do každé zárodečné buňky dostává pouze



Obrázek 9-35 Meioza. Pro zjednodušení je nakreslen pouze jeden pár homologních chromosomů. Po replikaci DNA v původní buňce následují dvě buněčná dělení, která jsou nezbytná pro tvorbu haploidních gamet. Z každé diploidní buňky, která vstupuje do meiozy (u živočichů má tuto schopnost pouze specializovaná skupina buněk), tak vznikají čtyři haploidní buňky.

jedna sada chromosomů z původní diploidní buňky. Tento proces se nazývá **meioza** a spočívá v duplikaci každého chromosomu, po které následují dvě buněčná dělení. Detailně si meiozu popíšeme v závěru Kapitoly 17; zde si tento proces pouze nastíníme.

Vše začíná u specializovaných diploidních buněk ve vaječnicích a varlatech. Každá z těchto buněk obsahuje dvě kopie každého chromosomu, z nichž jeden je zděděn od otce (*otcovský* neboli *paternální* homolog) a druhý od matky (*mateřský* neboli *maternální* homolog). Jak je znázorněno na obr. 9-35, prvním krokem při meioze, stejně jako při mitoze, je duplikace chromosomů – DNA je zreplikována a dceřiné molekuly DNA jsou obaleny proteiny a zformovány do nových chromosomů (viz Kapitola 8). Podobně jako v mitoze zůstávají nové chromosomy spolu spojeny stejně jako siamská dvojčata.

V následném kroku unikátním pouze pro meiozu se každý zdvojený otcovský chromosom podélně páruje se zdvojeným mateřským homologem. Protože nukleotidová sekvence otcovských a mateřských homologů je na mnoha místech jejich délky identická a protože se oba chromosomy nacházejí velmi blízko sebe, může mezi nimi v tomto kroku docházet k homologní rekombinaci (viz obr. 9-9). V případě meiozy se tyto rekombinační procesy označují jako *překřížení chromosomů* neboli *chiasmata* a jejich výsledkem jsou hybridní chromosomy vzniklé z otcovských a mateřských chromosomů (viz obr. 9-35). Rekombinace v průběhu meiozy je hlavním zdrojem genetické rozmanitosti u pohlavně se množících organismů, protože na jeden chromosom připadá minimálně jedno překřížení.

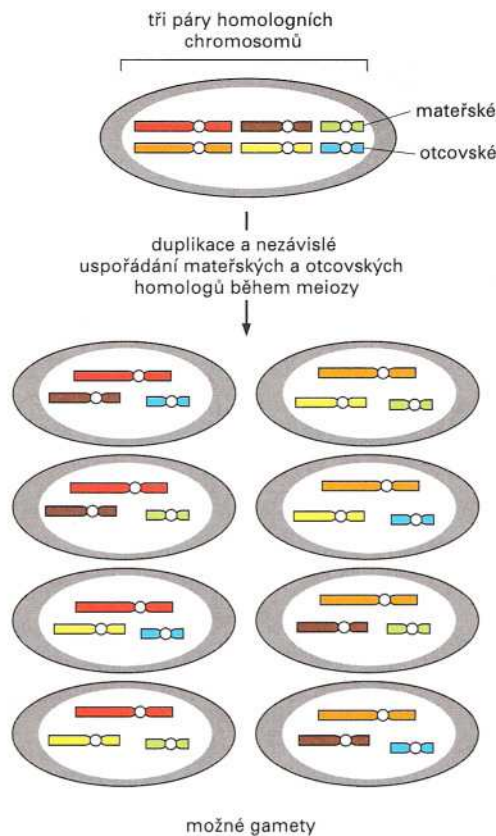
Ve dvou následných děleních každá gameta získá kompletní sadu chromosomů s jedním exemplářem od každého druhu, jak je ukázáno na obrázku 9-35. Díky proběhнувšímu překřížení jsou chromosomy distribuované do gamet složeny ze segmentů DNA pocházejících jak z otcovských, tak mateřských chromosomů.

Distribuce chromosomů v průběhu meiozy je pozoruhodný jev. U člověka je nutno během meiozy správně rozdělit 92 jednotlivých chromosomů (23 párů, každý duplikovaný) tak, aby výsledkem byla jedna kompletní sada chromosomů v každé gametě. Proto nepřekvapuje, že v průběhu distribuce chromosomů do gamet dochází, i když vzácně, k omylům. Tak například Downův syndrom – lidská nemoc projevující se těžkou mentální retardací – je způsoben tím, že se do gamety dostane jeden chromosom 21 navíc. Pokud tato gameta oplodní vajíčko, vyvíjející se embryo bude mít tři kopie chromosomu 21 a po dvou kopiích ostatních chromosomů. Tato chromosomální nerovnováha pak narušuje správný vývoj embrya.

Meiozou se vytváří velká genetická rozmanitost

Jednovaječná dvojčata, která se vyvinula z jedné zygoty, jsou geneticky identická. V ostatních případech nejsou žádní dva sourozenci geneticky stejní. Je tomu tak proto, že než došlo k oplození, byly při meioze uplatněny dva druhy náhodných genetických reorganizací.

Především je to náhodné rozdělení mateřských a otcovských chromosomů do jednotlivých gamet v průběhu meiozy. Přestože jsou chromosomy pečlivě rozdělovány tak, že do každé gamety přijde jedna a pouze jedna kopie každého z nich, každá gameta získá



Obrázek 9-36 Přeuspořádání chromosomů v průběhu meiozy. Nezávislé předávání otcovských a mateřských homologních chromosomů vytváří 2^n různých haploidních gamet, kde n označuje počet chromosomů organismu. Zde je $n = 3$, a tak je možné vytvořit 2^3 , tedy 8 různých gamet. Pro zjednodušení není znázorněno překřížení.

náhodnou směs otcovských a mateřských chromosomů (obr. 9-36). Díky tomuto typu rozdělování může každý jedinec teoreticky produkovat 2^n různých gamet, kde n je haploidní počet chromosomů. Například každý člověk tedy může teoreticky produkovat $2^{23} = 8,4 \times 10^6$ různých gamet, a to jenom díky náhodnému uspořádání chromosomů při meioze.

Skutečný počet různých gamet produkovaných jedincem je však mnohem větší v důsledku genetické reorganizace způsobované homologními rekombinacemi, které se během meiozy také odehrávají. Průměrně dochází k překřížení jednou až dvakrát u každého páru lidských chromosomů při jedné meioze. Při tomto procesu se na jeden chromosom dostávají mateřské i otcovské geny, které původně ležely na samostatných chromosomech, jak je nakresleno na obr. 9-35. Protože k rekombinaci dochází na víceméně náhodných místech po celé délce chromosomu, jsou při každé meioze produkovány gamety jiného genetického složení.

Přetřídění chromosomů v meioze spolu s rekombinací genů při překřížení poskytuje téměř neomezený zdroj genetické rozmanitosti v gametách produkovaných jedním člověkem. Pokud si uvědomíme, že každý člověk vzniká splynutím dvou takovýchto gamet, není vůbec překvapující bohatství v lidské rozmanitosti, které vidíme kolem nás.

Otázka 9-7 Pokud pomíneme efekt rekombinace chromosomů, může lidský jedinec teoreticky produkovat $2^{23} = 8,4 \times 10^6$ rozdílných gamet. Kolik těchto možností může být uskutečněno v průměrném životě (a) ženy ? (b) muže ?

Základní shrnutí

- Na buněčné úrovni patří k nejlépe prostudovaným organismům bakterie, zejména *E. coli*, a to díky jejich jednoduchosti a rychlému množení.
- Vzácné spontánní chyby při replikaci DNA poskytují populaci bakterií stálý zdroj nových genetických variant. Pokud se změní vnější podmínky, převládne v populaci taková varianta, která je lépe přizpůsobena novým podmínkám.
- Bakteriální buňka může v bakteriální populaci získávat geny od jiných buněk pomocí tří mechanismů: konjugace, transformace a transdukce (pomocí virů). Toto mísení genů v genofondu populace je důležitým zdrojem genetické rozmanitosti.
- Homologní rekombinace je proces, při kterém se dvě dvoušroubovicové molekuly DNA s obdobnou nukleotidovou sekvencí mohou překřížit a dát tak vznik molekule DNA s novou sekvencí.
- Transponovatelné elementy (transpozony) jsou sekvence DNA, které se mohou v genomu hostitele přemisťovat z místa na místo. Tímto přemisťováním se v hostitelském genomu vytvářejí změny, které jsou dalším zdrojem genetické rozmanitosti.
- Mnohé mechanismy způsobující genetickou rozmanitost u bakterií jsou využívány i u eukaryotních organismů. Eukaryotní organismy však navíc mají některé další možnosti, které v průběhu evoluce usnadnily změny v jejich genomech.
- U eukaryot může nerovné překřížení (crossing-over) vést k vytvoření duplikací genů, o kterých se předpokládá, že daly vznik rodinám příbuzných genů, přítomných v eukaryotních genomech. Nerovný crossing-over je také považován za mechanismus, zodpovědný za duplikaci exonů; tím jsou vytvářeny proteiny s opakujícími se krátkými doménami.
- Třicet procent lidského genomu tvoří DNA, která se v genomu mnohokrát opakuje. Přibližně jednu třetinu této repetitivní DNA (asi 10% celého genomu) představují dva transponovatelné elementy, které se v genomu zmnožily do velmi vysokého počtu kopií.
- Jeden typ transponovatelných elementů se v eukaryotním genomu pohybuje prostřednictvím RNA-intermediátů a označuje se jako retrotranspozony.
- O transponovatelných elementech se předpokládá, že jsou zodpovědné za mnoho evolučních změn, které vedly k současným eukaryotním genomům. Transpozice je také jedním z mechanismů přeskupování exonů – spojování různých exonů v průběhu evoluce vedoucí k vytvoření nového proteinu.
- Viry jsou jen o málo více než geny zabalené v ochranném plášti. Aby se mohly reprodukovat, potřebují hostitelskou buňku.
 - Některé viry mají genom tvořený RNA místo DNA. Jedna skupina virů, retroviry, musí nejprve zkopírovat svůj RNA genom do DNA, aby se mohly replikovat.
- Retroviry nesoucí onkogeny mohou infikované buňky změnit v nádorové.
- Při pohlavním rozmnožování dochází k cyklickému střídání diploidního a haploidního stavu: při meioze se diploidní buňky dělí a vznikají haploidní gamety; při oplození spolu splývají haploidní gamety dvou odlišných jedinců a formuje se nová diploidní buňka.
- V průběhu meiozy jsou mateřské a otcovské chromosomy rozděleny do gamet tak, že je v každé gametě jedna kopie každého chromosomu. Protože umístění každého z páru chromosomů probíhá náhodně, může každý jedinec produkovat mnoho geneticky odlišných gamet.
- Při překřížení v průběhu meiozy dochází k výměnám genů mezi homologními chromosomy, což vede k dalšímu zvýšení genetické rozmanitosti.
- Pohlavní rozmnožování bylo v průběhu evoluce upřednostněno zřejmě proto, že náhodné mísení genetické informace zvyšuje pravděpodobnost, že alespoň někdo z potomstva přežije nepředvídatelně se měnící podmínky prostředí.

Klíčová slova

bakteriální konjugace	místně specifická rekombinace	retrotranspozon	transformace
homologní rekombinace	onkogen	retrovirus	transformující virus
integrace	protoonkogen	spermie	transformace
meioza	plasmid	transdukce	vajíčko
	přeskupení exonů	transponovatelný element	virus
			zárodečná buňka

10 DNA-technologie

JAK SE MOLEKULY DNA ANALYZUJÍ

- Restrikční endonukleázy štěpí DNA ve specifických místech
- Gelová elektroforéza dělí fragmenty DNA podle velikostí
- Stanovení nukleotidové sekvence DNA

HYBRIDIZACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

- Hybridizace DNA umožňuje prenatální diagnostiku genetických chorob
- Hybridizací in situ lze určit polohu sekvencí nukleových kyselin v buňkách nebo na chromosomech

KLONOVÁNÍ DNA

- DNA-ligáza spojuje dva fragmenty za vzniku rekombinantní molekuly DNA
- Bakteriální plasmidy mohou být využity pro klonování DNA
- Lidské geny se izolují klonováním DNA
- Knihovny cDNA reprezentují mRNA vznikající v určité tkáni
- Hybridizace umožňuje identifikaci i vzdáleně příbuzných genů
- Polymerázovou řetězovou reakcí lze amplifikovat vybrané sekvence DNA

GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ

- Je možné vytvořit zcela nové molekuly DNA
- Klonováním DNA můžeme získat vzácné buněčné proteiny ve velkém množství
- RNA může vznikat transkripce in vitro
- Mutantní organismy nejlépe odrážejí funkci studovaného genu
- Transgenní živočichové obsahují geneticky pozměněné geny

Lidé experimentovali s DNA, ačkoliv si to neuvědomovali, po tisíce let. Například dnešní zahradní odrůdy růží jsou výsledkem staletí trvajících křížení divokých druhů (obr. 10-1A). V devadesátých letech osmnáctého století přivezli obchodníci do Evropy čtyři druhy růží pocházející z Číny, které se později zkřížily s evropskými odrůdami. Genomy většiny dnešních růží jsou tvořeny DNA z čínských i evropských druhů; k jejich smísení by však pravděpodobně nikdy nedošlo bez přispění člověka. Jiným příkladem dlouhodobých experimentů s DNA je velké množství psích plemen, které můžeme vidět kolem sebe. Vlk – předek dnešního psa – byl poprvé ochočen někdy před 10 000–15 000 tisíci let. Rozličné velikosti, barvy, tvary a dokonce i chování různých plemen jsou výsledkem záměrného křížení – výběru požadovaných rysů – prováděného až do dnešní doby (obr. 10-1B).

Ačkoliv selektivní křížení užitkových plodin a domácích zvířat probíhalo od nepaměti, k technologické revoluci došlo přibližně před 25 lety, kdy značně vzrostly možnosti experimentátorů. Na začátku sedmdesátých let tohoto století byl poprvé izolován požadovaný úsek DNA z mnoha milionů nukleotidových párů typického chromosomu. To umožnilo vytváření nových molekul DNA ve zkumavkách a jejich zpětné zavádění do živých organismů. Tyto



(A)



(B)

Obrázek 10-1 První pokusy s DNA.

(A) Nejstarší známé vyobrazení růže v západním umění (palác v Knossu na Krétě, kolem 2000 let před naším letopočtem). Dnešní růže jsou výsledkem několika staletí trvajících křížení mezi podobnými divokými růžemi. (B) Pudl a mopsil ilustrují variabilitu mezi psími plemeny. Všichni psi bez ohledu na křížení jsou stejného druhu.

nové metody, nazývané „rekombinantní DNA“, přes „sestřih genů“ či „genové inženýrství“, umožňují vytvoření chromosomů s kombinací genů, které by se v přírodě nikdy nevyskytly. Nové techniky s sebou přinesly možnosti manipulovat s geny v podobném smyslu jako v přírodě, kde by však vznik stejných, ale náhodných mutací mohl trvat tisíce let.

Před technologickou revolucí v sedmdesátých letech představovala DNA pro biochemiky jednu z nejhůře analyzovatelných molekul. Molekuly DNA v chromosomech, a to i v bakteriálních, jsou enormně dlouhé – například chromosom bakterie *E. coli* obsahuje 4,6 milionů nukleotidových párů. Protože je DNA tvořena pouze čtyřmi druhy nukleotidů, tehdy známé biochemické analytické metody neumožňovaly rozlišit jednu část genomu od jiné. Nejdůležitější vlastnost DNA, její sekvenci, nebylo možno určit.

Dnes je situace naprosto odlišná. DNA se stala jednou z nejsnáze analyzovatelných buněčných makromolekul. Nyní je snadné i pro začínajícího studenta vyštěpit z genomu oblast DNA, která obsahuje požadovaný gen, udělat si ničím neomezené množství přesných kopií tohoto genu a zjistit jeho nukleotidovou sekvenci rychlostí několika tisíc nukleotidů za den. Obměnami těchto technik je možno izolovaný gen požadovaným způsobem pozměnit, vrátit ho zpět do buněk a zkoumat jeho funkci v živých buňkách. Složitějšími metodami může být pozměněný gen začleněn do genomu celé rostliny nebo živočicha, a stát se tak jeho funkční a dědičnou součástí.

V této kapitole si vysvětlíme základní metody **technologie rekombinantní DNA**. Průlom v oblasti technologie DNA měl obrovský vliv na všechny oblasti buněčné biologie, když umožnil zkoumání buňky a jejích makromolekul dříve nepředstavitelnými metodami. Přinesl s sebou i poznání organizace a evoluční historie eukaryontního genomu (viz Kapitola 9) a vedl k objevu nových tříd genů a proteinů. Navíc umožnil zkoumání funkcí jednotlivých proteinů, jejich domén a vztahů mezi nimi. Metody studia DNA dávají biologům možnost prozkoumat i zatím neznámý mechanismus regulace eukaryontních genů.

Dnes je již známa první kompletní nukleotidová sekvence genomu eukaryontního organismu, jednobuněčné kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, úplné sekvence genomů několika bakterií a archebakterií. Dokončení sekvenování lidského genomu se předpokládá v příštích deseti letech. Ačkoliv budeme znát veškeré informace nutné pro vznik člověka, neznamená to ještě, že budeme vědět, jak jsou tyto instrukce v buňkách využívány. Pochopení tohoto procesu si vyžádá ještě mnoho desítek let výzkumu.

Technologie rekombinantní DNA má také hluboký vliv na život člověka i mimo vědecký výzkum: je používána k detekci mutací v DNA, které jsou příčinou dědičných chorob, v kriminalistice pro identifikaci osob při podezření ze spáchání trestného činu nebo k produkci zvyšujícího se počtu farmaceutických látek (například insulinu pro diabetiky nebo koagulačního proteinu faktoru VIII pro hemofiliky). Také při výrobě pracích prášků, do kterých jsou pro odstranění skvrn od krve a jídla přidávány teplotně stabilní proteázy, se využívá metod genového inženýrství. Ze všech objevů popsaných v této knize zřejmě nejvíce ovlivňuje náš každodenní život právě technologie rekombinantní DNA.

V první části této kapitoly si vysvětlíme základní techniky zkoumání DNA. Pak si popíšeme, jak může být DNA izolována a namnožena pomocí metod *klonování DNA* a *polymerázové řetězové reakce* (PCR – anglicky: polymerase chain reaction). V závěru si řekneme něco o využití těchto metod v genovém inženýrství a genetické manipulaci celých buněk a organismů.

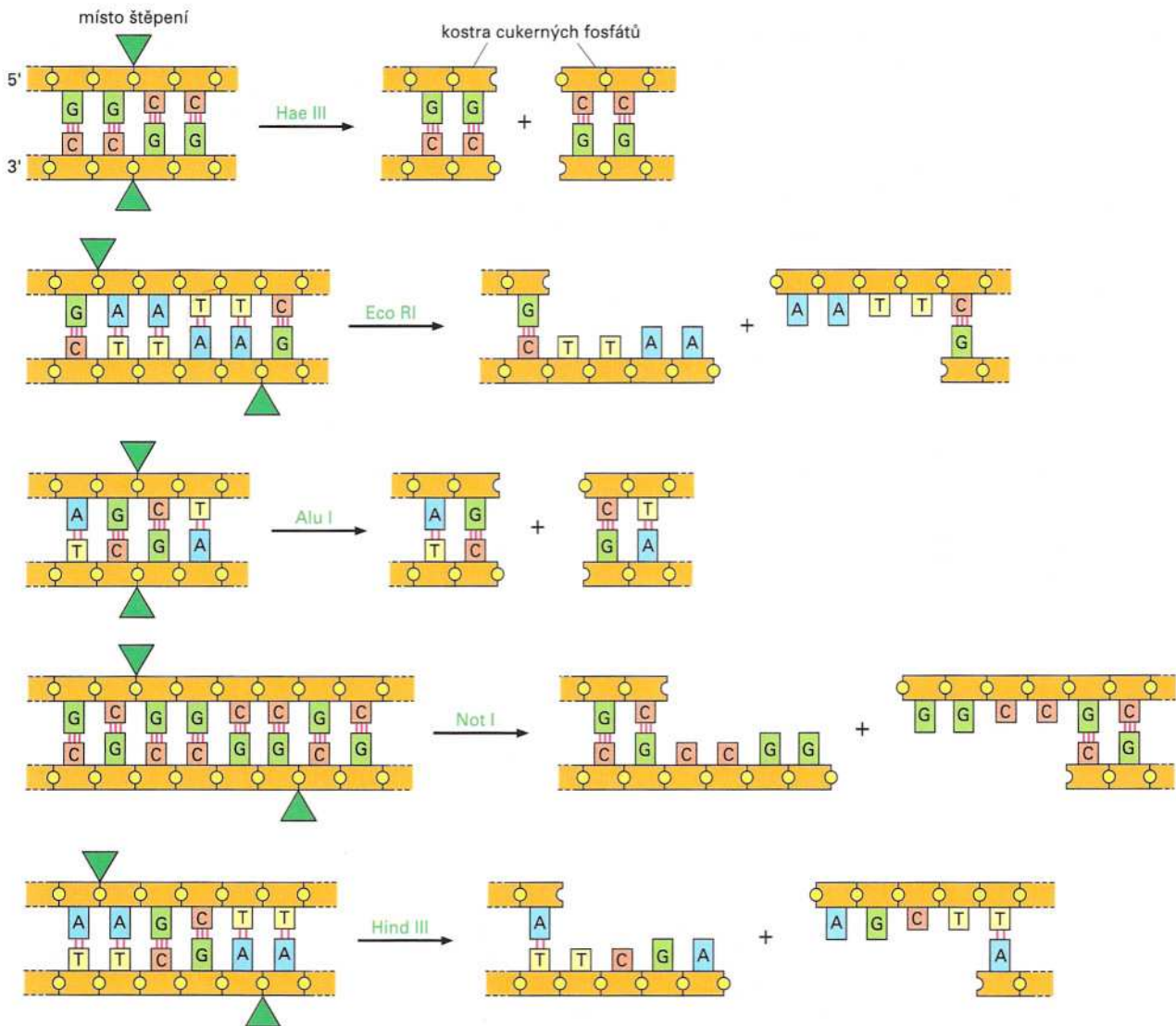
Jak se molekuly DNA analyzují

Po zjištění, že je genetická informace uložena v pořadí nukleotidů DNA, vědci vždy toužili stanovit tuto sekvenci a poznat funkci genů na molekulární úrovni. Před revolucí v technologii DNA to však bylo téměř nemožné. Velké pokroky v poznání struktury genu a jeho regulaci přinesly nepřímé genetické metody, které využívaly „modelových“ organismů, jako jsou *E. coli* a *Drosophila*, ale velké genomy savců zůstávaly převážně neprobádány. V té době se zdálo nemožné izolovat konkrétní gen, protože geny na rozdíl od proteinů neexistují v buňce jako samostatné jednotky, ale jsou součástí mnohem větší molekuly DNA. Ačkoliv může být DNA mechanicky rozbita na malé kousky, úsek s naším požadovaným genem by byl pouze jedním ze stovek tisíců či ještě více fragmentů savčího genomu vzniklých tímto způsobem. Navíc zlomy v DNA při mechanickém štěpení vznikají náhodně – pokud bychom vycházeli ze vzorku obsahujícího mnoho identických molekul DNA, byla by výsledkem směsice různě dlouhých fragmentů s naším genem. Jak tedy může být gen izolován?

Řešení tohoto problému přišlo s objevením třídy bakteriálních enzymů, dnes známých pod pojmem *restrikční endonukleázy*. Nukleázy katalyzují hydrolyzu fosfodiesterové vazby v nukleových kyselinách. Restrikční endonukleázy však mají jednu zajímavou vlastnost, která je odlišuje od ostatních nukleáz – štěpí DNA pouze v místech se specifickou krátkou nukleotidovou sekvencí. Proto jich lze využít ke štěpení genomové DNA na sadu specifických fragmentů. V příští části si popíšeme, jak restrikční endonukleázy fungují a jak mohou být jimi vzniklé fragmenty od sebe odděleny. Pak si vysvětlíme, jak může být stanovena nukleotidová sekvence fragmentu, který jsme takto izolovali.

Restrikční endonukleázy štěpí DNA ve specifických místech

Jako většina nástrojů technologie DNA byly restrikční endonukleázy objeveny při studiu specifického problému. Biologové si všimli, že pokud do bakterií experimentálně vložili cizorodou DNA, která pocházela z jiného druhu bakterií (pomocí metod popsaných v Kapitole 9), byla tato DNA vždy rozštěpena. Při hledání příčiny jejího odbourávání objevili novou třídu nukleáz přítomných uvnitř hostitelských bakterií. Nejzajímavější vlastností těchto nukleáz bylo, že štěpily DNA jen v určitých nukleotidových sekvencích. Vlastní DNA si bakterie před rozštěpením chránily chemickou modifikací těchto rozpoznávaných sekvencí. **Restrikční endonukleázy** tedy zabraňují přenosu DNA mezi různými druhy bakterií, protože různé druhy bakterií syntetizují restrikční endonukleázy štěpící různé nukleotidové sekvence.



Restrikční endonukleázy používané v molekulární genetice pocházejí převážně z bakterií, a protože jsou jimi rozpoznávána místa na DNA krátká (obvykle 4-8 nukleotidových párů), je vysoká pravděpodobnost, že se tato místa náhodně vyskytnou v každé delší molekule DNA. Proto mohou být tyto enzymy využity pro analýzu DNA z jakéhokoliv zdroje. Restrikční endonukleázy se staly běžným předmětem obchodu a v dnešní době jsou rozesílány poštou; typický katalog firem zabývajících se dodáváním těchto enzymů obsahuje více než stovku restrikčních endonukleáz, přičemž každá rozpoznává jinou sekvenci DNA. Několik příkladů je na obr. 10-2.

Schopnost štěpit DNA ve specifických sekvencích učinily z restrikčních endonukleáz nepostradatelný nástroj moderní technologie DNA, neboť štěpí danou molekulu DNA vždy ve stejných místech. Pokud tedy opakovaně štěpíme například DNA z lidské tkáně určitou restrikční endonukleázou, dostaneme vždy stejnou sadu fragmentů.

Frekvence štěpení DNA daným restrikčním enzymem se liší podle délky jím rozpoznávaného místa. Jak bylo ukázáno na obr. 10-2, enzym HaeIII štěpí sekvenci tvořenou čtyřmi specifickými

Obrázek 10-2 Rozpoznávané a štěpené nukleotidové sekvence pěti často používaných restrikčních endonukleáz. Jak je zde ukázáno, cílová místa, která jsou těmito enzymy štěpena, se liší nukleotidovou sekvencí i její délkou podle druhu enzymu. Cílové sekvence jsou často palindromické (symetrické podle centrálního bodu). V nakreslených příkladech jsou oba řetězce štěpeny ve specifických místech uvnitř rozpoznávané sekvence. Některé enzymy, jako jsou *HaeIII* a *AluI*, štěpí oba řetězce DNA proti sobě, takže obě výsledné molekuly mají zarovnané neboli tupé konce; štěpením ostatními restrikčními endonukleázami, jako například *EcoRI*, *NotI* a *HindIII*, vznikají na jednom z řetězců přesahující jednovláknové úseky. Restrikční endonukleázy jsou obvykle získávány z bakterií a v jejich názvech se odráží jejich původ: například enzym *EcoRI* pochází z *Escherichia coli*.

5' - AAGAATTGCGGAATTCGAGCTTAAGGGCCGCGCCGAAGCTTTAAA - 3'
 3' - TTCTTAACGCCTTAAGCTCGAATTCCTCCGGCGCGGCTTCGAAATTT - 5'

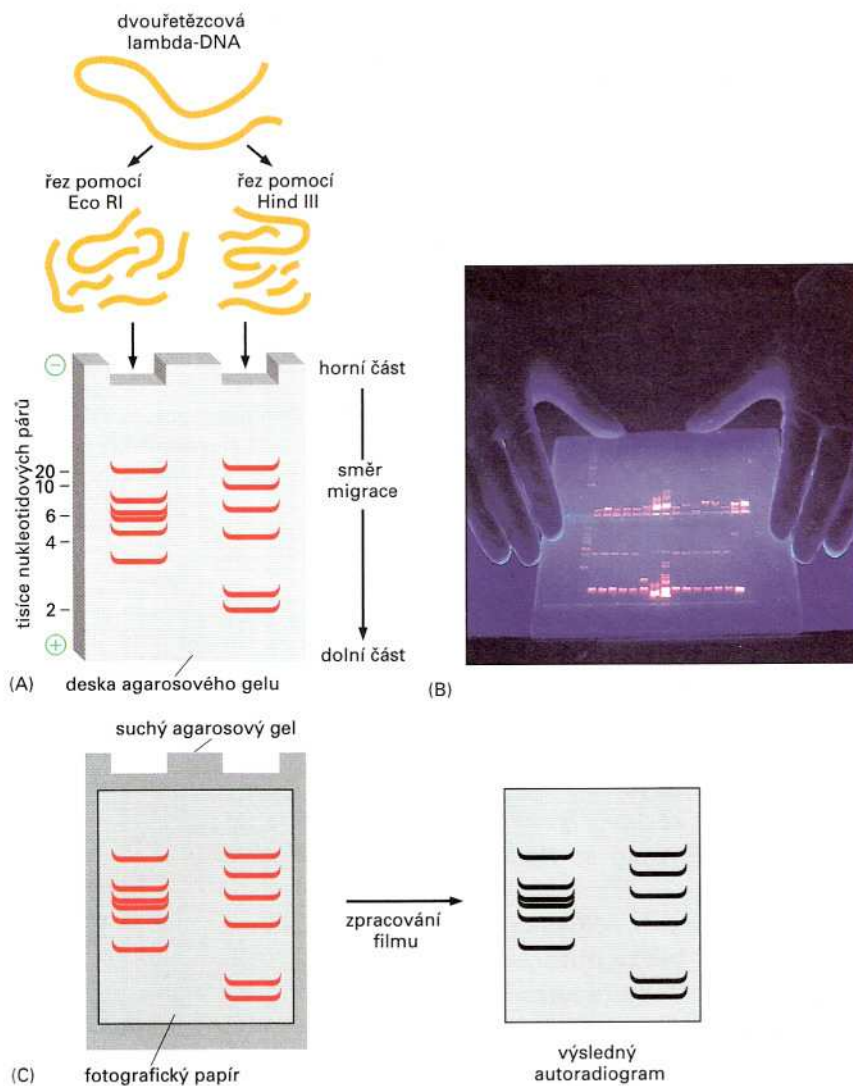
Otázka 10-1 Jaký produkt vznikne štěpením následující sekvence enzymy (A) EcoRI, (B) AluI, (C) NotI a (D) všemi třemi enzymy najednou?

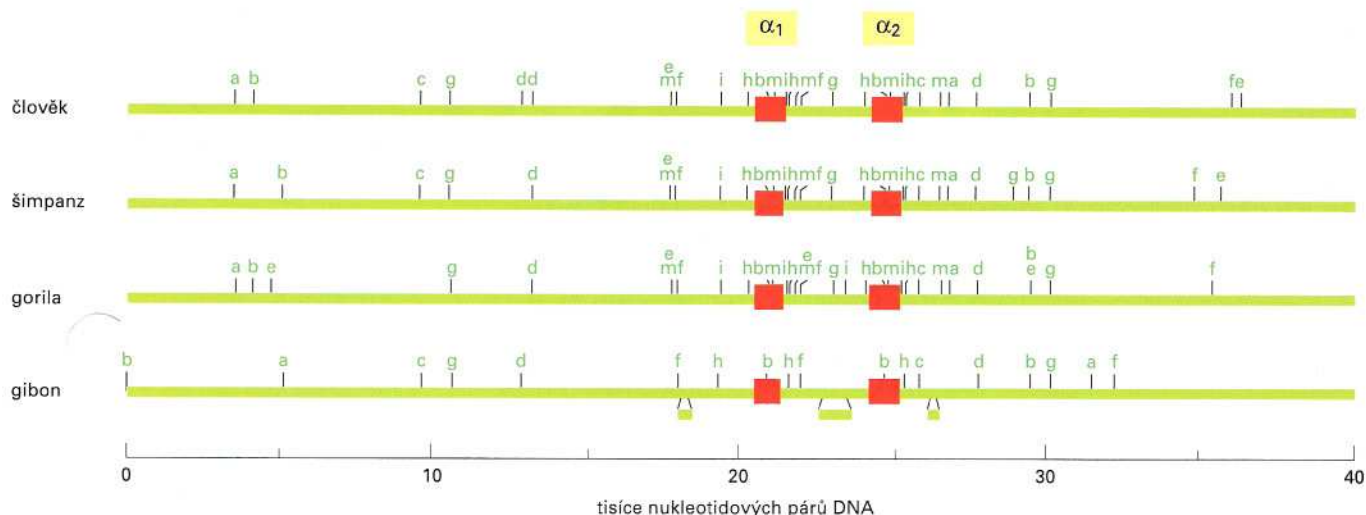
nukleotidovými páry; očekávaný výskyt rozpoznávaného místa v DNA daný náhodou je tedy jedno místo na každých 256 nukleotidových párů (jedno ve 4^4 nukleotidových párech). Ze stejných příčin bude enzym NotI, který rozpoznává sekvenci o délce 8 nukleotidů, průměrně štěpit DNA jednou v každých 65 536 nukleotidových párech (jednou ve 4^8). Průměrná velikost fragmentů produkovaných různými restričními endonukleázami se tedy značně liší, což umožňuje naštěpit dlouhou molekulu DNA na fragmenty o délce, která nejlépe vyhovuje jejich dalšímu využití.

Gelová elektroforéza dělí fragmenty DNA podle velikosti

Po rozštěpení velké molekuly DNA na menší úseky pomocí restriční endonukleázy se třeba od sebe jednotlivé fragmenty DNA oddělit. Pro tento účel se obvykle používá gelová elektroforéza, která dokáže

Obrázek 10-3 Detekce a separace molekul DNA podle velikosti pomocí gelové elektroforézy. (A) Schéma ukazuje porovnání výsledků štěpení stejné molekuly (v tomto případě genomu bakteriofága lambda, viz obr. 9-15) dvěma různými restričními endonukleázami - EcoRI (vlevo) a HindIII (vpravo). Fragmenty jsou rozděleny gelovou elektroforézou. Směs fragmentů DNA získaná enzymovým štěpením je nanášena do žlábků v horní části tenkého gelu a v elektrickém poli putují jednotlivé fragmenty směrem ke kladné elektrodě. Větší fragmenty se pohybují pomaleji než menší, a proto dojde k rozdělení fragmentů podle jejich velikosti. Například dva nejspodnější proužky v pravém sloupci představují dva nejmenší fragmenty vzniklé štěpením enzymem HindIII. Abychom mohli rozdělené fragmenty DNA spatřit, je gel ponořen do roztoku s barvivem, které se váže na DNA a při osvětlení ultrafialovým světlem jasně fluoreskuje (B). (C) Alternativní metodou vizualizace DNA je autoradiografie. Před štěpením restričním enzymem je DNA označena radioaktivním izotopem fosforu ^{32}P , který nahradí některé neradioaktivní atomy. Radioaktivně lze označit virus například jeho replikací v přítomnosti ^{32}P . Protože částice emitované z ^{32}P způsobují změny na fotografickém filmu, lze tento film přiložit na povrch agarosového gelu a po vyvolání je možno vidět polohu všech fragmentů DNA.





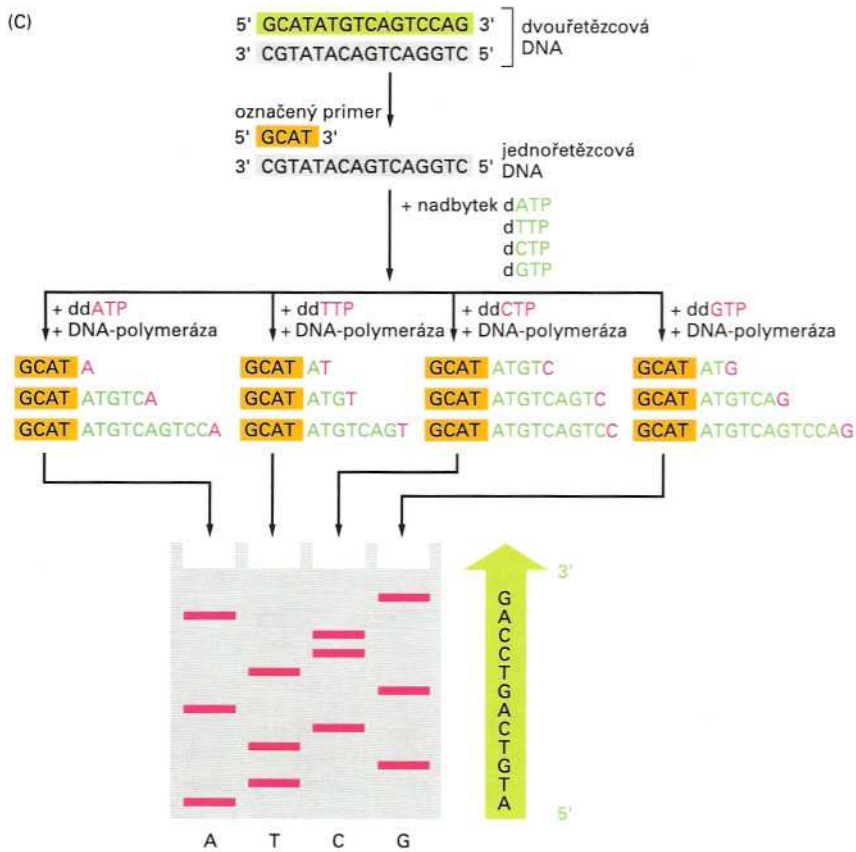
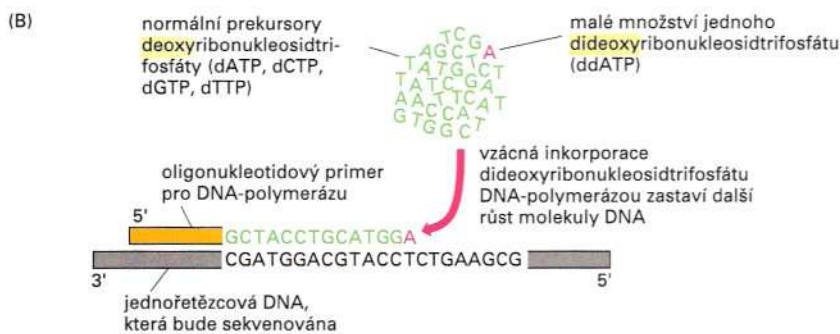
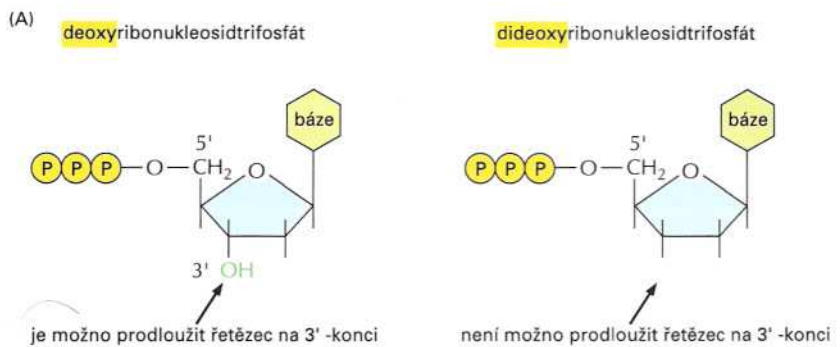
Obrázek 10-4 Porovnání restrikčních map oblastí DNA obsahující α -globinový gen u člověka a dalších primátů. *Silné zelené čáry* představují úseky chromosomální DNA se dvěma α -globinovými geny (*červené čtverce*) tak, jak se vyskytují v genomu primátů (α -globin je podjednotkou hemoglobinu, který je tvořen dvěma α - a dvěma β -globinovými polypeptidovými řetězci). *Malá písmena* označují místa štěpená různými restrikčními endonukleázami. Šimpanz, primát nejvíce příbuzný člověku, má také člověku nejpodobnější restrikční mapu, zatímco restrikční mapa gibona, našeho nejvzdálenějšího příbuzného z uvedených primátů, je lidské podobná nejméně. *Malé zelené úsečky* pod hlavní čarou u gibona zobrazují pozice, kde se vyskytuje DNA, kterou u ostatních primátů nenajdeme.

fragmenty rozdělit podle velikosti. Směs fragmentů se nanese do žlábků na jednom konci plochého agarózového nebo polyakrylamidového gelu, ve kterém je mikroskopická síť pórů, a celý gel je umístěn do elektrického pole. DNA se díky svému negativnímu náboji pohybuje směrem ke kladné elektrodě, přičemž dlouhé úseky DNA se pohybují pomaleji, protože jsou v hustém gelu více zpomalovány. Po několika hodinách se fragmenty v gelu rozdělí podle velikosti za vzniku „žebříku“ z jednotlivých proužků tvořených molekulami DNA o stejné velikosti (obr. 10-3A). Obvykle je velmi jednoduché izolovat požadovaný fragment: stačí pouze pomocí skalpelu nebo žiletky vyříznout kousek gelu, který ho obsahuje.

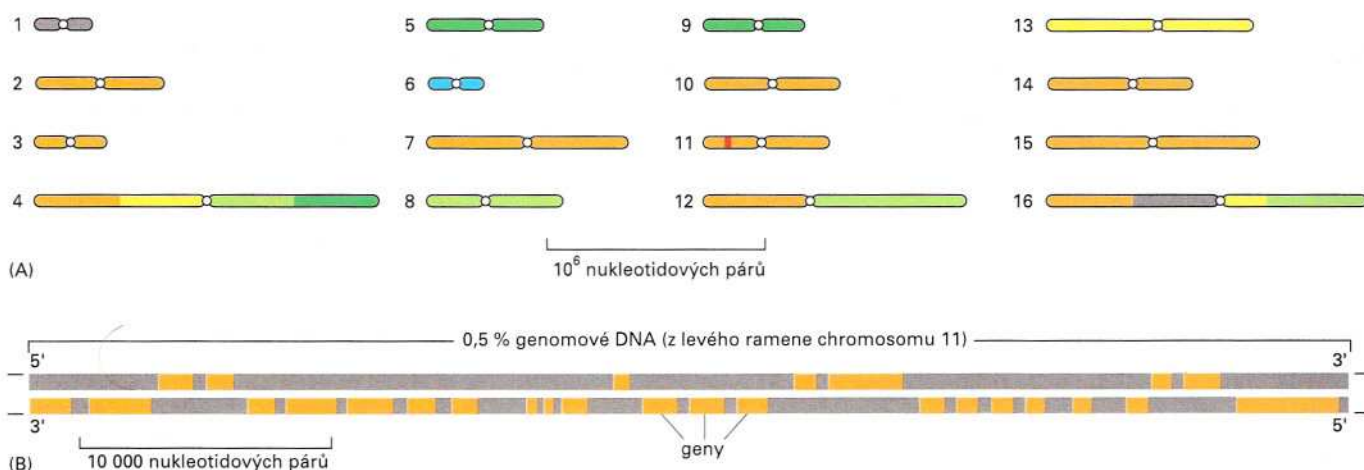
DNA však není v agarosovém ani polyakrylamidovém gelu možno vidět. Je proto nutné ji nějakým způsobem obarvit nebo označit. Jednou z citlivých metod detekce je smíchání DNA s látkou, která po navázání na DNA fluoreskuje v ultrafialovém světle (obr. 10-3B). Ještě citlivější metodou je začlenění radioaktivně značených nukleotidů do DNA před elektroforézou; pro tyto účely se nejčastěji používá radioizotop ^{32}P , který je možno snadno inkorporovat ve formě fosfátu do DNA a který emituje vysoce energetické β -částice, jež je možno jednoduše detegovat pomocí autoradiografie (obr. 10-3C).

Jednou z prvních aplikací štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz a následné separace jednotlivých fragmentů podle velikosti byla konstrukce *fyzických map* malých molekul DNA. Fyzická mapa DNA charakterizuje daný úsek DNA pozicemi různých značek a mezi nejužitečnější značky patří právě místa štěpená restrikčními endonukleázami. Porovnáním velikostí fragmentů vzniklých po štěpení několika kombinacemi restrikčních enzymů lze sestavit fyzickou mapu štěpených míst. Těmto druhům fyzických map se říká **restrikční mapy**.

Protože restrikční mapy vycházejí z nukleotidových sekvencí daných DNA, můžeme s jejich pomocí od sebe odlišit blízce příbuzné DNA (obr. 10-4). Přesto jsou nejlepšími fyzickými mapami kompletní nukleotidové sekvence DNA a v následující části si ukážeme, jakým způsobem je sekvence nukleotidů určována.



Obrázek 10-5 Enzymová metoda sekvenování DNA. (A) Tato metoda je založena na použití dideoxyribonukleosid trifosfátů – derivátů normálních deoxyribonukleosidtrifosfátů postrádajících 3'-hydroxylovou skupinu. (B) DNA je syntetizována *in vitro* ve směsi, která obsahuje jednořetězcové molekuly DNA, která má být sekvenována (*šedě*), enzym DNA-polymerázu, krátký primer DNA (*oranžově*), který umožňuje DNA-polymeráze začít replikaci, a čtyři deoxyribonukleosidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP: *zeleně* A, C, G a T). Jestliže je do této reakce přidán dideoxyribonukleosidový analog (*červeně*) jednoho z nukleotidů, je tento analog začleněn do rostoucího řetězce DNA. V tomto případě však řetězci chybí 3'-hydroxylová skupina, což blokuje přidání dalšího nukleotidu a syntéza tohoto vlákna je ukončena. V našem případě bylo do reakce přidáno malé množství dideoxyATP (ddATP, zde jako *červené* A). ddATP soutěží s nadbytkem normálního deoxyATP (dATP, *zelené* A) a je příležitostně začleňován do rostoucího řetězce DNA. Produktem této reakční směsi bude sada různě dlouhých DNA, které budou komplementární k templátové DNA a jejich posledním nukleotidem bude vždy adenin. (C) Ke stanovení kompletní nukleotidové sekvence dvouvláknové DNA je nutné nejprve od sebe oddělit oba řetězce a jeden z nich použít jako templát pro sekvenování. Ve čtyřech oddělených sekvenačních reakcích se stejným jednořetězcovým DNA-templátem (*šedě*), jsou použity čtyři různé dideoxyribonukleosidtrifosfáty (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, také *červeně*). Výsledkem každé reakce je sada molekul DNA, které končí na různých místech původní sekvence. Produkty všech čtyř sekvenačních reakcí jsou paralelně vedle sebe elektroforeticky rozděleny v polyakrylamidovém gelu (označeno jako A, T, C a G). Nově nasynetizované fragmenty jsou detegovány radioaktivně nebo fluorescenčně, přičemž označen může být buď primer nebo jeden z deoxyribonukleosidtrifosfátů. V každém sloupci reprezentují proužky fragmenty DNA, které končí vždy stejným druhem nukleotidu (adeninem ve sloupci nejvíce vlevo), ale v různých pozicích původní DNA. Směrem zdola nahoru poté lze porovnání všech čtyřech sloupců odečíst sekvenci nově nasynetizované DNA. Tato sekvence je v *zelené šipce* napravo od gelu a je stejná jako 5'→3' řetězec původní dvouvláknové DNA (*zeleně*).



Stanovení nukleotidové sekvence DNA

Na konci sedmdesátých let tohoto století byly objeveny rychlé a jednoduché metody pro určení nukleotidové sekvence jakéhokoliv izolovaného fragmentu DNA. Bylo vyvinuto několik technik, dnes nejpoužívanější jsou založeny na DNA-polymeráze, která syntetizuje částečné kopie sekvenovaného fragmentu. Princip této techniky spočívá v produkci sady řetězců DNA *in vitro* za podmínek, které zajišťují, že nově vznikající řetězec DNA bude ukončen po dosažení jednoho konkrétního nukleotidu (A, T, C nebo G) (obr. 10-5A a B). Ve čtyřech nezávislých reakcích tak vzniknou fragmenty DNA, které se liší svojí délkou o jediný nukleotid, přičemž z typu použité reakce je známo, kterým nukleotidem fragment končí (obr. 10-5C). Tyto nově nasynetizované fragmenty jsou elektroforeticky rozděleny podle velikosti a sekvence původní DNA je čtena na gelu z jejich pořadí, jak je vysvětleno na obrázku.

Dnes je známa kompletní nukleotidová sekvence desítek tisíc genů, několika bakteriálních genomů a genomové DNA jednoduchého eukaryontního organismu *S. cerevisiae* (pekařská kvasinka) (obr. 10-6). Do roku 2000 se předpokládá dokončení sekvenování genomu octomilky *Drosophila melanogaster* a hlístice *Caenorhabditis elegans*. Množství sekvencí DNA uložených v počítačových databázích je už nyní tak ohromné (stovky milionů nukleotidů), že pro práci s těmito údaji jsou potřebné speciální programy.

Se zdokonalením sekvenačních technik přišla i myšlenka projektu stanovení sekvence celého lidského genomu, to znamená DNA o přibližné délce 3×10^9 nukleotidů. Protože tato sekvence kóduje všechny možné molekuly RNA a proteinů, které tvoří lidské tělo, dokončení tohoto projektu nám přinese jakýsi „slovník lidského bytí“, který značně urychlí budoucí studie lidských buněk a tkání.

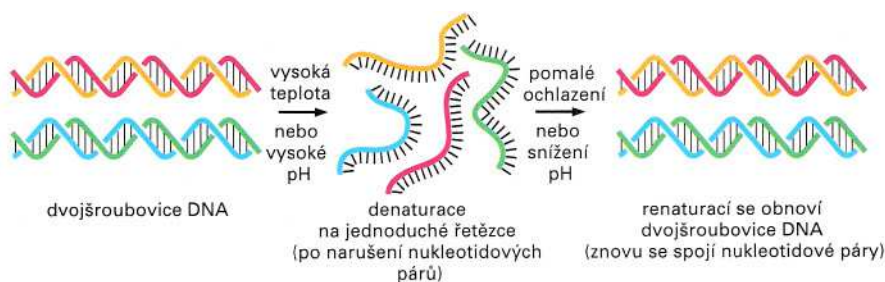
Obrázek 10-6 Schéma kompletní nukleotidové sekvence genomu *S. cerevisiae* (pučící kvasinky).

(A) Celý genom je tvořen 16 chromosomy a jeho nukleotidová sekvence byla určena díky spolupráci vědců z různých částí světa (šedě = Kanada, oranžově = Evropská Unie [zahrnuje vědce z mnoha evropských států], žlutě = Velká Británie, modře = Japonsko, světle zeleně = St. Louis, Missouri, tmavě zeleně = Stanford, Kalifornie). Zúžení na všech chromosomech představuje pozici centromery. Malá oblast chromosomu 11 označená červeně je pro demonstraci hustoty genů zvětšena v (B). Jak je zakresleno, některé geny jsou přepísány podle spodního, jiné podle horního vlákna. Genom této kvasinky má velikost 12 147 813 nukleotidových párů a obsahuje kolem 6200 genů.

Otázka 10-2 Jaké důsledky by pro sekvenační reakci mělo zvýšení poměru dideoxyribonukleosidtrifosfáty:deoxyribonukleosidtrifosfáty? Co by se stalo, kdyby tento poměr byl nižší?

Hybridizace nukleových kyselin

Jakmile se nám podařilo izolovat gen z genomové DNA, můžeme se ptát, na kterém chromosomu se tento gen nachází a jaká je jeho poloha na tomto chromosomu. Můžeme se také ptát, v kterých



Obrázek 10-7 Denaturace a renaturace (hybridizace) DNA. Aby mohlo dojít k hybridizaci, musí mít dva řetězce komplementární nukleotidovou sekvenci, která umožňuje párování. V tomto případě jsou navzájem komplementární červený řetězec s oranžovým a modrý se zeleným.

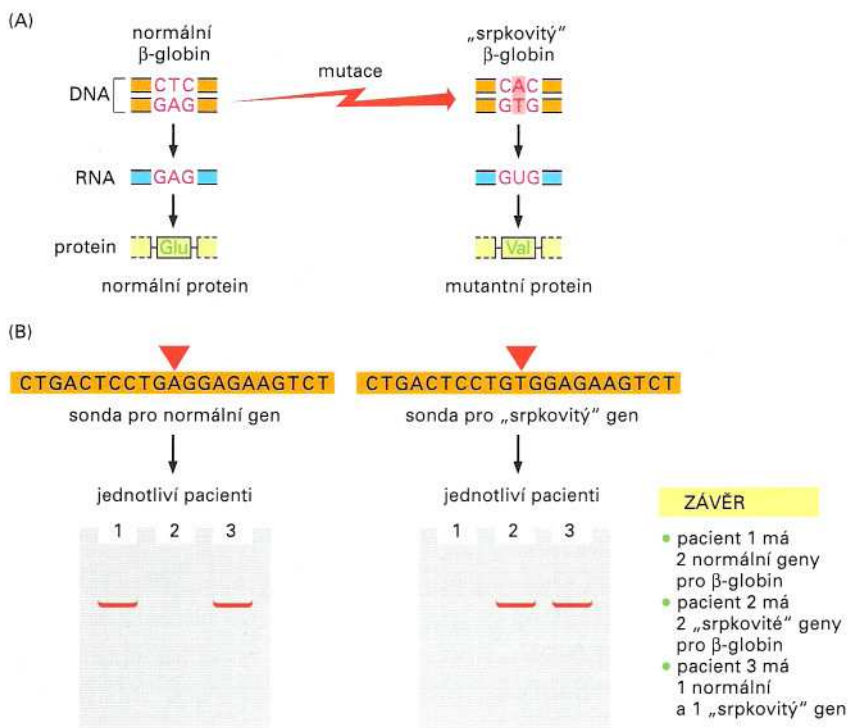
buňkách organismu dochází k jeho transkripci nebo zda jiné organismy mají podobný gen. Můžeme také chtít vědět, zda v určitém genu lidské DNA došlo k mutaci, která by byla příčinou dědičné choroby. Na všechny tyto otázky lze dát v laboratoři odpověď díky základní vlastnosti DNA – Watson–Crickovu párování bází, kdy se řetězce DNA vysoce selektivně párují se svými *komplementárními* řetězci. Oba řetězce jsou drženy pohromadě relativně slabými vodíkovými můstky, které mohou být přerušeny buď zahřátím DNA na přibližně 90 °C, nebo vystavením DNA extrémním hodnotám pH. Oba způsoby vedou k rozdělení obou vláken DNA (denaturaci), přičemž kovalentní vazby mezi jednotlivými nukleotidy v řetězci jsou zachovány. Pokud jsou příčiny denaturace pomalu odstraňovány (snížením teploty nebo upravením pH na neutrální), komplementární řetězce snadno znovu vytvoří dvojšroubovici. Tento proces se nazývá *renaturace* nebo **hybridizace** a jeho výsledkem je obnovení vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi (obr. 10-7).

K obdobné hybridizační reakci dochází mezi libovolnými jednořetězcovými molekulami nukleových kyselin (DNA/DNA, RNA/RNA nebo RNA/DNA), pokud obsahují komplementární nukleotidové sekvence. Schopnost jednořetězcových nukleových kyselin vytvořit dvojšroubovici jen v případě, pokud jsou navzájem komplementární, umožňuje detekci specifických nukleotidových sekvencí v DNA i RNA.

Hybridizace DNA umožňuje prenatální diagnostiku genetických chorob

Jestliže chceme najít nějakou konkrétní sekvenci pomocí hybridizace, musíme mít nukleovou kyselinu, která je komplementární k hledané sekvenci – tak zvanou sondu. *DNA-sonda* je krátká jednořetězcová DNA (oligonukleotid většinou o délce 10–1000 nukleotidů), která je používána při hybridizaci k nalezení nukleové kyseliny obsahující komplementární sekvenci. Dříve byly možnosti této metody velmi omezené, protože bylo možno používat jen sondy pocházející z přirozených zdrojů. Dnes díky pokroku v chemii nukleotidů mohou být krátké úseky DNA o požadované sekvenci syntetizovány v laboratoři bez použití enzymů. Přístroj o velikosti mikrovlnné trouby může být naprogramován tak, aby spojil nukleotidy v určitém pořadí. Touto *chemickou syntézou* jsou vytvářeny jednořetězcové molekuly DNA libovolné sekvence až do délky kolem 120 nukleotidů.

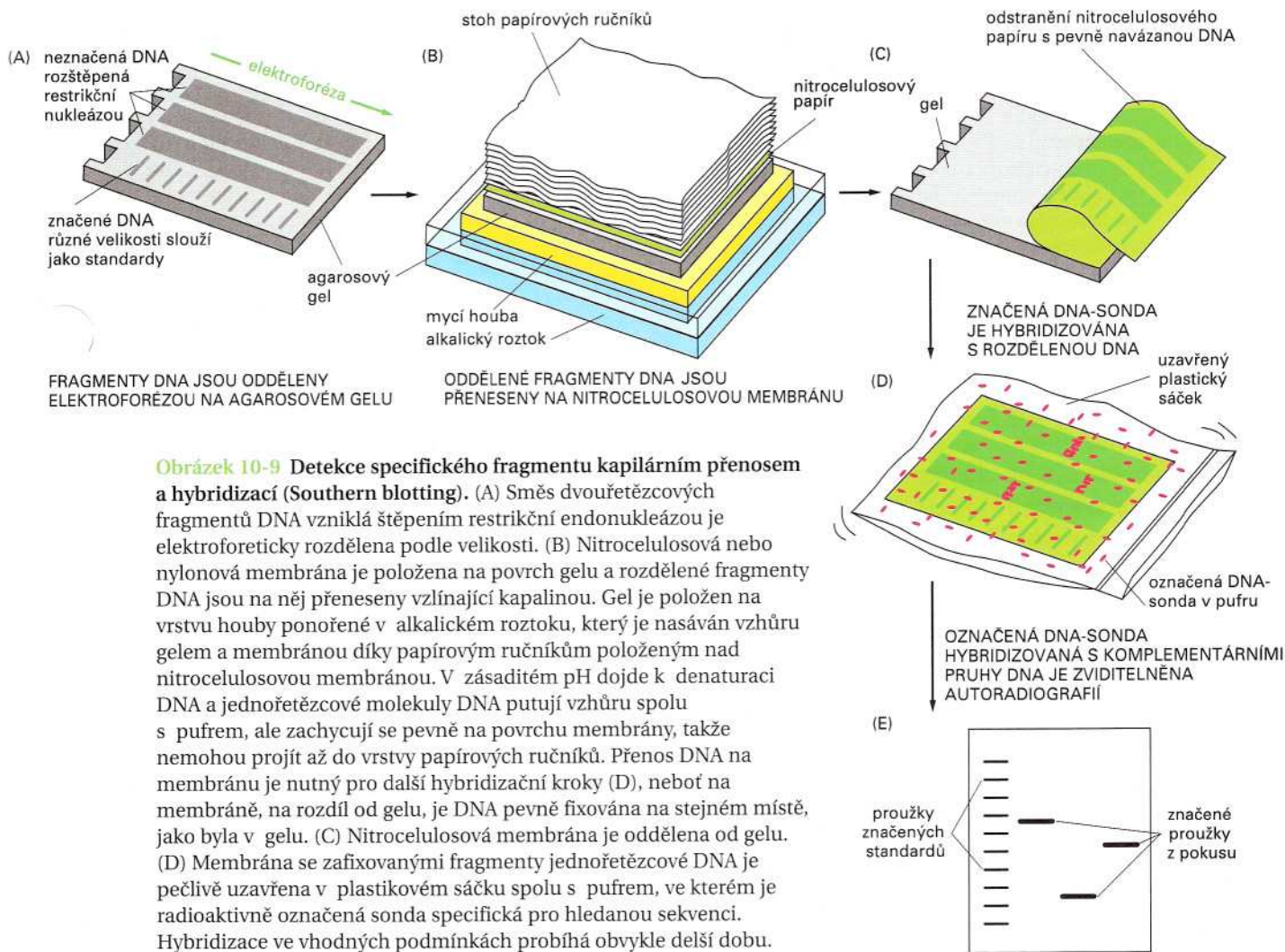
Následující příklad ilustruje jeden ze způsobů detekce potenciálních nositelů genetických chorob. Více než 3000 různých lidských



Obrázek 10-8 Detekce mutace způsobující srpkovou anemii pomocí hybridizace DNA. (A) Srpková anemie je způsobena mutací v genu pro β -globin, jejímž výsledkem je změna glutamové kyseliny na aminokyselinu valin. Jedinci, kteří mají obě alely β -globinového genu defektní, jsou postiženi touto anemií; ti, kdo mají poškozenou pouze jednu alelu, obvykle nejeví žádné symptomy. (B) Mutantní forma genu může být detegována v DNA plodu hybridizací. DNA plodu je nejdříve rozštěpena restriční endonukleázou a vzniklé fragmenty (včetně toho, který obsahuje β -globinový gen) jsou elektroforeticky rozděleny. Pro detekci jsou používány dvě různé synteticky připravené sondy – jedna odpovídá normální sekvenci, druhá mutovaná. Sondy jsou během přípravy označeny radioaktivními izotopy nebo fluorescenčně (viz také obr. 10-9).

dědičných onemocnění je způsobeno mutací v jediném genu. Ve většině případů jsou tyto mutace *recesivní* – to znamená, že se tato choroba projeví pouze tehdy, když daný jedinec zdědí poškozenou alelu tohoto genu od obou rodičů. Dnes je možno už v časném stadiu těhotenství určit, zda má plod obě alely genu zodpovědného za nějakou dědičnou chorobu poškozeny, a eventuálně doporučit ukončení těhotenství.

Zkoumání jednoho lidského genu znamená nalézt tento gen v genomu o více než 3 miliardách nukleotidů. Hybridizace je však vysoce specifická metoda, která nám to umožňuje. Například u recesivní dědičné choroby srpkové anemie je přesně známo, k jaké mutaci a v kterém genu k ní dochází – sekvence GAG je v genu pro β -globinový řetězec hemoglobinu nahrazena sekvencí GTG (obr. 10-8A). Mutace jediného nukleotidu vede v proteinové sekvenci k záměně glutamové kyseliny za aminokyselinu valin; tato relativně malá změna stačí, aby měl vzniklý protein odlišné vlastnosti od normálního proteinu, a byl tak příčinou choroby (viz obr. 6-23). Pro prenatální diagnostiku srpkové anemie je nejdříve z buněk plodu izolována DNA. K testování tohoto onemocnění jsou používány dvě DNA-sondy – jedna odpovídající normální sekvenci genu v oblasti mutace a druhá komplementární k této sekvenci mutovaného genu. Jestliže jsou tyto sondy krátké (kolem 20 nukleotidů), mohou se stabilně navázat na cílovou DNA při kritické teplotě pouze tehdy, jestliže jsou k ní stoprocentně komplementární. Pomocí této techniky lze rozlišit, zda DNA izolovaná z plodu obsahuje jeden či dva poškozené β -globinové geny nebo žádný (obr. 10-8B). Například plod s oběma mutovanými alelami je rozpoznán tak, že jeho DNA hybridizuje pouze se sondou komplementární k mutovanému genu. Celý postup vedoucí k vizualizaci výsledku hybridizace je nazýván *Southern blotting* (neboli Southernův přenos) a je popsán na obr. 10-9.



Obrázek 10-9 Detekce specifického fragmentu kapilárním přenosem a hybridizací (Southern blotting). (A) Směs dvouřetězcových fragmentů DNA vzniklá štěpením restriční endonukleázou je elektroforeticky rozdělena podle velikosti. (B) Nitrocelulosová nebo nylonová membrána je položena na povrch gelu a rozdělené fragmenty DNA jsou na něj přeneseny vztlínající kapalinou. Gel je položen na vrstvu houby ponořené v alkalickém roztoku, který je nasáván vzhůru gelem a membránou díky papírovým ručníkům položeným nad nitrocelulosovou membránou. V zásaditém pH dojde k denaturaci DNA a jednořetězcové molekuly DNA putují vzhůru spolu s pufrům, ale zachycují se pevně na povrchu membrány, takže nemohou projít až do vrstvy papírových ručníků. Přenos DNA na membránu je nutný pro další hybridizační kroky (D), neboť na membráně, na rozdíl od gelu, je DNA pevně fixována na stejném místě, jako byla v gelu. (C) Nitrocelulosová membrána je oddělena od gelu. (D) Membrána se zafixovanými fragmenty jednořetězcové DNA je pečlivě uzavřena v plastickém sáčku spolu s pufrům, ve kterém je radioaktivně označená sonda specifická pro hledanou sekvenci. Hybridizace ve vhodných podmínkách probíhá obvykle delší dobu. (E) Membrána je vyjmuta ze sáčku a pečlivě promyta tak, aby na ní zůstaly jen molekuly sondy hybridizované k DNA zafixované na membráně. Po autoradiografii jsou pak vidět jen ty fragmenty DNA, které hybridizovaly se sondou. Podobnou metodou, označovanou jako *Northern blotting*, je možno detegovat i specifické sekvence RNA. V tomto případě je elektroforeticky rozdělena RNA, sondou obvykle bývají jednořetězcové molekuly DNA.

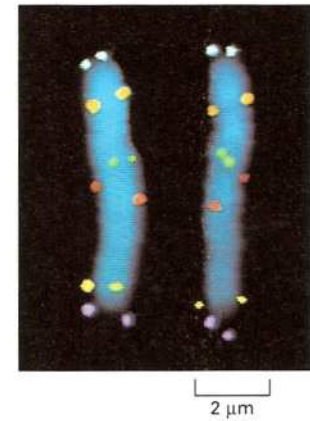
Otázka 10-3 Sekvenování DNA obou vašich β -globinových genů (tedy na každém z obou vašich chromosomů 11) odhalilo mutaci v jednom z těchto genů. Jak silně se musíte na základě této informace obávat toho, že jste nositelem dědičné choroby, která by mohla být přenesena na vaše potomky? Jaké další informace byste potřebovali ke stanovení tohoto rizika?

Stejná technika může být použita pro určení předpokladů k budoucím onemocněním člověka. S její pomocí lze identifikovat jedince, který zdědil abnormální kopie genů, které opravují nesprávně se párující nukleotidy. Protože u těchto lidí (odhadem 1 na 200 obyvatel Severní Ameriky) neprobíhá účinně oprava DNA při replikaci, je u nich zvýšené riziko vzniku rakoviny, zvláště určitých typů rakoviny tlustého střeva (viz Kapitola 6). Těmto jedincům je pak třeba věnovat preventivní péči, aby se zvýšily jejich šance ne onemocnět.

Hybridizací in situ lze určit polohu sekvencí nukleových kyselin v buňkách nebo na chromosomech

Nukleové kyseliny, stejně jako ostatní makromolekuly, zaujímají v buňkách a tkáních konkrétní místo a při jejich izolaci je ztraceno

Obrázek 10-10 Použití hybridizace *in situ* pro detekci polohy genů na chromosomech. Pro tuto fotografii bylo použito šest různých DNA-sond pro označení polohy odpovídajících sekvencí na lidském chromosomu 5 izolovaném v metafázním stadiu mitózy (viz obr. 8-5 a panel 17-1, str. 554-555). Sondy byly chemicky označeny tak, aby mohly být detegovány specifickými fluorescenčně značenými protilátkami, které rozpoznávají příslušnou chemickou značku. Mateřské a otcovské chromosomy 5 byly na obrázku umístěny paralelně. Každá sonda vytváří dvě tečky na každém chromosomu, protože před mitózou je chromosomální DNA zreplikována a každý chromosom je proto tvořen dvěma identickými dvoušroubovicemi DNA (chromatidami; *poznámka překladatele*).



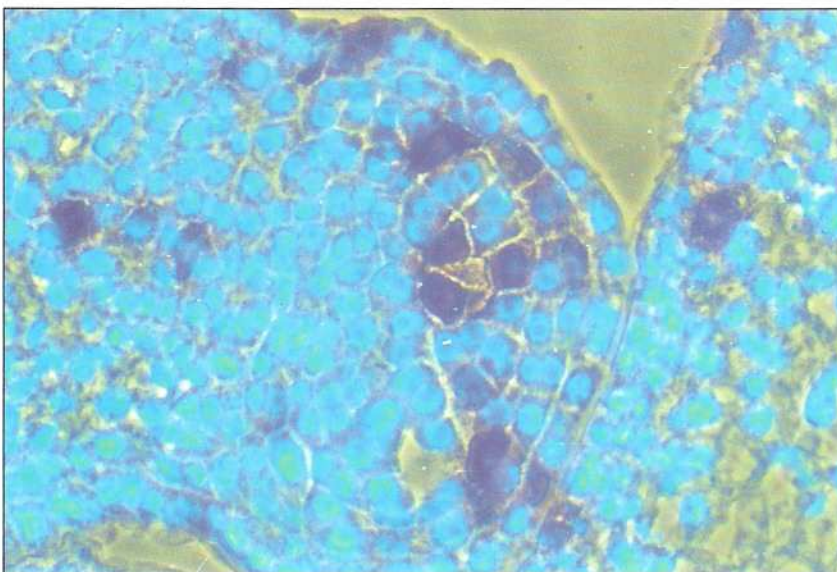
mnoho cenných informací. Proto byly vyvinuty techniky, které umožňují využít sondy k určení polohy specifických nukleotidových sekvencí uvnitř buněk nebo v chromosomech. Tato technika se nazývá **hybridizace *in situ*** (latinsky: *in situ* - na místě) a je používána k detekci sekvencí DNA v chromosomech nebo RNA-sequencí v buňkách. Pro první účel jsou sondy značené fluorescenčními barvami nebo radioaktivními izotopy hybridizovány s celými chromosomy, které byly před přidáním sondy krátce vystaveny vysokému pH, aby došlo k oddělení obou řetězců. Oblasti chromosomů, na které se navázala označená sonda, mohou být zviditelněny (obr. 10-10).

Hybridizace *in situ* může dát také odpověď na otázku, kde se v buňce nachází daná RNA nebo ve kterých buňkách tkáň dochází k expresi určitého genu (obr. 10-11). Tato technika má značné výhody například při studiu vývoje embrya, kdy můžeme snadno sledovat změny v expresi jednotlivých genů v různých buňkách.

Otázka 10-4 Naprostá většina všech buněk jednoho živočišného organismu obsahuje identické genomy. V experimentu byla zafixována a pro hybridizaci *in situ* použita tkáň složená z mnoha různých typů buněk. K vašemu překvapení je hybridizační signál v některých buňkách mnohem silnější než v jiných. Vysvětlete tento výsledek.

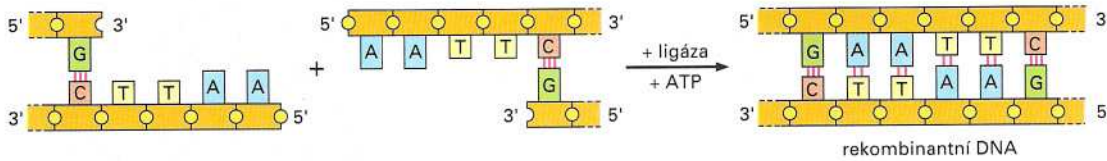
Klonování DNA

Řekli jsme si, že molekuly DNA mohou být štěpeny na kratší úseky restriktivními endonukleázami a tyto fragmenty mohou být od sebe odděleny gelovou elektroforézou. Také jsme se zmínili o tom, jak

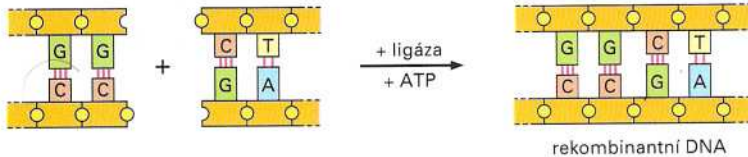


Obrázek 10-11 Buňky produkující určitou mRNA mohou být vizualizovány hybridizací *in situ*. Tento příklad ukazuje skupinu buněk vrcholové části stonku hledíku. Pouze několik buněk (obarveny tmavě modře) exprimuje mRNA pro protein cyklin, který aktivuje buňku k dělení. Pro detekci byla použita DNA-sonda pro mRNA cyklinu, na kterou byl navázán enzym tvořící tmavě modrý reakční produkt. Jádra v ostatních buňkách byla obarvena barvivem DAPI a jeví se proto světle modře.

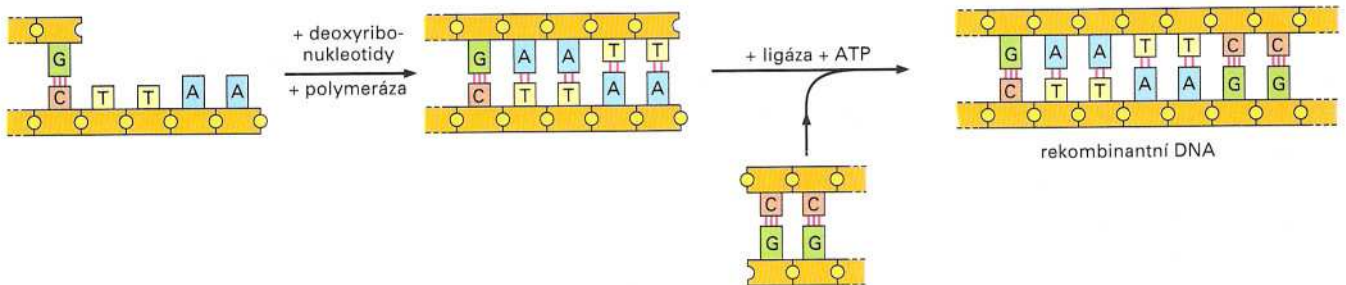
(A) SPOJENÍ DVOU KOMPLEMENTÁRNÍCH NEROVNÝCH KONCŮ



(B) SPOJENÍ DVOU TUPÝCH KONCŮ



(C) SPOJENÍ TUPÉHO KONCE S NEROVNÝM KONCEM



Obrázek 10-12 Vytváření

rekombinantních molekul DNA *in vitro*.

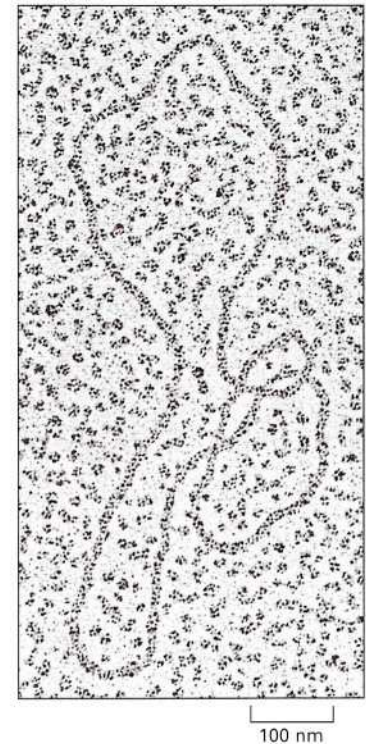
Enzym DNA-ligáza může spojit jakékoliv dva fragmenty DNA nezávisle na tom, z jakého zdroje pocházejí. Energie z hydrolýzy ATP je využívána ligázou pro spojení cukr-fosfátových koster obou molekul DNA. (A) Spojení dvou fragmentů DNA, které vznikly štěpením restriční endonukleázou *EcoRI*. Všimněte si, že přesahující jednořetězcové konce vzniklé štěpením stejným enzymem se mohou navzájem bezchybně párovat, což velmi usnadňuje jejich spojení. Touto liganční reakcí se obnoví původní restriční místo. (B) Spojení dvou fragmentů, které byly vytvořeny štěpením nukleázami *HaeIII* a *AluI*. (C) Spojení fragmentů DNA vzniklých štěpením enzymy *EcoRI* a *HaeIII*; při této liganční reakci je nezbytné použít DNA-polymerázu, která dosyntetizuje kratší vlákno DNA po štěpení enzymem *EcoRI*. Všechny fragmenty DNA mají stejnou orientaci, takže jejich 5'-konec horního řetězce je vlevo a dolního řetězce vpravo, jak je zakresleno v (A).

může být stanovena nukleotidová sekvence každého fragmentu DNA a jak můžeme rozpoznat určitou sekvenci pomocí hybridizace. V této části kapitoly si ukážeme, jak je možno tyto techniky kombinovat a klonovat jednotlivé úseky DNA. V buněčné biologii má termín **klonování DNA** dva významy. Za prvé se tímto termínem rozumí vytvoření mnoha identických kopií molekuly DNA a za druhé je tento termín chápán jako proces izolace určitého úseku DNA (obvykle genu) z celkové buněčné DNA, který je usnadněn specifickou amplifikací požadovaného úseku DNA.

DNA-ligáza spojuje dva fragmenty za vzniku rekombinantní molekuly DNA

Moderní technologie DNA je založena nejen na možnosti štěpit dlouhé molekuly DNA na kratší, ale také na možnosti spojit tyto fragmenty dohromady v nových kombinacích. Odpověď na otázku, jak toho dosáhnout, lze nalézt – jako ve většině případů technického pokroku – přímo v buňce. Jak bylo řečeno v Kapitole 6, enzym **DNA-ligáza** odstraňuje zlomy v páteři DNA, které vznikají během replikace a oprav DNA (viz obr. 6-20 a 6-30). Tento enzym se stal jedním z nejdůležitějších nástrojů technologie rekombinantní DNA, a to díky své schopnosti spojit jakékoliv dva fragmenty DNA do jedné molekuly (obr. 10-12). Protože DNA ze všech organismů má stejnou chemickou strukturu, může DNA-ligáza spojit i dva fragmenty z různých zdrojů a dát tak vzniknout molekulám, které se v přírodě nevy-

Obrázek 10-13 Bakteriální plasmid je běžně používán jako klonovací vektor (fotografie z elektronového mikroskopu). Tato kruhová dvouřetězcová molekula DNA je tvořena několika tisíci nukleotidových párů. Pro vizualizaci DNA v elektronovém mikroskopu je nutné ji nejprve obarvit, proto se DNA jeví širší, než ve skutečnosti je.

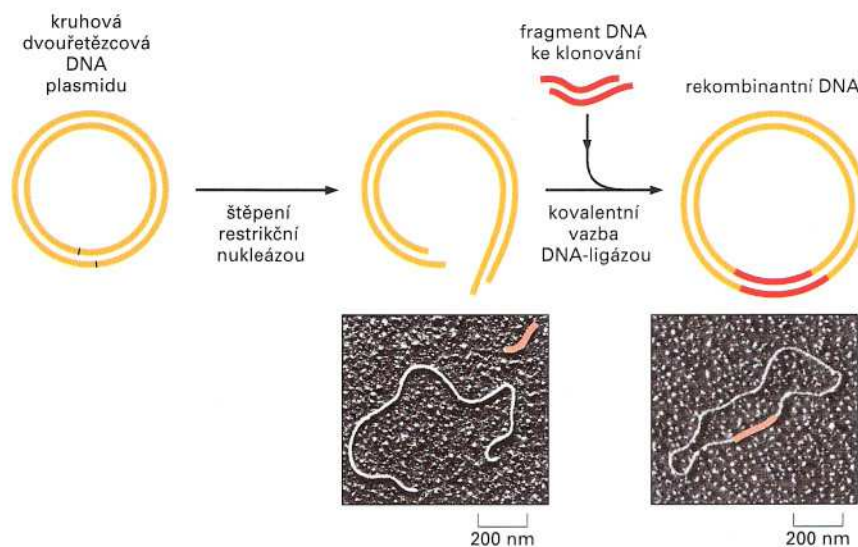


skytují. Jakmile jsou dva úseky DNA spojeny a začleněny do buněčné DNA, buňka už není schopná toto spojení rozpoznat a bude tuto cizorodou DNA replikovat a transkribovat jako normální součást buněčné DNA.

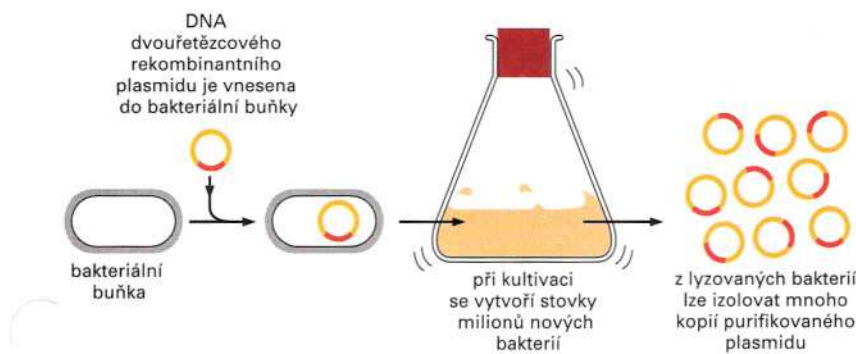
Bakteriální plasmidy mohou být využity pro klonování DNA

Pro mnoho aplikací technologie DNA je nutné naklonovat (vytvořit identické kopie) úsek DNA, většinou gen. To lze udělat několika způsoby nejjednodušší je namnožit požadovaný úsek v rychle se dělících bakteriích, kdy je při každé replikaci bakteriální DNA zkopírována i naše DNA. Aby se cizorodá DNA v bakteriální buňce udržela, je pro její amplifikaci využit nosič neboli *vektor*, kterým je bakteriální plasmid nebo virový genom. Typický **plasmidový** klonovací vektor je relativně malá kruhová molekula DNA o délce několika tisíc nukleotidových párů, která se může replikovat uvnitř bakterie (obr. 10-13). Plasmidový vektor musí obsahovat replikační počátek, který umožňuje replikaci plasmidu nezávisle na bakteriálním chromosomu. Dalším požadavkem je přítomnost místa rozpoznávaného restriční endonukleázou, aby mohl být plasmid rozpojen a do vzniklé mezery vložen cizorodý fragment DNA. Plasmidy obvykle obsahují také gen pro nějakou rozlišitelnou vlastnost, většinou rezistenci k antibiotikům, která umožňuje přímou identifikaci bakterií obsahujících tento plasmid (viz Kapitola 9).

Abychom mohli vložit nějaký fragment DNA do vektoru, musíme nejdříve tento vektor rozštěpit restriční endonukleázou, jejíž rozpoznávací místo je ve vektoru obsaženo pouze jednou. Pak obě mole-



Obrázek 10-14 Inserce fragmentu DNA do bakteriálního vektoru pomocí DNA-ligázy. Kruhová molekula plasmidu se otevře restriční endonukleázou (v tomto případě takovou, která vytváří přesahující konce) a smíchá se fragmentem DNA, který má být naklonován (a který byl připraven štěpením stejnou nukleázou). K reakci jsou přidány ještě DNA-ligáza a ATP. Navzájem kohezivní konce obou molekul, vektoru a insertu, se spárují a zlomy v řetězci jsou uzavřeny DNA-ligázou, čímž vznikne kruhová rekombinantní molekula DNA.



Obrázek 10-15 Klonování fragmentu DNA. Pokud potřebujeme získat mnoho kopií určitého fragmentu DNA, je nutné ho nejprve naklonovat do vektoru, jak je ukázáno na obr. 10-14. Vzniklý rekombinantní plasmid je pak zaveden do bakterie, kde může být mnohamilionkrát replikován, jak se bakterie množí.

kuly DNA kovalentně spojíme DNA-ligázou (obr. 10-14) a rekombinantní molekulu DNA vrátíme do bakteriální buňky (obvykle *E. coli*) transformací (viz obr. 9-8). Pokud pěstujeme *E. coli* v roztoku bohatém na živiny, dokáže se tato bakterie dělit každých 30 minut. S tím, jak se zdvojuje počet bakteriálních buněk, zdvojuje se i množství kopií rekombinantní molekuly a během jediného dne vznikají stovky milionů kopií plasmidu. Bakterie jsou pak lyzovány a malé plasmidové molekuly DNA jsou odděleny od zbytku buněčného obsahu včetně velkého bakteriálního chromosomu. Purifikovaná plasmidová DNA obsahuje miliony kopií původního fragmentu DNA (obr. 10-15). Tento fragment můžeme opět vhodnými restriktivními endonukleázami vyštěpit a od zbytku plasmidu oddělit gelovou elektroforézou (viz obr. 10-3).

Lidské geny se izolují klonováním DNA

Viděli jsme, že jakýkoliv fragment DNA lze amplifikovat za vzniku velkého množství kopií. Ale jak je možno tyto fragmenty identifikovat? Jak je možno naklonovat konkrétní gen z přibližného počtu 60 000 lidských genů? Vše si ukážeme na konkrétním případě izolace genu pro protein účastnící se srážení krve – *faktor VIII*. Ačkoliv se postupy použité pro izolaci různých lidských genů liší případ od případu, na tomto příkladě si můžeme demonstrovat mnoho společných rysů.

Poškození genu pro faktor VIII způsobuje nejčastější typ hemofilie – *hemofilii A*. Tato genetická choroba byla identifikována před více než tisíci lety a postihuje jednoho z přibližně 10 000 mužů. U pacientů trpících hemofilií A se tvoří jen částečně aktivní faktor VIII, což se projevuje opakovaným nekontrolovatelným krvácením. Donedávna se tato choroba standardně léčila injekcí koncentrovaného roztoku faktoru VIII izolovaného z mnoha vzorků krve. Bohužel tato metoda vystavovala pacienty riziku infekce virem, nevyjímaje HIV (původce AIDS). Komerční produkce čistého faktoru VIII pomocí metod rekombinantní DNA přinesla značné zlepšení léčby této choroby. Nejdříve však bylo nutné naklonovat kódující sekvenci pro faktor VIII a použít ji pro produkci velkého množství proteinu, jak bude popsáno později v této kapitole.

Pracovat se sekvencí dlouhou 3×10^9 nukleotidových párů kompletního lidského genomu je odstrašující úkol; prvním krokem při klonování lidského genu tedy musí být naštěpení celkové genomové DNA na menší, praktičtější úseky, s kterými se lépe pracuje. Nejdříve musí být izolována celková DNA ze vzorku tkáně nebo lidské

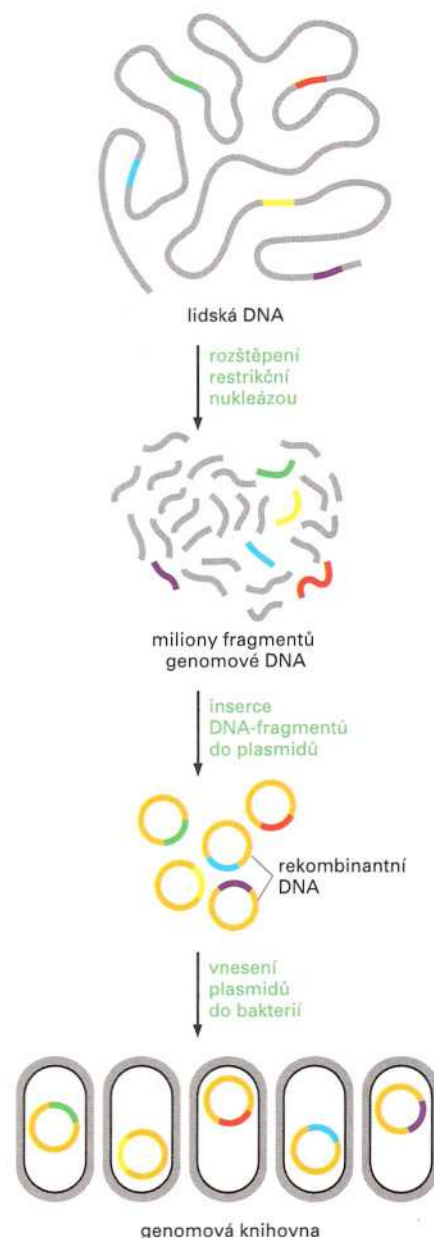
Obrázek 10-16 Konstrukce lidské genomové knihovny. Genomová knihovna je tvořena sadou bakterií, přičemž každá z nich nese odlišný malý fragment lidské DNA. Pro zjednodušení je ukázáno klonování pouze několika málo fragmentů (*barevně*). Ve skutečnosti jsou všechny *šedé* fragmenty také klonovány.

buněčné kultury, která je následně naštěpena na kratší fragmenty buď mechanicky nebo restriční endonukleázou a všechny vzniklé fragmenty jsou naklonovány dříve popsaným způsobem. Sbírká takto naklonovaných fragmentů se nazývá **DNA knihovna**. V tomto případě je to konkrétně *genomová knihovna*, protože fragmenty DNA vznikly naštěpením genomové DNA. Později však uvidíme, že existují i jiné typy DNA-knihoven. V současnosti existuje mnoho genomových knihoven odvozených od DNA různých organismů, které jsou volně dostupné pro všechny vědce. To umožňuje značné urychlení práce při hledání konkrétního genu, neboť vytvoření DNA knihovny je dosti náročné.

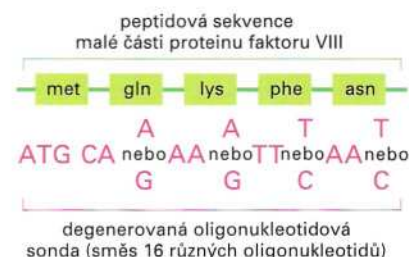
Jeden z obecných postupů tvorby lidské genomové knihovny je zachycen na obr. 10-16. Lidská DNA je nejprve vystavena účinkům restriční endonukleázy, čímž vznikají miliony různých fragmentů. Směs fragmentů DNA je vložena do plasmidových vektorů za podmínek, které upřednostňují inserci jediného fragmentu do vektorové molekuly DNA. Vzniklé rekombinantní plasmidy jsou smíchány s kulturou *E. coli* v koncentraci, která zajišťuje vstup pouze jediné molekuly DNA do bakteriální buňky. Výsledná bakteriální kultura představuje genomovou knihovnu. Jestliže tuto kulturu vysejeme na Petriho misky (jak je popsáno na obr. 9-2), každá kolonie vzniklá z jediné bakteriální buňky představuje jeden konkrétní úsek lidské DNA. Několik milionů kolonií této knihovny pak obsahuje celý lidský genom.

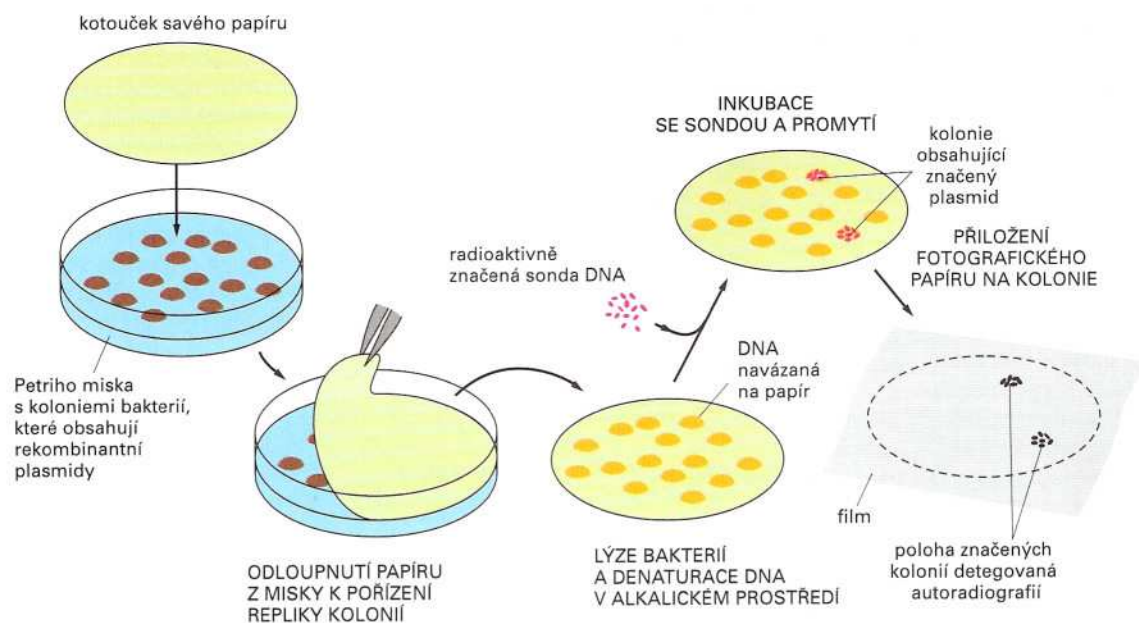
Najít konkrétní gen v této knihovně je problém srovnatelný se snahou najít knihu v normální knihovně, ve které neexistuje žádný katalog a ve které knihy nejsou nijak uspořádány. Jak tedy můžeme najít určitý úsek DNA (v našem případě gen pro faktor VIII) v celé knihovně? Klíčem pro nalezení hledaného úseku je využití hybridizace nukleových kyselin, kterou jsme si popsali na počátku této kapitoly. Jestliže máme sondu pro gen faktoru VIII, můžeme se pokusit najít v knihovně úsek DNA párující se s naší sondou. Ale kde vezmeme sondu pro gen, který ještě nebyl identifikován?

V našem případě bylo z lidské krve izolováno malé množství proteinu faktoru VIII a byla určena aminokyselinová sekvence jeho několika krátkých úseků (viz panel 5-6, str. 164-165). Použitím gene-



Obrázek 10-17 Oligonukleotidová sonda pro gen odvozená na základě znalosti krátké aminokyselinové sekvence proteinu. Díky degeneraci genetického kódu (to znamená, že každá aminokyselina může být kódována více než jedním tripletem DNA; viz obr. 7-20) existuje pro každou aminokyselinovou sekvenci mnoho různých nukleotidových sekvencí, které ji mohou kódovat. Avšak v genomové DNA se vyskytuje pouze jediná nukleotidová sekvence, která tento protein ve skutečnosti kóduje. Protože nevíme předem, která sekvence je ta jediná správná, je pro hledání genu v genomové knihovně použita směs možných sekvencí nazývaná degenerovaná oligonukleotidová sonda. Naším příkladem je lidský protein faktor VIII a právě zobrazená degenerovaná sonda byla použita pro klonování genu v roce 1984.





tického kódu v opačném směru mohou být z pořadí aminokyselin odvozeny nukleotidové sekvence, jejichž přepisem do proteinu by vznikly původní aminokyselinové sekvence (obr. 10-17) a vhodná DNA-sonda pak může být připravena chemickou syntézou. S použitím této sondy a DNA-hybridizace lze potom nalézt těch několik vzácných bakteriálních klonů, které obsahují lidskou DNA komplementární k nukleotidové sekvenci sondy (obr. 10-18).

Použitím sondy pro faktor VIII při hledání v lidské genomové knihovně byl identifikován jediný komplementární klon. Nukleotidová sekvence však ukázala, že tento klon obsahuje jen malou část celého genu. Následnými analýzami se zjistilo, že gen pro faktor VIII je tvořen 180 000 nukleotidovými páry a obsahuje 25 intronů (viz obr. 7-14B). Pak už tedy nebylo překvapující, že v jednom klonu nebyl obsažen celý gen.

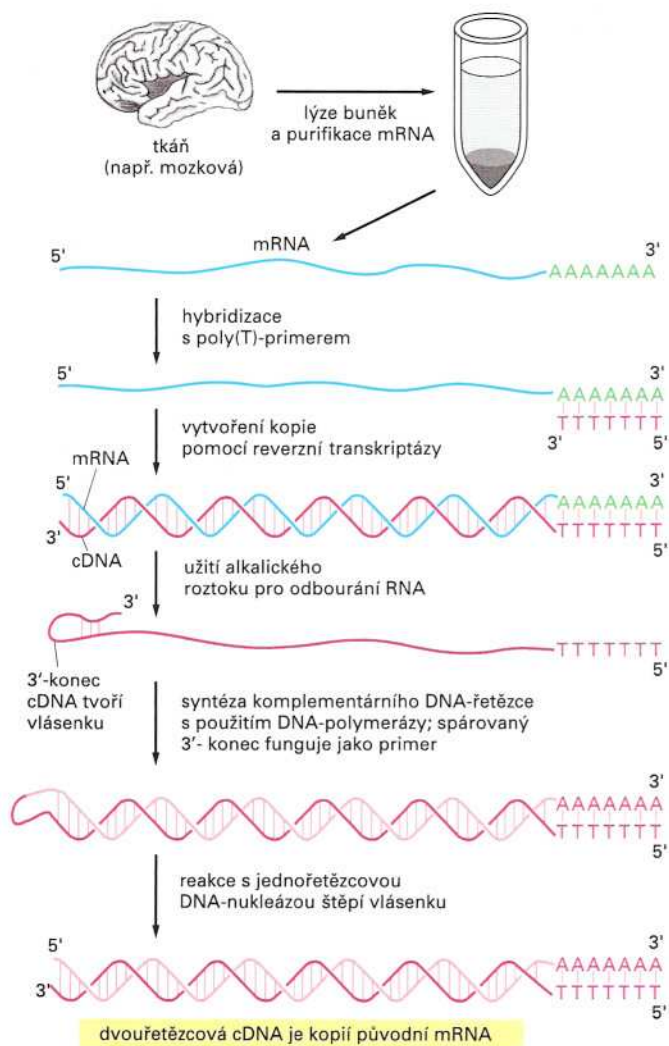
Pro mnoho aplikací technologie DNA je výhodné mít klon, který obsahuje jenom kódující sekvence genu, tedy takový, který neobsahuje intronovou DNA. Například gen pro faktor VIII – tvořený introny a exony – je tak velký, že je nezbytné analyzovat ho po částech. Navíc, pokud bychom chtěli určit úplné pořadí aminokyselin proteinu faktoru VIII z nukleotidové sekvence jeho genu, bylo by extrémně neúčinné určovat pořadí nukleotidů genu izolovaného z genomové knihovny, neboť velká většina tohoto genu odpovídá intronům. Protože je však poměrně snadné izolovat gen bez intronů, jak si ukážeme v následující části, jsou pro tyto účely využívány jiné typy knihoven, tzv. *cDNA-knihovny*.

Knihovny cDNA reprezentují mRNA vznikající v určité tkáni

Lidská cDNA-knihovna je podobná genomové knihovně tím, že také obsahuje velké množství klonů s různými lidskými sekvencemi DNA. Významně se však od ní liší v jednom aspektu – DNA, která je obsažena v cDNA-knihovně, není genomová (chromosomální DNA), ale byla vytvořena zpětným přepisem molekul mRNA vyskytujících se v určité tkáni nebo buněčné kultuře do sekvence DNA.

Obrázek 10-18 Technika, která je běžně používána pro detekci bakteriálního klonu nesoucího určitý fragment DNA. Přiložením nitrocelulosové membrány na povrch misky je zhotovena přesná kopie polohy jednotlivých kolonií rostoucích na Petriho misce. Bakterie otisklé na membráně jsou lyzovány alkalickým roztokem, který zároveň denaturuje DNA. Jednořetězcové molekuly DNA na membráně jsou hybridizovány s vysoce radioaktivně označenou sondou a kolonie bakterií, které obsahují plasmid s hledaným genem, jsou vizualizovány autoradiografií. Živé buňky pak mohou být nalezeny podle polohy na Petriho misce.

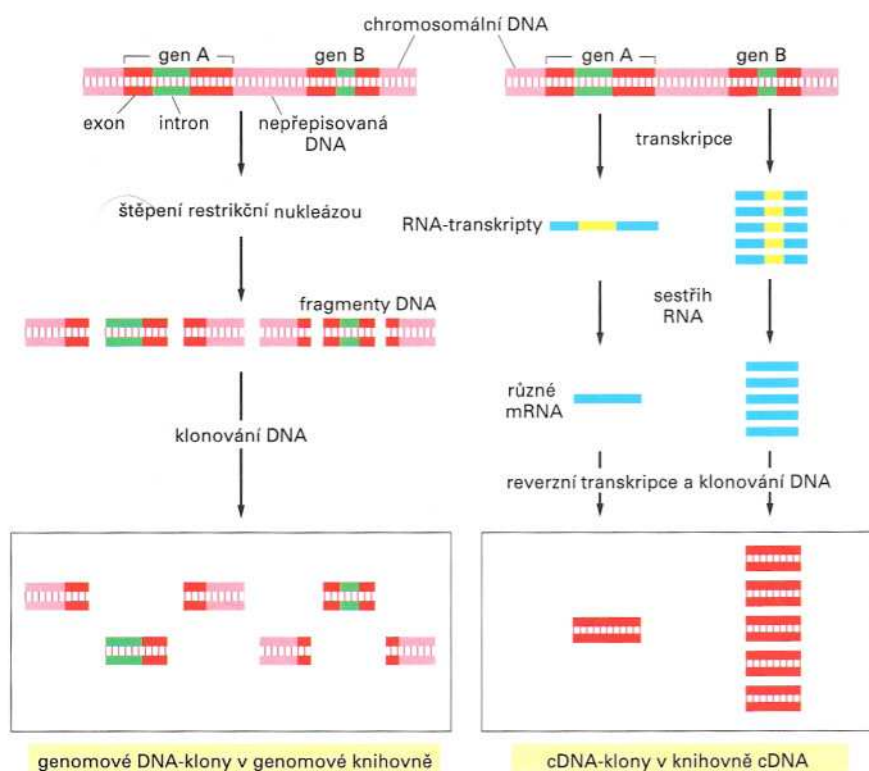
Otázka 10-5 Každá z DNA-sond na obr. 10-17 je dlouhá pouze 15 nukleotidů. Kolik párujících se sekvencí se bude průměrně vyskytovat v haploidním lidském genomu o velikosti 3×10^9 nukleotidů? Jak můžete zjistit, že párující se sekvence odpovídá genu pro faktor VIII?



Obrázek 10-19 Syntéza cDNA. Celková mRNA je izolována z určitého typu tkáně a její DNA-kopie jsou vytvořeny enzymem reverzní transkriptázou (viz obr. 9-30 a 9-31). Pro zjednodušení je ukázán přepis pouze jedné molekuly mRNA do cDNA. Nejprve se hybridizací k RNA připojí krátký oligonukleotid komplementární k úseku poly(A) (probírá se v Kapitole 7) na 3'-konci mRNA, který se použije jako primer pro reverzní transkriptázu. Ta potom kopíruje RNA do komplementárního řetězce DNA, a tak vytváří hybridní šroubovici DNA/RNA. Působením alkalického pH se v hybridní dvojšroubovici vlákno RNA selektivně odbourává na jednotlivé nukleotidy. Podle zbylé jednovláknové molekuly cDNA je enzymem DNA-polymerázou vytvořen druhý řetězec cDNA. Primerem pro syntézu druhého řetězce je 3'-konec jednořetězcové DNA, který se může otočit zpět a vytvořit vlásečku na základě náhodně se párujících bází.

Pro přípravu cDNA knihovny je nejprve izolována celková mRNA, která je enzymem nazývaným reverzní transkriptáza přepsána zpět do sekvence DNA (cDNA; anglicky *complementary DNA* = komplementární DNA) (obr. 10-19). Molekuly cDNA jsou pak naklonovány stejným způsobem jako fragmenty genomové DNA do plasmidových vektorů, jak bylo popsáno dříve. Při použití cDNA-knihovny vytvořené z mRNA jaterních buněk, které syntetizují faktor VIII, je možno izolovat kompletní kódující sekvenci genu pro faktor VIII, která neobsahuje introny. cDNA pro faktor VIII byla izolována z cDNA knihovny pomocí sondy z části genomové DNA pro faktor VIII stejným postupem, jaký je zachycen na obr. 10-18. V závěrečné části kapitoly si ukážeme, jak byla izolovaná sekvence použita pro komerční produkci lidského faktoru VIII.

Mezi klony genomové DNA a klony cDNA je několik podstatných rozdílů (obr. 10-20). Klony s genomovou DNA reprezentují náhodný vzorek všech sekvencí DNA, které jsou součástí genomu organismu a kromě velmi vzácných výjimek nezáleží na tom, z kterého buněčného typu byla genomová DNA izolována. Genomové knihovny obsahují kromě kódujících sekvencí genů také velké množství repetitivní DNA, intronů, regulačních oblastí genů a mezeríkové DNA. Naproti tomu obsahují klony cDNA pouze kódující



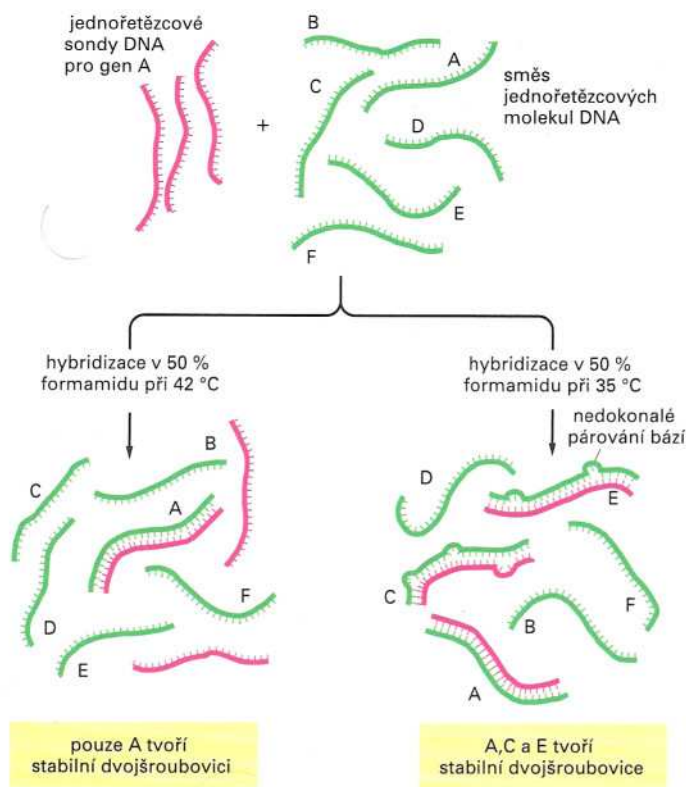
Obrázek 10-20 Odlišnosti mezi genomovými DNA-klony a cDNA-klony odvozenými ze stejné oblasti DNA. V tomto případě je gen A na rozdíl od genu B velice zřídka přepisován, oba geny obsahují introny (*zeleně*). V genomové DNA-knihovně se nacházejí jak introny, tak nepřepisované sekvence (*růžově*), a většina klonů bude obsahovat jen část kódující sekvence genu (*červeně*). V cDNA-klonech byly intronové sekvence (*žlutě*) během vzniku mRNA (*modře*) odstraněny sestřihem, a proto je každý klon tvořen nepřerušovanou kódující sekvencí. Protože je gen B ve tkáni, ze které byla cDNA-knihovna připravena, mnohem více transkribován než gen A, bude i více klonů cDNA-knihovny obsahovat tento gen. Naproti tomu se v genomové knihovně budou oba geny vyskytovat přibližně stejně často.

sekvence, a to jen těch genů, které byly přepisovány v buňkách, ze kterých byla izolována mRNA. Protože buňky různých tkání exprimují různé geny, každá tkáň obsahuje jinou sadu molekul mRNA a cDNA-knihovny se tedy navzájem liší i v rámci jednoho organismu podle tkáně, ze které byla mRNA izolována. Expresí genů se mění v závislosti na vývojovém stadiu, lze tedy konstruovat i cDNA-knihovny, které odrážejí tyto změny během vývoje organismu.

Největší výhodou cDNA-knihoven je však to, že obsahují pouze nepřerušované kódující sekvence genů. Z těchto sekvencí lze tedy přímo vyčíst aminokyselinové složení proteinu, který kódují, nebo je použít pro syntézu tohoto proteinu v bakteriálních nebo kvasinkových buňkách (žádné z nich nemohou odstraňovat introny ze savčích RNA). V obou případech je tedy naprosto nezbytné použít gen izolovaný z cDNA-knihovny. Podobně jako genomové knihovny jsou i cDNA-knihovny různých tkání a organismů volně dostupné pro všechny vědce, nebo si je lze opatřit z komerčních zdrojů.

Hybridizace umožňuje identifikaci i vzdáleně příbuzných genů

Jak jsme si vysvětlili v Kapitole 9, vznikají nové geny během evoluce duplikací a divergencí již existujících genů nebo spojením částí různých původních genů v nové kombinace. Z tohoto důvodu je většina genů součástí rodiny tvořené vysoce příbuznými geny, které se mohou vyskytovat na různých místech genomu; mnoho z nich má pravděpodobně podobnou funkci. Jak jsme si ukázali, izolace konkrétního genu je složitý úkol, často vyžadující sekvenování proteinu; na základě zjištěné aminokyselinové sekvence je pak navrženo několik vhodných sond a jejich testováním můžeme v knihovně nalézt



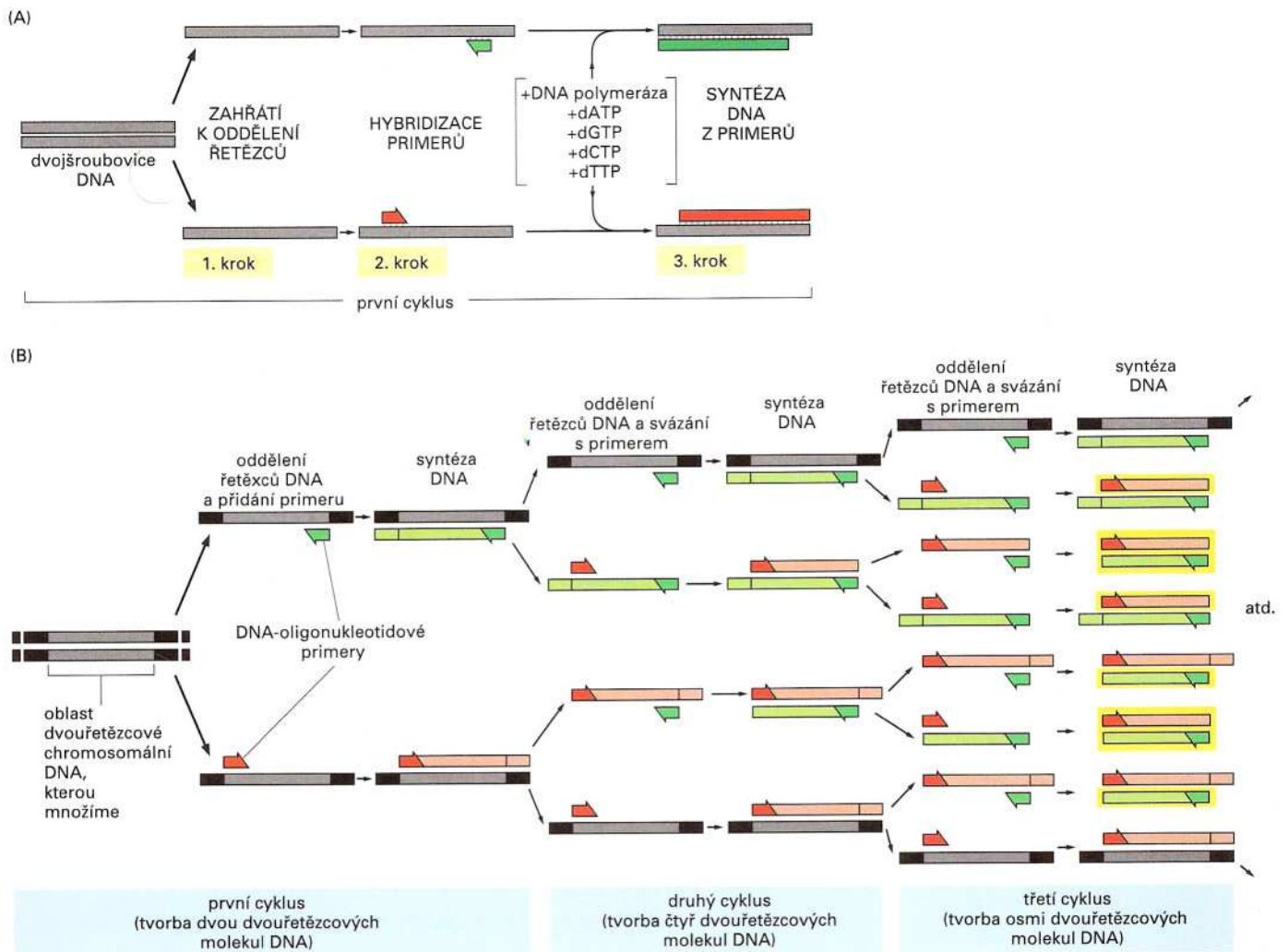
Obrázek 10-21 Různé hybridizační podmínky umožňují vytvoření dvojšroubovice s některými nespárovanými nukleotidy. Pokud hledáme pomocí hybridizace pouze molekuly DNA stoprocentně se párující se sondou, hybridizační reakce probíhá při teplotě pouze o několik stupňů nižší, než při které tato dvojšroubovice v témže roztoku denaturuje (než je její *teplota tání*), takže ne zcela se párující dvojšroubovice jsou nestabilní. Pokud chceme najít sekvence, které jsou se sondou příbuzné, hybridizace probíhá při nižší teplotě. To umožňuje vytvoření i dvojšroubovic, které nemají spárované všechny nukleotidy. Pouze hybridizací při nižší teplotě můžeme najít geny (C a E v tomto příkladě), které nejsou stejné, ale pouze příbuzné s genem A (viz obr. 10-18).

hledaný gen. Jakmile však známe sekvenci jediného genu z určité genové rodiny, je poměrně snadné izolovat geny patřící do stejné rodiny, a to použitím sekvence prvního genu jako sondy pro hybridizaci. Protože geny tvořící jednu rodinu nemusí mít velmi podobnou nukleotidovou sekvenci, jsou při těchto hybridizacích zvoleny takové podmínky, které umožňují tvorbu stabilních duplexů DNA-sonda, ve kterých nejsou všechny nukleotidy spárovány (obr. 10-21). Tímto způsobem lze také izolovat gen z jednoho druhu (například člověka) pomocí sondy, která byla odvozena od hledaného genu izolovaného z experimentálně vhodnějšího organismu (například myši nebo octomilky).

Polymerázovou řetězovou reakcí lze amplifikovat vybrané sekvence DNA

Ačkoliv klonování DNA pomocí knihoven je hlavním způsobem izolace genů, přibližně před deseti lety byla vynalezena rychlejší a méně nákladná metoda pro izolaci genů a mnohé další aplikace technologie DNA. Tato metoda se nazývá **polymerázová řetězová reakce (PCR; anglicky *polymerase chain reaction*)** a probíhá zcela v podmínkách *in vitro*, tedy bez použití buněk. Pomocí této techniky může být rychle a vysoce selektivně namnožena konkrétní nukleotidová sekvence obsažená v jakékoliv DNA. Polymerázová řetězová reakce je v dnešní době široce používána, například v diagnostice při analýze genetických chorob nebo pro namnožení jakéhokoliv genu z malého vzorku DNA.

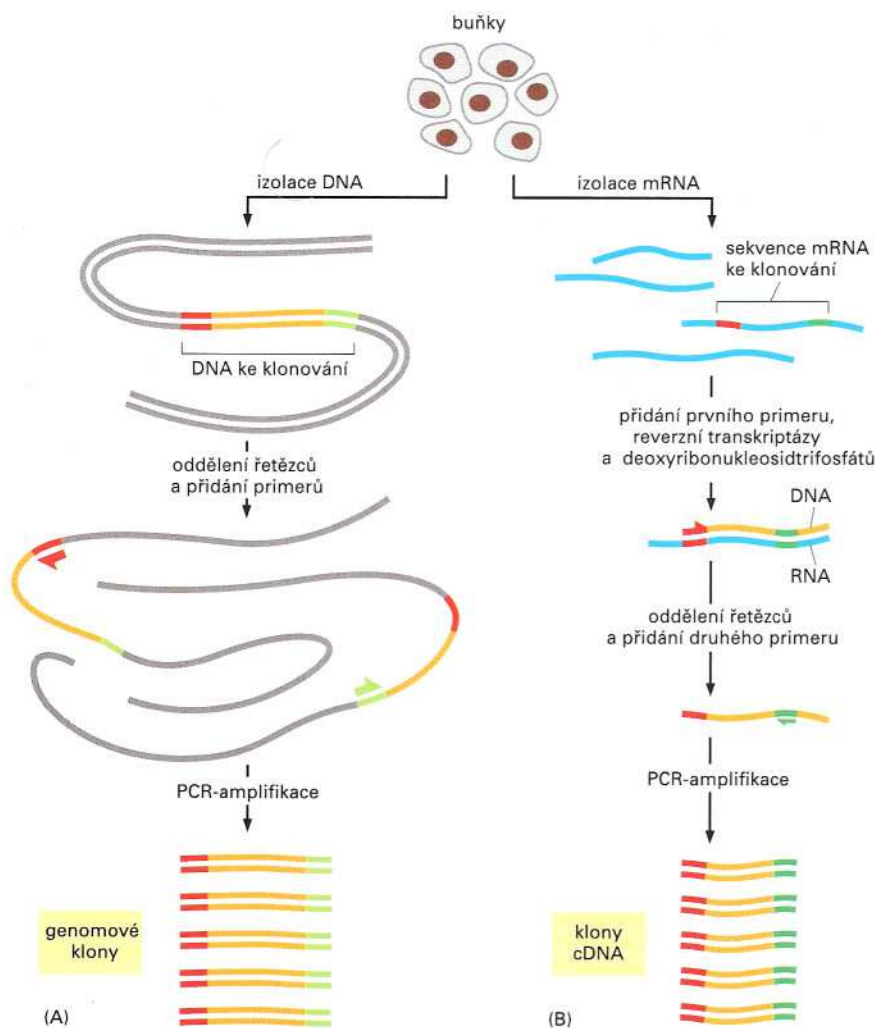
PCR je založena na využití DNA-polymerázy pro opakované kopírování templátové molekuly DNA. Syntéza DNA je řízena krátký-



Obrázek 10-22 Namnožení DNA pomocí PCR. Na základě znalosti sekvence DNA, kterou chceme amplifikovat, jsou nasynthetizovány dva oligonukleotidy, přičemž každý je komplementární k sekvenci jednoho řetězce dvoušroubovice na opačných koncích úseku, který má být amplifikován. Tyto oligonukleotidy slouží jako primery pro syntézu DNA *in vitro* pomocí DNA-polymerázy a navíc ohraničují amplifikovaný segment. (A) PCR začíná s dvouřetězcovou DNA, a proto na začátku každého cyklu je třeba od sebe oddělit oba řetězce krátkým zvýšením teploty (krok 1). Po denaturaci je reakční roztok ochlazen v přítomnosti velkého nadbytku obou primerů, které nasedají na obě komplementární sekvence DNA (krok 2). V kroku 3 jsou z obou primerů syntetizovány nové řetězce DNA v přítomnosti DNA-polymerázy a všech čtyř deoxyribonukleosidtrifosfátů. Další cyklus je pak znovu zahájen denaturací zvýšenou teplotou, kdy dojde k oddělení nasynthetizovaných řetězců DNA. Celá technika je založena na použití speciální DNA-polymerázy, která byla izolována z termofilní bakterie; tato polymeráza je stabilní i při mnohem vyšších teplotách než eukaryontní DNA-polymerázy, takže není denaturována vysokou teplotou v kroku 1, a nemusí být tedy přidávána po každém cyklu reakce.

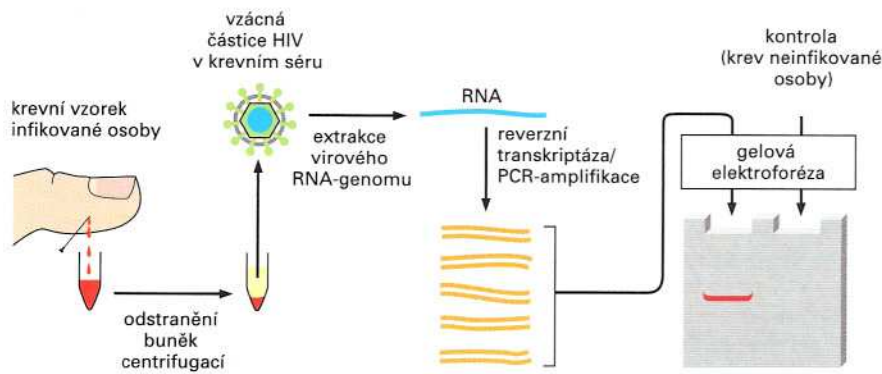
(B) V dalších cyklech reakce slouží i nově nasynthetizované molekuly DNA jako templáty a během několika málo cyklů začnou v roztoku převažovat amplifikované molekuly ohraničené z obou stran primery. Obvykle se pro amplifikaci používá 20-30 cyklů, přičemž se v každém cyklu množství molekul oproti předcházejícímu cyklu zdvojnásobí. Jelikož jeden cyklus trvá přibližně pět minut a protože byla celá technika zautomatizována, je nyní možno naklonovat fragment DNA bez použití buněk během několika hodin na rozdíl od několikadenního standardního postupu. Z celé molekuly DNA, která je pro reakci použita, je amplifikován pouze úsek mezi primery, protože DNA-polymeráze pro iniciaci replikace na jiném místě chybí primer.

Jak je ukázáno v (B), produktem tří cyklů je 16 řetězců DNA, z nichž 8 (žlutě) má požadovanou délku (zcela vlevo, úsek původní DNA ohraničený závorkou) a odpovídá jednomu nebo druhému řetězci původní DNA; ostatní řetězce jsou delší a obsahují i sekvence, které se nacházejí za místem, na které nasedá primer pro syntézu opačného řetězce DNA – tyto řetězce vznikají jen tehdy, pokud je templátem původní řetězec. Po dalších třech cyklech má 240 z 256 řetězců požadovanou délku a po několika dalších cyklech začnou řetězce ohraničené primery zcela převažovat.



Obrázek 10-23 Použití PCR pro získání genomového nebo cDNA-klonu. (A) Pro získání genomového klonu pomocí PCR je nezbytné nejdříve izolovat z buněk chromosomální DNA. K DNA jsou přidány primery ohraničující sekvenci, kterou chceme amplifikovat, a celá reakce probíhá stejným způsobem jako na obr. 10-22. Protože je amplifikována pouze primery ohraničená sekvence, je možno pomocí PCR získat velké množství fragmentu, který chceme klonovat, a to ve velice čisté formě. (B) Pokud chceme naklonovat cDNA, musíme pro PCR vyjít z celkové buněčné mRNA. Do reakce je přidán první primer a reverzní transkriptázou je nasyntetizován komplementární řetězec DNA. Pak je přidán druhý primer a další postup už je stejný jako při normální PCR, jak je ukázáno na obr. 10-22.

mi oligonukleotidy (primery) které se párují s templátovou DNA na počátku a konci amplifikovaného fragmentu, každý s jiným vláknem původní dvouřetězcové molekuly DNA. Protože primery musí být chemicky syntetizovány, PCR může být použita pouze pro klonování DNA, u které známe alespoň začáteční a koncovou nukleotidovou sekvenci. Pomocí těchto primerů nasyntetizuje DNA-polymeráza obvykle několik miliard kopií požadované sekvence. Celá metoda je vysvětlena na obr. 10-22. PCR je velice citlivá metoda, která umožňu-



Obrázek 10-24 Použití PCR pro detekci virového genomu ve vzorku krve. Genom viru lidské imunodeficiency (HIV), původce AIDS, je tvořen jednořetězcovou molekulou RNA (viz obr. 9-30). Díky možnosti amplifikovat i jedinou molekulu nukleové kyseliny je PCR velice citlivou metodou pro detekci i stopového množství viru ve vzorku krve nebo tkáně; přítom není nutné virus předem izolovat. Kromě HIV je v dnešní době PCR používána pro detekci mnoha dalších lidských virů.

je detekci jediné kopie DNA ve vzorku tím, že tuto sekvenci namnoží do té míry, že ji můžeme po separaci gelovou elektroforézou a obarvení snadno detegovat (viz obr. 10-3B).

PCR je speciálně využívána ve třech aplikacích. Zaprvé může být použita pro klonování úseku DNA (například genu), přičemž templátem může být jak DNA, tak RNA. Můžeme tedy pomocí PCR získat jak kopii genomové DNA, tak cDNA (obr. 10-23).

Dalším využitím PCR, zvláště díky vysoké citlivosti této metody, je detekce virové infekce již v počátečních stádiích. Jako primery sepří této reakci používají krátké úseky DNA odvozené z virové sekvence a po několikanásobné amplifikaci lze dokázat přítomnost či absenci i jediné kopie v malém vzorku krve (obr. 10-24). Pro mnoho virových infekcí je PCR tou nejcitlivější metodou detekce a postupně nahrazuje dříve používanou metodu detekce viru založenou na použití protilátek namířených proti pláštovým proteinům viru.

Velké využití našla PCR také v soudním lékařství. Díky vysoké citlivosti stačí pouze malé množství vzorku – minimální stopy krve nebo tkáně, které obsahují třeba jen zbytky jediné buňky – ke spolehlivé identifikaci osoby, z které tento vzorek pochází. Genomy všech osob (kromě jednovaječných dvojčat) se navzájem liší; DNA amplifikovaná pomocí stejných primerů se tedy bude s vysokou pravděpodobností u různých osob lišit v nukleotidové sekvenci. V dnešní době jsou k identifikačním účelům používány takové sady primerů, s jejichž pomocí jsou amplifikovány úseky s nejvyšší variabilitou v lidské populaci; výsledkem je pak pro jedince charakteristický vzorec fragmentů DNA, tzv. *DNA-fingerprint* (obr. 10-25). (Poznámka překladatele: Otisk prstů, anglicky fingerprint, je v kriminalistice používán jako nezvratný důkaz identifikace osob. Protože je výsledkem popsané PCR-reakce vzorec fragmentů DNA, který je pro daného člověka jedinečný, je analogicky nazýván DNA-otisk, neboli DNA fingerprint).

Genové inženýrství

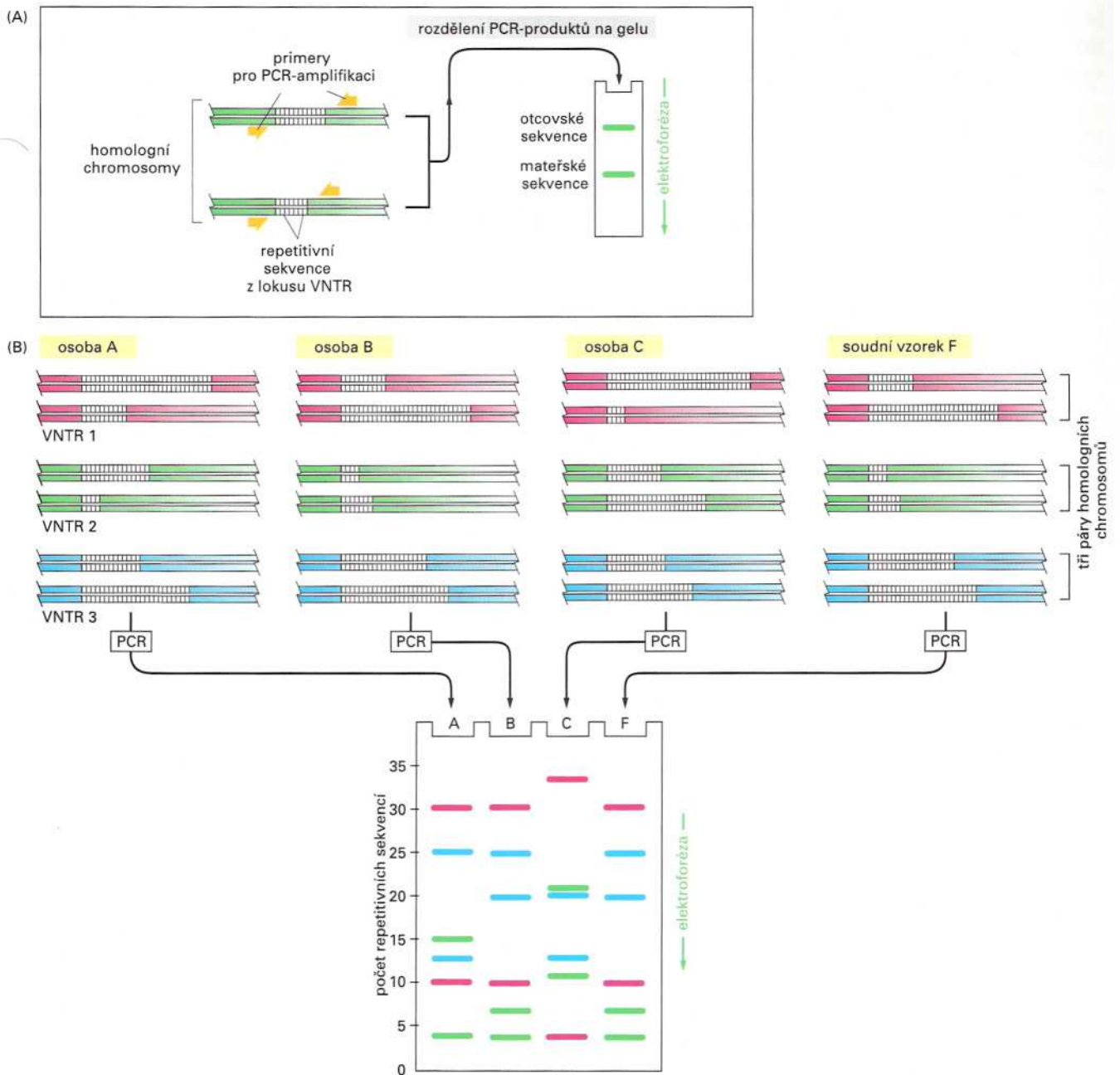
V této části si popíšeme, jak se další aplikace metod vysvětlených v předcházejících odstavcích staly průlomem v buněčné biologii a daly nám další možnosti, jak studovat funkci jednotlivých genů, molekul RNA a proteinů.

Je možné vytvořit zcela nové molekuly DNA

Ukázali jsme si, že rekombinantní molekuly DNA jsou obvykle tvořeny spojením dvou molekul DNA-ligázou (viz obr. 10-12). Pro konstrukci DNA-knihovny je jednou z těchto molekul vektor odvozený od bakteriálního plasmidu nebo viru a druhou molekulou je fragment chromosomu nebo cDNA (viz obr. 10-16). Tato rekombinantní molekula DNA může dále sloužit jako vektor pro inserci a klonování dalšího úseku DNA a dát vznik takové nukleotidové sekvenci, jaká se v přírodě nevyskytuje (obr. 10-26). Nová nukleotidová sekvence může být vytvořena kombinací z přirozeně se vyskytujících molekul DNA, nebo může být vytvořena zcela nově podle našich

Otázka 10-6

- A. Jestliže by v PCR na obr. 10-22 proběhly ještě další dvě kola amplifikace, kolik fragmentů označených šedě, zeleně, červeně a žlutě by vzniklo? Jestliže by proběhlo ještě velké množství cyklů, který typ fragmentu by převažoval?
- B. Předpokládejte, že jste začali PCR s jednou molekulou DNA a že amplifikujete úsek o délce 500 nukleotidových párů. Kolik budete muset přibližně provést amplifikačních cyklů, abyste získali 100 ng této DNA? 100 ng je dostatečné množství pro detekci DNA obarvením fluorescenčním barvivem. (Doporučení: pro tento výpočet předpokládejte, že každý nukleotid má průměrnou molekulovou hmotnost 330 g/mol.)



Obrázek 10-25 Použití PCR v kriminalistice. (A) Sekvence DNA, které vytvářejí variabilitu využívanou při těchto analýzách, obsahují krátká opakování motivů (jako například GTGTGT...), které můžeme nalézt v různých místech (lokusech) lidského genomu. Počet opakování v každé pozici se v lidské populaci liší, obvykle počet kolísá mezi 4 a 40 repetitivy. Série opakování tohoto typu se obecně nazývají VNTR-sekvence (z anglického *variable number of tandem repeat*, variabilní počet tandemových opakování). Díky variabilitě těchto sekvencí v populaci získá každý jedinec s vysokou pravděpodobností různé VNTR-oblasti od matky a od otce; dvě nepříbuzné osoby obvykle nemají tyto lokusy stejné. Pokud pro PCR reakci použijeme primery obklopující takovýto lokus, dostaneme u každého jedince dva druhy fragmentů; jeden z nich představuje lokus získaný od matky a druhý od otce. Délka amplifikovaného úseku, a tím i jeho poloha po elektroforéze, záleží pouze na počtu opakování v lokusu. (B) Identifikace osob. Několik fragmentů DNA získaných po amplifikaci tří různých VNTR-oblastí u tří podezřelých osob (A, B a C) se sice v některých případech shodují, celkový obraz se však u všech tří osob navzájem liší a může sloužit podobně jako otisky prstů pro téměř jednoznačnou identifikaci osoby. Čtvrtý sloupec (F) obsahuje produkty stejné PCR, pro kterou byla použita DNA pocházející z kriminalistického vzorku. Počátečním materiálem přitom může být i jediný vlas, který zůstal na místě činu. V tomto příkladě mohou být osoby A a C vyloučeny z vyšetřování, zatímco osoba označená jako B zůstává na seznamu podezřelých.

Obrázek 10-26 Postupné klonování může být využito pro spojení fragmentů DNA, které pocházejí z různých genů. Po každé inserci fragmentu je rekombinantní plasmid namnožen v bakterii a izolován (viz obr. 10-15). Tato rekombinantní molekula je znovu naštěpena restriční endonukleázou, jak je naznačeno, a použita jako klonovací vektor pro inserci dalšího fragmentu.

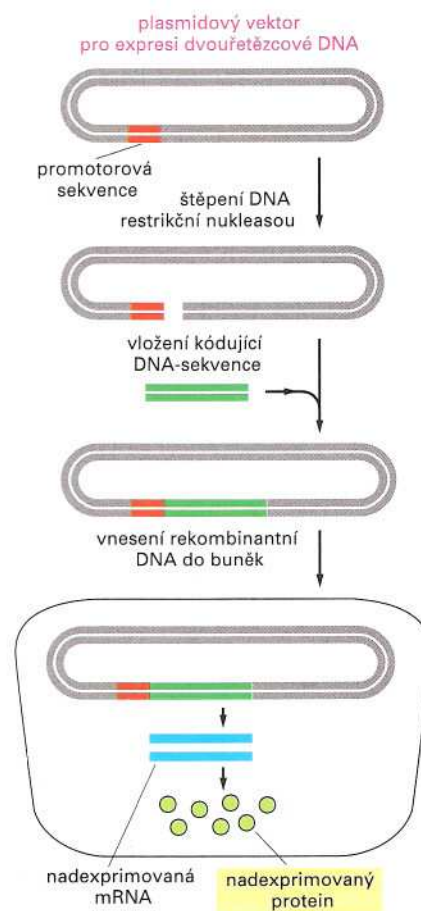
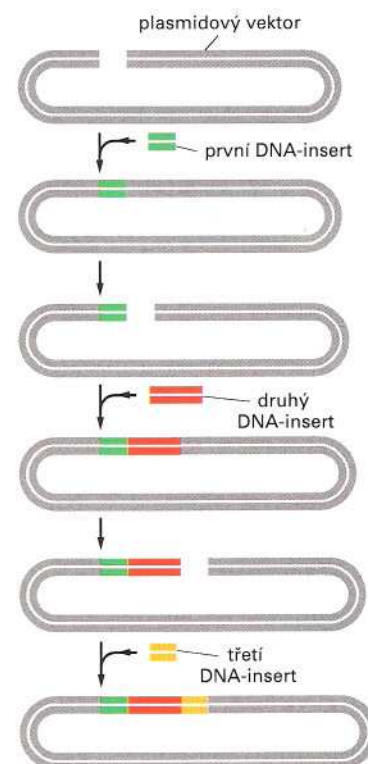
požadavků pomocí chemické syntézy. Jedním z nejdůležitějších použití rekombinantních molekul DNA je produkce velkého množství proteinů, které se v buňce vyskytují vzácně.

Klonováním DNA můžeme získat vzácné buněčné proteiny ve velkém množství

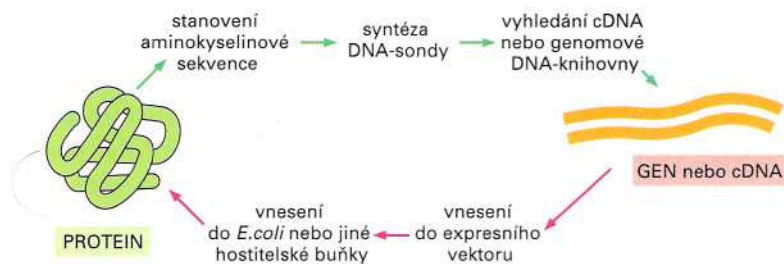
Až donedávna mohly být studovány jen proteiny, které jsou v buňce přítomny v relativně velkém množství. Pro získání kolem 0,1 g (100 mg) čistého proteinu, který tvoří 1 a více procent všech buněčných proteinů, bylo nutné začít s několika stovkami gramů buněk, aby mohl být tento protein pomocí chromatografie izolován (viz panel 5-5, str. 162-163). Toto množství je dostatečné pro sekvenování, analýzu biologické aktivity (například kterou biochemickou reakci může tento protein katalyzovat) a pro vytvoření protilátek proti tomuto proteinu, abychom mohli studovanou bílkovinu detegovat v buňce. Navíc, pokud lze tento protein vykryštalizovat (což bývá problematické), může být stanovena jeho trojrozměrná struktura pomocí rentgenové krystalografie (viz panel 5-6, str. 164-165). Tímto způsobem byla určena struktura mnoha proteinů vyskytujících se v hojném množství, například hemoglobinu izolovaného z červených krvinek.

Avšak většina z mnoha tisíců různých proteinů eukaryontních buněk včetně těch, které jsou pro život naprosto nezbytné, tvoří jen zlomek hmotnosti buňky. V těchto případech je velice těžké, ne-li nemožné, získat více než několik málo mikrogramů čistého proteinu. Proto bylo velikým přínosem zavedení klonovacích technik a genového inženýrství do buněčné biologie, neboť s jejich pomocí lze nasyntetizovat velké množství i těch nejvzácnějších proteinů.

Pro tvorbu proteinů byly zkonstruovány speciální, tzv. *expresní* vektory. Na rozdíl od dříve popsaných vektorů obsahují expresní vektory vhodné regulační sekvence a promotor v těsné blízkosti místa, do kterého je vklonován insert s kódující sekvencí. Promotor spolu s regulačními sekvencemi zajišťuje produkci velkého množství mRNA, která může být překládána uvnitř buňky (obr. 10-27). Pro expresi v bakteriálních, kvasinkových, hmyzích nebo savčích buňkách bylo nutné vytvořit vždy speciální expresní vektory, které obsahují vhodné regulační sekvence pro transkripci a translaci v daném typu buněk. Protože se expresní vektory při každém buněčném



Obrázek 10-27 Produkce velkého množství proteinu založená na inserci kódující oblasti genu do expresního vektoru. V plasmidovém vektoru je umístěn silný promotor, který zodpovídá za produkci velkého množství mRNA z kódující oblasti genu, který byl naklonován za tento promotor. Podle charakteristiky expresního vektoru je tento plasmid začleněn do bakteriálních, kvasinkových, hmyzích nebo savčích buněk, ve kterých je gen účinně přepisován a překládán.



Obrázek 10-28 Na základě znalostí molekulární biologie buňky můžeme dojít od proteinové sekvence ke genu a naopak. Malé množství purifikovaného proteinu obvykle stačí pro určení alespoň části jeho primární aminokyselinové sekvence. Tato informace je dostačující pro nalezení odpovídajícího genu v DNA-knihovně (viz obr. 10-18). Jakmile je jednou gen naklonován, jeho kódující sekvence může být použita k produkci velkého množství proteinu v geneticky pozmeněných buňkách (viz obr. 10-27)

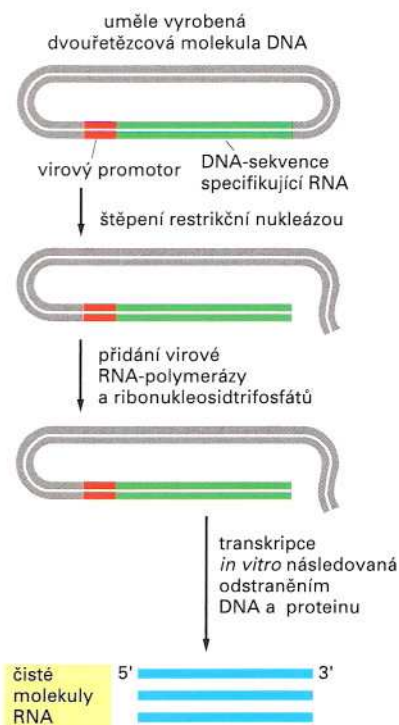
dělení replikují, vzniklá populace buněk je schopná vytvořit ohromné množství studovaného proteinu. Jelikož se protein kódovaný expresním vektorem nachází obvykle uvnitř buňky, je nutné ho oddělit od ostatních buněčných proteinů. Buňky jsou zlyzovány a požadovaný protein je chromatograficky purifikován (viz panel 5-4, str. 160-161); vzhledem k tomu, že izolovaná bílkovina tvoří v lyzátu obvykle 1-10% všech buněčných proteinů, lze purifikaci jednoduše provést v několika krocích.

Pomocí těchto technik bylo vyprodukováno mnoho buněčných proteinů v množstvích, která byla dostatečná pro detailní strukturní a funkční studie, které byly před zavedením technologie DNA realizovatelné pouze s několika málo proteiny (obr. 10-28). Navíc v dnešní době jsou tyto metody využívány pro produkci mnoha proteinů užitečných v medicíně. Například faktor VIII je dnes již komerčně vyráběn z kultur geneticky manipulovaných savčích buněk bez rizika nákazy viry. Dalšími proteiny takto syntetizovanými jsou insulin, růstový hormon a také plášťové proteiny virů, které se používají při očkování.

RNA může vznikat transkripcí *in vitro*

Mnoho objevů probíraných v této knize bylo uskutečněno díky molekulám DNA a proteinům vzniklých technikami rekombinantní DNA. Mnoho experimentů však vyžaduje purifikované molekuly RNA – například studie sestřihu RNA, proteosyntézy a enzymů založených na RNA (viz Kapitulu 7). Většina druhů RNA je však v buňce přítomna ve velmi malém množství a je těžké ji oddělit od ostatních částí buňky, hlavně od jiných molekul RNA. Jakmile byl však požado-

Obrázek 10-29 Velké množství jakékoliv molekuly RNA lze připravit pomocí virových RNA-polymeráz transkripcí *in vitro*. Tato technika využívá neobyčejně účinných RNA-polymeráz některých bakteriálních virů. Pro tyto účely je templát určený pro transkripci naklonován za promotor rozpoznávaný virovou RNA-polymerázou. Jak je nakresleno, budoucí 3'-konec RNA je určen naštěpením DNA templátu restrikční endonukleázou, která má rozpoznávací místo za přepisovaným genem. Purifikovaný templát je pak smíchán s RNA-polymerázou a čtyřmi ribonukleosidtrifosfáty používanými pro syntézu RNA (ATP, CTP, GTP a UTP). Během mnoha cyklů transkripce *in vitro* je vytvořeno velké množství požadované RNA, která může být snadno oddělena od templátové DNA a RNA-polymerázy.



vaný gen jednou izolován, pomocí technologie rekombinantní DNA lze poměrně jednoduchým způsobem také vyprodukovat velké množství molekul RNA. Nejúčinnější metoda je založena na syntéze RNA *in vitro*, kdy je přepisován pouze gen našeho zájmu (obr. 10-29).

Mutantní organismy nejlépe odrážejí funkci studovaného genu

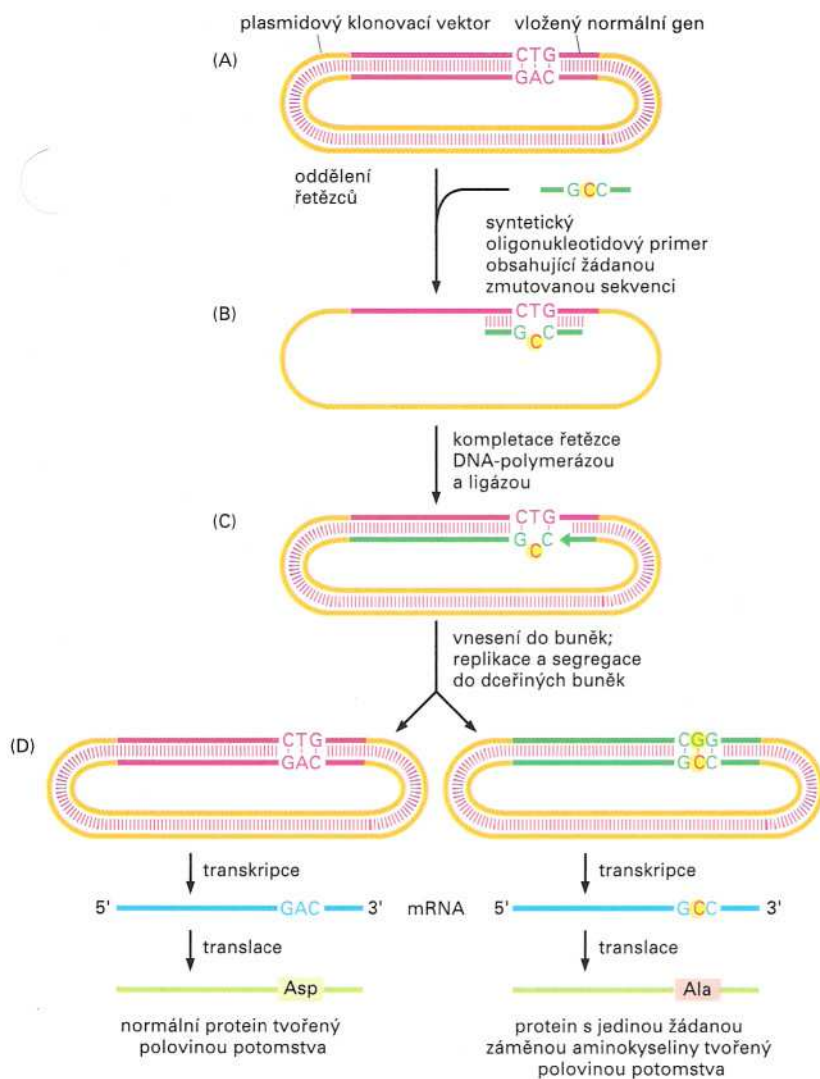
Až do této chvíle jsme předpokládali, že funkce naklonovaného genu je známa. Ale jak se dá určit funkce proteinu v buňce, jestliže se nám podařilo naklonovat neznámý gen? Popřípadě jaká je jeho role v rámci celého organismu? S rozvojem projektů zabývajících se sekvenováním genomů přibývá genů, jejichž funkce je nejasná a stanovení jejichž role se pomalu stává běžným úkolem v buněčné biologii. Ani kompletní nukleotidová sekvence genu nebo trojrozměrná struktura proteinu nestačí k odvození fyziologické role proteinu. Mnoho proteinů, jako například ty se strukturální funkcí nebo ty, které jsou součástí multienzymového komplexu, samo o sobě žádnou aktivitu nemá. Nebo naopak ty, u kterých je známa biochemická funkce (například kinázy nebo molekulární motory), se mohou v rámci buňky účastnit celé řady drah a není vždy zcela jasné, jakou roli v buňce v určitém okamžiku hrají.

Genetika však přesto našla vhodné řešení. Mutanty, které postrádají určitý protein, mohou pomoci odhalit funkci tohoto proteinu v buňce. Ještě výhodnější je studium mutantů produkujících protein, který je funkční pouze v úzkém teplotním rozmezí; tyto proteiny mohou být snadno inaktivovány malým zvýšením nebo snížením teploty. Před objevením možnosti klonovat geny byla funkce většiny proteinů stanovena právě pomocí teplotně citlivých mutantů, a to na základě toho, které buněčné nebo fyziologické procesy byly narušeny. Genetický výzkum se nejnáze provádí na organismech, které se rychle dělí a je snadné je v laboratoři geneticky pozměnit, nejčastějšími modely jsou proto bakterie, kvasinky, hlístice a drosophila.

Technologie rekombinantní DNA umožnila odlišný přístup ke studiu genů. Místo zkoumání náhodně vzniklých mutantů je nyní možno pozměnit naklonovaný gen v podmínkách *in vitro* a vrátit zmutovaný gen zpět do organismu, ze kterého pocházel, a pak studovat jeho funkci. U genu lze změnit jednak kódující sekvenci tak, že vznikne nefunkční protein nebo protein s pozměněnými vlastnostmi, nebo je možno mutovat regulační oblasti genu, což umožňuje změnit množství proteinu v buňce nebo navodit expresi genu v jiném buněčném typu či vývojovém stadiu.

Dnešní možnosti manipulace s DNA *in vitro* dovolují přesné zavedení požadovaných mutací; velice často je ve vznikajícím proteinu pozměněna pouze jedna nebo několik málo aminokyselin. Takových změn se dosahuje pomocí řízené mutageneze, jejíž postup je zachycen na obr. 10-30. Změnou vybraných aminokyselin je navíc možno určit, která část polypeptidového řetězce je nezbytná pro sbalení, interakci proteinu s ligandem či enzymovou katalýzu.

Otázka 10-7 Po několika desítkách let Dr. Ricky izoloval ze vzorků vlasů hollywoodských hvězd malé množství atraktázy, enzymu produkujícího silný lidský feromon. Aby mohl využít atraktázu pro svoji vlastní potřebu, získal klon genomové DNA obsahující gen pro atraktázu, připojil ho k silnému bakteriálnímu promotoru v expresním vektoru a zavedl tento plasmid do buněk *E. coli*. Avšak ke svému zděšení zjistil, že buňky jeho enzym vůbec neprodukovaly. Jaké je nejpravděpodobnější vysvětlení jeho neúspěchu?



Obrázek 10-30 Použití syntetických oligonukleotidů pro modifikaci kódující oblasti genu řízenou mutagenézí. (A)

Rekombinantní plasmid obsahující vložený gen, který má být pozměněn, je rozdělen na jednotlivé řetězce. K nim je přidán syntetický oligonukleotidový primer, který je kromě jednoho na předem daném místě změněného nukleotidu komplementární k oblasti genu, která má být zmutována. Vlastní hybridizace probíhá za méně přísných podmínek, které umožňují párování i ne zcela komplementárních úseků (viz obr. 10-21).

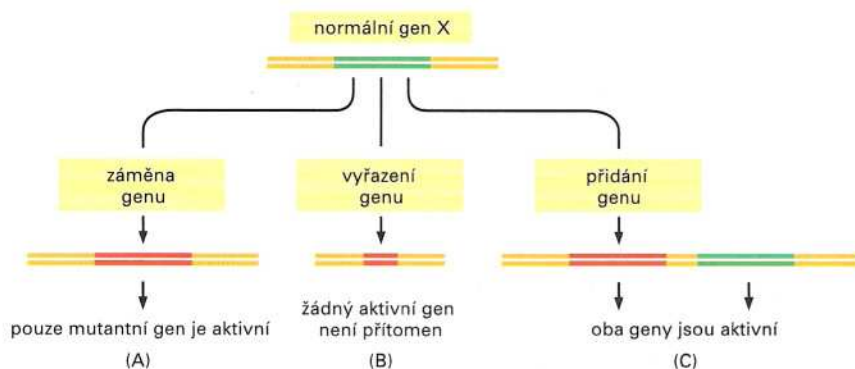
(B) Primer hybridizuje s DNA, přičemž jedna dvojice nukleotidů zůstává nespárovaná. (C) *In vitro* je z dosud jednovláknové molekuly DNA vytvořena pomocí DNA-polymerázy a DNA-ligázy dvouřetězcová molekula DNA. (D)

Dvouřetězcová DNA je zavedena do buňky, kde se replikuje. Replikace jednoho řetězce produkuje normální molekuly DNA, zatímco replikací druhého vlákna (obsahujícího primer) vznikl plasmid nesoucí zmutovanou formu genu. Tímto postupem lze získat pouze polovinu potomstva s mutací daného genu; jakmile však je jednou bakterie s mutovaným genem identifikována, může být namnožena a všechny její dceřiné buňky budou obsahovat stejný plasmid. Zde je ukázána záměna pouze jednoho nukleotidu, stejným způsobem však lze najednou provést substituci několika nukleotidů nebo jejich delecii či inserci.

Transgenní živočichové obsahují geneticky pozměněné geny

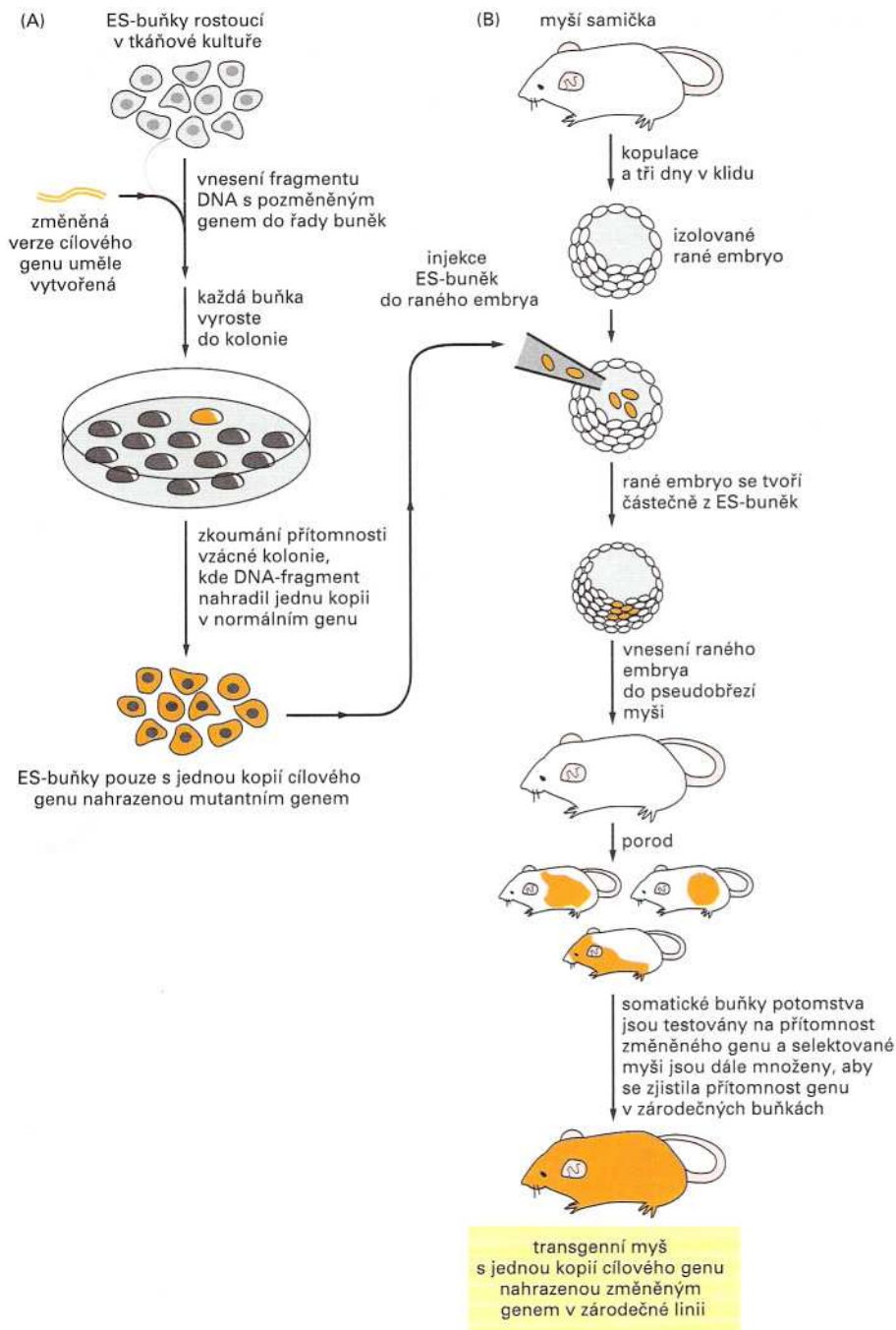
Konečným testem funkce zmutovaného genu je jeho inserce zpět do genomu organismu a sledování vlivů této změny. Organismy, které ve svém genomu obsahují nové geny nebo geny pozměněné metodami rekombinantní DNA, se nazývají **transgenní organismy**.

Při studiu funkce genu zmutovaného *in vitro* je nejlepší metodou nahradit normální gen jeho zmutovanou formou tak, aby mohla být



Obrázek 10-31 Nahrazení genu, vyřazení genu ("knockout") a přidání genu.

Normální gen může být pozměněn v geneticky zmanipulovaných organismech několika způsoby. (A) Normální gen může být zcela nahrazen zmutovanou formou, čímž lze zjistit aktivitu zmutovaného genu bez ovlivnění pokusu normálním genem, a tak určit vliv malé mutace na funkci proteinu. (B) Normální gen může být vyřazen například rozsáhlou delecí. Tento typ změn je velmi často používán pro určení možných funkcí genu v rámci celého organismu. (C) Zmutovaný gen může být jednoduše přidán do genomu. U některých organismů je to nejjednodušší způsob genetické manipulace; přesto lze tímto způsobem získat zajímavé informace, zvláště když zmutovaný gen převažuje svou funkcí nad normálním genem.

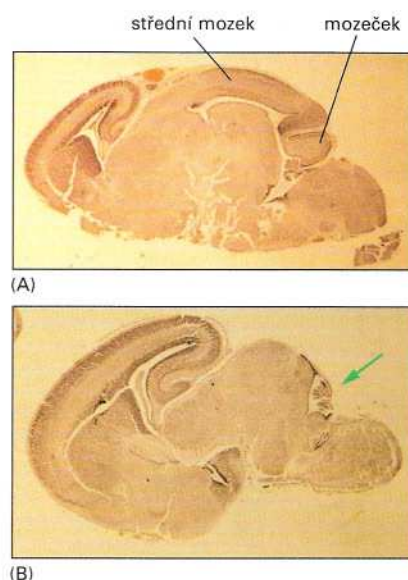


Obrázek 10-32 Souhrn technik používaných pro nahrazení genů u myši. (A) V prvním kroku je pozměněná verze genu zavedena do kultury embryonálních kmenových (ES) buněk. Několik málo buněk bude mít díky homologní rekombinaci (viz obr. 9-13A) normální gen nahrazen zmutovanou formou genu. Ačkoliv je to často velice pracný úkol, lze tyto pozměněné buňky identifikovat, oddělit od ostatních a namnožit. V každé buňce je pak jedna alela genu nahrazena zmutovanou formou a druhá je původní. V dalším kroku (B) jsou tyto pozměněné embryonální kmenové buňky injikovány do velice časného vývojového stadia embrya myši; tyto buňky jsou normálně začleněny do rostoucího embrya a z něho vzniklá myš pak má ve svém těle somatické buňky s pozměněným genem (*oranžově*). U některých z těchto myší se tyto pozměněné buňky stanou buňkami zárodečné linie a část jejich potomstva bude mít poškozený gen ve všech buňkách svého těla. Pokud jsou dva tito potomci zkríženi, část jejich potomstva bude mít poškozené obě alely (každou na jiném chromosomu) ve všech buňkách těla. Pokud byl normální gen pozměněn ve smyslu úplné ztráty funkce, označují se tyto myši jako “knockout-myši”. Pokud je studovaný gen funkční během vývoje myši, myši obvykle umírají před dosažením dospělosti (viz obr. 10-33).

funkce pozměněného proteinu studována v nepřítomnosti normálního proteinu. Taková výměna genů (obr. 10-31A) se u některých jednoduchých haploidních organismů (jako jsou bakterie nebo kvasinky) nechá dosti snadno provést homologní rekombinací mezi zmutovanou DNA a chromosomální DNA (viz obr. 9-13A). Pokud použijeme zmutovanou formu genu s delecí, homologní rekombinace povede k delecí části normálního genu a tím jeho kompletní inaktivaci (často je používán i anglický termín *knockout*) (obr. 10-31B). Třetí možností je začlenění zmutovaného genu do genomu bez jakékoliv změny normálního genu (obr. 10-31C).

Mnohem složitější je dosáhnout nahrazení genu v diploidním organismu s velkým genomem, jako je například myš (obr. 10-32). Pokud je pozměněný gen zaveden do buněk, které dají vznik záro-

Obrázek 10-33 Transgenní myš, u které byly homologní rekombinací vyřazeny obě kopie genu pro vývojově nezbytný růstový faktor *wnt-1*. (A) Normální embryo, (B) mutantní embryo. U mutantního embrya se nevyvinul mozeček (šipka) a většina středního mozku a toto embryo zemřelo *in utero*. Tento experiment ukázal, že gen *wnt-1*, člen genové rodiny, která je důležitá pro vývoj mnoha různých organismů, je nezbytný během časného savčího vývoje pro vznik mozečku.



dečným buňkám, alespoň část potomstva tohoto transgenního živočicha bude mít ve svém genomu stabilně integrovanou zmutovanou formu genu. Technicky je to možné i u člověka a ačkoliv by to v některých terapeutických případech bylo vhodné, je použití těchto metod u člověka nezákonné kvůli obavě z nepředvídatelných odchylek, které by mohly nastat u těchto jedinců. Podobné techniky jsou však zkoumány pro případné opravy genetických defektů v lidských somatických buňkách a jejich využití v genové terapii. Například by mohly být zmírněny projevy některých genetických chorob zavedením geneticky správných somatických buněk do tkáně nejvíce postižené touto chorobou, ale vzhledem k tomu, že by nebyly pozměňovány zárodečné buňky, nemohly by se tyto změny přenést na potomstvo.

Jestliže je normální gen odstraněn nebo jinak inaktivován (viz obr. 10-31B), je možno transgenními technikami vytvořit organismus, který zcela postrádá aktivní produkt daného genu. V dnešní době je například vytvářeno velké množství tzv. knock-out myší – myších klonů, které mají trvale inaktivovaný určitý gen. Studie myší s inaktivovanými geny řídicími ontogenezi vedly ke značným pokrokům při určování konkrétní role těchto genů při vývoji savců (obr. 10-33).

Základní shrnutí

- Technologie rekombinantní DNA vnesla převrat do studia buněk, umožnila identifikovat a izolovat konkrétní gen z mnoha tisíců genů v buňce a po jeho amplifikaci stanovit přesnou molekulární strukturu genu.
- Základem této technologie je možnost štěpit velké molekuly DNA na specifickou a reprodukovatelnou sadu fragmentů pomocí restričních endonukleáz, které štěpí dvojšroubovici DNA pouze v určité nukleotidové sekvenci.
- Fragmenty DNA mohou být rozděleny podle své velikosti pomocí gelové elektroforézy.
- V současnosti jsou již známy techniky, jimiž lze rychle stanovit nukleotidovou sekvenci jakéhokoliv izolovaného fragmentu DNA.
- Nyní jsou známy kompletní nukleotidové sekvence genomu několika jednobuněčných organismů (několika bakterií a kvasinky). V příštích deseti letech se předpokládá dokončení sekvenování několika komplexnějších organismů (*Caenorhabditis*, *Drosophila*, několika rostlin a člověka).
- Hybridizací nukleových kyselin lze detegovat jakoukoliv sekvenci DNA nebo RNA ve směsi fragmentů těchto nukleových kyselin. Tato technika je založena na skutečnosti, že jednořetězcová DNA i RNA vytváří dvojšroubovici pouze s řetězcem s komplementární nukleotidovou sekvencí.
- Jednořetězcové molekuly DNA se známou sekvencí, které byly označeny fluorescenčními barvami nebo radioizotopy, jsou používány jako sondy při hybridizačních reakcích. Hybridizace nukleových kyselin může být také využita pro

detekci přesné polohy genů na chromosomech nebo RNA v buňkách či tkáních.

- Řetězec DNA o libovolné sekvenci do délky přibližně 120 nukleotidů může být vytvořen chemickou (neenzymovou) syntézou.
- Klonováním DNA lze vybrat jednu konkrétní sekvenci z milionů dalších a vytvořit nekonečné množství jejích kopií.
- Fragmenty DNA mohou být spojeny *in vitro* pomocí DNA-ligázy a dát tak vznik molekule DNA, která se v přírodě nevyskytuje.
- Prvním krokem při typickém klonování je inserce požadovaného fragmentu do molekuly DNA, která je schopná replikace, jako je například plasmid nebo virový genom. Vytvořená rekombinantní molekula DNA je pak vložena do rychle se dělící hostitelské buňky, například bakterie, a při každém buněčném dělení dochází i k její replikaci.
- Sada klonovaných fragmentů, které reprezentují kompletní genom organismu, se nazývá genomová knihovna. Knihovna je často udržována ve formě bakteriálních klonů, přičemž každý klon nese jiný klonovaný fragment DNA.

tkáň. Na rozdíl od genomové knihovny obsahují cDNA-knihovny pouze sekvence, které kódují proteiny; nejsou v nich introny, regulační sekvence a promotory. cDNA-knihovny jsou využívány převážně pro expresi genů ve formě proteinů.

- Polymerázová řetězová reakce (PCR) umožňuje *in vitro* amplifikaci DNA pomocí purifikované DNA-polymerázy. Pro PCR je nutné znát sekvenci amplifikované DNA, aby mohly být nasyntetizovány dva oligonukleotidové primery, které ohraničují nově syntetizovanou DNA.
- Klonované geny mohou být pomocí technik genomového inženýrství trvale začleněny do genu buňky nebo organismu. Pro studium funkce daného genu může být klonovaná DNA pozměněna v podmínkách *in vitro* a znovu zavedena do buňky či organismu.
- Genové inženýrství má dalekosáhlé důsledky. Bakterie, kvasinky i savčí buňky mohou být manipulovány tak, aby ve velkém množství produkovaly proteiny pocházející z libovolného organismu. To umožňuje i studium vzácných nebo obtížně izolovatelných proteinů.

Klíčová slova

hybridizace DNA

plasmid

restrikční endonukleáza

cDNA

hybridizace *in situ*

in situ hybridization

polymerázová řetězová reakce (PCR)

technologie

rekombinantní DNA

DNA-knihovna

klonování DNA

restrikční mapa

transgenní organismus

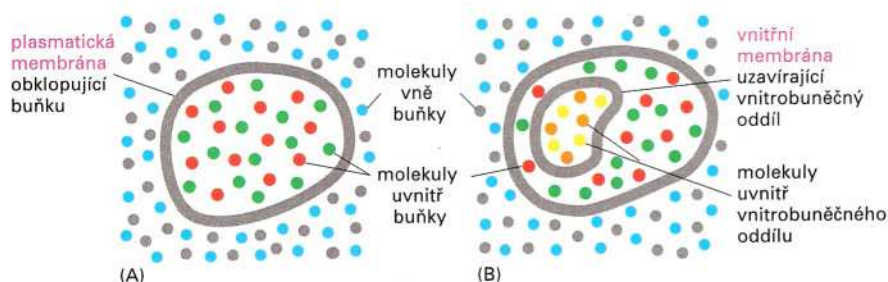
DNA-ligáza

řízená mutagenese

11 Struktura membrán

Živá buňka je samoreprodukční soustava molekul držených uvnitř obalu. Tímto obalem je **plasmatická membrána** - vrstva tuků, která je tak tenká a průsvitná, že ji nelze spatřit přímo ve světelném mikroskopu. Její stavba je jednoduchá: v podstatě jde o vrstvu lipidových molekul o tloušťce asi 5 nm, t.j. asi 50 atomů. Svými vlastnostmi se však nepochybně neliší od žádného materiálu, který známe z běžného života. Ačkoli slouží jako bariéra, která má bránit úniku obsahu buňky a jeho smíchání s okolním médiem (obr. 11-1A), dělá plasmatická membrána mnohem více než to. Má-li se buňka udržet při životě a růst, musí do ní membránou procházet živiny a naopak odpadní látky musí přes membránu odcházet pryč. Proto je membrána prostoupena vysoce selektivními kanály a pumpami, tvořenými molekulami proteinů, které umožňují import a export specifických látek. Další proteiny v membráně působí jako čidla; díky nim může buňka odpovídat na změny ve svém okolí. Stejně tak pozoruhodné jsou mechanické vlastnosti membrány. Když buňka roste nebo mění tvar, činí tak i membrána: zvětšuje svůj povrch přidáním nových membránových složek bez ztráty celistvosti, a může se deformovat, aniž by se trhala (obr. 11-2). Při proděravění se ani nezhroutí do sebe jako balón, ani nezůstane potrhaná, nýbrž se rychle zacelí.

Nejjednodušší bakterie mají jen jednu membránu - plasmatickou membránu. Naproti tomu eukaryontní buňky obsahují navíc celou řadu *vnitřních membrán*, které uzavírají vnitrobuněčné oddíly. Tyto další membrány jsou sestaveny na stejném principu jako plasmatická membrána a také slouží jako selektivní přepážky mezi prostory obsahujícími různé soubory molekul (obr. 11-1B). Tak membrány endoplasmatického



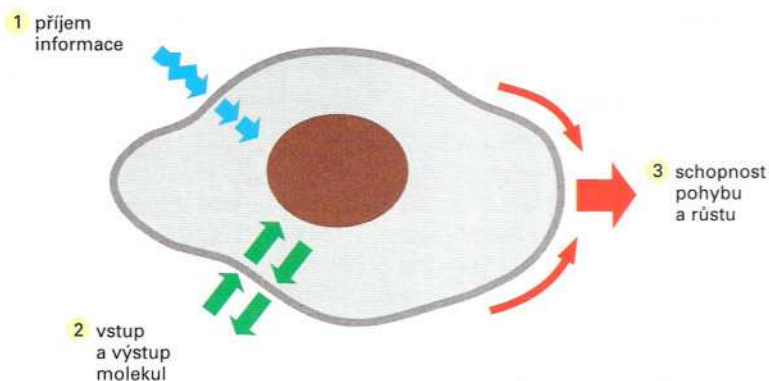
LIPIDOVÁ DVOJNÁ VRSTVA

- Membránové lipidy tvoří ve vodě dvojné vrstvy
- Lipidová vrstva je dvourozměrnou kapalinou
- Tekutost lipidové dvojné vrstvy závisí na jejím složení
- Lipidová dvojná vrstva je asymetrická
- Asymetrie lipidů se rodí uvnitř buňky
- Lipidové dvojné vrstvy jsou nepropustné pro nenabitě molekuly i pro ionty

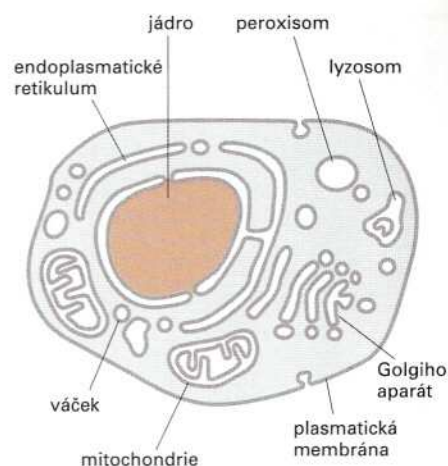
MEMBRÁNOVÉ PROTEINY

- Membránové proteiny asociují s lipidovou dvojnou vrstvou různými způsoby
- Polypeptidový řetězec obvykle prochází dvojnou vrstvou jako α -šroubovice
- Membránové proteiny mohou být solubilizovány detergentem a přečištěny
- Úplná struktura je známa jen u několika málo membránových proteinů
- Plasmatická membrána je zesílena buněčným kortexem
- Povrch buněk je vybaven pláštěm sacharidů
- Buňky mohou omezit pohyb membránových proteinů

Obrázek 11-1 Buněčné membrány jako přepážky. Membrány slouží jako přepážky mezi dvěma oddíly - buď mezi vnitřkem buňky a vnějším prostředím (A) nebo mezi dvěma intracelulárními oddíly (B). V obou případech membrána brání smíšení molekul z jedné strany s molekulami z druhé strany.



Obrázek 11-2 Některé funkce plasmatické membrány.



Obrázek 11-3 V eukaryontní buňce tvoří membrány mnoho různých oddílů.

Na obrázku jsou membránové organely v typické živočišné buňce. Všimněte si, že jádro a mitochondrie mají membrány dvě.

retikula, Golgiho aparátu, mitochondrií a ostatních membránových organel (obr. 11-3) udržují charakteristické rozdíly ve složení a funkci mezi organelami. Vnitřní membrány mají ještě další funkce a nejsou pouhými přepážkami, a zvláště rozdíly v membránových proteinech jsou z velké části zodpovědné za odlišný charakter každé organely.

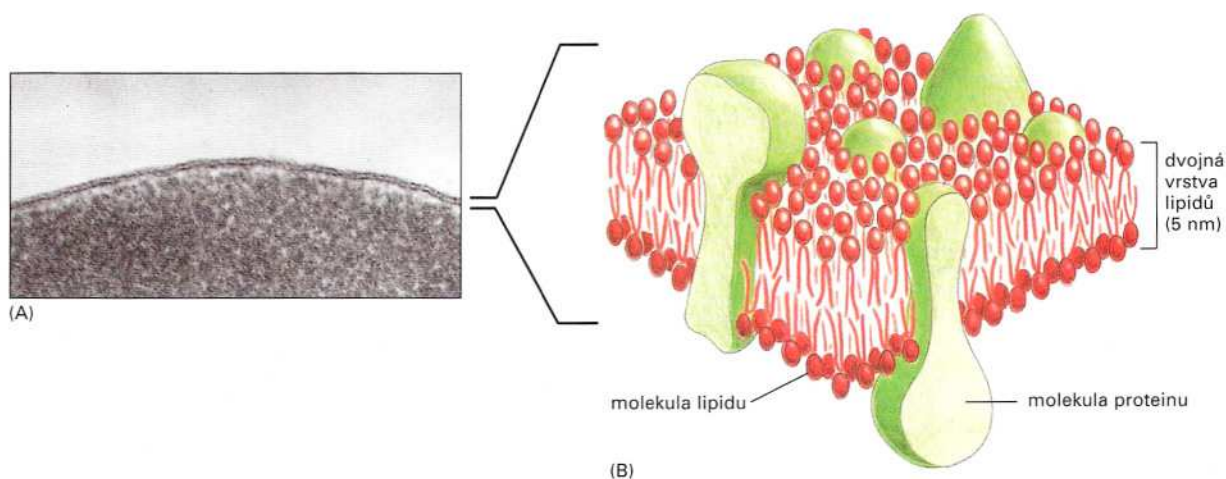
Všechny buněčné membrány jsou složeny z lipidů a proteinů a mají stejnou obecnou strukturu (obr. 11-4). Lipidový podíl se skládá z milionů lipidových molekul uspořádaných do dvou těsně přiléhajících listů, které utvářejí lipidovou dvojnou vrstvu (viz obr. 11-4B). Tato dvojná vrstva poskytuje základní strukturu a slouží jako nepropustná přepážka. Proteinové molekuly zprostředkovávají většinu dalších funkcí membrány a udílejí různým membránám jejich charakteristické vlastnosti. V této kapitole probereme nejprve membránové lipidy a potom membránové proteiny.

Lipidová dvojná vrstva

Lipidová dvojná vrstva se pevně ustavila jako univerzální základ struktury buněčných membrán. Její vlastnosti jsou zodpovědné za obecné vlastnosti buněčných membrán. Tuto sekci začneme tím, že vysvětlíme strukturu dvojně vrstvy jako důsledek chování molekul membránových lipidů ve vodném prostředí.

Obrázek 11-4 Dva pohledy na buněčnou membránu.

(A) Elektronmikroskopický snímek plasmatické membrány lidské červené krvinky v příčném řezu. (B) Schematický náčrt ukazující trojrozměrný pohled na buněčnou membránu.

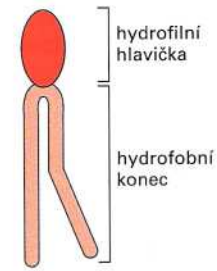


Membránové lipidy tvoří ve vodě dvojné vrstvy

Lipidy v buněčných membránách spojují v každé ze svých molekul dvě naprosto odlišné vlastnosti: mají hydrofilní („vodu milující“) *hlavičku* a jeden nebo dva hydrofobní („vody se bojíci“) *uhlovodíkové konce* (obr. 11-5). Nejhojnějšími membránovými lipidy jsou **fosfolipidy**, ve kterých je hydrofilní hlavička spojena se zbytkem molekuly přes fosfátovou skupinu. Nejběžnějším typem fosfolipidů je u většiny buněk **fosfatidylcholin**, který obsahuje malou molekulu cholinu připojenou k fosfátu a k jeho hydrofilní hlavičce, a dva uhlovodíkové řetězce v roli hydrofobních konců (obr. 11-6).

Molekuly, které mají části s hydrofilními i s hydrofobními vlastnostmi, se označují jako **amfipatické**. Tuto vlastnost sdílejí i ostatní typy membránových lipidů – *steroly* (jako cholesterol v membránách živočišných buněk) a *glykolipidy*, které mají v místě své hydrofilní hlavičky cukerný zbytek (obr. 11-7). To hraje klíčovou roli při řízeném skládání lipidových molekul do dvojných vrstev.

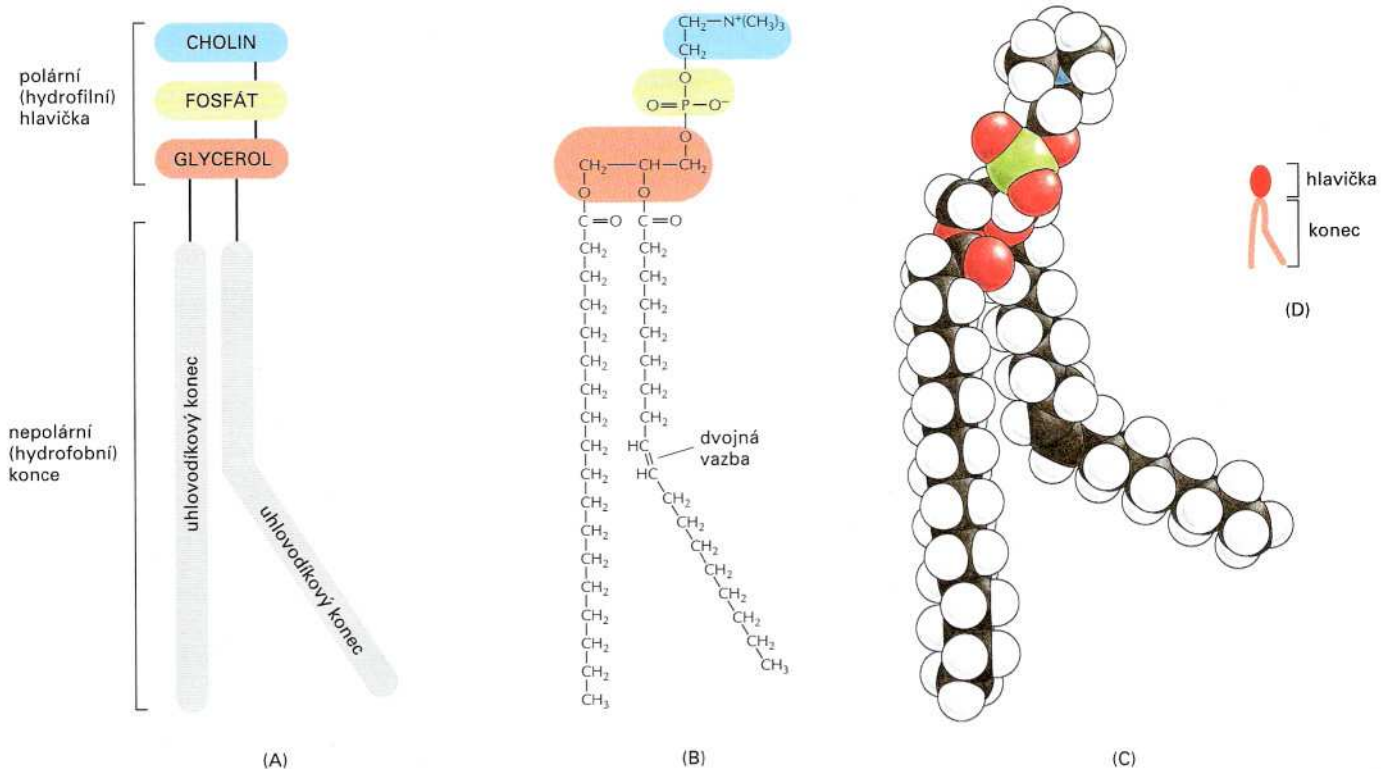
Jak jsme probrali v Kapitole 2, rozpouštějí se hydrofilní molekuly ochotně ve vodě, neboť obsahují nabitě atomy či polární skupiny (tj. skupiny s nerovnoměrným rozdělením kladných a záporných nábojů), které mohou vytvářet elektrostatické vazby nebo vodíkové můstky s molekulami vody, které jsou samy o sobě polární (obr. 11-8). Hydrofobní molekuly jsou naopak ve vodě zcela nerozpustné, neboť všechny či téměř všechny jejich atomy jsou nenabitě a nepolární, a proto nemohou vytvářet můstky s molekulami vody. Místo toho se snaží přimět sousední molekuly vody, aby se přeuspořádaly do klíčovitých struktur okolo hydrofobních molekul (obr. 11-9). Protože klíčovitá struktura je mnohem uspořádanější než okolní voda, vyžaduje její tvorba energii. Tyto energetické náklady jsou však

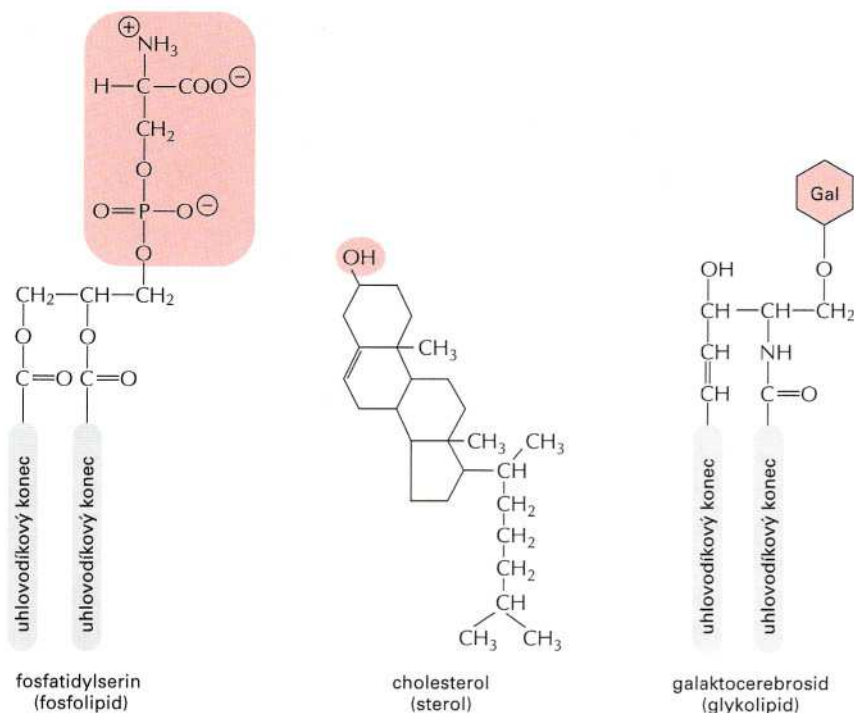


Obrázek 11-5 Schematická kresba molekuly typického membránového lipidu.

Obrázek 11-6 Molekula fosfatidylcholinu.

Je uvedena (A) schematicky, (B) vzorcem, (C) jako prostorový model a (D) jako symbol. Tento zvláštní fosfolipid je sestaven z pěti částí: hydrofilní hlavička, *cholin*, se pojí přes *fosfátový zbytek* ke *glycerolu*, který je spojen se dvěma *uhlovodíkovými řetězci*, jež tvoří hydrofobní část molekuly. Uhlovodíkové řetězce jsou tvořeny *acyly mastných kyselin* (R–CO–), které jsou připojeny ke kyslíkovým atomům glycerolu. V místě dvojné vazby mezi dvěma atomy C v uhlovodíkovém řetězci dochází k ohnutí molekuly, které je zde pro názornost zvětšeno. Slovo *fosfatidyl* v názvu molekuly označuje zbytek kyseliny fosfatidové, což je kyselina glyceroylfosforečná s dvěma acyly mastných kyselin na kyslíkových atomech (tedy všechno, co je na obrázku, kromě cholinu).

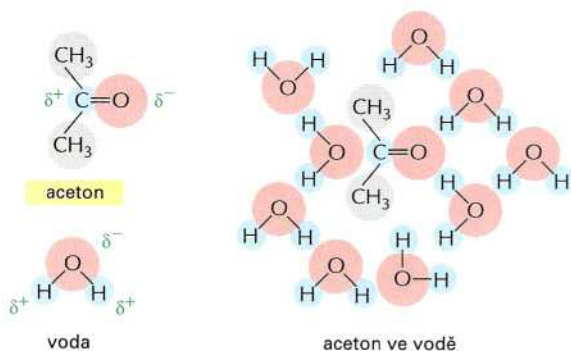




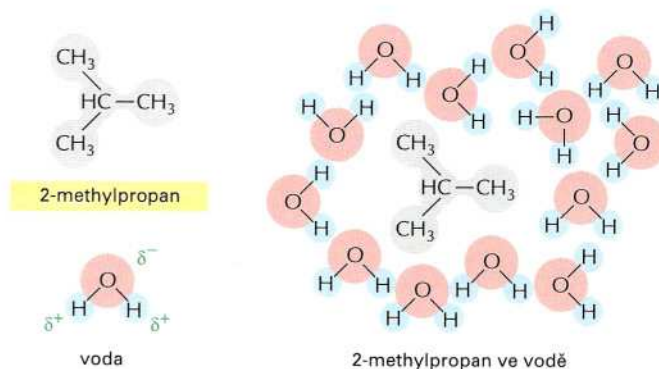
Obrázek 11-7 Tři typy molekul membránových lipidů. Všechny jsou amfipatické, s hydrofilní hlavičkou na jednom konci a s jedním nebo dvěma hydrofobními řetězci. Hydrofilní hlavičku (růžově) tvoří u fosfatidylserinu serinofosfát, u cholesterolu skupina –OH a v galaktocerebrosidech cukr galaktosa. Viz také Panel 2-4, str. 58-59.

minimalizovány, pokud se hydrofobní molekuly shlukují dohromady, takže je jimi ovlivněn nejmenší možný počet molekul vody. Jen zcela hydrofobní molekuly, jako jsou tuky z živočišných tukových buněk a oleje ze semen rostlin (obr. 11-10), se při disperzi ve vodě shlukují do jediné velké kapky.

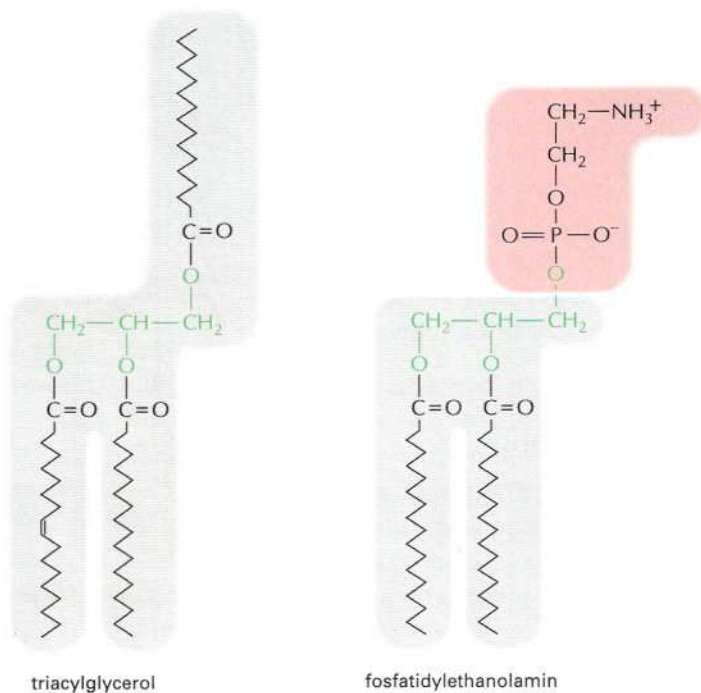
Amfipatické molekuly jako fosfolipidy jsou proto objekty, v nichž se střetávají dvě protikladné síly: hydrofobní hlavička je přitahována k vodě, zatímco hydrofobní konec se vodě vyhýbá a snaží se agregovat s jinými hydrofobními molekulami. Tento konflikt se nádherně řeší vznikem lipidové dvojvrstvy – uspořádání, které uspokojí všechny zúčastněné strany a je energeticky nejvýhodnější. Hydrofilní hlavičky jsou v obou listech tvořících dvojnou vrstvu obráceny k vodě; naproti tomu všechny



Obrázek 11-8 Hydrofilní molekula interaguje s molekulami vody. Aceton je polární, a tudíž může energeticky příznivě interagovat s molekulami vody, které jsou rovněž polární. Proto se aceton ve vodě ochotně rozpouští. δ⁻ ukazuje částečný záporný náboj a δ⁺ označuje částečný kladný náboj. Polární atomy jsou vyznačeny barevně (růžově a modře), nepolární skupiny jsou šedé.



Obrázek 11-9 Hydrofobní molekula ve vodě. Protože je 2-methylpropan celý hydrofobní, nemůže vytvářet energeticky příznivé interakce s vodou a nutí sousední molekuly vody, aby se kolem něj uspořádaly do struktury připomínající klec.



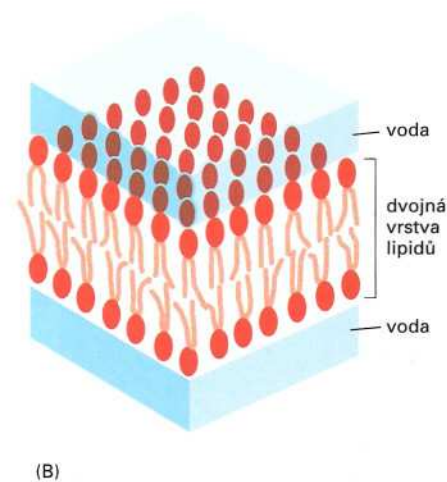
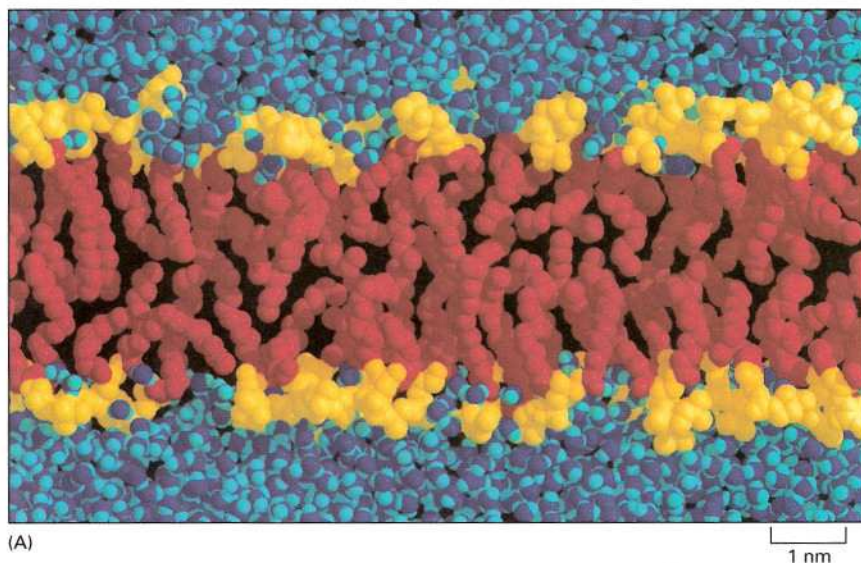
Obrázek 11-10 Srovnání mastné molekuly (triacylglycerolu) s molekulou fosfolipidu (fosfatidylethanolaminu). Hydrofobní části jsou ukázány šedě, hydrofilní části růžově. Mastná molekula je celá hydrofobní, zatímco molekula fosfolipidu je amfipatická. (Třetí hydrofobní část triacylglycerolu je v tomto vzorci pro lepší srovnání s fosfolipidem rozepsána směrem vzhůru.)

hydrofobní konce jsou před vodou chráněny a leží jeden vedle druhého ve vnitřním prostoru „sendviče“ (obr. 11-11).

Stejně síly, které řídí amfipatické molekuly při utváření dvojné vrstvy, udělají dvojné vrstvě i samozacelovací schopnost. Každá trhlinka vytvoří volné rozhraní s vodou, což je energeticky nevýhodné, a proto se molekuly dvojné vrstvy samovolně přeuspořádají, aby toto volné rozhraní odstranily. Je-li trhlinka malá, povede toto spontánní přeuspořádání k opravě dvojné vrstvy a znovuuštění jediného nepřetržitého listu. V případě velké trhliny se může list rozpadnout na oddělené váčky. V obou případech se děj řídí snahou o co nejrychlejší odstranění volných rozhraní.

Zákaz volných rozhraní má hluboké důsledky: existuje jen jediná cesta jak se vyhnout volným rozhraním u konečného listu, která spočívá

Obrázek 11-11 Fosfolipidová dvojná vrstva v příčném řezu. (A) Počítačová simulace ukazuje fosfolipidové molekuly (červené konce a žluté hlavičky) a okolní molekuly vody (modře). (B) Schematická kresba fosfolipidové dvojné vrstvy ve vodě.



Obrázek 11-12 Fosfolipidové dvojné vrstvy se samovolně uzavírají samy do sebe a vytvářejí uzavřené oddíly. Uzavřená struktura je stabilní, neboť v ní nedochází k energeticky nepříznivému vystavení hydrofobních uhlovodíkových řetězců do vodného prostředí.

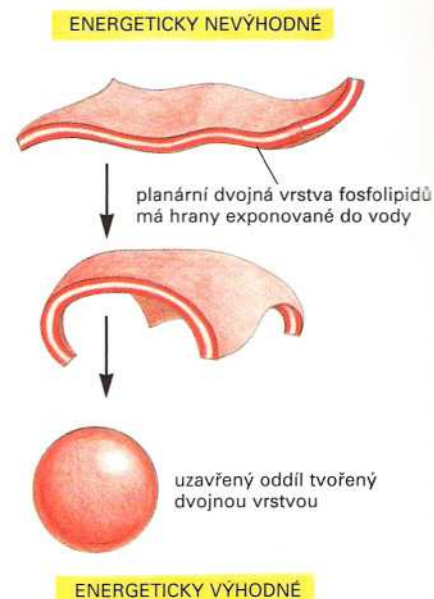
v utvoření hraniční plochy kolem uzavřeného prostoru (obr. 11-12). Proto se amfipatické molekuly, jako například fosfolipidy, musí spojovat a utvářet samozacelovací nádoby, které tak představují uzavřené oddíly. Toto pozoruhodné chování, základní při tvoření živé buňky, je v podstatě pouhým důsledkem toho, že každá molekula dvojné vrstvy je na jednom konci hydrofilní a na druhém konci hydrofobní.

Lipidová dvojná vrstva je dvourozměrnou kapalinou

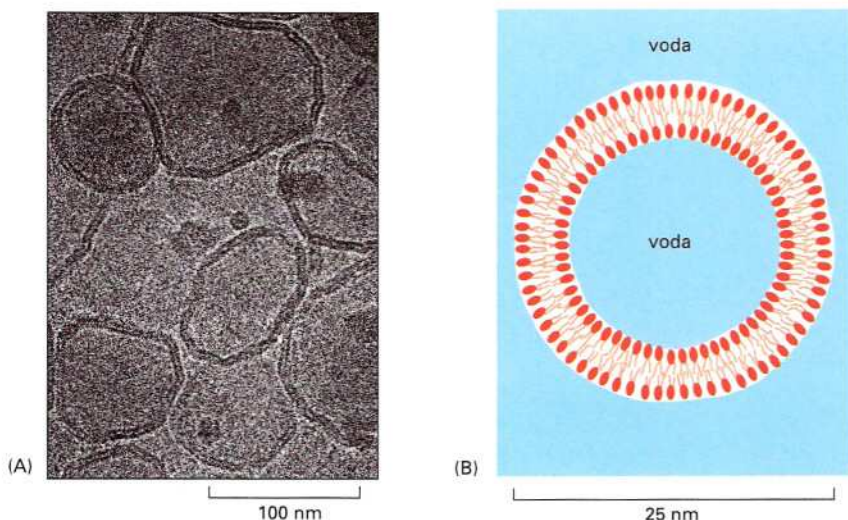
Vodné prostředí uvnitř buňky a mimo ni znemožňuje lipidům opustit dvojrstvu, ale nic těmto molekulám nebrání v tom, aby se pohybovaly v samotné membráně a vyměňovaly si navzájem svá místa v rovině dvojné vrstvy. Membrána se proto chová jako dvojrozměrná tekutina, což je velmi důležité pro její funkci. Tato vlastnost je odlišná od *flexibility*, kterou se rozumí schopnost membrány ohýbat se (vytvářet záhyby). Flexibilita membrány je rovněž důležitá a určuje spodní hranici 25 nm pro velikost váčků, které se mohou z membrány tvořit.

Tekutost lipidových vrstev lze studovat s použitím umělé lipidové dvojné vrstvy, která spontánně vzniká agregací amfipatických lipidových molekul ve vodě. Při pokusech se obvykle používají dva druhy lipidových dvojných vrstev. Při přidání čistých fosfolipidů k vodě se tvoří uzavřené kulovité váčky zvané *liposomy* o průměru od 25 nm do 1 μm (obr. 11-13). Druhou možností jsou ploché dvojné vrstvy, které se mohou tvořit v otvoru v přepážce oddělující dva prostory s vodným prostředím (obr. 11-14).

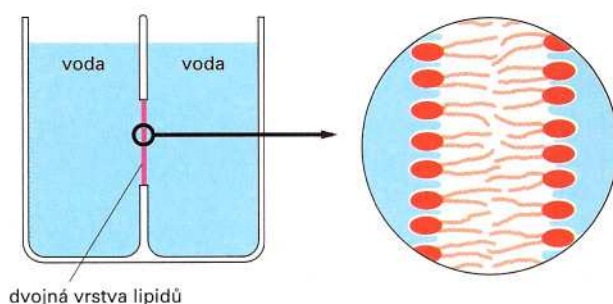
Tyto jednoduché umělé dvojné vrstvy umožňují jemná měření pohybů lipidových molekul. Výsledky měření prozrazují, že některé druhy pohybu jsou poměrně vzácné, zatímco jiné jsou časté a rychlé. Fosfolipidové molekuly se v umělých lipidových dvojných vrstvách například jen velmi zřídka přemísťují z jedné monovrstvy (jedné poloviny dvojné vrstvy) do druhé. Odhaduje se, že bez pomoci speciálních proteinů a za podmínek podobných podmínkám v buňce k tomuto ději zvané-



Otázka 11-1 O molekulách vody se říká, že „vytvářejí klíčkovitou strukturu“ kolem hydrofobních sloučenin (viz například obr. 11-9). To se zdá podivné, neboť vodné molekuly s hydrofobní sloučeninou nereagují. Jak by se tedy mohly „dozvědět“ o její přítomnosti a reagovat navzájem odlišným způsobem? Proberte tuto námitku a přitom si ujasněte, co se rozumí „klíčkovitou strukturou“. Jak se dá srovnat s ledem? Proč by měla být taková struktura energeticky nevýhodná?



Obrázek 11-13 Liposomy. (A) Elektronmikroskopický snímek fosfolipidových váčků (liposomů) ukazuje strukturu dvojné vrstvy membrány. (B) Kresba malého kulatého liposomu, pozorovaného v řezu.



Obrázek 11-14 Pohled na syntetickou dvojnou vrstvu fosfolipidů v příčném řezu. Tato rovná dvojná vrstva vzniká v malém otvoru (o průměru asi 1 mm) v přepážce, která odděluje dva vodné oddíly. K vytvoření takové dvojně vrstvy stačí nanést štětcem na otvor v přepážce roztok fosfolipidu a potom přepážku ponořit do vody.

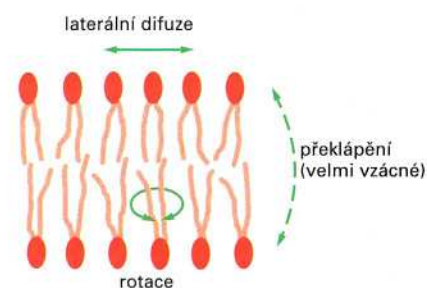
mu překlápění (angl. *flip-flop*) dochází u jedné lipidové molekuly méně než jednou za měsíc. Na druhé straně se díky tepelným pohybům lipidové molekuly v rámci jedné monovrstvy rychle otáčejí kolem své podélné osy a také si stále vyměňují místa se svými sousedy (obr. 11-15). Tyto výměny vedou k rychlé difuzi v rovině membrány, takže například lipidová molekula v umělé dvojně vrstvě může difundovat na vzdálenost dlouhé bakteriální buňky (2 μm) asi během jedné sekundy. Při snížení teploty způsobí pokles tepelné energie snížení rychlosti pohybu lipidů, v důsledku čehož se dvojná vrstva stane méně tekutou.

U celých buněk byly získány podobné výsledky jako u izolovaných buněčných membrán. To ukazuje, že lipidová vrstva buněčné membrány se také chová jako dvojrozměrná tekutina, ve které se stavební lipidové molekuly volně pohybují ve své vlastní vrstvě libovolným směrem v rovině membrány. V buňkách i v syntetických dvojných vrstvách se jednotlivé molekuly fosfolipidů normálně zdržují ve své vlastní monovrstvě a spontánně se nepřeklápějí (viz obr. 11-15).

Tekutost lipidové dvojně vrstvy závisí na jejím složení

Stupeň tekutosti buněčné membrány (tím se rozumí snadnost, s jakou se její lipidové molekuly pohybují v rovině dvojně vrstvy) je důležitý pro funkci membrány a musí být udržován v určitých mezích. Míra tekutosti dvojně vrstvy při dané teplotě závisí na fosfolipidech, z kterých se skládá, a zvláště na povaze uhlovodíkových řetězců: čím těsněji a pravidelněji se může řetězec sbalit, tím viskoznější a méně tekutá dvojná vrstva bude. Uspořádání uhlovodíkových řetězců v dvojně vrstvě ovlivňují především dvě jejich vlastnosti: délka a *stupeň nenasycení* (tj. kolik dvojných vazeb obsahují). Uhlovodíkové konce fosfolipidových molekul kolísají ve své délce od 14 do 24 atomů uhlíku, přičemž nejčastější jsou řetězce s 18–20 atomy C. Kratší řetězce zmenšují snahu uhlovodíkových konců interagovat navzájem, a proto zvyšují tekutost dvojvrstvy. Jeden ze dvou uhlovodíkových konců každé fosfolipidové molekuly má obvykle jednu nebo více dvojných vazeb mezi sousedními atomy uhlíku (viz obr. 11-6). Takový řetězec tedy neobsahuje maximální počet vodíkových atomů, které by se teoreticky mohly vázat k jeho uhlíkové páteři, a proto se mu říká **nenasycený** vzhledem k vodíkům. Druhý zbytek mastné kyseliny obvykle neobsahuje žádné dvojně vazby, má maximální možný počet vodíkových atomů, a proto se mu říká **nasycený**. Každá dvojná vazba v nenasyceném konci vytváří malou nepravidlost v uhlovodíkovém řetězci (obr. 11-6), která znesnadňuje přikládání jednoho řetězce k druhému. Proto jsou lipidové dvojně vrstvy s velkým obsahem nenasycených uhlovodíkových konců tekutější než dvojvrstvy s malým obsahem dvojných vazeb v uhlovodíkových řetězcích.

Otázka 11-2 Pět studentů ve vaší třídě sedí vždy společně v první řadě. Může tomu být proto, že (A) se skutečně mají tak rádi, nebo (B) nikdo jiný s nimi nechce sedět. Které z obou vysvětlení platí při utváření dvojně vrstvy lipidů? Vysvětlete. Předpokládejte, že by se lipidové molekuly chovaly opačně. Jak by se změnila vlastnosti lipidové dvojně vrstvy?



Obrázek 11-15 Pohyblivost fosfolipidů. Kresba ukazuje tři typy možných pohybů molekul fosfolipidů v lipidové dvojně vrstvě.

V buňkách bakterií a kvasinek, které se musí přizpůsobovat měnícím se teplotním podmínkám, se délky řetězců i jejich složení stále nastavují, aby se tekutost membrány udržela stále stejná. Například při vyšších teplotách buňka produkuje membránové lipidy s řetězci, které jsou delší a obsahují méně dvojných vazeb. Podobný trik se používá při výrobě margarínu z rostlinných olejů. Tuky produkované rostlinami jsou obvykle nenasycené, a proto jsou při pokojové teplotě kapalné. Tím se liší od živočišných tuků (např. sádla nebo másla), které jsou obecně nasycené, a tudíž při pokojové teplotě tuhé. Margarin se vyrábí z hydrogenovaných rostlinných olejů, ze kterých se předtím odstranily dvojný vazby přidáním atomů vodíku; tím se tyto tuky staly tužšími a při pokojové teplotě více podobnými máslu.

Tekutost membrány je pro buňku důležitá z mnoha důvodů. Umožňuje membránovým proteinům rychle difundovat v rovině membrány a interagovat navzájem. To je důležité například při buněčné signalizaci, jak uvidíme v Kapitole 15. Poskytuje jednoduchý způsob distribuce membránových lipidů a proteinů difuzí z míst, kde byly po své syntéze začleněny do membrány, do jiných míst v buňce. Umožňuje membránám vzájemnou fúzi a smísení jejich molekul a zajišťuje rovnoměrné rozdělení membránových molekul mezi dceřiné buňky při buněčném dělení. Je těžké si představit, jak by buňka mohla žít, růst a rozmnožovat se, kdyby její membrány nebyly tekuté.

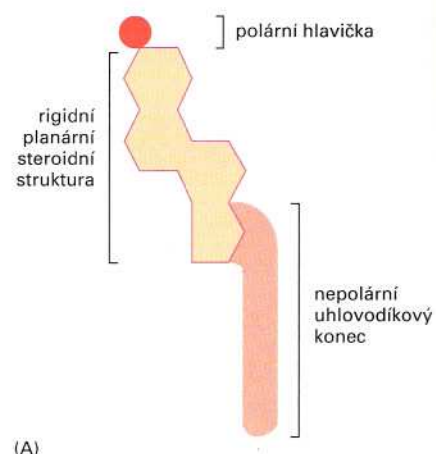
V živočišných buňkách je tekutost membrán snižována přítomností **cholesterolu**, který v rostlinách, kvasinkách a bakteriích chybí. Jeho krátké tuhé molekuly jsou u živočichů přítomny ve zvláště velkém množství v plasmatické membráně, kde vyplňují mezery mezi sousedními fosfolipidovými molekulami způsobené nepravidelnostmi v jejich nenasycených uhlovodíkových řetězcích (obr. 11-16). Tímto způsobem cholesterol zpevňuje dvojnou vrstvu a činí ji méně tekutou a méně propustnou.

Lipidová dvojná vrstva je asymetrická

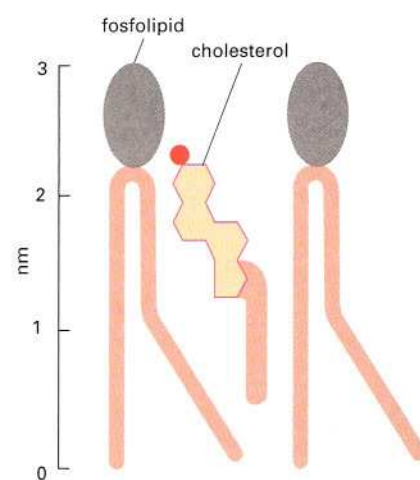
Buněčné membrány jsou obecně asymetrické a obracejí zcela jinou tvář k okolí buňky či orgány a jinou dovnitř těchto struktur. Obě poloviny dvojných vrstvy obsahují pozoruhodně odlišné sbírky fosfolipidů a glykolipidů (obr. 11-17). Proteiny jsou navíc do membrány zanořeny ve specifické orientaci, která je důležitá pro jejich funkci.

Asymetrie lipidů začíná už při jejich vzniku. Nové fosfolipidové molekuly jsou v buňkách syntetizovány enzymy vázanými na membránu, které jako substráty využívají mastné kyseliny dostupné v polovině dvojných vrstvy – tedy v monovrstvě – a uvolňují nově vytvořené fosfolipidy do téže dvojných vrstvy. To umožňuje membráně jako celku růst, přičemž část lipidových molekul musí být potom přesunuta do druhé monovrstvy. Tento přesun katalyzují enzymy zvané *flipázy* (z angl. *flip* = překloupat) (obr. 11-18). Byla vyslovena domněnka, že flipázy mohou přenášet specifické fosfolipidové molekuly selektivně, takže se v každé z obou polovin dvojných vrstvy nahromadí vyšší koncentrace některých fosfolipidů.

Začleňování nových složek jen z jedné strany a selektivní flipázy však nejsou jedinou příčinou asymetrie lipidových dvojných vrstev. Odlišný mechanismus funguje pro glykolipidy; tato třída lipidových molekul vykazuje nejpodivuhodnější a stále asymetrické rozdělení v živočišných

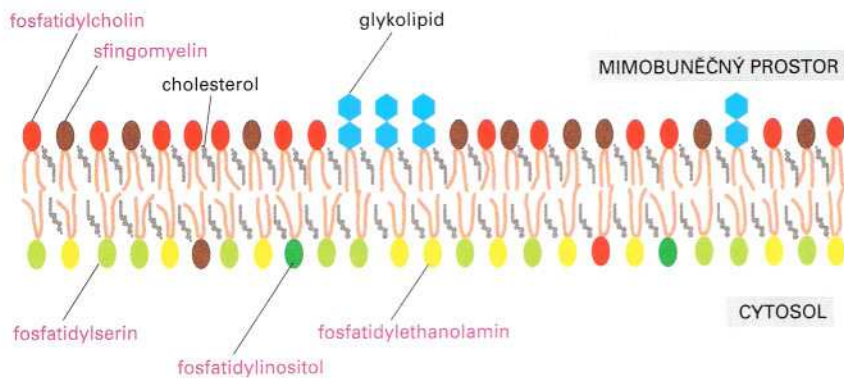


(A)



(B)

Obrázek 11-16 Úloha cholesterolu v buněčných membránách. (A) Struktura cholesterolu. (B) Představa, jak tato struktura zapadá do mezer mezi molekulami fosfolipidů v lipidové dvojných vrstvě. Chemický vzorec cholesterolu je uveden na obrázku 11-7.



Obrázek 11-17 Asymetrické rozdělení fosfolipidů a glykolipidů v plasmatické membráně. V různých barvách je ukázáno pět typů fosfolipidových molekul (popsaných červeně). Glykolipidy jsou nakresleny s šestiúhelníkovými hlavičkami, které představují cukry. Všechny glykolipidové molekuly se nacházejí ve vnější monovrstvě membrány, zatímco cholesterol je zastoupen přibližně rovnoměrně v obou monovrstvách.

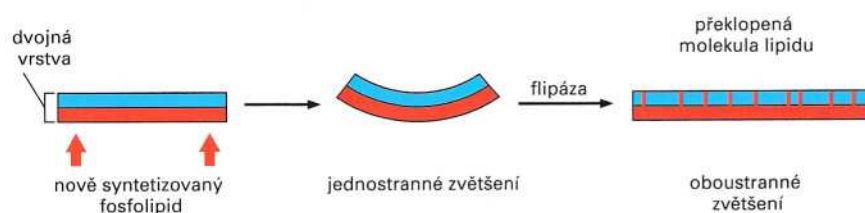
buňkách. K vysvětlení jejich distribuce si musíme podrobněji popsat to, jak se v eukaryontních buňkách tvoří nové membrány.

Asymetrie lipidů se rodí uvnitř buňky

V eukaryontních buňkách se syntéza téměř všech nových membrán odehrává v jednom vnitrobuněčném oddílu, zvaném *endoplasmatické retikulum*, zkratkou ER (probírá se podrobněji v kapitole 14). Nová membrána, která se zde sestavuje, je exportována do jiných membrán v buňce v cyklu pučících a fuzujících váčků: malé kousky membrány se odškrtí od ER a vytvoří malé váčky, které potom splynou s jinou membránou, a tak se do ní začlení. Protože se během přenosu ve formě váčků orientace dvojvrstvy vzhledem k cytosolu zachovává, mají všechny buněčné membrány – ať už jde o membránu plasmatickou nebo vnitrobuněčnou, obklopující organelu – rozlišitelnou „vnitřní“ a „vnější“ stranu: Vnitřní *cytosolová* strana je obrácena k cytosolu, zatímco vnější *necytosolová* strana je vystavena vnějšímu prostředí okolo buňky nebo vnitřnímu prostředí některé organely (obr. 11-19).

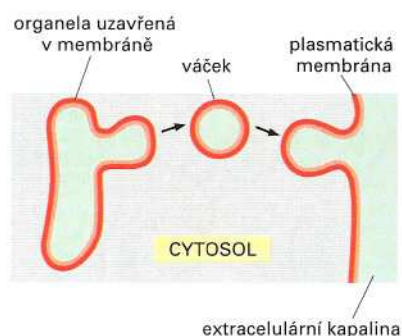
Glykolipidy se nacházejí hlavně v plasmatické membráně, a to výhradně v necytosolové polovině dvojné vrstvy. Jejich cukerné skupiny jsou proto vystaveny vnějšímu prostředí buňky (viz obr. 11-17), kde tvoří část ochranného pláště sacharidů obklopujícího většinu živočišných buněk. Glykolipidové molekuly získávají své cukerné skupiny v Golgiho aparátu (probírá se v kapitole 14). Enzymy, které k základům glykolipidů připojují cukerné skupiny, se nacházejí jen uvnitř Golgiho aparátu, takže cukry se připojují k lipidovým mnolekulám v necytosolové části lipidové dvojvrstvy. Jakmile byla tímto způsobem vytvořena glykolipidová molekula, zůstává zachycena v této monovrstvě, neboť neexistují žádné lipázy, které by ji přenesly do cytosolové monovrstvy. Proto se glykolipidová molekula po svém konečném doručení do plasmatické membrány odvrací od cytosolu a vystavuje svůj cukr do okolí buňky (obr. 11-19).

Další lipidové molekuly vykazují různé typy asymetrického rozdělení,



Obrázek 11-18. Úloha flipáz v syntéze lipidové dvojné vrstvy. Ačkoli jsou všechny nové fosfolipidové molekuly přidávány k dvojné vrstvě z jedné strany, flipázy některé z nich přenášejí do opačné monovrstvy, takže se celá dvojná vrstva rozpíná.

Obrázek 11-19 Pučení a fúze membránových váčků. Membránový váček na obrázku pučí z membránové organely a splývá s plasmatickou membránou. Všimněte si, že orientace plasmatické membrány během pučení váčku a jeho následné fúze s plasmatickou membránou zůstává zachována, takže původně cytosolový povrch zůstává i nadále cytosolovým.



kteřá se vztahují k jiným funkcím. Například *inositolové fosfolipidy* jsou menšinou složkou plasmatické membrány, ale hrají zvláštní roli v přenosu signálu z povrchu buňky do vnitrobuněčných oddílů, které na signál odpovídají (viz Kapitola 15). Tyto inositolové fosfolipidy fungují jen po přenosu signálu přes plasmatickou membránu, a proto se koncentrují v cytosolové polovině této lipidové dvojné vrstvy (viz obr. 11-17).

Lipidové dvojné vrstvy jsou nepropustné pro nenabitě molekuly i pro ionty

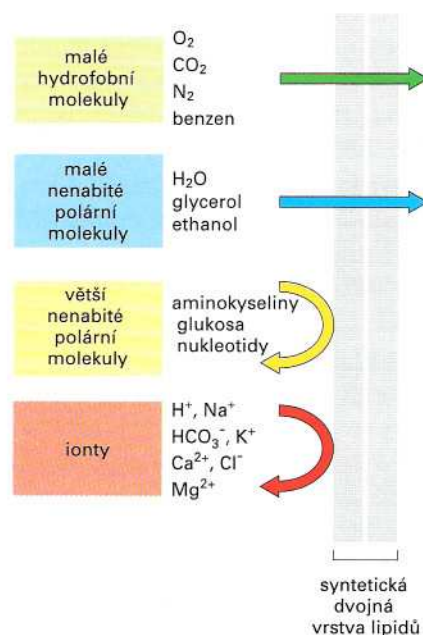
Viděli jsme, že základní úlohou každé buněčné membrány je fungovat jako přepážka, která reguluje průchod molekul do buňky a ven. Hydrofobní vnitřek lipidové dvojné vrstvy zde hraje důležitou roli, neboť vytváří bariéru pro většinu hydrofilních molekul. Tyto molekuly vstupují do lipidového prostředí stejně neochotně, jako hydrofobní molekuly vstupují neochotně do vody.

Tuto funkci přepážky, kterou lipidová dvojná vrstva zastává, lze ukázat v syntetických dvojných vrstvách jako obrázku 11-14. Během dostatečně dlouhé doby bude přes takovou dvojnou vrstvu difundovat většina molekul. *Rychlost* difuze však nesmírně závisí na velikosti molekuly a na jejích schopnostech se rozpouštět. Obecně lze říci, že čím menší je molekula a čím rozpustnější je v oleji (to znamená, čím je hydrofobnější nebo-li nepolární), tím rychleji bude difundovat přes membránu. Platí tedy:

1. *Malé nepolární molekuly*, jako je kyslík (O_2 , molekulová hmotnost 32 Da) a oxid uhličitý (44 Da) se ochotně rozpouštějí v lipidových dvojrstvách, a proto jimi rychle difundují. Buňky potřebují tuto propustnost pro plyny k buněčnému dýchání, které se probírá v Kapitole 13.
2. *Nenabitě polární molekuly* (molekuly s nerovnoměrným rozdělením elektrického náboje) také difundují přes membránu rychle, pokud jsou dostatečně malé. Například voda (18 Da) a ethanol (46 Da) procházejí membránou poměrně rychle; glycerol (92 Da) difunduje pomaleji a glukosa (180 Da) difunduje jen stěží (obrázek 11-20).
3. *Naopak pro všechny ionty a nabitě molekuly* bez ohledu na jejich velikost jsou lipidové dvojné vrstvy téměř zcela nepropustné. Náboj a silné elektrické přitahování k molekulám vody brání výše uvedeným molekulám vstupovat do uhlovodíkové fáze dvojné vrstvy. Například pro vodu jsou umělé dvojné vrstvy miliardkrát (10^9 krát) propustnější než pro malé ionty jako Na^+ či K^+ .

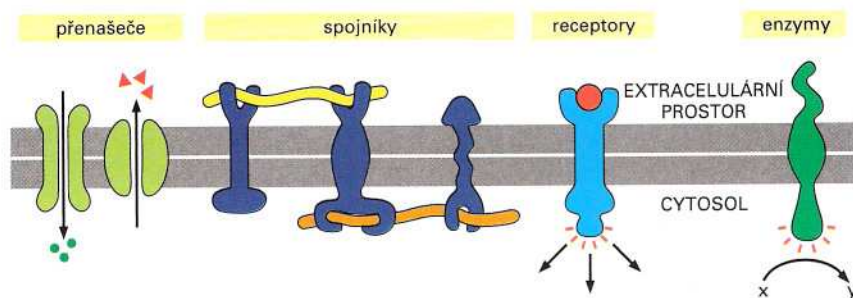
Buněčné membrány proto umožňují vodě a malým nepolárním molekulám vstupovat prostou difuzí. Pro přívod živin do buňky a pro odstraňování odpadů je však důležitý i transport mnoha jiných molekul, jako jsou ionty, cukry, aminokyseliny, nukleotidy a mnoho buněčných metabolitů. Tyto molekuly procházejí lipidovými dvojnými vrstvami příliš pomalu, pokud zvolí prostou difuzi, a proto jsou pro jejich přenos přes membránu

Otázka 11-3 Zdá se zvláštní, že lipidová vrstva může být tekutá a zároveň asymetrická. Vysvětlete.



Obrázek 11-20 Relativní propustnost syntetické dvojné vrstvy lipidů pro jednotlivé třídy molekul. Čím je molekula menší a hlavně čím méně ochotně interaguje s vodou (čím méně je polární), tím rychleji difunduje dvojnou vrstvou. Všimněte si, že mnohé z molekul, které buňka používá jako živiny, jsou příliš velké a polární na to, aby mohly čistou dvojnou vrstvou lipidů projít.

Obrázek 11-21 Některé funkce proteinů plasmatické membrány.



zapotřebí zvláštní transportní proteiny. Tyto *membránové transportní proteiny* jsou námětem Kapitoly 12. Avšak předtím, než o nich budeme mluvit, je nutno probrat některá obecná pravidla, podle nichž proteiny asociují s lipidovou dvojnou vrstvou za vzniku buněčných membrán.

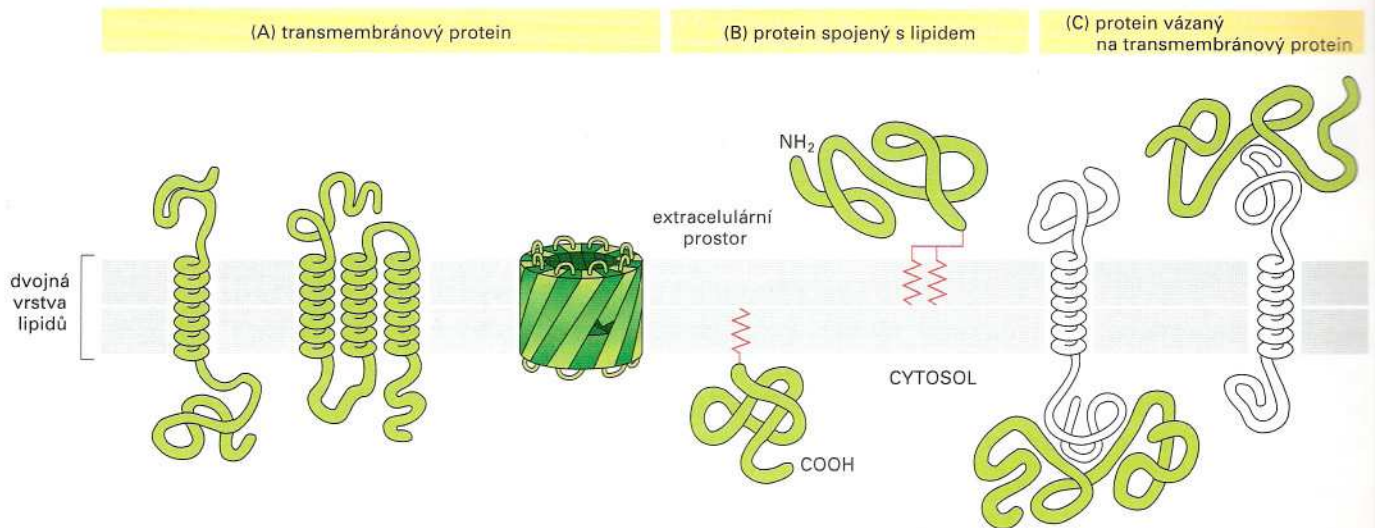
Membránové proteiny

Ačkoli lipidová dvojná vrstva poskytuje základní strukturu všech buněčných membrán a slouží jako nepropustná přepážka, většinu specifických funkcí membrány plní **membránové proteiny**. U živočichů představují proteiny asi 50 % hmotnosti většiny plasmatických membrán, přičemž zbytek tvoří lipidy a poměrně malý podíl uhlovodíků. Protože jsou však lipidové molekuly mnohem menší než molekuly proteinů, je v buněčné membráně obvykle asi 50krát více lipidových molekul než molekul proteinů (viz obr. 11-4).

Proteiny v membránách mají kromě transportu specifických živin, metabolitů či iontů přes lipidovou dvojnou vrstvu celou řadu dalších úkolů. Některé ukotvují membránu k makromolekulám na jedné či druhé straně. Jiné fungují jako receptory, které detegují chemické signály v okolí buňky a předávají je dovnitř buňky, a ještě další pracují jako enzymy, které katalyzují specifické reakce (obr. 11-21, tabulka 11-1). Každý typ buněčných membrán obsahuje jinou sadu proteinů odrážejících specifickou funkci specifické membrány. V této sekci promluvíme o stavbě membránových proteinů a ukážeme různé způsoby jejich spojení s lipidovou dvojnou vrstvou.

Tabulka 11-1 Některé proteiny plasmatické membrány a jejich funkce

Funkční třída	Příklad proteinu	Specifická funkce
Přenašeče	sodná pumpa (Na ⁺ /K ⁺ -ATPáza)	aktivně čerpá Na ⁺ ven z buněk a K ⁺ do buněk
Spojníky	integriny	spojují aktinová filamenta uvnitř buňky s proteiny extracelulární matrix
Receptory	receptor destičkového růstového faktoru	váže extracelulární destičkový růstový faktor PDGF a v důsledku toho generuje intracelulární signál, který způsobí růst a dělení buňky
Enzymy	adenylátcykláza	katalyzuje tvorbu cyklického AMP uvnitř buňky v odpověď na extracelulární signály



Membránové proteiny asociují s lipidovou dvojnou vrstvou různými způsoby

Existují tři hlavní způsoby, kterými mohou asociovat s lipidovou dvojnou vrstvou buněčné membrány (obr. 11-22).

1. Mnoho membránových proteinů se roztáhne napříč dvojnou vrstvou a na každé straně částí molekuly z ní vyčnívá (obr. 11-22A). Podobně jako lipidy v jejich sousedství mají i tyto transmembránové proteiny hydrofilní a hydrofobní oblasti. Jejich hydrofobní oblasti leží uvnitř dvojně vrstvy a jsou v kontaktu s hydrofobními konci lipidových molekul. Hydrofilní oblasti jsou vystaveny do vodného prostředí na obou stranách membrány.
2. Jiné membránové proteiny jsou umístěny zcela mimo dvojnou vrstvu a jsou k ní připojeny pouze jednou či několika kovalentními vazbami k lipidovým skupinám (obr. 11-22B).
3. Ještě další proteiny jsou nepřímo vázány na jednu nebo druhou stranu membrány pouhými interakcemi s jinými membránovými proteiny (obr. 11-22C).

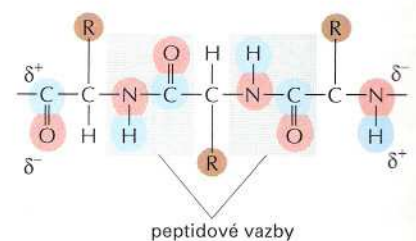
Všechny membránové proteiny mají v membráně svou jedinečnou orientaci: například transmembránový protein má obrácenou do cytosolu vždy tutéž část. Orientace plyne ze způsobu, jakým je protein syntetizován, jak se probírá v Kapitole 14.

Proteiny, které jsou přímo připojeny k membráně - ať už transmembránové nebo připojené k lipidům, mohou být od membrány odděleny jen narušením lipidové dvojně vrstvy detergenty, jak se probírá dále. Takové proteiny se nazývají *integrální membránové proteiny*. Ostatní membránové proteiny jsou známy jako *periferní*; z membrány je lze uvolnit poměrně mírnými extrakčními postupy, které přeruší interakce typu protein-protein, ale lipidovou dvojnou vrstvu zanechají netknoutou.

Polypeptidový řetězec obvykle prochází dvojnou vrstvou jako α -šroubovice

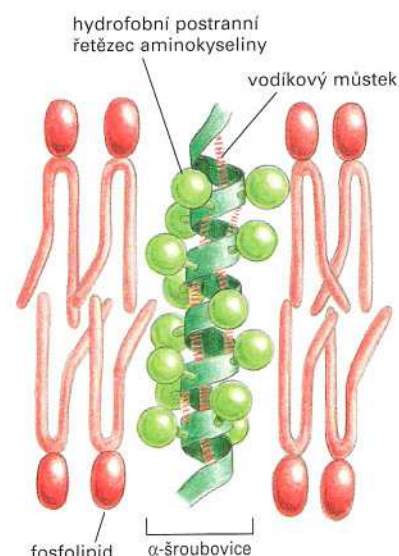
Části transmembránového proteinu, které vyčnívají z lipidové dvojně vrstvy, jsou spojeny zvláštními membránovými úseky polypeptidového řetězce. Tyto úseky, které procházejí hydrofobním prostředím vnitřku

Obrázek 11-22 Jak se membránové proteiny začleňují do dvojně vrstvy lipidů. (A) Transmembránové proteiny se mohou rozpínat napříč membránou jako samostatné α -šroubovice, jako skupiny α -šroubovic nebo jako β -skládaný list (β -sudek). (B) Jiné membránové proteiny jsou s membránou spojeny pouhou kovalentní vazbou k lipidové molekule (znázorněna červeně klikatě). (C) Mnoho proteinů je k membráně připojeno pouze slabšími nekovalentními interakcemi s jinými membránovými proteiny.



Obrázek 11-23 Peptidové vazby. Peptidové vazby (na obrázku šedě), které v polypeptidovém řetězci spojují sousední aminokyseliny, jsou polární, a tudíž hydrofilní. δ^- ukazuje částečný záporný náboj, δ^+ ukazuje částečný kladný náboj.

Obrázek 11-24 Úsek šroubovice procházející lipidovou dvojnou vrstvou. Hydrofobní postranní řetězce aminokyselin, které tvoří α -šroubovici, jsou v kontaktu s hydrofobními uhlovodíkovými řetězci fosfolipidových molekul, zatímco hydrofilní části polypeptidové páteře se uvnitř šroubovice navzájem spojují vodíkovými můstky. K překonání tloušťky plasmatické membrány tímto způsobem je zapotřebí asi 20 aminokyselin.



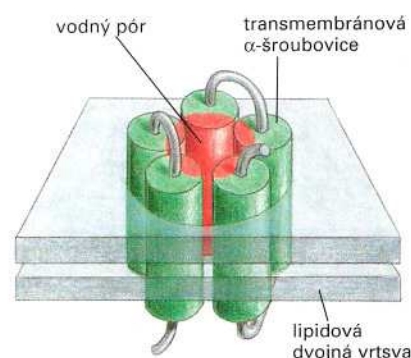
lipidové dvojnou vrstvy, jsou složeny hlavně z aminokyselin s hydrofobními postranními řetězci. Protože tyto postranní řetězce nemohou tvořit příznivé interakce s molekulami vody, dávají přednost lipidovému prostředí, kde žádná voda není.

Na rozdíl od hydrofobních postranních řetězců jsou však peptidové vazby, které spojují po sobě jdoucí aminokyseliny v proteinu, normálně polární, čímž činí polypeptidovou kostru hydrofilní (obr. 11-23). Protože voda se uvnitř dvojnou vrstvy prakticky nenachází, tvoří atomy polypeptidové kostry vodíkové můstky mezi sebou navzájem. Tvorba vodíkových můstků je maximální, pokud polypeptidový řetězec tvoří pravidelnou α -šroubovici, a proto velká většina membránových úseků má tuto sekundární strukturu. V těchto membránových α -šroubovicích jsou postranní řetězce aminokyselin exponovány do okolí šroubovice, kde se setkávají s hydrofobními lipidovými konci, zatímco části polypeptidové kostry vytvářejí navzájem vodíkové můstky uvnitř šroubovice (obr. 11-24).

V mnoha transmembránových proteinech prochází polypeptidový řetězec membránou jen jednou (viz obr. 11-22A). Některé takové proteiny fungují jako receptory pro extracelulární signály: jejich extracelulární část váže signální molekulu, zatímco jejich cytoplasmatická část signalizuje dovnitř buňky (viz obr. 11-21).

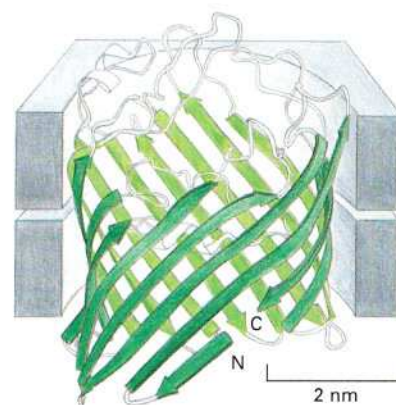
Další transmembránové proteiny tvoří vodné póry, které umožňují ve vodě rozpustným molekulám projít membránou. Takové póry nemohou vytvářet proteiny s jedinou uniformně hydrofobní transmembránovou α -šroubovicí. Pro tuto úlohu jsou zapotřebí složitější membránové proteiny, jejichž polypeptidový řetězec protíná membránu několikrát, buď jako α -šroubovice nebo jako β -skládaný list (viz obr. 11-22A). V mnoha z těchto proteinů je jedna nebo více transmembránových oblastí tvořena α -šroubovicemi, které obsahují jak hydrofobní tak hydrofilní postranní řetězce aminokyselin. Hydrofobní postranní řetězce se nacházejí na jedné straně šroubovice, vystavené lipidům membrány. Hydrofilní postranní řetězce jsou soustředěny na druhé straně, kde tvoří část lemu hydrofilního póru utvořeného složením několika šroubovic k sobě v hydrofobním prostředí lipidové dvojnou vrstvy (obr. 11-25). V Kapitole 12 probereme, jak takové póry fungují v selektivním transportu malých, ve vodě rozpustných molekul přes membránu.

Ačkoli je α -šroubovice zdaleka nejběžnější podobou, ve které polypeptidový řetězec prochází lipidovou dvojnou vrstvou, procházejí polypeptidové řetězce některých membránových proteinů membránou jako β -skládaný list (probírá se v Kapitole 5), zakřivené do válce, tvořící soudek s otevřeným koncem zvaný β -soudek. Jak lze očekávat, jsou postranní řetězce aminokyselin, které jsou obráceny dovnitř soudku, a proto lemují vodní kanál, většinou hydrofilní, zatímco zbytky na druhé straně soudku, kde se stýkají s hydrofobním vnitřkem lipidové dvojnou vrstvy, jsou výlučně hydrofobní. Nejznámějším příkladem jsou *porinové* proteiny, které tvoří velké vodotěsné póry ve vnější membráně mitochondrií, chlo-



Obrázek 11-25 Transmembránový hydrofilní pór tvořený skupinou šroubovic. V tomto příkladu pět transmembránových α -šroubovic tvoří vodou naplněný kanál napříč dvojnou vrstvou lipidů. Hydrofobní postranní řetězce aminokyselin (zeleně) na jedné straně každé šroubovice se stýkají s hydrofobními uhlovodíkovými řetězci, zatímco hydrofilní postranní řetězce (červeně) na opačné straně šroubovic tvoří pór, který je naplněn vodou.

Obrázek 11-26 Trojrozměrná struktura proteinu zvaného porin ve vnější membráně bakterie *Rhodobacter capsulatus*, jak byla určena rentgenovou krystalografií. Protein se skládá z 16 pásů β -struktury, která je zakřivena do tvaru soudku za vzniku transmembránového kanálu zaplněného vodou. Ačkoli to na kresbě není vidět, tři porinové jednotky se spojují do trimeru, který má tři oddělené kanály.



roplastů a některých bakterií, kde umožňují průchod živin a malých iontů, zatímco brání ve vstupu velkým antibiotikům a molekulám jedů. Narozdíl od α -šroubovice mohou β -soudky tvořit jen široké kanály, neboť pro skládání β -listu do soudku je jeho zakřivení omezeno (11-26)-V tomto ohledu je β -list málo pestrý ve srovnání se sbírkou α -šroubovic.

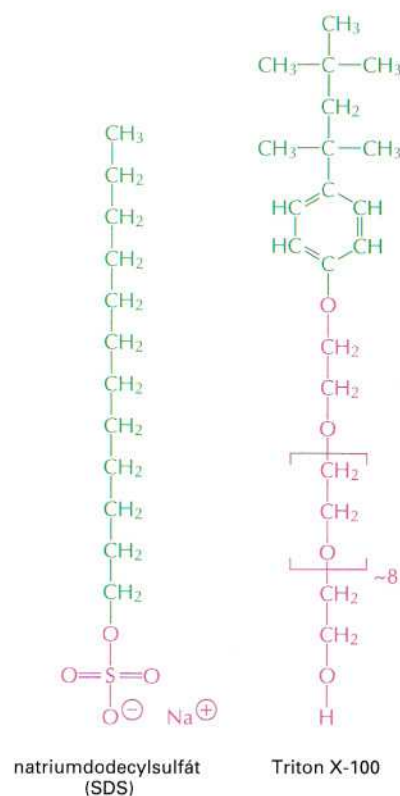
Membránové proteiny mohou být solubilizovány detergentem a přečištěny

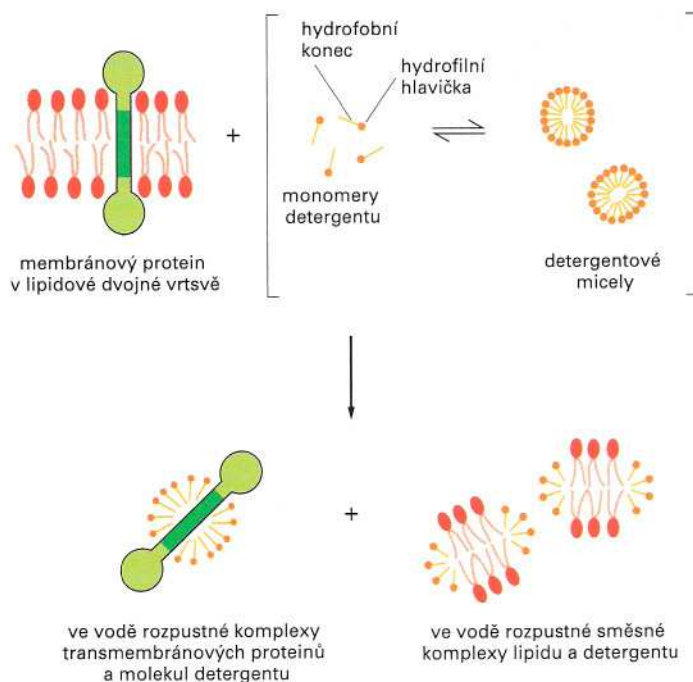
Abychom funkci proteinů plně pochopili, potřebujeme znát podrobně jejich strukturu. U membránových proteinů to představuje zvláštní problém. Většina biochemických postupů byla navržena pro práci s molekulami rozpuštěnými ve vodě nebo v jiném jednoduchém rozpouštědle; membránové proteiny jsou však přizpůsobeny činnosti v prostředí, které je částečně vodné a částečně lipidové povahy. Jejich vynětí z tohoto prostředí a přečištění za současného zachování jejich základní struktury není lehkou úlohou.

K podrobnému studiu jednotlivého proteinu je nezbytné jej oddělit od všech ostatních proteinů. U většiny membránových proteinů je prvním krokem v separačním postupu solubilizace membrány činidly, která naruší lipidovou dvojnou vrstvu tak, že přeruší hydrofobní asociace. Nejužitečnějšími z takových činidel jsou **detergenty**, což jsou malé amfipatické molekuly podobné lipidům, které mají jak hydrofilní tak hydrofobní oblast (obr. 11-27). Detergenty se od membránových fosfolipidů liší v tom, že mají jen jeden hydrofobní konec, a proto se i jinak chovají. Díky svému jedinému hydrofobnímu konci mají molekuly detergentů spíše tvar kužele než válce a ve vodě se místo do dvojvrstev snaží agregovat do malých shluků zvaných *micely*. Když je smícháme ve velkém přebytku s membránami, vážou se hydrofobní konce detergentních molekul k membránové části transmembránových proteinů stejně jako hydrofobní konce fosfolipidových molekul, a tím oddělují proteiny od fosfolipidů. Protože druhý konec molekuly detergentu je hydrofilní, snaží se tato vazba převést proteiny do roztoku v podobě komplexů protein-detergent (obr. 11-28). Současně detergent solubilizuje fosfolipidy. Komplexy protein-detergent mohou být potom odděleny jeden od druhého a od komplexů lipid-detergent s využitím takových technik, jako je

Otázka 11-4 Vysvětlete, proč polypeptidový řetězec většiny membránových proteinů přetíná lipidovou dvojnou vrstvu jako α -šroubovice nebo jako β -soudce.

Obrázek 11-27 Struktura dvou běžně užívaných detergentů. Dodecylsulfát sodný (SDS) je silný iontový detergent (to znamená, že má na svém hydrofilním konci ionizovanou skupinu), Triton X-100 je mírný neiontový detergent (to znamená, že má na svém hydrofilním konci neionizovanou, ale polární skupinu). Hydrofobní části obou detergentů jsou ukázány zeleně, hydrofilní části jsou ukázány červeně. Část Tritonu X-100 v hranaté závorce se opakuje asi osmkrát. Silné iontové detergenty jako SDS mohou kromě uvolňování lipidů z proteinů také uvolňovat některé vazby v proteinech, a tak tyto proteiny rozbíhat.





Obrázek 11-28 Rozpouštění membránových proteinů s pomocí mírného detergentu, například Tritonu X-100. Detergent porušuje lipidovou dvojnou vrstvu a proteiny převádí do roztoku ve formě komplexů protein-detergent. Také membránové fosfolipidy se s pomocí detergentů solubilizují, tj. stávají se rozpustnými. Jak je vidět na obrázku, molekuly detergentu jsou v průřezu konické a ve vodě se snaží shlukovat do útvarů zvaných micely.

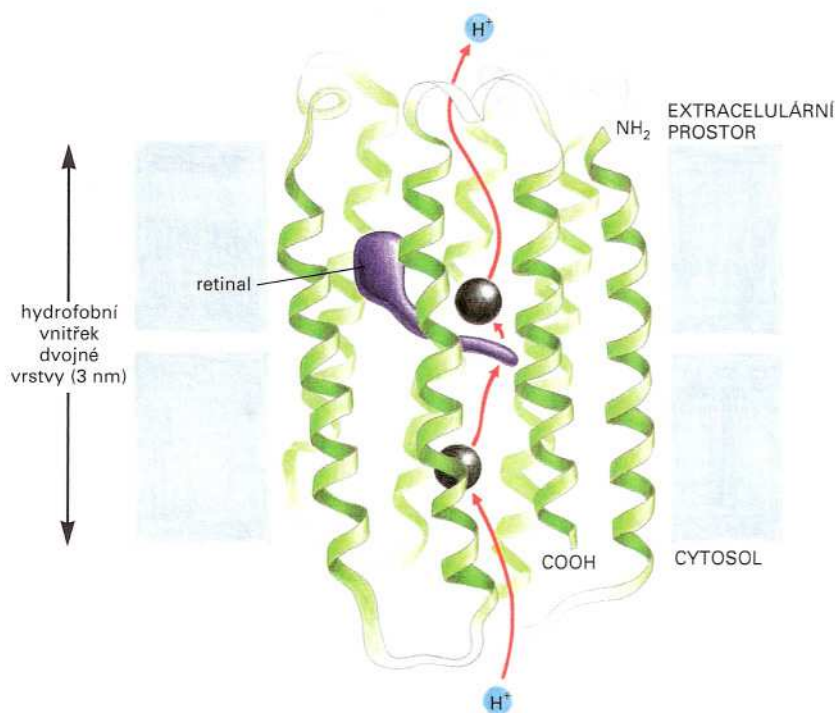
Otázka 11-5 Vysvětlete u dvou detergentů na obrázku 11-27, proč jsou červené části molekuly hydrofilní a zelené části hydrofobní. Nakreslete krátký úsek polypeptidového řetězce, složený ze tří aminokyselin s hydrofobními postranními řetězci (Panel 2-5, str. 62-63) a použijte podobné barevné schéma.

například elektroforéza na SDS-polyakrylamidovém gelu (probírá se v Kapitole 5).

Úplná struktura je známa jen u několika málo membránových proteinů

Mnoho z věcí, které víme o struktuře membránových proteinů, bylo zjištěno nepřímo. Standardní přímou metodou určování struktury proteinů je rentgenová krystalografie (probírá se v Kapitole 5), ale ta vyžaduje pravidelné krystalické uspořádání molekul. Membránové proteiny však krystalizují obtížně. Dvě pozoruhodné výjimky představují *bakteriorhodopsin* a *fotosyntetické reakční centrum purpurové bakterie*, což jsou bakteriální membránové proteiny, které hrají důležitou roli při zachycování a využívání energie slunečního světla. Struktura těchto proteinů přesně prozradila, jak α -šroubovice procházejí lipidovou dvojnou vrstvou a jak může soubor různých proteinových molekul asociovat a vytvářet funkční komplexy v membráně.

Struktura **bakteriorhodopsinu** je ukázána na obrázku 11-29. Tento malý protein (asi 250 aminokyselin) se nachází ve velkém množství v plasmatické membráně archebakterie *Halobacterium halobium*, která žije ve slaných močálech. Bakteriorhodopsin funguje jako membránový transportní protein, který pumpuje ionty H^+ ven z bakterie. Tato činnost vyžaduje energii; bakteriorhodopsin ji získává přímo ze slunečního světla. Každá molekula bakteriorhodopsinu obsahuje jednu neproteinovou složku, zvanou retinal, která absorbuje světlo a která způsobuje purpurovou barvu proteinu a bakterie. Tato malá hydrofobní molekula je kovalentně spojena s jedním ze sedmi závitů α -šroubovice bakteriorhodopsinu, které procházejí membránou, a leží v rovině lipidové dvojně vrstvy, zcela obklopena sedmi α -šroubovicemi (obr. 11-29). Když retinal absorbuje foton, změní svůj tvar, což způsobí řadu malých změn konformace proteinu zanořeného do lipidové dvojně vrstvy. Tyto změny vyústí v přenos jednoho H^+ z retinalu do okolí bakterie: H^+ se pohybuje napříč



Obrázek 11-29 Trojrozměrná struktura molekuly bakteriorhodopsinu.

Polypeptidový řetězec protíná lipidovou dvojnou vrstvou jako sedm šroubovic. Umístění retinalu a pravděpodobná cesta, kterou podstupují protony během transportního cyklu vyvolaného světlem: postranní řetězce dvou polárních aminokyselin, podle všeho zapojené do přenosu H^+ , jsou na obrázku černě. Retinal také využíváme k detekci světla v našich vlastních očích, kde je připojen k proteinu zvanému rhodopsin.

dvojnou vrstvou podél strategicky rozmístěných polárních zbytků aminokyselin (viz obr. 11-29). Retinal se potom regeneruje přijetím H^+ z cytosolu; protein se přitom vrátí do své původní konformace a cyklus se může opakovat. Celkovým výsledkem je přenos jednoho iontu H^+ ven z bakterie a snížení koncentrace H^+ v buňce.

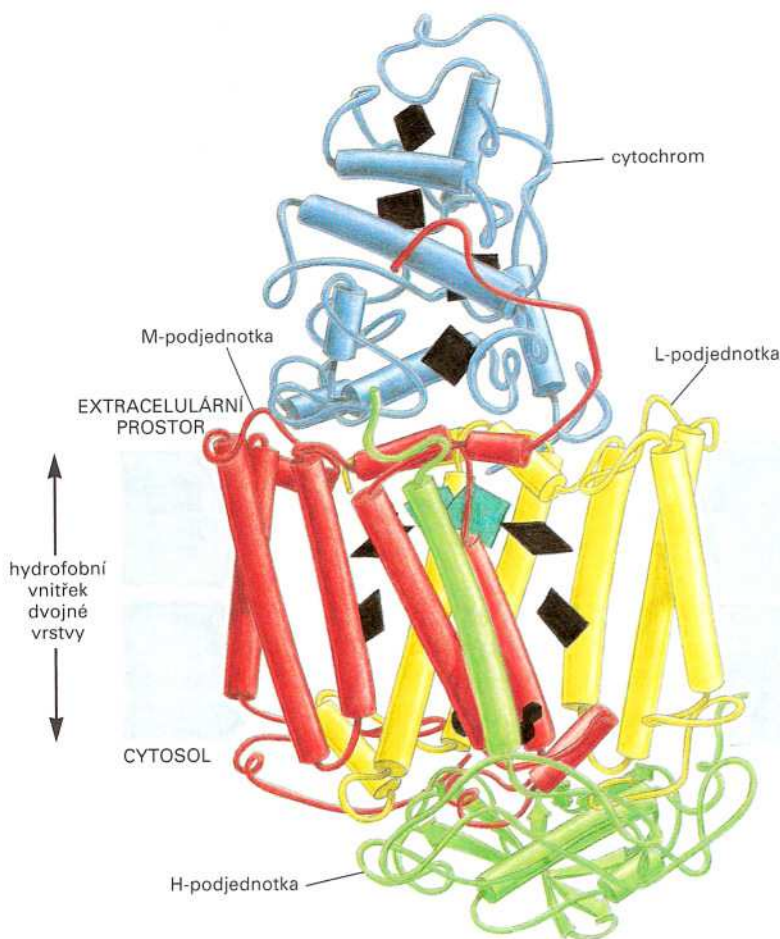
Za přítomnosti slunečního světla pumpují tisíce molekul bakteriorhodopsinu H^+ ven z buňky, a tak vytvářejí gradient koncentrace H^+ napříč membránou. Tento gradient H^+ slouží jako zásobárna energie podobně jako voda za přehradou. A stejně jako voda za hrází může být využita k výrobě elektřiny, nechá-li se padat dolů přes turbínu, může se i gradient H^+ využít k výrobě ATP, když ionty H^+ proudí zpět do bakterie přes další membránový protein, zvaný *ATP-syntáza*. Stejný typ *ATP-syntázy* vytváří ATP v rostlinných a živočišných buňkách, jak se probírá v Kapitole 13.

Struktura bakteriálního *fotosyntetického reakčního centra* je ukázána na obrázku 11-30. Jde o velký komplex složený ze čtyř proteinových molekul. Tři z nich jsou transmembránové proteiny (procházejí membránou); dva z těchto proteinů (M a L) obsahují početné závitě α -šroubovice, které procházejí lipidovou dvojnou vrstvou, zatímco třetí protein (H) má jen jeden takový závit. Čtvrtý protein (cytochrom) je spojen s vnějším povrchem membrány a je vázán na transmembránové proteiny. Celý bílkovinný komplex slouží jako proteinový stroj, který přijímá světelnou energii absorbovanou molekulami chlorofylu a produkuje vysokoenergetické elektrony potřebné k fotosyntetickým reakcím (probírá se v Kapitole 13). Mnoho membránových proteinů je uspořádáno do velkých komplexů a fotosyntetické reakční centrum je nejlepším modelem, který máme pro tisíce dalších membránových proteinů, jejichž struktura není známa.

Plasmatická membrána je zesílena buněčným kortexem

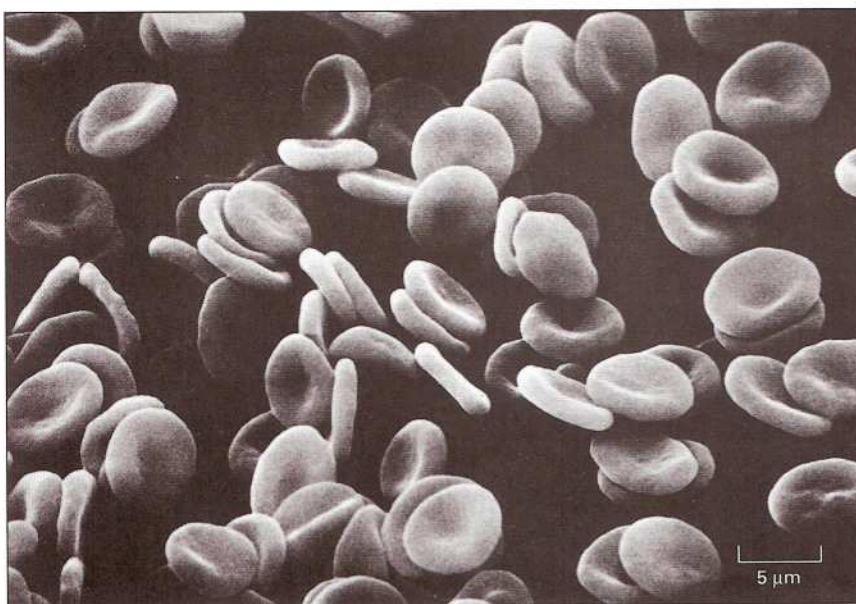
Buněčná membrána je sama o sobě velmi tenká a křehká. Museli bychom na sebe naskládat téměř 10 000 buněčných membrán, abychom vytvořili

Otázka 11-6 Podívejte se na strukturu fotosyntetického reakčního centra na obrázku 11-30. Jak byste očekávali, membránu protíná řada α -šroubovic. V pravém dolním rohu se však nachází úsek polypeptidového řetězce podjednotky L, který tvoří neuspořádanou smyčku v hydrofobním středu dvojnou vrstvy lipidů. Vyvrací to obecné pravidlo, podle něhož mohou transmembránové proteiny protínat lipidovou dvojnou vrstvou buď jako α -šroubovice nebo jako β -skládané listy?

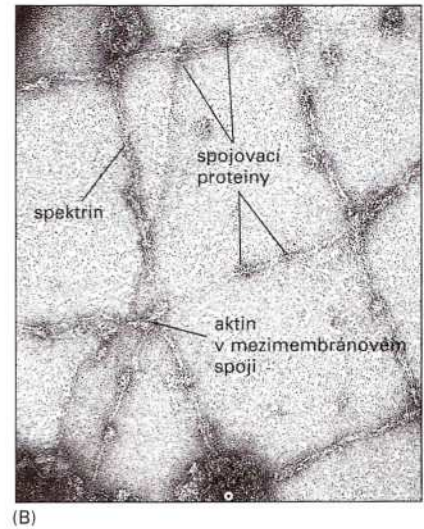
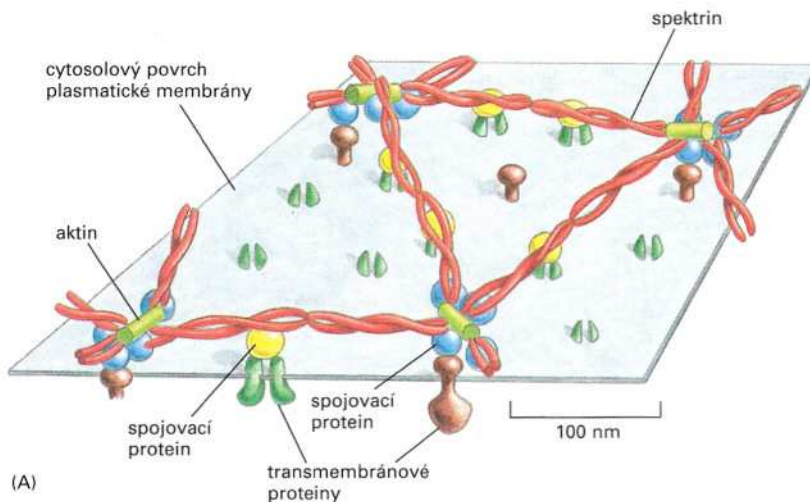


Obrázek 11-30 Trojrozměrná struktura fotosyntetického reakčního centra bakterie *Rhodospseudomonas viridis*. Struktura byla určena rentgenovou difrakční analýzou krystalů tohoto transmembránového proteinového komplexu. Komplex se skládá ze čtyř podjednotek: L, M, H a cytochromu. Podjednotky L a M tvoří jádro reakčního centra a každá z těchto podjednotek obsahuje pět α -šroubovic, které protínají dvojnou vrstvu lipidů. Všechny α -šroubovice jsou znázorněny jako válečky. Místa různých skupin přenášejících elektrony, kovalentně vázaných k proteinovým podjednotkám, jsou ukázána černě, kromě zvláštního páru chlorofylových molekul, které jsou excitovány světlem; ty jsou ukázány jako tmavě zelené obdélníky ve středu kresby. Všimněte si, že cytochrom je k vnějšímu povrchu membrány připojen pouze svou vazbou k transmembránovým podjednotkám.

vrstvu tlustou jako tento papír. Většina buněčných membrán je proto zesílena a podpírána sítí proteinů připojených k membráně přes transmembránové proteiny. Zvláště tvar buňky a mechanické vlastnosti plasmatické membrány jsou určovány sítí vláknitých proteinů, zvaných *buněčný kortex* (latinsky *cortex* = kůra), který je připojen k cytosolovému povrchu membrány.



Obrázek 11-31 Snímek lidských červených krvinek z rastrovacího elektronového mikroskopu. Lidské červené krvinky mají různě zploštělý tvar a postrádají jádro i další vnitrobuněčné organely.



Buněčný kortex lidských červených krvinek je poměrně jednoduchou a pravidelnou strukturou a je nyní nejlépe prostudovaným příkladem takové podmembránové sítě. Lidské erythrocyty jsou malé a mají zploštělý tvar (obr. 11-31). Hlavní složkou jejich kortexu je protein *spektrín* - tenké ohebné vlákno asi 100 nm dlouhé. Vytváří síť, která podpírá plasmatickou membránu a udržuje tvar buňky. Spektrínová síť je spojena s membránou intracelulárními spojovacími proteiny, které připojují spektrín ke specifickým transmembránovým proteinům (obr. 11-32). Důležitost této sítě můžeme pozorovat u lidí a myši s genetickými abnormalitami spektrínové struktury. Tito jedinci jsou anemičtí - mají nedostatek červených krvinek a jejich červené krvinky mají místo obvyklého zploštělého tvaru podobu koule a jsou neobvykle křehké.

Proteiny podobné spektrínu a k němu připojeným spojovacím proteinům jsou přítomny v kortexu většiny našich buněk. Kortex těchto buněk je však mnohem složitější než kortex červených krvinek. Zatímco kortex červených krvinek jim zajišťuje hlavně mechanickou pevnost, když jsou tlačeny přes stěny cév, jiné buňky využívají kortex také k aktivním změnám svého tvaru a k pohybu, jak probereme v Kapitole 16.

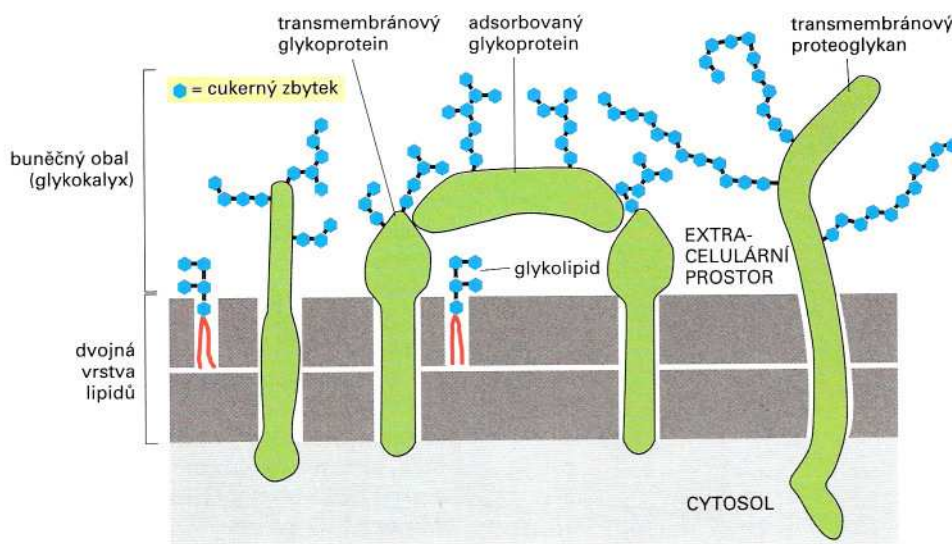
Povrch buněk je vybaven pláštěm sacharidů

Už jsme viděli, že u eukaryotních buněk jsou k mnoha lipidům z vnější vrstvy plasmatické membrány kovalentně vázány cukry. Stejně tak je tomu u většiny proteinů plasmatické membrány. Velká většina z nich obsahuje krátké řetězce cukrů, zvané *oligosacharidy*; takovým sloučeninám se říká **glykoproteiny**. Jiné membránové proteiny k sobě poutají po jednom či více dlouhých polysacharidových řetězců a nazývají se **proteoglykany**. Všechny sacharidy v glykoproteinech, proteoglykanech a glykolipidech se nacházejí na jedné straně membrány - na necytoplasmové straně, kde tvoří sacharidový plášť zvaný glykokalyx (obr. 11-33).

Glykokalyx chrání povrch buňky před mechanickým a chemickým poškozením. Protože oligosacharidy a polysacharidy absorbují vodu, propůjčují buňce slizovitý povrch. To pomáhá pohyblivým buňkám, jako

Obrázek 11-32 Buněčný kortex lidských červených krvinek, založený na spektrínu. (A) Molekuly spektrínu (společně s malým množstvím aktinových molekul) tvoří síť, která je spojena s plasmatickou membránou s pomocí nejméně dvou typů přichytných či spojovacích proteinů (ukázány modře a žlutě). Snímek z elektronového mikroskopu (B) na cytoplasmatické straně membrány červené krvinky. Aby bylo vidět podrobnosti ze struktury sítě, byla tato síť roztažena; v normální buňce by síťovina z obrázku zaujímal jen asi jednu desetinu této plochy.

Otázka 11-7 Podívejte se pozorně na transmembránové proteiny ukázané na obr. 11-32A. Co můžete říci o jejich pohyblivosti v membráně?



Obrázek 11-33 Zjednodušené schéma glykokalyxu eukaryontní buňky. Glykokalyx je vytvořen z oligosacharidových řetězců připojených k membránovým glykolipidům a glykoproteinům, a z polysacharidových řetězců na membránových proteoglykanech. Ke glykokalyxu mohou přispívat i glykoproteiny a proteoglykany, které buňka vyloučila a poté adsorbovala zpět na svůj povrch. Všimněte si, že všechny sacharidy jsou na extracelulární (necytosolové) straně plasmatické membrány.

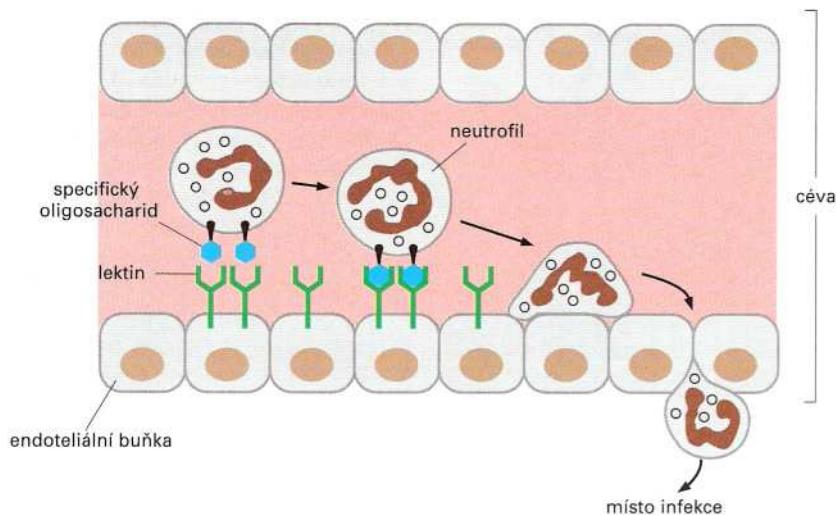
jsou například bílé krvinky, proklouzávat úzkými mezerami, a zabraňuje to také lepení krvinek k sobě navzájem a ke stěnám cév.

Sacharidy na povrchu buňky však zajišťují více než ochranu buňky a její kluzký povrch. Plní důležitou úlohu při vzájemném rozpoznávání buněk a při adhezi. Právě tak jako řada proteinů rozpoznává specifická místa v jiných proteinech a váže se na ně, rozeznávají některé proteiny (zvané *lektiny*) specifická místa v oligosacharidových postranních řetězcích a vážou se k těmto místům. Ačkoli jsou oligosacharidové postranní řetězce glykoproteinů a glykolipidů krátké (obvykle méně než 15 sacharidových jednotek), jsou nesmírně rozmanité. Na rozdíl od polypeptidových (proteinových) řetězců, kde jsou aminokyseliny spojeny vždy lineárně stejnými peptidovými vazbami (viz obr. 11-23), mohou být cukry spojeny různými způsoby a v různém pořadí, často za vzniku rozvětvených oligosacharidových řetězců (viz panel 2-3., str. 56-57). Dokonce i pouhé tři cukerné zbytky lze spojit různými kombinacemi kovalentních vazeb do stovek různých trisacharidů.

V mnohobuněčném organismu může tedy glykokalyx sloužit jako určitý druh různých uniforem, podle kterých lze buňky rozpoznat. Skutečně je podle této „uniformaly“ rozpoznávají jiné buňky, které s nimi interagují. Specifické oligosacharidy v glykokalyxu se účastní například rozpoznání vajíčka a spermie či zánětlivé odpovědi. V raném stadiu bakteriální infekce je např. sacharid na povrchu krevních buněk zvaných *neutrofilů* rozpoznáván lektinem buněk ve stěnách krevních cév v místě infekce. Toto rozpoznání přiměje neutrofilů k adhezi na krevní váčky a k následné migraci krevním řečištěm do infikovaných tkání, kde pomáhají odstraňovat bakterie (obr. 11-34).

Buňky mohou omezit pohyb membránových proteinů

Protože je membrána dvojrozměrnou kapalinou, mnoho z jejích proteinů se stejně jako lipidy může volně pohybovat v rovině lipidové dvojně vrstvy. Lze to snadno ukázat na fúzi myší buňky s buňkou lidskou za vzniku hybridní buňky o dvojnásobné velikosti a následném sledování rozdělení myších a lidských membránových proteinů v membráně nové buňky.

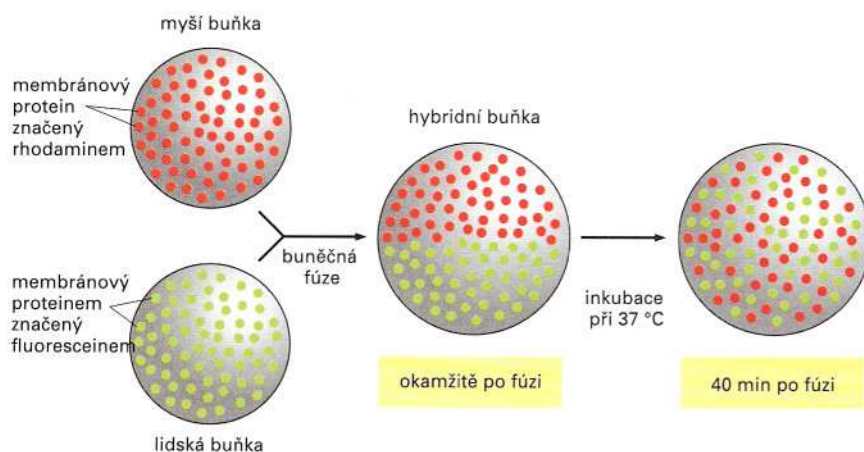


Obrázek 11-34 Rozpoznání sacharidů na buněčném povrchu neutrofilů je prvním stadiem jejich přesunu z krve do místa infekce. V odpověď na chemické signály přicházející z místa infekce buňky vystylající cévy (endoteliální buňky) vytvářejí speciální transmembránové proteiny zvané lektiny. Tyto proteiny rozpoznávají zvláštní skupiny cukrů nesené glykolipidy a glykoproteiny na povrchu neutrofilů obíhajících v krvi. Neutrofil se následně přilepí ke stěně cévy. Toto spojení není příliš pevné, ale vede k jiné, mnohem pevnější protein-proteinové interakci (na obrázku není vidět), která neutrofilu pomáhá přesunout se z krevního oběhu mezi endoteliálními buňkami do tkáně v místě infekce.

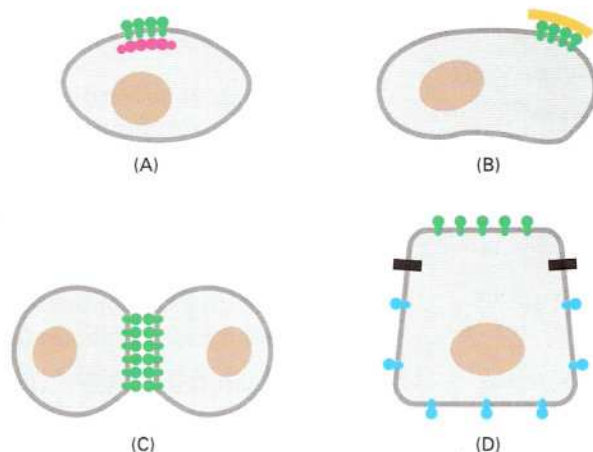
Ačkoli se na počátku proteiny zdržují ve svých původních částech membrány, dojde přibližně během půl hodiny k rovnoměrnému promíchání obou sad proteinů v celém povrchu buňky (11-35).

Obrázek membrány jako moře lipidů s plujícími proteiny je však příliš jednoduchý. Buňky mohou poutat určité proteiny plasmatické membrány v některých oblastech, a tak vytvářet na povrchu buňky specializované části plasmatické membrány – **membránové domény**. Některé způsoby omezení pohybu membránových proteinů jsou shrnuty na obrázku 11-36.

Proteiny mohou být vázány k fixním strukturám vně buňky – například k molekulám extracelulární matrix (probírá se v Kapitole 19). Membránové proteiny mohou být také ukotveny k poměrně nepohyblivým strukturám uvnitř buňky, zvláště k buněčnému kortexu (viz obr. 11-32). Nakonec mohou buňky také vytvářet bariéry, které omezují určité složky membrány do jedné membránové domény. Například v buňkách střevního epitelu důležité, že transportní proteiny účastníci se přenosu



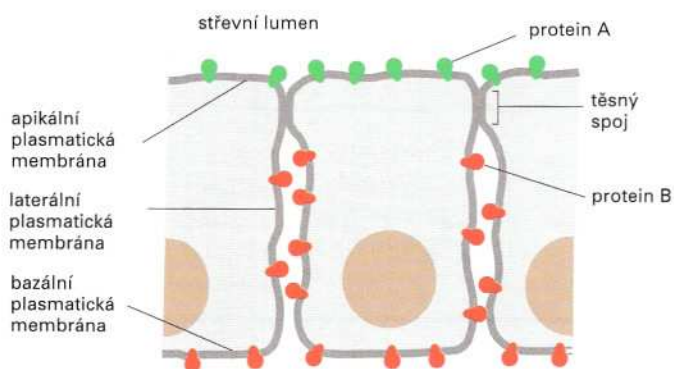
Obrázek 11-35 Pokus ukazující smíšení proteinů plasmatické membrány v hybridních buňkách myši a člověka. Na počátku zůstávají myší a lidské proteiny ve svých polovinách plasmatické membrány nově vzniklé hybridní buňky, ale během krátké doby se smísí. Abychom mohli proteiny pozorovat, označili jsme postupně dvě protilátky, které se vážou k lidským a k myším proteinům, různými fluorescenčními značkami (jednu protilátku rhodaminem a druhou fluoresceinem) a přidali jsme je k buňkám. Obě fluorescenční protilátky teď můžeme ve fluorescenčním mikroskopu od sebe rozeznat, neboť fluorescein je *zelený*, zatímco rhodamin je *červený*.



Obrázek 11-36 Čtyři způsoby omezení laterální pohyblivosti (tj. v jedné monovrstvě) proteinů plasmatické membrány. Mohou být připojeny k buněčnému kortexu uvnitř buňky (A) nebo k molekulám extracelulární matrix (B), případně k proteinům na povrchu jiné buňky (C). K tomu navíc mohou ještě difuzní přepážky (vyznačené jako *černé obdélníčky*) udržovat proteiny v určité membránové doméně.

živin ze střeva náleží k *apikálnímu* povrchu buněk (povrch, který se stýká s obsahem střev) a že jiné proteiny zahrnuté v transportu rozpuštěných látek z epiteliálních buněk do tkáně a krevního řečiště, náleží k *bazálním* a *laterálním* povrchům (obr. 11-37). Toto asymetrické rozdělení membránových proteinů je udržováno s pomocí přepážky utvořené podél linie, kde jsou buňky připojeny k sousedním epiteliálním buňkám tak zvaným *těsným spojem*. V tomto místě vytvářejí speciální pojivové proteiny nepřetržitý pás kolem buňky v místech styku se sousedy, a tak vzniká těsný uzávěr mezi sousedícími plasmatickými membránami. Membránové proteiny nemohou přes tento spoj difundovat.

V další kapitole prozkoumáme jednotlivé funkce proteinových molekul, které jsou pečlivě umístěny na povrchu buněk, aby umožňovaly transport látek přes membránu.



Obrázek 11-37 Kresba střevního epitelu ukazuje, jak je membránový protein omezen na určitou doménu epiteliální buňky. Protein A (v apikální membráně) a protein B (v bazální a laterální membráně) mohou laterálně difundovat ve svých vlastních membránových doménách, ale ve vstupu do jiné domény jim brání zvláštní buněčné spojení zvané *těsný spoj*.

Otázka 11-8 Popište různé způsoby, které buňky užívají k udržování proteinů ve specifických oblastech plasmatické membrány. Je membrána s mnoha ukotvenými proteiny stále tekutá?

Základní shrnutí

- Buněčné membrány umožňují buňce vytvářet bariéry, které omezují určité molekuly do specifických oddílů.
- Buněčné membrány sestávají z nepřerušovaných dvojných vrstev lipidových molekul, ve kterých jsou zanořeny proteiny.
- Lipidová dvojná vrstva je základní strukturou a prostředkem k utváření bariér ve všech buněčných membránách.
- Molekuly membránových lipidů mají hydrofobní a hydrofilní oblasti. Ve vodě se samovolně organizují do dvojných vrstev a tvoří uzavřené oddíly, které se při protržení opět zacelí.
- Existují tři hlavní třídy molekul membránových lipidů: fosfolipidy, steroly a glykolipidy.
- Lipidová dvojná vrstva je tekutá a jednotlivé lipidové molekuly mohou difundovat ve svých monovrstvách; nemohou však spontánně přecházet z jedné monovrstvy do druhé.
- Každá z obou polovin lipidové dvojně vrstvy má odlišné složení, které odráží různou funkci každého z povrchů buněčné membrány.
- Buňky regulují tekutost svých membrán změnami složení lipidových dvojných vrstev.
- Dvojná vrstva lipidů je nepropustná pro všechny druhy iontů a pro velké polární molekuly, ale propouští malé nepolární molekuly, jako například

- Membránové proteiny odpovídají za většinu specifických funkcí membrány, například za transport malých molekul rozpustných ve vodě přes lipidovou dvojnou vrstvu.
- Transmembránové proteiny procházejí napříč dvojnou vrstvou lipidů, obvykle jako jeden nebo více závitů α -šroubovice, výjimečně pak jako β -skládaný list ve formě soudku.
- Řada membránových proteinů neprochází napříč membránou, ale je připojena k jedné či druhé straně membrány buď nekovalentní asociací s membránovými proteiny nebo kovalentní vazbou s lipidy.
- Mnohé z proteinů a některé z lipidů vystavených na povrchu buněk obsahují řetězce cukrů, které pomáhají zajišťovat ochranu a kluzkost buněčného povrchu a účastní se vzájemného rozpoznávání buněk.
- Většina buněčných membrán je podpírána připojeným proteinovým lešením. Příkladem je síť fibrilárních proteinů, které tvoří buněčný kortex pod plasmatickou membránou.
- Ačkoli může mnoho membránových proteinů rychle difundovat v rovině membrány, buňky mají prostředky k omezení tohoto pohybu proteinů do určitých membránových domén a k ukotvení určitých proteinů k intracelulárním nebo extracelulárním makromolekulám.

Klíčové pojmy

amfipatický
bakteriorhodopsin

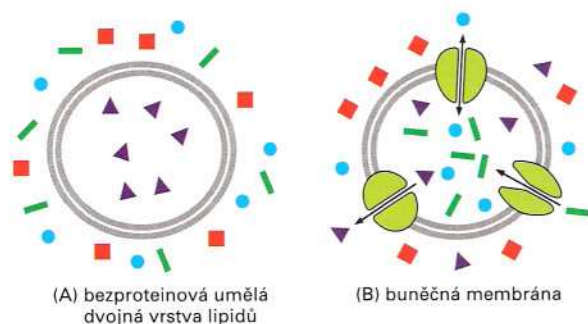
cholesterol
detergent
dvojná vrstva lipidů
fosfatidylcholin
fosfolipid

glykokalyx
glykolipid
glykoprotein
membránová
doména

membránový protein
nasycený
nenasycený
plasmatická
membrána

12 Přenos látek přes membrány

V Kapitole 11 jsme poznali význam buněčných membrán v roli přepážek: vnitřek dvojné vrstvy lipidů je hydrofobní a brání průchodu téměř všech molekul rozpustných ve vodě. Ale život buněk se zakládá na výměně molekul s okolím, takže plasmatickou membránou musí být schopny procházet různé molekuly rozpustné ve vodě: je nutné přivádět živiny jako cukry a aminokyseliny a odvádět odpadní produkty, mezi které patří například CO_2 . Rovněž je nezbytné upravovat koncentrace H^+ , Na^+ , K^+ a Ca^{2+} . Několik málo z těchto *solutů*, např. CO_2 a O_2 , může prostě difundovat přes lipidovou dvojnou vrstvu, avšak velká většina pro buňku potřebných látek toho není schopna (obr. 11-20). Jejich přenos zajišťují **membránové transportní proteiny**, které protínají membránu a vytvářejí „soukromé“ průchody pro specifické látky (obr. 12-1). Například některé průchody jsou otevřené pro Na^+ , ale ne pro K^+ , jiné jsou otevřené pro K^+ , ale ne pro Na^+ , zatímco další jsou otevřené glukose, ale uzavřené aminokyselinám. Sada transportních proteinů v plasmatické membráně nebo v membráně vnitrobuněčné organely přesně určuje, jaké rozpuštěné látky neboli *soluty* mohou procházet do organely či buňky, nebo je opouštět. Proto má



Obrázek 12-1 Membránové transportní proteiny jsou zodpovědné za přenos malých, ve vodě rozpustných molekul přes buněčné membrány. Umělé dvojné vrstvy lipidů, které neobsahují proteiny, jsou pro většinu ve vodě rozpustných látek nepropustné (A), zatímco buněčnými membránami tyto látky procházejí (B). Všimněte si, že každý typ transportního proteinu přenáší určitý typ molekuly. Díky tomu vždy určitý soubor solutů skončí uvnitř daného membránového oddílu buňky.

- Koncentrace iontů uvnitř buňky a v jejím okolí se mohou značně lišit

PŘENAŠEČOVÉ PROTEINY A JEJICH FUNKCE

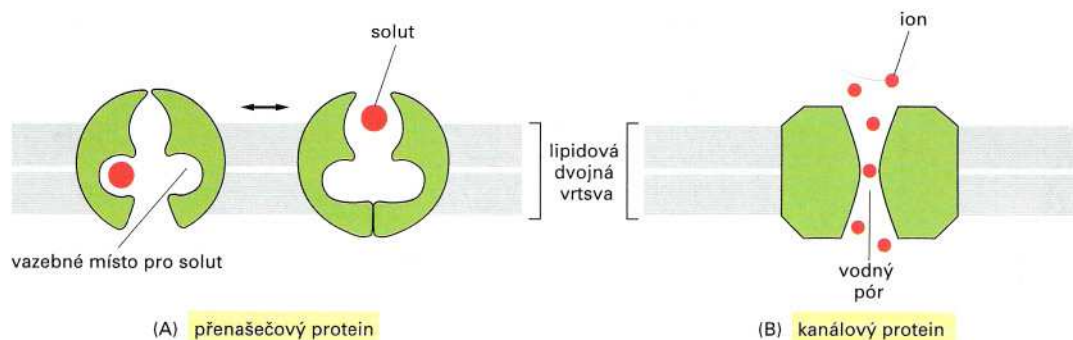
- Rozpuštěné látky se přes membránu dostávají aktivním nebo pasivním transportem
- Pasivní transport může být poháněn jak koncentračním gradientem tak elektrickými silami
- Aktivní transport pohání rozpuštěné látky proti gradientu jejich (elektro)-chemického potenciálu
- Živočišné buňky využívají k odstraňování Na^+ energii hydrolyzy ATP
- Na^+/K^+ -ATPáza je poháněna přechodnou adicí fosforylové skupiny
- Živočišné buňky využívají k pohonu aktivního transportu živin gradient Na^+
- Sodno-draselná pumpa pomáhá udržovat osmotickou rovnováhu v živočišných buňkách
- Koncentrace Ca^{2+} uvnitř buňky jsou udržovány nízké s pomocí Ca^{2+} -pump
- Gradient H^+ se využívá k pohonu membránového transportu u rostlin, hub a bakterií

IONTOVÉ KANÁLY A MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL

- Iontové kanály jsou iontově selektivní a uzavíratelné
- Iontové kanály se náhodně otevírají a zavírají
- Iontové kanály uzavíratelné napětím reagují na změny membránového potenciálu
- Membránový potenciál je řízen propustností membrány pro specifické ionty

IONTOVÉ KANÁLY A SIGNALIZACE V NERVOVÝCH BUŇKÁCH

- Akční potenciály přispívají k rychlé komunikaci na dlouhé vzdálenosti
- Akční potenciály jsou obvykle zprostředkovány sodnými kanály ovládanými napětím
- Napětím ovládané Ca^{2+} -kanály přeměňují v nervových zakončeních elektrické signály v chemické
- Chemicky regulované kanály v cílových buňkách převádějí chemické signály zpět do elektrické podoby
- Neurony dostávají jak excitační tak inhibiční podněty
- Synaptické spoje nám umožňují myslet, jednat a vzpomínat



každý druh membrány svou vlastní charakteristickou sadu transportních proteinů.

Lze rozlišit dvě hlavní třídy membránových transportních proteinů. *Přenašečové proteiny* vážou na jedné straně membrány solut a přemístí ho dovnitř změnou své konformace. Tímto způsobem se přenášejí malé organické molekuly nebo anorganické ionty. *Kanálové proteiny* naopak vytvářejí v membráně úzké hydrofilní póry, kterými mohou rozpuštěné látky difundovat (obr. 12-2). Většinou kanálů mohou procházet jen anorganické ionty, a proto se těmito kanálům říká *iontové kanály*. Buňky mohou nechat přes membrány selektivně přenášet i makromolekuly jako např. proteiny, ale to vyžaduje důmyslnější aparát, o kterém promluvíme v Kapitole 14.

V první sekci této kapitoly se zaměříme na přenašečové proteiny a jejich funkce v přenosu rozpuštěných látek. Ve druhé sekci pojednáme o chování a funkcích iontových kanálů. Protože jsou ionty elektricky nabitě, mohou jejich pohyby vyvolat mohutné elektrické síly působící napříč membránou. Tyto síly umožňují nervovým buňkám pracovat s elektrickými signály, jak uvidíme v poslední sekci.

Abychom získali základní půdu pro další diskusi, začneme tím, že si všimneme rozdílů koncentrací některých iontů v buňkách a v jejich okolí. Díky tomu nám bude jasné, proč je pro buňky transport iontů přenašeči i iontovými kanály tak důležitý.

Obrázek 12-2 Schematický pohled na dvě třídy membránových transportních proteinů. Přenašečový protein prochází řadou konformačních změn, které mu umožňují přenášet malé molekuly rozpustné ve vodě přes dvojnou vrstvu lipidů. Naproti tomu kanálový protein vytváří hydrofilní pór přes dvojnou vrstvu, kterým mohou difundovat specifické anorganické ionty. Jak by se dalo očekávat, kanál zajišťuje transport mnohem větší rychlostí než přenašečové proteiny. Iontové kanály mohou existovat buď v otevřené nebo v zavřené konformaci, přičemž k přenosu látek dochází jenom tehdy, je-li takový protein v otevřené konformaci. Uzavírání a otvírání kanálů je obvykle ovládáno vnějším podnětem nebo vnitřními podmínkami v buňce.

Koncentrace iontů uvnitř buňky a v jejím okolí se mohou značně lišit

Transport iontů přes membrány má v biologii ústřední význam. Buňky udržují vnitřní iontové složení, které je velmi odlišné od složení okolní kapaliny, a tento rozdíl je mimořádně důležitý pro funkce a život buněk. Nejhojnějšími ionty v okolí živočišných buněk jsou Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- a H^+ ; jejich pohyb přes buněčné membrány je základem mnoha buněčných dějů. Například živočišné buňky udržují nízkou vnitřní koncentraci Na^+ tím, že tyto ionty pumpují ven. Tato činnost pomáhá udržovat rovnováhu osmotických tlaků na obou stranách membrány: pokud se pumpování zastaví, voda se osmosou dostane do buněk a způsobí jejich nabobtnání a posléze prasknutí. Pohyb iontů přes buněčné membrány hraje také zásadní roli při práci nervových buněk, jak probereme později, a při tvorbě ATP ve všech buňkách, jak uvidíme v Kapitole 13.

V tabulce 12-1 jsou uvedeny koncentrace iontů uvnitř typické savčí buňky a v jejím okolí. Nejhojnějším kationtem v okolí těchto buněk je Na^+ , zatímco uvnitř je nejvíce zastoupen K^+ . Pokud nemají buňku roztrhat elektrické síly, musí být kladné náboje v buňce vyváženy téměř

Tabulka 12-1 Srovnání koncentrací iontů uvnitř a vně typické savčí buňky

Složka	Koncentrace uvnitř buňky (mM)	Koncentrace v okolí buňky (mM)
Kationty		
Na ⁺	5–15	145
K ⁺	140	5
Mg ^{2+*}	0,5	1–2
Ca ^{2+*}	10 ⁻⁷	1–2
H ⁺	6,3 × 10 ⁻⁸ M neboli pH 7,2	4,0 × 10 ⁻⁸ M neboli pH 7,4
Anionty		
Cl ⁻	5–15	110
Vázané anionty**	vyšoká	0

* Koncentrace Ca²⁺ a Mg²⁺ je udána pro volné ionty v cytosolu. Tyto ionty se v buňkách vyskytují v celkové koncentraci asi 20 mM Mg²⁺ a 1–2 mM Ca²⁺, ale většina z tohoto množství je vázána na proteiny a jiné látky, a proto nemůže opustit buňku. Většina z celkového množství Ca²⁺ je uložena v různých organelách.

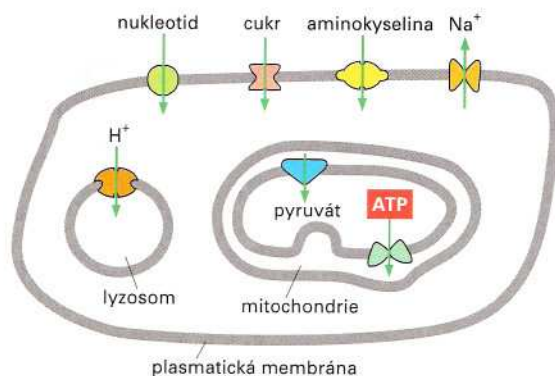
** Vázané anionty jsou záporně nabitě malé a velké organické molekuly uvězněné v buňce, které nemohou projít plasmatickou membránou.

přesně stejným množstvím záporných nábojů, a totéž platí i o okolní kapalině. (Malý přebytek kladného nebo záporného náboje v blízkosti plasmatické membrány je povolen a je zdrojem důležitých elektrických efektů, o kterých promluvíme později.)

Vysoká koncentrace Na⁺ v okolí buňky je vyvažována hlavně extracelulárními ionty Cl⁻. Vysokou koncentraci K⁺ uvnitř buňky vyrovnává celá řada záporně nabitých intracelulárních iontů (aniontů). Ve skutečnosti je většina složek buňky nabitá záporně; vedle Cl⁻ obsahují buňky i další anorganické ionty hydrogenukarbonátový HCO₃⁻ a fosfátový PO₄³⁻ nebo HPO₄²⁻, organické metabolity nesoucí záporně nabitě fosfátové a karboxylátové skupiny (COO⁻), a makromolekuly jako proteiny a nukleové kyseliny, které také nesou početné fosfátové a karboxylové skupiny. Záporně nabitě organické molekuly se někdy nazývají „vázané anionty“, protože nemohou uniknout z buňky průchodem přes plasmatickou membránu.

Přenašečové proteiny a jejich funkce

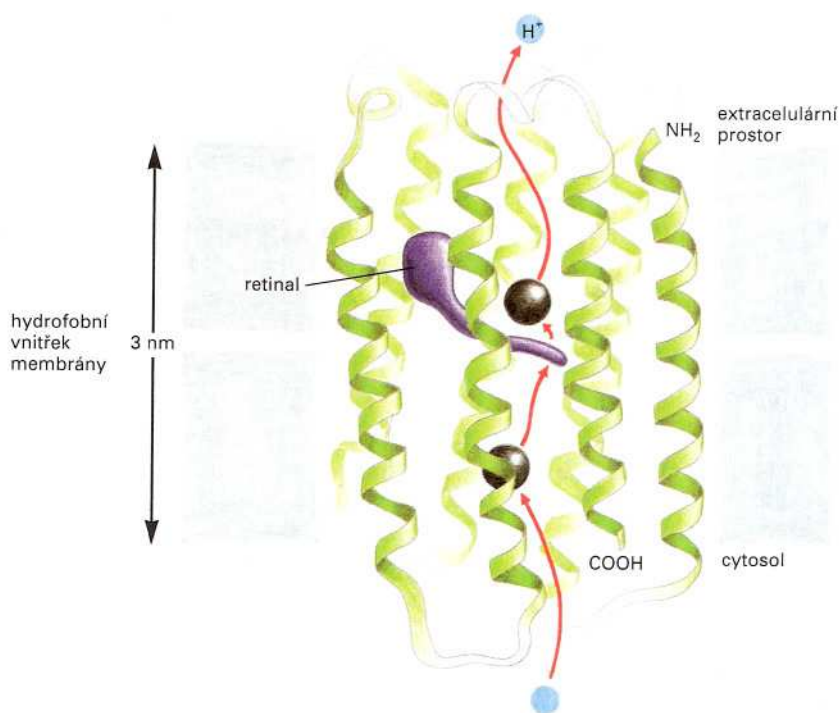
Přenašečové proteiny jsou potřebné k transportu téměř všech malých organických molekul přes buněčné membrány. Výjimkou jsou molekuly rozpustné v tucích a malé nenabitě molekuly, které mohou procházet přímo přes lipidovou dvojnou vrstvu *prostou difuzí* nebo, správněji, *nespecifickou permeací*. Každý přenašečový protein je vysoce selektivní a často přenáší jen jeden typ molekuly. K řízení a pohonu složitějšího pohybu malých molekul mezi buňkou a jejím okolím a mezi různými membránovými organelami a cytosolem má každá buněčná membrána sadu různých přenašečových proteinů specifických pro danou membránu. Tak se v plasmatické membráně nacházejí přenašeče pro import živin, jako jsou cukry, aminokyseliny a nukleotidy, zatímco ve vnitřní membráně mitochondrií jsou přenašeče pro import pyruvátu a ADP a pro export ATP atd. (viz obr. 12-3).



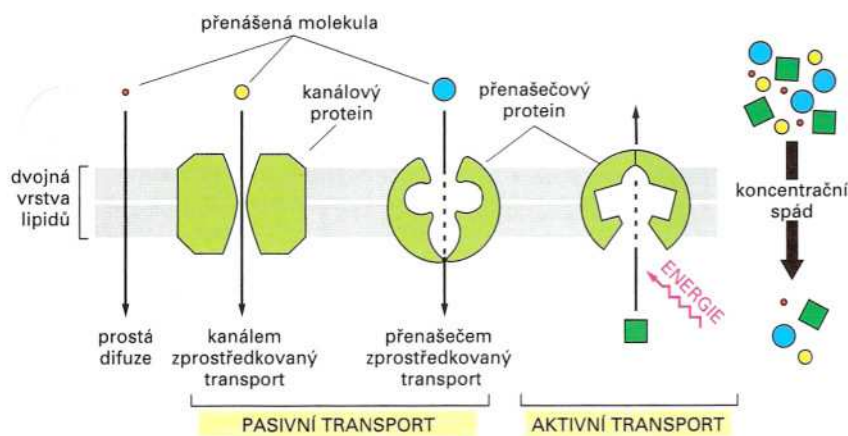
Obrázek 12-3 Několik příkladů látek, které se dostávají přes membránu s pomocí přenašečových proteinů. Každá buněčná membrána má svou vlastní sadu přenašečových proteinů.

Jak jsme probrali v Kapitole 11, podrobně prostudované proteiny membránového transportu – přenašeče i kanály – jsou sestaveny z polypeptidových řetězců, které mnohokrát protínají dvojnou vrstvu lipidů – jsou vlastně mnohonásobně transmembránovými proteiny (viz obr. 11-29). Má se za to, že svým mnohonásobným průchodem membránou takový protein utvoří tunel se stěnami z tohoto proteinu. Tímto tunelem potom procházejí vybrané malé hydrofilní molekuly na druhou stranu membrány, aniž by se dostaly do přímého kontaktu s hydrofobním prostředím lipidové dvojně vrstvy (obr. 12-4).

Základní rozdíl mezi přenašečovými a kanálovými proteiny spočívá ve způsobu, jakým si oba proteiny vybírají, kterým rozpuštěným látkám umožní průchod. Kanálové proteiny si vybírají hlavně na základě velikosti a elektrického náboje: když je kanál otevřený, dostatečně malé molekuly se správným nábojem mohou proklouznout velmi úzkými „dvířky pasti“. Přenašečové proteiny pracují spíše jako otáčivá závora s turniketem: umožní průchod pouze těm molekulám rozpuštěné látky, které se hodí do vazebného místa na proteinu. Toto místo potom přepraví molekuly přes membránu v jednom kroku tím, že změní svou vlastní konformaci (viz obr. 12-2A). Přenašečové proteiny vážou speci-



Obrázek 12-4 Trojrozměrná struktura přenašečového proteinu. Přenašečem je bakteriorhodopsin, který jsme probírali v Kapitole 11 (viz str. 361-363). Je jedním z několika málo membránových transportních proteinů, jejichž podrobná trojrozměrná struktura je známa. Odčerpává protony (H^+) z bakterie *Halobacterium halobium* v odpověď na světlo, které je zachyceno kovalentně vázanou skupinou absorbující světlo (chromoforem); na obrázku je tato skupina znázorněna fialově. Polypeptidový řetězec prochází lipidovou dvojnou vrstvou v podobě sedmi α -šroubovic. Všimněte si, že dráha protonu mu plně umožní vyhnout se styku s lipidovou dvojnou vrstvou.



Obrázek 12-5 Srovnání pasivního a aktivního transportu. Pokud jsou nenabitě soluty dostatečně malé, mohou se pohybovat přes dvojnou vrstvu lipidů samovolně pouhou difuzí. Příklady takových solutů jsou ethanol, oxid uhličitý a kyslík. Většina proteinů však může procházet jen s pomocí transportního proteinu, buď přenašeče nebo kanálu. Jak je ukázáno, pasivní transport podél koncentračního gradientu probíhá samovolně, zatímco transport proti spádu koncentrace (aktivní transport) vyžaduje přísun energie. Aktivní transport mohou zajišťovat jen přenašečové proteiny, zatímco pasivní transport mohou obstarávat jak přenašeče, tak kanály.

ficky své soluty stejným způsobem, jako enzym váže svůj substrát, a právě požadavek na specifickou vazbu činí tento transport selektivním.

Abychom plně pochopili, jak přenašečový protein přenáší rozpuštěné látky přes membránu, potřebujeme podrobně znát jeho trojrozměrnou strukturu. Tato informace je však zatím dostupná jen u několika málo membránových transportních proteinů. Jedním z nich je bakteriorhodopsin (viz obr. 12-4), který funguje jako světlem aktivovaná H^+ -pumpa, jak se probírá v Kapitole 11. Obecným principům, kterými se řídí transport s přenašečovými proteiny, však rozumíme dobře.

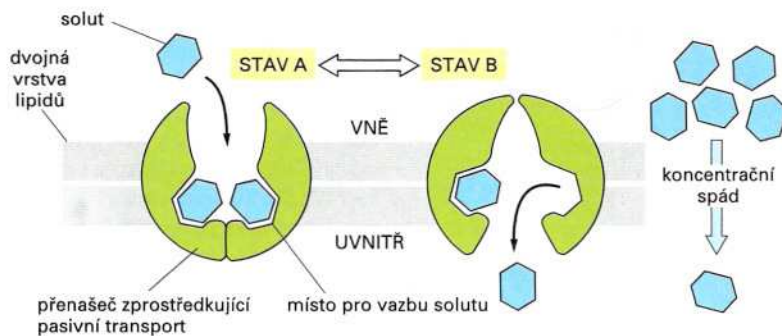
Rozpuštěné látky se přes membránu dostávají aktivním nebo pasivním transportem

Důležitou otázkou u mnoha transportních procesů je, co pohání transport v jednom či druhém směru. Pohyb molekul „z kopce“, tj. z místa o vysoké koncentraci solutu do místa s nízkou koncentrací, probíhá samovolně za předpokladu, že mezi oběma místy existuje nějaká cesta. Takovému pohybu se říká *pasivní*, protože nepotřebuje žádnou hnací sílu. Pokud se například rozpuštěná látka vyskytuje v okolí buňky ve větší koncentraci než uvnitř a pokud je v plasmatické membráně přítomen vhodný kanálový nebo přenašečový protein, bude solut samovolně procházet membránou do buňky **pasivním transportem** (kterému se někdy říká usnadněná difuze) bez výdajů energie ze strany transportního proteinu.

K přenosu rozpuštěné látky proti gradientu koncentrace však musí transportní protein pracovat: musí pohánět tok solutu „do kopce“ spřažením tohoto děje s nějakou jinou reakcí, která uvolňuje energii (jak se to probírá v Kapitole 3 u enzymových reakcí). Pohyb solutu přes membránu, který je poháněn takovýmto způsobem, se nazývá **aktivní transport**. Zajišťují ho jen některé typy přenašečových proteinů, které umí pro transportní děj získávat energii z nějakého zdroje (obr. 12-5).

Pasivní transport může být poháněn jak koncentračním gradientem tak elektrickými silami

Jednoduchým příkladem přenašečového proteinu, který zprostředkovává pasivní transport, je *přenašeč glukosy*, který se nalézá v plasmatické membráně savčích jaterních buněk (a mnoha jiných typů buněk). Skládá se z proteinového řetězce, který 12krát protíná plasmatickou

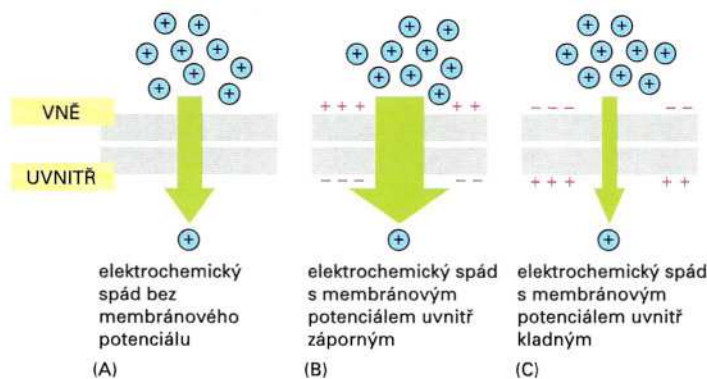


Obrázek 12-6 Hypotetický model ukazuje, jak může konformační změna v přenašečovém proteinu zprostředkovat pasivní transport solutu, jakým je například glukosa. Přenašečový protein může existovat ve dvou konformačních stavech: ve stavu A, kdy jsou vazebná místa pro solut vystavena z vnější strany membrány, a ve stavu B, kdy jsou stejná místa exponována na druhé straně membrány. Přechod mezi oběma stavy se podle všeho děje náhodně, nezávisle na tom, zda je navázán solut, a je zcela reverzibilní. Pokud je koncentrace solutu vyšší na vnější straně membrány, bude solut častěji zachycován při přechodech A → B, které ho přenášejí dovnitř buňky, než při přechodech B → A, které ho přenášejí směrem ven. Čistý transport solutu bude probíhat ve směru klesajícího koncentračního gradientu.

membránu. Má se za to, že se tento protein může vyskytovat ve dvou hlavních konformacích a náhodně se mezi nimi přepíná. V jedné konformaci vystavuje přenašeč vazebná místa pro glukosu do okolí buňky, v druhé konformaci je toto místo obráceno dovnitř buňky (obr. 12-6).

Když je glukosa v okolí jaterní buňky hodně (po jídle), molekuly glukosy se vážou k vazebným místům vystaveným do okolí. Potom protein změní svou konformaci a přenesou tyto molekuly dovnitř a uvolní je do cytosolu, kde je koncentrace glukosy nízká. Naopak, je-li koncentrace cukru v krvi nízká (když jste hladoví), hormon glukagon stimuluje jaterní buňky k produkci velkého množství glukosy odbouráváním glykogenu. Výsledkem je zvýšení koncentrace glukosy uvnitř buňky oproti vnějšku, a glukosa se váže na všechna vazebná místa přenašečového proteinu, která jsou uvnitř buňky dostupná. Když protein změní konformaci v opačném směru, glukosa se přenáší ven z buňky. Glukosa tedy může proudit oběma směry podle směru *gradientu koncentrace* glukosy přes membránu; pokud je vyšší koncentrace glukosy v okolí buňky, bude glukosa proudit dovnitř a pokud je vyšší koncentrace glukosy uvnitř buňky, bude proudit směrem ven. Transportní proteiny tohoto druhu, které umožňují tok solutu, ale nehrají žádnou roli v určení jeho směru, zajišťují pasivní transport. Ačkoli je tento transport pasivní, je vysoce selektivní: vazebná místa na přenašeči glukosy vážou jen D-glukosu, a nikoli například její zrcadlový obraz L-glukosu, kterou buňka nemůže využít pro glykolýzu.

U glukosy, jejíž molekula zůstává nezměněna, je směr transportu určen pouze koncentračním gradientem. U elektricky nabitých molekul, buď malých organických iontů nebo anorganických iontů, se do hry dostává ještě další síla. Z důvodů, které vysvětlíme později, existuje u většiny membrán mezi oběma jejich povrchy napětí – rozdíl v elektrických potenciálech na každé straně membrány, který se označuje jako *membránový potenciál*. Tento potenciál působí silou na každou molekulu, která nese elektrický náboj. Cytoplasmatická strana



Obrázek 12-7 Dvě složky gradientu elektrochemického potenciálu. Čistá hnací síla (gradient elektrochemického potenciálu), díky níž se nabitá částice solutu (ion) pohybuje přes membránu, je společným vlivem koncentračního gradientu solutu a napětí přes membránu (membránovým potenciálem). Šířka zelené šipky představuje velikost gradientu elektrochemického potenciálu pro stejný kladně nabitý solut ve třech různých situacích. V situaci (A) působí jen koncentrační gradient. V (B) je vliv koncentračního gradientu doplněn membránovým potenciálem, který zvětšuje hnací sílu. V (C) membránový potenciál snižuje hnací sílu, kterou vyvolává koncentrační gradient.

plasmatické membrány je obvykle vzhledem k vnějšímu povrchu nabitá záporně; to vede ke snaze kladně nabitých iontů proniknout dovnitř buňky a záporně nabitých iontů dostat se z buňky ven. Současně se soluty snaží pohybovat podle svého koncentračního gradientu.

Celková síla, která žene nabitý solut přes membránu, se tedy skládá ze dvou složek. První z nich je koncentrační gradient a druhou je napětí mezi oběma povrchy membrány. Tuto celkovou hnací sílu nazýváme **gradient elektrochemického potenciálu** vzhledem k danému solutu. Právě tento gradient určuje směr pasivního transportu přes membrány. Pro některé ionty pracují napětí a koncentrační gradient ve stejném směru a vytvářejí poměrně strmý elektrochemický gradient (obr. 12-7B). To se děje například u Na^+ , který je kladně nabitý a jehož koncentrace v okolí buňky je větší než uvnitř. Na^+ se proto snaží vstupovat do buněk při každé příležitosti. Působí-li napětí a koncentrační gradient v opačných směrech, může být výsledný gradient elektrochemického potenciálu malý (obr. 12-7C). To je případ K^+ , jehož kladně nabitý ion je přítomný v mnohem větší koncentraci uvnitř buňky než v jejím okolí. Protože oba efekty působí proti sobě, má K^+ přes svůj velký koncentrační gradient jen malý gradient elektrochemického potenciálu přes membránu, a proto je i výsledný tok K^+ přes membránu malý.

Otázka 12-1 Jednoduchou enzymovou reakci lze popsat rovnicí $\text{E} + \text{S} \rightleftharpoons \text{ES} \rightarrow \text{E} + \text{P}$, kde E je enzym, S je substrát, P je produkt a ES je komplex enzym- substrát.

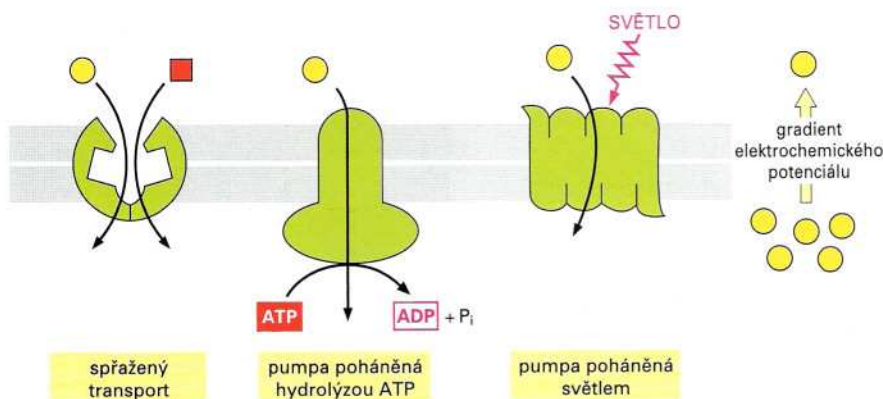
- Napište odpovídající rovnici, která popisuje práci přenašečového proteinu, jenž zajišťuje přenos solutu (S) po jeho koncentračním gradientu.
- Co vám tato rovnice říká o funkci přenašečového proteinu?
- Proč by se tato rovnice nehodila k popisu funkce kanálového proteinu?

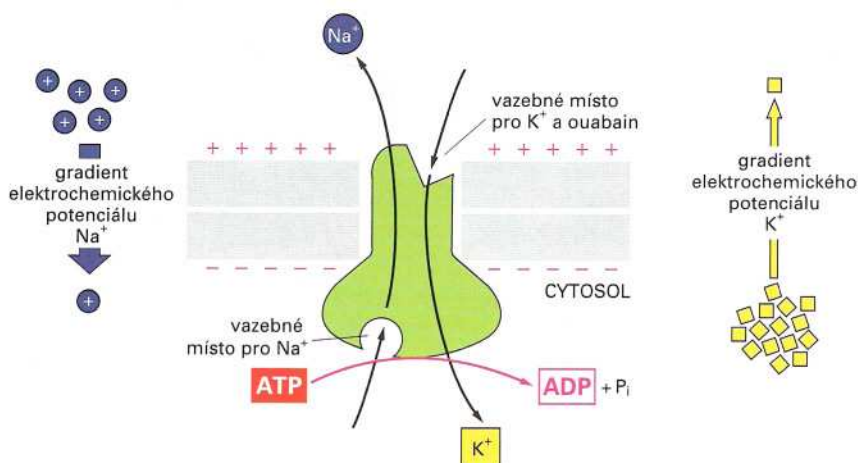
Aktivní transport pohání rozpuštěné látky proti gradientu jejich (elektro)chemického potenciálu

Buňky se nemohou spoléhat jen na pasivní transport. Při udržování iontového složení v buňkách a v importu solutů, jejichž koncentrace je vně buňky nižší než uvnitř, je základním dějem aktivní transport rozpuštěných látek proti gradientu jejich chemického nebo elektrochemického potenciálu. Buňky uskutečňují aktivní transport třemi hlavními způsoby (obr. 12-8): (1) *spřažené přenašeče* spojují přenos jednoho solutu přes membránu směrem „do kopce“ s přenosem jiného solutu směrem „z kopce“; (2) *pumpy poháněné ATP* spřahují transport „do kopce“ s hydrolýzou ATP; (3) *pumpy poháněné světlem*, které se nacházejí pouze v buňkách halobakterií, spřahují transport „do kopce“ s přívodem světelné energie, jak jsme se o tom dříve zmínili u bakteriorhodopsinu.

Protože se látka před svou cestou „z kopce“ musí nejprve na „kopec“ dostat, je nutné, aby byly různé formy aktivního transportu spolu spřaženy. Tak například v plasmatické membráně živočišných buněk přenáší pumpa poháněná ATP ionty Na^+ ven z buňky proti gradientu jejich

Obrázek 12-8 Tři cesty řízení aktivního transportu. Aktivně přenášená molekula je vyznačena žlutě a zdroj energie červeně.





Obrázek 12-9 Sodno-draselná pumpa.

Tento přenašečový protein využívá energii z hydrolyzy ATP k čerpání Na^+ z buňky a K^+ do buňky, v obou případech proti gradientu elektrochemického potenciálu iontu. Ouabain je droga, která se váže na pumpu a inhibuje její aktivitu tím, že brání navázání K^+ .

elektrochemického potenciálu, a Na^+ potom proudí dovnitř - podle tohoto gradientu. Protože cesta Na^+ zpět do buňky vede přes přenašeče spřažené s Na^+ , pohání tok Na^+ do buňky aktivní transport mnoha jiných látek proti gradientu jejich (elektro)chemického potenciálu. Pokud by se Na^+ -pumpa zastavila, gradient Na^+ by brzy poklesl a transport zajišťovaný Na^+ -spřaženými přenašeči by se zastavil. Proto má sodíková pumpa poháněná ATP ústřední roli v transportu přes membrány živočišných buněk. V buňkách rostlin, hub a mnohých bakterií fungují pumpy poháněné ATP podobně a vytvářejí gradient elektrochemického potenciálu iontů H^+ (protonů) čerpáním H^+ ven z buňky, jak probereme později.

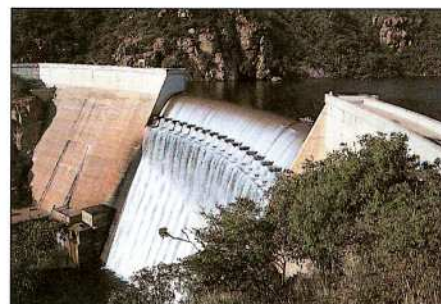
Živočišné buňky využívají k odstraňování Na^+ energii hydrolyzy ATP

Sodíková pumpa poháněná ATP v živočišných buňkách hydrolyzuje ATP na ADP, aby zajistila transport Na^+ ven z buňky; není proto pouhým přenašečem, ale navíc i enzymem – ATPázou. Současně spřahuje čerpání Na^+ z buňky s transportem K^+ směrem dovnitř. Pumpa je proto známa jako Na^+/K^+ -ATPáza neboli **sodno-draselná pumpa** (obr. 12-9).

Tento přenašečový protein má ústřední místo v energetické bilanci živočišné buňky a obvykle spotřebuje až 30 % všeho ATP v buňce. Podobně jako pumpa v podpalubí dřevé lodi pracuje bez přestání na odstraňování Na^+ , který stále vstupuje do buňky s pomocí jiných přenašečů a iontových kanálů. Tak udržuje koncentraci Na^+ v cytosolu asi 10-30krát nižší a koncentraci K^+ 30krát vyšší než mimo buňku (viz tabulku 12-1, str. 373). Za normálních podmínek je vnitřek většiny buněk záporně nabitý vzhledem k jejich okolí. Proto se kladně nabité buňky snaží dostat do buňky. Díky tomu je elektrochemická hnací síla pro Na^+ velká, neboť je součtem koncentračního gradientu a stejným směrem působícího gradientu elektrického potenciálu (viz obr. 12-7B).

Ionty Na^+ vně buňky, na „kopci“ gradientu svého elektrochemického potenciálu, se podobají velkému množství vody v přehradě:

Obrázek 12-10 Přehrada na řece Blyde v Jižní Africe. Voda v přehradě má potenciální energii, kterou lze využít k pohonu jiných dějů. Stejným způsobem lze gradient iontů přes membránu využít k pohonu aktivních dějů v buňce včetně aktivního transportu jiných molekul.



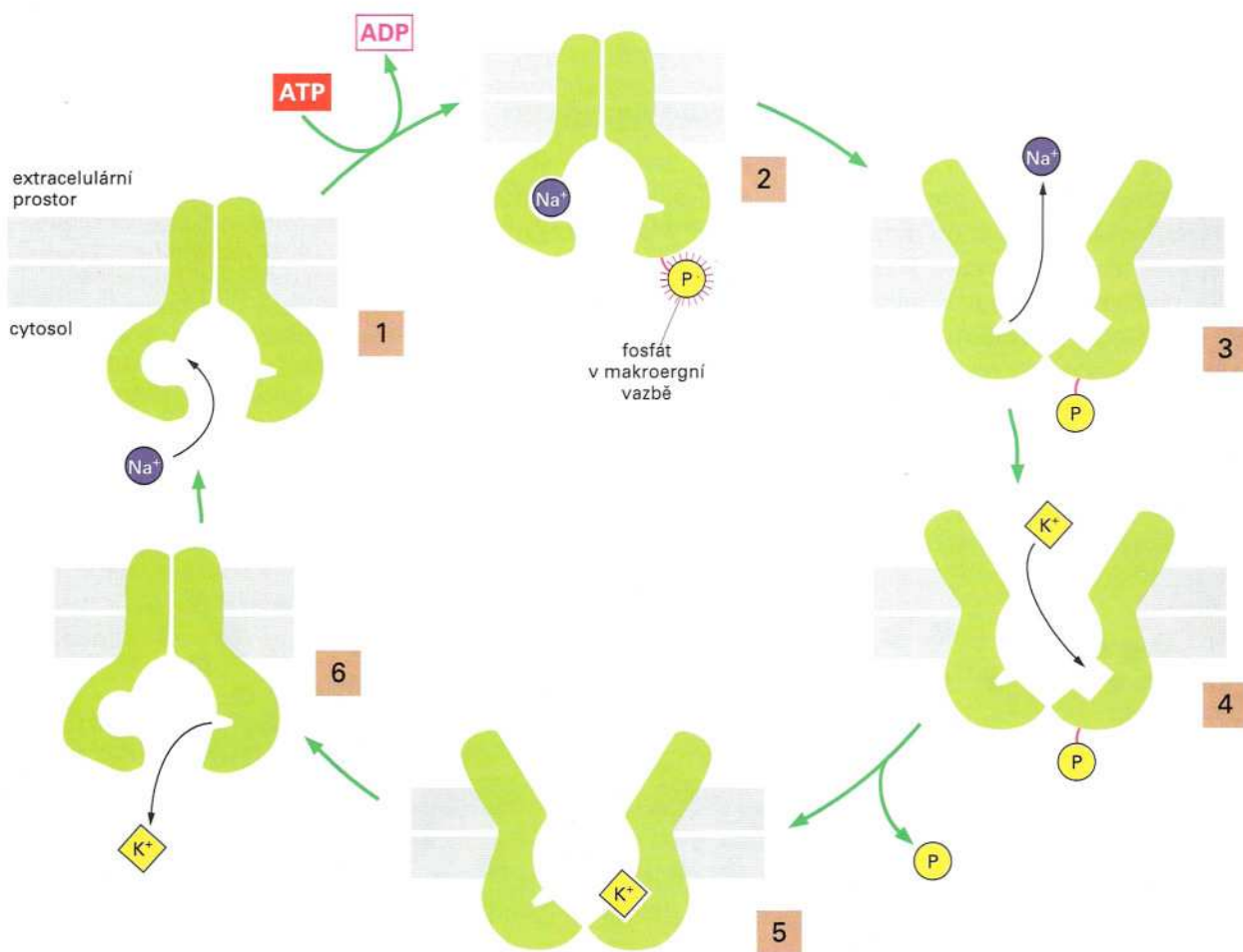
představuje velkou zásobárnu energie (obr. 12-10). I když sodno-draselnou pumpu uměle zastavíme jedem, například rostlinným glykosidem ouabainem, který se váže na ATPázu, a brání tak v navázání K^+ (viz obr. 12-9), energie v této zásobárně stačí po mnoho minut pohánět jiné transportní děje, které jsou spřaženy s transportem Na^+ „z kopce“.

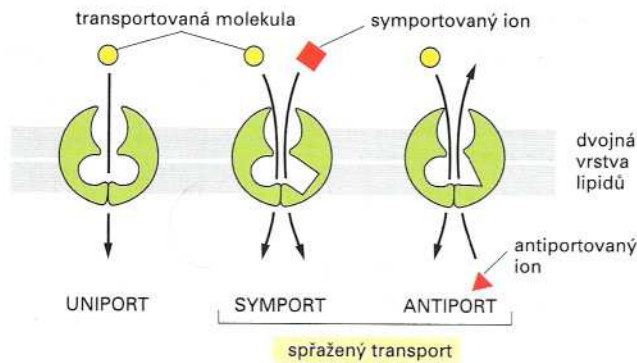
U K^+ je situace jiná. Elektrická síla je stejná jako u Na^+ , neboť závisí jen na náboji, který nese ion. Koncentrační gradient má však opačný směr. Výsledný tok K^+ přes membránu je potom za normálních podmínek blízky nule: elektrické síly, které táhnou K^+ do buňky, jsou téměř přesně vyváženy koncentračním gradientem, který ionty K^+ žene z buňky ven.

Na^+/K^+ -ATPáza je poháněna přechodnou adicí fosforylové skupiny

Sodno-draselná pumpa je krásným obrazem toho, jak protein spřáhne jednu reakci s druhou podle zásad probíraných v Kapitole 3. Pumpa pracuje v cyklu, který je schematicky znázorněn na obrázku 12-11. Na^+ se váže na pumpu v intracelulárně exponovaných místech (fáze 1), čímž aktivuje ATPázovou činnost proteinu. Dojde k rozštěpení ATP, uvolnění ADP a přenosu fosforylové skupiny do vysokoenergetické vazby k samotné pumpě. To znamená, že se pumpa sama fosforyluje (fáze 2). Fosforylace vyvolá změnu konformace pumpy a uvolnění Na^+ na vnějším povrchu buňky a současně vystaví vazebné místo pro K^+ na téměř

Obrázek 12-11 Schematický model čerpacího cyklu sodno-draselné pumpy. Navázání Na^+ (1) a následná fosforylace cytosolové strany pumpy ATP (2) přiměje protein ke konformační změně, která přenesení Na^+ přes membránu a uvolní ho ven (3). Vysoce energetická vazba fosforylu na protein poskytne proteinu energii pro konformační změnu. Navázání K^+ na vnější povrch (4) a následná defosforylace (5) vrátí protein zpět do původní konformace, což přenesení K^+ přes membránu a uvolní ho do cytosolu (6). Tyto změny v konformaci jsou analogické přechodům $A \rightleftharpoons B$ z obrázku 12-6. Jediný rozdíl je v tom, že Na^+ -dependentní fosforylace a K^+ -dependentní defosforylace proteinu vyvolá konformační přechody ve správném sledu a proteiny budou potom moci konat užitečnou práci. Pro jednoduchost jsme ukázali jen jedno místo pro sodík a jedno vazebné místo pro draselné ionty K^+ . Ve skutečné pumpě v savčích buňkách jsou zřejmě tři vazebná místa pro Na^+ a dvě vazebná místa pro K^+ . Čistým výsledkem jednoho cyklu pumpy je proto přenos tří Na^+ ven z buňky a dvou K^+ do buňky.





Obrázek 12-12 Tři typy transportu přenašečovými proteiny. Některé přenašečové proteiny přenášejí přes membránu jediný solut (uniport). Naproti tomu ve spřáženém transportu závisí přenos jednoho solutu na současném nebo následném přenosu jiného solutu, buď ve stejném směru (symport) nebo ve směru opačném (antiport). Uniport, symport i antiport nacházejí využití jak při pasivním tak při aktivním transportu.

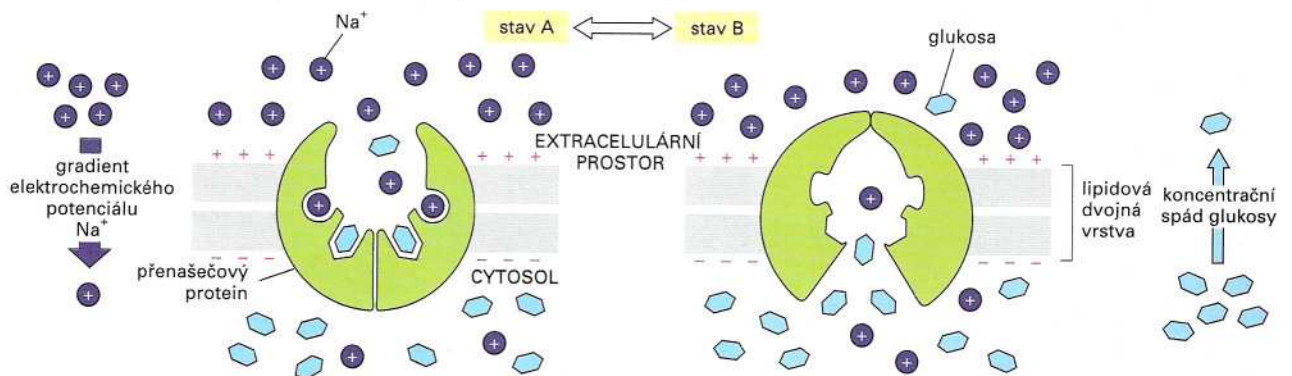
Otázka 12-2 Diagram na obrázku 12-6 ukazuje pasivní přenašečový protein, který zprostředkovává přenos solutu přes membránu po spádu jeho koncentrace. Jak by bylo třeba změnit diagram, aby se přenašečový protein změnil v pumpu, která přenáší solut proti gradientu jeho elektrochemického potenciálu za současné spotřeby ATP? Vysvětlete potřebu každého kroku na svém novém obrázku.

povrchu (fáze 3). Navázání extracelulárního K^+ spustí odstranění fosforylové skupiny (defosforylace) (fáze 4 a 5); to způsobí návrat pumpy do její původní konformace a uvolnění K^+ do vnitřku buňky (fáze 6). Celý cyklus, který zabere asi 10 milisekund, se může opakovat. Každý děj v cyklu závisí na předchozím kroku, takže jestliže zablokujeme některý z kroků, zastavíme práci celé pumpy. Toto těsné spřázení zajistí, že pumpa funguje, jen pokud jsou dostupné správné ionty, a tak se zamezí zbytečné hydrolyze ATP.

Živočišné buňky využívají k pohonu aktivního transportu živin gradient Na^+

Gradient jakéhokoli solutu přes membránu, jako například gradient Na^+ vytvářený sodno-draselnou pumpou, lze využít k pohonu aktivního transportu druhé molekuly. Pohyb prvního solutu „z kopce“ jeho gradientu poskytuje energii k pohonu druhého solutu směrem „do kopce“. Přenašečové proteiny, které takový děj zajišťují, se nazývají **spřážené přenašeče** (viz obr. 12-8). Mohou spojovat pohyb jednoho anorganického iontu s pohybem jiného iontu, pohyb anorganického iontu s pohybem organické molekuly nebo pohyb organické molekuly s pohybem jiné organické molekuly. Pokud se přenášejí oba soluty stejným směrem přes membránu, jde o *symport*. Pokud protein přenáší dvě látky v opačných směrech, jedná se o *antiport*. Přenašečový prote-

Obrázek 12-13 Jedna z možností, jak by mohl být přenašeč glukosy v podstatě poháněn gradientem Na^+ . Přenašeč osciluje mezi dvěma alternativními stavy A a B. Ve stavu A je protein otevřený do extracelulárního prostoru, zatímco ve stavu B je otevřený do cytosolu. Na^+ a glukosa se na protein vážou stejně dobře v jakémkoli stavu, ale vážou se účinně, jen pokud jsou spolu. Navázání Na^+ vyvolá v proteinu konformační změnu, která značně zvýší afinitu proteinu ke glukose, a naopak. Protože je koncentrace Na^+ mnohem větší v extracelulárním prostoru než v cytosolu, bude se glukosa tím ochotněji vázat na přenašeč ve stavu A. Proto Na^+ a glukosa vstupují do buňky (přechodem A \rightarrow B) mnohem častěji, než ji opouštějí (přechodem B \rightarrow A). Čistým výsledkem je přenos glukosy a Na^+ do buňky. Díky tomu, že navázání obou látek vyžaduje spolupráci, pokud jeden z obou solutů chybí, nemůže se druhý solut vázat k přenašeči, a tudíž se nemůže ani přenášet. O alternativním způsobu práce spřáženého transportu se hovoří v otázce 12-3.



in, jako třeba dříve zmíněný pasivní přenašeč glukosy, který dopravuje přes membránu jen jeden druh solutu (a proto není spřaženým přenašečem), tak zajišťuje *uniport* (obr. 12-12).

Ačkoli neznáme podrobnou trojrozměrnou strukturu žádného spřaženého přenašeče, je možno si představit, jak by mohl molekulární mechanismus spřaženého transportu fungovat. Podívejte se na obrázek 12-13. Tento model je založen na jednoduché změně mechanismu předkládaného na obrázku 12-6. Bez ohledu na to, že si nejsme jisti v detailech, jeden princip spřaženého transportu je základní: pokud jeden z přenášených solutů chybí, nemůže se uskutečnit ani přenos jeho společníka.

V živočišných buňkách hraje zvláště důležitou roli symport, který využívá toku Na^+ dovnitř po elektrochemickém gradientu k pohonu přenosu dalších solutů do buňky. Například epiteliální buňky, které vystylají střevo, přenášejí glukosu ze střeva přes střevní epitel. Pokud by tyto buňky obsahovaly jen pasivní přenašeče glukosy popsané dříve, uvolňovaly by po jídle bez sacharidů glukosu do střeva právě tak rychle, jak ji z něj přijímaly po jídle bohatém na sacharidy. Mají však k dispozici také glukoso-sodný symport, s jehož pomocí mohou aktivně přijímat glukosu ze střevního lumen, i když je koncentrace glukosy v buňce mnohem vyšší než ve střevě. Pokud by však buňky střevního epitelu měly k dispozici *pouze* tento symport, nikdy by neuvolňovaly glukosu k použití ostatními buňkami v těle. Proto tyto buňky obsahují dva typy přenašečů glukosy. V apikální části plasmatické membrány, která je obrácena do lumen střeva, obsahují přenašeč pro Na^+ , který zároveň přenáší glukosu a zvyšuje její koncentraci v cytosolu. V bazální a laterální části plasmatické membrány jsou obsaženy přenašeče pro pasivní glukosový uniport, který uvolňuje glukosu ve směru klesající koncentrace (tedy „z kopce“ koncentračního gradientu) k použití ostatními tkáněmi (obr. 12-14). Oba druhy glukosových přenašečů jsou udržovány odděleně ve svých vlastních doménách plasmatické membrány difuzními přepážkami, tvořenými těsnými spoji okolo vrcholu buňky, které zabraňují smíchání membránových složek z apikální, bazální a laterální domény, jak se probírá v Kapitole 11 (viz obr. 11-37).

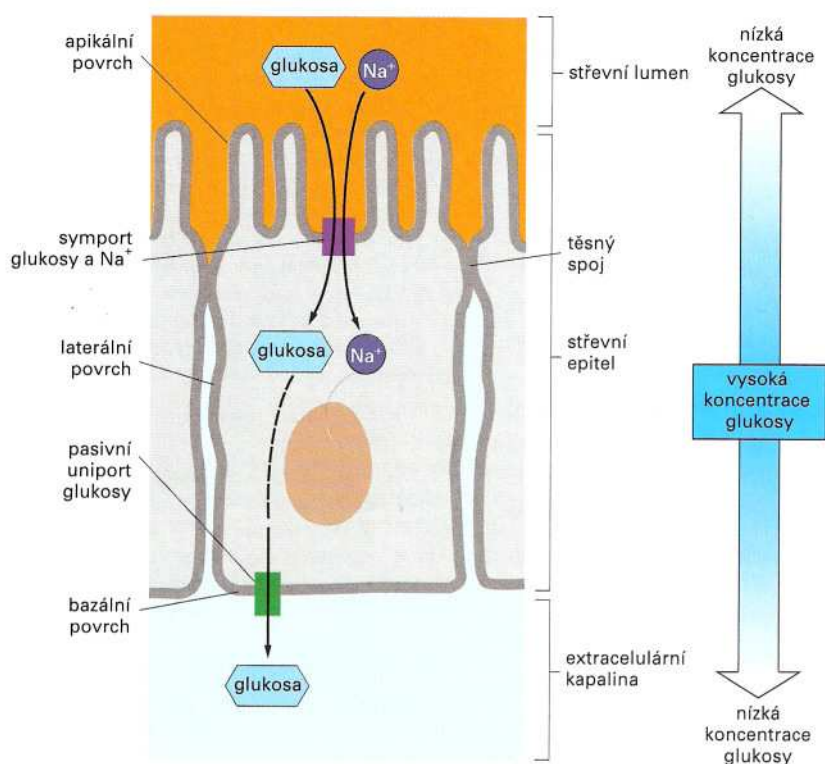
Buňky, které vystylají střevo a mnoho jiných orgánů, jako např. ledviny, obsahují ve svých plasmatických membránách celou řadu symportů, které jsou podobně poháněny gradientem elektrochemického potenciálu Na^+ . Každý takový protein specificky přenáší dovnitř buňky malou skupinu příbuzných cukrů nebo aminokyselin. Stejně důležité jsou i antiporty poháněné Na^+ . Příkladem je *antiport Na^+/H^+* v plasmatické membráně mnoha živočišných buněk. Tento antiport využívá tok Na^+ do míst s nižší koncentrací k čerpání H^+ ven z buňky a je jedním z hlavních nástrojů, jimiž živočišné buňky regulují pH ve svém cytosolu.

Sodno-draselná pumpa pomáhá udržovat osmotickou rovnováhu v živočišných buňkách

Plasmatická membrána je propustná pro vodu (viz obr. 11-20) a pokud je celková koncentrace rozpuštěných látek na jedné její straně větší než na druhé, voda se snaží pronikat přes membránu do míst o nižší koncentraci solutu tak dlouho, až se koncentrace vyrovnají. Takovému pohybu vody z oblasti nízké koncentrace solutu (vysoké koncentrace

Otázka 12-3 Transmembránový protein má následující vlastnosti: má dvě vazebná místa, jedno pro solut A a druhé pro solut B. Protein může podstupovat konformační změny a přecházet z jednoho stavu do druhého: buď jsou obě vazebná místa vystavena výlučně na jedné straně membrány nebo výlučně na druhé straně. Protein může přepínat mezi oběma stavy jen tehdy, kdy jsou obsazena obě vazebná místa nebo když jsou obě vazebná místa prázdná, ale nemůže se přepnout, pokud je obsazeno jen jedno vazebné místo.

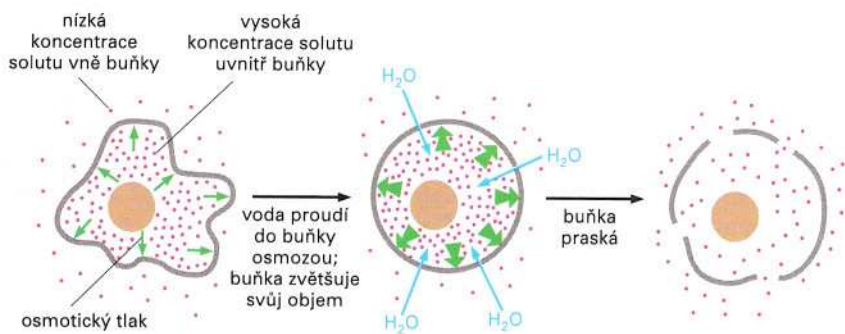
- Jaký druh proteinu má tyto vlastnosti?
- Potřebujete znát ještě nějaké podrobnosti, abyste tento protein mohli zapojit do symportu. Jenž spřahuje pohyb solutu A proti gradientu jeho koncentrace s pohybem solutu B po spádu jeho elektrochemického potenciálu?
- Napište, jakými pravidly se řídí antiport.



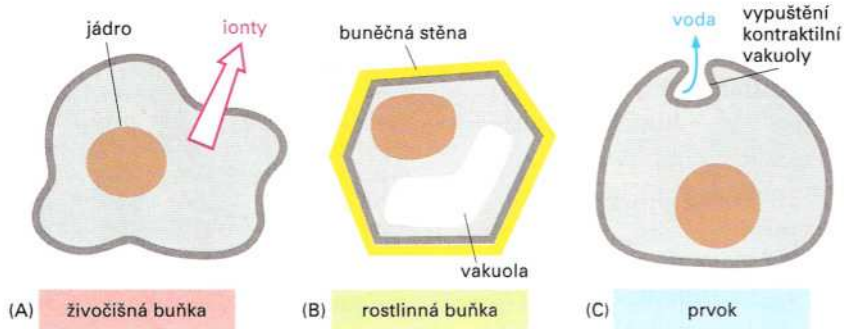
Obrázek 12-14 Dva typy přenašečů glukosy umožňují buňkám střevního epitelu přenášet glukosu přes střevní výstelku. Glukosa je aktivně přenášena do buňky glukosovým symportem poháněným Na^+ v apikální části povrchu a z buňky ve směru spádu své koncentrace pasivními glukosovými uniporty v bazální a laterální části povrchu. Tyto dva typy přenašečů glukosy jsou v plasmatické membráně udržovány oddělené těsným spojem.

vody) do míst s vysokou koncentrací solutu (nízkou koncentrací vody) se říká **osmoza**. Hnací síla pro pohyb vody je rovna rozdílu v tlaku vody a nazývá se **osmotický tlak**. Neexistuje-li nějaký protitlak, způsobí osmotický pohyb vody do buňky botnání buňky. To může představovat vážný problém pro živočišné buňky, které nemají žádné pevné stěny, které by je před nabotnáním chránily. Pokud takové buňky umístíme do čisté vody, nabotnají a posléze prasknou (obr. 12-15).

Ve tkáních živočišného těla jsou buňky omývány kapalinou bohatou na soluty, zvláště na Na^+ a Cl^- . To vyvažuje koncentraci organických a anorganických solutů uvnitř buňky a brání osmotické katastrofě. Osmotická rovnováha je však stále ohrožena, neboť vnější soluty se neustále snaží proniknout do buňky podél svých individuálních gradientů elektrochemického potenciálu. Buňky tedy musí neustále pracovat a odčerpávat nechťené soluty, aby udržely osmotickou rovnováhu (obr. 12-16A). Tuto práci zastává hlavně Na^+/K^+ -ATPáza, která odčerpává Na^+ proudící dovnitř. Současně se sodno-draselná pumpa podílí na zamezení vstupu záporně nabitých Cl^- tím, že pomáhá udržovat membránový potenciál (jak vysvětlíme později). Pokud pumpu zastavíme inhibítorem, např. ouabainem, nebo pokud buňce jednoduše dojde



Obrázek 12-15 Osmoza. Pokud je koncentrace solutu uvnitř buňky vyšší než v okolí buňky, bude voda osmoticky vstupovat dovnitř a buňka nabotná. Při dostatečně velkém rozdílu koncentrace rozpuštěné látky buňka praskne.



Obrázek 12-16 Tři způsoby, kterými se buňky vyhýbají osmotickému zbotnění. Živočišná buňka udržuje nízkou vnitřní koncentraci solutu tím, že aktivně odčerpává ionty. (A) Rostlinná buňka je před nabotněním a prasknutím chráněna tuhou stěnou. (B) Prvek se nabotnění brání tak, že periodicky vystřikuje vodu nahromaděnou v buňce (C).

palivo pro pumpu, ATP, proniknou ionty Na^+ a Cl^- dovnitř přenašečovými proteiny, a tím poruší osmotickou rovnováhu. To povede k nabotnění a posléze i k popraskání buněk.

Další typy buněk se vyrovnávají se svými osmotickými problémy odlišným způsobem. Rostlinné buňky chrání před nabotněním a prasknutím jejich tuhé buněčné stěny. Proto rostlinné buňky snesou velké osmotické rozdíly mezi oběma stranami plasmatické membrány (obr. 12-16B). Buňka vyvíjí protitlak, který se snaží vyrovnat osmotický tlak vytvářený soluty v buňce, a tím omezuje pohyb vody směrem do buňky. Osmoza společně s aktivním transportem iontů do buňky vyústí v *turgorový tlak*, díky kterému rostlinné buňky naplněné vodou stále těsně vyplňují prostor, který jim vymezují jejich buněčné stěny. Tak rostlinné buňky připomínají fotbalové míče, jejichž vnější kožené obaly jsou udržovány napjaté nafouknutou gumovou duší uvnitř. V našem případě funguje buněčná stěna jako kožený obal míče a plasmatická membrána jako gumová duše. Turgorový tlak slouží k různým účelům. Udržuje stonky rostlin tuhé a listy roztažené. Hraje roli v regulaci výměny plynů přes průduchy – mikroskopické otvory na povrchu listu; zvláštní buňky okolo průduchů regulují svůj vlastní turgorový tlak (regulací pohybu K^+ přes membránu) a s jeho pomocí průduchy otevírají a zavírají.

U některých sladkovodních prvků, např. u měňavky, jsou přebyteky vody nepřetržitě proudící do buňky shromažďovány v kontraktilních vakuolách, které periodicky vyprazdňují svůj obsah do okolí buněk (obr. 12-16C). Buňka nejprve umožní naplnění vakuoly značně koncentrovaným roztokem solutů; to přiměje vodu k osmotickému pohybu tímž směrem. Potom buňka aktivní pumpou přečerpá soluty zpět do cytosolu a vyprázdní vakuolu do okolí. Pro většinu živočišných buněk je však k udržení osmotické rovnováhy nejdůležitější sodno-drazečná pumpa.

Koncentrace Ca^{2+} uvnitř buňky jsou udržovány nízké s pomocí Ca^{2+} -pump

Ionty Ca^{2+} , podobně jako Na^+ , jsou v cytosolu udržovány v nižší koncentraci než v extracelulární kapalině, ale na obou stranách plasmatické membrány jsou mnohem méně hojné než Na^+ (viz tabulku 12-1, str. 373). Pohyb Ca^{2+} přes buněčné membrány je však velmi důležitý, neboť Ca^{2+} se může pevně vázat k mnoha jiným molekulám v buňce a měnit jejich aktivitu. Přítok Ca^{2+} do cytosolu přes Ca^{2+} -kanály se využívá například jako signál ke spuštění různých dějů uvnitř buňky, jako třeba vylučování signálních molekul a kontrakce svalových buněk.

Čím nižší je základní koncentrace Ca^{2+} v cytosolu, tím je buňka citlivější na vzrůst koncentrace cytosolického Ca^{2+} . Tak eukaryotní buňky obecně udržují v cytosolu velmi nízkou koncentraci volných Ca^{2+} (asi 10^{-7} M) oproti mnohem vyšší koncentraci Ca^{2+} vně buněk (obvykle 1-2 mM). Dosahují toho hlavně s pomocí vápenatých pump poháněných ATP jak v plasmatické membráně tak v membráně endoplasmatického retikula, které aktivně odčerpávají Ca^{2+} z cytosolu.

Podobně jako sodno-draselná pumpa je i vápenatá pumpa ATPázou, která se v průběhu čerpacího cyklu fosforyluje a defosforyluje. Má se za to, že tato pumpa pracuje stejným způsobem, jaký jsme ukázali u Na^+/K^+ -pumpy na obrázku 12-11. Jediný rozdíl je v tom, že se pumpa vrací do své původní konformace, aniž by vážala a přenášela druhý ion. Tyto dvě pumpy poháněné ATP mají podobnou aminokyselinovou sekvenci a strukturu. V hlavní podjednotce prochází membránou 10 α -šroubovic a je zřejmé, že obě pumpy mají společný evoluční původ.

Gradient H^+ se využívá k pohonu membránového transportu u rostlin, hub a bakterií

Rostlinné buňky, houby (včetně kvasinek) a bakterie nemají ve svých membránách sodno-draselné pumpy. Místo gradientu elektrochemického potenciálu Na^+ používají k pohonu transportu solutů do buňky hlavně gradient elektrochemického potenciálu H^+ . Gradient vytvářejí H^+ -pumpy v plasmatické membráně, které odčerpávají H^+ z buňky a vytvářejí gradient elektrochemického potenciálu protonů s vyšší koncentrací H^+ vně buňky a nižší koncentrací H^+ uvnitř. V tomto ději tedy protonová pumpa také vytváří kyselé pH v okolí buňky. Například příjem mnoha cukrů a aminokyselin bakteriální buňkou je poháněn H^+ -symporty, které využívají gradient elektrochemického potenciálu H^+ přes plasmatickou membránu v podstatě stejným způsobem, jakým živočišné buňky využívají gradient elektrochemického potenciálu Na^+ .

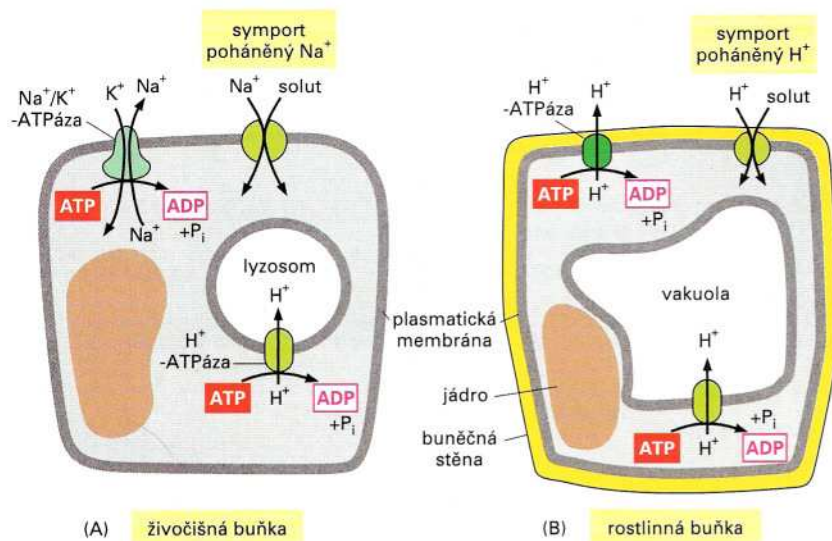
V některých halobakteriích vytváří gradient H^+ světlem poháněná protonová pumpa bakteriorhodopsin. V jiných bakteriích vzniká gradient díky aktivitě proteinů plasmatické membrány, které zajišťují poslední fáze buněčného dýchání (respirace) vedoucího k syntéze ATP, jak se probírá v Kapitole 13. Rostliny, houby a mnohé bakterie však upravují svůj protonový gradient s pomocí ATPáz v plasmatických membránách, které využívají energie hydrolýzy ATP k odčerpávání H^+ z buňky; připomínají Na^+/K^+ -pumpy a Ca^{2+} -pumpy v savčích buňkách, které jsme probrali dříve.

Odlišné typy H^+ -ATPázy se nacházejí v membránách některých intracelulárních organel, např. lyzozomů živočišných buněk a v centrální vakuole buněk rostlin a hub. Jejich funkcí je čerpat H^+ z cytosolu do organely; tím pomáhají udržovat pH cytosolu neutrální a pH vnitřku organely nízké. Kyselé prostředí je v mnoha organelách důležité pro jejich funkci, jak uvidíme v Kapitole 14.

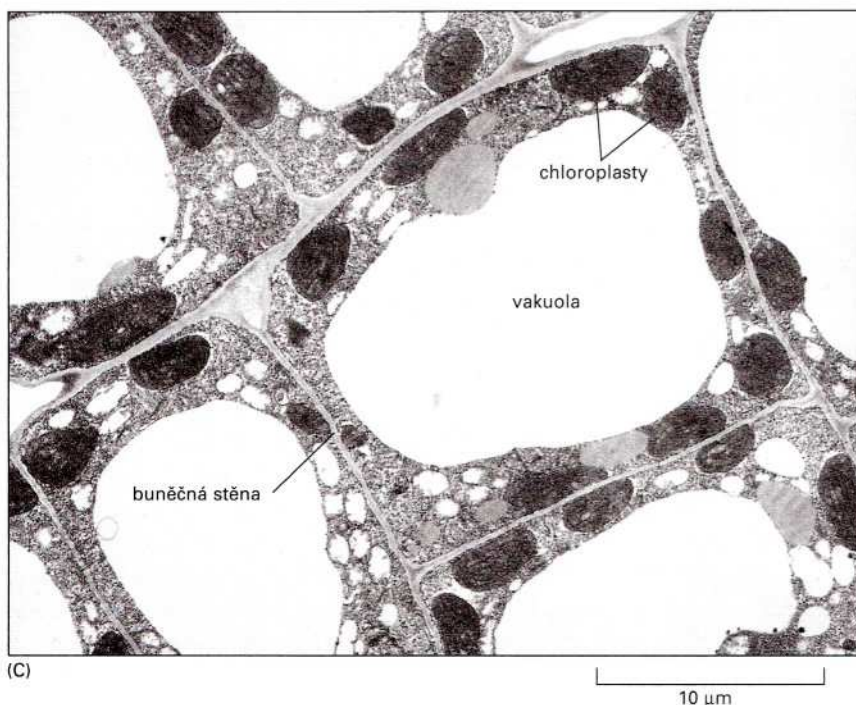
Některé z přenašečových proteinů, přítomných v rostlinných a živočišných buňkách, které jsme právě probrali, jsou ukázány na obrázku 12-17. Tyto a některé další přenašečové proteiny probírané v této kapitole jsou uvedeny v tabulce 12-2 (str. 386).

Nyní se zaměříme na transport iontovými kanály a na vytváření membránového potenciálu.

Otázka 12-4 Vzrůst koncentrace Ca^{2+} uvnitř svalových buněk je příměje ke kontrakci. Buňky svalů, které se musí stahovat rychle a pravidelně, například srdce, vyměňují přes plasmatickou membránu antiportem Ca^{2+} za Na^+ . Většina iontů Ca^{2+} , které vstoupily do buňky během svalového stahu, je tímto antiportem rychle vyčerpána z buňky ven; to umožní opětné uvolnění buňky. Ouabain a digitalis jsou důležité léky pro pacienty se srdečními potížemi, neboť jsou schopny přimět srdeční sval k silnějším stahům. Oba léky fungují tak, že částečně inhibují sodno-draselnou pumpu v membráně buňky srdečního svalu. Můžete navrhnout nějaké vysvětlení účinku léku na pacienty? Co se stane při podání nadměrné dávky jednoho nebo druhého léku?



Obrázek 12-17 Některé podobnosti a rozdíly mezi transportem solutu s pomocí přenašečů v živočišných a rostlinných buňkách. Zatímco gradient elektrochemického potenciálu Na^+ , vytvářený sodno-draselnou pumpou (Na^+/K^+ -ATPázou) se často využívá k pohonu aktivního přenosu rozpuštěných látek přes plasmatickou membránu živočišných buněk (A), gradient elektrochemického potenciálu H^+ , obvykle vytvářený H^+ -ATPázou, se k tomuto účelu obvykle používá v rostlinných buňkách a u bakterií a hub (včetně kvasinek). Lyzosomy v živočišných buňkách a vakuoly v buňkách rostlin a hub obsahují ve svých membránách ATPázy, která čerpá dovnitř H^+ , a tak pomáhá udržovat kyselé prostředí v těchto organelách. Snímek z elektronového mikroskopu ukazuje vakuoly v rostlinných buňkách z mladého listu tabáku.



Iontové kanály a membránový potenciál

V podstatě nejjednodušším způsobem, jak umožnit malé ve vodě rozpustné molekule přestup z jedné strany plasmatické membrány na druhou, je vytvořit hydrofilní kanál, přes který může molekula procházet. Tuto funkci mají v buněčných membránách **kanálové proteiny**, které tvoří transmembránové vodné póry; ty umožňují pasivní pohyb malých ve vodě rozpustných molekul dovnitř buňky či organely nebo naopak.

Několik proteinů tvoří poměrně velké póry: příkladem jsou proteiny, z nichž jsou sestaveny tzv. mezerové spoje (*gap junctions*) mezi dvěma sousedními buňkami (viz obr. 19-28) a *poriny*, nacházející se ve vnější membráně mitochondrií a chloroplastů a v membráně některých bakterií (viz obr. 11-26). Pokud by však velké propustné kanály přímo spojovaly cytosol s extracelulárním prostorem, vedlo by to ke katastrofálnímu průniku různých iontů do buňky. Většina kanálových

Tabulka 12–2 Některé příklady přenašečových proteinů

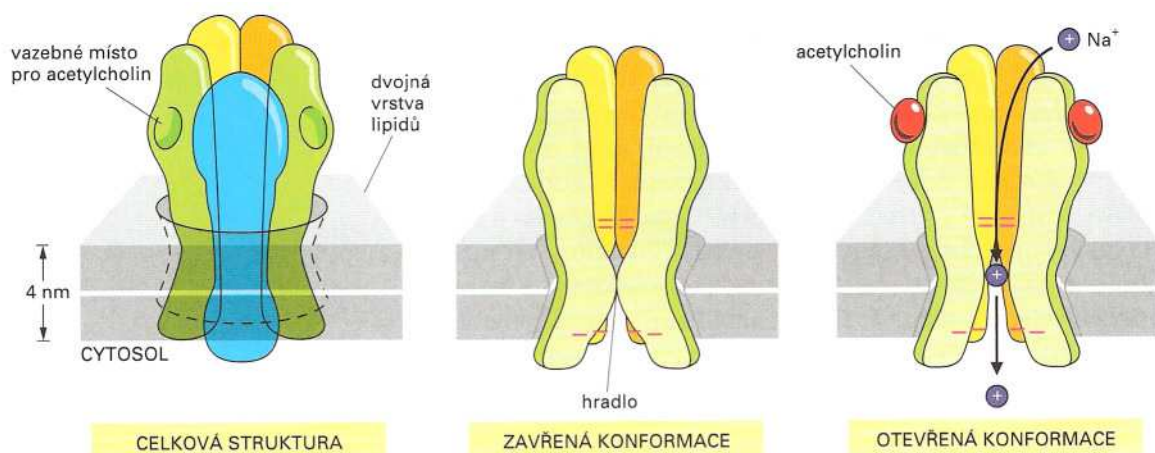
Přenašečový protein	Umístění	Zdroj energie	Funkce
Přenašeč glukosy	plasmatická membrána většiny živočišných buněk	žádný	pasivní přenos glukosy do buňky
Přenašeč glukosy poháněný spádem Na ⁺	apikální plasmatická membrána buněk ledvin a střeva	gradient Na ⁺	aktivní přenos glukosy do buňky
Antiport Na ⁺ a H ⁺	plasmatická membrána živočišných buněk	gradient Na ⁺	aktivní export iontů H ⁺ , regulace pH
Sodno-draselná ATPáza	plasmatická membrána většiny živočišných buněk	hydrolýza ATP	aktivní export Na ⁺ a import K ⁺
Vápenatá ATPáza	plasmatická membrána eukaryontních buněk	hydrolýza ATP	aktivní export Ca ²⁺
Protonová ATPáza	plasmatická membrána buněk, rostlin, hub a některých bakterií	hydrolýza ATP	aktivní export H ⁺ z buňky
Protonová ATPáza	membrány lyzozomů v živočišných buňkách a vakuol v buňkách rostlin a hub	hydrolýza ATP	aktivní čerpání H ⁺ z cytosolu
Bakteriorhodopsin	plasmatická membrána některých bakterií	světlo	aktivní čerpání H ⁺ ven z buňky

proteinů v plasmatické membráně živočišných a rostlinných buněk proto vypadá zcela jinak a má úzké vysoce selektivní póry. Téměř všechny tyto proteiny jsou **iontovými kanály**, zaměřenými výlučně na transport anorganických iontů, hlavně Na⁺, K⁺, Cl⁻ a Ca²⁺.

Iontové kanály jsou iontově selektivní a uzavíratelné

Od prostých vodných pórů se iontová kanály liší dvěma důležitými vlastnostmi. Zaprvé, vykazují *iontovou selektivitu*, takže umožňují vstupovat jen některým iontům. Iontová selektivita závisí na průměru a tvaru iontového kanálu a na rozdělení nabitých aminokyselin v jeho stěnách. Kanál je dostatečně úzký v místech, kde se mají ionty setkávat se stěnami kanálu, takže mohou projít jen ionty vhodné velikosti a náboje. Například úzké kanály nepustí velké ionty a kanály se záporně nabitými stěnami budou od svého ústí odpuzovat záporně nabití ionty díky elektrostatickému působení. Tímto způsobem se vyvinuly kanály, které jsou selektivní jen pro určitý druh iontu, např. pro Na⁺ nebo pro Cl⁻. Každý ion je ve vodném prostředí obklopen tenkou slupkou molekul vody a má se za to, že ionty se musí zbavit většiny těchto molekul, aby mohly jeden za druhým projít nejužším místem kanálu. Tento krok v transportu určitého iontu omezuje maximální rychlost průchodu přes kanál. Jak se zvyšuje koncentrace iontů, zvyšuje se nejprve úměrně tomu i jejich tok přes kanály. Potom je však dosaženo mezní rychlosti, protože všechny dostupné kanály jsou vysyceny.

Druhým důležitým rozdílem mezi jednoduchými vodnými póry a iontovými kanály je to, že iontové kanály nejsou stále otevřené. Transport iontů by pro buňku neměl žádnou cenu, pokud by se jejich tok nedal regulovat a pokud by všech mnoho tisíc iontových kanálů v buněčné membráně bylo stále otevřených. Jak probereme později, většina iontových kanálů je *uzavíratelná*. Změnou konformace se otevírají a zavírají a tento přechod je regulován podmínkami uvnitř a vně buňky (obr. 12-18).



Iontové kanály mají ve srovnání s přenašečovými proteiny velkou výhodu ve vysoké rychlosti transportu. Jedním kanálem může za sekundu projít více než milion iontů, což je více než 1000krát větší rychlost průchodu než v přenašečových proteinech. Na druhé straně kanály nemohou spřáhnout tok iontů se zdrojem energie a uskutečňovat aktivní transport. Funkce většiny iontových kanálů spočívá v tom, že učiní membránu přechodně propustnou pro vybrané anorganické ionty, hlavně Na^+ , K^+ , Ca^{2+} nebo Cl^- , přičemž těmto iontům umožní rychle difundovat ve směru jejich elektrochemického gradientu přes membránu, když je otevřeno kanálové hradlo (někdy se říká vrátka).

Díky aktivnímu transportu pumpami a dalšími přenašeči se koncentrace iontů na obou stranách membrány udržuje daleko od rovnováhy. Proto při otevření kanálu začnou tímto kanálem rychle proudit ionty. Nárazový tok iontů představuje impuls elektrického náboje buď směrem do buňky nebo z ní (když ionty opouštějí buňku). Tok iontů změní napětí přes membránu – *membránový potenciál*, a ten změní elektrochemické hnací síly, které působí transmembránový pohyb všech ostatních iontů. Během milisekund také přiměje k otevření jiné iontové kanály, které jsou specificky citlivé na změny membránového potenciálu. Výsledná bouře elektrické aktivity může rychle přecházet z jedné oblasti buněčné membrány do druhé a přenášet elektrický signál, jak o tom promluvíme později v souvislosti s nervovými buňkami. Tento typ elektrické signalizace není výsadou živočichů; vyskytuje se také u prvoků a rostlin. Masožravé rostliny, jako například rosnatka, využívají elektrickou signalizaci k rozeznání a zachycení hmyzu (12-19).

Membránový potenciál je základem všech elektrických aktivit v buňkách, ať už jsou to buňky rostlinné či živočišné, anebo prvoci. Před tím, než probereme vznik membránového potenciálu, podíváme se, jak se měří aktivita iontových kanálů.

Obrázek 12-19 Rosnatka. List se uzavírá za méně než půl sekundy poté, co na něm přistál hmyz. Odpověď je spuštěna dotykem alespoň dvou ze tří spouštěcích vlásků po sobě uprostřed každého listu. To otevře iontové kanály, a tak způsobí vyslání elektrického signálu, který zatím ještě neznámým mechanismem vede k rychlé změně turgorového tlaku, která uzavře list.

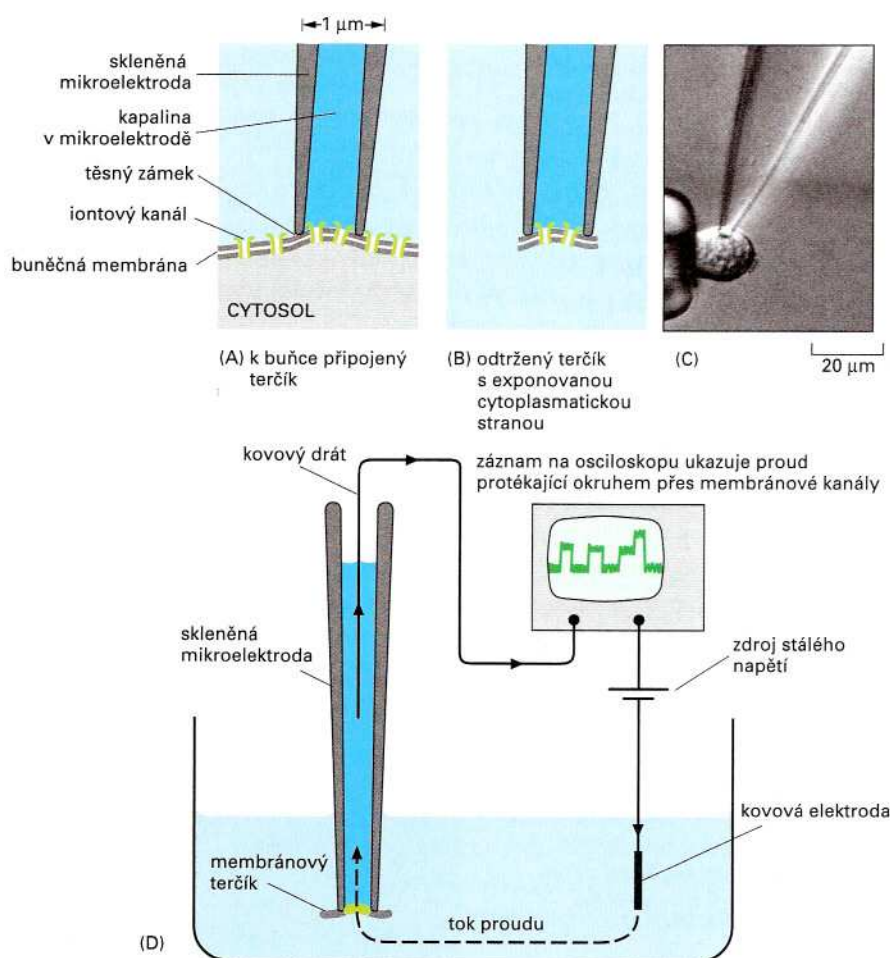
Obrázek 12-18 Struktura iontového kanálu. Tento iontový kanál se vyskytuje v plasmatické membráně svalových buněk a otevírá se při navázání nervového mediátoru acetylcholinu, uvolňovaného nervy, na strukturu kanálu. (Jde tedy o příklad iontového kanálu ovládaného nervovým mediátorem, jak budeme probírat později.) Iontový kanál se skládá z pěti transmembránových proteinových podjednotek, které se spojují za vzniku vodného póru napříč dvojnou vrstvou lipidů. Pór je ohraničen pěti transmembránovými α -šroubovicemi, přičemž každá podjednotka přispívá jednou šroubovicí. Záporně nabitě postranní řetězce aminokyselin na obou koncích póru zajišťují, že pórem mohou procházet jen kladně nabitě ionty, především Na^+ a K^+ . Když se kanál nachází ve své uzavřené konformaci, je pór v oblasti zvané *hradlo* obklopen hydrofobními postranními řetězci aminokyselin. Váže-li se acetylcholin, podstupuje protein konformační změnu, při níž se tyto postranní řetězce navzájem vzdalují a hradlo se otevírá. To umožňuje iontům Na^+ a K^+ procházet přes membránu po spádu svého elektrochemického potenciálu. Jak probereme později, i při navázaném acetylcholinu kanál náhodně přechází z otevřeného stavu do uzavřeného a naopak; bez navázaného acetylcholinu se otevírá zřídka.



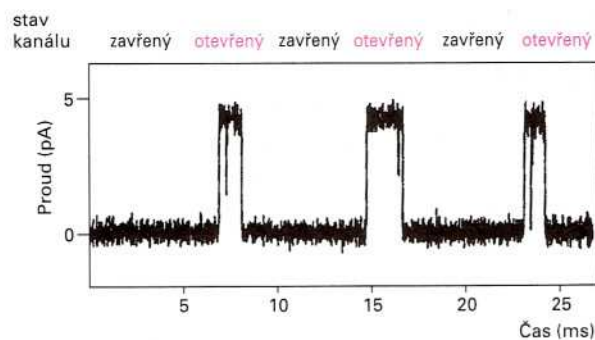
Iontové kanály se náhodně otevírají a zavírají

Elektrické měření je základní metodou používanou při studiu pohybu iontů a iontových kanálů v živých buňkách. Je obdivuhodné, že elektrické měření bylo dovedeno do takové dokonalosti, že je dnes možné měřit proud procházející jedinou molekulou kanálu. Metoda, které se při tom využívá, se nazývá záznam s pomocí terčíkového zámku a přinesla přímý a překvapující obrázek chování jednotlivých iontových kanálů.

Při technice terčíkového zámku se používá tenké skleněné trubičky jako *mikroelektrody* k zajištění elektrického kontaktu s povrchem buňky. Mikroelektroda se vyrobí tak, že se zahřeje skleněná trubička a vytáhne se do extrémně dlouhé špičky o průměru nanejvýš několik mikrometrů. Trubička se potom naplní vodivým roztokem a špička se přitlačí na povrch buňky. Jemným sáním se vytvoří elektrický spoj v místě kontaktu buněčného povrchu s ústím mikroelektrody (obr. 12-20A). Je-li zapotřebí exponovat cytosolovou stranu membrány, oddělí se kousek membrány držený v mikroelektrodě opatrně od buňky (obr. 12-20B). Ve druhém, otevřeném konci mikroelektrody je umístěn kovový vodič. Proud, který vstupuje do mikroelektrody přes iontové kanály v malém úseku membrány pokrývajícím její špičku, prochází vodičem, měřicími přístroji a zpět do lázně, ve které se nachází buňka nebo oddělená část membrány (obr. 12-20D). Tato technika umožňuje záznam z iontových kanálů všech typů buněk – nejen velkých nervových buněk, které jsou známé svou elektrickou aktivitou, ale také napří-



Obrázek 19-20 Záznam z terčíkového zámku. Díky mimořádně těsnému spojení mezi ústím mikroelektrody a membránou může proud vstupovat do mikroelektrody nebo ji opouštět pouze tak, že prochází kanály v terčíku membrány, který pokrývá ústí elektrody. Termín „zámek“ se používá proto, že během záznamu iontových proudů tekoucích jednotlivými kanály se s pomocí elektronického zařízení udržuje stálý membránový potenciál – „uzamkne“ se na určité hodnotě. Záznam proudu tekoucího těmito kanály lze provést s terčíkem, který je stále spojen s buňkou (A), stejně jako s terčíkem odpojeným (B). Výhodou odpojeného terčíku je snadnější změna složení roztoku na každé z obou stran membrány za účelem testování vlivu různých roztoků na chování kanálu. Snímek z mikroskopu (C) ukazuje nervovou buňku z oka drženou v sací pipetě (jejíž špička je vidět vlevo), zatímco pro techniku terčíkového zámku se používá mikroelektroda (*nahoře vpravo*). (D) Obvod pro záznam z terčíkového zámku.



Obrázek 12-21 Proud procházející jediným iontovým kanálem, ze záznamu z terčíkového zámku. Napětí (membránový potenciál) přes izolovaný terčík membrány bylo po celou dobu měření udržováno na stejné hodnotě. Membrána v tomto příkladu pochází ze svalové buňky a obsahuje jediný kanálový protein, shodný s typem z obrázku 12-18, který reaguje na nervový mediátor acetylcholin. Tento iontový kanál se při navázání acetylcholinu na vnější stranu kanálu otevírá, aby umožnil průchod kladných iontů. Ani při navázání acetylcholinu nezůstává kanál otevřený po celou dobu: přechází z otevřeného stavu do uzavřeného a naopak. V ukázaném časovém úseku (asi 25 milisekund) se kanál třikrát otevřel na různě dlouhou dobu. Pokud by se acetylcholin ke kanálu nenavázal, kanál by se otevíral jen vzácně.

klad kanálů kvasinek, které jsou příliš malé na sledování elektrických dějů v nich jinými prostředky.

Změnou koncentrace iontů v médiu na jedné straně kousku membrány lze zkoumat, které ionty budou procházet přítomnými iontovými kanály. Pomocí vhodného elektrického obvodu lze také nastavit napětí mezi jednou a druhou stranou membrány (tj. membránový potenciál) na jakoukoli zvolenou hodnotu a udržovat je na této hodnotě (proto se metoda nazývá terčíkový zámek). Tak lze pozorovat vliv změny membránového potenciálu na otevírání a zavírání kanálů v membráně.

Odebereme-li dostatečně malý kousek membrány, nachází se v něm jen jediný iontový kanál. Moderní elektrické přístroje jsou dostatečně citlivé a mohou prozradit tok iontů přes tento jediný kanál jako nepatrný elektrický proud (řádově 10 pikoampérů). Tyto proudy se obvykle chovají překvapujícím způsobem: ačkoli jsou udržovány stále podmínky, proudy se zapínají a vypínají, jako by náhodně přeskakoval přepínač (obr. 12-21). Toto chování napovídá, že kanál má pohyblivé části a že přechází sem a tam mezi otevřenou a zavřenou konformací (viz obr. 12-18). Protože tento jev pozorujeme i při konstantních podmínkách, nasvědčuje všechno tomu, že změnu konformace kanálu způsobují náhodné tepelné pohyby molekul z jeho okolí. Jde o jeden z mála případů, kdy je možno sledovat konformační změny jediné proteinové molekuly. Tento zázračný obrázek trhavě se pohybujícího stroje, který je navíc neustále vystaven nárazům z okolí, lze jistě aplikovat i na další proteiny s pohyblivými částmi.

Pokud iontové kanály náhodně přecházejí mezi otevřenou a zavřenou konformací i v případě, že jsou podmínky na každé z obou stran membrány udržovány konstantní, jak může být jejich stav regulován změnou podmínek uvnitř či vně buňky? Odpověď je jednoduchá: když se změní vhodné podmínky, náhodné chování pokračuje, ale se silně změněnou pravděpodobností. Pokud se například změněné podmínky snaží otevřít kanál, bude kanál mnohem větší část svého času setrávat v otevřené konformaci, ačkoli nezůstane otevřený pořád (viz obr. 12-21). Když je iontový kanál otevřený, je otevřený úplně, a když je zavřený, je zavřený úplně.

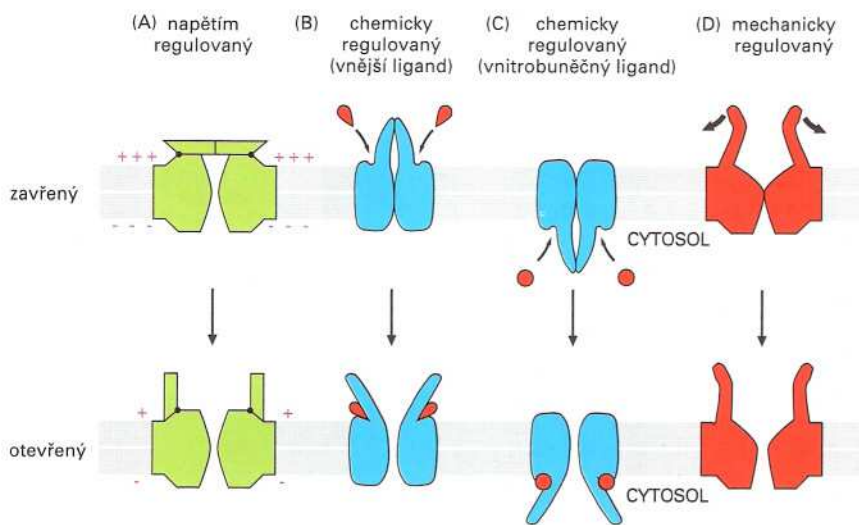
Iontové kanály uzavíratelné napětím reagují na změny membránového potenciálu

Už bylo objeveno více než 100 druhů iontových kanálů a stále se ještě nacházejí nové. Jeden od druhého se liší především (1) *iontovou selektivitou* - druhem iontů, které mohou procházet, a (2) *uzavíráním* – podmínkami, které ovlivňují jejich otevírání a zavírání.

U **kanálů řízených napětím** je pravděpodobnost otevření regulována membránovým potenciálem (obr. 12-22A). U **kanálů řízených ligandem**, jako je acetylcholinový receptor ukázaný na obrázku 12-18, je pravděpodobnost otevření regulována navázáním nějaké molekuly (ligandu) ke kanálovému proteinu (12-22B,C). U **mechanicky aktivovaných kanálů** je otevření regulováno mechanickou silou působící na kanál (12-22D). *Vlásokvé buňky vnitřního ucha* jsou důležitým příkladem buněk, které závisí na tomto typu kanálu. Zvukové vibrace otvírají mechanicky aktivované kanály a způsobí tak tok iontů K^+ do vláskových buněk. To vyvolá elektrický potenciál, který je přenášen z vláskových buněk do sluchového nervu, který vede signál do mozku (obr. 12-23).

Iontové kanály uzavíratelné napětím hrají hlavní roli při šíření elektrického signálu v nervových buňkách. Jsou přítomné také v celé řadě jiných buněk včetně svalových buněk, vajíček, prvků a dokonce v rostlinných buňkách, kde umožňují elektrickým signálům putovat z jedné části rostliny na druhou, jako třeba při uzavírání listů mimozy (citlivky) – viz obr. 12-24. Iontové kanály uzavíratelné napětím mají zvláštní nabité proteinové domény zvané *napětová čidla*, která jsou mimořádně citlivá na změny v membránovém potenciálu. Změny nad jistou prahovou hodnotou působí na tyto domény dostatečnou silou, aby je přiměly „povzbudit“ kanál ke změně konformace z uzavřené na otevřenou nebo naopak. Změna membránového potenciálu neovlivní dobu, po kterou je kanál otevřen, ale zvýší pravděpodobnost, že bude nalezen v otevřeném stavu. Tak můžeme v kousku membrány s mnoha molekulami kanálového proteinu v každém okamžiku najít asi 10 % z nich otevřených, pokud je membrána udržována na jedné hodnotě potenciálu, zatímco při jiném potenciálu membrány můžeme vždy nalézt otevřených asi 90 % kanálů.

Abychom mohli ocenit funkci iontových kanálů ovládaných napětím, podívejme se, co reguluje membránový potenciál. Jednoduchá odpověď zní: řídí ho samy iontové kanály a otvírání a zavírání těchto kanálů působí jeho změnu. Tato regulační smyčka, od iontových kanálů přes membránový potenciál na iontové kanály, je základní pro veškerou elektrickou signalizaci v buňkách. Už jsme viděli, jak může membránový potenciál regulovat iontové kanály, a nyní se podíváme, jak mohou iontové kanály regulovat membránový potenciál. V poslední části kapitoly probereme, jak tato regulační smyčka funguje jako celek.



Otázka 12-5 Obrázek Q12-5 ukazuje záznam z terčíkového zámku v pokusu, při kterém se elektrický proud procházející terčíkem membrány měří jako funkce času. Membránový terčík byl získán z plasmatické membrány svalové buňky technikou ukázanou na obrázku 12-20 a obsahuje molekuly acetylcholinového receptoru, který je chemicky ovládaným kationtovým kanálem, jenž se otvírá při navázání acetylcholinu na extracelulární stranu kanálového proteinu. Abychom získali záznam, byl k roztoku v mikroelektrodě přidán acetylcholin. Řekněte, co se z tohoto záznamu můžeme o kanálech dozvědět. Jak by se záznam lišil, kdybychom acetylcholin (a) nepřidali nebo (b) přidali jen do roztoku vně mikroelektrody?

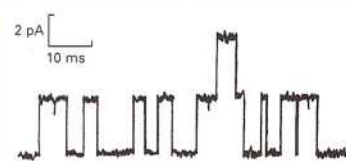
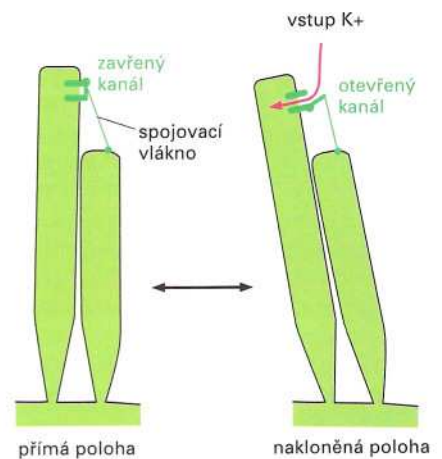
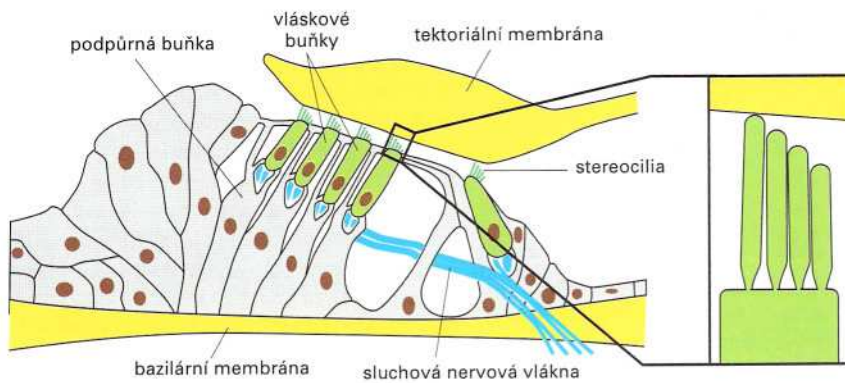


Figure Q12-5

Obrázek 12-22 Řízené iontové kanály.

V závislosti na typu iontového kanálu se hradlo otvírá v odpověď na změnu napětí přes membránu (A), na navázání chemické látky ke kanálu na vnější (B) nebo vnitřní (C) straně buňky, nebo na mechanické podráždění (D).



(A)

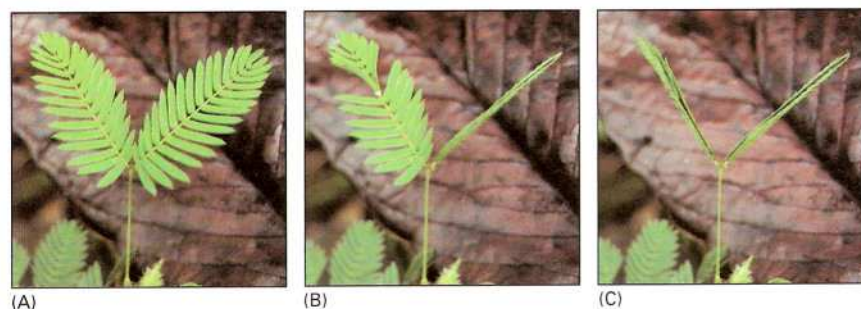
(B)

Obrázek 12-23 Jak nám mechanicky aktivované kanály umožňují slyšet. (A) Řez Cortiho orgánem, který probíhá podél hlemýžďe vnitřního ucha. Každá vlásková buňka vnitřního ucha obsahuje výběžky zvané stereocilia, které vyčnívají z horní části jejího povrchu. Vláskové buňky jsou zanořeny ve vrstvě podpůrných buněk, které tvoří vrstvu mezi bazilární membránou pod nimi a tektorální membránou nad nimi. (V tomto případě nejde o membrány tvořené lipidovou dvojnou vrstvou, ale o vrstvy extracelulární matrix.) (B) Zvukové vibrace rozkmitávají bazilární membránu a způsobí naklánění stereocilií. Každé v takto rozkmitávaném shluku stereocilií je spojeno tenkým vláknem s dalším, kratším stereociliem. Nakláněním jsou tato vlákna napínána a otevírají mechanicky ovládané iontové kanály v membráně stereocilií, čímž umožní vstup kladně nabitých iontů K^+ z okolní kapaliny. Vstup těchto iontů aktivuje vláskové buňky, které stimulují připojené sluchové nervy, jež pak vedou sluchový signál do mozku. Mechanismus vláskových buněk vnitřního ucha je obdivuhodně citlivý: síla potřebná k otevření jediného kanálu je asi 2×10^{-13} newtonu a odhaduje se, že nejjemnější zvuky, které můžeme slyšet, pohnou vlákny přibližně o 0,04 nm, což je méně než průměr atomu vodíku.

Membránový potenciál je řízen propustností membrány pro specifické ionty

Téměř u všech buněk existuje rozdíl elektrického potenciálu mezi jednou a druhou stranou membrány, tzv. **membránový potenciál**. Abychom pochopili, jak vzniká, bude dobré, připomeneme-li některé základní vědomosti o elektřině.

Zatímco v kovech vedou elektřinu elektrony, ve vodných roztocích vedou elektrický proud ionty, které jsou buď kladně nebo záporně nabitě (kationty a anionty). Tok iontů přes membránu je měřitelný jako elektrický proud, a hromadění iontů, pokud není přesně vyváženo hromaděním opačně nabitých iontů, je měřitelné jako akumulace elektrického náboje neboli membránový potenciál (obr. 12-25).

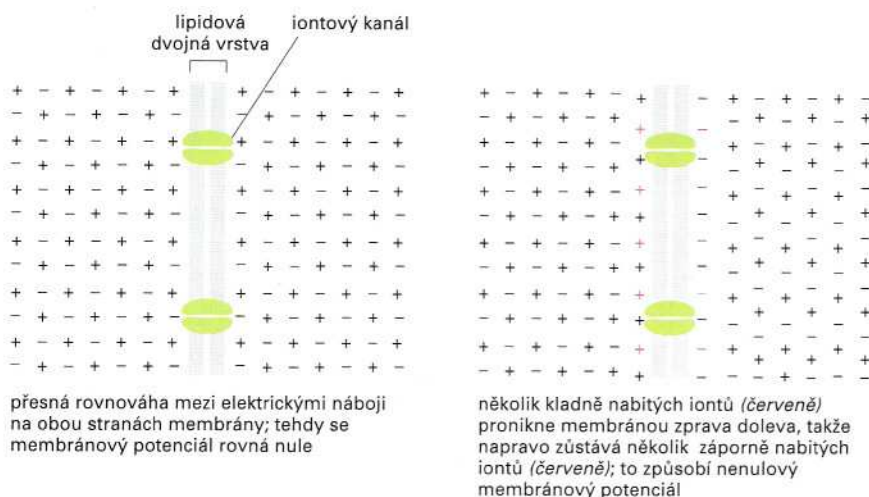


(A)

(B)

(C)

Obrázek 12-24 Sevření listu jako odpověď na podráždění u mimozy. (A) List v klidu. (B a C) Odpověď na dotek. Několik sekund poté, co se dotkneme listu, se lístečky sevřou. Odpověď zahrnuje otevření napětově ovládaných iontových kanálů, které generují elektrický signál. Když tento signál dorazí do specializovaných závěsových buněk v úpatí každého lístečku, dojde k rychlému odvodnění těchto buněk, což způsobí náhlé poskládání všech lístků k řapíku.

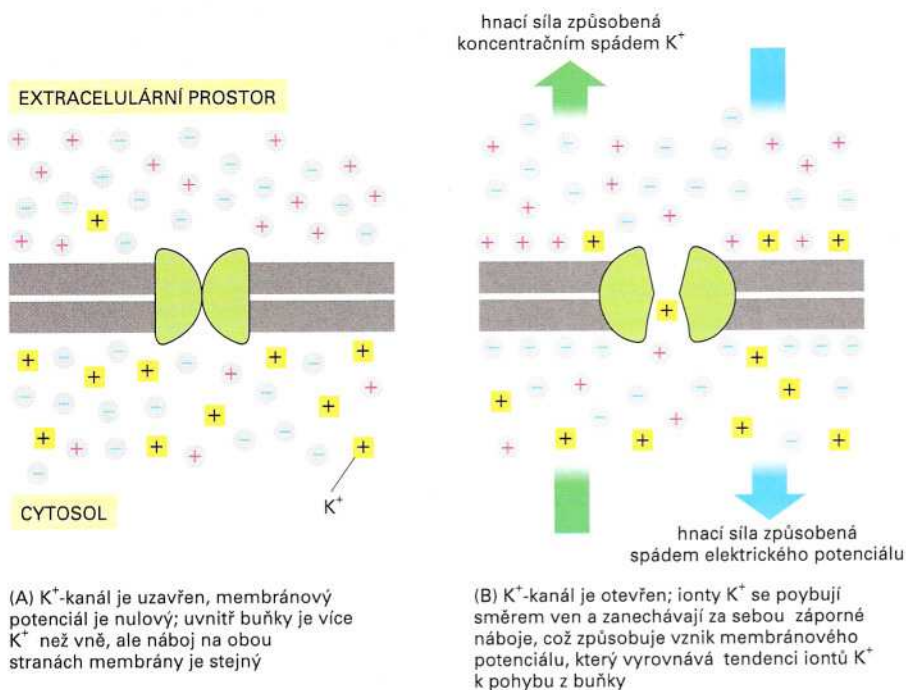


Obrázek 12-25 Distribuce iontů způsobující membránový potenciál. Membránový potenciál vzniká díky tenké vrstvě iontů (<1 nm) v těsné blízkosti membrány, které jsou ve své poloze drženy elektrickým přitahováním k opačně nabitým iontům na druhé straně membrány. Počet iontů, které musí procházet membránou aby se ustavil membránový potenciál, představuje nepatrný podíl přítomných iontů. (6000 iontů K^+ procházejících jedním čtverečním mikrometrem membrány stačí ke změně membránového potenciálu asi o 100 mV; počet iontů K^+ v $1 \mu m^3$ cytoplasmy je 70 000krát vyšší.

Chceme-li vidět, jak je membránový potenciál vytvářen a udržován, podívejme se na pohyby iontů směrem do typické živočišné buňky a ven z této buňky v nestimulovaném „klidovém“ stavu. Záporné náboje organických molekul nacházejících se v buňce jsou z velké části vyrovnány K^+ , převažujícím kladným iontem v buňce. Vysoká vnitrobuněčná koncentrace K^+ je z části vytvářena sodno-draselnou ATPázou, která aktivně čerpá K^+ do buňky. To vede k velkému rozdílu koncentrace K^+ na jedné a na druhé straně membrány, přičemž koncentrace K^+ uvnitř buňky je mnohem vyšší než koncentrace K^+ v jejím okolí. Plasmatická membrána však také obsahuje sadu K^+ -kanálů, známých jako výtokové kanály. Tyto kanály se bez ohledu na podmínky uvnitř a vně buňky náhodně přepínají z otevřeného do zavřeného stavu a naopak; když jsou otevřené, umožňují volný pohyb K^+ . V klidové buňce jsou hlavními otevřenými iontovými kanály v plasmatické membráně a zajišťují větší průchodnost plasmatické membrány pro K^+ ve srovnání s ostatními ionty.

Ionty K^+ se budou snažit proudit těmito kanály ven z buňky, „dolů“ po svém strmém koncentračním gradientu. Ale každý přenos kladného náboje do okolí buňky za sebou nechává nevyvážený záporný náboj v buňce a tím vytváří elektrické pole neboli membránový potenciál, který bude bránit jakémukoli dalšímu pohybu iontů K^+ ven z buňky. Během milisekund se ustaví rovnováha, při které je membránový potenciál právě dostatečný na to, aby vyrovnal tendenci iontů K^+ pohybovat se do míst s menší koncentrací, tedy ven z buňky. Při těchto rovnovážných podmínkách je tudíž gradient elektrochemického potenciálu pro K^+ nulový, ačkoli je v buňce mnohem větší koncentrace draselných iontů než v jejím okolí (obr. 12-26).

Klidový membránový potenciál je membránový potenciál při takovém ustáleném stavu, kdy je tok záporných a kladných iontů přes plasmatickou membránu přesně vyvážen, takže se ani na jedné straně membrány nehromadí náboj. Membránový potenciál se měří jako rozdíl napětí přes membránu. V živočišných buňkách klidový membránový potenciál kolísá mezi -20 a -200 milivolty (mV) podle organismu a druhu buňky. Vyjadřuje se jako záporná hodnota, protože vnitřek buňky je vzhledem ke svému okolí záporný; záporné náboje jsou totiž v buňce oproti kladným nábojům v mírném přebytku. Aktuální hodnota klidového potenciálu v živočišných buňkách je hlavně odrazem



Obrázek 12-26 Úloha K^+ při tvorbě membránového potenciálu přes plasmatickou membránu. Pokud začneme v hypotetické situaci s nulovým membránovým potenciálem, budou se ionty K^+ snažit opustit buňku po spádu své koncentrace volně průchodnými kanály pro K^+ . Pokud membrána nemá žádné kanály pro jiné druhy iontů, budou ionty K^+ procházet membránou, ale záporně nabitě ionty je nebudou schopny následovat. Výsledkem bude přebytek kladného náboje na vnější straně membrány a přebytek záporného náboje uvnitř buňky. To vede ke vzniku membránového potenciálu, který se snaží hnát ionty K^+ zpět do buňky. V rovnováze je efekt koncentračního gradientu K^+ přesně vyrovnán účinkem membránového potenciálu a k výslednému pohybu K^+ jedním směrem nedochází.

gradientu koncentrace K^+ přes plasmatickou membránu, neboť v klidovém stavu je tato membrána propustná především pro K^+ a K^+ jsou hlavními kladnými ionty. Tuto rovnováhu kvantitativně popisuje **Nernstova rovnice** (obr. 12-27), která umožňuje vypočítat teoretický klidový potenciál, známe-li poměr vnitřní a vnější koncentrace iontů.

Předpokládejme nyní, že další kanály, které jsou prostupné pro některé jiné ionty, např. Na^+ , se v klidové plasmatické membráně náhle otevřou. Protože koncentrace Na^+ je v okolí buňky vyšší než uvnitř, budou ionty Na^+ proudit těmito kanály do buňky a membránový potenciál se stane méně záporným. Je také možné, že se membránový potenciál stane kladným (takže vnitřek buňky bude kladný vzhledem k jejímu okolí). Membránový potenciál nabude nové hodnoty, která je kompromisem mezi zápornou hodnotou, která by odpovídala rovnováze pro K^+ , a kladnou hodnotou, která by odpovídala rovnováze pro Na^+ . Jakákoli změna v propustnosti membrán vzhledem ke specifickým iontům, tedy jakákoli změna v počtu otevřených iontových kanálů nejrůznějších druhů, vyvolá změnu iontového potenciálu. Membránový potenciál je proto určován jak stavem iontových kanálů tak koncentracemi iontů v cytosolu a v extracelulárním mediu. Protože se však elektrické děje v plasmatické membráně odehrávají velmi rychle ve srovnání se změnami koncentrace iontů v celém potřebném objemu, jsou při krátkých časech – milisekundách až sekundách či minutách – iontové kanály nejdůležitějším prvkem v regulaci membránového potenciálu.

Abychom viděli, jak je souhra mezi membránovým potenciálem a iontovými kanály využívána k elektrické signalizaci, obrátíme teď pozornost od chování iontů a iontových kanálů k chování celých buněk. Jako první příklad si vezmeme nervové buňky, neboť právě ony mají více než jakýkoli jiný typ buněk elektrickou signalizaci ve svém „popisu práce“ a využívají k ní iontové kanály tím nejrafinovanějším způsobem.

Síla, která žene iont přes membránu, má dvě složky: první z nich je elektrický potenciál membrány, druhou je gradient koncentrace tohoto iontu. V rovnováze jsou obě složky vyrovnány; tento stav popisuje Nernstova rovnice

$$V = k \cdot \ln \frac{C_o}{C_i}$$

kde V je membránový potenciál ve voltech, k je konstanta závislá na teplotě a na náboji daného iontu; druhý výraz rovnice je přirozený logaritmus podílu extracelulární a intracelulární koncentrace iontu. Konstanta k je definována vztahem $k = RT/zF$, kde R je plynová konstanta, T je absolutní teplota v K, z je počet kladných nábojů iontu a F je Faradayova konstanta

Obrázek 12-27 Nernstova rovnice.

Iontové kanály a signalizace v nervových buňkách

Základní úlohou nervové buňky neboli **neuronu** je přijímat, vést a předávat signály. Neurony přenášejí nervové signály ze smyslových orgánů do centrální nervové soustavy, která se skládá z mozku a míchy. V centrální nervové soustavě si neurony předávají signály navzájem v nesmírně složité síti a analyzují a interpretují (překládají do elektrické či chemické podoby) signály přicházející ze smyslových orgánů a odpovídají na ně. Z centrální nervové soustavy se neuronové děje šíří dále a vedou signály k akci ke svalům a žlázám. K zajištění těchto funkcí jsou neurony často značně dlouhé: například motorické neurony v lidském těle, které přenášejí signály z míchy do svalu na noze, mohou měřit až jeden metr.

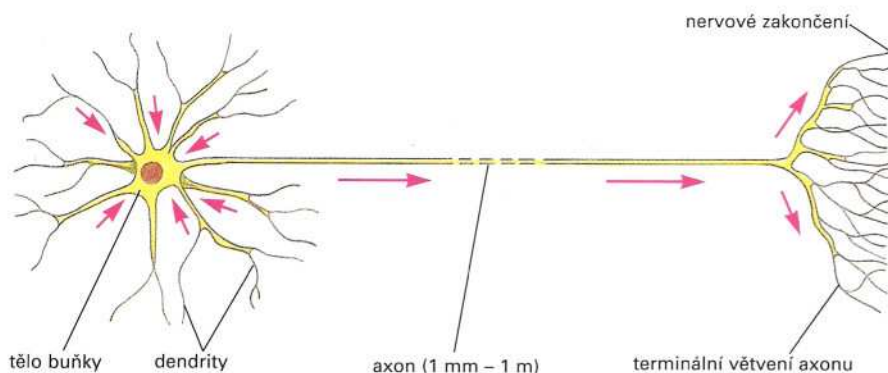
Každý neuron se skládá z *těla buňky* (které obsahuje jádro) a z celé řady dlouhých tenkých výběžků z tohoto těla. Každý neuron má obvykle jeden dlouhý **axon**, který vede signály daleko od těla buňky ke vzdáleným cílovým buňkám, a několik kratších rozvětvených *dendritů*, které se šíří z těla buňky jako tykadla a poskytují zvětšený povrch k příjmu signálů z axonů ostatních neuronů (obr. 12-28). Axon se obvykle na svém vzdáleném konci dělí do mnoha větví, z nichž každá má **nervové zakončení**, takže poselství dendritů může být současně předáváno do mnoha cílových buněk – buď ostatním neuronům nebo buňkám svalů či žláz. Podobně i větvení neuronu může být značně rozsáhlé a v některých případech může zajišťovat až 100 000 vstupů do jediného neuronu.

Bez ohledu na význam signálu přenášeného neuronem, ať už je to zraková informace z oka, motorický příkaz svalů či jeden krok analýzy signálu v mozku, je podoba signálu vždy stejná. Ve všech případech jde o změny elektrického potenciálu přes plasmatickou membránu neuronu.

Otázka 12-6 Z koncentrací uvedených v tabulce 12-1 (str. 373) vypočítejte rovnovážný membránový potenciál K^+ a Na^+ (předpokládejte intracelulární koncentraci Na^+ 10 mM). Jaký membránový potenciál byste čekali v klidové buňce? Vysvětlete svou odpověď. Co by se stalo, kdyby se najednou otevřelo větší množství kanálů pro Na^+ a membrána by se tak stala pro Na^+ propustnější než pro K^+ ? (Protože již pohyb malého množství iontů přes membránu stačí k dramatické změně v rozdělení nábojů uvnitř a vně buňky, měli byste předpokládat, že se ani na jedné straně koncentrace iontů nebude podstatně měnit.) Co byste očekávali v případě opětovného uzavření kanálů pro Na^+ ?

Akční potenciály přispívají k rychlé komunikaci na dlouhé vzdálenosti

Neuron je stimulován signálem, který přichází na specifické místo na jeho povrchu obvykle z jiného neuronu. Tento signál vyvolá v místě příchodu změnu membránového potenciálu. K dalšímu přenosu tohoto signálu dále se však musí změna membránového potenciálu rozšířit z tohoto místa, které je obvykle na dendritu nebo na těle buňky, do axonových zakončení, která předají signál dalším buňkám ve štafetě.



Obrázek 12-28 Neurony. Schematický obrázek typického neuronu. Červené šipky ukazují směr vedení signálů. Z těla nervové buňky odvádí signál jediný axon, zatímco četné dendrity přijímají signály z axonů ostatních neuronů.

Ačkoli se místní změna membránového potenciálu pasivně šíří podél axonu nebo dendritu do sousedních oblastí plasmatické membrány, s rostoucí vzdáleností od zdroje rychle slábne. Při krátkých vzdálenostech je toto zeslabení nepatrné, ale při komunikaci na velké vzdálenosti je takové *pasivní šíření* signálu nevhodné. Stejně tak může být telefonický signál dobře přenášen dráty ve vašem městě bez zesílení, ale přenášeli ho za oceán podmořským kabelem, je třeba tento signál občas zesílit.

Neurony řeší tento problém užitím aktivního signálního mechanismu: místní elektrický stimulus dostatečné síly způsobí výbuch elektrické aktivity v plasmatické membráně, který se rychle šíří podél plasmatické membrány axonu a automaticky se obnovuje po celou cestu. Tato putující vlna elektrického vzruchu je známa jako **akční potenciál** či nervový impuls. Může bez zeslabení signálu přenášet zprávu z jednoho konce neuronu na jiný rychlostí až 100 metrů za sekundu.

Všechno předchází výzkum, který vedl k objasnění mechanismu elektrické signalizace podél nervových buněk, byl proveden s obřím axonem sépie (obr. 12-29), který má tak velký průměr, že je možné zaznamenávat jeho elektrickou aktivitu z elektrody umístěné přímo do něj. Z takových studií bylo vyvozeno, že akční potenciály jsou přímými důsledky vlastností iontových kanálů ovládaných napětím (viz obr. 12-22A) v membráně nervové buňky, jak nyní vysvětlíme.

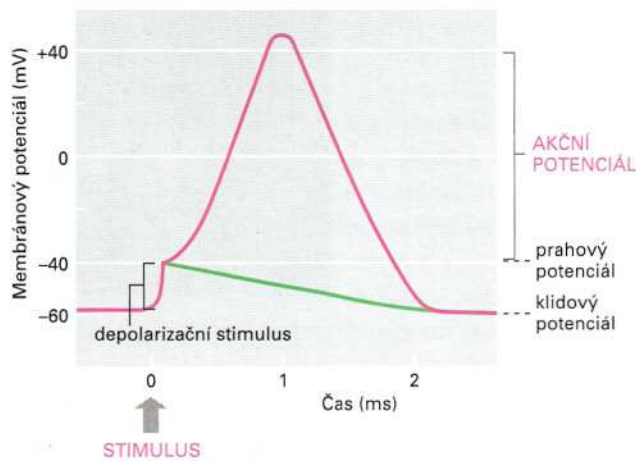
Akční potenciály jsou obvykle zprostředkovány sodnými kanály ovládanými napětím

Akční potenciál v neuronu je obvykle spouštěn náhlou místní *depolarizací* plasmatické membrány, tedy změnou membránového potenciálu na méně zápornou hodnotu. Později probereme, jak takovou depolarizaci vyvolají signální molekuly – *nervové mediátory* – uvolněné jiným neuronem. Podnět, který způsobí, že dostatečně velká depolarizace překročí jistou prahovou hodnotu, přiměje **elektricky regulované sodné kanály**, aby se v tomto místě přechodně otevřely a umožnily určitému množství iontů Na^+ vstoupit do buňky po gradientu svého elektrochemického potenciálu. Tok kladných nábojů dále depolarizuje membránu (takže membránový potenciál se stává méně záporným), a tím otevírá další napětově uzavíratelné sodné kanály, které umožní vstup dalších iontů Na^+ , a tím i další depolarizaci. Tento proces se sám zesiluje a během několika milisekund se změní klidový membránový potenciál z asi -60 mV až na $+40$ mV (obr. 12-30). Tato hodnota je blízká membránovému potenciálu, při němž je hodnota elektrochemické hnací síly pro pohyb Na^+ přes membránu nulová. Účinky membránového potenciálu a koncentračního gradientu pro Na^+ jsou tedy opačné a vyrovnané, a ionty Na^+ nejeví žádnou další snahu proniknout do buňky nebo z ní uniknout. Pokud by iontové kanály donekonečna pokračovaly v takové odpovědi na změnu membránového potenciálu, byla by buňka brzy blokována svými převážně otevřenými sodnými kanály.

Buňka je však takového osudu ušetřena, neboť sodné kanály disponují mechanismem automatické inaktivace, který je během milisekund přiměje přijmout speciální inaktivní konformaci, ve které už se kanál



Obrázek 12-29 Oliheň *Loligo*. Tento živočich obsahuje nervovou buňku s obrovským axonem, která mu umožňuje rychle reagovat na nebezpečí z okolí. Dlouho před použitím techniky záznamu z terčíkového zámku pro jednotlivé kanály v malých buňkách byli vědci schopni zaznamenávat akční potenciály v obrovském axonu olihně a odvodit existenci iontových kanálů v membránách.

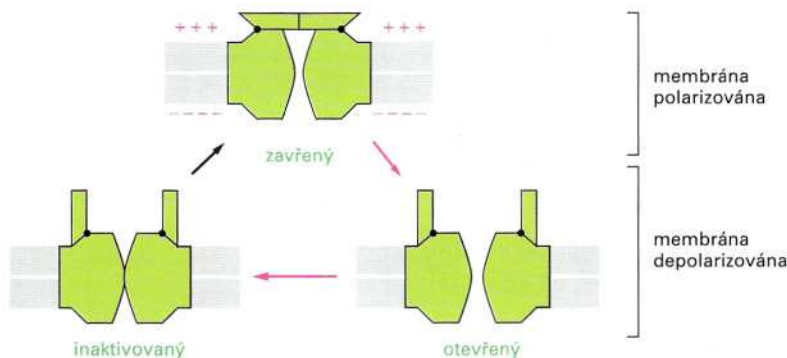


Obrázek 12-30 Akční potenciál. Klidový membránový potenciál v tomto neuronu je -60 mV. Akční potenciál se spouští, když podnět depolarizuje membránu asi o 20 mV, čímž se její potenciál změní na -40 mV, což je v této buňce prahová hodnota pro spuštění akčního potenciálu. Jakmile je akční potenciál spuštěn, membrána se rychle dále depolarizuje: membránový potenciál se přehoupne přes nulu a dosáhne hodnoty $+40$ mV, ale po průchodu akčního potenciálu se vrátí ke své klidové záporné hodnotě. Zelená křivka ukazuje, jak by se membránový potenciál po počátečním depolarizačním podnětu postupně vracel ke své klidové hodnotě, pokud by v plasmatické membráně nebyly žádné napětově ovládané iontové kanály.

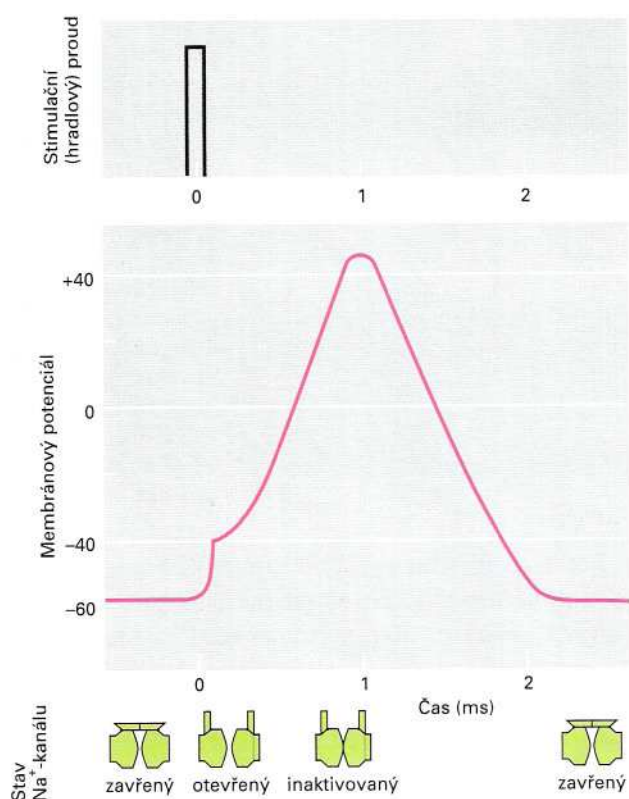
nemůže znovu otevřít. Ačkoli je membrána stále depolarizována, sodné kanály zůstanou ve svém *inaktivním stavu* a do normální konformace se vrátí až několik milisekund poté, co se membránový potenciál vrátí ke své původní záporné hodnotě. Tyto tři různé stavy napětím ovládaného Na^+ -kanálu jsou schematicky znázorněny na obrázku 12-31. Obrázek 12-32 ukazuje, jak takové kanály přispívají k vzestupu a poklesu akčního potenciálu.

Membráně při návratu do klidového stavu pomáhá otevření *napětově ovládaných draselných kanálů*. Tyto kanály se také otvírají v odpověď na depolarizaci membrány, ale na rozdíl od Na^+ -kanálů o něco později, a potom zůstávají otevřené tak dlouho, dokud je membrána depolarizována. Jakmile akční potenciál dosáhne svého vrcholu, draselné ionty (nesoucí kladný náboj) proto začnou těmito kanály unikat z buňky ven – po gradientu svého elektrického potenciálu, přičemž je už nebrzdí záporný potenciál membrány, který je dříve zadržoval v klidové buňce. Rychlý výtok K^+ napětově ovládanými draselnými kanály způsobí návrat membrány do jejího klidového stavu mnohem rychleji, než by to dokázal jen tok K^+ přes samotné výtokové K^+ -kanály.

Výše uvedený popis akčního potenciálu bere v úvahu jen malý úsek plasmatické membrány. Samovolně se zesilující depolarizace malého úseku membrány však stačí depolarizovat sousední oblasti membrány, které pak procházejí stejným samovolně se zesilujícím cyklem. Takto se akční potenciál šíří jako putující vlna z původního místa depolarizace, až nakonec dosáhne nejvzdálenějších míst axonu (obr. 12-33).



Obrázek 12-31 Elektricky ovládaný sodný kanál může nabývat nejméně tří konformací. Kanál může přecházet z jedné konformace (stavu) do druhé v závislosti na membránovém potenciálu. Je-li membrána v klidu (vysoce polarizována), je nejstálejší uzavřená konformace. Je-li však membrána depolarizována, je stálější otevřená konformace a kanál se s velkou pravděpodobností otevře. V depolarizované membráně je však ještě pravděpodobnější inaktivovaná konformace, a tak se po krátké prodlevě v otevřené konformaci kanál inaktivuje a nemůže se otevřít. Červené šipky ukazují pořadí dějů, ke kterým dochází po náhlé depolarizaci, a černá šipka ukazuje návrat do původní konformace po opětné polarizaci membrány.



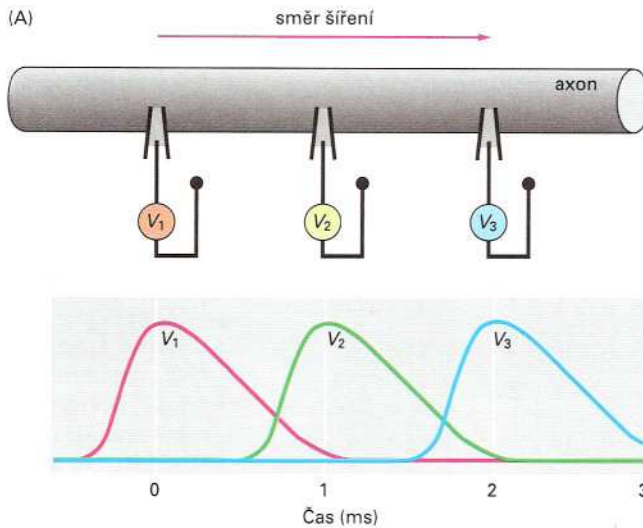
Obrázek 12-32 Toky iontů a akční potenciál. V tomto příkladu je akční potenciál spouštěn krátkým elektrickým impulzem (ukázán v horním grafu), který částečně depolarizuje membránu, jak je vidět v grafu závislosti membránového potenciálu na čase (dolní graf). Dolní graf ukazuje průběh akčního potenciálu, který je vyvolán otevřením a následnou inaktivací elektricky ovládaných sodných kanálů, jejichž stav je ukázán ve spodní části obrázku. Ani při opětovné stimulaci nemůže membrána vytvořit druhý akční potenciál, dokud se Na⁺-kanály nevrátí z inaktivované do prostě uzavřené konformace (viz obr. 12-31); do té doby zůstává membrána vůči stimulaci netečná.

Napětím ovládané Ca²⁺-kanály přeměňují v nervových zakončeních elektrické signály v chemické

Když akční potenciál dospěje na konec axonu (*nervového zakončení*), musí být signál nějak předán *cílovým buňkám*, se kterými jsou nervová zakončení v kontaktu; obvykle to jsou neurony nebo svalové buňky. Signál je předáván ve specializovaných místech styku zvaných **synapse**. Ve většině synapsí jsou plasmatické membrány zprostředkující a přijímající buňky (*presynaptické* a *postsynaptické* buňky) odděleny úzkou *synaptickou štěrbinou* (obvykle 20 nm), kterou nemůže elektrický signál projít (obr. 12-34). Zpráva, která se má předat od jednoho neuronu druhému, se z elektrického signálu mění v chemický signál ve formě malých signálních molekul známých jako **nervové mediátory**.

Tyto mediátory jsou v nervových zakončeních připraveny k použití, zabaleny do membránových **synaptických váčků** čili **synaptosomů** (viz obr. 12-34). Uvolňují se z nervových zakončení exocytózou (probírá se v Kapitole 14) ve chvíli, kdy akční potenciál dospěje k zakončení. Tato vazba mezi akčním potenciálem a vylučováním nervových mediátorů zahrnuje aktivaci ještě dalších typů napětově ovládatelných kationtových kanálů. Depolarizace plasmatické membrány nervového zakončení vyvolaná příchodem akčního potenciálu přechodně otevře *napětím ovládané vápenaté kanály*, které jsou soustředěny v plasmatické membráně nervového zakončení. Protože koncentrace Ca²⁺ v okolí buňky je více než 1000krát vyšší než v cytosolu, proudí ionty Ca²⁺ otevřenými kanály do nervových zakončení. Výsledný vzrůst koncentrace Ca²⁺ v cytosolu nervového zakončení spustí fúzi synaptických váčků s plasmatickou membránou, čímž uvolní mediátor do synaptické štěrbiny.

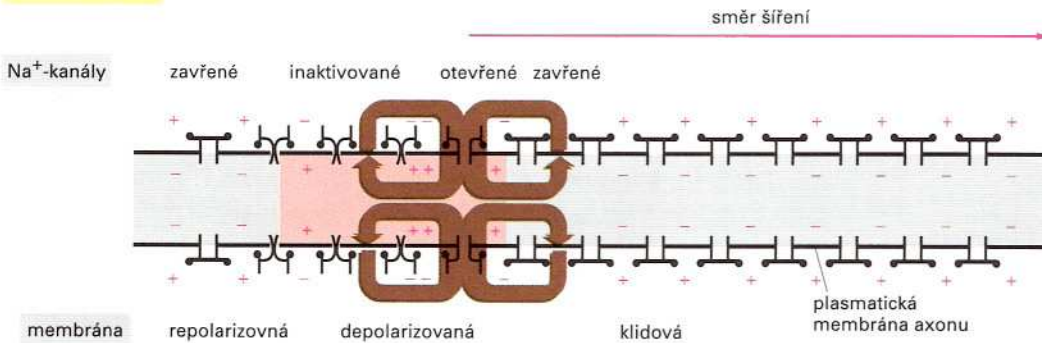
Otázka 12-7 Vysvětlete sto nebo méně slovy, jak se akční potenciál pohybuje podél axonu.



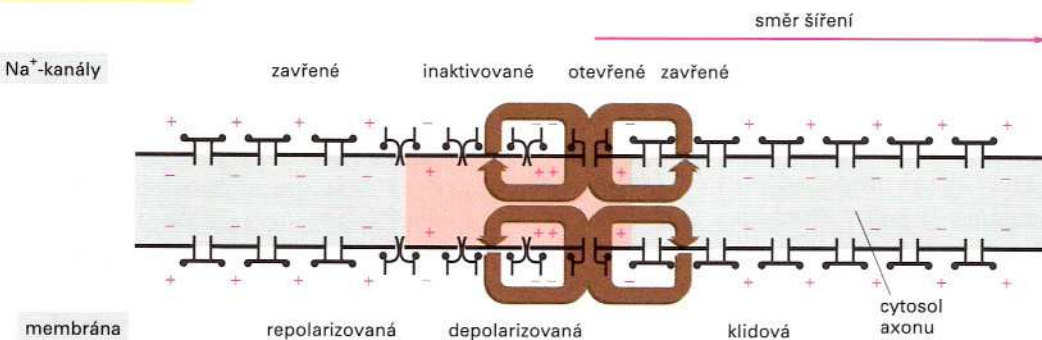
Obrázek 12-33 Šíření akčního potenciálu podél axonu. (A) Napětí, které by bylo možno zaznamenat z řady intracelulárních elektrod umístěných v pravidelných vzdálenostech od sebe podél axonu, jehož šířka je v tomto schematickém obrázku značně zveličena. Všimněte si, že akční potenciál při své cestě neslábne. (B) Změny v Na⁺-kanálech a tocích proudu (*hnědé šipky*), které dávají vznik putujícím poruchám membránového potenciálu. Oblast axonu s depolarizovanou membránou je stínována *růžově*. Akční potenciál může se může šířit jen dopředu, neboť inaktivace sodných kanálů brání šíření depolarizace opačným směrem (viz také obr. 12-32).

(B)

pohled při $t = 0$



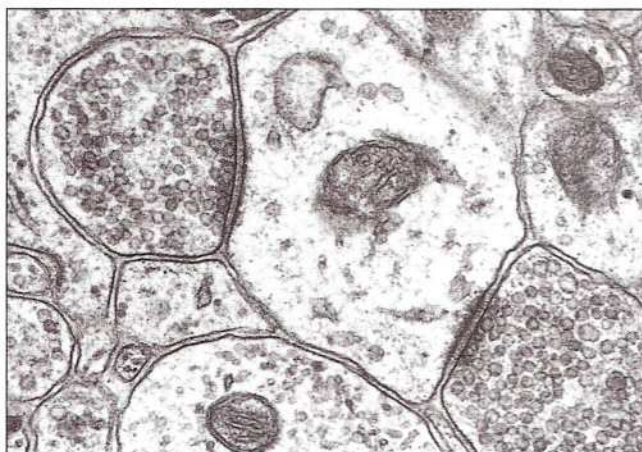
pohled při $t = 1$ ms



Díky napětím ovládaným vápenatým kanálům se tak elektrický signál přeměnil v signál chemický (obr. 12-35).

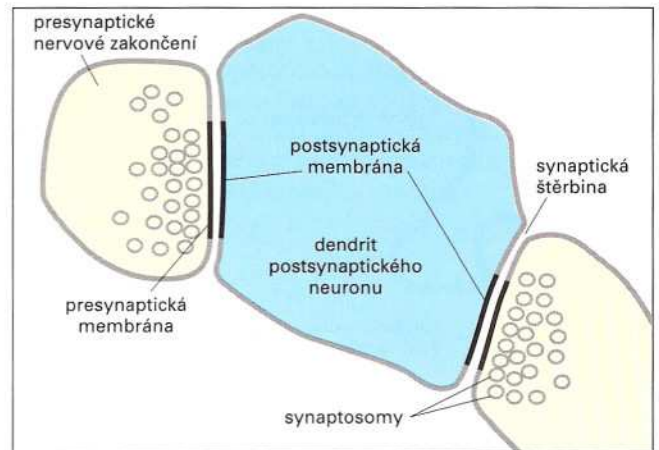
Chemicky regulované kanály v cílových buňkách převádějí chemické signály zpět do elektrické podoby

Uvolněný nervový mediátor rychle difunduje přes synaptickou štěrbinu a váže se na *receptory* soustředěné v postsynaptické membráně cílové buňky. Vazba mediátoru na jeho receptory vede ke změně membránového potenciálu cílových buněk, což u buněk způsobí „odpále-



(A)

2 μm



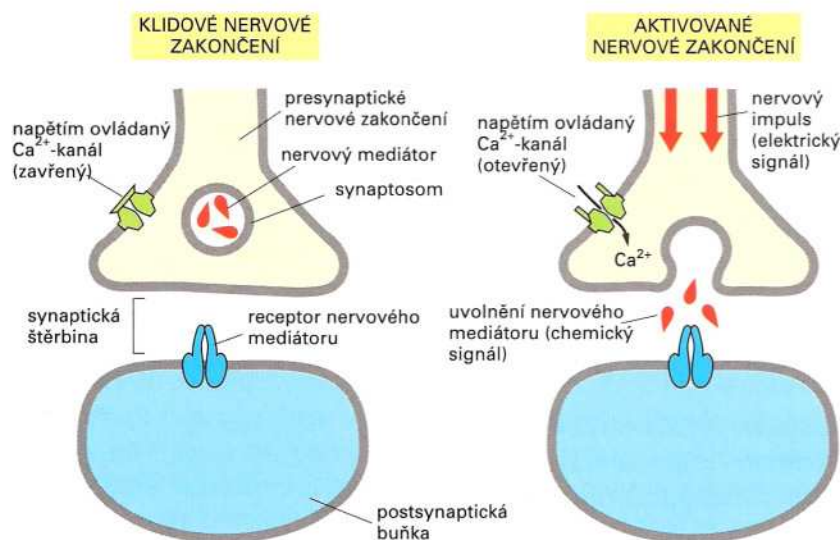
(B)

ní“ akčního potenciálu. Nervový mediátor je rychle odstraněn, čímž se zajistí, že při zklidnění presynaptické buňky se zklidní i buňka postsynaptická. Mediátor se odstraní buď rychlým odbouráním enzymy v synaptické štěrbině nebo opětným přijetím buď do nervových zakončení, z nichž se uvolnil, nebo do sousedních buněk.

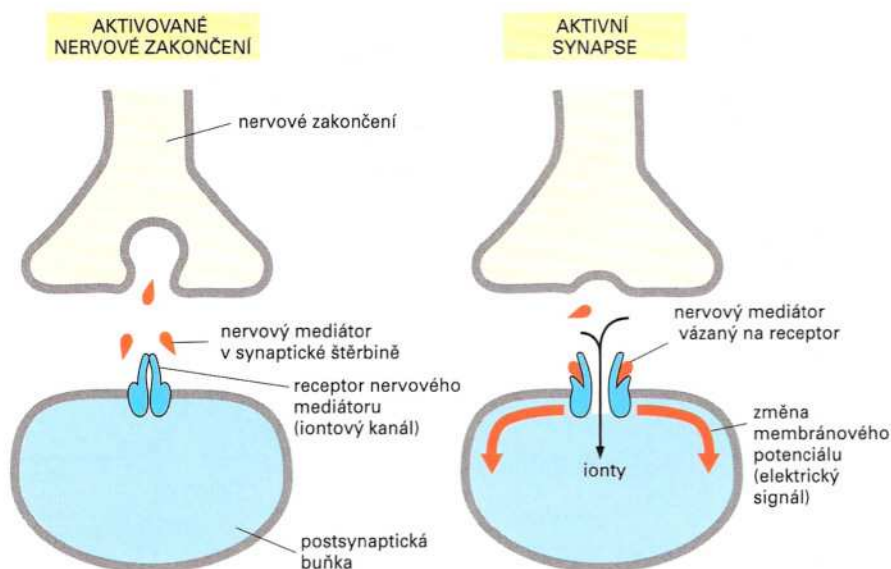
Receptory nervových mediátorů mohou být různého typu: některé mohou v cílových buňkách zprostředkovat poměrně pomalé účinky, jiné zprostředkují rychlejší odpovědi. Rychlé odpovědi v měřítku milisekund závisí na receptorech, kterými jsou *chemicky ovládané iontové kanály*. Ty patří do skupiny ligandy ovládaných iontových kanálů (viz obr. 12-22B) a jejich funkcí je převádět chemický signál nesený mediátorem přímo na signál elektrický. Kanály se v odpovědi na navázání mediátoru přechodně otevírají, a tak mění propustnost postsynaptické membrány vůči iontům. To naopak vyvolá změnu membránového potenciálu (obr. 12-36). Pokud je tato změna dostatečně velká, může v postsynaptické buňce vyvolat akční potenciál. Dobře prostudovaným příkladem postsynaptického kanálu ovládaného nervovým mediátorem je *nervosvalový spoj* – specializovaný druh synapse mezi neuronem a svalovou buňkou. V tělech obratlovců je běžným mediátorem *acetylcholin* a příslušným chemicky ovládaným kanálem je už dříve probraný *acetylcholinový receptor* (viz obr. 12-18).

Obrázek 12-34 Synapse.

Elektronmikroskopický snímek (A) a kresba (B) příčného řezu dvou nervových zakončení (*žlutě*), která tvoří synapse na jediném dendritu nervové buňky (*modře*) v savčím mozku. Všimněte si, že presynaptické i postsynaptické membrány jsou v místě synapse zesílené.



Obrázek 12-35 Přeměna elektrického signálu v chemický v místě nervového zakončení. Jakmile akční potenciál dosáhne nervového zakončení, otevře elektricky ovládané Ca^{2+} -kanály v plasmatické membráně, a tak umožní vápenatým iontům proudit do zakončení nervové buňky. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} v nervovém zakončení stimuluje synaptické váčky k fúzi s presynaptickou membránou, při níž se uvolní v nich obsažený nervový mediátor do synaptické štěrbiny.



Obrázek 12-36 Přeměna chemického signálu v elektrický s pomocí mediátorem ovládaných iontových kanálů v synapsi. Uvolněný nervový mediátor se váže na chemicky regulované iontové kanály v plasmatické membráně postsynaptické buňky a otevírá je. Výsledné toky iontů mění membránový potenciál postsynaptické buňky, a tím převedou chemický signál zpět do elektrické podoby.

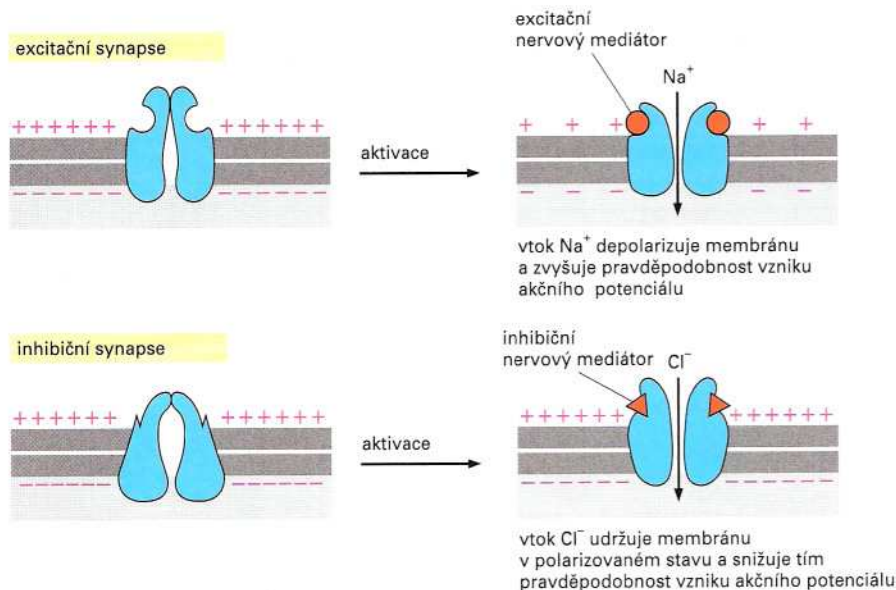
Otázka 12-8 Nemoc zvaná myasthenia gravis (těžká svalová ochablost) způsobuje, že lidské tělo vytváří protilátky proti vlastním molekulám receptorů acetylcholinu. Tyto protilátky se vážou na acetylcholinové receptory v plasmatické membráně svalových buněk a inaktivují je. Nemoc vede k rychle postupujícímu slábnutí pacientů. V raném stadiu může například činit potíže zdvihnutí očního víčka a u zvířecích modelů této nemoci mají králíci potíže s udržení svých uší ve vztyčené poloze. Jak nemoc pokračuje, většina svalů dále slábne a pacienti mají potíže s mluvením a polykáním. Nakonec může narušení dýchací činnosti způsobit smrt. Vysvětlete, který krok svalové funkce je postížen.

Neurony dostávají jak excitační tak inhibiční podněty

Odpověď vytvářená mediátorem v synapsi může být buď excitační nebo inhibiční. Některé nervové mediátory (dodávané axonovými konci *excitačních neuronů*) přimějí postsynaptickou buňku vyslat akční potenciál, zatímco jiné (uvolňované axonovými konci *inhibičních neuronů*) postsynaptickým buňkám ve „střelbě“ brání. Droga kurare, kterou chirurgové při operacích používají k uvolnění svalů, působí paralýzu blokováním dodávek excitačních signálů do nervosvalových spojů. Naproti tomu jed strychnin způsobuje svalové křeče a smrt zablokováním přívodu inhibičních signálů (speciálně glycinu).

Excitační a inhibiční mediátory se vážou na odlišné receptory a za to, zda dojde k excitaci nebo k inhibici, je zodpovědný právě receptor. Hlavními receptory excitačních mediátorů, především *aetylcholinu* a *glutamátu*, jsou iontové kanály, které umožňují průchod Na^+ a Ca^{2+} . Když se mediátor naváže, kanály se otevřou a umožní vtékání hlavně Na^+ , který depolarizuje plasmatickou membránu na hodnotu prahového potenciálu potřebného pro spuštění akčního potenciálu. Stimulace těchto receptorů tedy vede k aktivaci postsynaptické buňky. Receptory inhibičních mediátorů, především *kyseliny γ -aminomáselné* (GABA - anglicky *γ -aminobutyric acid*) a *glycinu* jsou naopak kanály pro Cl^- . Když se mediátor naváže, kanály se otevřou. V tomto okamžiku prochází do buňky jen velmi málo Cl^- , neboť hnací síla pro pohyb iontů Cl^- přes membránu je při klidovém membránovém potenciálu téměř nulová. Pokud jsou však otevřeny také sodné kanály, proudí do buňky Na^+ a značně vychýlí membránový potenciál od jeho klidové hodnoty. Tato změna způsobí pohyb Cl^- do buňky, kde neutralizují účinek přílivu Na^+ (obr. 12-37). Tímto způsobem inhibiční mediátory potlačují tvorbu akčního potenciálu tím, že učiní membránu cílové buňky odolnější proti depolarizaci. Struktury těchto čtyř mediátorů jsou ukázány v tabulce 12-3.

Většina přípravků používaných při léčbě nespavosti, úzkosti, deprese a schizofrenie působí na synapse v mozku a mnoho z nich se váže na chemicky ovládané iontové kanály. Barbituráty a uklidňující přípravky jako Valium, Halcium a Temazepam působí na GABA-ovládané chlori-



Obrázek 12-37 Rozdíl mezi signalizací ve vzrušivé a tlumivé synapsi. Vzrušivé (excitační) nervové mediátory aktivují iontové kanály, které umožňují průchod Na^+ a Ca^{2+} , zatímco tlumivé (inhibiční) nervové mediátory aktivují iontové kanály, které umožňují průchod Cl^-

dové kanály. Tato vazby ulehčí otevírání kanálů kyselinou γ -aminomáselnou, a tak učiní buňku citlivější vůči inhibičnímu účinku této kyseliny. Naopak antidepressivum Prozac blokuje zpětný příjem excitačního nervového mediátoru *serotoninu*, čímž zvyšuje množství serotoninu v synapsích, které tento mediátor využívají. Proč to zahání deprese, je zatím tajemstvím.

Počet různých typů mediátorových receptorů je značně velký, ačkoli spadají do několika málo rodin. Existuje například mnoho podtypů acetylcholinových, glutamátových, GABA-, glycinových a serotoninových receptorů; obvykle se vyskytují v různých neuronech a často se svými vlastnostmi liší jen nepatrně. S tak velkou řadou rozmanitých receptorů můžeme vytvořit novou generaci psychoaktivních látek, které budou více selektivně působit na specifická místa neuronů, aby zmírnily duševní nemoci, které ničí život tolika lidem. Například jedno procento lidské populace má schizofrenii a další jedno procento lidstva trpí manio-depresivními stavy.

Synaptické spoje nám umožňují myslet, jednat a vzpomínat

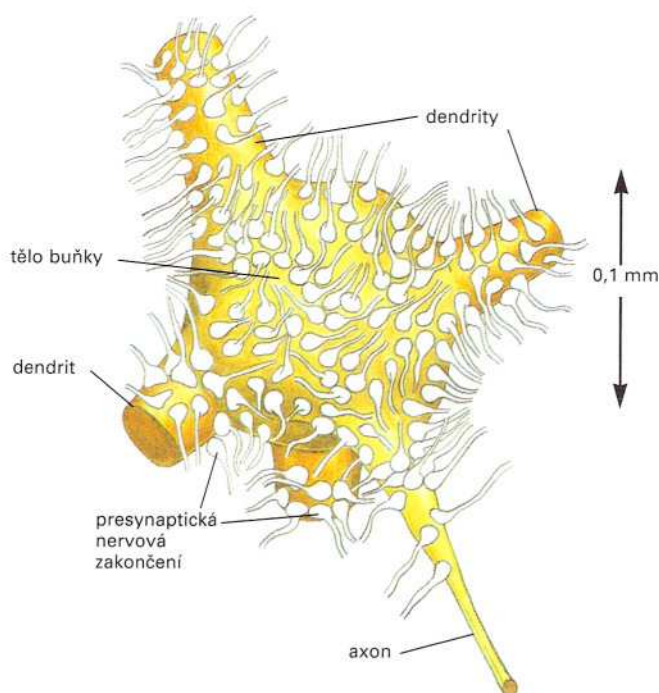
V chemické synapsi převádí nervové zakončení presynaptické buňky elektrický signál na chemický a postsynaptická buňka převádí chemický signál zpět na elektrický. Vzájemné působení mezi těmito ději, ať dobré či špatné, má pro nás nesmírný praktický význam. Proč však evoluce upřednostnila tento podle všeho neúčinný způsob předávání elektrického signálu? Zdálo by se účinnější mít přímý elektrický spoj mezi presynaptickou a postsynaptickou buňkou nebo odstranit synapsi docela a používat jednu nepřerušovanou buňku.

Hodnotu chemické synapse poznáme, vezmeme-li ji v úvahu v kontextu fungující nervové soustavy – obrovské sítě neuronů, spojených mezi sebou mnoha větvenými cestami, provádějící složité výpočty, ukládající do paměti a vytvářející plány činnosti. K výkonu těchto funkcí potřebují neurony dělat více, než jen vytvářet a uvolňovat signály: musí je také spojovat, překládat a zaznamenávat. Chemické synapse tyto činnosti umožňují. Například motorický neuron v míše přijímá vstupní signály ze stovek či tisíců jiných neuronů, které na něm vytvá-

Tabulka 12-3 Některé běžné nervové mediátory, které působí na chemicky ovládané iontové kanály

Nervový mediátor	Struktura	Účinek	Ionty procházející aktivovaným kanálem
Acetylcholin	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_3$	excitační	Na^+ a Ca^{2+}
Glutamát	$^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{NH}_3^+}{\text{CH}}-\text{COO}^-$	excitační	Na^+ a/nebo Ca^{2+}
Kyselina γ -aminomáselná	$^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	inhibiční	Cl^-
Glycin	$^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	inhibiční	Cl^-

řejí synapse (obr. 12-38). Některé z těchto signálů se snaží stimulovat neuron, zatímco jiné se ho snaží inhibovat. Motorický neuron má spojovat všechny obdržené informace a reagovat buď tak, že odešle podél svého axonu akční potenciály ke stimulaci svalů nebo zůstane v klidu. Tato úloha vyhodnocování zmatku vcházejících signálů v rozumný výstupní signál je řešena dokonalou souhrou mezi různými typy iontových kanálů v plasmatické membráně neuronu. Každý ze stovek typů neuronů ve vašem mozku má svou vlastní charakteristickou sadu receptorů a iontových kanálů, které buňce umožňují odpovídat zcela přesným způsobem na danou sadu vstupů, a tak plnit svou specializovanou úlohu. Iontové kanály a další složky synapse mohou navíc prodělávat neustálé změny podle toho, jak jsou používány, přičemž si uchovávají stopy posledních událostí. Tímto způsobem se ukládají



Obrázek 12-38 Synapse na těle buňky a dendritech motorického neuronu v míše. Mnoho tisíc nervových zakončení vytváří na neuronu synapse a přivádí z jiných částí těla signály, které ovládají spouštění akčních potenciálů podél axonu neuronu.

Tabulka 12–4 Některé příklady iontových kanálů

Iontový kanál	Typické místo výskytu	Funkce
Výtokový K ⁺ -kanál	plasmatická membrána většiny živočišných buněk	udržování klidového membránového potenciálu
Elektricky ovládaný Na ⁺ -kanál	plasmatická membrána axonu nervové buňky	vytváření akčních potenciálů
Elektricky ovládaný K ⁺ -kanál	plasmatická membrána axonu nervové buňky	návrat membrány do klidového stavu po vzniku akčního potenciálu
Elektricky ovládaný Ca ²⁺ -kanál	plasmatická membrána nervového zakončení	stimulace uvolnění nervového mediátoru
Acetylcholinový receptor (acetylcholinem regulovaný kanál pro Na ⁺ a Ca ²⁺)	plasmatická membrána svalových buněk (na neuromuskulárních spojích)	excitační synaptická signalizace
GABA-receptor (Cl ⁻ -kanál regulovaný kyselinou aminomáselnou (GABA))	plasmatická membrána mnoha neuronů (v synapsích)	inhibiční synaptická signalizace
Mechanicky aktivovaný kationtový kanál	vláskové buňky vnitřního ucha	detekce zvukových vibrací

informace do paměti. Iontové kanály jsou proto srdcem soustrojí, které vám umožňuje jednat, cítit, myslet, mluvit a – což je ze všeho nejdůležitější – číst a pamatovat si všechno v této knize.

Některé z iontových kanálů, které jsme probrali v této kapitole, jsou uvedeny i se svým umístěním a funkcí v tabulce 12-4.

Základní shrnutí

- Dvojná vrstva lipidů buněčných membrán je nepropustná pro většinu molekul rozpustných ve vodě a pro všechny ionty. Přenos živin, metabolitů a iontů přes plasmatickou membránu a přes vnitřní buněčné membrány zajišťují membránové transportní proteiny.
- Buněčné membrány obsahují celou řadu transportních proteinů, z nichž každý zodpovídá za přenos určitého typu solutu přes membránu. Existují dvě třídy transportních proteinů: přenašečové proteiny a kanálové proteiny.
- Gradient elektrochemického potenciálu představuje výslednou hnací sílu, která na ionty působí v jejich koncentračním gradientu a v elektrickém poli.
- Při pasivním transportu se nenabitý solut pohybuje spontánně z vrcholu svého koncentračního gradientu směrem dolů, tedy do míst o nižší koncentraci, a nabitý solut (ion) se samovolně pohybuje do míst, kde má nižší elektrochemický potenciál. Při aktivním transportu je nenabitý solut nebo ion přenášen proti spádu koncentrace nebo elektrochemického potenciálu v ději, který vyžaduje přísun energie.
- Přenašečové proteiny specificky vážou soluty (anorganické ionty či malé organické molekuly nebo obojí) a přenášejí je přes dvojnou vrstvu lipidů tak, že mění svou konformaci a vystavují vazebné místo pro solut nejprve na jedné a potom na druhé straně membrány.
- Přenašečové proteiny mohou fungovat jako pumpy a čerpat solut proti spádu jeho elektrochemického potenciálu. Přitom využívají energie pocházející z hydrolýzy ATP nebo z toku Na^+ či H^+ po spádu jejich elektrochemických potenciálů, nebo zcela výjimečně energie světla.
- Sodno-draselná pumpa v plasmatické membráně živočišných buněk je ATPáza, která aktivně odčerpává Na^+ ven z buňky a K^+ čerpá dovnitř, čímž udržuje strmý gradient Na^+ přes plasmatickou membránu. Tento gradient se používá k pohonu jiných aktivních transportních dějů a k vedení elektrických signálů.
- Kanálové proteiny utvářejí vodné póry přes dvojnou vrstvu lipidů; těmito kanály mohou difundovat soluty. Zatímco transport s pomocí přenašečových proteinů může být energeticky aktivní nebo

pasivní, transport kanálovými proteiny je vždy pasivní.

- Většina kanálových proteinů jsou selektivní iontové kanály, které umožňují anorganickým iontům vhodné velikosti a náboje průchod membránou po spádu jejich elektrochemického potenciálu. Transport iontovými kanály je nejméně 1000krát rychlejší než transport s pomocí jakéhokoli známého přenašečového proteinu.
- Většina iontových kanálů je uzavíratelná a otevírá se přechodně v odpovědi na specifické podněty, jakými jsou například změna membránového potenciálu (napětím ovládané kanály) či vazba ligandu (ligandem ovládané kanály).
- I když se iontové kanály působením specifického podnětu otevrou, nezůstávají otevřené pořád. Tyto kanály přecházejí náhodně mezi uzavřenou a otevřenou konformací a aktivující podnět zvětšuje podíl času, který kanál stráví v otevřeném stavu.
- Membránový potenciál je dán nerovnoměrnou distribucí elektrického náboje na obou stranách plasmatické membrány a mění se při průtoku iontů otevřenými kanály. Ve většině živočišných buněk udržují selektivní draselné kanály klidový membránový potenciál na záporné hodnotě, blízko stavu, kdy jsou hnací síly pro pohyb iontů K^+ přes membránu téměř nulové.
- Neurony šíří signály v podobě akčních potenciálů, které putují na dlouhé vzdálenosti podél axonu, aniž by ztrácely na intenzitě. Akční potenciály jsou obvykle zprostředkovány napětově uzavíratelnými sodnými kanály, které se otevírají v odpověď na depolarizaci plasmatické membrány.
- Napětím ovládané Ca^{2+} -kanály v nervových zakončeních spřahují elektrické signály s uvolněním nervových mediátorů v synapsích. Chemicky regulované kanály převádějí tyto chemické signály zpět na elektrické signály v postsynaptických cílových buňkách.
- Excitační nervové mediátory otevírají chemicky ovládané kanály propustné pro Na^+ , a tím depolarizují membránu postsynaptické buňky směrem k prahovému potenciálu potřebnému pro vyslání akčního potenciálu. Inhibiční mediátory otevírají chemicky ovládané chloridové kanály, a tak potlačují vyslání akčních potenciálů tím, že udržují membránu postsynaptické buňky polarizovanou.

Klíčové pojmy

akční potenciál	mechanicky ovládané kanály	nervové zakončení	synapse
aktivní transport	chemicky ovládané iontové kanály	nervový mediátor	synaptický váček (synaptosom)
axon	membránový potenciál	neuron	záznam z terčíkového zámku
gradient elektrochemického potenciálu	membránový transportní protein	osmotický tlak	
iontová síla	napětím ovládané kanály	osmoza	
kanálový protein	napětím ovládaný sodný kanál	pasivní transport	
ligandy ovládané kanály		přenašečový protein	
		sodno-draselná pumpa	

13 Získávání energie v mitochondriích a chloroplastech

Z geologických výzkumů vyplývá, že v době počátků života na Zemi se v atmosféře nevyskytoval žádný kyslík. Jednou z cest, která buňkám umožňovala růst a přežití v takových podmínkách, bylo odbourávání organických molekul z předchozích geologických procesů, například nějakou formou anaerobního kvašení (fermentace). Jak jsme probrali v kapitole 4, fermentační reakce probíhají u současných buněk v cytosolu. Tyto reakce využívají energii z částečné oxidace energeticky bohatých molekul potravy ke tvorbě ATP, „chemicko-energetické měny buněk“. Již v rané fázi historie života se však objevil jiný, mnohem účinnější způsob získávání energie a syntézy ATP, který je založen na transportu elektronů v membránách. O miliardy let později se stal natolik závažným pro pokračování života na Zemi, že mu věnujeme celou tuto kapitolu. Jak uvidíme, buňky tento mechanismus využívají k získávání energie z celé řady zdrojů: je například ústřední částí přeměny světelné energie v energii chemické vazby při fotosyntéze a v aerobním dýchání (respiraci), které nám umožňuje využívat kyslík k vytváření velkých množství ATP z molekul potravy.

Nástup tohoto mechanismu přeměny energie měl obrovský vliv na historii života na Zemi. Země je stará 4,6 miliardy let. Fosilie z doby před 3,5 miliardami let napovídají, že již tenkrát existovaly fotosyntetické bakterie, které produkovaly kyslík (obr. 13-1). Potomstvo těchto buněk naplnilo za další dvě miliardy let atmosféru plynným kyslíkem (O_2) a zaplnilo každý kout a každou štěrbinu země a oceány úžasným zvěřincem všech možných forem života.

Odkud přicházíme a jaký je náš vztah k ostatním živým tvorům – tyto otázky fascinovaly lidstvo již od samého počátku jeho dějin. Vývoj života, jak ho dnes chápeme, je načrtnut na obrázku 13-2. Tento příběh, sestavený díky nekonečné řadě vědeckých výzkumů, je jedním z nejnapínavějších vyprávění, jaká kdy vyšla z lidských úst. A ještě nejsme hotovi. Každý rok nám další objevy v buněčné biologii umožňují přidávat další podrobnosti – výsledky molekulárně detektivní práce, jejíž prostředky jsou stále mocnější. Nejdůležitějším pro rozvoj života bylo zabezpečení dostatečného zdroje energie pro buňky. Nyní probereme pozoruhodný mechanismus, který to všechno umožnil.

- Buňky získávají většinu své energie mechanismem vázaným na membrány

MITOCHONDRIE A OXIDAČNÍ FOSFORYLACE

- Mitochondrie obsahuje dva membránové oddíly
- Vysokoenergetické elektrony jsou generovány v cyklu kyseliny citronové
- Elektrony jsou přenášeny v řetězci proteinů ve vnitřní membráně mitochondrie
- Přenos elektronů dává vznik protonovému gradientu přes membránu
- Protonový gradient pohání syntézu ATP
- Spřažený transport přes vnitřní mitochondriální membránu je poháněn gradientem elektrochemického potenciálu protonů
- Protonové gradienty vytvářejí většinu buněčného ATP
- Rychlá přeměna ADP na ATP v mitochondriích udržuje v buňce vysoký poměr ATP:ADP

ELEKTRONTRANSPORTNÍ ŘETĚZCE A ČERPÁNÍ PROTONŮ

- Protony se snadno pohybují v důsledku přenosu elektronů
- Redoxní potenciál je měřítkem elektronové afinity
- Přenos elektronů uvolňuje velké množství energie
- Kovy vázané na proteiny tvoří nejrůznější přenašeče elektronů
- Protony jsou čerpány přes membránu třemi dýchacími enzymovými komplexy
- Dýchání je obdivuhodně účinné

CHLOROPLASTY A FOTOSYNTÉZA

- Chloroplasty připomínají mitochondrie, ale mají samostatný oddíl
- Chloroplasty zachycují energii slunečního světla a s její pomocí vážou uhlík
- Excitované molekuly chlorofylu fungují jako nálevka a svádějí energii do reakčního centra
- Světelná energie pohání syntézu ATP a NADPH
- Fixace uhlíku je katalyzována ribulosabisfosfátkarboxylázou
- Fixací uhlíku v chloroplastech se tvoří sacharosa a škrob
- Genetický aparát mitochondrií a chloroplastů odráží jejich prokaryontní původ

NAŠI JEDNOBUNĚČNÍ PŘEDKOVÉ

- Sekvence RNA vydávají svědectví o průběhu evoluce
- Dávne buňky zřejmě vznikly v horkém prostředí
- *Methanococcus* žije v temnotě a živí se pouze anorganickými látkami



(A)

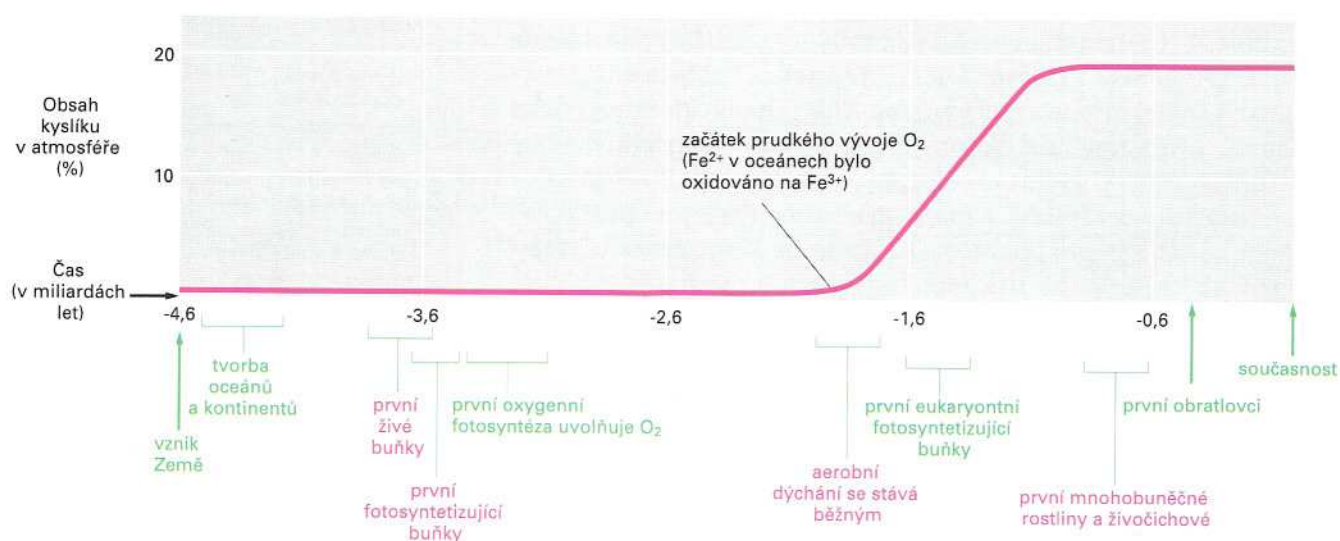


(B)



(C)

Obrázek 13-1 Mikroorganismy, které při fotosyntéze vytvářejí kyslík, změnilly pozemskou atmosféru. (A) Živé stromatolity z laguny v západní Austrálii. Tyto útvary jsou výsledkem činnosti velkých kolonií fotosyntetizujících sinic, které vytvářejí kyslík; ty postupně ukládají stále nové vrstvy materiálu, a vznikají jen v určitém prostředí. (B) Příčný řez současným stromatolitem ukazuje jeho vrstevnatou strukturu. (C) Příčný řez fosilním stromatolitem ve skále staré 3,5 miliardy let. Všimněte si vrstevnaté struktury podobné struktuře z části (B). Fosilní stromatolity zřejmě vznikly působením fotosyntetických bakterií, které se značně podobaly současným sinicím. Činnost takových bakterií, které uvolňovaly plynný O_2 jako hojný produkt fotosyntézy, postupně změnila pozemskou atmosféru.



Obrázek 13-2 Některé hlavní jevy, ke kterým zřejmě došlo během evoluce živých organismů na Zemi. S vývojem membránového procesu fotosyntézy se organismy stávaly nezávislými na již existujících organických látkách a mohly už vytvářet vlastní organické molekuly z plynného CO_2 . Více než miliardu let od výskytu bakterií, které při fotosyntéze štěpily vodu a uvolňovaly kyslík, se uvolňovaný O_2 spotřebovával na oxidaci železnatých iontů (Fe^{2+}) v raných oceánech; teprve potom začal kyslík v atmosféře postupně přibývat, až dosáhl současné koncentrace. Železnaté ionty v mořích odčerpávaly při své oxidaci vzdušný kyslík a daly vznik ohromným zásobám oxidu železitého, který se dnes nachází v některých skalách. Membránové aerobní dýchání podle všeho vzniklo jako odpověď na vzrůstající koncentraci kyslíku v ovzduší. Koncentrace O_2 v atmosféře se postupně ustálila poté, co se objevily i organismy neznající fotosyntézu, které kyslík spotřebovávaly,

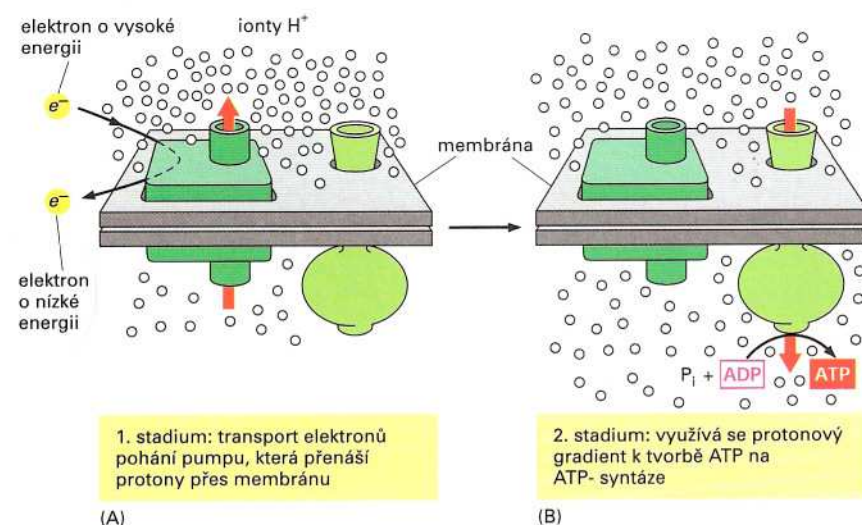
Buňky získávají většinu své energie mechanismem vázaným na membrány

Hlavním chemicko-energetickým platidlem v buňkách je ATP (viz obr. 3-25). V eukaryontních buňkách vznikají malá množství ATP při glykolýze v cytosolu (jak jsme probrali v Kapitole 4); většina ATP se však tvoří při membránových dějích v mitochondriích (a také v chloroplastech v rostlinách a v řasách). Velmi podobné děje probíhají také v buněčných membránách mnoha bakterií. Základní mechanismus, který je využíván při tvorbě všeho tohoto ATP, vznikl v rané fázi vývoje života a byl tak úspěšný, že se jeho základní znaky zachovaly po celé dlouhé cestě evoluce od raných prokaryot až po dnešní buňky. Děj sestává ze dvou na sebe navazujících fází, z nichž obě zajišťuje proteinový komplex vázaný v membráně.

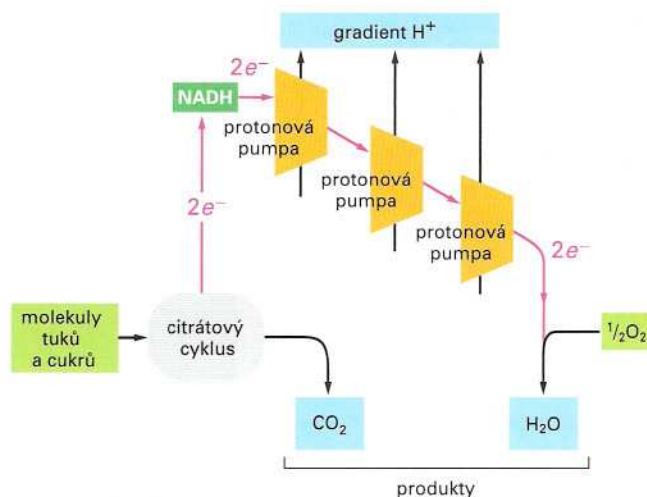
Fáze 1. Elektrony pocházející z oxidace molekul potravy nebo z jiných zdrojů, probíraných později, jsou přenášeny řadou přenašečů elektronů (zvanou také *elektrontransportní řetězec*) zanořenou v membráně. Při těchto přenosech elektronů se uvolňuje energie, která se využívá k čerpání protonů (H^+ pocházejících z vody, která je v buňce všudypřítomná) přes membránu; tak vzniká gradient elektrochemického potenciálu protonů. Jak jsme probrali v Kapitole 12, iontový gradient přes membránu je formou uložené energie. Tato energie může být získána a využita k užitečné práci, když iontům umožníme proudit zpět přes membránu do míst, kde je jejich elektrochemický potenciál nižší.

Fáze 2. H^+ proudí zpět po spádu svého elektrochemického potenciálu proteinovým komplexem zvaným *ATP-syntáza*, který katalyzuje enzymovou syntézu ATP z ADP a z anorganického fosfátu (P_i). Tento všudypřítomný enzym funguje jako turbína, která umožňuje protonovému gradientu pohánět produkci ATP (obr. 13-3).

Spojení přenosu elektronů, čerpání protonů a syntézy ATP bylo při svých prvních zveřejněních v šedesátých letech nazváno *chemiosmotická hypotéza* díky spřažení reakcí vytvářejících chemickou vazbu při syntéze ATP („chemi“) a membránově-transportních dějů („osmotický“, z řeckého *osmos*, „tlačit“). Nyní je známo jako **chemiosmotické spřažení**.



Obrázek 13-3 Získávání energie pro život. (A) Základní vybavení pro chemiosmózu tvoří membrána, ve které je zanořena proteinová pumpa a ATP-syntáza, a zdroje vysokoenergetických elektronů (e^-) a protonů (H^+). Pumpa využívá energii získanou při přenosu elektronů (detaily zde nejsou uvedeny) k čerpání protonů pocházejících z vody a k vytváření protonového gradientu přes membránu. (B) Tento gradient slouží jako zásoba energie, kterou lze využít k pohonu syntézy ATP v ATP-syntáze. Červená šipka ukazuje směr pohybu protonů v každém stadiu.



Obrázek 13-4 Čerpání protonů v mitochondriích. Na obrázku je ukázáno jen první stadium chemiosmotického spřažení. Vstupující látky jsou vyznačeny světle zeleně, produkty modře a tok elektronů ukazují červené šipky.

Základní chemiosmotický mechanismus načrtnutý na obrázku 13-3 využívá naprostá většina živých organismů, přičemž jako zdroj elektronů, které pohánějí čerpání protonů, může sloužit celá řada různých látek. Chemiosmotické spřažení je například ústřední reakcí v aerobním dýchání, které produkuje ATP v mitochondriích a v anaerobních bakteriích. Elektrony zde původně pocházejí z oxidace glukosy nebo mastných kyselin (probírané v Kapitole 4) a konečným příjemcem elektronů je molekulární kyslík (O_2). Jako vedlejší produkt přitom vzniká voda (obr. 13-4). Při fotosyntéze jsou elektrony potřebné pro chemiosmotické spřažení získávány při působení světla na zelené barvivo chlorofyl. Jisté bakterie získávají své vysokoenergetické elektrony, které potřebují k syntéze ATP, z anorganických látek, například z vodíku, železa a síry.

Chemiosmotické spřažení se nejprve vyvinulo u bakterií. Proto zřejmě nepřekvapí, že aerobní eukaryotní buňky získaly podle všeho bakteriální chemiosmotické mechanismy nezměněné: nejprve pohlcením bakterií, z nich se staly mitochondrie, a o něco později – v liniích vedoucích k řasám a rostlinám – pohlcením sinic za vzniku chloroplastů, jak je popsáno v Kapitole 1.

V této kapitole pojednáme o získávání energie v mitochondriích a chloroplastech, přičemž zdůrazníme obecná pravidla, podle nichž se v těchto organelách a bakteriích vytváří a využívá protonový gradient. Začneme popisem stavby a funkce mitochondrií a podíváme se podrobně na děje, které se odehrávají v mitochondriální membráně a vedou ke vzniku protonového gradientu a tvorbě ATP. Potom probereme fotosyntézu tak, jak se vyskytuje v chloroplastech rostlinných buněk. Na konci kapitoly se podíváme na způsob života některých našich jednobuněčných předchůdců.

Mitochondrie a oxidační fosforylace

Mitochondrie jsou přítomny skoro ve všech eukaryotních buňkách – u rostlin, živočichů a ve většině eukaryotních mikroorganismů, a právě v těchto organelách se vytváří většina buněčného ATP. Jak jsme si říkali v Kapitole 4, mitochondrie zpracovávají acetylové skupiny v cyklu kyseliny citronové, přičemž produkují NADH – aktivované nosičové molekuly nesoucí vysokoenergetické elektrony, a jako ved-

Otázka 13-1 Dinitrofenol (DNP) je malá molekula, která zvyšuje prostupnost membrán pro protony. Po roce 1940 byla malá množství této vysoce toxické sloučeniny podávána pacientům pro snížení hmotnosti. DNP fungoval při snižování hmotnosti skvěle, zvláště při odstraňování tukových rezerv. Co podle vás mohlo působit takové ztráty tuku? Nepříjemným vedlejším účinkem však byla zvýšená teplota a úporné pocení během léčby. Vysvětlete tyto symptomy.

lepší produkt CO_2 . NADH předává své vysokoenergetické molekuly do elektrontransportního řetězce v mitochondriální membráně a sám přechází do oxidovaného stavu NAD^+ . Elektrony jsou rychle předávány v řetězci a k molekulárnímu kyslíku (O_2) za vzniku vody (H_2O). Energie uvolněná při průchodu elektronů elektrontransportním řetězcem se využívá k čerpání protonů (viz obr. 13-4); protonový gradient naopak pohání syntézu ATP, čím doplňuje chemiosmotický mechanismus. Tento děj zahrnuje jak spotřebu O_2 tak připojení fosforylové skupiny k ADP, a proto se mu říká **oxidační fosforylace** (obrázek 13-5).

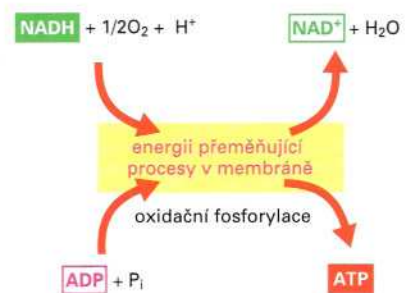
Stejné pochody se odehrávají v aerobních bakteriích, které nevládní mitochondrie; zde zajišťuje chemiosmotické děje plasmatická membrána. Na rozdíl od bakteriální buňky, která musí zajišťovat také řadu jiných funkcí, se však mitochondrie úzce specializovala na získávání energie, jak uvidíme později.

Mitochondrie obsahuje dva membránové oddíly

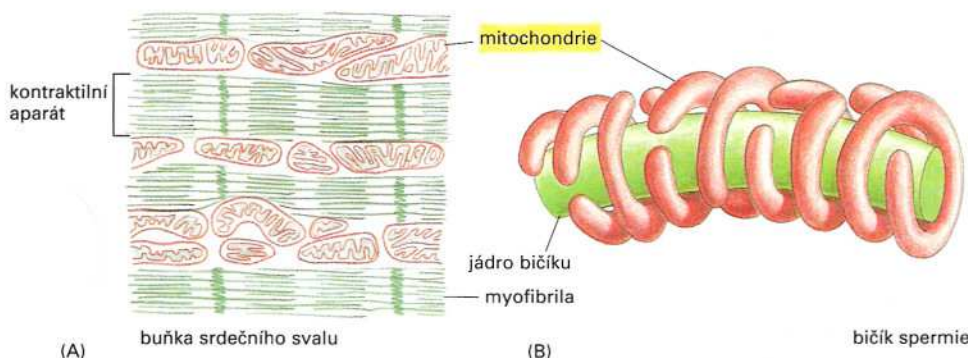
Mitochondrie jsou obecně podobné bakteriím svou velikostí a tvarem, i když se jedno i druhé může měnit v závislosti na typu buňky. Obsahují svou vlastní DNA a RNA a uskutečňují transkripci a translaci včetně použití vlastních ribosomů, které jim umožňují syntetizovat některé ze svých vlastních proteinů. Zrychlené záběry živých buněk ukazují mitochondrie jako pozoruhodně pohyblivé organely, které neustále mění tvar a polohu. Jsou v buňce přítomny ve velkém množství a ve spojení s mikrotubuly cytoskeletu (viz Kapitola 16) mohou vytvářet dlouhé pohybující se řetězce. V jiných buňkách zůstávají vázány v jednom místě buňky, aby dodávaly ATP přímo do míst jeho vysoké spotřeby. Například v buňce srdečního svalu jsou mitochondrie umístěny blízko kontraktálního aparátu, zatímco ve spermii jsou těsně ovinuty kolem hnacího bičíku (obr. 13-6).

Každá mitochondrie má dvě membrány, vnitřní a vnější, které hrají klíčovou roli v mitochondriálních dějích. Tyto membrány vytvářejí dva mitochondriální oddíly: velký vnitřní prostor zvaný **matrix** a mnohem užší **mezimembránový prostor** (obr. 13-7). Pokud izolované mitochondrie rozdělíme diferenciací centrifugací (viz panel 5-4, str. 160-161) na jednotlivé složky, můžeme určit biochemické složení každé z obou membrán a jimi vymezených prostorů. Každá část obsahuje jedinečnou sbírku proteinů.

Vnější membrána obsahuje mnoho molekul transportního proteinu zvaného porin, který – jak je popsáno v Kapitole 11 – tvoří vodné



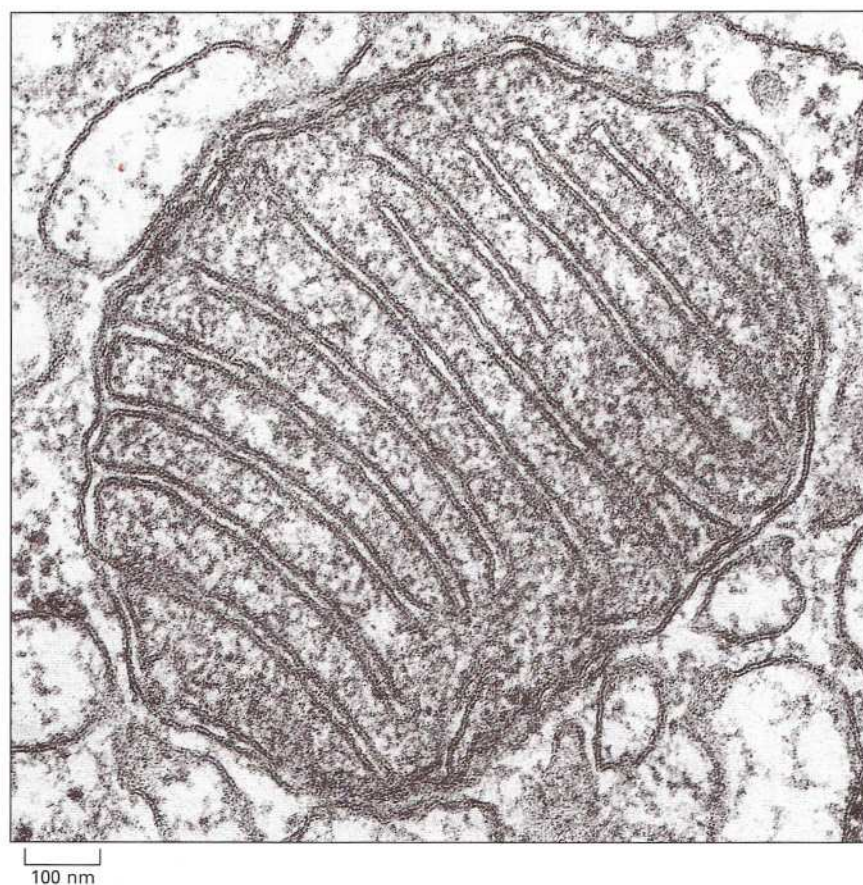
Obrázek 13-5 Hlavní přeměna energie katalyzovaná mitochondrií. V oxidační fosforylaci se energie uvolněná při oxidaci NADH na NAD^+ celou řadou procesů v membráně (přenos elektronů, čerpání protonů, tok protonů ATP-syntázou) ukládá do energeticky náročné fosforylace ADP za vzniku ATP. Vysokoenergetické elektrony uvolněné z NADH se pohybují podél elektrontransportního řetězce v membráně a nakonec se spojují s molekulovým kyslíkem a s H^+ za vzniku vody. Výsledná rovnice pro tento přenos elektronu je $\text{NADH} + \frac{1}{2}\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$, s dvěma elektrony přecházejícími z NADH na kyslík (viz obr. 13-4).



Obrázek 13-6 Umístění mitochondrií blízko míst vysoké spotřeby ATP. (A) V buňce srdečního svalu jsou mitochondrie umístěny blízko kontraktálního aparátu. (B) Ve spermii jsou mitochondrie umístěny okolo ústřední části hnacího bičíku, který ke svému pohybu vyžaduje ATP.

kanály dvojnou vrstvou lipidů. Proto je vnější membrána propustná jako síto pro všechny molekuly až do 5000 daltonů nebo o něco méně včetně malých proteinů. To činí mezimembránový prostor vzhledem k malým molekulám, které obsahuje, chemicky ekvivalentním cytosolu. Naopak *vnitřní membrána*, podobně jako další membrány v buňce, je nepropustná pro ionty a většinu malých molekul, kterým mohou zajistit průchod jen membránové transportní proteiny. Mitochondriální matrix proto obsahuje pouze ty molekuly, které do ní mohou být selektivně přenášeny přes vnitřní membránu; obsah matrix je vysoce specifický.

Vnitřní mitochondriální membrána je místem přenosu elektronů a čerpání protonů a obsahuje ATP-syntázu. Většina proteinů zanoře-



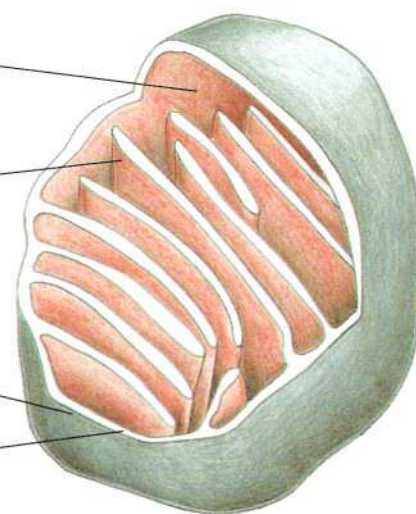
Obrázek 13-7 Obecné uspořádání mitochondrie. Každá ze čtyř oblastí v mitochondrii obsahuje unikátní sadu proteinů, která každému oddílu umožňuje plnit jeho specifické funkce. V jaterních mitochondriích je zhruba 67 % celkového mitochondriálního proteinu soustředěno v matrix, zatímco dalších 21 % se nachází ve vnitřní membráně, 6 % ve vnější membráně a 6 % v mezimembránovém prostoru.

Matrix. Velký vnitřní objem obsahuje vysoce koncentrovanou směs enzymů, včetně těch, které se účastní oxidace pyruvátu a mastných kyselin i v citrátovém cyklu. Matrix též obsahuje několik identických kopií mitochondriálního genomu, speciálních mitochondriálních ribosomů, tRNA a různých enzymů pro translaci mitochondriálních mRNA.

Vnitřní membrána. Vnitřní membrána (růžově) je poskládána do četných hran (krist), které výrazně zvětšují její povrch. Obsahuje proteiny s trojí funkcí. (1) Ty, které se účastní oxidačních reakcí v transportu elektronů; (2) ATP-syntázu, která produkuje ATP do matrix; (3) transportní proteiny, které umožňují vstup a výstup metabolitů z matrix. Elektrochemický potenciál H^+ , který pohání ATP-syntázu, tvoří gradient přes membránu, takže ta je zřejmě nepropustná vůči iontům.

Vnější membrána. Protože tato membrána obsahuje velký kanálový protein zvaný porin, je permeabilní vůči všem molekulám do velikosti 5 kDa. Další proteiny této membrány zahrnují enzymy mitochondriální syntézy lipidů a enzymy, které přeměňují lipidy na formy, které jsou pak metabolizovány v matrix.

Mezimembránový prostor. V tomto prostoru (bíle) jsou uloženy enzymy, které využívají ATP vypuzovaný z matrix k fosforylaci dalších nukleotidů.



ných ve vnitřní mitochondriální membráně tvoří části elektrontransportního řetězce potřebného k oxidační fosforylaci. Tato membrána má odlišné lipidové složení a obsahuje také celou řadu transportních proteinů, které umožňují vstup vybraných malých molekul, jako pyruvátu a mastných kyselin, do matrix.

Vnitřní membrána obvykle tvoří řadu záhybů známých jako *kristy* (jednotné číslo *krista*), které zasahují do prostoru matrix a značně zvětšují povrch vnitřní membrány mitochondrie (viz obr. 13-7). Tím je také zajištěn velký povrch, na kterém může probíhat syntéza ATP. Například v játrech tvoří vnitřní membrány všech mitochondrií asi jednu třetinu všech membrán v buňce.

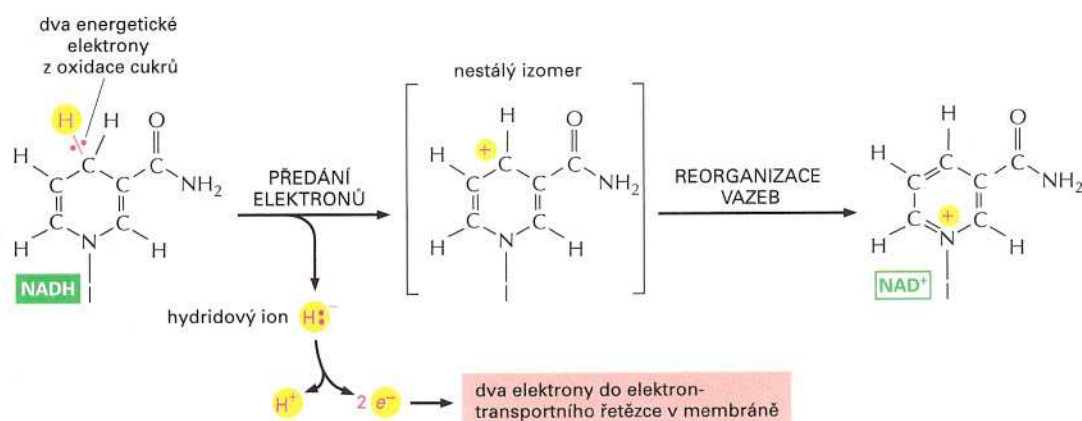
Vysokoenergetické elektrony jsou generovány v cyklu kyseliny citronové

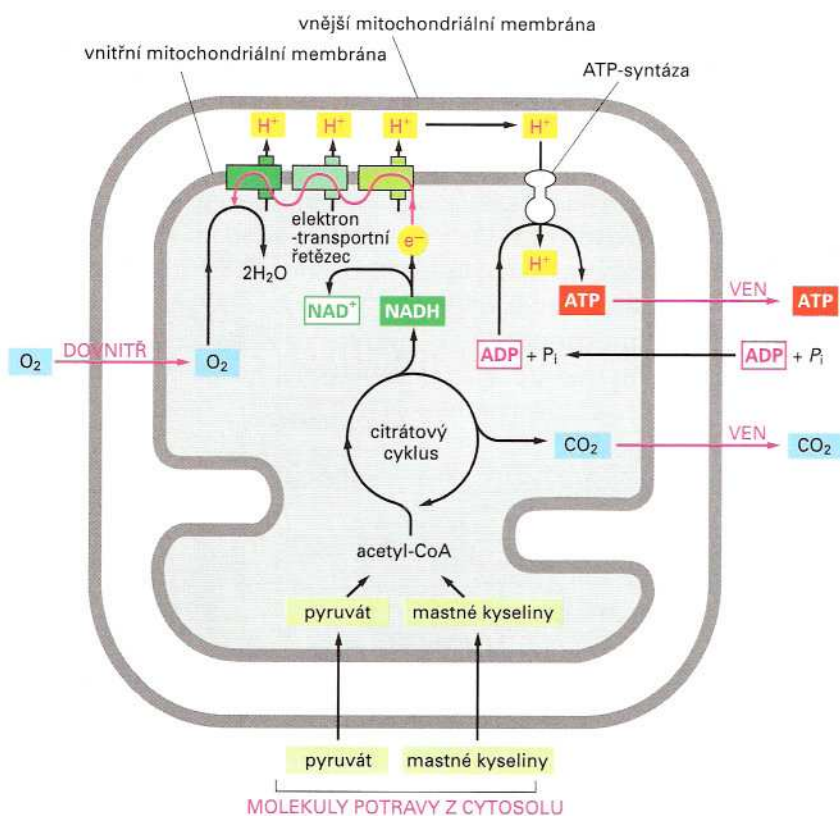
Mitochondrie byly nepostradatelné pro evoluci mnohobuněčných živočichů a rostlin. Bez nich by byla dnešní eukaryota v celé své produkci ATP závislá na poměrně neúčinné glykolýze (popsané v Kapitole 4) a zdá se nepravděpodobné, že by se složité mnohobuněčné organismy mohly udržovat při životě tímto způsobem. Při přeměně glukosy na pyruvát glykolytickou cestou se uvolní méně než 10 % veškeré potenciálně dostupné volné energie. V mitochondriích se metabolismus cukrů doplňuje a volná energie se „sklízí“ tak úspěšně, že na jednu molekulu oxidované glukosy se získá asi 30 molekul ATP. Naopak při glykolýze se na jednu molekulu glukosy získají jen dvě molekuly ATP.

Mitochondrie využívají jako palivo jak pyruvát tak mastné kyseliny. Pyruvát pochází z glukosy nebo z jiných cukrů a mastné kyseliny pocházejí z tuků. Molekuly obou těchto paliv jsou přenášeny přes vnitřní mitochondriální membránu a poté jsou převedeny na klíčový metabolický meziprodukt *acetylkoenzym A* enzymy, které se nacházejí v mitochondriální matrix (viz str. 121). Acetylové skupiny v molekulách acetyl-CoA jsou potom v matrix oxidovány v cyklu kyseliny citronové. Cyklus produkuje CO_2 , který se z buňky uvolňuje jako vedlejší produkt, a generuje vysokoenergetické elektrony, nesené aktivovanými nosičovými molekulami NADH a FADH_2 (obr. 13-8). Tyto vysokoenergetické elektrony jsou potom přenášeny do vnitřní mitochondriální membrány, kde vstupují do elektrontransportního řetězce. Ztrátou elektronů se obnoví NAD^+ a FAD^+ , které

Otázka 13-2 Snímek z elektronového mikroskopu ukazuje, že mitochondrie v srdečním svalu mají mnohem vyšší hustotu přepážek (krist) než mitochondrie v buňkách kůže. Navrhněte vysvětlení pro tuto skutečnost.

Obrázek 13-8 Jak NADH odevzdává své elektrony. Na této kresbě jsou vysokoenergetické elektrony vyznačeny jako dvě červené tečky na žlutém vodíkovém atomu. Hydridový ion (vodíkový atom s jedním elektronem navíc) se odděluje od NADH a je převáděn na proton a dva vysokoenergetické elektrony: $\text{H}^- \rightarrow \text{H}^+ + 2e^-$. Zobrazen je jen kruh, který nese elektrony ve vysokoenergetické vazbě; na úplnou strukturu a přeměnu NAD^+ zpět na NADH se můžete podívat na obrázku 3-28, kde je zobrazen bližce příbuzný NADPH. Elektrony se také podobně přenášejí s pomocí FADH_2 , jehož struktura je na obrázku 4-12B.





Obrázek 13-9 Souhrn energetického metabolismu v mitochondriích. Pyruvát a mastné kyseliny vstupují do mitochondrie (*zespoda*), jsou odbourány na acetylkoenzym A a poté metabolizovány v cyklu kyseliny citronové, kde se NAD^+ redukuje na NADH a FAD^+ na FADH_2 (druhá reakce není ukázána). V oxidační fosforylaci se potom vysokoenergetické elektrony z NADH (a z FADH_2) přenášejí v elektrontransportním řetězci ve vnitřní membráně na kyslík (O_2). Tento transport elektronů vytváří protonový gradient přes vnitřní membránu, který se využívá k pohonu tvorby ATP s pomocí ATP-syntázy

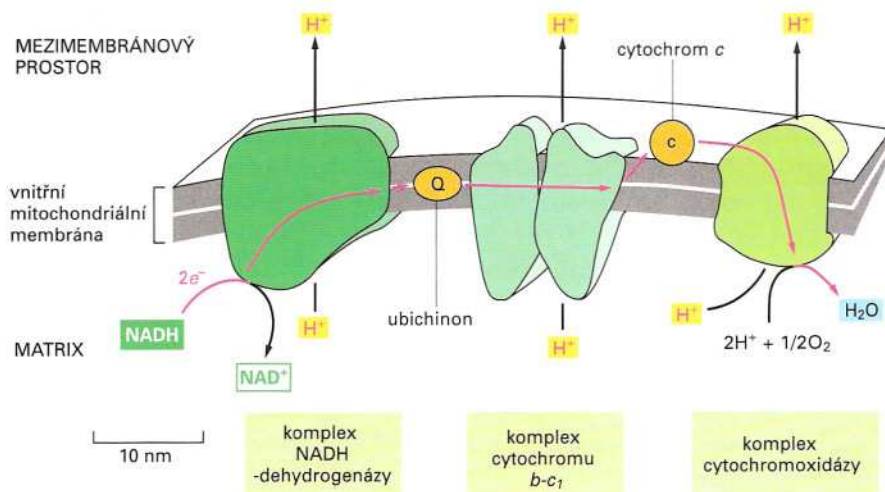
jsou potřebné pro nepřetržitý oxidační metabolismus. Nyní začíná přenos elektronů v řetězci. Celý sled reakcí je uveden na obrázku 13-9.

Elektrony jsou přenášeny v řetězci proteinů ve vnitřní membráně mitochondrie



Elektrontransportní řetězec, který zajišťuje oxidační fosforylaci, se nachází v mnoha kopiích ve vnitřní mitochondriální membráně; je také známý jako *dýchací řetězec*. Obsahuje více než 40 proteinů, z nichž asi 15 je přímo zapojeno do přenosu elektronů. Většina z těchto proteinů je zanořena do lipidové dvojné vrstvy a funguje jen v neporušené membráně, což značně znesnadňuje jejich studium. Avšak složky elektrontransportního řetězce, stejně jako ostatní membránové proteiny, lze převést do roztoku s pomocí neiontových detergentů (viz obr. 11-28), přechistit a znovu sestavit do „provozního“ tvaru v malých membránových váčcích. Takové studie prozrazují, že většina proteinů mitochondriálního elektrontransportního řetězce je seskupena do tří velkých *dýchacích enzymových komplexů*, z nichž každý obsahuje mnoho jednotlivých proteinů. Každý komplex zahrnuje transmembránové proteiny, které drží celý proteinový komplex pevně ve vnitřní mitochondriální membráně.

Tři dýchací enzymové komplexy jsou: (1) *NADH-dehydrogenázový komplex*, (2) *komplex cytochromů b-c₁* a (3) *cytochromoxidázový komplex*. Každý z komplexů obsahuje kovové ionty a další chemické skupiny, které tvoří dráhu pro průchod elektronů komplexem. Dýchací komplexy jsou místy čerpání protonů a každý z nich může být vnímán jako proteinový stroj, který při přenosu elektronů čerpá napříč membránou protony.



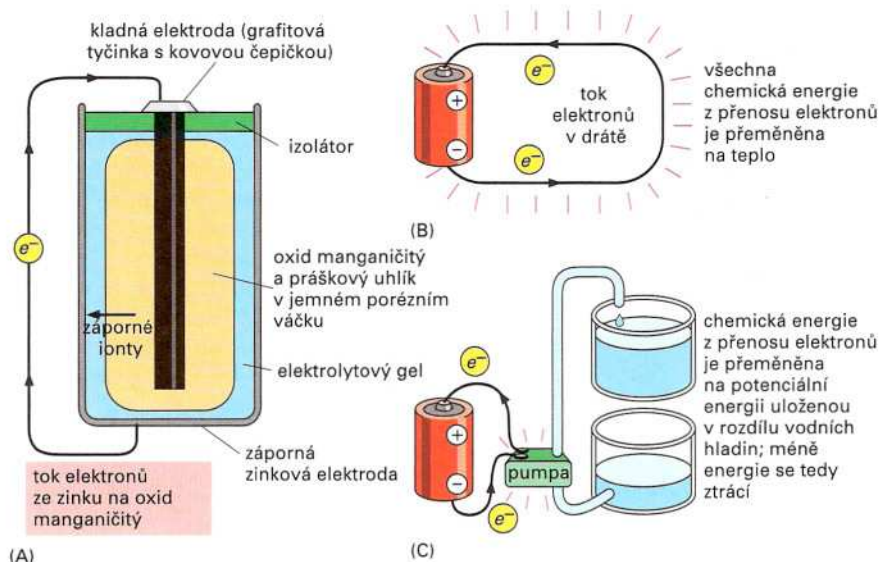
Obrázek 13-10 Přenos elektronů přes tři dýchací enzymové komplexy ve vnitřní mitochondriální membráně. Je ukázána relativní velikost a tvar každého komplexu. Během přenosu elektronů z NADH na kyslík (červené šipky) každý z dýchacích enzymových komplexů čerpá přes membránu protony pocházející z vody. Ubichinon (Q) a cytochrom *c* (c) slouží jako pohyblivé přenašeče, které dopravují elektrony od jednoho komplexu ke druhému. Strukturu a úlohu těchto dvou molekul probereme později (viz obrázky 13-20 a 13-23).

Přenos elektronů začíná odebráním hydridového iontu (H^-) z NADH a jeho převedením na proton a dva vysokoenergetické elektrony: $\text{H}^- \rightarrow \text{H}^+ + 2e^-$, jak bylo u vysvětleno na obrázku 13-8. Jak ukazuje obrázek 13-10, je tato reakce katalyzována prvním z dýchacích enzymových komplexů – NADH-dehydrogenázou, která elektrony přijímá. Elektrony jsou potom předávány v řetězci k dalším enzymovým komplexům s pomocí pohyblivých přenašečů elektronů, které popíšeme později. Přenos elektronů v řetězci je energeticky příznivý: elektrony začínají s velmi vysokou energií a tuto energii při každém kroku řetězcem ztrácejí, až nakonec vstoupí do cytochromoxidasy, kde se spojí s molekulou O_2 za vzniku vody. Tento krok buněčného dýchání vyžaduje kyslík a využívá právě ten kyslík, který dýcháme.

Přenos elektronů dává vznik protonovému gradientu přes membránu

Proteiny dýchacího řetězce vedou elektrony tak, že se pohybují v přesném pořadí od jednoho enzymového komplexu k dalšímu – žádnou zkratkou, která by některý z komplexů vynechala. Každý přenos elektronů představuje oxidačně-redukční reakci: jak je popsáno v Kapitole 3, molekula či atom poskytující elektron se oxiduje, zatímco molekula či atom, který elektron přijímá, se redukuje (viz str. 84). Elektrony budou proudit samovolně z molekuly, která má pro dostupné elektrony jen malou afinitu a tak je snadno ztrácí, k molekule, jejíž elektronová afinita je větší. Například NADH se svými vysokoenergetickými elektrony má nízkou elektronovou afinitu, takže se jeho elektrony snadno přenášejí na NADH-dehydrogenázu. Běžné elektrické baterie jsou založeny na podobném přenášení elektronů mezi dvěma chemickými látkami s rozdílnou elektronovou afinitou.

Pokud chybí některý z výše uvedených nástrojů na zachycování energie uvolňované při přenosu elektronů, změní se tato energie jednoduše v teplo. Ale stejně jako může být baterie připojena k zařízení, které čerpá vodu (obr. 13-11), získává buňka mnoho z energie přenosu elektronu tím, že umísťuje transport elektronů do proteinů, které čerpají protony (H^+). Každý z enzymových dýchacích komplexů spřahuje energii uvolněnou při přenosu elektronu přes něj s příjmem

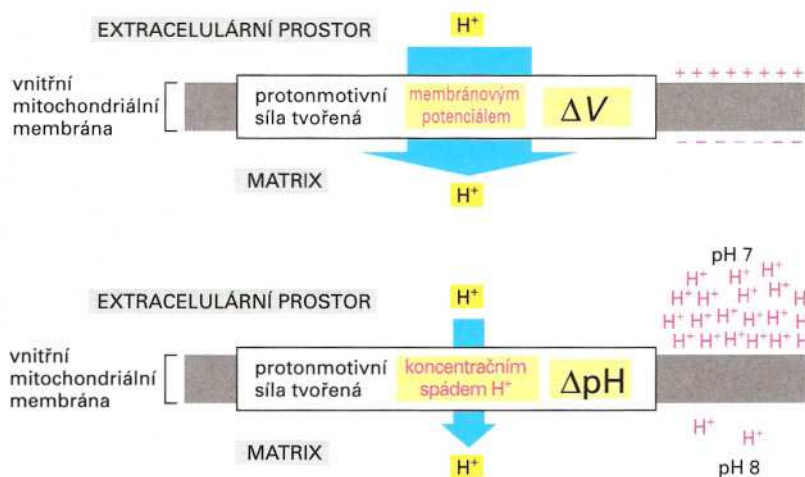


Obrázek 13-11 Elektrické baterie jsou založeny na přenosu elektronů. (A) Standardní tužková baterie, ve které elektrony přecházejí ze zinkového obalu (Zn) k atomům manganu v oxidu mangančitém (MnO₂) za vzniku zinečnatých iontů (Zn²⁺) a oxidu manganatého (MnO). (Uhlík v baterii slouží jen k vedení elektronů.) (B) Jsou-li oba konce baterie spojeny, mění se všechna energie uvolněná při přenosu elektronů v teplo. (C) Připojíme-li baterii k čerpadlu, lze velkou část energie uvolněné při přenosu elektronů využít k práci (v našem příkladu k čerpání vody). Buňky mohou podobným způsobem dodávat energii z přenosu elektronů do čerpacího mechanismu, jak je vidět na obr. 13-3A.

protonu z vody ($H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$) v mitochondriální matrix; potom následuje uvolnění protonu na druhé straně membrány do mezimembránového prostoru. Energeticky příznivý tok elektronů elektrontransportním řetězcem odčerpává protony přes membránu ven z matrix a vytváří gradient elektrochemického potenciálu protonů přes vnitřní membránu mitochondrie (viz obr. 13-10).

Aktivní čerpání protonů tak má dva hlavní důsledky:

1. Vytváří gradient koncentrace protonů (H⁺), tedy gradient pH, přes vnitřní mitochondriální membránu, přičemž pH uvnitř matrix (pH asi 8) je o jednotku vyšší než v mezimembránovém prostoru, kde je pH obecně blízké 7. (Protože ionty H⁺ stejně jako malé molekuly snadno procházejí vnější mitochondriální membránou, je pH v mezimembránovém prostoru stejné jako v cytosolu) Tento jednotkový rozdíl pH znamená desetinásobný pokles koncentrace H⁺ v matrix oproti prostoru mezi oběma membránami.
2. Generuje membránový potenciál (probíraný v Kapitole 12) přes vnitřní mitochondriální membránu. Vnitřní strana této mem-



Obrázek 13-12 Dvě složky gradientu elektrochemického potenciálu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. Celkový gradient elektrochemického potenciálu H⁺ přes vnitřní mitochondriální membránu se skládá z velké síly, která je výsledkem membránového potenciálu a z menší síly, která je důsledkem koncentračního gradientu H⁺. Obě síly se spojují a vytvářejí celkovou *protonmotivní sílu*, která vhání H⁺ do prostoru matrix.

brány je záporná a vnější strana je kladná jako výsledek toku kladně nabitých protonů směrem ven z matrix.

Jak jsme probrali v Kapitole 12, je síla pohánějící pasivní tok iontů Na^+ a K^+ přes membránu úměrná gradientu elektrochemického potenciálu daného iontu přes membránu. Ten naopak závisí na napětí přes membránu, které se měří jako membránový potenciál, a na gradientu koncentrace iontu (viz obr. 12-7). Protože jsou protony nabitě kladně, budou se přes membránu pohybovat snadněji, pokud bude na druhé straně membrány přebytek záporných nábojů. V případě vnitřní mitochondriální membrány pracují gradient pH a membránový potenciál společně na vytváření strmého gradientu elektrochemického potenciálu protonů, díky kterému je zpětný tok H^+ do matrix energeticky velice příznivý. Ve všech membránách, v nich se získává energie a které probereme v této kapitole, přispívá membránový potenciál k síle, která žene ionty H^+ zpět přes membránu. Tento potenciál tedy zvyšuje množství energie uložené v protonovém gradientu (obr. 13-12).

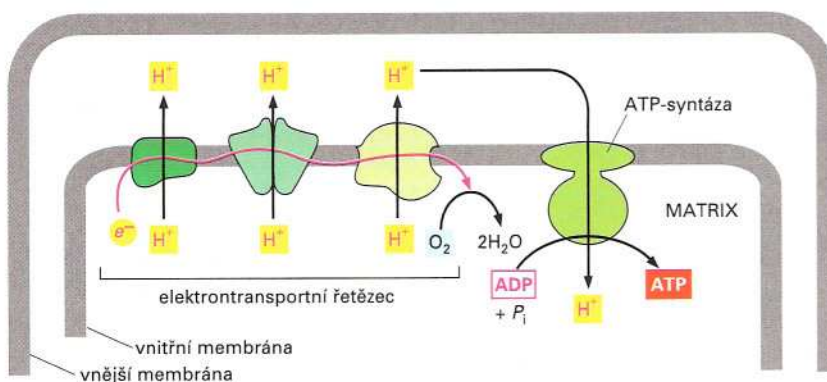
Protonový gradient pohání syntézu ATP

Gradient elektrochemického potenciálu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu se využívá k pohonu syntézy ATP při oxidační fosforylaci (obr. 13-13). Zařízením, které to umožňuje, je velký enzym vázaný na membránu, zvaný **ATP-syntáza**. Tento enzym tvoří hydrofilní průchod vnitřní membránou mitochondrie, který umožňuje protonům proudit po gradientu svého elektrochemického potenciálu. Protože dráha těchto iontů vede skrz ATP-syntázu, využívají se k pohonu energeticky nepříznivé reakce mezi ADP a P_i , při níž vzniká ATP (viz obr. 2-22). Původ ATP-syntázy je velmi starý; stejný enzym se vyskytuje v mitochondriích živočišných buněk, v chloroplastech rostlin a řas a v plasmatické membráně bakterií.

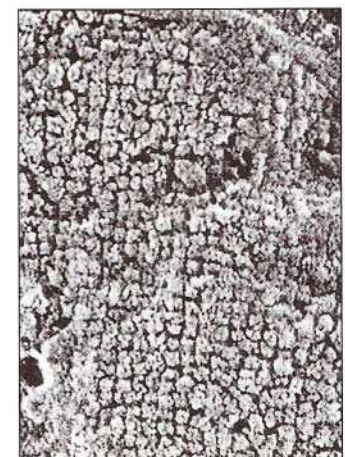
Strukturu ATP-syntázy ukazuje obrázek 13-14. Jedná se o velký protein s mnoha podjednotkami. Velká enzymová část, která vypadá jako lízátko, je vystavena na matrixové straně vnitřní membrány mitochondrie a je připojena tenčí „stopkou“, složenou z více podjednotek, k transmembránovému přenašeči protonů. Ačkoli úplný mechanismus fungování tohoto zařízení ještě neznáme, má se za to, že protony procházející transmembránovým přenašečem vyvolávají

Otázka 13-3 Když se k mitochondriím přidá dinitrofenol (DNP), stane se vnitřní membrána propustná pro protony (H^+). Naopak, přidá-li se k mitochondriím nigericin, stane se vnitřní membrána propustnou pro K^+ . (A) Jak by se v odpověď na DNP změnil gradient elektrochemického potenciálu protonů? (B) Jak by se změnil v odpověď na nigericin?

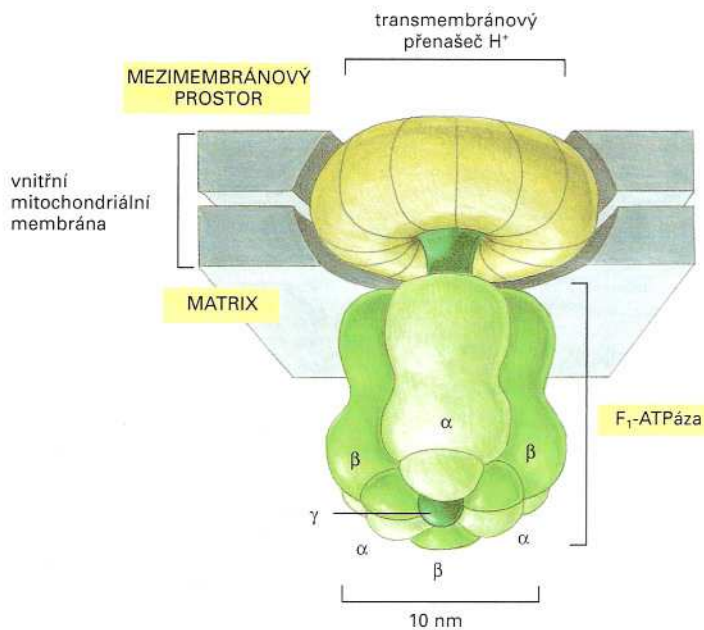
Obrázek 13-13 Obecný mechanismus oxidační fosforylace. (A) Při pohybu vysokoenergetického elektronu v elektrontransportním řetězci se část uvolněné energie využívá k pohonu tří dýchacích enzymových komplexů, které odčerpávají H^+ z matrix. Výsledný gradient elektrochemického potenciálu protonů přes vnitřní membránu žene H^+ zpět ATP-syntázou – transmembránovým proteinovým komplexem, který využívá energii toku H^+ k syntéze ATP z ADP a P_i v matrix. (B) Elektronmikroskopický snímek vnitřního povrchu vnitřní mitochondriální membrány v rostlinné buňce. Jsou vidět hustě uspořádané částice skládající se z vyčnívajících částí molekul ATP-syntázy a komplexů dýchacích enzymů.



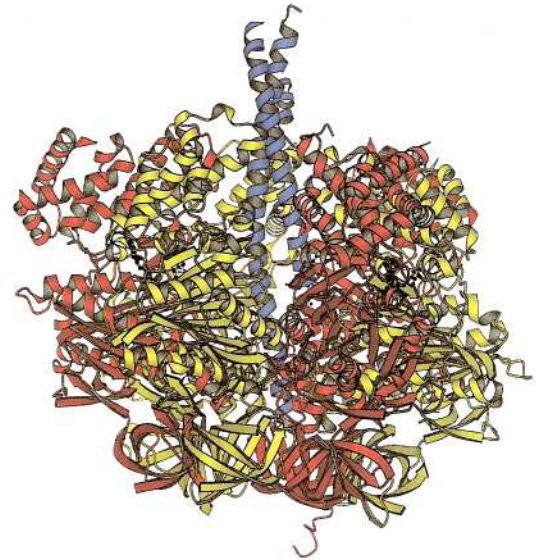
(A)



(B)



(A)



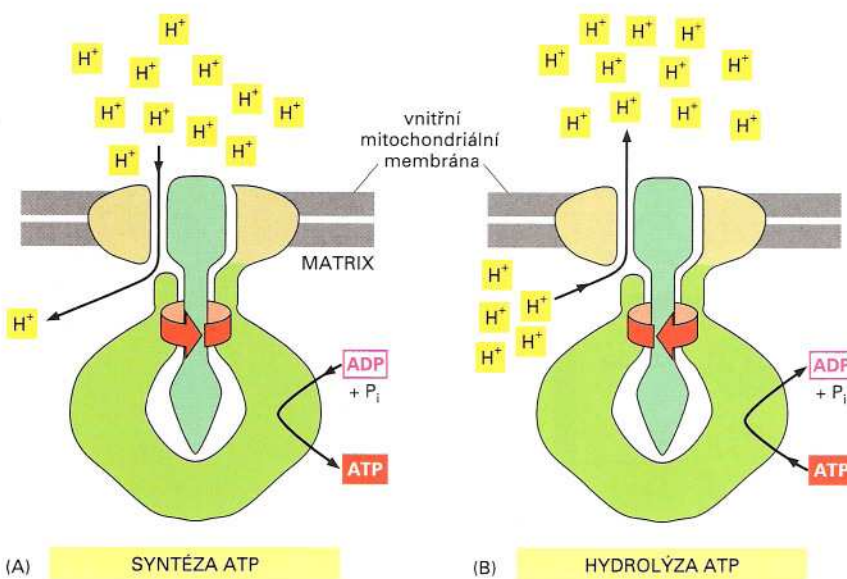
(B)

rychlé otáčení stopky v hlavě, a tím přimějí hlavu k tvorbě ATP. Syntáza je schopná vytvořit více než 100 molekul ATP za sekundu a na každou vytvořenou molekulu ATP musí tímto báječným zařízením projít asi tři protony.

ATP-syntáza představuje vratně spřažené zařízení. Umí buď využívat toku protonů po jejich gradientu elektrochemického potenciálu k tvorbě ATP (což je normální v mitochondriích a v chloroplastech) nebo může využívat energii z hydrolýzy ATP k čerpání protonů přes membránu, jako protonové pumpy popsané v Kapitole 12 (obrázek 13-15). Bude-li ATP-syntáza ATP vytvářet nebo využívat, závisí na velikosti gradientu elektrochemického potenciálu protonů přes membránu, ve které se ATP-syntáza nachází. U mnoha bakterií, které mohou růst aerobně i anaerobně, se směr práce ATP-syntázy normálně obrátí, kdy bakteriím dojde kyslík. V tomto okamžiku ATP-syntáza využije něco z ATP vytvořeného v buňce glykolýzou, aby

Obrázek 13-14 ATP-syntáza. (A)

Schematická kresba. Enzym se skládá z hlavy, F₁-ATPázy a transmembránového sektoru přenášejícího H⁺, zvaného F₀. Obě části jsou složeny z mnoha podjednotek. Řecká písmena označují jednotlivé podjednotky F₁-ATPázy. (B) Trojrozměrná struktura F₁-ATPázy, jak byla určena pomocí rentgenové krystalografie. Tato část ATP-syntázy se jmenuje podle své schopnosti provádět obrácenou reakci syntézy ATP, totiž hydrolýzu ATP na ADP a P_i, pokud je uvolněna z transmembránové části.



(A) SYNTÉZA ATP

(B) HYDROLÝZA ATP

Obrázek 13-15 ATP-syntáza je zařízení pro vratně spřažení, které převádí energii gradientu elektrochemického potenciálu protonů na energii chemické vazby nebo naopak. ATP-syntáza může buď vytvářet ATP, využívajíc energii gradientu H⁺ (A), nebo čerpat protony proti gradientu jejich elektrochemického potenciálu při hydrolýze ATP (B). Směr činnosti v každém okamžiku závisí na čisté změně volné energie (ΔG , probírá se v Kapitole 3) pro spřažené přemístování H⁺ přes membránu a syntézu ATP z ADP a P_i. Pokud se-li například gradient elektrochemického potenciálu protonů pod určitou úroveň, nebude už ΔG pro transport H⁺ stačit k pohonu produkce ATP. Naproti tomu lze ATP hydrolyzovat ATP-syntázou za účelem znovuustavení gradientu.

vyčerpala protony z buňky. Tím vytvoří protonový gradient, který bakteriální buňka potřebuje k importu svých základních živin aktivním transportem.

Spřažený transport přes vnitřní mitochondriální membránu je poháněn gradientem elektrochemického potenciálu protonů

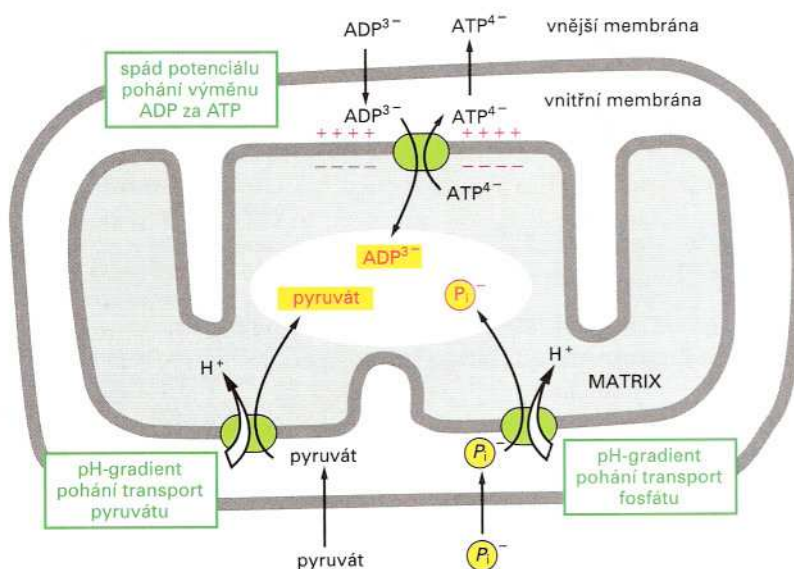
Syntéza ATP není jediným dějem poháněným gradientem elektrochemického potenciálu protonů. V mitochondriích je mnoho nabitých molekul, například pyruvát, ADP a P_i , čerpáno z cytosolu do matrix, zatímco jiné molekuly jako ATP musí být přenášeny v opačném směru. Mnoho přenašečových proteinů spřahuje transport s energeticky výhodným tokem H^+ do mitochondriální matrix. Tak jsou pyruvát a anorganický fosfát (P_i) přenášeny dovnitř současně s ionty H^+ , které proudí do matrix. Naopak ADP je přenášén současně s přenosem ATP opačným směrem, a to jediným přenašečovým proteinem. Protože ATP má oproti ADP jeden záporný náboj navíc, vede každá taková výměna k vnesení jednoho záporného náboje z mitochondrie. Současný přenos ADP a ATP je tedy poháněn rozdílem náboje přes membránu (obr. 13-16).

V eukaryontních buňkách se protonový gradient následně využívá k pohonu tvorby ATP a zároveň k přenosu některých metabolitů přes vnitřní mitochondriální membránu. V bakteriích zajišťuje protonový gradient přes plasmatickou membránu všechny tyto funkce, ale navíc je sám důležitým zdrojem přímo využitelné energie: v pohyblivých bakteriích gradient H^+ pohání rychlou rotaci bakteriálního bičíku, který umožňuje pohyb bakterie (obr. 13-17).

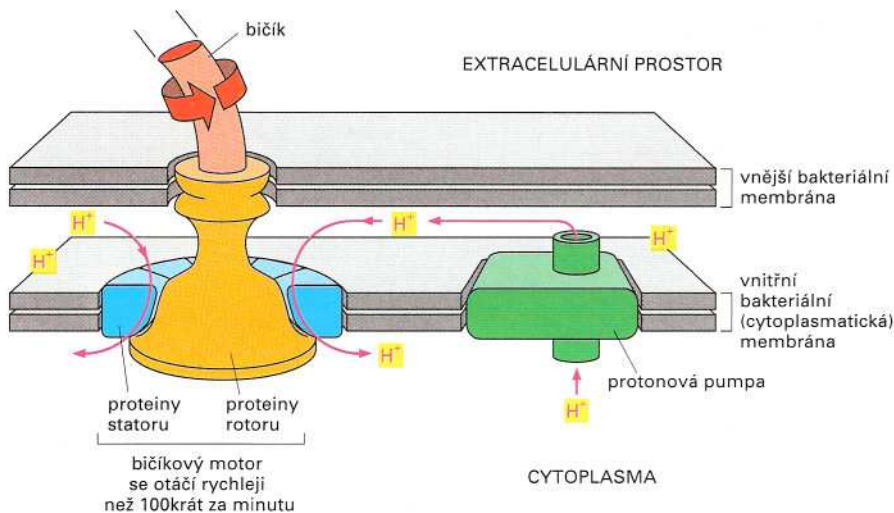
Protonové gradienty vytvářejí většinu buněčného ATP

Jak už bylo uvedeno, sama glykolýza vytváří čistý zisk dvou molekul ATP na každou molekulu glukosy; to představuje celkový energetický zisk pro fermentační procesy, které probíhají za nepřítomnosti O_2 (probírá se v Kapitole 4). Naproti tomu při oxidační fosforylaci každý pár elektronů odevzdaných NADH, vytvořeným v mitochondriích,

Otázka 13-4 Pozoruhodné vlastnosti ATP-syntázy, které jí dovoluji fungovat v obou směrech, umožňují převádět energii uloženou v gradientu H^+ na energii uloženou v ATP a naopak. (A) Pokud by byla ATP-syntáza vyrábějící ATP spojena s vodní turbínou, která vyrábí elektřinu, co by bylo vhodnou analogií její práce v opačném směru? (B) Za jakých podmínek byste očekávali, že se ATP-syntáza zastaví a nepoběží ani v jednom směru? (C) Co určuje směr fungování ATP-syntázy?



Obrázek 13-16 Některé z aktivních transportních dějů poháněných gradientem elektrochemického potenciálu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. Pyruvát, anorganický fosfát a ADP jsou přenášeny do mitochondriální matrix, zatímco ATP je odčerpáván. Náboj každé přenášené molekuly je ukázán pro srovnání s membránovým potenciálem, který je uvnitř matrix záporný. Vnější membrána je volně propustná pro všechny tyto sloučeniny. Aktivní transport molekul přes membránu přenašečovými proteiny se podrobně probírá v Kapitole 12.

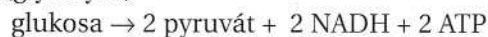


Obrázek 13-17 Otáčení bakteriálního bičíku je poháněno tokem H^+ . Bičiček je připojen k řadě proteinových kroužků (vyznačeny *oranžově*), které jsou zanořeny ve vnější a vnitřní (cytoplasmatické) membráně a otáčejí bičičkem. Otáčení je poháněno tokem protonů vnějším proteinovým kruhem (*stator*em).

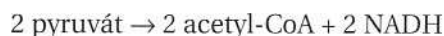
podle všeho poskytuje energii pro vytvoření asi 2,5 molekul ATP, pokud započítáme i energii potřebnou pro přenos tohoto ATP do cytosolu. Oxidační fosforylace také vytváří 1,5 molekuly ATP na elektronový pár z $FADH_2$ nebo z molekul NADH produkovaných při glykolýze v cytosolu. Z výtěžků produktů glykolýzy a cyklu kyseliny citronové, které jsou shrnuty v tabulce 13-1, lze snadno spočítat, že pokud začneme glykolýzou a skončíme oxidační fosforylací, přináší úplná oxidace jedné molekuly glukosy čistý zisk asi 30 molekul ATP. Velká většina ATP vytvářeného při oxidaci glukosy v živočišných buňkách vzniká v chemiosmotickém mechanismu na mitochondriální membráně. Oxidační fosforylace v mitochondrii také vytváří velká množství ATP z molekul NADH a z $FADH_2$, které pocházejí z oxidace tuků (tabulka 13-1 a obrázky 4-9 a 4-10).

Tabulka 13-1 Celkové výtěžky produktů při oxidaci cukrů a tuků

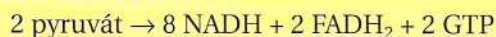
A. Výsledné produkty oxidace jedné molekuly glukosy v cytosolu (glykolýza)



v mitochondrii (pyruvátdehydrogenáza a cyklus kyseliny citronové)

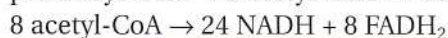
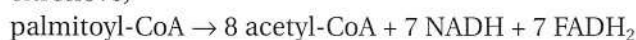


Čistý výsledek v mitochondrii:

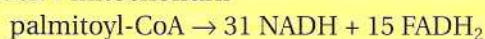


B. Výsledné produkty oxidace jedné molekuly palmitoyl-CoA (tj. aktivované formy kyseliny palmitové, mastné kyseliny)

v mitochondrii (cyklus oxidace mastných kyselin a cyklus kyseliny citronové)



Čistý výsledek v mitochondrii



Otázka 13-5

A. Kolik molekul ATP se vytvoří při přenosu jednoho páru elektronů z NADH na kyslík, jestliže ...

1. se při průchodu každého elektronu třemi dýchacími enzymovými komplexy čerpá přes vnitřní mitochondriální membránu pět protonů,
2. při vzniku každé molekuly ATP z ADP a anorganického fosfátu uvnitř mitochondrie musí ATP-syntázou projít tři protony, a
3. k vytvoření gradientu elektrického potenciálu, který je nutný k transportu jedné molekuly ATP z mitochondrie na místo určení v cytosolu, potřebujeme jeden proton.

B. Použijte údaje v tabulce 13-1 a výtěžek ATP na jeden elektronový pár z (A) a vypočtete

1. kolik molekul ATP vznikne při využití jedné molekuly glukosy v samotném cyklu kyseliny citronové. (Předpokládejte, že oxidace, která je výsledkem přenosu páru elektronů z každé molekuly $FADH_2$, vede k přečerpání šesti protonů, a že GTP a ATP jsou navzájem volně směnitelné podle reakce $GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$.)
2. celkový počet molekul ATP, které vzniknou při úplné oxidaci glukosy. (Předpokládejte, že do elektrontransportního řetězce se (nepřímo) dostávají elektrony z každé molekuly NADH vzniklé při glykolýze v cytosolu; výtěžek ATP je však jen 1,5 molekuly ATP na každou z těchto molekul NADH.)

Rychlá přeměna ADP na ATP v mitochondriích udržuje v buňce vysoký poměr ATP:ADP

S pomocí transportních proteinů ve vnitřní mitochondriální membráně, které jsme probrali v předchozí části, vstupují molekuly ADP pocházející z hydrolyzy ATP rychle do mitochondrií, aby se znovu „nabily“, zatímco molekuly ATP vytvořené v mitochondriální matrix oxidační fosforylací jsou rychle čerpány do cytosolu k dalšímu použití. Typická molekula ATP v lidském těle putuje takto z mitochondrie a zpět do ní (jako ADP) více než jednou za minutu, čímž udržuje koncentraci ATP v buňce asi 10krát vyšší oproti koncentraci ADP.

Jak jsme se zmínili v Kapitole 3, biosyntetické enzymy často pohánějí energeticky nepříznivé reakce tak, že je spřáhnou s energeticky výhodnou hydrolyzou ATP (viz obr. 3-24). Zásoby ATP se využívá k pohonu buněčných pochodů stejným způsobem, jakým se baterie používá k pohonu elektrických motorů: pokud by se činnost mitochondrií zastavila, koncentrace ATP by poklesla a buněčné „baterie“ by se vybily. Energeticky nepříznivé reakce by už nic nepohánělo a buňka by zemřela. Jed kyanid, který blokuje přenos elektronů ve vnitřní mitochondriální membráně, způsobuje smrt právě tímto způsobem.

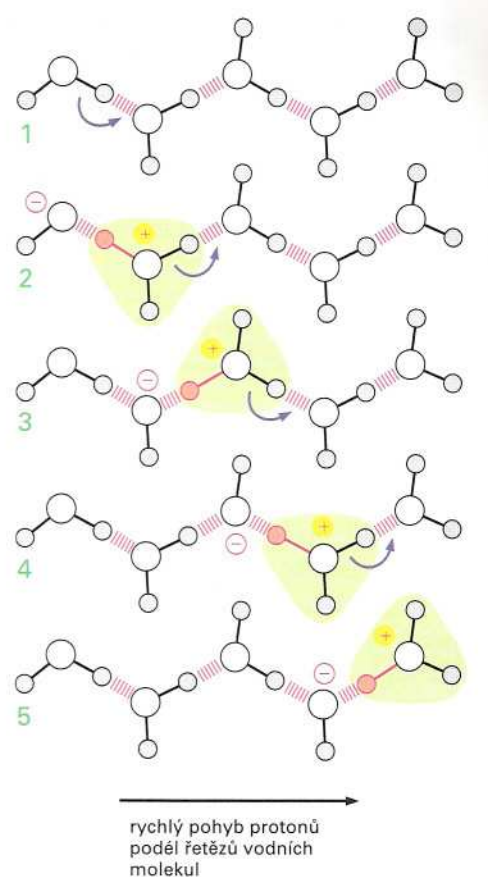
Elektrontransportní řetězce a čerpání elektronů

Když jsme v obecných termínech probrali, jak mitochondrie funguje, měli bychom podrobněji prozkoumat mechanismy, které jsou základem jejích membránových procesů přeměny energie. Když to uděláme, budeme úspěšnější při zkoumání dalších částí. Jak jsme zdůraznili na začátku této kapitoly, v mitochondriích, chloroplastech a bakteriích se na přeměnu energie používají velmi podobná zařízení; proto jsou principy probírané v následující části společné téměř všem živým tvorům. Abychom tento ústřední bod zdůraznili, popíšeme v závěru kapitoly, jak přenos elektronů poskytuje energii jednomu z mnoha druhů bakterií, které žijí v obrovském množství v úplné tmě a bez kyslíku, kilometry pod hladinou oceánu.

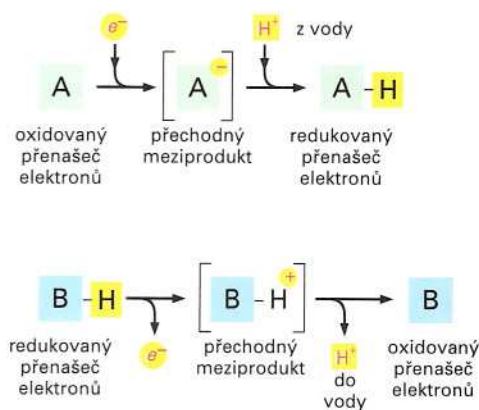
Po mnoho let unikál biochemikům zkoumajícím elektrontransportní řetězce důvod, proč jsou tyto řetězce zanořeny v membránách. Hádanka byla vyřešena hned poté, co byla na počátku šedesátých let navržena základní role transmembránových protonových gradientů v získávání energie. Proces chemiosmotického spřažení však vyvolává hru elektrických a chemických sil, kterou není jednoduché rozluštit na molekulární úrovni. Myšlenka byla natolik nová, že nebyla široce přijata až do chvíle, kdy se z pokusů konaných k testování této hypotézy nahromadily další podpůrné důkazy.

Ačkoli i dnešní badatelé mnohé z detailů chemiosmotického spřažení stále rozplétají, základy už jsou jasné. V této části kapitoly se podíváme na některá pravidla přenosu elektronů a vysvětlíme, jak tento pochod vytváří protonový gradient.

Obrázek 13-18 Jak se protony chovají ve vodě. (A) Protony se velmi rychle pohybují podél řetězce molekul vody spojených vodíkovými můstky. Na této kresbě jsou přeskoky elektronů vyznačeny tmavě modrými šipkami, a hydroxoniové ionty jsou vyznačeny zeleně. Jak se probírá v Kapitole 2, volné protony se vyskytují jen velmi zřídka a místo toho se spojují s molekulami vody za vzniku hydroxoniových iontů H_3O^+ . Při neutrálním pH (7,0) jsou hydroxoniové ionty přítomny v koncentraci 10^{-7} M; pro jednoduchost se však tento údaj obvykle uvádí jako koncentrace H^+ 10^{-7} M (viz Panel 2-2, str. 50-51). (B) Přenos elektronů může vyvolat přenos celých vodíkových atomů, neboť protony jsou ochotně přijímány mezi molekuly vody uvnitř buněk a stejně snadno se z nich uvolňují. V tomto příkladu A přijímá elektron a v tomto redukovaném stavu i proton, a B elektron ztrácí a ve svém novém oxidovaném stavu ztrácí i proton.



(A)



(B)

Protony se snadno pohybují v důsledku přenosu elektronů

Ačkoli protony svým pohybem přes membránu připomínají jiné ionty jako například Na^+ a K^+ , v některých aspektech jsou unikátní. Atomy vodíku jsou s převahou nejhojnějšími atomy v živých organismech a je jich mnoho nejen v uhlíkatých biologických molekulách, ale také ve vodě, která je obklopuje. Protony ve vodě jsou vysoce pohyblivé a přeskakují v síti vodíkových můstků mezi molekulami vody tak, že se vždy oddělí od jedné molekuly vody, aby se vzápětí spojily s její sousedkou, jak ukazuje obrázek 13-18A. Tak voda, která je v buňkách všude, slouží jako dostupná zásoba pro výdej a příjem protonů.

Ať už se molekula redukuje přijetím elektronu kdekoli, elektron (e^-) s sebou přináší záporný náboj. V mnoha případech je tento náboj rychle neutralizován adicí protonu (H^+) z vody, takže čistým výsledkem redukce je přenos celého vodíkového atomu, $\text{H}^+ + e^-$ (obr. 13-18B). Podobně může při oxidaci molekuly vodíkový atom ochotně disociovat na své složky elektron a proton, přičemž elektron může být přenesen odděleně na molekulu, která přijímá elektrony, zatímco proton je předán vodě. Proto je v membráně s elektrony putujícími v elektrontransportním řetězci poměrně snadné čerpat elektrony z jedné strany membrány na druhou. Je k tomu zapotřebí jen takové uspořádání přenašeče elektronů v membráně, aby při záchytu elektronu přijímal proton z jedné strany membrány a aby po předání elektronu další přenašečové molekule v řetězci uvolňoval proton na druhé straně membrány (obr. 13-19).

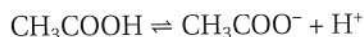
Redoxní potenciál je měřítkem elektronové afinity

V biochemických reakcích se všechny molekuly odebrané z jedné molekuly vždy přenášejí na jinou, takže kdykoli se jedna molekula oxiduje, jiná se redukuje. Jako při každé chemické reakci je i směr samovolného průběhu této oxidačně-redukční neboli **redoxní reakce** závislý na změně volné energie (ΔG) při přenosu elektronů, která naopak závisí na poměrných afinitách dvou molekul k elektronům. (Úloha volné energie při chemických reakcích se probírá v Kapitole 3, str. 89.)

Protože přenosy elektronů poskytují živým tvorům většinu energie, bude užitečné strávit nad nimi více času a dobře jim porozumět. Mnozí čtenáři již důvěrně znají kyseliny a zásady, které odevzdávají a přijímají protony (viz panel 2-2, str. 50-51). Kyseliny a zásady existují v konjugovaných acidobazických párech, kde se kyselina ztratou

Obrázek 13-19 Jak mohou být elektrony čerpány přes membrány. Jak elektron prochází elektrontransportním řetězcem, může na každém kroku vázat elektron a zase ho uvolňovat. Na této schematické kresbě elektronový přenašeč B váže proton (H^+) z jedné strany membrány, když přijímá elektron (e^-) od přenašeče A, a uvolňuje proton na druhé straně membrány, když odevzdává svůj elektron přenašeči C.

protonu snadno mění v zásadu. Například kyselina octová (CH_3COOH) se mění ve svou konjugovanou zásadu (CH_3COO^-) v reakci

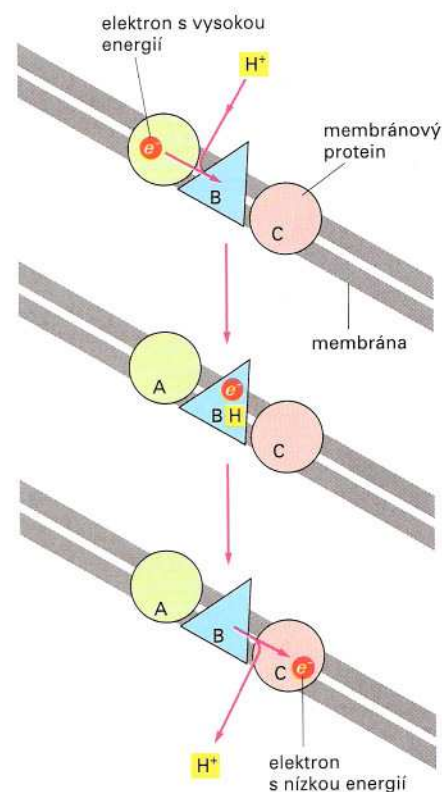


Z naprosto stejného důvodu se sloučeninám jako jsou NADH a NAD^+ říká **redoxní páry**, protože NADH se mění v NAD^+ ztrátou elektronů v reakci



NADH je silným donorem elektronů: protože se jeho elektrony podílejí na vazbě s velkým obsahem energie, je změna volné energie při průchodu těchto elektronů mnoha dalšími molekulami příznivá (viz obr. 13-8). Naopak je velmi nesnadné vytvořit vysokoenergetickou vazbu a jeho konjugovaný protějšek NAD^+ .

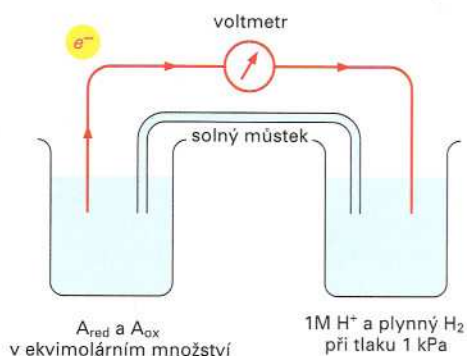
Sklon přenášet elektrony z libovolného redoxního páru lze měřit experimentálně. Vše, co k tomu potřebujeme, je vytvořit elektrický obvod, který spojí ekvimolární (1:1) směs redoxního páru s druhým redoxním párem, který byl vybrán jako referenční standard; mezi těmito dvěma redoxními páry pak můžeme měřit napětí (panel 13-1, str. 424). Tento rozdíl potenciálů je znám jako **redoxní potenciál**; podle definice se elektrony budou samovolně pohybovat od redoxního páru s nízkým redoxním potenciálem (nízkou afinitou k elektronům), například $NADH/NAD^+$, k redoxnímu páru s vysokým redoxním potenciálem (vysokou afinitou k elektronům), např. O_2/H_2O . Proto je molekula NADH dobrým donorem elektronů do dýchacího řetězce, zatímco O_2 je vhodně umístěn tak, aby fungoval jako příjemce elektronů na konci jejich dráhy. Jak je vysvětleno v panelu 13-1, rozdíl v redoxním potenciálu, $\Delta E'^\circ$, je přímým měřítkem standardní změny volné energie (ΔG°) pro přenos elektronu z jedné molekuly na druhou.



Přenosem elektronů se uvolňuje velké množství energie

Jak jsme právě probrali, páry sloučenin, které mají nejzápornější redoxní potenciály, mají nejnižší afinitu k elektronům a tudíž obsahují nosiče s největší snahou odevzdávat elektrony. Naopak páry s nejkladnějšími redoxními potenciály mají nejsilnější afinitu k elektronům, a proto obsahují nosiče s největší snahou elektrony přijímat. Směs $NADH$ a NAD^+ (1:1) má redoxní potenciál -320 mV; to napovídá, že $NADH$ má silnou snahu odevzdávat elektrony. Směs H_2O a $1/2 O_2$ má redoxní potenciál $+820$ mV, což ukazuje, že O_2 má silnou snahu elektrony přijímat. Rozdíl redoxního potenciálu činí $1,14$ voltu (1140 mV), což znamená, že přenos každého elektronu z $NADH$ na O_2 za těchto standardních podmínek je energeticky nesmírně příznivý; $\Delta G^\circ = -109,6$ kJ/mol ($-219,2$ kJ/mol na dva elektrony přenášené molekulou $NADH$; viz panel 13-1). Pokud srovnáme tuto změnu volné energie se změnou, která je zapotřebí k vytvoření fosfoanhydridové vazby

JAK SE MĚŘÍ REDOXNÍ POTENCIÁLY



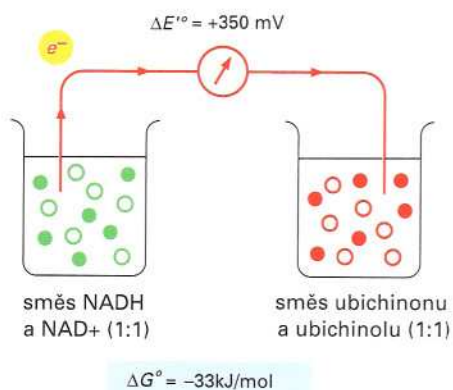
Kádinka vlevo obsahuje látku A v ekvimolárním poměru redukované a oxidované formy (A_{red} a A_{ox}). Druhá kádinka obsahuje vodíkový referenční standard ($2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2$), jehož redoxní potenciál je podle mezinárodních dohod položen rovným nule. (Solný můstek tvořený koncentrovaným roztokem KCl dovoluje iontům K^+ a Cl^- volný pohyb mezi oběma kádinkami, tak aby se neutralizovaly náboje v kádinkách při průchodu elektronů.) Kovový drát (červeně) umožňuje bezodporovou dráhu pro elektrony a voltmetr měří redoxní potenciál látky A. Jestliže elektrony proudí od A_{red} k H^+ , jak je naznačeno zde, redoxní pár tvořený látkou A má negativní redoxní potenciál. Jestliže naopak proudí od H_2 k A_{ox} , má redoxní pár kladný redoxní potenciál.

NĚKTERÉ STANDARDNÍ REDOXNÍ POTENCIÁLY PŘI pH 7

Podle zvyklosti se redoxní potenciál oxidoredukčního páru označuje E . Ve standardním stavu, kdy jsou všechny reaktanty včetně H^+ v koncentraci 1 M, hovoříme o standardním redoxním potenciálu, označovaném E° . Protože biologické reakce většinou probíhají při pH 7, biologové používají jiného standardního stavu, kdy $[A_{red}] = [A_{ox}]$ a $[H^+] = 10^{-7}$ M. Tento standardní potenciál se označuje ΔE° . Uvádíme tu několik příkladů z oblasti oxidační fosforylace.

Redoxní reakce	Standardní redoxní potenciál při pH 7
$NADH \rightleftharpoons NAD^+ + H^+ + 2e^-$	-320 mV
ubichinol \rightleftharpoons ubichinon + $2H^+ + 2e^-$	+30 mV
redukováný cyt c \rightleftharpoons oxidovaný cyt c + e^-	+230 mV
$H_2O \rightleftharpoons \frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^-$	+820 mV

VÝPOČET ΔG° Z REDOXNÍHO POTENCIÁLU

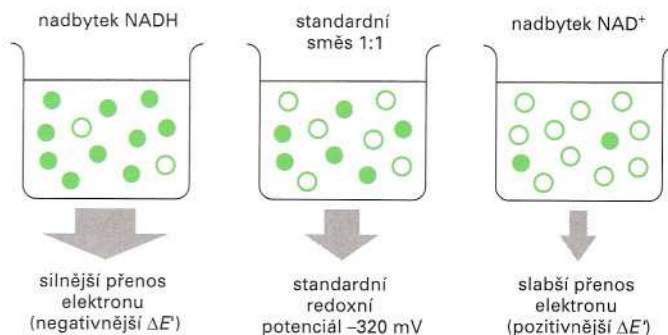


$\Delta G^\circ = -nF\Delta E^\circ$, kde n je počet elektronů přenesených při změně redoxního potenciálu o ΔE° voltů.

Příklad: Přenos jednoho elektronu z NADH na ubichinon vykazuje příznivou hodnotu ΔG° (-33 kJ/mol), zatímco přenos elektronu z ubichinolu na kyslík má ještě výhodnější hodnotu -76 kJ/mol. Hodnota ΔG° pro přenos jednoho elektronu z NADH na kyslík je součtem obou částečných hodnot, tedy 110 kJ/mol.

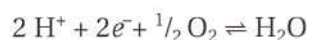
VLIV KONCENTRAČNÍCH ZMĚN

V Kapitole 3 na straně 89 bylo vysvětleno, že skutečná změna volné energie reakce ΔG závisí na koncentraci reaktantů a obecně se liší od standardní volné energie ΔG° . Standardní redoxní potenciály se udávají pro směs redoxního páru 1:1. Například standardní redoxní potenciál -320 mV platí pro směs NADH:NAD (1:1). Jestliže však máme nadbytek NADH vůči NAD^+ , bude přenos elektronu z NADH k akceptoru probíhat snadněji. To se odráží v negativnějších hodnotách redoxního potenciálu a zápornější ΔG° pro přenos elektronu.



v ATP ($\Delta G^\circ = -30,5$ kJ/mol; viz obr. 4-7), vidíme, že při oxidaci jedné molekuly NADH se uvolní více než dost energie na syntézu několika molekul ATP z ADP a P_i .

Živé soustavy by jistě mohly vyvinout enzymy, které by umožnily NADH předávat elektrony přímo O_2 za vzniku vody v reakci

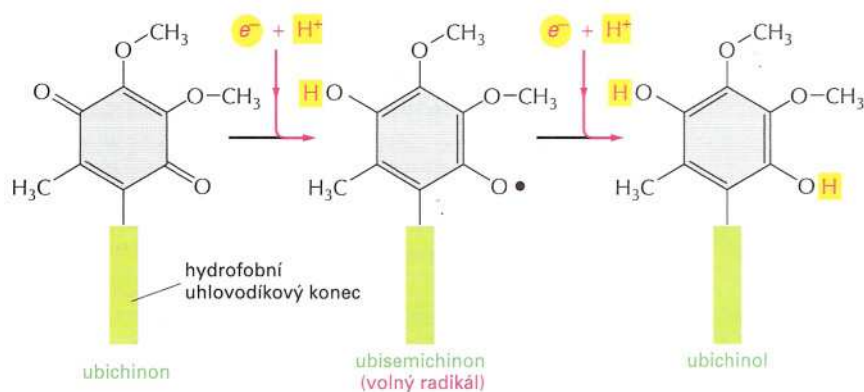


Protože však při této reakci dochází k obrovskému poklesu volné energie, reakce by probíhala s téměř výbušnou silou a téměř všechna energie by se uvolnila jako teplo. Buňky tuto reakci uskutečňují, ale nechávají ji probíhat mnohem více postupně – tak, že vysokoenergetické elektrony z NADH pošlou ke kyslíku přes řadu elektronových přenašečů v elektrontransportním řetězci. Protože každý další přenašeč v řetězci drží své elektrony pevněji, probíhá energeticky příznivá reakce $2 H^+ + 2 e^- + \frac{1}{2} O_2 \rightleftharpoons H_2O$ v několika malých krocích. To umožňuje uložení téměř poloviny uvolněné energie, která by se jinak ztratila do okolí jako teplo.

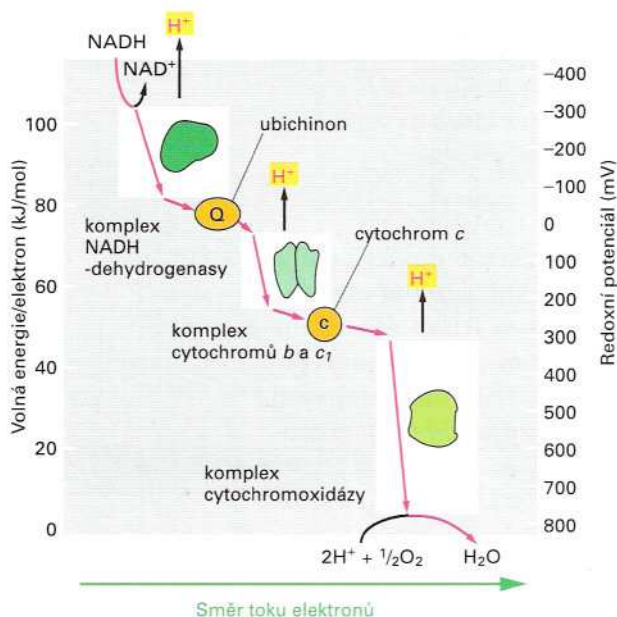
Kovy vázané na proteiny tvoří nejrůznější přenašeče elektronů

V dýchacím řetězci jsou přenašeče elektronů uspořádány podle vzrůstajícího redoxního potenciálu, čím umožňují postupné uvolňování energie uložené v elektronech NADH. V každém ze tří dýchacích enzymových komplexů se elektrony pohybují hlavně mezi atomy kovů, které jsou pevně vázány k proteinům, přičemž elektrony přeskakují z jednoho kovového iontu na druhý.

Naopak mezi různými dýchacími komplexy jsou elektrony přenášeny molekulami, které difundují v dvojné vrstvě lipidů a přebírají elektrony z jednoho komplexu a odevzdávají je druhému v přesně daném pořadí. Jediným přenašečem elektronů, který není částí žádného proteinu, je *ubichinon* – malá hydrofobní molekula rozpustná v dvojné vrstvě lipidů. V mitochondriálním dýchacím řetězci ubichinon přejímá elektrony z komplexu NADH-dehydrogenázy a odevzdává je do komplexu cytochromů *b-c₁* (viz obr. 13-10). Jak ukazuje obrázek 13-20, **chinon** (jako ubichinon) může přijmout nebo odevzdat jeden nebo dva elektrony a s každým elektronem, který přijímá z okolí, také jeden H^+ . Se svým redoxním potenciálem +30 mV stojí ubichinon asi v jedné čtvrtině cesty řetězce od NADH do maximálního uvolnění energie (obr. 13-21). Všechny ostatní nosiče elektronů v elektrontransportním řetězci jsou malé molekuly pevně vázané na



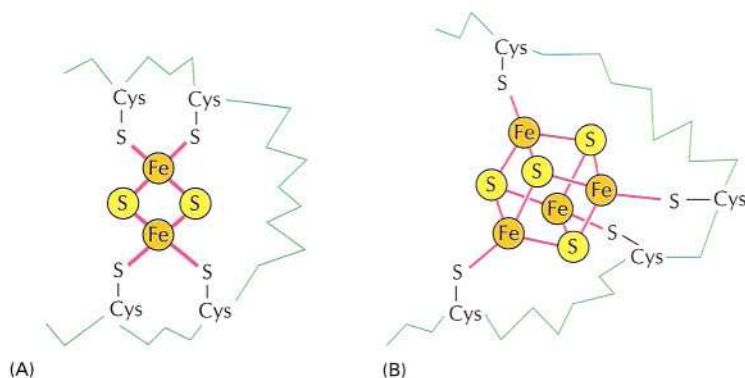
Obrázek 13-20 Chinonové přenašeče elektronů. Ubichinon v mitochondriálním elektrontransportním řetězci váže jeden proton H^+ z vodného prostředí na každý elektron, který přijímá, a může přenášet jeden nebo dva elektrony jako součást vodíkového atomu (*žlutě*). Když v redukováném stavu ubichinon odevzdává své elektrony následujícímu přenašeči v řetězci, tyto protony se uvolní. Dlouhý hydrofobní konec, který poutá ubichinon k membráně, se skládá z 6-10 pětiuhlíkových isoprenových jednotek, přičemž přesný počet závisí na konkrétním organismu. Odpovídajícím chinonovým přenašečem elektronů ve fotosyntetických membránách chloroplastů je plastochinon, jehož struktura je téměř identická. Pro jednoduchost zde budeme ubichinon i plastochinon uvádět jako *chinon* a zkracovat písmenem Q.



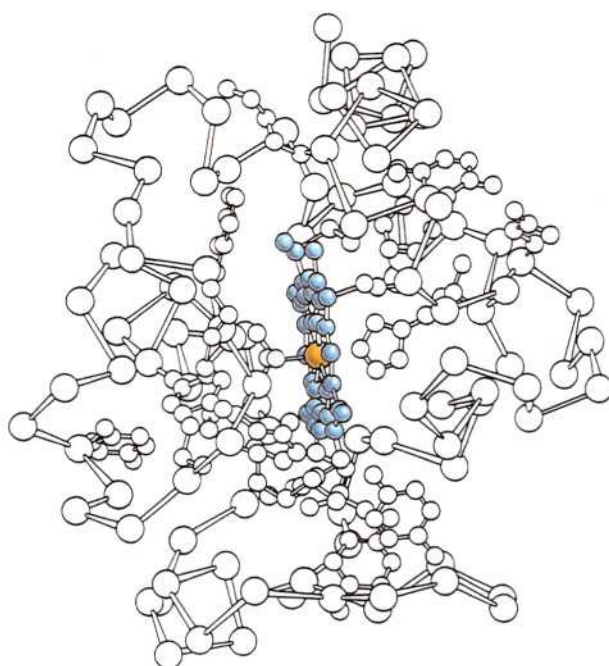
Obrázek 13-21 Redoxní potenciál podél mitochondriálního elektrontransportního řetězce vzrůstá. Symboly použité v tomto obrázku jsou vysvětleny u obr. 13-10. Všimněte si, že k velkému nárůstu redoxního potenciálu dochází u každého ze tří dýchacích enzymových komplexů, kde je tento potenciál potřebný k čerpání protonů.

proteiny. Mezi NADH a ubichinonem uvnitř komplexu NADH-dehydrogenázy přecházejí elektrony mezi flavinovou skupinou (strukturu viz na obr. 4-12) vázanou k proteinovému komplexu a sadou center obsahujících železo a síru podle vzrůstajících redoxních potenciálů. Stavba **Fe-S-center** (center obsahujících nehemové železo) připomíná struktury z obrázku 13-22; v každém kroku centra přenášejí jeden elektron. Poslední Fe-S-centrum v dehydrogenáze předává své elektrony ubichinonu.

Fe-S-centra mají poměrně nízkou afinitu k elektronům, a proto by v další části elektrontransportního řetězce, v dráze od ubichinonu k O_2 , byla méně užitečná. V této části dráhy jsou atomy železa v hemových skupinách pevně vázány k cytochromovým proteinům a obvykle se využívají jako přenašeče elektronů, podobně jako v komplexech cytochromů *b-c₁* a cytochromoxidázy. **Cytochromy** tvoří rodinu barevných proteinů (odtud i jejichž jméno, z řeckého *chroma*, „barva“). Všechny obsahují jednu nebo více hemových skupin, jejichž atom železa se při příjmu elektronu mění z železitého iontu (Fe^{3+}) na železnatý (Fe^{2+}). Jak by se dalo čekat, redoxní potenciál různých cytochromů roste, když v mitochondriálním elektrontransportním řetězci postupujeme směrem ke kyslíku. Stavba *cytochromu c*, malého proteinu, který přepravuje elektrony mezi komplexem cytochromů *b-c₁*



Obrázek 13-22 Struktura dvou typů Fe-S-center. (A) Centrum typu $2Fe_2S$. (B) Centrum typu $4Fe_4S$. I když centra mohou obsahovat více atomů železa, každé Fe-S-centrum může v daném okamžiku nést jen jeden elektron. V mitochondriálním elektrontransportním řetězci se vyskytuje mnoho Fe-S-center.



Obrázek 13-23 Trojrozměrná struktura cytochromu *c*, přenašeče elektronů v elektrontransportním řetězci. Tento malý protein obsahuje jen o málo více než 100 aminokyselin a je volně poután iontovými interakcemi k matrixové straně membrány (viz obr. 13-10). Atom železa (oranžově) v navázaném hemu (modře) může nést jediný elektron. Struktura hemové skupiny v hemoglobinu, který namísto elektronu ochotněji reverzibilně váže O_2 , byla ukázána na obr. 5-31.

a komplexem cytochromoxidázy, je ukázána na obrázku 13-23; jeho redoxní potenciál je +230 mV.

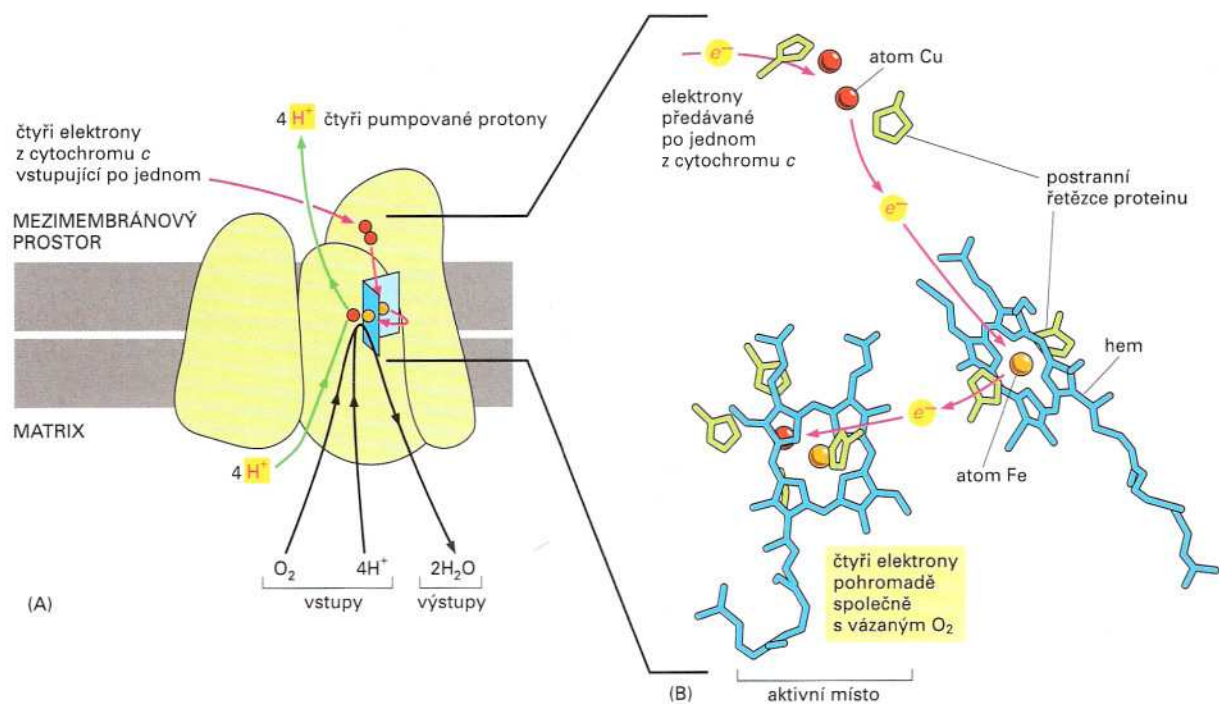
Na samém konci dýchacího řetězce, těsně před kyslíkem, přenáší elektrony právě nosiče v komplexu cytochromoxidázy. Tamější přenašeče jsou buď atomy železa v hemových skupinách nebo atomy mědi, které jsou pevně vázány v komplexu specifickým způsobem, který jim dodává vysoký redoxní potenciál. Redoxní potenciál každého přenašeče elektronů v řetězci byl přesně nastaven tak, aby vyhovoval požadavkům, a to navázáním atomu či molekuly přenašeče v kontextu každého z proteinů, čím se pozměnila normální afinita těchto přenašečů k elektronům.

Protony jsou čerpány přes membránu třemi dýchacími enzymovými komplexy

Pokusy ukázaly, že při průchodu elektronů každým ze tří komplexů dýchacích enzymů je přes membránu čerpán H^+ (viz obr. 13-10). V průměru jsou při průchodu elektronu každým z komplexů přečerpány skoro dva H^+ , neboli pět H^+ na průchod jednoho elektronu všemi třemi komplexy, čili $10 H^+$ na jednu oxidovanou molekulu NADH. Abychom mohli začít doufat, že podrobně pochopíme, jak protonové pumpy pracují, potřebujeme znát jejich trojrozměrnou strukturu. Krystaly membránových proteinů, které potřebujeme pro rentgenovou difrakci (viz panel 5-5, str. 162-163), se obecně získávají velmi obtížně. Proto známe podrobnou strukturu jen u **cytochromoxidázy**, posledního dýchacího enzymového komplexu v řetězci. Probereme teď čerpání protonů ve vztahu k tomuto enzymovému komplexu.

Cytochromoxidáza přebírá elektrony z cytochromu *c*, a tak ho oxiduje (odtud její jméno). Získané elektrony předává kyslíku. Schematický pohled na reakci katalyzovanou cytochromoxidázou je

Otázka 13-6 V mnoha krocích elektrontransportního řetězce jsou ionty železa využívány jako část hemu či ve slucích FeS, kde vážou procházející elektrony. Proč tyto funkční skupiny, které zajišťují chemické reakce transportu elektronů, potřebují být vázány k proteinům? Uveďte několik důvodů pro takové spojení.



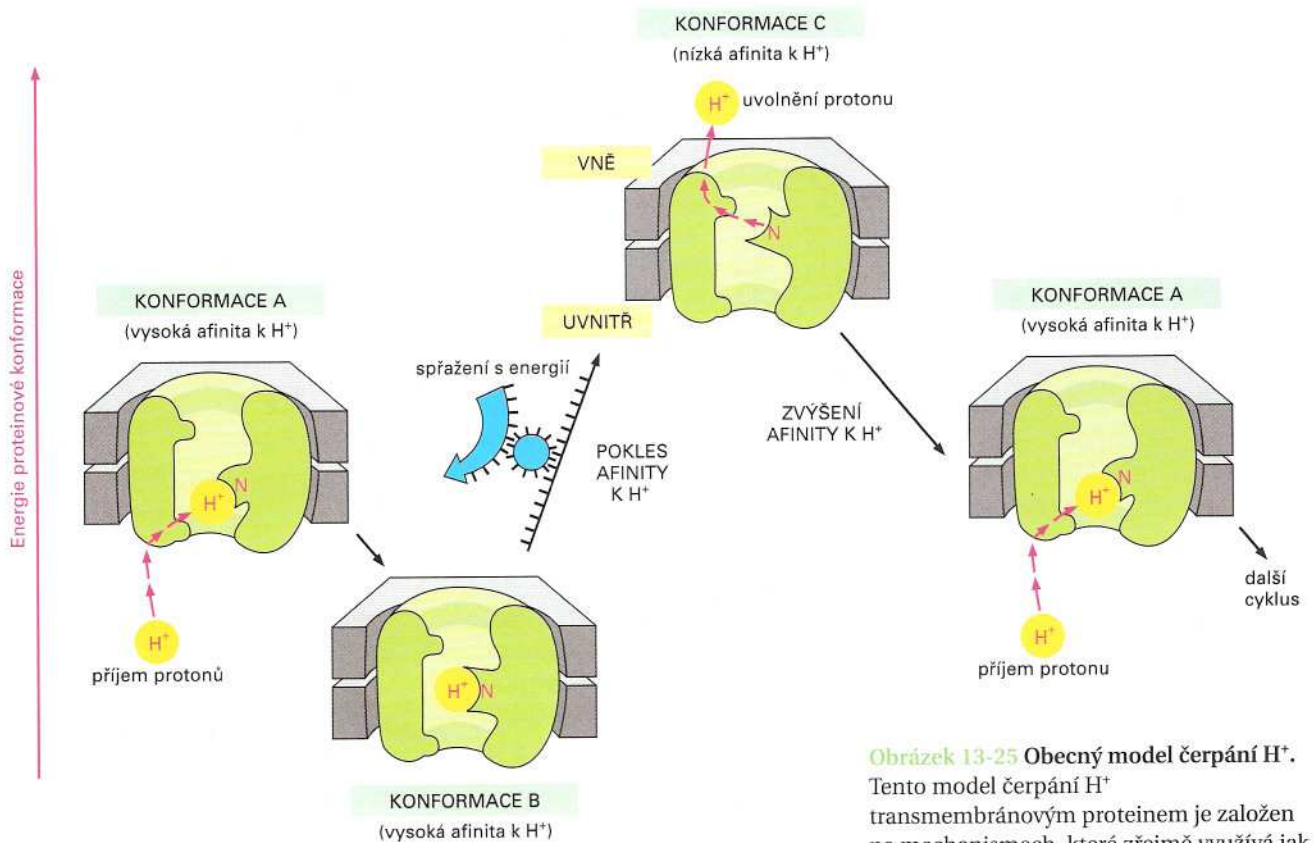
představen na obrázku 13-24A; je založen na úplně trojrozměrné struktuře tohoto velkého transmembránového proteinového komplexu. Celkem se ke každé molekule O₂ přidávají čtyři elektrony z cytochromu *c* a čtyři protony z vodného prostředí v reakci $4e^- + 4H^+ + O_2 \rightarrow 2H_2O$. Navíc se při přenosu elektronů čerpají přes membránu další čtyři protony; tak se zvyšuje gradient elektrochemického potenciálu protonů. Čerpání protonů je vyvoláno allosterickými změnami v konformaci proteinu, které jsou poháněny energií pocházející z transportu elektronů.

Cytochromoxidáza obsahuje ve svém aktivním místě komplex hemového atomu železa hned vedle pevně vázaného atomu mědi (obr. 13-24B). Právě zde téměř všechen kyslík, který dýcháme, slouží jako konečný příjemce elektronů, které na počátku elektrontransportního řetězce uvolnil NADH. Kyslík se k tomuto účelu skvěle hodí, neboť má velmi vysokou afinitu k elektronům. Jakmile však O₂ přijme jeden elektron, vytváří superoxidový radikál O₂⁻; tento radikál je nebezpečně reaktivní a snaží se přijmout další tři elektrony, ať už je najde kdekoli. Jednou z úloh cytochromoxidázy je pevně se držet své kyslíkové molekuly, dokud nejsou k dispozici všechny čtyři elektrony potřebné pro její převedení na dvě molekuly H₂O, a tak chránit molekuly v buňce před náhodným útokem superoxidových radikálů. Vynález cytochromoxidázy byl proto klíčovým jevem v evoluci buněk, které jsou schopné využívat kyslík jako příjemce elektronů.

Aby mohl protein aktivně čerpat protony přes membránu, musí být změna konformace proteinové pumpy spřažena s energeticky příznivou reakcí. V případě cytochromoxidázy je energeticky příznivou reakcí adice elektronů k O₂ v aktivním místě enzymu. Má se za to, že protony se přenášejí v jiném místě cytochromoxidázy postranním řetězcem histidinu, který reaguje na procházející elektrony pohybem. Tento postranní řetězec zřejmě při styku s prostředím matrix váže ion H⁺ a při styku s mezimembránovým prostorem ho uvolňuje (obr. 13-25).

Obrázek 13-24 Cytochromoxidázový komplex. (A) Reakce katalyzované cytochromoxidázou. Tvary a uspořádání zobrazených tří podjednotek jsou založeny na úplně struktuře určené pomocí rentgenové krystalografie. Vnitřní povrch membrány je u mitochondrií obrácen do prostoru matrix a v aerobních bakteriích do cytoplasmy. (B) Podrobnosti z aktivního místa v (A). Je vidět umístění kovových iontů navázaných na protein; tyto ionty přenášejí elektrony z cytochromu *c* na kyslík (O₂). Stejně jako v (A) jsou i zde dva atomy železa (Fe) oranžově, tři atomy mědi (Cu) jsou červené a dva hemy, které nesou atomy železa, jsou nakresleny modře. Všechny tyto kovové ionty jsou skryty uvnitř proteinu a přeskoky elektronů mezi nimi zajišťuje děj zvaný elektronové tunelování.

Otázka 13-7 Mezi třemi proteinovými komplexy elektrontransportního řetězce jsou elektrony přepravovány dvěma různými difuzibilními přenašeči elektronů, ubiquinonem a cytochromem *c*. Mohl by být principiálně pro oba kroky transportu použit stejný přenašeč? Vysvětlete svou odpověď.



Obrázek 13-25 Obecný model čerpání H^+ . Tento model čerpání H^+ transmembránovým proteinem je založen na mechanismech, které zřejmě využívá jak cytochromoxidáza tak světlem poháněná bakteriální protonová pumpa, bakteriorhodopsin (viz obr. 11-29). Protein je nucen postupně zaujmout tři konformace, zde označené jako A, B a C. Jak je vidět na svislé souřadnicové ose, tyto konformace proteinu mají odlišnou energii. V konformaci A má protein vysokou afinitu k H^+ , a proto tento ion váže na vnitřní straně membrány. V konformaci C má protein nízkou afinitu k H^+ , a proto tento ion na vnější straně membrány uvolňuje. Přechod z konformace B do konformace C, která uvolňuje H^+ , je energeticky nevýhodný a dochází k němu jen díky tomu, že je poháněn allostericky spřaženou energeticky výhodnou reakcí, která probíhá na jiném místě proteinu (modrá šipka). Protože další dvě konformační změny, $A \rightarrow B$ a $C \rightarrow A$, vedou ke stavům s nižší energií, probíhají samovolně. Cyklus $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow A \rightarrow B \rightarrow C$ je proto jednosměrný a jeho výsledkem je odčerpávání H^+ z vnitřku (prostoru matrix u mitochondrií) ven (do mezimembránového prostoru v mitochondriích). U cytochromoxidázy pochází energie pro přechod $B \rightarrow C$ z přenosu elektronů, zatímco bakteriorhodopsinu tuto energii poskytuje světlo. Další protonové pumpy využívají energii z hydrolýzy ATP (probírá se v Kapitole 12).

Dýchání je obdivuhodně účinné

Změny volné energie při spalování tuků a sacharidů přímo na CO_2 a H_2O lze srovnat s celkovým množstvím získané energie, která je uložena ve fosfátových vazbách ATP při odpovídajících biologických reakcích. Když takové srovnání provedeme, zjistíme, že energie z oxidace je převedena na energii vazeb v ATP s účinností vyšší než 40 %. To je podstatně lepší účinnost než u většiny nebiologických zařízení na přeměnu energie. Pokud by buňka pracovala jen s účinností elektrického motoru či parního stroje (10–20 %), organismus by se mohl udržovat při životě jen za cenu nesmírné žravosti. Navíc by velké organismy potřebovaly účinnější mechanismy pro předávání tepla okolí, protože se většina nevyužitá energie uvolňuje jako teplo.

Studenti se někdy diví, proč chemické změny v organismech postupují po tak složitých drahách. Oxidace cukrů na CO_2 a H_2O bychom jistě dosáhli mnohem přímější cestou, kdybychom odstranili cyklus kyseliny citronové a řadu kroků dýchacího řetězce. Tím by se stalo dýchání lehčí pro studenty, kteří se ho mají naučit, ale pro buňku by znamenalo katastrofu. Při oxidaci se uvolňuje obrovské množství energie, která se může účinně využít jen po malých dávkách. Biologické oxidační dráhy zahrnují mnoho meziproductů, z nichž každý se jen nepatrně liší od svého předchůdce. Uvolňovaná energie se tak rozdělí do malých množství, která se mohou ve spřažených reakcích (viz obr. 4-1) účinně převést do vysokoenergetických vazeb v užitečných molekulách, jakými jsou ATP a NADH.

Poté, co jsme si vysvětlili, jak se chemiosmotické spřažení využívá k tvorbě ATP v mitochondriích, podíváme se, jak se pro tvorbu ATP zachycuje světelná energie v chloroplastech.

Chloroplasty a fotosyntéza

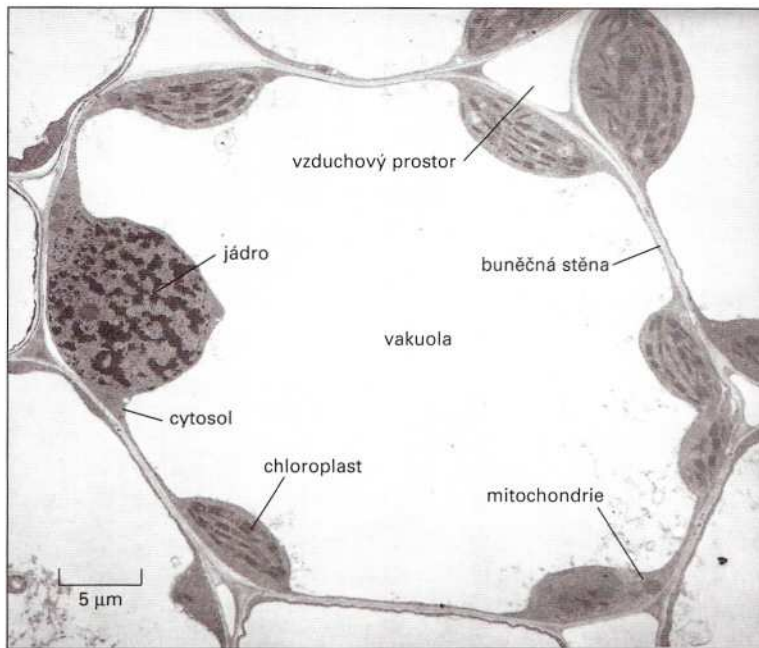
Doslova všechny organické látky, které vyžadují dnešní buňky, vznikají při **fotosyntéze** - řadě světlem poháněných reakcí, která vytváří organické molekuly z atmosférického oxidu uhličitého (CO_2). Organismy, které provádějí fotosyntézu, zahrnují rostliny, řasy a mnoho typů fotosyntetických bakterií. Rostliny, řasy a nejpokročilejší fotosyntetické bakterie, jako například sinice (viz obr. 13-1A), využívají elektrony z vody a energii slunečního světla k převedení CO_2 na organické sloučeniny. Při štěpení vody uvolňují do atmosféry velká množství plynného kyslíku. Tento kyslík je naopak potřebný pro buněčné dýchání, a to nejen živočichů, ale také rostlin a mnoha bakterií.

V rostlinách provádějí fotosyntézu specializované vnitrobuněčné organely zvané **chloroplasty**. Chloroplasty fotosyntetizují při denním světle a přitom vytvářejí ATP a NADH, kterých se uvnitř chloroplastu využívá k přeměně CO_2 na cukry. Vytvořené cukry jsou přenášeny do okolního cytosolu, kde se používají jako palivo pro výrobu ATP a jako výchozí látky pro syntézu mnoha jiných organických molekul, které rostlinná buňka potřebuje. Cukry jsou také přenášeny do všech buněk v rostlině, ve kterých chybějí chloroplasty. Stejně jako u živočišných buněk vzniká i v rostlinných buňkách většina ATP přítomného v cytosolu oxidací cukrů a tuků v mitochondriích.

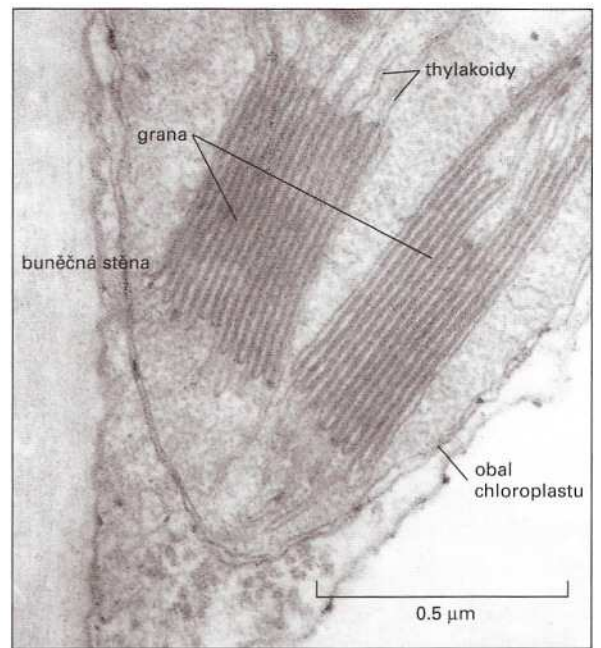
Chloroplasty připomínají mitochondrie, ale obsahují jeden oddíl navíc

Chloroplasty uskutečňují své přeměny energie s pomocí protonových gradientů z velké části stejným způsobem jako mitochondrie. Ačkoli jsou větší (obr. 13-26A), jsou uspořádány podle stejných pravidel. Mají vysoce propustnou vnější membránu, mnohem méně propustnou vnitřní membránu, ve které jsou zanořeny membránové transportní proteiny, a mezi nimi úzký mezimembránový prostor. Společně tyto membrány tvoří obal chloroplastu (obr. 13-26B). Vnitřní membrána obklopuje velký prostor zvaný **stroma**, který je analogický mitochondriální matrix a obsahuje mnoho metabolických enzymů. Podobně jako mitochondrie se i chloroplast vyvinul z pohlčené bakterie (viz obr. 1-14) a stále obsahuje svůj vlastní genom a genetický aparát. Proto stroma, stejně jako mitochondriální matrix, obsahuje speciální sadu ribosomů, RNA a DNA.

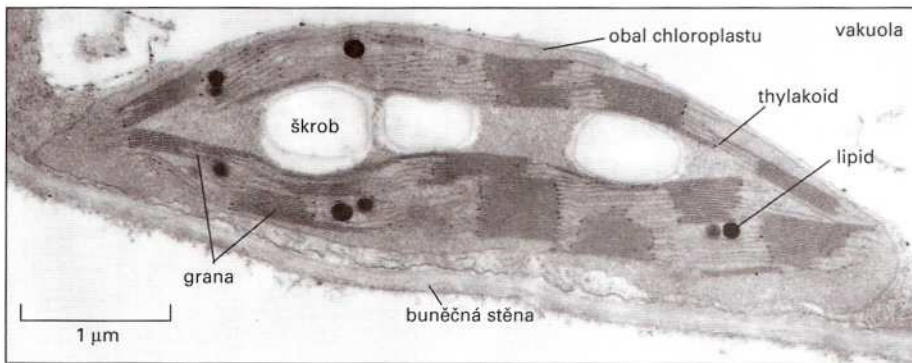
Mezi uspořádáním mitochondrie a chloroplastu však existuje důležitý rozdíl. Vnitřní membrána chloroplastu neobsahuje elektrontransportní řetězce. Místo toho jsou systémy zachycující světlo, elektrontransportní řetězce a ATP-syntáza obsaženy v *thylakoidní membráně*, třetí membráně, která tvoří soubor zploštělých diskovitých váčků zvaných *thylakoidy* (obr. 13-26C). Ty jsou uspořádány ve stozích a prostory uvnitř thylakoidů jsou podle všeho navzájem propojené. Tak vzniká třetí kontinuální vnitřní oddíl, který je od stromatu



(A)



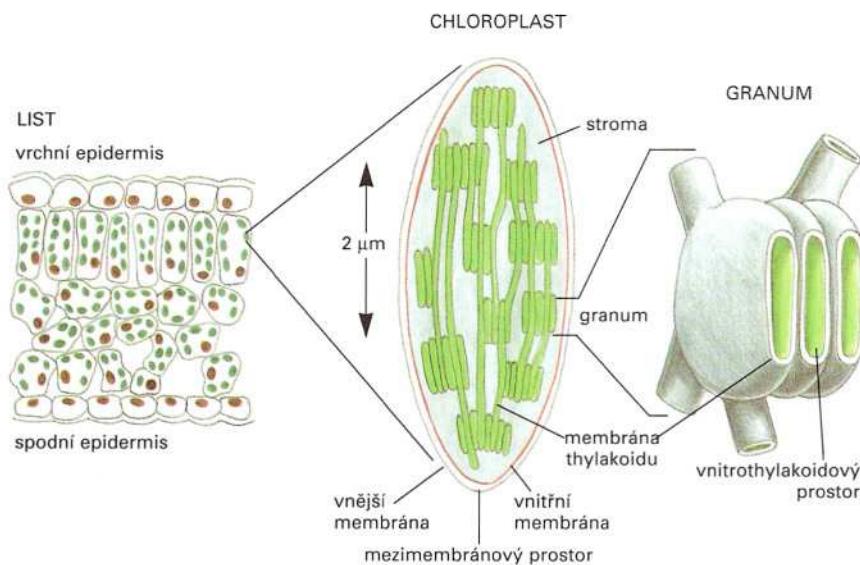
(C)



(B)

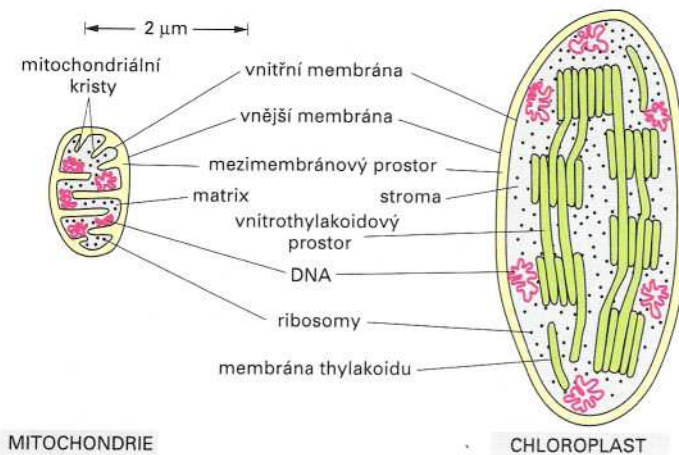
Obrázek 13-26

Elektronmikroskopický snímek chloroplastů. (A) Buňka pšeničného listu, ve které tenká vrstva cytoplasmu obsahující jádro, chloroplasty a mitochondrie obklopuje velkou vakuolu. (B) Tenký řez jedním chloroplastem ukazuje obal chloroplastu, zrnka škrobu a kapénky lipidů (tuků), které se ve stromatu nashromáždily v důsledku probíhající biosyntézy. (C) Ve velkém zvětšení vidíme dvě grana - stohy thylakoidů.



Obrázek 13-27 Chloroplast.

Tato fotosyntetizující organela obsahuje tři různé membrány (vnější membrána, vnitřní membrána a membrána thylakoidů), které určují tři oddělené vnitřní oddíly (mezimembránový prostor, stroma a prostor uvnitř thylakoidu). Thylakoidní membrána obsahuje všechny systémy, které v chloroplastu získávají energii, včetně chlorofylu. Na elektronmikroskopickém snímku se tato membrána jeví jako rozdělená do oddělených jednotek, které uzavírají jednotlivé zploštělé váčky (viz obr. 13-26C), ale tyto váčky jsou zřejmě v každém chloroplastu připojeny k jediné vysoce poskládané membráně. Jak je na obrázku vidět, chloroplasty jsou vzájemně propojeny a snaží se vytvářet grana.



Obrázek 13-28 Srovnání mitochondrie s chloroplastem. Chloroplast je obecně větší než mitochondrie a vedle vnější a vnitřní membrány obsahuje navíc ještě thylakoidní membránu, která vymezuje prostor thylakoidu. Na rozdíl od vnitřní membrány chloroplastu je vnitřní membrána mitochondrie poskládána do přepážek (*cristae*), aby se zvětšila její plocha.

oddělen thylakoidní membránou (obr. 13-27). Podobnosti a rozdíly ve stavbě mitochondrie a chloroplastu jsou ukázány na obrázku 13-28.

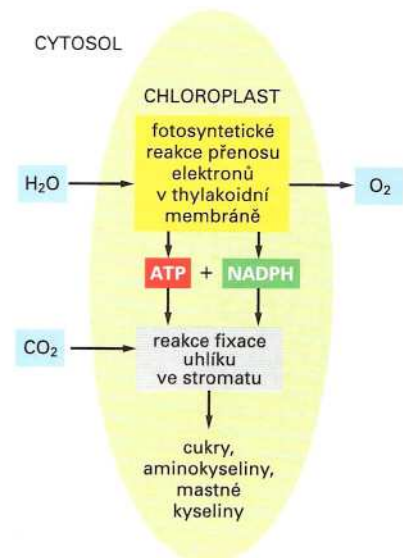
Chloroplasty zachycují energii slunečního světla a s její pomocí vážou uhlík

Velké množství reakcí probíhajících během fotosyntézy v rostlinách může být rozděleno do dvou širokých kategorií:

1. Ve *fotosyntetických reakcích přenosu elektronu* (zvaných také „světelná fáze“) se energie ze slunečního světla přenáší na elektron v zeleném organickém barvivu *chlorofylu* a umožňuje elektronu putovat elektrontransportním řetězcem v thylakoidní membráně z velké části stejným způsobem, jakým se pohybuje elektron v dýchacím řetězci v mitochondrii. Chlorofyl získává své elektrony z vody (H_2O), přičemž vedlejším produktem je O_2 . Během přenášení elektronů jsou přes thylakoidní membránu čerpány H^+ a výsledný gradient elektrochemického potenciálu protonů pohání syntézu ATP ve stromatu. V posledním kroku této řady reakcí se elektrony s vysokým obsahem energie spojí (společně s H^+) s molekulou $NADP^+$ a převedou ji tak na $NADPH$. Všechny tyto reakce probíhají v chloroplastu.
2. V *reakcích fixace uhlíku* (zvaných také „temnotní fáze“) ATP a $NADPH$ vytvořené fotosyntetickými reakcemi přenosu elektronů slouží jako zdroj energie a jako redukční činidlo při pohonu syntézy sacharidů z CO_2 . Reakce, při nichž se váže uhlík, začínají ve stromatu chloroplastu a pokračují v cytosolu; jejich výsledkem je sacharosa a mnoho jiných organických molekul v listech rostliny. Sacharosa je přenášena do jiných tkání jako zdroj organických molekul a energie potřebné k růstu.

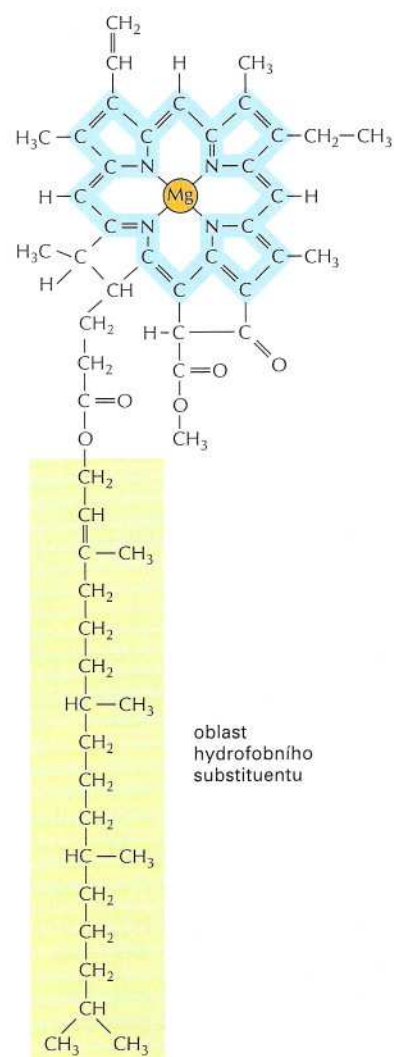
Tvorba ATP, $NADPH$ a O_2 , která přímo vyžaduje světelnou energii, a přeměna CO_2 v sacharidy, která vyžaduje světelnou energii jen

Otázka 13-8 Chloroplasty mají třetí vnitřní oddíl, thylakoidní prostor, obklopený thylakoidní membránou. Tato membrána obsahuje fotosystémy, reakční centra, elektrontransportní řetězec a ATP-syntázu. Naproti tomu mitochondrie užívají svou vnitřní membránu k přenosu elektronů a k syntéze ATP. V obou organelách jsou elektrony čerpány ven z největšího vnitřního oddílu (matrix v mitochondriích a stroma v chloroplastech). Thylakoidní prostor je zcela uzavřen proti zbytku buňky. Proč toto uspořádání umožňuje dosáhnout většího gradientu H^+ v chloroplastech, než jaký by mohl být dosažen v mitochondriích?



Obrázek 13-29 Reakce fotosyntézy v chloroplastech. V reakcích fotosyntetického elektrontransportního řetězce se voda oxiduje a uvolňuje se kyslík, zatímco oxid uhličitý se váže, aby dal postupně vzniknout cukrům a celé řadě dalších organických molekul.

Obrázek 13-30 Struktura chlorofylu. Atom hořčíku (oranžově) je držen v centru porfyrinového kruhu, který je strukturně podobný porfyrinovému kruhu, který váže železo v hemu. Světlo je pohlcováno elektrony v *modře vyznačené* síti vazeb, zatímco dlouhý hydrofobní řetězec pomáhá držet chlorofyl v thylakoidní membráně.



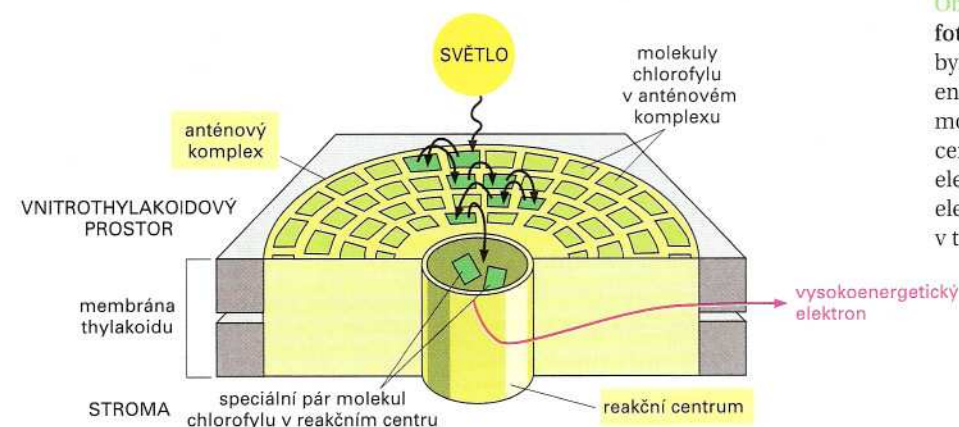
nepřímo, jsou tedy oddělené děje (obr. 13-29), ačkoli je vzájemně spojují důmyslné mechanismy zpětné vazby. Například některé z enzymů chloroplastu potřebné pro fixaci uhlíku jsou ve tmě inaktivovány a opět se aktivují světlem stimulovanými přenosy elektronů.

Excitované molekuly chlorofylu fungují jako nálevka a svádějí energii do reakčního centra

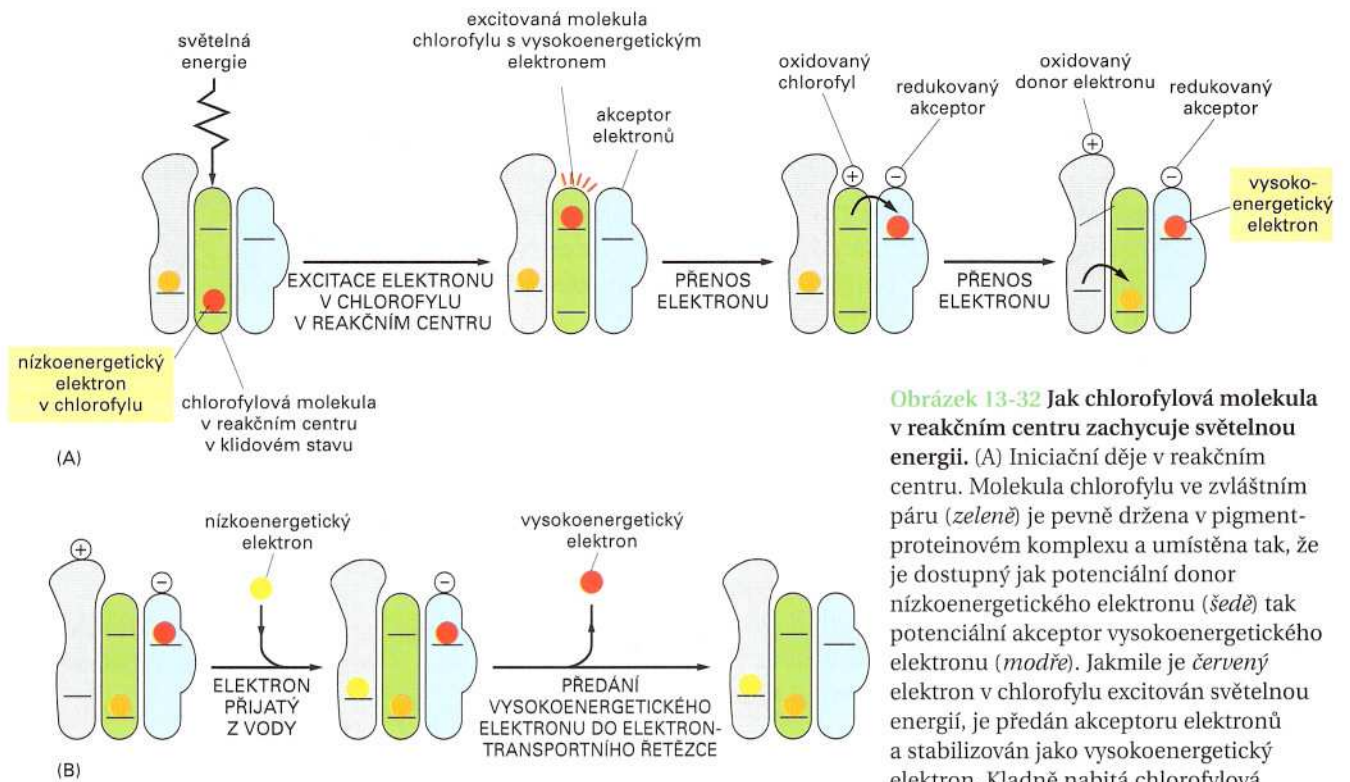
Viditelné světlo je formou elektromagnetického záření složeného z mnoha různých vlnových délek od fialové barvy (vlnová délka 400 nm) po temně červenou (760 nm). Kdy se zamyslíme nad ději na úrovni jedné molekuly, například nad absorpcí světla, musíme si světlo znázornit jako složené z jednotlivých balíčků energie zvaných *fotony*. Světlo různých barev představují fotony o různé energii, přičemž větší vlnová délka odpovídá menší energii. Fotony červeného světla tedy mají menší energii než fotony zeleného světla.

Když sluneční světlo absorbuje molekula zeleného barviva **chlorofylu**, elektrony v této molekule interagují s fotony světla a jsou vyneseny na vyšší energetickou hladinu. Elektrony v rozsáhlé síti střídajících se jednoduchých a dvojných vazeb v molekule chlorofylu (obr. 13-30) absorbují nejsilněji červené světlo.

Izolovaná molekula chlorofylu neumí převést absorbované světlo do formy energie, kterou mohou živé soustavy využít. To může udělat jen pokud je spojena s vhodnými proteiny a zanořena v membráně. V membránách rostlinných thylakoidů a v membránách fotosyntetických bakterií jsou chlorofyly absorbující světlo drženy ve velkých multiproteinových komplexech, zvaných **fotosystémy**. Část fotosystému zvaná *anténa* se skládá ze stovek molekul chlorofylu, které zachycují světelnou energii ve formě excitovaných (vysokoenergetických) elektronů. Tyto chlorofyly jsou uspořádány tak, že energie excitovaného elektronu může být předávána od jedné molekuly chlorofylu ke druhé, a tak může být dopravena do přilehlého proteinového komplexu v membráně – *reakčního centra*. Tam je energie zachycena a využita k excitaci jednoho elektronu ve *zvláštním páru* chlorofylových molekul (obr. 13-31). *Reakční centrum* je transmembránovým



Obrázek 13-31 Reakční centrum a anténa fotosystému. Anténa sbírá elektrony, které byly excitovány světlem, a předává jejich energii speciálnímu páru chlorofylových molekul v reakčním centru. Reakční centrum tak získává vysokoenergetický elektron, který může být rychle předán do elektrontransportního řetězce v thylakoidní membráně.

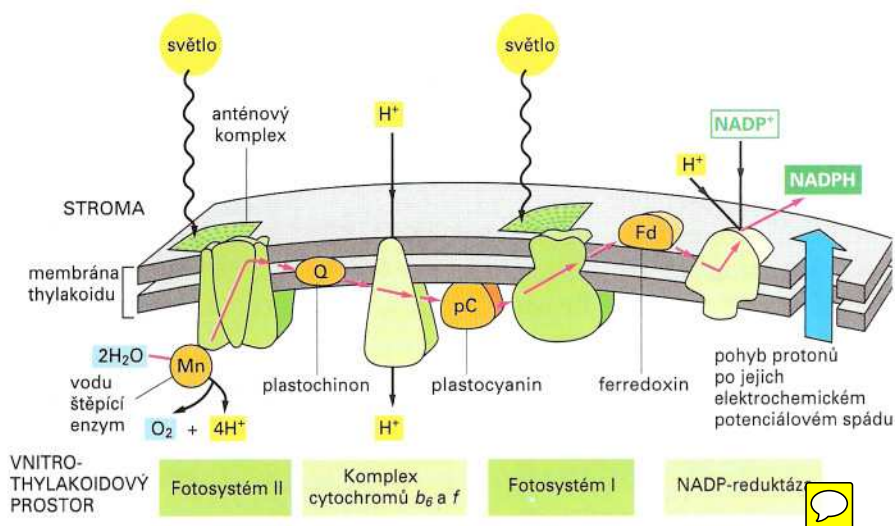


Obrázek 13-32 Jak chlorofylová molekula v reakčním centru zachycuje světelnou energii. (A) Iničiační děje v reakčním centru. Molekula chlorofylu ve zvláštním páru (*zeleně*) je pevně držena v pigment-proteinovém komplexu a umístěna tak, že je dostupný jak potenciální donor nízkoenergetického elektronu (*šedě*) tak potenciální akceptor vysokoenergetického elektronu (*modře*). Jakmile je *červený* elektron v chlorofylu excitován světelnou energií, je předán akceptoru elektronů a stabilizován jako vysokoenergetický elektron. Kladně nabitá chlorofylová molekula rychle přitáhne nízkoenergetický *oranžový* elektron a vrátí ho do klidového stavu. Tyto reakce probíhají v čase kratším než 1 mikrosekunda. (B) Finální produkce vysokoenergetického elektronu z nízkoenergetického elektronu. V tomto ději, který následuje po reakci uvedené v (A), se celé reakční centrum vrátí do svého klidového stavu. Výsledkem děje je produkce vysokoenergetického elektronu v thylakoidní membráně z nízkoenergetického elektronu pocházejícího z vody.

komplexem proteinů a organických barviv, který se nachází v samotném srdci fotosyntézy. Má se za to, že se poprvé vyvinulo před více než 3,5 miliardami let v jednoduchých fotosyntetických bakteriích. Zvláštní pár chlorofylových molekul v reakčním centru působí jako past se záklopkou, do které se „chytí“ excitovaný elektron. Tyto chlorofyly jsou umístěny tak, aby předaly elektron s vysokým obsahem energie do přesně umístěné sousední molekuly ve stejném proteinovém komplexu. Reakční centrum přesune energizovaný elektron rychle pryč z chlorofylů a umístí ho v prostředí, kde je tento elektron daleko stabilnější. Poloha elektronu je přitom vhodná pro následující fotochemické reakce, které vyžadují více času. V tomto ději molekula chlorofylu v reakčním centru ztrácí elektron a stává se kladně nabitou. Jak ukazuje obrázek 13-32A, chlorofyl rychle získává elektron zpět od sousední molekuly a vrací se do svého základního (neexcitovaného) stavu. Donor elektronu se potom v pomalejších reakcích regeneruje elektronem odebraným z vody a elektron s vysokým obsahem energie je přenesen do elektrontransportního řetězce (obr. 13-32B).

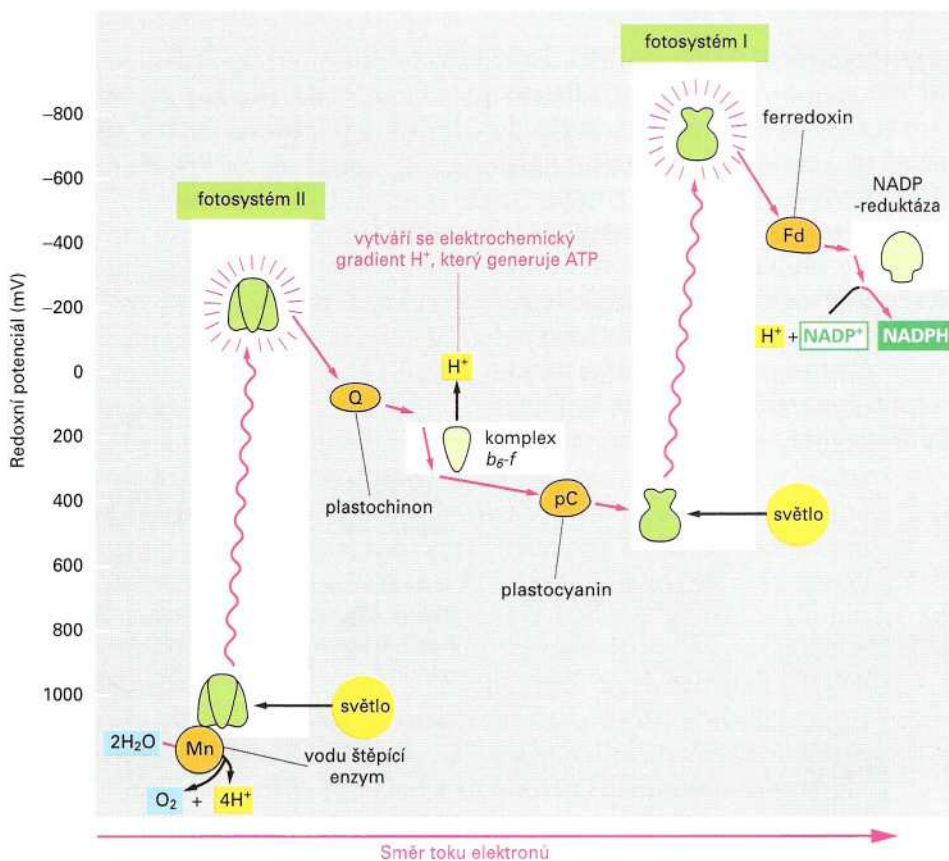
Světelná energie pohání syntézu ATP a NADPH

Jak jsme si říkali v Kapitole 3, je biosyntéza v podstatě opakem oxidačního odbourání. K vytváření svých složek buňka nepotřebuje jen energii ve formě ATP, ale také redukční činidlo ve formě přenašeče vodíku NADPH (viz obr. 3-28). Protože základní funkcí fotosyntézy je syntéza organických molekul z CO_2 , klade tento děj značné požadavky jak na ATP tak na redukční činidlo. S potřebou redukčního činidla se setkáváme při tvorbě NADPH z NADP^+ za použití energie ze slunečního světla, kdy se mají nízkoenergetické elektrony z vody převést na vysokoenergetické elektrony v NADPH.



Obrázek 13-33 Tok elektronů během fotosyntézy v thylakoidní membráně. Pohyblivé elektronové přenašeče v řetězci představují plastoquinon (který je velmi podobný ubiquinonu v mitochondriích), plastocyanin (malý protein obsahující měď) a ferredoxin (malý protein obsahující centrum se sírou a železem). Komplex cytochromů b_6-f blíže připomíná cytochromový komplex $b-c_1$ mitochondrií a je jediným místem aktivního čerpání H^+ v chloroplastovém elektrontransportním řetězci. H^+ , který se uvolnil při oxidaci vody a H^+ přijatý při tvorbě NADPH také přispívají k tvorbě gradientu elektrochemického potenciálu protonů. Protonový gradient pohání ATP-syntázu umístěnou ve stejné membráně (na obrázku není vidět).

Fotosyntéza v rostlinách a sinicích produkuje ATP a NADPH v ději, který vyžaduje dva fotony světla. ATP vzniká po absorpci prvního fotonu, NADPH po absorpci druhého. Vždy jsou spojeny dva fotosystémy za sebou. V celkovém schématu je světelná energie nejprve absorbována jedním fotosystémem (který se z historických důvodů zcela zmateně jmenuje *fotosystém II*), kde se využije k produkci elektronu s vysokým obsahem energie. Tento elektron je elektron-transportním řetězcem přenesen do druhého fotosystému. Zatímco elektron putuje směrem „dolů“ po svém elektron-transportním řetězci, pohání protonovou pumpu v thylakoidní membráně a vytváří proto-



Obrázek 13-34 Změny v redoxním potenciálu během fotosyntézy. Redoxní potenciál každé molekuly je vidět z její polohy vzhledem ke svislé ose. Fotosystém II předává elektrony ze svého excitovaného chlorofylu přes elektrontransportní řetězec v thylakoidní membráně, který ústí do fotosystému I. Čistý tok elektronů přes oba sériově spojené fotosystémy začíná u vody a končí u NADP⁺; výsledkem je NADPH a ATP. ATP je vytvářen ATP-syntázou (na obrázku není vidět), která využívá gradient elektrochemického potenciálu protonů, vznikající při přenosu elektronů.

nový gradient tak, jak jsme to již dříve popsali u oxidační fosforylace (obr. 13-33). ATP-syntáza v thylakoidní membráně potom tento protonový gradient využije k pohonu syntézy ATP na stromální straně membrány.

Jakmile elektron při své cestě dorazí do časově druhého fotosystému (*fotosystém I*), zaplní kladně nabitou „díru“ v reakčním centru, která tam zbyla po elektronu, jenž reakční centrum opustil po absorpci druhého fotonu. Protože je fotosystém I zkonstruován pro start na vyšší energetické úrovni než fotosystém II, končí na vyšší úrovni a může dodat elektronům značnou dávku energie potřebnou k tvorbě NADPH z NADP⁺ (viz obr. 13-33). Redoxní potenciály složek tohoto elektrontransportního řetězce jsou uvedeny v obrázku 13-34.

V celém dosud popsaném ději je elektron po svém odstranění z chlorofylové molekuly v reakčním centru fotosystému II předán NADPH. Tento počáteční elektron musí být nahrazen, aby se systém vrátil do základního stavu. Náhradní elektron pochází z nízkoenergetického donoru elektronů, kterým je u rostlin a u mnoha fotosyntetických bakterií voda (viz obr. 13-32B). Reakční centrum fotosystému II zahrnuje enzym, který štěpí vodu. Tento enzym drží kyslíkové atomy dvou molekul vody vázané v shluku atomů manganu v proteinu (viz obr. 13-33 a 13-34). Tento enzym odstraňuje v každém kroku elektrony z vody a zaplňuje jimi díry, které způsobilo světlo v chlorofylových molekulách reakčního centra. Jakmile se ze dvou molekul vody odstraní čtyři elektrony, kyslík se uvolní jako O₂. Právě tento děj, který už probíhá miliardy let, uvolnil všechen O₂, který je dnes přítomen v atmosféře.

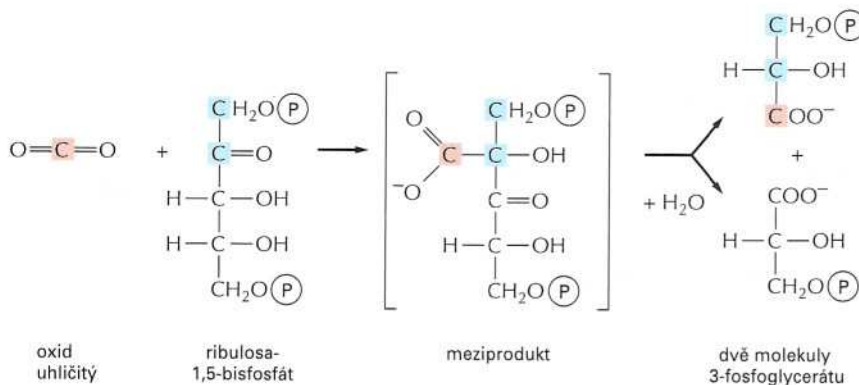
Otázka 13-9 Která z následujících tvrzení jsou správná? Vysvětlete své odpovědi.

- A. Po uvolnění elektronu světlem je u kladně nabitého chlorofylu v reakčním centru prvního fotosystému (fotosystému II) afinita k elektronům dokonce větší než elektronová afinita O₂.
- B. Fotosyntéza je světlem poháněný přenos elektronů z chlorofylu na druhou molekulu s mnohem menší elektronovou afinitou.
- C. Protože k uvolnění jedné molekuly O₂ ze dvou molekul H₂O musí být pohlceny čtyři fotony, musí enzym, který štěpí vodu, udržovat meziproducty pevně navázané, aby nedošlo k úniku částečně redukovaných, a tudíž nebezpečných superoxidových radikálů.

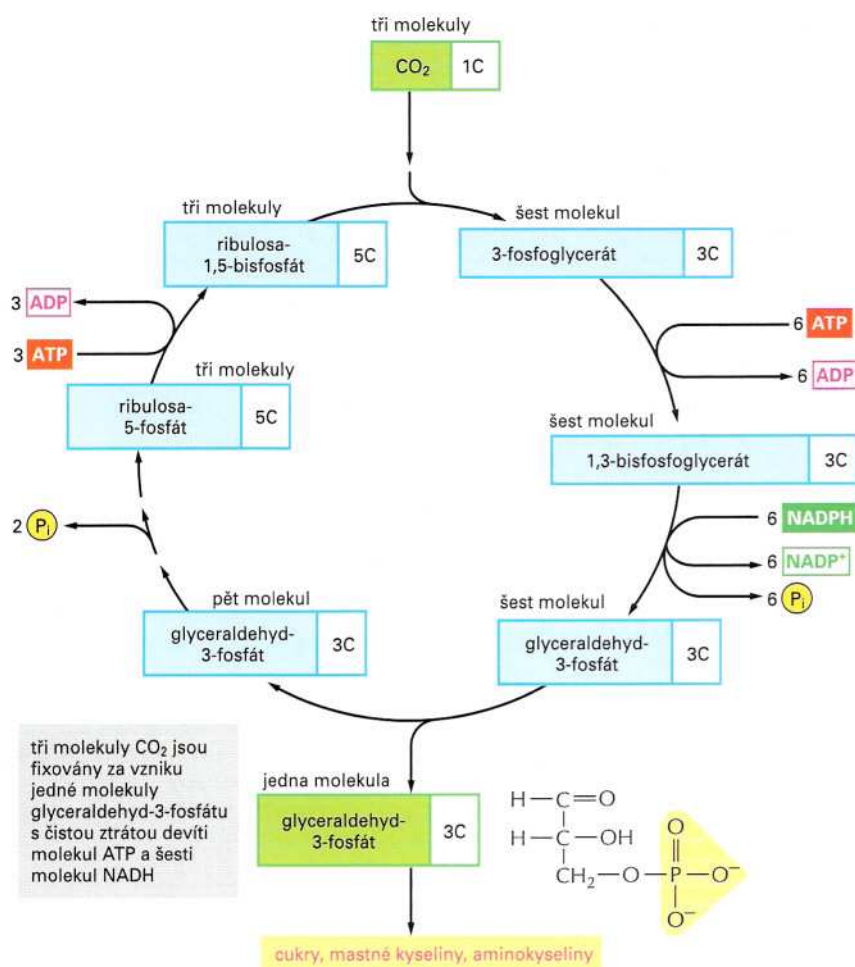
Fixace uhlíku je katalyzována ribulosabisfosfátkarboxylázou

U jsme viděli, jak světelná fáze fotosyntézy vytváří ATP a NADPH. Teď se zaměříme na to, jak se tyto sloučeniny využívají v reakcích **fixace uhlíku**. Při oxidaci sacharidů na CO₂ a H₂O se uvolňuje velké množství volné energie. Je proto jasné, že opačná reakce, vznik sacharidu z CO₂ a H₂O, musí být energeticky velmi nepříznivá. Aby mohla probíhat, musí být spřažena s energeticky příznivou reakcí, která ji pohání.

Hlavní reakce fixace fotosyntetického uhlíku, ve které se atom anorganického uhlíku (v podobě CO₂) mění v uhlík organický, je uvedena na obrázku 13-35. CO₂ z atmosféry se spojuje s pětiuhlíkovým cukerným derivátem *ribulosa-1,5-bisfosfátem* a vodou za vzniku dvou trojuhlíkatých molekul 3-fosfoglycerátu. Tato reakce, které byla objevena v roce 1948, je v chloroplastovém stromatu katalyzována velkým



Obrázek 13-35 Iničiální reakce fixace uhlíku. Tato reakce, ve které se oxid uhlíčitý převádí na organickou sloučeninu, je ve stromatu chloroplastu katalyzována hojným enzymem ribulosabisfosfátkarboxylázou. Produktem je 3-fosfoglycerát.



Obrázek 13-36 Cyklus fixace uhlíku, v kterém vznikají organické molekuly z CO₂ a H₂O. Počet uhlíkových atomů v každém typu molekuly je udán v bílém políčku. Mezi glyceraldehyd-3-fosfátem a ribulosa-5-fosfátem je celá řada meziproductů, ale zde jsme je pro názornost vynechali. Není také ukázán vstup vody do cyklu.

enzymem zvaným *ribulosabisfosfátkarboxyláza* (*rubisco*). Protože tento enzym pracuje ve srovnání s jinými enzymy velmi pomalu (zpracuje asi tři molekuly substrátu za sekundu, zatímco typický enzym jich zpracuje 1000), je zapotřebí mnoha jeho molekul. Ribulosabisfosfátkarboxyláza často představuje více než 50 % celkové hmotnosti proteinů v chloroplastech a je známa jako nejhojnější protein na Zemi.

Reakce prvního navázání CO₂ je energeticky příznivá, ale jen proto, že do ní vstupuje energeticky bohatá látka ribulosa-1,5-bisfosfát, s níž se vždy spojí jedna molekula CO₂ (obr. 13-35). Důmyslná metabolická dráha regenerace této sloučeniny vyžaduje jak ATP tak NADPH; byla prozkoumána při jednom z prvních úspěšných použití radioaktivních izotopů jako značících látek v biochemii. Tento *cyklus fixace uhlíku* (neboli Calvinův cyklus) je načrtnut na obrázku 13-36. Je to cyklický děj, který začíná a končí ribulosa-1,5-bisfosfátem. Na každé tři molekuly oxidu uhličitého, které vstupují do cyklu, se vytvoří jedna nová molekula *glyceraldehyd-3-fosfátu*, tj. tříuhlíkatého cukru, který je čistým výtěžkem cyklu. Tento cukr se potom použije k syntéze mnoha dalších cukrů a jiných organických molekul.

V cyklu fixace uhlíku se na každou molekulu CO₂ převedenou do sacharidu spotřebují tři molekuly ATP a dvě molekuly NADPH. Proto je pro tvorbu cukerných molekul z CO₂ a H₂O zapotřebí jak energie fosfátové vazby (jako ATP) tak redukční činidlo (NADPH).

Fixací uhlíku v chloroplastech se tvoří sacharosa a škrob

Velká část glycerinaldehyd-3-fosfátu vytvořeného v chloroplastech se přenáší do cytosolu. Část z něj vstupuje do glykolytické dráhy (viz str. 112) a mění se v pyruvát, který se potom využije k tvorbě ATP oxidační fosforylací v mitochondriích rostlinných buněk. Glycerinaldehyd-3-fosfát se rovněž převádí na mnoho jiných metabolitů včetně disacharidu sacharosa. *Sacharosa* je hlavní formou, ve které je cukr přenášen mezi rostlinnými buňkami. Jako se glukosa přenáší v krvi živočichů, tak se z listů cévními svazky přenáší sacharosa, aby byly zásobovány sacharidem i ostatní části rostliny.

Glycerinaldehyd-3-fosfát, který zůstane v chloroplastu, je z největší části převeden ve stromatu na *škrob*. Podobně jako glykogen v živočišných buňkách je škrob polymerem glukosy a slouží jako sacharidová rezerva. Tvorba škrobu je regulována, takže se škrob vytváří v době zvýšené fotosyntetické aktivity a ukládá se v podobě velkých zrněk ve stromatu chloroplastu (13-26B). V noci se škrob odbourává na cukry a tak pomáhá pokrýt metabolické potřeby rostliny. Škrob tvoří důležitou složku potravy všech živočichů, kteří se živí rostlinami.

Genetický aparát mitochondrií a chloroplastů odráží jejich prokaryontní původ

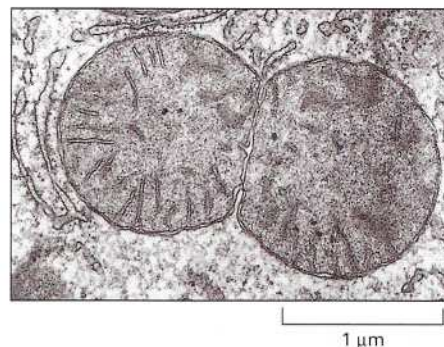
Způsob, jakým se mitochondrie dělí, totiž růst následovaný přehrádečným dělením (obr. 13-37), je důkazem jejich bakteriálního původu. Jak bylo vysvětleno v Kapitole 1, existuje důkaz, že mitochondrie vznikly před více než miliardou let při pohlcení aerobní bakterie primitivní anaerobní eukaryontní buňkou (viz obr. 1-12). Od té doby se většina původních bakteriálních genů přenesla do buněčného jádra a v samotné mitochondrii zůstalo poměrně málo genů. Živočišné mitochondrie obsahují jen velmi jednoduchý genetický systém: například lidský mitochondriální genom obsahuje pouze 16 569 nukleotidových párů DNA, které představují 37 genů. Velká většina mitochondriálních proteinů, včetně těch, které jsou potřebné k tvorbě mitochondriální RNA (polymeráza, ribosomální proteiny), a všech enzymů cyklu kyseliny citronové, je produkována geny z jádra a musí se do mitochondrií přenášet z cytosolu, kde tyto látky vznikají (probírá se v Kapitole 4).

Chloroplast také vznikl pohlcením bakterie, v tomto případě fotosyntetické bakterie, která odebírala své elektrony z vody a uvolňovala kyslík jako vedlejší produkt (viz obr. 1-14). Jako důkaz pravosti tohoto původu chloroplast obsahuje mnoho vlastních genů a úplný transkripční a translační aparát, který je při vytváření proteinů podle těchto genů zapotřebí. Genomy chloroplastů jsou podstatně větší než genomy mitochondrií a jejich geny jsou velice podobné genům sinic, ze kterých se podle všeho vyvinuly. Právě tak je řada chloroplastových proteinů podobně jako proteiny mitochondrií kódována jadernými geny a musí být importována z cytosolu.

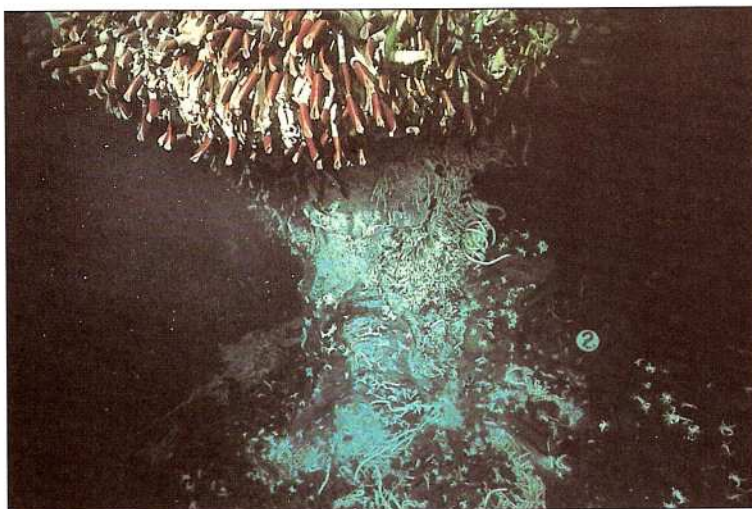
Země je zaplněna miliony druhů organismů. Život je všude, kam se podíváme. Většinu z těchto organismů jsme nikdy neviděli - počínaje mnoha podivnými formami života, jimž se daří v horkých vodách hydrotermálních pramenů hluboko v moři (obr. 13-38)

Otázka 13-10

- Jak se mohou buňky kořenů rostlin udržet při životě, když neobsahují žádné chloroplasty a nejsou vystaveny světlu?
- Na rozdíl od mitochondrií nemají chloroplasty žádný přenašeč, který by jim umožnil exportovat ATP do cytosolu. Jak potom rostlinné buňky získávají ATP, který potřebují pro energeticky náročné metabolické reakce v cytosolu?



Obrázek 13-37 Elektronmikroskopický snímek dělící se mitochondrie.



Obrázek 13-38 Některé organismy žijící v blízkosti horkých zřídél hluboko na dně oceánu. Tyto organismy byly objeveny teprve poté, co do těchto míst pronikla moderní podmořská plavidla.

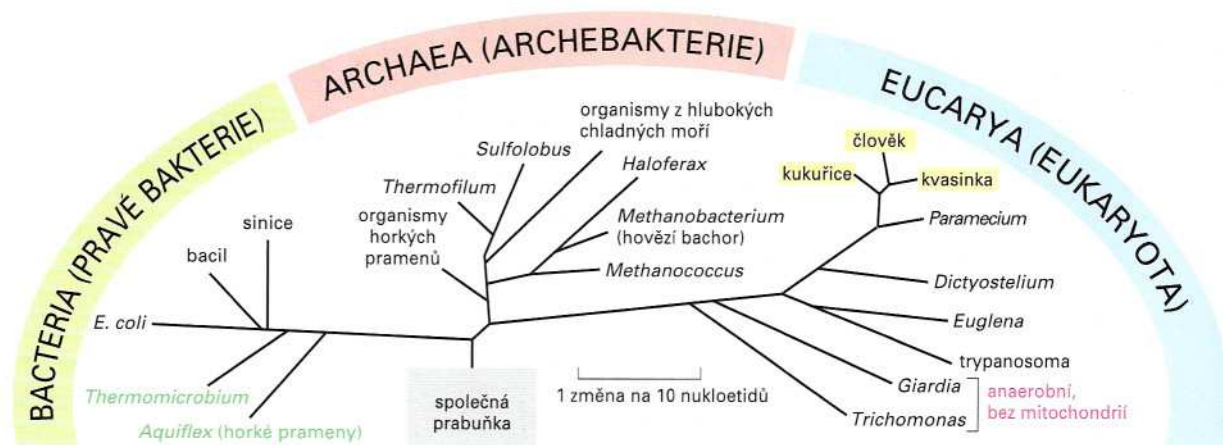
a konče nepředstavitelným množstvím jednobuněčných mikroorganismů v půdě pod našima nohama. Techniky rekombinantní DNA, popsané v Kapitole 10, nám nyní poskytují mocná zvětšovací skla, kterými si můžeme tento živý svět prohlédnout. Díky těmto sklům objevujeme mnoho nových jednobuněčných organismů, které nám pomáhají procítit obrovskou různorodost živých tvorů. Proto v závěru této kapitoly rozebereme podstatu některých našich jednobuněčných předků, přičemž se zaměříme hlavně na způsob, jakým získávali energii.

Naši jednobuněční předkové

Naše současné pojetí historie života na Zemi ukazuje obrázek 13-2. Mikrofosilie poskytly solidní důkazy, podle nichž již před 3,5 miliardami let existovaly jednobuněčné organismy, které do velké míry připomínaly dnešní prokaryota. Fosilie nám však nemohou říci nic o chemii těchto dávných buněk, zvláště když víme, že povrchové podobnosti mnoha prokaryot nám prozrazují jen velmi málo z jejich neobyčejně různorodé biochemie. Místo toho nacházíme nejlepší klíče k historii života v buňkách současnosti – v podobě mnoha molekul, z nich jsou sestaveny. Tyto molekuly nám podobně jako otisky zanechané na místě činu poskytují mocný důkaz, díky kterému můžeme sledovat běh dávných událostí.

Sekvence RNA vydávají svědectví o průběhu evoluce

Ribosomální ribonukleové kyseliny (rRNA) se nacházejí ve všech živých buňkách. Srovnávání pořadí nukleotidů ribosomálních RNA v různých organismech lze využít k sledování evolučních vztahů organismů hluboko do minulosti. Takto určená příbuznost mezi organismy je prezentována jako *dendrogram* (*fylogenetický strom*), ve kterém je celková délka čáry spojující libovolné dva organismy úměrná počtu rozdílů v nukleotidové sekvenci jejich dvou rRNA - čím více je rozdílů, tím je spojnice delší a tím vzdálenější je vztah mezi oběma organismy. Obrázek 13-39 ukazuje dendrogram sestavený ze sekvencí rRNA, který ukazuje polohu několika vybraných organismů v celé říši



Obrázek 13-39 **Fylogenetický strom odvozený z pořadí nukleotidů v ribosomální RNA.** Tento dendrogram ukazuje vztahy mezi několika vybranými organismy ze tří navržených oblastí žijících organismů: Bacteria, Archaea a Eucarya.

živých tvorů. Shoda těchto dendrogramů s ostatními biochemickými údaji potvrzuje, že evoluční vztahy mezi organismy mohou být tímto způsobem spolehlivě měřeny.

Dostupné údaje ze studií molekulární evoluce vyústily v největší přehodnocení našeho pohledu na živý svět. Na základě údajů buněčné biologie a molekulárních studií můžeme živý svět rozčlenit do tří částí: dvě velké a navzájem velmi odlišné domény tvoří dva typy prokaryot – Archaea a Bacteria, třetí doménou jsou eukaryota, tedy Eucarya. Shledáváme, že nám neznámější organismy, jako jsou zvířata, rostliny a houby, zabírají ve světě živých tvorů jen docela malý koutek (vyznačený na obr. 13-39 žlutou barvou).

Molekulární studie nám také říkají, že všechny tyto tři domény živých organismů jsou velmi staré. Zvláště počátky eukaryot se vztahují k mnohem starší době, než se dříve myslelo. Dlouhá čára, která v diagramu fylogenetického stromu spojuje Eucarya se společným předchůdcem všech tří skupin, ukazuje, že linie eukaryot začíná dosti dávno, a to pravděpodobně pohlcením archebakteriální buňky nějakou Gram-negativní bakterií postrádající buněčnou stěnu (*poznámka překladatele*). V souladu s touto teorií druhy *Giardia* a *Trichomonas* postrádají mitochondrie (viz obrázky 13-29 a 1-28). Teprve po získání bakteriálních symbiontů, z nichž se později vyvinuly mitochondrie (a chloroplasty v případě rostlin a řas), se eukaryotní buňky vydaly na úchvatnou cestu evoluce, která nakonec vedla až ke složitým mnohobuněčným organismům.

Dávné buňky zřejmě vznikly v horkém prostředí

Stále širší používání technik rekombinantní DNA nás přivádí k překvapujícímu zjištění, že svět je zaplněn mnohem větším počtem jednobuněčných organismů, než bychom kdy mohli tušit. Techniky jako klonování DNA a PCR-analýza (viz Kapitola 10) mohou být použity k popisu všech různých mikroorganismů, které žijí v určité lokalitě – například v horkých sirtých pramenech či v půdě. Ve srovnání se standardními mikrobiologickými technikami, které detegují jen ty mikroby, které mohou přežít a množit se v laboratorní kultuře, studie rekombinantní DNA mohou předem zjistit jeden mikroorganismus ve společnosti sta jiných. Odhaduje se, že jen ve svrchních 15 centimetrech půdy žijí desítky tun jednobuněčných mikroorganismů na hektar. Je proto jasné, že zbývá objevit ještě celou obrovskou spoustu

mikroorganismů a že jsme do dnešního dne prozkoumali jen nepatrný vzorek celého živého světa.

Druhy, které mají na obrázku 13-39 nejbližší k hypotetickému společnému předchůdci všech tří domén, patří jak mezi Archaea tak mezi Bacteria a jsou označeny *zeleně*. Tyto organismy spojuje záliba v horkých místech (75-95 °C, což je blízko bodu varu vody); to napovídá, že jejich společný jednobuněčný předek žil ve velmi horkém anaerobním prostředí.

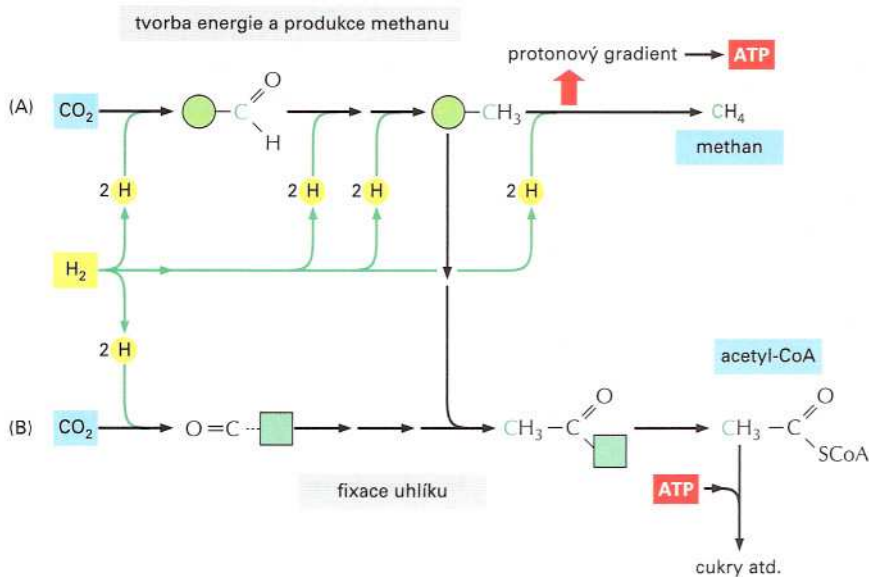
Prostředí, ve kterém žily buňky před 3,5-3,8 miliardami let, dnes nejvíce připomínají hydrotermální „komíny“ hluboko v moři. Tyto prameny jsou místy, kde se roztavený plášť jádra Země prodírá zemskou kůrou a rozšiřuje mořské dno (viz obr. 13-38). Tuto kapitolu ukončíme krátkým pojednáním o jednom organismu, který v tomto prostředí žije. Jeho způsob existence nám napovídá, jak mohly první buňky využívat přenosu elektronů k získávání energie a uhlíkatých sloučenin z anorganických materiálů, které byly na horké prvotní Zemi dostupné.

***Methanococcus* žije v temnotě a živí se pouze anorganickými látkami**

Lidský genom, který je souhrnem DNA všech našich chromosomů, obsahuje 3 miliardy nukleotidových párů. Velký mezinárodní projekt, který si klade za cíl úplné rozluštění sekvence této DNA, má být ukončen v roce 2005. Avšak technologie vyvinutá pro tento projekt umožnila splnit mnohem jednodušší úkol – určit pořadí celého genomu u mnohem menších „modelových organismů“, se kterými můžeme srovnávat svou vlastní DNA. Zatím je úplná genomová sekvence známa u dvou eukaryontů – kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, jejíž genom obsahuje 12 milionů nukleotidových párů a je 250krát menší než náš (viz obr. 10-6), a u hlístice *Caenorhabditis elegans*.

Kvasničný genom obsahuje oproti našim 60 000 genům jen asi 5700 genů. Byly také kompletně osekvenovány genomy tuctu prokaryot. Mezi ně patří nejjednodušší známá buňka, drobná bakterie *Mycoplasma genitalium* s pouhými 500 geny a bakterie *Methanococcus jannaschii*. *Methanococcus* obsahuje asi 1800 genů a byl původně izolován z hydrotermálního zřídla více než jednu míli pod hladinou oceánu.

Methanococcus patří mezi Archaea, která žijí při vysokých teplotách. Živí se výhradně anorganickou stravou za nepřítomnosti světla a plynného kyslíku, přičemž využívá plynný vodík (H_2), CO_2 a dusík (N_2), které bublají z pramene. Redukuje N_2 na amoniak (NH_3) přidáním vodíku, čím dusíku umožní začlenit se do organických molekul. Tento děj **fixace dusíku** spotřebuje velké množství energie, podobně jako fixace uhlíku, kterou bakterie potřebuje k převádění CO_2 na cukry. Velká část energie vyžadovaná oběma ději pochází z přenosu elektronů z H_2 na CO_2 za uvolnění velkého množství methanu (CH_4) jako vedlejšího produktu. Produkce zemního plynu tedy dala těmto bakteriím jejich název). Část tohoto přenosu elektronů se odehrává v bakteriální membráně a jeho výsledkem je čerpání protonů (H^+) přes tuto membránu. Výsledný gradient elektrochemického potenciálu protonů pohání ATP-syntázu ve stejné membráně při tvorbě ATP (obr. 13-40A). Výskyt chemiosmotického spřažení v takových organismech jako



Obrázek 13-40 Získávání energie a fixace uhlíku v bakterii *Methanococcus*. Tato bakterie, žijící hluboko v moři, používá v obou ukázaných drahách jako redukční činidlo plyný vodík (H_2). (A) Získávání energie. Tvorba methanu (CH_4) z CO_2 probíhá v několika krocích. Počáteční redukční děje jsou katalyzovány enzymy a probíhají v cytoplasmě. Naproti tomu poslední redukční krok zahrnuje membránový přenos elektronů, který vytváří protonový gradient pohánějící syntézu ATP a methan při něm vzniká jako vedlejší produkt. (B) Fixace uhlíku. Výsledkem hlavní dráhy fixace oxidu uhličitého je tvorba acetylkoenzymu A. Ten je zdrojem uhlíku pro cukry, mastné kyseliny a nukleotidy, které buňka potřebuje k biosyntéze. Zelené kroužky a čtverce na obrázku představují řadu koenzymů, na které jsou uvedené metabolické meziproducty navázány.

Methanococcus napovídá, že ukládání energie, pocházející z přenosu elektronů, do gradientu H^+ je mimořádně starým procesem.

Mechanismus fixace uhlíku, který využívá *Methanococcus*, se zcela liší od způsobu fixace uhlíku u rostlin, řas a sinic, jak jsme jej probírali dříve. Jak ukazuje obrázek 13-40B, plyný vodík (H_2) je nejen zdrojem vysokoenergetických elektronů pro membránové děje, při nich se tvoří ATP, ale také redukčním činidlem, které převádí CO_2 na enzymově vázanou molekulu oxidu uhelnatého (CO). CO potom reaguje s methylovou skupinou, která je meziproduktem při vzniku methanu, a vytváří acetyl-CoA. Acetyl-CoA se v dalších reakcích mění v cukry, nukleotidy a mnoho dalších malých a velkých molekul; tyto obecně známé dráhy jsou katalyzovány enzymy a vyžadují ATP.

Methanococcus není v žádném případě jednoduchým organismem. Mezi jeho 1800 genů je například více než 60 těch, které kódují enzymy fungující pouze v dráze od CO_2 k CH_4 . První buňky, které obsahovaly proteiny, musely být mnohem jednodušší. Odhadujeme, že jim stačila necelá stovka genů. Je sekvenováno mnohem více genů z různých jednobuněčných organismů; to nám dává stále mocnější nástroje pro rekonstrukci minulosti. Hlavní výzvy však zůstávají. Například si žádným přesvědčivým způsobem neumíme vysvětlit, jak buňky založené na RNA, jejichž existenci předpokládáme v rané fázi buněčné evoluce (viz obr. 7-39), mohly vyvinout a začít využívat procesy kvašení či přenosu elektronů v membráně, při nichž se získává energie a které pohánějí všechny dnes známé buňky.

Základní shrnutí

- Mitochondrie, chloroplasty a mnohé bakterie produkují ATP v membránovém ději známém jako chemiosmotické spřažení.
- Mitochondrie produkují většinu ATP v živočišných buňkách; přitom využívají energie pocházející z oxidace cukrů a mastných kyselin.
- Mitochondrie jsou ohraničeny dvěma soustřednými membránami, z nichž vnitřní v sobě uzavírá mitochondriální matrix. Prostor matrix obsahuje mnoho enzymů včetně enzymů cyklu kyseliny citronové. Tyto enzymy vytvářejí velké množství NADH a FADH₂ z oxidace acetyl-CoA.
- Ve vnitřní mitochondriální membráně procházejí vysokoenergetické elektrony z NADH a FADH₂ elektrontransportním (dýchacím) řetězcem a nakonec se spojují s molekulovým kyslíkem (O₂) v energeticky příznivé reakci.
- Část energie uvolňované při přenosu elektronů v dýchacím řetězci je zachycována a využívá se k odčerpávání H⁺ z matrix. Tím vzniká gradient elektrochemického potenciálu protonů (H⁺) přes membránu. Čerpání protonů zajišťují tři velké dýchací enzymové komplexy zanořené v membráně.
- Výsledný gradient elektrochemického potenciálu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu se potom využívá k tvorbě ATP při zpětném toku H⁺ do matrix skrz ATP-syntázu, enzym umístěný ve vnitřní mitochondriální membráně.
- Gradient elektrochemického potenciálu protonů také pohání aktivní transport metabolitů do mitochondrie a ven z ní.
- Při fotosyntéze v chloroplastech a fotosyntetických bakteriích se vysokoenergetické elektrony generují při absorpci slunečního světla chlorofylem. Tato energie se zachycuje proteinovými komplexy známými jako fotosystémy, které se nacházejí v thylakoidních membránách chloroplastů.
- Elektrontransportní řetězce spojené s fotosystémy přenášejí elektrony z vody na NADP⁺ za vzniku NADPH a současně tvorby gradientu elektrochemického potenciálu protonů přes membránu thylakoidu. Jako vedlejší produkt vzniká molekulový kyslík (O₂).
- Stejně jako v mitochondriích je i gradient elektrochemického potenciálu přes membránu thylakoidu využíván ATP-syntázou zanořenou v membráně k tvorbě ATP.
- ATP a NADPH vznikající při fotosyntéze se v chloroplastu používají k pohonu cyklu fixace uhlíku ve stromatu chloroplastu; přitom z CO₂ vznikají cukry.
- Tyto cukry se přenášejí do cytosolu, kde jsou metabolizovány a poskytují organický uhlík, ATP (přes mitochondrie) a redukční činidlo pro zbytek buňky.
- Mechanismy chemiosmotického spřažení jsou velmi rozšířené a jejich původ je velmi starý. Mitochondrie i chloroplasty se zřejmě vyvinuly z bakterií pohlčených jednoduchými eukaryontními buňkami.
- Bakterie žijící v prostředí velmi podobném tomu, které podle všeho panovalo v rané fázi vývoje Země, také používají k produkci ATP chemiosmotické spřažení.

Klíčová slova

ATP-syntáza

chemiosmotické
spřažení

chinon

chlorofyl

chloroplast

cytochrom

cytochromoxidáza

elektron-transportní
řetězec

Fe-S-centrum

fixace dusíku

fixace uhlíku

fotosyntéza

fotosystém

matrix

mitochondrie

oxidační fosforylace

redoxní reakce

redoxní pár

redoxní potenciál

stroma

14 Vnitrobuněčné oddíly a transport

V typické eukaryotní buňce se v každém okamžiku odehrávají tisíce chemických reakcí, z nichž mnohé jsou vzájemně neslučitelné. Například jedna řada reakcí vytváří glukosu, zatímco jiná ji odbourává; některé enzymy syntetizují peptidové vazby, zatímco jiné tyto vazby hydrolyzují atd. Pokud například rozbijeme jaterní buňky a smícháme jejich obsah ve zkumavce, bude výsledkem chemický chaos a buněčné enzymy a další proteiny budou rychle odbourány vlastními proteolytickými enzymy buňky. Aby mohla buňka účinně fungovat, musí být současně probíhající chemické děje nějak odděleny.

Buňky vyvinuly k oddělení a organizaci svých chemických dějů hned několik strategií. Jednou možností, kterou využívají jak prokaryotní tak eukaryotní buňky, je soustředit různé enzymy potřebné ke katalýze určitého sledu reakcí do jediného velkého proteinového komplexu. Jak se probírá v jiných kapitolách, nacházejí takové multiproteinové komplexy uplatnění například při syntéze DNA, RNA a proteinů. Druhou strategií, která je vysoce rozvinutá v eukaryotních buňkách, je soustředění různých metabolických dějů a proteinů potřebných k jejich provedení do různých oddílů ohraničených membránou. Jak jsme probrali v Kapitolách 11 a 12, buněčné membrány plní funkce selektivně propustných bariér, které mohou řídit transport většiny molekul.

V první sekci si popíšeme základní membránové oddíly neboli *membránové organely* eukaryotních buněk a krátce pojednáme o jejich funkcích a o tom, jak se mohly vyvinout. V druhé sekci probereme, jak se ustavuje a udržuje proteinové složení různých oddílů. Každý oddíl obsahuje jedinečný soubor proteinů, které se musí selektivně přenášet z cytosolu, kde jsou syntetizovány, do oddílu, kde se využívají. Tento transportní proces, zvaný třídění proteinů, závisí na signálech vestavěných do aminokyselinové sekvence proteinů. Ve třetí sekci si popíšeme, jak některé membránové oddíly eukaryotní buňky navzájem komunikují tak, že vytvářejí malé membránové

MEMBRÁNOVÉ ORGANELY

- Eukaryotní buňky obsahují základní sadu membránových organel
- Membránové organely se vyvíjely různými cestami

TŘÍDĚNÍ PROTEINŮ

- Proteiny se dostávají do organel třemi mechanismy
- Adresová sekvence směřuje proteiny do správného oddílu
- Proteiny vstupují do jádra jadernými póry
- Při vstupu do mitochondrií a chloroplastů se proteiny rozvinou
- Proteiny vstupují do endoplasmatického retikula už během své syntézy
- Rozpustné proteiny se uvolňují do lumen ER
- Iniciační a terminační signál určují uspořádání transmembránového proteinu v dvojné vrstvě lipidů

VEZIKULÁRNÍ TRANSPORT

- Transportní vácčky přepravují rozpustné proteiny a membrány mezi jednotlivými oddíly buňky
- Pučení vácčků je poháněno skládáním proteinového pláště
- Specifická místa pro navázání vácčků určují proteiny SNARE
- Specifita navádění vácčků k jejich cílům závisí na SNARE-proteinech

SEKREČNÍ DRÁHY

- Většina proteinů je kovalentně modifikována v ER
- Kvalita proteinů je zajištěna kontrolou při výstupu z ER
- Proteiny jsou dále chemicky upravovány a tříděny v Golgiho aparátu
- Sekreční proteiny se z buňky uvolňují exocytózou

ENDOCYTOTICKÉ DRÁHY

- Specializované fagocytotické buňky pohlcují velké částice
- Endocytoza zprostředkovaná receptory poskytuje specifickou cestu do živočišných buněk
- Endocytované makromolekuly jsou tříděny v endosomech
- Lyzosomy jsou základními místy vnitrobuněčného trávení

váčky (*vezikuly*), které se odškrcují od oddílu, pohybují se cytosolem a fúzí s jinými složkami v ději zvaném *vezikulární transport*. V posledních dvou sekcích probereme, jak tento stálý provoz uvnitř buňky také velkou měrou přispívá k uvolňování proteinů z buňky v ději zvaném *exocytoza* a naopak přijímání proteinů v *endocytoze*.

Membránové organely

Zatímco prokaryotní buňka se skládá z jediného oddílu, kterým je **cytosol** uzavřený v plasmatické membráně, je eukaryotní buňka důmyslně rozdělena vnitřními membránami. Tyto membrány vytváří uzavřené oddíly, ve kterých mohou působit sady enzymů, aniž by je rušily reakce probíhající v jiných oddílech. Díváme-li se pod elektronovým mikroskopem na příčný řez rostlinné nebo živočišné buňky, vidíme mnoho malých membránou ohraničených váčků, trubiček, kuliček a nepravidelných struktur, často rozmístěných bez příliš viditelného pořádku (obr. 14-1). Všechny tyto struktury jsou různé membránové organely nebo části takových organel a každá z nich obsahuje unikátní sadu velkých a malých molekul.

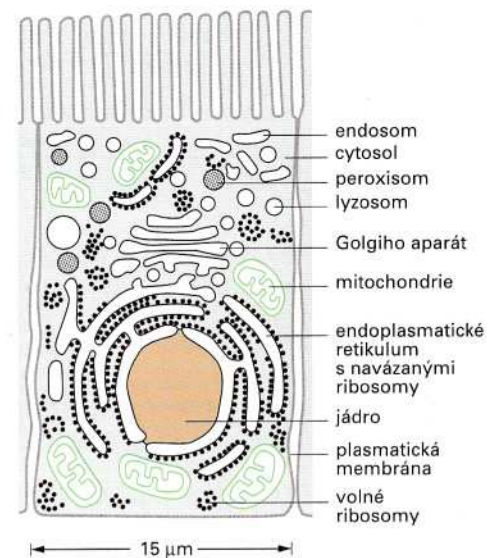


Obrázek 14-1 Elektronmikroskopický snímek části jaterní buňky pozorované v příčném řezu. Lze tu vidět celou řadu příkladů hlavních membránových organel. Malé černé granule mezi membránovými oddíly jsou zrnka glykogenu (glykosomy), která jsou agregáty glykogenu a enzymů řídících jeho syntézu a odbourání.

Eukaryontní buňky obsahují základní sadu membránových organel

Hlavní **membránové organely** živočišné buňky jsou znázorněny na obrázku 14-2 a jejich funkce jsou shrnuty v tabulce 14-1. Jsou obklopeny cytosolem, který je uzavřen v plasmatické membráně. *Jádro* je ústřední organelou každé buňky. Je obklopeno dvojitou membránou, známou jako *jaderný obal*, a komunikuje s cytosolem přes *jaderné póry* v tomto obalu. Vnější jaderná membrána plynule přechází v *endoplasmatické retikulum (ER)*, což je soustava vzájemně propojených membránových váčků a trubiček, která se často rozpíná téměř po celé buňce. ER je hlavním místem syntézy nových membrán buňky. K velké části jeho cytosolového povrchu jsou přisedlé ribosomy; proto se tato část ER nazývá *drsňé endoplasmatické retikulum*. Ribosomy se aktivně účastní syntézy proteinů, které jsou poté dodávány do lumen ER nebo do jeho membrán. *Hladké ER* se v některých buňkách vyskytuje jen poskrovnu; v jiných je však značně vyvinuté a plní specifické funkce: je například místem syntézy steroidního hormonu v buňkách nadledvin a také místem detoxikace celé řady organických molekul včetně alkoholu v jaterních buňkách.

Golgiho aparát, který se obvykle nachází blízko jádra, přijímá proteiny a lipidy z ER, chemicky je upravuje a potom je rozesílá do různých míst určených v buňce. *Lyzosomy* jsou malé váčky s trávicími enzymy. Odbourávají opotřebované organely i makromolekuly a částice, které buňka pohltila při endocytoze. Na své cestě k lyzozomům musí pohlcené látky nejprve projít řadou oddílů zvaných *endosomy*, které vybírají některé z natrávených molekul a zařazují je zpět do plasmatické membrány. *Peroxisomy* jsou malé organely s jednoduchou membránou. Obsahují enzymy užívané v oxidačních reakcích, při kterých se odbourávají lipidy a ničí se toxické molekuly. *Mitochondrie* a (v rostlinných buňkách) *chloroplasty* jsou obklopeny dvojitou membránou a jsou místy oxidační fosforylace a fotosyntézy (viz Kapitola 13); oba druhy organel obsahují membrány, které jsou úzce specializovány na produkci ATP.



Obrázek 14-2 Hlavní membránové organely živočišné buňky. Tato buňka z výstelky střeva obsahuje základní soubor organel, které se nacházejí ve většině živočišných buněk. Jádro, endoplasmatické retikulum (ER), Golgiho aparát, lyzosomy, endosomy, mitochondrie a peroxisomy jsou různé oddíly oddělené od cytosolu (*šedý*) nejméně jednou selektivně propustnou membránou. Jsou ukázány také ribosomy, ačkoli nejsou uzavřeny v membráně a jsou příliš malé na to, abychom je mohli spatřit ve světelném mikroskopu, a tudíž neodpovídají původní definici organely. Některé ribosomy se v cytosolu vyskytují volně, jiné jsou vázány na cytosolovém povrchu ER.

Tabulka 14-1 Hlavní funkce membránových oddílů eukaryontní buňky

Oddíl	Hlavní funkce
Cytosol	obsahuje mnoho metabolických drah (Kapitoly 3 a 4), syntéza proteinů (Kapitola 7)
Jádro	obsahuje hlavní genetickou výbavu (Kapitola 8), syntéza DNA a RNA (Kapitoly 6 a 7)
Endoplasmatické retikulum (ER)	syntéza většiny lipidů (Kapitola 11), syntéza proteinů pro distribuci do celé řady organel a do plasmatické membrány (tato kapitola)
Golgiho aparát	úprava, třídění a balení proteinů a lipidů pro sekreci nebo k předání jiné organely (tato kapitola)
Lyzosomy	odbourávání látek uvnitř buňky (tato kapitola)
Endosomy	třídění endocytovaného materiálu (tato kapitola)
Mitochondrie	syntéza ATP oxidační fosforylací (Kapitola 13)
Chloroplasty (v rostlinných buňkách)	syntéza ATP a fixace uhlíku fotosyntézou (Kapitola 13)
Peroxisomy	oxidace toxických molekul

Tabulka 14-2 Relativní objemy zabírané hlavními membránovými organelami jaterní buňky (hepatocytu)

Buněčný oddíl	Procenta z celkového objemu buňky	Přibližný počet v jedné buňce
Cytosol	54	1
Mitochondrie	22	1700
Endoplasmatické retikulum	12	1
Jádro	6	1
Golgiho aparát	3	1
Peroxisomy	1	400
Lyzosomy	1	300
Endosomy	1	200

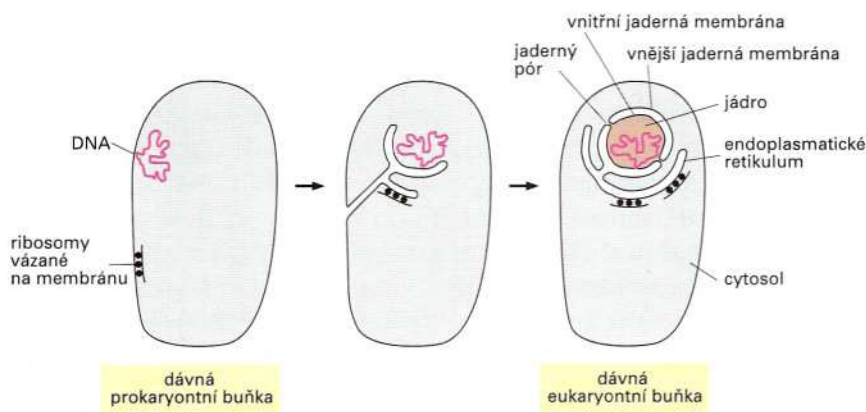
Mnoho membránových organel včetně ER, Golgiho aparátu, mitochondrií a chloroplastů se udržuje na svých pozicích v buňce tak, že jsou přichyceny na cytoskelet, přesněji řečeno k mikrotubulům. Cytoskeletální vlákna představují dráhy pro pohyb organel v buňce a pro dopravu váčků mezi nimi. Tento pohyb je zprostředkován motorovými proteiny, které využívají energii z hydrolýzy ATP k pohonu organel a váčků podél vláken, jak se probírá v Kapitole 16.

Membránové organely společně v průměru zaujímají téměř polovinu objemu eukaryontní buňky (tabulka 14-2) a celkové množství membrány, která je s nimi spojena, je enormní: například v typické savčí buňce je plocha membrány endoplasmatického retikula 20–30krát větší než plocha plasmatické membrány. V pojmech plochy a hmotnosti plasmatická membrána ve většině eukaryontních buněk představuje jen malou část membrán.

Jakmile je organela oddělena od ostatních buněčných struktur, můžeme se dozvědět o hodně víc o její struktuře a funkci. Velká většina organel je příliš malá na to, abychom je mohli izolovat jednotlivě; je však možné oddělit jeden druh organel od druhého *diferenciální centrifugací* (popisuje se v panelu 5-4 na str. 160-161). Jakmile byl získán přečištěný vzorek jednoho typu organel, můžeme identifikovat proteiny dotýčné organely. V mnoha případech lze celou organelu inkubovat ve zkumavce za podmínek, které umožní studium jejích funkcí. Například izolované mitochondrie mohou produkovat ATP při oxidaci pyruvátu na CO_2 a vodu, pokud je dostatečně zásobíme ADP a O_2 .

Membránové organely se vyvíjely různými cestami

Snažíme-li se porozumět vztahu mezi různými oddíly v současné eukaryontní buňce, je užitečné vzít v úvahu možné cesty jejich evoluce. Oddíly se pravděpodobně vyvíjely po etapách. Předchůdci prvních eukaryontních buněk byly zejména jednoduché mikroorganismy podobné bakteriím, které měly plasmatickou membránu, ale žádné membrány vnitřní. Plasmatická membrána v takových buňkách zřejmě zajišťovala všechny funkce závislé na membráně včetně syntézy ATP a lipidů, jak je zajišťuje plasmatická membrána v současných bakteriích. Bakterie mohou s touto výbavou vystačit díky své malé velikosti a z toho plynoucímu vysokému poměru povrchu k objemu; jejich plasmatická membrána je schopna udržovat všechny životně důležité

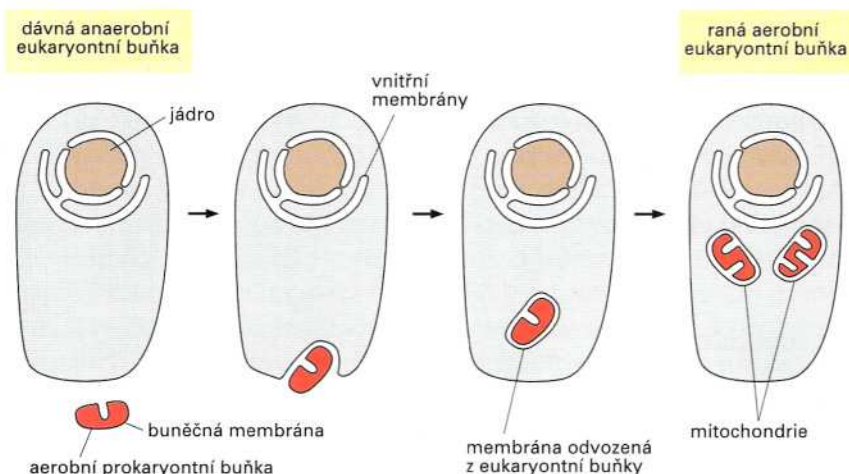


Obrázek 14-3 Možná cesta evoluce jaderných membrán a ER. V bakteriích je obvykle jediná molekula DNA uchycena k plasmatické membráně. Je možné, že ve velmi dávné prokaryontní buňce se plasmatická membrána s navázanou DNA mohla vchlípnit a nakonec vytvořila úplný dvojrstevný obal kolem DNA. Tento obal se zřejmě nakonec zcela odškrtl od plasmatické membrány a vytvořil jaderný oddíl obklopený dvojitou membránou. Jaderný obal prostupují kanály zvané jaderné póry, které jádru umožňují přímou komunikaci s cytosolem. Další části stejné membrány vytvořily ER, na kterém se uchytily některé ribosomy. Toto hypotetické schéma by vysvětlovalo, proč prostor mezi vnitřní a vnější membránou jaderného obalu plynule přechází v lumen ER.

funkce, pro které je membrána nezbytná. Současné eukaryontní buňky však mají objem 1000krát až 10 000krát větší než typická bakterie, jakou je např. *E. coli*. Takové velké buňky mají malý poměr povrchu k objemu, a zřejmě by nemohly přežít pouze s plasmatickou membránou. Eukaryontní buňky by tedy zřejmě nedosáhly své dnešní velikosti bez současného vývoje vnitřních membrán.

Má se za to, že membránové organely vznikly v průběhu evoluce nejméně dvěma způsoby. Jaderné membrány a membrány ER, Golgiho aparátu, endosomů a lyzosomů mají podle všeho svůj původ ve vchlípeních plasmatické membrány (obr. 14-3). Tyto membrány a organely, které v sobě uzavírají, tvoří dohromady část *soustavy vnitřních membrán*. Jak probereme později, interiéry těchto organel (s výjimkou jádra) široce komunikují navzájem i s okolím buňky prostřednictvím malých váčků, které se odškrcují od jedné organel a fúzí s jinými. V souladu s tímto navrhovaným evolučním původem buňka sama považuje vnitřní prostory organel v mnoha ohledech za „extracelulární“. Hypotetické schéma na obrázku 14-3 by také vysvětlovalo, proč je jádro obklopeno dvěma membránami. Ačkoli v současných bakteriích dochází ke vchlípení membrány jen zřídka, lze ho pozorovat v některých fotosyntetizujících bakteriích, ve kterých jsou oblasti plasmatické membrány obsahující fotosyntetický aparát internalizovány (tj. převedeny dovnitř) za vzniku intracelulárních váčků.

Mitochondrie a chloroplasty mají zřejmě odlišný původ. Narozdíl od ostatních organel mají svou vlastní krátkou DNA a mohou podle ní vyrábět některé proteiny, jak se probírá v Kapitole 13. Podobnost těch-



Obrázek 14-4 Možný evoluční původ mitochondrie. Má se za to, že mitochondrie se vyvinuly při pohlcení aerobního prokaryota velkou aerobní eukaryontní buňkou. Chloroplasty se zřejmě vyvinuly později podobným způsobem, když aerobní eukaryontní buňka pohltila fotosyntetizujícího prokaryota. To by vysvětlovalo, proč mají tyto organely dvě membrány a proč se neúčastní buněčného transportu, který spojuje mnoho jiných buněčných oddílů.

to genomů s genomy bakterií a značná podobnost některých jejich proteinů s bakteriálními proteiny napovídá, že mitochondrie a chloroplasty se vyvinuly z bakterií, které byly pohlceny primitivními eukaryontními buňkami a žily s nimi v symbioze. To by také vysvětlovalo, proč jsou tyto organely obklopeny dvojitou membránou (obr. 14-4). Jak by se dalo z jejich původu čekat, zůstávají mitochondrie a chloroplasty izolovány od rozsáhlé vezikulární dopravy, která spojuje vnitřní prostory většiny ostatních membránových organel navzájem a s okolím buňky. Po stručném přehledu membránových organel eukaryontní buňky se nyní zaměříme na to, jak která organela získává svou unikátní sadu proteinů.

Třídění proteinů

Před svým rozdělením na dvě dceřiné buňky musí eukaryontní buňka zdvojnásobit počet svých membránových organel. Buňka nemůže vytvořit tyto organely z ničeho: potřebuje informaci obsaženou v samotných organelách. Proto se organely tvoří z již existujících organel, které rostou a dělí se. Jak buňky rostou během buněčného cyklu (probírá se v Kapitole 17), membránové organely jsou zvětšovány přidáváním nových molekul; organely se potom dělí a při buněčném dělení jsou rozděleny mezi dvě dceřiné buňky. Jaderný obal, ER a Golgiho aparát se rozpadnou na malé váčky, které se hned po utvoření dvou dceřiných buněk slévají opět dohromady (viz Kapitolu 17). Růst organel vyžaduje přísun nových lipidů k tvorbě nových membrán a přísun příslušných proteinů – jak membránových proteinů tak rozpustných proteinů, které zaujmou vnitřek organely. Dokonce i v buňkách, které se nedělí, se musí proteiny nepřetržitě a přesně dodávat do organel; některé pro případnou sekreci z buňky, jiné jako náhrada za odbourané proteiny organely. Proto hlavní část tvorby a udržování membránových organel spočívá ve správném směřování nově syntetizovaných proteinů do jejich organel.

Některým organelám včetně mitochondrií, chloroplastů, peroxisomů a vnitřku jádra jsou proteiny dodávány přímo z cytosolu. Do jiných, mezi něž patří Golgiho aparát, lyzosomy, endosomy a jaderná membrána, se proteiny dostávají nepřímo přes ER, které je samo hlavním místem syntézy lipidů a proteinů. Některé proteiny syntetizované na ER zůstanou v ER, ale většina jich pokračuje vezikulárním transportem do Golgiho aparátu a potom dále do jiných organel či do plasmatické membrány, nebo ven z buňky.

V této sekci probereme mechanismy, kterými proteiny přímo vstupují do membránových organel z cytosolu, a podrobnou diskusi o vezikulárním transportu ponecháme na později. Proteiny vytvořené v cytosolu se rozdělí na různá místa v buňce podle specifických adresních štítků, kterými u proteinů jsou jejich aminokyselinové sekvence. Jakmile se protein dostane na správnou adresu, vstoupí do organely.

Proteiny se dostávají do organel třemi mechanismy

Syntéza všech proteinů v buňce začíná na ribosomech v cytosolu. Výjimku tvoří několik mitochondriálních a chloroplastových proteinů, které jsou syntetizovány na ribosomech uvnitř těchto organel; většina

Otázka 14-1 Jak je naznačeno v obr. 14-3, tvoří lipidová dvojná vrstva vnitřní a vnější jaderné membrány souvislou plochu, která je protkána jadernými póry. Protože jsou membrány vlastně dvourozměrnou kapalinou, znamenalo by to, že membránové proteiny mohou volně difundovat mezi oběma jadernými membránami. Avšak každá z těchto membrán obsahuje charakteristické proteiny, které odpovídají za různé funkce. Jak byste vysvětlili tento zdánlivý rozpor?

mitochondriálních a chloroplastových proteinů se však syntetizuje v cytosolu a následně se do mitochondrií a chloroplastů importuje. Osud proteinové molekuly syntetizované v cytosolu závisí na pořadí jejích aminokyselin, které obsahuje *adresovou sekvenci*; ta nasměruje protein do organely, ve které je zapotřebí. Proteiny, které adresovou sekvenci nemají, zůstávají nastálo v cytosolu, zatímco proteiny s touto sekvencí cestují z cytosolu do příslušných organel. Různé adresové sekvence směřují proteiny do jádra, mitochondrií, chloroplastů (v rostlinách), peroxisomů a ER (v tomto případě se adresová sekvence nazývá signální).

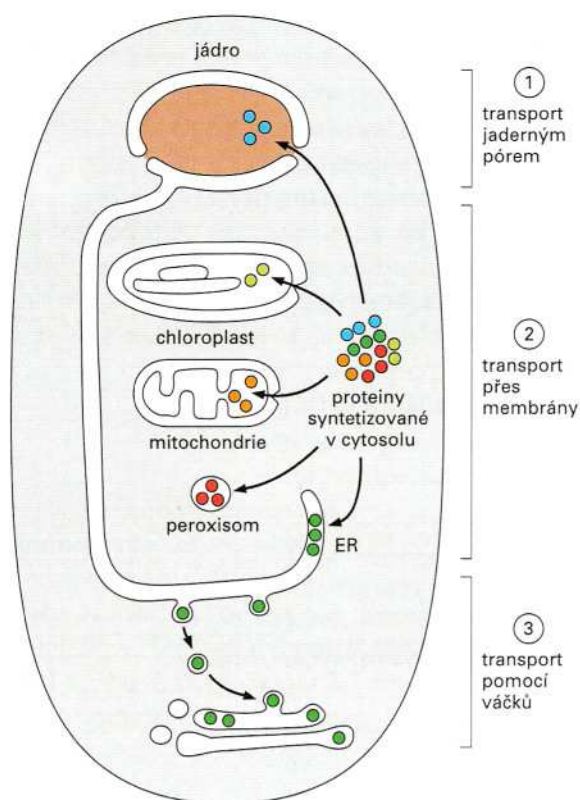
Obecným problémem, který musí každá membránová organela při importu proteinů vyřešit, je přenos proteinů přes membrány, které jsou normálně pro hydrofilní molekuly nepropustné. Různé organely se s touto otázkou vypořádají různě; vždy k tomu však potřebují přísun energie.

1. Proteiny, které směřují z cytosolu do jádra, jsou přenášeny jadernými póry, které prostupují vnější a vnitřní jadernou membránu. Póry fungují jako selektivní branka či hradlo, které aktivně přenáší specifické makromolekuly, ale umožňuje také volnou difuzi menších makromolekul (mechanismus 1 na obrázku 14-5).
2. Proteiny směřující z cytosolu do ER, mitochondrií, chloroplastů či peroxisomů se přenášejí přes membránu organely proteinovými translokátory umístěnými v membráně. Na rozdíl od transportu jadernými póry se přenášený protein obvykle musí rozvinout, aby se mohl protáhnout membránou (mechanismus 2 na obrázku 14-5). Bakterie mají ve své plasmatické membráně podobné proteinové translokátory.
3. Proteiny, které pokračují z endoplasmatického retikula dále a z jednoho oddílu systému vnitřních membrán do jiného, jsou přenášeny mechanismem, který se od předchozích dvou výrazně liší. Jejich dopravu zajišťují transportní váčky (vezikuly), do kterých se protein nakládá z vnitřního prostoru čili lumen buněčného oddílu, když se tyto váčky odškrcují z jeho membrány. Váčky později vyloží svůj náklad v druhém oddílu, když splynou s jeho membránou (mechanismus 3 na obrázku 14-5). Tímto způsobem se od jednoho oddílu buňky ke druhému dostávají také membránové lipidy a membránové proteiny.

Adresová sekvence směřuje proteiny do správného oddílu

Typickým třídícím signálem proteinu je souvislý úsek asi 15–60 aminokyselin. Tato **adresová sekvence** je často (ne však vždy) z hotového proteinu po ukončení třídění odstraněna. Některé sekvence užívané pro specifikaci různých míst určení v buňce jsou uvedeny v tabulce 14-3.

Adresové sekvence jsou nezbytné a postačující pro směrování proteinu do příslušné organely. To bylo prokázáno v pokusech, při kterých byla technikami genetického inženýrství (probírají se v Kapitole 10) adresová sekvence buď odstraněna nebo přenesena z jednoho proteinu na jiný. Například odstraněním adresové sekvence z proteinu endoplasmatického retikula tuto bílkovinu odsoudíme do role cytosolového proteinu, zatímco umístěním signální sekvence pro ER na počátek cytosolového proteinu tento protein nasměrujeme zpět do endoplasmatického retikula (obr. 14-6). Adresová sekvence pro stejné cílové



Obrázek 14-5 Tři hlavní mechanismy, kterými membránové organely importují proteiny. U mechanismů 1 a 3 zůstává protein během transportu ve svinuté formě, ale u mechanismu 2 se musí rozvinout. Všechny tyto děje vyžadují energii.

místo se mohou značně lišit, i když mají stejnou funkci: fyzikální vlastnosti jako hydrofobicita či umístění nabitých aminokyselin se často ukazují pro jejich funkci důležitější než přesné pořadí aminokyselin.

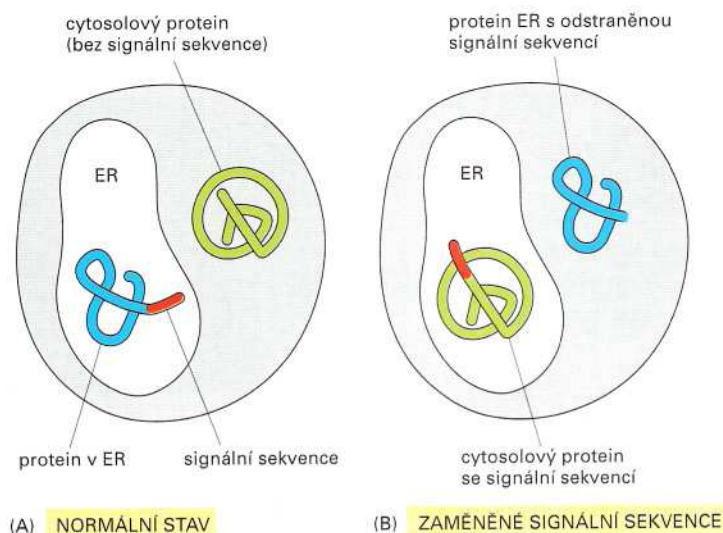
Proteiny vstupují do jádra jadernými póry

Jaderný obal v sobě uzavírá jadernou DNA a vymezuje jaderný oddíl. Je tvořen dvěma soustřednými membránami. Vnitřní jaderná membrána obsahuje proteiny, které působí jako vazebná místa pro chromosomy (probírané v Kapitole 8) a pro *jadernou laminu*, jemně utkanou síť proteinových vláken, která lemuje vnitřní povrch této membrány a posky-

Tabulka 14-3 Některé typické adresové sekvence

Funkce signálu	Příklad adresové sekvence
Import do ER	⁺ H ₃ N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Zadržení v lumen ER	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO ⁻
Import do mitochondrií	⁺ H ₃ N-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Import do jádra	-Pro-Pro-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Import do peroxisomů	-Ser-Lys-Leu-

Kladně nabitě aminokyseliny jsou ukázány červeně, záporně nabitě aminokyseliny jsou vyznačeny zeleně. Rozsáhlý úsek hydrofobních aminokyselin je uzavřen ve žlutém poli. ⁺H₃N znázorňuje N-konec proteinu (amino-konec), COO⁻ ukazuje C-konec proteinu (karboxylový konec).



Obrázek 14-6 Role adresové sekvence v třídění proteinů. (A) Proteiny určené do ER vlastní N-koncovou adresovou (signální) sekvencí, která je navádí k této organelle, zatímco proteiny, které mají zůstat v cytosolu, takovou sekvenci nemají. (B) Ve znázorněném pokusu byla s použitím technik rekombinantní DNA připojena signální sekvence pro ER k cytosolovému proteinu a zároveň byla odstraněna signální sekvence z proteinu ER. V obou případech skončil upravený protein v neobvyklém místě v buňce. To ukazuje, že signální sekvence je nutnou a postačující podmínkou pro navedení proteinu do ER.

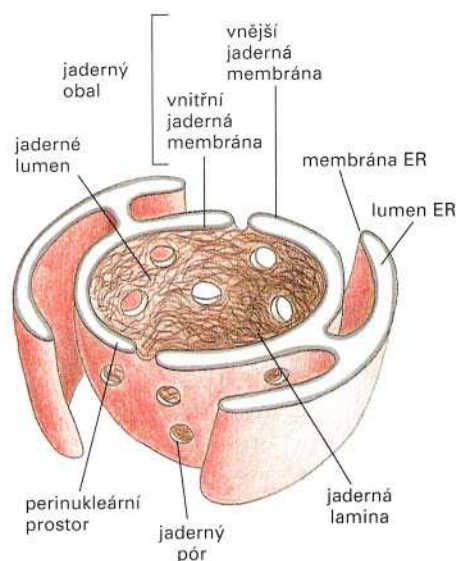
tuje tuhou strukturální oporu pro jaderný obal (probírá se v Kapitole 16). Svým složením vnější jaderná membrána značně připomíná membránu ER, ve kterou přechází (obr. 14-7).

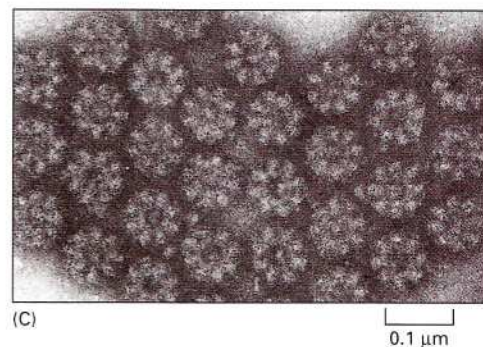
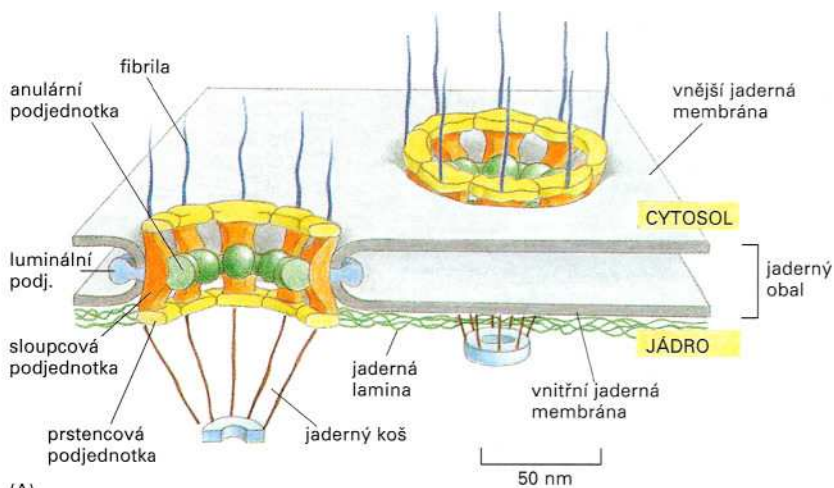
Jaderný obal je ve všech eukaryontních buňkách prostoupen **jadernými póry**, které tvoří vstupní a výstupní bránu pro všechny molekuly. Doprava póry probíhá oběma směry: z cytosolu přicházejí nově utvořené proteiny určené jádru, zatímco z jádra směrem ven cestují molekuly RNA, syntetizované v jádře, a ribosomální podjednotky, které se v jádře skládají. Molekuly informační RNA (mRNA; anglicky *mediator RNA*), které neprojdou úplným sestřihem, nejsou z jádra exportovány. To ukazuje, že export z jádra slouží jako poslední krok kontroly kvality syntézy mRNA a jejího zpracování (probírá se v Kapitole 7).

Jaderný pór je velkou a nanejvýš důmyslnou strukturou, složenou z více než 100 různých proteinů (obr. 14-8). Každý pór obsahuje jeden nebo více kanálů naplněných vodou, kterým mohou malé molekuly rozpustné ve vodě volně a neselektivně procházet mezi jádrem a cytosolem. Větší molekuly (jako RNA a proteiny) a makromolekulární komplexy však nemohou póry procházet bez zvláštního třídícího signálu. Tento adresový signál zvaný *jaderný lokalizační signál*, který směřuje proteiny z cytosolu do jádra, obvykle představuje jednu nebo dvě krátké sekvence obsahující několik kladně nabitých lysinů či argininů (viz tabulku 14-3, str. 454).

K počáteční interakci nově syntetizovaného budoucího jaderného proteinu s jaderným pórem je nutná pomoc dalších proteinů v cytosolu. Tyto cytosolové proteiny, zvané *jaderné importní receptory*, se vážou na jaderný lokalizační signál a pomáhají ho navést k póru interakcí s vlákny jaderného póru (viz obr. 14-9). Budoucí jaderný protein je potom aktivně přenášen do jádra v procesu, který využívá energii hydrolýzy GTP. Struktura uprostřed jaderného póru funguje jako přesně padnoucí těsnicí kroužek: otevře se jen do takové míry, která umožní

Obrázek 14-7 Jaderný obal. Obal ze dvou membrán je prostoupen jadernými póry. Vnější membrána plynule přechází v ER. Ribosomy, které jsou normálně vázány k cytosolovému povrchu membrány ER a vnější jaderné membrány, nejsou znázorněny.





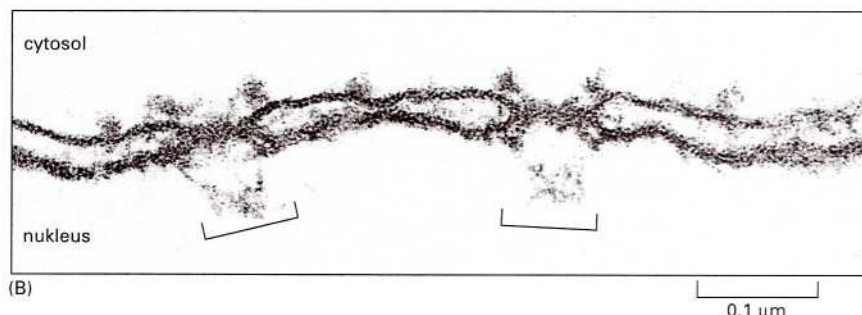
Obrázek 14-8 Komplex jaderného póru.

(A) Nákres malé oblasti jaderného obalu ukazuje dva pórové komplexy. Každý komplex se skládá z velkého počtu různých proteinových podjednotek.

Z obou stran komplexu vyčnívají proteinová vlákna; na jaderné straně se sbíhají a tvoří košíček. Mezery mezi vlákny jsou dost velké na to, aby vlákna neblokovala přístup k póru.

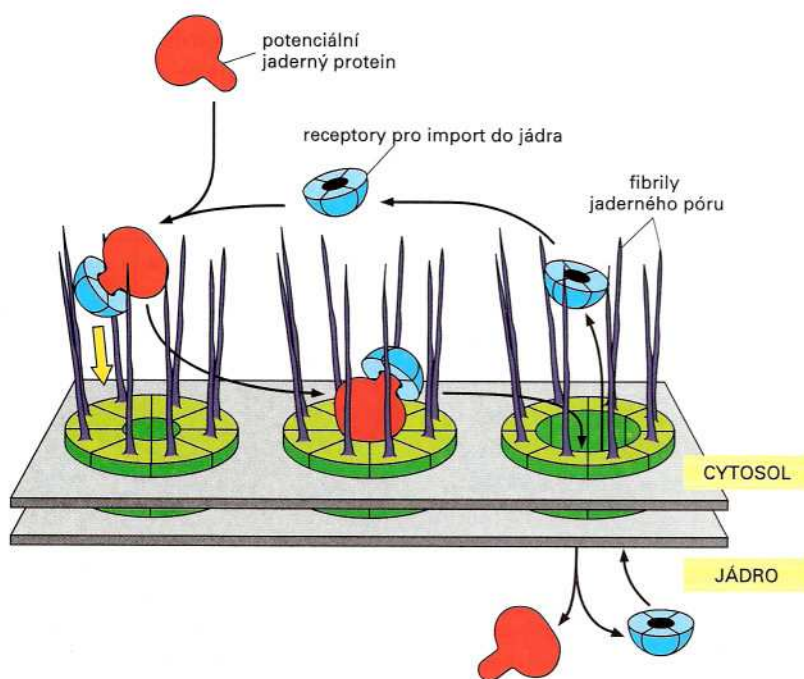
(B) Elektronmikroskopický snímek oblasti jaderného obalu ukazující dva jaderné póry v pohledu ze strany.

(C) Elektronmikroskopický snímek ukazující komplexy jaderných pórů v pohledu zepředu; membrány byly odstraněny detergentem.



proteinovému komplexu průchod. Jaderné importní receptory se potom vrací jaderným pórem do cytosolu k novému použití (obr. 14-9). Molekulární podstatu tohoto hradlového mechanismu a způsob, jakým čerpá molekuly jaderným pórem v obou směrech, zatím neznáme.

Jaderné póry přenášejí proteiny v jejich kompletně složené konformaci a ribosomální komponenty jako složené částice. Tím se tento



Obrázek 14-9 Schematický pohled na mechanismus aktivního transportu jadernými póry.

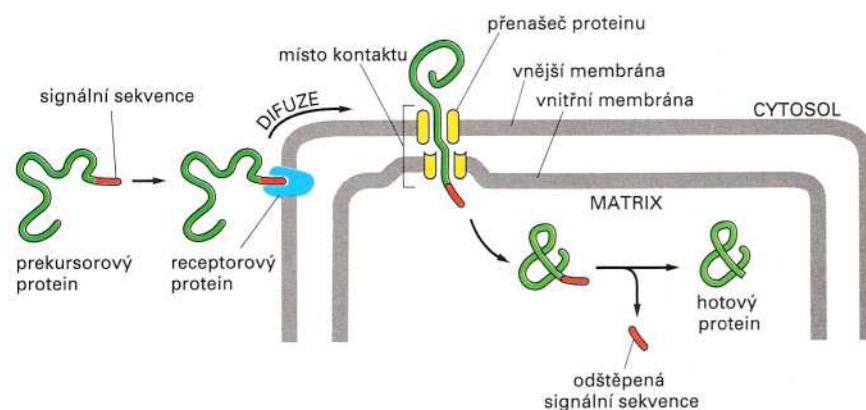
Nejprve se zvláštní cytosolové proteiny zvané *jaderné importní receptory* vážou k budoucímu jadernému proteinu. Komplex je naveden do jaderného póru vlákny, která vyčnívají z póru do cytosolu. Navázání jaderného proteinu na pór způsobí jeho otevření a jaderný protein se svými navázanými receptory je aktivně přenesen do jádra. Receptory jsou potom exportovány póry zpět do cytosolu k opětovnému použití.

transportní mechanismus odlišuje od mechanismů, které přenášejí proteiny do ostatních organel. Proteiny se během přenosu přes membrány jiných organel, jako jsou mitochondrie, chloroplasty a ER, musí rozvinout, jak budeme probírat později. Poměrně málo je známo o tom, jak se proteiny dostávají do peroxisomů; těmito organelami se dále nebudeme zabývat.

Při vstupu do mitochondrií a chloroplastů se proteiny rozvinou

Mitochondrie i chloroplasty jsou ohraničeny vnitřní a vnější membránou a oba druhy organel se zaměřují na syntézu ATP. Chloroplasty navíc obsahují třetí membránový systém – thylakoidní membránu (probírá se v Kapitole 13). Ačkoli obě organely obsahují své vlastní genomy a syntetizují některé ze svých proteinů, většina mitochondriálních i chloroplastových proteinů je kódována geny v jádře a importována z cytosolu. Tyto proteiny obvykle obsahují na svém N-konci adresovou sekvenci, která jim umožňuje vstoupit do mitochondrie nebo do chloroplastu. Protein se zároveň přemísťuje přes vnější i vnitřní membrány ve zvláštních místech, kde jsou tyto membrány ve vzájemném kontaktu. Během svého transportu je protein rozvinut a po ukončení přenosu je signální sekvence odstraněna (obr. 14-10). Chaperonové proteiny (probírané v Kapitole 5) uvnitř organel pomáhají táhnout protein přes obě membrány a znovu ho složit, jakmile je uvnitř. Následný transport do přesného místa v organelle, např. do vnitřní či vnější membrány nebo do membrány thylakoidu, obvykle vyžaduje další třídící signály v proteinu, které jsou často dostupné teprve po odstranění první adresové sekvence. Začlenění transmembránových proteinů do vnitřní membrány je například řízeno signálními sekvencemi v proteinu, které začínají a ukončují proces přenosu přes membránu, jak popíšeme později u začleňování transmembránových proteinů do membrány ER.

Růst a udržování mitochondrií a chloroplastů vyžaduje vedle stálého přísunu proteinů také stálý přísun lipidů do membrán. Většina membránových fosfolipidů těchto organel je zřejmě importována z ER, které je hlavním místem syntézy lipidů v buňce. Fosfolipidy se k těmto organelám dostávají individuálně s pomocí ve vodě rozpustných proteinových přenašečů, které vyjmají fosfolipidy z jedné membrány a předávají je membráně jiné.



Obrázek 14-10 Import proteinů do mitochondrií. Adresová sekvence je rozpoznávána receptorem ve vnější mitochondriální membráně. Komplex receptoru a navázaného proteinu difunduje v membráně ke kontaktnímu místu, kde je protein přenesen přes vnější i vnitřní membránu proteinovým translokátorem. Adresová sekvence je odštěpena signální peptidázou uvnitř organely. Do chloroplastu jsou proteiny vnášeny podobným mechanismem. Na obrázku nejsou znázorněny chaperonové proteiny, které pomáhají protáhnout protein přes membránu a znovu ho složit.

Otázka 14-2 Proč eukaryotní buňky pořebují jádro jako samostatný oddíl, když se prokaryotní buňky bez něj mohou obejít?

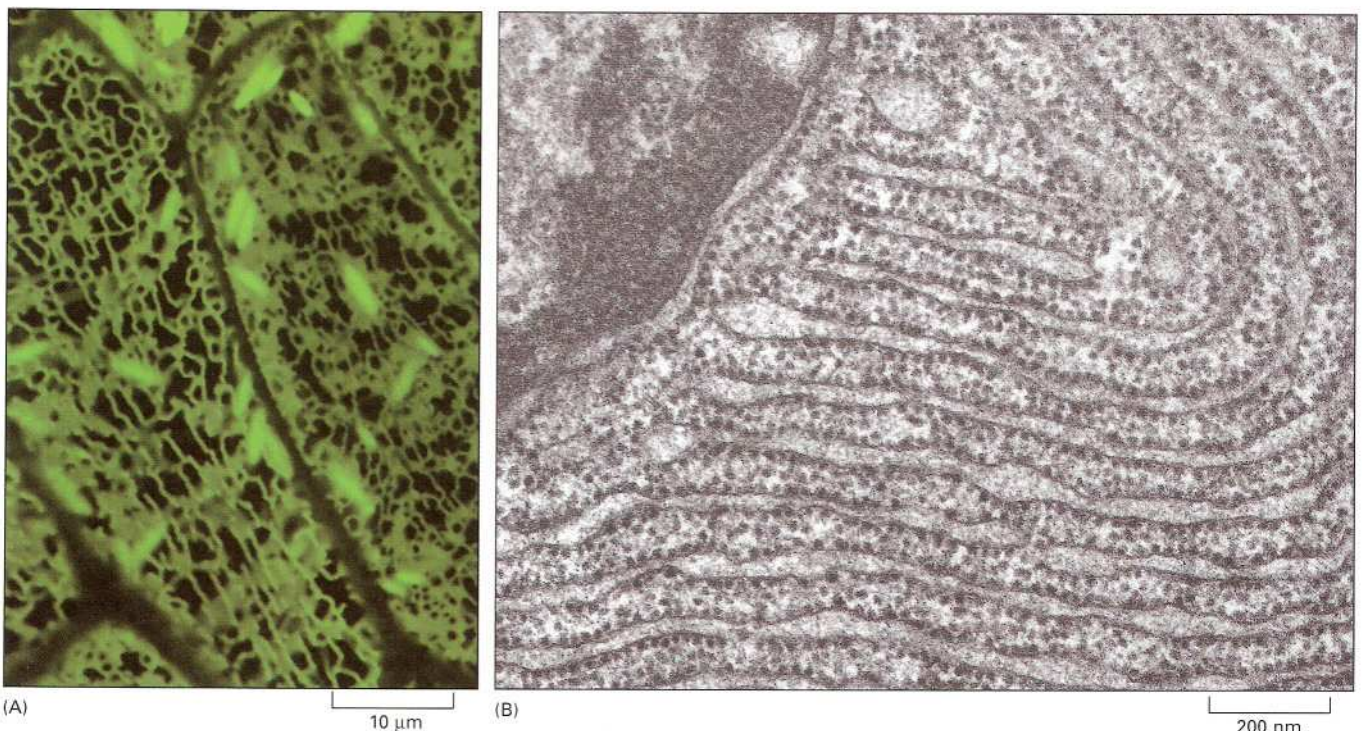
Proteiny vstupují do endoplasmatického retikula už během své syntézy

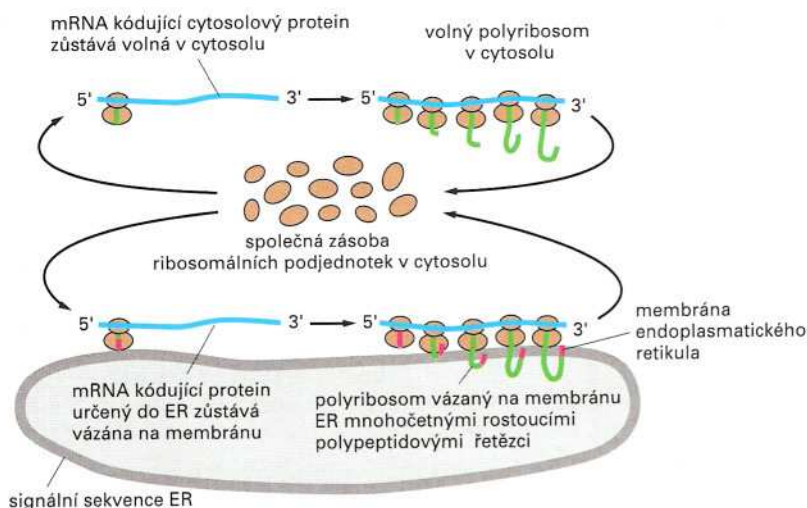
Endoplasmatické retikulum (ER) je nejrozsáhlejším membránovým systémem v eukaryotní buňce (obr. 14-11A) a na rozdíl od dříve probíraných organel slouží jako vstupní brána pro proteiny určené pro jiné organely i pro samotné ER. Proteiny určené pro Golgiho aparát, endosomy a lyzosomy, stejně jako proteiny určené pro povrch buňky, nejprve vstupují z cytosolu do ER. Jednotlivé proteiny, které se již jednou ocitly uvnitř ER nebo uvnitř membrány ER, se již do cytosolu jako stejná chemická individua nevrátí. Budou přenášeny transportními vácíky od organely k organelu a v některých případech od organely k plasmatické membráně.

Z cytosolu jsou do ER přenášeny dva druhy proteinů: (1) proteiny rozpustné ve vodě jsou kompletně přenášeny přes membránu ER a uvolněny v lumenu ER, (2) budoucí membránové proteiny se přes membránu ER přenášejí jen zčásti a zůstávají v ní zanořeny. Proteiny rozpustné ve vodě jsou určeny buď k sekreci (uvolněním na povrchu buňky) nebo pro lumen některé organely; transmembránové proteiny jsou určeny buď k pobytu v membráně ER, v membráně jiné organely nebo v plasmatické membráně. Všechny tyto proteiny jsou na počátku směřovány do ER buď *signální sekvencí ER*, úsekem osmi či více hydrofobních aminokyselin (viz tabulku 14-3, str. 454), která je také zahrnuta v translokaci přes membránu.

Na rozdíl od proteinů, které vstupují do jádra, mitochondrií, chloroplastů a peroxisomů, většina proteinů vstupujících do endoplasmatického retikula začíná pronikat membránou ER ještě před tím, než je ukončena syntéza jejich řetězce. K tomu je nutné, aby ribosom, na kterém syntéza probíhá, těsně přisedal k membráně ER. Tyto ribosomy, vázané na membránu, pokrývají povrch ER a vytvářejí úseky zvané **drsne endoplasmatické retikulum** díky charakteristickým gra-

Obrázek 14-11 Endoplasmatické retikulum. (A) Snímek živých rostlinných buněk pozorovaných pod fluorescenčním mikroskopem ukazuje ER jako složitou síť listů a trubiček. Buňky byly připraveny technikami genového inženýrství, takže ve svém ER obsahují fluorescenční protein. Světlé elipsy jsou chloroplasty. (B) Snímek z elektronového mikroskopu ukazuje drsné ER v buňce psi slinivky, která vylučuje velká množství trávicích enzymů. Cytosol je vyplněn těsně sbalenými listy ER s přisedlými ribosomy. V levém horním rohu je vidět část jádra a jeho obal. Všimněte si, že vnější jaderná membrána, která plynule přechází v ER, je také pokryta ribosomy.





Obrázek 14-12 Volné ribosomy a ribosomy vázané na membránu.

Společná zásoba ribosomů se používá jak k syntéze proteinů, které zůstávají v cytosolu, tak těch, které jsou přenášeny do membránových organel včetně ER. Právě signální sekvence na rostoucím polypeptidovém řetězci navádí ribosom, který právě syntetizuje protein, na membránu ER. Molekula mRNA může zůstat navázána na ER jako část polyribosomu, zatímco ribosomy, které se po ní pohybují, jsou recyklovány; na konci každého cyklu proteosyntézy se ribosomální podjednotky uvolní a vrátí se do společné zásoby v cytosolu.

nulím na jeho povrchu při pozorování v elektronovém mikroskopu (obr. 14-11B).

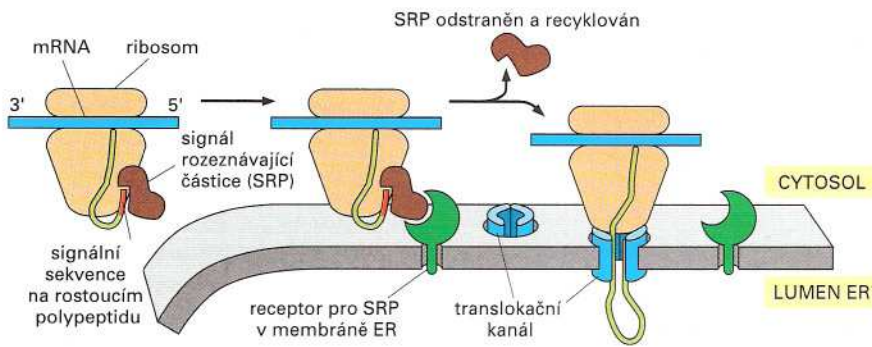
V cytosolu tedy existují dvě oddělené populace ribosomů. *Membránové ribosomy* jsou přisedlé k cytosolovému povrchu membrány ER (a vnější jaderné membrány) a vyrábějí proteiny, které se potom přemísťují do ER. *Volné ribosomy* nejsou připojeny k žádné membráně a syntetizují všechny ostatní proteiny kódované jadernou DNA. Membránové ribosomy a volné ribosomy jsou strukturně a funkčně stejné; liší se jen v proteinech, které právě vytvářejí. Vytváří-li zrovna ribosom protein endoplasmatického retikula, signální sekvence proteinu ho navede k membráně ER. Při translaci molekuly mRNA se na ni váže mnoho ribosomů a vzniká *polyribosom* nebo *polysom* (probírá se v Kapitole 7). V případě molekuly mRNA, která kóduje protein se signální sekvencí pro ER, se polysom pevně připojí k membráně ER rostoucími polypeptidovými řetězci, které pronikají do membrány (obr. 14-12).

Rozpustné proteiny se uvolňují do lumen ER

Signální sekvenci pro ER navádějí k membráně ER nejméně dvě složky: (1) *signál rozpoznávající částice (SRP)*, která je přítomna v cytosolu a váže se k signální sekvenci pro ER při jejím vystavení na ribosomu, a (2) *SRP-receptor*, který je zanořen v membráně ER. Navázání SRP na signální sekvenci způsobí zpomalení syntézy proteinu na ribosomu, dokud se ribosom a na něm vázaný SRP nenavážou na SRP-receptor. Po navázání na svůj receptor se SRP uvolní a začne syntéza proteinu, přičemž polypeptid se nyní provléká do lumen ER *translokačním kanálem* v membráně ER (obr. 14-13). SRP a jeho receptor tak fungují jako molekulární spojky, které zajišťují vazbu mezi ribosomy, jež syntetizují proteiny se signální sekvencí pro ER, a dostupnými translokačními kanály ER.

Po navázání komplexu ribosom-mRNA-SRP na membránu ER se uplatní další funkce signální sekvence, kterou je u rozpustných proteinů téměř vždy N-konec proteinu: tato sekvence otevírá translokační kanál. Zůstává přitom navázána na translokační kanál, zatímco zbytek proteinového řetězce se provléká přes membránu jako velká smyčka. V některém stadiu během translokace je signální sekvence odštěpena

Otázka 14-3 Vysvětlete, jak může molekula mRNA zůstat připojena k membráně ER, zatímco jsou jednotlivé ribosomy, které ji překládají, postupně uvolňovány a vrací se zpět do společné zásoby v cytosolu po každém cyklu proteosyntézy.



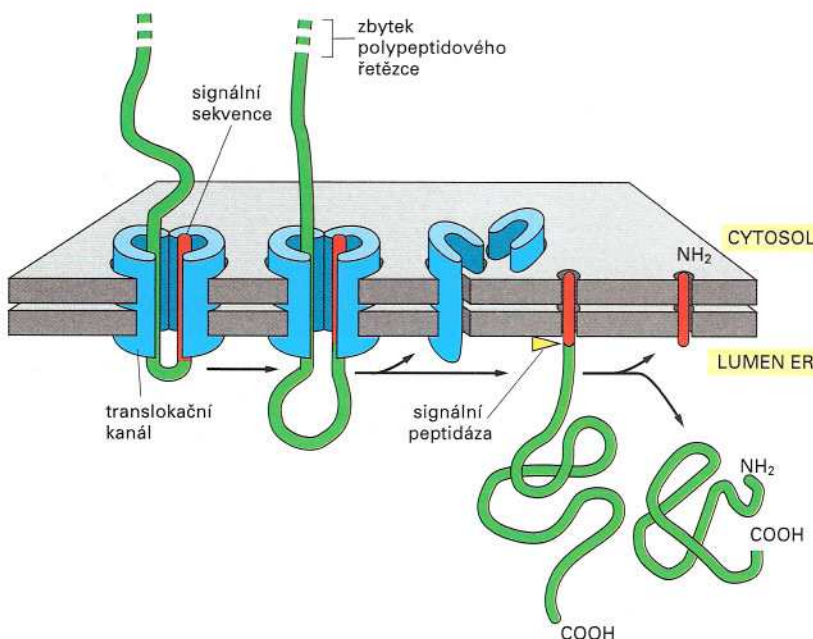
Obrázek 14-13 Jak signální sekvence pro ER společně se SRP navádějí ribosom k membráně ER. SRP se váže k obnažené signální sekvenci pro ER a k ribosomu, čímž zpomaluje syntézu proteinu na ribosomu. Komplex SRP-ribosom se pak váže k receptoru SRP v membráně ER. SRP se potom uvolní a zanechá ribosom na membráně ER. Proteinový translokační kanál v membráně ER potom zavede polypeptidový řetězec do membrány a začne ho protahovat lipidovou dvojnou vrstvou.

signální peptidázou, která se nachází na luminální straně membrány ER; signální peptid je potom uvolněn z translokačního kanálu a rychle odbourán na aminokyseliny. Jakmile karboxylový konec proteinu prošel přes membránu, je protein uvolněn do lumen ER (obr. 14-14).

Iniciační a terminační signál určují uspořádání transmembránového proteinu v dvojné vrstvě lipidů

Ne všechny proteiny, které vstupují do ER, jsou uvolněny do jeho lumenu. Některé z nich zůstávají zanořeny v membráně ER jako transmembránové proteiny. Translokační proces je u takových proteinů složitější než u proteinů rozpustných, neboť některé části polypeptidového řetězce je nutno přemístit přes membránu, zatímco jiné zůstávají na původní straně.

Nejjednodušším případem je transmembránový protein, z něž prochází membránou jen jediný úsek. V tomto případě iniciuje přemístění N-koncová signální sekvence, stejně jako u rozpustných proteinů. Přesun je však zastaven přídatnou sekvencí hydrofobních aminokyselin, které se říká *terminační sekvence transferu* a která leží dále v polypeptidovém řetězci. Tato druhá sekvence je z translokačního kanálu uvolňována stranou do lipidové dvojnou vrstvy a vytváří α -heliální transmembránový segment, který ukotvuje protein v membráně.

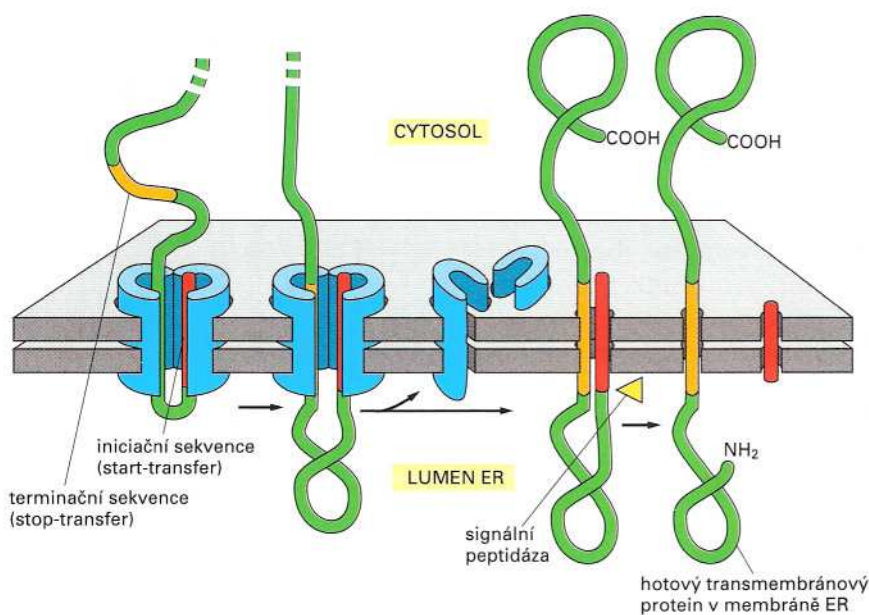


Obrázek 14-14 Translokace (přemístění) rozpustného proteinu membránou ER do lumenu. Proteinový translokační kanál váže signální sekvenci a aktivně přemísťuje zbytek polypeptidu přes dvojnou vrstvu lipidů jako smyčku. V některém okamžiku translokačního procesu se translokační kanál otevře do strany a uvolní signální sekvenci do lipidové dvojnou vrstvy, kde ji odštěpí enzym signální peptidáza. Přepravený polypeptid je uvolněn do lumenu ER jako rozpustný protein. Na tomto obrázku a následujících dvou jsou ribosomy navázané na membránu pro názornost vynechány.

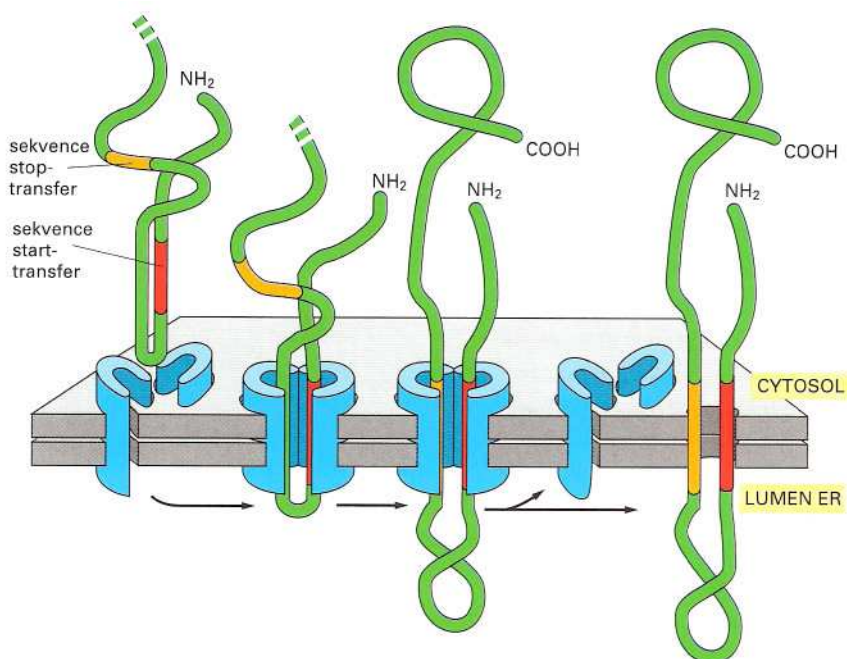
Současně je také N-koncová signální sekvence uvolněna z kanálu do lipidové dvojné vrstvy a odštěpena. Výsledkem je, že takto přemísťovaný protein skončí jako transmembránový protein začleněný do membrány s definovanou orientací, při níž se jeho N-konec nachází na lumenální straně membrány a karboxylový konec na straně cytosolové (obr. 14-15). Translokační kanál ER se tedy musí umět otvírat do dvou směrů: musí být schopen otevřít se jako pór, který se táhne od jedné strany membrány ER ke druhé, a musí být rovněž schopen otevřít se do strany, aby umožnil transmembránovým proteinům pronikat do lipidové dvojné vrstvy. Jak se probírá v Kapitole 11, jakmile je transmembránový protein jednou začleněn do membrány, jeho orientace se nemění a zůstává zachována i při všech následných procesech pučení či fúze.

U některých transmembránových proteinů se k zahájení transferu místo N-koncové sekvence používá častěji sekvence vnitřní, která se neodstraňuje. Toto uspořádání se vyskytuje u některých transmembránových proteinů, jejichž polypeptidový řetězec prostupuje několikrát tam a zpět lipidovou dvojnou vrstvou. V těchto případech zřejmě hydrofobní signální sekvence pracují v párech; vnitřní signální sekvence (*iniciační sekvence transferu*) slouží k zahájení přesunu, který pokračuje až do dosažení terminační sekvence transferu; obě α -helikální hydrofobní sekvence jsou potom uvolněny do lipidové dvojné vrstvy (obr. 14-16). V komplexních proteinech, které procházejí membránou mnohokrát a jejichž hydrofobní α -šroubovice procházejí ve velkém počtu lipidovou dvojnou vrstvou, se přesunu účastní další páry terminačních a iniciačních sekvencí: jedna sekvence znovu zahájí přesun dále ve směru polypeptidového řetězce, zatímco jiná tento děj zastaví a způsobí uvolnění polypeptidu, a tak dále u dalších iniciačních a terminačních sekvencí. Membránové proteiny s mnoha transmembránovými úseky jsou tedy do membrány vetkávány již v době svého vzniku, a to způsobem, který připomíná práci šicího stroje.

Když jsme si vysvětlili, jak se proteiny dostávají do lumen endoplasmatického retikula, podíváme se nyní, jak jsou přepravovány dále soustavou vezikulárního transportu.



Obrázek 14-15 Začlenění transmembránového proteinu do membrány ER. N-koncová signální sekvence pro ER (*červeně*) iniciuje přenos jako na obrázku 14-14. Protein však navíc obsahuje druhou hydrofobní sekvensi, terminační sekvenci pro transport (*oranžově*). Když tento protein vstoupí do translokačního kanálu, kanál vypustí protein stranou do lipidové dvojné vrstvy. Poté je N-koncová signální sekvence odštěpena a transmembránový protein zůstane ukotven v membráně ER. Proteosyntéza na cytosolové straně pokračuje.



Obrázek 14-16 Začlenění proteinu s dvěma transmembránovými úseky do membrány ER. Vnitřní signální sekvence pro ER (červeně) působí jako iniciační signál pro přenos polypeptidového řetězce. Když do translokačního kanálu vstoupí terminační sekvence přenosu, kanál vypustí obě sekvence stranou do dvojné vrstvy lipidů. Ani iniciační ani terminační sekvence přenosu se neodštěpí a celý polypeptidový řetězec zůstává ukotven v membráně jako transmembránový protein se dvěma transmembránovými úseky. Proteiny, které prostupují membránu vícekrát, obsahují další páry terminačních a iniciačních sekvencí a pro každý pár se opakuje stejný děj.

Vezikulární transport

Vstup do ER je obvykle jen prvním krokem na cestě k jiné cílové stanici, kterou je alespoň pro první okamžik Golgiho aparát. Doprava z endoplasmatického retikula do Golgiho aparátu a z Golgiho aparátu do dalších oddílů endomembránové soustavy je uskutečňována nepřetržitým pučením a fúzí **transportních váčků** čili **vezikulů**. Transportní dráhy zajišťované těmito transportními váčky se táhnou od ER k plasmatické membráně a od ní zase opačným směrem k lyzozomům, a tak zajišťují komunikaci mezi vnitřkem buňky a jejím okolím. Jak jsou proteiny a lipidy přepravovány po těchto drahách, je řada z nich podrobeno různým typům chemických úprav – například přidání cukerných postranních řetězců (k proteinům i lipidům) a vytvoření disulfidových můstků (v proteinech), které stabilizují strukturu proteinů.

Transportní váčky přepravují rozpustné proteiny a membrány mezi jednotlivými oddíly buňky

Vezikulární doprava mezi membránovými oddíly endomembránové soustavy je velice dobře organizována. Hlavní *sekreční dráha* vede od biosyntézy proteinů na membráně ER a jejich vstupu do ER přes Golgiho aparát až k buněčnému povrchu; v Golgiho aparátu začíná postranní větev, která vede přes endosomy k lyzozomům (obr. 14-17).

Aby mohl transportní váček správně plnit svou funkci, musí si nakládat jen proteiny vhodné pro příslušnou cílovou stanici a musí fúzovat jen s vhodnou cílovou membránou. Například váček nesoucí náklad z Golgiho aparátu do plasmatické membrány nesmí obsahovat proteiny, které mají zůstat v Golgiho aparátu, a musí fúzovat jen s plasmatickou membránou a s žádou jinou membránou některé jiné organely. Při své účasti v tomto nepřetržitém toku membránových složek musí každá organela udržovat svou jednoznačnou identitu, tj. své vlastní osobité složení proteinů a lipidů. Všechny tyto rozpoznávací děje závisí na proteinech spojených s membránou transport-

Otázka 14-4

- Předpovězte orientaci v membráně u proteinu, který je syntetizován s neodštěpenou vnitřní signální sekvencí (ukázána jako červená iniciační sekvence přenosu v obrázku 14-15), ale neobsahuje terminační sekvenci přenosu.
- Podobně předpovězte orientaci v membráně u proteinu, který je syntetizován s odštěpenou N-koncovou signální sekvencí následovanou terminační sekvencí přenosu, po níž následuje iniciační sekvence přenosu.
- Jaké uspořádání signálních sekvencí by umožnilo začlenit do membrány protein s lichým počtem transmembránových úseků?

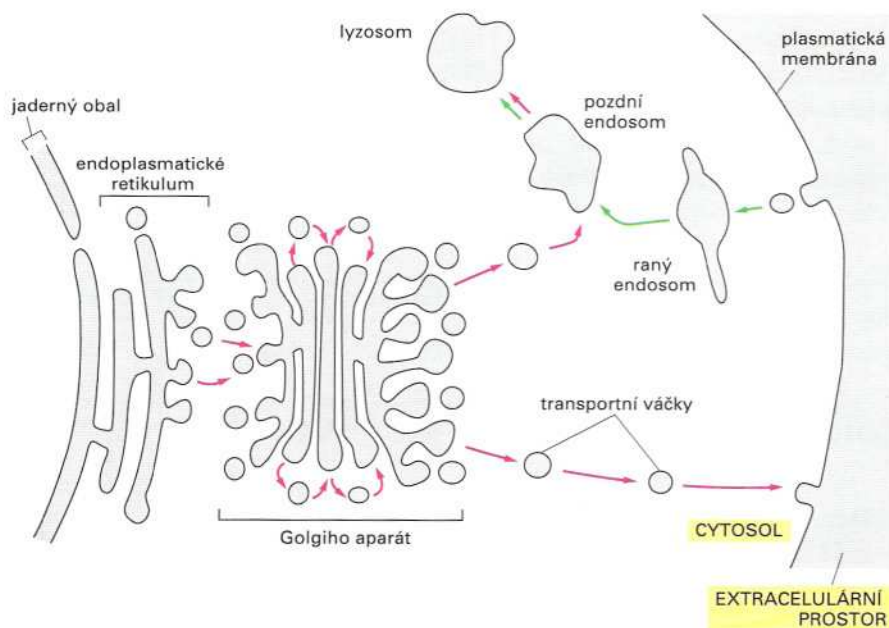
ního váčku. Uvidíme, že mezi různými organelami zajišťují kyvadlovou dopravu různé typy transportních váčků, přičemž každý z nich nese specifický náklad molekul.

Pučení váčků je poháněno skládáním proteinového pláště

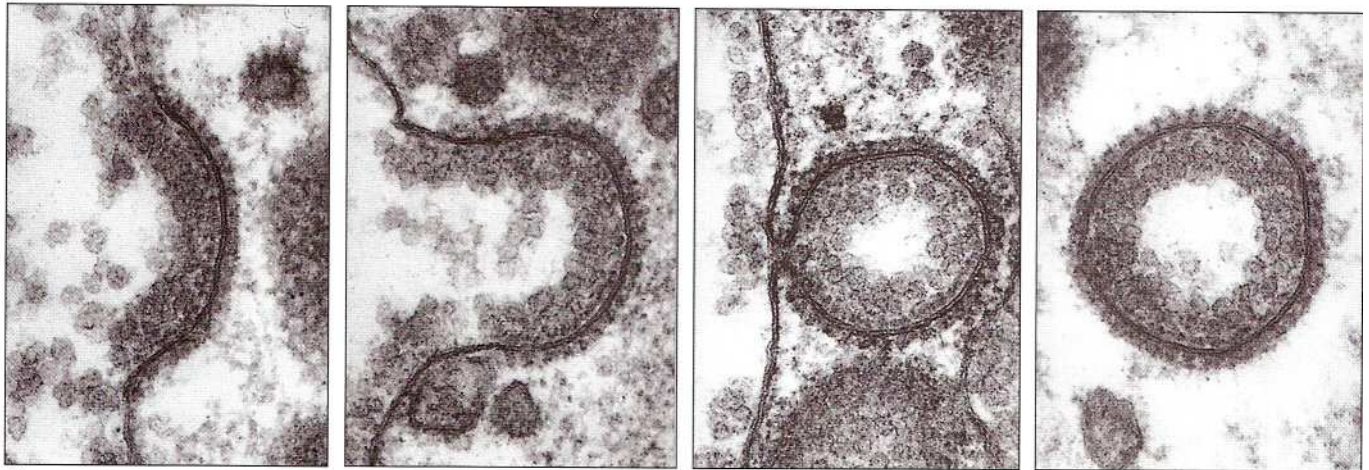
Váčky, které pučí z membrány, mají obvykle na své cytosolové straně specifický proteinový plášť, a proto se jim říká **opláštěné váčky**. Jakmile je pučení ukončeno, váček ztrácí svůj plášť, a jeho membrána tak může přímo interagovat s membránou, s níž bude fúzovat. Existuje několik druhů opláštěných váčků a každý z nich má svůj specifický proteinový obal. Ten zřejmě zajišťuje nejméně dvě funkce: vytvaruje membránu do váčku a pomáhá zachytit molekuly v průběhu transportu.

Nejlépe prozkoumanými váčky jsou ty, které mají svůj plášť hlavně z proteinu **klathrinu** a kterým se říká *klathrinové váčky*. Pučí z Golgiho aparátu na počátku sekreční dráhy směřující ven z buňky a z plasmatické membrány na počátku endocytotické dráhy vedoucí do nitra buňky. Například z plasmatické membrány se každý váček odděluje jako *jamka s klathrinovým pláštěm*. Molekuly klathrinu se na cytosolové straně membrány skládají do sítě podobné koši, a tak postupně membránu přimějí nabývat podoby váčku (obr. 14-18). Kolem ústí každého hluboce vchlípeného potaženého váčku se jako kroužek složí malý GTP-vázající protein *dynamin*. Dynamin potom hydrolyzuje svůj navázaný GTP, čímž se stáhne a odškrtí váček od membrány. Vezikulární transport zahrnuje i další druhy transportních váčků, jejichž pláště jsou tvořeny jinými proteiny. Vznikají podobným způsobem a přenášejí své charakteristické náklady molekul mezi endoplasmatickým retikulem, Golgiho aparátem a plasmatickou membránou. Jak si však váček vybere právě svůj specifický náklad? Tento mechanismus nejlépe známe u klathrinových váčků.

Klathrin sám nehraje v zachycování specifických molekul pro transport žádnou roli. Tuto funkci zastává druhá třída plášťových



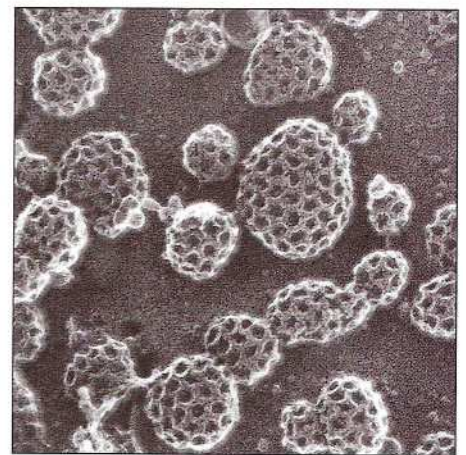
Obrázek 14-17 Vezikulární transport. Mímobuněčný prostor a každý z membránových oddílů (*stínovány šedě*) navzájem komunikují prostřednictvím transportních váčků. V sekreční dráze (*červené šipky*) jsou molekuly proteinu přenášeny z ER přes Golgiho aparát do plasmatické membrány, nebo (cestou pozdních endosomů) do lyzozomů. V endocytotické dráze, směřující do nitra buňky (*zelené šipky*), jsou extracelulární molekuly uavřeny do váčků odvozených od plasmatické membrány a jsou předávány raným endosomům a posléze (cestou pozdních endosomů) lyzozomům.



(A)

0.1 μm

Obrázek 14-18 Klathrinové jamky a váčky. (A) Snímky z elektronového mikroskopu ukazují pořadí událostí při utváření klathrinového váčku z klathrinové jamky. Klathrinové jamky a váčky na těchto snímcích jsou neobvykle velké a vznikají z plasmatické membrány slepičích oocytů (nezralých vajíček). S jejich pomocí oocyt přijímá částice složené z lipidů a proteinů, které potřebuje k vytvoření žloutku. (B) Elektronmikroskopický snímek ukazuje četné klathrinové jamky a váčky pučící z vnitřního povrchu plasmatické membrány v kultuře buněk kůže.



(B)

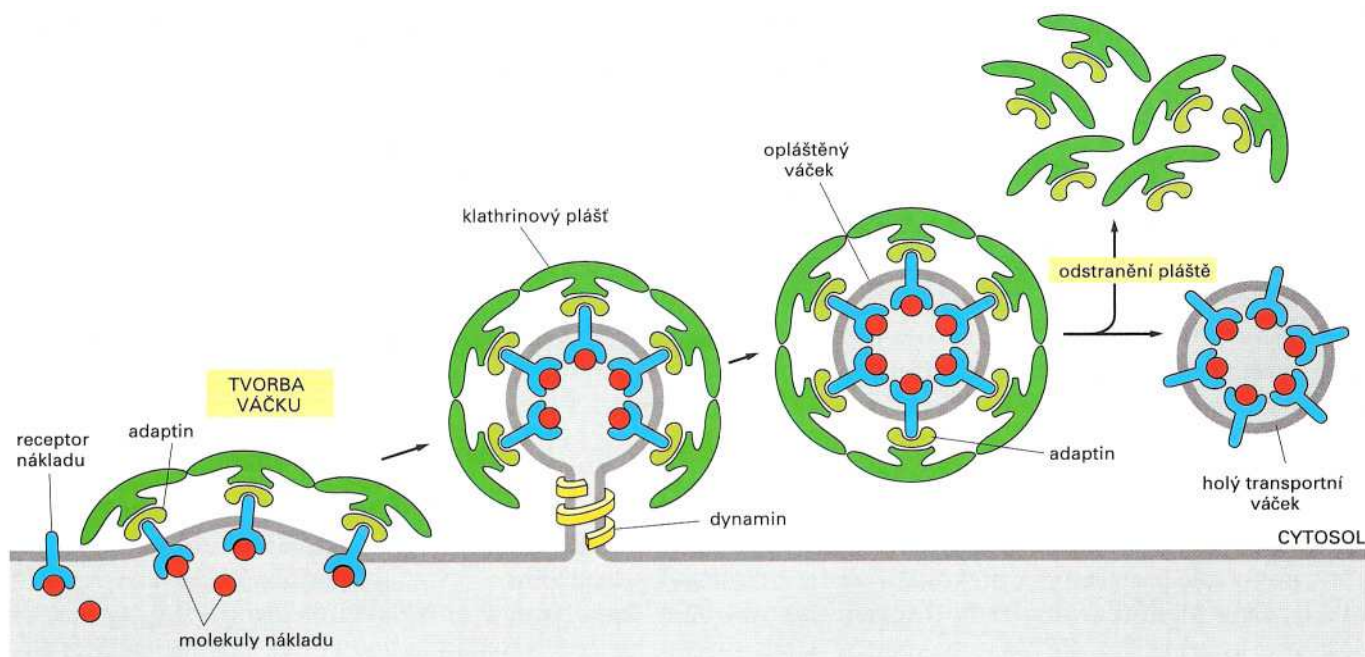
0.2 μm

proteinů klathrinových váčků, kterým se říká *adaptiny*; vážou plášť k membráně váčku a zároveň pomáhají vybrat molekuly do nákladu pro transport. Molekuly určené k přepravě nesou specifické *transportní signály*, které jsou rozpoznávány *receptory nákladu* v membránovém oddílu. Adaptiny pomáhají zachytit specifické molekuly nákladu tak, že zachycují receptory nákladu, které se na přepravované molekuly vážou. Tímto způsobem se vybraný soubor molekul nákladu, vázaných na své specifické receptory, začleňuje do lumen každého nově utvořeného klathrinového váčku (obr. 14-17). Existují nejméně dva typy adaptinů: adaptiny, které vážou receptory nákladu v plasmatické membráně, se liší od těch, které vážou receptory nákladu v Golgiho aparátu; to ukazuje na různé druhy molekul nákladu, který je v klathrinových váčcích přepravován z plasmatické membrány a z Golgiho aparátu.

Do přepravy molekul mezi ER a Golgiho aparátem a mezi jednotlivými částmi Golgiho aparátu je zapojena další třída opláštěných váčků tzv. *COP-váčky* (podle *coat protein*, viz tabulku 14-4).

Specifita navádění váčků k jejich cílům závisí na SNARE-proteinech

Aby mohl transportní váček po svém odškrčení od membrány předat svůj náklad do správné cílové stanice, musí k ní najít cestu. Pokud jde o krátkou vzdálenost, jako při pohybu z ER do Golgiho aparátu, pohybuje se váček prostou difuzí. Je-li vzdálenost velká, jako při



pohybu z Golgiho aparátu až na konec dlouhé nervové buňky, je váček aktivně přenášen motorovými proteiny, které se pohybují podél cytoskeletálních vláken, jak se probírá v Kapitole 16.

Když už transportní váček dorazil ke své cílové organelle, musí ji poznat a navázat se na ni. Teprve poté může membrána váčku splynout s cílovou membránou a váček odevzdá svůj náklad. Obdivuhodná specifita vezikulárního transportu napovídá, že všechny typy transportních váčků v buňce mají na svém povrchu molekulární značky, které svědčí o původu váčku a o jeho nákladu. Tyto značky musí být rozpoznávány komplementárními receptory na příslušných cílových membránách, včetně plasmatické membrány. Ačkoli mechanismus tohoto rozpoznávacího procesu ještě není zcela objasněn, má se za to, že zahrnuje rodinu příbuzných transmembránových proteinů, zvaných **SNARE-proteiny** (podle anglického *soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion-protein attachment-protein receptor*). SNARE-proteiny na povrchu váčků (v-SNARE) jsou specificky rozpoznávány komplementárními SNARE-proteiny na povrchu cílových membrán (t-SNARE) (obr. 14-20). Každá organela a každý typ transportních váčků zřejmě nese unikátní SNARE-proteiny a interakce mezi komplementárními SNARE-proteiny zajišťují, že

Obrázek 14-19 Selektivní transport zprostředkovaný klathrinovými váčky. Receptory nákladu se svými navázanými molekulami nákladu jsou zachycovány adaptiny, které také vážou klathrinové molekuly k cytosolovému povrchu pučícího váčku. Molekuly dynaminu se skládají do většího celku kolem ústí pučícího váčku; když je skládání ukončeno, hydrolyzují svůj navázaný GTP a odškrtí váček. Po ukončení pučení jsou proteiny pláště odstraněny a obnažený váček může fúzovat se svou cílovou membránou. V dalších typech opláštěných váčků se vyskytují podobné plášťové proteiny.

Tabulka 14-4 Některé typy opláštěných váčků

Typ váčku	Proteiny pláště	Původ	Cílová stanice
Klathrinový	klathrin + adaptin 1	Golgiho aparát	lyzosom (přes endosomy)
Klathrinový	klathrin + adaptin 2	plasmatická membrána	endosomy
COP	proteiny COP	ER cisterna Golgiho aparátu Golgiho aparát	Golgiho aparát cisterna Golgiho aparátu ER

Otázka 14-5 Pučení klathrinových váčků lze pozorovat z fragmentů eukaryotní plasmatické membrány po přidání adaptinů, klathrinu a GTP-dynaminu. Co byste viděli, pokud byste nepřidali (A) adaptiny, (B) klathrin nebo (C) dynamin? Co byste viděli, kdyby fragmenty plasmatické membrány pocházely z prokaryotní buňky?

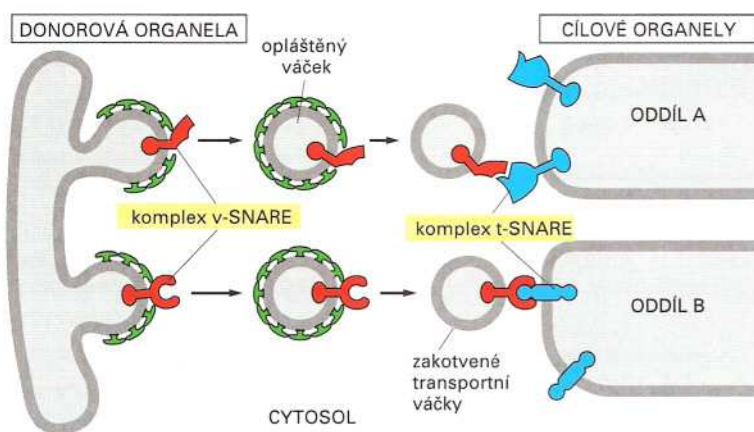
transportní váčky fúzí jen se správnými membránami.

Když už transportní váček poznal svou cílovou membránu a navázal se na ni, musí s ní splynout, aby mohl odevzdat svůj náklad. Kromě nákladu, který transportní váček předá dovnitř organely, odevzdá také do membrány organely svou vlastní membránu. Ke splynutí membrán však často nedochází ihned po navázání váčku na cílovou membránu, nýbrž až po spuštění reakce specifickým signálem. Zatímco navedení transportního váčku do cíle vyžaduje jen přiblížení dvou membrán na dostatečně malou vzdálenost, aby mohly interagovat proteiny vyčnívající z obou lipidových dvojných vrstev, fúze vyžaduje mnohem těsnější přiblížení: aby mohly dvě lipidové dvojně vrstvy splynout, musí se k sobě dostat na vzdálenost 1,5 nm. Proto musí být z hydrofilního povrchu membrány odstraněna i voda což je energeticky velmi nevýhodný proces. Proto jsou zřejmě všechny fúze membrán v buňce katalyzovány zvláštními proteiny, které se shromažďují v místě budoucí fúze a skládají se do fúzního komplexu, který poskytuje prostředky k překonání této energetické bariéry (obr. 14-21). Byla identifikována řada cytosolových proteinů, které jsou potřebné k fúzi váčků, ale zatím se stále neví, jak fungují.

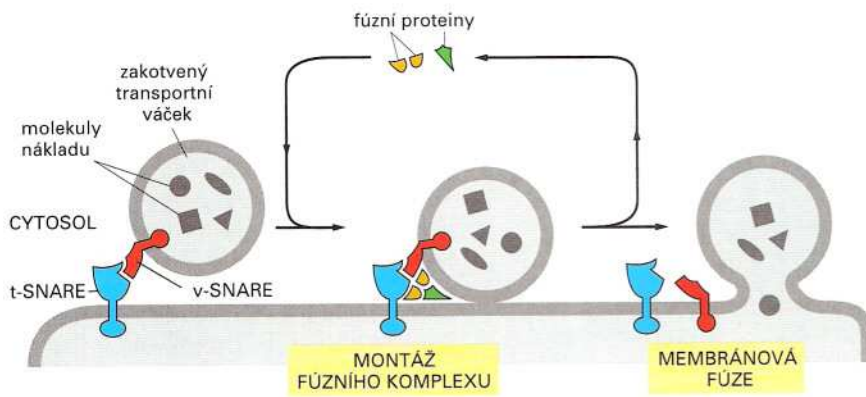
Sekreční dráhy

Vezikulární doprava se neomezuje jen na vnitřní prostředí buňky. Sahá až k plasmatické membráně a dokonce i dále za ni. Nově utvořené proteiny, lipidy a sacharidy jsou převáděny z ER přes Golgiho aparát až k buněčnému povrchu transportními váčky, které fúzí s plasmatickou membránou v ději zvaném exocytóza. Každá molekula, která cestuje po této dráze, prochází pevně daným pořadím membránových buněčných oddílů a na této cestě je často chemicky upravována.

V této sekci budeme sledovat dráhu proteinů směrem ven z buňky, od endoplasmatického retikula, na němž vznikají a v němž jsou chemicky upravovány, přes Golgiho aparát, kde jsou dále modifikovány a tříděny, až k plasmatické membráně. Jak protein cestuje z jednoho oddílu buňky do druhého, je stále sledován a kontrolován, zda se správně spojil s odpovídajícími partnery. Jen správně sestaveným proteinům je umožněno dosáhnout buněčného povrchu; všechny ostatní proteiny jsou v buňce opět odbourány.



Obrázek 14-20 Současný model navádění transportních váčků. Váčky, které pučí z membrány, nesou na svém povrchu specifické značkové proteiny, zvané váčkové SNARE (v-SNARE), které se vážou ke komplementárním cílovým SNARE-proteinům (t-SNARE; *target SNARE*) v cílové membráně. Má se za to, že v navádění cílových váčků k jejich cílovým membránám hraje klíčovou roli celá řada komplementárních párů váčkových a cílových SNARE-proteinů.



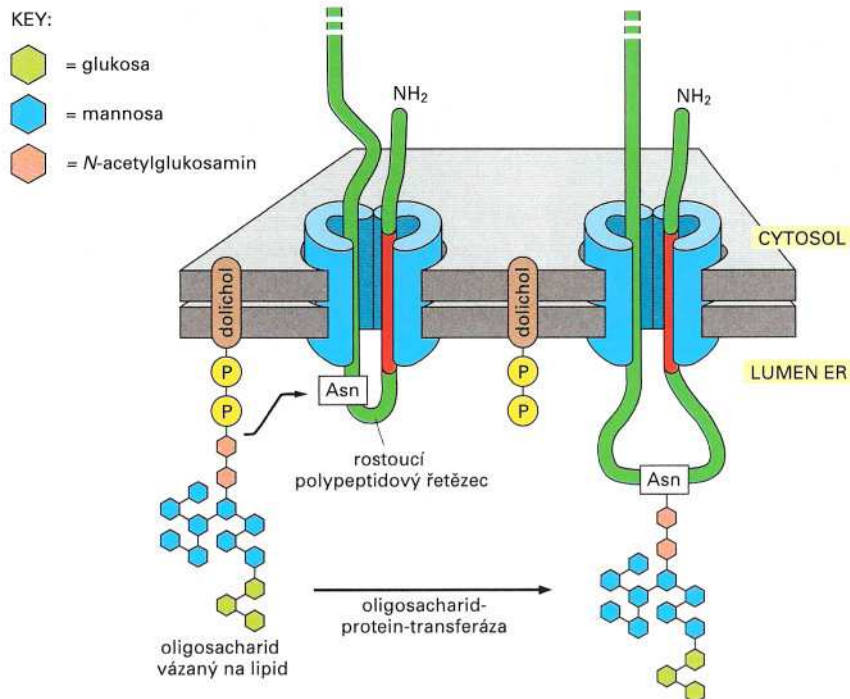
Obrázek 14-21 Fúze transportního váčku.
Po navedení transportního váčku k cílové membráně se v místě „přistání“ váčku složí komplex proteinů zajišťujících fúzi a katalyzuje fúzi váčku s cílovou membránou. Po fúzi se obsah váčku stane součástí vnitřního obsahu cílové organely a membrána váčku se stane částí membrány této organely.

Většina proteinů je kovalentně modifikována v ER

Většina proteinů, které vstupují do endoplasmatického retikula, je tam chemicky modifikována. Oxidací párů cysteinových postranních řetězců se tvoří disulfidové můstky (probírané v Kapitole 5); tato reakce je enzymově katalyzována a odehrává se v lumen ER. Disulfidové můstky pomáhají stabilizovat strukturu těch proteinů, které by se mohly vně buňky setkat se změnami pH nebo s enzymy, které odbourávají bílkoviny. Takto modifikované proteiny jsou buď vylučovány nebo začleňovány do plasmatické membrány. Disulfidové můstky nemohou vznikat v cytosolu kvůli tamnímu redukujícímu prostředí.

Celá řada proteinů vstoupivších do lumen nebo do membrány ER se v ER mění v glykoproteiny kovalentním připojením krátkých postranních řetězců oligosacharidů. Tento proces *glykosylace* zajišťují glykosylující enzymy, které se nacházejí v ER, nikoli však v cytosolu. V cytosolu je glykosylováno jen velmi málo proteinů, a i k těm je připojen jen jediný cukerný zbytek. Oligosacharidy na proteinech plní různé funkce podle druhu proteinu: mohou chránit protein před odbouráním, zadržovat ho v ER, dokud není správně složen, nebo pomáhat při jeho nasměrování do správné organely tak, že slouží jako transportní signál pro zabalení proteinu do správného transportního váčku (jako v případě lyzomálních proteinů probíraných později). Při vystavení na povrchu buňky tvoří oligosacharidy část glykokalyxu (probírá se v Kapitole 11) a mohou se uplatnit při vzájemném rozpoznávání buněk.

V ER nevzniká oligosacharidový postranní řetězec proteinu tak, že by se přidávaly jednotlivé cukerné podjednotky jedna po druhé. Místo toho se k proteinu obsahujícímu příslušné místo pro glykosylaci připojí najednou blok 14 cukrů. Tento oligosacharid je původně vázán ke zvláštnímu lipidu zvanému *dolichol* v membráně ER a poté je přenesen na aminoskupinu ($-NH_2$) asparaginového postranního řetězce proteinu hned poté, co se cílový asparagin během translokace proteinu zanoří do lumen ER (obr. 14-22). Připojení se odehrává v jednom reakčním kroku, který katalyzuje enzym (oligosacharid:proteintransferáza) vázaný na membránu, který má své aktivní místo vystavené na lumenální straně membrány ER; to vysvětluje, proč cytosolové proteiny tímto způsobem glykosylovány nejsou. Jednoduchá sekvence tří aminokyselin, z nichž jednou je asparagin, určuje, ke kterému asparaginovému zbytku v proteinu bude připojen oligosacharid. Oligosacharidové postranní řetězce připojené v prote-



Obrázek 14-22 Glykosylace proteinu v ER. Téměř ihned po svém vstupu do lumen ER je polypeptidový řetězec glykosylován přidáním oligosacharidového postranního řetězce k určitým asparaginům v polypeptidu. Každý polysacharidový řetězec je na asparagin přenášen jako neporušená jednotka z lipidu zvaného dolichol. Asparaginy, které jsou glykosylovány, jsou vždy přítomny v tripeptidové sekvenci asparagin-X-serin (nebo threonin), přičemž X může být jakákoli aminokyselina.

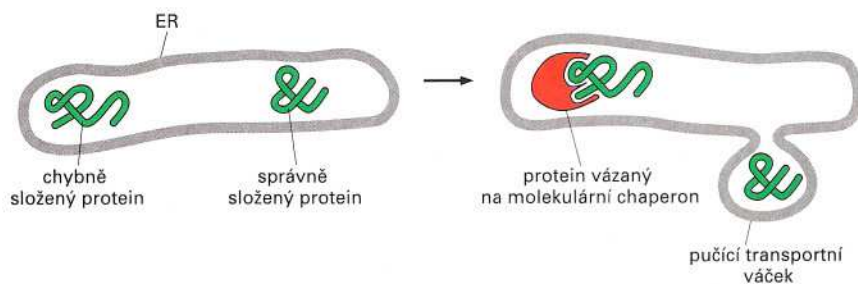
inu k aminoskupině asparaginu se označují jako *N-vázané* a představují zdaleka nejběžnější způsob spojení ve známých glykoproteinech.

Připojení oligosacharidového postranního řetězce se 14 cukernými zbytky v ER je pouhým prvním krokem v řadě dalších chemických úprav, které předcházejí vynoření zralého glykoproteinu na druhém konci sekreční dráhy. Bez ohledu na počáteční podobnost jsou *N-vázané* oligosacharidy na zralých glykoproteinech neobyčejně rozmanité. Tato rozmanitost pramení z dalších modifikací původního prekursoru z obrázku 14-22. Tyto *úpravy oligosacharidu* začínají v endoplasmatickém retikulu a pokračují v Golgiho aparátu.

Kvalita proteinů je zajištěna kontrolou při výstupu z ER

Některé proteiny vyrobené v ER jsou určeny pro samotné ER. Jsou zadržovány v ER (a vráceny do něj, pokud se jim podaří uniknout do Golgiho aparátu) karboxyterminální sekvencí čtyř aminokyselin, zvanou *retenční signál endoplasmatického retikula* (viz tabulku 14-3, str. 454). Tento signál je rozpoznáván receptorovým proteinem v membráně ER a Golgiho aparátu. Většina proteinů, které vstupují do ER, je však určena pro jiná místa; jsou zabaleny do transportních váčků, které pučí z ER a fúzí s Golgiho aparátem. Výstup z ER je však vysoce selektivní. Proteiny, které se skládají nesprávně, a dimerní a multimerní proteiny, které se nedokázaly správně složit ze svých podjednotek, jsou v ER aktivně zadržovány navázáním chaperonových proteinů, které zde sídlí. Interakce s molekulárními chaperony udržuje proteiny v ER až do okamžiku správného složení. Pokud správné složení neproběhne, jsou tyto proteiny nakonec odbourány (obr. 14-23). Například molekuly protilátek jsou složeny ze čtyř polypeptidových řetězců (viz Panel 5-3, str. 158-159), které se skládají do kompletní molekuly protilátky v ER. Částečně složené protilátky jsou zadržovány v ER až do sestavení všech čtyř polypeptidových řetězců;

Otázka 14-6 Proč by mohlo být výhodné přidání předem složeného bloku 14 cukerných zbytků k proteinu v ER místo vystavby sacharidových řetězců postupným přidáváním cukerných zbytků na povrchu proteinu s pomocí různých enzymů?



Obrázek 14-23 Kontrola kvality v ER.

Chybně svinuté proteiny se v lumen ER vážou na chaperonové proteiny a jsou tak zadrženy v ER, zatímco normálně svinuté proteiny jsou přepravovány v transportních váčcích do Golgiho aparátu. Pokud se chybně svinuté proteiny nedokážou svinout do správné polohy, jsou přeneseny do cytosolu a tam odbourány.

každá molekula neschopná správného složení je odbourána. Tímto způsobem ER kontroluje kvalitu proteinů, které posílá do Golgiho aparátu.

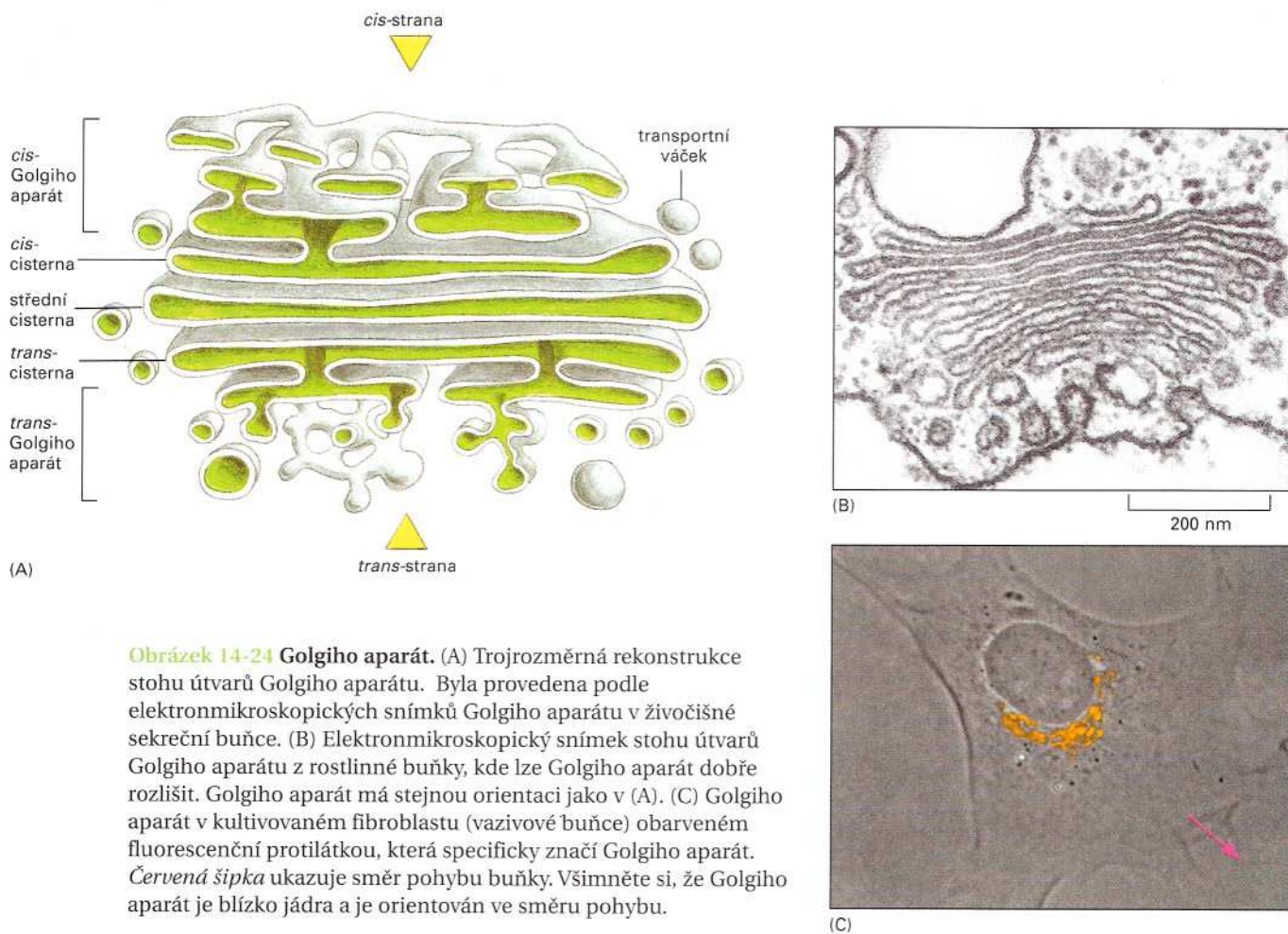
Někdy však může být tento mechanismus kontroly kvality pro organismus škodlivý. Například hlavní mutace, která způsobuje běžné genetické onemocnění *cystickou fibrozu*, vede k transportnímu proteinu plasmatické membrány, v jehož skládání dochází k malé odchylce. Ačkoli by tento zmutovaný protein mohl bezchybně fungovat v plasmatické membráně, pokud by jí dosáhl, zůstává zadržen v ER se strašnými následky pro pacienta. Ničivá nemoc nepropuká proto, že mutace inaktivuje důležitý protein, ale proto, že se buňky zbavují aktivního proteinu, aniž by mu daly příležitost se uplatnit.

Proteiny jsou dále chemicky upravovány a tříděny v Golgiho aparátu

Golgiho aparát se obvykle nachází v blízkosti buněčného jádra, a v živočišných buňkách je často blíže centrosomu než středu buňky. Je tvořen souborem zploštělých membránových váčků zvaných cisterny, které jsou na sobě naskládány jako talíře. Každý stoh obsahuje od tří do dvaceti cisteren (obr. 14-24). Počet takových stohů Golgiho aparátu v buňce se velmi liší v závislosti na druhu buňky: některé buňky obsahují jeden velký stoh, zatímco jiné obsahují stovky malých.

Každý stoh Golgiho aparátu má dva různé povrchy: vstupní, neboli *cis*, a výstupní, neboli *trans*. *Cis*-povrch sousedí s ER, zatímco *trans*-povrch směřuje k plasmatické membráně. Vnější cisterna na každém povrchu je připojena k síti vzájemně propojených membránových trubiček a váčků (viz obr. 14-24A). Rozpustné proteiny a membrány vstupují do *cis*-sítě Golgiho aparátu transportními váčky pocházejícími z ER. Proteiny putují cisternami v pořadí, v jakém se jejich transportní váčky odškrucují od membrány jedné cisterny a fúzí s membránou cisterny další. Proteiny vystupují z ***trans*-sítě Golgiho aparátu** v transportních váčcích, které směřují buď k další organelle nebo k povrchu buňky (viz obr. 14-17). Má se za to, že pro třídění proteinů jsou důležité obě sítě Golgiho aparátu – *cis* i *trans*: proteiny vstupující do *cis*-sítě Golgiho aparátu se mohou pohybovat dále celým jeho stohem, nebo, pokud obsahují retenční signál ER, mohou být vráceny do ER; proteiny vystupující z *trans*-sítě Golgiho aparátu jsou tříděny podle toho, zda jsou určeny pro lyzozomy nebo pro povrch buňky. Později probereme několik příkladů třídící práce *trans*-sítě Golgiho aparátu.

Celá řada oligosacharidových skupin, které se přidávají k proteinům v ER, prochází dalšími změnami v Golgiho aparátu. Na někte-

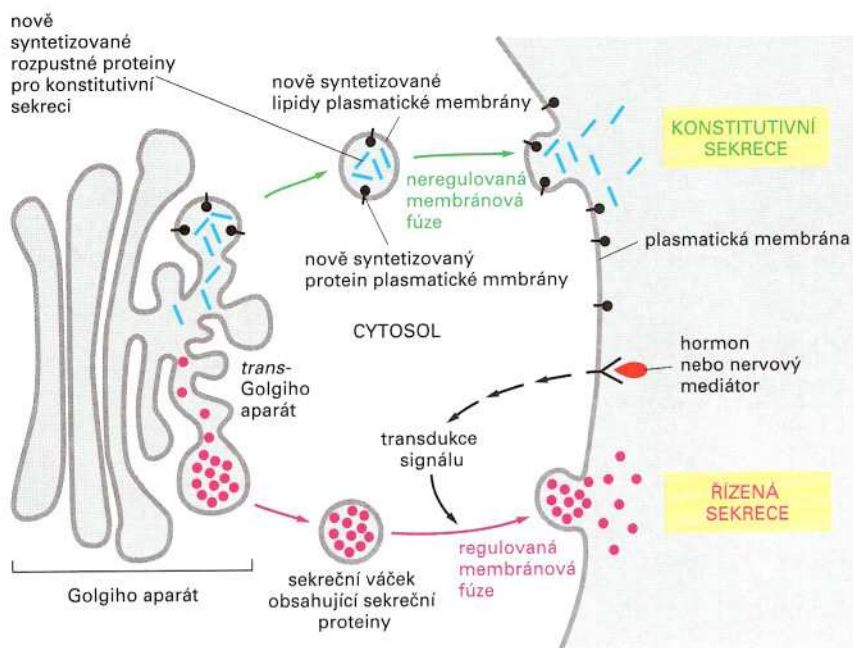


Obrázek 14-24 Golgiho aparát. (A) Trojrozměrná rekonstrukce stohu útvarů Golgiho aparátu. Byla provedena podle elektronmikroskopických snímků Golgiho aparátu v živočišné sekreční buňce. (B) Elektronmikroskopický snímek stohu útvarů Golgiho aparátu z rostlinné buňky, kde lze Golgiho aparát dobře rozlišit. Golgiho aparát má stejnou orientaci jako v (A). (C) Golgiho aparát v kultivovaném fibroblastu (vazivové buňce) obarveném fluorescenční protilátkou, která specificky značí Golgiho aparát. Červená šipka ukazuje směr pohybu buňky. Všimněte si, že Golgiho aparát je blízko jádra a je orientován ve směru pohybu.

rých proteinech jsou například vytvářeny složité oligosacharidové řetězce ve vysoce uspořádaném ději, při kterém jsou cukry přidávány a odstraňovány řadou enzymů působících v přesně daném pořadí, podle toho, jak protein prochází stohem Golgiho aparátu. Existuje jasný vztah mezi polohou enzymu v řetězci chemických úprav a jeho umístěním ve stohu Golgiho aparátu: enzymy, které působí dříve, se nacházejí v cisternách blízkých *cis*-povrchu, zatímco enzymy, které působí později, se nacházejí v cisternách blízko povrchu *trans*.

Sekreční proteiny se z buňky uvolňují exocytózou

Ve všech eukaryontních buňkách existuje neustálý proud váčků, které pučí z *trans*-sítě Golgiho aparátu a fúzí s plasmatickou membránou. Tato *základní dráha exocytózy* funguje nepřetržitě a dodává nově utvořené lipidy a proteiny do plasmatické membrány; je drahou zodpovědnou za růst plasmatické membrány před dělením. Nese také proteiny k povrchu buňky, kde se vylučují; tomuto ději se říká sekrece. Některé z uvolněných proteinů přilnou k povrchu buňky a stanou se periferními proteiny plasmatické membrány. Některé jsou začleněny do extracelulární matrix, ještě další difundují do extracelulární kapaliny, aby přinášely výživu nebo signály dalším buňkám.

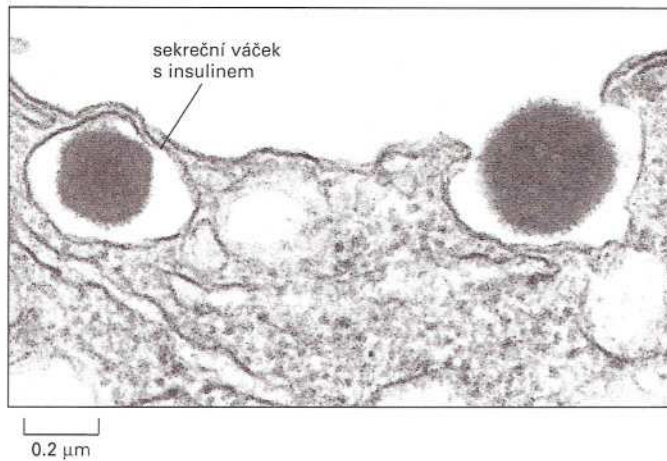


Obrázek 14-25 Řízená a základní dráha exocytozy. Obě dráhy se rozcházejí v *trans*-části Golgiho aparátu. Mnoho rozpustných proteinů je neustále vylučováno z buňky základní sekreční dráhou, která se vyskytuje ve všech buňkách. Tato dráha také zásobuje plasmatickou membránu nově syntetizovanými lipidy a proteiny. Zvláštní sekreční buňky mají také řízenou exocytotickou dráhu, kterou se vybrané proteiny v *trans*-části Golgiho aparátu dostávají do sekrečních váčků, kde se proteiny koncentrují a skladují, dokud extracelulární signál nevyvolá jejich sekreci.

Vedle základní dráhy exocytozy, která funguje nepřetržitě ve všech eukaryontních buňkách, existuje také *regulovaná dráha exocytozy*, která funguje jen v buňkách zaměřených na sekreci. Speciální *sekreční buňky* produkují velká množství speciálních látek, jako jsou hormony, sliz nebo trávicí enzymy, které jsou uloženy v **sekrečních váčcích**. Tyto váčky pučí z *trans*-sítě Golgiho aparátu a shromažďují se v blízkosti plasmatické membrány. K jejich fúzi s plasmatickou membránou a uvolnění jejich obsahu mimo buňku je třeba stimulace buňky vnějším signálem (obr. 14-25). Například vzrůst koncentrace glukosy v krvi signalizuje buňkám slinivky břišní, že mají vylučovat hormon insulin (obr. 14-26).

Proteiny určené sekrečním váčkům jsou tříděny a baleny v *trans*-části sítě Golgiho aparátu. Proteiny, které touto cestou procházejí, mají zvláštní povrchové vlastnosti, díky kterým se za určitých iontových podmínek, které převládají právě v *trans*-síti Golgiho aparátu (kyselé prostředí a vysoká koncentrace Ca^{2+}), shlukují dohromady. Agregované proteiny jsou rozpoznávány neznámým mechanismem a baleny do sekrečních váčků, které se odškrucují od sítě GA. Proteiny vylučované základní sekreční dráhou se neshlukují, a proto jsou automaticky předávány do plasmatické membrány transportními váčky základní dráhy. Selektivní agregace má ještě další funkci: umožňuje balení sekrečních proteinů do sekrečních váčků při koncentraci až 200krát vyšší, než je koncentrace neagregovaného proteinu v lumen Golgiho aparátu. To umožňuje sekrečním váčkům uvolnit velké množství proteinu hned poté, co dorazil příslušný podnět (viz obr. 14-26).

Když sekreční nebo transportní váček splyne s plasmatickou membránou a uvolní svůj obsah exocytozou, stane se jeho membrána součástí plasmatické membrány. Ačkoli by to mělo podstatně zvětšit povrchovou plochu plasmatické membrány, děje se tak jen přechodně, neboť složky membrány jsou z jiných částí jejího povrchu odstraňovány endocytozou téměř stejně rychle, jako jsou přidávány v exocytoze. Toto odstranění lipidů a proteinů vrací membránu váčku zpět do Golgiho aparátu, kde může být znovu využita.



Obrázek 14-26 Exocytoza sekrečních váčků. Elektronmikroskopický snímek ukazuje uvolnění insulínu ze sekrečního váčku α -buňky slinivky do extracelulárního prostoru. Insulin je v každém sekrečním váčku skladován ve vysoce koncentrované formě a je uvolněn, jen pokud buňka dostane signál k sekreci v podobě zvýšení hladiny glukosy v krvi.

Endocytotické dráhy

Eukaryontní buňky stále přijímají kapalinu a velké i malé molekuly cestou endocytozy. Specializované buňky jsou také schopny pohltnout velké částice a dokonce i celé další buňky. Materiál, který má být pohlčen, je postupně uzavřen do malé části plasmatické membrány, která nejprve vypučí dovnitř buňky a potom se odškrtní a vytvoří vnitrobuněčný *endocytotický váček*. Pohlčený materiál je nakonec předán lyzozomům, kde je stráven. Metabolity utvářené při trávení jsou přímo z lyzozomu přenášeny do cytosolu, kde je buňka může využít.

Podle velikosti utvářených endocytotických váčků se rozlišují dva typy endocytozy. *Pinocytoza* („buněčné pití“) zahrnuje pohlcování kapaliny a molekul prostřednictvím malých váčků (<150 nm v průměru). *Fagocytoza* („buněčné pojídání“) zahrnuje trávení velkých částic, například mikroorganismů a zbytků buněk, prostřednictvím velkých váčků zvaných *fagosomy* (obecně >250 nm v průměru). Zatímco všechny eukaryontní buňky neustále přijímají kapalinu a molekuly pinocytozou, velké částice pohlcují hlavně specializované *fagocytotické buňky*.

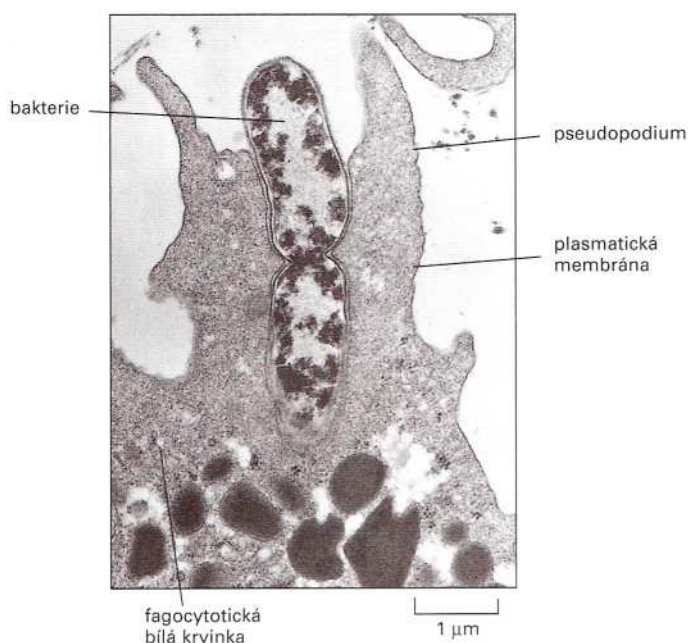
V této závěrečné sekci budeme sledovat endocytotickou dráhu od plasmatické membrány k lyzozomům. Nejprve se zaměříme na přijímání velkých částic fagocytozou.

Specializované fagocytotické buňky pohlcují velké částice

Nejdramatičtější formou endocytozy je **fagocytoza**, která byla poprvé pozorována před více než sto lety. U prvoků představuje fagocytoza způsob, jakým tyto organismy přijímají potravu: velké částice jako například bakterie jsou uzavírány do fagosomů, které potom fúzí s lyzozomy. V lyzosomech jsou pak částice potravy stráveny. V mnohobuněčných organismech je jen málo buněk schopno účinně trávit velké částice. Například ve střevě živočichů musí být velké částice potravy nejprve rozloženy na jednotlivé molekuly extracelulárními enzymy a teprve potom je mohou přijmout absorpční buňky, které vystylají střevo.

U většiny živočichů je však fagocytoza důležitá z jiného důvodu, než pro příjem potravy. Nejúčinněji ji provádějí **fagocytotické buňky**, například *makrofágy*, které se hojně vyskytují v tkáních, a některé bílé krvinky. Fagocytotické buňky nás chrání proti infekci, neboť

Otázka 14-7 Co byste očekávali, že se stane v buňkách, které vylučují velká množství proteinu řízenou sekreční dráhou, pokud budou iontové podmínky v lumen ER změněny tak, aby připomínaly iontové podmínky v lumen *trans*-části Golgiho aparátu?



Obrázek 14-27 Fagocytoza bakterie bílou krvinkou. Na snímku z elektronového mikroskopu je fagocytotická bílá krvinka (neutrofil), která pohlcuje právě se dělící bakterii. Bílá krvinka vytvořila povrchové výběžky zvané panožky (*pseudopodia*), které postupně obalují bakterii.

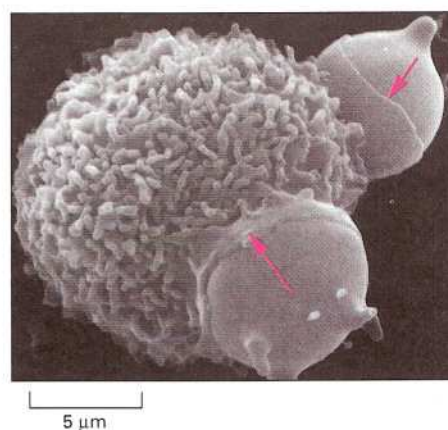
pohlcují mikroorganismy proniknuvší do těla. Aby mohly být částice pohlceny makrofágem nebo bílou krvinkou, musí se vázat k povrchu fagocytotické buňky a aktivovat jeden z celé řady povrchových receptorů. Některé z těchto receptorů rozeznávají protilátky – proteiny, které nás chrání před infekcí tak, že se vážou na povrch mikroorganismů. Navážou-li se bakterie s protilátkami na svém povrchu na tyto receptory, přiměje to fagocytotickou buňku k vytváření listovitých výběžků plasmatické membrány, zvaných *pseudopodia*, které bakterii pohltní (obr. 14-27) a fúzíjí na svých koncích za vzniku *fagosomu*.

Fagocytotické buňky také hrají důležitou úlohu při odklizení mrtvých a poškozených buněk a jejich zbytků. Například makrofágy mohou každý den strávit víc než 10^{11} zestárlých červených krvinek (obr. 14-28).

Kapaliny a makromolekuly jsou přijímány pinocytozou

Eukaryontní buňky stále pohlcují část své plasmatické membrány ve formě malých pinocytotických váčků, které jsou později vraceny k buněčnému povrchu. Rychlost, jakou je plasmatická membrána převedena **pinocytozou** do nitra buňky, se různí u jednotlivých typů buněk, ale obvykle je obdivuhodně velká. Například makrofág pohltní každou hodinu 25 % svého vlastního objemu tekutiny. To znamená, že pohltní 3 % své plasmatické membrány každou minutu, neboli celou membránu pohltní během asi půl hodiny. Endocytoza prováděná fibroplasty probíhá poněkud pomaleji, zatímco některé fagocytotické měňavky (améby) pohltní svou plasmatickou membránu ještě rychleji. Protože celková povrchová plocha buňky a její objem zůstá-

Obrázek 14-28 Fagocytoza červené krvinky makrofágem. Na snímku z rastrovacího elektronového mikroskopu je makrofág fagocytující dvě červené krvinky. Červené šipky ukazují k okrajům jemných listů membrán - panožek, které makrofág vysílá jako lasa, do kterých chytá červené krvinky a pohlcuje je.



vají během tohoto děje nezměněny, je jasné, že velké množství membrány je k buněčnému povrchu dodáváno fúzí váčků (exocytozou) a odstraňováno endocytozou.

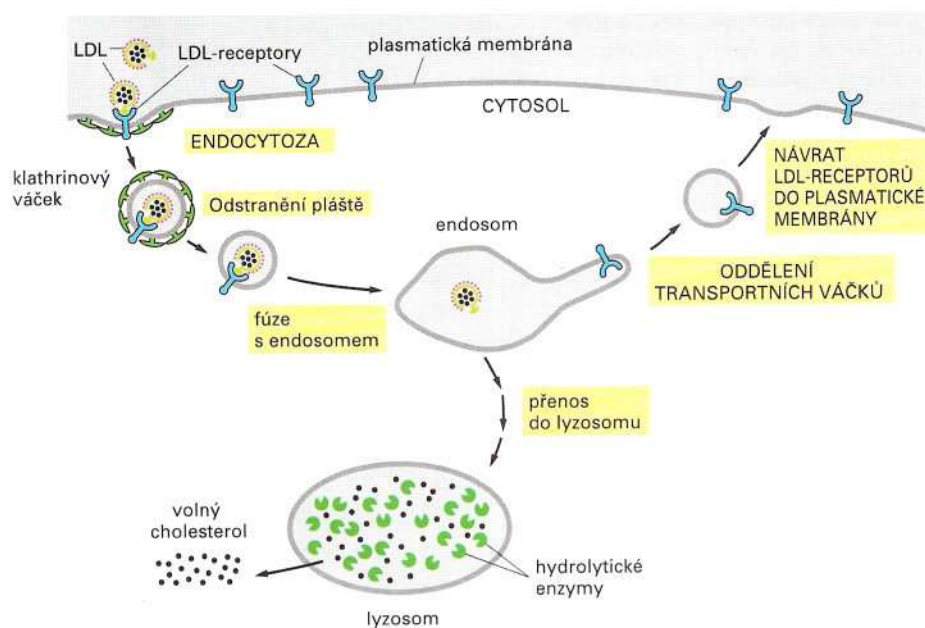
Pinocytoza se odehrává hlavně s pomocí klathrinových jamek a váčků, které jsme už probrali (viz obr. 14-18 a 14-19). Po svém odškrcení od plasmatické membrány ztrácejí klathrinové váčky svůj plášť a fúzují s *endosomy*. Při vchlipování opláštěných jamek a jejich přeměně v opláštěné váčky je v nich zachycována extracelulární tekutina; látky rozpuštěné v extracelulární tekutině se tak dostávají do nitra buňky a tam až k endosomům. Tento příjem tekutiny je obecně vyrovnáván ztrátou tekutiny při exocytoze.

Endocytoza zprostředkovaná receptory poskytuje specifickou cestu do živočišných buněk

Pinocytoza, kterou jsme právě popsali, je neutrální – nerozlišuje přijímané materiály. Endocytotické váčky jednoduše zachytí každou molekulu, která je náhodou přítomna v extracelulární tekutině, a vnesou ji do buňky. U většiny živočišných buněk však pinocytoza prostřednictvím klathrinových váčků poskytuje také účinný způsob pro příjem specifických makromolekul z extracelulární kapaliny. Makromolekuly se vážou ke komplementárním receptorům na buněčném povrchu a vstupují do buňky v podobě komplexů s receptory v klathrinových váčcích. Tento proces, zvaný **receptory zprostředkovaná endocytoza**, poskytuje mechanismus pro selektivní zvyšování koncentrace určitých látek, a tak zvyšuje účinnost přenosu určitých makromolekul do nitra buňky více než 1000krát ve srovnání s obvyklou pinocytozou, takže buňka může přijímat i velmi málo koncentrované látky z extracelulární kapaliny, aniž by musela přijímat i odpovídající objem této kapaliny. Důležitým příkladem endocytozy zprostředkované receptory je její využití živočišnými buňkami pro příjem cholesterolu, který tyto buňky potřebují k tvorbě nových membrán.

Cholesterol je extrémně nerozpustný a je přenášen v krevním řečišti vázaný na proteiny ve formě částic zvaných *lipoproteiny s nízkou hustotou* (LDL; *low-density lipoproteins*). LDL se vážou na receptory umístěné na povrchu buněk a komplexy LDL s receptory jsou následně pohlcneny receptorovou endocytozou a dodány **endosomům**. Vnitřek endosomů je kyselější než okolní cytosol či extracelulární tekutina, a v tomto kyselém prostředí se LDL uvolní z komplexů se svými receptory. Receptory se vracejí v transportních váčcích do plasmatické membrány k opětovnému použití, zatímco LDL jsou předávány lyzosomům. V lyzosomech jsou LDL rozštěpeny hydrolytickými enzymy: uvolní se cholesterol a přechází do cytosolu, kde je k dispozici pro syntézu nových membrán. LDL-receptory na povrchu buňky jsou neustále přenášeny do jejího nitra a recyklovány nezávisle na tom, zda jsou právě navázány na LDL či nikoli (obr. 14-29).

Tato cesta pro příjem cholesterolu je přerušena u jedinců, kteří zdělili vadný gen kódující LDL-receptorový protein. V některých případech receptory chybějí, v jiných jsou přítomné, jsou však nefunkční. Ve všech těchto případech nemohou buňky těchto jedinců přijímat LDL, cholesterol se hromadí v krvi a předurčuje tyto jedince k vývinu aterosklerozy. Většina z nich umírá v raném věku



Obrázek 14-29 Receptory zprostředkovaná endocytoza LDL. LDL se váže k receptorům na povrchu buňky a je přenášen do jejího nitra v klathrinových váčcích. Váčky ztrácejí svůj plášť a poté fúzí s endosomy. V kyselém prostředí endosomu se LDL uvolní ze svých receptorů. Zatímco LDL skončí v lysosomech, kde je odbouráván za uvolnění cholesterolu, receptory LDL jsou transportními váčky vráceny do plasmatické membrány k opětovnému použití. Na obrázku je pro jednoduchost jen jeden receptor LDL, který vstupuje do buňky a vrací se do plasmatické membrány. Bez ohledu na to, zda je naložen či nikoli, receptor LDL obvykle vykoná jednu cestu do buňky a zpět během každých 10 minut a celkem několik set takových cest během svého 20hodinového života.

na srdeční záchvat, který je důsledkem ucpání tepen zásobujících srdce.

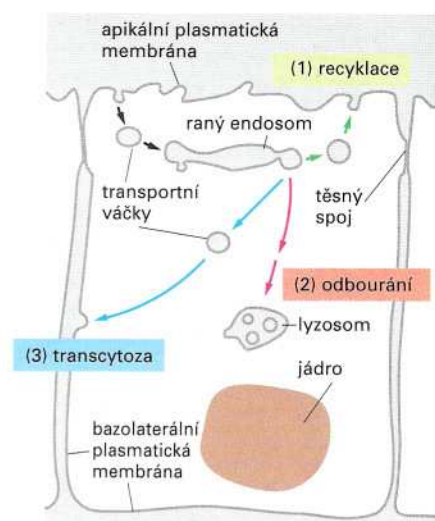
Endocytoza zprostředkovaná receptory se také využívá k příjmu mnoha dalších esenciálních látek, například vitamínu B₁₂ a železa, jež buňky nemohou přijímat membránovým transportem probírajícím v Kapitole 12. Vitamin B₁₂ i železo jsou nezbytné například k syntéze hemoglobinu, který je hlavním proteinem v červených krvinkách. Mnoho povrchových receptorů, které vážou extracelulární adresové molekuly, je rovněž převáděno do nitra buněk tímto způsobem: některé z nich jsou vráceny zpět k plasmatické membráně k opětovnému použití, jiné jsou odbourávány v lysosomech. Bohužel mohou receptorovou endocytozu využívat také viry: virus chřipky a HIV, který způsobuje AIDS, získávají přístup do buněk právě tímto způsobem.

Endocytované makromolekuly jsou tříděny v endosomech

Protože extracelulární materiál je po pinocytoze rychle předán endosomům, je možné zviditelnit endosomální oddíl inkubací živých buněk v tekutině obsahující elektron-densní značku, kterou lze později pozorovat v elektronovém mikroskopu. Po označení tímto způsobem se endosomální oddíl jeví jako složitá sada spojených membránových trubiček a větších váčků. Při tomto značení lze rozlišit dvě sady endosomů: molekuly značkové látky se nejprve objevují v *raných endosomech* těsně pod plasmatickou membránou a o 5 – 15 minut později v *pozdních endosomech* v blízkosti jádra. Vnitřek endosomálního oddílu je udržován v kyselém stavu (pH 5-6) ATP-poháněnou H⁺-pumpou v endosomální membráně, která čerpá ionty H⁺ do endosomálního lumen z cytosolu.

Endosomální oddíl funguje jako hlavní třídící stanice v endocytotické dráze směrem do nitra buňky, podobně jako *trans*-sít Golgiho aparátu funguje jako třídící zařízení v sekreční dráze směrem ven z buňky. Toto kyselé prostředí endosomu hraje klíčovou roli v třídě-

Obrázek 14-30 Možné osudy receptorových proteinů zapojených do receptorové endocytozy. Na obrázku jsou tři dráhy z endosomálního oddílu v epiteliální buňce. Receptory, které nejsou specificky získávány z raných endosomů, sledují dráhu z endosomálního oddílu do lyzozomů, kde jsou odbourávány. Receptory zachráněné z raných endosomů jsou vráceny do původní oblasti plasmatické membrány (recyklace) nebo do jiné oblasti plasmatické membrány (transcytoza). Pokud ligand, který je endocytován společně se svým receptorem, zůstane v kyselém prostředí endosomu navázán k receptoru, bude putovat po stejné dráze jako receptor; v opačném případě bude převeden do lyzozomů k odbourání.



cích dějích, neboť přiměje řadu receptorů, aby uvolnily svůj vázaný náklad. Cesty jednotlivých receptorů se po jejich vstupu do endosomu liší podle typu receptoru: (1) většina z nich se vrací do původní domény plasmatické membrány, jako například LDL-receptor probíraný dříve; (2) některé cestují do lyzozomů, kde se odbourávají, a (3) některé pokračují k jiné doméně plasmatické membrány, přičemž přenášejí svůj vázaný náklad z jednoho extracelulárního prostoru do jiného v ději zvaném *transcytoza* (obr. 14-30).

Molekuly nákladu, které zůstávají navázány ke svým receptorům, sdílejí osud těchto receptorů. Ty molekuly, které se ze svých receptorů v endosomech uvolní, jsou odsouzeny ke zničení v lyzosomech společně s většinou obsahu endosomálního lumen. Zatím není zcela jasné, jak se molekuly dostávají z endosomů k lyzozomům. Je možné, že jsou přenášeny v transportních váčcích; jinou možností je postupná přeměna endosomů v lyzozomy.

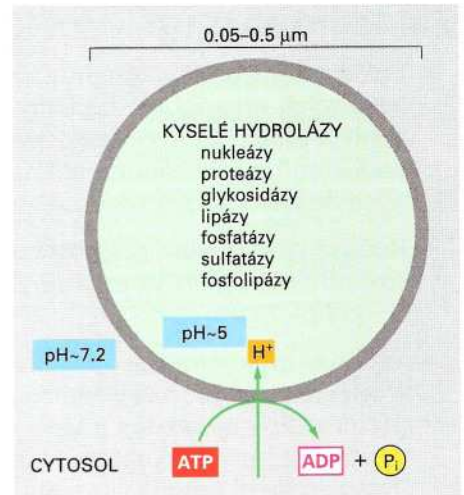
Lyzosomy jsou základními místy vnitrobuněčného trávení

Mnoho extracelulárních částic a molekul, které byly pohlceny buňkami, skončí v **lyzosomech** – membránových váčcích s hydrolytickými enzymy, které zajišťují řízené vnitrobuněčné trávení původně extracelulárních materiálů a opotřebovaných organel. Obsahují asi 40 typů hydrolytických enzymů včetně těch, které odbourávají proteiny, nukleové kyseliny, oligosacharidy a fosfolipidy. Všechny jsou optimálně aktivní v kyselém prostředí (pH ≈ 5), které se udržuje v lyzosomech. Membrána lyzozomu normálně udržuje tyto destruktivní enzymy oddělené od cytosolu (jehož pH je asi 7,2), ale závislost těchto enzymů na kyselém prostředí zajišťuje strukturám v cytosolu bezpečnost i v případě porušení lyzozomální membrány.

Podobně jako všechny ostatní vnitrobuněčné organely obsahuje lyzozom nejen unikátní sbírku enzymů, ale má také unikátní membránu. Membrána lyzozomu obsahuje transportní proteiny, které umožňují přenos konečných produktů trávení makromolekul, tedy například aminokyselin, cukrů a nukleotidů, do cytosolu, odkud mohou být buď postupně vyloučeny z buňky, nebo být buňkou znovu použity. Obsahuje také ATP-poháněnou H⁺-pumpu, která – podobně jako v membráně endosomu, čerpá do lyzozomu H⁺, a tak udržuje obsah lyzozomu při kyselém pH (obr. 14-31). Většina proteinů lyzozomální membrány je značně glykosylována: cukry, které pokrývají velkou část povrchu proteinů na lumínální straně, chrání proteiny před natrávením lyzozomálními proteázami.

Otázka 14-8 Železo (Fe) je esenciální stopový kov, který potřebují všechny buňky. Vyžadují ho například pro syntézu hemových skupin, které jsou částí aktivního místa mnoha enzymů zahrnutých v elektrontransportních reakcích; jsou také nezbytné v hemoglobinu, hlavním proteinu červených krvinek. Buňky přijímají železo receptorovou endocytozou. Systém příjmu elektronů má dvě složky: rozpustný protein zvaný transferrin, který obíhá v krevním řečišti, a receptor transferrinu, transmembránový protein, který je podobně jako receptor LDL na obrázku 14-29 neustále endocytován a zase vrácen zpět do plasmatické membrány. Ionty železa se na transferrin vážou při neutrálním pH, nikoli však při kyselém pH. Transferrin se váže na transferrinový receptor při neutrálním pH, jen pokud má navázaný ion železa, ale při kyselém pH se váže k receptoru dokonce i bez navázaného železa. Vycházejíce z těchto vlastností, popište způsob příjmu železa a proberte výhody tohoto důmyslného systému.

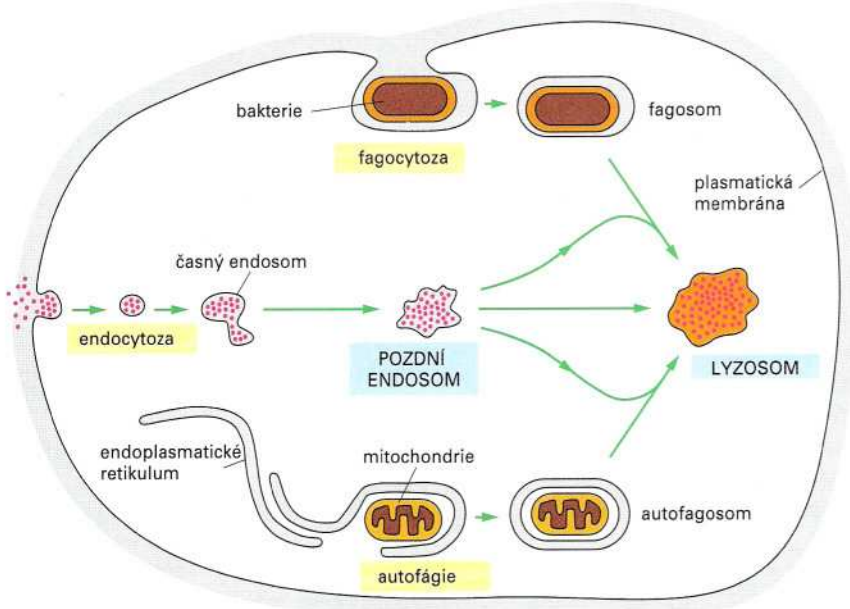
Obrázek 14-31 Lyzom. Kyselé hydrolázy jsou enzymy, které jsou aktivní při kyselých podmínkách. V lumen lyzozomu udržuje kyselé pH protonová ATPáza v membráně, která čerpá H^+ do lumen.



Specializované trávicí enzymy a membránové proteiny lyzozomu jsou syntetizovány v ER a přenášeny přes Golgiho aparát do Golgiho *trans*-sítě. V ER a v *cis*-síti Golgiho aparátu jsou enzymy označeny specifickou fosforylovanou cukernou skupinou (mannosa-6-fosfát), takže mohou být rozpoznány příslušným receptorem – receptorem mannosa-6-fosfátu, a tak tříděny a baleny do transportních váčků, které vznikají pučením a předávají svůj obsah lyzozomům přes pozdní endosomy (viz obr. 14-17).

Podle svého zdroje materiály sledují různé dráhy k lyzozomům. Viděli jsme, že extracelulární částice jsou přijímány ve fagosomech, které fúzí s lyzozomy, a že extracelulární kapalina a makromolekuly jsou přijímány do menších endocytotických váčků, které předávají svůj obsah lyzozomům přes endosomy. Buňky však mají ještě jednu cestu pro dodávání materiálu do lyzozomů; tato cesta se užívá pro odbourávání starých částí samotné buňky. Například na elektron-mikroskopickém snímku jaterních buněk můžeme často spatřit lyzozomy trávící mitochondrie či jiné organely. Tento děj zřejmě začíná uzavřením organely do membrány odvozené z ER. Tak vznikne *autofagosom*, který potom fúzuje s lyzozomy (obr. 14-32). Zatím není známo, čím je označena organela určená ke zničení.

Obrázek 14-32 Tři dráhy odbourání lyzozomů. Každá dráha vede k intracelulárnímu strávení materiálů odvozených z různých zdrojů. Někdy je možné morfologicky (tj. podle tvaru) rozlišit oddíly, které jsou výsledkem těchto tří drah – odtud termíny „autofagolyzosom“, „fagolyzosom“, atd. Takové lyzozomy se však liší jen tím, že se v nich tráví různé materiály.



Základní shrnutí

- Eukaryotní buňky obsahují celou řadu membránových organel včetně jádra, endoplasmatického retikula (ER), Golgiho aparátu, lyzozomů, endosomů, mitochondrií, chloroplastů (v rostlinných buňkách) a peroxisomů.
- Buňky vytvářejí nové membránové organely zvětšováním těch, které již existují. Zvětšené organely se potom dělí.
- Většina organelových proteinů je vytvářena v cytosolu a poté přenášena do organel, kde tyto proteiny fungují. Třídící adresa v aminokyselino-ové sekvenci přivádí protein ke správné organelce. Proteiny, které fungují v cytosolu, nemají žádnou adresovou sekvenci a zůstávají tam, kde jsou.
- Proteiny jádra obsahují jaderný adresový signál, který pomáhá řídit jejich aktivní transport z cytosolu do jádra jadernými póry, které prostupují dvojitou membránu jaderného obalu.
- Většina chloroplastových a mitochondriálních proteinů je utvářena v cytosolu a poté aktivně přenášena do organel proteinovými translokátory (přenašeči) v membránách těchto organel.
- ER je membránovou továrnou buňky; vyrábí většinu buněčných lipidů a celou řadu buněčných proteinů. Proteiny jsou syntetizovány na ribosomech, které jsou navázány na povrchu drsného ER.
- Ribosomy v cytosolu se pohybují směrem k ER, pokud má protein, na němž zrovna pracují, adresovou sekvenci pro endoplasmatické retikulum, která je rozpoznávána signál-rozpoznávající částicí (SRP) v cytosolu. Navázání komplexu ribosom-SRP zahájí translokační děj, při němž se rostoucí polypeptid provlékne do ER translokačním kanálem v membráně této organely.
- Rozpustné proteiny určené k sekreci nebo pro lumen některé organely se dostávají celé do lumen ER, zatímco transmembránové proteiny určené pro membránu ER nebo pro jiné membrány buňky zůstávají ukotveny v dvojné vrstvě lipidů jednou nebo více otočkami α -šroubovic, které procházejí membránou.
- V lumen ER se proteiny svinují, skládají se do větších molekul s jinými proteiny, vytvářejí disulfidové můstky a jsou různě ozdobeny polysacharidovými řetězci.
- Výstup z ER představuje důležitý krok v kontrole kvality proteinů. Proteiny, které se nedokážou řádně svinout nebo se nemohou spojit se svými normálními partnery, jsou v ER zadrženy a popřípadě odbourány.
- Transport proteinů z ER do Golgiho aparátu a z Golgiho aparátu do dalších míst určení zajišťují transportní váčky, které neustále pučí z jedné membrány a fúzí s jinou; tomuto ději se říká vezikulární transport.
- Pučící transportní váčky mají na své cytosolové straně různé proteinové pláště; utváření pláště řídí proces pučení a proteiny pláště pomáhají začlenit receptory s jejich navázanými molekulami nákladu do vznikajících váček.
- Opláštěné váčky ztrácejí svůj proteinový plášť brzy po odškrcení z membrány; to jim umožňuje „přistát“ na specifické cílové membráně a posléze s ní splynout. Samotný přistávací manévř zřejmě zajišťují proteiny v-SNARE a t-SNARE, zatímco samotná fúze je katalyzována cytosolovými proteiny, které se v místě přistání skládají do fúzního komplexu.
- Golgiho aparát získává nově syntetizované proteiny od ER; modifikuje jejich oligosacharidy, třídí proteiny a odesílá je ze své *trans*-části do plasmatické membrány, do lyzozomů nebo do sekrečních váček.
- Ve všech eukaryotních buňkách transportní váčky nepřetržitě pučí z *trans*-sítě Golgiho aparátu a fúzí s plasmatickou membránou. Tomuto ději se říká základní exocytóza; převádí lipidy a proteiny plasmatické membrány na povrch buňky a také uvolňuje molekuly z buňky v ději zvaném sekrece neboli vylučování.
- Zvláštní sekreční buňky mají také řízenou exocytotickou dráhu, kde jsou molekuly uložené v sekrečních váčkách uvolňovány z buňky exocytózou, když buňka dostane podnět k vylučování těchto látek.
- Buňky přijímají kapalinu, molekuly, a někdy dokonce i velké částice endocytózou, při které se části plasmatické membrány vchlipují a odškrcují za vzniku endocytotických váček.
- Většina endocytovaného materiálu je předána endosomům a potom lyzozomům, kde ho odbourávají hydrolytické enzymy. Většina složek membrány endocytotického váčku je však v transportních váčkách vracena zpět do plasmatické membrány k novému použití.

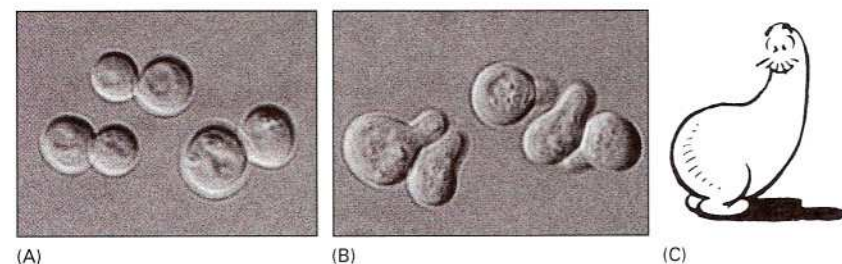
Klíčová slova

adresová sekvence	endoplasmatické retikulum	jaderný pór	sekrece
cytosol	endosom	jaderný obal	sekreční váčky
drsné endoplasmatické retikulum	exocytoza	klathrin	signální sekvence
endocytoza zprostředkovaná receptory	fagocytotická buňka	lyzom	SNARE
	fagocytoza	membránová organela	<i>trans</i> -sít' Golgiho aparátu
	Golgiho aparát	opláštěný váček	transportní váček
		pinocytoza	

15 Komunikace mezi buňkami

Jednotlivé buňky, podobně jako mnohobuněčné organismy, potřebují vnímat své okolí a odpovídat na jeho podněty. Typická volně žijící buňka musí být například schopna vypátrat potravu, cítit rozdíl mezi světlem a tmou a registrovat jedy a dravce a vyhýbat se jim. Má-li taková buňka navíc vést společenský život, musí být schopna používat své smysly ke komunikaci s ostatními buňkami. Je-li například buňka kvasinky připravena ke kopulaci, vylučuje malý protein, zvaný kopulační faktor, na který jsou ostatní buňky kvasinek citlivé: zaznamenávají tento faktor a odpovídají na něj tím, že zastaví pokračování svého buněčného cyklu a vyšlou výběžky směrem k buňce, která vyslala signál (obr. 15-1).

V mnohobuněčném organismu musí buňky své chování sladit nejrozličnějšími způsoby. Jako v každé zaměstnané společnosti vládne i zde neustálá čilá komunikace: sousedé si povídají jeden s druhým, veřejná oznámení jsou rozesílána celé populaci, jednotlivcům jsou doručovány naléhavé zprávy ze vzdálených míst, v případě nebezpečí se ozve poplach. Tato souhra je životně důležitá jak pro přežití společenství tak pro jeho utváření. Během vývoje si buňky v embryu vyměňují signály, aby si rozdělily, kterou specializovanou funkci bude každá z nich zastávat, jakou polohu zaujme a zda bude dál žít nebo umřít či se rozdělit. V pozdějším stadiu řídí růst a každodenní fyziologii a chování živočicha obrovské množství nejrozličnějších signálů. Také v rostlinách mezi sebou buňky neustále komunikují a odpovídají na změny světla, tmy a teploty, které řídí cyklus růstu, kvetení a vytváření plodů, a rozhodují, co se bude dít v každé části rostliny.



OBECNÉ PRINCIPY BUNĚČNÉ SIGNALIZACE

- Signály mohou působit na dlouhou nebo krátkou vzdálenost
- Každá buňka odpovídá na omezený soubor signálů
- Receptory předávají signály po vnitrobuněčných signálních drahách
- Některé signální molekuly mohou prostupovat plasmatickou membránou
- Oxid dusnatý může vstupovat do buněk a aktivovat enzymy přímo
- Existují tři hlavní třídy receptorů na povrchu buněk
- Receptory spojené s iontovými kanály převádějí chemické signály na elektrické
- Signální kaskády uvnitř buňky fungují jako řada molekulových přepínačů

RECEPTORY SPOJENÉ S G-PROTEINY

- Stimulace receptorů spojených s G-proteiny aktivuje G-proteinové podjednotky
- Některé G-proteiny regulují iontové kanály
- Některé G-proteiny aktivují enzymy vázané v membráně
- Dráha cyklického AMP může aktivovat enzymy a zapínat geny
- Dráha přes fosfolipázu C vede ke vzrůstu hladiny Ca^{2+} uvnitř buňky
- Ca^{2+} -signál spouští řadu biologických dějů
- Signální kaskády uvnitř buňky mohou být velmi rychlé, citlivé a přizpůsobivé: fotoreceptory v oční sítnici

RECEPTORY SPOJENÉ S ENZYMY

- Aktivované receptorové tyrosinkinázy vytvářejí komplex intracelulárních signálních proteinů
- Receptorové tyrosinkinázy aktivují GTP-vázající protein Ras
- Síť proteinkináz sjednocuje informace pro řízení složitého chování buněk

Obrázek 15-1 Buňky kvasinek odpovídající na kopulační faktor. Buňky *Saccharomyces cerevisiae* jsou normálně kulovité, jak je vidět v části (A), ale když je vystavíme kopulačnímu faktoru, vytvářejí výběžky směrem ke zdroji tohoto faktoru (B). Buňky, které v odpověď na kopulační signál nabývají této podoby, se nazývají šmoo (*shmoo*) podle postavíček z kreslených filmů Al Cappa ze čtyřicátých let (C).

V této kapitole prozkoumáme některé z nejdůležitějších způsobů, kterými živočišné buňky komunikují, a rozebereme, jak buňky překládají do své řeči signály, které obdrží. Zaměříme se na živočišné buňky, protože mechanismus přijímání a překládání signálů v rostlinných buňkách zatím chápeme mnohem méně. Začneme přehledem obecných principů buněčné signalizace a potom probereme dva hlavní systémy, které živočišné buňky užívají k příjmu a překladačným signálů.

Obecné principy buněčné komunikace

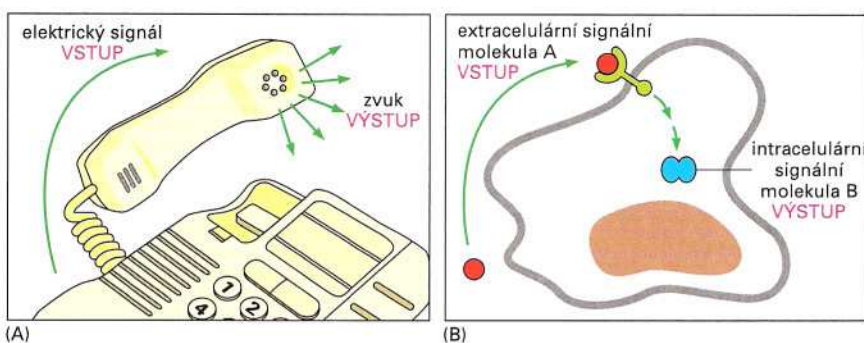
K předání zprávy od jedné osoby ke druhé je třeba informaci nejprve napsat na papír, potom nahlas přečíst a nechat přenést jako elektrické impulsy telefonním drátem. Nakonec je zachycena jako nervové impulsy v mozku příjemce. V jednotlivých krocích této komunikační dráhy se k prezentaci stejné informace používají různé formy signálů; kritickými místy v přenosu informace jsou body, kde se jedna forma převádí v druhou. Tato přeměna se nazývá **transdukce signálu** (obr. 15-2).

Signály, které si předávají buňky, jsou mnohem prostší než zprávy ze světa lidí: *signalizující buňka* obvykle produkuje specifický typ molekul, které jsou předávány *cílové buňce* prostřednictvím *receptorového proteinu*, který rozpoznává signální molekulu a specificky na ni odpovídá. Receptorový protein zajišťuje první krok v řadě transdukčních procesů na konci dráhy signálu, v cílové buňce, kde je přicházející extracelulární signál převáděn na intracelulární signály, jež řídí chování buňky. Většina této kapitoly se bude zabývat přijímáním a transdukci signálu. Když buněční biologové mluví o **buněčné signalizaci**, mají na mysli zmíněné dva aspekty. Nejprve se však krátce podíváme na různé typy signálů, které si buňky vzájemně posílají.

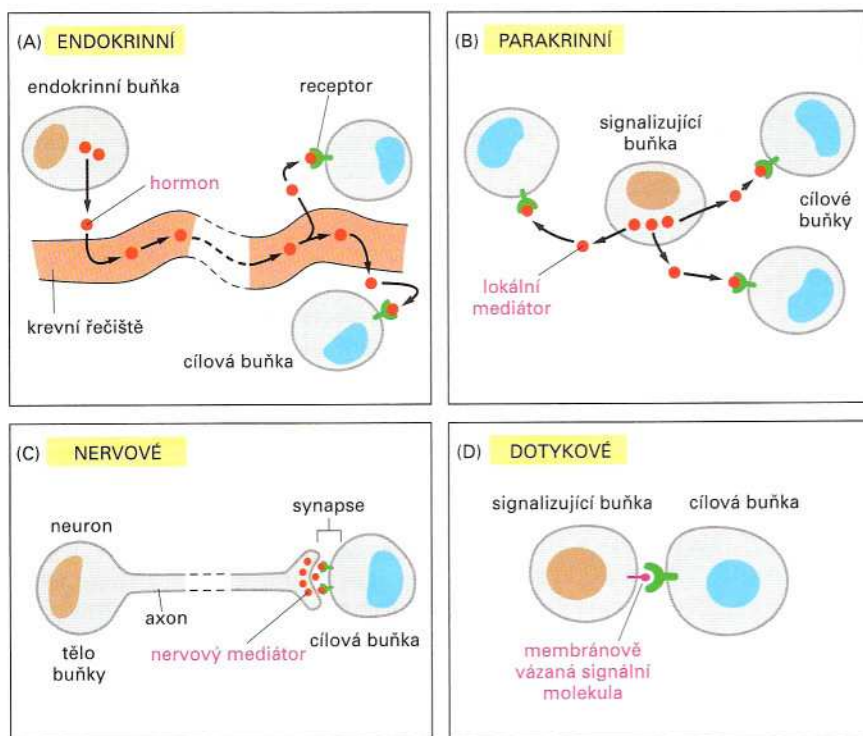
Signály mohou působit na dlouhou nebo krátkou vzdálenost

Buňky v mnohobuněčném organismu užívají k vysílání signálů k jiným buňkám stovky druhů extracelulárních molekul: proteiny, peptidy, aminokyseliny, nukleotidy, steroidy, mastné kyseliny a jejich deriváty, a dokonce rozpuštěné plyny. Existuje však jen několik základních druhů komunikace (obr. 15-3).

Nejrozšířenější cestou je vyslat signál pro celé tělo tak, že se uvolní do krevního oběhu živočicha nebo do mízy rostliny. Signální molekuly



Obrázek 15-2 Převod signálu z jedné formy do druhé. Na obrázku (A) telefonní přijímač převádí elektrický signál na zvukový. Na obrázku (B) buňka převádí extracelulární signál (signální molekula A) na intracelulární signál (signální molekula B).



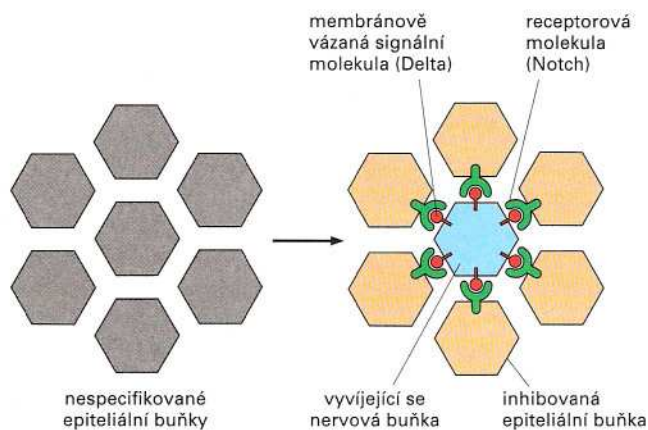
Obrázek 15-3 Formy signálu. (A) Hormony, které se tvoří v endokrinních žlázách, jsou vylučovány do krevního oběhu a mohou být přenášeny do nejrůznějších částí těla. (B) Parakrinní signály jsou buňkami uvolňovány do extracelulárního média v sousedství těchto buněk a působí lokálně. (C) Nervové signály jsou přenášeny podél axonu cílové buňky. (D) Signalizace závislá na kontaktu vyžaduje, aby se membrány dvou sousedních buněk dotýkaly. Mnoho signálních molekul stejného typu je využíváno v endokrinní, parakrinní a nervové signalizaci. Základní rozdíl tkví v rychlosti a selektivitě, s jakou jsou signály předávány ke svým cílům.

užívané tímto způsobem se jmenují **hormony** a u živočichů říkáme buňkám, které je produkují, *endokrinní buňky* (obr. 15-3A).

Méně obecným je děj známý jako *parakrinní* signalizace. Při něm signální molekuly difundují lokálně extracelulárním médiem, přičemž zůstávají v sousedství buněk, které je vylučují: fungují jako **lokální mediátory** (obr. 15-3B). Řada signálních molekul, které regulují zánět v místě infekce nebo buněčnou proliferaci při hojení ran, funguje tímto způsobem.

Třetím způsobem komunikace je **neuronová** signalizace. Podobně jako u hormonální signalizace jsou i zde zprávy často předávány na velké vzdálenosti; v neuronální signalizaci jsou však zprávy předávány velmi rychle po soukromých linkách pro jednotlivé buňky (obr. 15-3C). Jak se probírá v Kapitole 12, končí neuronový axon na specializovaných spojích (synapsích) na cílových buňkách daleko od těla neuronové buňky. Při aktivaci signálem z okolí nebo od jiných nervových buněk neuron vysílá svým axonem elektrické impulsy rychlostí až 100 metrů za sekundu. Jakmile dospějí ke konci axonu, jsou elektrické signály převedeny na extracelulární chemickou formu: každý elektrický signál stimuluje zakončení k vyloučení dávky chemického signálu zvaného **nervový mediátor**. Nervové mediátory difundují za dobu kratší než jedna milisekunda úzkou štěrbinou (<100 nm) mezi membránou axonového zakončení a membránou cílové buňky.

Čtvrtý způsob komunikace mezi buňkami – nejdokonalejší a působící na nejkratší vzdálenost – nevyžaduje uvolnění vylučované molekuly. Místo toho buňky ustavují přímý kontakt prostřednictvím signálních molekul ve svých plasmatických membránách. Zpráva se předává navázáním signální molekuly ukotvené v plasmatické membráně signalizující buňky k receptoru zanořenému v plasmatické membráně cílové buňky (obr. 15-3D). Zatímco neuronový signál připomíná telefonní hovor, *signalizace závislá na kontaktu* je jako důvěrný rozhovor tváří v tvář.



Obrázek 15-4 Signalizace závislá na kontaktu řídí produkci nervových buněk.

Nervová soustava v embryu pochází z vrstvy epiteliálních buněk. Izolované buňky v této vrstvě se začnou specializovat jako neurony, zatímco jejich sousedé zůstávají neneuronálními buňkami a udržují epiteliální strukturu vrstvy. Každý budoucí neuron dodává do buněk, s nimiž je v kontaktu, inhibiční signál, čímž jim zabrání specializovat se stejně a vypět také v neurony. Jak signální molekula (zvaná delta) tak molekula receptoru (zvaná notch čili zářez) jsou transmembránové proteiny. Stejný mechanismus, z větší části zprostředkovaný stejnými molekulami, řídí podrobný plán diferencovaných typů buněk v různých dalších tkáních u obratlovců i bezobratlých. V mutantech, u kterých tento mechanismus selhává, se některé buněčné typy (jako např. neurony) vytvářejí ve velkém přebytku na vrub jiných buněk.

Signalizace závislá na kontaktu má důležitou roli například v embryonálním vývoji, kde se původně velmi podobné buňky mají postupně různě specializovat. Tak se ve vrstvě buněk, která dá vznik nervovému systému, část buněk vydělí, aby se diferencovaly jako neurony, zatímco jejich sousedé se v nervové buňky nemění. Signály, které řídí tento děj, se přenášejí přímým kontaktem mezi buňkami: každý budoucí neuron brání přeměně sousedních buněk v neurony (obr. 15-4).

Tabulka 15-1 ukazuje některé příklady hormonů, lokálních mediátorů, nervových mediátorů a kontaktně signálních molekul. Účinek některých z nich probereme podrobněji později v této kapitole.

Každá buňka odpovídá na omezený soubor signálů

Typická buňka v mnohobuněčném organismu je ve svém prostředí vystavena stovkám různých signálních molekul. Tyto molekuly se mohou vyskytovat volně v extracelulární kapalině, nebo mohou být připoutány k extracelulární matrix či navázány na povrchu sousedních buněk. Buňka musí na tuto směs signálů odpovídat selektivně: některým nevěnovat pozornost, jinými se naopak řídit, podle své specifické funkce.

To, zda buňka reaguje na signální molekulu, závisí především na tom, zda vlastní receptor pro tento signál. Bez receptoru může být buňka k signálu hluchá a nemusí vůbec odpovídat. Tím, že produkuje jen omezený soubor receptorů, buňka omezuje množství signálů, které jí mohou ovlivnit. Tento omezený rozsah signálů se však dá stále použít k řízení chování buněk velmi složitými způsoby. Složitost zde může být dvojitá:

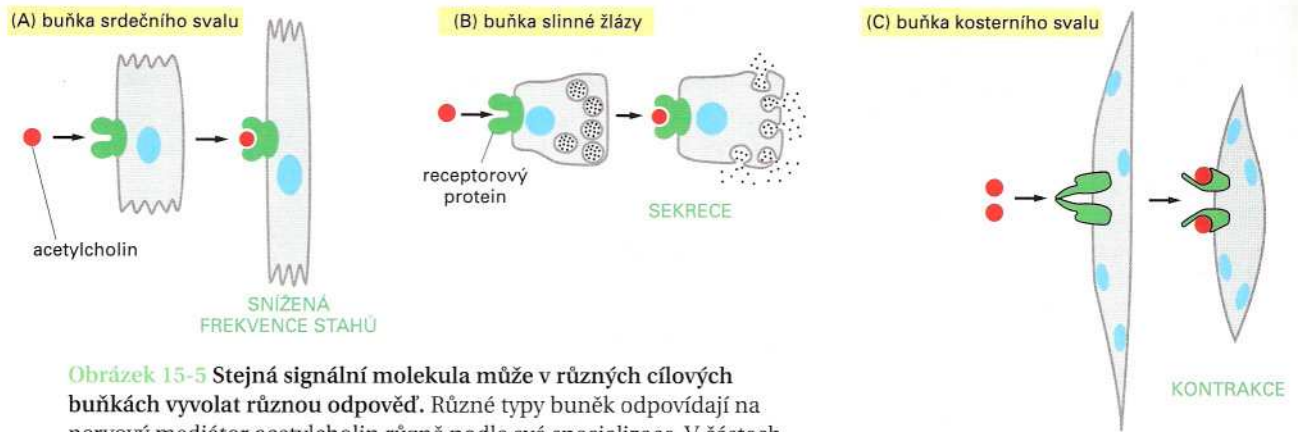
Zaprvé, jeden signál, který se váže k jednomu typu receptorového proteinu, může v cílové buňce způsobit obrovské množství různých účinků, díky kterým se mění např. podoba, pohyb, metabolismus a genová exprese. Jak uvidíme, je signál z receptoru na povrchu buňky obecně veden dovnitř buňky sadou různých vnitrobuněčných složek, které mají značný dosah působnosti. Tento vnitrobuněčný štafetový systém a cíle uvnitř buňky, které zasahuje, se liší od jednoho typu specializované buňky ke druhému, takže různé buňky odpovídají na stejný signál různým způsobem. Je-li například srdeční sval vystaven nervovému mediátoru acetylcholinu, sníží frekvenci svých stahů; je-li však stejnému signálu vystavena slinná žláza, vylučuje složky slin (obr. 15-5).

Otázka 15-1 Aby odpověď zůstala lokální, nesmí se parakrinní signální molekuly dostat příliš daleko od svých míst původu. Navrhněte různé cesty, kterými by toho šlo dosáhnout. Vysvětlete svou odpověď.

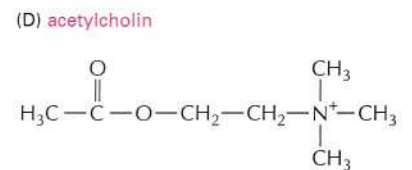
Tabulka 15-1 Některé příklady signálních molekul

Signální molekula	Původ	Chemická podstata	Některé účinky
Hormony			
<i>Adrenalin</i>	nadledvina	derivát tyrosinu	zvyšuje krevní tlak, zrychluje tep srdce a metabolismus.
<i>Kortisol</i>	nadledvina	steroid (derivát cholesterolu)	ovlivňuje metabolismus proteinů, sacharidů a lipidů v mnoha tkáních
<i>Estradiol</i>	vaječník	steroid (derivát cholesterolu)	indukuje a udržuje sekundární samičí pohlavní znaky
<i>Glukagon</i>	α -buňky slinivky břišní	peptid	stimuluje syntézu glukosy, odbourání glykogenu a odbourání lipidů například v jaterních a tukových buňkách
<i>Insulin</i>	β -buňky slinivky břišní	protein	stimuluje příjem glukosy, syntézu proteinů a syntézu lipidů například v jaterních buňkách
<i>Testosteron</i>	varlata	steroid (derivát cholesterolu)	indukuje a udržuje sekundární samčí pohlavní znaky
<i>Thyroidní hormon (thyroxin)</i>	štítná žláza	derivát tyrosinu	stimuluje metabolismus řady buněčných typů
Lokální mediátory			
<i>Epidermální růstový faktor (EGF)</i>	různé buňky	protein	stimuluje epidermální buňky a řadu jiných buněk k proliferaci.
<i>Růstový faktor krevních destiček (PDGF)</i>	různé buňky včetně krevních destiček	protein	stimuluje mnoho buněčných typů k proliferaci
<i>Nervový růstový faktor (NGF)</i>	různé inervované tkáně	protein	zajišťuje přežití jistých tříd neuronů; působí růst jejich axonů
<i>Histamin</i>	žírné buňky	derivát histidinu	působí prodloužení buněk a zvyšuje jejich propustnost, pomáhá vytvářet záněty
<i>Oxid dusnatý (NO)</i>	nervové buňky; endoteliální buňky, které vystylají cévy	rozpuštěný plyn	působí uvolnění hladkého svalstva, reguluje aktivitu nervové buňky
Nervové mediátory			
<i>Acetylcholin</i>	nervová zakončení	derivát cholinu	excitační nervový mediátor v mnoha nervosvalových synapsích a v centrální nervové soustavě
<i>Kyselina γ-aminomáselná (GABA)</i>	nervová zakončení	derivát kyseliny glutamové	inhibiční nervový mediátor v centrální nervové soustavě
Signální molekuly, které závisí na kontaktu			
<i>Delta</i>	zárodečné neurony, různé další buňky embrya	transmembránový protein	zabraňuje sousedním buňkám, aby se specializovaly stejným směrem, jako signalizující huňka

Druhá část složitosti tkví v tom, že typická buňka disponuje celou sbírkou nejrůznějších receptorů – sice spíše několika tucty než několika tisíci, ale i to stačí k zajištění její citlivosti vůči mnoha extracelulárním signálům. Pokud tyto signály působí současně, mohou vyvolat odpovědi, které představují více než pouhý součet účinků, jež by vyvolal každý jednotlivý signál. Vnitrobuněčný štafetový systém pro různé signály je důmyslně propojen, takže přítomnost jednoho signálu ovlivňuje odpověď buňky na jiný signál. Tak může jedna kombinace signálů prostě umožnit buňce přežít, zatímco jiná kombinace ji může přimět ke specifické diferenciaci; ještě další kombinace signálů může přivést buňku k dělení, a buňka může být naprogramována i tak, že bez přítomnosti některých signálů zemře (obr. 15-6). Takto může být poměrně malý počet signálů v různých kombinacích využíván k jemnému a složitému ovládní chování buňky.



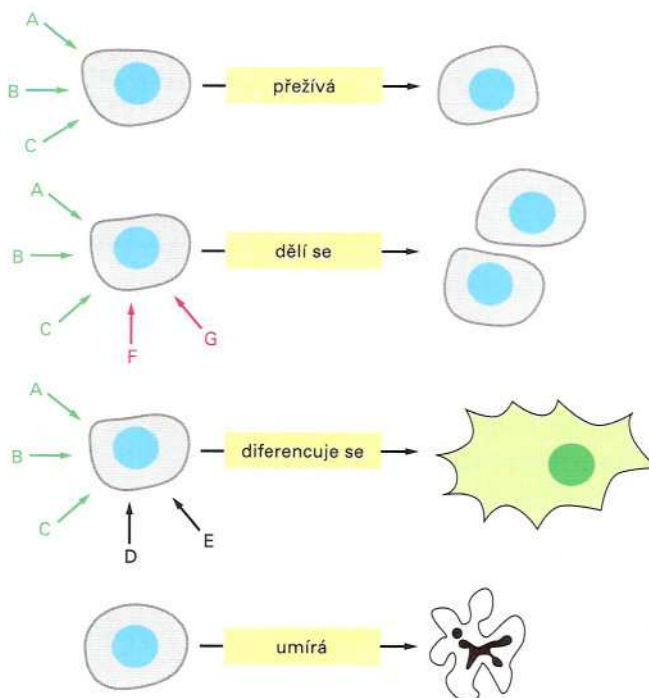
Obrázek 15-5 Stejná signální molekula může v různých cílových buňkách vyvolat různou odpověď. Různé typy buněk odpovídají na nervový mediátor acetylcholin různě podle své specializace. V částech (A) a (B) se signální molekula váže na podobné receptorové proteiny, ale ty v buňkách specializovaných na různé funkce vyvolávají různé odpovědi. V části (C) buňka produkuje různé typy receptorových proteinů pro tentýž signál. Jak uvidíme, různé typy receptorů generují značně rozdílné intracelulární signály, a tak umožňují různým typům svalových buněk reagovat rozdílně na acetylcholin. (D) Chemická struktura acetylcholinu.



Receptory předávají signály po vnitrobuněčných signálních drahách

Před tím, než se podrobně podíváme na to, jak určitá signální molekula řídí chování buňky, bude dobré si uvést některá obecná pravidla.

Příjem signálu začíná v místě, kde se signál pocházející z okolí buňky setká s cílovou molekulou, která patří samotné buňce. Ve všech případech je touto cílovou molekulou **receptorový protein**, a ten je obvykle aktivován jen jedním typem signálu. Receptorový protein zajišťuje první krok přenosu signálu: zachytí vnější signál a v odpovědi na něj generuje nový signál uvnitř buňky (viz obr. 15-2B). To je zpravidla jen



Obrázek 15-6 Živočišná buňka závisí na vícečetných vnějších signálech. Každý typ buňky vystavuje na povrch sadu receptorových proteinů, která mu umožňuje reagovat na odpovídající soubor signálních molekul, které produkují jiné buňky. Tyto signální molekuly fungují v dokonalé souhře a společně regulují chování buňky. Jak je vidět na tomto obrázku, mnoho buněk potřebuje k přežití násobné signály (*zelené šipky*), další signály k dělení (*červené šipky*) a ještě další signály k diferenciaci (*černé šipky*). Pokud je buňka zbavena příslušných signálů, spáchá ve většině případů sebevraždu, známou jako programovaná buněčná smrt neboli apoptóza (probírá se v Kapitole 18).

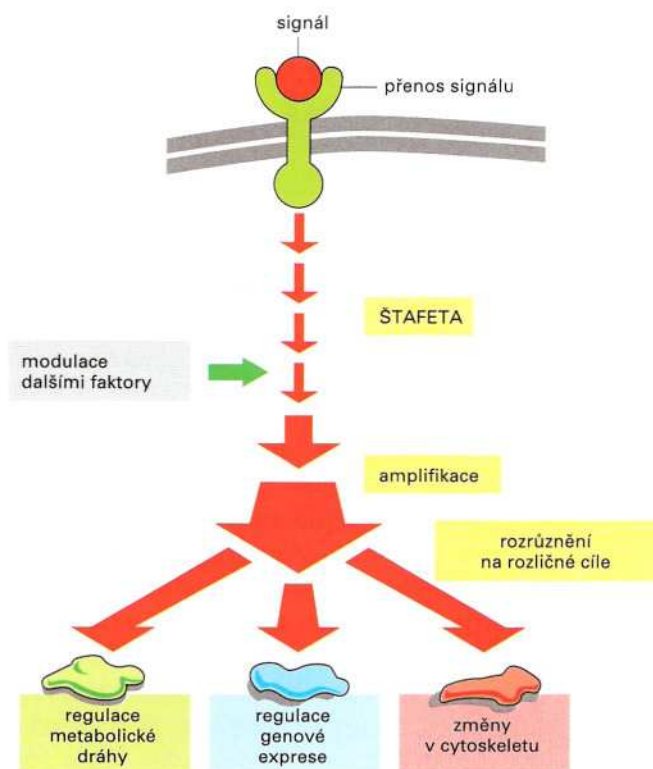
prvním krokem v řetězci přenosů signálu uvnitř buňky. V těchto přeno-
sech je zpráva předávána od jednoho souboru *intracelulárních signál-
ních molekul* ke druhému, přičemž každý soubor naopak vyvolá tvor-
bu dalšího, až je nakonec například aktivován metabolický enzym a je
zahájena exprese genu nebo je uveden do akce cytoskelet. Konečný
výsledek představuje *odpověď buňky*.

Štafetové řetězce neboli **signální kaskády** vnitrobuněčných signál-
ních molekul mají několik základních funkcí (obr. 15-7):

1. Fyzicky *přenášejí* signál z bodu, kde byl přijat, do buněčného aparátu, který vytvoří odpověď; ta se obvykle nachází ve stejné části buňky.
2. *Transformují* signál do molekulární podoby, která může tuto odpověď stimulovat.
3. Ve většině případů signální kaskády také přijatý signál *zesilují*, takže několik extracelulárních signálních molekul stačí k vyvo-
lání rozsáhlé odpovědi.
4. Signální kaskády mohou signál *rozdělit* tak, aby současně ovlivnil několik dějů: v libovolném bodu své dráhy se signál může *rozdě-
lit* a být předán řadě různých cílů uvnitř buňky. To vede k rozvět-
vení toku informace a ke komplexní odpovědi (viz obr. 15-7).
5. Nakonec je každý krok této signální dráhy otevřen působení dalších faktorů, takže přenos signálu může být *modulován* podle podmínek, které uvnitř a vně buňky převládají.

Nejprve se zaměříme na některé jednodušší a přímější signální dráhy a potom si všimneme delších kaskád, které přenášejí signál od receptorů v plasmatické membráně živočišných buněk.

Otázka 15-2 Když je jeden foton světla absorbován rhodopsinovým fotorecepto-
rem, aktivuje asi 200 jednotlivých molekul intracelulárního signálního proteinu, zva-
ného transducin. Každá jeho molekula se váže na enzym fosfodiesterázu, jež hydro-
lyzuje 4000 molekul cyklického GMP za sekundu. Cyklický GMP je malá molekula, podobná cyklickému AMP, která se v cyto-
solu tyčinkových fotoreceptorových buněk váže na sodné kanály v plasmatické mem-
bráně a udržuje je v otevřené konformaci, jak probereme později (obr. 15-26). Jaký je stupeň amplifikace, pokud každá molekula transducinu zůstane aktivní po 100 milise-
kund?



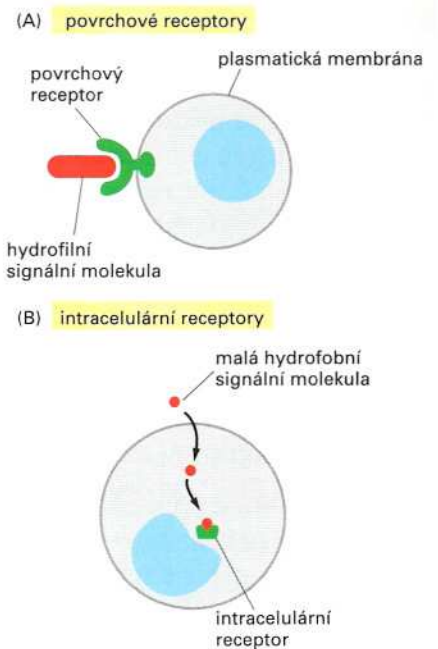
Obrázek 15-7 Vnitrobuněčná signalizační kaskáda. Receptorový protein umístěný na povrchu buňky převádí extracelulární signál na signál intracelulární, přičemž zahajuje signalizační kaskádu, ve které se signál štafetou různých molekul postupně dostane až do nitra buňky; tato kaskáda signál cestou zesílí a rozdělí do různých směrů. Řada kroků takové kaskády může být ovlivněna (modulována) jinými pochody v buňce.

Některé signální molekuly mohou prostupovat plasmatickou membránou

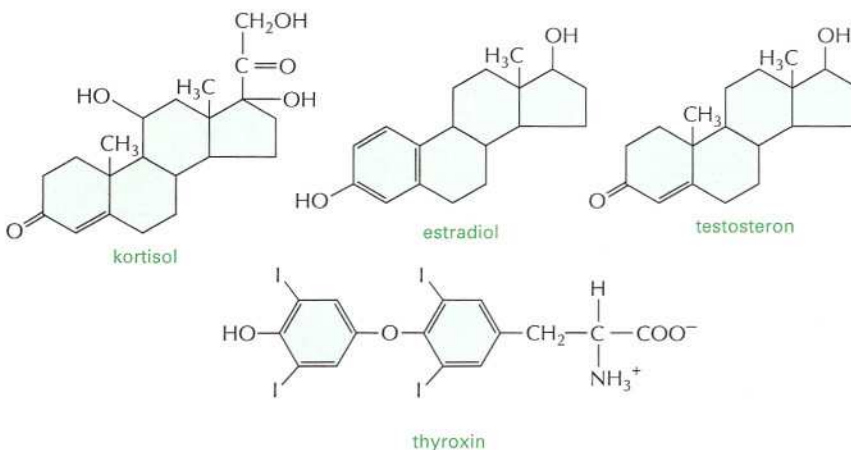
Signální molekuly z okolí buňky můžeme rozdělit do dvou tříd, které odpovídají dvěma zásadně odlišným druhům receptorů. První a největší třída signálů sestává z molekul, které jsou příliš dlouhé nebo příliš hydrofilní na to, aby procházely plasmatickou membránou cílové buňky. Receptorové proteiny pro tyto signální molekuly proto musí ležet v plasmatické membráně cílové buňky a předávat zprávu přes membránu (obr. 15-8A). Druhou a menší třídou signálů jsou molekuly, které jsou dostatečně malé a hydrofobní na to, aby mohly difundovat plasmatickou membránou. Pro tyto signální molekuly leží receptory uvnitř cílové buňky a jsou to obecně buď regulační proteiny genů (probírané v Kapitole 8) nebo enzymy. Tyto receptory se aktivují, když se na ně signální molekula naváže (obr. 15-8B).

Nejnámějšími hydrofobními signálními molekulami jsou **steroidní hormony** (včetně *kortisolu*, *estradiolu* a *testosteronu*) a **thyroidní hormony** jako *thyroxin* (obr. 15-9, viz také tabulku 15-1, str. 485). Všechny procházejí plasmatickou membránou cílové buňky a vážou se na receptorové proteiny, které se nacházejí buď v cytosolu nebo v jádře. Receptory těchto hormonů jsou genové regulační proteiny, které jsou v nestimulované buňce přítomny v neaktivním stavu. Když se k receptoru naváže jeho hormon, receptorový protein změní svou konformaci, a to mu umožní navázat se ke své odpovídající regulační sekvenci v DNA, což může následně vést k zahájení či inhibici transkripce vybraného souboru genů (obr. 15-10). Pro každý typ hormonu existují různé typy receptorových proteinů; každý receptor působí na jiný soubor regulačních míst, a tak řídí různé soubory genů.

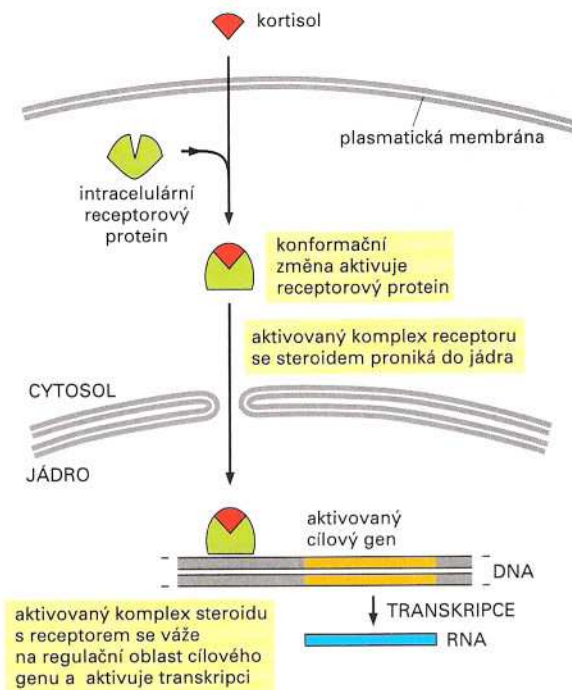
Esenciální roli receptorů steroidních hormonů lze pozorovat podle dramatických následků nedostatku receptoru pro testosteron u lidí. Mužský pohlavní hormon testosteron působí v plodu a během puberty jako signál pro vývoj sekundárních mužských pohlavních znaků. Někteří velmi vzácní jedinci jsou geneticky mužského pohlaví (to znamená, že mají jeden chromosom X a jeden Y), avšak v důsledku mutace v odpovídajícím genu postrádají receptor pro testosteron: produkují sice hormon, ale jejich buňky na něj nemohou reagovat. Výsledkem je, že se tyto jedinci se všemi vnějšími znaky vyvinou jako ženy. To ukazuje klíčovou roli receptoru hormonu v působení testosteronu a také to



Obrázek 15-8 Extracelulární signální molekuly se vážou buď k receptorům na povrchu buňky nebo k intracelulárním receptorům. (A) Většina signálních molekul je hydrofilní, a proto nemohou přímo procházet plasmatickou membránou. Namísto toho se vážou k receptorům na buněčném povrchu, které potom generují jeden nebo více signálů uvnitř cílové buňky. (B) Některé malé hydrofobní signální molekuly naopak difundují přes plasmatickou membránu a vážou se na receptory uvnitř cílové buňky – buď v cytosolu (jak je vidět na obrázku) nebo jádru.



Obrázek 15-9 Několik malých hydrofobních hormonů, jejichž receptory jsou intracelulární regulační proteiny genů. Místa původu a funkce těchto hormonů jsou uvedeny v tabulce 15-1 (str. 485). Receptory pro všechny z nich jsou evolučně příbuzné a patří do nadrodiny receptorů steroidních hormonů regulačních proteinů genů.



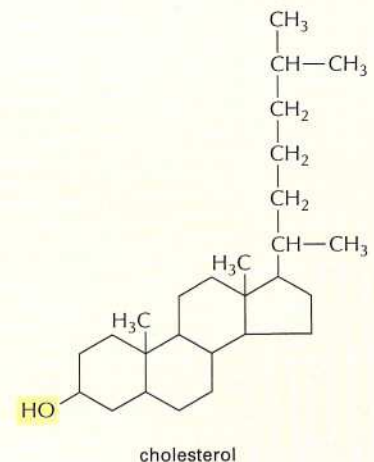
Obrázek 15-10 Steroidní hormon kortisol aktivuje regulační protein genu. Kortisol přímo difunduje přes plasmatickou membránu a váže se na svůj receptorový protein, který se nachází v cytosolu. Komplex receptoru a steroidního hormonu je potom přenášen do jádra jadernými póry. Navázání steroidu aktivuje receptorový protein, který je potom schopen se vázat na specifickou regulační sekvenci DNA a aktivovat transkripci genu, jak se probírá v Kapitole 8. Receptory pro kortisol a některé další steroidní hormony se nacházejí v cytosolu; receptory pro jiné signální molekuly této rodiny jsou už umístěny v jádře.

dokládá, že tento receptor není zapotřebí jen v jednom typu buněk k zajištění jediného účinku, nýbrž v mnoha buněčných typech, kde vyvolává celou řadu vlastností, které odlišují muže od ženy.

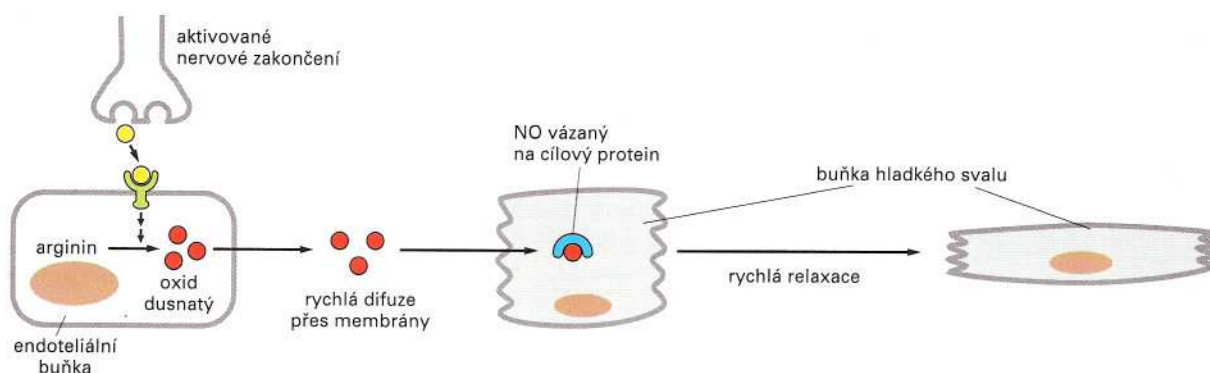
Oxid dusnatý může vstupovat do buněk a aktivovat enzymy přímo

Odpovědi buněk, které zahrnují změny genové exprese, mohou trvat několik minut nebo i několik hodin, neboť geny musí být nejprve transkribovány (přepsány) a informační RNA musí být potom přeložena do podoby proteinu. Musí-li buňka odpovědět na signál během několika sekund či minut, vede mnohem rychleji k požadovanému účinku přímá aktivace enzymu. Takto působí některé signální molekuly. Pozoruhodným příkladem molekuly, která prochází plasmatickou membránou a aktivuje enzymy uvnitř buňky, je **oxid dusnatý (NO)**. Tento rozpuštěný plyn pochází z aminokyseliny argininu a působí jako lokální mediátor v mnoha tkáních. Endoteliální buňky, které vystylají každou cévu, uvolňují NO v odpověď na stimulaci ze strany nervových zakončení. Tento NO působí uvolnění buněk hladkého svalstva cévních stěn, takže se céva roztáhne a krev skrze ní může volněji proudit (obr. 15-11). Účinek NO na krevní cévy poskytuje vysvětlení účinku nitroglycerinu, který byl téměř před sto lety patentován jako lék pro pacienty

Otázka 15-3 Zamyslete se nad strukturou cholesterolu (obrázek Q15-3), malé hydrofobní molekuly se sterolovou kostrou podobnou třem hormonům z obrázku 15-9, ale s menším počtem polárních skupin jako -OH, =O a -COO⁻. Pokud by se cholesterol normálně nenacházel v buněčných membránách, dal by se účinně využít jako hormon, pokud by se k němu vyvinul patřičný receptor?



Obrázek Q15-3



Obrázek 15-11 Úloha oxidu dusnatého (NO) při uvolňování hladkého svalu v cévní stěně. Acetylcholin uvolňovaný v nervových zakončeních v cévní stěně způsobí, že endoteliální buňky, které vystylají cévu, vytvoří a uvolní NO. Tento NO difunduje ven z endoteliálních buněk do sousedních buněk hladkého svalu, a tak způsobí uvolnění svalu. Všimněte si, že při vdechování je NO velmi jedovatý a neměli bychom ho zaměňovat s oxidem dusným (N_2O), známým také jako rajský plyn.

s anginou pectoris (bolestí danou nepřiměřeným průtokem krve srdečním svalem). Nitroglycerin se v těle mění na NO, který uvolňuje krevní cévy, a tím snižuje pracovní zatížení srdce a jeho spotřebu kyslíku. NO je také využíván mnoha nervovými buňkami k signalizaci sousedním buňkám: například NO uvolňovaný nervovými zakončeními v penisu způsobuje místní roztažení krevních cév, které je zodpovědné za erekci.

Rozpuštěný NO snadno difunduje z buněk, kde vznikl, do okolních buněk. Působí pouze lokálně, neboť v prostoru mimo buňku existuje jen velmi krátkou dobu, než se reakcí s vodou a kyslíkem změní v dusičnan a dusitan s poločasem 5–10 s. Jakmile se NO ocitá v cílové buňce, stává se jeho cílem většinou enzym *guanylátcykláza*, který katalyzuje tvorbu *cyklického GMP* z nukleotidu GTP. cGMP je vnitrobuněčná signální molekula, která aktivuje krátkou signální dráhu, a tak zajistí konečnou odpověď buňky. Cyklický GMP je svou strukturou a svým mechanismem účinku velmi podobný *cyklickému AMP*, který je mnohem běžnější intracelulární signální molekulou, jejíž účinky probereme později.

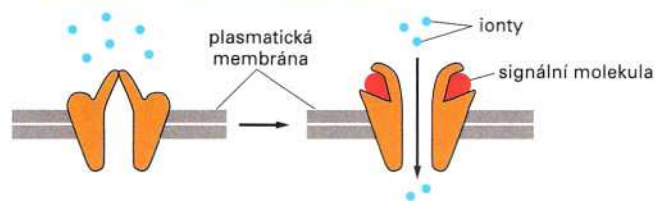
Existují tři hlavní třídy receptorů na povrchu buněk

Na rozdíl od steroidních a thyroidních hormonů představuje velká většina signálních molekul hydrofilní proteiny, peptidy a další ve vodě rozpustné molekuly, které nejsou schopny procházet plasmatickou membránou cílové buňky. Jejich receptorové proteiny proto musí být umístěny v plasmatické membráně tak, že zachycují signál z vnějšku a předávají zprávu v nové podobě přes membránu do buňky.

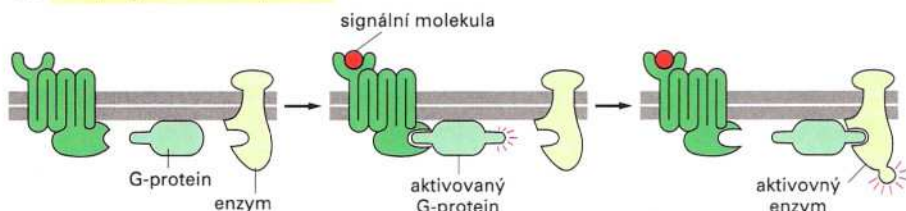
Většina povrchových receptorových proteinů patří do jedné ze tří velkých rodin: *receptory spojené s iontovými kanály*, *receptory spojené s G-proteiny* a *receptory spojené s enzymy*. Tyto tři rodiny se liší podstatou signálu, který vytvářejí uvnitř buňky, když se na ně naváže extracelulární signální molekula. U receptorů spojených s iontovými kanály je to tok iontů, vedoucí k elektrickým jevům. U receptorů spojených s G-proteiny je to aktivovaná forma membránového proteinu (*G-proteinová podjednotka*), která se uvolní a difunduje v rovině plasmatické membrány, kde vyvolá kaskádu dalších pochodů. V případě receptorů spojených s enzymy se na cytoplasmatickém konci receptoru změní jeho enzymová aktivita a díky ní se tvoří řada signálů, včetně molekul, které jsou uvolňovány do cytosolu (obr. 15-12).

Počet různých typů receptorů v těchto třídách je dokonce vyšší než počet extracelulárních signálů, které na ně působí; na mnoho extracelulárních signálních molekul totiž připadá více než jeden typ receptoru. Například nervový mediátor acetylcholin působí na buňky kosterního svalstva přes receptory spojené s iontovými kanály, zatímco

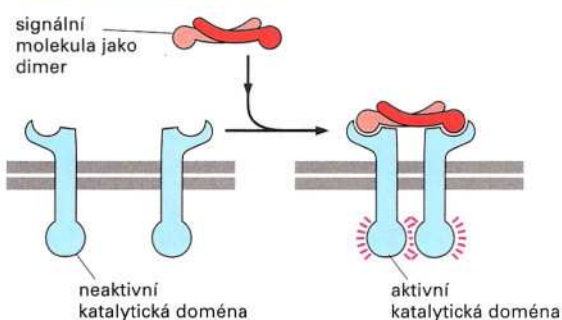
(A) receptory spojené s iontovým kanálem



(B) receptory vázané na G-protein



(C) receptory vázané na enzym



Obrázek 15-12 Tři třídy povrchových buněčných receptorů. (A) Receptor spojený s iontovým kanálem se otevírá (nebo zavírá) v odpověď na navázání svého ligandu. (B) Když receptor spojený s G-proteinem naváže svůj ligand, je signál nejprve předán GTP-vázajícímu proteinu (G-proteinu), který se spojí s receptorem. Potom tento protein receptor opustí a aktivuje cílový enzym (nebo iontový kanál) v plasmatické membráně. Pro jednoduchost je zde G-protein ukázán jako jediná molekula; jak uvidíme, jde ve skutečnosti o komplex tří podjednotek, které mohou disociovat. (C) Receptor spojený s enzymem váže svůj extracelulární ligand a přitom aktivuje enzym na druhém konci receptoru, na opačné straně membrány. Ve všech třech případech navázání signální molekuly způsobí v receptoru změnu, která se štafetově šíří dále spolu se zprávou, aniž by samotná signální molekula musela vstoupit do buňky.

v srdečním svalu působí přes receptor spojený s G-proteinem (viz obr. 15-5A a C). Tyto dva typy receptorů vytvářejí různé typy intracelulárních signálů, a tak umožňují dvěma typům svalových buněk reagovat na acetylcholin různými způsoby.

Obrovské množství různých buněčných povrchových receptorů, které tělo vyžaduje pro své vlastní signalizační účely, se může stát také cílem mnoha cizích látek, které ovlivňují naše fyziologické pochody a citění, od heroínu a nikotinu až po tisíce prostředky a pálivou papriku. Tyto látky buď napodobují přirozený ligand receptoru, aby zaujaly normální místo pro jeho vazbu, nebo se vážou na receptor v jiném místě, a tak blokují nebo nadměrně stimulují přirozenou aktivitu receptoru. Takto působí mnoho drog a jedů a velká část farmaceutického průmyslu se věnuje hledání látek s přesně definovanými účinky vyvolávanými vazbou ke specifickému receptoru na povrchu buněk.

Receptory spojené s iontovými kanály převádějí chemické signály na elektrické

Receptory spojené s iontovými kanály, známé také jako mediátorově ovládané iontové kanály, fungují tím nejjednodušším způsobem a byly probrány v Kapitole 12. Jsou to receptory, které slouží k rychlému přenosu signálu přes synapse v nervovém systému: převádějí chemický signál ve formě dávky nervového mediátoru, uvolněného do okolí cílové buňky, přímo na elektrický signál v podobě změny napětí přes plas-

Otázka 15-4 Signální mechanismy, které využívá receptor steroidního hormonu a receptor spojený s iontovým kanálem, jsou oba velmi jednoduché a mají málo složek. Mohou vést k zesílení původního signálu? Pokud ano, jak?

matickou membránu. Když se nervový mediátor naváže, změní tento typ receptoru svou konformaci, a tak otevře nebo zavře kanál pro průtok specifických iontů, například Na^+ , K^+ , Ca^{2+} či Cl^- , přes membránu (viz obr. 15-12A). Poháněny gradientem svého elektrochemického potenciálu se tyto ionty pohybují do buňky nebo ven z ní, a v průběhu milisekund působí změny membránového potenciálu. To může vyslat nervový impuls nebo ovlivnit schopnost jiných signálů tak učinit. Jak probereme později v této kapitole, má otevření kanálů pro Ca^{2+} zvláštní účinky, neboť změny koncentrace Ca^{2+} uvnitř buňky mohou značně ovlivnit aktivitu mnoha enzymů.

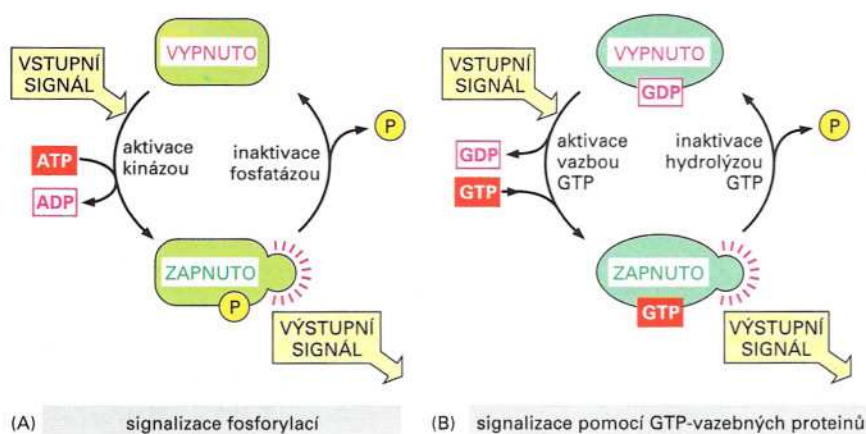
Signální kaskády uvnitř buňky fungují jako řada molekulových přepínačů

Zatímco receptory spojené s iontovými kanály jsou specialitou nervové soustavy a dalších elektricky vzrušitelných buněk, například svalových, receptory spojené s G-proteiny a receptory spojené s enzymy jsou využívány prakticky každým typem buněk v těle. Většina zbývajících částí této kapitoly bude věnována právě jim a jimi iniciovaným převodům signálů.

Signály zachycené receptory spojenými s G-proteiny nebo s enzymy jsou převáděny do důmyslných štafetových systémů, jež jsou tvořeny kaskádami signálních molekul uvnitř buňky. Kromě několika malých molekul (jako jsou například cyklický GMP, cyklický AMP a Ca^{2+}) jsou tyto intracelulární signalizační molekuly proteiny. Některé slouží jako chemické převodníky: na jeden typ chemického signálu odpovídají tím, že generují další. Jiné slouží jako mediátory či poslové, kteří obdrží signál v jedné části buňky a přemístí se do jiné části, kde vyvolají příslušný efekt.

Většina klíčových intracelulárních signálních proteinů se chová jako **molekulové přepínače**: přijetí signálu je převede z neaktivního stavu do aktivního, kde zůstanou, dokud je jiný proces nepřepne zpět. Důležitost procesu vypnutí často zůstává nedoceněna. Má-li se signální dráha po přenosu signálu obnovit a připravit na přenos dalšího signálu, musí se každý molekulový krok znovu nastavit do svého původního nestimulovaného stavu. Proto u každého kroku pro každý aktivní mechanismus musí existovat mechanismus inaktivace a oba mechanismy jsou pro funkci systému stejně důležité.

Proteiny, které mohou fungovat jako molekulové přepínače, většinou spadají do jedné ze dvou hlavních tříd. První a zdaleka největší



Obrázek 15-13 Intracelulární signální proteiny, které mohou fungovat jako molekulové přepínače. Signální protein uvnitř buňky je v obou případech aktivován navázáním fosforylové skupiny a inaktivován odstraněním fosforylu. V (A) se fosforyl připojuje k proteinu kovalentně proteinkinázou, která přenáší koncovou fosforylovou skupinu z ATP na signální protein. Fosforyl je odstraňován proteinfosfatázou. V (B) je signální protein přiveden do reakce, v níž vymění svůj navázaný GDP za GTP. Hydrolyza navázaného GTP na GDP protein deaktivuje.

třída sestává z proteinů, které se aktivují nebo inaktivují fosforylací, jak se probírá v Kapitole 5 (viz obr. 5-36). U těchto proteinů nastavuje přepínač do jedné polohy proteinkináza, která k proteinu-přepínači přidává fosforylovou skupinu, a do druhé polohy proteinfosfatáza, která štěpí fosfát vzniklý v předchozí reakci a odstraňuje fosforylovou skupinu z proteinu-přepínače (obr. 15-13A). Mnohé z přepínačových proteinů řízených fosforylací jsou samy proteinkinázami a jsou často uspořádány do *fosforylačních kaskád*: jedna proteinkináza aktivovaná fosforylací fosforyluje další proteinkinázu atd., a signál se neustále předává, zesiluje, rozděluje a moduluje

Druhou hlavní třídou přepínačových proteinů zúčastněných v signalizaci jsou proteiny vázající GTP. Ty přepínají mezi aktivním a neaktivním stavem podle toho, zda je k nim vázaný GTP nebo GDP (obr. 15-13B); mechanismus, který řídí zapínání a vypínání, bude popsán v následující sekci. Proteiny vázající GTP jsou důležité v několika signálních drahách. Jeden typ, totiž G-proteiny, hraje ústřední roli v signalizaci prostřednictvím receptorů spojených s G-proteiny, na které se nyní zaměříme.

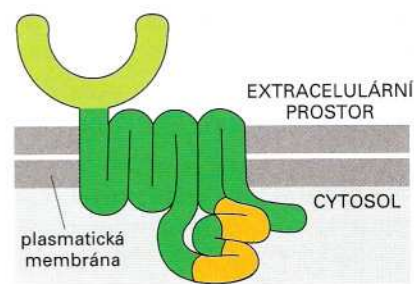
Receptory spojené s G-proteiny

Receptory spojené s G-proteiny tvoří největší rodinu buněčných povrchových receptorů se stovkami členů již identifikovaných v savčích buňkách. Zprostředkují odpovědi na nesmírně rozmanité extracelulární signální molekuly, včetně hormonů, lokálních mediátorů a nervových mediátorů. Tyto signální molekuly se liší jak svou strukturou tak svou funkcí: mohou to být proteiny, malé peptidy nebo deriváty aminokyselin nebo mastných kyselin, a pro každou z nich existuje jiný receptor nebo soubor receptorů.

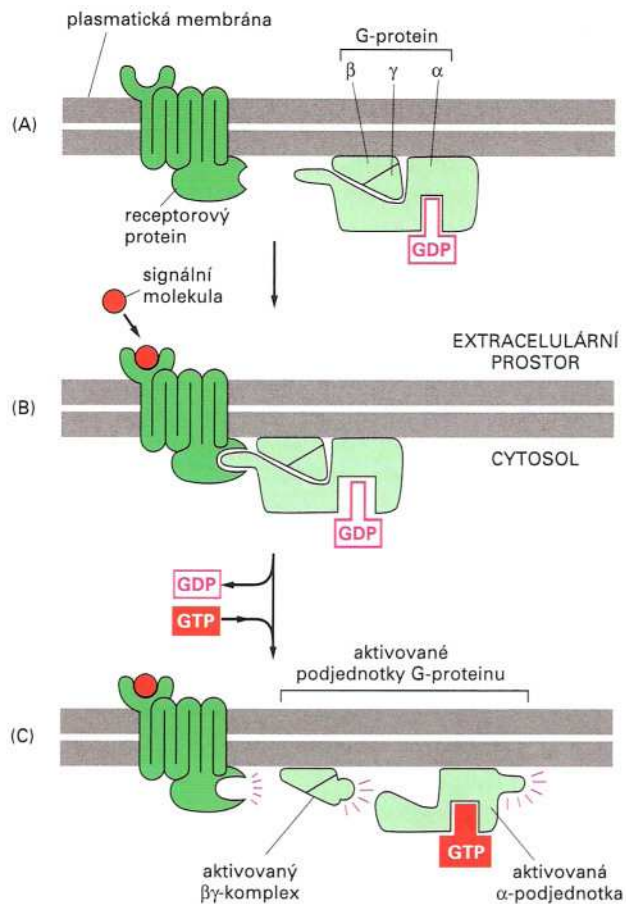
Nehledě na rozmanitost signálních molekul, které se na ně vážou, mají všechny dosud analyzované receptory spojené s G-proteiny podobnou strukturu – jediný polypeptidový řetězec, který sedmkrát prostupuje lipidovou dvojnou vrstvou tam a zpět (obr. 15-14). Tato nadrodina *sedmkrát procházejících transmembránových receptorových proteinů* zahrnuje rhodopsin (světlem aktivovaný fotoreceptorový protein v sítnici obratlovců), stejně jako čichové receptory v nosní sliznici obratlovců. Její evoluční původ je velmi starý, neboť receptory spojené s G-proteiny se vyskytují ve velmi vzdáleně příbuzných eukaryontních organismech, jakými jsou třeba kvasinky. V bakteriích existují dokonce strukturálně příbuzné membránové proteiny – například bakteriorhodopsin, který funguje jako světlem poháněná H⁺-pumpa (probírá se v Kapitole 11). V bakteriích však takové proteiny nepůsobí jako receptory spojené s G-proteiny. Bakterie nedisponují G-proteiny a jejich povrchové receptory, jimiž například vycítí potravu, jsou spřaženy s jinými systémy převodu signálu.

Stimulace receptorů spojených s G-proteiny aktivuje G-proteinové podjednotky

Když se signální molekula váže k sedminásobně transmembránovému receptoru, podstupuje receptorový protein konformační změnu, která změní intracelulární část receptoru a umožní mu interagovat



Obrázek 15-14 Schéma receptoru spojeného s G-proteinem. Cytoplasmatické části receptoru, které jsou hlavně zodpovědné za vazbu ke G-proteinu, jsou ukázány *oranžově*. Receptory, které vážou proteinové signální molekuly, mají vně buňky velkou doménu vázající ligandy, tvořenou částí polypeptidového řetězce, který je na obrázku *světle zeleně*. Receptory pro malé signální molekuly, jako např. pro adrenalin, však mají malé extracelulární domény; vazebné místo pro ligand je často tvořeno hluboko v membráně částmi transmembránových segmentů (na obrázku nejsou vidět).



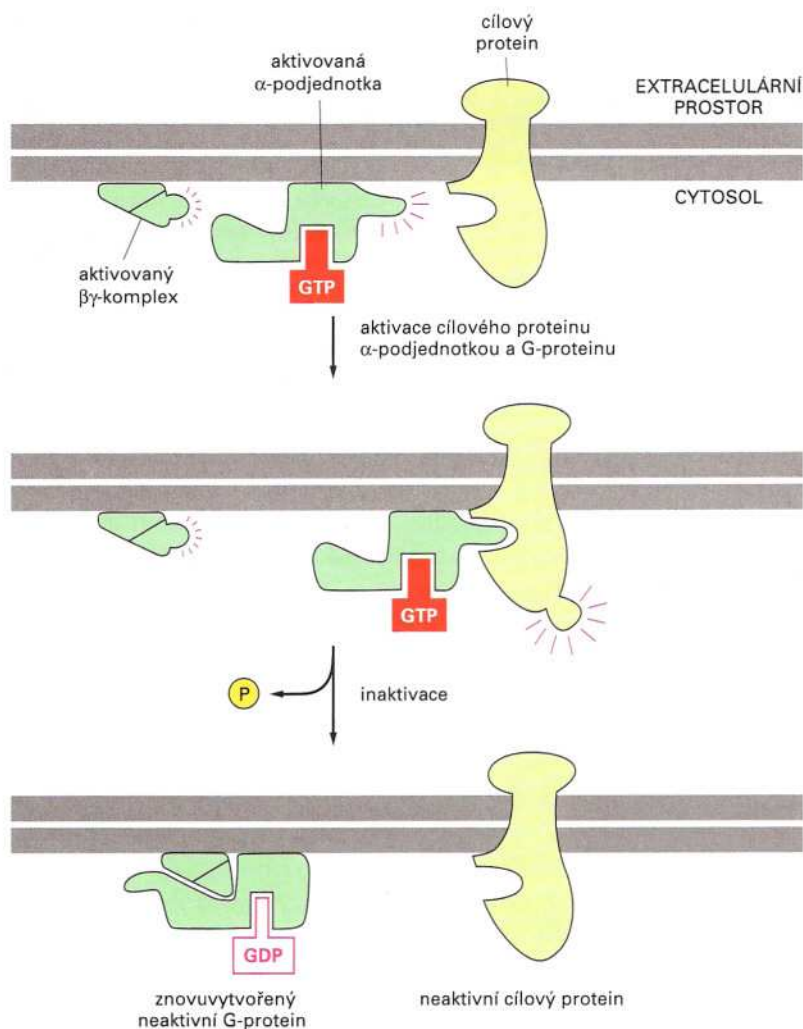
Obrázek 15-15 G-proteiny se při aktivaci rozpadají na dva signální proteiny.

(A) V nestimulovaném stavu jsou receptor i G-protein inaktivní a pravděpodobně se ani nedotýkají. (B) Aktivace receptoru extracelulární signální molekulou umožní G-proteinu spojit se s receptorem. (C) Navázání aktivovaného receptoru umožní α -podjednotce G-proteinu vyměnit svůj GDP za GTP. To způsobí rozpad G-proteinu na aktivovanou podjednotku α a na komplex $\beta\gamma$, které difundují podél cytoplasmatického povrchu plasmatické membrány, dokud nenajdou své cílové proteiny, jak je vidět na obr. 15-16. Receptor zůstává aktivní, dokud je k němu navázána externí signální molekula, a může takto katalyzovat aktivaci stovek či tisíců molekul G-proteinu.

s **G-proteinem** umístěným na cytosolové straně plasmatické membrány. Abychom mohli vysvětlit následky této události, musíme se nejprve zaměřit na to, jak jsou G-proteiny sestaveny a jak fungují.

Existuje několik variant G-proteinů. Každá z nich je typická pro určitý soubor receptorů a určitý soubor následujících cílových proteinů, jak bude vysvětleno později. Všechny tyto G-proteiny však mají podobnou obecnou strukturu a pracují podobným způsobem. Jsou složeny ze tří proteinových podjednotek: α , β a γ . V nestimulovaném stavu je na podjednotce α navázán GDP (obr. 15-15A) a G-protein je v klidu. Naváže-li se na receptor nějaký extracelulární ligand, váže se receptor na G-protein a aktivuje ho tím, že přiměje jeho podjednotku uvolnit svůj navázaný GDP a nahradit ho GTP. To způsobí rozdělení G-proteinu na „zapnutou“ podjednotku α s navázaným GTP a na samostatný komplex $\beta\gamma$. Tak vzniknou dvě samostatné molekuly, které mohou volně difundovat po membráně (obr. 15-15B a C). Obě aktivované části G-proteinu – α -podjednotka a komplex $\beta\gamma$ – mohou přímo interagovat s cíli v plasmatické membráně, které mohou předávat signál k dalším místům určení. Čím delší mají tyto cíle navázanou podjednotku α nebo $\beta\gamma$, tím silnější a delší bude předávaný signál.

Doba, po kterou zůstanou podjednotky α a $\beta\gamma$ disociované a schopné akce, je omezena chováním podjednotky α . Podjednotka α má vnitřní *GTPázovou aktivitu*, a po určité době hydrolyzuje navázaný GTP na GDP. Podjednotka α se potom znovu spojí s komplexem $\beta\gamma$ a signál je vypnut (obr. 15-16). To se obecně děje během několika sekund po aktivaci G-proteinu.



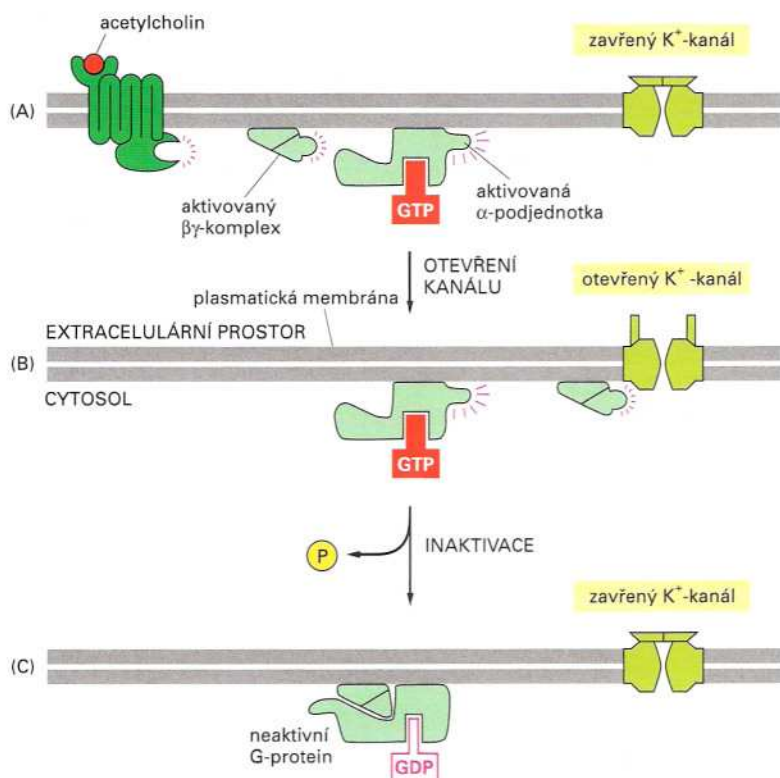
Obrázek 15-16 α -Podjednotka G-proteinu se sama deaktivuje hydrolyzou svého GTP. Když aktivovaná α -podjednotka najde a naváže svůj cílový protein, aktivuje ho (nebo v některých případech deaktivuje; na obrázku tato možnost není naznačena) na celou dobu, po kterou oba proteiny zůstanou spolu. Po několika sekundách je GTP vázaný na α -podjednotce GTPázovou aktivitou této podjednotky hydrolyzován na GDP. To inaktivuje α -podjednotku, která se oddělí od svého cílového proteinu a znovu se spojí s komplexem $\beta\gamma$ za opětovného vzniku neaktivního G-proteinu. G-Protein je nyní připraven spojit se s dalším receptorem, jako na obrázku 15-15B. Jak aktivovaná podjednotka α (jak je ukázáno) tak volný komplex $\beta\gamma$ mohou regulovat cílové proteiny.

Tento systém nám umožňuje znovu zdůraznit obecný princip buněčné signalizace: mechanismy, které vypínají signál, jsou právě tak důležité jako ty, které ho zapínají. Poskytují mnoho příležitostí k řízení a stejně mnoho nebezpečí nehody. Příkladem je onemocnění cholery. Cholera způsobuje bakterie, která se množí ve střevech, kde vytváří protein zvaný *choleroxin*. Ten vstupuje do buněk vystylajících střeva a modifikuje α -podjednotku G-proteinu tak, že už nemůže hydrolyzovat svůj navázaný GTP. Pozměněná podjednotka tak zůstává stále v aktivním stavu a stále předává signál svým cílovým proteinům. Ve střevních buňkách to vede k neustálému výtoku Na^+ a vody do střeva; výsledkem je katastrofální průjem a dehydratace, která často způsobí smrt, pokud se nepodniknou rychlé kroky k doplnění chybějící vody a iontů.

Některé G-proteiny regulují iontové kanály

Cílovými proteiny G-proteinových podjednotek jsou buď iontové kanály nebo enzymy navázané na membránu. Tyto různé cíle se spojují s různými typy G-proteinů (z nichž asi 20 bylo zatím objeveno v savčích buňkách); tyto různé G-proteiny jsou samy aktivovány různými třídami povrchových receptorů. Navázání extracelulární signální molekuly k receptoru spojenému s G-proteinem tak vede k účinkům na

Otázka 15-5 Receptory spojené s G-proteinem aktivují G-proteiny zmenšením síly vazby GDP. To vede k rychlému oddělení navázaného GDP, který je potom nahrazen GTP, přítomným v cytosolu v mnohem větší koncentraci než GDP. Jaké následky by měla mutace α -podjednotky G-proteinu, která by způsobila snížení jeho afinity pro GDP bez výrazné změny jeho afinity pro GTP? Srovnajte účinky této mutace s působením choleroxinu.



Obrázek 15-17 G-Protein spráhuje aktivaci receptoru s otevřením draselného kanálu v plasmatické membráně v buňce srdečního svalu. (A) Navázání nervového mediátoru acetylcholinu k jeho receptoru spojenému s G-proteinem v buňce srdečního svalu vede k disociaci G-proteinu na aktivovaný komplex $\beta\gamma$ a na aktivovanou podjednotku α . (B) Aktivovaný komplex $\beta\gamma$ se naváže na K^+ -kanál v plasmatické membráně buňky srdečního svalu a otevírá ho. (C) Inaktivace podjednotky α hydrolyzou navázaného GTP způsobí opětné spojení α -podjednotky s komplexem $\beta\gamma$ za vzniku neaktivního G-proteinu. Draselný kanál se uzavírá.

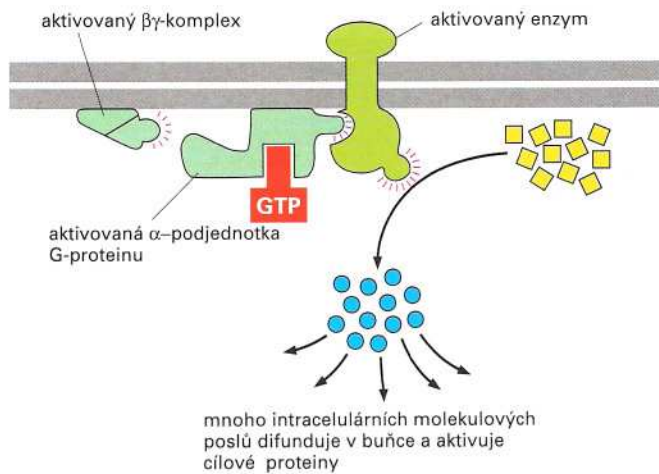
určitý soubor možných cílových proteinů, příslušných k danému signálu a k danému typu buňky.

Nejprve se podíváme na příklad regulace iontových kanálů G-proteiny. Tlukot srdce je řízen dvěma sadami nervových vláken: jedna sada se snaží srdce urychlit, druhá se ho snaží zpomalit. Nervová vlákna, která signalizují zpomalení tlukotu srdce, tak činí uvolněním acetylcholinu, který se váže na receptor spojený s G-proteinem na buňkách srdečního svalu. Když se acetylcholin naváže na receptor, dojde k aktivaci G-proteinu. Ten disociuje na podjednotku α a na komplex $\beta\gamma$ (obr. 15-17A). V tomto konkrétním příkladu je aktivní signální složkou komplex $\beta\gamma$: váže se na intracelulární stranu K^+ -kanálu v plasmatické membráně buňky srdečního svalu a přiměje tento kanál zaujmout otevřenou konformaci (obr. 15-17B). To změní elektrické vlastnosti buňky srdečního svalu a způsobí, že se buňka stahuje méně často. Působení komplexu $\beta\gamma$ je ukončeno a draselný kanál se znovu uzavře, když se podjednotka α stane neaktivní po hydrolyze svého navázaného GTP a znovu se spojí s komplexem $\beta\gamma$ do neaktivního G-proteinu (obr. 15-17C).

Nyní se podíváme na interakce G-proteinů s jejich dalšími hlavními cíli – enzymy, které se nacházejí v plasmatické membráně.

Některé G-proteiny aktivují enzymy vázané v membráně

Interakce G-proteinů s iontovými kanály způsobují okamžitou změnu stavu a chování buňky. Jejich interakce s enzymovými cíli má komplexnější důsledky, neboť vede k tvorbě dalších vnitrobuněčných signálních molekul. Nejčastějšími cílovými enzymy G-proteinů jsou *adenylátcykláza*, která zodpovídá za tvorbu malé signální molekuly *cyklického AMP*, a *fosfolipáza C*, která je zodpovědná za tvorbu malých signálních molekul *inositoltrisfosfátu* a *diacylglycerolu*. Tyto dva enzymy jsou



Obrázek 15-18 Enzymy aktivované G-proteiny katalyzují syntézu molekul intracelulárních poslů. Protože každý aktivovaný enzym aktivuje řadu molekul posla, dochází v této části k značnému zesílení signálu. Signál je předáván dále molekulami poslů, které se vážou na jiné cílové proteiny v buňce a ovlivňují jejich aktivitu.

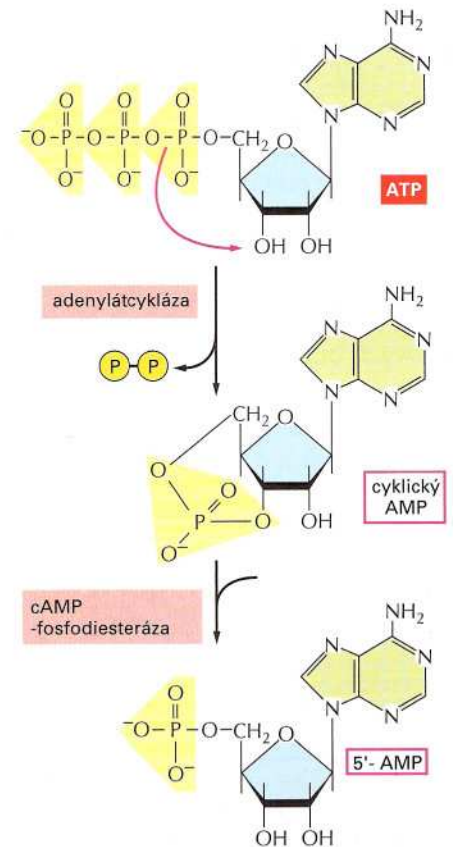
aktivovány různými typy G-proteinů a spřahují tvorbu malých vnitrobuněčných signálních molekul s různými extracelulárními signály. Spřažení může být buď stimulační (zprostředkované stimulačním G-proteinem) nebo inhibiční (zprostředkované inhibičním G-proteinem); pro jednoduchost se zde zaměříme na případy, kdy G-protein stimuluje aktivitu enzymu. Malé vnitrobuněčné signální molekuly v těchto drahách se obvykle nazývají **druhý posel** („prvním poslem“ je extracelulární signál); tyto látky jsou vytvářeny ve velkém množství při aktivaci enzymu vázaného na membránu a potom rychle difundují ze svého zdroje a šíří signál v buňce (obr. 15-18).

Nejprve se podíváme na důsledky vzrůstu koncentrace cyklického AMP. To nás provede jednou signalizační dráhou, která začíná u receptorů spojených s G-proteiny. Potom probereme působení diacylglycerolu a inositoltrisfosfátu, které nás provedou odlišnou dráhou.

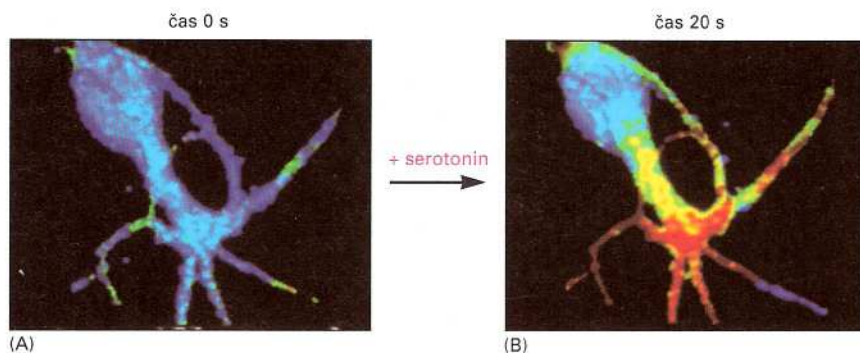
Dráha cyklického AMP může aktivovat enzymy a zapínat geny

Řada extracelulárních signálů, které působí na receptory spojené s G-proteiny, ovlivňuje aktivitu **adenylátcyklázy**, a tak mění koncentraci druhého posla – **cyklického AMP** – v buňce. Obecně řečeno, aktivovaná podjednotka G-proteinu zapne adenylátcyklázu, která způsobí dramatický a náhlý vzrůst syntézy cyklického AMP z ATP (který je v buňce vždy přítomen). Druhý enzym, *cAMP-fosfodiesteráza*, která je stále aktivní, rychle štěpí cyklický AMP na normální AMP (obr. 15-19). Protože se cyklický AMP v buňce tak rychle odbourává, může se jeho koncentrace rychle měnit v odpověď na extracelulární signály a během sekund může desetkrát vzrůst nebo poklesnout (obr. 15-20). Cyklický AMP je rozpustný ve vodě, a tak může přenášet signál z místa na membráně, kde je syntetizován, k proteinům v cytosolu, jádru nebo jiných částech membrány.

Některé příklady buněčných odpovědí zprostředkovaných cyklickým AMP jsou uvedeny v tabulce 15-2. Jak tato tabulka ukazuje, různé



Obrázek 15-19 Syntéza a odbourání cyklického AMP (cAMP). Cyklický AMP se tvoří z ATP cyklizační reakcí, která z ATP odstraní difosfátovou skupinu a připojí „volný“ konec zbývajících fosforylové skupiny k sacharidové části molekuly ATP. Odbourávací reakcí se tato vazba ruší a vzniká AMP.



Obrázek 15-20 Vzdůst koncentrace cyklického AMP v odpověď na extracelulární signál. Nervová buňka v kultuře odpovídá na navázání nervového mediátoru serotoninu k receptoru spojenému s G-proteinem tak, že zvýší intracelulární hladiny cyklického AMP. Koncentrace cyklického AMP uvnitř buňky byla sledována po vstříknutí fluorescenčního proteinu do buňky; fluorescence tohoto proteinu se změnila, když navázal cyklický AMP. *Modrá* ukazuje na nízkou hladinu cyklického AMP, *žlutá* na střední hladinu a *červená* na vysokou hladinu. (A) V klidové buňce je koncentrace cyklického AMP asi 5×10^{-8} M. (B) Dvacet sekund po přidání serotoninu k mediu kultury hladina cyklického AMP uvnitř buňky vzrostla na více než 10^{-6} M, tedy více než 20krát.

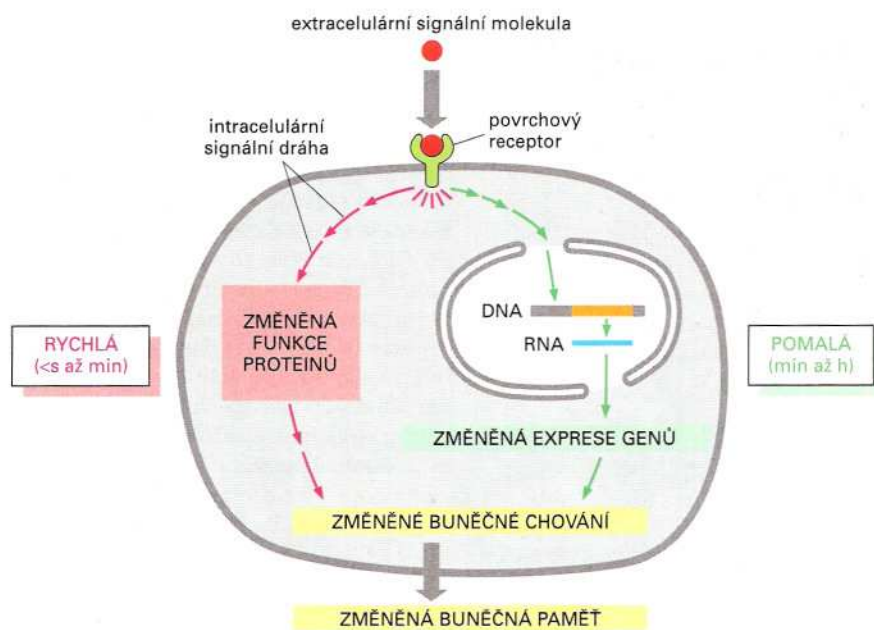
cílové buňky odpovídají zcela různě na extracelulární signály, které mění hladinu cyklického AMP uvnitř buňky. V mnoha typech živočišných buněk připomíná aktivace tvorby cyklického AMP sešlápnutí plynového pedálu v autě: zvýší rychlost spotřeby metabolického paliva. Pokud se například lekne nebo vzrušíme, nadledvina uvolní hormon adrenalin, který cirkuluje v krevním oběhu a váže se na třídu receptorů spojených s G-proteiny (adrenergní receptory), které jsou přítomny v mnoha typech buněk. Důsledky jsou různé pro různé typy buněk, ale všechny pomáhají připravit tělo k rychlé akci. Například v kosterním svalu vede vazba adrenalinu na jeho receptor k stimulaci adenylátcyklázy prostřednictvím G-proteinu a ke vzrůstu hladiny cyklického AMP uvnitř buňky. To vyvolá odbourání glykogenu (polymerovaná zásobní forma glukosy) k zajištění většího množství glukosy dostupné jako palivo pro očekávanou svalovou aktivitu. Adrenalin také působí na tukové buňky a stimuluje odbourávání triacylglycerolů (zásobní forma tuku) na mastné kyseliny – okamžitě použitelnou formu buněčného paliva (probírá se v Kapitole 4), které lze exportovat do ostatních buněk.

Cyklický AMP vyvolává tyto různé účinky hlavně aktivací enzymu *cAMP-dependentní proteinkinázy (A-kinázy)*: tato kináza je normálně vázána v komplexu s jiným proteinem; navázání cyklického AMP způsobí konformační změnu, která uvolní aktivní enzym. Aktivní proteinkináza potom katalyzuje fosforylaci určitých serinů či threoninů v jistých vnitrobuněčných proteinech, čímž se změní jejich aktivita. V různých typech buněk jsou fosforylaci přístupné různé soubory cílových proteinů; to vysvětluje různé účinky cyklického AMP v různých cílových buňkách.

Tabulka 15-2 Některé buněčné odpovědi na hormony, kde je prostředníkem cyklický AMP

Extracelulární signální molekula*	Cílová tkáň	Hlavní odpověď
Adrenalin	sval	odbourává se glykogen
Adrenalin	srdce	srdce bije rychleji a stahy jsou silnější
Adrenalin, ACTH, glukagon	tuk	odbourává se tuk
ACTH	nadledvina	vylučuje se kortisol

*Ačkoli všechny zde uvedené signální molekuly jsou hormony, některé odpovědi na lokální mediátory a na nervové mediátory jsou také zprostředkovány cyklickým AMP.



Obrázek 15-21 Rychlé a pomalé odpovědi na extracelulární signály. Extracelulární signály regulují mnoho aspektů chování buňky. Některé typy změněného chování buňky, jako například zvýšený buněčný růst a dělení, zahrnují změny v genové expresi a syntézu nových proteinů, a proto probíhají poměrně pomalu. Jiné, jako například změny buněčného pohybu, sekrece nebo metabolismu, nepotřebují jaderný aparát, a proto probíhají mnohem rychleji.

V některých případech jsou účinky rychlé, zatímco v jiných jsou pomalé (obr. 15-21). Například v buňkách kosterního svalu aktivovaná A-kináza fosforyluje enzymy metabolismu glykogenu; tak spustí mechanismus, který odbourává glykogen na glukosu. K této odpovědi dochází během několika sekund. Druhým extrémem jsou účinky cAMP, které se vyvinou v průběhu několika minut až hodin. Důležitou třídou pomalých účinků jsou ty, které zahrnují změny v genové expresi. Tak v některých buňkách A-kináza fosforyluje genové regulační proteiny, které aktivují transkripci vybraných genů. Obrázek 15-22 ukazuje rozsáhlý štafetový řetěz pro takovou dráhu:

hormon → sedmisegmentový transmembránový receptor → G-protein → adenylátcykláza → cyklický AMP → A-kináza → genový regulační protein → transkripce genu

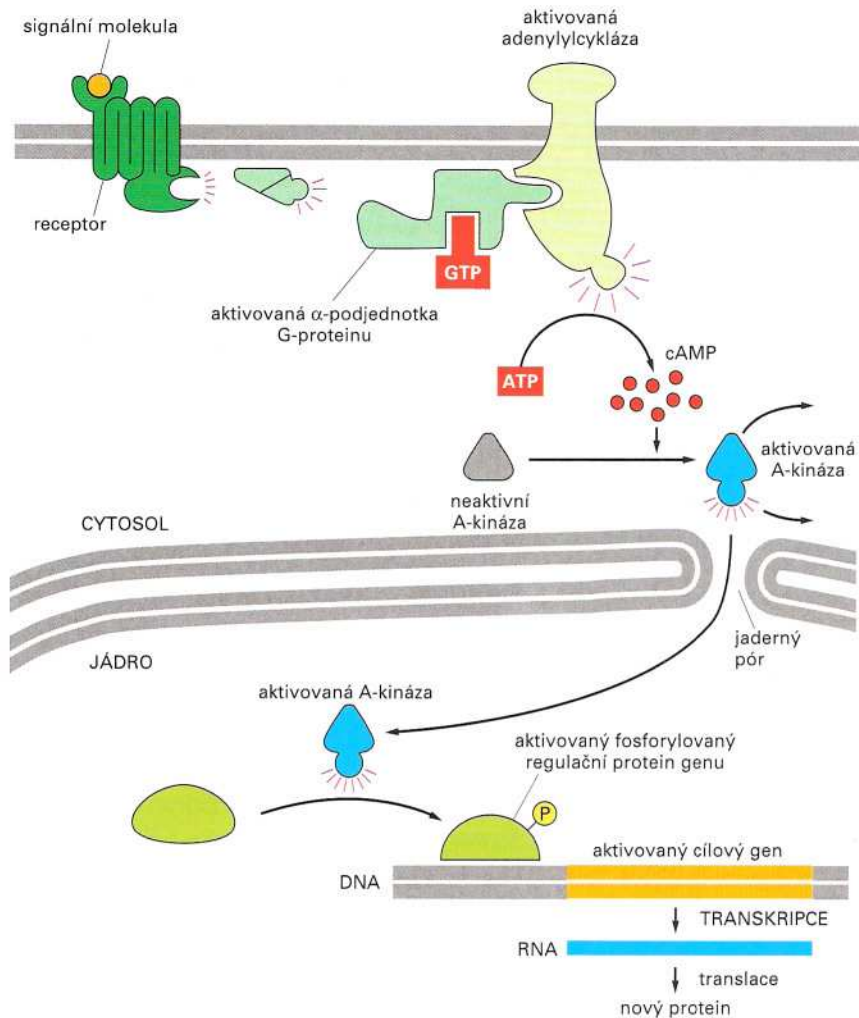
Nyní jsme sledovali jednu větev signální dráhy cestou receptorů spojených s G-proteiny a adenylátcyklázou od plasmatické membrány až k buněčnému jádru. V tomto okamžiku musíme obrátit své kroky zpět k plasmatické membráně, abychom prozkoumali druhou enzymově zprostředkovanou signální dráhu, která vede od receptorů spojených s G-proteiny – dráhu, která začíná aktivací membránového enzymu fosfolipázy C.

Dráha přes fosfolipázu C vede ke vzrůstu hladiny Ca^{2+} uvnitř buňky

Více než 25 známých receptorů spojených s G-proteiny působí prostřednictvím G-proteinu, který místo adenylátcyklázy aktivuje membránový enzym fosfolipázu C; několik příkladů uvádí tabulka 15-3.

Fosfolipáza C působí na membránový inositolový fosfolipid (fosfolipid, ke kterému je připojen cukr inositol), který je v malém množství přítomen ve vnitřní polovině lipidové dvojné vrstvy plasmatické mem-

Otázka 15-6 Vysvětlete, proč je k rychlé buněčné signalizaci nutné rychlé odbourání cyklického AMP.



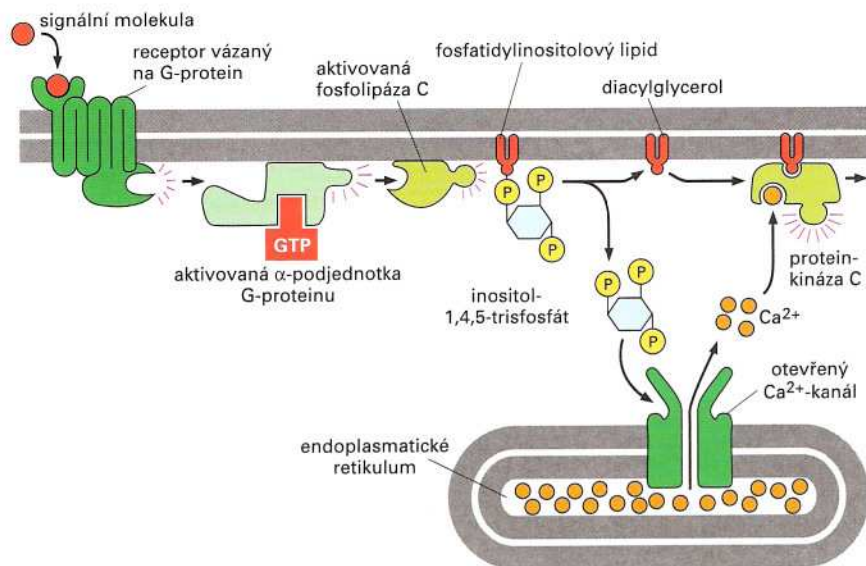
Obrázek 15-22 Aktivace transkripce genu při zvýšení koncentrace cyklického AMP. Navázání hormonu nebo nervového mediátoru na příslušný receptor spojený s G-proteinem vede k aktivaci adenylylcyklázy a vzrůstu hladiny cyklického AMP. Cyklický AMP aktivuje A-kinázu v cytosolu a ta se potom přesouvá do jádra, kde fosforyluje genový regulační protein. Fosforylovaný regulační protein je schopen vyvolat transkripci celého souboru cílových genů. Tato signální dráha řídí celou řadu dějů v buňkách, od syntézy hormonů v endokrinních buňkách až po tvorbu proteinů v mozku potřebných pro dlouhodobou paměť.

brány. Díky zapojení tohoto fosfolipidu je signální dráha, která začíná působením fosfolipázy C, často známa jako *inositolfosfolipidová dráha*. Fosfolipáza C vytváří dvě různé mediátorové molekuly. Odštěpuje hydrofilní cukrfosfátovou hlavičku fosfolipidu za vzniku cukerného fosfátu *inositol-1,4,5-trisfosfátu* (IP_3), zatímco lipidový konec *diacylglycerol* (DAG) zůstává zanořený v plasmatické membráně. Obě molekuly hrají klíčovou roli v signalizaci uvnitř buňky a my se jim budeme postupně věnovat.

IP_3 opouští plasmatickou membránu a difunduje cytosolem. Když dosáhne endoplasmatického retikula, naváže se na něj a otevře Ca^{2+} -kanály v membráně ER. Ionty Ca^{2+} uložené uvnitř endoplasmatického

Tabulka 15-3 Některé odpovědi zprostředkované aktivací fosfolipázy C

Signální molekula	Cílová tkáň	Hlavní odpověď
Vasopresin	játra	odbourání glykogenu
Acetylcholin	slinivka	vylučování amylázy (trávicího enzymu)
Acetylcholin	hladký sval	kontrakce
Thrombin (proteolytický enzym)	krevní destičky	agregace



Obrázek 15-23 Signální dráhy aktivované fosfolipázou C. Při hydrolyze membránového inositolfosfolipidu aktivovanou fosfolipázou C vznikají dvě molekuly intracelulárních posílů. Inositol-1,4,5-trisfosfát (IP_3) difunduje cytosolem a uvolňuje Ca^{2+} z endoplasmatického retikula tak, že se naváže na Ca^{2+} -kanály v membráně ER a otevře je. Velký gradient elektrochemického potenciálu Ca^{2+} způsobí výtok Ca^{2+} do cytosolu. Diacylglycerol zůstává v plasmatické membráně a společně s Ca^{2+} pomáhá aktivovat enzym proteinkinázu C, která se shromažďuje z cytosolu na cytoplasmatické straně plasmatické membrány.

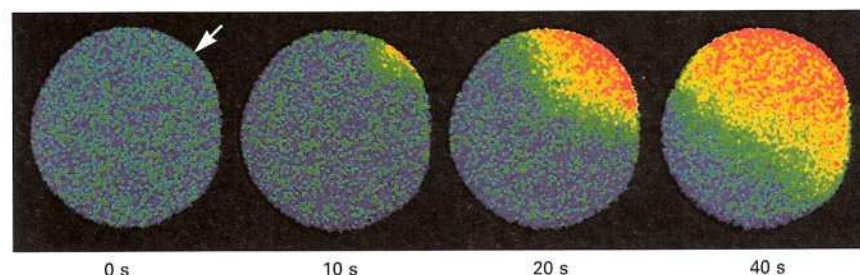
retikula proudí otevřenými kanály ven do cytosolu (obr. 15-23), čímž prudce vzroste cytosolová koncentrace volných iontů Ca^{2+} , která je normálně udržována na velmi nízké hodnotě.

Diacylglycerol zůstává připojený k plasmatické membráně, kde pomáhá aktivovat proteinkinázu. Tato kináza se jmenuje *proteinkináza C* (**C-kináza**), protože ke své aktivitě také potřebuje navázat Ca^{2+} (viz obr. 15-23). Jakmile je C-kináza aktivována, fosforyluje soubor intracelulárních proteinů; jejich výběr závisí na typu buňky. Principy jsou stejné jako pro A-kinázu, ačkoli se většina cílových proteinů liší.

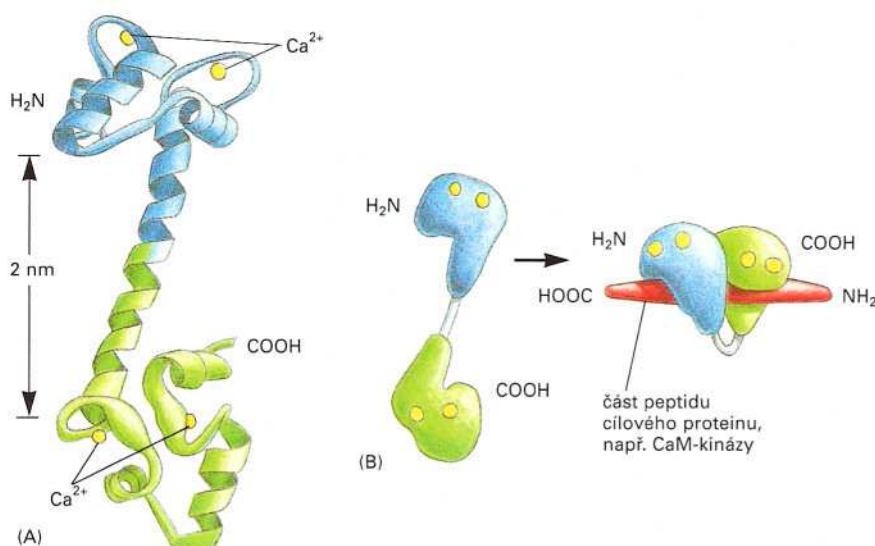
Ca^{2+} -signál spouští řadu biologických dějů

Vápenatý ion má natolik důležitou a rozšířenou úlohu intracelulárního posla, že se musíme podívat na jeho funkce z obecnějšího hlediska. Vzrůst koncentrace volných Ca^{2+} v cytosolu je odpovědí na mnoho různých signálů, nejen na ty, které působí prostřednictvím receptorů spojených s G-proteiny. Například ve vaječných buňkách náhlý vzrůst intracelulární koncentrace Ca^{2+} po oplodnění spermii spouští první reakce embryonálního vývoje (obr. 15-24), ve svalech Ca^{2+} spouští kontrakci, v mnohých sekrečních buňkách, včetně nervových buněk, spouští sekreci. Ca^{2+} provádí všechny tyto akce tak, že se váže na proteiny citlivé na vápenaté ionty a ovlivňuje jejich aktivitu.

Normální koncentrace volných iontů Ca^{2+} v cytosolu je ve srovnání s koncentrací volných Ca^{2+} v extracelulární kapalině a v endoplasmatickém retikulu extrémně nízká (10^{-7} M). Tento rozdíl je udržován membránovými pumpami, které aktivně odčerpávají Ca^{2+} z cytosolu,



Obr. 15-24 Oplodnění vajíčka spermii vyvolá vzrůst koncentrace Ca^{2+} v cytosolu. Do vajíčka hvězdice bylo vstříknuto fluorescenční barvivo citlivé na Ca^{2+} a poté bylo vajíčko oplodněno. Na obrázku je vidět vlnu cytosolového Ca^{2+} (červeně), uvolněného z endoplasmatického retikula, která se šíří po vajíčku z místa vstupu spermie (šipka). Tato vlna Ca^{2+} vyvolá v buněčné membráně vajíčka změnu, která zabrání průniku další spermie, a zároveň zahájí embryonální vývoj.



Obrázek 15-25 Struktura Ca^{2+} -kalmodulinu určená s pomocí rentgenové difrakce a nukleární magnetické rezonance (NMR). (A) Molekula kalmodulinu vypadá jako činka s dvěma globulárními konci spojenými dlouhým ohebným úsekem α -šroubovice. Každý konec má dvě domény vázající Ca^{2+} . (B) Zjednodušené znázornění struktury ukazuje konformační změny v Ca^{2+} -kalmodulinu, které nastanou při jeho navázání na cílový protein. Všimněte si, že se α -šroubovice ohnula, aby se celá molekula mohla obtočit okolo cílového proteinu.

buď přes plasmatickou membránu nebo do endoplasmatického retikula. Výsledkem je strmý gradient elektrochemického potenciálu Ca^{2+} přes membránu endoplasmatického retikula a přes plasmatickou membránu (viz Kapitola 12). Když signál přechodně otevře Ca^{2+} -kanály v některé z membrán, ionty Ca^{2+} proudí do cytosolu po spádu svého elektrochemického potenciálu, přičemž spustí změny Ca^{2+} -citlivých proteinů v cytosolu.

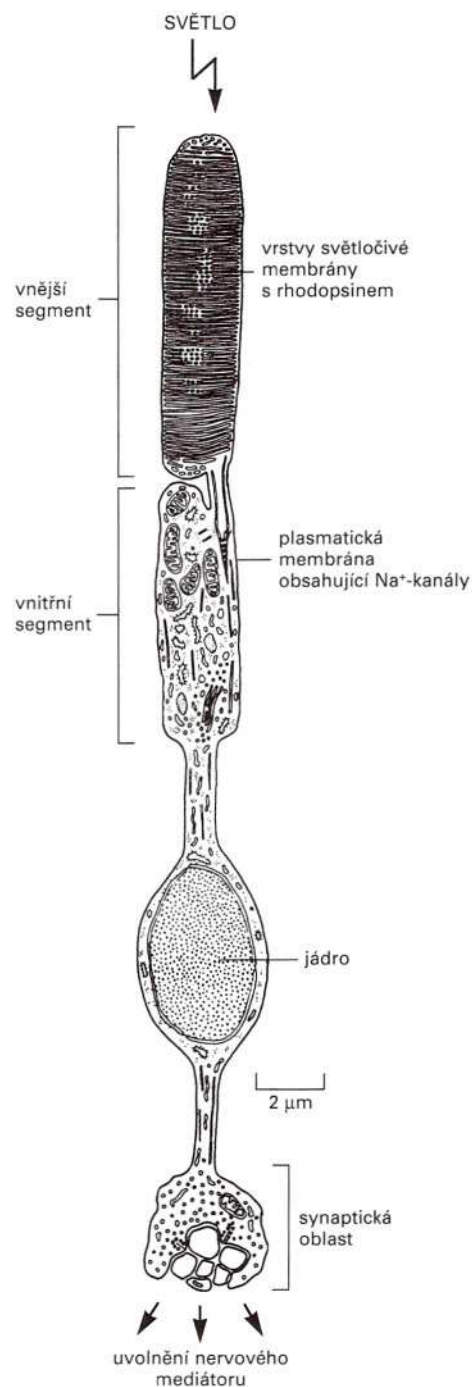
Inositolfosfátová signální dráha, která vede k uvolnění Ca^{2+} z ER do cytosolu, se vyskytuje skoro ve všech eukaryontních buňkách a ovlivňuje řadu různých cílových proteinů i dříve zmíněnou C-kinázu. Účinky Ca^{2+} jsou na většinu proteinů nepřímé a jsou zprostředkovány řadou převodních proteinů zvaných *Ca^{2+} -vázající proteiny*. Nejdůležitější a nejběžnější z těchto proteinů je Ca^{2+} -citlivý protein **kalmodulin**. Kalmodulin se vyskytuje v cytosolu všech dosud prozkoumaných eukaryontních buněk, včetně buněk rostlin, hub a prvoků. Při navázání Ca^{2+} mění kalmodulin svou konformaci; to mu umožní vázat se k celé řadě cílových proteinů a měnit jejich aktivitu (obr. 15-25). Zvláště důležitou cílovou třídou pro kalmodulin jsou **CaM-kinázy**. Tyto kinázy se aktivují navázáním komplexu kalmodulinu s Ca^{2+} a v aktivním stavu ovlivňují další buněčné děje fosforylací vybraných proteinů. Příkladem je specifický typ CaM-kinázy, který se hojně vyskytuje v synapsích v savčím mozku, kde se zřejmě podílí na vytváření paměťových záznamů v odpověď na pulzy vnitrobuněčného Ca^{2+} , ke kterým dochází během synaptické signalizace. Mutantní myši, kterým CaM-kináza chybí, vykazují neschopnost vzpomenout si, kde se co nachází.

Signální kaskády uvnitř buňky mohou být velmi rychlé, citlivé a přizpůsobivé: fotoreceptory v oční sítnici

Popis signálních kaskád spojených s receptory vázanými na G-proteiny vyžaduje poměrně dost času, ale k jejich průběhu stačí několik sekund. Zamyslete se nad tím, jak rychle může vzrušení zrychlit tep vašeho srdce (adrenalin stimuluje receptory spojené G-proteiny v buňkách srdečního svalu, a tak zrychluje srdeční tep), nebo jak rychle u vás vůně jídla způsobí vylučování slin (prostřednictvím

Otázka 15-7 Proč podle vás buňky vyvinuly intracelulární zásobárny Ca^{2+} i přes to, že množství Ca^{2+} v okolí buněk obvykle není limitující?

Obrázek 15-26 Tyčinková světlocitlivá buňka ze sítnice. Vnější segment buňky obsahuje velké množství tenkých diskovitých membránových váčků, s molekulami rhodopsinu, které absorbují světlo. Z opačného konce buňky se uvolňuje nervový mediátor, který řídí vyslání signálů z nervových buněk sítnice do mozku. Když je tyčinka stimulována světlem, je signál postupně přenášen z rhodopsinových molekul v discích přes cytosol vnějšího segmentu až k iontovým kanálům v plasmatické membráně vnitřního segmentu. Iontové kanály se v odpověď na tento signál zavírají, a tak způsobují změnu v membránovém potenciálu tyčinky. Podobným způsobem jako při uvolňování nervového mediátoru v normálních nervových buňkách, ovlivní změna membránového potenciálu rychlost uvolňování nervového mediátoru ze synaptické oblasti buňky.



receptorů pro zápachy ve vašem nose spojených s G-proteiny, a receptorů pro acetylcholin spojených s G-proteiny v buňkách slinné žlázy, které stimulují sekreci). Mezi nejrychlejší odpovědi zprostředkované receptory spojenými s G-proteiny patří reakce oka na ostré světlo: vytvoření elektrické odpovědi na náhlý záblesk světla trvá nejrychleji odpovídajícím fotoreceptorovým (světlocitlivým) buňkám sítnice (čípkovým buňkám) pouhých 20 milisekund.

Této rychlosti je dosahováno bez ohledu na nutnost předat signál v několika krocích intracelulární kaskády. Fotoreceptory však také poskytují nádherný příklad výhod signálních kaskád, zvláště zesílení, kterého mohou dosáhnout, a jejich přizpůsobivosti jako detektorů signálů značně proměnlivé intenzity. Kvantitativní podrobnosti byly nejdůkladněji analyzovány u tyčinkových fotoreceptorových buněk v oku (obr. 15-26). Zde světlo interaguje s *rhodopsinem*, receptorem spojeným s G-proteiny. Světlem aktivovaný rhodopsin aktivuje G-protein zvaný *transducin*. Aktivovaná α -podjednotka transducinu potom aktivuje signální kaskádu uvnitř buňky, která způsobí uzavření iontových kanálů v plasmatické membráně světlocitlivé buňky. To způsobí změnu napětí přes buněčnou membránu; konečným důsledkem je odeslání nervového signálu do mozku.

Signál je v jednotlivých částech své dráhy opakovaně zesilován (obr. 15-27). Při špatných světelných podmínkách (například v bezměsíčné noci) je zesílení vpravdě obrovské a pouhý tucet fotonů pohlcený v celé sítnici způsobí odeslání vnímatelného signálu do mozku. V ostrém slunečním světle, když každou fotoreceptorovou buňku během každé sekundy zaplavují miliardy fotonů, se signální dráha *adaptuje* a sníží zesílení asi 10 000krát, aby fotoreceptorové buňky nebyly přetíženy a stále mohly v silném světle registrovat jeho vzrůst a pokles. Adaptace závisí na negativní zpětné vazbě: intenzivní odpověď ve fotoreceptorových buňkách generuje intracelulární signál (změnu koncentrace Ca^{2+}), který inhibuje enzymy zodpovědné za zesílení signálu.

Adaptace se také vyskytuje v signálních drahách, které odpovídají na chemické signály, a tak buňkám umožňuje zůstat citlivými ke změnám intenzity signálů v širokém rozmezí úrovně stimulace. Jinými slovy lze říci, že díky adaptaci mohou buňky odpovídat jak na zprávy pronesené šepem tak na ty, které na ně posel zakřičí.

Na receptorech spojených s G-proteiny nezávisí pouze zrak, ale také chuť a čich. Zdá se pravděpodobné, že tento mechanismus při-

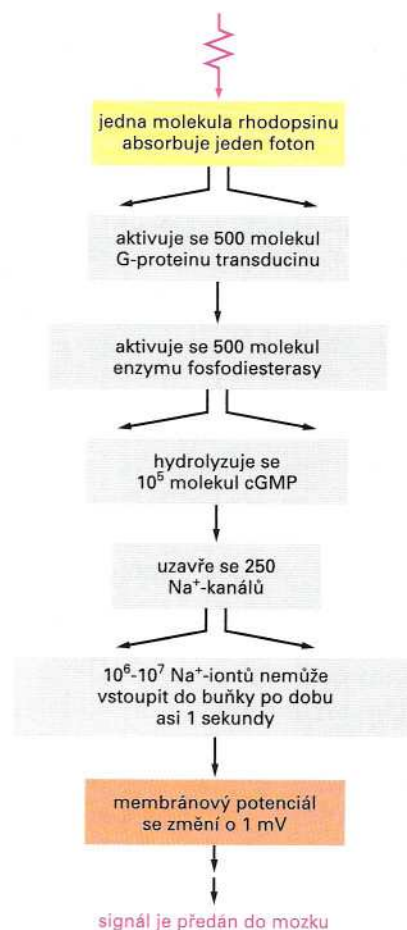
Obrázek 15-27 Zesílení světlem indukované signální kaskády v tyčinkových světlocitlivých buňkách. Tento obrázek ukazuje zesílení, kterého může být dosaženo, když se fotoreceptorová buňka přizpůsobí tlumenému světlu. Vnitrobuněčná signální dráha od G-proteinu transducinu využívá různé složky již popsaných drah. V nepřítomnosti světelného signálu světlocitlivá buňka stále produkuje molekuly buněčného posla – cyklického GMP, který je velmi podobný cyklickému AMP. Cyklický GMP se váže na sodné kanály v plasmatické membráně světlocitlivé buňky a udržuje je otevřené. Aktivace rhodopsinu světlem vede k tvorbě aktivovaých α -podjednotek transducinu. Tyto podjednotky aktivují enzym zvaný fosfodiesteráza cyklických nukleotidů, který převádí cyklický GMP na GMP. Prudký pokles koncentrace cyklického GMP uvnitř buňky způsobí oddělení navázaného cyklického GMP od kanálů a ty se uzavřou. *Rozbíhající se šipky* ukazují kroky, kterými dochází k zesílení signálu.

jímání signálů, vynalezený v raném stadiu evoluce eukaryot, má svůj původ v základní a univerzální potřebě buněk vnímat své okolí a reagovat na něj. Nyní se zaměříme na další třídu buněčných povrchových receptorů, které hrají klíčovou roli v regulaci počtu, diferenciaci a pohybů buněk v mnohobuněčném organismu.

Receptory spojené s enzymy

Receptory spojené s enzymy, třetí hlavní třída povrchových receptorů buněk (viz obr. 15-12 C), byly objeveny díky své úloze při odpovědích na *růstové faktory* – extracelulární signální proteiny, které řídí růst, proliferaci a diferenciaci buněk a jejich přežití v živočišných tkáních. Několik příkladů je uvedeno v tabulce 15-1 (str. 485). Většina růstových faktorů působí jako lokální mediátory a je potřebná jen ve velmi malých koncentracích (asi 10^{-9} – 10^{-11} M). Odpovědi na ně jsou obvykle pomalé (řádově v hodinách) a vyžadují mnoho intracelulárních převodních kroků, které nakonec vedou ke změnám v genové expresi. Receptory spojené s enzymy už od svého objevení zajišťují také přímé rychlé účinky na cytoskelet, čímž řídí způsob pohybu buňky a změny v jejím tvaru. Extracelulárními signály pro tyto pozdní odpovědi často nejsou difuzibilní růstové faktory, ale proteiny připojené na povrch, po němž se buňka pohybuje. Nepořádky v buněčné proliferaci, diferenciaci, přežití a migraci jsou základními příčinami vzniku rakoviny a abnormality v signalizaci s pomocí receptorů spojených s enzymy hrají hlavní roli při vzniku této třídy nemocí.

Podobně jako receptory spojené s G-proteiny jsou receptory spojené s enzymy transmembránovými podjednotkami s jejich ligand-vázacími doménami na vnějším povrchu plasmatické membrány. Místo cytoplasmatických domén receptoru spojeného s G-proteiny však působí jako enzym nebo tvoří komplex s dalším proteinem, který působí jako enzym. Největší třídu receptorů spojených s enzymy tvoří ty, které mají cytoplasmatickou doménu, jež funguje jako tyrosinová proteinkináza a fosforyluje tyrosinové postranní řetězce vybraných intracelulárních proteinů. Takovým receptorům se říká **receptorové tyrosinkinázy**. Tato kategorie zahrnuje velkou většinu receptorů růstových faktorů, na něž se zaměříme v této části.



Otázka 15-8 Důležitou vlastností každé signální kaskády je schopnost se vypnout. Podívejte se na kaskádu na obr. 15-27. Kde by bylo potřeba umístit vypínače a které z nich budou podle vás nejdůležitější?

Aktivované receptorové tyrosinkinázy vytvářejí komplex intracelulárních signálních proteinů

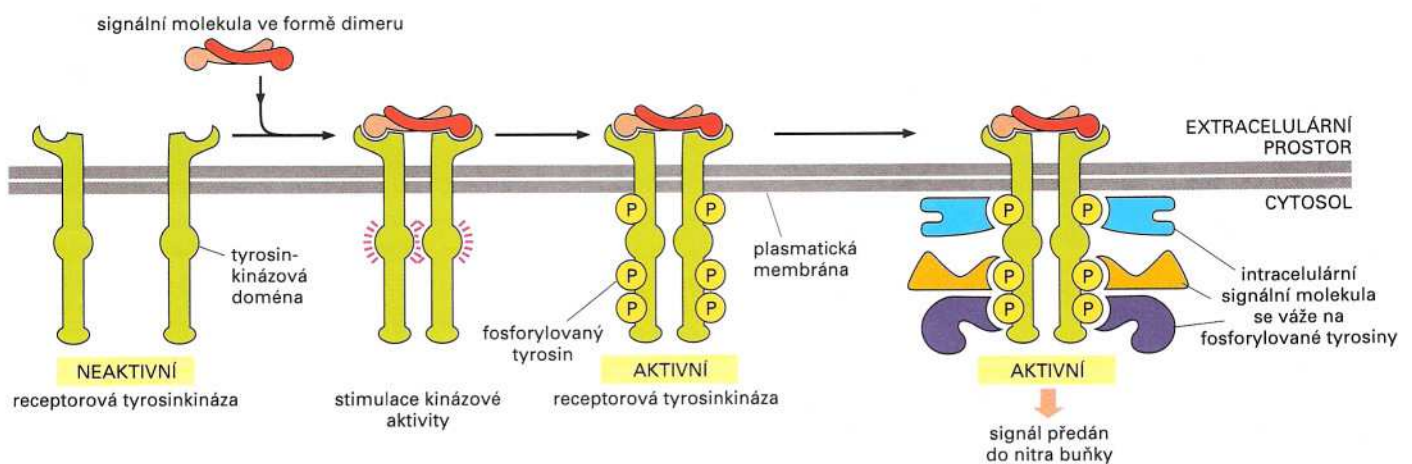
K zajištění své práce převodníku signálu musí receptor spojený s enzymem přepínat enzymovou aktivitu své intracelulární domény, když se na extracelulární doménu naváže externí signální molekula. Na rozdíl od sedmisegmentových transmembránových receptorů spojených s G-proteiny mají receptorové proteiny spojené s enzymy obvykle jen jeden transmembránový úsek, který zřejmě prochází lipidovou dvojnou vrstvou jako jediná α -šroubovice. Zřejmě nexistuje žádný způsob, jak předávat konformační změnu α -šroubovicí, a proto receptory spojené s enzymy převádějí extracelulární signál odlišným mechanismem. Navázání signální molekuly způsobí spojení dvou receptorových molekul v membráně, které tak vytvoří dimer. Kontakt mezi těmito dvěma sousedními intracelulárními receptory aktivuje funkce jejich kinázy, což vede k jejich vzájemné fosforylaci.

Tato fosforylace potom spustí sestavení důmyslného signálního komplexu v koncové části receptoru. Nově fosforylované tyrosiny slouží jako vazebná místa pro velkou skupinu intracelulárních signálních proteinů - snad až 10-20 různých molekul, které se po navázání samy stávají aktivními. Zatímco tento děj probíhá, signální komplex vysílá signál několika drahami současně do mnoha míst určení v buňce, a tak aktivuje a řídí četné biochemické změny, které jsou potřebné ke spuštění komplexní odpovědi, například proliferace buněk (obr. 15-28). K ukončení aktivace receptoru má buňka k dispozici *protein-tyrosin-fosfatázy*, které odstraňují fosforylové skupiny, které byly přidány v odpověď na extracelulární signál. V mnoha případech je s aktivovanými receptory naloženo podstatně hruběji: jsou vneseny dovnitř buňky endocytozou a poté odbourány v lyzosomech.

Různé kinázy receptorových tyrosinů se zaměřují na různé soubory intracelulárních signálních molekul, které mají různé účinky. Některé komponenty jsou však zřejmě značně rozšířené. Mezi ně patří například fosfolipáza, která funguje stejně jako fosfolipáza C při aktivaci inositolfosfátové signální dráhy (viz obr. 15-23). Hlavní signální dráha od receptorové tyrosinkinázy k jádru se však ubírá jinudy; tato druhá alternativa se stala dobře známou pro svůj možný zhoubný prů-

Otázka 15-28 Aktivace receptorové tyrosinkinázy vede k vytvoření intracelulárního signálního komplexu.

Navázání signální molekuly k extracelulární doméně receptorové tyrosinkinázy způsobí asociaci dvou molekul receptoru za vzniku dimeru. Zde uvedená signální molekula je sama dimerem, a tak může být pojitkem mezi oběma molekulami receptoru. V jiných případech navázání signální molekuly změní konformaci receptoru tak, že jeho dvě molekuly vytvoří dimer. V dimeru se kinázové domény intracelulárních konců molekul receptoru dostanou do kontaktu; to kinázy aktivuje a umožní jim vzájemně si fosforylovat postranní řetězce několika tyrosinů. Každý fosforylovaný tyrosin slouží jako specifické vazebné místo pro příslušný intracelulární signální protein, který přebírá signál a přenáší ho dále do nitra buňky.



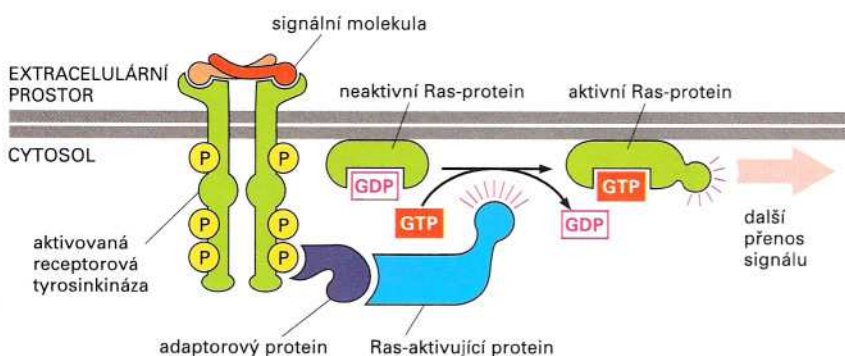
běh: mutace, které aktivují tuto dráhu, a tak stimulují buněčné dělení nesprávným způsobem, jsou příčinou mnoha typů rakoviny. Na závěr naší diskuse o receptorových tyrosinkinázách budeme sledovat tuto dráhu k jádru.

Receptorové tyrosinkinázy aktivují GTP-vázající protein Ras

Některé z intracelulárních signálních proteinů, které se vážou na aktivované receptorové tyrosinkinázy, fungují jako fyzikální *adaptéry*, které připojují receptory k jiným proteinům, a tak vytvářejí velký komplex, který se naopak může vázat k dalším proteinům a aktivovat je, čímž předává signál dále. Přes spojovací komplex výše uvedeného typu vede aktivace receptorové tyrosinkinázy k aktivaci malého intracelulárního signálního proteinu **Ras**, který je ukotven na cytoplasmatické straně plasmatické membrány. Tímto způsobem jsou k plasmatické membráně připojeny skutečně všechny receptorové tyrosinkinázy: od těch, které odpovídají na růstový faktor odvozený z krevních destiček (PDGF), jenž způsobuje takové efekty jako buněčnou proliferaci při hojení ran, až po ty, které odpovídají na nervový růstový faktor (NGF), čímž chrání určité neurony před smrtí ve vyvíjejícím se nervovém systému.

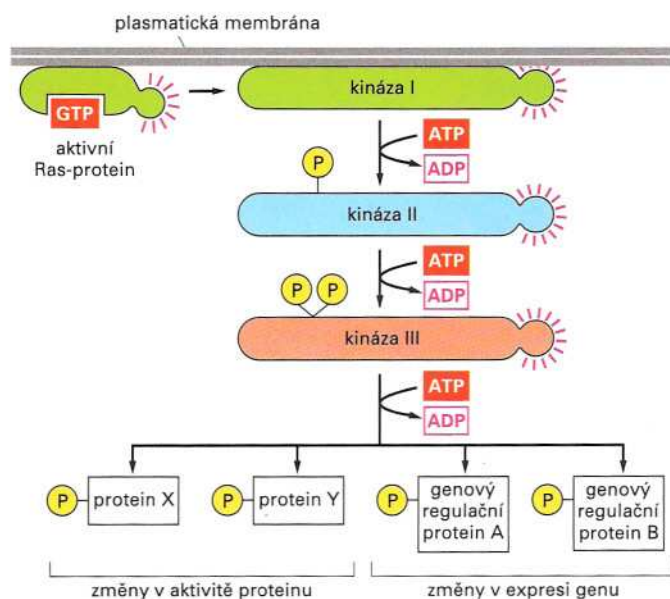
Protein Ras je členem velké rodiny malých GTP-vázajících proteinů s jedinou podjednotkou, kterým se často říká monomerní GTP-vázající proteiny pro odlišení od trimerních G-proteinů, s kterými jsme se setkali už dříve v této kapitole. Ras připomíná α -podjednotku G-proteinu a funguje jako molekulový přepínač. Cyklicky prochází dvěma různými konformačními stavy: aktivním, když je navázán GTP, a neaktivním, když je navázán GDP (viz obr. 13-15B). Interakce s aktivujícím proteinem způsobí výměnu GDP v molekule Ras za GTP, tedy přechod do aktivního stavu. Po chvíli je Ras znovu vypojen hydrolyzou GTP na GDP. Obrázek 15-29 ukazuje, jak je Ras spřažen s aktivovanou receptorovou tyrosinkinázou krátkými úseky spojovacích proteinů, z nichž poslední je protein aktivující Ras.

V aktivním stavu zahajuje Ras aktivaci fosforylační kaskády, ve které se postupně fosforyluje a aktivuje řada proteinkináz. Tento štafetový systém přenáší signál od plasmatické membrány k jádru. Poslední proteinkináza kaskády fosforyluje regulační proteiny určitých genů, a tak mění jejich schopnost regulovat přepis genů. Výsledkem je změna



Obrázek 15-29 Aktivace proteinu Ras aktivovanou receptorovou tyrosinkinázou.

Adaptérový protein je připojen ke zvláštnímu fosfotyrosinu (další signální proteiny, které jsou na obrázku 15-28 navázány k receptoru, jsou zde pro jednoduchost vynechány). Adaptér váže a aktivuje protein, který funguje jako aktivátor proteinu Ras. To stimuluje Ras k výměně navázaného GDP za GTP. Aktivovaný Ras potom stimuluje další krok signální dráhy, který je ukázán na obr. 15-30.



Obrázek 15-30 Fosforylační kaskáda aktivovaná proteinem Ras. Protein Ras, aktivovaný dějem ukázaným na obrázku 15-29, spouští fosforylační kaskádu tří proteinkináz, která zesiluje signál a rozděluje ho do různých směrů. Poslední kináza v kaskádě fosforyluje různé cílové proteiny, mezi něž patří další proteinkinázy a, co je nejdůležitější, genové regulační proteiny, které regulují genovou expresi. Změny v expresi genů a v aktivitě proteinů vedou ke komplexním změnám v chování buněk, například v jejich proliferaci a diferenciaci, což jsou typická vyústění signalizační dráhy Ras.

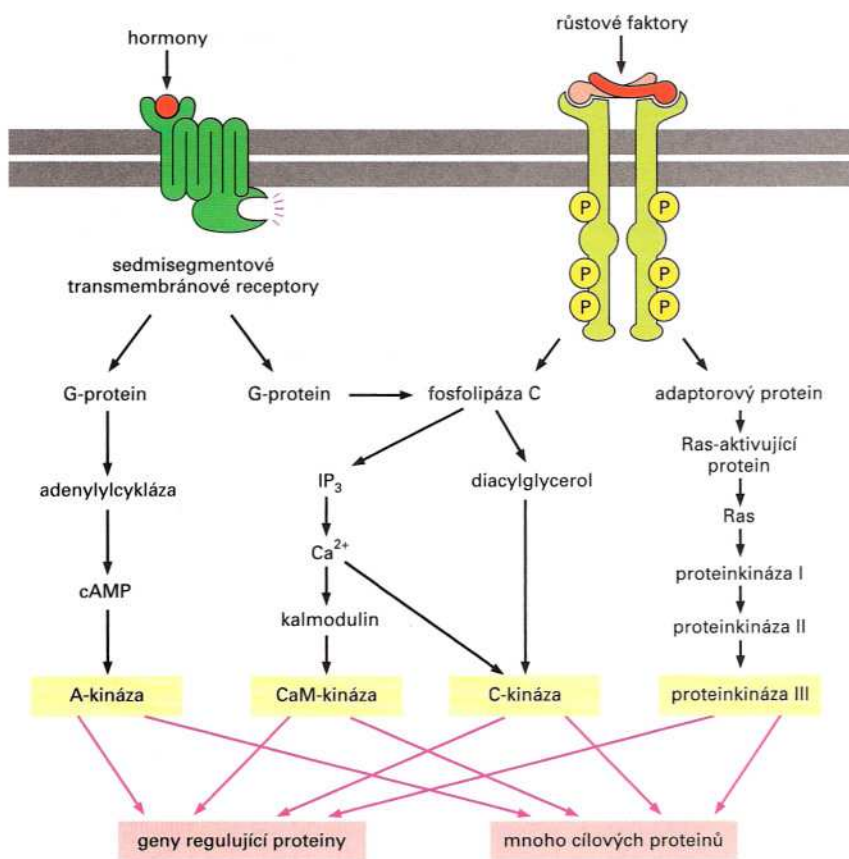
v modelu genové exprese (obr. 15-30). To může stimulovat proliferaci buněk, prodlužovat přežití buňky, nebo řídit diferenciaci buňky. Přesný výsledek bude záviset na tom, které další geny jsou v buňce aktivní a které další signály na ně působí.

Pokud Ras inhibujeme intracelulární injekcí protilátek inaktivujících Ras, a je-li buňka vystavena růstovému faktoru, na který by normálně reagovala, k žádné normální buněčné odpovědi nedojde. Tento pokus a další podobné experimenty ukazují, že Ras je životně důležitou složkou signální dráhy, která zprostředkovává normální buněčnou odpověď. Naopak, je-li Ras stále v aktivním stavu, což se děje u některých hyperaktivních mutantních forem proteinu Ras, je účinek na buňku stejný jako při neustálé stimulaci receptorové tyrosinkinázy růstovým faktorem. Protein Ras byl objeven v rakovinných buňkách, ve kterých mutace genu pro Ras vedla k produkci hyperaktivního Ras. Tento mutantní protein Ras stimuluje buňky k dělení dokonce v nepřítomnosti růstových faktorů, a výsledná neřízená proliferace buněk přispívá ke vzniku rakoviny.

Až u 30 % případů rakoviny u lidí se vyskytují mutace v genech *ras*, a u mnoha dalších druhů rakovin se vyskytují mutace v genech, jejichž produkty leží ve stejné signální dráze jako Ras. Mnoho genů, které kódují tyto vnitrobuněčné signální proteiny, bylo poprvé objeveno při pátrání po *onkogenech*, které způsobují rakovinu a jsou popsány v Kapitole 18. Normální verze těchto genů, které kódují normální signální proteiny, se často nazývají *protoonkogeny*, protože se mutací mohou změny v onkogeny.

Rakovina je nemoc, při které se buňky chovají samostatně a zcela nespolečensky a narušují harmonii mnohobuněčného organismu proliferací ve zcela nevhodném čase a invazí do tkání, do kterých by neměly vstoupit. Výskyt mutací genů pro složky buněčné signalizace u všech typů rakoviny odráží známou pravdu: udržování stabilní společnosti tkví především v dobré komunikaci.

Otázka 15-9 Budou se podle vás receptory spojené s G-proteiny a receptorové tyrosinkinázy aktivovat při vystavení buněk protilátkám proti příslušným proteinům? (Nápověda: podívejte se znovu na Panel 5-3 na stranách 158-159 a všimněte si vlastností molekul protilátek.)

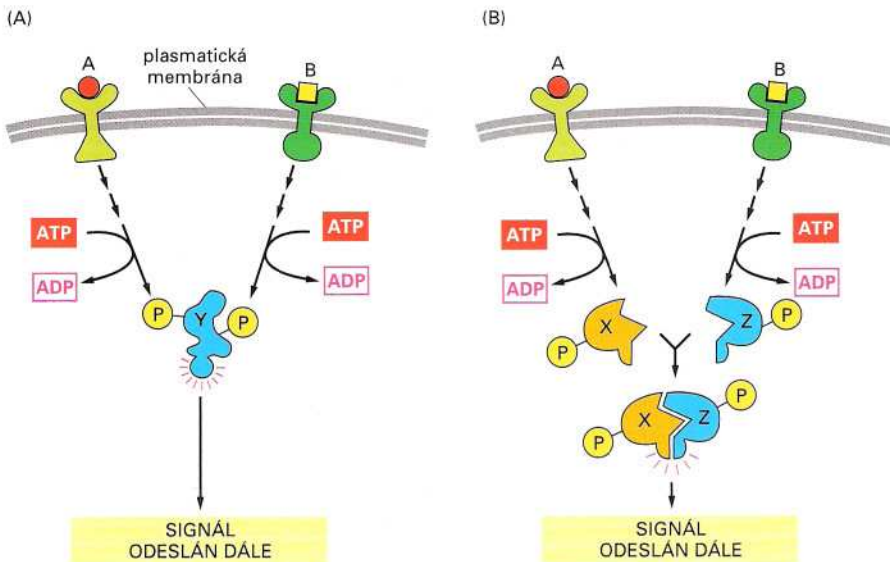


Obrázek 15-31 Čtyři paralelní signální dráhy uvnitř buňky a spojení mezi nimi. Na obrázku jsou dráhy od receptorů spojených s G-proteinem přes cyklický AMP a přes fosfolipázu C a od receptorů spojených s enzymem přes fosfolipázu C a přes Ras. Proteinkinázy v těchto drahách fosforylují mnoho proteinů včetně těch, které patří jiným drahám. Výsledná hustá síť regulačních spojů je znázorněna červenými šipkami vycházejícími ze žlutě vyznačených kináz, jež fosforylují několik společných cílových proteinů.

Sítě proteinkináz integrují informace pro řízení složitého chování buněk

V této kapitole jsme postupně načrtli několik hlavních drah pro přenos signálu z buněčného povrchu do nitra buňky. Obrázek 15-31 srovnává čtyři dráhy, které jsme probrali nejpodrobněji: cesty od receptorů spojených s G-proteiny přes cyklický AMP a přes fosfolipázu C, a cesty od receptorů spojených s enzymy přes fosfolipázu C a přes Ras. Každá dráha se od ostatních liší a v jiných ohledech se jim zcela nepochopitelně podobá v základních principech svého fungování. Různé dráhy sdílejí některé své složky, a všechny se zdají být v podstatě schopny regulovat jakýkoli děj v buňce konečnou aktivací proteinkináz.

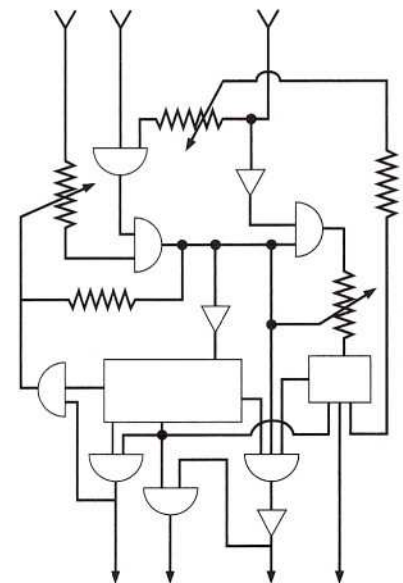
Ve skutečnosti jde o systém ještě mnohem složitější, než může ukázat náš dosavadní výčet. Zaprvé, existuje celá řada dalších drah, které jsme opomenuli; za druhé, hlavní dráhy mezi sebou interagují způsoby, které jsme nepopsali. Tyto interakce jsou nejrůznějšího druhu, ale nejrozsáhlejší z nich zprostředkovávají proteinkinázy, které se vyskytují v každé dráze. Tyto kinázy fosforylují, a tedy regulují, složky dalších signálních drah i složky dráhy, jíž jsou samy součástí. Mezi různými drahami tedy probíhá vzájemná výměna informací (viz obr. 15-31), které se účastní všechny řídicí systémy v buňce. Pro lepší představu o velikosti řídicího systému si uvedme, že podle současných odhadů asi 2 % našich genů kódují proteinkinázy a že v jediné savčí buňce se může nacházet asi 1000 různých typů proteinkináz. Jak se můžeme v této spleťavé pavučině řídicích spojů vyznat a k čemu je taková složitost dobrá?



Obrázek 15-32 Dva možné jednoduché mechanismy integrace signálu.
 V (A) signály A a B aktivují různé kaskády fosforylace proteinů, každá z nichž vede k fosforylaci proteinu Y, ale v různých místech tohoto proteinu. Protein Y je aktivován, jen pokud jsou fosforylována obě tato místa, a proto je aktivní jen za současné přítomnosti obou signálů A a B. V (B) signály A a B vedou k fosforylaci dvou proteinů X a Z, které se potom spojují za vzniku aktivního proteinu XZ.

Buňky si potřebují spojovat informace z mnoha různých zdrojů, aby mohly správně reagovat na podněty z okolí: rozhodnout se, zda dále žít či zemřít, zda změnit tvar nebo vylučovat nějakou chemickou látku atd. Díky komunikaci mezi jednotlivými signálními drahami může buňka spojit dva nebo více bitů informací a na tuto kombinaci informací reagovat. Tak mohou některé proteiny uvnitř buňky sloužit jako spojovací zařízení, obvykle tak, že mají několik míst, která mohou být fosforylována různými proteinkinázami. Informace z různých zdrojů se tedy mohou sbíhat právě u těchto proteinů, které je převádějí na jediný výstupní signál (obr. 15-32). Tyto integrující proteiny mohou naopak signál vyslat k různým cílům. Tak může vnitrobuněčný signalizační systém fungovat jako síť nervových buněk v mozku nebo jako mikroprocesory v počítači, které zpracovávají komplexní informaci a generují komplexní odpověď (obr. 15-33).

Tato kapitola začala pojednáním o signálech, které na buňky působí zvenčí, ale zavedla nás hluboko do buněčného nitra a ukázala nám práci důmyslného řídicího systému uvnitř buňky. Složky tohoto systému přenášejí zprávy mezi oddělenými částmi buňky, spojují a zpracovávají informace z různých zdrojů, slouží jako paměťová zařízení a ovládají načasování jednotlivých dějů. Jedním z důležitých cílů tohoto řídicího systému je cytoskelet, který určuje tvar buňky a je zodpovědný za její pohyby, jak probereme v následující kapitole.



Obrázek 15-33 Schéma integrujícího zařízení v počítači.

Základní shrnutí

- Buňky v mnohobuněčném organismu spolu komunikují celou řadou extracelulárních chemických signálů.
- Hormony se přenášejí v krvi ke vzdáleným cílovým buňkám, ale většina extracelulárních signálních molekul působí jen na krátké vzdálenosti. Sousední buňky spolu často komunikují přímo svými povrchy.
- Buňky jsou stimulovány extracelulární signální látkou, která se váže na jejich receptorový protein a aktivuje ho.
- Receptorové proteiny fungují jako převodníky signálu z jedné fyzikální formy do druhé.
- Většina extracelulárních signálních molekul nemůže procházet buněčnou membránou; vážou se na receptorové proteiny umístěné na povrchu buňky. Tyto receptory převádějí signál přes plasmatickou membránu.
- Malé hydrofobní extracelulární signální molekuly, jako například steroidní hormony a oxid dusnatý (NO), mohou přímo difundovat plasmatickou membránou; aktivují intracelulární receptorové proteiny, které jsou buď regulačními proteiny genů nebo enzymy.
- Existují tři hlavní třídy povrchových buněčných receptorů: (1) receptory spojené s iontovými kanály, (2) receptory spojené s G-proteiny a (3) receptory spojené s enzymy
- Receptory spojené s G-proteiny a receptory spojené s enzymy odpovídají na extracelulární signály zahájením kaskád vnitrobuněčných signálních reakcí, které změni chování buňky.
- Receptory spojené s G-proteiny aktivují třídu trimerních GTP-vázajících proteinů zvaných G-proteiny, které fungují jako molekulové přepínače, krátkou dobu přenášejí signál dále do nitra buňky a poté se samy vypnou hydrolýzou vlastního GTP na GDP.
- Některé G-proteiny přímo regulují iontové kanály v plasmatické membráně. Další aktivují enzym adenylátcyklázu, a zvyšují tak koncentraci cyklické-
ho AMP uvnitř buňky. Ještě další G-proteiny aktivují enzym fosfolipázu C, která vytváří signální molekuly inositoltrisfosfát (IP₃) a diacylglycerol.
- IP₃ otevírá iontové kanály v membráně endoplasmatického retikula a spouští tok volných iontů Ca²⁺ do cytosolu. Samotný ion Ca²⁺ funguje uvnitř buňky jako posel, který mění aktivitu celé škály proteinů.
- Vzrůst koncentrace cyklického AMP aktivuje proteinkinázu A (A-kinázu), zatímco Ca²⁺ a diacylglycerol společně aktivují proteinkinázu C (C-kinázu).
- C-kináza a A-kináza fosforylují vybrané cílové proteiny v místech serinů a threoninů, a tak mění aktivitu těchto proteinů. Různé typy buněk obsahují různé soubory cílových proteinů a jsou ovlivňovány různým způsobem.
- Obecně lze říci, že stimulace receptorů spojených s G-proteiny vede k rychlé a vratné odpovědi buňky.
- Mnoho receptorů spojených s enzymy obsahuje intracelulární proteinové domény, které fungují jako enzymy; většinu z nich představují receptorové tyrosinkinázy, které jsou aktivovány růstovými faktory a fosforylují tyrosiny ve vybraných intracelulárních proteinech.
- Aktivované receptorové tyrosinkinázy způsobují sestavení intracelulárního signálního komplexu na vnitrobuněčné části receptoru; část tohoto komplexu slouží k aktivaci Ras, malého GTP-vázajícího proteinu, který aktivuje kaskádu proteinových kináz, jež postupně předávají signál od plasmatické membrány až k jádru.
- Mutace, které stimulují proliferaci buňky tak, že abnormálně zvýší aktivitu Ras, jsou běžným znakem mnoha druhů rakoviny.
- Různé intracelulární signální dráhy spolu interagují, což jim umožňuje nejlepším způsobem odpovědět na složitou kombinaci signálů. Některé kombinace signálů buňce umožňují přežít; další kombinace signálů spustí proliferaci a pokud ještě jiné signály chybí, většina buněk se sama usmrtí.

Klíčové pojmy

A-kináza	CaM-kináza	lokální mediátor	receptor spojený s G-proteinem
adaptace	cyklický AMP	molekulární přepínač	receptorová tyrosinkináza
adenylátcykláza	druhý posel	nervový mediátor	receptorový protein
buněčná signalizace	fosfolipáza C	neuronální	signální kaskáda
C-kináza	G-protein	oxid dusnatý	steroidní hormon
	hormon	převod signálu	transdukce signálu
	kalmodulin	Ras	

16 Cytoskelet

STŘEDNÍ FILAMENTA

- Střední filamenta jsou pevná a odolná
- Střední filamenta ochraňují buňky proti mechanickému stresu

MIKROTUBULY

- Mikrotubuly jsou duté trubice se strukturálně odlišnými konci
- Mikrotubuly udržuje rovnováha mezi jejich růstem a rozpadem
- Centrosom živočišných buněk je hlavním centrem, které organizuje mikrotubuly
- Rostoucí mikrotubuly vykazují dynamickou nestabilitu
- Mikrotubuly organizují vnitřek buňky
- Molekulové motory pohánějí vnitrobuněčný transport
- Organely se pohybují podél mikrotubulů
- Řasinky a bičinky obsahují stabilní mikrotubuly, jimiž pohybuje dynein

AKTINOVÁ VLÁKNA

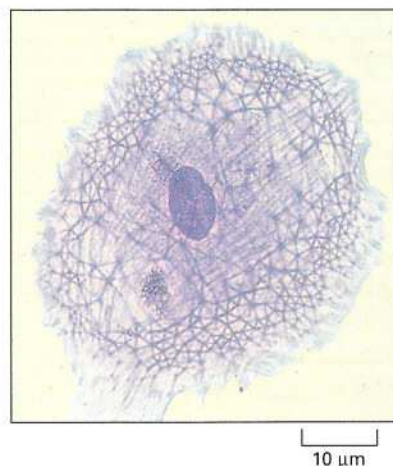
- Aktinová vlákna jsou tenká a pružná
- Mechanismus polymerace aktinu a tubulinu je podobný
- Řada proteinů se váže k aktinu a mění jeho vlastnosti
- Většina eukaryotních buněk má pod plasmatickou membránou buněčný kortex
- Pohyb buňky závisí na aktinu
- Aktin se spojuje s myosinem a vytváří kontraktilní struktury
- Během svalového stahu se aktinová vlákna posunují proti myosinovým vláknům
- Svalový stah je zapínán náhlým vzrůstem koncentrace Ca^{2+}

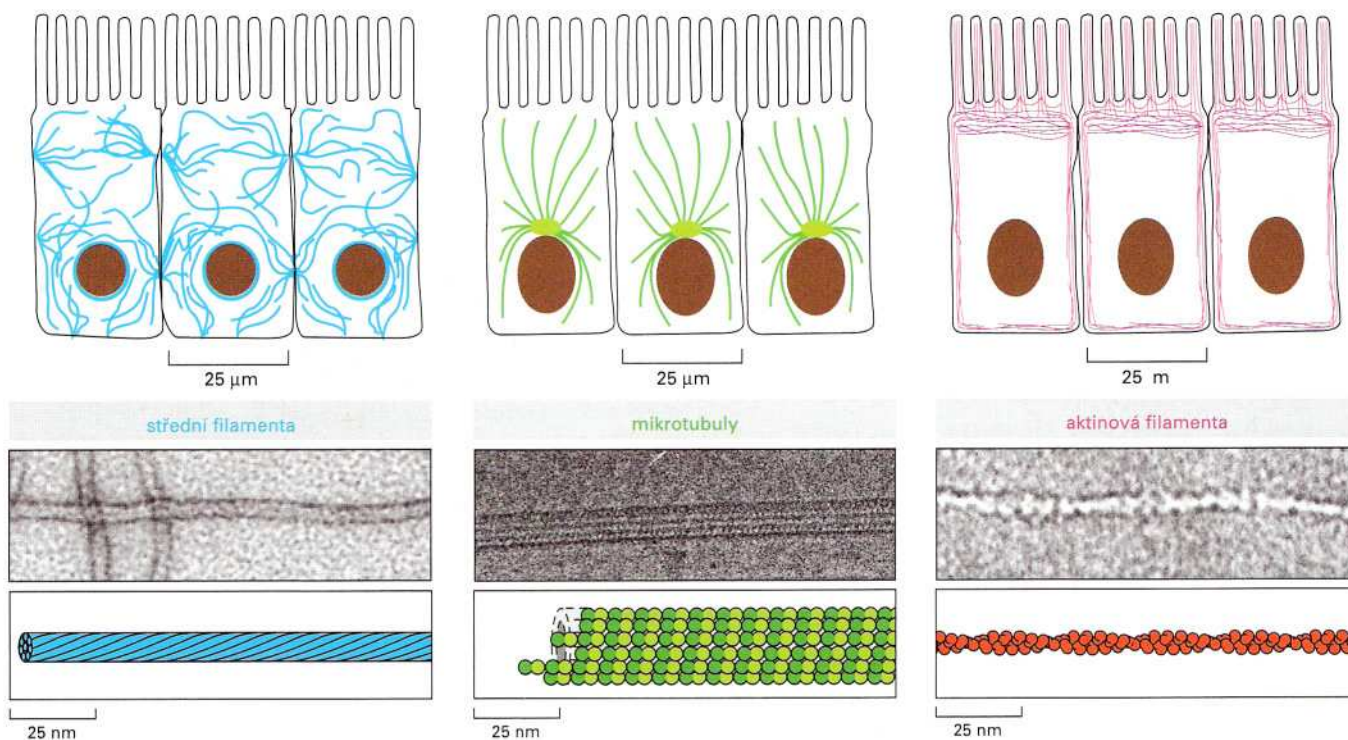
Schopnost eukaryotních buněk uspořádat všechny součásti svých těl, přijímat nejrůznější tvary a vykonávat koordinované pohyby závisí na **cytoskeletu** – složité síti proteinových vláken, rozprostírající se v cytoplasmě (obr. 16-1). Tato síť pomáhá podpírat velký objem cytoplasmy v eukaryotních buňkách, což je obzvláště důležité u živočišných buněk, které nemají buněčné stěny. Cytoskelet se ale nepodobá kostře našeho těla; na rozdíl od ní je cytoskelet vysoce dynamická struktura, která je neustále reorganizována během toho, jak buňka mění tvar, dělí se, nebo reaguje na změny ve svém okolí. Cytoskelet není tvořen jen „kostmi“, ale také „svaly“ a je přímo odpovědný za pohyb, vykonávaný na velké vzdálenosti, jako je pohyb buněk na podložce, stah buněk svalu, nebo změny buněčného tvaru během vývoje embrya.

Vnitřek buňky je v neustálém pohybu a právě cytoskelet poskytuje nástroje, potřebné k takovým nitrobuněčným pohybům, jako jsou pohyb organel z jednoho místa na druhé, rozdělení chromosomů do dvou dceřiných buněk během mitózy, nebo zaškrcování živočišných buněk při jejich dělení. Cytoskelet je nejspíše vynálezem eukaryotních buněk: chybí u prokaryot a je možné, že vývoj cytoskeletu byl zásadním faktorem v evoluci velkých a strukturálně složitých eukaryotních buněk. Eukaryotní buňka, podobně jako kterákoliv továrna vyrábějící složitý výrobek, má vysoce organizovaný interiér, v němž jsou specializované služby soustředěny na určitých místech a ta jsou spojena transportními systémy. Právě buněčný cytoskelet kontroluje umístění organel, které poskytují specializované služby, a zároveň zajišťuje transport mezi nimi.

Cytoskelet je vystaven ze tří typů proteinových vláken: *středních filament, mikrotubulů a aktinových vláken* (obr. 16-2). Každý typ vlákna je vystaven z jiného typu proteinů. Střední filamenta jsou tvořena rodinou vláknitých proteinů, *tubulin* je podjednotkou mikrotubulů, *aktin* je podjednotkou aktinových filament. V každém případě se tisíce podjed-

Obrázek 16-1. Cytoskelet. Kožní buňka (fibroblast) rostoucí v buněčné kultuře byla fixována a obarvena Coomassie-modří, která barví všechny proteiny. Různé vláknité útvary se rozprostírají uvnitř buňky. Tmavý oválný útvar uprostřed je buněčné jádro.





Střední čili intermediární filamenta jsou provazovitá vlákna o průměru 10 nm; jsou tvořena příslušnými proteiny, které představují velkou a rozvětvenou rodinu. Jeden typ intermediárních filament tvoří pletivo zvané jaderná lamina, která leží těsně pod vnitřní jadernou membránou. Jiné typy pronikají cytoplasmou přes celou šířku buňky, čímž dodávají buňkám mechanickou pevnost a vyrovnávají tlaky na buňky například ve střevním epitelu.

Mikrotubuly jsou dlouhé duté trubice tvořené výlučně proteinem tubulinem. Trubice mají vnější průměr 25 nm, a jsou tedy pevnější než intermediární nebo aktinová filamenta. Mikrotubuly jsou dlouhé a rovné a mají obvykle jeden konec připojen k organizačnímu centru mikrotubulů, zvanému *centrosom*.

Aktinová filamenta, někdy nazývaná mikrofilamenta, jsou šroubovitě polymery proteinu aktinu. Jeví se nám jako pružné struktury o průměru 7 nm, které jsou organizovány do různých lineárních svazků, dvourozměrných sítí a trojrozměrných gelů. I když jsou aktinová filamenta rozložena po celé buňce, nejkoncentrovanější jsou v kortexu, těsně pod plasmatickou membránou.

notek skládají do nevětvicího se vlákna, které někdy prochází napříč celou buňkou.

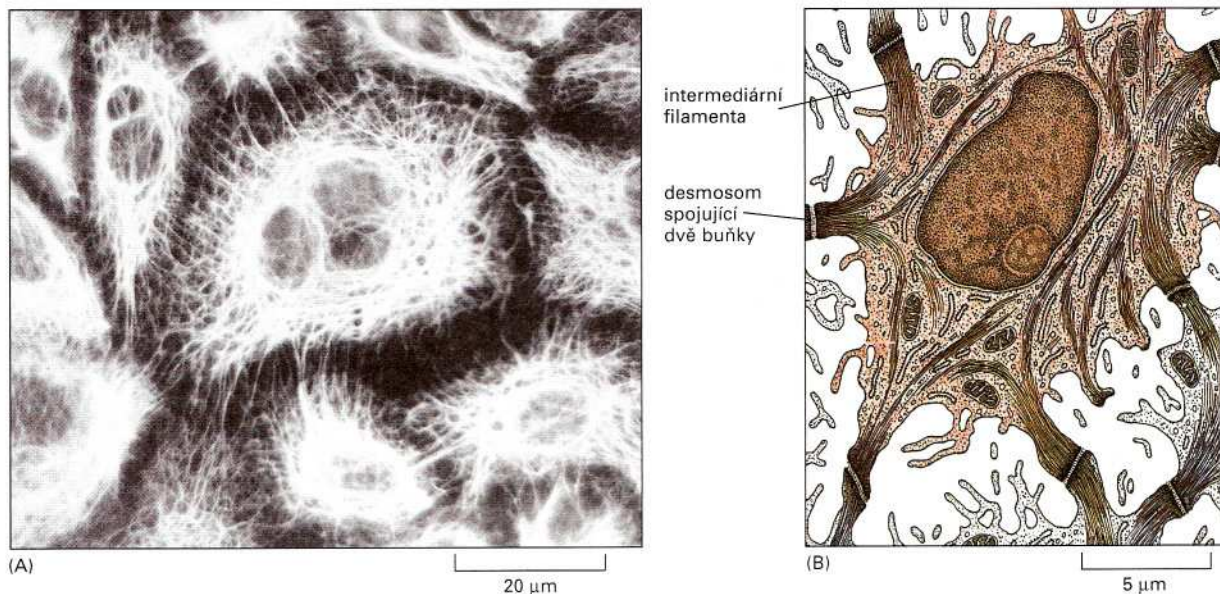
V této kapitole postupně probereme strukturu a funkce uvedených tří typů sítí, sestávajících z proteinových vláken. Začneme středními filamenti, která buňce poskytují mechanickou pevnost; dále pak uvidíme, jak aktinový cytoskelet poskytuje sílu k pohybu fibroblastu a jak buněčné výběžky tvořené mikrotubuly pohání pohyblivé buňky, jako jsou protozoa nebo spermie.

Střední filamenta

Střední filamenta mají velkou pevnost v tahu a jejich hlavní funkcí je umožnit buňkám vydržet mechanický stres, k němuž dochází při natažení buněk. Nazývají se „střední“, protože jejich průměr (kolem 10 nm) v buňkách hladkých svalů, kde byly poprvé popsány, leží mezi tenkými aktinovými vlákny a silnějšími vlákny myosinovými. Střední filamenta jsou nejpevnější a nejodolnější ze všech tří typů cytoskeletálních vláken: prakticky jako jediné cytoskeletální struktury přežívají působení koncentrovaných roztoků solí a silných neiontových detergentů.

Střední filamenta se nacházejí v cytoplasmě většiny buněk, avšak ne ve všech. Nejčastěji tvoří cytoplasmatickou síť, která obklopuje jádro. Odtud dosahují filamenta až k periferii buňky, kde jsou pak často zakot-

Obrázek 16-2. Tři typy proteinových filament, která vytvářejí cytoskelet. Zobrazené buňky jsou ze střevní výstelky.



Obrázek 16-3. Síť středních filament.

(A) Imunofluorescenční mikrosnímek skupiny epidermálních buněk, rostoucích v buněčné kultuře. Buňky byly obarveny, aby se zviditelnila cytoplasmatická síť středních filament. Filamenta každé buňky jsou nepřímo spojena s filamenti sousední buňky prostřednictvím spojů, zvaných desmosomy (popsáno v Kapitole 19). (B) Kresba na základě

elektronmikroskopického snímku řezu epidermis. Jasně jsou vidět svazky středních filament, jež procházejí cytoplasmou a zanořují se do desmosomů.

vena do plasmatické membrány v místech mezibuněčných spojů; v nich jsou buňky navzájem spojeny prostřednictvím vnějších stran plasmatických membrán (obr. 16-3). Střední filamenta se také nacházejí v buněčném jádře; pod jadernou membránou leží síť ze středních filament, **jaderná lamina**, která podpírá a zesiluje jadernou membránu všech eukaryotních buněk.

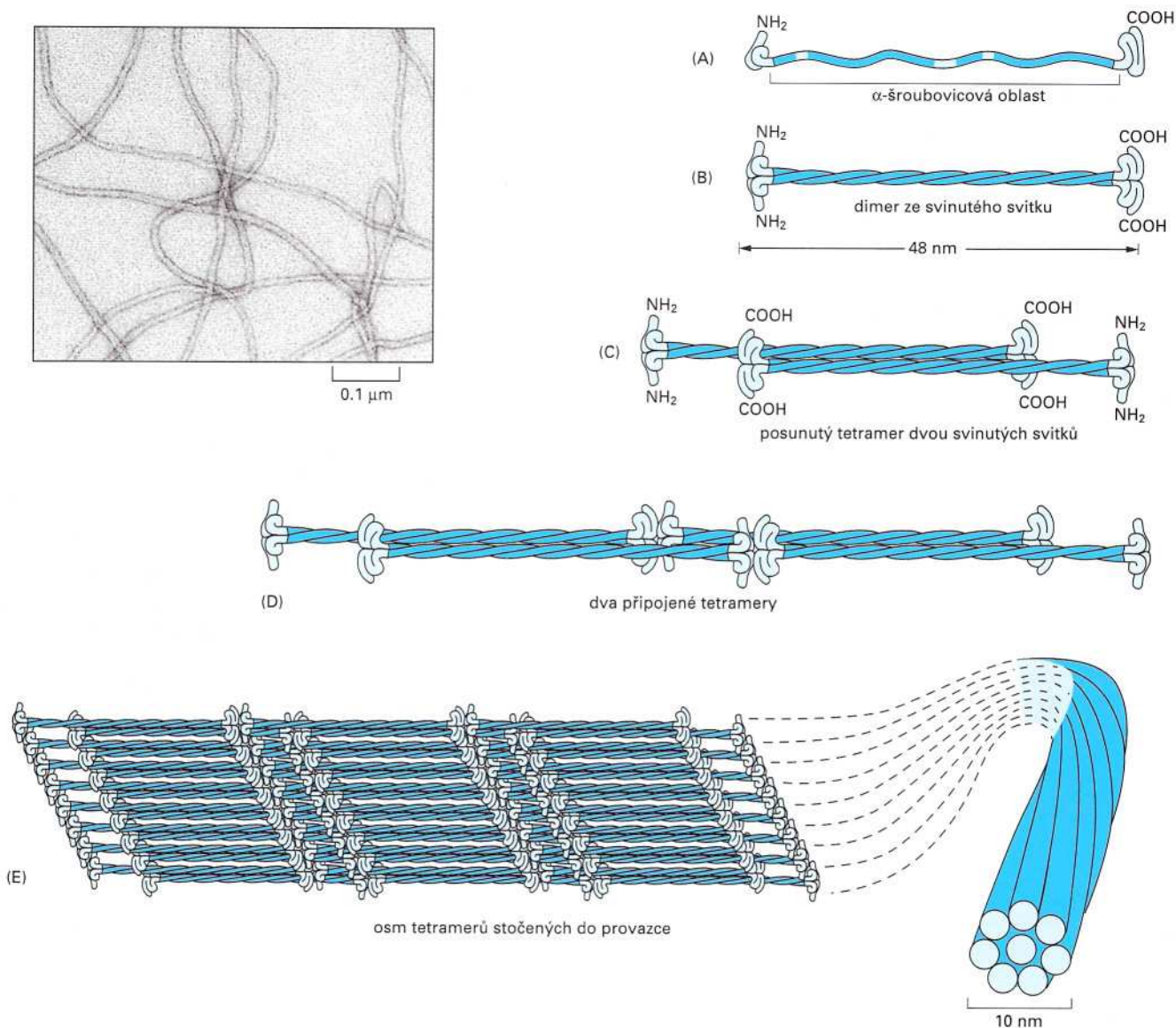
Střední filamenta jsou pevná a odolná

Střední filamenta jsou podobně jako lana zformována z mnoha stočených dlouhých vláken, čímž je dosaženo velké pevnosti v tahu. Vláknata těchto lan, podjednotky středních filament, jsou protáhlé (fibrilární) proteiny; každý z nich má globulární hlavičku na aminovém konci molekuly, centrální tyčovitou část a globulární konec na karboxylovém konci molekuly (obr. 16-4A). Tyčovitá část je tvořena α -šroubovicí, která umožňuje, aby se vždy dvě molekuly obtočily jedna kolem druhé (konfigurace stočené šroubovice) a vytvořily stabilní dimer (obr. 16-4B), jak je popsáno v kapitole 5. Dva takové dimery jsou dále spojeny pomocí nekovalentních vazeb do tetrameru (obr. 16-4C). Tetramery se pak rovněž pomocí nekovalentních vazeb skládají jeden za druhým a vedle sebe, takže nakonec je zformováno střední filamentum s vnitřním uspořádáním, podobným lanu (obr. 16-4D a E).

Střední tyčovité domény různých proteinů, tvořících střední filamenta, mají podobnou velikost a aminokyselinovou sekvenci. Proto mají různá střední filamenta vždy stejný průměr a vnitřní uspořádání. Naproti tomu globulární hlavičky a konce se velmi liší svou velikostí i sestavou aminokyselin a odlišují jednotlivé typy středních filament. Hlavičky a konce se nacházejí na povrchu vláken a jejich hlavní funkcí je interakce s ostatními součástmi cytoskeletu.

Díky středním filamentům jsou buňky odolné vůči mechanickému namáhání

Přítomnost středních filament je obzvláště zřetelná v cytoplasmě buněk, které jsou mechanicky namáhány. Například jsou ve velkém počtu



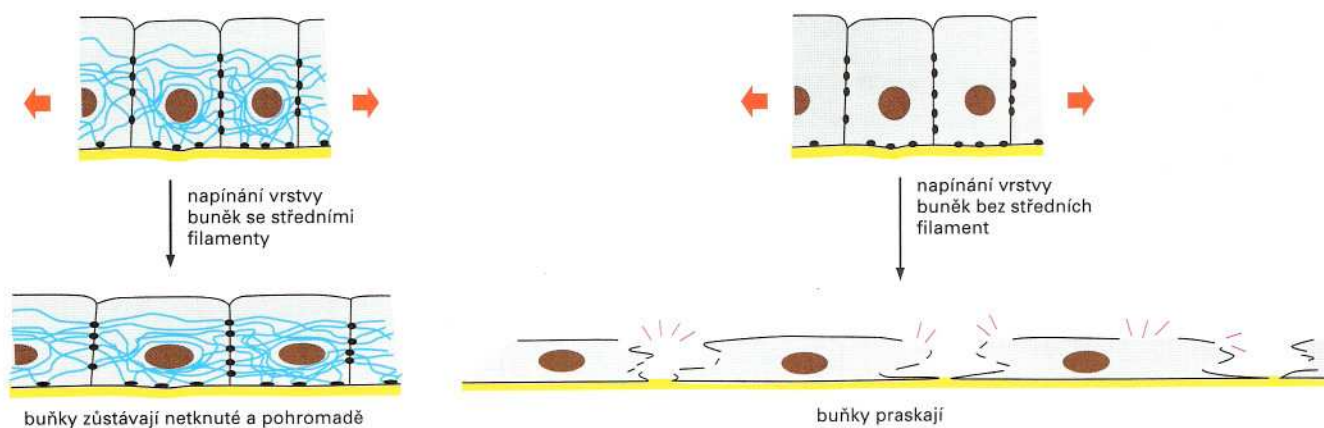
Obrázek 16-4. Stavba středního filamenta.

Monomer proteinu středního filamenta znázorněný na obr. (A) se skládá ze střední tyčinkovité oblasti a z globulárních oblastí na obou koncích. Páry monomerů se spojují do dimerů (B), dva dimery se spojují paralelně s určitým posunem a vytvářejí tetramer (C). Tetramery se uspořádávají spojením svých konců (D) a skládají se do stočené struktury (pro názornost zobrazeno rozvinuté do plochy), čímž dojde k dotvoření struktury středního filamenta, připomínající lano (E). Elektronmikroskopický snímek nahoře vlevo zobrazuje hotová střední filamenta o průměru 10 nm.

přítomny po celé délce axonů v nervových buňkách, kde vytvářejí hlavní vnitřní výztuhu v těchto extrémně dlouhých a tenkých buněčných výběžcích. Velké množství jich je také ve svalových buňkách a buňkách epiteliálních, zejména v těch, které jsou vystaveny mechanickému namáhání, jako je tomu např. v kůži. Ve všech těchto případech střední filamenta chrání buňky a buněčné membrány před roztržením, vyvolaném tahem, a to tím, že se napnou a rozloží bodově působící sílu na větší oblast (obr. 16-5). Podobného principu je využíváno při výrobě železobetonu a podobných kompozitních materiálů, v nichž jsou lineární elementy, nesoucí zátěž v tahu, zanořeny do objemové výplně.

Cytoplasmatická střední filamenta se dělí do tří tříd: (1) *keratinová filamenta* v epiteliálních buňkách; (2) *vimentinová a vimentinu příbuzná filamenta* v buňkách pojivových tkání, ve svalových buňkách a podpůrných buňkách nervového systému (neurogliové buňky); (3) *neurofilamenta* v nervových buňkách. Každý typ filament je tvořen polymerací odpovídajících proteinových podjednotek (obr. 16-6).

Keratiny jsou nejvíce různorodou rodinou. Rozdílné soubory keratinů se nachází v různých epitelech, např. ve střevní výstelce, jiné zase

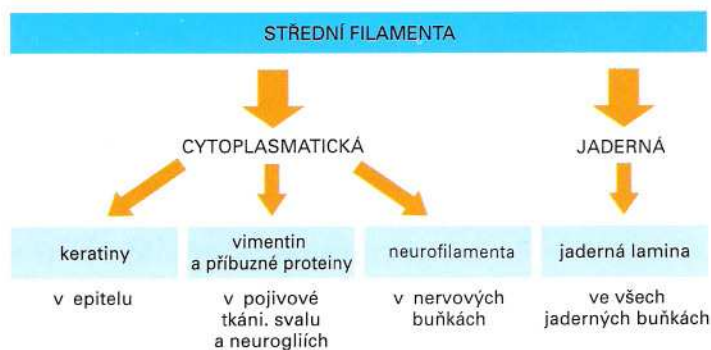


Obrázek 16-5. Střední filamenta zpevňují živočišné buňky. Pokud je vrstva epitelálních buněk natažena vnějšími silami (vznikajícími například růstem nebo pohybem okolní tkáně), síť tvořená středními filamenti a desmosomy je roztažena a bude omezovat míru natažení. Pokud by v epitelu byly přítomny pouze desmosomy bez středních filament, stejné vnější síly by způsobily silnou deformaci buněk, vedoucí až k roztržení plasmatické membrány a poškození epitelu.

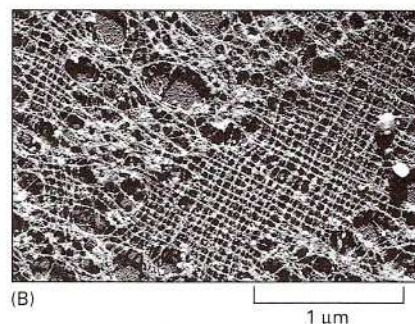
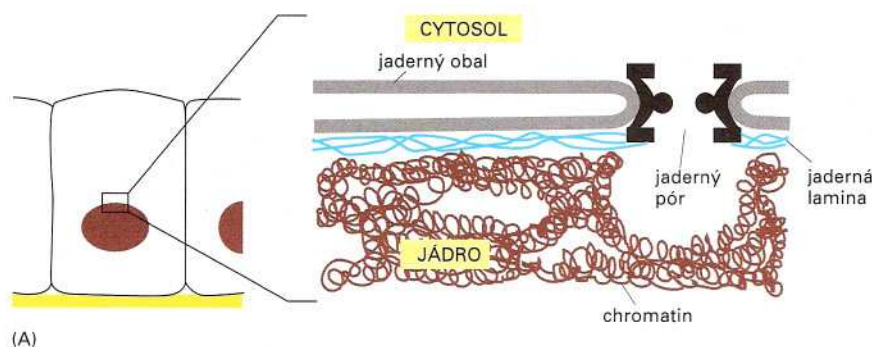
v epidermální vrstvě kůže. Speciální keratiny jsou přítomny ve vlasech, peří a drápech. V každém případě jsou keratinová vlákna tvořena směsí různých keratinových podjednotek. Keratinová vlákna jsou v epitelálních buňkách obvykle natažena napříč celou cytoplasmou a filamenta sousedních buněk jsou nepřímě spojena pomocí mezibuněčných kontaktů, zvaných *desmosomy* (viz. obr. 16-3), o nichž bude dále řeč v 19. kapitole. Konce keratinových vláken jsou zakotveny v desmosomech a kromě toho jednotlivá vlákna prostřednictvím globulárních hlaviček a konců, která vyčnívají z vlákna do stran, vytvářejí boční kontakty s dalšími buněčnými strukturami. Tato síť, zformovaná z vláken vysoce odolných proti přetržení a rozprostírající se napříč celým epitelem, rozkládá stres, k němuž dochází při natažení kůže. Důležitost této funkce prokazuje vzácné genetické onemocnění člověka, zvané *epidermolysis bullosa simplex*. Onemocnění je důsledkem mutací v keratinových genech, což znemožňuje vytváření keratinových filament v pokožce. Kůže postižených není odolná proti mechanickému stresu: i velmi slabý tlak na kůži způsobuje popraskání buněk s následnou tvorbou puchýřů.

Na rozdíl od cytoplasmatických středních filament, která připomínají lana, jaderná střední filamenta vytvářejí dvojrozměrnou síť, která vystylá a zpevňuje vnitřní jadernou membránu (obr. 16-7). Střední filamenta v této **jaderné lamině** jsou tvořena třídou proteinů, zvaných *laminy* (pozor na podobnost s názvem *laminin*, což je protein, obsažený v extracelulární matrix). Střední filamenta jaderné laminy se na rozdíl od velmi stálých středních filament cytoplasmy rozkládají a zase skládají během každého dělení buňky, kdy se jaderná membrána v mitoze rozpadá a je znovuvytvářena v každé z dceřiných buněk.

Rozpad i výstavba jaderné laminy jsou regulovány fosforylací a defosforylací laminů pomocí proteinkináz (viz Kapitulu 6.). Fosforylace laminů



Obrázek 16-6. Hlavní třídy středních filament.



Obrázek 16-7. Střední filamenta vystýlající jadernou membránu.

(A) Schéma příčného řezu jaderným obalem. Střední filamenta jaderné laminy vystýlají vnitřní stranu jaderného obalu. Předpokládá se, že poskytují místa k upevnění chromatinu, který obsahuje DNA.

(B) Elektronmikroskopický snímek části jaderné laminy žabího oocyty. Lamina je tvořena pravouhloú sítí středních filament, sestávajících z laminů. (Jaderné laminy jiných buněčných typů nejsou vždy takto pravidelně organizovány.)

mění jejich konformaci a v důsledku toho dojde k zeslabení interakcí mezi tetramery laminů a k rozpadu filament. Defosforylace na konci mitozy naopak způsobí, že se laminy opět poskládají do filament (viz obr. 17-14).

Mikrotubuly

Mikrotubuly mají v eukaryontních buňkách zásadní organizující funkci. Mají tvar dlouhých, poměrně málo ohebných a dutých trubek, které se mohou rychle rozpadnout na jednom místě a zase se rychle vystavět na místě jiném. V typické živočišné buňce mikrotubuly vyrůstají z malé struktury blízko středu buňky, nazývané *centrosom*. Z tohoto místa tubuly vyrůstají směrem k periférii buňky, a tak se vytváří systém drah, podél nichž se mohou transportovat vácčky, organely a další buněčné komponenty (obr. 16-8A). Celý systém cytoplasmatických mikrotubulů je součástí cytoskeletu a jeho hlavními funkcemi jsou určování pozice membránových buněčných organel a řízení transportu uvnitř buňky.

Pokud buňka vstupuje do mitozy, cytoplasmatické mikrotubuly se rozpadají a vytváří složitou strukturu, zvanou *dělicí vřeténko*. Jak bude popsáno v 17. kapitole, dělicí vřeténko obsahuje nástroje, které umožní, aby chromosomy byly rovnoměrně rozděleny mezi obě dceřiné buňky těsně před tím, než dojde k rozdělení samotné buňky (obr. 16-8B). Mikrotubuly mohou vytvářet i stálé struktury, jako je tomu v případě *řasinek* a *bičků* – vlasovitých struktur, schopných pravidelných úderů (obr. 16-8C). Nejrůznější typy eukaryontních buněk nesou takovéto útvary na svém povrchu a buňkám slouží k pohybu nebo k pohonu tekutiny nad buňkami. Střed eukaryontních řasinek a bičků je tvořen vysoce uspořádaným svazkem stálých mikrotubulů (bakteriální bičíky mají úplně jinou strukturu i mechanismus pohybu).

V této kapitole se budeme zabývat nejprve strukturou a mechanismem výstavby mikrotubulů, poté budeme hovořit o jejich funkcích při organizování cytoplasmy. Jejich organizující funkce závisí na spojení mik-

Otázka 16-1 Které z následujících buněčných typů mají podle vašeho názoru vysokou hustotu středních filament? Vysvětlete vaše odpovědi.

- Amoeba proteus* (volně žijící měňavka)
- Epiteliální buňka kůže.
- Hladká svalová buňka trávicí soustavy.
- Escherichia coli*.
- Nervová buňka míchy.
- Spermie.
- Rostlinná buňka.

rotubulů s přidavnými proteiny, zejména s *molekulovými motory*, které posunují orgány podél cytoplasmatických drah. Na závěr probereme strukturu a funkce řasinek a bičíků, v nichž jsou mikrotubuly trvale spojeny s molekulovými motory, pohánějícími jejich údery.

Mikrotubuly jsou duté trubice se strukturálně odlišnými konci

Mikrotubuly jsou vytvářeny z podjednotek, sestávajících z molekul **tubulinu**. Každá podjednotka je přítomna dimerem dvou velmi podobných globulárních proteinů, nazývaných α -tubulin a β -tubulin, spojených pevnými nekovalentními vazbami. Tubulinové podjednotky se navzájem spojují rovněž pomocí nekovalentních vazeb a vytvářejí stěnu dutého cylindrického mikrotubulu. Každý cylindr mikrotubulu sestává z 13 paralelních *protofilamentů*, což je řetěz tubulinových podjednotek, v němž se postupně střídají α -tubulin a β -tubulin (obr. 16-9). Proto je každé protofilamentum strukturálně polární, s α -tubulinem na jednom konci a s β -tubulinem na konci druhém. Tato strukturálně determinovaná polarita je vlastní každému protofilamentu a tím i celému mikrotubulu. Jeden konec mikrotubulu s vyčnívajícím β -tubulinem je nazýván *plus-konec*, kdežto druhý konec s α -tubulinem je nazýván *minus-konec*.

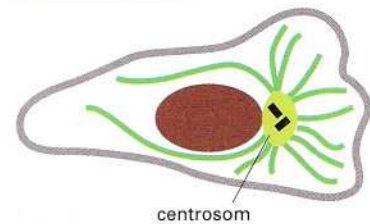
Mikrotubulus obvykle vzniká růstem z počátečního kruhu 13 tubulinových podjednotek, k němuž jsou postupně přidávány jednotlivé tubulinové dimery, až nakonec vznikne struktura dutého mikrotubulu. V pokusech *in vitro*, kdy je přítomna vysoká koncentrace čistého tubulinu, dochází k růstu na obou koncích mikrotubulu, avšak rychleji na plus-konci, než na minus-konci (to je také důvod pro jejich pojmenování). Právě popsaná polarita mikrotubulů je tedy určena vektorem samotné struktury mikrotubulu a rozdíly v chemickém složení a chování obou konců mikrotubulu. Tato polarita je zásadní pro formování mikrotubulů i pro jejich další fungování. Pokud by mikrotubuly nebyly polární, nemohly by plnit své funkce, např. určování směru transportu uvnitř buňky.

Mikrotubuly udržuje rovnováhu mezi jejich růstem a rozpadem

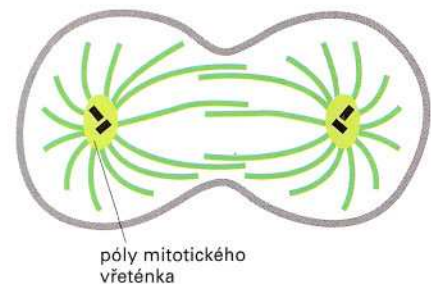
Živá buňka obsahuje jak mikrotubuly, tak volné tubulinové podjednotky. Například v typickém fibroblastu je obvykle polovina buněčného tubulinu obsažena v mikrotubulech. Druhá polovina se nachází volně v cytosolu a tvoří zásobu podjednotek, použitelných pro výstavbu mikrotubulů. Obdobnou situaci jen stěží nalezneme v případě stabilnějších středních filamentů, jejichž podjednotky jsou obvykle téměř kompletně poskládané do vláken. Relativní nestabilita mikrotubulů umožňuje neustálou rychlou změnu jejich tvaru. Je to hlavní předpoklad pro normální funkci mikrotubulů, což nám dokládají účinky látek, které znemožňují polymeraci nebo depolymeraci tubulinu.

Jako příklad si uveďme dělicí vřeténko – mikrotubulární síť, která směřuje chromosomy během mitózy (viz obr. 16-8B). Pokud na dělicí se buňku působí *kolchicin*, jenž se pevně váže k volným tubulinovým podjednotkám, je znemožněna polymerace tubulinu do mikrotubulů. Dělicí vřeténko rychle mizí a buňka zůstává v mitóze bez možnosti rozdělit chromosomy do dvou skupin. Uvedený příklad dokumentuje, že dělicí vřeténko je normálně udržováno neustálou rovnováhou mezi přidáváním a ode-

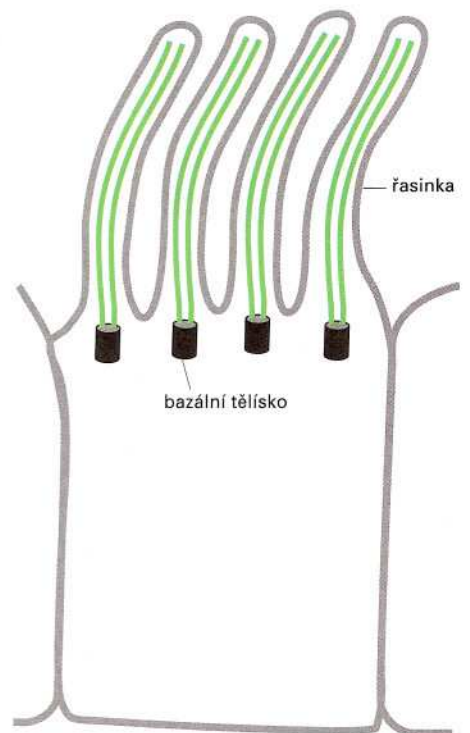
(A) buňka v interfázi



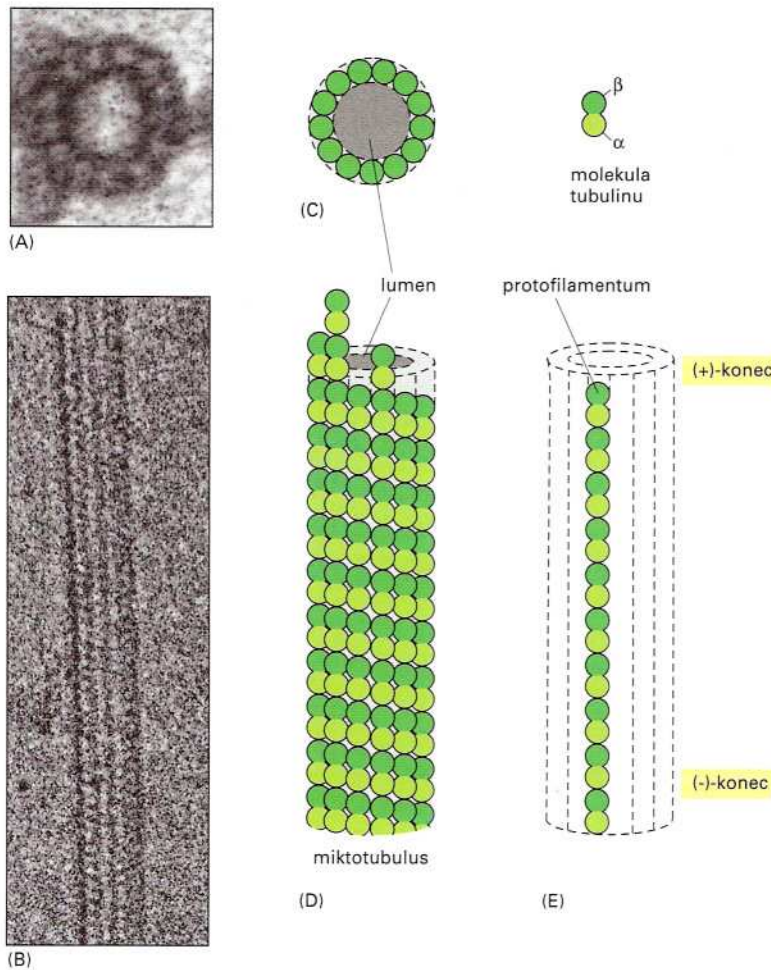
(B) dělicí se buňka



(C) buňka s řasinkami



Obrázek 16-8. Tři typická místa výskytu mikrotubulů v eukaryontních buňkách. Na rozdíl od středních filamentů, mikrotubuly (tmavě zelené) obvykle vyrůstají z organizačního centra, jako jsou (A) centrosom, (B) pól dělicího vřeténka, nebo (C) bazální tělísko řasinek.



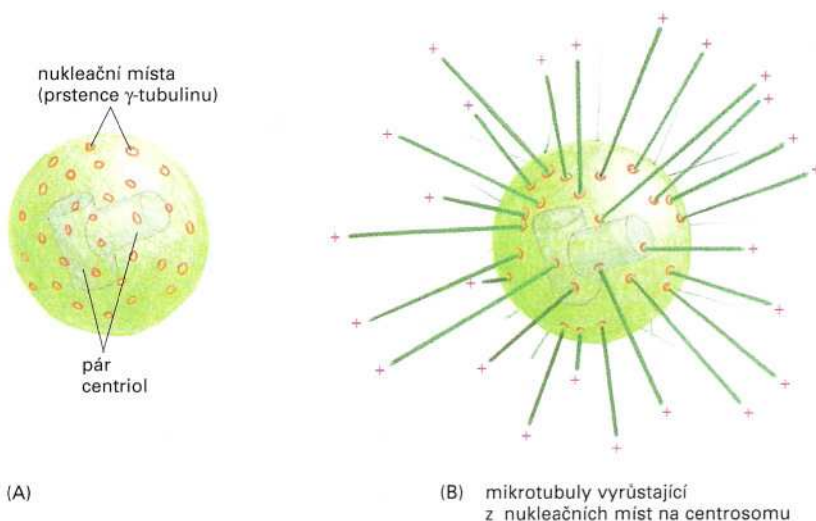
Obrázek 16-9. Struktura mikrotubulu. (A) Příčný řez mikrotubulem ukazuje kružnici, sestávající z 13 podjednotek, z nichž každá odpovídá jednomu tubulinovému dimeru. (B) Boční pohled na mikrotubulus v elektronovém mikroskopu. (C a D) Schematické zobrazení mikrotubulu, z něhož je patrné, jak se molekuly tubulinu vážou ve stěně mikrotubulu. (C) 13 molekul tubulinu na příčném řezu. (D) Boční pohled na krátký úsek mikrotubulu s tubulinovými molekulami seřazenými do paralelních řad neboli protofilament. (E) Schéma jedné tubulinové molekuly ($\alpha\beta$ -dimer) a jednoho protofilamentu ve stěně mikrotubulu. Pověšimněte si, že všechny tubulinové molekuly jsou v protofilamentech uspořádány jedním směrem, takže mikrotubulus má jasnou strukturní polaritu.

bíráním tubulinových podjednotek. Pokud je přidávání blokováno kolchicinem, odebrání podjednotek pokračuje, dokud celé vřetenko nevymizí.

Inaktivace nebo rozrušení dělicího vřetenka nakonec zabíjí dělicí se buňky. Rakovinné buňky se dělí rychleji než většina jiných buněk v těle. Proto je možné, aby se docílilo jejich přednostního zabití po podání *anti-mitotických látek*, stabilizujících (nebo naopak destabilizujících) mikrotubuly. Takovéto látky, deriváty kolchicinu nebo taxolu, jsou užívány při klinické léčbě rakoviny.

Centrosom živočišných buněk je hlavním centrem, které organizuje mikrotubuly

Mikrotubuly v buňce vyrůstají ze specializovaných organizačních center, která kontrolují jejich počet, umístění a orientaci v cytoplasmě. V živočišných buňkách je takovým centrem **centrosom**, který se obvykle nachází blízko buněčného jádra, pokud se buňka nedělí. Tento centrosom organizuje svazky mikrotubulů, které prorůstají cytoplasmou směrem od centrosomu k povrchu buňky (viz obr. 16-8A). Centrosomy obsahují stovky prstěnicových útvarů, tvořených dalším typem tubulinů, zvaným γ -tubulin. Každý z γ -tubulinových prstenců slouží jako počáteční bod, neboli *nukleační místo*, odkud vyrůstá jeden mikrotubulus (obr. 16-10A). $\alpha\beta$ -Tubulinové dimery jsou přikládány k γ -tubulinovým prstencům orientovaně, v důsledku čehož je minus-



Obrázek 16-10. Polymerace tubulinu na centrosomu. (A) Schematické zobrazení ukazuje, že centrosom sestává z amorfni proteinové hmoty, obsahující γ -tubulinové prstence – nukleační místa růstu mikrotubulů. V živočišných buňkách obsahuje centrosom pár centriol, každá z nichž je tvořena cylindricky uspořádanými krátkými mikrotubuly. (B) Centrosom s napojenými mikrotubuly. Minus-konec každého mikrotubulu je zanořen do centrosomu, v němž vyrůstá z γ -tubulinového prstence. Plus-konec mikrotubulu je volný a směřuje do cytoplasmy.

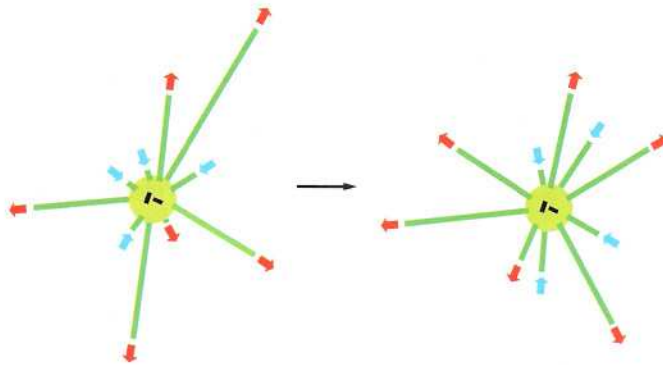
konec každého mikrotubulu ukotven na centrosomu, zatímco mikrotubulus roste pouze na opačném konci – na tom, který směřuje od centrosomu k povrchu buňky (obr. 16-10B).

Součástí centrosomů je další struktura, která se někdy zaměňuje s právě popsanými γ -tubulinovými prstenci. Jde o **centrioly**, zvláštní struktury obsažené v centrosomech většiny živočišných buněk, které sestávají z válcovitě uspořádaných krátkých mikrotubulů. Centrioly se přímo neúčastní nukleace mikrotubulů v centrosomech (samotné γ -tubulinové prstence postačují) a jejich funkce je dosud víceméně záhadná, zvláště proto, že v rostlinných buňkách se nenacházejí. Centrioly jsou velmi podobné *bazálním tělískům*, která vytvářejí organizační centra mikrotubulů v brvách a bičících (viz obr. 16-8C), jak uvidíme v této kapitole později.

Mikrotubuly potřebují k svému vzniku nukleační místa – γ -tubulinové prstence v centrosomech, neboť je daleko obtížnější začít formování nového mikrotubulu skládáním $\alpha\beta$ -tubulinových dimerů do prstence, než přikládáním takovýchto dimerů k již existujícímu zárodku mikrotubulu. Vyčištěný volný $\alpha\beta$ -tubulin může v roztoku samovolně polymerovat *in vitro*, pokud je ve vysoké koncentraci. V živé buňce je koncentrace $\alpha\beta$ -tubulinu podstatně nižší a nestačí pro vyplnění prvního obtížného kroku, totiž vytvoření prvního prstence nového mikrotubulu. Přítomnost organizačních center, obsahujících nukleační místa, spolu s udržováním nízké koncentrace volného $\alpha\beta$ -tubulinu dává buňce možnost kontrolovat, kde se budou nové mikrotubuly vytvářet.

Rostoucí mikrotubuly vykazují dynamickou nestabilitu

Pokud již došlo k nukleaci mikrotubulu, jeho plus-konec se prodlužuje směrem od organizačního centra pomocí přikládání dalších podjednotek; tento růst může probíhat po mnoho minut. Potom náhle dojde ke změně – mikrotubulus se začne rychle zkracovat směrem k organizačnímu centru v důsledku ztráty podjednotek tubulinu na svém volném konci. Může dojít jen k částečnému zkrácení a poté opět k náhlému růstu, nebo může mikrotubulus úplně vymizet a poté je nahrazen novým rostoucím mikrotubulem ze stejného γ -tubulinového prstence (obr. 16-11).



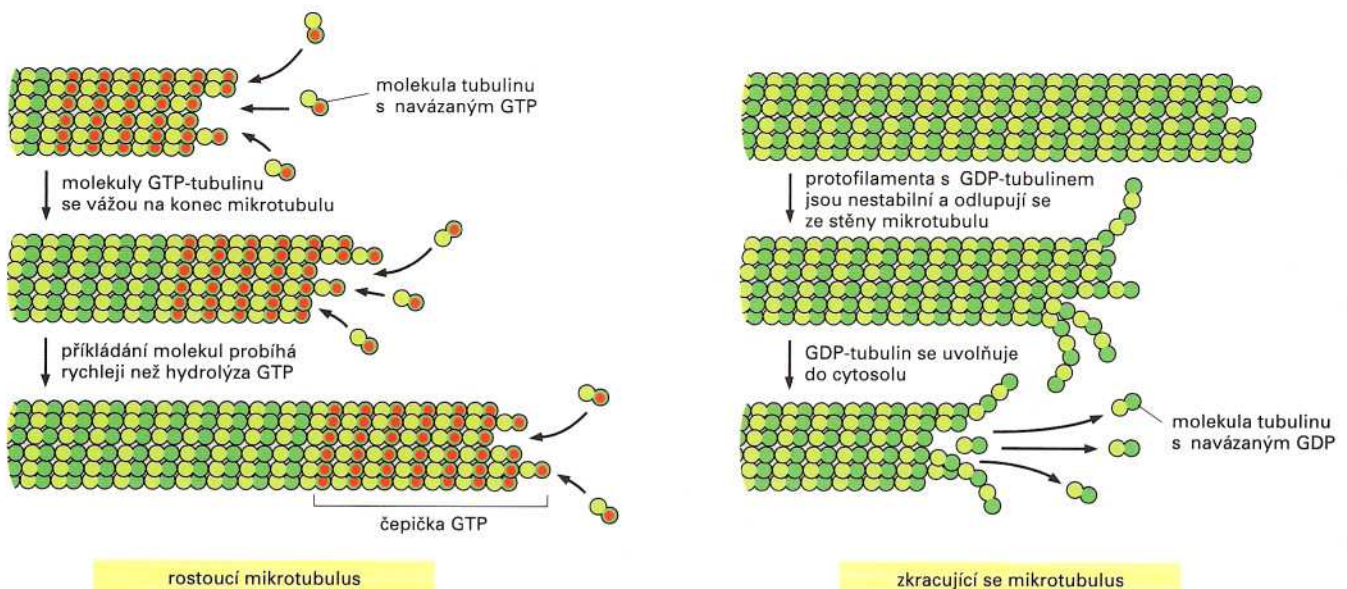
Obrázek 16-11. Růst a smršťování seskupení mikrotubulů. Seskupení mikrotubulů, ukotvených na centrosomu, se neustále mění, jak nové mikrotubuly rostou (červené šipky) a starší mikrotubuly se zkracují (modré šipky).

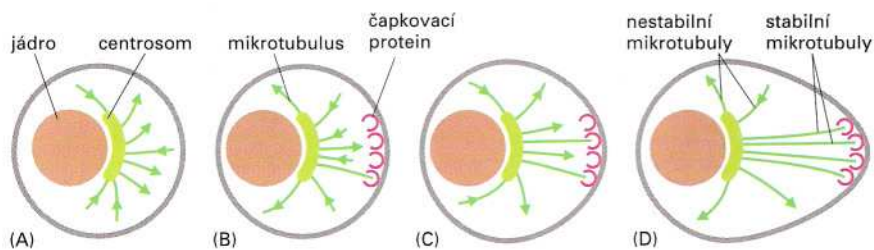
Toto zvláštní chování mikrotubulů, označované jako **dynamická nestabilita**, má původ ve schopnosti tubulinových molekul hydrolyzovat GTP. Každý volný tubulinový dimer obsahuje jednu pevně navázanou molekulu GTP, která je hydrolyzována na GDP (stále pevně vázané) krátce poté, co byl přidán na konec rostoucího mikrotubulu. Tubulinové molekuly s pevně navázaným GTP se velmi efektivně uspořádávají do stěny mikrotubulu, kdežto tubulinové molekuly, nesoucí GDP, mají odlišnou konformaci a vazby mezi nimi jsou slabší.

Pokud dochází k rychlé polymeraci, tubulinové molekuly jsou přidávány na konec mikrotubulu rychleji, než je hydrolyzováno GTP, které nesou. Tak vzniká mikrotubulus, jehož konec je tvořen výlučně GTP-tubulinovými podjednotkami. Protože se GTP-tubulinové podjednotky pevně vážou jedna k druhé, vzniká čepička na konci mikrotubulu, označovaná jako **GTP-čepička**, která zabraňuje depolymeraci mikrotubulu. Protože mikrotubulus může depolymerovat jen odebráním podjednotek na pluskonce, rostoucí mikrotubulus bude dále pokračovat ve svém růstu. Jelikož ale chemické procesy probíhají náhodně, tubulin na volném konci mikrotubulu příležitostně zhydrolyzuje vázaný GTP dříve, než je navázána další podjednotka tubulinu. Tím dojde k utvoření konce mikrotubulu, složeného z podjednotek GDP-tubulinu, což posune rovnováhu směrem k odebrání tubulinových podjednotek. Hlavní část mikrotubulu je tvořena GDP-

Otázka 16-2 Vysvětlete, proč je daleko jednodušší přidávat tubulinové podjednotky k již existujícímu mikrotubulu, než začít vytvářet nový mikrotubulus? Vysvětlete, jak γ -tubulin v centrosomu pomáhá při řešení tohoto problému.

Obrázek 16-12. Hydrolyza GTP je zřejmě používána ke kontrole růstu mikrotubulů. Tubulinové dimery nesoucí GTP (červené) se vážou jeden k druhému pevněji, než tubulinové dimery s navázaným GDP (tmavě zelené). Proto mikrotubuly, jež mají čerstvě přidané tubulinové dimery s navázaným GTP mají tendenci pokračovat v růstu. Občas však dojde v „GTP-čepičce“ (zejména pokud je růst mikrotubulu pomalý) k hydrolyze GTP na GDP, dříve než se stačí navázat nové tubulinové dimery nesoucí GTP. Tím dojde ke ztrátě GTP-čepičky; dimery s navázaným GDP jsou v tubulinovém polymeru méně pevně vázány a mohou být rychle uvolněny z volného konce mikrotubulů, takže se mikrotubulus začne rychle zkracovat.





Obrázek 16-13. Selektivní stabilizace mikrotubulů může buňku polarizovat.

Nově vytvořený mikrotubulus může v buňce přetrvávat, pouze když jsou oba jeho konce chráněny před depolymerací. V buňkách je minus-konec mikrotubulu obvykle chráněn organizačním centrem, z něhož mikrotubulus vyrůstá. Plus-konce mikrotubulu jsou nejprve volné, ale mohou být stabilizovány navázáním jiných proteinů. Obrázek znázorňuje nepolarizovanou buňku (A) s novými mikrotubuly vyrůstajícími z centrosomu a zkracujícími se nazpět k centrosomu zcela náhodně všemi směry. Pokud se některé z těchto mikrotubulů v buněčném kortexu navážou na speciální proteiny, vytvářejícími čepičku mikrotubulu (capping proteins), dojde ke stabilizaci volného plus-konce mikrotubulů (B). Tato selektivní stabilizace způsobí rychlou změnu orientace soustavy mikrotubulů (C) a silnou polarizaci buňky (D).

tubulinem; jakmile tedy depolymerace konce tubulu jednou začne, může pokračovat velkou rychlostí a mikrotubulus může vymizet (obr. 16-12). Uvolněné molekuly GDP-tubulinu se stávají součástí zásoby volných molekul tubulinu v cytosolu. Jejich GDP je vyměněn za GTP a poté se opět stávají schopnými vazby s koncem dalšího rostoucího mikrotubulu.

Jaký je význam takového chování mikrotubulů? Následkem dynamické nestability centrosomy (nebo jiná organizační centra) neustále vystřelují nové mikrotubuly, které různými směry jakoby ohledávají okolí a pak se zase stahují zpět. Mikrotubuly, rostoucí od centrosomu ale také mohou být stabilizovány, pokud dojde nějakým způsobem ke zpevnění plus-konce ukotvením k nějaké jiné molekule nebo buněčné struktuře. Pokud se takový mikrotubulus připevní na nějakou buněčnou strukturu, dochází k vytvoření relativně stabilního spojení mezi takovou strukturou a centrosomem (obr. 16-13). Centrosom lze srovnat s rybářem, lovcím na umělou mušku: pokud nic nezabere, vlasec je ihned stažen zpět a rybář provede nový hod; pokud však ryba zabere, vlasec se stává pevným pojitkem mezi rybou a rybářem. Tento jednoduchý princip náhodného průzkumu a selektivní stabilizace umožňuje centrosomům nebo jiným organizačním centrům vytvořit vysoce uspořádaný systém mikrotubulů, spojujících vybrané části buňky. Tento systém je využíván pro určení specifických poloh buněčných organel, jak uvidíme níže.

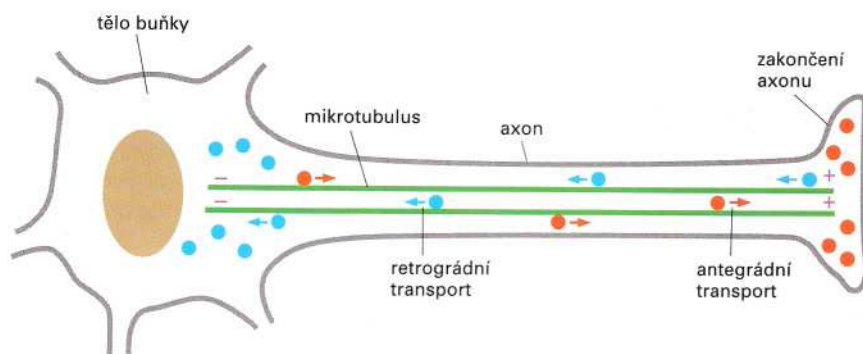
Mikrotubuly organizují vnitřek buňky

Buňky jsou schopny podle potřeby měnit dynamickou nestabilitu svých mikrotubulů. Například když buňka vstupuje do mitózy, mikrotubuly jsou nejprve velmi dynamické, střídavě rostou a zase se smršťují, daleko častěji, než je obvyklé v cytoplasmě nedělících se buněk. To jim umožní se rychle přeskupit a vytvořit mitotické vřetenko. Naproti tomu pokud je buňka již diferencována do specializovaného buněčného typu a fixována v určité pozici, dynamická nestabilita mikrotubulů je často potlačena proteiny, které se vážou ke koncům mikrotubulů nebo podél mikrotubulů a stabilizují je tak proti rozpadu. Takovéto stabilizované mikrotubuly pak fixují nitrobuněčné uspořádání.

Většina diferencovaných živočišných buněk je *polarizována*: například z nervových buněk vyrůstá na jedné straně axon a na straně druhé dendrity; buňky, jež jsou specializovány na buněčnou sekreci, mají Golgiho aparát umístěn směrem k místu sekrece, atd. Buněčná polarita odráží polarizované systémy mikrotubulů uvnitř buňky, jež pomáhají umístit organely na správné místo v buňce a které směřují dopravní proudy mezi různými částmi buňky. Názorným příkladem je nervová buňka, kde jsou v axonu všechny mikrotubuly směřovány svými plus-konci směrem k axonovému zakončení (obr. 16-14). Podél těchto orientovaných drah buňka posílá různé náklady, jako membránové váčky,

Otázka 16-3 Dynamická nestabilita způsobuje střídavý růst a zkracování mikrotubulů. Podívejme se na různé možnosti v případě mikrotubulu, který se nachází ve fázi zkracování.

- Co se musí stát na konci mikrotubulu, aby se přestal zkracovat a začal růst?
- Jak by mohla změna koncentrace tubulinových podjednotek ovlivnit tento přechod?
- Co by se stalo, pokud by v roztoku byl přítomen pouze GDP, ale žádný GTP?
- Co by se stalo, pokud by roztok obsahoval analog GTP, který nelze hydrolyzovat?



Obrázek 16-14. Transport podél mikrotubulů v axonu nervové buňky.

V nervových buňkách směřují všechny mikrotubuly (od jednoho do stovek) v axonu stejným směrem – svými plus-konci k axonovému zakončení. Orientované mikrotubuly slouží jako dráhy pro směrování transportu látek, syntetizovaných v těle buňky, jež jsou potřebné v axonovém zakončení (jako jsou například membránové proteiny, potřebné pro růst axonu). Cesta látek v axonu, který vyrůstá například z míchy a vede k ramennímu svalu, trvá přibližně dva dny. Tento *dopředný* neboli *antegrádní* transport látek je zajišťován jedním souborem molekulových motorů (*červená kolečka*), kdežto *zpětný* neboli *retrográdní* transport v opačném směru je zajišťován jiným souborem molekulových motorů (*modrá kolečka*). Retrográdní transport nese látky pohlcené koncem axonu nebo produkty rozpadu proteinů a dalších molekul směrem k těle buňky.

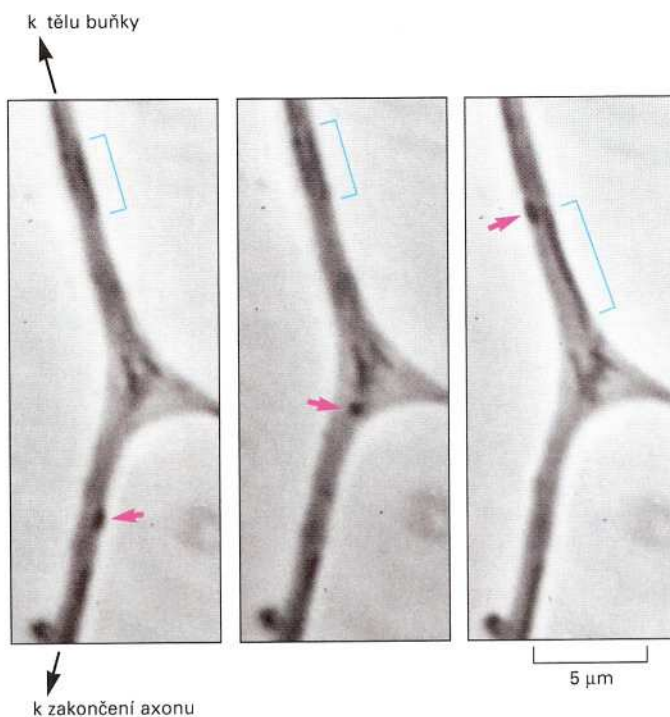
nebo proteiny určené k sekreci, jež byly vyrobeny v těle buňky a jsou potřebné na vzdáleném konci axonu.

Některé náklady se pohybují rychlostí více než 10 cm denně, což však stejně znamená, že náklad může cestovat týden nebo i více na konec dlouhých axonů u některých živočichů. Nicméně pohyb podél mikrotubulů je nesrovnatelně rychlejší a účinnější, než kdyby k pohybu docházelo pouhou pasivní difuzí. Proteinové molekule, cestující jen pomocí difuze, by trvalo roky, než by se dostala na konec dlouhého axonu, pokud by se tam ovšem vůbec dostala (viz otázku 16-10).

Je však důležité si uvědomit, že mikrotubuly v živých buňkách nikdy nepracují osamoceně. Jejich funkce, stejně jako je tomu u ostatních cytoskeletálních struktur, závisí na velkém množství přídavných proteinů, jež se vážou k mikrotubulům a mají různé funkce. Některé proteiny, asociované s mikrotubuly, je stabilizují a znemožňují jejich demontáž; jiné proteiny zase napojují mikrotubuly k dalším buněčným strukturám, včetně dalších cytoskeletálních filament. V důsledku toho všechny komponenty cytoskeletu navzájem interagují a jejich funkce mohou být koordinovány. Mikrotubuly také ovlivňují rozmístění membrán v buňkách, zejména díky proteinovým molekulovým motorům, které se pohybují podél mikrotubulů. Jak ukážeme níže, molekulové motory využívají energii, uvolňovanou během hydrolýzy ATP, k transportu organel, membránových váčků a dalších složek podél drah v cytoplasmě, vytýčených mikrotubuly a aktinovými vlákny.

Molekulové motory pohánějí vnitrobuněčný transport

Pozorujeme-li živou buňku ve světelném mikroskopu, zjistíme, že cytoplasma je v neustálém pohybu: mitochondrie, malé membránové organely a váčky se pohybují malými trhavými pohyby. Pohyb obvykle trvá po krátkou dobu, pak se částice zastaví a po chvíli opět pokračují v pohybu (obr. 16-15). Tento pohyb skokem je podstatně pravidelnější a vede určitým směrem na rozdíl od neustálých krátkých pohybů na všechny strany, které mají původ v náhodném tepelném Brownově pohybu. V eukaryontních buňkách jsou do vnitrobuněčných pohybů zapojeny jak mikrotubuly, tak aktinová filamenta. V obou případech jsou pohyby vytvářeny **molekulovými motory**, bílkovinami, jež se vážou k aktinovým vláknům nebo mikrotubulům a přeměňují energii z opakovaných cyklů hydrolýzy ATP v mechanický pohyb. Posunují se tak podél aktinových filament nebo mikrotubulů vždy v jednom určitém směru (viz obr. 5-40). Přitom se na ně vážou další buněčné komponenty a tento náklad je posunován podél vláken. Byly identifikovány desítky takových molekulových motorů. Liší se



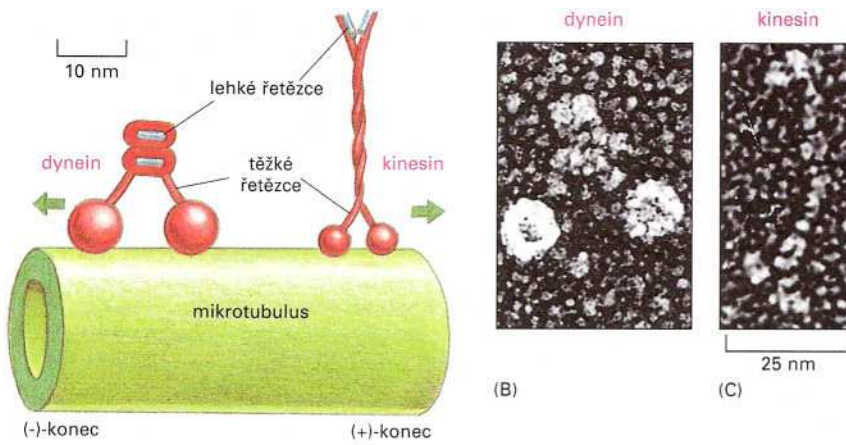
Obrázek 16-15. Nitrobuněčné pohyby organel. Tři fotografie axonu živé nervové buňky byly pořízeny po sobě s časovým odstupem méně než jedna minuta mezi prvním a třetím snímkem. Červená šipka ukazuje na velkou membránovou organelu, pohybující se rychle směrem k tělu nervové buňky. Modrá úsečka ukazuje polohu mitochondrie, pomalu se pohybující směrem k axonovému zakončení.

typem vlákna, k němuž se mohou vázat, ve směru, kterým se pohybují podél vláken a podle nákladu, který přenášejí.

Molekulové motory, které se pohybují podél mikrotubulů v cytoplasmě (jak je tomu například v axonech nervových buněk), patří do dvou skupin: **kinesiny** se pohybují směrem k plus-konci mikrotubulu (tedy směrem od centrosomu k periferii buňky; viz obr. 16-14), kdežto **dyneiny** se pohybují směrem k minus-konci mikrotubulu (tedy směrem k centrosomu; dovnitř buňky na obr. 16-14). Kinesiny i dyneiny mají dvě globulární hlavičky, které vážou ATP, a konec (obr. 16-16). Tyto hlavičky interagují s mikrotubuly prostorově specificky, takže se mohou k mikrotubulu navázat vždy pouze jedním směrem. Konec molekulového motoru se obvykle pevně váže k určitým buněčným komponentám, jakou jsou váčky nebo organely; tím se určuje, jaký typ nákladu bude převážen (obr. 16-17). Globulární hlavičky kinesinu a dyneinu jsou enzymy, schopné hydrolyzovat ATP (ATPázy). Tato reakce poskytuje energii pro cyklicky se opakující změny konformace molekuly hlavičky molekulového motoru. Pohyb podél mikrotubulu se uskutečňuje střídáním vazby, uvolnění a opětovné vazby k mikrotubulu (viz obr. 5-40).

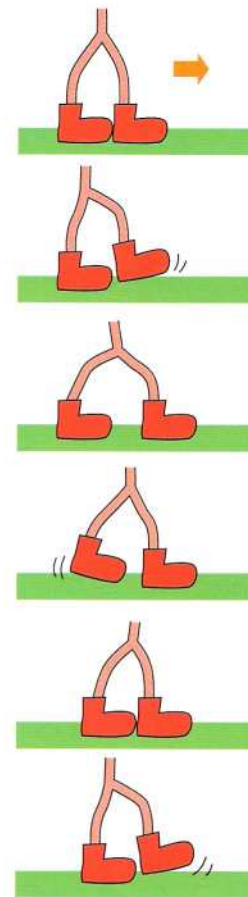
Organely se pohybují podél mikrotubulů

Mikrotubuly a s nimi asociované proteiny, molekulové motory, hrají důležitou úlohu při rozmísťování membránových organel v eukaryontní buňce. Podívejme se kupříkladu na živočišnou buňku, v níž se cisterny endoplasmatického retikula bohatě větví a zasahují skoro do všech okrajových oblastí buňky, kdežto Golgiho aparát je umístěn jen ve střední části buňky poblíž centrosomu (obr. 16-18A). Umístění a orientace endoplasmatického retikula i Golgiho aparátu jsou závislé na mikrotubulech. Membrány endoplasmatického retikula jsou nataženy od míst na povrchu buněčného jádra, kde se spojují s jadernou membránou, směrem k peri-



(A)

Obrázek 16-16. Molekulové motory spojené s mikrotubuly. (A) Kinesiny a cytoplasmatické dyneiny jsou molekulové motory, které se pohybují v opačném směru podél mikrotubulů. Tyto proteiny (znázorněné zde ve skutečném poměru velikostí) se skládají ze dvou stejných těžkých řetězců a z několika menších lehkých řetězců. Každý těžký řetězec vytváří globulární hlavičku, jež interaguje s mikrotubuly. (B) Elektronmikroskopický snímek cytoplasmatického dyneinu, pořízený metodou mrazového leptání. (C) Elektronmikroskopický snímek kinesinu, pořízený stejnou metodou. (D) Kresba proteinu – molekulového motoru, ukazující ATP-závislé „kráčení“ podél mikrotubulu.

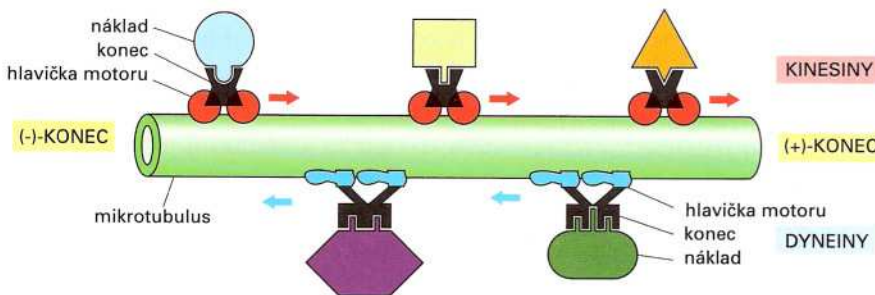


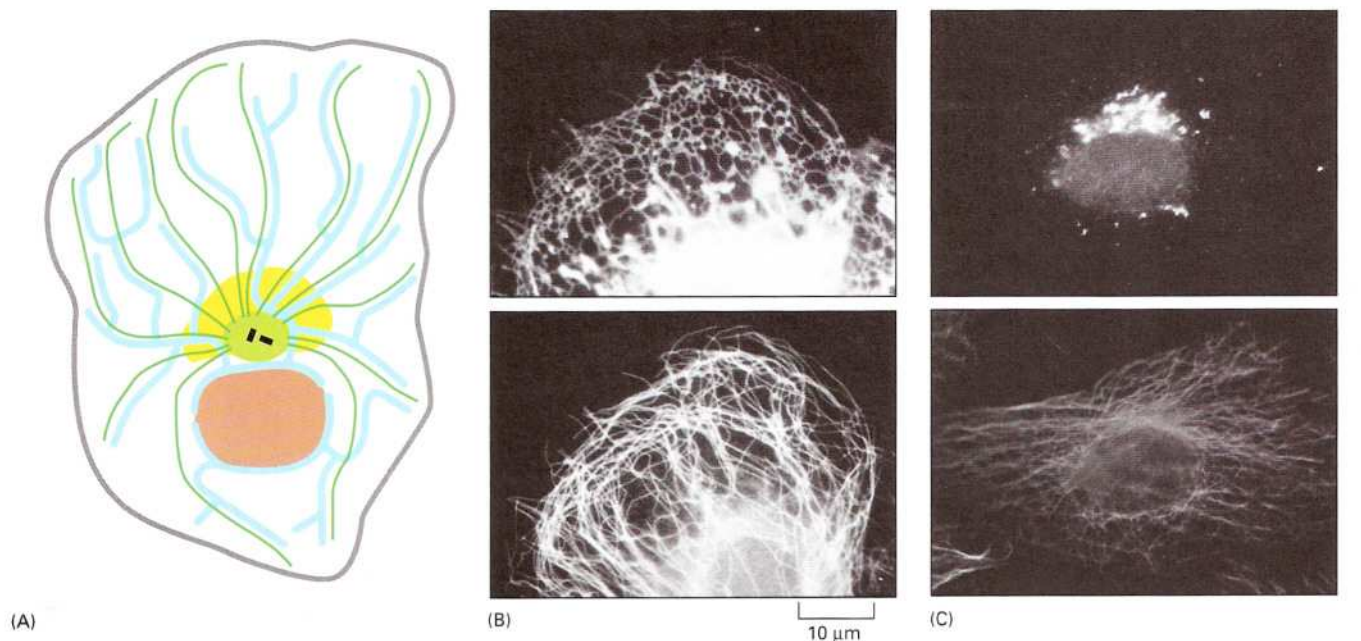
(D)

ferii buňky (viz obr. 1-15). Membrány endoplasmatického retikula přitom jsou orientovány podél mikrotubulů, vyrůstajících od centrosomu a dosahujících až k plasmatické membráně. Během vývoje buňky dochází k růstu endoplasmatického retikula; kinesiny, upevněné na vnější stranu membrán endoplasmatického retikula, je roztahují podél mikrotubulů – celý proces lze přirovnat k roztahování sítě. Dyneiny táhnou membrány Golgiho aparátu na opačnou stranu – směrem do centra buňky k centrosomu. Tímto způsobem dochází ke specifické prostorové organizaci nitrobuněčných membránových útvarů, na níž závisí mnoho buněčných procesů.

Pokud buňky ovlivníme nějakou z drog, která rozkládá mikrotubuly (jako např. kolchicin), výše popsané prostorové rozmístění obou membránových organel se dramaticky změní. Endoplasmatické retikulum, jež má spojení s jadernou membránou, kolabuje v centru buňky. Golgiho aparát, který není spojen s žádnou další buněčnou organelou, je fragmentován do neuspořádaných malých váčků. Pokud je droga odstraněna, molekulární motory opět začnou posunovat membrány obou organel podél nově rostoucích mikrotubulů a organely se navrátí na svá výchozí místa. Normální poloha zmíněných organel v buňce je určována interak-

Obrázek 16-17. Molekulové motory, transportující náklady podél mikrotubulů. Kinesiny se pohybují směrem k plus-konci mikrotubulů, kdežto dyneiny se pohybují k minus-konci mikrotubulů. Oba typy molekulárních motorů existují v mnoha formách, o nichž předpokládáme, že přenášejí rozdílné náklady. Druhý konec proteinu – molekulového motoru určuje, jaký náklad je protein schopen přenášet.





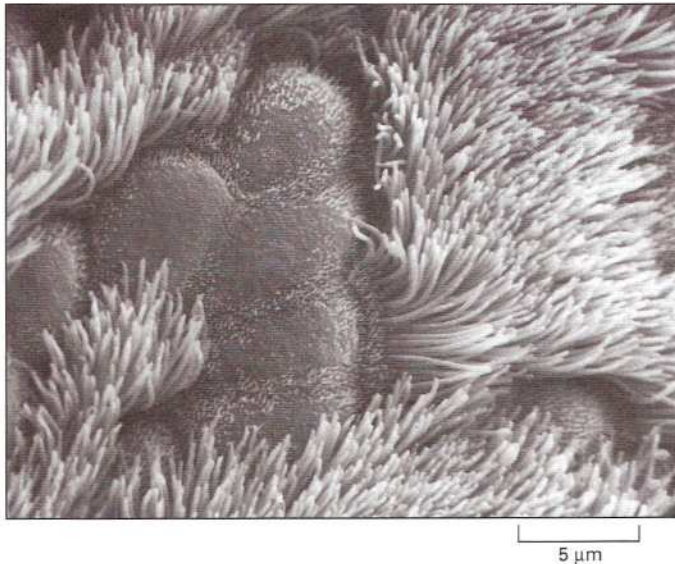
cemí receptorových proteinů, umístěných na povrchu membrán endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu. Tyto receptory se vážou na molekulové motory: na kinesiny v případě endoplasmatického retikula a na dyneiny v případě Golgiho aparátu

Řasinky a bičíky obsahují stabilní mikrotubuly, jimiž pohybuje dynein

Výše v kapitole jsme se již zmínili, že mnoho buněčných mikrotubulů je stabilizováno díky jejich spojení s dalšími proteiny. Proto již více nevykazují dynamickou nestabilitu. Buňky používají stabilní mikrotubuly jako pevné nosníky pro výstavbu různých polarizovaných struktur, včetně pozoruhodných řasinek a bičíků, které eukaryotním buňkám umožňují prohánět tekutiny podél buněčného povrchu. **Řasinky** (cilia, cilium v jednotném čísle) jsou vláskovité výběžky buněčného povrchu o průměru kolem 0,25 µm, jež nacházíme u mnoha buněčných typů. Jednotlivá řasinka obsahuje jádro ze stabilizovaných mikrotubulů, uložených ve svazku a vyrůstajících z *bazálního tělíska* v cytoplasmě. Bazální tělísko je organizačním centrem každé řasinky. Celý povrch řasinky je kryt plasmatickou membránou (viz obr. 16-8C). Hlavní funkcí řasinek je prohánění tekutin podél povrchu buňky, nebo pohon jednotlivých buněk ve vodném prostředí. Například někteří prvoci užívají řasinky jak ke shánění částic potravy, tak pro svůj pohyb. Povrch epitelálních buněk lidského dýchacího traktu je pokryt obrovským počtem řasinek (s hustotou více než miliarda na čtvereční centimetr), které posunují vrstvy hlenu s vychytanými prachovými částicemi a mrtvými buňkami nahoru směrem k hrtanu, odkud jsou pak spolknuty nebo odstraněny z těla. Řasinky buněk stěny vejcovodu vytvářejí proud, který pomáhá posunovat vajíčka ve vejcovodu.

Každá řasinka se pohybuje bičovitým způsobem, podobným pohybem plavce při stylu prsa (obr. 16-20). Bičíky (flagella, flagellum v jednotném čísle), které pohánějí spermie a mnohé druhy prvoků, se velmi podobají řasinkám, obvykle jsou však mnohokrát delší. Jsou uzpůsob-

Obrázek 16-18. Umístování organel pomocí mikrotubulů. (A) Schematické znázornění buňky s vyznačeným typickým uspořádáním mikrotubulů (*tmavě zeleně*), endoplasmatického retikula (*modré*) a Golgiho aparátu (*žlutě*). Buněčné jádro je zobrazeno *hnědě*, centrosomy *světle zeleně*. (B) Buňka obarvená protilátkami k bílkovinám endoplasmatického retikula (*horní obrázek*) a k mikrotubulům (*spodní obrázek*). Molekulové motory roztahují endoplasmatické retikulum podél mikrotubulů. (C) Buňka obarvená protilátkami ke složkám Golgiho aparátu (*horní obrázek*) a k mikrotubulům (*spodní obrázek*). V tomto případě posunují molekulové motory Golgiho aparát do středu buňky, do jeho obvyklé polohy poblíž centrosomu.



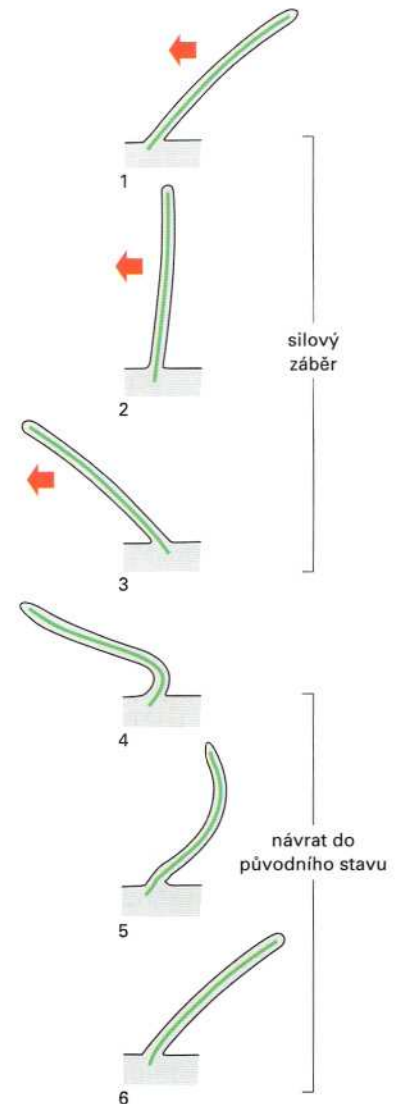
Obrázek 16-19. Řasinky. Snímek řasinkového epitelu vystylající dýchací trakt člověka, pořízený řádkovacím elektronovým mikroskopem. Silné svazky řasinek na řasinkových buňkách se střídají s vypouklými povrchy epiteliálních buněk, nenesoucích řasinky.

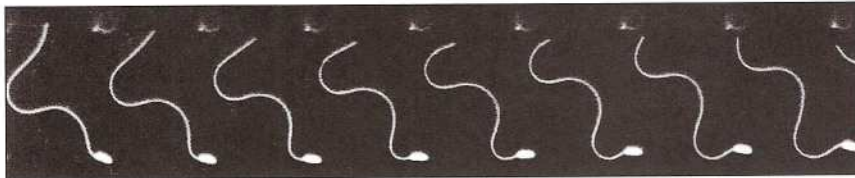
beny k pohybu celou buňkou: místo bičovitých pohybů vyvíjejí pravidelné podélné vlnovité pohyby, které buňku posunují v kapalině (obr. 16-21).

Mikrotubuly řasinek a bičků se poněkud liší od cytoplasmatických mikrotubulů. Jsou uspořádány do zvláštního a specifického seskupení, jež bylo jedním z prvních překvapivých objevů elektronové mikroskopie. Příčný řez řasinkou ukazuje devět dvojic mikrotubulů, uspořádaných kolem páru jednoduchých mikrotubulů (obr. 16-22A). Uvedené schéma 9+2 je charakteristické pro téměř všechny formy eukaryontních řasinek a bičků, počínaje prvoky a konče člověkem.

Pohyb řasinek a bičků je generován prohýbáním centrální části útvaru v důsledku posunu jednotlivých mikrotubulů. Mikrotubuly jsou zde asociovány s množstvím přídatných proteinů, umístěných v pravidelných intervalech podél svazku mikrotubulů (obr. 16-22B). Některé slouží jako příčné vzpěry, držící svazek mikrotubulů pospolu, jiné zase vyvíjejí sílu, způsobující prohnutí řasinky. *Řasinkový dynein* je nejdůležitější z těchto přídatných proteinů, protože je zodpovědný za generování síly k ohybu svazku mikrotubulů. Tento dynein je velmi podobný cytoplasmatickému dyneinu a pracuje naprosto stejným způsobem. Jeho konec je spojen s jedním mikrotubulem, kdežto jeho hlavičky jsou připojeny k vedlejšímu mikrotubulu. Při vykonávání své práce se dynein snaží posunout jeden mikrotubulus vůči druhému; to však není možné, neboť tubuly jsou navzájem spojeny četnými příčnými vzpěrami. Proto je pohyb, který by byl jednoduchým paralelním posuvem jednoho tubulu vůči druhému, transformován do ohybu řasinky (obr. 16-23).

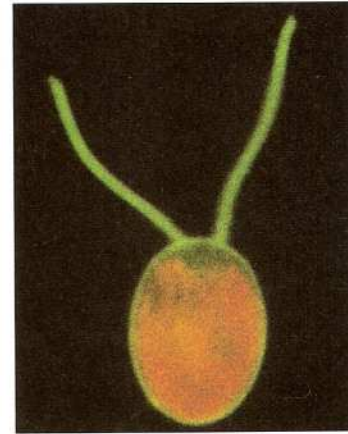
Obrázek 16-20. Údery řasinky. Každá řasinka se pohybuje v cyklu, sestávajícím ze silového úderu, následovaného fází návratu. Během rychlého silového úderu je řasinka plně natažena a tekutina je prohnána po povrchu buňky; v pomalejší fázi návratu se řasinka prohýbá a postupně se dostává do výchozí polohy bez vyvolání silnější turbulence v okolní tekutině. Každý cyklus trvá kolem 0,1-0,2 vteřiny a generuje sílu, jež je kolmá k ose řasinky.





(A)

Obrázek 16-21. Bičinky. (A) Opakované vlnité pohyby bičíku spermie byly zachyceny stroboskopickým osvětlením s frekvencí 400 záblesků za vteřinu. (B) Zelená řasa *Chlamydomonas* plave pomocí dvojice bičků, jež vykonávají opakované pohyby připomínající plavecký styl prsa.

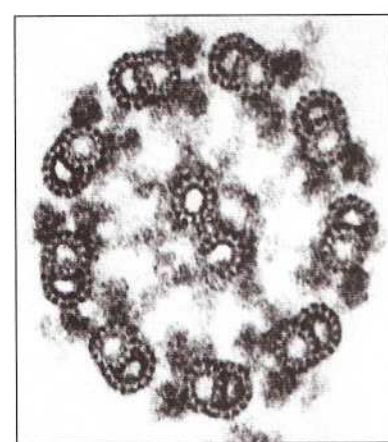


(B) 10 μm

Aktinová vlákna

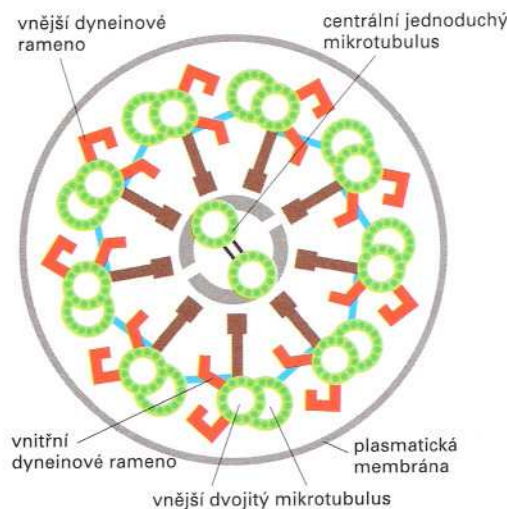
Aktinová vlákna se nacházejí ve všech eukaryontních buňkách a jsou zásadně důležitá pro buněčný pohyb, zejména v případech, kdy je pohyb uskutečňován prostřednictvím buněčného povrchu. Bez aktinových vláken by se živočišná buňka nebyla schopna pohybovat na podkladu, nemohla by pohlcovat velké částice pomocí fagocytozy, ani by se nemohla dělit. Většina aktinových vláken je, podobně jako mikrotubuly, nestabilní. Mohou však v buňkách vytvářet i stabilní struktury, jako například kontraktilní systém ve svalech. Aktinová vlákna se spojují s velkým počtem *aktin-vázajících proteinů*, které umožňují, aby vlákna vykonávala různorodé buněčné funkce. V závislosti na spojení s takovými proteiny se aktinová vlákna mohou stát pevnými a relativně stálými strukturami, jako v mikrovlnkách (*microvilli*) apikální části buněk, tvořících výstelku tenkého střeva (obr. 16-24A). Dalším příkladem je vytváření malých *kontraktilních svazků* v cytoplasmě, jež mohou pracovat jako miniaturní nitrobuňčné „svaly“ (obr. 16-24B). Aktinová vlákna se mohou stát relativně pevnými strukturami i v dočasně se vytvářejících buněčných strukturách, např. ve výběžcích přední části buňky, pomocí nichž buňka „ohmatává“ své okolí (obr. 16-24C), nebo v *kontraktilním prstenci*, jenž zaškrcením rozděluje cytoplasmu na dvě části během dělení živočišných buněk (obr. 16-24D). Přítomnost určitého aktin-vázajícího proteinu v buňce určuje, jaké typy uspořádání aktinových vláken se v buňce vytvoří. Ačkoliv jsou aktinová vlákna a mikrotubuly vytvářeny z napros-

Otázka 16-4 V řasince jsou ramena dyneinu uspořádána takovým způsobem, že při aktivaci hlavičky dyneinu tlačí sousední dvojici mikrotubulů směrem k periférii řasinky a nahoru směrem k vrcholu řasinky. Prohlédněte si příčný řez řasinkou na obr. 16-22. Proč by nemohlo dojít k prohnutí řasinky, pokud by všechny molekuly dyneinu byly aktivovány zároveň? Navrhněte, jak by mohla v řasince být aktivita dyneinu rozložena, aby docházelo k ohybu řasinky jedním směrem. Navržené schéma musí souhlasit se směrem tlaku dyneinu na mikrotubuly (viz obr. 16-23) a také se známou strukturou řasinky.



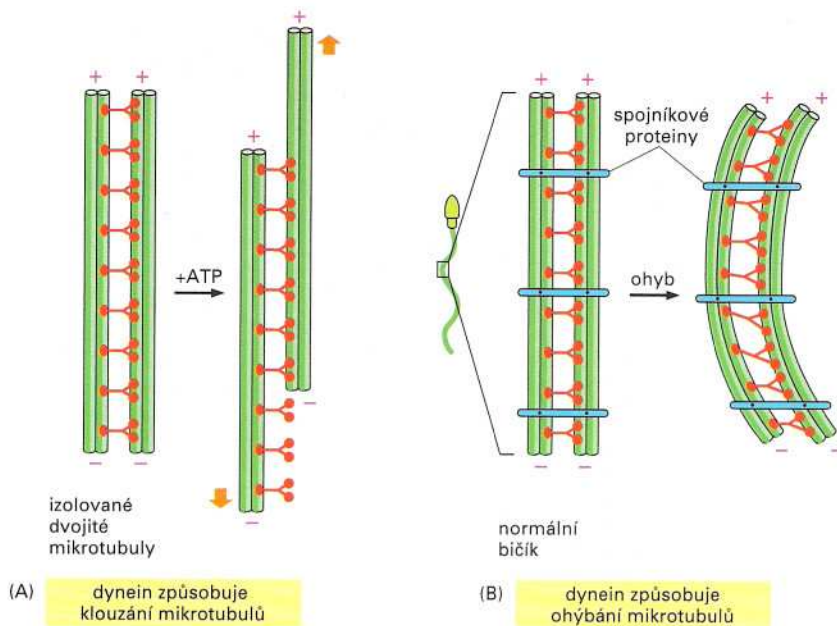
(A)

100 nm



(B)

Obrázek 16-22. Uspořádání mikrotubulů v řasince a bičíku. (A) Elektronmikroskopický snímek příčného řezu bičíkem *Chlamydomonas* jasně ukazuje uspořádání mikrotubulů „9+2“. (B) Schéma příčného řezu bičíkem. Devět vnějších zdvojených mikrotubulů nesou dvě řady dyneinových molekul. Hlavičky těchto dyneinů v tomto pohledu vypadají jako dvojice ramen, dosahující na sousední mikrotubulus. V živé buňce se dyneinové hlavičky periodicky připojují k sousedním mikrotubulům a posouvají se po nich, čímž vytvářejí sílu potřebnou pro úder bičíku nebo řasinky. Další struktury viditelné na příčném řezu bičíkem jsou další proteiny, které spojují svazky mikrotubulů a přetvářejí posuvný pohyb, vytvářený dyneiny, na ohyb bičíku, jak je vysvětleno na obr. 16-23.



Obrázek 16-23. Pohyb dyneinu způsobuje ohyb bičíku. (A) Představme si, jak pracuje dvojice vnějších mikrotubulů s navázanými dyneiny, jestliže ji uvolníme z celé složité struktury bičíku spermie. Za přítomnosti ATP se v důsledku opakované činnosti dyneinů dvojice mikrotubulů teleskopicky posunují jedna vůči druhé. (B) V kompletním bičíku je situace jiná: dvojice mikrotubulů jsou spjaty příčnými proteinovými spojkami, takže posun dyneinů vyvolává namísto posuvu mikrotubulů prohnutí celého bičíku.

to odlišných proteinů, uvidíme, že hlavní principy, kterými se řídí tvorba a rozpad obou struktur i jejich podíl na kontrole buněčné struktury, jsou nápadně podobné.

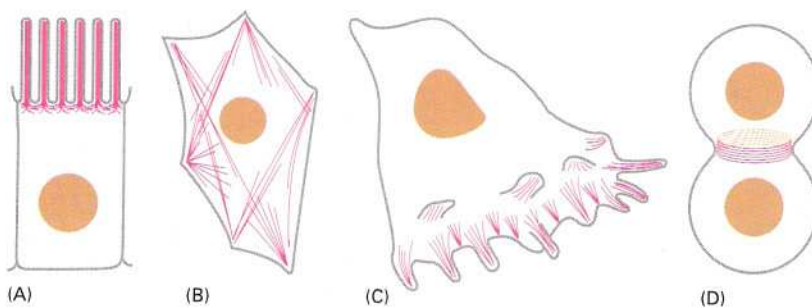
Aktinová vlákna jsou tenká a pružná

V elektronovém mikroskopu vypadají aktinová vlákna jako provazce o průměru kolem 7 nm. Každé vlákno představuje stočený řetězec, sestávající ze stejných globulárních molekul aktinu. Všechny molekuly v řetězci směřují stejným směrem podél osy vlákna; proto mají aktinová vlákna strukturální polaritu a konce vlákna jsou označovány jako plus-konec a minus-konec (obr. 16-25).

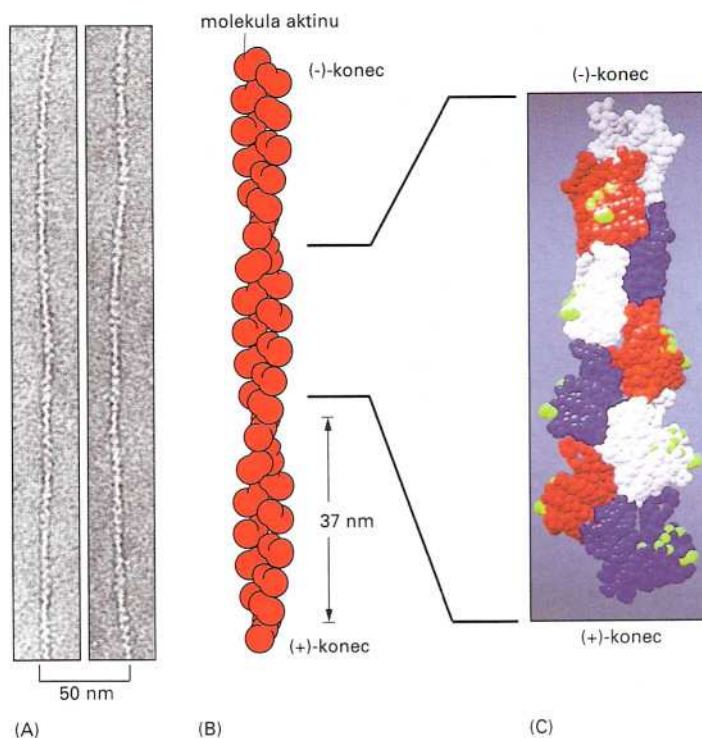
Aktinová vlákna jsou tenčí, pružnější a obvykle kratší než mikrotubuly. V buňce je přítomno mnohem více aktinových vláken než mikrotubulů. Celková délka aktinových vláken v buňce je nejméně třicetkrát větší, než délka všech mikrotubulů. Aktinová vlákna se málokdy vyskytují osamocně; většinou jsou přítomna ve svazcích nebo sítích, které jsou mnohem pevnější než osamocená vlákna.

Mechanismus polymerace aktinu a tubulinu je podobný

Aktinová vlákna rostou přidáváním aktinových monomerů na obou koncích, avšak rychlost růstu je vyšší na plus-konci vlákna, než na minus-konci. Holé aktinové vlákno je velmi nestabilní, podobně jako mikrotubu-



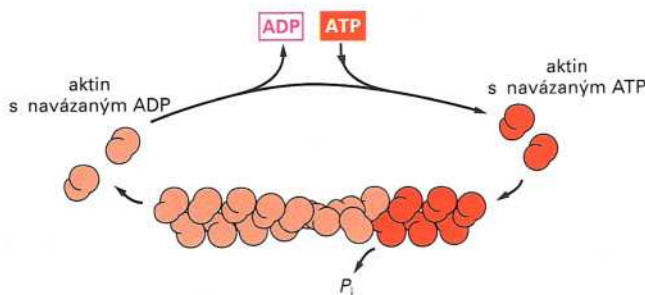
Obrázek 16-24. Svazky aktinových vláken v buňkách. Různé aktinové buněčné struktury jsou znázorněny červeně. (A) Mikroklky na povrchu střevní výstelky. (B) Kontraktilní svazky v cytoplasmě. (C) Listovité (*lamellipodia*) a prstovité (*filopodia*) výběžky na vedoucím okraji pohybující se buňky. (D) Kontraktilní prstenec během buněčného dělení.



Obrázek 16-25. Aktinová vlákna. (A) Elektronmikroskopický snímek aktinových vláken, pořízených metodou negativního barvení. (B) Uspořádání aktinových molekul v aktinovém filamentu. Každé vlákno je jakási dvojšroubovice se závitem, opakujícím se každých 37 nm. Silné interakce mezi vlákny zabraňují rozvolnění šroubovice. (C) Shodné podjednotky aktinového filamenta jsou zobrazeny stejnou barvou, aby byly zdůrazněny těsné interakce mezi každou aktinovou molekulou a čtyřmi dalšími molekulami s ní sousedícími.

lus bez asociovaných proteinů, a k jeho rozpadu může docházet na obou koncích. Každý volný monomer aktinu nese pevně navázaný nukleosidtrifosfát, v tomto případě ATP, který je hydrolyzován na ADP krátce po zapojení monomeru do aktinového vlákna. Obdobně jako v případě GTP a tubulinu, hydrolyza ATP na ADP u aktinu, vázaného ve vlákne, snižuje sílu vazby mezi monomery, a tím i stabilitu vlákna. Hydrolyza nukleotidu tedy usnadňuje depolymeraci, a tak i rozložení aktinových vláken (obr. 16-26).

Obdobně jako u mikrotubulů, schopnost vláken se skládat a rozkládat je nutná pro mnoho funkcí aktinových vláken, například při pohybu buňky. Funkce aktinových vláken může být v pokusech vážně poškozena toxiny některých hub, které znemožňují polymeraci aktinu (např. *cytochalasiny*), nebo které naopak stabilizují aktinová vlákna a znemožňují jejich depolymeraci (např. *faloidin*). Přidání nízké koncentrace cytochalasinu okamžitě zmrazí buněčné pohyby, jako například posun fibroblastu na podložce. (Faloidin má podobný účinek, musí být ale do buňky injikován, neboť neprochází plasmatickou membránou.) Funkce aktinových vláken tedy závisí na rovnováze mezi aktinovými vlákny a zásobou aktinových monomerů; typické aktinové vlákno v buňce přetrvává pouze několik minut od doby, kdy se vytvořilo.



Obrázek 16-26. Hydrolyza ATP během polymerace aktinu. Aktinové monomery v cytosolu nesou ATP, jenž je hydrolyzován na ADP krátce po zapojení monomerů do rostoucího aktinového vlákna. Molekuly ADP zůstávají zachyceny uvnitř aktinového vlákna bez možnosti výměny za ATP, dokud aktinové monomery, který je nesou, se neoddělí od filamenta a nedostanou se zpět do monomerní formy.

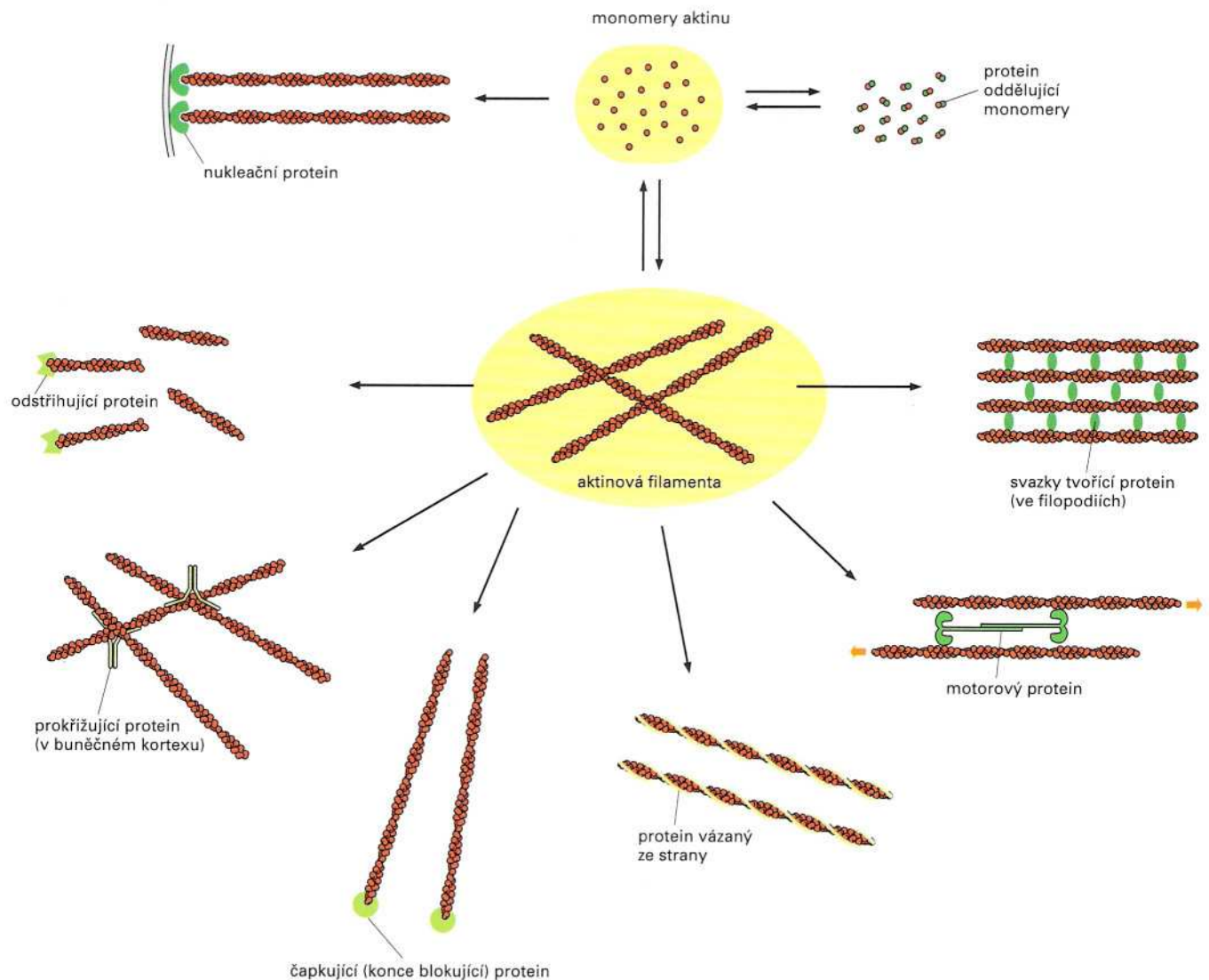
Řada proteinů se váže k aktinu a mění jeho vlastnosti

V typické živočišné buňce tvoří aktin kolem 5% celkového množství všech proteinů. Z toho je přibližně polovina přítomna ve formě aktinových vláken, kdežto druhá polovina jsou volné aktinové monomery v cytosolu. Koncentrace monomerů je tedy velmi vysoká – mnohem vyšší, než koncentrace, které je potřeba dosáhnout, aby aktinová vlákna polymerovala *in vitro*. Co tedy vlastně brzdí monomery aktinu, aby nedošlo k jejich úplné polymeraci do vláken? V buňce jsou přítomny malé proteiny, jako jsou například *thymosin* a *profilin*, které se vážou k monomerům aktinu a tím jim zabraňují vázat se na konce aktinových vláken. Protože thymosin udržuje neustálou rezervu monomerů aktinu až do chvíle, kdy jsou v buňce potřeba, hraje rozhodující úlohu v regulaci polymerace aktinu.

Existuje řada dalších proteinů, jež se vážou na aktin. Mnohé z nich interagují se sestavenými aktinovými vlákny spíše než s monomery aktinu; ty často kontrolují chování vláken (obr. 16-27). Některé proteiny například spojují paralelně uspořádaná aktinová vlákna a vytvářejí tak jejich svazky, jako je tomu v apikální části buněk výstelky tenkého střeva; jiné proteiny spojují překřížená vlákna aktinu a vytvářejí hustou síť

Otázka 16-5 Vytváření aktinových vláken v cytosolu je regulováno proteiny, vážajícími se na aktin. Některé z těchto proteinů výrazně zvyšují rychlost započetí tvorby nových aktinových vláken. Navrhněte možný mechanismus.

Obrázek 16-27. Hlavní třídy aktin-vázajících proteinů v buňkách obratlovců. Aktin je zobrazen červeně, aktin-vázající proteiny zeleně.



s gelovitou konzistencí v buněčném kortexu – ve vrstvě cytoplasmy, ležící těsně pod cytoplasmatickou membránou. Další proteiny (např. *gelso-lin*) rozřezávají aktinová vlákna na kratší fragmenty, a tím zvyšují tekutost aktinových gelů. Aktinová vlákna se též mohou spojovat s molekulovými motory do kontraktilních svazků, jako v případě svalových buněk. Aktinová vlákna mohou sloužit i jako dráhy, podél nichž molekulové motory pohybují organelami – to je obzvláště patrné v rostlinných buňkách.

Ve zbytku této kapitoly se budeme věnovat charakteristickým strukturám, které mohou aktinová vlákna vytvářet, a ukážeme si různé typy asociovaných proteinů, které jsou k tomu nezbytné. Nejprve budeme hovořit o *buněčném kortexu*, který je silně obohacen aktinem, a o jeho úloze v buněčném pohybu, poté se budeme zabývat kontraktilním aparátem svalových buněk jako příkladem stálých struktur, založených na aktinových filamentech.

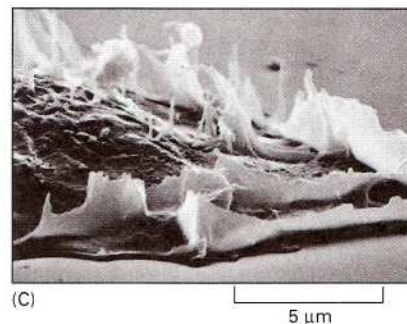
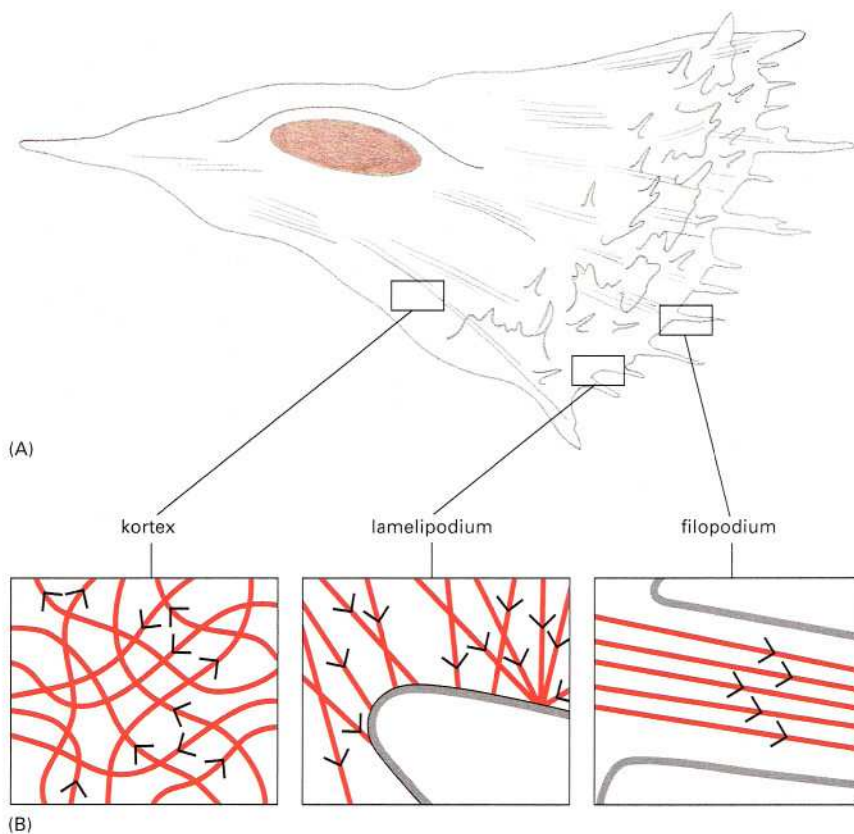
Většina eukaryotních buněk má pod plasmatickou membránou buněčný kortex

Aktin se v buňce sice nachází v celém objemu cytoplasmy, avšak ve většině buněk je koncentrován ve vrstvě cytoplasmy, uložené těsně pod plasmatickou membránou. V této oblasti, nazývané **buněčný kortex**, jsou aktinová vlákna pospojována aktin-vázajícími proteiny do husté sítě. Buněčný kortex zpevňuje povrch buňky a dodává mu mechanickou odolnost. Jak je popsáno v Kapitole 11, v červených krvinkách jednoduchá pravidelná síť fibrilárních proteinů připevněných k plasmatické membráně poskytuje oporu, potřebnou k udržení stálého diskovitého tvaru krvinky (viz. obr. 11-31). Buněčný kortex jiných živočišných buněk je mnohem tlustší a komplikovanější a umožňuje buňce měnit tvar a pohybovat se. Kortex obsahuje též spektrin a ankyrin; aktinová vlákna zde tvoří hustou síť, z níž vlákna vycházejí hlouběji do cytoplasmy, kde jsou opět pospojována do třírozměrné struktury. Aktinová kortikální síť určuje tvar a mechanické vlastnosti plasmatické membrány a buněčného povrchu. Jak dále uvidíme, právě přestavba aktinových struktur v kortexu představuje molekulární základ pro změny buněčného tvaru a pro buněčný pohyb.

Pohyb buňky závisí na aktinu

Jenom malá část buněk je schopna se pohybovat v kapalině za pomoci řasinek nebo bičíků; většina buněk se posunuje po povrchu podložky. Masožravé měňavky lezou při hledání potravy neustále. Bílé krvinky, známé jako *neutrofil*y, vycestovávají z krevního řečiště do tkání, když tam „cítí“ malé molekuly, uvolňované bakteriemi, aby mohly bakterie pohltnout a zničit. Určité růstové faktory aktivují růst konce vyvíjejícího se axonu, který pak sleduje směr vyznačený molekulami, vázanými v mezibuněčném prostředí (ale zřejmě i koncentračním spádem některých volných molekul), dokud nedosáhne svého cíle, tedy místa pro vytvoření synaptického spojení.

Molekulární mechanismy různých typů buněčného pohybu, včetně právě popsaného, se jen obtížně identifikují. Zahrnují koordinované změny mnoha molekul v různých zónách buňky a není možno jednoduše určit konkrétní organelu, která by byla zcela odpovědná za buněčný

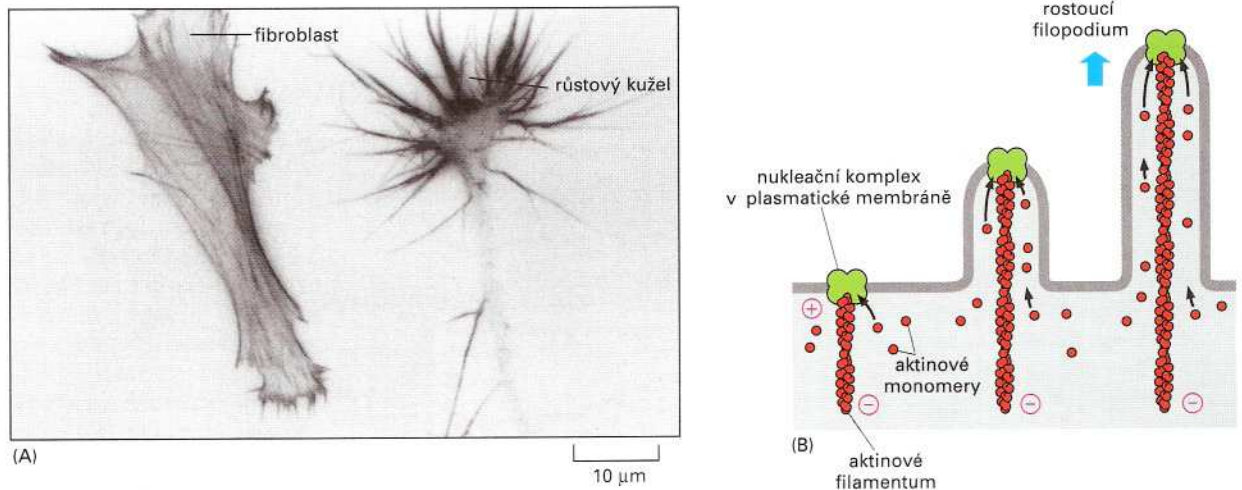


Obrázek 16-28. Aktinová vlákna v pohybující se živočišné buňce. (A) Schematické zobrazení fibroblastu s plochými lamelipodii a jemnými filopodii, jež se na buněčném povrchu nacházejí zejména v oblasti vedoucího okraje. (B) Detail uspořádání aktinových vláken ve třech různých oblastech fibroblastu; šípky ukazují k plus-koncům vláken. (C) Snímek pořízený řádkovacím elektronovým mikroskopem ukazuje lamelipodia a filopodia na vedoucím okraji lidského fibroblastu během jeho pohybu v buněčné kultuře.

pohyb, jako tomu je v případě buněk s bičíkem. Obecně však můžeme určit tři základní, vzájemně propojené procesy: (1) buňka vysunuje výběžky na své „přední“ straně, neboli vedoucím okraji (leading edge); (2) výběžky přilnou k povrchu, po němž se buňka pohybuje; (3) zbytek buňky se tahem za tato ukotvení přitáhne dopředu.

Všechny tři uvedené procesy využívají aktin, avšak různým způsobem. První krok, vysunování výběžků, je poháněno polymerizací aktinu. Vedoucí okraj pohybujícího se fibroblastu v buněčné kultuře stále vysouvá tenká, listovitá **lamelipodia** (obr. 16-28), která obsahují hustou síť aktinových vláken, orientovaných takovým způsobem, že většina jich má své plus-konce těsně pod plasmatickou membránou. Mnohé buňky též vysouvají tenké, pevné výběžky, zvané **filopodia** (viz obr. 16-28), ať už na vedoucím okraji nebo kdekoli na buněčném povrchu. Filopodia jsou obvykle 0,1 μm silná a 5–10 μm dlouhá a obsahují svazek 10–20 aktinových vláken, opět směřujících svými plus-konci ven z buňky. Konec rostoucího výběžku vyvíjejícího se axonu nervové buňky vysouvuje ještě daleko delší filopodia, dlouhá až 50 μm , která pomáhají „ohmatávat“ okolí a nalézt správnou cestu k jejich cíli (obr. 16-29A). Lamelipodia a filopodia jsou průzkumné pohyblivé struktury, které se vysouvají a zasouvají zpět velkou rychlostí. U obou typů se předpokládá, že vznikají rychlým lokálním růstem aktinových vláken, které jsou nukleovány pod plasmatickou membránou a svým růstem ji natahují, aniž by došlo k jejímu protržení.

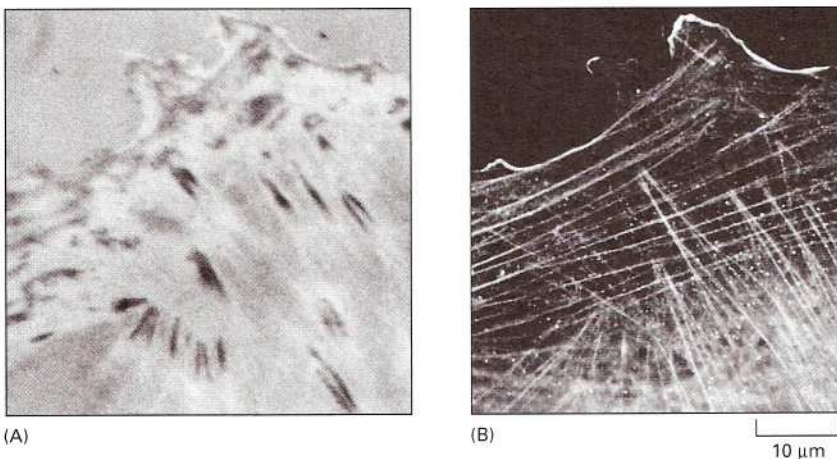
Aktinová vlákna lamelipodií a filopodií na vedoucím okraji buňky jsou zřejmě organizována plasmatickou membránou obdobně, jako centrosomy organizují mikrotubuly; malé agregáty určitých proteinů zde podporují polymeraci aktinu (obr. 16-29B). Je zde však jeden zásadní roz-



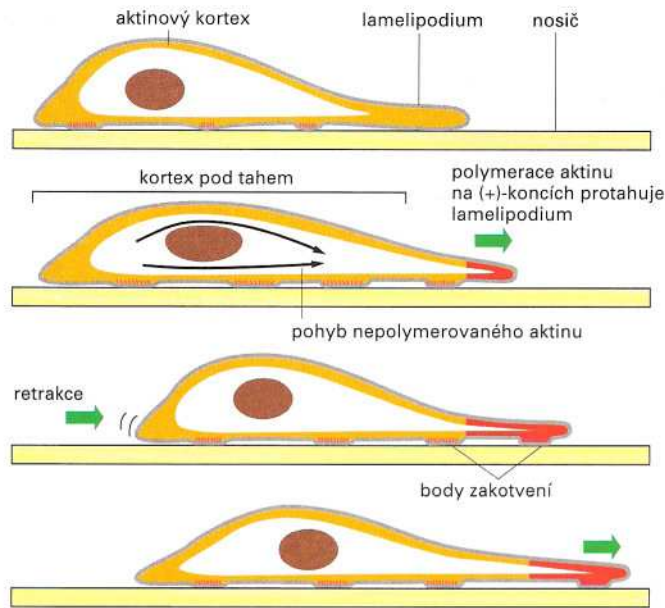
Obrázek 16-29. Růst filopodií. (A) Dva typy buněk s obarveným aktinem. Jemné svazky aktinových vláken ve filopodiích jsou viditelné jak na vedoucím okraji plochého fibroblastu, tak na rostoucím konci axonu nervové buňky. (B) Na špičce každého filopodia se na vnitřní straně membrány nachází seskupení proteinů, které zahajuje vytváření aktinového vlákna z monomerů aktinu. Růst aktinového filamenta vytlačuje plasmatickou membránu směrem ven z buňky, a tím se vytváří filopodium nebo jiný typ výběžku. Pro jednoduchost je zobrazeno jen jedno aktinové vlákno, ačkoliv většina výběžků buněčného povrchu obsahuje četná aktinová vlákna.

díl mezi mikrotubuly a aktinovými vlákny: organizující agregát proteinů je zde umístěn na plus-konci aktinového vlákna a monomery aktinu jsou k vláknu připojovány v tomto místě. Ovšem jak přesně pracuje tento organizující agregát proteinů na molekulární úrovni, zůstává zatím hádankou.

Jakmile se lamelipodia nebo filopodia dotknou příhodného místa na povrchu substrátu, „přilepí“ se tam; transmembránové proteiny plasmatické membrány, *integriny*, adherují k molekulám extracelulární matrix nebo k povrchu jiné buňky, přes níž pohybující se buňka přelézá. Zatím integriny na vnitřní straně plasmatické membrány nukleují (neboli zachycují) aktinová vlákna, čímž v pohybující se buňce dojde k vytvoření pevného kotvicího systému pro systém aktinových vláken (obr. 16-30). Nyní se buňka pomocí těchto uchycení může posunout kupředu tím, že vnitřní kontrakce přitáhne zadní část buňky (obr. 16-31). Tento krok rovněž závisí na aktinu, avšak mechanismus je jiný. Jsou zde využívány interakce aktinových vláken s molekulovými motory, nazývanými *myosiny*. Není



Obrázek 16-30. Spojitost mezi vnějšími kontakty buňky a aktinovými vlákny uvnitř buňky. (A) Byl zde využit speciální optický efekt, který znázorňuje místa těsného přilnutí fibroblastu k povrchu skla, na kterém buňka spočívá, jako tmavé zóny. (B) Po fixaci buňky byl aktin obarven protilátkami s navázaným fluorescenčním barvivem. Je zřejmé, že většina svazků aktinových vláken je ukončena v místech kontaktů se sklem nebo těsně vedle nich.



Obrázek 16-31. Jeden z modelů, vysvětlující pohyb buňky pomocí kortexu, bohatého na aktin. Polymerace aktinu na vedoucím okraji buňky vysunuje plasmatickou membránu kupředu a vytváří nové oblasti s aktinovým kortexem, zobrazeným červeně. Vytvářejí se nová spojení mezi aktinovými vlákny v cytoplasmě a ukotveními plasmatické membrány na povrchu, po němž se buňka pohybuje (substrát). Stah kortexu posunuje buňku kupředu, zatímco se zadní část buňky odpojuje od substrátu a přitahuje se k tělu buňky. Přitom depolymerují aktinová vlákna v přitahované části buňky a uvolněné monomery aktinu se po koncentračním spádu pohybují do přední části buňky, kde mohou být zapojeny do dalšího cyklu polymerace aktinových vláken. Stejný cyklus se trvale opakuje a umožňuje pohyb buňky kupředu po malých „krocích“.

zcela jasné, jak jsou síly, působící přitažení zadní části buňky, generovány; uvažuje se o stahu svazků aktinových vláken v cytoplasmě, stahu aktinové sítě v kortikální vrstvě cytoplasmy, nebo o kombinaci obou. Obecné principy interakcí myosinových molekulárních motorů s aktinem, které vytvářejí pohyb, jsou však známy a budou popsány níže.

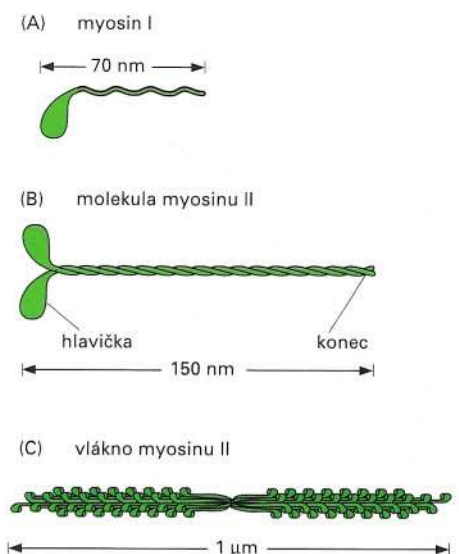
Aktin se spojuje s myosinem a vytváří kontraktilní struktury

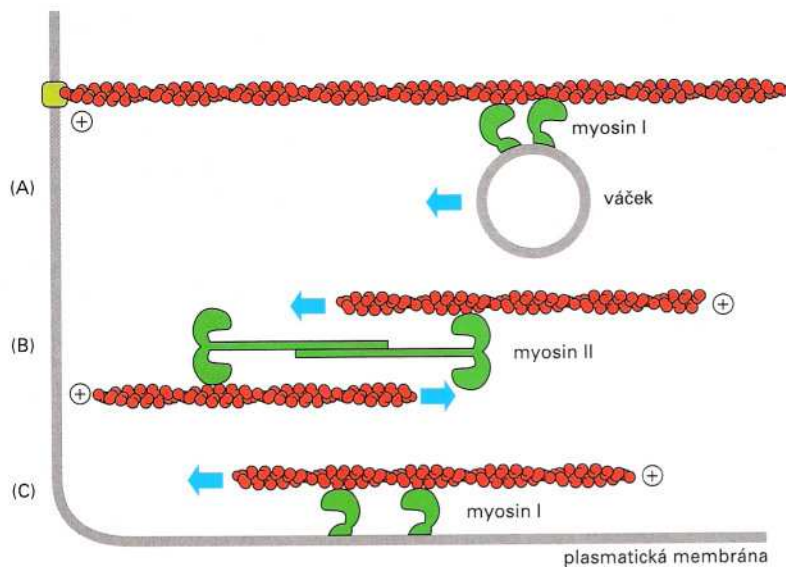
Všechny známé aktin-dependentní molekulární motory patří do rodiny **myosinů**. Myosiny vážou a hydrolyzují ATP, který poskytuje energii pro jejich pohyb podél aktinových vláken – vždy směrem od minus-konce k plus-konci vláken. Myosin byl společně s aktinem poprvé objeven v kosterním svalu a většina našich znalostí o interakcích obou proteinů pochází právě ze studia svalů. V buňkách existuje několik různých typů myosinů, z nichž jsou nejhojnější zástupci podrodin *myosinu I* a *myosinu II* (obr. 16-32). Myosin I se nachází ve všech typech buněk a vzhledem k tomu, že jeho molekula i způsob činnosti jsou jednodušší, začneme s jeho popisem.

Molekuly myosinu I mají jednu globulární doménu – hlavičku a dále konec (viz. obr. 16-32A). Hlavičková doména interaguje s aktinovými vlákny a je schopna ATP-hydrolázové motorické aktivity, která molekule myosinu umožňuje pohybovat se podél aktinového vlákna

Obrázek 16-32. Myosiny. Zobrazení jsou dva členové myosinové rodiny molekulových motorů. (A) Myosin I je jednořetězcová molekula s jednou globulární hlavičkou a koncem, který se může vázat k jiné molekule nebo k buněčné organelle. Napojená molekula či organela pak může být tažena za využití motorové aktivity hlavičky myosinu I podél drah, vytýčených aktinovými vlákny. (B) Myosin II je složen ze dvou identických myosinových molekul, a tedy má dvě globulární hlavičky a konec ve formě stočené šroubovice. (C) Konce myosinu II se mohou navzájem spojovat a vytvářet myosinové vlákno, v němž hlavy myosinu II trčí navěnek. Holá oblast uprostřed vlákna sestává pouze z konců.

Otázka 16-6 Na vedoucím okraji buňky, sunoucí se po podložce, jsou plus-konce aktinových vláken připevněny k plasmatické membráně. Aktinové monomery jsou připojovány k těmto koncům, a tím dochází k vytlačování membrány směrem ven z buňky a k tvorbě lamelipodií a filopodií. Domníváte se, že aktinová vlákna musí být něčím držena na svých minus-koncích, aby jednoduše nedocházelo k jejich zatlačování dovnitř buňky namísto směrem ven?





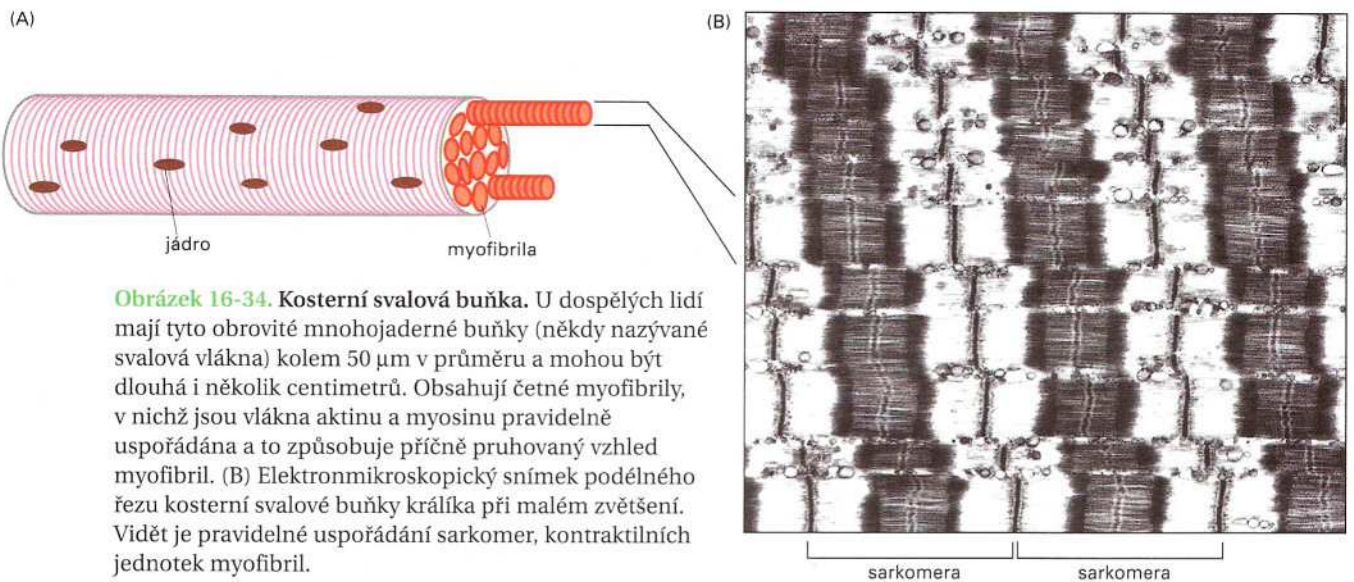
Obrázek 16-33. Některé funkce myosinu I a myosinu II v eukaryotních buňkách.

Krátký konec molekuly myosinu I obsahuje vazebná místa pro různé buněčné složky, včetně membrán. To umožňuje pohybovat membránovými váčky podél aktinových vláken (A), nebo pohybovat aktinovým filamentem vzhledem k plasmatické membráně (C). Malá vlákna složená z molekul myosinu II jsou schopna posunovat aktinová vlákna proti sobě, čímž se dosahuje místního zkracování svazků aktinových vláken (B). Pověšměte si, že v každém případě se hlavičky myosinů pohybují po aktinových filamentech směrem k jejich plus-koncům.

v cyklu, sestávajícím z vazby, uvolnění a opětovné vazby. Konec je různý u jednotlivých typů myosinů a určuje, jakými buněčnými komponentami bude pohybováno. Může se například vázat k určitému typu membránových váčků a posunovat je cytoplasmou podél drah, daných aktinovými vlákny (obr. 16-33A); může se též vázat k plasmatické membráně a tahat za ni při svém pohybu podél aktinových vláken, čímž dojde k deformaci membrány a vzniku různých tvarů buňky (obr. 16-33C).

Svalový myosin patří do podrodiny myosinů, zvané myosiny II. Všechny myosiny v této skupině obsahují dvě ATPázové hlavičky a dlouhý, tyčkovitý konec (viz. obr. 16-32B). Zástupci rodiny myosinů II jsou hojní i v nesvalových buňkách. Myosin II tvoří s aktinem kontraktilní struktury, které jsou nejhojněji zastoupeny ve svalectech. Svaly jsou nejznámějším příkladem těchto struktur, nicméně se vyskytují i v mnoha dalších typech živočišných buněk. Každá molekula myosinu II je dimerem složeným z páru stejných myosinových molekul, držaných pohromadě jejich konci; každá molekula myosinu II tedy má dvě kulovité ATPázové hlavičky na jedné straně a jeden konec tvořený dvěma vzájemně obtočenými (coiled-coil) konci na straně druhé (viz obr. 16-32B). Svazky molekul myosinu II se spojují dohromady prostřednictvím svých konců a tím je tvořeno *myosinové vlákno*, z něhož do stran vystupují hlavičky (viz obr. 16-32C).

Myosinové vlákno je polární způsobem, který si můžeme představit jako oboustranný šíp: dvě sady hlaviček směřují od středu šípu k oběma opačným koncům vlákna. Jedna sada hlaviček se váže k orientovaným aktinovým vláknům a posunuje je jedním směrem; druhá sada se váže k jiným, opačně orientovaným, vláknům aktinu a posunuje je na opačnou stranu. Výsledkem je paralelní pohyb dvou opačně orientovaných sad aktinových vláken (obr. 16-33B). Vidíme tedy, že pokud jsou aktinová a myosinová vlákna uspořádána do svazku, tento útvar může generovat sílu. Nejlépe je to vidět při stahu svalů (bude popsáno níže), stejný princip však pracuje i v *kontraktilních svazcích* aktinových vláken a vláken myosinu II, která se dočasně vytvářejí v cytoplasmě nesvalových buněk (viz obr. 16-24B), nebo také v *kontraktilním prstenci*, který rozděluje mitotickou buňku ve dvě postupným zaskrcováním cytoplasmy (popsáno v Kapitole 17).



Obrázek 16-34. Kosterní svalová buňka. U dospělých lidí mají tyto obrovité mnohoaderné buňky (někdy nazývané svalová vlákna) kolem 50 μm v průměru a mohou být dlouhá i několik centimetrů. Obsahují četné myofibrily, v nichž jsou vlákna aktinu a myosinu pravidelně uspořádána a to způsobuje příčně pruhovaný vzhled myofibril. (B) Elektronmikroskopický snímek podélného řezu kosterní svalové buňky králíka při malém zvětšení. Vidět je pravidelné uspořádání sarkomer, kontraktilních jednotek myofibril.

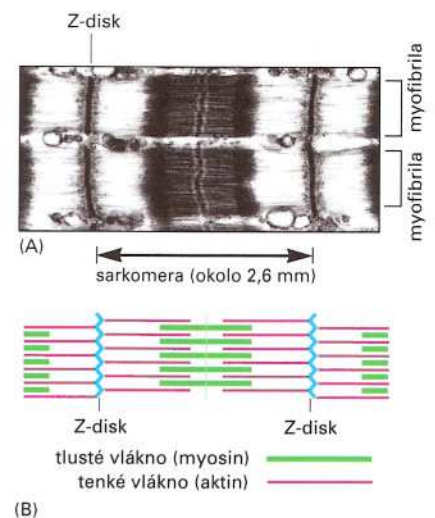
Během svalového stahu se aktinová vlákna posunují proti myosinovým vláknům

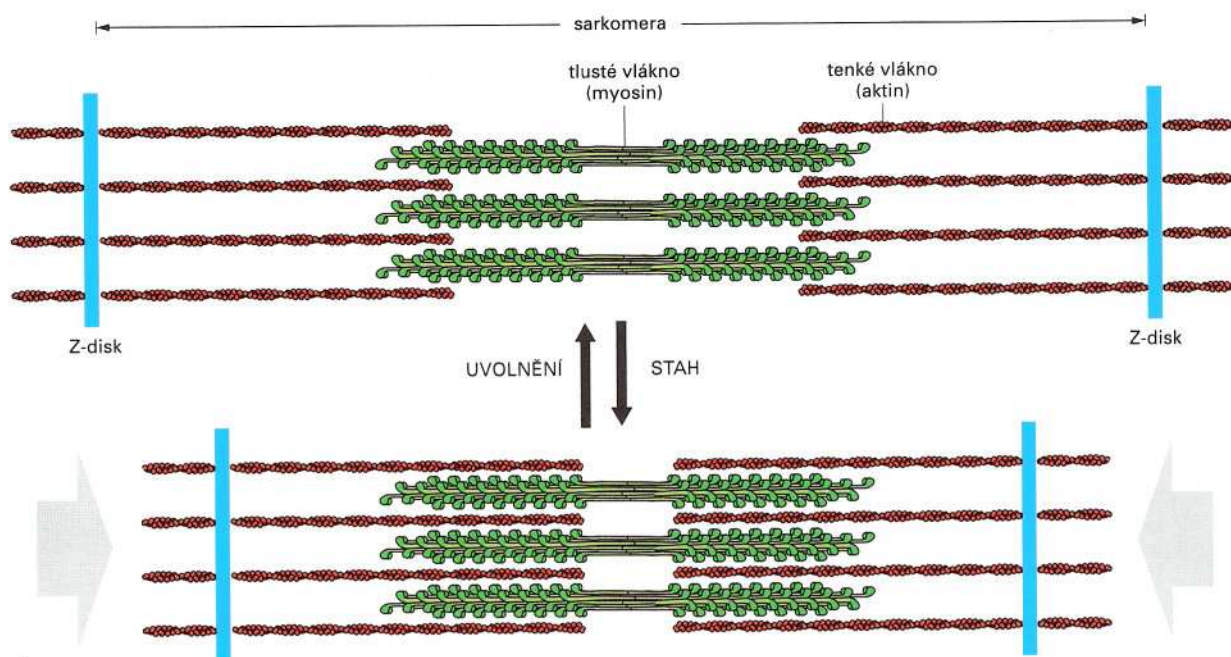
Svalový stah je nejznámější a nejlépe prostudovaný typ pohybu, k němuž dochází v živočišné buňce. U obratlovců závisí všechny pohybové činnosti jako běh, chůze, plavání a let, na schopnosti *kosterního svalstva* silně se stahovat a pohybovat různými kostmi. Nevolní pohyby, jakými jsou srdeční stahy a střevní peristaltika, závisí na *srdečním svalu* a na *hladkých sva-lech*, jež jsou tvořeny svalovými buňkami se strukturou, odlišnou od kosterního svalu. Nicméně i zde pracuje stejný princip, založený na interakcích aktinu a myosinu.

Dlouhá vlákna kosterních svalů jsou ve skutečnosti obrovské jednotlivé buňky, které během vývoje vznikly splynutím mnoha menších buněk. Jádra všech splynuvších buněk se nachází těsně pod plasmatickou membránou. Cytoplazma je vyplněna **myofibrilami**, kontraktilními jednotkami svalových buněk. Tyto válcovité útvary mají kolem 1–2 μm v průměru a mohou dosahovat délky jako samotná svalová buňka (obr. 16-34A).

Myofibrily se skládají z řady stejných malých kontraktilních jednotek, zvaných **sarkomery**. Každá sarkomera je dlouhá kolem 2,5 μm ; pravidelný posun sarkomer vytváří typické proužkování myofibril, což je důvodem pro užívaný název „příčně pruhované svalstvo“ (obr. 16-34B). Sarkomery jsou vysoce organizované útvary, tvořené vlákny aktinu a myosinu II, specifického pro svaly. Myosinová vlákna (*silná vlákna*) jsou v každé sarkomeře umístěna uprostřed, kdežto tenčí aktinová vlákna (*tenká vlákna*) vycházejí z obou konců sarkomery (kde jsou ukotvena svými plus-konci k útvarům nazývaným *Z-disky*, nebo *Z-linie*) směrem dovnitř ke středu sarkomery, kde se svými konci překrývají s vlákny myosinu (obr. 16-35).

Obrázek 16-35. Sarkomery. (A) Detail předcházejícího snímku kosterní svalové buňky, zachycující dvě paralelní myofibrily s jednou celou sarkomerou a dvěma polovinami sarkomer. (B) Schematické zobrazení sarkomery, které vysvětluje původ tmavých a světlých pruhů, viditelných pod mikroskopem. Z-disky na obou stranách sarkomery jsou místy, kam se upínají aktinová vlákna; uprostřed se nacházejí silná vlákna, přičemž každý z nich sestává z mnoha molekul myosinu II.





Stahu svalové buňky je dosahováno současným zkracováním všech sarkomer v důsledku posuvu aktinových vláken podél myosinových vláken, aniž se přitom mění délka samotných vláken (obr. 16-36). Tento pohyb je vyvolán hlavičkami myosinových molekul, jež trčí ze stran myosinového vlákna a interagují s aktinovými vlákny. Když je sval stimulován ke stahu, myosinové hlavičky se začínají posunovat po aktinovém filamentu v opakovaných cyklech připojení a odpojení. Důsledkem je vzájemný posun aktinových a myosinových vláken a stah sarkomery. Po úplném stahu se myosinové hlavy úplně odpojují od aktinových vláken a dochází k uvolnění stahu.

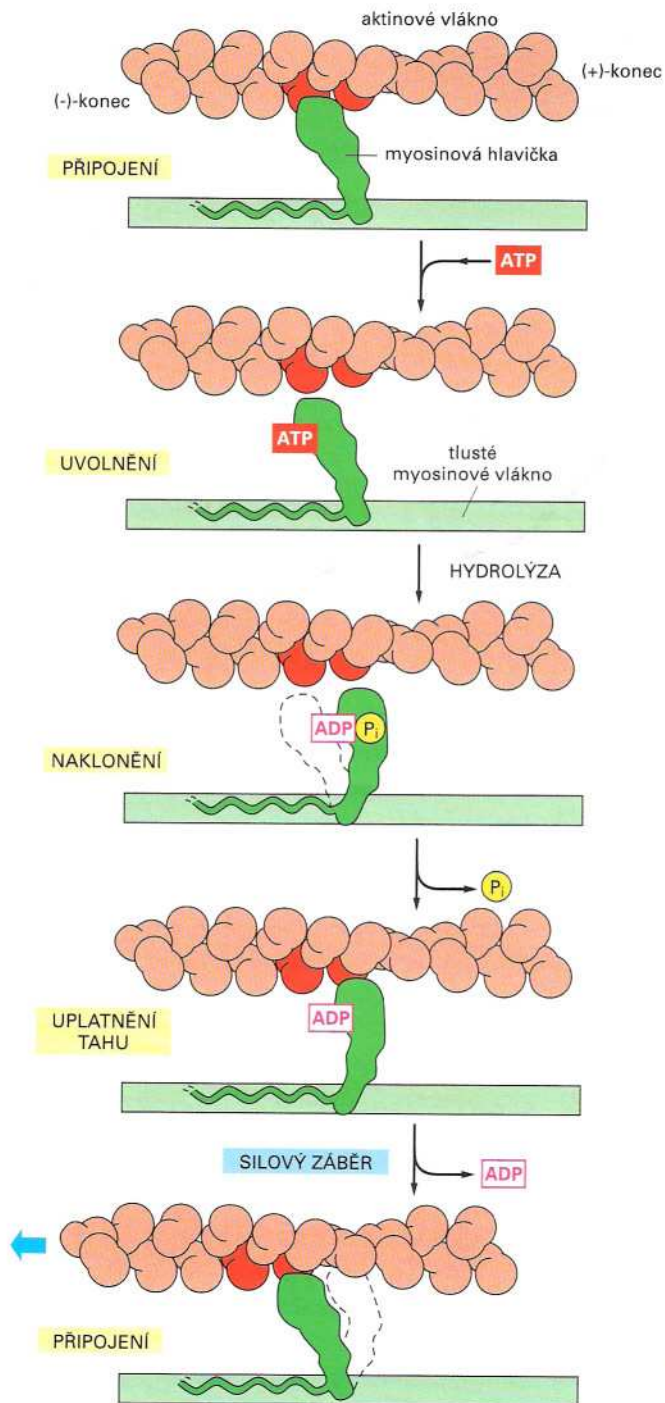
Během každého z cyklů připojení a odpojení myosinová hlavička váže a hydrolyzuje jednu molekulu ATP. Předpokládá se, že to způsobuje konformační změny v molekule myosinu, v jejichž důsledku se špička hlavičky posunuje asi o 5 nm podél aktinového vlákna směrem k jeho plus-konci. Tento pohyb, opakovaný s každým cyklem hydrolyzy molekuly ATP, posunuje myosinovou molekulu jedním směrem podél aktinového vlákna (obr. 16-37). Každé z vláken myosinu nese kolem 300 myosinových hlaviček; každá myosinová hlavička zvládá asi pět cyklů připojení a odpojení za vteřinu, což vede k rychlosti posuvu až 15 μm za vteřinu. Tato rychlost je dostatečná k tomu, aby došlo ke stahu sarkomery z plně nataženého stavu (3 μm) do plně staženého (2 μm) za méně než desetinu vteřiny. Všechny sarkomery ve svalu jsou propojeny speciální signalizační soustavou, která umožňuje okamžitý stah všech sarkomer; tato soustava je popsána v následujícím odstavci. Celý sval je tedy schopen prakticky okamžitého stahu, který obvykle trvá jen kolem desetiny vteřiny.

Svalový stah je zapínán náhlým vzrůstem koncentrace Ca^{2+}

K molekulárním interakcím mezi myosinem a aktinem, které generují svalovou sílu, dochází jen v případech, že kosterní sval obdrží signál z nervové soustavy. Signál z nervového zakončení spouští akční potenciál (popsaný v Kapitole 12) na plasmatické membráně svalové buňky. Tento elektrický vzruch se šíří během milisekund prostřednictvím *příčných*

Obrázek 16-36. Model posunujících se vláken vysvětluje svalový stah. (A) Myosinová a aktinová vlákna sarkomery se překrývají symetricky na obou stranách od středové linie sarkomery. Připomeňme si, že aktinová vlákna jsou ukotvena svými plus-konci na Z-disku a že myosinová vlákna jsou bipolární. (B) Během stahu se aktinová a myosinová vlákna vzájemně posunují, aniž by se sama zkracovala. Posunování je poháněno myosinovými hlavičkami, jež kráčeji směrem k plus-koncům aktinových vláken.

Otázka 16-7 Porovnejte strukturu středních filament se strukturou vláken myosinu II, která nalézáme v buňkách kosterního svalu. Jaké nalézáte podobnosti? Jaké jsou hlavní odlišnosti? Jak se odrážejí rozdíly stavby obou vláken v jejich funkcích?



PŘIPOJENÍ - Na začátku cyklu je myosinová hlavička bez navázaného nukleotidu pevně spojena s aktinovým vláknem v tzv. *rigorové konfiguraci* (podle *rigor mortis*, což je mrtvolná tuhost). V aktivně se zkracujícím svalu je tato fáze velmi krátká a obvykle se ukončí navázáním ATP.

UVOLNĚNÍ - Molekula ATP se váže k velkému zářezu na „zadní“ straně hlavičky, tedy co nejdále od aktinového vlákna, a okamžitě způsobuje drobnou změnu v konformaci těch domén, které tvoří aktin-vázací místo. To snižuje afinitu hlavičky vůči aktinu a dovoluje mu pohyb podél vlákna. (Prostor tady nakreslený mezi hlavičkou a aktinem zdůrazňuje tuto změnu, i když ve skutečnosti zřejmě zůstává hlavička velmi blízko aktinu.)

NAKLONĚNÍ - Zářez se uzavře kolem molekuly ATP jako škeble a spustí tak mohutnou změnu tvaru, která vede k tomu, že se hlavička posune podél vlákna o přibližně 5 nm. Dojde k hydrolyze ATP, ale ADP a P_i zůstávají vázány k proteinu.

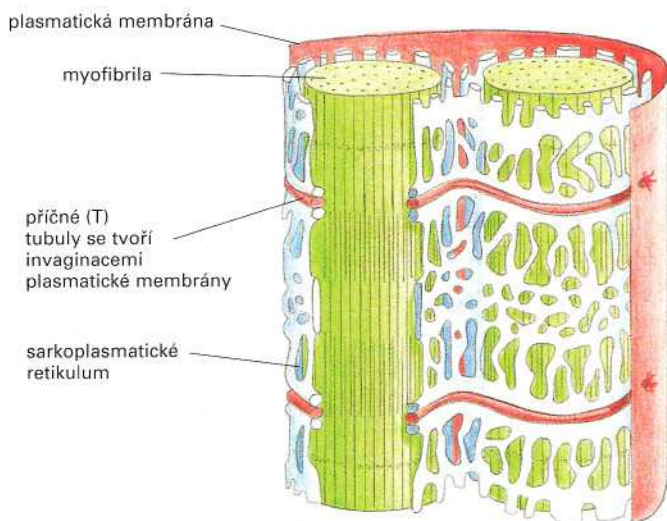
SÍLOVÝ ZÁBĚR - Slabá vazba myosinové hlavičky na novém místě na aktinovém vlákně způsobí uvolnění anorganického fosfátu z hydrolyzy ATP, za současného pevného navázání hlavičky na aktinové vlákno. Toto uvolnění fosfátu spouští „sílový záběr“, což je silotvorná změna tvaru molekuly, při níž hlavička získá zpět svoji původní konformaci. Během sílového záběru ztrácí hlavička navázaný ADP, a vrací se tak na start nového cyklu.

PŘIPOJENÍ - Na konci cyklu se myosinová hlavička opět octne v těsném sevření s aktinovým vláknem v rigorové konfiguraci. Všimněte si, že hlavička se po aktinovém vlákně posunula do nové polohy.

Obrázek 16-37. Cyklus změn pomocí nichž dochází ke „kráčení“ molekul myosinu podél aktinového filamenta.

kanálků (T-systém, od transversální, příčný), které z povrchu buňky zacházejí dovnitř buňky k myofibrilám. T-systém předává signál *sarkoplasmatickému retikulu*, plochému membránovému útvaru, jenž obklopuje každou myofibrilu jako děrovaná punčocha (obr. 16-38A).

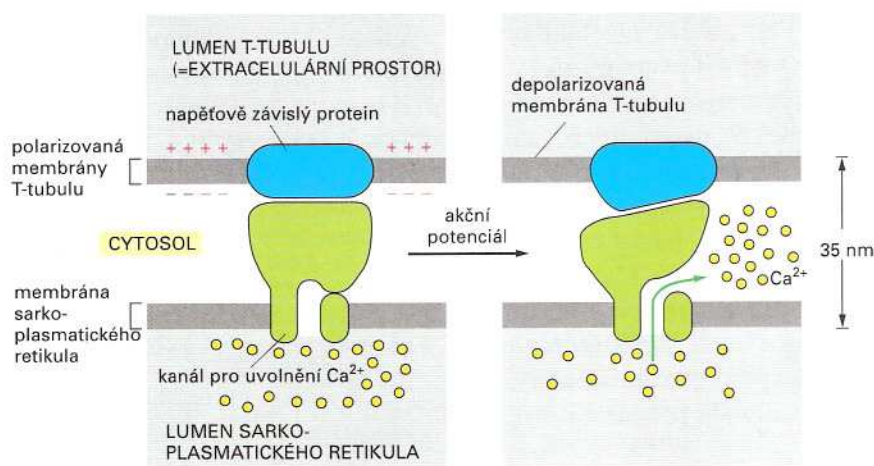
Sarkoplasmatické retikulum je specializovaná oblast endoplasmatického retikula, typická pro svalové buňky, jež obsahuje velmi vysokou koncentraci iontů Ca^{2+} . Elektrický signál vyvolává změnu potenciálu plasmatické membrány, v důsledku čehož dojde k otevření iontových kanálků membrán sarkoplasmatického retikula a uvolnění Ca^{2+} do cytosolu (obr. 16-38B). Jak bylo popsáno v Kapitole 15, ionty Ca^{2+} jsou často používány



Obrázek 16-38. T-tubuly a sarkoplasmatické retikulum.

(A) Kresba dvou membránových systémů, jež umožňují rychlé šíření kontrakčního signálu od plasmatické membrány svalové buňky ke všem myofibrilám v buňce. (B) Schematická kresba ukazující předpokládané otevření Ca^{2+} -kanálu v membráně sarkoplasmatického retikula pomocí transmembránového proteinu, nacházejícím se v přilehlém T-tubulu. Tento protein reaguje konformační změnou na výkyv elektrického potenciálu.

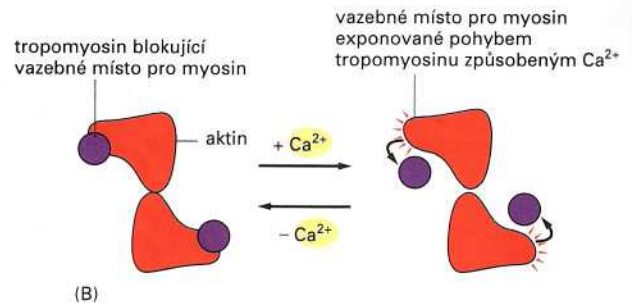
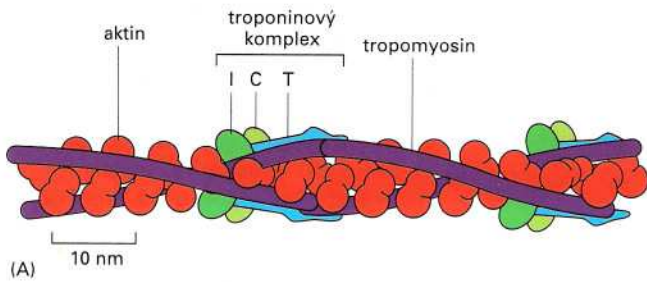
(A)



(B)

jako nitrobuněčný signál, přenášející informace z povrchu buňky k buněčným strukturám. V případě svalu Ca^{2+} interaguje s molekulárním spínačem, tvořeným speciálními aktin-vázajícími proteiny, který je těsně napojen na aktinová vlákna (obr. 16-39A). Jedním z nich je *tropomyosin* s pevnou tyčkovitou molekulou, vázající se do záhybu aktinové šroubovice a překrývající sedm aktinových monomerů, čímž brání napojení myosinových hlaviček k aktinovým vláknům. Dalším je *troponin*, proteinový komplex obsahující speciální protein, citlivý k Ca^{2+} (*troponin C*), jenž se váže ke konci tropomyosinové molekuly. Pokud se hladina Ca^{2+} v cytosolu zvýší, Ca^{2+} se váže k troponinu a vyvolává změnu tvaru jeho molekuly. Tím dojde k posunu tropomyosinové molekuly a k uvolnění vazebných míst na aktinovém vlákně pro myosinové hlavy; takto je iniciován stah sarkomery (obr. 16-39B).

Protože je signál z plasmatické membrány předán ke každé sarkomere během milisekund (prostřednictvím příčných kanálků a sarkoplasmatického retikula), všechny myofibrily v buňce se stahují zároveň. Zvýšení Ca^{2+} v cytosolu se snižuje na normální hladinu, jakmile je ukončen nervový signál, neboť ionty Ca^{2+} jsou rychle vypumpovány zpět do sarkoplas-



matického retikula četnými Ca^{2+} -pumpami, umístěnými v jeho membráně (popsáno v Kapitole 12). Jakmile se koncentrace Ca^{2+} vrátí na klidovou úroveň, molekuly troponinu a tropomyosinu se vrátí do jejich klidových poloh, v nichž je vazba myosinu na aktinová vlákna blokována, a tím je stah ukončen.

Předpokládá se, že tato vysoce specializovaná kontraktilní výbava svalových buněk se v evoluci postupně vyvinula z jednoduchých kontraktilních svazků myosinových a aktinových vláken, které i dnes vidíme v eukaryontních buňkách. Myosin II v jiných než svalových buňkách je také aktivován zvýšením hladiny cytosolového Ca^{2+} , avšak mechanismus je odlišný. Zvýšení koncentrace Ca^{2+} vede k fosforylaci myosinu II, což mění konformaci myosinu a umožňuje mu interagovat s aktinem. Podobný mechanismus je používán v *hladkých svalech*, nacházejících se např. ve stěnách žaludku, střev, dělohy, cév a v mnoha jiných strukturách, kde je potřeba trvale udržovat pomalé stahy. Stahy svalů, vyvolávané pomocí tohoto druhého mechanismu, jsou pomalejší, neboť je třeba více času, než dojde k difuzi molekul enzymů k myosinovým hlavičkám a pak k jejich fosforylaci nebo defosforylaci. Na druhé straně má tento mechanismus výhodu, že je méně specializovaný a může být řízen různými signály; stah hladkého svalu je regulován například adrenalinem, serotoninem, prostaglandiny i mnohými dalšími signály, přicházejícími z vnějšku.

Sarkomery kosterního svalu jsou vysoce specializovanými strukturami, využívajícími základní stavební kameny eukaryontního cytoskeletu. V Kapitole 17 budeme studovat další funkci cytoskeletu, která je natolik závažná pro všechny buňky, že si vyžaduje zvláštní kapitolu: rozdělení složité buňky a jejích komponent do dvou částí během buněčného dělení.

Obrázek 16-39. Kontrola stahu kosterního svalu pomocí troponinu. (A) Tenké svalové vlákno. Znáznorněno je umístění tropomyosinu a troponinu podél aktinového vlákna. Každá molekula tropomyosinu má sedm homologních sekvencí, umístěných v pravidelných intervalech, přičemž každá z nich se váže k aktinovému vláknu. (B) Tenké vlákno při pohledu z jeho konce. Znáznorněno je mírný pohyb tropomyosinu, způsobený vazbou Ca^{2+} k troponinu, jež umožňuje hlavičkám myosinu interagovat s aktinem.

Otázka 16-8

- Na obr. 16-39 si připomeňme, že molekuly troponinu jsou rozloženy pravidelně podél aktinového vlákna; jedna molekula troponinu se nachází na každé sedmé molekule aktinu. Jak byste vysvětlili příčinu takové pravidelnosti? Co vám to říká o charakteru vazby troponinu k aktinovým vláknům?
- Co se domníváte, že by se stalo, pokud bychom smísili aktinová vlákna (a) se samotným troponinem, (b) se samotným tropomyosinem, (c) s troponinem a tropomyosinem, a teprve poté byste přidali myosin? Bude výsledek v uvedených třech případech závislý na Ca^{2+} ?

Základní shrnutí

- Cytoplasma eukaryontních buněk je prostorově organizována cytoskeletem, sestávajícím ze středních filament, mikrotubulů a aktinových vláken.
- Střední filamenta jsou stabilní, provazovité polymery fibrilárních proteinů, jež buňkám udílejí mechanickou odolnost. Některé typy zevnitř jaderné membrány vytváří jadernou laminu; jiné typy se nacházejí v cytoplasmě.
- Mikrotubuly jsou pevné, duté trubice vytvářené polymerací tubulinových dimerů. Jsou to polarizované struktury s pomaleji rostoucím minus-koncem a rychleji rostoucím plus-koncem.
- Tvorba mikrotubulů začíná v organizačních centrech (např. v centrosomu); minus-konce mikrotubulů jsou zanořeny do organizačních center, odkud mikrotubuly rostou směrem ven.
- Mnohé mikrotubuly v buňce jsou labilní dynamické útvary, jež mohou střídavě růst a zkracovat se. Tato vlastnost, známá jako dynamická nestabilita mikrotubulů, je regulována hydrolyzou GTP, navázaného k tubulinovým dimerům.
- Každý tubulinový dimer nese pevně navázanou molekulu GTP, jež je hydrolyzována na GDP po napojení dimeru k mikrotubulu. Hydrolyza GTP snižuje vazebnou sílu dimeru tubulinu k okolním dimerům v mikrotubulu a v důsledku se snižuje stabilita polymeru, což vede ke zkracování mikrotubulu.
- Mikrotubuly mohou být stabilizovány proteiny, které zachytí jejich plus-konec. Tento proces ovlivňuje polohu svazků mikrotubulů v buňce. Buňky obsahují řadu speciálních proteinů, asociovaných s mikrotubuly, jež mikrotubuly stabilizují, spojují je s dalšími buněčnými strukturami, nebo mikrotubuly připravují pro speciální funkce.
- Kinesiny a dyneiny jsou molekulární motory, využívající energii hydrolyzy ATP k jednosměrnému pohybu podél mikrotubulů. Přenášejí určité membránové váčky a jiné náklady, a tím udržují prostorovou organizaci cytoplasmy.
- Eukaryontní řasinky a bičíky obsahují svazek stabilních mikrotubulů. Pohyb obou struktur je vytvářen ohýbáním mikrotubulů v důsledku činnosti specifického proteinu – molekulového motoru, zvaného řasinkový dynein.
- Aktinová vlákna jsou šroubovicové polymery aktinových molekul. Jsou ohebnější než mikrotubuly a často se vyskytují ve svazcích nebo sítích, spojených s plasmatickou membránou.
- Aktinová vlákna jsou polární útvary s rychle a pomalu rostoucím koncem. Skládání a rozebírání vláken je kontrolováno hydrolyzou ATP, jež je pevně navázaná ke každému monomeru aktinu.
- Různé aktinové útvary buňky a jejich funkce závisí na četných aktin-vázajících proteinech. Ty jsou schopny regulovat polymeraci aktinových vláken, příčně spojují vlákna a vytvářejí řídké sítě nebo pevné svazky vláken, připevňují vlákna k membránám a pohybují jedním vláknem vzhledem k vlákně druhému.
- Myosiny jsou molekulární motory, využívající energii hydrolyzy ATP k pohybu podél aktinových vláken. Jsou schopny přenášet organely podél aktinových svazků a mohou vytvářet skluz aktinových vláken vzhledem k dalším aktinovým vláknům v kontraktilních svazcích, umístěných v cytoplasmě.
- Síť aktinových vláken pod plasmatickou membránou tvoří buněčný kortex, jež zodpovídá za tvar a pohyb buněčného povrchu, včetně pohybů, souvisejících s posunem buňky na podložce.
- Svalový stah je závislý na posunu aktinových vláken podél filament myosinu II; stah je poháněn opakovaným pohybem hlaviček myosinových molekul.
- Svalový stah je spouštěn rychlým zvýšením koncentrace cytosolového Ca^{2+} ; tím dojde k přenosu signálu prostřednictvím proteinů, vázajících Ca^{2+} , ke kontraktilnímu aparátu.

Klíčová slova

aktinové vlákno
bičík
buněčný kortex
centriola

centrosom
cytoskelet
dynamická nestabilita
dynein
filopodium
jaderná lamina

kinesin
lamelipodium
mikrotubulus
molekulový motor
myofibrila
myosin

řasinka
sarkomera
střední filamentum
tubulin

17 Buněčné dělení

PŘEHLED BUNĚČNÉHO CYKLU

- Eukaryontní buněčný cyklus je rozdělen do čtyř fází
- Cytoskelet se účastní mitozy i cytokineze
- Některé organely se v průběhu mitozy dělí

MITOZA

- Mitotické vřetenko se začíná skládat v profázi
- Chromosomy se připojují na mitotické vřetenko v prometáfázi
- V metafázi se chromosomy řadí v ekvatoriální rovině vřetenka
- K segregaci dceřiných chromosomů dochází v anafázi
- Jaderný obal znovu vzniká v telofázi

CYTOKINEZE

- Mitotické vřetenko určuje rovinu dělení cytoplasmy
- Kontraktilní prstenec živočišných buněk je tvořen aktinem a myosinem
- Cytokineze u rostlinných buněk zahrnuje tvorbu nové buněčné stěny

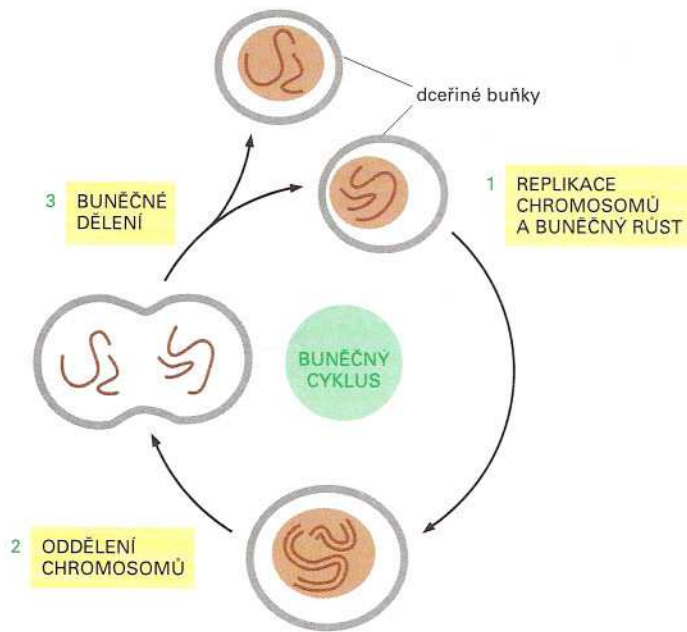
MEIOZA

- Homologní chromosomy se v průběhu meiozy rozcházejí
- V meioze dochází ke dvěma buněčným dělením místo jednoho

„Tam, kde vzniká buňka, tam před tím musela nějaká buňka existovat, stejně jako živočichové mohou vznikat jen z živočichů a rostliny pouze z rostlin.“ Tato *buněčná doktrína* navržená německým patolo-
logem Rudolfem Virchowem v roce 1858 ukazuje hlubokou myšlenku kontinuity života. Buňky vznikají z buněk a jedinou možnou cestou, jak vytvořit více buněk, je dělení buněk, které již existují. Všechny živé organismy od jednobuněčných bakterií po mnohobuněčné savce jsou výsledky opakovaného buněčného růstu a dělení již od počátku vzniku života před více než třemi miliardami let.

Buňka se rozmnožuje prováděním uspořádaného sledu akcí, ve kterých zdvojnásobí svůj obsah a pak se dělí na dvě buňky. Tento cyklus duplikace a dělení, známý jako **buněčný cyklus**, je základním mechanismem, kterým se rozmnožuje vše živé. U jednobuněčných organismů, jako jsou bakterie nebo kvasinky, vzniká buněčným dělením celý nový organismus, zatímco u mnohobuněčných organismů je pro vznik nového individua z jednobuněčného vajíčka zapotřebí mnoha buněčných dělení. U většiny mnohobuněčných organismů k buněčnému dělení dochází i v průběhu života – i během dospělosti je nezbytné vyměnit buňky, které odumřely. Například u dospělých lidí se některé buňky obvykle vůbec nedělí (např. nervové a svalové buňky), ale mnoho jiných se dělí, i když různě rychle: například jaterní buňky se dělí přibližně jednou za rok, zatímco epitelální buňky výstelky střeva a mnoho z prekursorových krevních buněk v kostní dřeni se dělí víckrát než jednou denně. Ve skutečnosti musí každý z nás, aby přežil, vyrobit každou sekundu mnoho milionů buněk: pokud by se buněčné dělení zastavilo – například vystavením vysoké dávce rentgenových paprsků – jedinec by zemřel během několika dní.

Detaily buněčného cyklu se liší od organismu k organismu a v různých obdobích života. Některé charakteristiky jsou však univerzální, protože cyklus musí obsahovat soubor úkonů, které buňka musí provést, aby splnila svůj základní úkol – zkopírovat svoji genetickou informaci a přenést ji na další generaci buněk. Aby vznikly dvě geneticky identické dceřiné buňky, musí být DNA v každém chromosomu věrně zreplikována a zreplikované chromosomy potom musí být



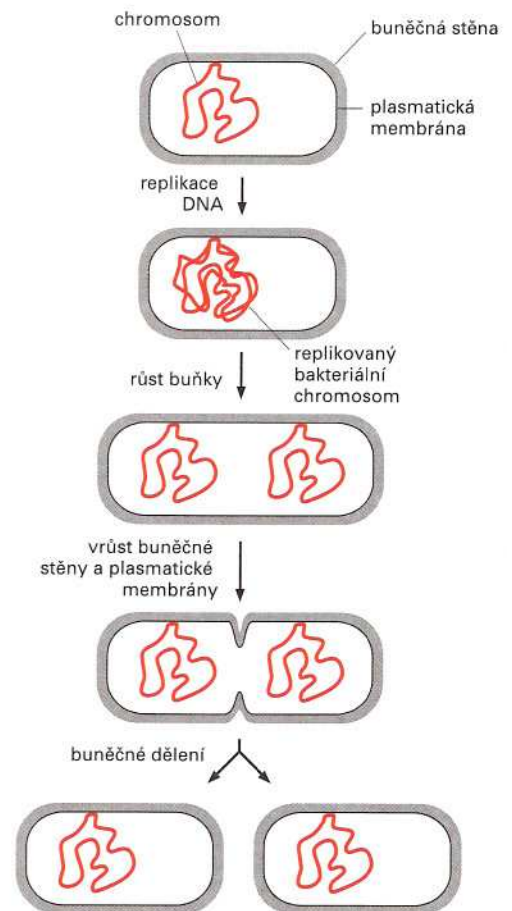
Obrázek 17-1 Buněčný cyklus. Na dělení hypotetické eukaryontní buňky se dvěma chromosomy je pro ilustraci ukázáno, jak při každém buněčném cyklu vznikají dvě geneticky identické dceřiné buňky.

přesně rozděleny mezi obě dceřiné buňky tak, aby každá buňka získala kopii kompletního genomu (obr. 17-1). Ve většině případů v každém buněčném cyklu buňky zdvojují svůj objem; jinak by se stávaly při každém dělení menšími, jako se tomu děje u některých časných embryí, jak si povíme později.

Nejjednodušší a nejrychlejší je buněčné dělení u bakterií, které nemají jádro a obsahují jediný chromosom. Například u *Escherichia coli* může celý buněčný cyklus za příznivých růstových podmínek trvat méně než dvacet minut. Její jediný kruhový chromosom, který obsahuje jedinou molekulu DNA, je přichycen k plasmatické membráně a zůstává k ní připojen i v průběhu své replikace. Jak buňka roste, jsou oba nové chromosomy od sebe oddělovány. Když buňka přibližně zdvojnásobí svoji velikost, rozdělí se jednoduchým dělením. Tento proces se nazývá *binární dělení*, protože se nová buněčná stěna a plasmatická membrána dostanou mezi oba chromosomy, a tak se vytvoří dvě samostatné dceřiné buňky (obr. 17-2).

Buněčné dělení u eukaryontních buněk, a to i u jednobuněčných eukaryot, jako jsou kvasinky a měňavky, je mnohem složitější: částečně díky tomu, že hlavní genetická informace buňky – její jaderný genom – je rozložena mezi mnoho chromosomů (připomeňme si, že eukaryontní buňka obsahuje také malé množství DNA ve svých mitochondriích; pokud se jedná o rostlinnou buňku, i v chloroplastech). Eukaryontní buňky také obsahují důmyslnou síť cytoplasmatických organel a cytoskeletálních filament, která musí být všechna zduplikována a rovnoměrně rozdělena mezi obě dceřiné buňky. Tyto složité cytoplasmatické a jaderné procesy musí být v průběhu eukaryontního buněčného cyklu vzájemně koordinovány.

Obrázek 17-2 Buněčné dělení u bakterií. Bakteriální chromosom obsahující jedinou kruhovou molekulu DNA je přichycen k plasmatické membráně a zůstává k ní přichycen během své replikaci i po ní. Dvě nové molekuly DNA jsou od sebe odděleny růstem buňky, buněčná stěna a plasmatická membrána se mezi ně vchlipují a rozdělují tak buňku na dvě jednoduchým dělením. V bakteriální buňce neexistují žádné organely, takže tato metoda dělení postačuje k rozdělení genetického materiálu a obsahu cytoplazmy na dvě stejné části mezi obě dceřiné buňky.



Abychom si vysvětlili, jak se buňky rozmnožují, musíme se zamyslet nad třemi hlavními otázkami: (1) Jak buňky duplikují svůj obsah? (2) Jak svůj zdvojený obsah třídí a dělí na dvě části? (3) Jak buňky koordinují veškerou mašinérii, která je potřebná pro tyto dva procesy, aby bylo například zajištěno, že k dělení nedojde dříve, než je duplikace kompletní? První problém je řešen jinde – v Kapitole 6 je probráno, jak se DNA replikuje, a v Kapitolách 7, 11, 14 a 16 jsme si ukázali, jak si buňka vyrábí ostatní komponenty, jako jsou proteiny, membrány, organely a cytoskeletální filamenta. V této kapitole si vyjasníme druhý problém – fyzický proces buněčného dělení. V Kapitole 18 se zaměříme na třetí a nejzávažnější problém – jak eukaryotní buňka koordinuje různé kroky svého rozmnožovacího cyklu.

Většina této kapitoly se týká událostí, které se u typické eukaryotní buňky objevují během jaderného dělení (*mitozy*) a cytoplasmatického dělení (*cytokineze*). V závěrečné části kapitoly se krátce podíváme na srovnatelné události objevující se v průběhu *meiozy*, specializovaného buněčného dělení, kterým vznikají haploidní gamety – u živočichů spermie a vajíčka – z diploidních prekursorových buněk (viz Kapitolu 9). Abychom se seznámili se základními pojmy buněčného dělení, začneme krátkým popisem událostí typického živočišného buněčného cyklu.

Přehled buněčného cyklu

Délka buněčného cyklu se značně liší od jednoho buněčného typu k druhému. Jednobuněčná kvasinka se v ideálních podmínkách může rozdělit každých 90–120 minut, zatímco savčí jaterní buňka se v průměru rozdělí méně než jedenkrát za rok (tabulka 17-1). Zde se zaměříme na posloupnost událostí u středně rychle se dělící savčí buňky s délkou buněčného cyklu okolo 24 hodin.

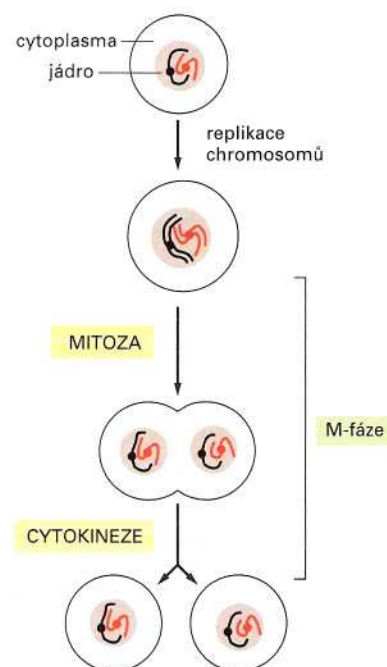
Eukaryotní buněčný cyklus je rozdělen do čtyř fází

Eukaryotní buněčný cyklus je tradičně rozdělován do čtyř částí neboli *fází*. Při pohledu do mikroskopu jsou nejdramatičtějšími událostmi dělení jádra (proces nazývaný *mitoza*) a dělení buňky na dvě v procesu nazývaném *cytokineze*. Oba procesy spolu tvoří *M-fázi* buněčného cyklu (obr. 17-3). U typické savčí buňky trvá celá M-fáze přibližně hodinu, což je pouze malá část z celkové délky buněčného cyklu.

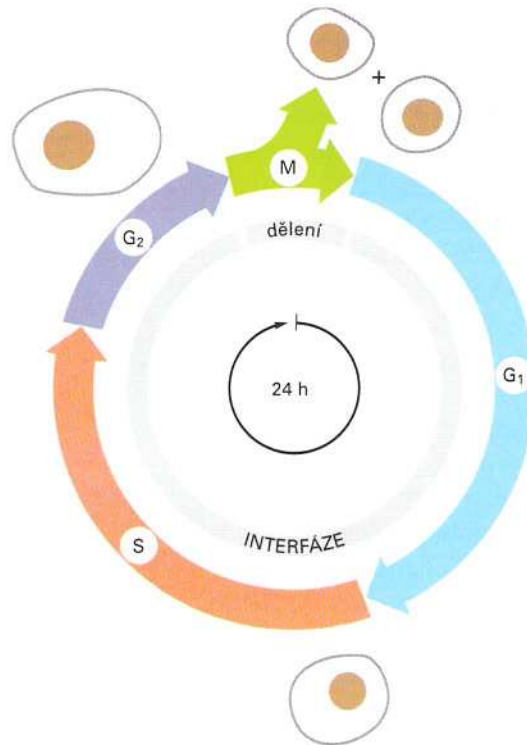
Doba mezi dvěma M-fázemi je nazývána *interfáze*. Při pozorování v mikroskopu se zdá, avšak mylně, že se v této fázi nic neděje a že se buňka pouze jednoduše zvětšuje. Přesto je interfáze pro buňku velice

Tabulka 17-1 Délka buněčného cyklu některých eukaryotních buněk

Buněčný typ	Délka buněčného cyklu
Buňky časného žabího embrya	30 min
Buňky kvasinky	1,5 - 3 h
Buňky střevního epitelu	~12 h
Savčí fibroblasty v kultuře	~20 h
Lidské jaterní buňky	~1 rok



Obrázek 17-3 M-fáze buněčného cyklu. M-fáze je tvořena jaderným dělením (mitoza) s následným cytoplasmatickým dělením (cytokineze).



Obrázek 17-4 Čtyři po sobě jdoucí fáze typického eukaryontního buněčného cyklu. Během interfáze buňka neustále roste. V M-fázi se růst buňky zastaví, nejprve se rozdělí jádro a potom následuje buněčné dělení. K replikaci DNA dochází v části interfáze nazývané S-fáze. G₁-fáze vyplňuje mezeru mezi M- a S-fází; G₂-fáze se nachází mezi S- a M-fází.

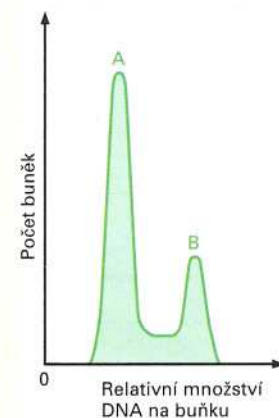
rušné období, které je rozdělováno do dalších tří fází buněčného cyklu. Během **S-fáze** (S = syntéza) buňka replikuje svoji jadernou DNA, což je základní předpoklad pro buněčné dělení. S-fáze se nachází v mezeře mezi dvěma fázemi, ve kterých buňka roste. **G₁-fáze** (G z anglického *gap* = mezeru) je období mezi koncem M-fáze a začátkem S-fáze (syntézy DNA). **G₂-fáze** je stadium buněčného cyklu mezi koncem S-fáze a začátkem M-fáze (obr. 17-4). Jak si vysvětlíme v Kapitole 18, ve fázích G₁ a G₂ existují určitá období, ve kterých se buňka rozhoduje, zda přejde do další fáze nebo zda se zastaví v této fázi buněčného cyklu, aby získala více času na přípravu.

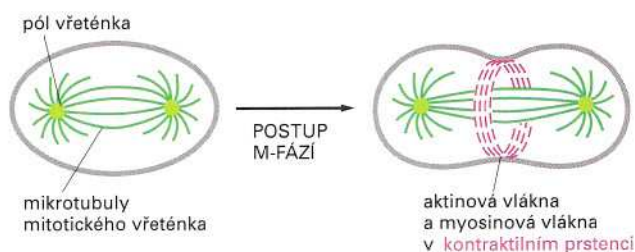
Během celé interfáze buňka přepisuje své geny, syntetizuje proteiny a zvětšuje svoji velikost. Fáze G₁ a G₂ představují pro buňku jakýsi čas navíc, aby mohla vyrůst a zduplikovat své cytoplasmatické organelly: kdyby interfáze trvala pouze tak dlouho jako replikace DNA, buňka by před rozdělením neměla čas zdvojnásobit svoji hmotnost a zmenšovala by se s každým buněčným dělením. K tomu v některých zvláštních případech také ve skutečnosti dochází – například u některých živočišných embryí je několik prvních dělení po oplození velice rychlých. Z velké vaječné buňky tak vzniká velké množství menších buněk, protože v těchto buněčných cyklech buňky před rozdělením nerostou a fáze G₁ a G₂ jsou extrémně krátké.

První snadno viditelnou známkou toho, že buňka přechází do M-fáze, je postupná *kondenzace* chromosomů, které byly zreplikovány během předcházející S-fáze (dvě kopie každého chromosomu – sesterské chromatidy – přesto zůstávají pevně spojeny dohromady). Kondenzace chromosomů určuje konec G₂-fáze. V této části buněčného cyklu se stávají chromosomy viditelnými ve světelném mikroskopu, a to jako dlouhá vlákna, která se postupně zkracují a ztlustňují způsobem popsaným v Kapitole 8. Tato kondenzace snižuje pravděpodobnost, že se chromosomy navzájem propletou, a je tedy fyzicky jednodušší je během mitózy od sebe oddělit.

Otázka 17-1 Buňky z rostoucí populace byly obarveny barvou, která po navázání na DNA fluoreskuje, takže intenzita fluorescence je přímo úměrná množství DNA v každé buňce. Pro měření množství DNA v každé buňce byly buňky analyzovány fluorescencí aktivovaným třídícím buněk (FACS, z anglického *fluorescence-activated cell sorter*) – přístrojem, který registruje intenzitu fluorescence v jednotlivých buňkách. Počet buněk s určitým obsahem DNA byl vyneseno do grafu na obr. Q17-1. Kde byste na grafu očekávali výskyt buněk v následujících fázích buněčného cyklu: G₁, S, G₂ a v mitóze? Která z fází buněčného cyklu je v této populaci buněk nejdelší?

Obrázek Q17-1





Obrázek 17-5 Dvě přechodné cytoskeletální struktury, které zprostředkovávají M-fázi u živočišných buněk. Nejdříve vzniká mitotické vřeténko umožňující rozchod chromosomů. Pak dochází ke vzniku kontraktálního prstence, který rozděluje buňku na dvě.

Cytoskelet se účastní mitozy i cytokineze

Jakmile jsou zreplikované chromosomy kondenzovány, v buňce postupně vznikají dvě oddělené cytoskeletální struktury, aby uskutečnily dva mechanické procesy, které probíhají během M-fáze – jaderné dělení (mitozu) a cytoplasmatické dělení (cytokinezi). Jakmile splní svoji úlohu, jsou obě struktury rychle rozloženy.

Aby vznikly dvě geneticky identické dceřiné buňky, musí eukaryotní buňka od sebe naprosto přesně oddělit zreplikované chromosomy a do každého dceřiného jádra umístit právě jednu kopii každého chromosomu. K tomu dochází během mitozy a za správné rozdělení chromosomů je zodpovědné *mitotické vřeténko*, které je tvořeno převážně mikrotubuly (o nichž jsme hovořili v Kapitole 16) a které se začíná formovat v pozdní G_2 -fázi. Mitotické vřeténko tvořené mikrotubuly zprostředkovává mitozu ve všech eukaryotních buňkách – rostlinných, živočišných i v jednobuněčných kvasinkách.

Druhá cytoskeletální struktura vznikající v M-fázi je zodpovědná za cytokinezi, ale můžeme ji najít pouze u živočišných buněk. Protože je tvořena převážně z kontraktálního prstence aktinových a myosinových filament (viz Kapitolu 16), je tato struktura nazývána *kontraktální prstenec*. Kontraktální prstenec začíná vznikat na konci mitozy pod plasmatickou membránou v ekvatoriální rovině buňky. Jak se prstenec stahuje, táhne plasmatickou membránu dovnitř, až se buňka rozdělí na dvě (obr. 17-5). Cytokineze u rostlinných buněk, které mají navíc buněčnou stěnu, probíhá zcela odlišným způsobem, jak si ukážeme později.

Některé organely se v průběhu mitozy dělí

Proces mitozy zajišťuje, že každá z dceřiných buněk obdrží úplnou sadu chromosomů. Avšak při dělení eukaryotní buňky musí obě dceřiné buňky získat také všechny ostatní nezbytné buněčné komponenty včetně organel obalených membránou. Organely jako mitochondrie a chloroplasty nemohou vznikat spontánním sestavením ze svých stavebních částí, mohou vznikat pouze růstem a rozdělením již dříve existujících organel. Podobně si buňka nemůže vytvořit zcela nové endoplasmatické retikulum nebo Golgiho aparát, pokud neobsahuje alespoň jeho malou část, která může být později zvětšena. Jak jsou tedy tyto membránou obalené organely segregovány, když se buňka dělí? Organely jako mitochondrie a chloroplasty se obvykle v buňce vyskytují ve velkém množství a budou proto bezpečně zděděny, jestliže se jejich počet během každého buněčného cyklu průměrně zdvojnásobí. Ostatní organely, jako je Golgiho aparát a endoplasmatické

Otázka 17-2 Golgiho aparát je rozdělen mezi dceřiné buňky při dělení náhodnou distribucí fragmentů, které vznikly během mitozy. Vysvětlete, proč by náhodné rozdělení chromosomů nefungovalo.

retikulum, se během mitozy rozpadají na malé fragmenty, což zvyšuje šanci, že budou během buněčného dělení víceméně rovnoměrně rozděleny mezi obě dceřiné buňky

Mitoza

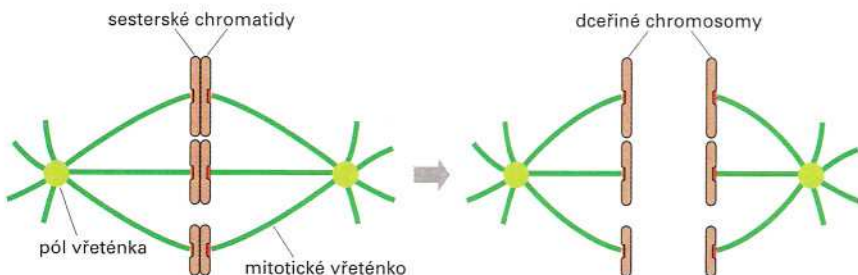
Před začátkem jaderného dělení neboli **mitozy** byl každý chromosom zreplikován (viz Kapitola 8) a je tvořen dvěma identickými **chromatidami** (nazývanými *sesterské chromatidy*), které jsou po celé délce spojeny interakcemi mezi proteiny, navázanými na povrchu obou chromatid. Během mitozy jsou tyto proteiny rozštěpeny, sesterské chromatidy se pak od sebe oddělují a stávají se na sobě nezávislými dceřinými chromosomy, které jsou mitotickým vřeténkem taženy od sebe k opačným pólům buňky (obr. 17-6).

Mitozu tvoří plynulý sled událostí, ale tradičně je rozdělována na pět stadií: (1) během *profáze* dochází ke kondenzaci zreplikovaných chromosomů a vně jádra začíná vznikat mitotické vřeténko; (2) v *prometafázi* se rozpadá jaderný obal, což umožňuje navázání chromosomů na mikrotubuly vřeténka; (3) v *metafázi* se všechny chromosomy shromáždí v centru mitotického vřeténka (v jeho ekvatoriální rovině); (4) během *anafáze* se obě sesterské chromatidy od sebe synchronizovaně oddělují a jsou taženy mitotickým vřeténkem k opačným pólům buňky (viz obr. 17-6); (5) v *telofázi* se znovu vytváří jaderný obal kolem každé sady chromosomů za vzniku dvou jader. Všechny pět stadií mitozy spolu s cytokinezí je zachyceno na panelu 17-1 (str. 554-555). V této části kapitoly si ukážeme, jak vzniká mitotické vřeténko a jak pracuje.

Mitotické vřeténko se začíná skládat v profázi

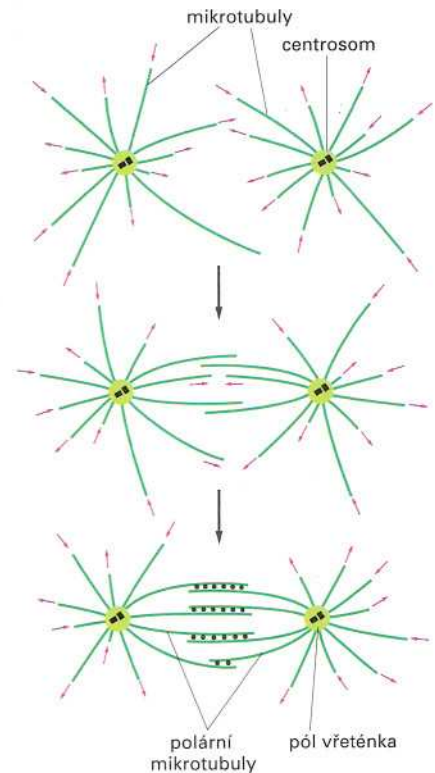
U většiny živočišných buněk v interfázi existuje v cytoplasmě uskupení mikrotubulů vybíhajících z jediného centrosomu, jak jsme si pověděli v Kapitole 16. Ke konci S-fáze buňka svůj centrosom duplikuje a vznikají dva dceřiné centrosomy, které můžeme zpočátku najít u jednoho pólu jádra. Na začátku **profáze** se od sebe oba centrosomy oddělují a pohybují se směrem k opačným pólům buňky. Jejich pohyb je řízen proteiny asociovanými s centrosomem, které pro posun podél mikrotubulů využívají energii pocházející z hydrolyzy ATP. (Obecný mechanismus fungování motorových proteinů je vysvětlen v Kapitole 16.) Každý centrosom slouží jako organizátor vlastního svazku mikrotubulů; oba svazky pak spolu interagují za vzniku **mitotického vřeténka** (viz panel 17-1).

Jak bylo řečeno v Kapitole 16, mikrotubuly, které vybíhají z centrosomu v interfázové buňce, kontinuálně polymerují a depolymerují



Obrázek 17-6 Rozchod sesterských chromatid. Každý pár sesterských chromatid se od sebe odděluje za vzniku dvou dceřiných chromosomů, které jsou mitotickým vřeténkem taženy k opačným pólům buňky

Obrázek 17-7 Vznik bipolárního mitotického vřeténka selektivní stabilizací interagujících mikrotubulů. Nové mikrotubuly vyrůstají náhodnými směry z obou centrosomů. U živočišných buněk je v centru každého centrosomu umístěn pár centriol (viz obr. 16-10). Oba konce mikrotubulů, nazývané plus- a minus-konce, mají odlišné vlastnosti; k centrosomu je mikrotubulus připoután svým minus-koncem (viz Kapitola 16). Volné plus-konce jsou „dynamicky nestabilní“ a přecházejí z rovnoměrného růstu (*červené šipky směřující ven*) k rychlému rozpadu (*červené šipky směřující dovnitř*). Pokud spolu v překrývající se zóně interagují dva mikrotubuly vybíhající z různých centrosomů, proteiny asociované s mikrotubuly je spojí dohromady (*černé tečky*), a to způsobem, který stabilizuje jejich plus-konce snížením pravděpodobnosti depolymerace.



přidáváním a ztrátou tubulinových podjednotek tvořících mikrotubulus: jednotlivé mikrotubuly kolísají mezi růstem a odbouráváním - tento stav je nazýván *dynamická nestabilita* (viz obr. 16-11). Mikrotubuly, které vybíhají z obou oddělených dceřiných centrosomů, se na začátku mitózy chovají stejně, ale jsou mnohem dynamičtější - změny mezi polymerací a depolymerací jsou přibližně dvacetkrát rychlejší než u interfázových mikrotubulů. Navíc z každého centrosomu vybíhá mnohem větší množství mikrotubulů, které jsou v průměru mnohem kratší. Předpokládá se, že tyto rozdíly odrážejí změny ve fosforylaci určitých centrosomálních proteinů, ke kterým dochází na počátku profáze.

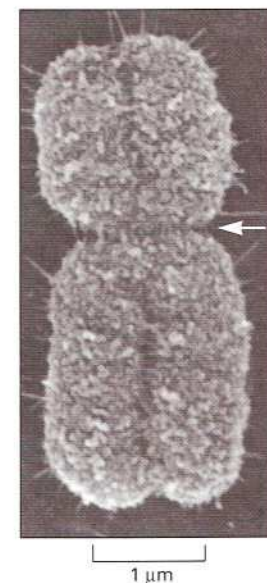
Rychle rostoucí a zkracující se mikrotubuly vybíhají z obou centrosomů do všech stran a prozkoumávají vnitřek buňky. Během profáze, zatímco je jaderný obal stále neporušený, jsou některé z těchto mikrotubulů stabilizovány proti depolymeraci a vytvářejí vysoce organizované mitotické vřeténko: některé mikrotubuly vyrůstající z různých centrosomů spolu interagují a spojením dvou sad mikrotubulů vzniká základní kostra mitotického vřeténka s jeho charakteristickým bipolárním tvarem. Tyto interagující mikrotubuly se nazývají *polární mikrotubuly* (neboť pocházejí ze dvou pólů vřeténka) a dva centrosomy, z nichž mikrotubuly vznikají, jsou nazývány *póly vřeténka* (obr. 17-7).

V dalším stadiu mitózy jsou zreplikované chromosomy přichyceny k vřeténku takovým způsobem, že po oddělení sesterských chromatid jsou obě chromatidy taženy k opačným pólům.

Chromosomy se připojují na mitotické vřeténko v prometafázi

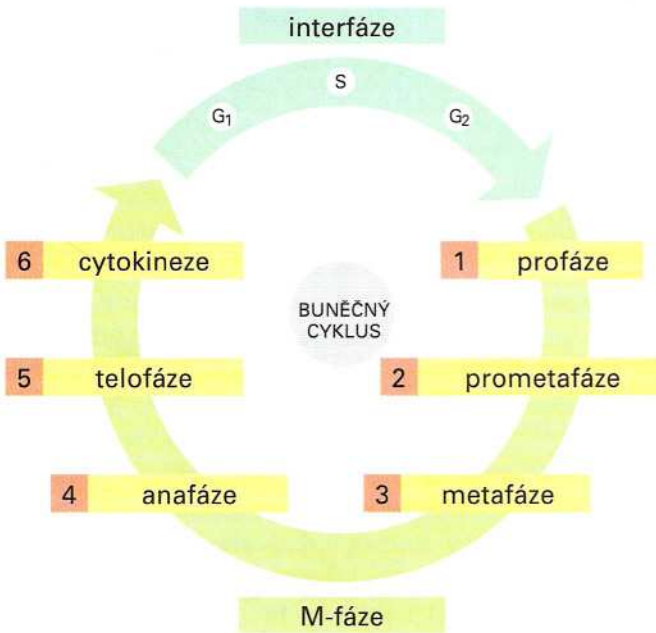
Prometafáze začíná v okamžiku rozpadu jaderného obalu na malé membránové váčky. Jak si povíme později, tento proces je spouštěn fosforylací a následným rozpadem intermediárních filament jaderné laminy – sítě filamentálních proteinů, která se nachází pod jaderným obalem a stabilizuje ho (viz obr. 14-8). Mikrotubuly vřeténka, které byly prozatím mimo jádro, tím získávají přístup k zreplikovaným chromosomům a vážou se na ně (viz panel 17-1, str. 554-555).

Mikrotubuly vřeténka se vážou na chromosomy díky speciálním proteinovým komplexům nazývaným **kinetochory**, které vznikají na chromosomech během pozdní profáze. Jak bylo řečeno v Kapitole 8, každý zreplikovaný chromosom je tvořen dvěma sesterskými chroma-



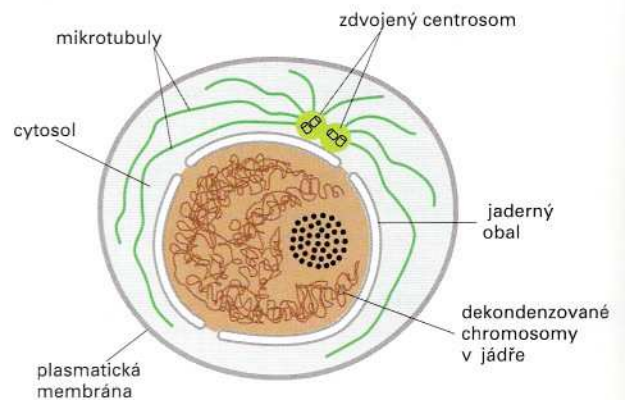
Obrázek 17-8 Zreplikovaný mitotický chromosom. Na fotografii z elektronového rádkovacího mikroskopu je zachycen lidský mitotický chromosom tvořený dvěma sesterskými chromatidami, které jsou spojeny po celé své délce. Zaškrčená oblast (*šipka*) je centromera, na které se uspořádávají kinetochory.

BUNĚČNÉ DĚLENÍ



Rozdělení buňky na dvě buňky dceřiné se odehrává v M-fázi buněčného cyklu. M-fáze obsahuje dělení jádra čili mitozu, a rozdělení cytoplasmy, čili cytokinezi. Na tomto obrázku byla M-fáze rozšířena. Sama mitóza se skládá z pěti kroků a o těch, spolu s cytokinezí, bude řeč na tomto panelu.

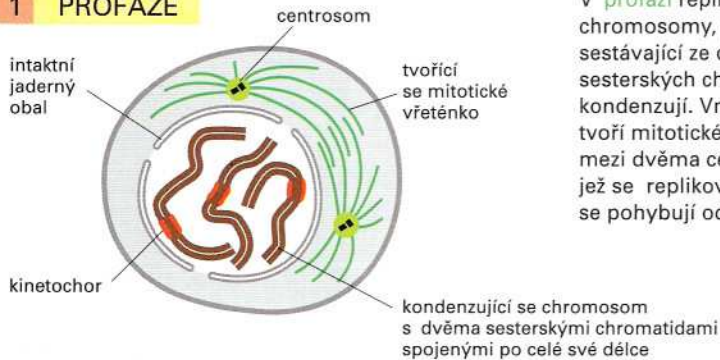
INTERFÁZE



Během interfáze nabývá buňka na objemu. Chromosomální DNA je replikována a centrosom je duplikován.

Fotografie ze světelného mikroskopu na této dvoustraně byly pořízeny s živou buňkou z plicního epitelu čolka. Táž buňka byla fotografována v různých okamžicích jejího dělení na dvě buňky dceřiné.

1 PROFÁZE

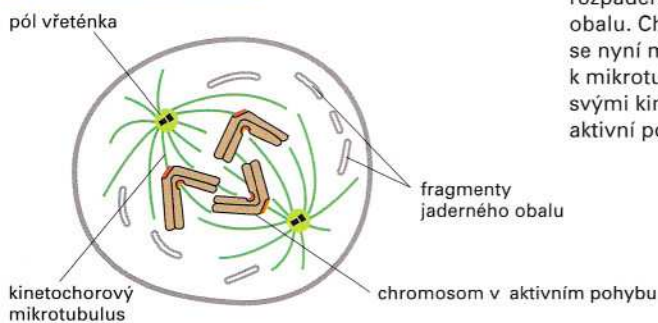


V **profázi** replikované chromosomy, každý sestávající ze dvou sesterských chromatid, kondenzují. Vně jádra se tvoří mitotické vřeténko mezi dvěma centrosomy, jež se replikovaly a nyní se pohybují od sebe.



Čas = 0 min

2 PROMETAFÁZE

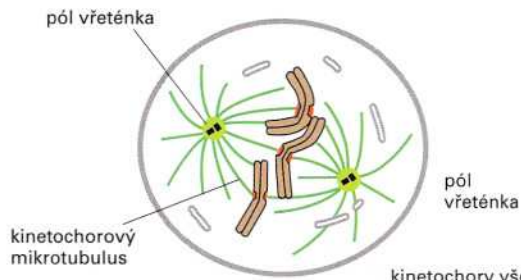


Prometafáze začíná náhle rozpadem jaderného obalu. Chromosomy se nyní mohou připojit k mikrotubulům vřeténka svými kinetochory a zahájit aktivní pohyb.



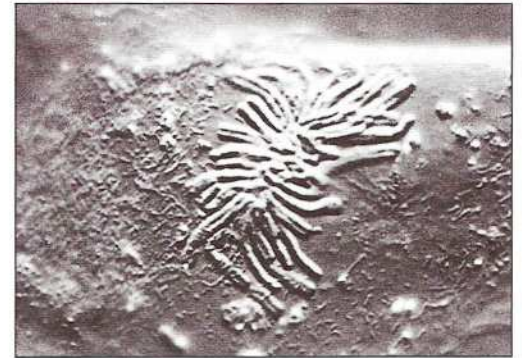
Čas = 79 min

3 METAFÁZE



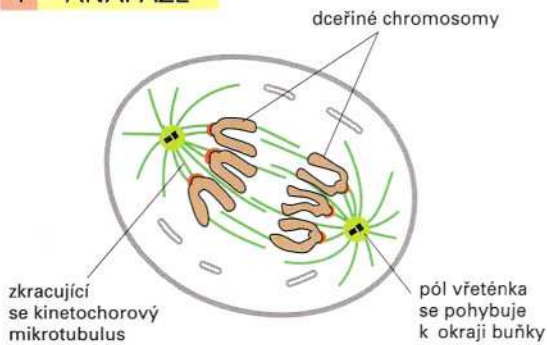
kinetochory všech chromosomů jsou srovnány v rovině mezi oběma póly vřetének

V **metafázi** jsou chromosomy srovnány v ekvatoriální rovině vřeténka uprostřed mezi jeho póly. Párové kinetochorové mikrotubuly na každém chromosomu jsou připojeny k opačným pólům vřeténka.



Čas = 250 min

4 ANAFÁZE

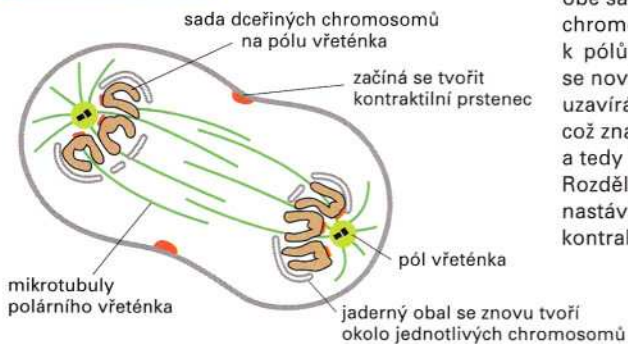


V **anafázi** se párové chromatidy synchronně oddělují od sebe a tvoří dva dceřiné chromosomy, při čemž je každý z nich pomalu tažen k pólu svého vřeténka. Kinetochorové mikrotubuly se zkracují a póly se oddalují, což obojí přispívá k separaci chromosomů.

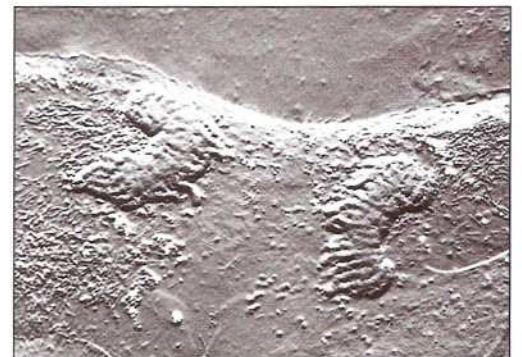


Čas = 279 min

5 TELOFÁZE

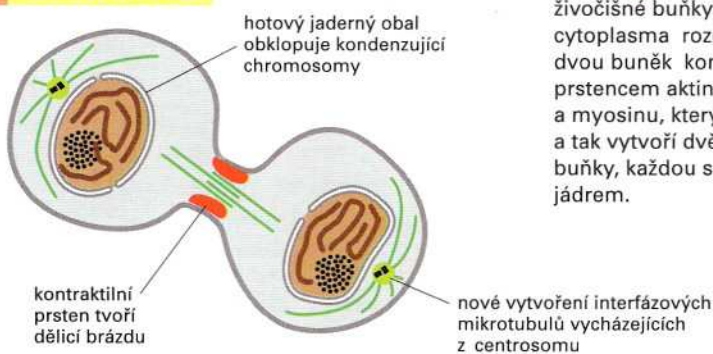


Během **telofáze** se obě sady dceřiných chromosomů dostanou k pólům vřeténka. Tvoří se nový jaderný obal, který uzavírá každou sadu, což znamená tvorbu jader a tedy i konec mitózy. Rozdělení cytoplasmy nastává spolu s tvorbou kontraktilního prstence.

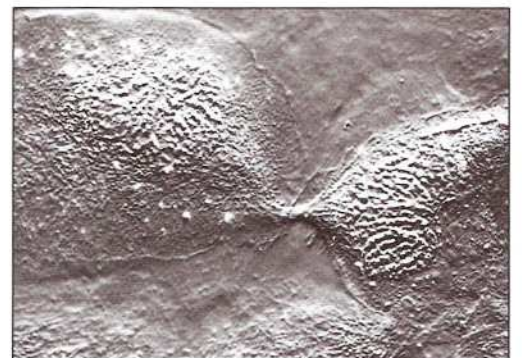


Čas = 315 min

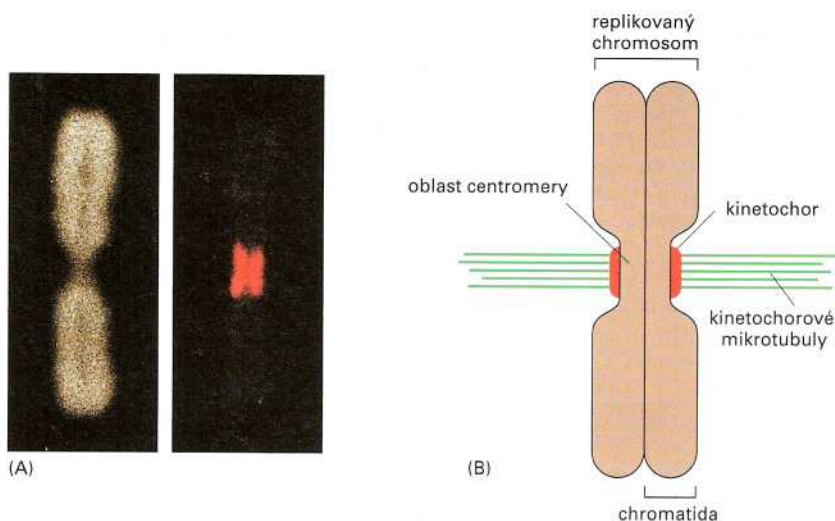
6 CYTOKINEZE



Během **cytokineze** živočišné buňky se cytoplasmata rozdělí do dvou buněk kontraktilním prstencem aktinu a myosinu, který se stáhne, a tak vytvoří dvě dceřiné buňky, každou s jedním jádrem.



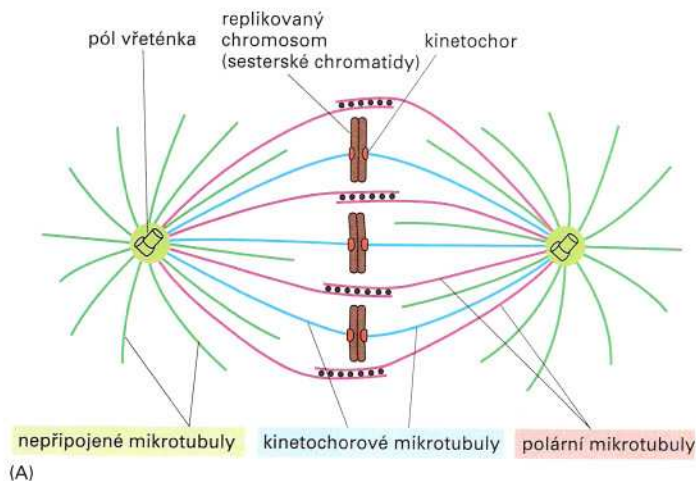
Čas = 362 min



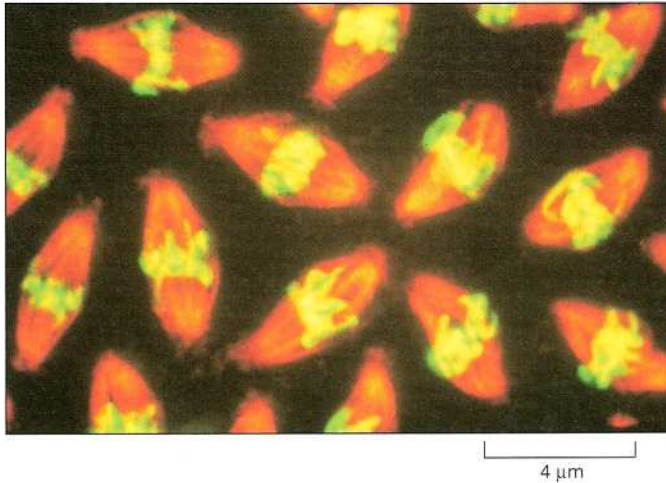
Obrázek 17-9 Kinetochory a kinetochorové mikrotubuly. (A) Zreplikované chromosomy v mitoze. DNA je obarvena fluorescenčním barvivem (*fotografie vlevo*) a kinetochory jsou obarveny červeně fluorescenčními protilátkami, které rozpoznávají proteiny kinetochoru (*fotografie vpravo*). Tyto protilátky pocházejí od pacientů s chorobou zvanou skleroderma (onemocnění, které způsobuje fibrozu pojivových tkání v kůži a ostatních orgánech), u kterých z neznámých důvodů dochází k produkci protilátek rozpoznávajících jejich vlastní kinetochorové proteiny. (B) Schematická kresba mitotického chromosomu ukazuje dvě sestřské chromatidy připojené díky kinetochorům ke kinetochorovým mikrotubulům. Každý kinetochor tvoří destičku na povrchu centromery. Na kinetochory se vážou plus-konce mikrotubulů.

tidami spojenými po celé délce a každá chromatida má zaškrčení v oblasti se speciální sekvencí DNA – tato oblast je nazývána *centromera* (obr. 17-8; viz také obr. 8-5). Před začátkem prometafáze se na každé centromere uspořádávají proteiny kinetochoru do velkého komplexu. Každý zduplikovaný chromosom má tedy dva kinetochory (na každé sestřské chromatidě jeden), které směřují na opačné strany. Vznik kinetochoru je zcela závislý na přítomnosti centromerové sekvence DNA: pokud je tato sekvence odstraněna, kinetochory nemohou vzniknout a chromosomy se pak během mitozy nemohou správně segregovat.

Po rozpadu jaderného obalu se náhodné mikrotubuly setkají s kinetochorem a naváží se na ně a tím i na celý chromosom. Tyto mikrotubuly jsou nyní nazývány *kinetochorové mikrotubuly* a spojují chromosomy s póly vřeténka (obr. 17-9 a viz panel 17-1, str. 554-555).



Obrázek 17-10 Tři druhy mikrotubulů mitotického vřeténka. (A) Schematická kresba vřeténka s připojenými chromosomy ukazuje tři druhy mikrotubulů vřeténka: volné mikrotubuly, kinetochorové mikrotubuly a polární mikrotubuly. Ve skutečnosti jsou chromosomy vzhledem k ostatním útvarům mnohem větší než na obrázku a ke každému kinetochoru je připojeno více mikrotubulů. (B) Mitotické vřeténko ve fázovém kontrastu. Vřeténko bylo izolováno v metafázi a zřetelně ukazuje chromosomy v ekvatoriální rovině vřeténka.



Obrázek 17-11 Velké množství mitotických vřetének v metafázi u embrya drosofil. Mikrotubuly jsou obarveny červeně, chromosomy zeleně. V tomto stadiu vývoje drosofil se v jednom velkém cytoplasmatickém oddílu vyskytuje mnoho jader, která se synchronizovaně dělí. Ačkoliv se metafázová vřeténka obvykle zobrazují dvourozměrně (jako zde), v trojrozměrném zobrazení jsou chromosomy uspořádány do plochy v ekvatoriální rovině vřeténka – tzv. metafázové destičky.

Protože jsou kinetochory umístěny na opačných stranách sesterských chromatid, mají tendenci připojit se k mikrotubulům opačných pólů vřeténka, takže každý zreplikovaný chromosom je připojen k oběma pólům vřeténka (obr. 17-10). Počet mikrotubulů připojených ke každému kinetochoru se různí mezi jednotlivými druhy: například na každý lidský kinetochor se váže 20-40 mikrotubulů, zatímco na kinetochor kvasinky je navázán pouze jeden.

V metafázi se chromosomy řadí v ekvatoriální rovině vřeténka

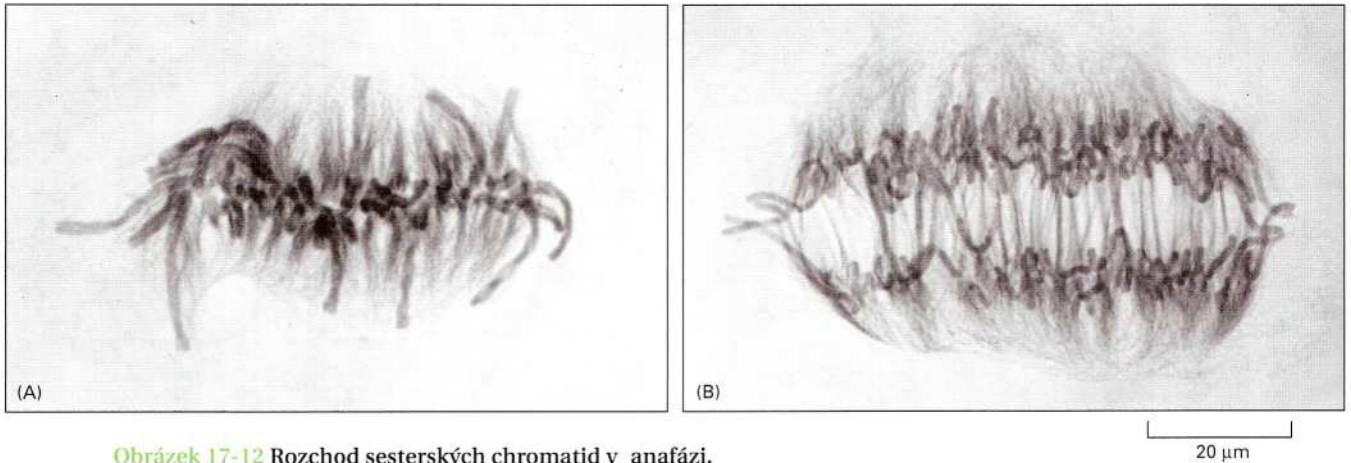
Během prometafáze se chromosomy, nyní už připojené k mitotickému vřeténku, začínají pohybovat sem a tam, až se nakonec uspořádají v ekvatoriální rovině, tedy v poloviční vzdálenosti mezi oběma póly vřeténka, a vytvářejí *metafázovou destičku*. Tato událost definuje začátek **metafáze** (obr. 17-11). Ačkoliv nejsou síly, které umožňují uspořádání chromosomů do ekvatoriální roviny, dobře prozkoumány, předpokládá se podíl jak mikrotubulárních motorových proteinů, tak kontinuální narůstání a odbourávání mikrotubulů. Kontinuální vyvážené přidávání a ztráta tubulinových podjednotek jsou nezbytné pro udržení vřeténka: jestliže je přidávání tubulinových podjednotek zablokováno jedním kolchicinem, ztráta tubulinu pokračuje do té doby, než vřeténko zcela zmizí.

Chromosomy seskupené v ekvatoriální rovině metafázového vřeténka se pohybují sem a tam a nepřetržitě tak upravují svoji polohu, což nasvědčuje přetahování mezi mikrotubuly připojenými k různým pólům vřeténka i po vzniku metafázní destičky. Jestliže je během metafáze jeden z kontaktů kinetochorů s mikrotubuly uměle přerušeno laserovým paprskem, celý chromosom se začne okamžitě pohybovat směrem k pólu, ke kterému zůstal přichycen. Podobně, pokud je přerušeno spojení mezi sesterskými chromatidami, obě chromatidy se od sebe oddělí a putují k opačným pólům. Tyto pokusy ukazují, že chromosomy v metafázní destičce jsou drženy pod značným napětím. Síly, které později odtahují sesterské chromatidy od sebe, zřejmě začínají působit okamžitě, jakmile jsou mikrotubuly připojeny ke kinetochorům.

K segregaci dceřiných chromosomů dochází v anafázi

Na začátku **anafáze** je spojení mezi sesterskými chromatidami

Otázka 17-3 Jestliže použijeme jemnou skleněnou jehlu pro manipulaci s chromosomem uvnitř živé buňky během časné M-fáze, je možné zajistit připojení kinetochorů obou sesterských chromatid k stejnému pólu vřeténka. Toto uspořádání je za normálních podmínek nestabilní, ale připojení může být stabilizováno jemným tahem jehlou za chromosom, takže mikrotubuly, které ho pojí s pólem, jsou napnuté. Co vás napadá o mechanismu, kterým jsou kinetochory za normálních okolností připojovány k mikrotubulům vycházejícím z opačných pólů vřeténka a jak k nim zůstávají připojeny během M-fáze? Je toto zjištění v souladu s možností, že je kinetochor naprogramován k připojení na mikrotubuly různých pólů vřeténka? Vysvětlete svoje odpovědi.



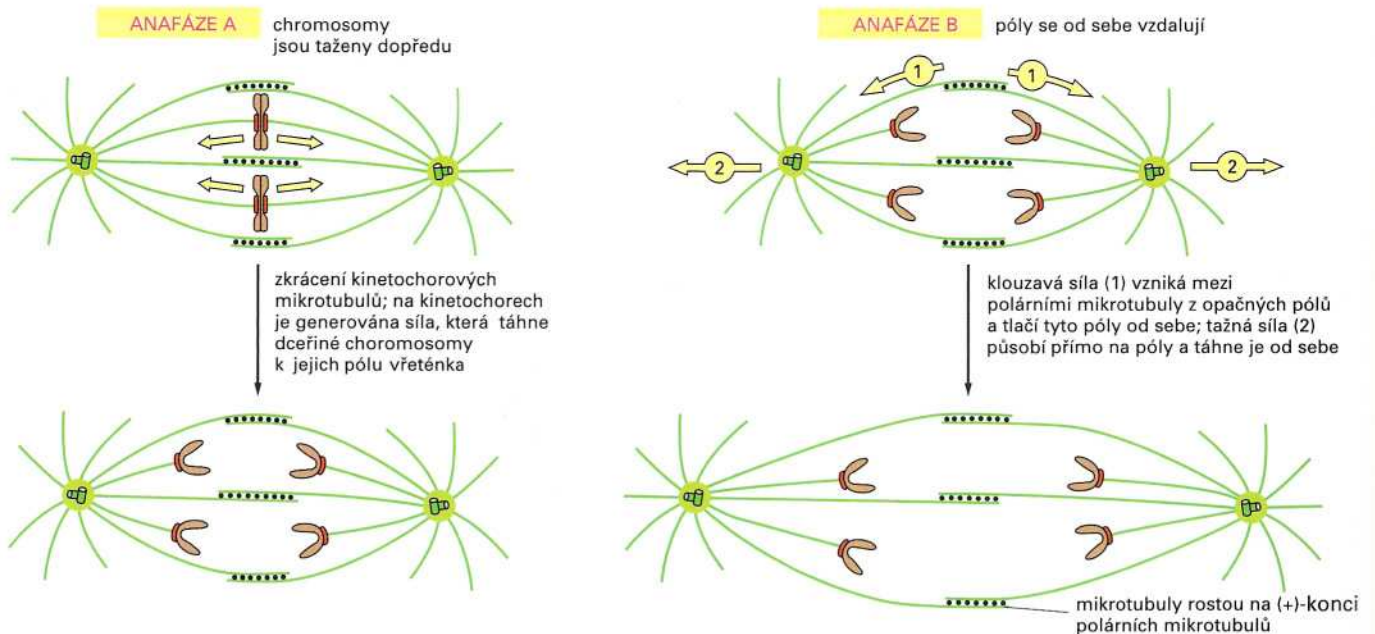
Obrázek 17-12 Rozchod sesterských chromatid v anafázi.

Na přechodu z metafáze (A) do anafáze (B) se od sebe sesterské chromatidy oddělují a jsou taženy směrem od sebe mikrotubuly vřeténka, jak je možno vidět na buňkách endospermu lilie, v nichž byly mikrotubuly obarveny protilátkami s navázanými částicemi zlata. Rostlinné buňky mají obecně méně přesně ohraničené póly vřeténka než živočišné buňky a ačkoliv nejsou vidět, jsou na obou fotografiích umístěny nahoře a dole.

Obrázek 17-13 Dva procesy, které od sebe v anafázi oddělují sesterské chromatidy.

V anafázi A jsou dceřiné chromosomy taženy směrem k opačným pólům depolymerací kinetochorových mikrotubulů u kinetochoru. Hybná síla pro tento pohyb vzniká převážně v kinetochoru. V anafázi B se oba póly vřeténka pohybují směrem od sebe díky dvěma různým silám: (1) prodlužování a klouzání polárních mikrotubulů po sobě tlačí oba póly od sebe a (2) síly vyvíjené ven vybíhajícími mikrotubuly každého pólu vřeténka táhnou oba póly od sebe směrem k povrchu buňky. Všechny tyto síly pravděpodobně závisí na motorových proteinech asociovaných s mikrotubuly.

přerušeno proteolytickými enzymy, což umožňuje každé chromatidě (nyní nazývané *dceřiný chromosom*) pohybovat se směrem k pólu vřeténka, ke kterému je připojena (obr. 7-12). Tento pohyb neboli *segregace* rozděluje chromosomy do dvou identických sad na opačných koncích vřeténka (viz panel 17-1, str. 554-555). Všechny oddělené chromosomy se pohybují stejnou rychlostí, obvykle 1 µm za minutu. Pohyb je výsledkem dvou nezávislých procesů, které jsou zprostředkovány různými částmi mitotického vřeténka. Tyto procesy jsou nazývány *anafáze A* a *anafáze B* a odehrávají se víceméně současně. V anafázi A jsou kinetochorové mikrotubuly zkracovány depolymerací a připojené chromosomy jsou tak od sebe odtahovány. V anafázi B se od sebe pohybují i samotné póly vřeténka, což dále přispívá



k segregaci obou sad chromosomů.

Hybná síla pohybu anafáze A je pravděpodobně generována převážně mikrotubulárními motorovými proteiny na kinetochoru a částečně ztrátou tubulinových podjednotek, ke které dochází především na kinetochorovém konci mikrotubulů. Jednou z možností je, že motorové proteiny kinetochoru „kráčí“ i s připojeným chromosomem podél kinetochorového mikrotubulu a jakmile se plus konec každého mikrotubulu uvolní, depolymeruje.

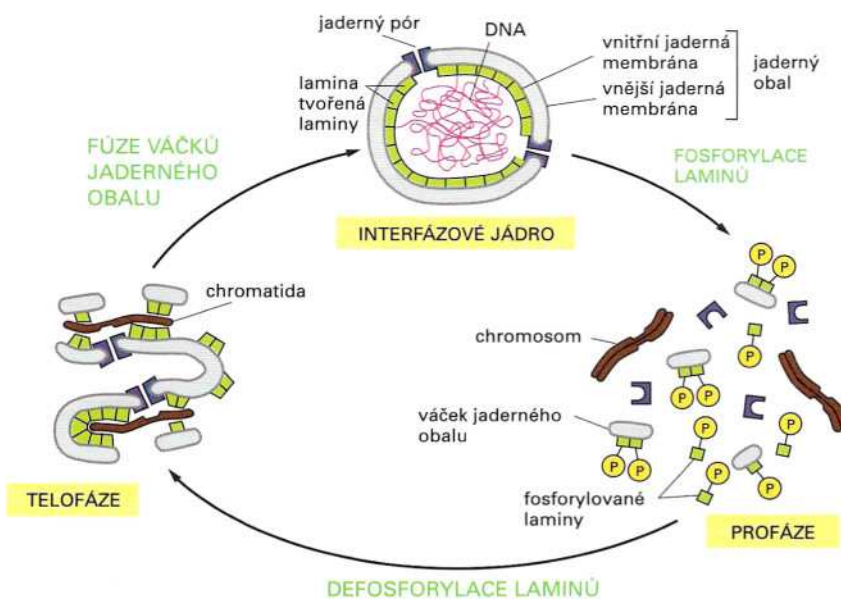
Oddalování pólů vřeténka v anafázi B je doprovázeno prodlužováním polárních mikrotubulů, které polymerují na svých plus (volných) koncích. Předpokládá se, že hybné síly jsou zajišťovány dvěma sadami motorových proteinů, které jsou asociovány s polárními mikrotubuly. Jedna sada proteinů je na dlouhých polárních mikrotubulech, které vytvářejí mitotické vřeténko jako takové; tyto motorové proteiny posunují v ekvatoriální rovině vřeténka polární mikrotubuly vycházející z opačných pólů po sobě a tlačí tak póly od sebe. Druhá sada proteinů se nachází na mikrotubulech, které vybíhají z pólu vřeténka do všech stran, ale místo k chromosomům směřují k povrchu buňky. O těchto mikrotubulech se předpokládá, že jsou navázány k vnitřní straně povrchu buňky a táhnou každý pól směrem k povrchu buňky a pryč od druhého pólu (obr. 17-13).

Jaderný obal znovu vzniká v telofázi

Na konci anafáze jsou dceřiné chromosomy rozděleny na dvě stejné skupiny, které se nacházejí na opačných pólech vřeténka. Během **telofáze** – poslední fáze mitózy – se kolem každé sady chromosomů tvoří nový jaderný obal a vznikají dvě dceřiná jádra. Váčky jaderné membrány se nejdříve shlukují kolem jednotlivých chromosomů a později fúzí za vzniku jaderného obalu (viz panel 17-1, str. 554-555). Během tohoto procesu se znovu v obalu skládají ze svých částí jaderné póry (viz Kapitulu 14), a jaderné laminy, proteinové podjednotky intermediárních filament, které byly v profázi fosforylovány, jsou nyní defosforylovány a reasociují za vzniku jaderné laminy,

Obrázek 17-14 Rozpad a znovuvytvoření jaderného obalu během mitózy.

Fosforylace laminů v profázi napomáhá spuštění rozpadu jaderné laminy, což způsobuje rozpad jaderného obalu na jednotlivé váčky. Defosforylace laminů v telofázi pomáhá obrátit tento proces.



skládající se ze tří druhů laminů (obr. 17-14). Jakmile znovu vznikl jaderný obal, skrz póry pronikají do jádra další jaderné proteiny, jádro roste, kondenzované mitotické chromosomy dekondují do svého interfázního stavu a díky této dekonduzaci může být obnovena transkripce genů. Bylo vytvořeno nové jádro a mitoza je dokončena. Vše, co buňce zbývá udělat, je rozdělit se na dvě dceřiné buňky.

Cytokineze

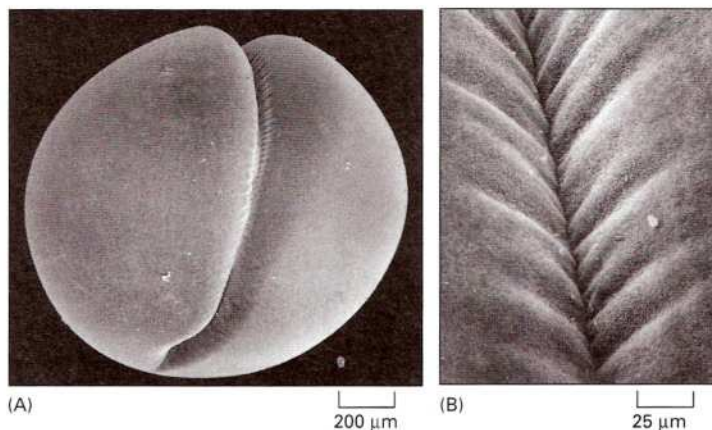
M-fáze v sobě zahrnuje více než segregaci chromosomů a vznik dvou nových jader. Je to také období, ve kterém jsou i ostatní složky buňky – membrány, cytoskelet, organely a rozpustné proteiny, rozděleny mezi dvě dceřiné buňky. Toho je dosaženo **cytokinezí**, procesem, ve kterém je cytoplazma rozdělena na dvě části. Cytokineze obvykle začíná v anafázi, ale není dokončena do té doby, než vzniknou obě dceřiná jádra. Zatímco se v mitoze vytváří přechodná struktura tvořená mikrotubuly – mitotické vřeténko, při cytokinezi se u živočišných buněk vytváří přechodná struktura z aktinových filament – *kontraktilní prstenec* (viz obr. 17-5). Avšak rovina buněčného dělení i načasování cytokineze jsou určeny mitotickým vřeténkem.

Mitotické vřeténko určuje rovinu dělení cytoplasmy

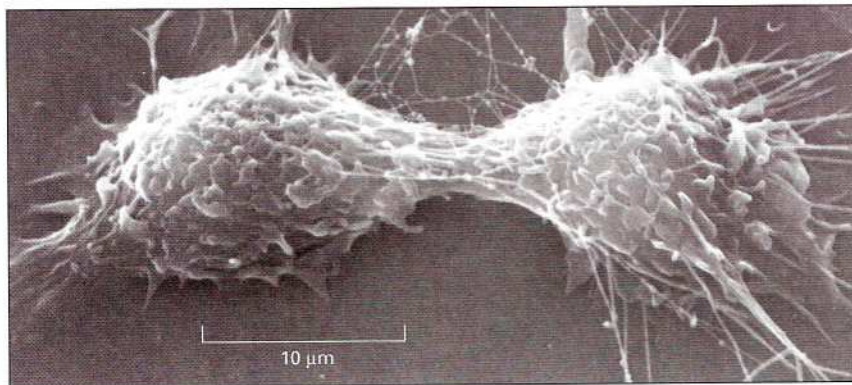
První viditelnou známkou cytokineze u živočišných buněk je sraštění plasmatické membrány a vytvoření rýhy během anafáze (obr. 17-15). Vytvářející se žlábek je vždy kolmý k podélné ose mitotického vřeténka, což zajišťuje, že *dělicí rýha* se vytvoří mezi oběma skupinami dceřiných chromosomů - proto obě dceřiné buňky získají identickou a kompletní sadu chromosomů. Jakmile je ihned po vzniku rýhy mitotické vřeténko záměrně přesunuto (pomocí jemné skleněné jehly vbodnuté do buňky), původní žlábek zmizí a vytvoří se nový, a to v místě odpovídajícím nové poloze a orientaci mitotického vřeténka. Pokud se začal žlábek vytvářet a mitotické vřeténko bylo uměle odstraněno nebo depolymerováno kolchicinem, k rozdělení buňky přesto dojde. Jak tedy mitotické vřeténko určuje pozici dělicí rýhy, zůstává záhadou.

Pokud je mitotické vřeténko umístěno uprostřed buňky, jak je

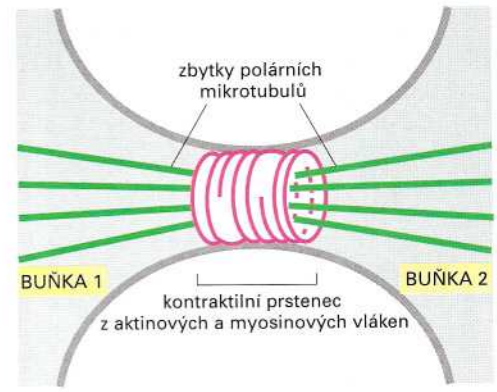
Otázka 17-4 Přemýšlejte o událostech, které vedou ke vzniku nového jádra v telofázi. Jak se mohou jaderné a cytoplasmatické proteiny roztrždit tak, že nové jádro obsahuje pouze jaderné proteiny, ale ne cytoplasmatické?



Obrázek 17-15 Časný rýhování oplozeného vajíčka žáby na fotografii z elektronového řádkovacího mikroskopu. Rýhování buněčné membrány je způsobeno aktivitou *kontraktilního prstence*, který se nachází pod membránou. Dělicí rýha je u těchto kulatých buněk neobvykle přesně vymezena. (A) Povrch vajíčka při malém zvětšení. (B) Povrch rýhy při větším zvětšení.



(A)



(B)

Obrázek 17-16 Kontraktilní prstenec.

(A) Živočišná buňka v kultuře v posledním stadiu dělení (fotografie z řádkovacího elektronového mikroskopu). (B) Schéma střední oblasti téže buňky ukazuje kontraktilní prstenec, který probíhá pod plasmatickou membránou, a zbytky dvou sad polárních mikrotubulů.

obvyklé u většiny dělících se buněk, buňka se rozdělí symetricky. Dělicí rýha se vytváří kolem ekvatoriální roviny mateřské buňky a obě dceřiné buňky jsou stejně velké a obsahují podobné molekuly. Během embryonálního vývoje však dochází k mnoha případům, kdy se buňka dělí asymetricky. V těchto případech je i mitotické vřetenko umístěno asymetricky, a proto následně vznikají dvě buňky, které se liší velikostí a často také molekulami, které obsahují; obvykle se pak vyvíjejí v různé buněčné typy.

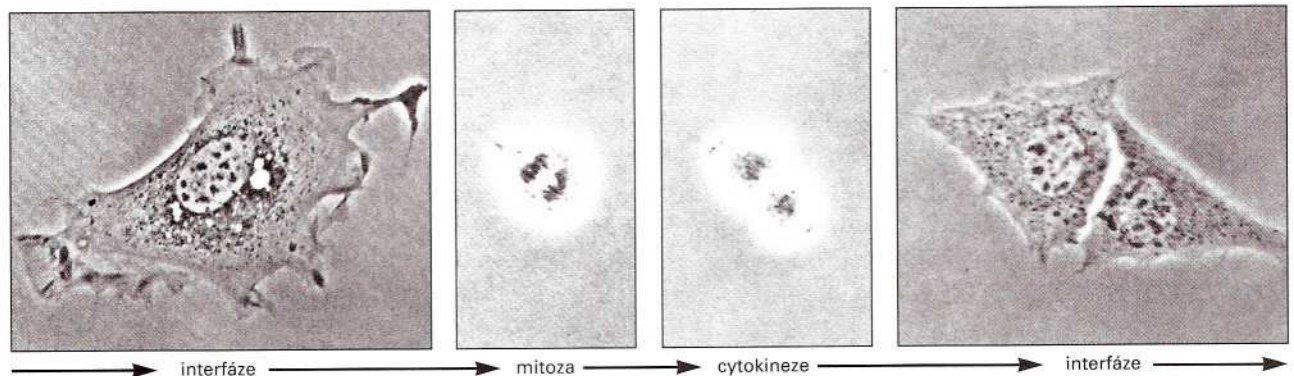
Kontraktilní prstenec živočišných buněk je tvořen aktinem a myosinem

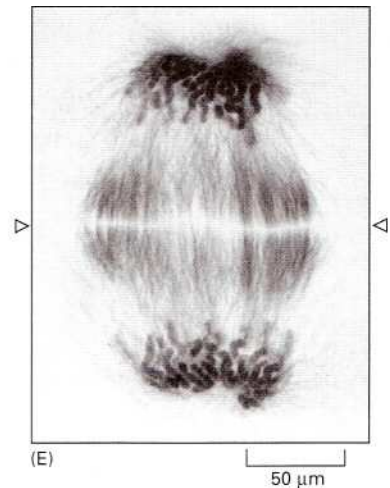
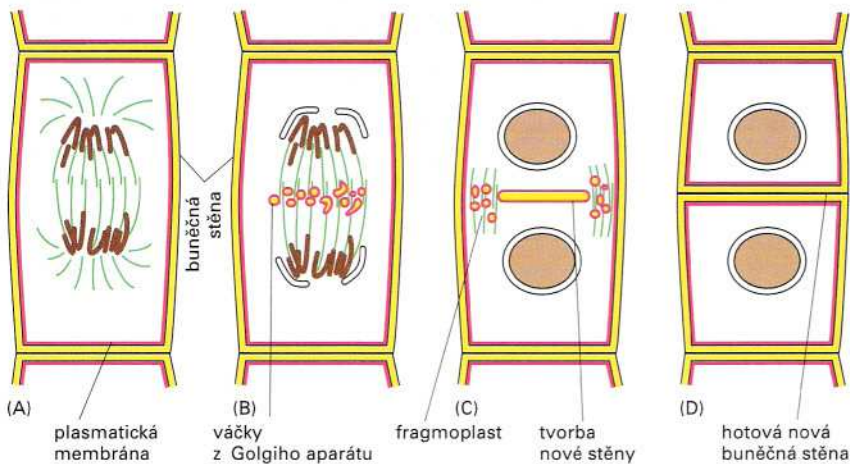
Kontraktilní prstenec je tvořen převážně z překrývajících se svazků aktinových a myosinových filament (obr. 17-16). Začíná vznikat v anafázi a je připojen k proteinům asociovaným s vnitřní stranou cytoplasmatické membrány. Jakmile prstenec vznikne, je schopný vyvinout takovou sílu, která dokáže ohnout jemnou skleněnou jehlu vbodnutou do buňky před cytokinezi. Tato síla je vytvářena pohybem aktinových filament proti myosinovým, podobně jako je tomu při kontrakci svalu (viz obr. 16-36). Na rozdíl od kontraktilního aparátu ve svalu je však kontraktilní prstenec pouze přechodnou strukturou: je vytvářen, aby vykonal cytokinezi a s jejím průběhem se neustále zmenšuje, až nakonec při rozdělení buňky zcela zmizí.

Buněčné dělení mnoha živočišných buněk je provázáno velkými změnami ve tvaru buňky a sníženou adhezí buňky k extracelulární matrix. Tyto změny jsou výsledkem reorganizace aktinových a myosinových filamentů pod buněčným povrchem a vedou například ke

Obrázek 17-17 Fotografie dělícího se myšního fibroblastu v kultuře.

Stejná buňka byla fotografována v různých, po sobě jdoucích okamžicích. Pověšměte si, jak se buňka se vstupem do mitozy zakulacuje; obě dceřiné buňky se po dokončení cytokineze opět zplošťují.





vzniku kontraktálního prstence. Savčí fibroblasty v kultuře jsou v interfázi ploché, a to díky silným adhezním kontaktům, které vytvářejí s povrchem, na němž rostou – tento povrch se nazývá substrát. Jakmile však vstoupí do M-fáze, buňky se alespoň částečně zakulacují, protože některé proteiny cytoplasmatické membrány zodpovědné za přichycení buňky k substrátu, tzv. *integriny* (popsané v Kapitole 19) – jsou fosforylovány, což zeslabuje sílu jejich interakce se substrátem. Jakmile je cytokineze dokončena, obnoví dceřiné buňky své kontakty se substrátem a znovu se zploští (obr. 17-17). Pokud se buňky dělí v živočišné tkáni, tento cyklus uvolnění a znovu-obnovení kontaktů jim pravděpodobně umožňuje přeuspořádat kontakty s okolními buňkami a extracelulární matrix, takže nové buňky vzniklé buněčným dělením se mohou snadno začlenit do tkáně.

Cytokineze u rostlinných buněk zahrnuje tvorbu nové buněčné stěny

Mechanismus cytokineze u vyšších rostlin je zcela odlišný od živočichů – pravděpodobně proto, že rostlinné buňky jsou obklopeny pevnou buněčnou stěnou (viz Kapitola 19). Dvě dceřiné buňky od sebe nejsou odděleny pomocí kontraktálního prstence pod povrchem buňky, ale místo toho vzniká uvnitř buňky nová stěna. Rostoucí nová buněčná stěna je obklopena membránou a s tím, jak roste, rozděluje cytoplasmu buňky na dvě části. Pozice nové buněčné stěny zcela určuje polohu obou dceřiných buněk vzhledem k sousedícím buňkám. Tak rovina buněčného dělení spolu s růstem buňky určuje konečný tvar rostliny.

Nová buněčná stěna se začíná vytvářet v cytoplasmě mezi oběma sadami segregovaných chromosomů na začátku telofáze. Vznik buněčné stěny je řízen útvarem zvaným **fragmoplast**, který je formován ze zbytků polárních mikrotubulů v ekvatoriální rovině starého mitotického vřeténka. Malé, membránou obalené váčky odvozené převážně od Golgiho aparátu a naplněné polysacharidy a glykoproteiny nezbytnými pro matrix buněčné stěny jsou transportovány podél mikrotubulů k fragmoplastu. Zde se slévají do struktury podobné disku obklopenému membránou, která s tím, jak s ní fúzí další a další váčky, postupně roste směrem k povrchu buňky, dokud se

Obrázek 17-18 Cytokineze u rostlinné buňky. Na počátku telofáze – poté, co byly chromosomy segregovány (A) – začíná uvnitř buňky v ekvatoriální rovině starého vřeténka vznikat nová buněčná stěna (B). Polární mikrotubuly mitotického vřeténka přetrvávající v telofázi vytvářejí *fragmoplast* a směřují váčky k centru vřeténka. Membránové váčky odvozené od Golgiho aparátu obsahující materiál pro vznik buněčné stěny fúzí a začíná vznikat nová buněčná stěna (C), která roste směrem k povrchu buňky, až dosáhne k plasmatické membráně a původní buněčné stěně. Plasmatická membrána a membrána obklopující novou buněčnou stěnu (obě zakresleny červeně) spolu fúzí a zcela tak oddělují obě dceřiné buňky (D). Fotografie rostlinné buňky v telofázi je ukázána na obrázku (E); tato fotografie odpovídá buňce ve stadiu na obrázku (B). Buňka byla obarvena, aby bylo možné pozorovat mikrotubuly a dvě sady dceřiných chromosomů. Poloha nově se tvořící buněčné stěny je naznačena šipkami.

Otázka 17-5 Nakreslete podrobné schéma vzniku nové buněčné stěny, která při dělení rostlinné buňky odděluje dvě dceřiné buňky. Zejména ukažte, kde končí membránové proteiny váček odvozených od Golgiho aparátu a co se stane s částí proteinu v membráně váčku, která směřovala dovnitř váčku. (Pro připomenutí struktury membrány se můžete podívat do Kapitoly 11.)

nespojí s cytoplasmatickou membránou a původní buněčnou stěnou, a nerozdělí tak buňku na dvě (obr. 17-18). Později jsou k matrix přidány ještě celulosové mikrofibrily a tvorba nové buněčné stěny je dokončena.

Meioza

Meioza byla objevena v roce 1883, kdy bylo pozorováno, že oplozené vajíčko určitého červa obsahovalo čtyři chromosomy, zatímco jeho gamety (spermie u samců a vajíčka u samic) obsahovaly pouze dva. Poprvé tak bylo pozorováno, že gamety, buňky specializované pro rozmnožování, jsou **haploidní** - nesou pouze jednu sadu chromosomů, a proto obsahují jedinou kopii genetické informace. Ostatní buňky těla včetně buněk zárodečné linie, ze kterých gamety vznikají, jsou **diploidní** a obsahují dvě sady chromosomů - jednu získanou od matky, druhou od otce (viz obr. 9-34). Z tohoto pozorování vyplývá, že spermie a vajíčka (obr. 17-19) musí vznikat speciálním typem buněčného dělení, ve kterém se počet chromosomů naprosto přesně sníží na polovinu. Tento typ buněčného dělení se nazývá **meioza**, z řeckého slova pro zmenšení.

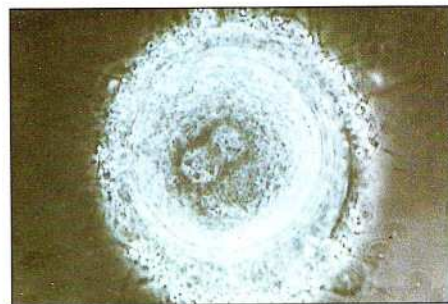
V této závěrečné části kapitoly si vysvětlíme mechanismus meiozy a poukážeme na rozdíly mezi mitozou a meiozou. Genetický a biologický význam meiozy je probrán v Kapitole 9.

Homologní chromosomy se v průběhu meiozy rozcházejí

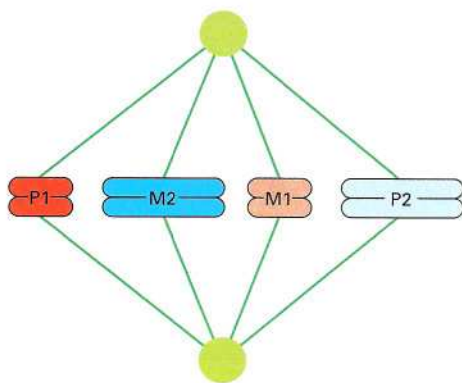
Kromě chromosomů určujících pohlaví (*pohlavních chromosomů*) obsahuje diploidní jádro dvě navzájem si velmi podobné verze každého chromosomu; jeden chromosom pochází od otce (paternální chromosom), druhý od matky (maternální chromosom) (viz obr. 8-2). Obě verze každého chromosomu přesto nejsou geneticky identické, protože nesou různé varianty mnoha genů (jak jsme probrali v Kapitole 9). Jsou proto nazývány **homologní chromosomy** nebo **homology**, což znamená podobné, ale ne identické. Diploidní buňka u pohlavně se rozmnožujícího organismu tedy obsahuje dvě podobné sady genetické informace. Ve většině buněk se homology chovají jako na sobě zcela nezávislé chromosomy.

V mitoze, jak jsme si ukázali dříve, se každý chromosom replikuje a zreplikované chromosomy se náhodně seřadí v metafázní destičce, sesterské chromatidy se od sebe oddělí a vzniknou samostatné chromosomy, načež obě dceřiné buňky vzniklé cytokinezí obdrží jednu kopii každého paternálního (otcovského) a jednu kopii každého maternálního (mateřského) chromosomu. Obě sady genetické informace jsou tak předány neporušené do obou dceřiných buněk, které jsou proto diploidní a geneticky identické.

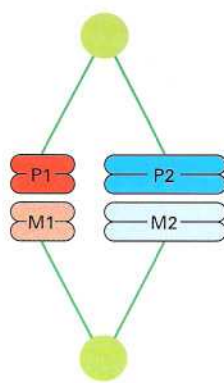
Na rozdíl od mitozy, když se diploidní buňky dělí meioticky, vznikají haploidní gamety s pouze polovičním množstvím původního počtu chromosomů - s jedním chromosomem od každého typu místo páru homologních chromosomů. Proto každá gameta získá buď maternální, nebo paternální kopii každého genu, nikdy ne obě dvě kopie. Tato redukce je nezbytná, protože splynutím dvou gamet (vajíčka a spermie u živočichů) při oplození dojde k obnovení diploidního



Obrázek 17-19 Fotografie lidského vajíčka s navázanými spermii na povrchu. Vajíčko je již oplozeno a obsahuje dvě jádra (jedno pochází z vajíčka a druhé ze spermie). Mnoho neúspěšných spermii je dosud navázáno na povrchu vajíčka.



(A) Metafázová destička při **mitoze**; homologní chromosomy se chovají nezávisle na sobě.



(B) Metafázová destička při **meioze**; homologní chromosomy se párují.

Obrázek 17-20 Porovnání metafáze mitózy a meiozy. V mitóze (A) se jednotlivé maternální (M) a paternální (P) chromosomy seřadí náhodně v metafázni destičce, zatímco v meioze (B) se homologní maternální a paternální chromosomy před uspořádáním do metafázni destičky párují. V obou případech byly před seřazením chromosomy zreplikovány. Vřetenko je nakresleno zeleně.

počtu chromosomů v buňkách embrya. Protože je rozchod maternálních a paternálních chromosomů do gamet během meiozy náhodný, původní maternální a paternální chromosomy jsou smíšeny v různých kombinacích.

Potřeba snížit počet chromosomů na polovinu klade zvláštní požadavky na aparát zodpovídající za buněčné dělení a vede k prvnímu hlavnímu rozdílu mezi mitózou a meiozou. Při meiotickém dělení se zreplikované homologní maternální a paternální chromosomy (včetně dvou zreplikovaných pohlavních chromosomů) přikládají k sobě, a to ještě před tím, než se navážou na vřetenko (obr. 17-20). Jak uvidíme dále, umožňuje toto fyzické párování homologních chromosomů segregaci maternálních a paternálních homologů do různých dceřiných buněk. Zatím není jasné, jak se mohou homologní chromosomy (včetně dvou pohlavních chromosomů) navzájem rozpoznat.

V meioze dochází ke dvěma buněčným dělením místo jednoho

Principiálně by se meioza mohla odehrávat jednoduchou modifikací normálního mitotického dělení, kde by byla vynechána replikace DNA (S-fáze). Nezreplikované chromosomy by se mohly párovat a pak se uspořádat do metafázni destičky; výsledkem oddělení homologů s následnou cytokinezí by byl přímý vznik dvou haploidních buněk. Z neznámého důvodu je skutečná meioza mnohem komplikovanější a zahrnuje dvě buněčná dělení místo jednoho. Navíc u některých buněk může trvat meioza mnohem déle než mitóza: například u lidských oocytů může trvat až 50 let.

Na obr. 17-21 jsou zachyceny události *prvního meiotického dělení*. Před spárováním maternálních a paternálních chromosomů jsou stej-

Obrázek 17-21 První meiotické dělení.

Pro zjednodušení je zakreslen pouze jeden pár homologních chromosomů, ačkoliv všechny eukaryontní buňky obsahují více než jeden pár chromosomů. Po replikaci DNA je každý chromosom tvořen dvěma sesterskými chromatidami, které jsou po celé délce spojeny. Párování zreplikovaných homologních chromosomů je charakteristické pro meiozu. Jak je ukázáno na chromosomech, které jsou částečně *červené* a částečně *černé*, párování chromosomů umožňuje genetickou rekombinaci (crossing-over) mezi homologními chromosomy, jak je vysvětleno v Kapitole 9. Po dokončení rekombinace vzniká meiotické vřetenko, rozpadá se jaderný obal, spárované homologní chromosomy se seřadí v metafázni destičce a jsou taženy vřetenkem směrem od sebe. Obě dceřiná jádra, která jsou výsledkem prvního meiotického dělení, obsahují jeden z duplikovaných homologů.

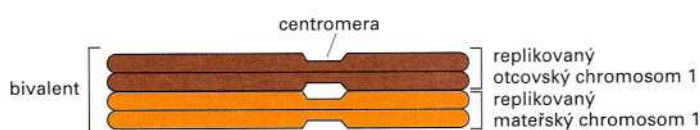


ně jako při normálním mitotickém dělení všechny chromosomy zreplikovány a vznikají dvě sesterské chromatidy. Po dokončení replikace DNA vstupují do hry specifické rysy meiotického dělení. Před rozpadem jaderného obalu a před uspořádáním chromosomů do metafázní destičky se každý zreplikovaný chromosom páruje se svým homologem za vzniku struktury nazývané *bivalent*, která obsahuje čtyři chromatidy (obr. 17-22). To je stadium první profáze meiozy, které může trvat řadu let; zbytek meiotického dělení se odehrává rychle. Při prvním meiotickém dělení se od sebe zreplikované homology oddělují a rozcházejí se do dvou oddělených dceřiných buněk; sesterské chromatidy však spolu zůstávají spojeny po celé dělení a chovají se jako celek, jako kdyby k žádné duplikaci chromosomu nedošlo (viz obr. 17-21). Obě sesterské chromatidy se rozcházejí až ve druhém meiotickém dělení.

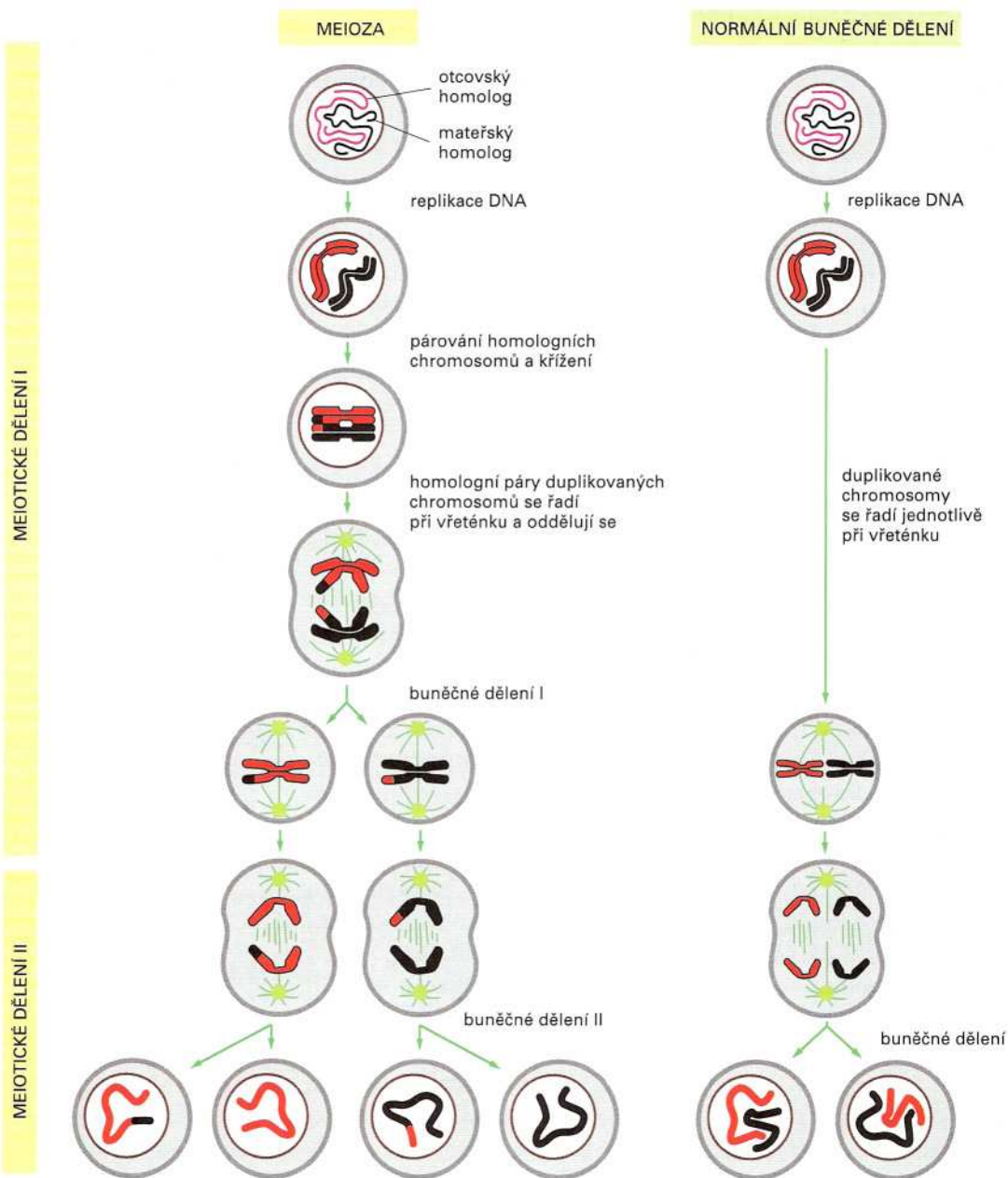
Během dlouhé profáze prvního meiotického dělení jsou zreplikované homologní chromosomy drženy u sebe *synaptonemálním komplexem*. Tento komplex je tvořen protáhlou, žebříku podobnou proteinovou kostrou, která má z každé strany přiložen jeden z replikovaných homologních chromosomů. Sesterské chromatidy v každém homologu jsou dohromady pevně sbaleny tak, že ze strany směřující k proteinové kostře vybíhá řada chromatinových smyček.

Jak jsme si ukázali v Kapitole 9, párování homologů do bivalentů během dlouhé profáze prvního meiotického dělení umožňuje genetickou rekombinaci, při které může být část maternální chromatidy zaměněna odpovídajícím fragmentem homologní paternální chromatidy. Tento proces nazývaný **crossing-over** čili překřížení (viz obr. 17-21) je důležitým rysem meiozy. Reorganizace genetické informace každého chromosomu v gametě napomáhá vzniku jedinců se zcela novým uspořádáním genů. Na konci dlouhé profáze prvního meiotického dělení se jaderný obal rozpadá, což signalizuje začátek prometafáze.

Zbytek prvního meiotického dělení probíhá stejně jako normální mitotické dělení. Bivalenty se připojují k meiotickému vřetenku a seřazují se v metafázní destičce. V anafázi se oba zreplikované chromosomy (stále tvořené dvěma sesterskými chromatidami) oddělují a jsou taženy k opačným pólům (viz obr. 17-21). Protože jsou sesterské chromatidy stále pevně spojeny a pohybují se jako jeden celek, každá dceřiná buňka získá dvě kopie maternálního nebo paternálního homologu každého páru. Obě tyto kopie jsou navzájem identické – s výjimkou míst, kde došlo ke genetické rekombinaci (viz obr. 17-21). Obě dceřiné buňky tedy obsahují stejné množství DNA jako diploidní buňky, liší se však od normálních diploidních buněk ve dvou aspektech: (1) obě kopie DNA každého chromosomu pocházejí pouze z jednoho ze dvou homologních chromosomů původní buňky (kromě míst, kde se odehrála genetická rekombinace) a (2) obě tyto kopie jsou děděny jako pevně spojené sesterské chromatidy, jako kdyby byly jediným chromosomem (viz obr. 17-21).



Obrázek 17-22 Bivalent. Maternální i paternální kopie chromosomu byly zreplikovány a spárovány za tvorby bivalentu, který je tvořen čtyřmi chromatidami. Když vznikají na centromerách kinetochory, oba kinetochory sesterských chromatid zreplikovaného chromosomu směřují stejným směrem; mikrotubuly vřetenka proto připojí každý ze zreplikovaných chromosomů k jinému pólu vřetenka.



Tvorba gamet nyní může pokračovat *druhým meiotickým dělením*, ve kterém už nedochází k replikaci DNA ani nějaké významné interfázi. Vzniká vřeténko, chromosomy se uspořádají v jeho ekvatoriální rovině, sesterské chromatidy se rozejdou jako při běžné mitoze a vznikají dvě dceřiné buňky s haploidním obsahem DNA. Meioza je tedy tvořena jednou replikací, po níž následují dvě buněčná dělení, takže z každé diploidní buňky, která vstoupila do meiozy, vznikají čtyři haploidní buňky. Meioza a mitóza jsou porovnány na obr. 17-23.

Občas se meioza vyvíjí abnormálně a homology se od sebe neoddělí – tento jev se nazývá **nondisjunkce**. V tomto případě některé vzniklé haploidní buňky postrádají určitý chromosom, zatímco jiné mají tento chromosom nadbytečný. Takové gamety dávají vznik abnormálním embryím, z nichž většina umírá. Některé však přesto přežívají. Například *Downův syndrom* u člověka je způsoben přítom-

Obrázek 17-23 Porovnání meiozy a mitózy. Stejně jako na obr. 17-21 je zde nakreslen jediný pár homologních chromosomů. Při meioze následující po replikaci DNA jsou pro vznik haploidních gamet nezbytná dvě jaderná a buněčná dělení. Z každé diploidní buňky, která vstupuje do meiozy, vznikají tedy čtyři haploidní buňky, zatímco mitotické dělení každé diploidní buňky dává vznik dvěma diploidním buňkám. Stadia telofáze a prometafáze nebyla pro zjednodušení zakreslena. Zatímco mitóza a druhé meiotické dělení obvykle trvá přibližně několik hodin, první meiotické dělení může trvat dny, měsíce i roky, a to díky dlouhé době strávené v profázi.

ností nadbytečné kopie chromosomu 21. To je způsobeno tím, že se během meiozy nerozešel pár chromosomu 21, a tak vznikla gameta, která obsahovala dvě kopie chromosomu 21 místo jedné. Když tato abnormální gameta splyne při oplození s normální gametou, výsledné embryo obsahuje tři kopie chromosomu 21 místo dvou.

Otázka 17-6 Proč by pro organismus nebylo žádoucí použít první kroky meiozy (včetně prvního meiotického dělení) pro normální mitotické dělení somatických buněk?

Základní shrnutí

- Všechny buňky vznikají rozdělením jiné buňky. Bakterie se dělí jednoduchým dělením, zatímco eukaryontní buňky se dělí mnohem komplikovanějším způsobem.
- Eukaryontní buněčný cyklus je tvořen několika různými částmi. Zahrnuje S-fázi, ve které je replikována jaderná DNA, a M-fázi, během níž se dělí nejprve jádro (mitoza) a pak cytoplazma (cytokineze).
- U většiny buněk ještě existují další dvě fáze – G₁-fáze mezi M-fází a S-fází a G₂-fáze mezi S-fází a M-fází. Obě G-fáze poskytují buňce více času pro růst.
- Začátek M-fáze je signalizován vznikem mitotického vřeténka z mikrotubulů, které napomáhá dceřiným chromosomům rozejít se k opačným pólům buňky.
- Velké, membránou obalené orgány, jako jsou endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát, se během M-fáze rozpadají na velký počet malých fragmentů, což zajišťuje jejich rovnoměrné rozdělení mezi obě dceřiné buňky.
- Před vznikem mitotického vřeténka na počátku M-fáze jsou nejprve zduplikovány centrosomy. Dceřiné centrosomy se rozcházejí k opačným pólům jádra a dávají vznik pólům vřeténka.
- Z centrosomů vyrůstají mikrotubuly; některé z nich interagují s mikrotubuly vyrůstajícími z druhého centrosomu a stávají se polárními mikrotubuly vřeténka.
- Jakmile se rozpadne jaderný obal, mikrotubuly vřeténka pronikají oblastí bývalého jádra. Některé z nich se spojují se zreplikovanými chromosomy díky vazbě na proteinové komplexy nazývané kinetochory, které jsou asociovány s centromerou každé sesterské chromatidy.
- Mikrotubuly vybíhající z opačných pólů vřeténka působí tahem na každý chromosom a napomáhají tak seřazení chromosomů v ekvatoriální rovině mitotického vřeténka.
- Dceřiné chromosomy vznikají synchronizovaným oddělením sesterských chromatid a jsou taženy vřeténkem k opačným pólům. Oba póly se také pohybují směrem od sebe a napomáhají tak oddělení obou sad chromosomů.
- Pohyb chromosomů pomocí vřeténka je řízen mikrotubulárními motorovými proteiny a také polymerací a depolymerací mikrotubulů.
- Kolem každé z obou segregovaných sad chromosomů se znovu vytváří jaderný obal a vznikají dvě nová jádra. Tím je dokončena mitoza.
- U živočišných buněk je buněčné dělení dokončeno kontraktilním prstencem, který je tvořen aktinovými a myosinovými filamenti. Kontraktilní prstenec vzniká uprostřed mezi póly vřeténka a svým stažením rozděluje cytoplazmu na dvě části. Naproti tomu u rostlinných buněk je buněčné dělení dokončeno vznikem nové buněčné stěny uvnitř buňky, která rozdělí cytoplazmu na dvě poloviny.
- Gamety (u živočichů spermie a vajíčka) vznikají meiozou – specializovaným buněčným dělením, při kterém se z diploidních buněk vytváří haploidní. Haploidní gamety jsou nezbytné pro pohlavně se rozmnožující organismy, protože tímto způsobem není při každém oplození kontinuálně zdvojeňován počet chromosomů.
- Ačkoliv je většina mechanických rysů meiozy podobná mitotickým, chování chromosomů je odlišné; výsledkem dvou následných meiotických dělení jsou čtyři geneticky rozdílné haploidní buňky, zatímco mitozou vznikají dvě geneticky identické buňky jediným dělením.

Klíčová slova

anafáze	fragmoplast	meioza	profáze
buněčný cyklus	G ₁ -fáze	metafáze	prometafáze
crossing-over	G ₂ -fáze	M-fáze	překřížení
cytokineze	haploidní	mitotické vřeténko	S-fáze
diploidní	homolog	mitoza	telofáze
	chromatida	nondisjunkce	
	interfáze		

18 Kontrola buněčného cyklu a buněčná smrt

SYSTÉM REGULACE BUNĚČNÉHO CYKLU

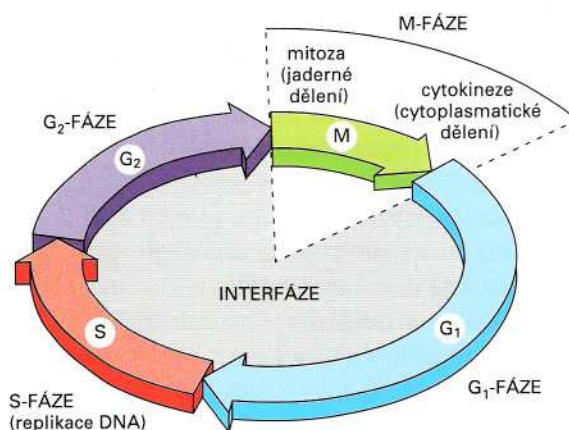
- Centrální regulační systém spouští hlavní procesy buněčného cyklu
- Systém regulace buněčného cyklu je založen na cyklicky aktivovaných proteinkinázách
- MPF je komplex cyklin-Cdk, který kontroluje vstup do M-fáze
- Cyklin-dependentní proteinkinázy jsou regulovány akumulací a degradací cyklinu
- Aktivita Cdk-kináz je dále regulována jejich fosforylací a defosforylací
- Různé komplexy cyklin-Cdk spouštějí různé kroky buněčného cyklu
- Buněčný cyklus může být zastaven v G_1 -fázi Cdk-inhibičními proteiny
- Buňky mohou odbourat svůj regulační systém a uniknout tak z buněčného cyklu

REGULACE POČTU BUNĚK U MNOHOBUNĚČNÝCH ORGANISMŮ

- Buněčná proliferace je závislá na signálech od ostatních buněk
- Živočišné buňky mají vnitřně limitovaný počet buněčných dělení, kterými mohou projít
- Živočišné buňky vyžadují signály od okolních buněk, aby se vyhnuly programované buněčné smrti
- Programovaná buněčná smrt je realizována intracelulární proteolytickou kaskádou
- Rakovinné buňky se neřídí regulačními signály buněčného dělení a přežívání, pocházejícími z buněčného společenství

Pro buněčný cyklus jsou vyžadovány dva druhy „strojního zařízení“: jedno vytváří nové komponenty rostoucí buňky a druhé dopravuje tyto komponenty na jejich správná místa a rovnoměrně je rozděluje do dceřiných buněk při buněčném dělení, jak je popsáno v Kapitole 17. A právě toto soustrojí *buněčného cyklu* je první, co přitahuje pozornost stejně tak jako pracující stroje, kterých si jako prvních všimneme při návštěvě továrny. Neméně důležitý je centrální regulační systém, který všechny stroje zapíná a vypíná ve správný čas a řídí všechny aktivity tak, aby byl vytvořen konečný produkt. U buněk je koordinace soustrojí buněčného cyklu v průběhu buněčného cyklu řízena *systémem regulace buněčného cyklu*, který si vysvětlíme v prvních částech této kapitoly.

Jak jsme si řekli v Kapitole 17, jednotlivé události buněčného cyklu se objevují v přesně daném pořadí (viz panel 17-1, str. 554-555). Pokud začneme replikací DNA (S-fáze), po ní následuje G_2 -fáze, na ni navazuje mitóza a cytokineze (M-fáze) a pak další přestávka (G_1 -fáze), po níž dochází k další replikaci DNA, a tak dále (obr. 18-1). Systém regulace buněčného cyklu musí ve správném čase aktivovat enzymy a jiné proteiny nezbytné pro provedení každého procesu a po dokončení daného procesu je musí deaktivovat. Musí také zajistit, aby byl každý krok cyklu dokončen dříve, než začne krok následující: musí například zajistit, aby byla replikace DNA



Obrázek 18-1 Fáze buněčného cyklu.

Interfáze zahrnuje všechny fáze buněčného cyklu kromě M-fáze; je to období stálého buněčného růstu, její součástí je S-fáze, kdy je replikována DNA. V průběhu M-fáze se jádro a později i cytoplazma rozdělí. G_1 -fáze je doba mezi M-fází a S-fází; G_2 -fáze je doba mezi S-fází a M-fází.

ukončena před vstupem buňky do mitózy, aby mitóza byla ukončena dříve, než se buňky rozdělí na dvě dceřiné a aby nová replikace DNA nezačala dříve, než buňka projde mitózou a doroste do správné velikosti.

Regulační systém musí také brát ohledy na okolní podmínky. Co je nejdůležitější, u mnohobuněčných organismů musí regulační systém reagovat na signály od ostatních buněk, jako jsou například stimuly k buněčnému dělení, když je potřeba více buněk. Regulační systém buněčného cyklu tak hraje klíčovou úlohu v regulaci počtu buněk v tkáních těla; pokud tento systém funguje nesprávně, může to vyústit ve vznik rakoviny. Ve druhé části této kapitoly se podrobněji zaměříme na otázku, jak je počet buněk regulován. Uvidíme, že regulace počtu buněk není pouze záležitost regulace buněčného dělení, ale také zahrnuje kontrolu toho, zda buňka přežije nebo zahyne procesem nazývaným *programovaná buněčná smrt*.

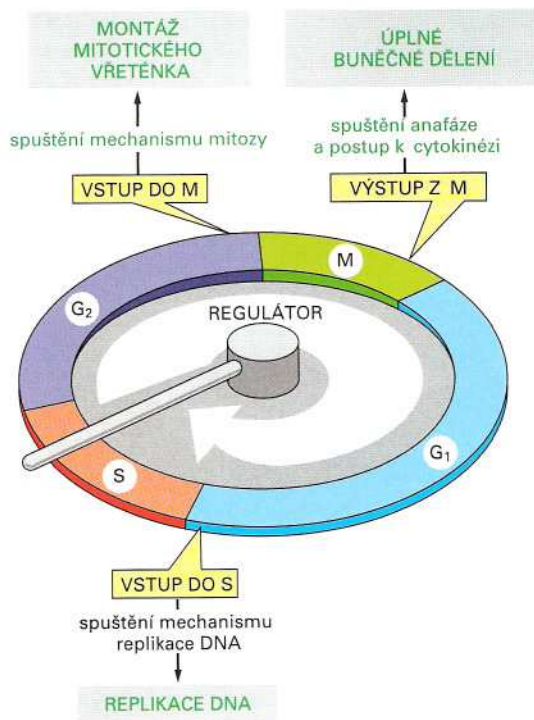
Systém regulace buněčného cyklu

Po mnoho let buněční biologové pozorovali loutkové divadlo syntézy DNA, mitózy a cytokineze bez toho, aniž by tušili, co leží za oponou a kontroluje tyto procesy. *Systém regulace buněčného cyklu* byl prostě „černou skříňkou“ uvnitř buňky. Nebylo vůbec jasné, zda existuje nějaký oddělený regulační systém nebo zda se mašinerie buněčného cyklu nějakým způsobem kontroluje sama. Průlom nastal po identifikaci klíčových proteinů regulačního systému a po zjištění, že jsou tyto proteiny odlišné od komponent mašinerie buněčného cyklu, tj. enzymů a jiných proteinů účastnících se základních procesů replikace DNA, segregace chromosomů a dalších. Nejprve se zamyslíme nad základními principy fungování systému regulace buněčného cyklu, potom si probereme jednotlivé proteinové součásti tohoto systému a ukážeme si, jak společně spouští jednotlivé fáze buněčného cyklu.

Centrální regulační systém spouští hlavní procesy buněčného cyklu

Systém regulace buněčného cyklu pracuje podobně jako kontrolní systém automatických praček. K praní dochází v sérii kroků: napouštění vody, přidání pracího prášku, vyprání prádla, máchání a ždímání. Tyto základní procesy praní jsou analogické se základními procesy buněčného cyklu – replikace DNA, mitóza atd. V obou případech spouští nějaký centrální ovladač každý proces podle zadané posloupnosti (obr. 18-2). Ovladač je sám o sobě regulován v určitých kritických místech cyklu zpětnou vazbou na procesy, které jsou právě prováděny. Například v pracím bubnu kontrolují senzory hladinu vody a posílají tyto signály zpět ovladači, který zabrání zahájení nového procesu před ukončením toho předcházejícího. Bez takové zpětné vazby by jakékoliv přerušení nebo opoždění v některém z procesů mohlo skončit pohromou.

K jednotlivým událostem buněčného cyklu musí dojít v určité posloupnosti a tato posloupnost musí být zachována dokonce i tehdy, když jeden krok trvá déle než obvykle. Veškerá jaderná DNA musí být zreplikována dříve, než dojde k rozdělení jádra, což znamená, že kom-



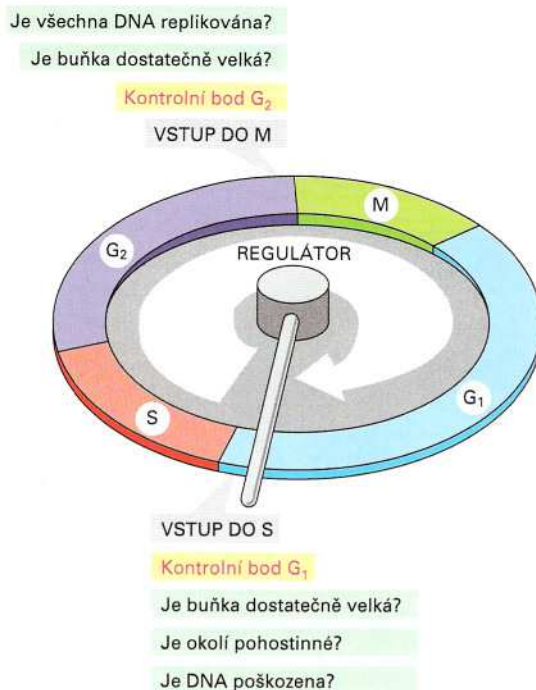
Obrázek 18-2 Regulace buněčného cyklu. Klíčové procesy, jako jsou replikace DNA, mitóza a cytokineze, jsou spouštěny systémem regulace buněčného cyklu. Na základě analogie s pračkou je regulační systém buněčného cyklu nakreslen jako ručička, která se otáčí po směru hodinových ručiček podél děleného kruhu a spouští jednotlivé procesy po průchodu specifickým bodem.

pletní S-fáze musí předcházet M-fázi. Pokud je syntéza DNA zpomalena nebo zastavena (například pro poškození DNA a potřebu její opravy), mitóza a buněčné dělení musí být také zpožděno. Obdobně je pro většinu buněk naprosto nezbytné, aby se před rozdělením dvakrát zvětšily, jinak by se buňky s každým rozdělením zmenšovaly. Regulační systém buněčného cyklu toho dosahuje využitím molekulárních brzd, které mohou buněčný cyklus zastavit v různých **kontrolních bodech**. Tímto způsobem zabraňuje regulační systém spuštění dalšího kroku v cyklu, dokud není předcházející krok úplně dokončen.

Regulační systém u většiny buněk tvoří kontrolní body pro buněčnou velikost, ve kterých je zastaven buněčný cyklus až do té doby, než buňka doroste do správné velikosti. Pokud je třeba, aby buňka ještě rostla, umožňuje kontrolní bod v G_1 -fázi regulačnímu systému zastavit buněčný cyklus dříve, než je spuštěna replikace DNA. Buněčný růst je závislý na dostatečném přísunu živin a jiných faktorech v extracelulárním prostředí, a tak G_1 -kontrolní bod umožňuje buňce ověřit si ještě před vstupem do S-fáze, zda jsou okolní podmínky vhodné pro proliferaci. Druhý kontrolní bod velikosti se nachází v G_2 a umožňuje zastavit cyklus před vstupem do mitózy. Tento bod navíc také umožňuje buňce zkontrolovat, zda je před vstupem do mitózy kompletně zreplikována DNA (obr. 18-3).

Kontrolní body jsou důležité i z jiného důvodu – jsou to body v buněčném cyklu, ve kterých může být systém regulován signály od ostatních buněk, jako jsou růstové faktory a jiné extracelulární signální molekuly, které mohou buňku podporovat nebo ho inhibovat. V dalších částech této kapitoly se zamyslíme nad faktory, které v těchto bodech ovlivňují rozhodování, ale nejdříve se seznámíme s proteiny, které tvoří centrální regulační systém.

Otázka 18-1 V G_1 -bodě buněčného cyklu je místo, kde buňka před rozhodnutím o vstupu do dalšího kroku kontroluje svoji velikost. Pravděpodobné vodítko k tomu, jak mechanismus kontroly velikosti v tomto bodě funguje, přineslo pozorování buněk, které mají abnormální počet kopií svého genomu. Pro daný typ buněk se zdá být obecným pravidlem, že buněčná velikost je v určitém poměru k počtu chromosomálních sad v buňce. S přihlédnutím k tomuto pozorování navrhněte mechanismus, kterým by buňka mohla kontrolovat svoji velikost v G_1 -fázi.



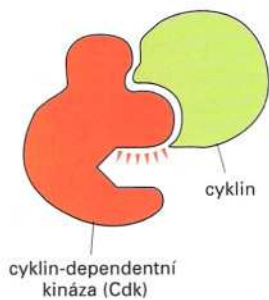
Obrázek 18-3 Dva kontrolní body v buněčném cyklu. Zpětná vazba na probíhající intracelulární procesy stejně jako signály z buněčného okolí určují, zda regulační systém projde určitým kontrolním bodem. Zde jsou ukázány dva důležité kontrolní body. Jeden se nachází v G₁-fázi, kde regulační systém rozhoduje o tom, zda buňka vstoupí do S-fáze, a druhý je v G₂, kde se rozhoduje o tom, zda buňka vstoupí do mitózy.

Systém regulace buněčného cyklu je založen na cyklicky aktivovaných proteinkinázách

Systém regulace buněčného cyklu řídí mašinérii buněčného cyklu fosforylací klíčových proteinů, které iniciují nebo regulují replikaci DNA, mitózu a cytokinezi. Jak je popsáno v Kapitole 5, patří fosforylace (a defosforylace) k nejběžnějším způsobům, jakými buňka mění aktivitu proteinu. Fosforylační reakce, které regulují buněčný cyklus, provádí určitá skupina proteinkináz – enzymů, které katalyzují přenos jedné fosfátové skupiny z ATP na určitý postranní řetězec aminokyseliny v cílovém proteinu. Účinek fosforylace může být velice rychle zrušen odstraněním této fosfátové skupiny (defosforylace), tuto reakci provádí jiná skupina enzymů – proteinfosfatázy (viz Kapitolu 5).

Proteinkinázy systému regulujícího buněčný cyklus jsou v dělicí se buňce přítomny v průběhu celého cyklu. Jsou ale aktivovány pouze v určité době cyklu a poté jsou opět rychle deaktivovány. Aktivita těchto kináz tedy vzrůstá a klesá cyklickým způsobem. Některé z těchto proteinkináz jsou například aktivovány ke konci G₁-fáze a způsobují přechod buňky do S-fáze; jiné jsou aktivovány těsně před M-fází a řídí vstup buňky do mitózy.

Tyto proteinkinázy jsou přítomny v buňce po celý buněčný cyklus, jak je tedy jejich aktivita ve správný čas zapínána a vypínána? Za to jsou zodpovědné hlavně proteiny z druhé skupiny složek regulačního systému, tzv. *cykliny*. Cykliny samy o sobě nemají žádnou enzymovou aktivitu, ale jejich navázání na kinázy buněčného cyklu je nezbytné k enzymové aktivaci těchto kináz. Kinázy systému regulace buněčného cyklu se proto nazývají *cyklin-dependentní proteinkinázy*, neboli Cdk (obr. 18-4). Cykliny přišly ke svému jménu díky tomu, že na rozdíl od Cdk se jejich koncentrace v průběhu buněčného cyklu cyklicky mění. Abychom si ukázali, jak cykliny pomáhají aktivovat Cdk ve správném čase, zaměříme se nyní na komplex cyklin-Cdk, který je zodpovědný za vstup buňky do mitózy.



(A)



(B)

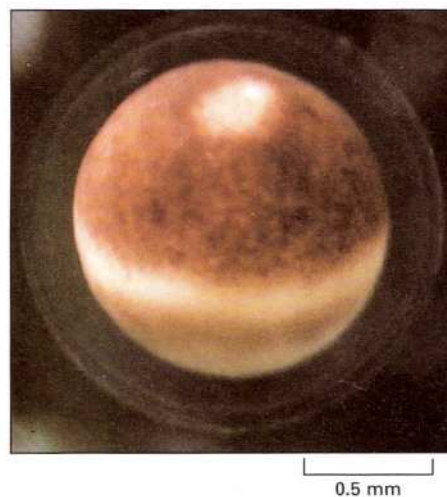
Obrázek 18-4 Dvě klíčové proteinové složky komplexu cyklin-Cdk. (A) Cyklin-dependentní kináza (Cdk) je enzym, který katalyzuje fosforylaci proteinů, zatímco cyklin je regulační protein, který je třeba pro enzymovou aktivaci Cdk. Aktivní komplex pak fosforyluje klíčové buněčné proteiny, které iniciují jednotlivé kroky buněčného cyklu. (B) Trojrozměrná struktura komplexu cyklin-Cdk nazývaného MPF, který kontroluje vstup do M-fáze.

MPF je komplex cyklin-Cdk, který reguluje vstup do M-fáze

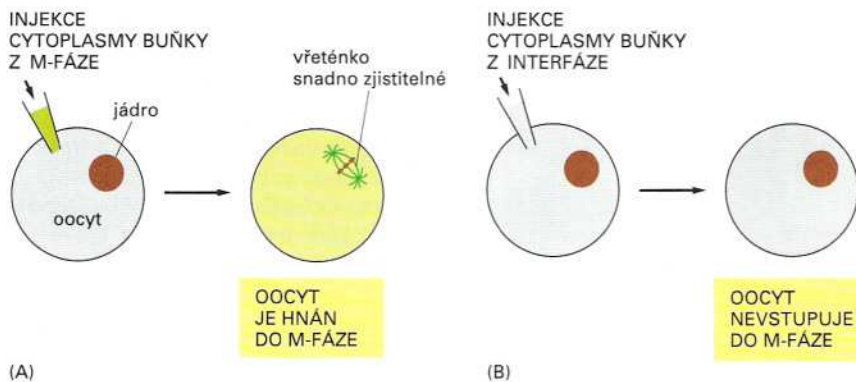
Komplex cyklin-Cdk, který řídí vstup buněk do M-fáze, byl poprvé objeven při studiu buněčného dělení u žabích vajíček. Oplozená vajíčka mnohých živočichů jsou výborným materiálem pro různé biochemické studie, protože jsou obzvláště velká a rychle se dělí. Například vajíčko žáby *Xenopus* (drápatka) má v průměru 1 mm (obr. 18-5). Po oplození začíná embryonální vývoj, při kterém dochází k řadě rychlých dělení a vajíčko se rozděluje na mnoho menších buněk. Tyto rychlé buněčné cykly jsou tvořeny hlavně opakováním S-a M-fází s krátkými nebo žádnými G_1 - či G_2 -fázemi mezi nimi. Neprobíhá zde žádná nová transkripce – veškerá mRNA, stejně tak jako většina proteinů potřebných pro časná stadia embryonálního vývoje, je do velmi velkého vajíčka uložena již při jeho vývoji z oocyty ve vaječniku matky. V těchto časných embryonálních děleních (nazývají se *ryhování*) nedochází k žádnému růstu buněk a všechny buňky embrya se dělí synchronně.

Pokud vezmeme žabí vajíčka v určitém stavu buněčného cyklu, můžeme z nich připravit extrakt, který bude charakteristický pro toto stadium buněčného cyklu. Biologická aktivita tohoto extraktu může být zkoumána po jeho injekci do oocyty (nezralý prekursor neoplozeného vajíčka) drápatky, kde můžeme pozorovat jeho vliv na buněčný cyklus. Oocyty drápatky jsou velmi vhodným materiálem pro detegování aktivity řídící přechod buňky do M-fáze, protože mají ukončenou replikaci DNA a jsou zastaveny těsně před M-fází prvního meiotického dělení (viz Kapitola 17). Oocyt se tedy nachází ve stadiu buněčného cyklu, které je ekvivalentní G_2 -fázi mitotického buněčného cyklu.

Při těchto experimentech bylo zjištěno, že extrakt z vajíček v M-fázi řídil vstup oocyty do M-fáze, zatímco cytoplasma z dělicích se buněk v jiných fázích buněčného cyklu přechod do M-fáze nevyvolala. Když bylo toto poprvé objeveno, nebylo známo nic o biochemických vlastnostech a mechanismech působení faktoru zodpovědného za tuto aktivitu, a tak byla tato aktivita jednoduše nazvána *M-fází podporující faktor*, neboli MPF (anglicky: *M-phase-promoting factor*) (obr. 18-6). Testováním cytoplasmy z různých stadií buněčného cyklu podle schématu ukázaného na obr. 18-6 bylo zjištěno, že aktivita MPF velmi výrazně osciluje v průběhu každého buněčného cyklu – rychle se zvyšuje těsně před vstupem do mitózy a rychle klesá až k nule ke konci mitózy (obr. 18-7).



Obrázek 18-5 Zralé vajíčko žáby *Xenopus*. Tato obrovská buňka je připravena na oplození. (Poskytl Tony Mills.)



Obrázek 18-6 Pokus demonstrující aktivitu MPF. (A) Do oocytu drápatky je injikována cytoplasmata z vajíčka drápatky v M-fázi. Buněčný extrakt způsobí přechod oocytu do M-fáze prvního meiotického dělení, kdy dojde k rozpadu velkého jádra a k vytvoření vřeténka. (B) Pokud je cytoplasmata vzata z vajíčka v interfázi, k přechodu oocytu do M-fáze nedojde. Proto tedy musí extrakt v (A) obsahovat nějakou aktivitu, totiž M-fázi podporující faktor (MPF), který spouští přechod do M-fáze.

Když byl MPF konečně vyizolován, bylo zjištěno, že obsahuje jedinou proteinkinázu, která je zodpovědná za jeho aktivitu. Fosforylací příslušných proteinů způsobuje tato kináza kondenzaci chromosomů, rozpad jaderného obalu a reorganizaci mikrotubulů cytoskeletu při tvorbě mitotického vřeténka. Například rozpad jaderné membrány je způsoben rozložením jaderné laminy - submembránové vrstvy laminových filamentů. Jak je popsáno v Kapitole 17, MPF-kináza fosforyluje proteiny laminy a tím dochází k jejímu rozpadu (viz obr. 17-14). Obdobně kináza fosforyluje proteiny asociované s mikrotubuly, které pak mění vlastnosti mikrotubulů tak, že mohou vytvořit mitotické vřeténko.

Ale MPF-kináza nemůže fungovat sama o sobě. Jak bylo popsáno výše, pro svoji funkci musí mít navázán specifický cyklin. Dále se také předpokládá, že navázání cyklinu pomáhá kináze nalézt proteiny, které bude fosforylovat. Cykliny byly původně objeveny v experimentech odlišného typu, jak si popíšeme nyní.

Cyklin-dependentní proteinkinázy jsou regulovány akumulací a degradací cyklinu

Zatímco k objevení MPF vedly pokusy s přenosem cytoplasmata u žabích vajíček, k objevení cyklinů vedly biochemické pokusy s rýhujícím se vajíčkem škeble. Cykliny byly původně identifikovány jako proteiny, jejichž koncentrace během interfáze postupně rostla a potom rychle klesla na nulu po průchodu buňky M-fází, což se opakovalo každý buněčný cyklus (obr. 18-8). Protože cyklin sám o sobě nemá žádnou enzymovou aktivitu, jeho role v kontrole buněčného cyklu byla zprvu zahalena tajemstvím. Průlom nastal po zjištění, že cyklin je součástí MPF a je nezbytný pro aktivaci MPF-kinázy - *mitotické Cdk*. MPF je tedy proteinový komplex složený ze dvou podjednotek - regulační podjednotku tvoří cyklin a katalytickou podjednotku představuje mitotická Cdk. Po identifikaci složek MPF byly izolovány i jiné druhy cyklinů a Cdk, jejichž koncentrace nebo



Obrázek 18-7 Oscilace aktivity MPF během buněčného cyklu u embryí drápatky. Aktivita zkoumaná podle experimentu na obrázku 18-6 rychle vzrůstá před začátkem mitozy a prudce klesá k nule ke konci mitozy. Podobný obrázek aktivity MPF je možno pozorovat u všech eukaryontních buněk od kvasinky po člověka.



Obrázek 18-8 Nárůst a pokles aktivity MPF a koncentrace cyklinu během buněčného cyklu u rýhujících se vajíček mlže. Zatímco aktivita MPF roste a klesá během každé mitózy, koncentrace cyklinu se pozvolna zvyšuje během interfáze, vrcholí v mitóze a rychle klesá na konci mitózy. Koncentrace MPF-kinázy se během buněčného cyklu nemění, mění se pouze její aktivita.

aktivita rostou a klesají v jiných fázích buněčného cyklu, jak je popsáno později.

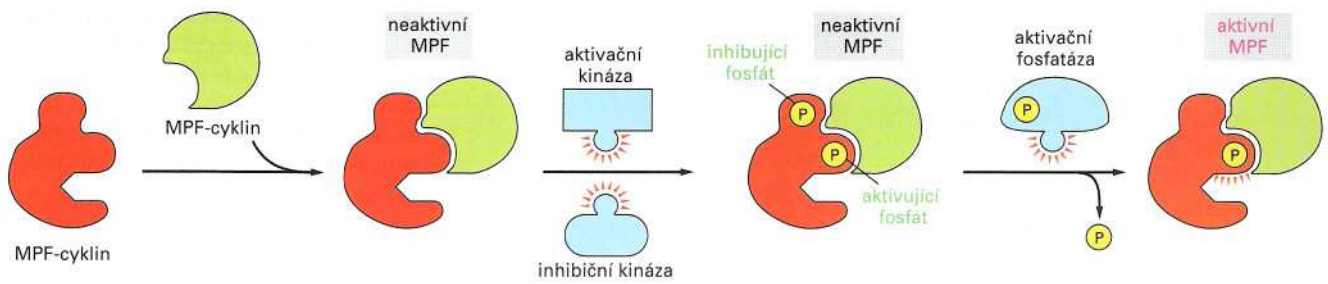
Ve stejné době, kdy biochemici identifikovali proteiny, které regulují buněčný cyklus u embryí žab a škeblí, zvolili genetici zabývající se kvasinkami odlišný přístup ke studiu systému regulace buněčného cyklu. Kvasinky jsou jednobuněčné houby. Protože jsou to relativně jednoduchá eukaryota, která se dělí téměř tak rychle jako bakterie, jsou ideálním organismem pro genetické studie v eukaryontní buněčné biologii. Bylo izolováno velké množství mutantů, které se zastavovaly nebo se abnormálně chovaly v určitých fázích buněčného cyklu a díky těmto mutantům bylo nalezeno mnoho genů zodpovědných za kontrolu buněčného cyklu. Také se ukázalo, že některé z těchto genů kódovaly cykliny a Cdk, které byly bez jakýchkoliv pochyb podobné – a to jak funkčně, tak i aminokyselinovou sekvencí – svým protějškům u žab a mlžů. Podobné geny byly brzy identifikovány i u lidských buněk.

Mnoho z genů regulujících buněčný cyklus se v průběhu evoluce změnilo jen nepatrně, takže lidská verze genu funguje bez jakýchkoliv problémů i v kvasinkách. Například kvasinky, které mají defektní svoji vlastní kopii určitého *cyklinu* nebo *Cdk*, se nebudou dělit, ale kvasinky, do kterých byl uměle zaveden odpovídající lidský gen, se budou dělit zcela normálně. Určitě i Darwin by žasl nad tak jasným důkazem, že lidé a kvasinky jsou si blízce příbuzní. I přes miliardu let odlišné evoluce používají všechny eukaryontní buňky (kvasinky, živočichové, rostliny) stejné klíčové molekuly, které regulují průběh jejich buněčného cyklu.

Regulace koncentrace cyklinů hraje důležitou roli ve správném načasování fází buněčného cyklu. Například syntéza cyklinové složky MPF začíná ihned po rozdělení buňky a pokračuje po celý průběh interfáze. Cyklin se akumuluje, a tak jeho koncentrace stále stoupá a pomáhá tak načasovat začátek mitózy; její následný rychlý pokles pak určuje konec mitózy (viz obr. 18-8). Náhlý pokles koncentrace cyklinu je způsoben jeho rychlou degradací ubiquitin-dependentním proteolytickým systémem. Mnoho molekul ubiquitinu je kovalentně navázáno na molekuly cyklinu a označí je tak pro degradaci v proteasomech (viz Kapitulu 7). Ubikvitinace cyklinu je nepřímým výsledkem aktivace samotné MPF-kinázy, protože aktivace MPF-kinázy iniciuje s určitým zpožděním ubiquitinaci cyklinu, jeho degradaci, a tím i vypnutí sebe sama.

Aktivita Cdk-kináz je dále regulována jejich fosforylací a defosforylací

Koncentrace cyklinu narůstá postupně v průběhu interfáze, zatímco MPF-kináza se aktivuje náhle na konci interfáze (viz obr. 18-8). Z toho vyplývá, že přítomnost cyklinu je pro aktivaci nezbytná, ale nemůže to být



jediný potřebný mechanismus. Aby byla kináza enzymově aktivní, musí být fosforylována na jednom nebo více místech a defosforylována na jiných. Odstranění inhibičního fosfátu specifickou proteinfosfatázou na konci interfáze je krok, který vede k aktivaci kinázy (obr. 18-9). Pokud je kináza jednou aktivována, může komplex cyklin-Cdk aktivovat další komplexy cyklin-Cdk, jak je ukázáno na obr. 18-10. Tato pozitivní zpětná vazba je vlastní příčinou náhlého prudkého nárůstu MPF-kinázové aktivity, která rychle řídí vstup buňky do M-fáze.

Různé komplexy cyklin-Cdk spouštějí různé kroky buněčného cyklu

Existuje mnoho variant cyklinů a u většiny eukaryot také mnoho variant Cdk, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu. Různé komplexy cyklin-Cdk spouští různé kroky buněčného cyklu. Zatímco komplex MPF-cyklin-Cdk funguje v G_2 -fázi a iniciuje vstup buňky do mitózy, jiná skupina cyklinů, nazývaná *cykliny S-fáze*, se váže na Cdk v pozdní G_1 -fázi a řídí vstup do S-fáze (obr. 18-11). Další skupina cyklinů, označovaných jako *G_1 -cykliny*, funguje v časně G_1 -fázi, kde po navázání na molekuly Cdk pomáhá iniciovat tvorbu a aktivaci komplexů cyklinu S-fáze s Cdk a směřuje tak buňku do S-fáze. Jak uvidíme později, vytváření komplexů G_1 -cyklin s Cdk je u živočišných buněk obvykle závislé na extracelulárních růstových faktorech, které stimulují buňku k proliferaci.

Koncentrace každého typu cyklinu vzrůstá a pak v určité fázi buněčného cyklu prudce klesá, protože cykliny jsou degradovány ubiquitinovou cestou. Nárůst koncentrace každého typu cyklinu umožňuje aktivaci svého Cdk-partnera a po jejím rychlém poklesu se Cdk vrátí do klidového stavu (obr. 18-12). Můžeme tedy říci, že pomalá akumulace cyklinu až ke kritické hladině je jedním ze způsobů, jak systém regulace buněčného cyklu měří časové intervaly mezi jednotlivými kroky buněčného cyklu.

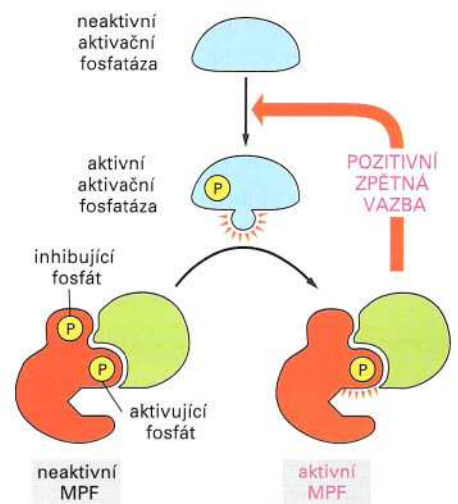
Stejně jako v případě MPF-kinázy musí být i ostatní Cdk před svojí aktivací fosforylovány a defosforylovány na příslušných místech. Každý komplex cyklin-Cdk ovlivňuje odlišnou skupinu buněčných proteinů. Výsledkem je, že každý komplex řídí průchod jiným bodem cyklu.

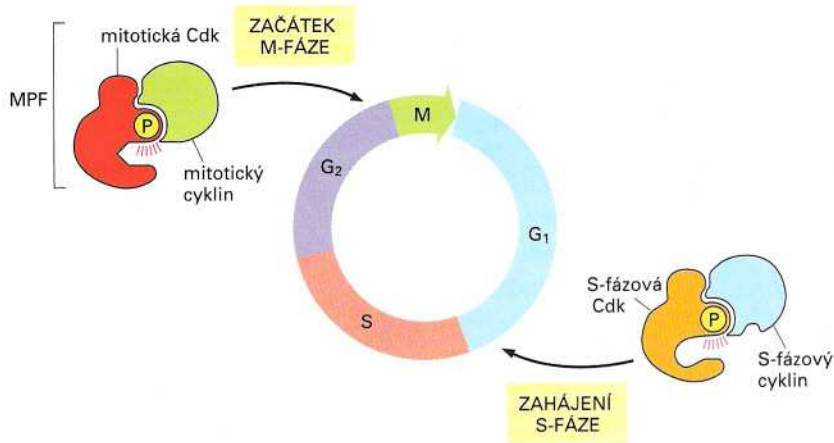
Obrázek 18-10 Aktivovaný MPF nepřímo aktivuje další MPF.

Jakmile je MPF aktivován, MPF-kináza fosforyluje (a tím i aktivuje) další molekuly aktivační fosfatázy, která nyní může aktivovat více MPF. Ačkoliv to zde není ukázáno, aktivovaný MPF také inhibuje inhibiční kinázu nakreslenou na obrázku 18-9 a tím také podporuje aktivaci dalších MPF. Těmito způsoby tedy MPF nepřímo aktivuje další MPF, což se projeví jako prudký nárůst aktivace MPF.

Obrázek 18-9 Aktivace MPF. MPF-cyklin-Cdk komplex je po svém zformování enzymově neaktivní. Následně je Cdk fosforylována na místech, která jsou potřebná pro její aktivaci, a zároveň na jiných místech, která inhibují její aktivitu. V této chvíli je MPF stále neaktivní. Jak je ukázáno, komplex je nakonec aktivován fosfatázou, která odstraní inhibiční fosfatovou skupinu. Stále však není jasné, jak je správné načasování této aktivace regulováno.

Otázka 18-2 Malé množství cytoplasmy izolované z mitotické buňky je injikováno do neoplozeného žabího oocyty a způsobí tak jeho vstup do M-fáze. Z tohoto oocyty je pak vzat vzorek cytoplasmy a injikován do druhého oocyty, kde opět způsobí jeho přechod do M-fáze. Tento postup je opakován tak dlouho, dokud nejsou z injikovaného vzorku odstraněny všechny proteiny z původního vzorku cytoplasmy. A nyní cytoplasmata vzata z posledního takto ošetřeného vajíčka je opět schopna spustit přechod do M-fáze s nezmenšenou účinností. Vysvětlete toto zajímavé pozorování.

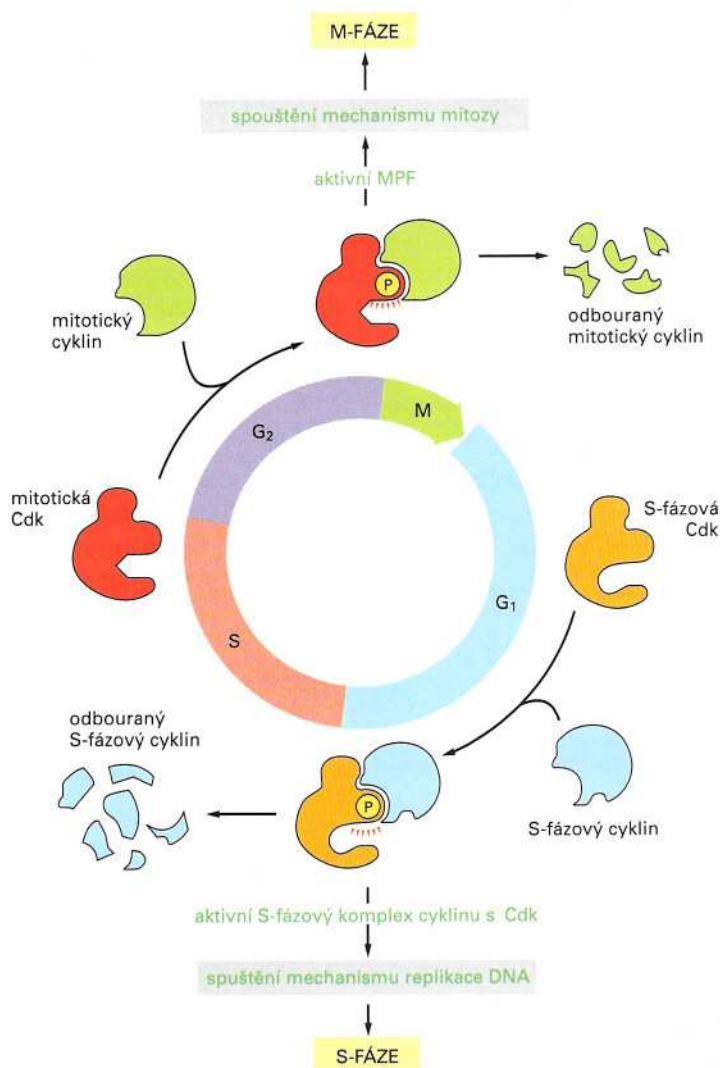




Obrázek 18-11 Dva komplexy cyklin-Cdk, které fungují v odlišných krocích buněčného cyklu. Nakreslený komplex cyklin S-fáze-Cdk směřuje buňku do S-fáze, zatímco komplex mitotický cyklin-Cdk (MPF) řídí vstup buňky do M-fáze.

Buněčný cyklus může být zastaven v G₁-fázi Cdk-inhibičními proteiny

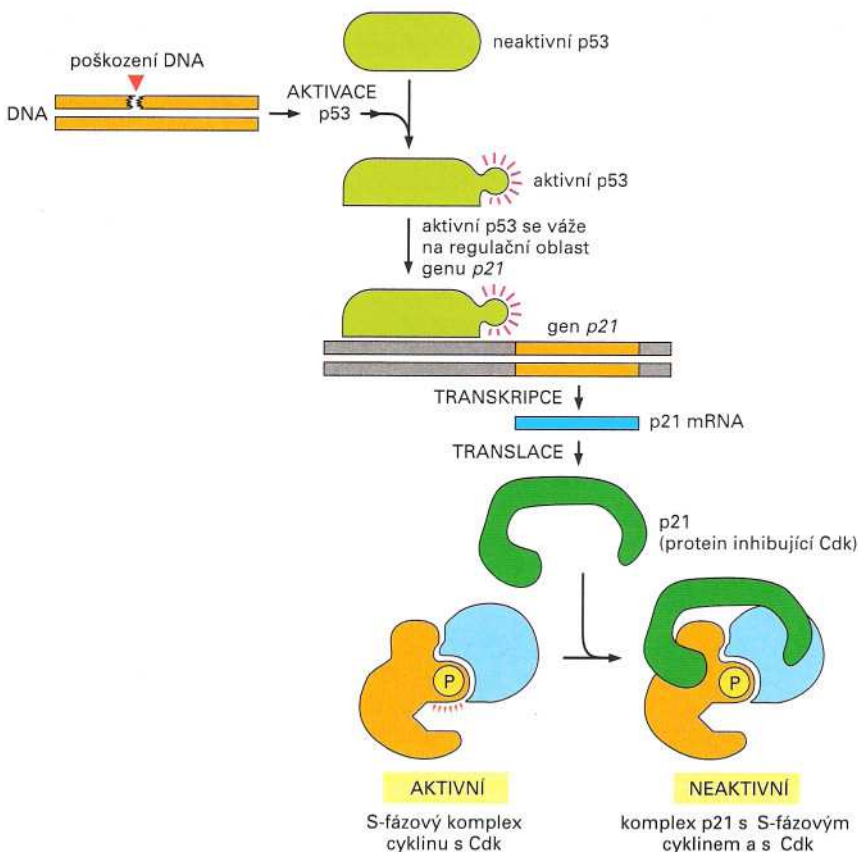
Ukázali jsme si, že systém regulace buněčného cyklu spouští jednotlivé kroky v určitém pořadí. Například mitózu spouští pouze po úplné repli-



Obrázek 18-12 Regulace Cdk degradací cyklinu. Jsou zde nakresleny pouze dva typy cyklin-Cdk komplexů, jeden spouští S-fázi, druhý M-fázi. V obou případech je pro aktivaci Cdk vyžadováno navázání cyklinu (samozřejmě kromě fosforylace a defosforylace, jak je ukázáno na obrázku 18-9) a inaktivace Cdk je tak závislá na degradaci cyklinu.

kaci DNA a dovoluje buňce rozdělit se až poté, co byla dokončena mitóza. Pokud se jeden krok opozdí, regulační systém zpozdí i následující aktivity, takže pořadí kroků zůstane zachováno. Tato samoregulační schopnost regulačního systému zajišťuje, že pokud je například syntéza DNA z nějakého důvodu zastavena v průběhu S-fáze, buňka nevstoupí do M-fáze s napůl zreplikovanou DNA. Jak bylo řečeno dříve, regulační systém toho dosahuje díky molekulárním brzdám, které mohou zastavit buněčný cyklus v určitých *kontrolních bodech*, a tak buňce umožňují monitorovat svůj vnitřní stav a své okolí před dalším pokračováním v buněčném cyklu (viz obr. 18-3).

Převážná část molekulárních mechanismů zodpovědných za zastavení buněčného cyklu v kontrolních bodech není známa. Alespoň v některých případech se zdá, že za to mohou specifické **Cdk-inhibiční proteiny**, které blokuji sestavení nebo aktivitu jednoho nebo více cyklin-Cdk komplexů. Jeden z nejlépe prostudovaných kontrolních bodů zastavuje buněčný cyklus v G_1 -fázi v případě, že je poškozena DNA, a zabraňuje tak replikaci poškozené DNA. Zatím neznámým mechanismem indukuje poškození DNA zvýšení jak koncentrace, tak aktivity genového regulačního proteinu nazývaného p53. Pokud je aktivován, stimuluje transkripci genu kódujícího Cdk-inhibiční protein označovaný jako p21. Tak se zvyšuje koncentrace proteinu p21, který se váže na komplex cyklinu S-fáze s Cdk, který je zodpovědný za přechod do S-fáze, a blokuje tak jeho funkci (obr. 18-13). Zastavení buněčného cyklu v G_1 -fázi poskytuje buňce čas na opravu DNA ještě dříve, než ji zreplikuje. Pokud p53 chybí nebo je defektní, replikace poškozené DNA vede ke vzniku vysokého počtu mutací a produkci buněk směřujících k tomu, že se z nich stanou buňky nádorové.



Obrázek 18-13 Zastavení buněčného cyklu v G_1 -fázi proteinem p53. Pokud je DNA poškozena, množství proteinu p53 se zvyšuje (neukázáno) a stává se aktivním. Aktivovaný p53 stimuluje transkripci genu, který kóduje Cdk inhibiční protein p21. Protein p21 se váže na komplex cyklin S-fáze-Cdk a inaktivuje ho, takže se buněčný cyklus zastaví v G_1 -fázi. Zatím není známo, jak poškození DNA aktivuje p53.

Ve skutečnosti jsou mutace v genu pro *p53*, které buňce umožňují dělit se i s poškozenou DNA, důležitým faktorem při vývoji většiny lidských rakovin, jak si povíme později.

Buňky mohou odbourat svůj regulační systém a uniknout tak z buněčného cyklu

Nejradikálnější rozhodnutí, které musí systém regulace buněčného cyklu učinit, je to, zda bude buněčné dělení úplně zastaveno. Jedná se o zcela odlišné rozhodnutí, než je zastavení uprostřed cyklu potřebné k zvládnutí dočasného zpoždění, a je zvláště důležité u mnohobuněčných organismů. Například v lidském těle musí většina nervových buněk a buněk kosterního svalstva vydržet bez dělení po celou dobu života; vstupují do modifikované G_1 -fáze nazývané G_0 (G nula), v které je systém regulace buněčného cyklu částečně odbourán, takže vymizí mnoho cyklin-dependentních kináz a cyklinů. Některé buněčné typy, jako třeba jaterní buňky, se normálně dělí jednou za rok až dva, zatímco určité epitelální buňky střeva se dělí více než dvakrát denně, aby byla zajištěna neustálá obnova střevní výstelky. Většina našich buněk spadá někde mezi uvedené příklady – mohou se dělit, pokud je třeba, ale normálně tak činí zřídka.

Pro savčí buňky se zdá být obecným pravidlem, že se dělí (*proliferují*) pouze tehdy, pokud jsou k tomu stimulovány signály od ostatních buněk. Pokud tyto signály nemají, buněčný cyklus se zastavuje v G_1 -kontrolním bodě a buňky vstupují do stavu G_0 . Buňky mohou v G_0 setrvat dny, měsíce a dokonce i roky, než se znovu začnou dělit. V dospělém těle je proto nejvíce odlišností v rychlosti buněčného dělení dáno rozdílnou dobou, kterou buňka stráví v G_0 nebo G_1 ; pokud už jednou buňka projde G_1 -kontrolním bodem, zbytek buněčného cyklu většinou proběhne velice rychle - u savců obvykle během 12-24 hodin.

G_1 -kontrolní bod je proto někdy označován jako *Start*, protože pokud jím buňka projde, je předurčena k dokončení celého buněčného cyklu, ale spíše by se tento bod měl nazývat *Stop* (obr. 18-14). Některé z hlavních kontrolních bodů buněčného cyklu jsou shrnuty na obr. 18-15. U mnohobuněčných organismů je začátek a ukončení buněčné proliferace naprosto zásadní při regulaci počtu buněk a tělesných proporcí. Ale kontrola buněčného dělení je pouze polovinou příběhu, jak si ukážeme v další části. Na druhé misce vah leží stejně důležitý regulační mechanismus, který rozhoduje o tom, zda bude buňka žít, nebo spáchá sebevraždu.

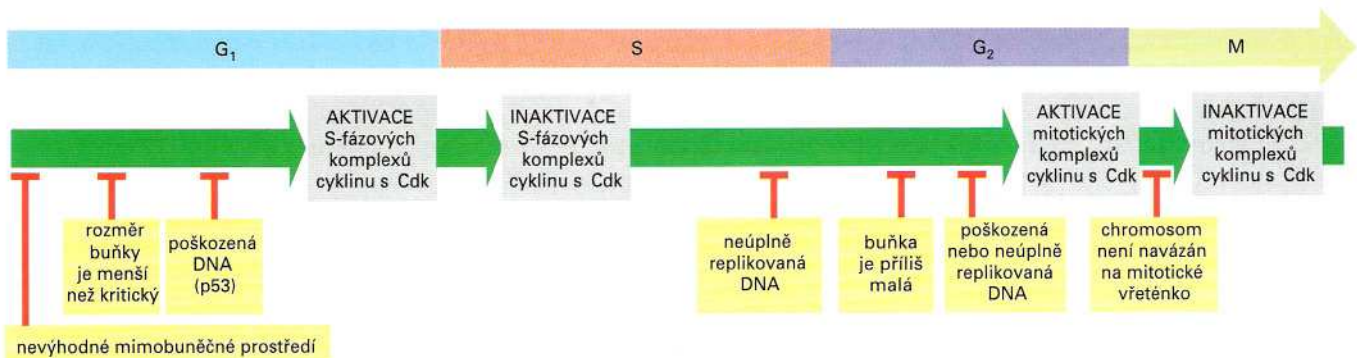


Obrázek 18-14 Rozhodnutí v G_1 -kontrolním bodě. Buňka se může rozhodnout pro zahájení dalšího buněčného cyklu, může se zde přechodně zastavit, dokud nebudou vhodné podmínky, nebo může buněčný cyklus úplně opustit a vstoupit do G_0 .

Otázka 18-3 Proč si myslíte, že si buňky pro opuštění buněčného cyklu vyvinuly speciální stav G_0 , než aby se prostě zastavily v G_1 -kontrolním bodě?

Obrázek 18-15 Souhrn některých kontrolních bodů buněčného cyklu.

Červená T představují potenciální místa kontroly průběhu buněčného cyklu, která jsou určena jednak na základě intracelulárních procesů, které nejsou zcela dokončeny nebo nejsou zcela v pořádku, a jednak na základě nevhodných extracelulárních podmínek (zvýrazněno žlutě). Kontrolní bod naznačený v M-fázi zajišťuje, že jsou všechny chromosomy přichyceny na mitotické vřeténko ještě před vstupem do anafáze, kde se dceřiné chromosomy oddělují a putují k opačným pólům vřeténka (viz Kapitola 17).



Regulace počtu buněk u mnohobuněčných organismů

Oplozené myši vajíčko a oplozené lidské vajíčko jsou stejně velká a přesto je dospělá myš mnohem menší než dospělý člověk. Tento rozdíl ve velikosti odráží především rozdíl v počtu buněk – dospělý člověk je tvořen mnohem větším počtem buněk než dospělá myš. Co je to za rozdíl v regulaci chování buněk u myši a lidí, který vytváří tak odlišná množství buněk? Stejný základní problém vyvstává u každého orgánu a tkáně jedince. Jaká regulace buněčného chování vysvětlí délku sloního chobotu nebo velikost jeho mozku nebo jater? Tyto otázky jsou většinou nezodpovězeny, ale přinejmenším je možno říci, co musí v odpovědi být. Buněčná proliferace, stejně tak jako přežívání buněk a buněčná smrt, musí být regulovány signály od ostatních buněk těla (viz Kapitola 15) v kombinaci s vlastními programy každé jednotlivé buňky.

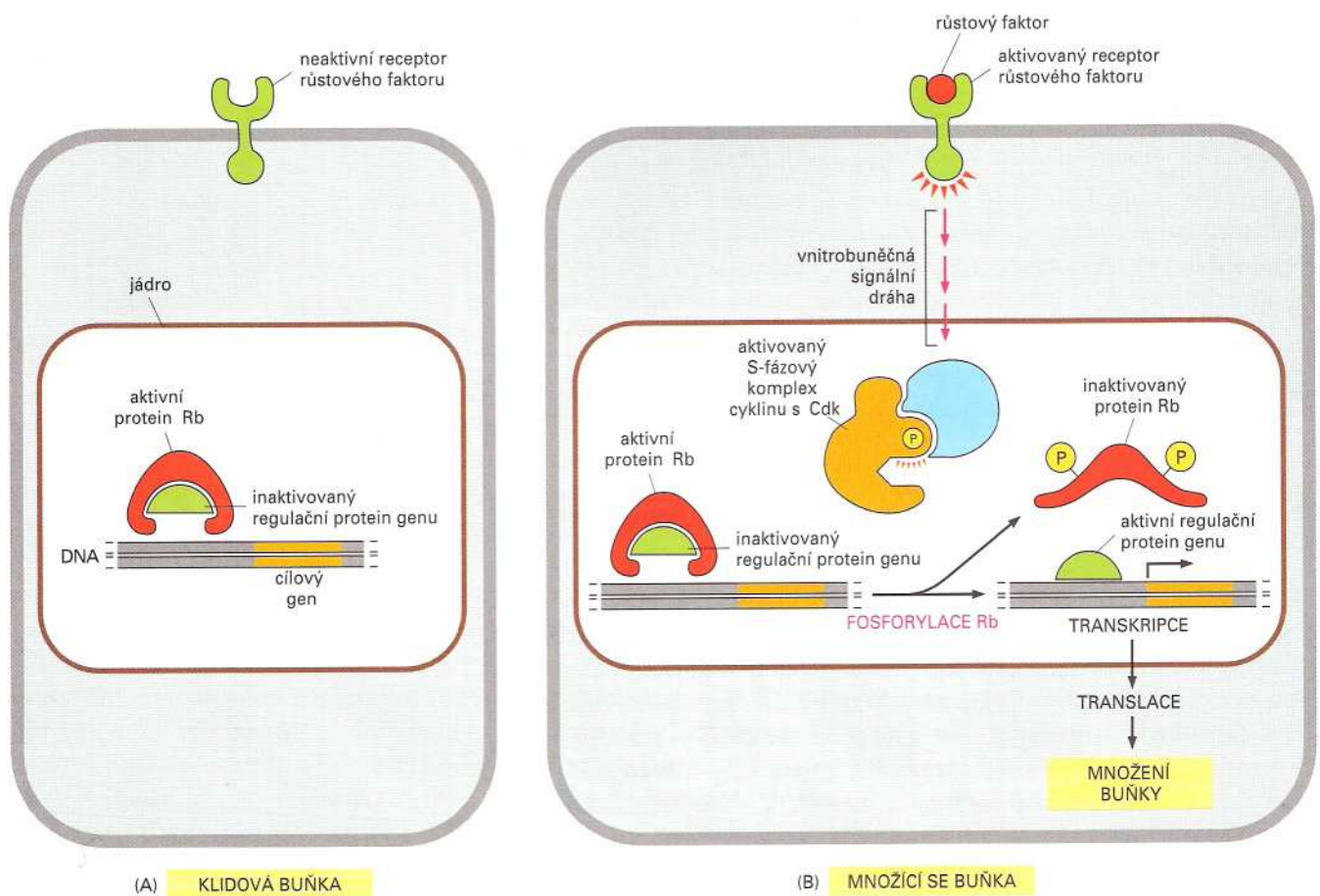
V této části se nejprve zaměříme na normální regulaci buněčné proliferace, přežívání buněk a buněčné smrti. Poté se zamyslíme nad tím, jak špatná regulace těchto procesů může vyústit ve vznik rakoviny.

Buněčná proliferace je závislá na signálech od ostatních buněk

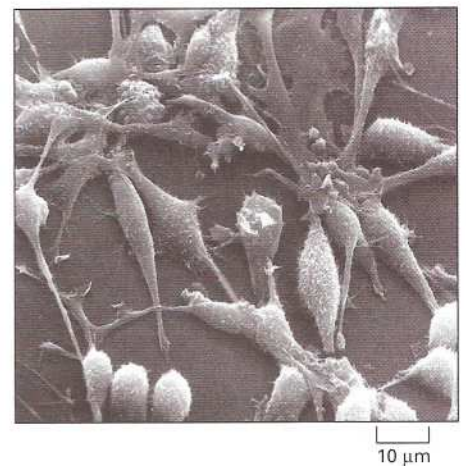
Jednobuněčné organismy, jako jsou bakterie a kvasinky, mají tendenci množit se tak rychle, jak je to jen možné a rychlost jejich proliferace je především závislá na nutričních zdrojích v okolí. Na rozdíl od nich jsou buňky mnohobuněčného organismu členy vysoce organizované komunity a jejich proliferace musí být regulována tak, aby se jednotlivé buňky dělily pouze v případech, když je v organismu zapotřebí další buňka - ať již pro růst nebo jako náhrada za ztracenou buňku. Aby tedy živočišné buňky proliferovaly, nestačí k tomu pouze živiny. Musí také obdržet stimulační chemické signály od ostatních buněk, obvykle od svých sousedů. Tímto způsobem se překonávají intracelulární mechanismy, které jinak brzdí růst a průběh buněčného cyklu.

Důležitým příkladem proteinů, které normálně udržují proliferaci pod kontrolou, je protein Retinoblastoma (Rb), který byl poprvé identifikován při studiích případů vzácných dětských očních nádorů označovaných jako retinoblastomy, u kterých protein Rb chybí nebo je defektní. Protein Rb se vyskytuje v hojném množství v buněčném jádře u všech obratlovců. Váže se na určité regulační proteiny a zabraňuje jim tak ve stimulaci transkripce genů, které jsou potřebné pro buněčnou proliferaci. Extracelulární signály, jako jsou *růstové faktory*, stimulují buněčnou proliferaci a vedou k aktivaci komplexů G_1 -cyklin-Cdk, jak jsme se již zmínili dříve. Tyto komplexy fosforylují protein Rb, čímž se mění jeho konformace a dojde k uvolnění na něj navázaných regulačních proteinů, které pak mohou volně aktivovat geny potřebné pro buněčnou proliferaci (obr. 18-16).

Stimulační signály, které překonávají brzdy buněčné proliferace, jsou většinou proteinové *růstové faktory*. Tyto secerňované signální proteiny se vážou na receptory na povrchu buněk a aktivují tak intracelulární signální dráhy (viz Kapitola 15), které stimulují buněčný růst a dělení. Většina růstových faktorů byla identifikována a charakterizována v tkáňových kulturách díky jejich vlivu na buněčný růst (obr. 18-17). Jedním z prvních růstových faktorů, který byl tímto způsobem identifikován, je



Obrázek 18-16 Zjednodušený model, jak růstové faktory stimulují buněčnou proliferaci. (A) Při absenci růstových faktorů udržuje defosforylovaný Rb-protein regulační proteiny genů v neaktivním stavu; tyto regulátory genů jsou nezbytné pro zahájení transkripce genů, které kódují proteiny potřebné pro buněčnou proliferaci. (B) Růstové faktory se vážou na receptory na povrchu buňky a aktivují intracelulární signální dráhy, které vedou ke vzniku a aktivaci G_1 -cyklin-Cdk-komplexů, o kterých jsme se zmínili již dříve. Tyto komplexy fosforylují Rb protein a tím ho inaktivují. Regulační proteiny se uvolní a mohou nyní aktivovat transkripci svých cílových genů, což vede k buněčné proliferaci.



Obrázek 18-17 Proliferující savčí buňky v kultuře na fotografii z řádkovacího elektronového mikroskopu. Tyto buňky jsou kryší fibroblasty rostoucí v přítomnosti telecího séra, které obsahuje růstové faktory stimulující buňky k dělení. Kulaté buňky ve spodní části obrázku jsou buňky, které se zakulatily při přípravě na buněčné dělení.

růstový faktor krevních destiček neboli *PDGF* (z angl. platelet-derived growth factor), jehož účinky jsou charakteristické i pro mnoho jiných růstových faktorů. Když dochází ke srážení krve (například při zranění), krevní destičky obsažené v krevní sraženině uvolňují PDGF, který se v místě poranění váže na receptorové tyrosinkinázy (viz Kapitolu 15) u přeživších buněk a stimuluje je k proliferaci a k zahojení rány. Obdobně, pokud je část jater chirurgicky odstraněna nebo vážně poškozena při zranění, jaterní i jiné buňky produkují protein označovaný jako *hepatocytární růstový faktor*, který pomáhá stimulovat přeživší jaterní buňky k dělení.

Aby se mohla většina živočišných buněk v kultuře množit, vyžadují tyto buňky určité kombinace několika růstových faktorů. Tak mohou u živočichů různé kombinace relativně malého počtu růstových faktorů selektivně regulovat proliferaci mnoha typů buněk. Některé proteinové růstové faktory a jejich účinky jsou ukázány v tabulce 18-1.

Tabulka 18–1 Některé proteinové růstové faktory a jejich zánik

Faktor	Hlavní působení*
Růstový faktor krevních destiček (PDGF)	stimuluje proliferaci buněk pojivových tkání
Epidermální růstový faktor (EGF)	stimuluje proliferaci buněk pokožky
Fibroblastový růstový faktor (FGF)	stimuluje proliferaci fibroblastů
Hepatocytární růstový faktor (HGF)	stimuluje proliferaci jaterních buněk
Erythropoietin	stimuluje proliferaci a diferenciaci vyvíjejících se červených krvinek

* S výjimkou erythropoietinu stimuluji všechny zmíněné faktory proliferaci i u mnoha jiných buněčných typů

Živočišné buňky mají vnitřně limitovaný počet buněčných dělení, kterými mohou projít

I v přítomnosti růstových faktorů se normální živočišné buňky nebudou v kultuře dělit navždy. Buněčné typy, u kterých je zachována schopnost dělit se v průběhu života živočicha, pokud jsou v neporušeném těle, se v kultuře obvykle přestávají po určitém počtu dělení dále dělit: například fibroblasty z lidského plodu se mohou rozdělit přibližně osmdesátkrát, než se přestanou dělit, a to i v případě, že jim je věnována velká péče, růstové faktory a prostor k množení. Existuje zde pozoruhodná odlišnost v proliferačních schopnostech buněk podle věku jedince, z kterého byly buňky odvozeny. Například fibroblasty získané od čtyřicetiletého člověka se přestávají dělit po přibližně čtyřiceti děleních.

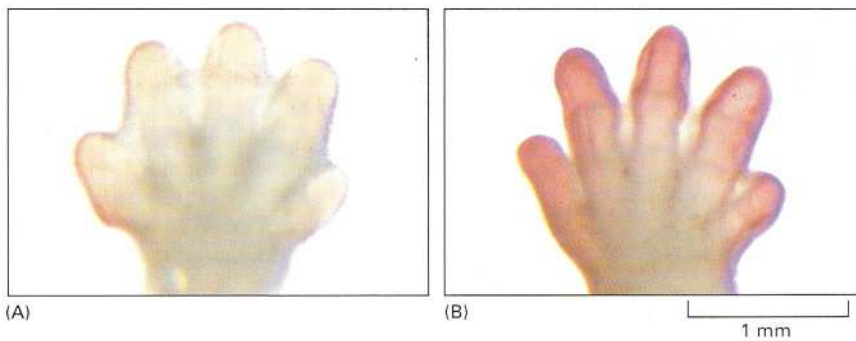
Tento jev se nazývá **buněčné stárnutí**, protože koresponduje se stárnutím těla jako celku, ale vztah ke stárnutí organismu je nejistý. Protože fibroblasty z myšího embrya zastavují v kultuře svoji proliferaci po přibližně třiceti děleních, je možné, že stárnutí buněk může pomáhat při určení velikosti těla. Myši mohou být tedy menší než lidé díky tomu, že jejich buňky přestanou reagovat na růstové faktory po méně buněčných dělení.

Mechanismy, které zastavují buněčný cyklus (ať už při diferenciaci nebo buněčném stárnutí), jsou zatím obestřeny tajemstvím, ačkoliv se nechá předpokládat, že se na tom pravděpodobně podílí akumulace Cdk-inhibičních proteinů a vymizení Cdk-kináz. Až porozumíme více molekulárním mechanismům, které normálně omezují buněčné dělení, bude pravděpodobně snazší stanovit biologický význam jevů, jako je třeba buněčné stárnutí, a možná konečně pochopíme, proč jsme větší než myši.

Otázka 18-4 Kromě akumulace Cdk-inhibičních proteinů a ztráty Cdk-kináz navrhněte ještě další možné mechanismy, kterými by buňka mohla „poznat svůj věk“, a omezit tak počet následných dělení.

Živočišné buňky vyžadují signály od okolních buněk, aby se vyhnuly programované buněčné smrti

Živočišné buňky potřebují signály od jiných buněk nejen proto, aby proliferovaly, ale dokonce i pro své přežití. Pokud jsou buňkám takovéto **faktory pro přežití** odebrány, aktivují intracelulární sebevražedný program a umírají procesem nazývaným programovaná buněčná smrt. Tato závislost na signálech pro přežití od jiných buněk zajišťuje, že buňky přežívají pouze na správných místech a ve správný čas.

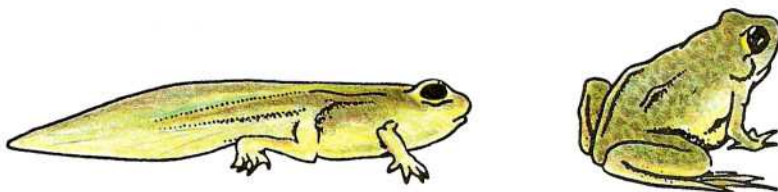


Obrázek 18-18 Programovaná buněčná smrt tvaruje prsty vyvíjející se nohy myši. (A) Zobrazená noha byla označena barvivem (červeně), které se specificky váže na buňky, které prodělaly programovanou buněčnou smrt. Touto buněčnou smrtí se odstraní tkáň mezi vyvíjejícími se prsty, jak je vidět na noze zachycené o jeden den později na obrázku (B).

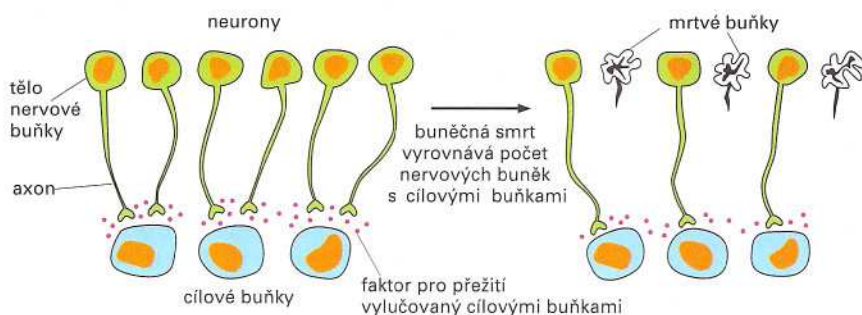
Rozsah programované buněčné smrti, ke které dochází jak ve vyvíjejících se, tak v dospělých tkáních, je ohromující. Například ve vyvíjejícím se nervovém systému obratlovců normálně zemře více než polovina nervových buněk brzy poté, co vznikly. U zdravého dospělého člověka umírají každou hodinu miliardy buněk v kostní dřeni a střevě. Vypadá to jako neobyčejné plýtvání, když umírá takové množství buněk, z nichž je v čase sebevraždy naprostá většina zcela zdravá. K jakým účelům slouží tato masová buněčná smrt?

V některých případech jsou odpovědi jasné. Například naše ruce a nohy jsou vytvářeny programovanou buněčnou smrtí v průběhu embryonálního vývoje – na začátku mají tvar rýče a jednotlivé prsty jsou od sebe odděleny teprve tehdy, když odumřou buňky mezi nimi (obr. 18-18). V jiných případech buňky zase odumírají, pokud už není struktura, kterou tvoří, déle potřebná. Když se pulec mění v žábu, buňky ocasu odumřou a u žab, které ho nepotřebují, už ocas neexistuje (obr. 18-19). V mnoha dalších případech pomáhá buněčná smrt regulovat počet buněk. Například ve vyvíjejícím se nervovém systému přizpůsobuje buněčná smrt počet nervových buněk počtu cílových buněk, které vyžadují inervaci. U embrya se nervové buňky vytvářejí v nadbytku a soutěží mezi sebou o omezené množství faktorů pro přežití vylučovaných cílovými buňkami, které kontaktují. Nervové buňky, které získají dostatečné množství faktorů, přežijí, zatímco ostatní zemřou (obr. 18-20).

U dospělých tkání vyvažuje buněčná smrt buněčnou proliferaci, takže je zabráněno jak nadměrnému růstu tkáně, tak jejímu zmenšování. Jak již bylo zmíněno dříve, pokud je dospělým krysám odebrána část jater, tato část je nahrazena zvýšenou proliferací jaterních buněk, která je částečně stimulována zvýšenou produkcí hepatocytárního růstového faktoru. A naopak, pokud je krysám podávána látka fenobarbital, která zatím neznámým mechanismem stimuluje dělení jaterních buněk (a tím i zvětšení jater), a pokud je poté podávání přerušeno, v játrech se značně zvyšuje počet umírajících buněk až do té doby, než se játra vrátí do původní velikosti, což obvykle trvá asi týden. Tak je tedy velikost jater udržována v konstantní velikosti díky vyvážené regulaci buněčné smrti a buněčného dělení.



Obrázek 18-19 Programovaná buněčná smrt se objevuje během přeměny pulce v žábu. Když se pulec začíná měnit v žábu, u buněk ocasu pulce se indukce programovaná buněčná smrt, jejímž následkem je ztráta ocasu. Všechny změny, ke kterým dochází v průběhu přeměny včetně indukce programované buněčné smrti u buněk ocasu, jsou vyvolány zvýšenou hladinou thyroïdního hormonu v krvi.



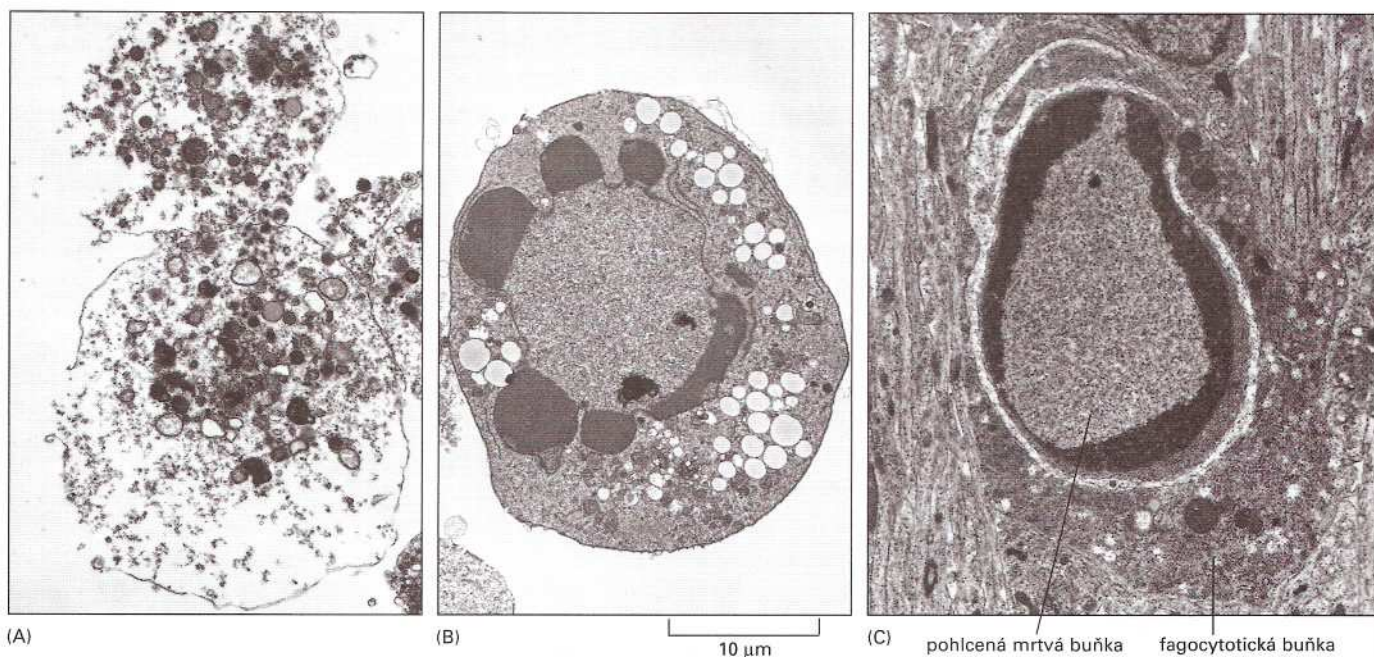
Programovaná buněčná smrt je realizována intracelulární proteolytickou kaskádou

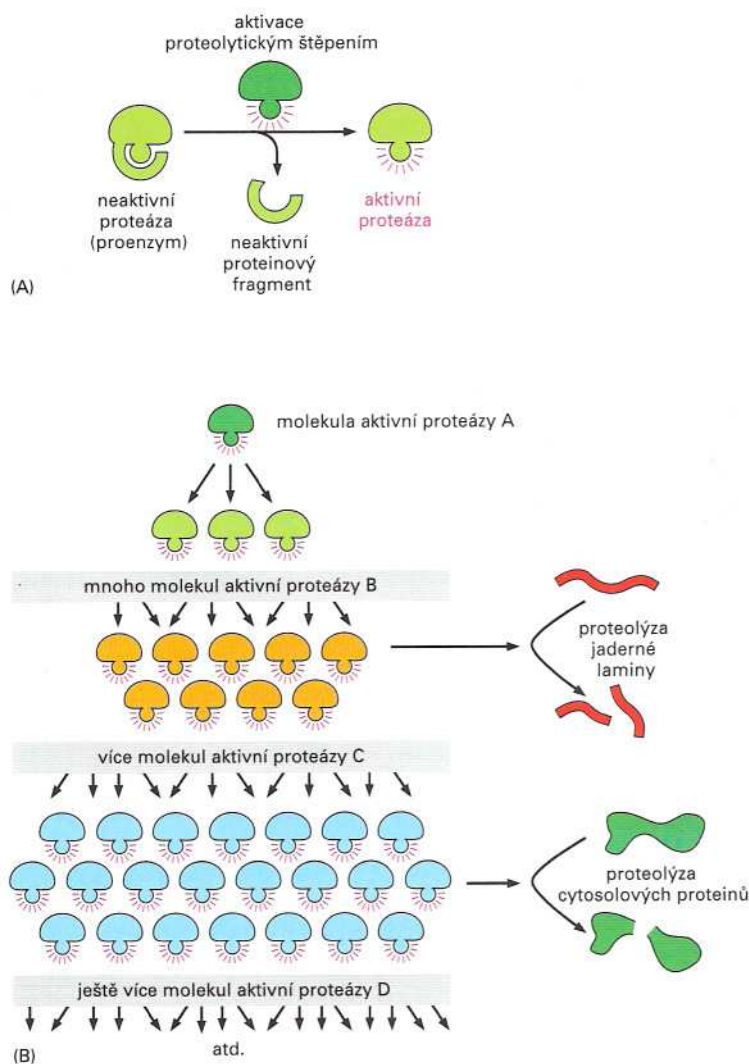
Buňky, které umírají následkem akutního poranění, obvykle zvětšují objem, prasknou a vylijí svůj obsah do svého okolí (tento proces je nazýván *nekroza buněk*) a způsobují tak potenciálně nebezpečnou zánětlivou reakci. Naopak, buňky, které procházejí **programovanou buněčnou smrtí** (také se jí říká **apoptóza**) umírají uspořádaně bez poškozování svých sousedů. Buňka se zmenšuje a kondenzuje. Cytoskelet je odbourán, jaderný obal se rozkládá a jaderná DNA je fragmentována na malé úseky. Co je nejdůležitější, buněčný povrch je změněn tak, že svými vlastnostmi způsobuje téměř okamžitou fagocytózu umírající buňky, ať již svými sousedy nebo makrofágy (specializované fagocytující buňky, viz Kapitola 14), a to ještě dříve, než dojde k vylití jejího obsahu (obr. 18-21).

Soustrojí, které je odpovědné za tento druh kontrolované buněčné smrti, se zdá být podobné u všech živočišných buněk. Tvoří je rodina proteáz (enzymů, které štěpí jiné proteiny), které jsou samy aktivovány proteolytickým štěpením v odpověď na signály indukující programovanou buněčnou smrt. Aktivované sebevražedné proteázy štěpí, a tím aktivují, další členy rodiny, což má za následek zesílení proteolytické kaskády. Aktivované proteázy pak štěpí další klíčové buněčné proteiny a buňku tak zabíjejí rychle a uspořádaně. Jedna z těchto proteáz například štěpí pro-

Obrázek 18-20 Buněčná smrt přizpůsobuje množství vyvíjejících se nervových buněk množství cílových buněk, které kontaktují. Vzniká větší množství nervových buněk, než může být podporováno omezeným množstvím faktorů pro přežití, které jsou uvolňovány cílovými buňkami. Proto některé buňky získají nedostatečné množství faktorů pro přežití, které by jinak potlačily jejich sebevražedný program, a následně u nich dojde k programované buněčné smrti. Tato strategie nadprodukce následovaná přetříděním zabezpečuje, že všechny cílové buňky jsou ve spojení s nervovými buňkami a že jsou nadbytečné nervové buňky automaticky eliminovány.

Obrázek 18-21 Buněčná smrt. Snímky z elektronového mikroskopu ukazují buňky, které umírají nekrozou (A) nebo programovanou buněčnou smrtí (B a C). Buňky v (A) a (B) umírají v tkáňové kultuře, zatímco buňka na obrázku (C) umírá ve vyvíjející se tkáni a je pohlcena sousední buňkou. Všimněte si, že buňka v (A) vypadá, jako by explodovala, zatímco buňky v (B) a (C) jsou sice kondenzované, ale vypadají relativně neporušeně. Veliké vakuoly v cytoplasmě u buňky v (B) jsou jedním z možných znaků programované buněčné smrti.





Obrázek 18-22 Programovaná buněčná smrt je realizována proteolytickou kaskádou. (A) Každá sebevraždná proteáza je tvořena jako neaktivní proenzym a je aktivována proteolytickým štěpením jiným zástupcem ze stejné rodiny proteáz. (B) Každá molekula aktivované proteázy může potom rozštěpit další molekuly proenzymu, čím je aktivovat a ty potom mohou aktivovat ještě více molekul proteáz. Tímto způsobem může počáteční aktivace malého množství molekul proteáz vést díky zesilovací řetězové reakci (kaskádě) k prudké aktivaci velkého množství proteázových molekul. Některé z těchto aktivovaných proteáz potom mohou štěpit mnoho klíčových buněčných proteinů, jako jsou jaderné laminy, a vést tak k řízené buněčné smrti.

teiny jaderné laminy, a způsobuje tak její nenávratný rozpad (obr. 18-22).

Celá sebevraždná mašinérie je regulována signály od jiných buněk. Některé z nich působí jako vražedné signály a aktivují buněčné sebevraždné mechanismy. Tímto způsobem funguje thyroïdní hormon v ocasu pulce v době jeho přeměny v žabu (viz obr. 18-19). Jiné fungují jako signály pro přežití a potlačují sebevraždné mechanismy, takže buňky přežívají (viz obr. 18-20).

U mnohobuněčných organismů je programovaná buněčná smrt zcela přirozená, běžná na všech místech a obecně neškodný jev. Co představuje skutečné nebezpečí, je nepřiměřená proliferace a přežívání buněk, jak si o tom povíme nyní.

Rakovinné buňky se neřídí regulačními signály buněčného dělení a přežívání, pocházejícími z buněčného společenství

Rakovina je výsledkem mutací, které osvobodí buňky od obvyklé regulace buněčného dělení a přežití. Buňka v těle mutuje díky sérii náhodných událostí a získává schopnost proliferovat bez normálních zábran. Potomstvo této buňky mutace zdědí a vzniká z nich nádor, který může neomezeně růst.

Jak si ukážeme v následující části, chybná kontrola buněčné proliferace není jediný znak rakovinných buněk, ale je to jejich hlavní a základní

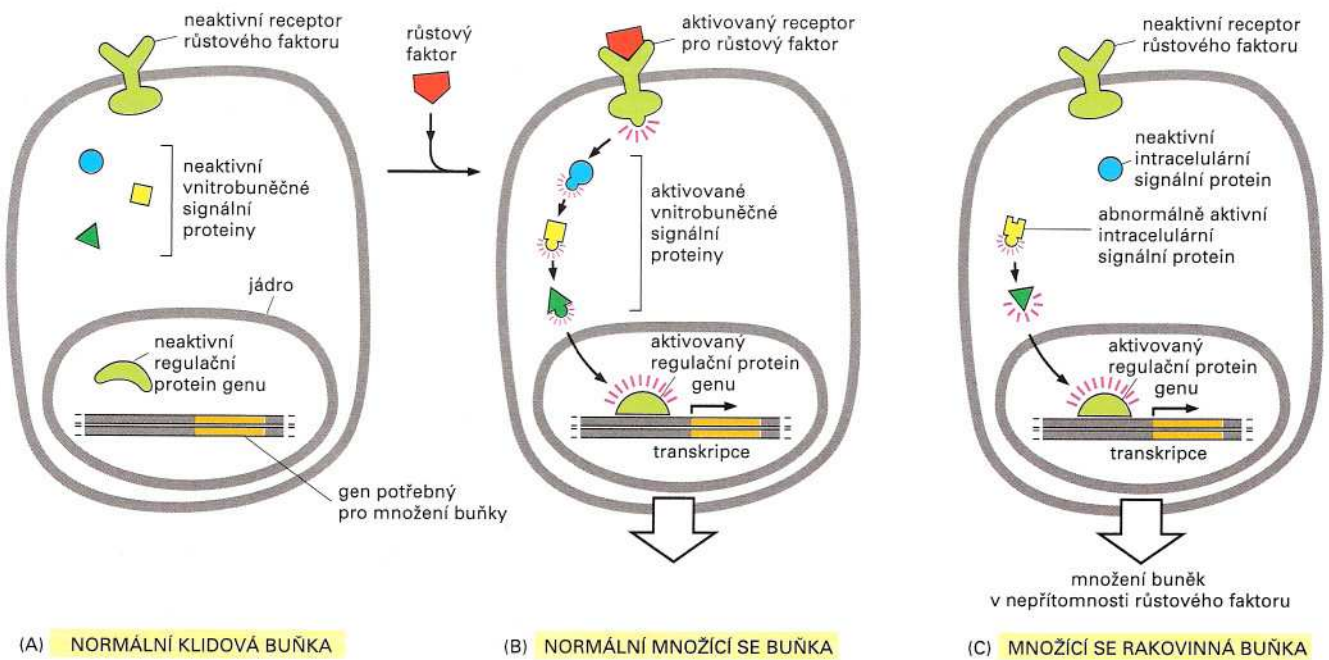
Otázka 18-5 Proč si myslíte, že k programované buněčné smrti dochází jinými mechanismy než při buněčné nekroze? Jaké by mohly být následky, kdyby k programované buněčné smrti nedocházelo tak spořádaným způsobem, při kterém buňka zabije sama sebe, aby zabránila vyli-tí svého buněčného obsahu do extracelulárního prostoru?

rys. Mutace, které způsobují u rakovinných buněk tyto defekty, postihují dvě široké kategorie genů: *proliferační geny*, které kódují proteiny normálně napomáhající buněčnému dělení, a *geny antiproliferační*, které kódují proteiny, které napomáhají za normálních okolností uplatňovat brzdy zastavující buněčný cyklus v kontrolních bodech, jak bylo diskutováno dříve.

Mutace v genu pro proliferaci, která způsobuje zvýšenou expresi nebo hyperaktivitu proteinu, vede k nadměrnému buněčnému dělení. Tento mutovaný gen je označován jako **onkogen** (což znamená rakovinu podporující gen), zatímco normální gen je nazýván **protoonkogen**. Podobně mutace, která inaktivuje antiproliferační gen, způsobuje uvolnění buňky z normálních zábran buněčného dělení a vede k nadměrné buněčné proliferaci. Proto jsou často antiproliferační geny, které jsou normálně v buňkách přítomny, označovány jako **tumor-supresorové geny**. U normální diploidní buňky se vyskytují dvě kopie každého tumor-supresorového genu; aby došlo ke ztrátě kontroly nad buněčnou proliferací, musí být ztraceny nebo inaktivovány zpravidla obě kopie genu, jedna kopie obvykle postačuje pro normální regulaci buněčného cyklu. Naopak, mutace jedné kopie protoonkogeny na onkogen stačí k vytvoření podobného efektu.

Protoonkogeny a tumor-supresorové geny patří do mnoha skupin a kódují různé typy proteinů. Onkogen může být například vytvořen mutací každého genu kódujícího protein signálních drah, které se podílejí na buněčné odpovědi na růstový faktor (viz Kapitola 15), pokud tato mutace vede k produkci abnormálně aktivního proteinu. Protein může být abnormálně aktivní, protože je vytvářen (1) v buňce, kde se normálně netvoří, (2) v nadměrném množství nebo (3) v takové formě, která není regulovatelná. Takovéto mutované geny podporují rakovinu tím, že umožňují buňce proliferovat i v nepřítomnosti příslušného extracelulárního signálu. Jeden onkogen je například odvozen od genu pro růstový faktor PDGF mutací v kontrolní sekvenci, která řídí jeho expresi. Buňky, které nesou tento onkogen, ho produkují v nesprávném čase, a pokud zároveň exprimují receptor pro PDGF, budou samy sebe neustále stimulovat

Obrázek 18-23 Normální buněčná proliferace v porovnání s neomezenou buněčnou proliferací způsobenou onkogenem. (A) U normální klidové buňky jsou intracelulární signální proteiny, které jsou normálně aktivovány extracelulárními růstovými faktory, v neaktivním stavu. (B) Pokud je normální buňka stimulována extracelulárním růstovým faktorem, jsou tyto signální proteiny a geny aktivovány a buňka se dělí. (C) U této nádorové buňky vznikl onkogen mutací protoonkogeny, který kóduje intracelulární signální protein za normálních okolností aktivovaný extracelulárním růstovým faktorem. Onkogen kóduje pozměněnou formu signálního proteinu, který je aktivní i v případě, že růstový faktor není navázán.



k proliferaci. Jiné onkogeny kódují hyperaktivní receptory pro růstové faktory nebo intracelulární signální proteiny (viz Kapitolu 15); buňky, které exprimují tyto onkogeny se chovají tak, jako by neustále dostávaly signály k proliferaci (obr. 18-23). Obdobně mutace, které postihují proteiny regulující přežití buněk a jejich smrt, mohou podporovat vznik rakoviny tím, že umožní buňce přežít i bez potřebných signálů.

Příkladem tumor-supresorového genu je Rb-gen, o kterém jsme se zmínili na straně 582: inaktivace obou kopií tohoto genu odstraňuje důležitou brzdu buněčného dělení a drasticky tak zvyšuje pravděpodobnost vzniku rakoviny v určitých senzitivních tkáních, jako je třeba sítnice.

Uvedené příklady ukazují, jak jsou poškození na molekulární úrovni, která jsou příčinou rakoviny, postupně detailně odhalována pochopením mechanismů, které regulují normální buněčnou proliferaci, přežití buněk a buněčnou smrt. Rychlý pokrok v poznání rakoviny na molekulární úrovni slibuje značné zlepšení léčby této nemoci, i když se tak zatím nestalo. K úplnému pochopení rakoviny, stejně tak jako většiny ostatních nemocí nebo funkcí těla, je důležité studovat organismus až na molekulárně-genetické úrovni a na úrovni jednotlivých buněk a pečlivěji zkoumat, jak spolu buňky žijí, jak spolu interagují a spolupracují jako členové veliké a vysoce organizované buněčné komunity, která vytváří tkáň a orgány těla. To je předmětem následující a poslední kapitoly knihy.

Otázka 18-6 Vysvětlete, proč mutace v jedné ze dvou kopií protoonkogenu v diploidní buňce může postačovat k vývoji rakoviny, zatímco k vyvolání stejného účinku jsou zapotřebí mutace obou kopií tumor-supresorového genu.

Základní shrnutí

- Systém regulace buněčného cyklu koordinuje jednotlivé události buněčného cyklu cyklickým zapínáním a vypínáním příslušných částí mašinerie buněčného cyklu.
- Regulační systém je tvořen převážně sadou proteinových komplexů, které jsou složeny z regulační podjednotky nazývané cyklin a katalytické podjednotky, nazývané cyklin-dependentní proteinkináza (Cdk).
- Cdk-kinázy jsou cyklicky aktivovány jak navázáním cyklinu, tak fosforylací určitých aminokyselin a defosforylací jiných; pokud jsou Cdk-kinázy aktivovány, fosforylují klíčové buněčné proteiny.
- Koncentrace cyklinů roste a klesá v určité době buněčného cyklu a představuje tak časovací mechanismus; nárůst koncentrace je způsoben stálou syntézou, zatímco náhlý pokles je způsoben rychlou proteolýzou.
- Různé komplexy cyklin-Cdk spouštějí různé kroky buněčného cyklu: MPE, komplex mitotického cyklin-Cdk, řídí vstup buňky do mitozy; komplexy cyklin S-fáze-Cdk řídí vstup buňky do S-fáze.
- Systém regulace buněčného cyklu může zastavit cyklus v určitých bodech, aby bylo zajištěno, že následující krok začne až poté, co je předchozí krok dokončen.
- Buněčný cyklus se může zastavit minimálně dvěma mechanismy: (1) Cdk-inhibiční proteiny mohou blokovat sestavení nebo aktivitu jednoho nebo více cyklin-Cdk komplexů nebo se (2) komponenty regulačního systému mohou přestat syntetizovat.
- Počet buněk u živočichů je regulován kombinací intracelulárních programů a mezibuněčných interakcí, které kontrolují buněčnou proliferaci, přežívání buněk a buněčnou smrt.
- Živočišné buňky proliferují pouze tehdy, pokud jsou stimulovány růstovými faktory, které aktivují intracelulární signální dráhy. Ty převáží nad brzdami, které normálně blokují průběh buněčného cyklu; tento mechanismus zajišťuje, že se buňka dělí pouze tehdy, pokud je další buňky třeba.
- Většina normálních živočišných buněk má zatím neznámý interní mechanismus, který určuje, kolikrát se buňka může rozdělit.
- Mnoho normálních buněk v průběhu života živočicha umírá aktivací vnitřního sebevražedného programu a zabíjejí samy sebe – tento proces se nazývá programovaná buněčná smrt neboli apoptóza.

- Programovaná buněčná smrt je závislá na rodině proteolytických enzymů, které jsou samy aktivovány proteolytickou kaskádou.
- Většina živočišných buněk potřebuje neustálou signalizaci od jiných buněk, aby se vyhnuly programované buněčné smrti; tímto mechanismem může být zajištěno, že buňky přežívají

Edited by Foxit PDF Editor právném
 Copyright (c) by Foxit Software Company, 2004
 For Evaluation Only.

- Rakovina vzniká následkem akumulace mutací, které aktivují proliferaci-podporující geny (proto-onkogeny) a inaktivují antiproliferační geny (tumor-supresorové geny) v jedné buňce a jejím potomstvu, které se potom dělí bez omezení.

Klíčová slova

	Cdk-inhibiční protein	MPF	rakovina
	cyklin	onkogen	růstový faktor
buněčné stárnutí	faktor pro přežití	programovaná buněčná	tumor-supresorový gen
Cdk	kontrolní bod	smrt (apoptóza)	

19 Tkáně

Buňky jsou stavebními kameny mnohobuněčných organismů. Tato věta vypadá jako jednoduché tvrzení, ale přináší závažné problémy. Buňky nejsou jako cihly: jsou malé a rozplácené. Jak mohou být využity ke stavbě žirafy nebo sekvoje? Každá buňka je obklopena tenkou membránou o tloušťce menší než stotisícina milimetru a její přežití závisí na integritě této membrány. Jak mohou být buňky navzájem pevně spojeny, bez porušení membrán, a vytvořit sval, který dokáže hýbat i váhou slona? Pokud jsou buňky stavebními kameny, zůstává nejtajemnější otázkou, kde je stavitel a kde jsou stavební plány? Jak vznikají všechny ty rozdílné typy buněk u rostlin a živočichů na správném místě podle pečlivě propracovaného scénáře (obr. 19-1)?

Většina buněk mnohobuněčného organismu je uspořádána do spolupracujících uskupení nazývaných **tkáně**, jako jsou například nervová tkáň, sval, epitel a pojivové tkáně obratlovců (obr. 19-2). Na začátku této kapitoly si povíme něco o stavbě tkání z mechanického pohledu. Ukážeme si, že tkáně nejsou tvořeny pouze buňkami s jejich vnitřní sítí cytoskeletálních filament, ale také **extracelulární matrix**, kterou buňky kolem sebe vylučují. Je to právě tato matrix, která dává podpružným tkáním jejich pevnost. Buňky mohou být navzájem spojeny pomocí extracelulární matrix nebo přímým kontaktem. Popíšeme si také spoje mezi buňkami v pružných a pohyblivých tkáních živočichů, kde přenášejí síly z cytoskeletu jedné buňky do sousední nebo z cytoskeletu buňky na extracelulární matrix.

Ale mechanické uspořádání tkání není vše. Stejně jako se budova neobejde bez rozvodných sítí, telefonních linek a dalšího vybavení, potřebuje živočišná tkáň krevní cévy, nervy a další komponenty vytvářené mnoha specializovanými buněčnými typy. Všechny tyto složky tkáně musí být správně koordinovány a mnoho z nich vyžaduje kontinuální udržování a obnovu. Buňky umírají a musí být nahrazovány novými buňkami správného typu, na správném místě a ve správném počtu. Poruchy obnovy tkání jsou hlavním problémem medicíny a ty, které vedou k nesprávnému chování buněk, jsou zodpovědné za rakovinu.

EXTRACELULÁRNÍ MATRIX A POJIVOVÉ TKÁNĚ

- Rostlinné buňky mají pevné vnější stěny
- Vlákna celulosy udělají rostlinné buněčné stěně její pevnost v tahu
- Pojivové tkáně živočichů jsou převážně tvořeny extracelulární matrix
- Kolagen poskytuje pojivovým tkáním živočichů pevnost v tahu
- Buňky uspořádávají kolagen, který secernují
- Integriny spojují matrix vně buňky s cytoskeletem uvnitř buňky
- Gely z polysacharidů a proteinů vyplňují prostory a zajišťují odolnost vůči tlaku

EPITELY A MEZIBUNĚČNÉ SPOJE

- Epitely jsou polarizovány a spočívají na bazální membráně
- Těsné spoje zaručují epitelu nepropustnost a oddělují jeho apikální a bazální povrch
- Spoje propojené s cytoskeletem pevně vážou epiteliální buňky navzájem a připojují je k bazální membráně
- Mezerové spoje umožňují výměnu iontů a malých molekul mezi buňkami

UDRŽOVÁNÍ A OBNOVA TKÁNĚ A JEJÍ DEZINTEGRACE PŘI RAKOVINĚ

- Různé tkáně jsou obnovovány různou rychlostí
- Kmenové buňky neustále produkují terminálně diferencované buňky
- Mutace v jedné dělicí se buňce mohou způsobit narušení normální kontroly této buňky i jejího potomstva
- Rakovina je následkem mutace a přirozeného výběru v populaci buněk, které tvoří tělo
- Pro vznik rakoviny je třeba akumulace mutací

VÝVOJ

- Programovaný pohyb buněk vytváří plán těla živočichů
- Buňky zapínají odlišné sady genů podle své polohy a historie
- Difúzní signály mohou poskytnout buňkám polohovou informaci
- Studie drosofily poskytly klíč k porozumění vývoji obratlovců
- Podobné geny jsou využívány v celé živočišné říši, aby poskytovaly buňkám vnitřní záznam o jejich poloze

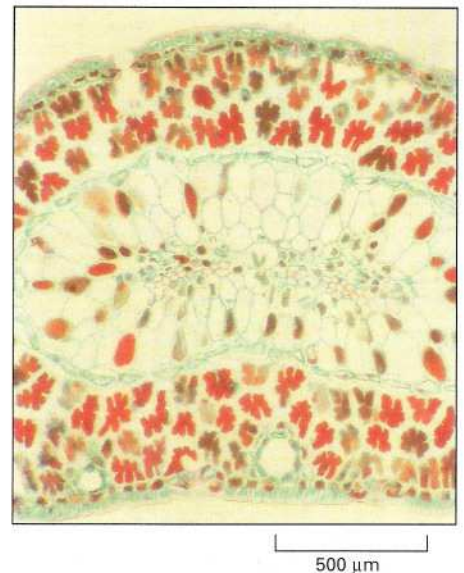
Problém vzniku všech specializovaných buněčných typů a jejich organizace do tkání těla je jednou z nejstarších a základních otázek biologie: jak je celý mnohobuněčný organismus vytvořen z jediného oplozeného vajíčka? Problém vývoje je složitý, přesto však pro něj existuje vysvětlení a v závěrečné části této knihy se o něm krátce zmíníme.

Extracelulární matrix a pojivové tkáně

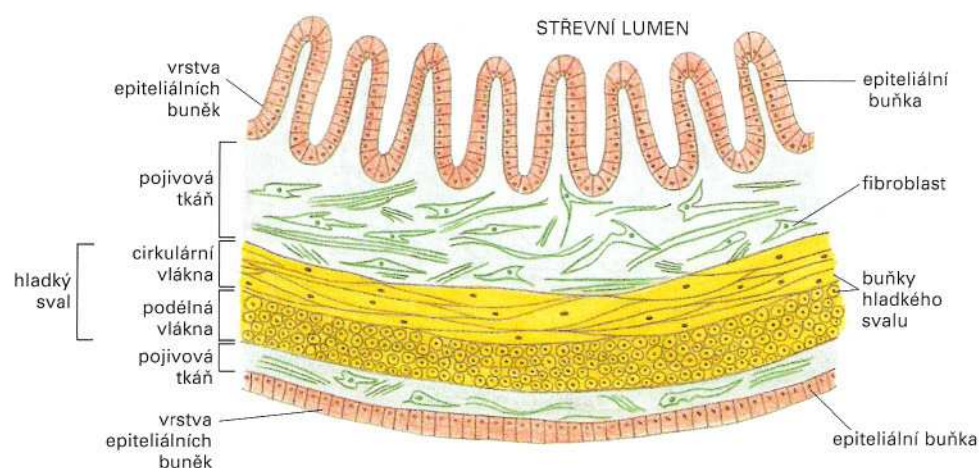
Rostliny a živočichové vyvinuli svoji mnohobuněčnou organizaci nezávisle na sobě a jejich tkáně (u rostlin mluvíme o pletivech) jsou založeny na odlišných principech. Živočichové jsou predátory jiných živých organismů, a proto musí být silní a hbití: musí být vytvořeni z tkání schopných rychlého pohybu a buňky, z nichž jsou tyto tkáně složeny, musí být schopné vytvářet a přenášet síly a velmi rychle měnit tvar. Na rozdíl od nich se rostliny nepohybují, jejich pletiva jsou více či méně pevná a jejich buňky, pokud jsou izolované, jsou slabé a křehké.

Pevnost rostlinných pletiv je dána **buněčnými stěnami**, které vytvářejí jakoby krabíčky, jež obklopují, chrání a dávají tvar každé buňce (obr. 19-3). Buněčná stěna je typem extracelulární matrix, kterou kolem sebe vytvářejí rostlinné buňky. Buňka kontroluje její složení: může být silná a pevná jako ve dřevě nebo slabá a ohebná jako v listu. Ale princip konstrukce pletiva je stejný v obou případech: mnoho malých komůrek pospojovaných dohromady a uvnitř každé se nachází křehká, živá buňka. Jak jsme se zmínili v Kapitole 1, byly to právě tyto mikroskopické komůrky, které před třemi stoletími pozoroval Robert Hooke v plátku korku a podle kterých vznikl termín „buňka“.

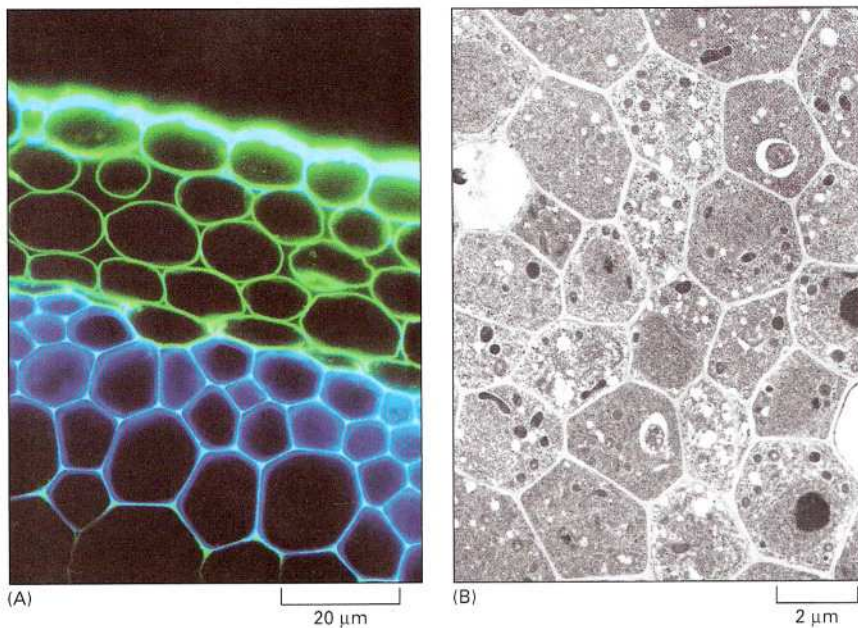
Živočišné tkáně jsou mnohem různorodější. Podobně jako rostlinná pletiva jsou i tkáně živočichů tvořeny extracelulární matrix a buňkami, ale tyto složky jsou organizovány mnoha různými způsoby. U některých tkání, například u kostí nebo u šlach, převažuje extracelulární matrix, která je z mechanického hlediska nejdůležitější; u jiných, jako u svalu nebo u pokožky, je minimum extracelulární matrix a mechanickou zátěž nese cytoskelet buněk. Nejprve si krátce popíšeme situaci u rostlin a později se budeme věnovat živočichům.



Obrázek 19-1 Obarvený příčný řez listem borovice (jehlicí), který ukazuje precizně organizované různé buněčné typy.



Obrázek 19-2 Organizace buněk ve tkáních. Zjednodušený náčrt příčného řezu stěnou savčího střeva. Tento dlouhý, trubicovitý orgán je tvořen epiteliální (červeně), pojivovou (zeleně) a svalovou tkání (žlutě). Každá tkáň je složena z organizovaného shluku buněk, které jsou navzájem spojeny na základě mezibuněčných adhezí, pomocí extracelulární matrix nebo oběma způsoby.

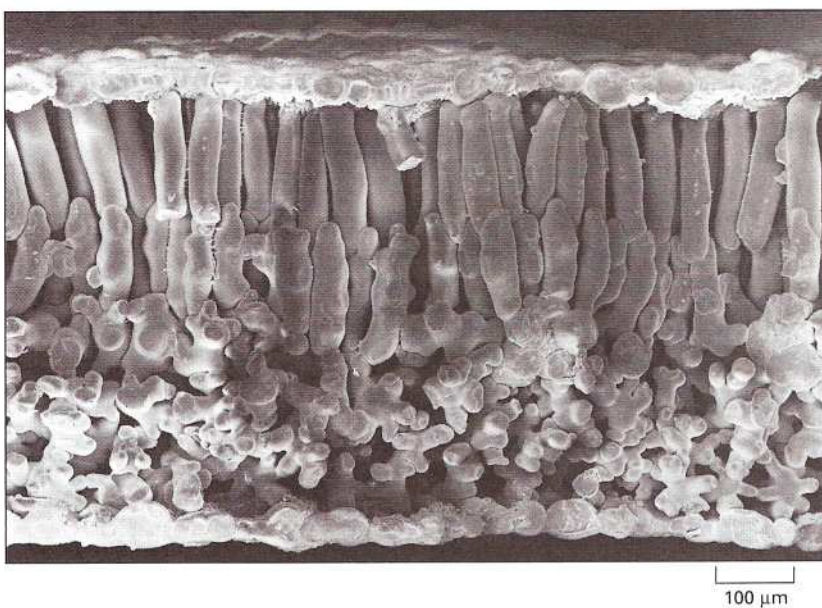


Obrázek 19-3 Stěna rostlinné buňky. (A) Příčný řez částí stonku kvetoucí rostliny *Arabidopsis* obarvený fluorescenčními barvivy, která specificky označují dvě různé komponenty buněčné stěny - celulóza je obarvena *modře* a jiný polysacharid (pektin) *zeleně*. Samy buňky zůstaly neobarvené a na tomto preparátu nejsou vidět. (B) Na této fotografii z elektronového mikroskopu jsou zřetelně vidět mladé buňky kořenu téže rostliny a jejich stěny.

Rostlinné buňky mají pevné vnější stěny

Nahé rostlinné buňky, uměle zbavené své stěny, jsou křehké a snadno zranitelné. Při opatrném zacházení mohou být udržovány v kultuře, ale velmi snadno praskají – i velmi malá změna osmotického tlaku kultivačního média může způsobit jejich bobtnání, které vede k prasknutí. Jejich cytoskelet postrádá tlaku odolná intermediární filamenta živočichů a ve skutečnosti nemá vůči tlaku žádnou odolnost. Vnější stěna je proto pro rostlinné buňky nezbytná.

Rostlinná buněčná stěna musí být odolná, ale není nezbytně nutné, aby byla rigidní. Osmotické botnání buňky limitované odolností buněčné stěny udržuje komůrku rozšířenou a množství takovýchto zbotnalých komůrek vytváří semirigidní pletivo (obr. 19-4). Tak je to například u křehkého listu salátu. Pokud voda z buněk uniká, buňky se zmenšují a list vadne.

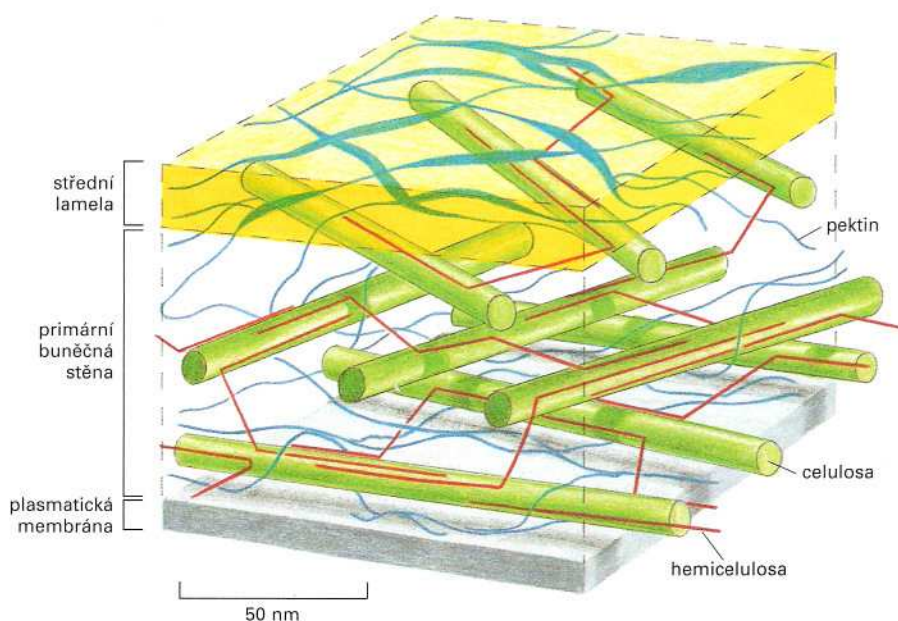


Obrázek 19-4 Buňky listu na fotografii z elektronového řádkovacího mikroskopu. Oblé buňky zbotnalé vodou díky osmotickým silám jsou spojeny svými buněčnými stěnami a tvoří tak křehký list.

Většina nově vznikajících buněk mnohobuněčných rostlin vytváří nejprve relativně tenkou *primární buněčnou stěnu*, která se může pomalu zvětšovat s tím, jak buňka postupně roste. Síla řídící růst je stejná jako ta, která způsobuje křehkost salátového listu – botnavý tlak neboli *turgor*, jenž vzniká na základě osmotické nerovnováhy mezi vnitřním prostředím buňky a jejím okolím (viz Kapitola 12). Pokud se růst zastaví a stěna se již dále nemusí zvětšovat, velice často se vytváří mnohem pevnější *sekundární buněčná stěna*, a to buď ztluštěváním primární buněčné stěny nebo ukládáním nových vrstev s odlišným složením pod staré vrstvy. Když se rostlinné buňky specializují, obvykle produkují speciálně adaptované typy buněčných stěn: voskové, pro vodu nepropustné stěny u povrchových epidermálních buněk listu; tvrdé, silné, dřevnaté stěny u xylémových buněk stonku a podobně, jak je ukázáno na Panelu 19-1 (str. 598-599).

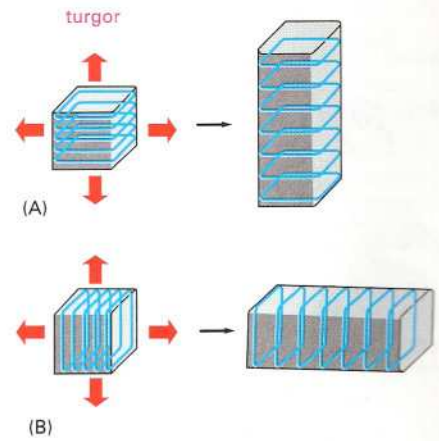
Vlákná celulosy udílejí rostlinné buněčné stěně její pevnost v tahu

U každé extracelulární matrix je pevnost v tahu u rostlinných buněčných stěn založena na dlouhých vlákních orientovaných ve směru působení tlaku. U vyšších rostlin jsou dlouhá vlákna obvykle tvořena z polysacharidu *celulosy*, který představuje nejrozšířenější organickou makromolekulu na Zemi. Celulosa vlákna jsou protkána jinými polysacharidy a některými strukturálními proteiny a vše propojené dohromady vytváří komplexní strukturu, která odolává stlačování i rozpínání (obr. 19-5). U dřevnatých pletiv je v extracelulární matrix navíc uložena hustě propletená *ligninová síť* tvořená jinou třídou molekul, která přispívá k ještě větší pevnosti a nepropustnosti stěny pro vodu. Protože rostlinná buňka roste nebo mění svůj tvar, musí se buněčná stěna rozpínat nebo deformovat. Jelikož celulosová vlákna zabraňují rozpínání, jejich orientace udává směr, kterým se může rostoucí buňka zvětšovat: například pokud jsou orientována obvodově jako korzet, buňka bude růst snadněji do délky místo do šířky (obr. 19-6). Způsobem, kterým buňka staví svou stěnu, následně kontroluje svůj tvar a tak i směr růstu pletiva, kterého je součástí.

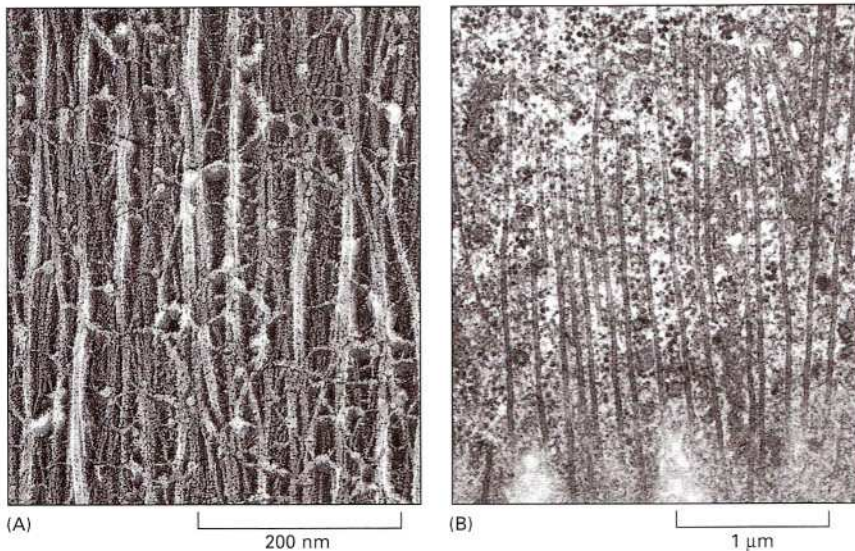


Obrázek 19-5 Schematický model části rostlinné primární buněčné stěny. Zelené válečky představují celulosová vlákna zajišťující pevnost v tahu; jiné polysacharidy (červená vlákna) celulosové fibrily propojují, jiné vyplňují prostor mezi nimi (modrá vlákna) a udílejí tak stěně odolnost proti stlačení. Střední lamela je vrstva, která spojuje dvě sousední buněčné stěny.

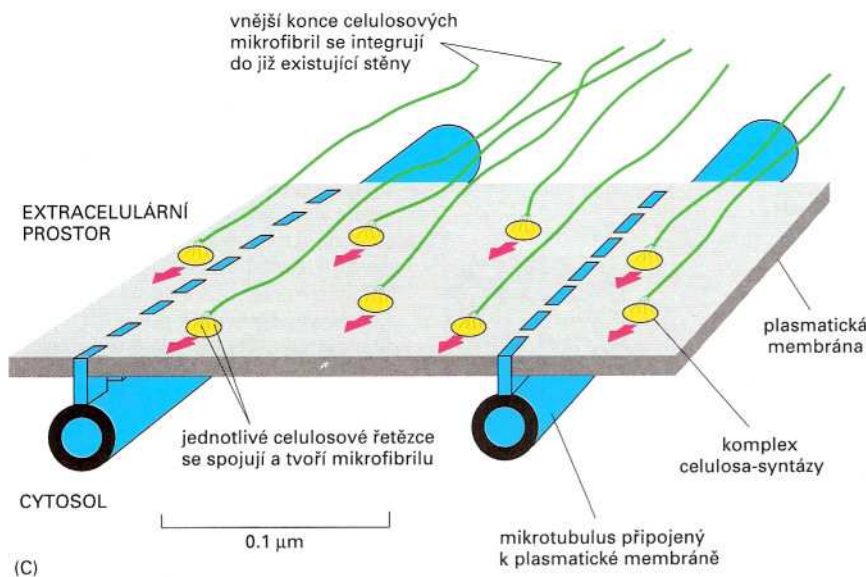
Obrázek 19-6 Orientace celulosových mikrofibril uvnitř buněčné stěny ovlivňuje směr, kterým se buňka prodlužuje. Na počátku mají buňky v (A) i (B) stejný tvar (zde nakresleny jako krychle), ale v jejich stěnách jsou celulosové mikrofibrily různě orientovány. Ačkoliv působí turgorový tlak všemi směry stejnou silou, každá buňka se prodlužuje v kolmém směru k orientaci mikrofibril, které jsou v tahu velmi odolné. Konečný tvar orgánu, například kořenu, je určen směrem, kterým jeho buňky rostou.



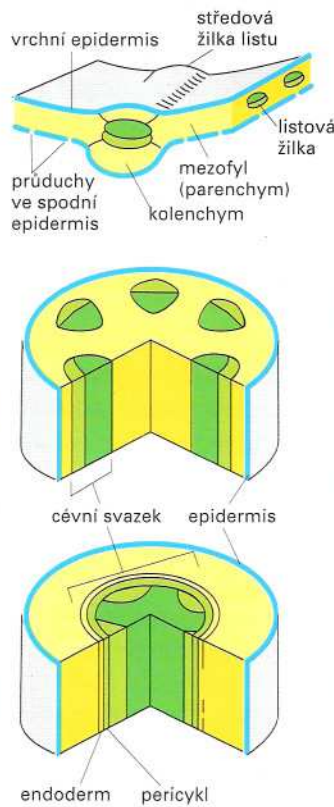
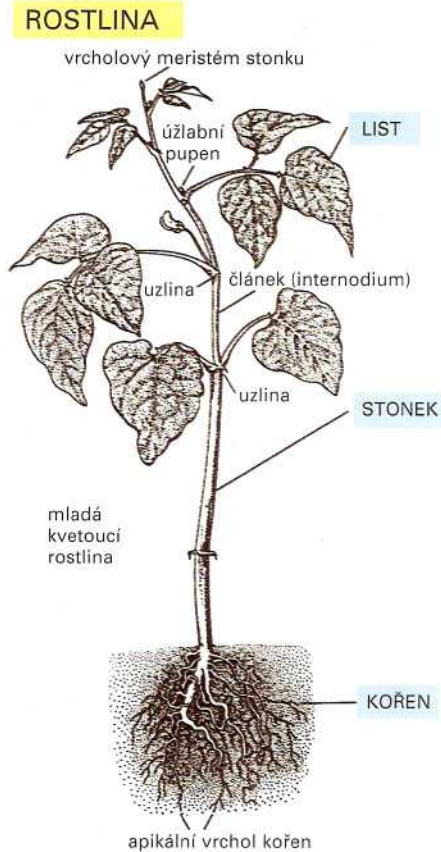
Celulosa je vytvářena naprosto odlišným způsobem než většina ostatních extracelulárních makromolekul. Místo jejího vytváření uvnitř buňky a následného exportu exocytózou (Kapitola 14) je celulosa syntetizována na vnějším povrchu buňky enzymovými komplexy, které jsou zanořeny do plasmatické membrány. Tyto komplexy transportují sacharidové monomery přes membránu a začleňují je do sady rostoucích polymerových řetězců v místě, kde jsou přichyceny k membráně. Každá sada řetězců vytváří celulosovou mikrofibrilu. Jak se enzymové komplexy za současného syntetizování pohybují membránou, zůstávají za nimi orientované celulosové fibrily. Dráhy, po kterých se enzymové komplexy pohybují, určují směr, ve kterém je celulosa uložena v buněč-



Obrázek 19-7 Orientované ukládání celulosy do buněčné stěny rostlin. (A) Orientovaná vlákna celulosy v rostlinné buněčné stěně na fotografii z elektronového mikroskopu. (B) Orientované mikrotubuly pod plasmatickou membránou rostlinné buňky. (C) Na jednom z modelů je ukázáno, jak může být směr nově ukládaných extracelulárních celulosových mikrofibril určen orientací intracelulárních mikrotubulů. Velké enzymové komplexy *celulosa-syntázy* jsou integrální membránové proteiny, které neustále syntetizují celulosové mikrofibrily na vnějším povrchu plasmatické membrány. Volné konce pevných mikrofibril jsou zabudovány do struktury stěny a prodlužováním na jejich začátcích jsou syntázové komplexy tlačeny před nimi v rovině membrány. Protože je kortikální svazek mikrotubulů připojen k plasmatické membráně způsobem, kterým je předem dána dráha pohybu enzymového komplexu v membráně, určuje orientace mikrotubulů směr, kterým rostou celulosové mikrofibrily.



ROSTLINA



Mladá kvetoucí rostlina vlevo se skládá ze tří hlavních typů orgánů: listů, stonků a kořenů. Každý orgán je sám sestaven ze tří druhů pletiva: základního (žlutě), krycího (modře) a vodivého (zeleně).

Všechny tři systémy pletiv se vyvinuly díky dělicí schopnosti apikálního meristému stonku nebo kořene a každý z nich obsahuje určitý malý počet specializovaných typů buněk. Všechny typy pletiv a příslušných buněk jsou popsány na této dvojstraně.

TŘI SYSTÉMY ROSTLINNÝCH PLETIV

Dělení buněk, růst a diferenciace daly vzniknout pletivovým systémům se specializovanými funkcemi.

KRYCÍ PLETIVO: Toto pletivo je ochrannou vnější vrstvou, která je ve styku s vnějším prostředím. Uspadňuje vstup vody a iontů do kořenů a reguluje výměnu plynů ve stoncích a listech.

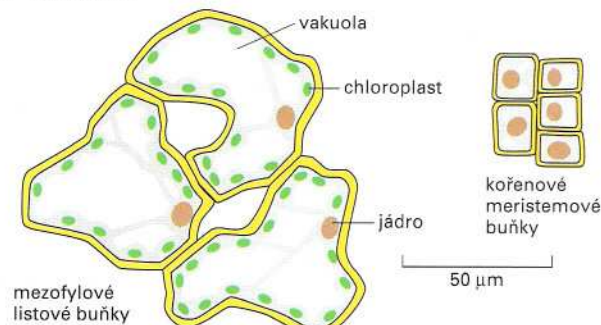
VODIVÉ PLETIVO: Floem a xylem tvoří kontinuální cévní svazky v celé rostlině. Toto pletivo přenáší vodu a rozpuštěné látky mezi orgány a zároveň poskytuje rostlině mechanickou oporu.

ZÁKLADNÍ PLETIVO: Toto pletivo je několika druhů, asimilační, zásobní a vyměšovací, a představuje většinu hmotnosti rostliny.

ZÁKLADNÍ PLETIVO

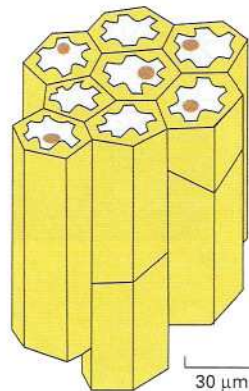
Typy pletiva tu zahrnují parenchym, kolenchym a sklerenchym.

Parenchymové buňky se vyskytují ve všech rostlinných pletivech. Jde o živé buňky, schopné dalšího dělení a obsahující poměrně tenkou buněčnou stěnu. Mají celou řadu funkcí. Apikální a laterální meristemové buňky ve vzrostných vrcholech a kořenech se dělí a produkují nové buňky pro růst rostliny. Produkce živin i jejich uskladnění probíhá ve fotosyntetických buňkách listů a stonků (jsou to mezofylové buňky). Parenchymové buňky zásobní pak tvoří většinu hmotnosti ovoce a zeleniny. Protože se parenchymové buňky mohou dělit, slouží i při nahrazování zraněných buněk a regeneraci.

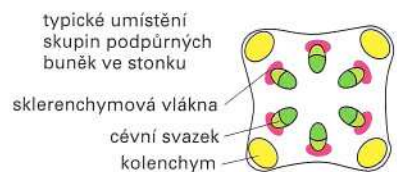


Transferová (přenosová) buňka, což je specializovaná forma parenchymové buňky, je charakterizována složitými vrstvy primární buněčné stěny. Zvětšený povrch plasmatické membrány pod touto stěnou usnadňuje rychlý transport solutů od buňky k buňce ve vodivém systému.

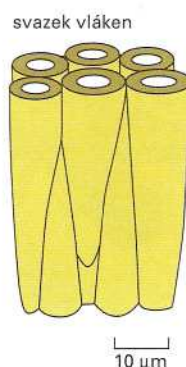
Kolenchym je tvořen živými buňkami podobnými



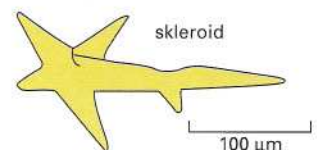
parenchymu, avšak buňky tu mají mnohem tlustší stěnu, jsou protáhlé a jsou uspořádány do dlouhých provazcovitých vláken. Jsou schopny se protahovat a poskytují mechanickou oporu základním pletivům v oblastech dlouhivého růstu rostliny. Kolenchym je hojný v subepidermálních oblastech stonků.



Sklerenchym má podobně jako kolenchym podpůrnou funkci.

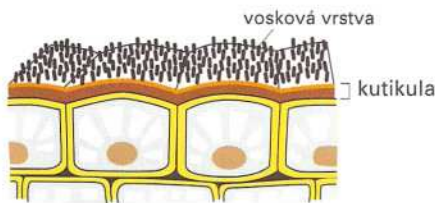


Jde tu však obvykle o mrtvé buňky s tlustými zdřevnatělými sekundárními stěnami, které jim zabraňují v natahování při růstu rostliny. Dva běžné typy tohoto pletiva jsou vlákna, která se často spojují do dlouhých svazků, a skleroidy, což jsou menší rozvětvené buňky, obsažené v krycím pletivu semen a plodů.

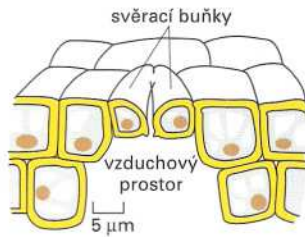
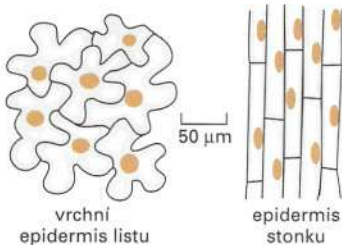


KRYCÍ PLETIVO

Epidermis je primární vnější krycí pletivo těla rostliny. Epidermální buňky mohou být modifikovány a tvoří průduchy a různé chlupy a kořenové vlásky.

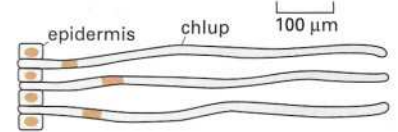


Epidermis, což je většinou jednobuněčná vrstva, pokrývá celý stoněk, listy a kořeny mladé rostliny. Obsahuje živé buňky s tlustými primárními stěnami, pokryté na povrchu voskovou vrstvičkou. Buňky epidermis jsou pevně navzájem spojeny v různých obrazech.



Průduchy jsou otvory v epidermis, hlavně na spodní straně listů, které regulují výměnu plynů. Tvoří je dvě specializované epidermální buňky, zvané svěrací, které regulují světlost póru. Průduchy jsou rozprostřeny po povrchu způsobem specifickým pro každý rostlinný druh.

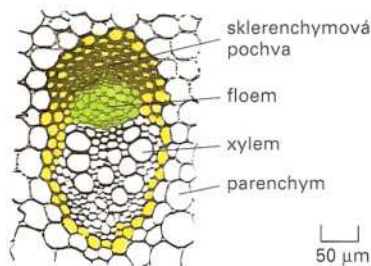
Chlupy (trichomy) jsou výrůstky epidermálních buněk. Vyskytují se v různých podobách a běžně je nalézáme ve všech typech rostlinných pletiv. Chlupy slouží ochraně, absorpci a sekreci;



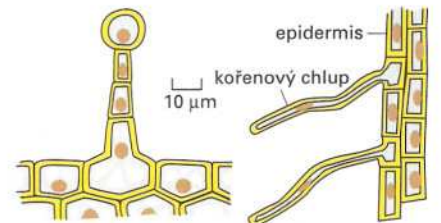
například mladé, jednobuněčné chlupy se vyvíjejí v epidermální vrstvě semen bavlníku. Při růstu se buněčné stěny sekundárně ztlustňují celulosou za tvorby bavlny.

Cévní svazky

Kořeny obsahují obvykle jediný cévní svazek, ale ve stoncích jich nalézáme několik. Každý svazek je komplexem různých typů buněk, který zabezpečuje dráhu pro transport roztoků.



typický cévní svazek z mladého stonku pryskyřníku

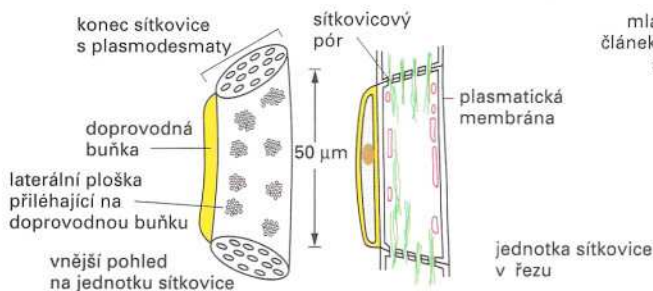


mnohobuněčný sekreční chlup z listu pelargonie

Jednobuněčné kořenové chlupy přijímají vodu a ionty z půdy.

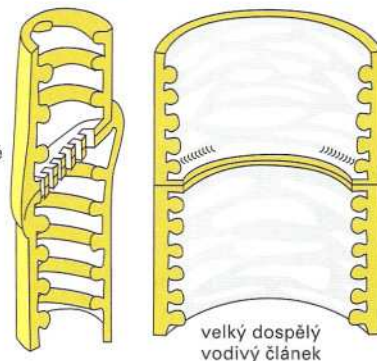
VODIVÉ PLETIVO

Floem a xylem tvoří dohromady kontinuální cévní systém v celé rostlině. V mladých rostlinách jsou obvykle asociovány s dalšími typy buněk do cévních svazků. Jak floem tak xylem jsou komplexní pletiva. Jejich vodivé buňky jsou ve styku parenchymovými buňkami, které udržují a vyměňují různé látky s vodivými buňkami. Skupiny kolenchymových a sklerenchymových buněk poskytují cévním svazkům mechanickou oporu.

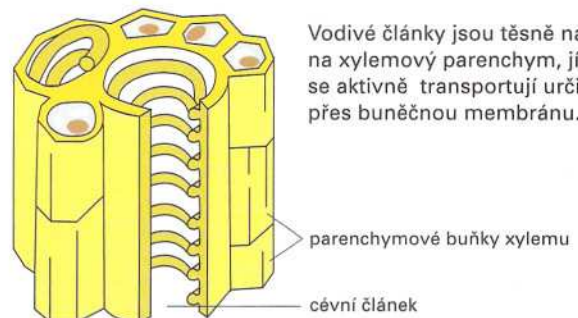


Floem je systém, kterým proudí vodný roztok různých organických látek. Hlavní vodivé články jsou uspořádány do dlouhých trubíc zvaných *sítkovnice*. Tyto články jsou v dospělé rostlině živé buňky, spojené perforacemi v stěnových koncích, vytvořených ze zvětšených a modifikovaných plasmodesmat. Tyto buňky obsahují plasmatickou membránu, ale nikoliv jádro a většinu cytoplasmy. Spoléhají v mnoha ohledech na doprovodné buňky. Tyto buňky mají další funkci v tom, že aktivně transportují rozpustné molekuly živin přes porézní sítkovicové plošky v buněčné stěně.

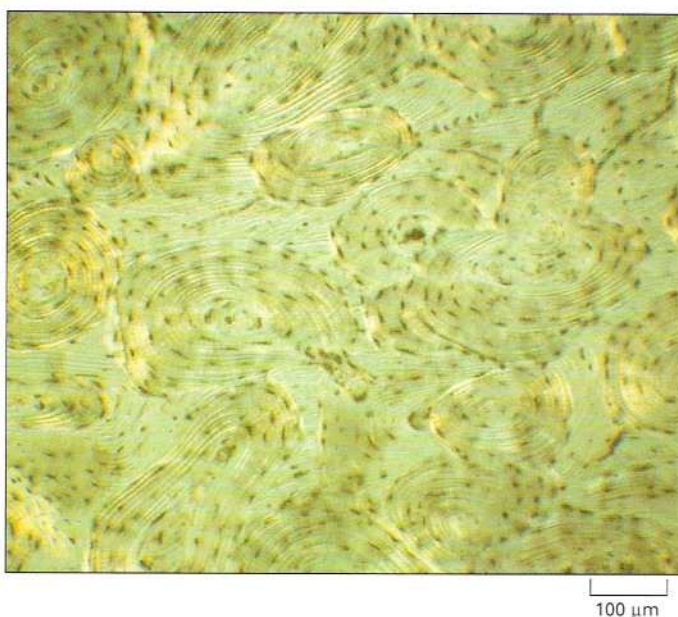
mladý cévní článek v kořenové špičce



sekundárně ztloustla a zdřevnatěla. V dospělosti se koncová buněčná stěna prakticky ztratila, takže se vytvořily dlouhé kontinuální trubice.



Vodivé články jsou těsně napojeny na xylemový parenchym, jímž se aktivně transportují určité soluty přes buněčnou membránu.



Obrázek 19-8 Příčný řez kostí. Buňky se jeví jako malé, tmavé hvězdicovité objekty obklopené matrix kosti, která představuje většinu objemu tkáně a zabezpečuje její mechanickou pevnost. Střídající se světlé a tmavé proužky představují vrstvy matrix, které obsahují orientovaný kolagen (zviditelněno pomocí polarizovaného světla). Krystaly fosforečnanu vápenatého vyplňující mezery mezi kolagenovými mikrofibrami zaručují matrix kosti odolnost vůči tlaku i napětí podobně jako železo v železobetonu.

Otázka 19-1 Buňky stonku rostlinky, která roste ve tmě, orientují své mikrotubuly horizontálně. Jak si myslíte, že to ovlivní růst rostliny?

né stěně; ale co řídí tyto enzymové komplexy? Přimo pod plasmatickou membránou se nacházejí mikrotubuly uspořádané přesně podle celulosových vláken vně buňky. Tyto mikrotubuly nejspíše slouží jako vodící vlákna, která usměrňují pohyb enzymových komplexů (obr. 19-7). Tímto zvláštním, nepřímým způsobem cytoskelet reguluje tvarování rostlinné buňky a modelování rostlinného pletiva. U živočišných buněk uvidíme, že tyto buňky využívají ke kontrole architektury tkání svůj cytoskelet mnohem přímějším způsobem.

Pojivové tkáně živočichů jsou převážně tvořeny extracelulární matrix

Tradičně rozeznáváme čtyři hlavní typy živočišných tkání – pojivové tkáně, epitely, nervové a svalové tkáně. Základní strukturální rozdíl je však mezi pojivy a ostatními druhy tkání. U pojivových tkání nese mechanickou zátěž extracelulární matrix, která se zde vyskytuje v hojné míře. U ostatních tkání, jako jsou epitely, se vyskytuje extracelulární matrix v malém množství, buňky jsou vzájemně připojeny jedna k druhé a mechanickou zátěž nesou samy. Nejprve si něco povíme o pojivových tkáních.

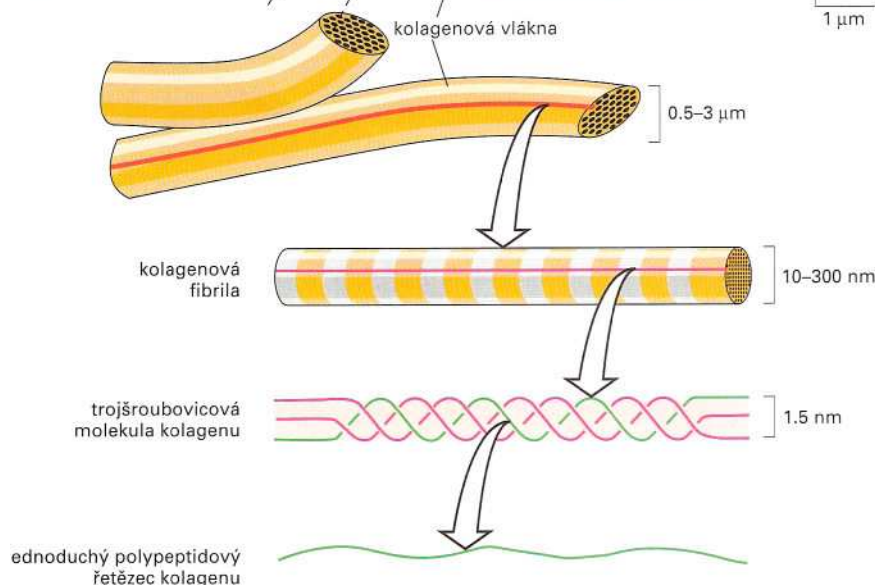
Živočišné pojivové tkáně jsou velmi variabilní. Mohou být pevné a pružné jako šlacha nebo škára kůže; tvrdé a hutné jako kost; pružné a tlumící nárazy jako chrupavka, nebo měkké a průhledné jako rosol vyplňující vnitřek oka. Ve všech těchto případech je velká část tkáně tvořena extracelulární matrix a buňky, které tuto matrix produkují, jsou v ní roztroušeny jako rozinky v pudinku (obr. 19-8). Navíc u všech těchto tkání není pevnost v tahu – větší či menší – založena na polysacharidu jako u rostlin, ale na fibrilárním proteinu **kolagenu**. Různé typy pojiv mají své specifické vlastnosti dané typem kolagenu, který obsahují, jeho množstvím a, co je nejdůležitější, ostatními molekulami, které jsou s ním protkány v různých poměrech.

Kolagen poskytuje pojivovým tkáním živočichů pevnost v tahu

Kolagen se vyskytuje u všech mnohobuněčných živočichů, a to v mnoha variantách. Savci mají přibližně dvacet genů pro kolagen, které



Obrázek 19-9 Organizace a struktura kolagenu. Fotografie z elektronového mikroskopu ukazuje kolagenové fibrily v pojivové tkáni kůže kuřecího embrya. Fibrily jsou organizovány do svazků – některé probíhají v rovině řezu, jiné jsou na ni přibližně kolmé. Buňka na fotografii je fibroblast, který vylučuje kolagen i ostatní složky extracelulární matrix. Schéma ukazuje molekulární strukturu kolagenové fibrily. (Fotografie převzata z C. Ploetz, E. I. Zycband a D. E. Birk, *J. Struct. Biol.* 106:73-81, 1991.)

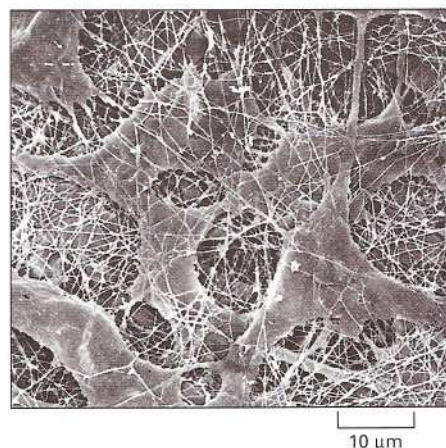


kódují jeho odlišné formy potřebné v různých tkáních. Kolageny jsou hlavními proteiny kostí, šlach a kůže (vyčiněná kůže je macerovaný kolagen) a u savců představují 25% z celkového množství proteinů – více než jakýkoliv jiný typ proteinu.

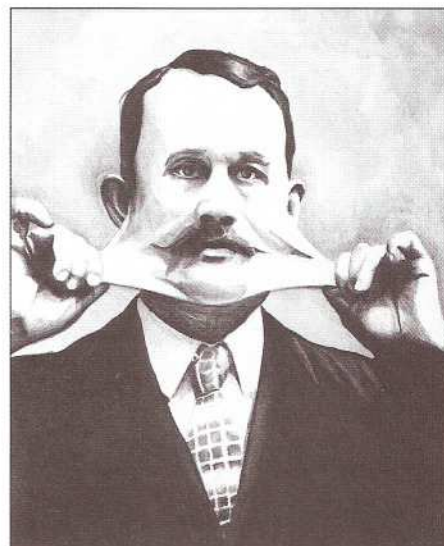
Charakteristickým znakem typické kolagenové molekuly je její dlouhá, tuhá trojřetězcová helikální struktura, ve které jsou tři kolagenové polypeptidové řetězce vzájemně kolem sebe obtočeny a vytvářejí superhelix podobný lanu (obr. 19-9). Tyto molekuly pak vytvářejí uspořádané polymery nazývané *kolagenové fibrily*, které mají v průměru 10-300 nm a jsou dlouhé mnoho mikrometrů. Ty se pak skládají ještě v mnohem silnější *kolagenová vlákna*. Jiné kolagenové molekuly jsou připojeny k povrchu kolagenových fibril a spojují fibrily navzájem a s ostatními složkami extracelulární matrix.

Buňky pojivových tkání, které se vyskytují v extracelulární matrix a vytvářejí ji, se nazývají různě podle druhu tkáně: v kůži, šlachách

Obrázek 19-10 Fibroblast v pojivové tkáni na fotografii z řádkovacího elektronového mikroskopu. Tkáň pochází z rohovky krysy. Extracelulární matrix obklopující fibroblasty je tvořena převážně kolagenovými fibrilami. Ostatní složky, které normálně vytvářejí hydratovaný gel vyplňující prostor mezi kolagenovými vlákny, byly odstraněny enzymově a působením kyselin.

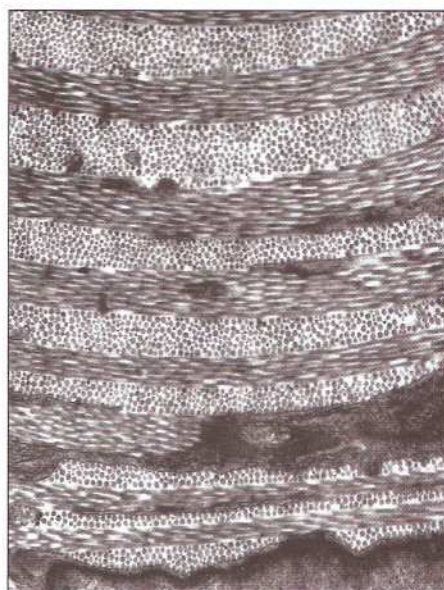


Obrázek 19-11 Hyperelastická kůže. James Morris, „muž s elastickou kůží“, na fotografii přibližně z roku 1890. Abnormálně roztažitelná kůže je příznakem genetického syndromu, který je důsledkem chyby v sestavování nebo zesíťování kolagenu. U některých jedinců je příčinou nepřítomnost kolagenázy, která přeměňuje prokolagen na kolagen.



Otázka 19-2 Mutace v genech kódujících kolagen mají často škodlivé následky, které se projevují vážnými chorobami. Obzvláště poškozující jsou takové mutace, při kterých dochází k záměně glycinových zbytků, jejichž výskyt na každém třetím místě v proteinovém řetězci je nezbytný pro správné sbalení proteinu do charakteristického triplexu.

- A. Myslíte si, že mutace v kolagenu jsou škodlivé i v případě, že je mutována pouze jedna ze dvou kopií kolagenového genu?
- B. Záhadně vypadá pozorování, že k nejzávažnějším poškozením vzniklým záměnou glycinu za jinou aminokyselinu dochází tehdy, když se záměna odehraje blízko k aminokonci domény, která se podílí na vzniku triplexu. Můžete toto pozorování vysvětlit?



5 μm

a mnoha dalších pojivových tkání jsou to *fibroblasty* (obr. 19-10); v kosti se nacházejí *osteoblasty*. Tyto buňky vytvářejí jak kolagen, tak ostatní organické složky matrix. Téměř všechny tyto molekuly jsou syntetizovány intracelulárně a jsou uvolňovány obvyklým způsobem, exocytózou. Vně buňky se uspořádávají do obrovských kohezních agregátů. Pokud by k uspořádání došlo předčasně – ještě v době, než dojde k sekreci – buňka by se zahltila svými vlastními produkty. V případě kolagenu se buňky tomuto nebezpečí vyhýbají sekrecí kolagenových molekul v pre-kursorové podobě nazývané *prokolagen*, kde na každé straně molekuly jsou přídavné peptidy, které zabraňují jejich uspořádání do kolagenových fibril. Extracelulární enzym *kolagenáza* odštěpí tyto koncové peptidy až tehdy, když se molekuly prokolagenu dostanou do extracelulárního prostoru, což umožní uspořádání kolagenu do fibril pouze vně buňky.

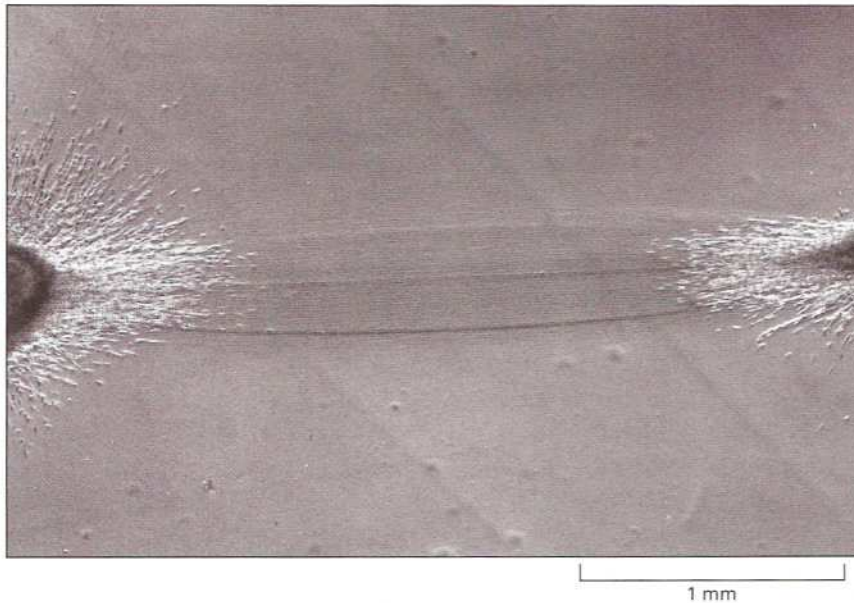
U některých lidí se vyskytuje genetický defekt v kolagenáze, takže se jejich kolagenové fibrily neuspořádávají správným způsobem. Výsledkem je, že kůže a různé další pojivové tkáně mají sníženou odolnost v tahu a jsou mimořádně elastické (obr. 19-11).

Buňky uspořádávají kolagen, který secernují

Aby mohly kolagenové fibrily vykonávat svoji funkci, musí být správně uspořádány. Například v kůži jsou uspořádány do proplétajícího se vzoru nebo do střídajících se vrstev s odlišnou orientací, aby odolávaly napětí v tahu v různých směrech (obr. 19-12). Ve šlachách (které upínají sval ke kosti) jsou tyto fibrily uloženy v paralelních svazcích souhlasně s hlavní osou napětí.

Buňky pojivových tkání tuto orientaci regulují částečně ukládáním kolagenu orientovaným způsobem a částečně jeho následným přeorganizováním. V průběhu vývoje tkáně zpracovávají fibroblasty kolagen, který secernují, pohybují se po něm, napínají ho a pomáhají ho zpevňovat do plochých listů a protahovat do provazců. Tato mechanická role fibroblastů ve formování kolagenové matrix byla přesvědčivě demonstrována v tkáňové kultuře. Pokud jsou fibroblasty smíchány se sítí náhodně orientovaných kolagenových fibril, které v kultivační misce vytvářejí gel, fibroblasty za síť tahají, uspořádávají kolagen ve svém okolí a zpevňují ho. Pokud jsou na kolagenový gel umístěny dva malé kousky embryonální tkáně obsahující fibroblasty, kolagen mezi nimi se organizuje v kompaktní pruh uspořádaných vláken, který spojuje oba explantáty (obr. 19-13). Fibroblasty migrují z explantátů podél uspořádaných kolagenových vláken. Tak ovlivňují jejich uspořádání a naopak kolagenová vlákna ovlivňují distribuci fibroblastů. Fibroblasty pravdě-

Obrázek 19-12 Příčný řez kůží pulce na fotografii z elektronového mikroskopu. Všimněte si uspořádání kolagenových fibril jakoby v překližce – sousední vrstvy fibril jsou uloženy kolmo k sobě (viz také obr. 19-9). Podobné uspořádání můžeme najít také u plně vyvinuté kosti nebo rohovky.



Obrázek 19-13 Tvarování kolagenové matrix buňkami. Tato fotografie ukazuje oblast mezi dvěma kousky srdce kuřecího embrya (jež je bohaté na fibroblasty stejně jako na buňky srdečního svalu), které byly čtyři dny pěstovány v kultuře na kolagenovém gelu. Mezi oběma explantáty vznikl hustý svazek uspořádaných kolagenových fibril, pravděpodobně jako výsledek tažné síly fibroblastů v explantátu.

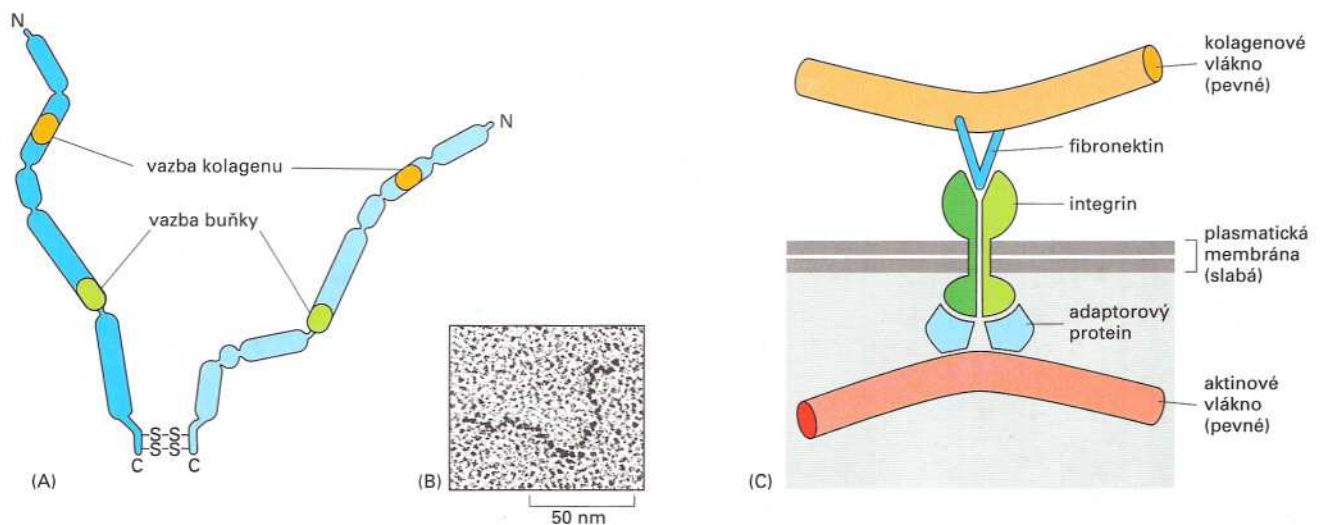
podobně hrají podobnou roli ve vytváření struktur většího rozsahu v extracelulární matrix uvnitř těla - pomáhají například vytvářet šlachy a pevné, husté vrstvy pojivové tkáně, které obalují a vzájemně vážou většinu orgánů.

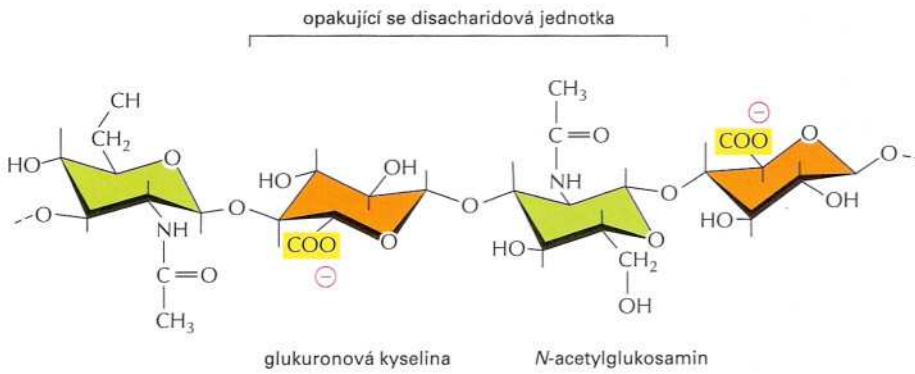
Integriny spojují matrix vně buňky s cytoskeletem uvnitř buňky

Pokud buňky tahají za matrix a pohybují se po ní, musí být schopny se k ní přichytit. K čistému kolagenu se buňky nepřichytávají příliš dobře. Za spojení zodpovídá jiný protein extracelulární matrix, *fibronektin*: jedna část molekuly fibronektinu se váže na kolagen, zatímco jiné části jsou přichytnými místy pro buňku (obr. 19-14 A).

Buňka se váže ke specifickým místům fibronektinu pomocí receptorového proteinu nazývaného *integrin*, který prochází plasmatickou membránou buňky. Zatímco se extracelulární doména integrinu váže k fibronektinu, druhý konec integrinové molekuly – ten v cytosolu – vytváří přichytné místo pro aktinová filamenta. Místo jeho vytržení z membrány v případě vzniku napětí mezi buňkou a matrix přenáší

Obrázek 19-14 Molekulové spojení extracelulární matrix a cytoskeletu u živočišné buňky. (A) Schéma a (B) fotografie (z elektronového mikroskopu) molekuly fibronektinu. (C) Transmembránové spojení zprostředkované integrinovou molekulou. Molekula integrinu přenáší napětí přes plasmatickou membránu: uvnitř buňky je připojena k cytoskeletu a vně přes fibronektin k extracelulární matrix. Plasmatická membrána tedy nemusí být pevná.





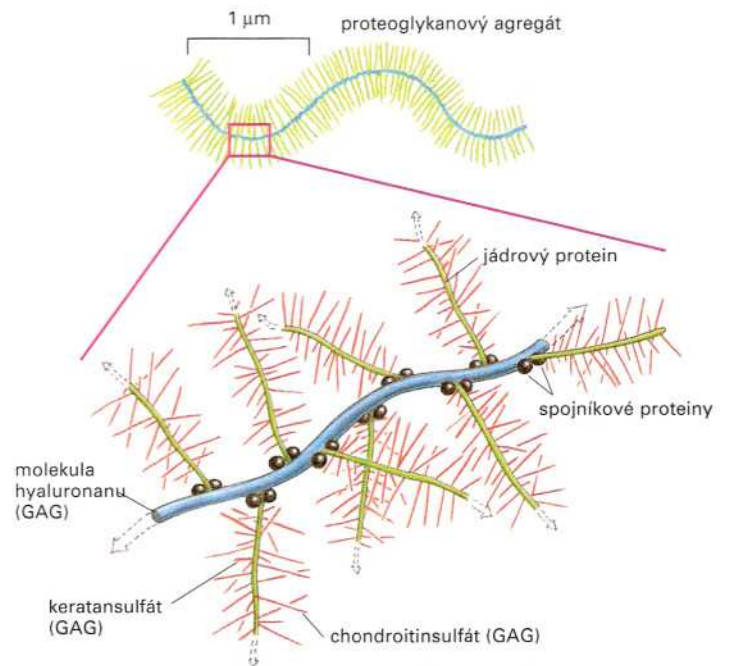
Obrázek 19-15 Kyselina hyaluronová, relativně jednoduchý GAG. Je tvořena jedním dlouhým řetězcem z více než 25 000 opakujících se disacharidových jednotek, z nichž každá nese záporný náboj. Podobně jako u jiných GAG je jedním ze sacharidových monomerů každého disacharidu aminocukr. Mnoho GAG obsahuje další záporně nabitě postranní skupiny, převážně sulfáty.

integrinové molekuly napětí z matrix na cytoskelet (obr. 19-14 C). Svalové buňky využívají podobného způsobu k propojení svého kontraktálního aparátu s extracelulární matrix na rozhraní svalu a šlachy, což jim umožňuje vyvíjet velké síly i přesto, že jsou obaleny pouze tenkou lipidovou dvojitou membránou.

Gely z polysacharidů a proteinů vyplňují prostory a zajišťují odolnost vůči tlaku

Zatímco kolagen zajišťuje pevnost v tahu a zabraňuje napínání, zcela odlišná skupina makromolekul v extracelulární matrix poskytuje u živočichů komplementární funkci – zabraňuje stlačování a slouží jako výplňová hmota. Jsou to *proteoglykany*, extracelulární proteiny připojené ke speciálnímu druhu komplexu negativně nabitých polysacharidů, **glukosaminoglykanů (GAG)** (obr. 19-15). Proteoglykany jsou extrémně různorodé ve velikosti, tvaru a chemickém složení. Obvykle je mnoho GAG-řetězců připojeno k jednomu centrálnímu proteinu, který může být zároveň koncem připojen k dalšímu GAG a vytvářet tak obrovské mak-

Obrázek 19-16 Proteoglykanový agregát z chrupavky. (A) Agregát rozprostřený do plochy zachycený na fotografii z elektronového mikroskopu. Je zde vidět i mnoho volných podjednotek – ve skutečnosti také velkých proteoglykanových molekul. (B) Schematický náčrt obřího agregátu z obrázku (A), ukazující jeho stavbu z GAG a proteinů. Molekulová hmotnost takového komplexu může být víc než 100 MDa a zaujímá prostor ekvivalentní bakterii, tedy přibližně $2 \times 10^{-12} \text{ cm}^3$.



romolekuly s molekulovou hmotností v řádech milionů, které vypadají podobně jako štětky na čištění lahví (obr. 19-16).

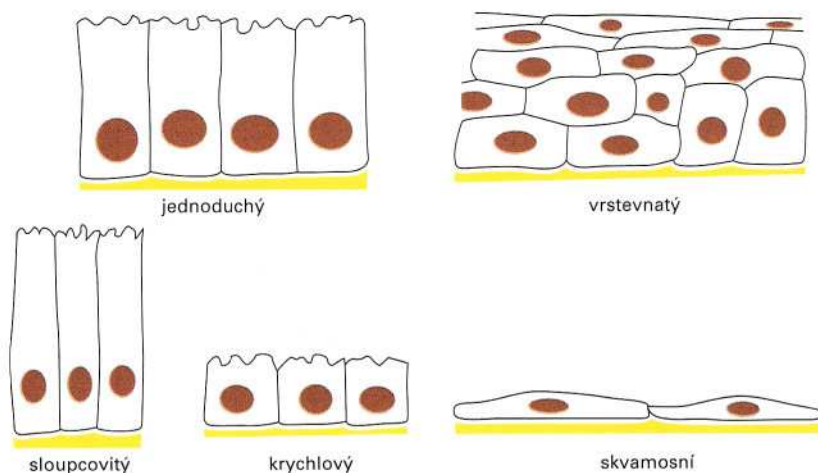
U hustých, kompaktních pojivových tkání, jako jsou šlacha a kost, představují GAG pouze malou část a matrix obsahuje převážně kolagen (v případě kosti je kolagen zpevněn krystaly fosforečnanu vápenatého). Druhým extrémem je rosolovitá výplň vnitřku oka, která je téměř zcela tvořena jediným typem GAG a vodou a obsahuje pouze malé množství kolagenu. Obecně jsou GAG silně hydrofilní a mají tendenci zůstat ve velmi rozvolněných konformacích, které zabírají obrovský prostor vzhledem k jejich hmotnosti (viz obr. 19-16). I při velmi nízkých koncentracích vytvářejí gely; obsahují mnoho negativních nábojů přitahujících množství kationtů, jako je Na^+ , které jsou osmoticky aktivní a způsobují, že je do matrix nasáváno velké množství vody. Tím vzniká botnavý tlak, který je v rovnováze s napětím v kolagenových vláknech, která jsou proteoglykany protkána. Pokud je matrix bohatá na kolagen a v kolagenové síti je zadržováno velké množství GAG, jsou jak botnavý tlak, tak protipůsobící napětí obrovské. Takováto matrix je pevná, pružná a odolná k tlaku. Například matrix chrupavky, která pokrývá kolenní kloub, má tuto vlastnost – vydrží tlak několika set kilogramů na čtvereční centimetr.

Proteoglykany plní mnoho dalších důmyslnějších funkcí než pouhé zajišťování hydratovaného prostoru okolo buněk. Mohou vytvářet gely s různou velikostí pórů a hustotou náboje, které fungují jako filtry regulující průchod molekul skrz extracelulární matrix. Mohou vázat růstové faktory a jiné proteiny, které pro buňku slouží jako signály. Mohou blokovat, podporovat nebo řídit migraci buněk skrz matrix. U všech těchto uvedených funkcí ovlivňují složky matrix chování buněk – často stejných buněk, které tuto matrix vyprodukovaly. Tím vzniká oboustranná interakce, která má významný vliv na diferenciaci buněk. Stále se však musíme naučit mnoho o tom, jak buňky spřádají tuto tapisérii z molekul matrix a jak jsou chemické zprávy, které ve svém výrobku zanechávají, organizovány a jak fungují.

Otázka 19-3 Proteoglykany jsou charakteristické přítomností velkého množství záporných nábojů na svých sacharidových skupinách. Jak by se změnila jejich vlastnosti, kdyby záporných nábojů nebylo tolik?

Epitely a mezibuněčné spoje

V těle obratlovců je více než 200 zřetelně odlišitelných typů buněk. Většina z nich je organizována do epitelů, to znamená, že jsou spolu spojeny stěnami, takže vytvářejí mnohobuněčné vrstvy. V některých



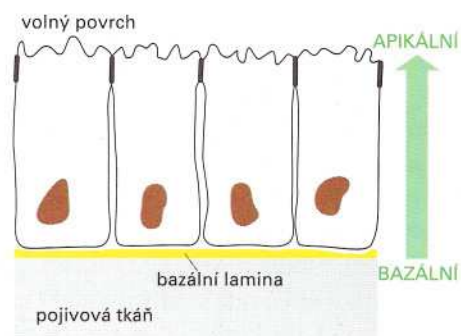
Obrázek 19-17 Různé způsoby vzájemného uspořádání buněk tvořících epitel.

případech se epitel skládá z více vrstev buněk, takzvaný *vrstevnatý (mnohovrstevný)* epitel (jako je tomu u pokožky kůže); v jiných případech je epitel *jednovrstevný* (například u výstelky střeva). Buňky mohou být vysoké a *válcové*, nebo jsou *krychlové* či ploché neboli *dlaždicové* (obr. 19-17). Buňky epitelu mohou být stejné nebo může jít o směs různých typů buněk. Mohou jednoduše sloužit jako ochranná bariéra, nebo mohou mít složité biochemické funkce: mohou vylučovat specializované látky, jako jsou hormony, mléko nebo slzy; mohou sloužit k absorpci výživných látek, jak se děje ve výstelce střeva, nebo mohou detegovat signály, jako například fotoreceptory v oku nebo vláskové buňky v uchu. Ačkoliv se epitely v různých ohledech liší, lze nalézt soubor strukturních znaků, které jsou pro všechny živočišné epitely společné. Uspořádání buněk je tak typické, že je každý pozná; přesto buňky potřebují řadu specializovaných zařízení a ta, jak uvidíme později, jsou společná mnoha různým buněčným typům.

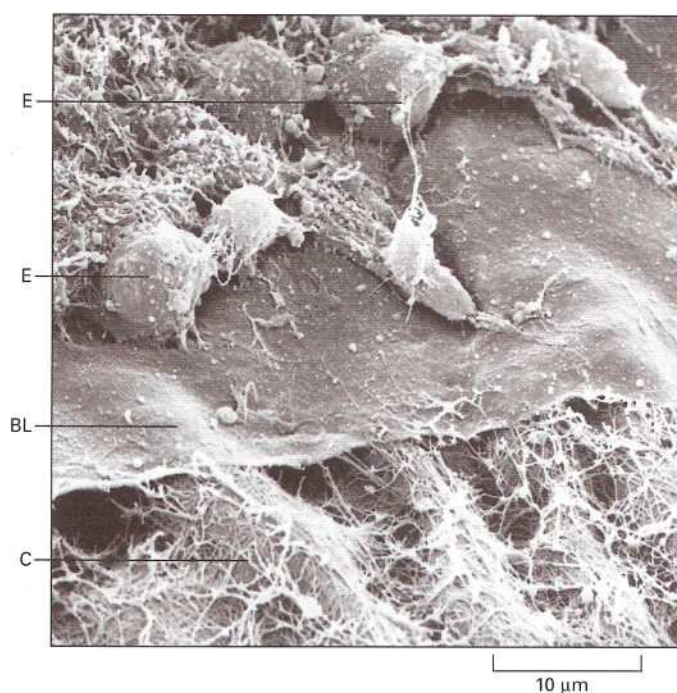
Epitely pokrývají vnější povrch těla a vystýlají všechny vnitřní dutiny, a proto se musely objevit v evoluci mnohobuněčných živočichů brzy. Jejich důležitost je zřejmá. Buňky spojené dohromady v epiteliální listy vytvářejí bariéru, která má pro mnohobuněčný organismus stejný význam jako plasmatická membrána pro buňku. Zadržuje některé molekuly uvnitř a jiné vně; zachytává živiny a exportuje odpady; obsahuje receptory pro signály z okolí; ochraňuje vnitřek organismu před invazí mikroorganismů a zabraňuje úniku tekutin.

Epitely jsou polarizovány a spočívají na bazální membráně

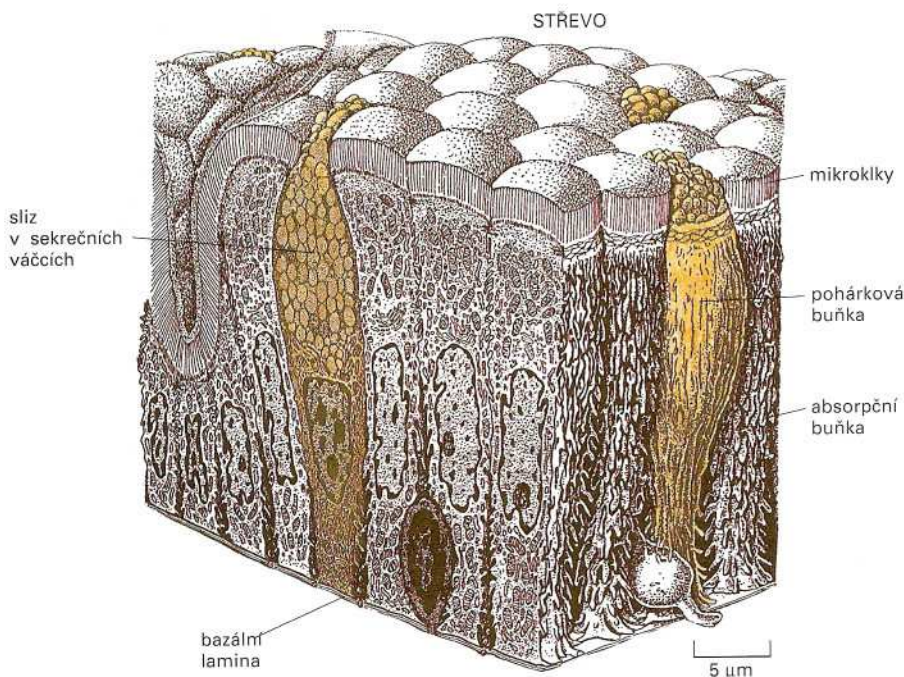
Epiteliální list má dvě strany: **apikální** povrch je volný a vystavený vzduchu nebo vodnému roztoku; **bazální** povrch spočívá na dalším druhu tkáně – obvykle pojivové, ke které je epitel připojen (obr. 19-18). Jako opora pod bazálním povrchem epitelu leží tenká tuhá vrstva extracelulární matrix nazývaná **bazální membrána** (obr. 19-19), která je složena ze speciálního typu kolagenu (kolagen typu IV) a různých jiných mole-



Obrázek 19-18 Polarizovaná organizace epitelu.



Obrázek 19-19 Bazální membrána rohovky kuřecího embrya na fotografii z řádkovacího elektronového mikroskopu. Některé epiteliální buňky (E) byly odstraněny, aby bylo vidět horní stranu rohožité bazální membrány tvořené kolagenem typu IV (BL). Síť jiných kolagenových fibril (C) v pojivové tkáni ležící pod ní interaguje se spodní stranou bazální membrány.



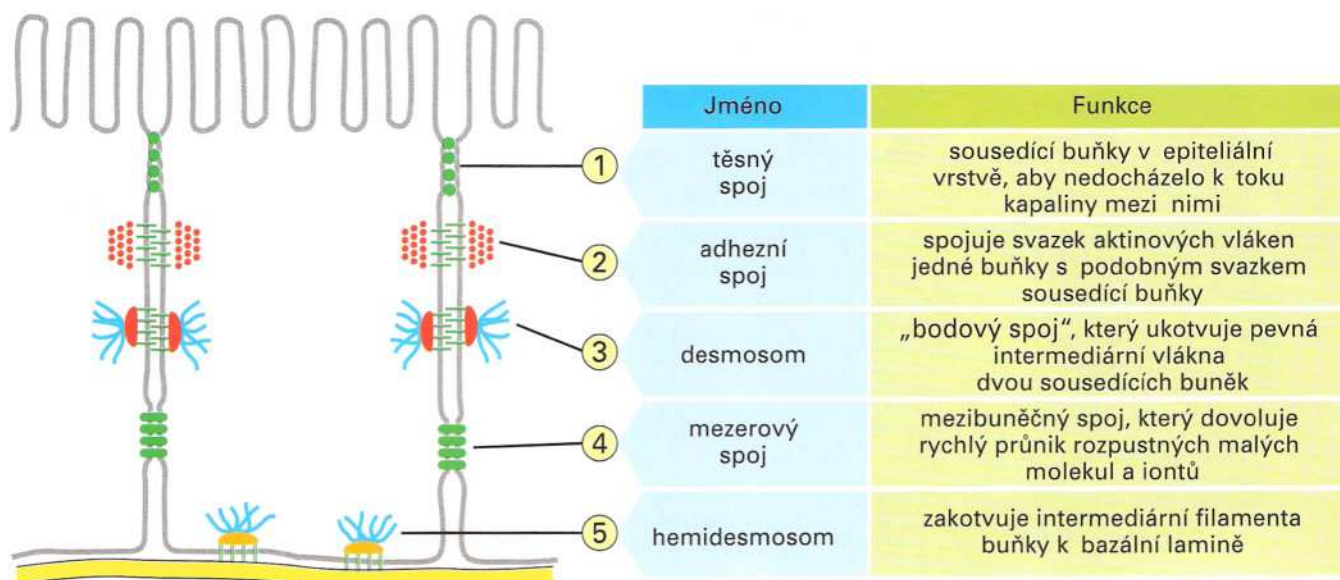
Obrázek 19-20 Funkčně polarizované buněčné typy ve výstelce střeva. Resorpční buňky, které vstřebávají živiny ze střeva, jsou ve výstelce střeva smíchány s pohárkovými buňkami, které vylučují do střeva hlen. Resorpční buňky vytvářejí díky mikroklkům na svém apikálním konci tzv. *kartáčový lem*. Tyto mikroklky zvětšují povrch membrány využitelný pro transport malých molekul dovnitř buňky. Pohárkové buňky vděčí za svůj pohárkovitý tvar množství sekrečních váčků, které zvětšují jejich apikální část.

kul. Jednou z nich je protein nazývaný *laminin*, který poskytuje adhezní místa pro molekuly integrinů v plasmatické membráně epiteliálních buněk, a slouží tak jako spojovací článek podobně jako fibronectin v pojivových tkáních.

Apikální a bazální strany epitelů jsou vždy chemicky odlišné a odrážejí tak polarizaci vnitřní organizace jednotlivých epiteliálních buněk; každá má horní a spodní část s odlišnými vlastnostmi. Tato organizovaná polarizace je pro funkci epitelů nezbytná. Představte si například jednoduchý cylindrický epitel ve výstelce tenkého střeva savců – ten je tvořen převážně dvěma vzájemně promíchanými typy buněk: *resorpčními buňkami*, které přijímají živiny, a *pohárkovými buňkami* (nazývanými podle svého tvaru) vylučujícími hlen, který chrání a zvlhčuje střešní výstelku (obr. 19-20). Oba typy buněk jsou polarizovány. Resorpční buňky importují z lumenu střeva molekuly živin přes svůj apikální povrch a exportují tyto molekuly přes svůj bazální povrch do tkání pod nimi. Aby toho dosáhly, potřebují na svých apikálních a bazálních membránách odlišné sady membránových transportních proteinů (viz str. 381). Pohárkové buňky musí být samozřejmě také polarizovány, ale jiným způsobem: musí syntetizovat hlen a uvolňovat ho pouze ze své apikální strany (viz obr. 19-20). To je zajištěno asymetrickou organizací Golgiho aparátu, sekrečních váčků a cytoskeletu. Přestože stále zůstává mnoho nezodpovězených otázek kolem udržování této organizace, je jasné, že záleží na spojích, které epiteliální buňky vytvářejí jednak mezi sebou a jednak s bazální membránou.

Těsné spoje zaručují epitelu nepropustnost a oddělují jeho apikální a bazální povrch

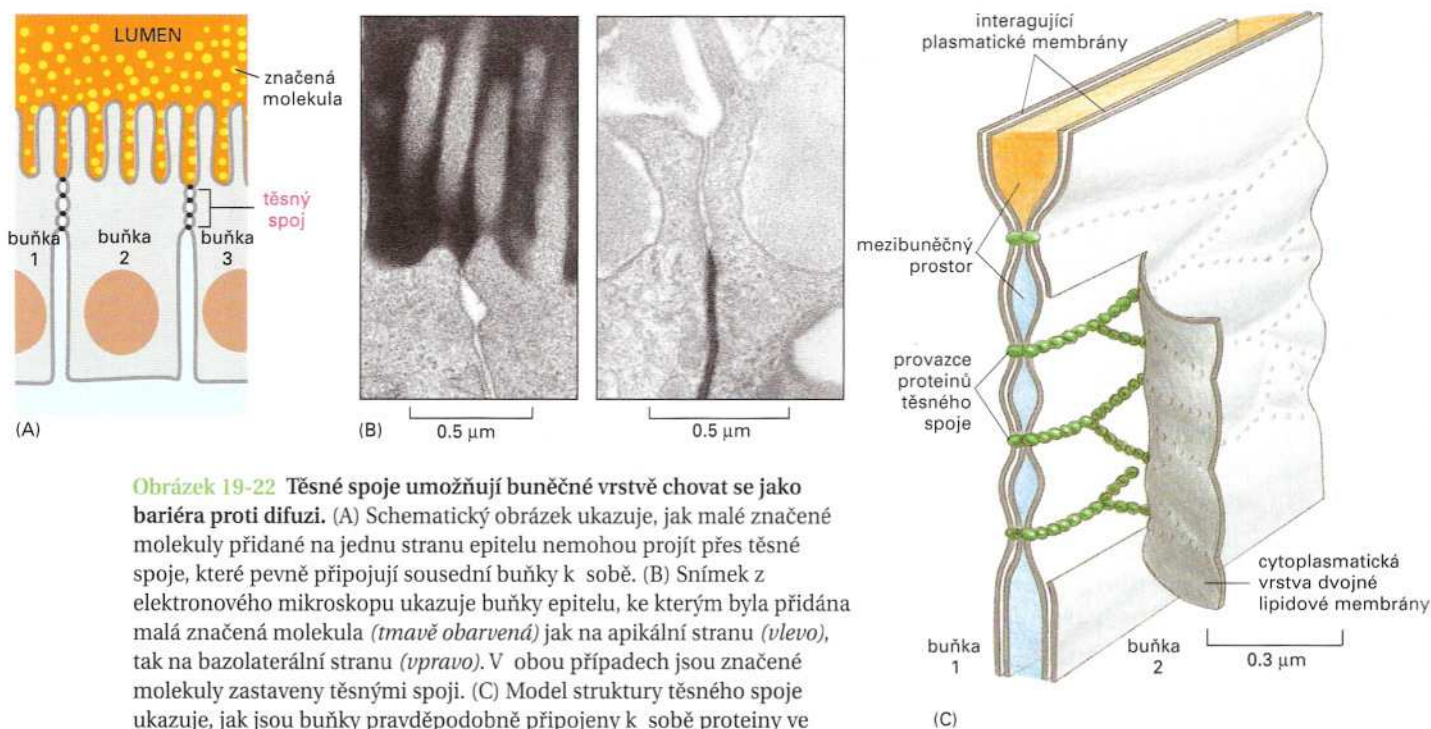
Spoje epiteliálních buněk mohou být klasifikovány podle jejich funkce. Některé vytvářejí neprodyšná spojení, která zabraňují úniku molekul přes epitel mezerami mezi buňkami. Jiné spoje zajišťují pevné, mechanické přichycení a některé jsou určeny pro speciální typ vzájemné che-



mické komunikace. U většiny epitelů jsou všechny tyto typy spojů přítomny současně (obr. 19-21).

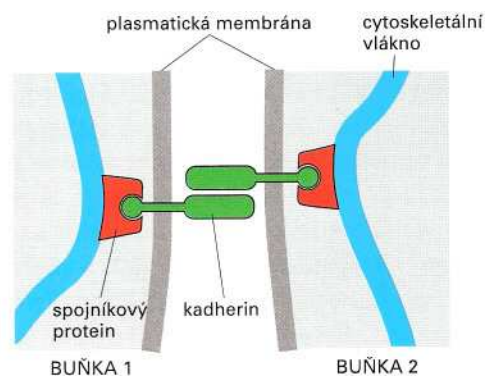
Neprodyšnost epitelů je (u obratlovců) dána **těsnými spoji**. Ty spojují sousední buňky tak, že molekuly rozpuštěné ve vodě nemohou procházet mezi nimi: pokud je nějaká pozorovatelná molekula přidána na jednu stranu epitelu, obvykle neprojde přes těsný spoj (obr. 19-22). Pokud by těsné spoje nezabraňovaly průchodu molekul, byla by pumpovací aktivita resorpčních buněk ve střevě zbytečná a složení roztoků na obou stranách epitelu by bylo stejné. Jak jsme si ukázali v Kapitole 11,

Obrázek 19-21 Souhrnné schéma hlavních typů mezibuněčných spojů v epitelech živočichů. Těsné spoje jsou charakteristické pro epitel; ostatní spoje můžeme najít v modifikované podobě také v různých mimoepiteliálních tkáních.



Obrázek 19-22 Těsné spoje umožňují buněčné vrstvě chovat se jako bariéra proti difúzi. (A) Schematický obrázek ukazuje, jak malé značené molekuly přidávané na jednu stranu epitelu nemohou projít přes těsné spoje, které pevně připojují sousední buňky k sobě. (B) Snímek z elektronového mikroskopu ukazuje buňky epitelu, ke kterým byla přidána malá značená molekula (*tmavě obarvená*) jak na apikální stranu (*vlevo*), tak na bazolaterální stranu (*vpravo*). V obou případech jsou značené molekuly zastaveny těsnými spoji. (C) Model struktury těsného spoje ukazuje, jak jsou buňky pravděpodobně připojeny k sobě proteiny ve vnější vrstvě lipidové dvojité vrstvy plasmatické membrány.

Obrázek 19-23 Molekuly kadherinu zprostředkovávají mechanické připojení jedné buňky k druhé. Dvě stejné molekuly kadherinů v plasmatických membránách sousedních buněk se vzájemně vážou; intracelulárně jsou prostřednictvím spojňkových proteinů připojeny k cytoskeletálním vláknům.

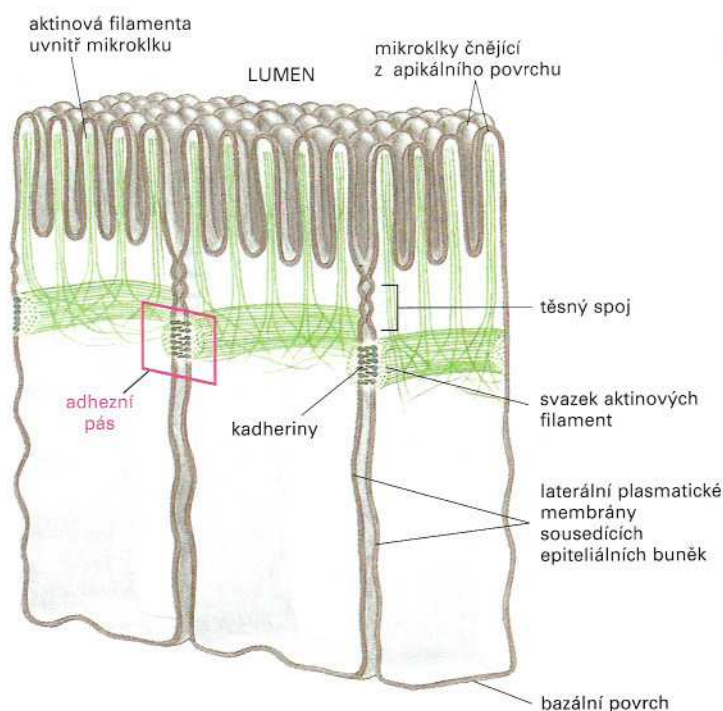


těsné spoje také hrají klíčovou úlohu v udržování polarity jednotlivých epiteliálních buněk: komplex těsného spoje okolo apikálního okraje epiteliální buňky zabráňuje difuzi membránových proteinů, a tak zůstává apikální doména plasmatické membrány odlišná od domény bazální (nebo bazolaterální) (viz obr. 11-37).

Spoje propojené s cytoskeletem pevně vážou epiteliální buňky navzájem a připojují je k bazální membráně

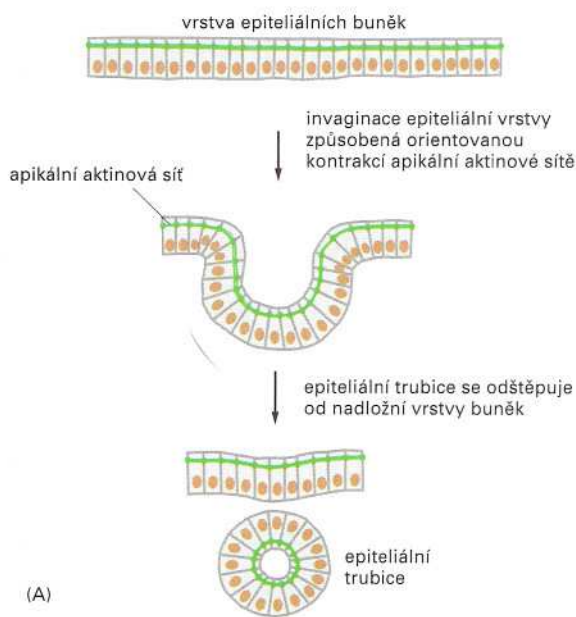
Spoje, které drží epitel pohromadě vytvářením mechanických vazeb, jsou tří hlavních typů: *mechanické (adhezní) spoje* a *desmosomy* vážou jednu epiteliální buňku k druhé, zatímco *hemidesmosomy* spojují epiteliální buňky s bazální membránou. Všechny tyto spoje vytvářejí mechanickou sílu stejným způsobem, jak jsme si již ukázali u pojivových tkání (viz obr. 19-14 C): molekula, která vně buňky vytváří spojení, prochází membránou a uvnitř buňky je připojena na silná cytoskeletální filamenta. Tímto způsobem jsou cytoskeletální filamenta provázána do sítě, která prochází z buňky do buňky a protkává celou epiteliální tkáň.

Mechanické spoje a desmosomy jsou tvořeny transmembránovými proteiny patřícími do jedné rodiny nazývané **kadheriny**: molekula kadherinu v plasmatické membráně jedné buňky se přímo váže na stejnou molekulu kadherinu v plasmatické membráně sousední buňky (obr. 19-23). Takováto vazba stejných proteinů se nazývá *homofilní*. V případě kadherinů je také zapotřebí, aby se v extracelulárním prostředí vyskytovaly Ca^{2+} ; odtud tedy pochází jejich jméno.

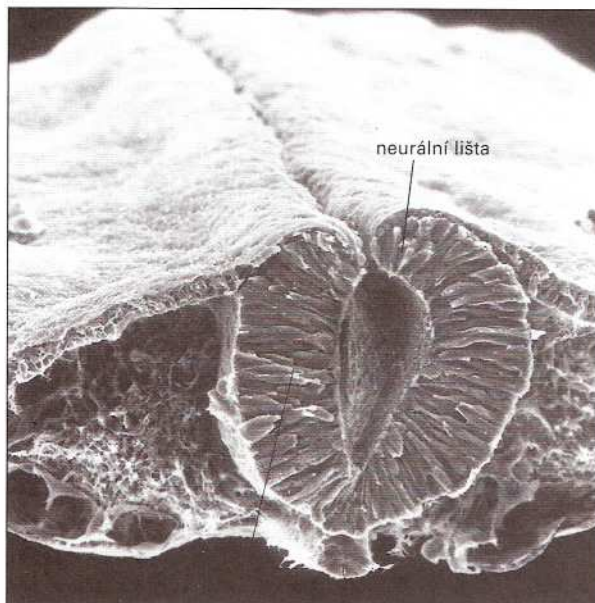


Obrázek 19-24 Adhezní pásy (pásové desmosomy) epiteliálních buněk tenkého střeva. Blízko vrcholu každé buňky probíhá pod cytoplasmatickým povrchem plasmatické membrány kontraktilní svazek aktinových filament, který je spojen se svazkem aktinových filament v sousedních buňkách pomocí kadherinových molekul, které procházejí buněčnými membránami (viz obr. 19-23).

V **mechanickém spoji** je každá kadherinová molekula uvnitř buňky propojena díky několika spojovacím proteinům s aktinovými filamenti. Mechanické spoje často vytvářejí souvislý *adhezní pás* (takzvaný *pásový desmosom*) okolo každé z interagujících epiteliálních buněk; tento pás je umístěn blízko apikálního konce buňky, přímo pod těsnými spoji (obr. 19-24). Aktinové svazky jsou tedy propojeny z buňky do buňky v celém epitelu. Tato aktinová síť se může i stahovat – tak získávají epitely schopnost vyvinout tlak a měnit nápadným způsobem svůj tvar. Zmenšováním svého apikálního povrchu podél jedné osy se epitel může ohnout, až se stočí a vytvoří trubici (obr. 19-25 A). Alternativně, lokálním zmenšováním apikálního povrchu podél obou os najednou může epitel vytvořit pohárkovitou výduň a nakonec může dojít i ke vzniku váčku, který se může od zbytku epitelu odštěpit. Epiteliální pohyby, jako jsou tyto, jsou důležité v embryonálním vývoji, při kterém vytvářejí struktu-



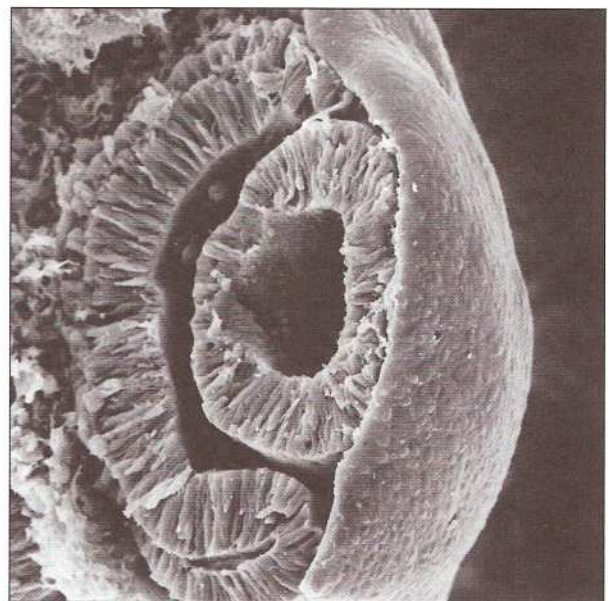
(A)



(B)

neurální lišta
notochord

50 μm

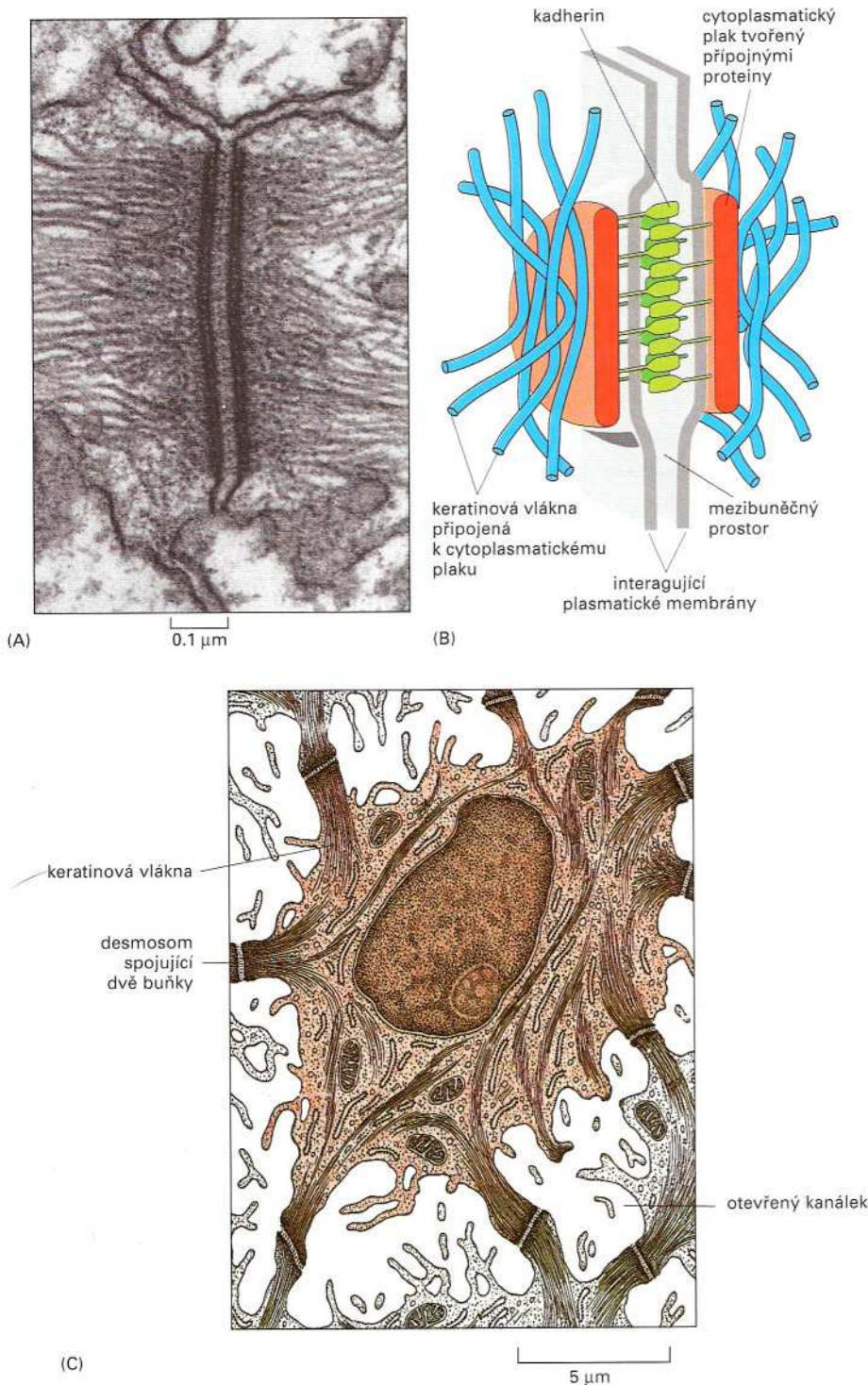


(C)

Obrázek 19-25 Ohýbající se epiteliální list tvoří trubici nebo váček. (A) Schéma ukazuje, jak kontrakce svazku aktinových filament, která jsou mezi buňkami propojena mechanickými spoji, způsobuje zúžení epiteliálních buněk na jejich apikální straně. Podle toho, zda je kontrakce orientována podle jedné osy nebo rovnoměrně ve všech směrech, se epitel stáčí buď do trubice nebo invaginuje a vytváří váček. (B) Tvorba nervové trubice; obrázek z řádkovacího elektronového mikroskopu ukazuje kolmý řez trupem dvoudenního kuřecího embrya. Část epitelu, který pokrývá povrch embrya, zesílila, apikální kontrakcí se stočila do trubice a připravuje se k oddělení, aby se z ní stala samostatná vnitřní struktura. (C) Tvorba čočky; část povrchového epitelu pokrývajícího zárodečný základ oční sítnice se vydul a nakonec se odštěpil jako samostatný čočkový váček uvnitř očního pohárku.

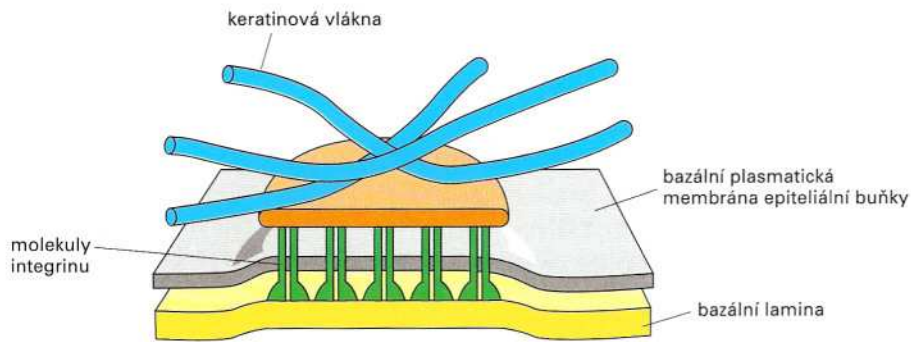
ry, jako je neurální trubice (základ centrálního nervového systému; obr. 19-25 B) a váček čočky (základ oční čočky; obr. 19-25 C).

U **desmosomů**, na rozdíl od mechanických spojů, jsou odlišné typy kadherinových molekul uvnitř každé buňky připojeny k intermediárním filamentům – speciálně ke keratinům, což je typ intermediárních filamentů vyskytujících se v epitelech (viz Kapitola 16) (obr. 19-26). Silné svazky provazců podobných keratinových intermediárních filamentů křížují cytoplasmu a přes desmosomy jsou připojeny ke keratinovým filamentům sousedních buněk. Tím vytvářejí velkou pevnost v tahu a jsou zejména hojné v pevných a exponovaných epitelech, jako je epidermis kůže.



Obrázek 19-26 Desmosomy.

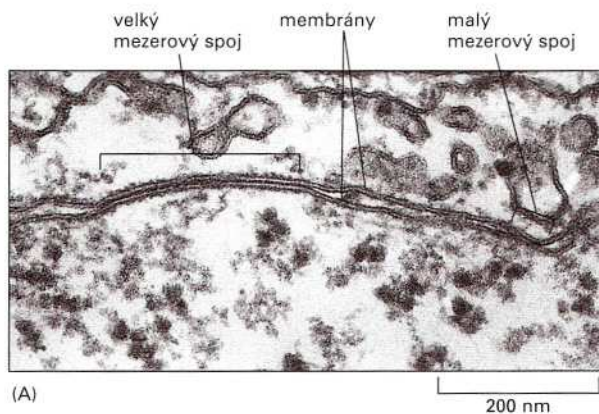
(A) Fotografie desmosomu z elektronového mikroskopu zachycuje spojení dvou buněk v epidermis čolka a přichycení keratinových filamentů. (B) Schematický náčrt desmosomu. Na cytoplasmatickém povrchu každé z interagujících membrán je hutná destička z intracelulárních přichytných proteinů, na jejíž vnitřní stranu jsou připojena keratinová filamenta. Na vnější straně každé destičky jsou přichyceny proteiny z kadherinové rodiny, které procházejí membránou a vážou obě buňky k sobě. (C) Náčrt řezu lidské epidermis podle snímku z elektronového mikroskopu ukazuje svazky keratinových filamentů, které procházejí cytoplasmou jedné z hlouběji uložených buněk k desmosomům, kterými je tato buňka (červeně) spojena se svými sousedy. Mezi sousedními buňkami v této hluboké vrstvě epidermis jsou také otevřené kanály, kterými mohou přes metabolicky aktivní tkáň volně difundovat živiny.



Puchýře jsou bolestivou připomínkou toho, že epitelálními buňkám nestačí, aby byly pevně připojeny jedna k druhé. Musí být také ukotveny ke tkáním ležícím pod nimi. Jak jsme se již zmínili dříve, ukotvení je zprostředkováno integriny – proteiny bazální plasmatické membrány epitelálních buněk. Vně se tyto integriny vážou k lamininu v bazální membráně; uvnitř buňky jsou připojeny ke keratinovým filamentům a vytvářejí tak strukturu, která se na první pohled podobá polovině desmosomu. Tato přichycení epitelálních buněk k extracelulární matrix pod nimi jsou proto nazývána **hemidesmosomy** (obr. 19-27).

Mezerové spoje umožňují výměnu iontů a malých molekul mezi buňkami

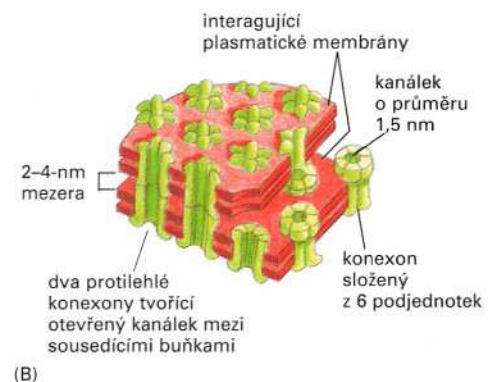
Poslední typ spojů mezi epitelálními buňkami, jež lze nalézt u všech epitelů i u mnoha dalších typů tkání, slouží ke zcela odlišnému účelu a je nazýván **mezerový spoj**. V elektronovém mikroskopu se jeví jako oblast, kde membrány dvou buněk leží rovnoběžně těsně vedle sebe a mezi nimi je úzká šterbina o šířce 2–4 nm (obr. 19-28 A). Šterbina není prázdná, ale je přemostěna vyčníhajícími konci mnoha stejných proteinových komplexů, které leží v plasmatické membráně obou sousedních buněk. Tyto komplexy nazývané *konexony* vytvářejí přes obě plasmatické membrány kanály a jsou uspořádány konci k sobě, takže vytvářejí úzké průchody umožňující anorganickým iontům a malým, ve vodě rozpustným molekulám (do molekulové hmotnosti okolo 1 000 daltonů) procházet přímo z cytoplasmy jedné buňky do cytoplasmy druhé buňky (obr. 19-28 B). Tím se vytváří elektrické a metabolické propojení mezi buňkami.

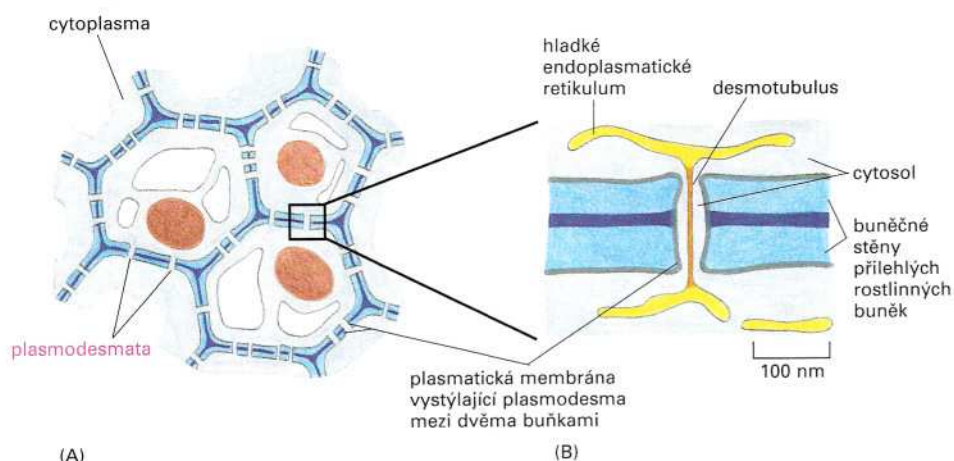


Obrázek 19-27 Hemidesmosom ukotvuje keratinová filamenta epitelální buňky k bazální membráně.

Otázka 19-4 Analogy hemidesmosomů jsou místa fokálních kontaktů popsaná v Kapitole 16, ve kterých také dochází k přichycení buňky k extracelulární matrix. Tyto spoje převládají u fibroblastů, ale téměř se nevyskytují u epitelálních buněk. Na druhé straně u epitelálních buněk převládají hemidesmosomy, které u fibroblastů chybějí. Fokální kontakty jsou intracelulárně propojeny s aktinem, zatímco hemidesmosomy jsou připojeny ke středním filamentům. Proč si myslíte, že se tyto dva odlišné typy buněk vážou k extracelulární matrix různými způsoby?

Obrázek 19-28 Mezerové spoje. (A) Tenký řez mezerovým spojem mezi dvěma buňkami v kultuře na snímku z elektronového mikroskopu. (B) Model mezerového spoje. Nákres ukazuje interagující plasmatické membrány dvou sousedních buněk. Přiložené dvojné vrstvy lipidů (červeně) jsou prostoupeny proteinovými komplexy nazývanými *konexony* (zeleně), které jsou složeny ze šesti stejných proteinových podjednotek, tzv. konexinů. Dva konexony se spojují a přemostují šterbinu mezi buňkami a vytváří tak mezi nimi pro vodu propustný kanál.





Obrázek 19-29 Plasmodesmata.

(A) Cytoplasmatické kanálky plasmodesmat pronikají rostlinnou buněčnou stěnou a spojují všechny buňky rostliny dohromady. (B) Plasmodesmata jsou ohraničena plasmatickou membránou společnou oběma buňkám. Obvykle je jejich součástí také jemná tubulární struktura, desmotubulus, která je odvozena od hladkého endoplasmatického retikula. Plasmodesmata mezi buňkami obvykle umožňují průchod pouze malých molekul a iontů.

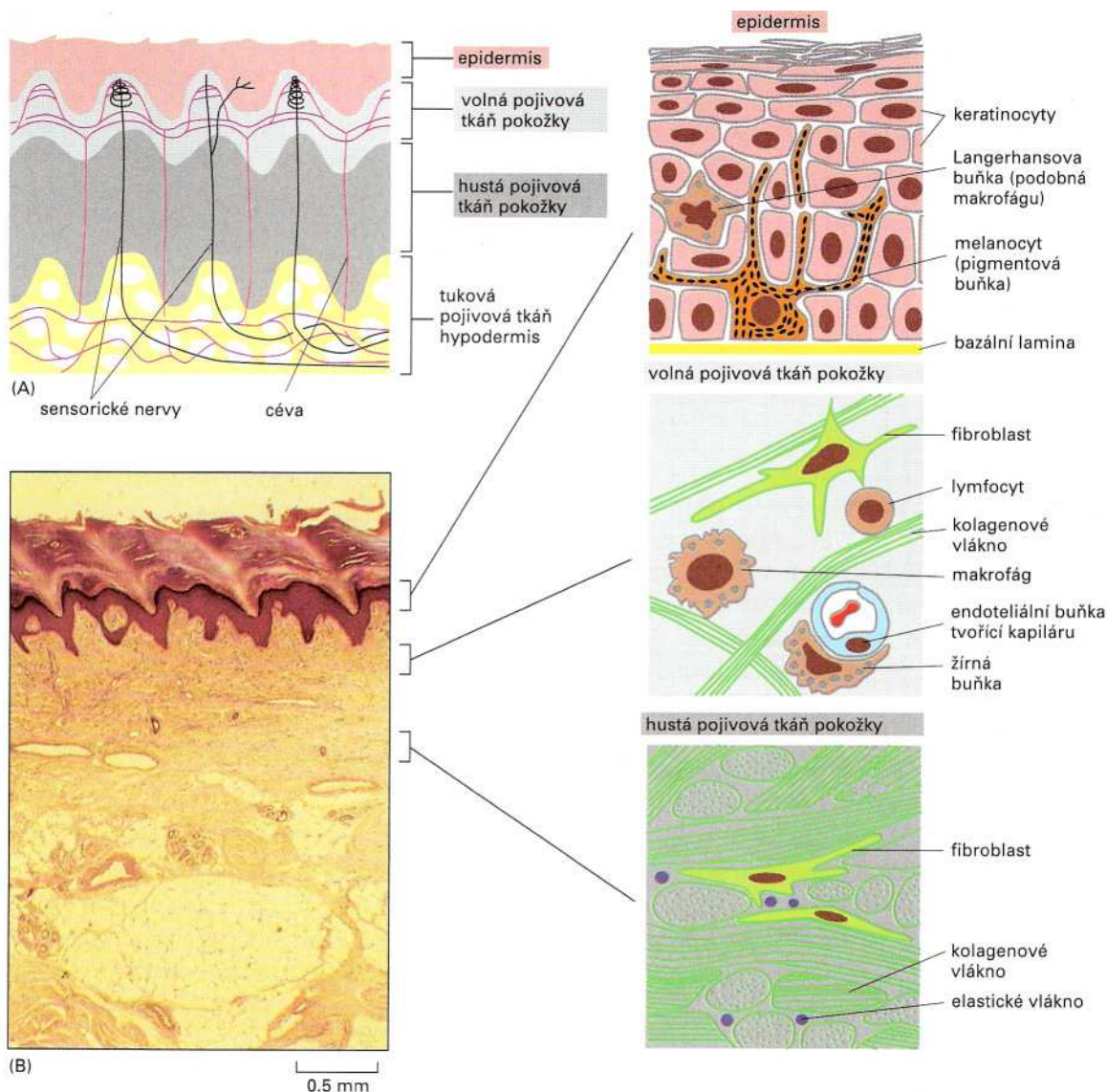
Kupodivu rostlinná pletiva, ačkoliv postrádají všechny ostatní typy mezibuněčných spojů, které jsme si popsali dříve, mají funkční obdobu mezerového spoje. Cytoplasma sousedních rostlinných buněk je spojena malými komunikačními kanály nazývanými *plasmodesmata*, která procházejí buněčnou stěnou mezi buňkami (obr. 19-29). Na rozdíl od kanálů mezerových spojů jsou plasmodesmata ohraničena plasmatickou membránou, která je tak spojitá od jedné rostlinné buňky k druhé. Ačkoliv jsou strukturně odlišné, plasmodesmata a mezerové spoje umožňují průchod obdobně vymezenému spektru iontů a malých molekul. Díky tomu se předpokládá, že jak rostlinné, tak živočišné sousedící buňky mají základní potřebu sdílet tyto látky, zatímco své makromolekuly udržují odděleně. Zatím stále není jasné, proč se tak děje.

Otázka 19-5 Mezerové spoje jsou dynamické struktury, které mají závěr podobně jako klasické iontové kanály: mohou se zavírat reverzibilní změnou konformace jako odpověď na změny uvnitř buňky. Permeabilita mezerových spojů klesá během sekund, například při vzrůstu intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Považujte nad tím, proč by mohla být tato forma regulace významná pro udržení tkáňové integrity.

Udržování a obnova tkáně a její dezintegrace při rakovině

Ačkoliv se specializované tkáně v našem těle liší v mnoha ohledech, všechny vyžadují určité základní potřeby obvykle zajišťované směsí buněčných typů, jak je naznačeno na příkladu kůže na obr. 19-30. Všechny tkáně potřebují mechanickou oporu, která je často poskytována podpůrnou vrstvou nebo strukturou z pojivové tkáně osídlené fibroblasty. V této pojivové tkáni zajišťují krevní cévy vystlané *endoteliálními buňkami* zásobování kyslíkem, živinami a odstraňování odpadních látek. Obdobně je většina tkání inervována axony *nervových buněk*, které jsou obaleny *Schwannovými buňkami*. *Makrofágy* odstraňují umírající buňky spolu s jinými nežádoucími zbytky a *lymfocyty* a další bílé krvinky zabírají infekci. Většina těchto buněčných typů vzniká mimo tyto tkáně, do kterých později invaduje, ať už časné v průběhu jejího vývoje (endoteliální buňky, axony nervových buněk a Schwannovy buňky) nebo průběžně během života (makrofágy a ostatní bílé krvinky). Tento složitý podpůrný aparát je nezbytný k udržování základních specializovaných buněk v tkáni, například kontraktálních buněk svalů, sekrečních buněk v žlázách, nebo krvetvorných buněk kostní dřeně.

Téměř každá tkáň je proto důmyslným propojením mnoha buněčných typů, které musí zůstat odlišné jeden od druhého v průběhu koexistence ve stejném prostředí. Navíc buňky téměř všech dospělých tkání neustále umírají a jsou nahrazovány novými; v průběhu buněčné a tkáňové obnovy.



ňové obnovy musí zůstat organizace tkáně zachována. To je možné díky třem následujícím faktorům (obr. 19-31).

1. **Buněčná komunikace.** Každý typ specializovaných buněk neustále kontroluje své okolí a vnímá signály od ostatních buněk, například růstové faktory, a podle toho přizpůsobuje svoji proliferaci a vlastnosti; ve skutečnosti přežití většiny buněk závisí právě na takovýchto signálech (Kapitola 15). Touto komunikací je zajištěno, že nové buňky vznikají pouze tehdy a tam, kde jich je třeba.

2. **Selektivní mezibuněčná adheze.** Protože různé buněčné typy mají ve své plasmatické membráně různé kadheriny a jiné adhezivní molekuly, mají tendence selektivně se vázat homofilní vazbou k ostatním buňkám stejného typu. Mohou také selektivně vytvářet kontakty s určitými jinými buněčnými typy nebo se specifickými složkami extracelulární matrix. Selektivní adheze zabraňuje chaotickému promíchání různých buněčných typů v tkáni.

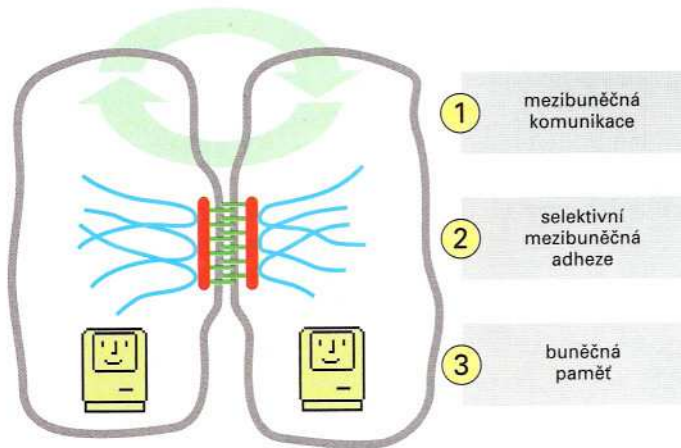
3. **Buněčná paměť.** Jak jsme viděli v Kapitole 8, speciální formy genové exprese vyvolané signály působícími v průběhu embryonálního vývoje jsou poté stabilně udržovány, takže si buňky autonomně uchová-

Obrázek 19-30 Kůže savců.

(A) Schematický náčrt ukazuje buněčnou strukturu silné kůže. (B) Fotografie příčného řezu kůže chodidla lidské nohy obarvené hematoxylinem a eosinem.

Na kůži můžeme pohlížet jako na orgán sestávající ze dvou hlavních tkání: epitelu (*epidermis*), který leží vně, a pojivové tkáně, která se skládá z houževnaté škáry (*dermis*) (z které se v koželužně vyrábí kůže), a z pod ní ležící tukové *hypodermis*. Každá tkáň je tvořena rozličnými typy buněk. Dermis a hypodermis jsou bohatě prokveny a inervovány. Některá nervová vlákna také procházejí do epidermis.

Obrázek 19-31 Tři klíčové faktory, které udržují buněčnou organizaci tkání.



vají svůj určitý charakter a přenášejí ho na své potomstvo. Fibroblast se dělí a vytváří další fibroblasty, endoteliální buňka se dělí a vytváří další endoteliální buňky. Tento princip, který si přesněji vysvětlíme později v této kapitole, zabezpečuje rozmanitost buněčných typů v tkáni.

Různé tkáně jsou obnovovány různou rychlostí

Buňky v tkáních se velmi výrazně liší rychlostí a způsobem své obměny. Jedním extrémem jsou nervové buňky, které fungují celý život bez výměny. Druhým extrémem jsou buňky vystylající střevo, které jsou kompletně vyměněny během několika dní. Mezi těmito extrémy existuje spektrum různých rychlostí a stylů buněčné výměny a obnovy tkáně. Například u lidí trvá u kosti výměna v průměru deset let a zahrnuje obnovu jak matrix, tak buněk. Stará kostní matrix je postupně odbourávána skupinou buněk nazývaných *osteoklasty* – příbuzných makrofágům, zatímco nová matrix je ukládána jinou skupinou buněk, *osteoblasty* – příbuzných fibroblastům. Nové červené krvinky jsou neustále vytvářeny v kostní dřeni (opět z jiné třídy buněk) a uvolňovány do krevního řečiště, z kterého jsou po 120 dnech odstraněny a odbourány. V kůži jsou svrchní vrstvy epidermis neustále odlupovány a nahrazovány zespodu, takže epidermis je obnovena přibližně za dva měsíce.

Život je závislý na těchto obnovovacích procesech. Veliká dávka ionizujícího záření tyto procesy zastavuje blokováním buněčného dělení: během několika dnů je například výstelka střeva zbavena buněk, což vede ke zničujícímu průjmu a ztrátě vody, jak je typické pro akutní nemoc z ozáření.

Otázka 19-6 Proč ionizující záření zastavuje buněčné dělení?

Kmenové buňky neustále produkují terminálně diferencované buňky

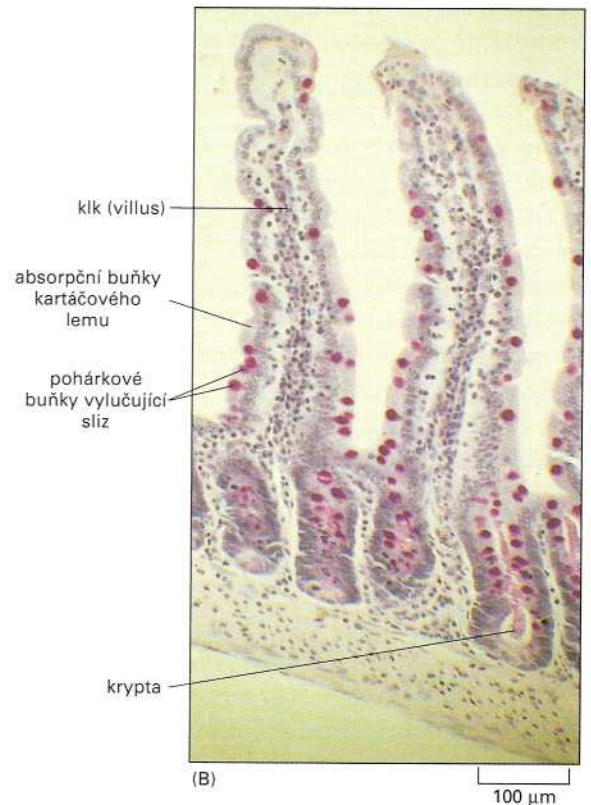
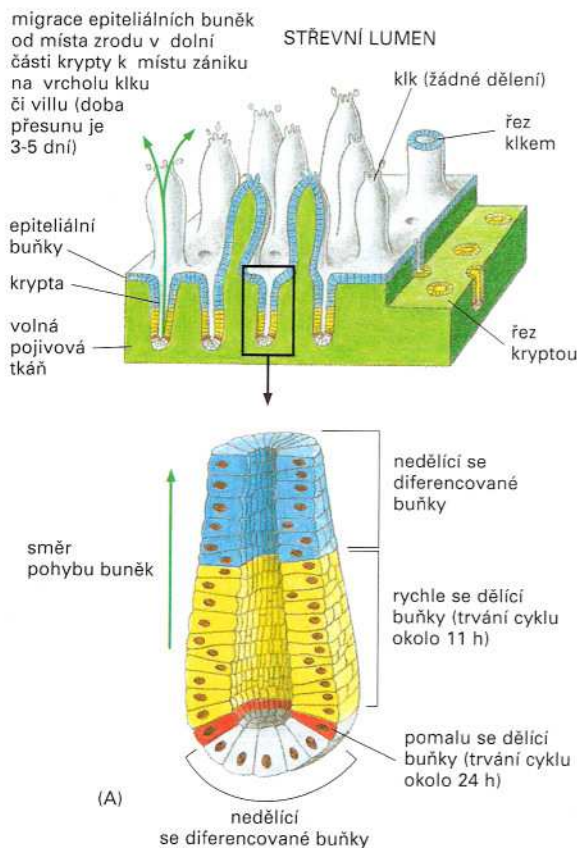
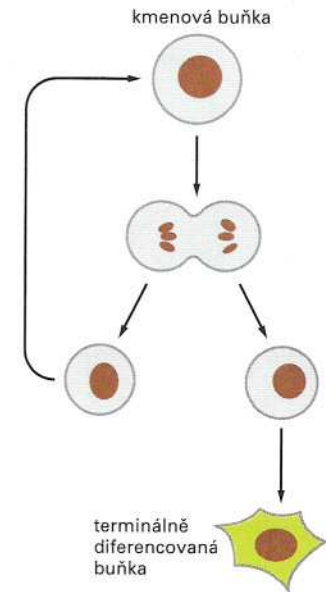
Mnoho diferencovaných buněk, které je třeba neustále obnovovat, není schopno samo se dělit. Červené krvinky, povrchové epidermální buňky, resorpční a pohárkové buňky výstelky střeva patří k tomuto typu. Jsou označovány jako *terminálně diferencované* a představují úplný konec své vývojové dráhy.

Mnoho takovýchto buněk vzniká ze zásobárny prekursorových buněk nazývaných **kmenové buňky**, které existují v příslušných tkáních společně s diferencovanými buňkami. Kmenové buňky nejsou terminálně diferencovány a mohou se neomezeně dělit (nebo alespoň po

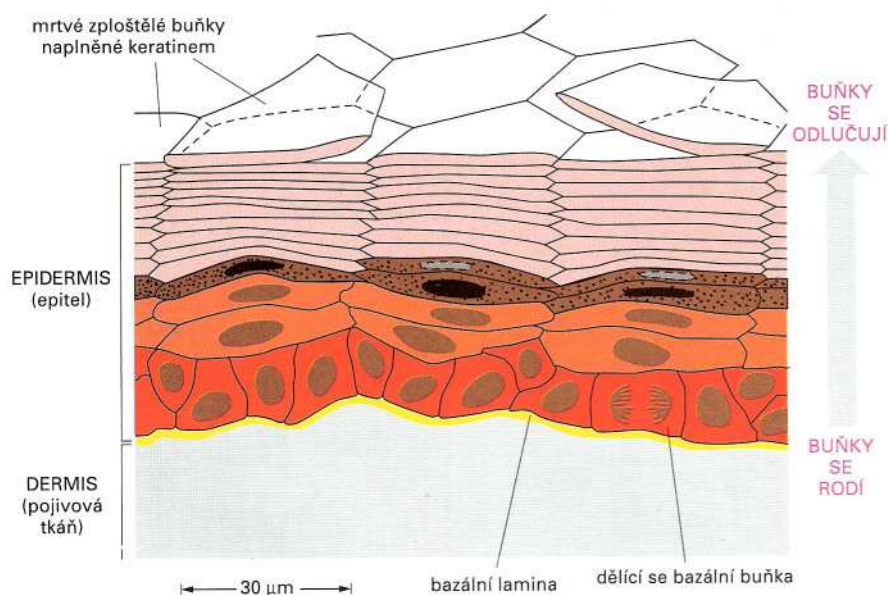
Obrázek 19-32 Kmenová buňka. Pokud se kmenová buňka rozdělí, z každé dceřiné buňky se buď může stát kmenová buňka, nebo může tato buňka pokračovat ve vývoji a terminálně se diferencovat.

celou délku života živočicha). Když se kmenová buňka rozdělí, dceřiná buňka se musí rozhodnout: buď zůstane kmenovou buňkou, nebo se vydá směrem vedoucím k nevratné terminální diferenciaci (obr. 19-32). Úkolem kmenové buňky tedy není vykonávat specializované funkce diferencovaných buněk, ale spíše tyto buňky produkovat. Kmenové buňky mají často nedefinovaný vzhled, takže je těžké je identifikovat. Ačkoliv nejsou kmenové buňky terminálně diferencované, jsou *determinované*. Stabilně exprimují sadu proteinů regulujících geny, která zabezpečuje, že jejich diferencované potomstvo bude patřit k příslušnému typu.

Způsob buněčných obměn se u tkání založených na kmenových buňkách vzájemně odlišuje. Například u výstelky tenkého střeva jsou resorpční a pohárkové buňky společně uspořádány do jednovrstevného epitelu, který pokrývá povrch prstovitých *klků* (villi) vyběhajících do lumenu střeva. Tento epitel přechází v epitel, který vystylá *krypty* zanořující se do podložní pojivové tkáně; kmenové buňky leží blízko dna těchto krypt. Nové resorpční a pohárkové buňky vytvořené z kmenových buněk jsou unášeny klouzavým pohybem v ploše epi-



Obrázek 19-33 Obnova střevní výstelky. (A) Organizace buněčné obnovy a proliferace kmenových buněk v epitelu, který tvoří výstelku tenkého střeva. Nedělící se diferencované buňky u báze krypt mají také určenou dobu života; jejich existence je ukončena programovanou buněčnou smrtí a i ony jsou neustále nahrazovány potomky kmenových buněk. (B) Fotografie řezu části výstelky tenkého střeva ukazuje klky a krypty. Všimněte si, jak jsou pohárkové buňky secernující hlen (obarveny červeně) roztroušeny mezi resorpčními buňkami tvořícími v epitelu klku kartáčový lem.



Obrázek 19-34 Organizace nahrazování buněk v epidermis. Nové buňky vznikají dělením kmenových buněk v bazální vrstvě, oddělují se od bazální membrány a v průběhu pohybu od ní diferencují. Nakonec buňka projde speciální formou buněčné smrti: buněčné jádro se rozloží, buňka se zmenší a vytvoří zploštělou šupinku naplněnou keratinem. Šupinky se nakonec z povrchu těla odloupnou.

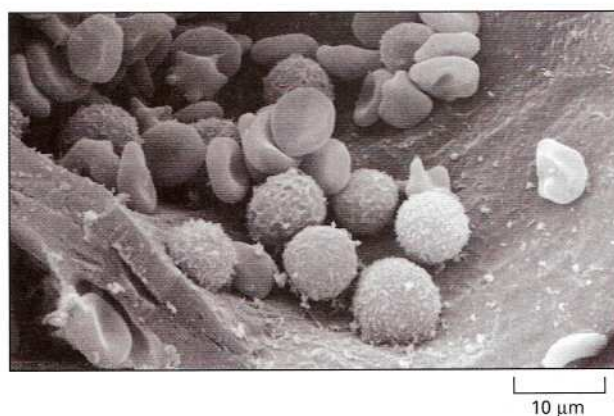
teliálního listu, dokud se nedostanou na exponovaný povrch klu; na vršcích klků buňky odumírají a odlupují se do lumenu střeva (obr. 19-33).

Naprosto jiný příklad lze nalézt u epidermis. Epidermis je mnoho-
vrstevný epitel s kmenovými buňkami v bazální vrstvě, která nasedá na bazální membránu. Diferencující buňky putují od místa svého vzniku v kolmém směru k rovině buněčného listu (obr. 19-34).

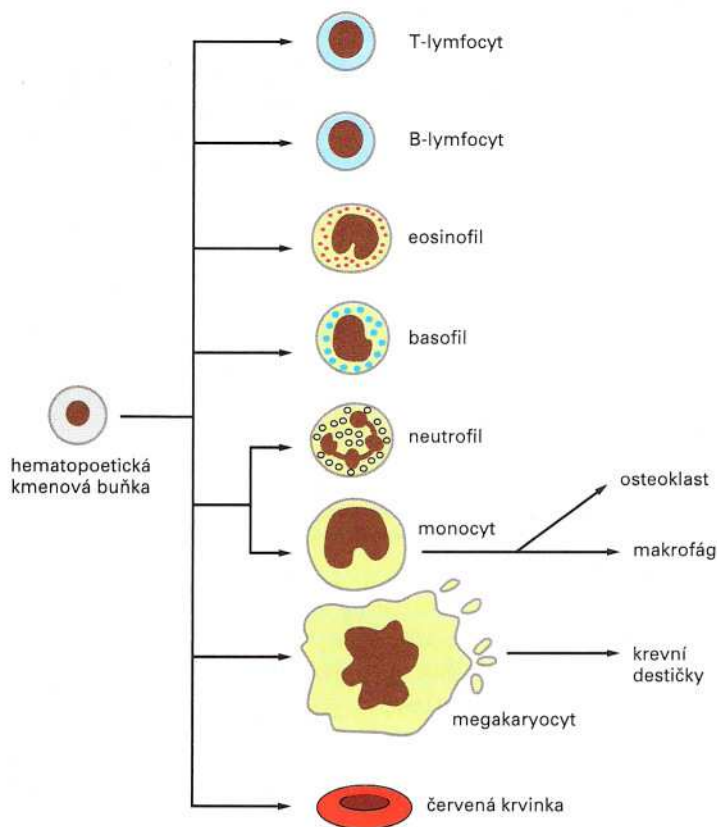
Často z jednoho typu kmenové buňky vzniká několik typů diferencovaného potomstva: typickým příkladem jsou kmenové buňky střeva, ze kterých vznikají resorpční buňky, pohárkové buňky a některé další buněčné typy. Extrémním případem tohoto fenoménu je proces krvetvorby neboli *hematopoeza*. Všechny rozdílné buněčné typy v krvi – jak červené krvinky přenášející kyslík, tak mnoho typů bílých krvinek bojujících s infekcí (obr. 19-35) – pocházejí původně z jediné *hematopoetické kmenové buňky*, která normálně osídluje kostní dřeň (obr. 19-36).

Protože kmenové buňky mohou proliferovat stejně dobře jako vytvářet diferencované potomstvo, jsou vhodné jak pro růst a obnovu tkání, tak pro jejich běžnou údržbu. Například po transfuzi několika hematopoetických kmenových buněk myši, u které byly její vlastní krevní kmenové buňky zničeny, dochází k osidlování novými krevními buňkami

Otázka 19-7 Proč si myslíte, že jsou epitelální buňky střevní výstelky tak často obnovovány, zatímco většina neuronů existuje po celou dobu života organismu?



Obrázek 19-35 Krevní buňky savců na snímku z řádkovacího elektronového mikroskopu. Větší a kulatější buňky s hrubým povrchem jsou bílé krvinky; menší ploché buňky s hladkým povrchem jsou červené krvinky.



Obrázek 19-36 Hematopoetická kmenová buňka a její potomstvo. Hematopoetická kmenová buňka se za normálních okolností dělí málokdy a vytváří specializovanější buňky, které dělením dávají vznik zralým krevním buňkám, které se nacházejí v krevním oběhu. Makrofágy, které se nacházejí v mnoha tkáních těla, a osteoklasty, které odbourávají kostní matrix, pocházejí ze stejného prekursoru jako některé další typy tkáňových buněk, které nejsou v schématu zakresleny.

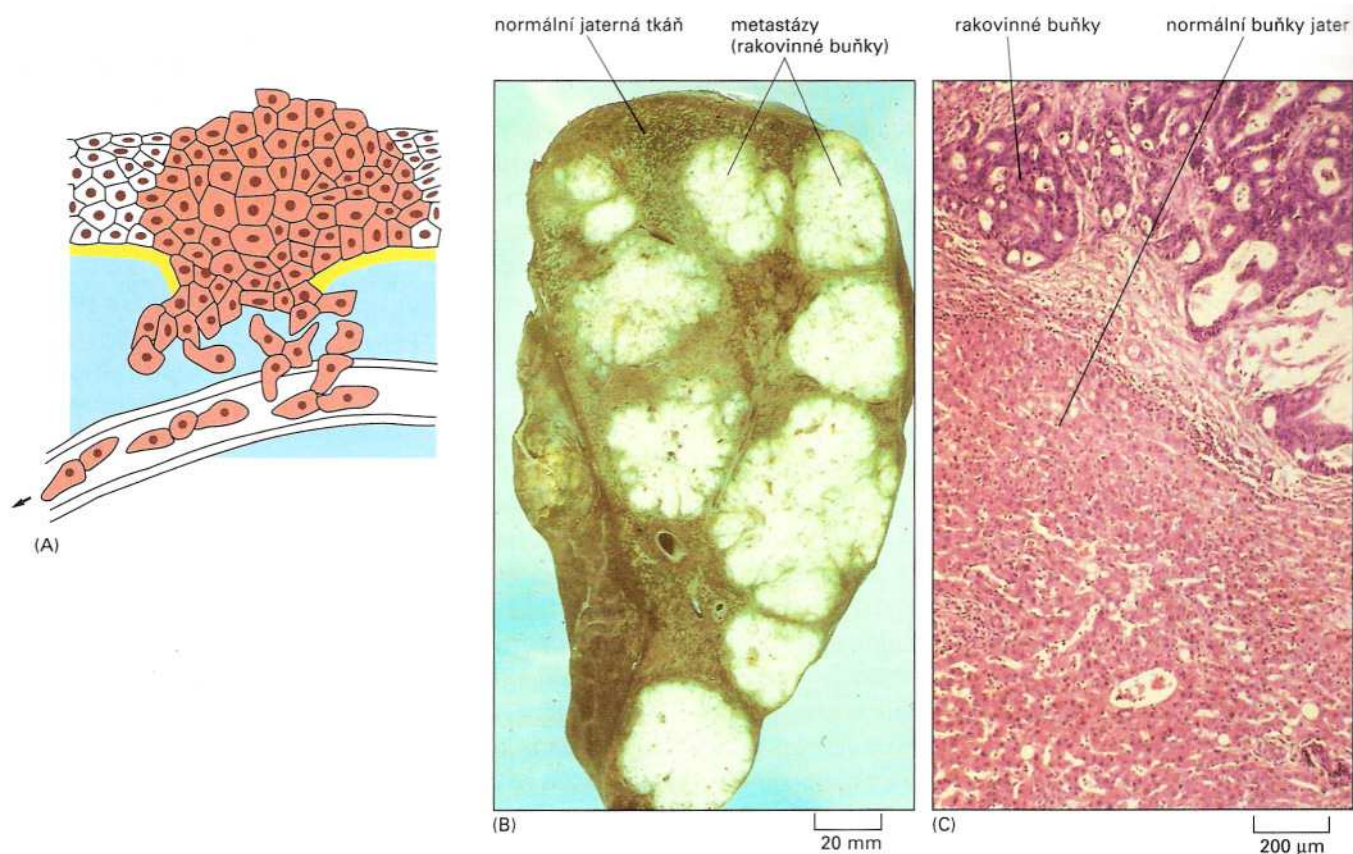
a myš je tak zachráněna před smrtí na anemii. Obdobný přístup je základem léčby leukemií u lidí pomocí transplantace kostní dřeně.

Mutace v jedné dělicí se buňce mohou způsobit narušení normální kontroly této buňky i jejího potomstva

Obnova tkáně vyžaduje komplexní kontrolu, která koordinuje chování jednotlivé buňky s potřebami organismu jako celku. Buňka se musí dělit, pokud jsou zapotřebí buňky odpovídajícího typu, a zastavit svoje dělení v okamžiku, kdy tyto buňky nutné nejsou; musí žít tak dlouho, dokud jí je zapotřebí a zemřít v případě, kdy je to nutné; musí si udržet příslušný specializovaný charakter a existovat na správném místě a nesmí se zatoulat do jiných oblastí.

Samozřejmě, že ve velkém organismu nedojde k významnému poškození, pokud se příležitostně jedna buňka chová neadekvátně. Ale závažné a potenciálně ničující poškození kontroly se objevují v případě, že se u jedné buňky vyskytnou *genetické* změny, které jí umožní, aby přežila a dělila se v okamžiku, kdy by neměla, a vytvářela tak dceřiné buňky, které se budou chovat stejně špatným způsobem. Organizace tkáně a případně těla jako celku může být poté poškozena neúprosnou expanzí klonu abnormálních buněk. Tato katastrofa se pak označuje jako **rakovina**.

Rakovinné buňky jsou charakterizovány dvěma dědičnými vlastnostmi: (1) ony samy i jejich potomstvo se rozmnožují i bez přítomnosti stimulů k dělení a (2) invadují a kolonizují oblasti, které jsou normálně vyhrazené pro jiné buňky. Právě kombinace těchto vlastností vytváří konkrétní nebezpečí. Buňky, které mají pouze první vlastnost, nadměr-



Obrázek 19-37 Metastázy. (A) Aby na novém místě vznikla kolonie nebo metastáza, musí obvykle buňky primárního nádoru překonat bazální membránu a dostat se přes pojivovou tkáň až do krevního řečiště. (B) Metastázy v lidských játrech, které pocházejí z primárního nádoru tračnicku. Metastázy jsou světle zbarvené masy buněk. (C) Obrázek při větším zvětšení a jinak obarvený ukazuje rozdíl mezi normálními a nádorovými buňkami.

ně proliferují, ale zůstávají nahloučeny pohromadě v jednom místě, mohou vytvořit *nádor (tumor)*, ale v tomto případě se nádor označuje jako *benigni*: obvykle může být chirurgicky čistě a kompletně vyjmut. Nádor je rakovinotvorný pouze tehdy, pokud jeho buňky mají schopnost invadovat do okolní tkáně; v tomto případě hovoříme o *maligních* nádorech. Buňky maligního nádoru s touto invazivní vlastností se mohou od primárního nádoru osamostatnit, vstoupit do krevního nebo lymfatického řečiště a vytvořit sekundární nádory neboli *metastázy* na jiných místech těla (obr. 19-37). Čím více se rakovina šíří, tím těžší je se jí zbavit.

Rakovina je následkem mutace a přirozeného výběru v populaci buněk, které tvoří tělo

Rakovina je genetická choroba – následek patologických změn v informaci nesené DNA. Od ostatních genetických chorob se liší v tom, že mutace způsobující rakovinu jsou převážně *somatické*. To jsou takové, které se objevují v jednotlivých buňkách dospělého těla, na rozdíl od mutací v *zárodečné linii*, které jsou přenášeny zárodečnými buňkami, z nichž se vyvíjí celý mnohobuněčný organismus.

Některé příklady z mnoha různých typů mutací, které se podílejí na vzniku rakoviny, byly v této knize probrány dříve (strany 302-303, 507 a 587-589). Dominantně funkčními mutacemi mohou vznikat **onkogeny**, které vývoj rakoviny podporují; například mutace může způsobit chybu v receptoru pro růstový faktor, takže se buňka a její potomstvo chovají tak, jako kdyby neustále dostávaly signál k dělení, i když tomu tak ve skutečnosti není. A naopak při recesivních mutacích spojených se

ztrátou funkce může dojít k vyštěpení nebo inaktivaci **tumor-supresorových genů**, jejichž normální produkty kontrolují buněčnou proliferaci nebo invazivitu.

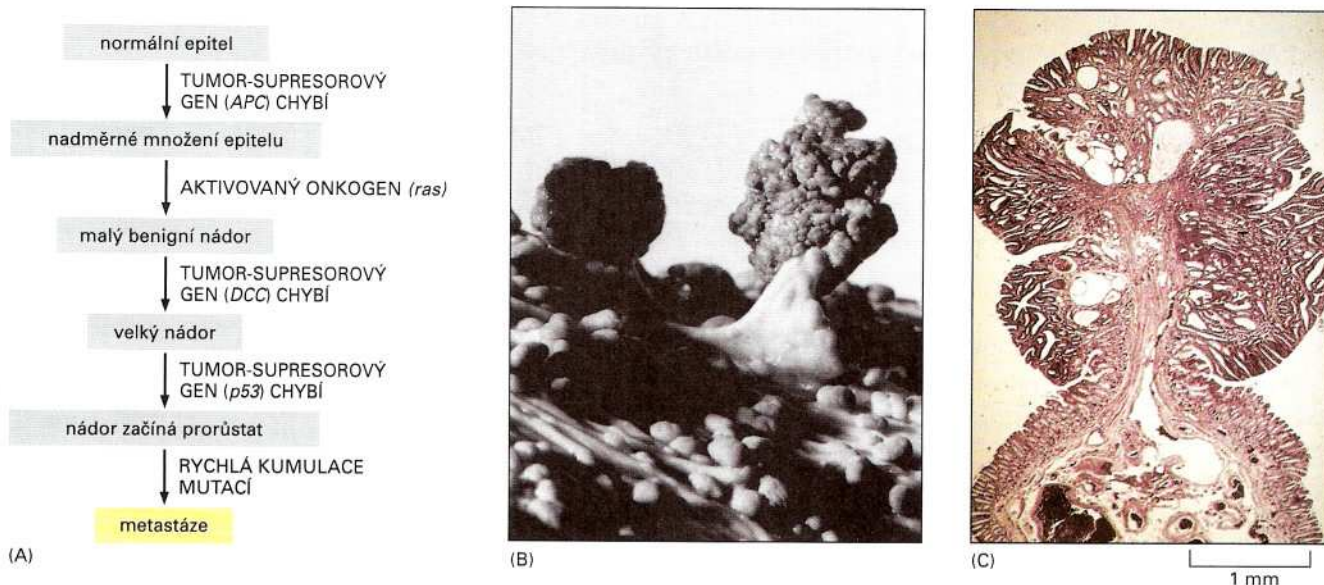
Klíčovým bodem v obou případech je, že tyto mutace neochromují mutované buňky, naopak těmto buňkám poskytují kompetitivní výhodu oproti jejich normálním sousedům. A to je právě to, co vede ke katastrofě u mnohobuněčného organismu jako celku: u rakoviny vedou mutace a přírodní výběr k chaosu v populaci buněk tvořících tělo a rozrušují jeho uspořádanou strukturu.

Pro vznik rakoviny je třeba akumulace mutací

Jak jsme si ukázali v Kapitole 6, jsou mutace nevyhnutelné. Dokonce i v prostředí bez tabákového kouře, radioaktivity a jiných vnějších mutagenů, které nás ohrožují, bude spontánně docházet k mutacím řádově asi 10^{-6} mutací na gen na buněčné dělení – tato hodnota je dána základními omezeními přesnosti replikace DNA a její opravy. V průběhu života se v lidském těle odehraje přibližně 10^{16} buněčných dělení, takže v každém jednotlivém genu genomu dojde pravděpodobně k mutaci přibližně v 10^{10} případech u každého lidského jedince. Z tohoto pohledu není problém rakoviny v jejím vzniku, ale v tom, proč vzniká tak vzácně.

Vysvětlení, které je nyní podpořeno velkým množstvím důkazů, je takové, že k přeměně normální buňky na rakovinnou je třeba více než jedné mutace. Obvykle je třeba pěti nebo šesti nezávislých mutací, které se musí odehrát v jediné buňce, aby získala všechny potřebné vlastnosti. Například epiteliální kmenová buňka v kůži nebo ve výstelce střeva musí projít změnami, které jí nejen umožní se dělit mnohem častěji, než by měla, ale také dovolí jejímu potomstvu uniknout smrti v exponovaném povrchu epitelu, která postihuje normální buňky, což jim umožní odstranit své normální sousedy a dovolí jim vytvořit si krevní zásobení dostačující pro pokračující nádorový růst. Aby tumor začal invadovat, musí dojít k dalším změnám, které umožní buňce dostat se přes bazální membránu epitelu do podložní tkáně, usadit se a přežít na nových místech (obr. 19-38).

Obrázek 19-38 Progrese nádoru při akumulaci mutací. (A) Posloupnost mutací, o kterých se předpokládá, že jsou důležité pro vznik mnoha případů rakoviny tlustého střeva (kolorektálních nádorů). Posloupnost událostí zde nakreslených obvykle trvá deset až dvacet let nebo déle. Začíná ztrátou APC (*adenomatosis polyposis coli*), tumor-supresorového genu, který byl původně identifikován díky studiím pacientů se vzácnou vrozenou predispozicí ke kolorektálním nádorům, které se u nich vyvíjejí v časném věku na mnoha nezávislých místech tlustého střeva. Tito lidé se narodili jen s jednou funkční kopií tohoto genu, proto k úplné ztrátě funkce genu stačí pouze jediná další mutace na rozdíl od dvou somatických mutací, ke kterým musí dojít u geneticky normálního člověka. Ztráta APC iniciuje růst benigního nádoru nazývaného polyp, z kterého po několika dalších mutacích vzniká maligní nádor. (B) U pacientů s vrozenou mutací APC lze ve výstelce tračníku nalézt tisíce polypů (u geneticky normálních lidí mohou být jeden nebo dva). Po několika dalších mutacích budou některé z těchto polypů progradovat a stanou se z nich maligní nádory, pokud není tkáň chirurgicky odstraněna. (C) Příčný řez jedním takovýmto polypem; všimněte si nadměrného množství hluboce zanořeného epitelu.



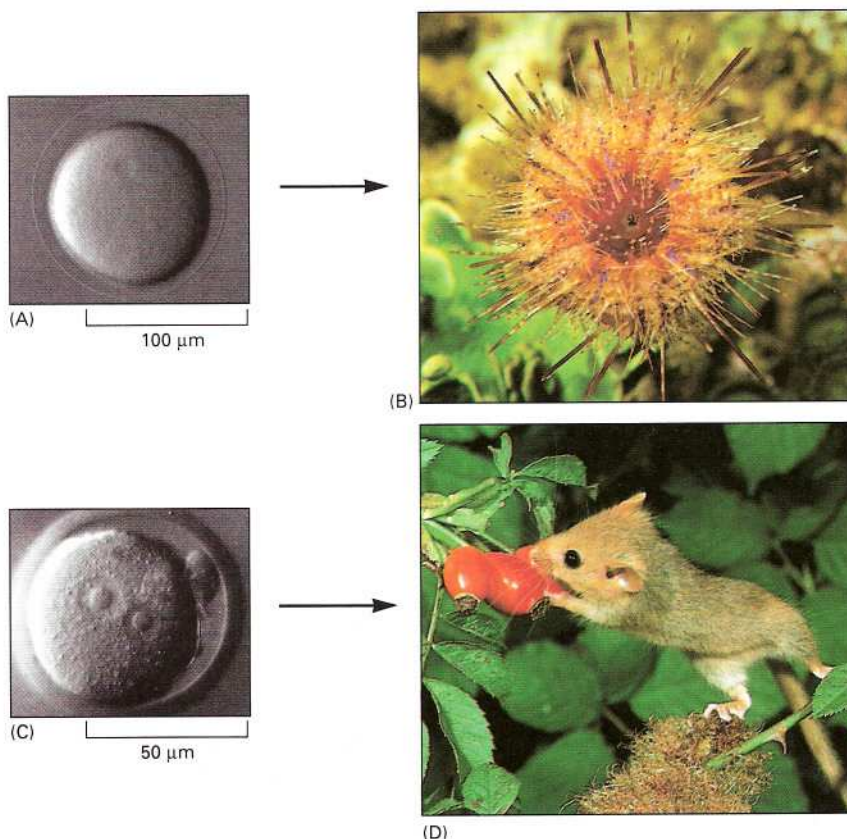
Mutace vedoucí ke vzniku rakoviny se neobjevují najednou, ale postupně se hromadí v průběhu mnoha let. Jak původní populace mutančních buněk roste, pomalu se vyvíjí: u těchto buněk se objevují nové náhodné mutace a některé z nich jsou upřednostňovány přírodním výběrem. Nakonec se objeví buňky, které mají všechny abnormality potřebné k plnému vývoji rakoviny.

Rakovina je tedy typickou nemocí staršího věku, protože nahromadění velkého množství somatických mutací v jednotlivé linii buněk trvá dlouhou dobu. Občas však mají někteří jedinci vrozenou zárodečnou mutaci v tumor-supresorovém genu nebo onkogenu; u těchto lidí je množství dalších mutací potřebných pro vznik rakoviny menší a tato nemoc se objevuje s vyšší frekvencí a v průměru v časnějším věku. Rodiny s takovými mutacemi jsou proto neobyčejně náchylné ke vzniku rakoviny.

Vývoj

Embryonální vývoj představuje opačný princip, než je rakovina. Rakovina rozrušuje uspořádanou architekturu těla, zatímco při vývoji se vytváří. Při rakovině se buňky chovají nepatřičně jako výsledek náhodných mutací v sekvenci jejich DNA. Při vývoji je sekvence DNA zachována nezměněna a buňky mění své chování pomocí kontrolovaných změn ve formě genové exprese. Základní principy rakoviny již byly objeveny a zdají se být samozřejmé; ale vývoj, přestože jsme ho nyní začali poznávat, zůstává hluboce udivujícím procesem.

Otázka 19-8 V lidském těle dojde v průběhu života k 10^{16} buněčným dělením, nicméně lidské tělo se skládá z 10^{12} buněk. Proč se tato dvě čísla tak liší?



Obrázek 19-39 Genom vajíčka určuje strukturu buněčného klonu, který se z něj vyvine. (A a B) Z vajíčka mořské ježovky vzniká mořská ježovka; (C a D) z myšího vajíčka vzniká myš.

Vývoj začíná u jediné buňky – oplozeného vajíčka. To se opakovaně dělí a vzniká tak klon buněk – u člověka více než 1 000 000 000 000 – obsahující stejný genom, ale různě specializovaných. Tento klon má strukturu – může mít podobu sedmikrásky nebo vysokého dubu, mořské ježovky, velryby nebo myši (obr. 19-39). Tato struktura je určena genomem, který dané vajíčko obsahuje. Lineární sekvence nukleotidů A, G, C a T v DNA řídí tvorbu množství odlišných buněčných typů, z nichž každý exprimuje odlišnou sadu genů, a jež jsou uspořádány v přesnou, složitou trojrozměrnou strukturu. Problémem zůstává vysvětlit, jak se vše odehrává.

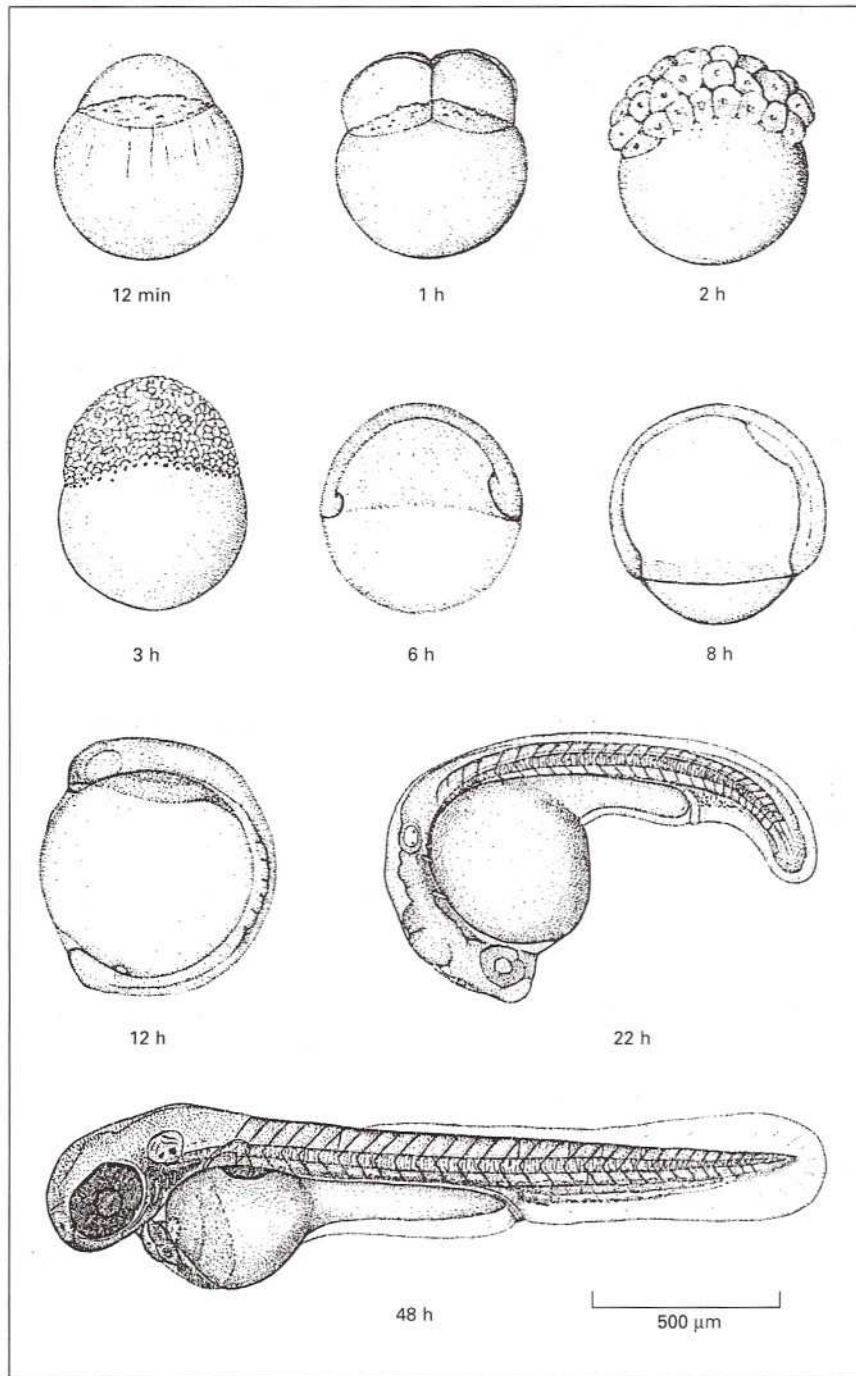
Programovaný pohyb buněk vytváří plán těla živočichů

Ačkoliv může být konečná struktura živočišného těla úžasně komplexní, je vytvářena omezeným repertoárem buněčných aktivit. Jak jsme si ukázali v předcházejících kapitolách, buňky rostou, dělí se a umírají; vytvářejí mechanická přichycení a vyvíjejí síly důležité pro pohyb; diferencují se zapínáním nebo vypínáním tvorby specifických sad proteinů; produkuje molekularní signály ovlivňující sousední buňky a odpovídají na signály, které sousední buňky uvolňují. Genom, který je v každé buňce stejný, určuje pravidla, podle kterých jsou tyto různé možné buněčné aktivity uplatňovány. Díky svému působení v každé jednotlivé buňce řídí genom celý složitý mnohobuněčný proces vývoje, kterým vzniká dospělý organismus z oplozeného vajíčka.

Strategie vývoje je dosti jednoduchá na to, aby se o ní mluvilo abstraktně, ale mnohem těžší je převést ji do konkrétních mechanismů a funkcí specifických genů. Prvním krokem je naučit se anatomii tohoto procesu u vybraného organismu – sledovat buňky, jak se dělí, pohybují a specializují, aby vytvořily strukturu těla. To může být překvapivě těžký úkol dokonce i u embrya, které je průhledné a snadno manipulovatelné. Obrázek 19-40 ukazuje sérii stadií ve vývoji jednoho takového embrya ryby zebříčky. Vajíčko je asymetrické s velikou zásobou žloutku ve své spodní části a s průhlednou cytoplasmou obsahující jádro nad ním. Oplození vajíčka spouští dělení (*rýhování*) této buňky na mnoho menších buněk, které potom vykonávají složitě série pohybů. Zatímco některé buňky putují jako samostatná individua, jiné se spojují mezibuněčnými spoji a pohybují se organizovaně jako epiteliální list. Klíčovým krokem v časném vývoji ryb, stejně jako u každého druhu živočichů, je vytvoření střeva vchlípením buněk z vnějšku dovnitř – procesem nazývaným *gastrulace*. Gastrulace vede jednoduše a rychle k dalšímu pohybu buněk a s magickou uhlazeností kouzelnického triku jsou brzy rozeznatelné základy všech hlavních znaků těla obratlovců: hlava a ocas, hřbet a břicho, oči, uši, mozek, svalovina, srdce, střevo.

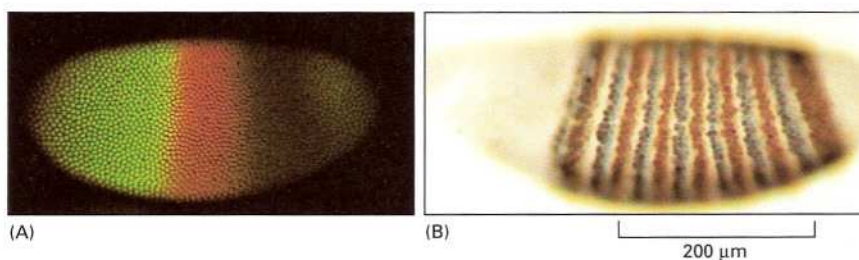
Buňky zapínají odlišné sady genů podle své polohy a historie

Pohybům, kterými se vytvářejí jednotlivé části těla, předcházejí biochemické změny: buňky v různých částech embrya produkují odlišné sady proteinů, které kontrolují jejich adhezivitu, pohyblivost a jejich biochemický osud. V době, kdy většina buněk v embryu vypadá stejně, a tedy dlouho před tím, než jsou viditelně diferencovány, je možné prokázat komplexní změny v programu exprese různých genů, které kódují regu-



Obrázek 19-40 Vývojová stadia embrya ryby *dania pruhoaného*. Díky složitému pohybu buněk a buněčné diferenciaci se oplozené vajíčko během 48 hodin přemění v rozeznatelný rybí potěr.

lační proteiny (obr. 19-41). Hlavním problémem vývoje – někteří by řekli tím *nejhlavnějším* problémem vývoje – je porozumění mechanismům, které vytvářejí tyto a ještě mnohem složitější prostorové programy geno-



Obrázek 19-41 Charakteristická genová exprese v časném embryu *drosofilu*. Buňky se nezačaly ještě zřetelně diferencovat, ale již exprimují různé regulační geny vzhledem ke své poloze v embryu. (A) 2,5 hodiny po oplození jsou na těle rozeznatelné rozsáhlé oblasti charakteristické genové exprese; zde bylo k zobrazení genové exprese dvou genů - *hunchback* (zeleně) a *Krüppel* (červeně), kódujících regulační proteiny, použito fluorescenčně značených protilátek. (B) 3,5 hodiny po oplození je budoucí segmentovaná struktura těla již zřetelně naznačena expresí mnoha dalších genů; dva z nich, které jsou zde ukázány, se nazývají *even-skipped* (šedě) a *fushi-tarazu* (hnědě).

Obrázek 19-42 Zpřesňování struktury opakovanou signalizací.

Posloupnost signálů způsobujících změny ve vlastnostech buněk může vytvořit složitou strukturu zahrnující mnoho buněk, přestože se začalo u jednoduché struktury s několika buňkami.

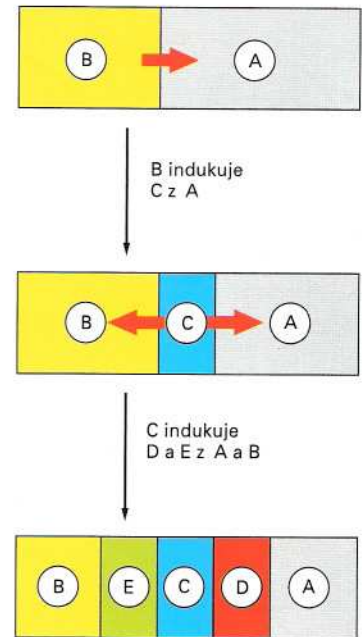
vé exprese, které se vyvíjejí následně. Jak je zajištěno, že každá buňka v embryu zapne specifickou sadu genů vzhledem ke své poloze?

U mnoha druhů lze původ tělního plánu vystopovat v asymetrii vajíčka nebo v jeho původním okolí. Tyto původní asymetrie vedou k rozdílům mezi buňkami vytvářenými rýhováním a tyto časné rozdíly dávají kaskádovitě vznik dalším odlišnostem. Obecně buňky fungují jako zdroje signálních molekul, které ovlivňují ostatní buňky ve svém okolí. Buňky v rozdílných vzdálenostech od takového zdroje jsou vystaveny signálům o různé intenzitě, čímž jsou vyvolány rozdílné odpovědi. Některé z odpovídajících buněk začínají jako odpověď produkovat nové signály. Tímto způsobem je původní hrubý plán modifikován a doplněn mnohem jemnějšími a složitějšími detaily (obr. 19-42).

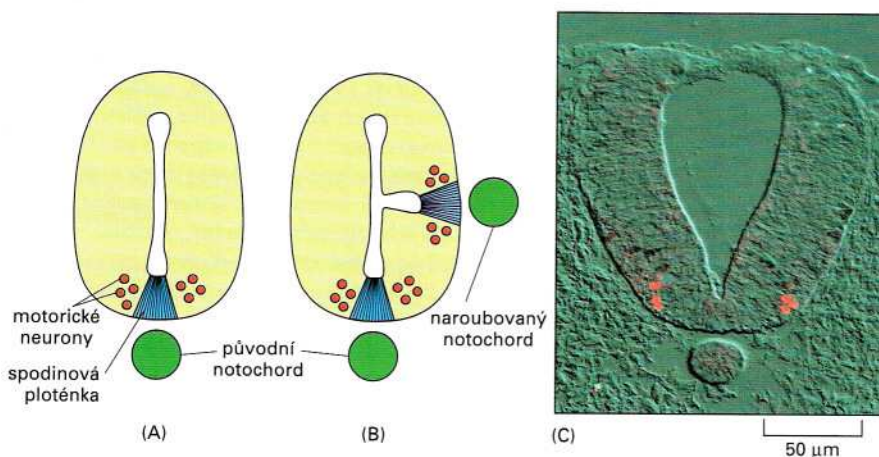
V tomto procesu **formování tělního plánu** je každá buňka vystavena posloupnosti signálů. Tyto signály jsou dočasné, ale buňka si je dokáže pamatovat: **buněčná paměť** uvnitř zachovává stopy signálů, kterým byla buňka vystavena – historie záznamů se odráží v genomu ve formě trvalého, stabilního stavu aktivace nebo represe určitých genů (Kapitola 8). Chování buňky je tedy řízeno nejen jednoduše vazbami se současným okolím, ale též akumulací zapamatovaných informací. Může být ukázáno tisíce příkladů využití těchto principů při formování tělního plánu; zde však máme místo pouze na dva nebo tři.

Difuzní signály mohou poskytnout buňkám polohovou informaci

Během gastrulace embrya obratlovců se některé z buněk, které se vchlípily dovnitř, specializují a spojují dohromady, takže vytvářejí tyčkovitou strukturu, *notochord* (je vidět na obr. 19-25 B). Je to předchůdce páteře obratlovců a definuje hlavní osu těla. Nad notochordem leží *neurální destička*, velká plocha epiteliálních buněk na vnější straně embrya, která se stáčí a vytváří nervovou trubici (viz obr. 19-25 A). Notochord vysílá signály kontrolující místní specializaci buněk v neurální destičce a v nervové trubici. Buňky, které leží podél středu, nejbližší k notochordu, se diferencují ve strukturu nazývanou *spodinová ploténka*; buňky o něco více vzdálené od notochordu po obou dvou stranách spodinové



Otázka 19-9 Během časného vývoje mnoha druhů se buňky dělí extrémně rychle a transkripce je zastavena, takže se nevytváří žádná nová mRNA. Transkripce tedy nemůže být regulována. Znamená to, že se buňky nemohou vzájemně odlišit, když jsou u nich aktivní stejné sady genových produktů? Vysvětlete svou odpověď.



Obrázek 19-43 Signalizace z notochordu řídí tvorbu struktur embryonálního centrálního nervového systému.

(A) Nákres příčného řezu normální strukturou: buňky nejbližší notochordu dostávají nejsilnější signály a diferencují v ploténku nervové trubice, zatímco ze vzdálenějších buněk se stávají motorické neurony. (B) Účinek transplantace druhého notochordu do jiného místa, než normálně leží. (C) Příčný řez nervovou trubicí a notochordem dvoudenního kuřecího embrya. Motorické neurony se právě začaly vyvíjet; jejich jádra jsou obarvena červeně specifickou protilátkou.

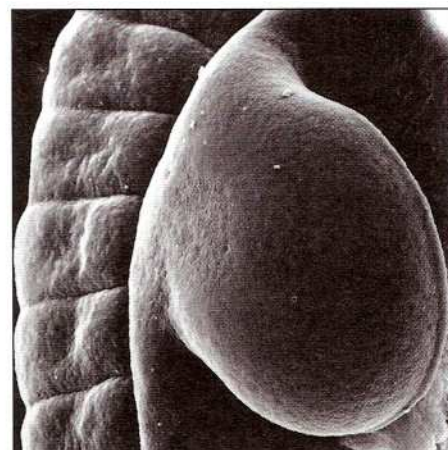
Obrázek 19-44 Křídelní pupen kuřecího embrya na snímku z řádkovacího elektronového mikroskopu.

ploténky se specializují v prekursory motorických neuronů (obr. 19-43 A). Pokud je kuřecímu embryu implantován druhý notochord na jednu stranu od centrální osy, vytvoří se v boční stěně centrálního nervového systému druhá spodinová ploténka lemovaná motorickými neurony vedle implantovaných buněk (obr. 19-43 B).

Signál z notochordu byl již identifikován – jde o secernovaný signální protein produkovaný genem nazývaným *sonic hedgehog*. Mutace tohoto genu způsobuje u myši a lidí ztrátu středových struktur v centrálním nervovém systému: v extrémních případech se embryo vyvíjí jako *kyklop* s jedním okem uprostřed obličeje a základy nosu s jedním nosním otvorem ve středu čela.

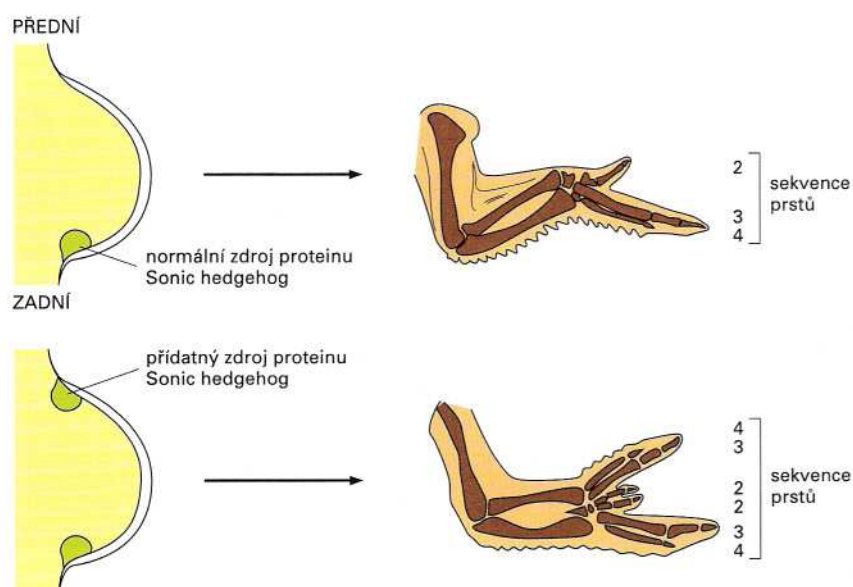
Pokud máme gen vyklonovaný, můžeme vytvořit sondu a zjistit, v kterých buňkách je exprimován pomocí techniky hybridizace *in situ* (viz strany 323-324). Tak bylo odhaleno, že mRNA pro Sonic hedgehog se nenachází pouze v notochordu, ale také například v každém končetinovém pupenu – jazykovitém výrůstku na boku embrya obratlovců, z kterého se vyvíjejí nohy, ruce, křídla nebo ploutve (obr. 19-44). Exprese genu *sonic hedgehog* je zde omezena pouze na malou oblast tkáně na posteriorní straně každého pupenu (malíková strana). Pokud je další zdroj proteinu Sonic hedgehog uměle umístěn na opačnou, anteriorní stranu končetinového pupenu (palcová strana), vyvine se končetina se zrcadlově zduplikovanými prsty (obr. 19-45): charakteristika každého prstu, který se vyvíjí – jeho délka, tvar a vnitřní struktura – je dána jeho vzdáleností od zdrojů proteinu sonic hedgehog. Očividně tedy koncentrace tohoto proteinu nebo nějakého faktoru kontrolovaného tímto proteinem poskytuje buňkám v končetinovém pupenu *polohovou informaci*: buňky odpovídají změnami v expresi genů, které regulují způsob, jakým buňky vzájemně interagují jedna s druhou, aby vytvořily kosti, šlachy a kůži příslušného typu prstu.

Příklad proteinu Sonic hedgehog ukazuje, jak je jeden a týž signální protein opakovaně využit v mnoha krocích vývoje. Různé skupiny



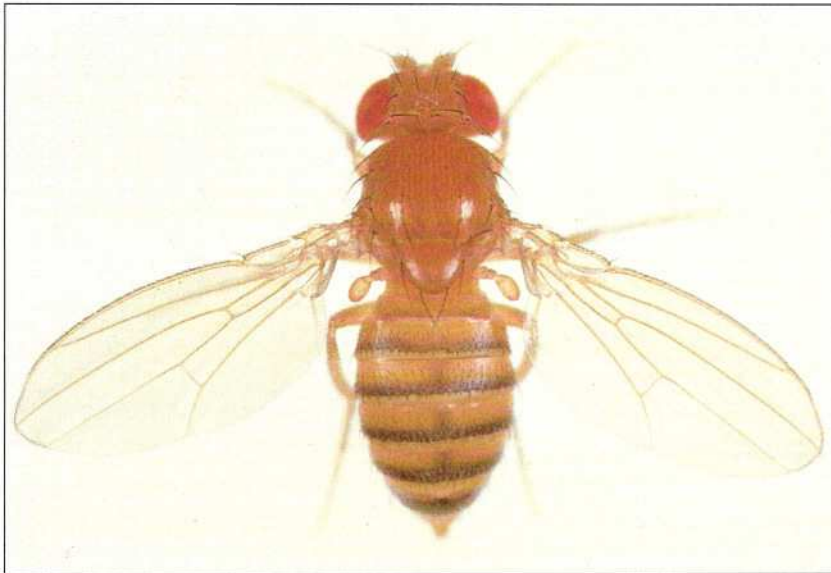
500 μm

Otázka 19-10 Zabýváte se studiem vývoje jednorozce a tušíte, že Sonic hedgehog by mohl být tím signálem, který spouští vývoj rohu uprostřed jeho čela. Testujete tuto hypotézu injekcí proteinu Sonic hedgehog na jednu stranu hlavy: vytváří se zde druhý roh. Mezitím kolega, který se také zabývá embryologií jednorozců, objevil mutantní kmen jednorozců, u kterých není nikde v blízkosti vyvíjejícího se rohu Sonic hedgehog exprimován, a přesto se roh vyvíjí normálně. Jaké závěry můžete učinit o roli proteinu Sonic hedgehog při indukci tvorby rohu?



Vývoj

Obrázek 19-45 Signalizace proteinem Sonic hedgehog při vývoji končetiny. Gen *sonic hedgehog* je normálně exprimován v části buněk na posteriorní straně končetinového pupenu; experimentální přidání druhého zdroje proteinu Sonic hedgehog na anteriorní stranu křídlového pupenu u kuřete způsobí zrcadlovou duplikaci rozložení prstů.



Obrázek 19-46 Moucha octomilka (*Drosophila melanogaster*).

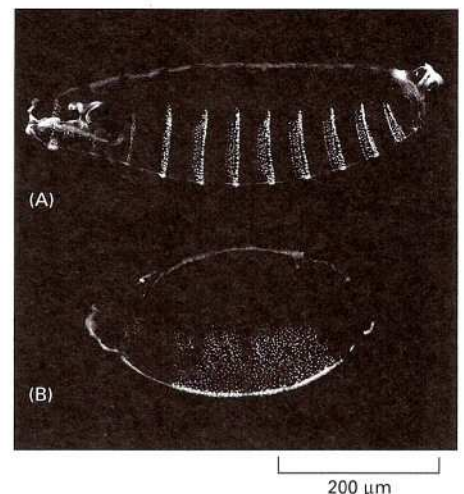
buněk interpretují tento signál různě podle jejich zapamatované vývojové historie: buňky centrálního nervového systému reagují na silný signál vytvořením spodinové ploténky nervové trubice, zatímco buňky končetinového pupenu reagují vytvořením malíčku. Sonic hedgehog představuje jednu z několika rodin signálních proteinů, jež jsou všechny dohromady nejspíše zodpovědné za organizaci plánu většiny těla. Díky buněčné paměti očividně postačuje k vytvoření obrovského množství vysoce komplikovaných struktur několik základních signálních mechanismů.

Studie drosofilly poskytly klíč k porozumění vývoji obratlovců

U octomilky čili drosofilly (obr. 19-46) je poměrně snadné vytvářet mutanty a analyzovat je. Díky heroickému úsilí, které zahrnovalo tvorbu a zkoumání stovek tisíců mutantních muších embryí v mnoha různých laboratořích, bylo možné u drosofilly identifikovat téměř každý gen, po jehož zmutování vznikne viditelná vývojová aberace. Klonováním těchto genů kontrolujících vývoj a použitím jejich sekvencí DNA jako sond pro hledání obdobných sekvencí DNA v genomu obratlovců bylo možno prokázat, že většina – možná téměř všechny – z genů kontrolujících vývoj u drosofilly má své homology u obratlovců, kde vykonávají obdobné funkce. Rozsáhlý seznam těchto genů u drosofilly tak poskytl klíč k dešifrování problému vývoje obratlovců.

Genová rodina, do které patří *sonic hedgehog* – genová rodina *hedgehog* – byla ve skutečnosti objevena právě touto cestou a své jméno získala podle vzhledu embryí drosofilly, u kterých byl gen mutován. Mikroskopické trny (zubovité výběžky), které normálně pokrývají břišní povrch larev v proučcích, u mutantů tento povrch pokrývají zcela a odrážejí tak radikální změny v organizaci každého ze segmentů tvořících tělo hmyzu (obr. 19-47). (Pozn. překladatele: larva pak připomíná

Obrázek 19-47 Mutace *hedgehog* u drosofilly. (A) Normální časná larva drosofilly má na svém břišním povrchu pruhy mikroskopických trnů (zubatých výběžků). (B) Mutace *hedgehog*: trny pokrývají břišní povrch larvy stejnoměrně.



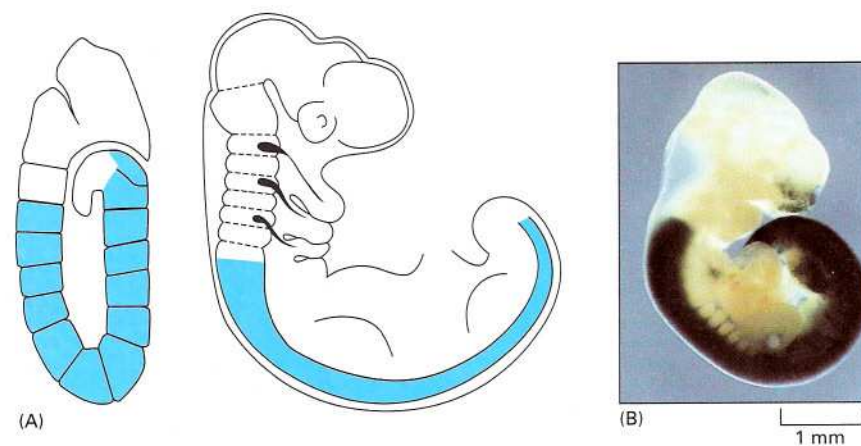
Obrázek 19-48 Účinek mutace v homeotickém (*Hox*) genu - v tomto případě v genu *Antennapedia*. Tykadla jsou přeměněna v nohy; srovnajte s normální drosofilou na obr. 19-46.



ježka, anglicky *hedgehog*.) Stejně jako u obratlovců funguje tento protein ve vývoji opakovaně v různých časech a místech a poskytuje buňkám polohovou informaci. Některé funkční paralely jsou si neuvěřitelně blízké: například jako kontroluje protein Sonic hedgehog anterioposteriorní (od palce k malíku) vzhled křídla kuřete, tak protein hedgehog kontroluje anterioposteriorní organizaci křídel drosofilu.

Podobné geny jsou využívány v celé živočišné říši, aby poskytovaly buňkám vnitřní záznam o jejich poloze

Výrazné podobnosti mezi hmyzem a obratlovců, objevené molekulárními genetiky, udivily vývojové biology a vnesly revoluci do celkového chápání vývoje. Paralely se netýkají pouze signálních molekul a jejich proteinových receptorů, ale také větší a mnohem komplexnější sady komponent, díky kterým buňky interpretují a zaznamenávají signály a reagují na ně. Mnoho z těchto komponent jsou regulační proteiny. Příkladem je gen *Pax-6/ey*, který funguje jako řídicí regulátor vývoje oka (viz strana 273). Ale pravděpodobně nejlepším příkladem jsou geny drosofilu zachovávající v každé buňce vnitřní záznam o tom, do kterého segmentu těla podél osy hlava-ocas patří. Mutace v genech této sady – v takzvaných *homeotických selekčních genech* neboli *Hox-genech* – dávají vznik buňkám s chybnou informací o jejich umístění: mutantní mouše mohou místo tykadla na hlavě vzniknout nohy (obr. 19-48) nebo jí vyroste jeden pár křídel navíc z tělního segmentu, na kterém by žádná křídla neměla být. Jedné sadě *Hox*-genů u drosofilu odpovídají čtyři sady genů u obratlovců; všechny jsou homologní se sadou u drosofilu a všechny se obdobně podílejí na specifikaci rozdílů mezi buňkami podél hlavní tělní osy hlava-ocas (obr. 19-49). U *Hox*-genů bylo nyní prokázáno, že obdobnou funkci ve formování hlavní tělní osy nevykonávají pouze u hmyzu a obratlovců, ale také u měkkýšů, hlístů a polypů – tedy skutečně u všech tříd živočichů. Podobně jako signální molekuly poskytující polohovou informaci jsou také *Hox*-geny, které tuto informaci zaznamenávají do buněčné paměti, využívány v jiných částech těla – například v končetinách obratlovců, stejně tak jako podél hlavní tělní osy.



Obrázek 19-49 *Hox*-geny určují polohu podél hlavní tělní osy u téměř všech živočichů. (A) Nákres ukazuje rozložení exprese genu *Antennapedia* u embrya drosofilu (vlevo) ve srovnání s odpovídajícím *Hox*-genem (*Hoxb-6*) u myšního embrya (vpravo). Expresce genu *Antennapedia* nebo jeho homologu u obratlovců buňkám říká, že se nacházejí spíše v posteriorní než anteriorní části embrya. U mutantní mouchy ukázané na obr. 19-48 je tento gen nepatřičně exprimován v buňkách, z kterých by měly vznikat tykadla (anteriorní struktura), a proto místo nich vznikají nohy (posteriorní struktura). (B) Fotografie rozložení genové exprese *Hox*-genu (*Hoxb-4*) u myši ukazuje, jak ohraničuje posteriorní tkáně od anteriorních. *Hox*-geny mají své hranice exprese v různých úrovních podél tělní osy.

Současný pokrok ve vývojové biologii je rychlý podobně jako závěr skládání mozaikové hádanky (puzzle) – roztroušené fragmenty začínají pasovat dohromady jako součásti logicky promyšleného celku. Organismy, které byly dříve považovány za zásadně odlišné, se nyní jeví jako v podstatě podobné. Více a více se zdá, že zázrak vývoje nespočívá v komplexitě výsledku, ale v úžasné ekonomice prostředků, kterými je dosažen. Během dlouhého evolučního procesu byla relativně jednoduchá sada buněčných biologických triků opakovaně aplikována a adaptována nekonečně mnoha vynalézavými způsoby, aby řídila buněčné chování tak, že vznikly všechny tyto fantastické odlišnosti mnohobuněčných živočichů, které se na Zemi nyní nacházejí.

Krajská knihovna
v Pardubicích

Základní shrnutí

- Tkáně jsou složeny z buněk a extracelulární matrix.
- U rostlin je každá buňka obklopena extracelulární matrix ve formě buněčné stěny, která je tvořena celulosou a dalšími polysacharidy.
- Nahé rostlinné buňky jsou křehké, ale mohou vyvíjet osmotický a turgorový tlak na obklopující stěnu, a tak udržet pletivo pevné.
- Celulosa vláknitá zajišťují rostlinným buněčným stěnám pevnost v tahu, zatímco jiné složky stěny jí udílejí odolnost vůči tlaku.
- Orientace, ve které je celuloza ukládána, kontroluje směr buněčného růstu.
- Živočišné pojivové tkáně poskytují mechanickou oporu a jsou tvořeny extracelulární matrix s řídkou roztroušenými buňkami.
- Organické složky matrix jsou vytvářeny specifickými buňkami pojivové tkáně, které jsou matrix obklopeny (u většiny pojivových tkání se nazývají fibroblasty).
- Pevnost v tahu je v extracelulární matrix živočichů zajišťována vláknitým proteinem kolagenem.
- Napětí je přenášeno z cytoskeletu buněk pojivové tkáně na kolagenová vlákna přes transmembránový protein integrin a extracelulární protein fibronektin.
- Glukosaminoglykany (GAG) v komplexu s proteiny vytvářejí proteoglykany, které fungují jako prostorová výplň a poskytují odolnost vůči tlaku.
- GAG jsou záporně nabitými polysacharidy; vážou množství malých kladně nabitých iontů, které osmozou přitahují vodu a vytváří se tak turgorový tlak.
- Buňky spojené k sobě do epitelů vystylají všechny vnější a vnitřní povrchy živočišného těla.
- Na rozdíl od pojivových tkání je napětí v epitelech přenášeno přímo z buňky do buňky přes mezibuněčné spoje.
- Proteiny z rodiny kadherinů procházejí membránou epitelu a vážou se k podobným kadherinům sousední epitelu.
- U mechanických spojů jsou kadheriny intracelulárně připojeny k aktinovým filamentům; u desmosomů jsou připojeny ke keratinovým filamentům.
- Aktinové svazky propojené z jedné buňky do druhé v rámci celého epitelu se mohou stahovat a způsobovat tak ohýbání epitelu.
- Hemidesmosomy připojují bazální část epitelu k bazální membráně.
- Těsné spoje pevně připojují jednu epitelu k druhé a vytváří tak bariéru, čímž zabráňují difuzi epitemem.
- Vodivé spoje vytvářejí kanály umožňující průchod malých molekul a iontů z buňky do buňky; plasmodesmata rostlin mají stejnou funkci, ale jinou strukturu.
- Většina tkání u obratlovců je složitou směsí buněčných typů, které jsou neustále obnovovány.
- Nové terminálně diferencované buňky vznikají z kmenových buněk.
- Organizace tkáně je aktivně udržována buněčnou komunikací, selektivní mezibuněčnou adhezí a buněčnou pamětí.
- Rakovinné buňky sobecky narušují řád, který za normálních okolností udržuje organizaci tkáně:

proliferují, když by neměly, a invadují do oblastí, kam by neměly.

- Rakovina vzniká akumulací mnoha somatických mutací v jedné buněčné linii.
- V embryonálním vývoji zdědí všechny buňky od oplozeného vajíčka stejný genom a stanou se odlišnými díky kontrolovaným změnám genové exprese.
- Genom přítomný v každé buňce určuje pravidla buněčného chování, na základě kterých se vytváří plán mnohobuněčného těla.
- Buňky slouží jako zdroj signálních molekul, které poskytují okolním buňkám polohové informace, které ovlivňují buněčnou specializaci.

- Uspořádání specializovaných buněk je postupně zpřesňováno po sobě jdoucími signály.
- Několik stejných základních signalizačních mechanismů je opakovaně použito při různých příležitostech.
- Stejně signály mohou buňky interpretovat odlišně vzhledem ke svému genomu a své vývojové historii.
- Buňky obratlovců a bezobratlých živočichů využívají podobné základní sady genů k vysílání, detekci, interpretaci a zaznamenání signálů, které řídí vývoj.

Klíčová slova

apikální

bazální

bazální membrána

buněčná paměť

buněčná stěna

buněčné spoje

desmosomy

extracelulární matrix

glukosaminoglykan

hemidesmosomy

Hox-geny

kadherin

kmenová buňka

kolagen

mechanické spoje

onkogen

rakovina

těsný spoj

tkáň

tumor-supresorový gen

vodivé spoje

vytváření organizace

vývoj

Slovníček základních pojmů

A-kináza (cAMP-dependentní proteinkináza)

Enzym, který fosforyluje cílové proteiny v odpověď na vzrůst intracelulárního cyklického AMP.

acetyl-CoA (acetylkoenzym A)

Malá molekula rozpustná ve vodě, která v buňkách přenáší acetylové skupiny. Obsahuje acetylovou skupinu spojenou s koenzymem A (CoA) thioesterovou vazbou, která snadno podléhá hydrolyze.

acetylová skupina

Chemická skupina odvozená od kyseliny octové.



acylová skupina

Funkční skupina odvozená od karboxylové kyseliny. (R představuje alkylovou skupinu, například methyl).



adaptače

Nastavení citlivosti buňky nebo organismu podle opakované stimulace. Umožňuje odpověď dokonce i v případě, kdy je stimulační pozadí vysoké.

adenylátcykláza

Membránový enzym, který katalyzuje tvorbu cyklického AMP z ATP. Důležitá složka některých intracelulárních signálních drah.

adhezí spoj

Buněčný spoj, ve kterém je cytoplasmatická strana spojovací membrány připojena k aktinovým vláknům.

ADP (adenosin-5'-difosfát)

Nukleotid, který vzniká hydrolyzou ATP, při níž se v reakci s vodou odštěpí koncová fosforylová skupina (viz obr. 3-25)

adresová sekvence

Aminokyselinová sekvence, která navádí protein do specifických míst v buňce, například do jádra, do mitochondrie či do endoplasmatického retikula (u proteinů směřujících do ER se používá označení **signální sekvence**).

akceptor elektronů

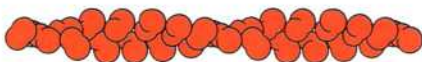
Atom nebo molekula, která ochotně přijímá elektrony. Když molekula přijme elektron, dostává se do redukovaného stavu.

akční potenciál

Rychlý, krátce trvajícím a sám sebe šířícím elektrický signál v plasmatické membráně takových buněk, jako jsou neurony či buňky svalu. Nervový impuls.

aktinové vlákno (aktinové filamentum, množné číslo

filamenta)
Proteinové vlákno o průměru asi 7 nm, tvořené řetězcem globulár-



ních aktinových molekul. Hlavní složka cytoskeletu všech eukaryontních buněk a zvláště hojně v buňkách svalů.

aktivační energie

Dodatečná energie, kterou musí molekula získat, aby mohla překonat energetickou bariéru a zúčastnit se určité chemické reakce.

aktivátor

V bakteriích, protein který se váže ke specifické oblasti DNA, aby umožnil transkripci sousedního genu.

aktivní místo

Oblast povrchu enzymu, ve které se váže molekula substrátu před tím, než podstoupí katalyzovanou reakci.

aktivní transport

Pohyb molekuly přes membránu poháněný hydrolyzou ATP nebo jinou formou metabolické energie.

aktivovaný nosič

Malá molekula nesoucí chemickou skupinu připojenou vazbou s vysokým obsahem energie, sloužící jako zdroj energie nebo donor chemické skupiny v mnoha různých chemických reakcích. Příklady jsou ATP, acetyl-CoA a NADH.

aldehyd

Reaktivní organická sloučenina, která obsahuje skupinu $-\text{CH}=\text{O}$. Příkladem je glycerinaldehyd.

alkalický - viz zásaditý

alkan

Sloučenina vytvořená z uhlíkových a vodíkových atomů, která obsahuje jen jednoduché kovalentní vazby. Příkladem je ethan.



alken

Uhlovodík s jednou nebo více dvojnými vazbami mezi uhlíky. Příkladem je ethen neboli ethylen.



alkin

Uhlovodík s jednou nebo více trojnými vazbami mezi uhlíky. Příkladem je ethin neboli acetylen.

alkohol

Organická sloučenina obsahující hydroxylovou skupinu ($-\text{OH}$) připojenou ke čtyřvaznému atomu uhlíku. Příkladem je ethylalkohol neboli ethanol.

alkylová skupina

Obecný termín pro skupinu kovalentně spojených atomů uhlíku a vodíku. Příkladem jsou skupiny methylová ($-\text{CH}_3$) a ethylová ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$).

allosterický protein

Protein, který existuje ve dvou nebo více konformacích závislých na navázání molekuly (ligandu) do jiného místa než katalytického. Allosterické proteiny složené z více podjednotek většinou odpovídají na navázání ligandu souhrou všech částí.

améba (měňavka)

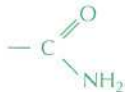
Obecný název pro volně žijící jednobuněčné masožravé prvky, kteří se pohybují plazením. *Amoeba proteus* je obrovská sladkovodní měňavka široce využívaná při zkoumání plazivého pohybu buněk.

amfipatický

Mají hydrofobní i hydrofilní oblasti. Příkladem jsou molekuly fosfolipidů nebo detergentů.

amid

Molekula obsahující karboxylovou skupinu připojenou k aminu.



aminokyselina

Organická molekula obsahující aminoskupinu i karboxyl. α -Aminokyseliny (ve kterých jsou aminoskupina a karboxyl připojeny ke stejnému uhlíku) jsou stavebními kameny proteinů (viz Panel 2-5, str. 62).

aminoskupina (-NH₂)

Slabě zásaditá funkční skupina odvozená od amoniaku (NH₃). Ve vodném roztoku může aminoskupina přijmout proton a nést kladný náboj.

aminoterminální - viz N-konec

AMP (adenosin-5'-monofosfát)

Jeden ze čtyř nukleotidů v RNA. AMP vzniká při energeticky výhodné hydrolýze ATP (viz obr. 3-35).

anabolický

Patří k biochemické reakci nebo reakční dráze, ve které se z malých molekul tvoří velké. Biosyntetický.

anaerobní

(Buňka, organismus či metabolický děj) fungující v nepřítomnosti vzduchu, přesněji v nepřítomnosti molekulového kyslíku.

anafáze

Stadium mitózy, během něhož se oddělí dvě sady chromosomů a vzájemně se vzdalují. Skládá se z anafáze A (chromosomy se pohybují ke dvěma pólům dělicího vřeténka) a anafáze B (póly vřeténka se vzdalují).

anion

Záporně nabitý ion, například Cl⁻ nebo CH₃COO⁻.

antigen

Molekula, kterou rozpoznává a váže k sobě molekula protilátky. Název plyne z toho, že antigen vyvolává imunitní odpověď, která vytváří protilátky.

antikodon

Sekvence tří nukleotidů v molekule transferové RNA, která je komplementární k třínukleotidovému kodonu v informační RNA; antikodon se váže ke speciální aminokyselině kovalentně spojené s molekulou transferové RNA.

antiparalelní

Paralelně uspořádané, ale s opačnou orientací. Příkladem jsou dvě vlákna dvojšroubovice DNA.

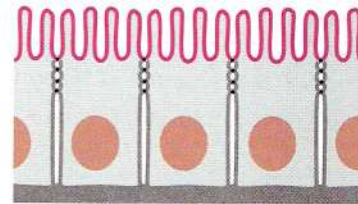


antiport

Membránový transport, při kterém se přes membránu přenášejí dva různé ionty nebo malé molekuly v navzájem opačných směrech.

apikální

Nacházející se na výběžku buňky, struktury nebo orgánu. Apikální povrch endoteliální buňky tvoří volně přístupný povrch (zde ukázán červeně), protějšek k bazálnímu povrchu.



apoptóza - viz programovaná buněčná smrt

atom

Nejmenší částice prvku, která si ještě zachovává své specifické chemické vlastnosti.

atomová hmotnost

Hmotnost atomu určitého izotopu vyjádřená v daltonech.

atomové číslo

Počet protonů v jádře atomu prvku.

ATP (adenosin-5'-trifosfát)

Nukleosid složený z adeninu, ribosy a jedné trifosfátové skupiny (nikoli tří fosfátových skupin, jak se často mylně uvádí. Sloučenina se třemi skupinami PO₄³⁻ by se nazývala trisfosfát, zatímco v trifosfátu zkondenzovaly tři molekuly kyseliny fosforečné (H₃PO₄) za uvolnění dvou molekul vody a vzniku kyseliny trifosforečné H₅P₃O₁₀, respektive trifosfátového iontu.). ATP je základním nosičem chemické energie v buňkách. Konečná fosforylová skupina (zbytek třetího fosfátu, který se připojil kondenzací) je velmi reaktivní a ochotně se odděluje při hydrolýze (tedy vlastně opak kondenzace), nebo se přenáší na jiné molekuly. Při těchto reakcích se uvolňuje velké množství energie (viz obr. 2-21).

ATP-syntáza

Membránový enzymový komplex, který katalyzuje tvorbu ATP při oxidační fosforylaci a při fotosyntéze. Nachází se v mitochondriích, chloroplastech a bakteriích.

Avogadrovo číslo

Počet daltonů (jednotek molekulové hmotnosti) v jednom gramu, jinak také počet molekul v M gramech látky, jejíž molekulová hmotnost je M daltonů. Avogadrovo číslo činí 6,02 × 10²³.

axon

Dlouhý tenký výběžek nervové buňky, schopný rychlého vedení nervových impulzů na velké vzdálenosti a předávání těchto signálů dalším buňkám.

bakterie

Obecný název prokaryotní buňky. Bakterie spadají do dvou evolučně starých skupin: Eubacteria (zvaná také prostě Bacteria) a Archaeobacteria (zvaná také prostě Archaea).

bakteriorhodopsin

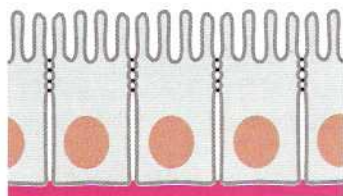
Purpurový protein, který pohlcuje světlo. Nachází se v plasmatické membráně slanofilné bakterie *Halobacterium halobium*; v odpověď na světlo odčerpává protony z buňky.

bazální

Nacházející se blízko báze (základny). Bazální povrch buňky je protějškem povrchu apikálního (viz bazální lamina).

bazální lamina

Tenká vrstva extracelulární matrix, která odděluje epiteliální vrstvy a řadu typů buněk, jako například svalové či tukové buňky, od pojivové tkáně. Někdy se uvádí jako bazální membrána.



bazální tělísko - viz centriola

bazický neboli zásaditý

Mající vlastnosti zásady.

bičík

Dlouhý výběžek, jehož údery umožňují pohyb buňky v kapalném prostředí. Eukaryotní bičinky jsou delšími verzemi brv; bakteriální bičinky se zcela liší: jsou menší, jejich konstrukce je jednodušší a druh pohybu odlišný.



biochemie

Studium sloučenin a reakcí v živých organismech.

biosyntetický

Patří k dějům, v kterých živé buňky vytvářejí organické molekuly.

brva (cilium)

Vlasovitý výběžek na povrchu buňky s ústředním svazkem mikrotubulů, schopný vykonávat opakované pohyby. Velké počty brv napomáhají pohybu kapaliny mezi vrstvami epitelu, například v plicích.

buněčná linie

Klon buněk rostlinného nebo živočišného původu, které se mohou v kultuře nekonečně dlouho dělit.

buněčná migrace

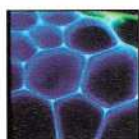
Aktivní pohyb buňky z jednoho místa do jiného. Zvláštním případem je migrace buňky po pevném podkladu.

buněčná signalizace

Komunikace mezi buňkami prostřednictvím extracelulárních chemických signálů. Zvláštním případem jsou molekulové mechanismy, kterými buňky takové signály detegují a odpovídají na ně.

buněčná stěna

Mechanicky odolná vláknitá vrstva, kterou buňka vytváří vně své plasmatické membrány. Hraje důležitou úlohu ve většině rostlin, bakterií, řas a hub, ale u živočišných buněk chybí.



buněčné dělení

Dělení buňky na dvě dceřiné buňky. V eukaryontních buňkách zahrnuje dělení jádra (mitozu), po které brzy následuje dělení cytoplasmu (cytokineze).

buněčné stárnutí

Normální stárnutí buněk vyšších živočichů, při kterém se po předem určeném počtu dělení, buď v těle nebo v kultuře, buňky přestanou dělit a umírají.

buněčný kortex

Zvláštní vrstva cytoplasmu při vnitřním povrchu plasmatické membrány. V živočišných buňkách je tato vrstva bohatá na aktin a zodpovídá za pohyby buněčného povrchu.

buněčný cyklus

Reprodukční cyklus buňky: uspořádaný sled dějů, v kterých buňka zdvojnásobí svůj obsah a rozdělí se na dvě nové buňky.

buněčný spoj

Zvláštní oblast spojení mezi dvěma buňkami nebo mezi buňkou a extracelulární matrix.

buňka

Základní stavební jednotka živých organismů. Skládá se z vodného roztoku organických molekul uzavřeného v systému jedné či více membrán. Všechny buňky vznikají z již existujících buněk, obvykle dělením.

C-kináza

Proteinkináza aktivovaná ionty Ca^{2+} a diacylglycerolem.

C-konec (karboxylový konec)

Konec polypeptidového řetězce, který nese volnou karboxylovou skupinu.

cAMP-dependentní kináza - viz A-kináza

Cdk (cyklin-dependentní kináza)

Proteinkináza, která se ke své funkci potřebuje spojit s cyklinem. Různé komplexy Cdk s cykliny spouštějí různé kroky v cyklu buněčného dělení fosforylací specifických cílových proteinů.

celulosa

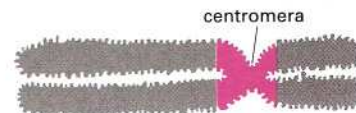
Strukturní polysacharid, který se skládá z dlouhých řetězců kovalentně spojených glukosových podjednotek. Poskytuje pevnost v tahu stěnám rostlinných buněk.

centriola

Krátký válcovitý svazek mikrotubulů, který se v živočišných buňkách obvykle vyskytuje ve dvou exemplářích uprostřed centrosomu. Podobné útvary se nacházejí v základně brv (cilií) a bičičků, kde se jim říká bazální tělíska.

centromera

Malý úsek mitotického chromosomu, který drží pohromadě sesterské chromatidy. Také úsek na DNA, kde se tvoří kinetochor jako místo připojení mikrotubulů z mitotického vřeténka.



centrosom

Centrálně umístěná organela, která je prvotním centrem organizace mikrotubulů a při mitoze se dělí za vzniku pólů dělicího vřeténka. Ve většině živočišných buněk obsahuje pár centriol.

cis

Na stejné straně, v blízkosti. Například *cis*-část Golgiho aparátu z celého Golgiho aparátu nejbližší endoplasmatickému retikulumu.

crossing-over - viz překřížení

cukr

Látka vytvořená z uhlíku, vodíku a kyslíku, s obecným vzorcem $(CH_2O)_n$. Jiným názvem také sacharid. Cukr, který denně používáme, je specifický sladce chutnající disacharid, vytvořený v cukrové řepě nebo v cukrové třtině.

cyklický AMP (cAMP)

Nukleotid vznikající z ATP v odpověď na hormonální stimulaci buněčných povrchových receptorů. cAMP funguje jako signální molekula, která aktivuje například A-kinázu. Je hydrolyzován na AMP fosfodiesterázou.

cyklin

Protein, jehož koncentrace během eukaryontního buněčného cyklu periodicky klesá a vzrůstá. Cykliny aktivují specifické proteinkinázy (viz Cdk), a tak pomáhají řídit postup buňky z jednoho stadia buněčného cyklu do dalšího.

cyklin-dependentní kináza - viz Cdk

cyklus kyseliny citronové (citrátový cyklus, cyklus trikarboxylových kyselin)

Ústřední metabolická dráha ve všech aerobních organismech, v níž se acetylové skupiny pocházející z molekul potravy oxidují na CO_2 . V eukaryontních buňkách tyto reakce probíhají v mitochondriální matrix.

cytochrom

Barevný protein obsahující hem; přenáší elektrony při buněčném dýchání a fotosyntéze.

cytokineze

Rozdělení cytoplasmy rostlinné či živočišné buňky na dvě části, které probíhá odděleně od dělení buněčného jádra (mitozy).

cytoplasma

Vše, co obklopuje plasmatická membrána, kromě jádra v eukaryontních buňkách.

cytoskelet

Systém proteinových vláken v cytoplasmě eukaryontní buňky, který buňce zajišťuje polární tvar a schopnost řízeného pohybu. Nejhojnějšími složkami cytoskeletu jsou aktinová vlákna, mikrotubuly a intermediární filamenta.

cytosol

Vodný roztok velkých a malých molekul, který vyplňuje hlavní oddíl cytoplasmy. Nezahrnuje membránové organely, jakými jsou endoplasmatické retikulum a mitochondrie.



čtecí rámec

Způsob čtení nukleotidové sekvence po trojicích, které představují kodony pro přepis genetického kódu do proteinové podoby. Nukleotidovou sekvenci lze číst jedním ze tří možných způsobů; závisí to na tom, který nukleotid si zvolíme jako první.

dalton

Jednotka molekulové hmotnosti. Je definována jako jedna dvanáctina hmotnosti atomu uhlíku ^{12}C ($1,66 \times 10^{-24}$ g), tedy přibližně jako hmotnost jednoho atomu vodíku.

dehydratační reakce

Reakce, při níž se z jedné molekuly sloučeniny uvolňuje voda a vzniká dvojná či trojná vazba. Zvláštním případem je kondenzace, kdy se část molekuly vody uvolňuje z jedné sloučeniny a část z druhé, a tyto dvě výchozí sloučeniny se spojí do jedné.

délka vazby

Vzdálenost mezi dvěma atomy spojenými určitou chemickou vazbou (obvykle kovalentní).

denaturovat

Způsobit dramatickou změnu v konformaci proteinu nebo nukleové kyseliny zahřátím nebo chemickými činidly. Obvykle vede ke ztrátě biologické funkce.

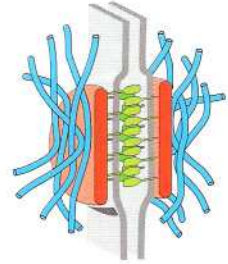
dendrit

Výběžek nervové buňky, obvykle rozvětvený a poměrně krátký, který přijímá podněty od ostatních nervových buněk.

deoxyribonukleová kyselina - viz DNA

desmosom

Specializovaný spoj mezi buňkami, obvykle mezi dvěma buňkami epitelu. Tento spoj je zprostředkován molekulami kadherinu a charakterizují ho husté vrstvy proteinu, do kterých pronikají intermediární filamenta dvou sousedících buněk.



detergent

Mýdlovitá sloučenina s dlouhým hydrofobním řetězcem a s hydrofilní hlavičkou. Biochemici ji často využívají k převedení membránových proteinů a dalších hydrofobních molekul do roztoku.

diferenciace

Proces, ve kterém buňka podstatně mění svůj charakter.

difuze

Rozšíření molekul a malých částic z jednoho místa do jiného náhodným tepelným pohybem.

dimer

Útvar složený ze dvou ekvivalentních podjednotek. Někdy se lze setkat s pojmem „heterodimer“ u případů, kdy obě složky dimeru nejsou identické.

diploidní

Obsahující dvě sady homologních chromosomů, a tudíž dva exempláře každého genu nebo genového lokusu místa.

disacharid

Molekula sacharidu, například sacharosy, složená ze dvou kovalentně spojených monosacharidových podjednotek.

disulfidový můstek (-S-S-)

Kovalentní spojení utvořené ze dvou hydrogensulfidových skupin (-SH) cysteinů. Obvyklý způsob spojení dvou proteinů nebo dvou částí téhož proteinu v extracelulárním prostoru.

DNA (deoxyribonukleová kyselina)

Dvouvláknový polynukleotid tvořený dvěma samostatnými řetězci deoxyribonukleových jednotek. Slouží jako nosič genetické informace.

DNA-ligáza

Enzym katalyzující spojení dvou částí vlákna DNA

doména

Individuální oblast velkého útvaru. Proteinová doména je kompaktním a stabilně poskládaným úsekem polypeptidu. Membránová doména je oblast dvojné vrstvy s charakteristickým lipidovým a proteinovým složením.

donor elektronů

Molekula, která ochotně odevzdává svůj elektron. V tomto ději se oxiduje.

Drosophila melanogaster

Druh mušky, obvykle zvané octomilka nebo také drosofila. Hojně se využívá při genetických studiích vývoje organismu.

drsné endoplasmatické retikulum (RER; z anglického

rough ER)

Oblast endoplasmatického retikula spojená s ribosomy. Účastní se syntézy sekrečních a membránových proteinů.

druhý posel

Malá intracelulární molekula vytvořená nebo uvolněná v cytosolu v odpověď na extracelulární signál. Druhý posel předává signál do vnitřku buňky. Příklady jsou cAMP, IP₃ a Ca²⁺.

dvojitá šroubovice

Typické uspořádání molekuly DNA, ve kterém jsou dvě vlákna DNA vzájemně obtočena okolo sebe a mezi komplementárními bazemi z protějších řetězců se tvoří vodíkové můstky.



dvojná vazba

Typ chemického spojení mezi dvěma atomy. Je tvořena sdílením čtyř elektronů.

dýchání

Obecný termín pro každý děj v buňce, při kterém je příjem molekul O₂ spřažen s produkcí CO₂.

dynamická nestabilita

Vlastnost vykazovaná mikrotubuly. Tyto útvary opakovaně rostou a ubývají přidáváním a ubíráním tubulinových podjednotek na volných koncích.

dynein

Člen rodiny velkých motorových proteinů, které s využitím energie hydrolyzy ATP cestují podél mikrotubulů. Dynein je zodpovědný za ohýbání cílů.

elektricky ovládaný kanál

Membránový protein, který vybraným iontům, například Na⁺, umožňuje průchod membránou, a který se otevírá změnou membránového potenciálu. Nachází se hlavně v elektricky vzrušivých buňkách, jako jsou nervové a svalové buňky.

divoký typ

Normální nemutovaná forma, která je výsledkem pěstování v přirozených podmínkách.

elektron

Elementární částice – jedna ze tří základních stavebních jednotek atomů. Nese záporný náboj (*e*⁻).

endocytoza

Příjem materiálu do buňky vchlípením plasmatické membrány a následným odškrcením takto vzniklého váčku směrem do nitra buňky (viz také **pinocytoza** a **fagocytoza**).

endoplasmatické retikulum (ER)

Membránový oddíl v cytoplasmě eukaryotní buňky podobný bludišti, kam se vylučují lipidy a kde se vytvářejí membránové proteiny.

enhancer (posilovač transkripce)

Řídící sekvence DNA, ke které se vážou regulační proteiny, a tak ovlivňují rychlost transkripce strukturálního genu, který může být o tisíce párů bází dále.

entropie

Termodynamická veličina, která vyjadřuje míru neuspořádanosti systému. Čím vyšší je entropie soustavy, tím větší v ní vládne chaos.

enzym

Protein, který katalyzuje určitou chemickou reakci.

epitel

Vrstva buněk, která pokrývá vnější povrch nebo vystýlá dutinu.

Escherichia coli (*E.coli*)

Tyčinkovitá bakterie, která se normálně vyskytuje v tlustém střevě lidí a dalších savců a hojně se využívá v biomedicinském výzkumu.



eukaryon(t)

Žijící organismus složený z jedné nebo více buněk s odděleným jádrem a cytoplasmou. Mezi eukaryota patří rostliny, živočichové, houby a prvoci, ne však bakterie (prokaryota).

evoluce

Postupná změna v populaci živých organismů, ke které dochází v důsledku mutací a přírodního výběru v průběhu mnoha generací. Tímto způsobem vznikají nové druhy organismů.

exocytoza

Proces, při kterém se z eukaryotní uňky exportují sekretované molekuly. Tyto molekuly jsou baleny do membránových váčků, které splynou s plasmatickou membránou a uvolní svůj obsah na její vnější straně.

exon

Segment eukaryotního genu, který se přepisuje do RNA a kóduje pořadí aminokyselin v proteinu (viz také **intron**).

extracelulární matrix

Složitá síť polysacharidů (jako jsou například glykosaminoglykany či celulóza) a proteinů (např. kolagenu), vylučovaných buňkami. Strukturální složka tkání také ovlivňuje jeho výkon a fyziologii.

FADH₂ (redukovaný flavinadenin dinukleotid).

Hlavní metabolický přenašeč elektronů: vytváří se při redukci FAD doprovázející oxidaci některých katabolitů, například sukcinátu.

fagocytotická buňka

Buňka, která je specializována na příjem částic a mikroorganismů fagocytozou. Příkladem je makrofág a neutrofil.

fagocytoza

Děj, při kterém buňka pohltí určitý materiál. Zvláště významný je u dravých prvoků, například u měňavky *Amoeba proteus*, a v jistých specializovaných buňkách mnohobuněčných živočichů, které se jmenují makrofágy. (Z řeckého *fagein* = jíst.)

faktor přežití

Extracelulární signální molekula, která musí být přítomna, aby bránila programované buněčné smrti.

Fáze G₁

Z anglického *Gap 1 phase*, neboli fáze první mezery či prodlevy v eukaryontním buněčném cyklu, mezi koncem cytokineze a začátkem syntézy DNA.

Fáze G₂

Fáze druhé prodlevy v eukaryontním buněčném cyklu, mezi koncem syntézy DNA a počátkem mitózy.

Fáze M

Mitotická část eukaryotního buněčného cyklu, během níž jsou chromosomy v kondenzovaném stavu a jádro a cytoplasma se dělí.

Fáze S

Období syntézy DNA v eukaryontním buněčném cyklu.

Fe-S-centrum

Seskupení atomů železa a síry v určitých proteinech. Atomy Fe jsou spojeny s atomy S a s postranními řetězci cysteinů.

fenotyp

Pozorovatelný charakter buňky nebo organismu.

fermentace - kvašení

Odbourání organických molekul bez účasti molekulového kyslíku. Oxidace tady není tak dokonalá jako při aerobním procesu a získá se při ní méně energie.

fibrilární protein

Protein vláknitého tvaru, obvykle například kolagen nebo protein intermediárního filamenta, který může asociovat do dlouhých vláknitých struktur.

fibroblast

Běžný typ buňky, který se vyskytuje v pojivových tkáních. Vylučuje extracelulární matrix bohatou na kolagen a další makromolekuly. Migruje a ochotně proliferuje při hojení rány a v buněčné kultuře.

filopodium (v množném čísle filopodia)

Dlouhý tenký výběžek povrchu živočišné buňky, který obsahuje aktin. Někdy má průzkumnou funkci, jako třeba rostoucí výběžek vyvíjející se nervové buňky.

fixace uhlíku

Děj, při kterém zelené rostliny začleňují do svých těl uhlíkové atomy z atmosférického oxidu uhličitého v podobě sacharidů.

fixace dusíku

Začleňování vzdušného dusíku do organických molekul. Schopnost takto vázat dusík mají půdní bakterie a sinice.

fosfatidylcholin

Běžný fosfolipid hojný ve většině buněčných membrán (viz obr. 11-6).

fosfodiesterová vazba

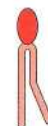
Kovalentní chemická vazba, která vzniká při reakci dvou hydroxylových skupin se stejnou fosfátovou skupinou. Příkladem je spojení dvou sousedních nukleotidů v řetězci RNA nebo DNA (viz Panel 2-6, str. 67).

Fosfolipáza C

Enzym spojený s plasmatickou membránou který zajišťuje klíčový krok v inositolfosfolipidových signálních drahách: štěpí molekuly inositolfosfolipidů, přičemž se uvolňuje diacylglycerol (DAG) a inositoltrisfosfát (IP₃).

fosfolipid

Typ lipidové molekuly využívané při tvorbě biologických membrán. Každý fosfolipid se skládá ze dvou mastných kyselin, které jsou spojeny přes glycerolfosfát s jednou z celé řady polárních skupin.



fosforylovat

Kovalentně navázat fosforylovou skupinu (PO₃²⁻) k malé molekule nebo k proteinu. Je-li tato skupina připojena ke kyslíku, vznikne v místě vazby fosfátová skupina (PO₄³⁻), což je velmi častý případ. V buňkách fosforylaci katalyzují enzymy kinázy, které jako zdroje fosforylových skupin využívají ATP.

fotosyntéza

Děj, při kterém rostliny a některé bakterie využívají slunečního světla k pohonu syntézy organických molekul z oxidu uhličitého a vody.

fotosystém

Velký multiproteinový komplex obsahující chlorofyl, který zachycuje světelnou energii.

fragmoplast

Útvar složený z mikrotubulů a membránových váčků, který se vytváří v oblasti dělení rostlinné buňky.

G-protein

Jeden z členů velké rodiny GTP-vázajících proteinů, které jsou důležitými prostředníky v signálních drahách. Obvykle se aktivuje navázáním hormonu nebo jiného ligandu k membránovému receptoru.

gameta

Buňka v diploidním organismu, která obsahuje jen jednu sadu chromosomů a je specializována pro pohlavní rozmnožování. Spermie nebo vajíčko.

gen

Úsek DNA, který řídí určitou dědičnou vlastnost organismu. Obvykle odpovídá jedinému proteinu nebo RNA.

genetický kód

Soubor pravidel určujících vztah mezi trojicemi nukleotidů (kodony) v DNA nebo v RNA a aminokyselinami v proteinech.

genom

Celková genetická informace, kterou obsahuje buňka nebo organismus (nebo molekuly DNA, které tuto informaci nesou).

genotyp

Specifická sada genů, nesená individuální buňkou nebo organismem.

genová exprese

Děj, při kterém gen uplatňuje svůj účinek na buňku nebo na organismus, obvykle řízením syntézy molekuly RNA, která může být překládána do proteinu s charakteristickou aktivitou.

genové inženýrství - viz **technologie rekombinantní DNA**

genový regulační protein

Obecný název pro každý protein, který se váže ke specifické sekvenci DNA, aby změnil expresi genu.

globulární protein

Každý protein přibližně kulovitěho tvaru. Takový tvar má většina enzymů.

glukosa

Šestiuhlíkatý cukr, který hraje hlavní úlohu v metabolismu živých buněk. Je uložena v polymerní formě jako glykogen v živočišných buňkách nebo jako škrob v buňkách rostlinných (viz Panel 2-3, str. 56-57).

glykogen

Polysacharid složený výlučně z glukosových jednotek. Využívá se ke skladování energie v živočišných buňkách. Velké granule glykogenu jsou zvláště hojné v játrech a ve svalových buňkách.

glykokalyx

Plášť z polysacharidů. Zahrnuje polysacharidové části proteoglykanů a oligosacharidů, připojené k proteinům či k molekulám lipidů na vnějším povrchu buňky.

glykolipid

Membránový lipid s krátkým sacharidovým řetězcem připojeným k hydrofobnímu řetězci.

glykolýza

Všudypřítomná metabolická dráha v cytosolu, ve které jsou cukry odbourány a vytváří se ATP (z řeckého *štěpení cukru*).

glykoprotein

Každý protein, ke kterému se kovalentně váže jeden nebo více oligosacharidových řetězců. Zahrnuje většinu sekretovaných proteinů na vnějším povrchu plasmatické membrány.

Golgiho aparát

Membránová organela v eukaryontních buňkách. Zde jsou modifikovány a tříděny proteiny a lipidy syntetizované na endoplasmatickém retikulu. (Jméno má po svém objeviteli, kterým byl Camillo Golgi.)



gradient elektrochemického potenciálu

Hnací síla, která působí pohyb iontů přes membránu. Je vyvolána rozdílem v koncentraci daného iontu a elektrického potenciálu na obou stranách membrány.

GTP (guanosin-5'-trifosfát)

Hlavní nukleosidtrifosfát užívaný při syntéze RNA a při některých přenosech energie. Má zvláštní roli při asociaci mikrotubul(ů), syntéze proteinů a buněčné signalizaci.

GTP-vázající protein

Allosterický protein, jehož konformace je určena tím, zda je spojen s GTP nebo s GDP. Do této skupiny patří mnoho proteinů z buněčné signalizace, například G-proteiny.

haploidní

Obsahující jen jednu sadu chromosomů. Příklady jsou spermie či bakterie (viz také **diploidní**).

helix - viz šroubovice

heterochromatin

Úsek chromosomu, který během interfáze obvykle zůstává kondenzovaný a nevykazuje transkripční aktivitu.

histon

Člen skupiny zásaditých proteinů, bohatý na arginin a lysin. Tyto proteiny asociují s DNA v chromosomech.

hladké endoplasmatické retikulum (SER; z anglického

smooth ER)

Oblast endoplasmatického retikula, která není spojena s ribosomy. Účastní se syntézy lipidů.

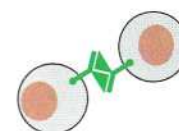


homofilní

(O adhezni molekule) vázající se k dalším molekulám stejného druhu.

homolog

(1) Homologní chromosom.
(2) Makromolekula, která má blízký evoluční vztah k jiné makromolekule.



homologní

Podobný ve smyslu společného evolučního původu. Homologní geny či proteiny obsahují podobné sekvence.

hormony

Chemický signál vytvářený sadou buněk v mnohobuněčném organismu a přenášený v oběhu k cílovým tkáním, na které může specificky působit.

hybridizace

Experimentální postup, při kterém se dvěma komplementárními řetězci nukleových kyselin umožní, aby se vzájemně spojily selektivním způsobem. Hojně se jí využívá k detekci specifických nukleotidových sekvencí.

hybridizace *in situ*

Technika, při které se jedno vlákno RNA nebo DNA, tzv. sonda, použije ke zjištění polohy genu nebo molekuly mRNA v buňce nebo tkáni. (Z latinského *in situ* = na místě)

hydrofilní

Nabitá nebo polární molekula nebo část molekuly, která je schopna vytvářet ve vodě dostatek vodíkových můstků a tak přecházet do roztoku. (Z řeckého *milující vodu*.)

hydrofobní (lipofilní)

Nepolární molekula nebo část molekuly, která nemůže vytvářet příznivé vazebné interakce s molekulami vody, a proto se ve vodě nerozpouští. (Z řeckého *bojící se vody*.)

hydrogensulfidová skupina (-SH, thiolová skupina)

Chemická skupina obsahující síru a vodík. Vyskytuje se v aminokyselině cysteinu a v dalších molekulách. Dvě hydrogensulfidové skupiny se mohou spojit a vytvořit disulfidový můstek.

hydrolyza (přídavné jméno hydrolytický)

Štěpení kovalentní vazby za současné adice vody. Přitom se skupina -OH přidá k jednomu z produktů štěpení a -H k druhému produktu.

hydroxoniový ion (H_3O^+)

Ion vznikající při adici protonu k molekule vody.

hydroxylová skupina (-OH)

Chemická skupina skládající se z atomu vodíku spojeného s kyslíkem. Oba atomy drží pohromadě tak, že každý z nich přispívá do vazby jedním elektronem a kyslíku zbývá ještě jeden volný nepárový elektron, kterým se kyslík může podílet na další vazbě. Příkladem je skupina -OH v alkoholech.

hypertonický

(Roztok, v němž se nacházejí buňky) obsahující dostatečně vysokou koncentraci rozpuštěných látek, díky které může voda unikat z buňky osmózou. (Z řeckého *hyper* = nad.)

hypotonický

(Roztok, v němž se nacházejí buňky) obsahující dostatečně nízkou koncentraci rozpuštěných látek, díky které může voda pronikat do buňky osmózou (Z řeckého *hypo* = pod.)

chemická vazba

Spojení mezi dvěma atomy, které je drží pohromadě v chemické sloučenině. V živých buňkách se nacházejí vazby iontové, kovalentní a polární, a vodíkové můstky.

chemická skupina

Jednovazná či vícevazná skupina kovalentně spojených atomů, například hydroxylová (-OH) nebo aminoskupina (-NH₂). Vyskytuje se v mnoha různých molekulách a má charakteristické chemické vlastnosti.

chemiosmotické spřažení

Mechanismus, ve kterém se gradient protonů (gradient pH) přes membránu využívá k pohonu energeticky náročného děje, například produkce ATP nebo přenosu molekuly přes membránu.

Chlamydomonas

Jednobuněčná zelená řasa se dvěma bičíky.

chlorofyl

Pigment, který pohlcuje světlo. Hraje ústřední roli ve fotosyntéze.

cholesterol

Lipidová molekula s charakteristickou strukturou tetra-cyklického steroidu. Je důležitou složkou plasmatické membrány živočišných buněk (viz obr. 11-7).

chromatid

Jeden ze dvou identických exemplářů chromosomu, které vznikly při replikaci DNA ale stále jsou drženy pohromadě centromerou. V průběhu mitózy se chromatidy oddělí a vzniknou dva samostatné dceřiné chromosomy.

chromatin

Komplex DNA, histonů a nehistonových proteinů v jádru eukaryotní buňky. Materiál, ze kterého jsou vytvořeny chromosomy.

chromosom

Dlouhý vláknitý útvar složený z DNA a asociovaných proteinů, který nese částečnou nebo úplnou genetickou informaci o organismu. Zvláště dobře viditelný v živočišných a rostlinných buňkách, které právě podstupují mitózu nebo meiózu (viz také **interfázový chromosom** a **mitotický chromosom**).

chromosom X

Jeden ze dvou pohlavních chromosomů u savců. Buňky samců obsahují po jednom chromosomu X a Y, zatímco samičí buňky obsahují dva chromosomy X.

chromosom Y

Jeden ze dvou pohlavních chromosomů savců, typický pro samce.

in vitro

Termín užívaný biochemiky k popisu děje v izolovaném buněčném extraktu či buněčnými biologii k označení buněk rostoucích v buněčné kultuře. (Latinsky *ve skle*.)

in vivo

V neporušené buňce nebo organismu. (Latinsky *v živoucím*.)

informační RNA (mRNA)

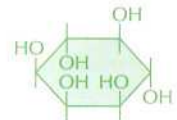
Molekula RNA, která nese informaci o pořadí aminokyselin proteinu. Vzniká přepisem z DNA jako komplementární kopie části jednoho jejího vlákna. Přepis zajišťuje enzym DNA-polymeráza a v eukaryotních buňkách po něm ještě následuje sestřih, tedy odstranění nepotřebných částí z čerstvého řetězce RNA. Podle mRNA se syntetizuje protein v ději, který katalyzují ribosomy.

iniciační faktor

Protein, který zahajuje vlastní asociaci ribosomů s mRNA a je potřebný pro zahájení proteosyntézy.

inositol

Sacharidová molekula s šesti hydroxylovými skupinami. Tvoří cukernou složku inositol-fosfolipidů.



inositolfosfolipidy (fosfoinositidy)

Minoritní lipidové složky plasmatických membrán. Obsahují fosforylované deriváty inositolu, jsou důležité při vedení signálu v eukaryotních buňkách.

integrace

Děj, při kterém se jedna molekula DNA začlení do druhé a stane se její součástí. Tímto způsobem se například genom retroviru začleňuje do genomu hostitele.

interfázový chromosom

Chromosom v dekondenzovaném (rozvinutém) stavu, do kterého přechází během interfáze buněčného cyklu, když je DNA přístupná transkripci (viz také chromosom a mitotický chromosom).

intermediární filamentum (množné číslo **filamenta**)

Vláknko z fibrilárního proteinu o průměru asi 10 nm, které v eukaryotních buňkách vytváří provazce. Často poskytuje pevnost v tahu, a tím odolnost proti tlaku působícímu z vnějšku.

iontová vazba

Přitažlivá síla, která drží pohromadě dva opačně nabitě ionty.

intron

Úsek eukaryotního genu, který nekóduje protein, ale je přepisován do molekuly RNA a později odstraněn sestřihem RNA (*RNA splicing*) při produkci mRNA.

ion (bez iontu, množné číslo **ionty**)

Atom nebo molekula nesoucí elektrický náboj, buď kladný nebo záporný.

iontový kanál

Transmembránový protein, který tvoří vodné spoje přes lipidovou dvojnou vrstvu. Specifické anorganické ionty jím mohou difundovat po spádu svého elektrochemického potenciálu.

izoforma

Jeden z řady proteinů, které se liší nepatrným rozdílem v pořadí aminokyselin. Mohou být produkovány různými geny nebo alternativním sestřihem RNA-transkriptů stejného genu.

izomer (stereozomer)

Jedna ze skupiny látek, které obsahují stejné atomy a mají stejný sumární vzorec, jako například $C_6H_{12}O_6$, ale liší se v prostorovém uspořádání těchto atomů. Optické izomery jsou si navzájem zrcadlovými obrazy, jako třeba pravá a levá ruka.

izotop

Jedna z řady forem téhož atomu, které mají stejné chemické vlastnosti, ale liší se počtem neutronů v jádře, a tedy svou atomovou hmotností. Příkladem je vodík, jehož jádro je nejčastěji tvořeno samotným protonem, ale existují i izotopy vodíku, v kterých atomové jádro kromě protonu obsahuje jeden nebo dva neutrony (D, deuterium; T, tritium). Izotopy mohou být buď stálé nebo radioaktivní.

jadérko

Útvar v jádře, kde je přepisována ribosomální RNA a sestavovány podjednotky ribosomů.

jaderná lamina

Vláknitá vrstva na vnitřním povrchu vnitřní jaderné membrány. Skládá se ze síťoviny intermediárních filament vytvořených z jaderných laminů (druh proteinů).

jaderný obal

Obal jádra v eukaryotní buňce. Skládá se ze dvou membrán, z nichž každá je tvořena dvojnou vrstvou fosfolipidů. Touto vrstvou dvou membrán – vnitřní a vnější – prochází jaderné póry.

jaderný pór

Kanál procházející jaderným obalem který umožňuje vybraným molekulám pohyb mezi jádrem a cytoplasmou.

jádro

(1) Hlavní organela eukaryotní buňky. Obsahuje DNA uspořádanou do chromosomů. (2) Ústřední část atomu složená z protonů a neutronů. V jádru je soustředěna téměř všechna hmotnost atomu.

joule (J)

Základní jednotka tepla a energie. 1 J je práce, kterou vykoná síla 1 N působící po dráze 1 m.

kalmodulin (CaM)

malý protein, který váže Ca^{2+} a modifikuje aktivitu mnoha enzymů a dalších proteinů v odpověď na změny koncentrace Ca^{2+} .

kalorie

Dříve používaná jednotka tepla, v USA se užívá dodnes. Množství tepla potřebné k ohřátí 1 gramu vody o $1^\circ C$. Vzorec pro přepočítání na jouly: $1 \text{ cal} = 4,184 \text{ J}$. V některých anglicky psaných pracích lze najít i pojem „Calorie“ což je označení pro 1000 cal neboli 1 kcal.

kanálový protein

Protein, který tvoří úzký hydrofilní pór membránou a specificky umožňuje iontům nebo malým molekulám pohyb z jedné strany membrány na druhou.

karbohydráty (čili uhlovodany)

Nevhodný starý název pro sacharidy a příbuzné sloučeniny s obecným vzorcem $(CH_2O)_n$. Nezaměňovat s uhlovodíky!

karbonylová skupina (C=O)

Dvojná chemická skupina, ve které je uhlík spojen s kyslíkem dvojnou vazbou.



karboxylová skupina (-COOH)

Chemická skupina, ve které je k atomu uhlíku dvojnou vazbou připojen kyslík a jednoduchou vazbou hydroxyl (-OH). Molekuly obsahující karboxylovou skupinu jsou slabě kyselé (karboxylové kyseliny).

karboxylový konec - viz C-konec

kaskáda - viz signální kaskáda

katabolický

(Biochemická reakce nebo reakční dráha) zahrnující odbourání větších molekul na menší za uvolnění využitelné energie.

katabolismus

Systém enzymově katalyzovaných reakcí v buňce, při nichž se složité molekuly odbourávají na jednodušší za uvolnění energie. Meziproductům v těchto reakcích se někdy říká katabolity.

katalyzátor

Látka, která urychluje chemickou reakci a sama se nemění. Enzymy jsou proteinové katalyzátory.

kation

Kladně nabitý ion, například Na^+ nebo $CH_3NH_3^+$.

kilojoule (kJ)

1000 joulů.

kináza

Enzym, který přenáší fosforylovou skupinu z ATP či z jiného nukleosidtrifosfátu na jinou molekulu ve fosforylační reakci (viz také proteinkináza).

kinesin

Jeden z typů motorových proteinů, které využívají energii z hydrolyzy ATP k pohybu podél mikrotubulů.

kinetochor

Složité útvar obsahující protein. Nachází se na mitotickém chromosomu, ke kterému se připojují mikrotubuly. Kinetochor tvoří část chromosomu známou jako centromera.

klonování

Vytváření mnoha identických kopií buňky nebo molekuly DNA.

K_m

Michaelisova konstanta. Koncentrace substrátu, při které enzym pracuje rychlostí rovnou polovině limitní rychlosti. Velké hodnoty K_m obvykle ukazují na malou afinitu enzymu k substrátu (vazba vzniká méně ochotně).

knihovna DNA

Sbírka klonovaných molekul DNA, obvykle představovaná buď celým genomem (genomová knihovna) nebo kopiemi mRNA, které byly extrahovány z buněčného nebo tkáňového vzorku (knihovna cDNA).

kodon

Sekvence tří nukleotidů v DNA nebo v informační RNA, která představuje instrukci k začlenění určité aminokyseliny do polypeptidového řetězce.

koenzym A (CoA)

Malá molekula využívaná v enzymovém přenosu acylových skupin v buňce (viz také **acetyl CoA** a obr. 3-30).

kolagen

Vláknitý protein bohatý na glycin a prolin. Je hlavní složkou extracelulární matrix v tkáních živočichů. Existuje v celé řadě forem: nejčastěji jako typ I v kůži, šlachách a kostech; typ II se vyskytuje v chrupavce, typ IV v **bazálních laminách** atd.

kombinační efekt

Popisuje každý děj, který je řízen specifickou kombinací faktorů, přičemž různé kombinace mají různé účinky

kombinační kontrola

(exprese genu) - kontrola závislá na přítomnosti či absenci specifických kombinačních či regulačních proteinů.

komplementární

(o dvou sekvencích nukleových kyselin) – schopný přesného párování bází se svým protějškem spojením G s C a A s T nebo U, jako dvě vlákna v dvojšroubovici DNA.

komplementární DNA (cDNA)

Molekula DNA vytvořená jako kopie mRNA, a proto postrádající introny, které jsou přítomny v genomové DNA. Používá se k určení aminokyselinové sekvence proteinu sekvenováním DNA nebo k produkci velkého množství proteinu klonováním, po kterém následuje genová exprese.

kondenzační reakce

Typ chemické reakce, v níž se dvě organické molekuly spojí dohromady za současného uvolnění molekuly vody.

konformace

Prostorové uspořádání atomů molekuly. Přesná podoba proteinu nebo jiné makromolekuly v trojrozměrném prostoru.

kontrolní bod

Bod v cyklu dělení eukaryontní buňky, kde může být pokračování cyklu zastaveno až do chvíle, kdy nastanou příznivé podmínky k pokračování do dalšího stadia.

korektura

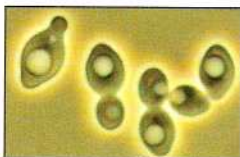
Proces, ve kterém DNA-polymeráza při svém pohybu podél vlákna DNA opravuje své vlastní chyby.

kovalentní vazba

Stálé chemické spojení mezi dvěma atomy, zajišťované sdílením jednoho či více elektronových párů.

kvasinky

Obecný název pro několik rodin jednobuněčných hub. Zahrnuje druhy používané v pivovarnictví a pekařství i druhy, které způsobují onemocnění.



kyselina

Látka, která ve vodě disocijuje a uvolňuje protony (ionty H⁺); tím se snižuje hodnota pH roztoku. Tyto protony asociují s vodou za vzniku hydroxoniových iontů H₃O⁺.

lamelipodium (množné číslo lamelipodia)

Pohyblivý listovitý výběžek plasmatické membrány živočišné buňky, zvláště buňky migrující po povrchu.

ligand

Molekula, která se váže na specifické místo na proteinu. Příklady jsou hormon a nervový mediátor.

lipid

Organická molekula, která obsahuje uhlovodíkový řetězec (či řetězce), je nerozpustná ve vodě, ale ochotně se rozpouští v nepolárních organických rozpouštědlech. Jedna třída lipidů - fosfolipidy - tvoří strukturální základ biologických membrán.

lipidová dvojná vrstva

Tenký list hlavně fosfolipidových molekul uspořádaných tak, jak je vidět na obrázku. Tvoří strukturální základ všech buněčných membrán. Hydrofilní fosfolipidové hlavičky směřují do vodního prostředí, zatímco hydrofobní řetězce směřují do nitra vrstvy.



lipofilní - viz hydrofobní

lumen (v češtině nesklonné)

Dutina obklopená epitelialním listem (v tkáni) nebo membránou (v buňce). Příkladem je lumen endoplasmatického retikula. (Z latinského *lumen* = světlo, otvor.)

lymfocyt

Bílá krvinka, která zprostředkuje specifickou imunitní odpověď na cizí molekulu (antigen). B-lymfocyty (B-buňky) vytvářejí molekuly protilátek, T-lymfocyty (T-buňky) rozpoznávají cizí molekuly na povrchu buňky a reagují na ně; tak pomáhají regulovat aktivitu lymfocytů B.

lyzozom

Intracelulární membránová organela obsahující trávicí enzymy. Vnitřek lyzozomu je silně kyselý a jeho enzymy pracují při nízkém pH.

makrofág

Buňka v živočišných tkáních, která je specializována na příjem určitého materiálu fagocytozou. Pochází z jednoho typu bílých krvinek. (Z řeckého: *makros* = velký; *fagein* = jíst.)

makromolekula

Polymerní molekula o hmotnosti více než několik tisíc daltonů. Příkladem jsou proteiny, nukleové kyseliny či polysacharidy. (Z řeckého *makros* = velký.)

mastná kyselina

Sloučenina, jako například palmitová kyselina, tedy karboxylová kyselina s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem. Mastných kyselin se využívá jako zdroje energie v metabolismu; jsou startovním bodem pro syntézu fosfolipidů (viz panel 2-4, str. 58).



matrice

Molekulární struktura, která slouží jako předloha pro výrobu dalších molekul. Tak specifická sekvence nukleotidů může sloužit jako matrice pro syntézu nového řetězce DNA s komplementární sekvencí.

mechanicky ovládaný kanál

Membránový protein, který umožňuje selektivní vstup specifických iontů do buňky a otvírá se mechanicky.

meioza

Speciální typ buněčného dělení, při kterém se tvoří vajíčka a spermie. Zahrnuje snížení počtu chromosomů z diploidního (dvojitého) na haploidní (jednoduchý). Dvě následná dělení jádra s pouhou jedinou replikací DNA dávají z původní diploidní buňky vzniknout čtyřem haploidním dceřiným buňkám. (Z řeckého *meiosis* = zmenšení.)

membrána

Tenká vrstva lipidových molekul a připojených proteinů, která obklopuje každou buňku a tvoří hranici mnoha buněčných organel.

membránový potenciál

Elektrické napětí mezi vnitřním a vnějším povrchem membrány, které je důsledkem malého přebytku kladných iontů na jedné straně membrány a záporných iontů na druhé. Typický membránový potenciál plasmatické membrány živočišné buňky je -60 mV vzhledem k okolní kapalině (záporná strana je uvnitř buňky).

membránový protein

Protein spojený s lipidovou dvojnou vrstvou. Integrální membránové proteiny jsou zanořeny v dvojnou vrstvě a celou ji protínají, zatímco periferní proteiny jsou připojeny k povrchu membrány.

membránový transportní protein

Každý protein zanořený v membráně, který umožňuje iontům nebo malým molekulám procházet z jedné strany membrány na druhou.

metabolická dráha

Sled enzymových reakcí, ve kterých je produkt jedné reakce substrátem pro další reakci.

metabolismus

Souhrn všech chemických reakcí, které probíhají v živé buňce nebo v mnohobuněčném organismu.

metafáze

Stádium mitózy, ve kterém jsou chromosomy ve svém středu pevně spojeny s mitotickým vřeténkem, ale ještě se nepohybují k opačným pólům.

methylová skupina (-CH₃)

Hydrofobní chemická skupina odvozená od methanu (CH₄).

mezerový spoj

Komunikační mezibuněčný spoj, který umožňuje iontům a malým molekulám přecházet z cytoplasmy jedné buňky do cytoplasmy buňky druhé.

Michaelisova konstanta - viz K_m

mikro-

Předpona s významem 10^{-6} , tedy jedna miliontina. Příkladem je mikrometr, tedy 10^{-6} m, nebo mikrolitr, což je kapka tak malá, že by se jich do jednoho litru vešel celý milion.

mikrofotografie

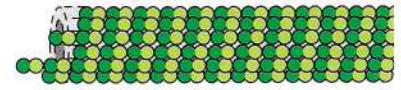
Snímek ze světelného nebo elektronového mikroskopu.

mikrometr (μm)

10^{-6} m, jedna miliontina metru.

mikrotubulus

Tuhý intracelulární útvar v podobě dlouhého



válce o průměru asi 20 nanometrů. Skládá se z proteinu tubulinu, jedné z hlavních složek cytoskeletu. Eukaryotní buňky ho užívají k regulaci svého tvaru a k ovládnutí svých pohybů.

mili-

Předpona označující 10^{-3} , tedy jednu tisícinu. Příkladem je milimetr, což je jedna tisícina metru, nebo mililitr, což je asi centimetrová vrstva kapaliny ve zkumavce běžného průměru.

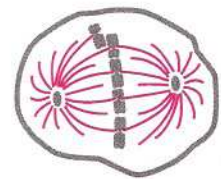
mitochondrie

Membránová organela velikosti běžné bakterie, ve které v eukaryotních buňkách probíhá oxidační fosforylace a produkce většiny ATP.



mitotické vřeténko

Svazek mikrotubulů a asociovaných molekul, který se během mitózy utváří mezi oběma póly eukaryotní buňky a slouží k rozdělení zdvojených chromosomů.



mitotický chromosom

Chromosom v kondenzovaném stavu, ve kterém se nachází během mitotické fáze buněčného cyklu. Mitotické chromosomy jsou narozdíl od interfázových chromosomů jednotlivě viditelné ve světelném mikroskopu jako útvary v podobě vláknů či páru uznek.

mitóza

Dělení jádra eukaryotní buňky, jež zahrnuje kondenzaci DNA do chromosomů, které jsou po obarvení viditelné. (Z řeckého *mitos* = vlákno, kvůli vláknitému tvaru kopndenzovaných chromosomů.)

mol

Látkové množství – M gramů látky, jejíž molekulová hmotnost je M daltonů neboli gramů na mol. Jeden mol jakékoli látky znamená $6,022 \times 10^{23}$ jejích částic.

molekula

Skupina atomů spojených dohromady kovalentními vazbami.

molekulární komplex

Soubor molekul, obvykle makromolekul, které drží pohromadě nekovalentními vazbami. Plní specifickou funkci, například replikuje DNA nebo syntetizuje fosfolipidy.

molekulární rozpoznávání

Navázání jedné molekuly k druhé prostřednictvím komplementárních povrchových vlastností. Příkladem je rozpoznání substrátu enzymem či antigenu protilátkou.

molekulární specifita

Selektivní afinita jedné molekuly k druhé, která oběma molekulám umožňuje vzájemnou vazbu či reakci jedné molekuly s druhou i v přítomnosti velkého množství zcela nepříbuzných molekul.

molekulová hmotnost

Hmotnost molekuly vyjádřená v daltonech.

monomer

Malá molekula, která může být spojena s dalšími molekulami stejného druhu za vzniku větší molekuly.

motorový protein

Protein, jako například myosin nebo kinesin, který využívá energii pocházející z hydrolýzy ATP k vlastnímu pohybu podél proteinového vlákna.

mutace

Dědičná změna pořadí nukleotidů v chromosomu.

myofibrila

Dlouhý a vysoce uspořádaný kontraktilní svazek aktinu, myosinu a dalších proteinů v cytoplasmě svalové buňky. Stahuje se způsobem ukázaným na obrázku 16-36.

myosin

Motorový protein, který využívá ATP k pohonu vlastního pohybu podél aktinových vláken. Myosin II je velký protein, který tvoří silná vlákna kosterního svalu. Menší myosiny, jako například myosin I, jsou zřídka rozšířené a zodpovídají za mnoho aktinových pohybů uvnitř buněk.

N-konec (aminokonec)

Konec polypeptidového řetězce s volnou aminoskupinou.

Na⁺/K⁺-ATPáza (sodno-draselná ATPáza, sodíková pumpa)

Transmembránový přenašečový protein. Nachází se v plasmatické membráně většiny živočišných buněk, kde čerpá ionty Na⁺ ven z buňky a ionty K⁺ dovnitř, k čemuž využívá energii hydrolýzy ATP.

NAD⁺ (nikotinamidadeninukleotid)

Molekula, která se účastní oxidační reakce a přijímá při ní hydridový ion (H⁻) od molekuly donoru. Přitom vzniká NADH, který slouží jako aktivovaný nosič elektronů; je důležitý například při odbourávání cukrů a tuků za uvolnění energie (srovnej s obr. 3-28).

NADP⁺ (nikotinamidadeninukleotidfosfát)

Přenašečová molekula blízké příbuzná NAD⁺. Využívá se jako donor elektronů v biosyntetických drahách.

nanometr (nm)

Jednotka délky ze světa molekul a buněk. Jeden nanometr je 10⁻⁹ m neboli jedna miliardtina metru.

nekovalentní vazba

Chemická vazba, v níž narozdíl od kovalentní vazby nedochází ke sdílení elektronů. Nekovalentní vazby jsou relativně slabé, ale v souhrnu mohou vytvořit velmi silné interakce mezi molekulami.

nenasycený

(O organické molekule) obsahující jednu nebo více dvojných či trojných vazeb mezi uhlíky.

nepolární molekula

Molekula, ve které se na žádném místě nevyskytuje pozitivní ani negativní náboj. Nepolární látky se obecně ve vodě nerozpouštějí.

nervová buňka - viz neuron

nervové zakončení

Zakončení axonu, z kterého jsou signály předávány dále do jedné nebo více buněk, obvykle prostřednictvím synapsí.

nervový mediátor

Malá signální molekula vylučovaná nervovou buňkou do chemické synapse jako signál pro postsynaptickou buňku. Mezi nervové mediátory patří acetylcholin, glutamát, GABA (kyselina γ-aminomáselná) a glycin.

neuron (nervová buňka)

Buňka s dlouhými výběžky (axonem a dendrity), specializovaná na přijímání, vedení a předávání signálů v nervové soustavě.



neutron

Elementární částice, jeden ze základních stavebních kamenů atomu. Má přibližně stejnou hmotnost jako proton, avšak nenese žádný elektrický náboj.

nondisjunkce

Jev, který příležitostně nastává během meiozy. Pár homologních chromosomů se při něm nerozdělí, takže výsledná zárodečná buňka má buď příliš mnoho nebo příliš málo chromosomů.

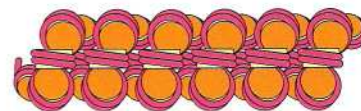
nukleolus - viz jádro

nukleosid

Purinová nebo pyrimidinová báze spojená s ribosou nebo deoxyribosou (viz Panel 2-6, str. 67).

nukleosom

Strukturní jednotka eukaryontního chromosomu podobná korálku.



Skládá se z krátkého úseku DNA, obtočeného kolem jádra z histonových proteinů. Základní podjednotka chromatinu.

nukleotid

Nukleosid s mono-, di- či trifosfátovou skupinou esterevě vázanou k cukerné části. DNA a RNA jsou polymery nukleotidů.

nukleová kyselina

RNA nebo DNA. Skládá se z řetězce nukleotidů spojených fosfodiesterovými vazbami.

nukleus - viz jádro

obecný transkripční faktor

Každý z proteinů, jejichž asociace okolo TATA-boxu je potřebná k zahájení transkripce většiny eukaryontních genů.

obrvenky (*Ciliata*)

Druh jednobuněčných eukaryontních organismů (prvoků), pro něž jsou charakteristické čtené brvy (cilia) na povrchu. Obvykle svých brv užívají k plavání, podávání potravy či při lovu.

oligo-

Předpona, která udává, že se takto označený objekt skládá z malého počtu podjednotek. Oligomer (krátký polymer) může být vytvořen z aminokyselin (oligopeptid), cukrů (oligosacharid) nebo nukleotidů (oligonukleotid). (Z řeckého *oligos* = několik)

onkogen

Gen, který mění normální buňku v rakovinnou. Obvykle jde o mutantní formu normálního genu (protoonkogen), který se účastní řídicích a kontrolních mechanismů buněčného růstu nebo dělení.

opravy DNA

Obecný termín pro enzymové procesy, které opravují různým způsobem poškozená vlákna DNA.

organela

Ohraničený útvar či oddíl eukaryotní buňky. Specializuje se na určitou funkci. Tyto buněčné struktury lze pozorovat ve světelném mikroskopu. Příklady jsou mitochondrie a Golgiho aparát.

organická chemie

Odvětví chemie, které se zabývá sloučeninami uhlíku. Zahrnuje v podstatě všechny molekuly, z nichž jsou vytvořeny živé buňky, kromě vody.

osmotický tlak

Tlak vody, který je třeba vyvinout na polopropustnou membránu, aby se vyrovnala snaha vody proudit přes membránu osmozou.

osmoza

Pohyb molekul vody přes polopropustnou membránu, pohnáný rozdílem koncentrace rozpuštěné látky na obou stranách membrány. Membrána musí být propustná pro vodu a nepropustná pro rozpuštěnou látku (solut).

oxid dusnatý (NO)

Malá vysoce difuzibilní molekula, kterou buňky využívají k signalizaci mezi sebou. Může procházet buněčnými membránami bez pomoci transportních proteinů.

oxidace

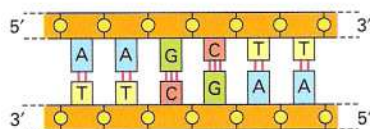
Úbytek hustoty elektronů v okolí atomu. Dochází k němu například při adici kyslíku na molekulu nebo při odstranění atomu vodíku. Opačným dějem je redukce (viz obr. 3-11).

oxidační fosforylace

Děj v bakteriích a mitochondriích, při kterém je přenosem elektronů z molekul potravy na molekulový kyslík poháněna tvorba ATP. Zahrnuje vytváření gradientu pH přes membránu, což pohání syntézu ATP chemiosmotickým spřažením.

palindromová sekvence

Sekvence nukleotidů, která je identická se svým komplementárním vláknem, když jsou obě vlákna čtena ve stejném směru (5'→3').



panožka neboli pseudopodium (množné číslo

pseudopodia)

Velký výběžek buněčného povrchu měňavkovitých buněk při plazení. V širším slova smyslu jde o dynamický výběžek povrchu živočišné buňky bohatý na aktin. (Z řečtiny: *falešná nožka*)

pár bází

Dva nukleotidy v molekule DNA nebo RNA, které jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky, například G s C a A s T nebo U.

pasivní transport

Pohyb malé molekuly nebo iontu přes membránu, pohnáný rozdílem v koncentraci nebo rozdílem elektrického potenciálu.

PCR (polymerázová řetězová reakce)

Technika sloužící k namnožení určitých úseků DNA mnohokrát opakovaným cyklem polymerace DNA a krátkého zahřátí, při němž se oddělí spárovaná komplementární vlákna.

peptidová vazba

Chemická vazba mezi karbonylovou skupinou jedné aminokyseliny a aminoskupinou druhé aminokyseliny, zvláštní podoba amidové vazby (viz Panel 2-5, str. 62).

peroxisom

Malá membránová organela, která využívá molekulární kyslík k oxidaci organických molekul. Obsahuje některé enzymy, které vytvářejí peroxid vodíku (H₂O₂), a jiné enzymy, které peroxid vodíku odbourávají.

pH

Běžné měřítko kyselosti roztoku: $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$, kde [H⁺] znamená koncentraci vodíkových iontů v molech na litr. Čím nižší je pH, tím je v roztoku více iontů H⁺, a tím je roztok kyselější. Příklad: V 0,001 molárním roztoku kyseliny chlorovodíkové (HCl) je přítomno 0,001 molu H⁺ na litr. pH je tedy $-\log(0,001) = -(-3) = +3$.

pinocytoza

Příjem tekutiny buňkou endocytoticky. (Z řeckého *pinein* = pít.)

plasmatická membrána

Membrána, která tvoří obal živé buňky.

plasmid

Malá kruhová molekula DNA, která se replikuje nezávisle na genomu. Široce se využívá jako vektor pro klonování.

plasmodesma (množné číslo plasmodesmata)

Mezibuněčný spoj v rostlinách, kde membránový kanál naplněný cytoplasmou spojuje dvě sousední buňky malým pórem v jejich stěnách.

podjednotka

Chemická skupina nebo molekula, která tvoří část větší molekuly; monomer. Například mnoho proteinů je tvořeno komplexem několika polypeptidových řetězců, držných pohromadě nekovalentními vazbami. Přitom každý polypeptidový řetězec takovém komplexu představuje podjednotku.

pohlavní chromosom

Chromosom, který může být přítomen a může i chybět či být přítomen v různém počtu kopií podle pohlaví jedince. U savců plní tuto funkci chromosomy X a Y.

pól vřeténka

Jeden z páru centrosomů v buňce, která podstupuje mitozu. Z těchto centrosomů vybíhají mikrotubuly, které vytvářejí mitotické vřeténko.

polární

Molekula nebo kovalentní vazba v molekule, ve které jsou vazebné elektrony přitahovány k jednomu atomu silněji než k jiným. Tak vzniká nerovnoměrné (polární) rozdělení elektrického náboje.

polohový efekt

Vztahuje se k rozdílu v expresi genu závislé na jeho poloze v genomu.

polymer

Velká a obvykle lineární molekula, vytvořená spojením mnoha identických nebo podobných podjednotek (monomerů) za sebou.

polymeráza

Obecný název enzymu, který katalyzuje připojení podjednotky k polymeru. Příkladem je DNA-polymeráza, která takto vytváří DNA, nebo RNA-polymeráza, která vytváří RNA.

polynukleotid

Molekulární řetězec nukleotidů spojených řadou fosfoesterových vazeb. Příkladem je RNA nebo DNA.

polypeptid

Lineární polymer složený z mnoha aminokyselin. Proteiny jsou velké polypeptidy a v jejich případě lze oba názvy zaměňovat.

polypeptidová kostra

Lineární řetězec atomů, který obsahuje opakující se peptidové vazby. Prochází celou molekulou peptidu a jsou k němu připojeny postranní řetězce všech aminokyselin polypeptidu.

polysacharid

Lineární nebo rozvětvený polymer složený z cukrů. Příklady jsou glykogen, hylauronová kyselina a celulóza.

postranní řetězec

V aminokyselinách část molekuly, která se neúčastní peptidové vazby a která dává každé aminokyselině její osobité vlastnosti.

primární transkript - viz transkripce

profáze

První stadium mitozy, během kterého dochází ke kondenzaci chromosomů, ale ještě ne k jejich připojení k mitotickému vřeténku. Na první pohled podobné stadium probíhá také v meioze.

programovaná buněčná smrt (apoptóza)

Normální benigní (= nezlobivý) proces buněčné sebevraždy, při kterém se buňka scvrkne, rozpustí svůj obsah a aktivuje u sousedních buněk fagocytózu.

prokaryon(t) (množné číslo prokaryota)

Druh žijících buněk, které postrádají jasně ohraničené jádro. Bakterie.

prometafáze

Fáze mitozy, která předchází metafázi.

promotor

Nukleotidová sekvence v DNA, ke které se váže RNA-polymeráza, a tak aktivuje transkripci.

proteasom

Velký proteinový komplex v cytosolu, který je odpovědný za odbourání cytosolových proteinů, které byly pro destrukci označeny ubiquitinací nebo jinak.



proteáza (proteínáza, proteolytický enzym)

Enzym, který odbourává proteiny hydrolýzou některých jejich peptidových vazeb. Příkladem je trypsin.

protein

Lineární polymer aminokyselin spojených do určitého pořadí peptidovými vazbami.

proteinfosfatáza (fosfoproteinfosfatáza)

Defosforylační enzym, který hydrolyticky štěpí fosfátovou skupinu na proteinu a odstraňuje z ní její hlavní část – fosforyl (zbytek kyseliny fosforečné). Toto hydrolytické štěpení fosfátové skupiny proteinu obvykle probíhá značně specificky.

proteinkináza

Enzym, který přenáší fosforylovou skupinu z ATP na specifickou aminokyselinu cílového proteinu. Je-li tato skupina přenesena na kyslíkový atom v postranním řetězci aminokyseliny, vznikne v cílovém místě z již přítomného O a nově přichozícího fosforylu fosfátová skupina. Buňky obsahují stovky různých proteinkináz, které fosforylují různé sady cílových proteinů.

proteolýza

Hydrolytické obourání proteinu s pomocí proteáz.

protilátka (imunoglobulin)

Protein vytvářený B-lymfocyty v odpověď na cizí molekulu nebo na cizí mikroorganismus. Váže se pevně k cizí molekule nebo buňce a přitom ji inaktivuje nebo označí pro pozdější zničení.

proton

Kladně nabitá elementární částice, základní stavební kámen každého atomu. V atomu vodíku ^1H představuje celé jádro. Vyskytuje se také volně jako vodíkový ion H^+ (přesně řečeno vodný, neboť nese jeden kladný náboj), ovšem v tomto stavu se rychle spojuje například s molekulami vody - hydratuje se.

protoonkogen - viz onkogen

prvek

Látka, kterou nelze rozložit na jednodušší chemické formy. Skládá se z jednoho typu atomů.

prvok

Volně žijící, zpravidla nefotosyntetický, jednobuněčný, pohyblivý eukaryontní organismus. Většina prvoků se živí jinými organismy, tedy jako predátoři nebo paraziti - příkladem je *Paramecium* nebo *Amoeba*.

přechodový stav - viz tranzitní stav

překřížení (crossing over)

Děj, při kterém se dva homologní chromosomy v odpovídajících místech přerušují a znovu se spojí za vzniku dvou rekombinantních chromosomů.

přenašeč elektronů

Molekula, jako například cytochrom *c*, která přenáší elektron z donorové molekuly na molekulu akceptorovou.

přenašečový protein

Membránový transportní protein, který váže rozpuštěnou látku a přenáší ji přes membránu řadou konformačních změn.

přenos elektronů

Pohyb elektronů od vyšší energetické hladiny k nižší v řadě molekul přenašečů elektronů (zvané *elektrontransportní řetězce*). Příkladem jsou oxidační fosforylace a fotosyntéza.

přeskupování exonů (exon shuffling)

Evoluční proces, při kterém vznikají nové geny spojením kombinací dříve oddělených exonů, které kódovaly různé proteinové domény.

převod signálu

Převod signálu z jedné fyzikální nebo chemické podoby do jiné. V buněčné biologii jde o proces, kterým buňka odpovídá na signál z okolí.

pumpa

Transmembránový protein, který pohání aktivní transport iontů a malých molekul přes dvojnou vrstvu lipidů.

puriny

Jedna ze dvou skupin dusíkatých cyklických sloučenin, které se nacházejí v DNA a v RNA. Příklady jsou adenin a guanin (viz Panel 2-6, str. 66).

pyrimidiny

Jedna ze dvou skupin dusíkatých cyklických sloučenin, které se nacházejí v DNA a v RNA. Příklady jsou cytosin, thymin a uracil (viz Panel 2-6, str. 66).

rakovina

Nemoc, při níž se mutantní buňky vymknou normálním řídicím mechanismům buněčného dělení, pronikají do jiných tkání těla a vytvářejí v nich kolonie.

receptorová endocytoza

Mechanismus selektivního příjmu látek živočišnými buňkami, při kterém se makromolekula váže na receptor v plasmatické membráně a vstupuje do buňky v klathrinovém váčku.

receptorový protein

Protein, který rozpozná podnět, obvykle zněnu koncentrace signální látky, a v reakci na tuto změnu spustí buněčnou odpověď. Mnoho receptorových proteinů se nachází v buněčné membráně, kde interagují s hormony, nervovými mediátory a ostatními molekulami z okolního prostředí.

redoxní potenciál

Měřítko ochoty daného systému odevzdávat své elektrony (působit jako redukční činidlo) nebo elektrony přijímat (působit jako oxidační činidlo).

redoxní reakce

Reakce, při níž jsou elektrony předávány z jedné chemické látky na druhou. Přitom se jedna látka oxiduje (odevzdává elektrony) a druhá se redukuje (přijímá elektrony). Proto se takové reakce označují jako oxidačně redukční.

redukce

Adice elektronů k atomu, jak probíhá při adici vodíku na molekulu nebo při odstranění kyslíku z molekuly. Opakem redukce je oxidace (viz obr. 3-11).

rekombinace

Proces, ve kterém jsou chromosomy či molekuly DNA rozštěpeny a jejich fragmenty jsou znovu spojeny novým způsobem. K rekombinaci může docházet v živých buňkách, například při překřížení v průběhu meiozy, nebo ve zkumavce při použití přečištěné DNA a enzymů, které řetězce DNA přerušují a znovu spojí.

replikace DNA

Děj, při kterém se vytváří kopie vlákna DNA.

replikační počátek

Místo v bakteriálním, virovém či eukaryontním chromosomu, ve kterém začíná replikace DNA.

replikační vidlička

Oblast replikující se molekuly DNA ve tvaru písmene Y, v níž se oddělují dva mateřské řetězce DNA a jsou syntetizovány dva nové dceřiné řetězce.

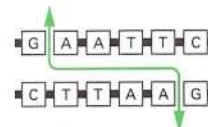
represor

Protein, který se váže ke specifické oblasti DNA, aby zabránil transkripci sousedního genu.

respirace - viz dýchání

restrikční enzym (restrikční nukleáza)

Nukleáza, která rozpoznává a štěpí specifickou krátkou sekvencí nukleotidů DNA ve všech místech výskytu této sekvence. Různé restrikční nukleázy štěpí různé nukleotidové sekvence. Široce se jich využívá v technologii rekombinantní DNA.



retrovirus

Virus obsahující RNA, který se reprodukuje tak, že vstoupí do buňky hostitele, syntetizuje DNA-kopii vlastního RNA-genomu reverzní transkripcí a integruje tuto DNA do genomu hostitelské buňky. Integrovaná virová DNA potom řídí syntézu mnoha molekul nové virové RNA pro tvorbu nových virových částic.

reverzní transkriptáza

Enzym přítomný v retrovirech. Vytváří dvouvláknovou DNA-kopii jednovláknové původní molekuly RNA.

ribosom

Částice složená z ribosomálních RNA a z ribosomálních proteinů, které se spojují s informační RNA a katalyzují proteosyntézu.



ribosomální RNA (rRNA)

Každá z velkého počtu specifických molekul RNA, které tvoří část struktury ribosomu a účastní se syntézy proteinů.

ribozym

Molekula RNA s katalytickými schopnostmi.

RNA (ribonukleová kyselina)

Polymer utvořený z kovalentně spojených ribonukleotidových podjednotek.

RNA-ligáza

Enzym katalyzující spojení dvou částí vlákna RNA.

RNA-polymeráza

Enzym, který katalyzuje syntézu molekuly RNA z nukleosidtrifosfátů na templátu DNA.

RNA-primer

Dlouhý úsek RNA vytvořený zpoždujícím se vláknem během replikace DNA a následně odstraněný.

rovnováha

V chemickém kontextu stav, kdy reakce jedním i druhým směrem probíhají přesně stejnou rychlostí, takže se celkové chemické složení soustavy nemění.

rovnovážná konstanta (K)

Číslo, které popisuje rovnovážný stav vratné chemické reakce. Vypočítá se jako poměr rychlostních konstant pro reakci vpřed a vzad (viz tabulku 3-1, str. 92).

růstový faktor

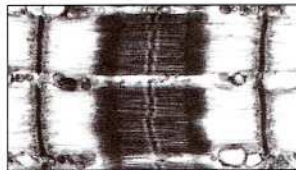
Extracelulární polypeptidová signální molekula, která stimuluje buňky k růstu a proliferaci. Příklady jsou epidermální růstový faktor (EGF) a růstový faktor krevních destiček (PDGF).

sacharid

Používá se jako přípona k označení cukru, například u disacharidu (vytvořen ze dvou cukerných jednotek) nebo polysacharidu (vytvořen z mnoha cukerných jednotek).

sarkomera

Opakující se jednotka myofibrilů ve svalové buňce, která je asi 2,5 μm dlouhá a je složena z tlustých (myosinových) a tenkých (aktinových) filament.



saturovaný (nasycený)

(O organické molekule) obsahující vazby C-C, ale žádnou vazbu C=C nebo C \equiv C.

sekrece

Produkce a uvolňování určité látky z buňky.

sekreční váček

Membránová organela, v níž se před vypuzením skladují molekuly určené pro sekreci. Někdy se mu říká sekreční granule, neboť silně barvicí obsah tuto organelu zviditelní jako malý hustý objekt.

sekvence

Lineární uspořádání podjednotek v polymerovém řetězci, například aminokyselin v proteinu nebo nukleotidů v DNA. Obecně řečeno sekvence makromolekuly přesněji určuje její biologickou funkci.

sestřih RNA

Děj, při kterém jsou v jádře během formování informační RNA vystřiženy intronové sekvence.

signální kaskáda

Sled spojených proteinových reakcí, který často zahrnuje fosforylaci a defosforylaci. Funguje jako štafetový řetězec, ve kterém se v buňce předává signál.

β -skládání list

Způsob složení vyskytující se u mnoha proteinů, kde se sousední oblasti polypeptidového řetězce navzájem spojují vodíkovými můstky a vytvářejí rigidní plochou strukturu.



SNARE

Jeden z rodiny membránových proteinů zodpovědný za selektivní fúzi váčků s příslušnými cílovými membránami.

sodná pumpa - viz Na⁺/K⁺-ATPáza

solut

Každá látka, která se rozpouští v kapalině. Kapalině říkáme rozpouštědlo.

spermie

Samčí gameta, obvykle malá a vysoce pohyblivá. Vytváří se ve velkých množstvích.

spřažená reakce

Spojený pár chemických reakcí, ve kterém se volná energie z první reakce používá pro pohon reakce druhé.

spřažený transport

Membránový transportní děj, ve kterém přenos jedné molekuly závisí na současném přenosu druhé molekuly.

steroidní hormon

Lipofilní (hydrofobní) molekula hormonu, příbuzná cholesterolu. Příklady jsou estrogen a testosteron.

stroma

(1) Pojivová tkáň, do které je zanořen žláznový či jiný epitel. (2) Velký vnitřní prostor chloroplastu, který obsahuje enzymy začleňující při fotosyntéze CO₂ do cukrů.

substrát

Látka, kterou enzym mění.

substratum

pevný povrch, na který buňky adherují.

svinuté klubko

Zvláště stabilní tyčinkovitý proteinový útvar, který je tvořen dvěma vzájemně obtočenými α -šroubovicemi.

symbioza

Blízký vztah mezi dvěma organismy různých druhů, z něhož mají obě strany dlouhodobou výhodu.

symport

Forma souběžného transportu, kdy membránový přenašečový protein přenáší přes membránu dva druhy solutu ve stejném směru.

synapse

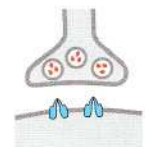
Specializovaný spoj mezi nervovou buňkou a další buňkou (nervovou, svalovou nebo žláznovou), přes který nervová buňka předává svůj signál. Ve většině synapsí je signál přenášen nervovým mediátorem, který je vylučován zakončením nervové buňky v důsledku nervového impulzu a difunduje k cílové buňce.

synaptický váček

Malý membránový váček naplněný nervovým mediátorem uvnitř nervového zakončení v synapsi. Když nervový impuls (akční potenciál) dospěje k nervovému zakončení, synaptické váčky uvolní svůj obsah exocytózou.

škrob

Polysacharid složený výhradně z glukosových jednotek a používaný jako zásoba energie v buňkách rostlin.



α -šroubovice (α -helix)

Běžný strukturální motiv proteinů, ve kterých lineární

sekvence aminokyselin vytváří pravotočivou šroubovici stabilizovanou vnitřními vodíkovými můstky mezi atomy kostry proteinu.

šroubovice

Dlouhý útvar připomínající vývrtku.



TATA-box

Charakteristická sekvence bohatá na thymin a adenin, která se nachází v oblasti promotoru u mnoha eukaryontních genů. Slouží ke specifikaci místa, kde začíná transkripce.

technologie rekombinantní DNA (genové inženýrství)

Soubor technik, jimiž jsou spojovány úseky DNA z různých zdrojů za vzniku nových DNA. Rekombinantní DNA se široce používají při klonování genů, při genových modifikacích organismů a obecně v molekulární biologii.

tělo buňky

Hlavní část nervové buňky, která obsahuje jádro. Dalšími částmi jsou axony a dendrity.

telofáze

Poslední stádium mitózy, ve kterém dekonduzují obě sady oddělených chromosomů a začínou se uzavírat do jaderných obalů.

telomera

Struktura na konci chromosomu, spojená s charakteristickou sekvencí DNA, která je replikována zvláštním způsobem. Blíže o funkci telomery na obr. 8-6. (Z řeckého telos = konec, meros = část.)

těsný spoj

Spoj mezi dvěma sousedními epiteliálními buňkami, který brání molekulám rozpuštěným v extracelulárním prostředí přecházet z jedné strany epitelové vrstvy na druhou.

thioesterová vazba

Vysokoenergetická vazba vzniklá kondenzační reakcí mezi karboxylovou kyselinou nebo acylem a thiolovou skupinou (-SH). Vyskytuje se například v acetyl-CoA a v mnoha komplexech enzym-substrát.

tkáň

Organizovaný soubor specializovaných buněk, který tvoří odlišnou část rostliny nebo živočicha.

trans

Na druhé straně.

trans-sít Golgiho aparátu (trans-Golgi network; TGN)

Část Golgiho aparátu, která se nalézá nejdále od endoplasmatického retikula. Z TGN pocházejí proteiny a lipidy určené pro lysosomy, sekreční váčky nebo buněčný povrch.



transdukce

(V genetice) bakteriofágem zprostředkovaný přenos hostitelské DNA z jedné buňky do druhé.

transferová RNA (tRNA)

Malá molekula RNA, využívaná v syntéze proteinů jako pojítko („adaptér“) mezi specifickým kodonem nebo skupinou kodonů, mRNA a specifickou aminokyselinou.

Každý typ molekuly tRNA je kovalentně spojen s určitou aminokyselinou a rozpoznává určitý kodon nebo sadu kodonů párováním bazí.

transformace

Děj, při kterém buňky přijmou DNA ze svého okolí a poté exprimují geny z této DNA.

transgenní

Rostlina nebo živočich vlastnící ve stabilně začleněné formě jeden či více genů z jiné buňky nebo z jiného organismu a schopný předat tyto geny následující generaci.

transkripce

Kopírování jednoho vlákna DNA do komplementární sekvence RNA enzymem RNA-polymerázou.

transkripční faktor

Termín volně používaný pro každý enzym potřebný k zahájení či regulaci transkripce v eukaryotech. Patří sem regulační proteiny genů stejně jako obecné transkripční faktory.

translace

Děj, při kterém se pořadí nukleotidů v RNA překládá do pořadí aminokyselin v proteinu. Toto začleňování aminokyselin do bílkoviny podle pořadí nukleotidů v RNA se děje na ribosomech, kterými mRNA prochází jako přehrávaná páska magnetofonem.

transportní váček

Membránový váček, který přenáší proteiny z jednoho vnitrobuněčného oddílu do druhého, například z ER do Golgiho aparátu.

transpozon (transponovatelný neboli přemístitelný element)

Úsek DNA, který se může pohybovat z jednoho místa chromosomu na druhé nebo dokonce z jednoho chromosomu na druhý v rámci jedné buňky. Důležitý zdroj genetické rozmanitosti u většiny organismů.

tranzitní stav

Chemický útvar, který přechodně vzniká v průběhu reakce a má nejvyšší energii ze všech reakčních meziproductů.

trávení

Enzymové odbourání velkých molekul přijatých v potravě. Výsledkem jsou malé molekuly, které potom vstupují do cytosolu buněk a jsou dále zužitkovány (metabolizovány).

triacylglycerol

Ester glycerolu a mastných kyselin. Hlavní složka tukových kapének v živočišných tkáních (kde jsou mastné kyseliny nasycené) a rostlinných olejů (kde jsou mastné kyseliny většinou nenasycené).

tubulin

Protein, z něhož jsou vytvořeny mikrotubuly.

tuk

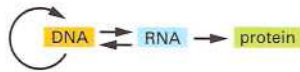
Lipid používaný žijícími buňkami jako zásobárna pro úschovu metabolické energie. Ve většině případů se skládá z triacylglycerolů (viz Panel 4-2, str. 58-59).

tumor-supresorový gen

Gen, který v normální tkáňové buňce omezuje proliferaci a invazivní chování buňky. Ztráta nebo inaktivace obou kopií tohoto genu v diploidní buňce vede ke ztrátě kontroly a napomáhá změně této buňky v buňku rakovinnou.

ústřední dogma molekulární biologie

Pravidlo, podle něhož tok informace směřuje od DNA přes RNA k proteinu.



váček

Malá membránová organela kulovitého tvaru. Nachází se v cytoplasmě eukaryontních buněk.

vajíčko

Samičí zárodečná buňka, obvykle velká a nepohyblivá. Obsahuje velké množství cytoplasmy.

van der Waalsova síla

Slabá přitažlivá síla způsobená fluktuací (náhodnými změnami polohy) elektrických nábojů. Působí mezi atomy na vzdálenost 0,3–0,4 nm. V kratších vzdálenostech začínají působit silné odpudivé síly.

vazba - viz chemická vazba

vazebná energie

Síla chemické vazby mezi dvěma atomy. Měří se jako energie v kilojoulech, která je potřebná k přerušení jednoho molu takových vazeb.

vazebné místo

Oblast na povrchu proteinu, obvykle dutina nebo žlábek, která je svým tvarem komplementární jiné molekule (ligandu), a proto ji může vázat mnoha slabými nekovaletními vazbami.

vedoucí vlákno

Jeden ze dvou nově vytvářených řetězců DNA v replikační vidličce. Vedoucí vlákno je vytvářeno nepřetržitou syntézou ve směru 5' → 3'.

vektor

(V molekulární genetice) genetický element, obvykle bakteriofág nebo plasmid, který do sebe může začlenit část cizí DNA a přenést ji do cizí buňky. Široce se používá při klonování genů.

virus

Infekční částice sestávající z nukleové kyseliny (RNA nebo DNA), uzavřené v proteinovém pouzdru. Replikuje se tak, že parazituje na reprodukčním aparátu hostitelské buňky, ze které se uvolňují nové částice viru, aby nakazily další buňky. Častý původce nemocí.



v_{lim} (někdy uváděná jako V a chybně jako V_{max})

Limitní rychlost enzymové reakce, dosahovaná při úplném nasycení enzymu.

vnitřní membrána

Každá membrána eukaryontních buněk kromě plasmatické membrány. Příklady jsou membrány endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu.

vodíkový ion (H^+)

Proton ve vodném roztoku, základní prvek kyselosti. Takové protony se ochotně spojují s molekulami vody za vzniku hydroxoniových iontů (H_3O^+), takže volné vodíkové ionty v pravém smyslu slova jsou vzácné.

vodíkový můstek

Slabá chemická vazba mezi elektronegativním atomem, například dusíkem nebo kyslíkem, a vodíkovým atomem spojeným s jiným elektronegativním atomem.

volná energie (G)

Energie, kterou lze ze soustavy uvolnit tak, aby konala užitečnou práci. Může například pohnout jinou chemickou reakcí.

vysokoenergetická vazba

Kovaletní vazba, při jejíž hydrolýze se uvolní neobvykle velké množství volné energie, a to za podmínek panujících v buňce. Příklady jsou fosfodiesterové vazby v ATP a thioesterový spoj v acetyl-CoA.



zárodečná buňka

Buňka patřící ke specializované buněčné linii, která dává vznik gametám (vajíčku nebo spermii) v mnohobuněčných tělech živočichů nebo rostlin.

zásada (neboli báze)

Molekula, která v roztoku přijímá proton. Označení báze se také používá pro puriny a pyrimidiny v DNA a RNA.

záznam z terčíkového zámku

Technika, při níž se ústí malé skleněné elektrody uzavře kouskem buněčné membrány, a tím se umožní záznam proudu procházejícího jednotlivými iontovými kanály v této membráně.

změna volné energie (ΔG)

Rozdíl mezi volnou energií produktů a výchozích látek v chemické reakci. Velká záporná hodnota ΔG znamená, že reakce má značný sklon probíhat samovolně.

zpětnovazebná inhibice

Způsob metabolického řízení, při kterém konečný produkt řetězce enzymových reakcí snižuje aktivitu některého předchozího enzymu v dráze.

zpožďující se vlákno (váznoucí vlákno)

Jeden ze dvou nově vytvářených řetězců DNA v replikační vidličce. Zpožďující se vlákno je tvořeno oddělenými částmi řetězce, které budou později kovaletně spojeny.

Rejstřík

Stránky označené F se vztahují k obrázku, stránky s označením FF obsahují po sobě jdoucí obrázky a čísla stránek s písmenem T odkazují na tabulky.

A

- absorpční buňky, 32F, 607F, 616, 616F
- acetylcholin, 400, 401F, 402T, 485T
různé typy receptorů, 486F, 491-492
strukturní vzorec, 486F
účinky na různé cíle, 484, 486F
- acetylcholinový receptor, 135F, 400, 403T
- iontový kanál acetylcholinového receptoru, 387F
- acetylkoenzym A (acetyl-CoA)
jako aktivovaný přenašeč, 100-101, 100T
oxidace v cyklu kyseliny citronové, 120-121, 120F
při hladovění, 126
struktura, 101F
tvorba
v buněčném metabolismu, 109-110, 109F
z mastných kyselin, 118-119, 119FF
z pyruvátu, 118, 118E, 120F
- acetylové skupiny, v aktivovaných přenašečích, 100-101, 100T
- adaptiny, 464-465, 465F, 465T
- ADE2-gen, 255F
- adenin, 66F
v DNA, 186-188, 188FF
v RNA, 213, 213FF
- adenosin, 67F
- adenosintrifosfát, *viz* ATP
- adenovirus, 298FF
- adenylátcykláza
funkce, obecně, 537T
v dráze spojené s G-proteiny, 496, 497, 497E, 499, 500F
- adhezní proteiny, 135F
- adhezní spoje, 608FF, 609-610
- ADP, při tvorbě z ATP, 96, 96F
- ADP/ATP, antiport, 419, 419E, 421
- adrenalin, 485T, 498, 498T
- adrenergní receptor, 135F
- adresová sekvence, 453, 45T
pro ER, 454T, 459-460, 460F, = signální sekvence
iniciační sekvence a terminační sekvence přenosu, 461-462, 461FF
- aerobní dýchání (respirace), 12
raná evoluce, 407, 408F
účinnost, 429
- afinitní chromatografie, 162F
- AIDS, 298T
- akční potenciály, 395-397, 396F, 398F
a elektricky ovládané K⁺-kanály, 396-397, 403T
a elektricky ovládané Na⁺-kanály, 395-396, 396FF, 403T
a uvolnění nervového mediátoru, 398, 399F
- A-kináza, aktivace a účinky, 498-499, 499 FF
- aktin, 135E, 530, 531F
jako genová rodina, 292
množství v buňce, 532
v buněčném kortexu červených krvinek, 364F
polymerace
hydrolýza ATP, 531, 531F
na vedoucím okraji, 534-535, 535FF
- aktinová vlákna (filamenta), 16-17, 16E, 18E, 513-514, 514E, 529-542, 530FF, 531F
a mikrotubuly, srovnání, 530-531
- funkce, 529-530
jako soubor proteinů, 149, 151, 151F
- kontraktilní prstenec, 551, 551E, 555E, 561, 561F
- na vedoucím okraji, dynamika, 534-535, 535FF
- v adhezních spojích, 609-610F
- v buněčné adhezi, 535, 535FF
k matrix, 603, 603F
- v modelu svalového stahu, 539, 539FF
- v sarkomerách, 538, 538F
- aktin-vázající proteiny, 529, 532-533, 532F
viz také gelsolin, myosin, profilin, thymosin, tropomyosin, troponin
- aktivace G-proteinu, 494, 494F
- aktivace proteinu Ras, 506, 506F
- aktivační energie, 85-86, 85F
bez enzymů, 168
s enzymy, 86, 86F
mechanismus snížení, 169, 170F
podstata, 85-86, 85F
přechodový (tranzitní) stav, 168
- aktivační proteiny, v regulaci genů
bakteriální, 262, 262F
eukaryontní, 265-266, 266FF
- aktivní místo, lysozymu, 168, 169F
- aktivní transport, 375, 375F, 377-385, 377E, 386T
přes jaderné póry, 456-457, 456F
přes vnitřní mitochondriální membránu, 419, 419F
spřažený, 380-381, 380F
- aktivované přenašeče, 95, 100T, 102
acetyl-CoA, 100-101, 101E, 100T
ATP, 96-97, 96FF, 100T
biosyntéza, 94-104, 94FF
FADH₂, 120E, 121, 122FF
GTP, 120E, 121, 122FF
karboxylovaný biotin, 100T, 101E, 102
NADH a NADPH, 98-100, 99E, 100T
tvorba ve spřažených reakcích, 96
tvorba s účastí ATP, 97E, 99E, 102
v přenosu energie, 94-95, 94F
vitaminy, 172
- alanin, 61E, 63F

- aldehyd, 47F
- aldehydová skupina, cukrů, 56F
- α -globin, uveden pod písmenem G
- α -šroubovice, (α -helix) 141, 144E, 145
středních filament, 515, 516F
transmembránových proteinů,
358-359, 359F
- alkalický, zásaditý, 51E, 52
- alkohol, 47F
- alkoholdehydrogenáza, 150F
- allosterická regulace, 173-174, 174FF
- Alu I (restrikční nukleáza), 316F
- Alu-sekvence, 295-296, 296F
- amfipatický, 59F, 60
lipidová dvojná vrstva, 349-352,
349FF
- aminoacyl-tRNA, v translaci, 229-230,
230F
- aminoacyl-tRNA-syntetázy, v syntéze
proteinů, 227, 227F
- aminokyseliny, 60-61, 61FF
fixace uhlíku, 437-438, 437F
optické izomery, 61, 62F
peptidová vazba v proteinech, 134,
136, 136F
polární a nepolární, 138F
postranní řetězce, 136-137, 137FF
připojení k tRNA, 227, 227F
syntéza, prebiotická, 235-236, 236F
- γ -aminomáselná kyselina, viz GABA
receptor, viz GABA-receptor
- aminoskupina, 47E, 52
jako slabá zásada, 51F
- aminy, amidy, 47F
- A-místo, ribosomu, 229-230, 229 FF
- amoniak, 51F
- AMP, tvorba, 103E, 104
- anabolické dráhy, 78, 79F
viz také biosyntetické dráhy
a NADPH, 100
- anaerobní, 12
fermentace, 114, 115F
- anafáze, 552, 552E, 555E, 557-559,
558F
A a B, mechanismus, 558-559,
558F
v cytokinezi, 560, 560F
- anhydrid kyseliny, 47F
- anionty, 42
- koncentrace uvnitř a vně buněk,
373, 373T
- Antennapedia*-gen, 627F
- antigen, 157
- antigen-vázací místo, struktura, 157,
157FF
- antikodon, funkce, 226, 226F
- antimitotické látky, 520-521
- antiport
ADP/ATP, 419, 419F
poháněný Na^+ , výměna protonů,
381, 386T
- APC-gen, 620F
- apoptóza, viz programovaná buněčná
smrt
- Arabidopsis thaliana*, 595F
- arginin, 62F
- Archaea (Archaeobacteria),
viz archebakterie
- archebakterie, 24
evoluce, 26, 26F
histony v, 252
Methanococcus, 439E, 441-442,
442F
fylogenetický strom, 440, 440F
- asexuální reprodukce, 304
- asparagin, 63F
- asparagová kyselina, 63E, 137F
- aspartáttranskarbamoyláza
allosterická regulace, 174, 174F
velikost, tvar, 150F
- atom, 3E, 8E, 9E, 37, 38-39, 38F
interakce, elektrony, 39-42, 41FF
násobné vazby, 44-45, 45F
reaktivita, elektronová slupka,
40-42, 41F
- atomová hmotnost, 38
- atomové číslo, 38-39, 38F
- ATP, 64E, 67F
jako aktivovaný přenašeč, 96-97,
96FE, 100T
poměr k ADP v buňkách, 421
množství v buňce, 110
z cAMP, 497, 497F
jako nosič energie, 12, 64, 64E, 67F
při fosforylaci proteinů, 175-176,
175F
- výtěžek z
oxidace tuků, 420, 420F
oxidace glukosy, 413, 420, 420F
- glykolýzy, 419
oxidační fosforylace, 419-420
- ATPázy, 168T
jako pumpy, 377-378, 377F
- ATP-syntáza, 417-418, 418F
syntéza ATP, 417-418, 417FF
v chemiosmotickém sprážení, 409,
409F
- autofagie, 477, 477F
- autofagosomy, 477, 477F
- autoradiografie, po gelové
elektroforéze DNA, 317E, 318
- Avogadrovo číslo, 39, 39F
- axon, 32E, 394, 394F
transport podél mikrotubulů, 524,
524F
- AZT, jako inhibitor HIV, 301F
-
- ## B
- β -globin - uveden pod písmenem G
- Bacillus subtilis*, transformace,
284-285, 284F
- bakteriální konjugace
- bakterie, 9, 18E, 19, 20E, 22-25, 23FF
ATP-syntáza, 418-419, 418
bakteriorhodopsin, 361-362, 362F
bičinky, protonový gradient, 419,
420F
buněčné dělení, 548, 548F
duplikace, 279, 279F
eubakterie a archebakterie, 24, 26F
evoluce, časový přehled, 28
fotosyntetické, 23-24, 24E, 362,
362E, 407, 408E, 362, 362F
fylogenetický strom (dendrogram),
440, 440F
geny pro mRNA, 216
gradient H^+ a H^+ -ATPázy, 384, 385F
chemické složení, 53, 53T
chromosom, 247
makromolekuly, 68F
membrána, složení a závislost na
teplotě, 354
odolnost vůči antibiotikům,
283-284
plasmidy, 282-284, 282FF
porin, 360, 360F
proliferace, 582
protilátky proti, 158F
regulace genů, 259, 261-262, 261FF

- replikační počátek, 192, 191
- reprodukce, 23
- siřné, 24, 24F
- syntéza ATP, 119
- syntéza proteinů, 231, 231F
- transformace, 284-285, 284F
- transkripce, iniciace a terminace, 216-218, 217FF
- transponovatelné elementy a transpozice, 289-290, 290F
- bakteriofág lambda
 - lokálně specifická rekombinace a transdukce, 289, 289F
 - životní cyklus, 288F, 289
- bakteriofág T4, 298FF
- bakteriorhodopsin, 135F, 361-362, 361F, 374F, 429F
- bazální lamina, 32
 - struktura, složky, 606, 606F
 - v kůži, 614F
- bazální tělísko, 519F, 527
 - a centrioly, 521
- báze, 49-52, 51F
 - nukleotidů, 64, 66FF
- benzen, 45, 46F
- bičinky
 - bakteriální, 18F
 - eukaryontní, 25F, 26, 528-529, 528F, 529F, 530F
- bílé krvinky, 617, 617FF
- biologická oxidace, 429
- biosyntetické dráhy
 - prekursory z glykolýzy a z cyklu kyseliny citronové, 127, 127F
 - viz také* anabolické dráhy a katabolické dráhy
 - zpětnovazebná inhibice, 172-173, 172FF
- biosyntéza, 77-78, 79F, 94-104, 94FF
 - poháněná hydrolyzou ATP, 97-98, 98F
- biotin, 172
 - přenos karboxylové skupiny, 101-102, 101F
- bivalent, 564FF, 565
- B-lymfocyty, 158F
- bromkyan, 164F
- buněčná adheze
 - glykokalyx, 365
 - extracelulární matrix, 603, 603F
- selektivní, při udržování tkáně, 614, 615F
- v plazivém pohybu buněk, 534-535, 535FF
- změny v buněčném dělení, 561-562, 561F
- buněčná biologie, počátek, 2-3
- buněčná diferenciaci, 257
 - genetický základ, 245
 - kombinační řízení cestou jediného proteinu, 269-271, 270FF
 - Ras-zprostředkované systémy, 507, 507F
 - údržba, 271-273, 272F
- buněčná doktrina, 547
- buněčná komunikace
 - integrační síť, 508-509, 508FF
 - mezerové spoje, 612, 612F
 - úrovně, 481, 481F
 - rakovina, 507
 - údržba tkání, 614, 615F
- buněčná lokomoce (pohyb z jednoho místa na jiné)
 - eukaryontní, brvy a bičinky, 518-519, 519F, 527-529, 528FF
 - svalový stah, 538-542, 539FF
 - bakteriální bičinky, 419, 420F
- buněčná membrána (plasmatická membrána)
 - asymetrie, 354, 355F
 - cytosolová a necytosolová strana, 355, 356F
 - fosfolipidy a tvorba, 59FF, 60
 - jako přepážka, 347, 347F, 356-357, 356F
 - membránové domény, 366-367, 367F
 - permeabilita (propustnost), 371, 371F
 - syntéza v eukaryotech, 355-356, 355FF
 - tekutost (fluidita), 353-354, 354F, 366
- buněčná paměť
 - dědičnost chromatinové struktury, 272-273, 272F
 - při údržbě tkání, 614-615, 615F
 - při vývoji
 - formování tělního plánu, 624
 - Hox-geny, 627, 627F
 - smyčka pozitivní zpětné vazby, 272, 272F
- buněčná proliferace
 - aktivace receptorové tyrosinkinázy, 505, 505F
 - buněčná smrt, 585
 - buněčné stárnutí, 584
 - fáze G₀, 581
 - jednobuněčné organismy, 582
 - rakovina, 587-589, 588F
 - Ras-zprostředkované systémy, 507, 507F
 - růstové faktory, 582-583, 583F, 584T
- buněčná reprodukce, 21
 - pohlavní, 22
- buněčná signalizace, 482-493, 482FF, 485T
 - GTP-vázající protein jako molekulový přepínač, 176, 176F
 - integrace, 508-509
 - kontrolní body buněčného cyklu, 573
 - odpověď v cíli, 484-485, 486F, 499, 499FF
 - receptorové proteiny, 482
 - transmembránová, proteinové stroje, 178-179, 179F
 - závislá na kontaktu, 483-484, 483FF, 485T
- buněčná smrt, 584-587, 585FF
 - v epidermis, 617
 - ve střevu, 618F
 - z poranění, 585-586, 586F
- buněčná stěna
 - bakterie, 18F
 - rostliny, 18F, 594-597, 595FF, 600
- buněčná teorie, 2-3
- buněčné dělení (cytokineze), 17F
 - adheze a změny tvaru buňky, 561-562, 561F
 - bakteriální buňky, 548, 548F
 - eukaryontní buňky, 548, 549
 - mnohobuněčné organismy, 547
 - omezení počtu b.d., 584
 - onkogeny v objevování řídicích mechanismů b.d., 303
 - organely během b.d., 551
 - průběh, 547-568, 548FF, 549T
 - rychlost v dospělých eukaryotech, 581
- buněčné dýchání, 12

- buněčné chování, kombinované účinky signálů, 485, 486F
- buněčné oddíly, 13-15, 14FF, 447-477, 448FF
- evoluce, 450-452, 451F
- organely, 448FF, 449-450, 449T, 450T
- buněčné pohyby
- aktinová vlákna, 529-530, 530F
- cytoskelet, 16-17, 16FF
- mikrotubuly, 526-529, 526FF
- rostlinné buňky, 597, 597F, 600
- svalový stah, 538-542, 539FF
- v prvních fázích vývoje, 622, 623F
- buněčné stárnutí, 584
- buněčný cyklus, 547, 549-551, 549FF, 549T
- fáze, 549-550, 549FF, 571, 571F, 581, 581F
- regulační systém buněčného cyklu, 572-581, 573FF
- trvání jednotlivých úseků u bakterií, 548
- trvání jednotlivých úseků u eukaryot, 549, 549T
- zjednodušený pohled, 248-249, 248F
- proteiny p53 a p21, 580-581, 580F
- MPE, 575-578, 575FF
- buněčný kortex, 363-364, 533
- červených krvinek, 364, 364F
- v plazivém pohybu buněk, 534-536, 534FF
- buněčný plazivý pohyb, 533-535
- adheze, 535, 535FF, 603, 603F
- mechanismus, 534-536, 534FF, 536F
- buňka, *viz také* bakterie, eukaryontní buňky, prokaryontní buňky a jednotlivé typy buněk
- ancestrální (prapůvodní), věk, 22
- biosyntéza, 77-78, 79F, 94-104, 94FF
- doba života, v tkáních, 615
- energie, použití a získávání, 77-104, 78FF, 82-83, 83F, 84, 107-124, 107FF, 127-129, 127FF
- evoluce, 21-22, 239-240
- faktory přežití, 584-585, 586F
- homogenizace a centrifugace, 160FF
- chemické složení, 20-21, 22FF, 37-73, 38FF, 39FF, 68F, 53T
- katalýza, 77-94, 78FF
- kmenové b., 615-616, 616F
- koncentrace iontů uvnitř a vně, 372-372, 373T
- makromolekuly, 65, 65FF, 68-73
- malé organické molekuly, 52-65, 53FF, 53T
- osmoza a, 382-383, 382FF
- pořádek v buňkách, 77, 79, 79F
- povrch, glykokalyx, 364-365, 366FF
- rozměry 3, 3FF, 8F, 19, 20F
- struktura, mikrotubuly, 518, 519F, 523-524, 523F, 526-527, 527F
- tažná síla a střední filamenta, 514-518, 515FF
- termodynamická analýza, 80-82, 80FF
- typy a specializace, 20-21, 31, 32FF, 605
- buňky kartáčového lemu, *viz* absorpční buňky
- buňky střevního epitelu, 607, 607F
- adhezní spoje, 609-610, 609F
- membránové proteiny, asymetrická distribuce, 367, 367F
- transport glukosy, 381, 382F
-
- C**
- Caenorhabditis elegans*, jako model, 29, 29F
- CaM-kinázy, 502, 502F
- cAMP, *viz* cyklický AMP
- cAMP-dependentní (závislá) proteinkináza, *viz* A-kináza
- cAMP-fosfodiesteráza, 497, 407F
- Cdk, 575F
- aktivace, 577, 578, 578F, 579
- buněčné stárnutí, 584
- cyklin, 578, 579F
- MPE, 575-578, 575FF
- pro řízení buněčného cyklu, 574-575
- Cdk-inhibitorové proteiny, 580-581, 580F
- cDNA, 329-330
- knihovna, 329-330, 331, 331F
- PCR za účelem získání klonu, 334F, 335
- syntéza, 329-330, 330F
- celulóza, 165F
- celulosa
- funkce, 55
- mikrofibrily, 597, 597F, 600
- místo syntézy, 596-597
- ve stěnách rostlinných buněk, 596, 596F
- celulosa-syntáza, 597F
- centrální nervový systém, vývoj, 624-626, 624F
- centrifugace, 160FF
- při izolaci organel, 450
- centrifugace v hustotním gradienu, 161F
- centrioly, 18F, 521, 521F
- centromera
- kinetochory, 553, 556, 556F
- satelitní DNA, 294-295
- v eukaryontních chromosomech, 249, 249F
- v mitotických chromosomech, 248F
- centrosomy, 18F, 518, 519F, 521, 521F
- duplikace a separace (zdvojení a oddělení), 552, 554F
- jádro a, nákres, 256F
- mitotické vřeténko a jeho póly, 552-553, 553F
- cévní svazky, 598FF
- cilia, *viz* brvy, řasinky
- cílové buňky, 482
- odpovědi na vzrůst koncentrace cAMP, 498, 498T
- selektivita odpovědi na změny G-proteinu, 495-495
- citrát
- v anabolismu, 127F
- v cyklu kyseliny citronové, 120, 120F, 122FF
- citrátový cyklus, *viz* cyklus kyseliny citronové
- C-kináza, aktivovaný diacylglycerol, 501, 501F
- CoA, *viz* koenzym A
- crossing over - *viz* překřížení
- cukry, 53-55, 53FF, 53T, 56FF *viz také* disacharidy; monosacharidy; oligosaccharidy; polysacharidy
- izomery, 54, 56F
- jako mechanická opora, 55

jako molekuly paliva, 107-108, 107F
jako zdroj energie, 54-55
glykolýza, 110-118, 111FF
cyklus kyseliny citronové, 119-121, 120FF
výtěžky ATP a produktů z, 420, 420E, 429
syntéza, prebiotická, 235-236, 236F
tvorba kruhu, 56F
tvorba při fotosyntéze, 436-438, 436FF
tvorba vazeb v, 54, 54F
ukládání
jako glykogen, 125, 125F
jako škrob, 125E, 127
v mezibuněčném rozpoznávání, 55
v nukleotidech, 64, 66F
cyklický AMP, 67E, 497F
aktivace CAP v bakteriích, 262, 262F
buněčné odpovědi
zprostředkované cAMP, 498, 498T
jako druhý posel, 497-499, 498FE, 498T
syntéza, odbourání, 497, 497F
cyklický GMP
jako druhý posel při vidění, 504F
v působení NO, 490
cykliny, 574, 575F
G_i, 578-579, 579F
Cdk-komplex, faktor Rb a růstový faktor, 582, 583F
komplex MPF-cyklin, 576-577, 577F
S-fáze, 578-579, 579F
odbourání, 578, 579F
ubikvitin, 577
změny koncentrace, 577, 577E, 578
cyklus kyseliny citronové, 119-121, 120FE, 122F
v anabolismu, 127, 127F
v biosyntetických reakcích, 121
v obecném katabolickém schématu, 109E, 110
cyklus trikarboxylových kyselin, *viz* cyklus kyseliny citronové
cystein, 63F
v tvorbě disulfidových můstků, 154, 154F

cystická fibroza, 469
cytidin, 67F
cytochalasiny, 531-532
cytochrom *b*₅₆₂, model, 147F
cytochrom *b-c*₁, 414, 415E, 426
cytochrom *c*, 150E, 415E, 426-427, 427F
cytochromový komplex *b₆-f*, 435-436, 435F
cytochromoxidázový komplex, 414, 415F
jako protonová pumpa, 427-428, 428FF
cytokineze, 549, 555E, 560-562, 560FF
cytoskeletální struktury, 551, 551F
dělicí rýha, 560-561, 560F
kontraktilní prstenec, 555E, 561-562, 561F
v rostlinných buňkách, 562-563, 562F
cytoplasma, 6, 6FF
struktura, 88, 88F
viz také cytosol
cytosin, 66F
v DNA, 186-188, 186FF
deaminace v poškozené DNA, 202, 202F
v RNA, 213, 213FF
cytoskelet, 16-17, 16FF, 135E, 513-542, 513FF
aktinová vlákna, 529-542, 530FF
izolace centrifugací, 160FF
mikrotubuly, 518-529, 519FF
modelování rostlinného pletiva a, 597, 597E, 600
proteinová vlákna c., 513-514, 514F
při adhezi buněk, 603, 603F
střední (intermediární) filamenta, 514-518, 515FF
v M-fázi, 551, 551F
cytosol *viz také* cytoplasma, 15-16, 15FF
glykolýza, 109, 109E, 110
vzhled, funkce, 448, 448FE, 449, 449T, 450T

Č

červené krvinky, 363F
buněčný kortex, 364, 364F
fagocytoza, 473, 473F

obnova, 615, 617, 617F
číslo přeměny, 171
člověk
jako modelový organismus, 29
počet buněk, 621
čočky, tvorba a vývoj, 610F

D

dalton, 39
ddC, jako inhibitor HIV, 301F
dědičnost
DNA a RNA, 65
mechanismus, struktura, 188-189, 188F
požadavky pro život, 183
definice, 53, 56F
dehydrogenační reakce, 85
dělicí rýha, 560-561, 561F
delta (signální molekula), 484, 484E, 485T
denaturace, 139, 139F
dendrity, 394, 394F
deoxyribonukleáza, 150F
deoxyribonukleová kyselina, *viz* DNA
deoxyribosa, 66F
depolarizace, 395
dermis, 614F
desmosomy, 515, 515E, 517, 608E, 610-611, 611F
keratinová vlákna, 517
detergenty, vlastnosti, příklady, použití, 360-361, 360FF
diacylglycerol, 497, 497E, 500-501, 501F
Didinium, 28, 28F
diferencované buňky, 31, 32FF
genom, 257, 257F
nahrazení terminálně diferencovaných, 615-617, 616FF
proteiny, 258
terminálně d.b., 615
difosfát, tvorba z ATP, 103E, 104
difuze solutu, těsné spoje, 608, 608F
difuze, při enzymové katalýze, 86-88, 88F
dihydroxyaceton, 56F
diploidní buňky, 278, 563
v pohlavně se rozmnožujících organismech, 305-306, 305F

- výhody, 292
 - z prvního dělení při meioze, 564F, 565
 - disacharidy, 57F
 - disulfidové můstky, 63F, 154, 154F, 467
 - DNA, 10, 65, 65FF
 - analýza, 315-324, 316FF, 317F, 321FF
 - denaturace a renaturace, *viz* hybridizace DNA
 - „fingerprinting“ při PCR, 335, 336F
 - helikáza, 196-197, 197FF
 - hybrid s RNA, retroviry, 300, 301F
 - jako genetický materiál, 185, 185F
 - mitochondrií, 10
 - nepřepisované úseky, 218
 - nové rekombinantní molekuly, 335, 337F
 - příprava pro Faktor VIII, 328-329, 328F
 - regulační proteiny genů, 259-260, 259F
 - RNA, hybridní, retroviry, 300, 301F
 - satelitní, 294-295
 - sekvenování, 319F
 - spojníková, 251, 252F
 - systém opravy chybného párování, 200-201, 201F
 - štěpení a spojování ribozymem, 238T
 - v elektronovém mikroskopu, 7F
 - v evoluci buněk, 239-240, 240F
 - velikost, 246, 314
 - vírové genomy, 298, 298F, 298T
 - z příbuzných genů, 332, 332F
 - DNA-klony
 - cDNA, použití, 331
 - detekce specifických D.-k., 328-329, 329F
 - genomové a cDNA-klony, 330-331, 331F
 - PCR za účelem získání D.-k., 334F, 335
 - DNA-knihovna, 328
 - cDNA, 329-330, 330FF, 331
 - a genomová knihovna, srovnání, 330-331, 331F
 - genomová
 - detekce genu, 328-329, 328FF
 - introny, 329
 - konstrukce, 328, 328F
 - DNA-ligáza
 - při homologní rekombinaci, 286F
 - při klonování DNA, 326-327, 326FF
 - při opravě DNA, 204, 204F
 - při opravě chybného párování v DNA, 201F
 - při replikaci DNA, 196, 196F
 - v technologii rekombinantní DNA, 325-326, 325F
 - DNA-polymeráza, 135F
 - při opravě chybného párování v DNA, 201F
 - při PCR, 332, 333F
 - při syntéze DNA, 192-194, 192FF
 - kontrola DNA-polymerázou, 194, 194FF
 - replikační vidličky, 193-194, 193F
 - RNA-polymeráza, srovnání, 214-215
 - směr syntézy DNA-polymerázou, 192F, 193, 194, 195F
 - svírací protein, 197, 197FF
 - v RNA-primeru, 195, 196, 196F
 - DNA-technologie, 315-320
 - dodecylsulfát sodný (SDS), 163F, 360, 360F
 - dolichol, 59F, 467, 468F
 - Downův syndrom, 307, 566-567
 - draselný ion
 - gradient elektrochemického potenciálu, 377, 378, 379
 - klidový membránový potenciál, 392-393, 392FF
 - koncentrace uvnitř a vně, 372-373, 373T
 - drogy, léky, přípravky
 - antimitotické, 520-521
 - anti-HIV, 300, 301F
 - psychoaktivní, 401
 - Drosophila*, (drosofila)
 - jako modelový eukaryot, 29-30, 29F
 - genová rodina sonic hedgehog, 626-627, 626F
 - hox-geny, 627, 627F
 - jako model pro obratlovce, 626-627, 627F
 - Oka a Ey, 273, 273F
 - vývoj, 626-628, 626FF
 - základní genová exprese, rané embryo, 622-623, 623F
 - druhý zákon termodynamiky, 79-81, 80F
 - živé buňky, 80-81, 80F
 - druhy, podobnost DNA u příbuzných druhů, 205, 205F
 - druzí poslové, definice, obecné vlastnosti, 497, 497F
 - duplikace genů, 291-292, 292-294, 293FF
 - exonů, 294, 294F
 - genové rodiny, evoluce, 292-293, 293F
 - proteinové domény, evoluce, 293-294, 294F
 - dvojnásobné vazby, 45, 46F
 - dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza (2D PAGE), 163F
 - dýchací enzymové komplexy, 414-415, 415F
 - jako protonové pumpy, 427-428, 428FF
 - kovy pro přenášení elektronů, 425-427, 426FF
 - dýchací řetězec, *viz* elektrontransportní řetězec
 - dýchací trakt, řasinkový epitel, 528, 528F
 - dýchání, 83
 - a fotosyntéza, 83-84, 83F
 - Dynamická nestabilita mikrotubulů, 522-523, 522FF
 - Dynamin, klathrinové jamky, 464, 465F
 - Dyneiny, 135F
 - cytoplasmatické, 525-526, 526F
 - řasinkové, 529, 529FF
-
- ## E
- EcoR I (restrikční nukleáza), 316FF
 - EF-Tu, *viz* elongační faktor
 - EGF, *viz* epidermální růstový faktor
 - elastáza, 148F
 - elastin, 32E, 135E, 153-154, 153F
 - elektrická signalizace
 - neurony, 394-400, 394FF
 - prvoci a rostliny, 387, 387F

- elektricky ovládané kanály, 390, 390F, 391F
- Ca²⁺ a uvolnění nervového mediátoru, 397-399, 399F, 403T
- K⁺, a akční potenciál, 396-397, 403T
- Na⁺ a akční potenciály, 395-396, 396FF, 403T
- elektroforéza, 163F
- elektronová mikroskopie, 3F, 5F, 6,8,19T
- elektronová slupka
- stabilita atomu a, 40-42, 41F
 - vznik chemické vazby, 40-42, 41F
- elektronové přenašeče, 426, 426F
- elektronový mikroskop
- rastrovací, 5F, 8
 - rozlišení, 3F, 5F
 - transmisní, 5F, 8
- elektrontransportní řetězce, 409-410, 410F, 414, 415, 415F
- čerpání protonů, 415-416, 415F, 422-429, 422FF, 423F, ,
 - v chemiosmotickém spřažení, 409-410, 410F
- redoxní potenciály, 423, 424F, 425, 426F
- tvorba protonového gradientu s pomocí e.ř., 124, 124F
- v chloroplastech, 432, 433-434, 433FF, 435-436
- elektrony, 38, 38F, 40F
- interakce atomů, 39-42, 41FF
 - v aktivovaných nosičích, 98-100, 99F, 100T
 - v iontových vazbách, 42-43, 42F, 43T
 - zachycování světelné energie chlorofylem, 434, 434F
- elongační faktor, 176, 177F
- E-místo ribosomu, 229-230, 229FF
- endocytotické dráhy, 463, 463F, 472-477, 473FF
- k lyzozomům, 477, 477F
- endocytoza, 472
- receptorová, 474-476, 475FF
 - třídění makromolekul
 - v endosomech, 475-476, 476F
- endokrinní žlázy, 33F
- v buněčné signalizaci, 483, 483F, 485T
- endomembránový systém *viz* soustava vnitřních membrán
- endoplasmatické retikulum (ER), 7F, 13-15, 14FF, 18F, 448FF, 449-450, 449T, 450T, 458, 458F
- drsné, 459
 - evoluce, 451, 451F
 - import proteinů, 454T, 459-460, 460F
 - opláštěné transportní váčky, 465T
 - při dělení buňky, 551
 - sarkoplasmatické retikulum, 540-541, 541F
 - sestavování a export membrán, 355
 - signální sekvence, 454T
 - syntéza proteinů 4458-462, 461FF, 467-469, 468F, 469F
 - umístění v buňce, 526-527, 527F
 - vztah k jádru, 256F
 - zadržování proteinů, 468-469, 469F
- endosomy, 449, 449T, 450T, 475
- evoluce, 451, 451F
 - opláštěné transportní váčky, 465T
 - syntéza a třídění proteinů, 458, 475-476, 476F
 - v endocytotické dráze, 474, 474F
 - zpracování LDL, 474, 474F
- endoteliální buňky, 613, 614F
- uvolňování NO, 489-490, 490F
- enhancery (zesilovače transkripce), 265-266, 266FF
- entropie, 80
- v živých soustavách, 80-81, 80F
- enzymová katalýza, 167, 169, 170F
- aktivační energie, 85-86, 85FF, 169, 170F
 - číslo přeměny, 171
 - lyzozym jako model, 167-169, 169FF
 - přechodný (transitní) stav 168, 169, 170F
 - regulace, 172-176, 172FF, 174FF, 175F
 - v_{lim} a K_m , 169-171
 - V_{max} , *viz* v_{lim}
- enzymy, 167-176, 168T, 169FF
- aktivní místo, 86, 87F
 - allosterické, 173-174, 174FF
 - běžné funkční třídy, 168T
 - číslo přeměny, 171
- difuze v buňkách, 88
- jako katalyzátory, mechanismus, selektivita, 86, 86FF
 - kinetika, 169-171, 171F
 - názvosloví, 111, 168T
 - příklady, 135F
 - RNA jako e., 238-239, 238FF, 238T
 - v metabolických drahách, 77, 78F
 - v plasmatických membránách, 357F, 357T
 - ve spřažených reakcích, 114-118, 116FF
- epidermální růstový faktor (EGF), 135F, 294F, 485T, 584T
- epidermis
- kůže, 614F
 - obnova, 617, 617F
 - rostlin, 599F
- epidermolysis bullosa simplex, 517
- epiteliální buňky, 32FF
- keratinová střední filamenta, 517, 517F
 - rychlosti dělení, 581
- epiteliální tkáň, 594F
- epiteliální vrstvy, 605-613, 605FF
- adhezní spoje, 608F, 609-610
 - desmosomy, 608F, 610-611, 611F
 - hemidesmosomy, 608F, 611-612, 612F
 - mezerové spoje, 608F, 612, 612F
 - polární uspořádání, 606-607, 606FF
 - řasinkové v dýchacím traktu, 528, 528F
 - střevní, 367, 367F, 381, 382F
 - těsné spoje, 607-608, 608F
 - vznik trubice při vývoji, 610, 610F
- ER, *viz* endoplasmatické retikulum
- erythrocyty, 33E, 617, 618F
- erythropoietin, 584T
- Escherichia coli*, 23F
- genetické mísení, 281-282
 - genom, 280
 - jako modelový organismus, 25
 - kopulace, F-plasmid, 282-283, 282FF
 - mutace, 280-281, 281F
 - regulace genů, 261-262, 261FF
 - rychlost dělení a růstu, 279, 279F, 548, 548F
 - transpozony, 289

estery, 47F
estradiol, 485T, 488, 488FF
Eubacteria, 24, 26, 26F
euchromatin, 254-255
 viz také chromatin
Eukarya, *viz* Eukaryota
eukaryontní buňky, 9-17, 25-26, 25FF
 brvy a bičíky, 527-529, 528FF
 buněčné oddíly, 447-477, 448FF, 451
 buněčný cyklus, 549-551, 549FF, 549T
 cilia, *viz* brvy, řasinky
 genová exprese, 234, 235F
 glykokalyx, 364-365, 365F
 intracelulární pohyby, motorové proteiny a, 525-526, 526F
 poměr povrchu k objemu, 451
 proteasomy v, 233-234, 233F
 Saccharomyces cerevisiae jako model, 26-27, 26F
 vnitřní membrány, 347-348, 347FF
Eukaryota, 9, 12
 evoluce, 28, 413, 440, 440F
 geny pro mRNA, 215-216
 iniciace transkripce, 264-265, 264FF
 introny, 219-220, 220F
 mechanismus opravy nesprávného párování v DNA, 200, 201F
 modelové rostliny, 28-29, 29F
 od genu k proteinu, souhrn kroků, 223, 223F
 proteosyntéza, iniciace, 231, 231F
 regulace genů, 259-260, 265-266, 266FF, 267-268, 268FF
 retrotranspozon, 295-296, 295F
 samostatná buňka, 26-28, 26FF
 struktura chromosomů, 246-256, 246FF
 transpozony, 295-297, 295FF
 viz také jednotlivé třídy
 zpracování RNA, 218-222, 219F, 221FF, 222F
 živočišné modely, 29-30, 29FF
evoluce, 22, 28
 buněk, 28, 352
 eukaryontních buněk, 25-26, 25FF
 fotosyntézy, 407, 408F
 fylogenetický strom (vývojový strom, dendrogram), 440, 440F

 genomů, transpozony, 296-297, 297F
 genových rodin duplikací genu, 292-293, 293F
 histony, zachování struktury, 252
 introny, 223-224
 mitochondrie a chloroplasty, 438
 organel, 450-452, 451F
 proteinu, 147, 293-294, 294F
 přeskupování exonů, 294, 294F
 retrovirů, 300
 RNA-svět, 239-240, 240F
 rychlost změn v DNA, 205, 205F
 společná prabuňka, 439-442, 439FF, 442F
 virů, 299-300
 zachování struktur Cdk a cyklinů, 577
 živých organismů, 407, 408F
exocytoza, 467
 sekrečních váčků, 471FF, 472
exokrinní žlázy, 33F
exony, 220, 220F, 221F
expresní vektory, 337-338, 337FF
extracelulární matrix, 593
 adheze buněk k, 603, 603F
 bazální lamina, 606, 606F
 fibroblasty
 syntéza, 601-602, 601F
 uspořádávání, 602, 602F
 množství v různých tkáních, 600
 proteiny v, 153
 proteoglykany, 604-605, 604F
 rostliny, 594-600, 595FF
 v pojivové tkáni, 32F, 600-605, 600FF
 v tkáních, 3, 3F
Ey (genový regulační protein), 273, 273F

F

FADH₂/FAD, 121F
 v elektrontransportním řetězci, 124, 124F
 v cyklu kyseliny citronové, 120F, 121, 122FF
 v oxidaci mastných kyselin na acetyl-CoA, 118-119, 119F
fagocytotické buňky, 472, 473, 473F
fagocytoza, 472-473, 473F
fagosomy, 472, 473, 473F
faktor IX, 294F
faktor VIII
 gen, 220E, 296
 klonování, 327-329, 328FF
 komerční produkce, 338
 konstrukce sondy, 328-329, 328F
falloidin, 532
fáze G₀, 581, 581F
fáze G₁, 550, 550F
fáze G₂, 550, 550F
fáze M, 549-551, 59FF, 552-562, 552F, 575-578, 575FF
fáze S, 550, 550F
fenotyp, 278
fenylalanin, 63F
fermentace, 114, 115F
ferredoxin, 435F
ferritin, 135F
fertilizace
 a Ca²⁺, 501, 501F
 jako spouštěcí mechanismus pro štěpení, 622, 623F
 první kroky po f., 575
Fe-S-centra, 426, 426F
fibroblastový růsový faktor (FGF), 584T
fibroblasty, 32F
 buněčné stárnutí, 584
 plazivý pohyb, 534-535, 534FF
 proliferace in vitro, 583F
 syntéza kolagenu, 601-602, 601F
 v pojivové tkáni kůže, 613, 614F
 ve svalových buňkách, 270-271, 270F
fibroin, 141
fibronektin, 603, 603F
filopodia, 534-535, 534FF
fixace dusíku, 441-442, 442F
fixace uhlíku, 83, 436-438, 436FF, 442, 442F
flavinadenindinukleotid, *viz* FADH₂/FAD
flipázy, 354, 355F
floem, 599F
fluorescenční barviva, 4F
 při barvení chromosomů, 247, 247F
 při gelové elektroforéze DNA, 317E, 318
fluorescenční mikroskop, 4F

formylmethionin, 231
fosfatidylethanolamin, 355F
fosfatidylcholin, 349F, 354, 355F
fosfatidylserin, 355F
fosfátová a fosforylová skupina, 47F, 52
 v aktivovaných přenašečích, 96-97, 96FF, 100T
 v regulaci proteinové aktivity, 175-176, 175F
fosfátová vazba, ΔG° některých, 117F, 118
fosfáty, 47F, 52
 v nukleotidech, 66F
 vysokoenergetická (makroergní) vazba, 47F
fosfoanhydridové vazby, 64, 64F, 67F, 97F, 117F
fosfodiesteráza, 504F
fosfodiesterová vazba, 65, 67F, 187F
fosfoenolpyruvát
 enolfosfátová vazba, 117F, 118
 v anabolismu, 127F
 v glykolýze, 113F
fosfoesterová vazba, 97F, 117F
fosfoestery, 47F
fosfofruktokináza, 112F
3-fosfoglycerát
 při fixaci uhlíku, 436-437, 436FF
 při glykolýze, 113F
 tvorba z glyceraldehyd-3-fosfátu, 114-118, 116FF
 v anabolismu, 127F
fosfoglycerátkináza, 115, 116F
fosfolipáza C, 497, 497F, 499-501, 500T, 501F
 a Ca^{2+} , 501, 501F
 odpovědi zprostředkované IP₃, viz inositol-1, 4, 5-trisfosfát
fosfolipidy, 58F, 349, 349FF
 distribuce v plasmatické membráně, 354, 355F
 import do mitochondrií a chloroplastů, 458
 pohyblivost v dvojných vrstvách, 352-353, 353F
 v membránách, 60, 60F
fosforylace a defosforylace
 aktivace Cdk, 579
 jaderné laminy, 518, 559, 559F
 jako molekulární přepínač, 492F, 493

myosinu II, 542
 Na^+ -pumpa, 379-380, 379F
regulace buněčného cyklu, 574, 576
regulace aktivity proteinů, 174-176, 175F
fosforylační kaskáda, Ras-aktivovaná, 506-507, 507F
fosforylační reakce, 96, 97F
fosfotransferázový protein, Hpr, 141, 142FF, 150F
fotony, 433
 syntéza ATP a NADPH, 435
 zachycování v reakčních centrech, 433, 433FF
fotoreceptorové (světlocitlivé) buňky, 503
 aktivační mechanismus, 503, 504F
fotosyntetické reakční centrum, 362, 363F
 získávání světelné energie, 433-434, 433FF
fotosyntetický elektrontransportní řetězec, 432-435, 432F, 435F, 436, 436F
fotosyntéza, 12, 13
 a dýchání, 83-84, 83F
 a fixace uhlíku, viz reakce fixace uhlíku
 obecné reakční schéma, 82-83, 82FF, 430
 raná evoluce, 407, 408F
 reakce světlé a temné fáze, souhrn, 432-433, 432F
 redoxní potenciály, 435F, 436
 význam, 430
fotosystémy PSI a PSII, 435-436, 435F
 zachycování světelné energie v reakčním centru, 433-434, 433FF
F-plasmid, v bakteriální konjugaci, 282-283, 282FF
fragmoplast, 562, 562F
frakční centrifugace, 161
fruktosa, 56F
fruktosa-1,6-bisfosfát, 111F, 112F
fruktosa-6-fosfát, 112, 127F

G

ΔG , 89, 90F
 energeticky příznivé a nepříznivé reakce, 89, 89FF

hydrolyzy ATP na ADP a na AMP, 104
 a koncentrace reaktantů, 89, 91FF, 92-93
 a redoxní reakce, 422
 záporná a kladná, 89, 90F
 ΔG° , 91F, 92
 hydrolyzy některých vazeb, 91F
 následné reakce, 93-94, 94F
 některých fosfátových vazeb, 117F, 118
 oxidace glyceraldehyd-3-fosfátu, 115
 rovnovážná konstanta, 91F, 92-93, 92T, 92FF, 166, 166F
 z redoxních potenciálů, 423, 424F
GABA, 400-401, 401F, 402T, 405T
GABA-receptor, 400-401, 401F, 402T
galaktosa, 56F
gamety, viz zárodečné buňky
gastrulace, 622, 622F
gelová elektroforéza, 163F
 při analýze DNA, 317-318, 317F
gelová chromatografie, 162F
gelsolin, 532F, 533
gen, 21, 183, 219-220, 220F
 centrální dogma, 212, 212F
 DNA, 185, 185F
 evoluce, role intronů, 222
 evoluce cestou duplikace genů, 292-293, 293F
 exony, 220, 220F
 mutantní organismy, 339, 340F
 chromosomy, 10
 introny, 219-220, 220F, 223-224
 izolace, 327-332, 328FF, 330F, 331F
 knockout (vyřazení genu), 340FF, 341-342
 kód pro protein, 188-189, 188F
 nahrazení, transgenní organismy, 340FF, 341-342
 provozní (housekeeping), 258
 rané teorie a studie, 184-185, 185F
 stabilita, opravy DNA, 202, 204
 transgenní organismy, 340FF, 341-342
 umístění na chromosomech, hybridizace in situ, 324, 324F
 v diferencovaných buňkách, 257, 257F

- genetická rekombinace, při meioze, 564FF, 565
- genetická rozmanitost, 277
- cestou duplikace genů, 292-294, 293FF
 - genetické mísení, ukázka in vitro, 281-282
 - a pohlavní rozmnožování, 304-308, 304FF
 - a retroviru, 302
 - u bakterií, 278-291, 279FF
 - výhody a nevýhody, 290-291
 - z přenosu genů, 282-291, 282FF
 - v mnohobuněčných eukaryotech, 291-297, 293FF, 298T, 299FF, 300-303, 303T
 - z meiozy, 307-308, 308F
 - z mutací z replikačních chyb, 280-281, 281F
 - z rekombinací v meiotických překříženích chromosomů (chiasmatach), 306F, 307, 308
 - zdroje, 277-278
- genetika
- historické mezníky, 183-184
 - ústřední dogma molekulární biologie, 212, 212F
- genetické nemoci, genové inženýrství k jejich nápravě, 342
- genetický kód, 224FF, 225
- mitochondrie, 225
 - redundance, 224F, 225, 226
- genom, 189
- eukaryontní a prokaryontní, 291-292
 - evoluce, transpozony, 296-297, 297F
 - lidský g.
 - transpozony, 295-297, 295FF
 - velikost, 189, 320, 327
 - mutace připadající na dobu života, 620
 - neměnnost, během difrenciace, 245
 - nepřepisovaná DNA, 218
 - opakované (repetitivní) nekódující sekvence, 294-297, 295FF
 - retroviry, 298T, 300
 - sekvenace úplného g., 441
 - u *Escherichia coli*, 280
 - v diferencovaných buňkách, 257, 257F
- virový, 298, 298F, 298T
- genomová knihovna, 328-331, 328F, 331F
- genová exprese
- a alternativní sestřih RNA, 222, 222F
 - buněčná paměť, 271-273, 272F
 - centrální dogma, od DNA k proteinu, 212, 212F
 - koordinace různých g. e., 261, 261F, 268-269, 270F
 - od DNA k proteinu, 234, 235F
 - polohové efekty, 255F, 256
 - při údržbě tkáně, 614-615, 615F
 - a skládání chromatinu, 253-255, 254F
 - a transpozony, 296-297, 297F
 - účinnost, rozdíl mezi geny, 212, 212F
 - v raném vývoji, 622-624, 623F
 - základní, 262
- genové inženýrství, 335-342, 337FF
- k získání velkých množství proteinů, 337-338, 337FF
 - nová DNA, 335, 337F
 - řízená mutagenese, 339, 340F
 - transgenní zvířata, 340-342, 340FF
- geny řídící vývoj
- Ey, Pax-6*, 273, 273F
 - homology v obratlovcích a mouchách, 626
 - Hox-geny, 627, 627F
 - rodina genů sonic hedgehog, 626-627, 626F
- Giardia*, 25-26, 25F
- Giemsa, barvení, 248F
- gliové buňky, 32F
- globin, z hemoglobinu, 149, 149F
- α -globinový gen, restriční mapy, 318F
- β -globinový gen
- detekce vadného g.g., 322, 322F
 - evoluce rodiny genu, duplikace genu, 292-293, 293F
 - exony a introny, 220F
 - nukleotidová sekvence, 189F
 - při srpkovité anémii, 199, 199F
 - regulace, 268, 269F
 - transpozony ve shluku, 296, 296F
 - výhody diploidního g.g., 292
 - životnost mRNA, 222-223
- glukagon, 485T
- glukokortikoidní hormon a receptor, při regulaci genů, 269, 270F
- glukosa, 53-54, 54F, 56F, 110-118, 111F, 112F, 114
- glukosa-6-fosfát, 112F, 127F
- glukosamin, 57F
- glukuronová kyselina, 57F
- glutamát, 400, 401F, 402T
- glutamin, 63F, 98F
- glutamová kyselina, 63F
- glyceraldehyd, 56F
- glyceraldehyd-3-fosfát
- oxidace na 3-fosfoglycerát, 114-118, 116FF
 - tvorba v cyklu fixace uhlíku, 437-438, 437F
 - v glykolýze, 111F, 112FF
- glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, 115, 116F
- glycerol, 55, 58, 60, 60F
- glycin, 63F
- jako nervový mediátor, 400-401, 401F, 402T
- glykogen, 57F
- jako zásoba paliva, 125, 125F
 - odbourání, zprostředkované cAMP, 499
- glykokalyx, 364-365, 365F
- glykolipidy, 55, 59F, 349, 350F
- g. plasmatické membrány, 355-356, 355FF
- glykolýza, 110-118, 111F, 112FF, 116FF
- v anabolismu, 127, 127F
 - v buněčném metabolismu, 109, 109F
- glykoproteiny, 55, 467
- funkce, 467
 - modifikace v Golgiho aparátu, 470
 - úpravy, 468, 468F
 - v plasmatické membráně a glykokalyxu, 364-365, 365F
- glykosaminoglykany (GAG), 604-605, 604F
- glykosylace, 467-468, 468F
- Golgiho aparát, 13-15, 14FF, 18F, 448FF, 449, 449T, 450T, 469, 470F
- evoluce, 451, 451F
 - lyzosomální třídění proteinů, 476-477

opláštěné transportní váčky, 465T
vezikulární transport proteinů,
469-470, 470F
modifikace oligosacharidů, 470
třídění proteinů, 469-470, 470F
umístění v buňce, mikrotubuly a,
526-527, 527F
v buněčném dělení, 551
v řízených sekrečních drahách, 471
zelený fluoreskující protein, 135F
G-proteiny, 494, 494F
a adenylátcykláza, 496-497, 496F,
497-499, 497FF, 498T
a fosfolipáza C, 497, 497F, 499-501,
500T, 501F
a iontové kanály, 495-496, 496F
aktivace a inaktivace, 494-495,
495F
podjednotky, 494, 494F
stimulační nebo inhibiční, 497
v selektivě odpovědi cílových
buněk, 495-496
gradient elektrochemického
potenciálu, 377
Nernstova rovnice, 393, 393F
sodné a draselné ionty, 372-373,
373T, 377, 378, 379
a transport přes membrány,
376-377, 376F
vápenaté ionty, 373T, 384, 502
vnitřní mitochondriální
membrána, 416-417, 416F
gradient elektrochemického
potenciálu, 377, 378-379
koncentrace uvnitř buňky,
372-373, 373T
toky během akčního potenciálu,
395-396, 397F
GTP, 121F
v citrátovém cyklu, 120F, 121, 122F
v aktivaci G-proteinů, 494, 494F
v aktivaci Ras, 506, 506F
v regulaci GTP-vázajících proteinů,
176, 176FF
GTP, hydrolýza
aktivovaným G-proteinem,
494-495, 495F
dynamická nestabilita
mikrotubulů, 522-523, 522F
při tvorbě klathrinových jamek,
463-464, 465F
a Ras, 506

v jaderném transportu proteinů,
457
GTP-čapka (v mikrotubulech), 522F,
523
GTP-vázající proteiny, 491F
jako molekulové přepínače, 176,
176FF, 492F, 493
monomerní, 506
Ras, 506-507, 506FF
guanin, 66F
v DNA, 186-188, 186FF
depurinace poškozeného g.,
201-202, 202F
v RNA, 213, 213FF
guanosin, 67F
guanosintrifosfát, viz GTP

H

H⁺-ATPáza, viz protonová pumpa
Hae III (restrikční nukleáza), 316F, 317
Halobacterium halobium, 361-362,
361F, 374F
haploidní buňky, 278, 305-306, 305F,
563
 α -helix, viz α -šroubovice
hem, 171-172, 171F
v cytochromech, jako přenašeč
elektronů, 426-427, 427FF
v cytochromoxidáze, přenos
elektronů, 428, 428F
hematopoeza, 617, 617F, 618F
hemidesmosomy, 612, 612F
hemofilie A, a klonovaná DNA,
327-329, 328FF
hemofilie, 296
hemoglobin, 135F, 150F
hem, 171-172, 171F
jako protein s více podjednotkami,
149, 149F
heterochromatin, 254, 254F
hexokináza, 167
Hind III (restrikční nukleáza), 316FF
histamin, 485T
histidin, 62F
histonové proteiny, 251-252, 252FF
HIV, viz virus lidské imunodeficiency
hladký sval, 33F, 538, 542
hlístice (*Caenorhabditis elegans*), 30,
30F
Hollidayův spoj, viz mezivláknová
výměna
homeodoménové proteiny, 135F
DNA-vazebný úsek, 260F
homeotické selekční geny, 627, 627F
homogenizace, 160F
homologní chromosomy, 247
v meioze, 563-565, 564FF
v mitoze, 563, 564F
homologní rekombinace, 285-287,
285FF
a transpozony, 296
duplikace genů, 293, 293F
F-plasmid, 283, 284F
mezivláknová výměna, 286-287,
286FF
při náhradě nebo knockoutu genů,
341, 341F
v meioze, 306F, 307
v přeskupování exonů, 293-294,
294F
začlenění pomocí h.r., 287, 287F
hormony v buněčné signalizaci,
482-483, 483F, 485T
Hox-geny, 627, 627F
HPr viz fosfotransferázový protein
hyaluronát, 604F
hybridizace DNA, 321
karyotyp, 247, 247F
nedokonale párování, 332, 332F
při izolaci příbuzných genů,
331-332, 332F
Southern blotting (Southernův
přenos), 322, 322F
srpkovitá anemie, detekce, 322,
322F
hybridizace in situ, 323-324, 323F
při studiu genové exprese sonic
hedgehog, 625
hybridizace nukleových kyselin,
320-324, 321FF
in situ, 323-324, 324F
Southern a Northern blotting, 322,
323F
hydridový ion
při odevzdávání elektronů NADH,
413F, 415
v oxidačně-redukční reakci
NADPH/NADP⁺, 99, 99F
hydrofilní molekula, 48, 50F
membránové lipidy jako, 349-352,
349FF

ve vodě, 350-351, 350FF
hydrofobní molekula, 48-49, 50F
membránové lipidy, 349-352, 349FF
schopnost procházet přes lipidové dvojné vrstvy, 356, 356F
ve vodě, 349-351, 350FF
hydrofobní síly, 71E, 72
při skládání proteinů, 136-137, 138F
hydrogenační reakce, 85
hydrolázy, 168T
v lyzosomech, 476, 477F
hydrolýza, 54, 54F
při odbourání cukrů, 54, 54F
katalyzovaná lyzozymem, 167-169, 169FF
v odbourání makromolekul, 102FF, 103-104
hydrolýza ATP, 54, 54F
ATP-syntázou, 418-419, 418F
biosyntetické reakce poháněné h. ATP, 97-98, 98F
Ca²⁺-pumpa, Ca²⁺-ATPáza, 384
konformační změny v motorových proteinech, 177-178, 178F
Na⁺, K⁺-ATPáza, 378-380, 378FF
a přenos fosforu, 96, 96F
při iniciaci transkripce, 264F, 265
při intracelulárních pohybech, 525-526
při oddělení centrosomů, 552
při polymerizaci aktinu, 531
při připojení aminokyseliny k tRNA, 228, 227F
při svalovém stahu, 539, 540F
v cyklu fixace uhlíku, 437-438, 437F
v glykolýze, 110, 112FF
volná energie h. ATP, 91F, 117F, 118
v polynukleotidu, 104, 104F
hydroxidový ion, 49F, 51F, 52
hydroxoniový ion (H₃O⁺), 49, 49E, 51F
hydroxylová skupina, 47E, 52, 57F

Ch

chemická rovnováha, 91FF, 92-93, 92T
chemické reakce
aktivační energie a enzymy, 85-86, 85FF

energeticky výhodné reakce a ΔG° , 89, 90FF
následné, ΔG° , 93-94, 94F
samovolné, 89, 90F
spřažené, 91F, 95-96, 95F
glykolýza jako příklad, 114-118, 116FF
volná energie a koncentrace reagujících látek, 89, 91FF, 92-93
volná energie a směr ch.r., 85, 89, 90F
chemické vazby, 37-52, 38FF
délka vazby, 43, 43F
elektrony, 39-42, 41FF
síla vazby, 43T, 44
typy, elektronové slupky, 41-42, 41F
vazebná energie, 91F
vazebné úhly, 44E, 45
chemicky ovládané kanály, 390, 390FF, 402T
chemiosmotické spřažení, 409-410, 410F, 442, 442F
chiasmata, 307
chinon, 425, 425FF
chitin, 55
Chlamydomonas, bičíky, 528, 529F
chlorid sodný (NaCl), 42-43, 42E, 50FF
chlorofyl, 12, 12F, 433, 433FF
v získávání světelné energie, 433-434, 433FF
chloroplasty, 12-13, 12FF, 18F, 430-439, 431FF, 449-450, 449T
evoluční původ, 13, 13E, 24, 26E, 438, 452
genomy a proteosyntéza, 438-439
import lipidů a fosfolipidů, 458
import proteinů, 457-458, 457F
jako zásobárna paliva, 125E, 127
mitochondrie, srovnání, 126, 126E, 430, 432, 432F
stavba, složky, 430, 431FF, 432
světelná a temnotní fáze, 432-433, 432F
v buněčném dělení, 551
v mesofylových buňkách, 598F
cholerotoxin, 495
cholesterol
biosyntéza, poslední stadia, 99F
dráha příjmu ch., 474-475, 475F
strukturní vzorec, 59E, 489F

v buněčných membránách, 354, 354F
v plasmatické membráně, distribuce/rozdělení, 354, 355F
chromatida, 253E, 552
rozchod sesterských, 552-553, 552E, 555FF, 556-557
chromatin, 18F, 246, 251F, 252, 253F
aktivní, skládání, 254-255
balení a skládání
heterochromatin, 254, 254F
inaktivní, skládání, 254, 254F
kondenzovaný, 252-254, 254F
nukleosomy, 250-252, 251FF
regulace genů, 266-267
v jadérku, 257, 257F
vzhled, interfáze a mitóza, 250, 251F
chromosom, 10, 10F
bakteriální, 247
centromera, 249, 249F
karyotyp, lidský, 247, 247F
kondenzace
v buněčném cyklu, 550
a MPE, 576
počet u různých druhů organismů, 10
přetřídění rodičovských genů, v gametách, 307-308, 308F
rané studie, 184-185
replikace, 249-250, 249FF
složení, 246
specifické proužky, lidský, 247, 248F
stavba, 246-256, 246FF
telomery, 249-250, 249FF
třídění v meióze a mitóze, 563-564, 564F
určení polohy genů, hybridizace in situ, 324, 324F
uspořádání v jádru, 256-257, 256FF
v diploidních buňkách 563
X a Y, 247, 248, 247E, 248E, 254, 254F
chřipkový virus, 298T, 299F
chymotrypsin, 148E, 150E, 294F

I

imunoafinitní sloupcová chromatografie, 159F

- imunoglobulin, lehký řetězec, 147F
 imunoglobulin, *viz* Protilátka
 imunoprecipitace, 159F
 inertní plyny, elektronové slupky v, 40F
 infekce
 fagocyty, 473, 473F
 vírová, 297-298, 298T, 334F, 335
 zánětlivá odpověď, 365, 366F
 informační RNA (mediátorová RNA), *viz* mRNA
 inhibice zpětnou vazbou, 172-174, 172FF, 174FF
 inositol-1,4,5-trisfosfát, 497, 497F, 500-501, 501F
 inositolfosfolipidová dráha, 500-501, 501F
 inositolfosfolipidy, 355F, 356
 insulin, 135F, 140, 150F, 485T
 komerční produkce, 338
 receptor, 135F
 vyučování exocytozou, 471, 472F
 integrace F-plasmidu, 283, 284F, 287, 287F
 integráza, 289, 300, 301F
 integriny, 357T, 535, 535FF
 vazebné vlastnosti, 603, 603F
 v M-fázi, 562
 interfáze
 intermediární filamenta, 16, 16E, 18E, 513-518, 514F, 515FF, 516F, 517F
 distribuce, 516
 funkce, mechanické namáhání buňky, 514-515, 516, 517F
 jádro, 256F
 jako vláknité proteiny, 153
 umístění v buňkách, 515, 515F
 intracelulární signální dráhy, 487, 487F, 508, 508F
 adaptace, 503
 citlivost a amplifikace, 503, 504F
 integrace, 509, 509F
 molekulární přepínače, 492-493, 492F
 pro NO, 490
 rychlost, 502-503
 v tyčinkových fotoreceptorových buňkách, 503, 504F
 vzájemné propojení, 508-509, 508F
 zprostředkované cAMP, 496-499, 497FF, 498T
 zprostředkované enzymem, 504-509, 505FF
 zprostředkované fosfolipázou C, 499-501, 500T, 501F
 zprostředkované G-proteinem, 493-504, 493FF, 498T, 500T
 intracelulární signální molekuly, 487, 487F, 492
 adaptéry, 506, 506F
 Ca²⁺, 501, 501FF, 502
 cAMP, 497-499, 497FF, 498T
 druzí poslové, 497, 497F
 IP₃ a diacylglycerol, 499-501, 501F
 jako molekulové přepínače, 492-493, 492F
 pro dráhy zprostředkované receptorovou tyrosinkinázou, 505-506, 505FF
 introny, 220, 220F
 odstranění, 220-221, 221FF
 v evoluci, 223-224
 proteinových domén, 294, 294F
 výhody a nevýhody, 223-224
 iontoměničová chromatografie, 162F
 iontové kanály, 372, 386-403, 387FF, 402T, 403T
 a nervové buňky, 395-403, 395FF, 402T, 403T
 a akční potenciály, 372, 395-397, 395FF
 elektricky ovládané, *viz* elektricky ovládané kanály
 chemicky ovládané, *viz* chemicky ovládané kanály
 a komplexní duševní funkce, 403
 mechanicky aktivované, *viz* mechanicky aktivované kanály
 metody elektrického měření, 388-389, 388F
 otevřený a uzavřený stav, 389, 389F
 ovládané ligandem, 386-387, 387F
 ovládané nervovým mediátorem, *viz* chemicky ovládané kanály
 regulace G-proteiny, 496, 496F
 selektivita, 386
 struktura, 387F
 transportní rychlosti, 387
 záznam z terčíkového zámku, 388-389, 388F
 iontové látky, ve vodě, 50F
 iontové vazby, 41-43, 42F, 43T, 71F
 při skládání proteinů, 136, 138F
 v biologických soustavách, 71F
 ve vodě, 71F
 ionty, koncentrace, 372-373, 373T
 prostup přes lipidové dvojné vrstvy, 356, 356F
 IP₃, *viz* inositol-1,4,5-trisfosfát
 isoleucin, 63F
 isopren, polyisoprenoidy, 59F
 izoelektrická fokusace, 163F
 izomerázy, 168T
 izomery, 54
 aminokyselin, 62F
 cukrů, 54, 56F
 izotopy, 38
-
- J**
 jádérko, 18F, 257, 257F
 jaderná lamina, 256, 256F, 455, 456F, 517-518, 518F
 a chromatin, 256-257, 256F
 při apoptoze 587, 587F
 při mitoze, 559, 559F
 střední filamenta, 515
 jaderné importní receptory, 456F, 457
 jaderné laminy
 fosforylace a defosforylace, 518, 559F
 při mitoze, 517-518, 518E, 559, 559F
 jaderné póry, 218, 218E, 256, 256F, 449
 při mitoze, 559-560, 559F
 struktura a složení, 455-456, 456F
 transport látek, 455-457, 456F
 jaderný obal, 9-10, 9F, 14F, 449, 455, 455F
 jádro atomu, 38, 38F
 jádro buňky, 6, 6FF, 9-10, 9F, 18F, 256, 256F, 448FF, 449, 449T, 450T
 evoluce, 451, 451F
 import proteinů, 453-457, 454T, 454FF
 izolační techniky, 160FF
 organizace chromatinu, 256-257, 256FF

transkripce v jádře a úpravy RNA, 218, 218F
v genové expresi, 235F
velikost, 246
jaterní buňky, 581
játra, HGF, 583, 584T

K

kadheriny
v adhezních spojích, 609, 609F
v desmosomech, 610-611, 611F
kalmodulin, 502, 502F
velikost a tvar, 150F
kanálové proteiny, 372, 372F
jako vodné póry, 359-360, 359FF
konexony v mezerových spojích, 612, 612F
příklady, 385-386
kanály ovládané nervovými
mediátory, 390, 390F,
398-400, 400F, 490-491, 491F
distribuce, 492
ovládané acetylcholinem, 387F,
389F
příklady, 400-401, 401F, 402F
karbonylová skupina, 47F, 52
karboxylová skupina, 47F, 52
aktivace a přenos, 101F
jako slabá kyselina, 51F
v aktivovaných nosičích, 100T,
101F, 102
v mastných kyselinách, 55, 58F
karboxypeptidáza, 172
kasein, 135F
katabolické dráhy, 78, 79F
katabolický aktivační protein (CAP),
146, 146F, 148, 149F, 262,
262F
katabolismus
aerobní, 118-124, 118FF, 120FF
anaerobní, 110-118, 111F, 115F
odbourání molekul potravy, tři
stadia, 108-110, 109F
kataláza, 150F
katalýza, 77-94, 78FF
katalyzátory, 86, 167
kationty, 42, 373, 373T
keratin, 517, 517F
distribuce, 153
v epidermis, 617F

α -keratin, 135F, 141
keratinová vlákna, 516, 517F
s desmosomy, 610-611, 611F
s hemidesmosomy, 612, 612F
kinesin, 135F, 525-526, 526F
jako motorový protein, 178
kinetochory, 553, 553F, 554F, 556,
556F, 557
klathrinové jamky, 464, 464F, 474
klathrinové váčky, 464-465, 464FF,
465T
v receptorové endocytoze, 474,
475F
klky, 616, 616F
klonování DNA, 324-335, 324FF
cDNA-knihovna, 329-331,
330FF
detekce genu, 328-329, 328FF
genomová knihovna, 327-328,
328F
genu lidského faktoru VIII,
327-329, 328FF
izolace
genů využívajících cDNA,
329-331, 330FF
genů využívajících genom,
327-329, 328FF
příbuzných genů, 331-332,
332F
k přípravě velkého množství
proteinu, 337-338, 337FF
PCR, 332-335, 333FF
plasmid jako vektor, 326, 326F
postup, 326-327, 326FF
sériová, 335, 337F
 K_m , definice a měření, 171, 171F
kmenové buňky, 615-616, 616F
hematopoetické, 617, 618F
při obnově střevních buněk, 616,
616F
v epidermis, 617, 617F
kodony, 224FF, 225
start, stop, 231
koenzym A, 67F
koenzymy, viz Aktivované přenašeče
kolagen, 32F, 135F, 150F, 153, 153F,
600, 601F
distribuce, množství, 600-601
funkce, 600, 602
jako genová rodina, 292
syntéza, 601-602, 601F

uspořádání do vláken, 601FF, 602
velikost a tvar, 150F
kolenchymové buňky, 598FF
kolchicin, 520-521, 527, 560
kolorektální rakovina, 620, 620F
geny pro opravu chybného
párování bazí 201
kombinační kontrola, 268-271, 268FF
diferenciace buněk, 269-271,
270FF
jediný regulační protein, 268-269,
270F
komplex enzym-substrát
v katalýze lysozymem, 169, 170F
vznik a disociace, 86-88, 88F
komplex jaderného póru, 456F
koncentrace iontů, 372-373, 373T
koncentrační gradient
draselných iontů, 372-373, 373T,
377, 378, 379
glukosy, 376
protonů, 416, 4160
sodných iontů, 372-373, 373T, 377,
378, 379
vápenatých iontů, 373T, 384, 502
kondenzační reakce, 54, 54F
při tvorbě cukru, 54, 54F
prebiotická (před vznikem života),
236, 236F
při tvorbě peptidové vazby, 136F
v biosyntéze, 97-98, 98F
v syntéze makromolekul, 68, 68F,
102FF, 103-104
konexony, 612, 612F
konformace
makromolekul, 69, 69F
proteinů, 139-140, 139F
konformační změny
GTP-vázající proteiny, 176, 176FF
malé molekuly, 174, 174FF
pohyby a buňka, 176-178, 178F
řízené fosforylací proteinů 174-176,
175F
sodno-draselná pumpa, 379-380,
379F
v allosterických regulacích
enzymů, 174, 174FF
v motorových proteinech,
hydrolyza ATP, 177-178, 178F
v myosinu, svalový stah, 539, 540F
v proteinových strojích, 178-179,
179F

v protonové pumpě, 429F
v receptorech spojených s G-
proteiny, 494-495, 495F
ve steroid-senzitivních regulačních
proteinech genů, 488
konjugace, *viz* bakteriální konjugace
kontaktně závislá signalizace, 483-
484, 483FF, 485T
kontrakce, 537, 537F
kontraktilní prstenec, 561
sval, 538-539, 539FF
kontraktilní prstenec, 530, 530F, 537, 542
v cytokinezi, 551, 551F
kontraktilní svazky, 530, 530F, 537, 542
kontrolní bod G₁, 573, 574F
pozastavení způsobené p21, 580-
581, 580F
start, 581
kontrolní bod G₂, 573, 574F
kopulační faktor, kvasinky, 481, 481F
korektura
DNA-polymerázou 194, 194FF
opravnou DNA-polymerázou, 196
primáza, 196
kortisol, 485T, 488, 488FF
kost, 32F, 600F, 604
obnova, 615
kosterní sval, 33F, 538-542
elektrické vzrušení, 540-541, 541F
fermentace na laktát, 114, 115F
stah, 539-542, 539FF, 541FF
kontraktilní aparát, 538, 538F
T-tubuly a sarkoplasmatické
retikulum, 540, 541F
kostní dřev, 617, 618F
kovalentní vazby, 41-48, 45FF
dvojně, 45, 46F
mezi více atomy, 44-45, 44F
polární, 45-48, 45F
síla vazeb, 43T, 44
srovnání s nekovalentními
vazbami, 43T
tvorba při oxidaci a redukci, 84-85,
84F
tvorba, vlastnosti, 41, 43-44, 43F
uspořádání, 44F, 45
vazebné úhly, 44F, 45
vysokoenergetické, 91F
kovy, 42

v elektrontransportním řetězci,
425-427, 425FF
Krebsův cyklus, *viz* cyklus kyseliny
citronové
krevní skupiny, 57F
kristy (přepážky, hrany),
v mitochondriích, 412F, 413
krvinky, 33F, 617, 618F
krycí pletivo, 599F
krypty, 616, 616F
kuchyňská sůl, *viz* chlorid sodný
(NaCl)
kurare, 400
kuře, onkogeny a nádory, 302-303,
302F, 303T
kůže, 602, 602F, 614F, 615
kolagen, uspořádání vláken, 602,
602F
obnova, 615
tkáň a uspořádání, 614F
kvasinky, 9F
Cdk-cyklinové geny, 577
fermentace (kvašení) na alkohol,
114, 115F
gradienty H⁺, 384, 385F
kopulační faktor, 481, 481F
membrána, složení a teplota, 354
proliferace, 582
sekvenace genomu, 441
kyanid, 421
kyseliny, 49, 49F, 51F
kyslík
produkce při fotosyntéze, 436
příjem elektronů od
cytochromoxidázy, 428, 428F
v evoluci buněk, 26, 26F
výskyt na Zemi, 407, 408F

L

laktátdehydrogenáza, 147F
laktosový represor, 135F
lamelipodia, 534-535, 534FF
laminin, 606
laminy, 517-518, 517FF
fosforylace a defosforylace při
mitoze, 559, 559F
MPF-kináza, 576
v apoptoze, 586, 587F
LDL a nemoci, 474-475

receptorová endocytoza, 474-475,
475F
LDL-receptory, příjem a recyklace,
474, 474F
lektiny, definice, 365, 366F
leucin, 63F, 137F
leucinový zip, 260F
leukemie, 618
leukocyty, 33F
lidský genom
mutace za život, 620
replikační počátky, 191
retrotranspozony, 295-296, 295FF
sekvenování, 441
transpozony, 295-297, 295FF
velikost, 327
genomové knihovny, konstrukce,
328, 328F
geny pro Cdk-cykliny, 577
chromosom
barvení podle Giemsy, 248F
karyotyp, 247, 247F
izolace genů klonováním, 327-329,
328FF
transpozony v β -globinovém
shluku genů, 296, 296F
ligand, definice, 155
lignin, 596
lipidová dvojná vrstva, 59FF, 348-357,
348FF, 354F
amfipatický charakter, 349-350,
349FF
asymetrie, 354, 355F
flexibilita, 352
laterální difuze, 353, 353F
lipidy, 349, 349FF
liposomy, 352, 352F
membránové proteiny, 358-359,
358F, 359F
nasycení, 353-354, 354F
překlápění, 353, 353F
relativní permeabilita, 356-357,
356F
samozacelovací schopnost,
351-352, 352F
syntetická, plochá, 352, 353F
syntéza, 354-356, 355E, 356F
tekutost (fluidita), 352-353, 352FF,
366, 366F
tvorba, 59FF, 60, 350-351, 351F
lipidy, 58FF, 60

import do mitochondrií a chloroplastů, 458
amfipatický charakter, 349-352, 349FF
nasycení, 353-354, 354F
odbourání, 108-110, 109F
pohyby v dvojné vrstvě, 352-353, 353F
liposomy, 352, 352F
lokální mediátory
NO, 489-490, 490F
v buněčné signalizaci, 483, 483E, 485T
lymfocyty, 33F, 613, 614F
lysin, 62F
lytická dráha, 288, 288F
lyzosomy, 7F, 13-15, 15F, 18F, 448FF, 449, 449T, 450T, 476-477, 477F
evoluce, 451, 451F
izolační techniky, 160FF
a opláštěné transportní vácčky, 465T
proteiny, syntéza v ER, 458
protonová pumpa, 384, 385F
lyzozym, 150F, 167
aktivní místo, 168-169, 169FF
reakce, 167-169, 169FF

M

makroergní vazba
acyl-anhydridová vazba, 116F
skupiny v některých aktivovaných nosičích, 100T, 102
fosfátové vazby, 117F, 118
v thioesterech, 115, 116F
makrofágy, 33F, 473, 473E, 474, 613, 614F
makromolekuly, 65, 65FF, 68-73
biosyntéza kondenzací, 65, 103
izolační techniky, 160FF
nekovalentní vazby a interakce mezi, 70E, 72-73, 72F
podoba, nekovalentní vazby, 69, 69FF, 72
rodiny, 68F
sekvence, výnam, 68-69
tvorba, obecné vlastnosti, 68-69, 68F
viz také DNA, proteiny, RNA

malé jaderné ribonukleoproteinové částice, *viz* snRNPs
mannosa, 56F
mannosa-6-fosfátový receptor, 477
mastné kyseliny, 55, 55E, 58FF, 60
acetyl-CoA, 109E, 110
jako zásoba živin, 55, 58F
modely, 55F
nasycené a nenasycené, 55, 58F
oxidace, 110
oxidační cyklus, 118-119, 119FF
skladování, 119E, 125
v buněčných membránách, 59FF, 60
matrix, mitochondriální, 411, 412E, 412
viz také Extracelulární matrix
měď, v cytochromoxidáze, přenos elektronů, 427, 428, 428F
mechanicky aktivované kanály, 390, 390FF, 391E, 403T
meioza, 305, 306-308, 306E, 308E, 563-567, 563FF
1. dělení, 564-565, 564F
2. dělení, 566, 566F
překřížení v bivalentu (crossing-over), 564FF, 565
délka, 564
chromosomální pohyby a křížení, přehled, 306E, 307
srovnání s mitozou, 566F
nondisjunkce, 566-567
objev, 563
třídění chromosomů, 563-564, 564F
membránová fúze, 466, 467F
membránové proteiny, 357-367, 357T, 358FF
integrální a periferní, 358, 358F
laterální mobilita (pohyblivost), 366-367, 366FF
lipidová dvojná vrstva, způsoby asociace, 358, 358F
lyzomální, 476, 477F
neproteinové modifikátory, 172
solubilizace detergenty, 360-361, 360FF
struktura, z rentgenové krystalografie, 361-362, 362FF
syntéza v ER, 461-462, 461FF

transmembránové, 358, 360, 358E, 359F, 360F
vícenásobný průchod, 359, 359E, 461-462, 462F
membránový potenciál, 376, 391
akční, *viz* akční potenciály
klidový, 392-393, 393F
Nernstova rovnice, 393, 393F
počet potřebných iontů, 392F
protonů, mitochondriální, 416-417, 416F
řídící faktory, 393
tvorba, K⁺, 392, 392FF
v postsynaptické buňce, 492
membránový transport, 371-403, 371FE, 373T, 386T, 402T, 403T
aktivní, *viz* aktivní transport iontů, *viz* ionty, transport pasivní nebo aktivní, 375, 375F
spřažený, *viz* spřažený transport
membrány, 347-367, 347FE, 357T
mentální funkce, synapse a integrace, 401-403, 402F
metabolické děje, segregální strategie, 447
metabolické dráhy, 93-94, 94F
 ΔG° a následné reakce, 93-94, 94F
a enzymová katalýza, 86, 87F
regulace, negativní a pozitivní, 172-173, 172FF
metabolismus, 78, 79F
účinnost oxidačního m., 429
metafáze, 552, 552E, 555E, 557, 557F
metafázová destička, 557, 563-564, 564E, 565
metamorfoza, programovaná buněčná smrt, 585, 585F
metastáze, 619, 619F
Methanococcus, genom, energetické dráhy, metabolismus, 439E, 441-442, 442F
methionin, 63E, 137F
7-methylguanosin, jako mRNA-čapka, 218, 219F
methylová skupina, 46E, 52
v aktivovaných nosičích, 100T, 102
mezerové spoje 385, 608E, 612, 612F
mezibuněčné spoje, 32E, 593, 608E
adhezní, 608E, 609-610
desmosomy, 608E, 610-611, 611F

- hemidesmosomy, 608F, 611-612, 612F
- mezerové, 608F, 612, 612F
- plasmodesmata, 612-613, 613F
- těsné, 607-608, 608F
- mezimembránový prostor
v mitochondriích, 411, 412F
- mezivláknová výměna, při homologní rekombinaci, 286-287, 286FF
- mezofilní buňky, 598F
- M-fáze, 549-562, 549FF, 552FF
- adheze buněk a jejich tvar, 561F, 562
- MPE, 575-578, 575FF
- M-fázi podporující faktor, viz MPF
- micely, detergentu, 360-361, 361F
- mikroelektrody, 388, 388F
- mikrosomy, izolační techniky, 160FF
- mikrotubuly, 16-17, 16FF, 18F, 513-514, 514F, 518-529, 519FF, 520FF
- a aktinová vlákna, 530-531
- asociované proteiny, 524
- funkce, souhrn, 518-519, 519F
- GTP-čepička, 522F, 523
- a jádro, 256F
- kinetochor, 554F, 556-559, 556F, 558F
- kolchicin a taxol, 520
- motorové proteiny a intracelulární transport, 525-526, 526F
- MPF a, 576
- organizační centra pro, 518, 519F
- ostatní cytoskeletální vlákna a, 524
- polarita buňky, 523-524, 523FF
- polární, 553F, 556, 559, 556F, 558F, 562, 562F
- prodlužování rostlinných buněk, 597, 597F, 600
- růst z organizačních center mikrotubulů, 521-522, 521F
- selektivní stabilizace, 523-524, 523F
- tubulin, 519, 520F
- údržba, cestou montáže a demontáže, 519-520
- umístění organel v buňce, 526-527, 527F
- umístění v buňce, 518-519, 519F
- v řasinkách a bičících, 528-529, 529FF
- v mitotickém vřeténku, 551, 553, 551F, 553F, 556F
- mikroklky, 32F, 530, 530F
- mimoza, odpověď na dotyk, 391F
- místně specifická rekombinace, 289
- mitochondrie, 7F, 10-12, 10FF, 18F, 411-413, 412F, 449-450, 448FF, 449T, 450T
- a dělení buněk, 551
- evoluční původ, 23, 26F, 438, 452
- genom a proteosyntéza, 438
- a chloroplasty, 430, 432, 432F
- import lipidů a fosfolipidů, 458
- import proteinů, 453, 454T, 453, 457-458, 457F
- izolační techniky, 160FF
- matrix, 411-413, 412F
- membrány, vnitřní a vnější, 411-412, 412F
- metabolismus, 413-430, 414F, 415FF
- porin, 360, 360F
- proteiny, 438
- přepážky (kristy), 412F, 413
- původ, 11F
- růst, 438
- tvorba acetyl-CoA, 118-119, 118FF
- umístění v buňkách, 411, 411F
- v evoluci eukaryot, 413
- v rostlinách, 126, 126F
- mitotické chromosomy, 248
- barvení a karyotyp, 247FF
- montáž kinetochoru, 553, 553F, 556, 556F
- oddělení sesterských chromatid, 249, 552-553, 552F, 554FF, 556-557
- segregace v anafázi, 555F, 557-559, 558F
- úroveň sbalení chromatinu, 252-253, 253F
- v metafázové destičce, 557, 557F
- mitotické vřeténko, 249, 518, 519F, 551, 551F, 552-553, 553F
- cytoplasmatická rovina dělení, 560-561
- časové nastavení cytokineze, 560
- dělení rostlinné buňky, 562, 562F
- MPF a, 576
- účinek kolchicinu na, 520
- v metafázi, 557, 557F
- mitoza, 549, 552-560, 552FF viz také jednotlivá stadia
- cytoskeletální struktury při, 551, 551F
- jaderný obal, 518, 553, 554FF, 559-560, 559F
- organely, 551
- separace chromatid, 552-553, 552F, 554FF, 556-557
- srovnání s meiozou, 566F
- stadia, 552, 554FF
- třídění, paternální (otcovské) a maternální (mateřské), 563, 564F
- segregace, 555F, 557-559, 558F
- stav během, 248-249, 248F
- mnohobuněčné organismy, 31, 32FF
- buněčná komunikace, 481
- buněčná proliferace, 582-583, 583F, 584T
- buněčné dělení, 547
- epitely, význam, 606
- počet buněk a jeho regulace, 582-589, 583FF, 584T
- stálost genomu ve všech buňkách, 245, 246F, 257, 257F
- vývoj z DNA dospělého jedince, 257, 257F
- močovina, 50F
- mol, definice, 39, 39F
- molární roztoky, 39, 39F
- molekulární evoluce
- měření, rRNA-sekvence, 439-440, 440F
- vývojový strom (dendrogram), 440, 440F
- molekulová hmotnost, 38
- molekulové přepínače, 492, 492F
- GTP-vázající proteiny, 176, 176F, 492F, 493
- proteinkinázy a fosforylační kaskády, souhrn, 492F, 493
- molekulové chaperony (*vyslov šaperony*)
- kontrola a regulace kvality v ER, 469, 469F
- při skládání proteinů, 139-140
- v syntéze proteinů, 232
- molekuly, 37, 43
- monelin, 135F
- monomery, 65
- monosacharidy viz také cukry

- motorické neurony
embryonální vývoj, 624-625, 624F
synapse a integrace signálu, 402-403, 402F
- motorové proteiny, 135F, 177, 525
allosterický pohyb, 177, 178F
eukaryontní brvy a bičíky, 529, 529FF
- hydrolýza ATP, 177-178, 178F
mikrotubulů cytoplasmy, 525-526, 526F
- myosin, *viz* myosin
v anafázové segregaci chromosomů, 558-559, 558F
ve svalu, 539, 539FF
vnitrobuněčný transport, 525-526, 526F
- MPE, 575-578, 575FF
- mRNA, 215, 216T
cDNA-knihovny, 329-331, 330FF
doba života, 222-223
genetický kód pro translaci, 224-225, 224FF
geny, 215-216
odbourání, 223
párování kodon-antikodon, 225-226, 227F
polyribosomy, 232, 233F
primární transkript, 218, 220, 220F
translace na ribosomu, 229-230, 229FF
v eukaryotech, 218, 219F
v prokaryotech, 218, 219F, 231, 231F
vazebné místo na ribosomu, 229, 229F
- mutace
geny *sonic hedgehog*, 626-627, 626F
Hox-geny, 627, 627F
následky, 184, 198-199, 199F
při rakovině, 199, 199F, 587-589, 588F, 619-620, 620F
při srpkovité anemii, 198-199, 199F
rychlost a počet na gen a lidský genom, 620
transpozony, 296-297, 297F
v evoluci buněk, 21-22
v somatických buňkách, 199-200, 199F, 619
v zárodečných buňkách, 199-200, 199F, 619
výběr v kultuře, 280-281, 281F
z chemických modifikací nukleotidů, 202, 203F
z nedostatků oprav DNA, 200, 201F
- mutageneze, 339
jako metoda genetického inženýrství, 339, 340F
transgenní organismy, 340-342, 340FF
- myoblasty, 269-270, 270F
MyoD, 270-271, 270FF
myofibrily, 538-539, 538FF
myoglobin, 150F
myosin, 135F, 536-537, 536FF
fosforylace, 542
jako motorový protein, 178
svinuté klubko, 145
v plazivém pohybu buněk, 536
ve svalu, 536FF, 537
- myosinová vlákna, 536-537, 536FF
kontraktilní prsteneček, 555F, 561, 561F
v kontrakci svalu, 539, 539FF
v M-fázi, 551, 551F
v sarkomerách, 538, 538F
- myš, 29
jako modelový organismus, 29
transgenní, 342, 342F
vývoj, 627, 627F
-
- ## N
- Na⁺/K⁺-ATPáza, 357T, 378-380, 378FF, 385F, 386T
transportní cyklus, 379-380, 379F
membránový potenciál a, 392
využití pro osmotickou rovnováhu, 381-383, 382F
- N-acetylglukosamin, 57F
NADH/NAD⁺, 413, 413E, 415
a elektrontransportní řetězec, 124, 124F
energie z oxidace na O₂, 423, 425
jako aktivovaný přenašeč, 98, 100, 100T
jako redoxní pár, 423, 424F, 425
při fermentaci, 114, 115F
v cyklu kyseliny citronové, 119-121, 120F, 122FF
v glykolýze, 110-118, 111FF
v metabolismu, 109-110, 109F
v oxidaci pyruvátu, na acetyl-CoA, 118, 118F
- NADH-dehydrogenázový komplex, 414, 415F
- nádor
benigní, 619
maligní, 619
metastázy, 619, 619F
progrese, 620-621, 620F
viz také rakovina; onkogeny; tumorsupresorové geny
- NADP-reduktáza, 435F
jako aktivovaný přenašeč, 98-100, 99F
při fotosyntéze, 435-436, 435F
v cyklu fixace uhlíku, 437-438, 437F
- náhodný pohyb, 88, 88F
- nanometry, definice, 3F, 6
- napětově ovládané kanály, *viz* elektricky ovládané kanály
- nekovalentní vazby, 69-74, 70FF
a biologická katalýza, 72
iontové, *viz* iontové vazby
srovnání s kovalentními vazbami, 43, 43T
při skládání proteinu, 136-137, 138F
síla vazby, 43T, 44
v makromolekulách, 69-73, 69FF
van der Waalovy přitažlivé síly, 69, 70F, 136, 138F
ve vazebných místech proteinů, 148
vodíkové můstky, *viz* vodíkové můstky
- nepohlavní rozmnožování, 304
- Nernstova rovnice, 393, 393F
- nervová signalizace, 483, 483E, 485T
nervové mediátory, *viz* Nervové mediátory
- nervová soustava
chemické synapse, 402-403, 402F
vývoj, 624-625, 624F
- nervová tkáň, 32F
- nervová zakončení, 394, 397, 394E, 399F
- nervové buňky, 19, 20E, 32E, 394, 394E, 613, 614F

- akční potenciál, *viz* akční potenciály
- kontaktně závislá signalizace, 484, 484F
- růstový kužel, 534, 535F
- transport podél mikrotubulů axonu, 524, 524F
- vývoj, buněčná smrt, 585, 586F
- nervové mediátory
- excitační, 400, 401F, 402T
 - inhibiční, 400-401, 401F, 402T
 - účinek, odstranění, 399, 399FF
 - uložení, 397, 399F
 - uvolnění, 398-399, 399F
 - v buněčné signalizaci, 483, 483F, 485T
- nervový růstový faktor (NGF), 135F, 485T
- a Ras, 506
- netrin, 135F
- neurální destička, při vývoji nervové soustavy, 624-625, 624F
- neuraminidáza, 148, 149F
- neurofilamenta, 516-517, 517F
- neuromuskulární spoj, 400, 403T
- neurony, *viz* nervové buňky
- neutrofily, 19, 20F, 33F
- v zánětlivé odpovědi, 365, 366F
- neutrony, 38, 38F, 40F
- nikotinamidadenin dinukleotid, *viz* NADH/NAD⁺
- nitroglycerin, 489-490, 490F
- NMR-spektroskopie, 165F
- nondisjunkce, 566-567
- Northern blotting, 323F
- Not I (restrikční nukleáza), 316F, 317
- Notch /zářez (receptorová molekula), 484, 484F
- notochord (struna hřbetní, chorda dorsalis), 624-626, 624FF
- nukleární magnetická rezonance, *viz* NMR-Spektroskopie
- nukleázy, 168T
- opravy DNA, 204, 204F
 - při replikaci DNA, 196, 196F
- nukleolus, *viz* jádérko
- nukleosidy, 67F
- nukleosidtrifosfáty, 214, 215F
- nukleosom, 250-252, 251FF
- histony, 251-252, 252FF
 - jádro, 251-252, 251FF
- při replikaci, 255
- při transkripci, 255, 266-267
- nukleotidy, 61, 64-65, 64FF
- jako koenzymy, 67F
 - jako nosiče energie, 64-65
 - názvosloví, 64, 67F
 - prebiotická polymerace, 236, 236F
 - při replikaci DNA, 192, 192F
 - syntéza, prebiotická, 235-236, 236F
- nukleové kyseliny, 65
- viz také* DNA, RNA
 - struktura, tvorba, 65, 67F
 - syntéza, 102FF, 103-104
-
- ## O
- obecné transkripční faktory, 264-265, 264FF
- obnova tkáně, 615-618, 616FF
- červené krvinky, 617, 618F
 - epidermis, 617, 617F
 - kmenové buňky, 615-616, 616F
 - a rakovina, 618
 - rychlosti a charakteristiky, 615
 - střevo, 616, 616F
- obrvené buňky, 32F
- odolnost *viz* rezistence
- oko, vnitřní stavba, 604
- olejová kyselina, 55, 58F
- oligosacharidy, 54, 57F
- komplexní, 57F
 - na proteinech, 468-470, 468F
- onkogeny, 507, 302, 303T, 588, 619
- při rakovině, 302-303, 302F, 303T, 588-589, 588F
 - původ, 302
 - při kolorektální rakovině, 620F
 - src, 302, 302F, 303T
- operátor a operony, 261, 261F
- opláštěné váčky, 463-465, 464FF, 465T
- COP-váčky, 465, 465T
 - klathrinové, 464-465, 464FF, 465T, 474, 475F
- oplození, *viz* fertilizace
- oprava DNA, 198-205, 199FF, 204F
- a dvě vlákna DNA, 202, 204
 - chemických modifikací nukleotidů, 202, 203F
 - chybného párování v DNA, 200-201, 201F
- přesnost a evoluce, 205, 205F
- při replikaci telomer, 250F
- význam, 204
- opravná DNA-polymeráza, 204, 204F
- opsiny, 292
- optické izomery, 54
- aminokyselin, 61, 62F
- organely, 6, 448-452, 448FF
- autofágie, 477, 477F
 - evoluce, 450-452, 451F
 - import proteinů, 452-453, 454F
 - intracelulární pohyby, 525, 525F
 - izolace, homogenizací a centrifugací, 160FF
 - objem, 450, 450T
 - při buněčném dělení, 551
 - umístění v buňkách, 526-527, 527F
 - velikosti, 3F, 6, 6FF
 - vnitrobuněčný transport, 15, 15F
- organické molekuly 52-53, 53T, 53F
- viz také* makromolekuly, a specifické látky
 - běžné chemické skupiny, 47F, 52
 - oxidace, ve sprážených reakcích, 114-118, 116FF
 - původ na Zemi, 235-236, 236F
 - tvorba při fotosyntéze, 436-438, 436FF
- organismy
- diploidní buňky, 305, 305F
 - fotosyntéza v energetice, 82-83, 82FF
 - jednobuněčné, 440-441
 - mnohobuněčné, *viz* mnohobuněčné organismy
 - model, 25-30, 441
 - pohlavní rozmnožování, 304
- osmotický tlak, 382
- osmoza, 382-383, 382FF
- osteoblasty, 32F, 615
- syntéza kolagenu, 601-602
- osteoklasty, 615
- ouabain, 378F, 379
- ovalbumin, 135F
- ovce, vývoj z DNA dospělého jedince, 257, 257F
- oxalacetát, 120-121, 120FF, 127F
- oxid dusnatý (NO), 485T
- jako lokální mediátor, 489-490, 490F

oxid uhličitý
fixace v chloroplastech, 436-438, 436FF
při získávání energie v bakterii *Methanococcus*, 442, 442F
oxidace
cukrů, obecný princip, 107-108, 107F
přenos elektronů při, 84-85, 84F
při dýchání, 83-84, 83FF
snížení počtu vazeb C-H, 85
oxidačně-redukční (redoxní) reakce
viz také elektrontransportní řetězce
NADPH/NADP⁺, 99-100, 99F
reakce přenosu elektronů, 415
oxidační fosforylace, 109F, 110, 417, 417F
při oxidaci, 124, 124F
v mitochondriích, 410-411, 411F, 413-429, 413FF, 420T
výtěžek ATP, 419-420
oxidoreduktázy, 168T
2-oxoglutarát (α -ketoglutarát), 121, 122FF, 127F

P

palmitová kyselina, 55, 58F
paměť, Ca²⁺, 502
panožky - *viz* pseudopodia
parakrinní signalizace, 483, 483F, 485T
Paramecium, 19, 20F
parenchymální buňky, 598F
párování bází
DNA, 187-188, 187F
kodon-antikodon, 226-228
RNA, 213, 213FF
pasivní transport, 375-377, 375FF, 386T
gradient elektrochemického potenciálu jako hnací síla, 376-377, 376F
přenašeč glukosy, 375-376, 376F, 386T
PCR, 332-335, 333FF
citlivost, 334
užitečné aplikace, 334F, 335, 336F
V soudním lékařství, 335, 336F
PDGF (platelet-derived growth factor), *viz* růstový faktor krevních destiček

pepsin, 135F
peptidová vazba, 61, 61F, 62F
polární charakter, 358F, 359
tvorba v proteinech, 136, 136FF
peptidyltransferáza, 230, 230F
permeabilita, lipidových dvojných vrstev, 356-357, 356F
peroxisomy, 7F, 13-15, 15F, 18F, 448FF, 449, 449T, 450T
import proteinů, adresová sekvence, 454T
izolační techniky, 160FF
pH, stupnice, 49, 51F
pinocytoza, 472-474
plán těla a stavba podle něj
plasmatická membrána, 6, 6FF, 8, 18F, 347, 348F
a buněčný kortex, 363-364, 363FF
a evoluce organel, 451, 451F
fosfolipidy, 355, 355F
glykolipidy, 355-356, 355F
glykoproteiny a proteoglykany, 364-365, 365F
cholesterol, 354, 354F
inositolfosfolipidy, 355F, 356
opláštěné transportní váčky, 465T
pinocytoza, 473-474
proteiny, 367, 367F, 458
recyklace, endocytoza, 476, 476F
v cytokinezi, 561, 561F
v importu a exportu, 15, 15F
vedoucí okraj
adheze, 535, 535FF
nukleace, 534-535, 535F
plasmidy, 282
jako klonovací vektor, 326-327, 326F
v přenosu genů, bakterie, 282-284, 282FF
plasminogen, 294F
plasmodesmata, 599F, 612-613, 613F
plastocyanin, 435F
plastochinon, 425F, 435F
P-místo ribosomu, 229-230, 229FF
pohárkové buňky, 616, 616F
pohlavní rozmnožování, 304-306, 305F
pojivové tkáně, 32F, 594F, 600-605, 600FF
adheze buněk a jejich plazivý pohyb po matrix, 603, 603F

fibroblasty a osteoblasty, 601-602, 601F
proteoglykanové agregáty, 604-605, 604F
v kůži, 614F, 617F
vývoj, organizace kolagenových vláken, 602, 602F
polární kovalentní vazba, 45-48, 45F
tvorba při oxidaci a redukci, 84-85, 84F
polární molekuly, 50F, 356, 356F
poliovirus, 298T, 298F
polohová informace
při vývoji, 624-626, 624FF
polohové efekty, 255F, 256
polyisoprenoidy, 59F
polymerázová řetězová reakce, *viz* PCR
polymerázy, 168T
polypeptid, 61, 61F
 α -šroubovice
v transmembránových proteinech, 358-359, 359F
polyribosomy (polysomy), 232, 233F
polysacharidy, 54, 57F
hydrolyza lysozymem, 167-169, 169FF
odbourání, tři stádia, 108-110, 109F
syntéza, 102F, 103-104
ve stěnách rostlinných buněk, 596, 596F
porin, 386
bakterií, 360
mitochondrií, 360, 412, 412F
struktura, 150F, 360, 360F
poškození DNA
deaminace, 202, 202FF
depurinace, 201-202, 202FF
při replikaci, 200, 201F
thyminové dimery, 202, 203F
pozitivní zpětnovazebná smyčka, 272, 272F
prebiotické podmínky, 235, 236F
primáza, 195-196, 196FF
profág, bakteriofág lambda, 288F, 289
profáze, 552-553, 553FF, 564FF, 565
profilin, 532, 532F
programovaná buněčná smrt, 486F
buněčná fagocytoza, 586, 586F

- proteolytická kaskáda, 585-586, 586F
 při vývoji, 584-585
 v dospělých tkáních, 585
 ve stěvu, 616F
- Prokaryota, 9
viz také bakterie
 aerobní a anaerobní, 12
 gen k proteinu, souhrn kroků, 223, 223F
 introny v evoluci, 224
 segregace metabolických dějů, 447
- prolin, 63F
- prometafáze, 552, 553, 556-557, 553FF
- promotor, 216
 eukaryontní, 265-267, 266FF
 prokaryontní, 261, 261F
 a RNA-polymeráza, 216-218, 217FF
- proteasomy, 233-234, 233F
- proteázy, 168T
 v odbourání proteinů, 233-234, 233F
 v programované buněčné smrti, 586-587, 587F
- protein p21, 580-581, 580F
- protein p53, 580-581, 580F
- proteinfosfatáza, 168T
 aktivace MPE, 578, 578F
 při defosforylaci proteinů, 175, 175F
- proteinkinázy, 135F, 168T
 A-kináza, 498-499, 499FF
 CaM-kinázy, 502
 Cdk, 574-581, 575FF *viz také* Cdk
 C-kináza, 501, 501F
 jako molekulové přepínače, 492F, 493
 normálních a rakovinných src-genů, 302, 303T
 počet, 508
 protoonkogenů, 302, 303T
 při fosforylaci proteinů, 175, 175F
 Ras-aktivovaná dráha, 506-507, 507F
 receptorová tyrosinkináza, 504-506, 505FF
 síť integrující informaci, 508-509, 509F
- proteinové komplexy, 149, 151, 151F
 aktinová filamenta, 149, 151, 151F
 jako proteinové stroje, 178-179, 179F
- viry a ribosomy, 151
- proteinové stroje, 178-179, 179F
 DNA-replikační aparát, 192, 196-197, 197FF
 fotosyntetické reakční centrum, 362
 Jako prostředek segregace metabolických dějů, 447
 motorové proteiny, *viz* Motorové proteiny
 ribosom, 227-230, 228FF
- proteinové tyrosinfosfatázy, 505
- proteiny, 62F, 135F, 146-148
 allosterické, 174, 175F, 261-262, 261FF
 denaturace, 139, 139F
 doména, definice, 146
 evoluce, 239-240, 240F, 293-294, 294F
 funkce, 68, 154-179, 155FF
 izoelektrický bod, 163F
 izolační techniky, 161FF
 motorové, *viz* Motorové proteiny
 odbourání, 108-110, 109F, 233-234, 233F
 oxidace, na acetyl-CoA, 121
 produkce pomocí rekombinantní DNA, 337-338, 337FF
 provozní proteiny (housekeeping), 258
 regulace, 135F, 173-176, 174FF
 renaturace, 139, 139F
 sekvence aminokyselin, 164F
 separační techniky, 162FF
 strukturní - *viz* cytoskelet
 syntéza, *viz* proteosyntéza, translace
 techniky selektivního štěpení, 164F
 translokace, během syntézy v ER, 459, 460, 460F
 translokátory, 453, 457F, 460, 460F
 transport, *viz* transport proteinů
 třídění, *viz* třídění proteinů
 ubikvitinovaný, 234
 vazebné místo, 155, 157, 156FF
 pro jiné proteiny, 148
 protilátky, 156-157, 157FF
 velikost, 140, 140F
 význam, 133
 životnost, 232-233
- proteoglykany
 v extracelulární matrix, 604-605, 604F
 v plasmatické membráně a glykokalyxu, 364-365, 365F
- proteosyntéza, 102F, 103-104
 směřování, 453
 tvorba peptidové vazby, RNA a, 238T
 v buněčném cyklu, 550, 554F
 v ER, 458-469, 460F, 461FF, 468FF
- protilátky, 156-157, 157FF
 monoklonální, 159F
 příprava v laboratoři, 158F
 syntéza a sekrece B-buňkami, 158 F
 vazba antigenu, 156-157, 156FF, 166-167, 166F
 využití, 159F
- protimrazové proteiny, 135F
- proton 38,
viz také hydroxoniový ion
 jako subatomární částice, 38, 38F, 40F
 v aktivovaných přenašečích, 98-100, 99F, 100T
 ve vodě, 49, 49F, 51F, 422, 422F
- protonová pumpa, 429F
 bakteriorhodopsin, 362, 362F
 cytochromoxidáza, 427-428, 428FF
 komplexy dýchacího řetězce, 415-416, 415F, 422-429, 422FF
 lyzosomální, 384, 385F, 476, 477F
 poháněná svělem, 384
 u bakterií, 384, 385F
 v bakterii *Methanococcus*, 442, 442F
 v endosomech, 475
 v chloroplastech, 432, 435-436, 435F
 zdroje elektronů, 409-410, 410F
- protonový gradient
 a bakteriální bičíky, 419, 420F
 a syntéza ATP, 417-419, 417FF
 spřažený transport a hnací síla, 384, 385F, 419, 419F
 tvorba p.g., 415FF, 416-417
 v bakterii *Methanococcus*, 441-442, 442F
 v mitochondriích, 124, 124F, 415FE, 416-417
- protoonkogeny, 302, 507, 588
 funkce, 303T

- objev, 303
- provirus, 300, 301F
- prvky, 37
- elektronové slupky a reaktivita, 40-42, 41F
 - v neživém světě, 39, 39F
 - v živém organismu, 39, 39FF
- první zákon termodynamiky, 81-82, 549-550, 549FF, 554F
- prvoci (Protozoa), 27-28, 27FF
- osmotický tlak, kontraktilní vakuola, 383, 383F
 - přijímání potravy fagocytozou, 472-473
 - řasinky, 527-528, 528F
- přechodný stav, v enzymové katalýze, 168, 169, 170F
- překřížení, v prvním dělení při meioze, 565
- přenašeč glukosy, 135F, 375-376, 376F, 386T
- přenašeče, 372, 372F
- pasivní, a aktivní transport, 375, 375F
 - přenašeč glukosy, 375-376, 376F, 386T
 - přenášené látky, příklady, 373-374, 374F
 - srovnání s kanály, 374-375
 - struktura, 361-362, 361F, 373-385, 373FF
 - typy uniportu, symportu a antiportu, 380F, 381
- přenašeče elektronů v plasmatické membráně, 357E, 357T
- cytochromoxidázový komplex, 427-428, 428F
- cytochromy, 426-427, 427F
- Fe-S-centra, 426, 426F
- hemová skupina, 427, 427F
- chinon, 425, 425F
- komplexy dýchacího řetězce, 425-427, 425FF
- NADH a NADPH, 98-100, 99F
- ve fotosyntetickém elektrontransportním řetězci, 433-436, 435F
- přenos elektronů
- elektrické baterie, 415, 416F
 - protonová pumpa, 415-416, 415F
 - přenos vodíkového atomu a, 422, 422F
 - při oxidaci a redukci, 84-85, 84F
 - s pomocí kovů v enzymových komplexech, 425-427, 425FF
 - uvolněná energie, 423, 425
 - v bakterii *Methanococcus*, 441-442, 442F
 - v cytochromoxidázovém komplexu, 427-428, 428F
 - v dýchacím řetězci, 415, 415F
- přenos energie, úloha aktivovaných nosičů, 94-95, 94F
- přenos fosfátu a fosforylu (fosfokupiny), 96-98, 97F
- přenos genů u bakterií, 282FF
- bakteriální konjugace, 282-283, 282FF
 - F-plasmid, 282-283, 282FF
 - homologní rekombinace, 285-287, 285FF
 - integrace, 287, 287F
 - místně-specifická rekombinace, 289
 - plasmidy rezistence vůči antibiotikům, 283-284
 - pomocí bakteriofágů, 288-289, 288F
 - s pomocí plasmidů, 282-284, 282FF
 - transdukce, 289, 289F
 - transformace, 284-285, 284F
 - transpozice, 289-290, 290F
- přenos genů u eukaryot
- duplikací genů a přeskupováním exonů, 292-294, 293FF
 - retroviry, 302
 - transpozony, 295-297, 295FF
- přenos signálu, 482, 482F, 486-487, 487T
- integrace, 508-509, 508FF
 - intracelulární kaskády, viz Intracelulární signální dráhy pro steroidní hormony, 488, 489F
 - prostřednictvím Ras, 506-507, 506FF
 - receptory spojené s enzymem, 505-506, 505FF
- přeskupování exonů, 294, 296, 294F, 297F
- příčné kanálky, 540, 541F
- přírodní výběr (selekce)
- bakterie v kultuře, 280-281, 281F
 - proteinů se stabilní konformací, 147
 - rakovina a, 619-620
- pseudopodia, 473, 473F
- puriny, 64, 66F
- prebiotická syntéza, 235-236, 236F
- původ života, 234-240, 236FF
- a autokatalytické molekuly, 237
- pyrimidiny, 64, 66F
- prebiotická syntéza, 235-236, 236F
- pyrofosfát - viz difosfát
- pyruvát, 110, 111F
- jako substrát, 128-129
 - oxidace na acetyl-CoA, 118, 118F
 - tvorba v glykolýze, 112FF
 - v anabolismu, 127F
 - v metabolismu, 109, 109F
 - ve fermentaci, 114, 115F
- pyruvátdehydrogenázový komplex, 118, 118F
- pyruvátkarboxyláza, 101F
-
- ## R
- rakovina, 587-589, 588F
- a antimitotické látky, 520-521
 - faktory věku, 621
 - kolorektální, 620, 620F
 - leukemie, 617
 - mutace, 199, 199F
 - gen p53, 581
 - geny ras, 507
 - potřeba více mutací, 620-621, 620F
 - a přírodní výběr, 619-620
 - obnova tkání, 618
 - onkogeny, 303T, 588-589, 588F
 - poškozený gen systému oprav chybného párování bazí, 201
 - predispozice, 620F, 621
 - proliferace a antiproliferační geny, 587-588
 - receptory spojené s enzymy, 504
 - tumor-supresorové geny, 588, 589
 - z retrovirů, 302-303, 302F, 303T
- Ras-protein, 506-507, 506FF
- Rb-gen, jako tumor-suppresorový gen, 589
- Rb-protein, 582, 583F
- receptorová endocytoza, 475
- receptorové proteiny, 135F, 482, 488, 488F, 490-491, 491F
- a cizí látky, 491
 - intracelulární, 488, 488F

- nadrodina 7segmentových transmembránových proteinů, 493, 493F
- spojené s enzymy, *viz* receptory spojené s enzymy
- spojené s G-proteiny, *viz* receptory spojené s G-proteiny
- spojené s iontovými kanály, *viz* chemicky ovládané kanály, kanály ovládané nervovým mediátorem
- tuky, 476, 476F
- v plasmatických membránách, 357F, 357T, 359
- třídy, 490-491, 491F
- v přijímání signálu, 486-487, 487F
- v selektivní odpovědi, 484-485, 486F
- receptorové tyrosinkinázy, 504
 - aktivační účinky, 505-506, 505F
 - Ras-protein, 506, 506F
- receptory nervových mediátorů, 401
 - aktivace a inaktivace, 399, 400F
- receptory spojené s enzymy, 504-509, 505FF
 - distribuce, 492
 - obecný systém, 490, 491F
- receptory spojené s G-proteiny, 490, 491F, 493-504, 493FF, 498T, 500T
 - aktivace ligandem, 493-494, 494F
 - fotoreceptorové (světlocitlivé) buňky, signální dráha, 503, 504F
 - obecný systém, 490, 491F
 - rhodopsin, 503, 504F
 - rychlost signálních kaskád, 502-503
 - srdeční buňky, 496, 496F
- redoxní páry, 423, 424F
- redoxní potenciál, 423, 424F
 - během fotosyntézy, 435E, 436
- redukce
 - přenos elektronů, 84-85, 84F
 - zvýšení počtu vazeb C-H, 85
- regulace genů u bakterií, 257-273, 257FF, 261-262, 261FF
 - aktivátorem u, 262, 262F, 265-266, 266FF
 - cAMP a, 499, 500F
 - kontrolní body v expresi, 258, 258F
 - operony, 261
- regulační proteiny genů, 259-260, 259FF
- Ras, 507F
- regulace transkripce, 259-273, 259FF
- regulační sekvence DNA, 259-260, 259F, 263, 265-266, 266FF
- represorové proteiny, 261-262, 261FF
- transpozony, 290
- regulace genů u eukaryot
 - aktivátorem, 265-266, 266FF
 - struktura chromatinu, 266-267
 - kombinační kontrola, 268-271, 268FF
 - enhancery (zesilovače transkripce), 265-266, 266FF
 - koordinovaná exprese, 268-269, 270F
 - odstranění nukleosomů z promotorů, 267
 - při diferenciaci svalové buňky, 269-271, 270FF
 - při vývoji oka, 273, 273F
 - rozdíly oproti prokaryotům, 263, 263T, 367F
 - steroidními hormony, 488-489, 488F
 - údržba během buněčného dělení, 271-273, 272F
- regulační proteiny genů, 135E, 259-260, 259FF, 263
 - A-kináza, 499, 500F
 - CAP, 262, 262F
 - DNA-vázající motivy, 260, 260F
 - Ey, 273, 273F
 - GATA-1, 269F
 - charakteristická exprese v raném vývoji, 622-624, 623F
 - kombinační, 268, 268FF
 - MyoD, 270-271, 270F
 - nadrodina receptorů pro steroidní hormony, 269, 270F, 487-489, 488FF
 - p53, 580-581, 580F
 - pozitivní zpětnovazebná smyčka, 272, 272F
 - Ras, 507F
 - Rb-protein a růstové faktory, 583F
 - řídící mechanismy při vývoji, 627
 - tryptofanový represor, 261-262, 261FF
 - u protoonkogenů, 303T
- účinek jediného genového regulačního proteinu
 - na více genů, 268-269, 270F
 - při diferenciaci buňky, 269-271, 270FF
 - při vývoji orgánu, 273, 273F
 - vázané na zesilovače transkripce, 265-266, 266FF
- rekombinantní DNA
 - a DNA-ligáza, 325, 325F
 - tvorba při klonování DNA, 326, 326F
- rentgenová krystalografie, 165F
 - membránových proteinů, 361-362, 363FF
- rentgenový difrakční obrazec, 165F
- replikace DNA, 189-197, 189FF
 - DNA-polymeráza, 192-194, 192FF, 194FF
 - frekvence chyb, 200, 200T
 - helikáza a proteiny vázající jediné vlákno, 196-197, 197FF
 - svírací protein, 197, 197FF
 - kontrolní bod buněčného cyklu, 573, 574F, 580-581, 580F
 - nukleosom, 255
 - Okazakiho fragmenty, 196, 196FF
 - opozdující se a vedoucí vlákno, 193-194, 193F
 - RNA-primery na, 195-196, 196FF
 - proteinové stroje, 178-179, 179F
 - přesnost a evoluce, 205, 205F
 - replikační počátky, 190-191, 191F, 249, 249F
 - replikační vidlička, 191, 191FF
 - asymetrie, 193-194, 193F
 - jako replikační aparát, 192, 196-197, 197FF
 - podrobný model, 198F
 - RNA-primer, 194-196, 196FF
 - rychlost, 191
 - řetězec DNA jako vzor, 189-190, 189FF
 - transkripce, srovnání, 213-214
 - v telomerách, 249-250, 249FF
 - valivá kružnice pro F-plasmid, 282-283, 283F
- replikační počátek, *viz* replikace DNA, replikační vidlička, *viz* replikace DNA
- represorový protein, v regulaci genů bakterie, 261-262, 261FF

- respirace, *viz* dýchání
- restrikční mapa, 318
- α-globinových genů, 318F
- restrikční nukleázy, 315-317, 316F
- při klonování DNA, 326-327, 326FF
- retinal v bakteriorhodopsinu, 171, 171F, 361-362, 362F, 374F
- retinoblastom, 582, 583F
- retrotranspozony, 295-296, 295FF
- retroviry, 300-302, 301FF, 302T
- evoluce, 300
 - kancerogenní, 302-303, 302F, 303T
 - životní cyklus, 300, 301F
- reverzní transkriptáza
- HIV, struktura a účinek léků, 300, 301F
 - v pohybu retrotranspozonů, 295, 295F
- rezistence na antibiotika
- nesená plasmidem, 283-284
 - nesená transpozonem, 290F
- rhodopsin, 135F, 493
- aktivace a signální kaskáda, 503, 504F
 - a retinal, 171, 171F
- ribonukleotidy, 213, 213FF
- ribonukleová kyselina, *viz* RNA
- ribosa, 56F, 66F
- v evoluci, 239
- ribosomální RNA, *viz* rRNA
- ribosomy, 7F, 16, 18F, 228-229, 228F
- izolační techniky, 160FF
 - jako proteinové komplexy, 151
 - jako stroje zajišťující proteosyntézu, 227-230, 228FF
 - při translaci, 229-231, 229FF
 - syntéza, 228-229
 - vazebná místa pro RNA, 229, 229F
 - volné a vázané na membránu, 459, 459F
- ribozym
- jako enzym, 238-239, 238FF, 238T
 - reakce katalyzované r., 238-239, 238T
 - viroidů, 238, 238F
- ribulosa, 56F
- ribulosabisfosfátcarboxyláza, 135F, 436-437, 436FF
- rentgenové difrakční studie, 165F
- rifampicin, 280-281, 281F
- RNA, 65, 65FF, 69, 69F, 213, 213FF, 215, 216T
- autokatalytická syntéza, 239, 239F
 - hybrid s DNA, retroviry, 300, 301F
 - informační RNA, *viz* mRNA
 - malá, funkce, 216T
 - na počátku života, 237-240, 237FF
 - párování bazí, 213, 213FF
 - polymerázy, *viz* RNA-polymerázy
 - primer, při syntéze DNA, 195-196, 196FF
 - produkce velkých množství technologií rekombinantní DNA, 338, 338F
 - replikace, 237, 237F
 - replikázy, 299, 299F
 - ribosomální, *viz* rRNA
 - transferová, *viz* tRNA
 - transport přes jaderné póry, 455-457, 456F
 - virové genomy, 298, 298F, 298T
- RNA-polymerázy
- a DNA-polymeráza, srovnání, 214-215
 - a obecné transkripční faktory, 263, 264-265, 264FF
 - bakteriální a eukaryontní, srovnání, 263
 - iniciace, 216-218, 217FF
 - RNA-dependentní, 299, 299F, 300
 - sigma-faktor, 216-217
 - terminátor, 216-217, 217F
 - v eukaryontních buňkách, 263, 263T
 - v pohybu retrotranspozonů, 295, 295F
 - v transkripci, 214-215, 215F
 - v životním cyklu retroviru, 301F
- RNA splicing, *viz* sestřih RNA
- rohovka, 606F
- rostlinná pletiva, 598FF
- modelování, cytoskelet a celulóza, 597, 600
 - plasmodesmata, 612-613, 613F
 - živočiškové, srovnání, 584
- rostlinné buňky, 18F, 19, 20F, 431F
- cytokineze, 562-563, 562F
 - elongace, orientace celulosových mikrofibril, 597, 597F, 600
- H⁺-gradienty a H⁺-ATPázy, 384, 385F
- osmotický tlak a buněčná stěna, 383, 383F
- skladování živin, 126-127, 126F
- rostliny, 598FF
- Arabidopsis* jako model, 28-29, 29F
 - bakterie, 24
 - elektrická signalizace, 387, 387F
 - evoluce, 28
 - fotosyntéza *viz také* chloroplasty, fotosyntéza
 - hospodaření s energií, 82-83, 82FF
 - sacharosa a škrob, 438
 - semena, ukládání živin, 126F, 127
 - světelná energie, 12-13
 - tuky, 354
 - vývoj z DNA dospělého jedince, 257, 257F
- rovnovážná konstanta (K)
- a síla vazby, 166, 166F
 - chemických reakcí, 91FF, 92T, 92-93
- rovnovážná sedimentace, 161F
- rozpuštědla, 51F
- roztoky, 51F
- rRNA, 215, 216T
- sekvence, k odvození fylogenetického stromu, 439-440, 440F
 - v jadérku, 257, 257F
 - v ribosomu, 228, 228F
- růst, rychlost u bakterií, 279
- růstové faktory, 485T, 504
- komerční produkce, 338
 - a onkogeny, 588-589, 588F
 - v proliferaci buněk, 582-583, 583F, 584T
- růstový faktor krevních destiček (PDGF), 485T, 582-583, 584T
- a Ras, 506
 - receptor, 357T
- rýhování embrya, 575, 622, 623F
- rychlostní sedimentace, 161F
-
- ## Ř
- řasinky, 19, 20, 518, 519F, 527-529, 528FF
- řízená mutageneze, 339, 340F

S

- Saccharomyces cerevisiae*, 26-27, 26F
DNA-sekvence genomu, 320, 320F
viz také kvasinky
- S-adenosylmethionin, jako aktivovaný přenašeč, 100T
- sacharosa, 57F
v rostlinných buňkách, 438
- sarkom, 302, 302F, 303T
- sarkomery, 538, 538F
v modelu kontrakce svalu, 539, 539FF
- sarkoplasmatické retikulum, 540-541, 541F
- SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE), 163F
- sekrece, 471-472, 471FF
- sekreční buňky, 32F
- sekreční dráhy, 463, 463F, 467-472, 468FF
ER, 467-469, 468FF
Golgiho aparát, 469-470, 469F
regulované, 471, 471FF
základní (konstitutivní), 470-471, 471F
- sekreční váčky, 471-472, 471FF
- sekvenátory aminokyselin, 163F
- sekvence aminokyselin
a struktura proteinů, 134, 136-137, 136FF
techniky určování, 140, 164F
- sekvence DNA
amplifikace s pomocí PCR, 332, 333F
centromera a kinetochory, 553, 556
DNA-technologie, 319FF, 320
jako lineární genetický kód, 188-189, 188FF
- komplementární povaha nukleotidových sekvencí, 187-188, 187F
- kompletních genomů, 320
- neesenciální, eukaryota, 291
- nekódující, 219-220, 220F, 294-297, 295FF
- opakované, nekódující
eukaryontní transpozony, 295-297, 295FF
retrotranspozony, 295-296, 295FF
- satelitní DNA, 294-295
- podobnosti, během evoluce, 205, 205F
- pro odstranění intronů, 220, 221F
- pro restriční nukleázy, 316, 316F
- promotor, bakterie, 216-218, 217FF
- regulační, 259-260, 259F, 263, 265-266, 266FF, 267-268, 268FF
bakterie, 261, 261F
mezerníková DNA, 268, 268F
TATA-box, 264, 265F
a transpozony, 296-297
- terminátor, 216-217, 217F
- v replikačních počátcích, 191, 191F
- serin, 63F
- serinové proteázy, jako rodina proteinů, 148, 148F
- sestřih RNA, 220-221, 221FF
výhody proti prokaryotům, 222, 222F
- sexuální reprodukce, *viz* pohlavní rozmnožování
- S-fáze, 550, 550F
- sfingomyelin, 354, 355F
- Schwannovy buňky, 613, 614F
- sigma-faktor, v bakteriální transkripci, 216-217
- signál rozpoznávající částice (SRP), 459-460, 460F
- signální kaskády, *viz* intracelulární signální kaskády
- signální molekuly, 485T, 488, 488F
hydrofilní, umístění receptorů, 490
intracelulární, *viz* Intracelulární signální molekuly
pro receptory spojené s enzymy, 504, 505, 505F
pro receptory spojené s G-proteiny, 493
pro základní typy signalizace, 482-484, 483FF, 485T
při vývoji těla a orgánů, 624-627, 624FF
rychlé a pomalé účinky, 499, 499FF
- selektivní odpovědi v cíli, 484-485, 486F
- spřažené s cAMP, 498, 498T
- steroidní hormony, 485T, 488-489, 488FF
- více účinků a typů receptoru pro jedinou s.m., 486F, 491-492
- signální peptidáza, 460, 460F
- sinice, 407, 408F
- sítkovnice, 599F
- skákavý pohyb, 525
- β-skládaný list, 141, 144FF
- sklerenchym, 598FF
- skleroderma, 556F
- slabé chemické vazby, 69-72, 70FF
- sloupcová chromatografie, 262FF
- sluch, mechanicky aktivované kanály, 390, 391F
- sluneční světlo jako zdroj energie, 82-83, 82FF
- smyslové buňky, 33F
- SNARE, pro rozpoznávání a navádění transportních váčků, 466, 466F
- snRNP, v sestřihu RNA, 220-221, 221FF
- solut, 51F
- solvent, *viz* rozpouštědlo
- somatické buňky, mutace v, 199-200, 199F
- sonic hedgehog*-gen
jako řídicí gen při vývoji, 625-627, 625FF
mutace v drosophile, 626-627, 626F
- β-soudek, transmembránových proteinů, 359-360, 360F
- soudní lékařství, PCR v, 335, 336F
- soustava vnitřních membrán, 451
pohyby proteinů, 453, 454F
syntéza proteinů v ER, 458
vezikulární transport, 463, 463F
- Southernův přenos (Southern blotting), 322, 322F
- spektrin, 364, 364F
- spermie, 33F, 304FF, 305, 563F
- spodinová ploténka při vývoji nervového systému, 624-625, 624F
- spřažené reakce, 91F, 95-96, 95F, 114-118, 116FF
- spřažený transport, 377-378, 377F
přes vnitřní mitochondriální membránu, 419, 419F
symport glukosa/Na⁺, 380F, 381, 382F, 385F, 386T
typy uniportu, symportu a antiportu, 380-381, 380F
- src*-gen a rakovina, 302, 302F, 303T
- srdeční sval, 33F, 538

- srpkovitá anemie, 199, 199F, 322, 322F
- stearová kyselina, 55, 58F
- stereocilia, 5E, 33F
funkce a mechanismus, 391F
- steroidní hormony, 485T, 488-489, 488F
- steroidy, 59F
- steroly, 349, 350F
- stomata, 599F
- Streptococcus*, 23F
- stroma chloroplastů, 430, 431F
- stromatolity, 408F
- struktura DNA, 184-189, 185FF
komplementární páry bazí, 187-188, 187F
mechanismus dědičnosti, 188-189, 188F
modely dvojšroubovice, 187-188, 187F
nukleotidové podjednotky, 186, 186FF
- struktura proteinů, 134-154, 136 FF
řetězec DNA
denaturace a renaturace, 139, 139F
DNA-vazebné motivy, 259-260, 260F
doména, 146, 146FF
drátový model, 141, 143F
kalotový model, 141, 143F
konformace, 69, 69F
a energie, 139, 139F
metody analýzy, 140, 165F
předpovídání, 140
přírodní selekce stabilních k., 147
kvartérní, 146, 146F
peptidová vazba, 61, 62F, 136, 136FF
podjednotky, 148-149, 148F
polypeptidová kostra, 136, 137F
pořadí aminokyselin, 134, 136-137, 136FF
primární, 146
sekundární, 146, 146F
skeletální model, 141, 142F
skládání
molekulové chaperony, 139-140
postranní řetězce aminokyselin, 137, 138F
slabé nekovalentní vazby, 136-137, 138F
význam pro funkci, 156
stabilizační disulfidové můstky, 154, 154F
stužkový model, 141, 142F
terciární, 146, 146F
střední filamenta, *viz* intermediární filamenta
střevo, *viz* epitelální listy; buňky střevního epitelu
substráty, 77, 78F, 86, 167
difuze a tvorba komplexu enzym-substrát, 88
sukcinát, 122FF
sukcinyl-CoA, 122FF, 127F
superoxidové radikály, 428
svalové buňky, 33F
diferenciace, řízení, 269-271, 270FF
hladkého svalstva, účinky NO, 489-490, 490F
skeletální
struktura, 538, 538F
účinky acetylcholinu, 486F
srdeční
G-protein, aktivace, 496, 496F
mezerové spoje a elektrické spřažení, 612, 612F
účinky acetylcholinu, 486F, 496, 496F
svalový stah (kontrakce)
hydrolyza ATP, 539, 540F
mechanismus klouzajícího vlákna, 538-539, 539FF
regulace, 539-542, 541FF, 542F
rychlost, 539
spouštění, 539-542, 541FF
světelná mikroskopie, 2-6, 2FF
fluorescenční, 4F
při studiu buněk, 19T
příprava, 4F, 6
světelné reakce, *viz* fotosyntetické reakce přenosu elektronů
světlem poháněné pumpy, 377-378, 377F
svinuté klubko, 145, 145F
svírací protein, v replikaci DNA, 197, 197FF
symport, 380E, 381
poháněný Na⁺, 380E, 381, 382E, 385E, 386T
synapse, 32F, 397, 399E, 483, 483F
CaM-kináza, 502
excitační a inhibiční (vzrušivé a tlumivé), 400, 401F
chemické, 401-403, 402F
pohybové nervy a vstupy, 402-403, 402F
synaptické váčky, v přenosu nervového signálu, 397-398, 399F
synaptonemální komplex, 565
syntázy, 168T
syntéza ATP
ATP-syntázou, 417-418, 418F
fermentací (kvašením), 114, 115F
při oxidaci glukosy, 124
při oxidační fosforylaci, 124, 124F
v bakterii *Methanococcus*, 442, 442F
v glykolýze, 6, 7, 110-118, 112FF, 116FF
v metabolismu obecně, 109-110, 109F
v rostlinách, 126, 126F
-
- ## Š
- škrob, jako zásobárna živin, 125E, 127, 438
šlachy, 604
kolagen, 602
šroubovice
pravotočivost a levotočivost, vlastnosti, 152, 152F
proteinových komplexů, 149, 151, 151F
-
- ## T
- TATA-box, 264, 264FF
TATA-vázací protein (TBP), 264, 264FF
taxol, 520-521
technologie rekombinantní DNA *viz* také analýza DNA, hybridizace DNA, genové inženýrství
detekce genových sekvencí, hybridizace, 320-324, 321FF
DNA-ligáza, 325-326, 325F
DNA-sonda, 321
k produkci velkých množství proteinů, 337-338, 337FF

klonování DNA, 324-335, 324FF
 PCR, 332-335, 333FF
 produkce RNA, 338, 338F
 restriční nukleázy, 315-317, 316F, 326-327, 326FF
 řízená mutagenese, 339, 340F
 transgenní organismy, 340-342, 340FF
 tělní plán
 signální molekuly, 625-626
 tvorba a doladění, 622-623, 624F
 tělo jako klon buněk, 621-622, 621F
 telofáze, 552, 555F, 559-560, 559F
 telomera
 a polohový efekt, 255F, 256
 v eukaryontním chromosomu, 249-250, 249FF
 telomeráza, 250, 250F
 teplo, biologický pořádek, 80-82, 80F
 termodynamika
 druhý zákon, 79-81, 80F
 první zákon, 81-82
 viz také energie, entropie
 volná energie, chemické reakce, 85
 těsné spoje, 608-609, 608F
 distribuce membránových proteinů, 367, 367F
 testosteron, 59F, 485T, 488-489, 488FF
 thioesterová vazba jako makroergní vazba, 115, 116F
 threonin, 63F
 thrombin, 167
 thylakoid a thylakoidní membrána, 430, 431FF, 432
 thymidin, 67F
 thymin, 66F
 v DNA, 186-188, 186FF
 thyminové dimery
 vznik, 202, 204F
 xeroderma pigmentosum, 204
 thymosin, 532-533, 532F
 thyroïdní hormony, 485T, 488, 488FF
 tkáň, 593-621, 594FF
 adheze buněk a plazivý pohyb po matrix, 603, 603F
 epiteliální listy, 605-613, 605FF
 homogenizace a centrifugace, 160FF
 pojivová, 600-605, 600FF
 údržba, 613-615, 615F
 ve stěně střeva, 594F
 ve světelném mikroskopu, 3, 3F
 živočišná, 593-594, 594FF, 600-621, 600FF
 Tn10 (bakteriální transpozon), 290F
 transcytoza, 476, 476F
 transducin, aktivace a účinky v dráze, 503, 504F
 transdukce, bacteriofág lambda, 289, 289F
 transferová RNA, *viz* tRNA
 transferrin, 135F
 transformace, příjem DNA, bakterie, 284-285, 284F
 transgenní organismy, 340-342, 340FF
 myši, 342, 342F
 přidání genů, 340F, 341
 vyřazení neboli knockout genu, 340FF, 341-342
 transkripce, 212-224, 212FF, 263-267, 264FF
 elongace, nucleosomy a, 266-267
 iniciace, v bakteriích, 216-218, 217FF, 261-262, 261FF
 iniciace, v eukaryotech, 263-267, 264FF
 mechanismus a transkripční aparát, 213-215, 214FF „
 nepřepisovaná DNA, 218
 nukleosomy a, 255
 replikace DNA, rozdíly, 214
 rychlost a množství, 214
 sbalení chromatinu, 253-255, 254F
 terminátor, v bakteriích, 216-217, 217F
 v buněčném cyklu, 550, 554F
 vizualizace v elektronovém mikroskopu, 215F
 výběr řetězce DNA, 217-218, 218F
 transkripční iniciační komplex, 264-265, 264FF
 transkripční kontrola, *viz* Regulace genů
 transkript, 214
 translace, 212, 224-234, 224FF
 čtecí rámce, 225, 225F
 Ef-Tu, 176, 177F
 elongace řetězce, 229-230, 230F
 iniciace
 iniciační faktory, 231, 231F
 mechanismy, 231, 231F
 význam, 230
 na polyribosomech, 232, 233F
 na ribosomech 229-230, 229FF
 rychlost, 229, 232
 skládání proproteinů, 232
 terminační mechanismus, 231-232, 232F
 uvolňovací faktory, 231, 232F
 transmembranová signalizace, 178-179, 179F
 transplantáty, 617
 transponázy, 289-290, 290F
 transponovatelné elementy, 289-290, 290F
 bakteriální, 289, 290F
 eukaryontní, 295-297, 295FF
 retrotranspozony, 295-296, 295FF, 300
 v evoluci, 296-297, 297F
 transport proteinů
 do jádra, 455-457, 455FF
 do mitochondrií a chloroplastů, 453, 457-458, 457F
 přes membrány, 453, 454F
 translokátory, 453, 460, 460F
 transportními váčky, 453, 454F, 462-466, 463FF
 transportní váčky, 453, 454F, 462-463
 fúze, 466, 467F
 klathrin, 463
 opláštěné, 463-465, 464FF
 pučení, 463-464, 464F
 rozpoznání cíle a přistání, SNAREs, 466, 466F
 transport v buňce, 465-466
 v Golgiho aparátu, 469-470, 470F
trans-síť Golgiho aparátu, *viz* Golgiho aparát
 trávení
 intracelulární, v lysosomech, 476-477, 477F
 při odbourání potravy, 108, 109F
Treponema pallidum, 23F
 triacylglyceroly, 55, 58F, 350, 351
 Triton X-100, 360, 360F
 tRNA, 215, 216T, 225-226, 226T
 antikodon, 226-227, 226F
 iniciační faktor, 231, 231F
 kolísavé párování bazí, 226-227, 227F
 připojení aminokyselin, 227, 227F
 vazebná místa na ribosomu, 229, 229F

tropomyosin v kontrakci svalu, 541-542, 542F
 α -tropomyosinový gen, 222, 222F
troponin, 541-542, 542F
trypsin, 164F
tryptofan, 63F, 261-262, 261FF
tryptofansyntetáza, 135F
třídění proteinů, 452
 adresová sekvence, 453-455, 454T, 455F
 do ER, 459-460, 460F
 do jádra, 455-457, 455FF
 do mitochondrií a chloroplastů, 457-458, 457F
 do organel, 452-462, 454FF
 do váčků, adaptiny, 464-465, 465F, 465T
 lyzozomální proteiny, 476-477
 pro sekreční váčky, 471
 v endosomech, 475-476, 476F
 vezikulární transport, 462-466, 463FF
 v Golgiho aparátu, 470
 ve váčkové dopravě, 463
třídící signály, 453
 adresové a signální sekvence, 453-455, 454T, 455F
 start-transfer a stop-transfer (iniciační a terminační signál přenosu), 461-462, 461FF
tubulin, 135F, 519, 520F
 α - and β -, 519
 γ -, 520-521, 521F
tukové buňky, 32F
tuky, 55, 58F, 350, 351F
 jako zásobní látky, 125-126, 125F
 nasycení a teplota, 354
 oxidace
 ATP a výtěžky produktů, 420, 420F
 účinnost, 429
 v cyklu kyseliny citronové, 119-121, 120FF
 skladování, 119F
 struktura, 119F
 tvorba při fotosyntéze, 436-438, 436FF
tumorové viry, 302
 onkogeny, 302-303, 302F, 303T
 tumor-supresorové geny, 588, 620

 při kolorektálním karcinomu, 620F
 retinoblastomální (Rb) gen, 589
turgor, 383
 růst rostlinných buněk a, 595-596
tvar proteinů, 134-141, 136FF, 150FF, 152-154, 153F
 fibrilární, 153-154, 153F
 globulární, 152-153
tyčinková světlocitlivá buňka, 33F, 503, 503FF
tyrosin, 63F, 137F

U

ubichinon, 415F, 425, 425FF
ubikvitin, 234
 odbourání cyklinu, 577
uhlík, 38, 38F
 dvojný a jednoduchý vazby, 45, 46F
 izotopy, 38-39
 jako základní prvek buněk, 52
 uhlíkaté kostry, 6F
uhlovodíky, 46F, 55, 58F
uložení a využití energie, 94-104, 94FF
ultrafialové záření, tvorba thyminových dimerů, 202, 203F
úpravy RNA
 čapkování, 218-219, 219F
 polyadenylace, 219, 219F
 s pomocí RNA, 238, 238T
 viz také RNA, sestřih
uracil, 66F
 v RNA, 213, 213FF
uridin, 67F
uridindifosfoglukosa, 100T
urokináza, 294F
ústřední dogma molekulární biologie, 212, 212F, 223, 223F, 234, 235F

V

váčky, 18F *viz také* transportní váčky
 izolační techniky, 160FF
 pučení, proteinové stroje, 178-179, 179F
 ve vnitrobuněčném transportu, 15, 15F
 velikost, rozmezí, 352

vakuola, rostliny, 18F, 431F
 protonová pumpa, 384, 385F
valin, 63F
van der Waalovy síly, 69, 70F
 při skládání proteinů, 136, 138F
vápenatá pumpa, 135F, 383-384, 386T, 502
 při kontrakci svalu, 542
vápenatý ion
 fyziologické účinky, 501, 501F
 jako druhý posel nebo spouštěč, 383-384, 501-502, 501FF
 kaderiny, 609
 koncentrace a gradienty, 373T, 384, 502
 kontrakce, 541-542, 541F, 542
 při uvolnění nervového mediátoru, 398-399, 501F, 502
vápník vázající proteiny, 502, 502F
vázané anionty, 373, 373T
vazba proteinu
 k regulačním sekvencím DNA, 259-260, 259F
 rovnovážná konstanta, 157, 166-167, 166F
 selektivita, 155
 síla nekovalentní vazby, 155, 155F
 v reakci katalyzované lysozymem, 169
vejce, 33F, 304FF, 305, 563F
 při studiu buněčného cyklu, 575-577, 575FF
 rýhování, 575
 vývojový plán těla, 624, 624F
vezikulární transport, 462-466, 463FF
 viz také opláštěné váčky; transportní váčky
 Golgiho aparátem, 469-470, 470F
 motorové proteiny, 525-526, 526F
 sekreční dráha, *viz* sekreční dráha
 transportními váčky, 463-466, 464FF, 465T
 vnitrobuněčný a asymetrie membrán, 355-356, 356F
vimentin, 516, 517F
viroid, ribozym, 238, 238F
virus lidské imunodeficiency (HIV), 298T
 detekce pomocí PCR, 334F, 335
 léky, 300, 301F
 receptorová endocytoza HIV, 475

- virus hepatitidy (žloutenky), 298T
virus Rousova sarkomu, genom a funkce, 302, 302F
viry, 297-303, 298FF, 298T, 303T *viz také* bakteriofág; retroviry; tumorové viry
 buňky, srovnání, 1
 detekce PCR, 334F, 335
 genomy, 298, 298F, 298T
 infekce, 297-298, 298T
 izolační techniky, 160FF
 jako parazity, 298-299, 299F
 lidských nemocí, 298, 298T
 obalené, 301F
 pláště, 299-300, 299F
 proteinové komplexy, 151
 protilátky, 158F
 provirus, 300, 301F
 životní cyklus, 288F, 299, 299F
vitaminy, 172
vláskové buňky vnitřního ucha, 390, 390, 391FF
vlásky, u rostlin, 599F
 v_{lim} , definice a měření, 170-171, 171F
 V_{max} , *viz* v_{lim}
vnitrobuněčné pohyby
 eukaryontní řasinky (brvy) a bičíky, 518-519, 519F, 527-529, 528FF
 organel a částic, 525-527, 525FF
 skákavé, 525, 525FF
 svalový stah, 538-542, 539FF
 využívající aktinových vláken, 529-530, 530F
 využívající mikrotubulů, 525-526, 526F
vnitrobuněčný transport *viz také* vezikulární transport
 motorové proteiny, 525-526, 526F
 váčky, 15, 15F
vnitřní membrány, 7F, 8, 13-15, 14FF, 18F, 347-348, 347FF
 viz také buněčné oddíly endomembránový systém, soustava vnitřních membrán, a jednotlivé organely
vnitřní mitochondriální membrána, 412-413, 412F
 elektrontransportní řetězec, 414-415, 415F
 oxidační fosforylace, 417, 417F
 spřažený transport, 419, 419F
 syntéza ATP, 417-419, 417FF
 tvorba protonového gradientu, 415-417, 416F
voda, 48, 50FF
 iontové vazby, 71F
 jako rozpouštědlo, 48, 51F
 kyseliny a zásady, 49-52, 49F, 51F
 vodíkové můstky ve v., 70F
vodíková molekula, tvorba kovalentní vazby, 43, 43F
vodíkové můstky
 v α -šroubovici, 141, 144F, 145
 v β -listech, 141, 144F
 v DNA, 185, 186FF, 187
 v makromolekulách, 70F
 v transmembránové α -šroubovici, 359, 359F
 ve skládání proteinů, 136-137, 138F
 ve vodě, 70F
 vlastnosti, tvorba, význam, 47F, 48-49, 50F
vodíkový ion, *viz* proton
vodivé pletivo, 599F
volná energie, 89, 90F
 v chemických reakcích, 85
vřeténko, 553, 553F
 umístění během mitozy, 554FF
 v anafázi B, 555F, 558, 558F, 559
výtokové draselné kanály
 G-protein v srdci, 496, 496F
 a membránový potenciál, 392-393, 392FF, 403T
vývoj končetin, 625-626, 626F
vývoj, 621-628, 621FF
 epiteliální listy, tvorba trubice, 610, 610F
 gastrulace, 622, 623F
 hospodaření s prostředky, 628
 Hox-geny, 627, 627F
 knockout-myši, 342, 342F
 končetin, 625-626, 625F
 kontaktně závislá signalizace, 484, 484F
 nervové soustavy, 624-625, 624F
 obratlovců, 626-628, 626FF
 oka, řízení genem *Ey*, 273, 273F
 osy těla, od hlavy k ocasu, 627, 627F
 polohová informace od signálních molekul, 625-626, 625F
 program exprese různých genů, 622-624, 623F
 programovaná buněčná smrt, 584-585, 585FF
 raná stadia
 Sonic-hedgehog-protein jako signál, 625-627, 625FF
 testosteron, 488-489, 488F
 tvorba tělního plánu, počátky a jemné doladění, 624, 624F
-
- ## W
- White*-gen, vliv polohy na expresi, 255F
-
- ## X
- Xenopus* (drápatka), 575-576, 576F
xeroderma pigmentosum, 204
X-chromosomy, *viz* chromosomy X
xylém, 599F
-
- ## Y
- Y-chromosomy, *viz* chromosomy Y
-
- ## Z
- základní pletivo, 598F
zánětlivé odpovědi, glykokalyx v, 365, 366F
zárodečné buňky, 33F, 304FF, 305
 mutace v, 199-200, 199F
 přetřídění rodičovských chromosomů, 307-308, 308F
záznam z terčíkového zámku, 388-389, 388F
Země
 původ organických molekul, 235-236, 236F
 věk, 407
zesilovače transkripce (enhancery), 265-266, 266FF
zinkový prst, DNA-vazebný motiv, 260F
získávání energie
 viz také elektrontransportní řetězce, oxidační fosforylace, protonová pumpa
 chemiosmotické spřažení, načrt, 409-410, 410F
 raná evoluce, 407, 408F

uvolněná při přenosu elektronů,
423, 425
v bakterii *Methanococcus*, 441-442,
442F
v buňkách, 77-104, 78FF
v chloroplastech, 430-439, 431FF
v mitochondriích, 421-429
souhrn metabolismu, 413-414,
414F
potřeba pro buňky, 77-78
z cukrů, 107-108, 107F
z oxidačních reakcí, 83-84, 83FF
ze spřažených reakcí, 114-118,
116FF

zrak, buněčný mechanismus, 503,
504F
zygota, v organismech s pohlavním
rozmnožováním, 305F, 306

Ž

žába, 257, 257F
železo, receptorová endocytoza, 475
živé organismy, evoluce na Zemi, 407,
408F
živočich
viz také vývoj
evoluční podobnost, 30, 31F

modelové organismy, 29-30, 29FF
srovnání s rostlinou, 584
tkáně, 600-613
živočišné buňky, 18F, 119, 120F
koncentrace iontů, 372
osmotická rovnováha, 382-383,
382F
plazivý pohyb buněk, 533-536,
534FF
polarita, 523, 523FF, 524
sodíková pumpa, 378
syntéza ATP, 108-124
ukládání živin, 125-126, 125F