

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická

Odchyly od standardního genetického kódu

Romana Nešporová

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Romana Nešporová**
Osobní číslo: **C14311**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Odchyly od standardního genetického kódu**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte literaturu týkající se funkce a evoluce genetického kódu. Popište odchylky, které byly dosud v přírodě nalezeny. Blíže se zaměřte na alternativní překlad kodonu CUG v patogenních kvasinkách. Vysvětlete, jaký je molekulární důvod těchto alterací a jaký je jejich vliv na proteom.
2. Ke studiu tématiky použijte hlavně zahraniční odbornou literaturu a informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Nirenberg (2004) Historical review: Deciphering the genetic code - a personal account. Trends Biochem. Sci. 29, 46-54.

Moghal, Mohler, Ibba (2014) Mistranslation of the genetic code. FEBS Lett 588, 4305-4310.

Sengupta a Higgs (2015) Pathways of genetic code evolution in ancient and moder organisms. J. Mol.Evol. 80, 229-243.

Heaphy et al. (2016) Novel ciliate genetic code variants including the reassignment of all three stop codons to sense codons in condylostoma magnum. Mol.Biol.Evol. 33, 2885-2889.

Bezerra et al. (2013) Reversion of fungal genetic alteration links proteome instability with genomic and phenotypic diversification. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 110, 11079-11084.

Další relevantní články vyhledejte pomocí standardních databází.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

28. listopadu 2016

Termín odevzdání bakalářské práce:

7. července 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlášení

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2017

Romana Nešporová

Poděkování

Mé poděkování patří především vedoucí bakalářské práce RNDr. Olze Heidingsfeldové, CSc. za odborné rady, trpělivost a ochotu, které mi v průběhu zpracovávání práce věnovala. Chtěla bych také poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

V Pardubicích dne 1. 7. 2017

Romana Nešporová

ANOTACE

*Práce popisuje nejen historii výzkumu a samotné vlastnosti genetického kódu, ale hlavně odchylky od standardního genetického kódu a teorie týkající se jejich vzniku. Největší pozornost je věnována změně významu CUG kodonu u patogenní kvasinky *Candida albicans*, což je jedna z nejvýraznějších odchylek v jaderném genomu. Zároveň se zabývá transformací proteomu, kterou způsobuje změna fenotypu. Tato schopnost může mít totiž vliv i na patogenitu a odolnost této kvasinky vůči stresu.*

KLÍČOVÁ SLOVA

*CUG kodon, *Candida albicans*, odchylka, Ser-tRNA_{CAG}, genetický kód.*

ANNOTATION

The thesis describes the history of research and properties of genetic code, as well as the deviations from standard genetic code and the theories concerning their origin. Most attention is dedicated to the change in the CUG codon translation in Candida albicans, the most significant deviation in nuclear genome. It also deals with the transformation of proteome, which causes a change in phenotype. This property may influence pathogenicity and stress resistance of this yeast.

KEYWORDS

CUG codon, Candida albicans, deviation, Ser-tRNA_{CAG}, genetic code.

Obsah

Seznam zkratk	10
Seznam ilustrací	11
Seznam tabulek	12
Úvod	13
1 Vlastnosti genetického kódu	14
1.1 Vliv genetického kódu na proteosyntézu	15
2 Historie výzkumu	16
3 Teorie vzniku odchylek	19
3.1 Teorie zachycení kodonu	19
3.2 Teorie dvojznačného meziprojektu	20
3.3 Hypotéza racionalizace genomu	20
4 Nalezené odchylky	21
4.1 Změny v mitochondriálním genetickém kódu	21
4.1.1 Organismy se změnou v mitochondriálním kódu	22
4.2 Změny v jaderném genetickém kódu	22
5 Rod <i>Candida</i>	24
5.1 Patogenita u <i>C. albicans</i>	25
5.1.1 Faktory virulence	25
5.1.2 Vliv změny fenotypu na patogenitu	25
6 Ser-tRNA_{CAG}	26
6.1 Struktura a funkce Ser-tRNA	26
6.2 Odlišnosti Ser-tRNA _{CAG}	28
6.2.1 Guanin namísto uracilu na pozici 33	28
6.2.2 Uracil na pozici 44 namísto guaninu	30
6.2.3 Ser-tRNA _{CAG} jako chimérická molekula	30
7 Časové rozmezí změn kódování	31
8 Proteom	32
8.1 Vliv dvojí identity CUG kodonu na proteom	32
8.1.1 Nárůst velikosti proteomu	32
8.1.2 Rozmanitost fenotypu	32
8.1.3 Změna funkce v iniciačním faktoru 4E	33

9 Metody využívané v detekci odchylek	34
9.1 Izolace DNA	34
9.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	35
9.3 Elektroforetická separace.....	36
9.4 Sekvenování DNA.....	37
9.4.1 Sangerova metoda.....	37
9.4.2 Maxam-Gilbertova metoda (M&G)	38
9.4.3 Systém Illumina.....	39
9.4.4 Využití sekvenování	40
10 Závěr.....	41
Seznam odborné literatury	42

Seznam zkratek

A	Adenin
AT	Adenin/Thymin
bp	páry bází neboli base pair
C	Cytosin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
G	Guanin
GC	Guanin/Cytosin
PCR	Polymerázová řetězová reakce
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
RNA	Ribonukleová kyselina (Ribonucleic acid)
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina (transfer ribonucleic acid)
SIR2	Zkratka genu z anglického silent information regulator
T	Thymin
U	Uracil

Seznam ilustrací

Obrázek 2.1 – Sekundární struktura molekuly DNA.....	17
Obrázek 3.1 – Princip zachycení kodonu.....	19
Obrázek 4.1 – Mapa odchylek od standardního genetického kódu.....	23
Obrázek 5.1 – <i>Candida albicans</i>	24
Obrázek 6.1 – Sekundární struktura Ser-tRNA	27
Obrázek 6.2 – Sekundární a terciární struktura Ser-tRNA _{CAG}	28
Obrázek 6.3 – Popis změny konfigurace.....	29
Obrázek 9.1 – Princip PCR	35
Obrázek 9.2 – Záznam z horizontální elektroforézy	36
Obrázek 9.3 – Schéma sekvenace Sangerovou metodou	38
Obrázek 9.4 – Ohnutí fragmentu do tvaru mostu a následná amplifikace	39

Seznam tabulek

Tabulka 1.1 – Genetický kód.....	14
Tabulka 4.1 – Rozdíly mezi změnami v mitochondriálním a jaderném genomu.....	21

Úvod

Dlouho se mělo za to, že genetický kód je univerzální. Tuto myšlenku podporovala například i teorie Francise Cricka, která říkala, že genetický kód je „zmražen“ tudíž se nemůže vyvíjet. Jakákoliv změna by podle tehdejších teorií měla pro buňku fatální následky. Z toho důvodu bylo velkým překvapením, když v roce 1992 Osawa et. al zveřejnil článek, ve kterém publikoval objevené změny. Tyto odchylky byly dvojího typu – mitochondriální anebo jaderné. Přičemž jaderné nebyly až tak časté. Z toho důvodu se začalo zkoumat, jakým způsobem tyto odchylky vznikají a co je způsobuje. Jedním z organismů, u kterého byly objeveny změny v jaderném genomu, které způsobovaly změny v translaci CUG kodonu, je rod *Candida*. Díky této změně nebyl zmiňovaný kodon překládán jako leucin, ale mnohem častěji jako serin. Následné výzkumy dospěly k závěru, že tuto změnu způsobuje nejspíše speciální ser-tRNA_{CAG}, která se oproti standardní leu-tRNA_{CAG} liší v několika bodech, které jsou v této práci také popsány (Osawa et al., 1992).

Cílem mé práce je rešerše veškerých publikovaných materiálů týkajících se vlastností genetického kódu a problematiky jeho odchylek s bližším zaměřením na nestandardní předklad tripletu CUG u *C. albicans*.

1 VLASTNOSTI GENETICKÉHO KÓDU

Pro pochopení, proč je pro nás genetický kód tak důležitý, je třeba si vysvětlit jeho roli v přenosu genetické informace. Struktura DNA, kterou v roce 1953 objevili Watson a Crick, říká, že její vlastnosti umožňují replikaci, která spočívá v párování komplementárních bází a kódování genetické informace pomocí určení pořadí těchto bází. DNA podléhá transkripci, což je přepis genetické informace do molekuly RNA. Ve většině případů se jedná o přepis pouze jednoho genu, ten následně slouží k výrobě jednoho specifického proteinu. Protože se jedná o enzymatický proces, působí zde enzym RNA polymeráza, rozeznávající promotor v molekule DNA. Ten nám označuje začátek transkripce. Po rozvázání vodíkových můstků dojde k nasyntetizování RNA vlákna dle komplementarity bází. Nově vzniklá RNA je poté na ribozomech pomocí translace přeložena do primární struktury proteinu.

A právě toto kódování se řídí určitými pravidly, která se souhrnně nazývají genetický kód. Ten má několik základních vlastností. Jednou z nich je tripletový neboli třípísmenný kodon. Vysvětlením, proč kodon není pouze dvoupísmenný je malá variabilita. Protože DNA obsahuje 4 druhy dusíkatých bází (adenin, guanin, cytosin a thymin), dostali bychom pouze 16 variant (4^2). Tato možnost ovšem není pravděpodobná, protože potřebujeme rozlišit 21 aminokyselin. Proto, se objevil názor, že kodon bude tripletový. Tím pádem je k dispozici 64 kodonů (4^3), přičemž pouze

Tabulka 1.1 – Genetický kód (Převzato z <http://www.genetika-biologie.cz/images/TABULKA.GIF>; 2.4.2017)

	U		C		A		G	
U	UUU	fenylalanin	UCU	serin	UAU	tyrosin	UGU	cystein
	UUC	fenylalanin	UCC	serin	UAC	tyrosin	UGC	cystein
	UUA	leucin	UCA	serin	UAA	stop	UGA	stop
	UUG	leucin	UCG	serin	UAG	stop	UGG	tryptofan
C	CUU	leucin	CCU	prolin	CAU	histidin	CGU	arginin
	CUC	leucin	CCC	prolin	CAC	histidin	CGC	arginin
	CUA	leucin	CCA	prolin	CAA	glutamin	CGA	arginin
	CUG	leucin	CCG	prolin	CAG	glutamin	CGG	arginin
A	AUU	izoleucin	ACU	treonin	AAU	asparagin	AGU	serin
	AUC	izoleucin	ACC	treonin	AAC	asparagin	AGC	serin
	AUA	izoleucin	ACA	treonin	AAA	lysin	AGA	arginin
	AUG	metionin	ACG	treonin	AAG	lysin	AGG	arginin
G	GUU	valin	GCU	alanin	GAU	kys.	GGU	glycin
	GUC	valin	GCC	alanin	GAC	asparagová	GGC	glycin
	GUA	valin	GCA	alanin	GAA	kys.	GGA	glycin
	GUG	valin	GCG	alanin	GAG	glutamová	GGG	glycin

61 jich je schopno kódovat aminokyselinu. Z toho ovšem vyplývá, že kód musí být degenerovaný (jedna aminokyselina může být kódována více kodony), jak ukazuje tabulka 1.1.

Proto jsou kodony řazeny do kodónových rodin (kodony kódující stejnou aminokyselinu). Další z mnoha vlastností je i to, že je univerzální. To znamená, že většina kodonů má stejný smysl ve všech živých soustavách. Moje práce se zabývá problematikou vzniku odchylek od tohoto univerzálu, a zda je možné jejich vznik nějakým způsobem ovlivnit (Pray, 2008; Yanovsky, 2007; Ralston et al., 2008).

1.1 VLIV GENETICKÉHO KÓDU NA PROTEOSYNTÉZU

Jak bylo řečeno výše, kodonů kódujících aminokyseliny je 61 a zbylé tři jsou použity jako stopkodony. Důležitý je ale i kodon AUG, který nejen kóduje aminokyselinu methionin, ale má roli coby iniciační neboli start kodon (opak stopkodonu). A právě tento kodon ribozom rozezná jako počátek kódující sekvence a je schopen právě odtud zahájit translaci. Aby k tomuto kroku mohlo dojít, je třeba přepsat genetickou informaci z deoxyribonukleové kyseliny DNA do kyseliny ribonukleové RNA. Tento proces se nazývá transkripce a probíhá v jádře. Dochází tu k rozpletení vlákna DNA za pomoci enzymu helikázy. Následně díky RNA-polymeráze dochází k samotnému přepisu a zároveň záměně thyminu za uracil. Tímto způsobem dostaneme mRNA, ta se následně přesouvá do cytoplasmy, kde se naváže na ribozom. V ribozomu se tRNA s navázanou příslušnou aminokyselinou spojí pomocí antikodonu s mRNA. Po připojení další tRNA, dochází ke spojení dvou aminokyselin pomocí peptidické vazby. Touto cestou vzniká primární struktura proteinu do doby, než ribozom rozezná jeden ze stop kodonů (UAA, UAG, UGA), kdy končí syntéza bílkoviny (Nirenberg et al., 1964, Alberts et al., 2002).

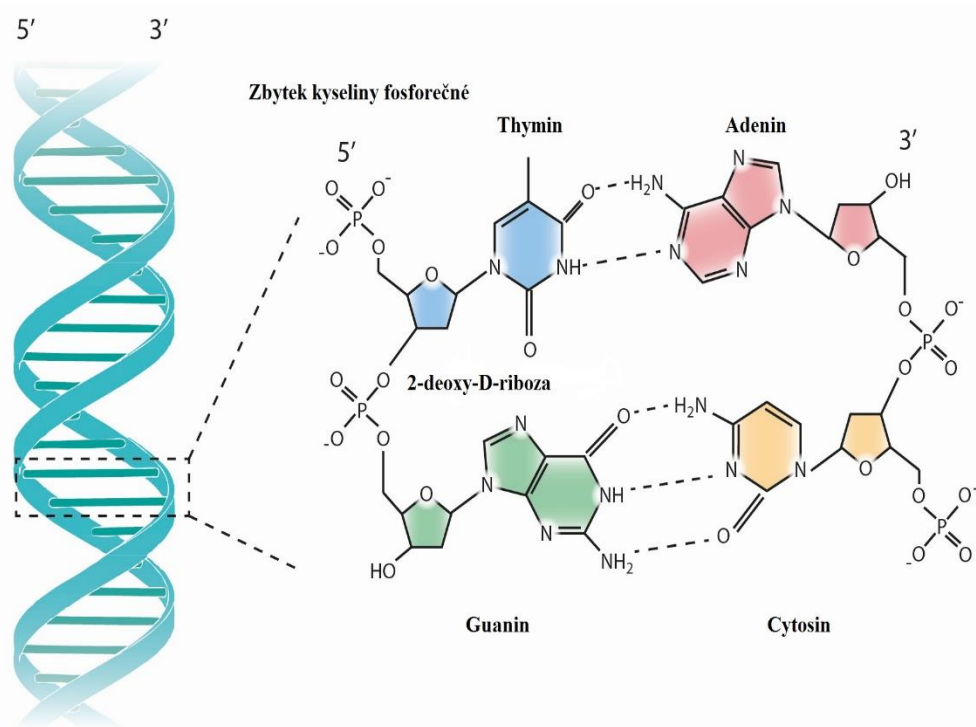
2 HISTORIE VÝZKUMU

V roce 1856 Johann Gregor Mendel vypořádal, že dědičné znaky se nezískávají přímo, ale ve formě tzv. elementů. Tyto elementy dnes chápeme pod pojmem gen. Ačkoliv ve své době nebyl Mendel dostatečně oceněn, dnes víme, že položil základní kámen pro genetiku a objasnil základní vztahy v dědičnosti.

Za objevitele DNA je považován švýcarský lékař a přírodovědec Friedrich Miescher. Jeho hlavním cílem bylo objasnit základní stavební kameny života. Z toho důvodu se soustředil na různé typy proteinů, které tvoří leukocyty a to proto, že proteiny byly považovány za nejslibnější cíl, co se pochopení fungování buňky týče. Miescher zjistil, že základem buněčné cytoplazmy jsou opravdu proteiny, společně s lipidy. Problém ovšem nastal, když se je pokoušel klasifikovat. Rozmanitost bílkovin totiž překonala jeho tehdejší možnosti, co se vybavení a analytických metod týče. I přesto, se mu však podařilo vyšetřováním proteinů objevit v té době neznámou látku s neočekávanými vlastnostmi. Ty byly oproti proteinům velmi rozdílné. Kvůli výskytu v jádru buňky, nazval tuto látku „nuklein“. Tento termín se zachoval dodnes (Dahm, 2005).

Dalším významným mezníkem bylo objasnění a pochopení, jak se genetická informace přenáší a co tento přenos zprostředkovává. V roce 1944 tým vědců – Oswald Avery, Colin MacLeod a Maclyn McCarty přišli s experimentem, při kterém získali první důkaz o roli DNA v přenosu genetické informace. O necelých 10 let později se udál objev, který byl oceněn Nobelovou cenou. Na základě dat, které získali Franklinová a Wilkins, se podařilo Jamesi Watsonovi a Francisu Crickovi navrhnout sekundární strukturu molekuly DNA (Watson et al., 1953).

Jak dnes víme, jednalo se o dva antiparalelní řetězce složené z cukru (2-deoxy-D-riboza), fosfátu a dusíkaté báze. Tuto strukturu můžete vidět na obrázku 2.1.



Obrázek 2.1 - Sekundární struktura molekuly DNA (převzato a upraveno <https://www.mechanobio.info/topics/genome-regulation/dna-structure/> 2.4.2017)

Dalším důležitým krokem pro pochopení, jak sekvence nukleotidů kódují aminokyseliny, bylo prolomení genetického kódu. Možnost, že se jedná o systém 1:1 (jedna báze odpovídá jedné aminokyselině) byl nepravděpodobný, protože aminokyselin podílejících se na stavbě proteinů je 20, kdežto nukleotidy jsou pouze čtyři.

Proto přišel v 50. letech 20. století George Gamow s teorií, že základem je zřejmě trojice nukleotidů (Nanjundiah, 2004). Ačkoliv neměl přesné představy o tom, jak by se kód četl (jednou z jeho myšlenek bylo i to, že by se triplety překrývaly, což bylo později vyvráceno) jeho teorii potvrdil Marshall Nirenberg. Ten se svým týmem objevil první triplet (kodon TTT kódující fenylalanin) neboli sekvenci kódující jednu z aminokyselin, které jsou základním stavebním kamenem proteinů (Nirenberg, 2004). Trvalo pouhých pět let, než rozluštil celý genetický kód.

Významným krokem bylo vyvinutí nové technologie pro sekvenování DNA. To se podařilo v 70. letech 20. století Walteru Gilbertovi a Fredericku Sangerovi. Dané metody umožnily čtení sekvence celých genů v délce 1 000 až 30 000 párů bází. Gilbert a Sanger pracovali samostatně, ale oba využili nedávno objevených enzymů, což vedlo ke zlepšení gelové elektroforézy. Touto metodou se zobrazuje pořadí nukleotidů. Gilbert, který spolupracoval s Allanem M. Maxemem vymysleli metodu, kdy

se násobila, dělila a pečlivě fragmentovala DNA. Sangerova metoda odhalovala nukleotidovou sekvenci pomocí jednovláknové DNA. Výsledný vzorek se rozdělil do čtyř částí, ke kterým se přidala jedna z bází. Za zmíněný objev dostali v roce 1980 sdílenou Nobelovu cenu v oboru chemie (Hutchison, 2007).

Během následujících desítek let mohli vědci díky vývoji techniky přejít k sekvenování až milionů párů bází. V říjnu 1990 začíná projekt zaměřený na mapování lidského genomu – HUGO (Human genome project). Do něj jsou zapojeny přibližně 2 000 vědců z mnoha zemí. Jedním z nich je i J. Craig Venter. Ten ještě v době, kdy byl zaměstnancem National institutes of Health (NIH) předvedl novou metodu, která mohla urychlit objev genů. Jednalo se o krátké fragmenty DNA označované jako expresní sekvenční značky (EST), díky kterým bylo možné gen najít a prozkoumat jeho funkci. Protože nebyl spokojený s rychlostí, jakou se při mapování genomu postupovalo, a zároveň byl velmi omezen rozpočtem, rozhodl se založit společnost Celera genomics, která byla financována ze soukromých zdrojů. To mělo za následek, že započalo soutěžení mezi HUGO a Celera genomics. O několik let později, tedy dne 26.června 2000 předstupuje před novináře americký prezident Bill Clinton a oznamuje, že lidský genom byl zmapován. Jedná se ovšem pouze o sekvenování hrubého genomu, kdy bylo sekvenováno pouze 85 % celého genomu. První osekvenovaný genom byl zveřejněn v únoru 2001 v časopise Nature. Tyto výsledky pocházely z HUGO. Celera genomics své výsledky zveřejnila pouze o den později. Dnešní čtení DNA je rychlejší, snadnější a levnější, než bylo tenkrát. Možná i proto známe kompletní genom několika stovek lidí, bakterií, virů ale i důležitých zemědělských plodin nebo hospodářských zvířat a můžeme tak genomy mezi sebou porovnávat a také využívat genetiky i v medicíně (Dahm, 2005, Nirenberg,2004, Lepshutz 1994, The International SNP Map Working Group,2001).

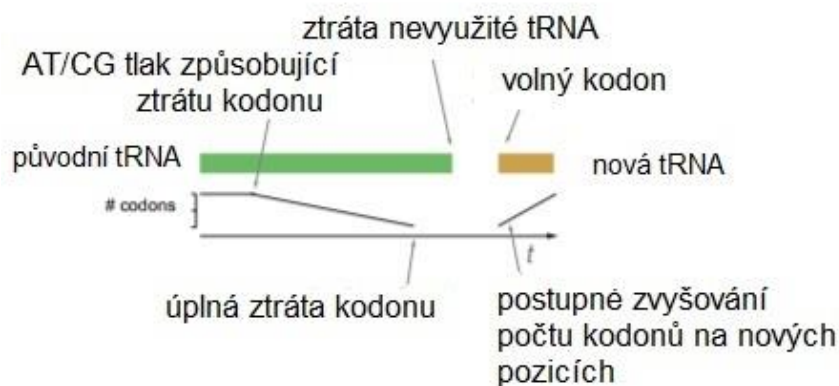
3 TEORIE VZNIKU ODCHYLEK

Dlouho panovala myšlenka, že genetický kód je shodný pro všechny organismy. Díky rozvoji techniky se ovšem během posledních třiceti let odkryla celá řada změn v překladu některých kodónů, a to nejen bakterií, ale i mitochondriích eukaryot. Tato zjištění vyvrátila teorii naprosté univerzálnosti kódu. Dalo by se říci, že základními příčinami pro vývoj genetického kódu bylo nižší využití kodónů, minimalizování genomu nebo vymizení tRNA. O dané důvody se opírají tři základní teorie vysvětlující vznik odchylek (Miranda et al., 2006, Bezerra, et al., 2015, Koonin et al., 2009).

3.1 TEORIE ZACHYCENÍ KODONU

Teorie zachycení kodonu říká, že díky AT nebo GC tlaku (jedná se o změnu poměru AT/GC, ke kterému dochází z důvodu stabilizace nebo jako následek oprav mutací DNA), vymizí některé kodony z kódující sekvence. To má za následek ztrátu funkčnosti a následné odstranění příslušné tRNA. Dané kodony se ovšem následkem genetického driftu mohou znovu objevit. Genetický drift je proces, kdy dochází k neúplnému náhodnému předání genů z jedné generace na druhou. V malých populacích díky tomu odchází ke změnám četnosti alel.

Znovu objeveným kodónům tak chybí tRNA. Díky mutacím v jiné tRNA, je možno dosadit původnímu kodonu jinou aminokyselinu. Zmíněnou teorii potvrzuje vymizení kodonu CGG u bakterie *Mycoplasma capricolum* (jednalo se o zvýšení tlaku AT), a kodónů AGA a AUA u *Micrococcus luteus* – v tomto případě se zvyšoval tlak GC (Bezerra, 2015, Koonin, 2009, Osawa, 1992).



Obrázek 3.1 – Princip zachycení kodonu (převzato a upraveno dle Mühlhausen, 2016)

3.2 TEORIE DVOJZNAČNÉHO MEZIPRODUKTU

Další teorie předpokládá, že změna kódování je přes mezistupeň, a to z toho důvodu, že kodon je nejednoznačně rozeznávám dvěma druhy tRNA – odpovídající i mutovanou. To umožňuje výběr výhodnější tRNA a získání vhodnější aminokyseliny. Může se zdát, že tento způsob by mohl mít pro organismus fatální následky. Avšak tuto teorii potvrzuje nejen rod *Candida*, u kterého je viditelná záměna v kodonu CUG, o němž bude později řeč.

Dalším příkladem je *Escherichia coli*, která využívá UGA jako kodon pro selenocystein, ale i jako stopkodon (Bezerra, 2015, Koonin, 2009).

3.3 HYPOTÉZA RACIONALIZACE GENOMU

Poslední hypotéza má za to, že vlastnosti translačního procesu i jeho organizace jsou ovlivněny evolučním tlakem, který je zaměřen na genomické rysy (velikost, složení a strukturu), nikoliv na translaci jako takovou. Změny kodonu jsou v tomto případě řízeny tak, aby se minimalizovaly translační pochody a došlo tak ke zvýšení hospodárnosti celého procesu. Právě tato teorie nejlépe vysvětluje změny v genomu mitochondrií (Anderson, 1995, Mühlhausen 2016).

4 NALEZENÉ ODCHYLKY

Veškeré nalezené odchylky vznikaly buď v mitochondriálním genomu, nebo genomu jaderném. Jak ukazuje tabulka 5.1, v případě mitochondriálního genomu se jednalo o změnu funkčního tripletu na nesmyslný (a naopak), častěji než u jaderného. Tím je myšleno „odebrání“ kódování daného tripletu. Stejně tak záměna příslušné aminokyseliny za jinou, tuto situaci můžeme vidět v posledním sloupci. Je tu popsáno, u kterého tripletu došlo k záměně, a jaká je výsledná aminokyselina. Oproti tomu v jaderném genomu docházelo spíše k záměně stopkodonu za triplet kódující aminokyselinu (Bezzera 2015, Osawa 1992).

Tabulka 4.1 – Rozdíly mezi změnami v mitochondriálním a jaderném genomu. Písmeno „R“ značí, že na této pozici může být jakákoliv báze, a i tak se význam nezmění. „X“ značí vyřazení tripletu, to znamená, že dále není přiřazen k příslušné aminokyselině (upraveno dle Bezzera et al., 2015)

	zařazený	vyřazený	STOP → AMK	AMK → STOP	AMK → AMK
Mitochondriální genom	AGA → Gly AGA → Ser AGR → Stop	ArgCGN → X SerAGR → X	UGA → Trp UAA → Tyr UAG → Leu AUG → Ala	SerUCA → Stop	SerAGG → Lys IleAUA → Met ArgAGA → Ser ArgAGG → Ser LysAAA → Asn ArgAGA → Gly ArgAGG → Gly
Jaderný genom		ArgAGA → X IleAUA → X ArgCGG → X	UGA → Trp UGA → Cys UAR → Gln		LeuCUG → Ser

4.1 ZMĚNY V MITOCHONDRIÁLNÍM GENETICKÉM KÓDU

Pro upřesnění by mělo být řečeno, že mitochondrie se mohou rozdělit na dvě kategorie – rostlinné a nerostlinné. Dělení je na základě využití kódu. Zatímco rostlinné mitochondrie využívají standardního genetického kódu, oproti tomu nerostlinné využívají například kodon UGA jako tryptofan (standardně se jedná o stopkodon), ale vyskytují se tu i jiné změny.

První změnou zřejmě byl již zmiňovaný UGA kodon, jak je vidět na obrázku 4.1. Tato odchylka nastala v nerostlinných mitochondriích po osamostatnění z rostlinných. Pokud bychom se zaměřili na linii hub, je u kvasinek viditelná změna v kodonu AUA z izoleucinu na methionin (tato změna je viditelná i u živočišné linie), a u tripletu CUN (N = jiný nukleotid), kde je záměna threoninu za leucin (Osawa 1992, Knight 2001).

4.1.1 Organismy se změnou v mitochondriálním kódu

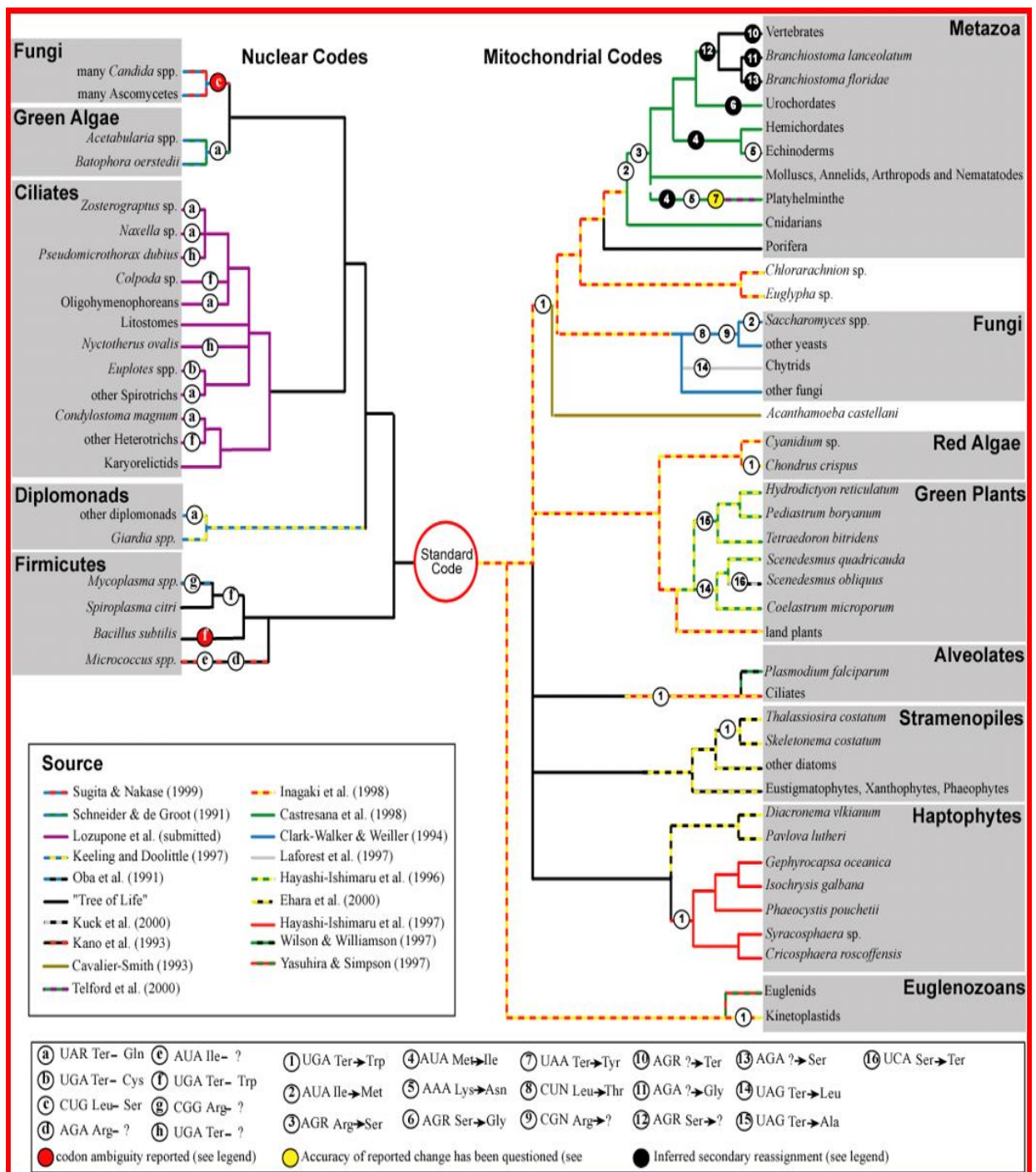
Nejčastější záměnou ve smyslu změny stop kodonu na aminokyselinu je dekódování UGA jako tryptofanu, a to díky Trp-tRNA_{UCA}. Tato změna je například u některých *Měňavek*, nebo kmenu *Euglenozoans*, přesněji u řádu *krásnooček*. Další změnou je například UAA jako tyrosin. Tuto odchylku lze nalézt u *Radopholus similis*, což je parazit na rostlinách. Parazituje zejména na banánovnících, citrusovnících, ale i kávovnících.

Případy, kdy dochází k záměně aminokyselin, jsou častější. Například mitochondrie kvasinek *Saccharomyces* nebo *Nakaseomyces* dekódují kodony CUN (N = A,G,C,T) jako treonin. Způsobuje to absence Leu-tRNA_{UAG} a změna struktury Thr-tRNA_{UAG}, což umožní rozeznání všech čtyř nukleotidů na třetí kodonové pozici. Dalšími triplety, které často mění svou identitu, jsou AGA a AGG. Základní aminokyselinou těchto kodonů je arginin, ovšem v případě rodu *Drosophila* se triplet AGA dekóduje pomocí Ser-tRNA_{GUC}, tudíž vystupuje jako serin. Oba tyto kodony nejčastěji využívají změnu na již zmiňovaný serin nebo glycin (Bezerra, 2015).

4.2 ZMĚNY V JADERNÉM GENETICKÉM KÓDU

Jak je z tabulky 4.1 zřejmé, v jaderném genetickém kódu dochází hlavně ke změnám ze stopkodonu na aminokyselinu. Jako příklad takových organismů lze uvést *Green algae*, tady dochází ke změně ze UAN ze stop kodonu na glutamin. Stop kodon UGA jako tryptofan je rozeznáván například u bakterie *Bacillus subtilis*. Nejpočetnější a nejrozmanitější skupinou co se změn celkově týče, jsou *Nálevníci*. Vyskytuje se tu změna tripletu jako u řas, ale i ze stop kodonu UGA na cystein.

Výjimku tvoří triplet CUG, který za standardních podmínek náleží aminokyselině leucinu. Jak ovšem bylo zjištěno, v kvasinkách rodu *Candida* a u většiny hub kmene *Ascomycetes* se častěji vyskytuje jako serin. Tomuto tématu jsou věnovány následující kapitoly.

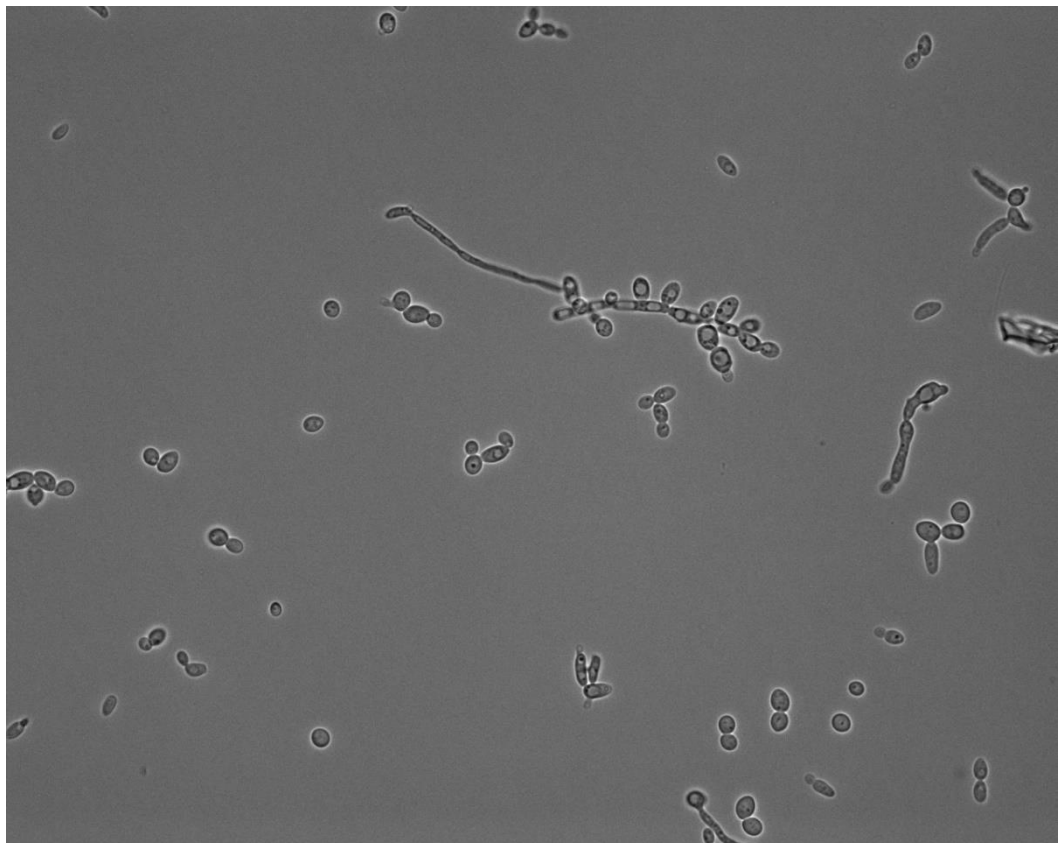


Obrázek 4.1 – Mapa odchylek od standardního genetického kódu (převzato z Knight et al., 2001)

5 ROD CANDIDA

Candida je jedním z rodů oportunně patogenních kvasinek (je patogenní v případě oslabení organismu nebo poškození obranných mechanismů). Tvoří oválné blastospory, s pučícími novými buňkami, ze kterých může vzniknout pseudohyfa. Ta může dosahovat délky i několika desítek mikronů. Vzhledem k jejich schopnosti tvořit biofilm, je můžeme považovat za nebezpečné fakultativní patogeny (Schindler, 2009).

První publikovaná zmínka o změně kódování u rodu *Candida* byla v roce 1989, kdy Yoshiyuki Kawaguchi a jeho tým objevili změnu u *C. cylindracea* a to díky sekvenční analýze genu lipázy I, kde byl triplet CUG přidělen jako kodon serinu. Tato teorie byla později potvrzena dalšími experimenty (Kawaguchi, 1989, Ohama, 1993). V souvislosti s touto změnou byla identifikována tRNA s antikodonovou sekvencí CAG – Ser-tRNA_{CAG}. To ovšem není jediná specifická vlastnost. Tou další je guanosin jednoznačně v pozici 33 – G33 (tuto pozici standardně zaujímá uracil).



Obrázek 5.1 – *Candida albicans*. Mikroskopický pohled při zvětšení 400x, po inkubaci při 37°C, 24 h v YPD mediu

5.1 PATOGENITA U *C. ALBICANS*

Candida albicans je druh, typicky se vyskytující ve střevní a ústní mikroflóře, který za fyziologických podmínek hostiteli neškodí. V případě, že dojde k oslabení imunity nebo nerovnováze systému, dojde k nadměrnému přemnožení a onemocnění kandidóze.

5.1.1 Faktory virulence

Mezi hlavní faktory virulence patří adheze, ať už z buňce hostitele nebo k povrchu materiálů – kanyly, katétry, protézy. Hlavním adhezinem *C. albicans* je mananprotein, Ten na povrchu buňky utvoří fibrilární vrstvu, která souží i jako ochrana před fagocytózou. Další faktor virulence, který blízce souvisí s patogenitou, je schopnost tvořit hyfy. Je to způsobeno tím, že podlouhlá forma má lepší schopnost přichycení k buňce a lépe proliferuje (množí se). Vlákničitá forma, která prorůstá do tkání je poté považována za invazivní, odolnější a parazitickou formu (Bednář, 1996).

5.1.2 Vliv změny fenotypu na patogenitu

Při bližším zkoumání *C. albicans* bylo zjištěno, že má schopnost střídat fenotypy (phenotype switching), tato vlastnost se projevuje i v patogenitě. Výzkum části DNA, zvané WO-1 prokázal dva fenotypy, jež se lišily zbarvením a tvarem kolonií. Jeden z nich se projevoval jako hladká bílá kolonie, druhý jako šedá kolonie vyrůstající vrásčitě. U další části – 3153A bylo objeveno nejméně sedm typů, které se také jednotlivě lišily vzhledem a fyziologií buněk. Zároveň v této části byl objeven gen *SIR2* (silent information regulator), který je nejspíše zodpovědný za přepínání fenotypů. Tento gen byl jako první objeven u *Saccharomyces cerevisiae*, u které odpovídá za útlum exprese okolních genů. U kvasinek, tedy i u *C. albicans* se tento gen nachází v okolí genů, které odpovídají za rozmnožování. Opomenout nelze ani regulátor transkripce, molekulu značenou jako Efg1p, která se také podílí na střídání fenotypů pomocí rychlé exprese. Genová exprese je proces, při kterém se informace, která je uložena v genu převádí na buněčnou strukturu nebo funkci. V tomto případě dochází k rychlé změně z šedého na bílý fenotyp (Bednář, 1996, Butler, 2009, Gomes 2007).

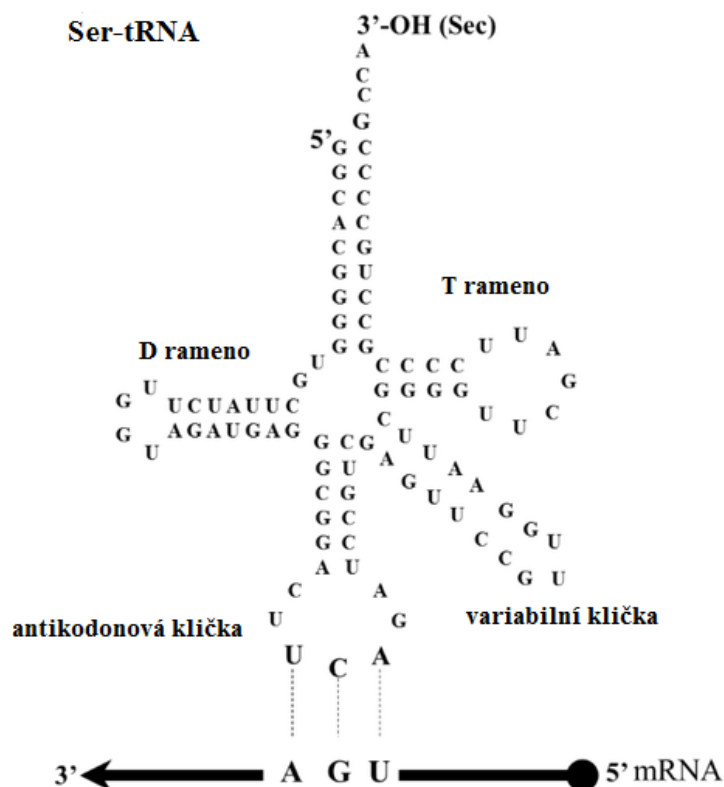
6 Ser-tRNA_{CAG}

Přiřazení standardně leucinového kodonu CUG k serinu, se objevilo již před 150 miliony let. Protože jsou biochemicky tyto aminokyseliny velmi rozdílné (serin je polární, leucin hydrofobní), dá se předpokládat, že tato záměna probíhá změnou v translačních pochodech.

Jak bylo zjištěno, triplet CUG je tedy překládán pomocí ser-tRNA_{CAG}. Zajímavé ovšem je, že tuto tRNA je schopna až ve 3 % případech rozeznat i leucin-tRNA-syntetáza. (Suzuki, 1997)

6.1 STRUKTURA A FUNKCE SER-TRNA

Struktura tRNA má charakteristický tvar podobný jetelovému listu. Skládá se z pěti ramen – akceptorové, D-rameno, TψC rameno, antikodonové a variabilní. Tato struktura je na obrázku číslo 6.1.



Obrázek 6.1 – Sekundární struktura ser-tRNA (Bezzera et al., 2015)

Akceptorové rameno se skládá ze sedmi párů bází a je zakončeno sekvencí CCA. Ta je umístěna na 3' konci, a právě sem se díky tRNA-syntetáze váže příslušná aminokyselina.

D-rameno funguje jako rozpoznávací místo pro aminoacyl-tRNA-syntetázu, která umožní navázání dané aminokyseliny na akceptorové rameno. Dohromady obsahuje čtyři páry bází. Může se stát, že některé báze chybí.

T-rameno má ve stopce pět párů bází a slouží jako specifická oblast, kterou rozeznává ribozom, což má na následek vznik komplexu tRNA-ribozom.

Antikodonové rameno má ve stopce pět párů bází a v samotné kličce sedm bází, které se ovšem nepárují. Z těchto sedmi jsou tři přiřazeny antikodonu – jedná se o nukleotidy 34, 35 a 36, přičemž kodon se přikládá v opačném směru, takže první písmeno je přiřazeno k nukleotidu 36. Na pozici 33 se nachází pyrimidinová báze – uracil a pozici 37 purinová báze – guanin.

Poslední zmíněné je rameno variabilní, které je odlišné hlavně svojí délkou. Ta může být 5-21 nukleotidů, a právě podle tohoto počtu se dělí do dvou tříd:

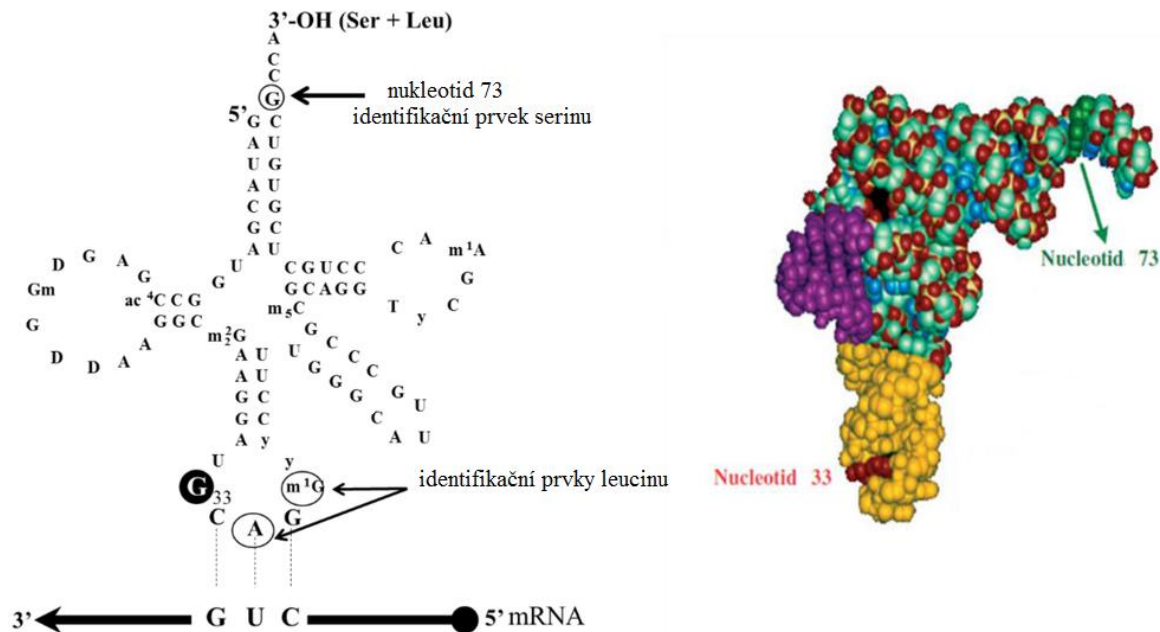
I. třída – délka ramena je do 10 nukleotidů

II. třída – délka ramena je delší než 10 nukleotidů

Ser-tRNA a leu-tRNA se řadí do druhé třídy (Perreau, 1999, Smith 1989).

6.2 ODLIŠNOSTI SER-TRNA_{CAG}

Hlavní odlišnosti struktury Ser-tRNA_{CAG} se vyskytují v antikodonové kličce. Všechny změny jsou viditelné na obrázku 6.2.



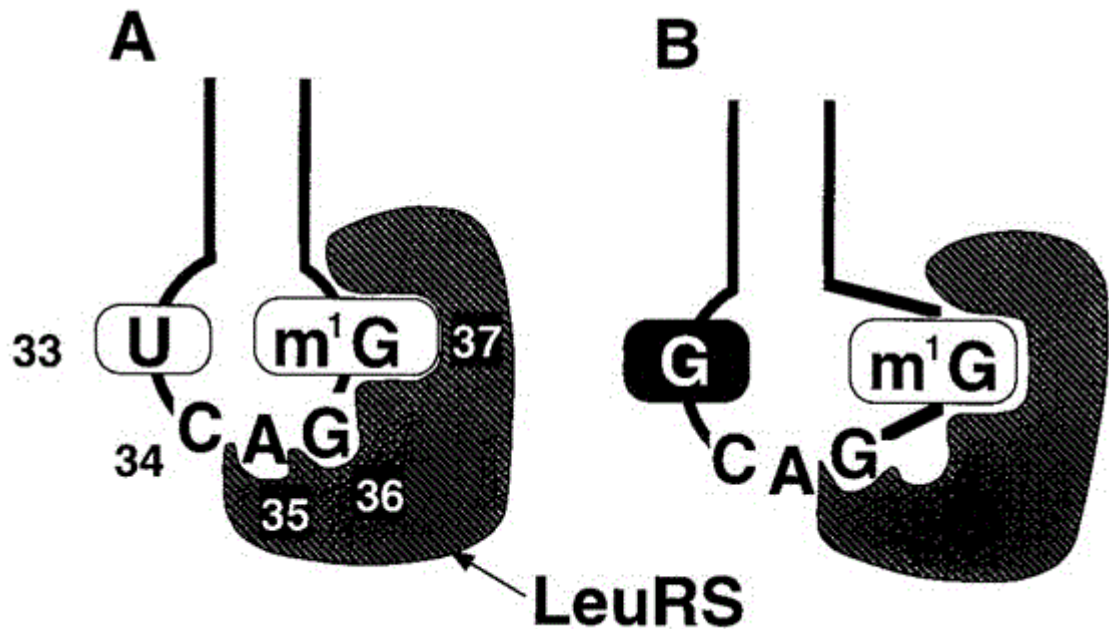
Obrázek 6.2 – Sekundární a terciární struktura Ser-tRNA_{CAG} (převzato a upraveno podle Miranda et al., 2006)

6.2.1 Guanin namísto uracilu na pozici 33

Prvním rozdílem je, že na pozici 33 se nachází purinová báze guanin namísto uracilu, který se na této pozici vyskytuje ve všech ostatních tRNA. Tato změna je důležitá pro opětovné přiřazení CUG kodonu k serinu. Za standardních podmínek totiž uracil napomáhá správnému tvaru antikodonové smyčky a tím ovlivňuje spojení kodonu a antikodonu. Při záměně na guanin dojde k změně tvaru kličky, která je způsobena velikostí báze. Tím se sníží dekódovací účinnost tRNA a to umožní buňce zpracování serinového tripletu CUG. Tuto situaci dokládá obrázek 6.2.

Předpoklad, proč k této změně došlo je ten, že se minimalizují škodlivé účinky, které by mohla mít změna kodonu na živou buňku. Tuto tezi podporuje i zjištění, že ser-tRNA_{CAG} s guanosinem na pozici 33 není toxická, a to v případě, že je exprimována z kvasinek příbuzných *Saccharomyces cerevisiae*. Na obrázku 6.3 pod tímto odstavcem je na pozici 37 guanosin, který je označen pomocí m¹G₃₇

methyltransferázy z *Escherchia coli*. Tato metoda byla použita ve studii Perreau et al. 1999, pro sledování a potvrzení nestandardní struktury v případě G33 namísto U33 (Santos 1993, Santos 1995, 1996, 1997, Bezerra, 2015, Perreau, 1999).



Obrázek 6.3 – Popis změny konfigurace. Při umístění guaninu na pozici 33 namísto uracilu. Označením m¹G je myšlen 1-methyl-guanosin. Označením LeuRS znamená leucinová tRNA syntetáza. (Převzato a upraveno z Suzuki, 1997)

6.2.2 Uracil na pozici 44 namísto guaninu

Ve výše uvedeném odstavci byla zmíněna studie, při které byla využita *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans* a to z toho důvodu, že tyto dva druhy mají podobné využívání kodonů a protože serinová a leucinová tRNA z *Saccharomyces cerevisiae* jsou dobře charakterizované. Vyšetřovala se tedy ser-tRNA_{CAG} z *C. albicans* a ser-tRNA_{IGA} a leu-tRNA_{m5CAA} (označením m5C je myšleno 5-methylcytosin) z *S. cerevisiae*. Při porovnání těchto vzorků se zjistilo, že všechny vzorky obsahují na pozici 44 uracil, namísto guaninu, který se v této pozici standardně vyskytuje. Největším rozdílem, mezi jednotlivými ser-tRNA byl netypický ohyb, který se vyskytuje v ser-tRNA_{CAG}. Následkem změny tohoto uspořádání je nejspíš snížení účinnosti párování mezi antikodonem a kodonem (Perreau et al., 1999).

6.2.3 Ser-tRNA_{CAG} jako chimérická molekula

Cílem aminoacyl-tRNA-syntetázy je navázat aminokyselinu na její odpovídající tRNA. Z toho vyplývá, že celkový počet je roven počtu aminokyselin – 20. Během let byl mechanismus, jakým aminoacyl-tRNA-syntetáza rozeznává příslušné tRNA zkoumán jak in vitro, tak in vivo. Původně se pracovalo s tRNA získané z *E. coli*, postupem času se začala využívat *S. cerevisiae*. Princip, jakým syntetázy reagují s tRNA je, že na ni přímo nasedají, jak je vidět na obrázku 6.2. Studie z roku 1997 (Suzuki et al., 1997) ovšem zjistila, že ser-tRNA_{CAG} obsahuje ve své struktuře motiv, který je schopen rozeznat ser-tRNA-syntetázu ale i leu-tRNA-syntetázu. Determinantou pro serinovou syntetázu je guanin na pozici 73. Na tomto místě se standardně nachází adenin. Determinanta pro leucin-tRNA-syntetázu se stále nachází na m1G37. Právě tento jev dokazuje, že se jedná o potencionálně chimérickou molekulu, která je schopna rozeznat právě dvě aminokyseliny. A to z 97 % je aminoacylována serinem a v pouhých 3 % leucinem. Tuto tezi potvrzuje i zjištění, že pokud se zamění nukleotid m1G na pozici 37 za adenin, dochází ke kompletní aminoacylaci serinem (Suzuki, 1997, Suzuki, 1997, Yokogawa, 1992).

7 ČASOVÉ ROZMEZÍ ZMĚN KÓDOVÁNÍ

Jak bylo již řečeno, rody *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae* si jsou velmi podobné. Analýza pomocí molekulární fylogeneze ukazuje, že tyto rody od sebe byly odděleny před 178 ± 19 miliony let. Tyto studie také prokázaly, že dekódování CUG jako serinu je přibližně 171 ± 27 milionu let staré (oproti tomu ser-tRNA_{CAG} vznikla nejméně před 272 ± 25 miliony let). Z toho se dá soudit, že CUG kodon byl pro předchůdce kvasinek jednoznačný a to po dobu přibližně 100 milionů let. Toto tvrzení může podpořit i fakt, že nejednoznačnost tripletu CUG způsobila ztrátu přibližně 26 000 – 30 000 CUG kodonů, které se u předka *C.albicans* vyskytovaly a silně ovlivňovaly použití ostatních kodonů z rodiny CUN. Během této studie bylo také zjištěno, že nejen *Candida albicans* ale také ostatní organismy jsou vybaveny tak, aby byli schopné tolerovat negativní vliv, který má poškození proteomu způsobené přeřazením identity kodonu.

Studie z roku 2006 tvrdí, že proteom kvasinek byl, co se časového měřítka týče, velmi nestabilní. To naznačuje, že dvojznačnost mohla být pro organismus výhodná. Podporuje to i skutečnost, že nedodržení přednosti dekódování neznamenal pro daný organismus smrt (Miranda, 2006).

8 PROTEOM

Po přečtení dědičných informací bylo třeba odhalit funkci bílkovin, které tělo vyrábí, podle informací uložených v genech. Zatímco geny zůstávají téměř stále stejné, bílkoviny se neustále mění – věkem, umístěním ale i stresem. Z toho důvodu vzniklo nové vědecké odvětví, zabývající se bílkoviny jednotlivých organismů - proteomika.

Proteom neboli soubor všech proteinů určitého systému. Tím jsou myšleny orgány, buňky, pletiva atd. Zároveň se sem řadí i všechny post-translační stavy proteinů – po translaci může být protein přítomen ve více funkčně odlišných formách. Proteom se dynamicky mění v průběhu celého buněčného cyklu, vývoje nebo reakce na změnu v metabolismu. Ovlivňuje ho například fyziologický stav buňky, teplota nebo stres.

8.1 VLIV DVOJÍ IDENTITY CUG KODONU NA PROTEOM

8.1.1 Nárůst velikosti proteomu

Důležitou charakteristikou proteomu *Candida albicans* je, že malé rozdíly v začlenění leucinu, mají velký vliv na expanzi a rozmanitost proteomu. Je to způsobeno tím, že v haploidním (to znamená, že v buňce je jedna alela daného druhu) stavu se vyskytuje triplet CUG průměrně třikrát na jeden gen (frekvence je 1 až 38 CUG), zároveň nebylo identifikováno žádné ovlivnění CUG kodonu. To naznačuje, že serin a leucin jsou vkládány na CUG pozici náhodně. Z toho důvodu je celkový počet proteinů, které mohou být degenerovány roven $2n$ (n = celkový počet CUG na gen). To má za následek, že velikost proteomu *C.albicans* exponenciálně narůstá s počtem tripletu CUG na příslušném genu (Gomes et al., 2007).

8.1.2 Rozmanitost fenotypu

V předchozích kapitolách byl vysvětlen vliv změny fenotypu na patogenitu. Vzhledem k tomu, že nejednoznačnost CUG kodonu měla za následek výrazné morfologické variace, byla provedena studie, kdy byl integrován kontrolní plazmid pUA12 a plazmid pUA15 do genomu *C.albicans*. Tento plazmid byl získán ze *Saccharomyces cerevisiae*, která obsahuje gen pouze pro leu-tRNA_{CAG}. Výsledkem

mělo být zjištěno, zda náhodná integrace plazmidů pUA12 a pUA15 by mohla být zodpovědná za pozorované fenotypy. Z důvodu toho, že klony, které udržovaly integrované plazmidy, obsahovaly gen URA3 který v kvasinkách usnadňuje růst na mediích díky obnově aktivity ODCázy. To je enzym katalyzující reakci při syntéze pyrimidinových ribonukleotidů. Tento po přidání kyseliny 5-fluorourové, převede danou kyselinu na toxickou sloučeninu, která způsobí buněčnou smrt. Z toho důvodu, lze usoudit, zda by ztráta plazmidu měla za následek vymizení fenotypové rozmanitosti. Zjištění, že neschopnost plazmidu pUA12 vyvolat fenotypovou variaci potvrdilo, že nejednoznačnost kódování CUG je skutečným generátorem fenotypové diverzity (Gomes, 2007).

8.1.3 Změna funkce v iniciačním faktoru 4E

U eukaryot je na iniciační tRNA s navázaným methioninem připojena malá ribozomální podjednotka. Toto spojení probíhá za asistence několika proteinů – iniciačních faktorů. Po jejím navázání se malá podjednotka váže na 5' konec mRNA, který rozezná podle čepičky na konci. Čepičkou je myšlena struktura na konci mRNA, kdy je přes řadu tří fosfátů navázán 7-methylguanosin. Její funkcí je chránit řetězec před rozkladem buněčnými enzymy a zároveň usnadnit transport mRNA a spustit translaci (Alberts, 1998).

Candida albicans je jediný známý eukaryotický organismus, který je schopen přežít defekt v zakončení mRNA. To značí jedinečné vlastnosti proteinu eIF4E, který je zodpovědný za navázání na čepičku RNA. Při jednom z experimentů byly zavedeny expresní vektory 4E116-Leu a 4E116-Ser získané z *C.albicans* do kmenů *Saccharomyces cerevisiae*. Důvodem byla snaha zjistit, zda je Ca4E protein zodpovědný za neobvyklé vlastnosti buněk kandidy. Výsledkem bylo zjištění, že žádná z variant Ca4E proteinu není schopna v náhradním organismu zachránit jeho růst. Z toho vyplývá, že buď kandidy využívají jiný mechanismus translační iniciace mRNA, nebo pozitivní vliv jiných iniciačních faktorů, které se v *C.albicans* vyskytují (Feketová, 2010).

9 METODY VYUŽÍVANÉ V DETEKCI ODCHYLEK

Jak bylo řečeno výše, bez odpovídajících instrumentálních metod, bychom v dnešní době nebyli tak daleko co se výzkumu genetického kódu a bílkovin celkově týče. Ještě předtím, než se tyto metody využijí, je třeba samotnou DNA vyizolovat z materiálu, který je k dispozici.

9.1 IZOLACE DNA

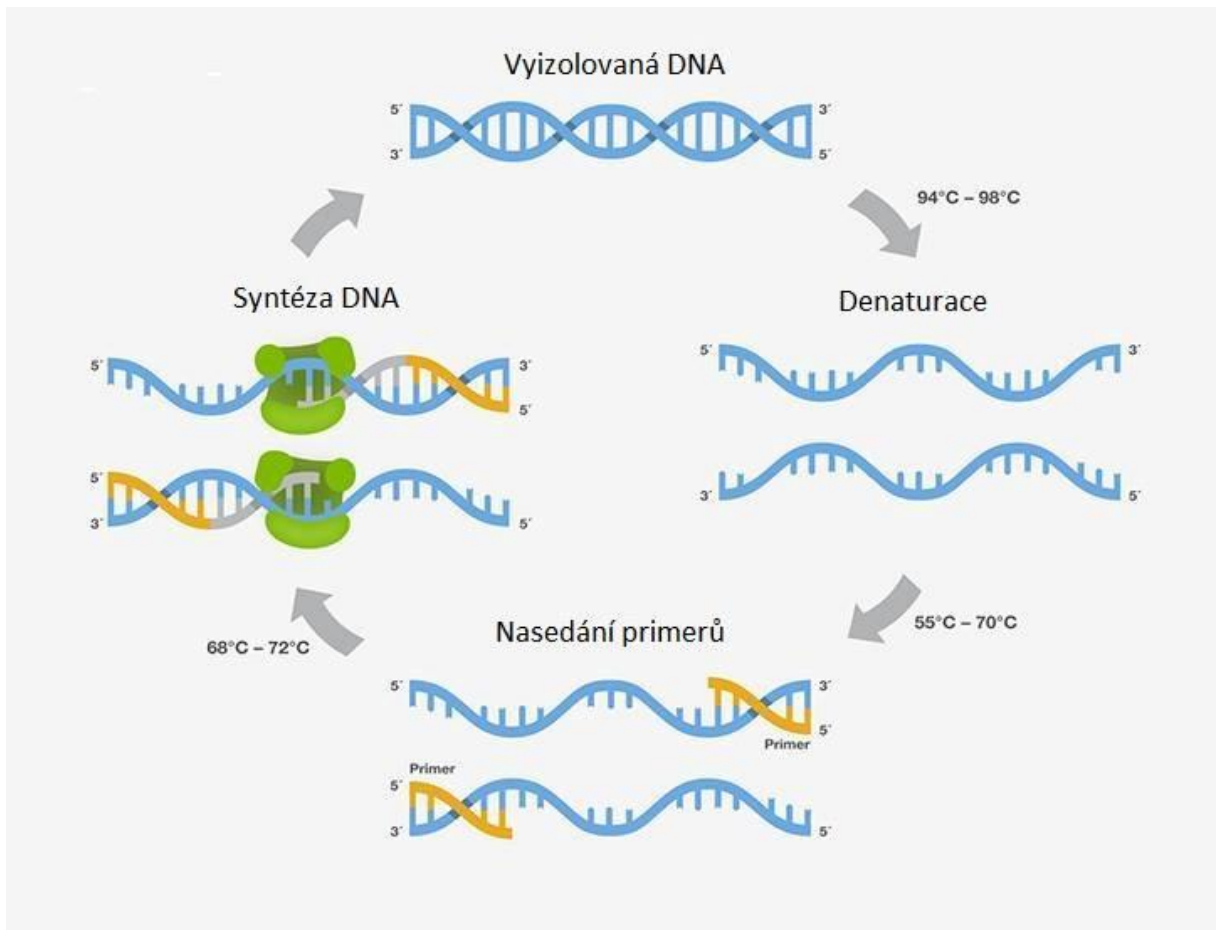
V tomto procesu se DNA získává pomocí chemických a fyzikálních metod. Jak bylo řečeno, poprvé byla DNA vyizolována Švýcarem Miescherem již v roce 1869, v dnešní době se jedná o téměř rutinní techniku. Materiálem vhodný pro izolaci mohou být například jednotlivé buňky, tkáně nebo i tělní tekutiny (Dahm, 2008).

Většinou je hlavním předmětem zájmu DNA ukrývající se v určité buněčné organele, proto je nutno tyto organely odseparovat. K samotnému uvolnění buněčného obsahu se potom používají detergenty, které mají za úkol rozrušit membrány. Tyto detergenty mohou být iontové povahy – nejčastěji dodecilsulfát, nebo soli žlučových kyselin. Namísto využití detergentů se mohou použít fyzikální případně chemicko-fyzikální metody. Příkladem je rozrušování membrán ultrazvukem (Anzenbacher, Kovář, 1986).

Dalším krokem se odstraní přebytečný buněčný obsah z roztoku, to se provádí denurací. Díky podobnosti RNA a DNA, získá se většinou směs těchto dvou látek, což je nežádoucí. Kvůli nestálosti RNA není její odstranění nijak složité a provádí se přidáním enzymu ribonukleázy (RNázy), která rozštěpí RNA na směs oligonukleotidů, aniž by znehodnotila nebo poškodila DNA. Oproti tomu DNA se štěpí pomocí nukleázy (DNázy), ta hydrolyzuje fosfodiesterovou vazbu nukleové kyseliny a tím jí rozkládá na menší fragmenty. Specifickým druhem jsou restriční endonukleázy, které štěpí DNA na určitých pozicích, tzv. restričních místech. Po získání takto čisté a rozštěpené DNA je možné s ní dále pracovat různými způsoby (Alberts et al., 1997).

9.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

PCR neboli polymerase chain reaction je metoda, která se využívá na amplifikaci neboli zmnožení specifického úseku *in vitro*. Úsek, který chceme zmnožit je ohraničen fragmenty DNA o délce přibližně 20–25 nukleotidů neboli primery. Ty díky principu komplementarity nasedají právě na konce vybraného úseku. Aby mohlo



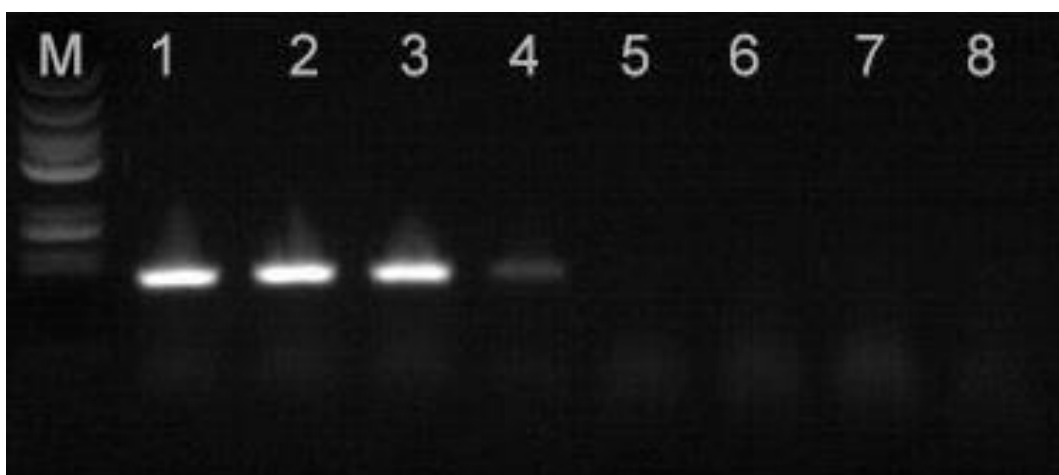
Obrázek 9.1 - Princip PCR (převzato a upraveno z <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>)

k tomuto nasednutí dojít, je třeba DNA denaturovat. Tím se rozvolní dvoušroubovice a vznikne vlákno, na které mohou primery nasednout. Od těchto primerů probíhá samotná syntéza DNA podobným principem jako při replikaci v buňce. Tyto tři kroky jsou viditelné na obrázku 9.1. Takto zmnožený úsek DNA se poté dá využít k analýze genů, diagnostice infekčních onemocnění, identifikaci osob nebo sekvenování DNA, o kterém bude řeč v jedné z následujících kapitol (Garibyan et al., 2013).

9.3 Elektroforetická separace

Elektroforéza je děj, při kterém se oddělují různě velké molekuly DNA. Využívá se tu rozdílné pohyblivosti jednotlivých fragmentů v elektrickém poli. Molekuly se pohybují ke kladnému pólu. Je to způsobeno tím, že nukleová kyselina má díky fosfátům záporný náboj a při proudění elektrického proudu je unášena k anodě. Rychlost, jakou se fragmenty pohybují je ovlivněna jejich velikostí, konformací ale i koncentrací gelu nebo napětím, které je vkládáno na aparaturu. Obvykle platí, že kratší se pohybují rychleji. Nejčastěji je používána gelová elektroforéza, při které probíhá separace v agarózovém, nebo polyakrylamidovém gelu. V případě použití agarózového gelu,

jedná se spíše o horizontální elektroforézu, tato metoda se používá pro fragmenty v délce 10 – 60 000 bp (base pair = páry bází). Oproti tomu polyakrylamid se používá častěji u vertikální. Výhodou tohoto gelu oproti agarózovému je, že je má vysokou rozlišovací schopnost. Je to způsobeno tím, že se používá pro kratší fragmenty (6–1000 bp), s tím souvisí i vysoká čistota DNA, která je v tomto gelu izolovaná. Proto může být následně použita i pro velmi citlivé molekulárně-biologické techniky. Nevýhodou ovšem je pracnější příprava gelu a nebezpečná kontaminace pracovníka, protože akrylamid je vysoce toxická látka.



Obrázek 9.2 – Záznam z horizontální elektroforézy. Ve sloupci označeném M je primer, 1-4 jsou pozitivní kontroly a 5-8 negativní kontroly (dosud nepublikovaný obrázek Mgr.Pavlíny Majtnerové)

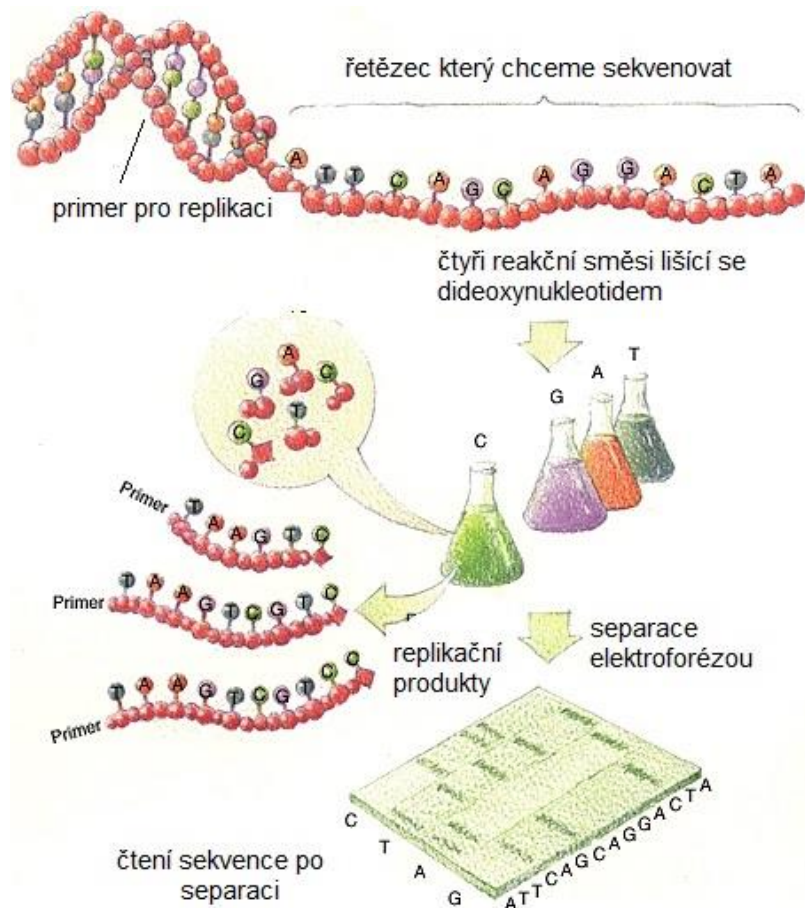
V praxi to vypadá tak, že po přípravě a dokonalém zatuhnutí gelu se ke katodě nanesou do jamek vzorky, které se porovnávají s komerčně vyrobeným markerem o specifické délce. Na obrázku 9.2 je marker na pozici M o délce 155-970 bp, pozice 1-4 jsou pozitivní kontroly, kdy produkt odpovídá 159 bp. Oproti tomu jamky 5-8 jsou negativní kontroly, které neobsahují testovanou DNA. Na daném obrázku se jedná o záznam elektroforézy *Candida albicans*.

9.4 SEKVENOVÁNÍ DNA

O tomto tématu byla zmínka již v kapitole o historii výzkumu, nyní bych chtěla přiblížit, jaké jsou způsoby, k čemu přesně slouží a jaké je využití. Sekvenování slouží ke stanovení pořadí nukleotidů v molekule DNA. Dodnes nejčastěji používanou je metoda Sangerova neboli enzymová. Ovšem s podtupem doby, se objevily i nové, modernější metody, kterými lze DNA osekvenovat. Příkladem takové je metoda zvaná Illumina.

9.4.1 Sangerova metoda

Tato metoda byla základem i pro projekt HUGO. Principem této techniky je sekvenace pomocí detekce konce prodlužujícího se vlákna DNA. Sekvenace probíhala ve čtyřech oddělených zkumavkách, s rozdílnou reakční směsí. Ty obsahovaly primery, templát, DNA polymerázu, fluorescenčně značený dNTP, což je deoxynukleotid sloužící k ukončení DNA vlákna. Hlavní rozdíl těchto směsí byl ddNTP (=dideoxynukleotid), ten byl charakteristický pro každou bázi – ddGTP pro guanozin, ddATP – adenin, ddCTP – cytosin, ddTTP – thymin. Tyto nukleotidy sloužily k ukončení řetězce, čímž vznikaly fragmenty DNA. Tyto fragmenty byly podrobeny elektroforéze a po ozáření vznikl obraz, ze kterého bylo možné odvodit sekvence DNA. Oproti tomu, jak jí Sanger zavedl je nyní modifikována, aby bylo provedení možné v jedné zkumavce. To je způsobeno fluorescenčním značením jednotlivých dideoxynukleotidů, tak, aby měl každý jinou barvu. Produkty je tak možno následně analyzovat kapilární elektroforézou. Schéma celé sekvenace je na obrázku 9.3.



Obrázek 9.3 – Schéma sekvenace Sangerovou metodou (převzato z <https://universe-review.ca/R11-16-DNAsequencing.htm>)

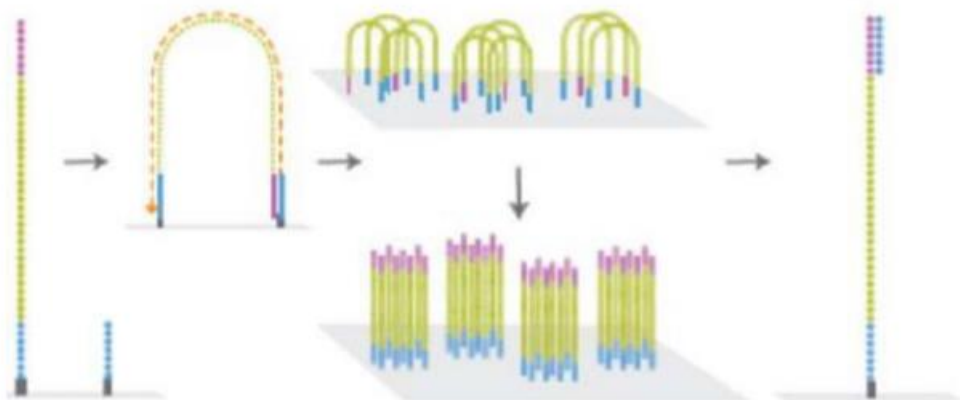
9.4.2 Maxam-Gilbertova metoda (M&G)

Přibližně ve stejné době přišli se svou metodou i Allan Maxam a Walter Gilbert. Jejich metoda se někdy označuje jako „chemické sekvenování“. Je to z toho důvodu, že vzorek obsahuje krátkou sekvenci, která je na svém 5' konci označena fosforem ^{32}P . Ta je díky použitým enzymům rozdělena na fragmenty, které jsou vystaveny chemickému působení. Fragmenty se následně podrobí elektroforéze, a právě tady přichází na řadu fosfor, kterým byla sekvence označena. Po ukončení elektroforézy je totiž gel vystaven γ -záření, a to způsobí zesvětlení těch částí, které byly označeny pomocí ^{32}P (Maxam, Gilbert, 1977).

9.4.3 Systém Illumina

Tato metoda patří mezi novější, byla vyvinuta v roce 2006 firmou Solexa a později odkoupena společností Illumina. Sekvenování je založeno na rozbití DNA na krátké fragmenty, tzv. vytvoření knihovny. Tím je myšleno přichycení jednotlivých fragmentů jedním koncem na povrch destičky. Toto přichycení je umožněno díky navázaným adaptorům, které se pomocí kovalentní vazby na povrch naváží. Tyto adaptory jsou na fragment připojeny před adenin, který je pomocí polymerázy napojen na 3' konec fragmentu. Po přidání specifického enzymu dojde k ohnutí fragmentu do tvaru mostu. Následnou amplifikací neboli zmožením, vznikají dva řetězce s jedním volným a jedním ukotveným koncem. Tento proces je na obrázku 9.4. Po denaturaci se fragmenty srovnají a uspořádají do shluků o vysoké hustotě.

Následně se určí jejich sekvence a pomocí počítačového programu se následně spojí podle navzájem přesahujících úseků. Na jednotlivé fragmenty se naváží sekvenační primery. Ty jsou obsaženy ve směsi s DNA polymerázou a nukleotidy, které jsou fluorescenčně značeny. Tyto nukleotidy způsobují vratné ukončení prodlužujícího řetězce DNA. Tím je zajištěno prodloužení řetězce o jednu bázi. Tento proces se neustále opakuje, dokud není zachycen obraz celé sekvence. Délka čtených úseků je 30-40bp, za dobu 4 dnů je ale systém schopen vyprodukovat přibližně 1500Mbp a to s přesností 99,9% (Ansorge, 2009, Illumina,2001).



Obrázek 9.4 – Ohnutí fragmentu do tvaru mostu a následná amplifikace (převzato a upraveno z <http://bitesizebio.com/13546/sequencing-by-synthesis-explaining-the-illumina-sequencing-technology/>)

9.4.4 Využití sekvenování

Výsledný sekvenogram lze využít pro studium fylogenetiky. Ta se zabývá fylogenezí neboli vývojem určitého organismu. Dalším odvětvím, kde se dá sekvenování uplatnit je například medicína. Přesněji diagnostika chorob a časně odhalení, zda je jedinec náchylný k určitým nemocem (rakovina, kardiovaskulární onemocnění atd.). Své uplatnění našlo ale i ve forenzních vědách, kriminalistice nebo zemědělství (tvorba geneticky modifikovaných plodin).

10 ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo objasnit vznik odchylek od standardního genetického kódu, s bližším zaměřením na změnu u rodu *Candida*.

V úvodu jsem se snažila objasnit historii výzkumu a důležitost samotného genetického kódu. Dalším krokem bylo vysvětlení, kde v buňce mohou odchylky vznikat, respektive jakým způsobem. Poté jsem se zaměřila hlavně na kodon CUG, který je u *Candida albicans* překládán jako serin namísto leucinu.

Během studia této problematiky jsem zjistila, že tuto změnu způsobuje přítomnost Ser-tRNA_{CAG}, namísto standardní leucinové tRNA a že tato změna má vliv i na patogenitu. Vzhledem k tomu, že se jedná o oportunně patogenní kvasinku, mohlo by toto zjištění napomoci při diagnostice a následné léčbě při onemocnění kandidózou.

Nabízí se proto další možný postup. Pokud bychom zjistili, čím je ovlivněna změna kódování – jestli se jedná o fyzikální změny, změny při soužití s jinými organismy a podobně – dalo by se překládání ovlivnit a tím by se mohlo zabránit výskytu více patogenních organismů.

Seznam odborné literatury

ALBERTS, B. Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero, c1998, 1 sv. (různé stránkování). ISBN 80-902-9062-0. 2002. 36, 630, 18, 65, 30 s.: ISBN: 80-902906-0-4

ANDERSSON, S. G. E.; KURLAND, C. G. Genomic evolution drives the evolution of the translation system. *Biochemistry and cell biology*, 1995, 73.11-12: 775-787. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8721994>)

ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. *New biotechnology*, 2009, 25.4: 195-203.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678409000089>)

ANZENBACHER, P.; KOVÁŘ, J. Metody chemického výzkumu pro biochemiky. *MŠ-ČSR, Praha*, 1986.

BEDNÁŘ, M. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Dotisk 1. vyd. Praha: Marvil, 1996.

BEZERRA, A. R.; GUIMARÃES, Ana R.; SANTOS, Manuel AS. Non-standard genetic codes define new concepts for protein engineering. *Life*, 2015, 5.4: 1610-1628. (<http://www.mdpi.com/2075-1729/5/4/1610/htm>)

BUTLER, G., et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 2009, 459.7247: 657-662.

(<https://www.nature.com/nature/journal/v459/n7247/abs/nature08064.html>)

CRICK, F., et al. General nature of the genetic code for proteins. Macmillan Journals Limited, 1961. (<http://labs.bio.unc.edu/Goldstein/1/Cricketal1961.pdf>)

DAHM, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental biology*, 2005, 278.2: 274-288.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160604008231>)

FEKETOVÁ, Z., et al. Ambiguous decoding of the CUG codon alters the functionality of the *Candida albicans* translation initiation factor 4E. *FEMS yeast research*, 2010, 10.5: 558-569. (<https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2010.00629.x#9925768>)

GARIBYAN, Lilit; AVASHIA, Nidhi. Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013, 133.3: 1-4.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X1536139X>)

GOMES, A. C., et al. A genetic code alteration generates a proteome of high diversity in the human pathogen *Candida albicans*. *Genome biology*, 2007, 8.10: R206. (<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2007-8-10-r206>)

HUTCHISON III, C A. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic acids research*, 2007, 35.18: 6227-6237.

(<https://academic.oup.com/nar/article/35/18/6227/2402812/DNA-sequencing-bench-to-bedside-and-beyond>)

ILLUMINA, *Illumina* [online]. 2017 [cit. 2017-06-30]. Dostupné z:

<https://www.illumina.com/techniques/sequencing.html>

KAWAGUCHI, Y, et al. The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature*, 1989, 341.6238: 164-166.

(<http://www.nature.com/nature/journal/v341/n6238/abs/341164a0.html>)

KNIGHT, R. D.; FREELAND, Stephen J.; LANDWEBER, Laura F. Rewiring the keyboard: evolvability of the genetic code. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2.1: 49-58. (http://www.nature.com/nrg/journal/v2/n1/abs/nrg0101_049a.html)

KOONIN, E. V.; NOVOZHILOV, Artem S. Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma. *IUBMB life*, 2009, 61.2: 99-111.

(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.146/full>)

LIPSHUTZ, R. J.; FODOR, Stephen PA. Advanced DNA sequencing technologies. *Current Opinion in Structural Biology*, 1994, 4.3: 376-380.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X94901066>)

MAXAM, A. M.; GILBERT, Walter. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74.2: 560-564.

(<http://www.pnas.org/content/74/2/560.short>)

MIRANDA, I; SILVA, R; SANTOS, M. AS. Evolution of the genetic code in yeasts. *Yeast*, 2006, 23.3: 203-213.

(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.1350/full>)

MÜHLHAUSEN, S., et al. A novel nuclear genetic code alteration in yeasts and the evolution of codon reassignment in eukaryotes. *Genome research*, 2016, 26.7: 945-955. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4937558/>)

NANJUNDIAH, V. George Gamow and the genetic code. *Resonance*, 2004, 9.7: 44-49. (<http://www.ias.ac.in/article/fulltext/reso/009/07/0044-0049>)

NIRENBERG, M.. Historical review: Deciphering the genetic code—a personal account. *Trends in biochemical sciences*, 2004, 29.1: 46-54.c (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000403003025>)

NIRENBERG, M.; LEDER, P. RNA codewords and protein synthesis. *Science*, 1964, 145.3639: 1399-1407. (<http://science.sciencemag.org/content/145/3639/1399>)

OHAMA, T, et al. Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. *Nucleic acids research*, 1993, 21.17: 4039-4045. (https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/nar/21/17/10.1093/nar/21.17.4039/2/21-17-4039.pdf?Expires=1493591061&Signature=NEwqIL3GYKFZc1ITyaYnHnTcu7G1nk~sDYp-utfBqTw4jJ7ADoHsxsXrrbx07Vc3kzrXwljpJjKKkz658L6dSSpkRaou5PfsJI1jvBI~mWx2kiU1NmVqpAAEO7vTj4SNeLII~2nYuDO8neiEBqCeS6gkLGrFiOlrg8~sDK8c1q0zEM3zhvccocTPLL8dGuUSUvEYx8DL6AUg0BUur8PNZEFmJ7E2Tg4n5jOOJQ2rTUb8e13D9IqC-AQbANn5C80r-42dzjzEZQH6GoMeXJmPyXIIH1GkpJAiS1thdLQXjRlImzqqQuxD1xqw1Kz~7h614RfH--yqWEEIzc6IMj9~iw_&Key-Pair-Id=APKAIUCZBIA4LVPAVW3Q)

OSAWA, S, et al. Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiological reviews*, 1992, 56.1: 229-264. (<http://mmlbr.asm.org/content/56/1/229.short>)

PERREAU, V. M., et al. The *Candida albicans* CUG-decoding ser-tRNA has an atypical anticodon stem-loop structure. *Journal of molecular biology*, 1999, 293.5: 1039-1053. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283699932096>)

PRAY, L. Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. *Nature Education*, 2008, 1.1: 100. (<https://pharmaceuticalintelligence.com/tag/genetic-code/>)

RALSTON, A.; SHAW, K. Reading the genetic code. How can just four nitrogenous bases--adenine, cytosine, guanine, and uracil--possibly code for all 20 amino acids? Nature Education 1 (1): 120

(<https://www.nature.com/scitable/nated/topicpage/reading-the-genetic-codce-1042>)

SANTOS, M. A.; KEITH, Gerard; TUIITE, Mick F. Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3'(leucine) anticodon. The EMBO journal, 1993, 12.2:607.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413244/>)

SANTOS, M. A.; PERREAU, Victoria M.; TUIITE, Mick F. Transfer RNA structural change is a key element in the reassignment of the CUG codon in *Candida albicans*. The EMBO journal, 1996, 15.18: 5060.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC452245/>)

SANTOS, M. AS; TUIITE, Mick F. The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. Nucleic Acids Research, 1995, 23.9: 1481-1486. (<https://academic.oup.com/nar/article/23/9/1481/2400909/The-CUG-codon-is-decoded-in-vivo-as-serine-and-not>)

SCHINDLER, J. Mikrobiologie -- Pro studenty zdravotnických oborů,. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4771-2.

SMITH, D; YARUS, M. Transfer RNA structure and coding specificity: I. Evidence that a D-arm mutation reduces tRNA dissociation from the ribosome. Journal of molecular biology, 1989, 206.3: 489-501.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2469803>)

SUGITA, T; NAKASE, T. Non-universal usage of the leucine CUG codon and the molecular phylogeny of the genus *Candida*. Systematic and applied microbiology, 1999, 22.1: 79-86.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202099800307>)

SUZUKI, T; UEDA, T; WATANABE, K. The 'polysemous' codon—a codon with multiple amino acid assignment caused by dual specificity of tRNA identity. The EMBO Journal, 1997, 16.5: 1122-1134.

(<http://emboj.embopress.org/content/16/5/1122>)

SUZUKI, T.; UEDA, T.; WATANABE, K. The 'polysemous' codon—a codon with multiple amino acid assignment caused by dual specificity of tRNA identity. The EMBO Journal, 1997, 16.5: 1122-1134.

(<http://emboj.embopress.org/content/16/5/1122>)

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. JAMA, 1993, 269.15: 1966-1967. (<https://www.nature.com/nature/dna50/watsoncrick.pdf>)

YANOFSKY, Ch. Establishing the triplet nature of the genetic code. Cell, 2007, 128.5: 815-818. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286740700253X>)

YOKOGAWA, T., et al. Serine tRNA complementary to the nonuniversal serine codon CUG in *Candida cylindracea*: evolutionary implications. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89.16: 7408-7411. (<http://www.pnas.org/content/89/16/7408.short>)