



Korespondenční Seminář Inspirovaný Chemickou Tematikou

Ročník 14 (2015/2016)

Série 4



Chemie je všude: je ve vodě, je v půdě, je ve vzduchu a je i v nás samotných. Veškeré materiály jsou tvořeny chemickými látkami, chemické reakce nám každodenně pomáhají s tvorbou světa kolem sebe a biochemické reakce nás vlastně utvářejí: katalytické reakce umožňují každodenní běh našich těl, neurotransmitery jsou nositeli našich emocí a naše DNA může dát vzniknout novým generacím. Avšak bez porozumění tajemným nebezpečnostem s chemií spojeným jsme jí vydáni napospas, proto stojí za to ji poznat blíže a hlouběji, aby se stala naším dobrým sluhou a ne obávaným pánem.

**Termín pro odeslání řešení 4. série:
23. 5. 2016**

Elektronicky (PDF)	Papírově
http://ksicht.natur.cuni.cz/odeslani-reseni	KSICHT Přírodovědecká fakulta UK Hlavova 2030 128 43, Praha 2

Anketa

Milí řešitelé, jsme rádi, že se účastníte KSICHTu. Snažíme se, aby vám řešení úloh nepřineslo jen pochvalu vyučujícího chemie, protože jste řešili úlohy zrovna z jeho předmětu, ale aby vám seminář přinášel co nejvíce znalostí, možností k zamyšlení a snad i trochu zábavy. Potřebujeme proto znát váš názor. Byli bychom velmi rádi, kdybyste si našli chvílku na zodpovězení několika málo otázek¹. Předem vám děkujeme za pomoc a přejeme vám hodně úspěchů nejen při řešení úloh KSICHTu.

Závěrečné soustředění KSICHTu

Od 19. do 24. června se v Praze na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy uskuteční soustředění KSICHTu. Na programu budou přednášky z různých oblastí chemie a práce v laboratoři. Laboratorní úlohy se budeme snažit sestavit tak, aby si na své přišel jak začátečník, tak i zkušený chemik. Samozřejmě nebudou chybět ani hry na odregování. Ubytování a strava budou hrazeny. Máme kapacitu pro 30 účastníků, pokud se vás přihlásí víc, bude rozhodovat počet bodů. Máte-li zájem, neváhejte se přihlásit bez ohledu na to, jak si ve výsledkové listině stojíte. Pokud se chcete soustředění zúčastnit, vyplňte prosím formulář² na webových stránkách KSICHTu nejpozději do **9. května**. Podrobnosti o soustředění zveřejníme na odkazované stránce v květnu, kdy vás rovněž budeme informovat e-mailem.

¹ <http://ksicht.natur.cuni.cz/anketa>

² <http://ksicht.natur.cuni.cz/akce-ksichtu>

Úvodníček

Drahé Ksicht'áčky, drazí Ksicht'áci,

Po mnoha letech pravidelných úvodníčků bohužel nastala situace, která mě nikterak netěší, ale přesto k ní dříve nebo později muselo dojít. Zcela bez vykrucování se vám přiznávám, že mám autorskou krizi. Nevím, jestli je to únavou, rýmičkou, chybějící inspirací nebo jen nedostatkem originálních a vtipných nápadů. Nevyhnutelným důsledkem prostě je, že obsah tohoto úvodníku si budete muset domyslet sami. Pomůžu vám alespoň podrobnou šablonou. Na začátku bych se s vámi ve svém neexistujícím úvodníku srdečně pozdravil. Poté bych krátce popsal téma, kterému bych se chtěl věnovat. Ideální by byla například zmínka o počasí, roční době, škole nebo státních svátcích. Nemusíte se však ve svých představách bránit ani něčemu náročnějšímu, kupříkladu úvaze o roli žen ve vědě. Text by měl každopádně být spíše v pozitivním duchu, abyste své čtenáře dobře naladili.

Nyní už můžete přistoupit ke stručné charakterizaci jednotlivých úloh. Ve své fantazii prosím počítejte s tím, že jejich popis musí být v souladu s pořadím úlozek v brožurce. Jako první bývá zařazena úloha spíše lehčí. Je-li jejím autorem Lumec, budete k ní potřebovat hlavně prostorovou představivost a nůžky. Pokud se stane, že jsou dvě lehké úlohy hned za sebou, většinou se je pokusili autoři nějak odlišit. Každá z nich může tak být třeba v jiném jazyce. Pokud během procházení narazíte na úlohy s abstraktnějším tématem, ukáže se, jak kvalitně jste zvolili téma úvodníku. Často pak skončíte s něčím podobným, jako ženy ve vědě a radioaktivita. Je na vás, abyste z toho vybruslili se ctí. Občas vás autoři také potrápí nějakou záludností, jako je třeba organická syntéza. Za žádných okolností nesmí být z úvodníku poznat, že úloze vůbec nerozumíte. Omezte se proto pouze na obecně platné pravdy, jako že uhlík je čtyřvazný³.

Někdy se vám dokonce může stát, že úloha vypadá jako z úplně jiného vědního oboru. K rozpoznání vám pomůže následující klíč. Pokud je v textu spousta zkratk psaných verzálkami, je to biochemie nebo molekulární biologie. Pokud jsou některá písmenka škrtnutá nebo nad sebou mají stříšku, je to kvantová fyzika a pokud se vzorečky v zadání stěží vejdou na řádek, jde o fyzikální chemii.

Pokud jste při pročítání tohoto textu dávali bedlivý pozor, určitě už víte, o čem jsou jednotlivé úlohy. Mějte se hezky a hodně štěstí při řešení.

Honza Havlík

³ <http://postimg.org/image/4ur3j9ac7>

Zadání úloh 4. série 14. ročníku KSICHTu

Úloha č. 1: Kubická osmisměrka

(7 bodů)

Autor: Luděk Míka

Již třináctkrát jste se mohli při řešení KSICHTu setkat s osmisměrkou. Pravidlem se stalo, že této hříčce se slovy a písmeny je vyhrazeno místo v poslední sérii daného roku a ani tentokrát vás o osmisměrku neochudíme. A jak už se dá u KSICHTu očekávat, nejedná se o osmisměrku obyčejnou. Nejen, že je prošpikována triviálními chemickými názvy, ale slova se nevyškrtávají jen tak na rovném kusu papíru...

Abyste se mohli dát do luštění osmisměrky, musíte si nejdřív opatřit nůžky a lepidlo a osmisměrku si připravit z listu papíru přiloženého ke KSICHTí brožurce. Osmisměrku je třeba vystříhnout a slepit tak, aby vznikla krychle.

Kubická osmisměrka se potom řeší úplně stejně jako obyčejná osmisměrka planární. Slova mohou být psána ve všech osmi směrech, jakmile narazíte při čtení na hranu krychle, pokračujete na další stěně, jako by se nic nedělo.

Všechna slova ukrytá v osmisměrce jsou triviálními názvy různých chemických sloučenin nebo jejich směsí. Aby řešení osmisměrky nebylo tak složité, v tabulce je nápověda, o jaké látky se jedná – jsou zde uvedeny jejich chemické vzorce, popřípadě složení.

Po vyškrtání všech slov z tabulky zbydou některá písmena nepoužitá. Tato písmena tvoří tajenku. Tajenka se čte tak, že si krychli položíte před sebe, vyberete si jeden roh a po obvodu postupně přečtete jednotlivá písmenka řádek po řádku. (Nevyškrtaná písmenka na podstavách se nepoužívají.) Od kterého rohu máte začít, vám ale nenapovíme...



Sehnal jsem (*tajenka*) moje zlato.

1. Vyřešte osmisměrku a pošlete nám celé znění vtipu (osmisměrku samotnou posílat nemusíte).

1	$C_4H_{10}O$	12	$C_7H_5O_6N_3$	24	K_2CO_3
2	C_8H_{10}	13	$C_3H_5N_3O_9$	25	CF_2Cl_2
3	$[NH(CH_2)_6NHCO(CH_2)_4CO]_n$	14	$KC_4H_5O_6$	26	$COCl_2$
		15	C (amorfní)	27	$KMnO_4$
4	$C_2H_6O_2$	16	$C_{14}H_9Cl_5$	28	MnO_2
5	C_8H_8	17	H_2SO_4	29	$NaCl$
6	D_2O	18	CO_2	30	CCl_4
7	$C_2H_4O_2$	19	$H_2S_2O_7$	31	As_2O_3
8	$(C_6H_{10}O_5)_n$	20	$(CF_2)_n$	32	Hg_2Cl_2
9	$C_4H_{10}FO_2P$	21	$Na_2[Fe(CN)_5NO]$	33	Hg_xAu_y
10	NH_4Cl	22	KNO_3	34	$HNO_3 + HCl$
11	$(CHClCH_2)_n$	23	$Cu_2[Fe(CN)_6]$	35	směs fenolů a kresolů

- Ke každé položce v tabulce připište příslušný pojem z osmisměrky.
- K položkám 1-32 v tabulce připište jejich systematické názvy.
- Napište, kterou typickou vlastnost má látka 18 společnou s látkou 10.
- Napište rovnici běžné přípravy látky 3. Jak se tato reakce nazývá?
- Jak byste z látky 19 vyrobili látku 17?

Jednotlivé sloučeniny nejsou v tabulce seřazeny zcela náhodně. Vyjma posledních tří položek jsou seřazeny podle určitého klíče.

- Napište, podle čeho jsou seřazeny.

Úloha č. 2: Historical crossword

(8 bodů)

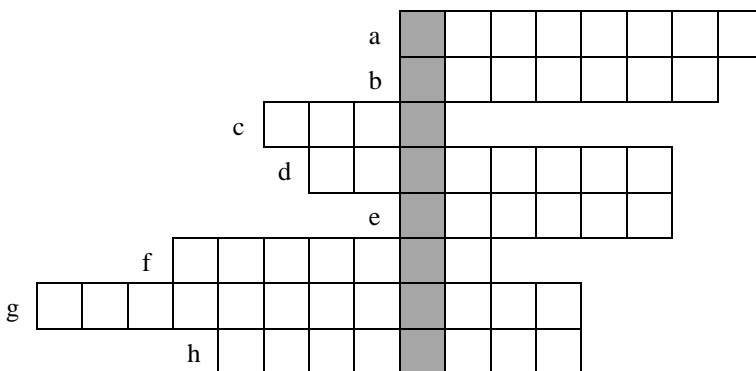
Autorka: Iva Hrubá



"Chlorine is a deadly poison gas employed on European battlefields in World War I. Sodium is a corrosive metal which burns upon contact with water. Together they make a placid and unpoisonous material, table salt. Why each of these substances has the properties it does is a subject called chemistry."

– Carl Sagan

1. Fill in the crossword using these following hints and write down the answer:
 - a) Name of the biggest chemical company during the first half of 20th century; it became infamous for its participation in the events of הגוראה.
 - b) Write the given name of one of the inventors of a nitrogen fixation process involving the use of calcium carbide.
 - c) Alchemy: ה
 - d) Name of the first synthetic organic dye.
 - e) Inventor of sodium carbonate production process used up to now.
 - f) Soapmaker and father of modern advertising.
 - g) Sodium compound used for bleaching since 1789.
 - h) US 3633 inventor.



2. Answer these questions related to the crossword:
- a) What did the company become infamous for?
 - b) Why has the process been phased out?
 - c) What god is related to this substance and what is his role in mythology?
 - d) What colour has it got and what was it primarily used for?
 - e) Name two participants of gatherings hosted by this man and their contribution to science.
 - f) What is the best advertisement you have ever seen? Describe it briefly.
 - g) Is there a traditional way of bleaching laundry without using additional chemicals? How does it work?
 - h) Was there anyone else who obtained a similar patent only a few weeks after US 3633 was assigned?

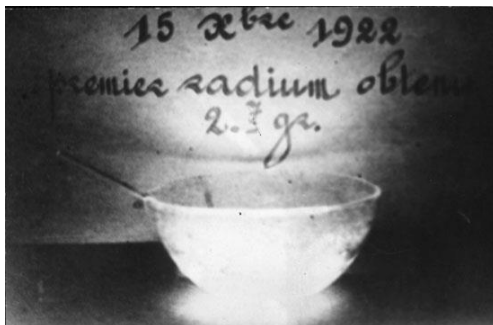
Úloha č. 3: Madam Curie-Sklodowska a radioaktivita

(12 bodů)

Autorky: Petra Mičolová, Ekaterina Kukleva, Anna Bajzíkoviá

PAŘÍŽ, 1892

Jak může žena, cizinka, žít se čtyřiceti rubly na měsíc, třemi franky na den, v Paříži roku 1892, když si sama platí bydlení, jídlo, oblečení, papíry, učebnice, stejně jako studijní poplatky na univerzitě? Tento problém potřebovala mladá studentka vyřešit, a to rychle. Ale Marie nikdy nevzdala hledání řešení jakéhokoli problému...



PAŘÍŽ, 1935

Rok po její smrti vyšla kniha, kterou stihla dokončit. Tato kniha, určená mladým „milovníkům fyziky“, která se pro obrovský zájem dočkala i dotisku, nese na šedém obale jméno autora: „Mme Curie, profesor na univerzitě Sorbonne, Nobelova cena za fyziku, Nobelova cena za chemii.“ Titul knihy se vešel do jednoho zářivého slova: RADIOAKTIVITA.

(Převzato z: Curie, Eve: Madame Curie)

Jak vidíte, Marie Curie-Sklodowska, dnes vědecká celebrita, znala těžkou práci, hlad i odříkání. Pojdme se teď vydat po stopách jejích nejnámějších objevů, které ji vynesly až k vědeckému vrcholu.

V rámci svého doktorského studia se věnovala studiu radioaktivity jednotlivých rud, přičemž hledala jejího původce. V těžkých podmínkách, ve kterých pracovala, se jí podařilo objevit dva nové prvky a po několikaleté práci je i získat v čisté podobě z velkého množství rudy.

1. Jaké radionuklidy M. Curie-Sklodowska objevila (radionuklidy X a Y)? Radionuklid X má kratší poločas rozpadu než radionuklid Y. Jaká jsou jejich hmotnostní čísla a poločasy přeměny? Po čem byly nově objevené prvky pojmenovány?
2. Jakou rudu použila pro získání těchto radionuklidů a odkud ruda pocházela? Proč byla vybrána právě tato ruda z tohoto konkrétního místa?

Pokud by kolem skladu rozdrčené rudy šel vnuk M. Curie-Sklodovské, zjistil by, že tam zůstala 1 tuna rudy. Vzhledem ke zvědavým rodinným genům by ho jistě zajímalo, jakou hmotnostní radioaktivitu změří, jestliže hmotnostní obsah uranu v rudě byl 0,01 %.

3. Jaký vliv má na radioaktivitu typu alfa rozdrčení rudy?
4. Jakou hmotnostní radioaktivitu alfa záření by naměřil při průchodu kolem skladu jeden rok poté, co byla ruda vytěžena?
5. Měla M. Curie-Sklodowska vnuka?

V Paříži, kde měla M. Curie-Sklodowska svou laboratoř, se v dnešní době nachází muzeum. Bylo zjištěno, že vybavení laboratoře a především její laboratorní deníky jsou kontaminovány radionuklidem Y. Aby mohla laboratoř dnes sloužit novému účelu, bylo nutné celé prostory a vybavení pečlivě dekontaminovat, až na její deníky, které zůstaly radioaktivní.

6. Po kolika letech se budeme moci do jejích deníků bez obav podívat, tedy, za jak dlouho klesne aktivita pod jedno promile původní hodnoty?

Vzhledem k tomu, že jméno Marie Curie-Sklodowské patří nejen mezi chemiky a fyziky k těm nejznámějším, můžeme konstatovat, že minimálně její zmíněná doktorská práce byla úspěšná. Ti, kdo se alespoň trochu zajímají o historii, vědí, že objevy M. Curie-Sklodowské vedly k rozvoji několika dalších oborů, využití radionuklidů a vývoji nových produktů. Podívejme se nyní na některé z nich více zblízka.

7. Dříve byla používána 1 Ci (curie) jako jednotka radioaktivity. Ta byla v roce 1910 stanovena jako radioaktivita radonu, který je v rovnováze s 1 g radionuklidu Y. Vypočítejte, jakou aktivitu má 1 g radionuklidu Y v dnes užívaných jednotkách becquerel (Bq).

8. Na fotografii je světélkující radionuklid Y. Co je příčinou tohoto jevu?

Lze ale vysvětlit všeobecnou známost života a odkazu M. Curie-Sklodowské mezi nejširší veřejností jednotkou a světélkujícím radionuklidem? Což o přínosu jejích objevů nikdo nepochyboval? Vždyť jevům, které popsala, po chemické a fyzikální stránce rozuměl jen málokdo... Objevené radionuklidy však našly spoustu, někdy až nečekaných, uplatnění v různých oblastech lidské činnosti. Tím rostla popularita objevů nejen mezi odborníky, ale i mezi laickou veřejností.

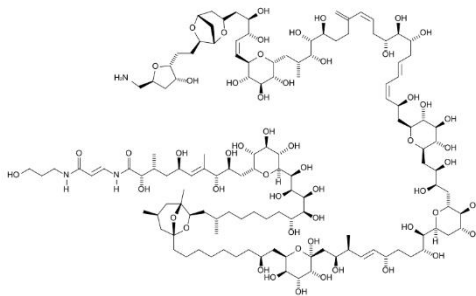
9. Dokážete vyjmenovat alespoň tři z dnešního pohledu nezvyklá využití radionuklidu Y? Kromě těchto kuriozit se také používal v medicíně. Za jakým účelem?

10. Radionuklidem X byl v roce 2006 v Londýně otráven Alexandr Litviněnko. Z jeho smrti byli obviněni bývalí agenti KGB, kteří radionuklid X pravděpodobně získali v továrně nedaleko Moskvy. Proč zvolili právě tento jed? Uveďte alespoň dva důvody.

Úloha č. 4: Přelet organickou chemií**(14 bodů)**

Autoři: Štefan Malatínek a Štefan Stanko

Jednoduchá jako chloroform a složitá jako DNA, voňavá jako menthol, odporně páchnoucí jako ethan-1,2-dithiol, sladká jako fruktóza a zároveň kyselá jako kyselina octová, extrémně hořlavá jako diethylether a absolutně nehořlavá jako tetrabrombisfenol, červená jako hemoglobin, zelená jako chlorofyl, esenciální jako fenylalanin, toxická jako dimethylrut, nebezpečná jako peroxid acetonu a zároveň užitečná jako kaučuk.



Určitě jste si domysleli, že je řeč o organické chemii. Organická chemie byla ve svých počátcích samostatně vyčleněnou disciplínou, prakticky nezávislou na chemii anorganické. Panovalo přesvědčení, že organické sloučeniny nelze připravit v laboratoři, neboť vznikají pouze v živých organismech působením „životní síly“. Za chemika, který tuto teorii vyvrátil, je považován Friedrich Wöhler.

1. Jak se také nazývá „životní síla“ a teorie z ní vycházející? Čím dokázal Wöhler její neplatnost?

Zpočátku byly skutečně všechny organické sloučeniny získávány z přírodních zdrojů. Později už musely být organické látky pocházející z exotických organismů vzhledem k rostoucí poptávce do Evropy dováženy nebo syntetizovány. Chemici v té době stáli před otázkou, jak určit strukturu látek, které chtěli připravit.

2. a) Jednou z užitečných metod v té době byla elementární analýza. Popište blíže tuto metodu dvěma krátkými větami. Myslíte, že by začátkem 19. století bylo možné touto metodou určit strukturu anilinu?
 - b) V období počátků organické chemie byla věnována velká pozornost syntéze barviv. Barvivo A, jehož roční produkce se na začátku 20. století pohybovala v tisících tun, bylo syntetizováno z isatinu. Analýzou bylo zjištěno, že obsahuje 73,27 % C, 10,68 % N, 12,20 % O a 3,84 % H (hmotnostní procenta). Napište sumární vzorec, který vypočítáte z hmotnostního složení, strukturu a název tohoto barviva a reakci, kterou se připravovalo. Molární hmotnost barviva je $M = 262,27 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.
 - c) Jistý slavný chemik se rozhodl pro jiný přístup. Vycházel z látky B, kterou nechal volně na vzduchu oxidovat za vzniku barviva A. Látka B má

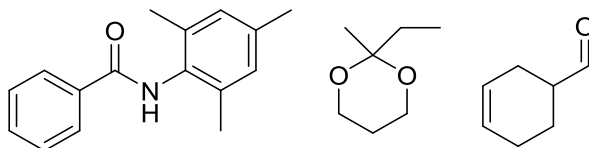
hmotnostní složení: 72,17 % C, 5,30 % H, 10,52 % N a 12,02 % O. Látka B má molární hmotnost $M = 133,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Nakreslete strukturu látky B.

- d) Uveďte název reakčního mechanismu, který vede od barviva A zpátky k isatinu.

Při výpočtech používejte tyto hodnoty atomových hmotností: $M_{\text{C}} = 12,011 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_{\text{N}} = 14,007 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_{\text{O}} = 15,999 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_{\text{H}} = 1,008 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Organická chemie se začala naplno rozvíjet hlavně od doby druhé světové války. Vědci již dokázali zjišťovat složení a strukturu sloučenin, problémem však zůstávala volba výchozích látek. Doposud nenahraditelný koncept retrosyntetické analýzy přinesl vynikající strateg E. J. Corey, čímž se chemie stala ještě sofistikovanější disciplínou.

3. Co je podstatou retrosyntetické analýzy (retrosyntézy)?
4. Pokuste se retrosyntetickou analýzou určit nejvhodnější výchozí látky pro syntézu následujících sloučenin vždy v jednom kroku. Jako výchozí látky uvažujte takové, jejichž molární hmotnost představuje alespoň 40 % (hmotnostních) molární hmotnosti produktu.



5. Někdy existuje pro syntézu jedné látky více možných způsobů. Napište alespoň tři kritéria, podle kterých byste se při výběru syntetické cesty rozhodovali.

Metody analýzy organických látek používané v 19. století nám dnes připadají prehistorické. Od té doby také retrosyntetické metody ustoupily novějšímu přístupu totální syntézy. Chemie se výrazně posunula také v oblasti analytických metod: určování struktury i množství produktů resp. reaktantů je dnes možné téměř v jakékoli reakci. Obzvláště komplexní disciplínou organické syntézy je totální syntéza přírodních látek, vyžadující značnou zkušenost a znalost nejmodernějších reakcí. Podívejme se nyní na jednu z nejtoxičtějších organických látek přírodního původu (s hodnotou LD_{50} podle některých zdrojů až $60 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$). Palytoxin, jehož strukturu můžete najít na začátku úlohy, byl izolován v roce 1971 na Havaji z měkkých korálů rodu *Palythoa*, které domorodci používali k napuštění hrotů šípů a oštěpů. Poprvé byl připraven o 23 let později týmem profesora Kishiho na Harvardově univerzitě.

6. Tato velká molekula obsahuje 129 atomů uhlíku. Napište, kolik z nich je chirálních a spočítejte počet enantiomerů palytoxinu.

Palytoxin byl syntetizován ze 7 stavebních bloků (jednodušších molekul) v 39 krocích. Těchto 7 bloků se podařilo syntetizovat ve více než 140 krocích (průměrně 20 reakcí na 1 blok).

7. Uvažujme, že na přípravu palytoxinu je nutno provést 60 následných reakcí. Jaký je celkový výtěžek palytoxinu, je-li průměrný výtěžek jedné reakce 70 %? Jaký by musel být průměrný výtěžek dílčích reakcí, kdybychom chtěli dosáhnout celkového výtěžku alespoň 90 %?

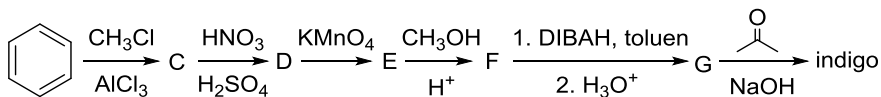
Při syntéze stavebního bloku vyznačeného ve struktuře na začátku úlohy se vycházelo z kyseliny (*E*)-hex-3-endiové. Na usmrcení člověka bohatě stačí 100 μg palytoxinu.

8. Kolik gramů kyseliny (*E*)-hex-3-endiové je potřeba k syntéze smrtelného množství palytoxinu? Počítejte s celkovým výtěžkem z první části úkolu 7.

Při výpočtech použijte následující hodnoty molárních hmotností: $M_{\text{palytoxin}} = 2690,22 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, $M_{\text{kyselina}} = 144,13 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

V úkolu 2 jsme zmínili, že velká poptávka po barvivech vedla k potřebě jejich syntézy. Na závěr se ještě podíváme na jednu syntézu indiga.

9. Napište vzorce látek C-G:



Úloha č. 5: Neznámá RNA

(9 bodů)

Autor: Karel „Krápník“ Berka



Pavel byl už od chvíle, kdy odeslal řešení KSICHTu, neklidný. Když usínal, ve snu zaslechl podivnou píseň připomínající zpěv goril:

AUGUA CUACG AGGCC AGGUG GAUCA CCCAC
AAGAG CAUCU GCCAC ACCGA GAACG ACAGC
CACGA GAGGG AG

Došlo mu, že jde o sekvenci RNA. Ale co asi znamená? Sekvenci si zapsal a rozhodl se, že ji zkusí rozluštit s pomocí českých bioinformatických nástrojů pro studium RNA - <https://www.elixir-czech.cz/services/all-services>.

Nejprve se pokusil zjistit, zda náhodou nejde o nějaký fragment ribozomu. K tomu slouží program rPredictor vyvíjený na MFF UK a MBÚ AV ČR: <http://rpredictor.ms.mff.cuni.cz/search#db,blat,blast>.

1. Zjistěte pomocí rPredictoru, zda sekvence RNA skutečně představuje nějaký fragment ribozomu.

Poté, co jej tato odpověď příliš neuspokojila, se Pavel pokusil zjistit, zda náhodou nejde o tzv. IRES sekvenci (zkratka z angl. *internal ribosome entry site*), což je zvláštní sekvence přítomná v oblasti před začátkem genu, umožňující nasednutí ribozomu a tedy spuštění translace, kterou používají k zahájení translace jak viry, tak občas i lidská mRNA. K tomu je možné využít hledání na stránce http://iresite.org/IRESite_web.php?page=search provozované na PřF UK. Vyhledávat se v této databázi dá pomocí nástroje BLAST („z anglického Basic Local Alignment Search Tool“) jak vůči všem známým nukleotidovým sekvencím virů a mRNA s IRES místy, tak jen vůči známým IRES místům nebo sekvencím se stanovenou 2D strukturou.

2. Prověřte, jakým sekvencím viru či IRES je Pavlova sekvence nejbližší. Vyzkoušejte všechny možnosti hledání a uveďte pro každou nalezenou sekvenci nalezenou shodu s největším skóre a současně s nejmenší šancí, že jde o náhodnou shodu (E value).
3. Pro sekvenci s nejmenší E value uveďte, o jaký vir se může jednat, jakou chorobu způsobuje a jaký orgán může zasáhnout.

Pak si Pavel uvědomil, že IRESite umí vyhledávat pomocí 2D struktury i mezi známými 2D strukturami RNA a rPredictor zase umí 2D struktury RNA predikovat.

4. Pomocí rPredictor módu v rPredictoru předpovězte, jakou 2D strukturu bude Pavlova RNA sekvence (bez mezer!) mít a stanovte, kolik je v ní jednotlivých

sekundárních strukturních prvků (stem, bulge, internal loop, hairpin; <http://rpredictor.ms.mff.cuni.cz/predict#rfpredict>)

5. Spočítejte počet párových interakcí mezi GU, AU a GC a stanovte celkový počet vodíkových vazeb stabilizujících stem.

Sekvenci s anotací 2D struktury (pomocí závorek a teček) lze posléze použít k hledání v IRESite tak, jak je zobrazena v příkladu na stránce: http://www.iresite.org/IRESite_web.php?page=RNAforestersearch&search_type=RNAforester_ss_experiments_by_structure.

6. Najděte mezi 2D strukturami tu s nejvyšším skóre a zjistěte, o jaký vir by se mohlo jednat, jakou způsobuje chorobu a jaký orgán zasahuje.

Zatímco 2D strukturu Pavel pro sekvenci našel, 3D struktur RNA je zatím vyřešeno jen málo, což platí dokonce i pro tRNA. Pavel si proto našel veškeré známé struktury tRNA a porovnal je mezi sebou pomocí nástroje MultiSETTER <http://setter.projekty.ms.mff.cuni.cz/> vyvíjeného na MFF UK a VŠCHT Praha. PDB kódy jednotlivých tRNA jsou v abecedním řazení:

1EHZ, 1I9V, 1TRA, 1TN1, 1VTQ, 2TRA, 3A3A, 3RG5, 3TRA, 3RG5, 4MGM

7. Porovnejte struktury tRNA pomocí MultiSETTERu a z jejich vzájemných podobností (S-distance) určete, které struktury patří třem tRNA-Asp, jedné tRNA-Gly, čtyřem tRNA-Phe, či dvěma tRNA-Sec.
8. Mimochodem, jaké aminokyseliny se nacházejí pod těmi trojpísmennými zkratkami?

Když se Pavel zamyslel nad názvy aminokyselin, napadlo ho, že vlastně ještě nezkoušel tu RNA sekvenci přeložit do proteinu. Zkusil si ji přeložit do peptidové sekvence a pak už byl jen smutný...

9. Přeložte RNA sekvenci do peptidové a запиšte ji pomocí jednopísmenných zkratek.

Řešení úloh 3. série 14. ročníku KSICHTu**Úloha č. 1: Dáma****(8 bodů)**

Autoři: Luděk Míka, Pavel Řezanka

1.

B(Li)	C	N(Na)	O	F(K)	Ne
Al	Si(Rb)	P	S(Cs)	Cl	Ar(Fr)
Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Tl(Be)	Pb	Bi(Mg)	Po	At(Ca)	Rn
Uut	Fl(Sr)	Uup	Lv(Ba)	Uus	Uuo(Ra)

2.

tah	Ludřkovy tahy	Pavlovy tahy
1	Be: Tl → Sn	Rb: Si → Ga
2	Ca: At → Te	Cs: S → As
3	Ca: Te → Si	Li: B → Tl
4	Ra: Uuo → At	Fr: Ar → Br
5	Ra: At → Te	K: F → Ar
6	Ra: Te → As	Fr: Br → Te
7	Mg: Bi → Br	K: Ar → Te
8	Ra: As → Si	Rb: Ga → Sn
9	Ra: Si → B	K: Te → Bi
10	Sr: Fl → Te	Li: Tl → Fl
11	Sr: Te → As	Li: Fl → Ar
12	Ba: Lv → At	Rb: Sn → Tl
13	Ba: At → Xe	Li: Ar → F
14	Ba: Xe → Br	Li: F → Sn

- Hra skončila remízou. Luděk měl obsazenou hlavní diagonálu dámou, takže se po ní mohl libovolně pohybovat a vzhledem k malým rozměrům hrací plochy nešlo na tuto dámu přichystat „past“ ve formě dvojskoku.
- Periodickou tabulku jako podklad pro hru jsme zatím využili jen dvakrát, jednou jsme hráli na periodické tabulce lodě, podruhé miny. Ale vypadá to, že jsme metrem nejeli zdaleka naposledy...
- Li – červená, Na – žlutá, K – fialová, Rb – fialová, Cs – modrofialová, Ca – oranžová, Sr – červená, Ba – zelená, Ra – červená, B – zelená, In – modrá, Tl – zelená
- Při 30 °C jsou kapalné tyto prvky: Br, Cs, Fr, Ga, Hg.

Otázka 1 – 0,6 bodu, 2 – 4,2 bodu, 3 – 1 bod, 4 – 0,5 bodu, 5 – 1,2 bodu, 6 – 0,5 bodu. Celkem 8 bodů.

Úloha č. 2: Mléčná**(10 bodů)**

Autorka: Anna-Marie Buková

1.

	P	R	O	L	A	K	T	I	N		
					L	A	K	T	Á	Z	A
				F	O	S	F	O	R		
L	A	K	T	O	F	E	R	I	N		
	A	L	B	U	M	I	N				
			I	M	U	N	I	T	A		

V tajence se ukrývá kasein – protein hojně zastoupený v mléce přežvýkavců.

2. Bodovány byly všechny zaslané fotografie, pokud na nich byla látka, která jako kasein vypadala (tzn. pevná látka bílé nebo nažloutlé barvy a tvarohovité konzistence). Nejlepší fotku produktu nám zaslala Veronika Valouchová.



3. 100 ml = 103 g mléka

$$\text{z toho bílkoviny} \rightarrow (3,3 / 100) \cdot 103 = 3,4 \text{ g}$$

$$\text{z toho kasein} \rightarrow (3,4 / 100) \cdot 80 = 2,72 \text{ g (při 100\% výtěžku)}$$

$$w = (m_{\text{produkt}} / 2,72) \cdot 100 \%$$

4. Ve formě škraloupu jsou nejprve odstraněny laktalbuminy, laktoglobuliny a tuk. Roztok je okyselován proto, že izoelektrický bod kaseinu je 4,6. Při této hodnotě pH je kasein nejméně rozpustný a z roztoku se vysráží (je ale třeba dát pozor na přílišné okyselení roztoku, protože při ještě nižším pH se kasein opět rozpouští). Filtrát obsahuje zbylé složky mléka, tj. hlavně vodu a syrovátku (syrovátku tvoří laktóza, zbylé laktalbuminy a laktoglobuliny, imunoglobuliny a sérový albumin – tzv. syrovátkové proteiny, spolu s minerálními látkami a vitaminy).
5. Jedná se o frakce α_{s2} , α_{s1} , β_{s1} a κ_{s1} (řazeno podle klesající vazebné schopnosti).
6. Pokud by vápník nebyl navázán na kasein, došlo by z velké části k jeho vysrážení ve formě fosforečnanu vápenatého, popř. fytátu. Tím by se výrazně snížilo množství vápníku, který může být absorbován v trávicím traktu savce.
7. Uznává se jakákoliv smysluplná diskuse vedoucí k závěru, že by zajičkův nápad opravdu nebyl moc šťastný.

Otázka 1 – 1,5 bodu, 2 – 4 body, 3 – 1 bod, 4 – 1,5 bodu, 5 – 1 bod, 6 – 0,5 bodu, 7 – 0,5 bodu. Celkem 10 bodů.

Úloha č. 3: Chemické úsměvy**(10 bodů)**

Autoři: Stanislav Geidl, Radka Svobodová-Vařeková, Karel Berka

1. SMILES a počet vynechaných vodíků:

- hex-1-en, C=CCCC, 12,
- ethanol, CCO, 6,
- 3-chlorprop-1-yn, C#CCC1, 3.

2. SMILES:

- trichlorethanová kyselina, ClC(Cl)(Cl)C(=O)O
- isopropylcyklopentan, CC(C)C1CCCC1
- pyridin, n1cccc1
- 1,3,5-trichlorbenzen, Clc1cc(Cl)cc(Cl)c1

3. Nejvíce lipofilní je fenol.

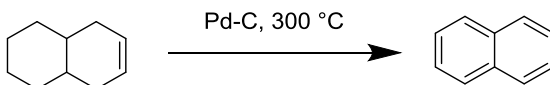
hledaná molekula	Název	miSMILES	miLogP	MW
<chem>CC(=O)N</chem>	acetamid	<chem>CC(N)=O</chem>	-0.92	59.07
fenol	fenol	<chem>Oc1ccccc1</chem>	1.46	94.11
<chem>Cn1cnc2n(C)c(=O)n(C)c(=O)c12</chem>	kofein	stejně jako SMILES	0.06	194.19

4. SMILES a název:

- Nc1ncnc2c1ncn2, adenin,
- c1cccc2c1cccc2, naftalen,
- c1cc(O)ccc1NC(=O)C, paracetamol,
- Nc1cccc2c1C(=O)NNC(=O)2, luminol,
- O=C1CCCCCN1, kaprolaktam.

5. SMILES a název:

- Adenin se v DNA páruje s **thyminem dvěma** vodíkovými vazbami.
- Například následující redukci:



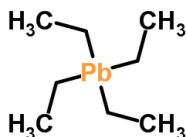
- Paracetamol tiší bolest blokováním **COX enzymů**.
- Luminol se používá k detekci **krve**. **Železo** obsažené v hemoglobinu katalyzuje oxidaci luminolu, která je spojena s vyzářením světla (chemoluminiscence).

- e) Kaprolaktam **5** vodíkových píků (+1 pokud bude vidět NH), cyklohexanoxim **3** (+1 za OH), cyklohexanon **3**. Jedná se o **Beckmannův přesmyk**.

6. Statistika látek:

Unikátních látek bylo 37, přičemž nejmenší unikátní látkou byl acetylen (C#C) těsně následován ethanolem (CCO),

u kterého jsme to vůbec nečekali. Asi nejzajímavější unikátní látkou byl basketan (C1CC2C3C4C1C5C2C3C45). Obecně převažovaly organické molekuly, ale našly se i látky anorganické - např. fulminát stříbrný ([C-]#[N+][O-].[Ag+]), či chlorid dysprosity (Cl[Dy](Cl)Cl).



Naopak neunikátní byly tyto látky: voda (O), methanol (CO), menthol (CC1CCC(C(C1)O)C(C)C), kyselina valerová (CCCCC(=O)O), kyselina jantarová (C(CC(=O)O)C(=O)O), vanillin (COc1cc(ccc1O)C=O), ale i tetraethylplumban (CC[Pb](CC)(CC)CC).

Otázka 1 – 1,2 bodu, 2 – 0,8 bodu, 3 – 2 body, 4 – 2 body, 5 – 3 body, 6 – 1 bod. Celkem 10 bodů.

Úloha č. 4: Pečivoprášková

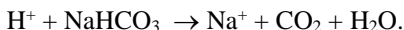
(12 bodů)

Autor: Luděk Míka

1. Kypřicí prášek se při pečení rozkládá na plynné látky, které nakypřují těsto.
2. Ukazuje se, že chemie kypřicího prášku není tak jednoduchá, jak se na první pohled zdá. Běžné vysvětlení, že se hydrogenuhličitan sodný rozkládá teplem podle rovnice:



není úplně přesné. V kypřicím prášku jsou kromě hydrogenuhličitanu sodného ještě další kyselé soli (hydrogenvinan a hydrogenfosforečnan). Jejich rozklad za tepla ve vodném prostředí vede ke snížení pH v těstu, což způsobí rozklad hydrogenuhličitanu sodného v kyselém prostředí podle rovnice:



3. Pokud bychom uvažovali pouhý rozklad uhličitanu sodného při teplotách panujících v troubě, nedospěli bychom k nakypřenému těstu. Teplota rozkladu uhličitanu sodného na oxid sodný a oxid uhličitý je vyšší než 800 °C. Pokud bychom ale uvažovali rozklad uhličitanu působením kyseliny, dalo by se o nějakém nakypření uvažovat. Vzniklé pečivo by pak rozhodně mělo silně zásaditou chuť :)
4. Používá se uhličitan (případně hydrogenuhličitan) amonný – cukrářské droždí. Jeho výhodou je, že se rozkládá na 4 molekuly plynných produktů a nic z něj v pečivu nezbyde. Díky tomu stačí pro dosažení stejné kyprosti těsta použít menší množství prášku.
5. $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$
6. Pro stanovení hydrogenuhličitanu bude nejrozumnější alkalimetrická titrace, kdy se navážka kypřicího prášku rozpustí a titruje kyselinou (pravděpodobně chlorovodíkovou) na indikátor methylooranž (fenolftalein nelze použít).
Problémem kypřicího prášku je, že kromě hydrogenuhličitanu sodného obsahuje ještě velké množství dalších kyselých solí. Takže v praxi bude jednodušší použít gazometrii, jen v trochu profesionálnějším uspořádání.
7. $\text{NaHCO}_3 + \text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{COONa} + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$
8. Při teplotě 25 °C a tlaku 1 atm se z 1 g hydrogenuhličitanu sodného uvolní
 $V = m \times R \times T / (M \times p) = 1 \times 8,314 \times 298 / (84 \times 101325) \text{ ml} = 291 \text{ ml CO}_2$
9. Nejčastějším (a zároveň nejrozumnějším) řešením bylo zachytávání vznikajícího plynu nad vodní hladinou do nějaké nádoby. Po vyrovnání hladin

(aby se vyrovnal tlak v nádobě a venku) stačilo na nádobu udělat lihovým fixem rysku, pak nádobu dát na váhu, nalít do ní vodu po rysku a vodu zvážit.

Často se objevovaly nápady s měřením obvodu balonku, ve kterém probíhala reakce. Zde je ale problém s tím, že balonek není dokonalá koule a navíc je uvnitř balonku vyšší tlak než v okolí.

10. Kypřicí prášek Vitana: cena 2,50 Kč za 12 g, uvolní se 820 ml CO₂

$$m = (820 / 291) \text{ g} = 2,82 \text{ g NaHCO}_3$$

11. $w = 2,82 / 12 = 23 \%$

12. $2,5 \text{ Kč} / 2,82 \text{ g} = 0,89 \text{ Kč/g}$

Lach-ner 140 Kč/kg \rightarrow 0,14 Kč/g

Penta 145 Kč/kg \rightarrow 0,15 Kč/g

13. Ke zkreslení výsledků může dojít v důsledku netěsnosti aparatury, nedostatečně rychlého uzavření aparatury po přilítí kyseliny, nezanedbatelné rozpustnosti CO₂ ve vodě nebo rozdílu tlaku v měřicí nádobě a atmosférického tlaku.

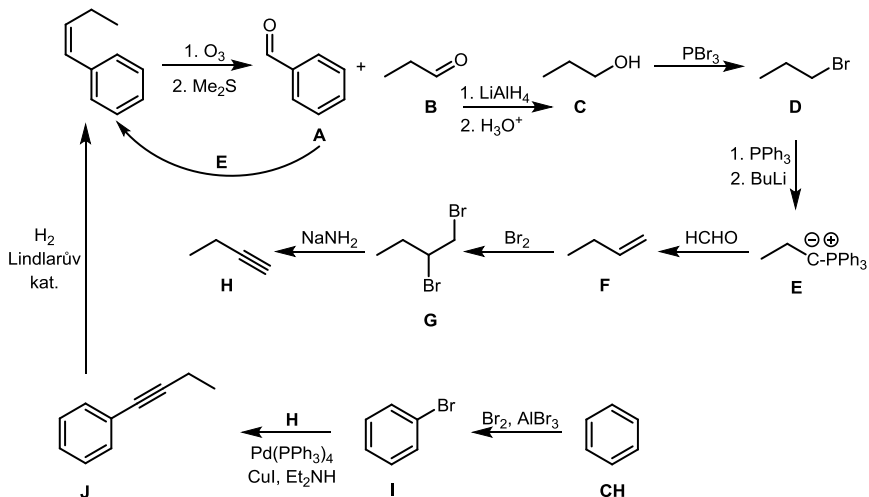
14. Fotky byly náležitě bodově ohodnoceny.

Otázka 1 – 0,25 bodu, 2 – 0,5 bodu, 3 – 0,25 bodu, 4 – 0,5 bodu, 5 – 0,5 bodu, 6 – 0,5 bodu, 7 – 0,5 bodu, 8 – 2 body, 9 – 2 body, 10 – 1 bod, 11 – 0,5 bodu, 12 – 0,5 bodu, 13 – 1 bod, 14 – 2 body. Celkem 12 bodů.

Úloha č. 5: Logohrátky

(10 bodů)

Autor: Michal Řezanka

1. Sloučeniny **A-J** jsou vyobrazeny ve schématu níže.

Při Wittigově reakci často vzniká směs *E/Z* izomerů. Záleží na přesných podmínkách reakce, který z izomerů bude převládat (přidání lithných solí apod.). V našem případě by měl převládat *Z*-alken, jelikož **E** je nestabilizovaný ylid.

2. Reakce z **I** na **J** je pojmenována po chemikovi jménem Kenkichi Sonogashira a reakce z **E** na **F** (a též z **A** na logo) po již vzpomenutém Georgu Wittigovi.

3. Redukce trojné vazby by proběhla úplně – až na vazbu jednoduchou.

4.

logo z let:	jméno autora
2002–2003	Pavel Řezanka
2003–2005	Michal Řezanka
2005–2015	Pavel „Lorgan“ Hamřík
2015–	Anna Trousilová

Otázka 1 – 5,5 bodu, 2 – 1 bod, 3 – 1 bod, 4 – 0,5 bodu, 5 – 2 body. Celkem 10 bodů.

Seriál: RNA – popelka genetiky

3. díl: Význam RNA v biologii a medicíně

Autoři: Karel Berka, Michal Janeček

V minulém díle jsme se seznámili s nejdůležitějšími typy RNA a jejich funkcemi a ukázali si tak, že RNA zastane celou škálu různých úloh. V tomto díle si ukážeme, v jakých složitějších procesech živé organismy tyto jednotlivé funkce využívají a jaké je jejich potenciální využití v medicíně – při diagnóze a terapii.

RNA interference

Podstatu a mechanismus RNA interference jsme stručně nastínili už v minulém díle u miRNA a siRNA.⁴ Nyní si tento proces objasníme podrobněji.

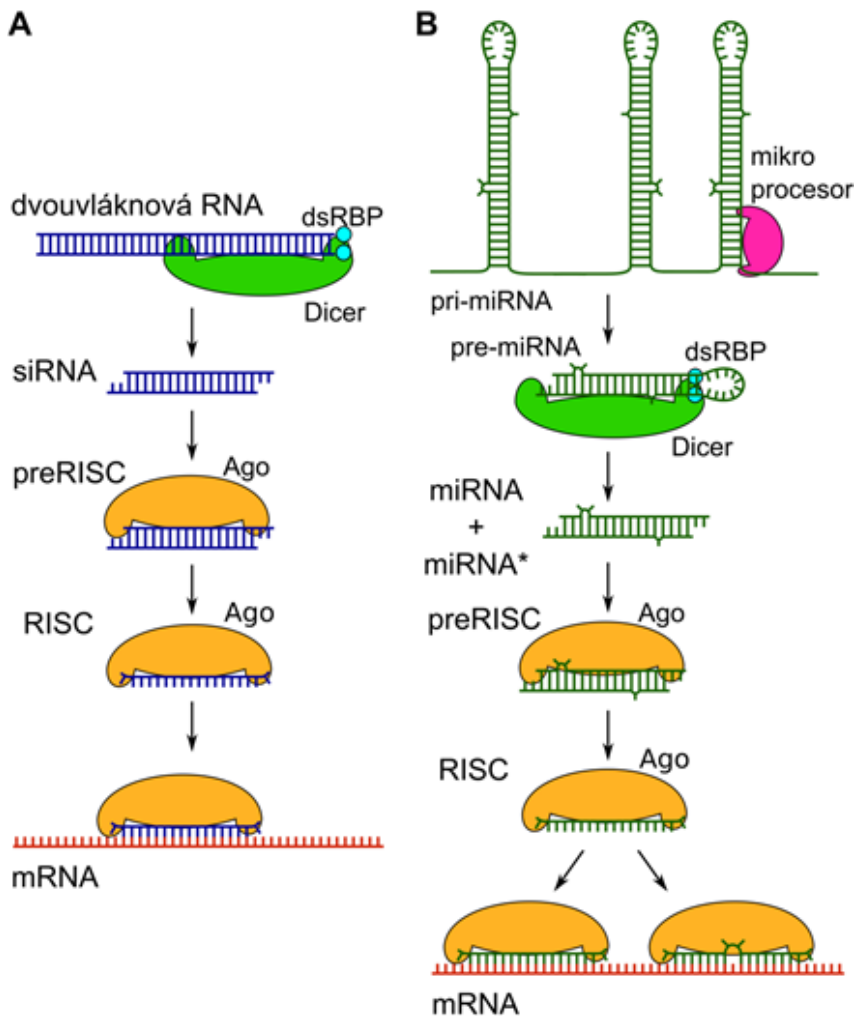
Pojmem **RNA interference** se obvykle označuje reakce metabolismu buňky na dvouvláknovou RNA, která vede k posttranskripčnímu tlumení genů – tedy k zamezení translace těch genů, které už byly přepsány do mRNA. Tento proces probíhá ve všech eukaryotických organismech (rostlinách, houbách i živočiších) a má dvě hlavní úlohy: (1) chránit organismus proti cizí RNA nebo DNA a (2) regulovat expresi vlastních genů organismu.⁵ Mechanismus RNA interference sestává ze tří základních kroků, které si vysvětlíme na modelovém příkladu reakce buňky na vniknutí dvouvláknového RNA viru (obrázek 1A).

Ochrana proti cizím genům

Když se virus dostane do hostitelské eukaryotické buňky, jeho dvouvláknová RNA se ocitne v její cytoplazmě. Tam ji objeví enzymový komplex zvaný Dicer, který je schopen ji specificky rozpoznat (v tomto je mu případně nápomocný tzv. dsRBP - double-stranded RNA binding protein) a následně rozštěpit na siRNA molekuly (tedy, jak již bylo popsáno v minulém díle, na pravidelné kusy dvoušroubovice o délce 20-25 párů bází s typickým přesahem 2-3 nukleotidy a koncovou OH skupinou na 3'-koncích a fosfátem na 5'-koncích). Název „Dicer“ nedostal enzymový komplex náhodou, je to totiž anglický výraz pro „kráječ, který nakrájí potraviny na malé pravidelné kostičky“.

⁴ Carthew, Richard W. and Sontheimer, E. J.: Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655, 2009.

⁵ Wilson, R. C., & Doudna, J. A.: Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Ann. Rev. Biophys.*, 42(1), 217–239, 2013.



Obrázek 1. Schéma mechanismu RNA interference v eukaryotických organismech. A – obrana proti cizí RNA za využití siRNA, B – regulace vlastních genů za využití miRNA.1

Třemi základními kroky jsou: 1) vznik **siRNA/miRNA** pomocí enzymového komplexu **Dicer** (a proteinu **dsRBP**), 2) vznik komplexu **RISC** z siRNA/miRNA a proteinu z rodiny Argonautů (**Ago**) a 3) navázání RISCu na **mRNA**.

Prvním krokem RNA interference je tedy rozpoznání dvouvláknové RNA a její rozštěpení na molekuly siRNA. Dvouvláknová RNA je přitom spouštěčem celého procesu. Důvodem je, že dvouvláknová RNA se kromě případů, kdy buňka sama chce použít RNA interferenci k tlumení svých genů, v eukaryotické buňce nevyskytuje.

Druhým krokem je vytvoření komplexu zvaného RISC (RNA-induced silencing complex). Nejprve vznikne tzv. pre-RISC, což je komplex proteinu zvaného Argonaut (Ago) s oběma vlákny siRNA. Hned vzápětí se podle stability koncových párů dvoušroubovice rozhodne, které vlákno bude cíl určující (guide strand) a které doprovodné (passenger). Jako cíl určující vlákno je vybráno to, jehož 5'-koncová báze tvoří v siRNA méně stabilní pár. Toto vlákno je pak pevně navázáno svým 5'- i 3'-koncem k Argonautu, zatímco doprovodné vlákno je z komplexu uvolněno a v cytoplazmě podléhá degradaci.

A konečně třetím a posledním krokem je navázání RISCu na sekvenci mRNA, která je komplementární k cíl určujícímu vláknu siRNA. RISC poté ve většině případů rozštěpí páteř mRNA mezi nukleotidy komplementárními k nukleotidům s pořadovým číslem 10 a 11 v siRNA, což má za následek degradaci celé mRNA cytoplazmatickými enzymy.

Pro dvouvláknový RNA virus to znamená jediné: když se pokusí využít metabolismus buňky k replikaci a translaci své genetické informace, je jeho mRNA pomocí komplexu RISC rozpoznána a odbourána.

U některých organismů (většina rostlin a hub a některé druhy bezobratlých) bylo také pozorováno, že přítomnost už jen několika molekul dvouvláknové RNA způsobí kontinuální a dlouhotrvající degradaci cílové mRNA, takže veškerá další mRNA, kterou virus vyprodukuje, je cíleně degradována. Tyto organismy jsou schopny syntetizovat tzv. sekundární siRNA, a to pomocí enzymu RNA-dependentní RNA polymerázy, která díky komplexu RISC rozpozná mRNA virového původu a syntetizuje podle ní nové siRNA. Díky tomu je reakce dané buňky proti cizí RNA či DNA podstatně intenzivnější, a navíc některé organismy (například hlístice či většina rostlin) mají schopnost šířit siRNA na nenakažené buňky, které vytvoří komplex RISC ještě před příchodem viru.⁶

Eukaryotická buňka tedy využívá RNA interferenci jako obranu proti invazi cizí RNA. Stejný mechanismus využívá buňka také proti jednovláknovým RNA virům i DNA virům, protože v jejich případě je dvouvláknová RNA jedním z meziproductů při replikaci viru.⁷

⁶ Carthew, Richard W. and Sontheimer, E. J.: Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655, 2009.

⁷ Cullen, B. R.: The virology–RNA biology connection. *RNA*, 21(4), 592–594, 2015.

RNA interference slouží také jako obrana proti začlenění cizího genu do genomu buňky. Když dojde k reverzní transkripci RNA do DNA hostitelské buňky, RISC komplex na základě komplementarity dané DNA sekvence k siRNA zajistí buďto metylaci dané DNA nebo její namotání na histony.⁸ Tím je cizorodý gen označen, aby jej buňka nepřepisovala na RNA. Zajímavostí je, že dle odhadů je kolem 8 % lidského genomu tvořeno právě sekvencemi pocházejícími z infekčních retrovirů.⁹

Regulace vlastních genů

RNA interferenci dokáže buňka využít také pro regulaci vlastních genů a to prostřednictvím miRNA (obrázek 1B). Nejprve vznikne v jádru buňky tzv. primární miRNA (pri-miRNA), která je buďto součástí intronů, nebo je kódována vlastní sekvencí DNA. pri-miRNA je jednovláknová RNA dlouhá asi 1000 nukleotidů a obsahuje jednu až několik vlásenek, jejichž stonek může obsahovat i nekanonické párování nebo vyboulené smyčky a má délku okolo 33 párů bází koncová smyčka pak okolo 10 bází.

Enzymový komplex zvaný mikroprocesor dokáže vlásenky (zejména díky jejich poměrně velké koncové smyčce) rozlišit a odštěpit od zbytku struktury, čímž vznikne tzv. pre-miRNA (nezaměňovat s pri-miRNA). pre-miRNA vlásenka je poté dopravena do cytoplazmy, kde další kroky probíhají již velmi podobně jako v případě virové dvouvláknové RNA (obrázek 1B). Existuje totiž více typů komplexu Dicer, z nichž některé umí specificky rozpoznat dvouvláknovou RNA, jiné vlásenku pre-miRNA a některé obojí (například savčí Dicer).

Komplex Dicer tedy rozštěpí pre-miRNA vlásenku na dvoušroubovici dlouhou okolo 22 párů bází tvořenou dvěma vlákny. Tato dvoušroubovice se poté zakomponuje do pre-RISC komplexu, ve kterém se opět podle stability koncových párů rozhodne, které z vláken se stane součástí komplexu RISC (miRNA) a které bude uvolněno do cytoplazmy k degradaci (miRNA*). Komplex RISC se může pomocí miRNA navázat na komplementární sekvenci mRNA buďto dokonalým párováním, což vede k degradaci mRNA rozštěpením páteře, nebo se nedokonalým párováním, což vede pouze k zablokování translace, v některých případech také k deadenylaci následované degradací mRNA.

Eukaryotické buňky tedy poměrně elegantně využívají tyto mechanismy k regulaci exprese vlastních genů. Určitě pak není udivující, že geny kódující miRNA jsou dědičné.

⁸ Histony jsou proteiny, kolem kterých je DNA omotána.

⁹ Griffiths, D.J.: Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol.* 2(6), reviews1017.1-reviews1017.5, 2001.

RNA interference má tedy pro buňku dosti zásadní význam. Tento mechanismus bychom mohli očekávat také u prokaryotických organismů, které rovněž potřebují chránit svůj genom proti virovým (respektive bakteriofágovým) infekcím, se kterými se běžně potýkají. Avšak v těchto organismech překvapivě nebyl nalezen. Ukázalo se, že u těchto organismů plní podobnou funkci, tzv. CRISPR interference, ovšem zcela jiným mechanismem.

CRISPR interference

Mechanismus CRISPR interference zajišťuje obranu proti cizí DNA či RNA, tedy především proti bakteriofágům a parazitickým plazmidům¹⁰ ve velké části prokaryotických buněk (u 45 % bakterií a 84 % archeí podle posledních údajů).¹¹

CRISPR interference se skládá ze dvou základních složek: i) *CRISPR* (zkratka z anglického „clustered, regularly interspaced short palindromic repeats“, což by se dalo přeložit jako shluky pravidelně prokládaných krátkých palindromatických¹² opakování) a ii) tzv. *Cas* genů (z anglického „CRISPR associated genes“, tedy geny přidružené ke CRISPRu).

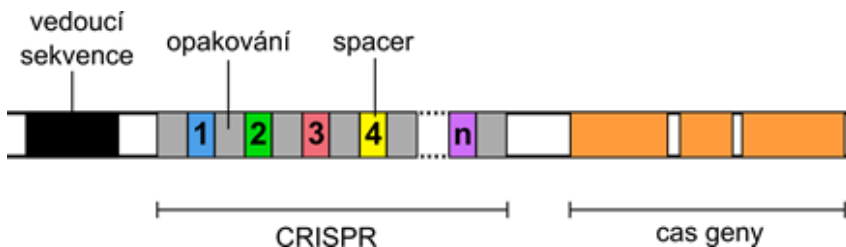
Jak už napovídá název, CRISPR se skládá z krátké palindromatické sekvence v prokaryotické DNA, která se pravidelně opakuje a vždy mezi dvěma těmito sekvencemi lze nalézt tzv. „spacer“ (obrázek 2). V genomu může být jedno i několik uskupení CRISPR přičemž pak zpravidla má každé své typické palindromatické opakování.

Opakování, navzdory přídomku „palindromatické“ v názvu CRISPR, nemusí být vždy dokonale palindromatické a jeho typická délka se pohybuje od 23 do 50 nukleotidů. Spacery pak představují klíčovou část celého uskupení. Každý spacer je totiž jedinečný a jeho sekvence vždy odpovídá DNA (případně RNA) bakteriofága či plazmidu. Uskupení CRISPR tak představuje jakousi databázi parazitů, se kterými se buňka už setkala a CRISPR jí umožňuje se proti nim účinně bránit. Navíc je tato databáze součástí DNA, takže je předávána potomkům. Dodejme ještě, že délka každého spaceru v rámci jednoho CRISPRu je vždy stejná. Napříč různými CRISPR bývá ovšem poměrně variabilní (17 až 84 nukleotidů) a stejně tak bývá u CRISPRů poměrně rozmanitý počet spacerů a tedy i opakování, od jednotek až po stovky, průměrně pak 66 spacerů. CRISPRu ve většině případů předchází tzv. vedoucí sekvence (leader sequence), což je sekvence dlouhá stovky nukleotidů s velkým obsahem thyminu a adeninu.

¹⁰ Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J.: CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet*, 11(3), 181–190, 2010.

¹¹ <http://crispr.u-psud.fr/crispr/CRISPRdatabase.php>

¹² Palindromatická znamená, že daná sekvence je stejná, ať ji čteme popředu nebo pozpátku – například „Jelenovi pivo nelej“.

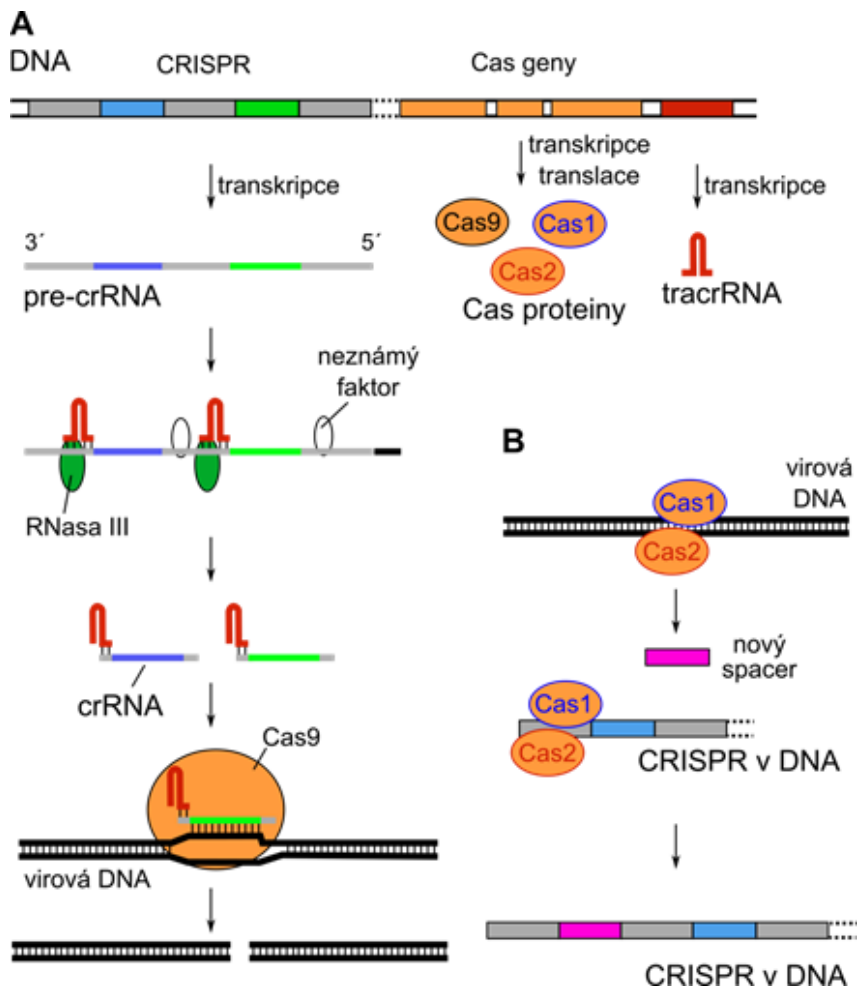


Obrázek 2. Znárodnění uskupení CRISPR (opakování šedě, spacery barevně a očíslovány 1 až n), vedoucí sekvence (černě) a Cas genů (oranžově); upraveno dle Ref 6

Pokud se v DNA daného prokaryotického organismu nachází uskupení CRISPR, nachází se tam téměř vždy také Cas geny, a to do vzdálenosti 1000 nukleotidů. Tyto geny kódují proteiny potřebné pro CRISPR interferenci. Celý systém se proto označuje jako CRISPR/Cas.

Expres systému CRISPR/Cas a působení proti parazitům

Podle mechanismu, kterým probíhá jejich exprese a obrana proti parazitům, se systémy CRISPR/Cas dělí do tří tříd. Rozdíly spočívají především v konkrétních Cas proteinech a dalších faktorech, které jsou zodpovědné za jednotlivé kroky mechanismu. Princip celého mechanismu je ale podobný, proto ho vysvětlíme na CRISPR/Cas systému typu II (obrázek 3A).



Obrázek 3. Mechanismus CRISPR/Cas systému typu II. **A** – exprese systému a degradace virové DNA, která odpovídá jednomu ze spacerů, **B** – získávání nových spacerů; upraveno dle Ref. 13

¹³ Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M.: The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119–128, 2015.

Nejprve je celé uskupení CRISPR přepsáno na RNA, tento transkript se označuje jako pre-crRNA (tedy prekurzor CRISPRové RNA), a Cas geny jsou přepsány a přeloženy na proteiny. Kromě toho je přepsána také tzv. tracrRNA (trans-activating crRNA), jejíž část je komplementární s částí palindromického opakování z pre-crRNA a vytvoří s ní tak dvoušroubovici. Dvoušroubovice je následně sestřížena enzymem RNAsou III, čímž je pre-crRNA sestřížána na mnoho molekul, z nichž každá obsahuje pouze jeden spacer. Na 5'-konci je navíc každá tato molekula zkrácena.¹⁴ Tím vznikne crRNA (CRISPRová RNA). Následně crRNA s navázaným zbytkem tracrRNA vytvoří spolu s proteinem Cas9 komplex. Ten poté najde ve virové DNA sekvenci komplementární ke spaceru a rozštěpí ji. Komplementarita musí být dokonalá, stačí jedna odlišná báze a virová DNA není rozštěpena.

Zajímavou otázkou je, jak dokáže tento systém rozlišit vlastní DNA (kde se logicky v uskupení CRISPR nachází sekvence komplementární ke crRNA) od cizí DNA. Odpověď je jednoduchá, ve vlastní DNA jsou spacery ohraničeny z obou stran palindromickými opakováními, což umožňuje její elegantní rozlišení. Proti bakteriofágům či plazmidům, z jejichž DNA má buňka spacery ve svém CRISPRu, je tedy účinně chráněna. Pochopitelně je ale třeba získávat nové spacery.

Získávání nových spacerů

Nové spacery buňka získává pomocí enzymů Cas1 a Cas2 (obrázek 3B). Sekvence pro nové spacery nejsou vybírány náhodně, ale potenciální nový spacer (tzv. protospacer) musí mít hned vedle sebe specifickou sekvenci dlouhou 2 až 3 nukleotidy (tzv. „protospacer adjacent motif“ – motiv v sousedství protospaceru). Teprve tehdy je enzym rozpoznán. Nový spacer je pak začleněn na konec CRISPRu vedle vedoucí sekvence. U některých prokaryot bylo také zjištěno, že CRISPR se novými spacery nezvětšuje donekonečna, ale při dosažení určité délky jsou ty nejstarší spacery odštěpovány pryč.

Ve srovnání s RNA interferencí je tedy CRISPR interference o něco méně „pohotová“, protože parazitická DNA musí být nejprve začleněna do CRISPRu, aby CRISPR/Cas systém mohl poskytnout buňce ochranu.

Využití RNA v medicíně

Při čtení tohoto seriálu vás možná napadlo, že některé z procesů, které probíhají na úrovni RNA, by bylo možné využít v diagnóze či při léčbě nemocí. V současnosti opravdu probíhá výzkum takovýchto možností diagnózy i terapie.

¹⁴ Jakým enzymem, či snad mechanismem, není zatím známo.

Využití RNA v diagnóze onemocnění

Velký potenciál v diagnóze onemocnění má v současné době využití miRNA. Po objevu miRNA a pochopení mechanismu jejího působení bylo zjištěno, že její nesprávná produkce (příliš mnoho či příliš málo) je příčinou mnoha nemocí, například některých druhů rakoviny či některých neurodegenerativních či kardiovaskulárních onemocnění. Kromě toho lze miRNA molekuly vždy najít v krevním oběhu i v dalších tělních tekutinách, kam se z buněk uvolňují. Uvedená onemocnění se tak zpravidla projeví změnou hladiny miRNA, přičemž konkrétní onemocnění je většinou spojeno s konkrétní miRNA.

Proto se nyní zkoumá, zda by hladina konkrétní miRNA nemohla sloužit jako spolehlivý ukazatel průběhu určitého onemocnění v organismu a nahradit tak některé současné invazivní metody.¹⁵

Využití RNA v terapii onemocnění

V současné době je nejvíce zkoumáno využití RNA interference k cílenému tlumení translace požadovaných genů či k nápravě špatné funkce miRNA a velká pozornost je věnována možnosti využití systému CRISPR k úpravě DNA in vivo.

Využití RNA interference

Léčivo založené na RNA interferenci (zkráceně RNAi léčivo) je schopno cíleně tlumit translaci požadovaného genu, nahradit nefunkční miRNA či eliminovat nadměrnou produkci miRNA. Mohlo by najít využití v následujících případech:

Zprvė, existují dědičná onemocnění, při nichž organismus syntetizuje defektní protein, pro která v současnosti neexistuje účinná léčba (např. Pachyonychia congenita). RNAi léčivo by pak mohlo zabránit syntéze daného proteinu. Dále bylo prokázáno, že některá onemocnění jsou způsobena špatnou produkcí miRNA. Nedostatečnou funkci miRNA lze nahradit, a naopak nadbytečnou miRNA lze selektivně vázat na komplementární sekvence. A konečně v současnosti neexistuje účinná terapie proti mnohým virům, např. Ebola.¹⁶ RNA interference může vyvolat cílenou degradaci virové mRNA a tím virus zahubit.

Výzkum RNAi léčiv probíhá poměrně intenzivně už od roku 2005. Klinické testy ovšem nedopadly dobře, účinnost léčiv byla malá a nežádoucí účinky značné. Hlavním důvodem bylo, že se siRNA (či jejich prekurzory) podávaly přímo do krevního oběhu, takže měly mnoho možností interferovat s jinými

¹⁵ Esteller, M.: Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, 12(12), 861–874, 2011.

¹⁶ resp. neexistovala, dnes je k dispozici látka GS-5734 vyvinutá Gilead Pharmaceuticals - Warren, T.K. et al.: Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature*, 531(7594), 381-385, 2016

genovými sekvencemi, než na které byly cílené. Od té doby však došlo ke značnému pokroku v oblasti doručování účinné látky do požadované tkáně. Konkrétně se využívá zapouzdření do lipidových nanočástic, konjugátů z N-acetylgalaktosaminu nebo dynamických polykonjugátů.

Od roku 2012 proto nastala tzv. druhá vlna klinického testování RNAi léčiv. V současnosti probíhá klinické testování více než 20 léčiv, z nichž mnohá jsou již ve fázi III. Z testovaných léčiv uvedeme ty nejnázornější příklady (aktuální a kompletní výčet všech testovaných léčiv lze nalézt v přehledovém článku¹⁷).

Příkladem použití RNAi léčiv je například velmi vzácné dědičné onemocnění kůže Pachyonychia congenita.¹⁸ Je způsobeno mutací jednoho z genů pro keratin a vznikající defektní keratin způsobuje vznik velmi bolestivých puchýřů zejména na dlaních a chodidlech. Vědcům se podařilo syntetizovat siRNA, která cílí pouze na zmutovaný gen, takže je tlumena translace pouze defektního keratinu. Lidský genom obsahuje kromě tohoto genu více než 20 dalších genů pro keratin, takže eliminace defektního keratinu je bez problémů kompenzována. Léčba byla úspěšně otestována na jedenácti pacientech a prošla fází Ib klinického testování.¹⁹ V současnosti se optimalizuje způsob aplikace siRNA do postižené tkáně.²⁰

Dále je v I. fázi klinického testování lék proti hemofilii.²¹ Hemofilie je recesivně dědičná porucha srážlivosti krve způsobená nedostatečnou produkcí tzv. koagulačních faktorů. RNA interference samozřejmě nedokáže opravit poškozené geny, způsobující nedostatek koagulačních faktorů v organismu. Vědci se ale vydali jinou cestou. Lidský organismus potřebuje kromě koagulačních faktorů i antikoagulační faktory, které s nimi musejí být v rovnováze. Protože je koagulačních faktorů u hemofilických pacientů nedostatek, vyvinuli vědci RNAi léčivo snižující hladinu antikoagulačního faktoru antitrombinu. U takto léčených pacientů byl zaznamenán pokles hladiny antitrombinu na třetinu a vzestup hladiny trombinu na trojnásobek.

RNAi léčiva jsou nyní vyvíjena jak proti některým typům rakoviny, tak proti virům hepatitidy B a C, kde již byla ukončena fáze I klinických testů, a proti Ebolě, kde klinická fáze I teprve probíhá.

¹⁷ Bobbin, M. L., & Rossi, J. J.: RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 56(1), 103–122, 2016.

¹⁸ V roce 2014 byl v ČR identifikován první pacient této choroby - Jiráková A, et al.: First case of pachyonychia congenita in the Czech Republic. *Dermat. Therapy*, 8, 2014.

¹⁹ http://www.pachyonychia.org/clinical_trials_studies.php

²⁰ Zakrewsky M., Kumar S., Mitragotri S.: Nucleic acid delivery into skin for the treatment of skin disease: Proofs-of-concept, potential impact, and remaining challenges. *J. Control Release*, 219, 445-456, 2015.

²¹ Margaret, V., & Ragni, M. D.: Targeting antithrombin to treat hemophilia. *NEJM*, 14(1), 389, 2015.

Úprava DNA pomocí systému CRISPR/Cas

Systém CRISPR/Cas má jedinečnou vlastnost: dokáže rozstříhnout DNA dvoušroubovici v místě, kde je sekvence přesně komplementární k crRNA. Systém typu II je navíc jedinečný tím, že k rozstřížení DNA potřebuje pouze crRNA, tracrRNA a protein Cas9. Proto se vědci rozhodli využít tento systém z bakterie *Streptococcus Pyogenes* k cílenému rozstřížení DNA v požadovaném místě. Syntetizovat RNA s požadovanou sekvencí není v současné době problém, a poté, co ji vědci vpravili na místo crRNA, systém skutečně vykonával požadovanou činnost.

Buňky mají navíc mechanismus, kterým přestříženou DNA opravují, a to podle určitého vzoru. Když se tedy spolu se systémem CRISPR/Cas9 přidají vhodné DNA sekvence, buňka je použije při opravě jako vzor a začlení je tak do své DNA.

V roce 2013 se vědcům podařilo takto úspěšně upravit DNA v mnoha živých organismech (např. kvasinky, tabák, pšenice, rýže, myš, králik, ryba rodu dánío či žába).²² Loni v dubnu (2015) čínští vědci oznámili, že se jim podařilo editovat DNA také v lidských embryích, z etických důvodů ovšem neživotaschopných.²³

Vědci tak mají k dispozici mocný nástroj, který velmi pravděpodobně bude v budoucnu schopen upravovat DNA také v lidském organismu. I když je třeba urazit ještě dlouhou cestu vývoje, znamená to velkou naději pro pacienty trpící dědičnými chorobami. DNA se špatným mutantním genem bude možné nahradit zdravým genem. Zároveň je ale třeba myslet na velkou zneužitelnost, proto pokusy čínských vědců vyvolaly velkou debatu mezi vědci. Nakonec letos v únoru (2016) britský Úřad pro lidskou fertilizaci a embryologii (UK Human Fertilisation and Embryology Authority) jako první na světě povolil použití technologie CRISPR/Cas9 pro úpravu genomu lidských embryí.²⁴ Britští vědci plánují editovat geny, které jsou aktivní v prvních několika dnech po fertilizaci, a tím zkoumat příčiny neplodnosti. Po sedmi dnech budou embrya zničena.

²² Sander, J. D., & Joung, J. K.: CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4), 347–355, 2014.

²³ Liang P., et al.: CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Proteins & Cells*, 6(5), 363-372, 2015.

²⁴ Callaway, E.: UK scientists gain licence to edit genes in human embryos. *Nature*, **530**, 18, 2016.

Závěr

Je vidět, že naše „Popelka RNA“ již rozlouskla několik oříšků²⁵ a jen budoucnost ukáže, kolik jich má ještě v záloze – co všechno dokážou metody založené na RNA změnit v našem chápání organismů, v léčbě genetických chorob i v biotechnologiích. Jisté je, že to ještě bude velmi zajímavé. :o)

Další webové zdroje

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/technai/>

http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0114/pdf/08-mirna-biogeneze-lekarstvi.pdf

<http://vesmir.cz/2015/05/27/crispr-presna-strelba-geneticke-cile/>

<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/40871/title/The-Second-Coming-of-RNAi/>

²⁵ některé z nich dokonce v době psaní tohoto seriálu...

Zajíček chemik

