

NBCM010

# Bioorganická chemie

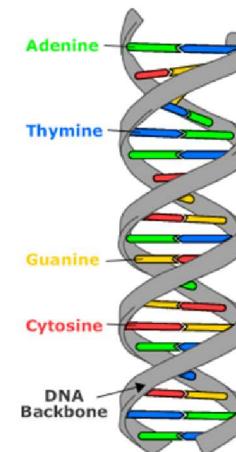
## Nukleové kyseliny

Kateřina Hofbauerová

s použitím materiálů z:  
D.L.Nelson, M.M.Cox: Lehninger Principles of Biochemistry. 2008 W.H. Freeman & Co.

### Co nás dnes eká?

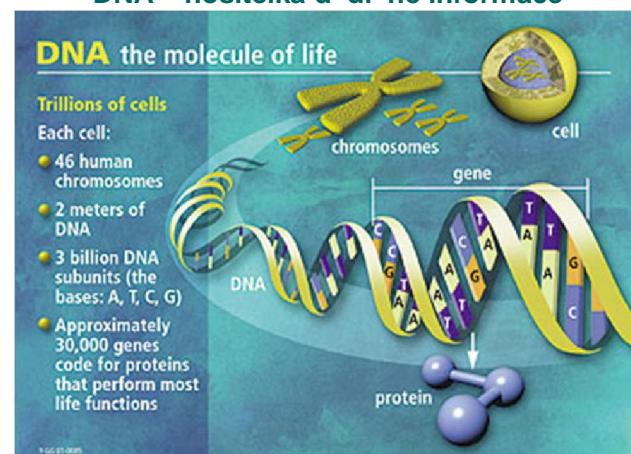
- ✓ base NK
- ✓ nukleosidy
- ✓ nukleotidy
- ✓ DNA
- ✓ RNA
- ✓ „DNA technologie“



### Úvod – základní informace

- nukleotidy:
  - „energetické ob živo“
  - signální molekuly
  - kofaktory enzym
  - základní složka nukleových kyselin
- nukleové kyseliny:
  - DNA (skladování a přenos genetické informace)
  - RNA
    - rRNA
    - mRNA
    - tRNA
    - ...
  - gen – segment DNA obsahující informaci pro syntézu funkčního biologického produktu (tj. RNA i proteinu)

### DNA – nositelka genetické informace



## Centrální dogma molekulární biologie

**Polymerní nukleové kyseliny**  
– „sklad genetické informace“ v živých systémech



**DNA**  
– genetický materiál živých bun k

**RNA**  
– p epis a p eklad genetické informace - „proteiny“  
– genetický materiál n kterých vir

## Genetický kód

➤DNA

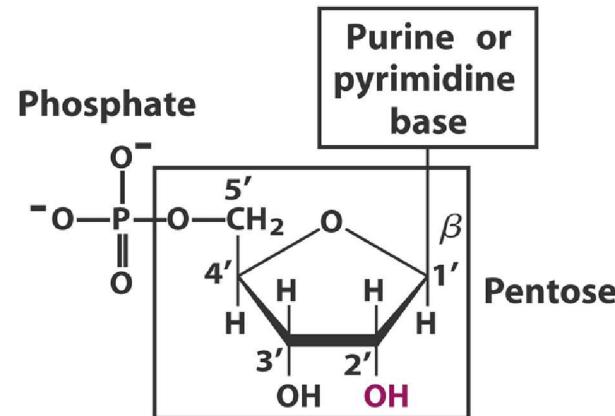
➤mRNA

➤protein

	SECOND BASE				
FIRST BASE	U	C	A	G	
U	UUU Phe UUC UUA UUG	UCU Ser UCC UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC UAG Stop UAG Stop	U G
C	CUU Leu CUC CUA CUG	CCC CCA CCG	CAU His CAC CAA Gln CAG	CGU CGC CGA Arg CGG	U C A G
A	AUU Ile AUC AUU Met or Start	ACU Thr ACC ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC AGA Arg AGG	C G A G
G	GUU Val GUC GUA GUG	GCU Ala GCC GCA GCG	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU Gly GGC GGA GGG	U C A G

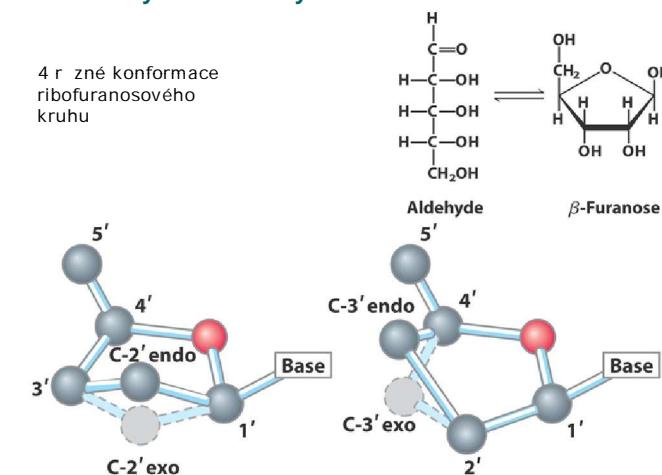
Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

## Nukleotidy – nukleosidy – dusíkaté báze



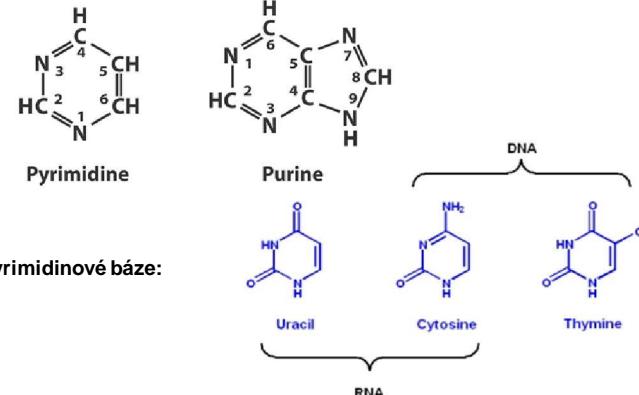
## Nukleotidy – nukleosidy – dusíkaté báze

4 rzné konformace ribofuranosového kruhu



## Dusíkaté báze

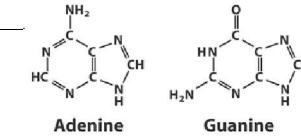
pyrimidinové x purinové báze



pyrimidinové báze:

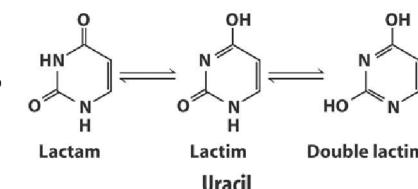
## Dusíkaté báze

Purinové báze:



Tautomerie:  
➤laktam x laktim  
➤rovnováha @pH 7.0 ?

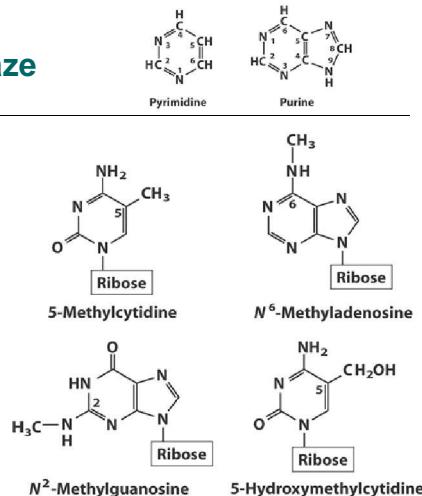
Tautomerie je vodíková isomerie, kdy se dva nebo více tautomerických struktur jedné látky liší pouze polohou jednoho vodíkového atomu a dvojné vazby. Jde o dynamickou rovnováhu mezi dvěma nebo více alternativními strukturami jedné a téže látky.



## Dusíkaté báze

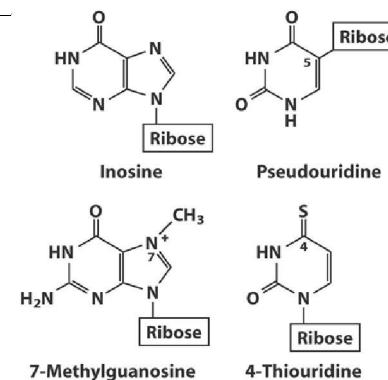
Málo zastoupené dusíkaté báze DNA ve formě nukleosid  
- methylace - role v regulaci i ochraně genetické informace

Konvence pojmenování:  
Jméno bývá dáno s vyznačením polohy a povahy substituentu (je-li na cyklu, tak jen všem, je-li mimo cyklus, je to uvedeno pozici na cyklu a písmeno na jaké „exocyclic“ skupiny je navázán).



## Dusíkaté báze

Málo zastoupené dusíkaté báze tRNA ve formě nukleosid:



## Nukleosidy

Nukleosid:

- dusíkatá báze + (deoxy-)ribosa
- N-glykosidická vazba (vždy )

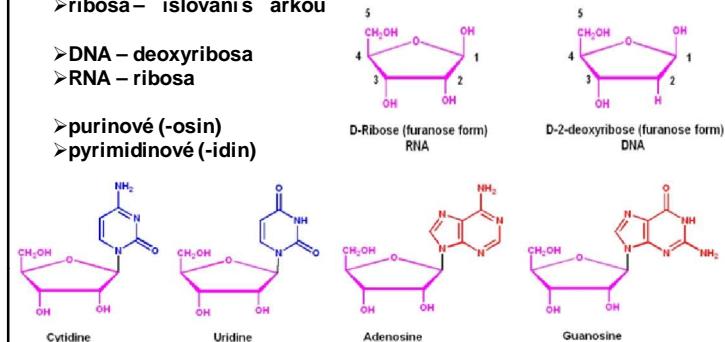
➤ ribosa – slování s árkou

➤ DNA – deoxyribose

➤ RNA – ribosa

➤ purinové (-osin)

➤ pyrimidinové (-idin)



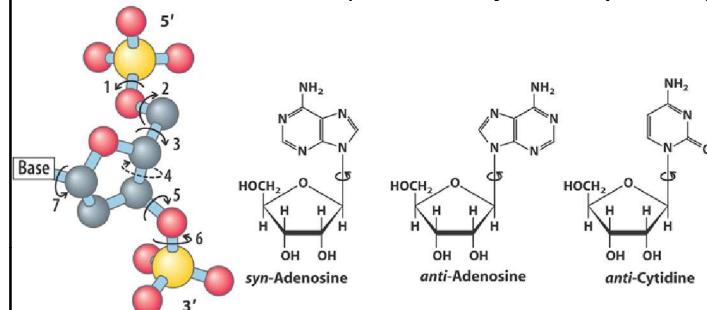
## Nukleosidy

➤ omezená rotace kolem glykosidické vazby

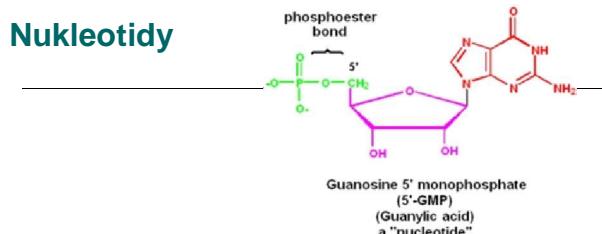
( H na C2')

➤ orientace base v i ribose – syn nebo anti

➤ anti konformace je up ednostn na u pyrimidinových basí  
(sterické d vody – ketoskupina na C2)



## Nukleotidy



Nukleotid:

➤ ester kyseliny fosfore né a nukleosidu  
(v třinou 5' hydroxyl z ídka i 3'; u DNA - 2' deoxy)

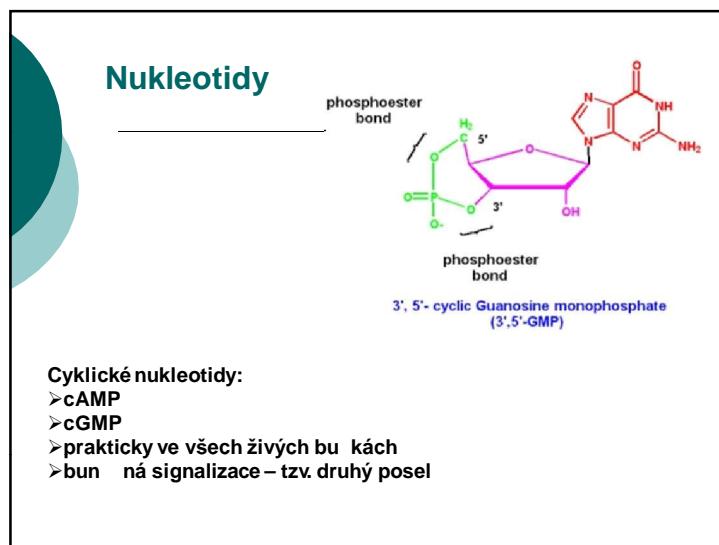
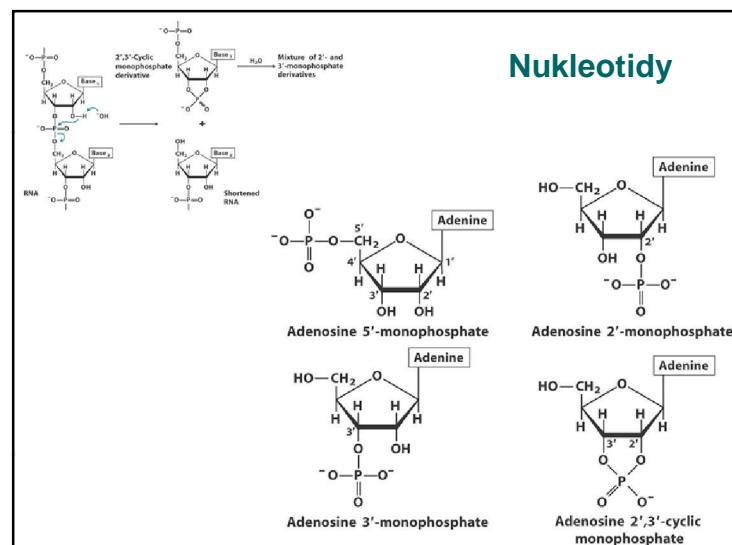
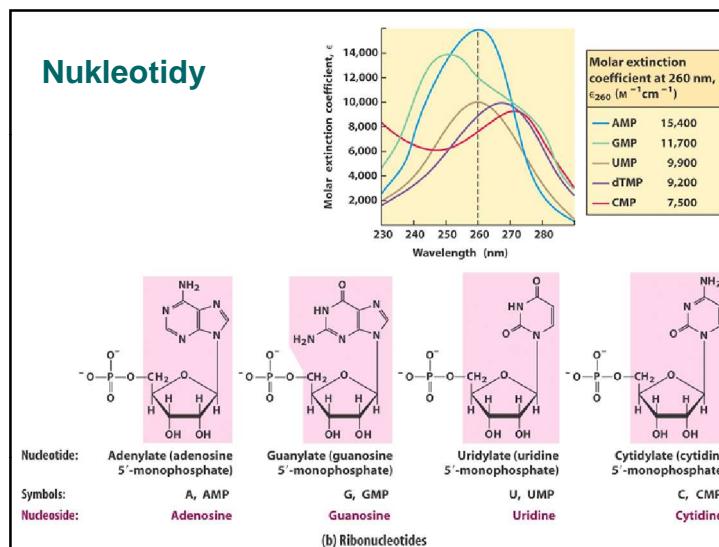
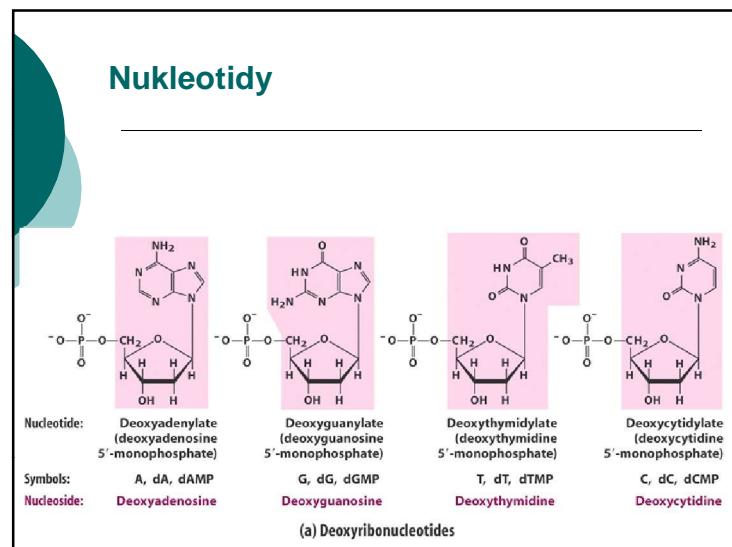
➤ nukleosid trifosfát – dNTP

➤ Pi - pK<sub>1</sub> ~1.0 a pK<sub>2</sub> ~6.0 ( @ pH 7.0 „net charge“ mezi -1 a -2)  
➤ kyselé vlastnosti

## Nukleotidy

TABLE 8-1 Nucleotide and Nucleic Acid Nomenclature

Base	Nucleoside	Nucleotide	Nucleic acid
<b>Purines</b>			
Adenine	Adenosine	Adenylate	RNA
	Deoxyadenosine	Deoxyadenylate	DNA
<b>Pyrimidines</b>			
Guanine	Guanosine	Guanylate	RNA
	Deoxyguanosine	Deoxyguanylate	DNA
Cytosine	Cytidine	Cytidylate	RNA
	Deoxycytidine	Deoxycytidylate	DNA
Thymine	Thymidine or deoxythymidine	Thymidylate or deoxythymidylate	DNA
Uracil	Uridine	Uridylate	RNA



## Nukleotidy

Nukleosid di- a tri-fosfáty:

- anhydridová vazba mezi fosfátovými skupinami („makroergní“)
- označení – NDP, NTP, resp. dNDP a dNTP
- v buňce se vyskytují ve volné formě
- obvykle jako komplexy s  $Mg^{2+}$  - kompenzace náboje
- kyseliny
- NTP mají v buňce unikátní role, jakožto „makroergní“ sloučeniny:
  - ✓ ATP: „energetické platičko“ buňky
  - ✓ GTP: zdroj energie při syntéze proteinů
  - ✓ CTP: základní metabolit při syntéze fosfolipidů
  - ✓ UTP: účastník se tvorby aktivovaných meziproduktů při biosyntéze sacharidů

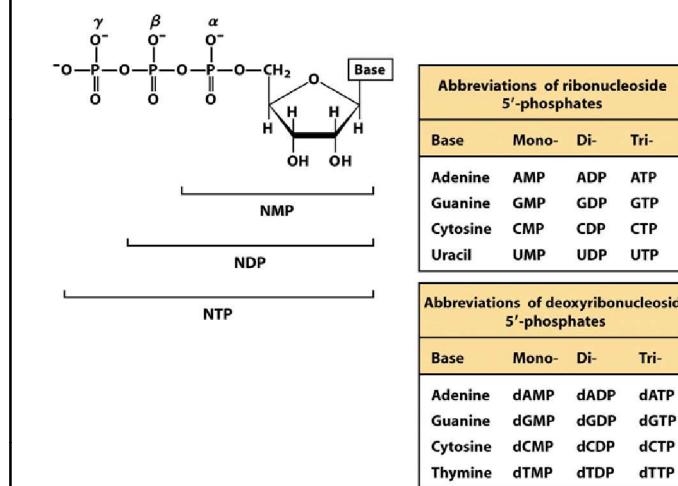
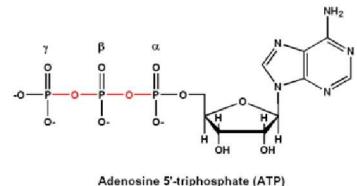


Figure 8-36  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

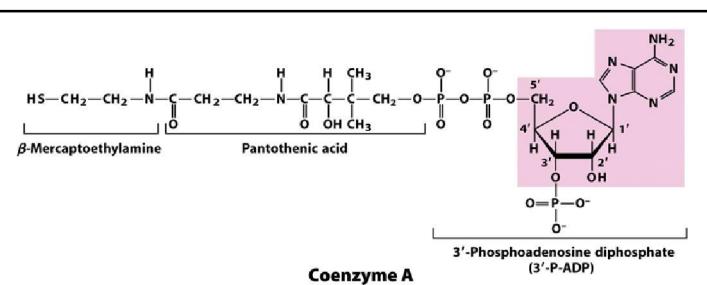


Figure 8-38 part 1  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

Skládá se z adenosindifosfátu, kyseliny pantothenové, -alaninu a cysteaminu. Pro tvorbu CoA je nutná kyselina pantothenová, tedy vitamín B5. Koenzym A je syntetizován v několika krocích, přičemž metabolická cesta začíná právě vitamínem B5. Písmeno „A“ pochází ze slova „acetylase“, protože právě v souvislosti s tímto procesem byl tento koenzym popsán.

Tento koenzym slouží v řadě různých enzymatických reakcích, jako je přenos acylových skupin při oxidaci mastných kyselin, při oxidaci pyruvátu, syntéze mastných kyselin a v různých acetylacích.

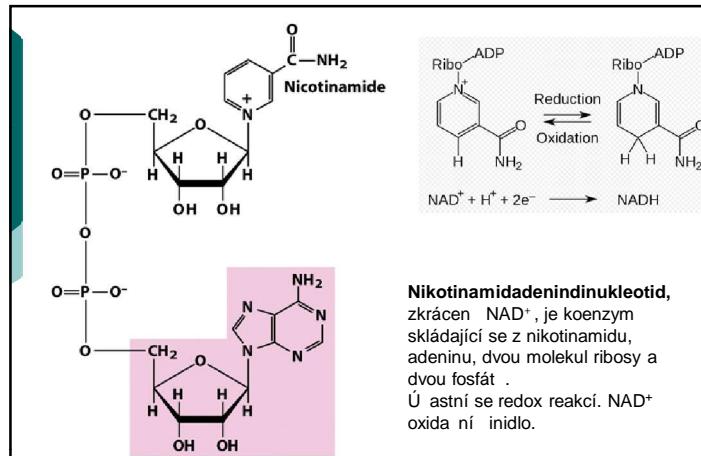
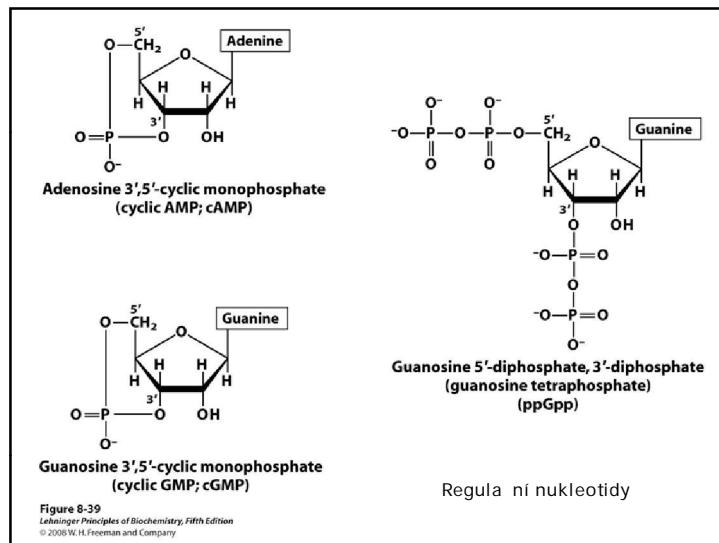
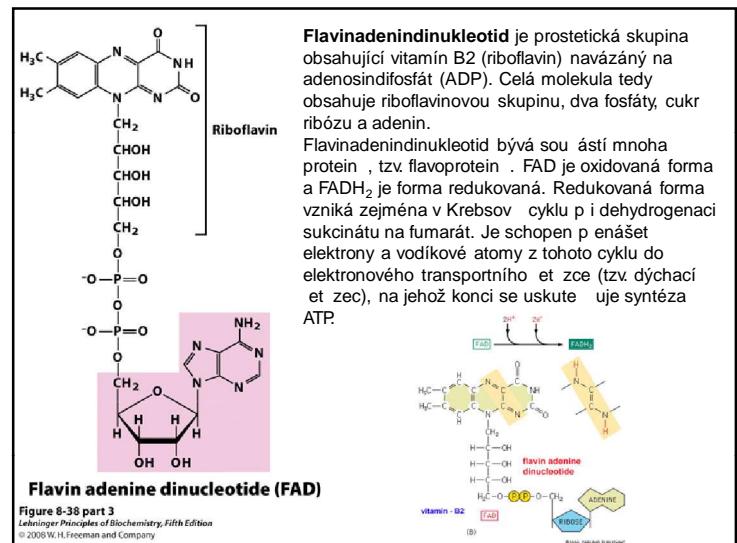


Figure 8-38 part 2  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

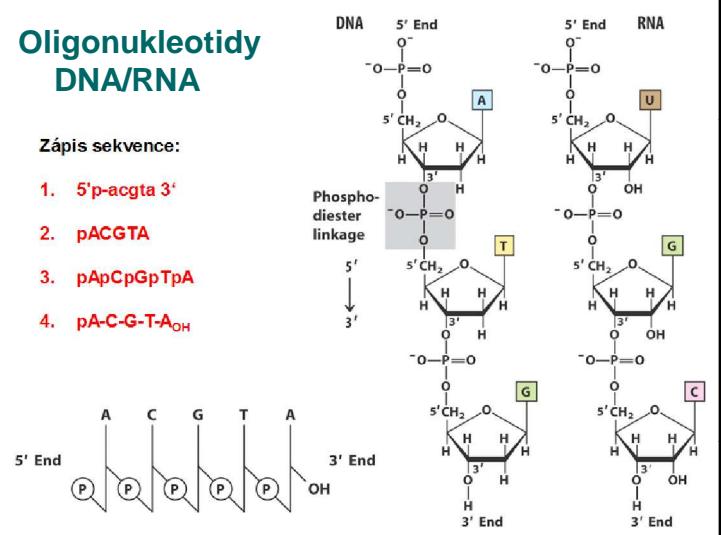
**Nicotinamidadenindinukleotid**, zkráceně  $NAD^+$ , je koenzym skládající se z nikotinamidu, adeninu, dvou molekul ribosy a dvou fosfátů. Účastní se redukční reakcí.  $NAD^+$  oxida nítridlo.



# Oligonukleotidy DNA/RNA

### Zápis sekvence:

1. 5'p-acgt 3'
  2. pACGTA
  3. pApCpGpTpA
  4. pA-C-G-T-A<sub>OH</sub>



## DNA – deoxyribonukleová kyselina

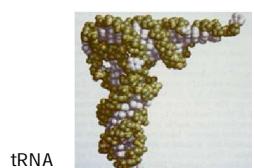
- nejv tší makromolekula v bu ce
  - obsahuje veškeré informace nutné k syntéze všech biomolekul v bu ce
  - prokaryotní organismy – cirkulární DNA tvo ící chromosom
  - genom bakterie *E. coli* obsahuje  $5 \times 10^6$  bp (páru bazí)
  - eukaryotní organismy – lineární DNA – sada chromosom  
(obvykle ve dvou kopíích – diploidní genom)



## RNA –ribonukleová kyselina

- molekuly ú astnící se „dekovodání“ genetické informace obsažené v DNA
- event. uchovávání genetické informace u n kterých vir
- RNA – obvykle více kopíí
- typy RNA:

- ✓ mRNA – messenger RNA
- ✓ tRNA – transfer RNA
- ✓ rRNA – ribosomal RNA
- ✓ snRNA – small nuclear RNA (v eukaryotních organismech)
- ✓ miRNA – micro RNA ... 21-23 nukleotid



## Historie DNA

- 1869 F.Miescher  
➤ objev nukleových kyselin – obsažené v jádru

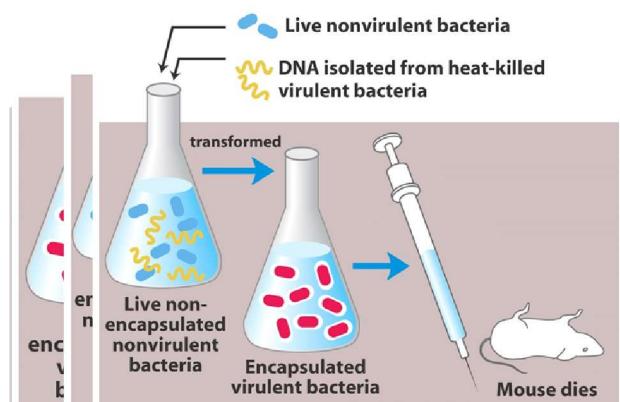
- 1909 A.Garrod  
➤ proteiny – důležitý materiál (choroby spojené s absencí urazitých enzymů)

- 1931 F.Griffith  
➤ princip genetické transformace, ale ...

chromosomy obsahují jak proteiny (ve velkém množství, 20 základních komponent), tak DNA (4 základní komponenty)

## Historie DNA

- 1924 Avery, MacLeod, McCarty  
➤ princip genetické transformace, ale ...  
➤ definitivní potvrzení principu genetické transformace



## Historie DNA

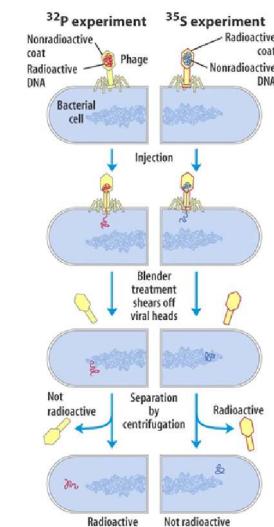
- 1944 O.T.Avery, C.MacLeod a

M.McCarty

- DNA – nositelka genetické informace (proenos DNA z virulentního kmene *S.pneumoniae* do avirulentního)

- 1952 A.D. Hershey a M.Chaseová

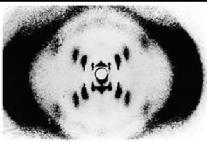
- DNA – nositelka genetické informace nutné pro replikaci viru



## Historie struktury DNA

1951 – Erwin Chargaff (1905-2002):

- experiment:
  - ✓ hydrolyza DNA z různých organismů na jednotlivé pyrimidiny a puriny
  - ✓ určení relativních koncentrací bází
- výsledky:
  - ✓ zastoupení bází je u různých organismů různé
  - ✓ DNA z různých tkání téhož organismu mají stejně složení
  - ✓ zastoupení bází daného druhu se nemá s věkem ani vlivem změny v jeho prostředí
  - ✓ **Chargaffovo pravidlo:**  $[A] = [T]$  a  $[G] = [C]$  ili  $[A]+[G] = [T]+[C]$  (pro libovolnou DNA)



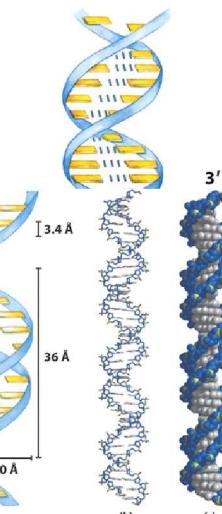
1950 – ... Rosalind E. Franklinová (1920-1958)

- RTG strukturní analýza DNA – DNA – vysoce organizovaná helikální struktura
- pohled na King's College London v listopadu 1951: "The results suggest a helical structure (which must be very closely packed) containing 2, 3 or 4 co-axial nucleic acid chains per helical unit, and having the phosphate groups near the outside."
- určení základních rozdílů šroubovice ze získaných dat
- 2 i více spletených vláken

## Historie struktury DNA

1953 L. Pauling a R.B. Corey

- navrhli model DNA struktury – trojšroubovici s cukrnofosfátovými ety zci uprostřed a bázemi exponovanými dovnitř prostoru



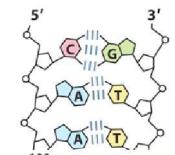
1953 J.D. Watson a F.H.C. Crick

- identifikace vodíkových místek A=T & G=C (Chargaffovo pravidlo)
- model dvoušroubovice odpovídající svými rozdíly RTG datu
- antiparalelní vlákna

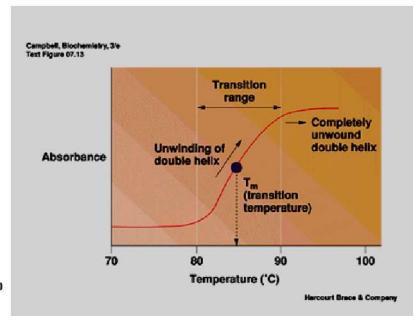
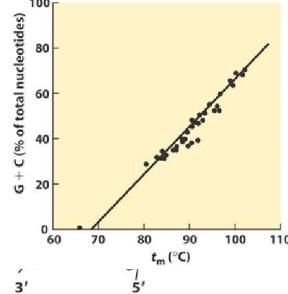
➢ 1962 – Nobelova cena

## Struktura DNA

➢ báze – UV absorpcí @ 260nm  
➢ DNA double helix – stacking



➢ tání dvoušroubovicové struktury  
➢ denaturace – renaturace  $T=T_m=20^\circ\text{C}$



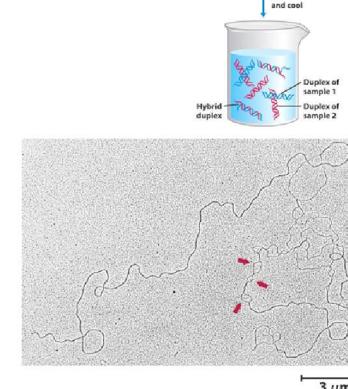
## Struktura DNA

Double-helical DNA  
Denaturation → Annealing

Partially denatured DNA

Separation of strands → Association of strands by base pairing

Separated strands of DNA in random coils



## Struktura DNA

- Watson-Crickovo párování basí
- model dvoušroubovice odpovídající svými rozměry RTG datům

Detailed description: This block contains two chemical diagrams. The top diagram shows a cross-section of the DNA double helix with four base pairs highlighted: Adenine-Thymine (A-T), Guanine-Cytosine (G-C), Adenine-Guanine (A-G), and Thymine-Cytosine (T-C). Below each pair is its chemical structure with bond lengths labeled: A-T (11.1 Å), G-C (10.8 Å), A-G (11.1 Å), and T-C (11.1 Å). The bottom diagram is a schematic of the DNA backbone with phosphate groups (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) and deoxyribose sugars.

## Struktura DNA

- malý a velký žlábek
- dv antiparalelní vlákna

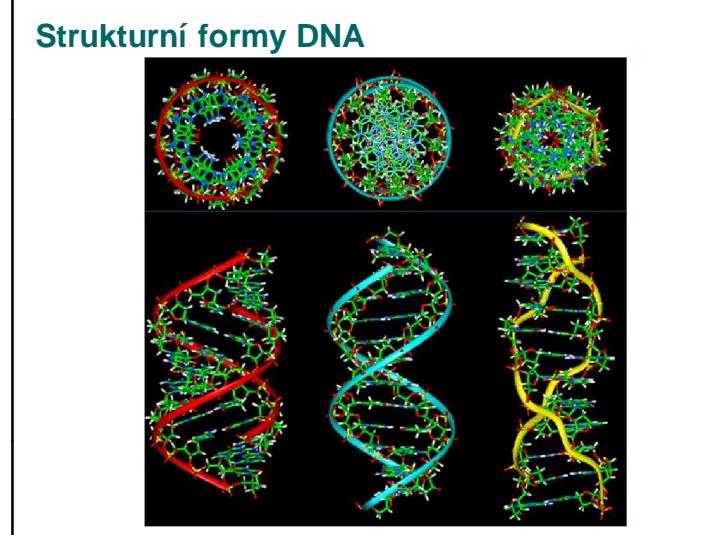
Detailed description: This block contains two diagrams. The left one is a detailed molecular view of the DNA double helix with labels for 'Hydrogen Bonding' and 'Base Stacking'. The right one is a space-filling model of the DNA molecule showing the 'Major Groove' and 'Minor Groove'. Below the diagrams is a sequence of nucleotides: 5' G C G C T A C A T T A T G C 3' and 3' C G C G A T C T A T A T A T G C 5'.

## Strukturní formy DNA

	A form	B form	Z form
Helical sense	Right handed	Right handed	Left handed
Diameter	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Base pairs per helical turn	11	10.5	12
Helix rise per base pair	2.6 Å	3.4 Å	3.7 Å
Base tilt normal to the helix axis	20°	6°	7°
Sugar pucker conformation	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo for pyrimidines; C-3' endo for purines Anti for pyrimidines; syn for purines
Glycosy bond conformation	Anti	Anti	Anti

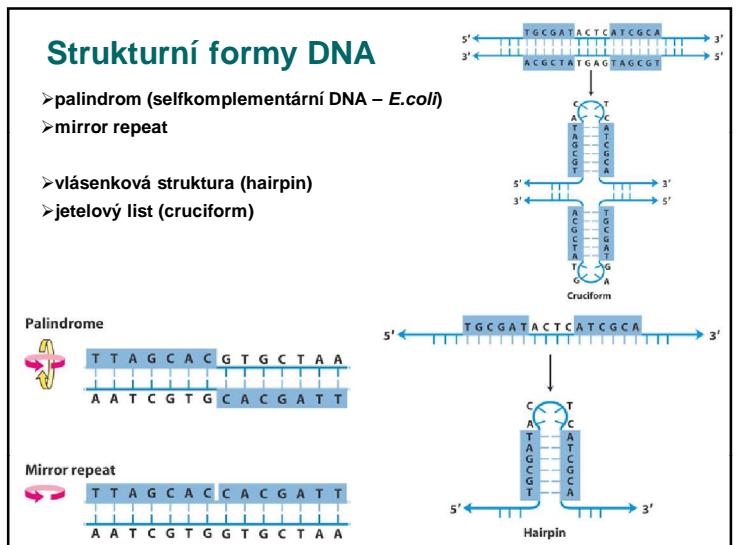
A – krystalická forma (dehydratovaná), pravd podobn nefyziologická  
B – fyziologická forma  
Z – v p ítomnosti kovových iont , alternující pyrimidin-purin – nespecifikovaná funkce v regulaci genové exprese i p i rekombinaci

Detailed description: This block contains a table comparing the structural parameters of A, B, and Z forms of DNA. It also includes text descriptions of each form and three 3D ball-and-stick models of the DNA molecules.



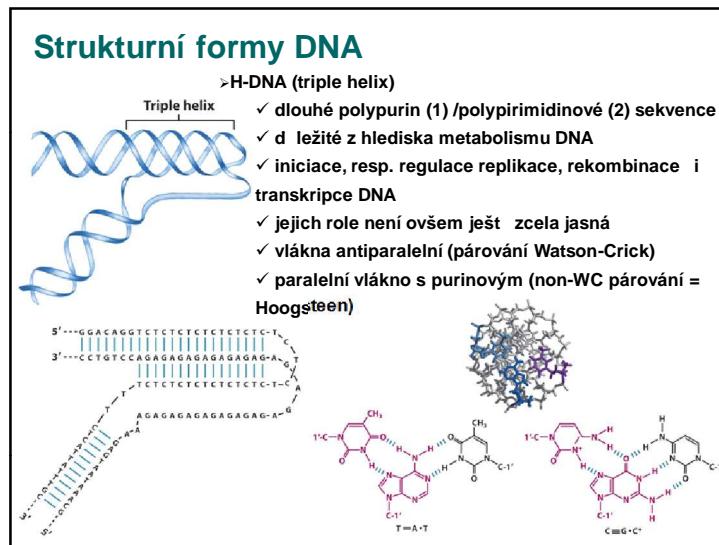
### Strukturní formy DNA

- palindrom (selfkomplementární DNA – *E.coli*)
- mirror repeat
  
- vlásenková struktura (hairpin)
- jetelový list (cruciform)



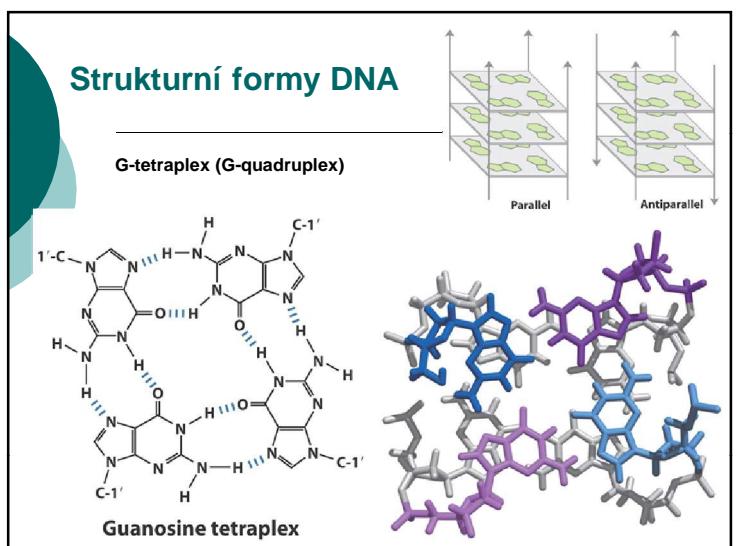
### Strukturní formy DNA

- H-DNA (triple helix)
- ✓ dlouhé polypyriminové (1) /polypirimidinové (2) sekvence
- ✓ d ležitě z hlediska metabolismu DNA
- ✓ iniciace, resp. regulace replikace, rekombinace i transkripcí DNA
- ✓ jejich role není ovšem ještě zcela jasná
- ✓ vlákna antiparalelní (párování Watson-Crick)
- ✓ paralelní vlákno s purinovým (non-WC párováním = Hoogsteen)



### Strukturní formy DNA

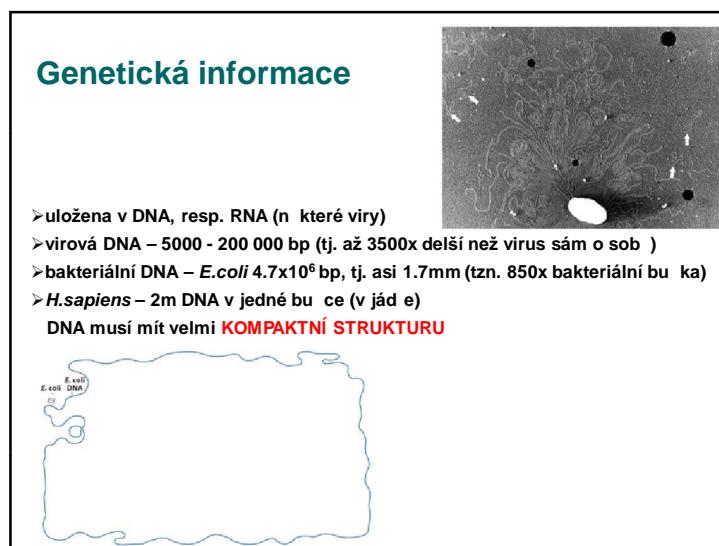
- G-tetraplex (G-quadruplex)



### Genetická informace

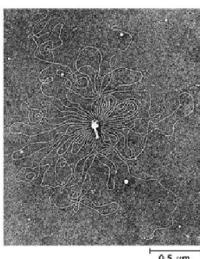
- uložena v DNA, resp. RNA (n které viry)
- virová DNA – 5000 - 200 000 bp (tj. až 3500x delší než virus sám o sob )
- bakteriální DNA – *E.coli*  $4.7 \times 10^6$  bp, tj. asi 1.7mm (tzn. 850x bakteriální bu ka)
- *H.sapiens* – 2 m DNA v jedné bu ce (v jád e)

DNA musí mít velmi **KOMPAKTNÍ STRUKTURU**



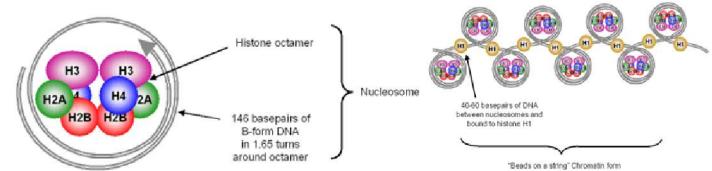
## Genetická informace

- bakterie – chromosom (cirkulární DNA) + plasmidy (extrachromosomalní DNA)
  - plasmidy – bakterie a kvasinky (rekombinantrní DNA – gen. ing. – GMO)
  - plasmidy – rezistence vůči antibiotikům
  - eukaryotní organismy – více chromosomů (diploidní)  
(nap. *Drosophila* – 8, volejba – 16, žába – 26, myš – 40, lev – 46, kuře – 78)
  - organely – vlastní DNA (mitochondrie ~20 000 bp, chloroplasty)
  - 95% mitochondriálních proteinů je kódováno nukleární DNA



## Sbalení eukaryotní DNA

- více úrovní
  - nukleosome – základní jednotka – DNA navinutá na histonech
  - nukleosomy - vyšší úrovn „sbalení“ – histonový oktamer
  - histony – proteiny H2A, H2B, H3 a H4
  - H3 a H4 (Arg) – konzervované
  - H2A a H2B – Lys
  - oktamer – 146 bp (otá ka -19bp)



## Genetická informace

**TABLE 24-2** DNA, Gene, and Chromosome Content in Some Genomes

	Total DNA (bp)	Number of chromosomes*	Approximate number of genes
Bacterium ( <i>Escherichia coli</i> )	4,639,221	1	4,405
Yeast ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	12,068,000	16†	6,200
Nematode ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	97,000,000	12‡	19,000
Plant ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	125,000,000	10	25,500
Fruit fly ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	180,000,000	18	13,600
Plant ( <i>Oryza sativa</i> ; rice)	480,000,000	24	57,000
Mouse ( <i>Mus musculus</i> )	2,500,000,000	40	30,000-35,000
Human ( <i>Homo sapiens</i> )	3,200,000,000	46	30,000-35,000

**Note:** This information is constantly being refined. For the most current information, consult the websites for the individual genome projects.

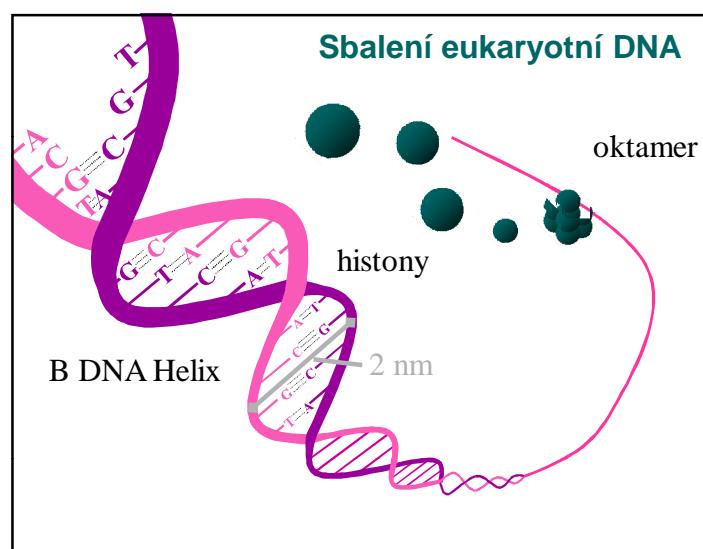
\*The diploid chromosome number is given for all eukaryotes except yeast.

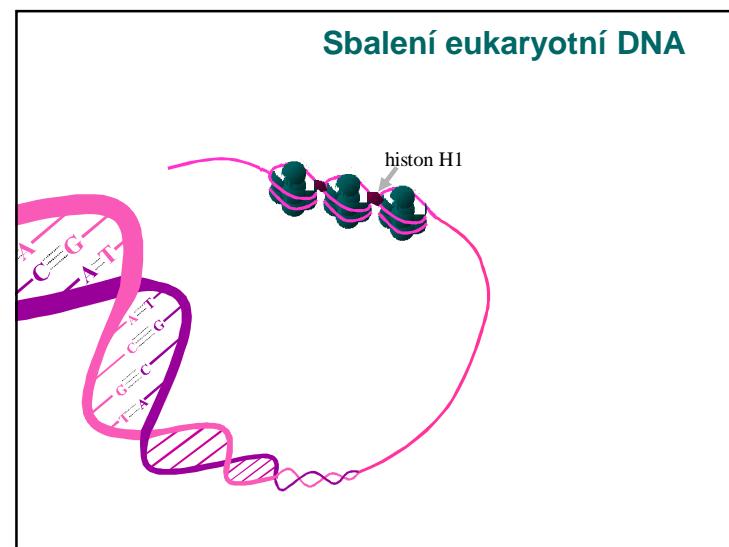
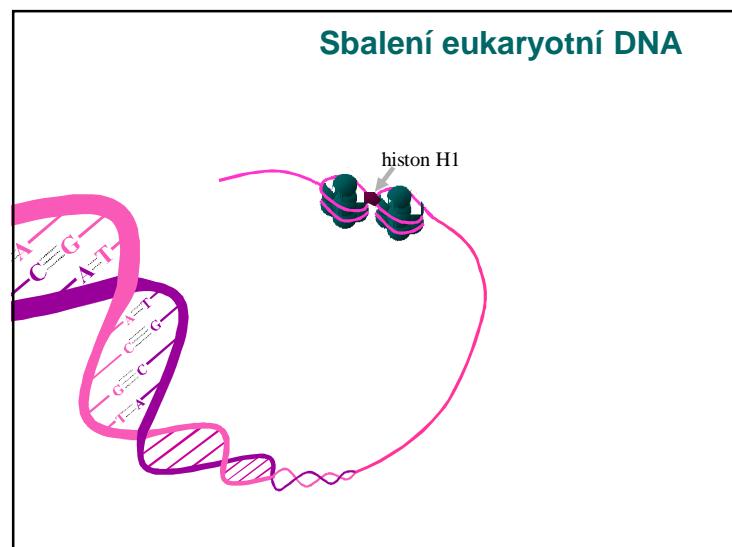
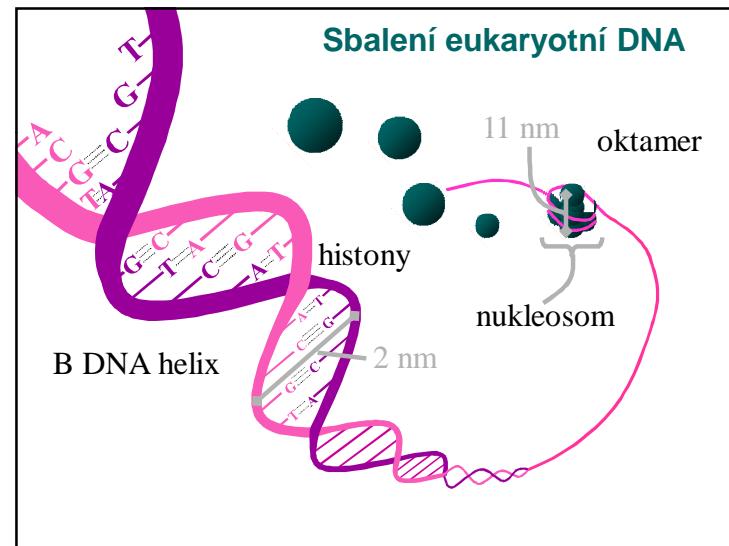
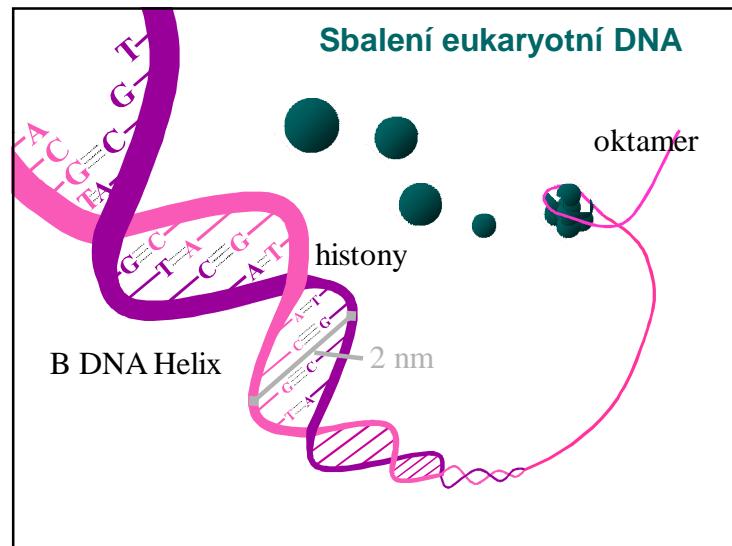
<sup>†</sup>Haploid chromosome number. Wild yeast strains generally have eight (octoploid) or more sets of these chromosomes.

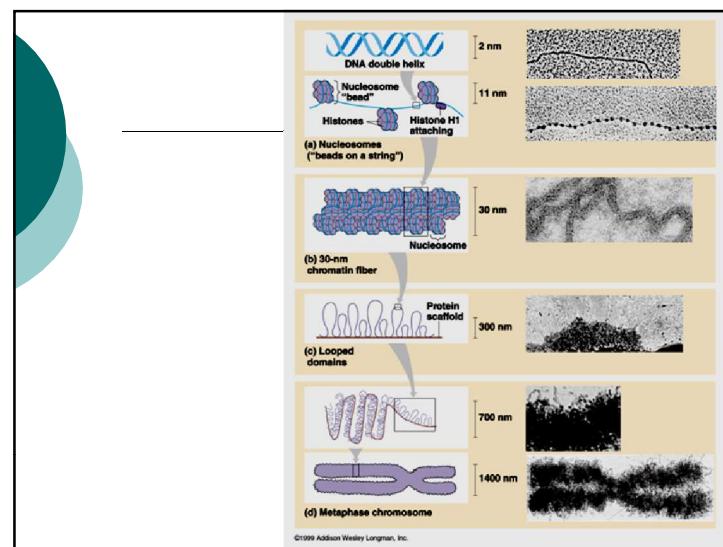
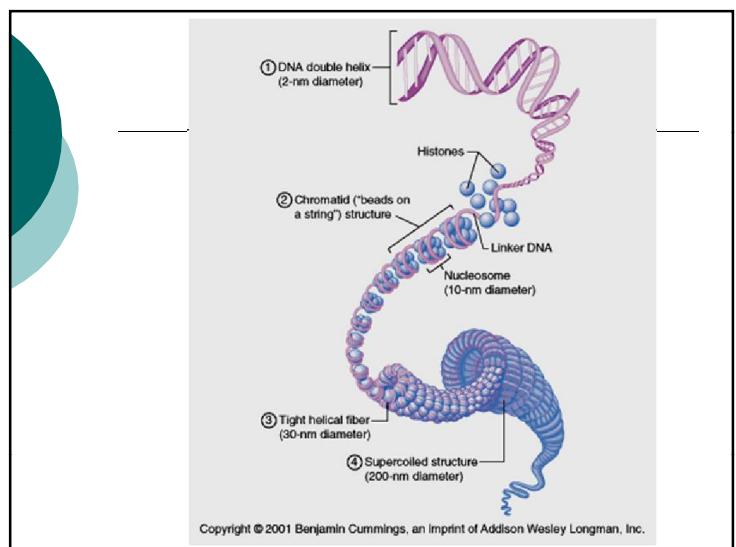
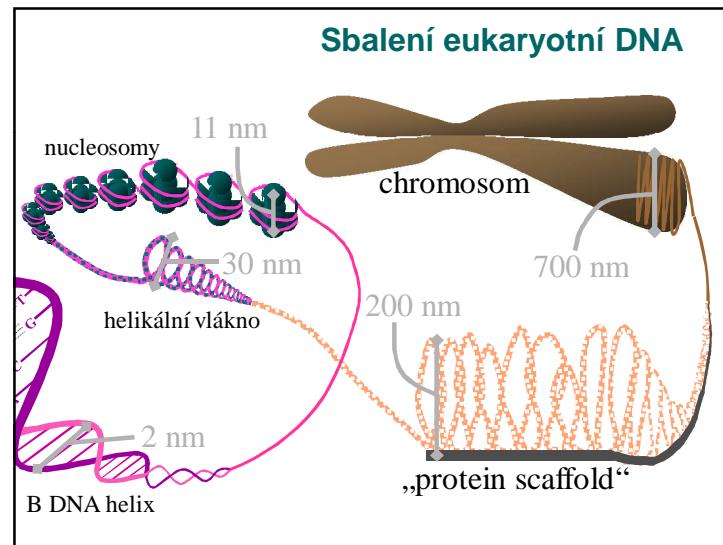
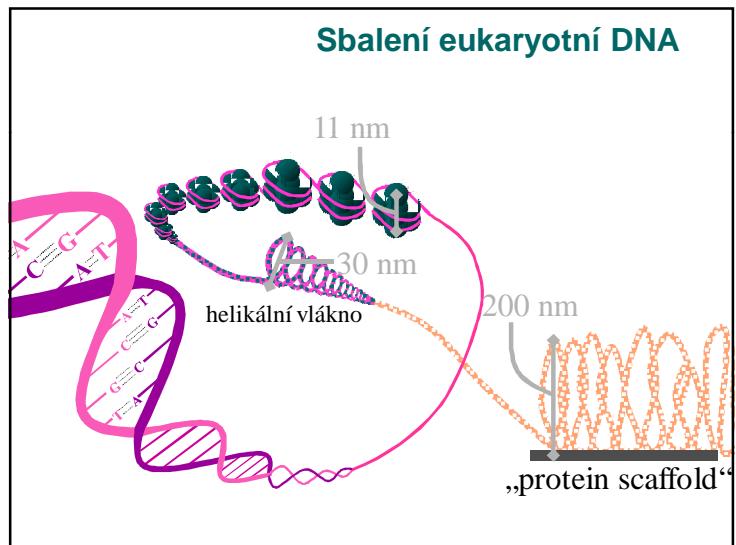
<sup>a</sup>Number for females, with two X chromosomes. Males have an X but no Y, thus 11 chromosomes in all.

**Há átko obecné** (*Caenorhabditis elegans*); **Huseník ek rolní** (*Arabidopsis thaliana*), také **chudina rolní**; **Octomilka obecná** (*Drosophila melanogaster*)

## Sbalení eukaryotní DNA







### Struktura RNA

- mRNA (matrice pro transkripcí)
  - ✓ polycistronní (prokaryotní organismy)
  - ✓ monocistronní (eukaryotní organismy)
  - ✓ intron-exonová struktura
  - ✓ 3'-polyA terminální doména (100-200)

Gen obsahuje ve své transkribované části oblasti pojedoucí po adi aminokyselin proteinu (exony) i oblasti nekjedoucí (introny) a nepřepisované oblasti na 3' konci (polyadenyla ní signál) a 5' konci (promotor).

(a) Monocistronic

(b) Polycistronic

**RNA Structure:**

### Struktura RNA

- neexistuje jednoduchá obecná sekundární struktura jako u DNA
- mž existovat A forma, B nebyla pozorována, Z jen v lab. podmínkách
- prostorová struktura RNA je unikátní podobná jako u proteinů (PDB)

**Figure 8.23b**  
Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

**RNA Structure:**

### Struktura RNA

M1 RNA z enzymu RNaza P z *E. coli* - modrou tečkou je označeno non-Watson-Crick párování, které je znázorněno v rámečku

**Chemical Structure:**

### Struktura RNA

- tRNA
- ✓ translace
- ✓ každá ze 20 AA – vlastní tRNA

**Legend:**

- R = Purine base
- Y = Pyrimidine base
- V = Pseudo-uridine
- 3' OH = 3' Acceptor stem

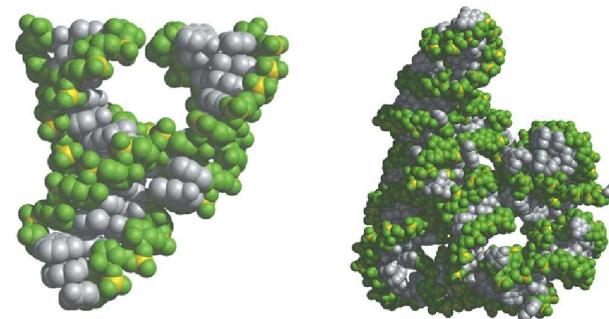
## Pseudouridin

Přeměna uridinu na pseudouridin i somerizaci

## Struktura RNA

➤ segment mRNA z *Tetrahymena thermophila* – asnatý prvek (intron&ribozyme)

➤ hammerhead ribozyme (Hammerhead = kladivoun)



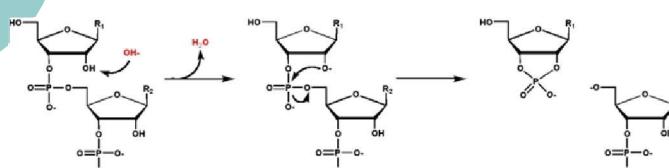
## Struktura RNA

- rRNA (ribosomální RNA)
  - ✓ ribosomy – translace
  - ✓ dv podjednotky (65% rRNA)
  - ✓ prokaryotické ribosomy – "70S" = "30S" + "50S" podjednotky
  - ✓ eukaryotní ribosomy – "80S" = "40S" + "60S" podjednotky
  - ✓ modifikované báze – pseudouridin, inosin, aj.
- snRNA (small nuclear RNA)
  - ✓ 100-200 bp
  - ✓ v jád e – komplex s proteiny
  - ✓ ribonukleoproteinové ástice
  - ✓ zpracování transkriptu eukaryotního genu do maturované mRNA

## RNA versus DNA

➤ 2'-OH x 2'-H

✓ fosfodiesterová vazba v RNA je labiln jší (hydrolýza)



➤ U x T

Pokud by U byl použit v DNA, replika ní systém by nev d l, zda se jedná o „skute ný“ U, nebo zda vznikl deaminací C a tím by mohly vzniknout chyby v p episu

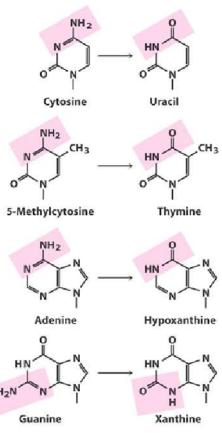
## Neenzymatické změny nukleových kyselin a nukleotid

➤ mutace – spontánní změny kovalentní struktury (velmi pomalé, ale...)

➤ deaminace

➤ C  $1/10^7$  za 24h, tj. v savé říbu cca 100x za den)

➤ A, G – stokrát nižší frekvence



➤ U → T

✓ spontánní deaminace C → U

✓ systém ale U koriguje na C

✓ U proto v DNA nesmí být

✓ záměna U za T v DNA

- země podstatná evoluční inovace

## Neenzymatické změny nukleových kyselin a nukleotid

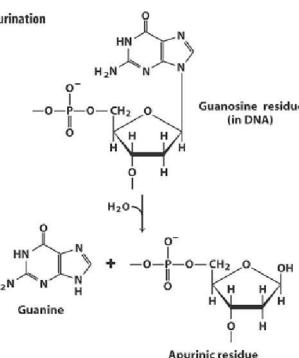
➤ depurinace (štěpení N-glykosidické vazby)

➤ mnohem rychleji u purinových bas

➤ 1/10<sup>5</sup> za 24h, tj. v savé říbu cca 10 000x za den

➤ u RNA pomalejší

➤ u RNA fyziologicky nevýznamné

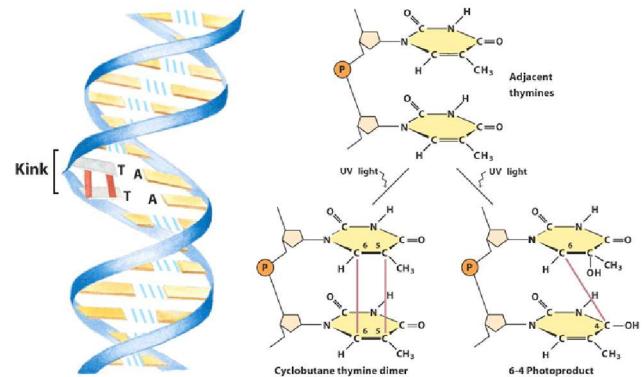


## Neenzymatické změny nukleových kyselin a nukleotid

➤ radikální poškození (cca 10% DNA změn způsobených environmentálními vlivy)

➤ UV záření

➤ ionizující záření otevírá cyklus, štěpení ostatních kovalentních vazeb

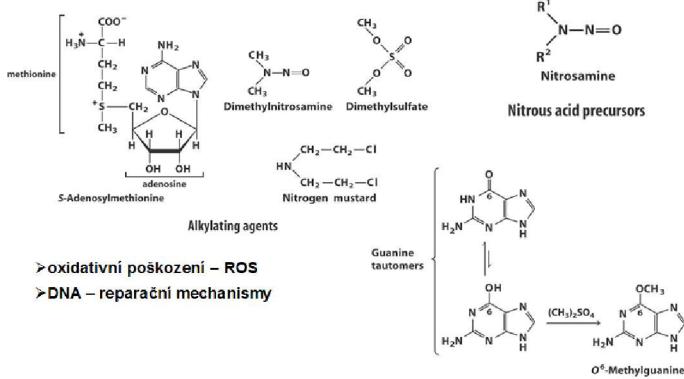


## Neenzymatické změny nukleových kyselin a nukleotid

➤ poškození vlivem reaktivních chem. látak

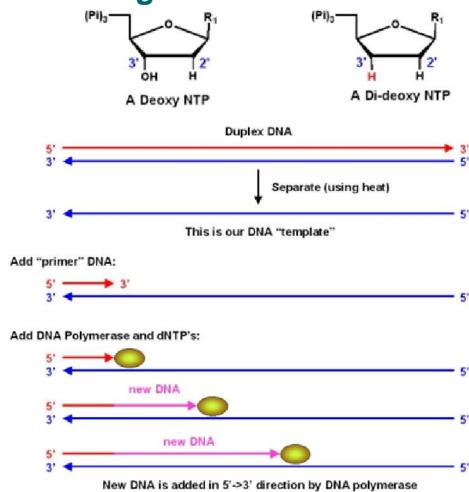
➤ HNO<sub>2</sub> (konzervant)

➤ alkylační činidla



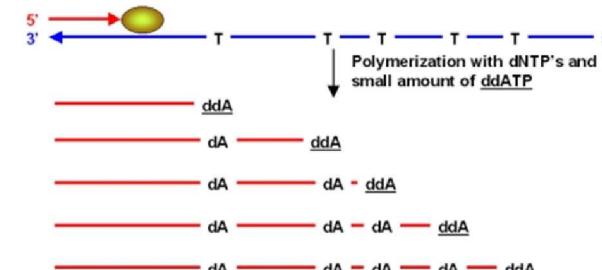
## Sekvenování DNA - Sanger

- DNA templát
- primer
- dNTP
- ddNTP
- DNA polymerasa
- elektroforéza



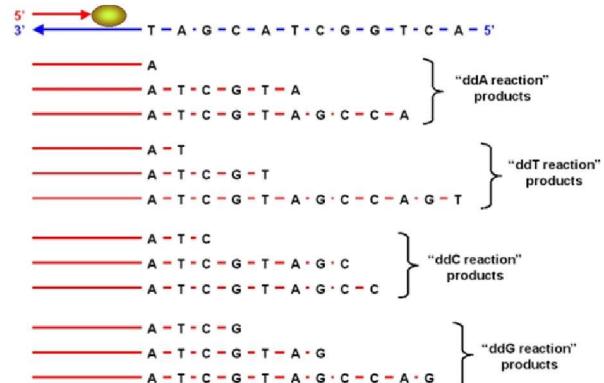
## Sekvenování DNA - Sanger

Location of Thymine bases in DNA template

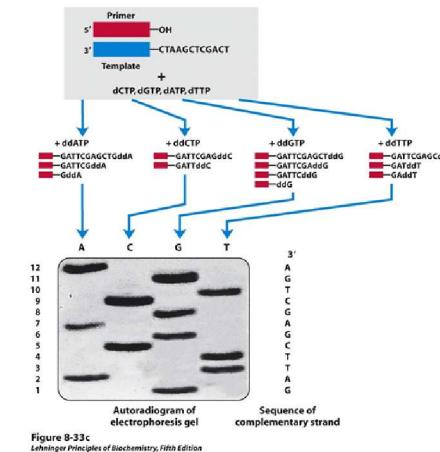


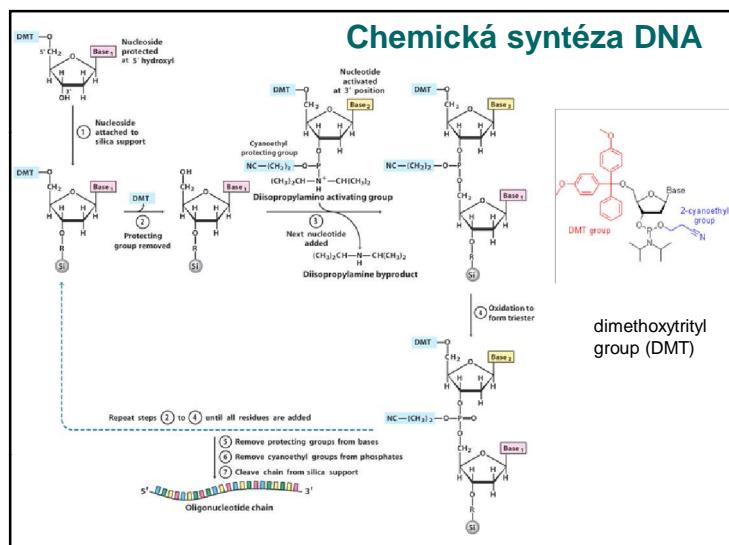
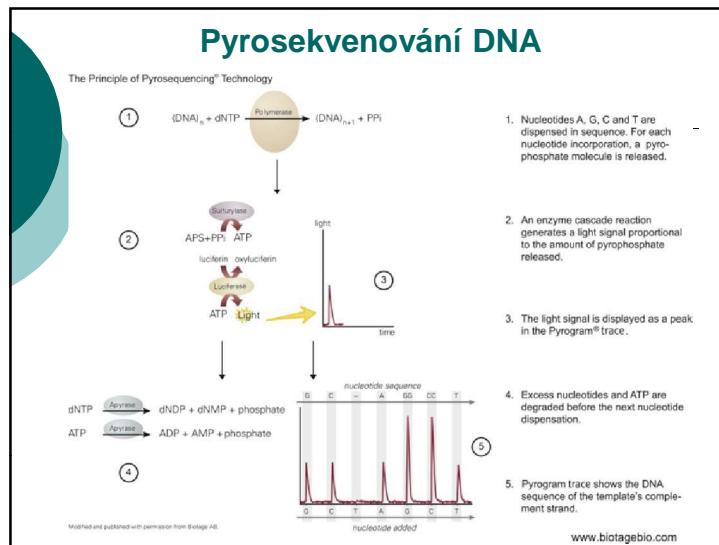
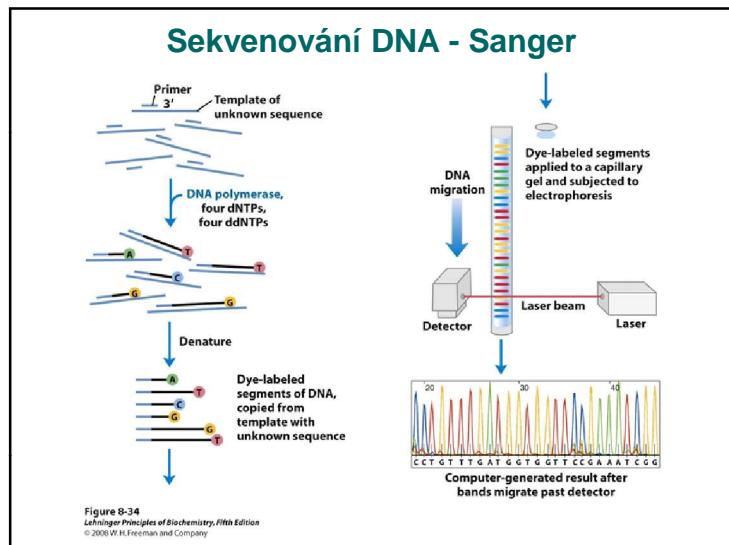
Collection of fragments of newly synthesized DNA:  
They all end in ddA at locations of complementary T bases in the template

## Sekvenování DNA - Sanger



## Sekvenování DNA - Sanger





### Genetické inženýrství – technologie rekombinantní DNA

#### genomika & proteomika

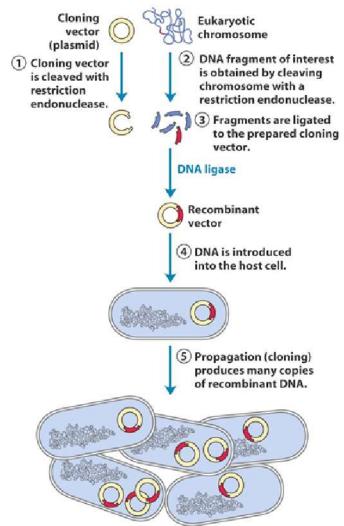
- studium genů a proteinů na buněčné úrovni i úrovni organismu

**klon** – identická kopie

**klonování DNA**

- selektivní amplifikace genu i DNA segmentu
- zahrnuje 5 kroků :
  - specifické vystřílení DNA (restrikční endonukleasy)
  - výběr vektoru - DNA schopné samoreplikace (plasmid, virální DNA)
  - vytvoření rekombinantní DNA
  - transformace buněk (replikativní mašinérie)
  - identifikace buněk obsahujících rekombinantní DNA

## Genetické inženýrství – technologie rekombinantní DNA



## Enzymatická hydrolyza nukleových kyselin

- endonukleasy
- exonukleasy

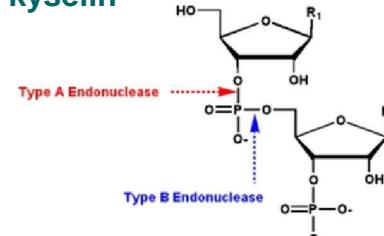
restrikční endonukleasy:

- typ I & III

- ✓ spotřeba ATP
- ✓ měření methylovat NA
- ✓ I (random) x III (specifická sekvence)

- typ II

- ✓ sekvenční specifické – typicky palindrom
- ✓ ATP – NE
- ✓ methylace – NE
- ✓ tupý-blunt x lepivý-sticky konec (3' i 5' plesa)



## Restrikční endonukleasy

např. EcoRI

➢ izolována z *E.coli*

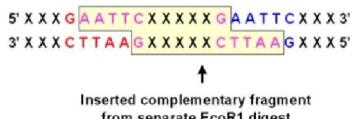
➢ palindrom „GAATTC“



➢ sticky – 5' overhang



➢ fragmenty vzájemně kompatibilní



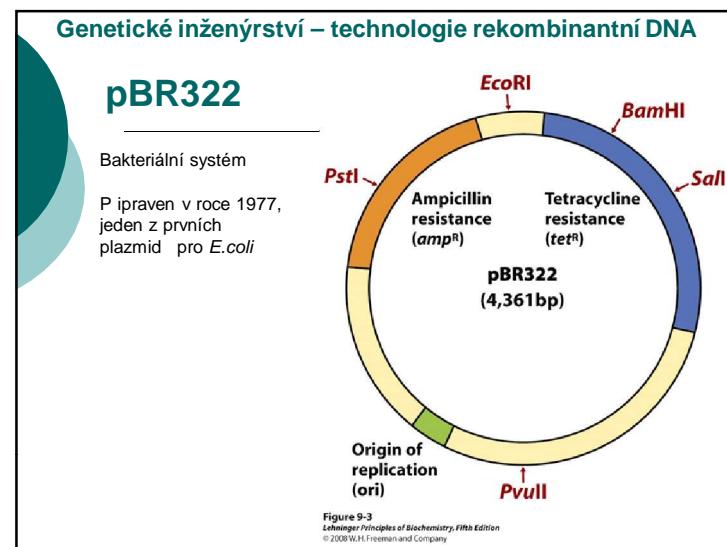
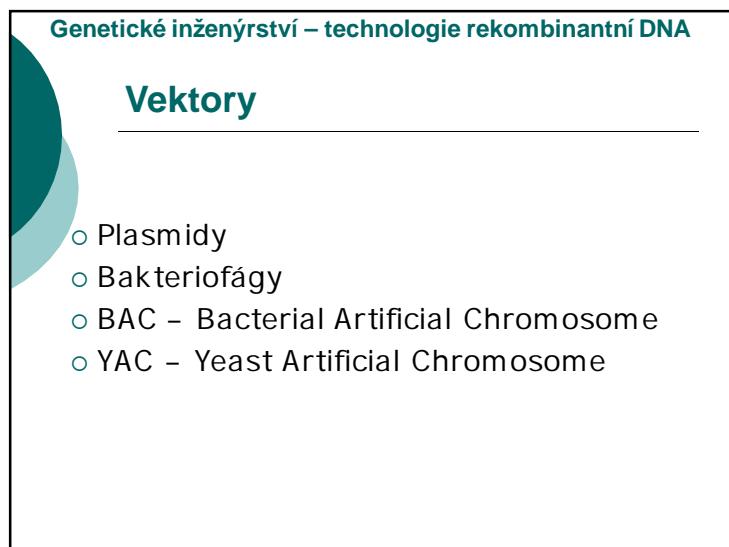
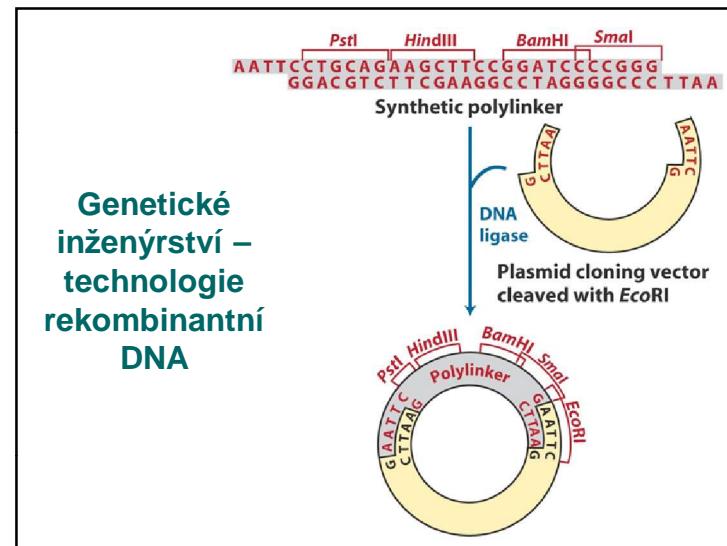
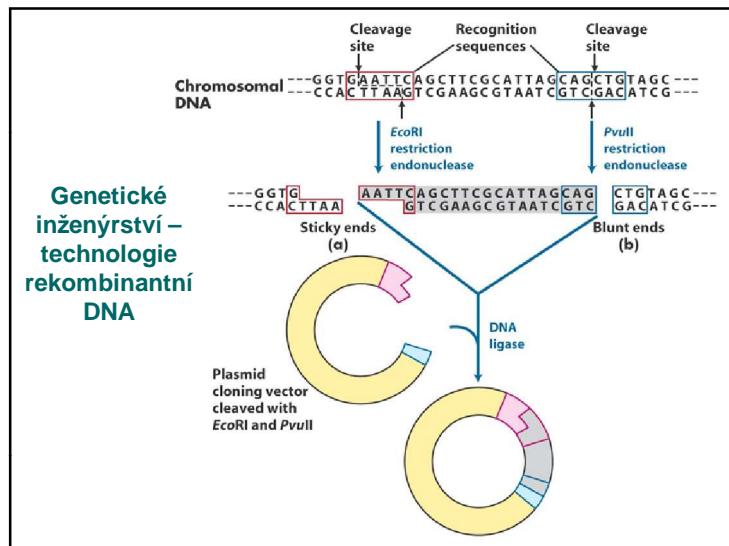
## Genetické inženýrství – technologie rekombinantní DNA

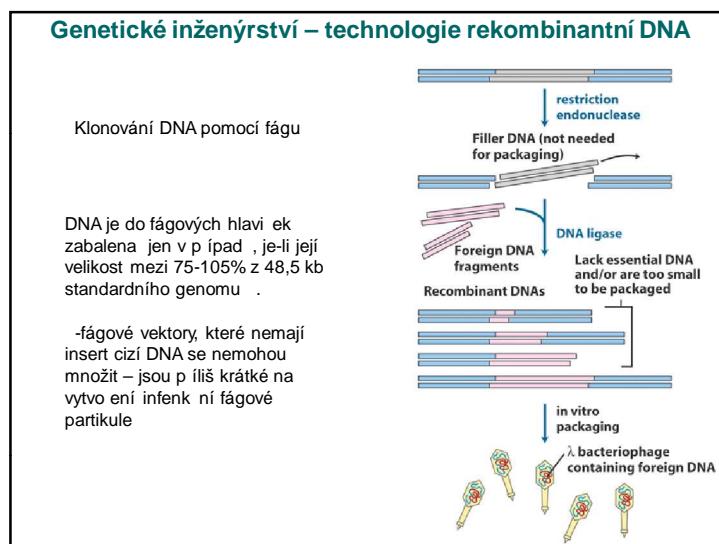
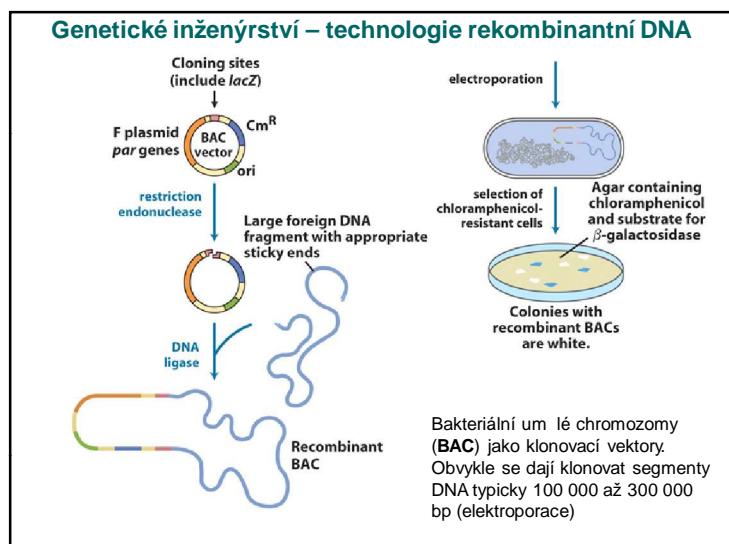
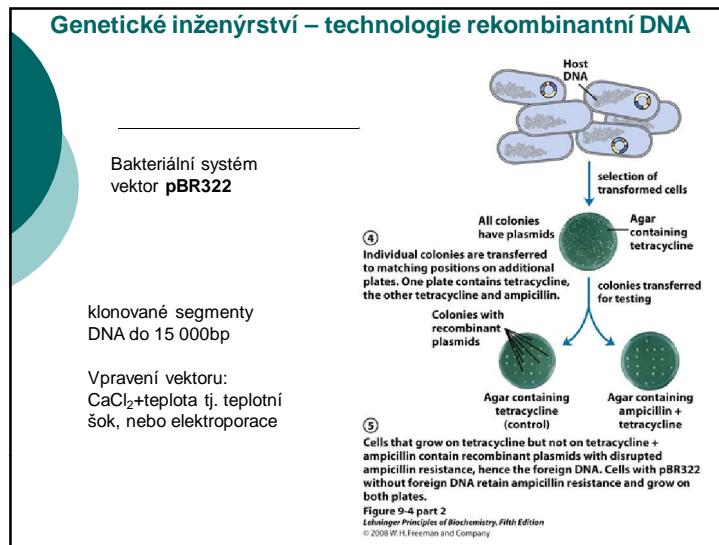
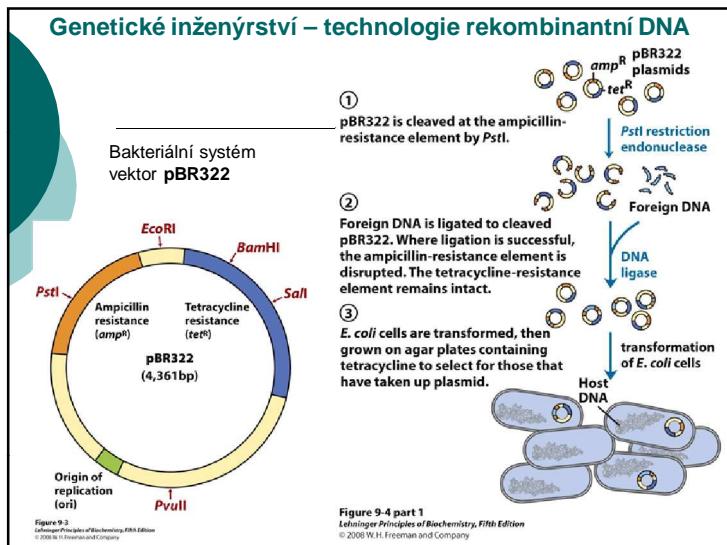
TABLE 9-1 Some Enzymes Used in Recombinant DNA Technology

Enzyme(s)	Function
Type II restriction endonucleases	Cleave DNAs at specific base sequences
DNA ligase	Joins two DNA molecules or fragments
DNA polymerase I ( <i>E. coli</i> )	Fills gaps in duplexes by stepwise addition of nucleotides to 3' ends
Reverse transcriptase	Makes a DNA copy of an RNA molecule
Polynucleotide kinase	Adds a phosphate to the 5'-OH end of a polynucleotide to label it or permit ligation
Terminal transferase	Adds homopolymer tails to the 3'-OH ends of a linear duplex
Exonuclease III	Removes nucleotide residues from the 3' ends of a DNA strand
Bacteriophage λ exonuclease	Removes nucleotides from the 5' ends of a duplex to expose single-stranded 3' ends
Alkaline phosphatase	Removes terminal phosphates from either the 5' or 3' end (or both)

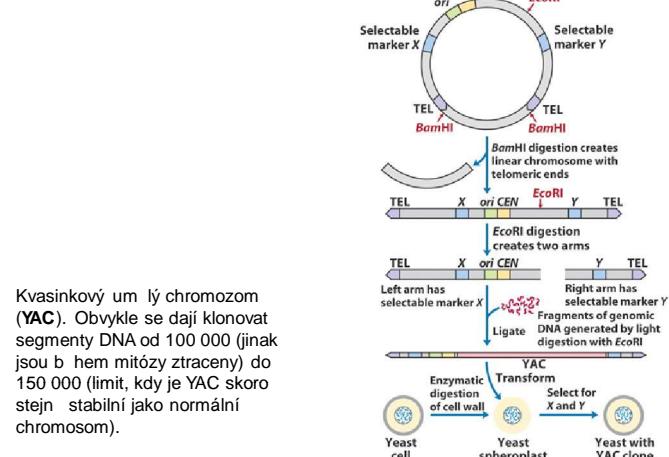
TABLE 9-2 Recognition Sequences for Some Type II Restriction Endonucleases

BamHI	(5') G G A T C (3') C C T A G G ↓ ↑	HindIII	(5') A A G C T T (3') T T C G A A ↓ ↑
ClaI	(5') A T C G A T (3') T A G C T A ↓ ↑	NotI	(5') G C G G C C G G (3') C G C C G G C G ↓ ↑
EcoRI	(5') G A A T T C (3') C T T A A G ↓ ↑	PstI	(5') C T G C A G (3') G A C G T C ↓ ↑
EcoRV	(5') G A T A T C (3') C T A T A G ↓ ↑	PvuII	(5') C A G C T G (3') G T C G A C ↓ ↑





### Genetické inženýrství – technologie rekombinantní DNA



### Použití hybridizace k identifikaci klonu s vybraným DNA segmentem

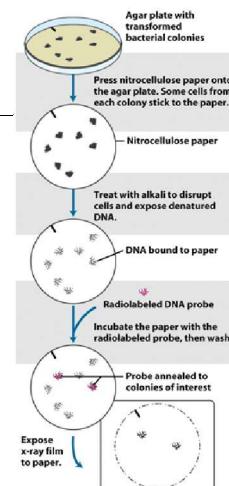
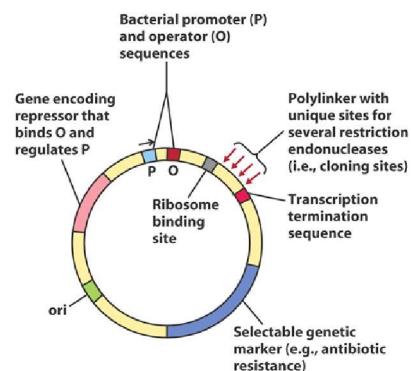
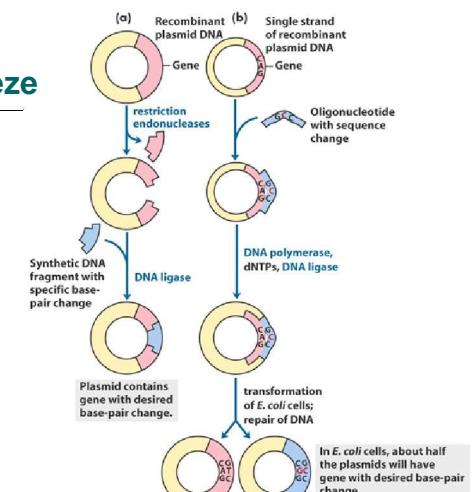


Figure 9-8  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

### Expresní vektory



### Mutageneze



### Použití značených proteinů k purifikaci

**Figure 9-12b**  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

TABLE 9-3	Commonly Used Protein Tags	
Tag protein/peptide	Molecular mass (kDa)	Immobilized ligand
Protein A	59	Fc portion of IgG
(His) <sub>6</sub>	0.8	Ni <sup>2+</sup>
Glutathione-S-transferase (GST)	26	Glutathione
Maltose-binding protein	41	Maltose
β-Galactosidase	116	p-Aminophenyl-β-D-thiogalactoside (TPEG)
Chitin-binding domain	5.7	Chitin

**Table 9-3**  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

**Glutathione-S-transferase (GST)**

Figure 9-12a  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

**Glutathione (GSH)** je tripeptid složený z aminokyselin kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu, nacházející se v buňkách živořících rostlin i bakterií. Je přítomen v mase, zelenině i ovoci a chrání organismus před oxidačním stresem (podílí se na odstranění peroxidu vodíku). Je obnovován reakcí katalyzovanou glutathionreduktasou. Jako glutathionemie se označuje zvýšená hladina glutathionu v krvi, jakožto známka vývoje některých chorob.

**Amplifikace DNA pomocí PCR**

**Region of target DNA to be amplified**

**PCR – Polymerase Chain Reaction**

### Amplifikace DNA pomocí PCR

Repeat steps ① and ②.

### Amplifikace DNA pomocí PCR

DNA synthesis (step ③)  
is catalyzed by the  
thermostable DNA  
polymerase (still present).

### Amplifikace DNA pomocí PCR

① Heat to separate strands.  
② Anneal primers containing noncomplementary regions with cleavage site for restriction endonuclease.

Repeat steps ① through ③.

After 25 cycles, the target sequence has been amplified about  $10^6$ -fold.

### Genetické inženýrství – technologie rekombinantrní DNA

Wounded plant cell produces acetosyringone.

Acetosyringone activates *vir* genes.

Copy of T-DNA is transferred and integrated into a plant chromosome.

Plant cell synthesizes auxins, cytokinins, opines; tumor forms.

Agrobacterium cell

(a) Ti plasmid without T-DNA

(b) Recombinant plasmid with foreign gene and kanamycin-resistance gene between T-DNA 25 bp repeats 25 bp repeats

Kanamycin resistance Foreign gene

Bacteria invade at wound sites (where leaf is cut).

Leaf segments are transferred to agar dish.

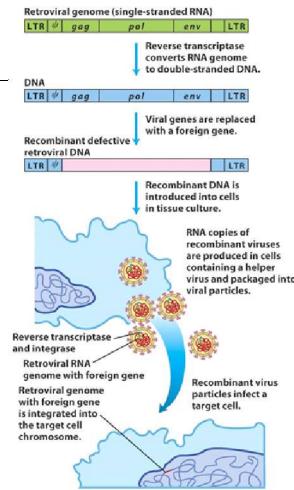
Agar plate with growth hormones and kanamycin

Plants are regenerated from leaf segments.

These kanamycin-resistant plants contain the foreign gene.

### Genetické inženýrství – technologie rekombinantní DNA

Retrovirové vektory transformované do tkáníových kultur



### Genetické inženýrství – technologie rekombinantní DNA

- Transgenní rostlinka tabáku exprimující gen pro luciferasu
- Transgenní myš exprimující gen pro lidský r stový hormon



### Nobelova cena za chemii v roce 2020

„za vývoj metody pro editaci genomu.“



Emmanuelle Charpentier  
(1968)  
1/2 Nobelovy ceny  
Max Planck Unit for the  
Science of Pathogens,  
Berlin, Nemecko

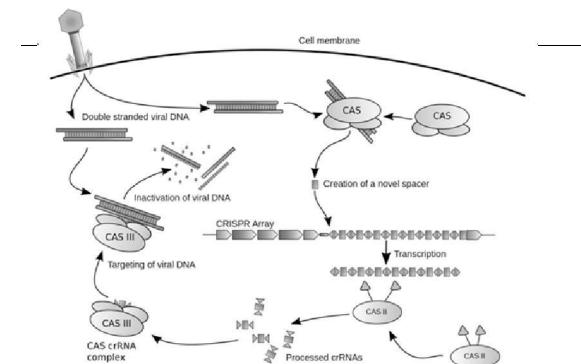


Jennifer A. Doudna  
(1964)  
1/2 Nobelovy ceny  
University of  
California, Berkeley  
USA

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. A programmable dual -RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337 (2012) 816–821.

### Schéma CRISPR prokaryotické antivirově obrany

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)



CRISPR/Cas systém je **prokaryotický imunitní systém**, který zajišťuje rezistenci v i cizím genetickém element m, jako jsou plastidy nebo fágy, a p edstavuje tedy formu získané imunity.

