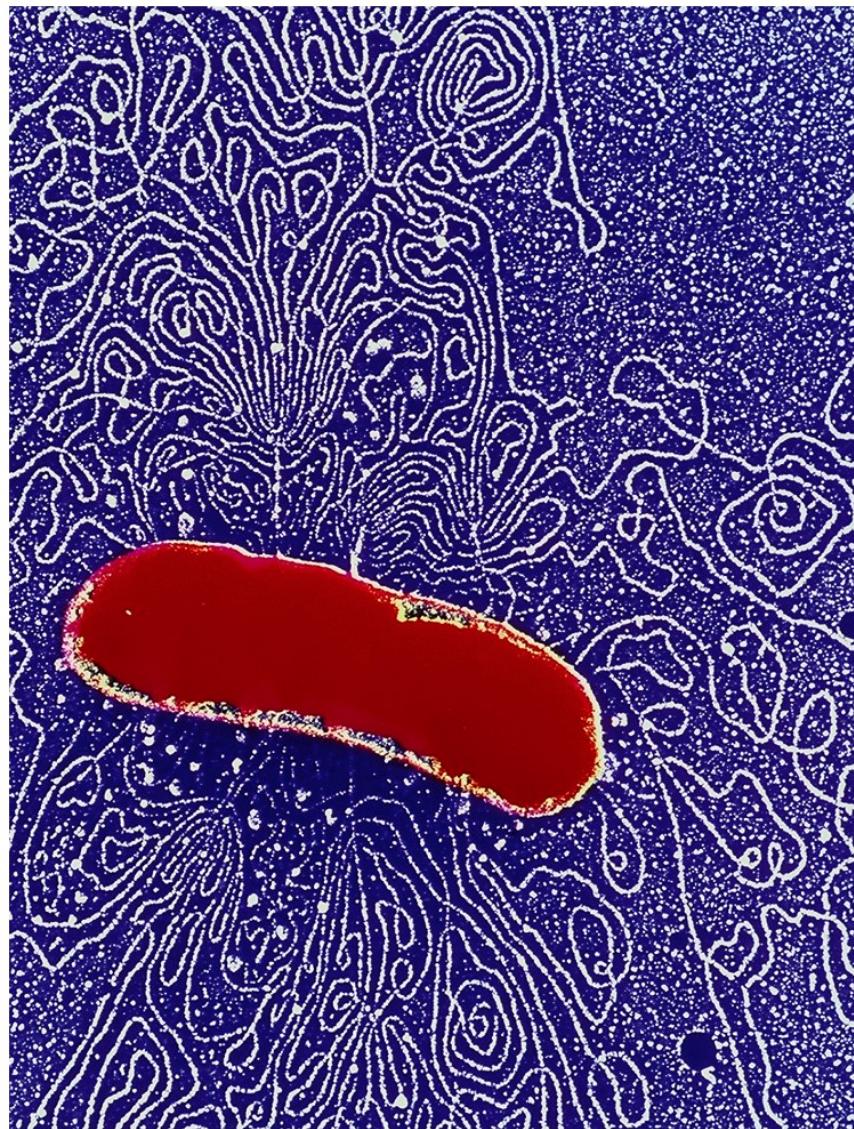
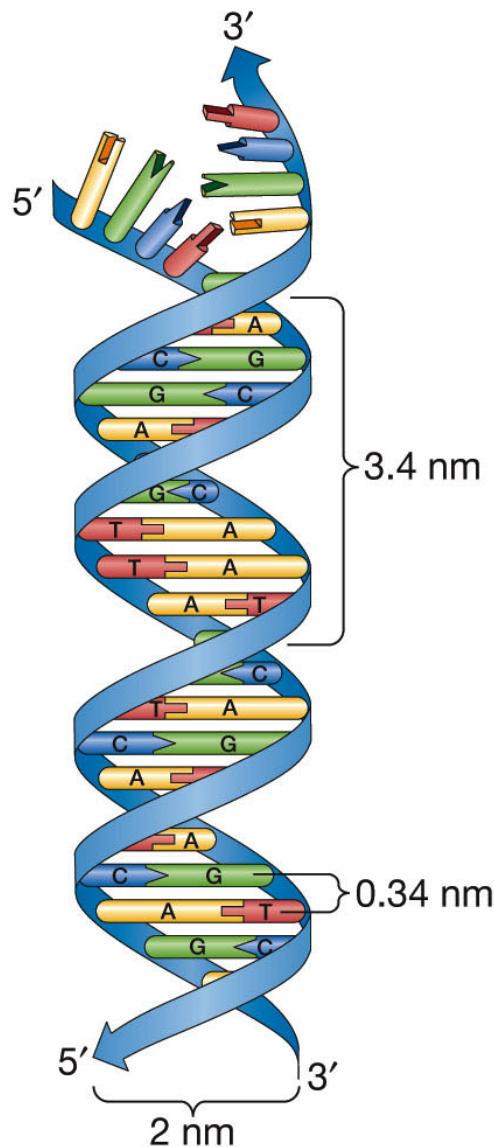


DNA a jej úloha v dedičnosti



Program prednášky:

Aké sú dôkazy, že DNA je genetickým materiálom?

Aká je štruktúra DNA?

Ako je DNA replikovaná?

1920: Chromozómy sú zložené z DNA a proteínov



**Fridrich Miescher
(1844-1885)**

Izolácia **nukleínu** z leukocytov

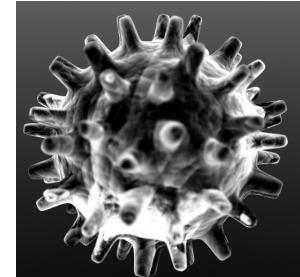
Aká je celková dĺžka DNA v aktuálne existujúcich organizmoch?

Vzdialenosť medzi 2 nukleotidmi: 0.3×10^{-12} km

Počet vírusových častíc v oceánoch: 10^{30}

Priemerná dĺžka vírusového genómu: 10^4 bp

Celková dĺžka vírusovej DNA: 10^{22} km

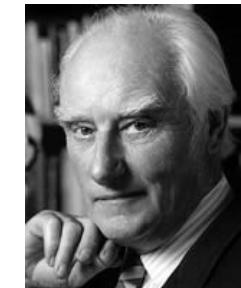


Počet ľudí: 7×10^9

Počet buniek / 1 človeka: 10^{13}

Dĺžka ľudského genómu: $2 \times 3 \times 10^9$ bp

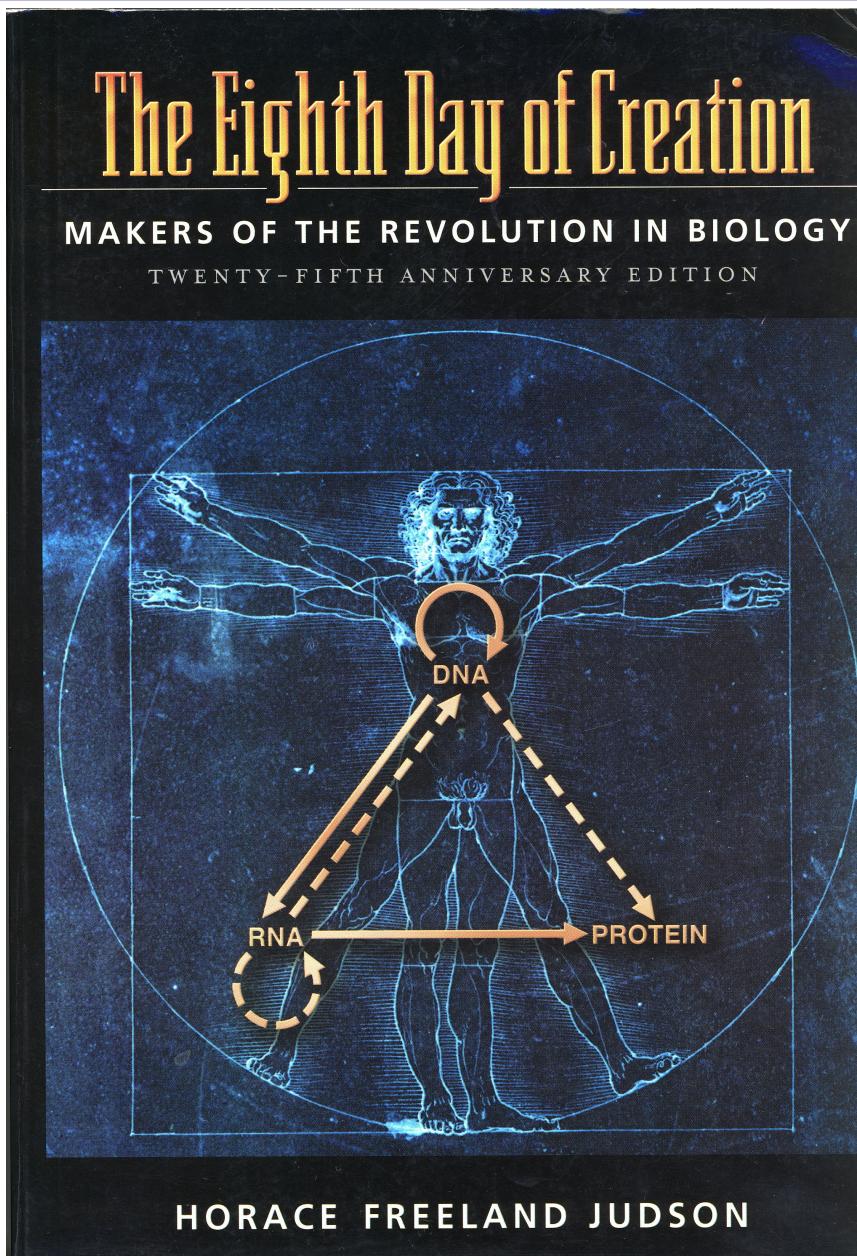
Celková dĺžka ľudskej DNA: 10^{20} km



Celkové množstvo DNA v biosfére: 5×10^{10} ton

Celková dĺžka DNA: 10^{25} km = 10^{12} svetelných rokov
= 10 dĺžok vesmíru

H.F.Judson: *The Eighth Day of Creation* Fascinujúci
príbeh molekulárnej biológie



Frederick Griffith experimentom z roku 1928 identifikoval
“transformačný princíp” u *Staphylococcus pneumoniae*

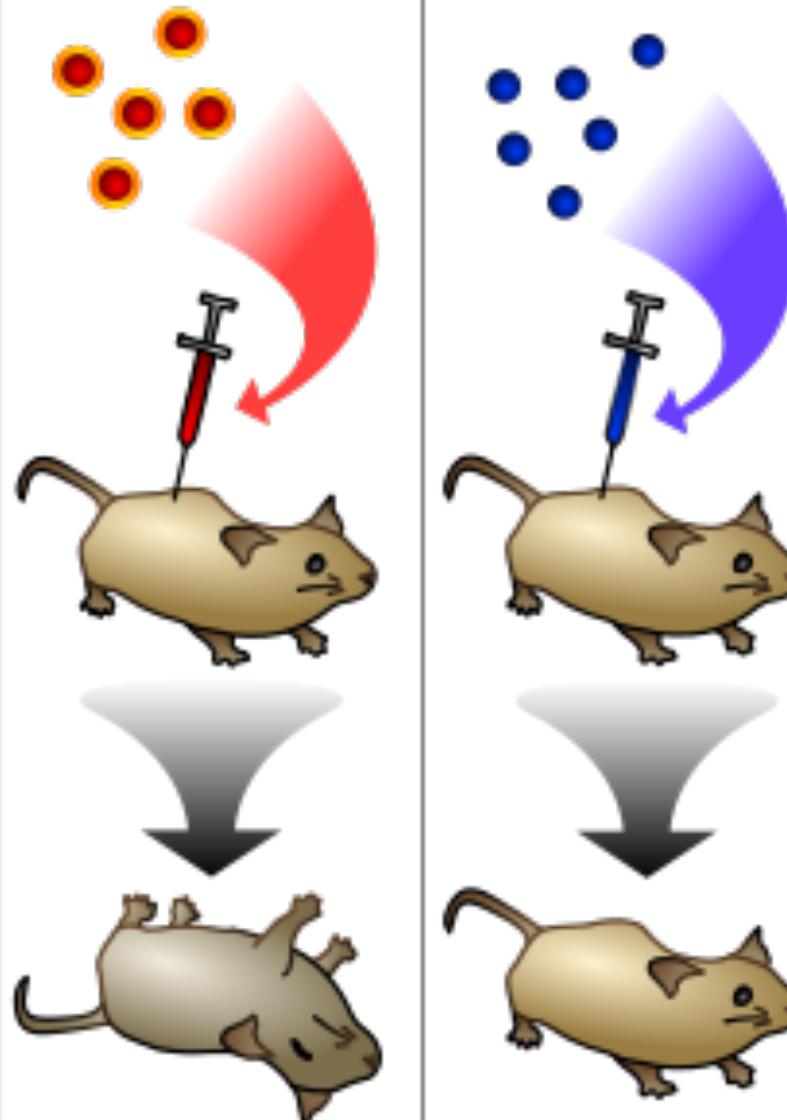


(1879–1941)

Dva kmene *Staphylococcus pneumoniae*: S (*smooth*) je virulentný, R (*rough*) je aviruletný

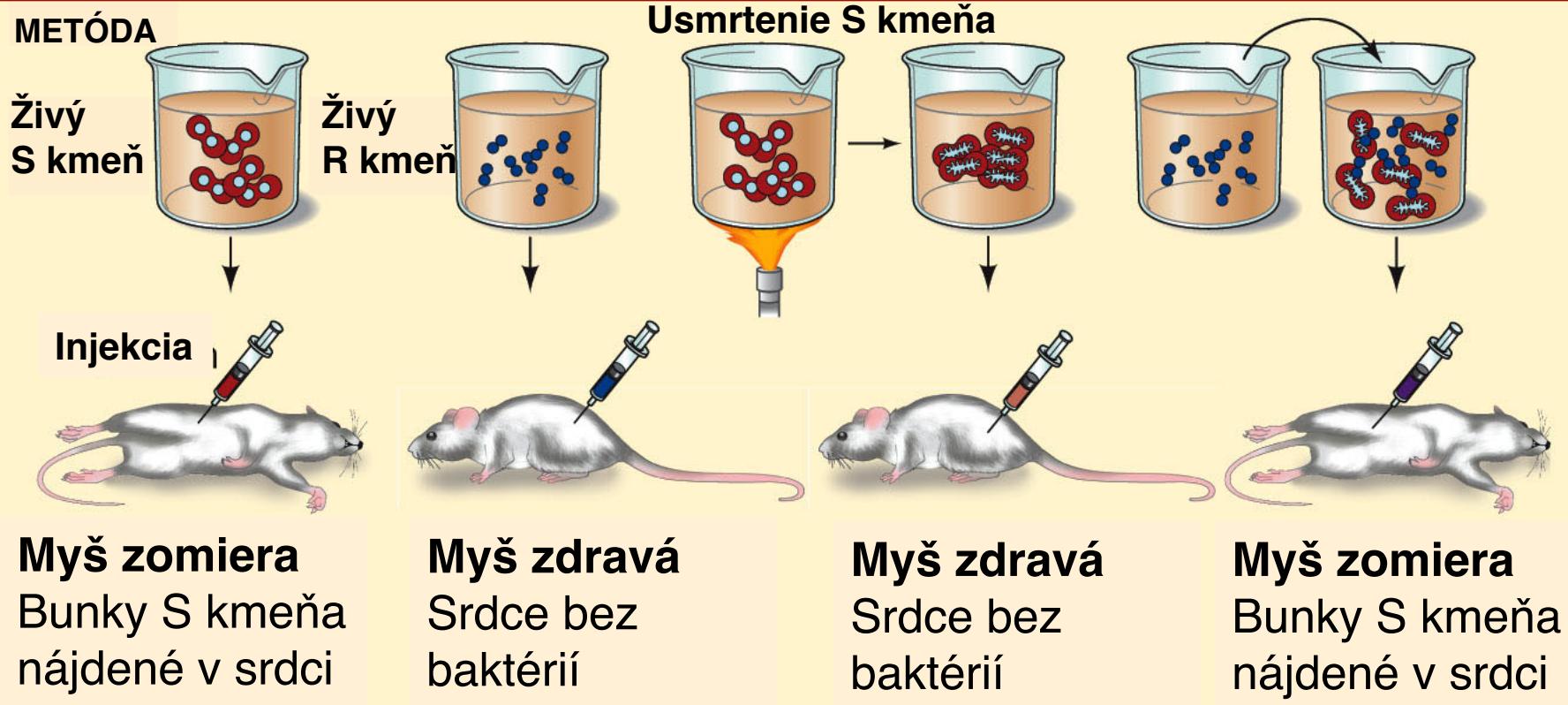
V tele pacientov sa často vyskytujú oba kmene. Znamená to, že jeden sa môže meniť (transformovať) na druhý?

S (*smooth*) R (*rough*)



Frederick Griffith experimentom z roku 1928 identifikoval "transformačný princíp" u *Staphylococcus pneumoniae*

HYPOTÉZA: Materiál prítomný v mŕtvych baktériach je schopný transformovať živé bunky baktérií



ZÁVER: Chemická substancia prítomná v bunkách je schopná po prenose do iných buniek indukovať v nich dedičné zmeny

Oswald Theodore Avery, Colin Munro MacLeod, Maclyn McCarty testujú chemickú povahu “transformačného princípu”



(1877-1955)



(1909-1972)

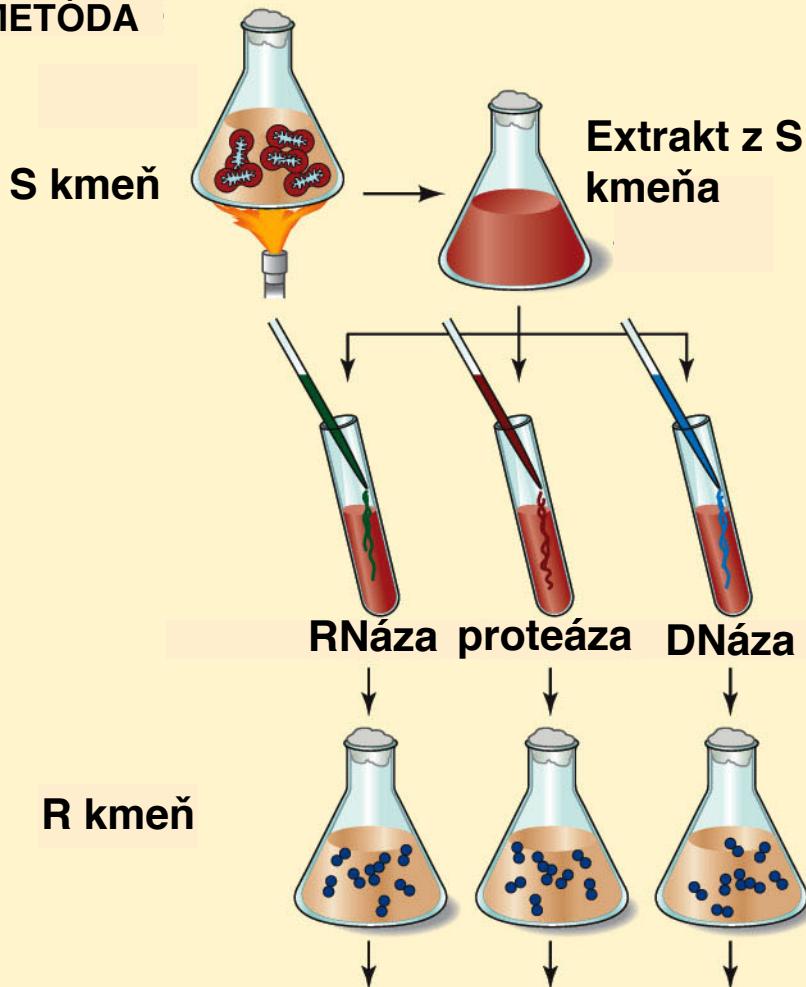


(1911-2005)

1944: Avery, MacLeod a McCarthy dokazujú,
že “transformačný princíp je” DNA

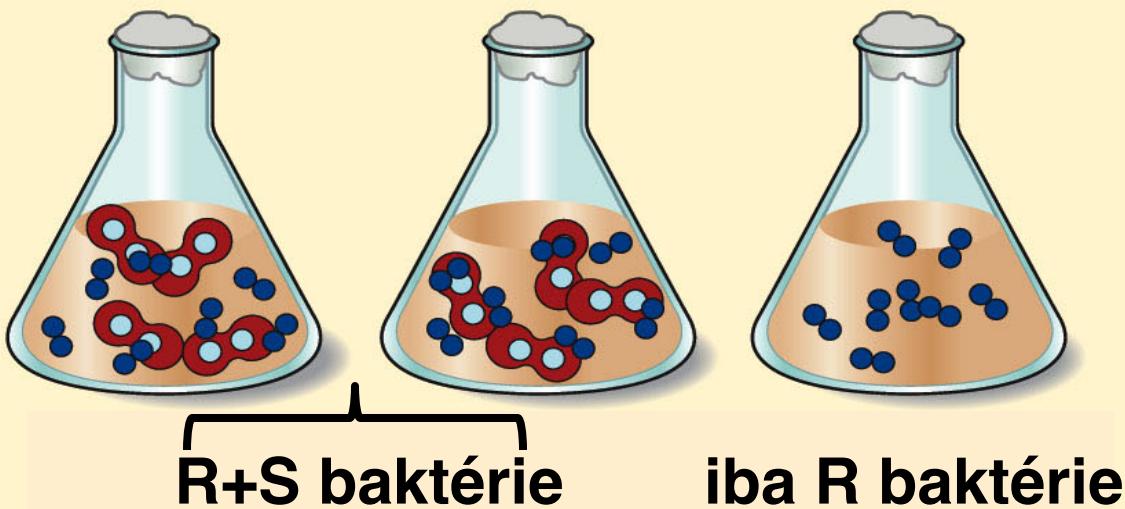
HYPOTÉZA: Chemická substancia transformujúca baktérie je DNA

METÓDA



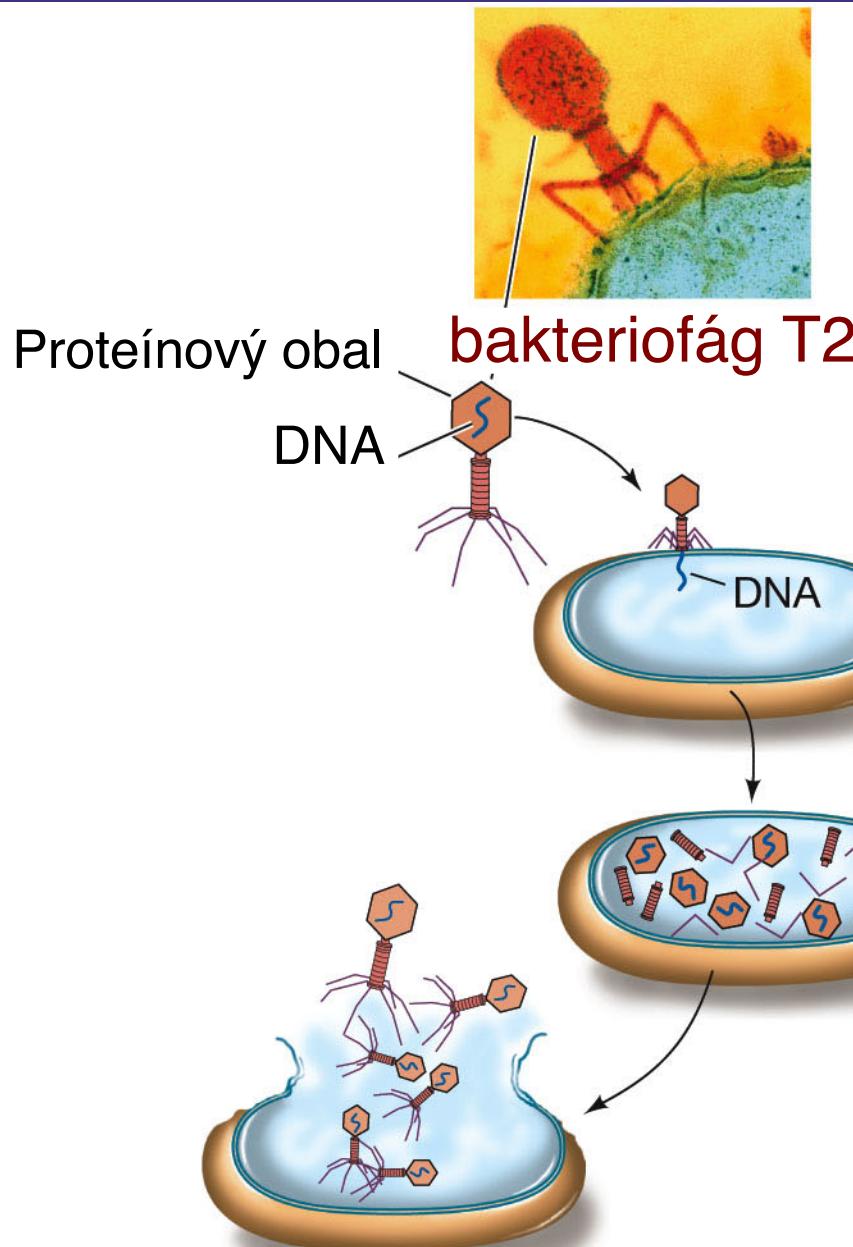
1944: Avery, MacLeod a McCarthy dokazujú,
že “transformačný princíp je” DNA

EXPERIMENT



ZÁVER: Pretože transformujúca substancia bola zničená iba DNázou, je to s najväčšou pravdepodobnosťou DNA

1952: Alfred Hershey a Martha Chaseová uskutočňujú experiment s bakteriofágom T2, ktorý dokazuje, že DNA je genetickým materiálom



1908-1997



1927-2003

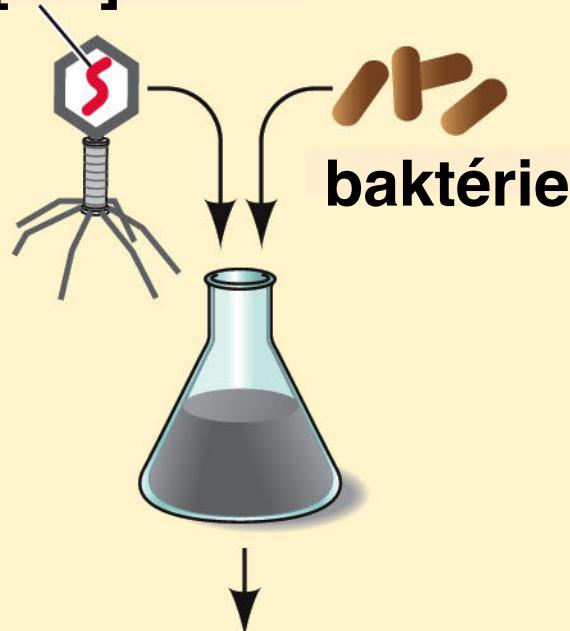
1952: Hershey a Chasesová uskutočňujú experiment s bakteriofágom T2, ktorý dokazuje, že DNA je genetickým materiálom

EXPERIMENT

HYPOTÉZA: Dedičným materiálom, ktorý vstupuje do bakteriálnej bunky je DNA, alebo proteín

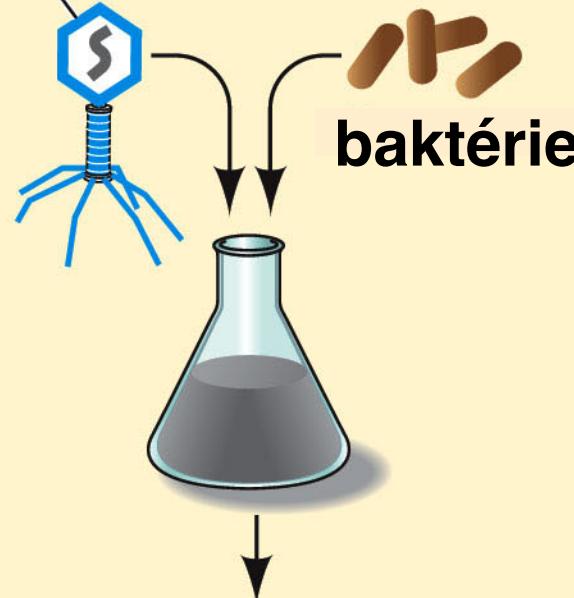
EXPERIMENT 1

[^{32}P]DNA

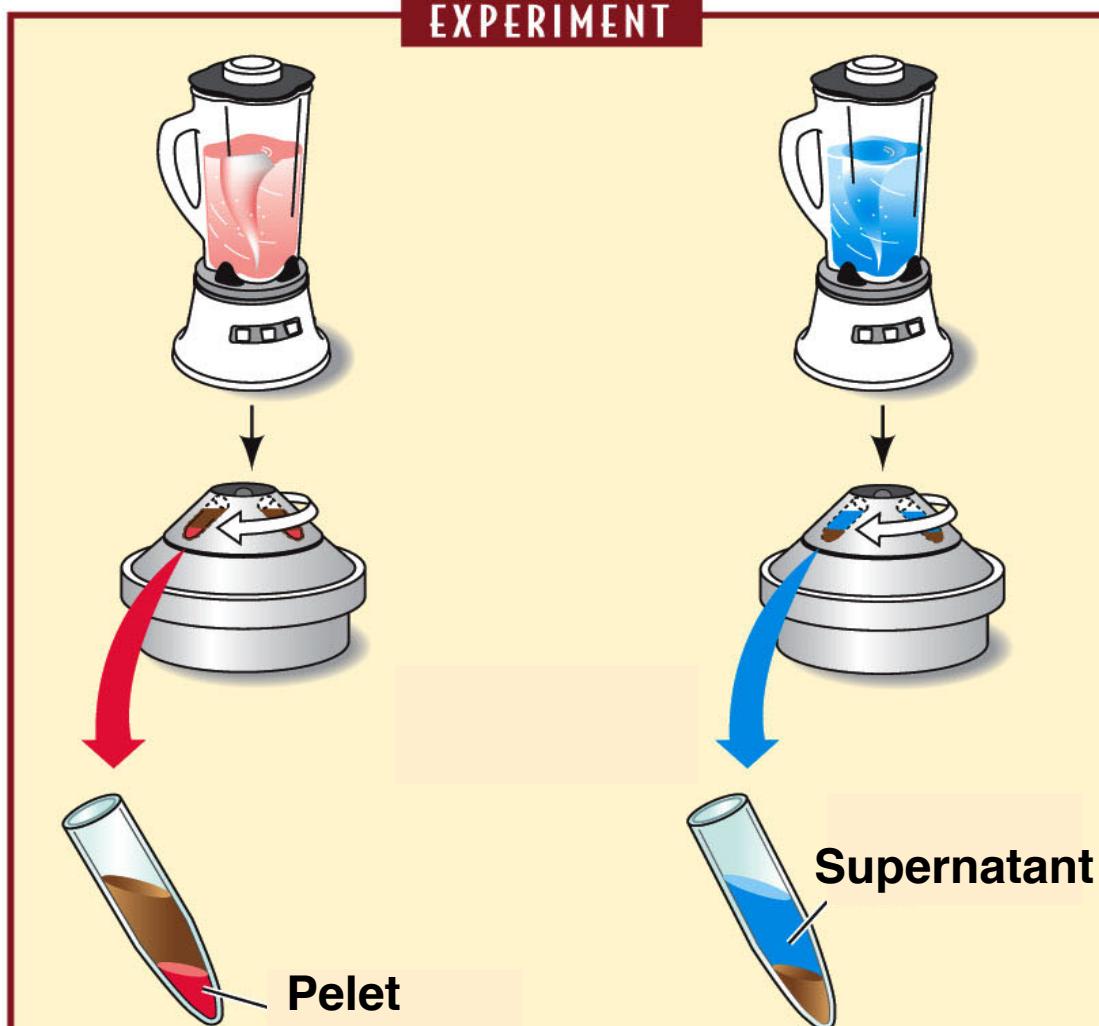


EXPERIMENT 2

[^{35}S]PROTEÍN

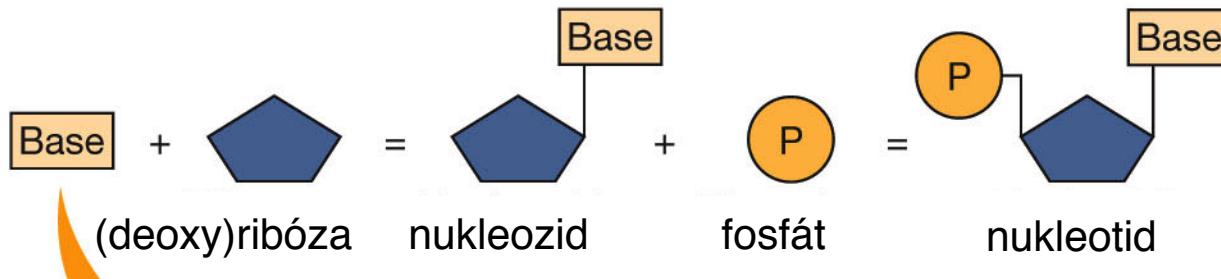


1952: Hershey a Chase uskutočňujú experiment s bakteriofágom T2, ktorý dokazuje, že DNA je genetickým materiálom

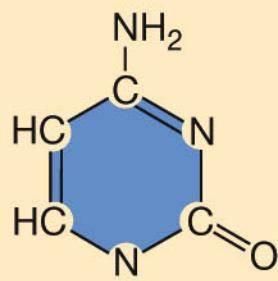


ZÁVER: Do bakteriálnej bunky vstupuje iba DNA a tá zabezpečuje skladanie nových fágových častíc

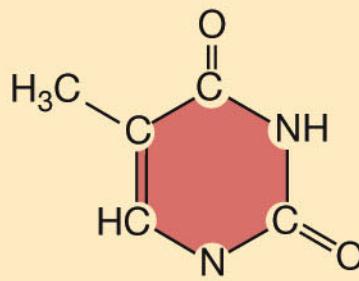
Nukleové kyseliny sú polyméry zložené z nukleotidov



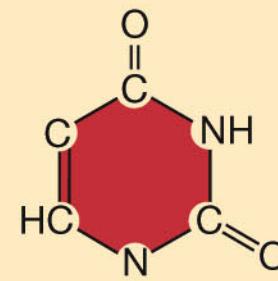
Pyrimidines



Cytosine (C)

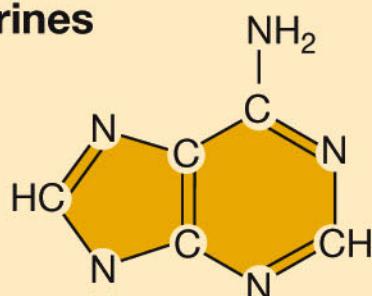


Thymine (T)

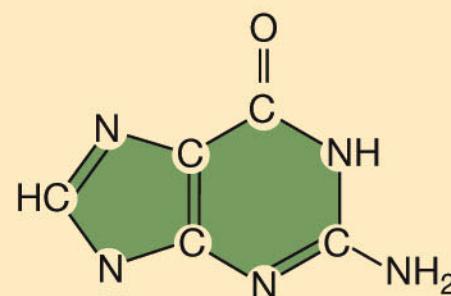


Uracil (U)

Purines



Adenine (A)



Guanine (G)

1950:

Erwin Chargaff objavuje univerzálne pravidlo platné pre DNA

Base Composition of DNA from Various Organisms

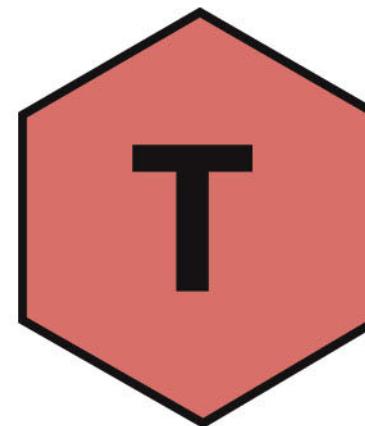
Species	% Adenine	% Guanine	% Cytosine	% Thymine	Molar Ratios	
					$\frac{A + G}{T + C}$	$\frac{A + T}{G + C}$
I. Viruses						
Bacteriophage λ	26.0	23.8	24.3	25.8	0.99	1.08
Bacteriophage T2	32.6	18.1	16.6	32.6	1.03	1.88
Herpes simplex	13.8	37.7	35.6	12.8	1.06	0.36
II. Bacteria						
<i>Escherichia coli</i>	26.0	24.9	25.2	23.9	1.04	1.00
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	14.4	37.3	34.6	13.7	1.07	0.39
<i>Ramibacterium ramosum</i>	35.1	14.9	15.2	34.8	1.00	2.32
III. Eukaryotes						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31.7	18.3	17.4	32.6	1.00	1.80
<i>Zea mays</i> (corn)	25.6	24.5	24.6	25.3	1.00	1.04
<i>Drosophila melanogaster</i>	30.7	19.6	20.2	29.4	1.01	1.51
<i>Homo sapiens</i> (human)	30.2	19.9	19.6	30.3	1.01	1.53

$$\frac{A+G}{T+C} = 1$$

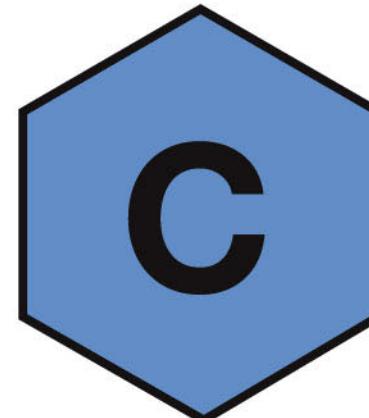
Chargaffovo pravidlo:



=

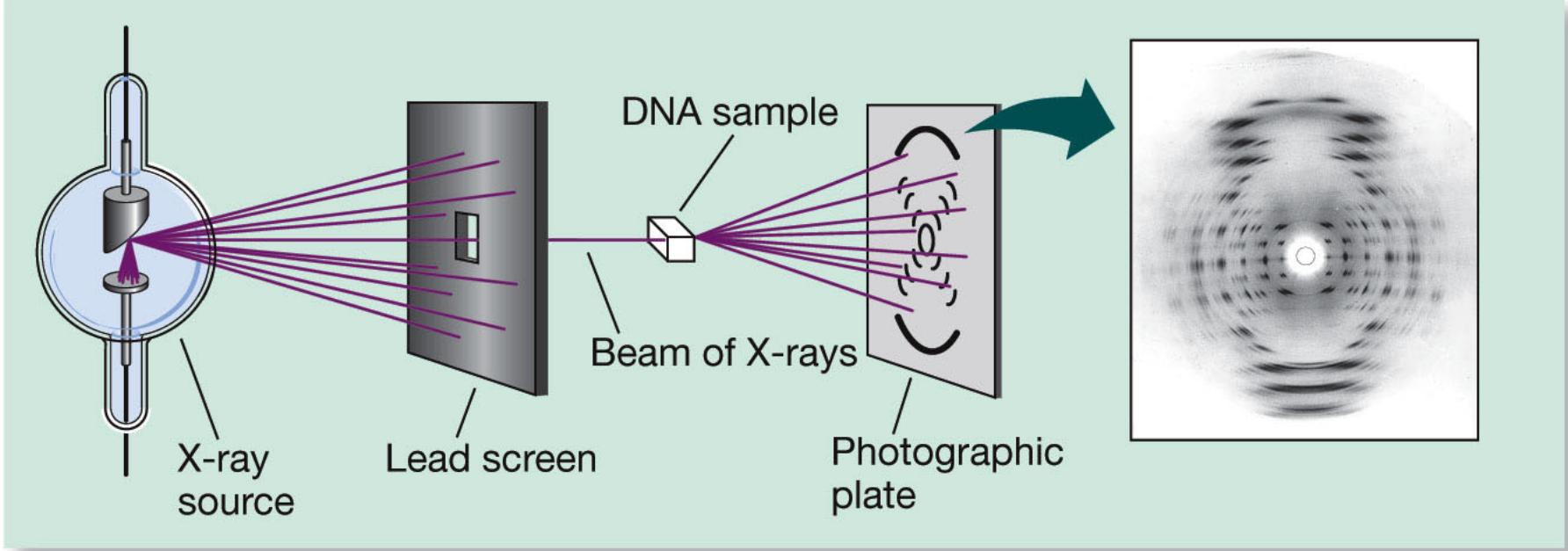


=



Puríny = Pyrimidíny

RTG analýza ako nástroj pre odhalenie štruktúry DNA



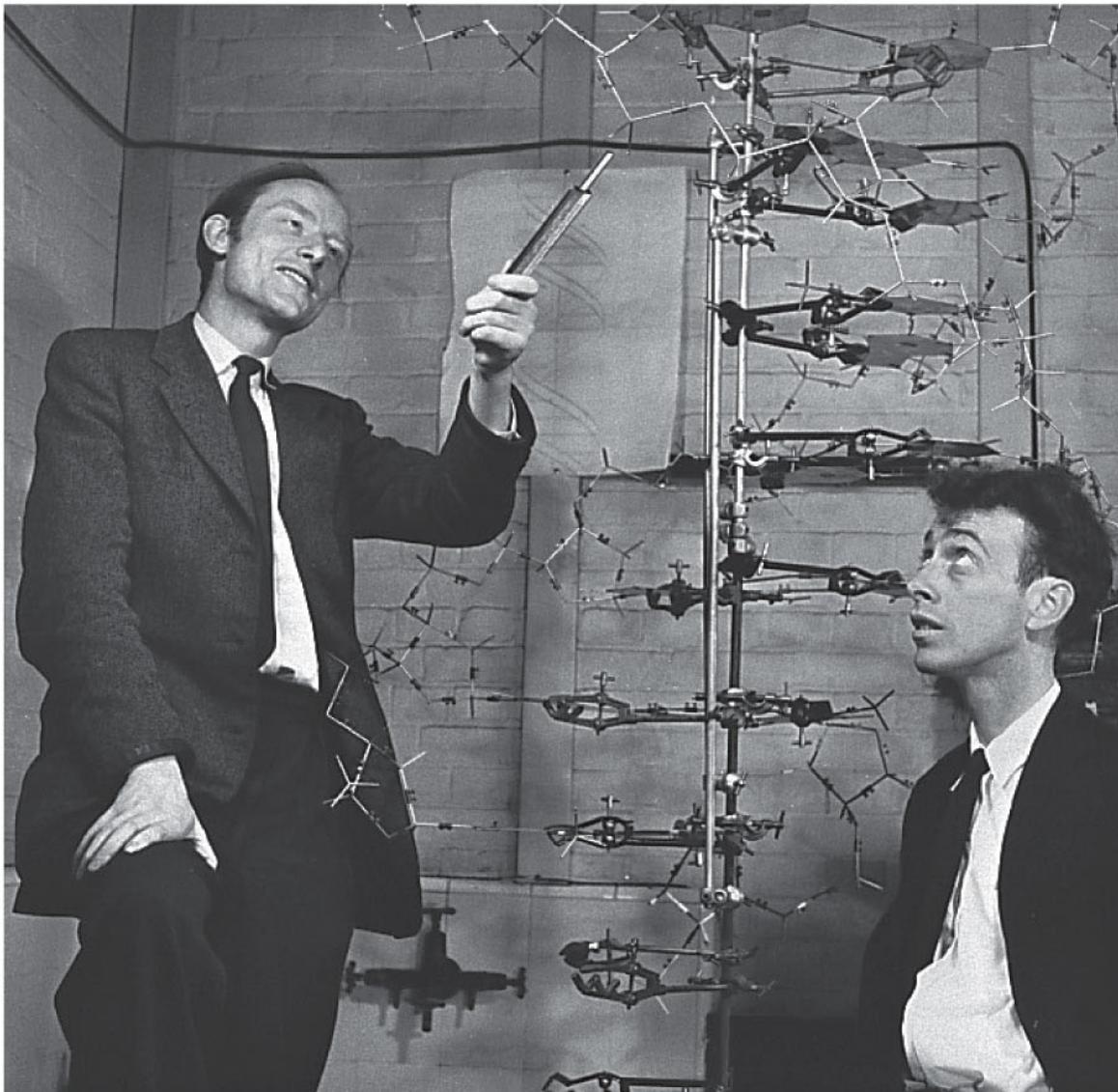
Rosalind Franklin
(1920-1958)

Molekula DNA
je helikálna

Maurice Wilkins
(1916–2004)



1953: Francis Crick (1916–2004) a
James Watson (1928-) rozlúštili štruktúru DNA



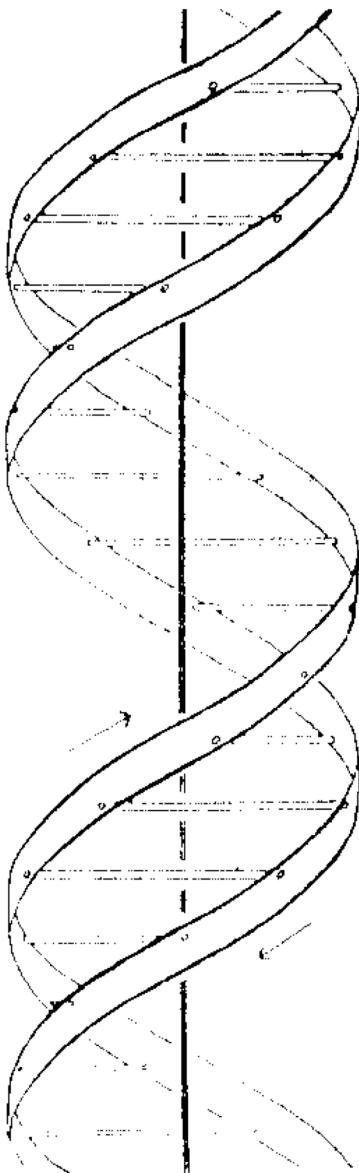
Nobelova cena (1962), spolu s M. Wilkinsom

28.2.1953: We had found the secret of life!



Eagle pub, Cambridge

1953: *We had found the secret of life!*



No. 4356

April 25, 1953

NATURE

737

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

J. D. WATSON
F. H. C. CRICK

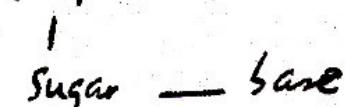
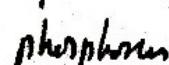
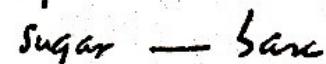
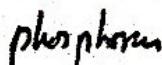
Medical Research Council Unit for the
Study of the Molecular Structure of
Biological Systems,
Cavendish Laboratory, Cambridge.
April 2.

List Francisa Cricka 13-ročnému synovi Michaelovi

March 19, 1953

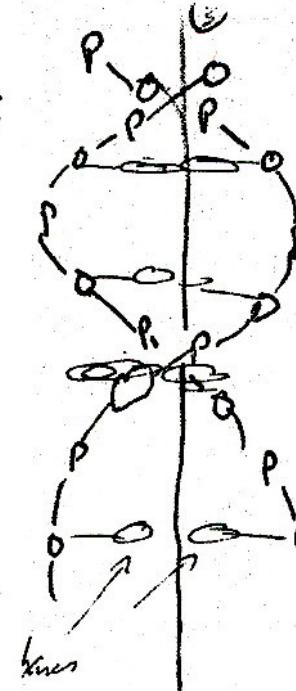
Dear Michael,...

like this



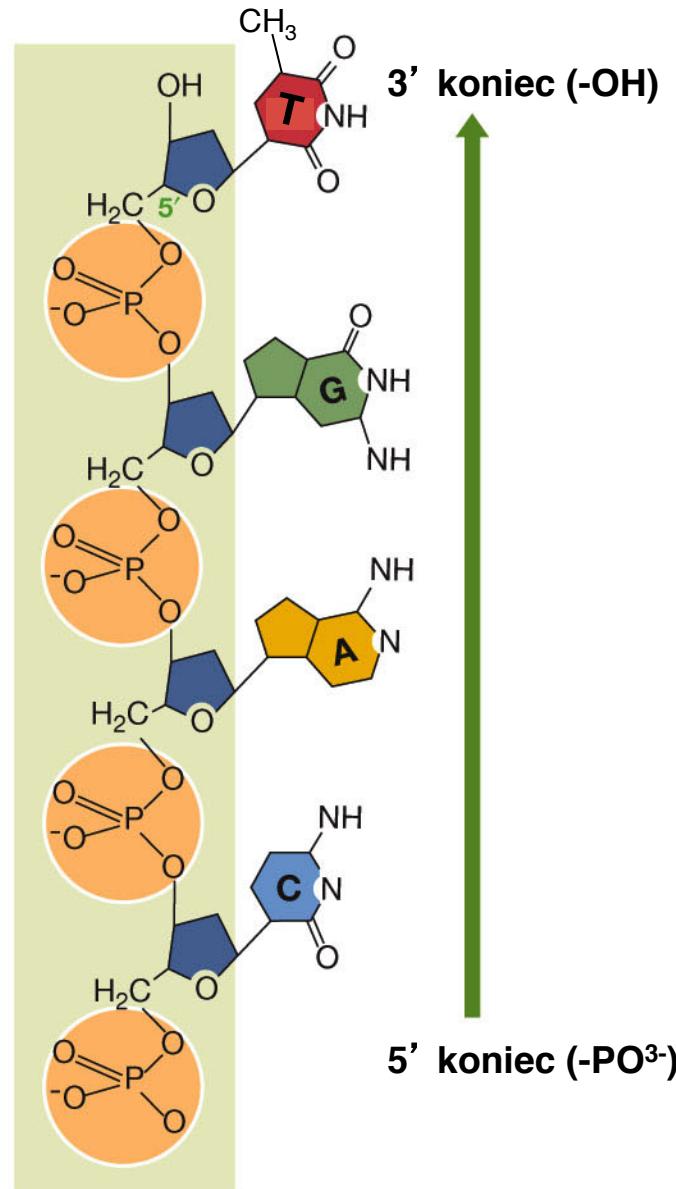
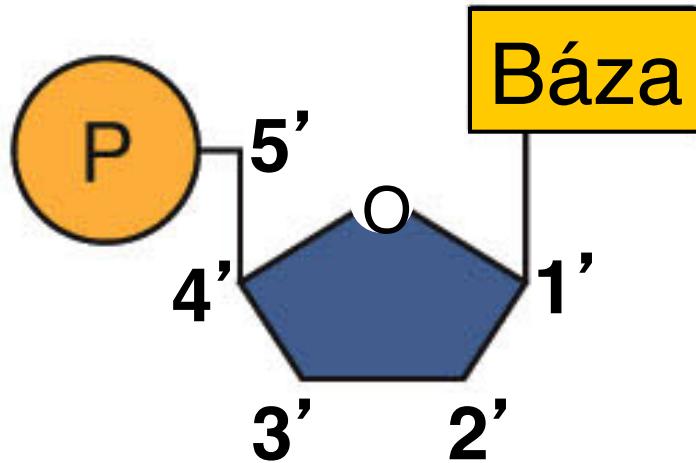
and so on.

like this

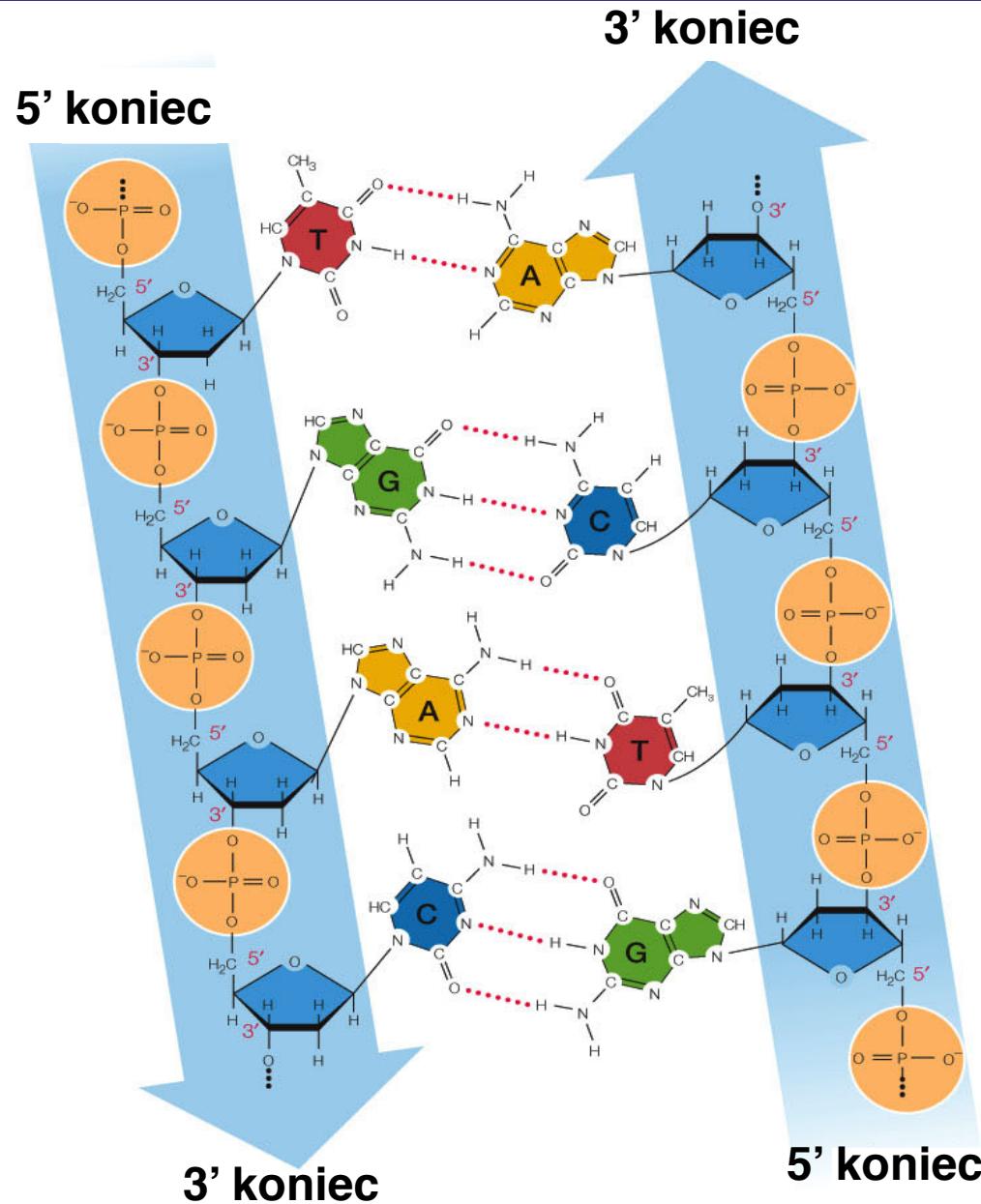


The model looks much nicer than this.

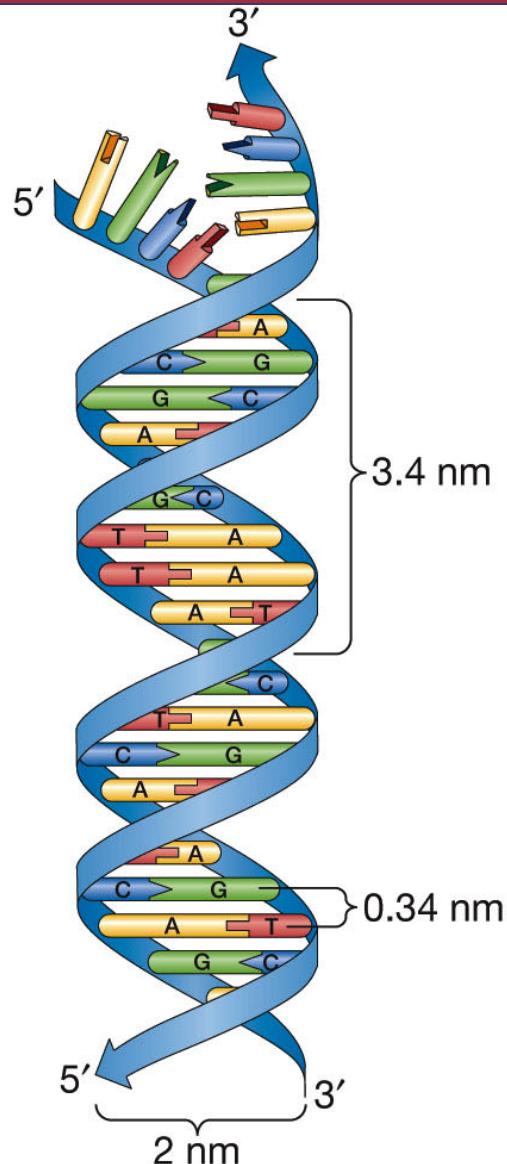
Polynukleotidy sú polárne polyméry



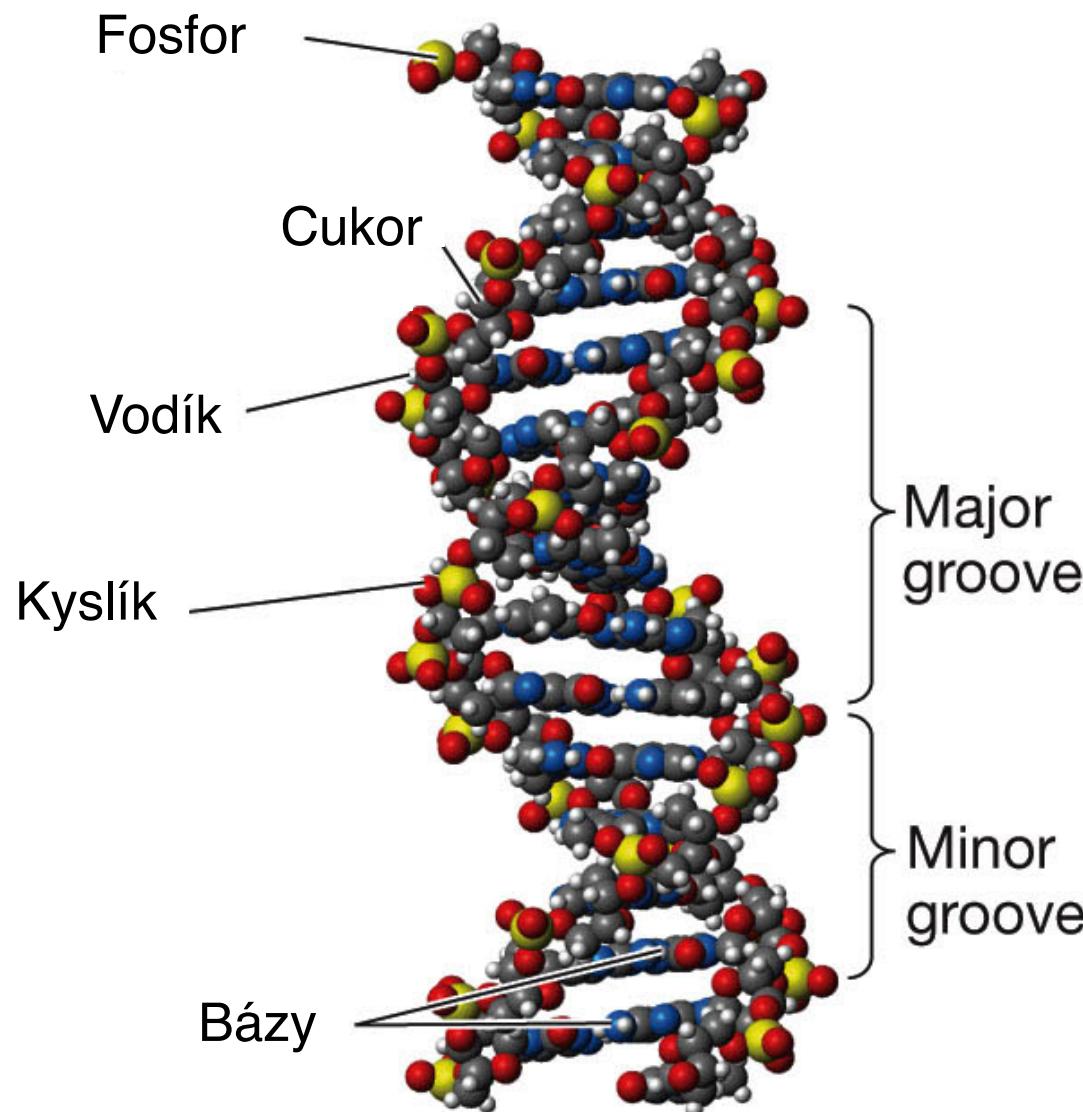
DNA je helikálna molekula tvorená dvomi antiparalelnými vláknami, ktoré sú spojené vodíkovými väzbami



DNA je helikálna molekula tvorená dvomi antiparalelnými vláknami, ktoré sú spojené vodíkovými väzbami



DNA je helikálna molekula tvorená dvomi antiparalelnými vláknami, ktoré sú spojené vodíkovými väzbami



Funkcie DNA:

- Uchovávanie genetickej informácie (poradie nukleotidov v DNA určuje poradie aminokyselín v proteínoch)
- Prenos genetickej informácie do ďalšej generácie prostredníctvom replikácie
- Zmeny (mutácie) v DNA ako zdroj genetickej variability

“It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.”

For example

A - T
T - A
C - G
A - T
G - C
T - A
T - A

Chains Separate

A
T
C
A
G
T
T

T
A
G
T
C
A
A

new chain form

A - T

T - A

C - G

A - T

G - C

T - A

T - A

T - A

A - T

G - C

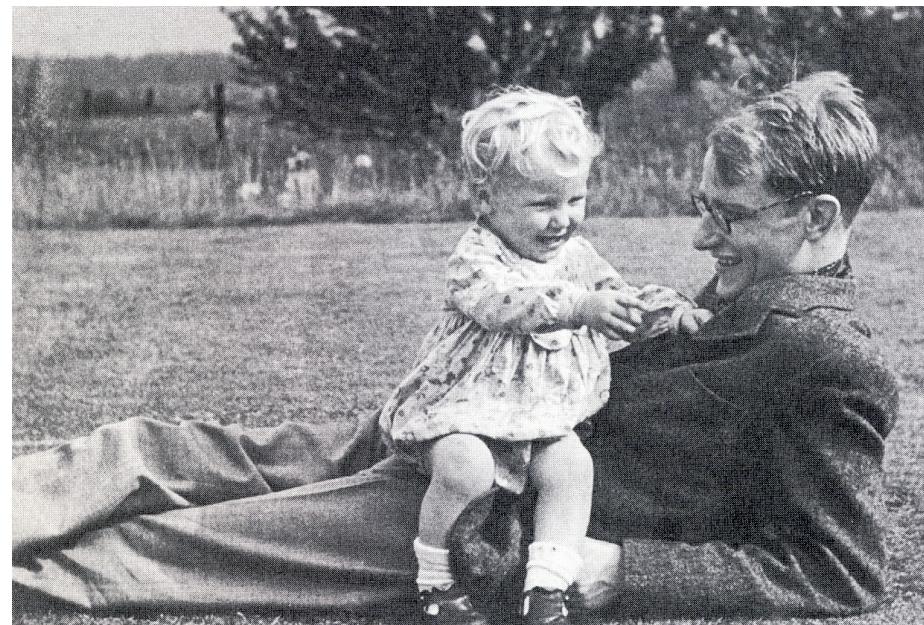
T - A

C - G

A - T

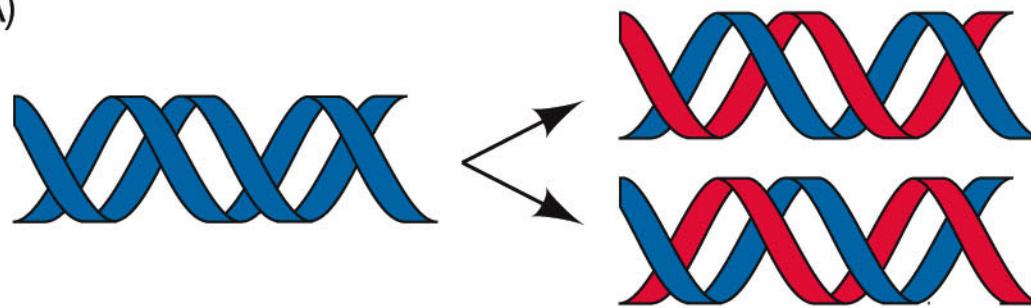
A - T

“[...] Read this carefully so that you understand it. When you come home we will show you the model.
Lots of love,
Daddy”



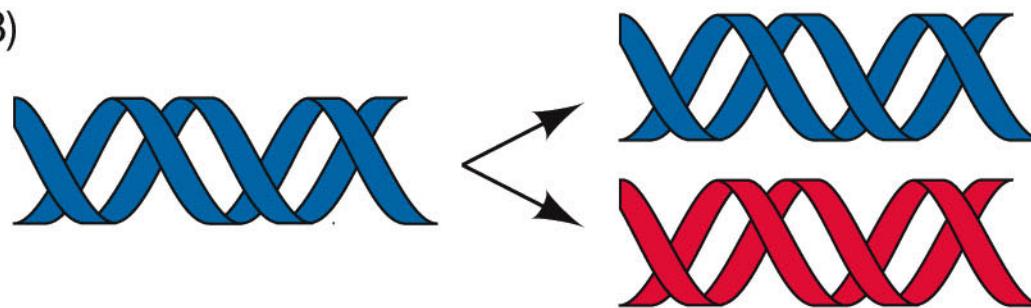
3 možné modely replikácie DNA:

(A)



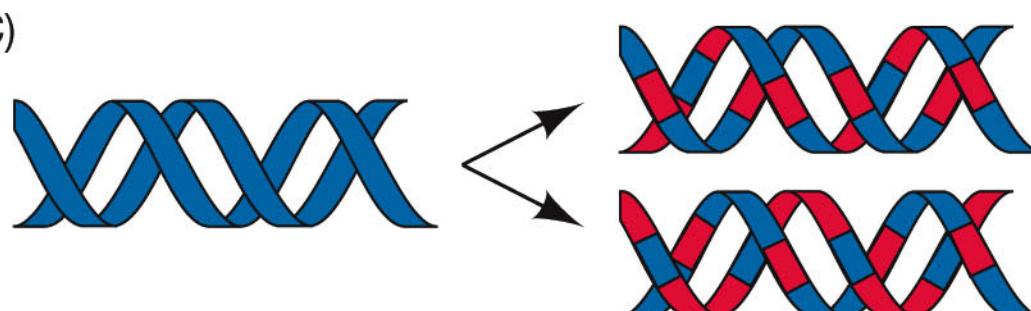
semikonzervatívna

(B)



konzervatívna

(C)

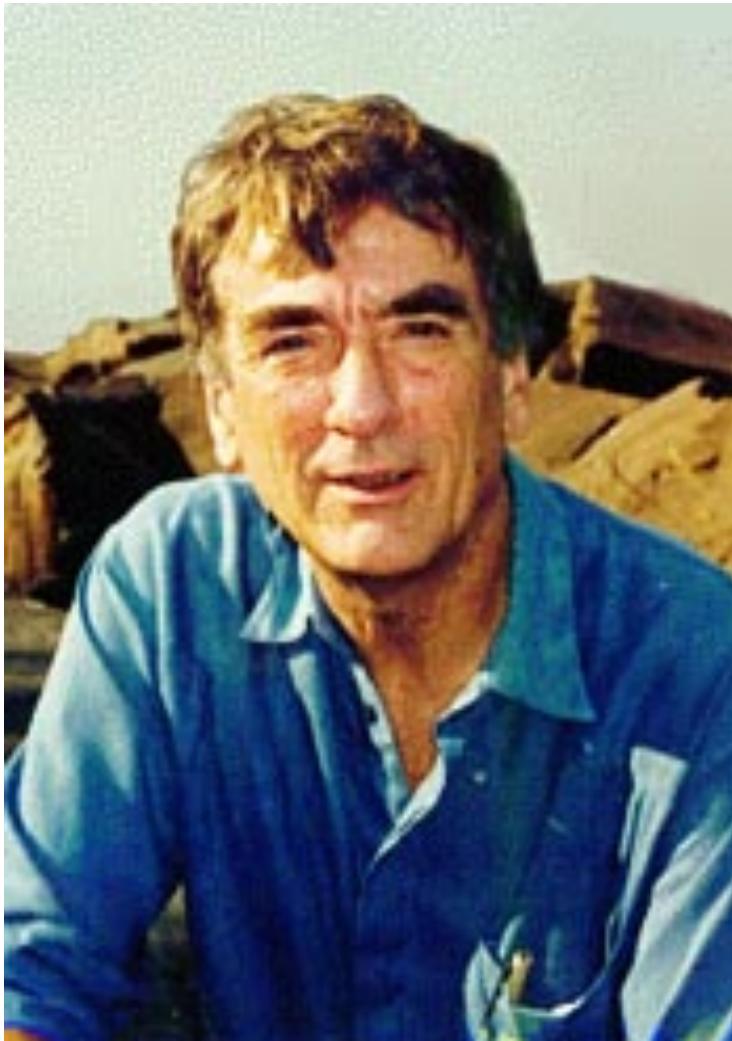


disperzná

1956: Matthew Meselson a Franklin Stahl experimentálne testujú modely replikácie DNA



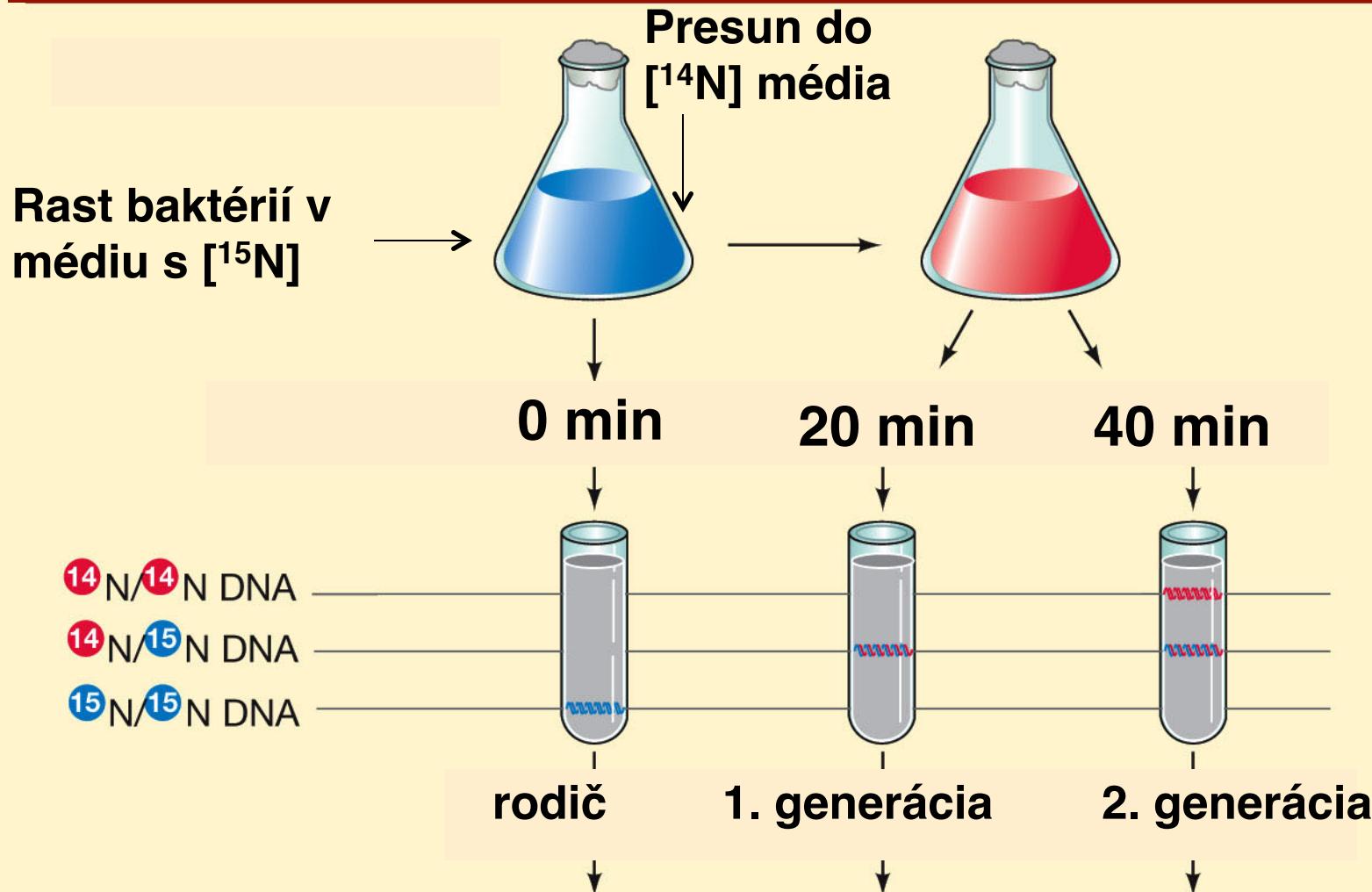
(1930-)



(1929-)

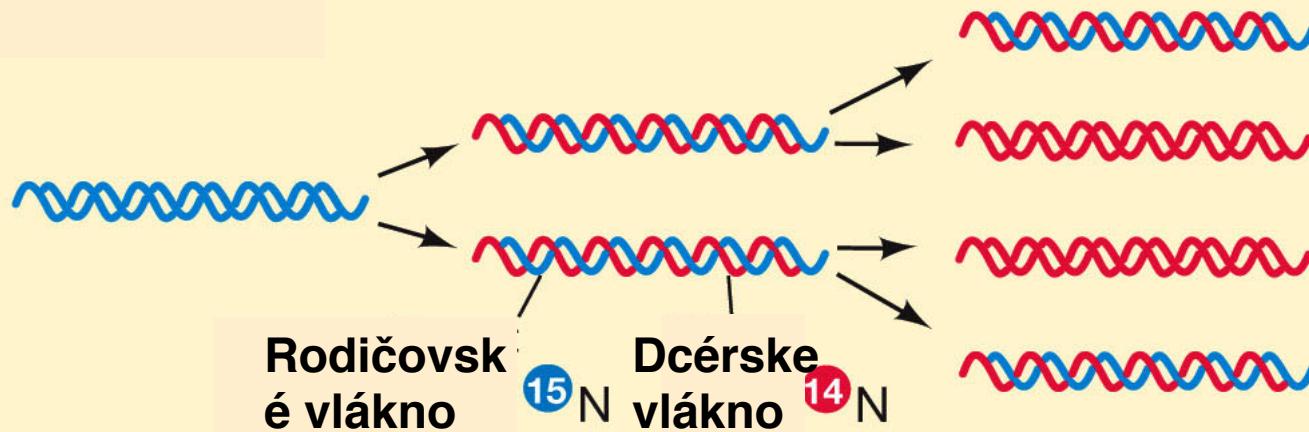
Experiment Meselsona a Stahla demonštruje semikonzervatívny spôsob replikácie DNA

HYPOTÉZA: DNA je syntetizovaná semikonzervatívne



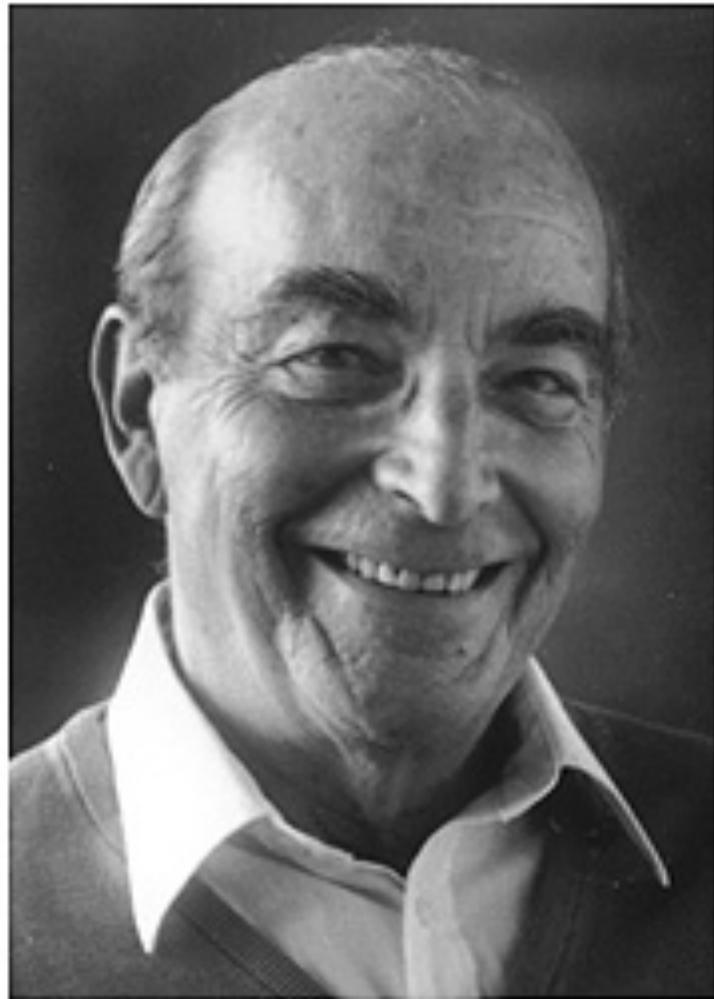
Experiment Meselsona a Stahla demonštruje semikonzervatívny spôsob replikácie DNA

EXPERIMENT



ZÁVER: Pozorovaný výsledok je možný iba v prípade, že templátové vlákno pochádza z rodičovského reťazca; DNA replikácia je preto semikonzervatívna

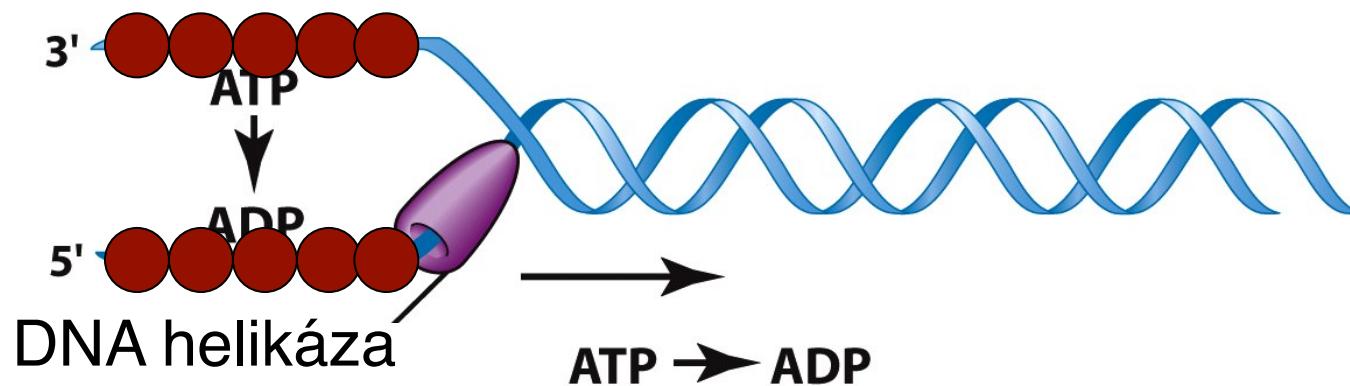
Biochemik Arthur Kornberg popísal základné princípy replikácie DNA pomocou izolovaných komponentov



(1918-2007)
Nobelova cena (1959)

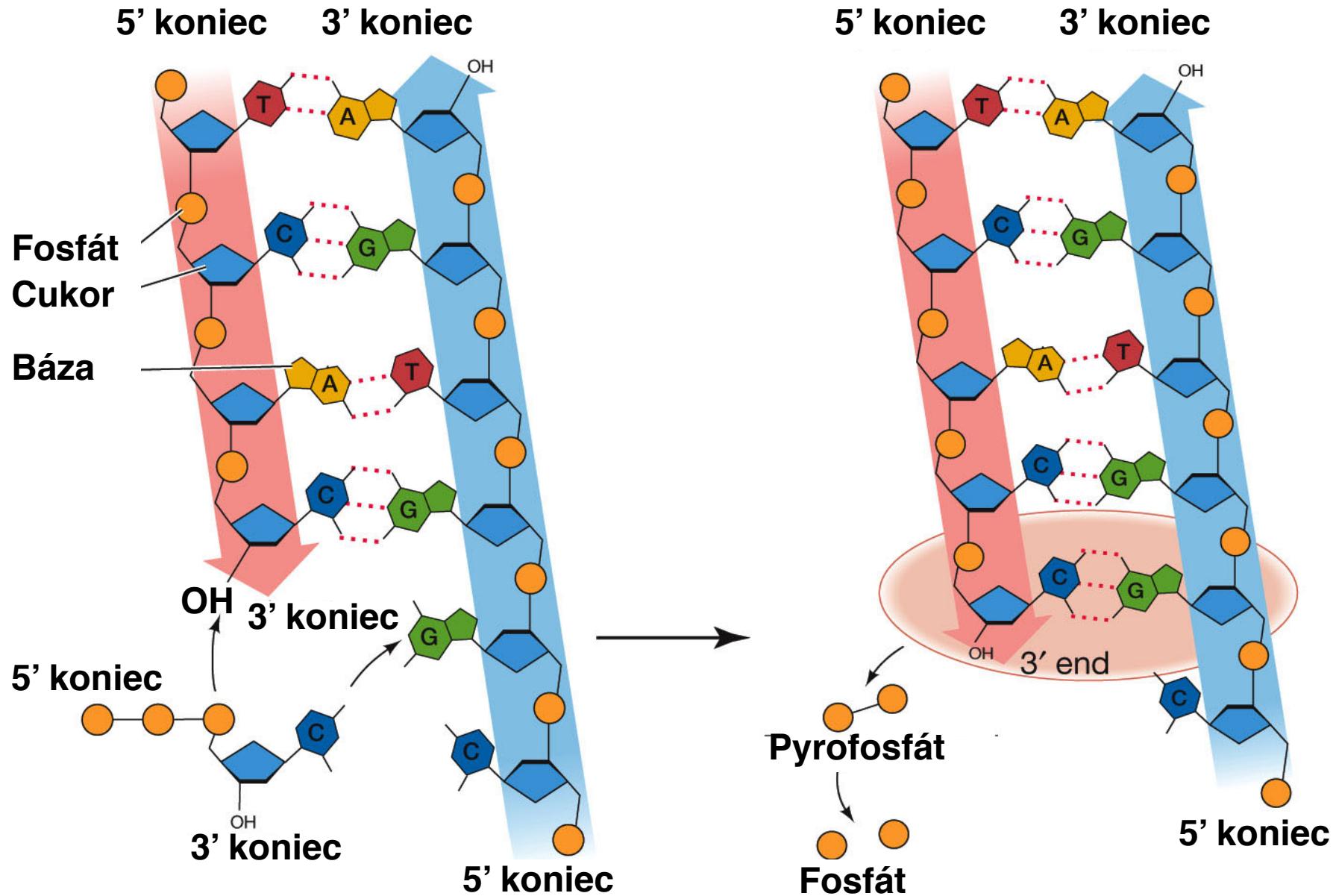
Prvým krokom v syntéze DNA je oddelenie dvoch vlákien prostredníctvom enzymu DNA helikáza

DNA helikáza využíva energiu uvoľnenú hydrolýzou ATP na oddelenie vláknien DNA

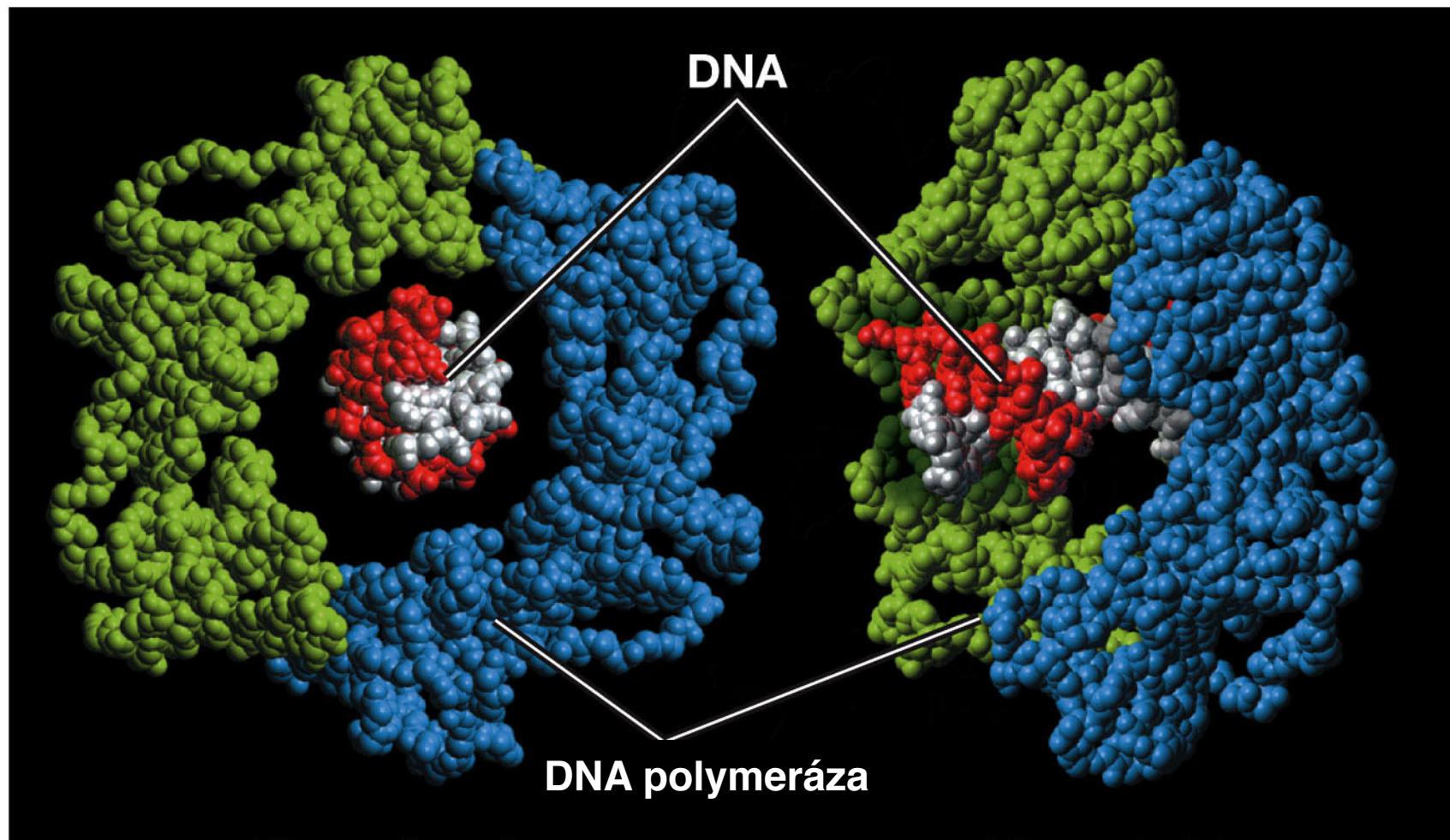


Jednovláknovú DNA-viažúce proteíny (SSB; Single-strand binding proteins) zabraňujú reasociácii vlákien

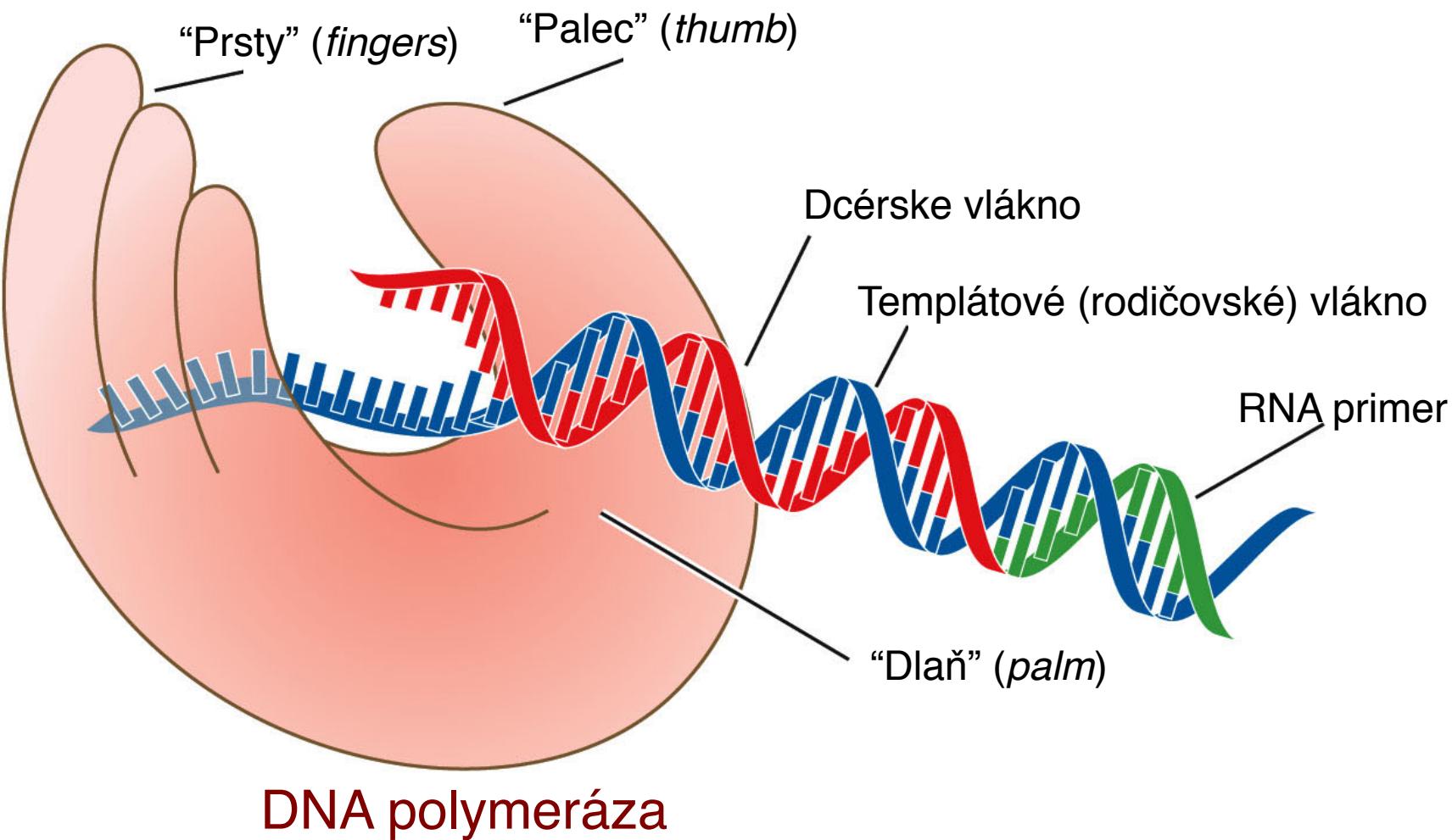
Rodičovské vlákno slúži ako templát pre syntézu dcérskeho vlákna, rastúceho v smere 5' → 3'



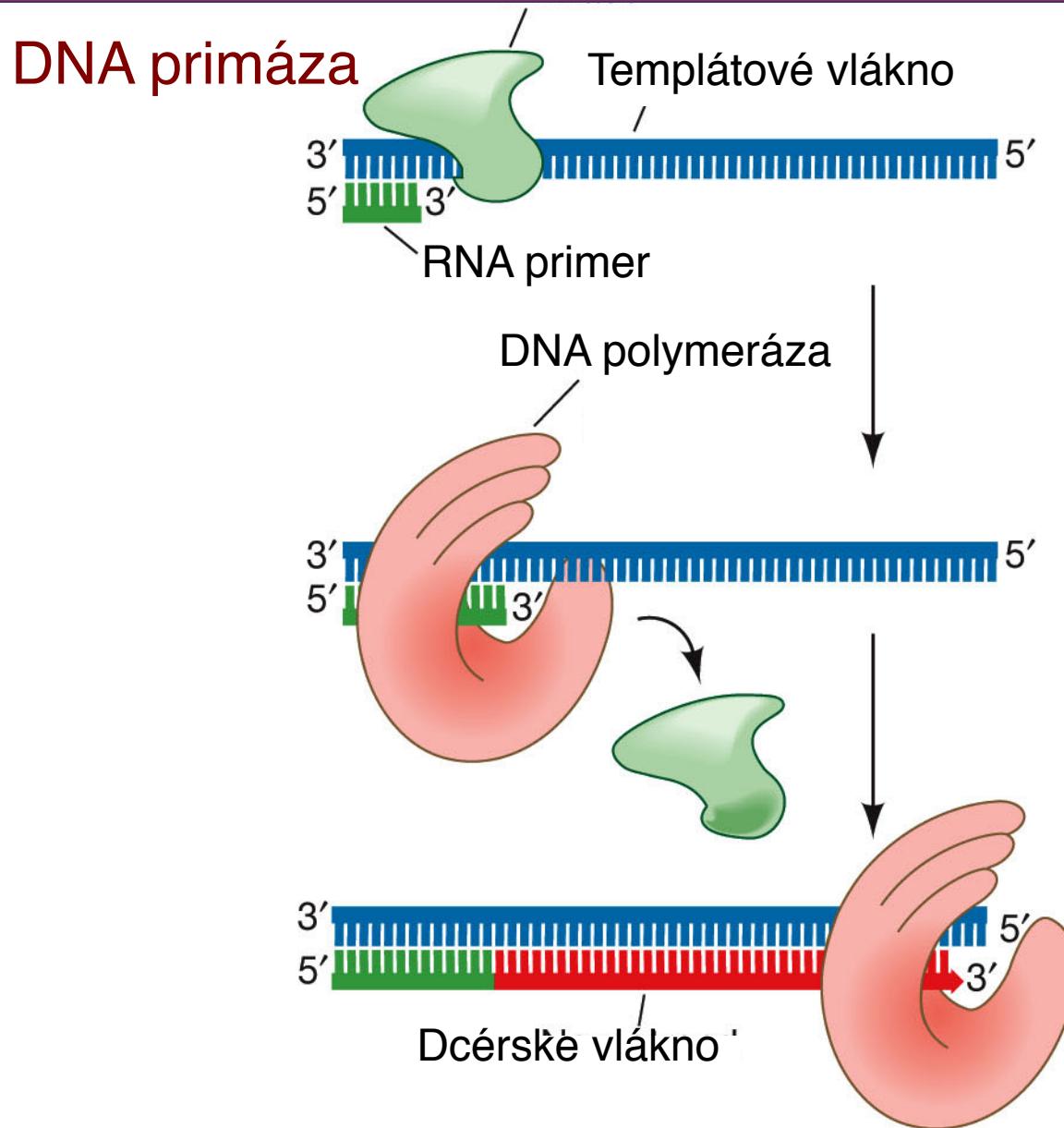
Replikácia DNA je katalyzovaná DNA polymerázami



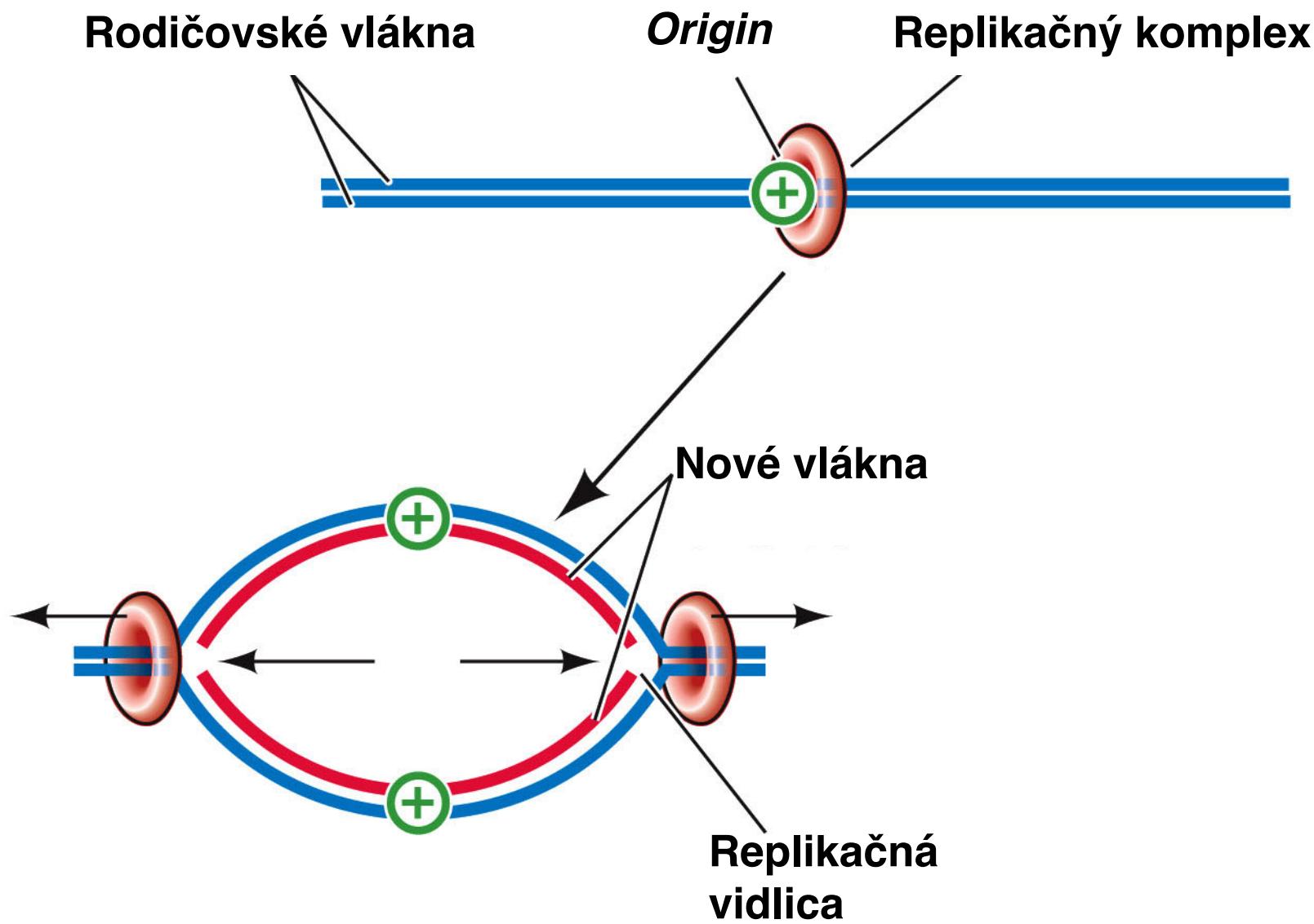
Replikácia DNA je katalyzovaná DNA polymerázami, PROCESÍVNYMI enzymami syntetizujúcimi dlhé bloky dcérskeho reťazca



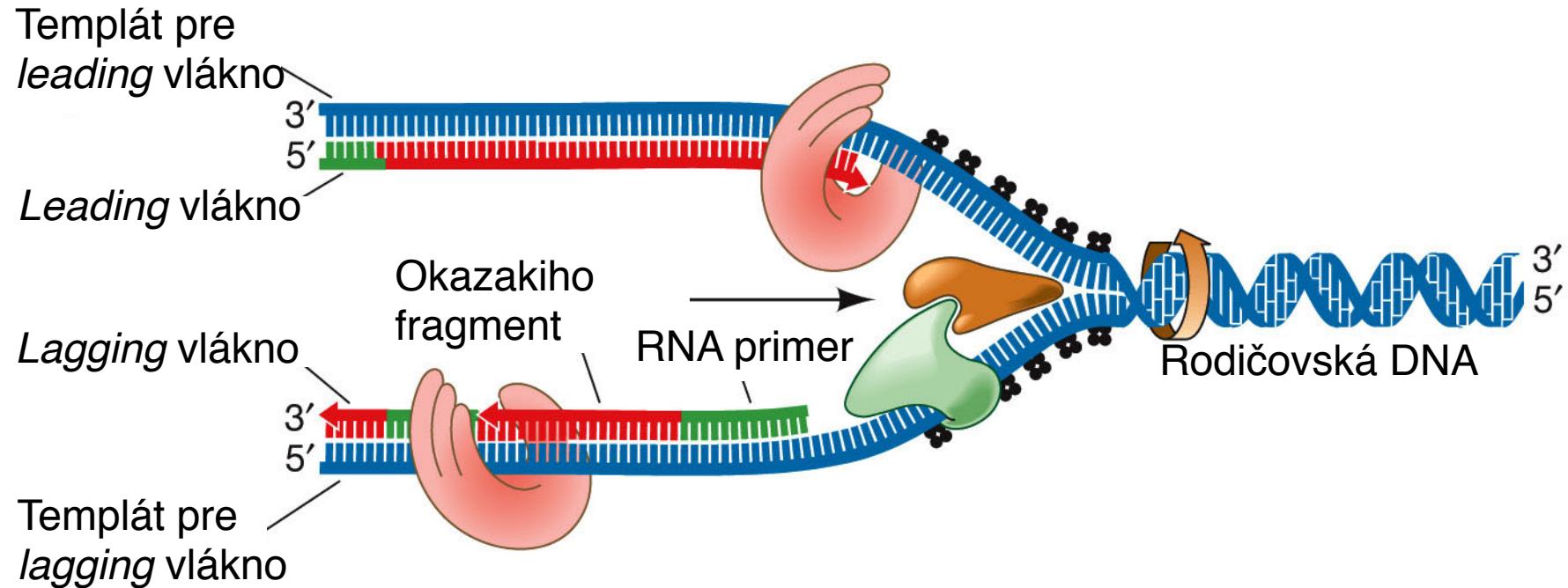
DNA polymeráza nie je schopná začať syntézu dcérskeho vlákna *de novo*; potrebuje krátky RNA primer



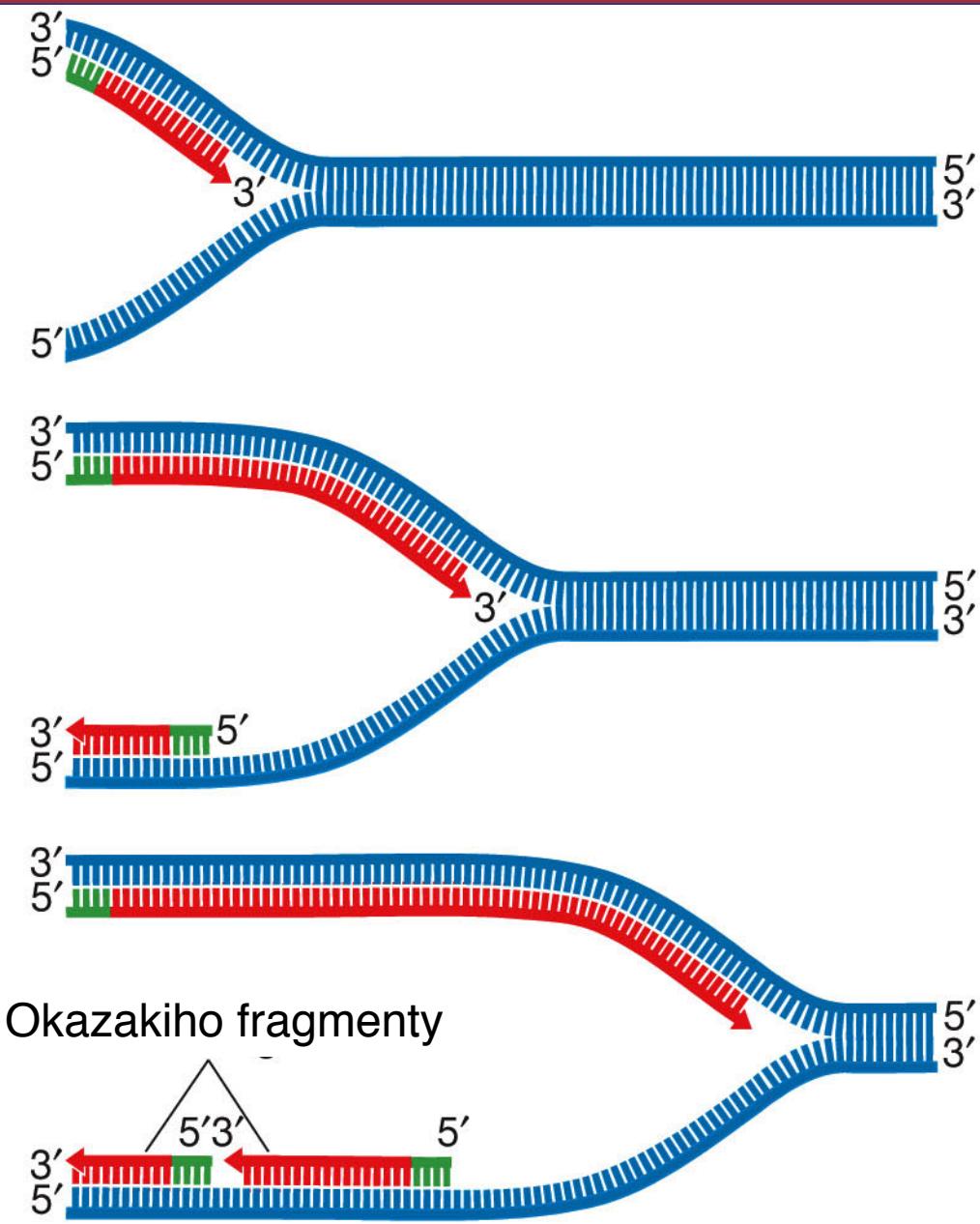
Replikácia DNA začína v oblasti počiatku (*origin*) replikácie a pokračuje OBOJSMERNÝM pohybom „replikačných vidlíc“



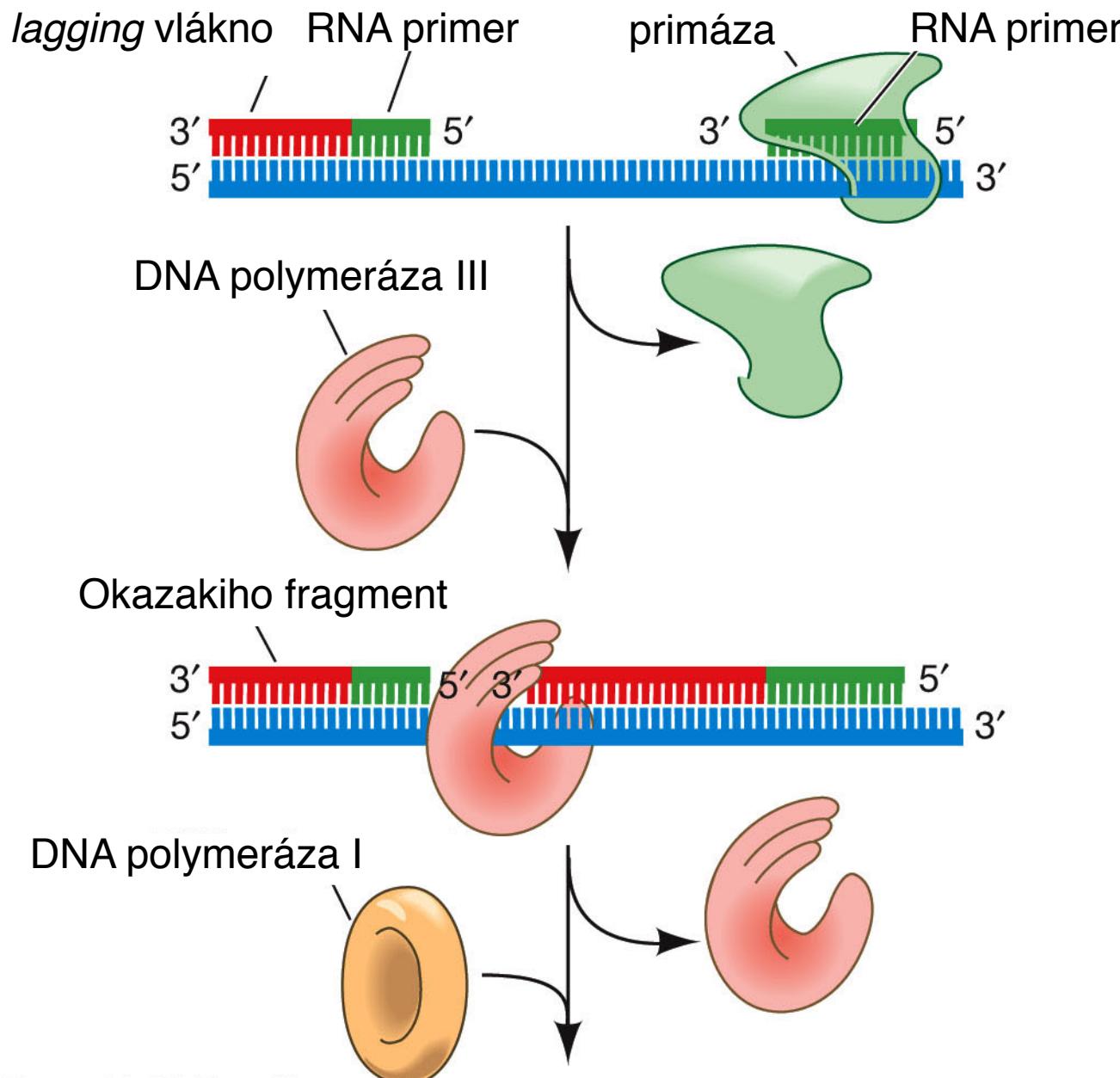
Pohyb replikačnej vidlice je zabezpečený dvomi spôsobmi syntézy dcérskych vlákien: *leading* vs *lagging* vlákno



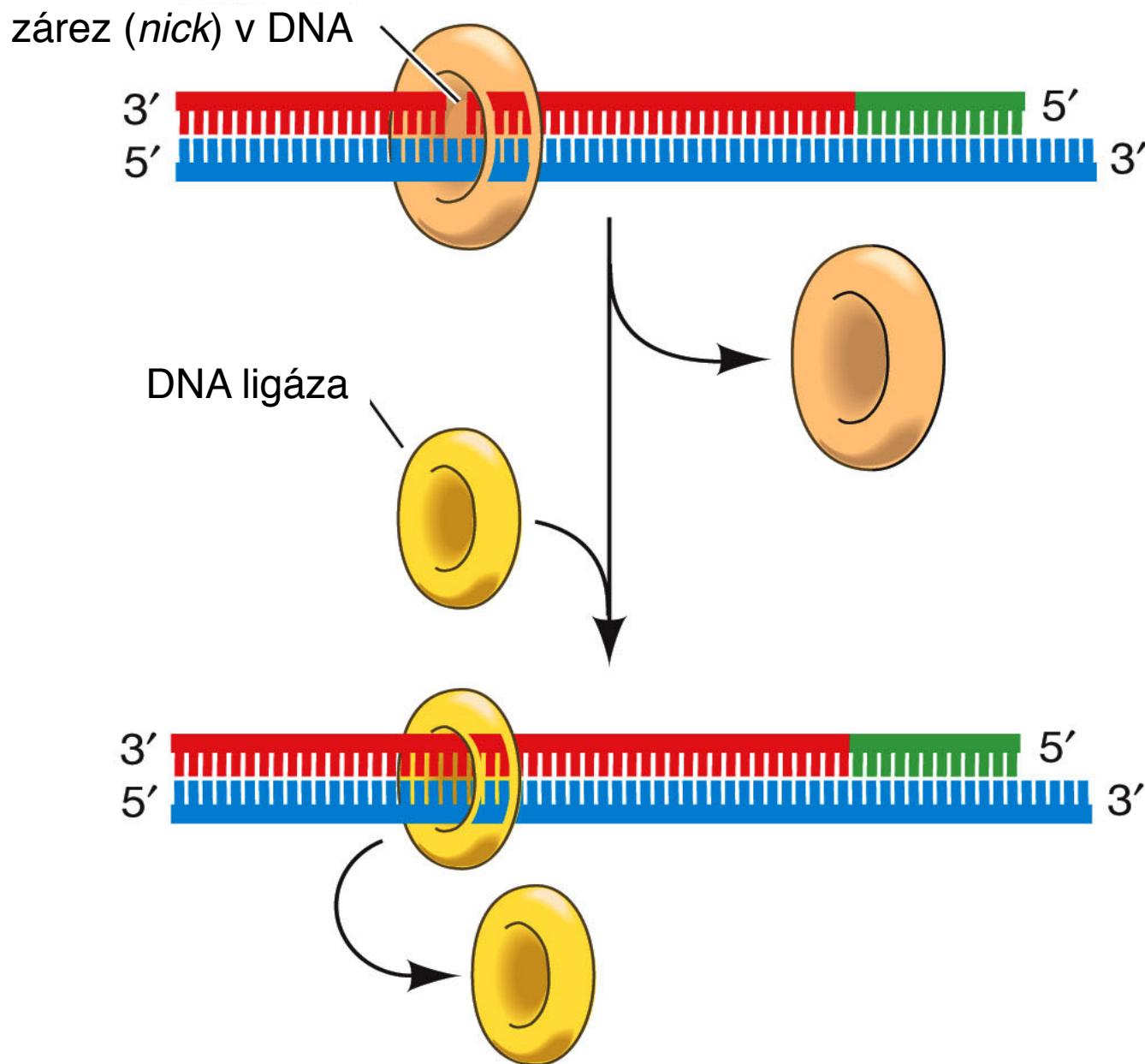
Lagging (zaostávajúce) vlákno je syntetizované vo forme Okazakiho fragmentov



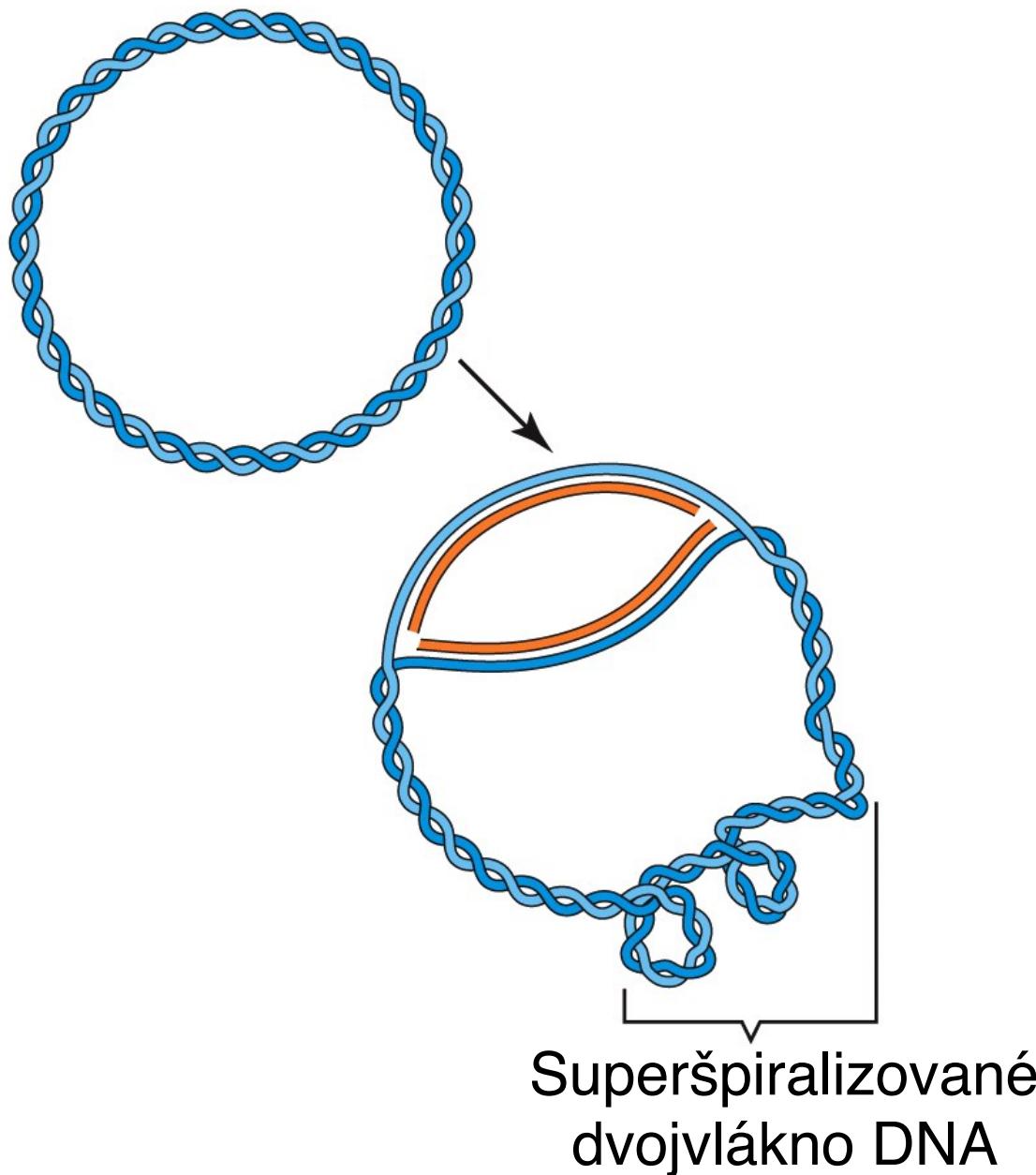
Na syntéze Okazakiho fragmentov participuje viacero replikačných proteínov (1)



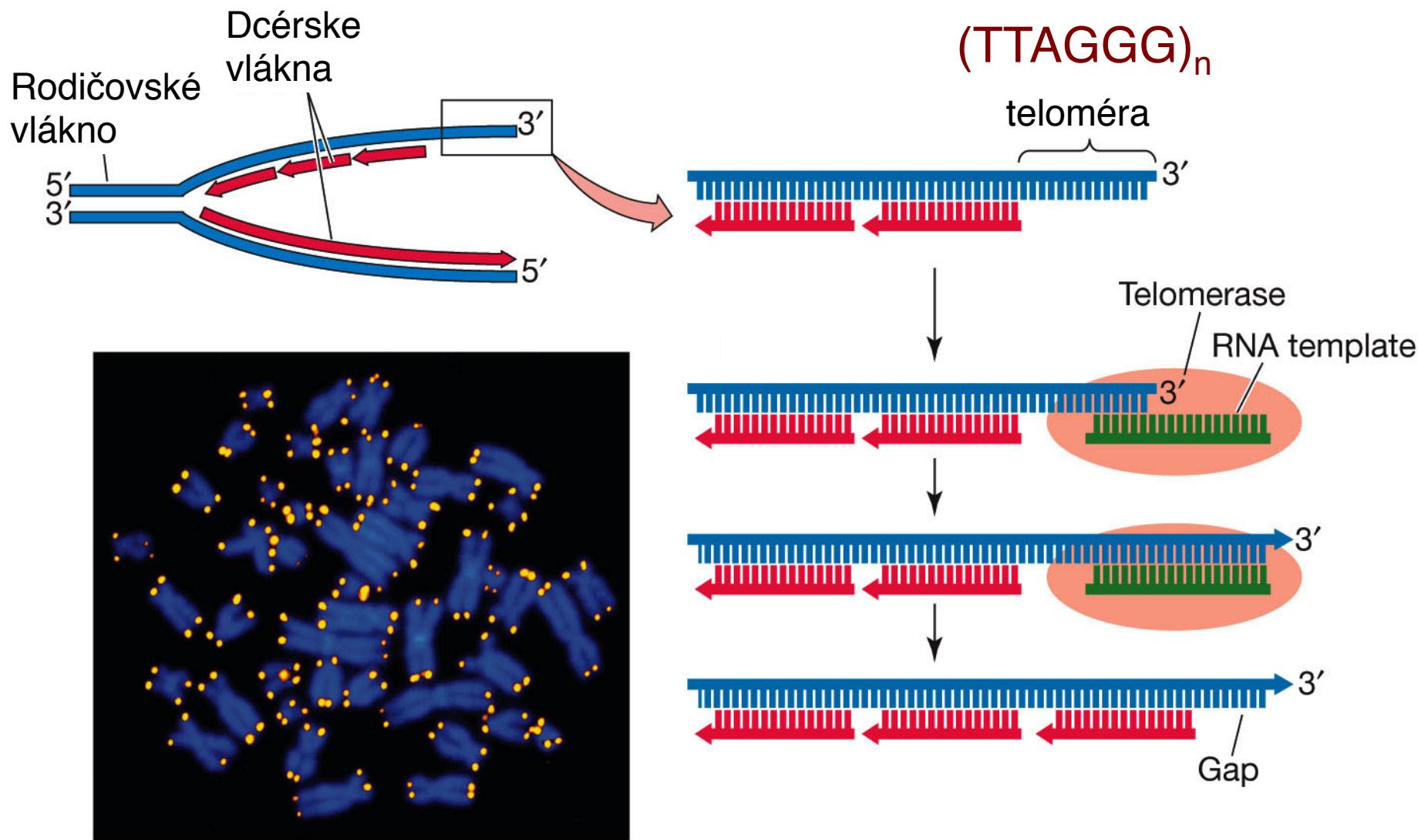
Na syntéze Okazakiho fragmentov participuje viacero replikačných proteínov (2)



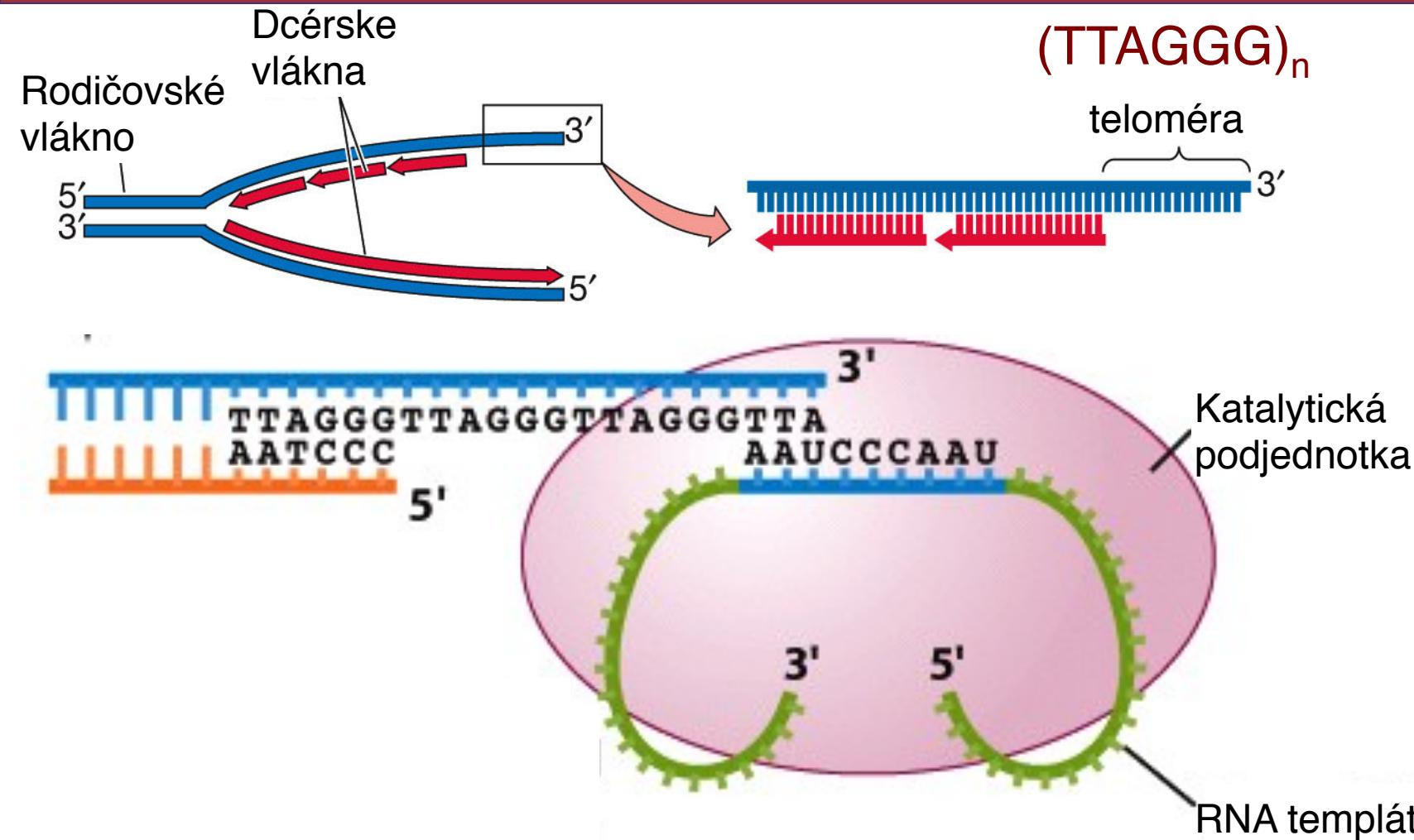
Počas replikácie DNA dochádza k jej superšpiralizácii, ktorá je odstraňovaná prostredníctvom TOPOIZOMERÁZ



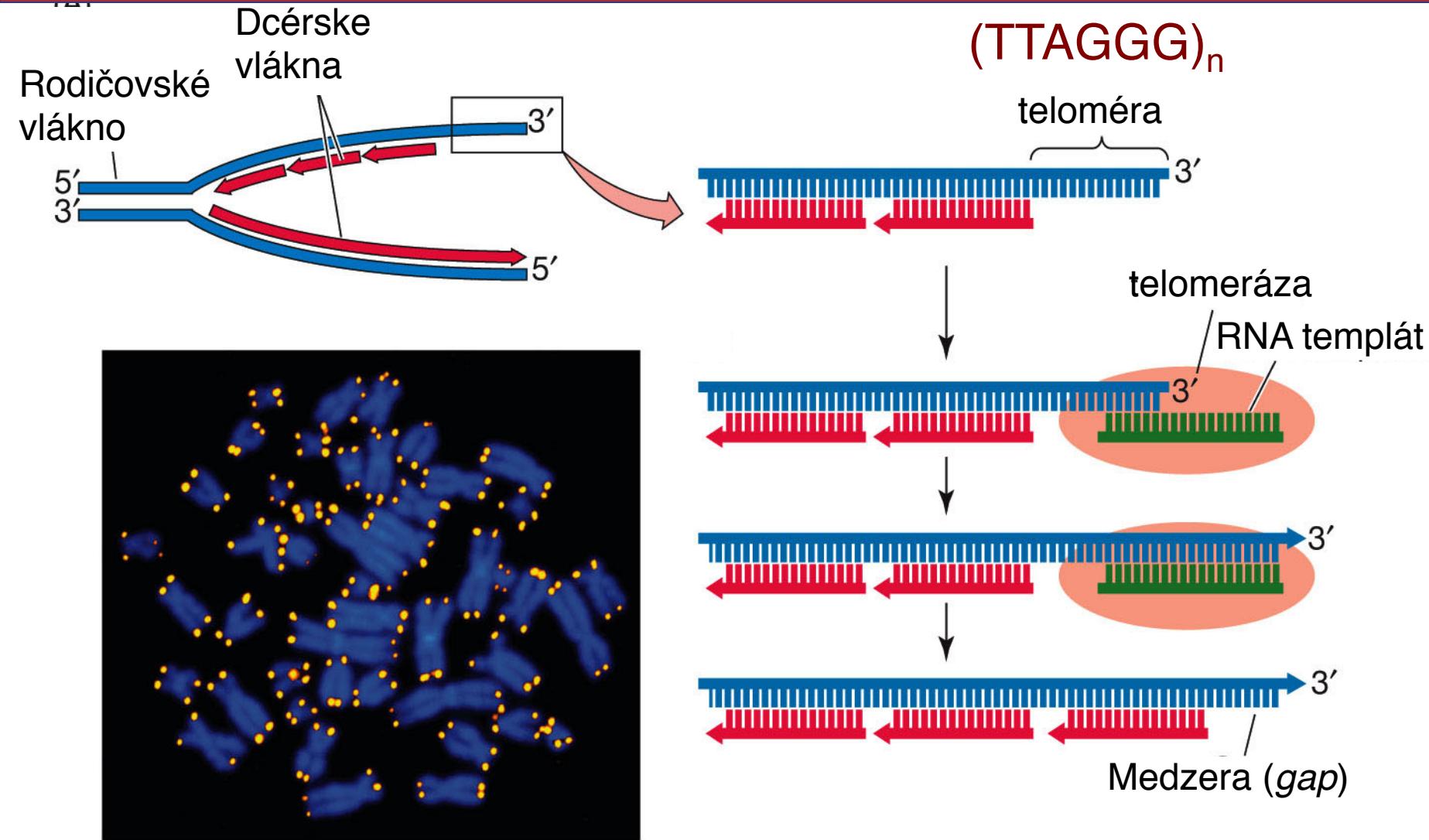
Syntéza lagging (zaostávajúceho) vlákna spôsobuje problém replikácie koncov (telomér) lineárnych molekúl DNA



Konce jadrových chromozómov (teloméry) sú tvorené opakujúcimi sa sekvenciami 5'-TTAGGG-3', ktoré predlžuje enzým telomeráza, zložený z RNA a proteínovej podjednotky

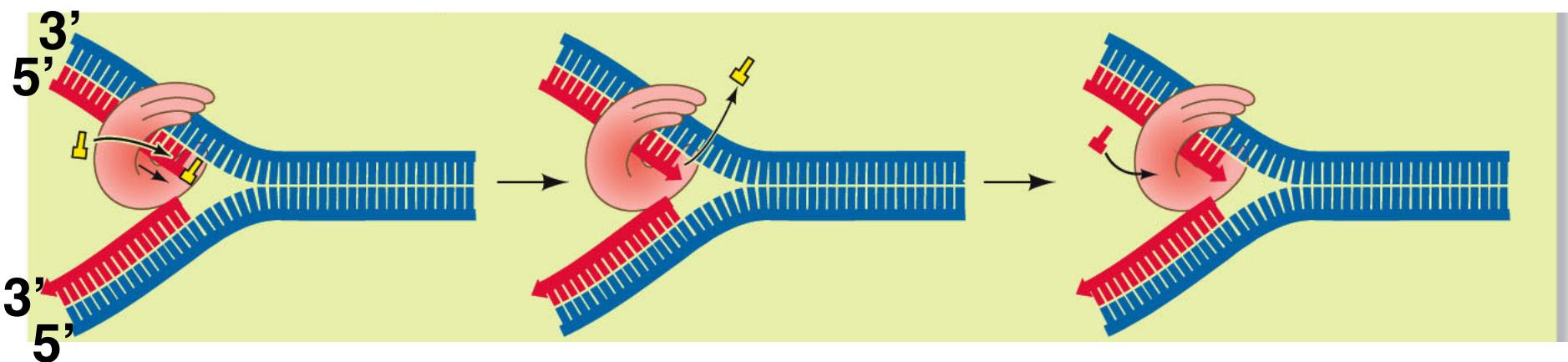


Konce jadrových chromozómov (teloméry) sú tvorené opakujúcimi sa sekvenciami 5'-TTAGGG-3', ktoré predlžuje enzým telomeráza, zložený z RNA a proteínovej podjednotky



DNA polymeráza zarádí na každé 1000-ce miesto chybný nukleotid, bunky v ľudskom tele však majú väčšinou rovnakú DNA. V čom spočíva riešenie tohto paradoxu?

Okrem polymerázovej aktivity majú DNA polymerázy často $5' \rightarrow 3'$ a $3' \rightarrow 5'$ exonukleázovú aktivitu



Okrem toho majú bunky v zálohe niekol'ko typov opravných mechanizmov, o ktorých bude mať nasledujúcu prednášku doc. Ševčovičová



Chasen Madden