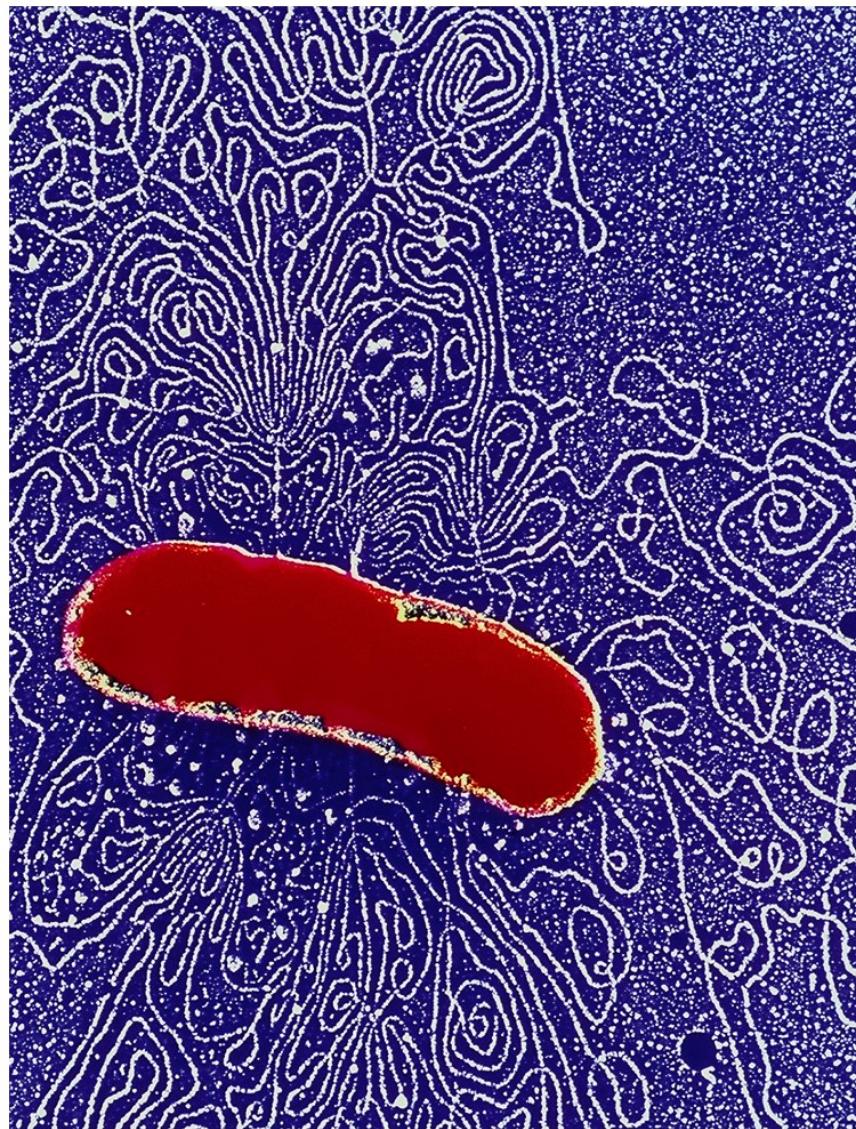
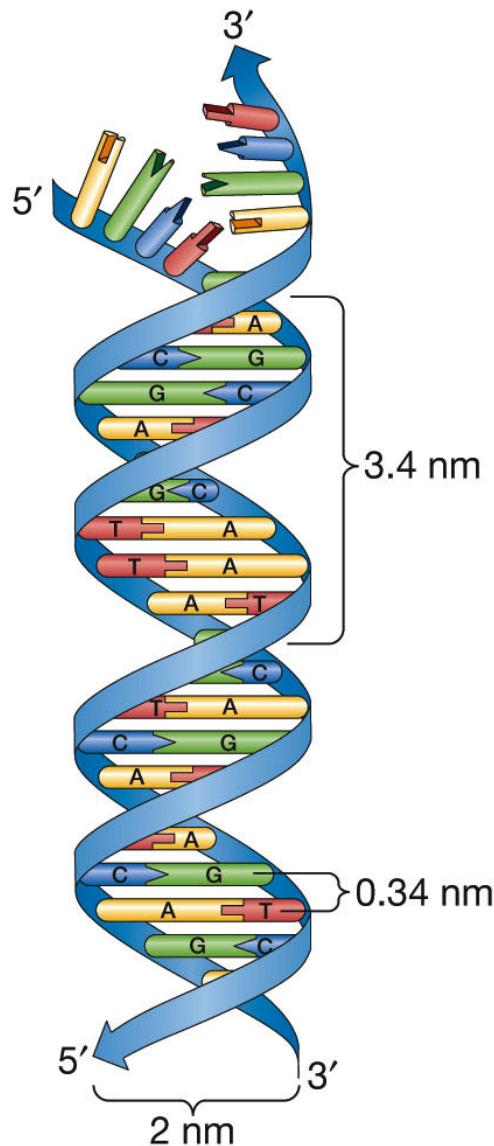


# DNA a jej úloha v dedičnosti: rekapitulácia



# Mechanizmus replikácie DNA

“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:

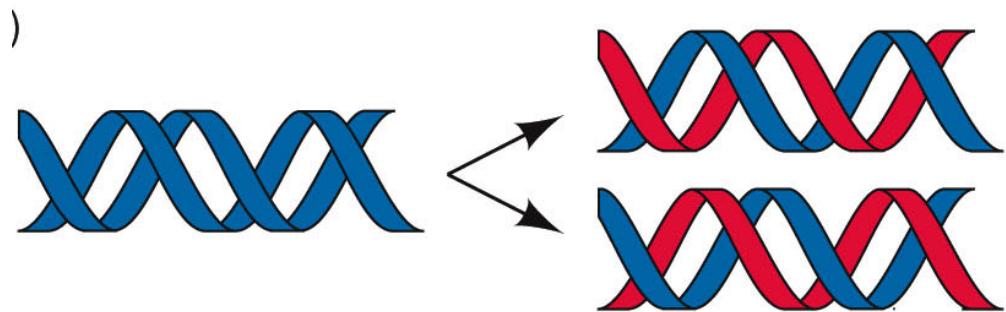
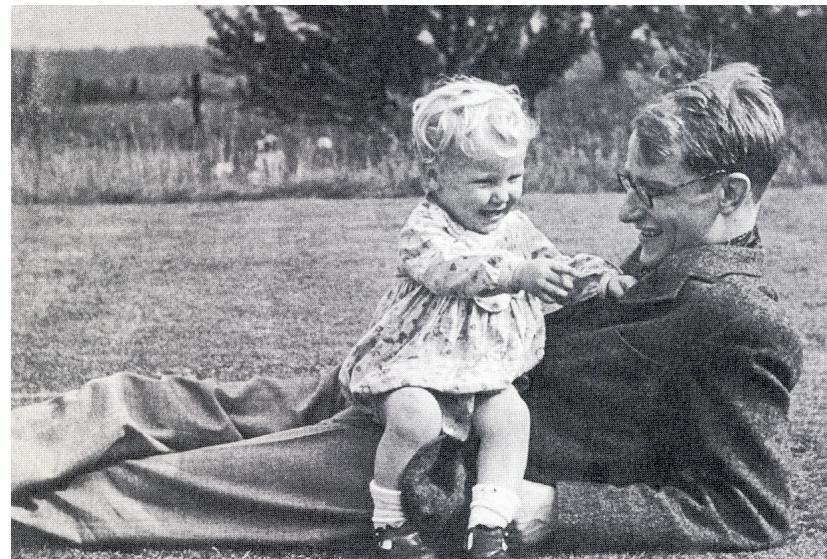
A - T  
T - A  
C - G  
A - T  
G - C  
T - A  
T - A

✓ chains separate

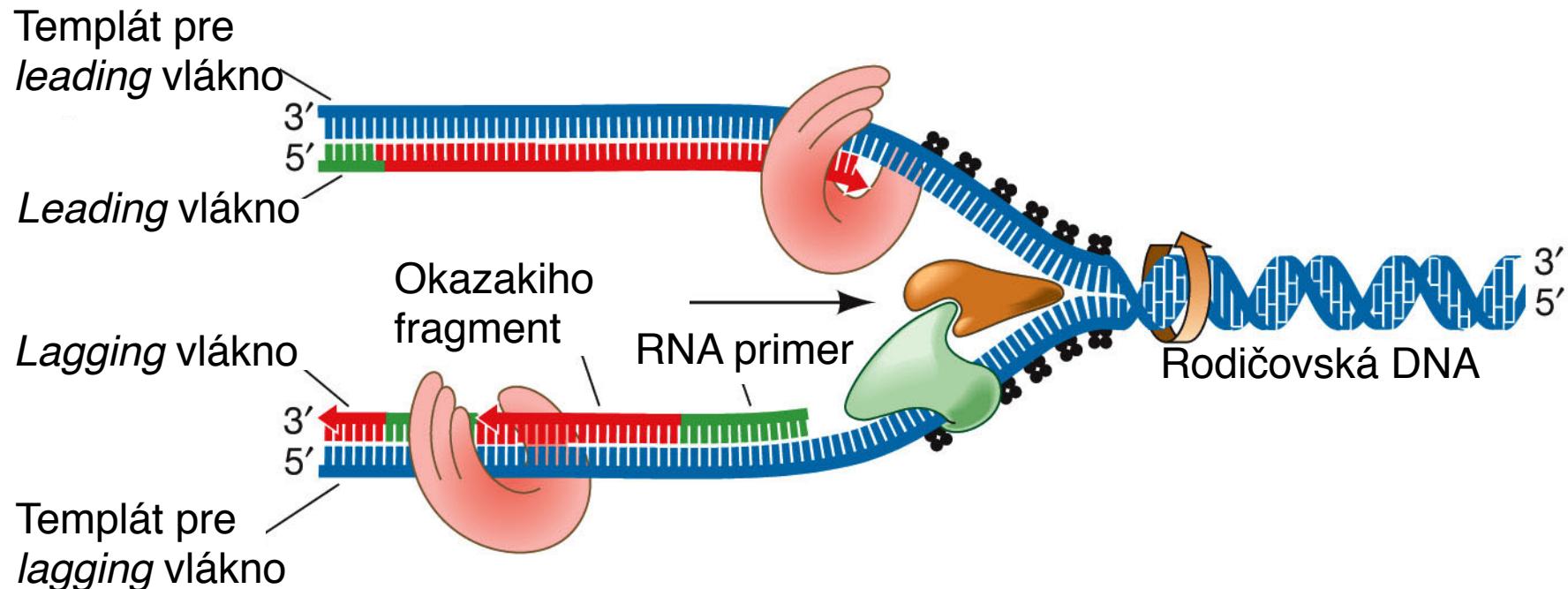
A T C A G T T

↓ new chain form

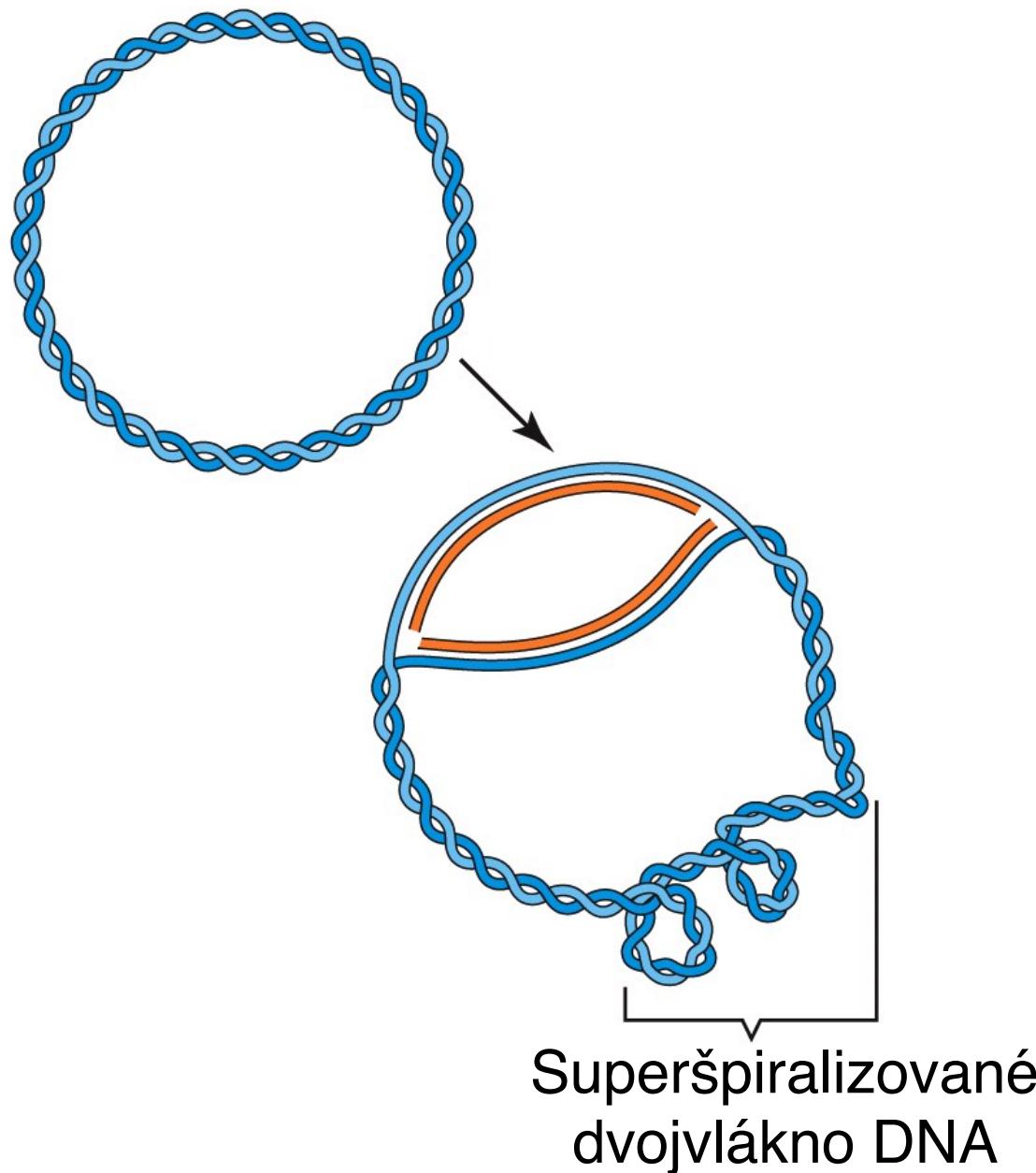
A - T T - A  
T - A A - T  
C - G G - C  
A - T T - A  
G - C C - G  
T - A A - T  
T - A A - T



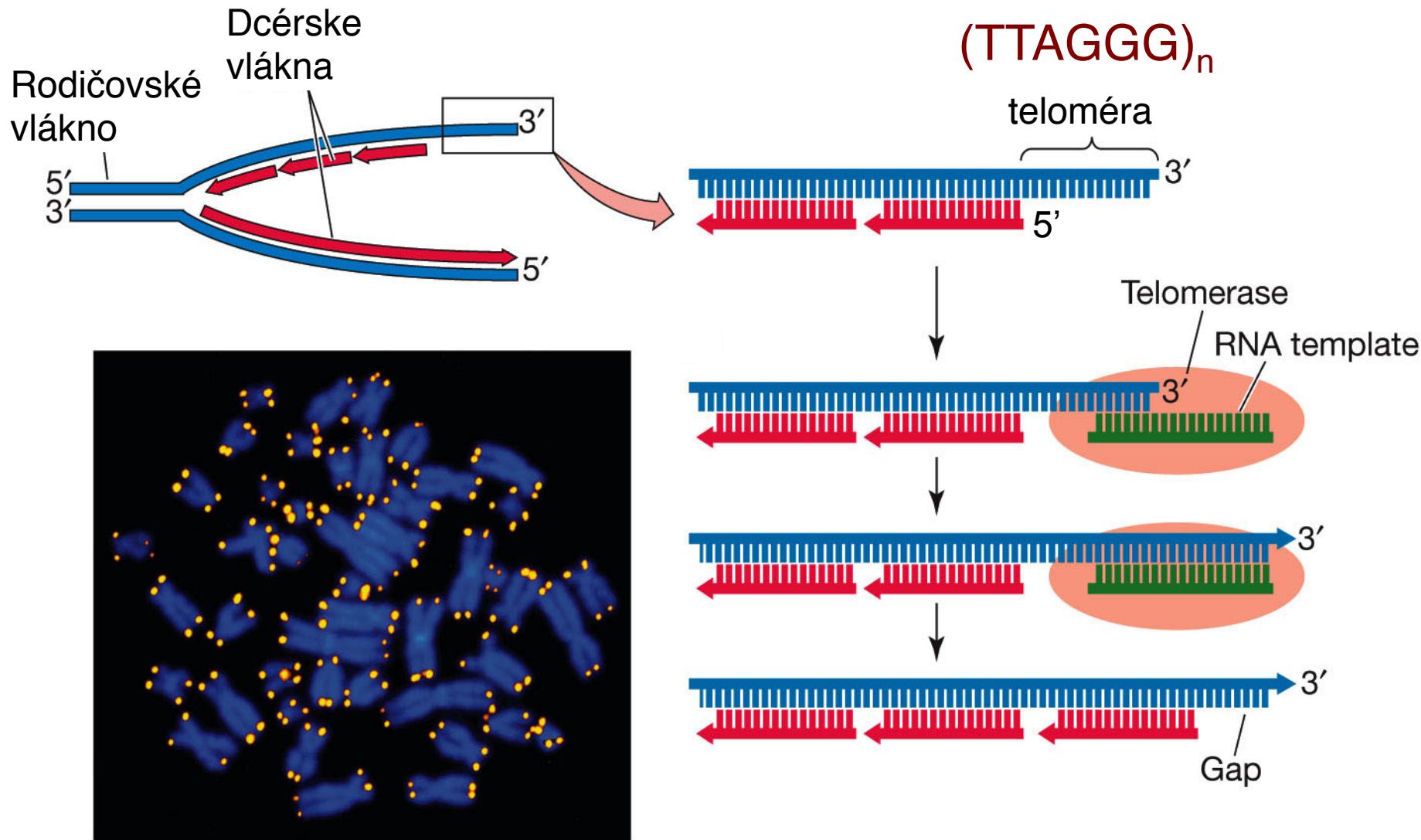
# DNA replikácia: SUMÁR



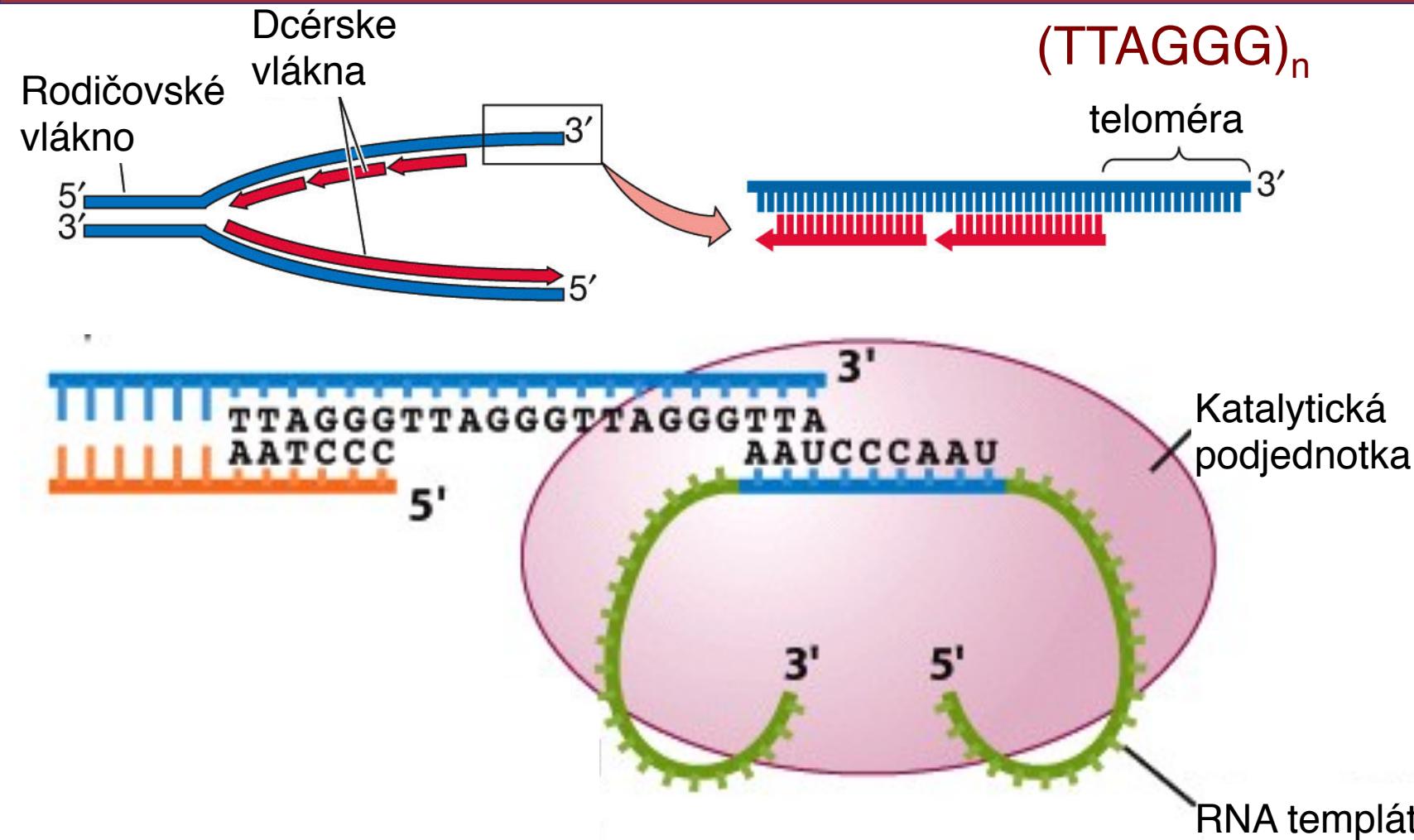
Počas replikácie DNA dochádza k jej superšpiralizácii, ktorá je odstraňovaná prostredníctvom TOPOIZOMERÁZ



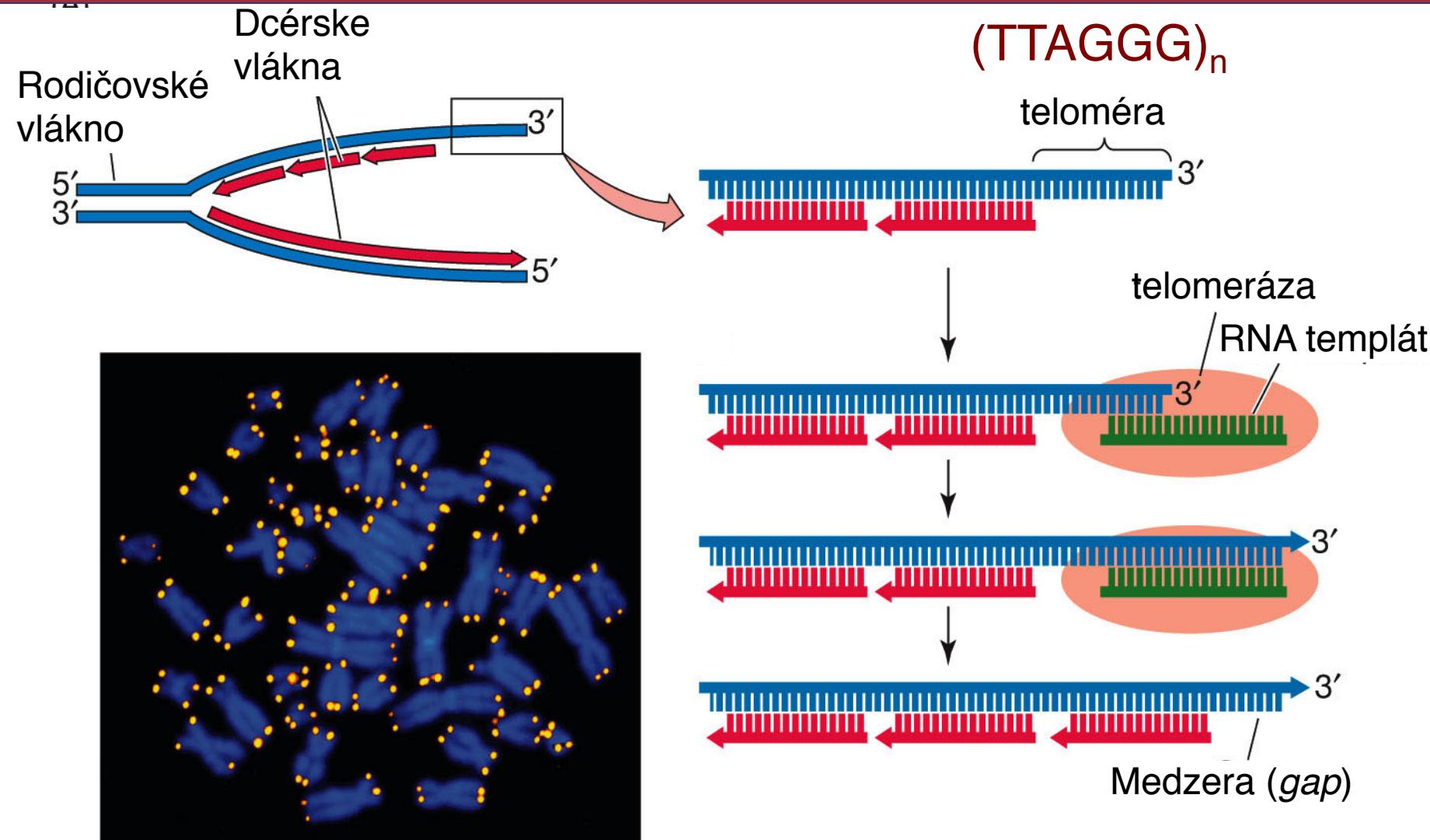
# Syntéza lagging (zaostávajúceho) vlákna spôsobuje problém replikácie koncov (telomér) lineárnych molekúl DNA



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

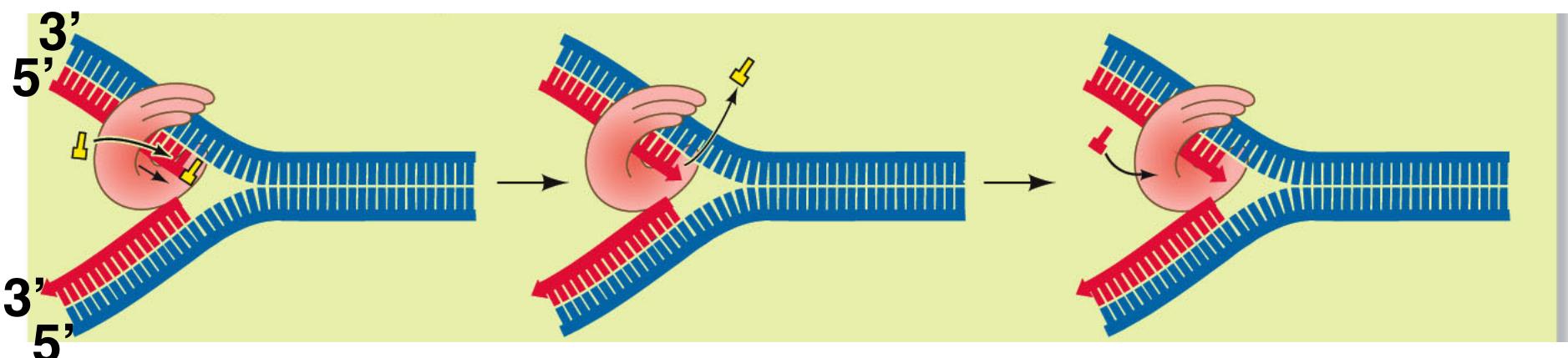


Konce jadrových chromozómov (teloméry) sú tvorené opakujúcimi sa sekvenciami 5'-TTAGGG-3', ktoré predlžuje enzým telomeráza, zložený z RNA a proteínovej podjednotky



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



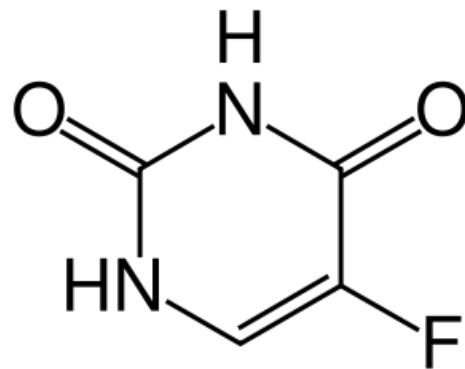
- DNA proofreading
- Mismatch repair
- Excision repair

[http://highered.mheducation.com/sites/9834092339/student\\_view0/chapter14/proofreading\\_function\\_of\\_dna\\_polymerase.html](http://highered.mheducation.com/sites/9834092339/student_view0/chapter14/proofreading_function_of_dna_polymerase.html)

[http://highered.mheducation.com/sites/9834092339/student\\_view0/chapter14/methyl-directed\\_mismatch\\_repair.html](http://highered.mheducation.com/sites/9834092339/student_view0/chapter14/methyl-directed_mismatch_repair.html)

[http://highered.mheducation.com/sites/9834092339/student\\_view0/chapter14/nucleotide\\_excision\\_repair.html](http://highered.mheducation.com/sites/9834092339/student_view0/chapter14/nucleotide_excision_repair.html)

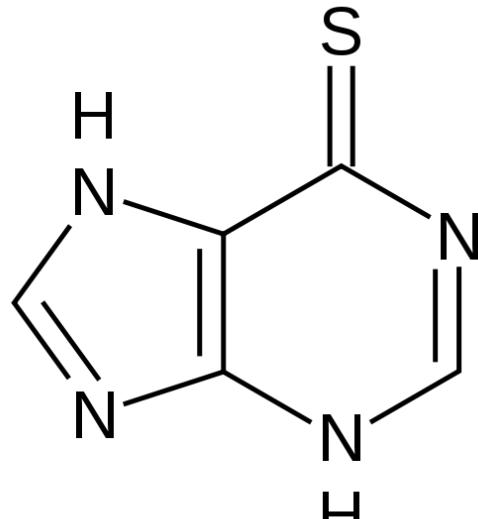
# Inhibítory replikácie DNA môžu byť využité v protinádorovej terapii



5-fluorouracil

Inhibítory  
syntézy  
pyrimidínov

Chemoterapia  
kolorektálnych  
nádorov

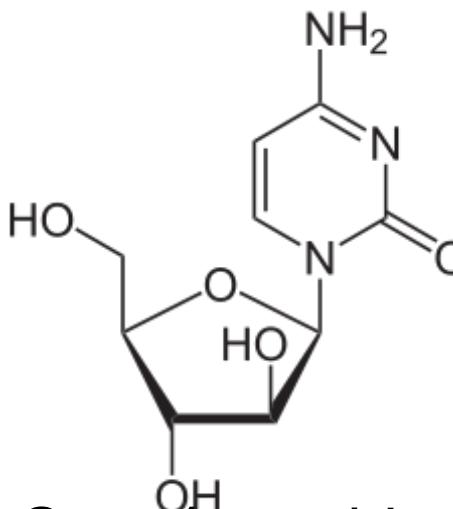


6-mercaptopurín

Inhibítory  
syntézy  
purínov

Chemoterapia  
akútnej leukémie

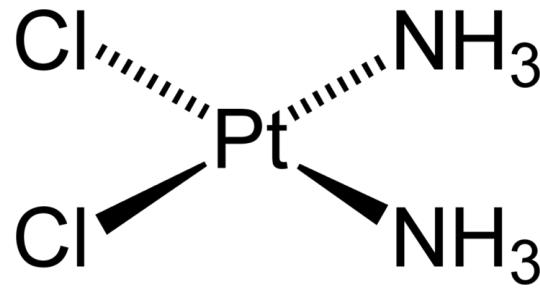
# Inhibítory replikácie DNA môžu byť využité v protinádorovej terapii



Cytozín-arabinozid

Analóg  
deoxycytidínu;  
inhibítorm  
elongácie DNA  
reťazca

Chemoterapia  
akútnej leukémie



Cis-platina

Indukcia tvorby  
krížových väzieb  
znemožňujúcich  
pohyb replikačnej  
vidlice

Chemoterapia  
rakoviny  
semenníkov

# Anatómia a funkcia génu



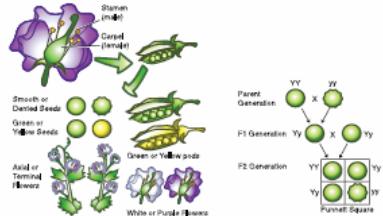
- ▶ Kol'ko génov má človek?
- ▶ Čo je to gén?

- ▶ Vývin koncepcie génu: od funkcie k štruktúre
- ▶ Koncepcia jeden gén-jeden enzym
- ▶ Genetická definícia génu
- ▶ *rII* lokus bakteriofága T4 ako molekulárno-genetický model génu
- ▶ Moderná koncepcia génu



# Konceptie génu: do 1940

Gregor Mendel

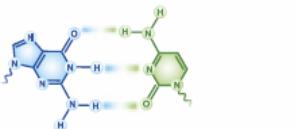


Popis základných genetických zákonov

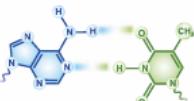
1865

1869

Gén ako diskrétna jednotka dedičnosti



Izolácia DNA  
(F. Miescher)



C. Correns  
E. Von Tschermak  
H. De Vries  
**genetika**



Thomas Morgan



Gény sú lokalizované na chromozómoch

1900

Gén ako definovaný úsek chromozómu

1909 1913 1928

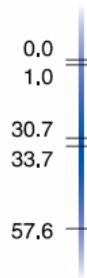
Termín **gén**  
(gr. *genesis*,  
*genos*)

Prvá genetická mapa

Griffith objavuje „transformačný princíp“ u baktérií



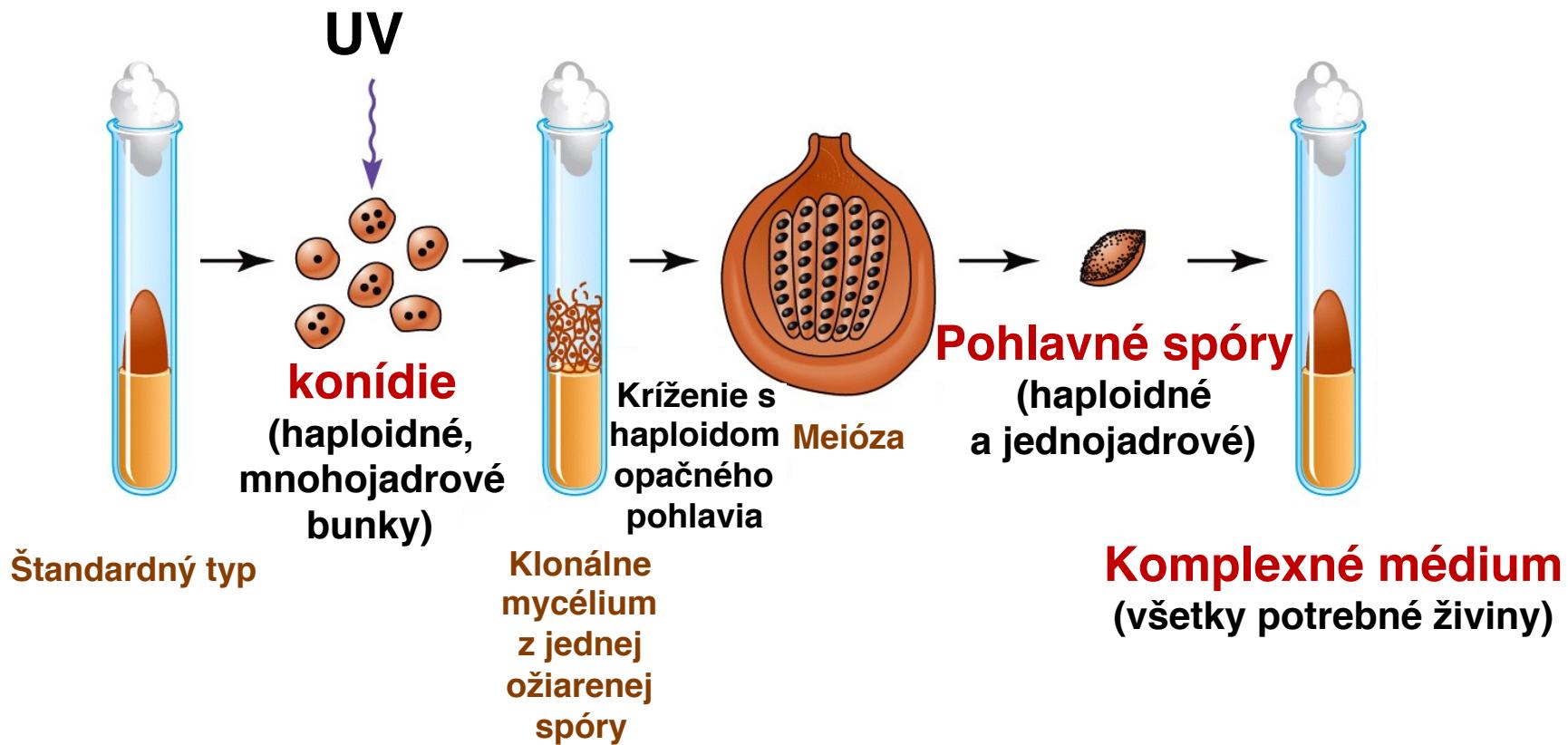
Wilhelm Johannsen



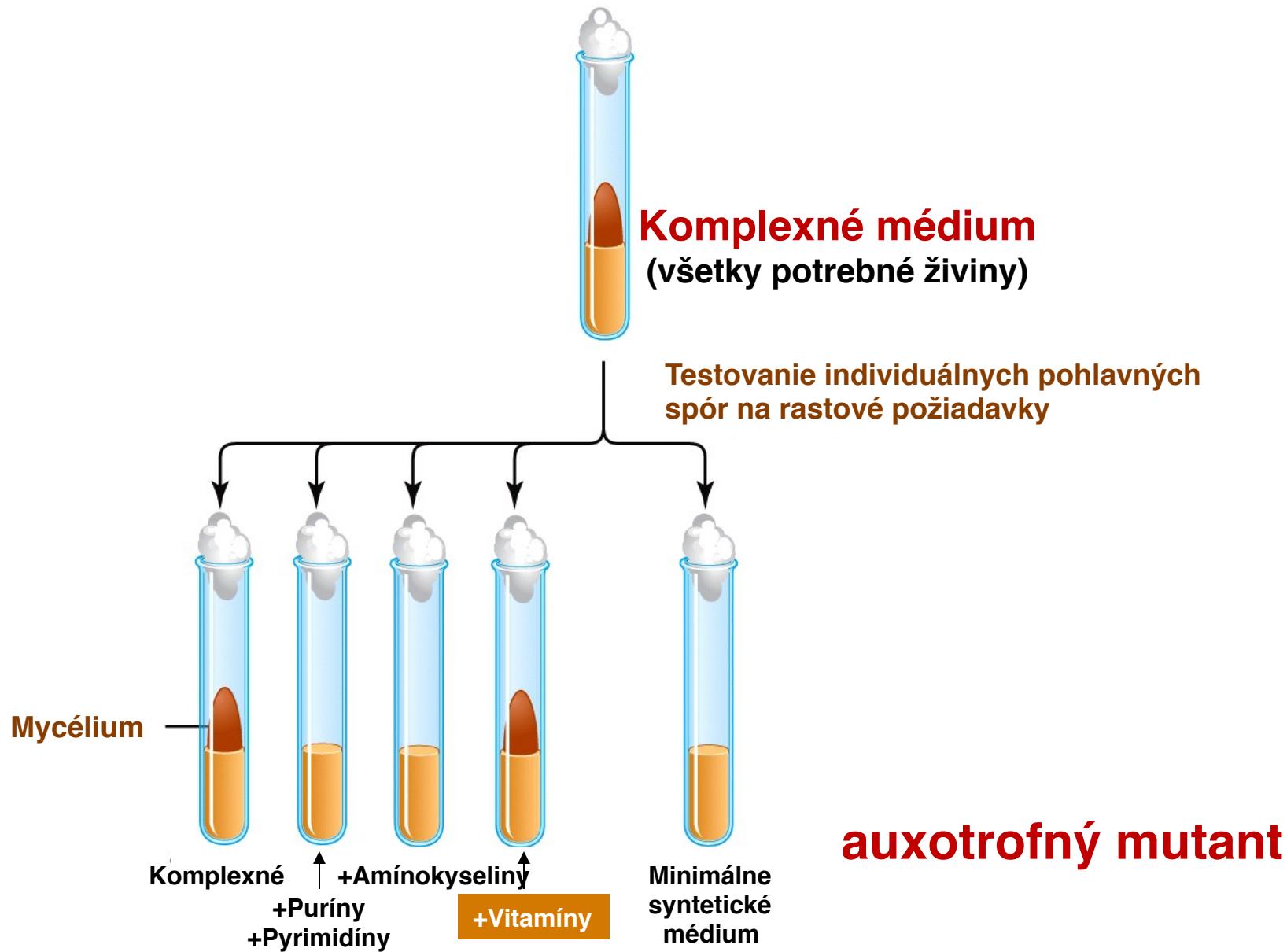
# Koncepcia jeden gén-jeden enzým: Experiment Beadla a Tatuma

- ▶ Hypotéza: Biosyntéza esenciálnych metabolitov je pod genetickou kontrolou
- ▶ Ak hypotéza platí, mutácia v génoch zúčastnených v biosyntéze metabolitov bude viest' k tvorbe buniek vyžadujúcich prídavok týchto metabolitov do média
- ▶ *Neurospora crassa* ako modelový organizmus pre testovanie tejto hypotézy

# Koncepcia jeden gén-jeden enzým: Experiment Beadla a Tatum

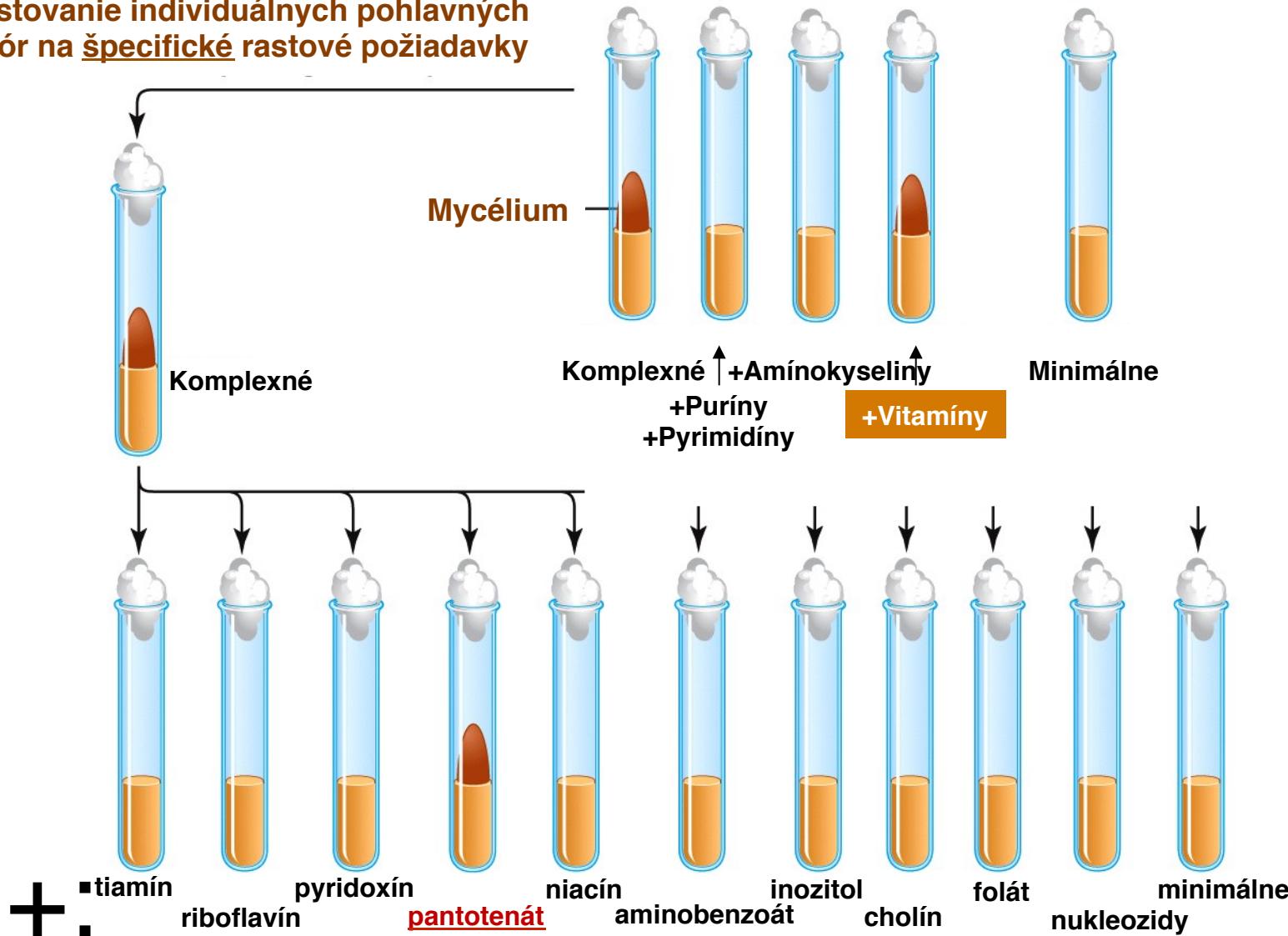


Auxotrofné mutanty nie sú schopné rásť a deliť sa na médiu bez príavku metabolitu, ktorý si mutantná bunka nedokáže sama nasynthetizovať

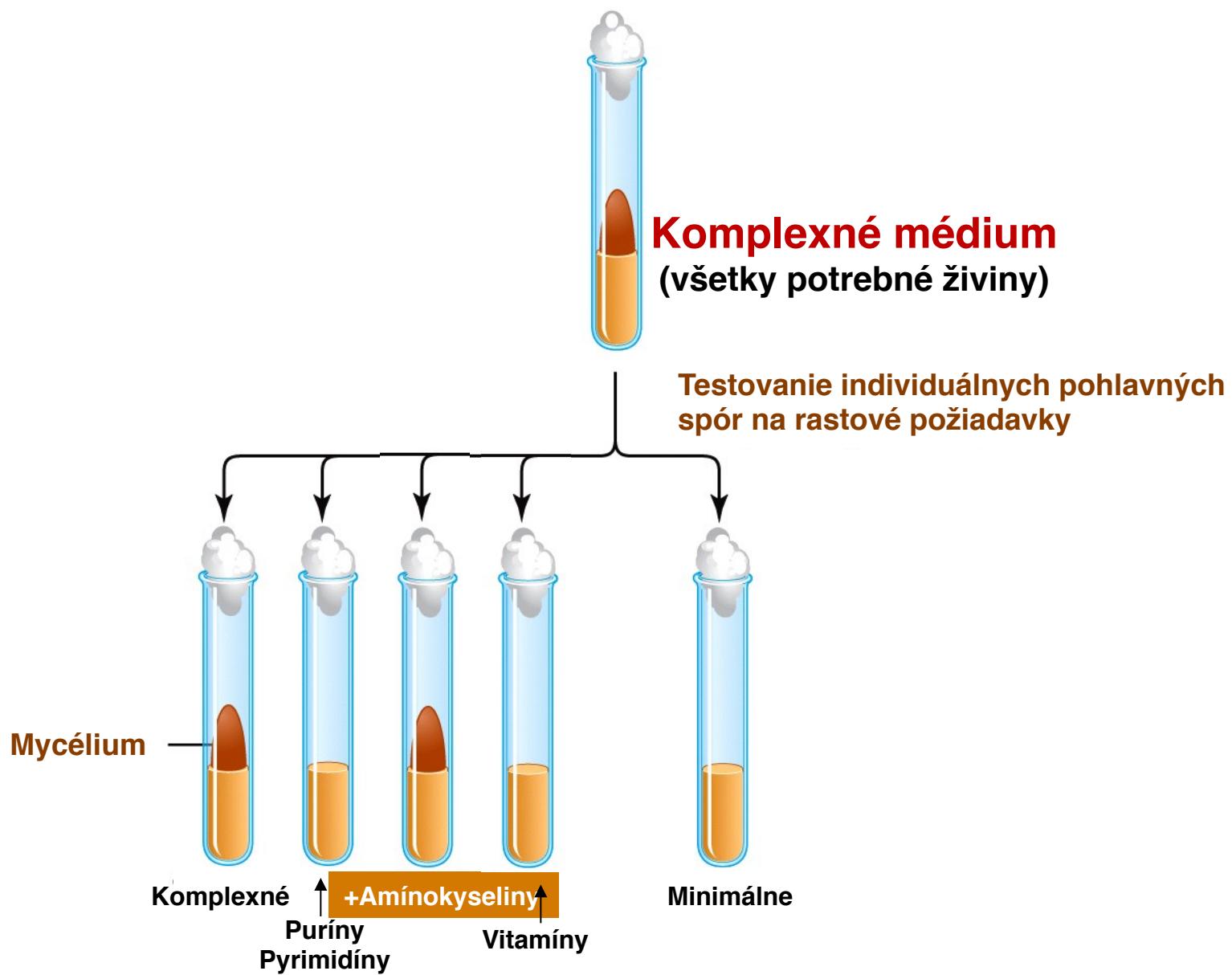


Auxotrofné mutanty nie sú schopné rásť a deliť sa na médiu bez prípadku metabolitu, ktorý si mutantná bunka nedokáže sama nasynthetizovať

**Testovanie individuálnych pohlavných spór na specifické rastové požiadavky**

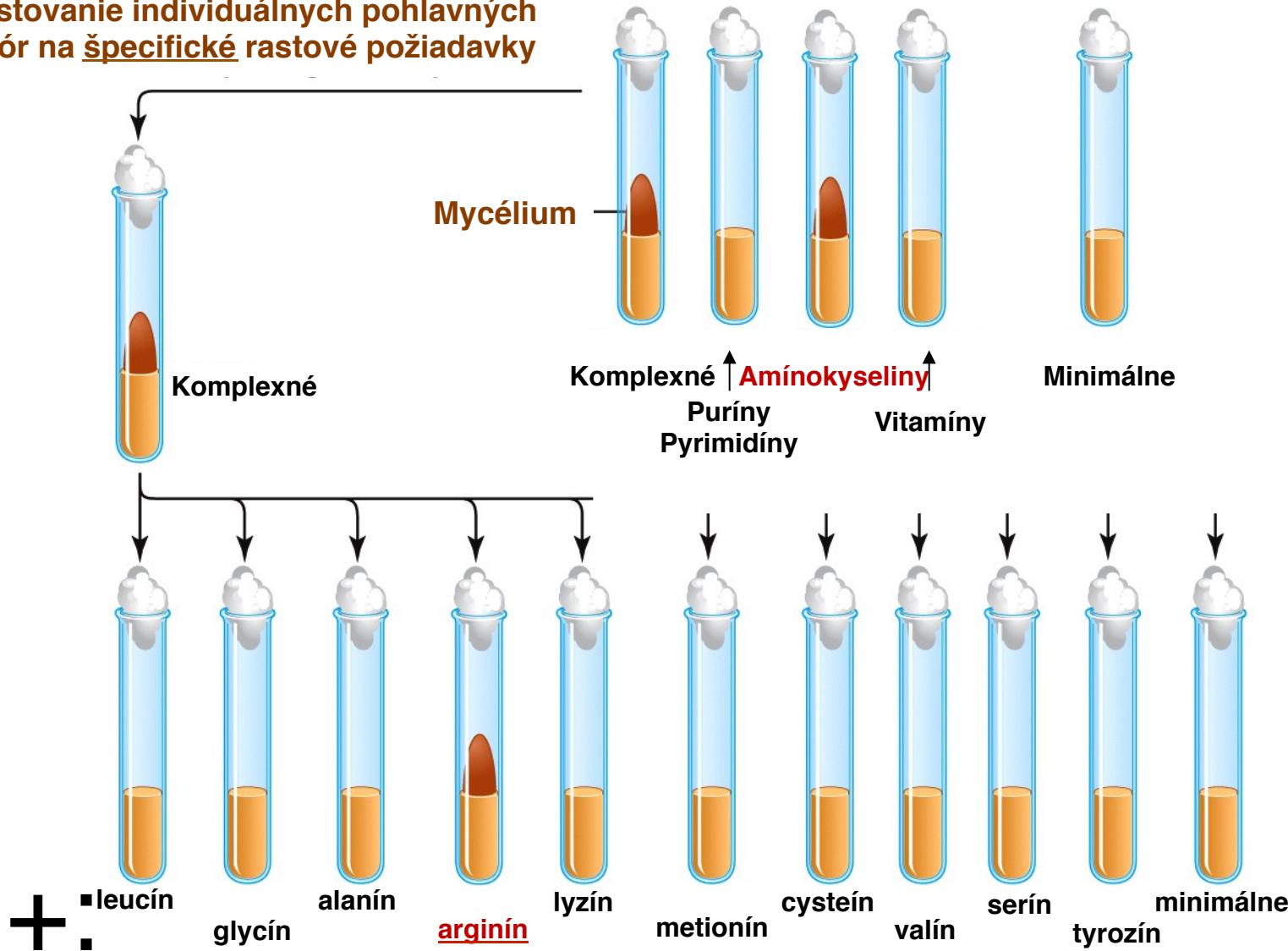


Spektrum auxotrofných mutantov mikroorganizmov nie je limitované iba na bunky neschopné syntetizovať vitamíny



Spektrum auxotrofných mutantov mikroorganizmov nie je limitované iba na bunky neschopné syntetizovať vitamíny

Testovanie individuálnych pohlavných spór na specifické rastové požiadavky



# Genetická analýza auxotrofných mutantov umožňuje konštrukciu biochemických dráh – BIOCHEMICKÁ GENETIKA

N-acetylornitín



ornitín



citrulín



arginínsukcinát

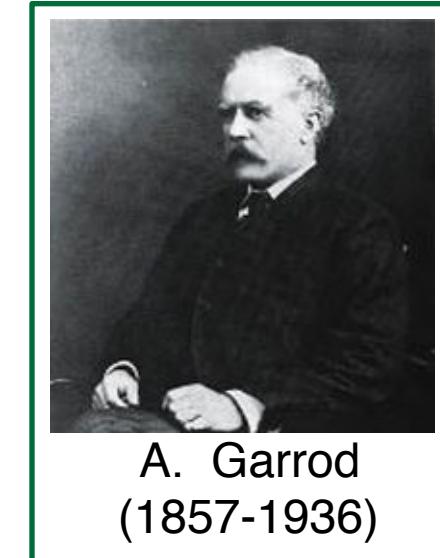
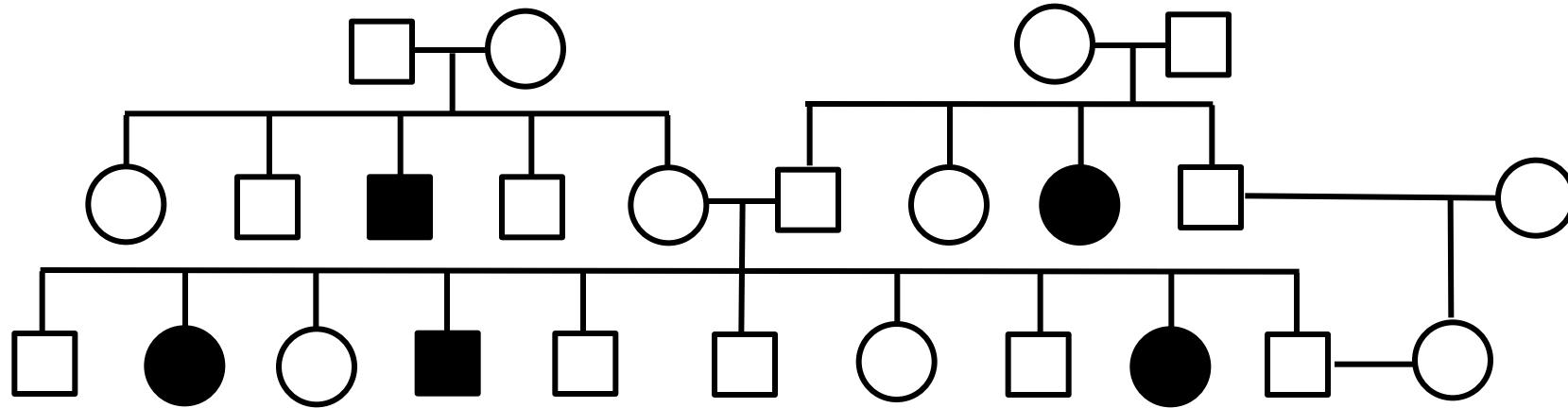


arginín

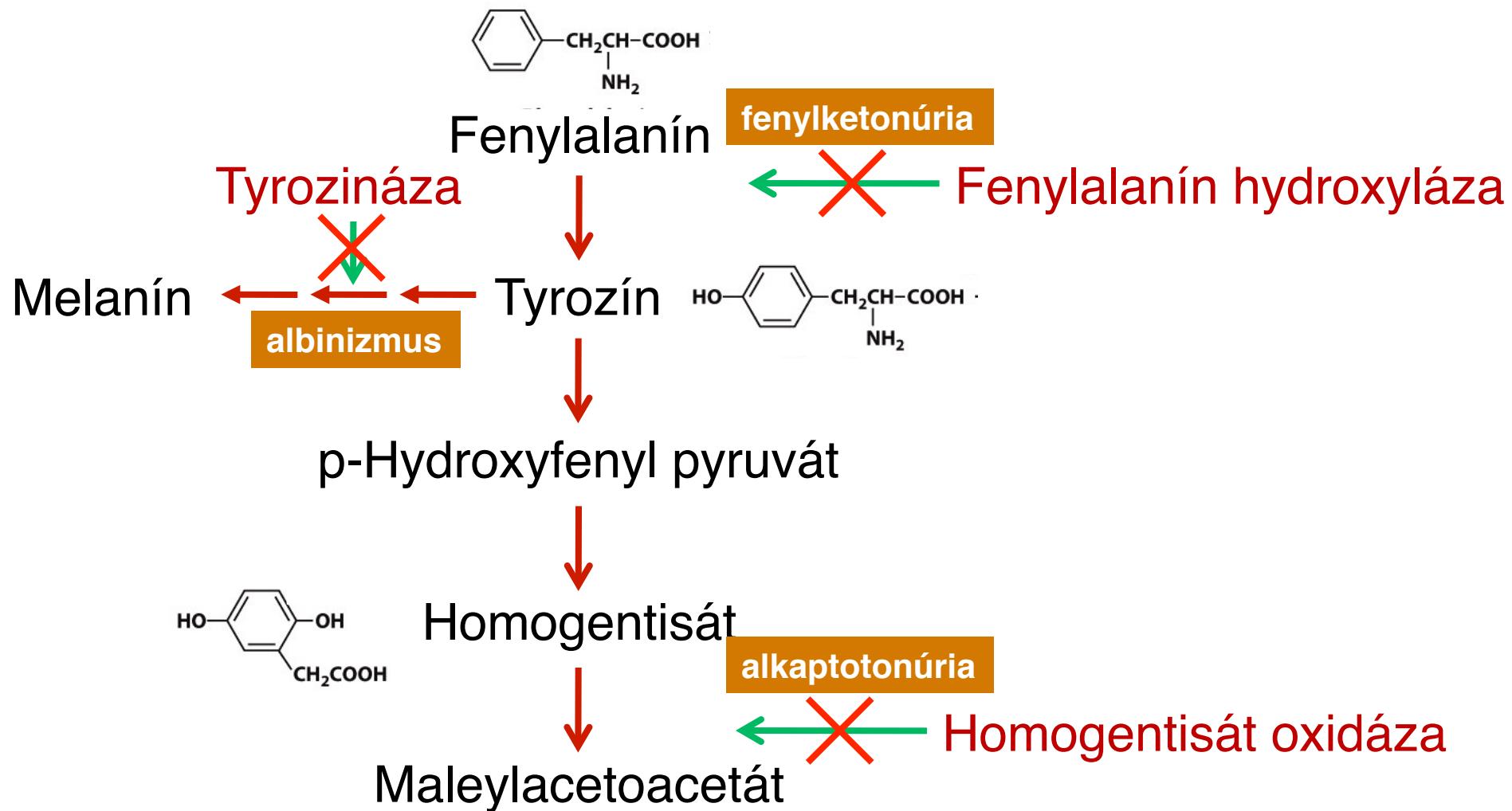
Kmeň	Prídatky do minimálneho média				
	-	ornitín	citrulín	arginín sukcinát	arginín
Štandard	+	+	+	+	+
<i>arg-E</i>	-	+	+	+	+
<i>arg-F</i>	-	-	+	+	+
<i>arg-G</i>	-	-	-	+	+
<i>arg-H</i>	-	-	-	-	+

Poznámka: Toto je správne poradie génov, teda také ako bolo prezentované na prednáške. Ak ste sa nedali pomýliť, je to dôkaz, že tomu rozumiete.

# Mutácie v génoch kódujúcich metabolické enzýmy sú časté aj u človeka: alkaptonúria



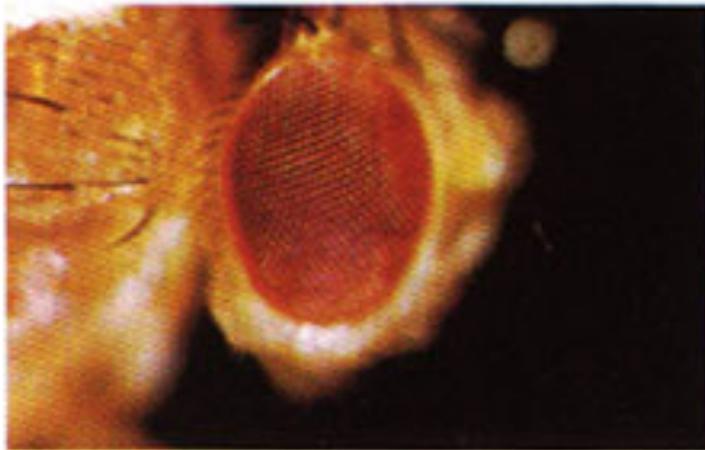
# Jeden mutovaný gén – jeden metabolický blok



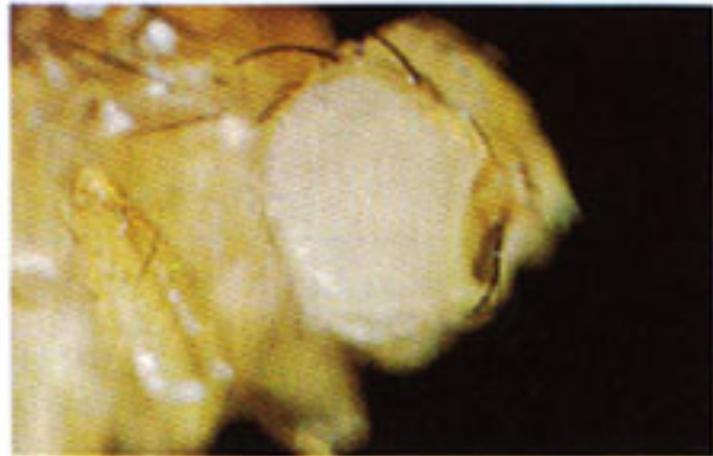
# Genetická definícia génu

**Komplementačný test** ako  
nástroj pre definíciu aliel génu

Genetická analýza farby očí u *D. melanogaster*



Štandardný typ  
**(wild-type)**

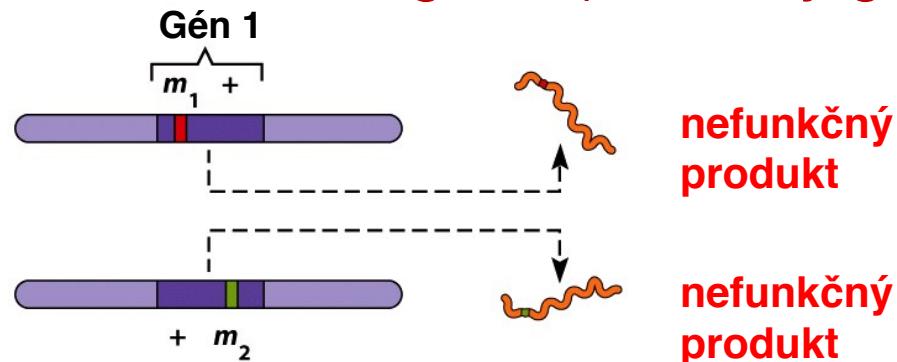


Mutant *white*

# Komplementačný test dokáže odlišiť, či mutácie nastali v 1 alebo 2 génoch

**2 mutácie v 1 géne (= 2 alely génu)**

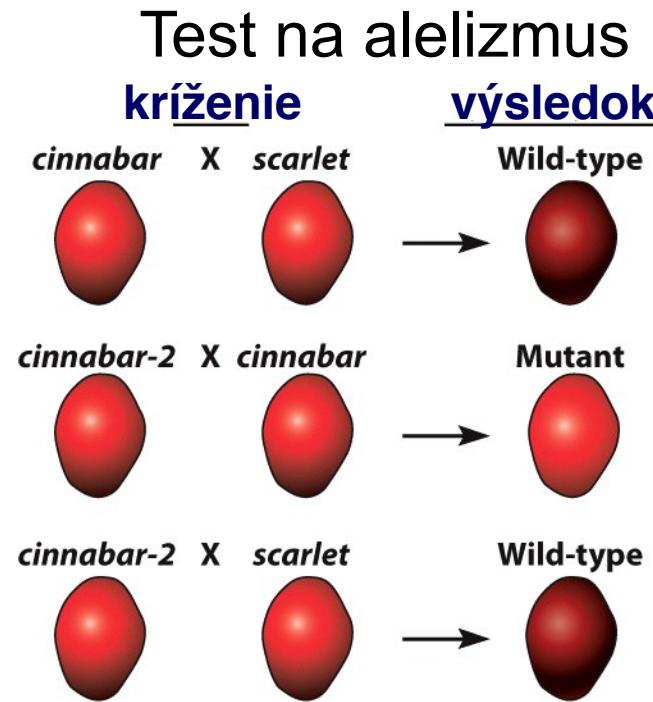
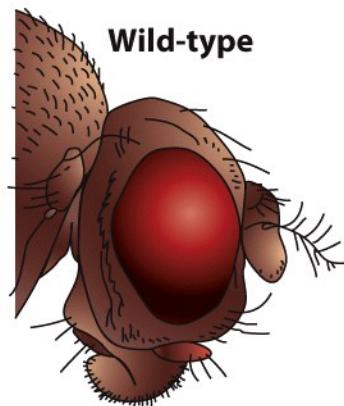
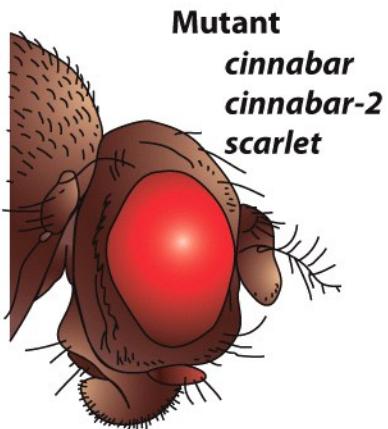
1. kópia homologického chromozómu



2. kópia homologického chromozómu

Mutantný fenotyp

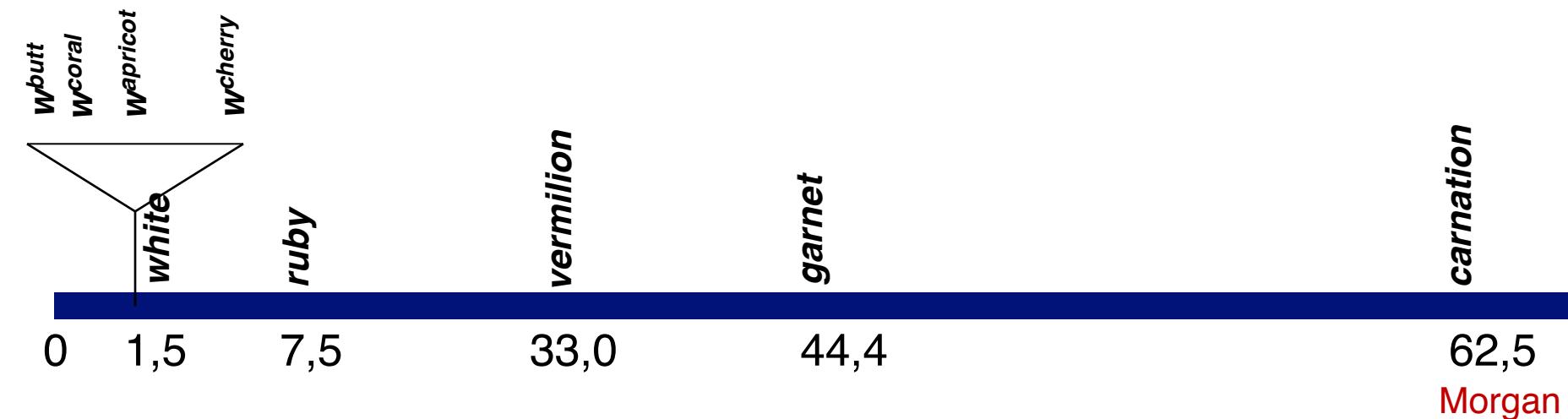
# Komplementačný test na funkčný alelizmus recesívnych mutácií



# Komplementačný test mutácií

## *D. melanogaster* vedúcich k zmene farby oka

Mutácia	<i>white</i>	<i>garnet</i>	<i>ruby</i>	<i>vermilion</i>	<i>cherry</i>	<i>coral</i>	<i>apricot</i>	<i>buff</i>	<i>carnation</i>
<i>white</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>garnet</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ruby</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>vermilion</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>cherry</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>coral</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>apricot</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>buff</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>carnation</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-



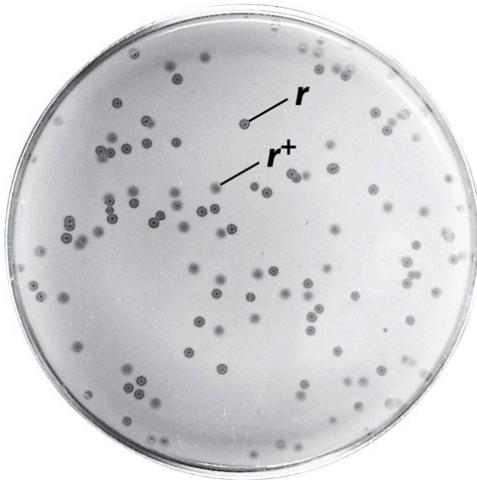
# Gény ako korálky na šnúrke? (*beads-on-a-string*)



To by znamenalo, že gén je FUNKČNÁ aj ŠTRUKTÚRNA jednotka, ktorá kontroluje konkrétnu fenotypovú charakteristiku a mala by byť nedeliteľná rekombináciou

**Rekombinácia** je proces, pri ktorom dochádza k výmene častí chromozómov

# *rII* Lokus bakteriofága T4 ako model intragénovej rekombinácie



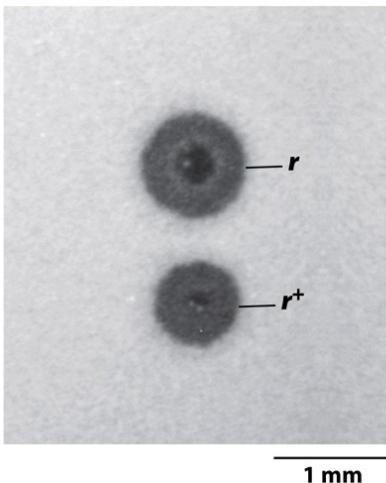
*rapid lysis* – *r* – mutanty

Zmena morfológie plakov

- Rastú na kmeni *E. coli* B, u ktorých tvoria väčšie (*r*) plaky
- *r* mutanty nerastú na kmeni *E. coli* K12



To umožňuje izoláciu zriedkavých rekombinantov

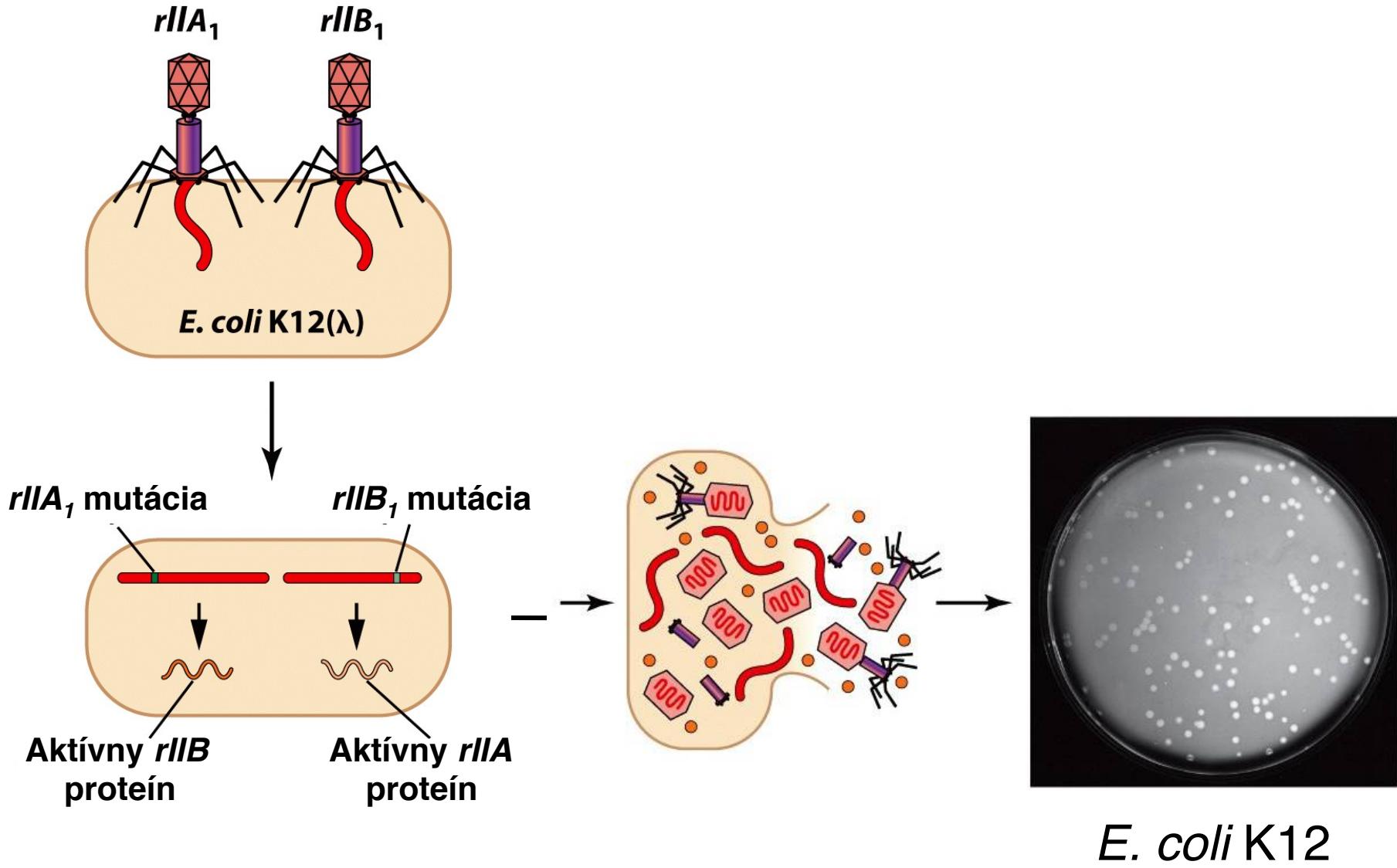


PROC. N. A. S. VOL. 41, 1955 pp. 344–354

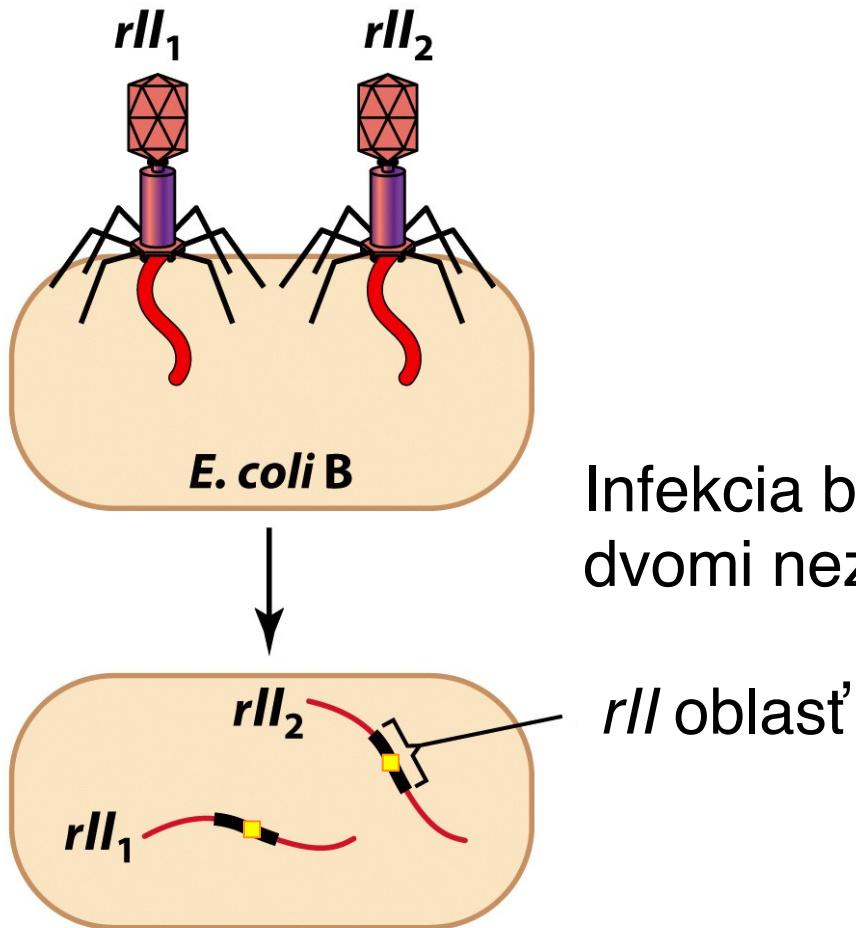
FINE STRUCTURE OF A GENETIC REGION IN BACTERIOPHAGE

BY SEYMOUR BENZER

# *rII* lokus pozostáva z dvoch génov *rIIA* a *rIIB*: Komplementačný test

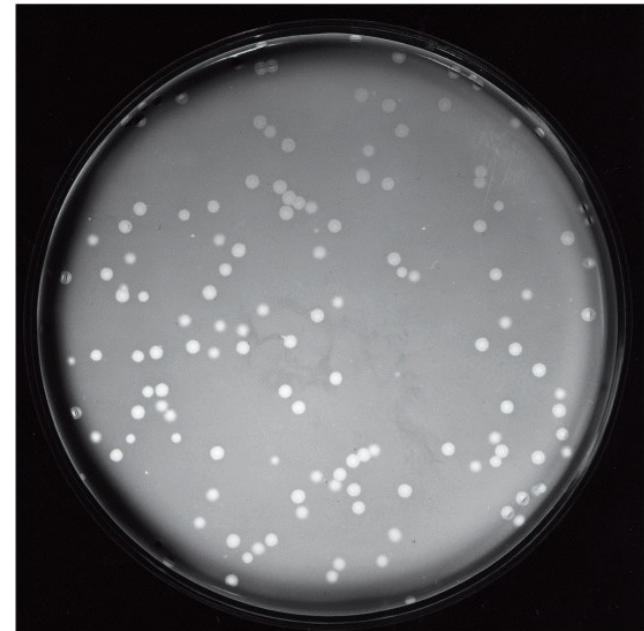
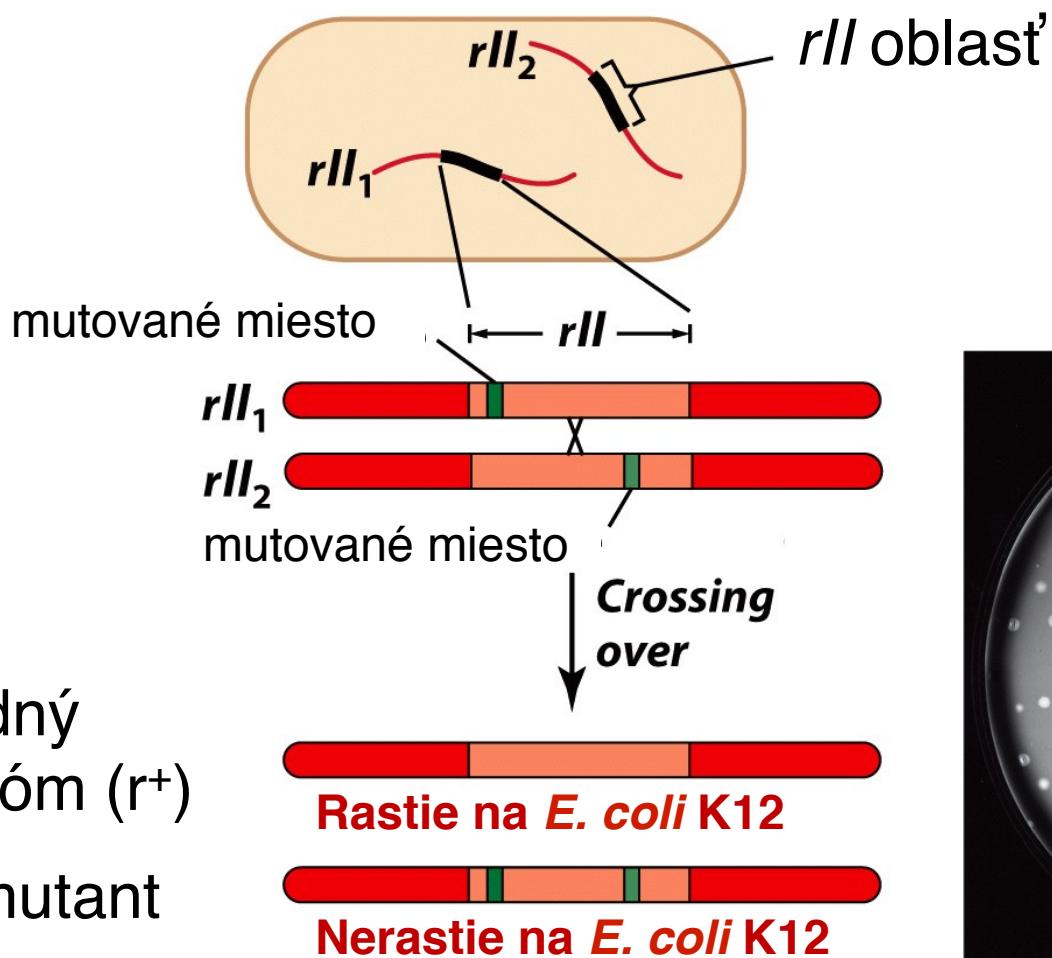


Je možné získať  $r^+$  fágové častice infekciou *E. coli* B fágmi mutantnými v tom istom géne?



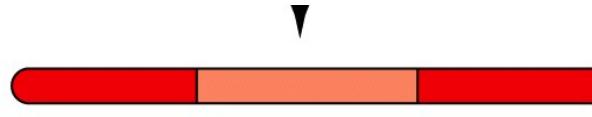
Infekcia buniek kmeňa *E. coli* B dvomi nezávislými *rII* mutatmi

Pokial' sú mutácie lokalizované v rôznych miestach chromozómu, môže medzi nimi dôjsť k rekombinácii



# Výpočet rekombinačnej frekvencie

Štandardný  
chromozóm ( $r^+$ )



Rastie na *E. coli* K12

Dvojitý mutant



Nerastie na *E. coli* K12

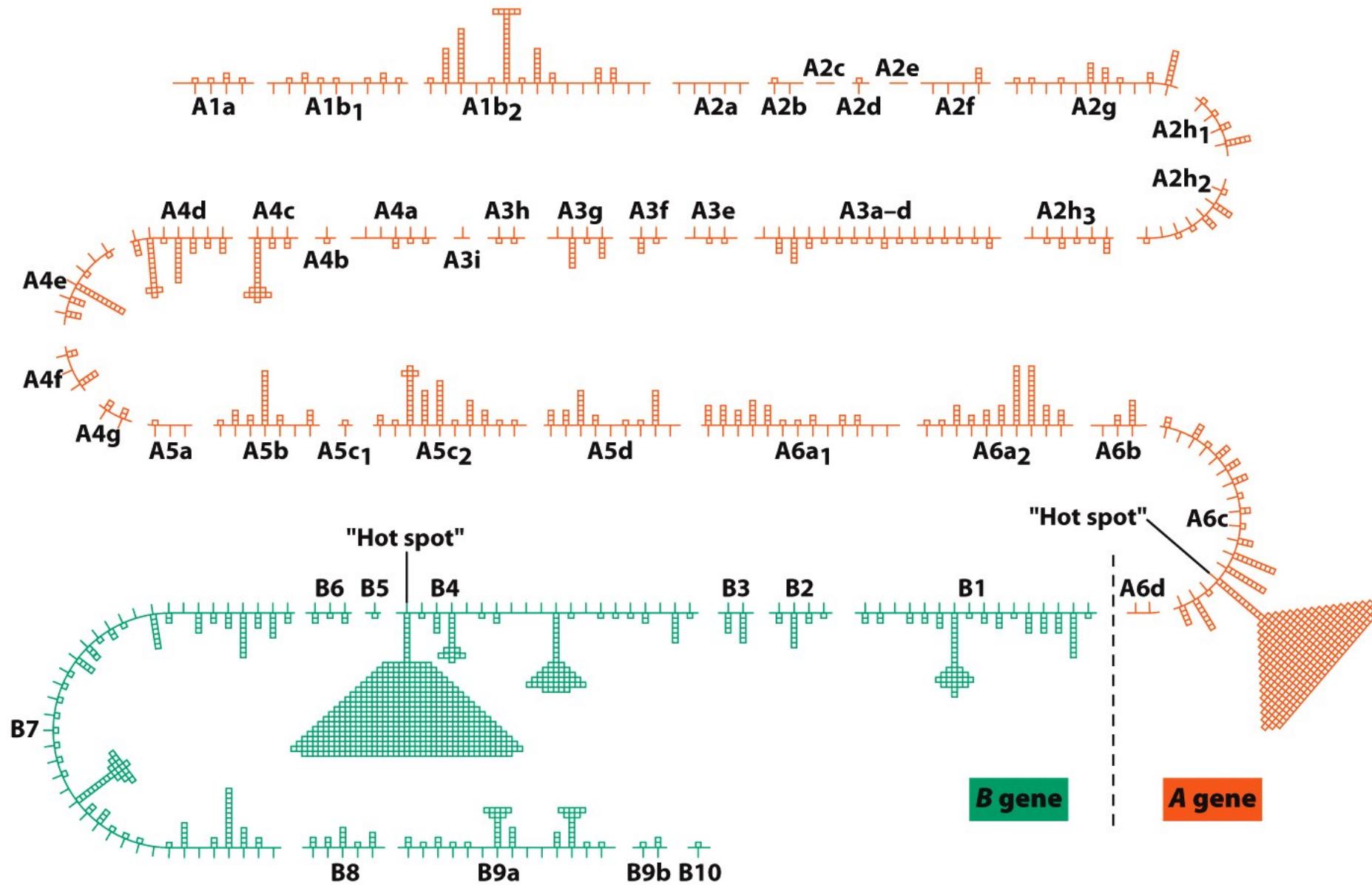
**$2 \times \text{počet WT potomstva} \div \text{celkový počet potomstva}$**

(určené na základe počtu plakov v kmeni *E. coli* B)

# Sumár Benzerových experimentov

- ▶ Najmenšou jednotkou podliehajúcou mutáciu, resp. rekombináciu je 1 pár nukleotidov v DNA

# Genetická mapa lokusu *rII* fága T4



# Moderná koncepcia génu

- ▶ **Gén je funkčnou jednotkou**, ktorá kontroluje syntézu polypeptidu, alebo RNA
- ▶ **Štruktúrnou jednotkou je pár nukleotidov**, ktorý je najmenšou jednotkou schopnou podliehať mutáciám a rekombináciám.