

Enzymy v molekulární biologii

Daniel Renčiuk
BFU AV ČR, v.v.i.

VFU, Brno
11.10.2018

Dělení enzymů

Dle typu reakce:

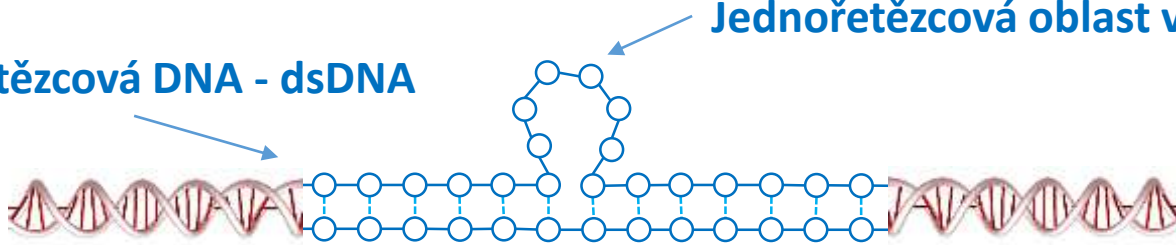
- **Polymerázy** – syntéza nového polynukleotidového řetězce dle matrice
- **Nukleázy** – štěpení polynukleotidového řetězce
- **Kinázy** – fosforylace substrátu – připojení fosfátové skupiny na 5' konec
- **Fosfatázy** – defosforylace substrátu – odštěpení fosfátové skupiny z 5' konce
- **Ligázy** – spojení dvou konců polynukleotidového řetězce
- **Transferázy** – připojení funkční skupiny nebo nukleotidu (bez matrice)

Dle typu substrátu:

- **DNA**
- **RNA**

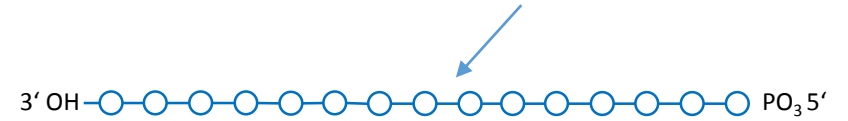
Terminologie

Dvouřetězcová DNA - dsDNA

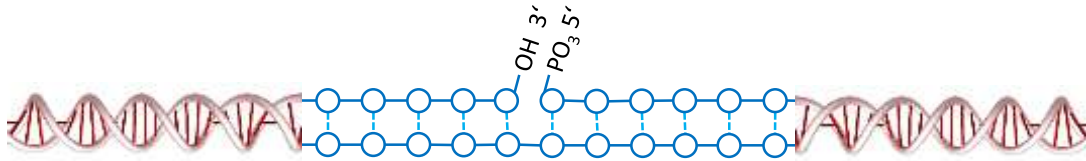


Jednořetězcová oblast v dsDNA

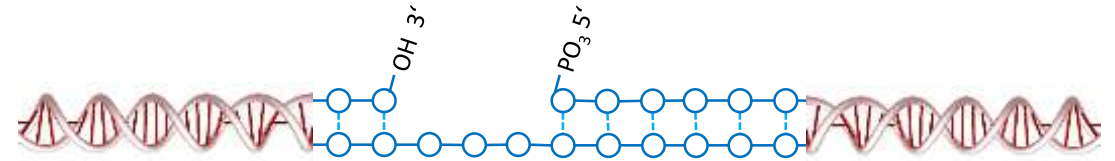
Jednořetězcová DNA - ssDNA



Jednořetězcový zlom (single-strand break; nick)

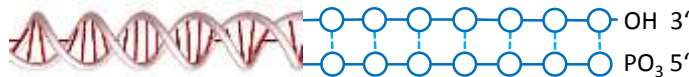


Mezera (gap)



Konce řetězců NK

Tupý konec (blunt end)

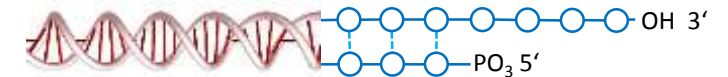


Lepivé /kohezivní konce (sticky / cohesive ends)

3' recessed x 5' protruding



5' recessed x 3' protruding



Polymerázy

- syntéza nového řetězce DNA (RNA) dle matrice DNA (RNA)
 - DNA polymerázy - připojováním nukleotidů k 3'-OH primeru
 - RNA polymerázy – pomocí komplementarity de novo a následně připojováním nukleotidů k 3'-OH nukleotidů připojených dříve
- anabolické enzymy

DNA-dependentní DNA-polymerázy

DNA polymeráza I

Klenowův fragment polymerázy I

Termostabilní DNA polymerázy – izolované z termofilních mikroorganismů – přednáška o PCR

RNA-polymerázy

T7 RNA polymeráza

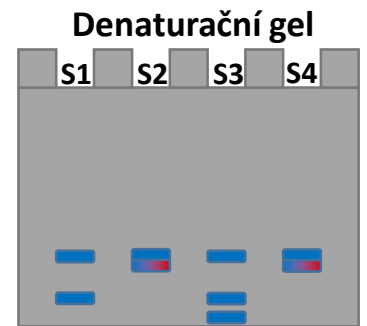
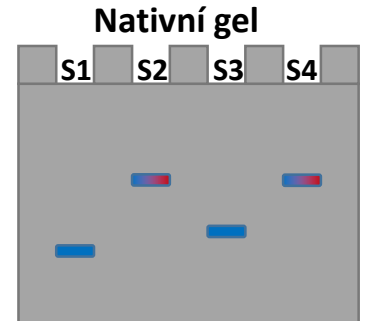
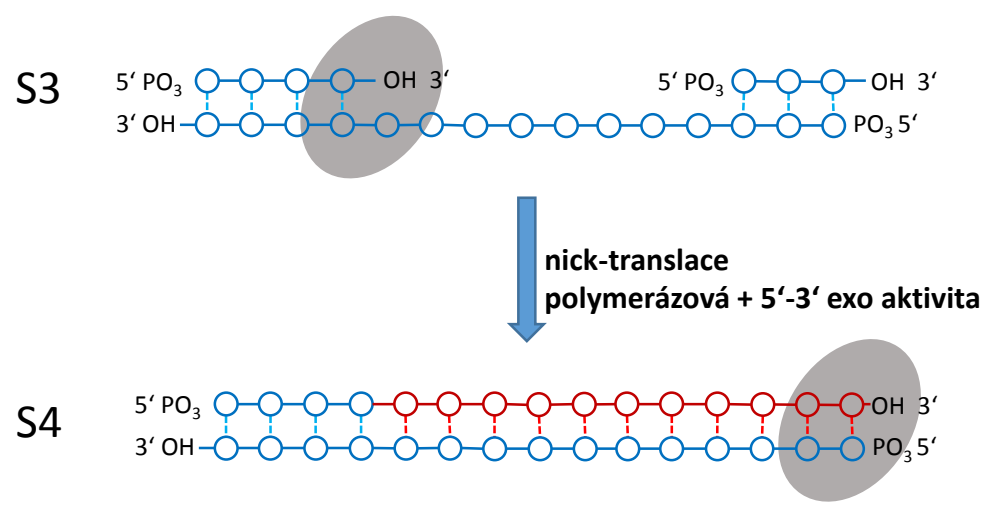
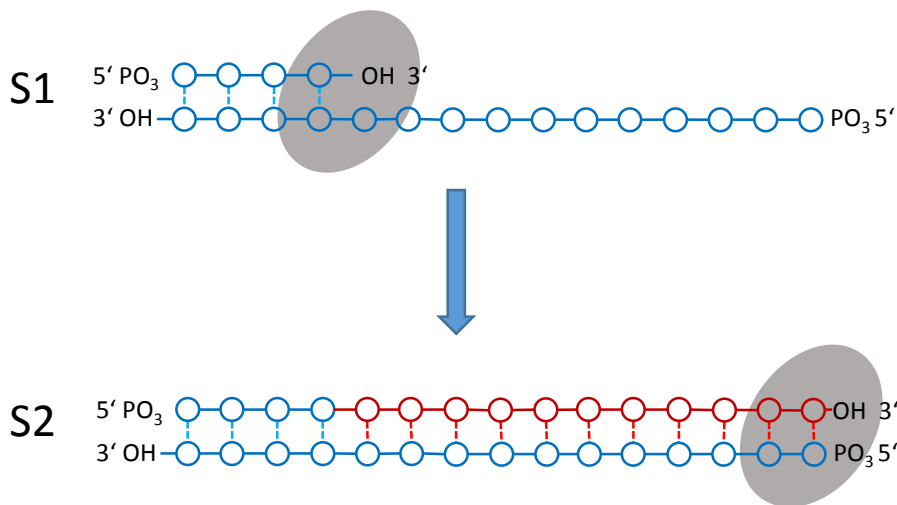
poly-A polymeráza – bez templátu

RNA-dependentní DNA-polymerázy

Reverzní transkriptáza

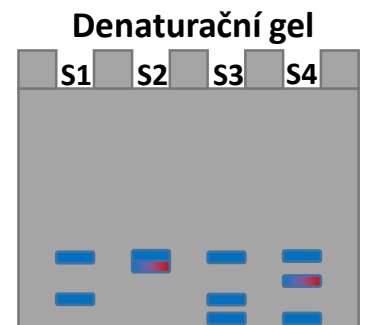
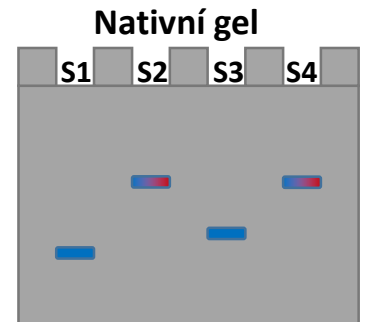
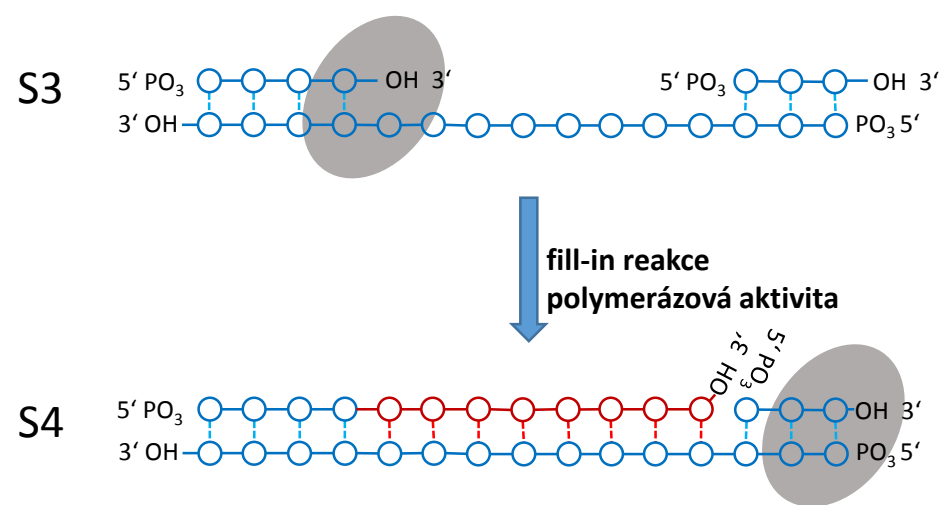
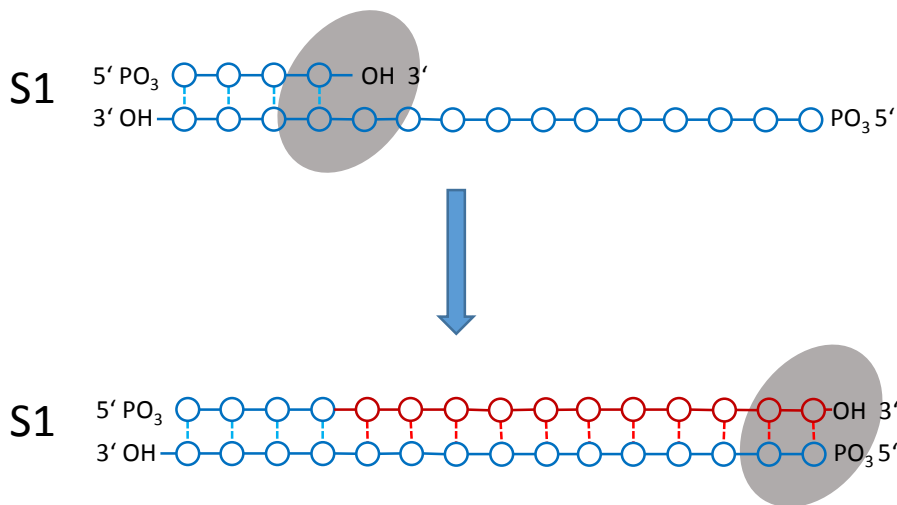
DNA polymeráza I

- 5′-3′ polymerázová aktivita, 5′-3′ i 3′-5′ (proofreading) exonukleázová aktivita – převažující aktivita v závislosti na templátu a koncentraci dNTP
- Jeden protein (109 kDa) se třemi doménami pro příslušné enzymové aktivity
- Zdroj: bakteriální, nyní jako rekombinantní protein
- Kofaktor: Mg^{2+}
- Využití: Značení DNA („nick-translace“), syntéza dvouřetězcové cDNA, modifikace konců molekul DNA



Klenowův fragment DNA polymerázy I

- 5'-3' polymerázová aktivita, pouze 3'-5' exonukleázová aktivita
- Vzniká odstraněním N-koncové domény DNA polymerázy I štěpením subtilizinem
- Zdroj: nyní jako rekombinantní protein
- Kofaktor: Mg^{2+}
- Využití: Doplnění zkrácených 3' konců („fill-in reaction“), syntéza dvouřetězcové cDNA, polymerase-stop assay



Termostabilní DNA polymerázy

- Syntéza nového řetězce DNA dle matrice DNA připojováním nukleotidů k 3'-OH primeru
- Izolace z termofilních organismů
- Katalytická aktivita maximální při 70-80°C, klesá s klesající teplotou
- Nyní spíše rekombinantní upravené varianty s optimalizovanými vlastnostmi
 - Optimalizovaná procesivita – schopnost polymerovat dlouhé molekuly DNA (desítky kb)
 - Zvýšená fidelity – velmi nízká chybovost – proofreading mechanismus
 - Optimalizovaná schopnost polymerovat GC bohaté oblasti
- Kofaktor: Mg²⁺
- Využití: polymerázová řetězová reakce (PCR - *in vitro* amplifikace DNA)

Taq – *Thermus aquaticus* – poločas cca 1,5 h při 95°C

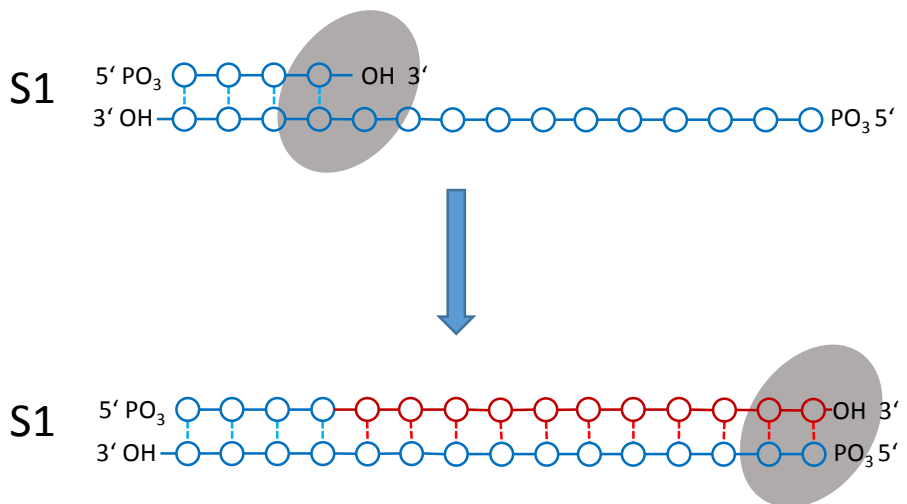
Pfu – *Pyrococcus furiosus* – extrémně přesná

Vent – *Thermococcus litoralis* – poločas až 7 h při 95°C

- **Podrobnosti v přednášce o PCR**

Reverzní transkriptázy

- RNA-dependentní DNA-polymerázy, možná RNáza H aktivita
- syntéza nového řetězce DNA (obvykle tzv. cDNA – complementary DNA) dle matrice RNA
- Vyžaduje primer (náhodné hexanukleotidy, oligo T – pro mRNA, ...)
- Zdroj: virového původu (AMV-Avian Myeloblastosis Virus; M-MuLV- Moloney Murine Leukemia Virus), nyní obvykle rekombinantní (ProtoScript, ...)
- Kofaktor: Mg^{2+}
- Využití: syntéza cDNA



Nukleázy

- štěpení polynukleotidového řetězce DNA (RNA) od konců (**exonukleázy**) nebo uvnitř řetězce (**endonukleázy**)
- katabolické enzymy

DNA nukleázy (DNázy)

Bal31

Exonukleáza fága lambda (λ)

Nukleáza ExoIII

Dnáza I

Nukleáza S1

Restrikční endonukleázy – sekvenčně specifické - samostatná přednáška o PCR

RNA nukleázy (RNázy)

RNáza A – DNA-dependentní RNA-polymeráza

RNáza H – bez templátu

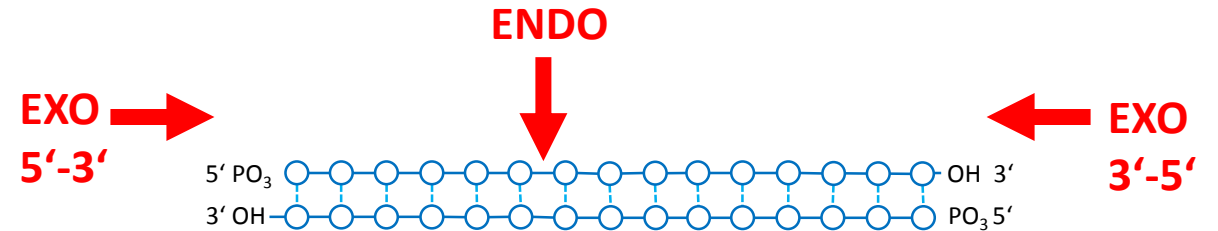
RNáza T1

Nukleázy využívané pro editaci genomu

Cas9 – CRISPR/Cas9

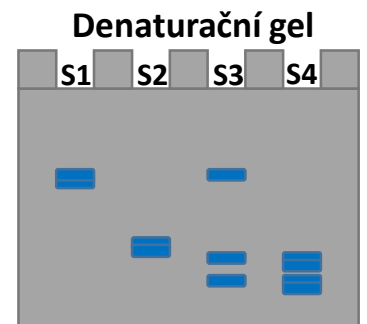
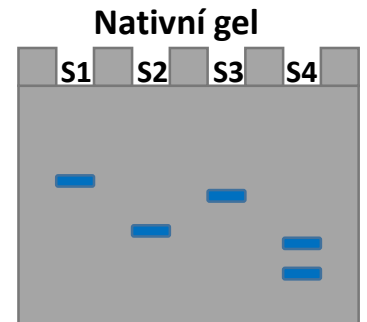
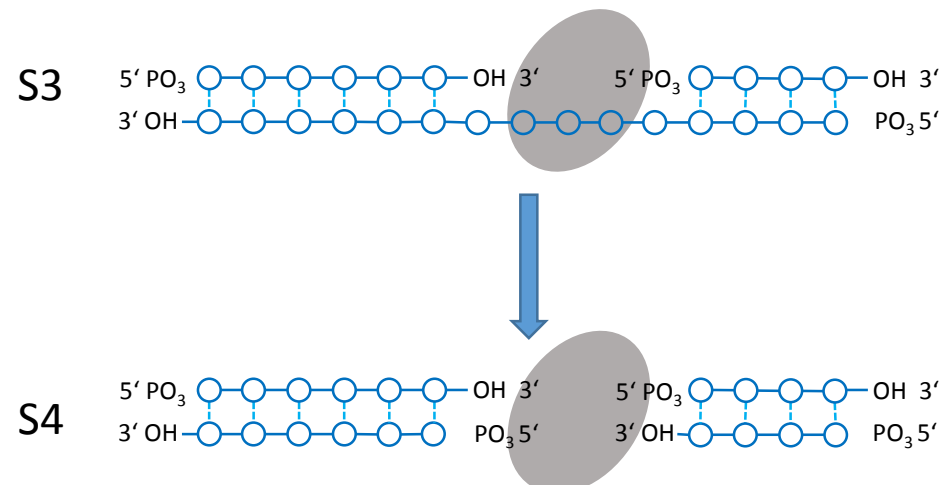
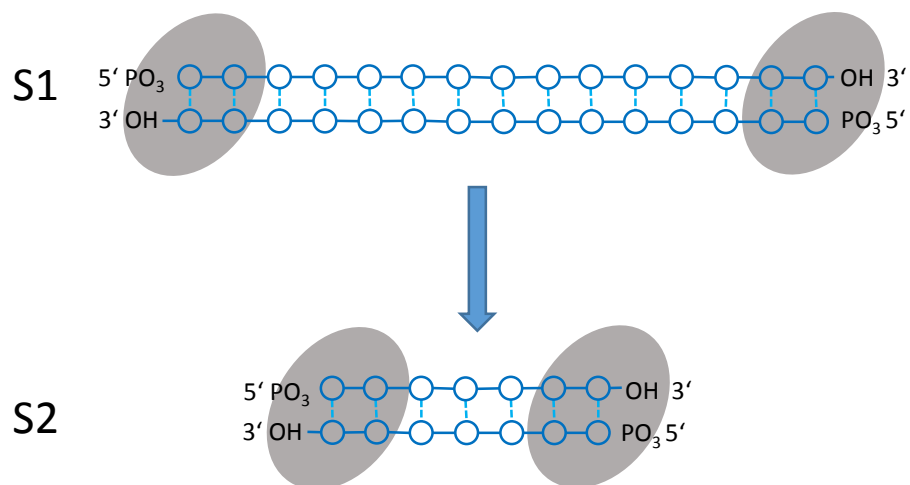
ZFN

TALEN



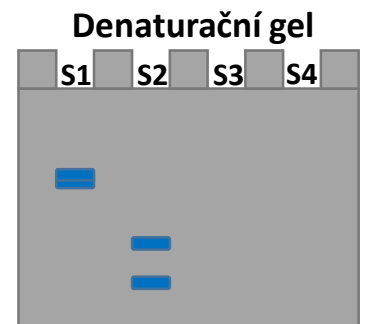
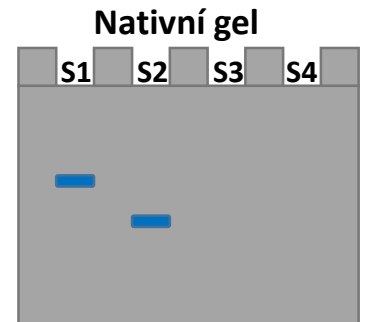
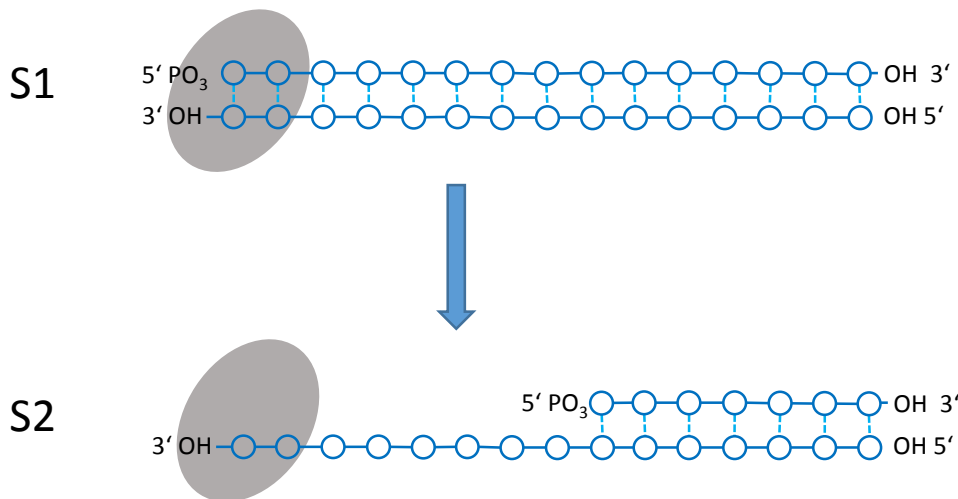
Nukleáza Bal31

- Primárně exonukleázová aktivita od obou konců dsDNA (5'-3' i 3'-5')
- Sekundární endonukleázová aktivita specifická pro jednořetězcové oblasti DNA i RNA v rámci dsDNA (zlomy, mezery, ...)
- Netvoří intramolekulární zlomy v dsDNA
- Zdroj: bakterie *Alteromonas esperijana*
- Kofaktor: Mg^{2+} , Ca^{2+}
- Využití: zkracování dsDNA z obou konců, odstranění jednořetězcových oblastí z DNA:RNA hybridu



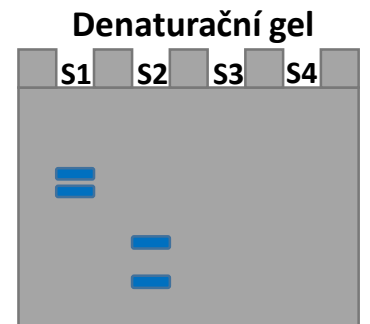
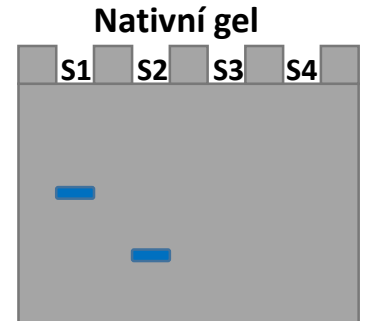
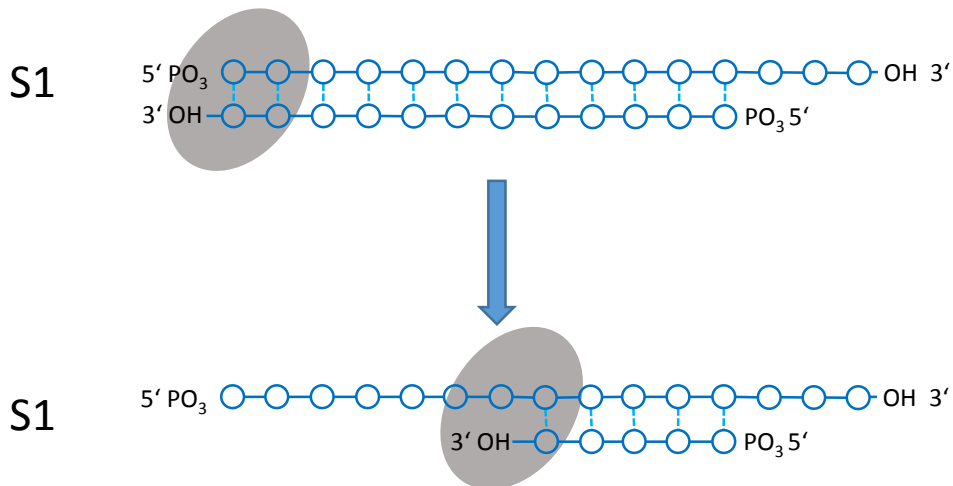
Exonukleáza fága lambda (λ)

- Exonukleázová aktivita ve směru 5'-3' na ds DNA, odštěpuje nukleosid-monofosfáty
- Silná preference pro 5' fosforylovaný řetězec, ale slabě štěpí i nefosforylovaný a jednořetězcovou DNA
- Není schopna začít štěpit v místě zlomů a mezer
- Zdroj: *E. coli* infikovaná bakteriofágem T4
- Využití: tvorba jednosměrných delecí, příprava ssDNA z dsDNA



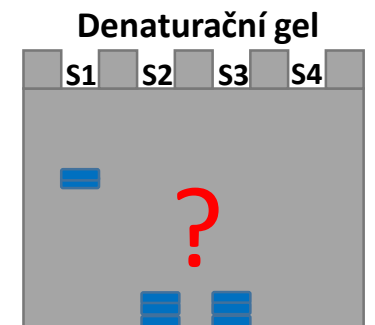
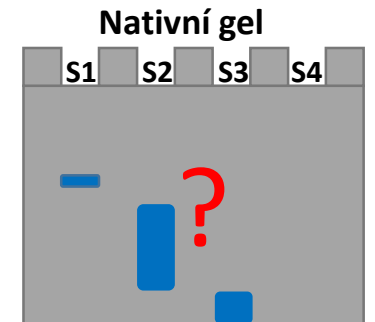
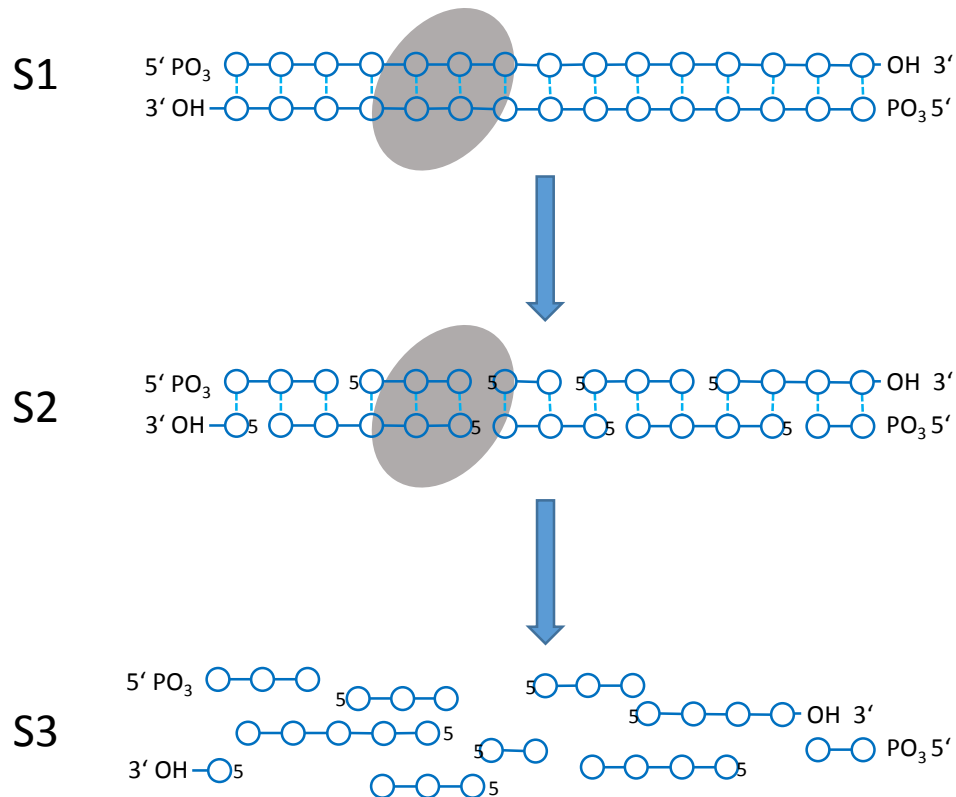
Nukleáza ExoIII

- Exonukleáza postupně odbourávající nukleosid-monofosfáty z 3' OH konců dsDNA (3'-5' exonukleáza)
- Vyžaduje tupé nebo 3' recesivní konce, 3' přesahující konce jsou rezistentní
- Schopna štěpit i v jednořetězcových zlomech, vytváří mezery
- Zdroj: *E. coli*
- Využití: příprava delecí, mutagenese, příprava jednořetězcových sond a substrátů pro dideoxy- sekvenování

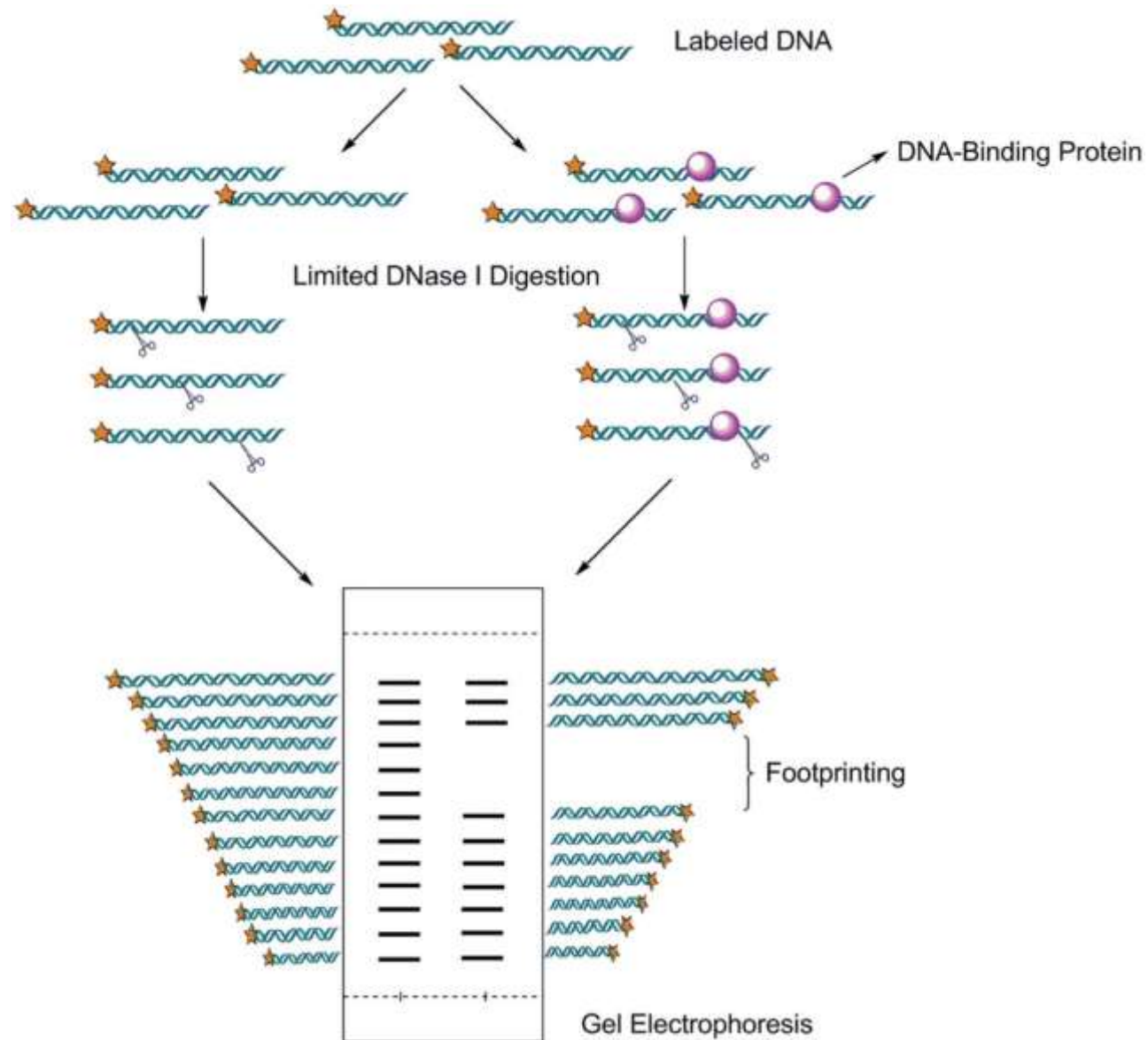


Dnáza I

- Nespecifická endonukleáza štěpící dsDNA i ssDNA, v DNA vytváří zlomy
- Produkuje di-, tri-, tetra- nukleotid-monofosfáty fosforylované na 5' koncích
- Zdroj: bakterie *Alteromonas esperijana*
- Kofaktor: Mg^{2+} - náhodné zlomy v obou řetězcích, Mn^{2+} - zlomy v obou vláknech proti sobě
- Využití: zlomy v dsDNA při nick translaci (nízká koncentrace), vyštěpení DNA při izolaci RNA (vysoká koncentrace), DNase footprinting (nízká koncentrace)

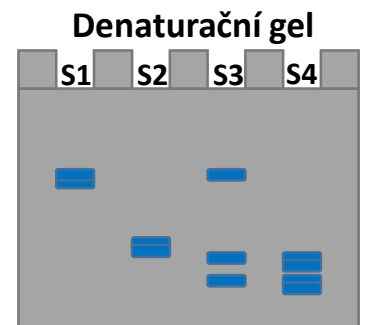
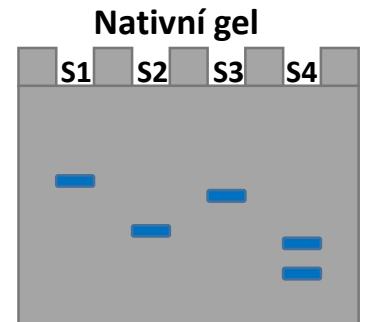
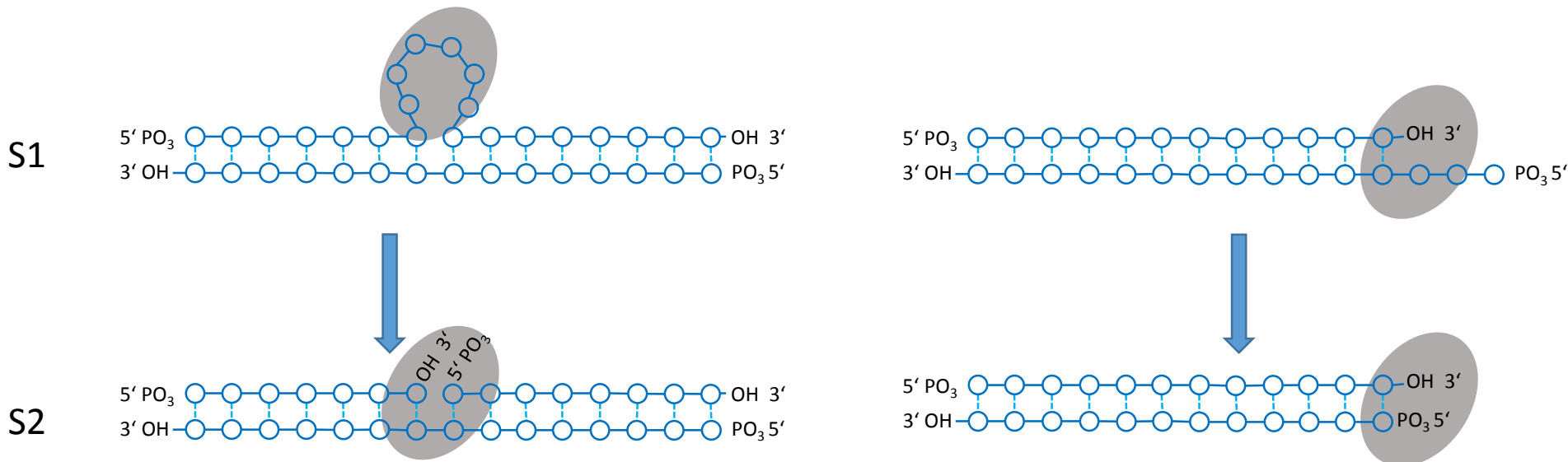


Sondování DNázou I (Dnase footprinting)



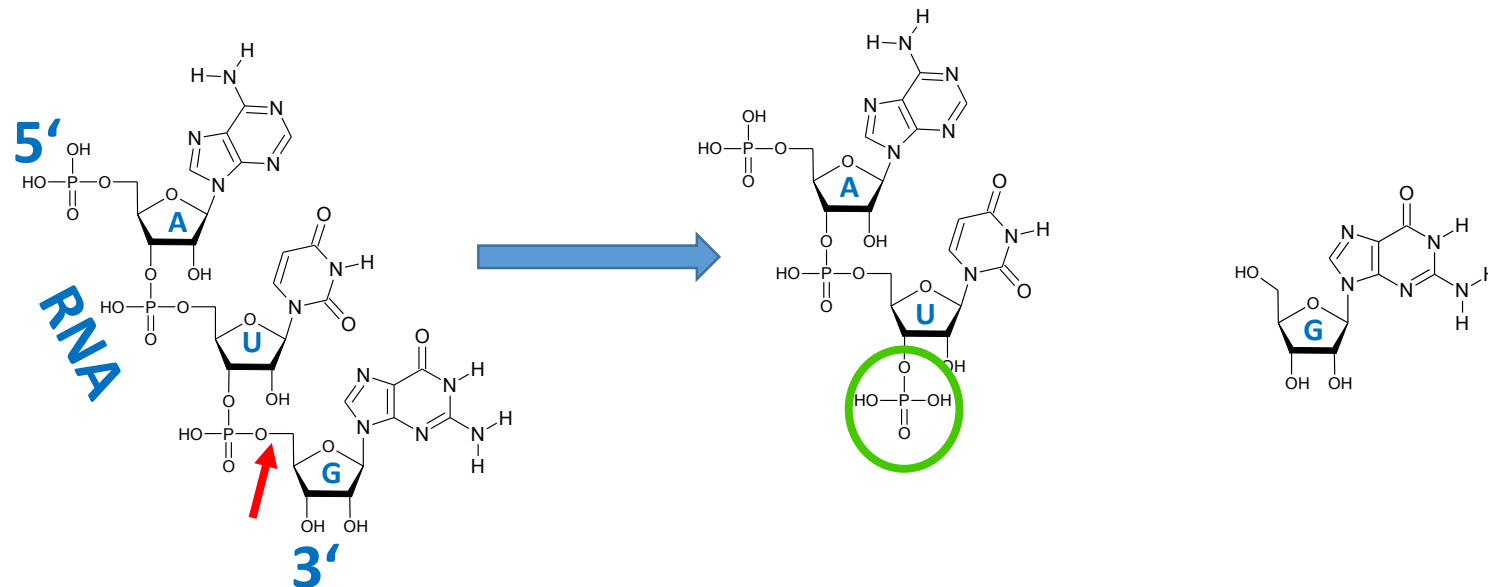
Nukleáza S1

- Endonukleáza specificky štěpící ssDNA a jednořetězcové oblasti v rámci dsDNA
- Produkuje di-, tri-, tetra- nukleotid-monofosfáty fosforylované na 5' koncích
- Zdroj: bakterie *Aspergillus oryzae*
- Kofaktor: Zn^{2+}
- Využití: mapování jednořetězcových oblastí DNA, zatupení kohezivních konců
- Obdobné nukleázy P1, Mung Bean atp.



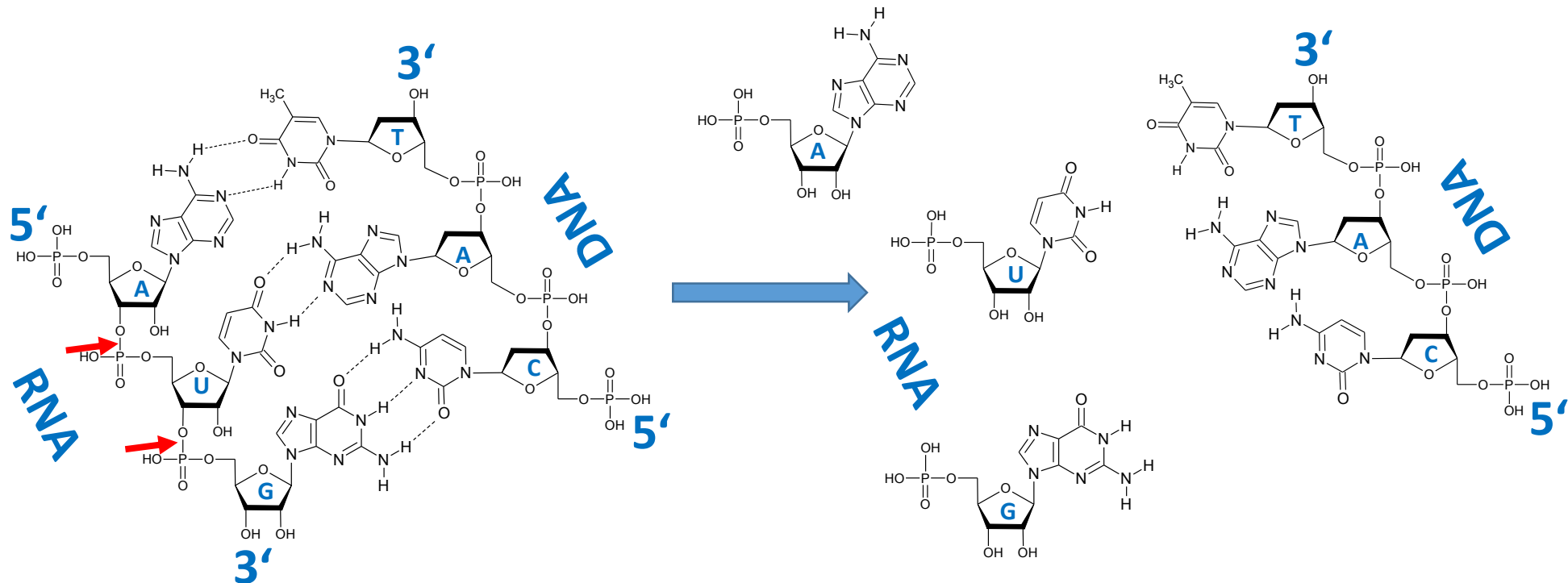
RNáza A

- Hydrolyzuje preferenčně fosfodiesterové vazby v jednořetězcové molekule RNA na 3' konci nespárovaných pyrimidinových nukleotidů (U a C)
- Produktem jsem ribonukleosid-monofosfáty s fosfátovou skupinou na 3' konci a OH skupinou na 5' konci
- Neštěpí ssDNA ani dsDNA
- Kofaktor: žádné
- Zdroj: hovězí slinivka – příprava intenzivním vařením hrubého buněčného extraktu – ostatní bílkoviny denaturovány
- Využití: odstranění RNA z roztoku (izolace DNA, ...), strukturální studie (nespárované úseky RNA)



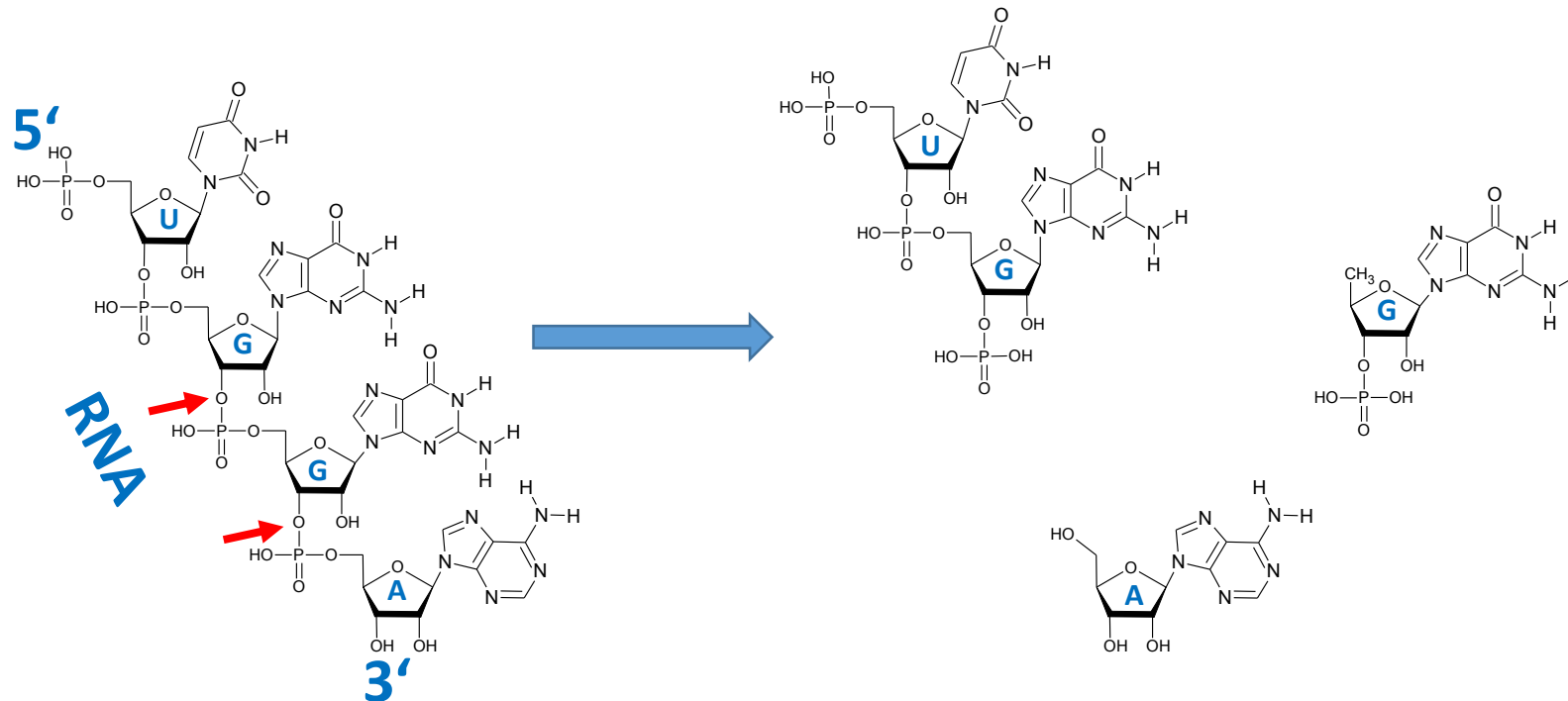
RNáza H

- Sekvenčně nespecificky hydrolyzuje preferenčně fosfodiesterové vazby v RNA molekule párované s DNA molekulou (hybrid RNA:DNA)
- Produktem jsou ribonukleosid-monofosfáty s fosfátovou skupinou na 5' konci a OH skupinou na 3' konci
- Neštěpí ssDNA ani dsDNA
- Kofaktor: Mg^{2+}
- Zdroj: *E. coli*

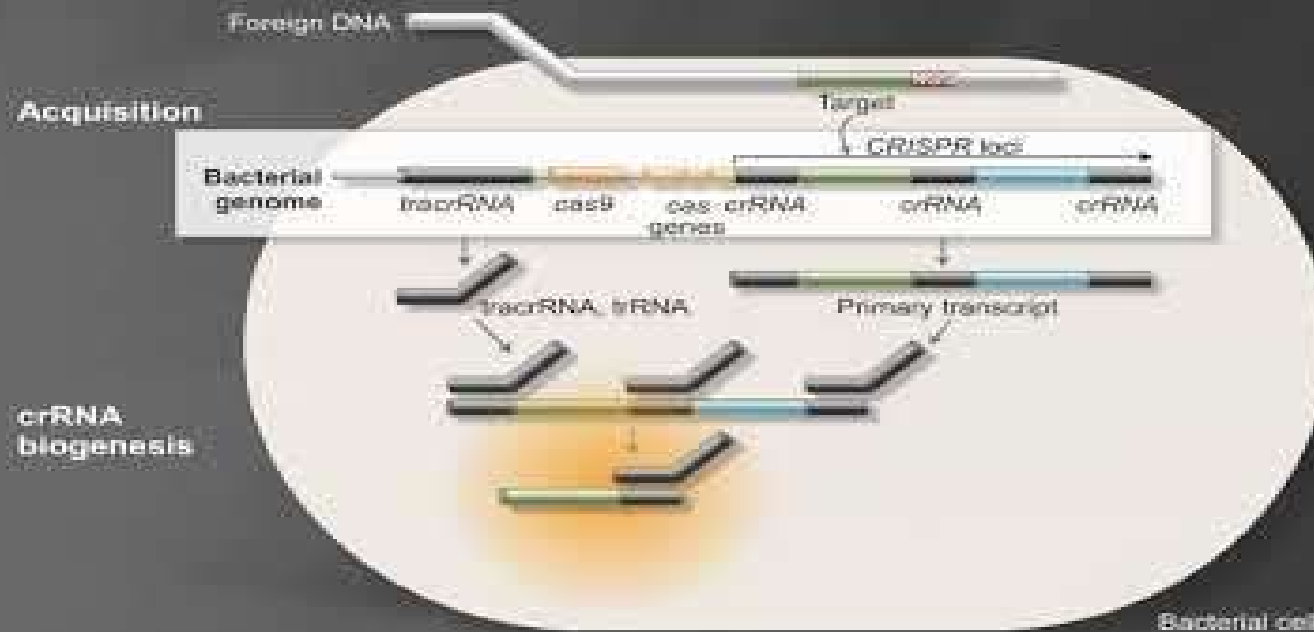


RNáza T1

- Hydrolyzuje preferenčně fosfodiesterové vazby v jednořetězcové molekule RNA na 3' konci guanosinových zbytků
- Produktem jsou oligoribonukleotidy končící G s fosfátovou skupinou na 3' konci a OH skupinou na 5' konci, případně GMP (s PO_4 na 3' konci)
- Neštěpí ssDNA ani dsDNA
- Kofaktor: žádné
- Zdroj: *Aspergillus oryzae*, dnes rekombinantní protein produkovaný *E. coli*
- Využití: strukturní studie RNA, sekvenování RNA



Cas9 nukleázy – CRISPR/Cas9



Genome Editing Glossary

Cas = CRISPR-associated genes

Cas9, Cas1 = a CRISPR-associated protein containing two nuclease domains, that is programmed by small RNAs to cleave DNA

crRNA = CRISPR RNA

dCAS9 = nuclease-deficient Cas9

DSB = Double-Stranded Break

gRNA = guide RNA

HDR = Homology-Directed Repair

HNH = an endonuclease domain named for characteristic histidine and asparagine residues

Indel = insertion and/or deletion

NHEJ = Non-Homologous End Joining

PAM = Protospacer-Adjacent Motif

RuvC = an endonuclease domain named for an *E. coli* protein involved in DNA repair

sgRNA = single guide RNA

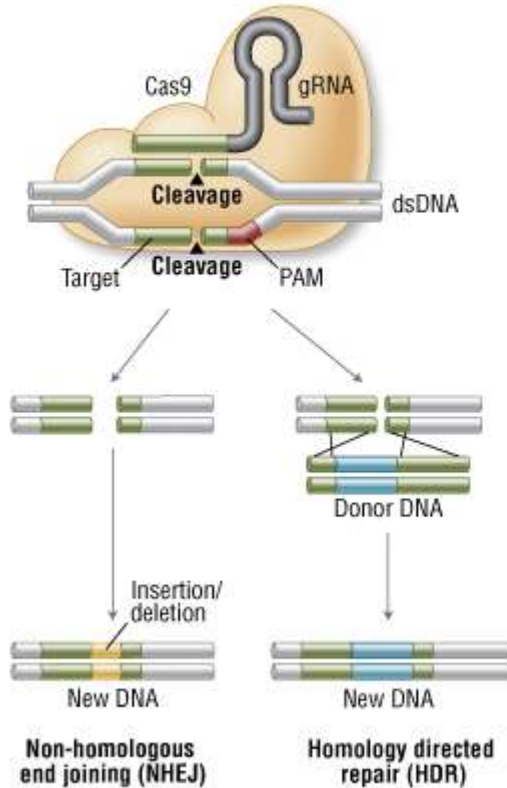
tracrRNA, trRNA = trans-activating crRNA

TALEN = Transcription-Activator Like Effector Nuclease

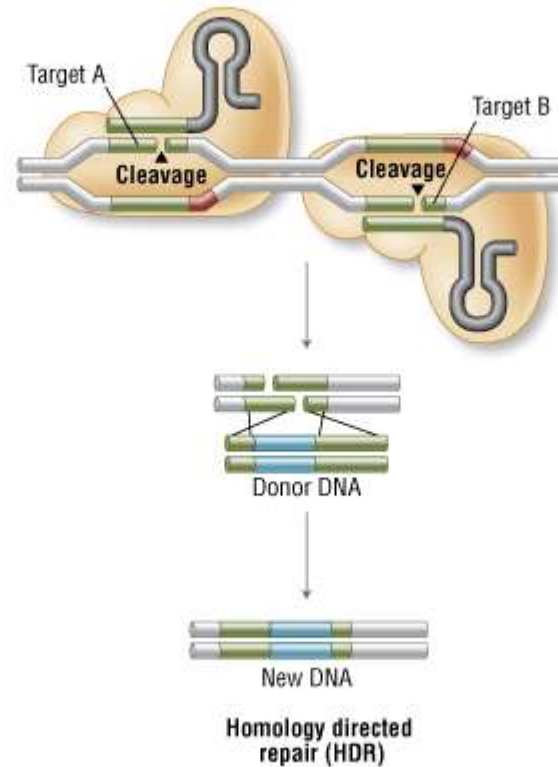
ZFN = Zinc-Finger Nuclease

Cas9 nukleázy – CRISPR/Cas9 – Genome editing

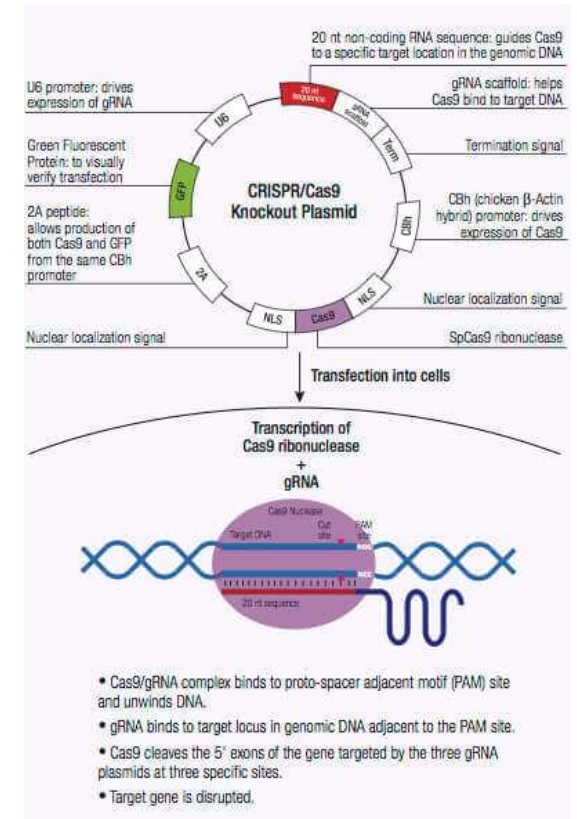
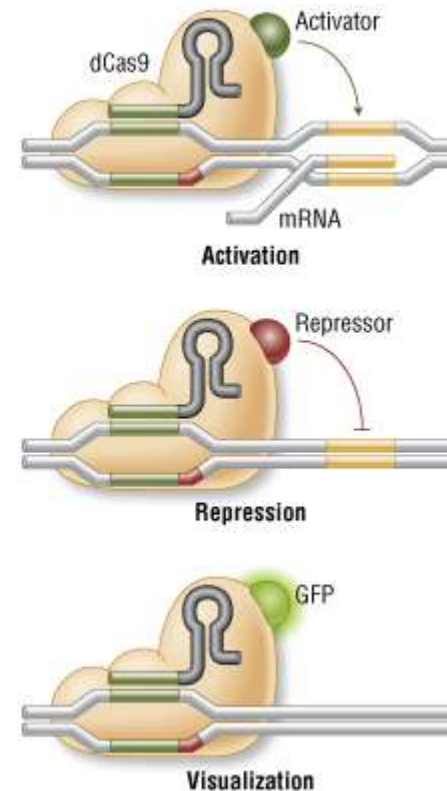
A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



B. Genome Engineering By Double Nicking With Paired Cas9 Nickases



C. Localization With Defective Cas9 Nuclease



A. Wild-type Cas9 nuclease site specifically cleaves double-stranded DNA activating double-strand break repair machinery. In the absence of a homologous repair template non-homologous end joining can result in indels disrupting the target sequence. Alternatively, precise mutations and knock-ins can be made by providing a homologous repair template and exploiting the homology directed repair pathway.

B. Mutated Cas9 makes a site specific single-strand nick. Two sgRNA can be used to introduce a staggered double-stranded break which can then undergo homology directed repair.

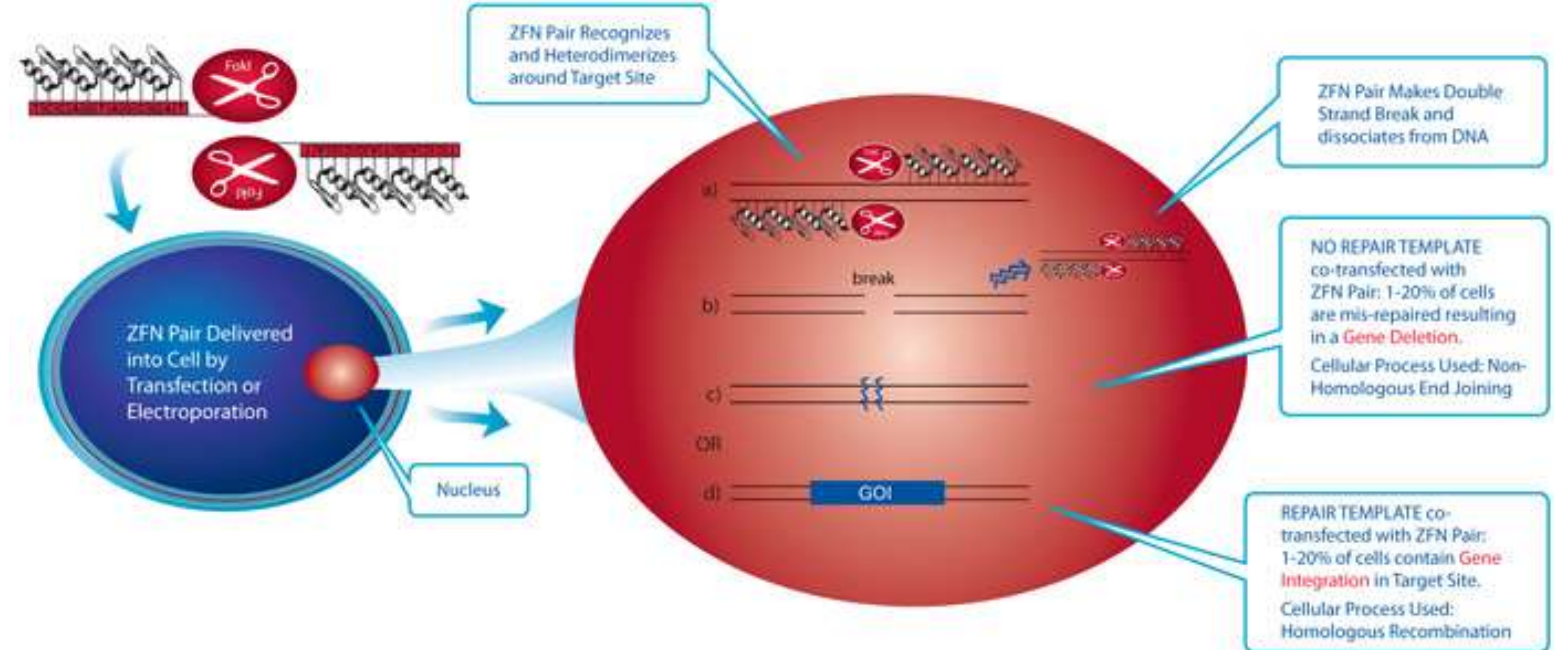
C. Nuclease-deficient Cas9 can be fused with various effector domains allowing specific localization. For example, transcriptional activators, repressors, and fluorescent proteins.

{<https://www.scbt.com/scbt/whats-new/crispr-systems>}

ZFN nukleázy – Genome editing

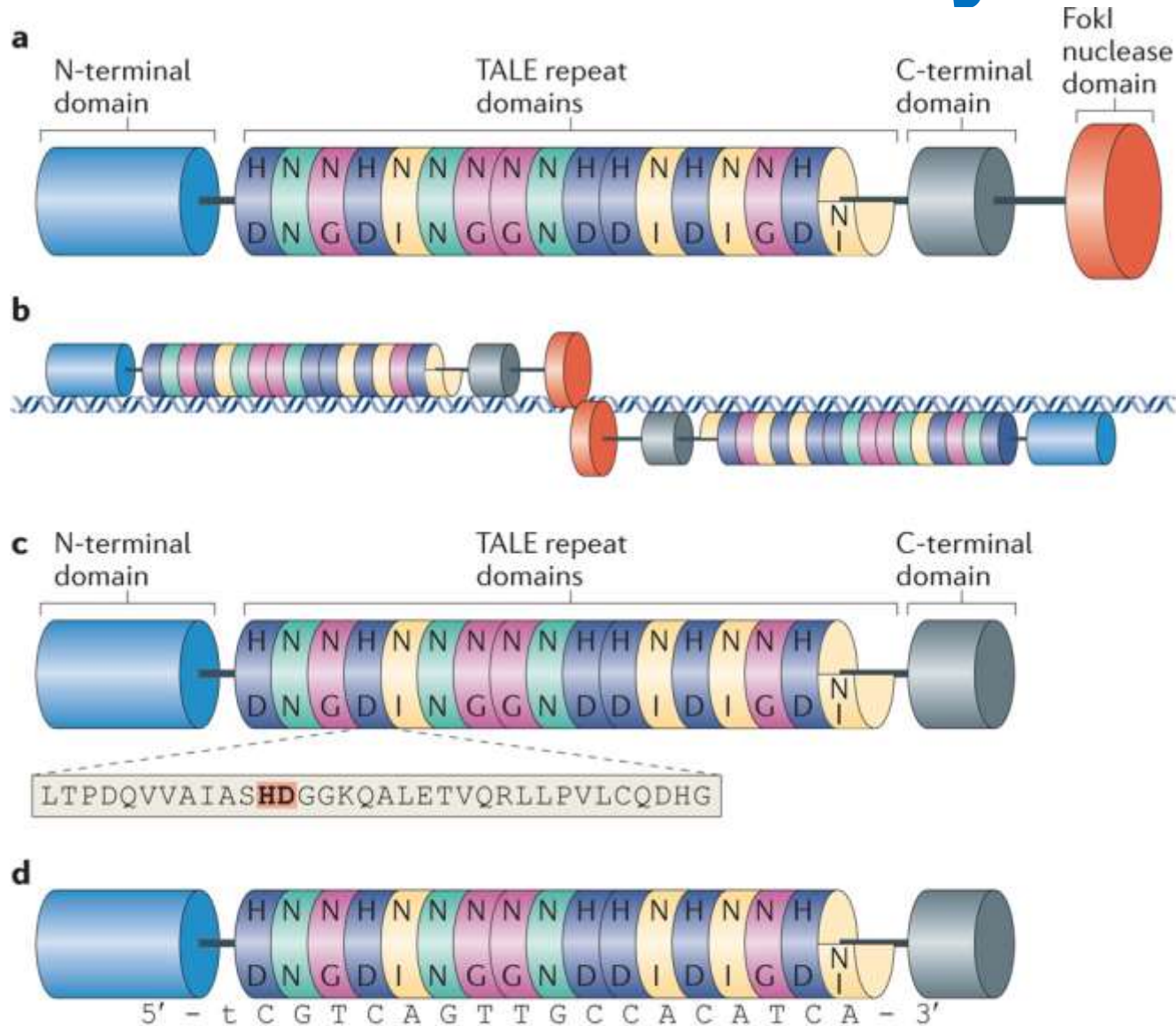


Each Zinc Finger Nuclease (ZFN) consists of two functional domains: a.) A DNA-binding domain comprised of a chain of two-finger modules, each recognizing a unique hexamer (6 bp) sequence of DNA. Two-finger modules are stitched together to form a Zinc Finger Protein, each with specificity of ≥ 24 bp. b.) A DNA-cleaving domain comprised of the nuclease domain of Fok I. When the DNA-binding and DNA-cleaving domains are fused together, a highly-specific pair of 'genomic scissors' are created.



ZFN-mediated genome editing takes place in the nucleus when a ZFN pair targeting the user's gene of interest is delivered into a parental cell line, either by transfection, electroporation or viral delivery.

TALEN nukleázy – Genome editing

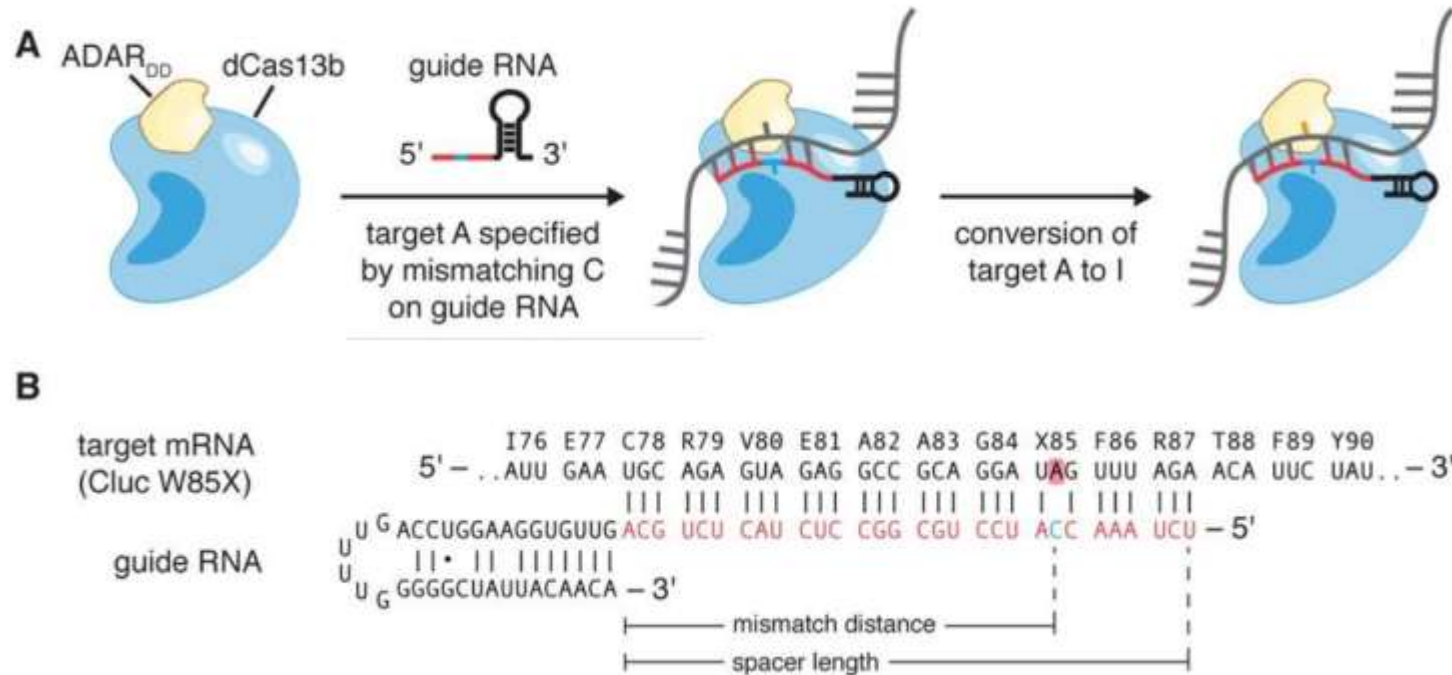


Transcription Activator-Like Effector Nucleases

a | Schematic diagram of a TALEN. TALE repeats are shown as colored cylinders with a final carboxy-terminal truncated “half” repeat. Letters inside each repeat represent the two hypervariable residues. TALE-derived amino- and carboxy-terminal domains required for DNA-binding activity are shown as longer blue and grey cylinders, respectively. The non-specific nuclease domain from the FokI endonuclease is shown as a larger orange cylinder. **b** | TALENs bind and cleave as dimers on a target DNA site. Note that the TALE-derived amino- and carboxy-terminal domains flanking the repeats may make some contacts to the DNA. Cleavage by the FokI domains occurs in the “spacer” sequence that lies between the two regions of the DNA bound by the two TALEN monomers. **c** | Schematic diagram of a TALE-derived DNA-binding domain. The amino acid sequence of a single TALE repeat is expanded below with the two hypervariable residues highlighted in orange and bold text. **d** | TALE-derived DNA-binding domain aligned with its target DNA sequence. Note the matching of repeat domains to single bases in the target site according to the TALE code. Also note the presence of a 5' thymine preceding the first base bound by a TALE repeat.

Cas13 nukleázy – Genome editing

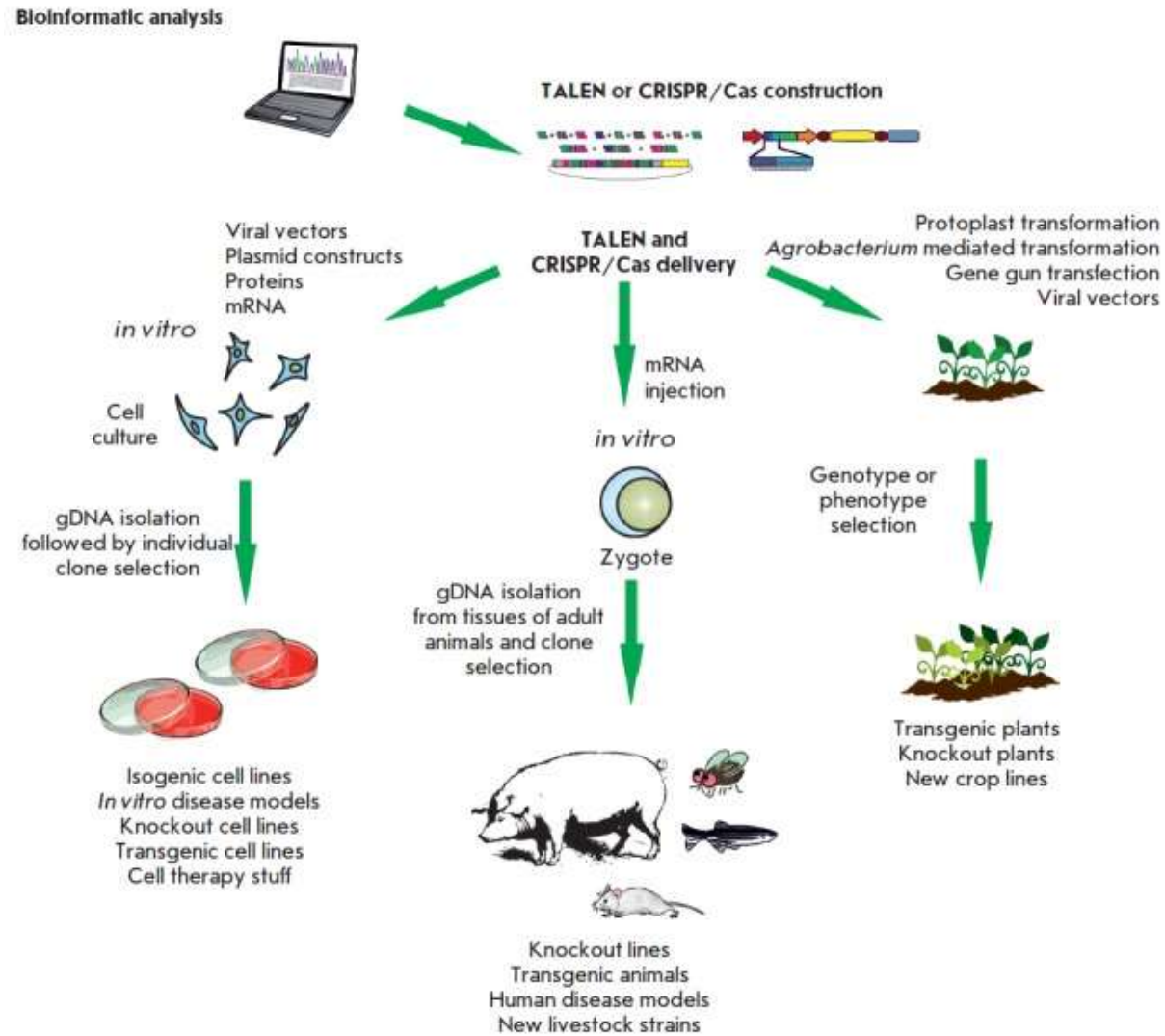
Komplex katalyticky inaktivní nukleázy Cas13 (dCas13b) s guide RNA a RNA-specifické Adenosin Deaminázy ADAR) místně specificky (primární sekvence z gRNA, rozpoznána Cas13) katalyzuje deaminaci A na I (ADAR), který funguje jako G



A) Schematic of RNA editing by dCas13b-ADAR_{DD} fusion proteins. Catalytically dead Cas13b (dCas13b) is fused to the deaminase domain of human ADAR (ADAR_{DD}), which naturally deaminates adenosines to inosines in dsRNA. The crRNA specifies the target site by hybridizing to the bases surrounding the target adenosine, creating a dsRNA structure for editing, and recruiting the dCas13b-ADAR_{DD} fusion. A mismatched cytosine in the crRNA opposite the target adenosine enhances the editing reaction, promoting target adenosine deamination to inosine, a base that functionally mimics guanosine in many cellular reactions.

B) Schematic of *Cypridina luciferase* W85X target and targeting guide design. Deamination of the target adenosine restores the stop codon to the wildtype tryptophan. Spacer length is the region of the guide that contains homology to the target sequence. Mismatch distance is the number of bases between the 3' end of the spacer and the mismatched cytosine. The cytosine mismatched base is included as part of the mismatch distance calculation.

Genome editing



A general scheme of the strategy for using the TALEN and CRISPR/Cas systems in genomic engineering

Další enzymy

Ligázy – spojování fragmentů nukleových kyselin

T4 DNA ligáza

Transferázy – připojování funkčních skupin a nukleotidů bez templátu

Terminální transferáza (TdT)

DNA metyltransferázy (DNA MTase) – metylace DNA – obvykle na C

Kinázy – připojení fosfátové skupiny

T4 polynukleotid kináza

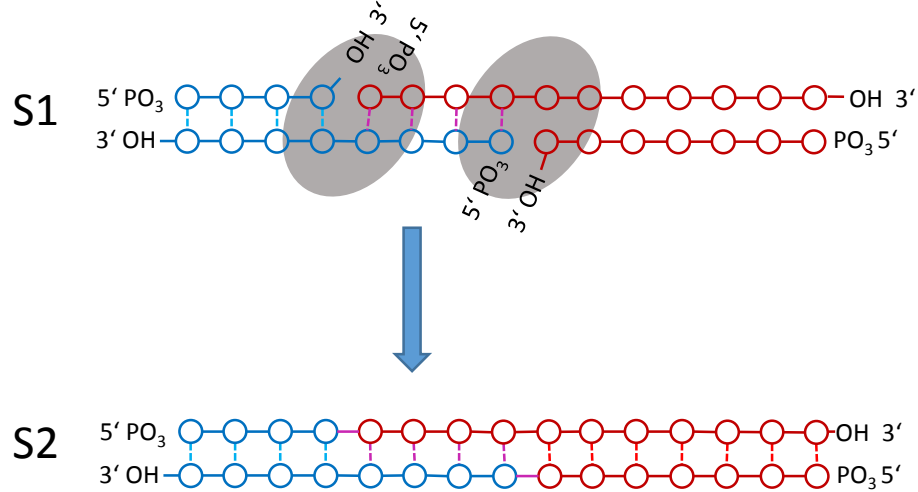
Fosfatázy – odštěpení fosfátové skupiny

Alkalická fosfatáza

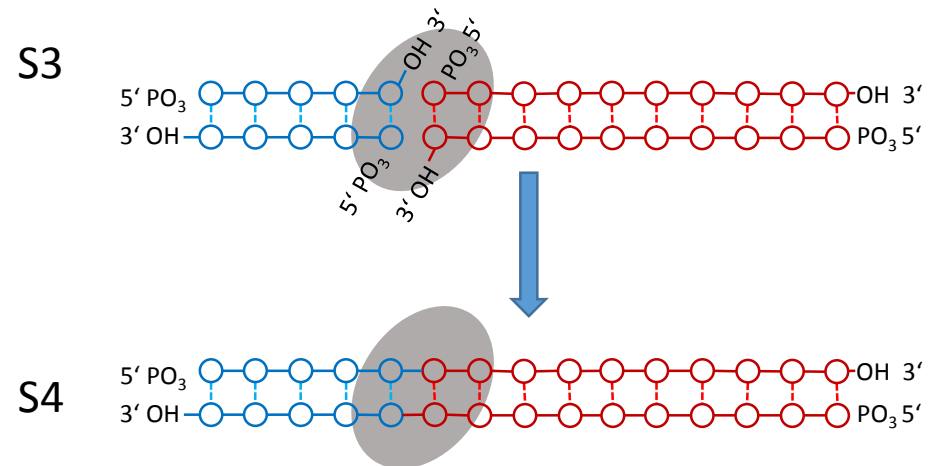
T4 DNA ligáza

- Spojuje dva konce polynukleotidového řetězce DNA, tupé i lepivé konce
- Vyžaduje přítomnost OH skupiny na 3' konci a fosfátové skupiny na 5' konci v místě spojení
- Nutné ATP nebo NAD jako zdroj energie pro vytvoření fosfodiesterové vazby
- Zdroj: *E. coli* infikovaná bakteriofágem T4
- Opravuje jednořetězcové zářezy („nick“) v dsDNA, RNA i DNA/RNA hybridech

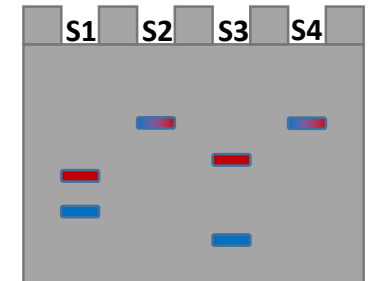
Spojení lepivých konců



Oprava tupých konců



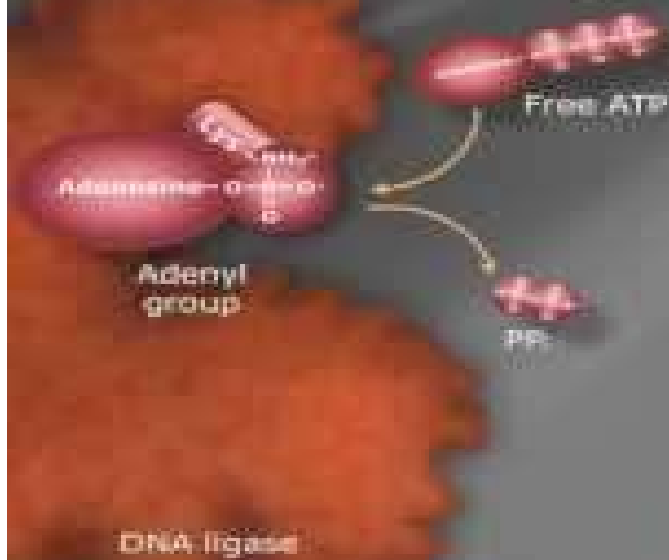
Nativní gel



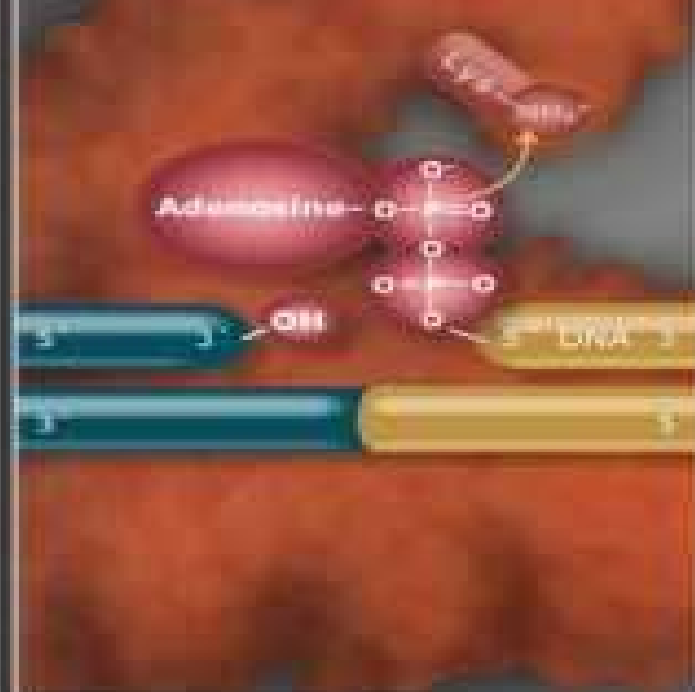
T4 DNA ligáza

LIGATION STEPS

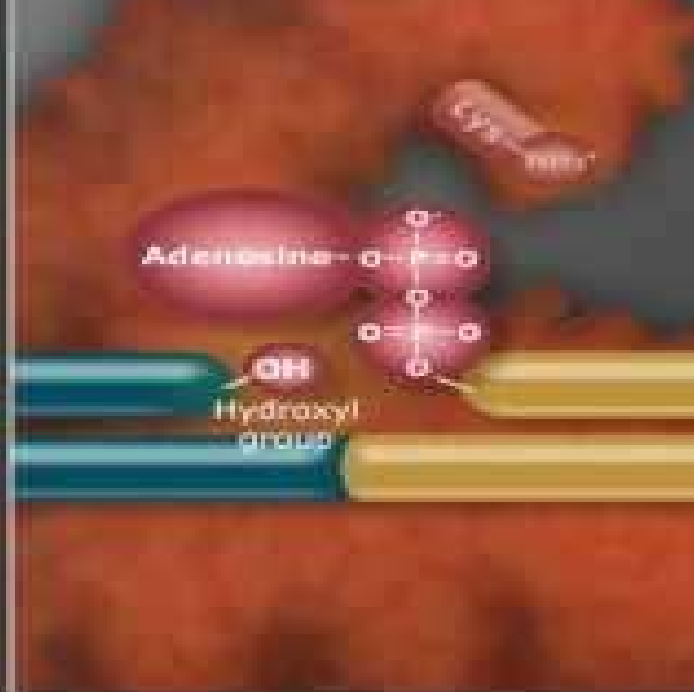
1 SELF-ADENYLATION OF DNA LIGASE



2 ADENYL GROUP TRANSFER TO DNA



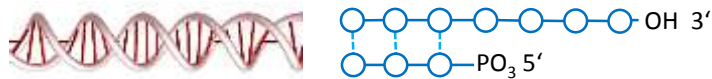
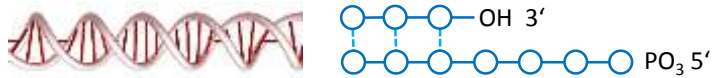
3 PHOSPHODIESTER BOND FORMATION



Úprava konců ligací

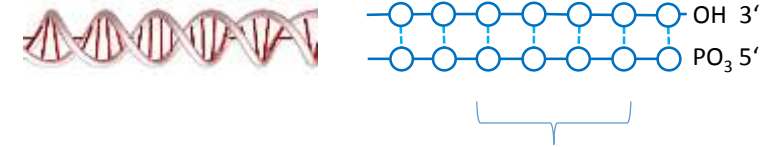
- Ligázou připojené krátké fragmenty dsDNA
- Specifický výběr modifikovaného konce zajištěn příslušnou fosforylací – T4 DNA ligáza preferenčně spojuje s fosforylovaným 5' koncem

Adaptory



- Mění tupý konec na lepivý
- Specifická sekvence a směr
- Pro připojení inzertu, primeru, ...

Linkery

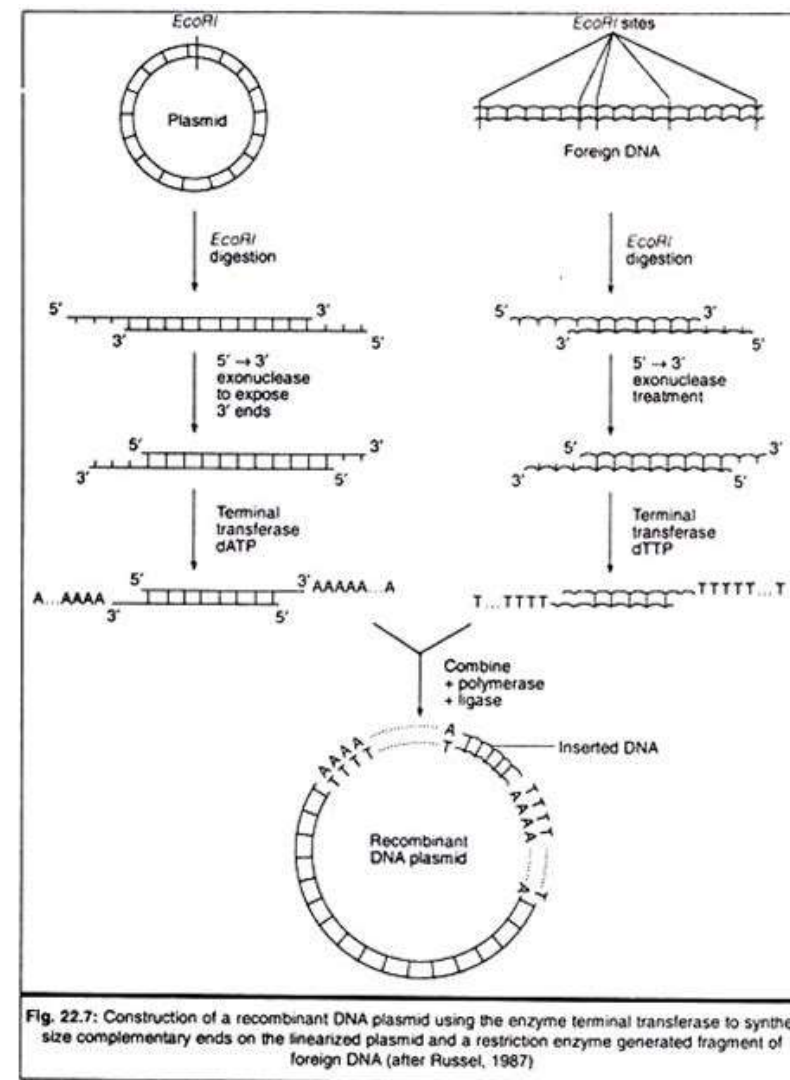


Restrikční místo

- Vnáší na konec specifickou sekvenci
- Pro štěpení restrikční endonukleázou
- Pro připojení primeru - PCR

Terminální transferáza (TdT)

- Přidání deoxynukleotidů k 3' OH skupině bez nutnosti matrice
- Substrátem jsou jak ssDNA, tak tupé recesivní i přesahující konce dsDNA
- Zdroj: např. hovězí brzlík, nyní rekombinantní v *E. coli*
- Kofaktor: Mg^{2+} , Co^{2+} - zvyšuje aktivitu
- Využití: 3' terminální značení DNA, přidávání homopolymerních konců, klonování pomocí TdT, ...



S1



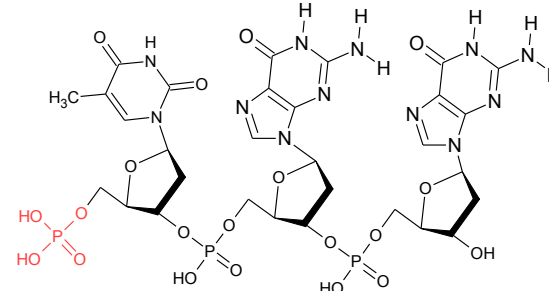
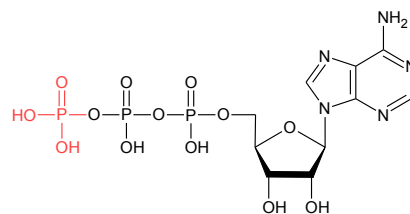
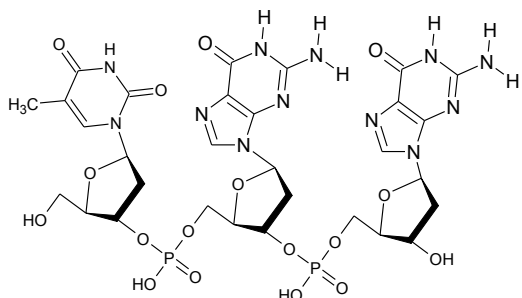
S2



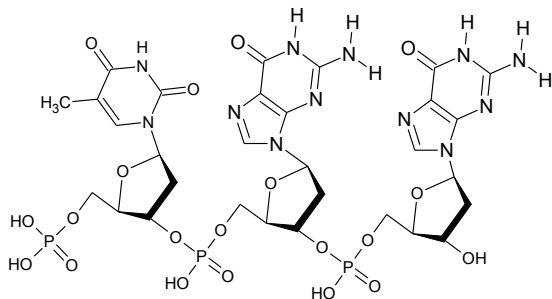
T4 polynukleotid kináza (T4 PNK)

- Katalyzuje přesun (forward reaction) nebo výměnu (exchange reaction) γ fosfátu z ATP na 5' konec ssDNA, dsDNA, RNA i dNTP
- Exchange reakce probíhá s nižší efektivitou – pro značení vhodnější defosforylace, pokud je 5' konec fosforylován
- Zlomky nejsou výrazněji fosforylovány, mezery ano za vyšší koncentrace ATP
- ATP může být nahrazeno jinými NTP, popřípadě dATP, dTTP
- Zdroj: nyní rekombinantní v *E. coli*
- Kofaktor: Mg^{2+}
- Využití: 5' terminální značení DNA, fosforylace 5' konce, odstraňování 3' fosfátu z DNA

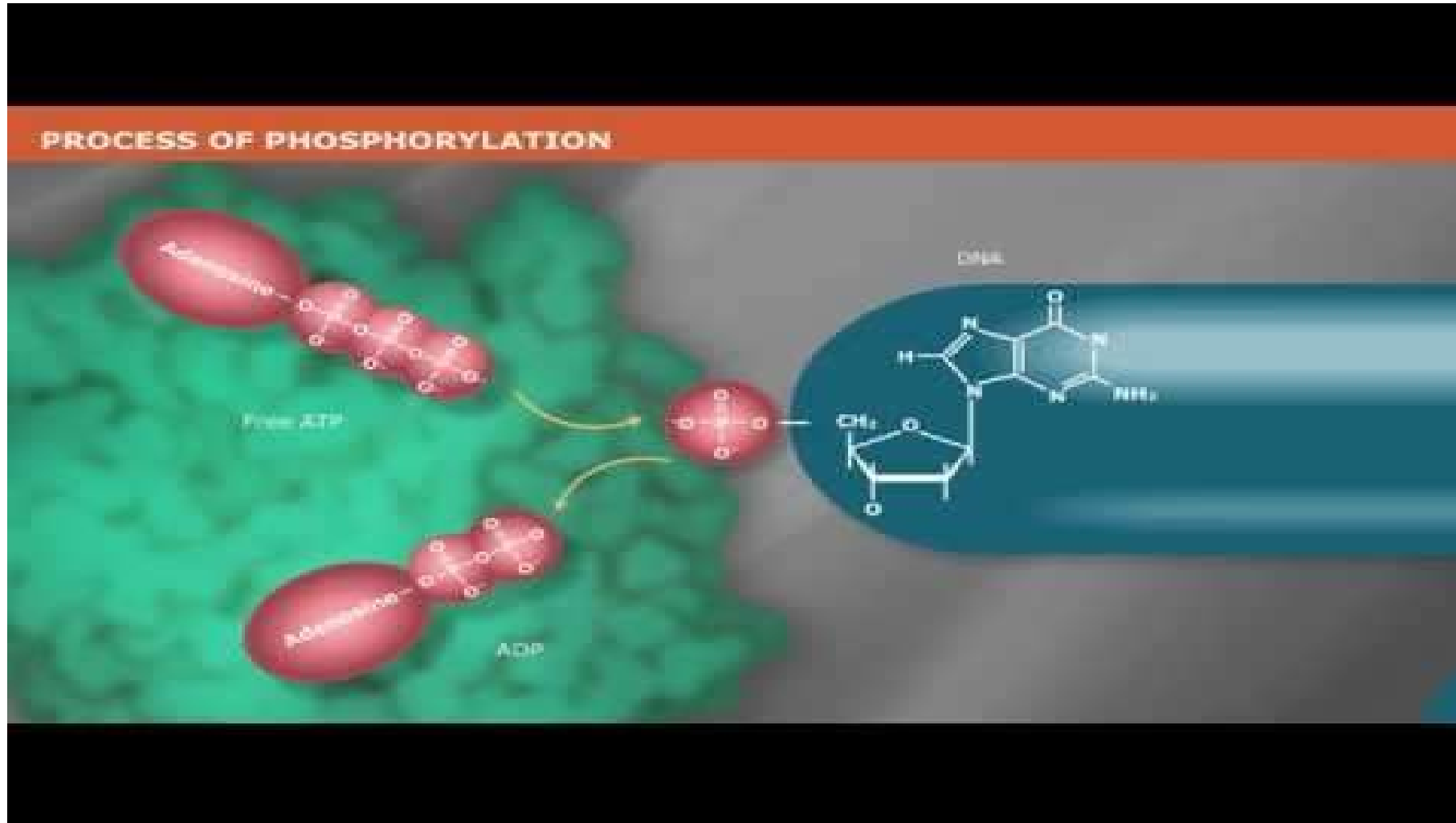
FORWARD



EXCHANGE

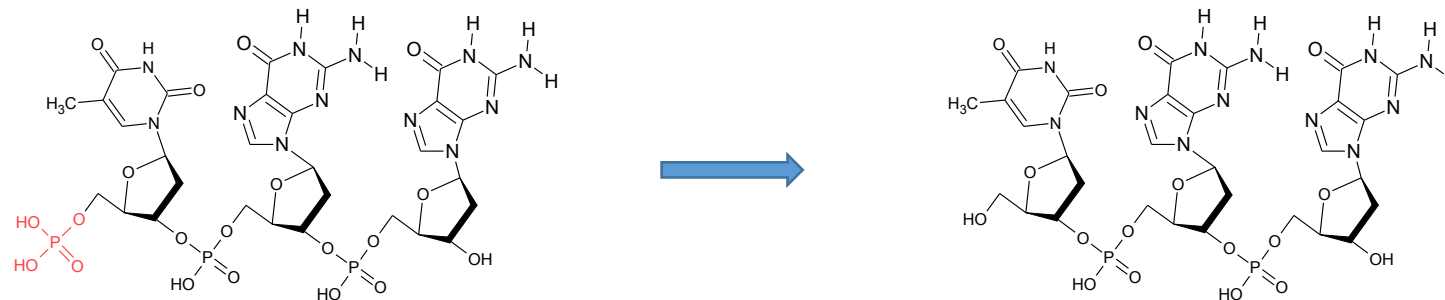


T4 polynukleotid kináza (T4 PNK)



Alkalická fosfatáza

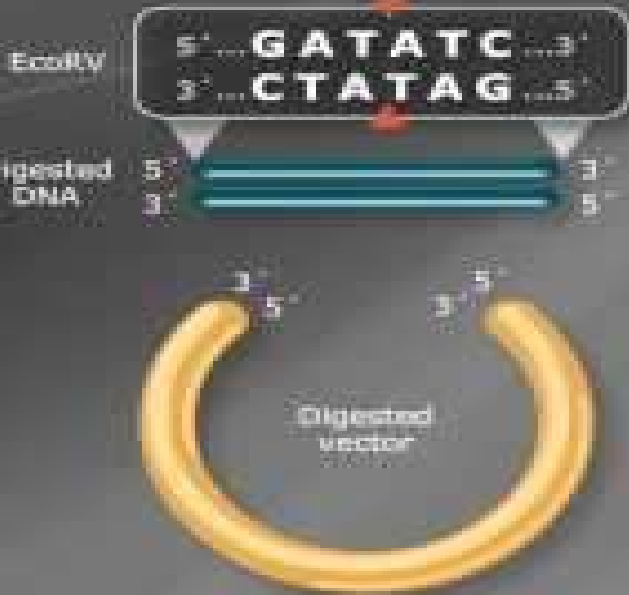
- Katalyzuje odstranění fosfátu z 5' i 3' konce ssDNA, dsDNA (recesivní, přesahující i tupé konce), RNA, dNTP
- Defosforyluje i proteiny (Ser, Thr, Tyr)
- Zdroj: telecí střevo (CIP) – aktivnější, těžko kontrolovatelná, *E. coli* (BAP) – méně aktivní
- Kofaktor: Mg^{2+} ,
- Využití: defosforylace fragmentů při klonování, značení T4 PNK, odstranění dNTP z reakce



Klonování

DIGESTION

SINGLE-ENZYME DIGESTION (NON-DIRECTIONAL)



DOUBLE-ENZYME DIGESTION (DIRECTIONAL)

