

Manipulace s nukleovými kyselinami

podmiňují

1. **enzymy** - zásahy do struktury DNA a RNA
2. **vektory** - klonování fragmentů DNA a RNA
3. **hybridizace** - identifikace specifických sekvencí

Výhody enzymů:

- vysoká specifická reakcí
- možnost pracovat s malým množstvím substrátu

Klasifikace enzymů, jejichž substrátem jsou nukleové kyseliny

Podle typu substrátu:

- DNA enzymy
- RNA enzymy

Podle typu reakce:

- enzymy anabolické = *polymerázy*
- enzymy katabolické = *nukleázy*
- enzymy spojující řetězce nuk. kyselin = *ligázy*
- enzymy modifikující nukleové kyseliny

Anabolické enzymy

Syntetizovaná molekula	Matrice	Enzymová třída	Příklad	Zdrojový organismus
DNA	DNA	DNA-polymerázy	DNA-polymeráza I	<i>E.coli</i>
	RNA	Zpětné transkriptázy	Zpětná transkriptáza AMV	AMV (virus ptačí myeloblastózy)
	Žádná	Terminální transferázy	Terminální transferáza	Telecí brzlík

Anabolické enzymy

Syntetizovaná molekula	Matrice	Enzymová třída	Příklad	Zdroj
RNA	DNA	RNA-polymerázy	RNA-polymeráza T3, T7, SP6	<i>E.coli</i> inf. fágem T3, T7, SP6
	Žádná	Poly (A) polymerázy	Poly (A) polymeráza	<i>E.coli</i>

Katabolické enzymy

Rozkládaná molekula	Typ degradace	Enzymová třída	Specifita	Příklad	Zdroj
DNA	<u>od konců</u>	<u>exonukleázy</u>	SS	Exonukleáza III	<i>E.coli</i>
			DS	Bal 31	<i>Alteromonas espejani</i>
	<u>uvnitř molekuly</u>	<u>endonukleázy</u>	SS	S1 nukleáza	<i>Aspergillus oryzae</i>
			DS	EcoRI (RE)	<i>E.coli</i>
				DNáza I	hovězí pankreas

Katabolické enzymy

Rozkládaná molekula	Typ degradace	Enzymová třída	Příklad	Zdroj
RNA	<u>od konců</u>	<u>exonukleázy</u>	fosfodiesteráza	hadí jed
	<u>uvnitř</u> molekuly	<u>endonukleázy</u>	ribonukleáza A	hovězí pankreas

Enzymy modifikující DNA

Typ enzymu	Příklad	Zdroj
Methyláza	<i>Dam</i> -methyláza	<i>E.coli</i>
	<i>Dcm</i> -methyláza	
	<i>EcoRI</i> -methyláza	
Kináza	T4-polynukleotid kináza	<i>E.coli</i> inf. fágem T4
Fosfatáza	BAP-fosfatáza	bakterie
	CIP-fosfatáza	hovězí střevo

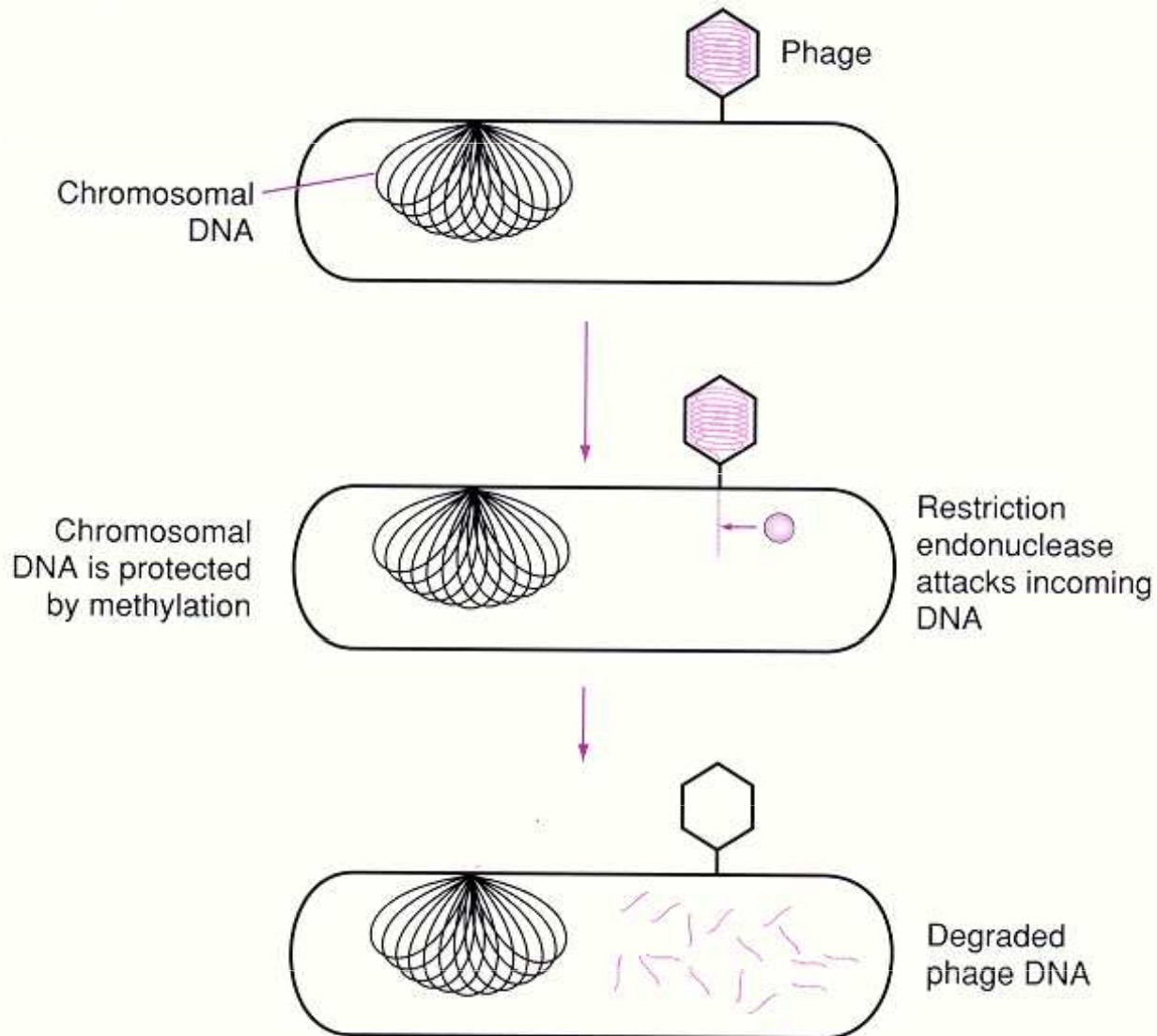
Enzymy spojující molekuly DNA

Typ enzymu	Příklad	Zdroj
DNA ligáza	T4-DNA-ligáza	<i>E.coli</i> inf. fágem T4

Restrikční endonukleázy (RE)

- endonukleázy izolované z bakterií
- spolu s metylázami představují jednoduché varianty imunitního systému: jejich úkolem je ochrana bakteriálních buněk před cizorodými molekulami DNA
- součást **restrikčně modifikačních** systémů
- omezují propagaci bakteriofágů (např. fág namnožený v kmeni *C. coli* nemůže účinně infikovat *E. coli* kmen K, protože fágová DNA je v kmeni K účinně **degradována**)
- DNA hostitelské buňky je před účinkem vlastní endonukleázy chráněna metylací
- objevitelé : H.O. Smith, K.W. Wilcox, and T.J. Kelley, (Johns Hopkins University, 1968)

Restrikce bakteriofága

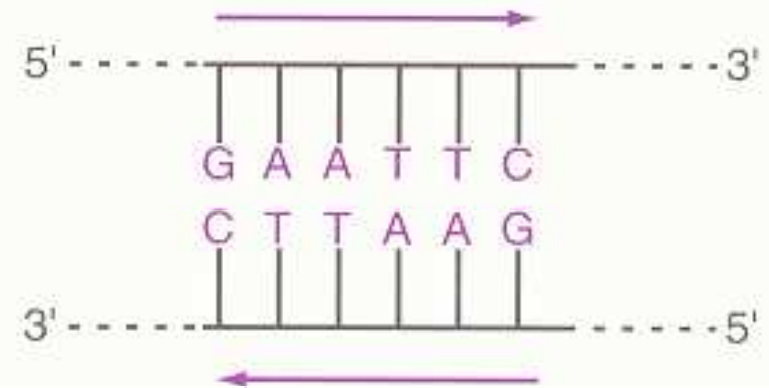


Význam restrikčních endonukleáz

- nástroj pro přípravu rekombinantních molekul DNA
- prostředek pro studium struktury, organizace, exprese a evoluce genomu
- základ pro genové inženýrství

Vlastnosti restrikčních endonukleáz

- sekvenčně specifické endonukleázy
- producenty jsou bakterie
- štěpí dvouřetězcové molekuly DNA většina RE rozeznává palindromy („radar“)
- štěpí oba řetězce DNA
- rozdělují se do tříd



Tři třídy RE

- rozdělení založeno na způsobu štěpení DNA, molekulové hmotnosti a požadavcích na kofaktory
- RE třídy I a III nesou v jediném proteinu **aktivitu modifikační a restriční**
- v genovém inženýrství se téměř výhradně používají RE třídy II, které mají pouze **aktivitu restriční**

Restrikční endonukleázy třídy I (*EcoK*, *EcoB*)

- vážou se na specifické nukleotidové sekvence
- štěpí **náhodně** v místech vzdálených až několik 1000 pb od místa vazby
- molekulová hmotnost dosahuje cca 300.000
- zajišťují modifikaci (metylace) i restrikci DNA
- vyžadují kofaktory ATP, Mg^{2+} a S-adenosylmetionin
- nevhodné pro analýzu sekvencí DNA nebo genové inženýrství

Restrikční endonukleázy třídy II

- vážou se na specifické (4-8 pb) dlouhé rozpoznávací (cílové) místo (často palindrom)
- katalyzují štěpení dvouřetězcových molekul DNA hydrolýzou fosfodiesterových vazeb obou řetězců v **restrikčním místě**, které je uvnitř vazebného místa nebo v jeho bezprostředním sousedství
- produktem jsou definované **restrikční fragmenty DNA**
- štěpení se podrobují všechna cílová místa v dané molekule DNA
- molekulová hmotnost: 20.000 - 100.000
- kofaktor: pouze ATP
- v současné době známo více než 3500 restrikčních endonukleáz II

Restrikční endonukleázy třídy III

- vážou se na specifická místa DNA, ale štěpení není sekvenčně specifické
- kofaktorem je ATP

Charakter cílových míst RE třídy II

5'... GAATTC...3'
3'... CTTAAG...5'

=

5'... GAA TTC...3'
3'... CTT AAG...5'

≠

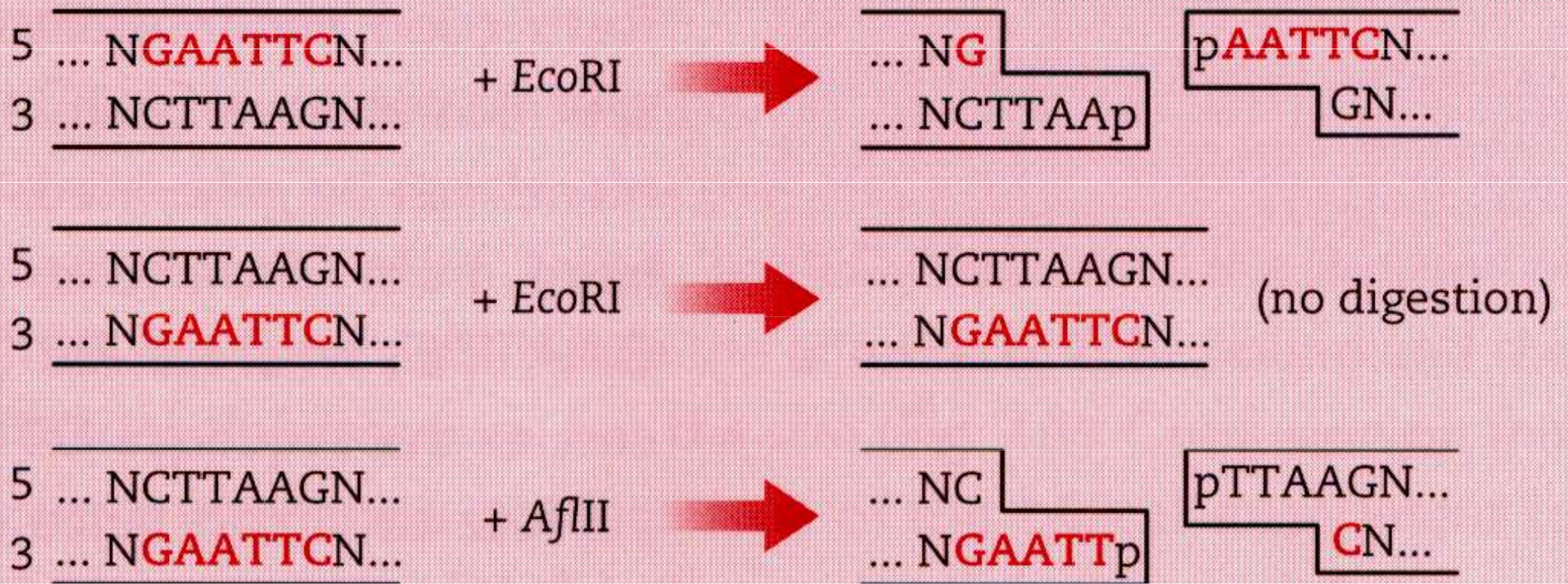
5'... GAA AAG...3'
3'... CTT TTC...5'

Restriction enzyme recognition sequences...

are rotationally symmetric...

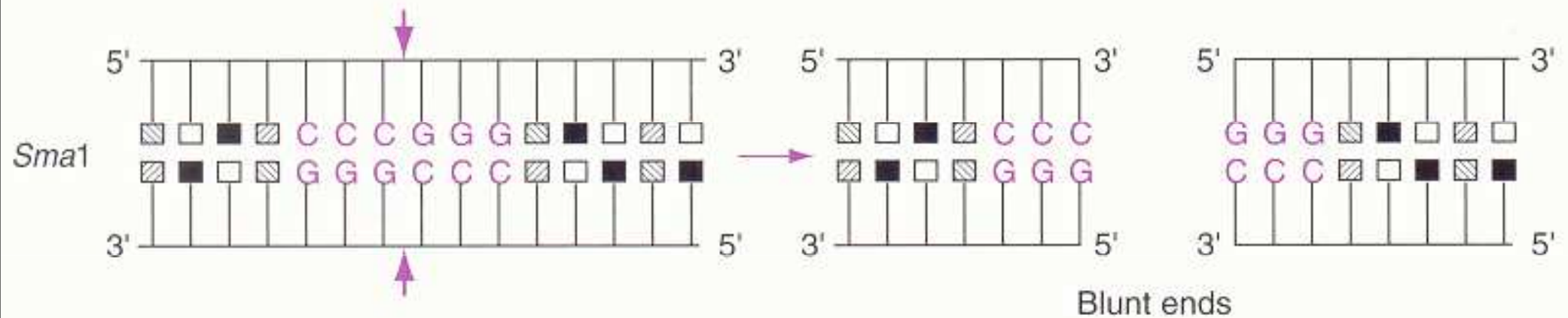
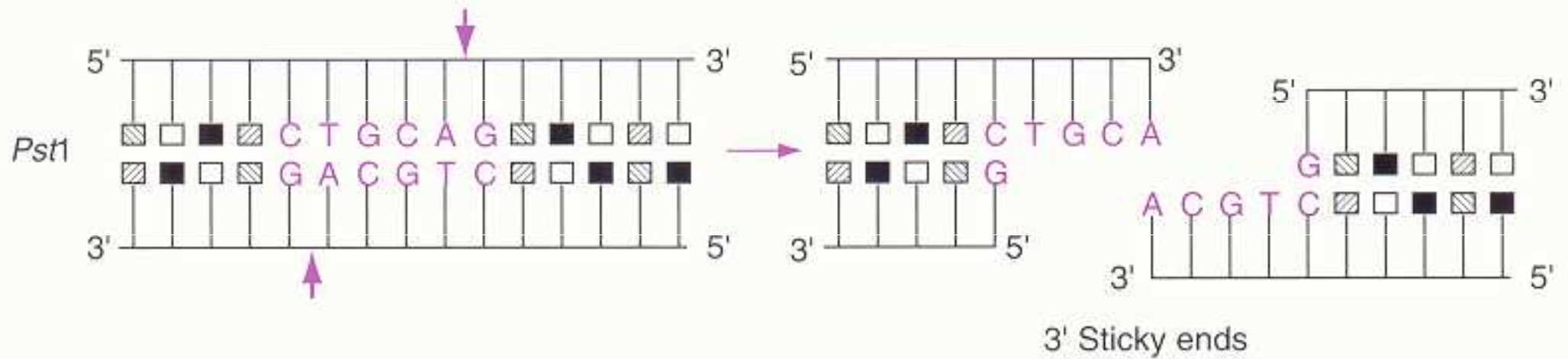
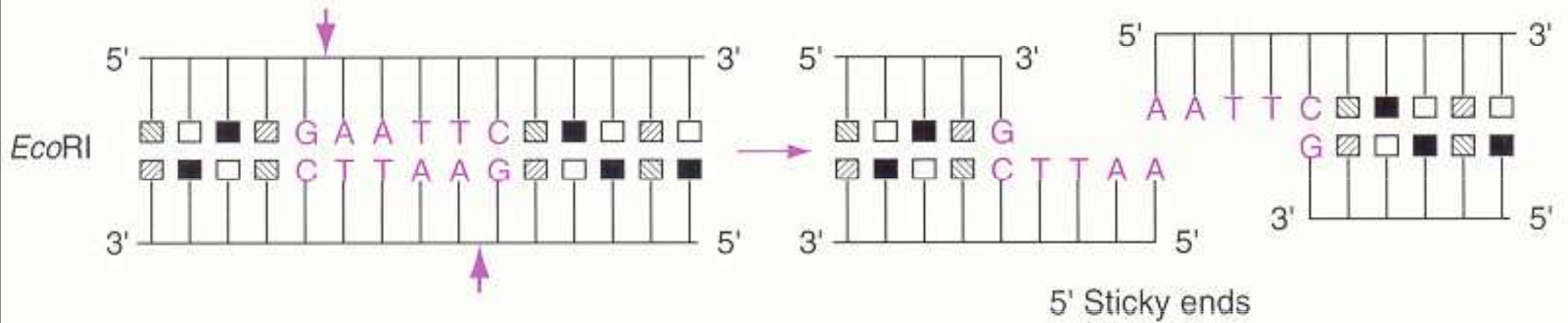
not mirror symmetric

Orientace cílových míst je důležitá

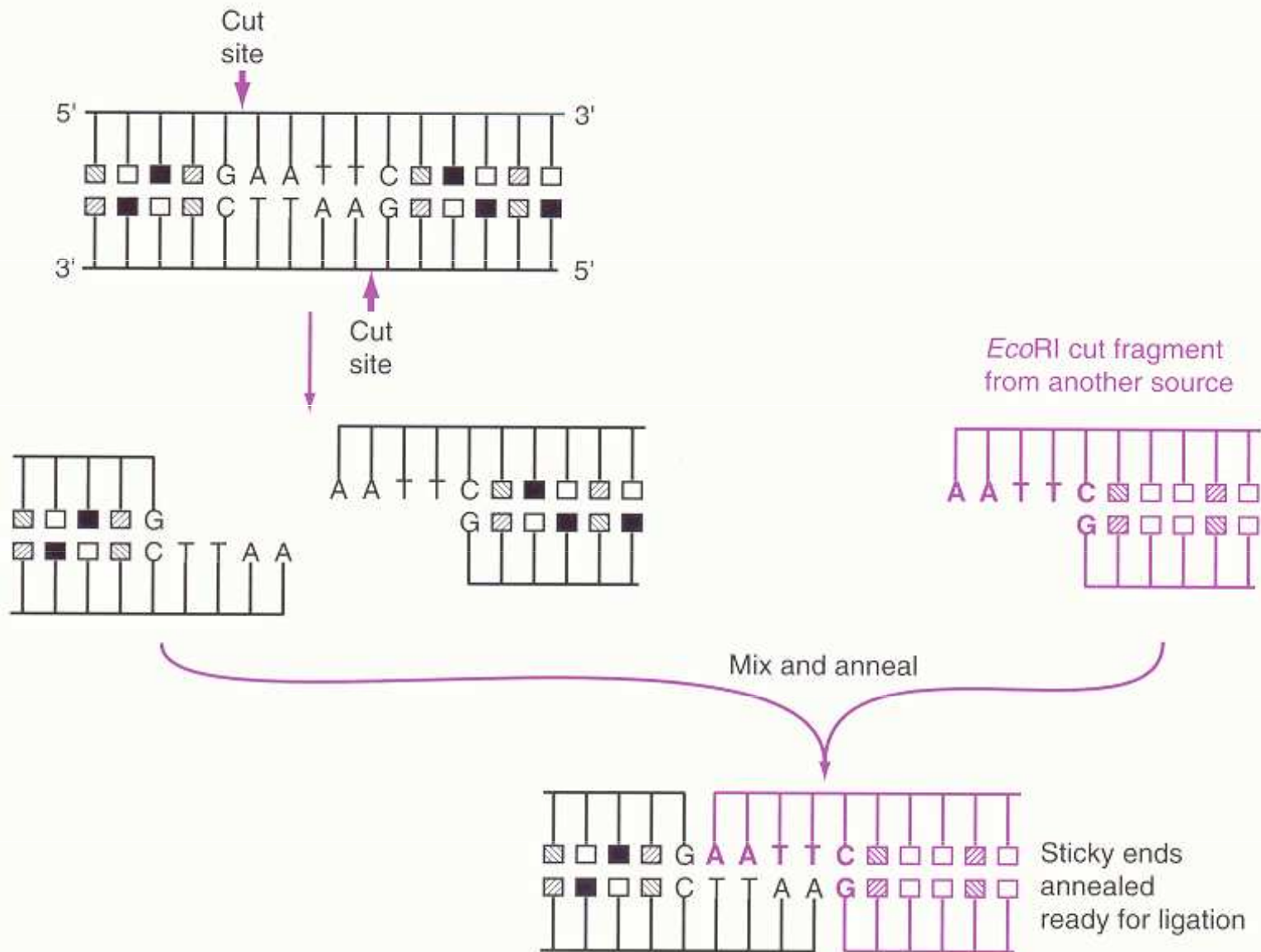


Produkty štěpení restričních endonukleáz

- **tupé** („blunt“) konce (po štěpení obou řetězců ve stejném místě)
- **ostré** („sticky“) konce (po štěpení řetězců v různých místech, která jsou obvykle vzdálena 1-4 nukleotidy)
 - 5' přečnávající („overhang“)
 - 3' přečnávající

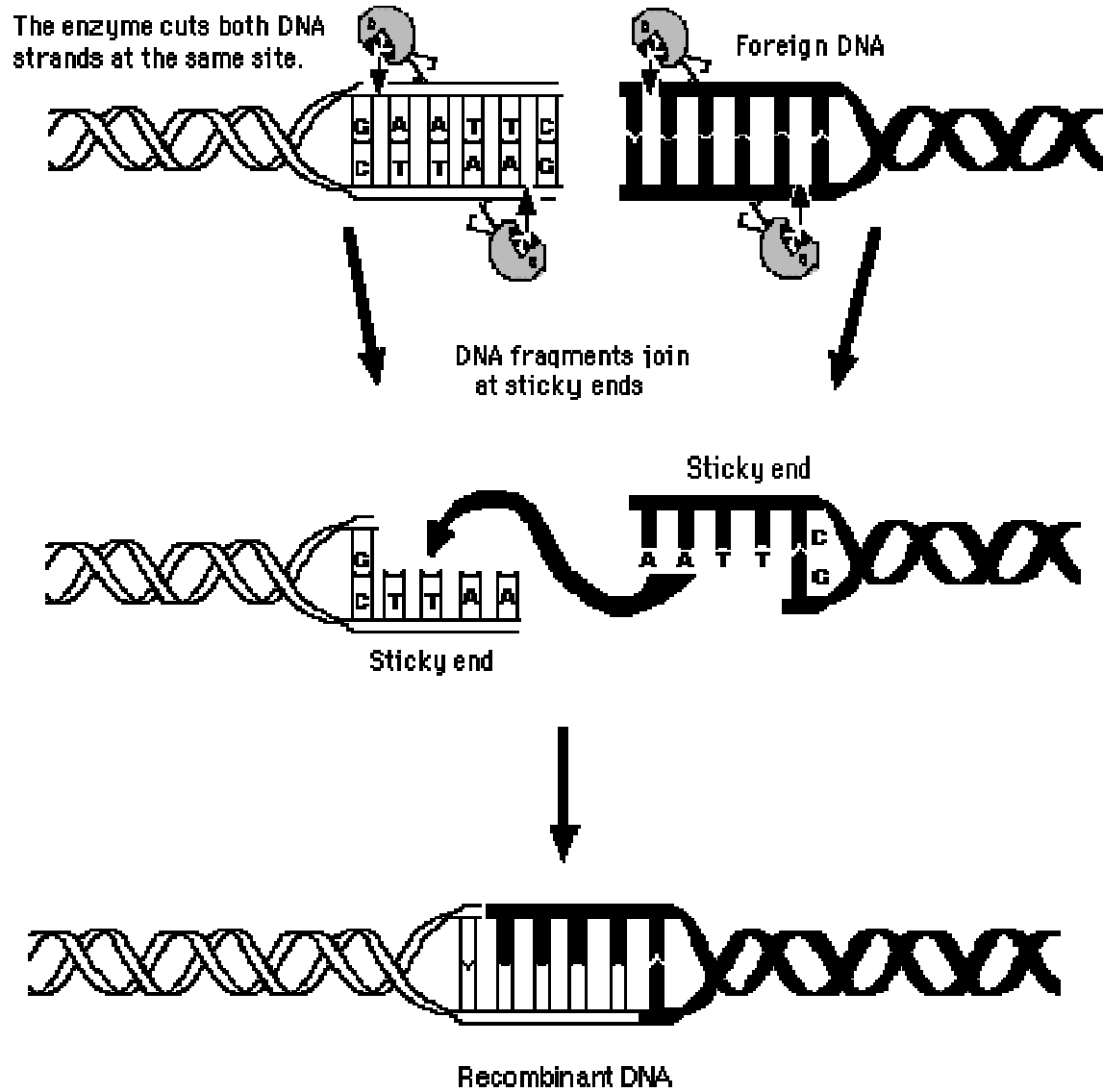


Přečnávající kompatibilní konce usnadňují spojení fragmentů DNA pocházejících z různých zdrojů



Restriction Enzyme

Action of EcoRI



Využití restričních enzymů

- fyzikální mapování DNA
- analýza populačních polymorfizmů
- změny v uspořádání molekul DNA
- příprava molekulárních sond
- příprava mutantů
- analýza modifikací DNA

Názvosloví restričních endonukleáz

např. *EcoRI*

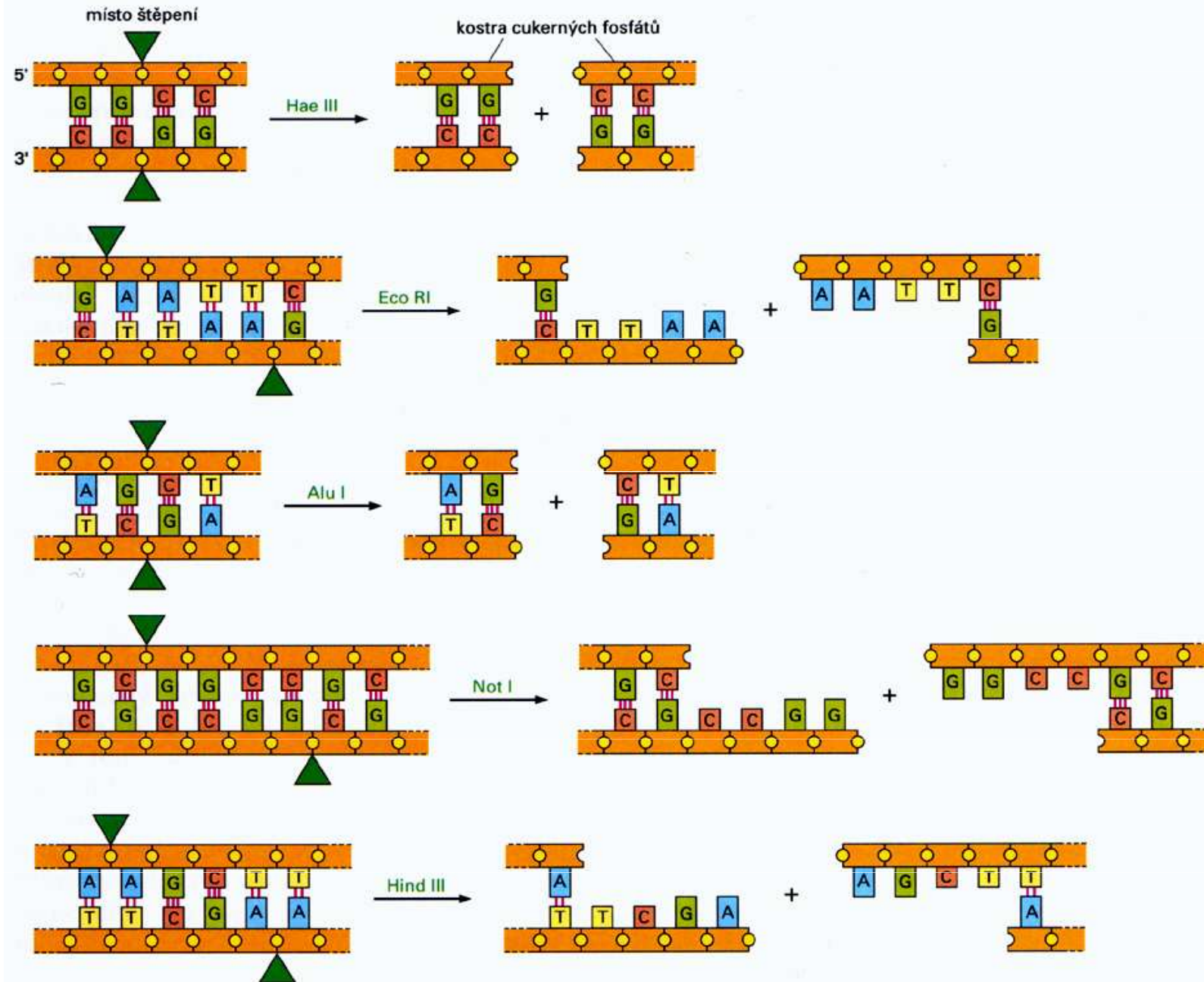
- **1. písmeno**: počáteční písmeno **rodu** produkční bakterie
- **2. a 3. písmeno**: první dvě písmena **druhu** produkční bakterie
- označení **kmene (serotypu)** produkční bakterie (ne vždy)
- římská číslice vyjadřuje **pořadové číslo** endonukleázy izolované z dané bakterie

Examples of restriction endonucleases

Enzyme	Recognition site	Number of bases	Ends generated	Original source of enzyme
<i>EcoRI</i>	G/AATTC	6	5' sticky	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>BamHI</i>	G/GATCC	6	5' sticky	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
<i>BglII</i>	A/GATCT	6	5' sticky	<i>Bacillus globigii</i>
<i>PstI</i>	CTGCA/G	6	3' sticky	<i>Providencia stuartii</i>
<i>XmaI</i>	C/CCGGG	6	5' sticky	<i>Xanthomonas malvacearum</i>
<i>SmaI</i>	CCC/GGG	6	blunt	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Sau3A</i>	/GATC	4	5' sticky	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A
<i>AluI</i>	AG/CT	4	blunt	<i>Arthrobacter luteus</i>
<i>NotI</i>	GC/GGCCGC	8	5' sticky	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
<i>PacI</i>	TTAAT/TAA	8	3' sticky	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>

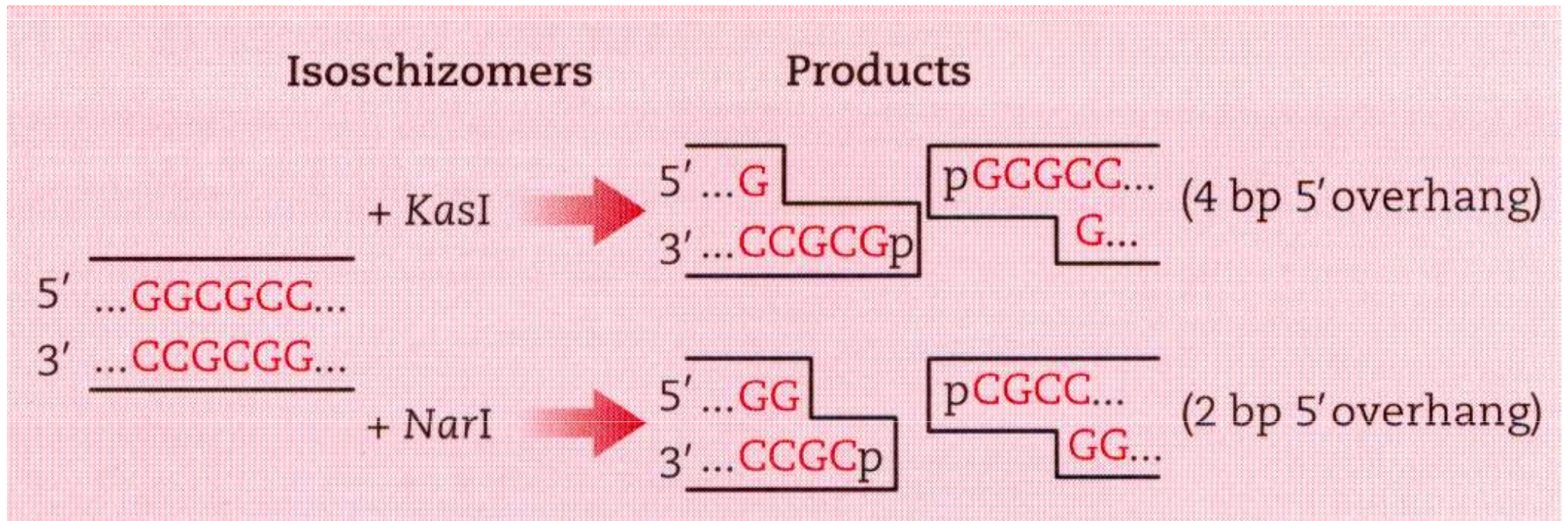
Only one strand of the recognition site is shown, with a slash (/) showing the position of the cleavage site. All the examples shown are palindromic, so the sequence of the second strand, read as the reverse complement, and the position of the cleavage site, will be the same as that shown. Thus the reverse complement of 5'-GAATTC-3' is also 5'-GAATTC-3, and both strands are cut by *EcoRI* between G and A.

Příklady cílových míst některých RE



Izoschizomery

- různé RE se **stejným rozpoznávacím místem** (odlišní producenti, reakce může být odlišná)
- izoschizomery mohou mít odlišnou citlivost k metylovaným bazím v cílové sekvenci



Izokaudamery

- různé RE, které mají **odlišné cílové sekvence**, ale vytvářejí **stejně lepivé konce**
- výhodné pro cílené spojování různých molekul DNA

Relaxovaná (uvolněná) specifita (hvězdičková aktivita)

- schopnost RE štěpit kromě cílového místa také jiné - příbuzné sekvence
- většinou za neoptimálních reakčních podmínek
- Např. *EcoRI* může vedle sekvence GAATTC štěpit i sekvence GGATTC, GGATTT, AGATTT

Citlivost RE k metylaci bází v rozpoznávací sekvenci

⁺⁺ AC - štěpení je inhibováno přítomností N⁶-metyladeninu nebo 5-metylcytozinu

⁰⁰ AC - štěpení není přítomností N⁶-metyladeninu nebo 5-metylcytozinu ovlivněno

Jednotka RE

množství RE, které zcela rozštěpí 1 μg
DNA fága Lambda za 1 hodinu při optimální
teplotě a v optimálním prostředí

Počet restrikčních míst pro daný enzym v molekule DNA klesá s jejich velikostí

DNA source	Genome size (kb)	Number of restriction sites		
		4bp	6bp	8bp
1 pUC19	3	10	0-1	0-1
2 SV40	5	20	1	0-1
3 Bacteriophage λ	48	190	12	0-1
4 Bacteriophage T4	165	660	40	2-3
5 Bacteria	4700	18400	1100	70
6 Yeast*	16000	62500	3900	250
7 Fruit fly*	120000	470000	30000	1800
8 Mammals*	3000000	11700000	730000	46000

* Haploid values (most somatic cells have twice as much DNA)

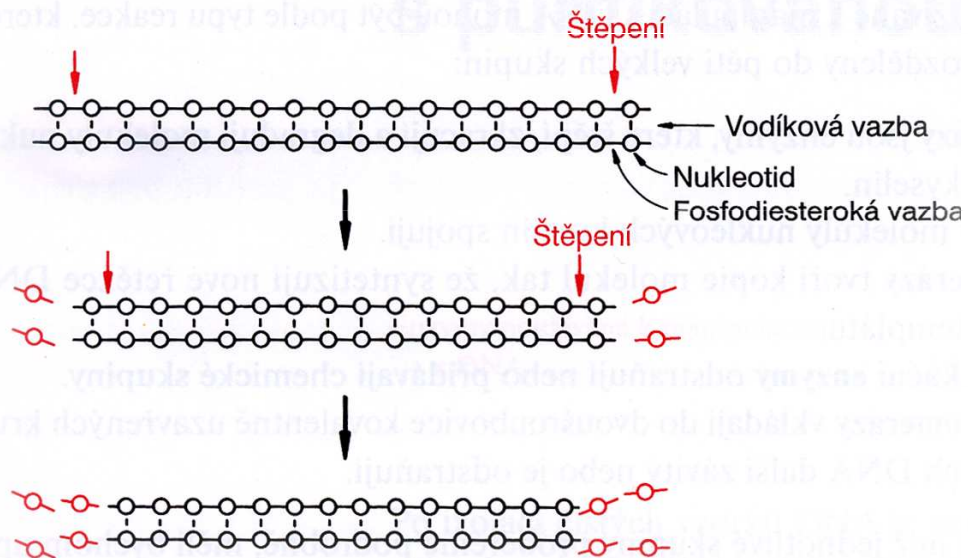
Nukleázy

- degradují molekuly DNA porušením fosfodiesterových vazeb
- jejich aktivity jsou obvykle nežádoucí - narušují integritu vzorků DNA a RNA
- existuje řada různých nukleáz, které se liší substrátovou specifitou, požadavky na přítomnost kofaktorů nebo způsobem degradace substrátu (exonukleázy, endonukleázy, příp. obě aktivity současně)

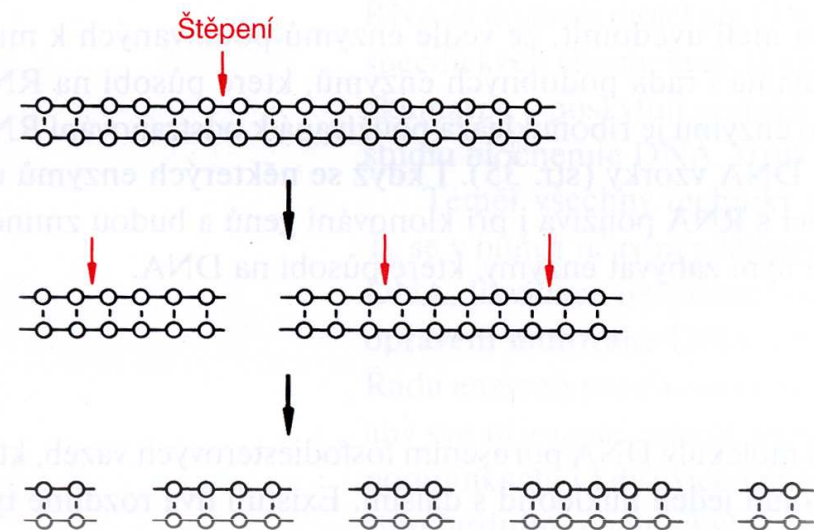
Exonukleázy versus endonukleázy

- Exonukleázy postupně odstraňují nukleotidy z konce molekuly DNA
- Endonukleázy štěpí vnitřní fosfodiesterové vazby uvnitř molekuly DNA

(a) Exonukleáza



(b) Endonukleáza



Deoxyribonukleáza I (DNáza I)

Aktivita:

- nespecifická endonukleáza, štěpící jedno i dvouvláknovou DNA
- v DNA vytváří jednořetězcové zlomy, od kterých se DNA dále degraduje na mono- a oligonukleotidy

Substrát:

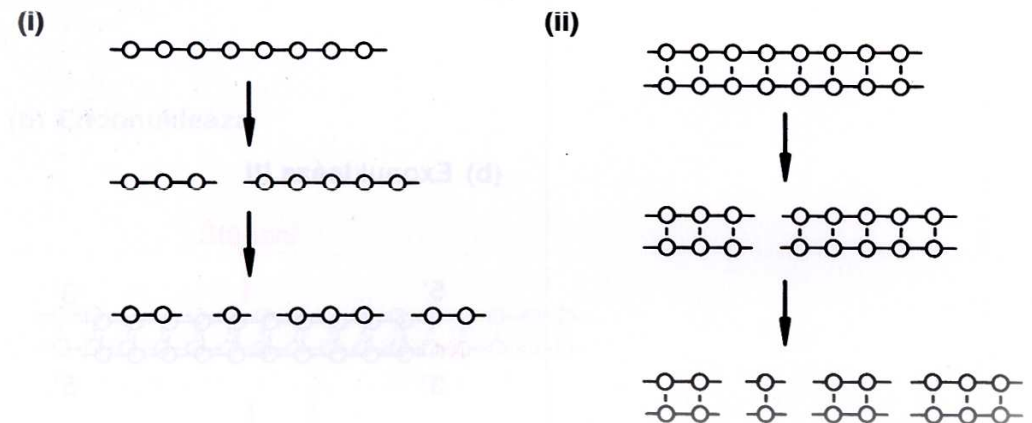
dvouřetězcová i jednořetězcová DNA

Hlavní produkty:

Dinukleotidy, trinukleotidy, tetranukleotidy
fosforylované na 5' konci

Zdroj: kravská slinivka

(b) DNáza I



Deoxyribonukleáza I (DNáza I)

Vliv kofaktorů:

- za přítomnosti Mg^{2+} jsou místa štěpení rozmístěna statisticky na obou řetězcích: náhodné zlomy
- za přítomnosti Mn^{2+} jsou přednostně štěpena místa ležící ve ds DNA proti sobě: tupé konce nebo přesahy 1 - 2 nukleotidů

Využití:

- nízké koncentrace: vytváření jednořetězcových zlomů v ds DNA před značením „nick translací“
- vyšší koncentrace: odbourání DNA z roztoků RNA
- Analýza interakcí protein-DNA („DNase footprinting“)

Nukleáza Bal31

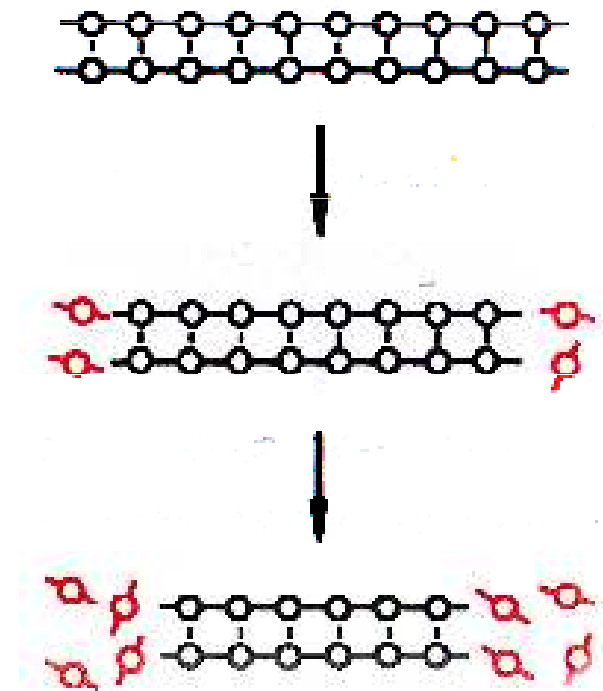
- štěpí lineární dvouřetězcovou DNA od obou konců bez tvorby intramolekulárních zlomů, vznikají zkrácené fragmenty DNA se zarovnanými konci

Aktivita:

- endonukleázová specifická pro jednořetězcovou DNA
- exonukleázová 5' → 3'
- exonukleázová 3' → 5'

Podmínka aktivity:

- přítomnost iontů Ca^{2+} (možnost inaktivace chelatačními činidly)



Nukleáza Bal31

Zdroj:

- bakterie *Alteromonas espejiana*

Využití:

- cílené zkracování dvouřetězcové DNA z obou konců
- odstranění restričních míst
- zavádění delecí (odstraňuje jednořetězcové oblasti v duplexu DNA a RNA)
- mapování restričních míst

Vytváření delecí nukleázou Bal31

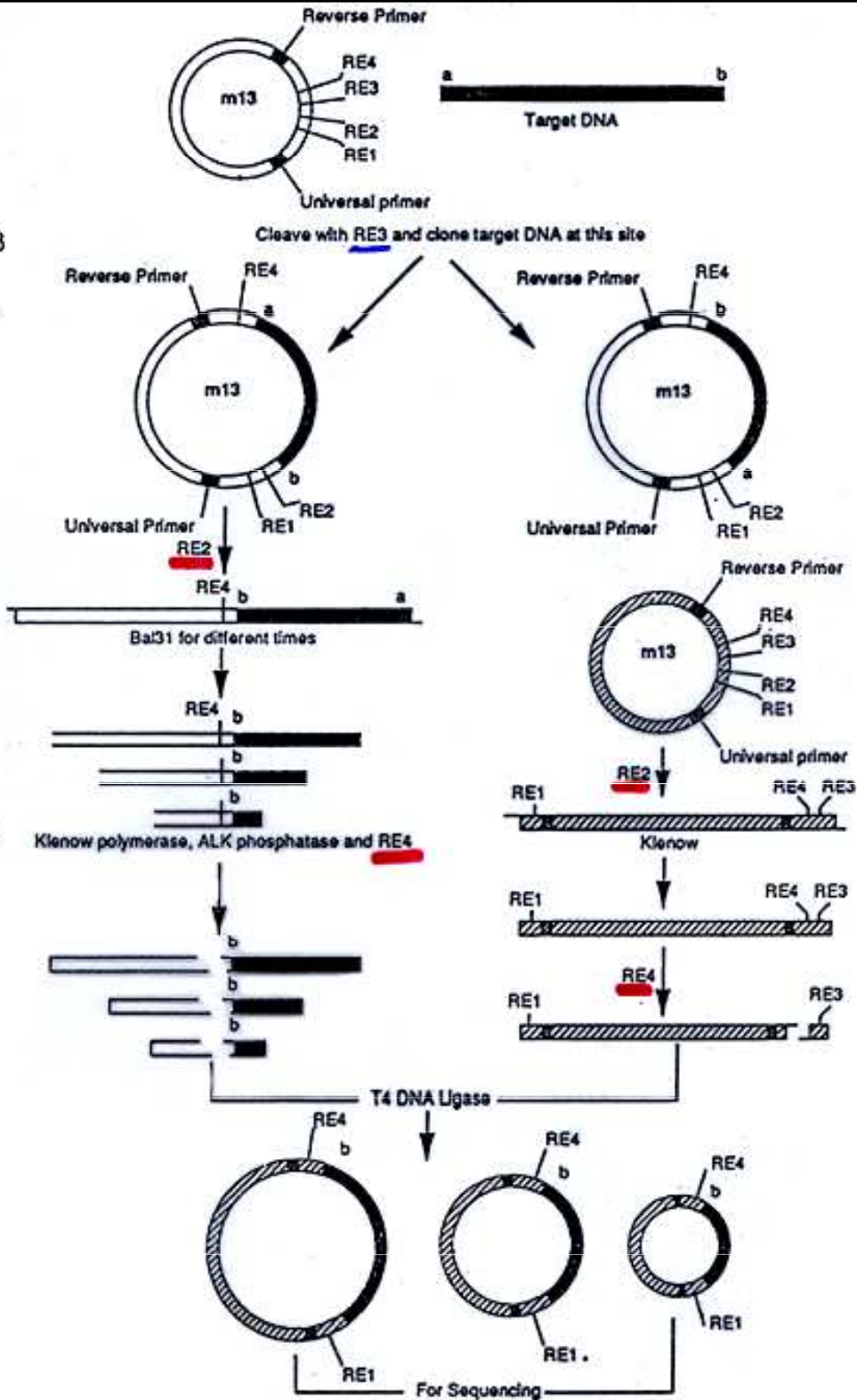
klonování DNA do místa RE3 v obou orientacích

linearizace RE2

štěpení Bal31 po různou dobu

Klenow, alk. fosfatáza, RE4

ligace do vektoru (tupý konec + RE4)



For Sequencing

Nukleáza S1

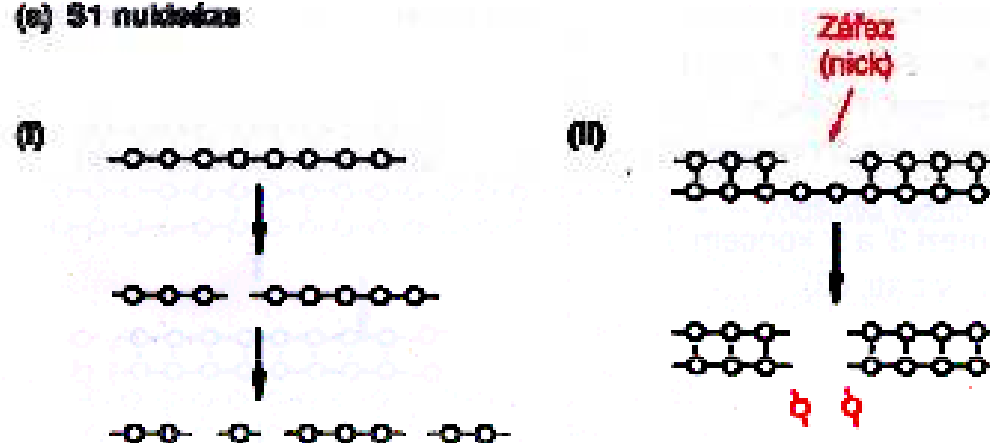
Endonukleáza specifická pouze pro jednořetězcovou DNA

Zdroj: *Aspergillus oryzae*

Využití:

- odstranění jednovláknových struktur z dvojláknové DNA a RNA (odstranění nespárovaných smyček)
- mapování intronů analýzou hybridních molekul DNA-mRNA
- odstranění jednořetězcových konců DNA: tupé konce

(a) S1 nukleáza



Nukleáza ExoIII

Aktivita:

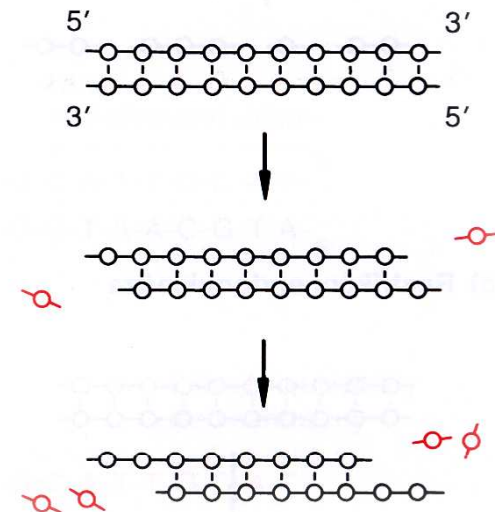
- katalyzuje postupné odstraňování 5' mononukleotidů z 3' OH konců dvouřetězcové DNA (na dvouřetězcové DNA postupně odstraňuje jedno vlákno od 3' konce)

Substrát:

- preferovaná je dvouřetězcová DNA s tupými nebo 5' přečnívajícími konci
- nízká účinnost na dvouřetězcové DNA s 3' přečnívajícími konci
- inaktivní na jednořetězcové DNA

Zdroj: *E.coli*

(b) Exonukleáza III

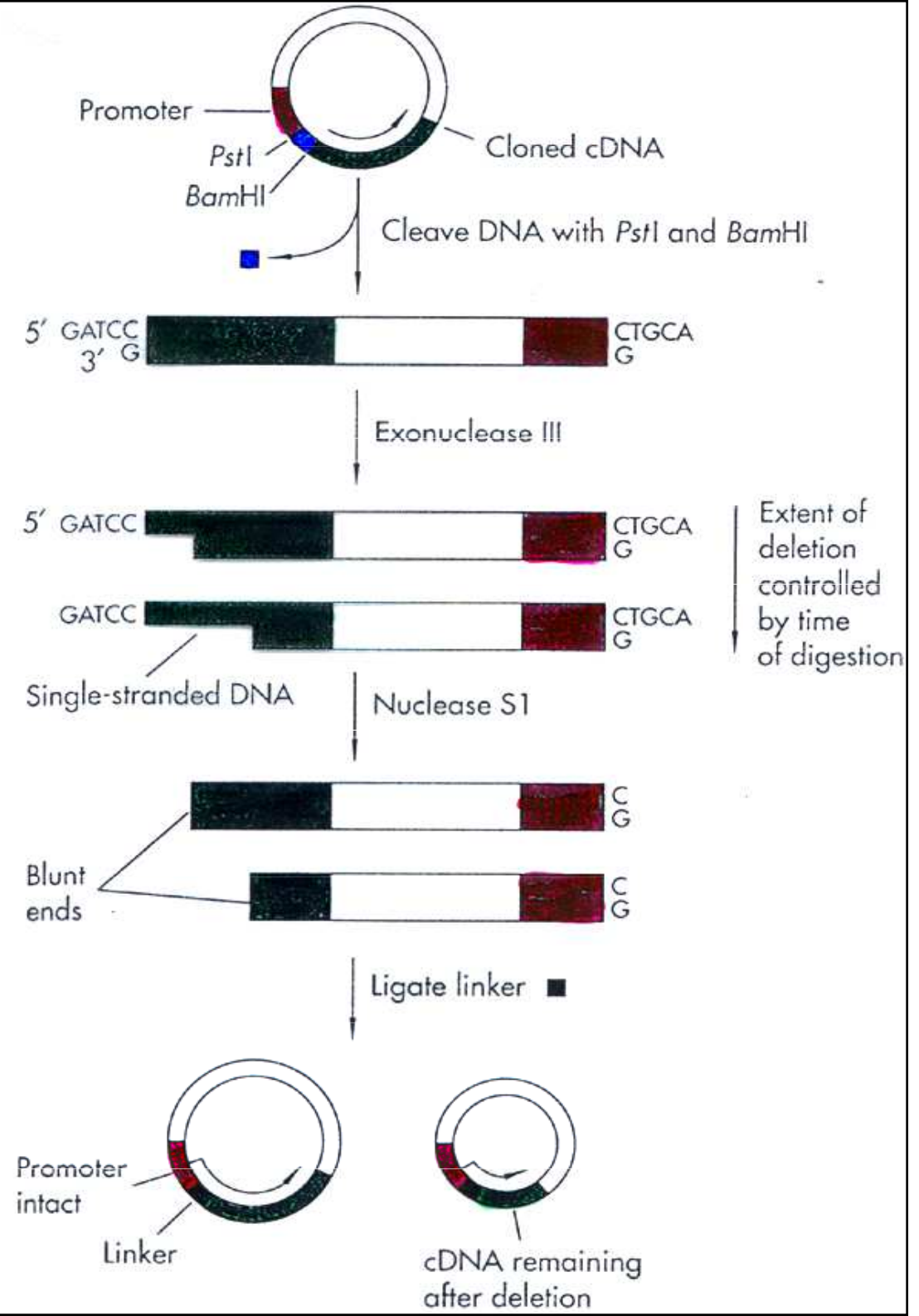


Nukleáza ExoIII

Využití:

- vytváření jednosměrných delecí od konců lineárních fragmentů DNA
- příprava jednořetězcových substrátů pro sekvenování DNA dideoxy terminační metodou

Příprava jednosměrných delecí ExoIII



Nukleáza fága Lambda (Lambda Exonuclease)

Aktivita:

exonukleázová, odstraňuje 5' mononukleotidy z dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3'

- produktem jsou 5' nukleosid - monofosfáty

Substrát:

- preferovaná je dvouřetězcová DNA fosforylovaná na 5' konci

Zdroj:

bakterie *E.coli* infikované fágem Lambda

Využití:

- vytváření jednosměrných delecí

Ribonukleázy

Ribonukleáza T1

- sekvenčně specifická ribonukleáza
- degraduje specificky RNA v místech G

Zdroj: *Aspergillus oryzae* (dnes příslušný gen klonován v *E. coli*)

Ribonukleáza T1

Substrát a aktivita:

- štěpí RNA v poloze 3' fosfátů guaninových zbytků: vznikají oligonukleotidy s koncovými guanosinovými 3' fosfáty

Využití

- odstranění nespárovaných oblastí RNA z hybridů DNA:RNA
- sekvenování RNA
- mapování RNA
- studium struktury RNA

Ribonukleázy

Ribonukleáza A

Endoribonukleáza, která specificky degraduje jednořetězcovou RNA v místech C a U.

Zdroj: kravská slinivka

Ribonukleáza A

Substrát a aktivita

Endoribonukleáza, štěpí jednořetězcovou RNA na 3' koncích pyrimidinových zbytků: degradace RNA do 3'-fosforylovaných oligonukleotidů.

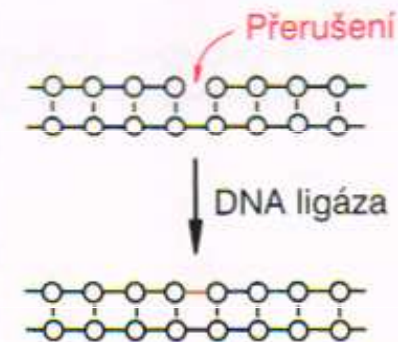
Využití:

- eliminace nebo snížení koncentrace kontaminující RNA v izolátech plazmidové DNA
- mapování mutací v DNA nebo RNA štěpením nespárovaných oblastí: RNáza štěpí RNA v hybridech RNA:DNA v místech nespárovaných oblastí, produkty štěpení jsou následně analyzovány

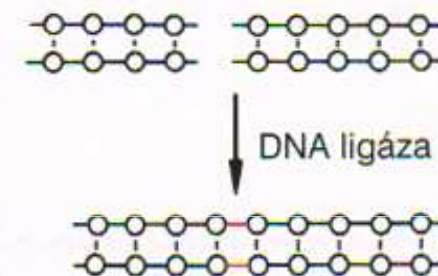
DNA ligázy

- enzymy, které obnovují cukr-fosfátovou kostru DNA tvorbou kovalentní fosfodiesterové vazby za spotřeby ATP nebo NAD
- fyziologický význam při replikaci, rekombinaci a reparaci DNA - opravy jednovláknových přerušení
- mohou spojit dva jednotlivé fragmenty dvouvláknové DNA - využití při genových manipulacích

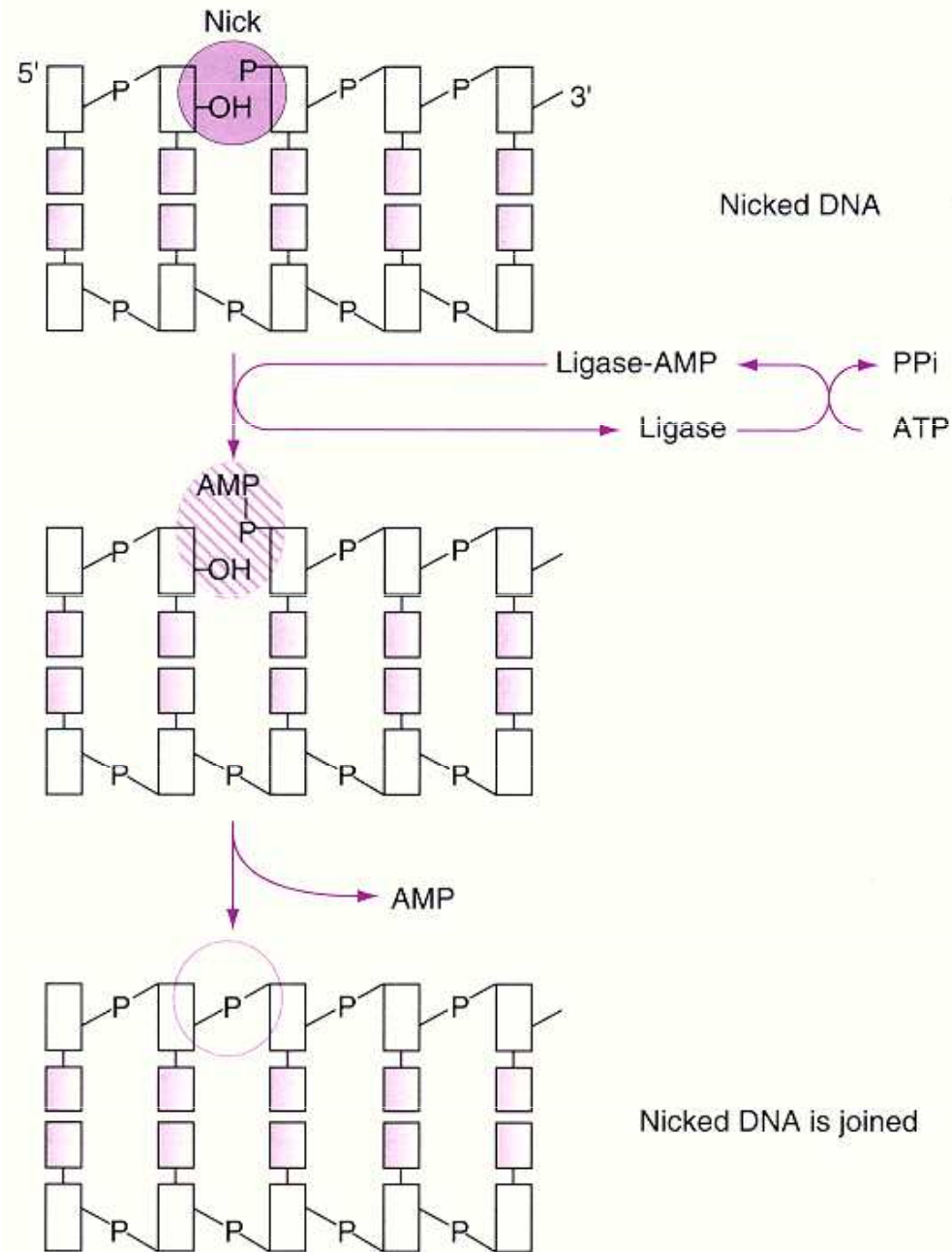
(a) Oprava přerušení



(b) Spojení obou molekul

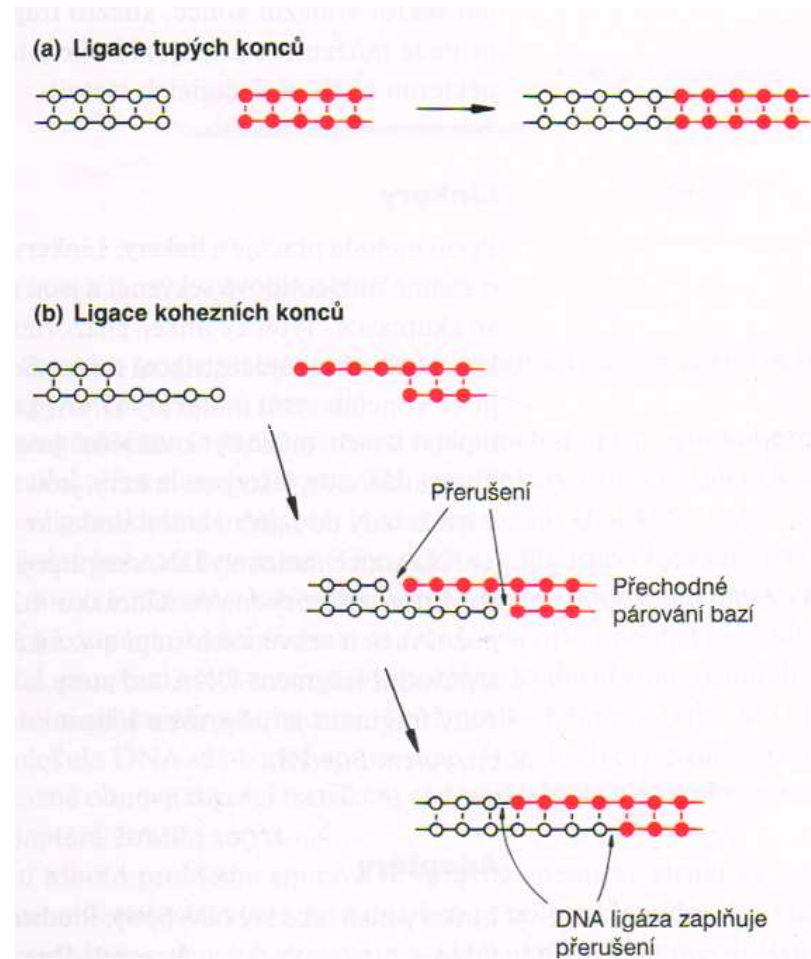


Reakce katalyzované DNA ligázami



Použití DNA ligáz

- příprava rekombinantních molekul DNA
- spojování fragmentů DNA různého původu (restrikční fragmenty DNA, uměle syntetizované molekuly DNA, produkty zpětné transkripce, atd.) s komplementárními konci
- připojování spojek a adaptérů
- cirkularizace lineárních molekul DNA



Běžné typy DNA ligáz

T4-DNA-ligáza

- izolována z buněk *E. coli* infikovaných fágem T4
- **spojuje lepivé i tupé konce DNA**
- opravuje jednořetězcové zlomy („nicks“) v dvouřetězcové DNA, RNA a u hybridů DNA/RNA
- vyžaduje přítomnost fosfátové skupiny na 5' konci a OH skupiny na 3' konci molekuly

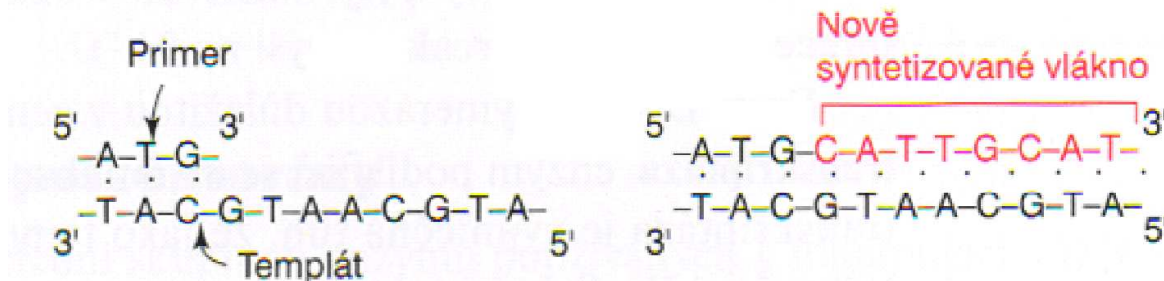
Bakteriální DNA ligáza

- izolována z buněk *E. coli*
- **spojuje jen DNA s lepivými konci**

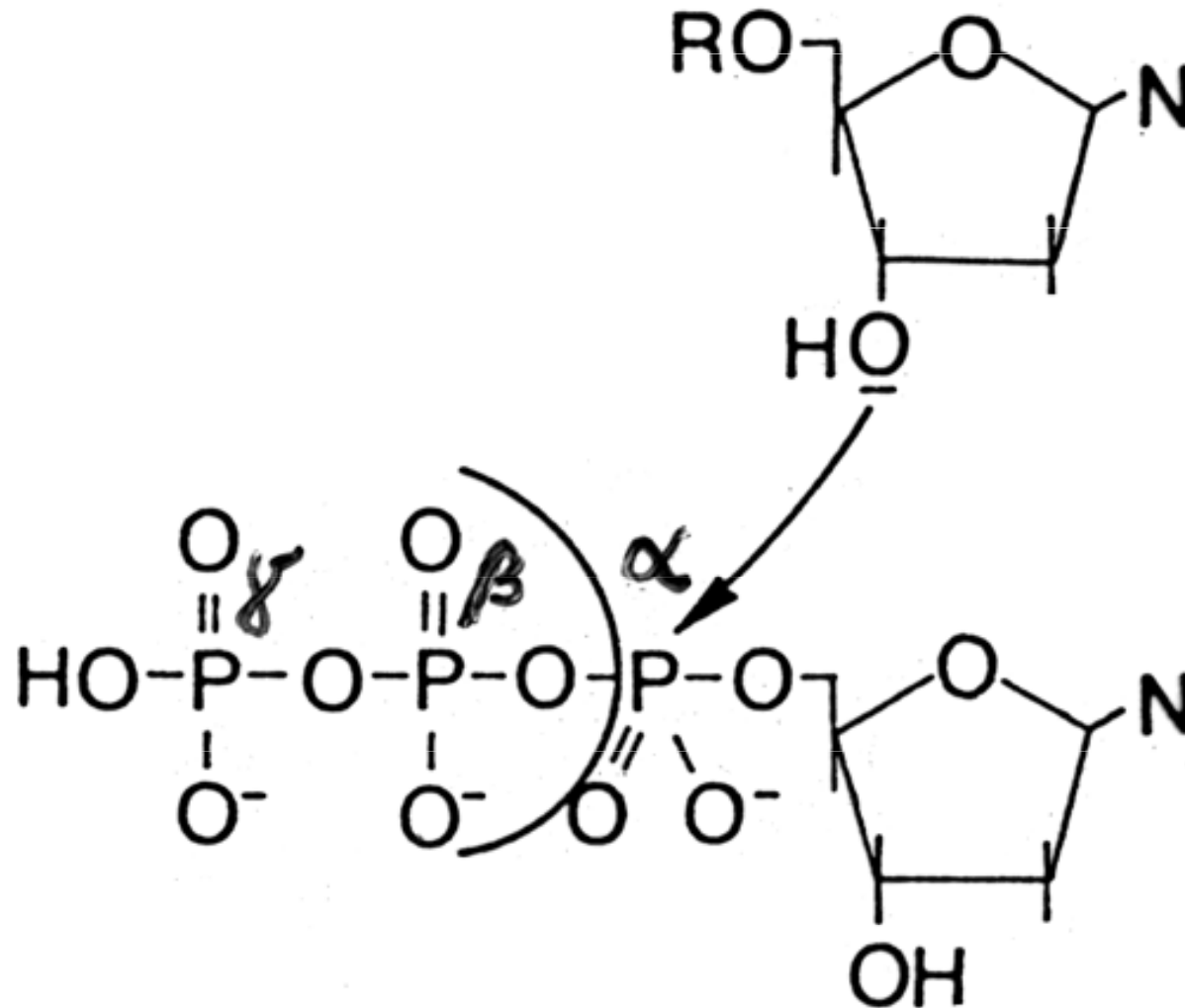
Polymerázy

- syntetizují nukleové kyseliny postupným doplňováním nukleotidů k 3' OH konci primeru
- není známa žádná polymeráza prodlužující 5' konec DNA
- matricí (templátem) je jednořetězcová DNA nebo RNA
- polymerázy vytvářejí komplementární kopii templátového řetězce

(a) Základní reakce



Polymerace DNA



DNA polymeráza I

- 3 aktivity, jejichž rychlost je ovlivněna stavem DNA a koncentrací dNTP v reakční směsi:
- DNA-dependentní DNA polymerační
- 3' → 5' exonukleázová
- 5' → 3' exonukleázová

Polymerace: prodlužování polynukleotidového řetězce ve směru 5' → 3'

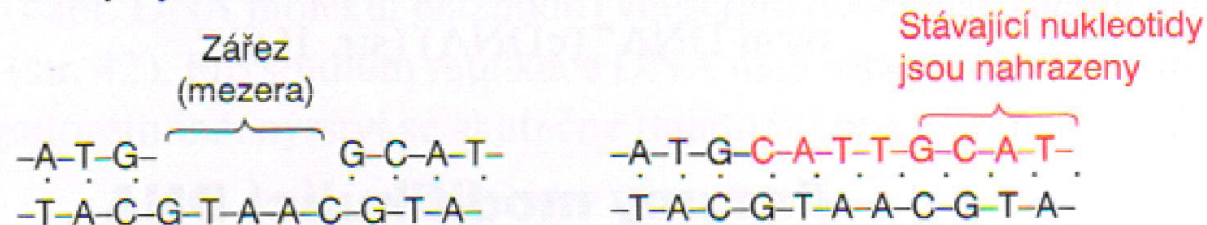
- matrice čtena ve směru 3' → 5'
- tvorba fosfodiesterové vazby nukleofilním atakem 3' OH skupiny rostoucího řetězce a 5' P dNTP za tvorby pyrofosfátu
- požadavek přítomnosti primeru

Exonukleázová aktivita: 5' → 3' i 3' → 5', hydrolýza DNA v obou směrech

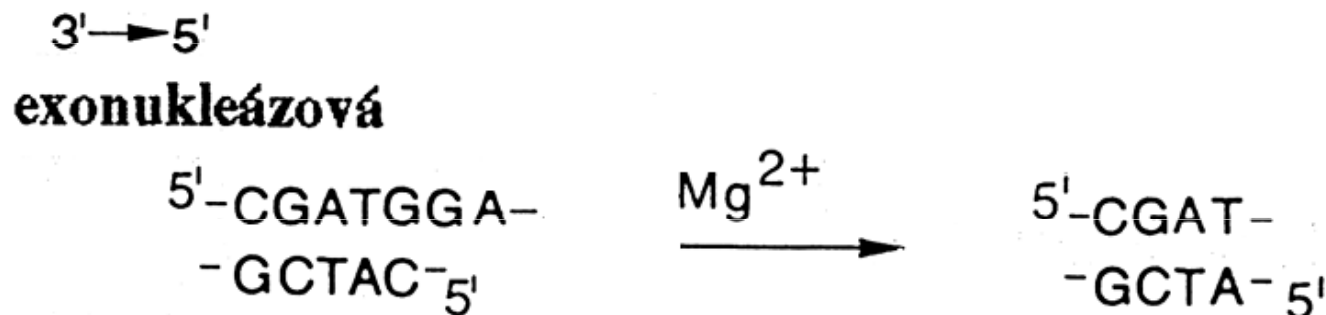
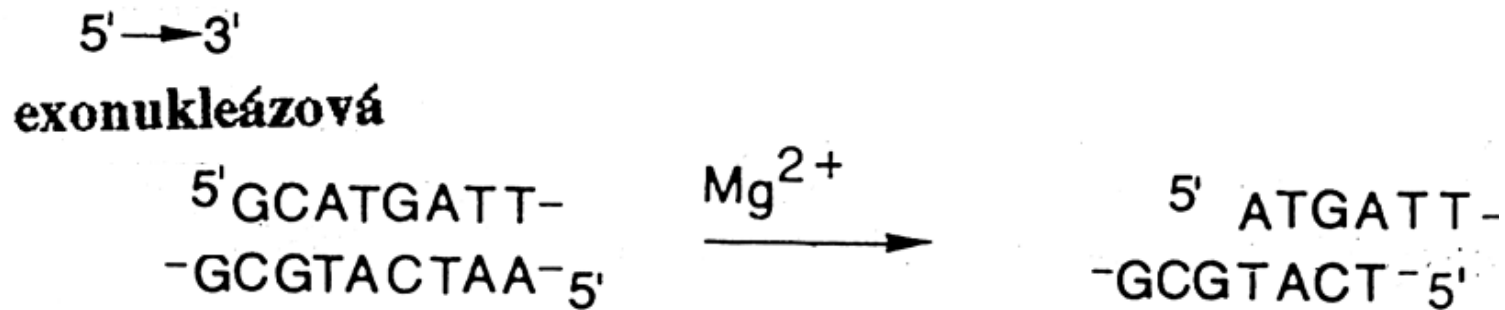
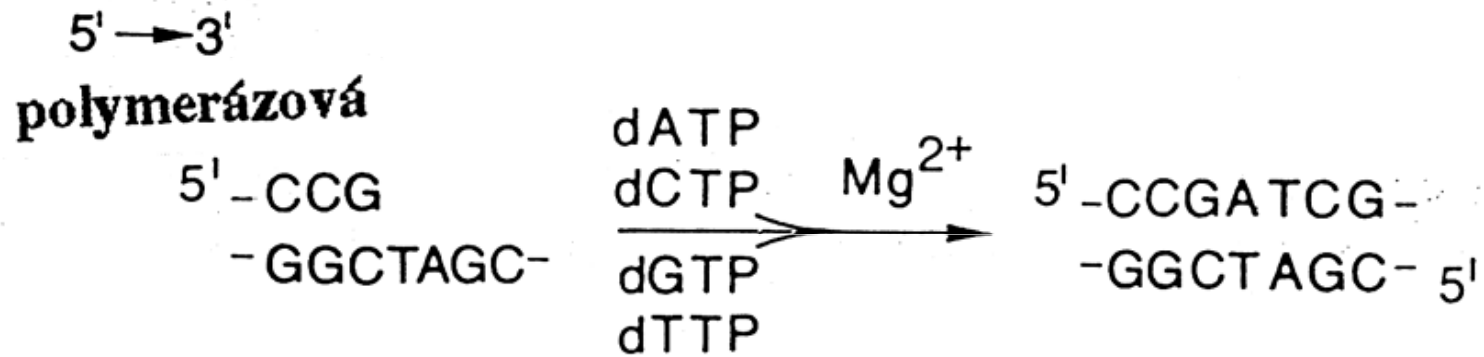
Degradace DNA ve směru 5' → 3' a **současná syntéza** degradovaného řetězce

- oprava chybně začleněných nukleotidů *in vivo* („proof-reading“)
- využití při značení DNA („nick translace“)

(b) DNA polymeráza I



Schématické znázornění tří aktivit DNA pol I

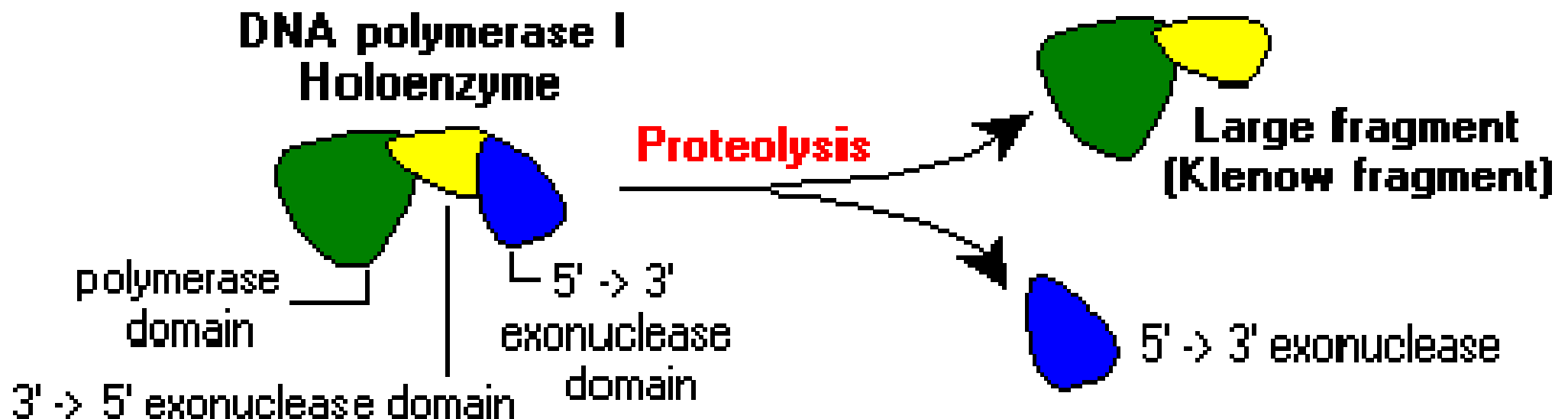


DNA polymeráza I

- jeden aminokyselinový řetězec (109 kDa), ale distinktní domény pro jednotlivé funkce
- N-koncová část (323 aminokyselin) zajišťuje nukleázové aktivity
- proteolýzou lze vytvořit zkrácené varianty, které postrádají některou z domén
- DNA polymeráza I je vhodná pro značení DNA, syntézu cDNA a pro modifikaci konců při tvorbě rekombinantních molekul DNA

Klenowův fragment DNA polymerázy I

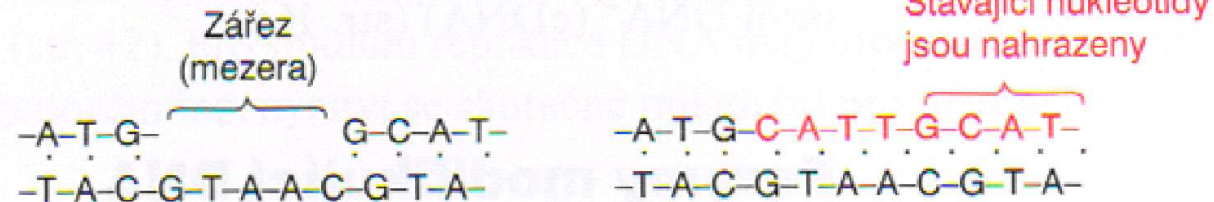
- vzniká odstraněním N-koncové části DNA polymerázy I štěpením subtilisinem
- postrádá exonukleázovou aktivitu 5' -3'



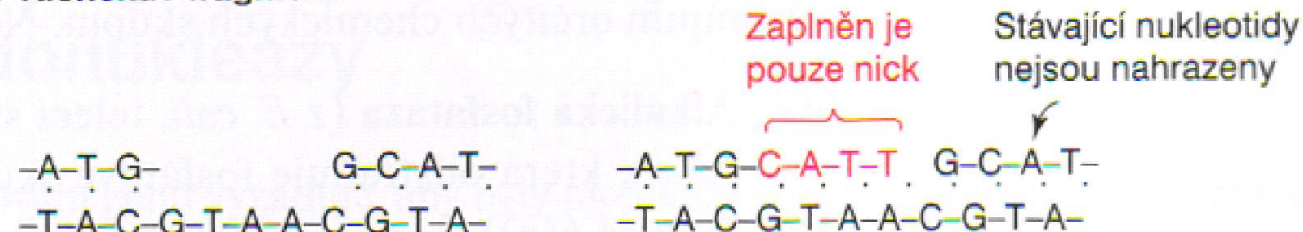
Klenowův fragment DNA polymerázy I

- syntetizuje vlákno DNA komplementární k danému templátu
- jakmile vyplní zářez, nemůže v syntéze pokračovat
- komerční enzymy: produkty exprese zkráceného genu kódujícího DNA polymerázu I v bakteriích

(b) DNA polymeráza I



(c) Klenoxův fragment



Klenowův fragment DNA polymerázy I - využití

- syntéza dvouřetězcové DNA z jednořetězcových templátů



Klenowův fragment DNA polymerázy I - využití

Doplnění zkrácených 3' konců fragmentů DNA („fill-in reaction“): vytváření tupých konců vhodných pro klonování.

5' A-G-G-C-A-G
3' T-C-C-G-T-C-C-T-A-G

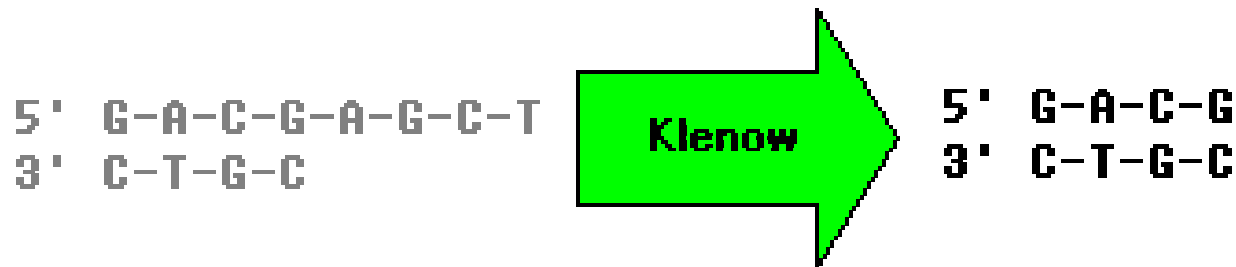
Klenow and
nucleotides

5' A-G-G-C-A-G-G-A-T-C
3' T-C-C-G-T-C-C-T-A-G

Klenowův fragment DNA polymerázy I - využití

Odstranění přečnávajících 3' konců s využitím 3' → 5' exonukleázové aktivity: vytváření tupých konců vhodných pro klonování

Odstraňování nukleotidů od 3' konců má tendenci pokračovat, ale za přítomnosti nukleotidů je tato aktivita vyrovnána aktivitou polymerační a vede k tvorbě tupých konců



T4 DNA polymeráza

- DNA polymeráza fága T4
- polymerázová aktivita $5' \rightarrow 3'$
- exonukleázová aktivita $3' \rightarrow 5'$ (200 x vyšší než u Klenowova enzymu)
- využití při značení 3' konců DNA nahrazovací reakcí: exonukleázová aktivita degraduje dvouřetězcovou DNA za tvorby molekul s překrytými 3' konci. Po přidání značených dNTP jsou konce doplněny polymerační aktivitou enzymu.

T7 DNA polymeráza

- DNA polymeráza bakteriofága T7

Aktivita:

- DNA polymerázová $5' \rightarrow 3'$
- $3' \rightarrow 5'$ exonukleázová ($5' \rightarrow 3'$ exonukleázová doména chybí)
- velmi podobná Klenowovu fragmentu a T4 DNA polymeráze

T7 DNA polymeráza - výhody

Vysoká procesivita:

Průměrná délka syntetizované DNA před tím než enzym disociuje od templátu je podstatně vyšší než u jiných enzymů.

Využití při sekvenování DNA

Sekvenáza a **Sekvenáza 2.0** jsou chemicky ošetřené nebo genetickými manipulacemi vytvořené deriváty T7 DNA polymerázy, které postrádají 3' → 5' exonukleázovou aktivitu - široce používány při sekvenování.

Termostabilní DNA polymerázy



Taq DNA polymeráza byla v roce 1976 purifikována z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horkých pramenech. Zhruba o 10 let později byla objevena polymerázová řetězová reakce.

Termostabilní DNA polymerázy

- nepodléhají denaturaci teplem (podmínkou PCR je, že DNA polymeráza vydrží teplotu denaturace DNA)
- katalyzují syntézu DNA z nukleosid trifosfátů na templátu (jako jiné DNA polymerázy)
- požadavky pro iniciaci polymerace:
 - volná 3' OH skupina
 - přítomnost hořčnatých iontů

Termostabilní DNA polymerázy

Katalytická aktivita je maximální mezi 75 a 80°C a klesá při nižších teplotách.

Kromě *Taq* DNA polymerázy bylo izolováno několik dalších termostabilních DNA polymeráz, např. *Pfu* a *Vent* polymeráza

Taq z *Thermus aquaticus*, poločas života je 1,6 hod v 95°C
Pfu z *Pyrococcus furiosus*, která má nejvyšší přesnost
Vent z *Thermococcus litoralis*, poločas života je 7 hod v 95°C

Zpětná (reverzní) transkriptáza

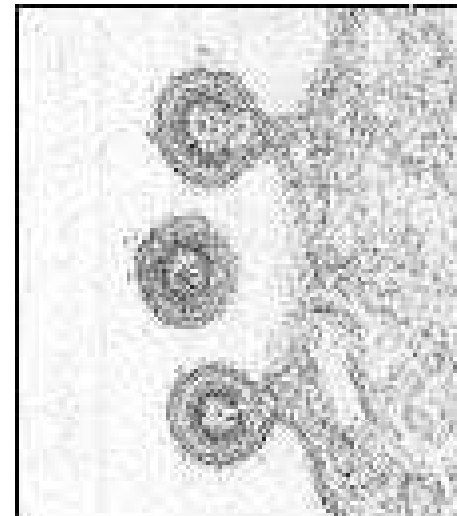
- **RNA-dependentní DNA polymeráza**
- přepis genetické informace z RNA do DNA
- požadována přítomnost primeru a templátu
- poskytuje v první fázi hybrid RNA/DNA, po odstranění RNA působením hydroxidů nebo RNázy H lze zpětnou transkriptázou katalyzovat i syntézu druhého vlákna DNA
- syntézu 2. vlákna může zajistit také DNA polymeráza I

Zdroj: retroviry

M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus)

AMV (Avian Myeloblastosis Virus)

RSV (Rous Sarcoma Virus)



Zpětná (reverzní) transkriptáza

Aktivity:

- **Polymerázová:** v životním cyklu retrovirů se uplatňuje pouze při kopírování RNA, v laboratorii lze využít pro transkripci jednořetězcové RNA i jednořetězcové DNA. V obou případech je pro iniciaci syntézy nutná přítomnost primeru.
- 5' → 3' exoribonukleázová
- 3' → 5' exoribonukleázová a endoribonukleázová (RNáza H): zajišťuje degradaci RNA z hybridů RNA-DNA, které vznikají při zpětné transkripci.

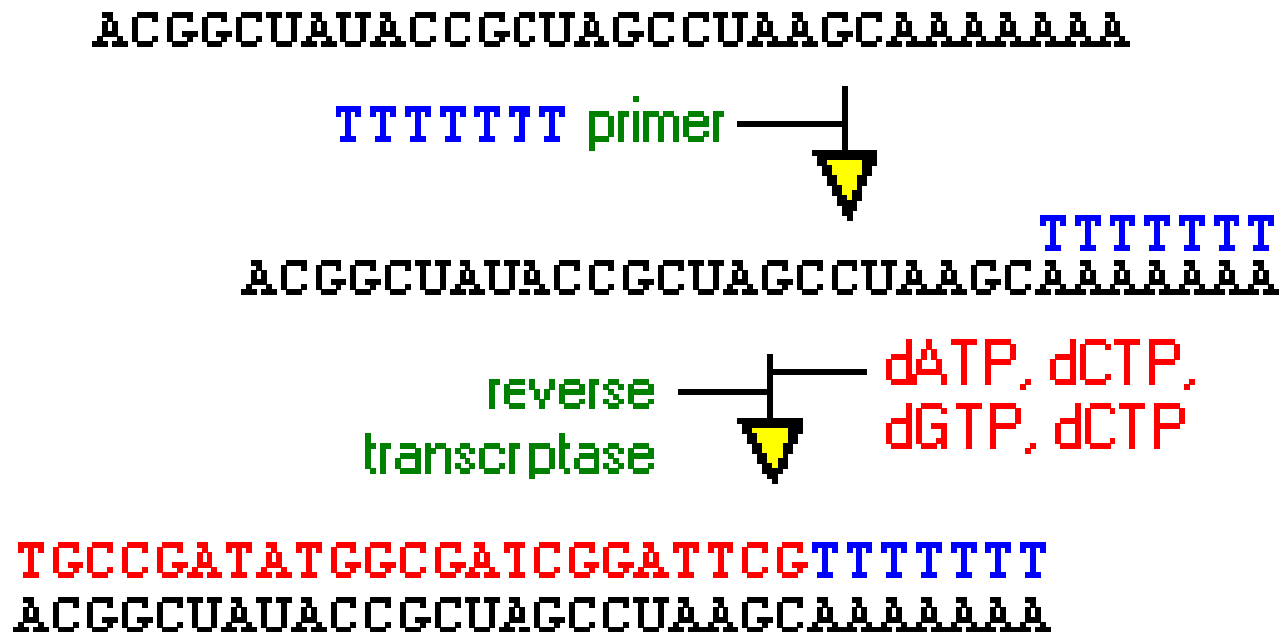
Využití:

tvorba komplementární DNA (cDNA)

- specifická (primer: oligo dT)
- nespecifická (primer: komplementární k 3' oblasti hledané mRNA)

Využití zpětné transkriptázy

Syntéza cDNA: inkubace mRNA s krátkým (12-18 bází) polymerem tymidinu (oligo dT), který se váže na polyA mRNA a zpětná transkriptáza jej využije jako primer pro iniciaci syntézy prvního řetězce.

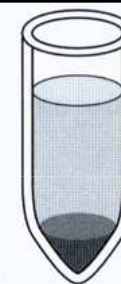


Syntéza cDNA



tkáň
(např. mozková)

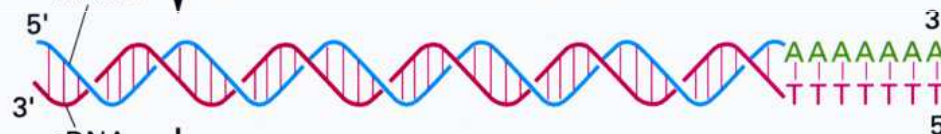
lýze buněk
a purifikace mRNA



hybridizace
s poly(T)-primerem



vytvoření kopie
pomocí reverzní transkriptázy

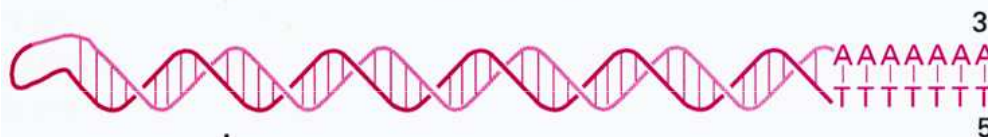


užití alkalického
roztoku pro odbourání RNA



3'-konec
cDNA tvoří
vlásečku

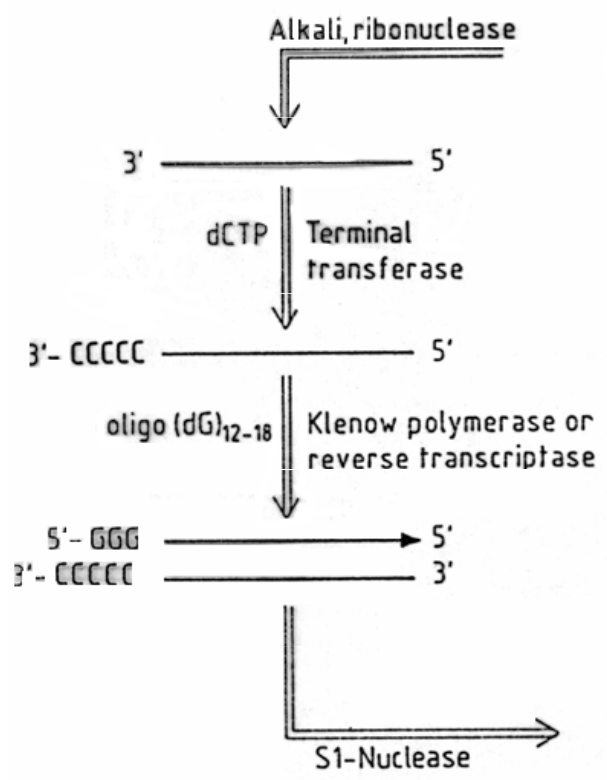
syntéza komplementárního DNA-řetězce
s použitím DNA-polymerázy; spárování
3'-konec funguje jako primer



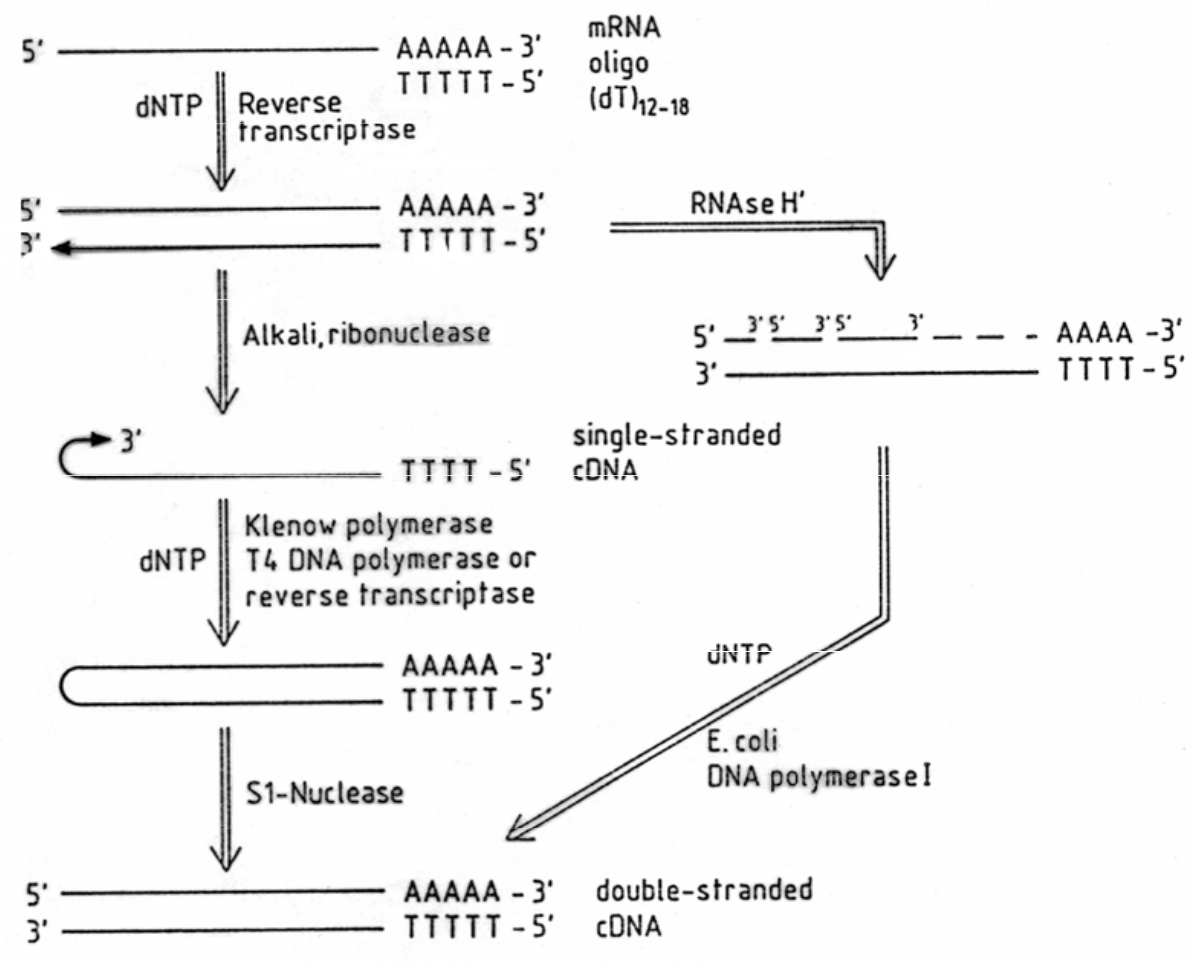
reakce s jednořetězcovou
DNA-nukleázou štěpí vlásečku



dvouřetězcová cDNA je kopií původní mRNA



A



B

C

Bakteriofágové RNA polymerázy

RNA polymeráza	Hostitel fága	Promotorová sekvence
T7 RNA polymeráza	<i>E. coli</i>	TAATACGACTCACT ATAGGG
T3 RNA polymeráza	<i>E. coli</i>	AATTAACCCTCACT AAAGGG
SP6 RNA polymeráza	<i>Salmonella typhimurium</i>	AATTTAGGTGACA CTATAGAA

Bakteriofágové DNA-dependentní RNA polymerázy

Obvyklé využití:

1. transkripce *in vitro* pro tvorbu definovaných RNA
 - značené ribonukleotidy se použijí k tvorbě značené RNA
 - značená RNA se využije jako sonda při hybridizaci
2. Příprava templátu pro translaci *in vitro*
3. Studium struktury a funkce RNA

Polymeráza syntetizující jednořetězce

Poly(A) polymeráza

- katalyzuje přidání cca 200 A na 3' konec mRNA při sestřihu eukaryotické RNA
- požadavky: přítomnost substrátu (ATP) a kofaktorů (ionty Mg a Mn) (není potřeba matrice)

Využití:

- Syntéza cDNA: prostřednictvím primerů oligo (dT) lze sekvenci mRNA zpětnou transkriptázou převést do cDNA

Enzymy modifikující DNA

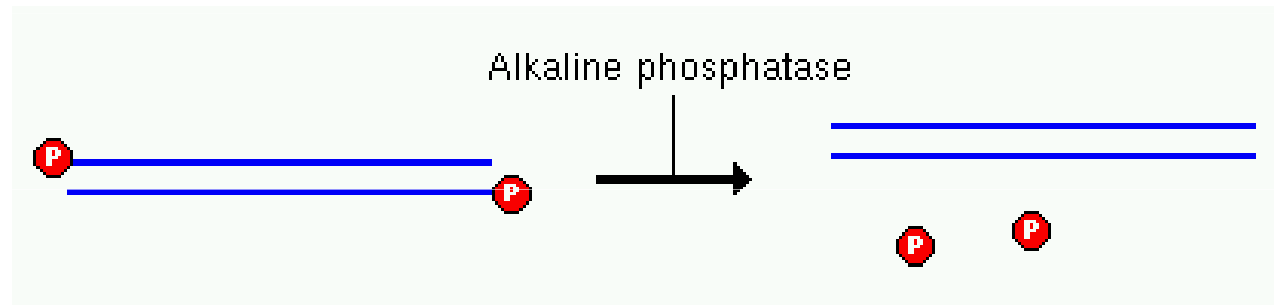
modifikují DNA přidáním nebo odebráním určitých chemických skupin

- fosfatáza
- kináza
- metyláza
- terminální deoxyribonukleotidyl transferáza

Alkalická fosfatáza

- odstraňuje fosfátové skupiny z 5' konců DNA (hydrolýza fosfomonoesterových vazeb) při alkalickém pH

(a) Alkalická fosfatáza



Alkalická fosfatáza

Zdroj:

- *E. coli* (**BAP**)
- hovězí střevo (**CIP**)

BAP je velmi aktivní enzym, je obtížné dosáhnout jeho včasné inaktivace

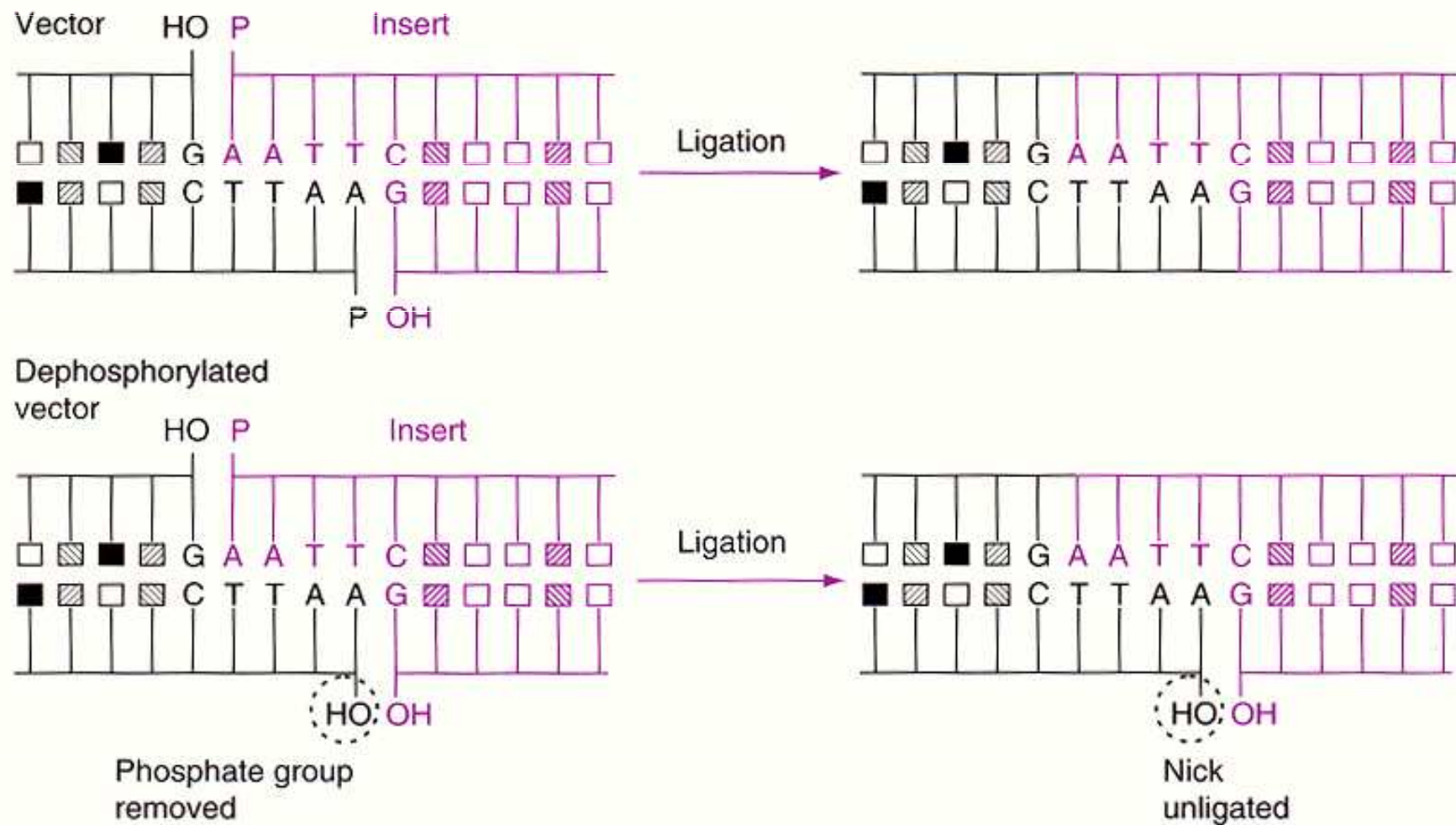
CIP se používá nejčastěji: je sice méně aktivní než BAP, ale lze ji účinně inaktivovat proteázovou hydrolýzou nebo zahřátím

Alkalická fosfatáza

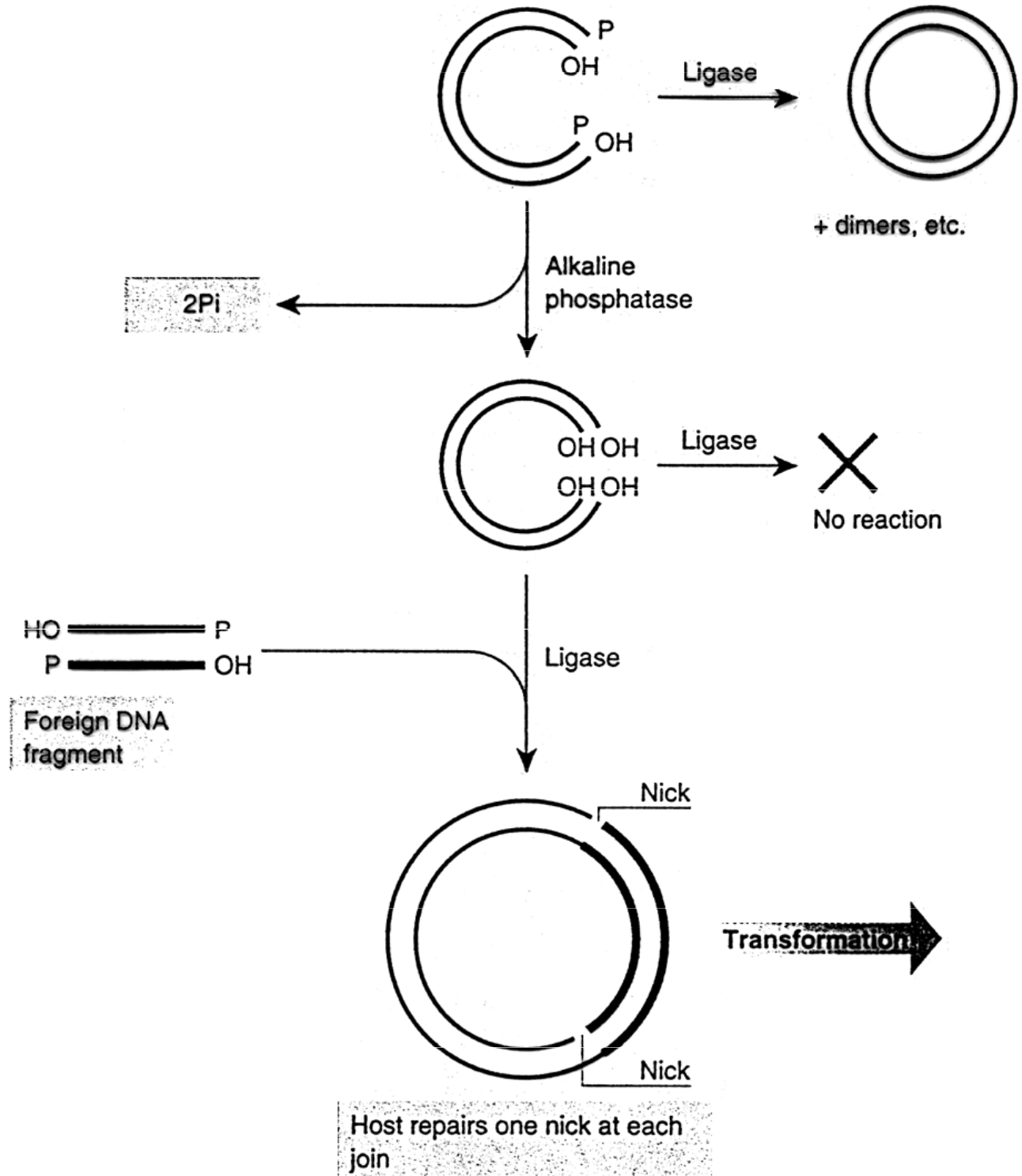
Využití:

- restrikční fragmenty DNA zbavené koncových fosfátů nemohou být spojeny ligací (zabránění recirkularizace prázdných vektorů, **usnadnění klonování**)
- **značení DNA ^{32}P** v kombinaci s kinázou: odstranění 5' fosfátů z fragmentů DNA před značením radioaktivním fosfátem
- **defosforylace proteinů**

Význam defosforylace DNA pro ligaci



Použití alkalické fosfatázy při klonování



Polynukleotidová kináza T4

Funkce:

- katalyzuje přenos P z γ ATP na 5' OH skupinu polynukleotidů (dvou- a jedno-řetězcová DNA a RNA) a nukleosid 3' monofosfátů (resyntéza fosfomonoesterových vazeb za spotřeby ATP)
- má i fosfátázovou aktivitu a proto může katalyzovat výměnu fosfátových skupin na 5' konci (využití pro značení fragmentů nukleových kyselin na 5' koncích pomocí ^{32}P).

Zdroj:

- bakterie *E. coli* infikované fágem T4, komerční preparáty jsou obvykle produkty bakteriální exprese klonovaného genu

(b) Polynukleotidová kináza

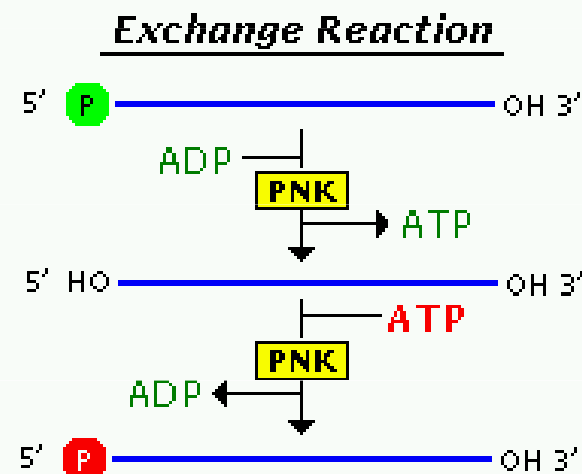
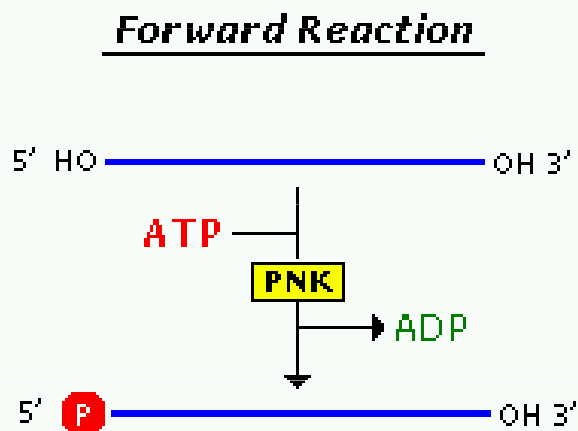


Polynukleotidová kináza T4

Enzymová aktivita se využívá ve dvou typech reakcí:

1. "**forward reaction**," - přenos fosfátu γ z ATP na 5' konec DNA nebo RNA. Cílový polynukleotid nemá 5' fosfát proto, že byl defosforylován nebo tak byl chemicky syntetizován.

2. "**exchange reaction**", cílová DNA nebo RNA, která nese 5' fosfát je inkubována v nadbytku ADP. Za těchto podmínek PNK nejprve přenáší fosfát z nukleové kyseliny na ADP za vzniku ATP a defosforylované cílové molekuly. Následně PNK běžnou reakcí „forward“ přenesse fosfát z ATP na cílovou NK.



Polynukleotidová kináza T4

Využití:

- značení 5' konců DNA nebo RNA ^{32}P pro přípravu hybridizačních sond a sekvenování DNA
- přidání 5' P k oligonukleotidům (např. linkerům a adaptérům) a fragmentům DNA pro umožnění jejich ligace nebo amplifikace PCR)
- odstranění 3' fosforylových skupin

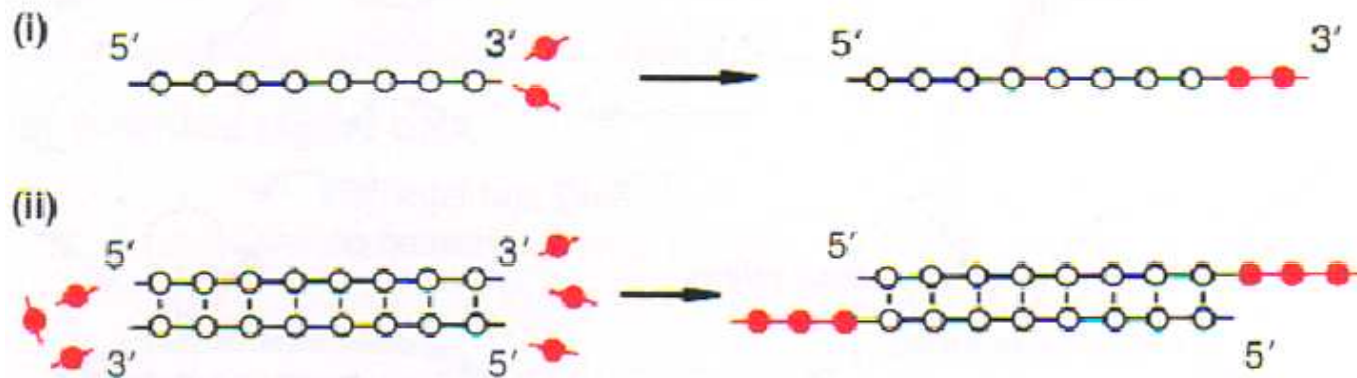
Terminální deoxynukleotidyl transferáza

- připojuje deoxynukleotidy k 3' koncům polynukleotidů v jednovláknových nebo dvouvláknových molekulách

Substrát:

- přečnívající, zkrácené i tupé konce **dvouřetězcové molekuly DNA** (preferované jsou přečnívající 3' konce) nebo **jednořetězcová DNA**
- nevyžaduje matrici ani primer

(c) Terminální deoxynukleotidyl transferáza



Terminální deoxynukleotidyl transferáza

Kofaktor: kobalt

Zdroj: telecí brzlík (jedná se o savčí enzym exprimovaný v lymfocytech, komerčně dostupné varianty jsou produktem exprese hovězího genu v *E. coli*)

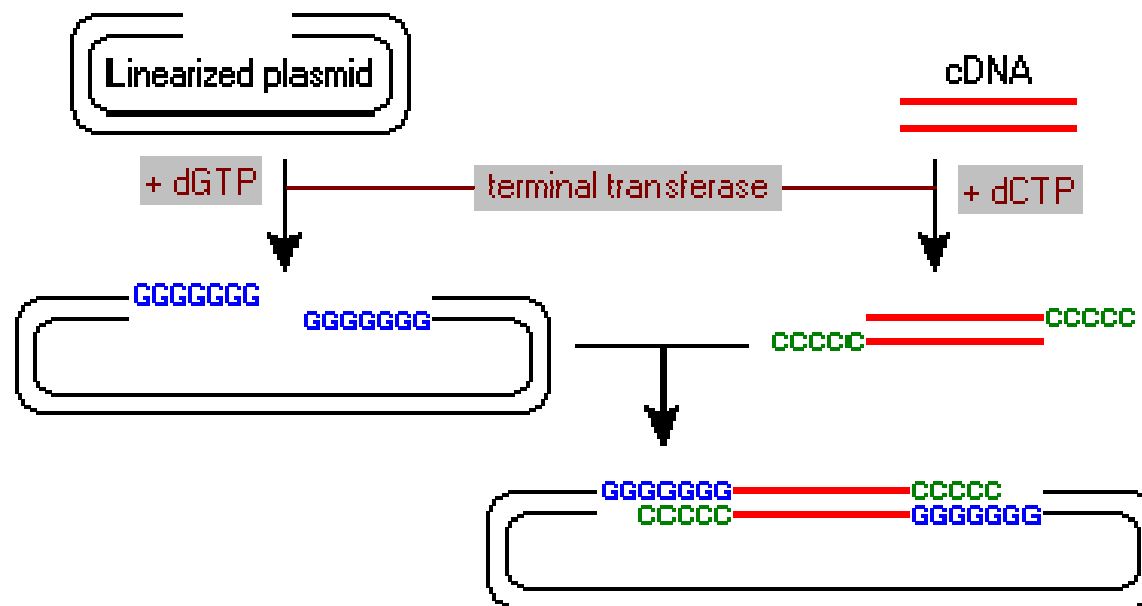
Využití:

- přidání homopolymerních konců k 3' koncům DNA
- značení 3' konců DNA

Přidání homopolymerních konců terminální transferázou

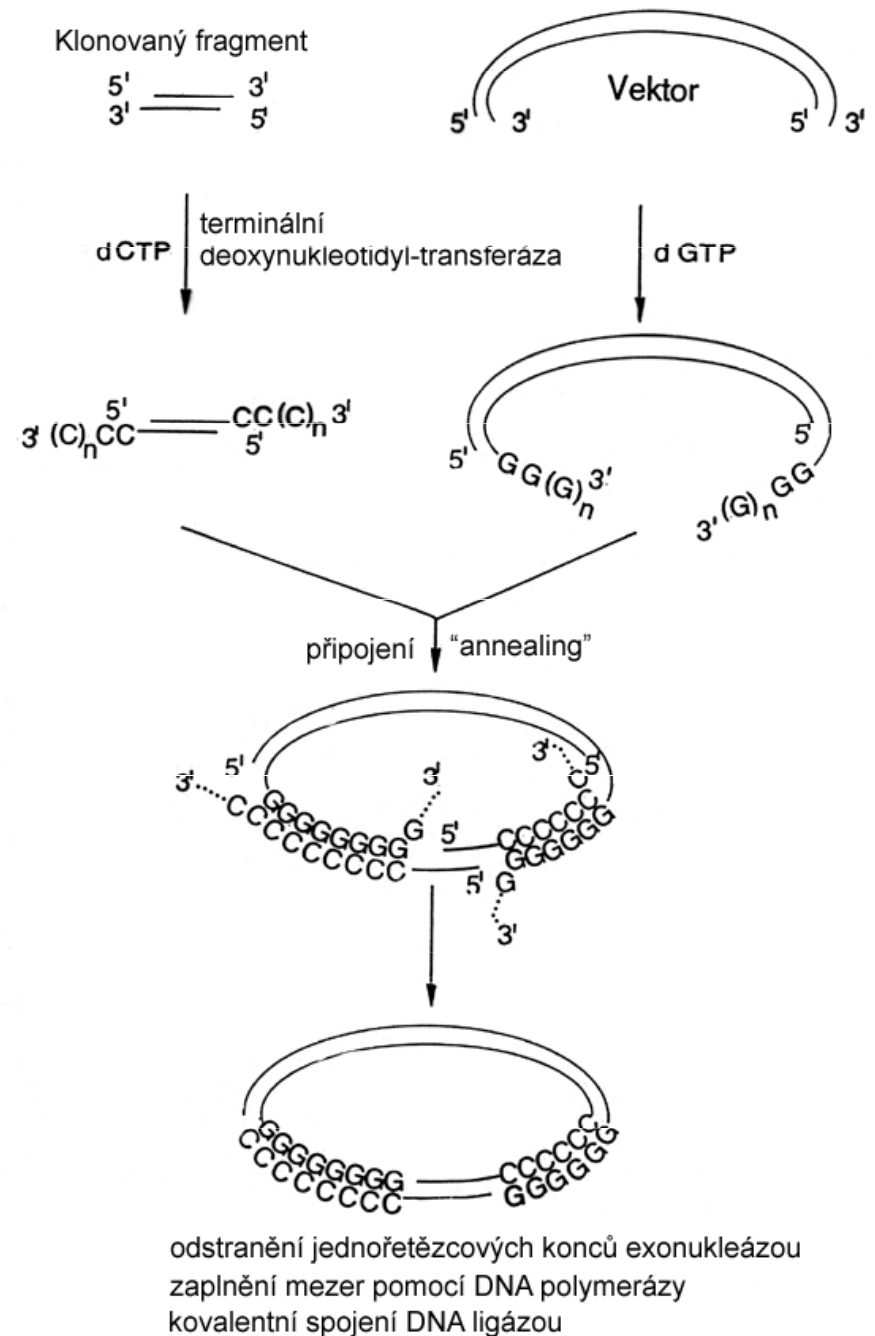
Využití: **klonování cDNA** do plazmidových vektorů.

Princip: terminální transferáza se využije k přidání úseku GGG... k linearizovanému plazmidovému vektoru a k přidání úseku CCC... k cDNA. Po smísení a inkubaci obou molekul dojde k vazbě komplementárních úseků a tím k včlenění cDNA do vektoru, který se pak použije k transformaci *E. coli*.

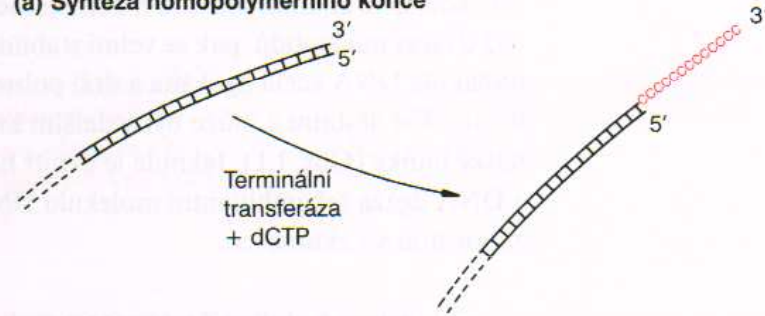


Výhody terminální transferázy

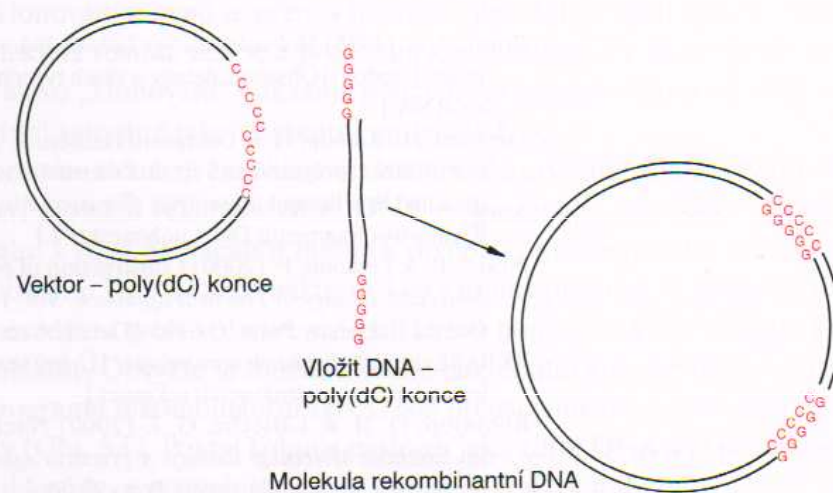
- velikost připojených úseků nemusí být stejná (pokud se jedná o úseky větší než 20 nukleotidů, jejich párování je dostatečně silné, aby zajistilo stabilitu duplexu v pokojové teplotě)
- v transformovaných buňkách se nespárované oblasti opraví reparačními mechanismy



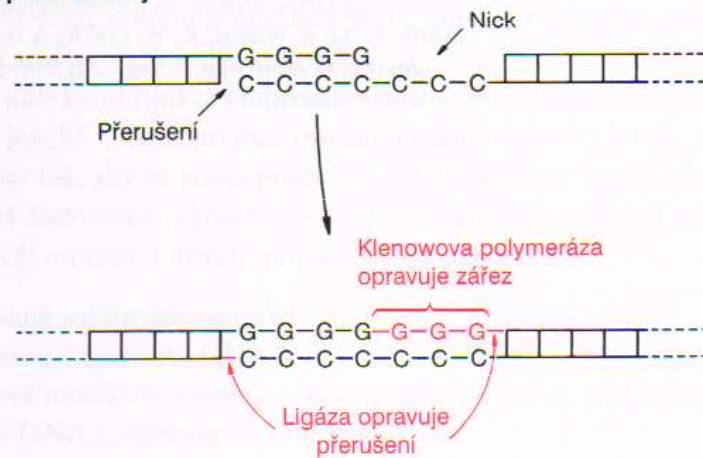
(a) Syntéza homopolymerního konce



(b) Ligace homopolymerních konců



(c) Opravné kroky



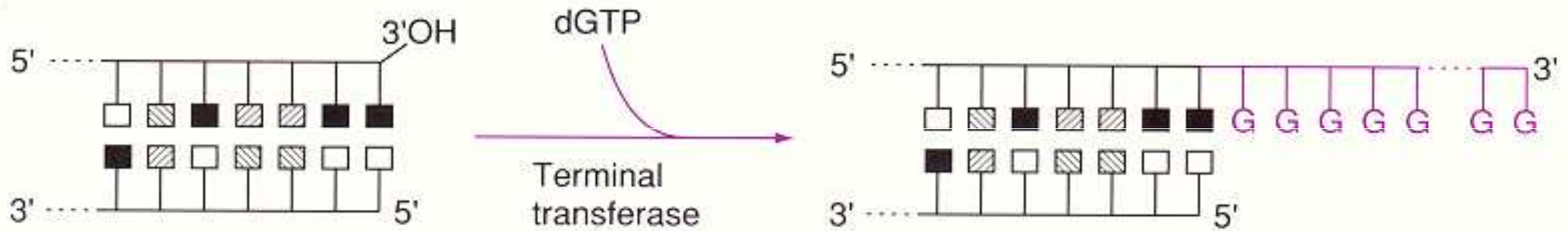
Značení 3' konců terminální transferázou

Substrát: - obvykle fragment DNA s 3' přečnivajícím koncem, vzniklý restričním štěpením
- oligodeoxynukleotid

Princip: DNA je inkubována se značenými nukleotidy, terminální transferáza začlení skupinu nukleotidů k 3' přečnivajícímu konci nebo k 3' konci oligonukleotidu

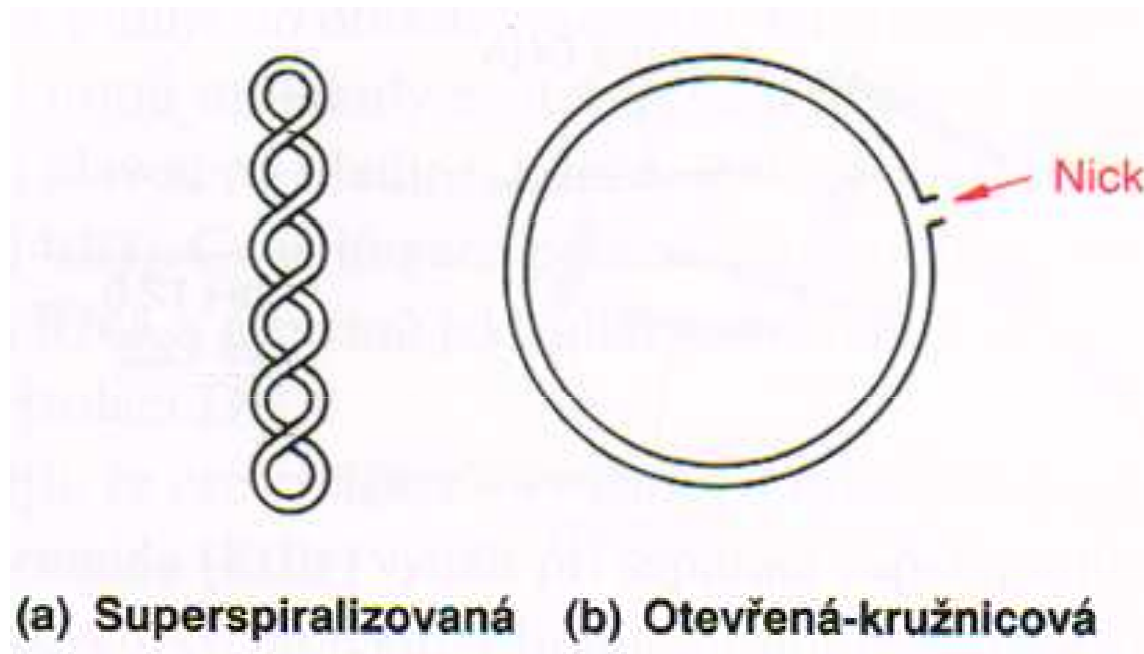


Terminální transferáza upravuje i nepřechánvající 3' konce dvouřetězcové DNA



Topoizomerázy

- mění konformaci kovalentně uzavřené kružnicové DNA vnesením nebo odstraněním nadšroubovicového vinutí
- uplatňují se při studiu replikace DNA



Proteinázy

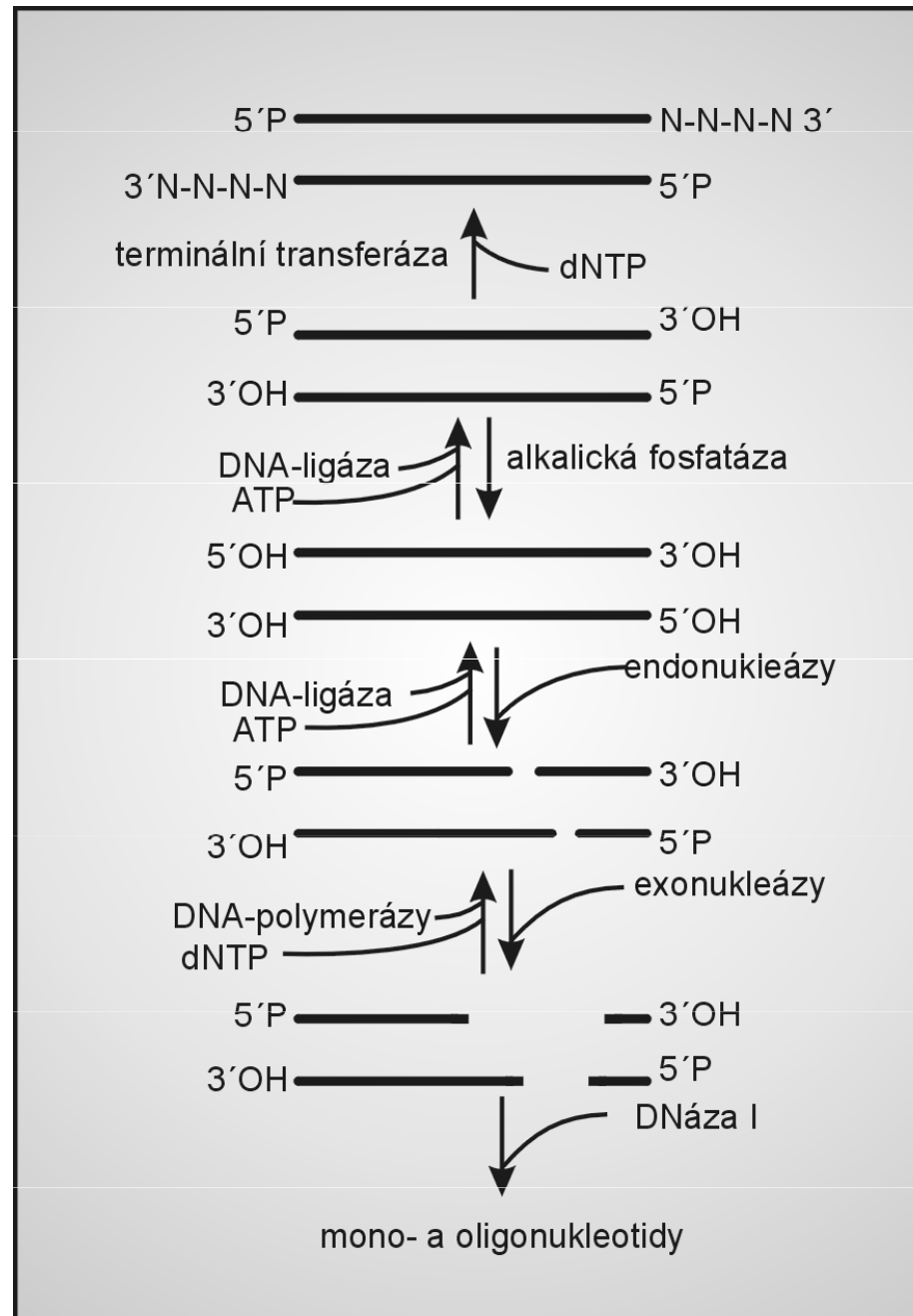
Pronáza

- enzym používaný k rozkladu proteinů při purifikaci nukleových kyselin, k odstranění nukleázových aktivit při izolaci DNA

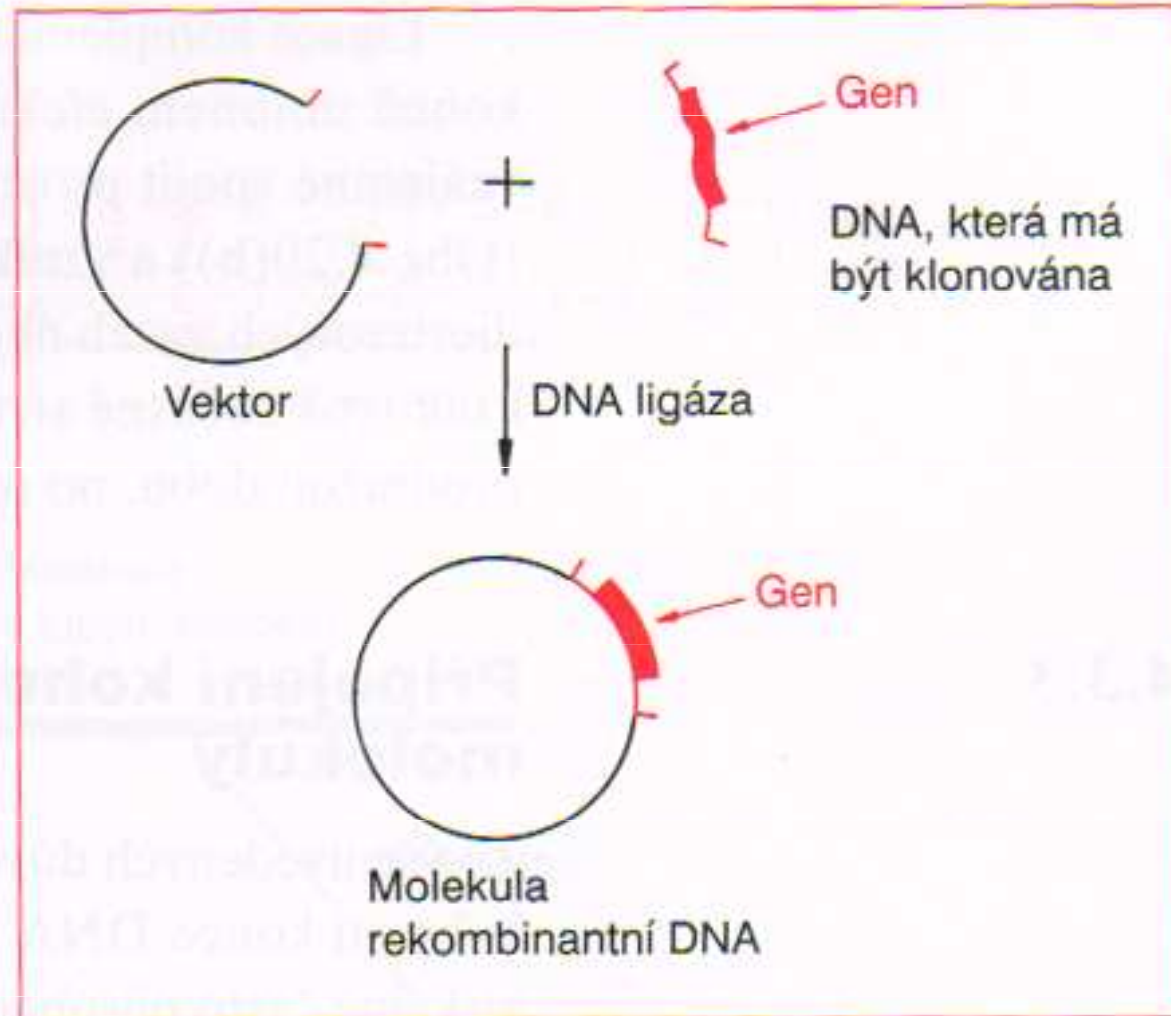
Lysozym (muramidáza)

- enzym používaný pro lýzu buněk

Přehled enzymů používaných při manipulaci s DNA



Klonování DNA



Metody spojování molekul DNA

A. s lepivými konci:

za vhodných podmínek dochází k párování komplementárních úseků, kovalentní spojení zajistí DNA ligáza

B. s tupými konci:

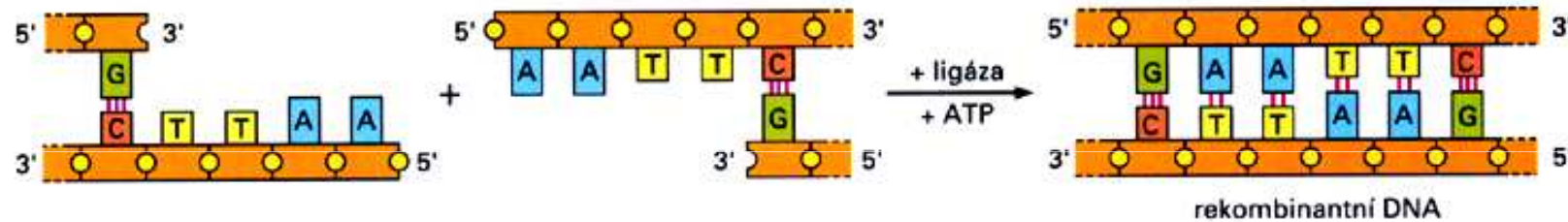
- vysokými koncentracemi T4 DNA ligázy
- přeměnou tupých konců na lepivé prostřednictvím tzv. linkerů, dále viz A

C. s přečnávajícími konci, které nejsou kompatibilní:

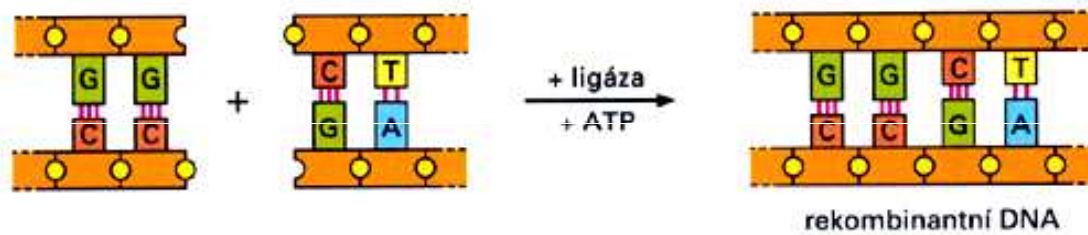
- terminální transferázou přidat k 3' koncům jednoho fragmentu homopolymerní extenze (např. poly-dA) a k 3' koncům druhého fragmentu komplementární homopolymerní extenze (poly-dT)
- „zatupení“ konců (polymerace, degradace)

Vytváření rekombinantních molekul DNA *in vitro*

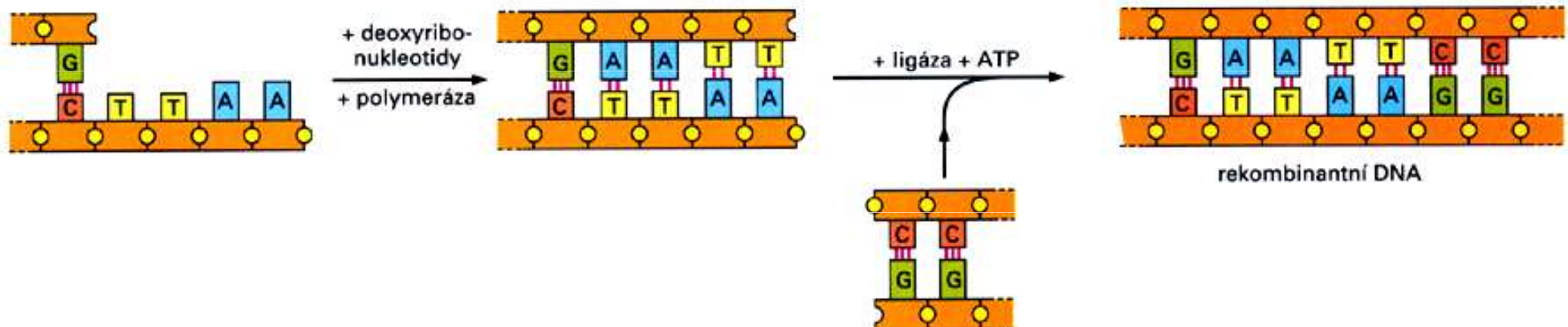
(A) SPOJENÍ DVOU KOMPLEMENTÁRNÍCH NEROVNÝCH KONCŮ



(B) SPOJENÍ DVOU TUPÝCH KONCŮ



(C) SPOJENÍ TUPÉHO KONCE S NEROVNÝM KONCEM



Kohezní konce zvyšují účinnost ligace

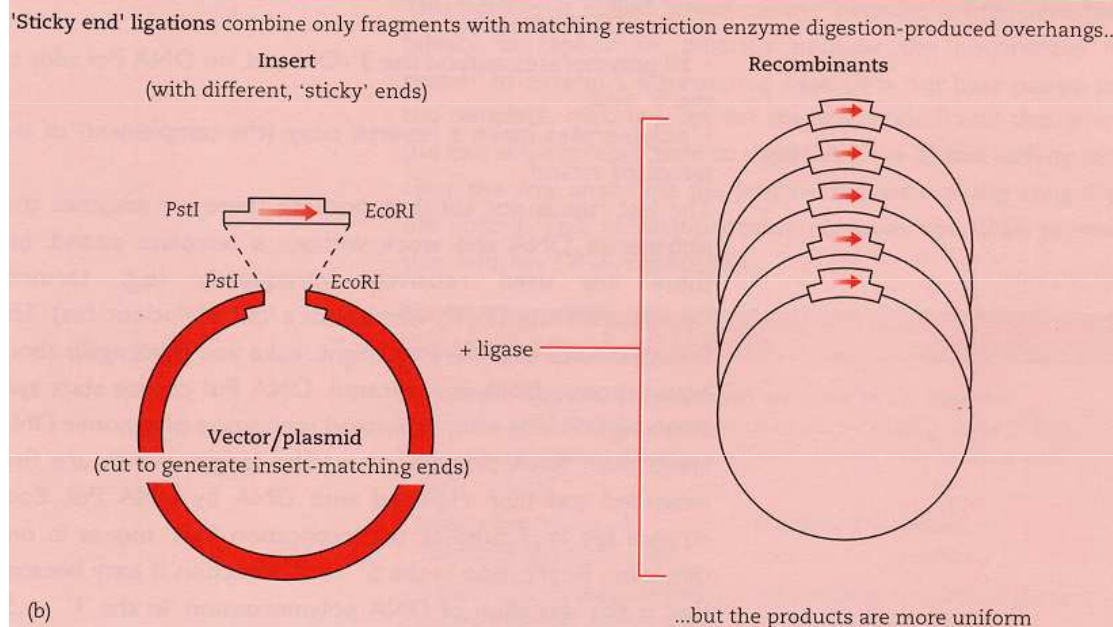
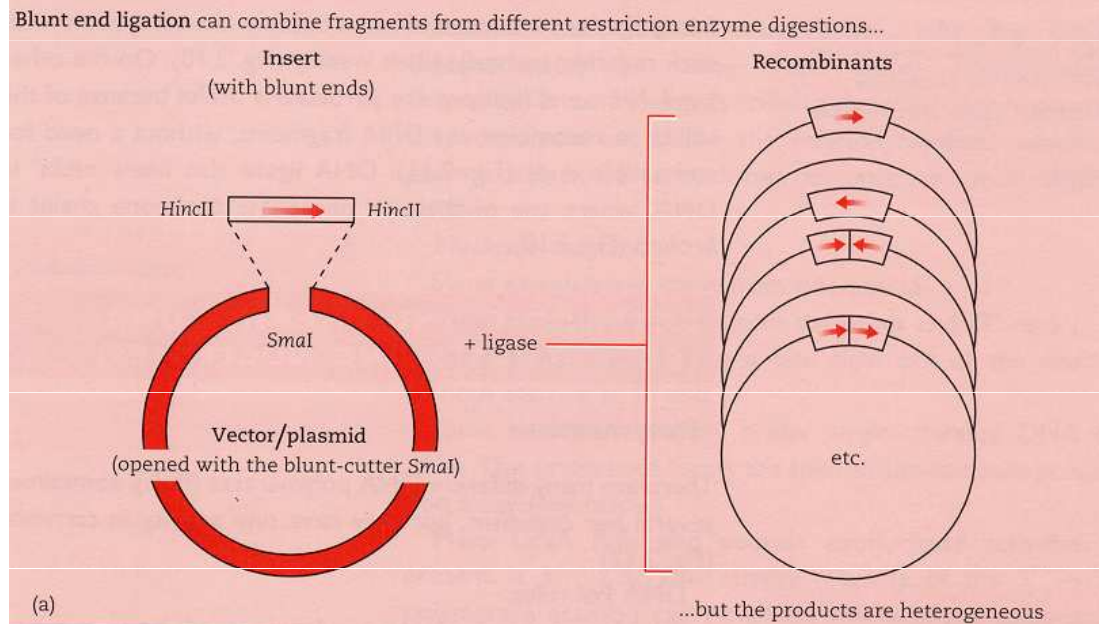
tupé konce

- ligace není efektivní
- setkání konců DNA pro ligační reakci je náhodné
- vhodné zvýšení koncentrace DNA

kohezní konce

- probíhá s vyšší účinností
- využití tvorby vodíkových vazeb komplementárních bází
- prodloužení doby, kdy jsou konce v kontaktu

Ligace tupých konců nezaručuje jednotnou orientaci klonovaného fragmentu DNA



Úpravy konců fragmentů DNA

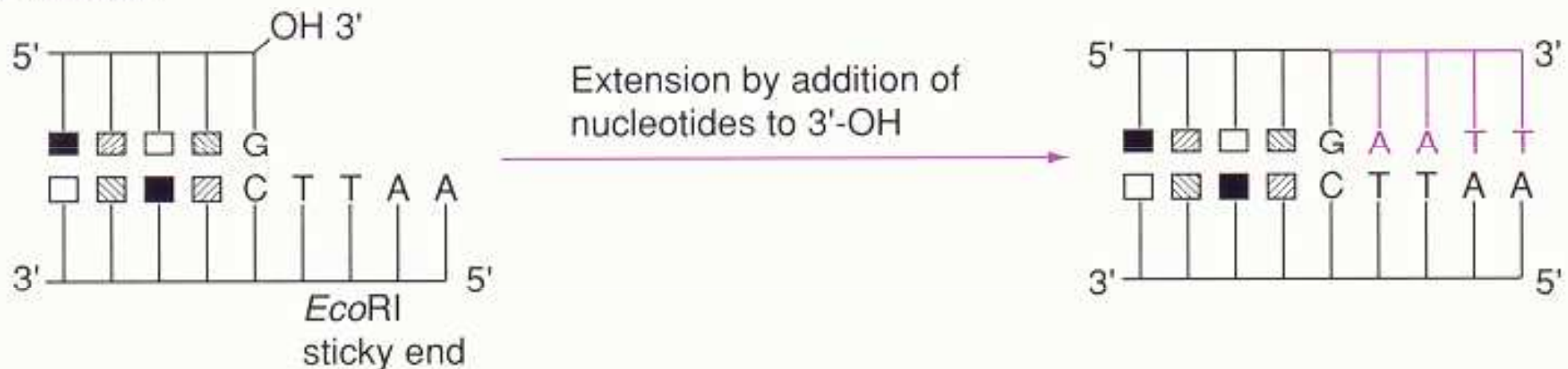
Přeměna lepivých konců na tupé:

- doplněním chybějících nukleotidů polymerací („filling in“)
- odstraněním přečnávající sekvence („trimming back“)

Doplnění 3' zkrácených konců polymerací

- umožněny přítomností 3' OH skupiny, která se uplatní jako primer (nutná podmínka pro funkci DNA polymerázy)
- chybějící sekvence je doplněna polymerací

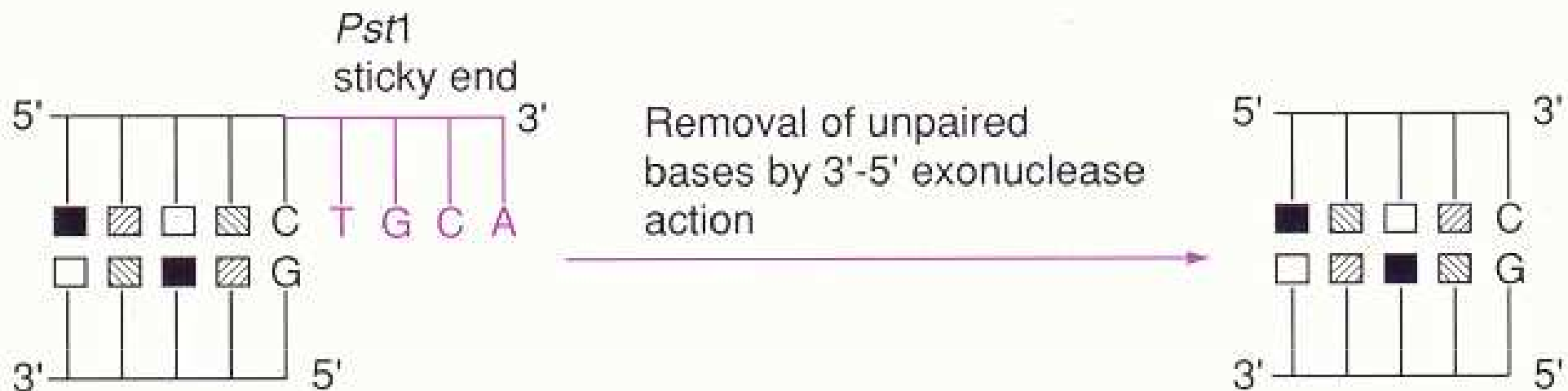
a) Filling in



Úpravy 3' přečnívajících konců DNA

- doplnění polymerací není možné
- k zatupení je třeba použít enzym, který disponuje 3' → 5' exonukleázovou aktivitou (např. Klenow, T4 DNA polymerázu)

b) Trimming back



Linkery

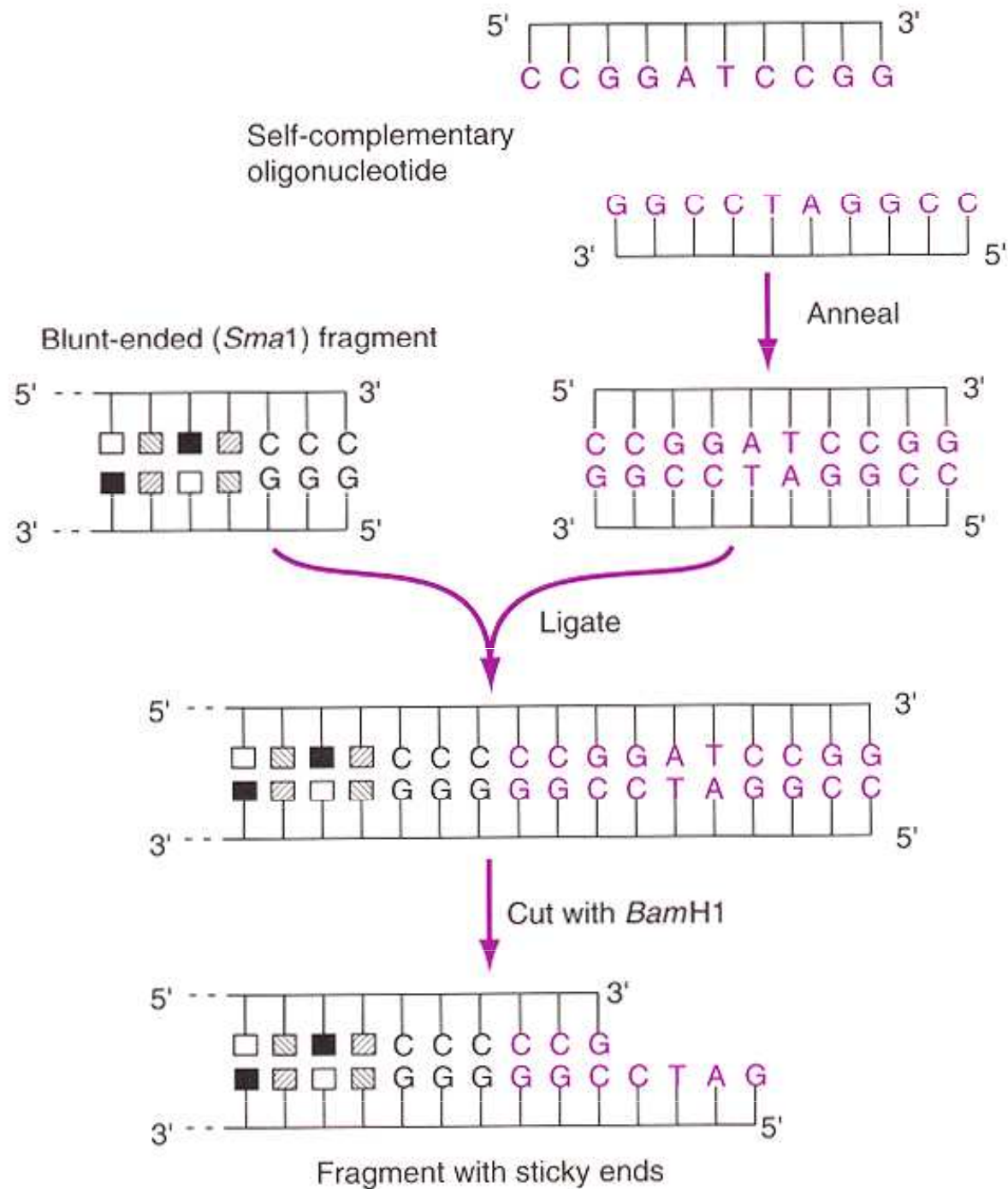
- krátké synteticky připravené oligonukleotidy (např. **CCGGATCCGG**)
- nesou cílovou sekvenci pro RE (např. *Bam*HI - **GGATCC**)
- v případě, že jsou autokomplementární, postačuje jen jeden řetězec
- mají tupé konce

Použití:

1. linker se připojí k tupým koncům DNA ligací
2. štěpením RE se vytvoří jednovláknové lepivé konce DNA
3. spojení původně nekompatibilních molekul DNA ligací

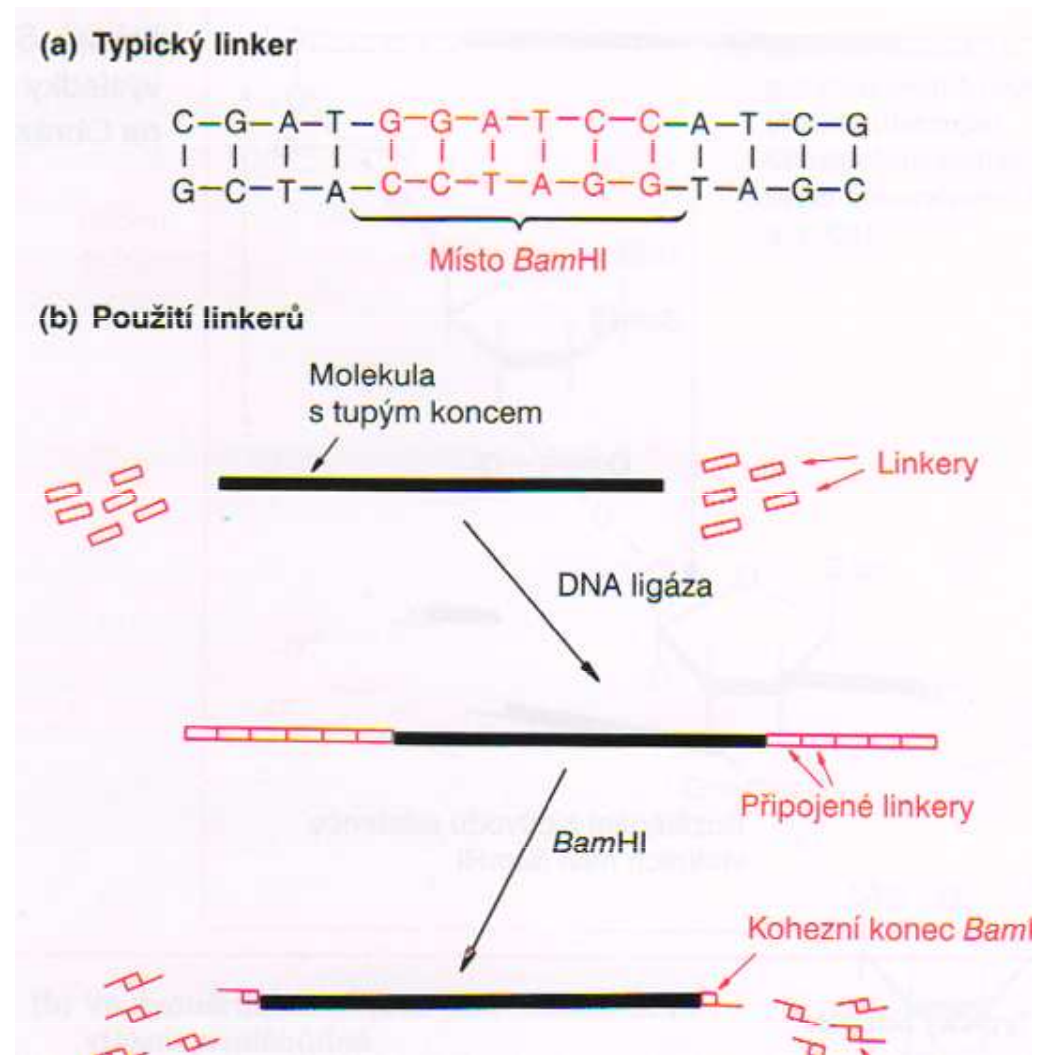
Význam:

- umožňují opatřit jakoukoliv DNA žádoucími konci



Použití linkerů

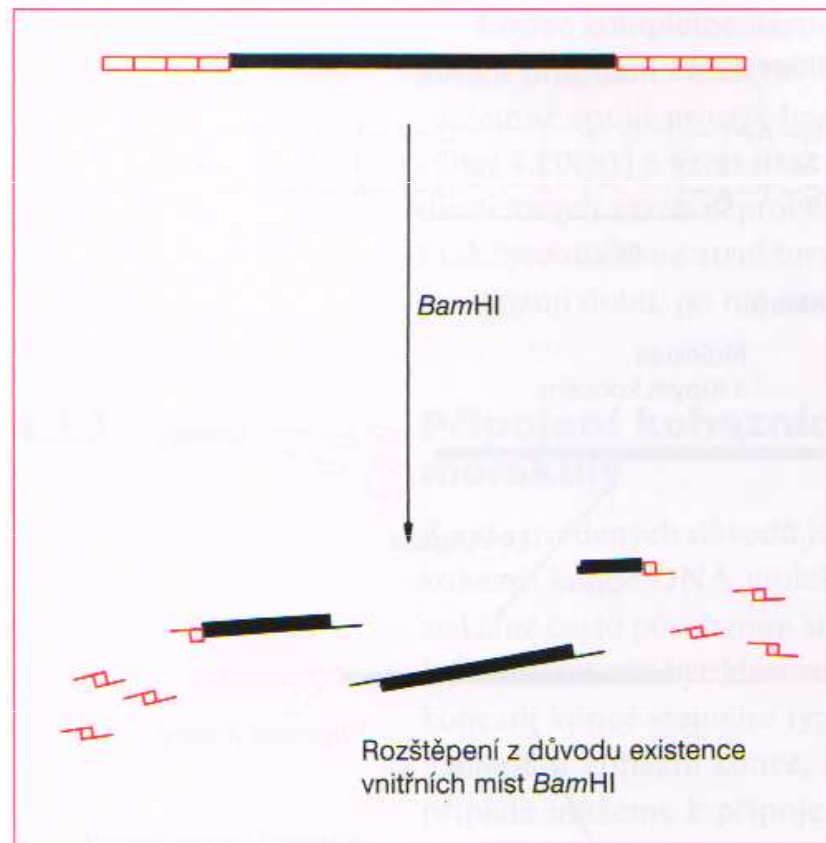
- pro usnadnění vazby linkerů a ligace „na tupo“ používají se vysoké koncentrace linkerů
- může dojít k vazbě většího počtu linkerů za sebou
- odstraní se následným štěpením



Použití linkerů

Nevýhoda:

restrikční místo linkeru nesmí být přítomno uvnitř klonované sekvence



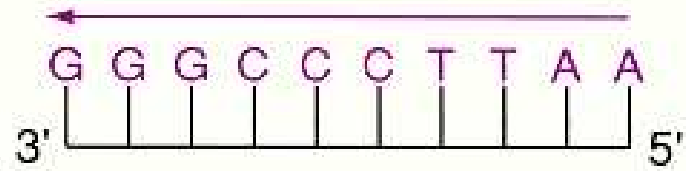
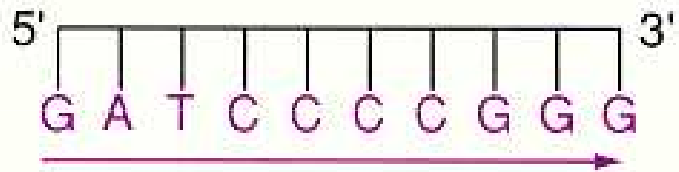
Adaptéry

- dvojice krátkých synteticky připravených oligonukleotidů, které se spolu částečně párují a přitom vytvoří krátký fragment dvouřetězcové DNA zakončený jedním tupým a jedním přečnávajícím koncem nebo dvěma přečnávajícími konci
- ostrý konec je získán bez restričního štěpení

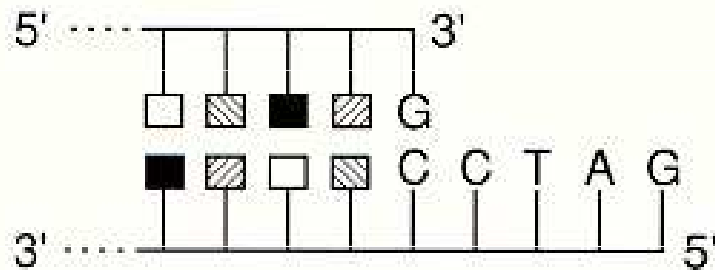
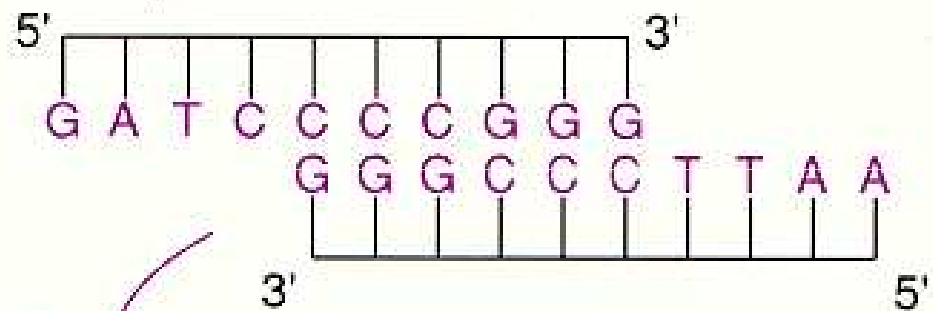
Použití:

1. přeměna tupých konců na ostré
2. přeměna jedné přečnávající sekvence na jinou
3. ostré konce jsou získány bez štěpení RE

Two synthetic, partly complementary, oligonucleotides

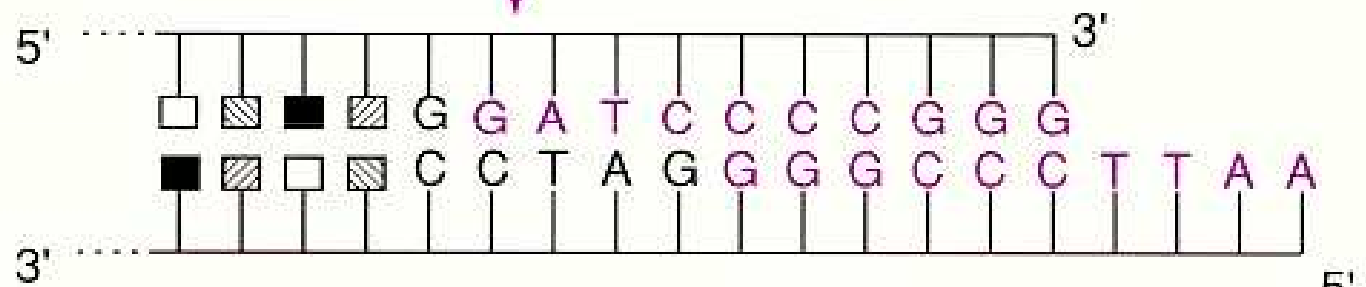


Anneal



Fragment with *Bam*H1 sticky ends

Ligate



Fragment with *Eco*R1 compatible ends

Adaptéry - problém

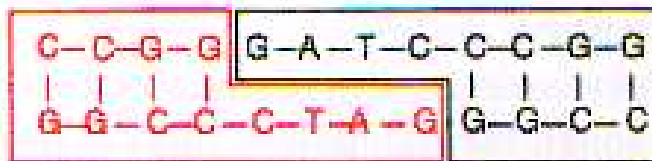
- Pokud se jedná o adaptéry s jedním ostrým a jedním tupým koncem: kohezní konce jednotlivých adaptérů se mohou párovat bázemi, čímž vznikají dimery - a nová molekula DNA má znovu konce tupé

(c) Nová molekula má stále tupé konce

(a) Typický adaptér



(b) Adaptéry se mohou vzájemně ligovat



Molekula zaměřená tupými konci



DNA ligáza



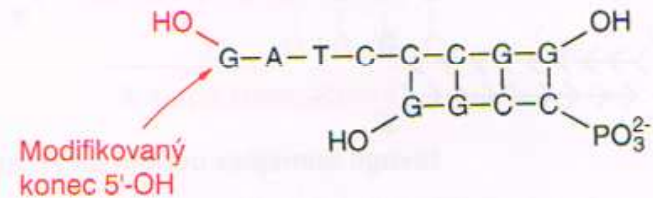
Adaptéry se vzájemně ligují

Adaptéry - problém

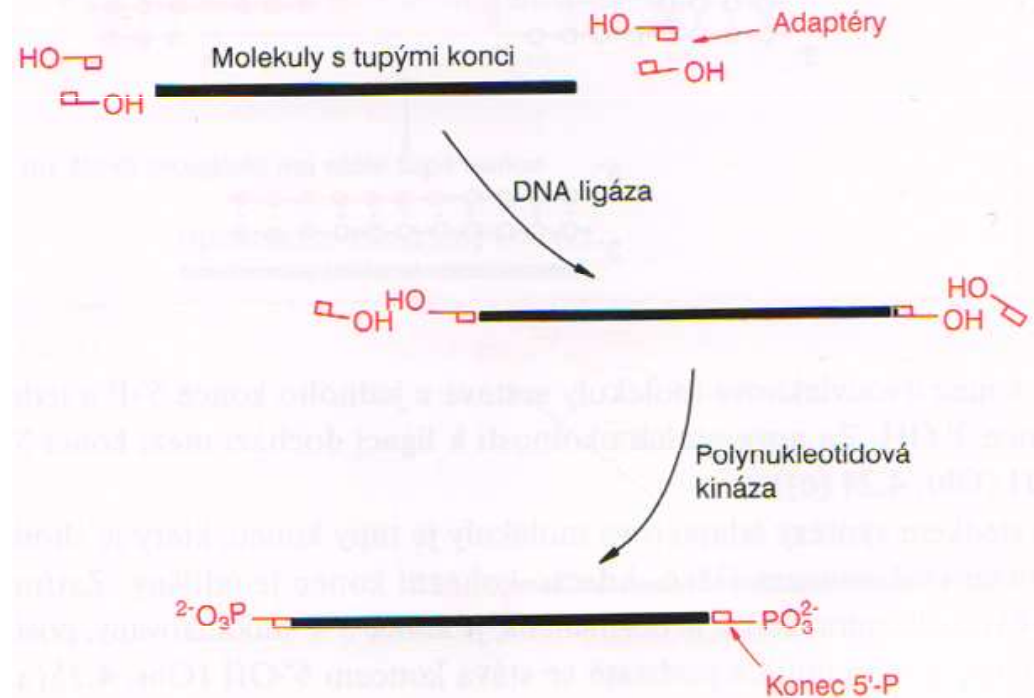
Řešení:

modifikace adaptérů -
OH skupina na 5' konci
ostrého konce místo
Fosfátu znemožňuje
vzájemnou ligaci adaptérů

(a) Přesná struktura adaptéru



(b) Ligace použitím adaptérů

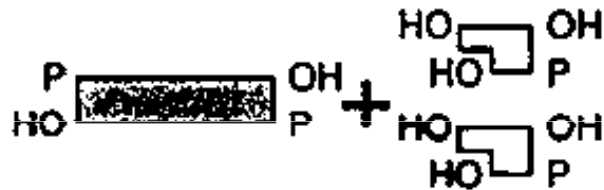


Použití adaptérů

5'-HO-GATCCCCGGG-OH

3'- HO-GGGCCC-P

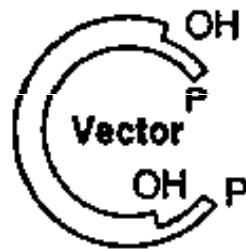
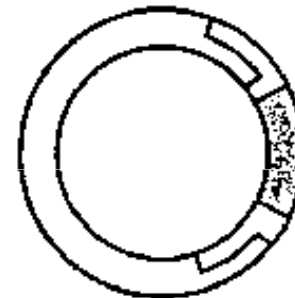
Adaptor molecule



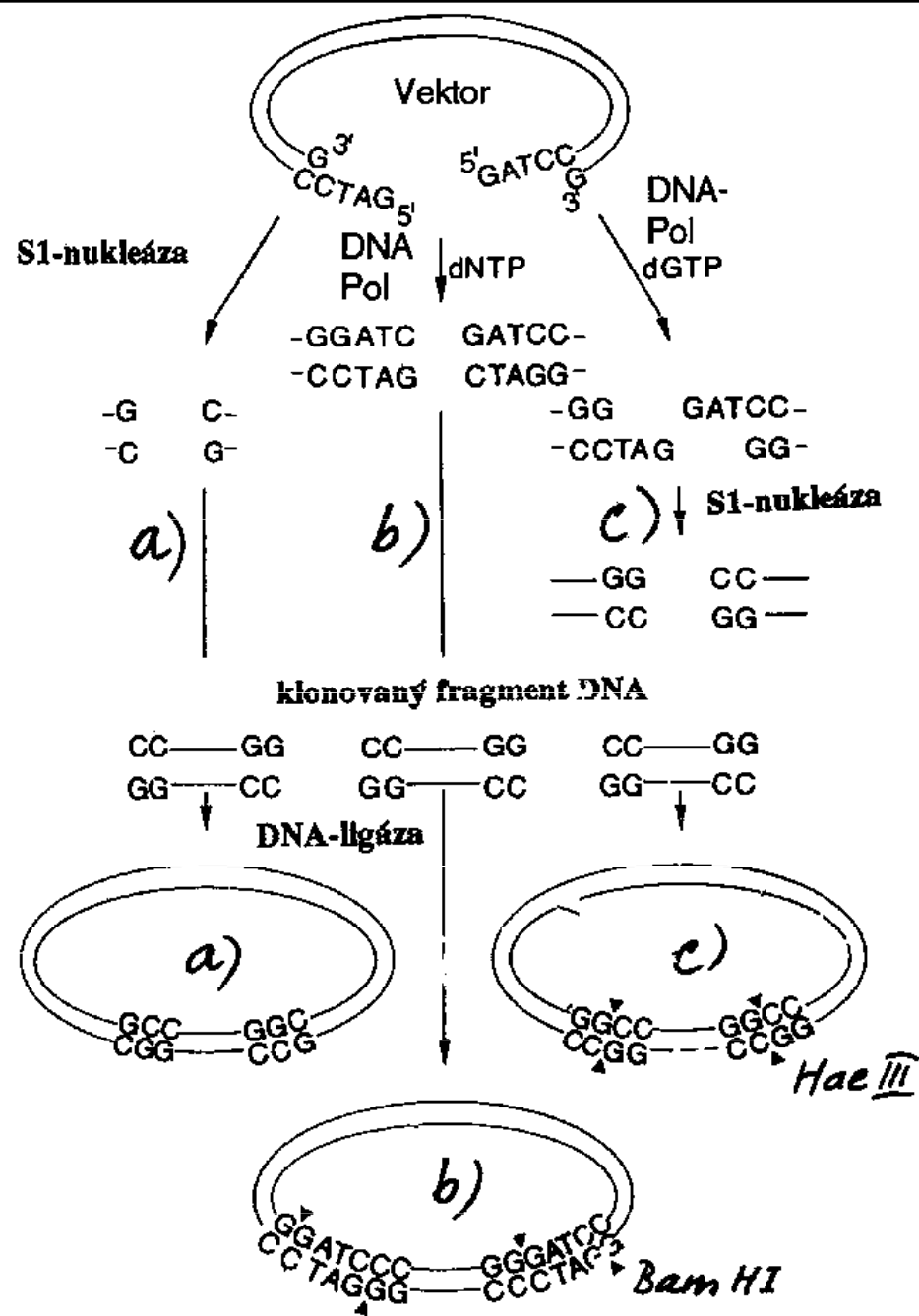
T4 DNA
ligase,
ATP



Polynucleotide
kinase, ATP



Přestavba restriční místa *Bam*HI



Jednořetězcové přesahující konce lze:
 a) odstranit (hydrolyzovat),
 b) zaplnit
 c) nebo částečně doplnit.

Aliž dojde ke změně struktury klonovaného fragmentu, je restriční místo pro *Bam*HI buď
 a) odstraněno
 b) regenerováno
 c) nebo změněno

Způsoby modifikace konců DNA

