

Molekulární biologie

(přednáška JS 2019, 3 hod)

prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.

Molekulární biologie - předmět studia

- Vědní obor zabývající se studiem vztahu struktury a interakcí biomolekul, zvláště **informačních biomakromolekul**, k funkcím a vlastnostem živých soustav.
- **Cílem molekulární biologie je vysvětlit funkce a vlastnosti živých soustav strukturou a interakcemi jejich molekul (makromolekul).**
- Tento vztah vysvětluje z komplexního hlediska integrujícího fyzikální, chemické a biologické přístupy.

Studium procesů, které probíhají v živých soustavách na molekulární úrovni a jimiž se realizuje genetická informace

Definice pojmu „Molecular Biology“

- is the study of the structure and function of biological molecules.
- study of the molecular basis of life including the biochemistry of molecules such as DNA, RNA and proteins and the molecular structure and function of the various parts of living cells
- a branch of biological science that studies the biology of a cell at the molecular level. Molecular biological studies are directed at studying the structure and function of biological macromolecules and the relationship of their functioning to the structure of a cell and its internal components ...
- the science of studying the genetic composition and mechanism of living organisms at the molecular level. The molecular studies of all other organic molecules like proteins, fats, and carbohydrates is called biochemistry.
- the study of molecules that are found in cells.
- field of biology that concerns itself with understanding the interactions among the molecules of life.
- a general term referring to study of the structure and function of proteins and nucleic acids in biological systems.

Biochemie se zabývá chemickými pochody v živých organismech. Předmětem studia biochemie je struktura a funkce základních stavebních kamenů živé hmoty jako jsou například cukry, tuky, bílkoviny, nukleové kyseliny a další biomolekuly.

Vznik a vývoj molekulární biologie umožnily tři základní objevy

1. Poznání struktury a funkce nukleových kyselin
(DNA a RNA)
2. Rozluštění genetického kódu
3. Poznání procesů, jimiž se realizuje genetická
informace
(transkripce, translace, regulace genové exprese)

Specifické rysy historie vzniku molekulární biologie

1. Zaměření molekulární biologie na řešení **genetických problémů**
2. Návaznost molekulární biologie na biofyziku, fyzikální chemii, biochemii, mikrobiologii a genetiku
3. Vznik molekulární biologie v podobě **molekulární genetiky** syntézou **funkcionalistické a strukturalistické koncepce** ve výzkumu proteinů a nukleových kyselin

Vznik molekulární biologie v podobě molekulární genetiky syntézou funkcionalistické a strukturalistické koncepce ve výzkumu proteinů a nukleových kyselin

**Strukturalisté
(fyzici, chemici)**

- zaměření na objasnění struktury biomakromolekul (proteinů, NK)
(nezajímali se o funkci biomakromolekul ani o genetické problémy)

W. T. Astbury

J.D. Bernal

L. Pauling

E. Chargaff

M.H.F. Wilkings

F.H.C. Crick

**Funkcionalisté
(biochemici, mikrobiologové, genetici)**

- zaměření na vysvětlení, které biomakromolekuly jsou nositeli genetické informace a jaké funkce plní
(objektem studia byly bakterie a bakteriofágy)

M. Delbrück, E. Schrödinger,

G.W. Beadle, E.L. Tatum

O.T. Avery, C.M. MacLeod, M. McCarty, J. Lederberg,

A.D. Hershey,

J.D. Watson

Rosypal S.: K historii pojetí molekulární biologie. DVT, 18: 193-209, 1985.

Důležité etapy ve vývoji molekulární biologie

- **1944 - transformace bakterií pomocí purifikované DNA**
- **1953 - model struktury DNA (J. Watson, F. Crick, M. Wilkins)**
- 1956 - genetická informace v DNA je zapsána pořadím bází
- 1958 - při replikaci se oddělují komplementární vlákna DNA
- 1958 - izolace DNA-polymerázy I a syntéza DNA *in vitro*
- **1958 - vyhlášení ústředního dogmatu molekulární biologie**
- **1960 - objev mRNA a důkaz její funkce**
- 1961 - mRNA použita k rozluštění genetického kódu
- **1961 - experimentální důkaz ústředního dogmatu MB**
- 1961 – postulování operonové teorie – regulace genové exprese
- **1966 - kompletní vyřešení genetického kódu**
- 1970 - izolace prvního restričního enzymu
- 1970 - objev reverzní transkriptázy u retrovirů
- **1972 - příprava prvních rekombinantních molekul DNA *in vitro***
- 1973 - začátek klonování genů - základ GI

Důležité etapy ve vývoji molekulární biologie

- 1975 - Asilomarská konference-moratorium na práce s rekombinantní DNA
- 1977 - první rekombinované molekuly nesoucí savčí geny
- 1977 - objev složených genů – exony/introny - sestřih pre-mRNA
- 1977 - zavedení metod sekvenování DNA
- **1981 - objev katalytické aktivity RNA - ribozymy**
- 1982 - komerční výroba lidského inzulinu v bakteriích
- 1983 - stanovení sekvence DNA bakteriofága λ - zahájení **projektů sekvenování genomů modelových organismů**
- **1983 – zavedení metody PCR (polymerázová řetězová reakce)**
- **Genomická a postgenomická éra**
- **2003 Stanovení kompletní sekvence lidského genomu**
- **2000 (2012) zavedení metod pro editaci genomů**

Současná etapa molekulární biologie

● Oblast výzkumu

- analýza genomu (genomika) a proteomu (proteomika) - **postgenomická etapa**
- transkriptomika, metabolomika, infektomika, sekretomika "...omics"
- studium regulace genové exprese a procesů diferenciací buněk (buněčný cyklus, signální dráhy, poruchy regulace, výzkum kmenových buněk)
- neurobiologie
- **Využití metodologie mol.biologie v řadě oborů: molekulární mikrobiologie, virologie, imunologie, fyziologie, antropologie, evoluce ...**

● Praktické aplikace

- genové inženýrství - moderní biotechnologie, příprava transgenních a geneticky modifikovaných organismů a nových látek cílenou změnou genů
- editace genomů - cílené změny v genomech *in vivo*, *CRISPR/Cas*
- molekulární diagnostika infekčních, dědičných a nádorových chorob, nové způsoby jejich léčby
- farmakogenomika - léky „šité na míru“
- genové terapie = léčba genetických onemocnění

Sylabus přednášky z Molekulární biologie (JS 2019)

1. Úvodní přednáška. Předmět studia molekulární biologie, její vznik a hlavní etapy vývoje. Struktura a funkce nukleových kyselin.
2. Základní pojmy molekulární biologie: Genetická informace, genetický kód, definice genu, typy genů.
3. Struktura a informační obsah genomů.
4. Replikace DNA (zúčastněné enzymy a mechanismus).
5. Transkripce u prokaryot a eukaryot, posttranskripční úpravy RNA.
6. Translace, translační aparát, kotranslační posttranslační procesy, samosestavování
7. Regulace genové exprese u prokaryot a eukaryot, struktura a vlastnosti regulačních molekul a regulačních sekvencí
8. Pozitivní a negativní regulace, atenuace, specifické rysy regulace genové exprese u eukaryot. Regulace na posttranskripční a translační úrovni.
9. Molekulární základ tvorby imunitních molekul.
10. Změny genetické informace: mutace, obecná a místně specifická rekombinace. Reparace mutačně poškozené DNA.
11. Mobilní genetické elementy (prokaryotické a eukaryotické transpozony, retrotranspozony).
12. Základy genového inženýrství, příprava transgenních organismů a jejich využití, mutagenese *in vitro*, editace genomů, příprava biopreparátů metodami GI, genové terapie

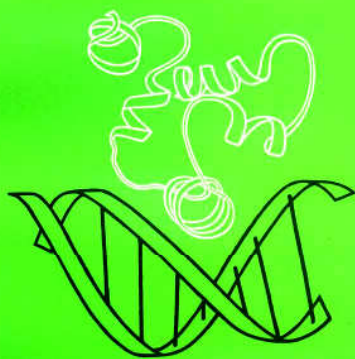
Doporučená literatura

- *Rosypal S. a kol.: Úvod do molekulární biologie. I.-IVdíl. Brno 1999-2002 (třetí vydání). 2006 - I. díl (čtvrté vydání)*
- *Rosypal S. a kol.: Terminologie molekulární biologie, Brno 2001.*
- *Šmarda J. a kol.. Metody molekulární biologie, Brno, 2005.*
- *Lewin B. Genes VIII, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 2004.*
- *Alberts et al.: Molecular biology of the cell. Garland Sci. 2008, 2015*
- *Alberts a kol: Základy buněčné biologie, Espero, 2000, 2005.*
- *Clark D.: Molecular biology, Elsevier, 2005.*
- *Watson J.D. et al., Recombinant DNA, 2nd ed., W.H.Freeman, New York 1992.*
- *Zlatanova J., van Holde K.E.: Molecular Biology - Structure and Dynamics of Genomes and Proteomes. Garland Science, 2016.*
- *Snustad D.P., Simmons M.J.: Genetika (překlad originálu Principles of Genetics), MU Brno, 2009 (nové vydání 2017)*

- **Předlohy k přednáškám: IS MU**

ÚVOD DO MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Stanislav Rosypal



Díl první

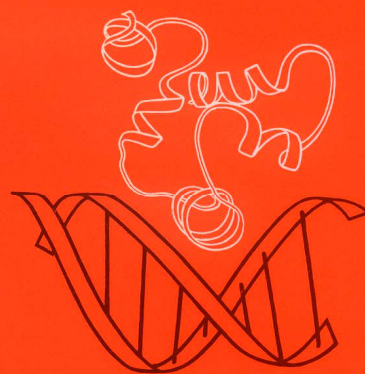
VSTUP DO MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE •
MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOTICKÉ BUŇKY

BRNO 2006

ČTVRTÉ (INOVOVANÉ) VYDÁNÍ

TERMINOLOGIE MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Stanislav Rosypal
& kol.



ČESKÉ ODBORNÉ TERMÍNY, JEJICH DEFINICE A ANGLICKÉ EKUIVALENTY

BRNO 2001

PRVNÍ VYDÁNÍ

The background of the cover is a fluorescence microscopy image showing several cells. The cells are stained with two different dyes: one in red and one in blue. The red staining appears to be in the cytoplasm or along the cell periphery, while the blue staining is concentrated in the nuclei. The cells are scattered across the dark background, with some appearing more prominent than others.

Základy buněčné biologie

Úvod do molekulární
biologie buňky

Alberts • Bray
Johnson • Lewis
Raff • Roberts • Walter

Molecular Biology of THE CELL

Sixth Edition

GS
Garland Science

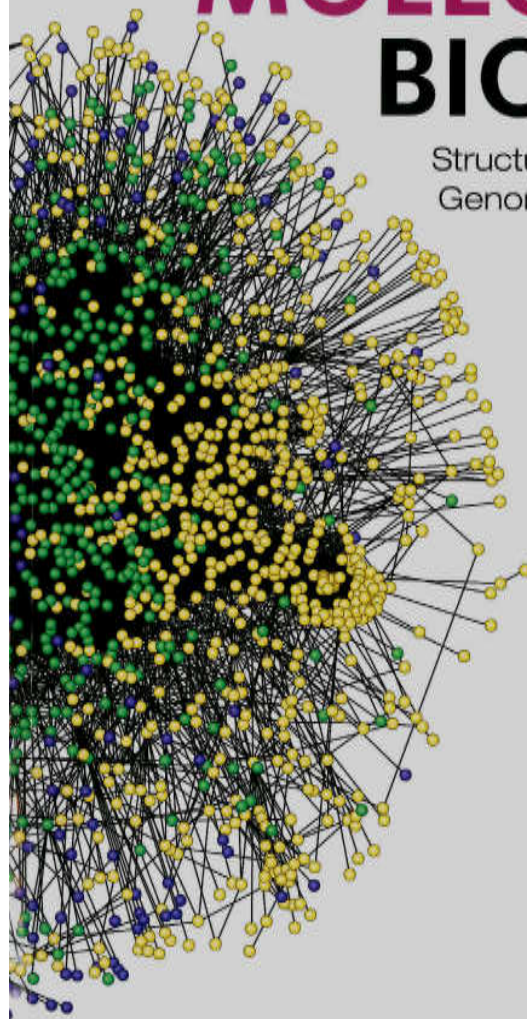


ALBERTS JOHNSON LEWIS MORGAN RAFF ROBERTS WALTER

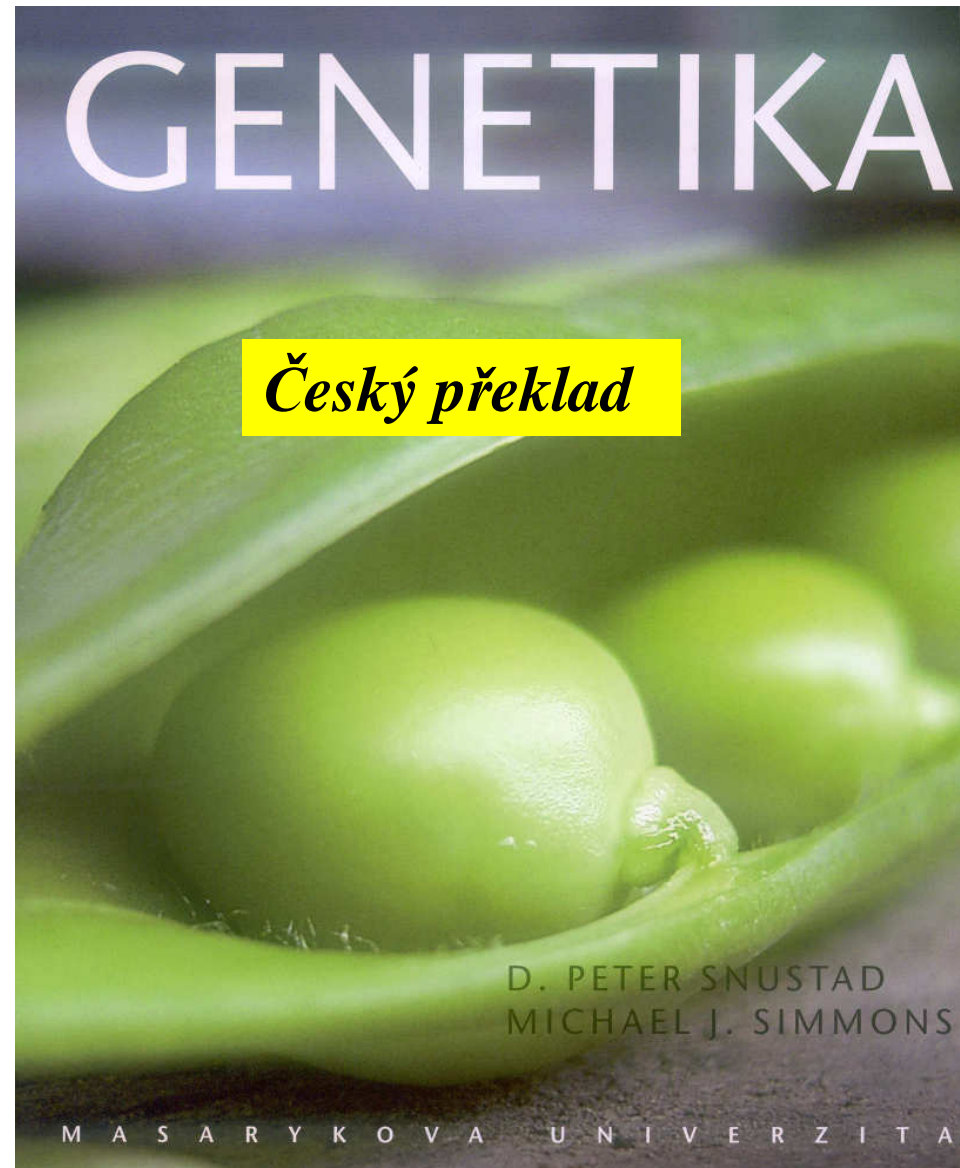
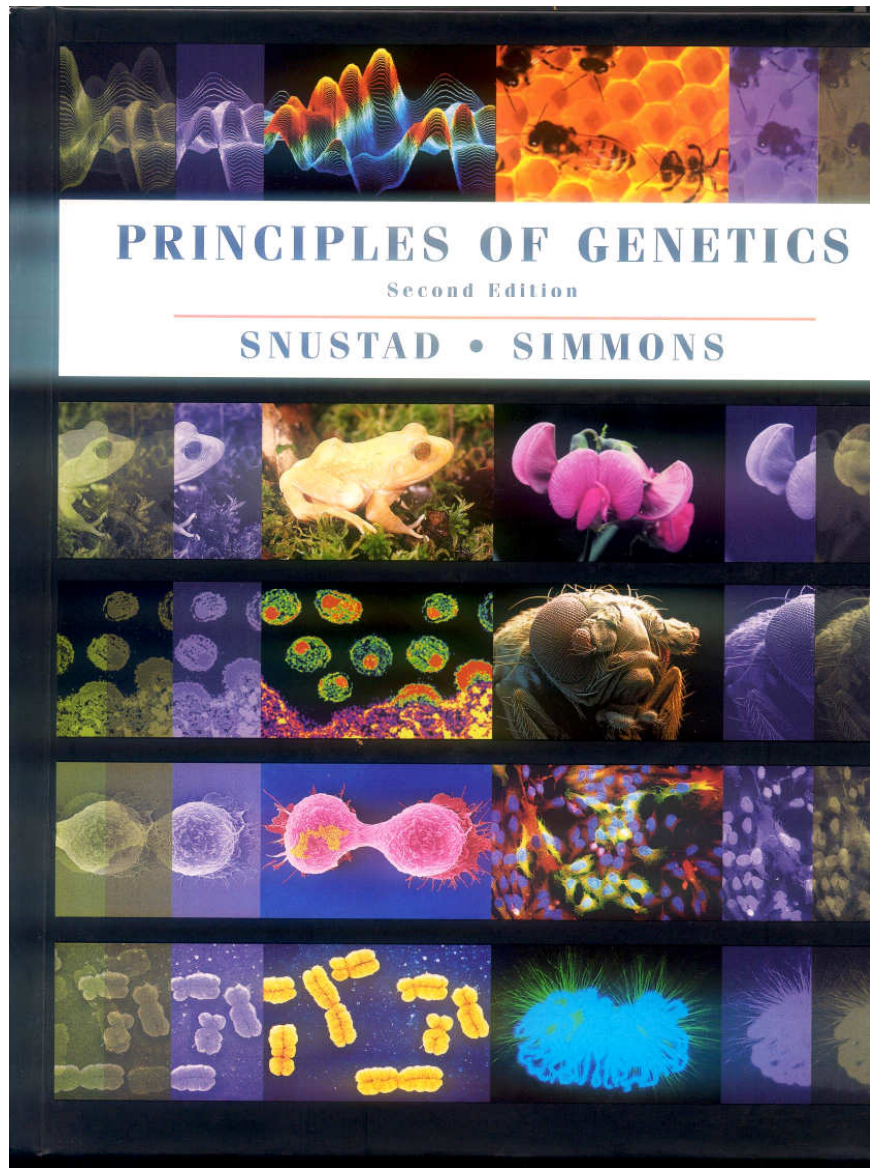
MOLECULAR BIOLOGY

Structure and Dynamics of
Genomes and Proteomes

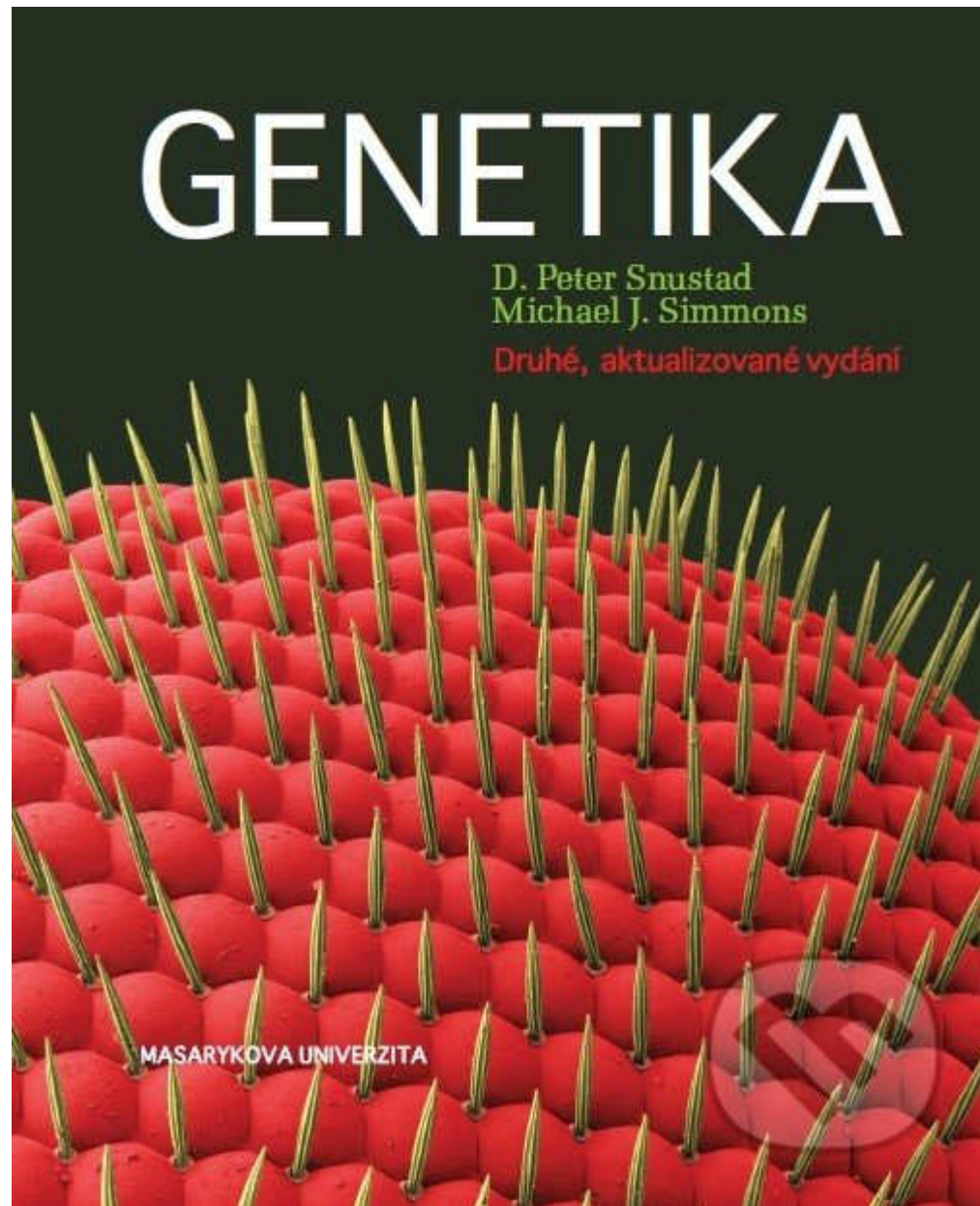
Jordanka Zlatanova
Kensal E. van Holde



GS
Garland Science



Nové vydání 2017

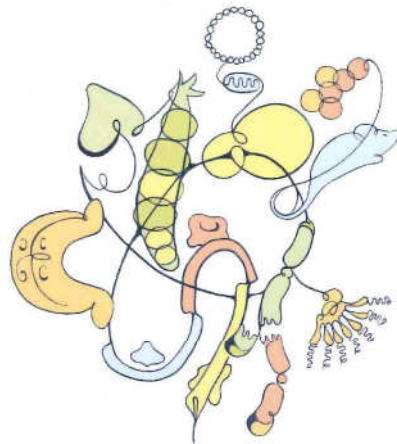


METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Jan Šmarda, Jiří Doškař, Roman Pantůček,
Vladislava Růžičková, Jana Koptíková



Klasické experimenty v genetike



NA CESTE K ODHALENIU
TAJOMSTIEV DEDIČNOSTI

Autoři:

PrF UK Bratislava

ed. Prof. L. Tomáška

Důkaz, že genetická informace je uložena v DNA

Nepřímé důkazy:

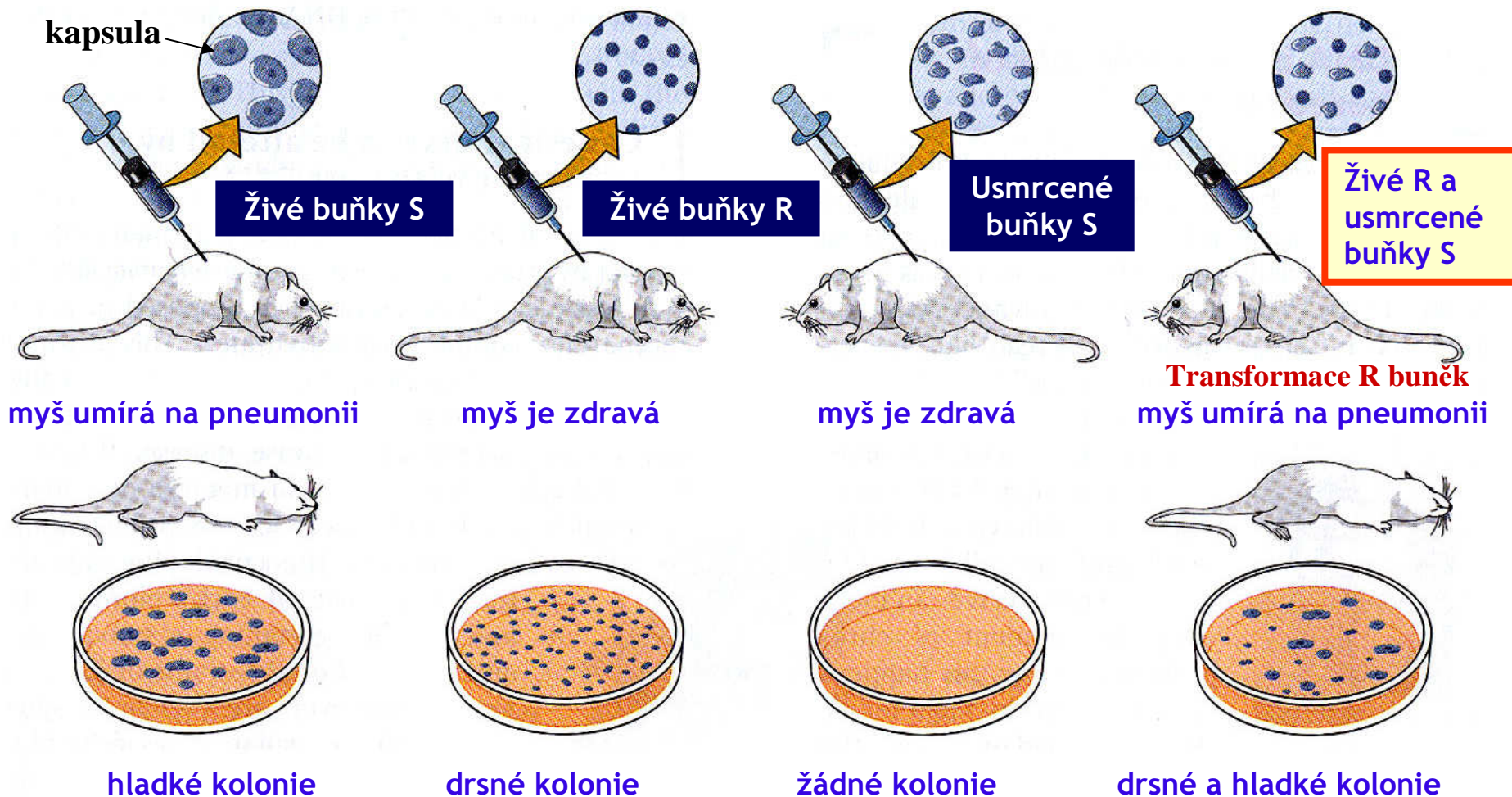
- DNA se nachází jen v chromozomech; RNA a proteiny jsou i v cytoplazmě
- Množství DNA v somatických buňkách koreluje s počtem sad chromozomů; v pohlavních buňkách je množství DNA poloviční
- DNA je stabilnější než RNA nebo proteiny

Přímé důkazy:

- Transformace u *Streptococcus pneumoniae* – změna virulence
- Analýza bakteriofága T2 – do bakteriální buňky vstupuje jen DNA, nikoliv proteiny (značení radiozotopy P a S)
- *U viroidů a některých virů je nositelkou genetické informace RNA – experiment s virem TMV*

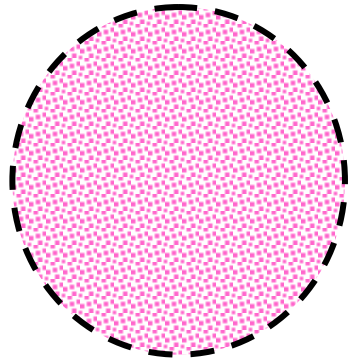
Experiment demonstrující transformaci bakteriálních buněk *Streptococcus pneumoniae* (Griffith 1928)

S buňky = virulentní, tvoří hladké kolonie, **R** buňky = avirulentní, tvoří drsné kolonie



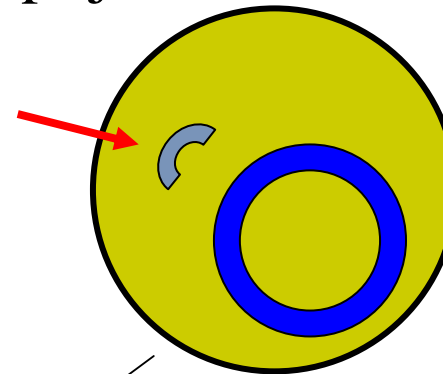
Princip transformace bakteriálních buněk

Usmrcená
donorová buňka S

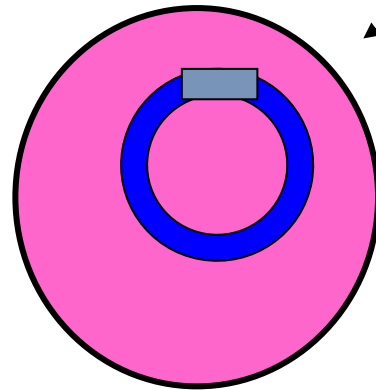


Lýze buňky, uvolnění
DNA, RNA a proteinů

DNA

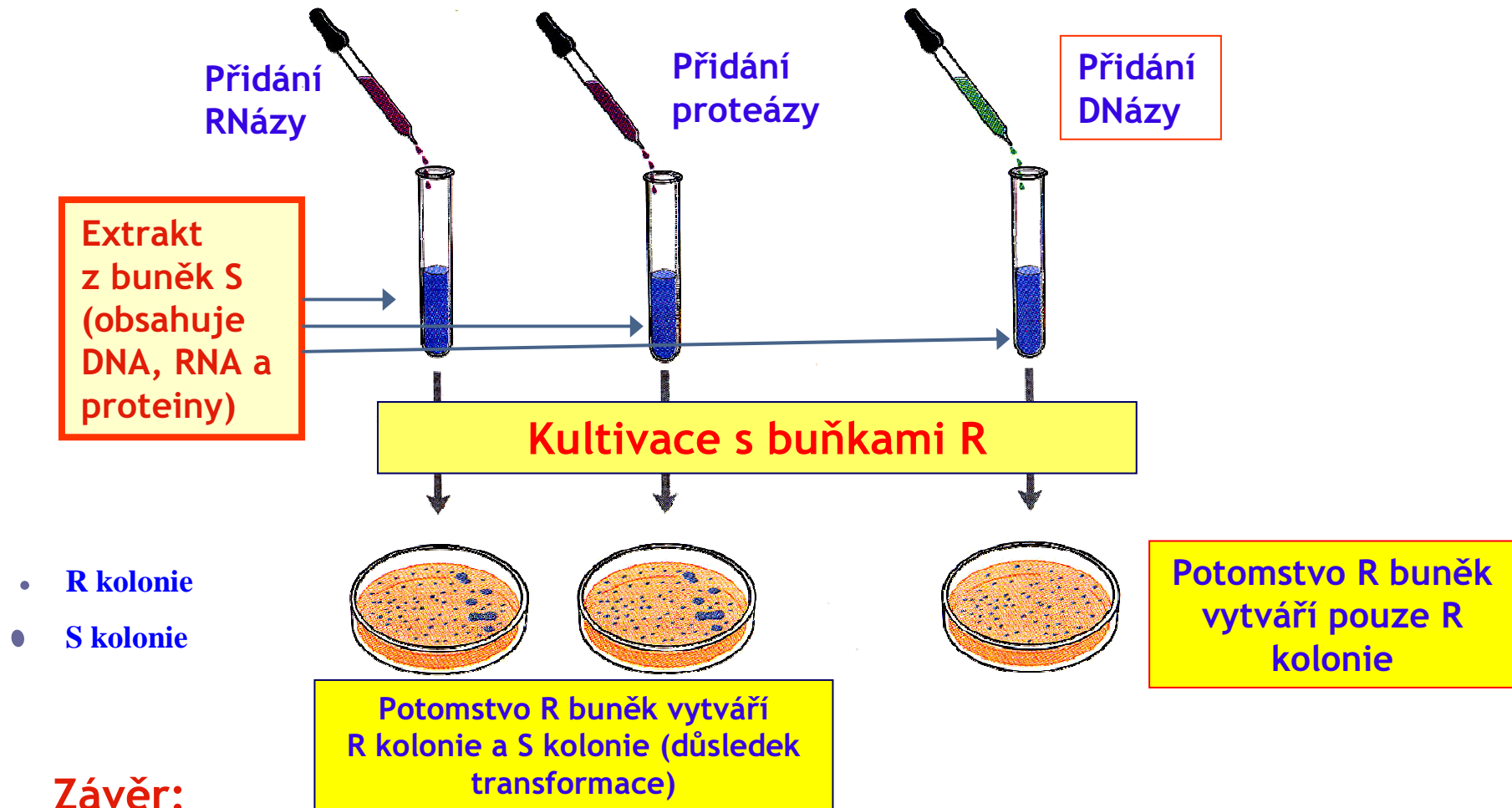


Recipientní buňka R
přijímá volnou DNA



Začlenění přijaté DNA do
genomu recipientní buňky,
změna znaku (= transformace)

Důkaz, že chemickou substancí zodpovědnou za transformaci buněk R na S je DNA (O. Avery, C. MacLeod, M. McCarty 1944)



Závěr:

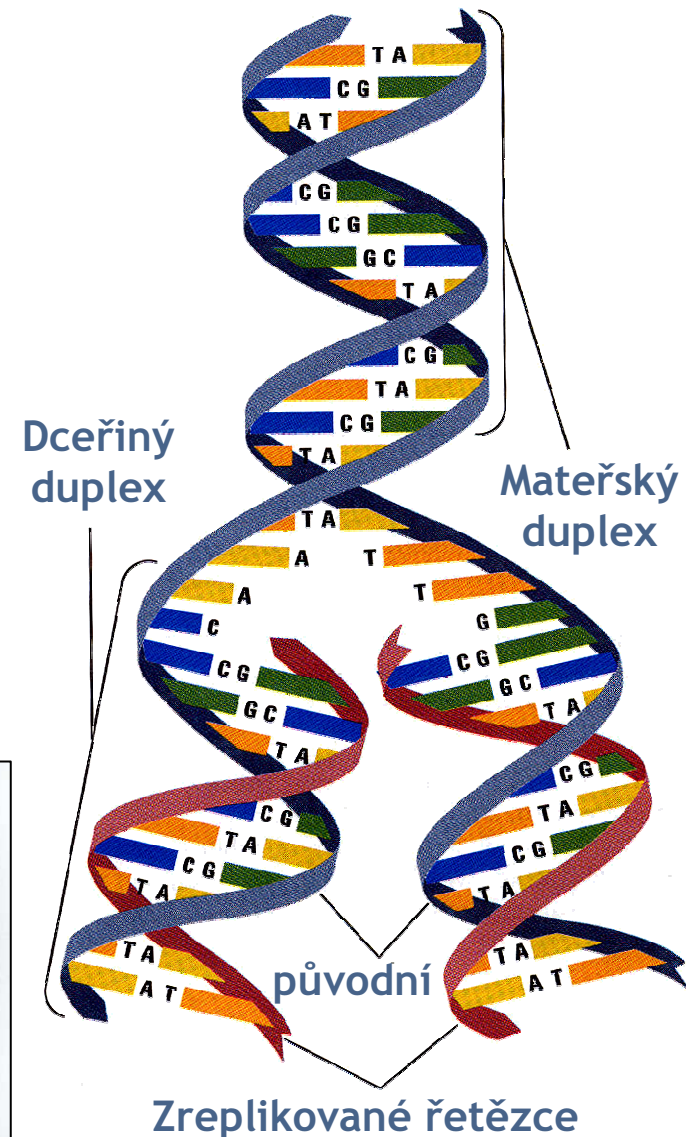
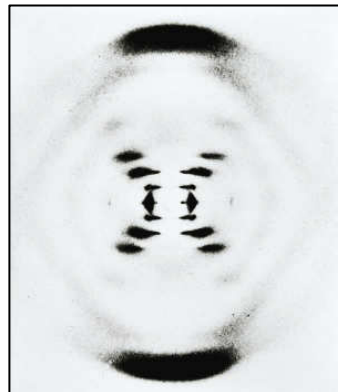
transformující aktivitu vykazuje pouze DNA, ne RNA nebo proteiny

Struktura DNA navržená Watsonem a Crickem (1953)

Vlastnosti navržené struktury DNA umožňují:

1. Replikaci spočívající v párování komplementárních bází
2. Spontánní mutabilitu v důsledku tautomerie bází
3. Kódování genetické informace ve formě pořadí (sekvence) bází

**Analýza rentgenogramů
krystalických preparátů DNA
(M. Wilkins, R. Franklinová,
R. Gosling)**



Nukleové kyseliny

- **DNA - tvoří genom prokaryot, eukaryot a DNA-virů**
- nDNA - jaderná, gDNA - genomová, mtDNA - mitochondriová, ctDNA - chloroplastová, pDNA - plazmidová, recDNA - rekombinantní, rDNA - ribozomální, rDNA, aDNA
- cDNA (copy DNA, complementary DNA) - komplementární;
- dsDNA - dvouřetězcová, ssDNA - jednořetězcová, cccDNA - kovalentně uzavřená kružnicová, ocDNA - otevřená kružnicová, linDNA - lineární
- A-DNA, B-DNA, Z-DNA - konformace ovlivněná sekvencí a prostředím
- **RNA - tvoří genom RNA-virů, u buněčných organismů je složkou ribozomů a plní různé funkce při přenosu, a regulaci realizaci genetické informace**
- mRNA - mediátorová, hnRNA - heteronukleární, tRNA - transferová, rRNA - ribozomová, tmRNA - transferová-mediátorová RNA, snRNA - malá jaderná, snoRNA - malá jadérková, scRNA - malá cytoplazmatická, gRNA - řídicí, crRNA - crisper-ová,
- **Ribozymy: RNA s katalytickou funkcí (např. introny, siRNA, miRNA aj)**

Složení nukleových kyselin

● Nukleotid

- kyselina fosforečná
- pentóza
 - ribóza
 - deoxyribóza
- organická báze
 - purinové báze
 - adenin
 - guanin
 - pyrimidinové báze
 - cytozin
 - tymin
 - uracil

*modifikace bází (např. metylace)

N-glykozidická vazba

● Nukleozid = pentóza[↑]---org. báze

● Kys. deoxyribonukleová

- kys. fosforečná
- deoxyribóza
- adenin, guanin, cytozin, **tymin***

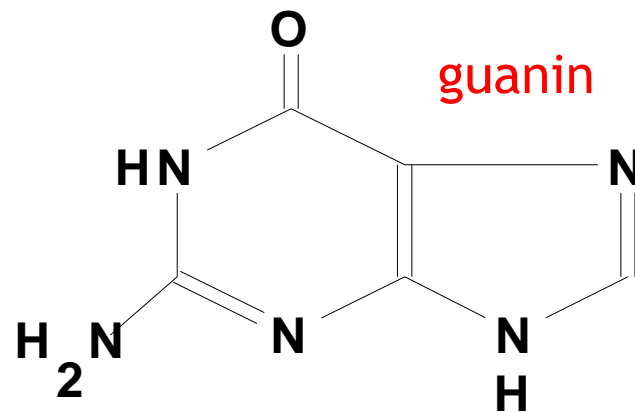
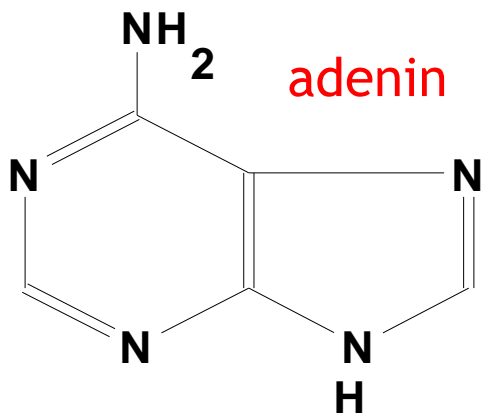
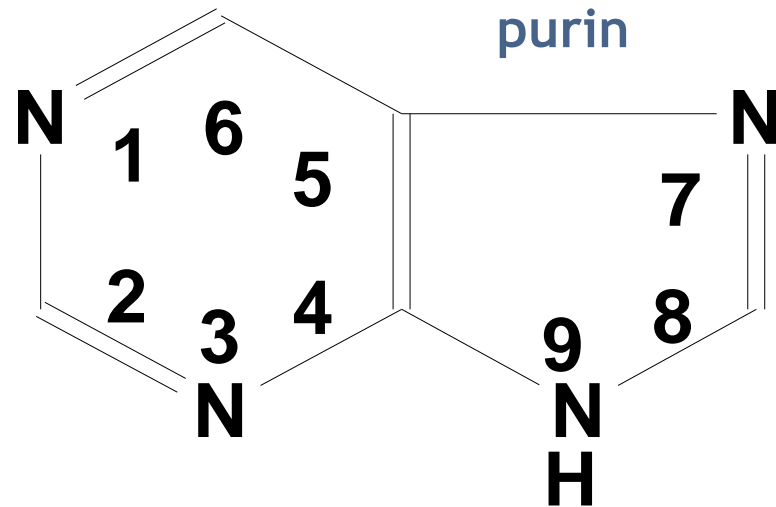
● Kys. ribonukleová

- kys. fosforečná
- ribóza
- adenin, guanin, cytozin, **uracil***

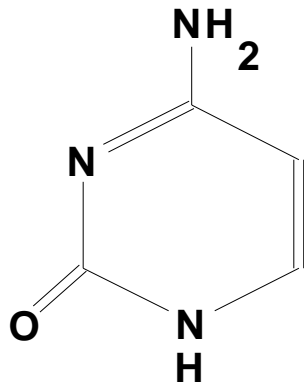
Organické báze

- Adenin = 6-aminopurin
- Guanin = 2-amino-6-oxopurin
- Cytozin = 4-amino-2-oxopyrimidin
- Tymin = 2,4-dioxo-5-metylpyrimidin
- Uracil = 2,4-dioxopyrimidin

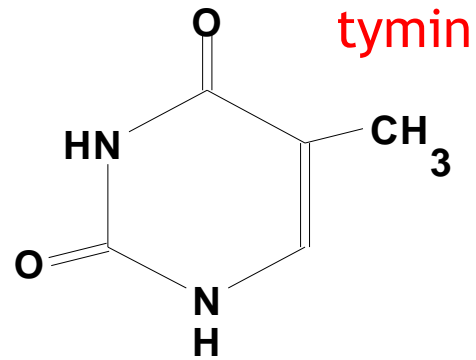
Purinové báze



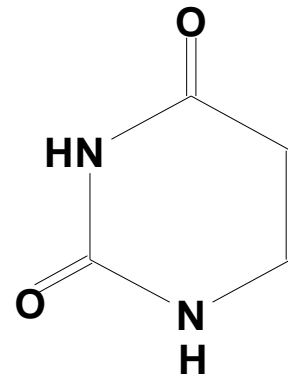
Pyrimidinové báze



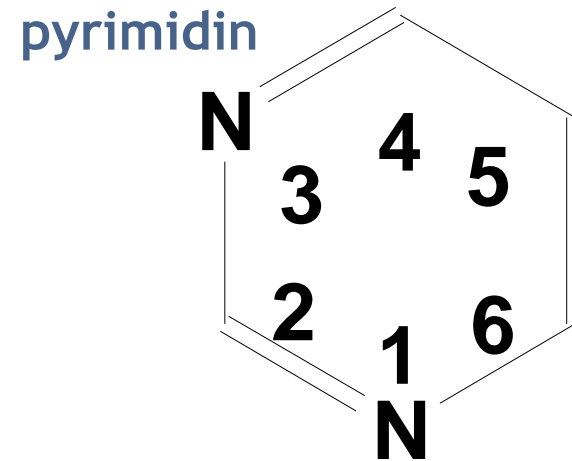
cytozin



tymin

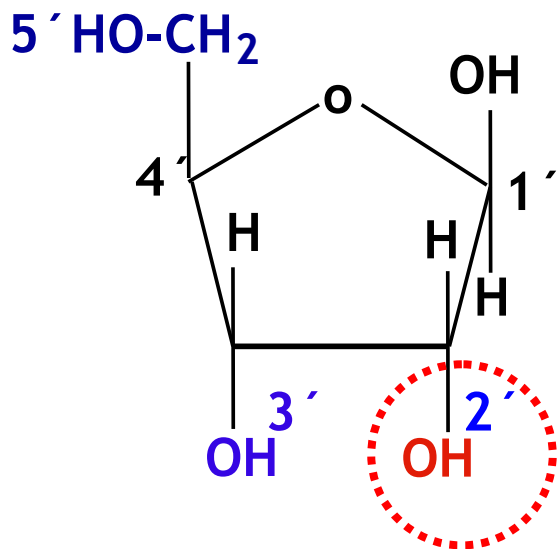


uracil



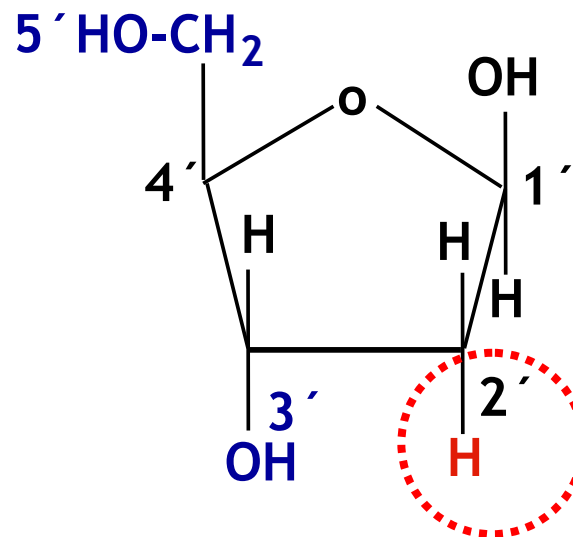
Pentózy nukleových kyselin

RNA



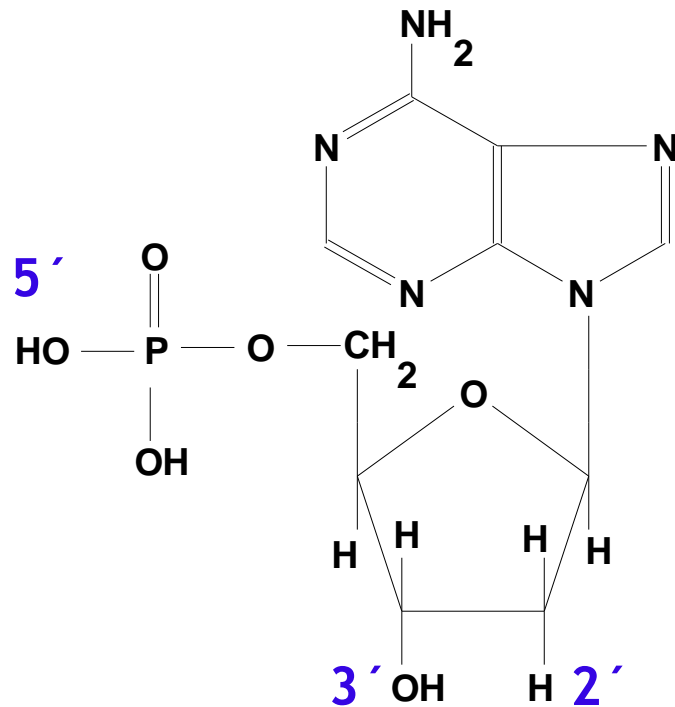
β-D-ribóza
β-D-ribofuranóza

DNA

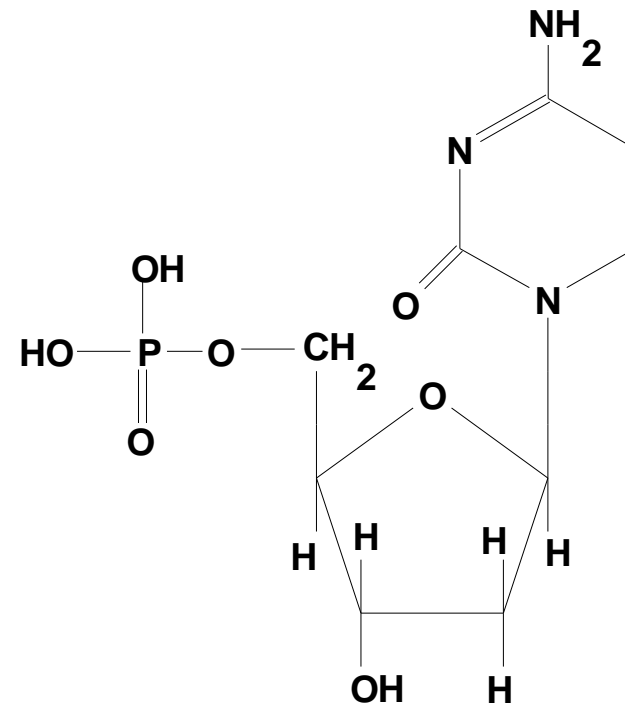


β-D-2-deoxyribóza
2-deoxy-β-D-ribofuranóza

Nukleotidy (nomenklatura)



2'-deoxyadenozin-5'-monofosfát



2'-deoxycytidin-5'-monofosfát

↙ -difosfát, -trifosfát

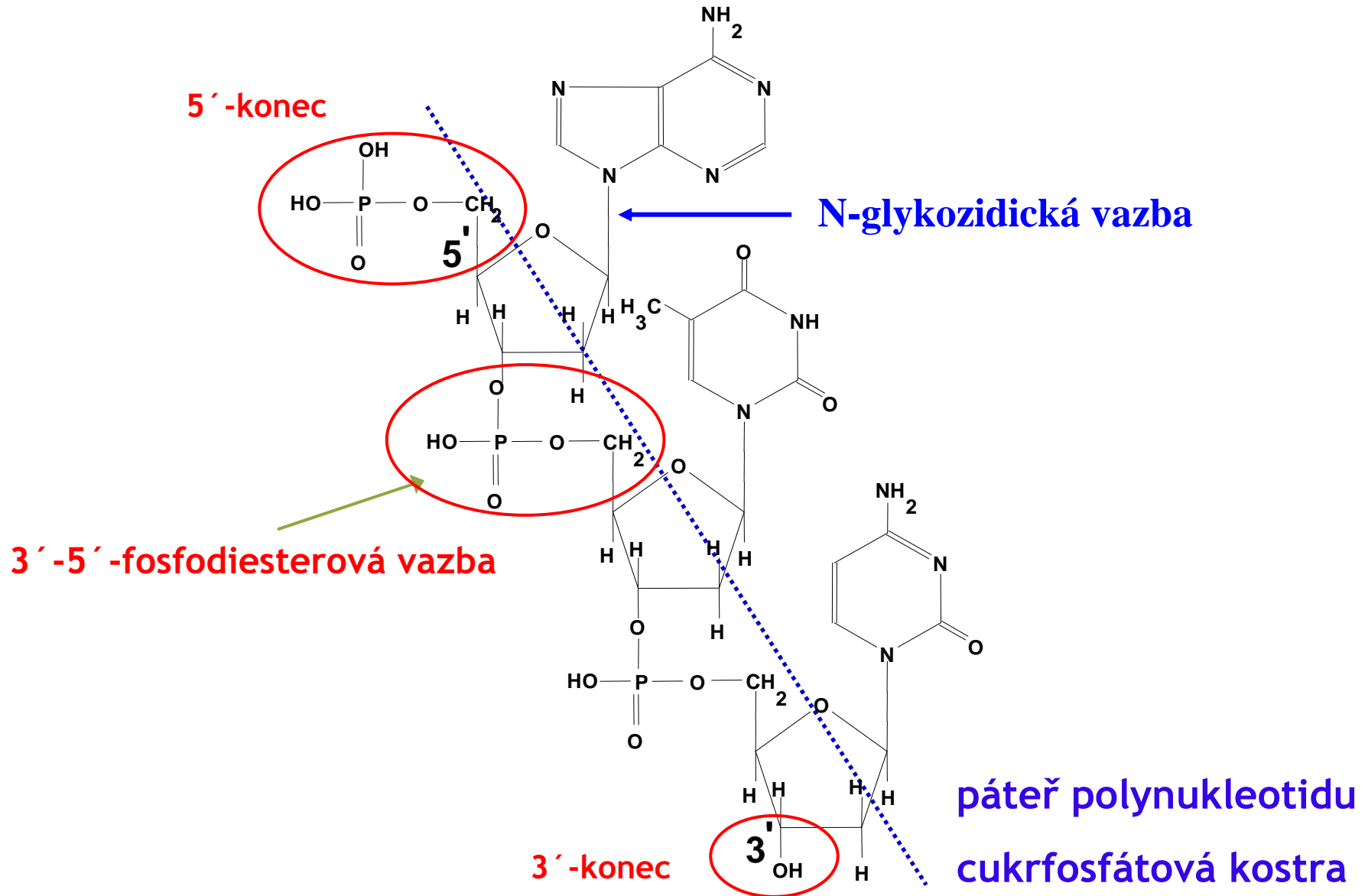
ATP, GTP

Polynukleotidový řetězec

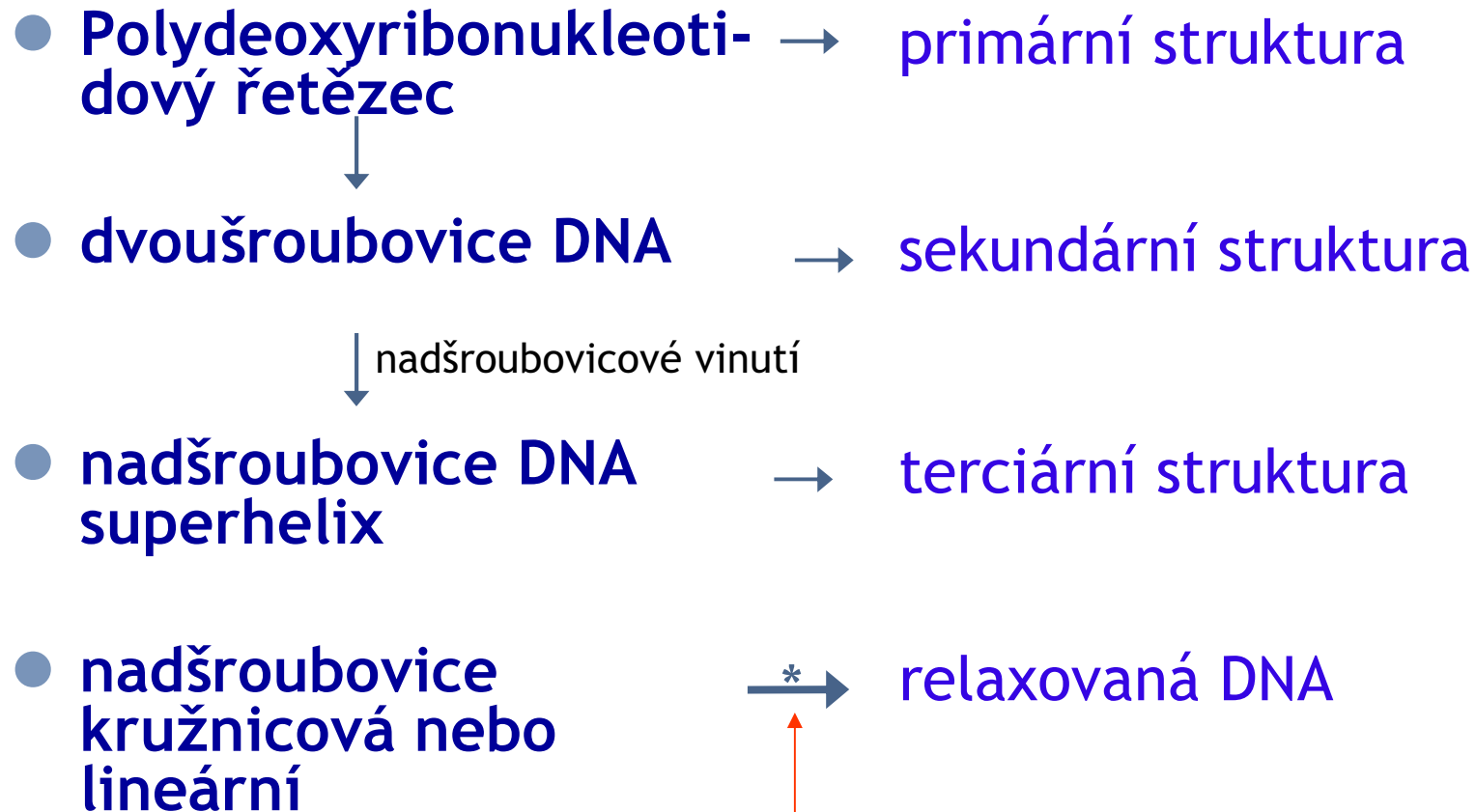
- Významné strukturní rysy:

- 5' - a 3' - konec polynukleotidového řetězce
- Páteř polynukleotidu (pentózafosfátová kostra, cukr-fosfátová kostra)
- Prodlužování (syntéza) polynukleotidového řetězce - *probíhá vždy ve směru 5' - 3'*

Část polynukleotidového řetězce DNA



Strukturní úrovně DNA



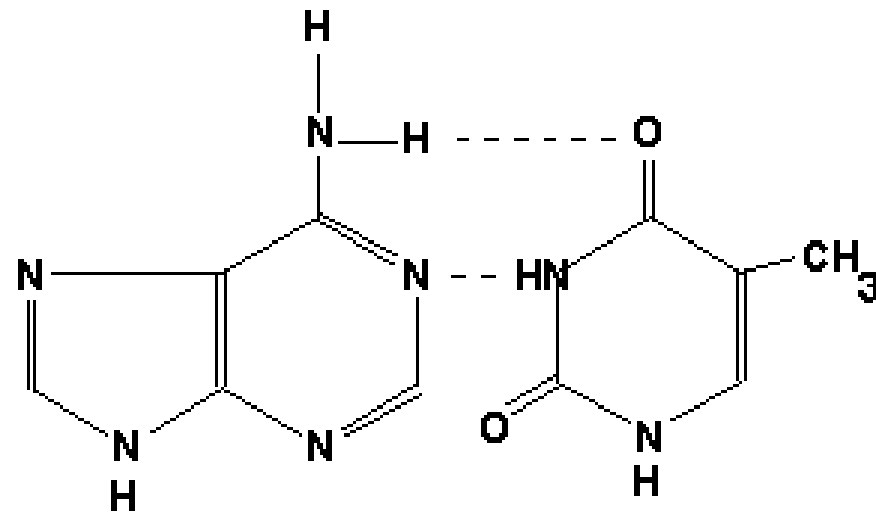
*zrušení nadšroubovicového vinutí

Párování bází

párování bází = spojování protilehlých bází
vodíkovými vazbami

- a) mezi dvěma řetězci = **duplex**
- b) mezi třemi řetězci = **triplex**
- c) mezi čtyřmi řetězci = **kvadruplex**

Watsonovo-Crickovo párování bází

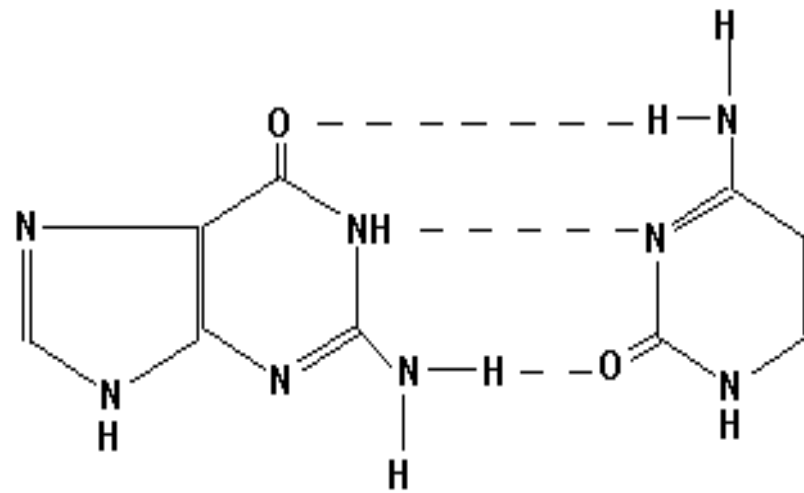


adenin
(aminoforma)

tymin
(ketoforma)

DNA

Watsonovo-Crickovo párování bází

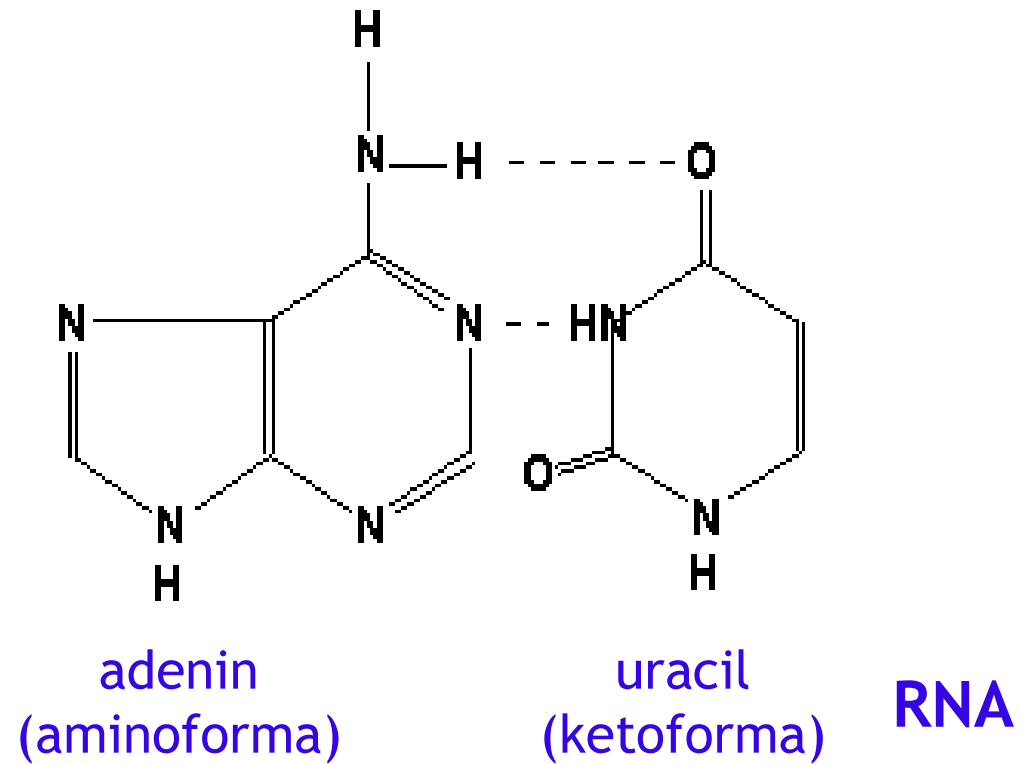


guanin
(ketoforma)

cytozin
(aminoforma)

DNA

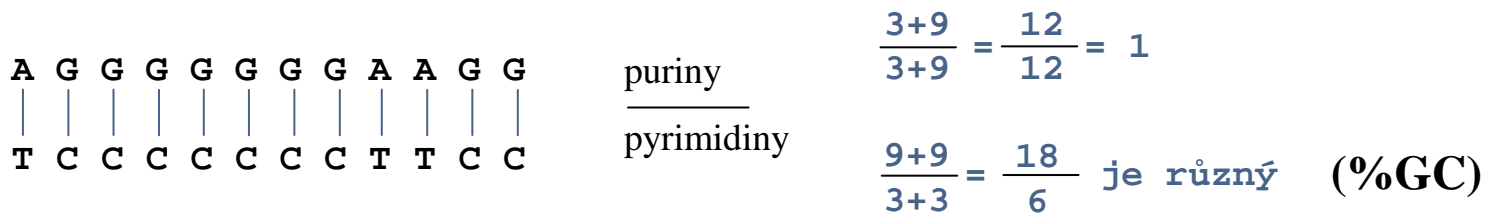
Watsonovo-Crickovo párování bází



Charakteristika dsDNA

1. společná osa
2. komplementarita řetězců
3. vnitřní část tvoří báze AT a GC
4. páteř - osa = 1nm
5. antiparalelizmus = směr fosfodiesterových vazeb 5'-3' a 3'-5'
6. Chargaffova pravidla

$$\frac{A+G}{T+C} = 1 \quad \frac{G+C}{A+T} \text{ je různý}$$
7. planární charakter bází
8. menší a větší žlábek = místa vazby proteinů k DNA

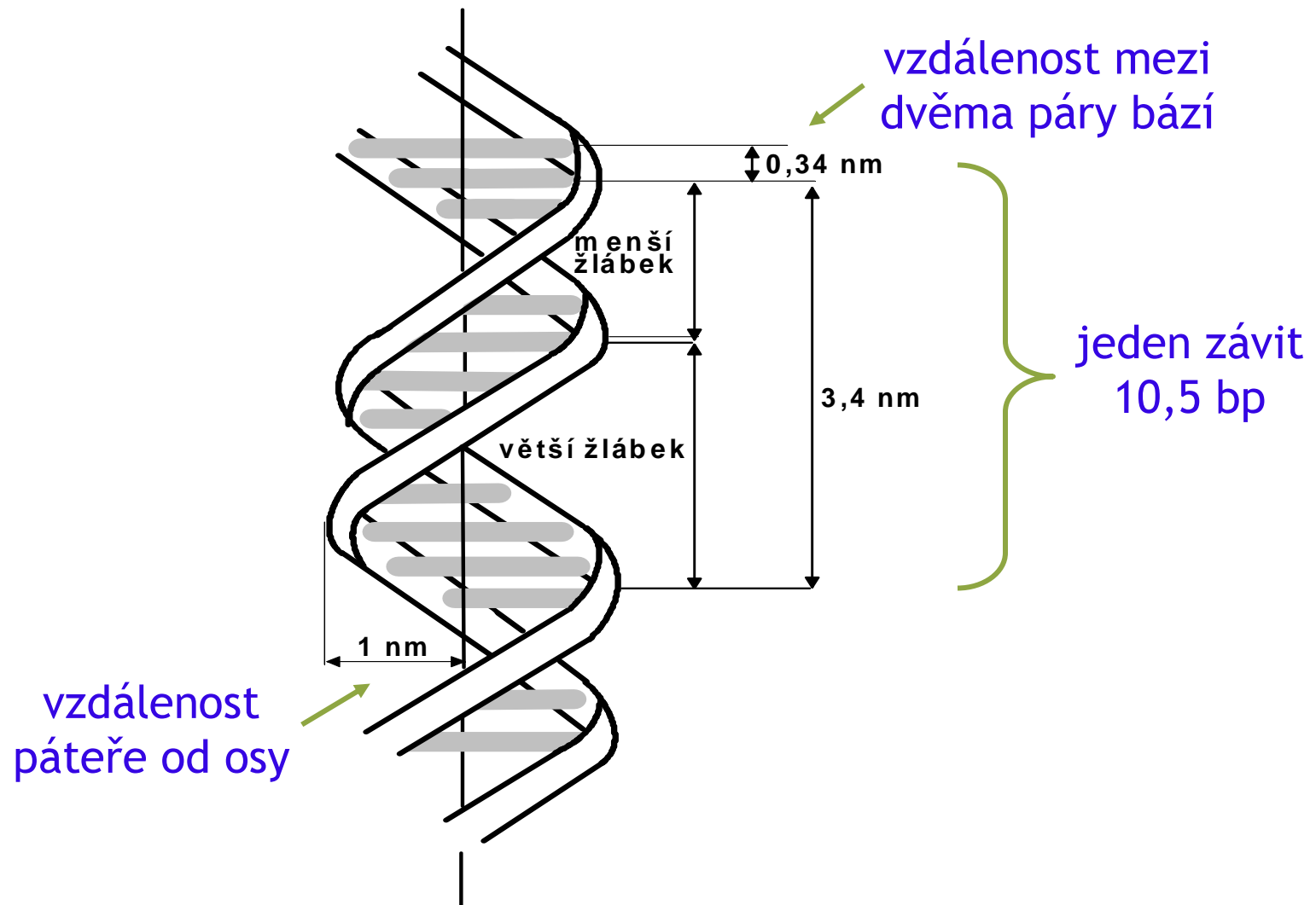


Obsah bází v DNA různých organismů

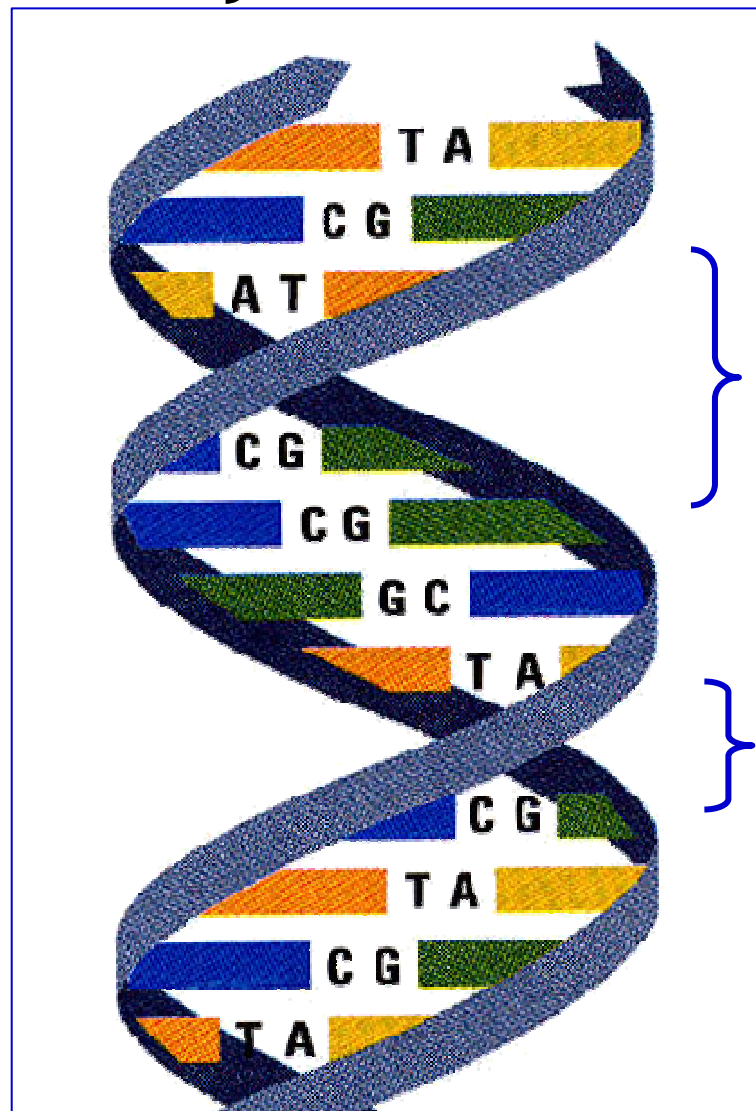
	Organism	A	G	C	T	(C+G)	A/T	G/C	Purines/ Pyrimidines
ssDNA	bacteriophage ϕ X174	24.0	23.3	21.5	31.2	44.8	<u>0.77</u>	1.08	<u>0.89</u>
	<i>Escherichia coli</i>	23.8	26.8	26.3	23.1	53.2	1.03	1.02	1.02
dsDNA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15.1	34.9	35.4	14.6	70.3	1.03	0.99	1.00
	yeast	31.7	18.3	17.4	32.6	35.7	0.97	1.05	1.00
	<i>Drosophila</i>	30.7	19.6	20.2	29.5	39.8	1.03	0.97	1.01
	corn/maize	26.8	22.8	23.2	27.2	46.1	0.99	0.98	0.98
	calf	27.3	22.5	22.5	27.7	45.0	0.99	1.00	0.99
	pig	29.8	20.7	20.7	29.1	41.4	1.02	1.00	1.01
	human	29.3	20.7	20.0	30.0	40.7	0.98	1.04	1.00

Plasmodium falciparum (GC% = ~20%) Streptomyces coelicolor GC% = 72%)

Sekundární struktura DNA (schéma dvoušroubovicové DNA - konformace B)



Velký a malý žlábek na dsDNA

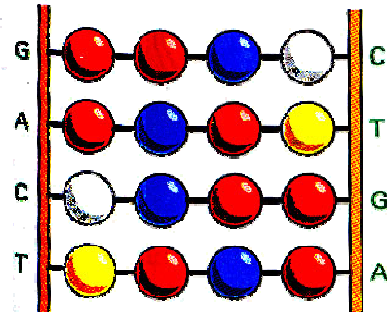


velký žlábek

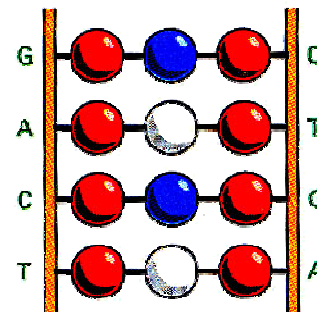
malý žlábek

Rekogniční kód DNA

INTERAKCE DNA S PROTEINY



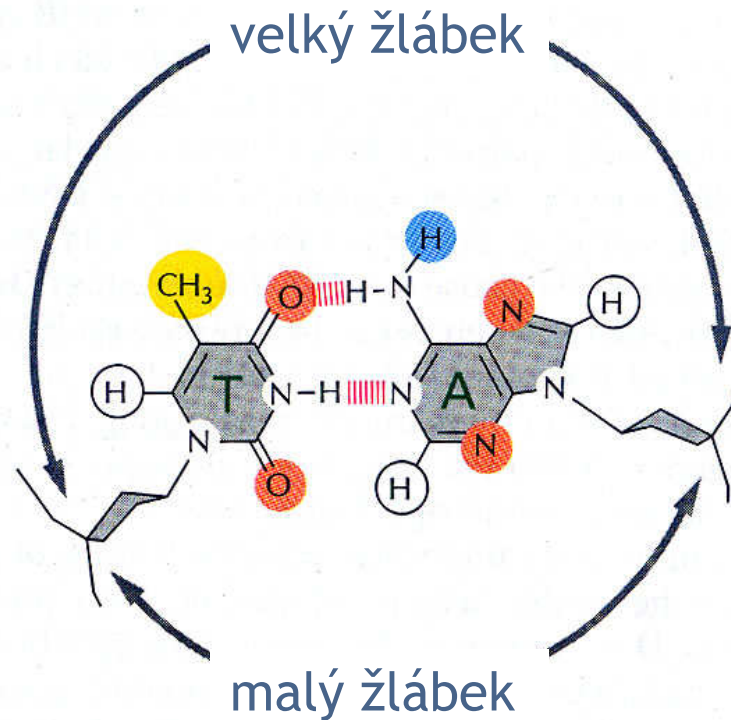
velký žlábek



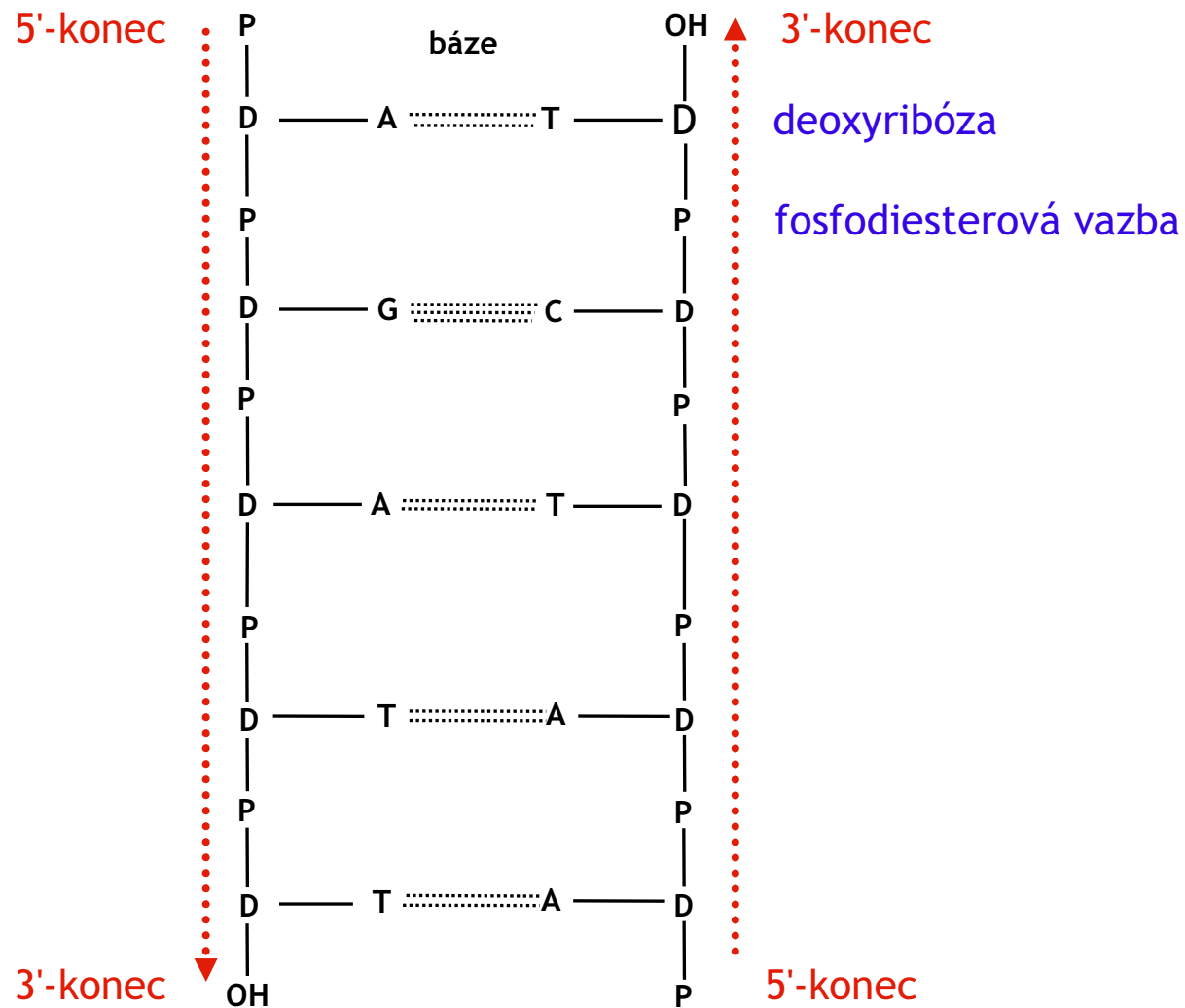
malý žlábek

KEY:

- = H-bond acceptor
- = H-bond donor
- = hydrogen atom
- = methyl group



Antiparalelismus komplementárních řetězců dsDNA = opačný směr fosfodiesterových vazeb

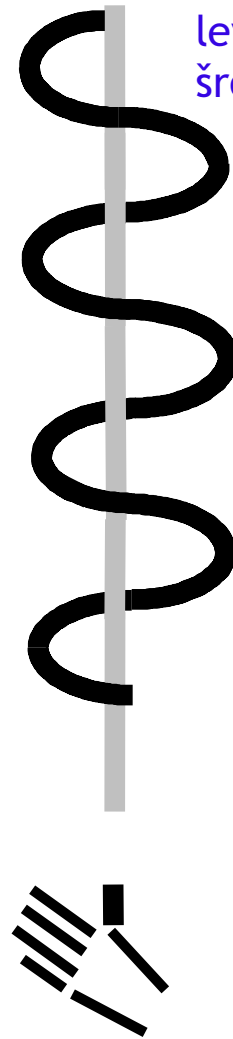
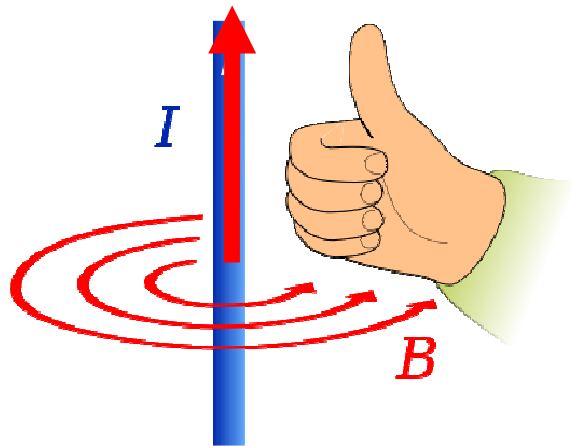


Vinutí dvoušroubovice DNA

- **Vinutí** = mnohonásobné otáčení jednoho řetězce kolem druhého
- Vinutí může být **pravotočivé** nebo **levotočivé**

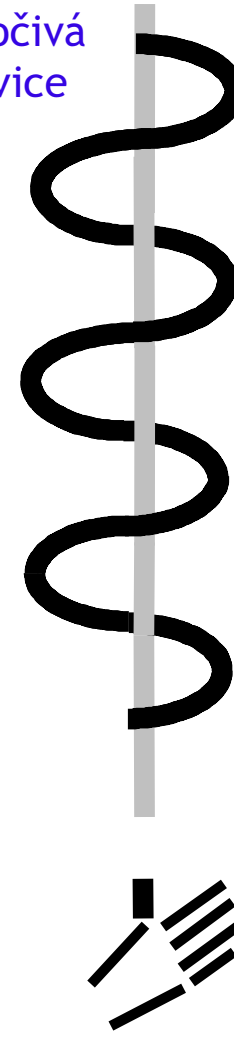
Vinutí dvoušroubovice DNA

Levotočivé a pravotočivé
vinutí šroubovice



levotočivá
šroubovice

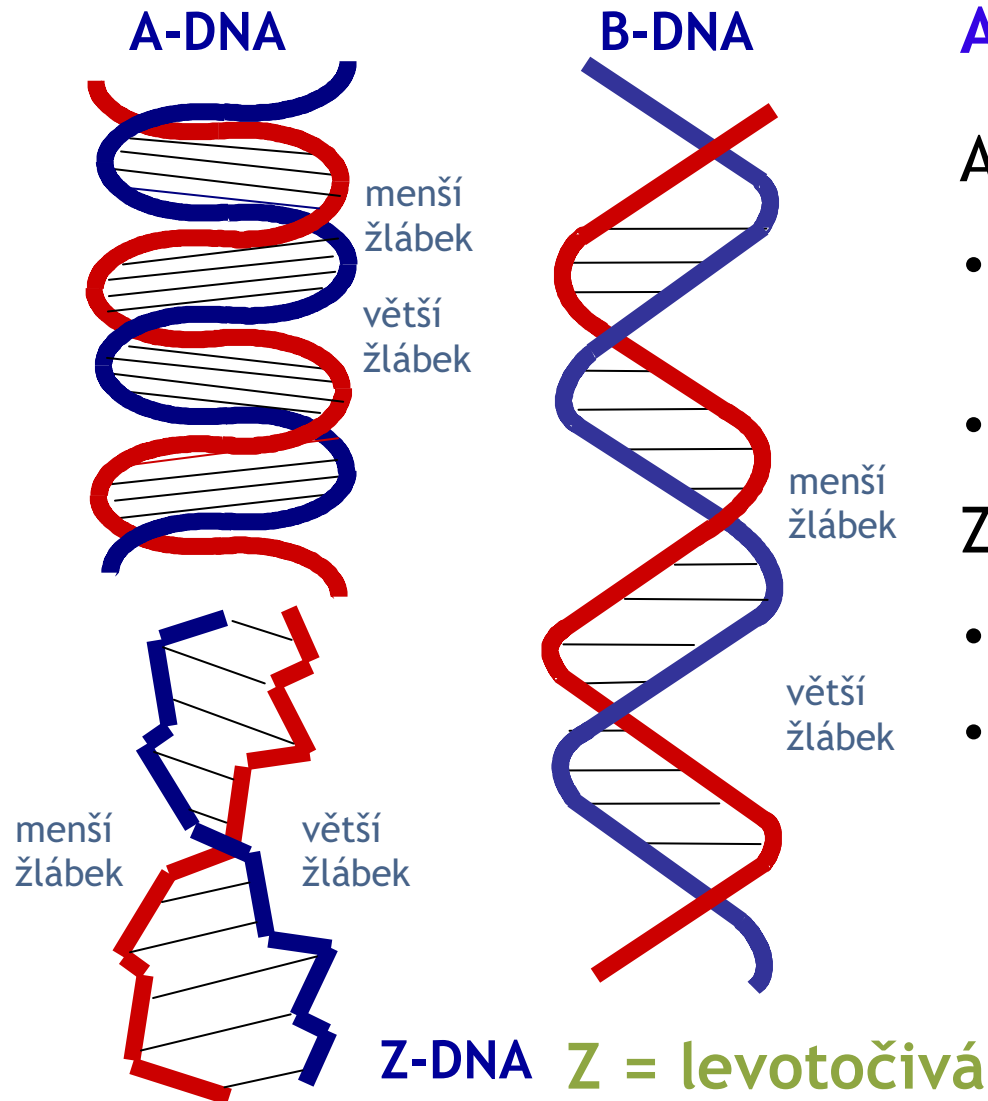
pravotočivá
šroubovice



Konformace dvouřetězcové DNA (RNA)

- **Konformace** = prostorové uspořádání biomakromolekuly do struktury, která je za daných podmínek energeticky nejvýhodnější
- **Konformace DNA závisí na:**
 - nukleotidové sekvenci
 - obsahu vody v prostředí
 - iontové síle prostředí

Konformace dsDNA



A, B = pravotočivá

A-DNA

- dsDNA při vysoké konc. solí nebo dehydrataci
- dsRNA, DNA/RNA hybrid,

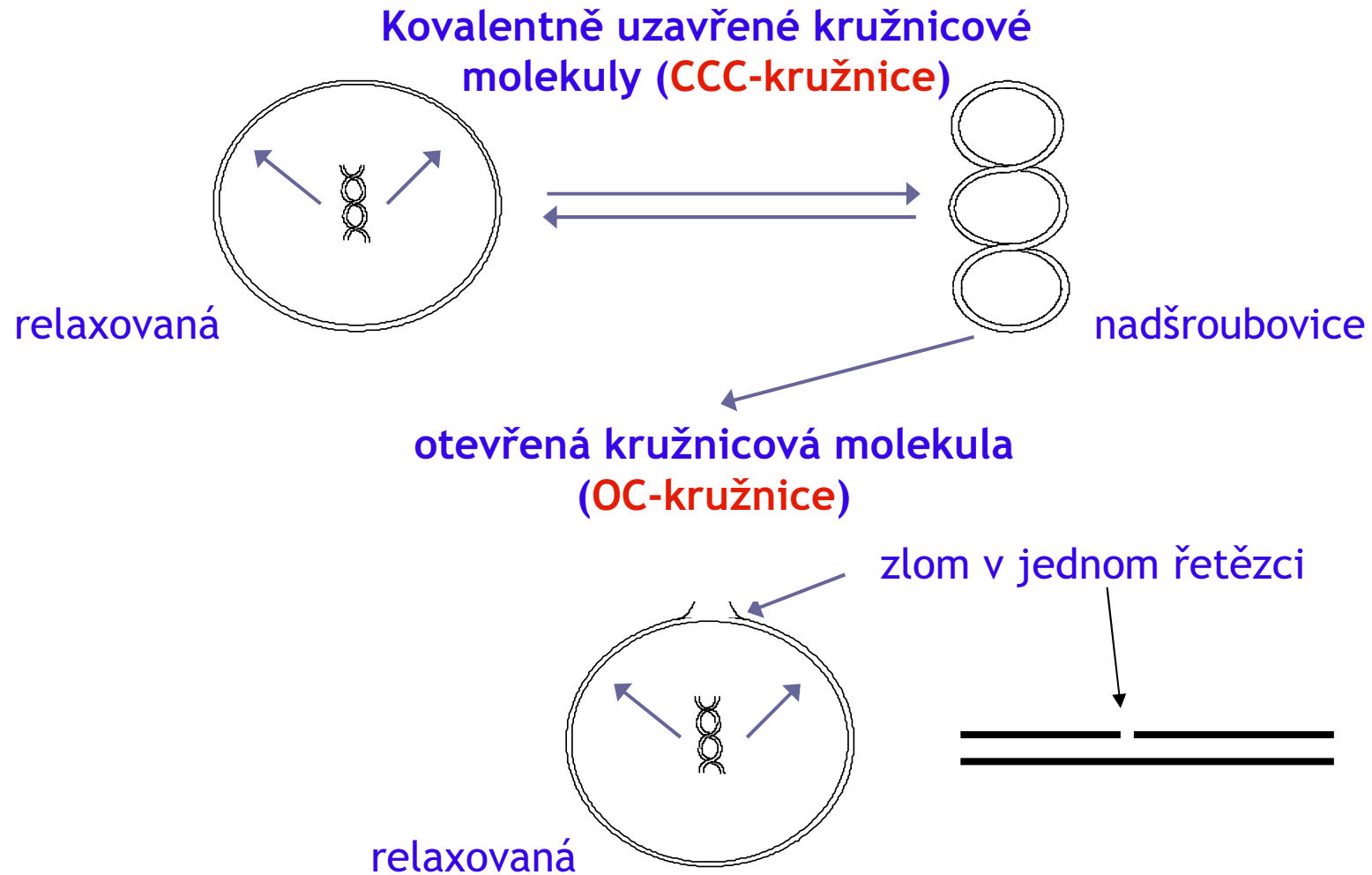
Z-DNA

- vysoké konc. solí
- úseky obsahující (GC)_n nebo (GT)_n

Terciární struktura DNA

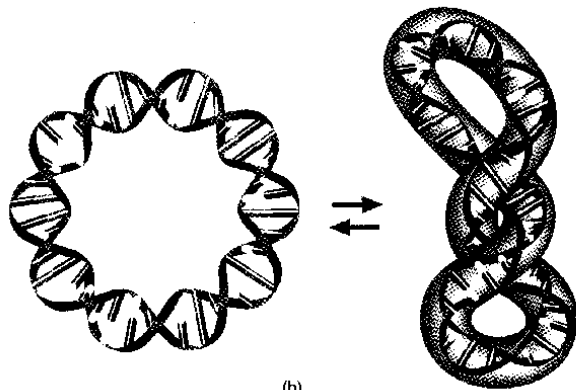
- **Terciární struktura dsDNA = nadšroubovice**
- Vzniká zavedením dalšího vinutí (záporného nebo kladného) do dvoušroubovice.
- Nadšroubovice se může vytvářet jak z relaxované uzavřené kružnicové DNA, tak i z lineární DNA
- Záporné vinutí vzniká odvinováním dvoušroubovice (ubíráním závitů, podvinutí), kladné vinutí jejím svinováním (přidáváním závitů, převinutí).

Konformace dvouřetězcových kružnicových molekul DNA



Konformace dvouřetězcových kružnicových molekul DNA

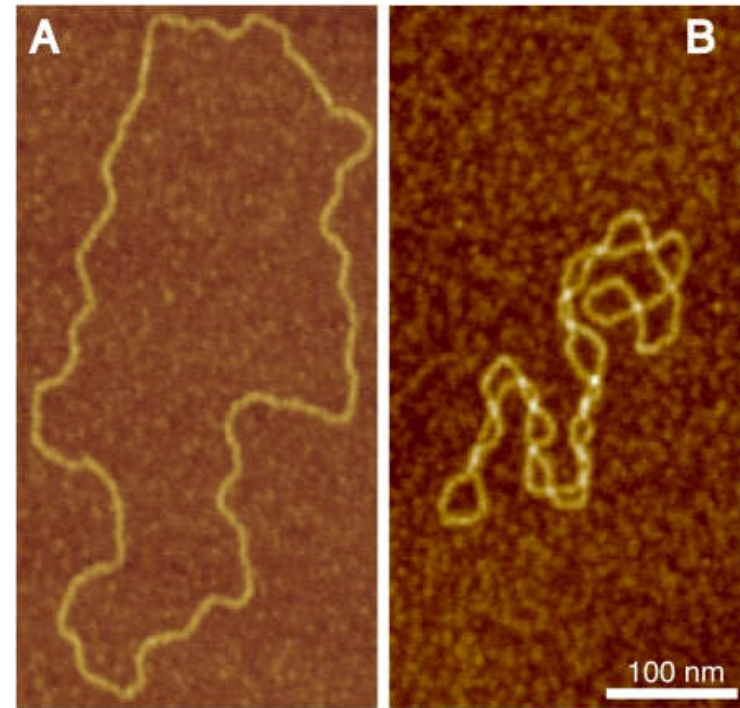
Lineární (LIN)



(b)

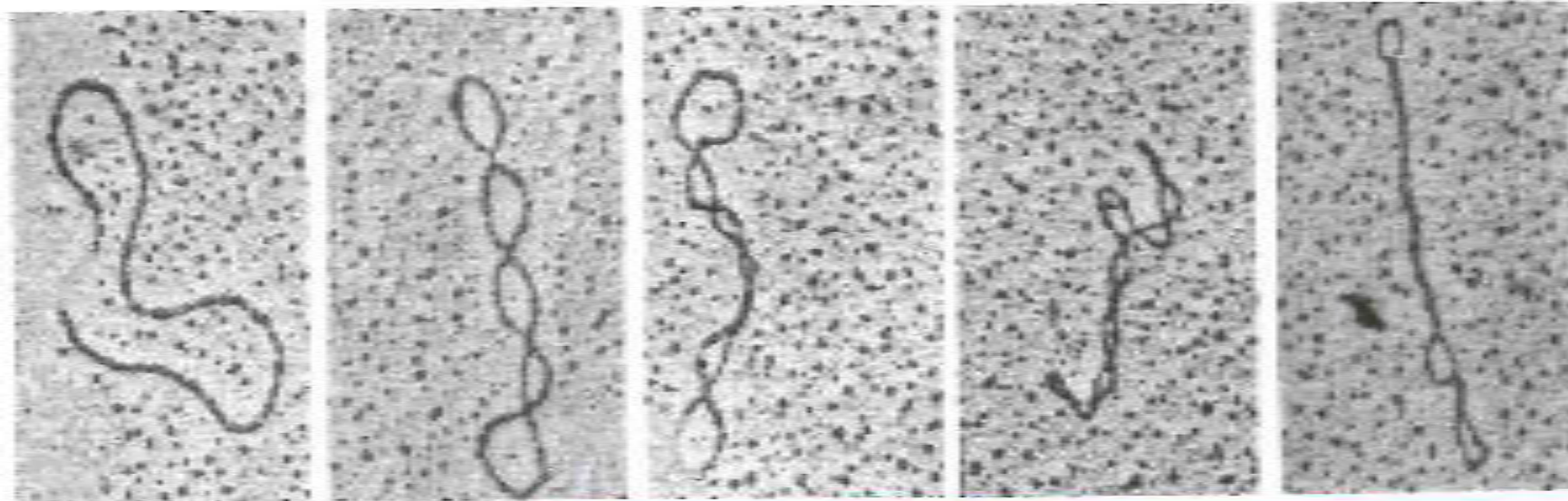
Otevřená kružnicová
DNA (OC forma)

superhelikální
kovalentně uzavřená
kružnicová molekuly
(CCC forma)



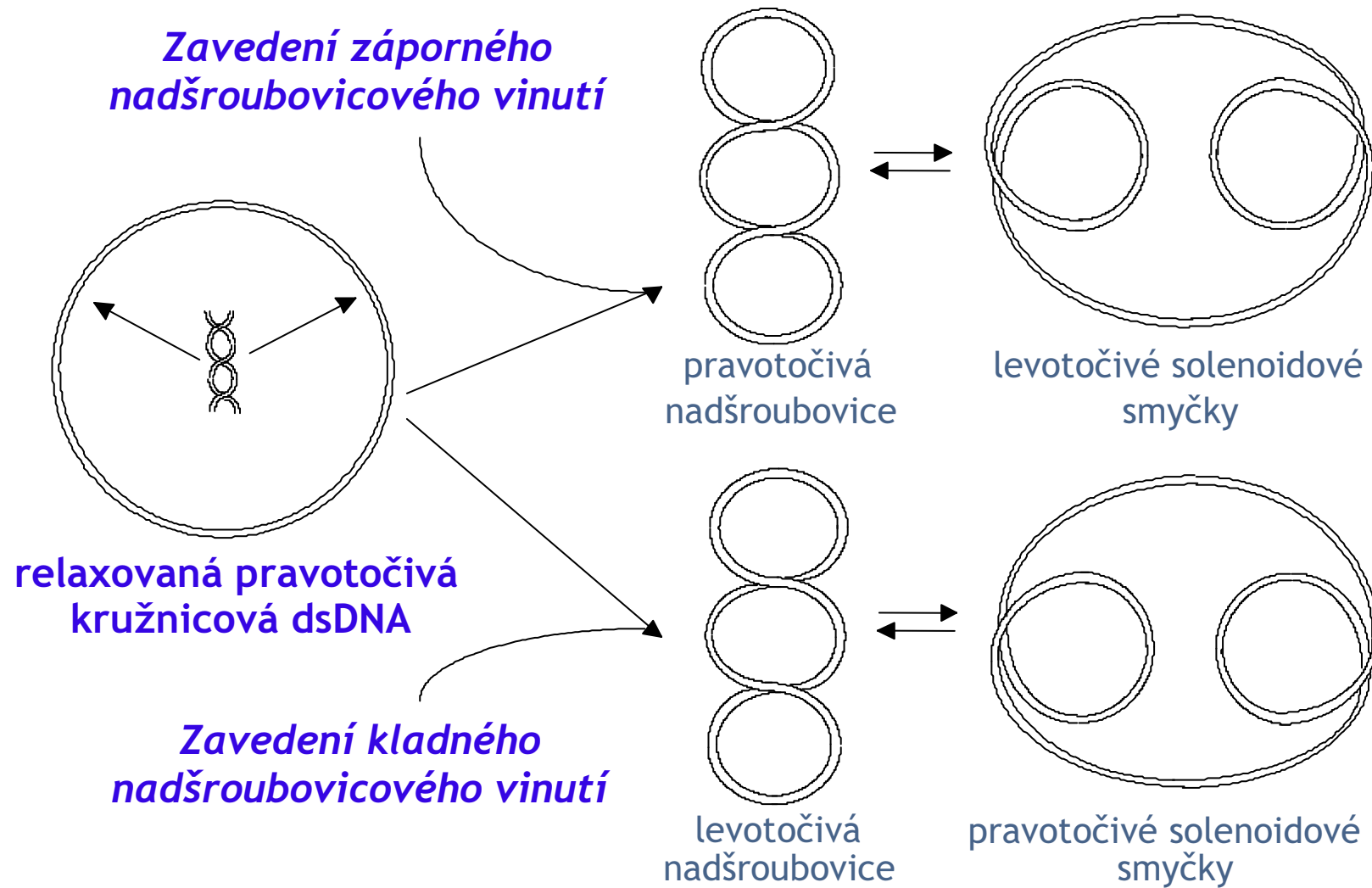
(OC forma) (CCC forma)

DNA s různým stupněm superhelicity

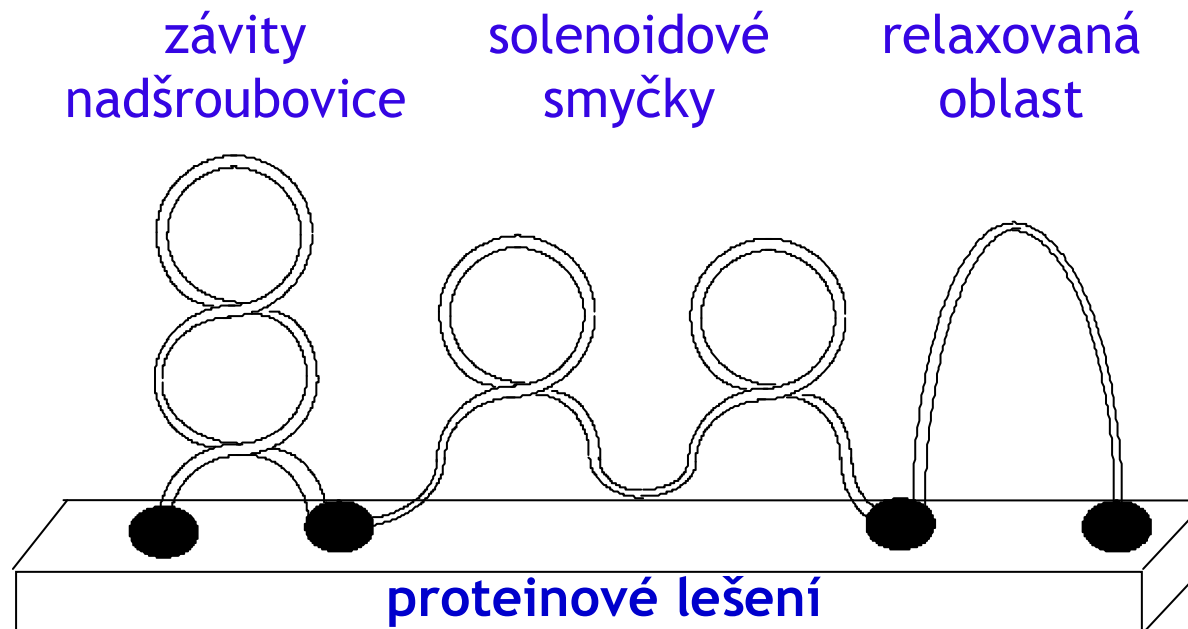


Zvyšující se počet nadšroubovicových závitů

Přechod relaxované DNA do nadšroubovicové

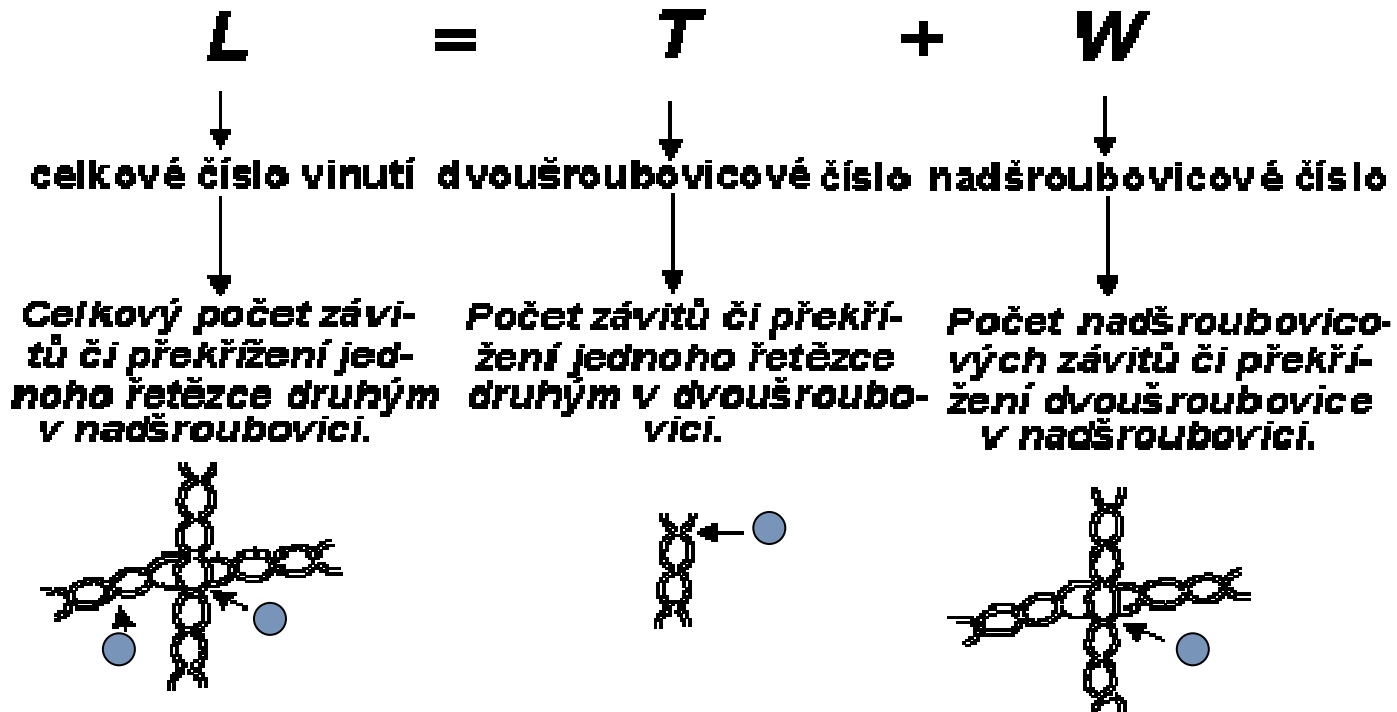


Nadšroubovicové a relaxované oblasti v lineární dvouřetězcové DNA



Eukaryotická DNA, která je lineární a dvouřetězcová, se váže k proteinovému lešení. Tvoří se v ní závity nadšroubovice, solenoidové smyčky a také relaxované oblasti.

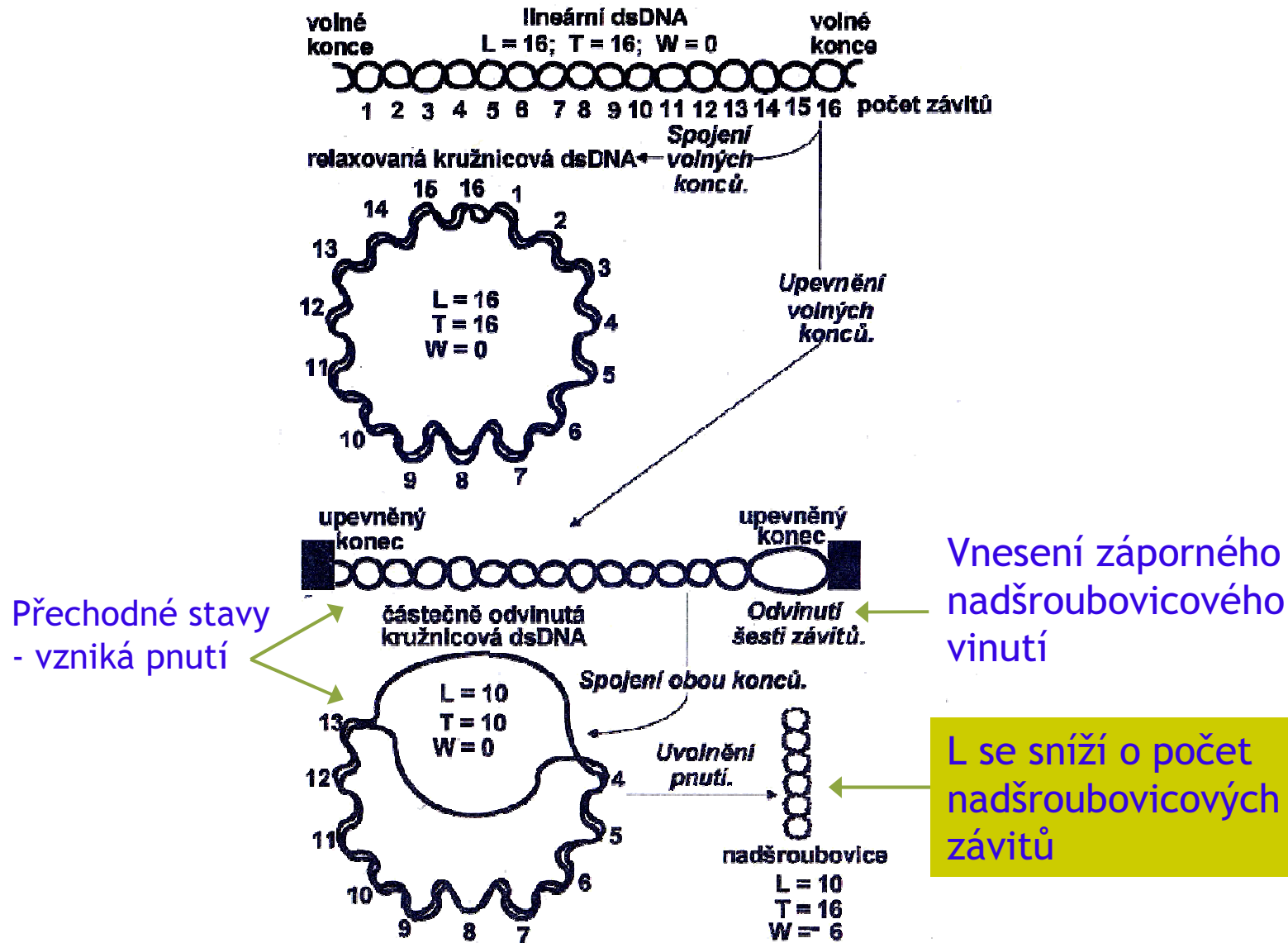
Parametry nadšroubovice



T a L jsou kladná čísla

W je záporné, když vyjadřuje počet záporných nadšroubovicových závitů, nebo kladné, jestliže vyjadřuje počet kladných nadšroubovicových závitů

Příklad vztahů mezi veličinami L, T a W



Přechod relaxované uzavřené dsDNA do nadšroubovice nebo toroidní (solenoidní) dsDNA

Uzavřená relaxovaná pravotočivá dsDNA

- Zavedení záporného nadšroubovicového vinutí. Ubírání závitů (odvinování).
- Zavedení kladného nadšroubovicového vinutí. Přidávání závitů (svinování, překrucování).



Záporná nadšroubovice

- Má záporné vinutí.
- Je pravotočivá.
- Proti relaxované dsDNA má nižší hodnotu L.

$$L < L_0$$



levotočivá

toroidní (solenoidní) dsDNA



Kladná nadšroubovice

- Má kladné vinutí.
- Je levotočivá.
- Proti relaxované dsDNA má vyšší hodnotu L.

$$L > L_0$$



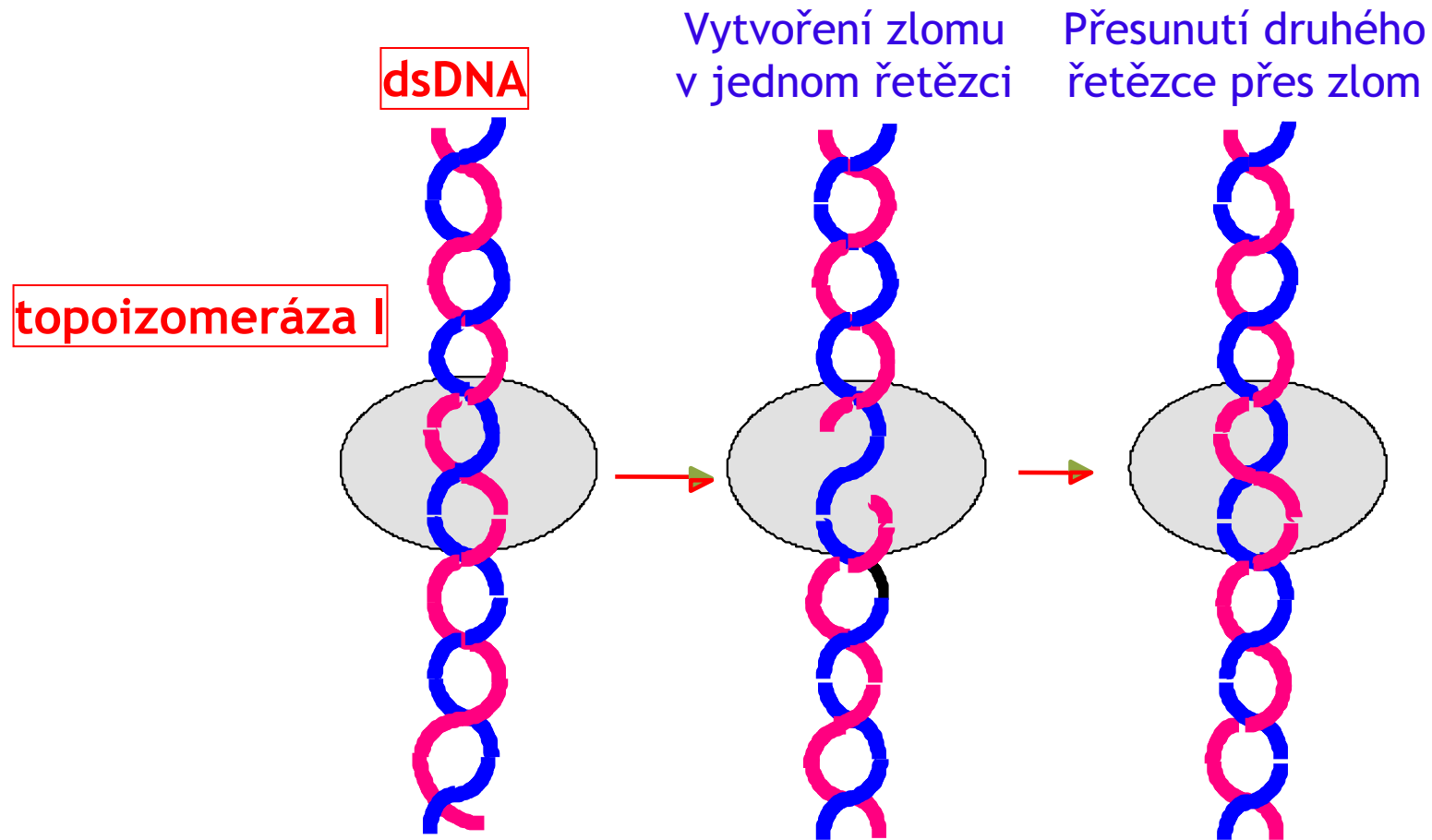
pravotočivá

toroidní (solenoidní) dsDNA

L = celkové číslo vinutí po svinování nebo odvinování

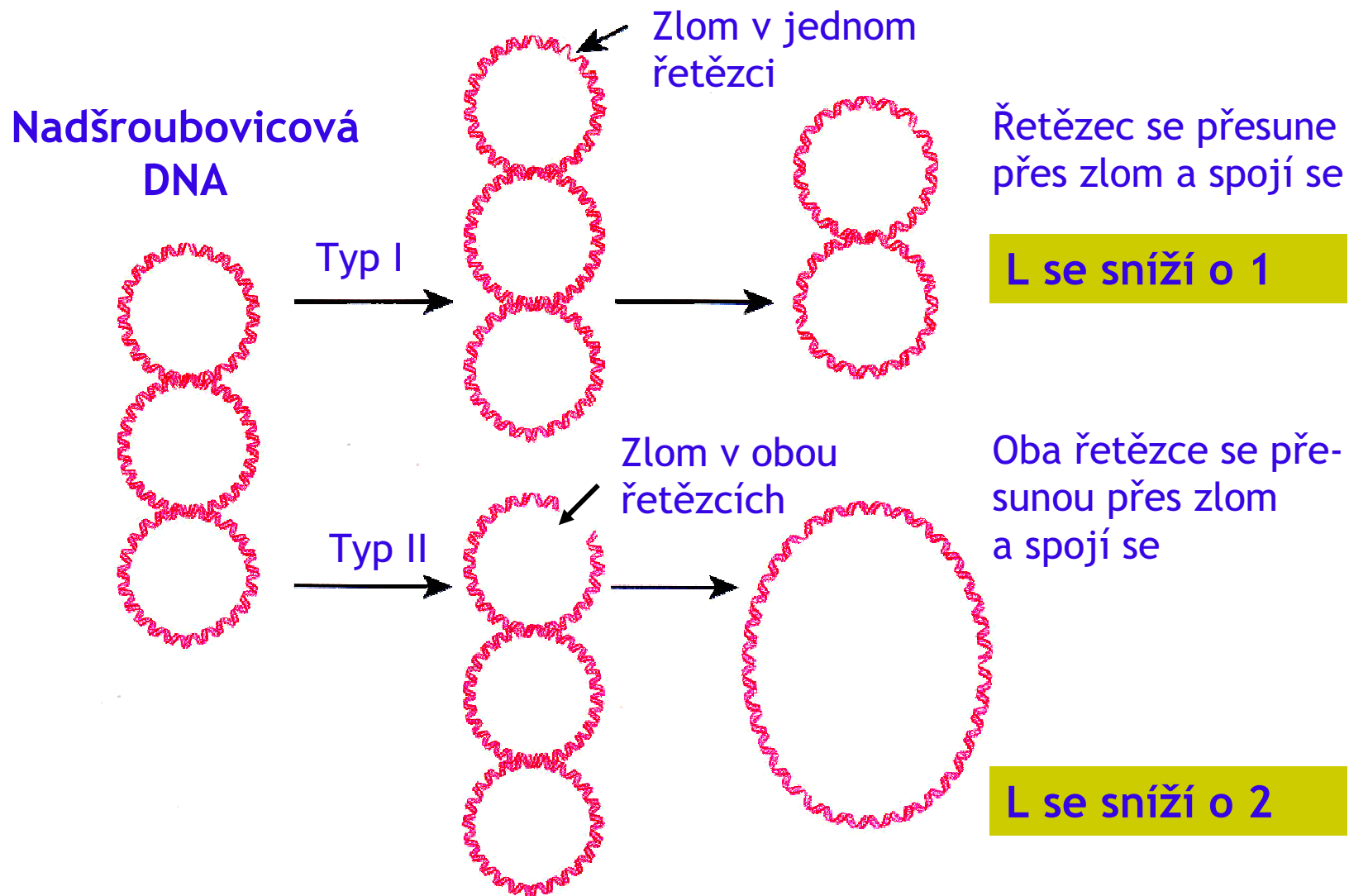
L_0 = celkové číslo vinutí před svinováním nebo odvinováním

Účinek topoizomerázy I



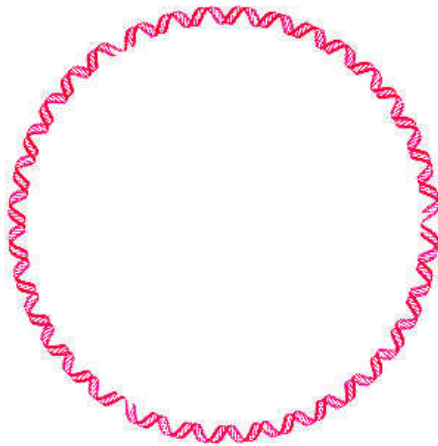
zlom = přerušení fosfodiesterové vazby mezi sousedními bázemi

Mechanismus účinku topoizomeráz I a II typu

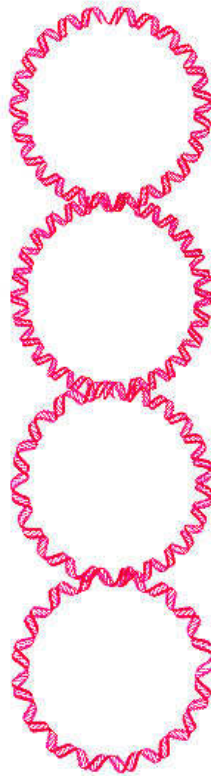


Nadšroubovicové uspořádání dsDNA

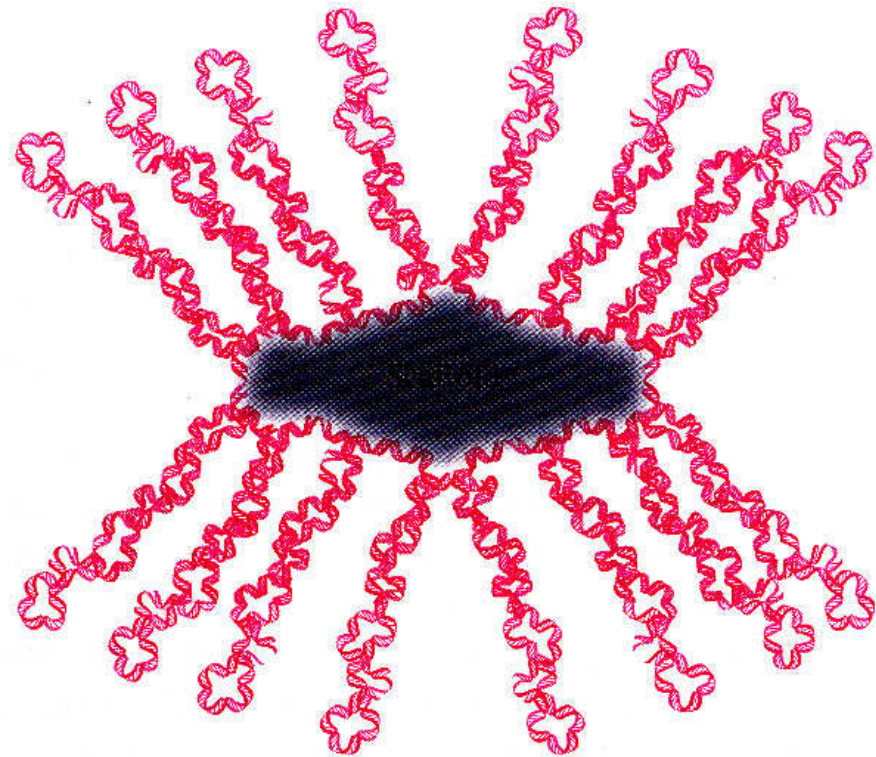
Kružnicová uzavřená
DNA (relaxovaná)



Nadšroubovicová
DNA (negativní)



Nadšroubovicové uspořádání
DNA - bakteriální chromozom



Typy sekvencí zodpovědné za vznik alternativních struktur

- Jedinečná DNA sekvence:AATGCTGATGTCTGACTCGGA...
- Repetitivní (opakující se) sekvence neboli repetice

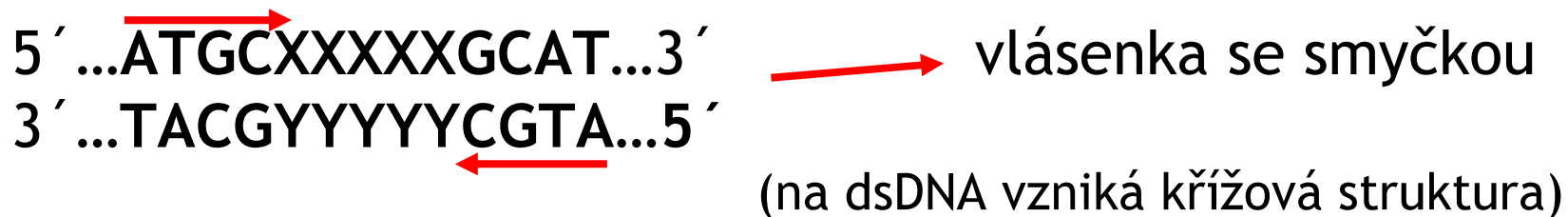
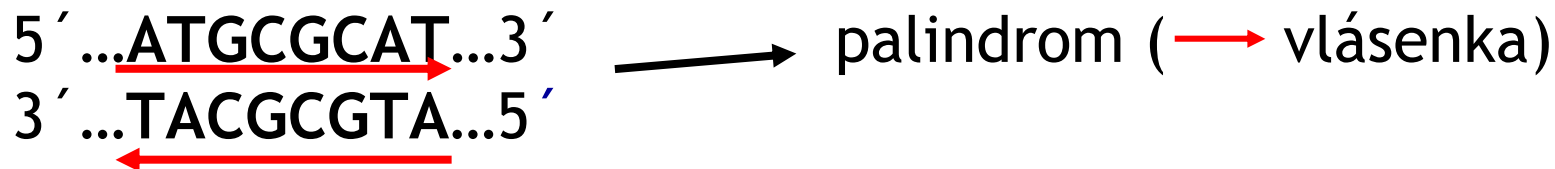
(jednotka repetice, délka jednotky repetice, četnost repetice).

ATG...ATG...ATG...ATG...

(jednotka = ATG, délka = 3 nukleotidy, četnost = 4x)

- Tandemová repetice ..ATGC**ATGC**ATGC..
- Přímá repetice (5'ATGC.....ATGC.....3') opakuje se na témže řetězci ve stejném směru (5' → 3')

Obrácená repetice (opakuje se na druhém řetězci v obráceném směru - potenciál pro vytvoření vlásenky nebo vlásenky se smyčkou)



- Dlouhá koncová repetice (sekvence LTR)



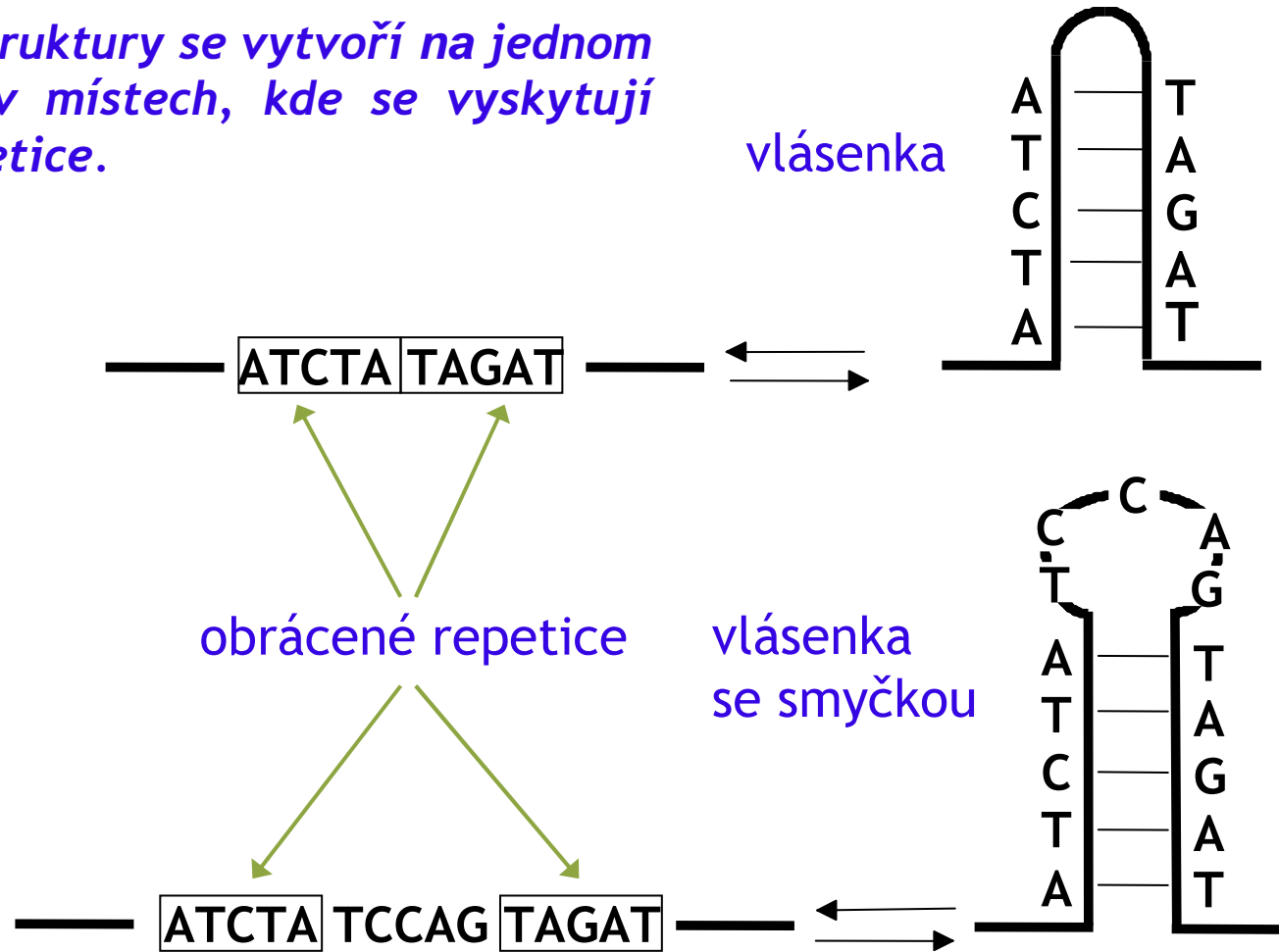
LTR = long terminal repeat

(madam; Karla zamazal rak, tahat)

(a dál vidí lítat netopýry potentát i lid i vláda)

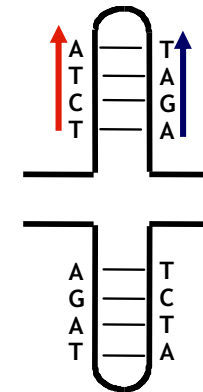
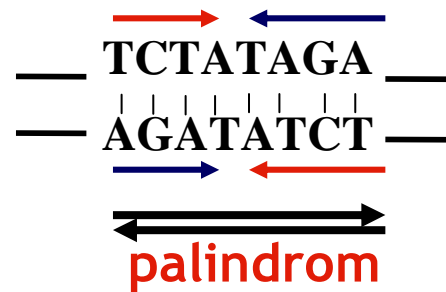
Schéma vlásenkových struktur DNA (RNA)

Vlásenkové struktury se vytvoří na jednom řetězci DNA v místech, kde se vyskytují obrácené repetice.

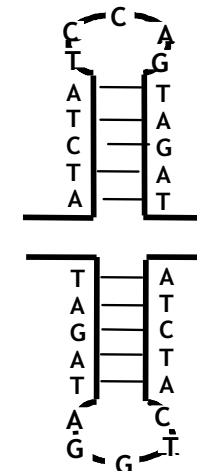


Vznik křížových struktur

křížová struktura bez smyčky



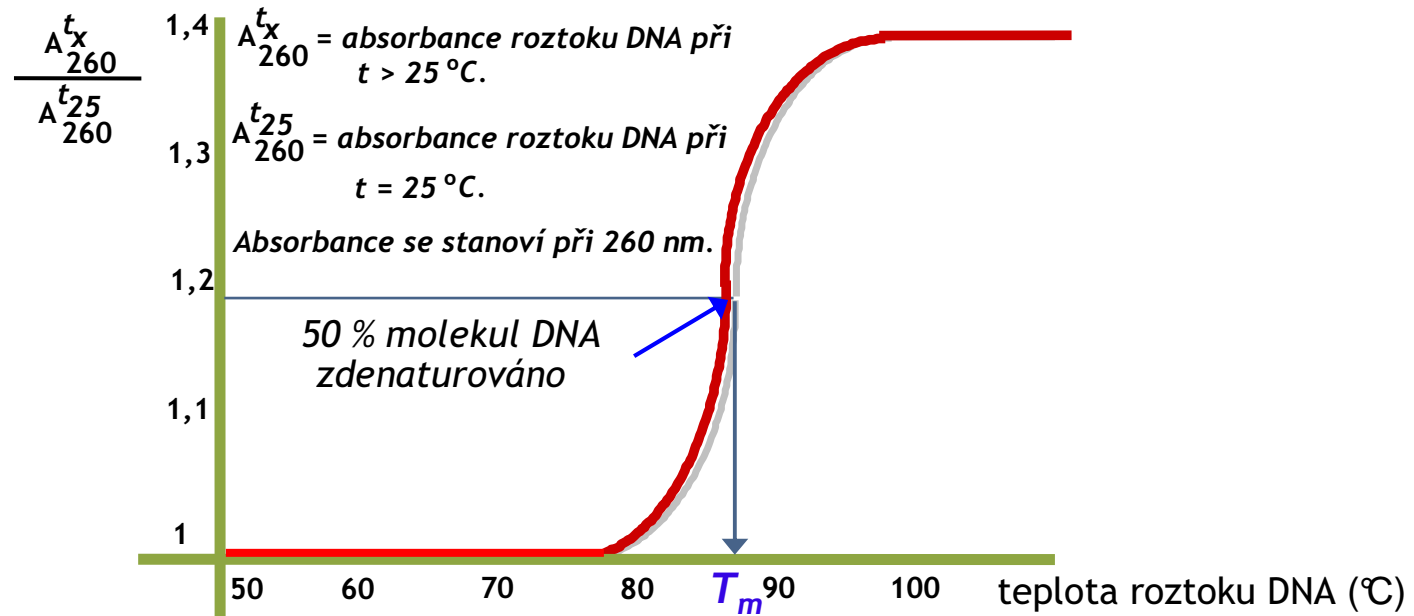
křížová struktura se smyčkou



Denaturace a renaturace dsDNA

- denaturace dsDNA = přechod dsDNA na ssDNA, opačný pochod = renaturace
- k denaturaci dsDNA dochází zvyšováním teploty roztoku, k renaturaci snižováním teploty (nebo změnou pH prostředí z neutrální hodnoty na alkalickou nebo kyselou)
- denaturace dsDNA se projevuje **hyperchromním efektem**, tj. zvýšením absorbance UV-světla o vlnové délce 260 nm.
- **hodnota T_m** nebo-li **teplota tání** = teplota, při které zdenaturovalo 50% molekul dsDNA - závisí na obsahu bází

Denaturační křivka dsDNA



V definovaném roztoku např. platí, že $T_m = 69,3 + 0,41 (GC)$.

Odtud $GC = \frac{T_m - 69,3}{0,41}$

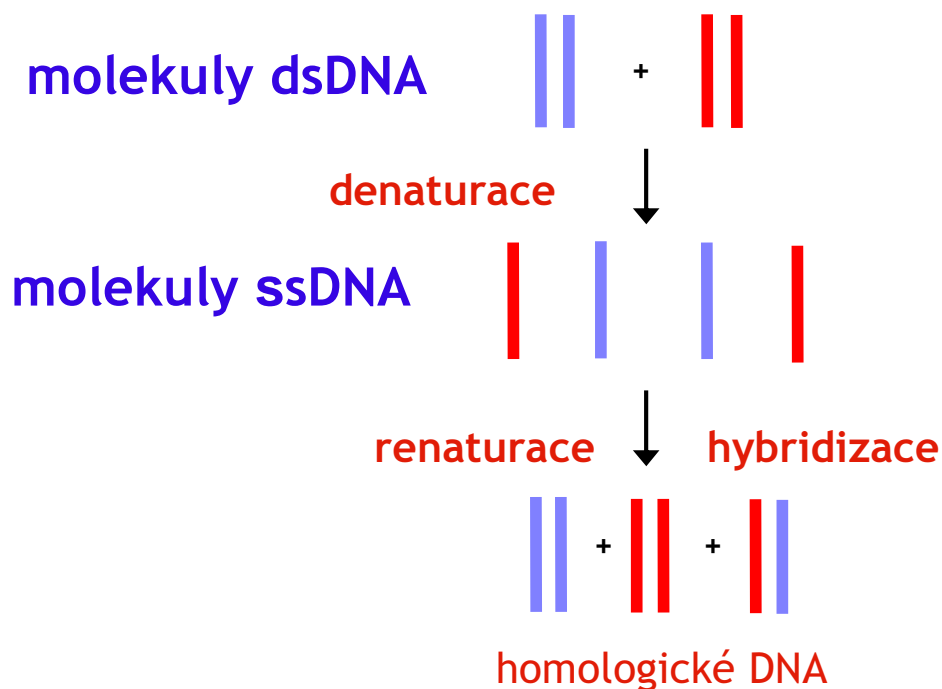
GC = molární podíl guaninu a cytozinu v DNA,
 69,3 a 0,41 jsou empiricky stanovené koeficienty;
 pro poly(AT) $T_m = 69,3$.

Další metody stanovení %GC

Ultracentrifugace v CsCl

HPLC

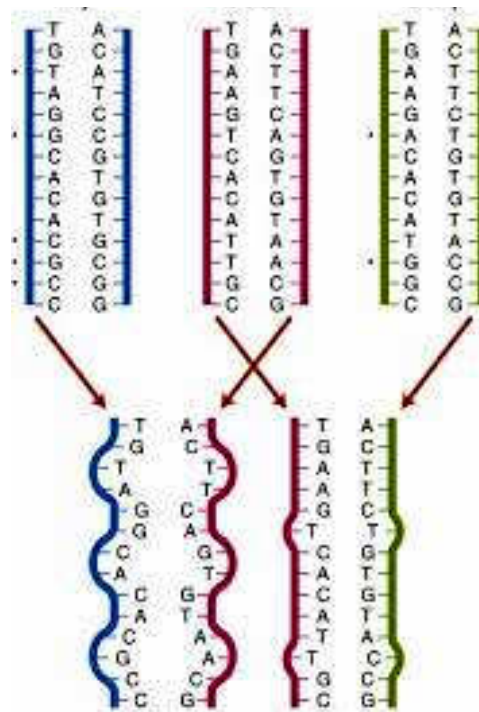
Denaturace, renaturace a hybridizace molekul dsDNA



Čím více se hybridizující molekuly shodují v sekvencích neboli čím vyšší je jejich sekvenční homologie, tím je větší pravděpodobnost jejich hybridizace.

Výsledek hybridizace DNA různých organismů

drosfila člověk šimpanz



nízká vysoká

sekvenční homologie