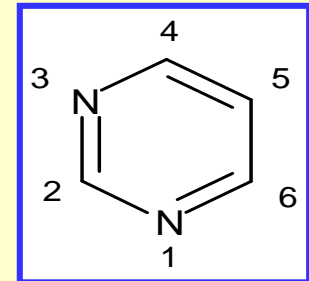


Modifikace nukleových kyselin

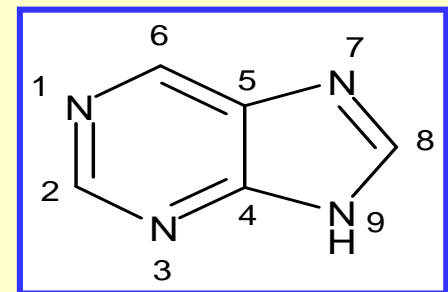
- nukleové kyseliny (DNA a RNA) jsou tvořeny z jednotlivých nukleotidů spojených fosfodiesterovou vazbou mezi sacharidovými kruhy

- základní složkou jsou **báze**

- pyrimidinové (C cytosin, T thymin a U uracil)

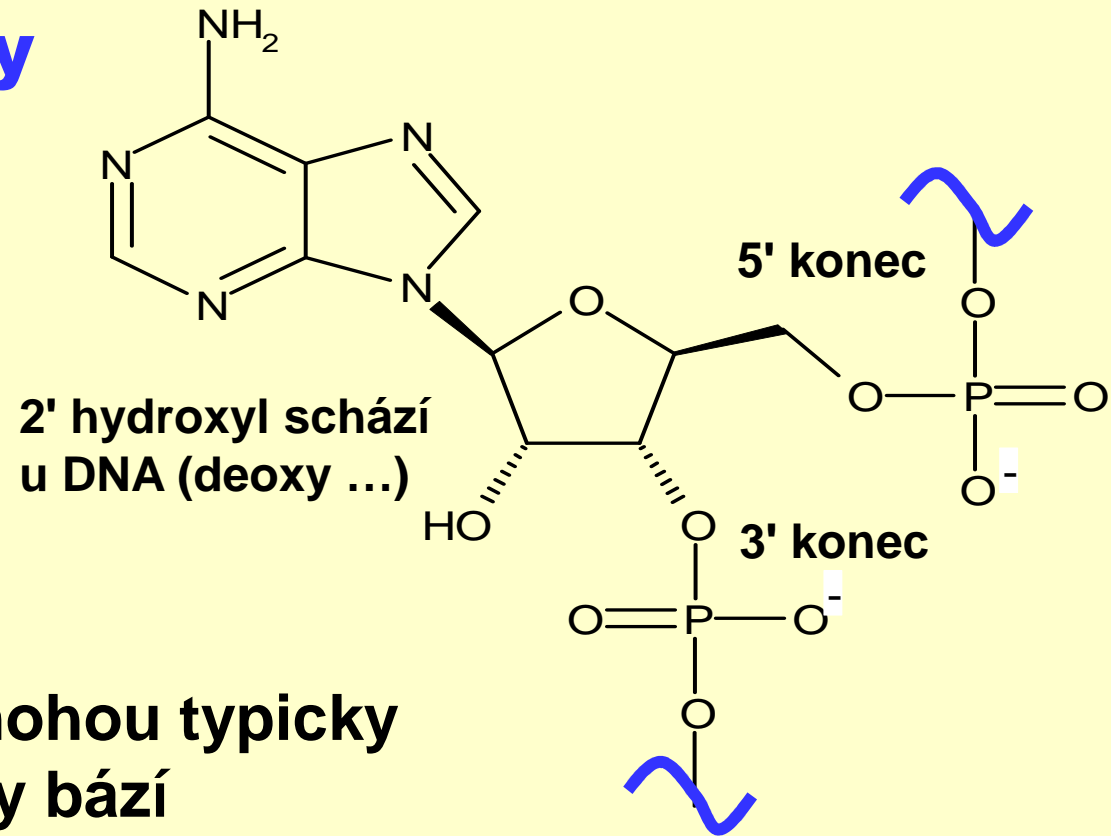


- purinové (A adenin, G guanin)



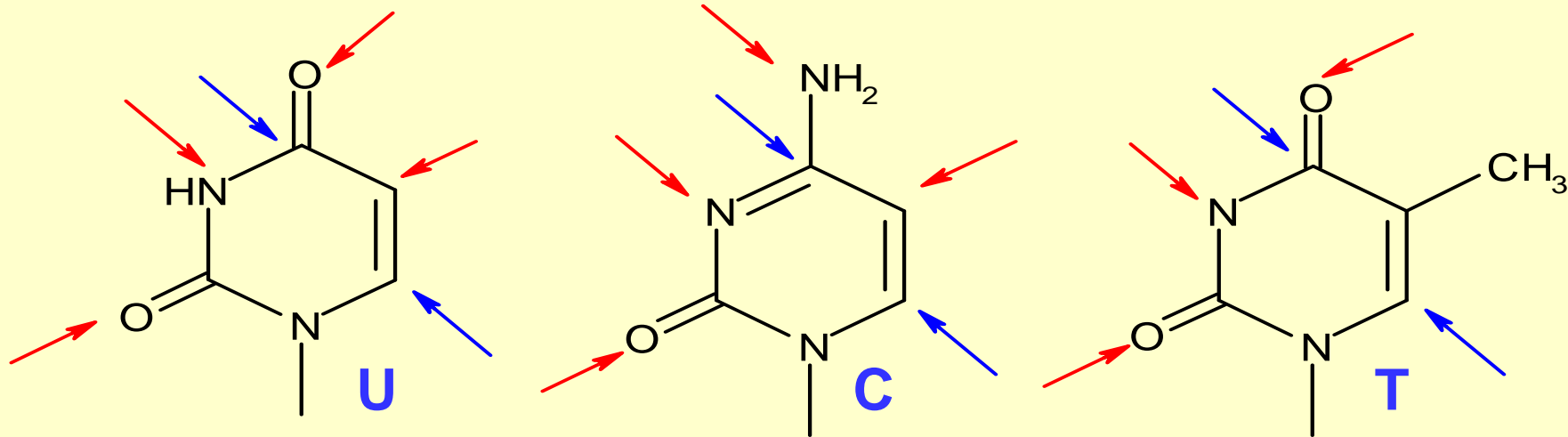
- spojením s molekulou sacharidu (ribosa nebo deoxyribosa) poskytují **nukleosidy** (např. Ade adenosin nebo dAde deoxyadenosin)
- připojením fosfátu vznikají **nukleotidy** (např. AMP adenosin monofosfát).

Nukleové kyseliny

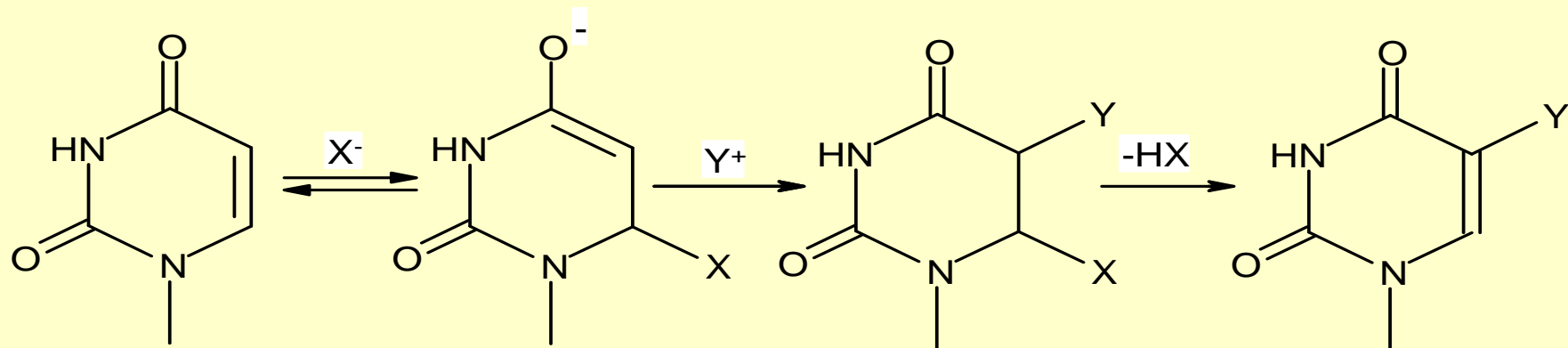


- modifikační reakce mohou typicky směřovat na molekuly bází
- méně časté je využití sacharidové části (2' hydroxyl u RNA)
- velmi běžné je připojení dalších funkčních molekul na konec řetězce nukleové kyseliny

Pyrimidinové base

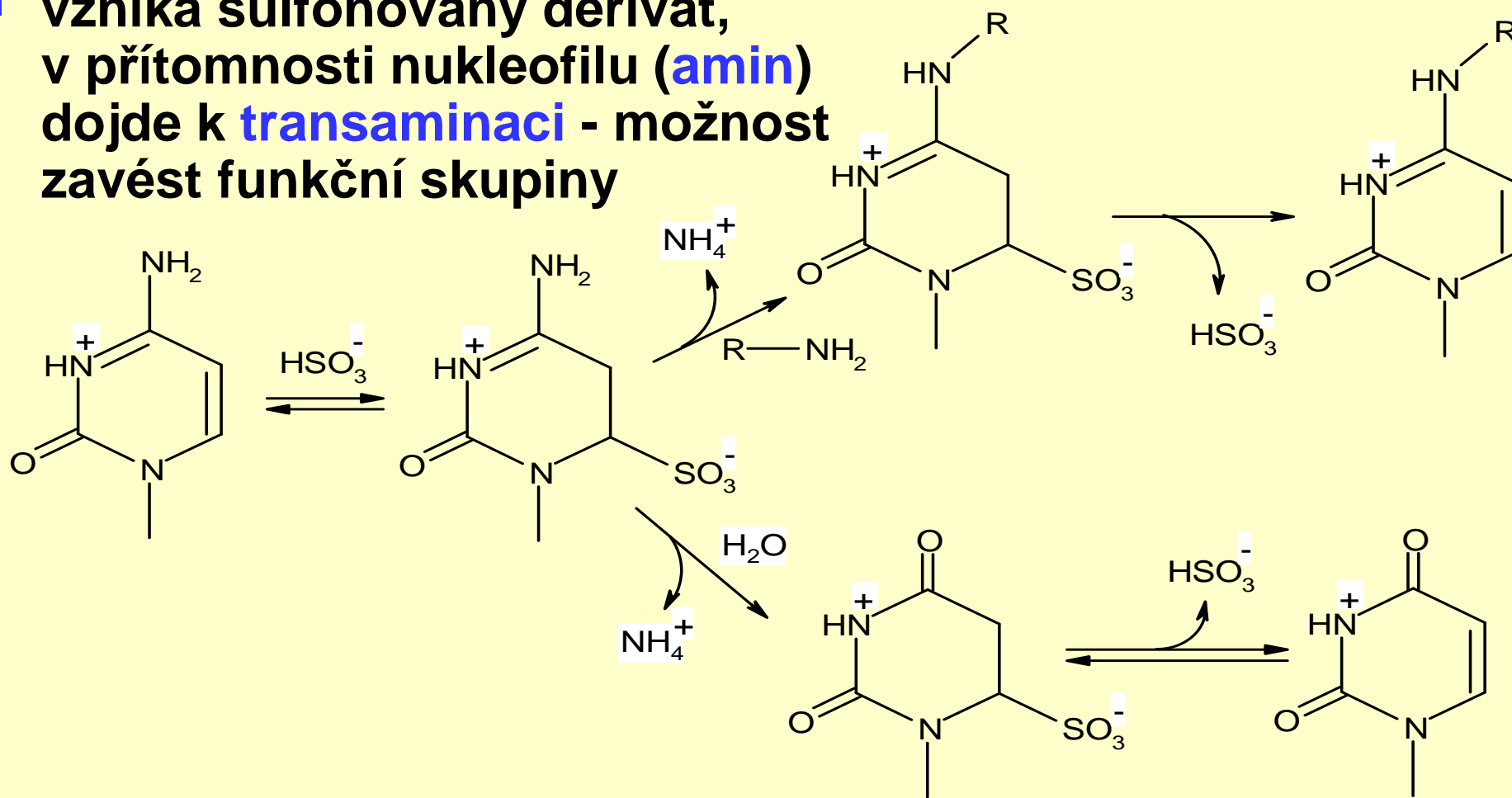


- části jejich molekul mohou být cílem ataku **elektrofilních (červeně)** i **nukleofilních (modře, pozice 4 a 6)** činidel
- v molekule uracilu nukleofilní substituce v C6 pozici následně aktivuje C5 pozici pro elektrofilní atak:



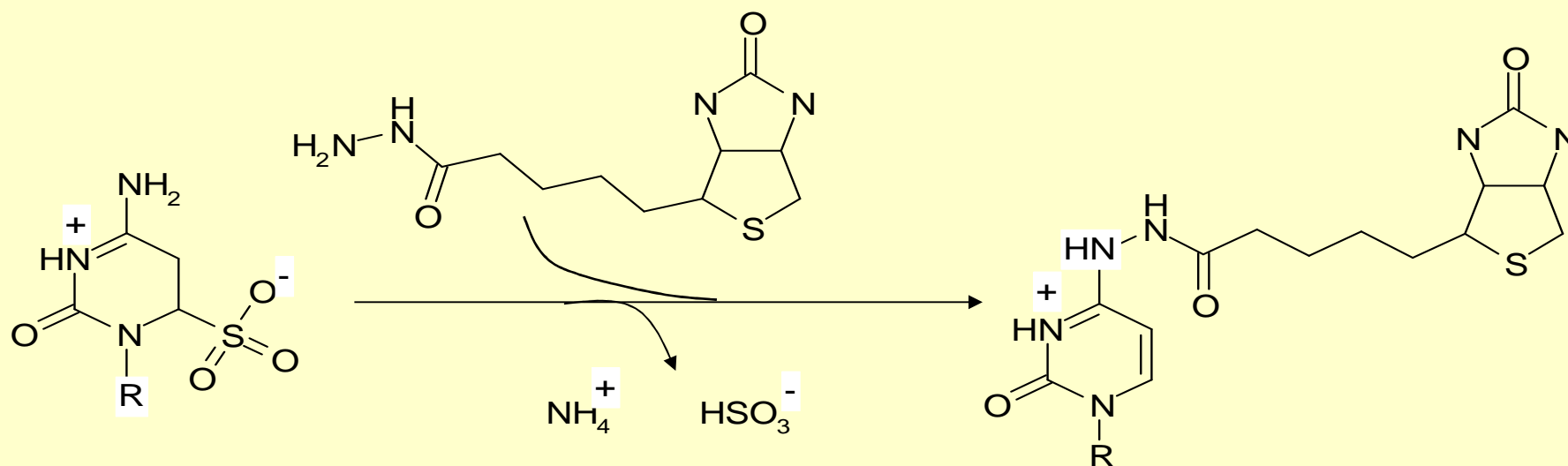
Reakce cytosinu s hydrogensířičitanem

- vzniká sulfonovaný derivát, v přítomnosti nukleofilu (**amin**) dojde k **transaminaci** - možnost zavést funkční skupiny



- v slabě kyselém prostředí pak dojde k hydrolyse aminoskupiny na C4 a následně po alkalizaci se odštěpí hydrogensířičitan - proběhla **konverze na uracil**

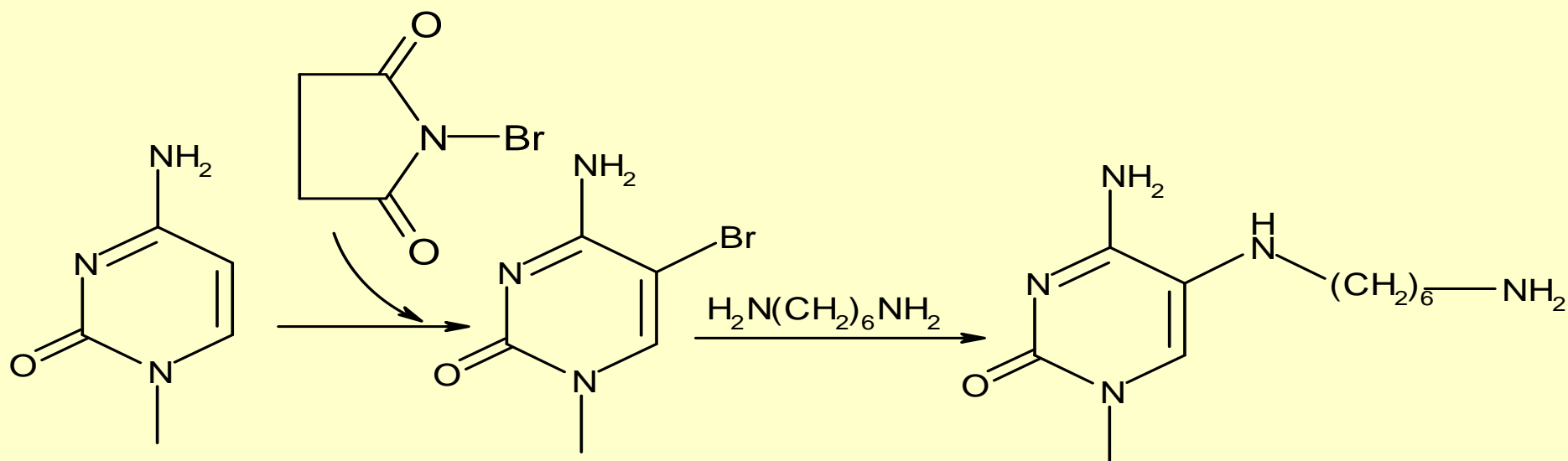
Biotinylace cytosinu



- reaktivní adukt cytosinu s hydrogensířičitanem se v reakci s **biotin-hydrazidem** přemění na žádaný derivát

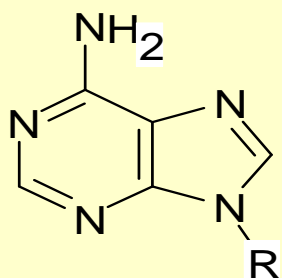
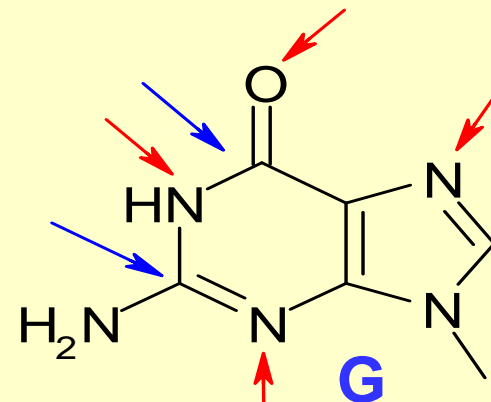
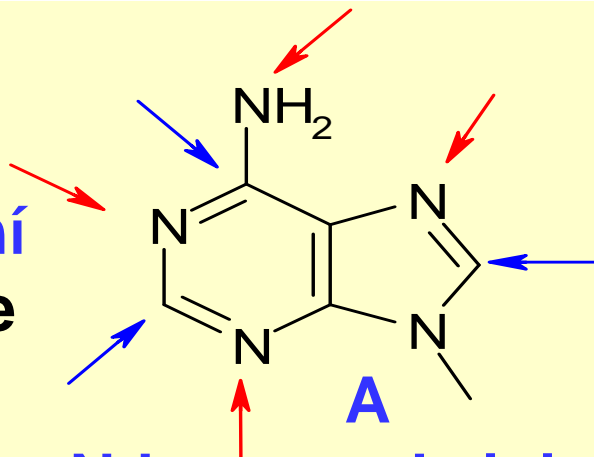
Cytosin - halogenace

- možností vpravení vhodné reaktivní aminoskupiny v postranním řetězci je halogenační reakce
- vodný roztok jodu nebo bromu, případně pomocí **N-bromosukcinimidu**
- poslední krok je substituce diaminem:

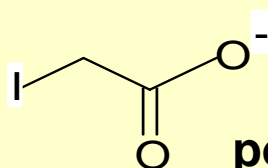


Purinové base

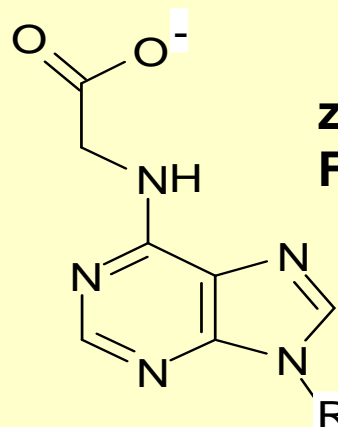
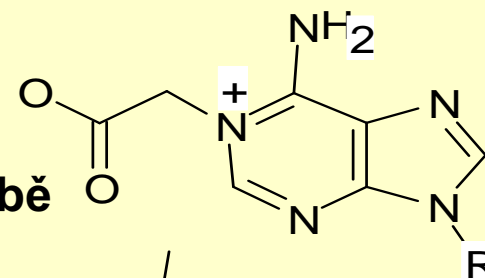
- pozic pro **nukleofilní** i **elektrofilní** ataky je celá řada
- halogenační reakce s **N-bromosukcinimidem** poskytuje brom v pozici C-8 jak v případě adeninu, tak guaninu
- reakce s **kyselinou jodoctovou**:



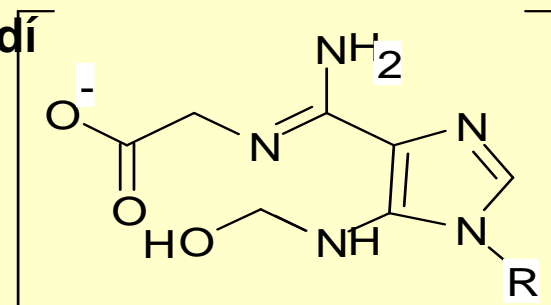
+



pomalá alkylace v slabě kyselém prostředí



zvýšená teplota, alk. prostředí
Fischer-Dimrothův přesmyk

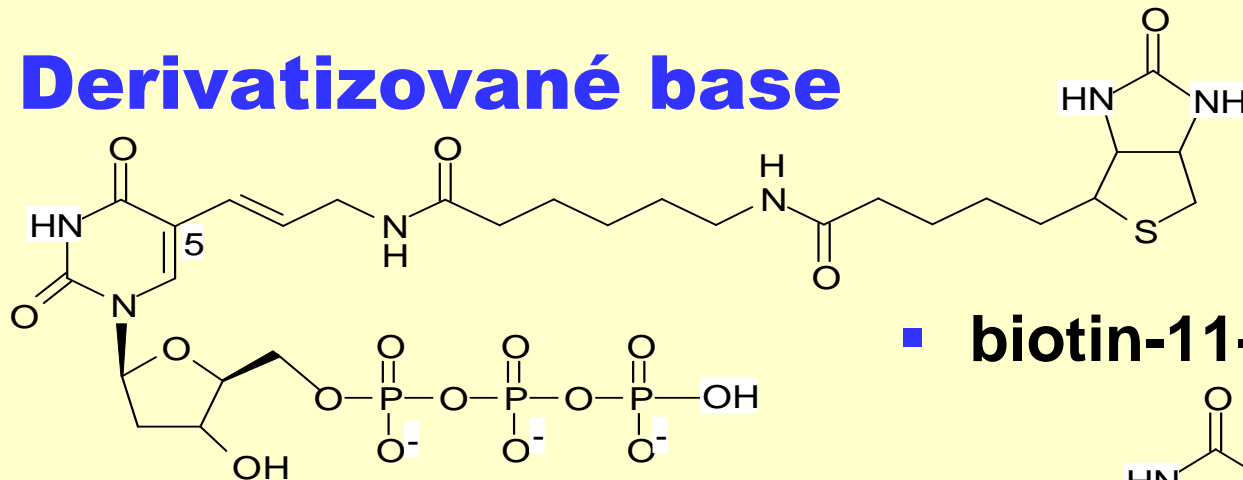


karboxyskupina na N6

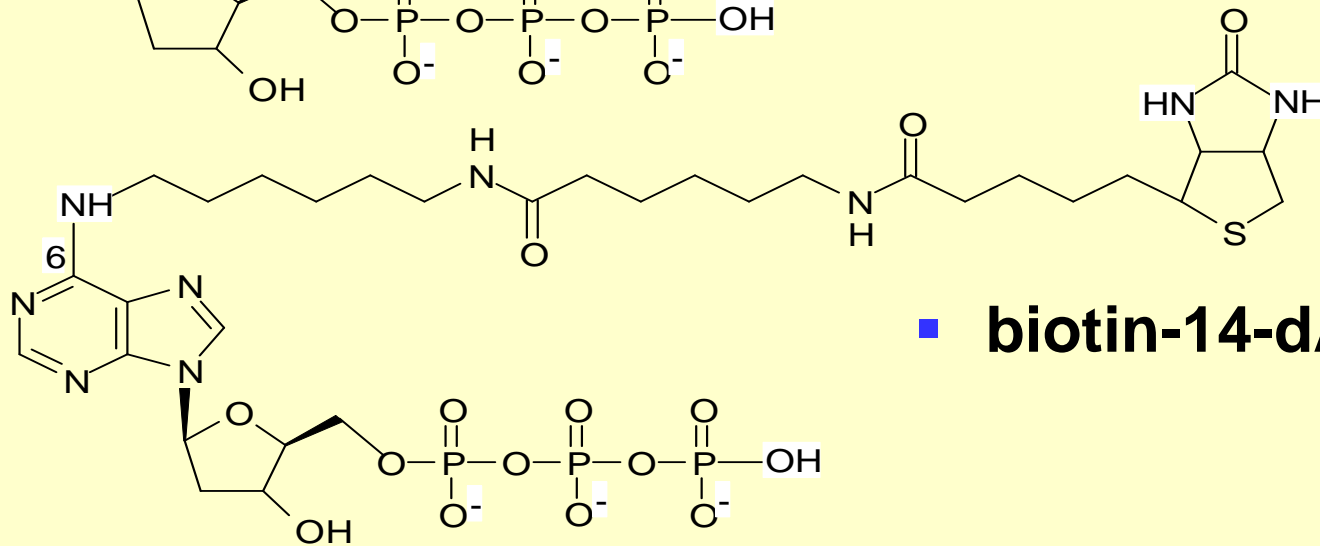
Modifikace DNA

- in vitro enzymová syntéza **DNA polymerasou** pomocí komplementárního templátového vlákna
- do reakční směsi se přidají pozměněné nukleotidy, schopné párování, které tak do struktury DNA vnesou žádané funkční skupiny
- je-li vyžadováno správné párování, tak stupeň substituce max. 30-40 modifikovaných míst/1000 bází
 - derivatizace na cukr-fosfátové kostře nebo na koncích vlákna párování nevadí
- pozměněné base - deriváty s biotinem, nebo methylenový řetězec s volnou aminoskupinou
 - menší modifikace - není ovlivněna rychlost připojování bází
- mnohočetné včlenění značených bází může být nevýhodné pro hybridizační reakci

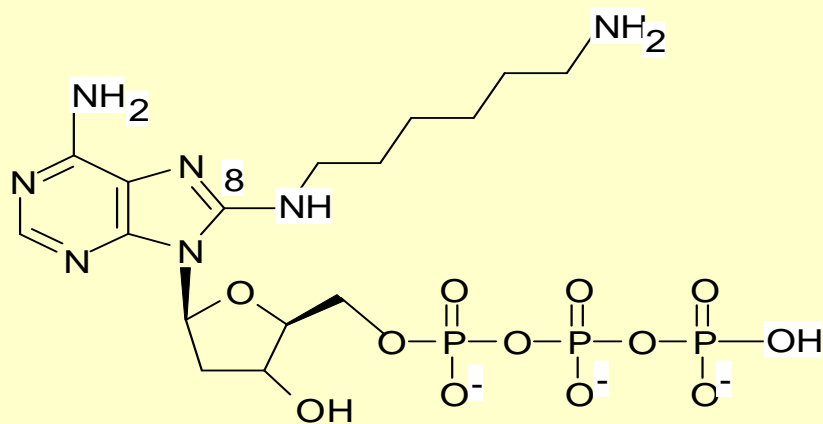
Derivatizované base



■ biotin-11-dUTP



■ biotin-14-dATP



■ 8-aminohexyl-dATP

Metoda náhodných primerů

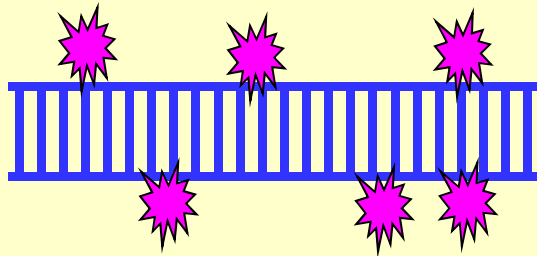
- směs náhodných hexanukleotidových úseků sloužících jako 3'-OH primery s templátovou DNA
- modifikované nukleotidy se připojují pomocí **DNA polymerasy I**
 - pouze **Klenowův fragment**, který postrádá 5'-3' exonukleasovou aktivitu přítomnou v nativním enzymu z *E. coli*
- výsledkem je náhodné včlenění značených bazí

Nick-translace

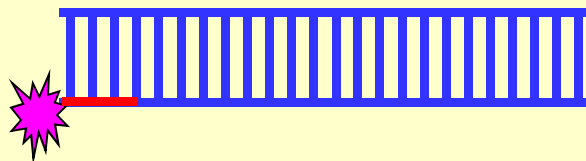
- nick-translační značení účinkuje na dvojitou šroubovici
- směs pankreatické **deoxyribonukleasy I** (DNasa I) a **DNA polymerasy I**
- v přítomnosti Mg^{2+} DNasa (v limitujícím množství) provádí hydrolýzu pouze v jednom vlákně
- vzniklé štěpy jsou však ihned zaplněny přítomnými modifikovanými i nativními nukletidovými monomery za katalysy DNA polymerasy
- výsledkem je modifikace původní molekuly dsDNA

Značení v průběhu PCR

- nejúčinnější metodou je provést značení DNA v průběhu polymerasové řetězové reakce (PCR)
 - současně se samozřejmě zmnoží množství původní DNA
- buď se do reakční směsi prostě přidají **značené nukleotidy** a jsou náhodně vestavovány do nově syntetizovaných řetězců

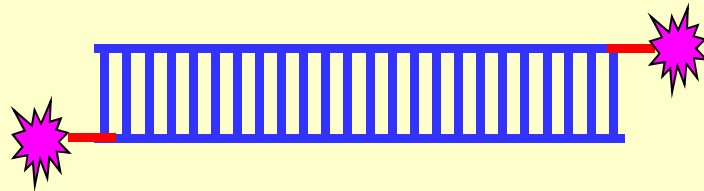


- nebo je možné použít pouze **značené primery** (např. biotinylované)



Koncové značení

- cílem je zamezit modifikaci uprostřed řetězce DNA
- využití **terminální transferasy** - přidává nukleotidy ke 3'-OH koncům DNA bez potřeby templátového vlákna
- např. také pro radioaktivní značení

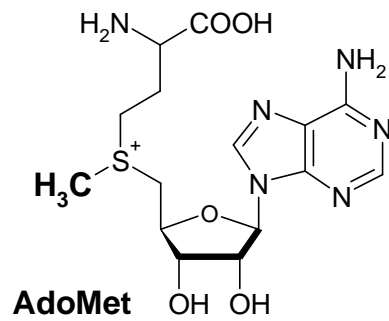
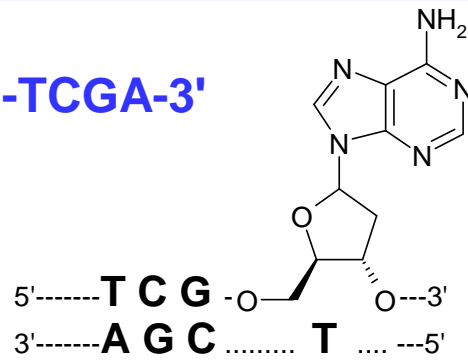


Sekvenčně-specifické značení

- rozpoznání cílového místa, vytvoření kovalentní vazby se značkou
- **DNA methyltransferasy (MTasy)** - přenáší methylovou skupinu z S-adenosyl-L-methioninu (AdoMet) na A nebo C zbytky
- methylová skupina se nahradí něčím "užitečnějším" - aziridinový reaktivní zbytek pro vytvoření kovalentní vazby s DNA v průběhu enzymové methylace, biotinová skupina připojena v postranní části
- značení DNA v předem určeném místě, daném polohou cílové sekvence MTasy

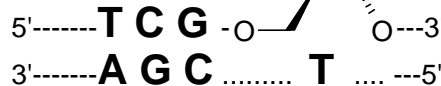
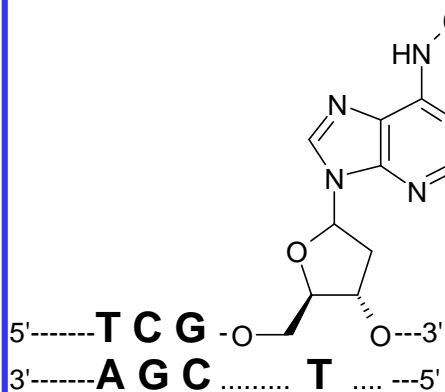
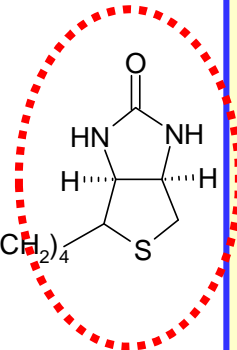
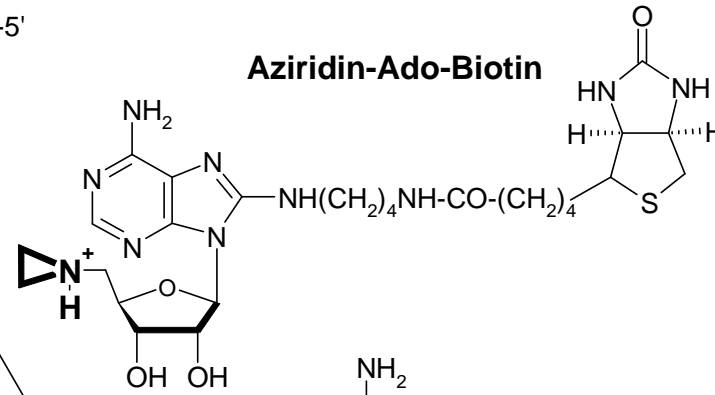
Značení pomocí methyltransferasy

cílová sekvence 5'-TCGA-3'



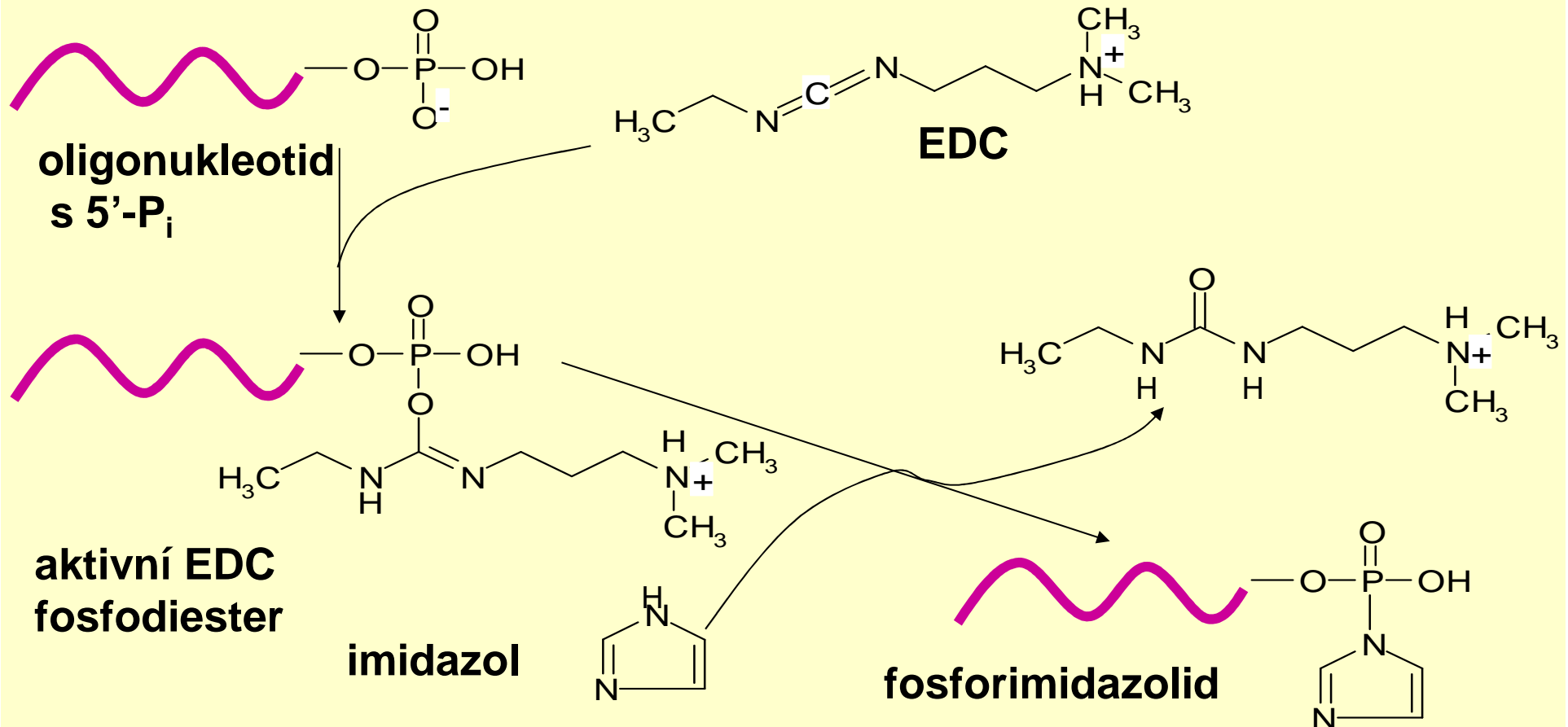
M-TaqI

Aziridin-Ado-Biotin



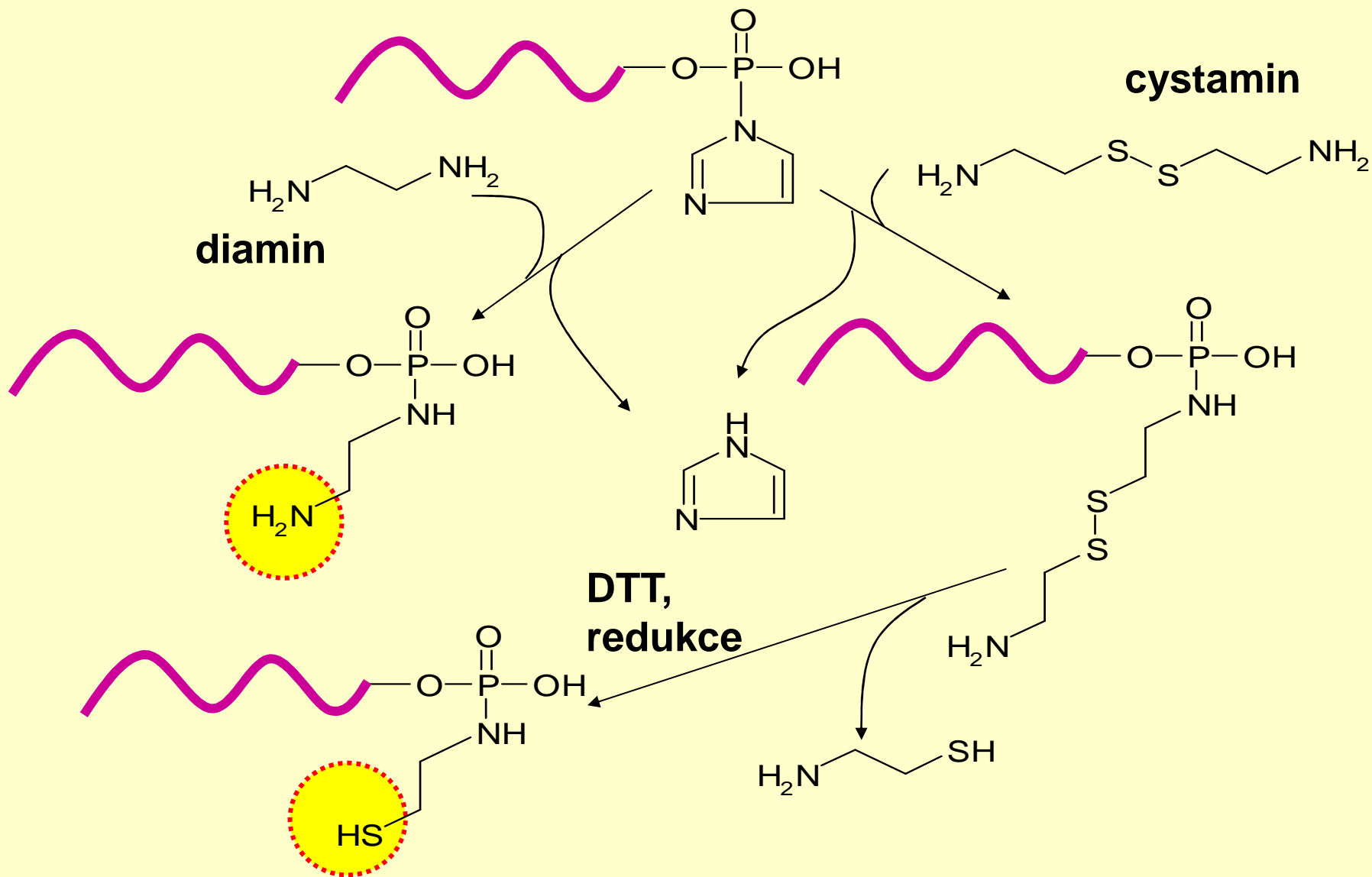
Fosforamidová metoda

- aktivace konc. fosfátu EDC vede s aminy k fosforamidům
- reakci lze provést také s **imidazolem**, čímž vznikne fosforimidazolidový produkt
 - má ve vodném prostředí prodlouženou životnost a reaguje velmi dobře s aminy - vyšší výtěžky fosforamidové reakce



Fosforimidazolid

- vnesení amino nebo thioskupiny na konec DNA

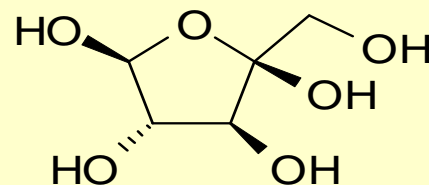
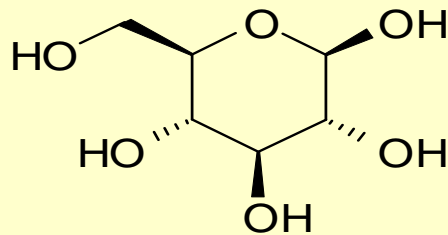


Modifikace RNA

- molekuly RNA obvykle jednořetězcové, vnitřní vzájemně komplementární krátké sekvence
- párování vede ke vzniku různých třídímenzionálních struktur (helikální úseky, smyčky, vlásenky, G-kvartety...)
- další změnou oproti DNA je existence **diolového uskupení** v molekule ribosy - lze specificky oxidovat **jodistanem**, na reaktivní aldehydové skupiny
- vhodně orientované struktury RNA (i DNA) mohou vytvářet vazebná místa, komplementární k jiným biomolekulám - **APTAMERY**
 - možnost náhrady protilátek
 - tyto vazebné struktury, tzv. aptamery, lze vytvářet uměle kombinatorickými postupy (SELEX, systematic evolution of ligands by exponential enrichment)
 - nejznámější je aptamer vážící thrombin

Modifikace sacharidů

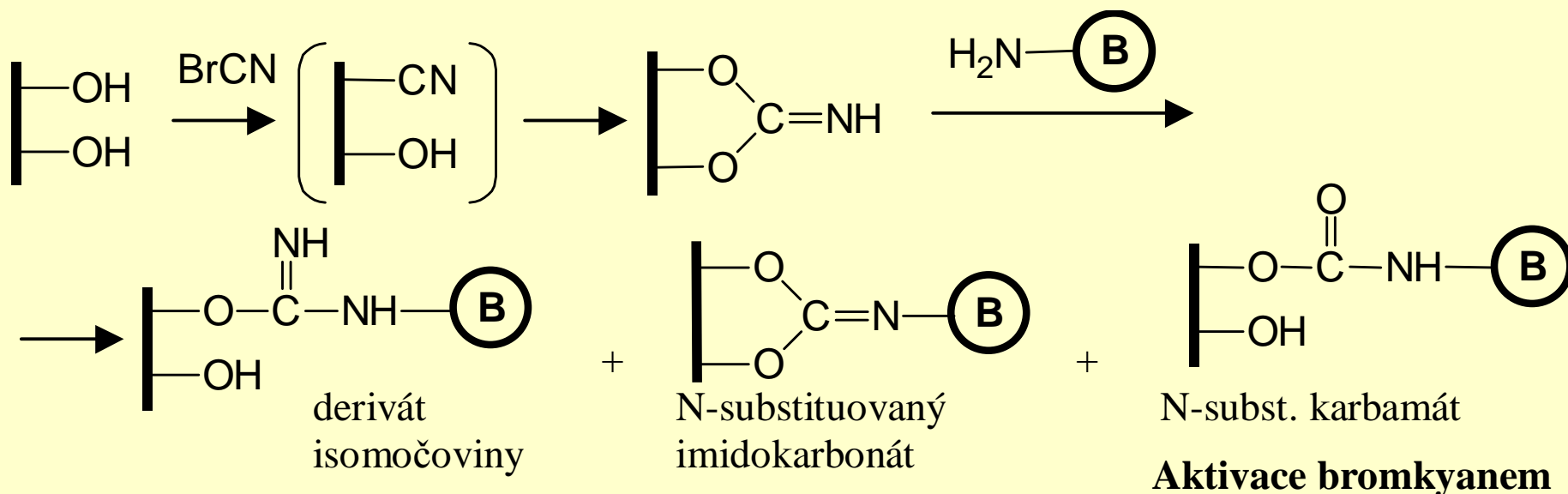
- volné existují v monomerní, oligo- a polymerní formě
- vázané ve formě konjugátů s proteiny (**glykoproteiny**) nebo lipidy (**glykolipidy**)
- reaktivní skupiny - hydroxyly a oxoskupiny
 - monosacharidy - dle polohy oxo skupiny aldosa a ketosa
 - ve vodném prostředí přítomna zejména hemiacetalová forma
 - glukosa jako glukopyranosa a fruktosa jako fruktofuranosa



- následně jsou přirozené oxoskupiny jsou méně reaktivní
- k modifikaci se využívají postranní glykosidické skupiny pokrývající povrch glykoproteinů
- velký význam má derivatizace polysacharidových matic sloužících jako stacionární fáze (separace, sensory, ...)

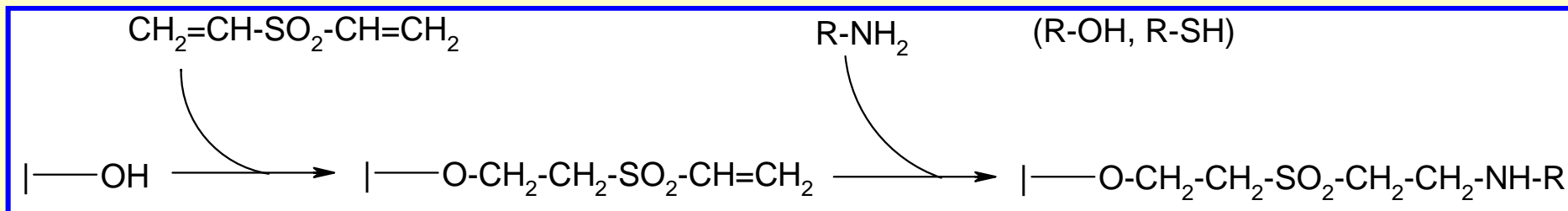
Aktivace bromkyanem BrCN

- klasická metoda aktivace polysacharidových materiálů
- nevýhodou je vysoká jedovatost činidla
- výhodou dobré výtěžky reakce
- reakce probíhá v alkalickém prostředí, rozsah je úměrný koncentraci činidla
- meziproduct imidokarbonát reaguje s aminoskupinou biomolekuly B za vzniku různých derivátů:

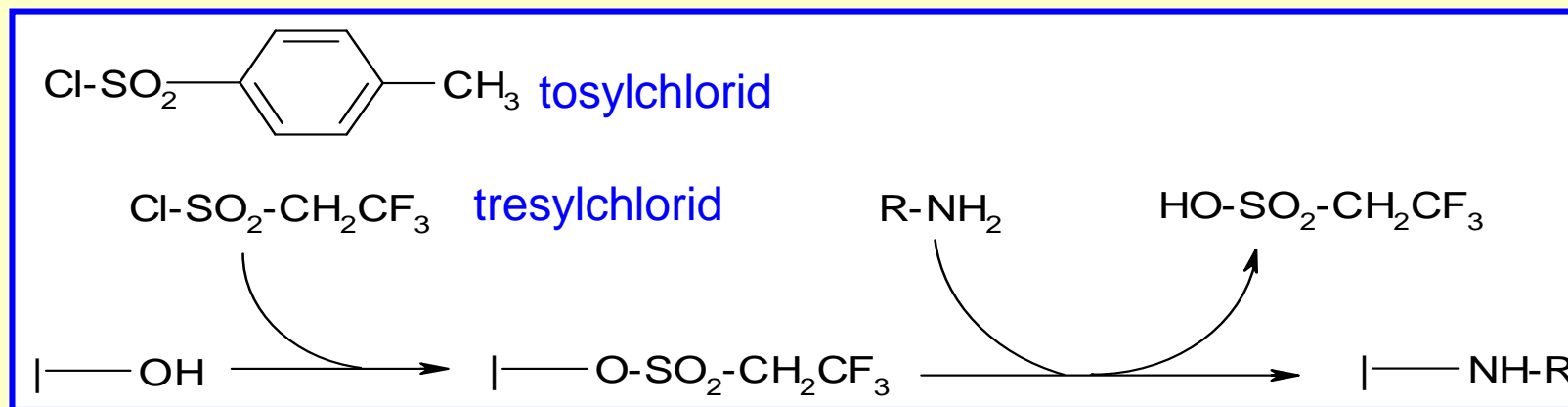


Aktivace -OH v sacharidech

- epoxyskupiny (bisoxiran, epichlorhydrin)
- bromkyanová metoda
- divinylsulfon

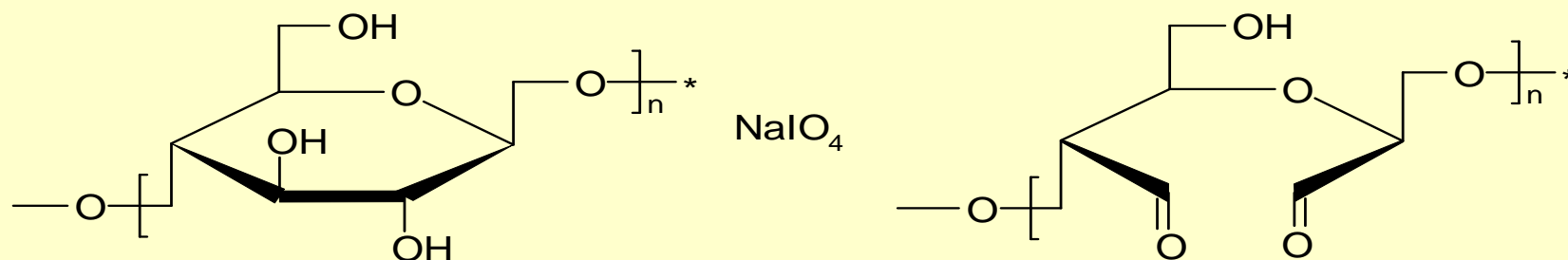


- sulfonylchloridy
 - tosylchlorid = *p*-toluensulfonylchlorid
 - tresylchlorid = 2,2,2-trifluoethansulfonylchlorid



Oxidace jodistanem

- jodistan (periodate) za mírných podmínek a v neutrálním pH účinkuje na diolová uskupení v molekule sacharidů
- vhodné i pro postranní sacharidové složky glykoproteinů
 - postup je např. často využíván k oxidaci peroxidasy při výrobě enzymových imunokonjugátů



- získají se reaktivní aldehydové skupiny