

Enzymy používané pro analýzu nukleových kyselin

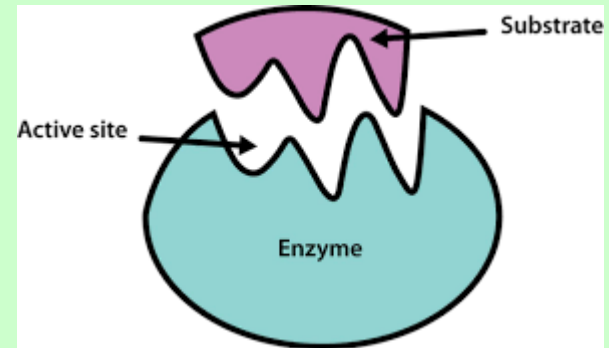
ROZDĚLENÍ

A. Podle typu substrátu

- DNA enzymy
- RNA enzymy

B. Podle typu reakce

- enzymy syntetizující NK (anabolické) = polymerázy
- enzymy odbourávající NK (katabolické) = nukleázy
- enzymy modifikující NK
- enzymy spojující molekuly NK = ligázy



Enzymy syntetizující DNA

syntetizovaná molekula	matrice	název enzymové třídy	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

Enzymy syntetizující RNA

syntetizovaná molekula	matrice	název enzymové třídy	příklad	zdrojový organismus
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	

Katabolické enzymy degradující DNA

rozkládaná molekula	typ degradace	název enzymové třídy	specifita	Příklad	zdrojový organismus
DNA	od konců	Exonukleázy	ss	Exonukleáza III	<i>E. coli</i>
			ds	Bal 31	<i>Alteromonas espejiani</i>
	uvnitř molekuly	Endonukleázy	ss	S1 nukleáza	<i>Aspergillus oryzae</i>
			ds	restrikční endonukleázy	bakterie
				DNáza I	Hovězí pankreas

ss = single stranded

ds = double stranded

Katabolické enzymy degradující RNA

rozkládaná molekula	typ degradace	název enzymové třídy	Příklad	zdroj
RNA	od konců	Exonukleázy	Fosfodiesteráza	Hadí jed
	uvnitř molekuly	Endonukleázy	Ribonukleáza A	Hovězí pankreas

Enzymy modifikující DNA

typ enzymu	příklad	zdroj
Metylázy	dam-methyláza dcm-methyláza EcoRI-methyláza	<i>E. coli</i>
Kinázy	T4-polynukleotid kináza	<i>E. coli</i> inf. fágem T4
Fosfatázy	BAP-fosfatáza	bakterie
	CIP-fosfatáza	Hovězí střevo

Enzymy spojující molekuly DNA

typ enzymu	příklad	zdroj
ligázy	T4-DNA-ligáza	<i>E. coli</i> inf. fágem T4

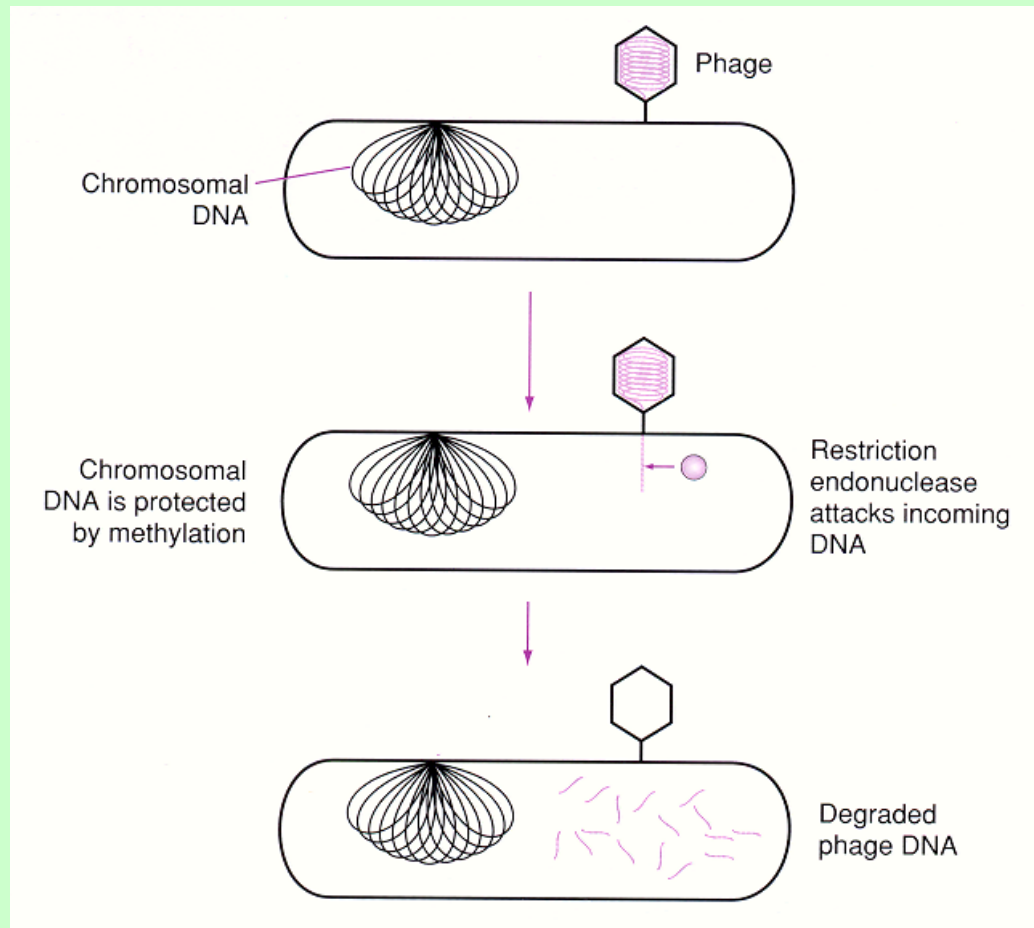
Restrikční endonukleázy (RE)

Video, restrikční
endonukleáza a
ligáza

<https://www.youtube.com/watch?v=937F0mIkjp8>

- součást restrikčně modifikačních systémů bakterií
- omezují propagaci bakteriofágů v různých bakteriálních kmenech (např. fág namnožený v *E.coli* kmeni C nemůže účinně infikovat *E.coli* kmen K – degradace fágové DNA)
- DNA hostitelské buňky je před účinkem vlastní endonukleázy chráněna metylací
- původní význam RE: ochrana před cizorodým genetickým materiálem

Restrikce bakteriofága



Význam restričních endonukleáz

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

Vlastnosti RE

- štěpí dvouřetězcové molekuly DNA ve specifických místech
- většina RE rozeznává palindromy (obrácené repetice)
- štěpí oba řetězce DNA
- rozdělují se do tříd I, II, III a IV



RE třídy II mají praktické využití

- vážou se na specifické (4-6 pb) sekvence nukleotidů
- katalyzují štěpení dvou řetězců molekuly DNA uvnitř vazebného místa nebo v jeho bezprostředním sousedství
- k štěpení dochází vždy ve stejném místě
- štěpení se podrobují všechna cílová místa v dané molekule DNA
- rozeznávací sekvence mají téměř vždy charakter obrácených opakování: stejná sekvence je štěpena ve stejném místě v obou řetězcích
- molekulová hmotnost: 20.000 - 100.000
- kofaktor: pouze ATP

Charakter cílových míst RE třídy II

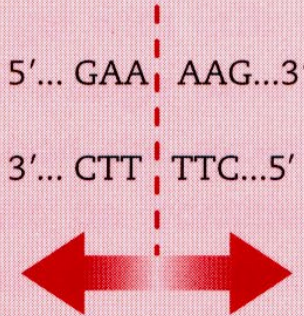
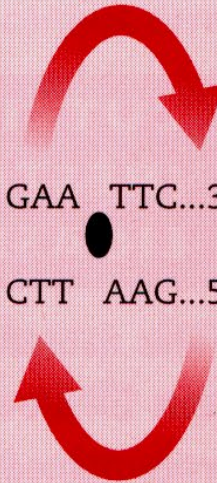
5'... GAATTC...3'
3'... CTTAAG...5'

=

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 je důležitá

5 ... **NGAATTC**N...
3 ... NCTTAAGN...

+ EcoRI



... **NG** | p**AATTC**N...
... NCTTAAGN... | GN...

5 ... NCTTAAGN...
3 ... **NGAATTC**N...

+ EcoRI



... NCTTAAGN...
... **NGAATTC**N... (no digestion)

5 ... NCTTAAGN...
3 ... **NGAATTC**N...

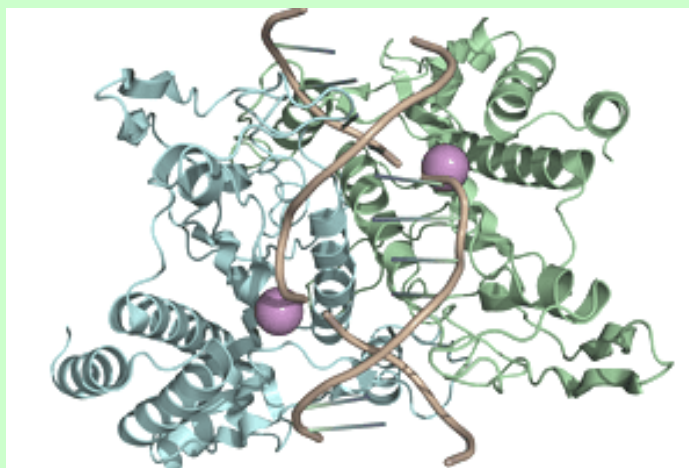
+ AflIII

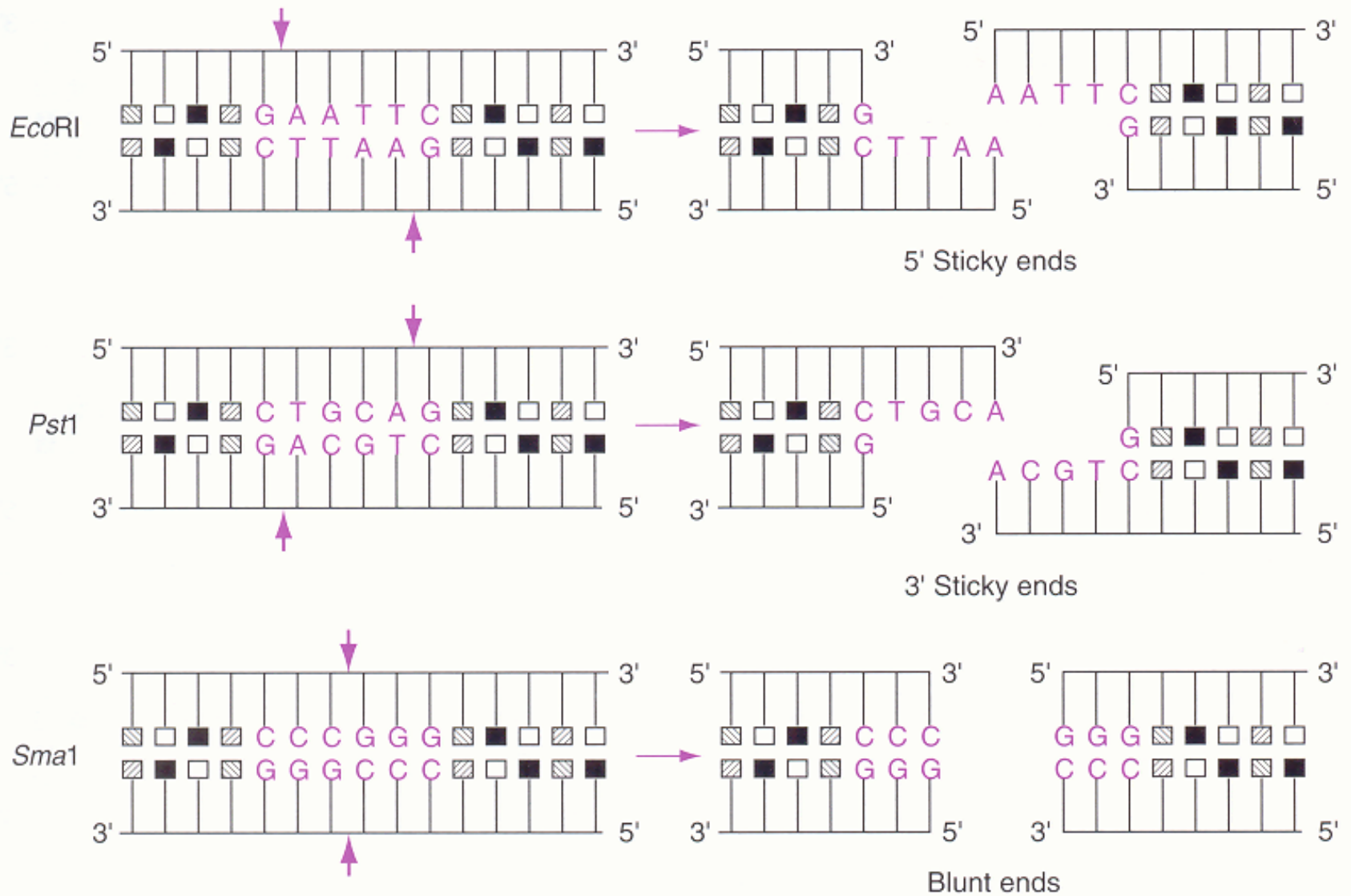


... **NC** | p**TTAAGN**...
... **NGAATT**p | **CN**...

Produkty štěpení RE

- tupé konce (po štěpení obou řetězců ve stejném místě)
- ostré konce (po štěpení řetězců v různých místech, která jsou obvykle vzdálena 1-4 nukleotidy)
 - 5' přečnivající
 - 3' přečnivající





Názvosloví RE

např. *EcoRI*

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

Jednotka RE

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

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

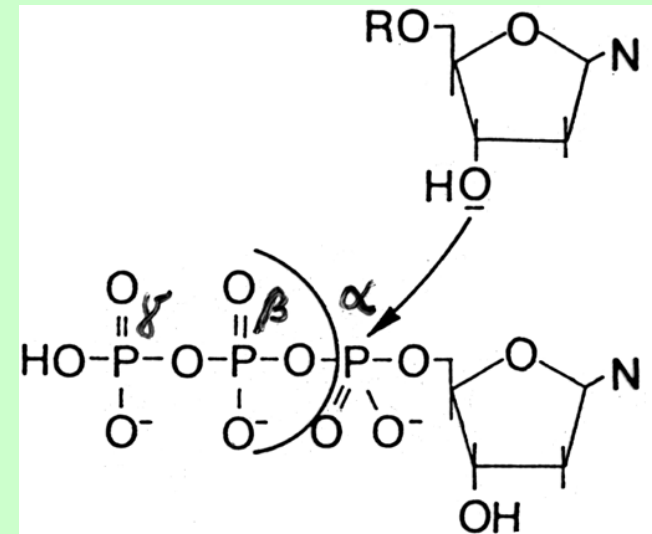
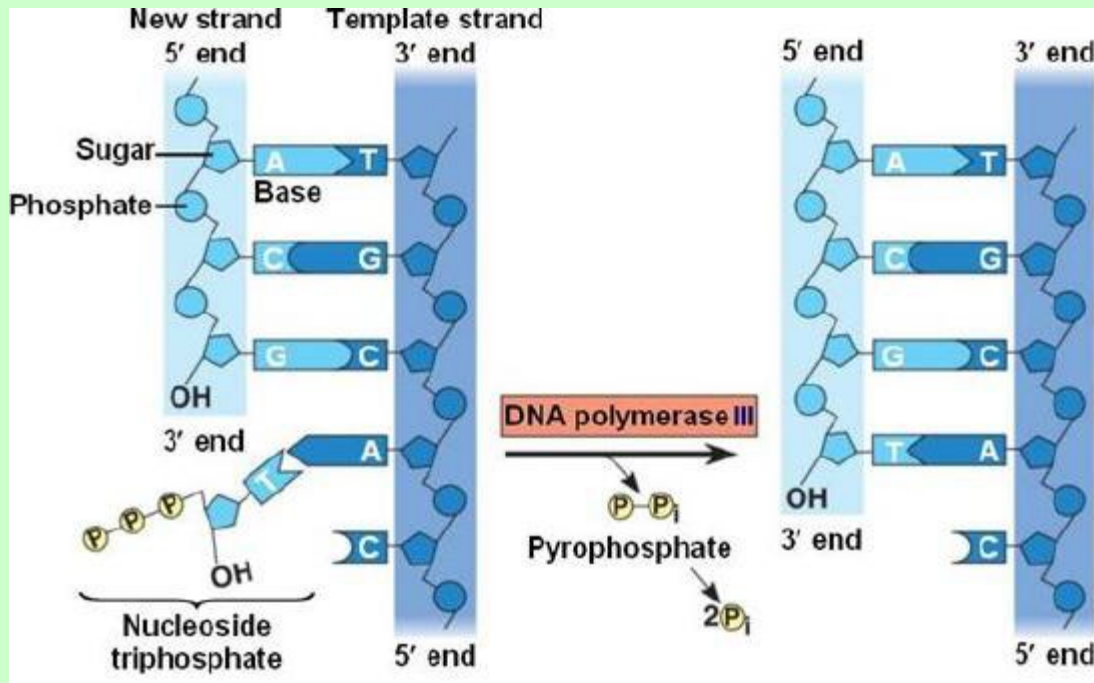
DNA source	Genome size (kb)	Number of restriction sites		
		4bp	6bp	8bp
1 pUC19	3	10	0-1	0-1
2 SV40	5	20	1	0-1
3 Bacteriophage λ	48	190	12	0-1
4 Bacteriophage T4	165	660	40	2-3
5 Bacteria	4700	18400	1100	70
6 Yeast*	16000	62500	3900	250
7 Fruit fly*	120000	470000	30000	1800
8 Mammals*	3000000	11700000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

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

Polymerázy

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

Polymerase DNA 5'→3'



DNA polymeráza I (Kornbergův enzym)

zdroj - *E.coli*

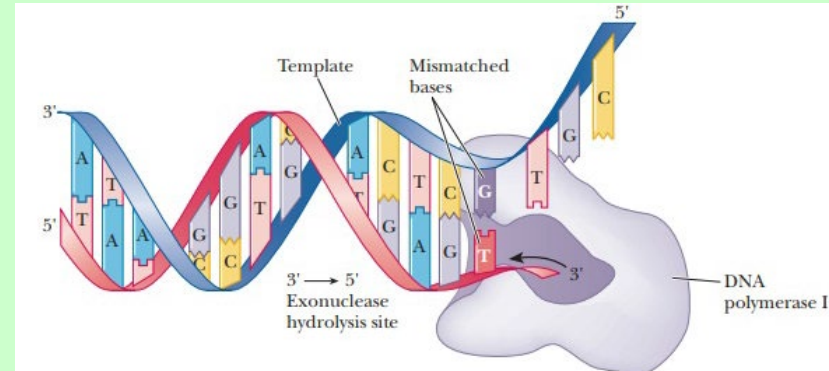
katalyzuje 3 různé reakce:

- 1. Polymerázová aktivita:** Prodlužování polynukleotidového řetězce ve směru 5' - 3'
 - matrice je 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

DNA polymeráza I (Kornbergův enzym)

2. Exonukleázová aktivita

- hydrolýza řetězce DNA v obou směrech

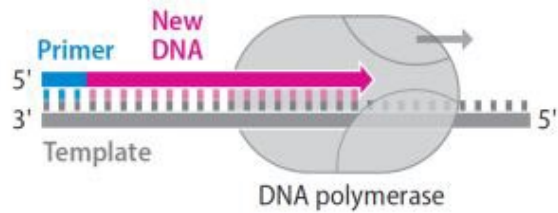


3. Degradace DNA ve směru 5'-3' a současná syntéza degradovaného řetězce

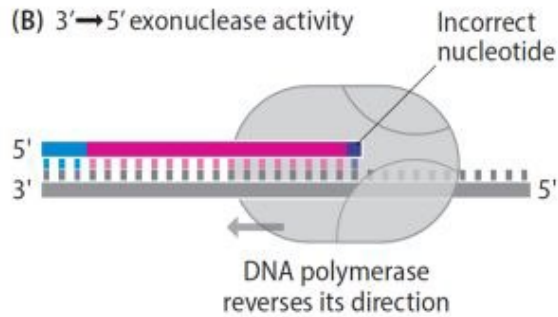
- oprava chybně začleněných nukleotidů *in vivo* („proof-reading“)
- využití při značení DNA („nick translace“)
- exonukleázové aktivity mohou záviset na přítomnosti iontů Mg^{2+} nebo Mn^{2+}

The 3 Activities of a DNA Polymerase

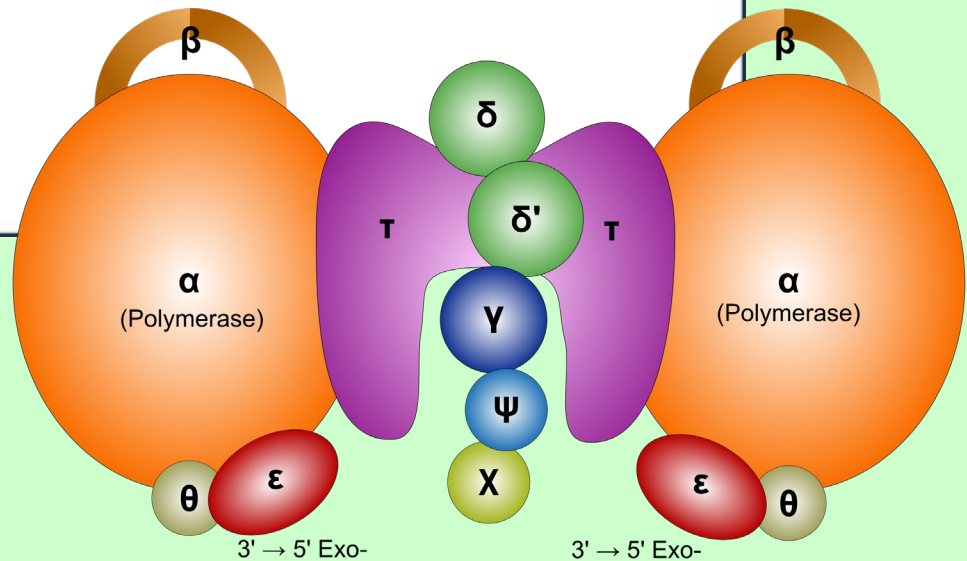
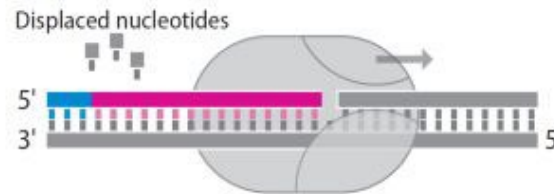
(A) 5' → 3' DNA synthesis



(B) 3' → 5' exonuclease activity



(C) 5' → 3' exonuclease activity



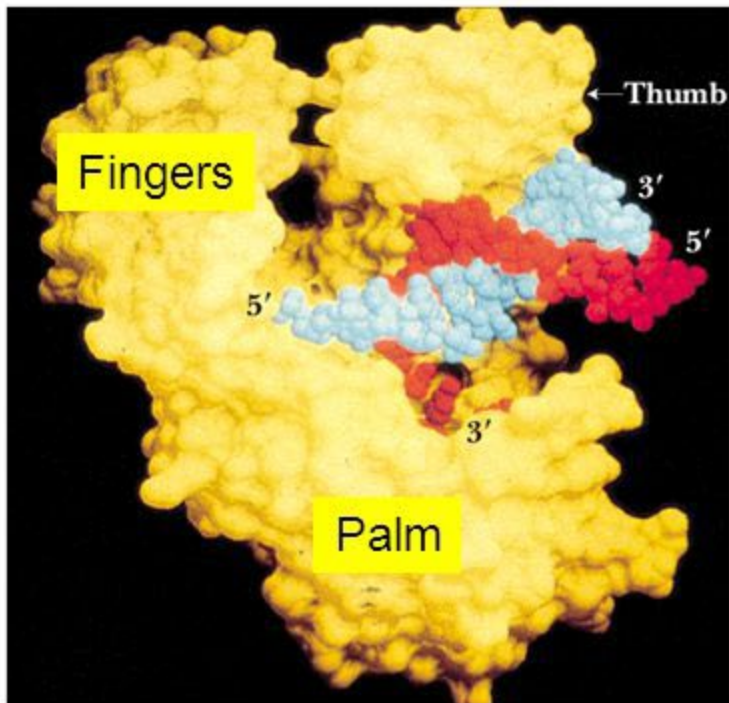
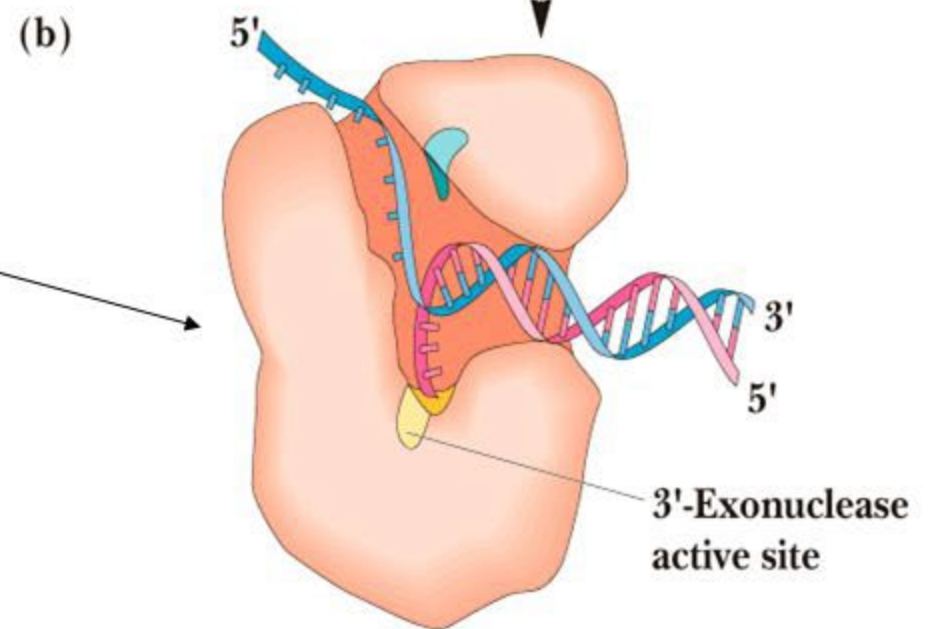
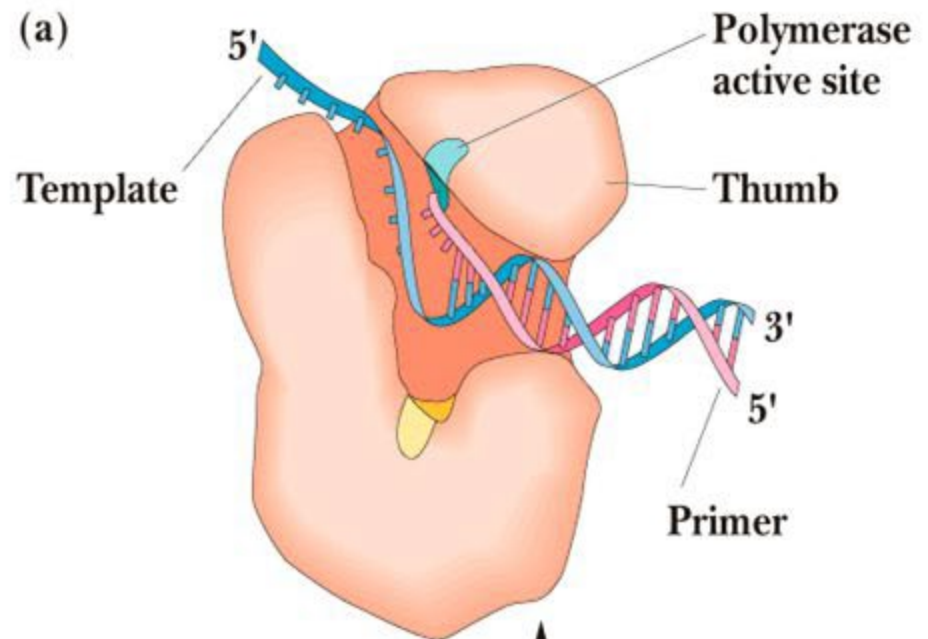
Klenowův fragment DNA polymerázy I

- jeden ze dvou produktů proteolytického štěpení DNA polymerázy I subtilizinem
- polymerázová aktivita 5' - 3'
- exonukleázová aktivita 3' - 5'

Využití: při značení DNA („fill-in“ 3' zkrácených konců a pomocí „random hexamers“)

- sekvenování DNA Sangerovou metodou
- syntéza druhého řetězce cDNA

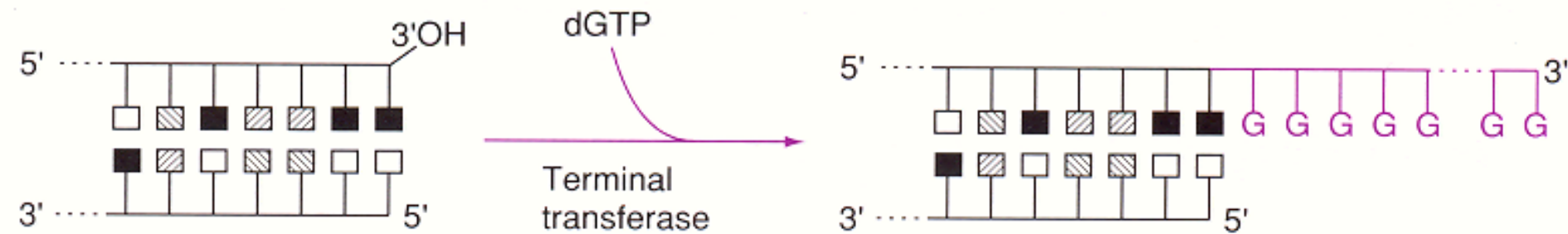
The structure of the Klenow fragment of DNAP I from *E. coli*



Terminální transferáza

- katalyzuje přidání deoxynukleotidů k 3'OH konci molekul DNA
- substrátem jsou přečnívající, zkrácené i tupé konce dvouřetězcové molekuly DNA nebo ssDNA
- nevyžaduje matrici ani primer
- zdroj: telecí brzlík
- využití: přidání homopolymerních konců k 3'koncům DNA
- značení 3'konců DNA

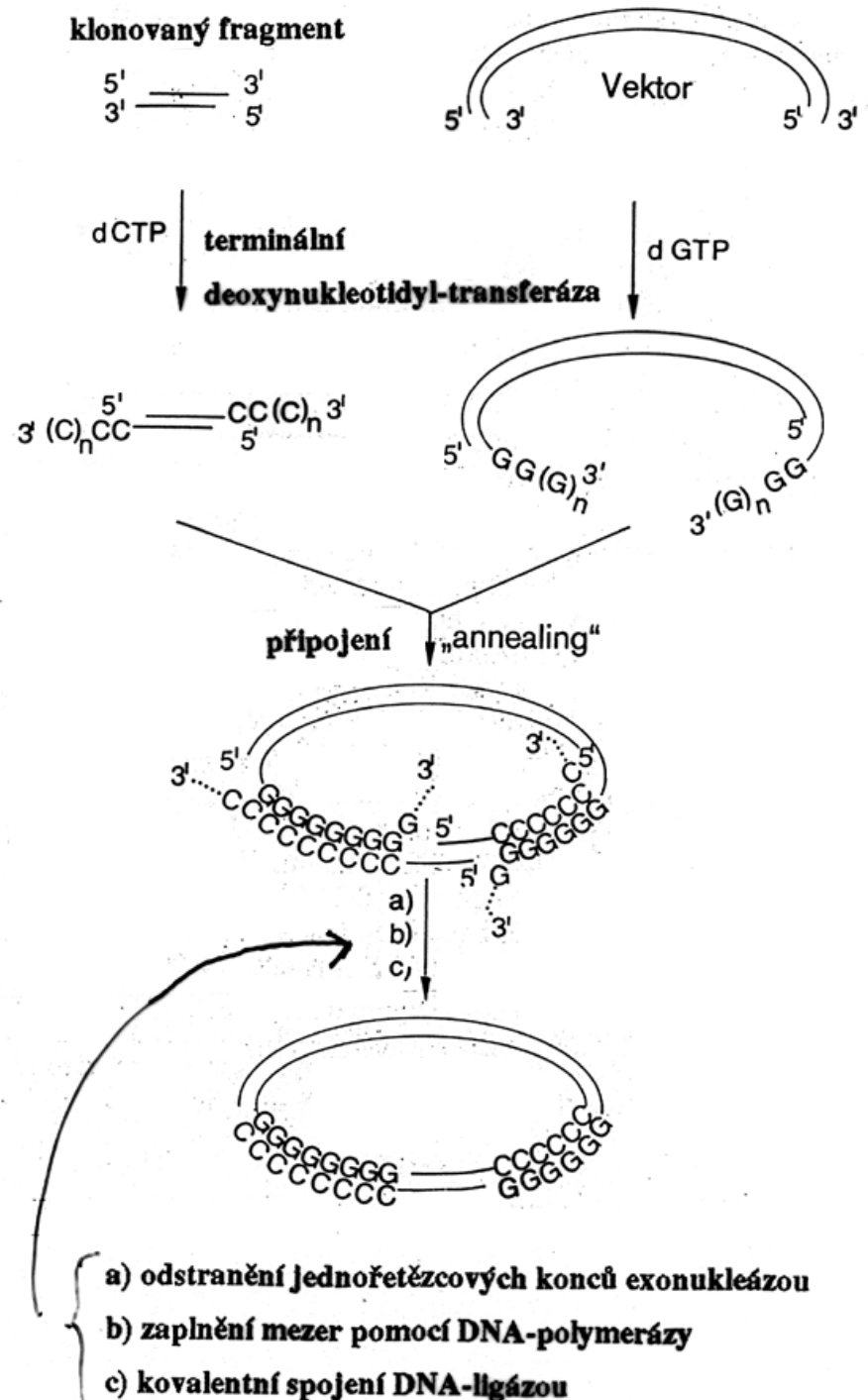
Příklad reakce katalyzované terminální deoxynukleotidyl transferázou



Výhody terminální transferázy

- možnost připojení dlouhých úseků komplementárních nukleotidů na 3' koncích vektoru a insertu
- 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

Připojení homopolymerních konců ke klonované DNA terminální transferázou



Zpětná (reverzní) transkriptáza

- RNA-dependentní DNA polymeráza
- přepis genetické informace z RNA do DNA
- požadována přítomnost primeru a matrice
- 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

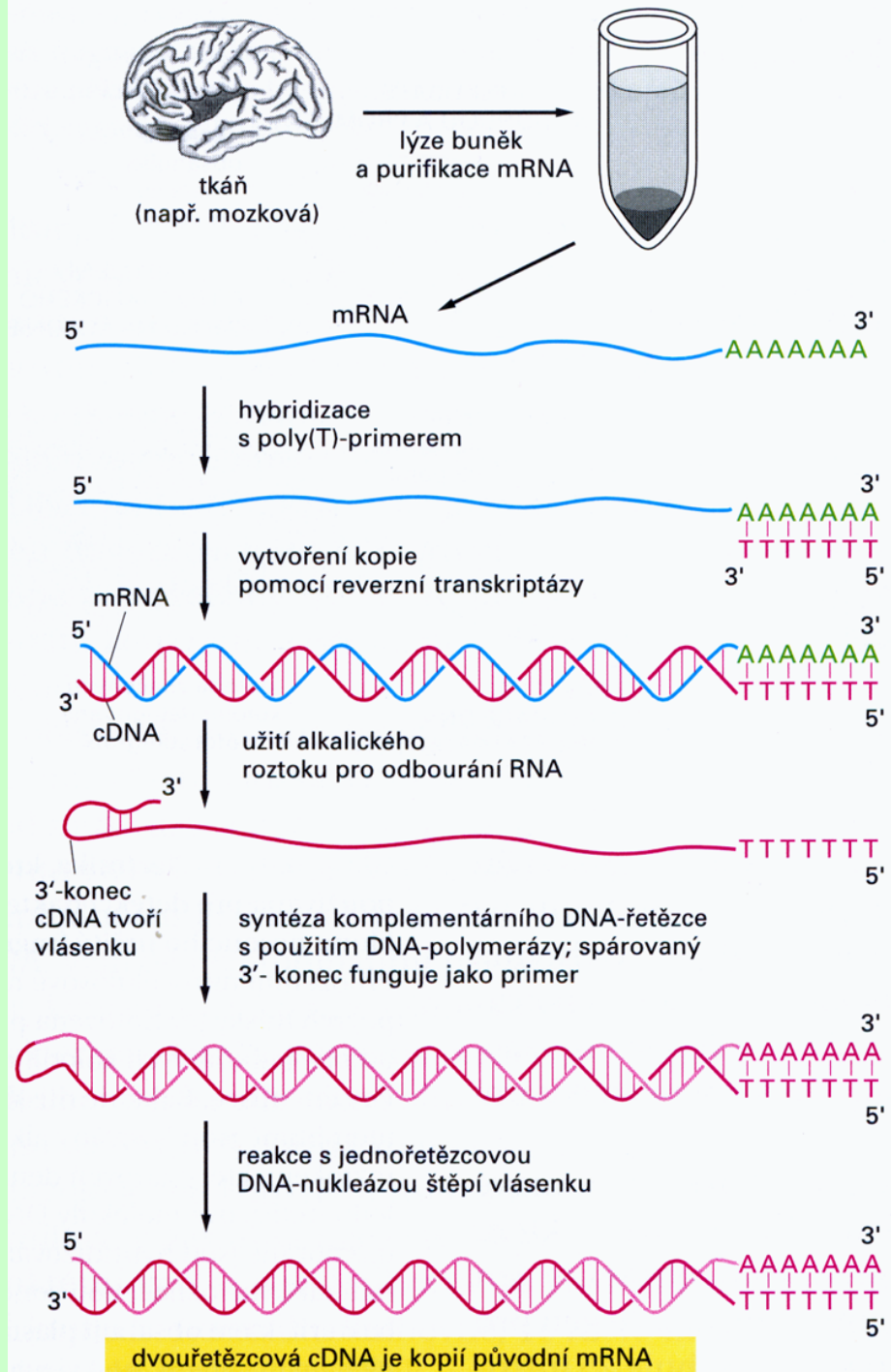
Aktivity:

- polymerázová
- 5'-3' exoribonukleázová
- 3'-5' exoribonukleázová (RNázaH)

Využití:

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

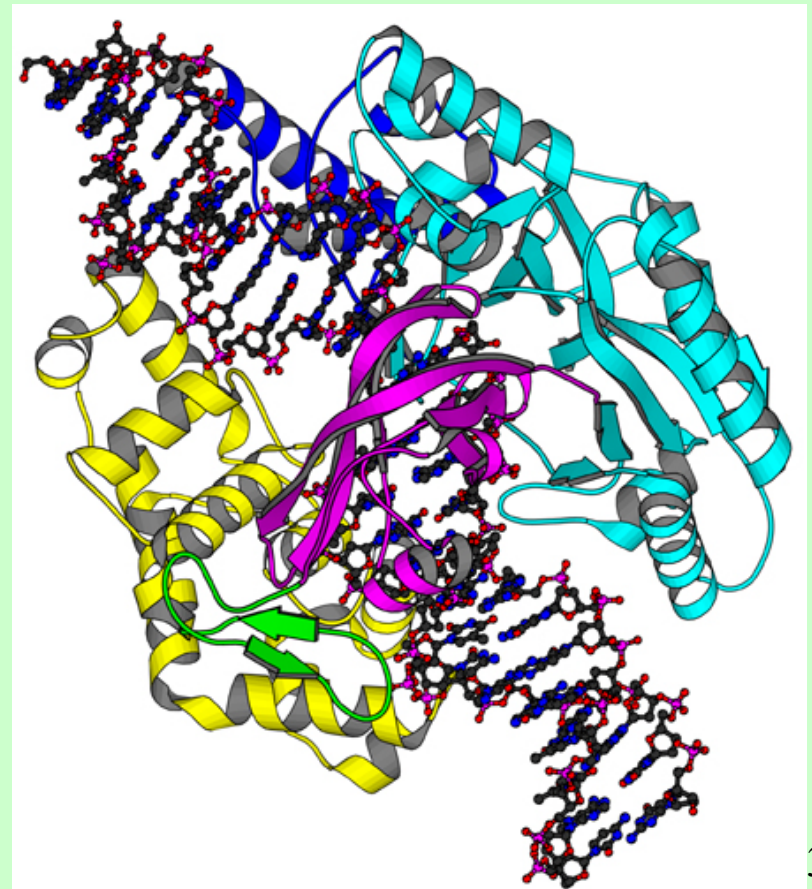
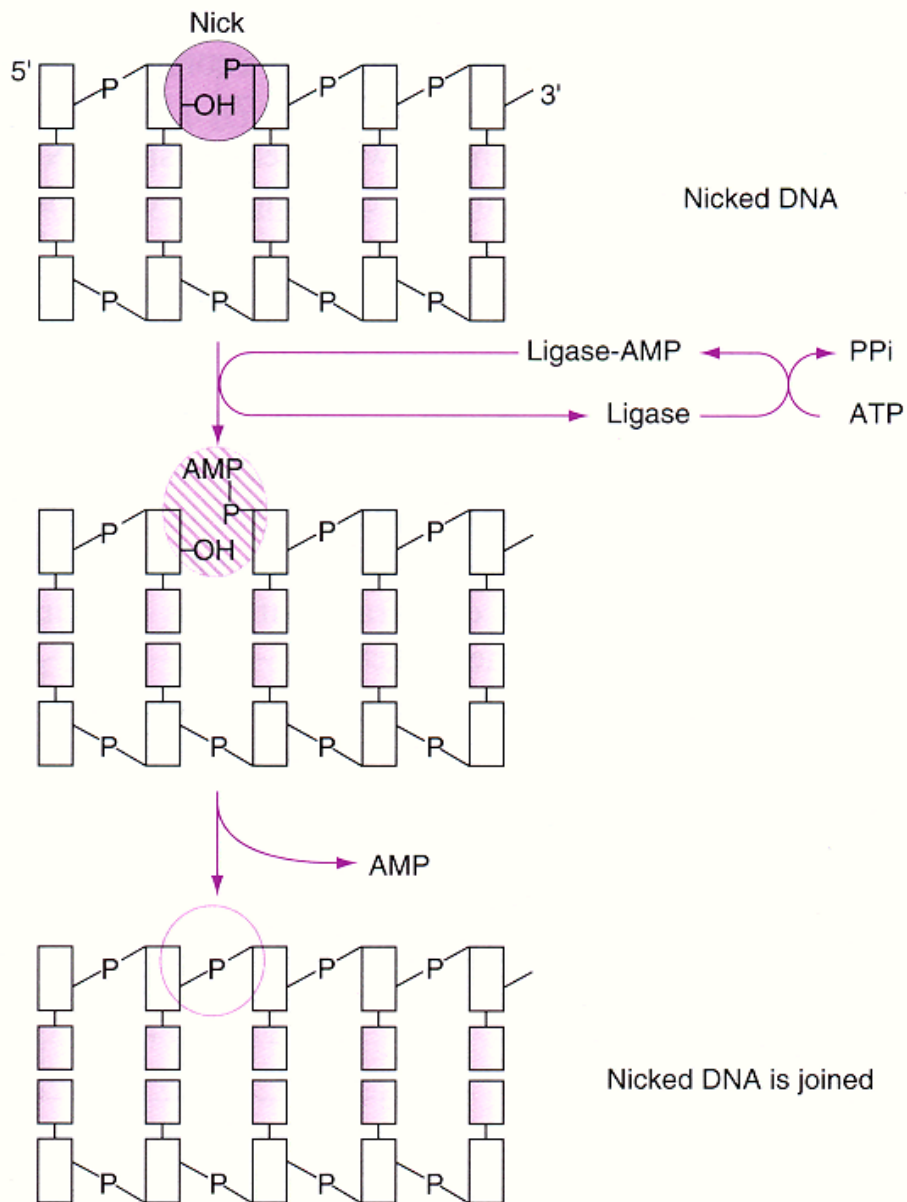
Syntéza cDNA



DNA ligázy

- enzymy, které obnovují cukr-fosfátovou kostru DNA tvorbou kovalentní fosfodiesterové vazby mezi 5' fosfátovou skupinou jednoho řetězce a 3' OH skupinou druhého řetězce za spotřeby ATP nebo NAD
- fyziologický význam při replikaci, rekombinaci a reparaci DNA
- analogické RNA ligázy katalyzují *in vitro* podobné reakce při ligaci ssRNA

Působení DNA ligáz

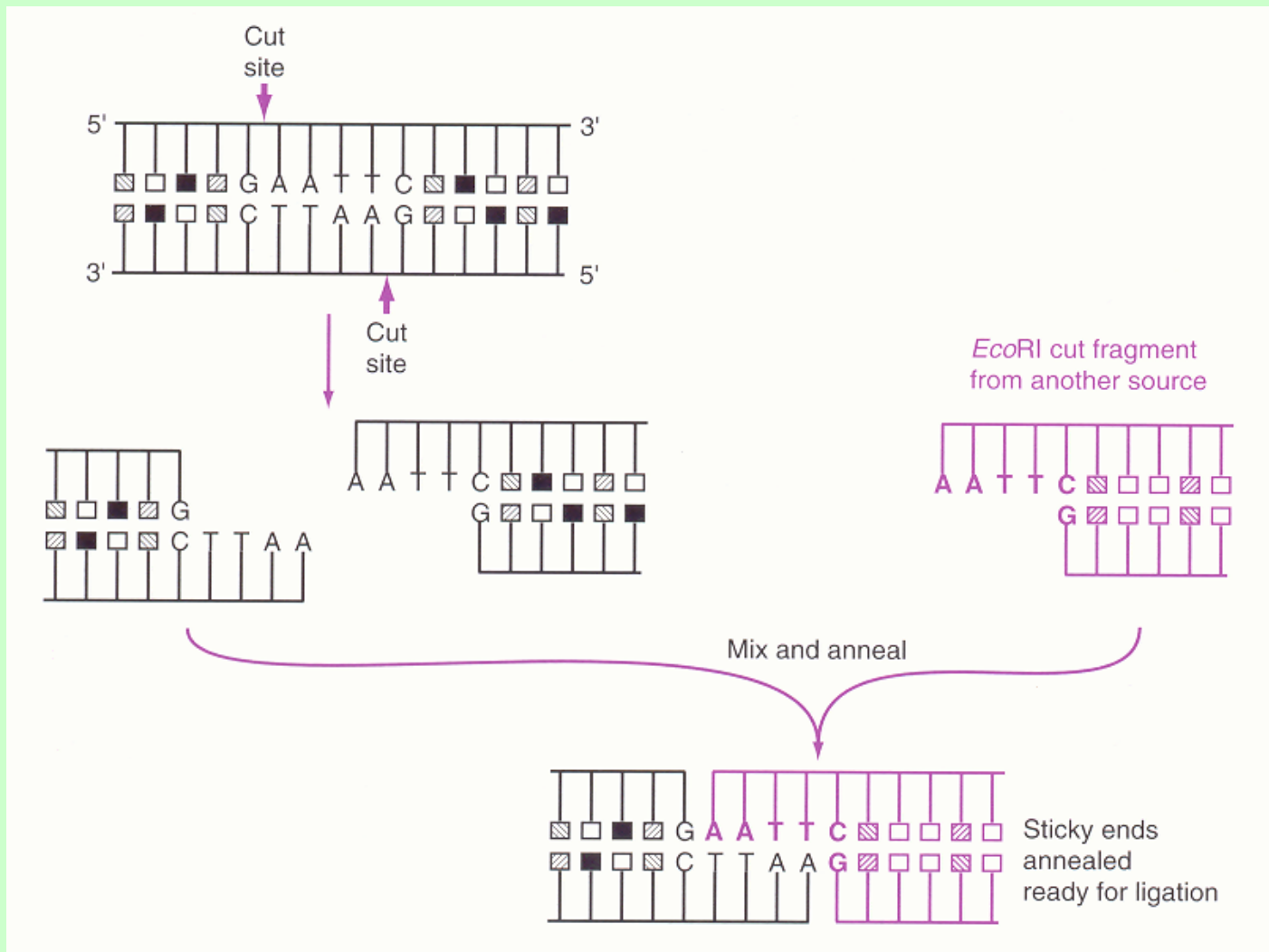


Použití DNA ligáz

- příprava rekombinantních molekul DNA
- možno spojovat fragmenty DNA různého původu (restrikční fragmenty DNA, uměle syntetizované molekuly DNA, produkty zpětné transkripce, atd.)

PŘÍPRAVA REKOMBINANTNÍCH MOLEKUL DNA

Přečnávající kompatibilní konce usnadňují spojení fragmentů DNA pocházejících z různých zdrojů



Běžné typy DNA ligáz

T4-DNA-ligáza

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

Bakteriální DNA ligáza

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

Nukleázy

Nukleáza S1

- endonukleáza specifická pro jednořetězcovou DNA

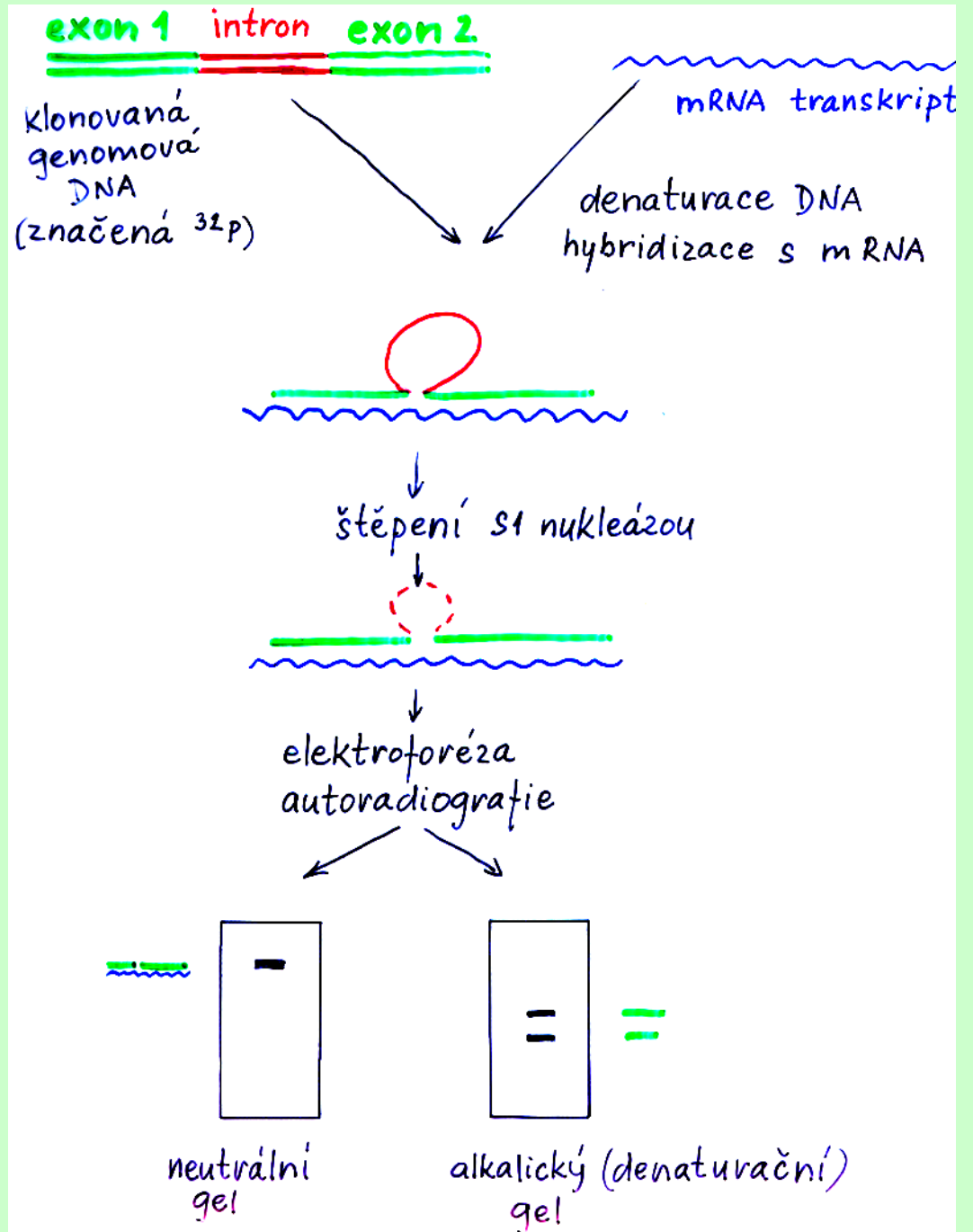
Zdroj:

- bakterie *Aspergillus oryzae*

Využití:

- odstraňuje jednovláknové struktury z DNA (odstranění nespárovaných smyček)
- hydrolýza jednořetězcových konců

Mapování nukleázou S1



Nukleázy

DNázaI

- nespecifická deoxyribonukleáza
- substrátem je dvouřetězcová i jednořetězcová DNA
- za přítomnosti kofaktoru Mg^{2+} jsou místa štěpení rozmístěna statisticky na obou řetězcích
- za přítomnosti kofaktoru Mn^{2+} jsou přednostně štěpena místa ležící ve ds DNA proti sobě

Zdroj: hovězí pankreas

Využití:

- nízké koncentrace: vytváření jednořetězcových zlomů v ds DNA
- vyšší koncentrace: odbourání DNA z roztoků RNA

Ribonukleázy

Ribonukleáza A

- nespecifická ribonukleáza

Zdroj: hovězí pankreas

Využití:

- odbourání RNA z roztoků DNA

Ribonukleáza H

- sekvenčně specifická ribonukleáza, rozpoznávající hybridní molekuly RNA:DNA

Působení enzymů používaných při manipulaci s DNA

