

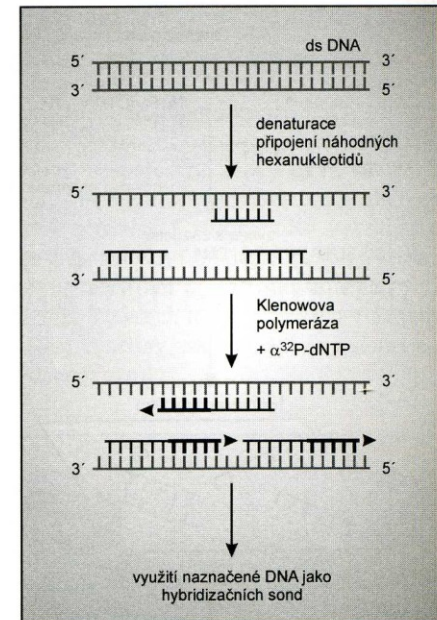
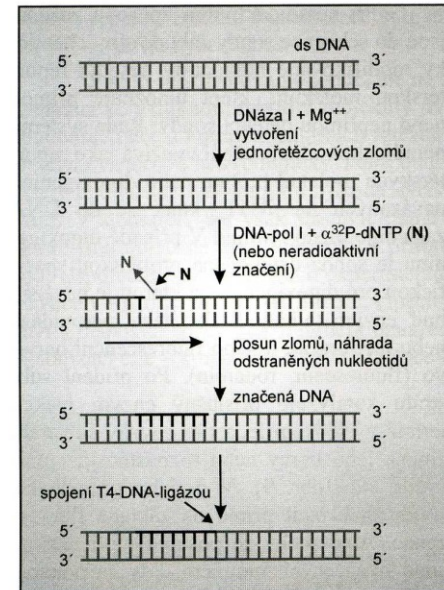
Enzymy používané v molekulární biologii

Rozdělení enzymů

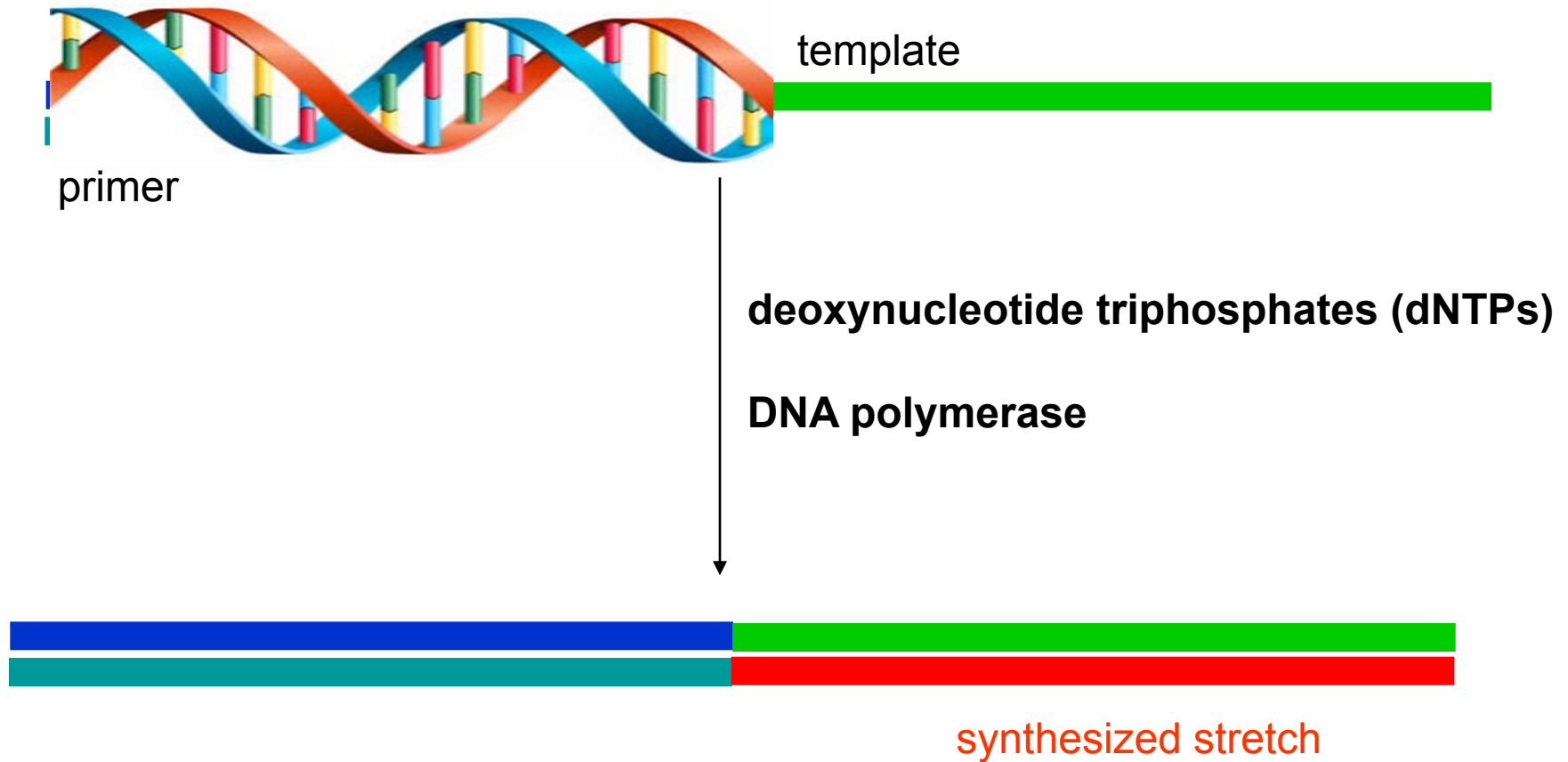
- 1. Podle substrátové specifity:** většina metod molekulární biologie je závislá na použití enzymů, jejichž substrátem jsou nukleové kyseliny. Tyto reakce jsou velmi specifické a umožňují pracovat s velmi malým množstvím materiálu. Podle substrátové specifity se tyto enzymy dělí na dvě základní skupiny:
 - Enzymy, jejichž substrátem je DNA
 - Enzymy, jejichž substrátem je RNA
 - Substrátová specifita je obvykle absolutní, i když rozlišení mezi oběma druhy nukleových kyselin je podmíněno pouze přítomností nebo absencí 2'-OH skupiny ribosy.
- 2. Podle typu reakcí:**
 - Enzymy syntetizující nukleové kyseliny (polymerázy)
 - Enzymy modifikující nukleové kyseliny (fosfatázy, metylázy, kinázy)
 - Enzymy spojující nukleotidové řetězce (ligázy)
 - Enzymy odbourávající nukleové kyseliny (nukleázy)
 - Podle substrátové specifity se enzymy jednotlivých skupin dále dělí, např. na DNA-polymerázy, RNA-polymerázy apod.

DNA-polymerázy

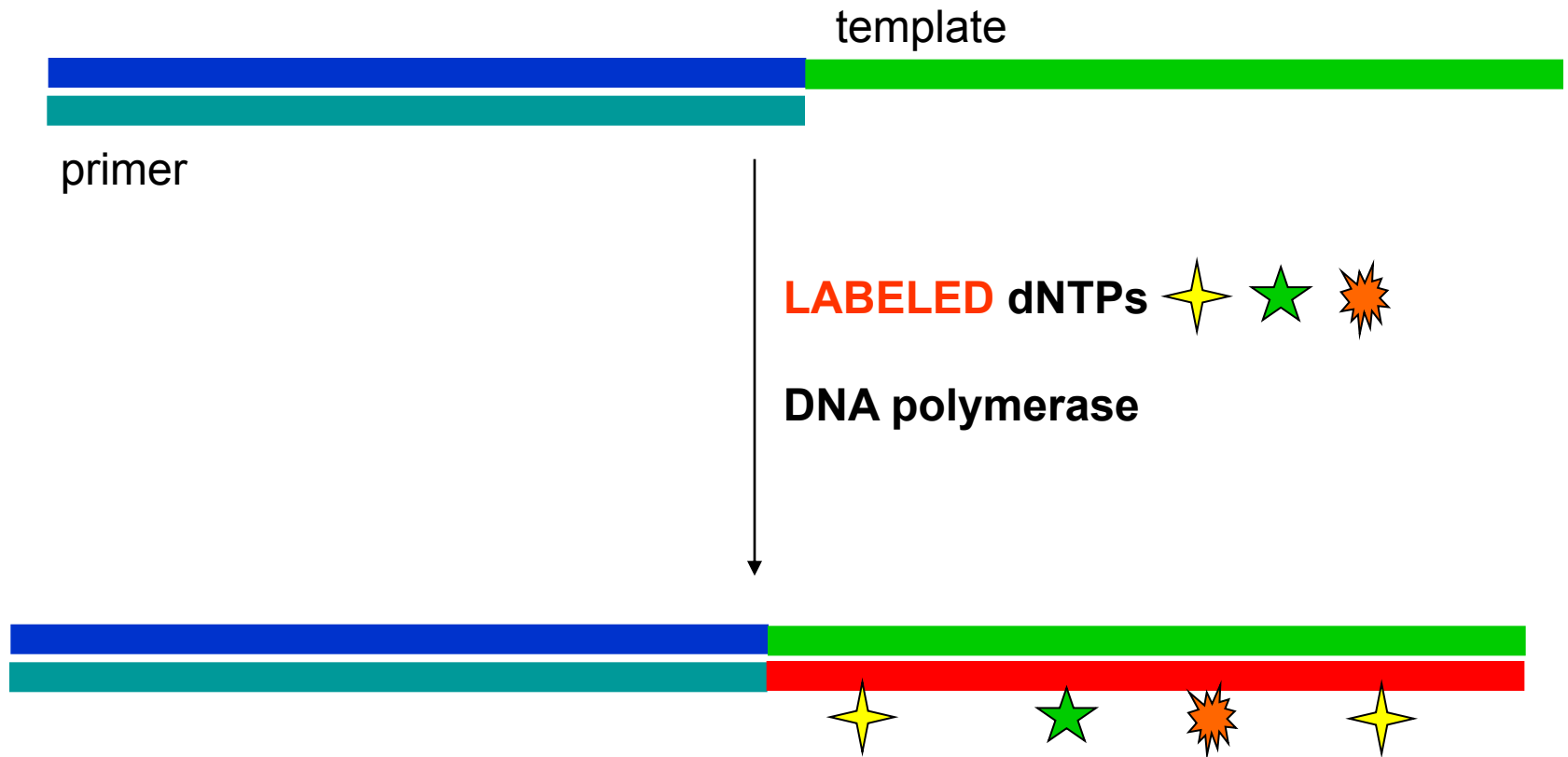
- **DNA-polymeráza I (E. coli):** katalyzuje 3 odlišné reakce, jejich rychlost je ovlivněna stavem DNA a koncentrací dNTP v reakční směsi. Za vhodných podmínek degraduje polynukleotidový řetězec DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ a současně degradovaný řetězec nahrazuje polymerační reakcí. Těto vlastnosti se využívá ke značení DNA metodou tzv. posunu jednořetězcového zlomu („nick translation“).
 - Na dvouřetězcové DNA se vytvoří DNázou I náhodné jednořetězcové zlomy. Ty jsou substrátem pro působení DNA-polymerázy I.
- **Klenowův fragment DNA-pol I:** jde o větší ze dvou fragmentů DNA-pol I, které vznikají při štěpení subtilizinem. Vykazuje $5' \rightarrow 3'$ polymerázovou a $3' \rightarrow 5'$ exonukleázovou aktivitu, oproti DNA-pol I postrádá $5' \rightarrow 3'$ exonukleázovou aktivitu. Používá se při syntéze DNA, kdy nesmí docházet k odbourávání primerů, např. při enzymové metodě sekvencování, při značení DNA prodloužením primeru nebo při doplnění přechuhujících $5'$ -konců po restriktivním štěpení DNA.



Primer extension



Introducing labels in DNA by primer extension



- Pomnožení (amplifikace) specifického úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce



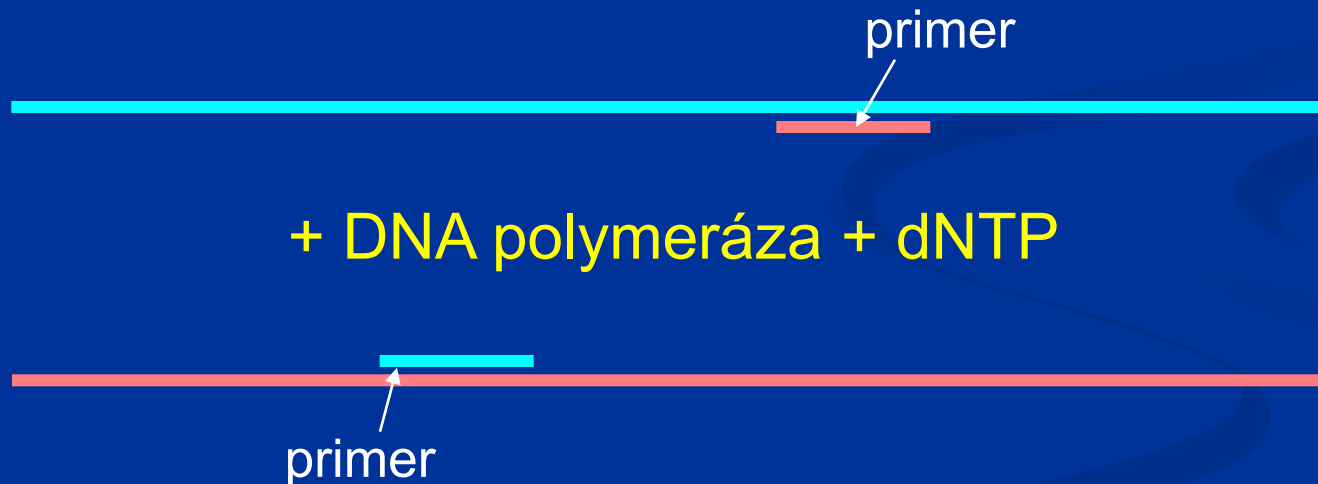
genomová DNA
(templát pro PCR)

- Pomnožení (amplifikace) specifického úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce

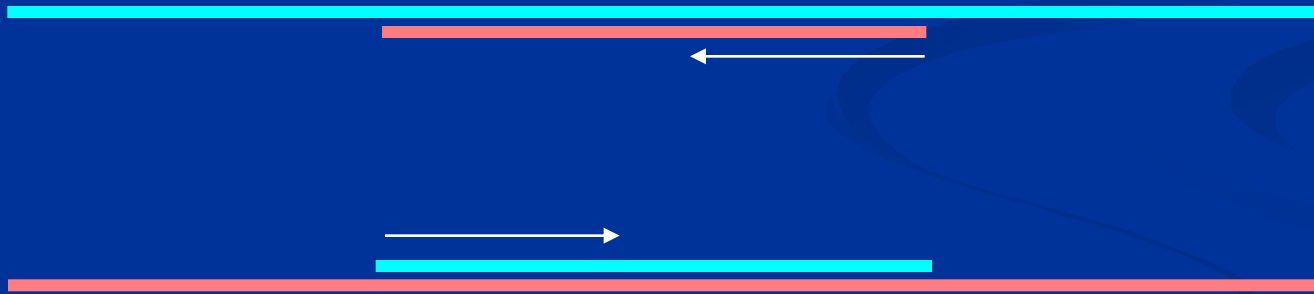


tepelná denaturace dvoušrobovice

- Pomnožení (amplifikace) specifického úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce



- Pomnožení (amplifikace) specifického úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce



Analýza reálných vzorků DNA

- Pomnožení (amplifikace) cílového úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce

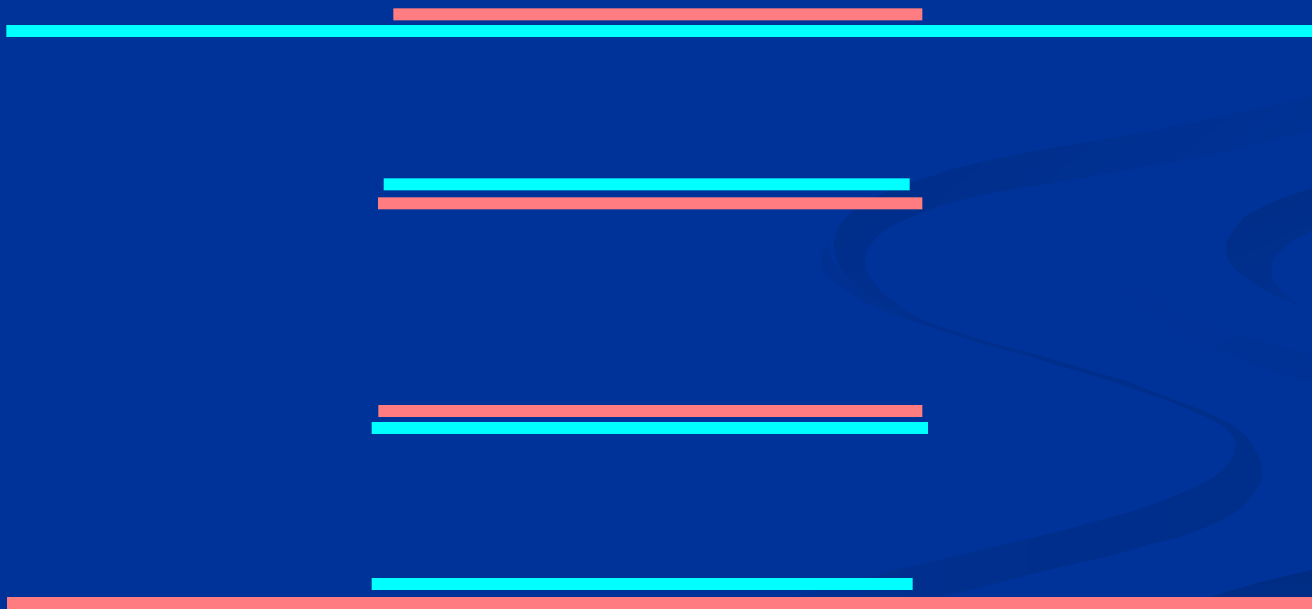


tepelná denaturace dvoušrobovice

- Pomnožení (amplifikace) specifického úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce



- Pomnožení (amplifikace) specifického úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce



atd.... (počet kopií úseku „mezi“ primery roste geometrickou řadou)

smíchá se DNA templát, primery
směs NTP, termostabilní DNA
polymeráza a proces se automaticky
cykluje



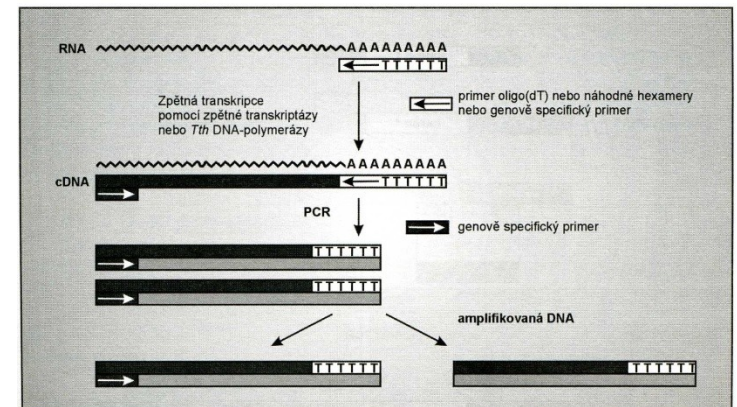
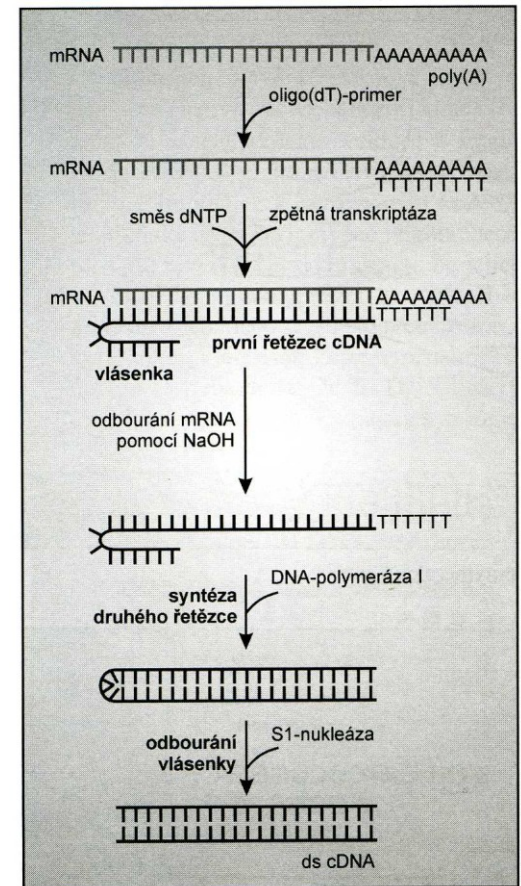
Animace PCR

Polymerázy používané při PCR

- **Taq DNA-polymeráza** (*Thermus aquaticus*): nejběžněji používaná polymeráza pro PCR, nemá korektorskou („proofreading“) aktivitu, následkem se při syntéze delších úseků hromadí chyby. Frekvence chyb je zhruba 1 na 4-5 tisíc bp. Špatně začleněná báze většinou vede k terminaci řetězce a současně i syntézy DNA.
 - Při použití PCR v molekulární diagnostice nejsou chybně začleněné báze problémem, protože vznik molekul DNA se stejnou chybou je málo pravděpodobný a molekuly s chybně inkorporovanou bází tvoří jen zlomek z celkového produktu.
 - Chybné začlenění bází však nabývá na důležitosti v případě klonování PCR produktů, neboť každý klon je odvozen z jediné molekuly DNA. Případná mutace vlivem špatné inkorporace báze způsobí, že tuto mutaci ponесou všechny molekuly DNA v potomstvu. Tyto mutace také mohou znamenat substituci aminokyselin při expresi prováděné in vitro.
- Tyto problémy lze eliminovat buď použitím většího množství templátových molekul DNA při zahájení replikace. Pak je třeba méněcyklů a nasyntetizuje se méně DNA.
- Nebo lze použít termostabilní DNA-polymerázu s 3'-exonukleázovou aktivitou.
- **Pwo DNA-polymeráza** (*Pyrococcus woesei*) a **Pfu DNA-polymeráza** (*Pyrococcus furiosus*): frekvence chyb je 2-6 x nižší než u Taq DNA-polymerázy, což je způsobeno 3'-exonukleázovou aktivitou těchto enzymů. Na druhou stranu 3'-exonukleasová aktivita často způsobuje degradaci jednořetězcových primerů. Často se používají v kombinaci s Taq DNA-polymerázou pro amplifikaci dlouhých úseků DNA (stačí 1% Pwo nebo Pfu).
- **Tth DNA-polymeráza** (*Thermus thermophilus*): je doporučována pro PCR dlouhých molekul DNA místo Taq DNA-polymerázy.

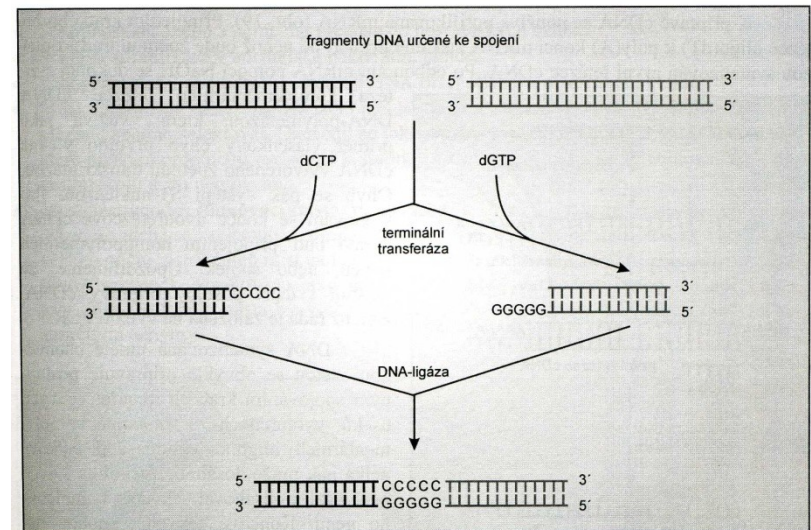
Zpětná (reverzní) transkriptáza (retroviry)

- Patří do skupiny RNA-dependentních DNA-polymeráz.
- Katalyzuje přepis genetické informace z RNA do DNA.
- Využívá se k přípravě cDNA z mRNA.
- Zpětné transkripty se využívají také k sekvencování RNA, jako sondy pro hybridizaci, případně jako templát při PCR.



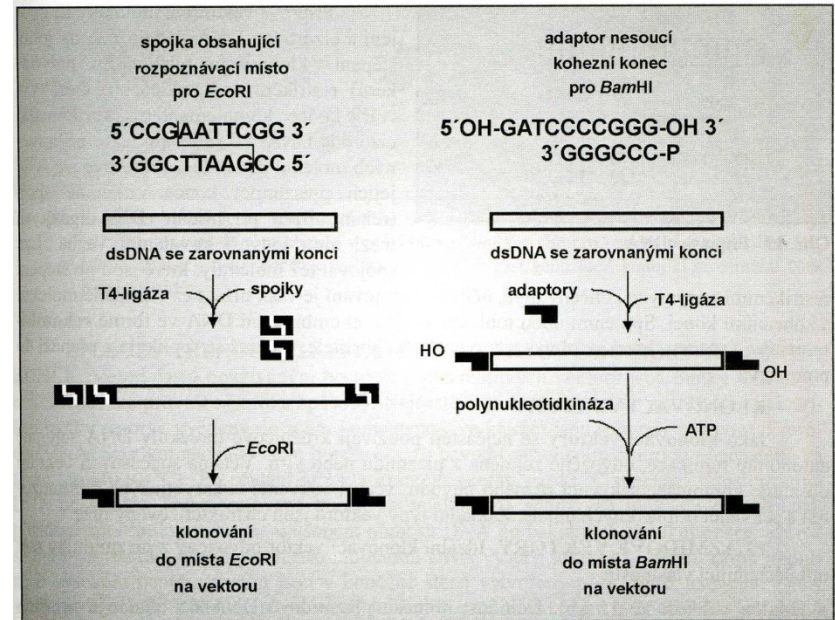
Terminální deoxyribonukleotidyltransferáza (telecí brzlík)

- Katalyzuje připojování nukleotidů k 3'-koncům DNA.
- Nevyžaduje matrici ani primer, tím se liší od DNA-polymeráz.
- Je využívána k připojování polydeoxyribonukleotidových úseků (tzv. homopolymerních konců) k fragmentům DNA a vektorovým molekulám s tupými konci. Tím se vytvářejí kohesivní (lepivé) navzájem komplementární konce.
- Rovněž je využívána při koncovém značení nukleových kyselin.



DNA-ligáza

- Katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby mezi 5'-fosfátovou skupinou a 3'-OH skupinou sousedního nukleotidu. Používá se k vzájemnému spojení dvou molekul DNA zakončených komplementárními konci, k připojení spojek a adaptorů a cirkularizaci lineárních molekul DNA.
- T4-DNA-ligáza (zdroj *E. coli* infikovaná bakteriofágem T4) dokáže na rozdíl od DNA-ligázy z *E. coli* spojovat i fragmenty s tupými konci.

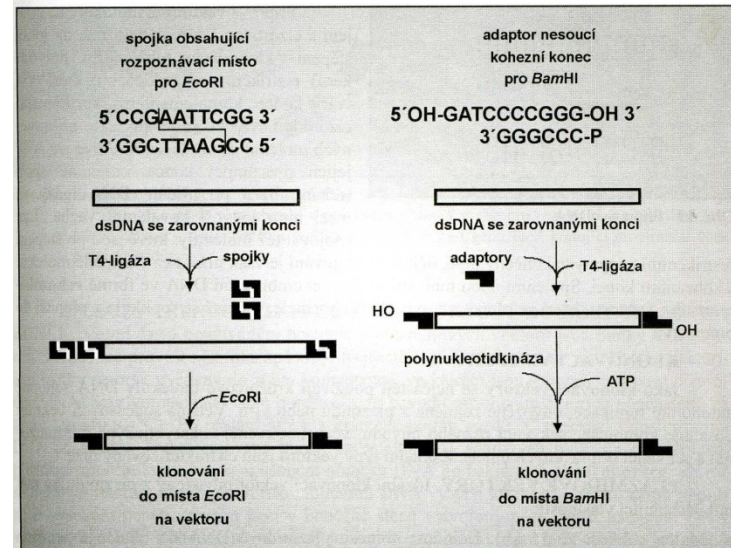


Alkalická fosfatáza

- Zdroje: telecí střevo, bakterie
- Odstraňuje fosfátové skupiny z 5'-konců DNA, RNA a oligonukleotidů.
- Využívá se při koncovém značení DNA, kdy se původní fosfátová skupina odstraní a její místo zaujme značená fosfátová skupina (^{32}P , ^{35}S).
- Při klonování DNA se často odstraňují 5'-koncové skupiny u vektoru – zabraňuje se tím ligaci samotné vektorové molekuly bez inzertu, zvyšuje se účinnost klonování.

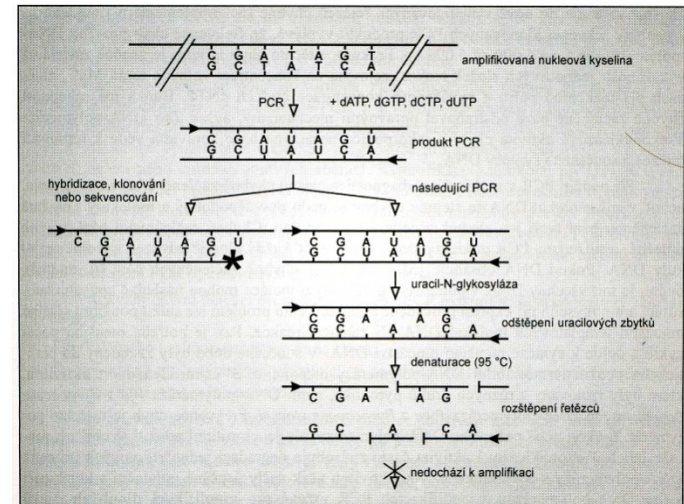
T4-DNA-polynukleotidkináza

- Zdroj: buňky *E. coli* infikované bakteriofágem T4
- Katalyzuje přenos terminální fosfátové skupiny z ATP na 5'-OH skupinu DNA nebo RNA.
- Může katalyzovat i výměnu fosfátových skupin na 5'-konci.
- Katalyzovaných reakcí se využívá ke značení fragmentů nukleových kyselin na 5'-koncích pomocí ^{32}P .



Uracil-DNA glykosylasa

- Účastní se oprav poškozené DNA. Uracil v DNA vzniká deaminací cytosinu.
- Uracil-DNA glykosylasa – katalyzuje uvolnění volného uracilu z DNA. Hydrolyzuje uracil z jedno- nebo dvouřetězcové DNA, ne z krátkých oligomerů (6 a méně nukleotidů).
- Používá se preventivně v laboratořích k odstranění dříve amplifikované DNA:
 - Protože přenesené sekvence z dříve amplifikované DNA patří k nejvýznamnějším zdrojům kontaminace vzorků podrobených PCR, používá se v laboratořích rutinně provádějících PCR 2'-deoxyuridin-5'-trifosfát (dUTP) místo dTTP.
 - Před amplifikací dalších vzorků se do reakční směsi přidá uracil-DNA-glykosylasa (uracil-N-glykosylasa), která odstraní z případných kontaminantů uracilové báze. Tím se v molekule DNA vytvoří abazická místa a DNA se stane termolabilní. Při první denaturaci dojde k rozštěpení DNA a zároveň denaturaci a inaktivaci uracil-DNA-glykosylasy.
- Používá se spolu s dalšími reparačními enzymy ke studiu a detekci poškození DNA.

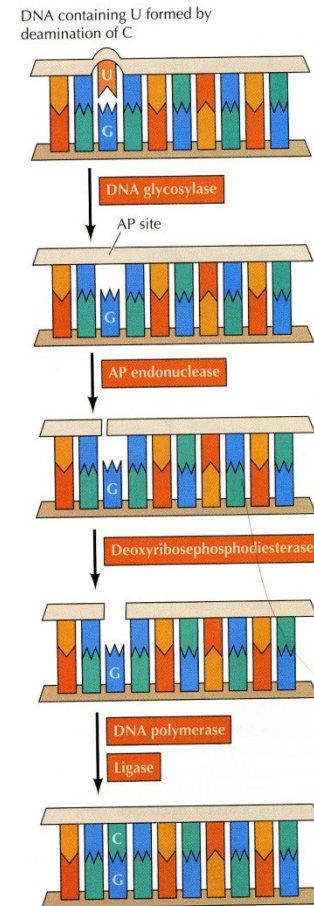


Exonukleázy

- Exonukleáza III (*E.coli*)
 - Působí ve směru $3' \rightarrow 5'$, na dvouřetězcové DNA odstraňuje od jejího 3'-konce jedno vlákno. Působí pouze na DNA, jejíž konce mají přesahující 5'-konec nebo jsou tupé, řetězce s přesahujícími 3'-konci štěpeny nejsou.
 - Vzhledem k výše uvedené specifitě se používá k vytváření jednosměrných delecí. Druhý řetězec je následně odstraněn nukleasou S1.
- Exonukleáza Bal31 (*Alteromonas espejiana*)
 - Štěpí lineární dvouřetězcovou DNA od obou konců za vzniku zkrácených fragmentů DNA se zarovnanými konci.
 - Používá se k přípravě obousměrných delecí.

Sekvenčně nespecifické endonukleasy

- Mnoho z nich nachází uplatnění při reparačních procesech.
- **Endonukleasa VIII** (*E. coli*) funguje jako N-glykosylasa a AP-lyasa. N-glykosylasová aktivita uvolňuje poškozené pyrimidiny z dvouřetězcové DNA, tím se vytvářejí apyrimidinová místa (AP). Produkty poškození bází rozpoznávané endonukleasou VIII zahrnují močovinu, 5,6-dihydroxythymin, thyminglykol, uracilglykol, 6-hydroxy-5,6-dihydrothymin apod.
- **Endonukleasa V** (*E. coli*) rozpoznává deoxyinosin (deaminační produkt deoxyadenosinu), štěpí poškozenou DNA na 3'-straně poškozené báze. Sama báze neodstraňuje.
- **Endonukleasa IV** – účastní se oprav mnoha oxidativních poškození DNA. Štěpí apurinová/apyrimidinová místa
- **Endonukleasa III** má podobné účinky jako endonukleasa VIII
- **Fpg** (8-oxoguanin DNA glykosylasa) enzym se vyznačuje jak N-glykosylasovou, tak AP-lyasovou aktivitou. Uvolňuje poškozené puriny z dsDNA. AP-lyasová aktivita slouží ke štěpení vzniklého apurinového místa na 3'- i na 5'-konci. Výsledkem je jednonukleotidová mezera s fosfátovými skupinami na obou stranách.

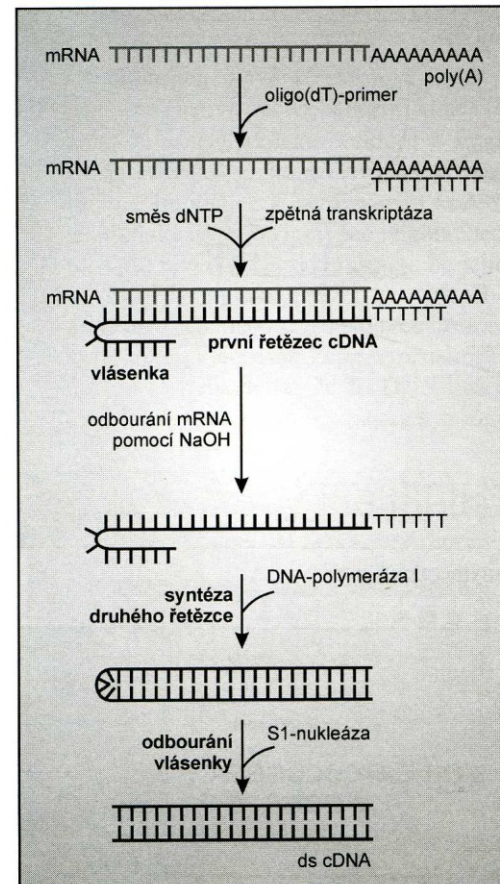
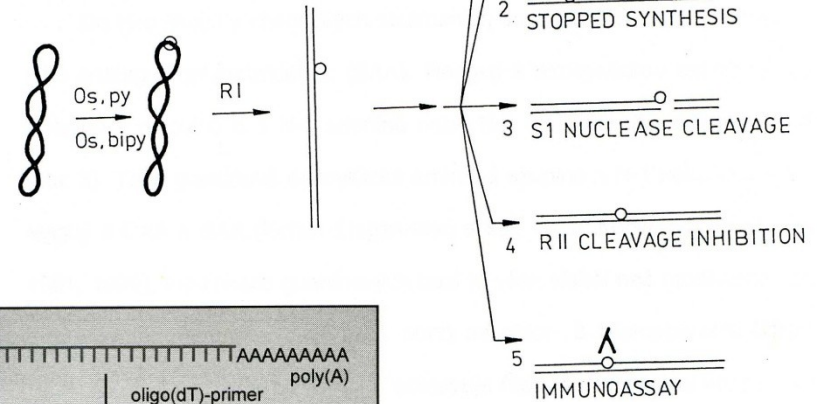


DNáza I (hovězí pankreas)

- Vytváří na DNA jednořetězcové zlomy. Od nich je pak DNA dále degradována na mono- a oligonukleotidy.
- Nevykazuje sekvenční specifitu.
- V přítomnosti Mg^{2+} vytváří na obou řetězcích náhodné zlomy, v přítomnosti Mn^{2+} iontů štěpí obě vlákna současně naproti sobě.
- V nízké koncentraci se používá při zavádění zlomů do molekul DNA, které se dále značí (např. DNA-polymerasa I) nebo se do nich zavádějí mutace.
- Ve vyšších koncentracích se DNáza I používá k odstranění DNA při izolaci RNA.

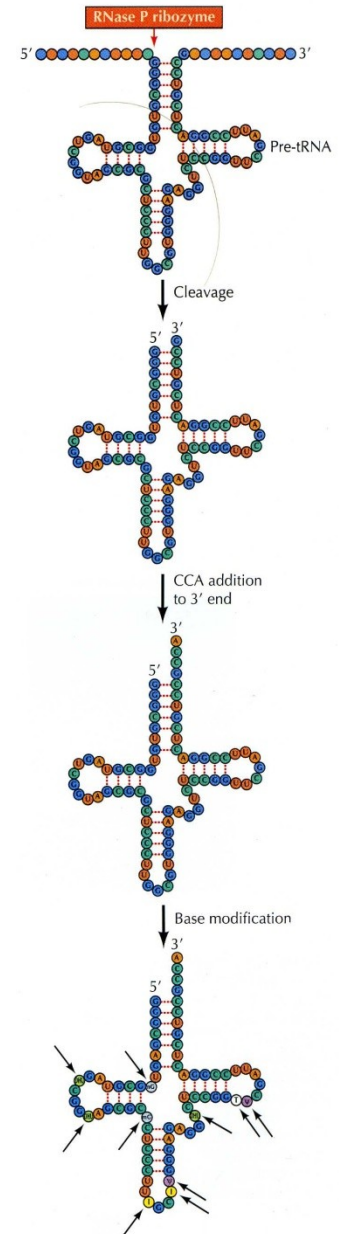
Nukleáza S1 (*Aspergillus oryzae*)

- Endonukleáza specifická pro jednořetězcovou DNA.
- Používá se k odstraňování jednořetězcových úseků na dsDNA, smyček na cDNA vznikajících při její syntéze, mapování intronů analýzou hybridních molekul DNA-mRNA.
- Také se využívá k detekci jednořetězcových úseků v molekulách DNA – mohou indikovat přítomnost struktur vznikajících při genové expresi a regulaci.
- pH optimum leží v kyselé oblasti, kromě nukleázy S1 se používá nukleázy P1, která má podobnou specifitu, ale je aktivní při neutrálním pH.



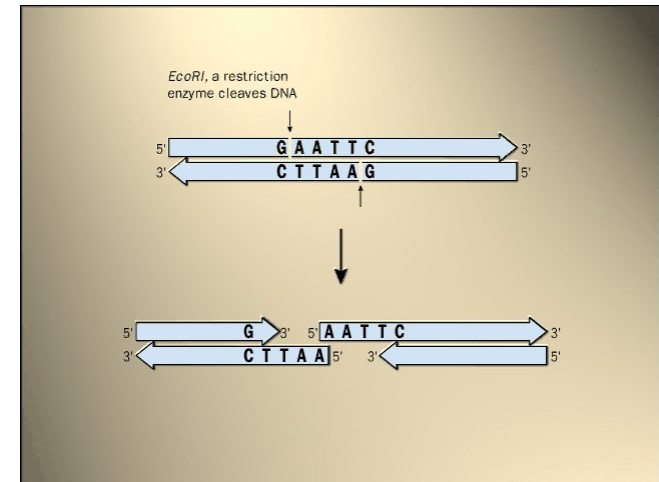
Ribonukleasy

- **Ribonukleasa T1** – štěpí RNA v sousedství G → G-3'-P.
- **Ribonukleasa T2** – štěpí RNA v sousedství A → A-3'-P.
 - Protože jsou sekvenčně specifické, využívají se obě ribonukleasy při analýze a sekvencování RNA.
- **Ribonukleasa A** – používá se k odstranění RNA z roztoků DNA.
- **Ribonukleasa P** – zkracuje tRNA, ribonukleoprotein: RNA vykazuje vlastní katalytickou aktivitu, proteinová složka má funkci pravděpodobně stabilizační.



Sekvenčně specifické (restrikční) endonukleázy

- Jde o sekvenčně specifické endonukleázy, produkované kmeny většiny bakteriálních druhů.
- Jejich přirozenou funkcí je degradace cizorodé DNA (například po infekci fágem).
- Dělí se do tří tříd.
- Nejvýznamnější jsou RE II. třídy. Jejich rozpoznávací místo je tvořeno krátkou (obvykle 4-8 bp) sekvencí. Sekvence má často charakter palindromu.
- K rozštěpení DNA dochází v místě, které je uvnitř nebo těsně vedle rozpoznávacího místa.
- Produktem štěpení jsou úseky DNA o definované délce. Označujeme je jako restrikční fragmenty.
- Nyní je známo asi 3500 RE, které rozpoznávají asi 160 různých sekvencí.



Endonuclease	DNA sequence	Cleavage products	
<i>Bam</i> HI	GGATCC CCTAGG	G GATCC CCTAG G	"Sticky" ends
<i>Eco</i> RI	GAATTC CTTAAG	G AATTC CTTAA G	"Sticky" ends
<i>Hind</i> III	AAGCTT TTCGAA	A AGCTT TTCGA A	"Sticky" ends
<i>Hae</i> III	GGCC CCGG	GG CC CC GG	Blunt ends
<i>Pst</i> I	CTGCAG GACGTC	CTGCA G G ACGTC	"Sticky" ends
<i>Sma</i> I	CCCGGG GGGCCC	CCC GGG GGG CCC	Blunt ends

Some Endonucleases

Sekvenčně specifické (restrikční) endonukleázy

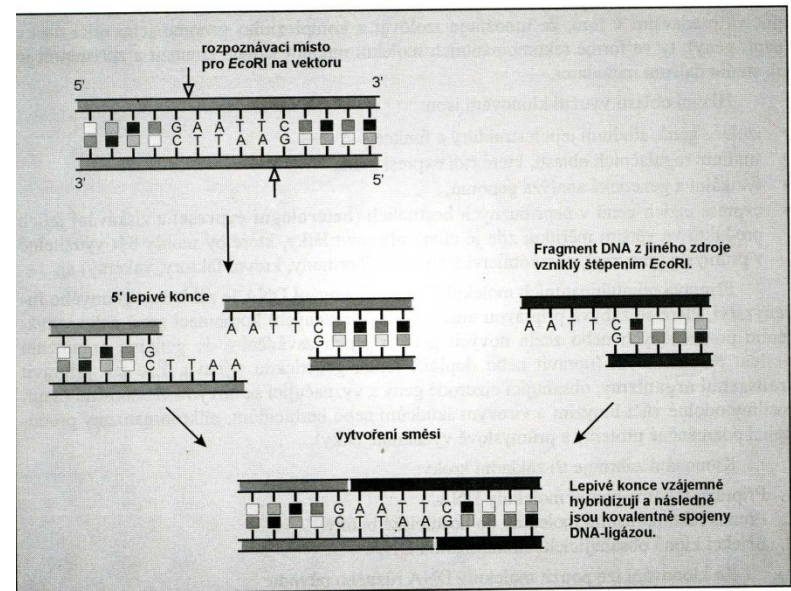
- Názvy restrikčních endonukleáz jsou odvozeny z počátečního (**E**scherichia, **S**taphylococcus) písmene rodového a prvních dvou písmen druhového (**coli**, **aureus**) jména organismu, z něhož byly izolovány.
- V některých případech je součástí názvu zkrácené označení konkrétního kmene (RY13→**R**, 3A→**3A**).
- Pokud daný organismus produkuje více různých restrikčních endonukleáz, odlišují se navzájem římskými číslicemi (*EcoRI*, *EcoRV*).

Označení enzymu	Producent enzymu	Rozpoznávací místo na sekvenci DNA	
		5' → 3'	3' ← 5'
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	GG↓CC	CC↑GG
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	G↓AATTC	CTTAA↑G
<i>Sau3AI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	↓GATC	CTAG↑
<i>PstI</i>	<i>Providentia stuartii</i>	CTGCA↓G	G↑ACGTC
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	CCC↓GGG	GGG↑CCC

- Některé RE se vyznačují tzv. relaxovanou specifitou, která se projevuje schopností enzymu štěpit za určitých reakčních podmínek blízké příbuzné sekvence.
- Např. *EcoRI* může vedle sekvence GAATTC štěpit i sekvence GGATTC, GGATTT a AGATTT.
- Jednotlivé RE jsou v různé míře citlivé k metylaci v rozpoznávaném místě. RE, které rozpoznávají stejnou sekvenci (izoschizomery), ale liší se svou citlivostí vůči metylacím, se využívají při studiu metylace DNA.

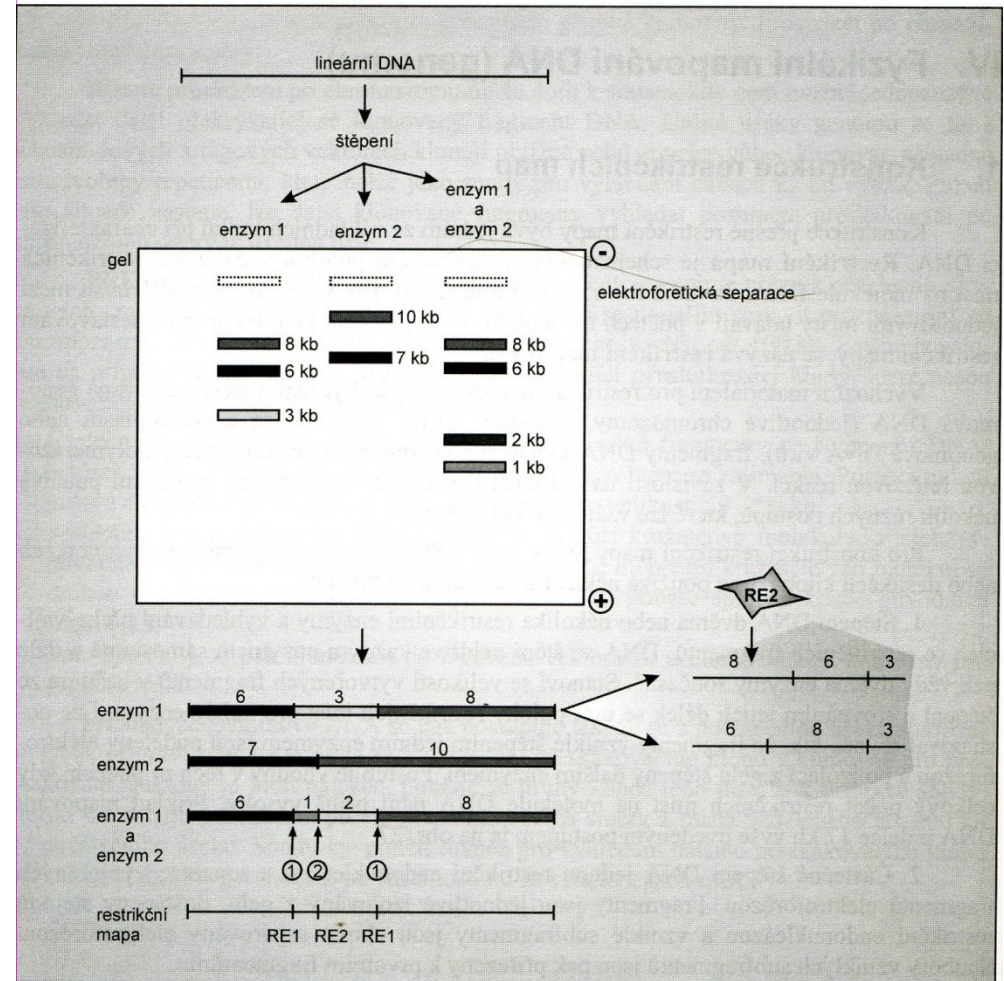
Využití restričních endonukleáz

- Štěpení DNA ve zcela konkrétních pozicích → vytváření fragmentů DNA o přesně definované délce.
- Tyto fragmenty mohou být použity ke klonování, koncovému značení, konstrukci restričních map apod.



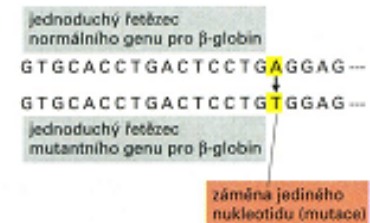
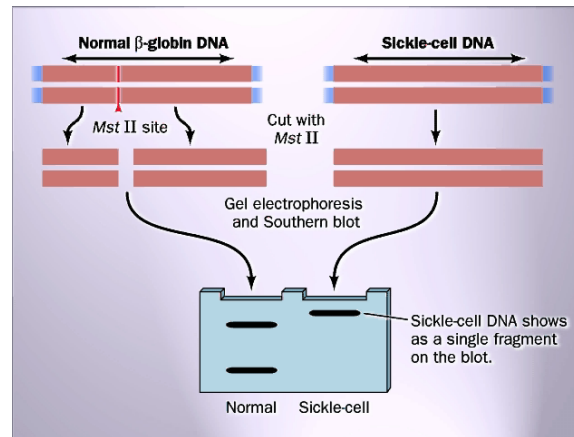
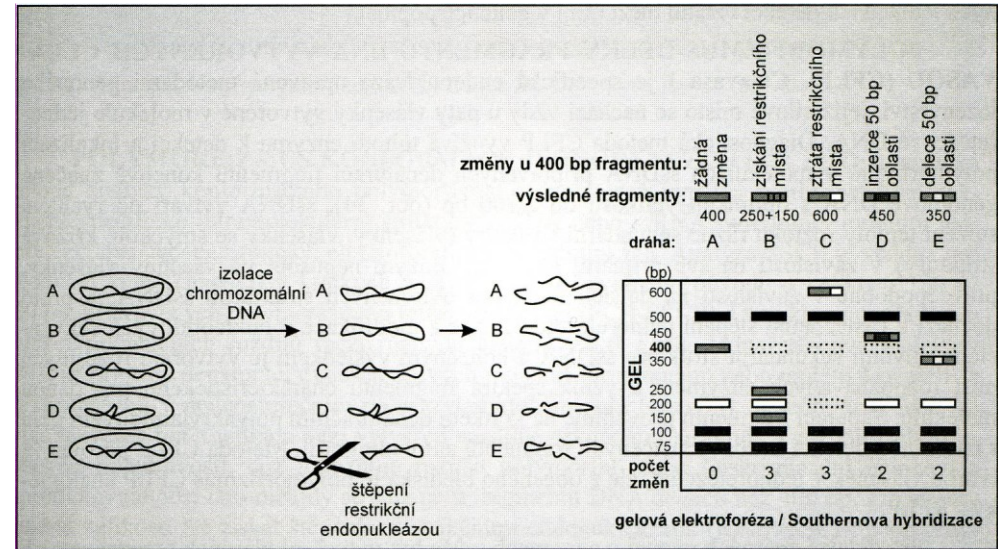
Konstrukce restrikční mapy kombinovaným štěpením dvěma restrikčními enzymy.

- Štěpení molekuly DNA enzymem 1 vedlo ke vzniku 3 kb, 6 kb a 8 kb fragmentů.
- Štěpení molekuly DNA enzymem 2 vedlo ke vzniku fragmentů o délce 7 kb a 10 kb.
- Abychom byli schopní seřadit jednotlivé fragmenty ve správném pořadí, je třeba provést kombinované štěpení oběma enzymy.
- Protože kombinované štěpení nechalo netknuté fragmenty 6 kb a 8 kb ze štěpení 1, ale došlo k rozštěpení 3 kb fragmentu, musí být restrikční místo enzymu 2 uvnitř 3 kb fragmentu a tento fragment musí ležet uprostřed molekuly DNA.
 - Pokud by 3 kb fragment byl na konci a ne uprostřed analyzované molekuly, potom by i štěpení samotným enzymem 2 muselo poskytnout 1 kb nebo 2 kb fragment.
- To, že cílové místo pro enzym 2 leží blíže 6 kb fragmentu než 8 kb fragmentu lze odvodit z faktu, že po štěpení enzymem 2 vznikají fragmenty o velikostech 7 kb a 10 kb.



Polymorfismus délky restrikčních fragmentů - RFLP

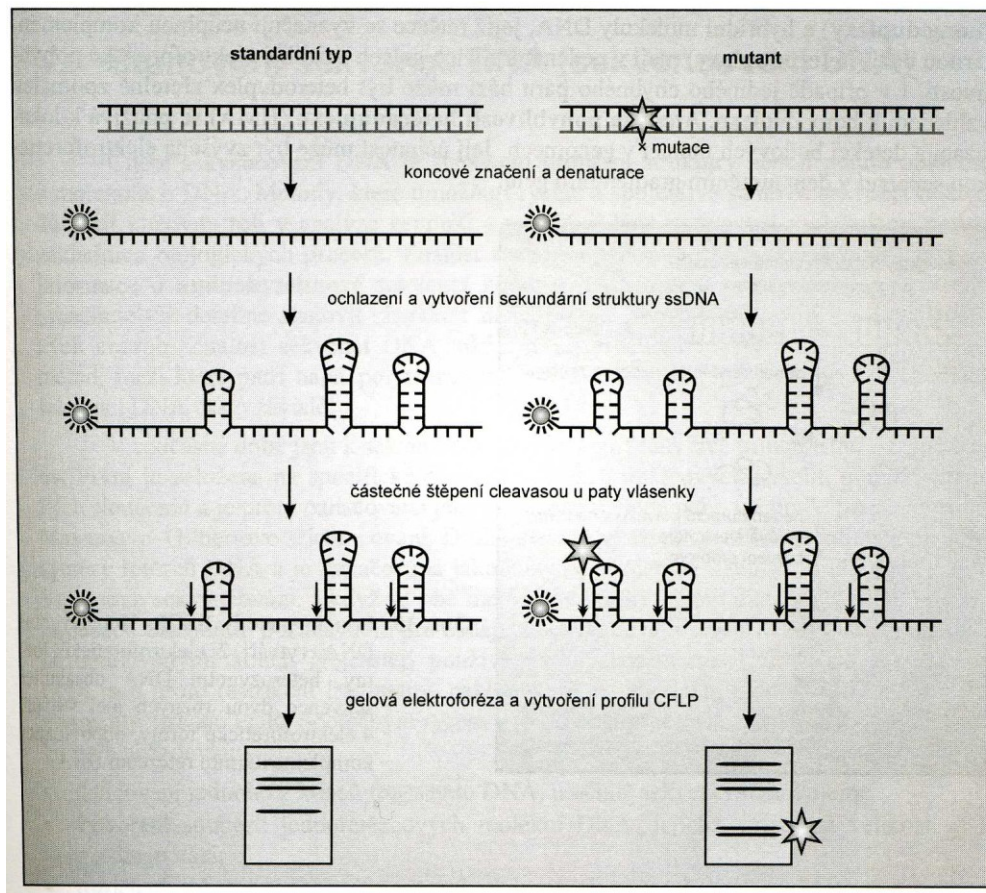
- Tato metoda se používá při analýze genomu.
- Využívá rozdíly v restrikčních mapách jedinců téhož druhu.
- Rozdíly jsou podmíněny různou délkou a počtem restrikčních fragmentů, které vznikají štěpením genomové DNA určitou restrikční endonukleázou.
- Tyto rozdíly vznikají jako důsledek buď **mutací**, které vedou ke vzniku (nebo zániku) cílových sekvencí pro tento typ enzymů, nebo jako důsledek přítomnosti různého **počtu repetitivních sekvencí, delecí, inzercí, případně přestaveb** ve specifických oblastech chromozomů.
- Vzniklé fragmenty lze rozdělit a detekovat gelovou elektroforézou.
- Výsledky se používají v lékařské diagnostice, v kriminalistice apod.
- **AFLP** – polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů: jde o rozdíly v délce amplifikovaných fragmentů vznikajících při použití některých variant PCR. Podstatou zde jsou změny v sekvencích pro vazebná místa primerů, případně delece a inzercie v amplifikovaných úsecích DNA.



MstII - CCTNAGG

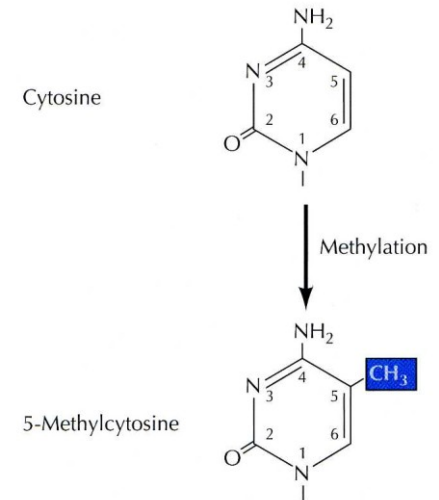
Cleavasa I

- Specifická endonukleasa upravená metodami genového inženýrství.
- Její cílové místo se nachází vždy u paty vlásenky vytvořené v molekule jednořetězcové DNA.
- Používá se při diagnostické metodě CFLP (Polymorfismus délky fragmentů DNA vytvořených cleavasou).
- Touto metodou se detekují a lokalizují polymorfizmy v molekulách ssDNA připravených denurací fragmentů koncově značené genomové DNA.
- Optimální velikost těchto fragmentů je do 2700 bp.
- ssDNA vytváří po rychlém ochlazení roztoku různé sekundární struktury v závislosti na své primární struktuře.
- Cleavasa I nepůsobí na všechny vlásenky, dochází pouze k částečnému štěpení ssDNA.
- Mutace a modifikace v nukleotidových sekvencích ovlivňují sekundární strukturu ssDNA. Konečným výsledkem je vytvoření rozdílných míst rozpoznávaných enzymem a vznik spektra fragmentů, které je charakteristické pro danou molekulu.
- Jde vlastně o analogii s RFLP metodou.



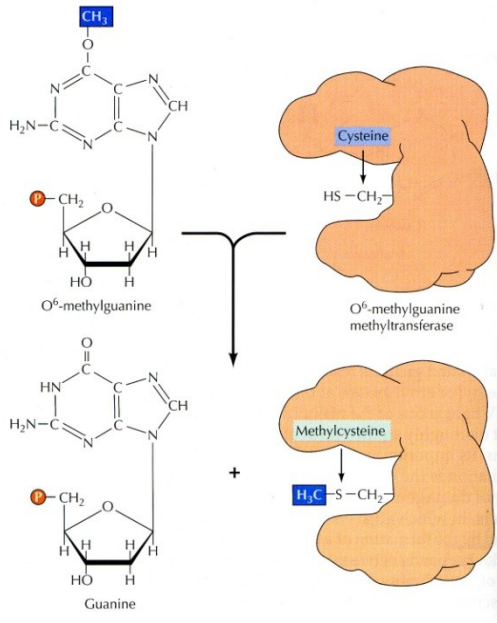
Metylázy

- Patří mezi tzv. **modifikující enzymy**, které přisyntetizováním skupin do určitých poloh (v tomto případě metylové skupiny) vytvářejí minoritní nukleotidy (nacházejí se např. v tRNA, účastní se tvorby terciární struktury).
- U prokaryot v DNA působením metylázy vzniká **6-N-metyladenin**.
- **5-methylcytosin** se nachází jak u prokaryot, tak i eukaryot.
- Význam metylovaných bází spočívá u prokaryot ve specifickém označení určitých sekvenčních motivů vlastní DNA – tím je DNA organismu vlastní označena a chráněna před působením endonukleáz, které vyhledávají a štěpí cizí (fágovou) DNA.
- U eukaryot má metylace cytosinu význam pro regulaci genové exprese. Pokud je cytosin v určitých sekvenčních motivech metylován, je zabráněno transkripci příslušného genu.

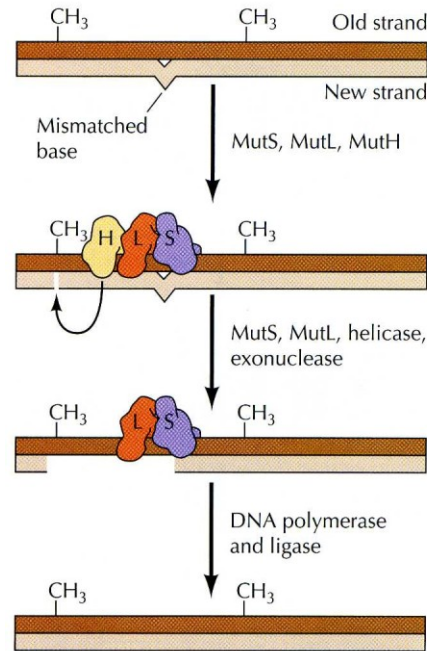


Reparační enzymy

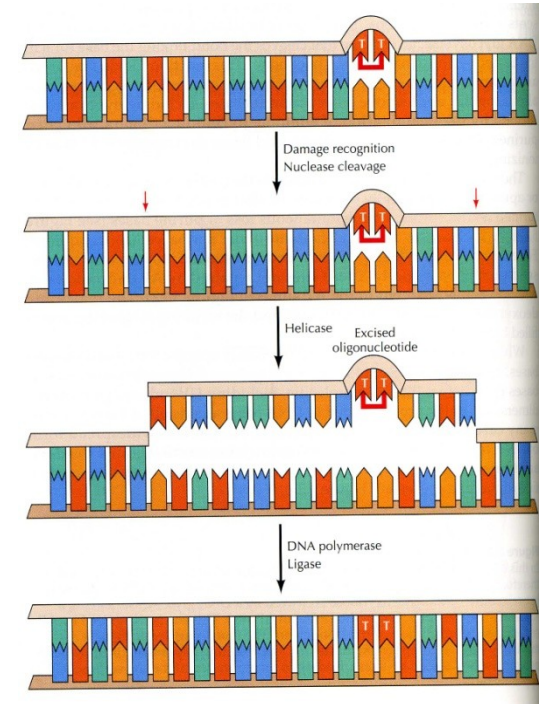
- Glykosylasy štěpí vazbu mezi cukrem a basí
- Excidasy – přeruší cukr-fosfátový řetězec před a za porušeným místem.
- Demetylasylasy – odstraňují metyly z basí.



Oprava O⁶-methylguaninu



Oprava špatného párování v *E. coli*: opravný systém rozpoznává a vystřihuje špatně spárovanou bázi z nově nasyntetizovaného řetězce – ten je dosud nemetylovaný.



Vystřížení a oprava tyminového dimeru