

# ENZYMOVÁ DEGRADACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

## **Zúčastněné enzymy:**

1. **NUKLEÁZY**: hydrolýza polynukleotidových řetězců,  
(různorodost co do substrátové specificity a specificity účinku)
2. fosforylázy (PNPáza) - při depolymeraci polyribonukleotidů  
přenášejí odštěpenou část řetězce na anorganický fosfát  
nejistá biologická role
3. fosfomonoesterázy (odštěpují koncový fosfát)

## **Úloha:**

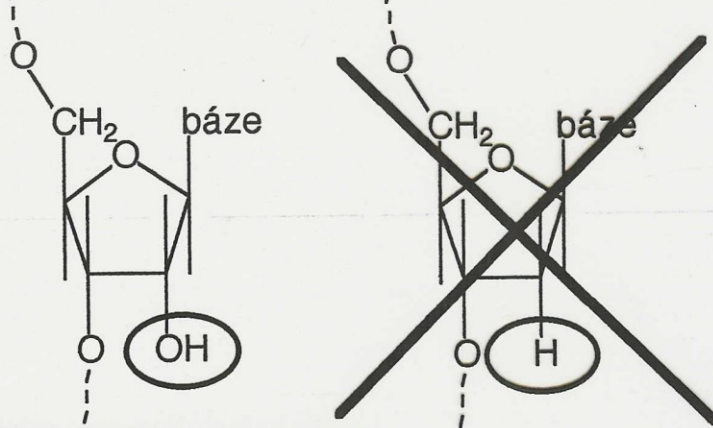
- trávicí enzymy (intra- a extracelulární)
- odbourání RNA (zejm. mRNA)
- sestřih prekurzorových molekul RNA
- reparace DNA
- štěpení cizorodých DNA

# KLASIFIKACE NUKLEÁZ

## A. PODLE SUBSTRÁTOVÉ SPECIFICITY

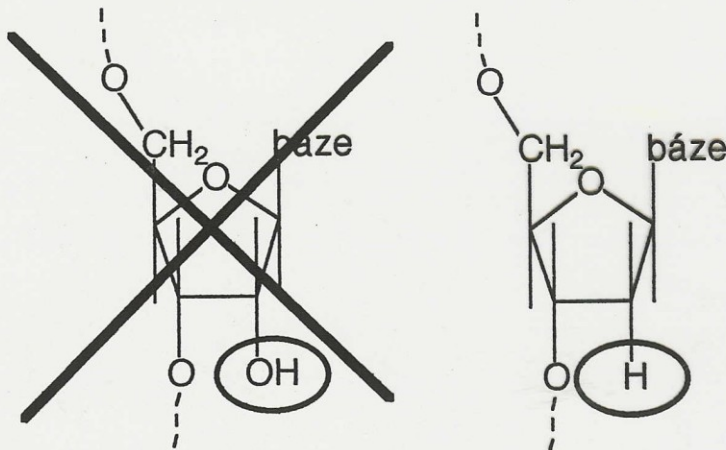
### 1. RIBONUKLEÁZY

štěpí pouze RNA => striktně vyžadují v substrátu **přítomnost 2'-OH** skupiny v cukerném zbytku



### 2. DEOXYRIBONUKLEÁZY

štěpí pouze DNA => striktně vyžadují **nepřítomnost 2'-OH** skupiny v cukerném zbytku



### 3. "NESPECIFICKÉ" NUKLEÁZY

štěpí oba typy substrátu (jsou obvykle „nespecifické“ pouze v tomto smyslu)

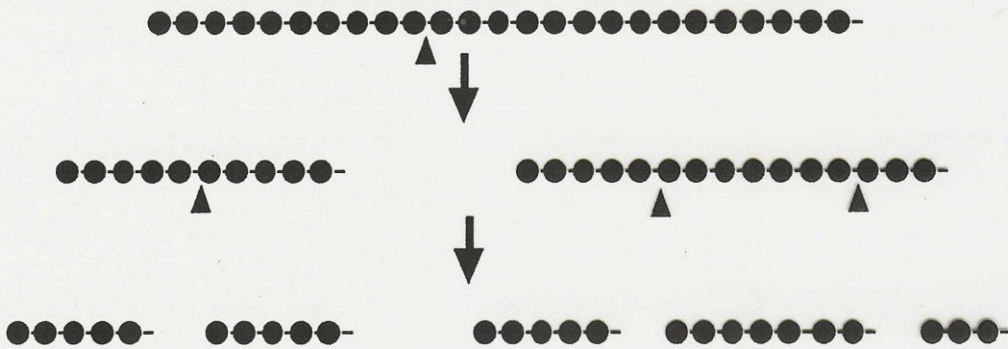


# B. PODLE ZPŮSOBU ATAKU POLYNUKLEOTIDOVÉHO ŘETĚZCE

## 1. ENDOLYTICKÉ ENZYMY (ENDONUKLEÁZY)

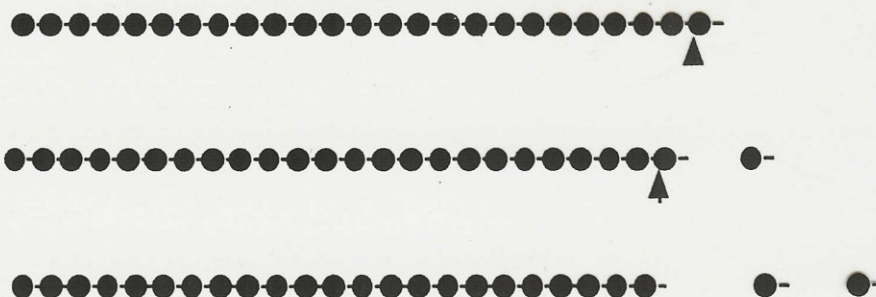
účinkují kdekoli **uvnitř řetězce**, produkují oligonukleotidy a způsobují rychlé změny fyzikálních vlastností (délka molekul => viskozita, sedimentace apod.)

obvykle nejsou schopny odštěpovat mononukleotidy => neštěpí dinukleotidy a trinukleotidy

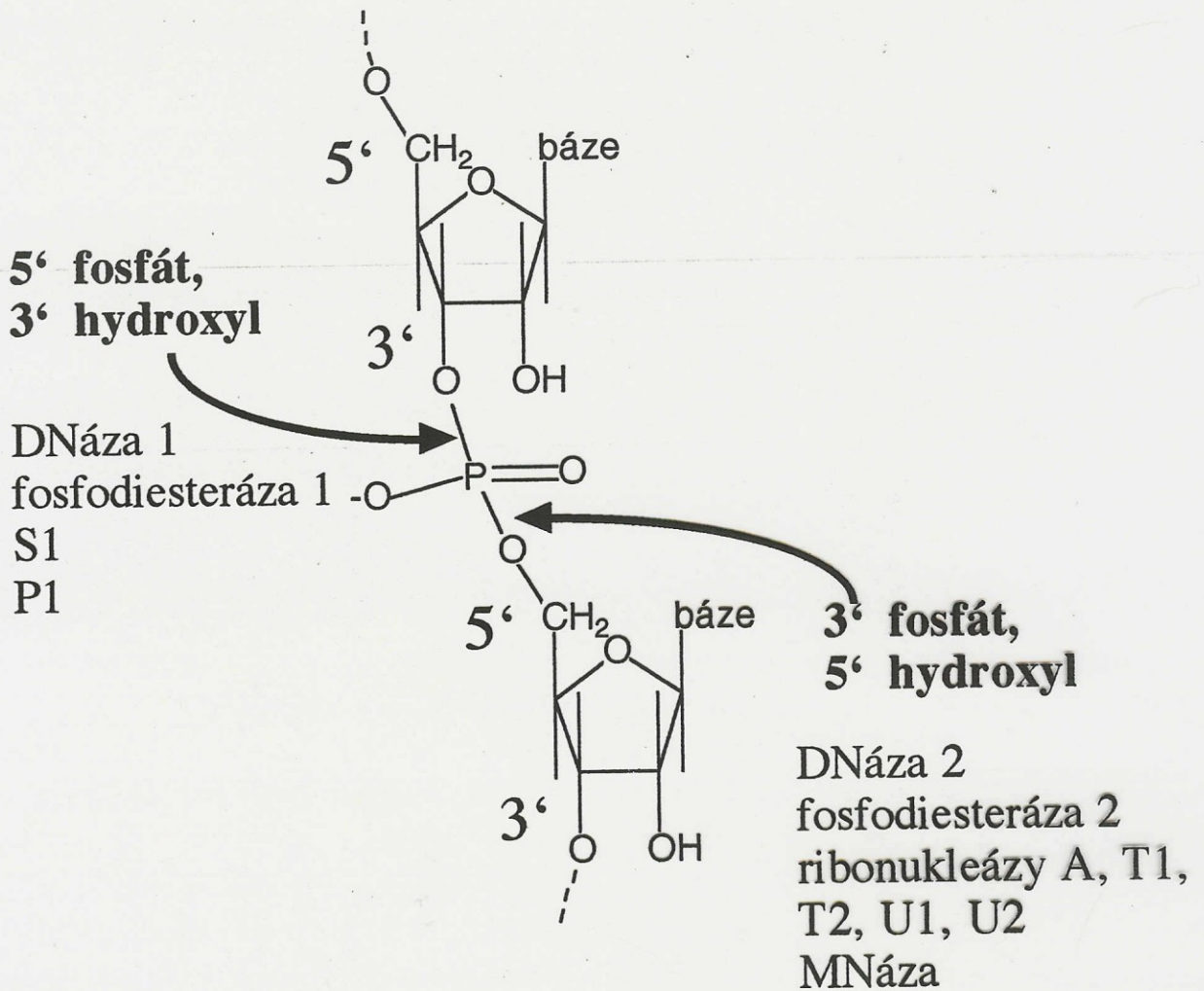


## 2. EXOLYTICKÉ ENZYMY (EXONUKLEÁZY)

postupně odštěpují mononukleotidy z konců řetězce  
změny fyzikálních vlastností polynukleotidů jsou pomalé



# C. PODLE ZPŮSOBU ŠTĚPENÍ FOSFODIESTEROVÉ VAZBY





## DALŠÍ KRITÉRIA:

### 1. sekundární struktura substrátu

(jednořetězcové vs. dvouřetězcové polynukleotidy, otevřené struktury)

- někdy může struktura substrátu ovlivnit způsob ataku enzymem (BAL31, MNáza)

---

### 2. směr štěpení u exonukleáz ( $5' \rightarrow 3'$ , $3' \rightarrow 5'$ )

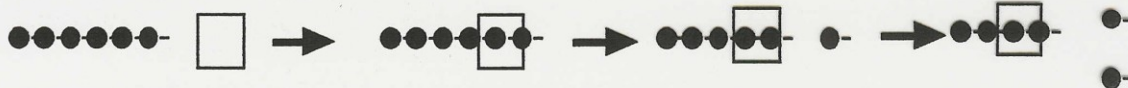
a požadavek na přítomnost koncového fosfátu

(fosfodiesterázy, exonukleáza III)

---

### 3. procesivní a distributivní exonukleázy:

procesivní: zůstávají vázány na stejný řetězec, dokud jej celý nerozštěpí (Exo III, RNáza II)



distributivní: oddisociují po odštěpení každého nukleotidu (fosfodiesterázy)



### 4. preferenční štěpení v sousedství určitého nukleotidu

báze - A, C, G, T/U (ribonukleázy A, T1, T2, U1, U2)

nebývá absolutní - obvykle se liší rychlost reakce

---

### 5. absolutní specifita pro určitou sekvenci

restrikční endonukleázy

**citlivost k metylaci cílového místa**

## „NESPECIFICKÉ“ ENDONUKLEÁZY

štěpí endolyticky RNA i DNA

### Mikrokokální nukleáza (MNáza) (*Staphylococcus*)

štěpí RNA a denaturovanou DNA na směs mono- a oligonukleotidů s 3'-koncovým fosfátem

(i ds DNA je pomalu štěpena: nejprve dvouřetězcové zlomy a poté exolyticky)

preferuje A+T bohaté oblasti; vyžaduje  $\text{Ca}^{2+}$

---

### Nukleázy selektivní pro jednořetězcové nukl. kyseliny

štěpí s vysokou selektivitou ss DNA a RNA, tvoří 5-fosfátové konce  
využití - detekce otevřených oblastí v dsDNA

detekce chemicky modifikovaných míst

N. z *Neurospora crassa* -  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ; preference pro G;

při vyšších konc. NaCl zcela specifická pro ss polynukleotidy

**Nukleáza S1** (*Aspergillus oryzae*)- kyselé pH optimum (4.5),  $\text{Zn}^{2+}$

**Nukleáza P1** (*Penicillium citrinum*)-neutrální pH,  $\text{Zn}^{2+}$ ,

štěpí i při vysokých teplotách (70 °C)

„Mung bean“ **nukleáza I** - kyselé pH optimum,  $\text{Zn}^{2+}$ , štěpí při nízké iontové síle (inhibice solemi)

---

### **Nukleáza BAL31** (*Alteromonas espejiano*)

extrémní tepelná stabilita, štěpí při vysoké iontové síle (7 M CsCl), je aktivní v 5% SDS; vyžaduje  $\text{Mg}^{2+}$  nebo  $\text{Ca}^{2+}$

jednořetězcové RNA a DNA štěpí endolyticky

nativní DNA štěpí exolyticky od obou konců

(zkracuje současně oba řetězce => využití při konstrukci

rekombinantních DNA)



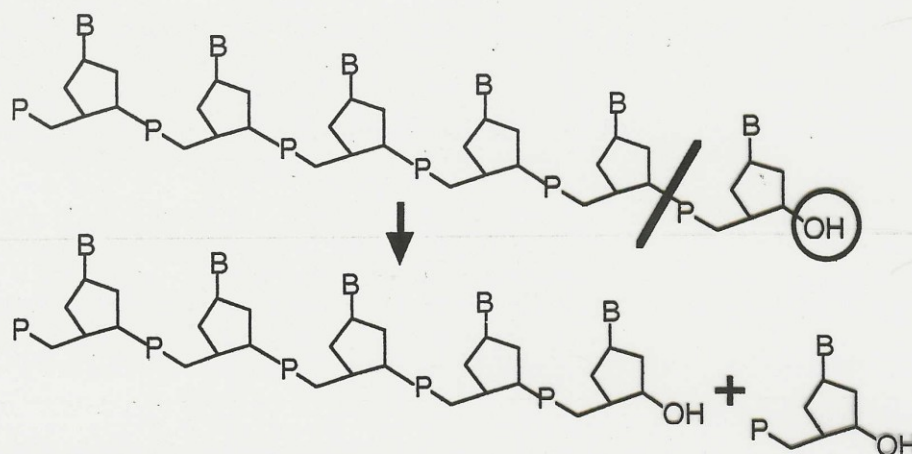
## B. NESPECIFICKÉ EXONUKEÁZY

### Fosfodiesteráza I (z hadího jedu)

odštěpuje z RNA a DNA (produktů štěpení DNázou I)

**nukleotid 5-fosfáty**

štěpí ve směru **3' → 5'**, vyžaduje volný **3' koncový hydroxyl**

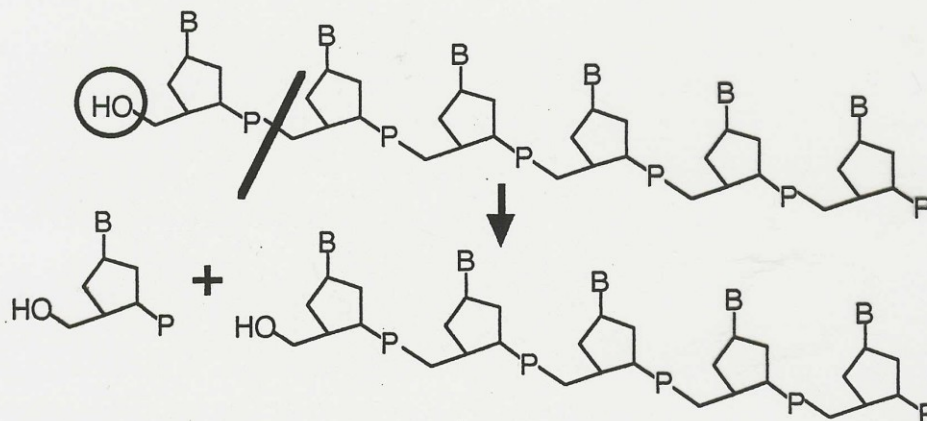


### Fosfodiesteráza II (ze sleziny)

odštěpuje z RNA a DNA (produktů štěpení DNázou II)

**nukleotid 3-fosfáty**

štěpí ve směru **5' → 3'**, vyžaduje volný **5' koncový hydroxyl**



### Exonukleáza III a exonukleázová aktivita DNA polymerázy I

z *E. coli* :- štěpí jeden řetězec duplexní DNA nebo RNA v hybridu s DNA



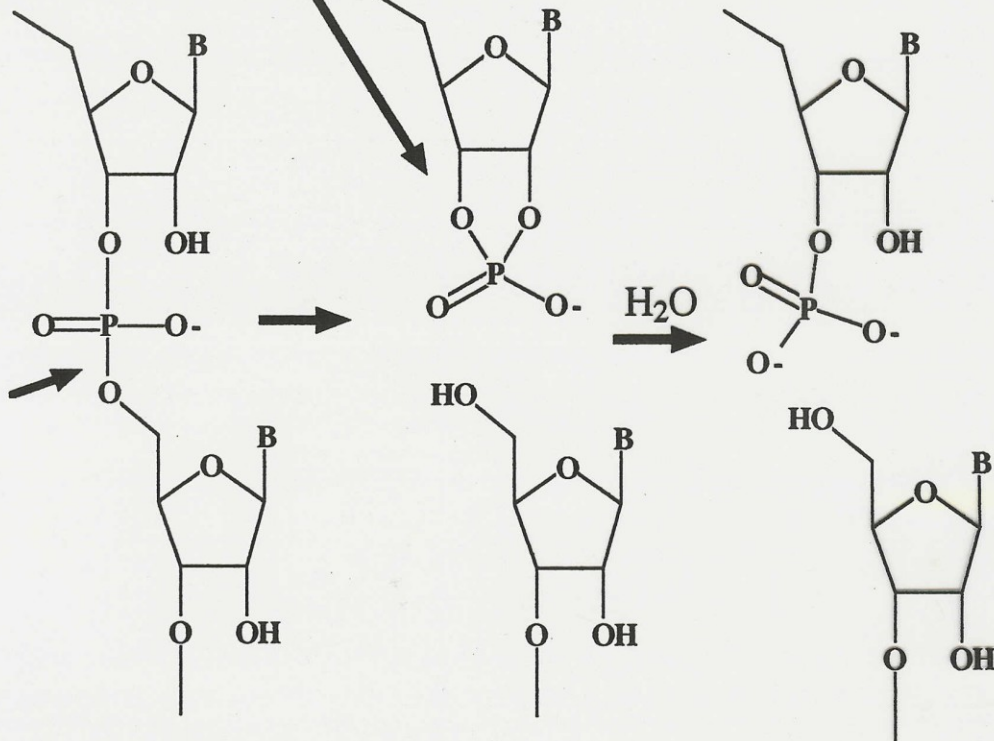
# RIBONUKLEÁZY

- enzymy zúčastněné v procesech **odbourání RNA** - dobře charakterizované, využití v laboratoři pro štěpení/odstranění RNA obvykle produkují 3'-koncový fosfát

-enzymy zúčastněné v „**procesování**“ prekurzorových RNA - málo charakterizované produkují 5' - koncový fosfát

## A. ENDONUKLEÁZY PRODUKUJÍCÍ 3'-KONCOVÝ FOSFÁT

vesměs štěpí **dvoustupňovým reakčním mechanismem** přes **cyklický 2', 3' fosfodiester** (RNázy A, T, U, L); z toho důvodu štěpení DNA nepřichází v úvahu



Hydrolýza cyklického diesteru je enzymem řízena do polohy 3' (stejným mechanismem probíhá i alkalická hydrolýza RNA; při ní však vzniká statistická směs 2' a 3' fosfátů)

**vesměs vykazují preferenční štěpení v sousedství určitého nukleotidu**

## Pankreatická ribonukleáza (RNáza A)

jeden z nejlépe prostudovaných proteinů

syntetizována chemicky (homogenní i heterogenní syntézou)

jako první uměle vyrobený aktivní enzym

jednoduchý protein, molekulová hmotnost **13 700**

široké pH optimum (**pH 7 - 8.2**) teplotní optimum **65 °C**

extrémní **tepelná stabilita** (nelze inaktivovat varem)

inaktivuje se alkáliemi

RNázy B, C, D: též enzym různě glykosylovaný na Asp-34

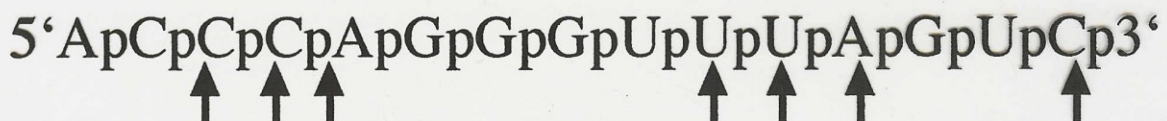
RNáza S: uměle získaná štěpením subtilisinem

(mezi 20. a 21. aminokyselinou)

**PREFERENČNĚ štěpí na 3' straně od pyrimidinového nukleotidu**

(„za“ fosfátem)

např.:



specifita není absolutní, Ap- vazby jsou též pomalou štěpeny



**Ribonukleáza T1** (*Aspergillus oryzae*)

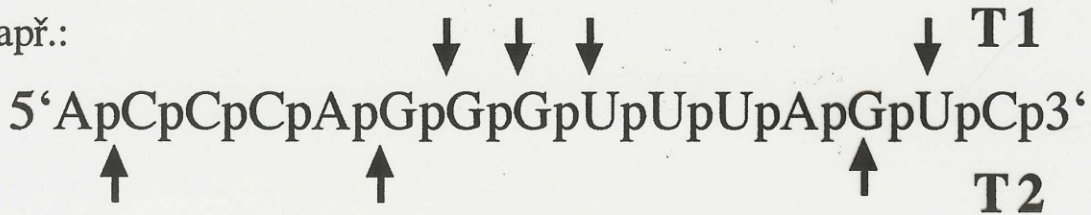
neutrální pH, tepelná stabilita,  $M_r$  11 085

preferenčně štěpí na 3' straně od **guaninového nukleotidu**

**Ribonukleáza T2** (*Aspergillus oryzae*)

preferenčně štěpí na 3' straně od **adeninového nukleotidu**

např.:

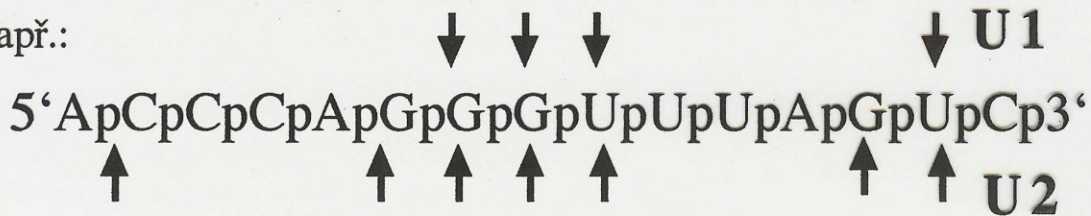


**Ribonukleáza U1** a **U2** (*Ustilago sphaerogena*)

**U1** preferenčně štěpí na 3' straně od **guaninového nukleotidu**,

**U2** obecně od **purinového nukleotidu**

např.:



**RNáza I** (*E. coli*)

štěpí ssRNA bez zjevné preference (ale polyU je štěpena rychleji než ostatní homopolyribonukleotidy)

---

**RNáza PhyI** a **PhyII** (*Physarum polycephalum*)

využití při sekvenování RNA (v kombinaci s dalšími ribonukleázami)

**PhyI** štěpí UpN mnohem rychleji než CpN

**PhyII** silně preferuje GpN, zatímco ApN a PypN zůstávají neštěpeny



# INHIBITORY RIBONUKLEÁZ

využití zejména při ochraně RNA během její izolace

## 1. kompetitivní inhibice oligonukleotidy

např. ApUp inhibuje RNázu A („špatný“, pomalu reagující substrát)  
2'-5' GpG RNázu T1 (neaktivní izomer substrátu)  
analogy oligonukleotidů s arabinózou místo ribózy

## 2. polyanionty

tvoří komplex s kladně nabitým enzymem (místo substrátu); heparin,  
polyvinylsulfát

## 3. inaktivace SDS, guanidiniumizothiokyanátem

inaktivují enzymy tím, že je denaturují zároveň se používají pro lýzi buněk

## 4. RNasin

proteinový inhibitor, který tvoří s RNázou A latentní komplex před tím, než je sekretována

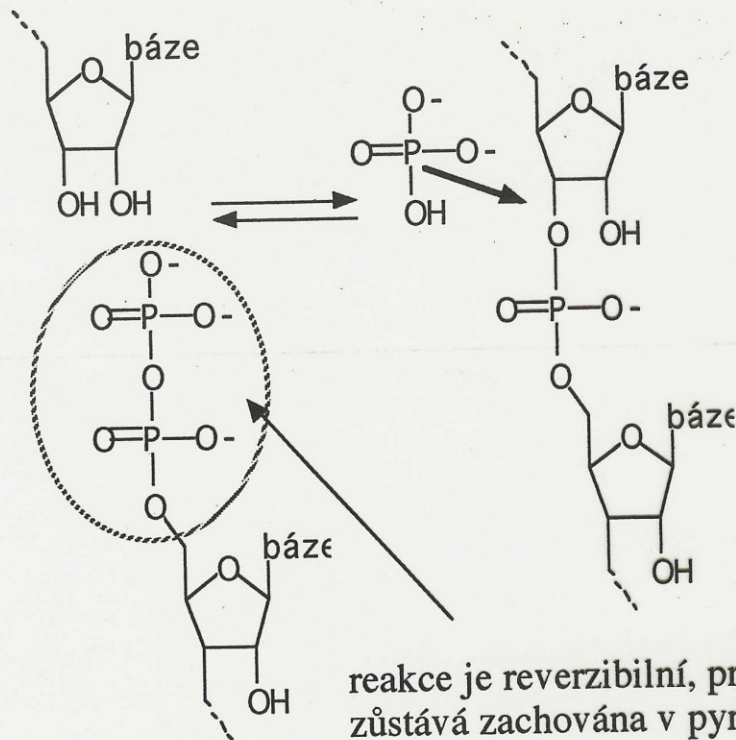
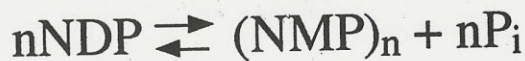
## 5. DEPC

běžná inaktivace RNáz v laboratoři X modifikuje nukleové kyseliny!!

# POLYNUKLEOTID FOSFORYLÁZA

(PNPáza); enzym běžně rozšířený v bakteriích

není to nukleáza - nekatalyzuje hydrolýzu, ale reverzibilní reakci



reakce je reverzibilní, protože energie zůstává zachována v pyrofosfátové („makroergické“) vazbě

- reakce ve směru polymerace neprobíhá podle žádného templátu, vzniká statistický polymer
- může prodlužovat oligonukleotidový primer
- při 0 °C štěpí pouze poly(A) => analýza mRNA

enzym z *E. coli*: tři identické podjednotky, každá okolo 90 000  
vyžaduje  $\text{Mg}^{2+}$  (lze nahradit  $\text{Mn}^{2+}$ )

využití: biosyntéza polynukleotidů, radioaktivní značení RNA  
velký význam při rozluštění genetického kódu

in vivo - ne zcela jasná funkce, zřejmě normálně katalyzuje depolymeraci RNA (při zachování chemické energie)  
- odbourání mRNA v kooperaci s RNázou II



# DEOXYRIBONUKLEÁZY

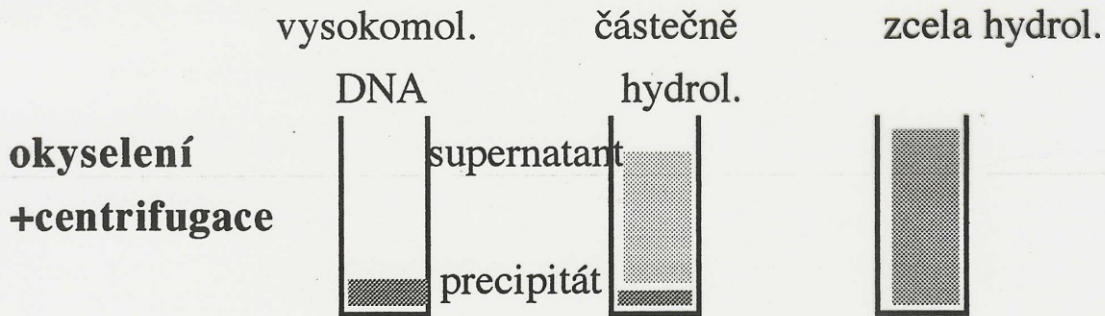
## A. DNA endonukleázy

dělení na „třídy“ I (produkuje 5' fosfáty) a II (3'fosfáty)

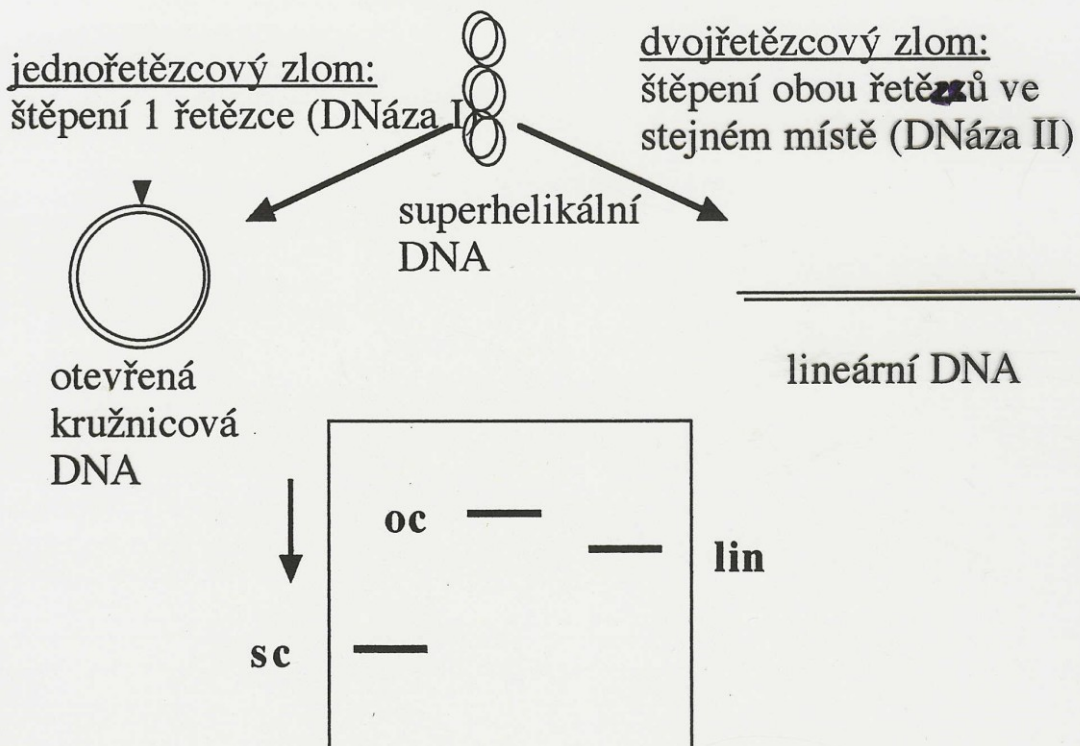
(srovn. fosfodiesterázy)

měření aktivity:

**a. vysoké aktivity** - měření podílu rozpustného v kyselinách (měří se UV absorbance nebo radioaktivita)



**b. malé aktivity** - štěpení superhelikální DNA: jediné přerušení řetězce způsobí změnu elektroforetické mobility





## Pankreatická deoxyribonukleáza I (DNáza I) (trávicí enzym)

štěpí DNA až na di- a oligonukleotidy (v průměru tetranukleotidy) s 5-koncovým fosfátem (substráty pro fosfodiesterázu I)

$M_r=31\ 000$ , pH optimum 6.8 - 8.2

má dvě disulfidové vazby, redukci (merkapt ethanol) se inaktivuje; k inaktivaci nedojde v přítomnosti  $Ca^{2+}$

vyžaduje  $Mg^{2+}$  (4 mM) => inhibice EDTA, citrátem...

$Mn^{2+}$  může  $Mg^{2+}$  nahradit (změna specificity)

vysokomolekulární nativní DNA je hydrolyzována rychleji než denaturovaná DNA a krátké řetězce => autoretardace

v počátečním stadiu - jednořetězcové zlomy

preferenčně jsou štěpeny 5'PupPy3' vazby

syntetické polynukleotidy: v poly(dG).poly(dC) je dC řetězec štěpen jen v přítomnosti  $Ca^{2+}$  (vedle  $Mg^{2+}$ )

nebo je-li  $Mg^{2+}$  nahrazen  $Mn^{2+}$

inhibitor: monomerní aktin

## DNáza II (brzlík, slezina; v lysozomech - intracelulární)

$M_r$  40 000,

pH optimum 4.5 - 5.5,

nevyžaduje  $Mg^{2+}$  (inhibuje)

vytváří dvouřetězcové zlomy, tvoří 3'-fosfátové konce

konečný produkt - průměrně hexanukleotidy

**Endonukleáza IV** - AP endonukleáza třídy II; asi 10 % AP aktivity (zbytek endonukleáza VI)

**Endonukleáza V** - nejlépe štěpí ssDNA na krátké oligonukleotidy, kromě toho též vytváří jednořetězové zlomy v ds DNA poškozené UV zářením (pyrimidinové dimery => distorze) a v dsDNA obsahující uracil místo thyminu; produkuje 5' koncový fosfát

**Endonukleáza VI** - totožná s exonukleázou III

AP endonukleáza třídy II (a 3' ->5' exo... a 3' fosfatáza >>)  
sama je schopna štěpit AP místo a rozšiřovat „mezeru“ při opravě

**Endonukleáza *uvrABC*** - vyštěpuje pyrimidinové dimery

**Restrikční endonukleázy** - štěpí dsDNA ve specifických sekvencích  
>>>

**Endonukleázy indukované fagy** po infekci bakteriální buňky

**T4 endonukleáza II** - vytváří jednořetězové zlomy v dsDNA (jiné než T4 DNA) vzdálené asi 1 kbp, 5' -koncový fosfát

**T4 endonukleáza IV** - podobný účinek, ale „hustěji“ a vždy s dCMP koncem

protože T4 DNA obsahuje 5-hmC, není štěpena



## Endodeoxyribonukleázy z *E. coli*

(*E. coli* obsahuje asi 9 DNáz kódovaných chromozomem; často mají význam v procesech reparače)

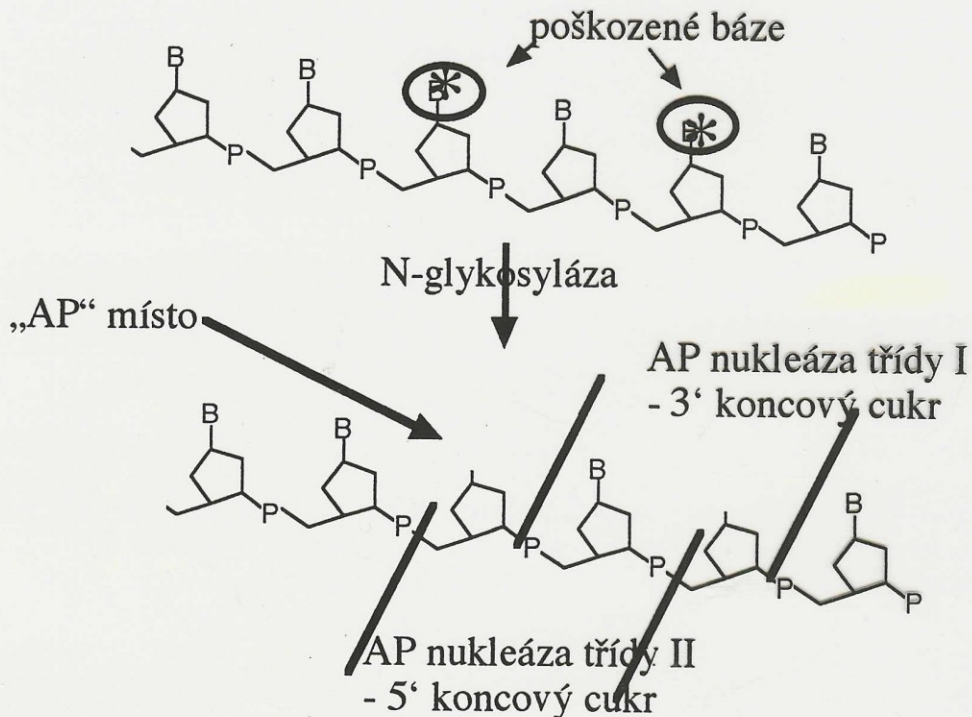
**Endonukleáza I** - náhodně štěpí dsDNA na fragmenty asi 400 bp dlouhé (dvojřetězcové zlomy)

denat. DNA štěpí asi 7x pomaleji

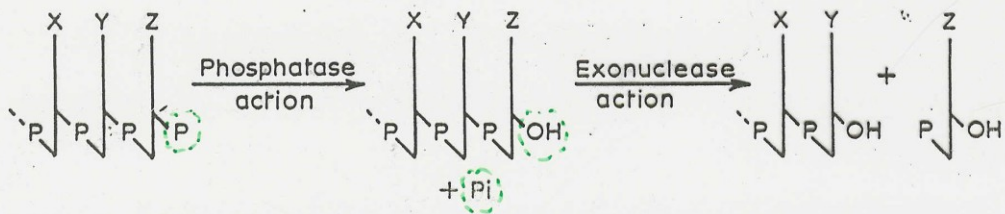
dsRNA ji inhibuje (tvorí v buňce latentní komplex, aktivace RNázou)

**Endonukleáza II** - jde ve skutečnosti o směs enzymů zúčastněných v procesech odstranění poškozené DNA, včetně N-glykosylázy a AP endonukleáz >>)

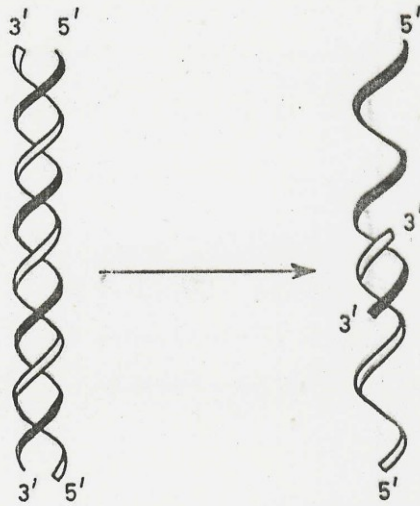
**Endonukleáza III** - jednoduchý enzym ( $M_r$  27 000), který vykazuje kombinovanou aktivitu **N-glykosylázy** (odstraňuje poškozené báze) a **AP-endonukleázy** (štěpí v místě chybějící báze) třídy I



další odbourání - exonukleázy třídy I, II



**Fig. 4.8** Sequential action of *E. coli* exonuclease III (DNA phosphatase-exonuclease) on a DNA chain terminated by a nucleotide carrying a 3'-phosphate group.



**Fig. 4.9** Mechanism of action of stepwise attack of *E. coli* exonuclease III on native DNA beginning at the 3'-hydroxyl termini.



**Exonukleáza IV** působí podobně jako fosfodiesteráza I (nejlépe štěpí DNA předštěpenou DNázou I => „oligonukleotid fosfodiesteráza“)

**Exonukeláza V** (*recBC* nukleáza) - úloha při reparaci a rekombinaci štěpí exolyticky ds i ss DNA na oligonukleotidy za současné hydrolýzy ATP (ATP dependentní DNáza a naopak); endonukeláza pro ssDNA pro nukleázovou aktivitu vyžaduje  $Mg^{2+}$ ; bez něj odvíjí dsDNA (vyžaduje ATP, stimulována ssb proteiny)

### **Exonukleázové aktivity DNA polymerázy I**

**A. 3'->5' EXO- AKTIVITA** (proti směru polymerace) - zachovaná v Klenowově fragmentu (76 000); většina prokaryotických DNA polymeráz (vč. *E. coli* II a III) od 3'-OH konce odštěpuje monofosfáty jako exo I (ale štěpí i dinukleotidy); preferuje ds DNA, neštěpí řetězce s 3'-fosfátem ani RNA význam - opravný mechanismus při polymeraci; ihned odstraní omylem zabudovaný „nepasující“ nukleotid (při absenci nukleotidtrifosfátů odbourá celý řetězec).

**B. 5'->3' EXO- AKTIVITA** (po směru polymerace)

- malý fragment (34 000)

zcela specifická pro ds DNA („na templátu“);

bez ohledu na 5' -koncový fosfát

odštěpuje z většiny mononukleotidy, 20-25 % jsou di- a delší oligos

=>může vyštěpit pyrimidinové dimery (reparace)

je RNázou H (odstraňuje primery při replikaci)

„nick translation“

## Exonukleázy z *E. coli*

**Exonukleáza I** - štěpí pouze ssDNA (ne ds ani RNA) od 3'-OH konce na 5' monofosfáty, až zbyde dinukleotid (ten neštěpí)  
štěpí i fágovou DNA obsahující glukosylovaný 5-hmC

**Exonukleáza II** - 3'->5' aktivita DNA polymerázy I >>

**Exonukleáza III** - 3'->5' exonukleáza, 3'-fosfatáza, AP endonukleáza

Fosfatázová aktivita: odštěpí 3' fosfát jako anorganický, ale ne z mono- a oligonukleotidů a z RNA, pouze z ds DNA

Exonukleázová aktivita: v ds DNA odštěpuje monofosfáty od 3' konce, pokud není fosforylovaný (pokud je, fosfát si odstraní); rovněž štěpí RNA v DNA:RNA hybridu (RNáza H)  
(10 000x rychleji)

AP-endonukleázová aktivita (třída II), = endonukleáza VI - asi 85 %  
AP aktivity v *E. coli*

„COMMON SITE MODEL“: enzym má tři oblasti:

a/ - rozeznává deoxyribózu v „neštěpeném“ řetězci

b/ - štěpí 3' fosfáty ve druhém řetězci; avšak pouze tehdy, když

c/ - nalezne bud' <sup>NE</sup>spárovaný deoxyribonukleotid (=> AP aktivita)

nebo 3' - koncový fosfát (=> fosfatáza)

nebo 3'-OH koncový nukleotid (je na konci tranzientně nespárovaný - srovn. DNA polymeráza I) (=> exo)



# RESTRIKČNÍ ENDONUKLEÁZY

## „story“:

při primární infekci bakterie fágem fág špatně roste  
avšak: při reinfekci fágem, který „přežil“ primární infekci, roste již dobře

## proč:

v bakteriích existují endonukleázy vysoce *specifické k určité sekvenci* (štěpí jen tehdy, pokud ji rozpoznají) - restrikční endonukleázy

vlastní DNA je chráněna modifikací (metylací >>) cílového místa;  
modifikované místo restriktáza nepozná a neštěpí

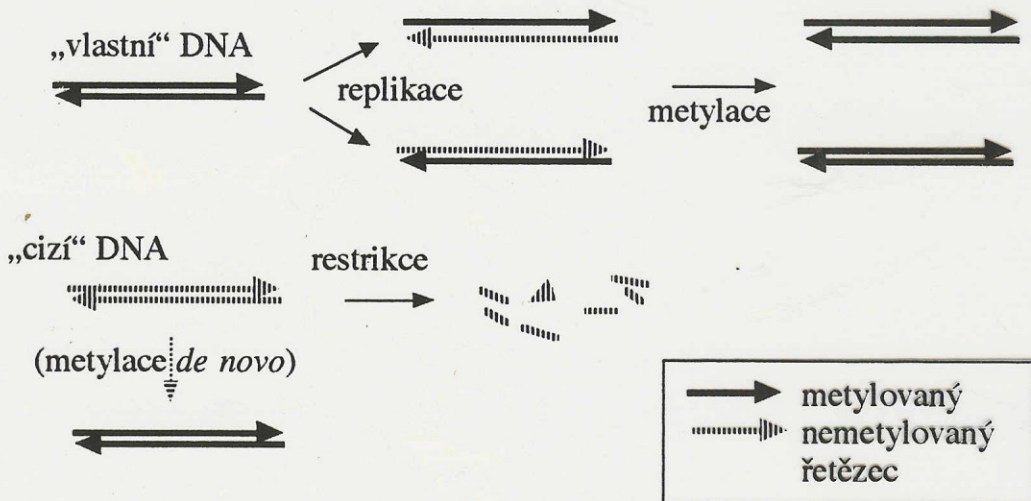
-při první infekci fág nemá metylovaná restrikní místa a je štěpen;  
avšak některé molekuly fágové DNA jsou „omylem“ metylovány („de novo“), ty přežijí a při příští infekci téhož hostitele jsou považovány za vlastní DNA

PRINCIP METYLACE a RESTRIKCE: restriktázy jsou buď samy metylázami (typ I a III) nebo mají své komplemetární metylázy (typ II)

po replikaci je jeden řetězec metylován, druhý ne; taková místa jsou rozpoznána a „dometylována“

místa nemetylovaná v obou řetězcích jsou rozpoznána a DNA štěpena  
místa metylovaná v obou řetězcích nejsou rozpoznána

s určitou frekvencí dochází k metylaci „de novo“, tj. v místech nemetylovaných v obou řetězcích



## Restriktázy typu I

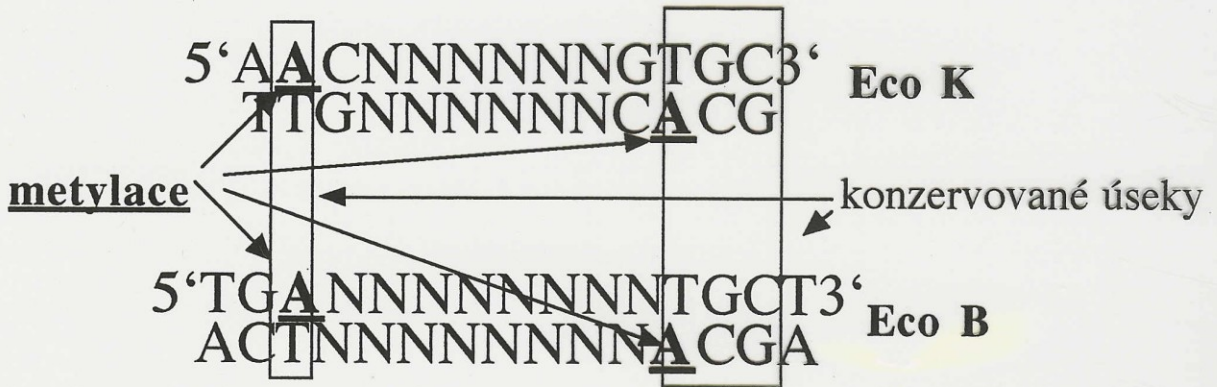
multifunkční komplexní proteiny

-nukleázová (vyžaduje ADP, AdoMet a  $Mg^{2+}$ ), metylázová a ATPázová aktivita

**EcoB, EcoK** - tři podjednotky, produkty tří genů (*hsdR*- restrikce, *hsdM*-metylace, *hsdS* - specificita)

1. nejprve naváže AdoMet => allosterická změna na aktivní formu

2. nspecificky interaguje s DNA, migruje podél DNA (lineární difuze) k místu, které specificky rozpozná:



3. reakce podle stavu rekogničního místa (<<);

-metylace v reakci stimulované ATP v zcela metylovaném místě; ve zcela nemetylovaném s frekvencí asi 0.2 % (přeživší fágy)

-restrikční štěpení - **mimo rekogniční místo** ve dvou stupních (jeden a po chvíli druhý řetězec „o kus vedle“ (posunutý zlom); poté se nukleázová aktivita zruší (při jedné aktivaci štěpí jen jedno místo) a následuje

ATPázová reakce - štěpení asi  $10^5$  na jednu restrikční reakci

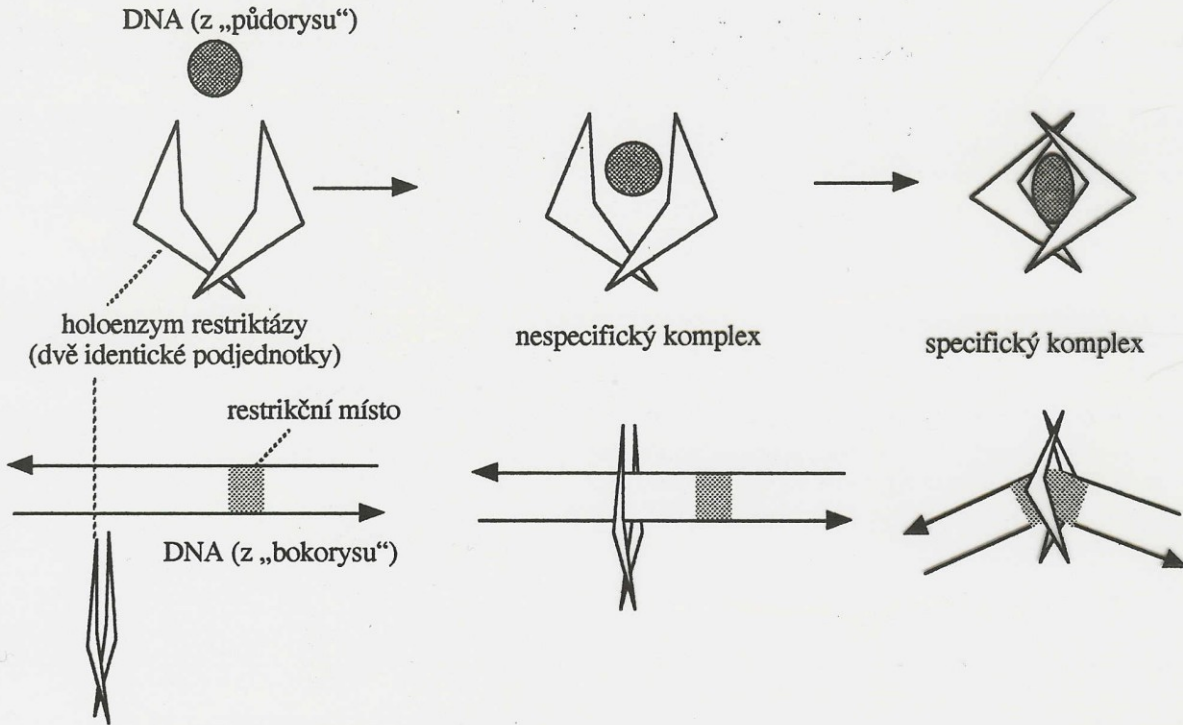




# Interakce restriktáz typu II s DNA

- velká podobnost jednotlivých enzymů
- společné reakční schéma:

*nespecifická interakce* kdekoli na molekule -> *lineární difuze* k restriktčnímu místu -> tvorba *specifického komplexu* spojená s *konformační změnou* proteinu i DNA -> *štěpení DNA*



## Nespecifická vazba

- relativně *slabá* za podmínek optimálních pro štěpení (tj. mM  $Mg^{2+}$ )
- *silnější* v nepřítomnosti hořčíku
- *značně závisí na koncentraci solí*: to ukazuje na značný elektrostatický příspěvek (tj. iontové interakce s fosfáty)

*Eco RV*: nejlépe prostudovaná:

- komplex je držen pohromadě *pěti kontakty aminokyselin* z každé podjednotky s *cukrfosfátovou kostrou*
- katalytické centrum není v nespecifickém komplexu v aktivní konformaci a ty části molekuly, které interagují s restriktčním místem, nejsou „správně“ uspořádány
- v těchto částech je volně vázáno velké množství molekul vody (~100 na holoenzym) a iontů, které jsou při tvorbě specifického komplexu uvolněny (interference s vazbou/uvolněním molekul vody, např. osmotický tlak, je zodpovědná za tzv. „hvězdičkovou aktivitu“, tj. méně stringentní štěpení)



## Lineární difuze

- "nasednutí" enzymu na DNA v kterémkoli místě a hledání restričního místa podél řetězce (= redukce na jednorozměrný problém) zvyšuje pravděpodobnost a rychlost jeho nalezení např. *EcoR I* postupuje rychlostí  $7 \times 10^{-6}$  bp/s !!

- enzym „klouže“ podél molekuly DNA a opisuje helikální zkrut; děj je podmíněn citlivou rovnováhou přitažlivých a odpudivých elektrostatických sil (alternativní mechanismus - „skákáni“, tj. mikroskopické disociace/asociace- není pravděpodobný: enzym „nepřehlédne“ žádné restriční místo a může být zablokován neobvyklou strukturou DNA, např. triplexem; navíc se „odráží“ od konců lineární DNA)

- „hvězdičková“ místa enzym „zdrží“ až na 20 s (i za optimálních podmínek, kdy nejsou štěpena; enzym „ověřuje“, zda není na „své“ sekvenci, a poté pokračuje. Čas, po který se „zdrží“, koreluje s podobností místa ke kanonické sekvenci a tedy s relativní afinitou enzymu k danému místu)

## Specifická vazba a rozpoznání restričního místa

- nejlépe prostudován je enzym *EcoRV* (GATATC)

- ve specifickém komplexu je DNA ohnuta o  $55^\circ$ , čímž je místo „odvinuto“, u centrálních bp porušena stacking interakce

- komplex je **těsný**, enzym těsně „obejme“ DNA kolem dokola

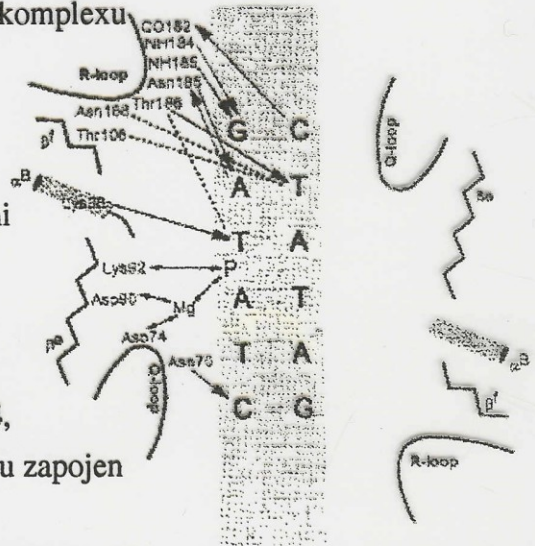
- v molekule enzymu **tři smyčky**, které v nespecifickém komplexu jsou neuspořádané, vytvoří **specifický kontakt s DNA ve velkém a malém žlábků**

- tzv. **R-smyčka** vytvoří 12 přímých vodíkových vazeb s bázemi, 12 vazeb zprostředkovaných molekulami vody s fosfáty a dva van der Waalsovské kontakty s vnějšími thyminy

- **Q-smyčka** („bohatá na glutamin“) tvoří čtyři vodíkové vazby s hranami bází v malém žlábků a obsahuje **Asp74**, který má katalytickou funkci; tam je rovněž do komplexu zapojen **hořečnatý ion**

- centrální bp nevstupuje do žádné přímé interakce (tam je v důsledku ohybu hluboký a úzký malý žlábek)

- dalších 24 aminokyselin (mimo R a Q smyčky) tvoří vodíkové nebo iontové můstky s fosfáty

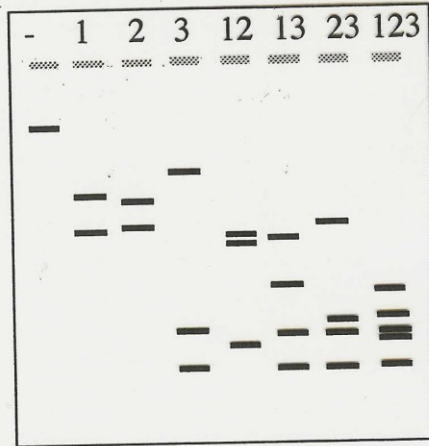
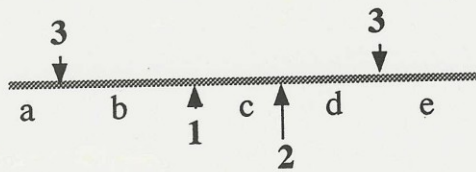


interakce je **vysoce specifická**: k téměř úplné *inaktivaci* komplexu *vede řízená substituce aminokyselin*, které tvoří vodíkové vazby s bázemi, *mutace restričního místa* (včetně centrálních bp, které netvoří přímé vodíkové vazby), a ve většině případů i *chemické změny fosfátových skupin* (nahrazení kyslíků) a *substituce aminokyselin s nimi interagujících* (např. za alanin)

## Využití restriktáz

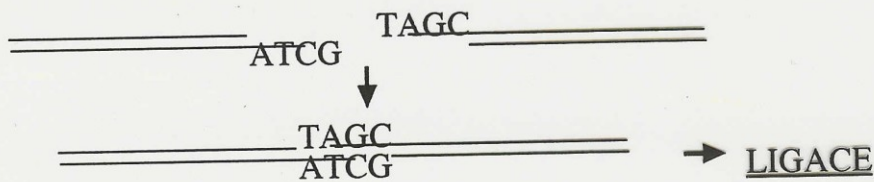
téměř výhradně typu II

- fyzikální mapování: štěpí v přísně specifických místech na fragmenty, jejichž počet relativně není vysoký

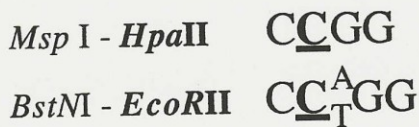


=> sekvenování DNA

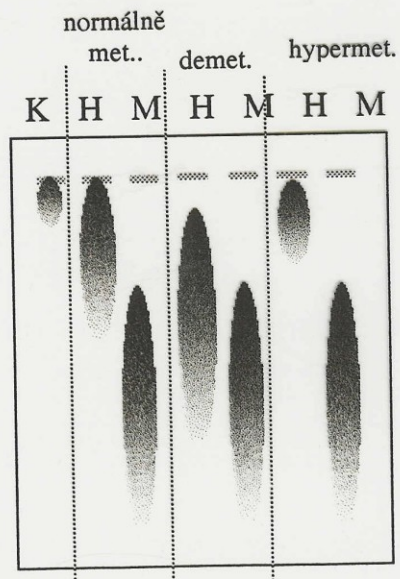
- konstrukce rekombinantních molekul (zejm. využití „lepivých“ konců)



- studium rozsahu metylace genomu (dvojice izoschizomerů, z nichž jeden je citlivý a druhý necitlivý k metylaci cílového místa)



K - neštěpená DNA  
H - *Hpa*II  
M - *Msp*I





### Metylázy u prokaryot:

a/ restriktáry typu I a III a komplementární metylázy typu II

b/ dvě další metylázy u *E. coli*

*dam* (metyluje adenin v sekvenci **GATC**)

*dcm* (metyluje cytosiny v sekvenci **CC<sup>A</sup><sub>T</sub>GG**)

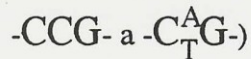
-úloha ne zcela jasná (rekombinace, reparace, iniciace replikace)

### Metylázy u eukaryot:

a/ živočichové: metylace sekvence 5'-**CG**- („dubleťová“)

b/ rostliny: navíc „tripletová“ metylace 5'-**CNG**-

(zřejmě existují nejméně dvě metylázy specifické pro středový nukleotid



- u eukaryot nejsou všechna rekogniční místa metylována, metylační vzor je specifický pro danou tkáň

(kontrola exprese genů: metylované geny jsou inaktivní --heterochromatin;  
metylace C silně ovlivňuje interakce DNA-protein)

-změny metylačního obrazce během gametogeneze, embryogeneze, maturace

-v somatických buňkách zřejmě probíhá jen „udržovací metylace“ (dometylování druhého řetězce po replikaci <<)

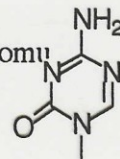
### Změna metylačního obrazce:

1/ v důsledku replikace bez metylace (po dvou replikacích vznikne jedna zcela nemetylovaná molekula)

-např. v důsledku překrytí rekogničního místa proteinem

-5-azacytidin: po inkorporaci do DNA inaktivuje metylázu => demetylace genomu (včetně konstitutivního heterochromatinu)

- druhý chromozom X u samic)

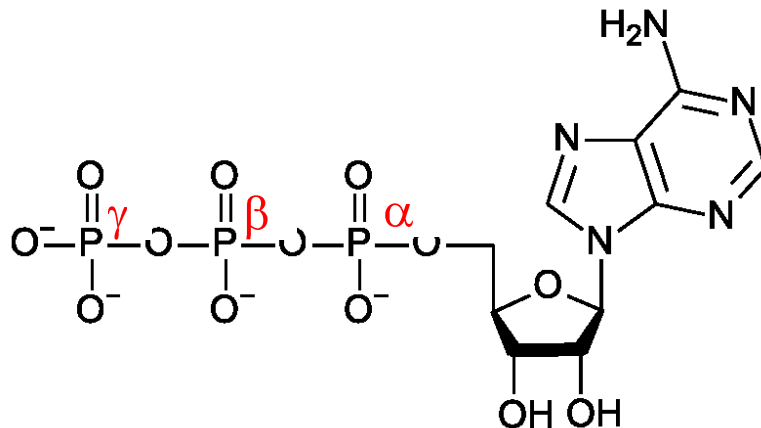


2/ metylace de novo - větší význam pouze v raných embriích;

=>diferenciace

**Metylace RNA** -všechny 4 báze; postraskripční modifikace >>

- **polynukleotid kináza**: přenos  $\gamma$ -fosfátu z ATP na 5'-OH poly- nebo oligonukleotidu
- (fosforyluje kináza, ne fosforyláza!!)



- pokud chci značit 3'-konec, tak DNA-polymerázou nebo **terminální nukleotidyl transferázou (TnT, TdT)** a radioaktivní fosfát musí být  $\alpha$ !!
- TnT, TdT: připojování nukleotidů (deoxynukleotidů) na volný 3'-OH konec bez templátu



- **DNA ligáza:** vytváří fosfodiesterové vazby, spojuje fragmenty DNA, zaceluje zlomy
- v prvním kroku přenos AMP z ATP nebo NAD na 5'-fosfo konec (meziprodukt obsahuje „makroergickou“ disfosfátovou vazbu)

