



# Metodologie molekulární fylogeneze a taxonomie hmyzu

## Bi7770

Andrea Tóthová



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Co se tady bude dít..

- proč DNA a jak to s ní vlastně bylo...
- Přehled základních metod
- Sekvencování NK
- Sbírání dat a co pak s nima, tvorba knihoven, GenBank, AToL
- Zásady bezpečné práce v laboratoři

# Co tady budem používat...

GeneRunner

Sequencher – placený SW

MEGA

Paup - dtto

MrModeltest

MrBayes

RAxML

Garli

Mesquite

CIPRES

FigTree

TreeView

TNT

<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>

Co je molekulární biologie?

**Co je molekulární fylogenetika?**

Jsou kladistika a fylogenetika sestry?

# Od biologie k molekulární biologii

- Molekulární biologie - studium struktury a funkce genu na molekulární úrovni pro pochopení základu dědičnosti, genetické variace a exprese znaků genů
- Překrývá se s dalšími oblastmi, jako např. genetika a biochemie

- **Fylogeneze** (vznik a vývoj jednotlivých vývoj. linií) – **kladogeneze** (pořadí a způsob větvení VL) a **anageneze** (hromadění fenotypových změn ve VL)
- **Last Universal Common Ancestor**
- Větve, uzly, stromy...
- **Homoplázie** (znak nepřítomen u společ.předka) a **homologie** (znak zděden od nejbližšího předka)
- **Plesiomorfie** a **apomorfie**
- Co na to Haeckel a von Baer? – pravidlo rekapitulace

Molekulární fylogenetika využívá molekulárněbiologické znaky pro účely fylogeneze a systematické biologie

Molekulární znaky mají oproti klasickým řadu výhod:

- Je jich libovolné množství
- Jsou vzájemně distinktní, kvalitativní, na sobě nezávislé
- Umožňují srovnávat i nepříbuzné organizmy
- Jsou selekčně neutrální, není nutno je vážit

# Jak to vše začalo...

- bakteriofág...chromatografie...dvouzávitnice...
- Jak to s DNA vypadá
- Dvouzávitnice – stavba - primární a sekundární struktura



# Začátky molekulární biologie

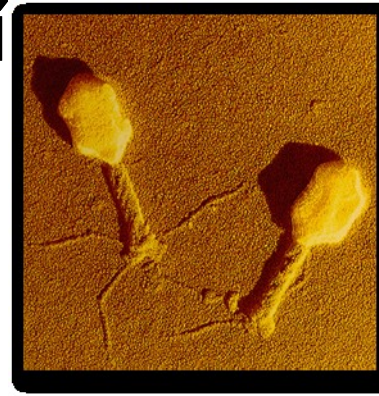
- **Moderní molekulární biologie** začíná v 30. letech konvergencí dalších biologických disciplín, jako biochemie, mikrobiologie, genetika a virologie s nadějí pro pochopení života a jeho nejzákladnějších procesů – mnoho fyziků a chemiků obrátilo svou pozornost na nové možnosti využití známých postupů k objevování „neviditelného světa“

# DNA - dědičnost a struktura

- To, co dnes víme o DNA, nebylo objeveno přes noc
- Mnoho různých vědců přispělo k výzkumu a jejich zásluhou dnes nejen známe model DNA, ale taky můžeme předpovědět další zatím neznámé „věci“

# Jedni z prvních...

- Genetický materiál je DNA – Alfred Hershey a Martha Chase, 1952
- Do té doby byly proteiny považovány za původce přenosu gen. informace
- Hershey a Chase pracovali s viry, které napadaly bakterie – bakteriofágy
- Série experimentů prokázala úvodní konstatování





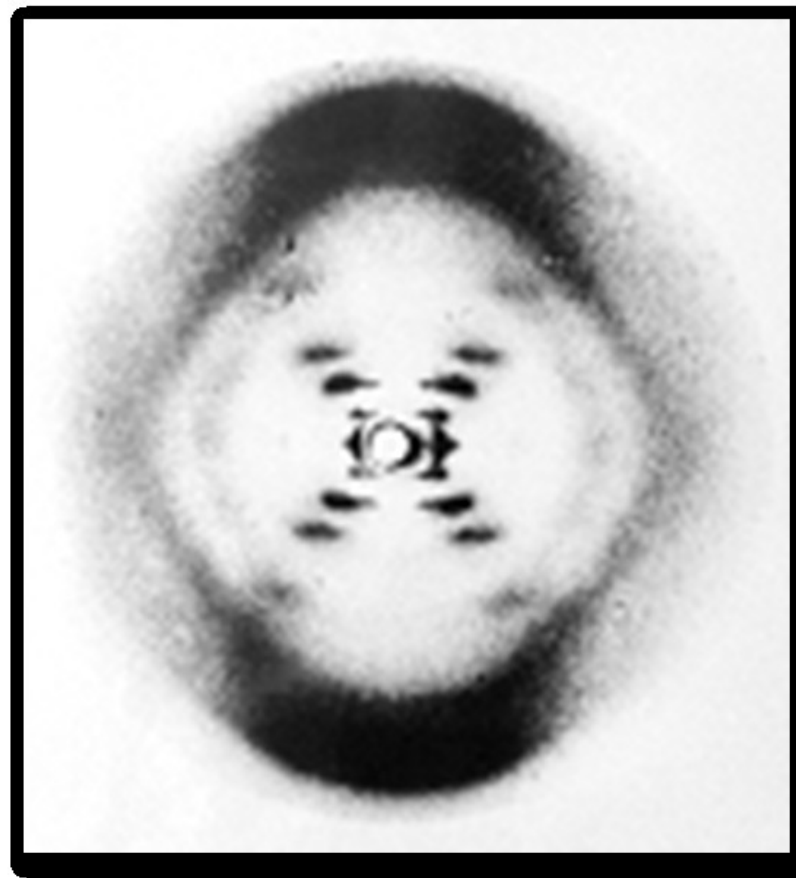
Martha Chase a Alfred Hershey

# Wilkins a Franklin

- **M.H.F. Wilkins a Rosalind Franklin, 50.léta**
- Wilkins a Franklin studovali strukturu DNA krystalů pomocí X-paprsků
- Zjistili pravidelně se opakující oblasti v krystalu
- Vzorek DNA obsahuje struktury o rozměrech 2 nm, 0.34 nm, a 3.4 nm. Tmavé struktury na vrcholu a spodku se opakovaly indikujíc závitnici

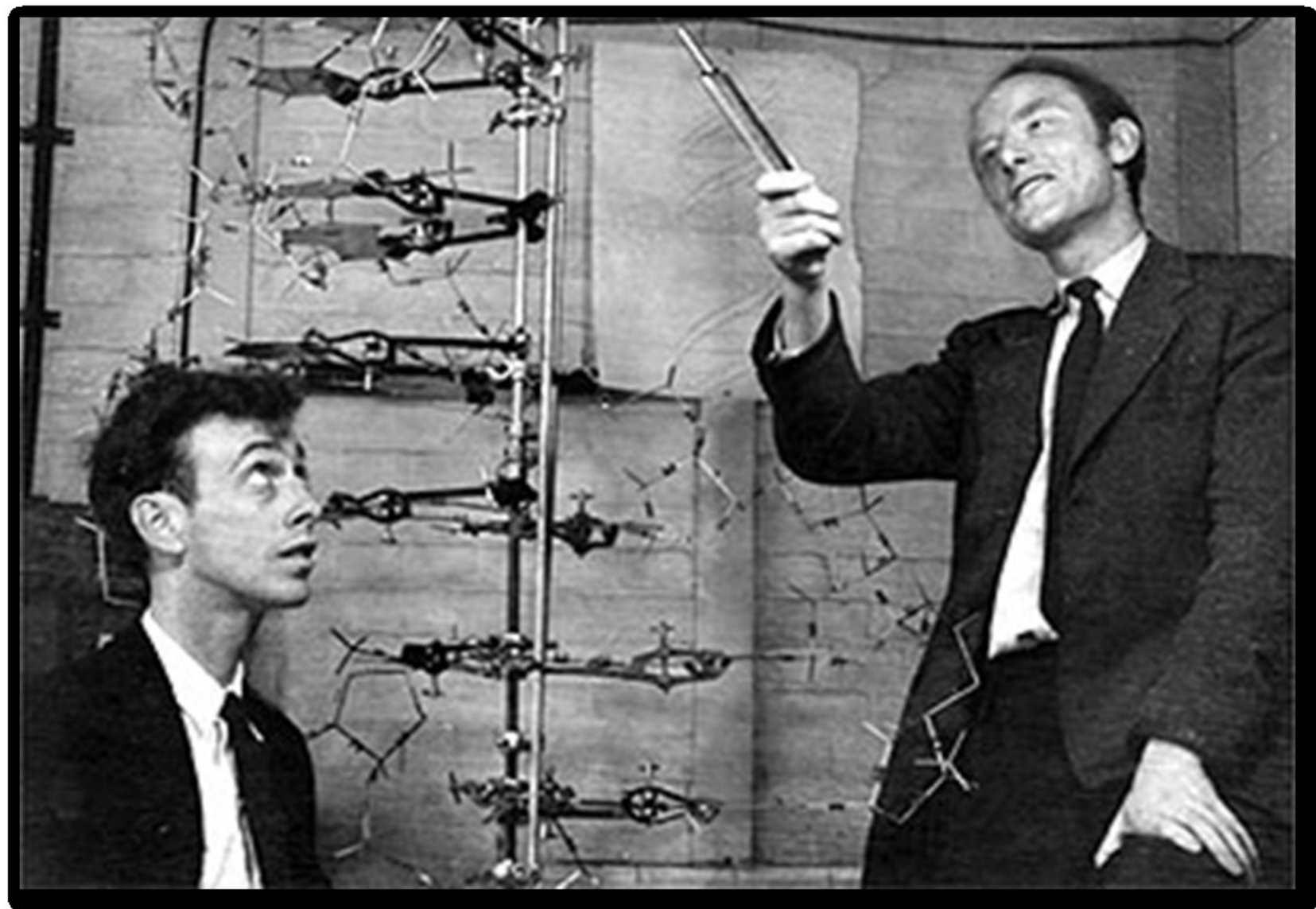


Rosalind Franklin



# Konečně..

- **James Watson a Francis H.C. Crick, 1953**
- Watson and Crick použili Chargaffovy základní data a Franklinovy výsledky z röntgenové analýzy a sestrojili model DNA
- Model ukázal, že DNA je double helix s cukro-fosfátovou kostrou, na kterou se zevnitř připojují nukleotidy
- Chargaffovo pravidlo ukázalo komplementaritu párování bazí  $A = T$  a  $G = C$ , tedy purinů s pyrimidiny, co dalo dvouzávitnici správnou šíři
- Párování bazí může proběhnout v libovolném pořadí, což umožňuje nekonečnou diversitu sekvence





# První dokument o DNA publikován v Nature 25. dubna 1953

*(Reprinted from Nature, Vol. 171, p. 737, April 25, 1953)*

## MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

### A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

**W**E wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey<sup>1</sup>. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

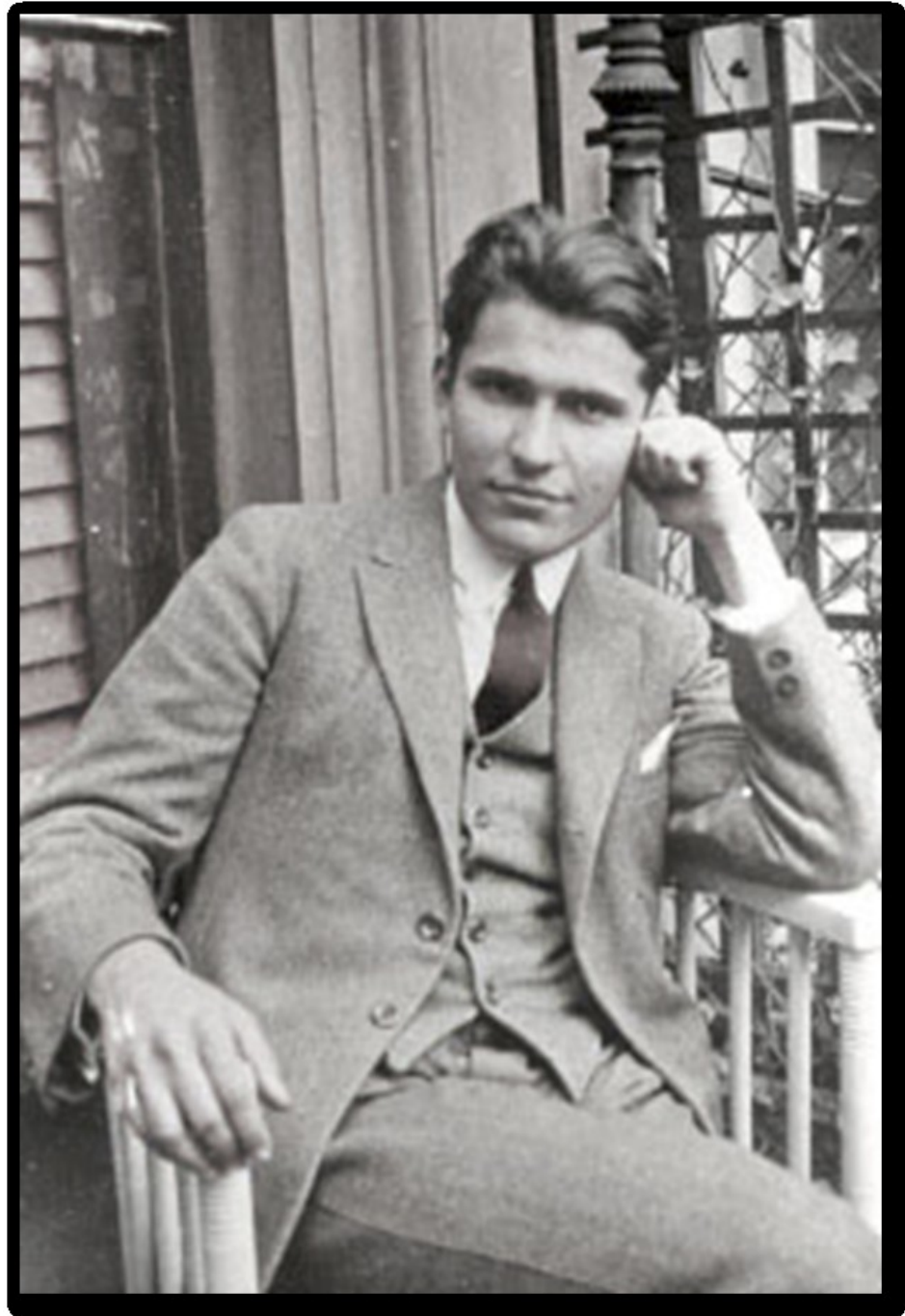
Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate di-ester groups joining  $\beta$ -D-deoxyribofuranose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's<sup>2</sup> model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same

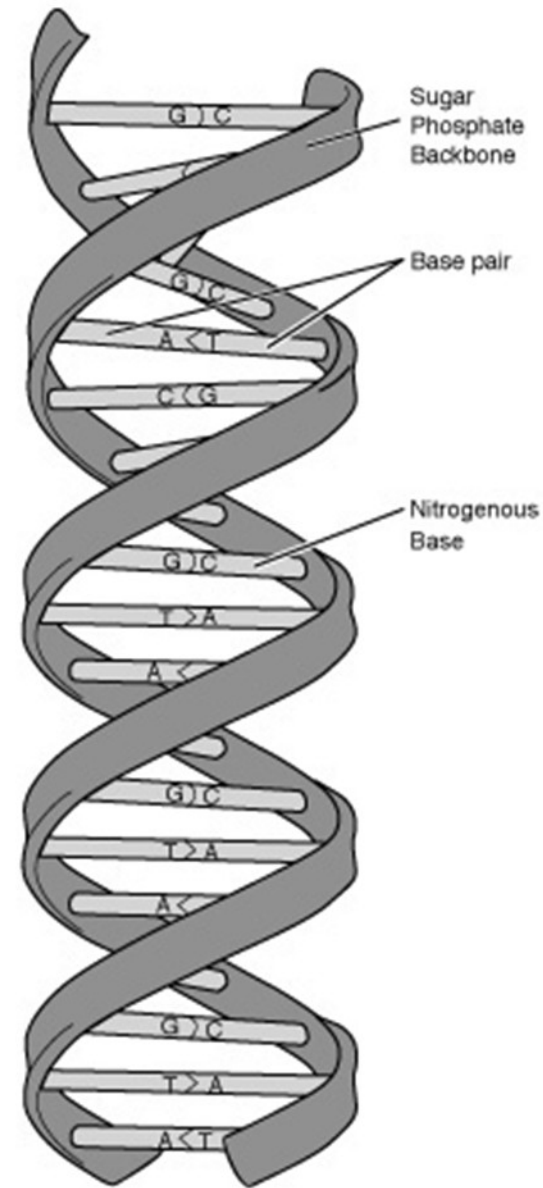
# Chargaffovy pravidla

- Base-pairing pravidlo je A-T and G-C
- Thymine je nahrazen Uracilem v RNA
- Báze jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky
- Bylo objeveno díky relativnímu obsahu jednotlivých bazí (obsah A-T je podobný a C-G totéž)

Erwin Chargaff



- Double Helix – stočený řebřík
- Tvořen monomery AKA nukleotidy
- Nukleotidy sestávají z:
  - Deoxyribosového cukru
  - Phosphátové skupiny
  - Dusíkaté báze

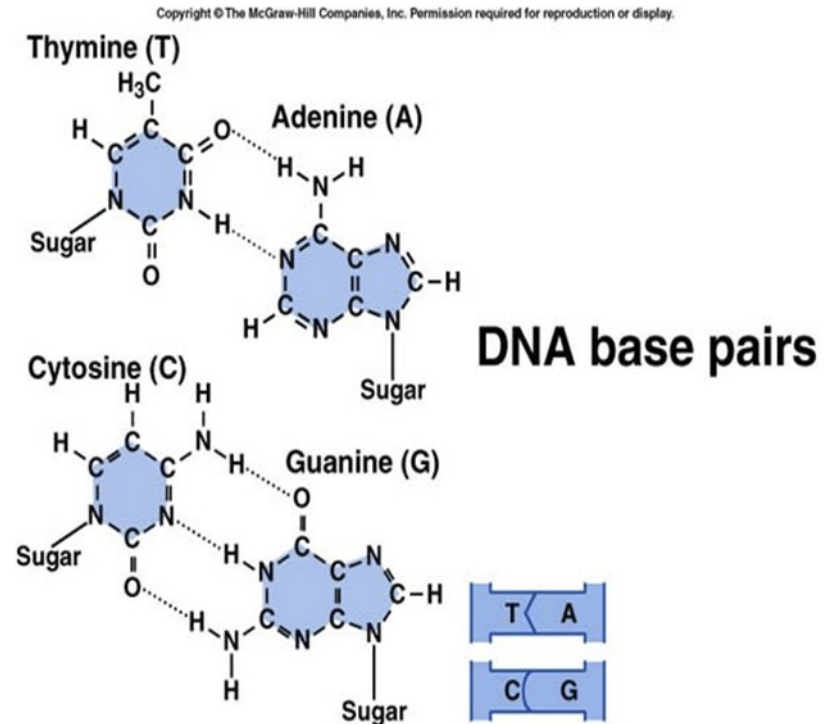


- dva typy:
  - Puriny
  - Pyrimidiny
  - Puriny:

**Adenine a Guanine**

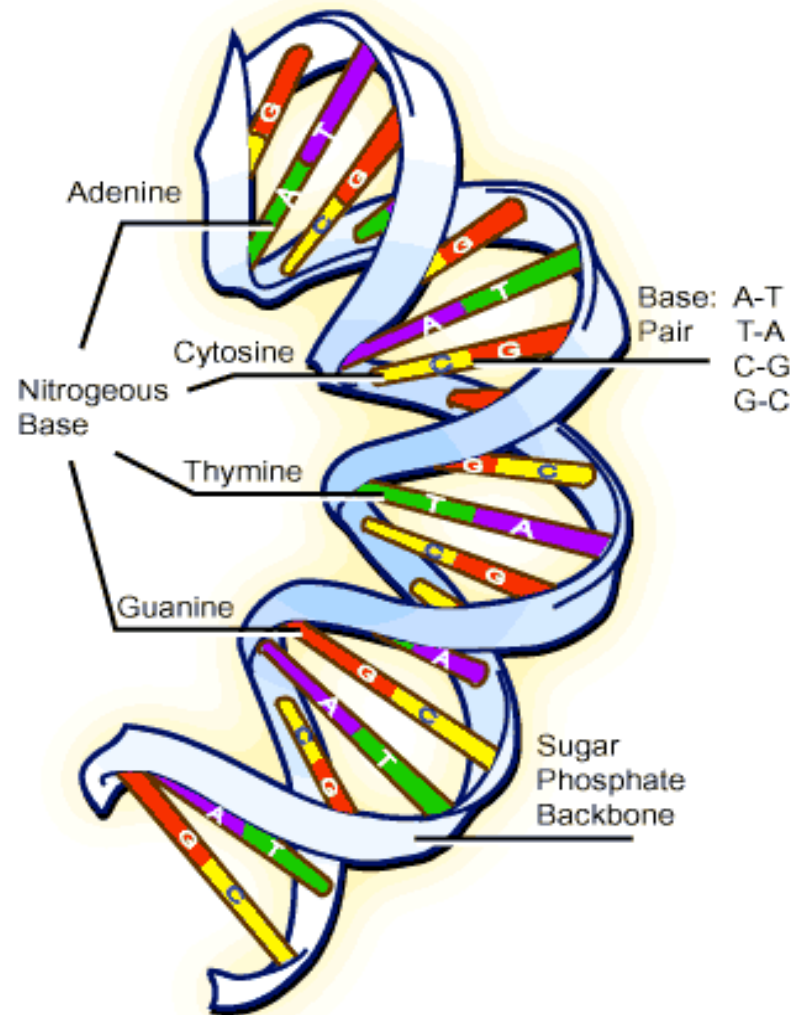
- Pyrimidiny:

**Thymine a Cytosine**



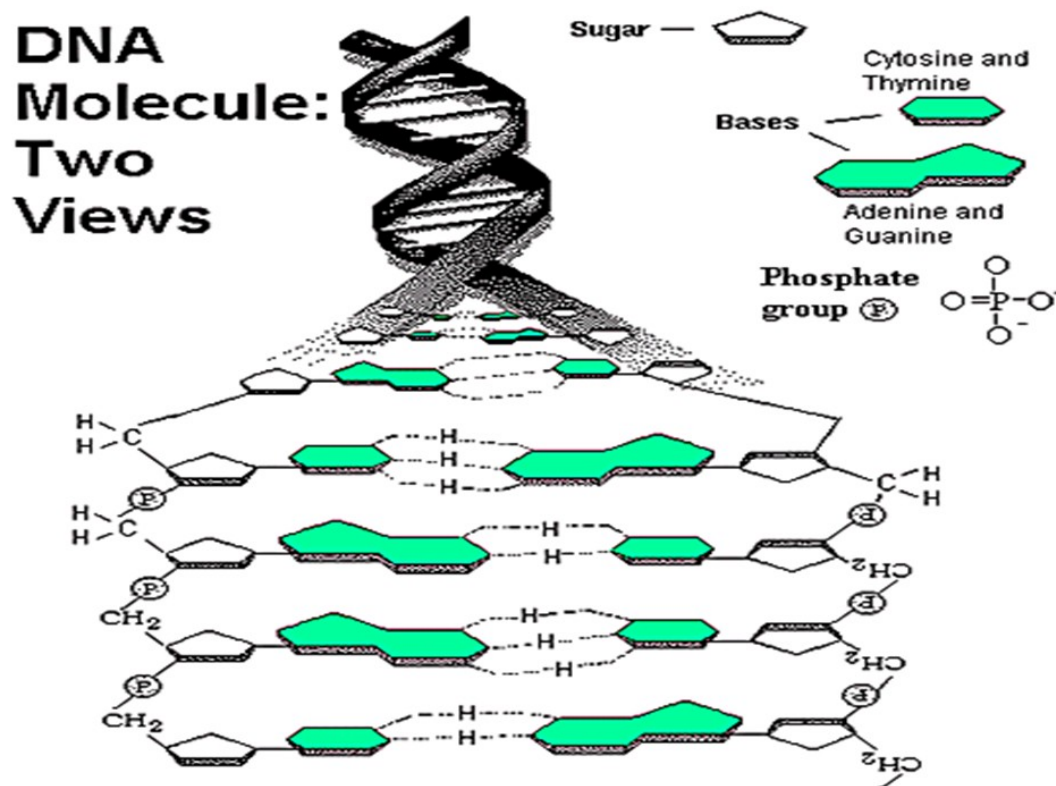
# DNA je nekonečná struktura

- „Špruše“ řebříku  
můžou jít za sebou v  
libovolném pořadí  
(zákon  
komplementarity musí  
platit)
- 4 báze mají v  
nekonečné množství  
kombinací



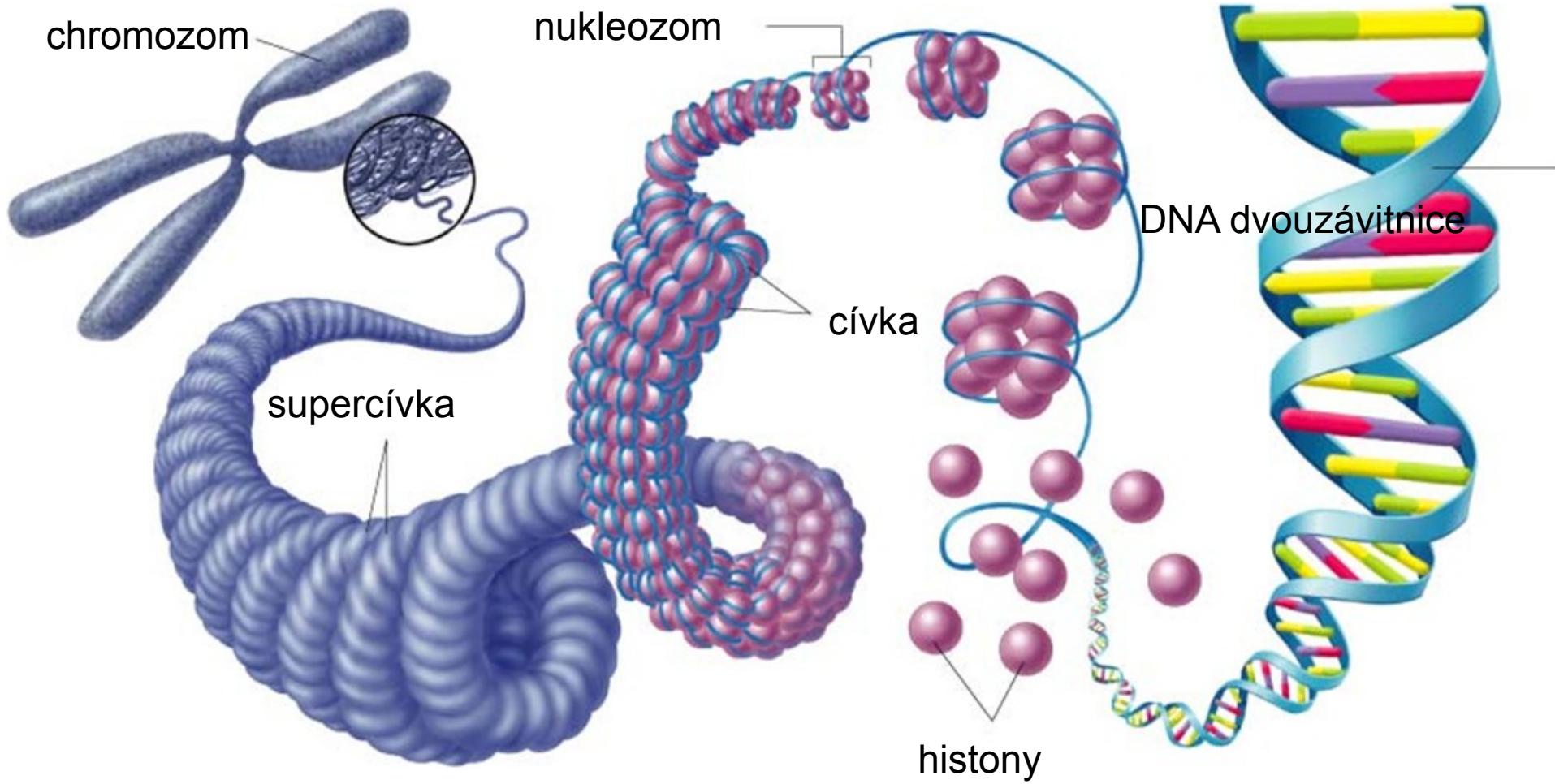
# Základ všeho..

- Kostra tvořena střídáním cukru a fosfátu  
K cukru se VŽDY připojuje dusíkatá báze

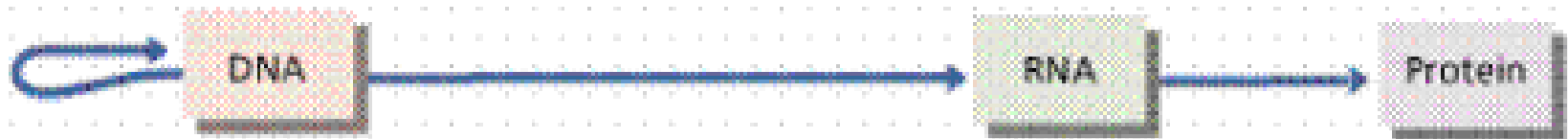
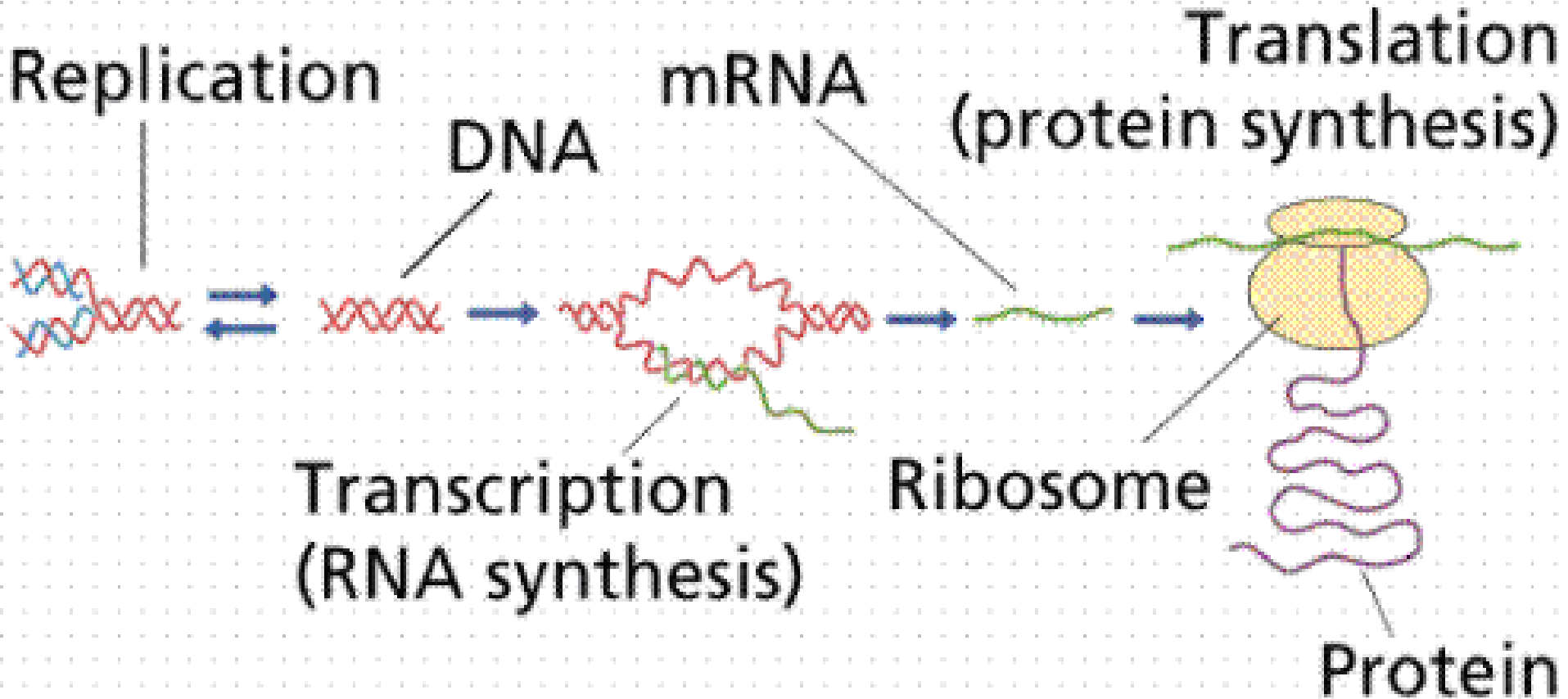


- DNA byla nalezena v jádru eukaryot a také v cytoplasmě prokaryot
- DNA je „sbalena“ a obtočena kolem speciálních proteinů zvaných HISTONY
- DNA obalující protein tvoří komplex zv. CHROMATIN
- Když chromatin zkondensuje (ztloustne), tvoří CHROMOSOMY





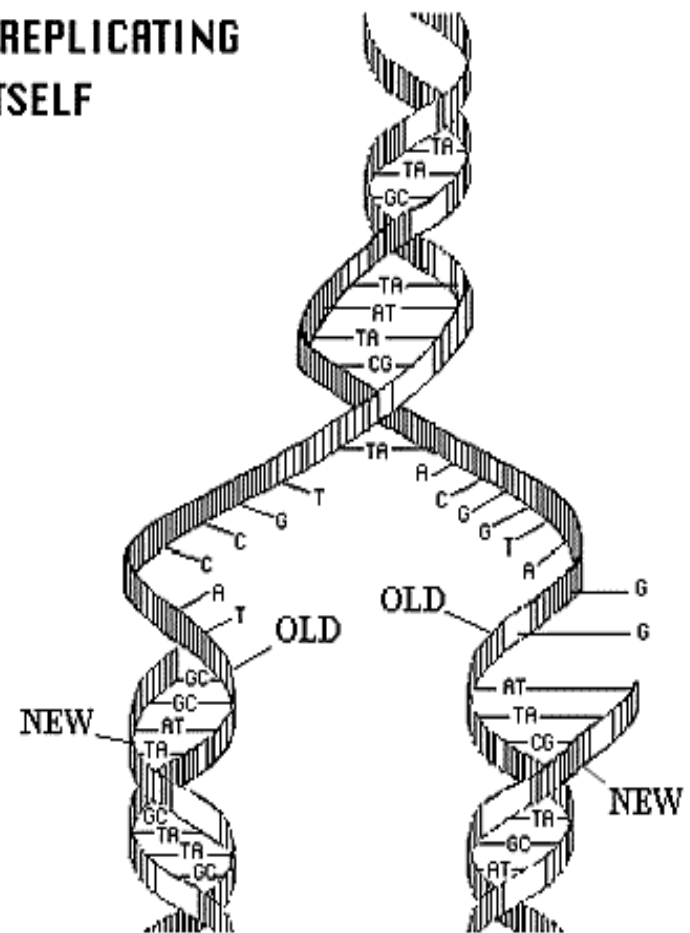
# Centrální dogma molekulární biologie



# DNA tvoří kopie sebe samé

- Replikace – proč je potřeba?
- Jednoduché: v každém organismu se buňky dělí, aby byl zabezpečen růst a reprodukce organismu, tudíž nové buňky potřebují DNA s instrukcemi, jak být buňkou
- DNA se replikuje těsně před dělením buňky.

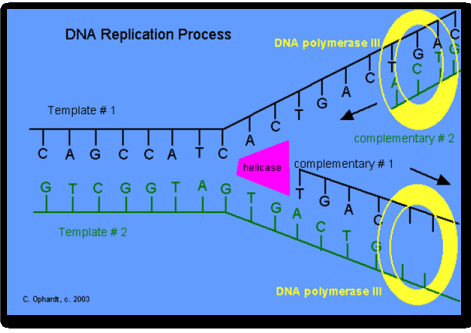
DNA REPLICATING ITSELF



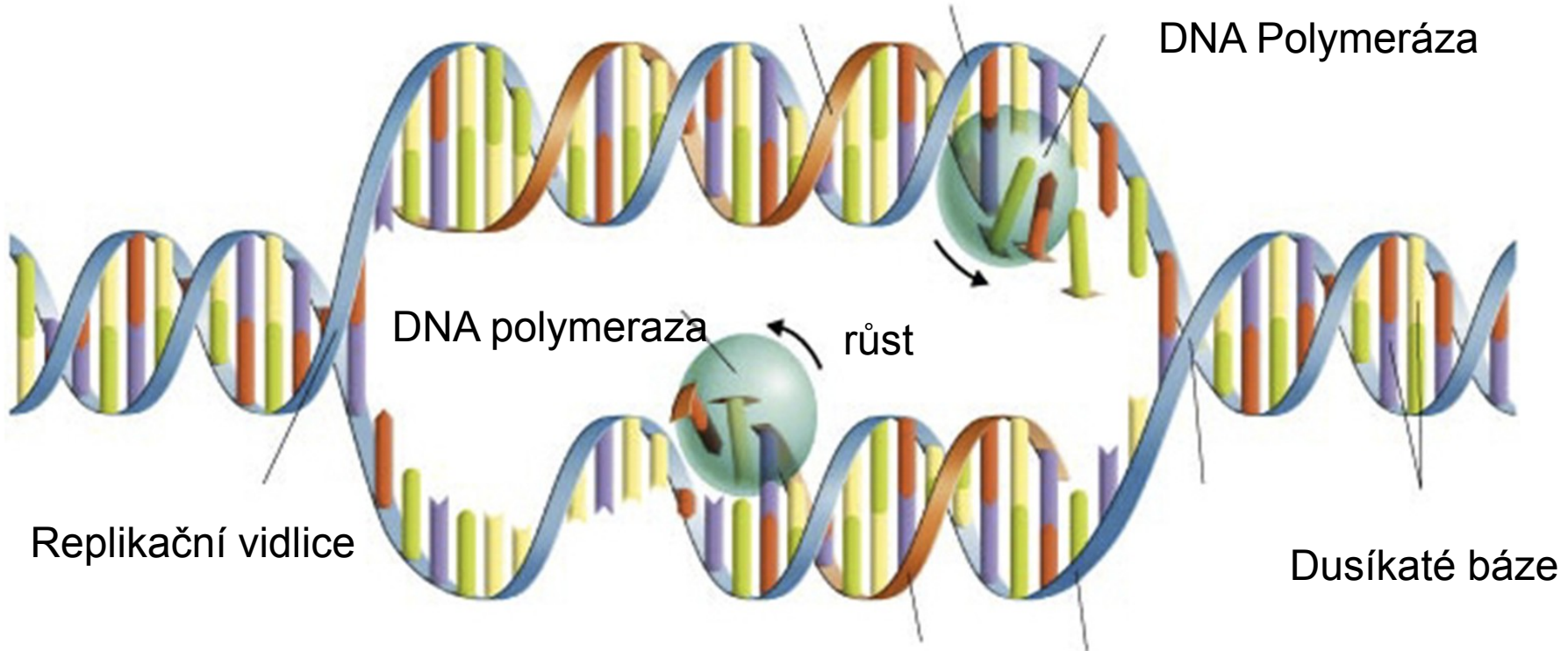
# Replikace...

- DNA se musí rozplést a zrušit vodíkové můstky
- Obě rozpletené strany slouží jako templát k replikaci
- Z původní dvouzávitnice jsou vytvořené pomocí DNA polymerázy dvě nové vlákna

- Počas replikace enzym helikáza „odzipuje“ DNA
- Další enzym – DNA polymeráza se posunuje podél vlákna a připojuje komplementární volné nukleotidy

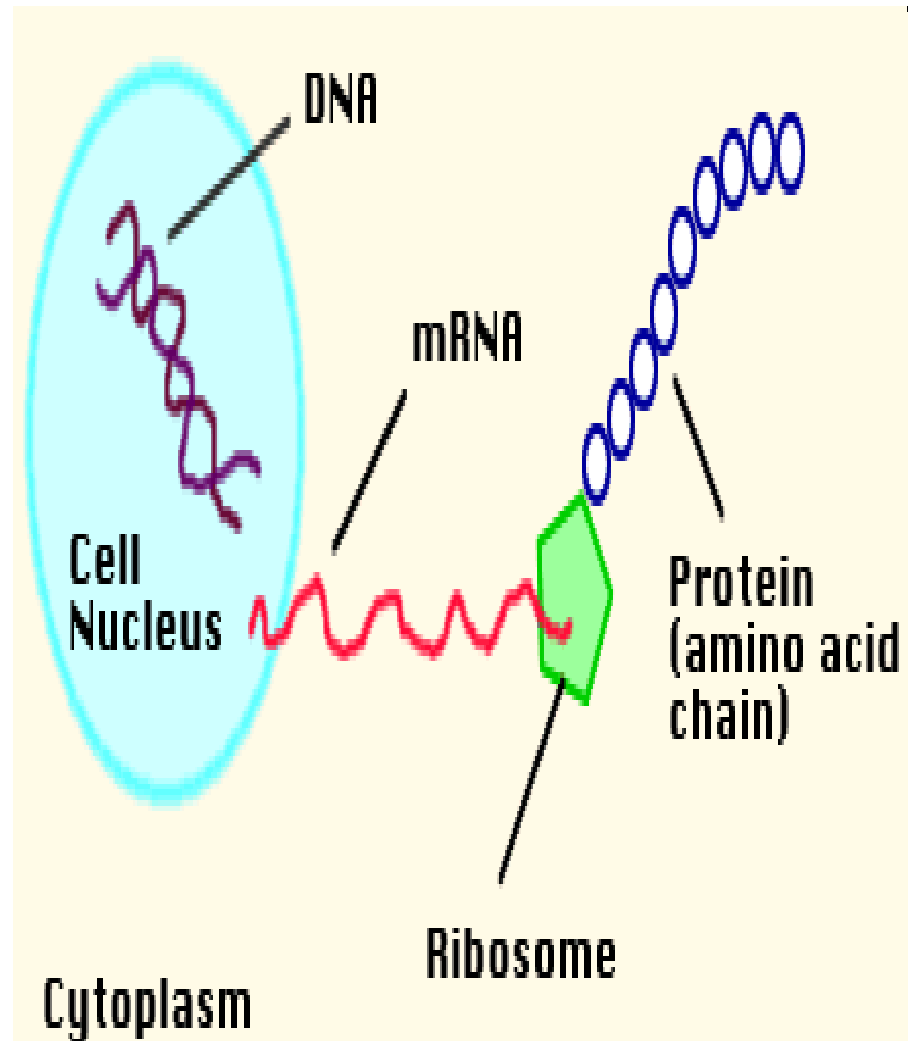


Nové vlákno      Původní vlákno



# DNA – RNA – DNA nekonečný cyklus

- RNA má za úkol předání vzkazu od DNA do jádra ribosomů
- **Transcripce** - RNA je vytvořena z DNA
- **Translace** – z RNA je přeložen vzkaz na výrobu proteinů



- Díky Chargaffovu pravidlu se začlení pouze komplementární nukleotid, tudíž DNA polymeráza vytvoří perfektní kopii  
Chyba se stává! → Mutace!



# Mutace

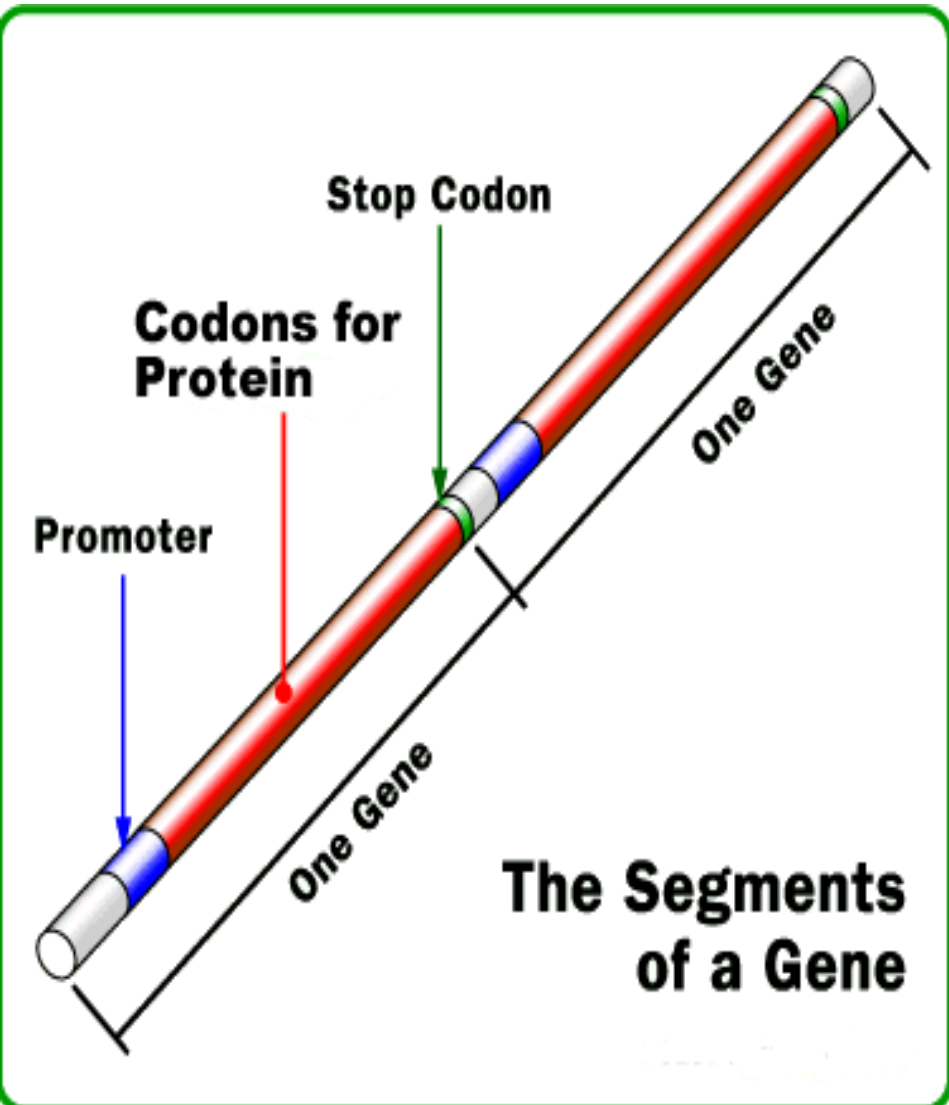
- Substituce – jedna báze nahradí druhou
- Inzerce – začlenění se extra báze
- Delece – ztráta jedné báze



# Genetický kód

- Genetický kód– řeč mRNA s instrukcemi
- Čtení třech písmen (dusíkatých bází) zaráz
- Kodón → na mRNA; složen ze tří bází
- 64 kodonů pro 20 aminokyselin – jsou univerzální pro všechny bakterie, rostliny a živočichy na Zemi

# Co je gen?



- Základní jednotka dědičnosti; dlouhá část DNA se specifickými instrukcemi pro produkci specifického proteinu
- Geny se nachází na specifickém místě chromozomu zvaném lokus

# Chromozomální variace definuje druh

- **Chromozom** je úložiště genetické informace, počet je druhově specifický
- Lidský genom má ca. 3 million kb.
- Ne-funkční kodony jsou introny
- Funkční jsou exony

