

Enzymové přeměny NK

enzymy štepící NK

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:

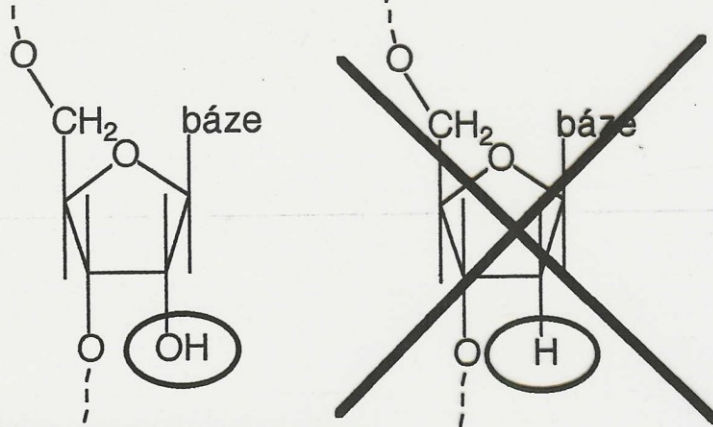
- trávicí enzymy (intra- a extracelulární)
- odbourání RNA (zejm. mRNA)
- sestřih prekurzorových molekul RNA
- reparace DNA
- štěpení cizorodých DNA

KLASIFIKACE NUKLEÁZ

A. PODLE SUBSTRÁTOVÉ SPECIFICITY

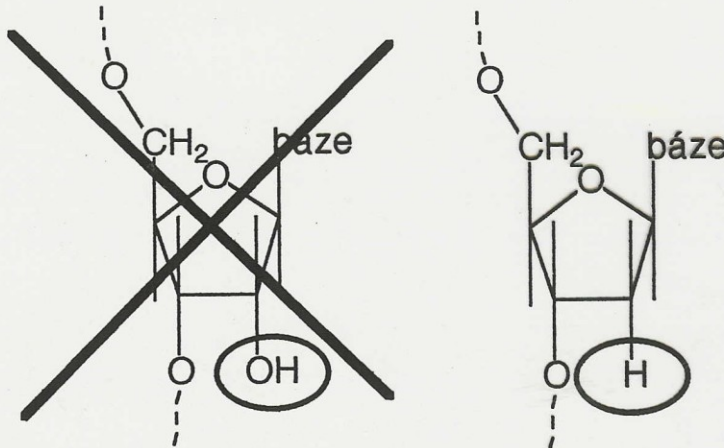
1. RIBONUKLEÁZY

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

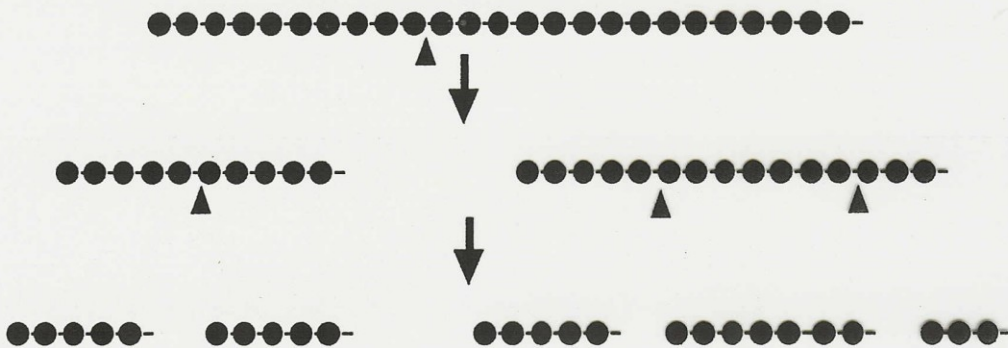
štěpí oba typy substrátu (jsou obvykle „nespecifické“ pouze v tomto smyslu)

B. PODLE ZPŮSOBU ATAKU POLYNUKLEOTIDOVÉHO ŘETĚZCE

1. ENDOLYTICKÉ ENZYMY (ENDONUKLEÁZY)

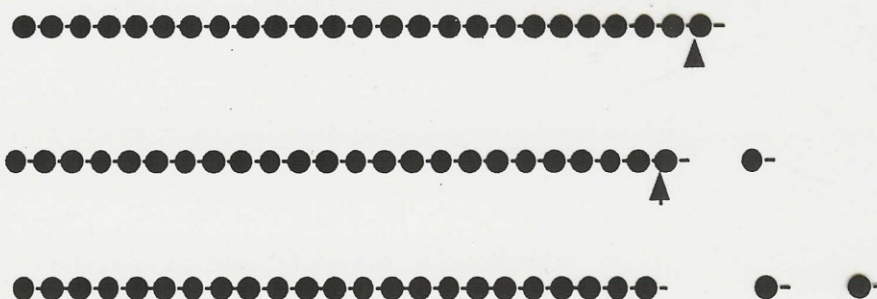
účinkují kdekoli **uvnitř řetězce**, produkují oligonukleotidy a způsobují rychlé změny fyzikálních vlastností (délka molekul => viskozita, sedimentace apod.)

obvykle nejsou schopny odštěpovat mononukleotidy => neštěpí dinukleotidy a trinukleotidy

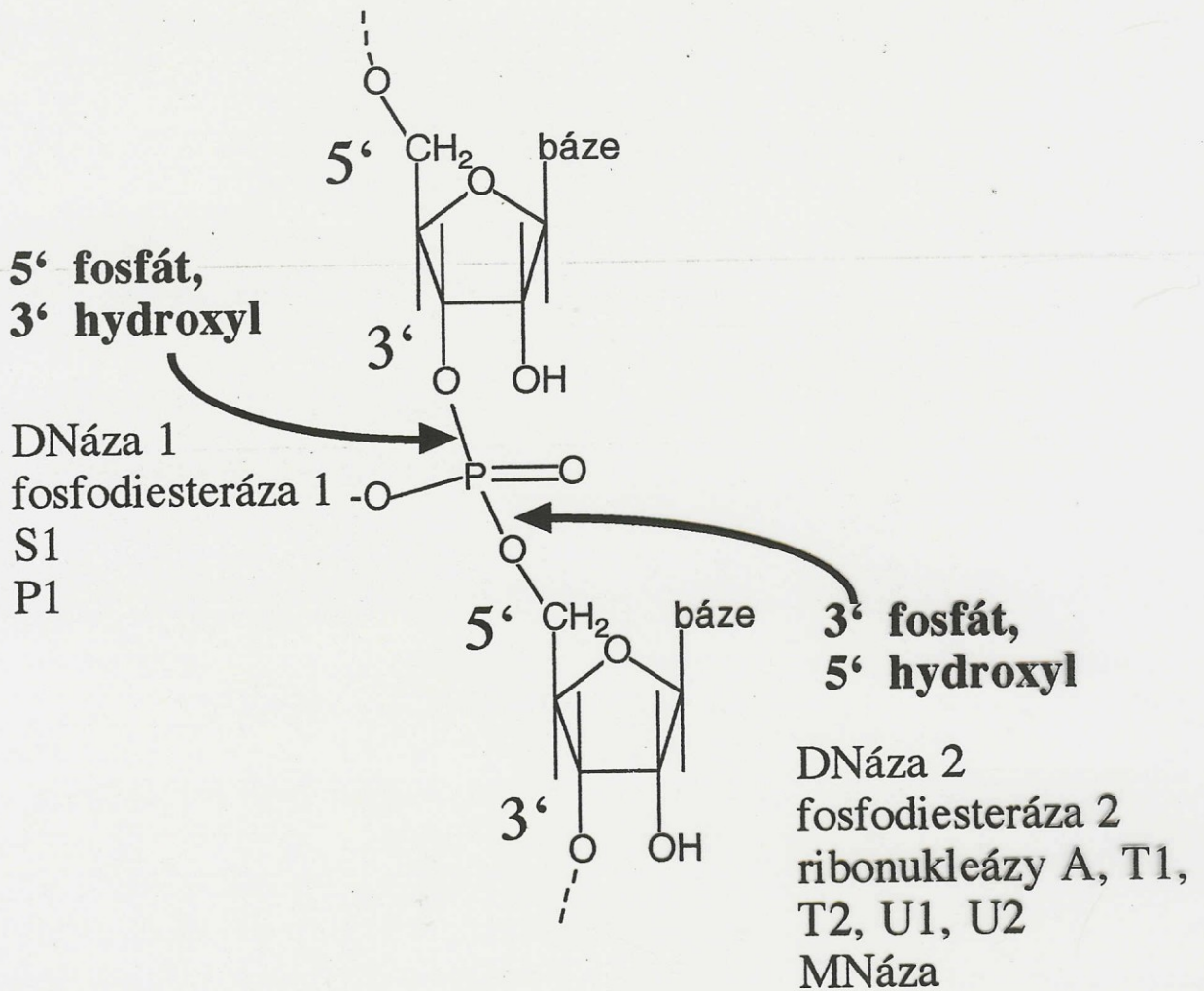


2. EXOLYTICKÉ ENZYMY (EXONUKLEÁZY)

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)

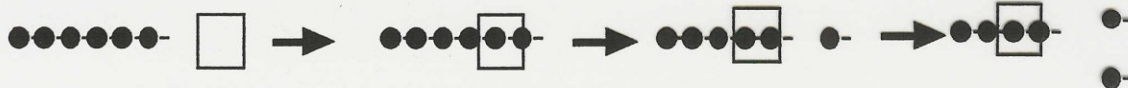
2. směr štěpení u exonukleáz ($5' \rightarrow 3'$, $3' \rightarrow 5'$)

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 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* - Ca^{2+} , Mg^{2+} ; preference pro G;

při vyšších konc. NaCl zcela specifická pro ss polynukleotidy

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

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

štěpí i při vysokých teplotách (70 °C)

„Mung bean“ **nukleáza I** - kyselé pH optimum, 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 Mg^{2+} nebo Ca^{2+}

jednořetězcové RNA a DNA štěpí endolyticky

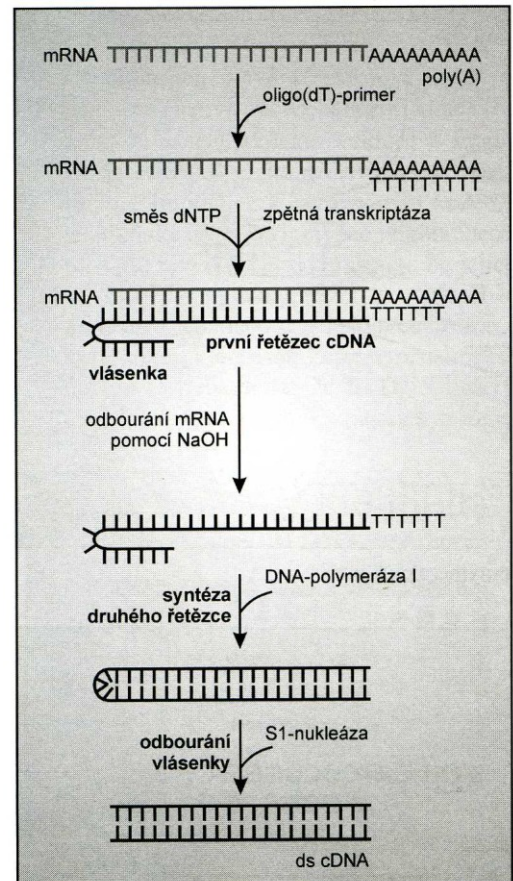
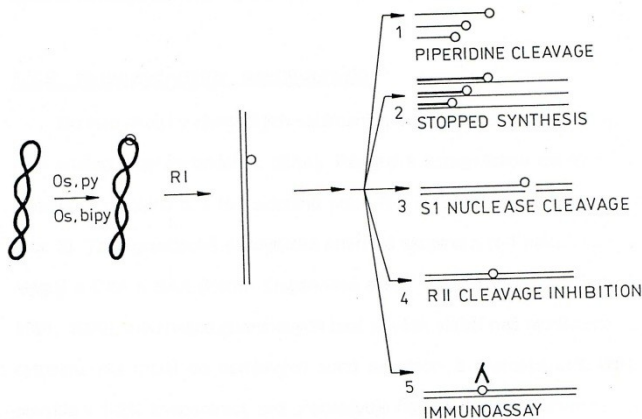
nativní DNA štěpí exolyticky od obou konců

(zkracuje současně oba řetězce => využití při konstrukci

rekombinantních DNA)

Nukleáza S1

- Endonukleáza specifická pro jednořetězcovou DNA (RNA)
- Používá se
 - k odstraňování jednořetězcových úseků na dsDNA, smyček na cDNA vznikajících při její syntéze, mapování intronů analýzou hybridních molekul DNA-mRNA.
 - 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.



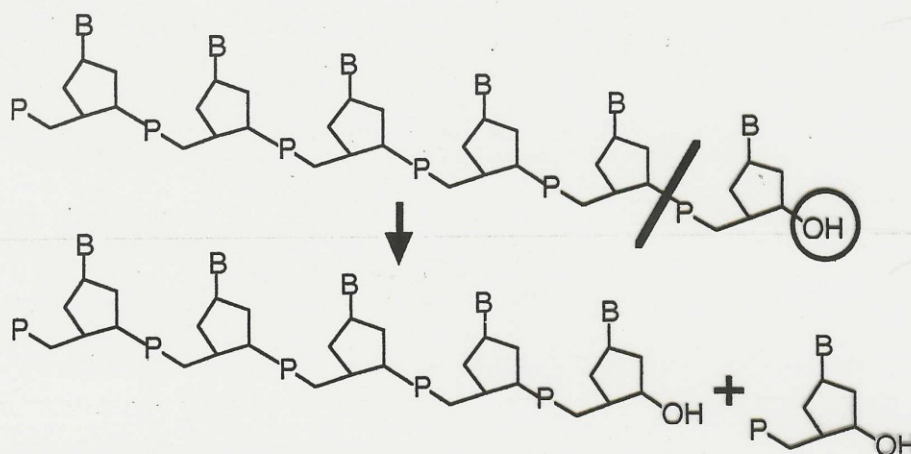
B. NESPECIFICKÉ EXONUKEÁZY

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**

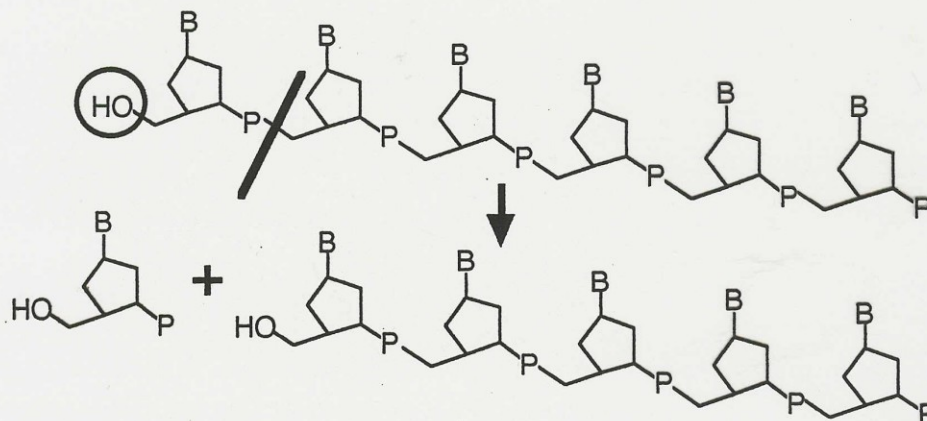


Fosfodiesteráza II (ze sleziny)

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

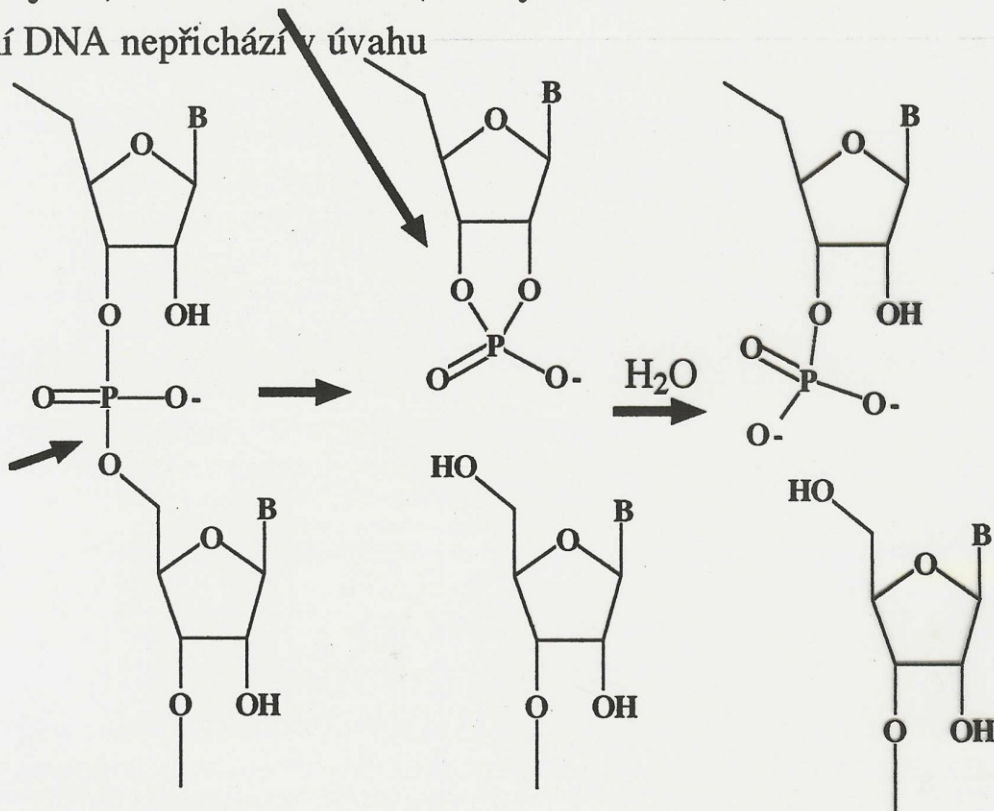
RIBONUKLEÁZY

- 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

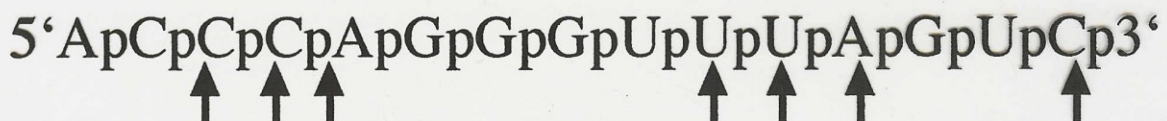
RNáza S: uměle získaná štěpením subtilisinem

(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*)

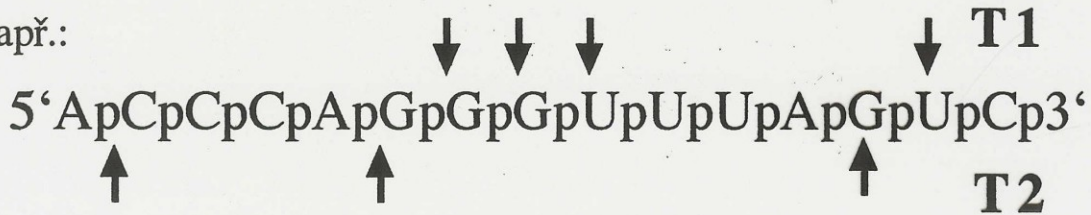
neutrální pH, tepelná stabilita, M_r 11 085

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

Ribonukleáza T2 (*Aspergillus oryzae*)

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

např.:

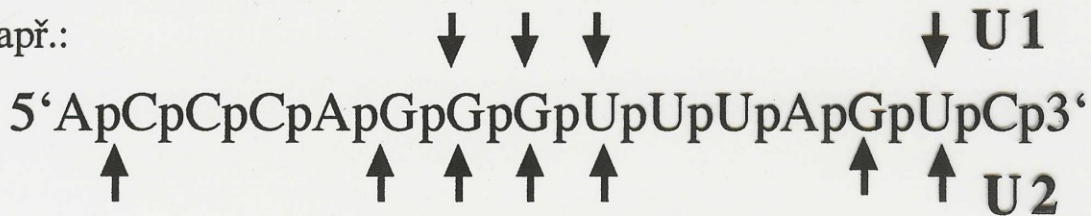


Ribonukleáza U1 a U2 (*Ustilago sphaerogena*)

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

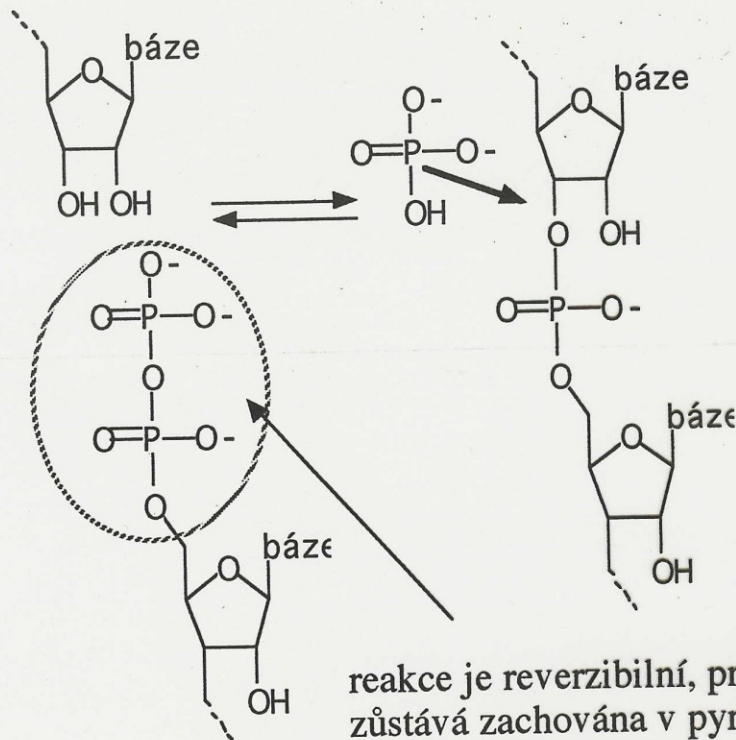
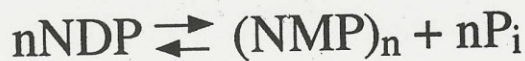
5. DEPC

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 Mg^{2+} (lze nahradit 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

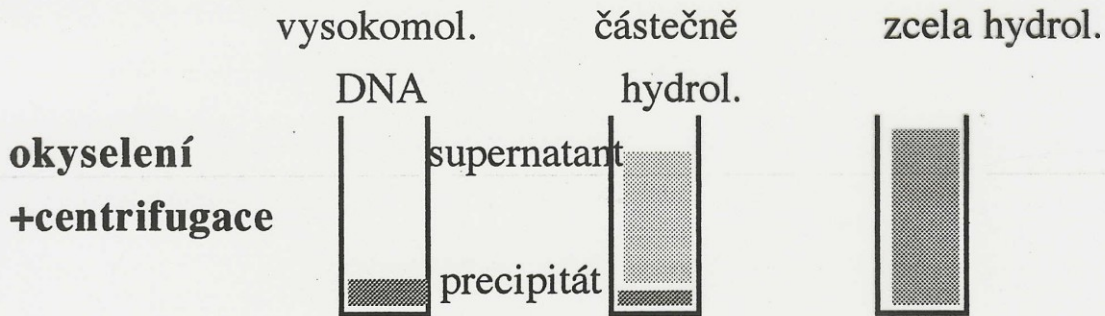
A. DNA endonukleázy

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

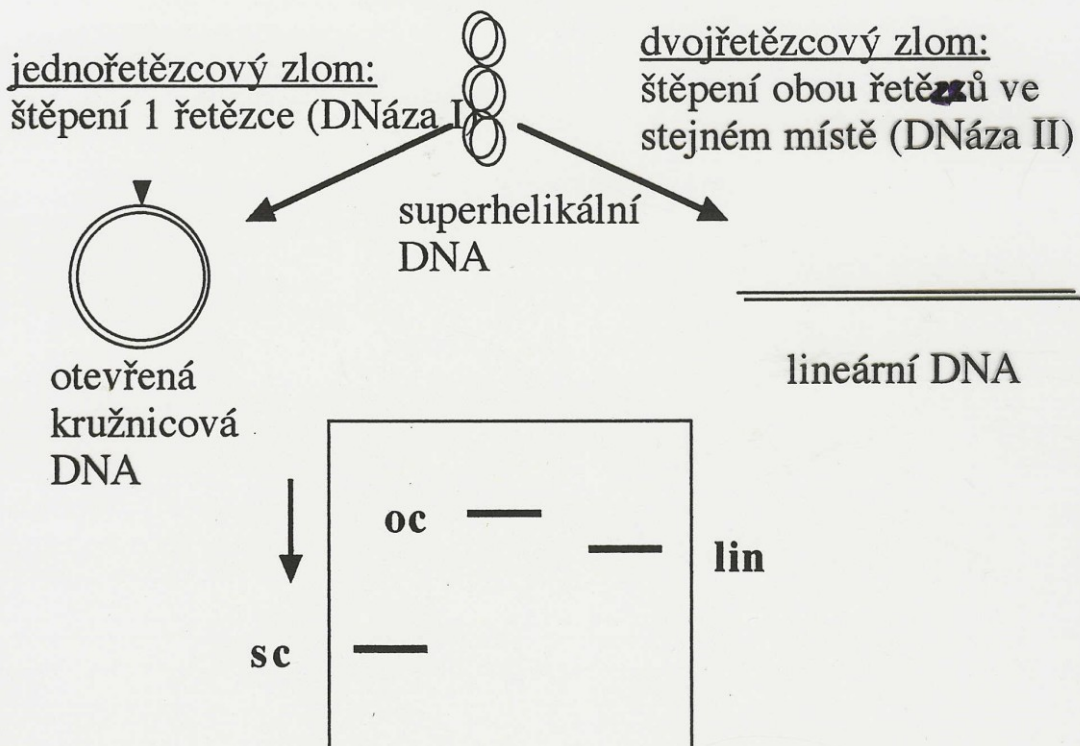
(srovn. fosfodiesterázy)

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'P_uP_y3' 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

Endodeoxyribonukleázy z *E. coli*

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

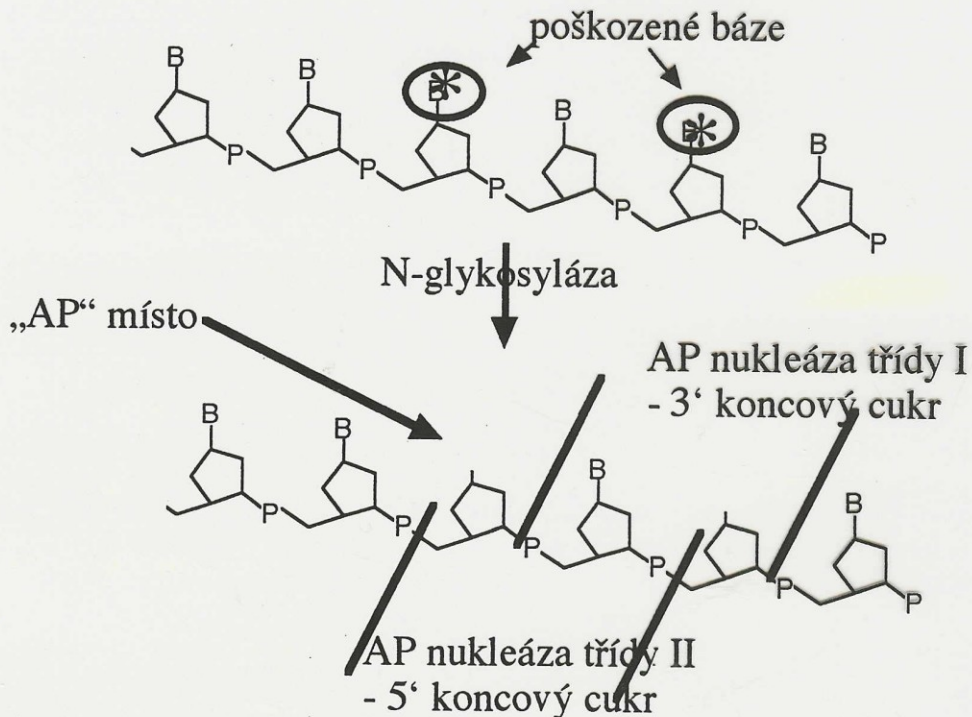
Endonukleáza I - náhodně štěpí dsDNA na fragmenty asi 400 bp dlouhé (dvojřetězcové zlomy)

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

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

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“

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

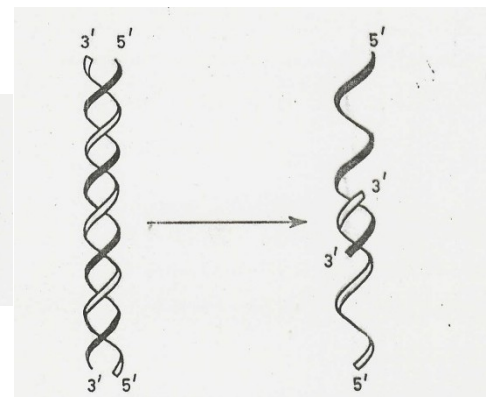
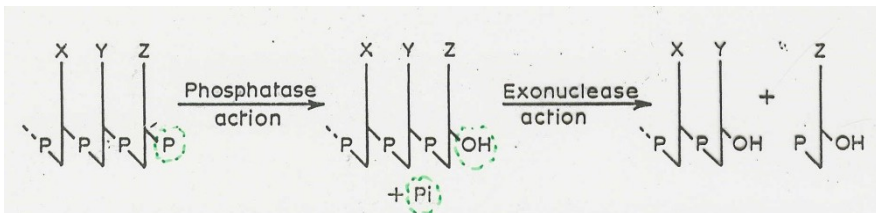
b/ - štěpí 3' fosfáty ve druhém řetězci; avšak pouze tehdy, když

c/ - nalezne bud' ^{NE}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

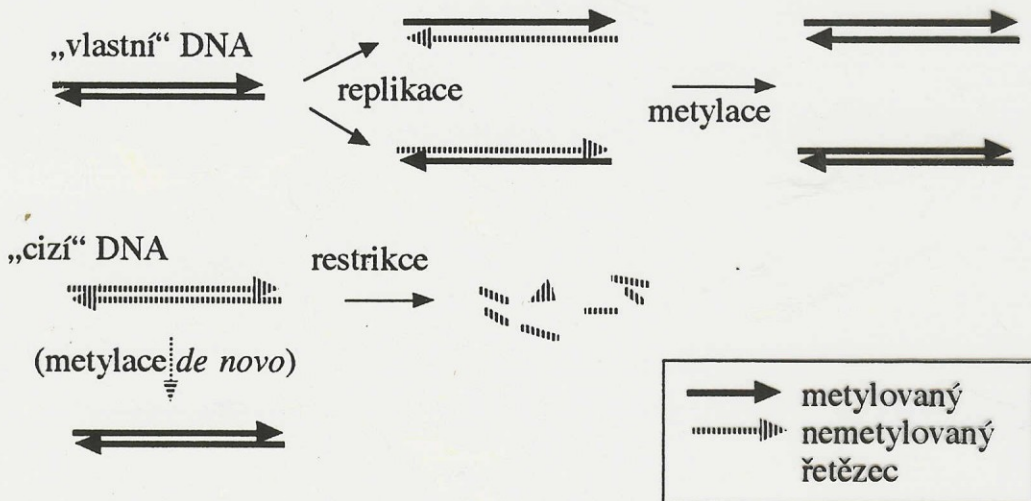
-při první infekci fág nemá metylovaná restrikní místa a je štěpen;
avšak některé molekuly fágové DNA jsou „omylem“ metylovány („de novo“), ty přežijí a při příští infekci téhož hostitele jsou považovány za vlastní DNA

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

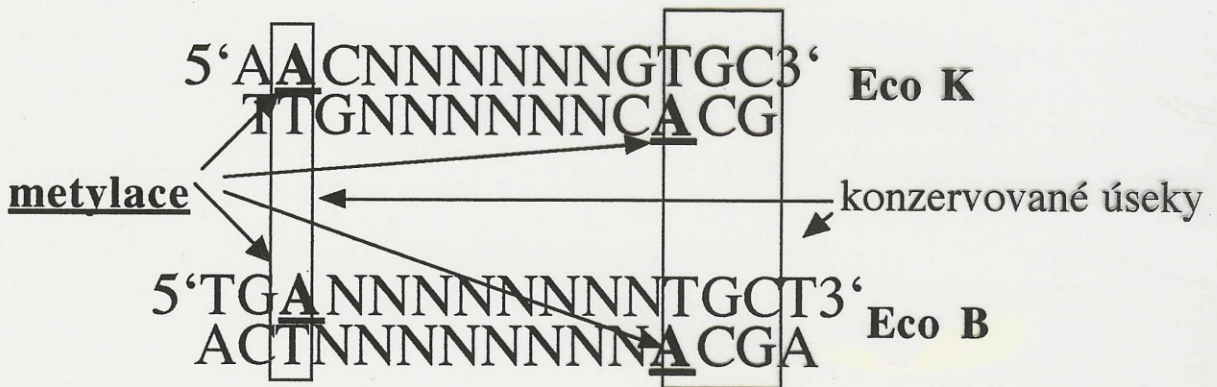
multifunkční komplexní proteiny

-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. nescificky 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

Restriktázy typu II

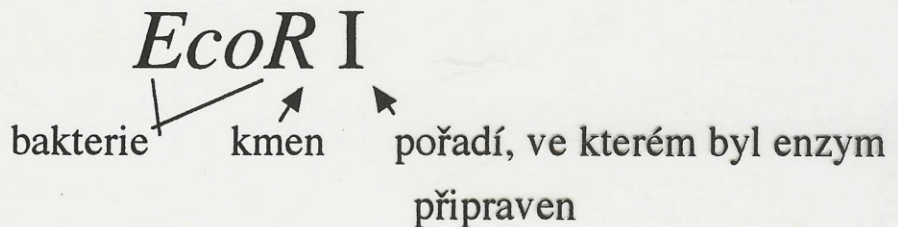
- jednodušší enzymy: dvě stejné podjednotky, vyžadují jen Mg^{2+} , nejsou metylázy (ani ATPázy), ale mají své komplementární metylázy (které rozpoznávají a metylují stejnou sekvenci) štěpí v sekvenci, kterou rozpoznávají (nebo blízko, *HgaI*) restriktční místa mívají středovou symetrii (stejně tak enzymy)
- tupé (*SmaI*, *HindII*) nebo kohezní (*EcoRI*, *BamHI*) konce
 - místa někdy obsahují nspecifické báze nebo částečně specifické (Pu, Py, A.T pár v jakékoli orientaci...)
 - mohou a nemusí být citlivé k metylaci (*HpaII* vs. *MspI*);
DpnI vyžaduje metylaci cílového místa

Restriktázy typu III

- dvě různé podjednotky, nukleázová, metylázová a rekogniční aktivita
- nejsou ATPázy
- methylázová a nukleázová aktivita kompetují, aktivní je pouze holoenzym
- nesymetrická rekogniční místa; jen jeden řetězec je metylován
- štěpí 20 - 30 bp na 3' straně od rozpoznávacího místa

Nomenklatura

system dle Smith a Nathans



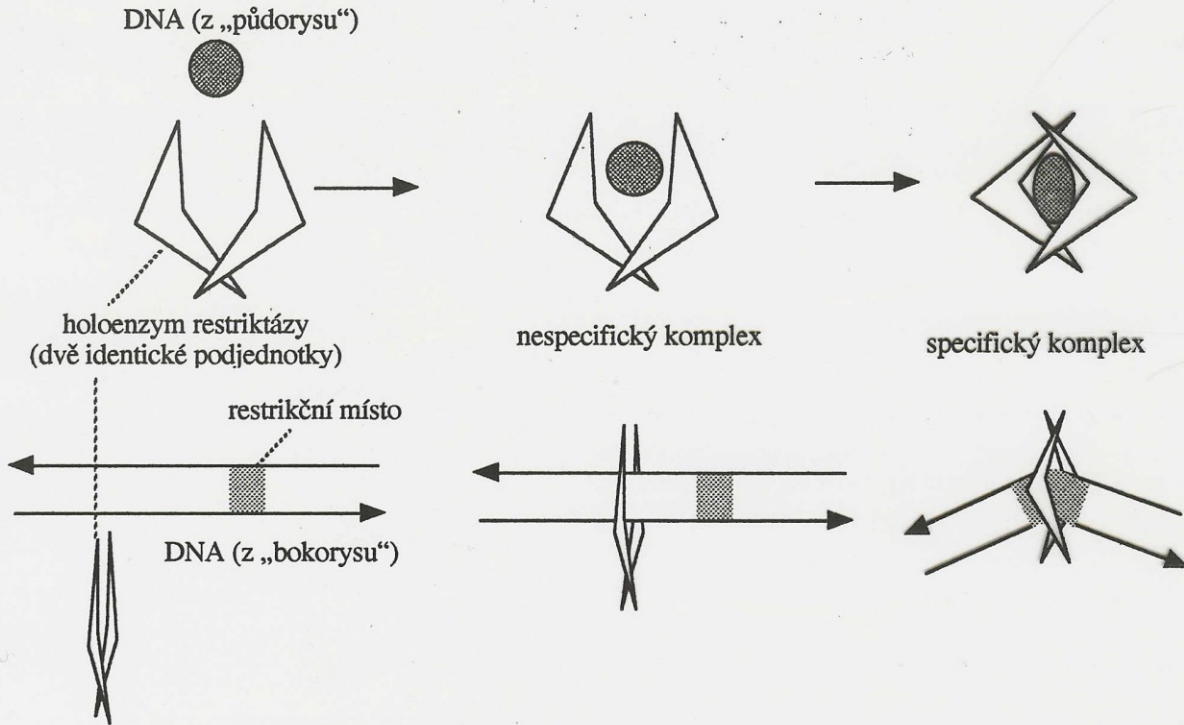
Izoschizomery

rozpoznávají stejnou sekvenci, ale nemusí ve stejném místě štěpit (a mohou být různě citlivé k metylaci)

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 7×10^{-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° , 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**

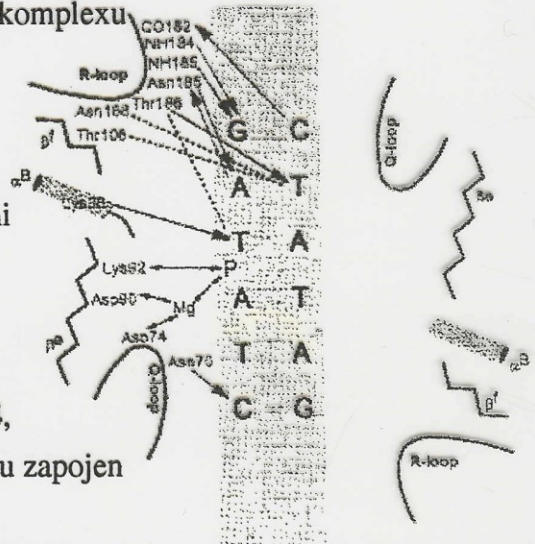
ve velkém a malém žlábků

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



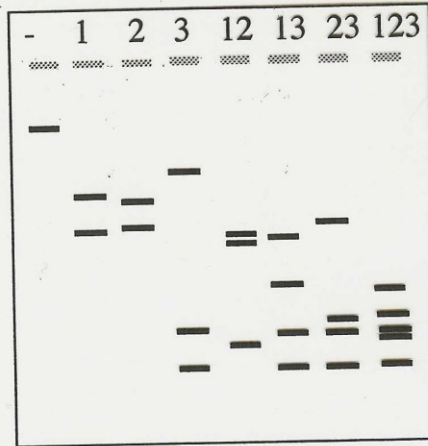
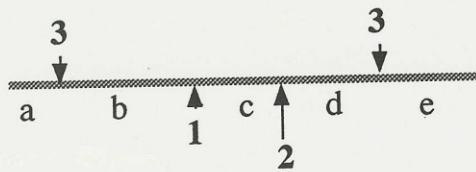
interakce je **vysoce specifická**: k téměř úplné *inaktivaci* komplexu *vede řízená substituce*

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

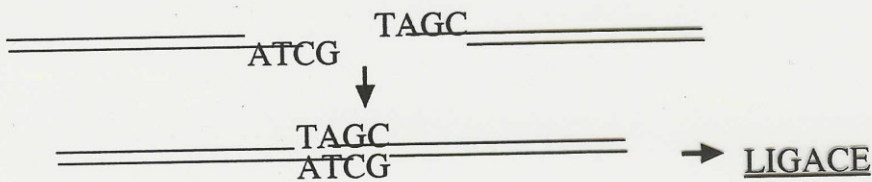
téměř výhradně typu II

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

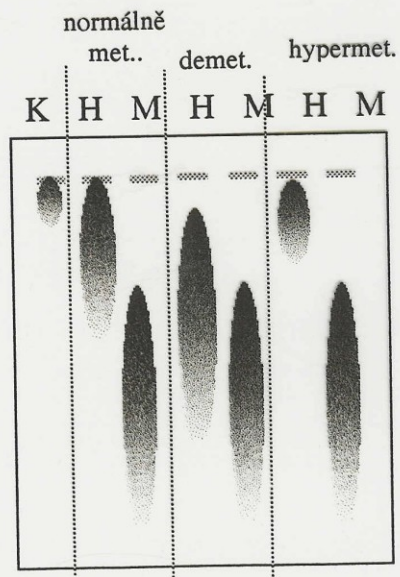
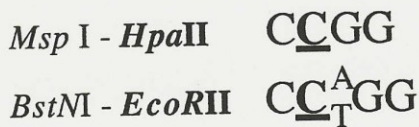


=> sekvenování DNA

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



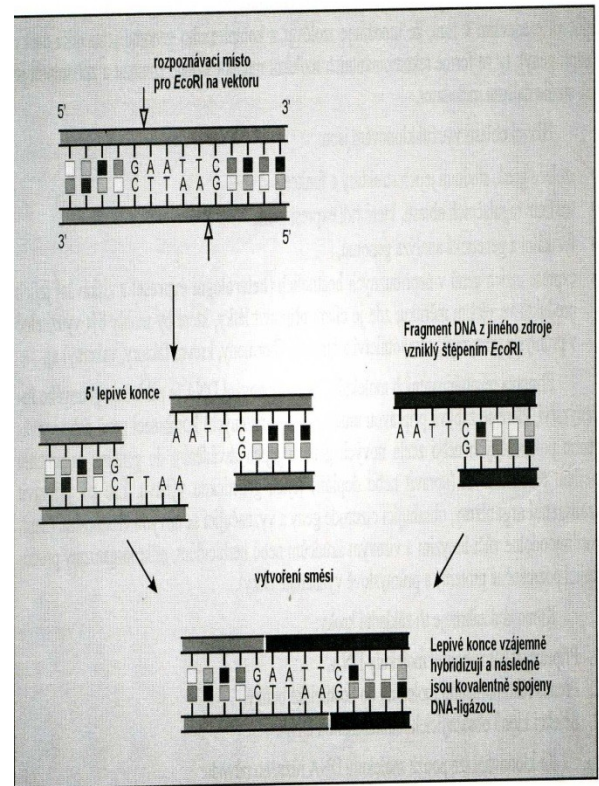
- studium rozsahu metylace genomu (dvojice izoschizomerů, z nichž jeden je citlivý a druhý necitlivý k metylaci cílového místa)



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

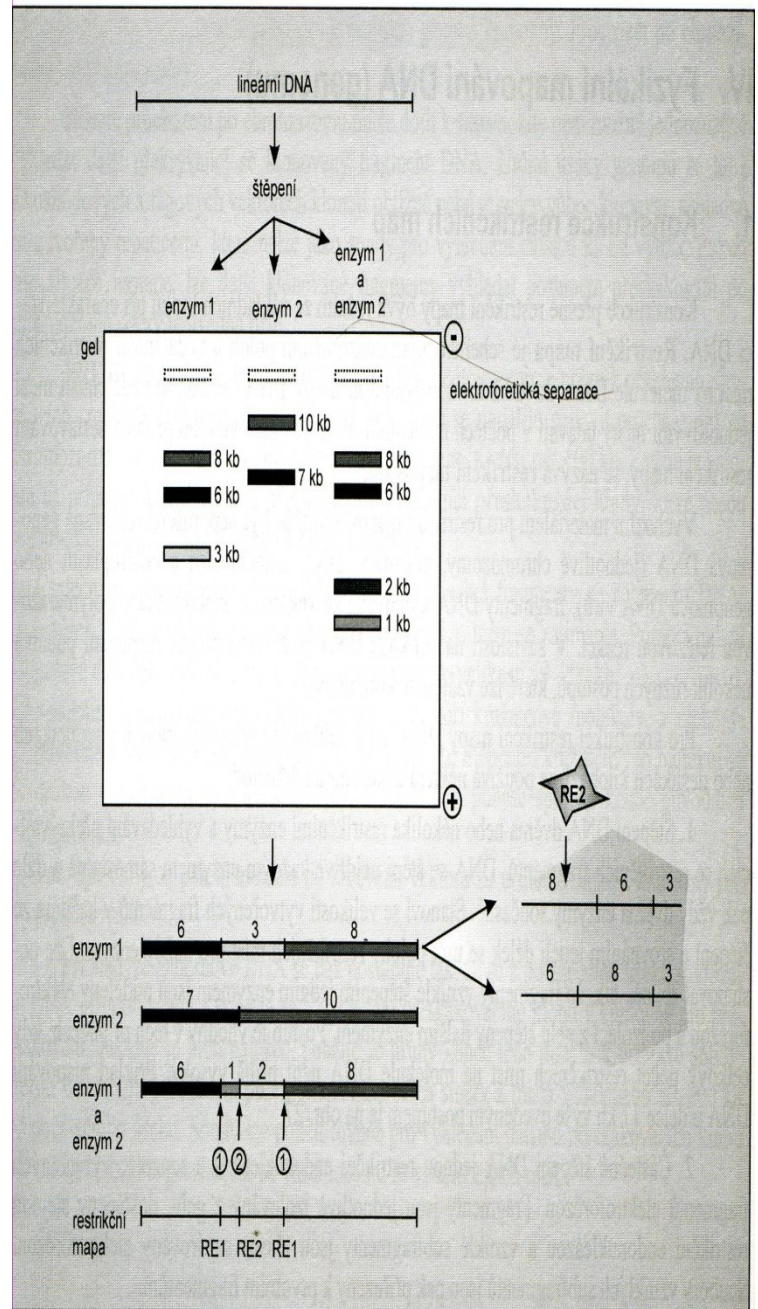
Využití restričních endonukleáz

- 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.



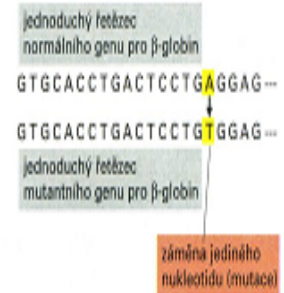
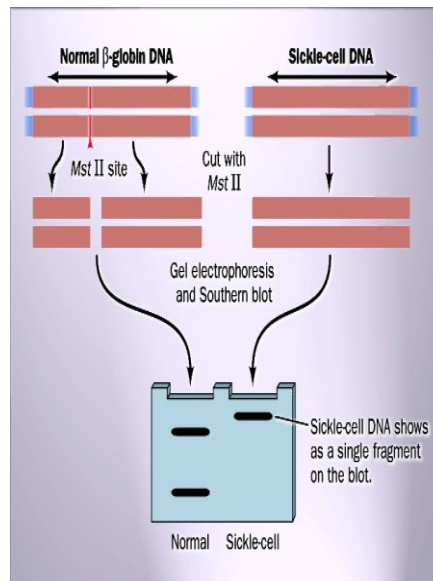
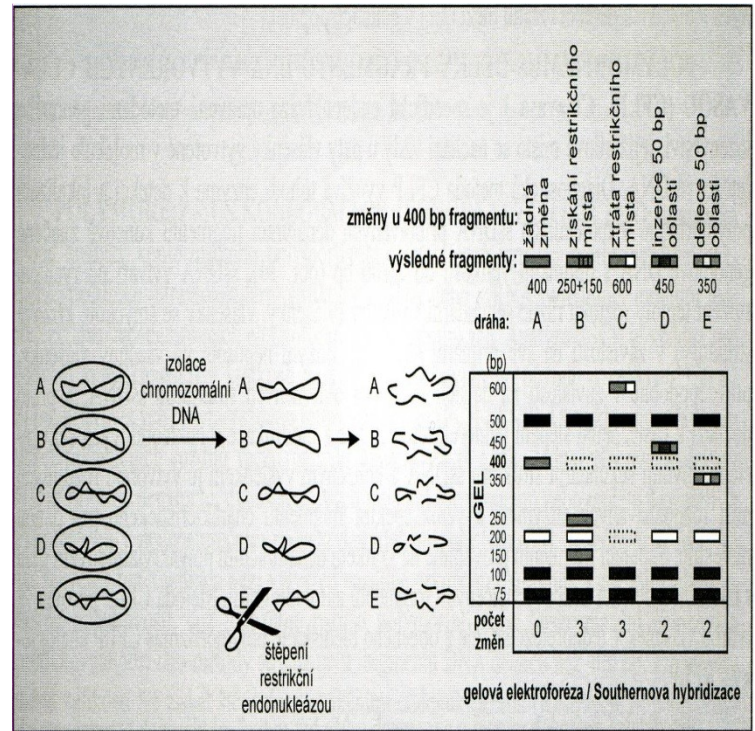
Konstrukce restrikční mapy kombinovaným štěpením dvěma restrikčními enzymy.

- Štěpení molekuly DNA enzymem 1 vedlo ke vzniku 3 kb, 6 kb a 8kb 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 3kb 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.



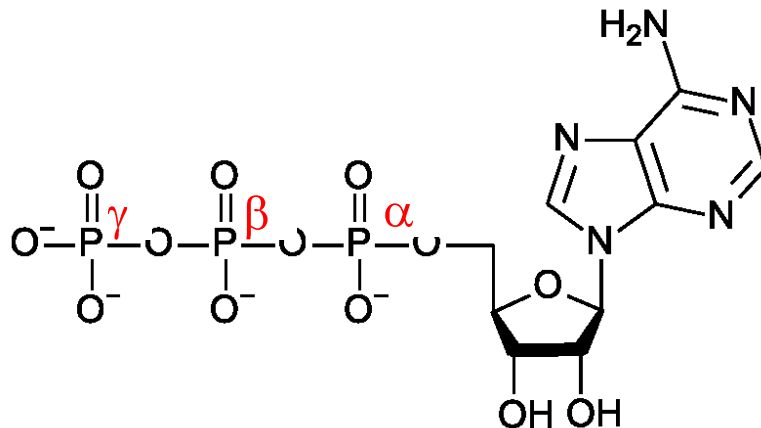
Polymorfizmus délky restričních fragmentů - RFLP

- Tato metoda se používá při analýze genomu.
- Využívá rozdíly v restričních mapách jedinců téhož druhu.
- Rozdíly jsou podmíněny různou délkou a počtem restričních fragmentů, které vznikají štěpením genomové DNA určitou restriční 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 inzerce v amplifikovaných úsecích DNA.



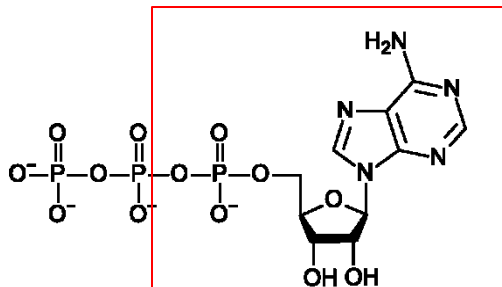
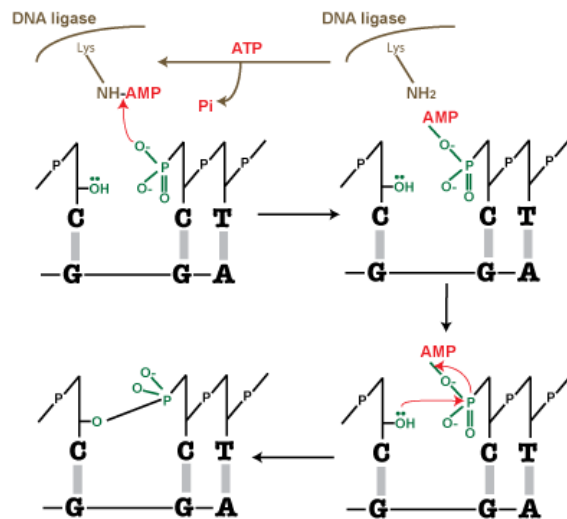
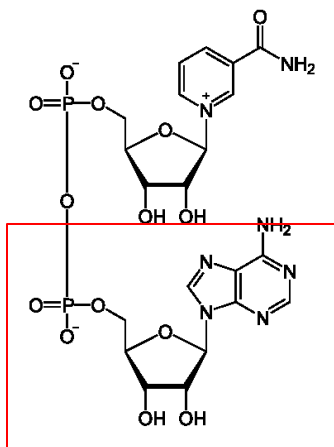
MstII - CCTNAGG

- **polynukleotid kináza**: přenos γ -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 α !!
- 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)



Jaké enzymy a prekurzory použiji pro značení DNA?

- 5'-konec: radioaktivním fosfátem – polynukleotid kináza + γ - ^{32}P -ATP (^{33}P , ^{35}S)
- 3'-konec: celým **deoxy**nukleotidem (včetně α -fosfátu) a polymerázou
 - tedy α - ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S **d**NTP (báze podle potřeby)
 - libovolný fluorofor, redox značka, biotin... vhodně připojený k cukru nebo bázi
 - primer extension (DNA polymerázy vč. Klenowova fragmentu)
 - výměna 3'-koncových nukleotidů (proofreading exo+ polymerázy vč. Klenowa)
 - terminální deoxynukleotidyl transferázou (TdT) – jeden nebo několik nukleotidů náhodně bez templátu
- inkorporace značek dovnitř syntetizovaného řetězce
 - „nick translation“ (DNA polymerázy s 5'→3' exo aktivitou; Pol I, Klenow+malý fragment – nikoli samotný Klenow!)
 - „random priming“ (DNA polymerázy vč. Klenowova fragmentu)
 - PCR (vhodné termostabilní DNA polymerázy)