

C5720 Biochemie

08-Nukleové kyseliny a proteosyntéza

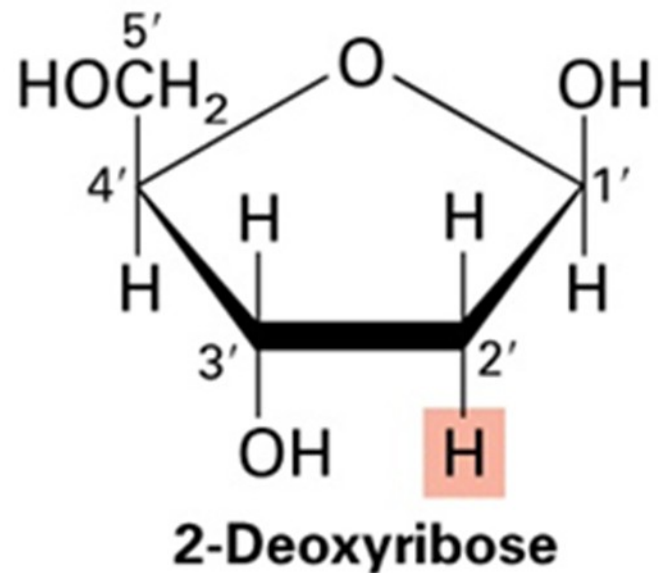
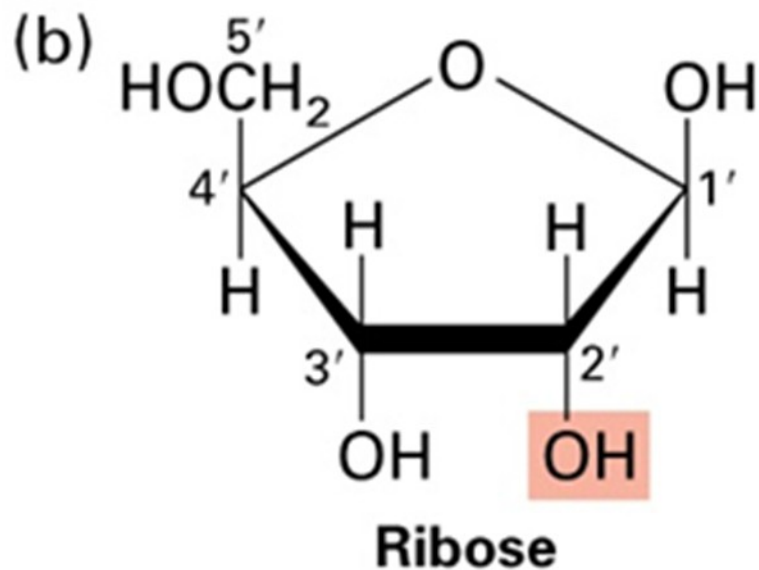
Obsah

- Struktura nukleových kyselin, stavební kameny.
- Báze a jejich tautomerní formy, nukleosidy, nukleotidy
- DNA, RNA a její typy, jejich primární a sekundární struktury, komplementarita bazí.
- Eukaryontní a prokaryontní genom.
- Metody studia. Denaturace a renaturace DNA, hybridní struktury, chemické metody stanovení sekvence DNA (Maxam-Gilbertova metoda).

Složení nukleových kyselin

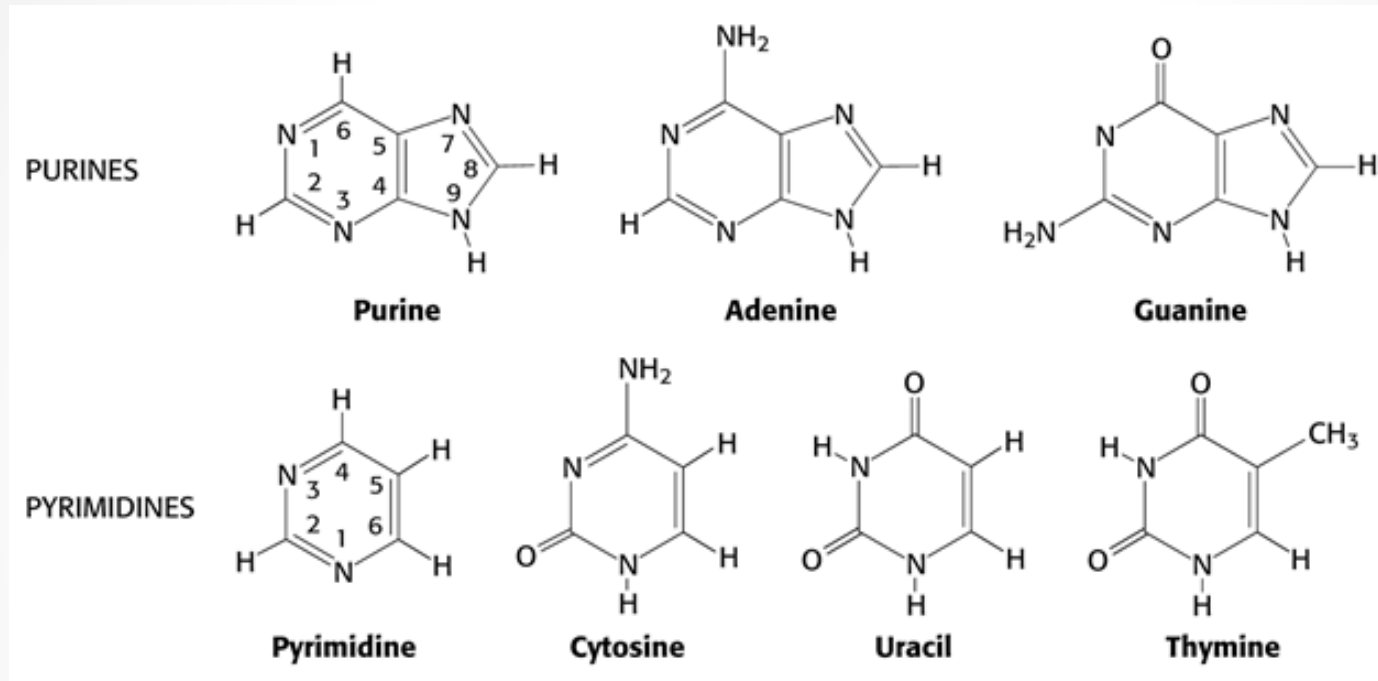
- Stavební kameny
 - Dusíkaté báze – purinové, pyrimidinové
 - Sacharid - pentosy ribosa, deoxyribosa
 - H_3PO_4
- Struktura
 - Báze + monosacharid = (d)Nukleosid
 - (d)Nukleosid + 5'-fosfát = (d)Nukleotid
 - (d)Nukleosid – di a trifosfáty
-

Pentosy



- Číslování pozic

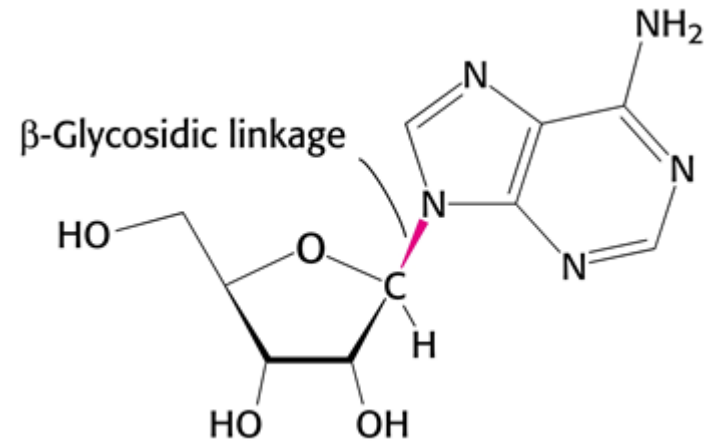
Báze - deriváty purinu a pyrimidinu



- Číslování pozic
- Vyskytují se 4 báze
 - 2 purinové a 2 pyrimidinové
 - alternují uracil (obsažen v DNA, nikoli v RNA) a thymin (naopak)
 - Další sporadicky se vyskytující báze

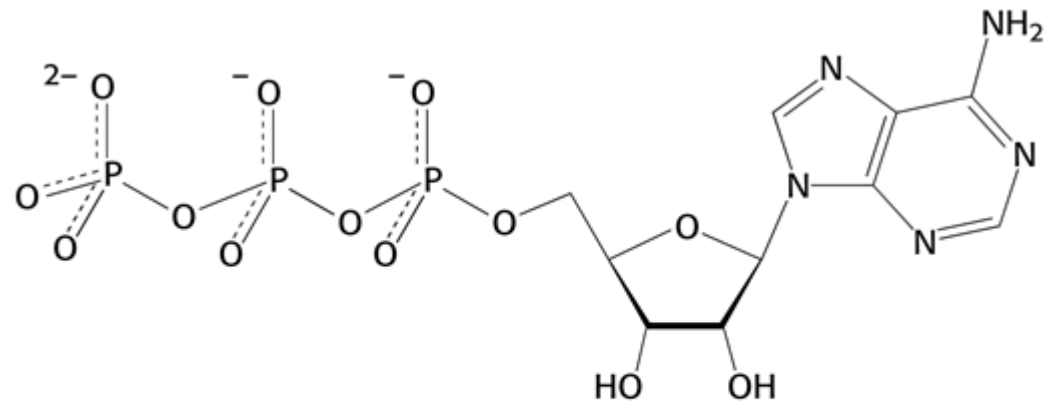
Nukleosidy

- N-glykosidy
- Nomenklatura
 - Adenosin, guanosin
 - Cytidin, thymidin, uridin
 - Ev. deoxy-



Nukleotidy

- Fosfátový ester na C₅
- Nomenklatura – (d)Nukleosid(mono)fosfáty
 - AMP, GMP
 - CMP, TMP, UMP
- Další fosforylace
 - anhydridy
 - (d)Nukleosiddifosfáty
 - (d)Nukleositrifosfáty

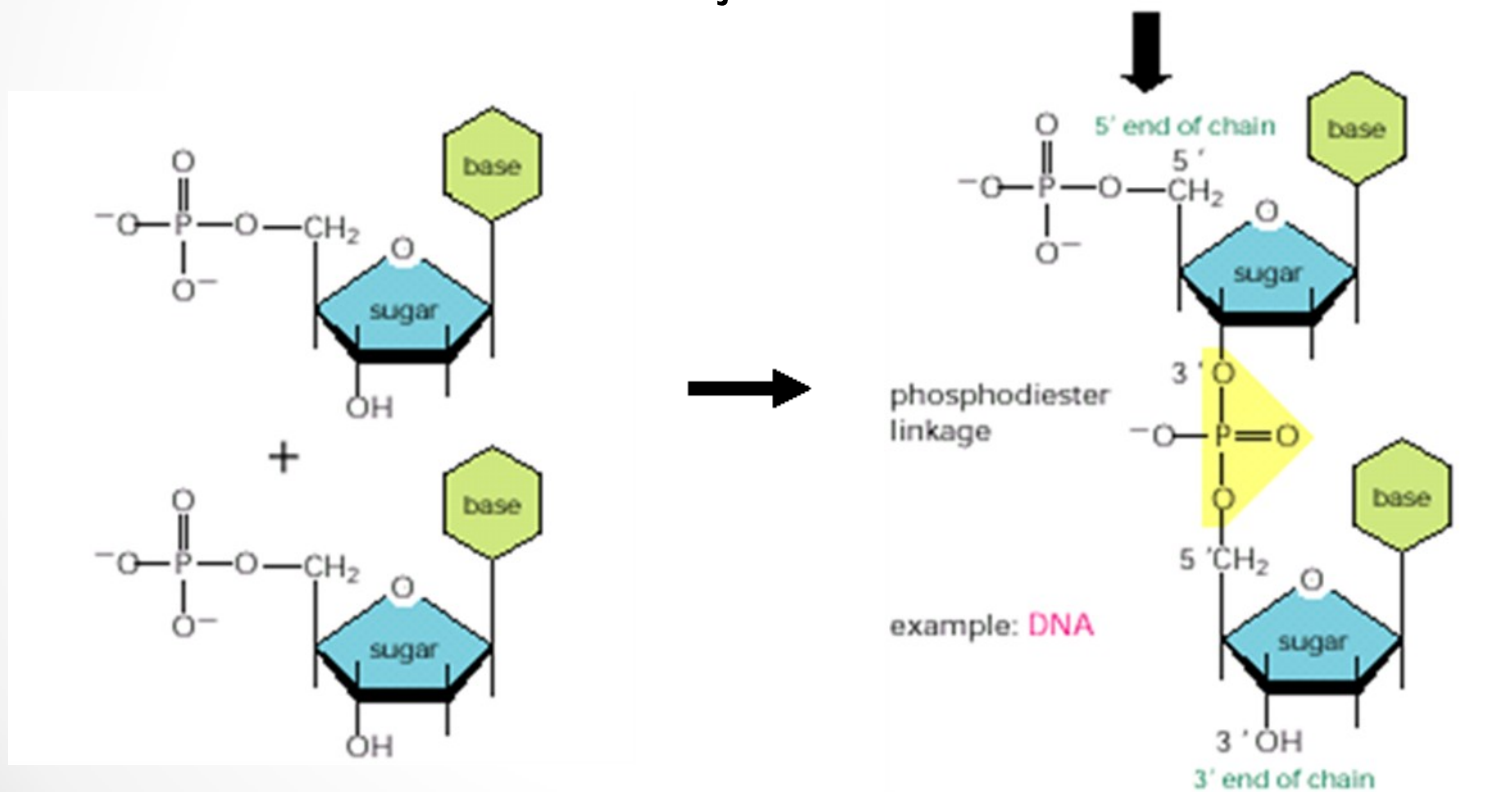


Oligo- a polynukleotidy

- Spojování nukleotidů
 - Fosfodiesterová vazba
 - Potřeba energie
- Sekvence nukleotidů – bazí
 - Primární struktura
 - Potřeba informace
- Směr čtení
 - 5' a 3' konce

Formální řetězení nukleotidů

- Fosfodiesterová vazba
- Skutečná reakce složitější – energie



Vyšší strukturní úrovně

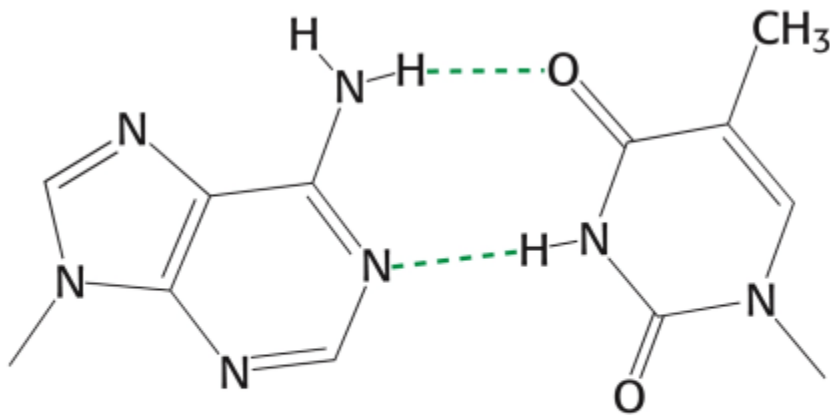
- Odlišnost DNA a RNA
 - Vývojové aspekty - RNA svět
 - Stabilita DNA
- Chemické složení
 - Deoxyribosa x ribosa
 - Thymin x uracil
- Velikost molekuly
 - RNA relativně malé proti DNA
 - Výjimka RNA viry
- Složitost struktury
 - DNA povšechně dimer

Struktura DNA

- Etapy
- Chragaffova pravidla – poměr bazí v DNA
 $A+G=T+C$ $A=T$ $G=C$ $A+C=G+T$
- Donohue – báze v tautomerních ketoformách
- Franklinová – RTG difrakční analýza
- Watson, Crick (1953) – dvojšroubovice

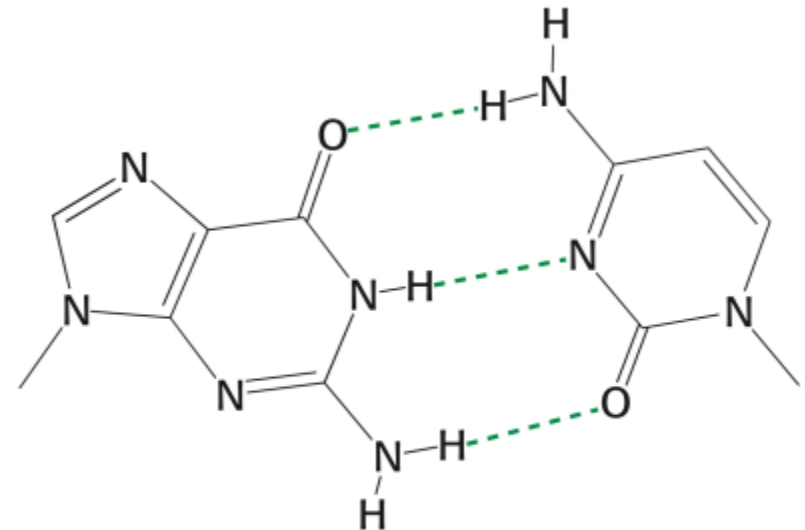
Struktura DNA

- Komplementarita bazí
 - Energeticky výhodné párování
 - H-můstky 2 u A-T, 3 u G-C
 - Nemí zcela automatické



Adenine (A)

Thymine (T)

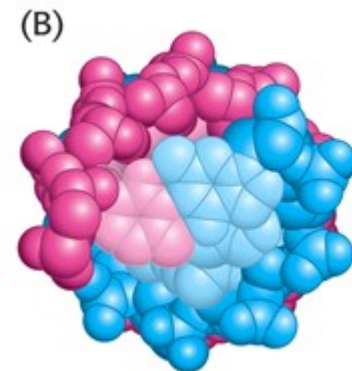
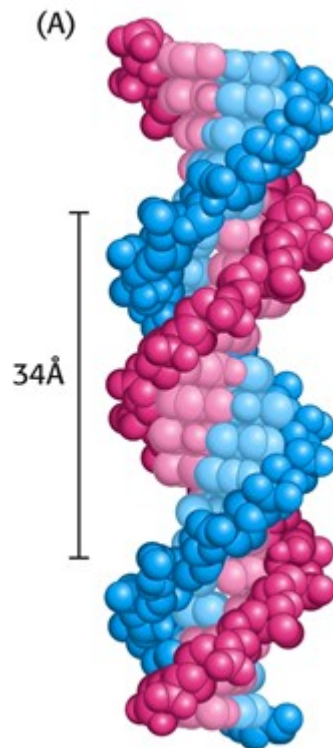


Guanine (G)

Cytosine (C)

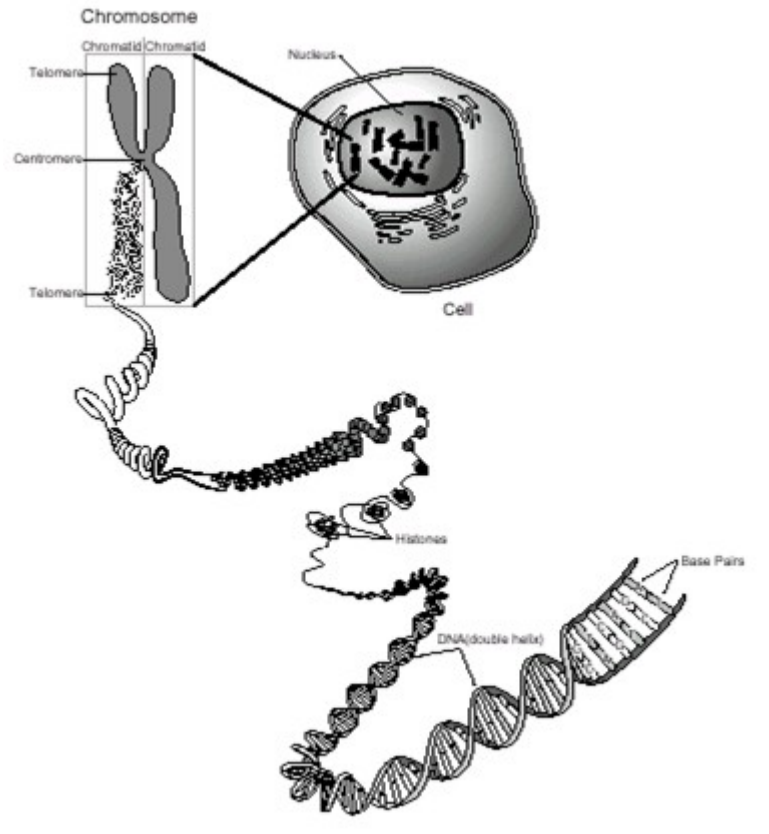
Struktura DNA

- Sekundární struktura
 - Šroubovice
- Vlákňité molekuly
- Dimer
 - Antiparalelní
 - Malý a velký zárez
- Jiné typy šroubovic



Struktura DNA

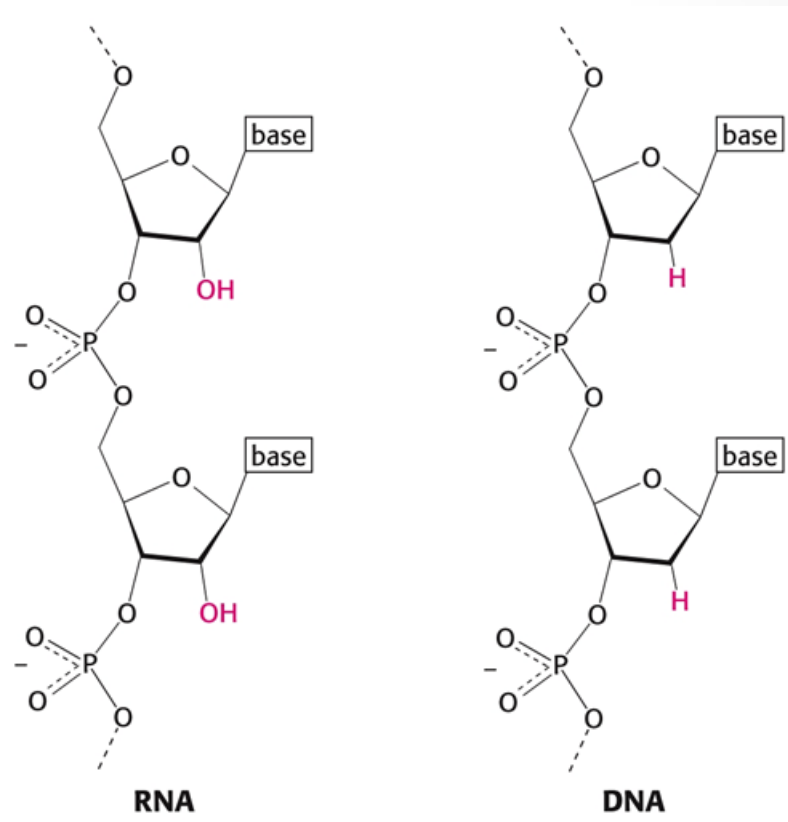
- Poskládání molekuly DNA u eukaryontů
 - Úloha histonů
 - Bazicita x fosfáty



Struktura RNA

- Všeobecně jednovláknová
 - Výjimka některé viry

- Srovnání RNA s DNA



Formy RNA

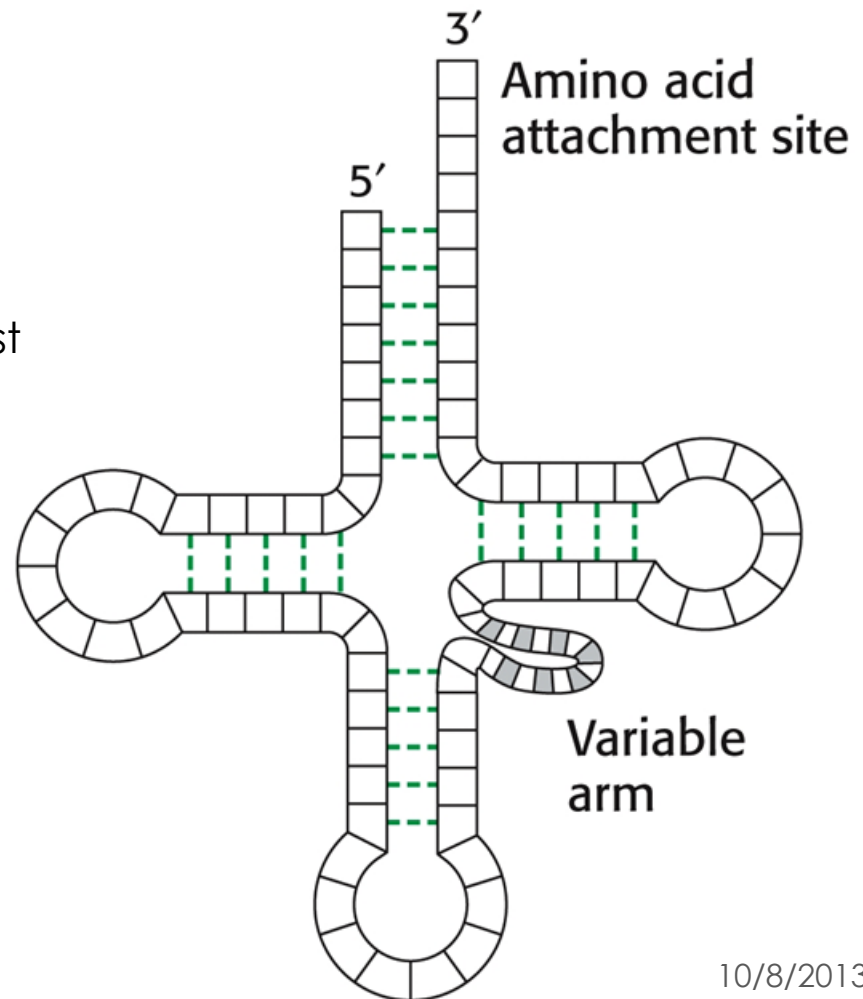
- mRNA
 - mediátorová, messenger
 - informační – 5-10 %
- rRNA
 - ribosomální – 80 %
- tRNA
 - transferová, přenosová – 10-15 %
 - 60 tRNA

TABLE 5.2 RNA molecules in *E. coli*

Type	Relative amount (%)	Sedimentation coefficient (S)	Mass (kd)	Number of nucleotides
Ribosomal RNA (rRNA)	80	23	1.2×10^3	3700
		16	0.55×10^3	1700
		5	3.6×10^1	120
Transfer RNA (tRNA)	15	4	2.5×10^1	75
Messenger RNA (mRNA)	5		Heterogeneous	

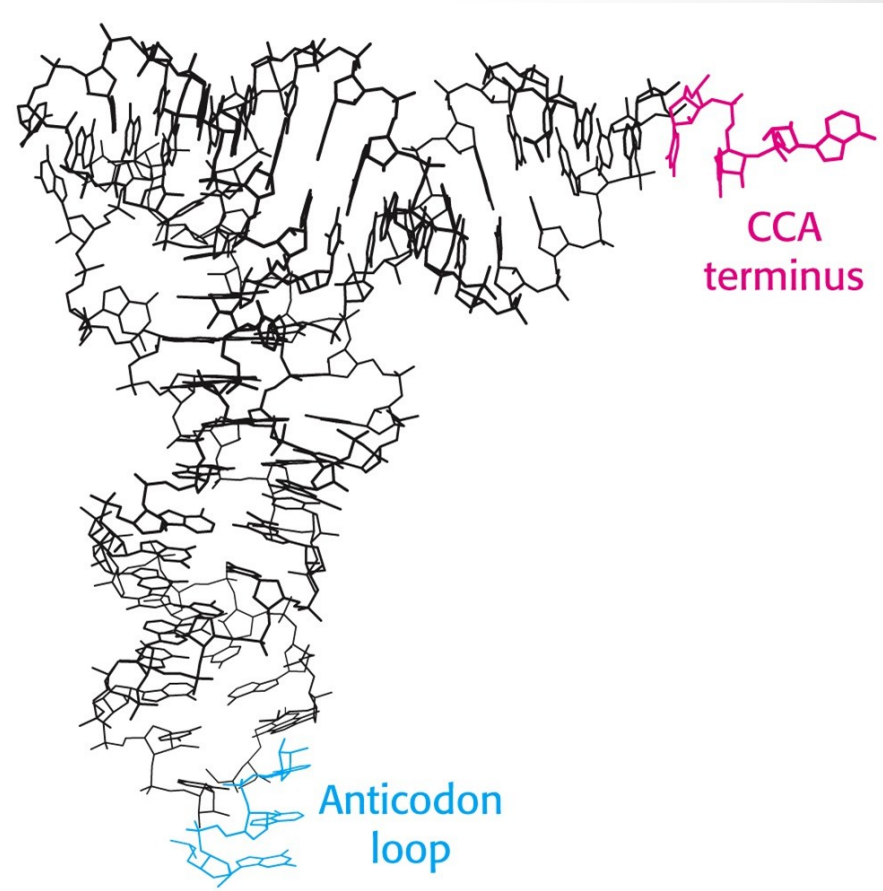
Struktura t-RNA

- Projekce do roviny
 - Jetelový list
- Typické úseky
 - Otevřené rameno
 - Antikodonové rameno
 - Variabilní – rozlišovací vl.astnost
 - Neobvyklé nukleotidy
 - Vysoká specifita



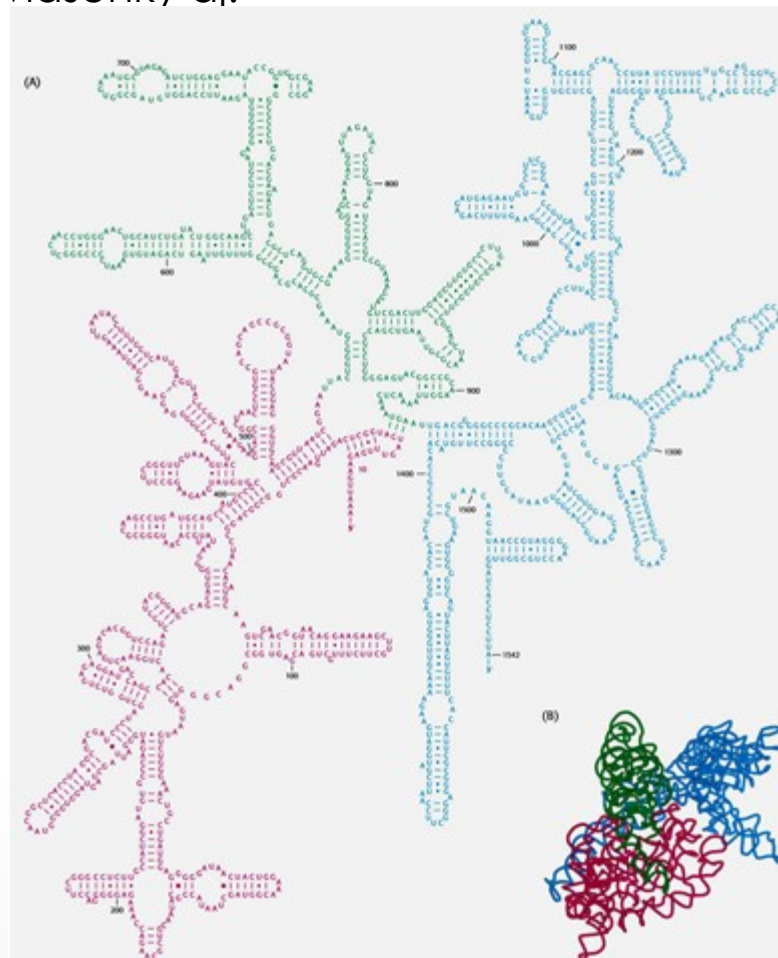
Struktura t-RNA

- Prostorová projekce
- Typické úseky
 - Otevřené rameno
 - Antikodonové rameno



Struktura rRNA

- Jednovláknno s množstvím komplementárních úseků
 - Typické struktury – vlásenky aj.

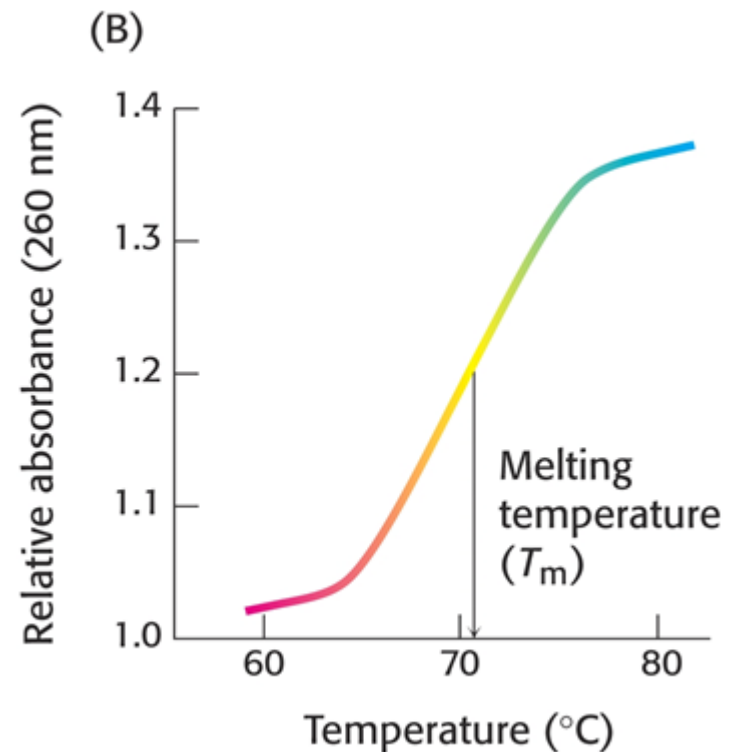
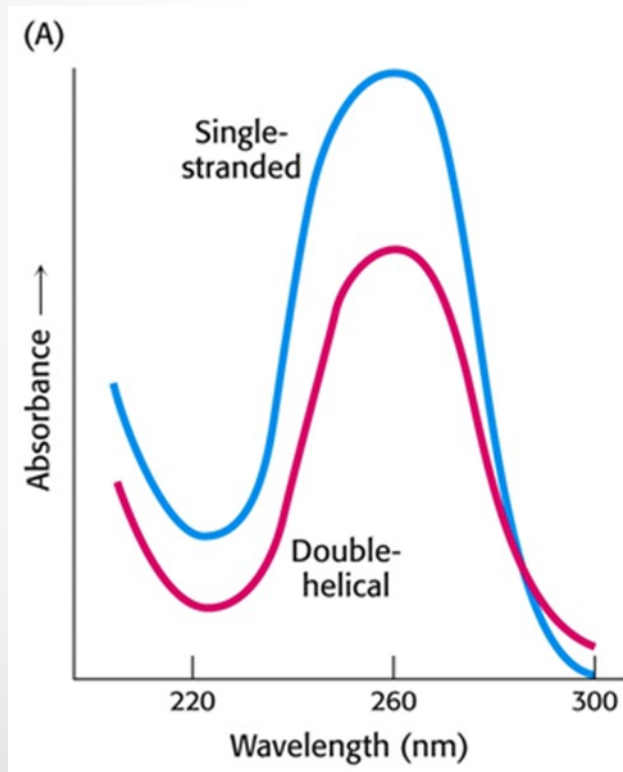


Denaturace a renaturace DNA

- Oddělování bazí – zánik H-můstků – vliv T
 - Světelná absorpce vyšší u oddělených bazí, interakce ji snižuje
 - Sledování procesu oddělování bazí - řetězců
- Vratný proces
 - Hybridizace řetězců
 - Nástroj studia – homologie
 - Metody – PCR, genové inženýrství aj.
 - Podle stupně oddělení

Denaturace a renaturace DNA

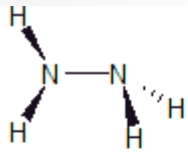
- Spektra DNA
- Proces denaturace DNA



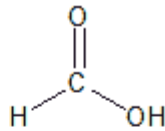
Určení primární struktury

- Chemická metoda Maxam-Gilbertova
- Specifické (téměř) štěpení řetězce činidly
- Pracná, málo efektivní, ale univerzální a nezávislá
 - Modifikace bazí – DMS – puriny
 - hydrazinolýza pyrimidinů
- Štěpení řetězce v místě této báze
 - G – DMS, piperidin
 - A+G – kys. mravenčí, piperidin
 - T+C – hydrazin, piperidin
 - T – hydrazin + NaCl, piperidin

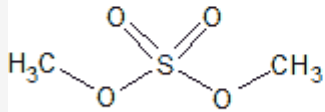
Destrukce bazí a štěpení řetězců



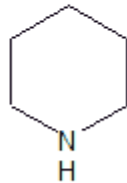
hydrazín



kys. mravčia



dimetylsulfát



piperidín

Obr. Štruktúrne vzorce chem. modifikačných činidiel

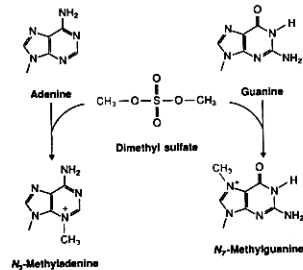


FIGURE 4A.1
Reaction of purines with dimethyl sulfate.

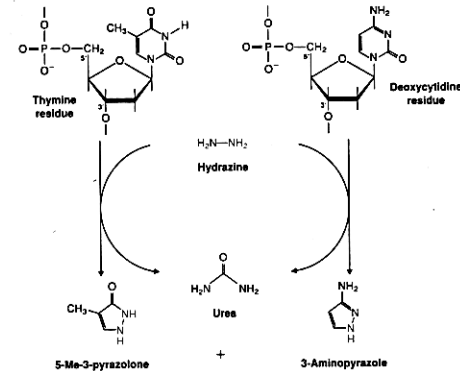
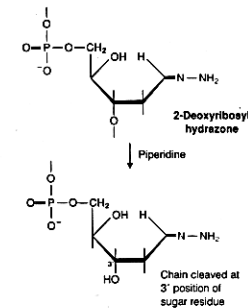


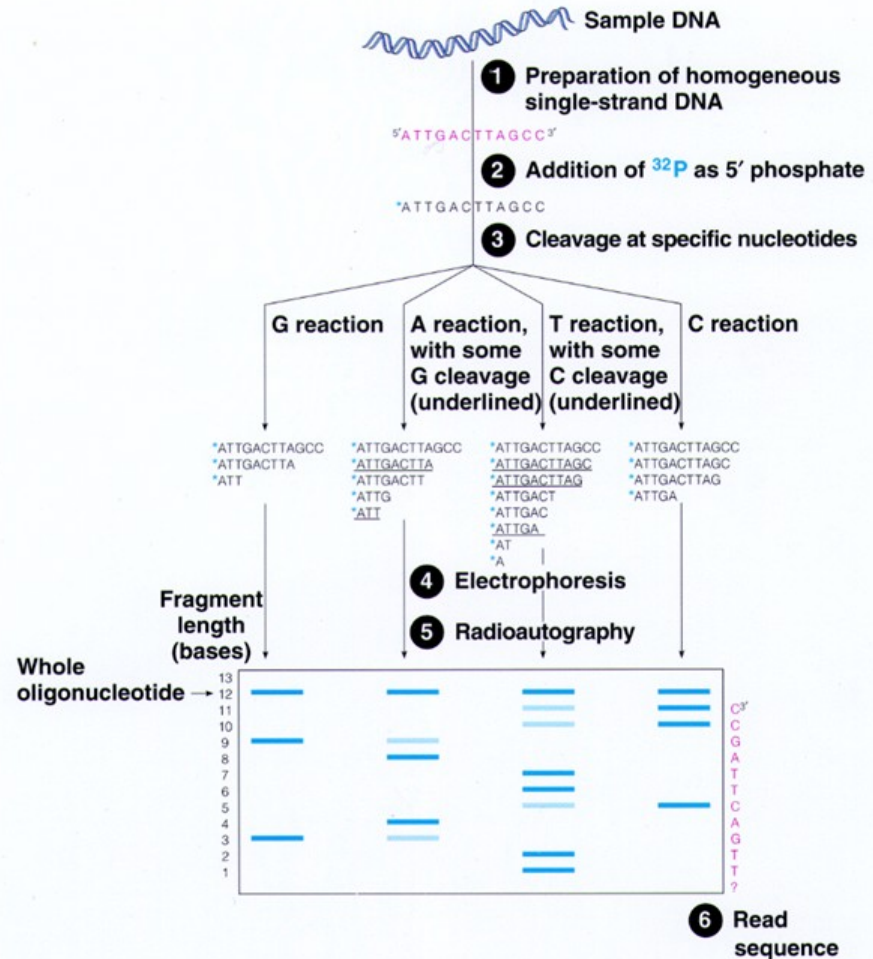
FIGURE 4A.2
Hydrazinolysis of pyrimidines.



Sekvence DNA

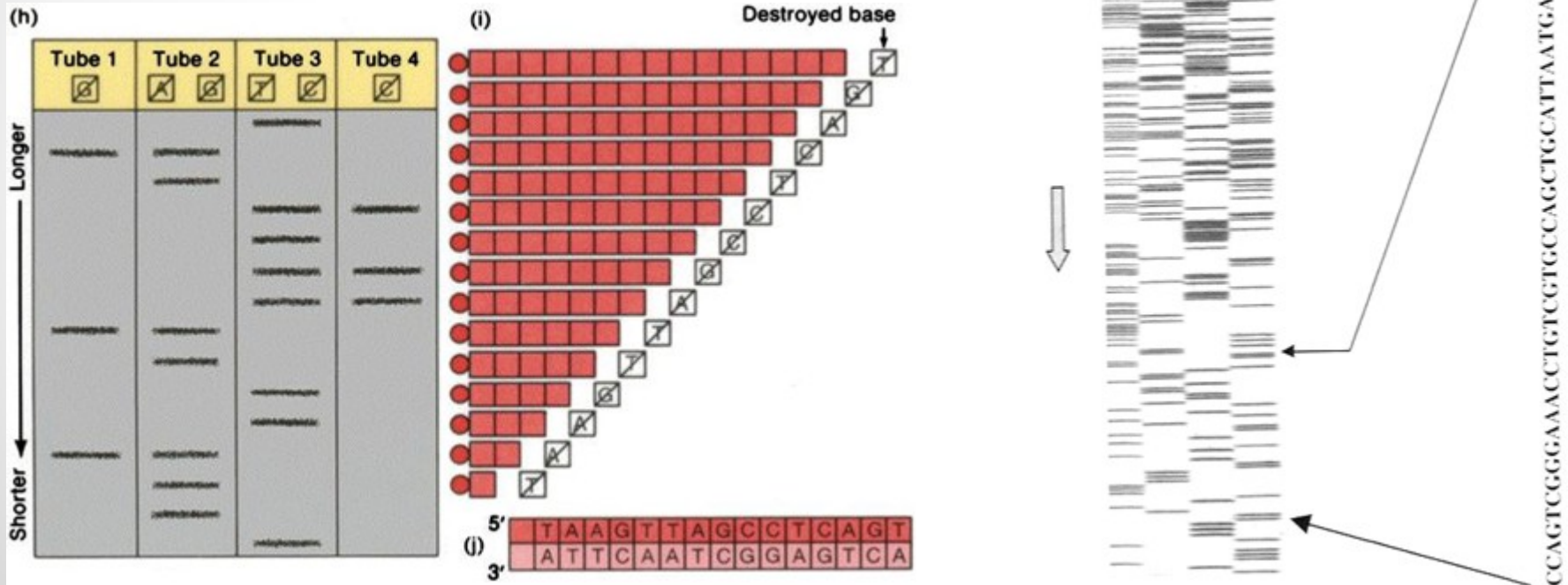
- Schema metody
- Ilustrace postupu
 - Od známe sekvence k výsledku

Figure 4A.4 Sequencing an oligonucleotide by the Maxam-Gilbert method



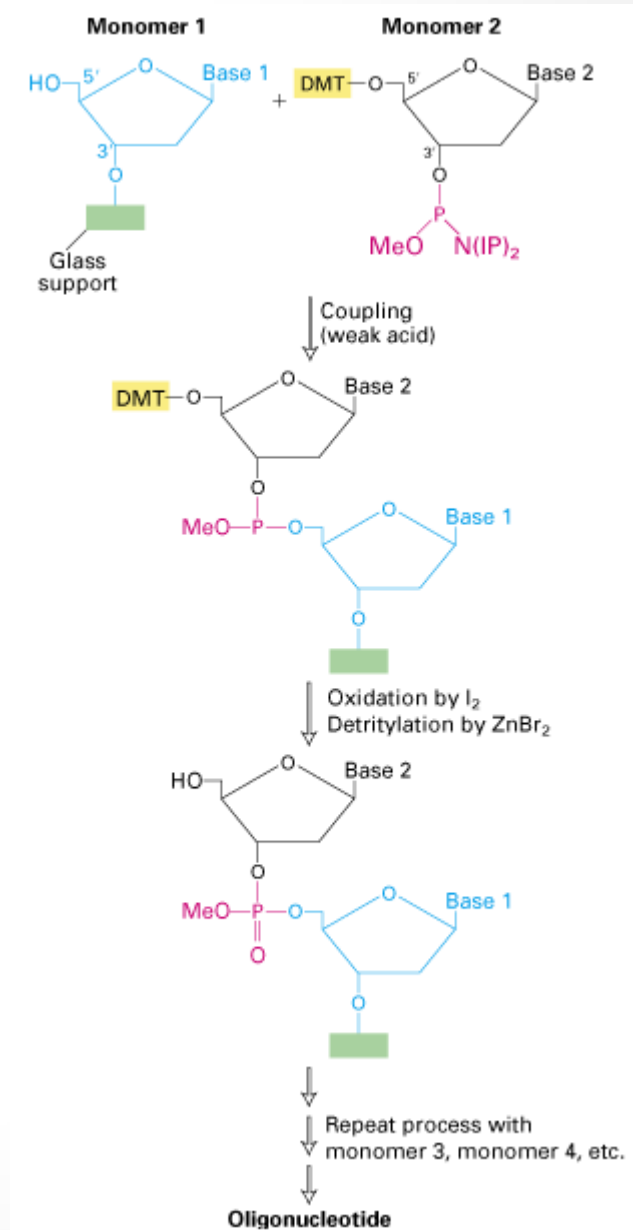
Sekvenace DNA

- Schema metody
- Ilustrace postupu
 - Od výsledku k sekvenci



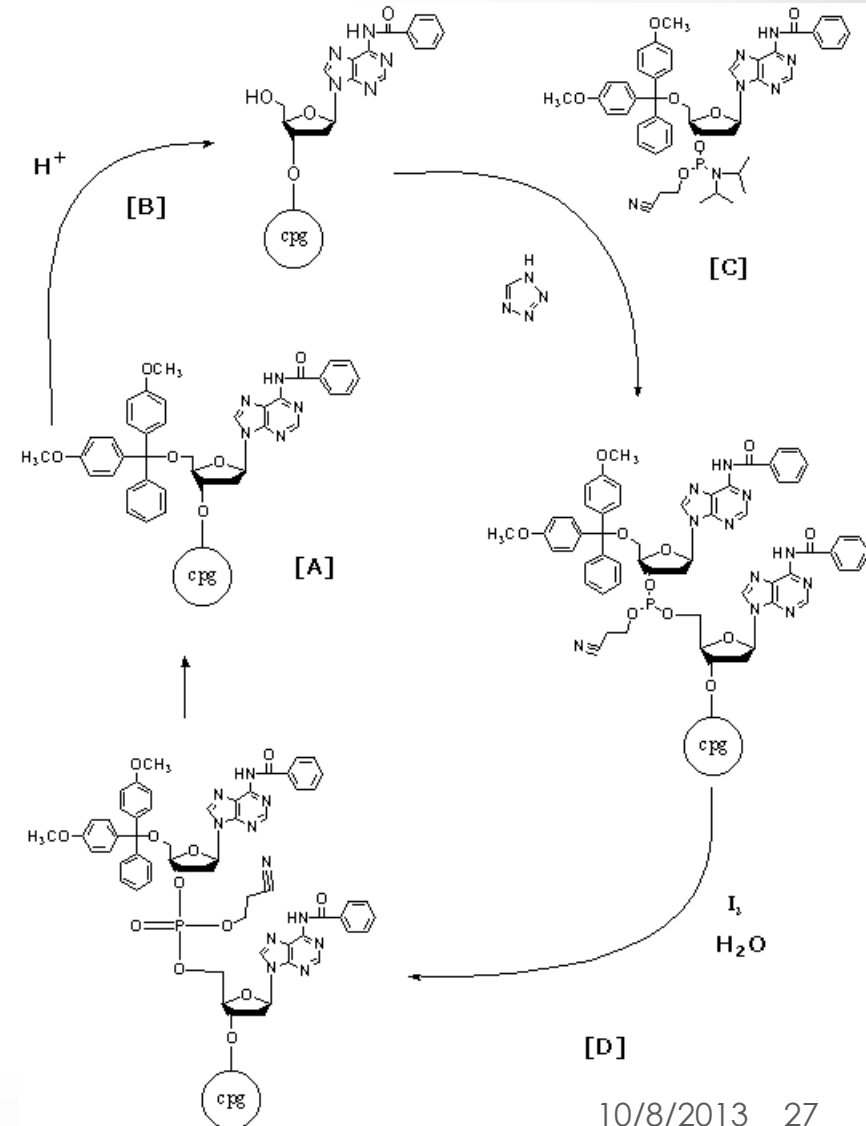
Syntéza oligonukleotidů

- Syntéza na pevné fázi
 - Monomery s aktivovanými a chráněnými skupinami
 - První zakotven na nosiči
 - Deblokace reagujících skupin
 - Vazba
 - Promývání
 - Cyklický proces - automatizace
- Příprava primerů
 - Komerční záležitost
- Umělé geny



Syntéza oligonukleotidů

- Fosforamiditová metoda
- Komerčně dostupné oligonukleotidy – primery
- Vlastní primery
- Umělé geny
- Modifikované geny



Syntéza oligonukleotidů

- Umělé geny
 - Delší geny po částech

Table 12.3

Some Chemically Synthesized Genes

Gene	Size (bp)
tRNA	126
α -Interferon	542
Secretin	81
γ -Interferon	453
Rhodopsin	1057
Proenkephalin	77
Connective tissue activating peptide III	280
Lysozyme	385
Tissue plasminogen activator	1610
c-Ha-ras	576
RNase T1	324
Cytochrome <i>b</i> ₅	330
Bovine intestinal Ca- binding protein	298
Hirudin	226
RNase A	375