

Enzymové přeměny nukleových kyselin

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:

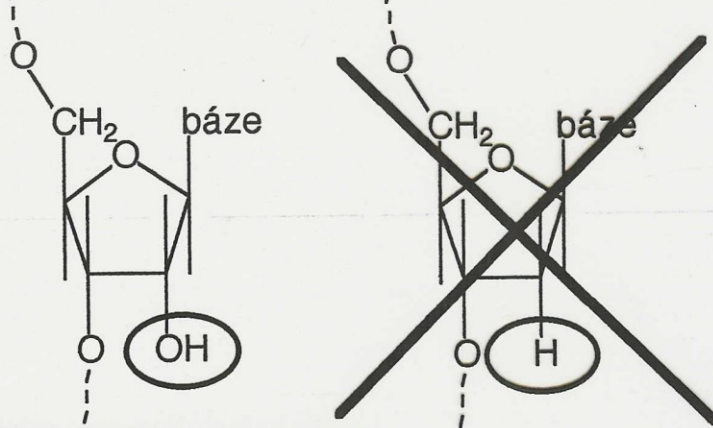
- trávicí enzymy (intra- a extracelulární)
- odbourání RNA (zejm. mRNA)
- sestřih prekurzorových molekul RNA
- reparace DNA
- štěpení cizorodých DNA

KLASIFIKACE NUKLEÁZ

A. PODLE SUBSTRÁTOVÉ SPECIFICITY

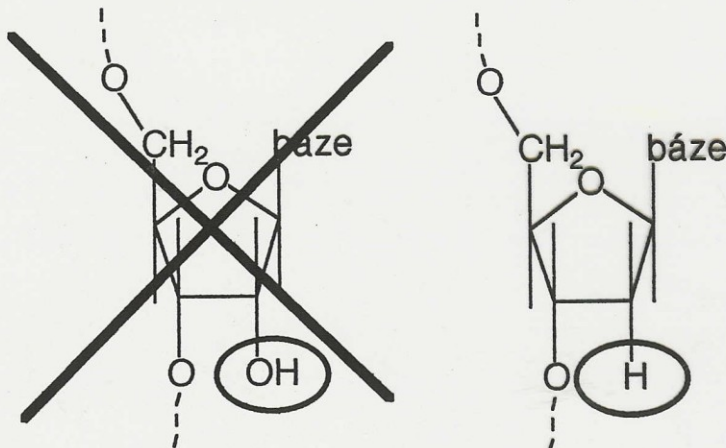
1. RIBONUKLEÁZY

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

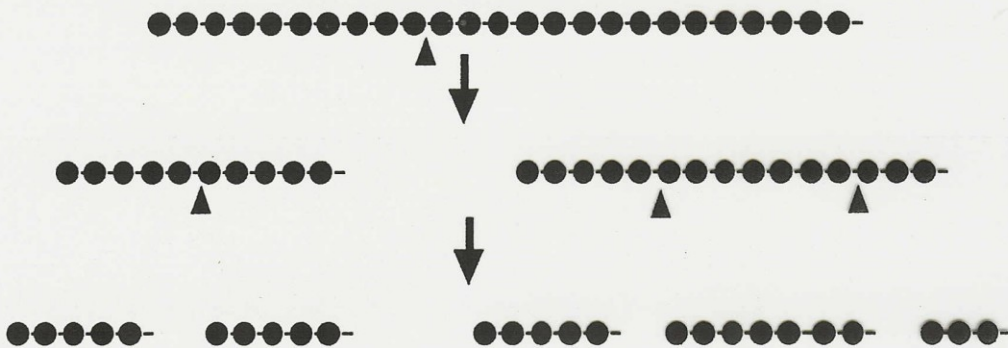
štěpí oba typy substrátu (jsou obvykle „nespecifické“ pouze v tomto smyslu)

B. PODLE ZPŮSOBU ATAKU POLYNUKLEOTIDOVÉHO ŘETĚZCE

1. ENDOLYTICKÉ ENZYMY (ENDONUKLEÁZY)

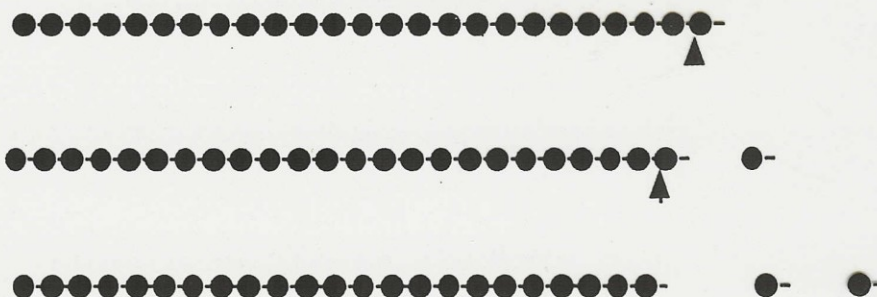
účinkují kdekoli **uvnitř řetězce**, produkují oligonukleotidy a způsobují rychlé změny fyzikálních vlastností (délka molekul => viskozita, sedimentace apod.)

obvykle nejsou schopny odštěpovat mononukleotidy => neštěpí dinukleotidy a trinukleotidy

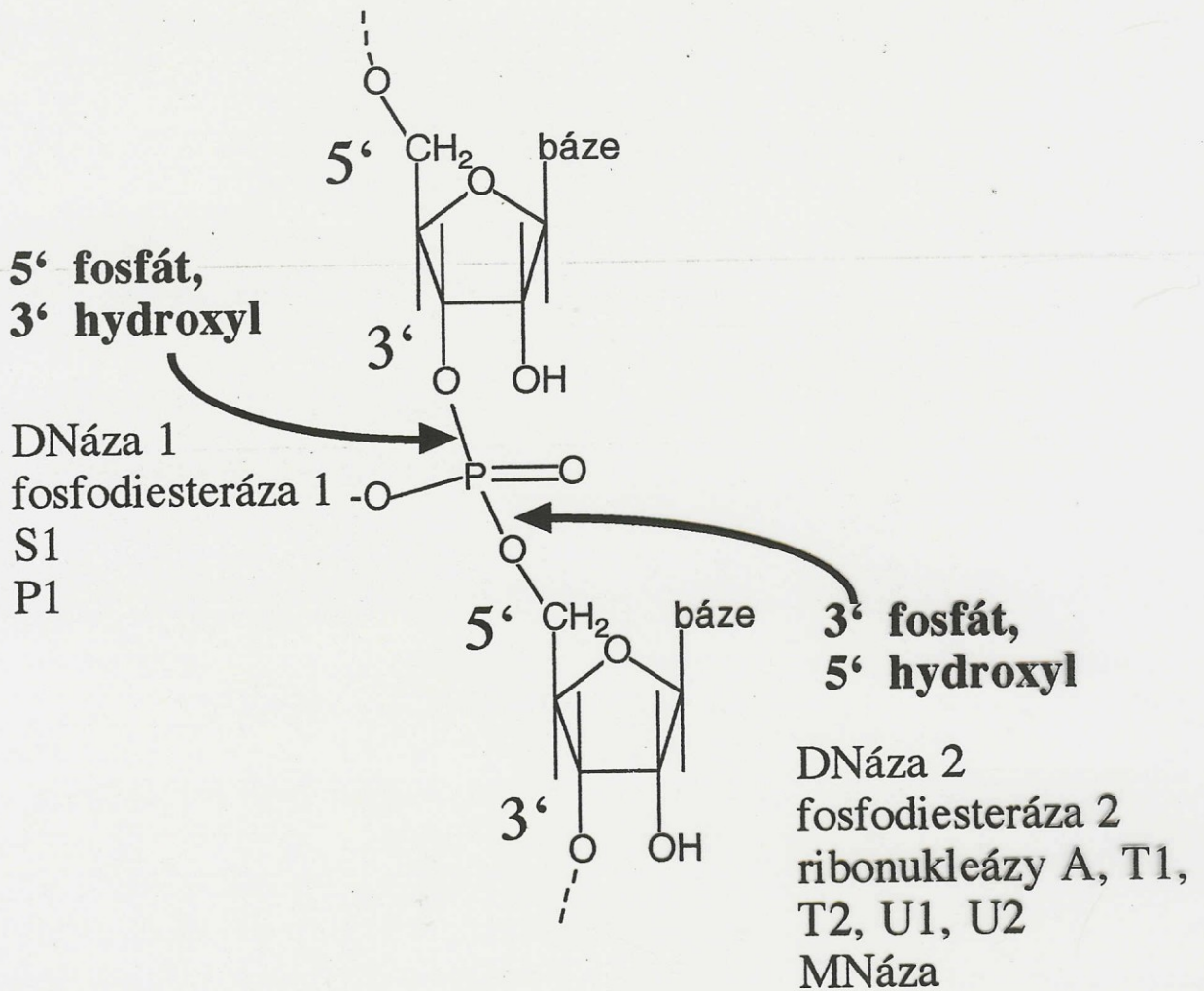


2. EXOLYTICKÉ ENZYMY (EXONUKLEÁZY)

postupně odštěřpují 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)

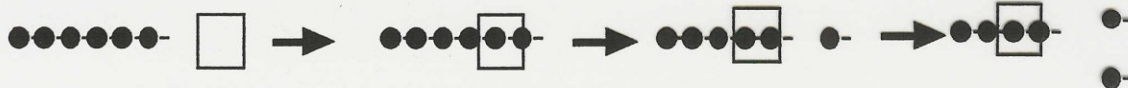
2. směr štěpení u exonukleáz ($5' \rightarrow 3'$, $3' \rightarrow 5'$)

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)

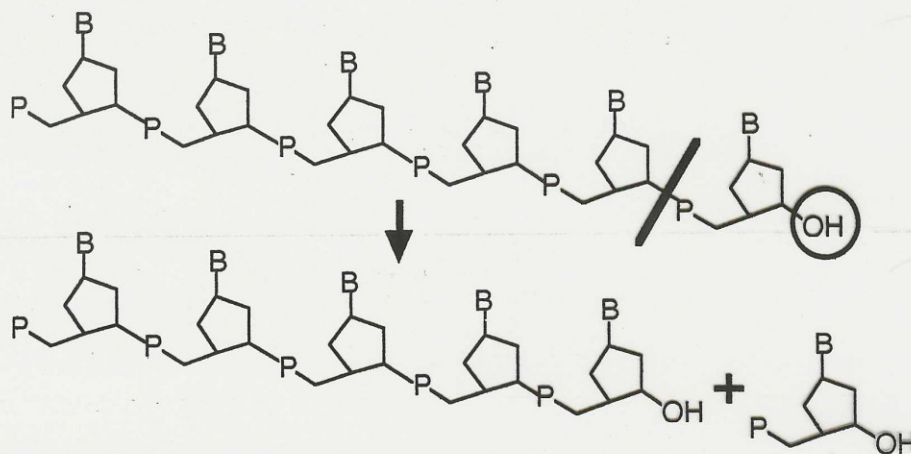
B. NESPECIFICKÉ EXONUKEÁZY

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**

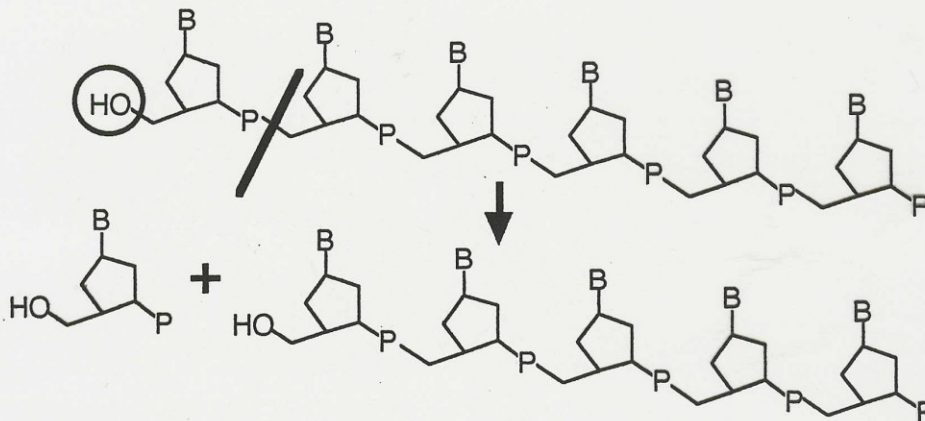


Fosfodiesteráza II (ze sleziny)

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

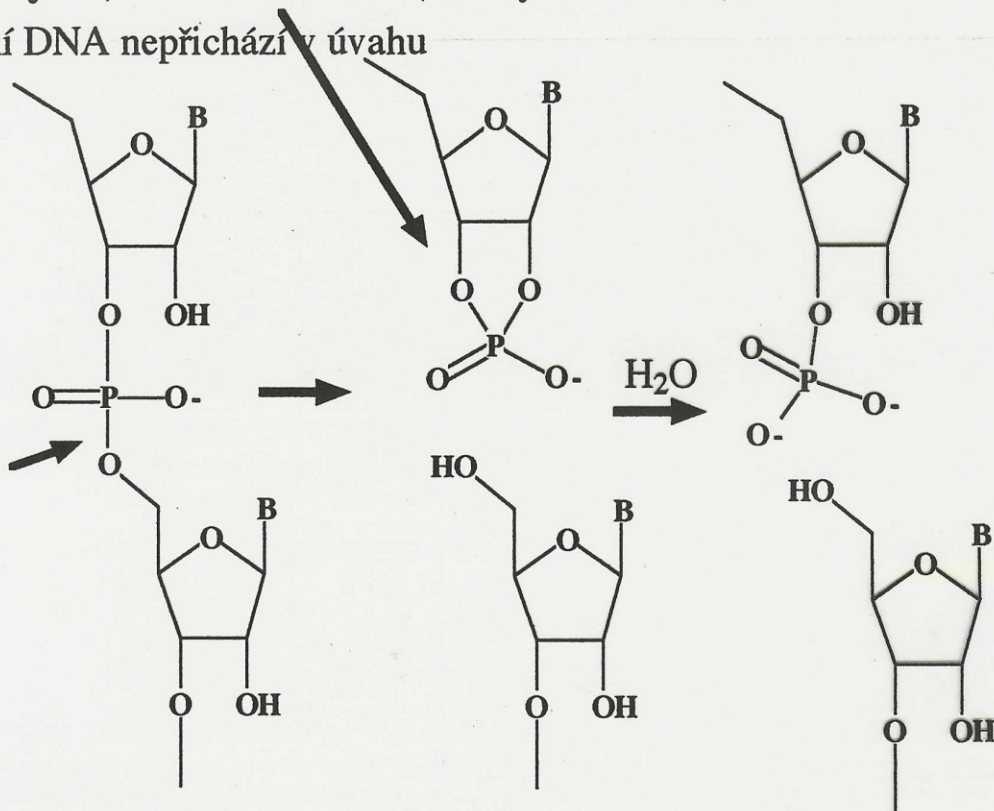
RIBONUKLEÁZY

- 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

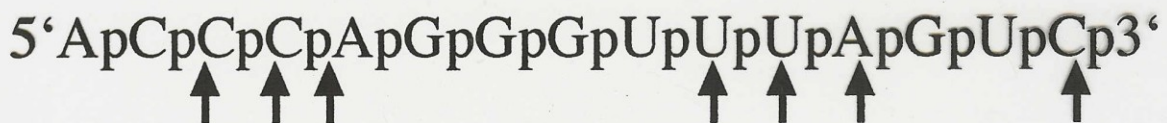
RNáza S: uměle získaná štěpením subtilisinem

(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*)

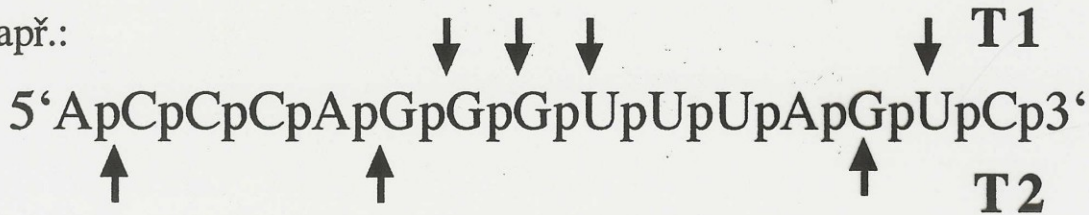
neutrální pH, tepelná stabilita, M_r 11 085

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

Ribonukleáza T2 (*Aspergillus oryzae*)

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

např.:

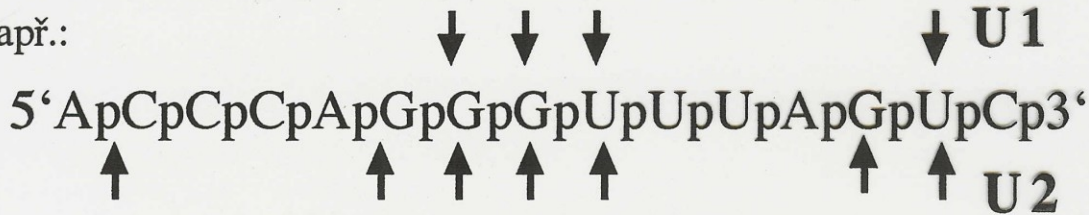


Ribonukleáza U1 a **U2** (*Ustilago sphaerogena*)

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

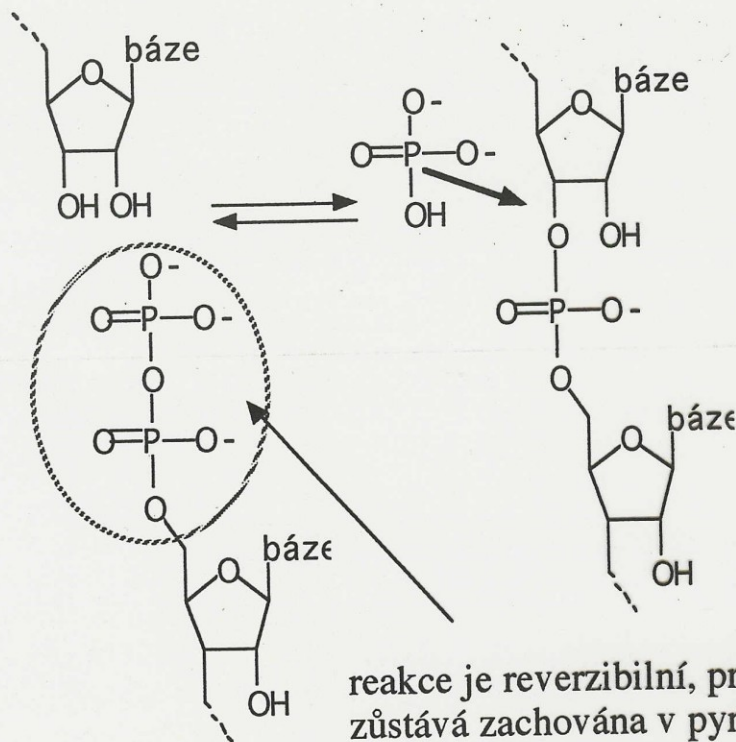
5. DEPC

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

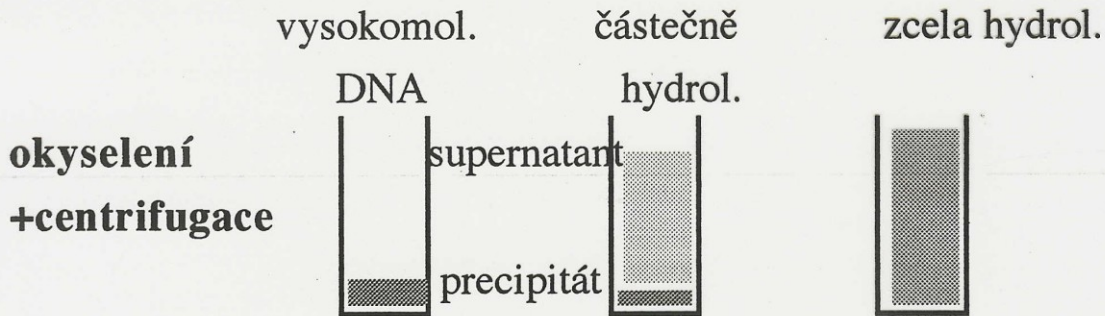
A. DNA endonukleázy

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

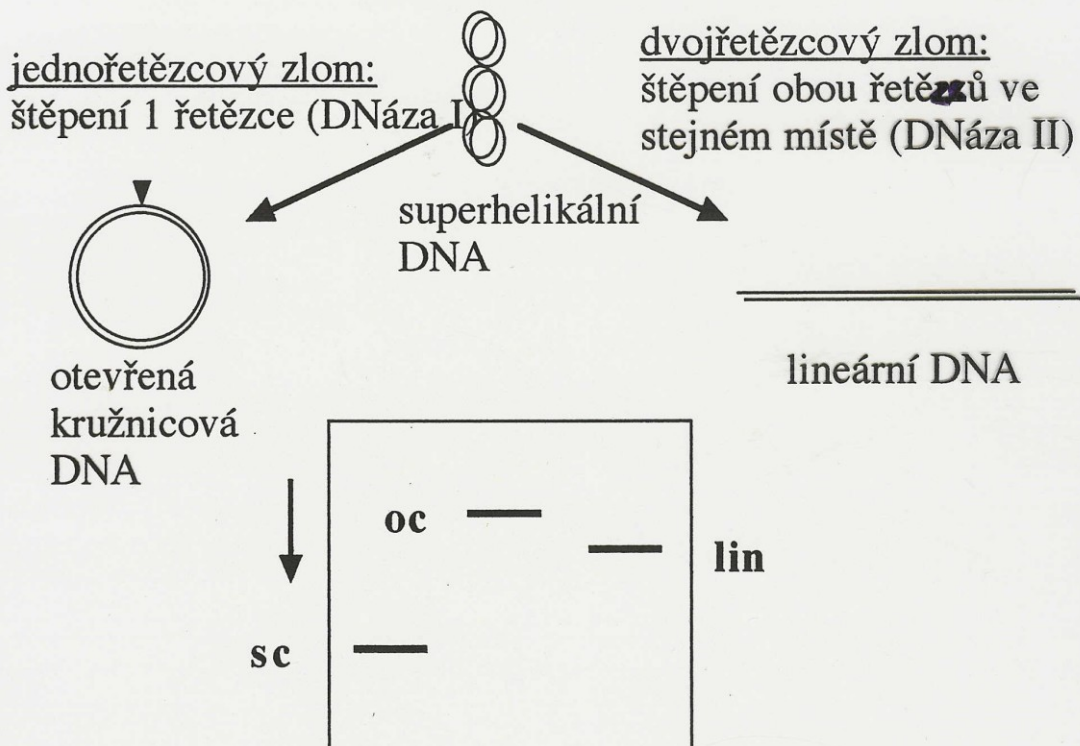
(srovn. fosfodiesterázy)

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 specifity)

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)

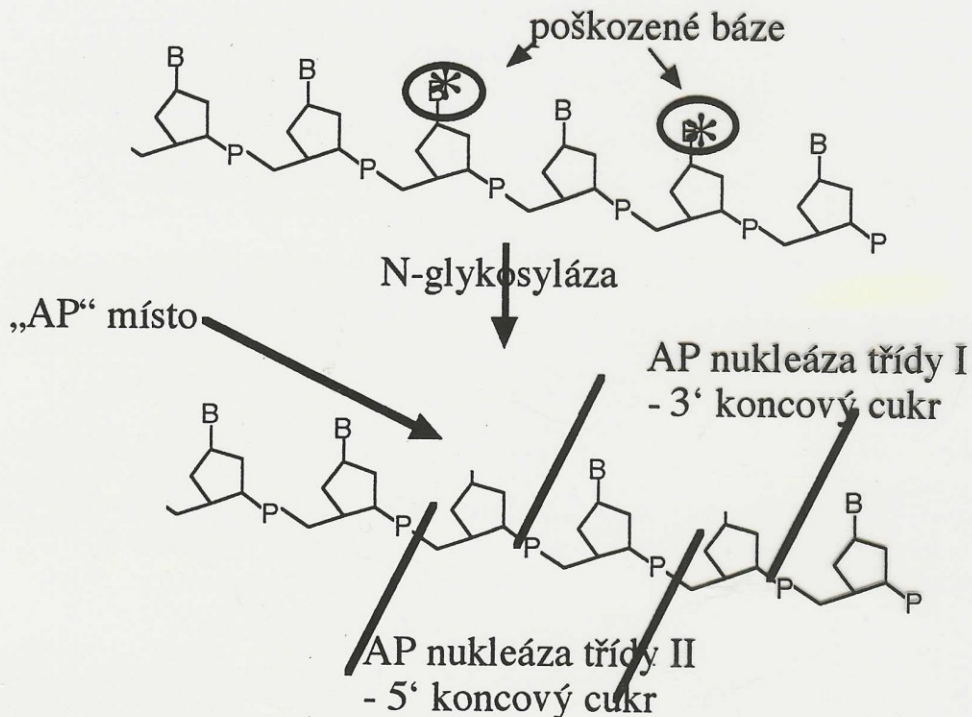
Endonukleáza I - náhodně štěpí dsDNA na fragmenty asi 400 bp dlouhé (dvojřetězcové zlomy)

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

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)

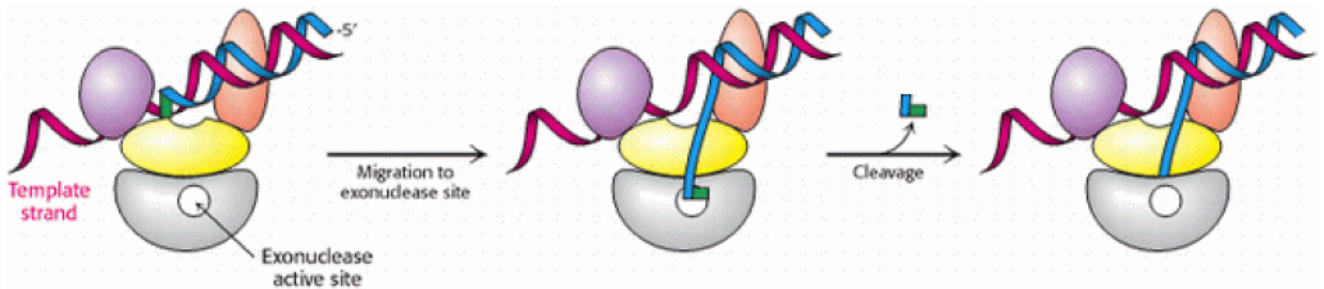
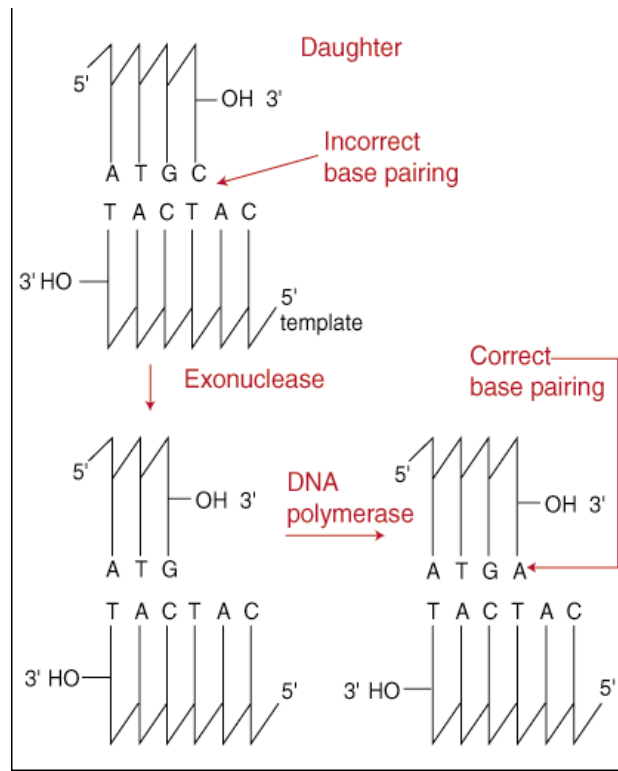


Figure 27.15. Proofreading. The growing polynucleotide chain occasionally leaves the polymerase site of DNA polymerase I and migrates to the exonuclease site. There, the last nucleotide added is removed by hydrolysis. Because mismatched bases are more likely to leave the polymerase site, this process serves to proofread the sequence of the DNA being synthesized.



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

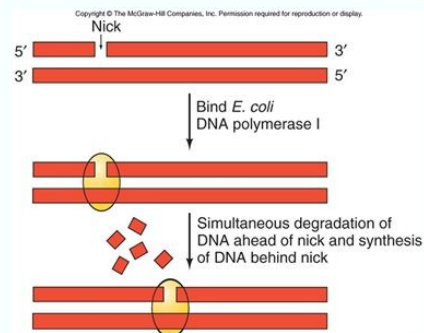
=> může vyštěpit pyrimidinové dimery (reparace)

je RNázou H (odstraňuje primery při replikaci)

„nick translation“

Nick Translation

- The nick translation process simultaneously:
 - Removes DNA ahead of a nick
 - Synthesizes DNA behind nick
 - Net result moves the nick in the 5' to 3' direction
- Enzyme often used is *E. coli* DNA polymerase I
 - Has 5' to 3' exonuclease activity
 - Allows enzyme to degrade DNA ahead of the nick



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)

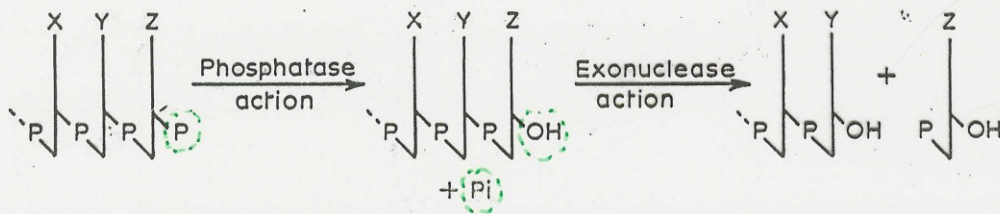


Fig. 4.8 Sequential action of *E. coli* exonuclease III (DNA phosphatase-exonuclease) on a DNA chain terminated by a nucleotide carrying a 3'-phosphate group.

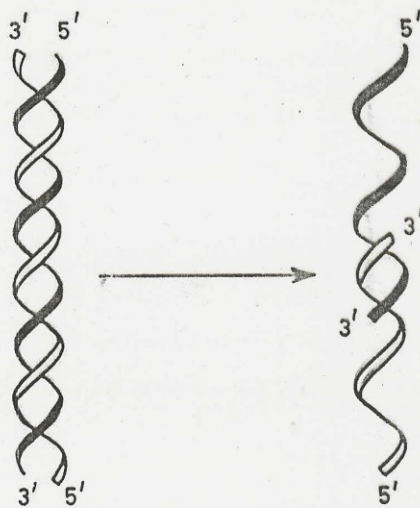


Fig. 4.9 Mechanism of action of stepwise attack of *E. coli* exonuclease III on native DNA beginning at the 3'-hydroxyl termini.

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

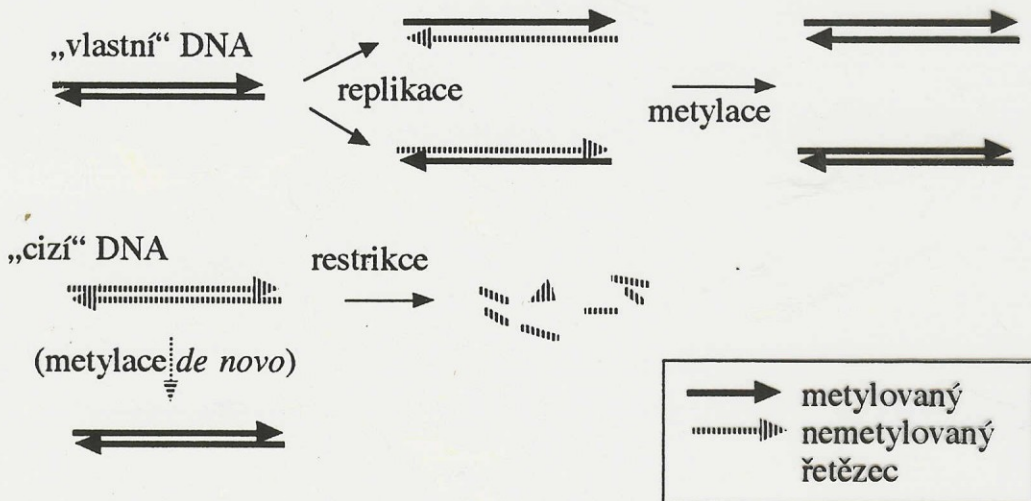
-při první infekci fág nemá metylovaná restrikní místa a je štěpen;
avšak některé molekuly fágové DNA jsou „omylem“ metylovány („de novo“), ty přežijí a při příští infekci téhož hostitele jsou považovány za vlastní DNA

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 II

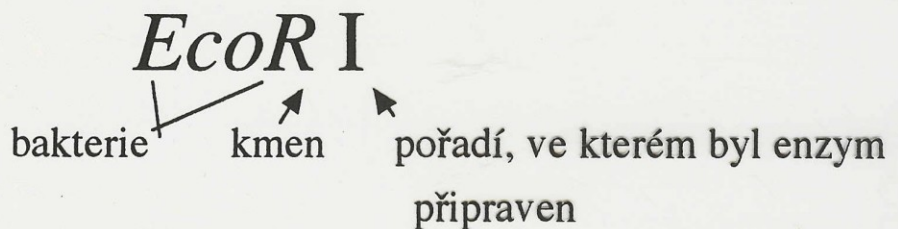
- jednodušší enzymy: dvě stejné podjednotky, vyžadují jen Mg^{2+} , nejsou metylázy (ani ATPázy), ale mají své komplementární metylázy (které rozpoznávají a metylují stejnou sekvenci) štěpí v sekvenci, kterou rozpoznávají (nebo blízko, *HgaI*) restriktční místa mívají středovou symetrii (stejně tak enzymy)
- 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



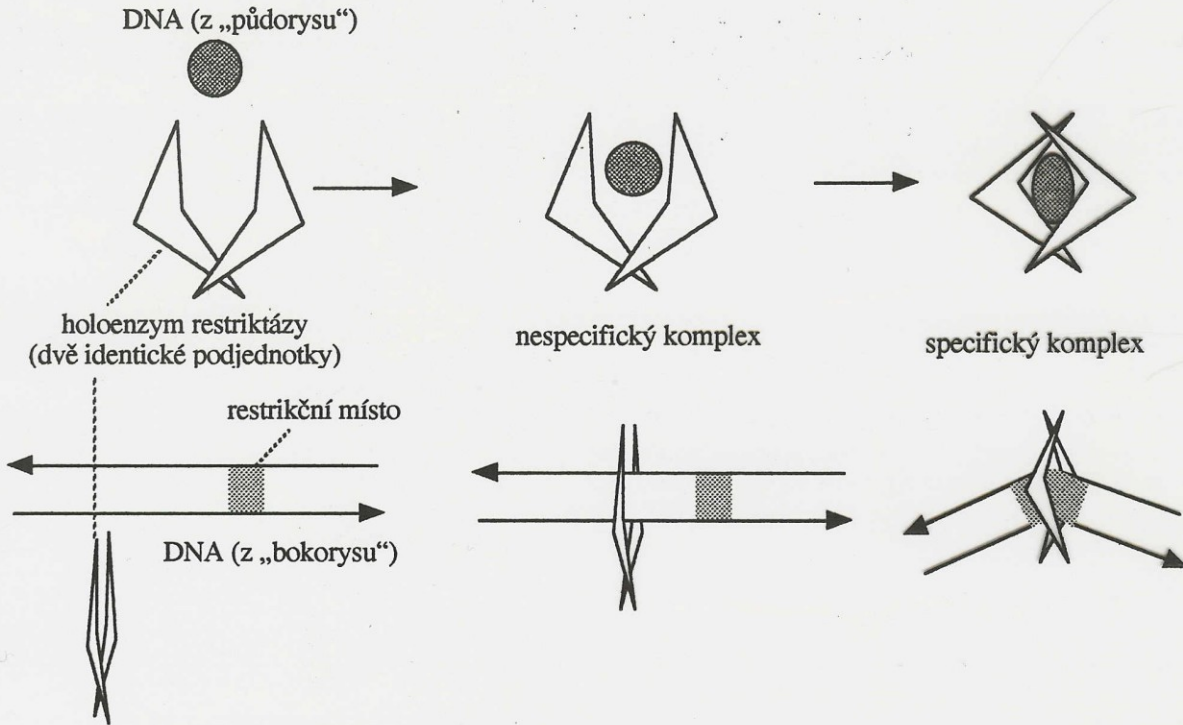
Izoschizomery

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**

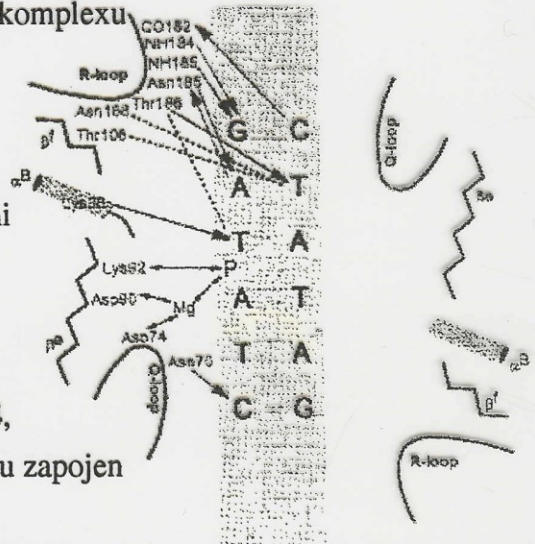
ve velkém a malém žlábků

-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



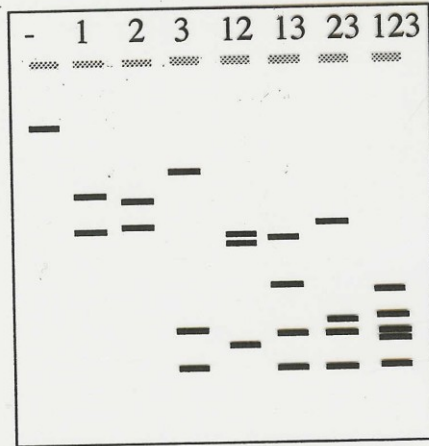
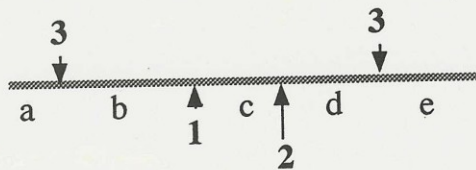
interakce je **vysoce specifická**: k téměř úplné *inaktivaci* komplexu *vede řízená substituce*

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

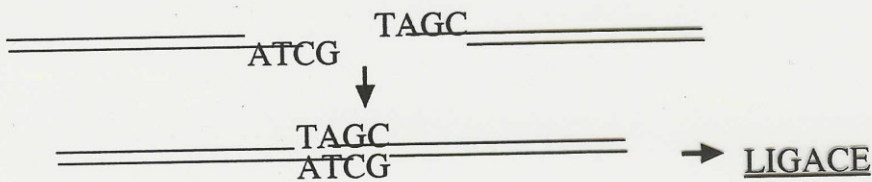
téměř výhradně typu II

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

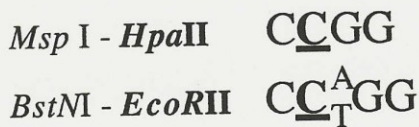


=> sekvenování DNA

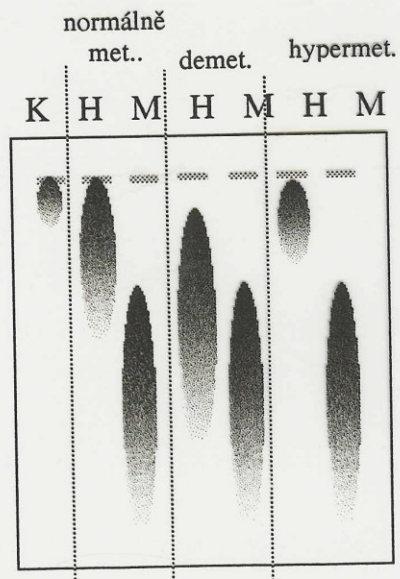
- konstrukce rekombinantních molekul (zejm. využití „lepivých“ konců)



- 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



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^AGG**)

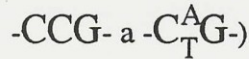
-úloha ne zcela jasná (rekombinace, reparace, iniciace replikace)

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 <<)

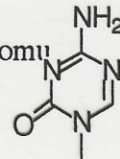
Změna metylačního obrazce:

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)

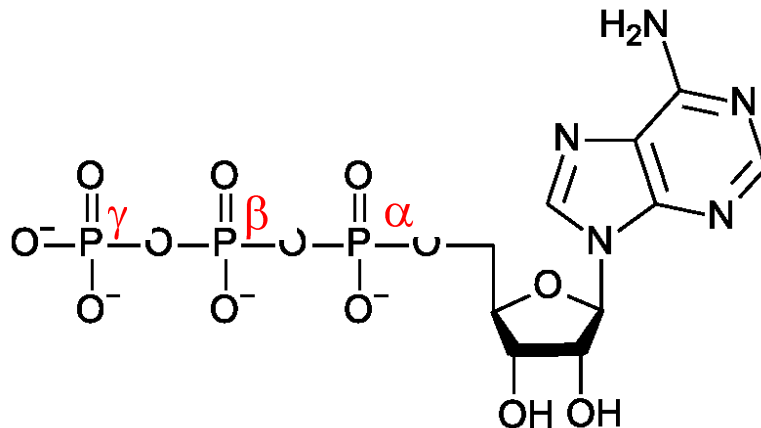


2/ metylace de novo - větší význam pouze v raných embriích;

=>diferenciace

Metylace RNA -všechny 4 báze; postraskripční modifikace >>

- **polynukleotid kináza**: přenos 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)

