

# C5720 Biochemie

## 08-Nukleové kyseliny

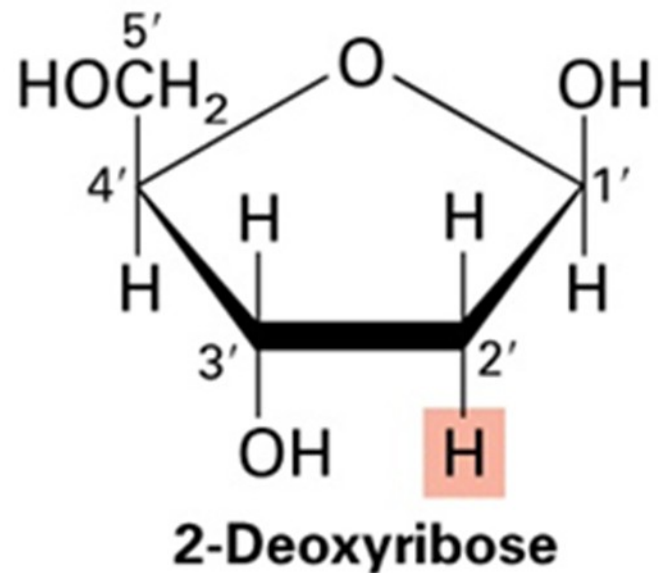
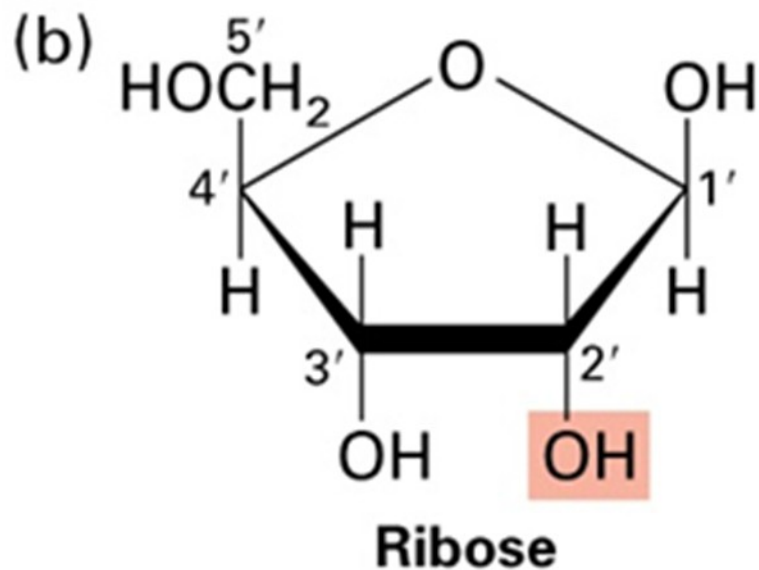
# Obsah

- 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

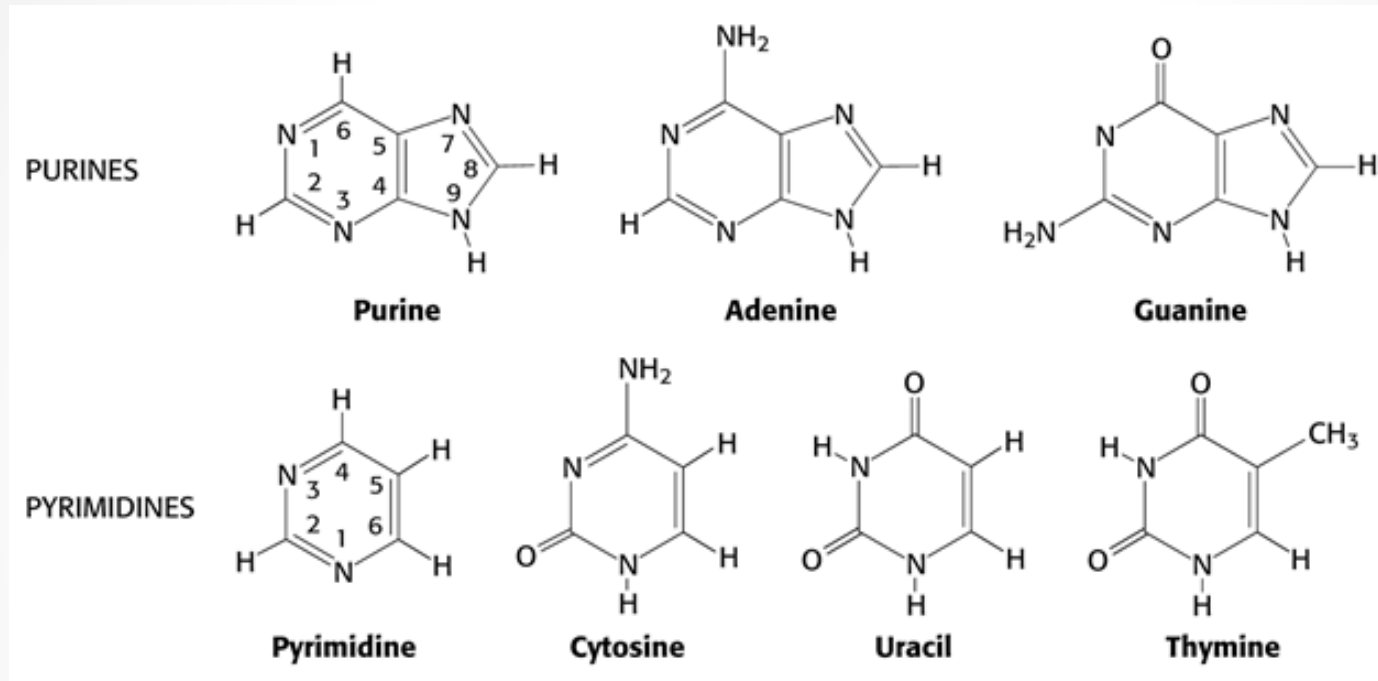
- Stavební kameny
  - Dusíkaté báze – purinové, pyrimidinové
  - Sacharid - pentosy ribosa, deoxyribosa
  - $H_3PO_4$
- Struktura
  - Báze + monosacharid = (d)Nukleosid
  - (d)Nukleosid + 5'-fosfát = (d)Nukleotid
  - (d)Nukleosid – di a trifosfáty
-

# Pentosy



- Číslování pozic

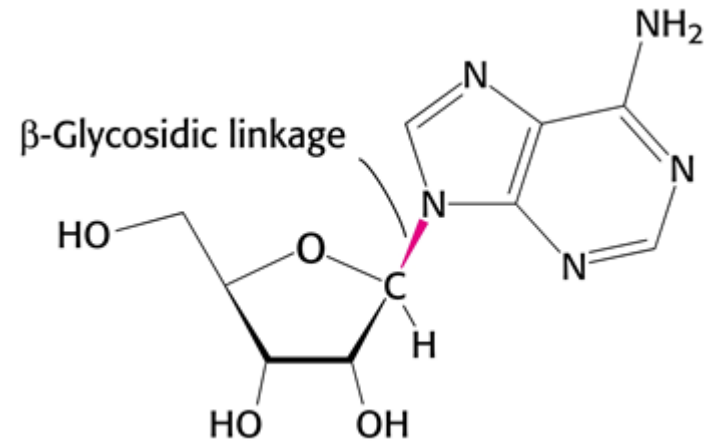
# Báze - deriváty purinu a pyrimidinu



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

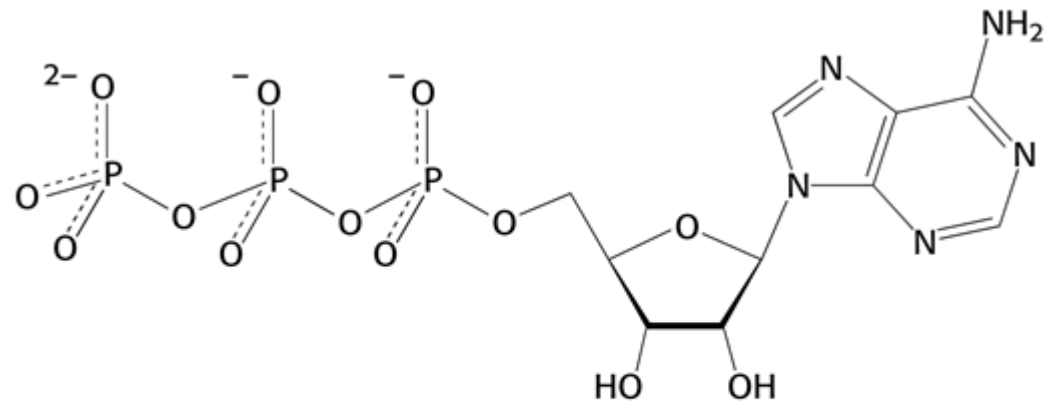
# Nukleosidy

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



# Nukleotidy

- Fosfátový ester na C<sub>5</sub>
- Nomenklatura – (d)Nukleosid(mono)fosfáty
  - AMP, GMP
  - CMP, TMP, UMP
- Další fosforylace
  - anhydridy
  - (d)Nukleosiddifosfáty
  - (d)Nukleositrifosfáty



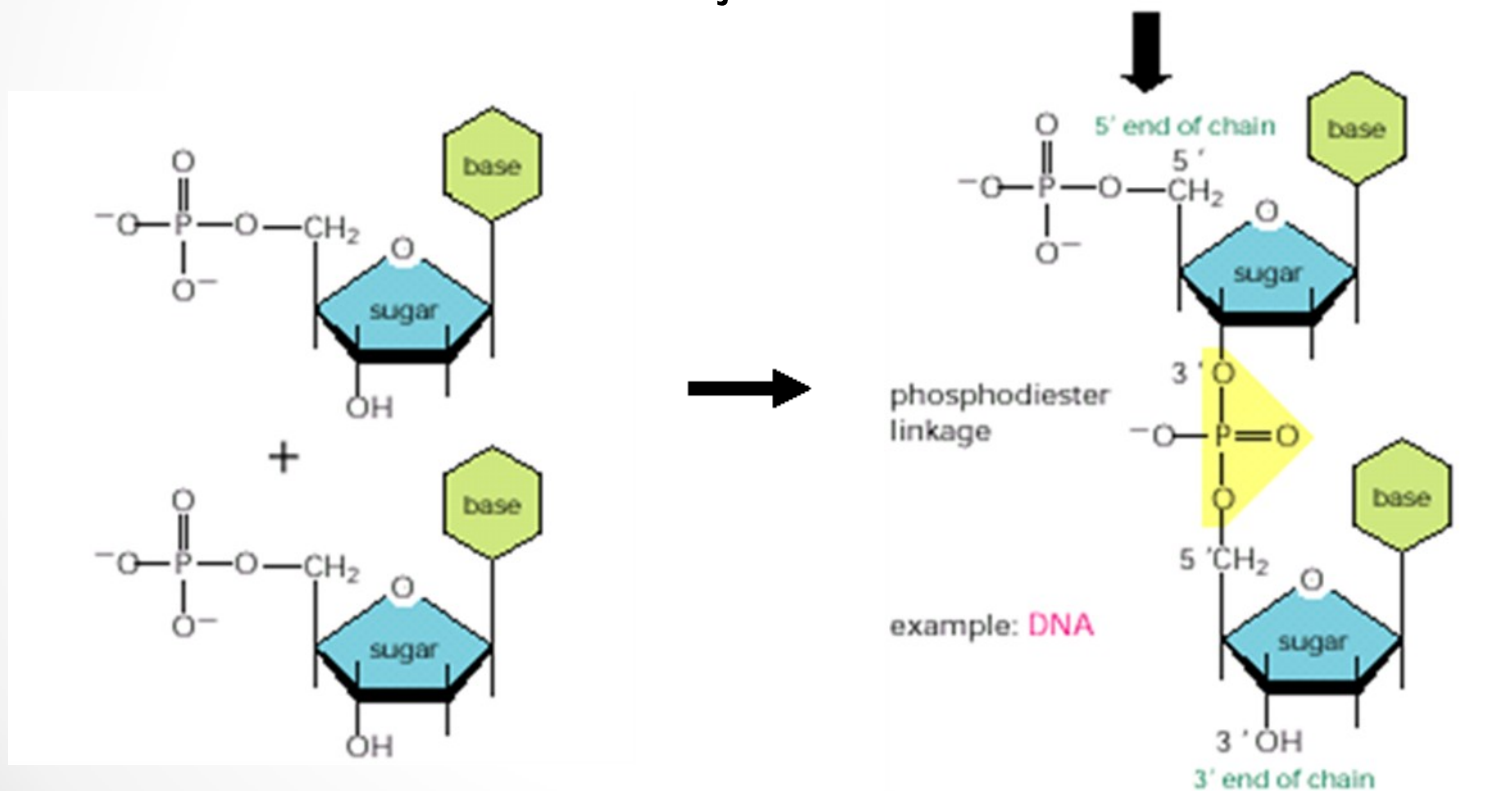
# Oligo- a polynukleotidy

- 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

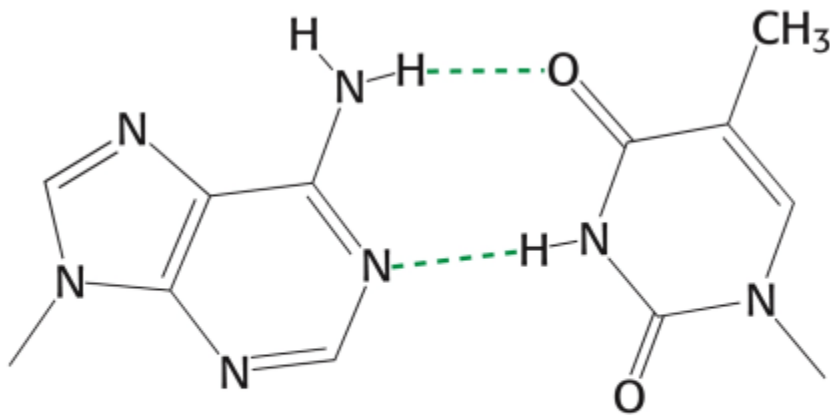
- Odlišnost DNA a RNA
  - Vývojové aspekty - RNA svět
  - Stabilita DNA
- Chemické složení
  - Deoxyribosa x ribosa
  - Thymin x uracil
- Velikost molekuly
  - RNA relativně malé proti DNA
  - Výjimka RNA viry
- Složitost struktury
  - DNA povšechně dimer

# 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

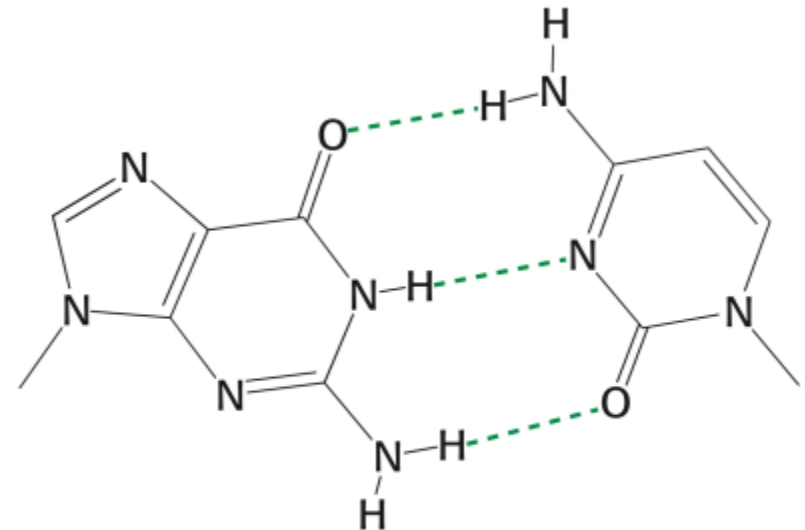
# Struktura DNA

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



**Adenine (A)**

**Thymine (T)**

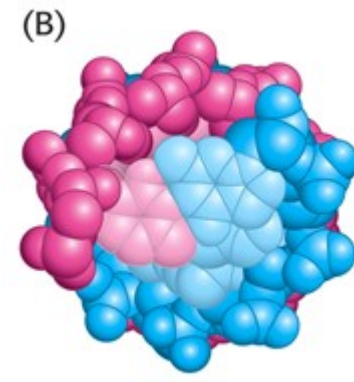
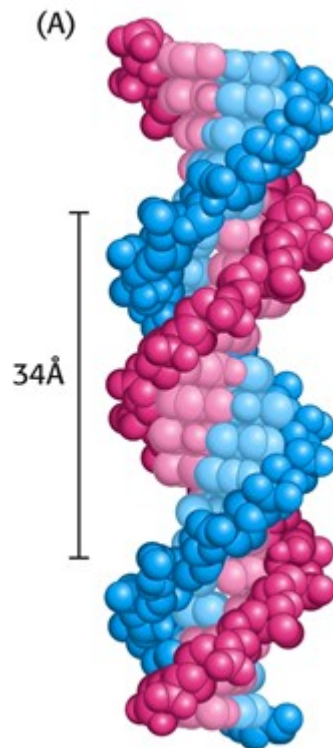


**Guanine (G)**

**Cytosine (C)**

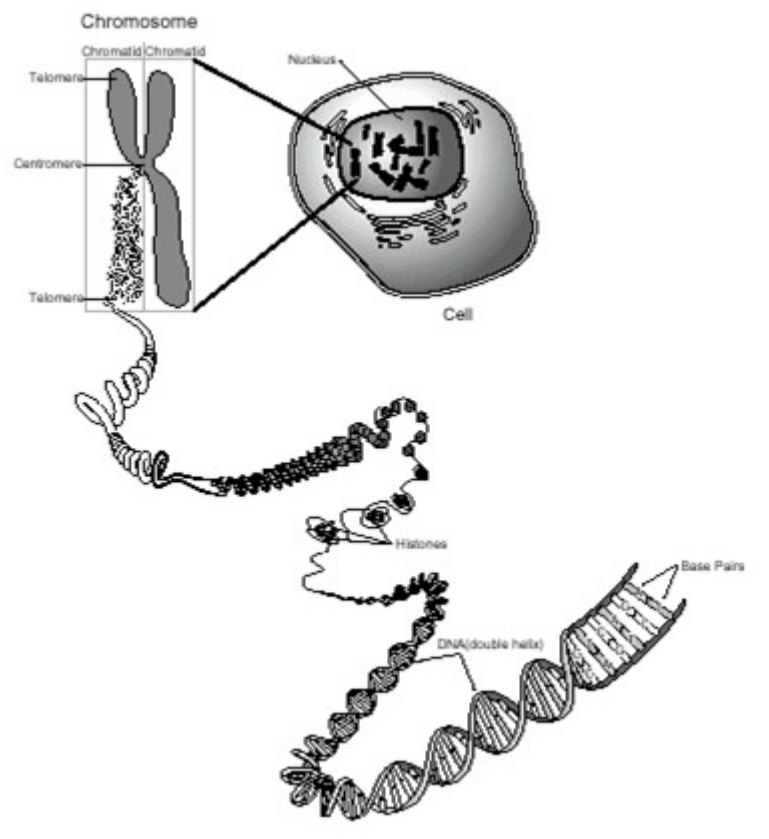
# Struktura DNA

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



# Struktura DNA

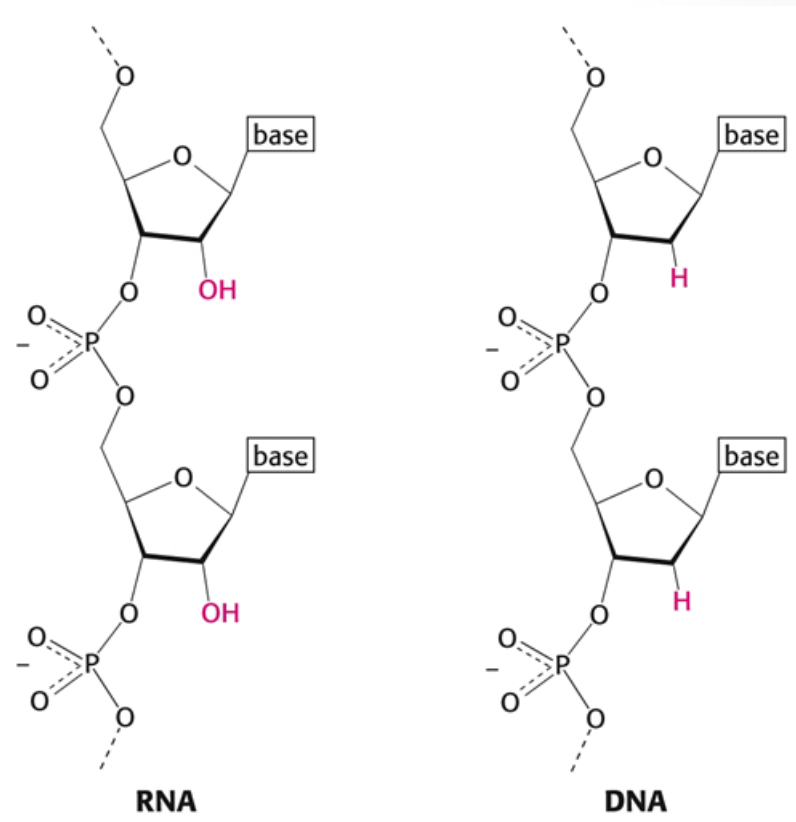
- Poskládání molekuly DNA u eukaryontů
  - Úloha histonů
  - Bazicita x fosfáty



# 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

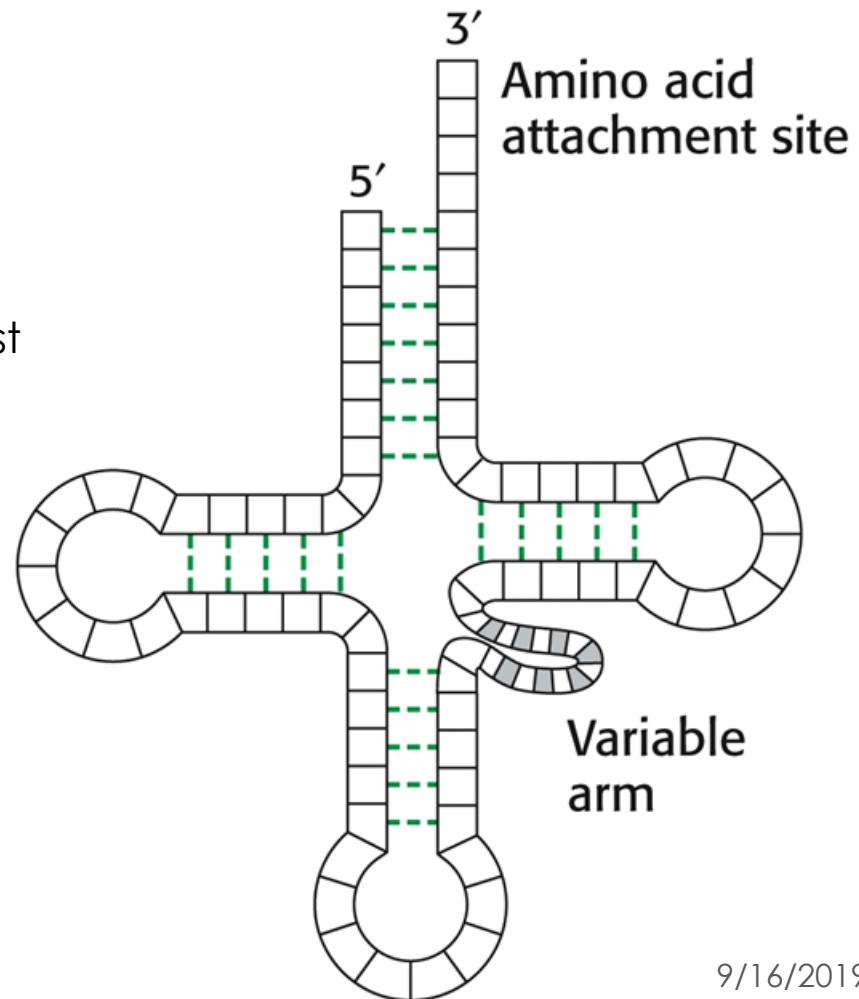
**TABLE 5.2** RNA molecules in *E. coli*

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



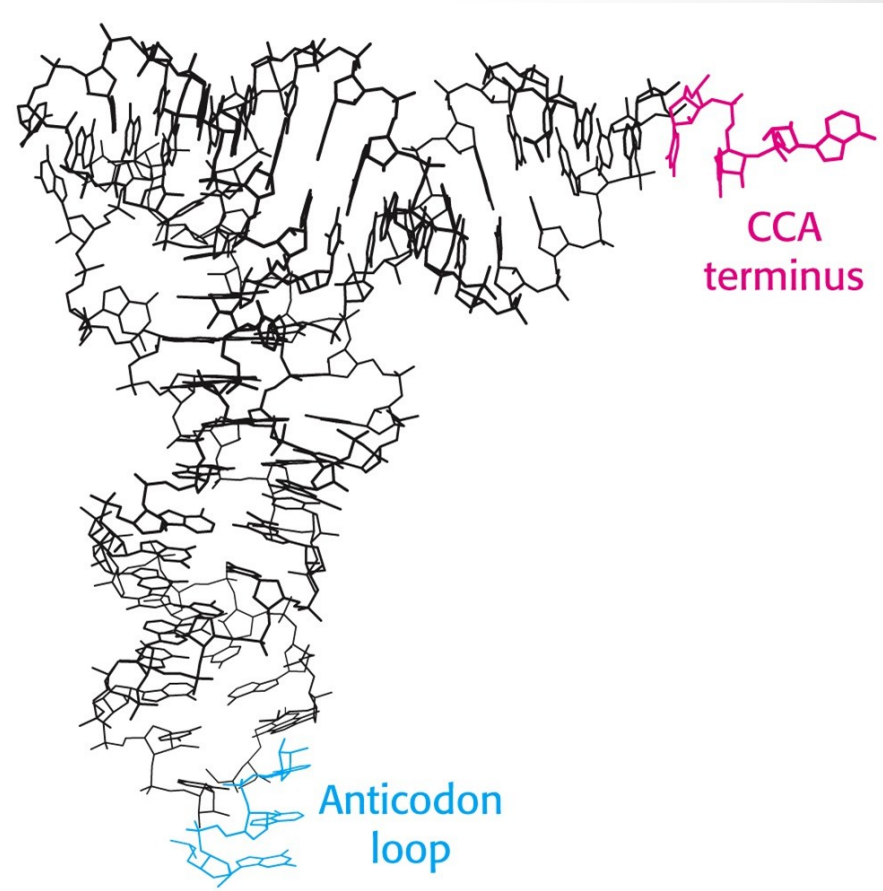
# Struktura t-RNA

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



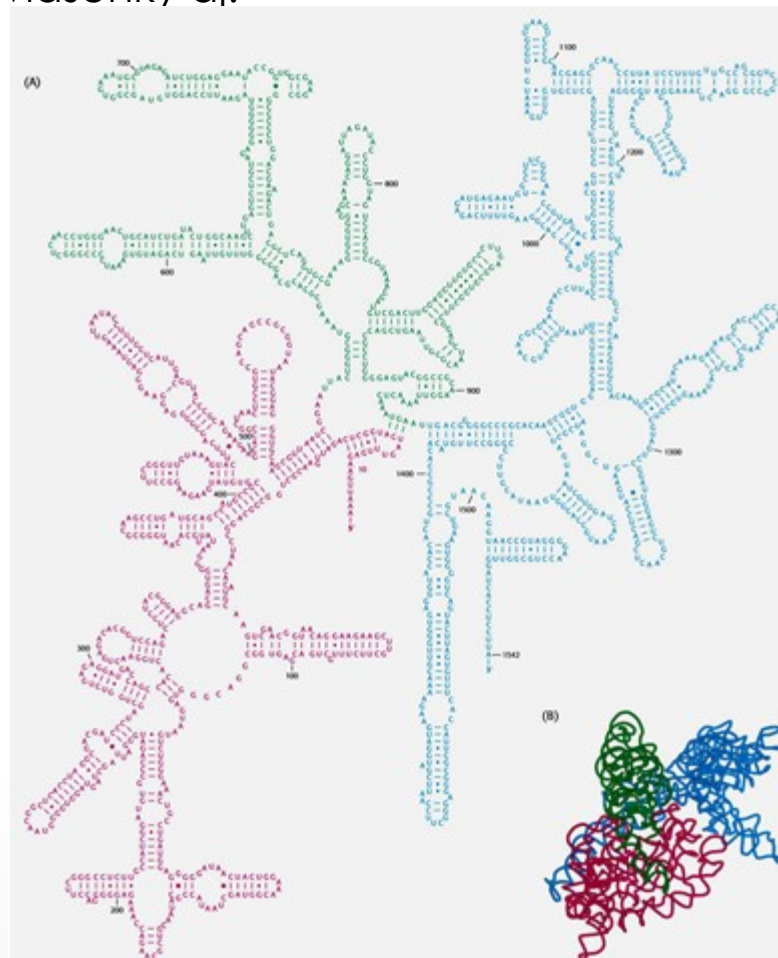
# Struktura t-RNA

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



# Struktura rRNA

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

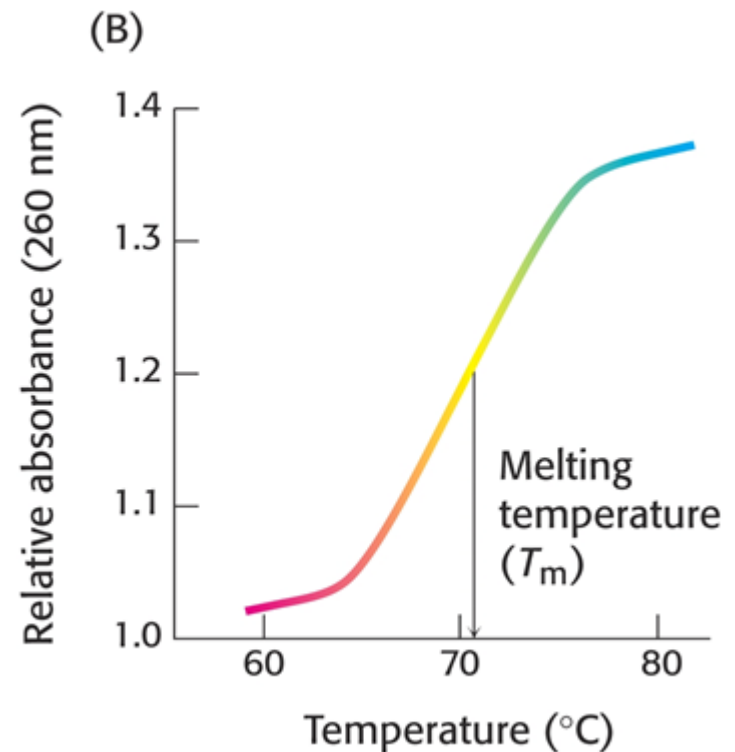
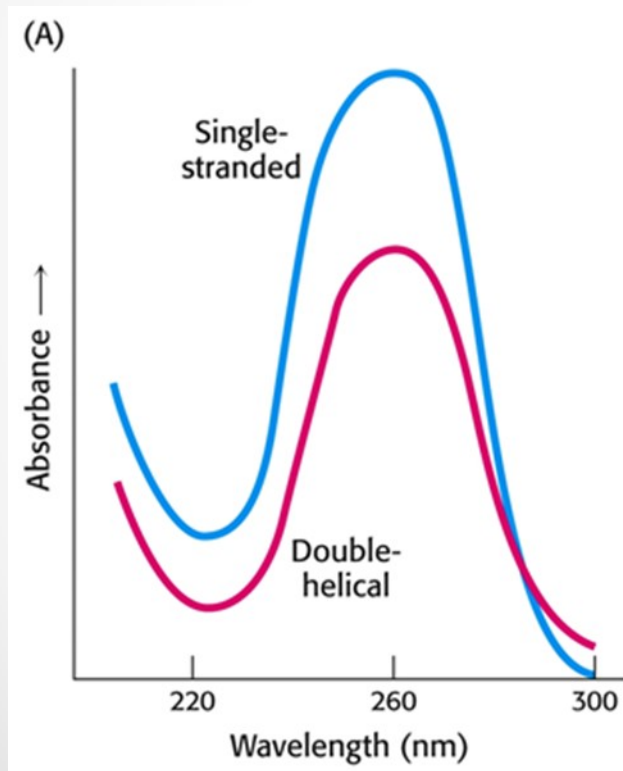


# Denaturace a renaturace DNA

- 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

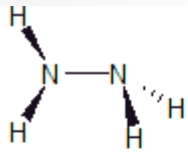
- Spektra DNA
- Proces denaturace DNA



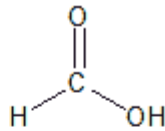
# Určení primární struktury

- 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

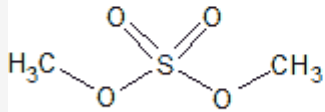
# Destrukce bazí a štěpení řetězců



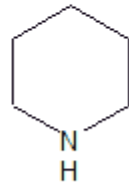
hydrazín



kys. mravčia



dimetylsulfát



piperidín

Obr. Štruktúrne vzorce chem. modifikačných činidiel

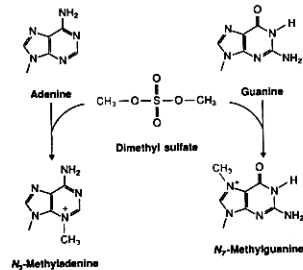


FIGURE 4A.1  
Reaction of purines with dimethyl sulfate.

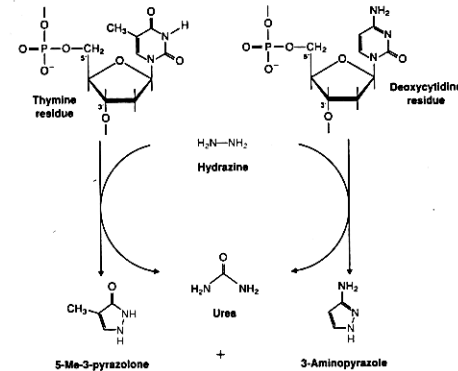
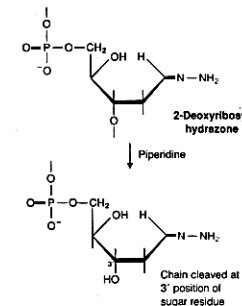


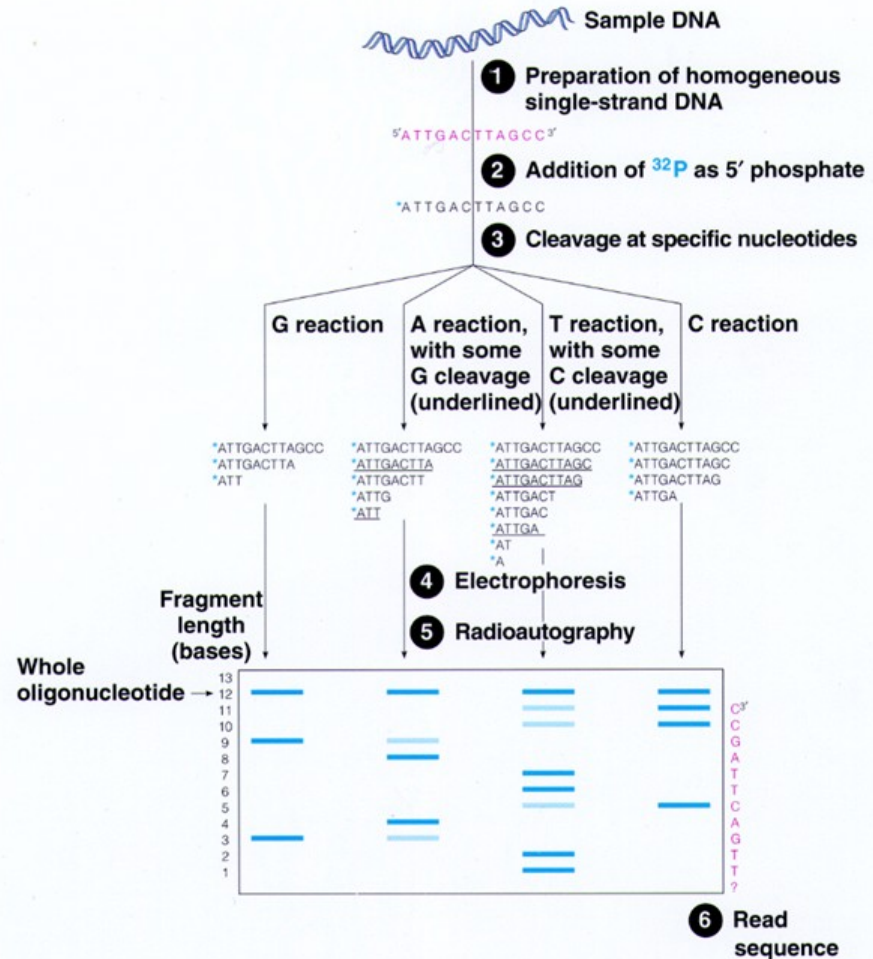
FIGURE 4A.2  
Hydrazinolysis of pyrimidines.



# Sekvenace DNA

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

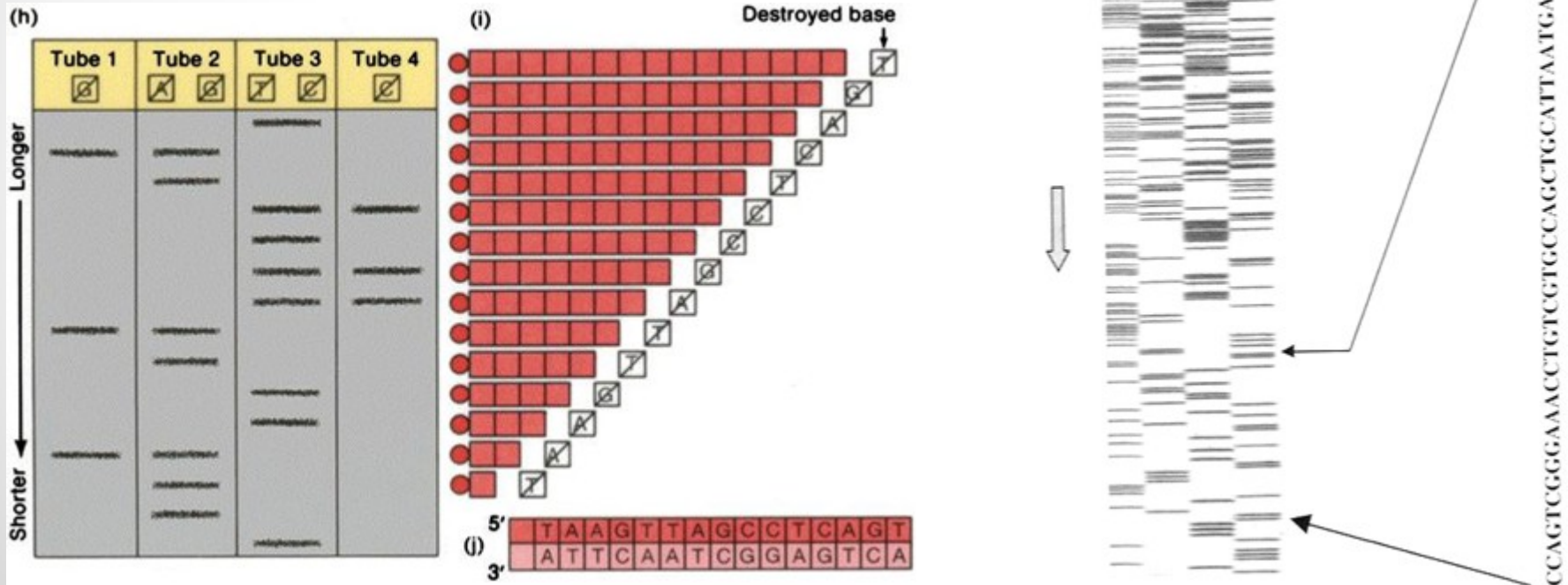
Figure 4A.4 Sequencing an oligonucleotide by the Maxam-Gilbert method





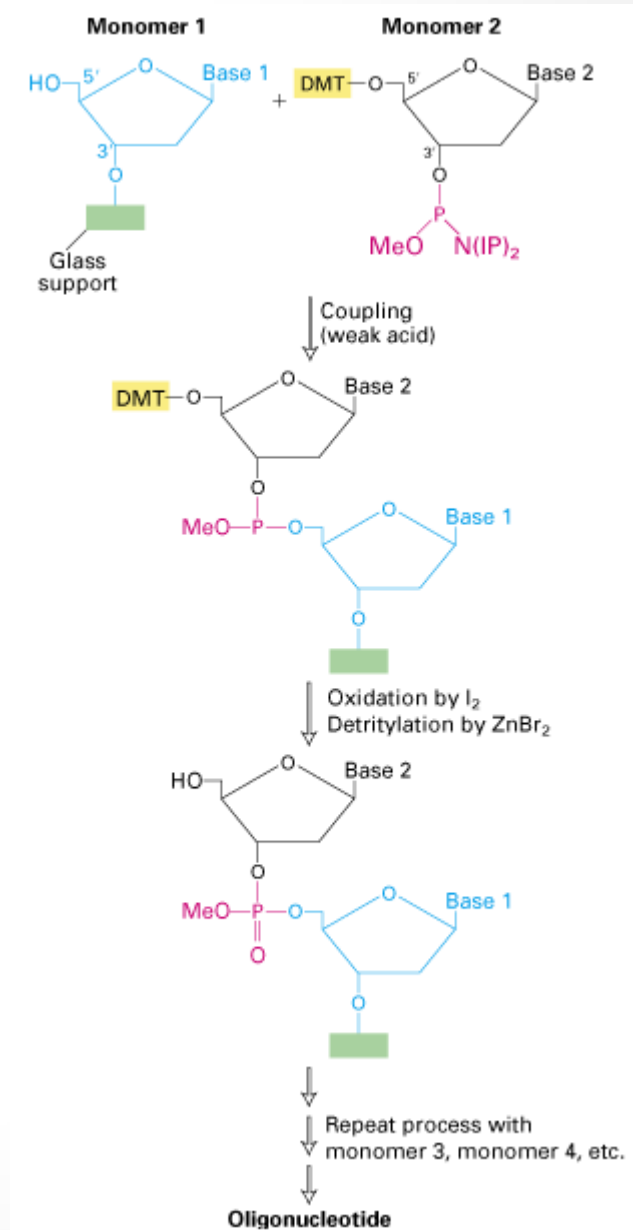
# Sekvenace DNA

- Schema metody
- Ilustrace postupu
  - Od výsledku k sekvenci



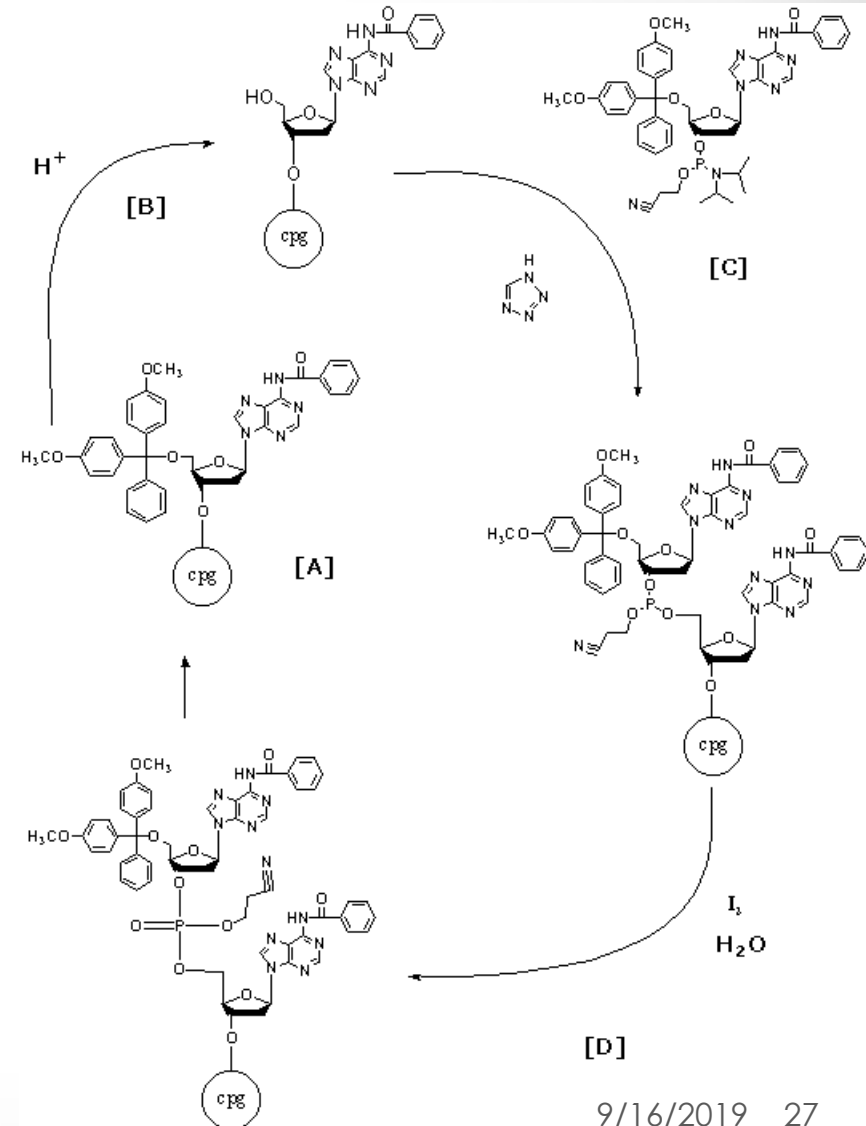
# Syntéza oligonukleotidů

- 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
$\alpha$ -Interferon	542
Secretin	81
$\gamma$ -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> <sub>5</sub>	330
Bovine intestinal Ca- binding protein	298
Hirudin	226
RNase A	375