

Základy biochemie KBC/BCH

Nukleové kyseliny

Inovace studia biochemie prostřednictvím e-learningu

CZ.04.1.03/3.2.15.3/0407



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky.



Osnova

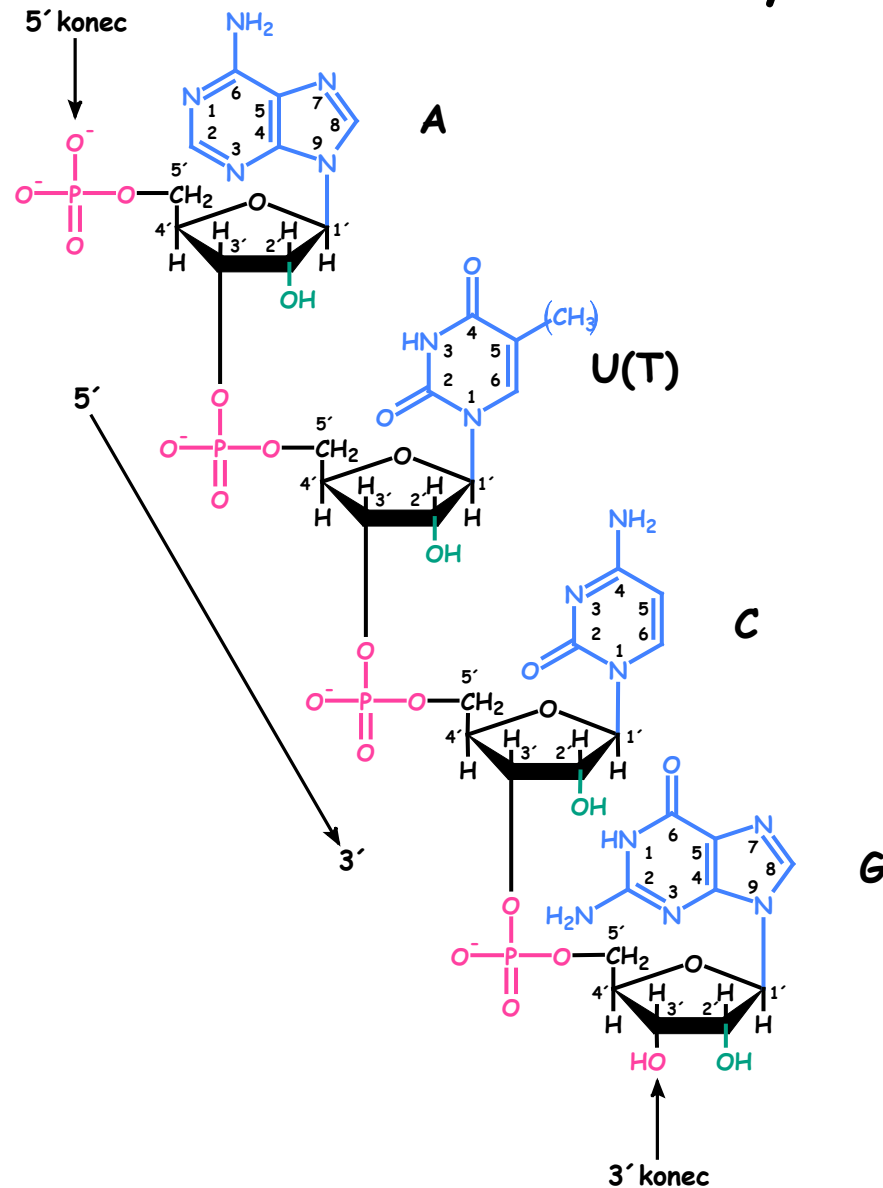
- Úvod ke struktuře nukleových kyselin
- Složení bází DNA
- Dvoušroubovice DNA
- Semikonzervativní replikace DNA
- Metody sekvencování nukleových kyselin
- Technologie rekombinantní DNA - klonovací techniky
- Polymerázová řetězová reakce - PCR
- Aplikace technologie rekombinantní DNA
- Typy ribonukleových kyselin



Základní pojmy struktury nukleových kyselin

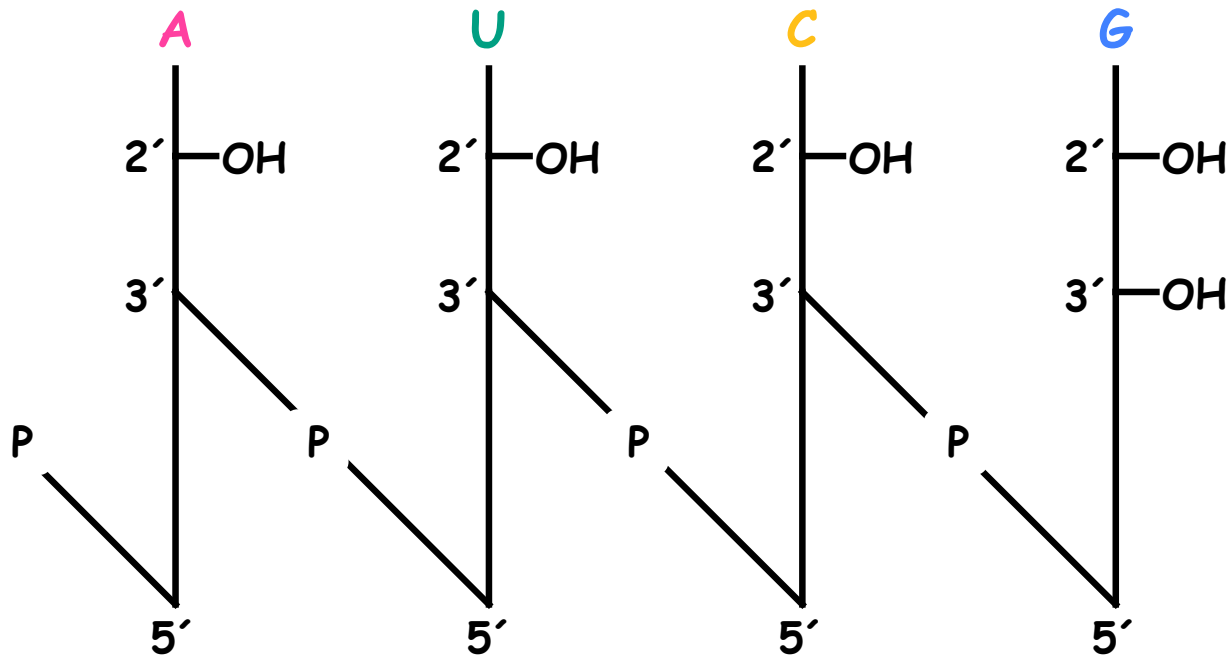
- Nukleotidy mohou být spojovány do řetězců ve formě ribonukleové kyseliny (RNA) nebo deoxyribonukleové kyseliny (DNA).
- Nukleové kyseliny jsou řetězce nukleotidů spojených fosfátovým můstkem mezi polohami 3' a 5' sousedních ribosových jednotek. Fosfáty polynukleotidů jsou kyselé při fyziologickém pH a nukleové kyseliny jsou polyanionty.
- Spojení mezi jednotlivými nukleotidy se nazývá fosfodiesterová vazba.
- Koncový nukleotidový zbytek, jehož C5' není dále již vázán se nazývá **5' konec**. Analogicky **3' konec**.
- **Sekvence nukleotidů v nukleové kyselině se píše zleva doprava od 5' konce ke 3' konci.**

Chemická struktura nukleové kyseliny

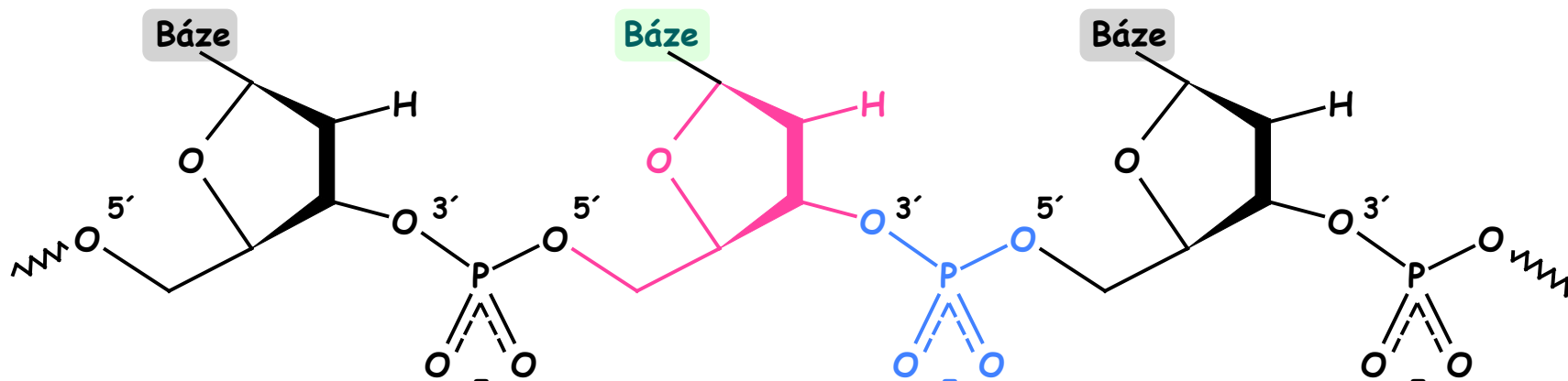


Zjednodušené schéma struktury nukleové kyseliny pAUCG

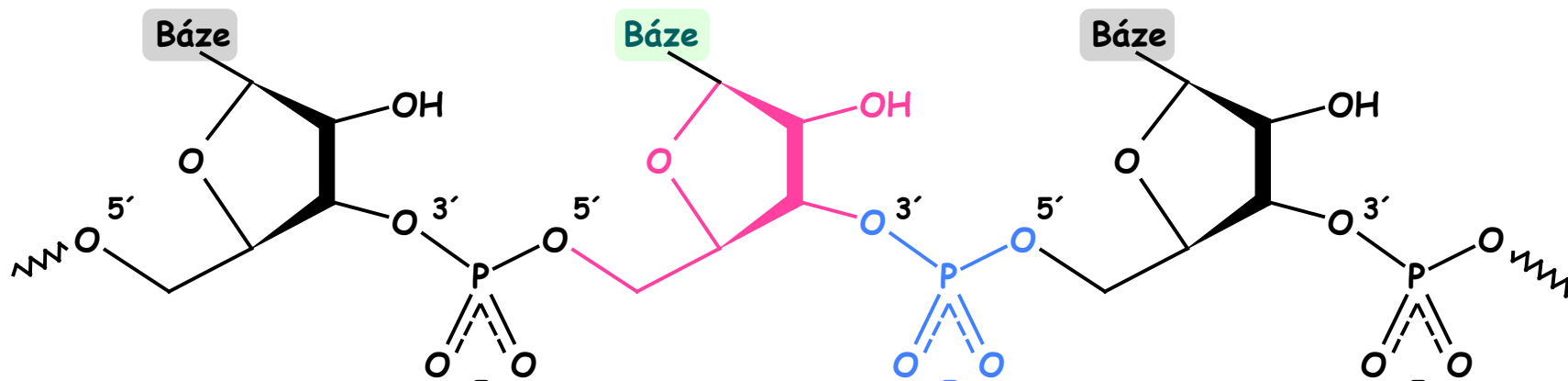
Písmeno „p“ před názvem tetranukleotidu reprezentuje fosfát na 5' konci. Vertikální čáry reprezentují ribosy, připojené báze jsou označeny písmenem, diagonální čáry s písmenem „p“ reprezentují fosfodiesterové vazby. Čteme zleva do prava. Deoxy ekvivalent se liší pouze absencí 2'-OH a záměnou U za T, např. dpATCG.



Řetězec DNA a RNA



DNA



RNA

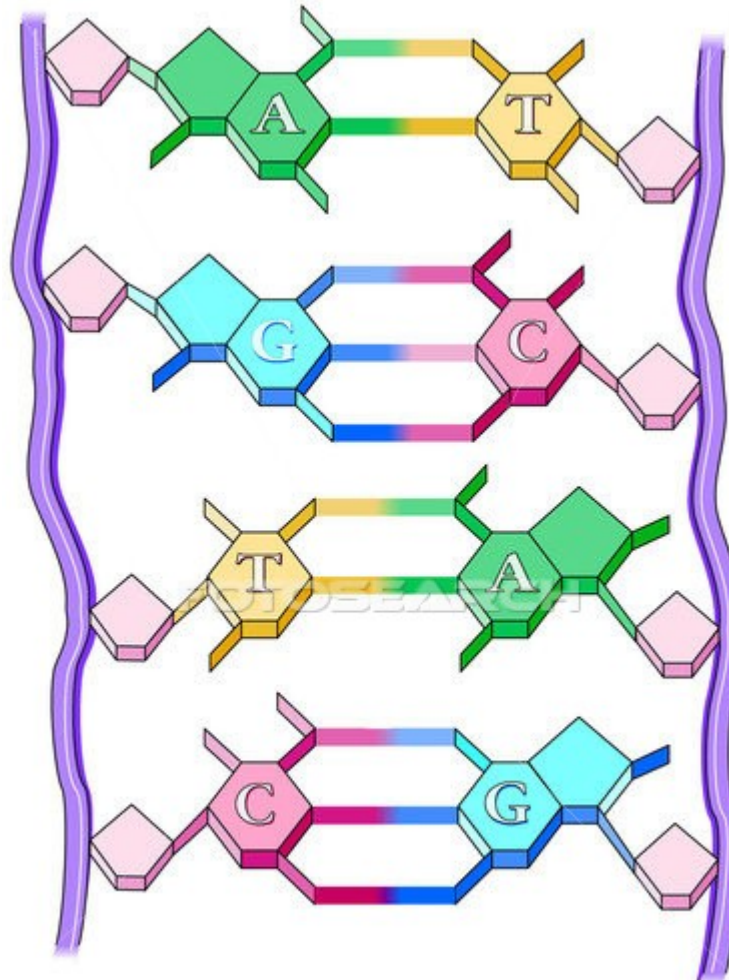
Skladba bází deoxyribonukleové kyseliny

- DNA mají stejné počty adeninů a thyminů ($A = T$) a stejné počty guaninů a cytosinů ($G = C$).
- Tato shoda se nazývá **Chargaffovo pravidlo**.

Experimentálně zjištěné poměry složení bází různých organismů.

• Organismus	A : T	G : C	A : G
• Člověk	1,00	1,00	1,56
• Pšenice	1,00	0,97	1,22
• Kvasinka	1,03	1,02	1,67
• <i>Escherichia coli</i>	1,09	0,99	1,05
• <i>Serratia marcescens</i> *	0,95	0,86	0,70
• * Gram negativní bakterie, enterobakterie, patogen.			

Párování bází A - T a G - C.



Párování bází v DNA (vlevo), vpravo mRNA.

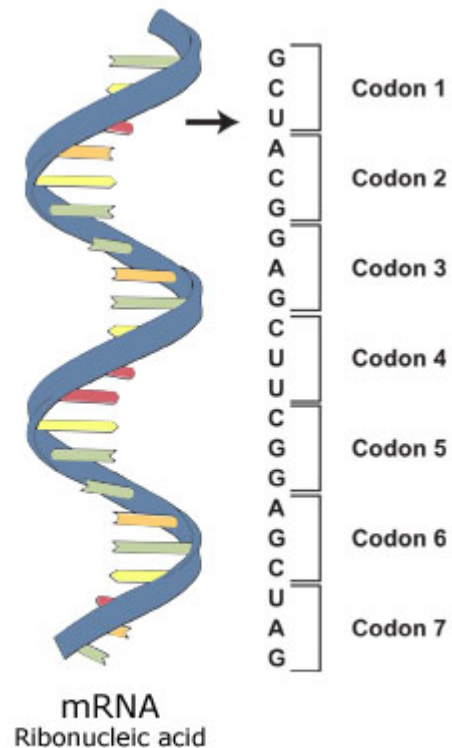
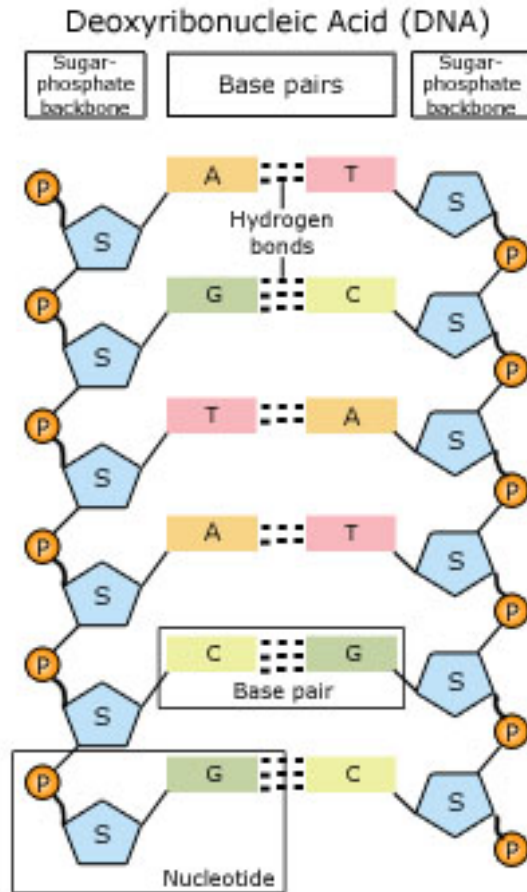


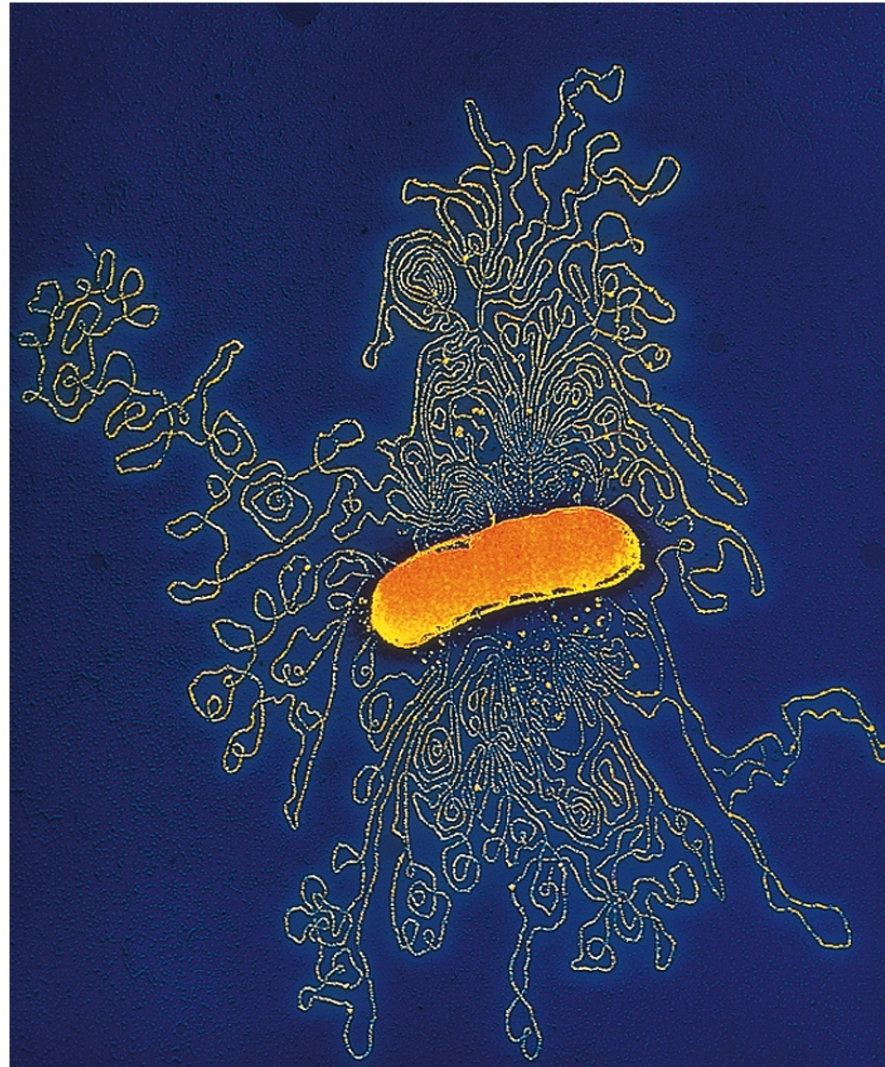
Image adapted from: National Human Genome Research Institute. Talking Glossary of Genetic Terms. Available at: www.genome.gov/Pages/Hyperion/DIR/VIP/Glossary/Illustration/dna2.shtml.

Image adapted from: National Human Genome Research Institute. Talking Glossary of Genetic Terms. Available at: www.genome.gov/Pages/Hyperion/DIR/VIP/Glossary/Illustration/codon.shtml.

Základní charakteristika DNA

- Charakteristickou vlastností přirozeně se vyskytující DNA je její délka. Je poskládána z velkého množství nukleotidů - nese genetickou informaci.
- Kvantifikace informací, které nese DNA: každá pozice jedné ze čtyř bází odpovídá dvěma bitům informace ($2^2 = 4$). Potom řetězec o celkové délce 5 200 nukleotidů nese $2 \times 5\,200 = 10\,400$ bitů, což je 1 300 bytů (1 byte = 8 bitů).
- Genom *E. coli* je jedna DNA složená ze dvou řetězců obsahujících 4,6 milionů nukleotidů, odpovídající 9,2 milionu bitů, nebo také 1,15 megabytů informace.
- DNA vyšších organismů je mnohem delší. Lidský genom obsahuje přibližně 3 biliony nukleotidů rozdělených do 24 různých DNA molekul: 22 autosomních a 2 typy pohlavních chromosomů (X a Y).
- Další podstatnou vlastností DNA je replikace - tvorba dvou kopií nukleové kyseliny z jedné. To umožňuje párování bází.

Elektronová mikrofotografie části genomu *E. coli*.

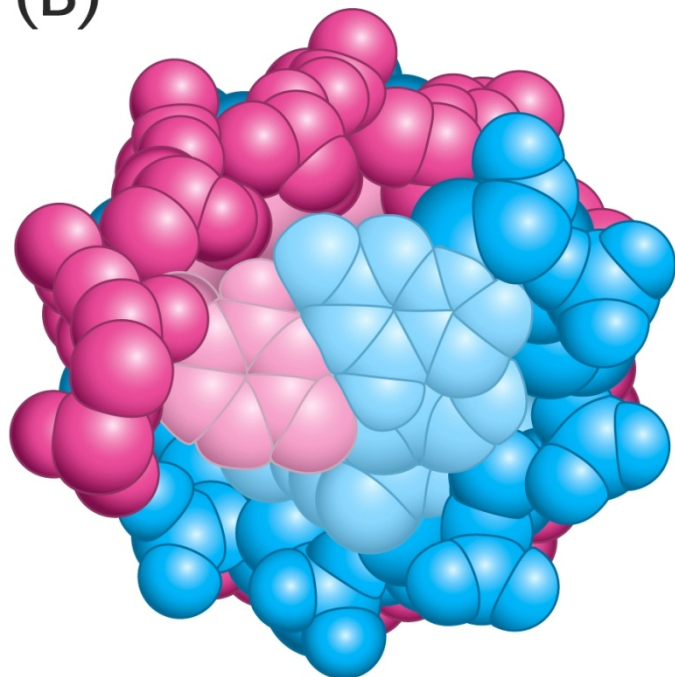


Dvojitá šroubovice DNA

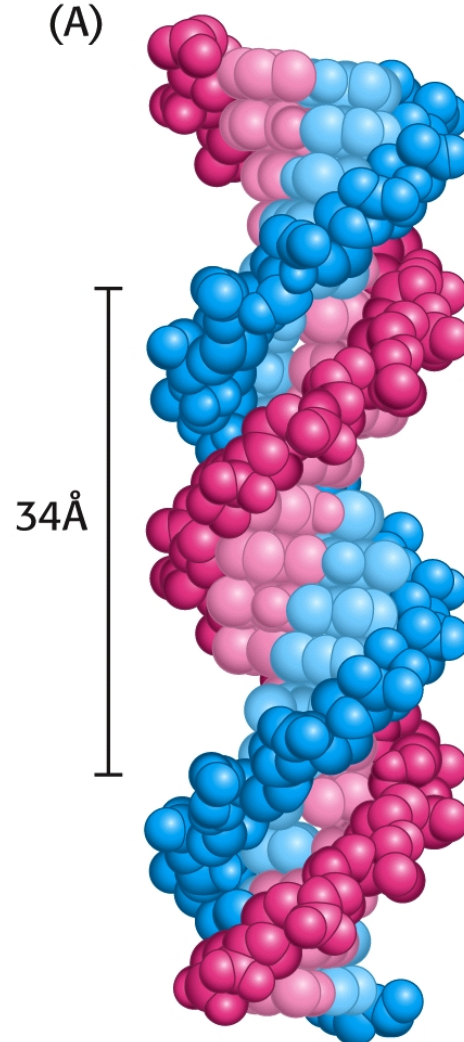
- Problém specifického párování bází byl vyřešen při studiu prostorové (třírozměrné) struktury DNA.
- Maurice Wilkins a Rosalinda Franklin získali rentgenové difrakční snímky vláken DNA a z těchto snímků se vydedukovalo, že DNA je dvoušroubovice!!!
- James Watson a Francis Crick z těchto a dalších dat sestavili model DNA (1953, Nature, London). [Watsoncrick.pdf](#)
- A) Dva helikální polynukleotidové řetězce se otáčejí kolem společné osy. Řetězce se vinou antiparalelně.
- B) Vazby sacharidu s fosfáty jsou na vnější straně šroubovice a purinové a pyrimidinové báze leží uvnitř šroubovice.
- C) Báze jsou kolmé na osu šroubovice. Sousední báze jsou od sebe vzdáleny 3,4 Å. Helikální struktura se opakuje každých 34 Å, což je 10 bází (= 34 Å na závit / 3,4 Å na bázi). Rotace 36° na bázi (360° na celý závit).
- D) Průměr helixu je 20 Å.

Watson-Crickův model dvojité helix DNA

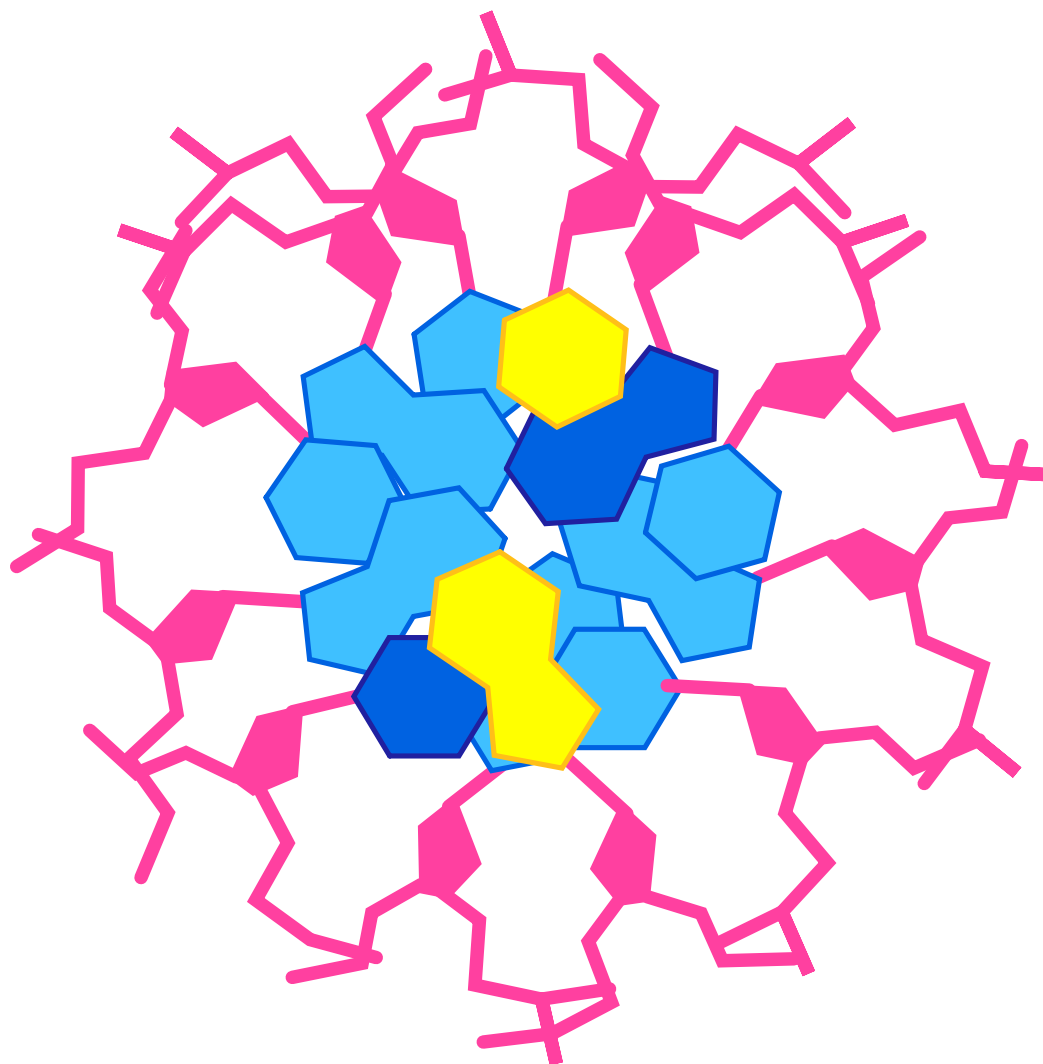
(B)



(A)



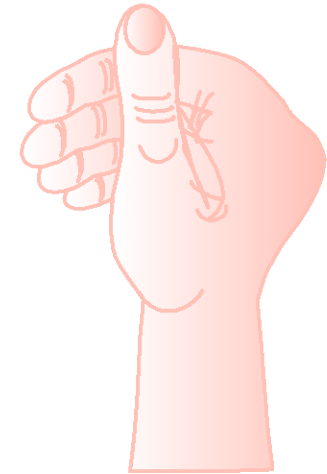
Osový pohled na DNA. Páry bází leží jeden na druhém.



Pomocný diagram k určení pravotočivé a levotočivé DNA

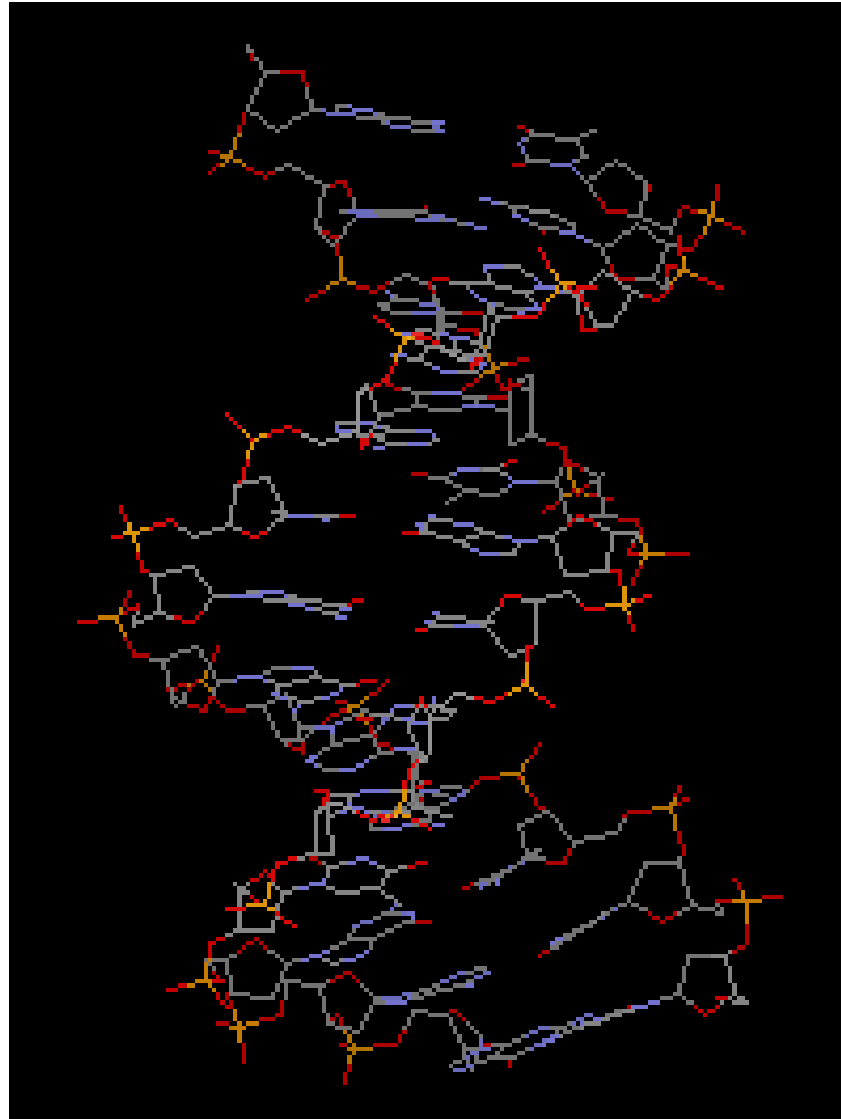


Levotočivá



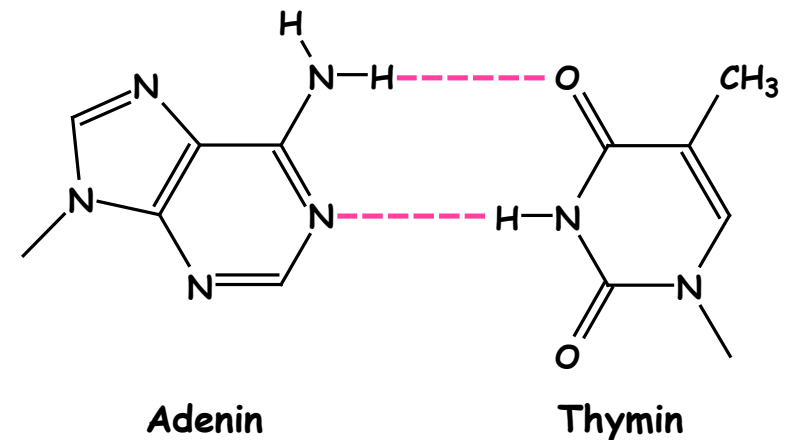
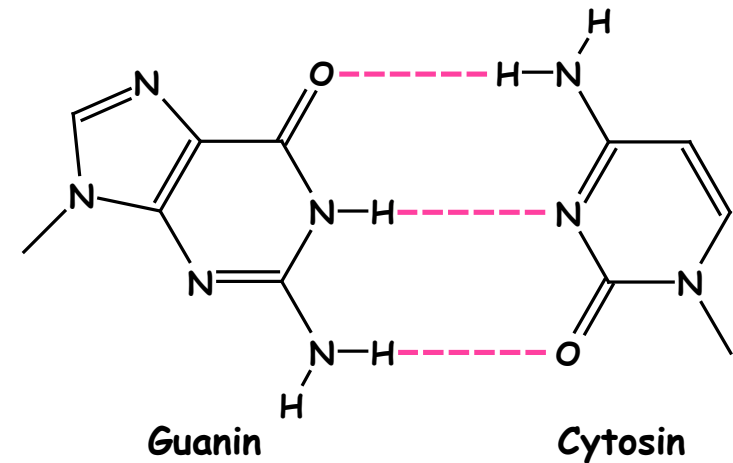
Pravotočivá

<http://pardubice.ic.cz/dna4.gif>



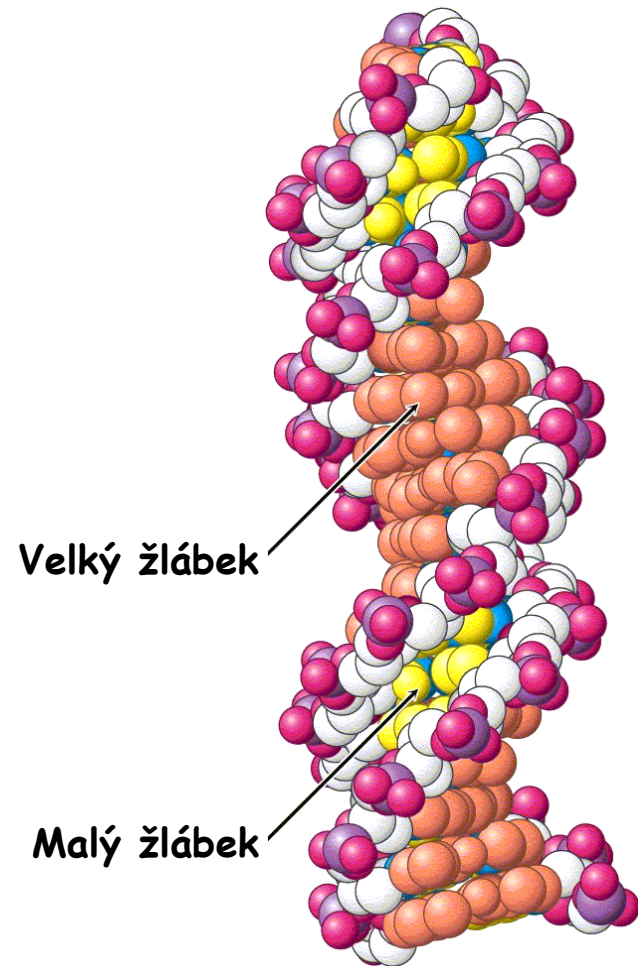
Párování bází DNA

- Watson a Crick objevili, že guanin může být párován s cytosinem a adenin s thyminem.
- E. Chargaff to publikoval již v roce 1950, ale Watson s Crickem to nevěděli.
- Stabilita dvojité helix DNA je dána:
 - A) vodíkovými vazbami,
 - B) báze jsou udržovány mezi sebou Van der Walsovými silami a hydrofobními interakcemi.



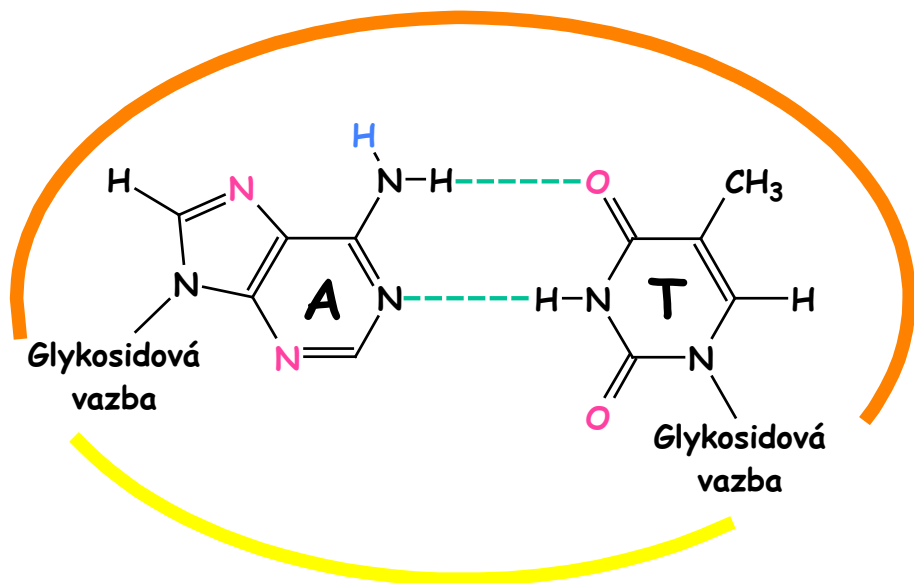
Velký a malý žlábek na DNA

- Na povrchu dvojité šroubovice jsou dva žlábků: velký a malý. Důvodem je, že glykosidové vazby párů bází nejsou úplně stejné.
- Malý žlábek obsahuje pár bází pyrimidin O-2 a purin N-3 a velký žlábek je na opačné straně páru.



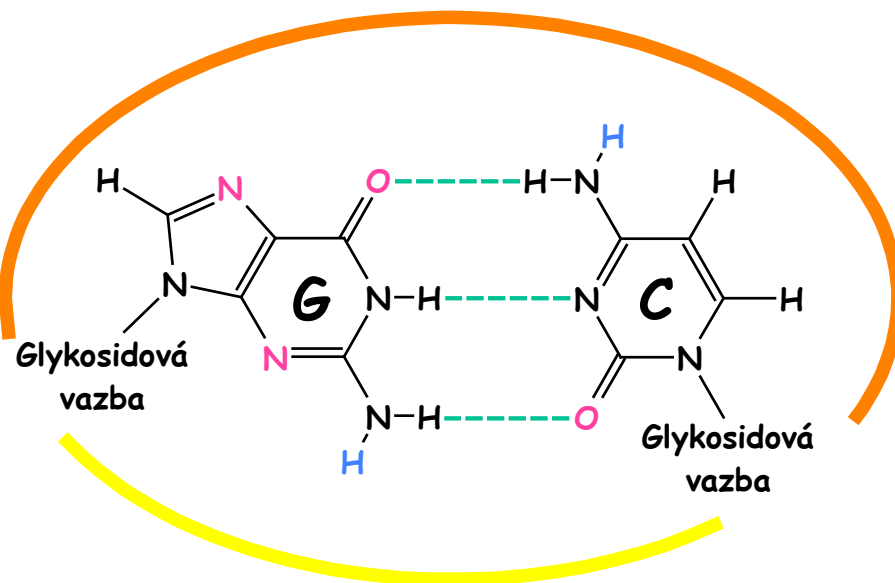
Strany malého a velkého žlábkku

Strana velkého žlábkku



Strana malého žlábkku
Adenin-Thymin

Strana velkého žlábkku

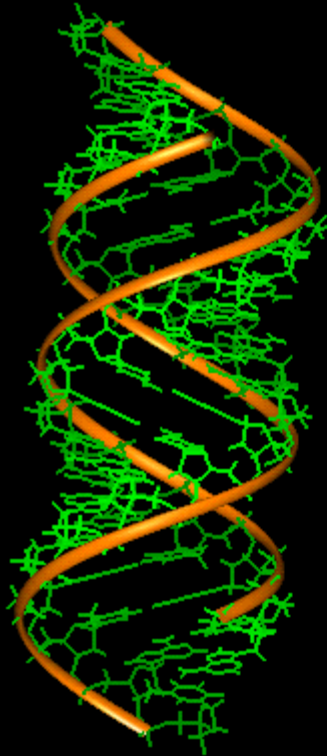


Strana malého žlábkku
Guanin-Cytosin

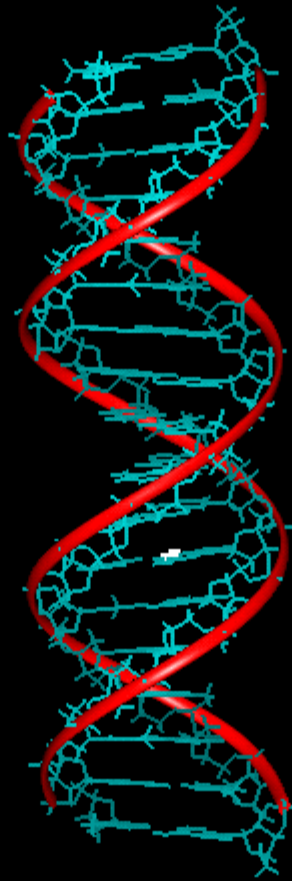
Různé strukturní formy DNA. Helix B - Watson-Crickova.

	Typ helixu		
	A	B	Z
Tvar:	nejširší	střední	nejužší
Stoupání na pár bazí:	2.3 Å	3.4 Å	3.8 Å
Průměr helixu:	25.5 Å	23.7 Å	18.4 Å
Smysl otáčení:	pravotočivá	pravotočivá	levotočivá
Glykosidová vazba:	<i>anti</i>	<i>anti</i>	střídavě <i>anti</i> a <i>syn</i>
Počet párů bazí na jeden závit helixu:	11	10.4	12
Výška jednoho závitu helixu:	25.3 Å	35.4 Å	45.6 Å
Odklon páru bazí od kolmice na osu helixu:	19°	1°	9°
Velký žlábek:	úzký a velmi hluboký	široký a celkem hluboký	plochý
Malý žlábek:	velmi široký a mělký	úzký a celkem hluboký	velmi úzký a hluboký

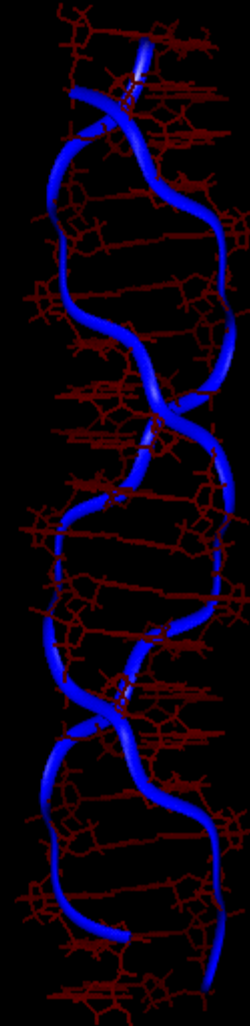
Tři typy DNA



A DNA



B DNA



Z DNA

Semikonzervativní replikace DNA

- Pokus M. Meselsona a F. Stahla (1958): bakterie s původní (rodičovskou) DNA byly pěstovány na médiu obsahujícím těžký isotop dusíku ^{15}N ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$). Po plné inkorporaci těžkého dusíku do DNA, byly přeneseny do média s běžným isotopem dusíku ^{14}N . Zkoumalo se, jaká bude distribuce obou dusíků po replikaci **metodou rovnovážné sedimentace v hustotním gradientu**. DNA po extrakci byla rozpuštěna v koncentrovaném roztoku chloridu cesného o hustotě $1,7 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (gradient zhruba stejný jako hustota DNA). Molekuly DNA putovaly při centrifugaci v hustotním gradientu na místa, kde byl gradient roven jejich hustotě.
- DNA byla extrahována z bakterií v různých časech po transferu z ^{15}N do ^{14}N .

Rozlišení ^{14}N od ^{15}N hustotním gradientem. A) UV absorpce. B) Densitogram.

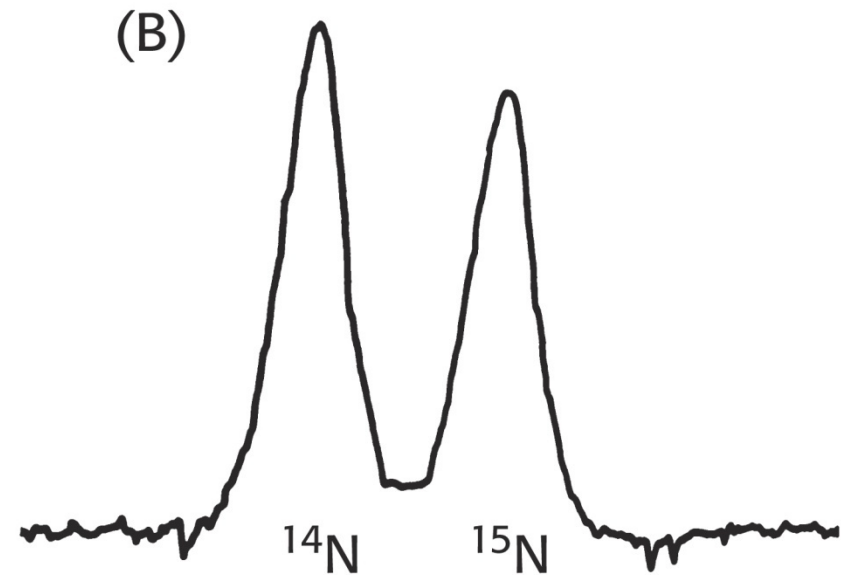
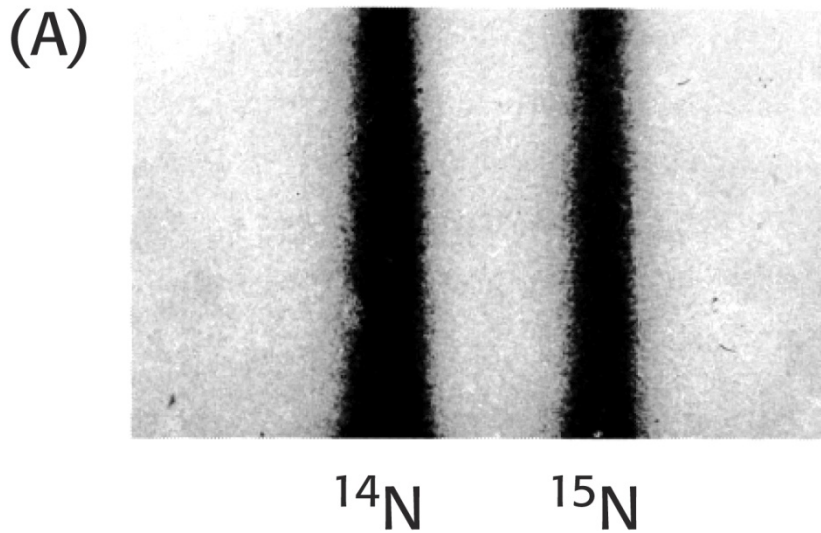
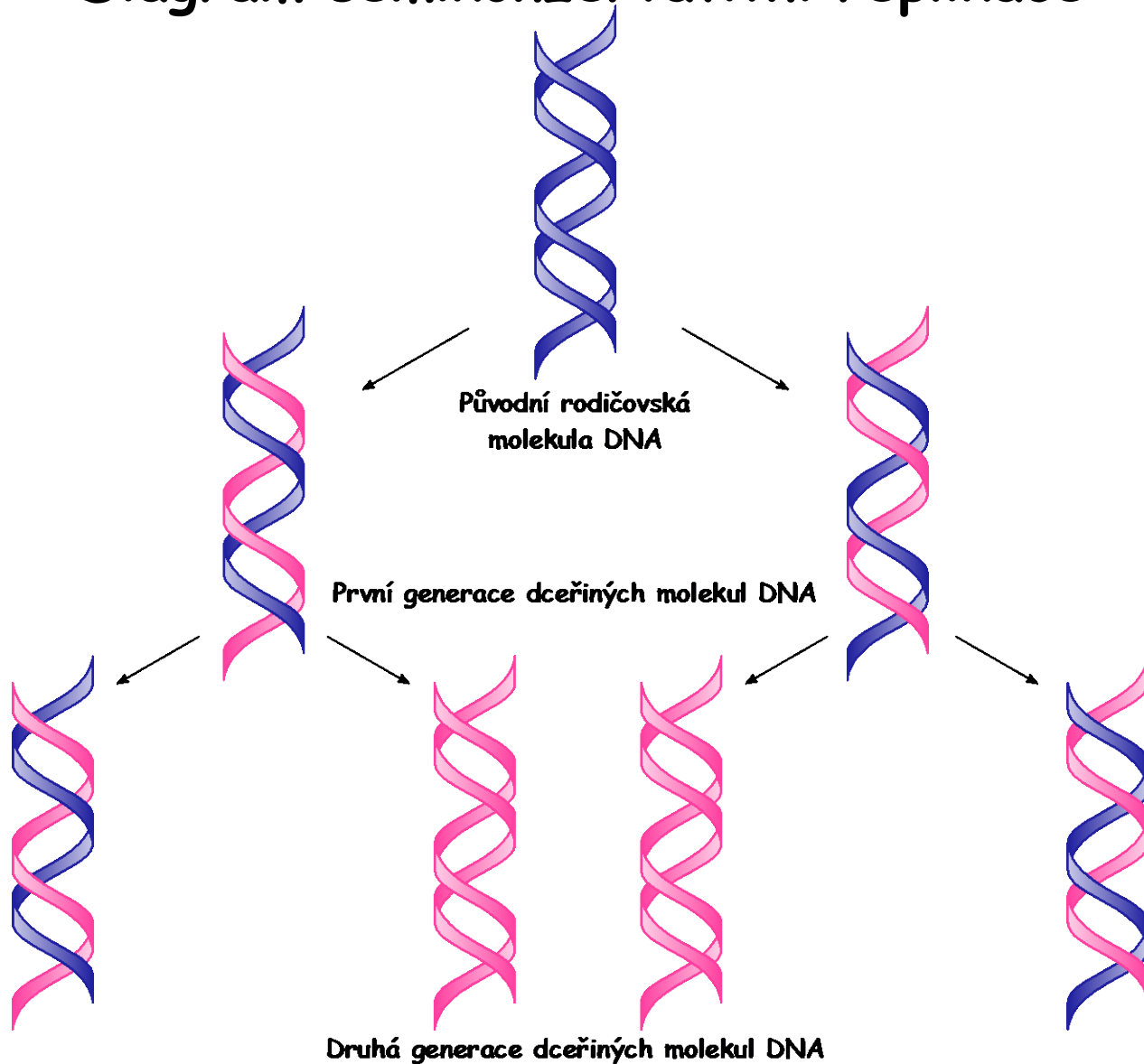
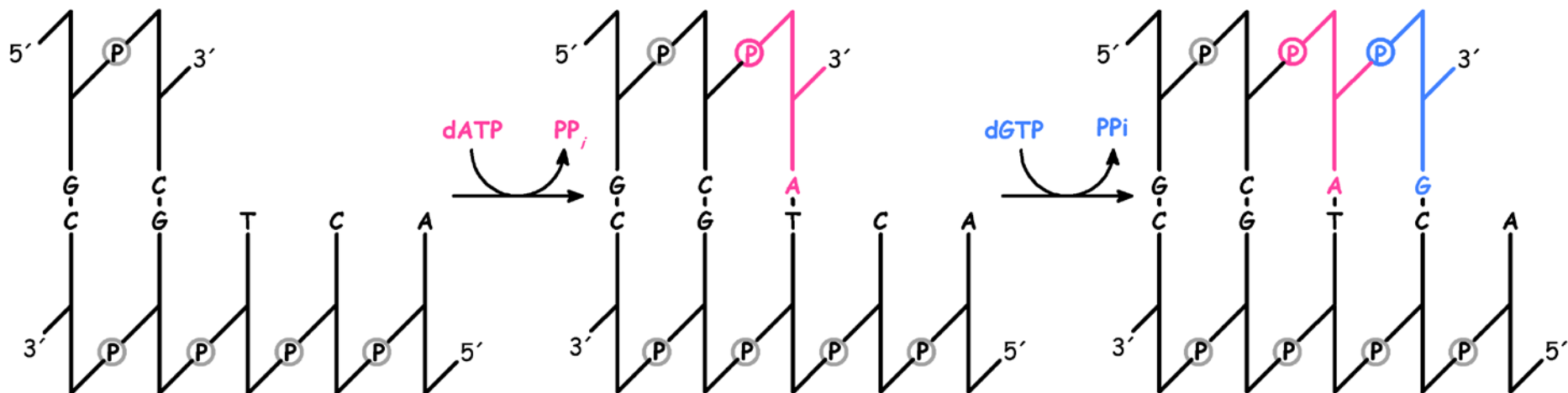


Diagram semikonzervativní replikace

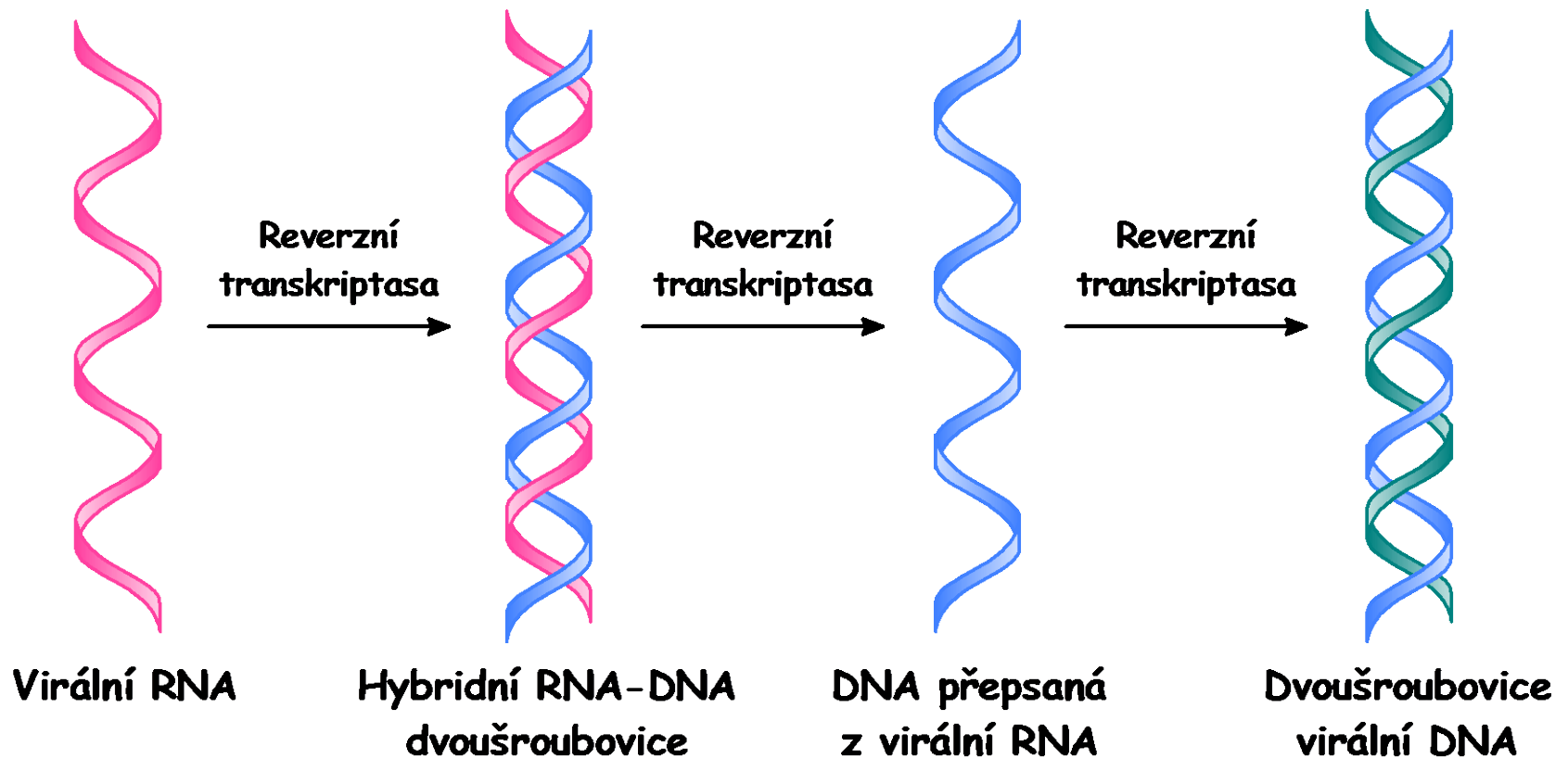


Mechanismus replikace DNA

- V roce 1958 Arthur Kornberg a jeho kolegové izolovali první enzym replikace nazvaný **DNA polymerasa**, který katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby mezi deoxynukleotidy. Celý replikační proces využívá dvacet proteinů. Nutný je DNA templát a primer s volnou 3' OH skupinou.
- Primer je počáteční segment polymeru, který je prodlužován.
- Templát je sekvence DNA nebo RNA, na které probíhá syntéza komplementární sekvence.
- Nový řetězec DNA se tvoří přímo na již existujícím DNA templátě.

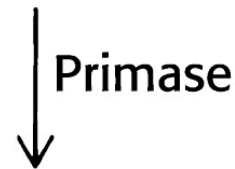


Tok informace z RNA na DNA u retrovirů (HIV-1)



Replikace DNA

DNA template

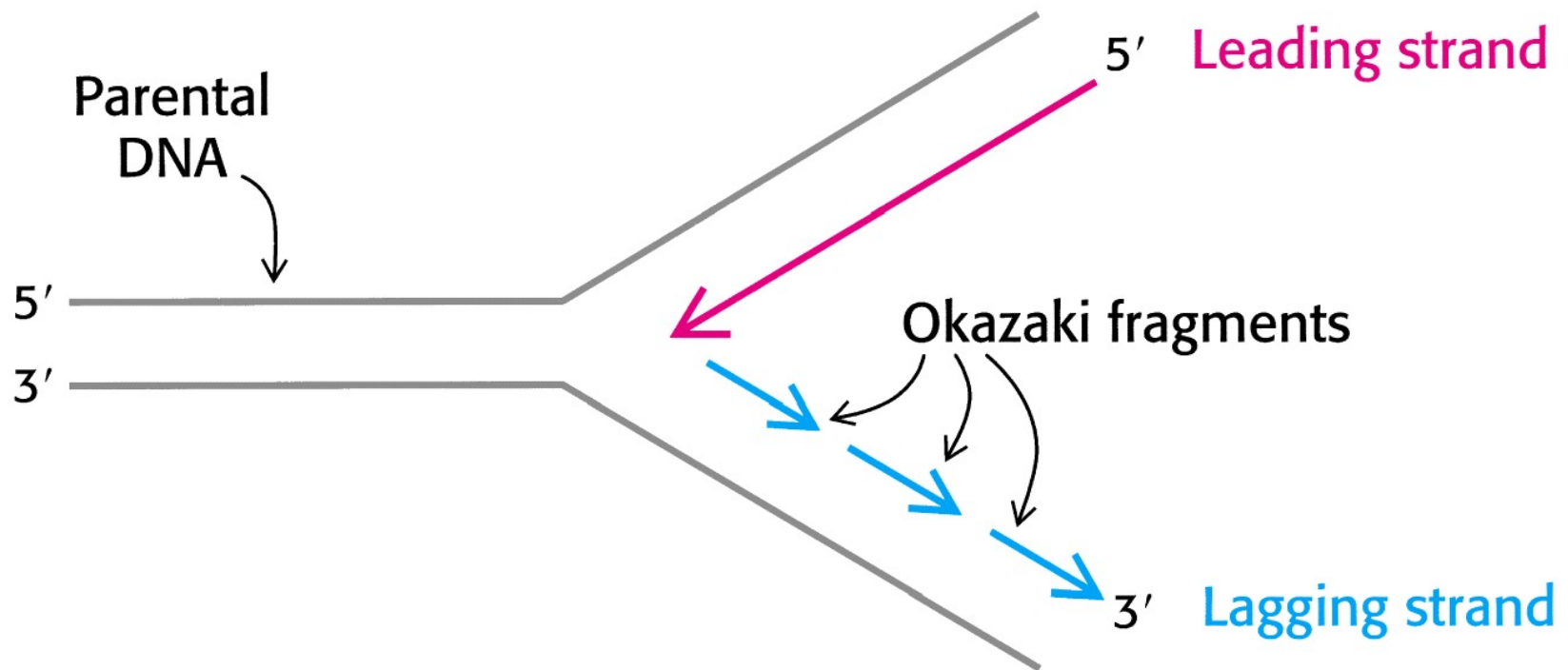


RNA
primer

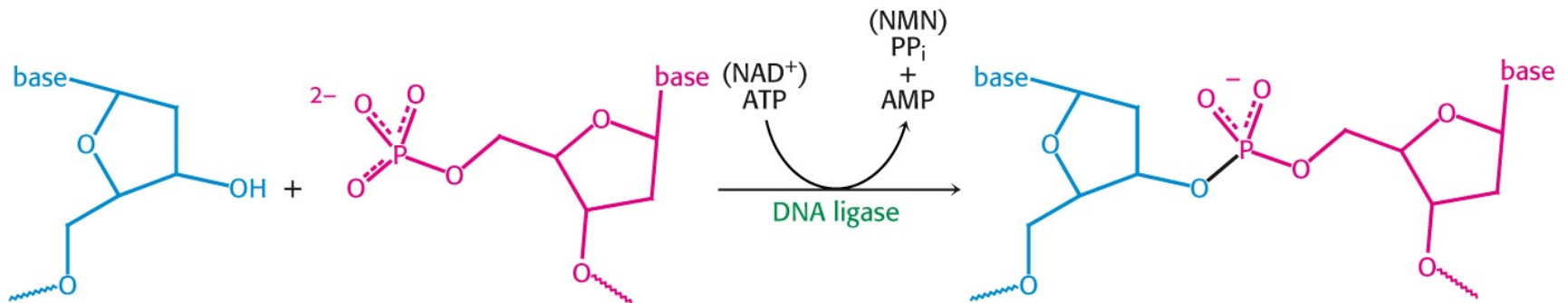


New DNA

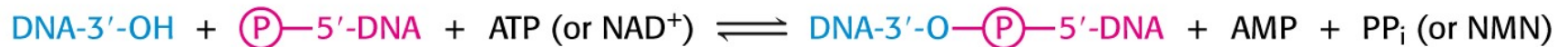
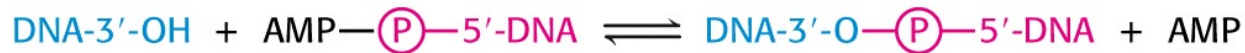
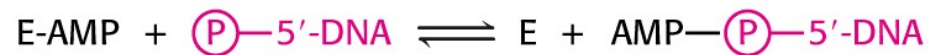
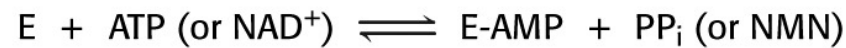
Okazakiho fragmenty- syntéza vždy ve směru 5' → 3'



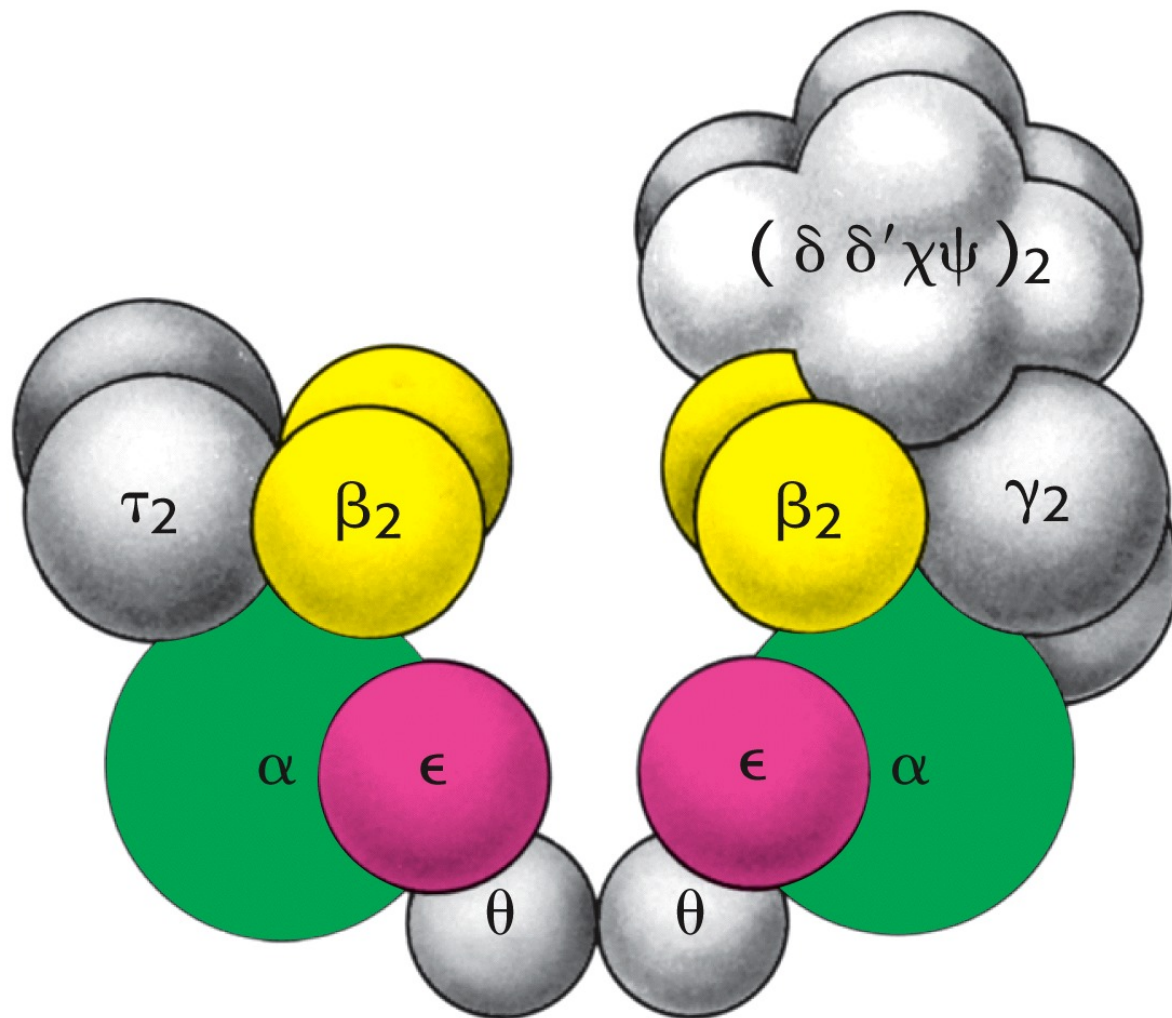
Reakce DNA ligasy. U eukaryot se štěpí ATP na AMP a PP_i . U bakterií NAD^+ na AMP a nikotinamidmononukleotid (NMN)



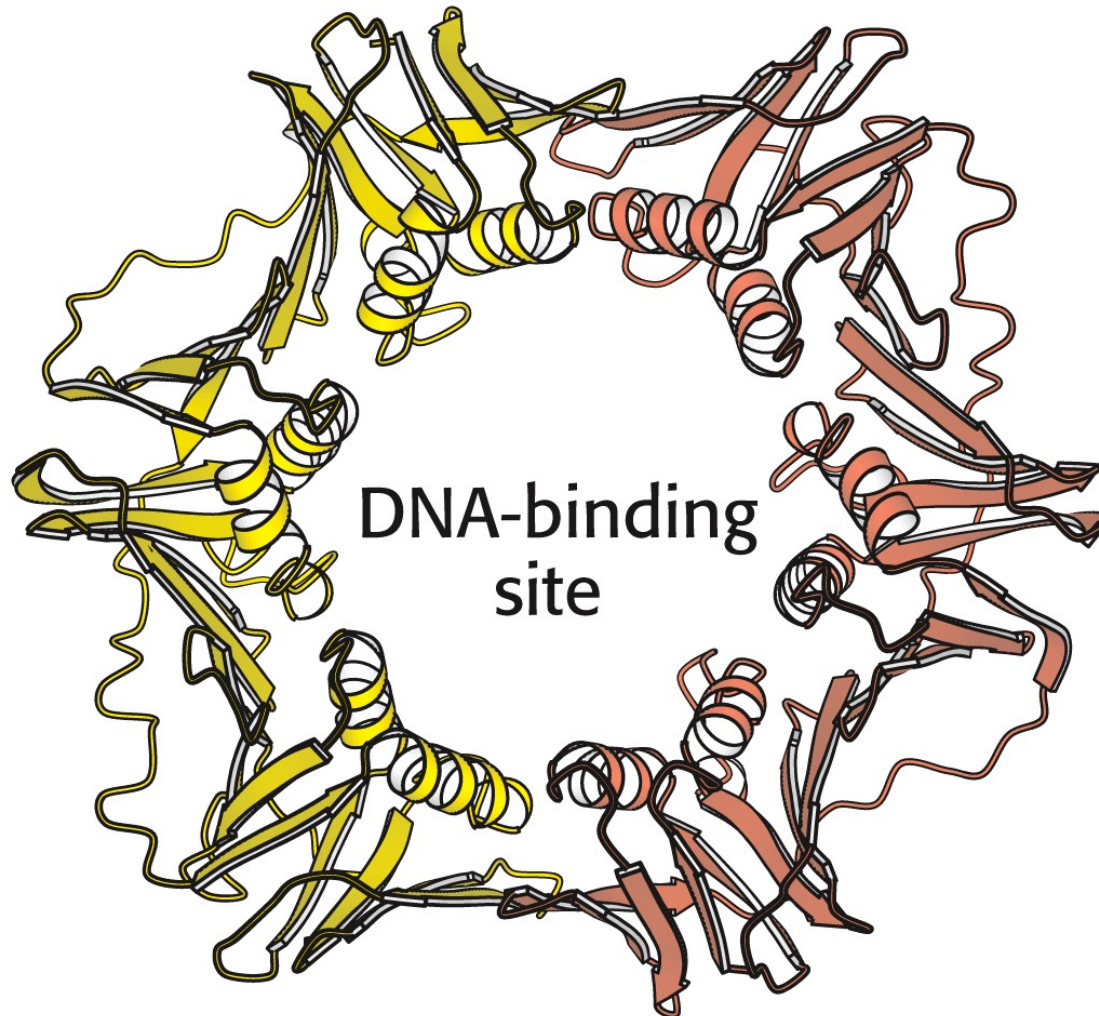
Mechanismus DNA ligasy



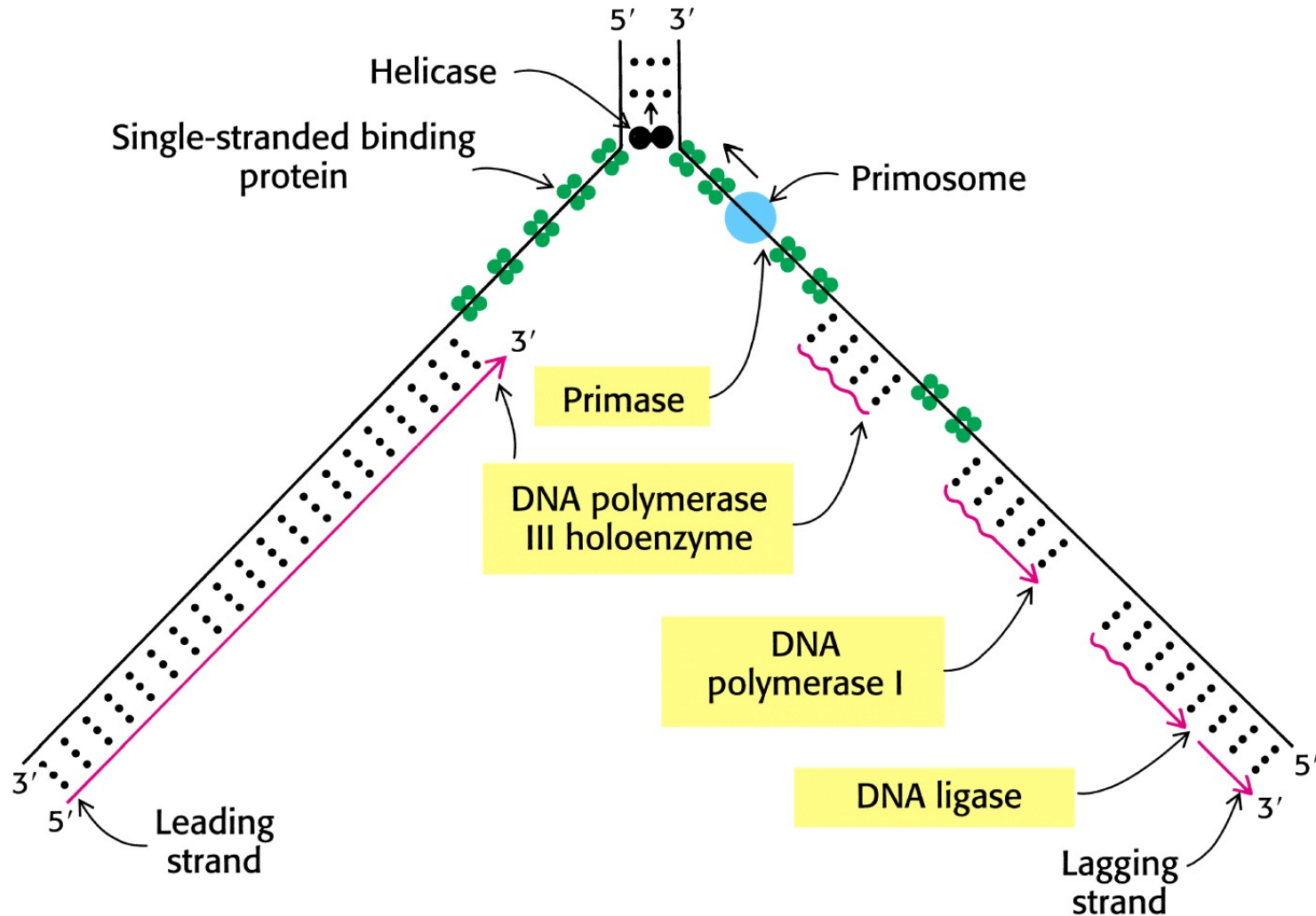
Struktura DNAPolymerasy (holoenzym)



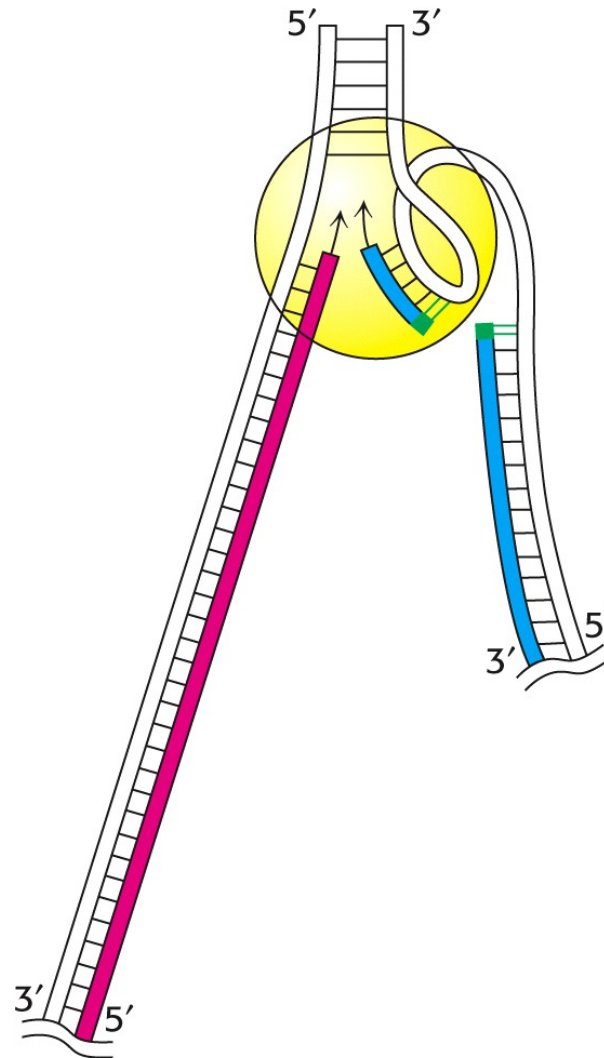
Struktura „sliding clamp = klouzavá svěrka“ dimerní β_2 podjednotky DNA polymerasy, tvoří kruh kolem DNA dvoušroubovice.



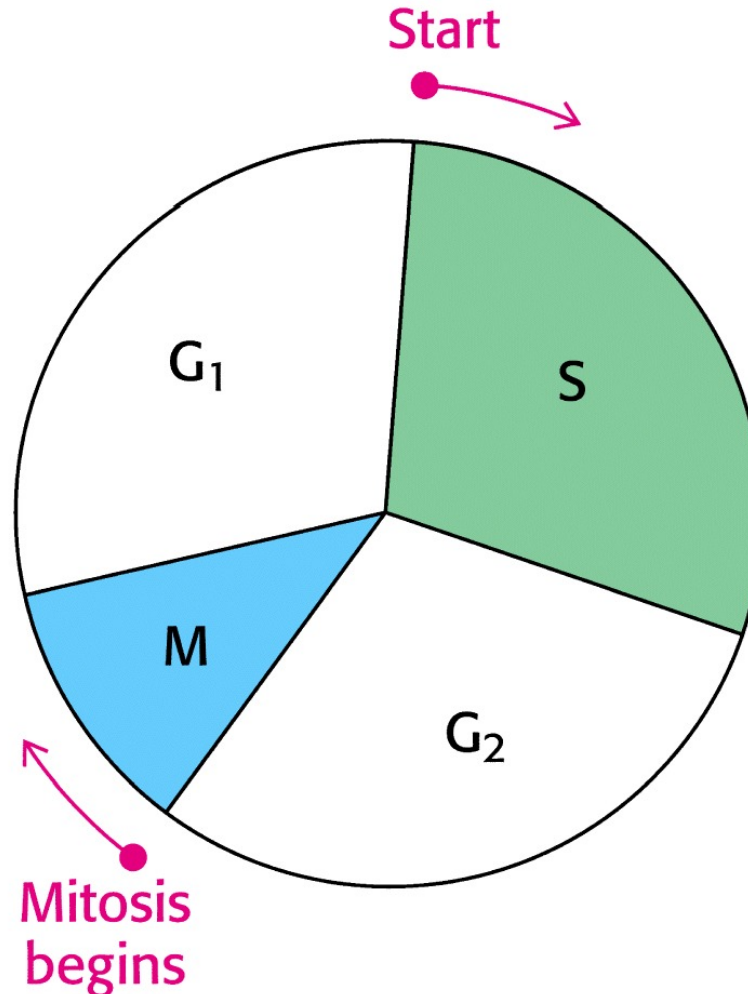
Replikační vidlička *E. coli*. Žlutě zbarvené enzymy katalyzují iniciaci, elongaci a spojení (ligaci). Primasa tvoří RNA primer - začátek nového (leading) řetězce.



Koordinace mezi syntézou nového vlákna (prvořadého -červeně) a zpožděného (modře). Zeleně RNA primer.



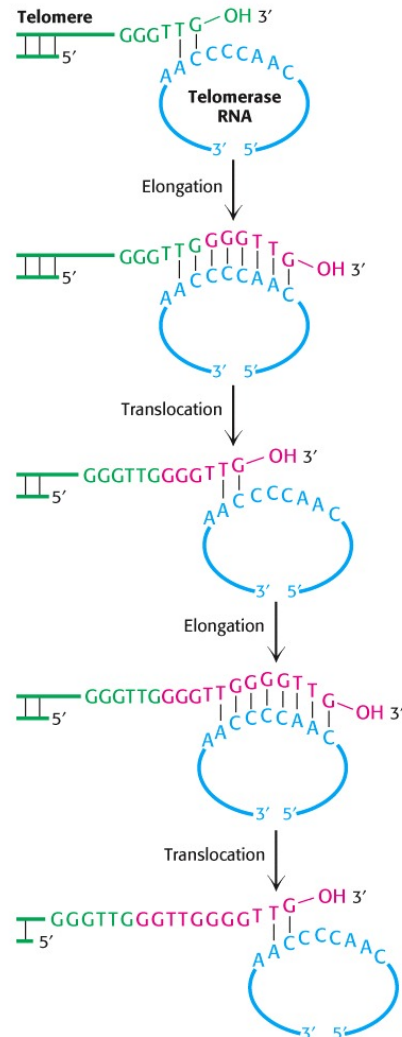
Cyklus eukaryotní buňky. Replikace DNA a buněčné dělení musí být koordinováno ! Mitosa (M) probíhá vždy až po syntéze DNA (S). Další dva stupně G_1 a G_2 oba proces oddělují.



U eukaryot je syntéza DNA složitější.

- Mechanicky je podobná replikaci prokaryot.
- Rozdíly:
- **Velikost:** *E. coli* replikuje 4,8 milionů párů bází; lidská diploidní buňka replikuje 6 bilionů párů bází.
- **Genetická informace** *E. coli* obsahuje 1 chromosom; lidská 23 párů chromosomů.
- **Chromosom *E. coli* je kruhový; lidské jsou lineární.**
- Lineární chromosomy jsou po každé replikaci kráceny !!!
- Proč ?
- Nelze plně replikovat DNA konce, protože polymerasy působí pouze ve směru 5' → 3'. Zpožděné (lagging) vlákno má nekompletní 5' konec po odštěpení RNA primeru.
- Chromosomy mají na konci řetězce **telomery** (z řečtiny telos = konec). Mnohonásobné hexanukleotidové sekvence. Sekvence bohaté na G - lidská je AGGGTT !! Nenesou žádnou informaci !!!

Telomerasa je zvláštní reverzní transkriptasa nesoucí svůj vlastní RNA templát. Tvoří telomery.



Telomery, telomerasa.

- Konce chromosomů mají telomery (z řečtiny telos = konec).
- Obsahují stovky opakujících se hexanukleotidových sekvencí. Jedna větev má 3' konec bohatý na G a je delší než druhá. Lidské DNA jsou bohaté na opakující se sekvence AGGGTT.
- Přecházející G sekvence vytvoří velkou duplexní smyčku (očko) na konci DNA (chromosomu).



Nobelova cena - lékařství a fyziologie 2009.

- Nobelova cena byla oficiálně udělena „za objev způsobu, jakým jsou chromozomy chráněny telomery a enzymem telomerasou“.
- Cena získala **Elizabeth Blackburnová** (61) z Kalifornské univerzity, její bývalá studentka **Carol Greiderová** (48) z Univerzity Johnse Hopkinse a **Jack Szostak** (57) z Lékařského institutu Howarda Hughese.
- Chromosomy mají na svých koncích jakési ochranné čepičky - **telomery**. Blackburnová (původem z Austrálie) se Szostakem zjistili, že jsou tvořeny specifickým řetězcem DNA, v němž se pořád dokola opakuje jedna sekvence „písmen“. Nenesou žádnou užitečnou informaci, takže pokud se o kousek zkrátí, nic se nestane.
- Greiderová s Blackburnovou poté objevily telomerasu - enzym zodpovědný za kopírování této DNA. Telomerasa tedy umí zajistit, aby se chromozom zkopíroval celý. Buňky v těle se mezi sebou liší aktivitou tohoto enzymu, tedy rychlostí, s jakou se stávají „neplodnými“.

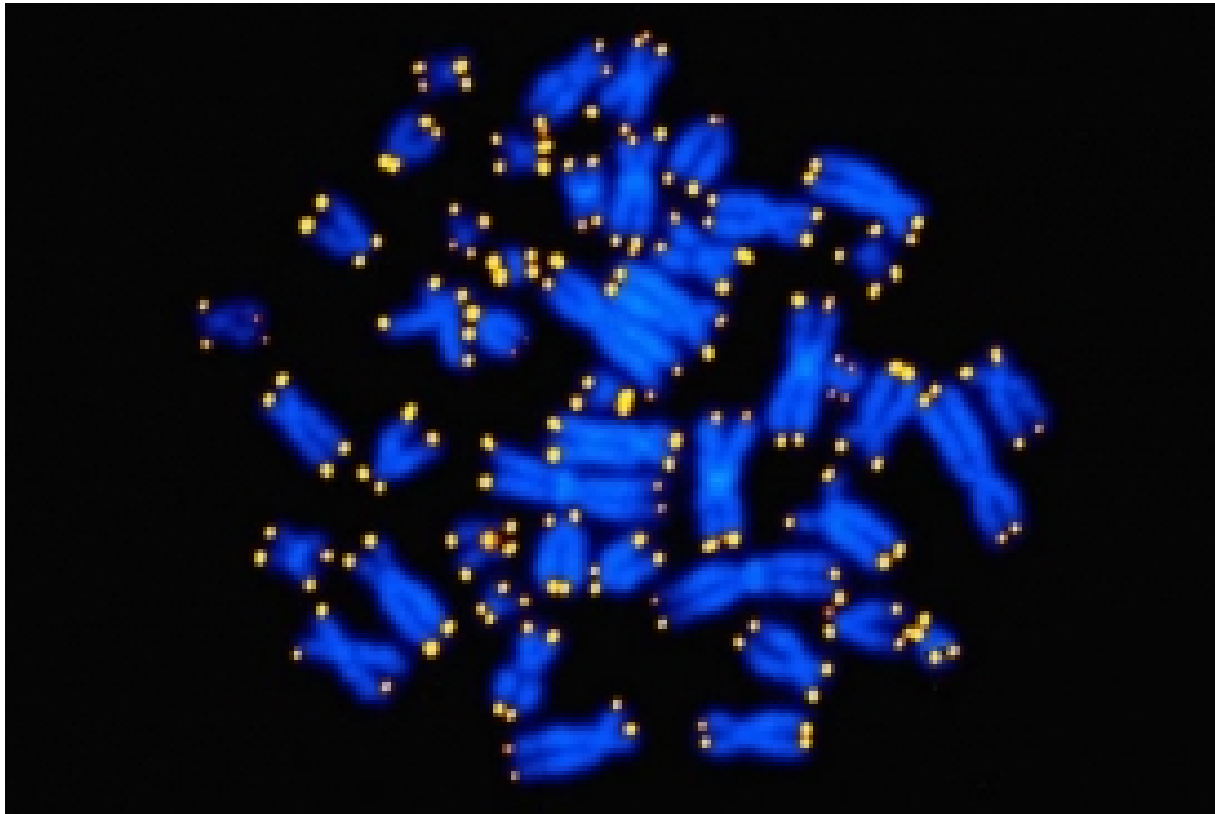
Elizabeth Blackburnová (61) z Kalifornské univerzity



Důsledky funkce telomerasy

- Únava buněk ovlivňovaná zkracováním telomer je jedním z klíčových faktorů stárnutí celého organismu. Telomery však hrají významnou roli také při vzniku řady chorob.
- V nádorových buňkách je telomerasa velmi aktivní, takže čepičky se stále obnovují a buňky jsou v podstatě nesmrtelné. Mohou se množit do nekonečna. Právě proto se nádory tak snadno zvětšují.
- Při některých dědičných chorobách naopak telomerasa nefunguje správně a buňky dospějí na konec své „životní pouti“ mnohem dříve, než by bylo záhodno. Dospělé buňky se zpravidla příliš často nedělí, aktivita telomerasy u nich proto není tak důležitá. Jiná situace je však například u intenzivně se dělících buněk zajišťujících průběžnou obnovu kůže nebo u kmenových buněk, jejichž dceřiné buňky plní různé specializované funkce.
Předčasná „únava“ zárodečných buněk je zodpovědná například za vznik některých typů chudokrevnosti nebo onemocnění kůže a plic.

Telomery jako žlutě svítící čepičky na koncích chromosomů.



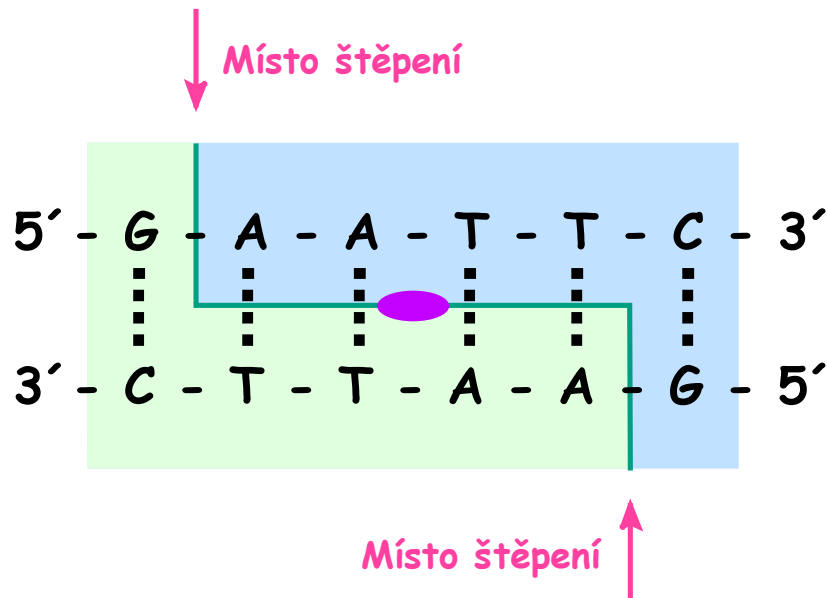
Metody sekvencování nukleových kyselin

- **Strategie sekvencování:**
- Štěpení polymerů na specifické fragmenty, které mohou být celé sekvencovány.
- Určení pořadí nukleotidů každého fragmentu.
- Sestavení překrývajících se fragmentů tak, aby došlo k rekonstrukci původního polymeru.
- Enzymy: restriční enzymy - nukleasy (endonukleasy a exonukleasy).
- **Restriční endonukleasy typu II rozpoznávají a štěpí palindromovou sekvenci DNA.**
- Palindrom je slovo nebo fráze, které se čtou stejně zleva i zprava.
- Např. refer nebo „Madam, I´m Adam“.
- V palindromovém DNA segmentu je sekvence nukleotidů stejná v obou řetězcích a segment má tzv. dvoučetnou symetrii.
- Fragmenty, které takto vznikají, mohou mít lepidivé nebo nelepivé konce.
- Restriční enzymy se označují podle bakterií původu. Např. *EcoRI*13 je produkovaná *E. coli* kmen RI13.

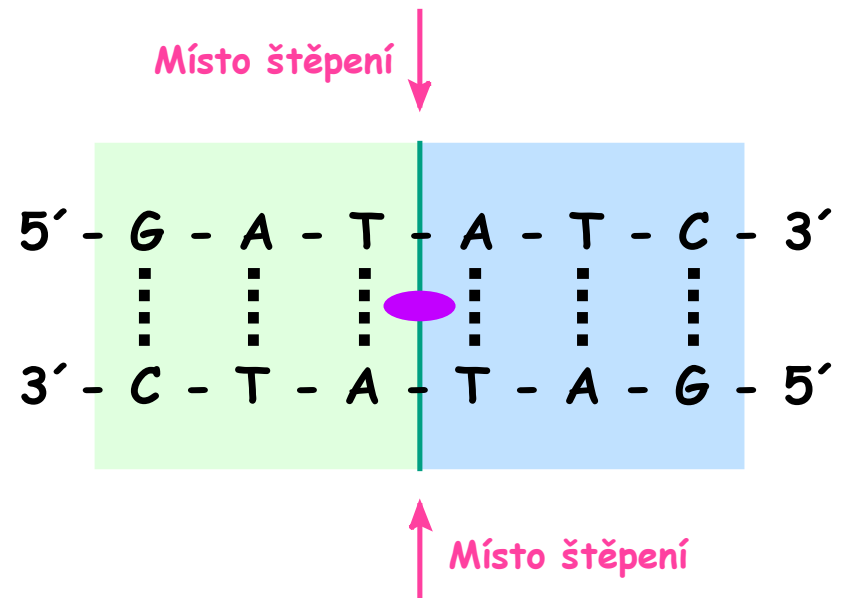
Restrikční místa

- Generuje fragmenty s lepivými konci.
- Generuje fragmenty s nelepivými konci.

a) *EcoRI*



b) *EcoRV*

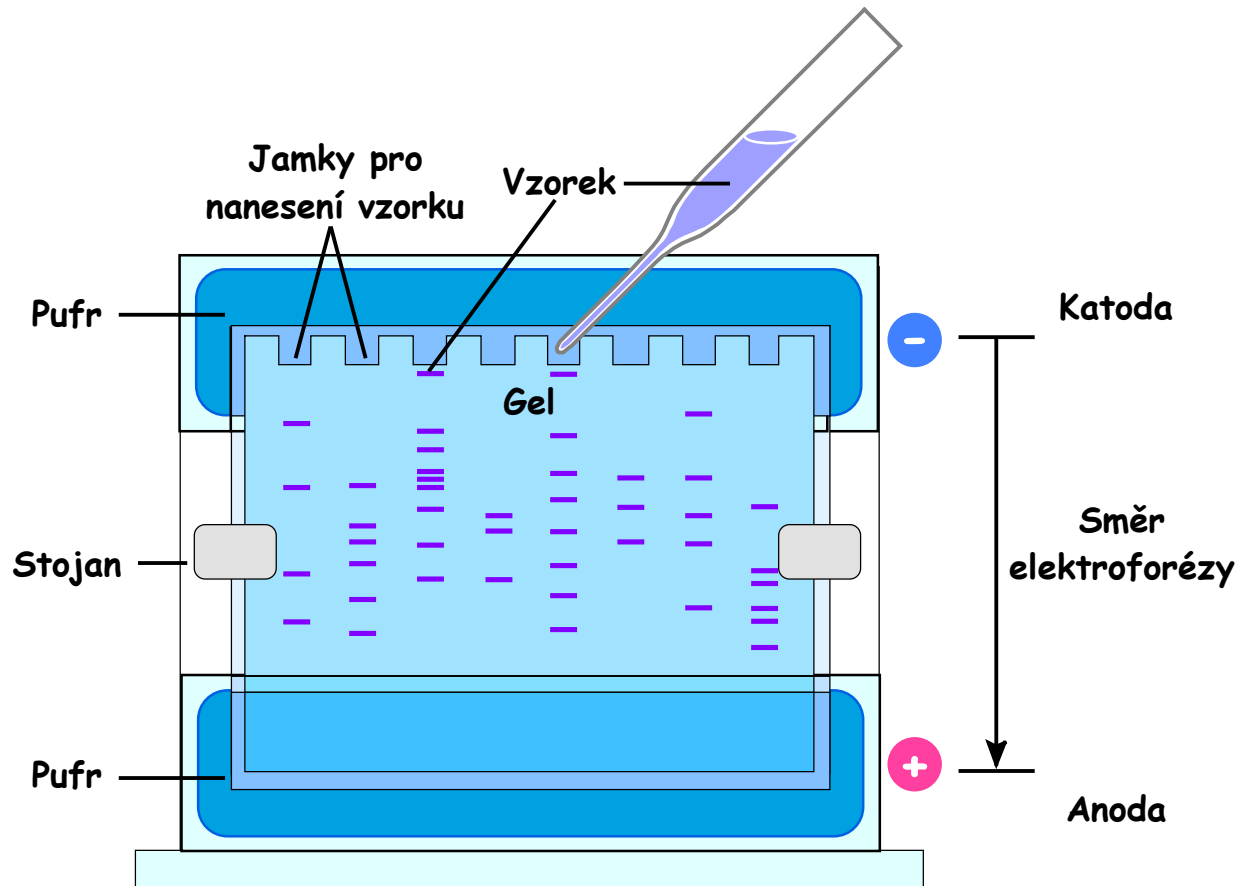


● Osa symetrie

Dělení fragmentů nukleových kyselin elektroforézou

Gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu, PAGE.

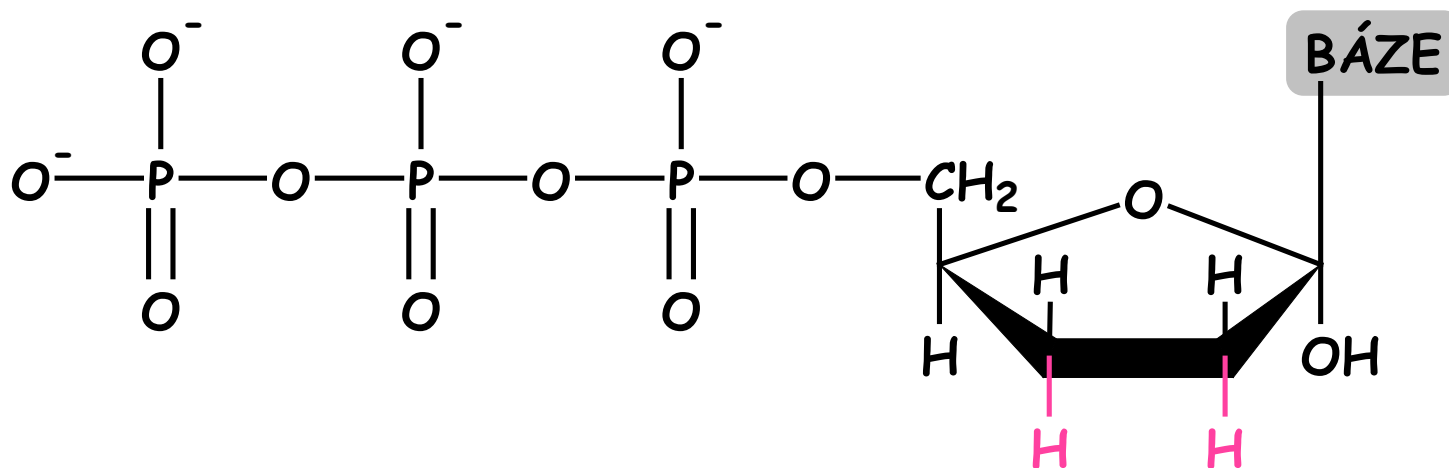
Výsledkem je restriční mapa.



Metoda sekvencování DNA dle F. Sangera - metoda ukončení řetězce neboli dideoxymetoda.

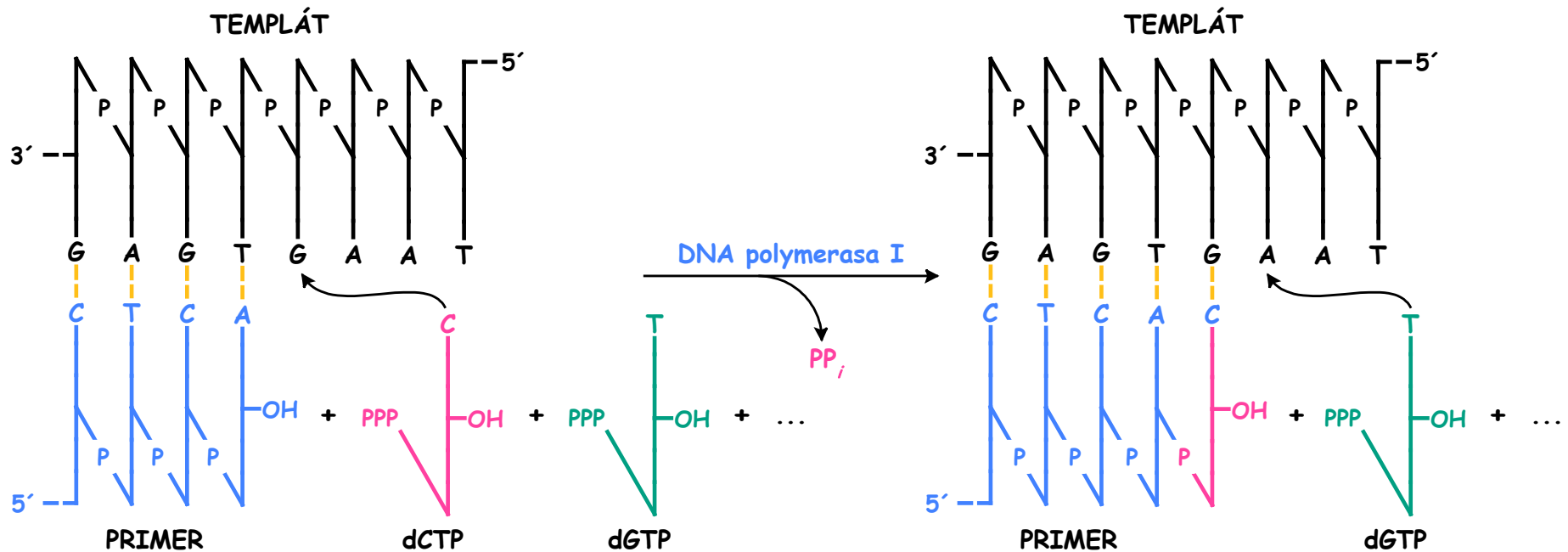
- Enzym DNA polymerasa I z *E. coli* (enzym podílející se na replikaci bakteriální DNA).
- Jednovláknová DNA jako templát a čtyři deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP): dATP, dCTP, dGTP a dTTP.
- Krátký polynukleotid primer, který je komplementární 3' koncem templátu DNA a stává se 5' koncem nového řetězce.
- Syntéza DNA je zakončována specifickými nukleotidy.
- Reakční směs také obsahuje označenou sloučeninu, buď jeden z dNTS nebo primer. Označení může být radioaktivním isotopem (např. ^{32}P) nebo fluorescenčně.
- Klíčovou komponentou je malé množství 2', 3'-dideoxynukleosidtrifosfátu (ddNTP), který nemá 3'-OH.
- Když je tato komponenta vřazena do syntetizovaného polynukleotidu, řetězec je ukončen.

2', 3' - Dideoxynukleosidtrifosfát



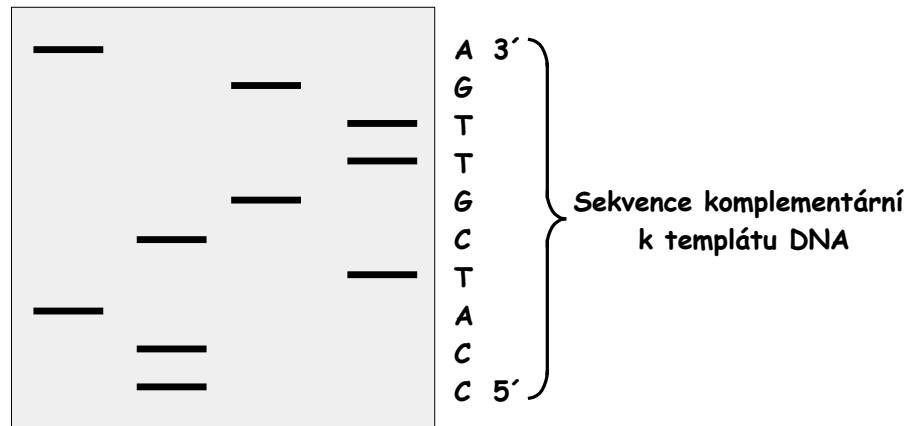
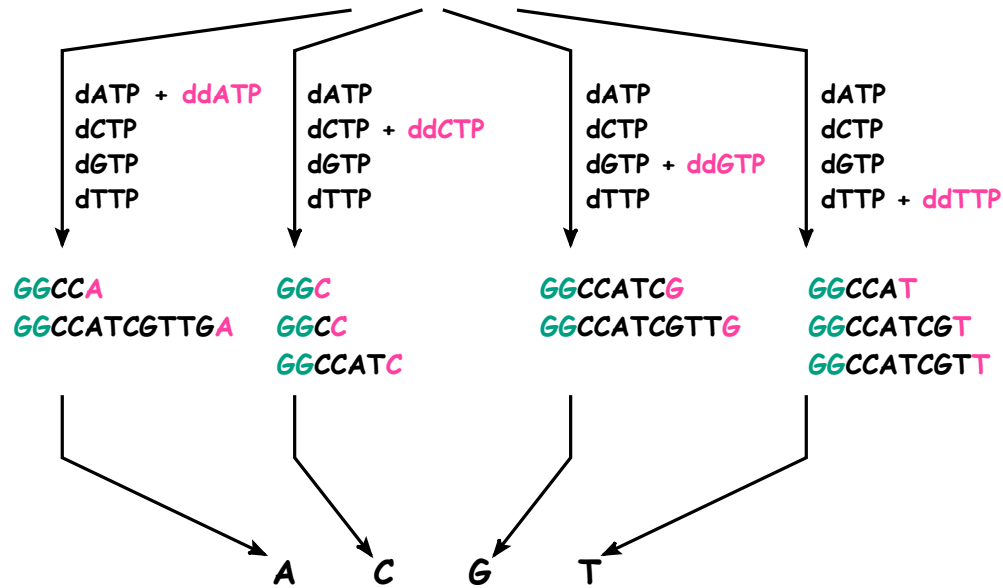
2',3' -Dideoxynukleosidtrifosfát

Reakce katalyzovaná DNA polymerasou I

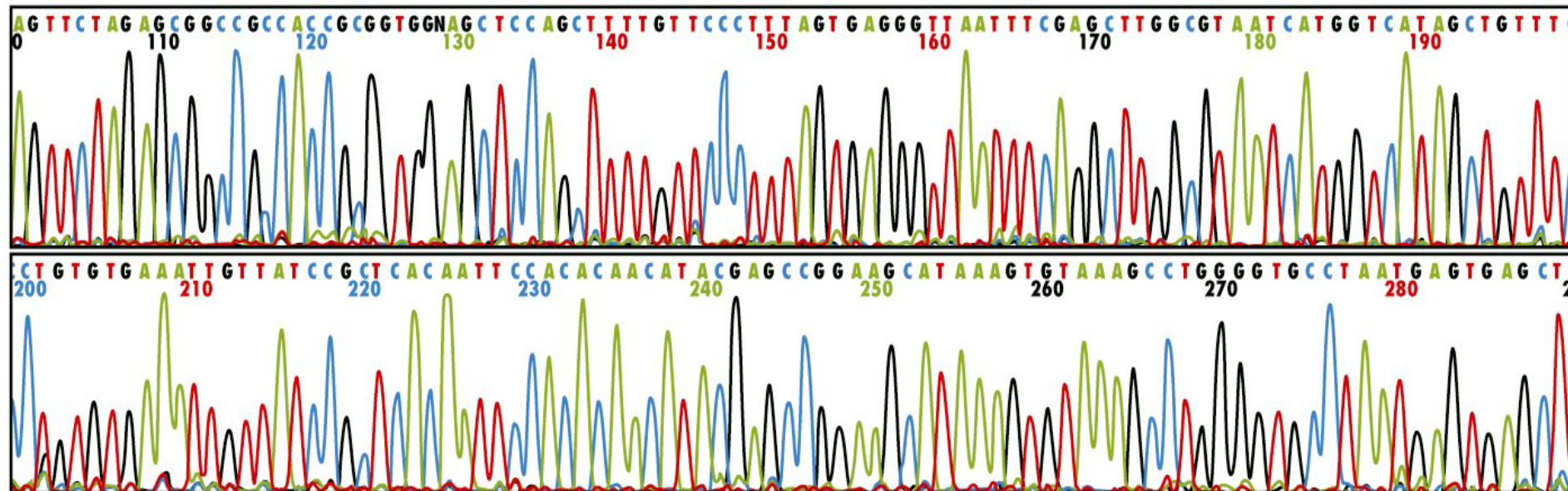


Metoda sekvencování DNA - terminace řetězce

TEMPLÁT: 3' — CCGGTAGCAACT — 5'
PRIMER: 5' — GG 3'



Automatické sekvencování DNA. Na primer v každé ze čtyř reakčních směsí jsou připojena fluorescenční barviva. Každá ze čtyř barevných křivek reprezentuje elektroforézou oddělený fragment s jedním dideoxynukleotidem. Barevné fragmenty: **Zelená = ddATP**, **červená = ddTTP**, **černá = ddGTP** a **modrá = ddCTP**.



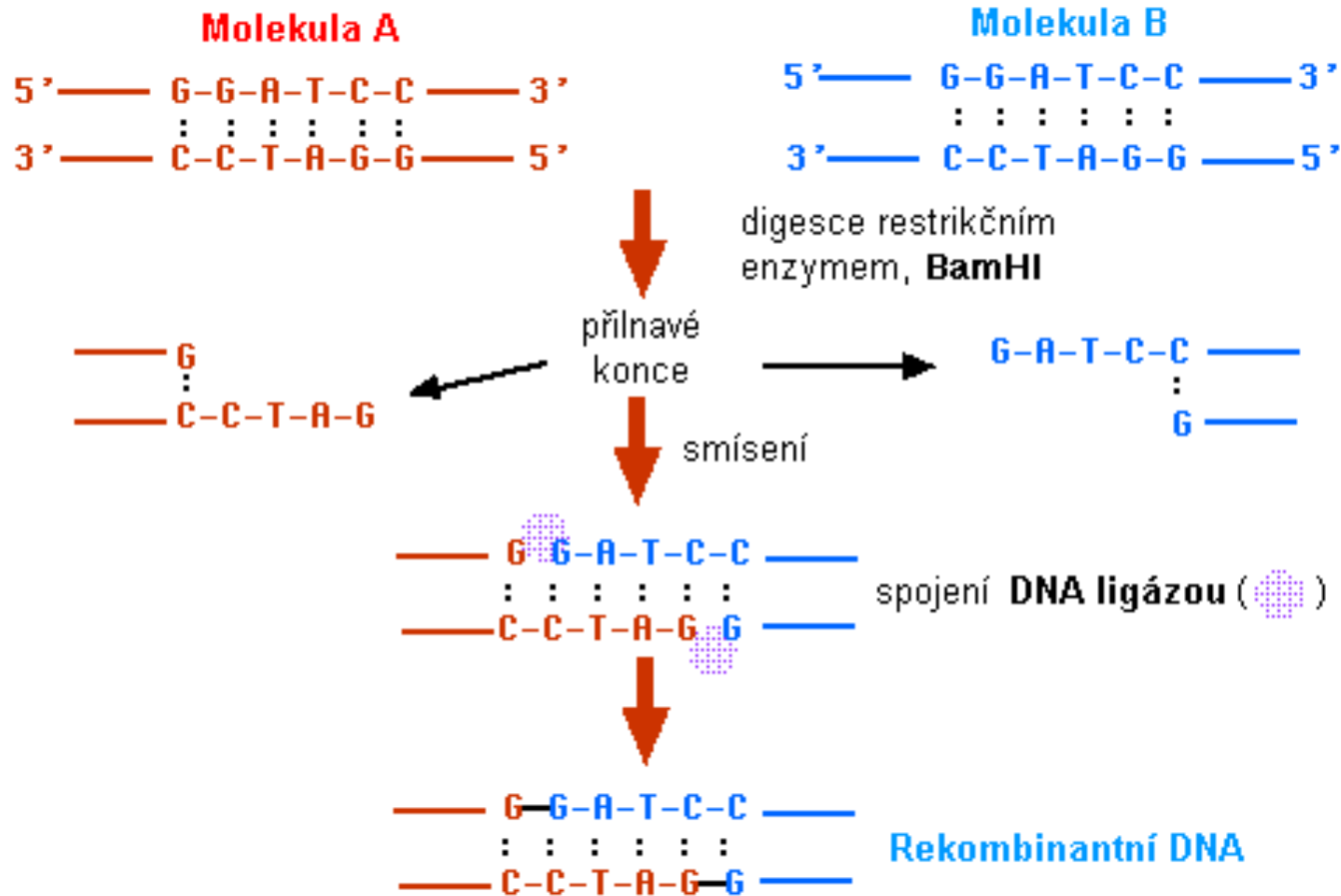
Technologie rekombinantní DNA - klonovací techniky

- **Klonování** - je produkce násobku identických organismů odvozených od jednoho předka. Never clone alone !!!!
- **Klon** je soubor buněk obsahujících vektor nesoucí žádanou DNA.
- Metoda dovoluje připravit větší množství DNA, které nelze získat např. izolací z bakteriální kultury. **Genové inženýrství**.
- Způsoby amplifikace segmentu DNA:
 - A) Specifický fragment DNA vytvořený restriční enzymem, technikou PCR (polymerázová řetězová reakce) nebo chemickou syntézou.
 - B) Fragment je vnesen do jiné DNA molekuly označené jako vektor, obsahující nezbytnou sekvenci k přímé replikaci DNA.
 - C) Vektor nesoucí vloženou DNA je inkorporován do buněk, kde je replikován.
 - D) Buňky obsahující požadovanou DNA jsou odděleny.
- **Klonovací vektory**. Nejčastěji **plasmidy**, kruhové DNA molekuly od 1 po 200 kb z bakterií nebo kvasinek.
- (kb = 1 000 párů bází dvojšroubovice nebo 1 000 bází jednovláknové DNA).

Součásti klonovacího vektoru

- 1. Počátek replikace
- 2. Dominantní selekční marker (obvykle gen, který uděluje hostitelské buňce rezistenci k léčivům)
- 3. Nejméně jedno unikátní restriční místo - místo štěpení, které je přítomno pouze jednou a leží v oblasti vektoru, které nenaruší ani počátek replikace ani selekční marker.
- V současnosti používané klonovací vektory obsahují seskupení unikátních restričních míst nazývané **polylinker** nebo **mnohočetné klonovací místo**.

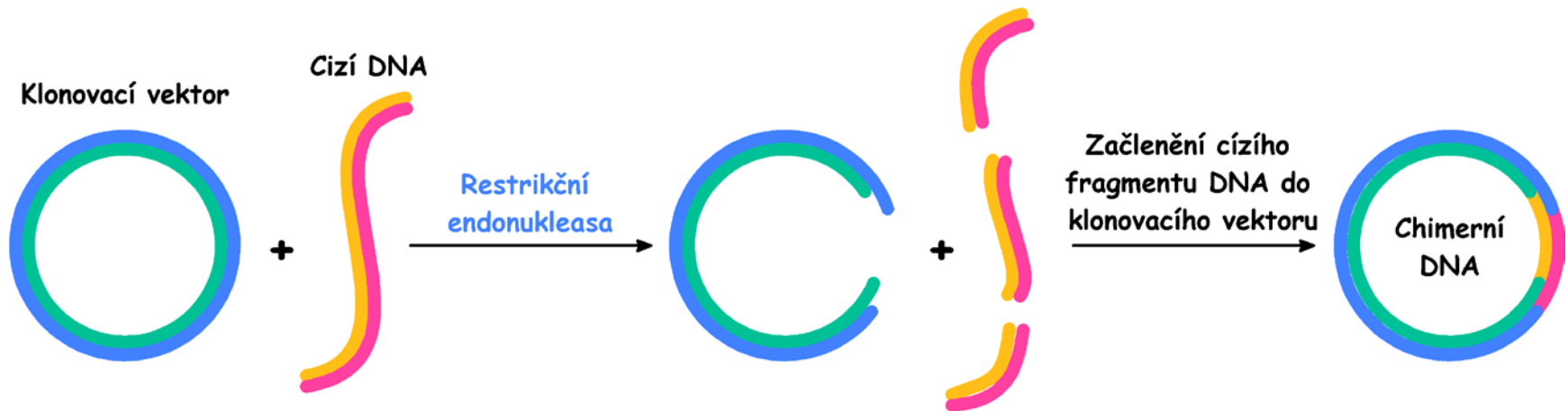
Tvorba rekombinantní DNA (rDNA)



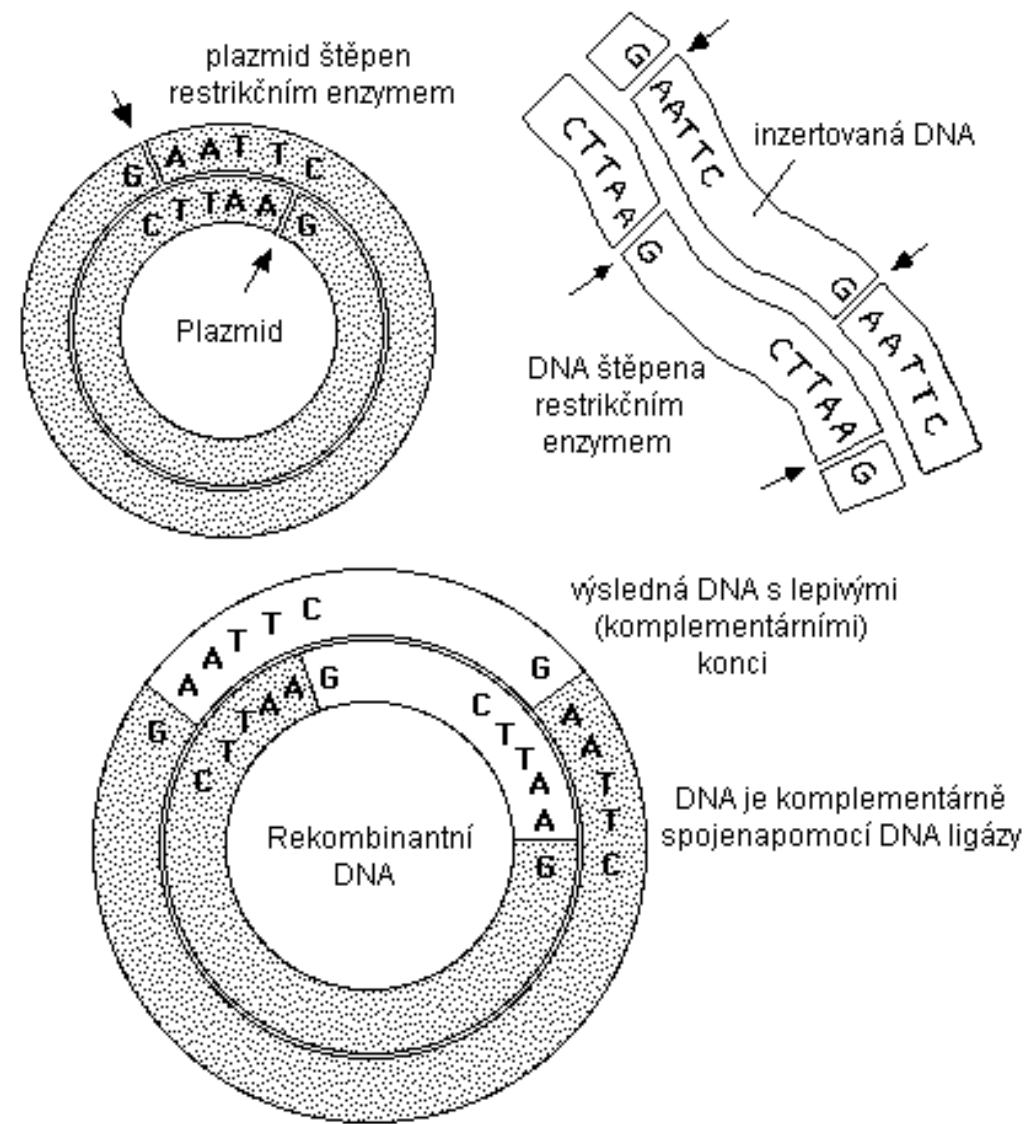
Technologie rekombinantní DNA - klonovací techniky

- **Laboratorní plasmidy** jsou relativně malé kruhové DNA, snadno se replikující, nesoucí geny specifické rezistence k jednomu nebo více antibiotikům a obsahující jedno nebo více míst pro restriční endonukleasu, kam může být zavedena cizí DNA.
- Např. ***E. coli* plasmid označený pUC18** (2,69 kb) reprezentuje klonovací vektor (pUC znamená plasmid Universal Cloning). Používá se ke klonování DNA do velikosti 10 kb.
- Obsahuje 13 restričních míst, **tři geny rezistence k ampicilinu**, *lacZ* kódující enzym β -galaktosidasu.
- **Bakteriofág λ** je vektor klonující DNA do 16 kb.
- **Rekombinantní DNA neboli chiméra** (podle řecké mytologie obluda se lví hlavou, kozím tělem a hadím ocasem) složená DNA.
- Ligace (vazba). DNA segment, který má být klonován má obvykle lepivé konce. **DNA ligasa** je enzym katalyzující spojení segmentu DNA s klonovacím vektorem.
- **Transformace** - exprese chimerního plasmidu do hostitelské bakterie.

Konstrukce rekombinantní DNA molekuly



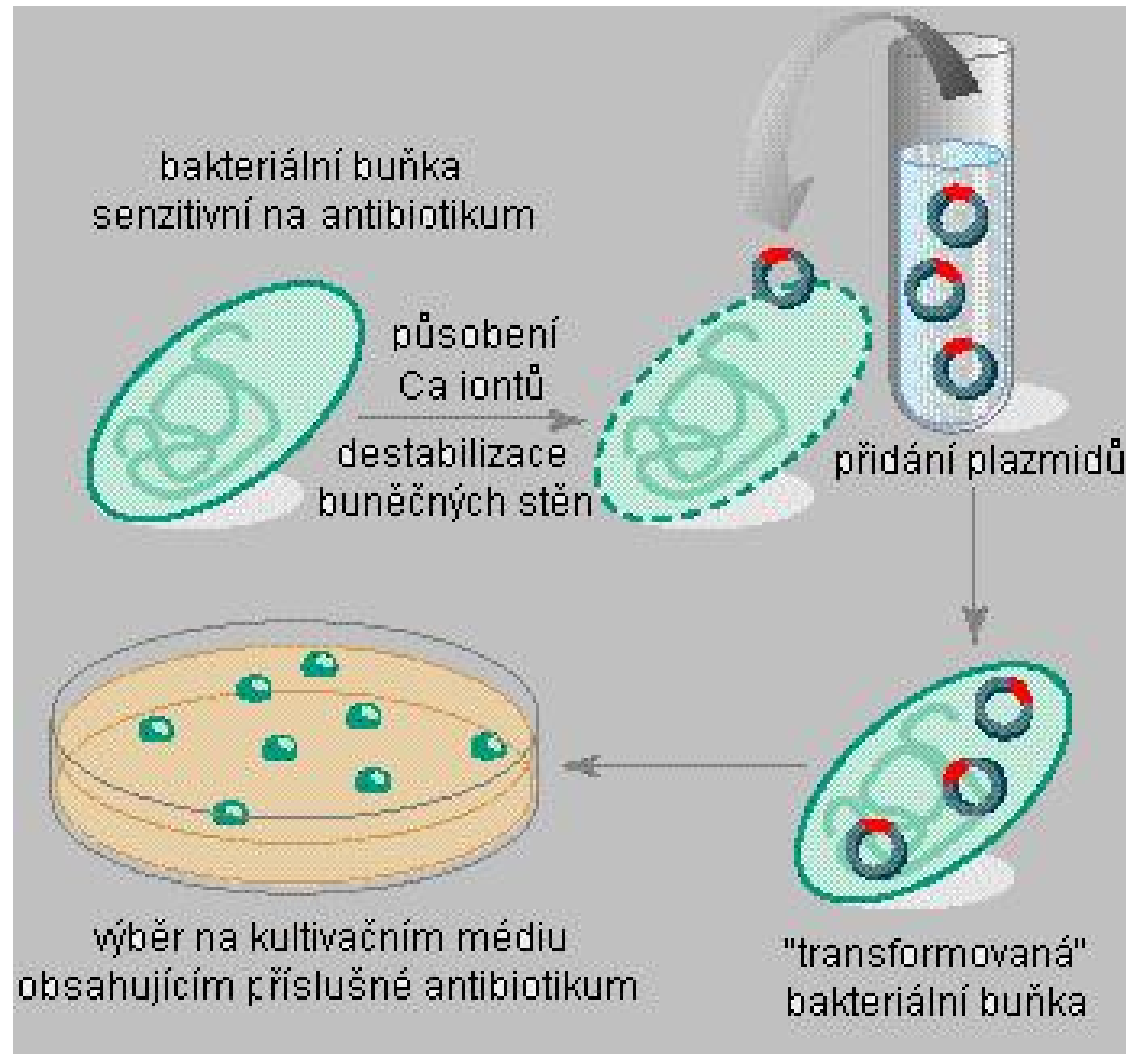
Inzerce DNA do plasmidu



Namnožení DNA

- Molekulární klonování **in vivo**
 - - pomocí prokaryot (bakterie, např. E. coli),
 - - pomocí eukaryot (kvasinky),
 - - pomocí buněk savců rostoucích v tkáňových kulturách.
- Molekulární klonování **in vitro**
 - - procesem polymerázové řetězové reakce (PCR)

Schéma bakteriální transformace



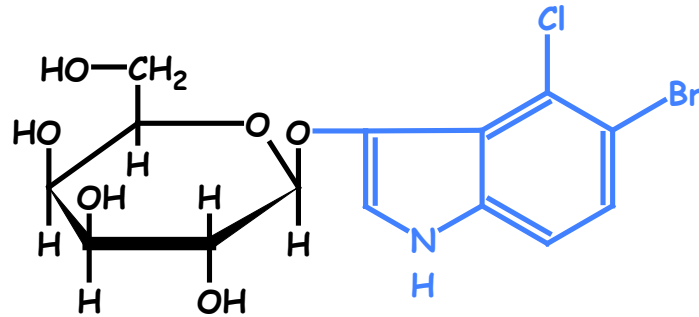
Transformace cizí DNA do bakterie

- Úspěšnost transformace cizí DNA je sledována na základě **marker genů**, které **novou** buněčnou kolonii odlišují na kultivačním mediu od kolonií bez přenesené DNA.
- **Marker geny:**
 - pro rezistenci vůči antibiotiku;
 - pro α -peptid enzymu (funkčně významný peptid jehož odštěpení vede ke ztrátě některé funkce proteinu);
 - β -galaktosidasy (enzymy štěpící galaktosu na laktosu a glukosu) zajišťující barevnou odlišnost kolonií atd.

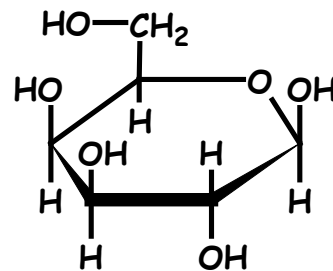
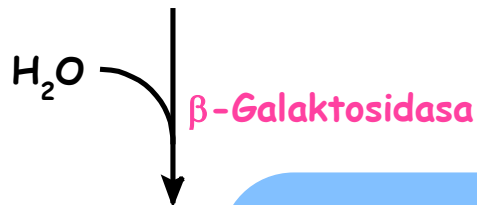
Transformace a selekce transformovaných buněk

- **Selekce** - oddělení pouze těch hostitelských organismů, které byly transformovány a obsahují správně konstruovaný vektor.
- V případě plasmidového vektoru lze provést výběr za použití antibiotik a nebo chromogenních látek.
- Např. *lacZ* gen v pUC18 plasmidu kóduje enzym β -galaktosidasu, který štěpí bezbarvou látku **X-gal** na modrý produkt.
- E.coli transformované nemodifikovaným pUC18 plasmidem tvoří modré kolonie.
- V případě, že plasmid obsahuje cizí DNA inkorporovanou do jeho **polylinker** regionu, jsou kolonie bezbarvé, protože kódující sekvence *lacZ* byla přerušena netvoří se funkční β -galaktosidasa.
- Bakterie, do kterých nebyl vnesen plasmid jsou také bezbarvé. Tyto bakterie mohou být odděleny přidáním antibiotika ampicilinu do růstového média (plasmid obsahuje gen rezistence k ampicilinu).
- Závěr: Úspěšně transformované buňky tvoří bezbarvé kolonie za přítomnosti ampicilinu. **Geny jako *amp^R* jsou nazývány selekční geny.**

X-gal jako chromogen pro β -galaktosidasu

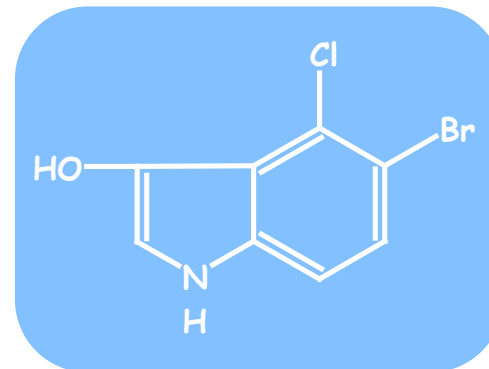


5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-gal)
(bezbarvý)



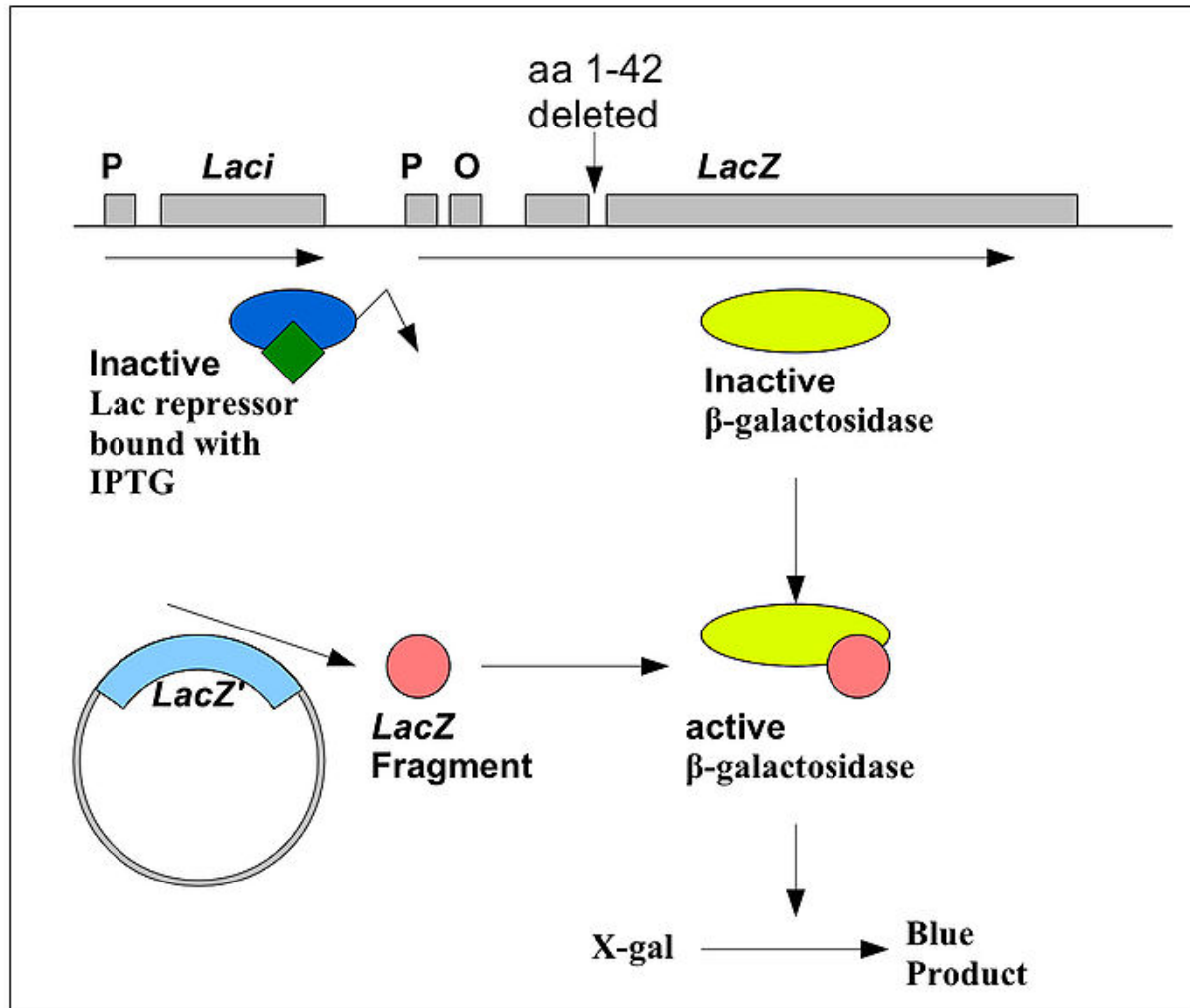
β -D-Galaktosa

+



5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol
(modrý)

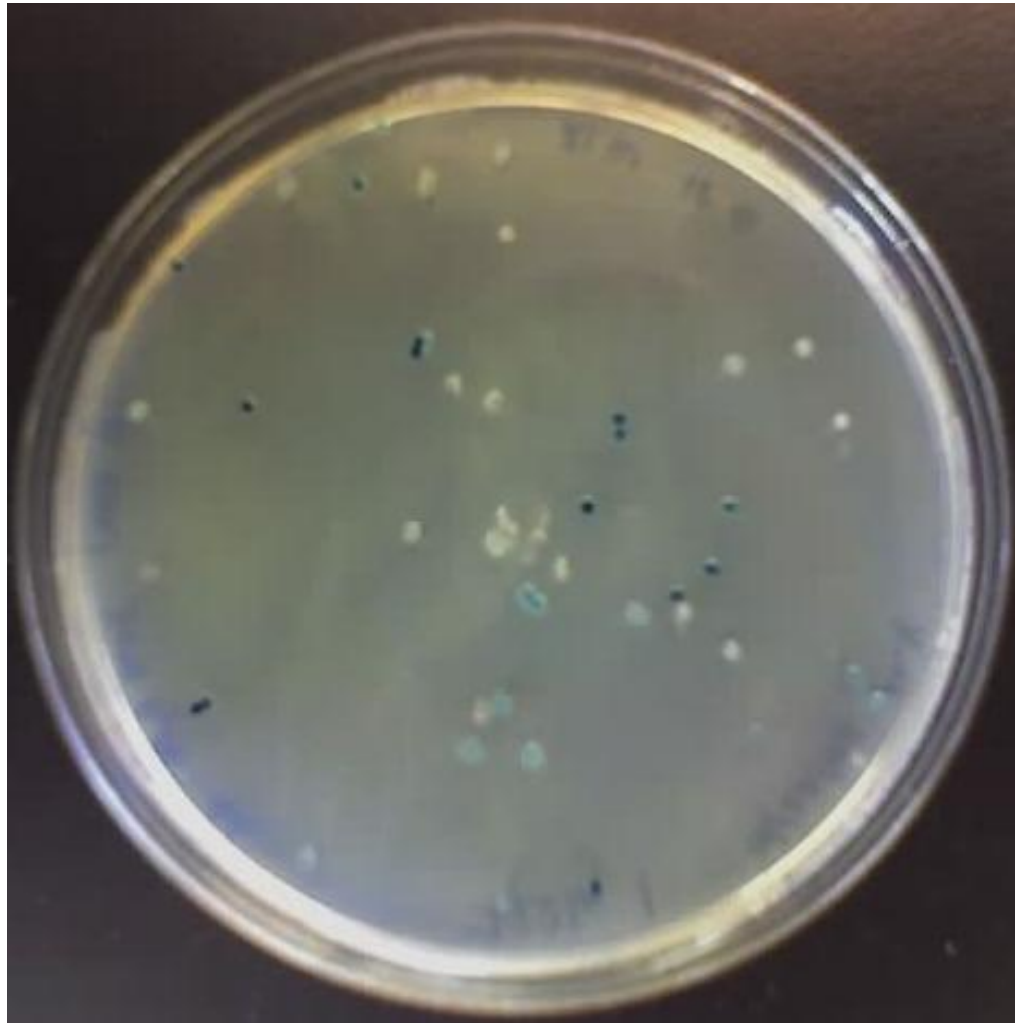
A schematic representation of the Blue-white assay, used to screen for recombinant vectors



pUC19

- This plasmid is introduced into a bacterial cell by a process called "transformation", where it can multiply and express itself. However due to the presence of polylinker(MCS) and several restriction sites, a foreign piece of DNA of choice can be introduced into it by inserting it into place in MCS region. The cells which have taken up the plasmid can be differentiated from cells which have not taken up the plasmid by growing it on media with Ampicillin. Only the cells with the plasmid containing the ampicillin resistance (*amp^R*) gene will survive. Further more, the transformed cells containing the plasmid with the gene of our interest can be distinguished from cell with the plasmid but without the gene of interest, just by looking at the colour of the colony they make on agar media. **Recombinants are white, whereas non-recombinants are blue in colour.** This is the most notable feature of pUC19.

LB agar plate showing the result of a blue white screen.



Výroba eukaryotických proteinů v bakteriích.

- Výroba lidského insulínu, lidského růstového hormonu a lidských interferonů.
- Prvním úspěchem rekombinantní technologie DNA v oblasti léků byl lidský insulin v roce 1982.
- Následují koagulační faktor VIII (chybí u jedinců s určitým druhem hemofilie), aktivátor plazminogenu (protein, který rozpouští krevní sraženiny) a lidský růstový hormon (deficitní u jedinců se zpomaleným růstem - SOMATROPIN!).
- Příprava lidského růstového hormonu (hGH -human growth hormone) v *E. coli*. hGH je jednoduchý peptidový řetězec o délce 121 aminokyselin.
- Na rozdíl od insulínu, hGH izolovaný z hypofýzy skotu nebo prasat u člověka není funkční. Až do roku 1985 byla hlavním zdrojem hGH těla zemřelých.

Výroba lidského hGH v *E. coli*.

- K dosažení exprese v *E. coli* je nutné, aby sekvence kódující hGH byla připojena k regulační oblasti *lac*-operonu (sada genů kódujících proteiny nezbytné pro růst za přítomnosti laktosy) *E. coli*, konkrétně k promotorové sekvenci a sekvenci zajišťující vazbu mRNA na ribosom.
- Pro dosažení fúze syntetické DNA kódující aminokyseliny 1 až 23 s částečnou sekvencí **cDNA**, která kóduje aminokyseliny 24 až 191, bylo použito cílové místo pro *Hae*III v nukleotidovém tripletu odpovídajícím kodonu 24.
- Tento konstrukt byl poté vložen do plasmidu obsahující signály *lac* a plasmid byl poté do *E. coli* vnesen transformací.
- hGH vyráběný v *E. coli* v rámci těchto prvních experimentů obsahoval Met na N-konci (Met je kódován iniciačním kodonem ATG).
- Přirozený hGH má na N-konci Phe. I tento hGH s Met je u člověka plně funkční.
- **Poznámka:** *Hae*III je jedním z více jako 100 restričních enzymů (endonukleas) objevených po roce 1970. Byl izolován z bakterie *Haemophilus aegyptius*, mol. hmotnost 37 126. Rozpoznávacím místem enzymu, kde se DNA štěpí, je **GGCC** nukleotidová sekvence.

Štěpení DNA restriční endonukleasou *HaeIII*

- Rozpoznávací sekvence (palindrom):
 - ...GGCC...
 - ...CCGG...
- Po štěpení:
 - ...GG CC...
 - ...CC GG...
- Nelepivé konce !

Výroba lidského hGH *E. coli*.

- Později byla ke genovému konstruktu hGH přidána DNA kódující signální peptid (aminokyselinová sekvence potřebná pro transport látek přes membrány). Jakmile byla signální sekvence přidána, byl koncový Met po transportu přes membránu odštěpován spolu se signálním peptidem.
- Tento produkt se zcela shoduje s přirozeným lidským hGH. Schválen od roku 1985.
- Prvním schváleným produktem byl v roce 1982 insulin.
- hGH, somatropin



Sylvester Stallone obhájí růstový hormon

- Slavný svalovec Sylvester Stallone se dostal do hledáčku policejních složek, když vyšlo najevo, že užívá a distribuuje zakázané látky. Po důkladném vyšetřování se však zjistilo, že se nejedná o zakázané steroidy, ale o lidský růstový hormon, který dosud patří mezi neklasifikované substance.
- Lidský růstový hormon známý jako hGH využívají ve velké míře jako povolený doping především sportovci. Dokud se přesně nezjistí, jaký má růstový hormon dopad na lidský organismus, bude patřit mezi povolené látky.

Výroba eukaryotických proteinů v bakteriích.

- Dostupné syntetické růstové hormony v USA (a jejich výrobci) zahrnují Nutropin (Genentech), Humatrope (Lilly), Genotropin (Pfizer), Norditropin (Novo), a Saizen (Serono). Produkty jsou téměř totožné ve složení, účinnosti a ceně.
- V roce 2005 izraelská společnost, Teva, nabídla Tev-Tropin v USA za nižší cenu.
- Tím pádem dnes asi 30 000 Američanů dostává na předpis injekce HGH, z nichž jedna je přijde na v průměru 25,- USD. Jsou předepisovány 3 denně.

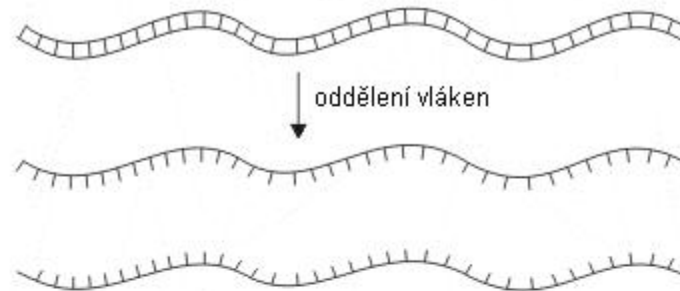
V České republice GENOTROPIN (Pfizer, injekčně).

Polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction - PCR)

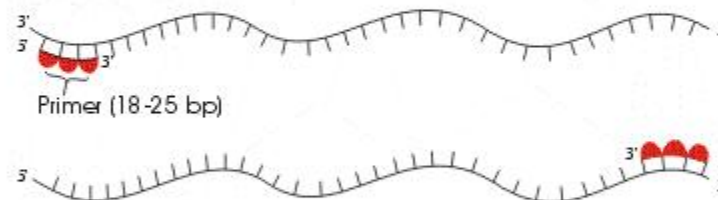
- Amplifikace (znásobení) DNA.
- Segmenty DNA do 6 kb mohou být zmnoženy metodou vyvinutou v roce 1985 K. Mullisem.
- Princip: DNA vzorek je rozdělen na jednotlivá vlákna a inkubován s DNA polymerasou, v reakční směsi jsou všechny čtyři dNTP, dva oligonukleotidové primery, jejichž sekvence je komplementární se segmentem DNA, který chceme zmnožit. Primery směřují DNA polymerasu syntetizovat komplementární vlákna k původní DNA.
- **Používá se tepelně stabilní *Taq* polymerasa izolovaná z *Thermus aquaticus*, která je stabilní do 95 °C.**
- Proces probíhá cyklicky. Po dvaceti cyklech se zvýší množství požadované sekvence DNA asi milionkrát (2^{20}).
- Metoda umožňuje amplifikovat DNA z 10^5 buněk a může být použita bez předchozí purifikace DNA.
- Používá se i klinicky k diagnostice onemocnění a k identifikaci lidí ze vzorků vlasů, spermií apod. (**forensní chemie**).

Princip polymerasové řetězové reakce

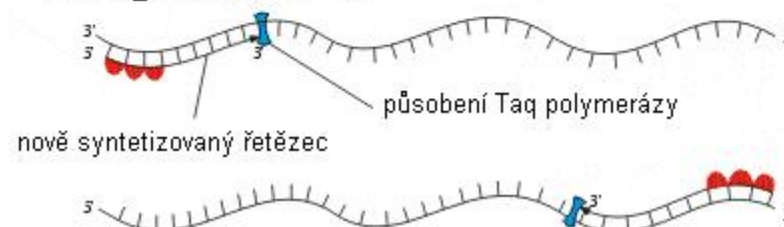
Denaturace (95°C):



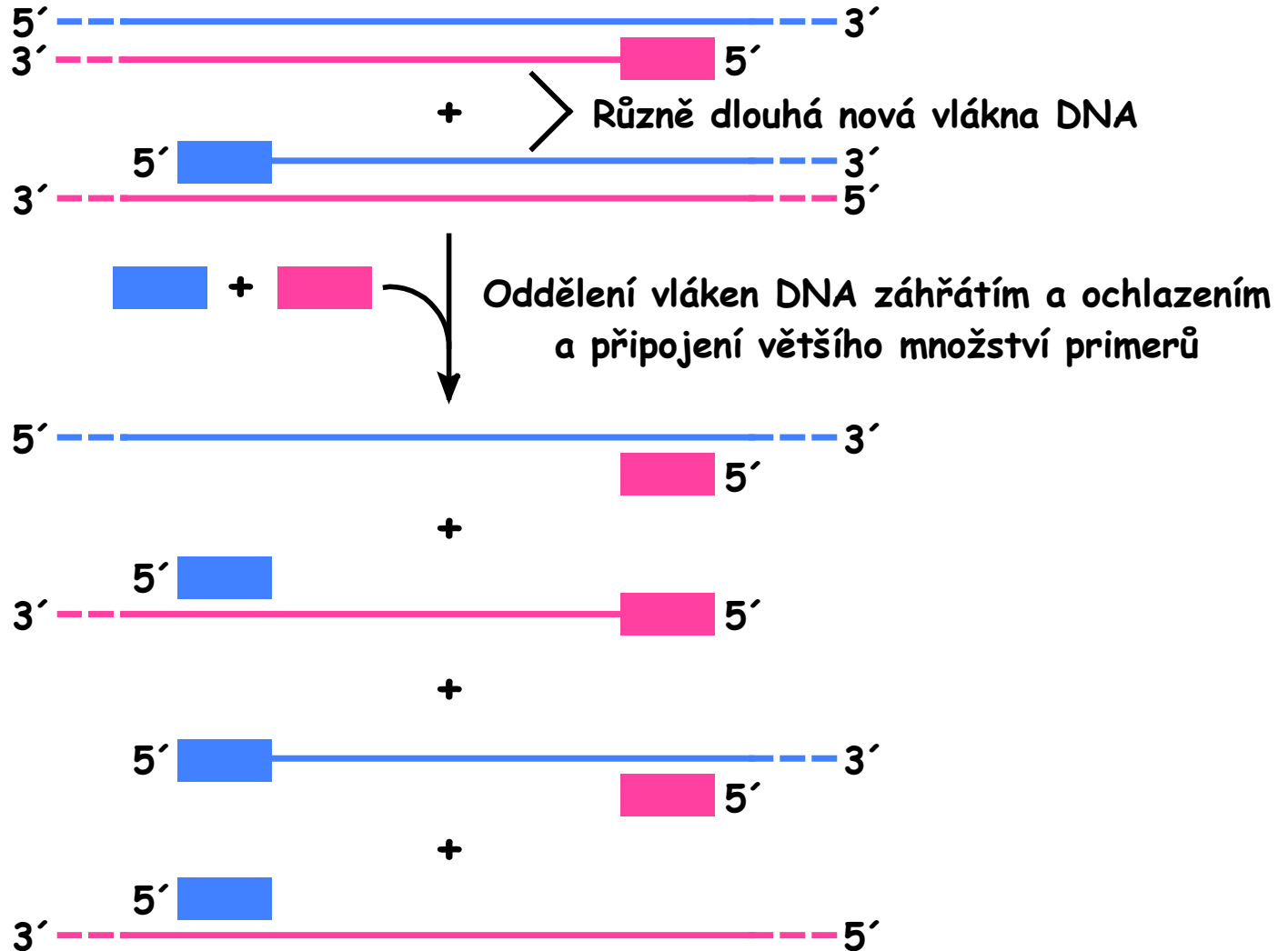
Annealing (54-63°C):



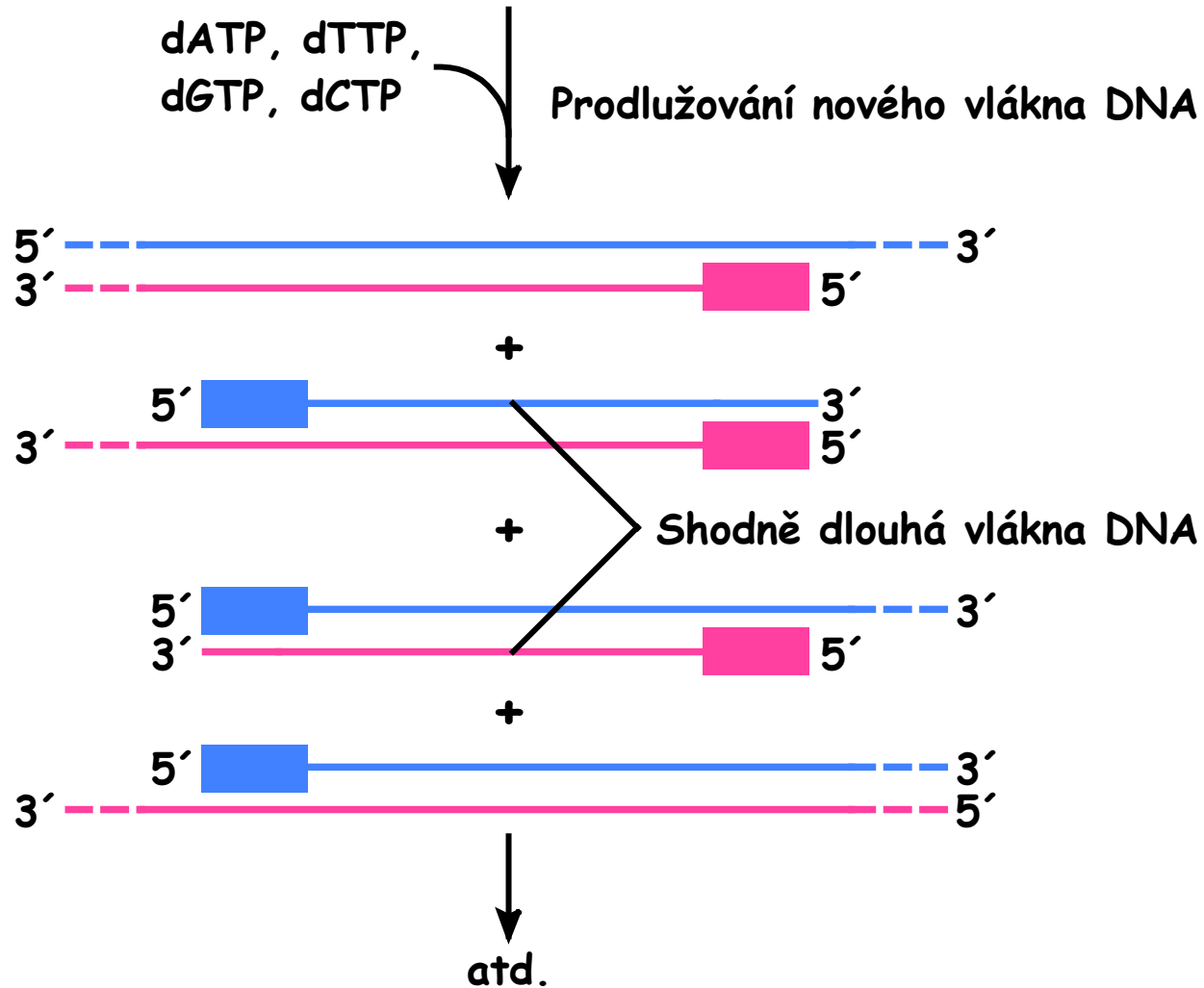
Elongace (72°C):



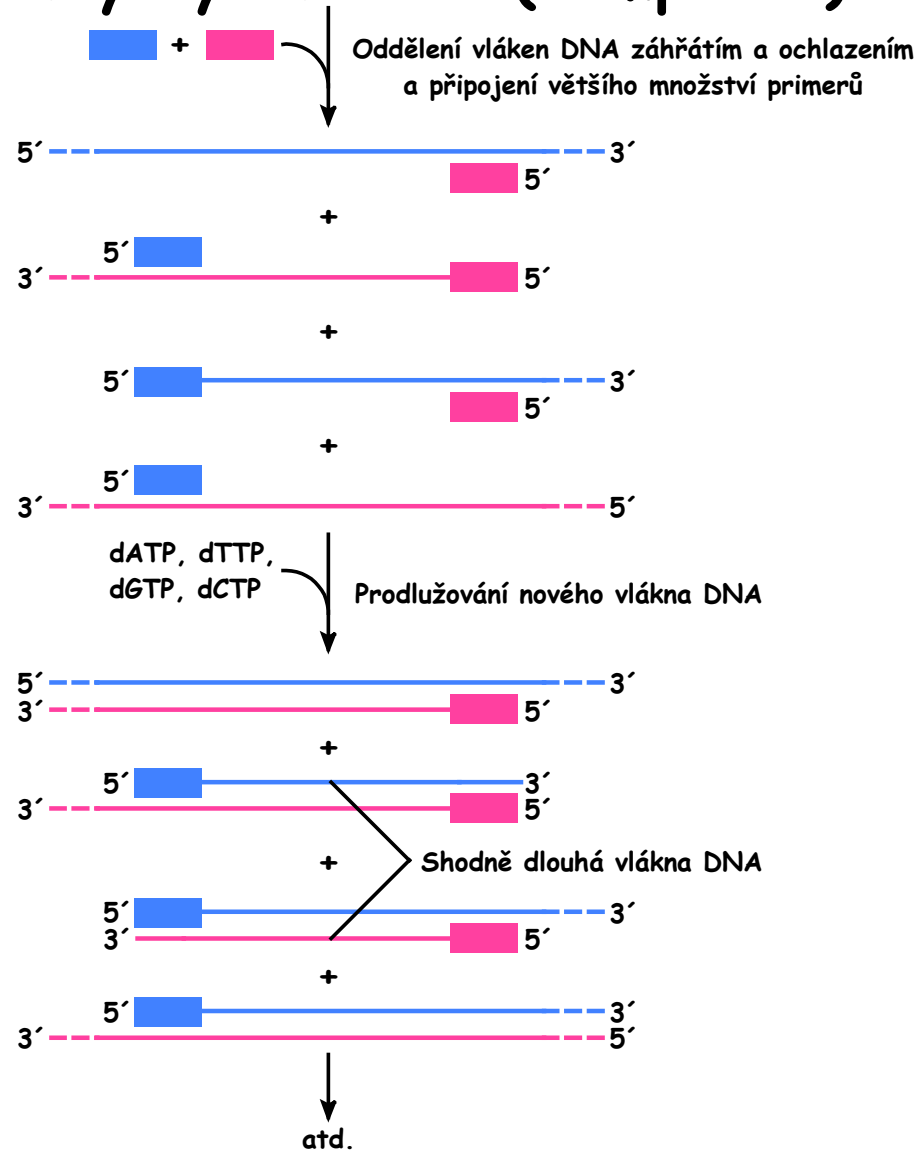
Druhý cyklus PCR (1. část)



Druhý cyklus PCR (2.část)



Druhý cyklus PCR (kompletní)



Aplikace technologie rekombinantní DNA

- **Produkce proteinů.**
- **Bakteriální proteiny** se připravují poměrně snadno. Produkce proteinů může dosáhnout až 30 % hostitelských proteinů. Takovéto geneticky upravené organismy nazýváme **nadprodukční**.
- **Bakteriální produkce eukaryotních proteinů** je možná jen tehdy, když rekombinantní DNA nesoucí sekvenci kódující požadovaný protein také obsahuje bakteriální transkripční a translační kontrolní sekvenci. Mnohé eukaryotní geny jsou velké a obsahují části zvané **introny**, které jsou obvykle před translací odstřiženy. Bakterie takový systém nemají. Mnoho proteinů je také posttranslačně modifikováno, aby byly funkční.
- Obchází se použitím eukaryotních hostitelů jako jsou kvasinky nebo živočišné buňky.
- **Bodová mutageneze** (site directed mutagenesis). Bodová mutageneze byla vyvinuta M. Smithem. Po izolaci genu je možné modifikovat nukleotidovou sekvenci a změnit tak aminokyselinovou sekvenci v kódovaném proteinu.

Transgenní organismy

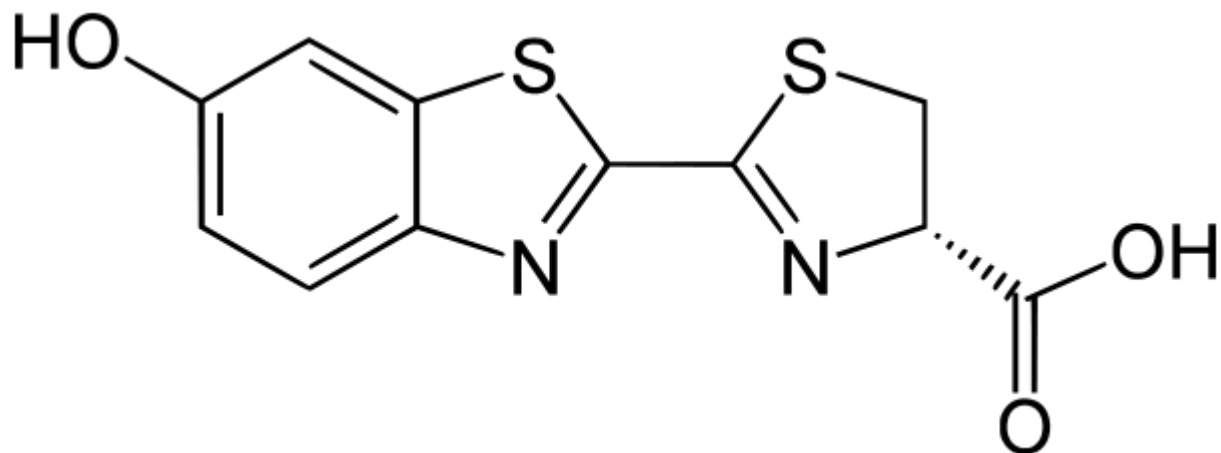
- **Transgenní organismy.** Multibuněčný organismus je exprimován genem z jiného organismu - je **transgenní**. Transplantovaný cizí gen se nazývá **transgen**.
- Nejúspěšnějším transgenním organismem je kukuřice, která byla geneticky modifikována pro produkci proteinu, který je toxický pro požerový hmyz.
- Toxin je syntetizován půdním mikroblem *Bacillus thuringiensis*. Gen toxinu byl klonován do kukuřice - Bt kukuřice.
- Do rýže byly naklonovány geny pro syntézu β -karotenu a gen pro protein ukládající Fe, ferritin. Tzv. zlatá rýže.
- Genová terapie je transfer nového genetického materiálu do buněk jednotlivců za účelem terapie.
- Jediným dosud známým výsledkem genové terapie je posílení nebo prakticky dodání části nutné pro funkci dětského imunitního systému.
- Do buněk kostní dřeně nemocných se vnese gen pro normální γ -C cytokinový receptor. Onemocnění zvané SCID-X1 (severe combined immunodeficiency disease).
- **Cytokiny** jsou malé peptidy produkované řadou různých buněk. Jsou to jakési signální molekuly působící hlavně v imunitním systému, kde ovlivňují růst, diferenciaci a chování buněk.

„Autoluminograph“ transgenní tabák obsahující gen luciferasy ze světlušky. Příklad možnosti genetického inženýrství.



Luciferasa je obecný název pro třídu oxidačních enzymů spojených s bioluminiscencí. Nejznámější je luciferasa světlušek (EC 1.13.12.7) *Photinus pyralis*.

- Luciferasová reakce (další složka Ca^{2+}):
- Luciferin + ATP \rightarrow luciferyl adenylate + PP_i
- Luciferyl adenylate + O₂ \rightarrow oxyluciferin + AMP + light
- Lucifer (z latiny) = světloňoš



Světluška (*Photinus pyralis*)



GMO rostliny a živočichové v ČR

- V České republice je doposud povoleno komerční pěstování jen geneticky modifikované kukuřice firmy Monsanto typu MON 810, do které byla vložena bakteriální dědičná informace způsobující produkci tzv. Bt-toxinu, který je jedovatý pro určité druhy hmyzu.
- Zatímco v Evropské unii výměr zemědělské půdy oseté GM plodinami v roce 2008 poklesl, v Česku se osetá plocha zvýšila a byla druhá nejvyšší v EU po Španělsku.

- Glofish, první geneticky modifikovaný živočich, který se prodává jako domácí zvíře. Dole původní zebra fish.



Proč byly připraveny fluoreskující rybičky ??

- The original zebrafish (*Danio rerio*) from which the GloFish was developed is a native of rivers in India and Bangladesh. It measures three centimeters long and has gold and dark blue stripes, and over 200 million have been sold in the last 50 years in the United States ornamental fish market. Despite the number of zebrafish sold, they have never established any reproducing populations in the United States, primarily because they are tropical fish, unable to survive in the temperate North American climate.
- In 1999, Dr. Zhiyuan Gong and his colleagues at the National University of Singapore were working with a gene called green fluorescent protein (GFP), originally extracted from a jellyfish (medúza), that naturally produced bright green bioluminescence. They inserted the gene into a zebrafish embryo, allowing it to integrate into the zebrafish's genome, which caused the fish to be brightly fluorescent under both natural white light and ultraviolet light. **Their goal was to develop a fish that could detect pollution by selectively fluorescing in the presence of environmental toxins. The development of the always fluorescing fish was the first step in this process.** Shortly thereafter, his team developed a line of red fluorescent zebra fish by adding a gene from a sea coral, and yellow fluorescent zebra fish, by adding a variant of the jellyfish gene. Later, a team of Taiwanese researchers at the National University of Taiwan, headed by Professor Huai-Jen Tsai (蔡懷禎), succeeded in creating a medaka (rice fish) with a fluorescent green color.

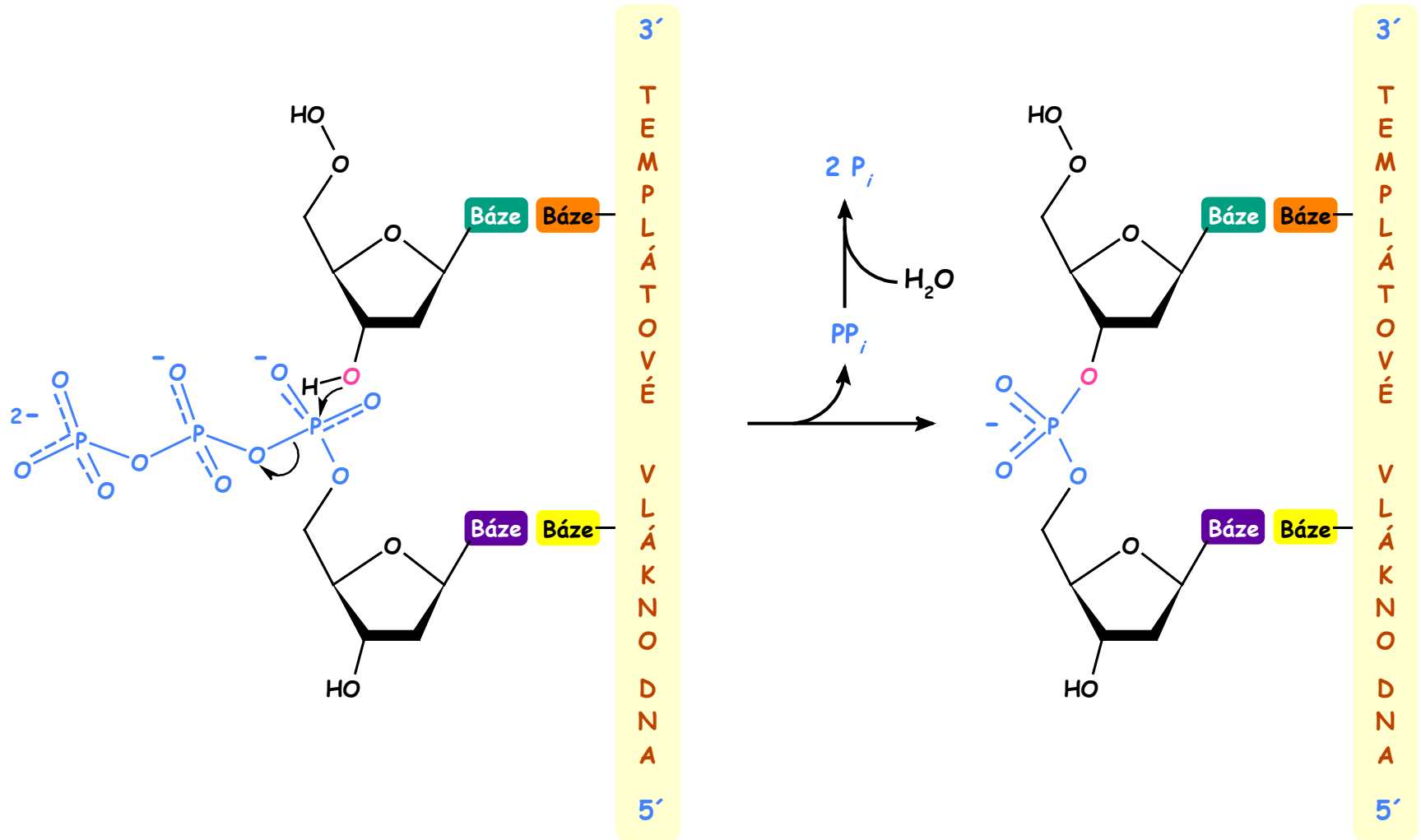
Ribonukleové kyseliny - RNA

- Tři typy ribonukleových kyselin: informační (mRNA), přenosová (tRNA) a ribosomální (rRNA).
- **Informační mRNA** je templát pro syntézu proteinů nebo translaci. Molekuly mRNA jsou produkovány z každého genu nebo skupiny genů. mRNA je heterogenní třída molekul.
- **Přenosová tRNA** přenáší aktivované aminokyseliny na ribosomy k syntéze proteinů. Máme 20 proteinogenních aminokyselin a tedy minimálně dvacet tRNA. tRNA sestává z asi 75 nukleotidů (hmotnost asi 25 kDa) - nejmenší RNA.
- **Ribosomální rRNA** je hlavní součástí ribosomů, hraje obě role při syntéze proteinů, katalytickou a strukturální. Např. v *E. coli* jsou tři typy rRNA označené 23S, 16S a 5S podle sedimentačního koeficientu. V každém ribosomu jsou všechny tři rRNA.

Všechny buněčné RNA jsou syntetizovány RNA polymerasou

- Syntéza RNA z DNA templátu se nazývá **transkripce** a je katalyzována enzymem **RNA polymerasa**.
- Pro funkci **RNA polymerasy** jsou nutné:
 - Templát, preferuje dvojšroubovici DNA. Jednovláknová slouží také jako templát. Templátem není RNA ani hybrid RNA-DNA.
 - Aktivované prekurzory, všechny čtyři ribonukleosidtrifosfáty - ATP, GTP, UTP a CTP.
 - Bivalentní kovové ionty Mg^{2+} nebo Mn^{2+} .
 - Směr syntézy je $5' \rightarrow 3'$. Syntéza je poháněna hydrolýzou PP_i .
 - RNA polymerasa nepotřebuje primer.
 - Syntéza řetězců RNA probíhá obdobně jako syntéza řetězců DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$, přičemž ribonukleotidy se připojují k $3'$ -OH skupině na konci řetězce.
 - RNA polymerasa nemá nukleasovou aktivitu jakou má DNA polymerasa a proto nemůže vyštípnout chybně vřazený nukleotid.

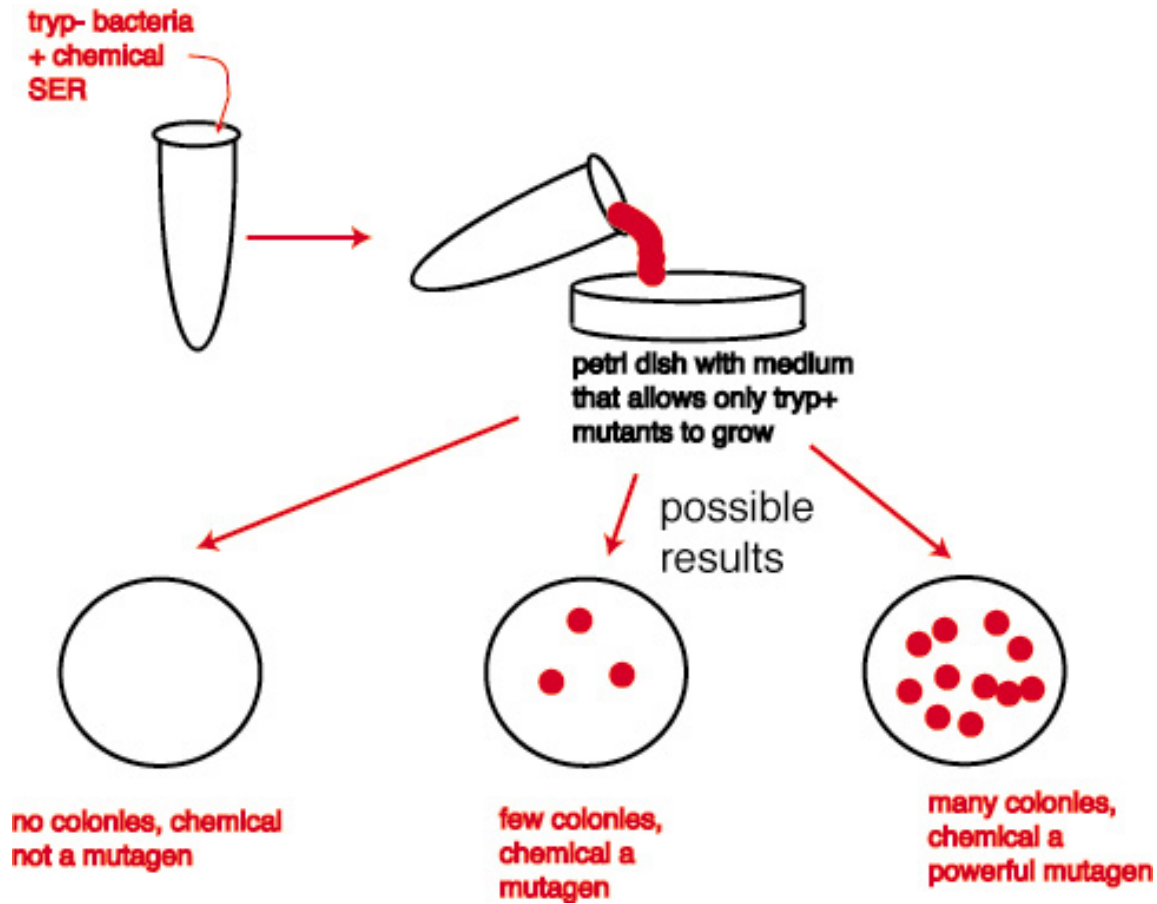
Transkripce, tvorba mRNA - RNA polymerasová reakce



Amesův test

- Tzv. **Amesův test** slouží pro identifikaci mutageních látek. V 60. letech 20.století vyvinul Bruce Ames test, který dosud nese jeho jméno a stále je využíván jako rychlý a relativně levný způsob posouzení mutagenního potenciálu chemických látek.
- Amesův test využívá bakterii *Salmonella typhimurium*, která dobře prospívá i na agaru s minimálním zastoupením živin, dokáže sama syntetizovat i všechny aminokyseliny. Ames vyšlechtil kmen
- *S. typhimurium*, který má **mutantní gen pro syntézu aminokyseliny histidinu**. Pokud není tato aminokyselina přidána do živného média, nemůže tento his⁻ kmen přežít. Princip Amesova testu je potom založen za předpokladu, že aplikace mutagenu vede k mutacím mj. i v tomto defektním genu, z nichž některé vrátí jeho nositeli funkci syntézy histidinu (**reverzní mutace**). Po vystavení his⁻ *S. typhimurium* testované látky jsou bakterie umístěny na agar, který neobsahuje histidin. Po inkubaci se určí poměr mezi zastoupením přežívajících kontrolních bakterií, které nebyly exponovány mutagenu (a ve kterých došlo ke spontánní mutaci) a přežívajících bakterií exponovaných. Pokud došlo u příliš mnoha bakterií v exponované skupině k reverzním mutacím, **považuje se tento nález za průkaz mutagenicity testované látky.**

Amesův test

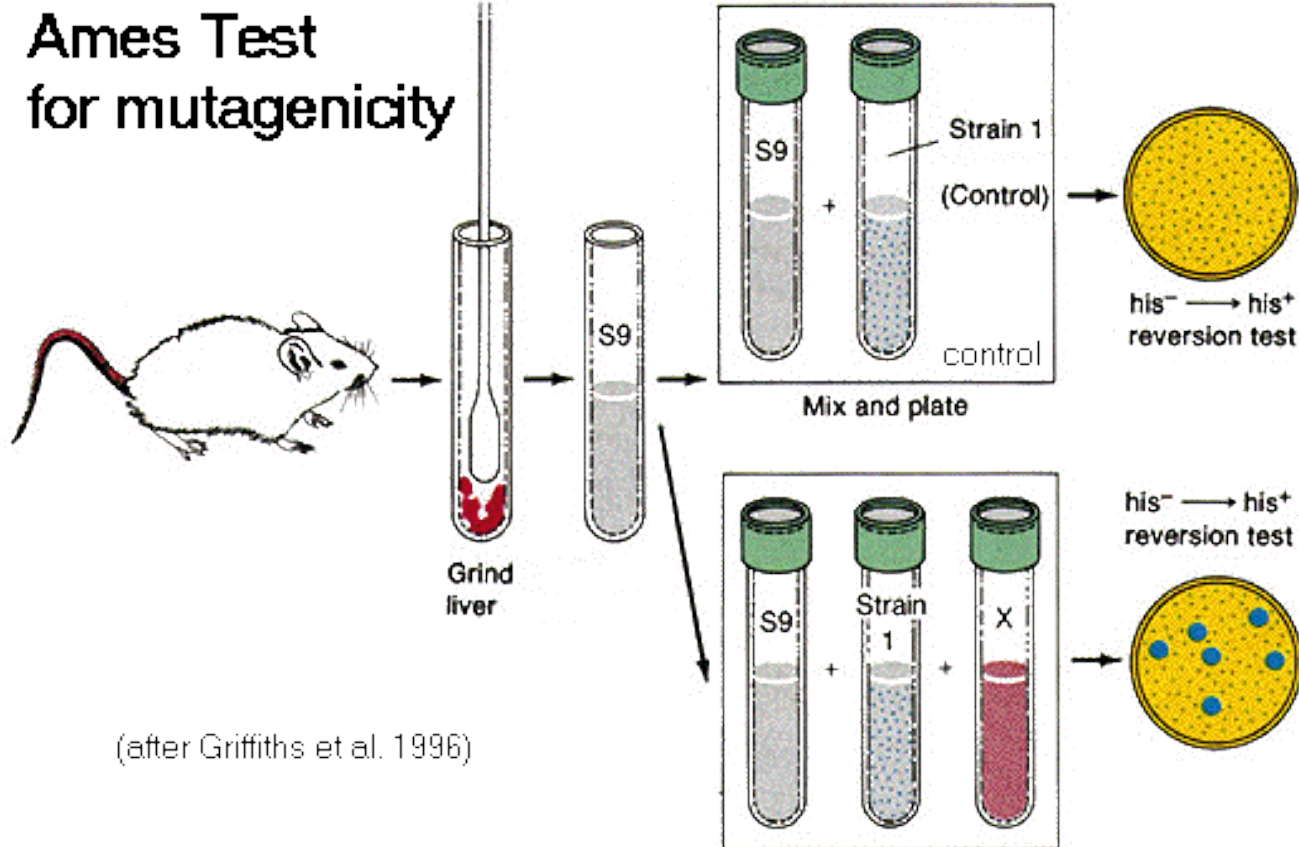


Amesův test mutagenity v jaterním homogenátu.

Extrakt krysích jater simuluje metabolismus látky v těle. Některé sloučeniny jako např. benzo[a]pyren nejsou mutagenní, ale mutagenní mohou být jejich metabolické produkty.

Test trvá cca 48 hod.

S9=aktivní jaterní extrakt, X=mutagení extrakt.



Mutagenita NaNO_3

- Dusičnan sodný je běžnou součástí uzeného masa, slaniny, hot dogů, šunky atd.
- Sám o sobě není mutagenní, avšak v žaludku je v kyselém prostředí převeden nejprve na dusičnou kyselinu a posléze na **dusitou kyselinu** a ta je, jak prokázal Amesův test, **silným mutagenem**.