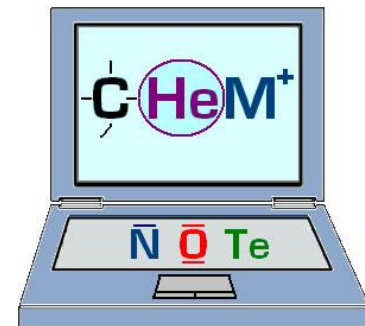




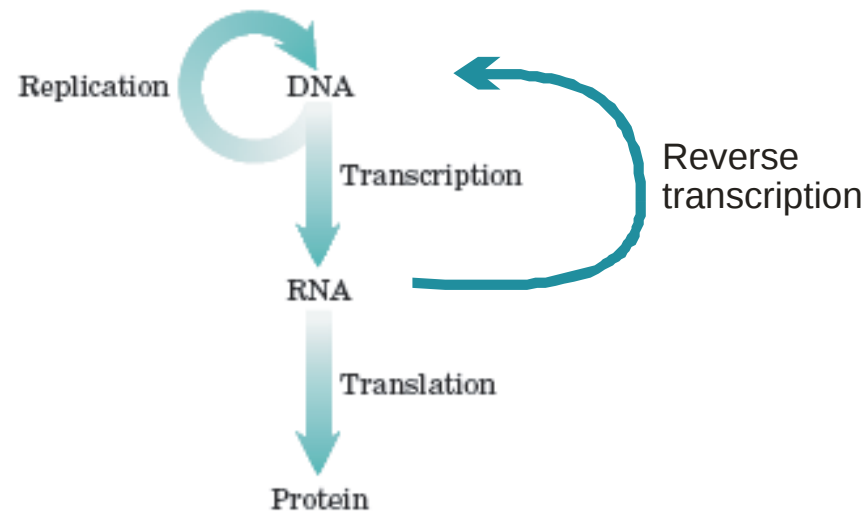
Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti



Vztah struktury a funkce nukleových kyselin. Replikace, transkripce

Nukleová kyselina

- gen – základní jednotka informace v živých systémech, segment DNA kódující informaci potřebnou pro produkci funkčního biologického produktu (většinou proteinu)



DNA vs. RNA

- DNA – uložení a přenos biologické informace, nutné pro syntézu funkčního produktu (proteinu či RNA)
- RNA – širší spektrum uplatnění
 - rRNA – součást ribosomu
 - mRNA – přenos informace z jednoho či více genů do ribosomu
 - tRNA – adaptorové molekuly pro přenos informace z mRNA do sekvence AK

Nukleotidy

- 3 složky
 - dusík obsahující báze (purin či pyrimidin)
 - pentosa
 - fosfát

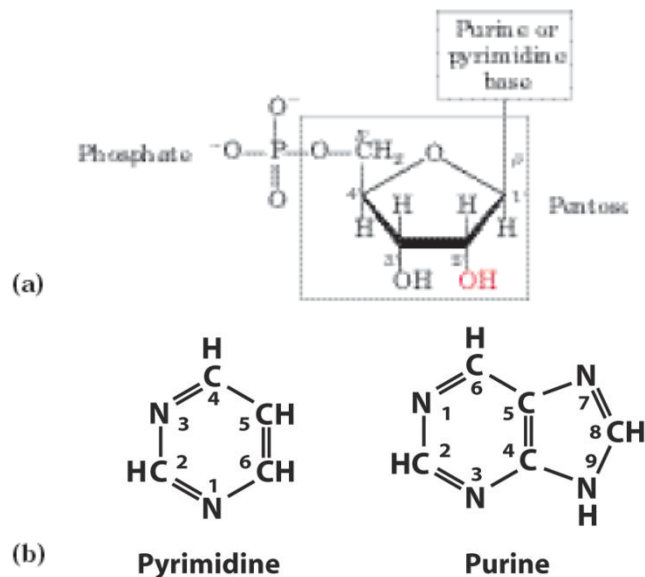


FIGURE 8-1 Structure of nucleotides. (a) General structure showing the numbering convention for the pentose ring. This is a ribonucleotide. In deoxyribonucleotides the —OH group on the 2' carbon (in red) is replaced with —H. (b) The parent compounds of the pyrimidine and purine bases of nucleotides and nucleic acids, showing the numbering conventions.

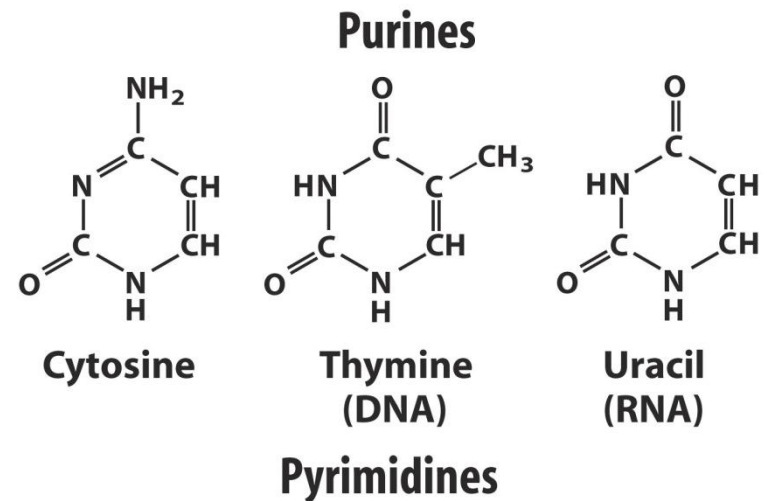
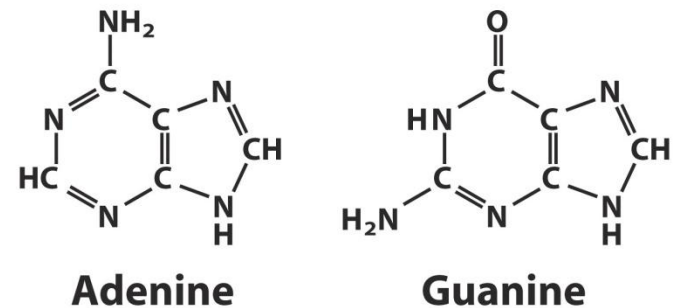


FIGURE 8-2 Major purine and pyrimidine bases of nucleic acids. Some of the common names of these bases reflect the circumstances of their discovery. Guanine, for example, was first isolated from guano (bird manure), and thymine was first isolated from thymus tissue.

Názvosloví

TABLE 8-1 Nucleotide and Nucleic Acid Nomenclature

<i>Base</i>	<i>Nucleoside</i>	<i>Nucleotide</i>	<i>Nucleic acid</i>
Purines			
Adenine	Adenosine	Adenylate	RNA
	Deoxyadenosine	Deoxyadenylate	DNA
Guanine	Guanosine	Guanylate	RNA
	Deoxyguanosine	Deoxyguanylate	DNA
Pyrimidines			
Cytosine	Cytidine	Cytidylate	RNA
	Deoxycytidine	Deoxycytidylate	DNA
Thymine	Thymidine or deoxythymidine	Thymidylate or deoxythymidylate	DNA
Uracil	Uridine	Uridylate	RNA

Minoritní báze v DNA a RNA

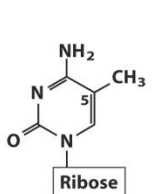
Neobvyklé či modifikované báze mívají regulační či ochrannou funkci.

DNA: methylované formy obvyklých bází

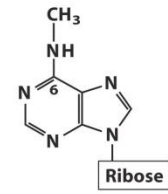
RNA: hlavně v tRNA

Buňky mohou obsahovat nukleotidy s fosfátem v jiné pozici než C₅

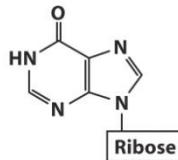
Př: ribonukleosid 2,3 – cyklický monofosfát
 adenosin 3,5 – cyklický monofosfát (cAMP)
 guanosin 3,5 – cyklický monofosfát (cGMP)



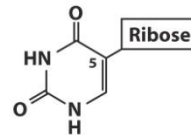
5-Methylcytidine



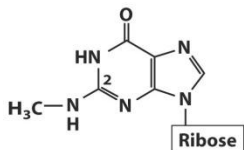
N⁶-Methyladenosine



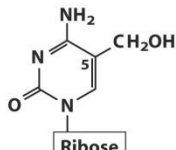
Inosine



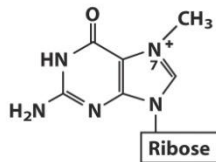
Pseudouridine



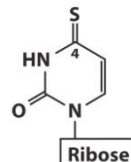
N²-Methylguanosine



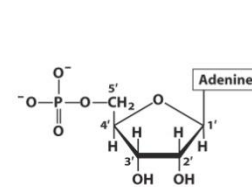
5-Hydroxymethylcytidine



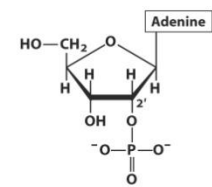
7-Methylguanosine



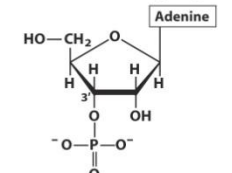
4-Thiouridine



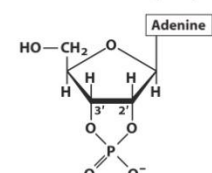
Adenosine 5'-monophosphate



Adenosine 2'-monophosphate



Adenosine 3'-monophosphate



Adenosine 2',3'-cyclic monophosphate

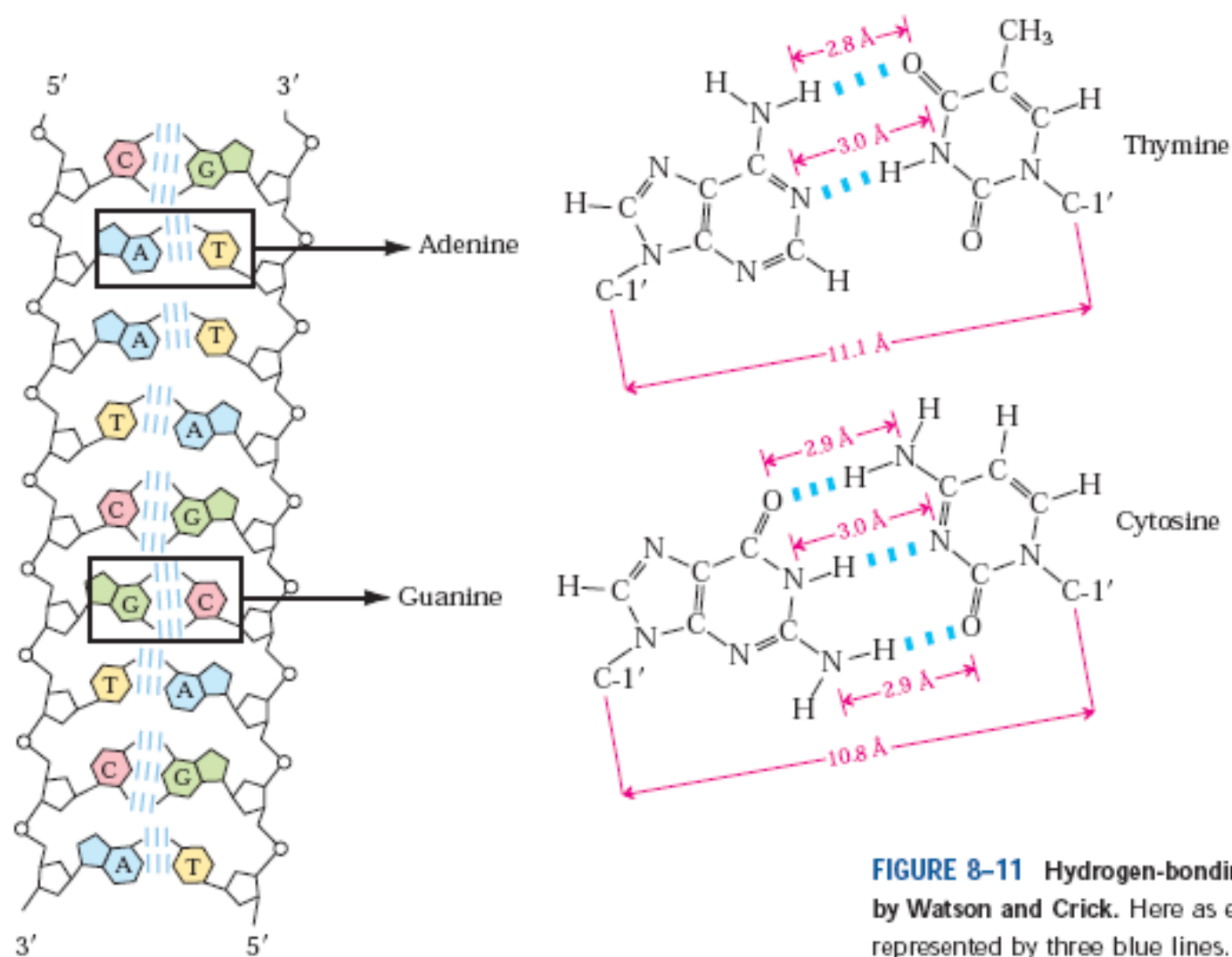
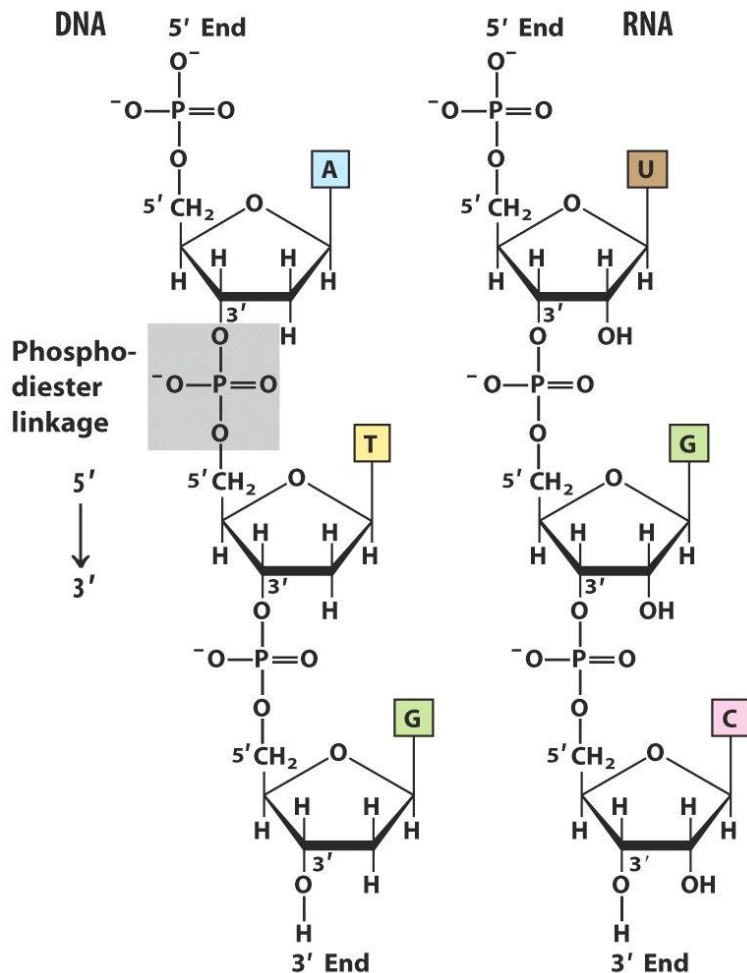


FIGURE 8-11 Hydrogen-bonding patterns in the base pairs defined by Watson and Crick. Here as elsewhere, hydrogen bonds are represented by three blue lines.

Fosfodiesterová vazba.

Vyskytuje se mezi následnými nukleotidy v NK.
Stejná u DNA i RNA.



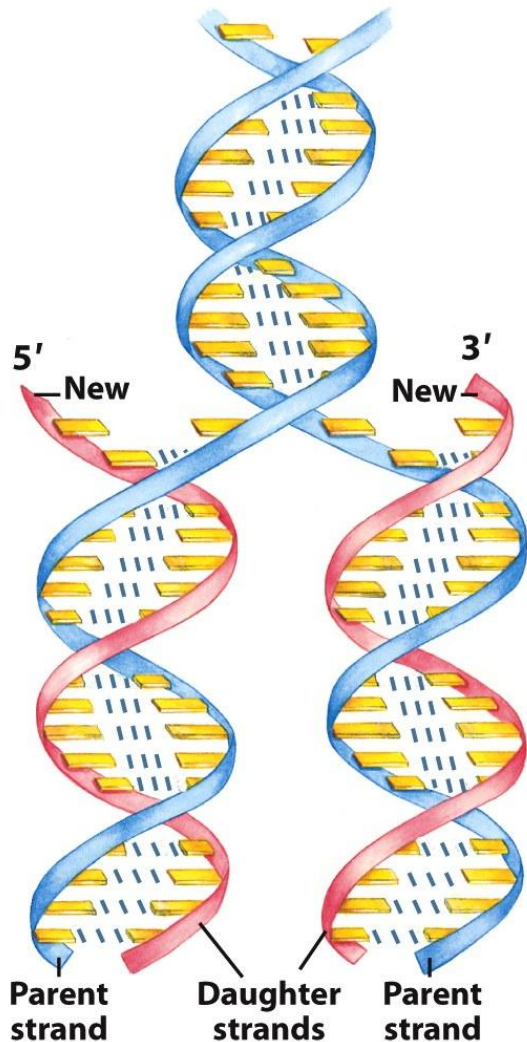
5' - fosfátová skupina jednoho nukleotidu se váže ke 3'hydroxylové skupině dalšího nukleotidu.

Konvence: struktura jednoho řetězce NK je psána s 5'koncem vlevo a 3'koncem vpravo.

Vzniká tak páteř DNA, tvořená fosfátovými a pentosovými zbytky – dusíkaté báze jsou napojeny jako postranní řetězce.

Fosfátová skupina je negativně nabitá

Model struktury naznačuje mechanismus předávání genetické informace.



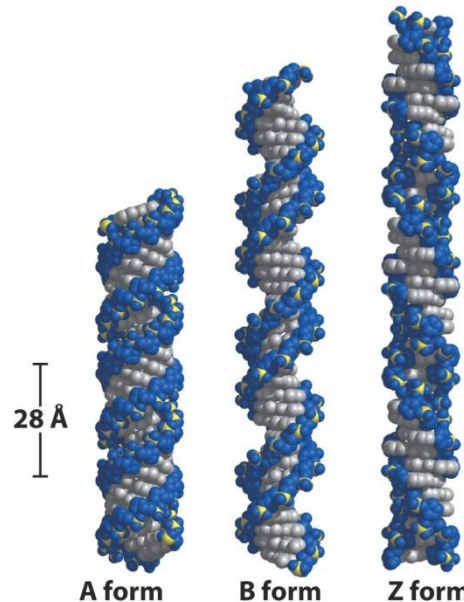
DNA je dihelix (sekundární struktura)

Hydrofilní kostra je orientována ven, báze jsou uvnitř dihelixu.

Řetězce jsou navzájem antiparalelní

Ve struktuře je patrný velký a malý žlábek.

Formy DNA



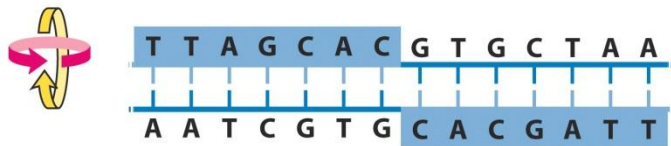
B-forma: pravotočivá
10 bází / otočka

A-forma: pravotočivá
11 bází / otočka

Z-forma: levotočivá
12 bází / otočka
Pouze 1 žlábek

Zvláštní sekvence DNA

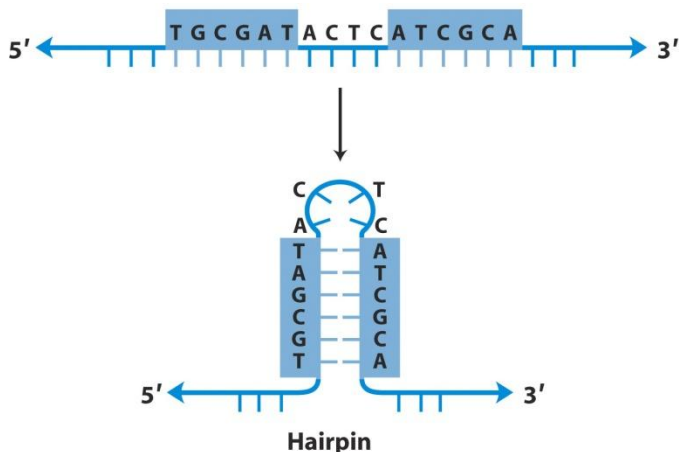
Palindrome



Mirror repeat



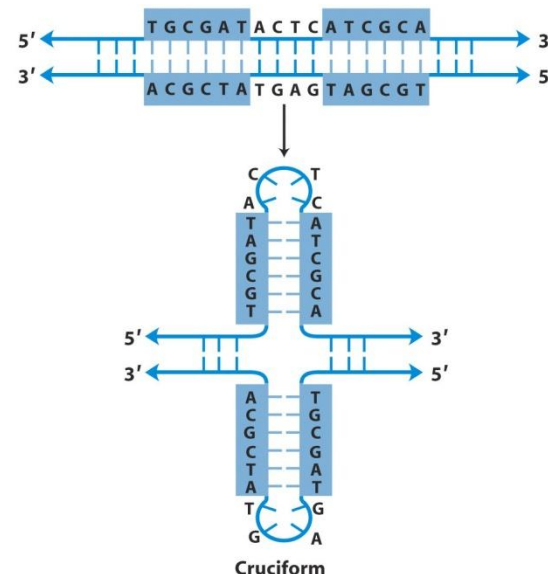
Zrcadlová sekvence sama se sebou vlásenku netvoří.



Palindromní sekvence: sled znaků, které se čtou stejně zleva doprava jako zprava doleva – tedy úsek dvoušroubovice, jehož pořadí bází je v obou vláknech totožné, ale při protisměrném čtení. Obvykle cílové sekvence pro restriční endonukleasy.

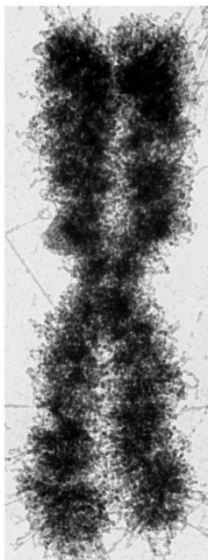
Mohou tvořit vlásenky a křížové formy (jsou samy k sobě komplementární).

Mnoho proteinů vážících se na DNA rozeznává palindromní sekvence.



Geny a chromosomy

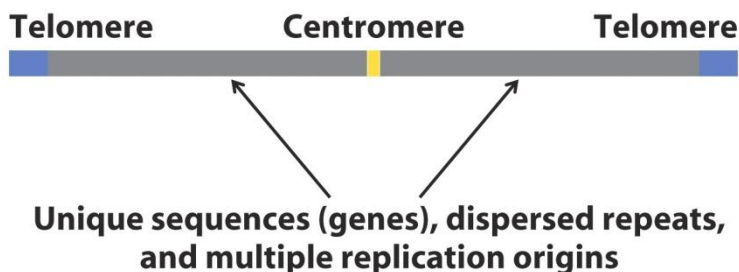
Genom – úplná genetická informace organismu – soubor všech chromosomálních genů daného organismu.



Gen – úsek molekuly DNA obsahující informaci pro syntézu funkčního biologického produktu (polypeptidu či RNA se strukturní či katalytickou funkcí).

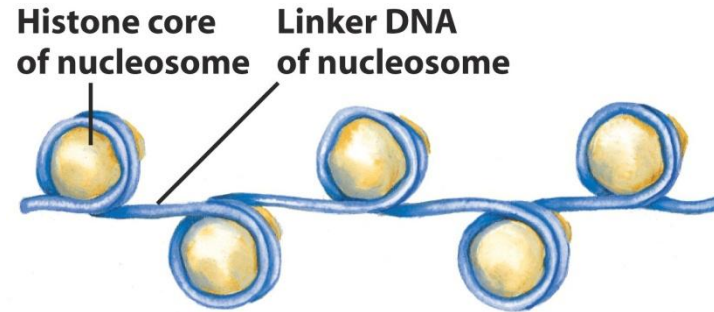
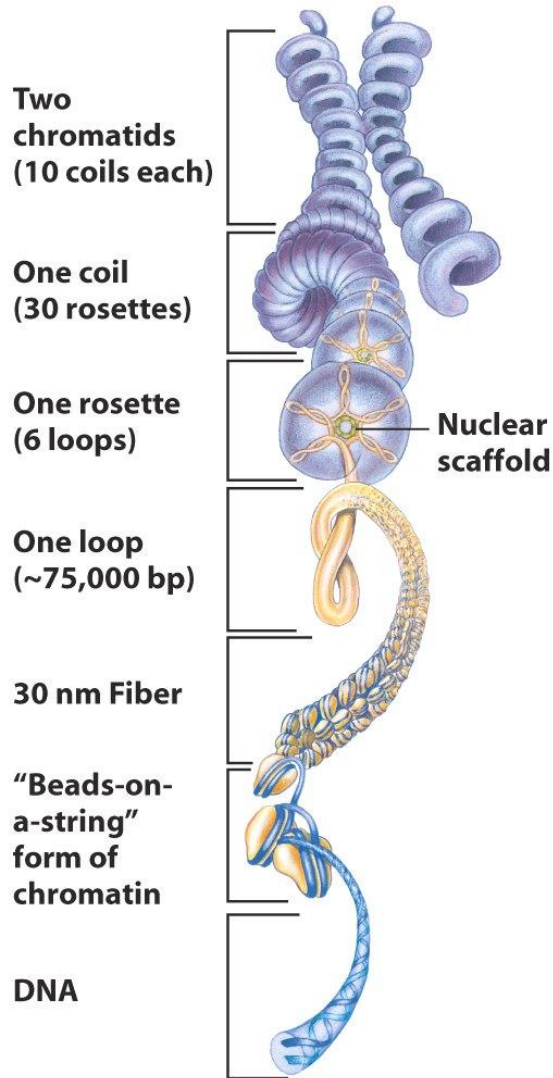
Chromosom – útvar tvořený DNA a základními proteiny (histony), obsahující základní genetický materiál buňky. Biologický druh obsahuje pro něj typickou sadu chromosomů. Lidská somatická buňka obsahuje 46 chromosomů.

Centromera – sekvence DNA zajišťující během buněčného dělení vazbu proteinů, které váží chromosom k mitotickému vřeténku – nezbytné pro dělení chromosomálních setů do dceřinných buněk.



Telomera – úseky na koncích eukaryotních chromosomů, napomáhají její stabilizaci – obsahují repetitivní sekvence. Neprobíhá u nich obyčejná replikace, tyto sekvence přidává telomerasa.

Struktura chromosomu



Chromatin

Sestává z vláken obsahujících protein a DNA. DNA je zde těsně asociována s proteiny (histony), které „balí“ DNA a uspořádávají ji do strukturních jednotek = **nukleosomů**.

Histony – malé basické proteiny (velký podíl Arg a Lys) – eukaryotní organismy obsahují 5 tříd histonů.

Ovinutí DNA kolem histonů zkracuje molekulu DNA cca 7x. Celkové zkrácení v chromosomu je ovšem asi 10 000x.

Replikace

- “kopírování”
- semikonzervativní
- DNA polymerasa
- prokaryota – jeden počátek replikace
- eukaryota – více počátků na jednom chromozomu

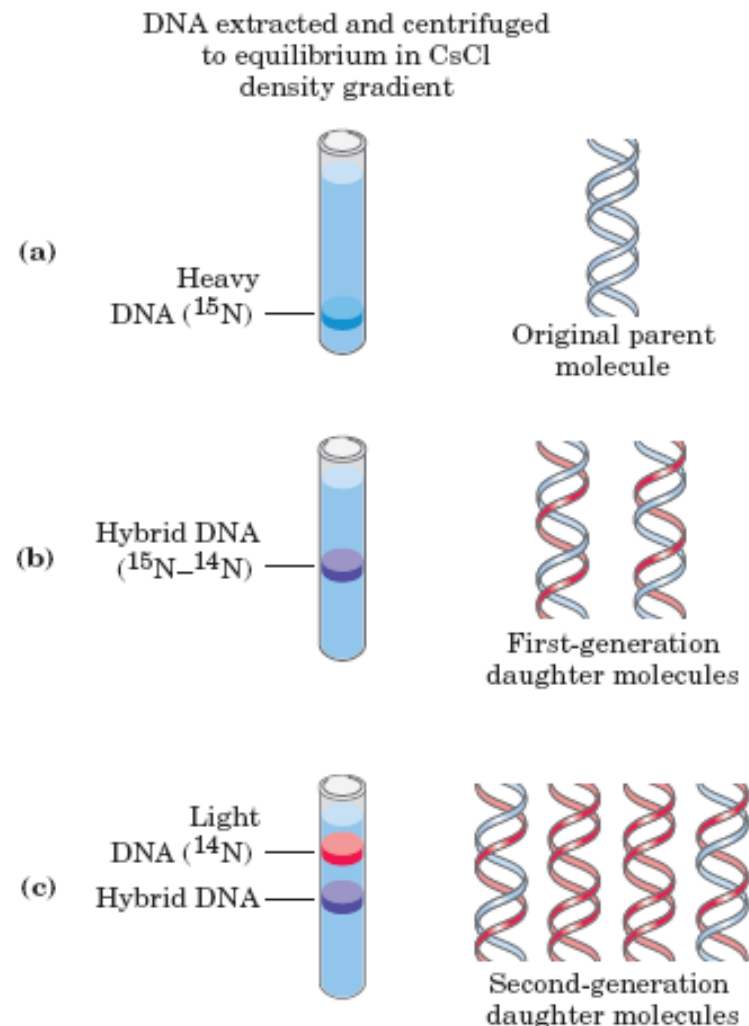


FIGURE 25-2 The Meselson-Stahl experiment. (a) Cells were grown for many generations in a medium containing only heavy nitrogen, ^{15}N , so that all the nitrogen in their DNA was ^{15}N , as shown by a single band (blue) when centrifuged in a CsCl density gradient. (b) Once the cells had been transferred to a medium containing only light nitrogen, ^{14}N , cellular DNA isolated after one generation equilibrated at a higher position in the density gradient (purple band). (c) Continuation of replication for a second generation yielded two hybrid DNAs and two light DNAs (red), confirming semiconservative replication.

prokaryotní DNA polymerasy

	I	II	III
5'→3' syntesa	+	+	+
3'→5' exonukleasová aktivita oprava chyb	+	+	+
5'→3' exonukleasová aktivita odstranění spárované RNA	+	-	-
funkce	opravy, replikace	opravy	replikace
počet v buňce	400	100	20
počet připojených nukl./min.	600	30	9000

eukaryotní DNA polymerasy

	α	β	γ	δ
lokalizace	jádro	jádro	mitochondrie	jádro
5'→3' syntesa	+	+	+	+
3'→5' exonukleasová aktivita oprava chyb	+	-	+	-
5'→3' exonukleasová aktivita odstranění spárované RNA	-	-	-	-
funkce	replikace jaderné DNA opozďující se řet.	opravy jaderné DNA	replikace mitochondriální DNA	replikace jaderné DNA vedoucí řet.

Proteiny potřebné pro replikaci

PROKARYOTA	EUKARYOTA
DNA polymerasy	
I, II, III	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$
DNA ligasa	
spojování Okazakiho fragmentů	spojování Okazakiho fragmentů
DNA helikasa	
odvíjení komplementárních řetězců více typů, komplex s primasou	odvíjení komplementárních řetězců
primasa	
syntesa RNA primeru v komplexu s helikasou, aktivace	syntesa RNA primeru v komplexu s DNA polymerasou α
RNAsa	
- (její funkci má polym. I)	odstranění primeru
gyrasa	
změna nadšroubicových závitů	
telomerasa	
-	dopolymerizování 5'-konce, nahrazení primeru
SSB proteiny	
ochrana a stabilizace jednořetězcové DNA	ochrana a stabilizace jednořetězcové DNA

Mechanismus replikace

- protein DnaA se naváže na počátek replikace (ori)
- helikasa se naváže před místo pro tvorby replikační vidličky a začne tvořit jednořetězcové DNA
- na jednořetězcové DNA se váže protein SSB, brání opětovné asociaci
- vazba primasy, syntesa RNA primerů
- vazba dimeru DNA polymerasy III k počátku replikace, extenze RNA primerů
- kontinuální prodlužování vedoucího řetězce, tvorba Okazakiho fragmentů na opoždujícím se řetězci, DNA polym III
- nahrazení RNA primerů DNA pomocí DNA polymerasy I na opoždujícím se řetězci
- spojení Okazakiho fragmentů DNA ligasou
- terminace na specifických sekvencích, vazba Tus proteinu, inhibuje helikasu a tím zastaví postup vidlice.
- postreplikační úpravy – methylace

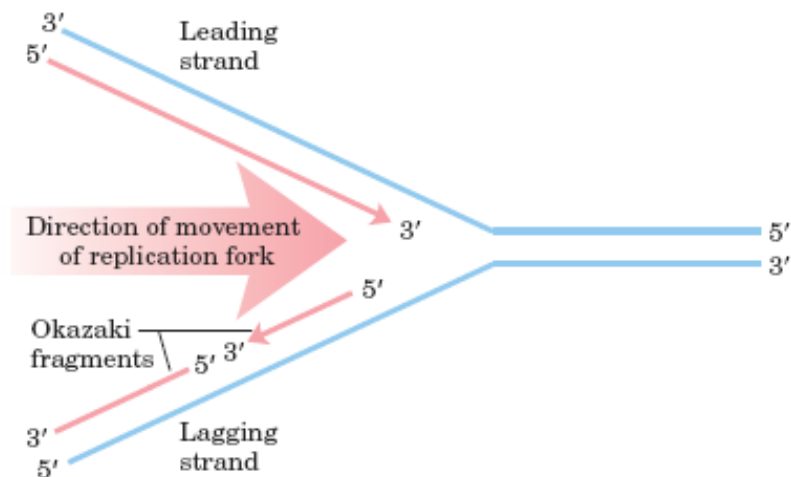


FIGURE 25-4 Defining DNA strands at the replication fork. A new DNA strand (red) is always synthesized in the 5'→3' direction. The template is read in the opposite direction, 3'→5'. The leading strand is continuously synthesized in the direction taken by the replication fork. The other strand, the lagging strand, is synthesized discontinuously in short pieces (Okazaki fragments) in a direction opposite to that in which the replication fork moves. The Okazaki fragments are spliced together by DNA ligase. In bacteria, Okazaki fragments are ~1,000 to 2,000 nucleotides long. In eukaryotic cells, they are 150 to 200 nucleotides long.



25_nucleotide_polym.swf

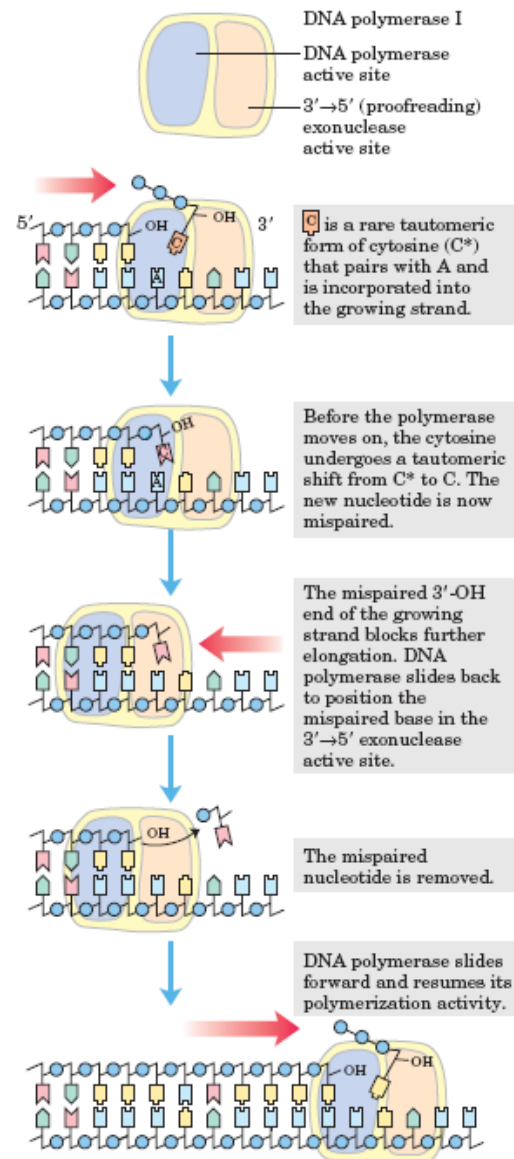


FIGURE 25-7 An example of error correction by the 3'→5' exonuclease activity of DNA polymerase I. Structural analysis has located the exonuclease activity ahead of the polymerase activity as the enzyme is oriented in its movement along the DNA. A mismatched base (here, a C-A mismatch) impedes translocation of DNA polymerase I to the next site. Sliding backward, the enzyme corrects the mistake with its 3'→5' exonuclease activity, then resumes its polymerase activity in the 5'→3' direction.

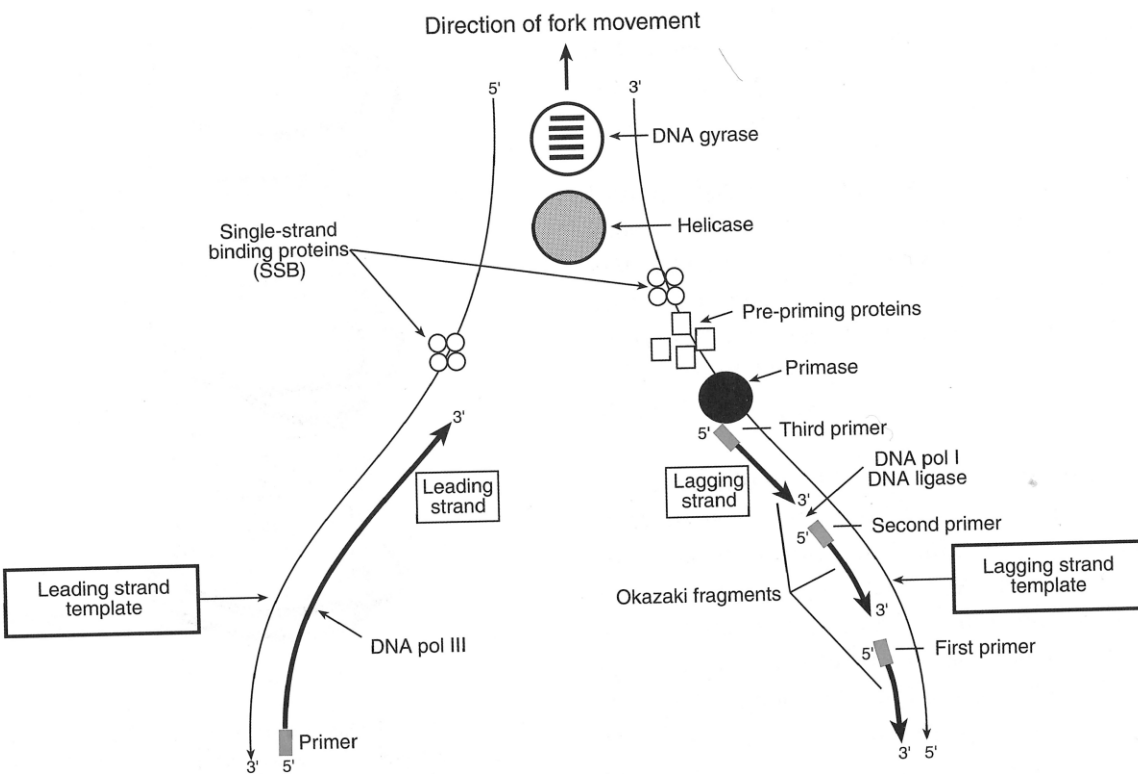


Figure 17.14. Schematic illustration of events at the replication fork in discontinuous DNA replication.

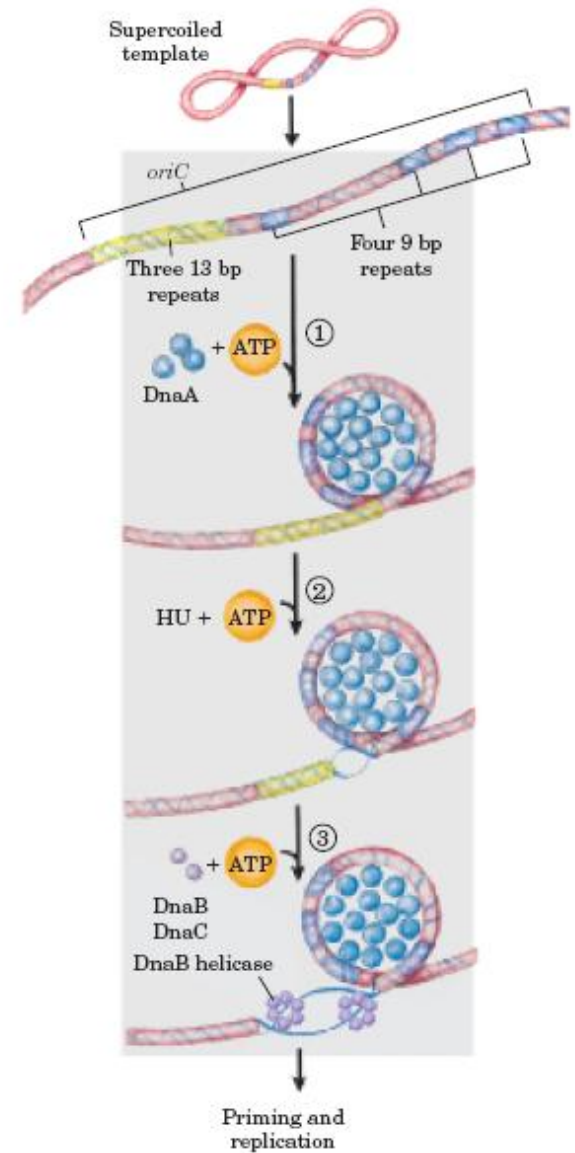


FIGURE 25-12 Model for initiation of replication at the *E. coli* origin, *oriC*. ① About 20 DnaA protein molecules, each with a bound ATP, bind at the four 9 bp repeats. The DNA is wrapped around this complex. ② The three A=T-rich 13 bp repeats are denatured sequentially. ③ Hexamers of the DnaB protein bind to each strand, with the aid of DnaC protein. The DnaB helicase activity further unwinds the DNA in preparation for priming and DNA synthesis.

Transkripce

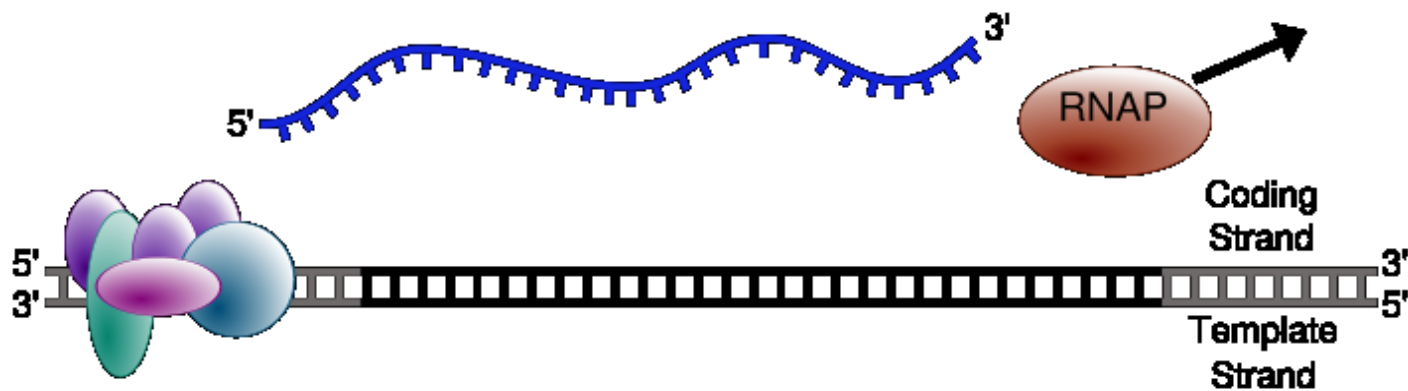
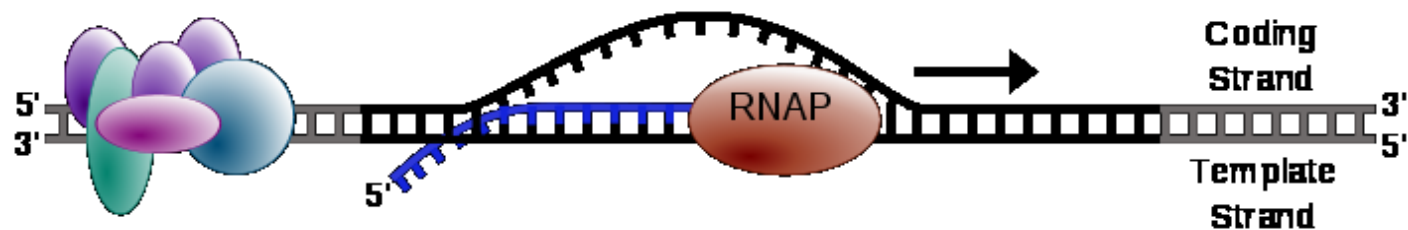
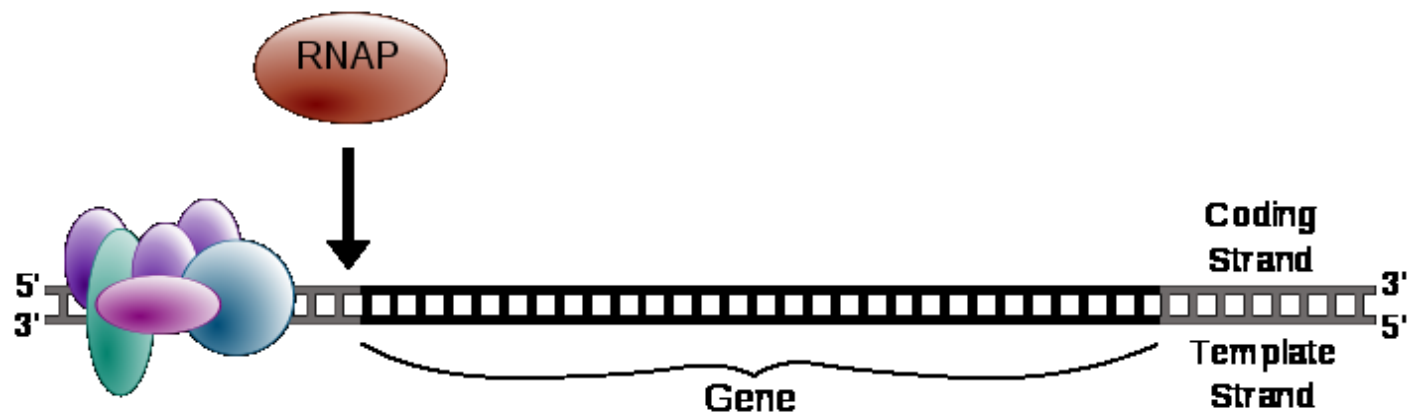
- syntesa RNA
- prokaryota
 - enzym DNA-dependentní RNA polymerasa
 - transkripční jednotka – operon (řízeno promotorem a operátorem)
 - promotory jsou si podobné, afinita k RNA polymerase
 - RNA polymerasa – holoenzym tvořen podjednotkami
 - α - stabilita komplexu
 - β - vazba ribonukleotidů na polymerasu
 - β' - vazba k DNA
 - σ - vazba k promotoru
- rozdíly u eukaryot
 - není organizace genů v operonech
 - 3 RNA polymerázy, specifické
 - I – pre-rRNA
 - II- pre-mRNA, malé rRNA
 - III – pre-tRNA, malé rRNA
 - regulace transkripce není přes operátor ale enhancerové a silencerové sekvence před vlastní přepisovanou oblastí
 - mnohem komplikovanější
 - oddělení transkripce a translace

Transkripce

- Iniciace
 - vazba σ podjednotky na komplex $\alpha\beta\beta'$
 - vazba holoenzymu na oblast nad promotorem
 - posun polymerasy na promotor, rozpoznání sekvence, rozvolnění DNA řetězců
 - vazba ATP na holoenzym
 - syntéza řetězce RNA (po spojení prvních asi 4 nukleotidů odpadne σ podjednotka)
- Elongace
 - postup polymerasy podél řetězce, syntesa RNA

Transkripce

- terminace
 - nezávislá na ρ faktoru
 - po rozpoznání terminační sekvence tvorba vlásenky, polymerasa se zastaví a komplex se rozpadne na DNA, RNA a polymerasu
 - závislá na ρ faktoru
 - ρ faktor se váže na RNA, postupuje směrem k polymerase, když se polymerasa na terminátoru zastaví, dojde ke kontaktu, uvolní se RNA a následně i polymerasa, spotřeba ATP
- posttranskripční modifikace – u eukaryot
 - **tvorba čepičky** na 5'konci – ochrana před hydrolysou
 - **polyadenylace** na 3'konci – ochrana před hydrolysou a pro transfer do cytoplasmy
 - **sestřih** – vystříhání intronů z hnRNA, dva mechanismy
 - s využitím proteinů – rozpoznají specifické sekvence, vytvoří smyčku a vystříhnou nežádoucí část
 - samosestřih – RNA s katalytickou aktivitou, nepotřebuje proteiny



First letter of codon (5' end)

Second letter of codon

	U	C	A	G
U	UUU Phe UUC Phe	UCU Ser UCC Ser	UAU Tyr UAC Tyr	UGU Cys UGC Cys
C	UUA Leu UUG Leu	UCA Ser UCG Ser	UAA Stop UAG Stop	UGA Stop UGG Trp
A	CUU Leu CUC Leu	CCU Pro CCC Pro	CAU His CAC His	CGU Arg CGC Arg
G	CUA Leu CUG Leu	CCA Pro CCG Pro	CAA Gln CAG Gln	CGA Arg CGG Arg
	AUU Ile AUC Ile	ACU Thr ACC Thr	AAU Asn AAC Asn	AGU Ser AGC Ser
	AUA Ile AUG Met	ACA Thr ACG Thr	AAA Lys AAG Lys	AGA Arg AGG Arg
	GUU Val GUC Val	GCU Ala GCC Ala	GAU Asp GAC Asp	GGU Gly GGC Gly
	GUA Val GUG Val	GCA Ala GCG Ala	GAA Glu GAG Glu	GGA Gly GGG Gly

DNA (kódující řetězec):

ATG CAT AAA AGG TCC TAA

mRNA:

AUG CAU AAA AGG UCC UAA

antikodon:

UAC GUA UUU UCC AGG AUU

protein:

Met His Lys Arg Ser