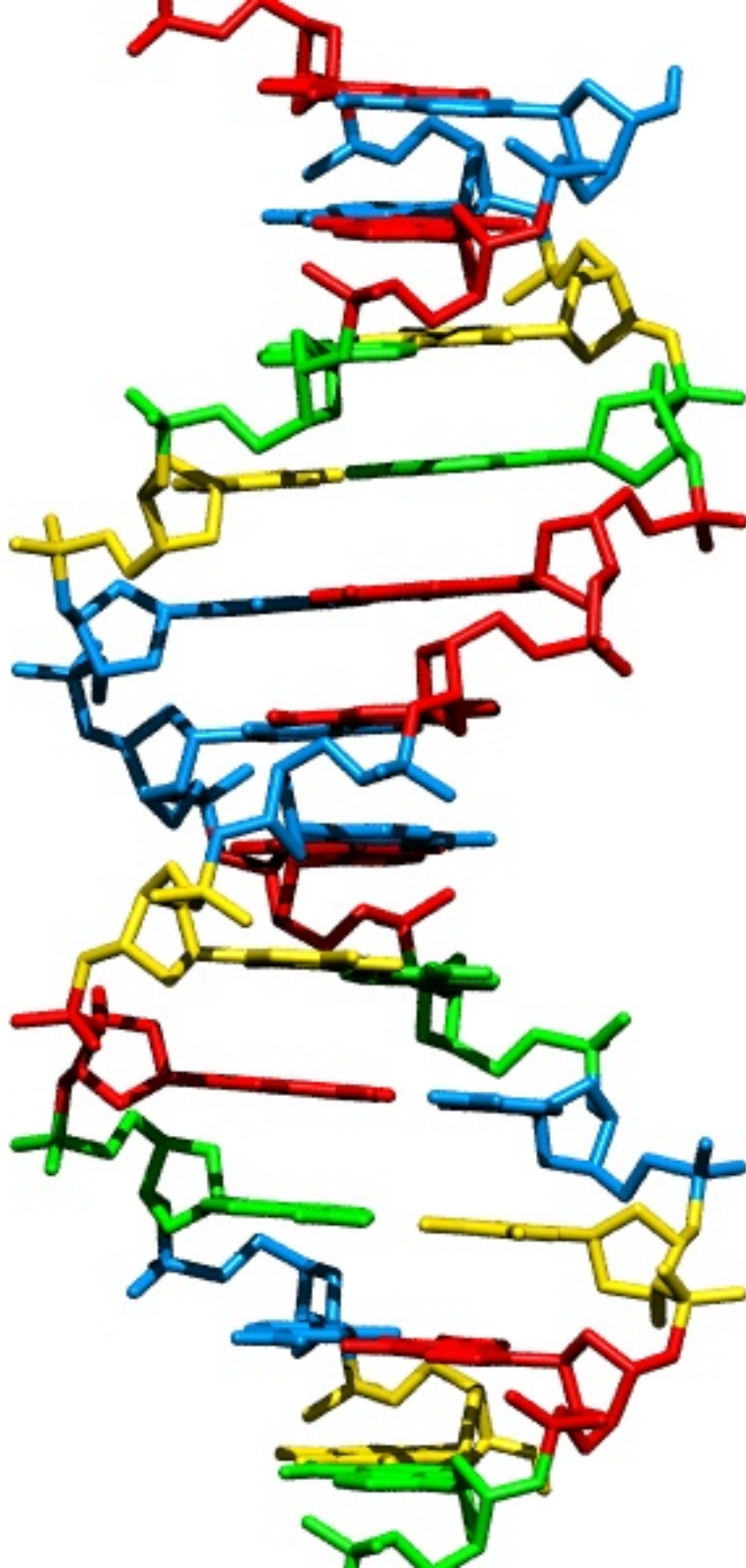
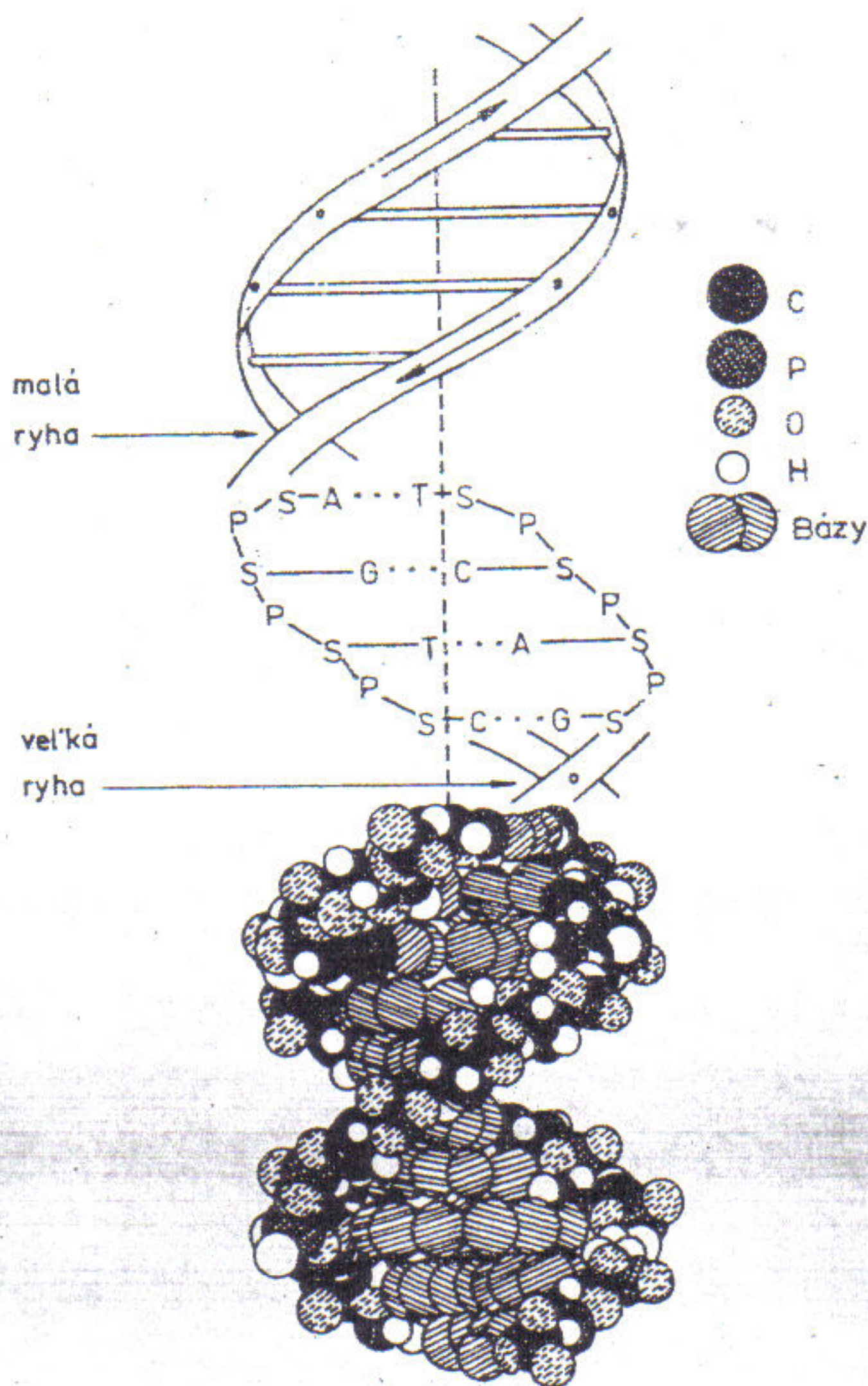


A-PDF MERGER DEMO



5. ŠTRUKTÚRA DNA

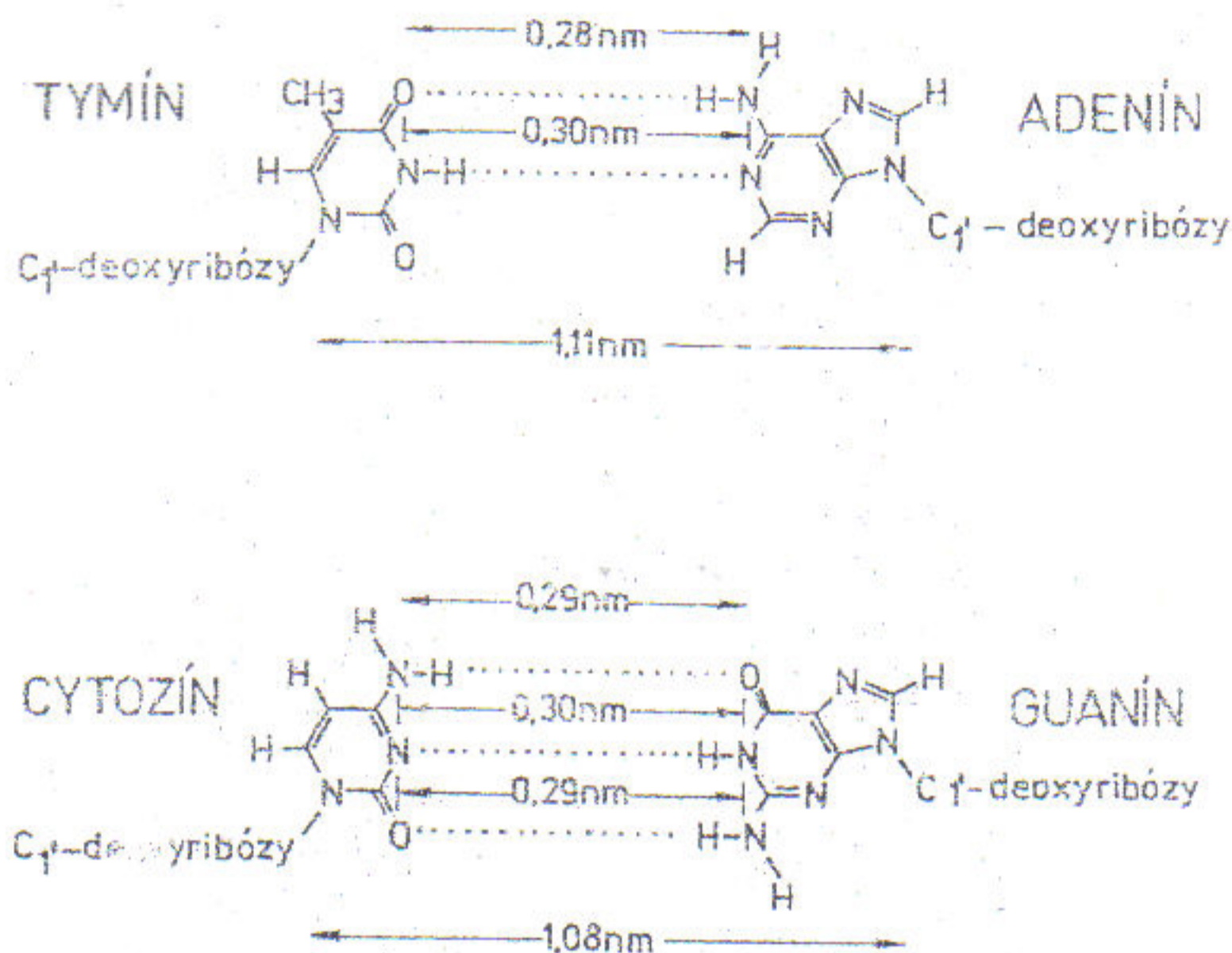
Biologické vlastnosti DNA závisia od jej zvláštnej priestorovej štruktúry. Na základe röntgenovej štruktúrnej analýzy, ktorou sa zaoberali Wilkins a Franklinová na kryštalickej DNA a chemickej analýzy, ktorá sa robila v Chargaffovom laboratóriu, zostrojili r. 1953 Watson a Crick model DNA. Tento model pravotočivej dvojitej závitnice /tzv. α -helix/ je platný podnes /obr. 19/.



Obr. 19 Štruktúrny model DNA /Watson a Crick, 1953/

5.1 WATSON-CRICKOV MODEĽ DNA

Watson-Crickova dvojzávitnica DNA obsahuje dva polynukleotidové reťazce, v ktorých sú jednotlivé nukleotidy pospájané diesterovou väzbou. Orientácia cukrov /leoxyribózy/ udáva reťazcom smer, ktorý nazývame polarita. Reťazce v molekule DNA majú rôznu polaritu, hovoríme, že sú navzájom antiparalelné. Ďalšou vlastnosťou závitnice je, že reťazce sú komplementárne. Komplementarita spočíva v párovaní báz patrí k základným princípom, ktorý sa uplatňuje pri nukleových kyselinách. Komplementárne bázy sú: A - T a G - C. Adenín s tymínom sa páruje dvoma vodíkovými väzbami a guanín s cytozínom tromi /obr. 20/.



Obr. 20 Vodíkové väzby medzi dusíkatými bázami A - T a C - G

Konformáciu závitnice udržujú jednak vodíkové väzby medzi bázami /čím viac G - C párov molekula obsahuje, tým je pevnejšia/, ďalej sú to van der Waalove sily a napokon sú to tzv. stacking sily, ktoré by sme mohli nazvať aj plošné.

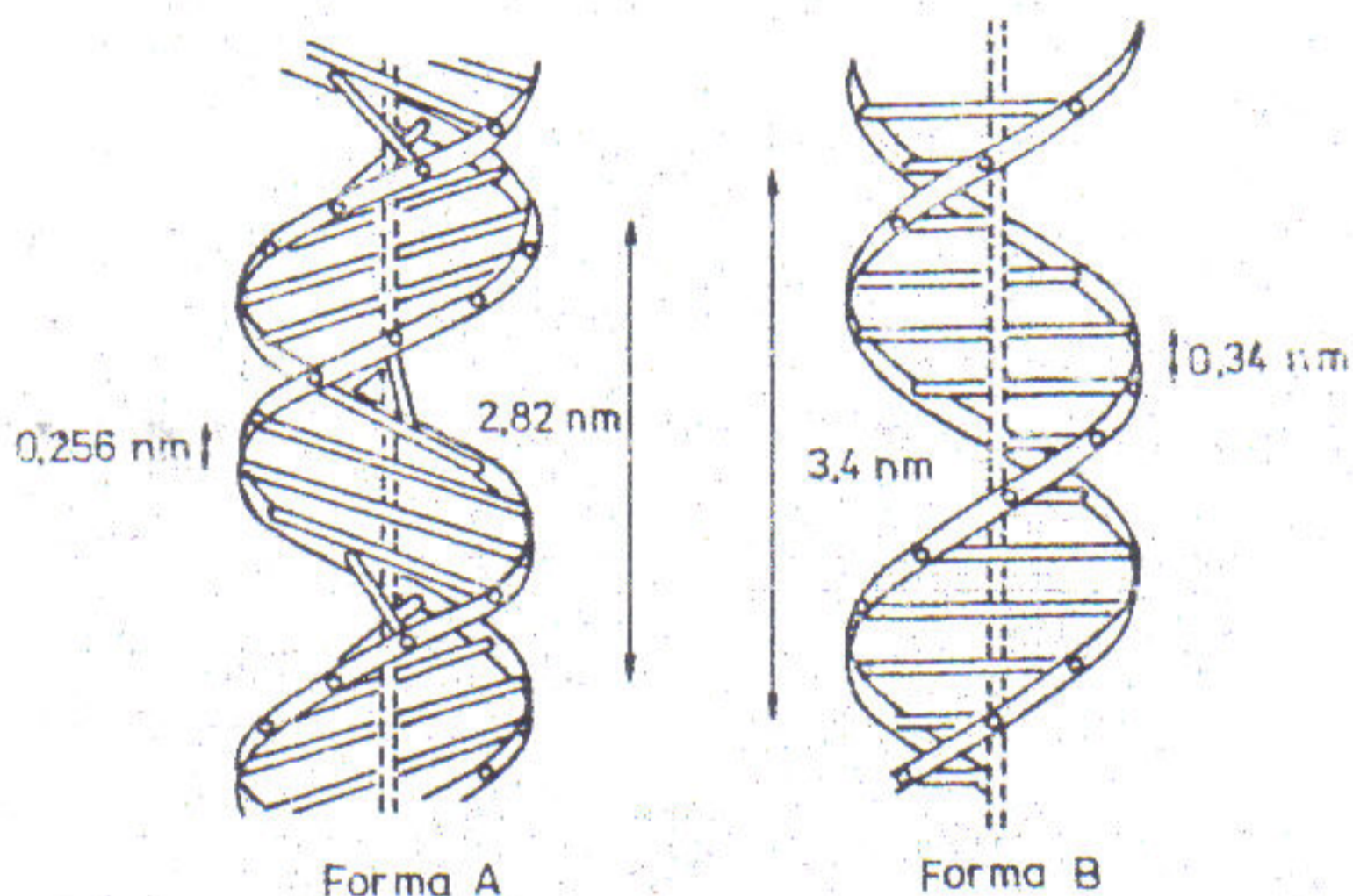
V dvojzávitnici DNA na jednu obrátku pripadá 10 párov nukleotidov, pričom vzdialenosť medzi nukleotidmi je 0,34 nm, šírka dvojšpirály je 2,0 nm. Bázy sa môžu oddialiť maximálne na vzdialenosť 0,68 nm. Táto vzdialenosť je dôležitá, lebo umožňuje včlenenie aromatických zlúčenín /interkalácia/.

Párovanie báz a ich vrstvenie pri 36° torznom uhle spôsobuje vznik malej a veľkej ryhy v molekule DNA. Cukor-fosfátové väzby tvoria vonkajšok špirály, zatiaľ čo bázy tvoria hydrofóbny vnútrašok. Štruktúra dvojzávitnice umožňuje predpovedať homologické sekvencie v jednotlivých reťazcoch na základe komplementarity báz. Watson a Crick predpokladali biologickú dôležitosť

modelu DNA. Komplementarita reťazcov umožňuje vysvetliť reduplikáciu genetického materiálu počas bunkového delenia.

5.2 FORMY DNA - KONFORMAČNÉ TYPY

Existujú tri hlavné formy DNA. Forma A je špirála, ktorá obsahuje 11 párov báz na jeden závit. Bázové páry sú naklonené o 20° od osi špirály. Vzdialenosť nukleotidov je 0,256 nm. Forma B je normálna natívna forma DNA, ktorá má parametre ako sme si uviedli /vzdialenosť nukleotidov 0,34 nm, šírka 2,0 nm/ - obr. 21. Ak sa hydratácia formy B zníži pod 66 %, možno za prítomnosti nadbytku soli pozorovať tretiu formu C, ktorá má sklon báz v opačnom smere oproti A.



Obr. 21 Formy DNA: forma B /natívna DNA/ a forma A

Najdôležitejší konformačný rozdiel medzi formami A a B je zmena v konformácii cukru. Forma A má 3'-endo konformáciu, forma B má 3'-exo konformáciu. Toto je významný rozdiel aj pri porovnávaní DNA a RNA. RNA je výlučne vo forme A, zatiaľ čo DNA môže prechádzať z formy B do formy A. Zaujímavé je, že hybridy RNA-DNA sú vo forme A. Zdá sa teda pravdepodobné, že počas transkripcie /prepisu DNA do RNA/ musí molekula DNA prejsť z formy B do formy A.

5.3 PRÍKÁNNÁ ŠTRUKTÚRA DNA

Nukleotidy ako základné stavebné prvky nukleových kyselín sú v polyméri DNA nospájané 5'-3'-diesterickou väzbou. Poradie /sekvencia/ nukleotidov predstavuje primárnu štruktúru DNA.

Dlho sa predpokladalo, že táto štruktúra je tetranukleotidová, teda, že predstavuje pravidelné opakovanie štyroch základných nukleotidov v molekule DNA. Podľa tejto teórie by zastúpenie báz malo byť nasledovné:

$$A : T : G : C = 1 : 1 : 1 : 1$$

Avšak experimentálne výsledky Chargaffa vyvrátili tento názor. Relatívna frekvencia výskytu štyroch základných báz v molekule DNA má niekoľko základných pravidiel, ktoré nazývame Chargaffove pravidlá:

- adenín a tymín sa vyskytujú rovnako často /A = T/; obdobne guanín a cytozín /G = C/,
- celkové množstvo purínov sa rovná množstvu pyrimidínov /A + G/ = /C + T/,
- počet keto-skupín v polohe 6 je rovnaký ako počet amino-skupín v polohe 6.

Sumárne teda DNA má len jeden meniteľný prvok, a to je pomer /A + T/ ku /G + C/.

Z toho vyplýva, že zastúpenie báz pozdĺž reťazca nie je pravidelné, ale je prísne špecifické a pre daný druh stále. Tak napr. človek má zastúpenie báz vyjadrené v percentách približne takéto: A : T : G : C = 30 : 30 : 20 : 20. Tieto čísla dostaneme pri analýze DNA izolovanej z ktoréhokolvek človeka i ktoréhokolvek orgánu. Niektoré výsledky analýz DNA udáva tabuľka 4.

Tabuľka 4.: Percentuálne zastúpenie báz v DNA /MC a HMC je počítaný ako cytozín/

Pôvod DNA	$\frac{A+T}{G+C}$	A	T	G	C	5MC	5 HMC
Človek /slezina/	1,51	29,9	29,8	19,5	20,1	-	-
Človek /pečeň/	1,53	30,3	30,3	19,5	19,9	-	-
Hovädzí dobytok	1,27	28,2	27,8	21,5	21,2	1,3	-
Pšenica /klíčky/	1,14	26,9	26,5	23,2	17,6	5,9	-
Zelené riasy	0,64	20,2	18,8	30,8	30,2	-	-
Kvasinky /S.c./	1,79	31,3	32,9	18,7	17,1	-	-
Mucobacterium phlei	0,48	16,2	16,4	33,7	33,7	-	-
E. coli	0,92	23,9	23,9	26,0	26,2	-	-
Clostridium perfringens	2,24	34,1	35,0	15,8	15,1	-	-
Fág λ	1,06	25,7	25,7	24,4	24,2	-	-
Fág T2	1,86	32,5	32,5	18,2	-	-	16,8
Fág T4	1,92	32,3	33,3	18,1	-	-	16,1

pravo- i ľavotočivá dvojšpirála. Experimentálne dokázali, že v jednoduchom kryštáli polynukleotidov /DNA/ majú reťazce pravotočivé i ľavotočivé segmenty.

Pri SBS modeli, obdobne ako pri Watson-Crickovej dvojšpirále, ide o zoskupenie nukleotidov ako základných stavebných jednotiek do polynukleotidových reťazcov, tak isto je tu párovanie báz na princípe komplementarity, reťazce sú antiparalelné. Rozdiel je v tom, že SBS model má tvar sinusovej krivky, pri ktorej reťazce majú aj ľavotočivú orientáciu. Autori si nenáročujú na absolútne prijatie nového modelu DNA, ale podávajú ho ako alternatívnu konformáciu k pravotočivej dvojšpirále. Podľa ich názoru takto usporiadaná DNA by mohla lepšie plniť svoju dvojjedinú funkciu: odovzdávať informáciu dcérskym molekulám a prostredníctvom ribonukleových kyselín realizovať genetickú informáciu v podobe syntézy bielkovín, predovšetkým enzýmov.

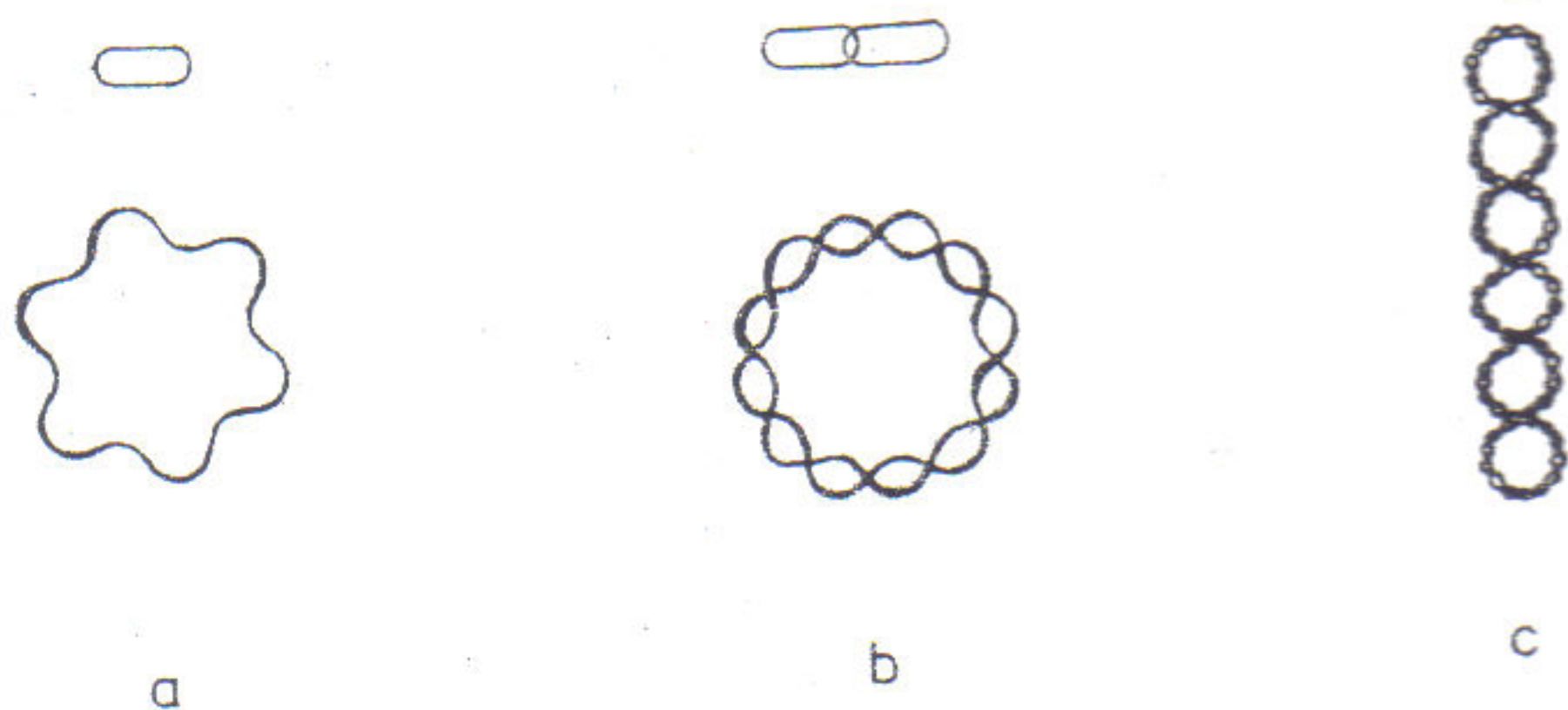
Treba na záver ešte poznamenať, že najnovšie výskumy potvrdzujú, že aj v natívnej DNA sa nachádza určitá časť DNA, ktorá má ľavotočivú orientáciu; nazýva sa Z-DNA. Avšak ani tieto skutočnosti nevyvrátili Watson-Crickov model dvojjávitnice DNA; skôr poukázali na fakt, že DNA je molekula, ktorá má zložitú štruktúru, ktorá môže vykazovať štruktúrnu heterogenosť.

5.5 TERCIÁRNA ŠTRUKTÚRA DNA

5.5.1 TERCIÁRNA ŠTRUKTÚRA DNA PROKARYONTOV

Terciárnou štruktúrou DNA pri prokaryontoch je priestorové usporiadanie kruhovej dvojšpirály DNA chromozómu do nadšpirálovej štruktúry, ktoré nazývame superhelix. Znamená to, že kovalentne uzavretá kruhová dvojšpirála DNA sa vlastne otočí okolo seba a to buď pravotočivým spôsobom - DNA pozitívne superšpiralizovaná, alebo ľavotočivým spôsobom, kedy sa stáva negatívne superšpiralizovaná. Uzavreté kruhové molekuly s rovnakou terciárnou štruktúrou, ktoré sa líšia stupňom superšpiralizácie predstavujú topologické izoméry.

Okrem dvojreťazcovej bunkovej DNA, ktorá sa nazýva aj CCC DNA /covalently closed circle DNA/, niektoré vírusy majú jednoreťazcovú kruhovú DNA /napr. vírus ϕ X 174/. Podrobnejšie si o nej povieme pri replikácii DNA. Na tomto mieste uvedieme, že jednoreťazcové molekuly DNA nemajú pochopiteľne komplementárne párovanie báz a teda pomer A : T a C : G nie je rovnaký. Tak napr. pri ϕ X 174 sa zistilo, že má toto zastúpenie báz: 24,6 % A; 18,5 % T; 32,6 % G a 24,1 % C. Niektoré typy prokaryotickej DNA sú na obr. 23.

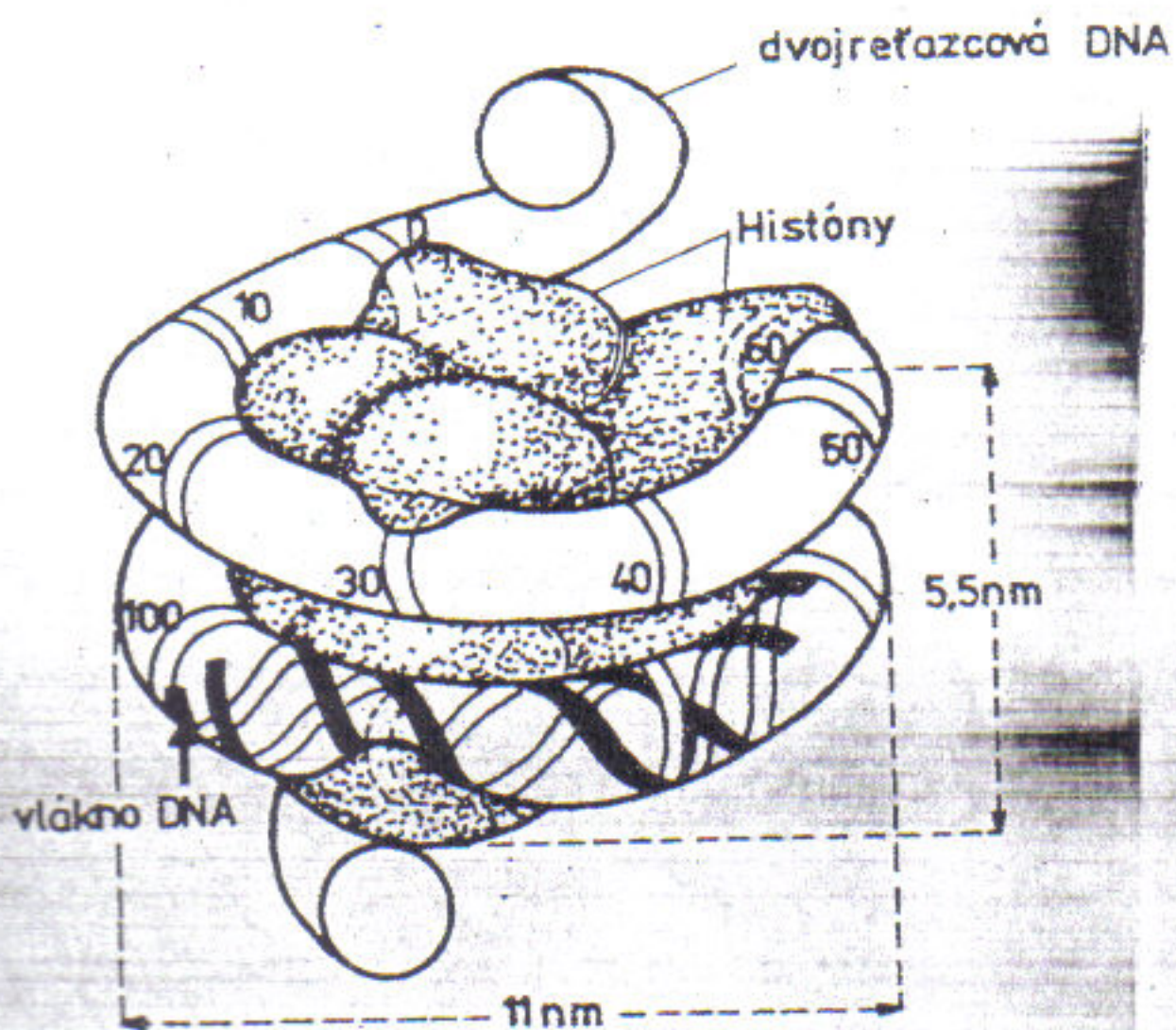


Obr. 23 Niektoré typy prokaryotickej DNA: a/ jednoreťazcová kružnicová DNA, b/ dvojreťazcová kružnicová DNA, c/ superšpiralizovaná dvojreťazcová kružnicová DNA

5.5.2 TERCIÁRNA ŠTRUKTÚRA DNA EUKARYONTOV

5.5.2.1 Organizácia chromozómov

Za terciárnu štruktúru DNA pri eukaryotoch považujeme jej špecifické usporiadanie pri asociácii s bielkovinami histónového typu /históny/. Zostava histónu a DNA sa nazýva nukleozóm. Históny vytvárajú jadro nukleozómu "tzv. histónovú dreň" /oktety dvojíc molekúl histónov H2A, H2B, H3, H4/, okolo ktorého sa ovíja DNA. Nukleozómy /obr. 24/ sú navzájom spojené viáknom DNA /tzv. spojovacia, internukleozomálna DNA/, ktoré je prekryté histónom H1. Vlákno nukleozómov sa v bunke priestorove orientuje do špirálovitých štruktúr vyšších rádov /solenoid/ - obr. 24. V takejto štruktúre už sú viazané aj



Obr. 24 Nukleozóm

kyslé bielkoviny, enzýmy a chromozomálna RNA do zložitého komplexu - chromatinu, ktorý sa pred delením organizuje do zreteľne morfológicky vyhranených útvarov - chromozómov.

5.5.2.2 Históny

Históny sú bázičné bielkoviny, ktoré sa asociujú s DNA chromozómov takmer všetkých eukaryontných organizmov. Prvýkrát ich izoloval Kossel z červených krviniek husí. Sú to bielkoviny s relatívne nízkou molekulovou hmotnosťou /12 000 - 20 000/. Klasifikujú sa ako bielkoviny bohaté na lyzín /frakcia 1/, stredne bohaté na lyzín /frakcia 2/ a bohaté na arginín /frakcia 3/. Toto je hrubé rozdelenie. Detailnejšie rozdelenie je na 5 skupín. Pomenovanie jednotlivých skupín prešlo viacerými zmenami a v súčasnosti sa ustálilo na tomto označení: H1, H2B, H2A, H3 a H4. Uvedieme si krátke charakteristiky jednotlivých typov histónov.

1 Histón H1 - pomer lyzínu ku arginínu je približne 20. Z ostatných aminokyselín sú bohato zastúpené alanín a prolín. Nenachádzajú sa tu aromatické aminokyseliny. NH₂-konce bývajú acetylované. Molekulová hmotnosť je približne 20 000.

2 Histón H2B - má pomer Lys/Arg približne rovný 2. Relatívne bohato je zastúpený serín. NH₂-koniec je tvorený prolínom. Molekulová hmotnosť je 13 700.

3 Histón H2A - má pomer Lys/Arg málo väčší ako 1. Bohato zastúpený je glycín. NH₂-koniec podobne ako pri H1 je acetylovaný. Molekulová hmotnosť je 15 000.

4 Histón H3 - je frakcia bohatá na arginín. Pomer Lys/Arg je menší ako 1. Pomerne vysoký je obsah leucínu a izoleucínu, ako aj dikarboxylových aminokyselín. Molekulová hmotnosť je približne 15 000. Špecifické pre H3 je prítomnosť SH-skupín v cysteíne.

5 Histón H4 - má obsah arginínu len o málo väčší ako H3. Molekulová hmotnosť je približne 12 000. Pomerne vysoký je obsah dikarboxylových aminokyselín.

Ako príklad uvádzame vlastnosti histónov telacieho tymusu /tabuľka 5/.

Tabuľka 5.: Vlastnosti histónov telacieho tymusu

Skupina	Vlastnosti	Lys/Arg	Relat. m.h.
H1	lyzín-bohatá	20	20 000
H2B	stredne lyzín-bohatá	2,5	13 774
H2A	stredne lyzín-bohatá	1,0-1,2	15 000
H3	arginín-bohatá	0,72	15 324
H4	arginín-bohatá	0,79	11 282

Uvedených 5 typov histónov sa vyskytuje v chromatine zhruba v rovnakom množstve. Treba ešte zdôrazniť, že históny izolované z rôznych organizmov sa líšia len nepatrne, z čoho sa usudzuje, že ide o evolučne veľmi konzervatívny typ bielkovín, ktoré sa objavili spolu s jadrovou membránou v procese diferenciovania eukaryontných buniek.

5.5.2.3 Bielkoviny nehistónovej povahy /alebo nehistónové bielkoviny/

Nazývame ich aj kyslé bielkoviny. Pomer kyslých bielkovín k zásaditým v eukaryotických chromozónoch je približne 1,2-1,6 : 1. Bielkoviny nehistónovej povahy majú štrukturálny a enzýmový význam. Delia sa na typy A1, A2, B, C, D a typy bohaté na lyzín. Patria sem aj HMG /high mobility group/ bielkoviny označované ako vysoko mobilná skupina. Prednostne sa spájajú s transkripčne aktívnou oblasťou chromatinu a vyznačujú sa vysokou elektroforetickou pohyblivosťou. Sú to napr. bielkoviny HMG 1, HMG 2, HMG 14 a HMG 17. Z nich HMG 1 a HMG 2 sa ľahko spája s jednoreťazcovou DNA. Pravdepodobne sa zúčastňujú na disociácii a reasociácii nukleozómov.

V chromatine ďalej boli nájdené nasledovné enzýmy: DNA-polymeráza, DNA-endonukleáza, DNA-ligáza, terminálna DNA-nukleotidyltransferáza, RNA-polymeráza, kináza a i.

Nehistónové bielkoviny majú na rozdiel od histónov väzbovú špecificitu k DNA. Zároveň sa vyznačujú aj tkanivovou či pletivovou špecificitou.

Vo všeobecnosti možno povedať, že bielkoviny nehistónovej povahy majú pravdepodobne význam pri aktivácii génov a zúčastňujú sa na regulácii transkripcie genetickej informácie.

25.10.2014

6. SYNTÉZA DNA - REPLIKÁCIA DNA

6.1 DEFINÍCIA REPLIKÁCIE DNA

Esenciálnou vlastnosťou bunky je schopnosť samoreplikácie, t.j. schopnosť vytvoriť z jednej materskej bunky dve alebo viac dcérskych buniek. Z toho vyplýva, že bunky musia mať ^{to umožní} informačný systém, ktorý je schopný kopírovať sa a prenášať počas bunkového delenia do dcérskych buniek.

Syntéza DNA predstavuje proces replikácie /zdvojovania/ DNA, ktorá je podmienkou pre ^{to umožní} odovzdávanie genetickej informácie z bunky do bunky. Schopnosť replikácie je najdôležitejšia ^{NK = sústredigen má} vlastnosť charakteristická pre genetický materiál - nukleové kyseliny.

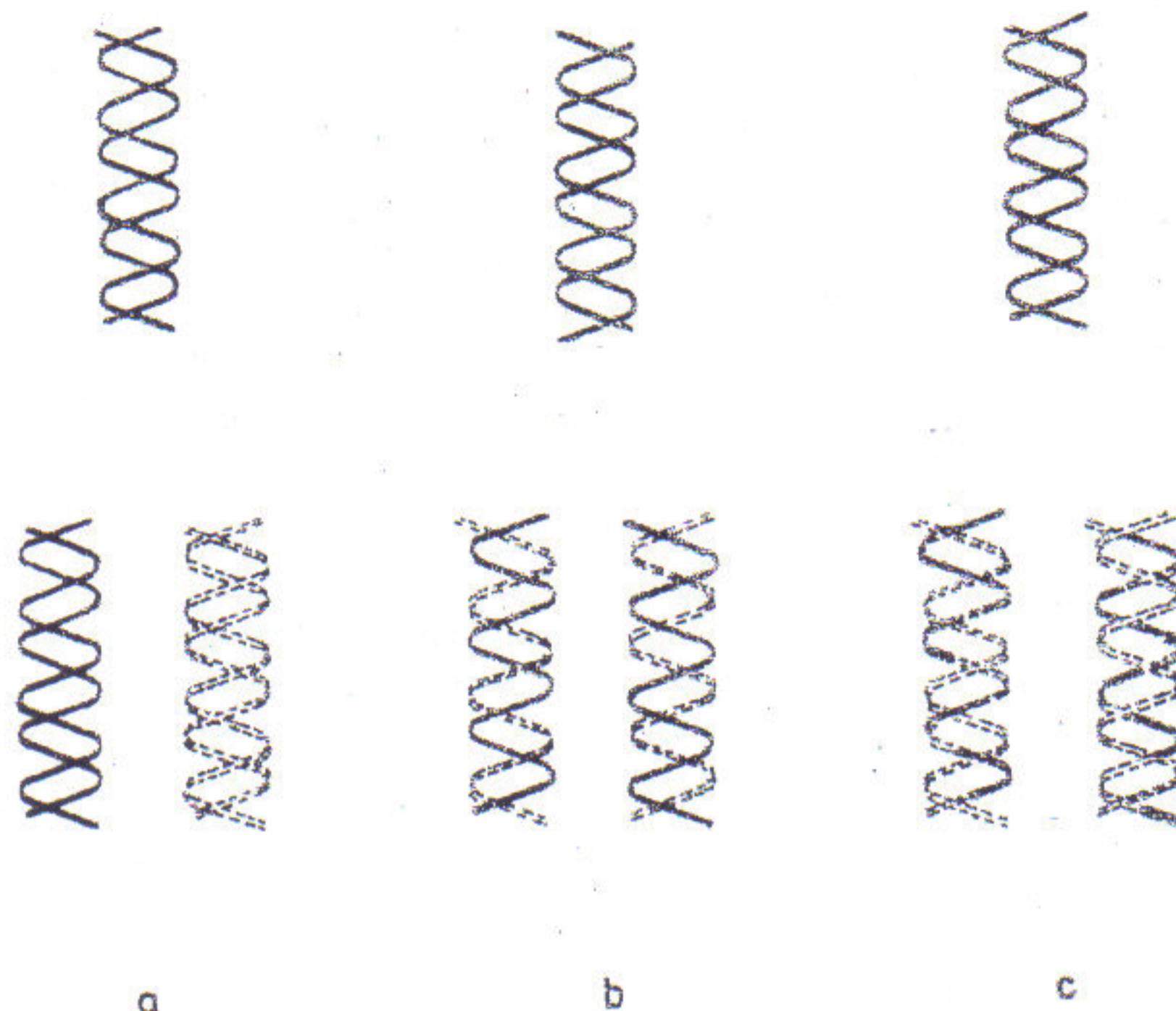
Replikácia nukleových kyselín ako základ ontogenézy je spojená s nepretržitým procesom bunkových delení. Uvedené procesy sú tak synchronizované, že replikácia musí predbiehať bunkové delenie. Výsledkom replikácie DNA sú ^{v dcérskych B} identické dcérske molekuly DNA, ktoré sa rozdeľujú do dcérskych buniek tak, že tieto obsahujú rovnakú genetickú informáciu ako pôvodná materská bunka. Replikácia nukleových kyselín prebieha matricovým spôsobom. Odohráva sa v S-fáze mitózy.

prebieha (matricovým) matricovým spôsobom počas S-fázy mitózy

6.1.1 MECHANIZMY SYNTÉZY DNA

Jednoduchá úvaha nás privedie teoreticky k trom /obr. 25/ možným spôsobom replikácie DNA:

- konzervatívny spôsob, kedy na materskej dvojšpirále by sa zosyntetizovala dcérska dvojšpirála a tie by sa neskôr osamostatnili;
- semikonzervatívny spôsob, pri ktorom materská dvojšpirála sa porušuje a na matrici každého z reťazcov sa komplementárne syntetizujú dcérske reťazce. Výsledkom sú dve identické molekuly DNA;
- disperzný spôsob predpokladá náhodné rozštiepenie dvojšpirály, zreplikovanie jednotlivých úsekov a ich opätovné spojenie /tu je možná značná nepresnosť/.

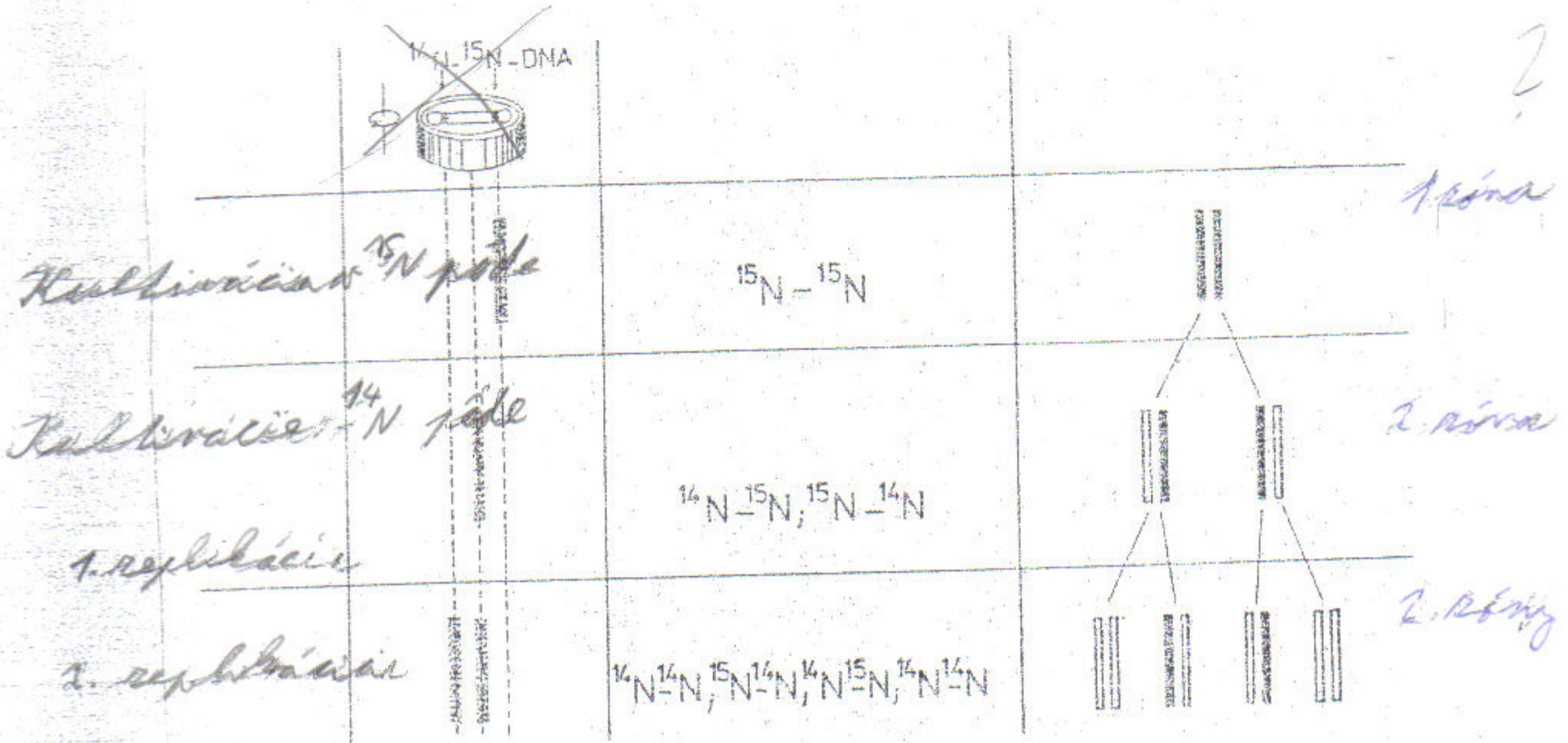


Obr. 25 Tri možné spôsoby replikácie DNA: a/ konzervatívny, b/ semikonzervatívny, c/ disperzný

Treba na tomto mieste uviesť, že ešte r. 1953 autori dvojšpirálového modelu DNA Watson a Crick teoretickými úvahami dospeli k názoru, že replikácia DNA sa odohráva semikonzervatívnym spôsobom. Podľa ich názoru replikácia DNA sa deje tak, že sa dvojšpirála porušovaním vodíkových väzieb rozmotáva a každý reťazec sa komplementárne dopĺňa. Tento ich názor však nebol v tom čase zďaleka tak jednomyselne prijatý ako model DNA.

6.1.2 DÔKAZ SEMIKONZERVATÍVNEJ REPLIKÁCIE DNA

Experimentálny dôkaz semikonzervatívnej replikácie DNA podali r. 1958 Meselson a Stahl /obr. 26/. Pracovali s baktériou E. coli a použili ako zdroj dusíka chlorid amonný označený ťažkým izotopom ^{15}N . Baktérie žili a rozmnožovali sa na tejto pôde a ^{15}N zavádzali do dusíkatých báz svojej DNA. Experimentátori odobrali vzorku na analýzu. Po určitom čase preniesli baktérie na pôdu s ľahkým izotopom dusíka ^{14}N a v presných časových intervaloch odoberali vzorky, z ktorých izolovali DNA. Túto DNA analyzovali pomocou sedimentácie v hustotnom gradiente chloridu cézneho. Vzhľadom k tomu, že DNA s izotopom ^{15}N a DNA s izotopom ^{14}N má rôznu hustotu, možno jednotlivé DNA identifikovať na základe šírky zón v gradiente CsCl. Bakteriálna DNA s ťažkým dusíkom dávala len jednu zónu, po prenesení na ľahký dusík, taktiež jednu zónu, ale v inej polohe /po prvej replikácii/. Po druhej replikácii sú už dva pruhy. Jeden uprostred medzi pôvodným a novým / $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$ / a nový pruh / $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ /. Pri



Obr. 26 Dôkaz semikonzervatívneho rozmnožovania DNA /Meselson a Stahl, 1958/

ďalších replikáciách narastá nový pruh /s $^{14}\text{N} \ ^{14}\text{N}$ / a stráca sa pruh hybridný / $^{15}\text{N} \ ^{14}\text{N}$ /.

Po prvej replikácii dostali Meselson a Stahl len jeden pruh tvorený hybridnou molekulou. Túto molekulu DNA denaturovali teplom a získali dva reťazce: s ťažkým izotopom ^{15}N a ľahkým ^{14}N . Z toho usúdili, že každá molekula DNA sa skladá z dvoch jednotiek; molekula DNA po replikácii obsahuje jeden starý a jeden nový reťazec a reťazce si zachovávajú kontinuitu. Inými slovami uvedení autori dokázali, že mechanizmus replikácie DNA je semikonzervatívny.

Ani tento brilantný experimentálny dôkaz semikonzervatívneho spôsobu replikácie DNA nebol jednoznačne prijatý, preto pokusy pokračovali ďalej v systémoch in vitro i v živých systémoch /in vivo/.

6.2 SYNTÉZA DNA IN VITRO

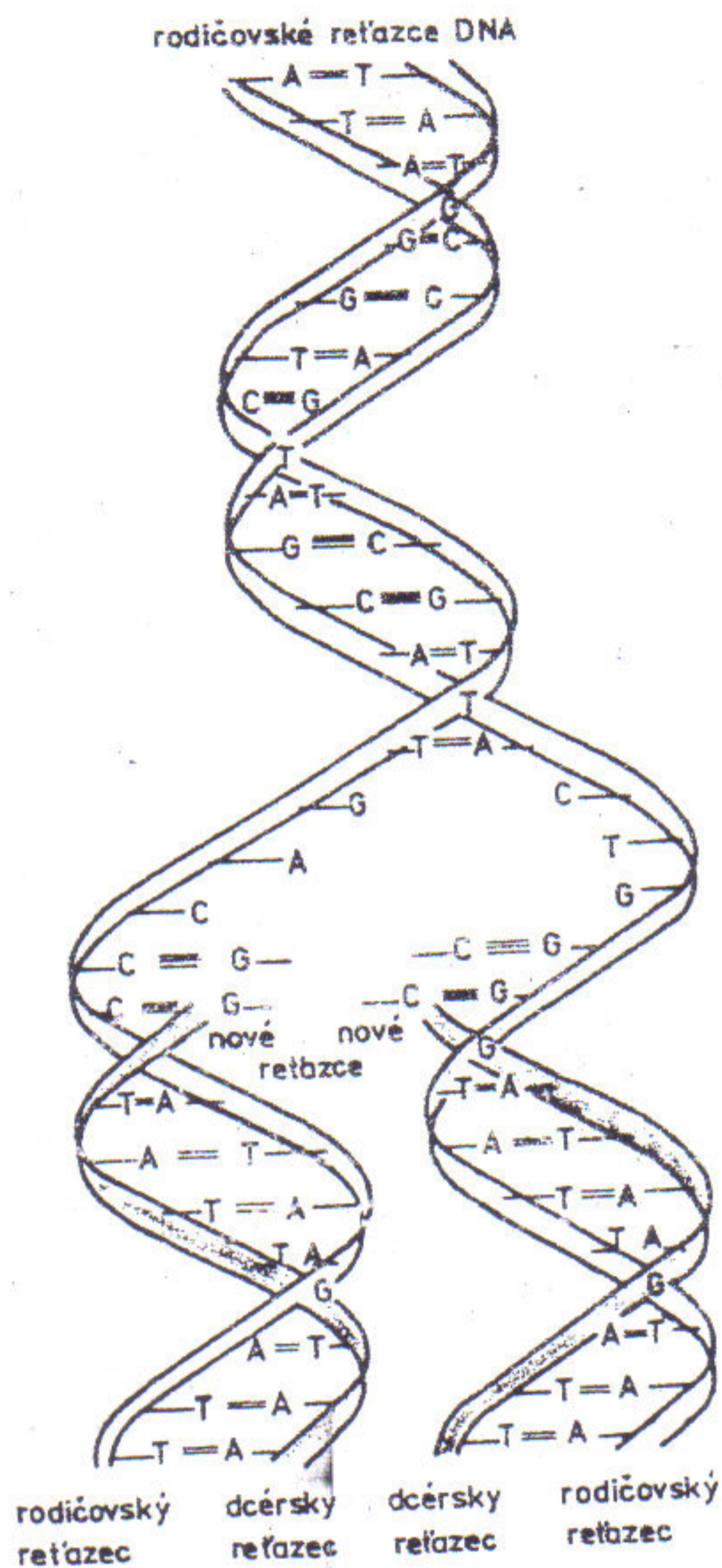
6.2.1 KORNBERGOVE POKUSY (1956) na *E. coli*

Dvojjávitnica DNA je tvorená vodíkovými väzbami komplementárnych báz, resp. nukleotidov. Vodíkové väzby sa za určitých okolností relatívne ľahko trhajú. Ak si predstavíme otvorenie dvojreťazca DNA ako zdrhovadlo /zips/, potom si môže každý nukleotid zvoliť zo zásobárne partnera, ktorý mu na základe komplementarity patrí /obr. 27/.

- sil väzby sa môžu relatívne ľahko narušiť (sept. zmena pH, ionové sily)

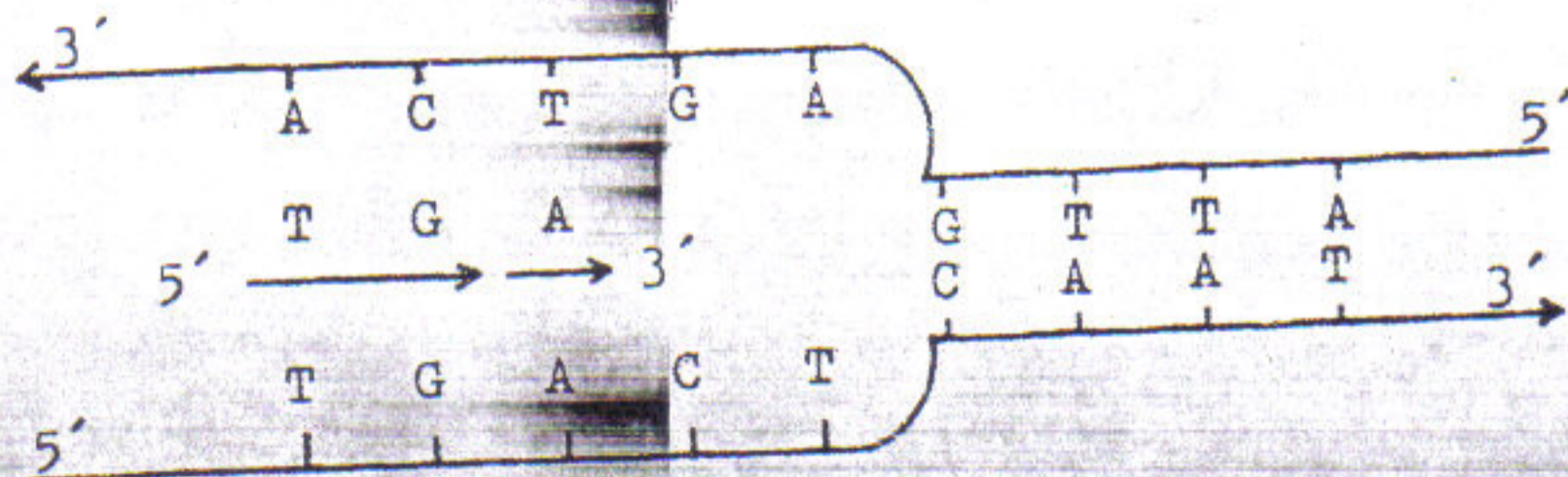
mo-
cia
DNA
kaž-
e

58
zdroj
požo-
eri-
na
era-
tá-
oto-
lifi-
eikom
ale
7.
ri



Obr. 27 Semikonzervatívny spôsob syntézy DNA

Jednoduchá schéma je nasledovná:



celo Mechanizmus syntézy DNA in vitro študoval Kornberg so spolupracovníkmi od r. 1956. Kornberg pracoval s baktériami E. coli. Pokus uspôsobil tak, že do reakčnej zmesi pridal extrakt z E. coli a dúfal, že je v ňom obsiahnutý enzým, ktorý je potrebný na syntézu DNA. Použil teda: extrakt z E. coli,

všetky 4 typy deoxynukleozid-monofosfátov /nukleotidov/, z ktorých jeden bol označený rádionuklidom, ďalej ATP ako zdroj energie a Mg^{2+} na stabilizáciu sústavy. Zmes inkuboval a potom vyzrážal. V zrazenine sa DNA nachádzala, syntéza prebehla, ale neskôr sa zistilo, že to bola skôr zásluha malého množstva DNA, ktorým bol extrakt znečistený.

2. Ďalšie pokusy sa uberali tým smerom, že sa do reakčnej zmesi dávali nukleozid-5'-trifosfáty, čím sa zvýšila výťažnosť DNA.

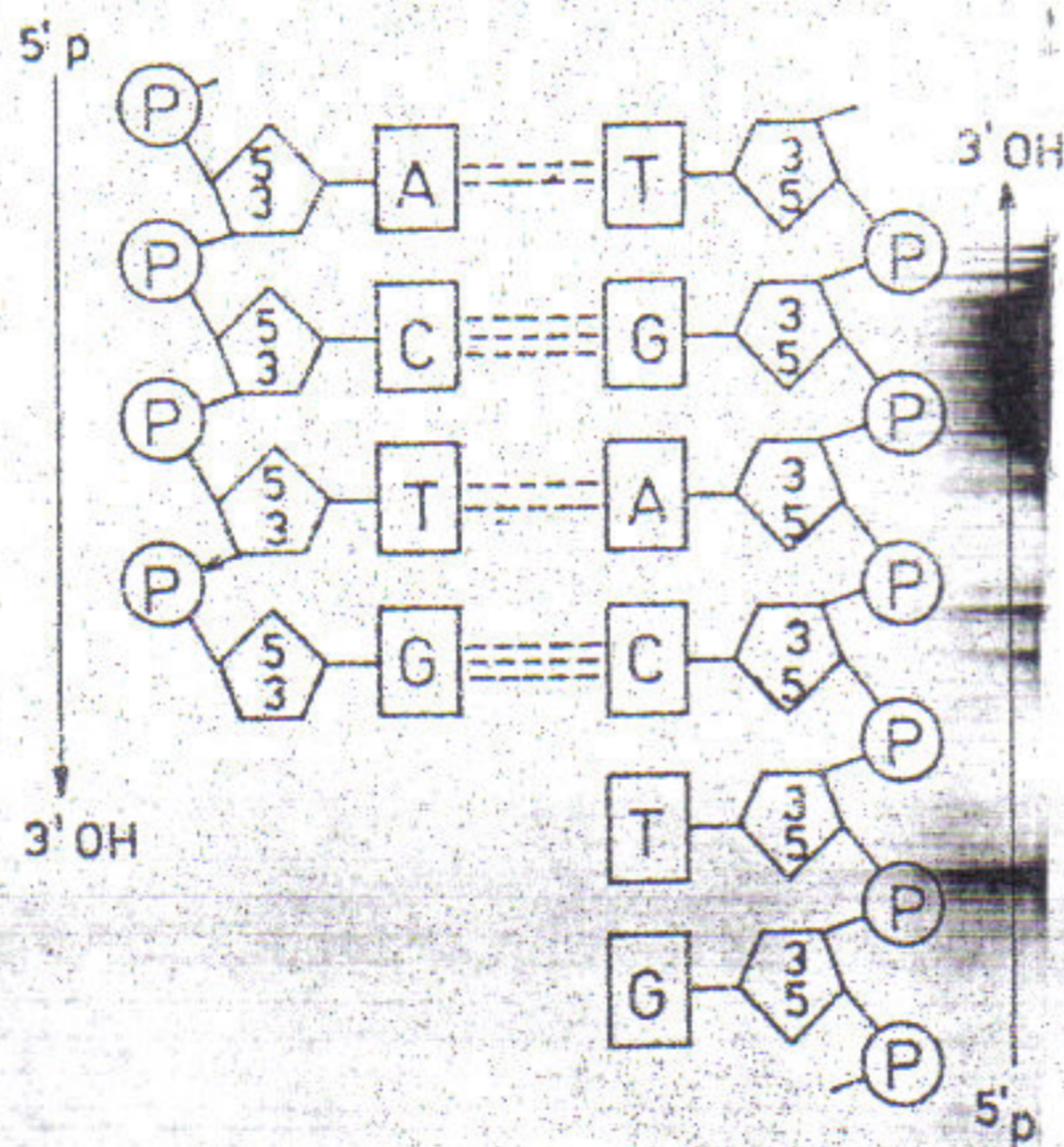
Enzým, ktorý Kornberg neskôr z *E. coli* izoloval, nazval *isolácia E2* nukleotid-pyrosfosforyláza, alebo deoxynukleotid-polymeráza, stručne hovoríme o DNA-polymeráze. Malé množstvo DNA, ktoré bolo podmienkou pre syntézu DNA, sa nazýva primer alebo očko.

Pretože enzým DNA-polymeráza používal hotovú DNA v úlohe matrice, ktorá riadi smer nového reťazca DNA, ozrejmil sa aj fakt, prečo na syntézu DNA sú nutné všetky štyri nukleozidtrifosfáty. Závislosť účinku enzýmu od matrice bola v enzymológii natoľko unikátnym a neočakávaným javom, že mnohí vedci roky nemohli tomu uveriť.

DNA-polymerázy katalyzujúce rast reťazca DNA sa našli v extraktach všetkých buniek, kde bola pozorovaná syntéza DNA: bakteriálnych, rastlinných a živočíšnych. Sú to na DNA závislé DNA polymerázy.

DNA /i RNA/ polymerázy sú medzi enzýmami unikátne v tom zmysle, že výber substrátu je určený matricou i enzýmom. Bakteriálne DNA polymerázy môžu syntetizovať živočíšnu DNA a opačne v závislosti na tom, aká DNA matrica je prítomná v inkubačnej zmesi. Biosyntéza DNA má dve základné zvláštnosti:

- každý deoxynukleozidtrifosfát pridaný k reťazcu odníma sa z prostredia na princípe komplementárneho párovania s bázou reťazca, ktorý sa nazýva matrica DNA;



Obr. 28 Zjednodušená schéma replikácie DNA

kmi
že
tý

- fosfodiesterová väzba sa vytvára medzi 3'-OH skupinou na konci rastúceho reťazca /nazývaného primer alebo očko/ a 5'-fosfátovou skupinou deoxynukleozidtrifosfátu z prostredia. Všeobecný smer rastu reťazca od 5' k 3' koncu môžeme stručne zapísať ako 5' ----> 3' /obr. 28/.

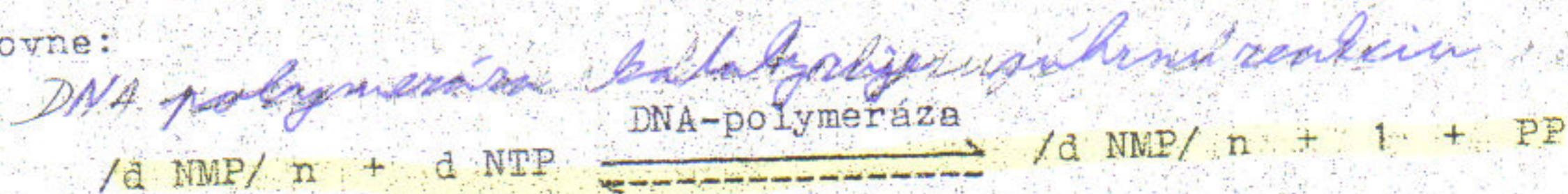
6.2.2 ÚLOHA MATRICE A PRIMERU PRI SYNTÉZE DNA

Keď hovoríme o účinku polymerázy, musíme dôsledne rozlišovať termíny primer a matrica. - *potrebne pre účinok DNA polymerázy*

Termín p r i m e r používal sa prv v biochémii na označenie glykogénu, ktorý sa pridával do zmesi na začatie syntézy samotného glykogénu. Pri syntéze DNA reťazce nevyhnutné pre reakciu spínajú dve rôzne funkcie. Slovo primer vztahuje sa k reťazcu rastúcemu z 3'-OH strany a označuje jej funkciu. Koniec primeru - jeho terminálny nukleotid nesie voľnú 3'-OH skupinu a to je vlastne v užšom slova zmysle primer /v širšom slova zmysle je to predchádzajúcich 5-6 nukleotidov/.

Termín *2* m a t r i c a /syn. templát/ vztahuje sa k reťazcu DNA, ktorý určuje postupnosť nukleotidov v komplementárnom reťazci. Matricou je jeden reťazec v molekule DNA a primer sa nachádza na druhom /komplementárnom/ vlákne DNA.

Sumárnu reakciu, ktorú DNA polymeráza katalyzuje, môžeme zapísať nasledovne:



DNA-polymeráza má vlastne až tri substráty: uvoľnený nukleotid na matrici, koniec primeru *a voľnú 3'-OH skupinu* obsahujúci 3-hydroxylovú skupinu a napokon deoxynukleozidtrifosfát. V literatúre sa nukleotid na matrici a koncový primer často označuje za jeden substrát a uvádza sa pod pojmom koniec matrice-primeru. Reakcia vyúsťuje v nukleofilný atak atómu fosforu nukleozidtrifosfátu na 3'-OH skupinu na konci primeru. Produktami tejto reakcie sú: nový koniec primeru, t.j. nukleotid naviazaný na pôvodný primer 3'-5' fosfodiesterickou väzbou a neorganický pyrofosfát /P-P/. Následné rozloženie pyrofosfátu zabezpečuje priebeh reakcie prevažne v smere polymerizácie a robí túto reakciu prakticky nezvratnou. Nový reťazec rastie v smere 5' → 3'.

6.2.3 BIOSYNTÉZA POLYMÉROV - VŠEOBECNÉ PRINCÍPY

Spôsoby biosyntézy polymerov môžeme zhrnúť do dvoch mechanizmov, ktoré nazývame:

a uvoľnením a nov. pyrofosfátu (P-P) ktoré sú prakticky nezvratné = NEVRATNOST REAKCIE

- rast hlavou - zahrňuje reakciu aktivovaného konca polyméru s monomérom. Tento mechanizmus sa uplatňuje pri syntéze bielkovín na ribozónoch a
- rast chvostom - zahrňuje reakciu aktivovaného monoméru s neaktivovaným koncom polyméru. Tento typ sa uplatňuje s najväčšou pravdepodobnosťou tam, kde jeden z komponentov /obyčajne monomér/ prichádza z prostredia. Aktivácia sa uskutočňuje pomocou fosforylácie.

koniec 3'-OH primeru, ale iba!

Sam patria

- opozitný nukleotid - je pripojený k 3'-OH koncu primeru (opozitný nukleotid - DNA polymeráza)

6.2.4 BIOSYNTÉZA DNA IN VITRO

Príklad s matricou

nie je odmietané nespárovaný a matricou

Pri enzýmovej syntéze DNA, ako sme už uviedli, môže polynukleotidový reťazec DNA narastať v dôsledku reakcie nukleozid-5'-trifosfátu s 3'-OH skupinou deoxyribózy. Pre DNA by spomínané mechanizmy boli nasledovné:

I. /rast hlavou/: k polynukleotidovému reťazcu, ktorý je na narastajúcom konci zakončený trifosfátom, pripája sa mononukleozid-5'-trifosfát a z akceptoru sa uvoľní pyrofosfát;

II. /rast chvostom/: nukleozid-5'-trifosfát sa spája s 3'-hydroxylovou skupinou koncovej deoxyribózy za uvoľnenia pyrofosfátu z donoru.

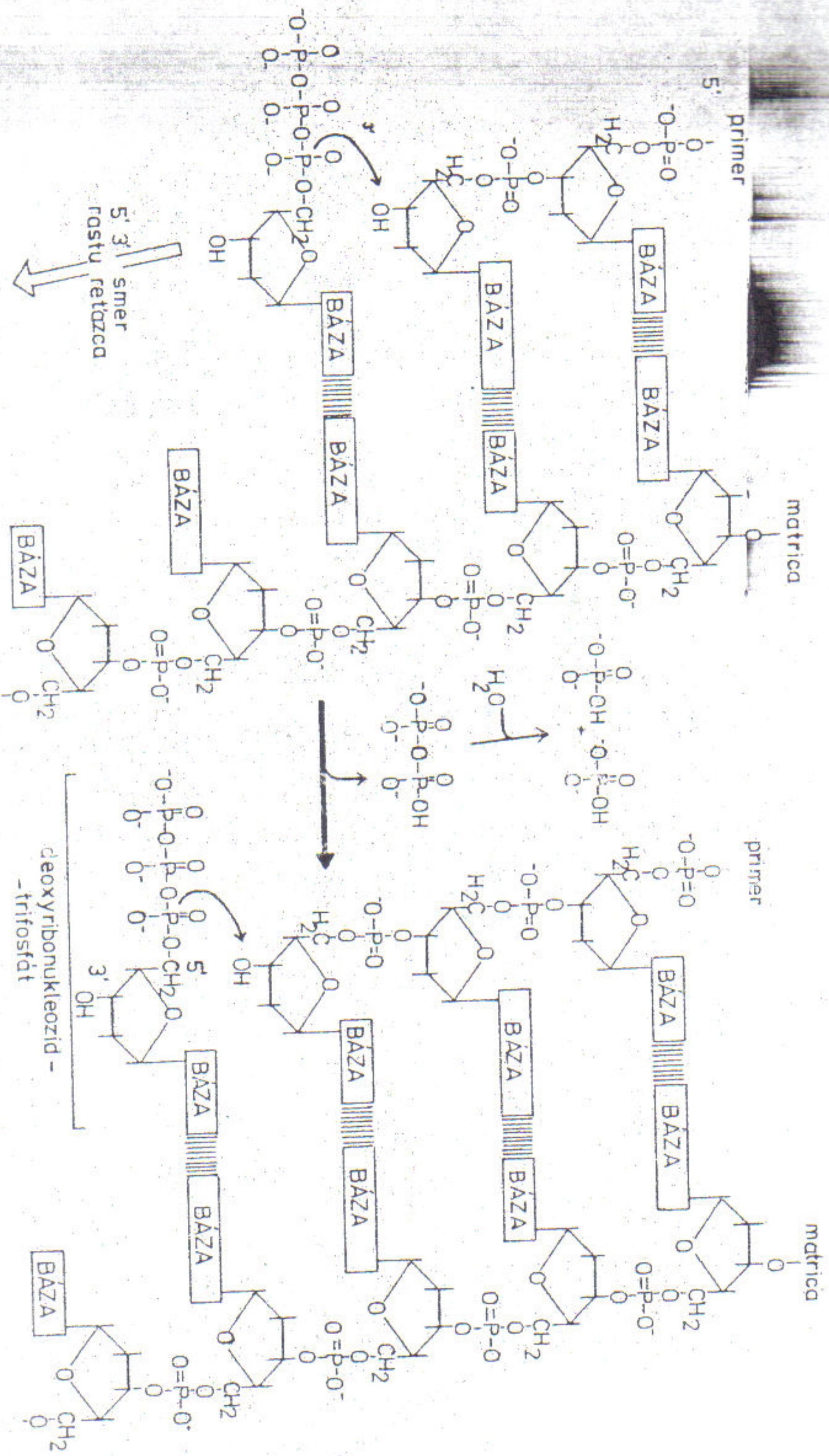
Presnosť replikácie DNA je zabezpečená presným párovaním komplementárnych báz /A-T, G-C/. Predtým, ako prebehne polymerizácia, deoxynukleozidtrifosfát z prostredia sa musí spárovať so svojím partnerom na matrici. Musíme mať na zreteli, že každý zo štyroch dNTP má rovnaké možnosti dosadnúť na voľný koniec primeru, ale len jeden tam komplementárne patrí. Ak sa náhodou vytvorí nepravidelný pár, enzým odmietne chybný nukleotid spojiť. Okrem toho, že enzým kontroluje presnosť párovania, kontroluje tento proces aj ako reakciu matrice a primeru. Ak sú bázy nespárované /matrica - dNTP/, polymerizácia /medzi 3'-OH skupinou primeru a dNTP/ neprebehne. Ak by predsa došlo k začudovaniu nesprávnej bázy, môže túto bázu DNA-polymeráza odstrániť, vďaka tomu, že má 3'-5' exonukleázovú aktivitu. Vplyvom tejto aktivity sa vyštiepujú z 3' konca rastúceho reťazca nespárované nukleotidy. Výsledkom uvedených krokov /ktorých završením je polymerizácia/ je vytvorenie dvojreťazcovej štruktúry s pravidelným párovaním báz pozdĺž molekuly DNA /obr. 29/.

V prípade omylem, t.j. pri nespárovaní nespárovaného nukleotidu na matricu DNA-polymeráza túto bázu odstrániť, vďaka tomu, že má 3'-5' exonukleázovú aktivitu. Tak sa vyštiepujú z 3' konca rastúceho reťazca nespárované nukleotidy.

6.2.5 KORNBERGOVÉ ZÁVERY

Kornberg na základe experimentálnych výsledkov urobil tieto dôležité závery pre syntézu DNA in vitro:

- 1. DNA-polymeráza za prítomnosti primeru, ktorý predstavuje riadiaci mechanizmus má nešpecifickú úlohu a pôsobí vo smere, ktorý je určený matricou DNA /templátom/;
- 2. izolované DNA-polymerázy majú schopnosť predlžovať reťazec DNA-primeru zachovávajúc pritom veľkú presnosť, ale



Obr. 29 Syntéza DNA

2) bez prítomnosti primeru ani jedna zo známych DNA-polymeráz nie je schopná začať /iniciovat/ syntézu nového reťazca DNA;

3) syntéza DNA nikdy neprebíha de novo, ale vždy cestou kovalentného zväzovania nukleotidov na matici existujúcich reťazcov DNA;

4) ako primer slúžia buď oligonukleotidové fragmenty DNA alebo RNA.

Experimentálne sa dokázalo, že DNA-polymerázy majú schopnosť syntetizovať deoxy-polynukleotidový reťazec, ktorý obsahuje ribonukleotidový koniec primeru. Je známe, že aj in vivo krátkodobé pôsobenie RNA-polymerázy zabezpečuje proces replikácie tvorbou RNA - primeru. Je pravdepodobné, že potom enzým nukleáza H rozozná a vyreže tento primerový úsek RNA. Takto sa zdá, že iniciácia syntézy DNA za spoluúčasti RNA-polymerázy je zrejme nevyhnutným krokom pre začatie syntézy DNA.

6.3 SYNTÉZA DNA IN VIVO

6.3.1 ÚVODNÁ POZNÁMKA

I napriek tomu, že experimentálne dôkazy o semikonzervatívnej replikácii DNA boli na svete ešte od r. 1958 /Meselson a Stahl/, presný mechanizmus replikácie in vivo nebol dlhý čas známy. Uvažovalo sa o tom, že rozpletené reťazce dvojspirály sú maticou pre radenie nukleotidov, a to po celej dĺžke reťazca a oba sa replikujú naraz. Takýto model by predpokladal, že jeden reťazec sa bude syntetizovať v smere 5' → 3' a druhý v smere 3' → 5'. Teda, že sa tu môžu uplatňovať oba mechanizmy: rast chvostom i rast hlavou. Ukázalo sa však, že také polymerázy neexistujú, ktoré by mali polymerizačnú aktivitu 3' → 5'.

SKUTOČNOSŤ: polymerázy syntetizujú iba v smere 5' → 3' a 3' → 5' neexistujú!

6.3.2 MECHANIZMUS REPLIKÁCIE DNA

Aký je teda mechanizmus replikácie DNA in vivo? Na pomoc prichádzajú opäť izotopy. A tak po r. 1960 sa definitívne rozhodlo a hlavne experimentálne dokázalo, že replikácia DNA je vlastne diskontinuitná.

Replikácia DNA je zložitý mnohostupňový proces. Na syntéze DNA sa podieľa niekoľko skupín proteínov /enzýmového a neenzýmového charakteru/, ktoré tento komplikovaný proces umožňujú a kontrolujú. Replikácia DNA je totiž proces veľmi presný, pri ktorom chybná báza sa vyskytuje vo frekvencii 1 na 10⁹ /na rozdiel od transkripcie, kde sa vyskytuje 1 na 10⁴/.

Pred samotnou replikáciou musí prebehnúť dešpiralizácia DNA, a to v niekoľkých fázach: najprv sa musí zrušiť superšpiralizovaná štruktúra. Na tomto

*prenosť klesá
v DNA → 1 chybná báza
na 10⁴ fic!*

processe sa podielajú topozomerázy a gyrázy. Napokon sa musia aj jednotlivé vlákna oddeliť a sprístupniť syntéze, čo majú na starosti helikázy /rozmotávacie proteíny/. Rep - proteíny, ako súhrnne nazývame proteíny podieľajúce sa na iniciácii replikácie, majú predovšetkým denaturačnú funkciu.

6.3.3 KROKY REPLIKÁCIE D

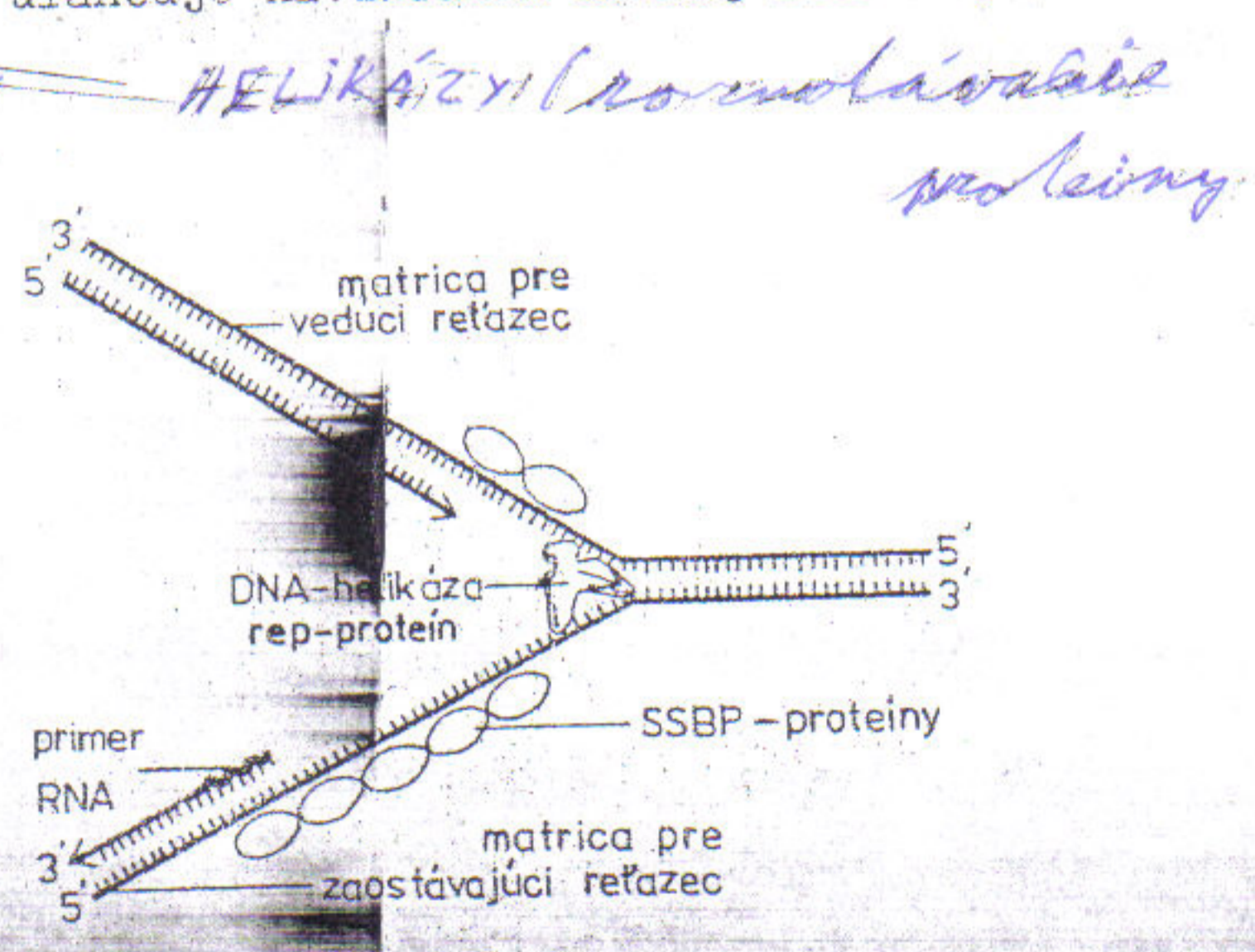
Vlastná replikácia DNA má tieto hlavné kroky:

- iniciáciu replikácie,
- elongáciu replikácie a
- ukončenie replikácie.

6.3.3.1 Iniciácia replikácie

Odohráva sa v bode, ktorý sa nazýva počiatkový bod alebo origin /ori/. Je to miesto na DNA, ktoré obsahuje asi 300 nukleotidov a je väzbovým miestom pre proteíny, ktoré sú potrebné na vytvorenie replikačnej vidlice, ktorá sa postupne mení na replikačnú bublinu. Ďalšia skupina proteínov, ktoré dnes nazývame SSBP /single strand binding proteins/, oddeľujú komplementárne vlákna DNA a stabilizujú jednovláknové reťazce v replikačnom bode. V replikačnej vidlici sa nachádza okolo 200 molekúl týchto bielkovín, pričom každá molekula tvorí komplex s 8-10 nukleotidmi. Každá naviazaná molekula rozmotávacích bielkovín priestorove uľahčuje naviazanie ďalšej molekuly uvedenej bielkoviny /obr. 30/.

*1.2 najvýznamnejších
biologické a genetické*



Obr. 30 Syntéza DNA - replikačná vidlica

Vzhľadom k tomu, že DNA polymerázy nie sú schopné začať /iniciovať/ syntézu DNA a vytvárať primer, túto úlohu preberá RNA-polymeráza zvané primáza. Primáza na DNA-reťazci vytvorí krátky hybridný /komplementárny/ úsek DNA-RNA

a voľnou 3'-OH skupinou na konci primeru, ktorá je potrebná pre funkciu DNA-polymerázy. Syntézou RNA-primeru sa končí fáza iniciácie replikácie, ktorá pokračuje samotnou replikáciou /elongácia/.

6.3.3.2 Elongácia replikácie

Ako sme si už uviedli, všetky známe DNA-polymerázy dokážu syntetizovať DNA len v smere 5' → 3'. Otázka bola, ako sa teda syntetizuje opozitný reťazec? R. 1968 Okazaki so spolupracovníkmi dokázal, že syntéza DNA je diskontinuitná a replikačná vidlica je asymetrická v tom zmysle, že jeden nový reťazec sa syntetizuje rýchlejšie, je to tzv. vedúci /leading strand/ a druhý nový reťazec sa syntetizuje pomalšie a v malých úsekoch zvaných Okazakiho fragmenty. Je to tzv. zaostávajúci /lagging strand/. Okazakiho fragmenty, ktoré pri prokaryotoch sú dlhé 1000 - 2000 nukleotidov /pri eukaryotoch len 100 - 200 nukleotidov/ sa tiež syntetizujú v smere 5' → 3'.

Každý Okazakiho fragment potrebuje RNA primer, ku ktorému DNA-polymeráza III, ktorá sa vyznačuje veľkou rýchlosťou syntézy, pripája deoxynukleozidtrifosfáty. Primer RNA sa z DNA odstraňuje buď exonukleázovou aktivitou DNA-polymerázy I /pôvodný Kornbergov enzým/ alebo ribonukleázou H. Mechanizmus je nasledovný: DNA-polymeráza I svojou exonukleázovou aktivitou 3' - 5' vyštiepuje a postupne 5' - 3' polymerázovou aktivitou syntetizuje tú časť reťazca DNA, kde bol pôvodne primer RNA.

DNA polymeráza I sa skladá vlastne z dvoch enzýmov spojených peptidovou väzbou, a to: z väčšieho fragmentu, ktorá má 5' - 3' polymerázovú a 3' - 5' exonukleázovú aktivitu a menšieho fragmentu, ktorý má len 5' - 3' exonukleázovú aktivitu.

6.3.3.3 Ukončenie replikácie

Replikácia DNA v jednej replikačnej vidlicke končí spojením úsekov /Okazakiho fragmentov/ novosyntetizovaného reťazca kontinuálneho vlákna pomocou enzýmu DNA-ligázy. Pre svoju činnosť vyžaduje tento enzým prítomnosť ko-faktora. Pri E. coli je to NAD a v eukaryontných bunkách ATP.

Replikácia je ukončená vtedy, keď prebehne pozdĺž celej molekuly DNA.

6.4 REPLIKÁCIA PROKARYOTICKEJ DNA

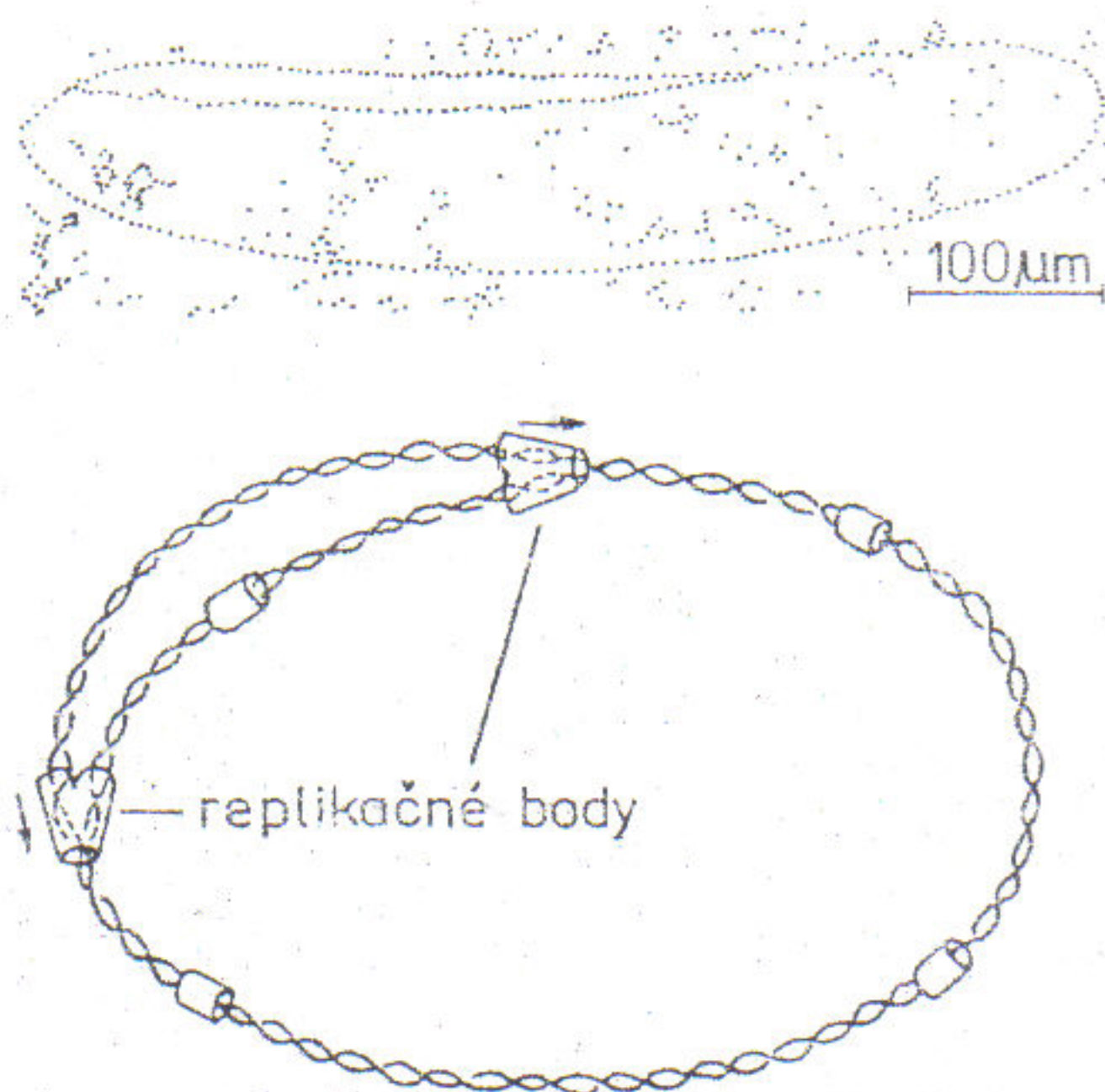
(na budúce prebrať)

Prokaryotické organizmy obsahujú DNA vo forme kovalentne uzavretej kružnicovej molekuly. Takáto DNA sa môže replikovať mechanizmom, ktorý sme práve

1. popísali a ktorý sa v literatúre označuje ako ypsilon model replikácie alebo tiež symetrický.

2. Druhý tzv. asymetrický model môže mať niekoľko variantov. Dvojreťazcová kruhová DNA sa môže replikovať buď vo oboch smeroch, napr. fág λ alebo chromozóm E. coli. Takáto replikácia si nutne vyžaduje zárez /nik/ aspoň v jednej reťazci DNA /najčastejšie v oboch/ - obr. 31. Iný variant predstavuje syntézu DNA v jednom smere.

Replikácia DNA



Obr. 31 Replikácia bakteriálnej DNA

Mechanizmus syntézy v jednom smere sa najčastejšie uplatňuje pri jedno-reťazcových kružnicových molekulách. Tento spôsob syntézy DNA nazývame mechanizmus /model/ otáčajúcej sa kružnice /rolling circle/. Kruh zostáva kovalentne uzavretý /tzv. plus vlákno/ a slúži ako matrica. Novosyntetizovaný 5'-koniec sa môže spojiť s membránou a na 3'-konci prebieha "permanentná" syntéza. Enzým nukleáza je schopný rozštiepiť takúto DNA na segmenty, ktoré /v prípade dvojreťazcovej DNA spájajú sa najprv kohéznymi komplementárnymi koncami/ cirkularizujú a vytvorenie kruhovej štruktúry završuje enzým ligáza. Takýmto spôsobom na jednej matrici môžu sa nasyntetizovať početné kópie kružnicovej /cirkulárnej/ DNA.

8.11.2004

6.5 REPLIKÁCIA EUKARYOTICKEJ DNA

Pri eukaryotoch syntéza DNA prebieha v tej časti mitotického cyklu, ktorú nazývame syntetická alebo S-fáza. V S-fáze sa syntetizujú aj históny, takže je to fáza replikácie celého chromozómu. Mechanizmus replikácie DNA eukaryotov je semikonzervatívny a v podstate v hrubých rysoch zhodný a tým mechanizmom, ktorý sme si uviedli pre prokaryotickú DNA.

Replikácia eukaryotickej DNA začína na väčšom počte miest ako pri prokaryotoch. Tak napr. chromozóm E. coli má dve replikačné vidlice, zatiaľ čo najväčší chromozóm drozofily /ovocnej mušky/ má asi 6000 replikačných vidlíc. Časti chromozómu, ktoré sa naraz replikujú vrátane počiatku replikácie sa nazývajú replikóny.

V poslednom čase sa dokázalo, že replikácia eukaryotickej DNA prebieha tiež prostredníctvom Okazakiho fragmentov, ktoré sa tvoria pomocou krátkych DNA-primerov s dĺžkou 9 ± 1 nukleotid, ktorých syntéza je katalyzovaná RNA-primázou. Okazakiho fragmenty sú tu však kratšie - v priemere asi 135 nukleotidov. Syntéza fragmentov je katalyzovaná DNA-polymerázou III. Po odstránení RNA-primeru a dosyntetizovaní chýbajúcich častí DNA-polymerázou I, Okazakiho fragmenty sa spájajú DNA-ligázou. Na replikácii eukaryotickej DNA sa zúčastňujú viaceré rozpustné cytoplazmatické faktory, ktoré majú význam pri iniciácii replikácie, pri disociácii histónov a iných bielkovín viazaných na DNA. Je jasné, že skôr ako sa môže DNA zreplikovať, musí sa dehistónovať, po zreplikovaní sa opäť spája s bielkovinami a organizuje sa do nukleozómov.

6.6 STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA PROKARYOTICKÝCH A EUKARYOTICKÝCH DNA-POLYMERÁZ

DNA-polymeráza I

je pôvodný Kornbergov enzým, syntetizuje krátke úseky DNA, ktoré zostávajú po odstránení RNA-primeru. Má skôr korekčnú funkciu. Relatívna molekulová hmotnosť tohto enzýmu je okolo 100 000. Je to polypeptid kódovaný génom polA. Obsahuje 928 aminokyselín, dva cysteíny a dvojmocný zinok Zn^{+2} . Čistá DNA-polymeráza pri $37^{\circ}C$ pripája asi 1000 nukleotidov za minútu. Má polymerizačnú aktivitu v smere $5' \rightarrow 3'$ a exonukleázovú aktivitu $3' \rightarrow 5'$ a $5' \rightarrow 3'$. Proteolýzou vznikajú dva fragmenty: väčší nazývaný Klenowov fragment si zachováva polymerizačnú aktivitu a $3' \rightarrow 5'$ exonukleázovú aktivitu. Menší fragment má len $5' \rightarrow 3'$ exonukleázovú aktivitu. Uvedené aktivity využívajú pri odstraňovaní RNA-primerov.

3 aktivít
1) väčší $5' \rightarrow 3'$ polymerizačná aktivita
2) $3' \rightarrow 5'$ exonukleázová aktivita
3) menší $5' \rightarrow 3'$ exonukleázová aktivita

DNA-polymeráza II

má relatívnu molekulovú hmotnosť 120 000. Je kódovaná génom pol B, má len 5 % aktivity DNA-polymerázy I. Okrem polymerizačnej aktivity vyznačuje sa 3' → 5' exonukleázovou aktivitou. Jej presná biologická funkcia nie je známa. Podľa niektorých autorov dosyntetizuje chýbajúce úseky v Okazakiho fragmentoch.

DNA-polymeráza III

je vlastný polymerizačný enzým, ktorý je kódovaný génom pol C. Mutácia v géne pol C je vždy letálna, z čoho sa usudzuje, že DNA-polymeráza III je skutočnou replikázou aj in vivo. Jej polymerizačná aktivita je asi 15-krát väčšia ako DNA-polymerázy /okolo 15 000 nukleotidov za minútu/. DNA-polymeráza III je mnohozložkový enzým, ktorý sa vyskytuje v komplexnej forme. Z toho vyplýva, že až spojenie viacerých polypeptidových reťazcov /protomérov/ tvorí biologicky aktívnu polymerázu, ktorá katalyzuje predlžovanie komplementárneho reťazca na matrici DNA. /Doteraz je známych 7 protomérov DNA pol III./

Eukaryotické bunky vyšších organizmov obsahujú tri odlišné typy DNA-polymerázy označované ako α , β a γ . Líšia sa navzájom molekulovou hmotnosťou, citlivosťou k sulfhydrylovým inhibítorm, napr. k N-etylmaleínimidu a k soľam. Naše znalosti o týchto polymerázach sú oveľa skromnejšie ako pri prokaryotických DNA polymerázach.

DNA-polymeráza α

katalyzuje syntézu Okazakiho fragmentov. Nemá nukleázovú aktivitu. Je citlivá k N-etylmaleínimidu. Jej aktivita závisí na iónoch Mg^{2+} a Mn^{2+} . Je inhibovaná koncentraciami NaCl vyššími ako $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$. Jej molekulová hmotnosť je asi 120 000 - 300 000. Táto DNA-polymeráza sa vyskytuje vo všetkých eukaryotických bunkách.

DNA-polymeráza β

je rezistentná k N-etylmaleínimidu a inhibuje ju dvojnásobná koncentrácia NaCl ako DNA polymerázu α . Nevyznačuje sa nukleázovou aktivitou a jej molekulová hmotnosť je 30 000 - 50 000. Vyskytuje sa len u mnohobunkových živočíchov.

DNA-polymeráza γ

je značne rozšírený enzým, ktorý je schopný replikovať natívnu DNA i syntetické matrice. Je inhibovaná N-etylmaleínimidom a má molekulovú hmotnosť 150 000 - 300 000.

Je vhodné uviesť, že označenie DNA-polymeráza I, II a III sa často používa aj pri eukaryontoch.

6.7 VÝZNAM KOMPLEMENTARITY BÁZ

Na záver kapitoly o syntéze DNA chceme uviesť, že špecifické párovanie medzi komplementárnymi nukleotidmi pravdepodobne zohralo rozhodujúcu úlohu pri vzniku života. Tento fakt zdôrazňujú aj slová prof. Dotyho, ktoré odzneli na Medzinárodnom sympóziu makromolekulovej chémie r. 1956 v Prahe: "Je najvyšš zaujímavé a z fyzikálno-chemického hľadiska musíme pripustiť, i kuriózne, že nespárované DNA reťazce reprezentujú akt I, ktorý sa môže nazvať hra života /play of Life/. Naša práca - pokračuje prof. Doty - smeruje k cieľu podporiť názor Watsona a Cricka, že duplikácia živého systému začína s otvorením reťazcov DNA. Po akte I nasleduje proces, pri ktorom sa monomerné jednotky pripájajú na báзовé skupiny uvoľnených reťazcov, produkujúc presnú sekvenciu ako mal druhý reťazec. V našej /nepresnej/ analógii toto je akt II a napokon v akte III monoméry sa spájajú dohromady enzymatickou akciou s výsledkom, ktorý nám poskytuje dve dvojreťazcové molekuly miesto jednej. Nové molekuly DNA sú presnou kópiou originálu".

Takýto komplementárny matricový mechanizmus je jednoduchý a tvorí základ informačno-transferových procesov v biologických systémoch. Genetická informácia je zakódovaná v poradí /sekvencii/ nukleotidov v polynukleotidových molekulách - nukleových kyselinách. Táto informácia sa odovzdáva z generácie na generáciu pomocou komplementárneho párovania báz, ktoré sa uplatňuje na všetkých stupňoch prenosu informácie: pri replikácii DNA, transkripcii genetickej informácie z DNA do RNA, ako aj pri translácii /preklade/ genetickej informácie z poradia nukleotidov do poradia aminokyselín v bielkovinách.

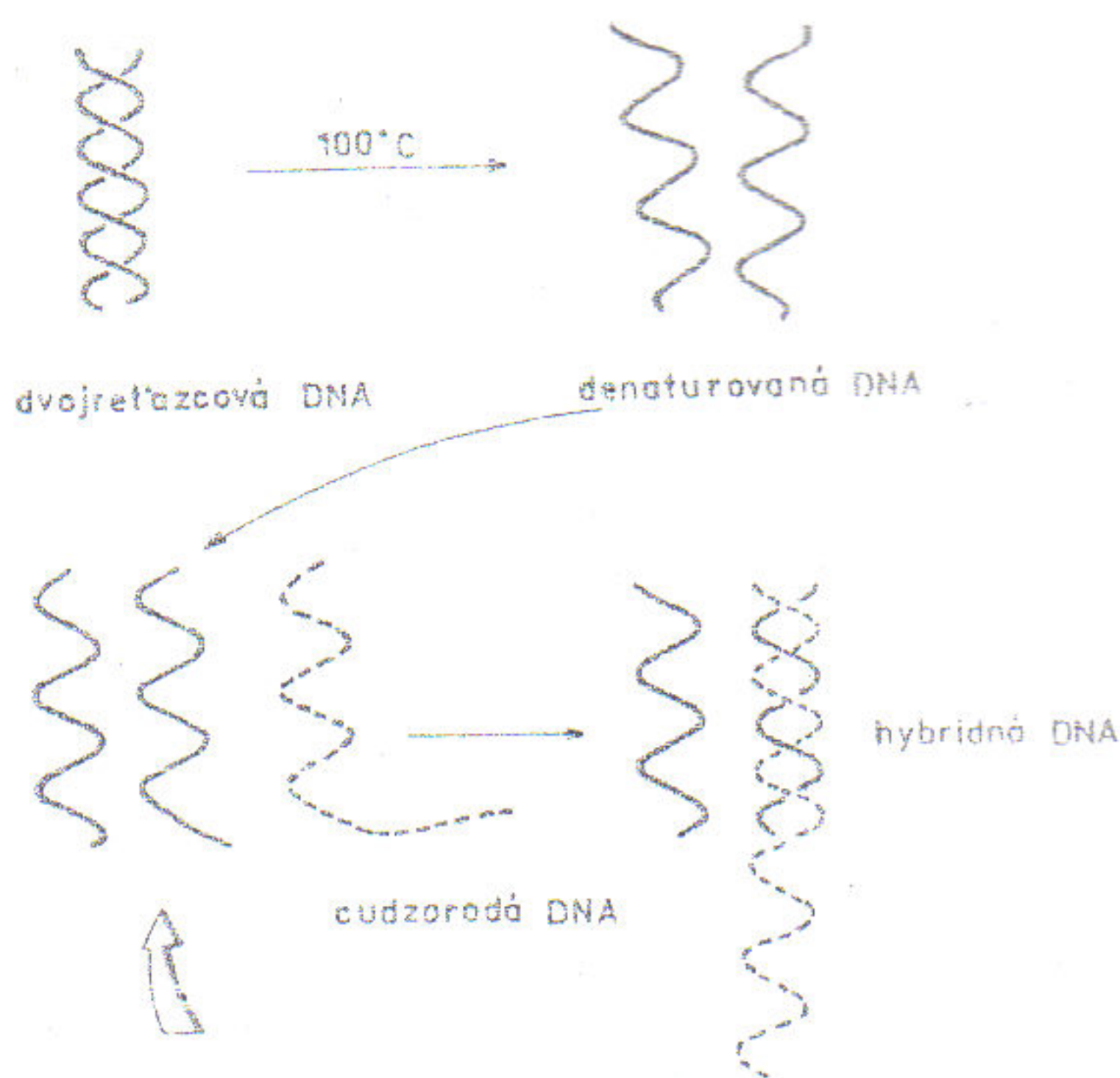
6.8 HYBRIDIZÁCIA NUKLEOVÝCH KYSELÍN

Hybridizácia je metóda, ktorá sa používa na určenie homologických sekvencií v nukleových kyselinách /obr. 32/.

Experimentálne sa dokázalo, že DNA molekula sa destabilizuje a rozpletá porušením vodíkových väzieb pôsobením teploty v závislosti od iónovej sily roztoku, v ktorom sa nachádza DNA. Hovoríme, že DNA sa denaturuje. Rýchlosť denaturácie okrem uvedených podmienok závisí od samotnej štruktúry DNA, konkrétne od obsahu jej G-C párov. DNA s vyšším obsahom G-C párov denaturuje pomalšie. Pre DNA sa používajú tieto podmienky:

- zahriatie vodného roztoku DNA na 100 °C, alebo
- použitie alkalických roztokov s vysokým pH /okolo 13/.

Opatrným ochladzovaním môžeme dosiahnuť úplnú renaturáciu denaturovanej DNA, čo zistíme spektrofotometricky. /Maximum UV absorpcie má DNA pri 260 nm./



Obr. 32 Schematické znázornenie hybridizácie DNA

Denaturovaná DNA dáva absorpčné spektrum asi o 10 % vyššie položené ako natívna DNA /hypochrómny efekt/. Pri denaturácii viskozita klesá, pri renaturácii opäť stúpa.

Hybridizovať môžu však i heterológne vlákna, napr. DNA-RNA.

Najčastejšie jedno z vlákien máme rádioaktívne označené, aby sme mohli detegovať hybridnú molekulu. Takto môžeme určiť stupeň homológie DNA, čo sa využíva v systematike na určenie genetickej príbuznosti a hybridy DNA-RNA za sa pri génových manipuláciách.

V súčasnosti sú veľmi rozšírené metódy tzv. presávania nukleových kyselín:

- presávanie DNA /Southern blotting/ je prenos denaturovanej DNA z gélu na membránový filter, na ktorom táto DNA môže hybridizovať s komplementárnou sekvenciou nukleovej kyseliny;
- presávanie RNA /Northern blotting/ je analogicky prenos RNA z gélu na membránový filter, na ktorom môže hybridizovať s komplementárnou DNA.

7. FUNKCIA, ŠTRUKTÚRA A SYNTÉZA RNA

7.1 FUNKCIA RNA A ROZDELENIE RNA

Ribonukleové kyseliny predstavujú skupinu polyribonukleotidov rôzneho zloženia a dĺžky. Delia sa na viacero typov a spĺňajú rôzne biologické funkcie, ktorým sú svojou štruktúrou dokonale prispôsobené. Ich prvoradou úlohou je prenášať genetickú informáciu o stavbe bielkovín z DNA k ribozómom, resp. z jadra do cytoplazmy. Tento smer prenosu genetickej informácie stručne zapisujeme nasledovne:



RNA môžu plniť tieto hlavné biologické úlohy:

- RNA môže predstavovať samotný genetický materiál /vírusová DNA/,
- sprostredkuje prenos informácie z DNA na RNA. To je mediátorová RNA - mRNA /predtým označovaná ako informačná RNA/,
- tvorí spojovací článok medzi mediátorovou RNA a bielkovinami. To je transferová RNA /tRNA/,
- je súčasťou dôležitých štruktúr - ribozómov. To je ribozómová RNA /rRNA/.

Okrem uvedených typov sa v organizme nachádzajú početné nízkomolekulárne RNA. Súčasnú experimenty sa zameriavajú na objasnenie ich biologickej funkcie.

neobjasnená biolog. funkcia

7.2 VÍRUSOVÁ RNA

7.2.1 CHARAKTERISTIKA VÍRUSOVEJ RNA

Niektoré vírusy a fágy majú ako nositeľa genetickej informácie jednorezcovú RNA. Do tejto skupiny patria najmä bakteriofágy. Z rastlinných pato-

vyskytujú sa u niektorých vírusov a fágov

in vitro syntéza kórovanej Q β RNA - infekcia vo výživ kultúry

- 1, syntéza RNA je funkčnejšia
- 2, Q β replikácia in vitro - pomocou podobnej
- 3, EE je špecifický prímes (Q β replikácia je komplex proteínov)

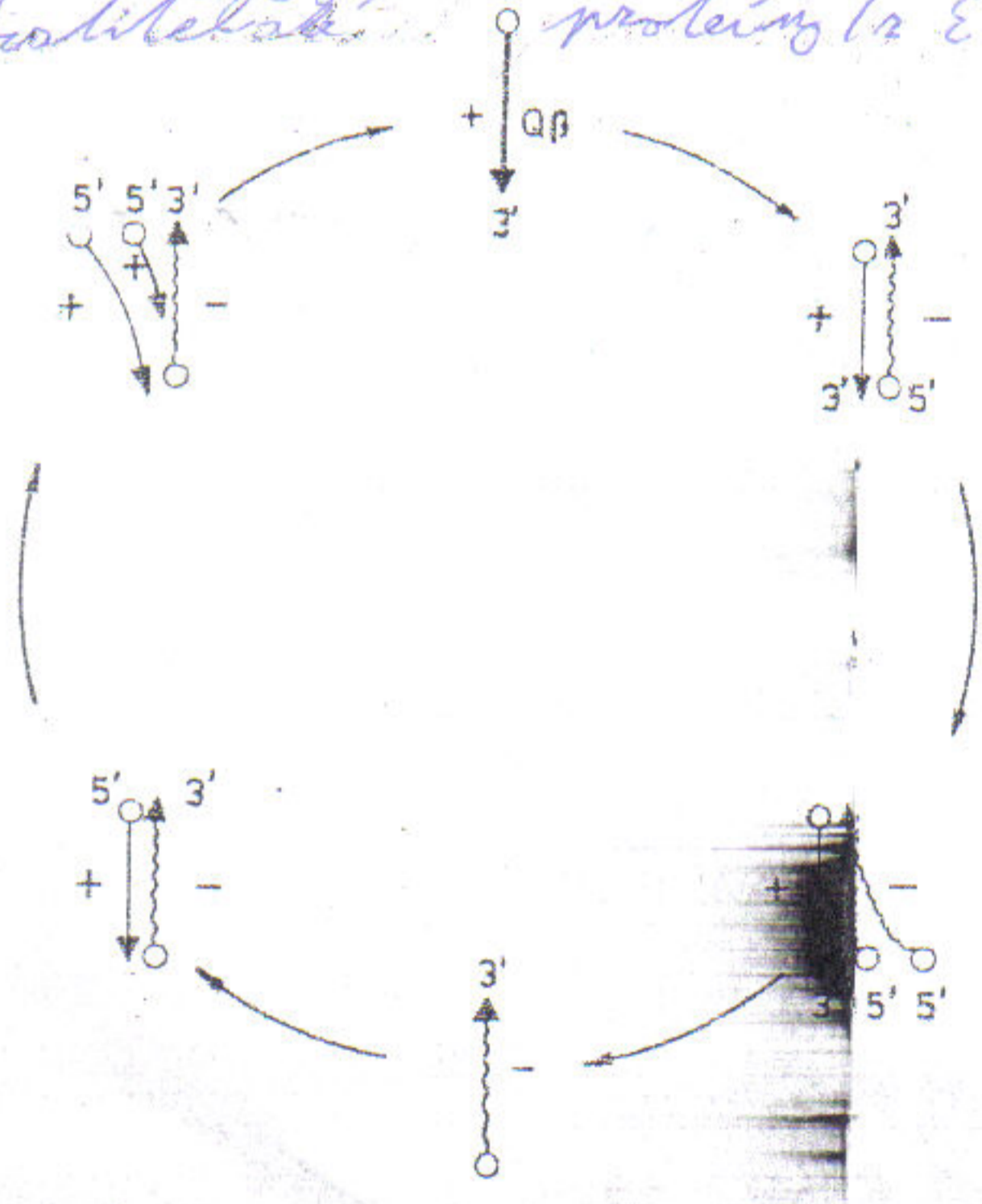
génov je to známy vírus tabakovej mozaiky /VTM/ a mnohé živočíšne a ľudské vírusy, napr. vírus poliomyelitídy, ďalej Rousov sarkómový vírus a i.

Z bakteriofágov obsahujúcich RNA sú najznámejšie MS2, R17 a Q β . Fágy, ktoré obsahujú jednovláknovú RNA predstavujú geneticky najjednoduchšie systémy. RNA tejto skupiny vírusov je tvorená jednou molekulou vo virióne. Uvedená RNA obsahuje informáciu pre 3 fágové proteíny, počnúc od 5'-konca je to oblasť pre prichytávací proteín, ďalej pre obalový proteín a pre enzým syntetázu. RNA-syntetáza je súčasť komplexného enzýmu, ktorý zabezpečuje syntézu /replikáciu/ fágovej RNA. Kompletný enzým, ktorý sa podieľa na syntéze fágovej RNA nazýva sa RNA-replikáza.

7.2.2 REPLIKÁCIA VÍRUSOVEJ RNA

Replikácia jednoreťazcovej RNA prebieha tak, že sa na tzv. plus vlákne vytvorí komplementárne mínus vlákno, ktoré sa osamostatní a na ňom sa opäť syntetizuje plus vlákno /obr. 33/. Toto plus vlákno po oddelení od mínus

* - a ktorých iba 1 (syntetáza) je kódovaný vírusom
 - ďalšie 3 sú hostiteľské proteíny (z E. coli)



Obr. 33 Replikácia fága Q β

vlákna slúži buď ako mediátorová RNA alebo ako genetický materiál pre utvorenie ďalších bakteriofágov. Aby sa mohli vytvoriť kompletne fágové častice, je potrebné, aby sa nasyntetizovali obalové bielkoviny. Tento proces sa odohráva na ribozómoch bakteriálnej bunky /v hostiteľovi/. Ako zdroj informácie slúži plus vlákno. /Mínus vlákno nemá túto schopnosť./

Stojí za zmienku, že pri fágu Q β sa prvýkrát podarilo dosiahnuť úplnú replikáciu syntetickej Q β RNA v systéme in vitro pomocou RNA-polymerázy závislej na RNA. Je to vlastne Q β -replikáza. Táto in vitro syntetizovaná RNA bola úplne funkčná, t.j. bola schopná vyvolávať infekciu. Môžeme teda predpokladať, že aj in vivo sa táto RNA replikuje pomocou RNA-replikázy. Ukázalo sa, že tento enzým je prísne špecifický, napr. Q β -replikáza predstavuje komplex štyroch proteínov, z ktorých, ako sme už uviedli, len jeden /syntetáza/ je kódovaný fágovou RNA. Ostatné tri sú hostiteľské proteíny /z E. coli/.

Vidíme, že v najjednoduchších systémoch sú procesy replikácie genetickej informácie a prenosu genetickej informácie úzko späté a často prebiehajú simultánne.

7.3 MEDIÁTOROVÁ RNA /mRNA/

*gen. materiál je vložený v 2 vláknovej DNA
→ ktorá je dostupná*

Treba na tomto mieste zdôrazniť, že väčšina živých organizmov obsahuje ako genetický materiál dvojreťazcovú DNA, ktorá je relatívne stabilná a metabolicky málo aktívna. Zakódovanú genetickú informáciu v poradí nukleotidov odovzdáva pomocou komplementárneho párovania báz na ďalšiu nukleovú kyselinu, ktorou je mediátorová RNA /mRNA/. Odovzdanie informácie z jedného reťazca DNA do mRNA sa nazýva prepis alebo transkripcia. Je to vlastne prvý stupeň prenosu informácie v procese proteosyntézy.

→ príde k transkripcii

Vzhľadom k tomu, že najviac poznatkov o tomto procese máme pri prokaryotoch, uvedieme si najprv syntézu mRNA pri E. coli, a potom poukážeme na niektoré zvláštnosti, ktoré boli v poslednom čase experimentálne zistené pri syntéze mRNA eukaryontov /najmä pri živočíchoch/.

7.3.1 PROKARYOTICKÁ mRNA

Syntéza mRNA odohráva sa na matrici DNA pomocou enzýmu RNA-polymerázy. Je to RNA polymeráza závislá na DNA a predstavuje mnohozložkový enzým. Podjednotky sa líšia molekulovou hmotnosťou a enzýmovou špecifitou. Pri prokaryotoch sa skladá z týchto podjednotiek: α , α , β , β' a σ . Coreferment pozostávajúci zo štyroch podjednotiek / α , α , β , β' / je schopný predlžovať započatú transkripciu, ale nie iniciovať. Túto funkciu má σ /sigma/ faktor, ktorý DNA rozozná iníciačný signál pre transkripciu /promótor/. Inú katalytickú funkciu nemá, preto sa z enzýmu uvoľňuje. Sigma faktor zodpovedá aj za výber reťazca pre transkripciu. Repetitívne miesta na DNA, ktoré sa nachádzajú v promotoroch, sú lokusom pre zachytenie RNA-polymerázy.

Pri E. coli sú známe gény zodpovedajúce za syntézu podjednotiek RNA polymerázy:

umánne
Fágy,
ie sys-
ie. Dve-
ca je to
ým syn-
e synté-
téze

vlákne
a opät
ínus

utvo-
astice,
sa od-
ormácie

- rpo A - pre polypeptidový reťazec α
- rpo B - pre polypeptidový reťazec β
- rpo C - pre polypeptidový reťazec β'
- rpo D - pre polypeptidový reťazec σ

Ďalší faktor ρ /ró/ netvorí súčasť enzýmu, ale je potrebný pre termináciu transkripcie.

Transkripčnú jednotku reprezentuje časť DNA začínajúca promótorom a končiacou terminátorom /transkripton/.

uľončení
 Pri ^{mRNA} prokaryotoch sa prepisuje viac štruktúrnych génov naraz a takáto mRNA sa nazýva multigénová. Prokaryotická mRNA je hneď po svojej syntéze aktívna. Po odstránení úvodnej a terminačnej sekvencie môže hneď uskutočňovať svoju genetickú funkciu. (na rozdiel od eukaryotov)

7.3.2 EUKARYOTICKÁ mRNA

Pre veľkú komplexnosť nebolo skôr možné študovať eukaryontný genóm priamymi metódami na molekulárnej úrovni. Nové techniky a použitie rádionuklidov ozrejmili v súčasnosti niektoré detaily aj tohto procesu.

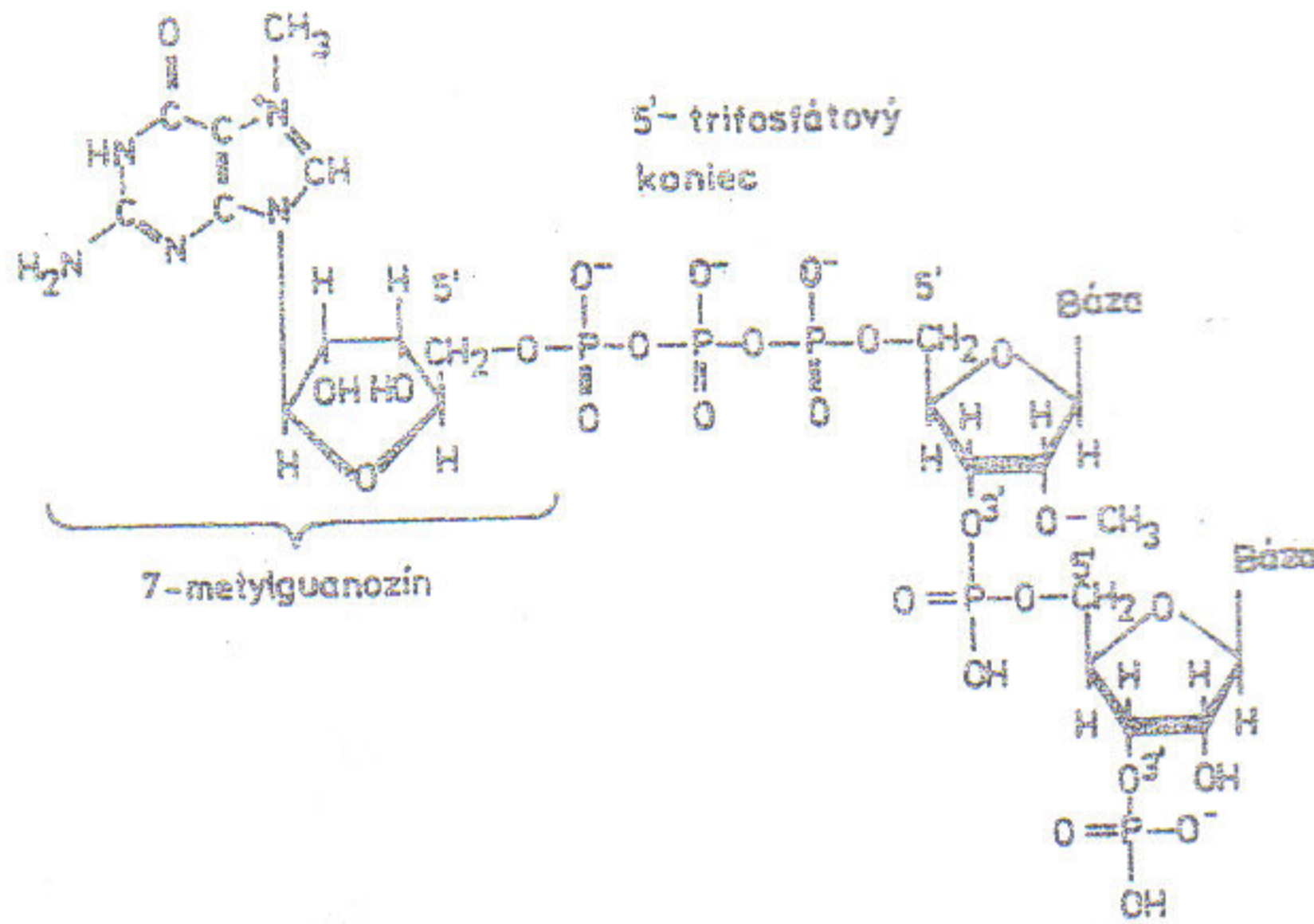
Musíme si uvedomiť, že pri vyšších organizmoch musí primárny transkript /tzv. pre-mRNA/ prekonať cestu od jadra - miesta syntézy do cytoplazmy, kde sa proteosyntéza odohráva. Táto pre-mRNA podlieha viacerým zmenám, z ktorých väčšina sa odohráva v jadre. Prekursorové mRNA sa premieňajú na zrelé a funkčne aktívne mRNA v procese, ktorý nazývame úprava mRNA alebo processing. Posttranskripčná modifikácia pre-mRNA zahŕňa tieto kroky:

- úpravu 5' konca tvorbou čiapky /cap/
- modifikáciu metyláciou
- úpravu 3' konca tvorbou poly A
- zostrih a vyštiepenie nekódujúcich sekvencií.

I 7.3.2.1 Úprava 5'-konca

Skupín a ribozómov
 Pri eukaryotoch krátko po iniciácii transkripcie pripája sa na 5'-koniec pre-mRNA alkylovaný guanín v polohe 7 viazaný zvláštnou 5' - 5' väzbou s nasledovným nukleotidom. Nazýva sa čiapka. Je to blokujúca štruktúra a môže byť trojakého typu: cap 0, cap 1 a cap 2 podľa počtu metylových skupín na ribozových zvyškoch. Cap 0 nemá metylovanú ribózu, cap 1 má metylovanú prvú ribózu a cap 2 má metylované prvé dve ribózy v polohe C-2'. Zdá sa, že štruktúra čiapky má význam pre rýchlosť s akou sa iniciuje translácia /preklad genetickej informácie/. Čiapka chráni mRNA pred účinkom nukleáz a umožňuje rozpoznávanie mRNA ribozómom /str. 34/.

Funkcie čiapky:



Obr. 34 Štruktúra čiapky na 5'-konci mRNA

7.3.2.2 Vnútoraná metylácia

vnútorných nukleotidov pre mRNA

Metylácia vnútorných nukleotidov pre-mRNA sa deje pomocou dvoch enzýmov - metyltransferáz. Jedna funguje pre tvorbu N-CH₃ a druhá pre O-CH₃. Metyláciou je pre-mRNA chránená pred nukleázami. Metylované bázy sú podstatné pre väzbu mRNA na ribozóm.

7.3.2.3 Úprava 3'-konca mRNA

A-adenin

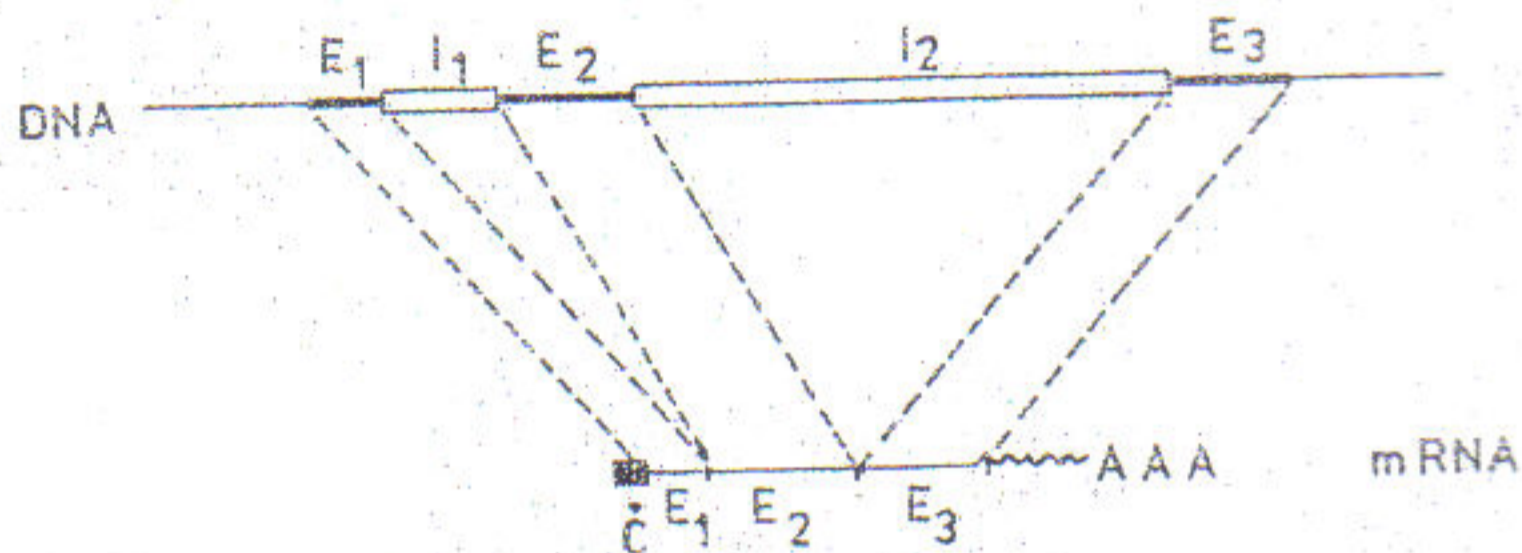
Tvorba polyadenylového úseku má za cieľ ochrániť 3'-koniec pre-mRNA. Enzým poly A-adenyláza pripája k hotovej pre-mRNA 200-300 A, ktoré nemajú na mRNA komplementárny úsek. Jedná sa o posttranskripčnú syntézu monotématického bloku, ktorého význam nie je celkom vyjasnený. V poslednom čase sa zistilo, že úsek poly A majú aj niektoré prokaryotické mRNA.

7.3.2.4 Zostrih mRNA /splicing/

Molekuly mRNA, ako produkty priamej transkripcie, vyznačujú sa veľkou heterogennosťou, lebo programujú veľké množstvo rôznych bielkovín, napr. solubilných enzýmov, sekrečných bielkovín, štruktúrnych bielkovín a pod. Rozsery funkčných jednotiek genómu /génov/ sú väčšie ako dĺžka štruktúrneho génu, ktorý často predstavuje len jej malú časť. Preto aj primárny transkript má obvyčajne vysokú molekulovú hmotnosť a nazýva sa heterogénna nukleárna RNA (hnRNA). hnRNA sú oveľa rozmernejšie ako cytoplazmatické mRNA. Len časť hnRNA

predstavuje pre-mRNA, teda vlastné prekurzorové mRNA. V prekurzorových molekulách prebieha úprava strihom a znovuspojením /splicing/.

Najprekvapivejším výsledkom výskumov posledných rokov bolo zistenie, že eukaryotické gény tvoria diskontinuitné sekvencie. Inými slovami, že gény sa skladajú z kódujúcich častí /exónov/ a nekódujúcich častí /intrónov/. Takéto gény boli nazvané zložené alebo mozaikové gény /obr. 35/. Uvedené pojmy exón a intrón však nemožno chápať absolútne, pretože v posledných rokoch sa zistilo, že niektoré intróny môžu plniť kódujúcu funkciu. Preto v súčasnosti chápeme exón a intrón ako relatívne pojmy.



Obr. 35 Schéma mozaikového génu a jeho prepis do mRNA /E1, E2, E3 sú exóny; I1, I2 sú intróny; Č = čiapka; AAA = poly A koniec mRNA/

Ako sme už uviedli, z primárneho transkriptu, ktorý sa nazýva hnRNA, po uvedených modifikáciách a strihu vzniká zrelá mRNA. Vystrihovanie intrónov sa robí teda na úrovni RNA a musí sa odohrávať veľmi presne. I napriek tomu, že eukaryotická mRNA je monogénová, môžu vzniknúť z jedinej mRNA alternatívne produkty.

Mechanizmus zostrihu zahŕňa tieto kroky: enzým endonukleáza naštiepi RNA na presne definovaných miestach spojov intrónov a exónov, nasleduje fosforylácia kinázou a spojenie ligázou. To znamená, že z jednej molekuly hnRNA vzniká najčastejšie jeden typ zrelej mRNA /alebo tRNA či rRNA/. Predpokladá sa, že na zostrihu sa zúčastňujú malé RNA označované ako U1 a U2.

V poslednom čase sa experimentálne zistilo, že zostrih môže prebiehať aj bez účasti enzýmov a nazýva sa selfsplicing - samozostrih. Pre autokatalytický účinok samotnej RNA je potrebná voľná 3'-OH skupina na GMP. Tento GMP sa napojí na intrón a pomocou transesterifikácie ho vyštípi. Tie intróny, ktoré sú schopné samy sa vyštíepovať, majú charakteristické sekvencie. RNA autokatalyzuje svoju vlastnú premenu, tým sa podobá enzýmom a preto ribonukleové kyseliny s touto vlastnosťou boli nazvané ribozýmy. Od pravého enzýmu sa však líši tým, že nie je schopná sprostredkovať strih iných molekúl pre-mRNA okrem vlastnej.

Existujú aj také výnimky, kedy intrón si kóduje vlastný proteín, ktorý mu pomáha vystrihovať sa /maturáza/.

GMP = guanosinmonofosfát