

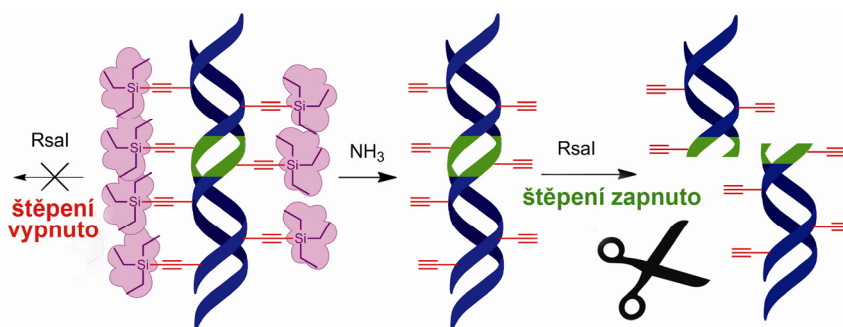


Chemické chránění DNA před enzymatickým štěpením

Vědci z Ústavu organické chemie a biochemie AVČR (tým Doc. Michala Hocka) vyvinuli novou metodiku, jak lze chemickou cestou regulovat stříhání řetězců DNA selektivními enzymovými nůžkami, tzv. restričními endonukleázami

Štěpení DNA restričními endonukleázami je základní postup při klonování DNA, bez kterého si nelze představit moderní molekulární biologii a genomiku. Vědci z týmu Doc. Hocka vyvinuli postup přípravy "zakuklené" DNA, která sice obsahuje genetickou informaci, ale zvenku je pokrytá objemnými chránícími skupinami, a není tedy rozpoznatelná pro štěpící enzymy (restriční endonukleázy). Po jednoduché chemické reakci takto ochráněné DNA s amoniakem se objemné chránící skupiny odštěpí a nově vzniklá "obnažená" DNA je opět štěpitelná endonukleázami. **Tato metodika by mohla usnadnit řadu aplikací v molekulární biologii vyžadující štěpení velkých úseků DNA.**

DNA je biologická makromolekula, která je nositelkou genetické informace. Je tvořena dvoušroubovicí dvou vláken. Klonování úseků DNA pro velkou část molekulárně-biologických aplikací vyžaduje sekvenčně-specifické stříhání a poté zase slepování částí DNA (genů). Pro štěpení jsou využívány tzv. restriční endonukleázy, což jsou bakteriální enzymy, kterými se bakterie brání proti virům. Tyto enzymy specificky rozpoznávají a štěpí krátké (4-8 nukleotidové) sekvence, zatímco všechny ostatní sekvence DNA zůstávají netknuté.



Nová metodika vědců z ÚOCHB AVČR umožňuje, aby určité části DNA byly dočasně ochráněny před štěpením, ale kdykoli je třeba, lze ochráněnou DNA opět obnažit a poté štěpit požadovaném místě. Metoda přípravy chráněné DNA je velmi rychlá a skládá se z pouhých dvou stupňů. Prvním krokem je příprava chráněného stavebního kamene DNA (nukleosid trifosfátu) a druhým enzymatická výstavba DNA z těchto stavebních bloků katalyzovaná enzymem zvaným DNA polymeráza. Pomocí polymerázové řetězové reakce (tzv. PCR) lze připravit jakoukoli sekvenci DNA, která bude obalena objemnými chránícími skupinami. Takto ochráněná DNA je odolná vůči štěpení restričními endonukleázami, přestože obsahuje rozpoznávací sekvence pro daný enzym. Pokud ovšem podrobně tuto DNA reakci s amoniakem, dojde k odštěpení všech objemných silylových chránících skupin a vzniklá DNA modifikovaná pouze malými molekulami acetyleny je už dále rozpoznatelná pro restriční enzymy a je štěpena v příslušných rozpoznávacích sekvencích. Jedná se o první případ přepínatelného chránění DNA před štěpením a v širším smyslu i před specifickou interakcí s proteinem. Vypínání a zapínání štěpení endonukleázami je využitelné při molekulárně-biologických manipulacích velkých úseků DNA, kde se rozpoznávací sekvence mohou vyskytovat ve více kopiích. Tým Doc. Hocka nyní bude studovat možnost přepínání interakce i dalších enzymů a proteinů vážících se na specifické sekvence DNA a případné využití tohoto jevu v regulaci biologických procesů.

Publikace:

Kielkowski, P.; Macíčková-Cahová, H.; Pohl, R.; Hocek, M.

Transient and switchable (triethylsilyl)ethynyl protection of DNA against cleavage by restriction endonucleases.

Angew. Chem. Int. Ed. **2011**, *50*, 8727-8730. doi: 10.1002/anie.201102898.

Další informace:

Doc. Ing. Michal Hocek, DSc., Ústav organické chemie a biochemie AVČR, v. v. i., Flemingovo nám. 2, 16610 Praha 6, tel. +420 220183324, e-mail: hocek@uochb.cas.cz