

Studium nukleových kyselin

Martin Beránek

Obsah:

Základní informace o klinickém vyšetření NK

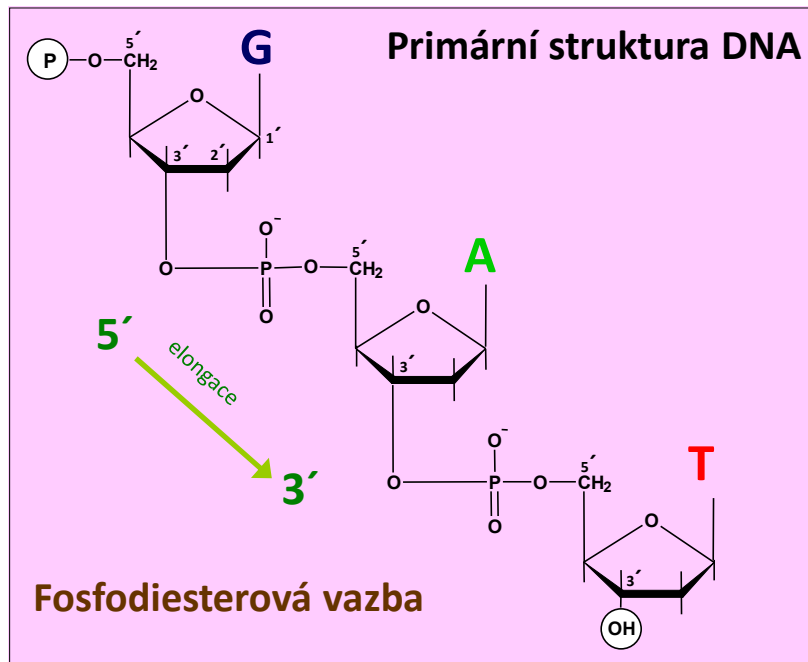
Synteticky modifikované oligonukleotidy a nukleotidy v molekulární diagnostice

Nukleotidy a antimetabolické léky



1

Primární struktura DNA



2



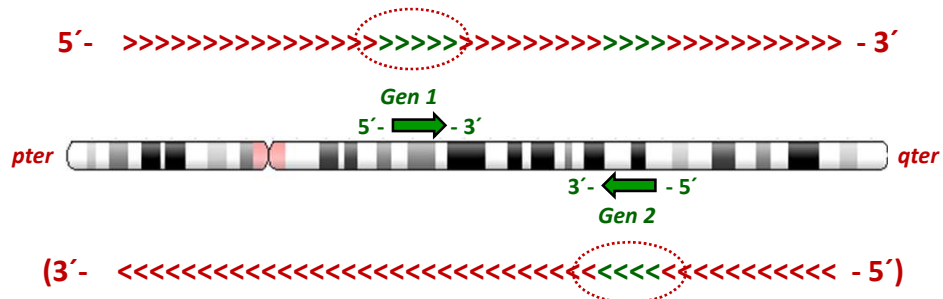
pter = p terminus (short, **petit** in French)

qter = q terminus (long, **queue**)

[illegible]

- Čtení celochromosomové začíná od telomery na **krátkém** raménku chromosomu a první nukleotid (5'- **konec DNA**) je značen pořadovým číslem 1, poslední nukleotid je koncový na dlouhém raménku značený jako 3' - konec DNA. **Komplementární vlákno v databázi není viditelné.**

Jak číslujeme nukleotidy v NK?



- **Každý gen na chromosomu začíná 5' - koncem a končí 3'**
- **Coding strand** = Sense strand = Positive strand = Plus strand = Forward strand
- **Non-coding** = Antisense = Negative = Minus = Reverse strand
- **Gen 1** má souřadnice na chromosomu 235.458 – 237.778
- **Gen 2** má souřadnice na chromosomu 358.656 – 350.328
- **Tyto geny budou transkribovány z rozdílných vláken/řetězců**

5

Referenční sekvence – prefixy vycházející z NCBI

well-annotated set of sequences, including genomic DNA, transcripts, and proteins. RefSeq sequences form a foundation for medical, functional, and diversity studies. They provide a stable reference for genome annotation, gene identification and characterization, mutation and polymorphism analysis (especially RefSeqGene records), expression studies, and comparative analyses.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>

Category	Description
NC	Complete genomic molecules
NG	Incomplete genomic region
NM	mRNA
NR	ncRNA
NP	Protein
XM	predicted mRNA model
XR	predicted ncRNA model
XP	predicted Protein model (eukaryotic sequences)
WP	predicted Protein model (prokaryotic sequences)

Source: Wikipedia article

Other databases

- NCBI Taxonomy: *Elephas maximus maximus*
- Assemblies, BioProjects, Sequence Read Archive, etc. ([list](#))
- FTP service

6

NC_ a NM_ referenční sekvence (číslování a orientace řetězců)

The screenshot shows the NCBI Genomic context page for the KRAS gene on chromosome 12. The top section, 'Genomic context', displays the location (12p12.1) and exon count (7). Below this is a table of annotations for different releases (RS_2023_10, RS_2023_10, 105.20220307) and assemblies (GRCh38.p14, T2T-CHM13v2.0, GRCh37.p13). The main visualization shows the genomic region on chromosome 12, with the KRAS gene structure highlighted. The bottom section, 'Genomic regions, transcripts, and products', shows the genomic sequence (NC_000012.12) and various transcripts (NM_004976.2, NM_001324.1, NM_001000000.2, NM_001257761.1).

7

NC_ referenční sekvence pro celý gen KRAS2

The screenshot shows the NCBI Nucleotide page for the full KRAS2 gene sequence. The top section, 'Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p14 Primary Assembly', displays the NCBI Reference Sequence (NC_000012.12). The main visualization shows the full genomic sequence (NC_000012.12) with the KRAS2 gene structure highlighted. The bottom section, 'Genomic regions, transcripts, and products', shows the genomic sequence (NC_000012.12) and various transcripts (NM_004976.2, NM_001324.1, NM_001000000.2, NM_001257761.1).

8

Home sapiens KRAS proto-oncogene, GTPase - NCBJ Reference Sequence: NM_001369786.1

National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide

Advanced Help

GenBank Send to

Homo sapiens KRAS proto-oncogene, GTPase (KRAS), transcript variant c, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001369786.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS	NM_001369786	5417 bp	mRNA	linear	PRI 04-DEC-2023
DEFINITION	Homo sapiens KRAS proto-oncogene, GTPase (KRAS), transcript variant c, mRNA				
ACCESSION	NM_001369786				
VERSION	NM_001369786.1				
SOURCE	Homo sapiens (human)				
ORGANISM	Homo sapiens				
	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorhini; Catarrhini; Hominoidea; Homo.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 5417)				
AUTHORS	Di Giorgio E, Cortezzi Y, Gualandi N, Agostini F, Rapozzi V and Xodo LE.				
TITLE	NRF2 interacts with distal enhancer and inhibits nitric oxide synthase 2 expression in KRAS-driven pancreatic cancer cells				
JOURNAL	Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1871 (1), 119606 (2024)				
PUBMED	37852325				
REMARK	GeneRIF: NRF2 interacts with distal enhancer and inhibits nitric oxide synthase 2 expression in KRAS-driven pancreatic cancer cells.				
REFERENCE	2 (bases 1 to 5417)				

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST
Pick Primers
Highlight Sequence Features
Find in this Sequence
Show in Genome Data Viewer

Articles about the KRAS gene

SLC25A21 downregulation promotes KRAS-mutant colorectal cancer progr [JCI Insight. 2023]

Acquired resistance to KRAS G12C small-molecule inhibitors via gene switching [Sci Adv. 2023]

A real-world analysis of trametinib in combination with hydroxychloroquine or C [JBMCC. 2023]

[See all...](#)

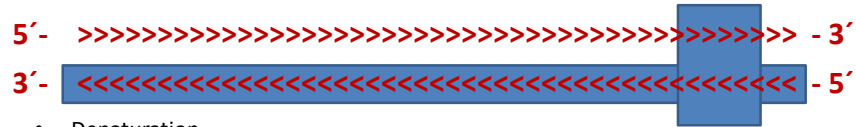
Reference sequence information

9

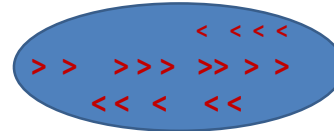
[illegible]

- 10

Synonyma a antonyma



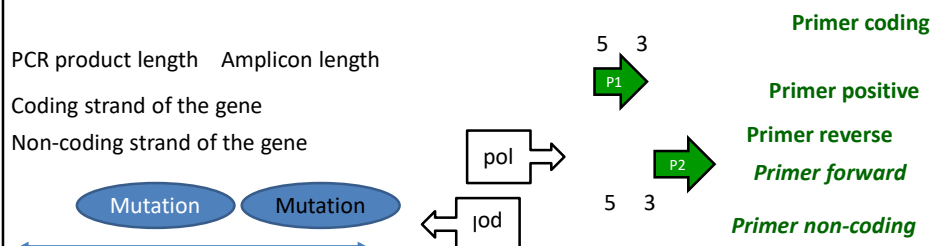
- Denaturation
- Degradation
- Fragmentation
- Renaturation
- Hybridization
- Polymerization
- Ligation



11

Pojmenování pramenů a jejich lokalizace

Gen 1 a jeho amplifikace *in vitro* (při PCR reakci)

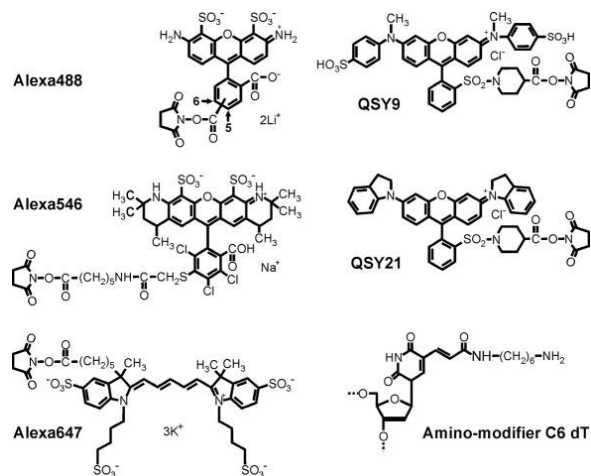


12

Synteticky modifikované oligonukletidy a nukleotidy v molekulární diagnostice

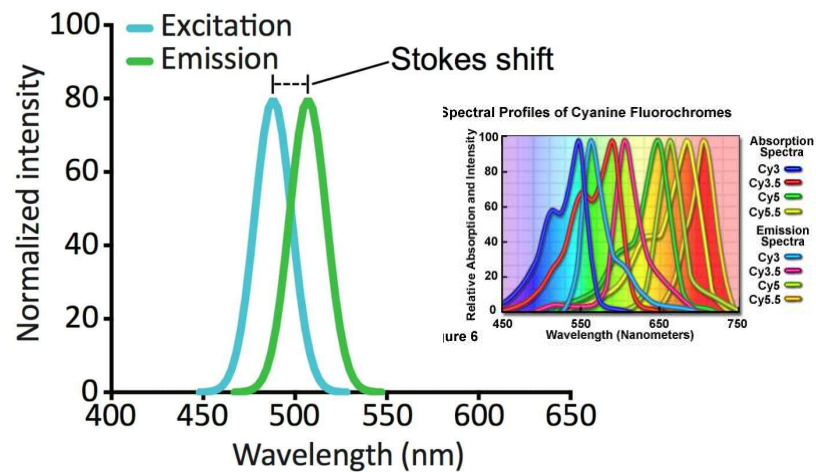
13

Oligonukleotidy modifikované na 5'- konci molekulou fluoroforu



14

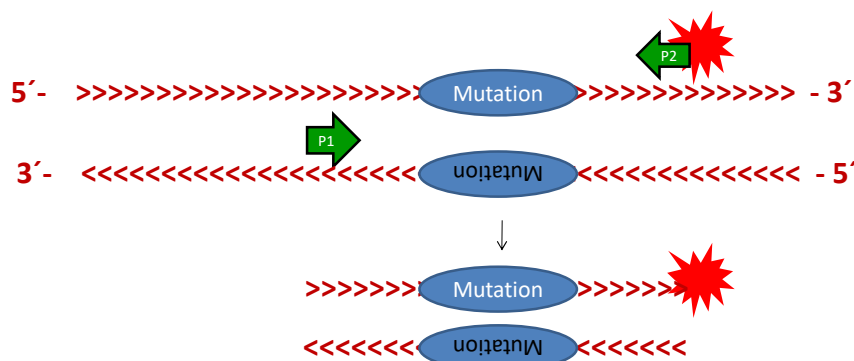
Oligonukleotidy modifikované na 5'-konci molekulou fluoroforu



15

Amplikony značené na 5'- konci

PCR reakce s primerem značeným fluoroforem na 5'- konci



5'- značené PCR produkty jsou detekovatelné na kapilární elektroforéze

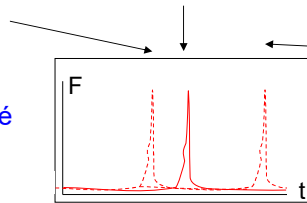
16

Diagnostický význam ampliconů značených na 5'-konci

Elektroforéza

Fluorescenční pík s 15 nukleotidovou delecí způsobující genetické onemocnění

Fluorescenční pík (pro wild-type amplicony)

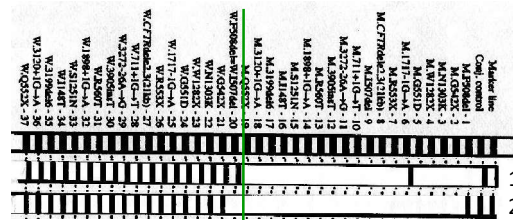


Fluorescenční pík s 26 nukleotidovou insercí způsobující genetické onemocnění

Rychlá a levná analýza pracující se spolehlivou DNA polymerasou a fluorofory

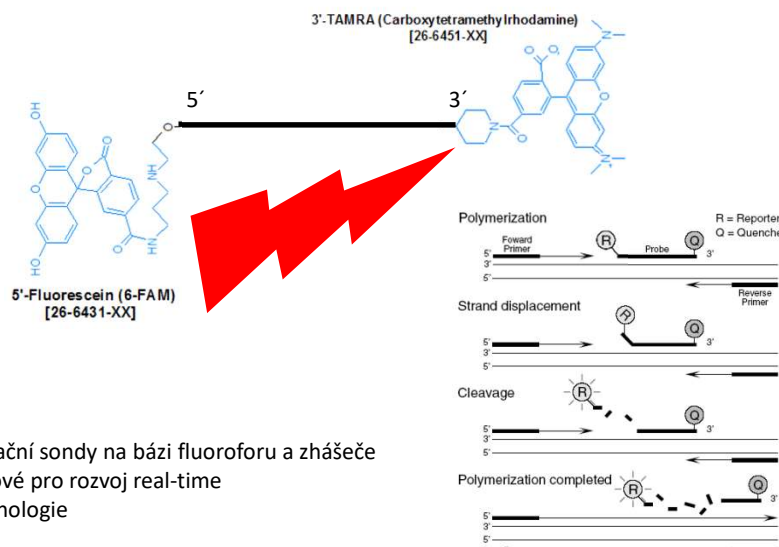
Microarray a mikročipy

Multiplexní analýza desítek-stovek bodových mutací souvisejících s onemocněním



17

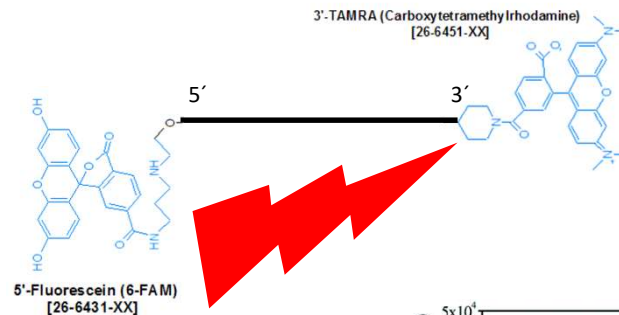
Oligonukleotidy (hydrolyzační sondy) modifikované na 5'-konci fluoroforem a na 3'-konci zháščečem



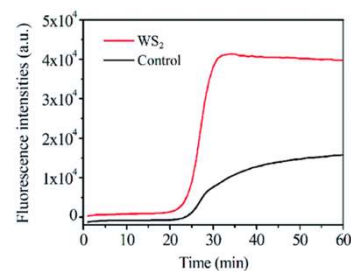
Hydrolyzační sondy na bázi fluoroforu a zháščeče
Jsou klíčové pro rozvoj real-time
PCR technologie

18

Real-time PCR technologie - význam

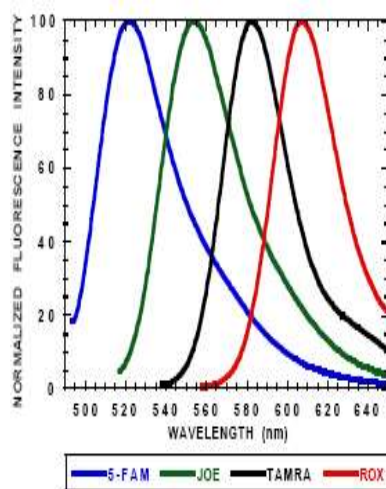


Detekce známých variant
 Kvantitativní analýza „genových dávek“
 Dynamika hladin RNA transkriptů v krvi
 Expresní profily léčených typů buněk
 Negativní amplifikace = žádný templát ve vzorku
 Rychlá detekce DNA při bioterorismu

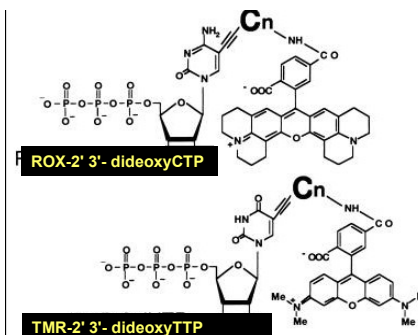


19

Mononukleotidy bez 3'-hydroxylové skupiny na deoxyribose (dideoxynukleotidy)



ddATP – **JOE (550 nm)** **A**
 ddGTP – **FAM (520 nm)** **C**
 ddTTP – **TAMRA (585 nm)** **G**
 ddCTP – **ROX (620 nm)** **T**

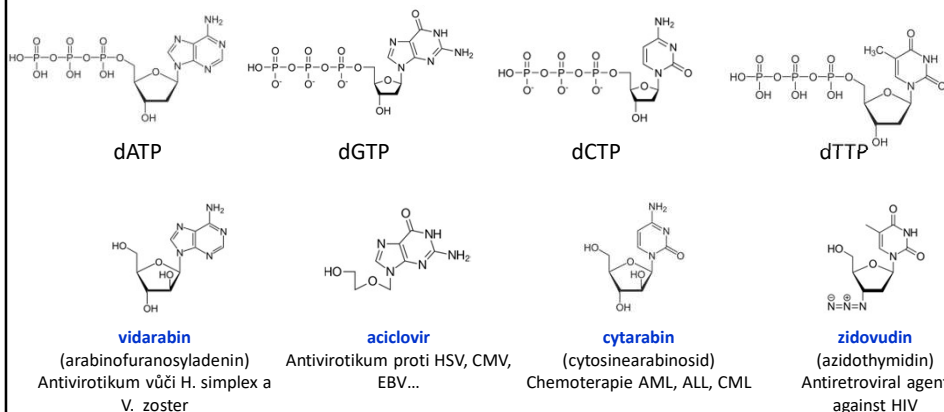


20

Nukleotidy a antimetabolické léky

23

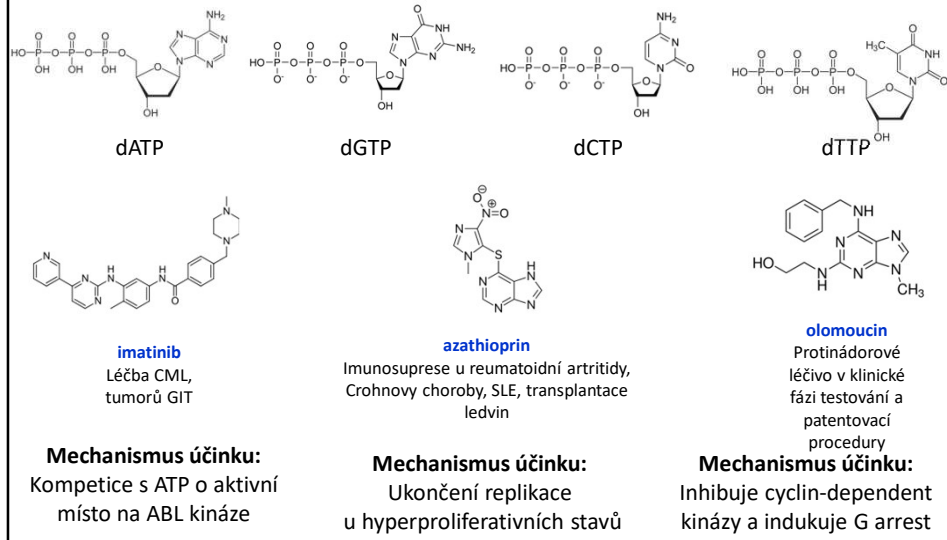
Modifikované nukleosidy a nukleotidy v klinické medicíně



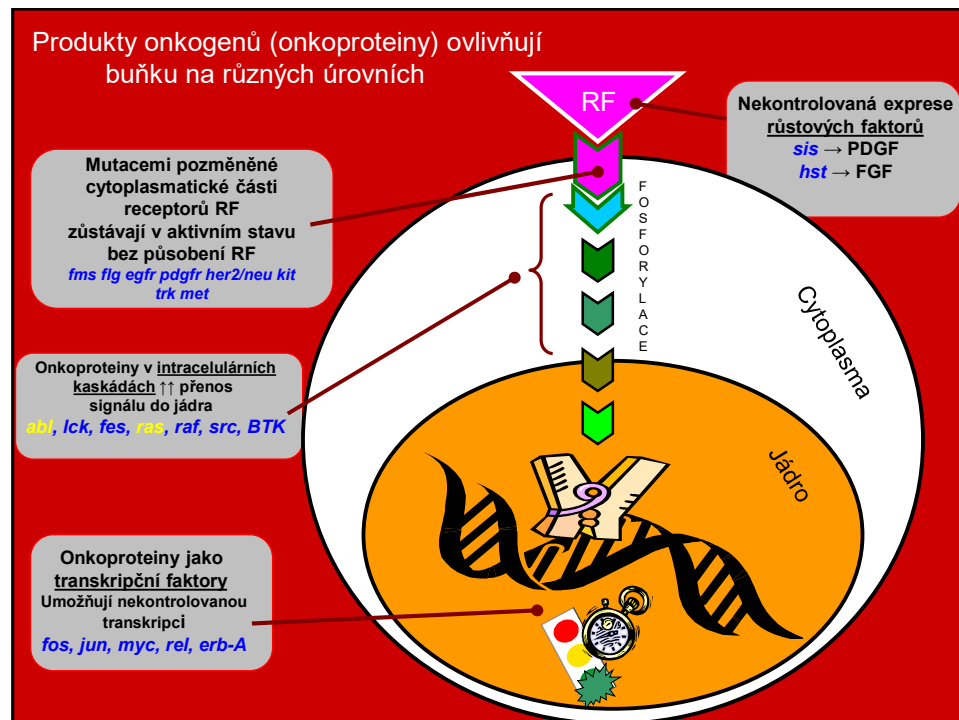
Mechanismus účinku: fosforylovaná forma po inserci do nového řetězce
Zajistí terminaci replikace virových, mitochondriálních DNA a nádorové DNA.

24

Modifikovanější nukleosidy a nukleotidy v klinické medicíně



25



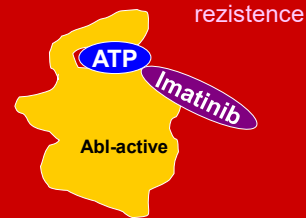
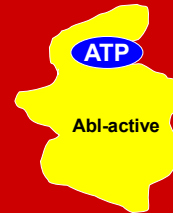
26

(BCR)-ABL kinasa a léčba CML

ABL v neaktivní konformaci

ABL aktivní konformace

Úspěšná léčba CML



27

Závěry

- Správná orientace řetězců a správné číslování nukleotidů v DNA a RNA umožňuje využívat a sdílet **databáze NK** a jednoznačně **pojmenovávat varianty** prokazané u daného pacienta (obor *bioinformatika*)
- **Synteticky vyrobené** oligonukleotidy (primery nebo sondy) vybavené fluorofory jsou nezbytnou součástí rozvoje **biotechnologií používaných v molekulární diagnostice**
- **Synteticky vyrobená** nukleotidová a nukleosidová **analoga** umožňují účinnou **antivirovou a antineoplastickou** léčbu zastavením replikačního procesu v postižené buňce

28