

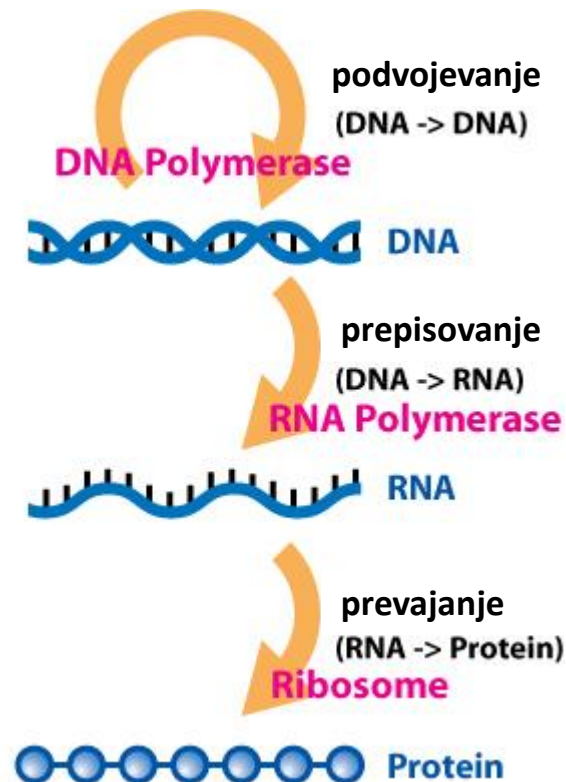
DNA in RNA: zgradba in vloga

Velika predavalnica IJS, 10. 4. 2014

Nukleinske kisline

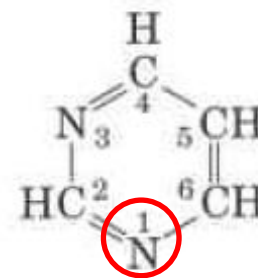
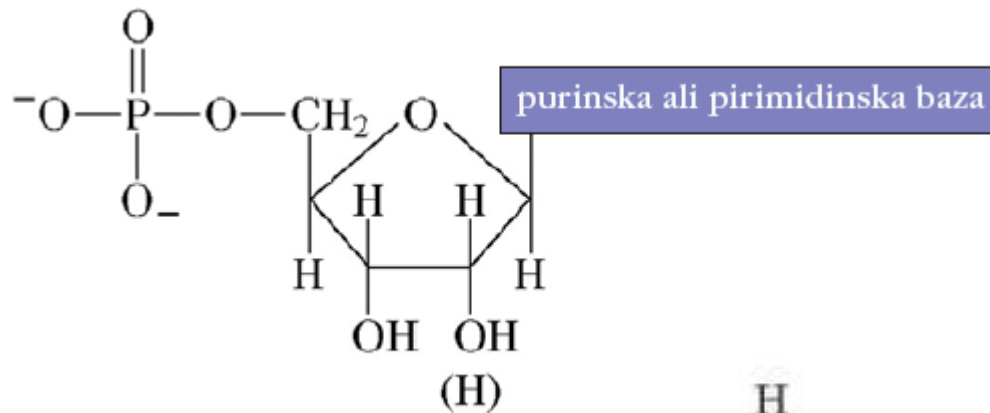
- **Shranjevanje, prenašanje in izražanje** genetske informacije.
- Dve vrsti nukleinskih kislin:
 - **deoksiribonukleinska kislina – DNA:** kromosomi v jedru, mitohondrijih in kloroplastih,
 - **ribonukleinska kislina – RNA:** rRNA, mRNA in tRNA.

- **Prenos biološke informacije:**

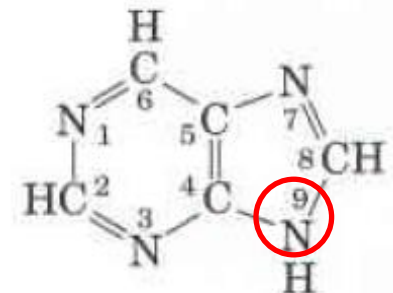


Nukleotidi

- Nukleotid je sestavljen iz treh enot:
 - **dušikove baze** – purina ali pirimidina,
 - **sladkorja** – aldopentoze,
 - ene, dveh ali treh **fosfatnih skupin**



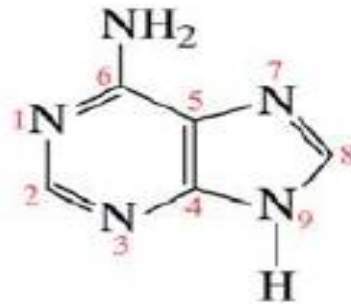
Pyrimidine



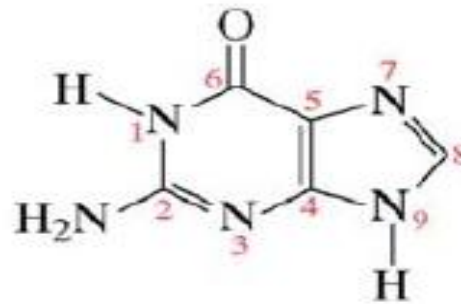
Purine

Dušikove baze

(a) osnovne baze

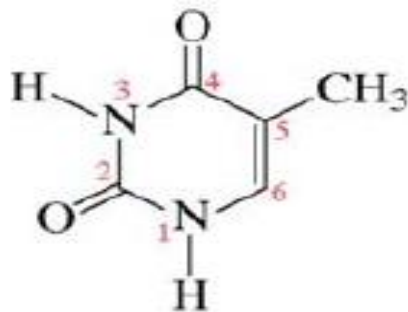


adenin

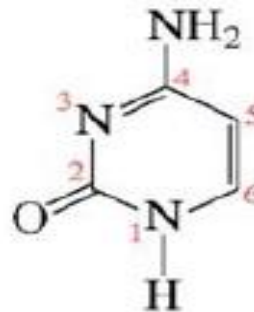


gvanin

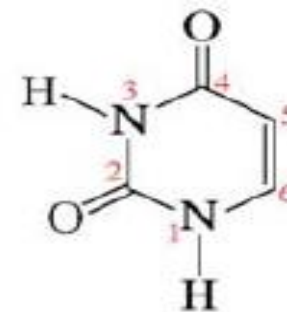
purini



timin (DNA)



citozin



uracil (RNA)

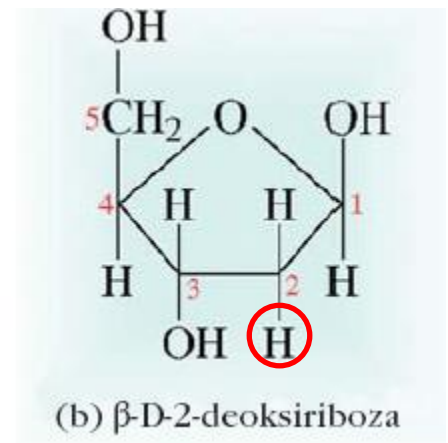
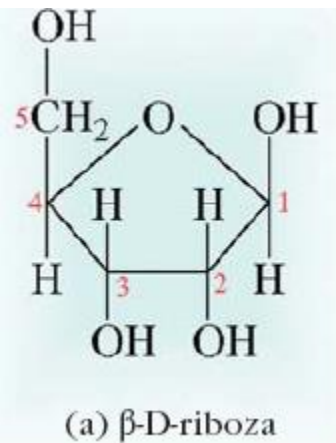
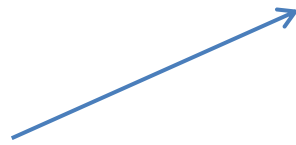
pirimidini

Aldopentozi

Nukleinske kisline gradita dve vrsti aldopentoz:

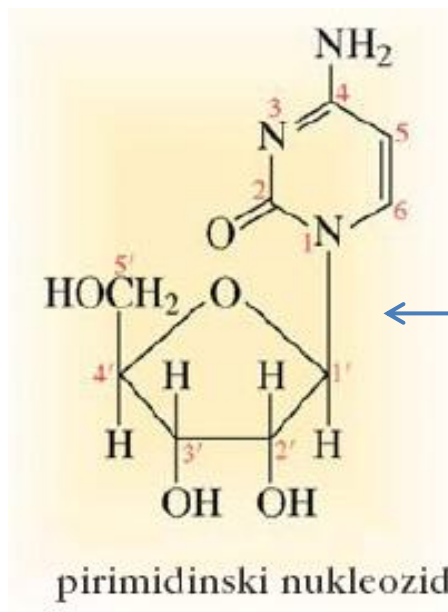
- β -D-riboza v RNA
- β -D-2-deoksiriboza v DNA

Pozicije na sladkorju označujemo s ' (npr. 5').

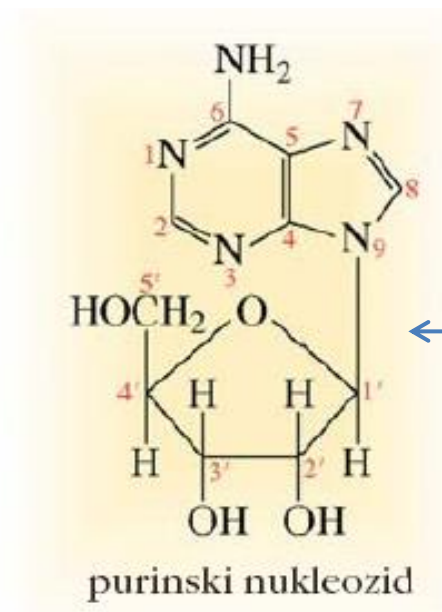


Nukleozidi

S povezavo **dušikove baze** in **aldopentoze** z N-glikozidno vezjo nastane **nukleozid**.



← glikozidna vez



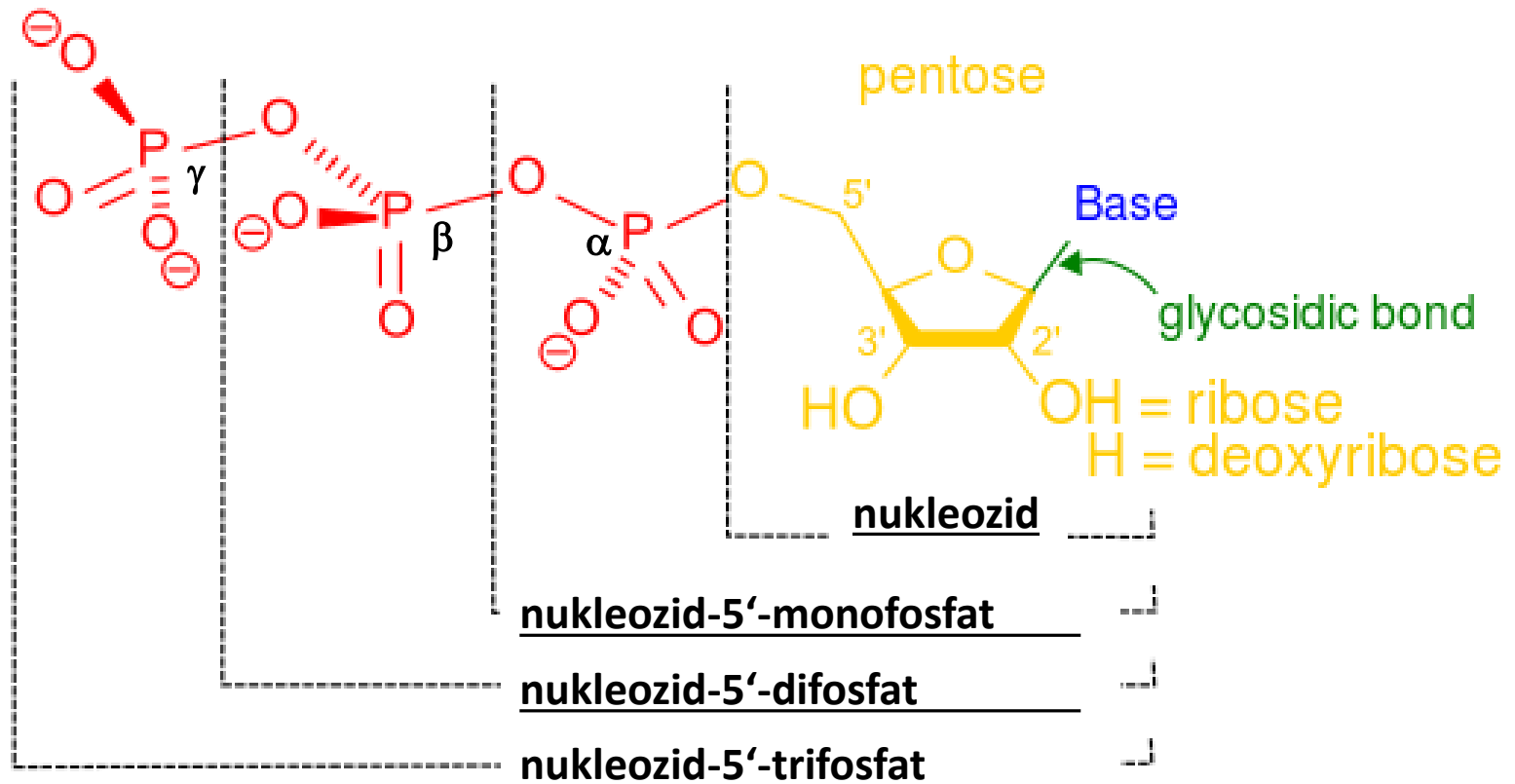
← glikozidna vez

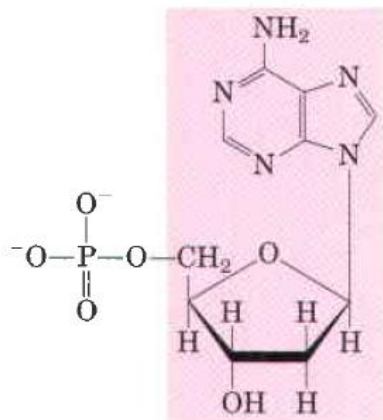
Pozicije na sladkorju označujemo s številko in ' (npr. 5').
Pozicije na bazi označujemo samo s številko.

Nukleotidi

Nukleotid = nukleozid + (ena ali več) fosforilna skupina (PO_3^{2-}).

Fosforilacija najpogosteje poteče na mestu 5'.

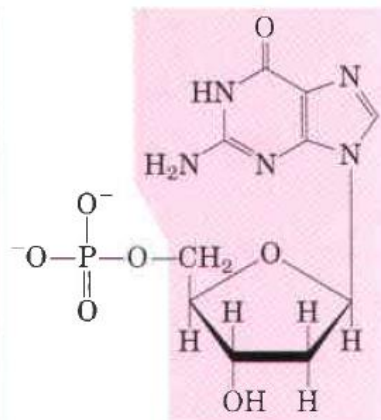




Nukleotid Deoxyadenylate
(deoxyadenosine
5'-monophosphate)

Okrajšava A, dA, dAMP

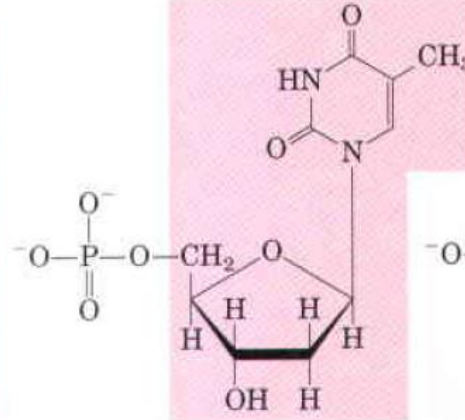
Nukleozid Deoxyadenosine



Nukleotid Deoxyguanylate
(deoxyguanosine
5'-monophosphate)

G, dG, dGMP

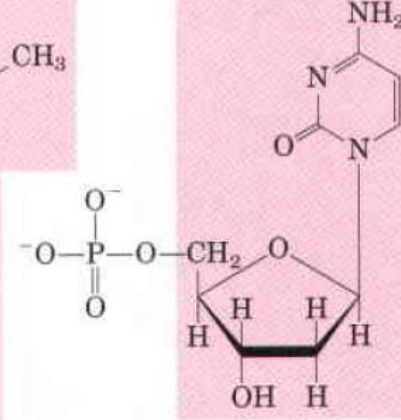
Deoxyguanosine



Nukleotid Deoxythymidylate
(deoxythymidine
5'-monophosphate)

T, dT, dTMP

Deoxythymidine

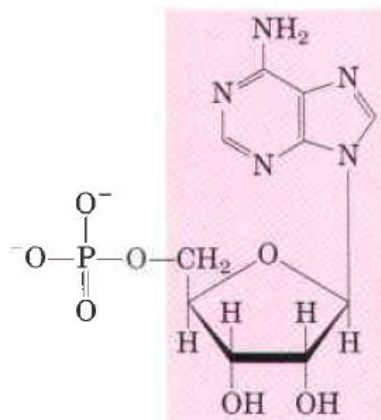


Nukleotid Deoxycytidylate
(deoxycytidine
5'-monophosphate)

C, dC, dCMP

Deoxycytidine

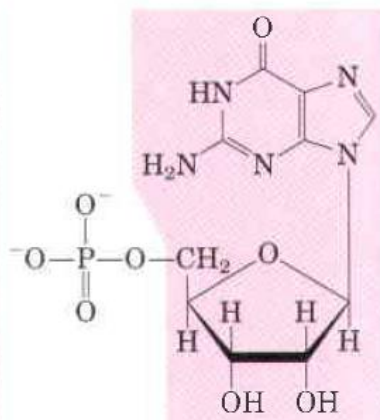
(a) Deoksiribonukleotidi



Nukleotid Adenylate (adenosine
5'-monophosphate)

A, AMP

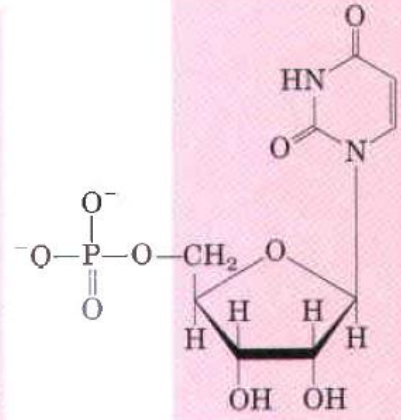
Okrajšava Adenosine



Nukleotid Guanylate (guanosine
5'-monophosphate)

G, GMP

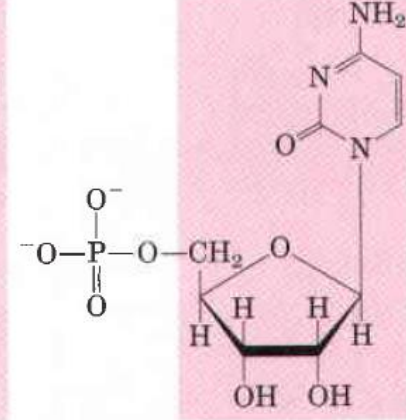
Guanosine



Nukleotid Uridylate (uridine
5'-monophosphate)

U, UMP

Uridine



Nukleotid Cytidylate (cytidine
5'-monophosphate)

C, CMP

Cytidine

(b) Ribonukleotidi

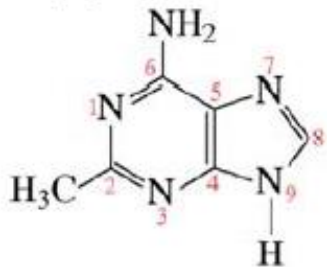
Nukleotidi

baza	nukleozid	nukleotid (okrajšava)	nukleinska kislina
purinske baze			
adenin	adenozin	adenozin-5'-monofosfat (5'-AMP)	RNA
	deoksiadenozin	deoksiadenozin-5'-monofosfat (5'-dAMP)	DNA
gvanin	gvanozin	gvanozin-5'-monofosfat (5'-dAMP)	RNA
	deoksigvanozin	deoksigvanozin-5'-monofosfat (5'-dGMP)	DNA
pirimidinske baze			
citozin	citidin	citidin-5'-monofosfat (5'-CMP)	RNA
	deoksicitidin	deoksicitidin-5'-monofosfat (5'-dCMP)	DNA
timin	deoksitimidin	deoksitimidin-5'-monofosfat (5'-dTMP)	DNA
uracil	uridin	uridin-5'-monofosfat (5'-UMP)	RNA

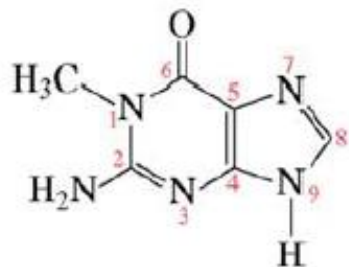
Opomba: Velikokrat v okrajšavah 5' izpuščamo (5'-AMP pišemo kar AMP, 5'-dAMP pa dAMP)

Manj pogoste baze

(b) manj pogoste baze

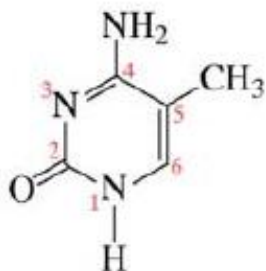


2-metiladenin

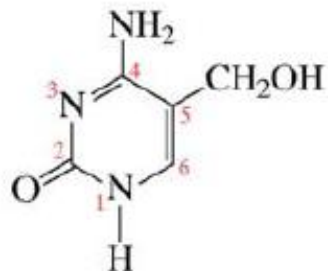


1-metilgvanin

purini

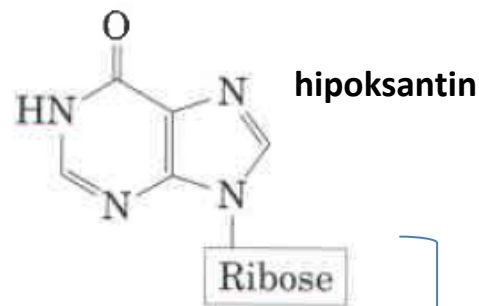


5-metilcitozin

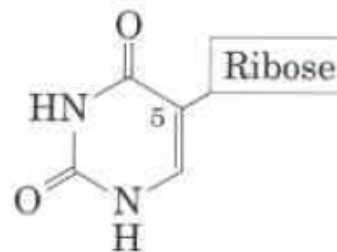


5-hidroksimetilcitozin

pirimidini



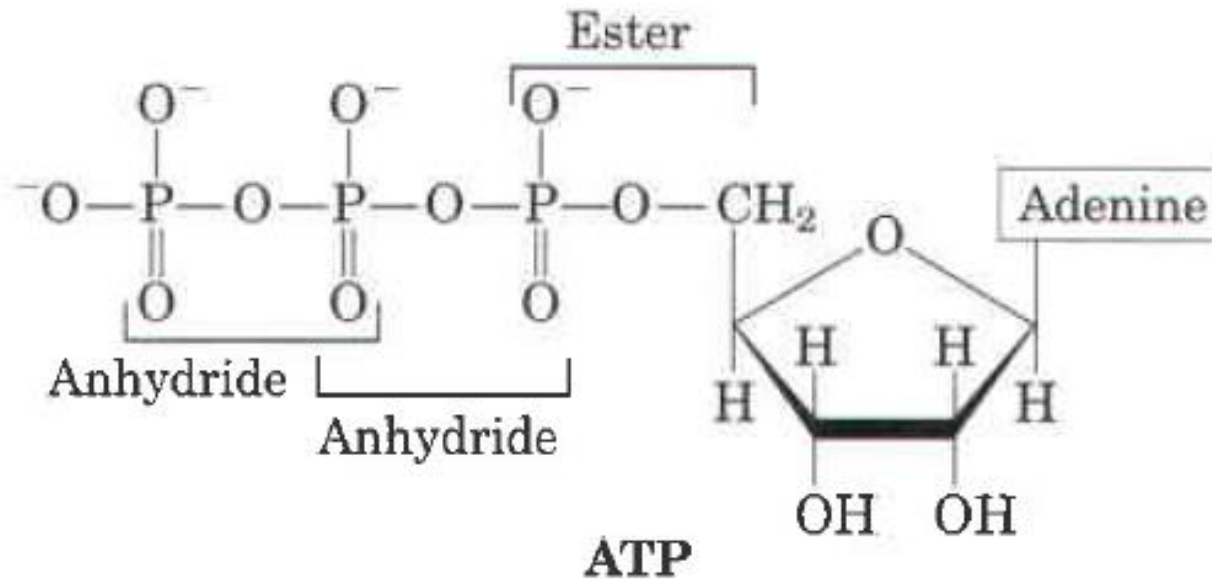
inozin



psevdouridin

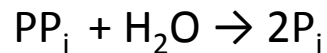
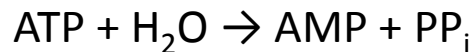
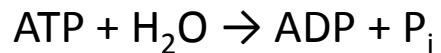
nukleozid

Vezi v nukleotidu



ATP = adenzin-5'-trifosfat

Hidroliza anhidridne vezi doprinese več energije od hidrolize estrske vezi.



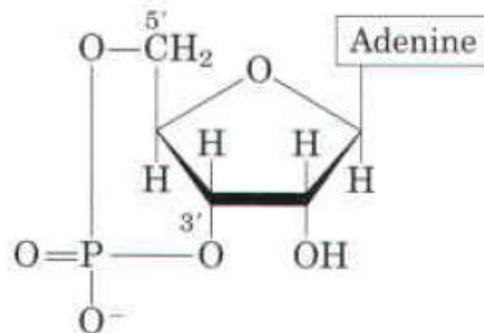
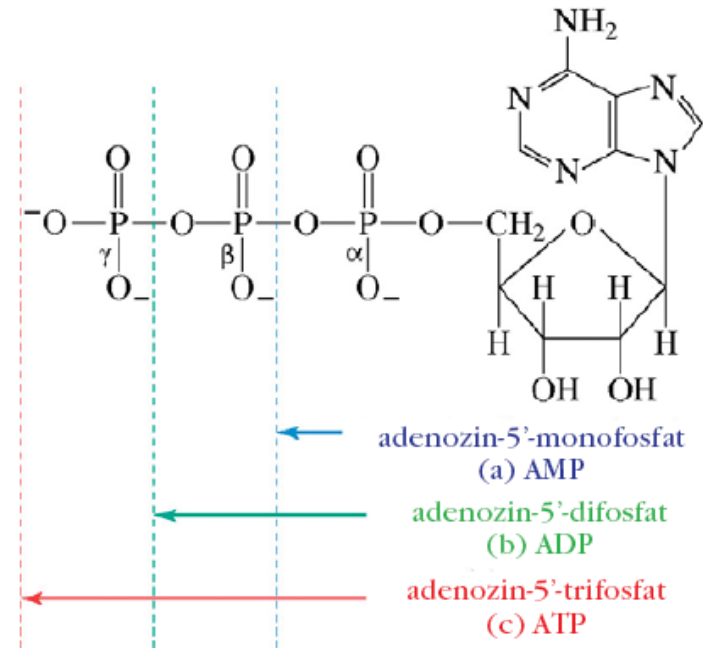
$$\Delta G^{\circ'} = -30,5 \text{ kJ/mol } (-7,3 \text{ kcal/mol})$$

$$\Delta G^{\circ'} = -45,6 \text{ kJ/mol } (-10,9 \text{ kcal/mol})$$

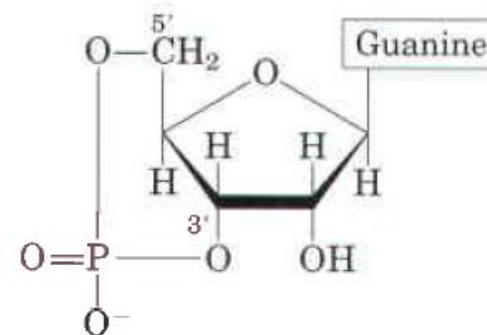
$$\Delta G^{\circ'} = -19,2 \text{ kJ/mol } (-4,6 \text{ kcal/mol})$$

Vloga nukleotidov

- Gradniki:
 - DNA so **dNTP**,
 - RNA so **NTP**.
- Prenašalci kemijske energije: **ATP** in **GTP**.
- Celično signaliziranje: **cAMP** in **cGMP**, **GTP**.



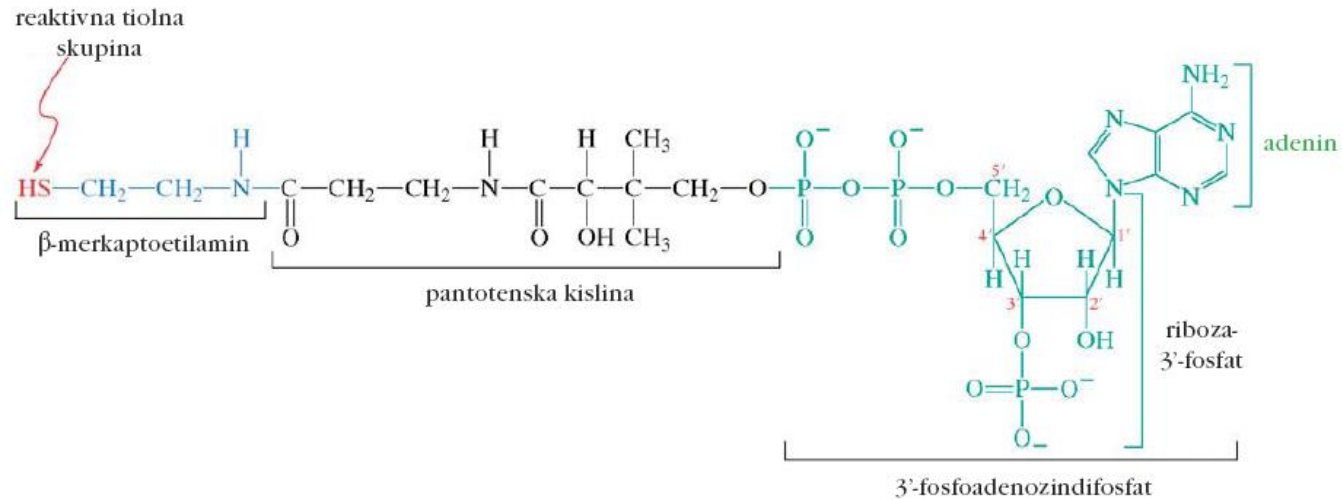
Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
(cyclic AMP; cAMP)



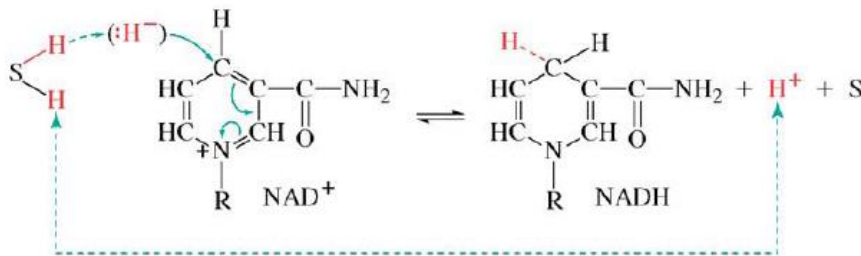
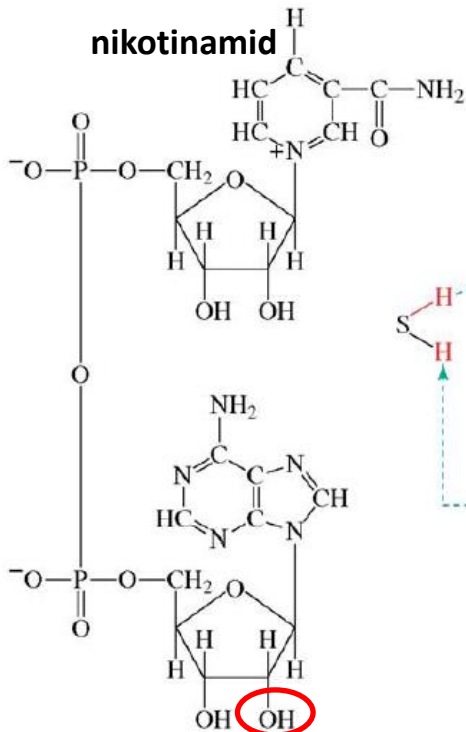
Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate
(cyclic GMP; cGMP)

Vloga nukleotidov

- Sestavine kofaktorjev: koencim A (**CoA**), flavinadeninnukleotid (**FAD**) in nikotinamidadenindinukleotid (**NAD⁺** in **NADP⁺**).



koencim A

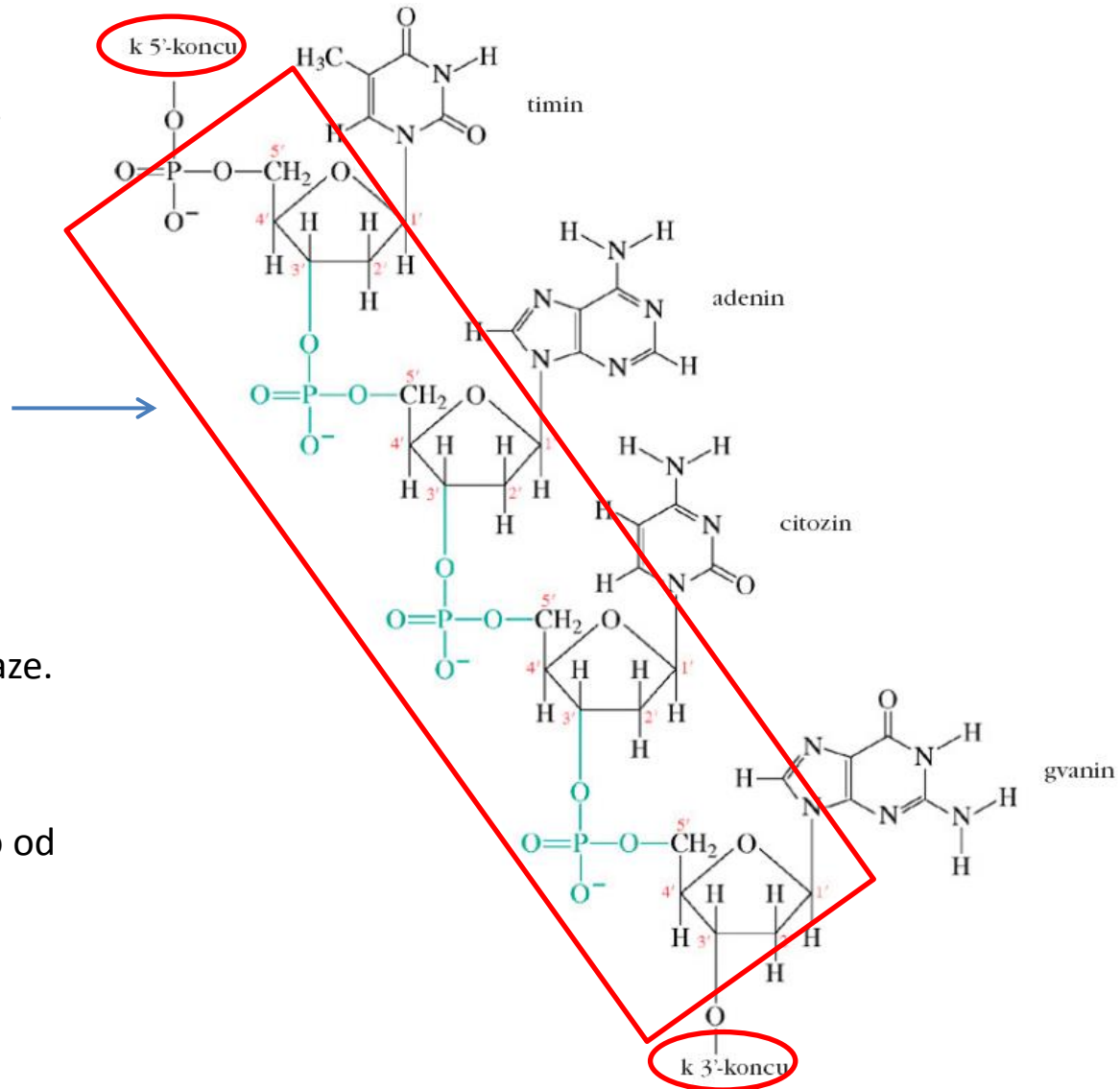


nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)

Nukleinske kisline

- Nukleinske kisline so polimeri nukleotidov, ki so povezani s **3', 5'-fosfodiestrsko vezjo**.
- **Kovalentno ogrodje** tvorijo izmenjujoče se molekule (deoksi)riboza in fosfatne skupine.
- Ogrodje ima negativen naboj in je hidrofilno.
- Spremenljivi del zgradbe tvorijo baze.
- Zaporedje nukleotidov zapisujemo od 5'-konca proti 3'-koncu:

5'-TACG-3'



DNA

- **Velikost in zaporedje DNA se razlikuje med organizmi.**
- DNA predstavlja ~1 % mase celice.
- Bakterija *E. Coli* ima eno **krožno** molekulo DNA.
- Človeška DNA je **linerana** v obliki kromosomov (22 parov in dva spolna).

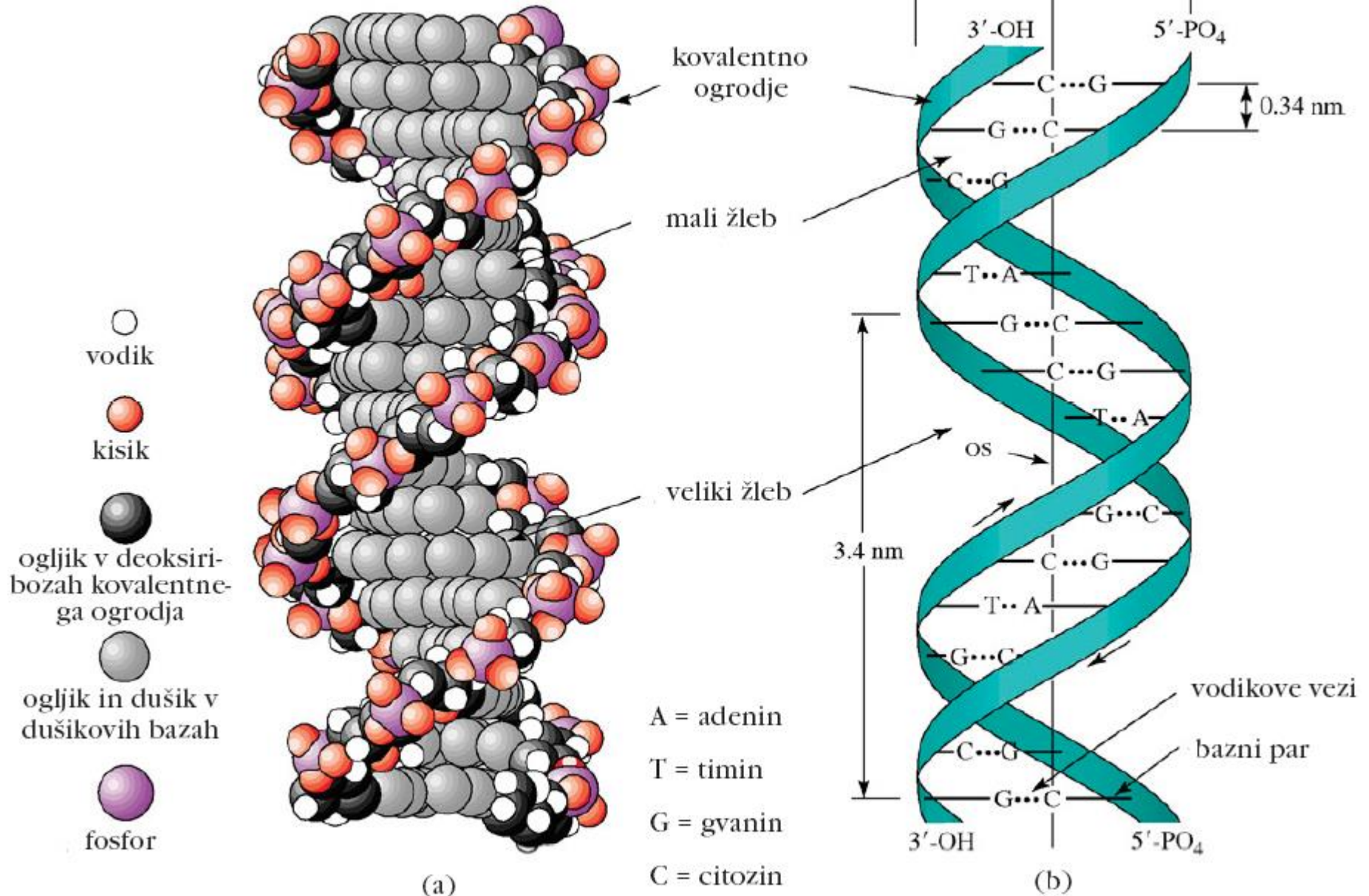
organizem	število baznih parov	dolžina (μm)	oblika
virusi			
SV40	5 100	1,7	krožna
adenovirus	36 000	12	linearna
fag λ	48 600	17	krožna
bakterija			
<i>E. coli</i>	4 700 000	1 400	krožna
evkarionti			
kvasovke	13 500 000	4 600	linearna
vinska mušica			
(diploidna celica)	165 000 000	56 000	linearna
človek			
(diploidna celica)	6 000 000 000	2 x 10 ⁶	linearna

Struktura DNA

- **Dvojna vijačnica** je prevladujoča strukturna oblika DNA.
- Značilnosti dvojne vijačnice:
 1. Dve **komplementarni** polinuklotidni verigi, oviti okrog skupne osi, sestavljata **dvojno desno vijačnico**. vzdolž strukture potekata **veliki** in **mali žleb**.
 2. Verigi sta **antiparalelni**: 3', 5'-fosfodiesterne vezi v posamezni verigi tečejo v nasprotnih smereh.
 3. V vodnem okolju je **kovalentno ogrodje** na zunanji strani vijačnice, kjer polarne skupine stopajo v interakcijo z vodo. **Hidrofobne baze** so obrnjene v notranjost strukture.
 4. Dvojno vijačnico **stabilizirata** dve vrsti vezi (interakcij):
 - a) **Vodikove vezi** med pari **komplementarnih baz** z nasprotnih verig (**A-T** in **G-C**).
 - b) **Van der Waalove** in **hidrofobne interakcije** med bazami, ki so naložene ena nad drugo – ravnine baz so skoraj pravokotne na os vijačnice.

Komplementarno parjenje baz omogoča shranjevanje in prenašanje genetske informacije.

Struktura DNA



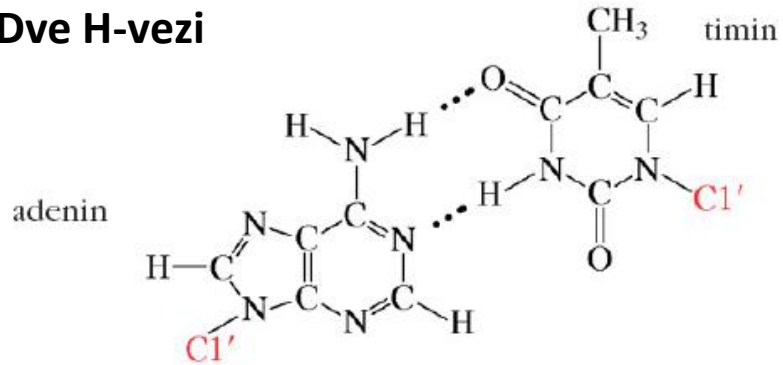
(a)

(b)

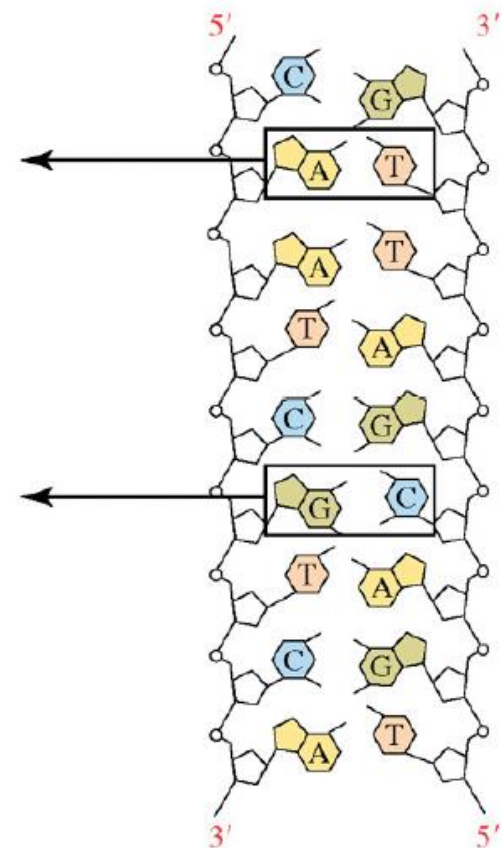
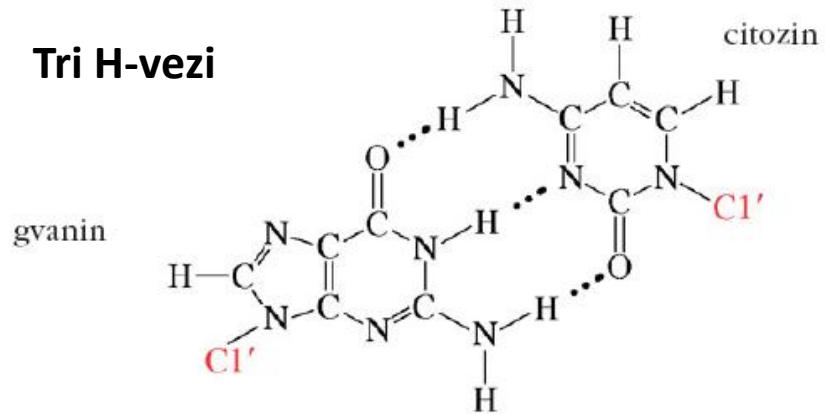
Struktura DNA

- Watson in Crickovi bazni pari:

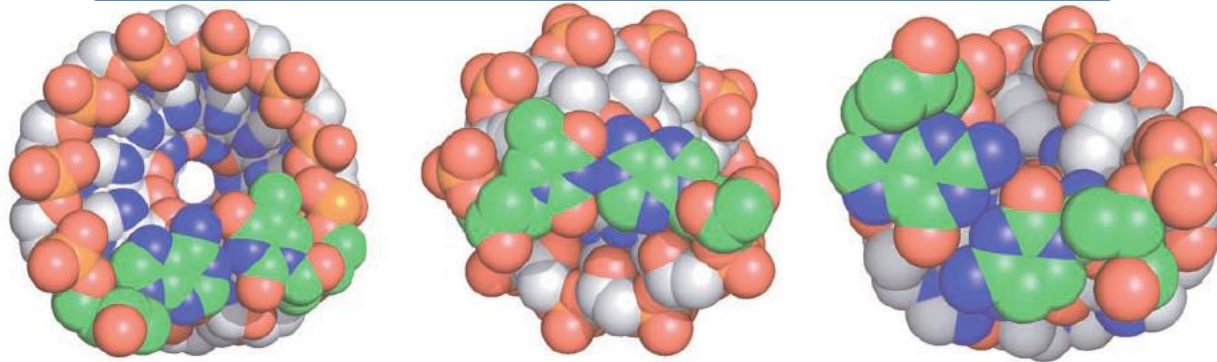
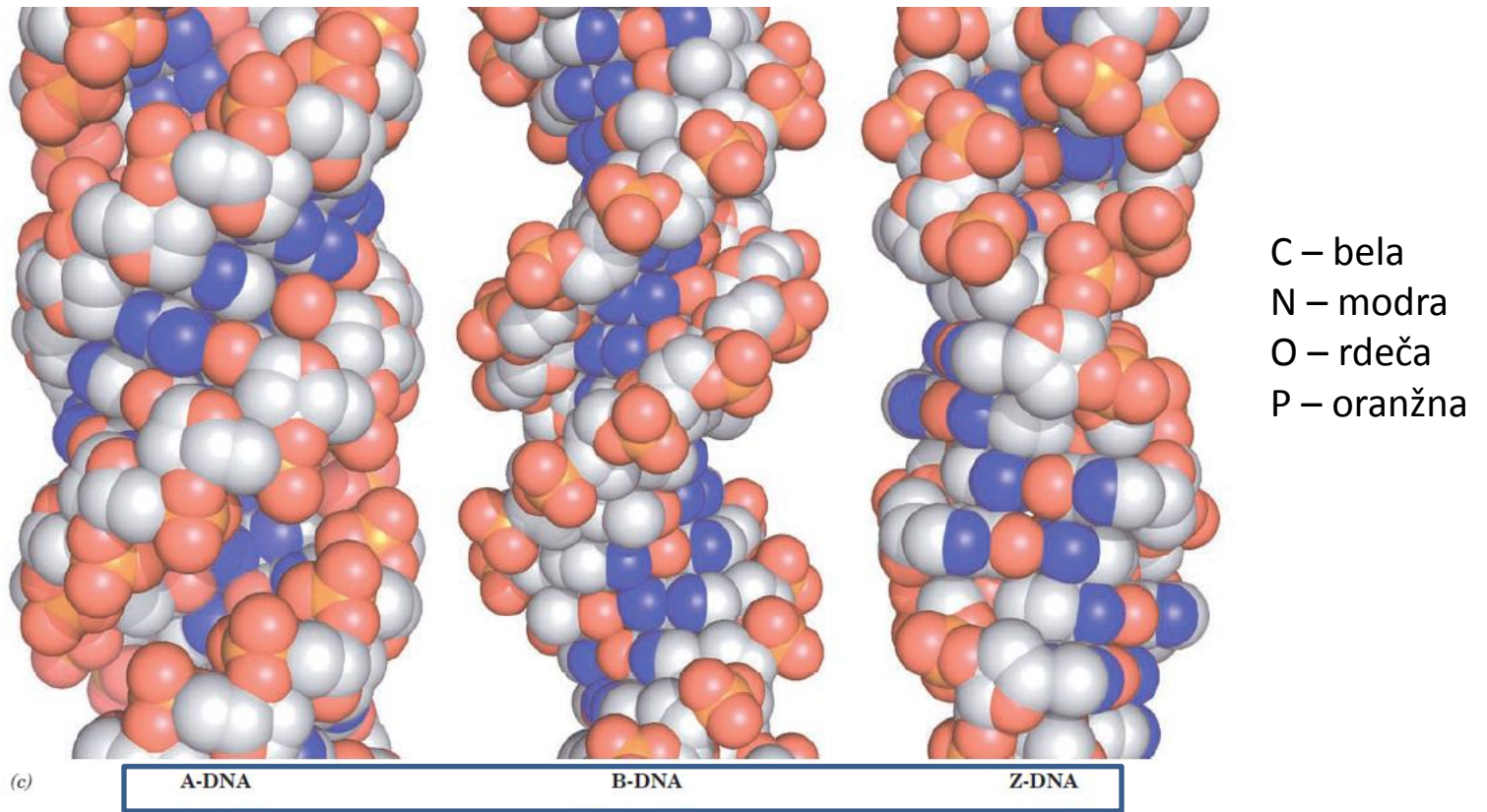
Dve H-vezi



Tri H-vezi



Struktura DNA



Prevladuje v fizioloških razmerah.
Molekula je hidratirana.

Molekula je dehidrirana.
Stisnjena v smeri osi.

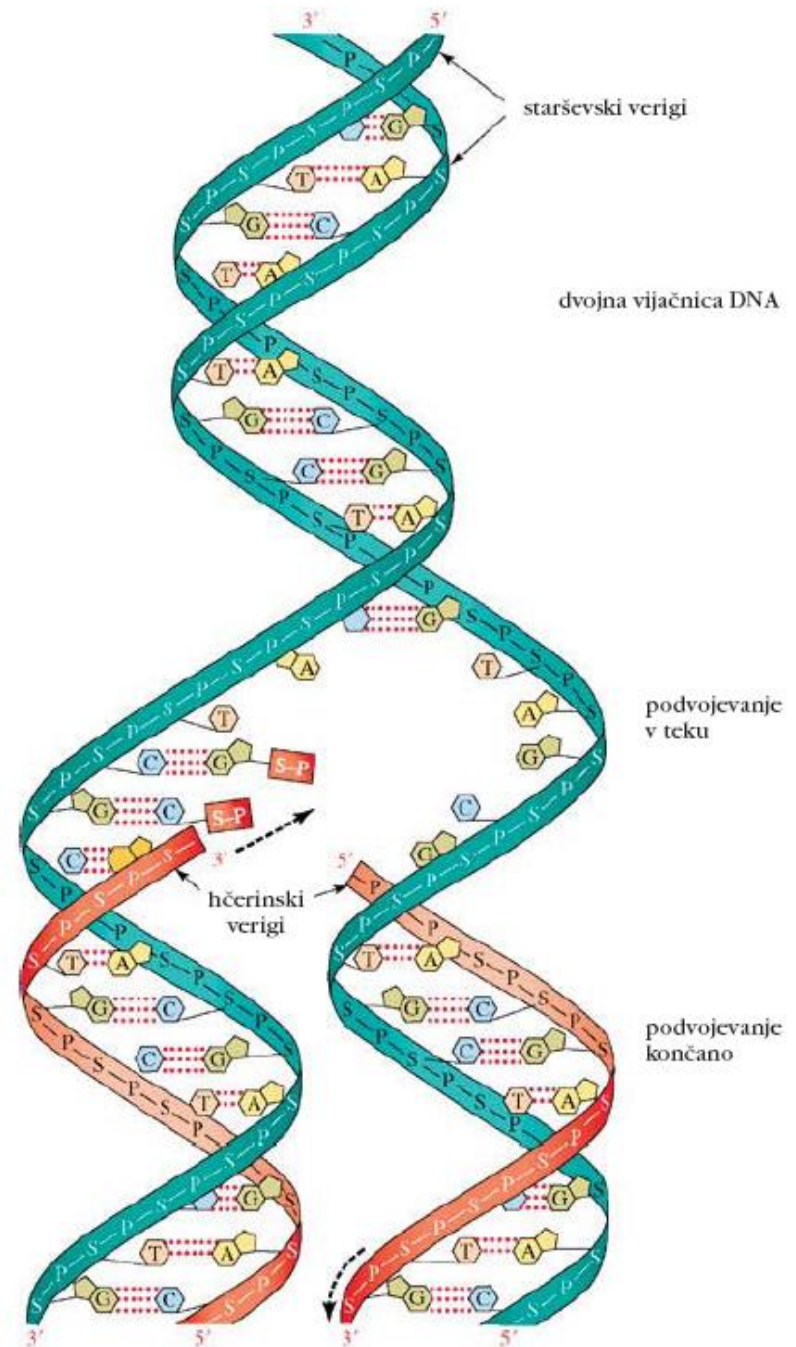
Kratki segmenti naravne DNA in sintetične DNA.
Levosučna vijačnica.

P - fosfat
S - sladkor
A - adenin
G - gvanin
C - citozin
T - timin

Verigi se ločita s prekinjanjem H-vezi.

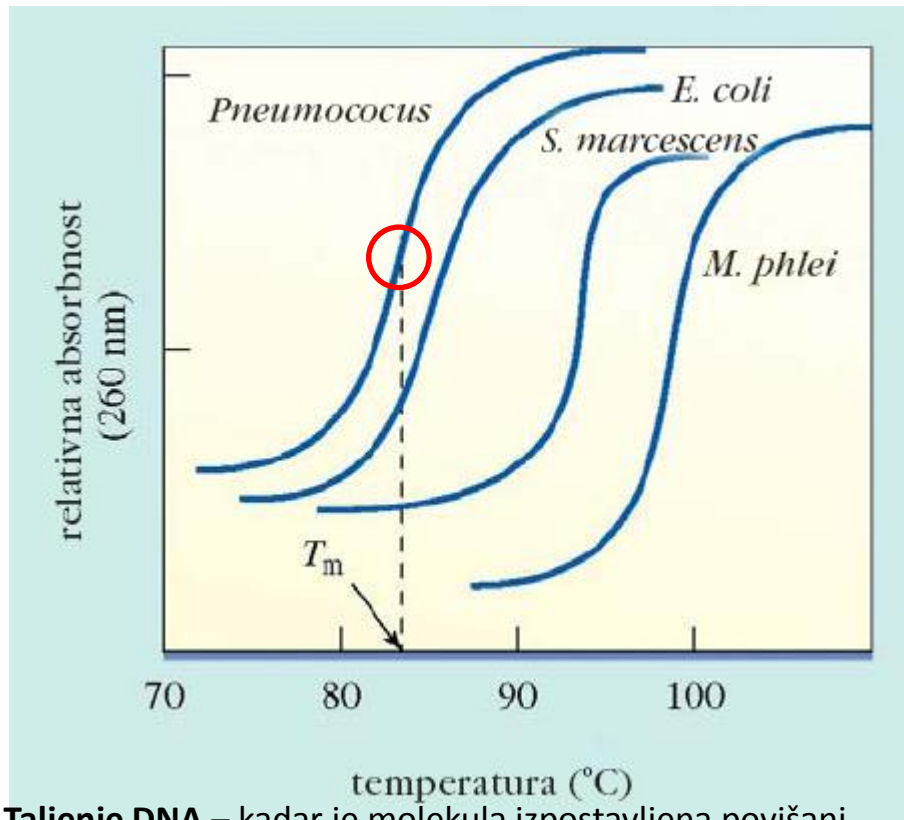
Ločeni verigi služita kot **matrici** za sintezo novih molekul.

Novonastali molekuli sta identični izvorni molekuli DNA.



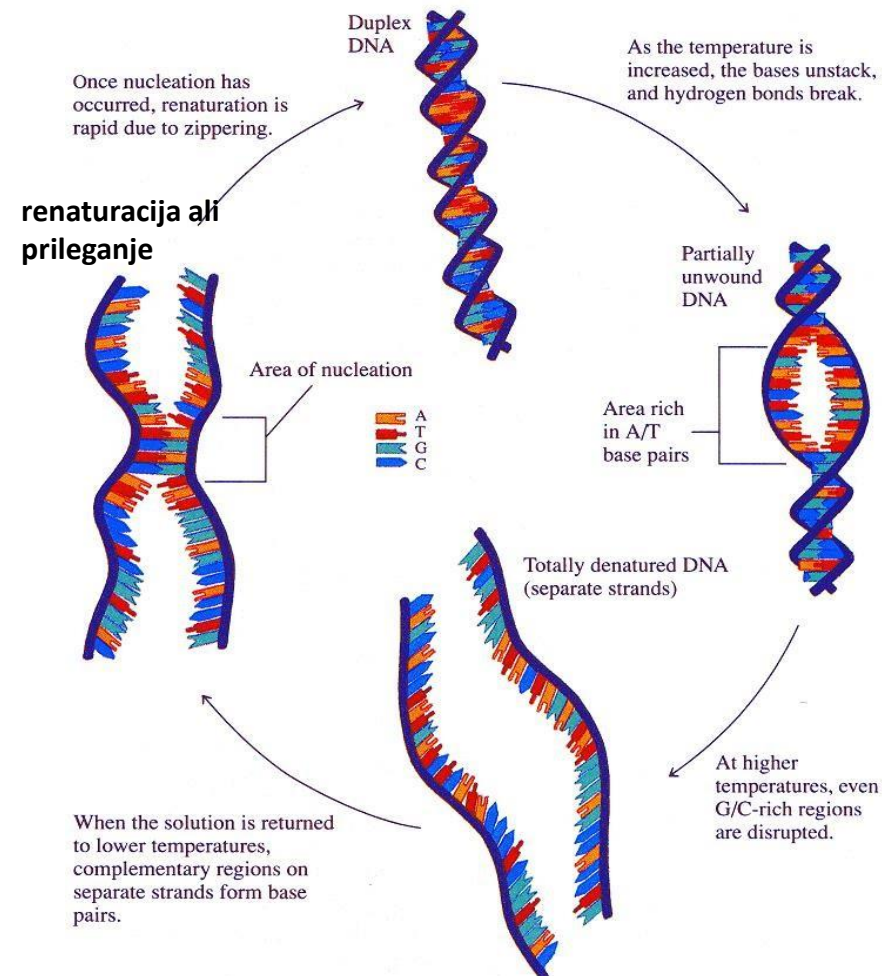
Denaturacija DNA

- Če molekulo DNA izpostavimo segrevanju, kislinam, bazam ali organskim topilom, se verigi ločita. Molekula je **denaturirana**.
- Z merjenjem absorbnosti pri **260 nm** kvantitativno spremljamo denaturacijo; povečanje absorpcije svetlobe povzroči večja dostopnost valenčnih (π) elektronov v aromatskih obročih – **hiperkromni učinek**.
- Deanturacija je **reverzibeln proces**.



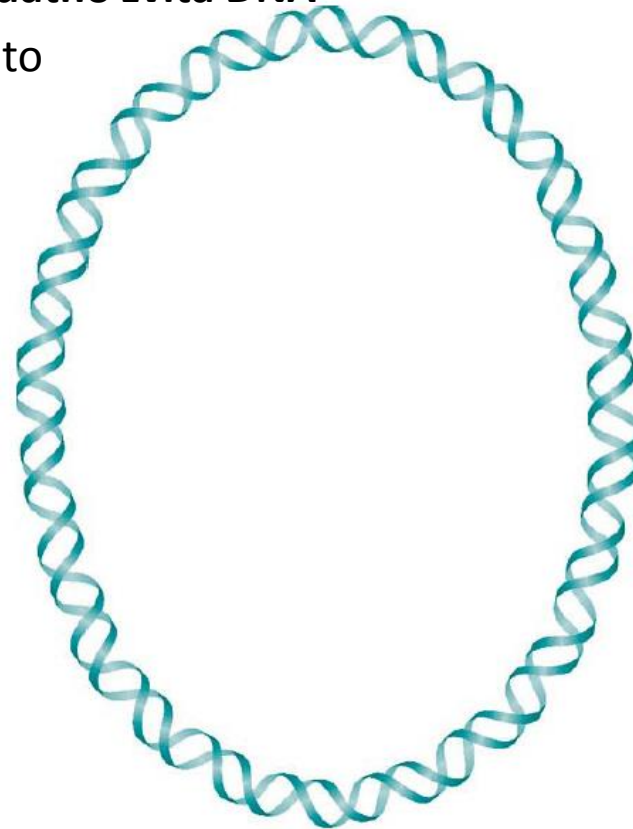
Taljenje DNA – kadar je molekula izpostavljena povišani temperaturi (85 – 90 °C).

Točko prevoja imenujemo **temperatura tališča, T_m** .



Terciarna struktura DNA

- Primarna struktura: zaporedje nukleotidov
- Sekundarna struktura: pravilna in ponavljajoča se ureditev
- **Terciarna struktura: kompleksno zvitje**
- Krožna DNA se zasuka okrog svoje osi – **dodatno zvita DNA**
- Pretvarjanje med sproščeno in dodatno zvito obliko DNA katalizirajo **topoizomeraze**.
- Dodatno zvitje ima verjetno biološki pomen: molekula postane bolj kompaktna in zavzame manj prostora v celici; uravnavanje podvojevanja in prepisovanja DNA.



(a) sproščena

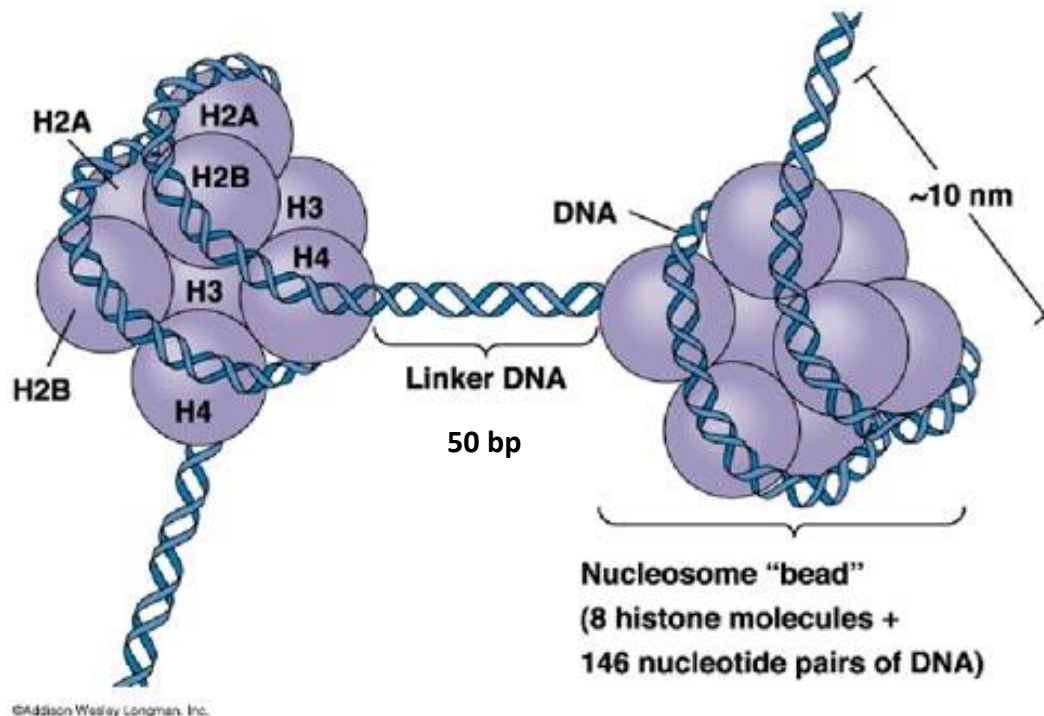


(b) dodatno zvita

krožna, dvoverižna DNA

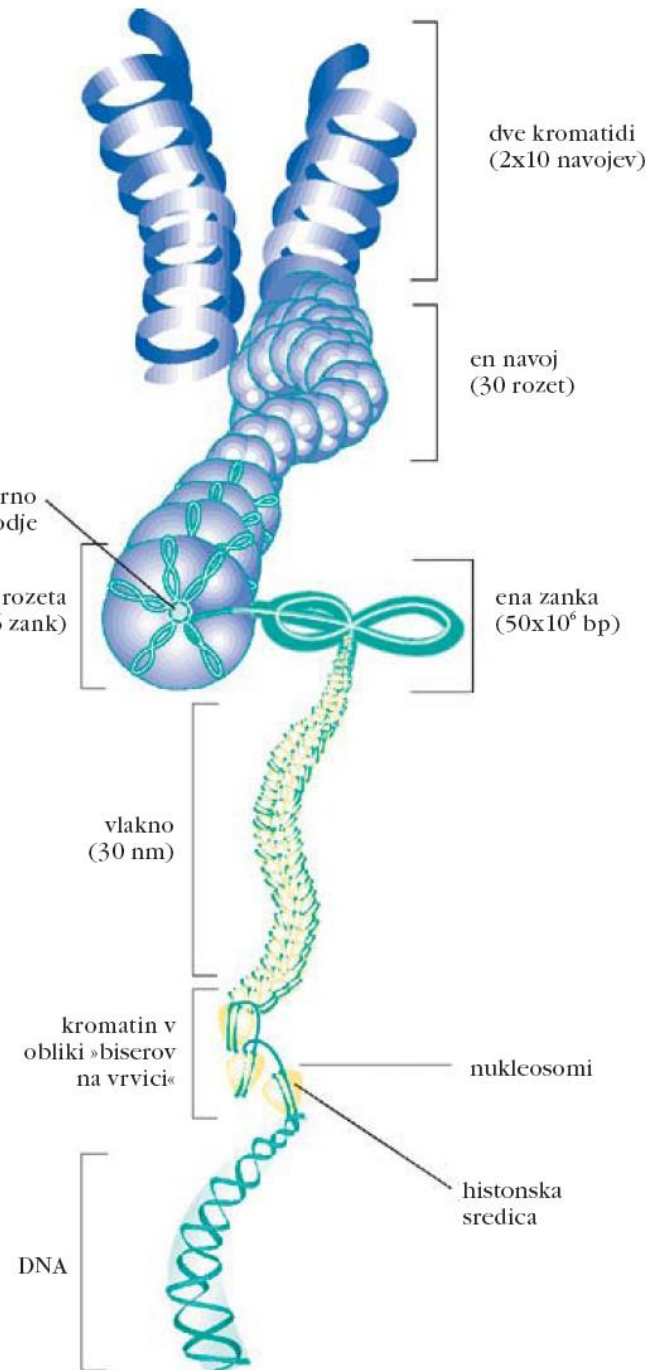
Dodatno zvitje DNA - evkarionti

- **Nukleosom** sestavlja **8 histonskih proteinov** (po dvakrat H2A, H2B, H3 in H4) okrog katerih se tesno navije **146 bp DNA**.
- **Histoni** so majhni proteini z velikim številom **bazičnih aminokislinskih ostankov** (Arg in Lys).
- Stabilizacija z ionskimi vezmi med pozitivno nabitimi Lys in Arg ter negativno nabitimi fosfatnimi ostanki.
- Znanih je **5 vrst** teh proteinov: H1, H2A, H2B, H3 in H4.
- V človeškem genomu je okrog 1.000.000 nukleosomov.



Dodatno zvitje DNA - evkarionti

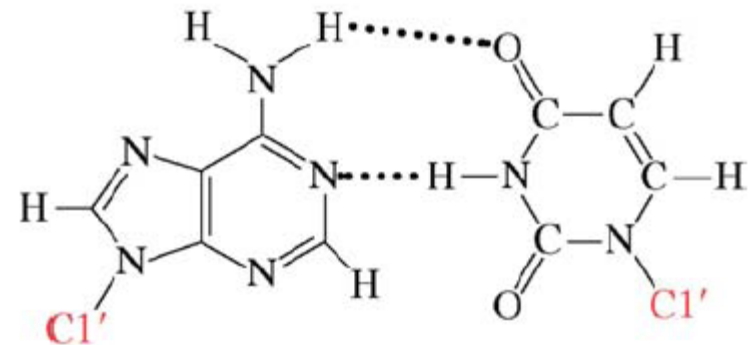
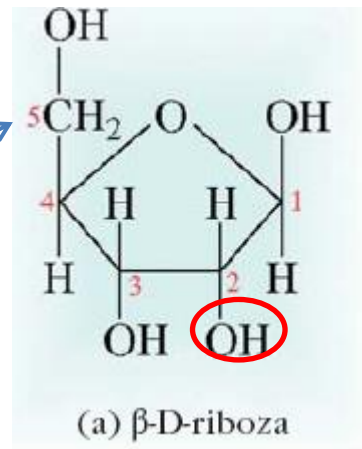
- **Nukleoproteinski kompleks** v jedru imenujemo **kromatin**.
- Sestavljajo ga **DNA, histoni** in **nehistonski kromosomski proteini**.
- Genomska DNA je v jedru evkariontskih celic spravljena v **kromosomih**.
- Kromosomi so zvitki **DNA** in **proteinov**.



RNA

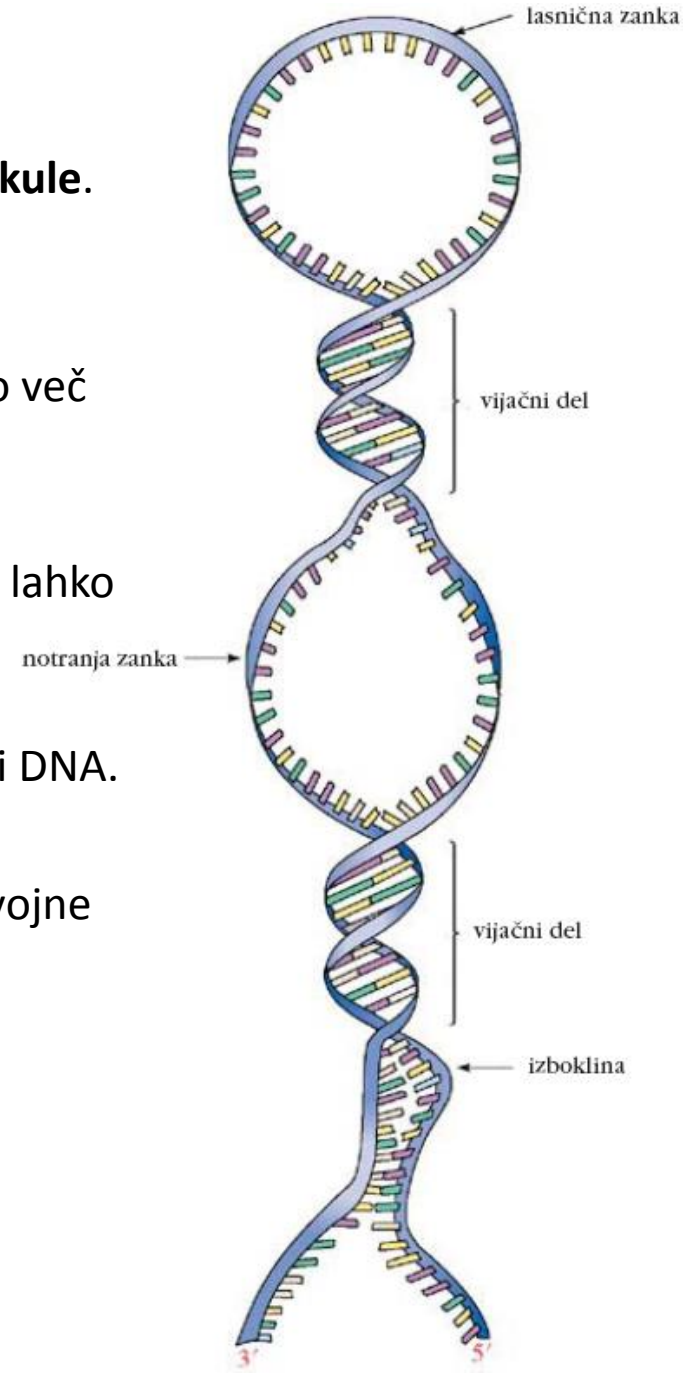
- Predstavlja 5 do 10 % celotne mase celice.
- **Poznamo različne vrste RNA, ki imajo značilno sestavo baz, velikost in biološko vlogo.**
- RNA vseduje **ribozo** in **uracil - U** (DNA vsebuje timin – T).
- Zaradi dodatne –OH skupine je RNA bolj občutljiva za hidrolizo kot DNA.
- Molekule RNA vsebujejo številne spremenjene baze.

Pozicije na sladkorju označujemo s ' (npr. 5').



Struktura RNA

- Vse vrste RNA se sintetizirajo kot **enoverižne molekule**.
 - Enoverižne RNA se uredijo v konformacije, ki imajo več **sekundarnih** in **terciarnih** strukturnih elementov.
1. **Lasnične zanke** zblížajo komplementarne dele, ki se lahko sparijo.
 2. **Desne dvojne vijačnice** nastanejo na dolgih komplementarnih odsekih; podobne so obliki A pri DNA. Ta področja imenujemo tudi '**steblo**'.
 3. **Notranje zanke** in **izbokline** prekinjajo področja dvojne vijačnice in so običajne v RNA.



Vrste RNA molekul

- Molekule RNA, ki so vključene v translacijo:
 - Ribosomalna RNA – **rRNA** so sestavni del ribosomov.
 - Prenašalna RNA – **tRNA** ima antikodon, ki prepozna zapis v mRNA in nosi ustrezno aminokislino.
 - Informacijska RNA – **mRNA** nosi genetsko informacijo, ki se prevede v protein.

vrsta	relativna množina (%)	vrednost S ^a	molekulska masa (v daltonih)	povprečno število nukleotidov
ribosomalna RNA (rRNA)	80	23 S ^a	1,2 x 10 ⁶	3 700
		16 S	0,55 x 10 ⁶	1 700
		5 S	36 000	120
prenašalna RNA (tRNA)	15	4 S	25 000	74-93
informacijska RNA (mRNA)	5	4 S	heterogena mešanica	

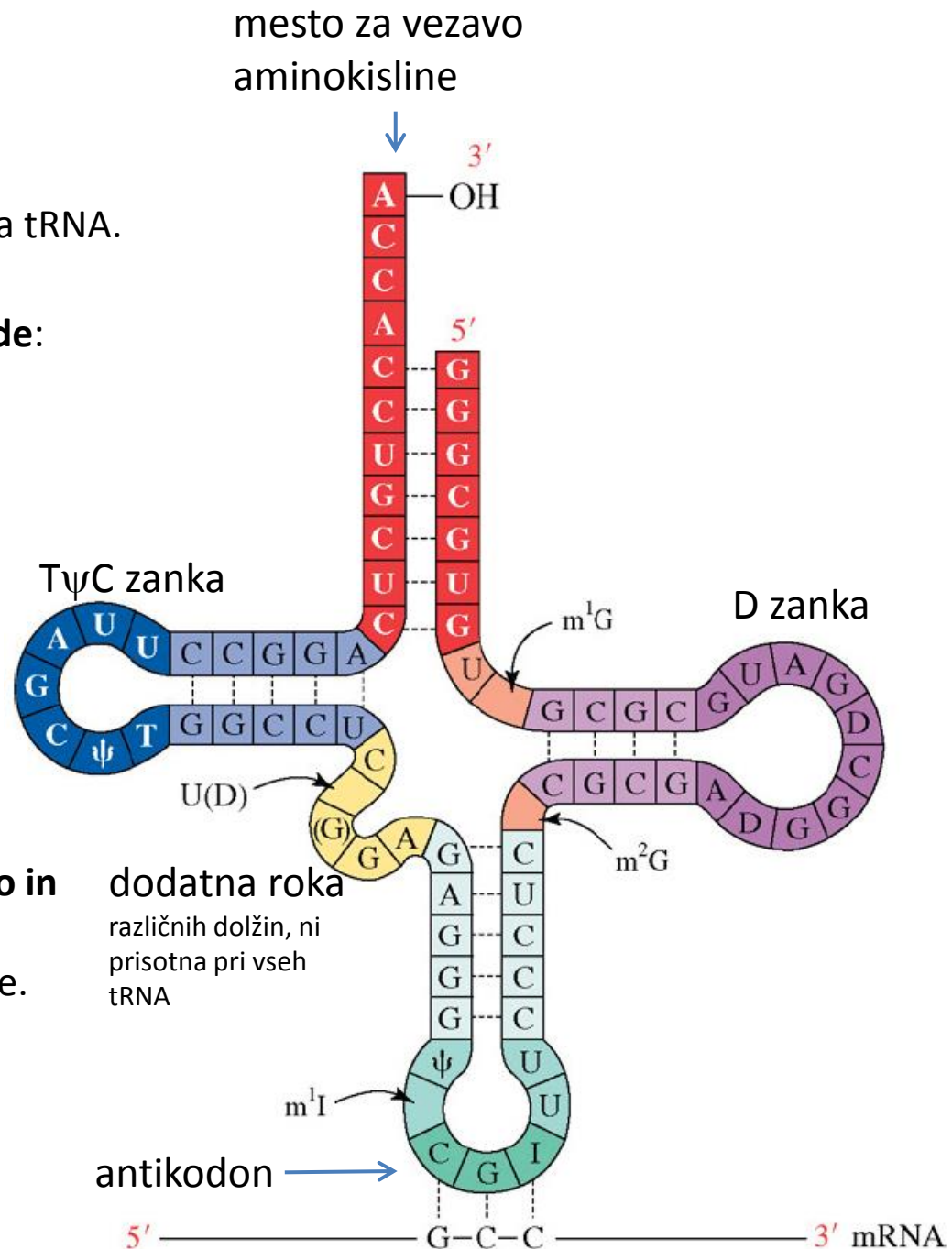
^a S je enota za sedimentacijski količnik, ki je običajno sorazmeren z velikostjo molekule.

Vrste RNA molekul

- RNA molekule z drugimi biološkimi vlogami:
 - Mikro RNA – **miRNA** so dolge ~ 22 nukleotidov in so vključene v regulacijo genov.
 - Mala interferenčna RNA – **siRNA** so vključene v regulacijo genov.
 - Mala nukleolarna RNA – **snoRNA** vodijo modifikacijo nukleozidov in nekatere cepitvene reakcije v nastanku ribosoma. S proteini tvorijo **ribonukleoproteinske delce (snoRNP)**.
 - Mala jedrna RNA – **snRNA** je vključena v proceisanje RNA (izrezovanje intronov), s proteini tvorijo male jedrne **ribonukleoproteinske delce (snRNP)**.

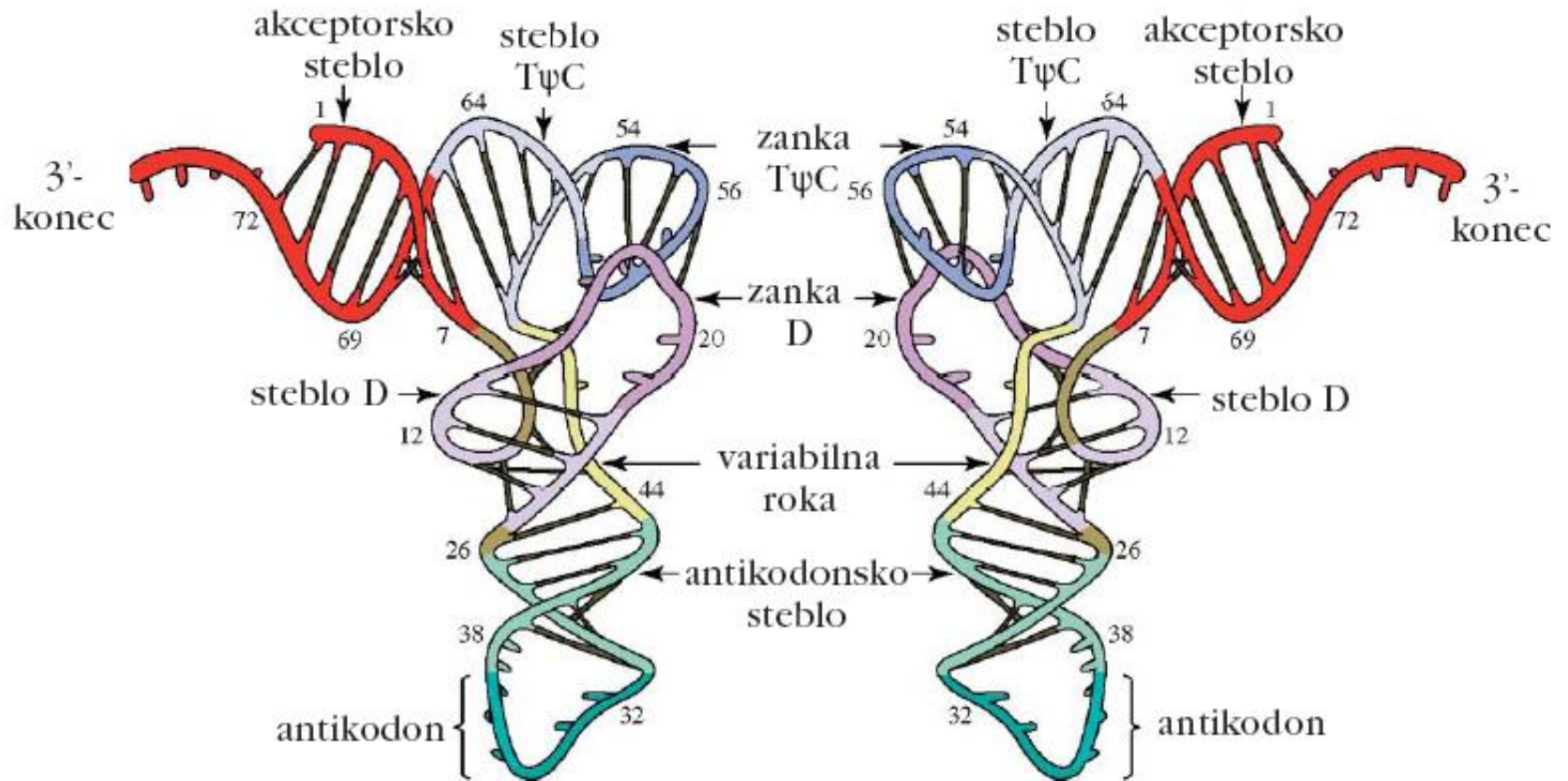
Struktura tRNA

- Velike so od 74 – 93 nukleotidov.
- Za vsako aminokislino obstaja vsaj ena tRNA.
- Vsebujejo tudi **modificirane nukleotide**:
 - m¹G – metilgvanozin
 - m²G – dimetilgvanozin
 - I – inozin
 - m¹I – metilinozin
 - D – dihidrouridin
 - Ψ – psevdouridin
 - T – ribotimidin
- **Vse tRNA imajo podobno sekundarno in terciarno strukturo.**
- Sek. struktura ima obliko lista deteljice.
- Strukturne značilnosti:
 - **lasnične zanke,**
 - področja z **dvojno vijačnico.**



Struktura rRNA

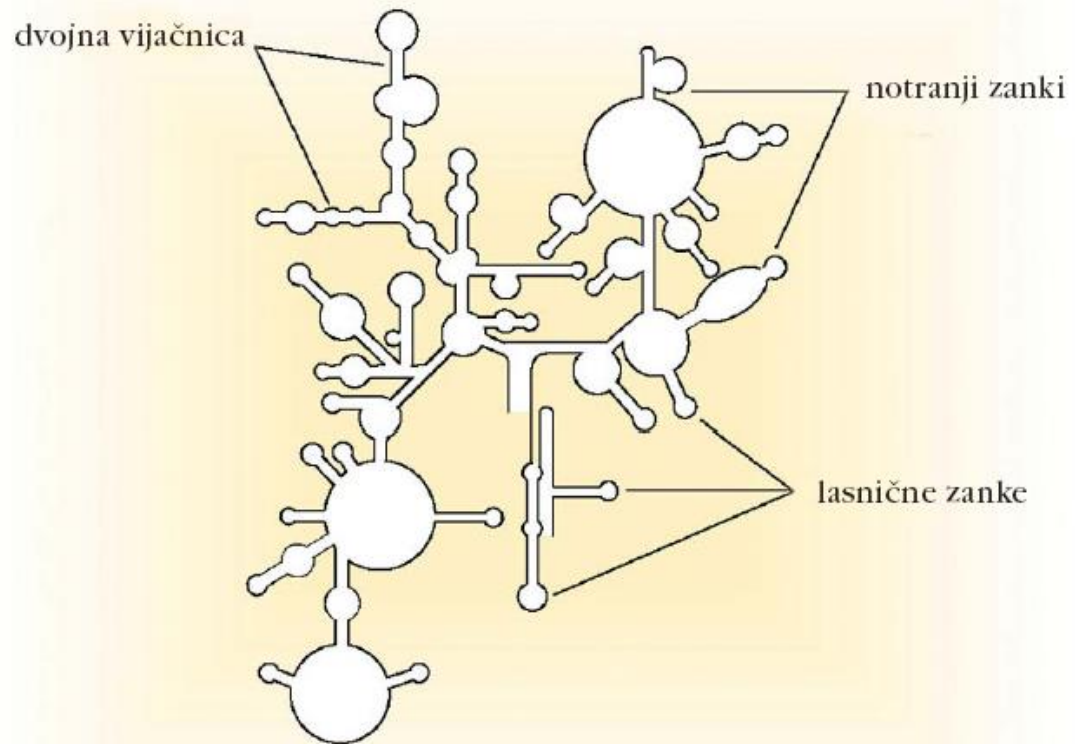
- Tridimenzionalna struktura tRNA za prenos fenilalanina iz kvasovke.



Pogled z dveh zornih kotov.

Struktura rRNA

- So sestavni **deli ribosomov** in so velike molekule.
- **Sekundarni** in **terciarni** elementi podobni kot v tRNA.
- Obsežna področja z dvojno vijačnico.
- Vrste prokariotskih rRNA: 5S, 16S in 23S.
- Vrste evkariontskih rRNA: 5S, 5,8S, 18S, 28S.



rRNA16 S iz bakterije *E. coli*

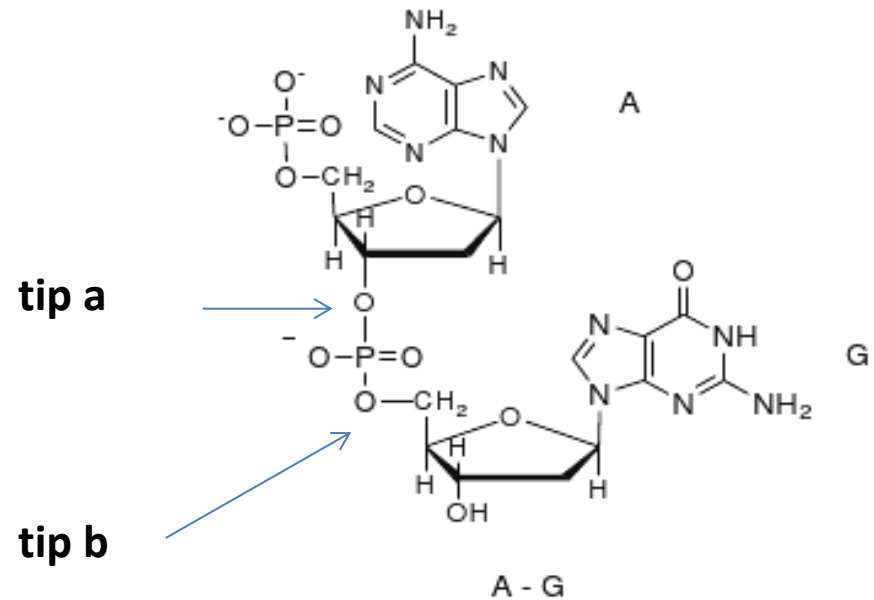
Nukleaze

- Nukleaze so **encimi**, ki **katalizirajo hidrolizo fosfoestrskih vezi** in so prisotni v vseh celicah.
- Omogočajo **ponovljive cepitve** na točno določenih mestih.
- V celicah skrbijo za katalizo **razgradnje poškodovanih** ali **postaranih** nukleinskih kislin ter s tem pomagajo vzdrževati red v celici.
- V **laboratoriju** nam pomagajo pri določanju primarne strukture DNA in RNA ter za priravo rekombinantne DNA.
- Glede na vrsto substrata ločimo:
 - **DNaze**, ki cepijo DNA in
 - **RNaze**, ki cepijo RNA.
- Glede na mesto hidrolitične cepitve ločimo:
 - **eksonukleaze** (cepijo končne nukleotide: 5'-eksonukleaze in 3'-eksonukleaze) in
 - **endonukleaze** (cepijo notranje fosfoestrške vezi).
- Glede na to katero fosfoestrsko vez cepijo, jih delimo na
 - **tipa a** – cepijo vez s 3'-OH skupino in
 - **tip b** – cepijo vez s 5'-OH skupino.

Nukleaze

Glede na to katero fosfoestrsko vez cepijo, jih delimo na

- **tipa a** – cepijo vez s 3'-OH skupino in
- **tip b** – cepijo vez s 5'-OH skupino.

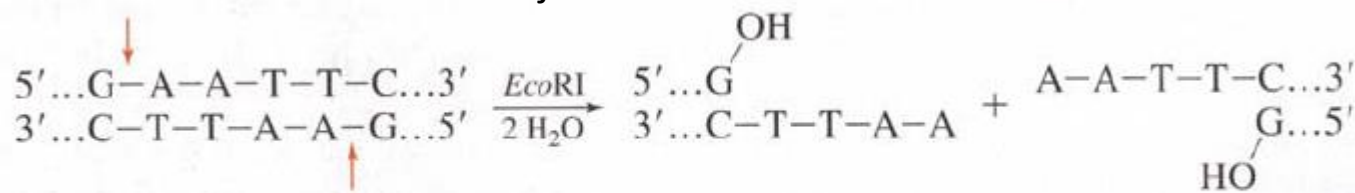


Spodnji encimi ne cepijo specifičnega zaporedja ali vrste baz.

encim	substrat	tip	specifičnost
običajne nukleaze			
fosfodiesteraza iz strupa klopotiče	DNA, RNA	ekso-a	začne na koncu 3'; ni specifična glede na zaporedje baz
fosfodiesteraza iz vranice	DNA, RNA	ekso-b	začne na koncu 5'; ni specifična glede na zaporedje baz
ribonukleaza A iz trebušne slinavke	RNA	endo-b	najpogosteje cepi ob pirimidinu na koncu 3'
deoksiribonukleaza II iz vranice	DNA	endo-b	notranje estrske vezi; ni specifična glede na zaporedje baz

Restriksijske endonukleaze

- Restriksijske endonukleaze (**restriktaze** ali **restriksijski encimi**) so najbolj specifični encimi, ki so na razpolago za **rezanje DNA** (in ne tudi RNA).
- **Izdelujejo jih bakterijske celice**, da z njimi razgrajujejo tuje molekule DNA (bakteriofagi).
- Restriktaze **prepoznajo specifična zaporedja baz v dvoverižni DNA** in katalizirajo hidrolizo obeh verig.
- **Poimenujemo** jih po bakterijah iz katerih so jih izolirali in dodamo rimsko številko: *EcoRI* je prva restriktaza iz seva R bakterij *E. Coli*.



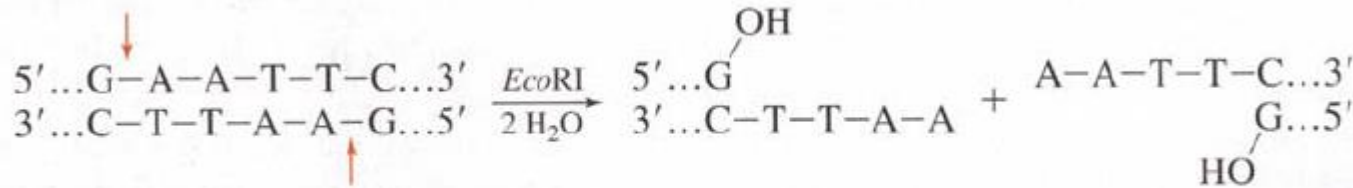
restriksijske endonukleaze

<i>EcoRI</i>	DNA	endo-a	5' GAATTC ^a
<i>BaI</i>	DNA	endo-a	5' TGGCCA
<i>TaqI</i>	DNA	endo-a	5' TCGA
<i>HinI</i>	DNA	endo-a	5' GANTC

^aRdeča puščica na prepoznavnem mestu vsake restriktaze označuje mesto cepitve.

Restriksijske endonukleaze

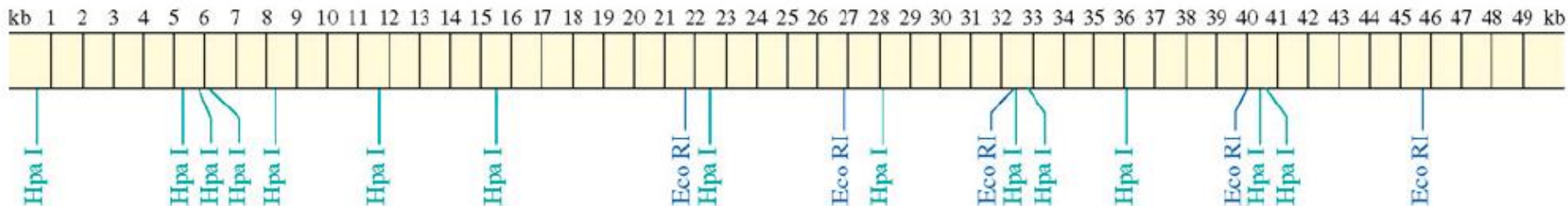
- Restriktaze pogosto uporabljamo v laboratoriju.
- Pomagajo nam pridobiti krajše fragmente, ki jih je mogoče analizirati.
- S pomočjo delovanja restriktaz ustvarino 'prstni odtis' določene molekule DNA.
- Cepitev z EcoRI nam da fragmenta z **lepljivimi konci**.



- Cepitev z AluI nam da fragmenta s **topimi konci**.

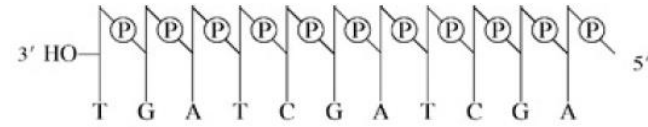


- Mesta cepitve na bakteriofagu λ:

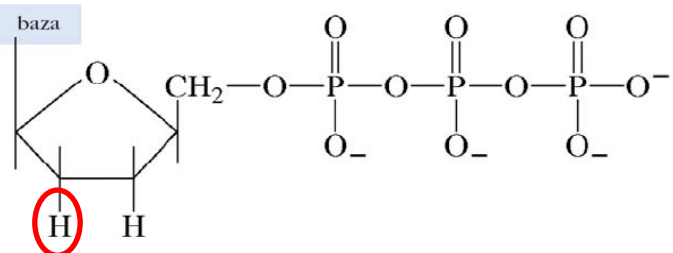
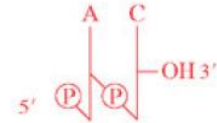


Določanje nukleotidnega zaporedja po Sangerjevi metodi

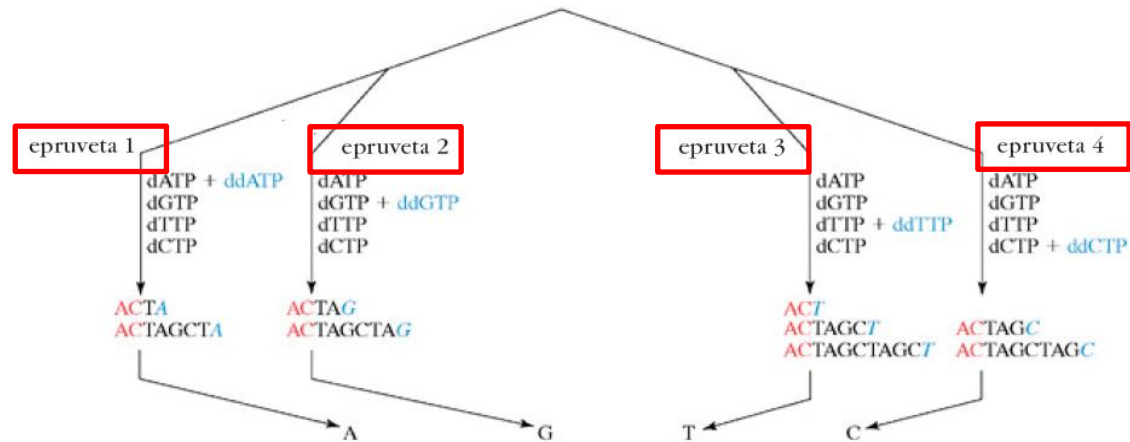
matrična veriga



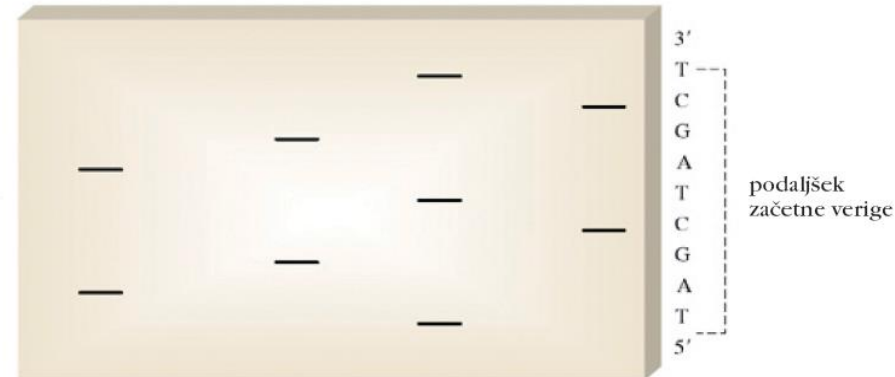
začetni oligonukleotid



ddNTP

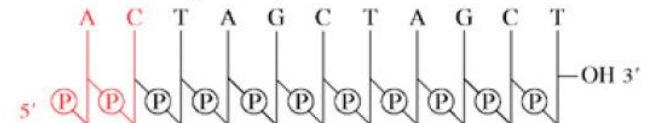


elektroforezni gel



avtoradiografsko detekcijo
omogoči ^{32}P -dATP

avtoradiografska slika elektroforeznega gela, iz katerega lahko odčitamo nukleotidno zaporedje preiskovane DNA



Določanje nukleotidnega zaporedja po Sangerjevi metodi

Avtomatizirano določanje nukleotidnega zaporedja s pomočjo ddNTP, ki so označeni vsak s svojim fluorescentnim barvilom.

Produkte ločimo na kapilarni elektroforezi.

