Kwasy nukleinowe

Odkrycie DNA

W latach 1868-1869 Friedrich Miescher wypłukiwał krwinki białe z opatrunków i stwierdził, że słabe roztwory zasadowe powodują pęcznienie i rozpad jąder komórkowych, czego wynikiem jest pojawienie się w roztworze nowego związku chemicznego. Związek ten znalazł także w drożdżach oraz jądrach komórek, stwierdził, że zawiera C, H, O, N, P i nazwał nukleiną.

W 1884 Oscar Hertwig stwierdził, że nukleina jest odpowiedzialna za przenoszenie dziedziczenia.

W 1909 naukowcy z Instytutu Rockefellera stwierdzili, że cukrem w kwasach nukleinowych jest ryboza.

Odkrycie DNA

W latach 20-tych XX wieku stwierdzono, że w niektórych postaciach kwasów nukleinowych występuje ryboza, której brakuje tlenu – nazwano ją deoksyrybozą.

W tym samym czasie Oswald Avery i zespół pracując nad pneumokokami stwierdzili, że substancja odpowiedzialna za przemianę kolonii niezjadliwych (R) w zjadliwe (S) jest kwasem DNA.

W połowie XX wieku James Watson i Francis Crick opisują strukturę DNA co pozwala na zrozumienie zapisu informacji genetycznej i sposobu jej przenoszenia.

Kwasy nukleinowe

Łańcuchy polinukleotydów, w których poszczególne nukleotydy łączą się ze sobą wiązaniami fosfodiestrowymi między C`-5 jednego a C`-3 drugiego.

Nukleotyd

Ester fosforanowy nukleozydu, w którym kwas fosforowy jest estrowo połączony z jedną z grup hydroksylowych pentozy. W deoksyrybonukleotydach - 3` i 5`,

w rybonukleotydach – 2`, 3`, i 5`.

Znaczenie nukleotydów:

- Jednostki budulcowe kwasów nukleinowych
- Uczestniczą w metabolizmie pośrednim i w reakcjach przetwarzania energii
- Nośniki energii
- Koenzymy w reakcjach przenoszenia reszt kwasu octowego, cukrów i amin
- Koenzymy oksydoreduktaz

1. Zasady azotowe:

Pirymidyny – uracyl, tymina, cytozyna (rzadkie – 5-metylo-cytozyna, 5-hydroksy-metylo-cytozyna)

Puryny – pierścień pirymidynowy + imidazolowy – adenina, guanina (rzadkie – 2-metyloadenina, 1-metyloguanina)

- Istnieją w formach tautomerycznych (laktim – OH --- laktam = O)
- Pochłaniają światło ultrafioletowe o dł fali 260-280nm
- Słabo rozpuszczalne w wodzie

Roślinne zasady azotowe

Metylowane puryny w roślinach:

Teofilina (1,3-dimetyloksantyna)

Teobromina (3,7-dimetyloksantyna)

Kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna)

Konsekwencje występowania form tautomerycznych - pirymidyny

Tautomeria keto-enolowa, wynikająca z przemieszczania się protonów H sprawia, że zasady azotowe występują w różnych postaciach tautomerycznych:

Laktam (postać ketonowa =O), lub

Laktym (postać enolowa –OH)

W warunkach fizjologicznych dominującą ilościowo postacią tyminy i uracylu jest laktam, natomiast cytozyny – laktym.

Mutagenny efekt tautomerii zasad pirymidynowych wynika z faktu, że laktym tyminy tworzy komplementarną parę z guaniną zamiast adeniną.

Konsekwencje występowania form tautomerycznych - puryny

W warunkach fizjologicznych głównymi formami tautomerycznymi guaniny i hipoksantyny są tautomery laktamowe, natomiast dominującą formą adeniny jest laktym.

Laktamowa forma tautomeryczna adeniny tworzy parę z cytozyną, co może leżeć u podłoża mutagenezy.

2. Cukier pięciowęglowy

Ryboza lub deoksyryboza

3. Reszty kwasu fosforowego

Nukleozyd

N-glikozyd zasad purynowych lub pirymidynowych z pięciowęglowym cukrem, połączonych poprzez atom węgla 1 pentozy i atom azotu N-1 pirymidyny lub N-9 puryny.

Właściwości fizykochemiczne

- Cząsteczki kwasu są długie w porównaniu do średnicy stąd ich roztwory mają dużą lepkość
- DNA jest odporny na działanie mocnych zasad. W podobnych warunkach RNA hydrolizuje – z powodu obecności grupy OH przy C2 rybozy.
- Hydroliza kwasowa dostarcza produktów rozpadu w zależności od czasu trwania i rodzaju użytego kwasu

Denaturacja i renaturacja DNA

- Denaturacja polega na zniszczeniu struktury II i III rzędowej – wysoka temp, wysokie pH, alkohole, fenole promieniowanie, ultradźwięki
- Dochodzi do rozerwania wiązań wodorowych podwójnej helisy
- Po usunięciu czynnika denaturującego dochodzi do renaturacji

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA)

Jest polimerem zbudowanym z jednostek monomerycznych – **deoksyrybonukleotydów.** Nośnikiem informacji genetycznej są zasady azotowe zawarte w cząsteczkach DNA, podczas gdy reszty cukrowe i fosforanowe pełnią rolę strukturalną. Zasadami purynowymi w DNA są adenina i guanina, a pirymidynowymi – tymina i cytozyna.

Łańcuch DNA wykazuje polarność – jeden z jego końców ma grupę 5`OH (po lewej stronie) a drugi 3`OH (po prawej stronie).

Model helisy DNA

1. Dwa helikalne łańcuchy polinukleotydowe biegnące w przeciwnych kierunkach oplatają wspólną oś.
2. Zasady purynowe i pirymidynowe znajdują się wewnątrz a fosforany i reszty deoksyrybozy na zewnątrz helisy, a płaszczyzny pierścieni cukrów są ułożone prostopadle względem zasad.
3. Średnica helisy wynosi 2.0 nm, odległość między zasadami 0.34^{o}, na skok helisy przypada 10 par nukleotydów.

Model helisy DNA

4. Dwa łańcuchy łączą się ze sobą wiązaniami wodorowymi między zasadami tworzącymi **KOMPLEMENTARNE PARY**:

   Adenina – Tymina (dwa wiązania wodorowe)

   Guanina – Cytozyna (trzy wiązania wodorowe)

5. Kolejność zasad w łańcuchu polinukleotydowym nie jest w żaden sposób ograniczona. Ściśle określona sekwencja zasad niesie informację genetyczną.

Synteza DNA

POLIMERAZY DNA (nukleotydylotransferazy DNA) – katalizują tworzenie wiązań fosfodiestrowych. Wykazują też aktywność endodeoksyrybonukleazy, która wykorzystywana jest do usuwania błędnie wprowadzonych nukleotydów

DNA+5`trifosforan deoksyrybonukleotydu $\rightarrow$ DNA+1+PPi

Niezbędne do tego procesu są: odcinek starterowy DNA, wszystkie cztery trifosforany deoksyrybonukleotydów oraz matryca DNA

Synteza DNA

LIGAZY DNA – enzymy łączące końce dwóch łańcuchów DNA lub dwa końca jednego łańcucha tworząc cząsteczkę kulistą. Wymagają obecności NAD, który działa jako źródło grupy adenylowej.

- Katalizują naprawę w miejscu przerwania jednej z dwóch nici dwuniciowego DNA
- Współdziałają z polimerazą DNA podczas replikacji obu przeciwnie polarnych nici DNA.

Mitochondrialny DNA

Mitochondrialny DNA człowieka jest dwuniciową kolistą cząsteczką o wielkości 16 569 pz. Koduje 13 białek, 22 tRNA i 2 rRNA. Używa 22 tRNA (podczas gdy w cytozolu jest ich 61).

AGA i AGG sa kodonami stop (w cytozolu kodują argininę), AUA koduje metioninę zamiast izoleucyny, UGA koduje tryptofan (w cytozolu jest kodonem stop).

Kwas rybonukleinowy (RNA)

Jest długim, nierozgałęzionym polimerem zbudowanym z rybonukleotydów połączonych wiązaniami 3`--5` fosfodiestrowymi.

Różnice w stosunku do DNA:

- Jednostką cukrową jest ryboza
- Jedną z głównych zasad jest uracyl zamiast tyminy
- Nie tworzy podwójnej helisy
- Proporcje stężeń poszczególnych zasad nie spełniają reguł komplementarności

Kwas rybonukleinowy (RNA)

INFORMACYJNY (mRNA) – stanowi matrycę do syntezy białek. Powstają odrębne cząsteczki mRNA dla każdego genu lub grupy genów

TRANSPORTUJĄCY (tRNA) – przenosi zaktywowane aminokwasy do rybosomów gdzie dochodzi do połączenia się wiązaniami peptydowymi w kolejności determinowanej przez matrycę mRNA. Dla każdego z 20 aminokwasów istnieje co najmniej jeden tRNA.

RYBOSOMALNY (rRNA) – główny składnik rybosomów, pełni podczas biosyntezy białka funkcje zarówno katalityczne jak i strukturalne.

mRNA

Czapeczka – chroni pre-mRNA oraz mRNA przed działaniem 5` egzonukleaz, uczestniczy także w dojrzewaniu mRNA i transporcie z jądra do cytoplazmy i translacji

Sekwencja kodująca (rejon ulegający translacji) – jest składana z eksonów pre-mRNA po wycięciu intronów (splicing) w procesie dojrzewania mRNA

Ogon poli(A) to sekwencja 200-250 nukleotydów adeninowych znajdująca się na końcu 3` mRNA. Stabilizuje mRNA i umożliwia przyłączenie białek zabezpieczających przed działaniem 3` egzonukleaz. Pomaga w translacji.

Synteza RNA

POLIMERAZY RNA (nukleotydylotransferazy RNA) – katalizują tworzenie wiązań fosfodiestrowych. Nie wykazują aktywności endonukleazowej. Nie wymagają odcinka starterowego.

REPLIKAZY RNA – wytwarzane wtedy gdy komórka jest zainfekowana wirusem zawierającym RNA. Wykazują aktywność polimerazową ale na matrycy RNA wirusa.

Enzymy hydrolizujące nukleotydy

Egzonukleazy:

- **Grupa a** – specyficznie hydrolizują wiązania estrowe utworzone między grupa 3` OH i kwasem fosforowym

Fosfodiesteraza z jadu grzechotnika – działa na DNA i RNA uwalniając nukleotydy w postaci nukleozydo 5`fosforanów

- **Grupa b** – specyficznie hydrolizują wiązania estrowe pomiędzy kwasem fosforowym a 5` OH końcem mostka fosfodiestrowego

Fosfodiesteraza ze śledziony wołu – działa na DNA i RNA uwalniając nukleozydo 3` fosforany

Enzymy hydrolizujące nukleotydy

Endonukleazy – nie wymagają obecności wolnych grup OH, działają wewnątrz łańcucha

- **Grupa a**

Deoksyrybonukleaza I z trzustki wołu – działa na DNA. Hydrolizuje wiązania pomiędzy parami pirymidyna –puryna w łańcuchu

- **Grupa b**

Deoksyrybonukleaza II ze śledziony i grasicy – działa na DNA

Rybonukleaza z trzustki wołu – działa na RNA, hydrolizując wiązanie b przy którym należące do niego wiązanie a łączy się z nukleotydem pirymidynowym uwalniając nukleozydo 3` fosforany zawierające pirymidynę i oligonukleotydy zakończone nukleotydem pirymidynowym z resztą fosforanową w pozycji 3`

Enzymy hydrolizujące nukleotydy

NUKLEOTYDAZY rozkładają hydrolitycznie nukleotydy do nukleozydów

FOSFORYLAZY NUKLEOZYDÓW katalizują fosforolityczne rozszczepienie nukleozydów do wolnych zasad i rybozo-1-fosforanu (lub deoksyrybozo -1-fosforanu)

FOSFORYBOMUTAZA izomeryzuje rybozo-1-fosforan do rybozo-5-fosforanu (substratu w syntezie PRPP)

Enzymy restrykcyjne (restryktazy)

To szczególna grupa endonukleaz. Syntetyzowane są przez bakterie i zadaniem ich jest degradacja obcego DNA (np. wirusowego) w tej komórce. Charakteryzują się prawie absolutną specyficznością, rozpoznają zazwyczaj 4 – 8 nukleotydową sekwencję w obrębie której rozcinają wiązania fosfodiestrowe.

Enzymy restrykcyjne rozpoznają sekwencje palindromowe w DNA (identyczna, gdy odczytuje się ją na obu niciach w kierunku 5`→3`). Są wykorzystywane w biologii molekularnej do rekombinacji cząsteczek DNA.

Synteza nukleotydów purynowych

AMP powstaje poprzez wprowadzenie grupy aminowej przy C-6 zamiast tlenu karbonylowego – donorem jest asparaginian, zostaje zużyty GTP

GMP jest syntetyzowany przez utlenienie inozynianu i wprowadzenie grupy aminowej przy C-2, która pochodzi z glutaminy, zostają zużyte dwa wysokoenergetyczne wiązania (ATP$\rightarrow$AMP)

Synteza nukleotydów pirymidynowych

Di i tri fosforany są przekształcane przez kinazy nukleozydodifosforanowe

CTP tworzy się z UTP – tlen karbonylowy przy C-4 zostaje zastąpiony przez grupę aminową (z glutaminy), wymagane jest ATP)

Deoksyrybonukleotydy powstają przez redukcję rybonukleotydów przy udziale kompleksu reduktazy rybonukleotydowej. Grupę 2` OH reszty cukrowej zastępuje atom wodoru, reduktorem jest NADPH.

dUMP jest metylowany do dTMP – donorem grupy metylowej jest pochodna tetrahydrofolianu.

Syntetyczne analogi nukleozydów

Pochodne zasad azotowych i nukleozydy w których została zmieniona struktura pierścienia lub cukru w celu uzyskania zmiany działania biologicznego związku co może być wykorzystane terapeutycznie.

- Hamowanie enzymów wykorzystujących fizjologiczne odpowiedniki analogów jako substraty
- Konsekwencje wbudowywania analogów nukleozydów w DNA lub RNA, wynikające z nieprawidłowego parowania zasad oraz wstrzymania replikacji lub transkrypcji

Syntetyczne analogi nukleozydów

- Allopurynol hamuje oksydazę ksantynową i enzymy biosyntezy puryn – stosowany w leczeniu hiperurykemii i dny moczanowej
- 9-(2-hydroksyetoksymetylo)guanina – acyklowir – stosowany w leczeniu chorób wirusowych
- 3`-azydo-2`-deoksytymidyna – zidowudyna – stosowana w leczeniu chorób wirusowych

Mechanizm działania antybiotyków

Z punktu widzenia mechanizmu działania wyróżnia się 3 grupy antybiotyków, które mogą działać przez:

1. Hamowanie biosyntezy ściany komórki bakteryjnej (penicyliny, cefalosporyny, bacytracyna, cykloseryna,nowobiocyna, wankomycyna, ristocetyna)
2. Uszkodzenie błony cytoplazmatycznej prowadzące do zaburzeń przepuszczalności dla elektrolitów, aminokwasów i nukleotydów (streptomycyna, neomycyna, polimyksyny B i E)
3. Hamowanie syntezy białek i kwasów nukleinowych (streptomycyna, tetracykliny, chloramfenikol, erytromycyna, kanamycyna, antybiotyki peptolidowe)

Mechanizm działania antybiotyków

Daktinomycyna tworzy wiązania wodorowe z guaniną DNA i zajmuje miejsce w którym normalnie wiąże się polimeraza katalizująca syntezę mRNA na DNA.

Fleomycyna hamuje działanie polimerazy DNA i blokuje ich syntezę.

Mitomycyna tworzy krzyżowe wiązania między łańcuchami DNA blokując ich rozwijanie a co za tym idzie replikację.

Stereptomycyna blokuje przyłączanie mRNA do rybosomów i hamuje translację.

Puromycyna, jako analog strukturalny aminoacylo-tRNA hamuje biosyntezę białka na etapie translacji. Peptydylotransferaza katalizująca powstawanie wiązań peptydowych katalizuje także syntezę peptydylopuromycyny z niedokończonym łańcuchem polipeptydowym

Znaczenie diagnostyczne

Rekombinacyjna technologia DNA opiera się na enzymologii kwasów nukleinowych oraz komplementarności zasad.

ENZYMY RESTRYKCYJNE wykorzystuje się do rozcinania DNA na specyficzne fragmenty, które poddają się analizie i różnego rodzaju manipulacjom znacznie łatwiej niż cząsteczka wyjściowa.

PCR – reakcja łańcuchowa polimeryzacji – wielokrotne powielanie wybranych sekwencji DNA

Synteza cDNA

Odwrotna transkryptaza pochodząca z niektórych wirusów ma właściwość katalizowania transkrypcji ale w odwrotnym kierunku. Tym sposobem otrzymuje się jednoniciowy DNA komplementarny do mRNA. Następnie jednoniciowy cDNA staje się matrycą na której syntetyzowana jest komplementarna nić. Powstaje dwuniciowy DNA zawierający wyłącznie sekwencje kodujące jakiegoś genu pozbawione sekwencji intronowych.

Rekombinacja DNA

Niektóre enzymy restrykcyjne tak tną dwuniciową cząsteczkę DNA, że pozostawiają 4-6 zasadowe, jednoniciowe końce tzw „lepkie”. Końce te wykazują tendencje do tworzenia komplementarnych połączeń z różnymi pasującymi cząsteczkami – też syntetycznymi.

Rekombinacja polega na wbudowaniu dowolnego fragmentu obcego DNA w dwuniciową kołową cząsteczkę DNA plazmidów.

Plazmidy

Plazmidy to małe cząsteczki DNA, występujące poza chromosomem zdolne do autonomicznej replikacji i odpowiedzialne za niektóre cechy charakterystyczne różnych bakterii np. lekooporność.

W rekombinacji z wybranym fragmentem DNA mogą przenosić informację genetyczną do bakterii.

Znaczenie diagnostyczne

SOUTHERN BLOTTING – metoda identyfikacji szukanego fragmentu DNA poprzez hybrydyzację z sondą znakowaną izotopem.

Po elektroforezie przenosi się frakcje na nitrocelulozę, poddaje hybrydyzacji z sondą i poprzez autoradiografię ujawnia położenie tych fragmentów, które są komplementarne do stosowanej sondy.

NORTHERN BLOTTING – dotyczy RNA

WESTERN BLOTTING – wykrywanie białek w reakcji ze specyficznymi przeciwciałami

Mechanizm działania hormonów sterydowych

Hormony sterydowe (estrogeny, androgeny, progestageny, mineralo- i glikokortykoidy) oraz **hormony tarczycy** działają poprzez połączenie z receptorem zlokalizowanym śródkomórkowo i wpływają na ekspresję genów. Wpływając w sposób selektywny na transkrypcję określonego genu i produkcję odpowiadającego mu mRNA, zmieniają stężenia swoistych białek oraz procesy metaboliczne.