



БИОМОЛЕКУЛИ

НУКЛЕИНСКИ КИСЕЛИНИ. IV ДЕЛ

2016 НАТАША РИСТОВСКА
ИНСТИТУТ ПО ХЕМИЈА
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ, СКОПЈЕ



ФИЗИЧКО-ХЕМИСКИ СВОЈСТВА НА НУКЛЕИНСКИТЕ КИСЕЛИНИ



ФИЗИЧКИ СВОЈСТВА НА НУКЛЕИНСКИ КИСЕЛИНИ

- Физички својства на нуклеинските киселини
 - Релативна молекулска маса и големина на молекулата
 - Растворливост, густина и вискозност на раствори
 - Оптичка активност, апсорпција на светлина
 - Денатурирање и ренатурирање
 - Хибридизација

РЕЛАТИВНА МОЛЕКУЛСКА МАСА

- Нуклеинските киселини претставуваат биополимери со огромни молекулски маси. Нивната релативна молекулска маса се изразува на три начини:
- Со единици за **релативна молекулска маса M_r** (единици g/mol или Da, kDA) кога молекулата е помала и попрецизно определена.
- Преку **должината изразена со бројот на нуклеотиди**, односно бази, **1kb = 1000 бази** (за DNA базни парови bp). (kb – килобаза)
- За приближно обележување на големината на молекулата се користат **седиментациони (Swedberg-ови единици -S)**

ПРОЦЕНУВАЊЕ НА РЕЛАТИВНАТА МОЛЕКУЛСКА МАСА

Соединение	М (g/mol)		Соединение	М (g/mol)	
AMP	347,2		dAMP	331,2	
CMP	323,2	Средна	dCMP	307,2	Средна
GMP	363,2	339,5	dGMP	347,2	327,0
TMP	324,2		dTMP	322,2	

$$Mr = (An \times 331,2) + (Tn \times 322,2) + (Cn \times 307,2) + (Gn \times 347,2)$$

A_n , T_n , C_n и G_n се однесуваат на бројот на соодветните деоксинуклеотиди

Средната вредност за Mr на база е 327 (приближно 330).

За dsDNA: Средната вредност за Mr на базниот пар е приближно 660 (649).

$$Mr(dsDNA) = 660 \times N \quad (\text{каде } N \text{ е број на базните парови})$$

Пр. хромозом на *E.coli* има $4,64 \times 10^6$ парови бази. Проценка за $Mr = 3 \times 10^9$ ($m = 3 \times 10^9 \text{ Da}$)

RNA	Број на нуклеотиди	Молекулска маса (g/mol)
E.Coli		
tRNA	75	$2,6 \times 10^4$
5S rRNA	120	$4,1 \times 10^4$
16S rRNA	1541	$5,2 \times 10^5$
23S rRNA	2904	$9,9 \times 10^6$
Глушец		
18S rRNA	1869	$6,4 \times 10^5$
28S rRNA	4712	$1,6 \times 10^6$
Зајак		
18S rRNA	2366	$8,0 \times 10^5$
28S rRNA	6333	$2,2 \times 10^6$
Човек		
18S rRNA	1868	$6,4 \times 10^5$
28S rRNA	5025	$1,7 \times 10^6$

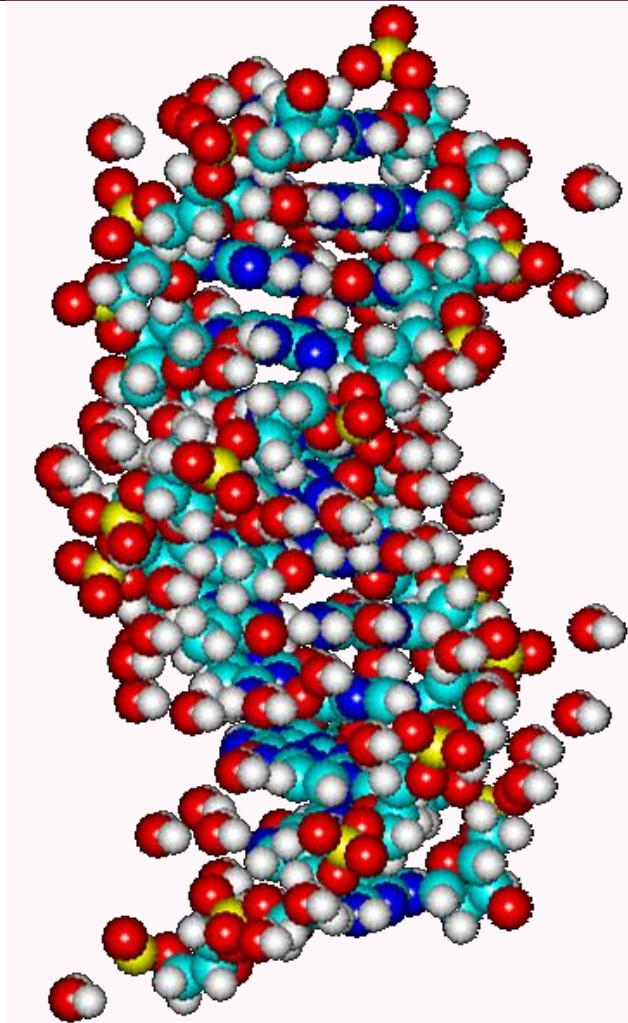
РЕЛАТИВНА МОЛЕКУЛСКА МАСА И ГОЛЕМИНА НА НУКЛЕИНСКИТЕ КИСЕЛИНИ

- Нуклеинските киселини имаат големи релативни молекулски маси и големи димензии во однос на бројот на бази, што се одразува врз нивната **должина**.
- Потсетување, кај линеарните молекули **растојанието меѓу две нуклеотиди изнесува 3,4 Å или 0,34 nm**. Нуклеинските киселини поради дополнителната спирализација може да имаат помали должини (определени со електронска микроскопија) од пресметаните. $l = N \times 0,34\text{nm}$

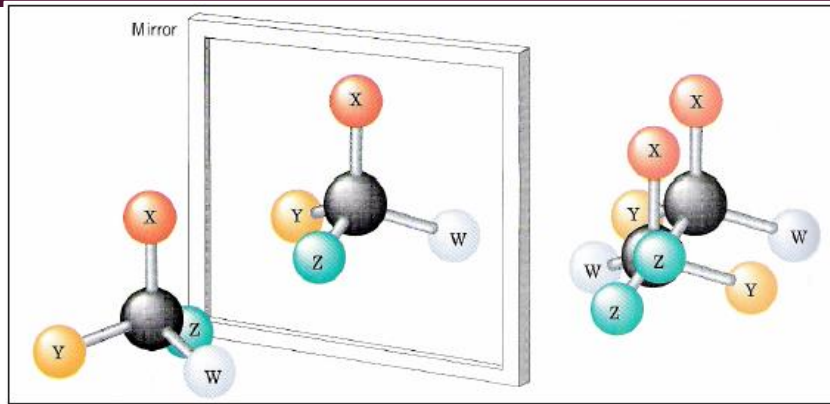
DNA	Должина	Големина	Проценка за Mr
Polyoma virus	0,6 μm	4500 bp = 4,5 kb	$2,97 \times 10^6$
Bacteriophage lambda	17 μm	48502 bp = 48,5 kb	$3,2 \times 10^7$
E.Coli chromosome	1,5 mm	4639221 bp = 4639,2 kb	$3,06 \times 10^9$
D. Melanogaster chromosome	20 mm	70000000 bp = 70000 kb	$4,62 \times 10^{10}$
Human chromosome	50 mm	150000000 bp = 150000 kb (150 Mb)	$9,9 \times 10^{12}$

РАСТВОРЛИВОСТ НА НУКЛЕИНСКИТЕ КИСЕЛИНИ

- Нуклеинските киселини **поради негативниот полнеж на фосфатните остатоци** долж шеќерно-фосфатниот скелет на полинуклеотидната низа се хидратирани.
- Олигонуклеотидите **се растворливи во вода (10mM)**.
- Нуклеинските киселини како високомолекуларни соединенија (над 200000 Da) се раствораат во **разредени водни раствори на моновалентни катјони**.
- Водните раствори **се многу вискозни** и со нив тешко се експериментира.
- **Размисли:** Каква е растворливоста во вода на нуклеотидите, нуклеозидите и азотните бази?
- **Задача:** Како ќе добиете преципитат на DNA од воден раствор?

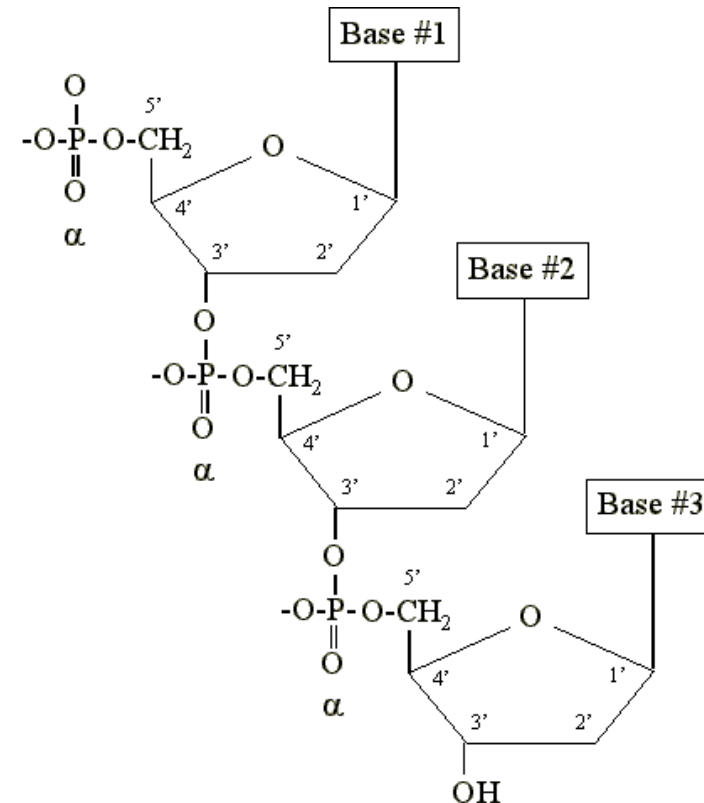


ОПТИЧКА АКТИВНОСТ НА НУКЛЕИНСКИТЕ КИСЕЛИНИ



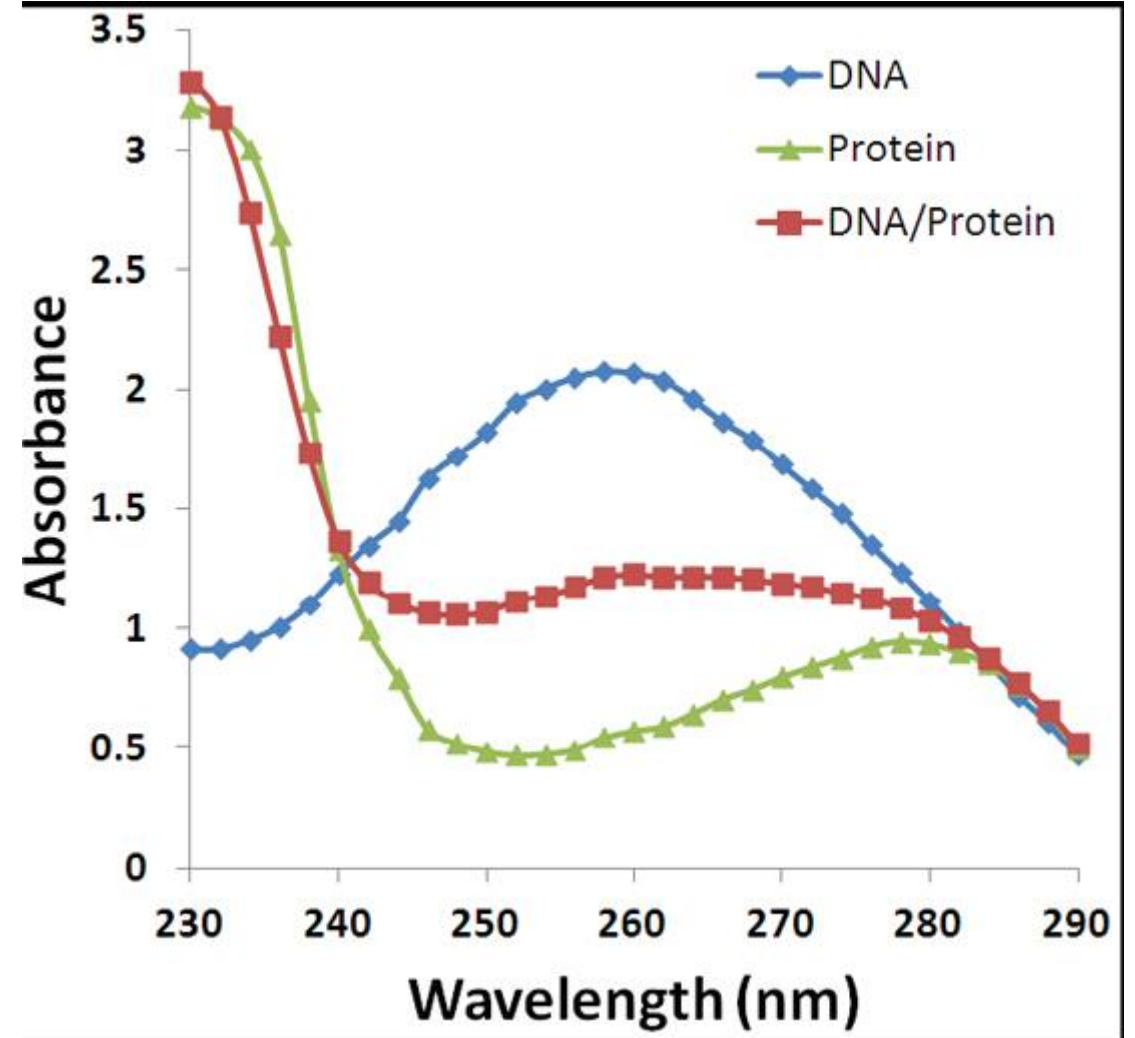
- Оптичката активност ја опишува појавата на **ротација (вртење) на рамнината на поларизираната светлина** во насока на стрелките на часовникот, или обратно. Ова својство го поседуваат супстанците со хирални молекули.
- **Хиралната молекула** или јон не се препокрива со својата огледална слика, за што причина е постоењето на асиметричен C-атом (стереоген центар).

- Нуклеинските киселини имаат **хирални центри (кои?)**, поради што нивните раствори покажуваат оптичка активност.



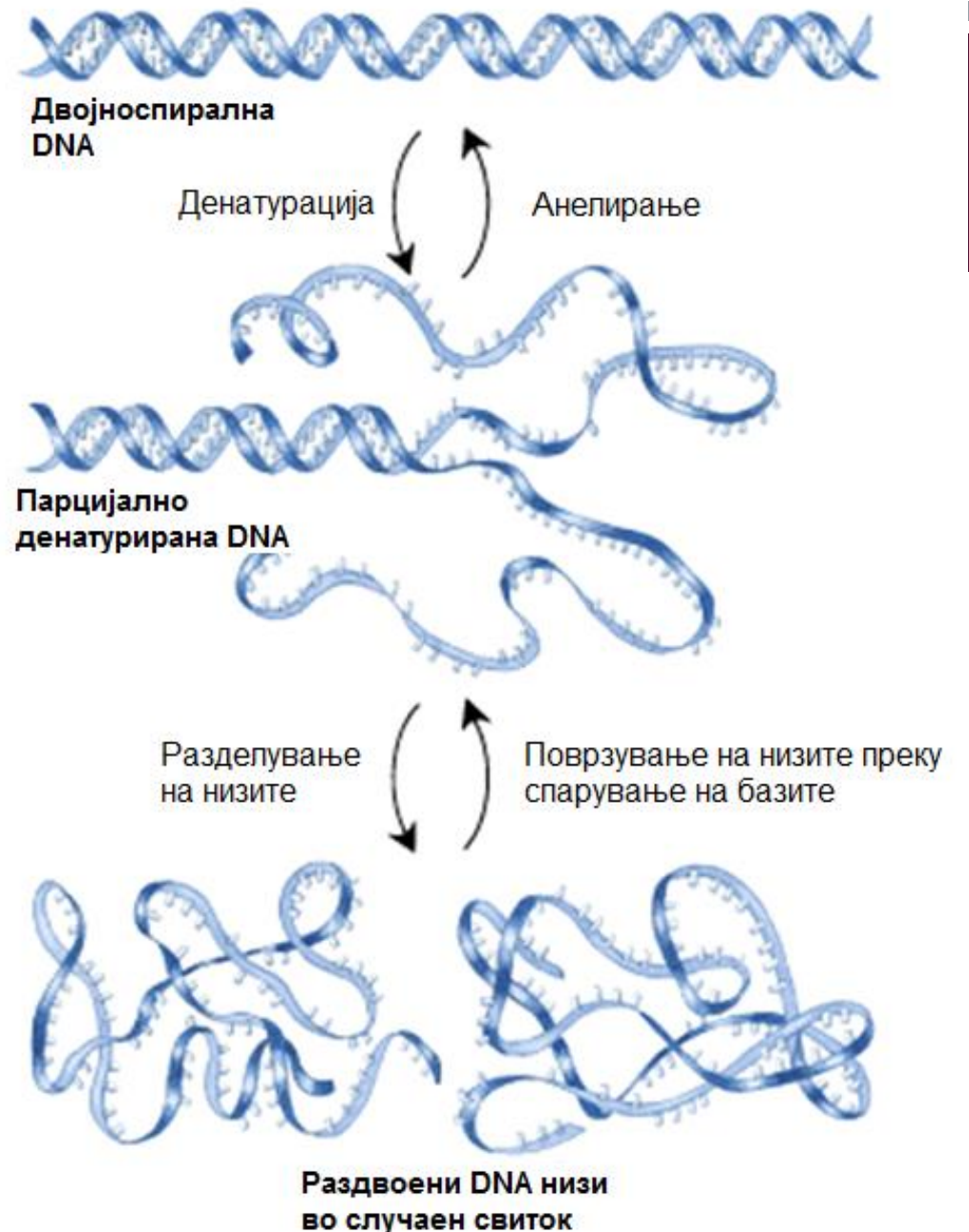
АПСОРПЦИЈА НА UV СВЕТЛИНА

- При апсорпција на **UV светлина**, **електроните** во молекулите се ексцитираат, при што **преминуваат од основна во возбудена (ексцитирана) состојба**.
- Овие електронски премини се забележуваат во UV областа од електромагнетниот спектар, само доколку молекулата има **хромофорни групи**.
- Нуклеинските киселини имаат хромофорни групи (**кои?**) и апсорбираат во UV областа, со карактеристичен максимум на **$\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$** .



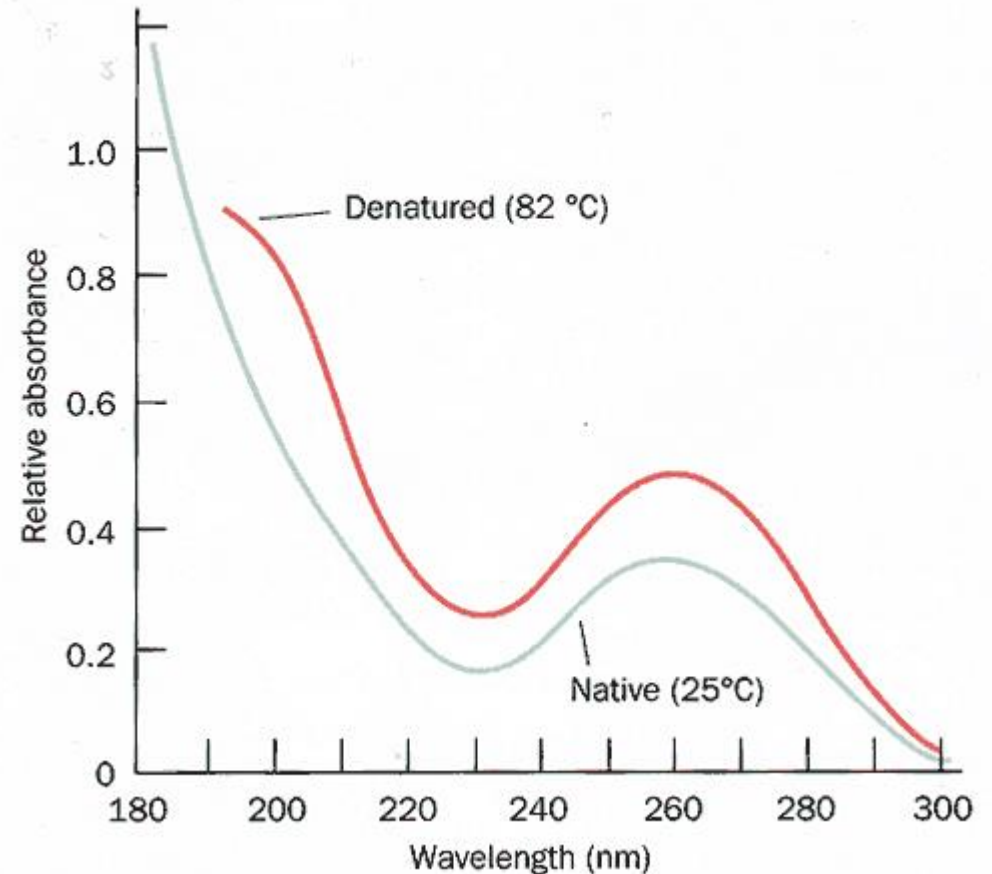
ДЕНАТУРИРАЊЕ ПОД ДЕЈСТВО НА ФИЗИЧКИ ФАКТОРИ

- **Загревањето и зрачењето** на раствор од DNA, предизвикуваат промена во секундарната структура: **денатурација** – одвиткување на двојната спирала и формирање на две единечни низи.
- При денатурација на DNA се **раскинуваат само водородните врски меѓу комплементарните азотни бази**, а не ковалентните врски.
- Денатурацијата може да се одвива по **целата должина на низата**, или **парцијално**.
- Спонтаното свиткување на раздвоените делови од парцијално денатурираната DNA се нарекува **анелација**.



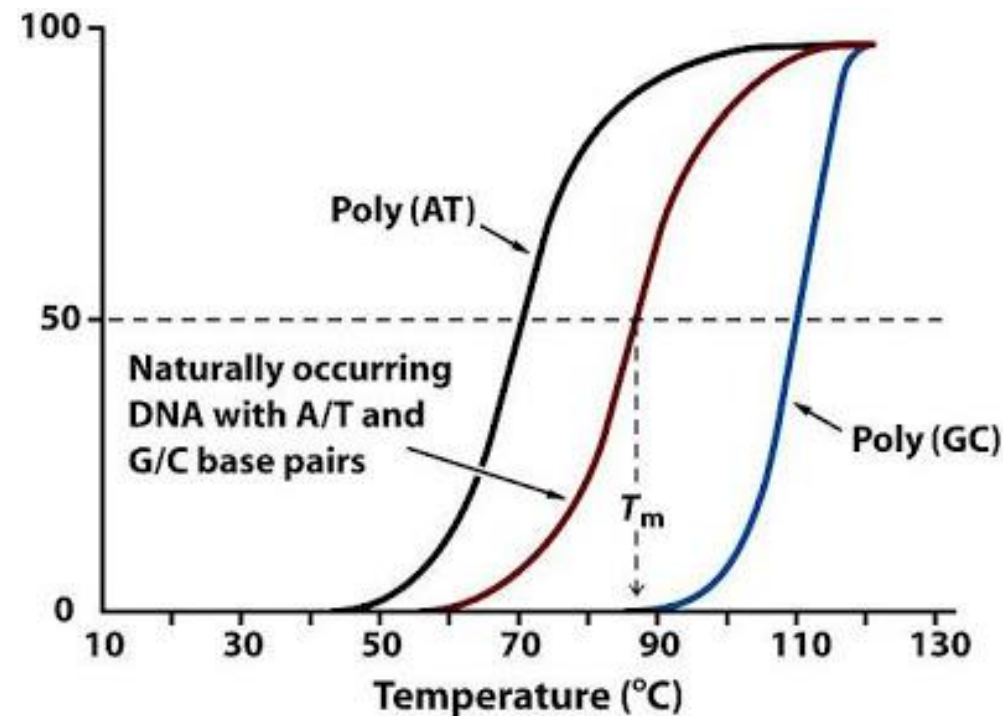
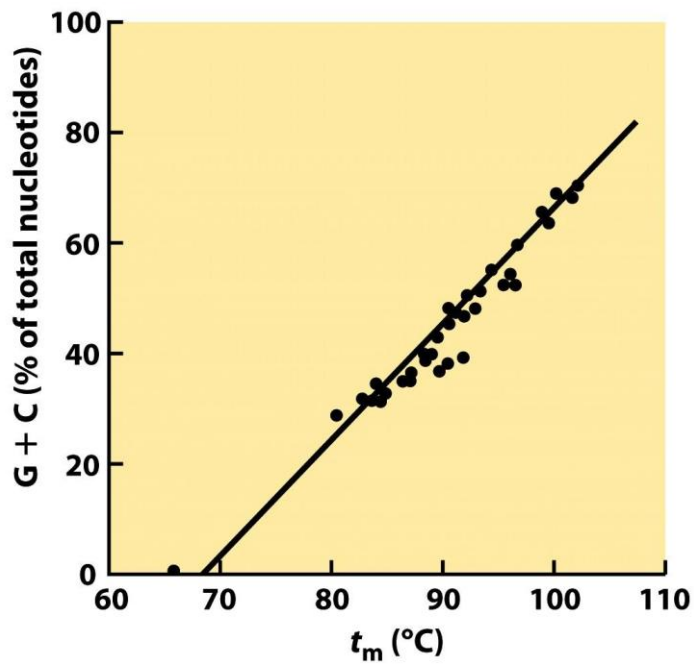
ДЕНАТУРИРАЊЕ ПОД ДЕЈСТВО НА ФИЗИЧКИ ФАКТОРИ

- Денатурацијата е проследена со квалитативни промени на физичките својства на DNA:
- Карактеристичната голема **ВИСКОЗНОСТ** на растворите од нативна DNA поради отпорот кон деформирање на компактниот и цврст двоен хеликс, драстично **се намалува** при денатурацијата до две конформационо флексибилни единечни низи.
- **UV апсорпцијата** на DNA, која речиси во целост се должи на ароматичните азотни бази, **по денатурацијата се зголемува** за 40% - **хиперхромен ефект**.



ТЕМПЕРАТУРА НА ТОПЕЊЕ НА DNA

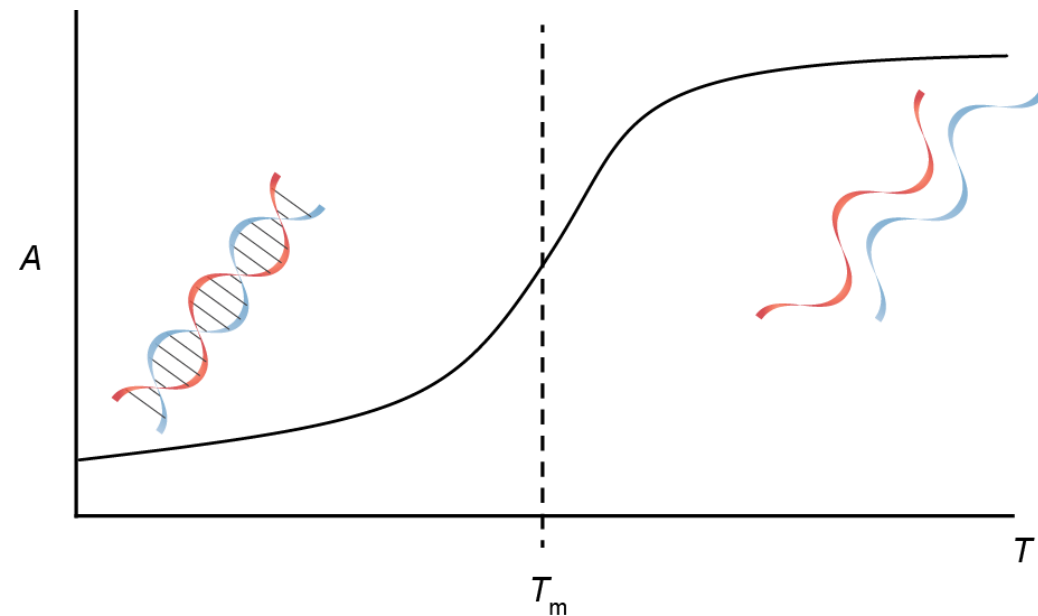
- Зависноста на апсорбанцата на 260 nm од промената на температурата на денатурација на DNA, се нарекува **крива на топење**.
- Температурата која одговара на **50% денатурација** се нарекува **температура на топење T_m** .



- T_m линеарно се зголемува со моларниот удел на GC паровите бази, поради водородната врска повеќе од AT парот на бази.

РЕНАТУРАЦИЈА

- Повторното сврзување на единечните полинуклеотидни низи на денатурираната DNA во нејзината нативна форма се нарекува ренатурација.
- Ренатурацијата се одвива само **при бавно ладење** на растворот на денатурирана DNA, на температура од **околу 25 °C под T_m** . (Зошто не со брзо ладење на ниски температури?)
- Ренатурацијата се одвива во **два одделни чекори**:
 - **(Бавен)** Меѓусебно барање на двете низи по пат на случајни судири и образување на краток сегмент од комплементарна двојна спирала.
 - **(Брз)** Формирање на двојна спирала преку спарување на преостанатите комплементарни бази.

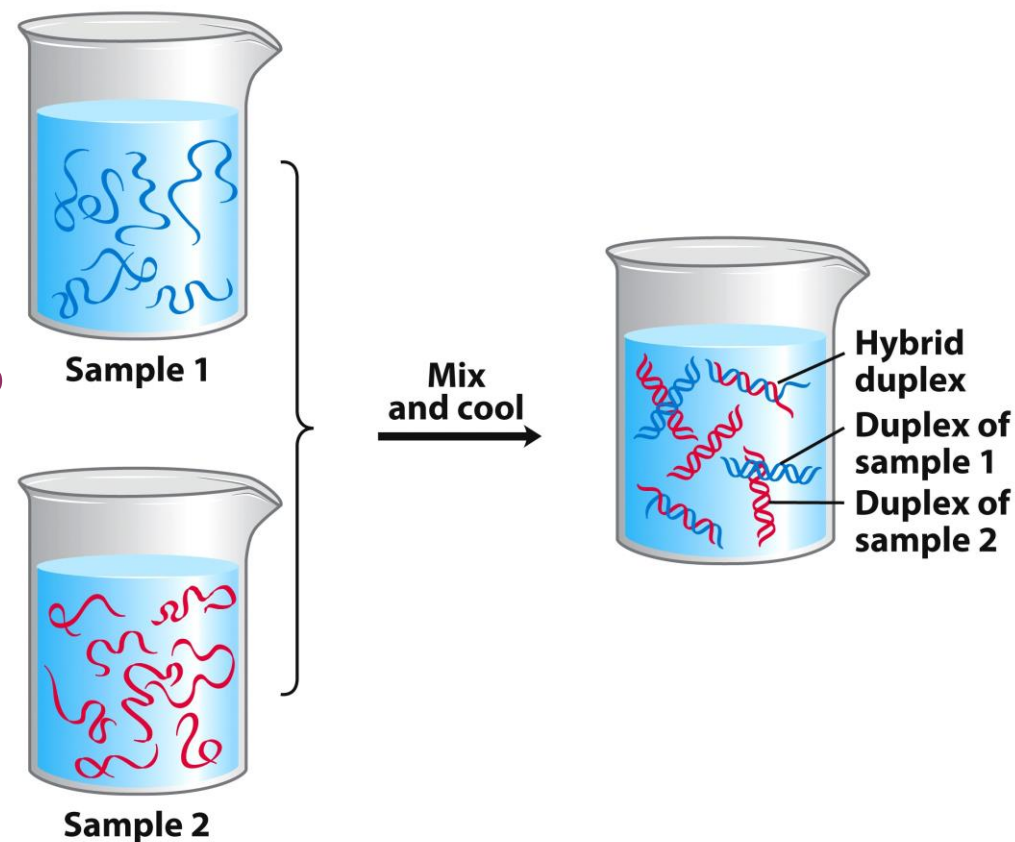


ХИБРИДИЗАЦИЈА

- Две комплементарни полинуклеотидни низи во раствор се спаруваат меѓу себе.
- Доколку полинуклеотидните низи припаѓаат на различни видови, се образуваат **хибридни дуплекси**.
- Нуклеинските киселини од различни видови можат да образуваат хибриди, а процесот се нарекува хибридизација.

ХИБРИДИЗАЦИЈА

- Со загревање се врши целосна денатурација на примероците од DNA.
- Топлите раствори се мешаат и се оставаат бавно да се ладат.
- Поголем дел од комплементарните полинуклеотидни низи од ист вид ќе се анелираат до нативните DNA молекули.
- Доколку DNA молекулите од различните видови имаат значителна сличност во поглед на нуклеотидната секвенца (висок степен на комплементарност), постои тенденција за образување на хибридни дуплекси.

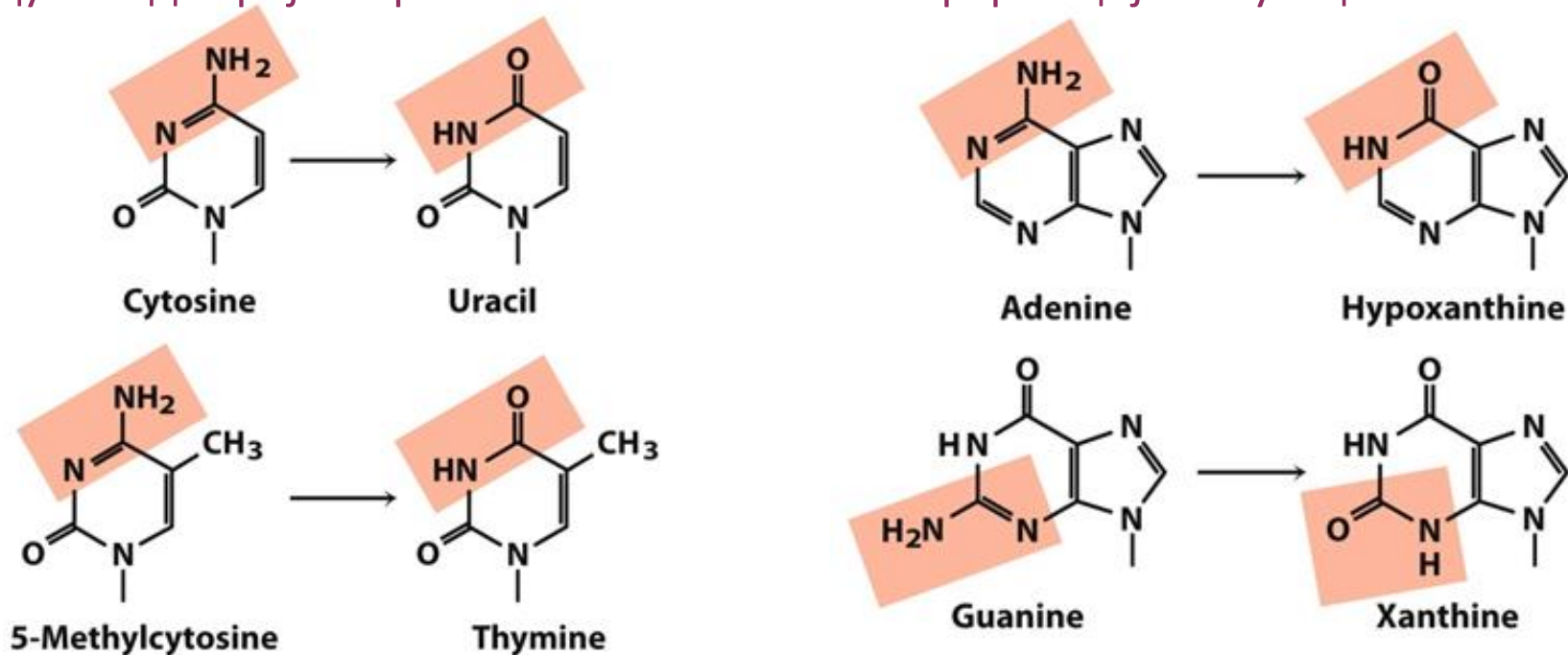


ХЕМИСКИ СВОЈСТВА НА НУКЛЕИНСКИ КИСЕЛИНИ

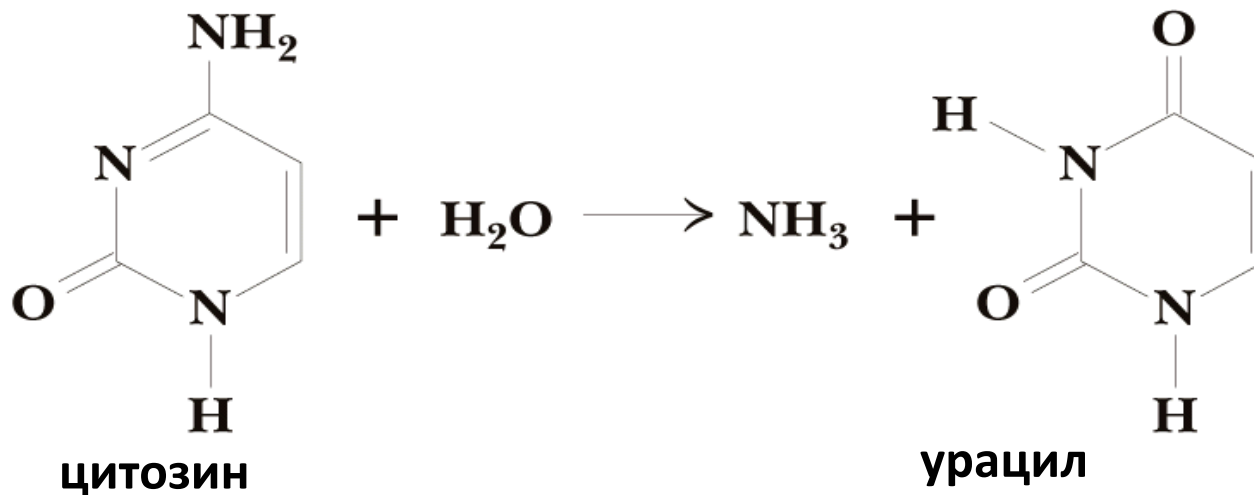
- Хемиски својства на нуклеинските киселини
 - Неензимски промени
 - Реакции со киселини и бази
 - Разложување со ензими
 - Реакции со мали молекули (лиганди и лекови) и големи молекули (со протеините градат сложени комплекси DNA-протеин и RNA-протеин), кои е одвиваат во големиот и малиот жлеб на DNA.

ДЕАМИНАЦИЈА НА АЗОТНИТЕ БАЗИ

- Деаминација: Спонтано губење на егзоцикличните amino групи од неколку нуклеотидни бази.
- Промената на ковалентната структура на азотните бази, со тоа и на нуклеотидите, предизвикуваат промени во структурата на DNA.
- Тие доведуваат до трајни промени во генетската информација – мутации.



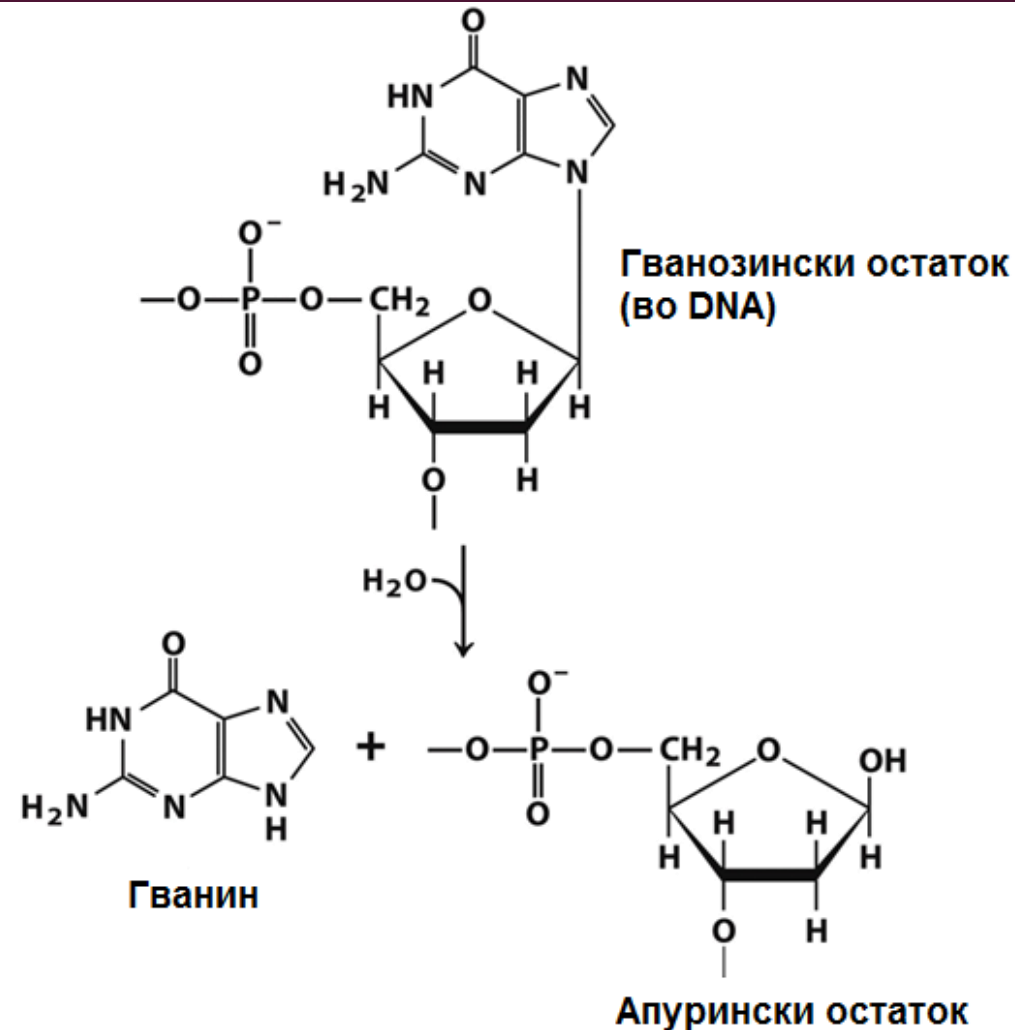
ДЕАМИНАЦИЈА НА АЗОТНИТЕ БАЗИ



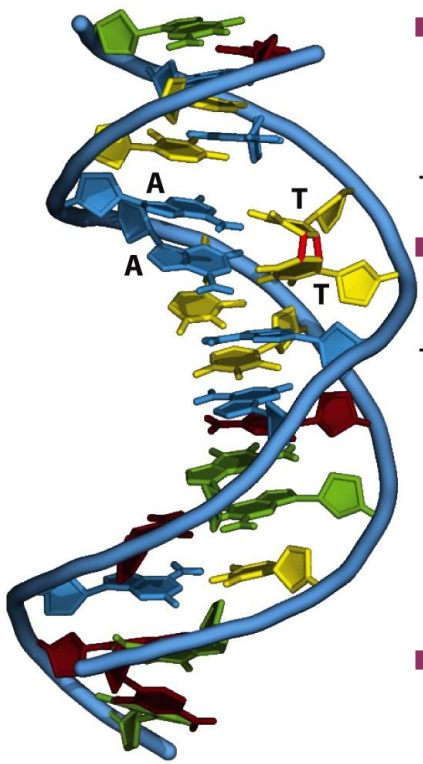
- Пример, деаминацијата на цитозинот (во DNA) и неговото преминување во урацил се случува на еден од секои 107 цитидински остатоци во период од 24 часа, односно 100 спонтани преминувања во текот на еден ден, во една клетка на цицачите.
- Зошто DNA содржи тимин, а не урацил?
- Урацилот кој се добива со деаминација на цитозинот се препознава како туѓ, па се отстранува од молекулата на DNA преку системот за репарација. (Тиминот е 5-метил дериват на урацилот)

ХИДРОЛИЗА НА N-ГЛИКОЗИДНА ВРСКА

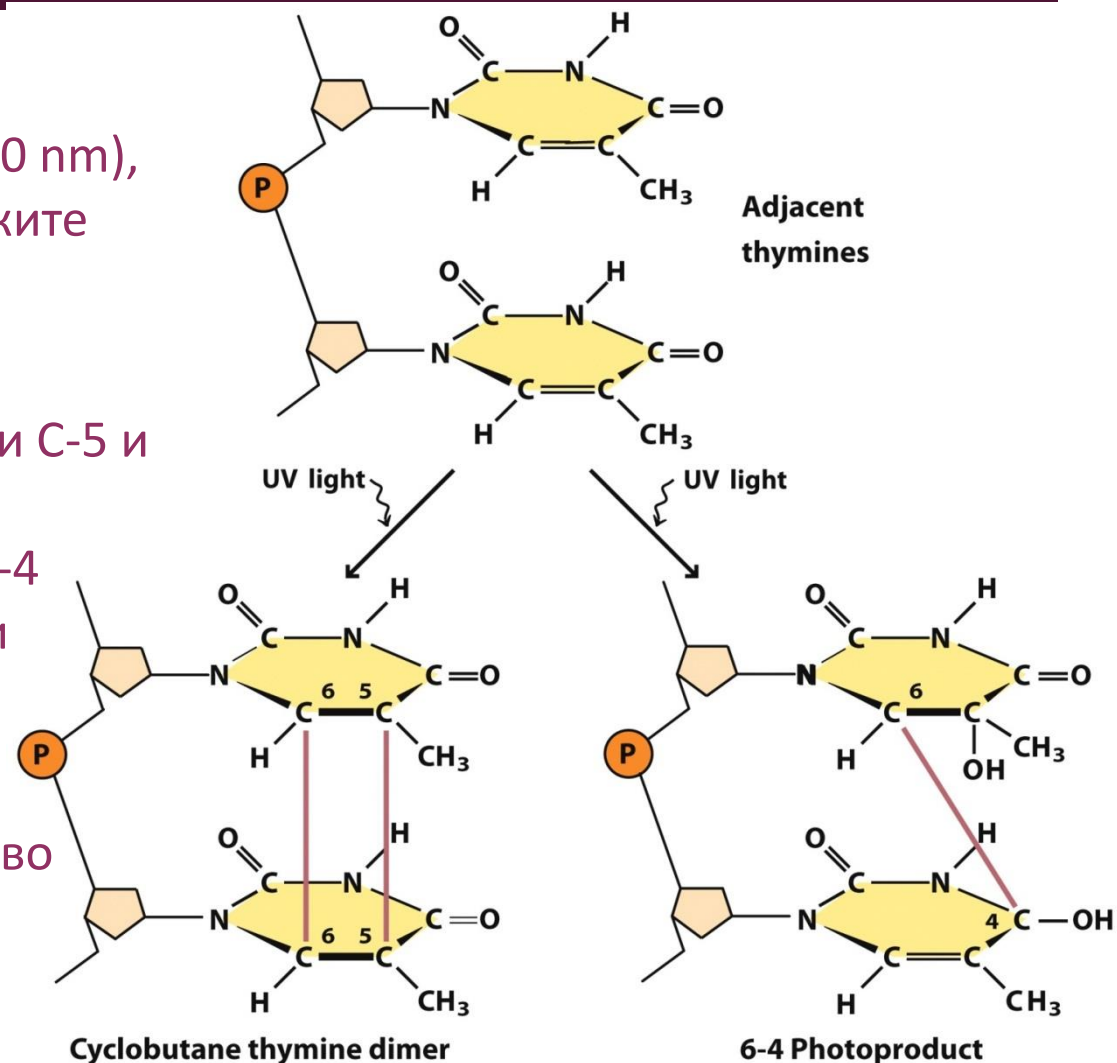
- Со хидролиза на *N*-β-гликозидната врска меѓу базата и пентозата се добиваат абазни киселини : апурински и апиримидински киселини.
- Во услови на клетка позастапено е спонтаното добивање на апурински киселини (се губи 1 од 105 пурины на 10000 клетки дневно).
- Експериментално, депуринацијата се забрзува со додавање на разредена киселина при pH = 3.
- Деоксирибозата по депуринацијата преминува од фуранозна во алдехидна форма.



ФОРМИРАЊЕ НА ПИРИМИДИНСКИ ДИМЕРИ ВО DNA



- Под влијание на UV светлина (200 до 400 nm), доаѓа до димеризација на пиримидинските остатоци.
- Можни се два продукти: димер со циклобутански прстен во кој се вклучени C-5 и C-6 атомите, и фотопродукт 6-4 за кој е карактеристична врската помеѓу C-6 и C-4 атомот од двата соседни пиримидински остатоци.
- При формирањето на циклобутански пиримидински димер се создава свиок во молекулата на DNA.

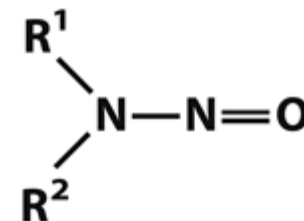


DNA И РЕАКТИВНИ ХЕМИСКИ АГЕНСИ

- Некои од продуктите на индустриските процеси претставуваат реактивни хемиски агенси кои може да предизвикаат оштетувања на DNA.
- Такви се **деаминирачките агенси**: **прекурсорите на азотеста киселина и бисулфатот**.
- Некои од овие реагенси се користат во прехранбената индустрија како конзерванси (**малите количества не се штетни**).

NaNO_2
Натриум нитрит

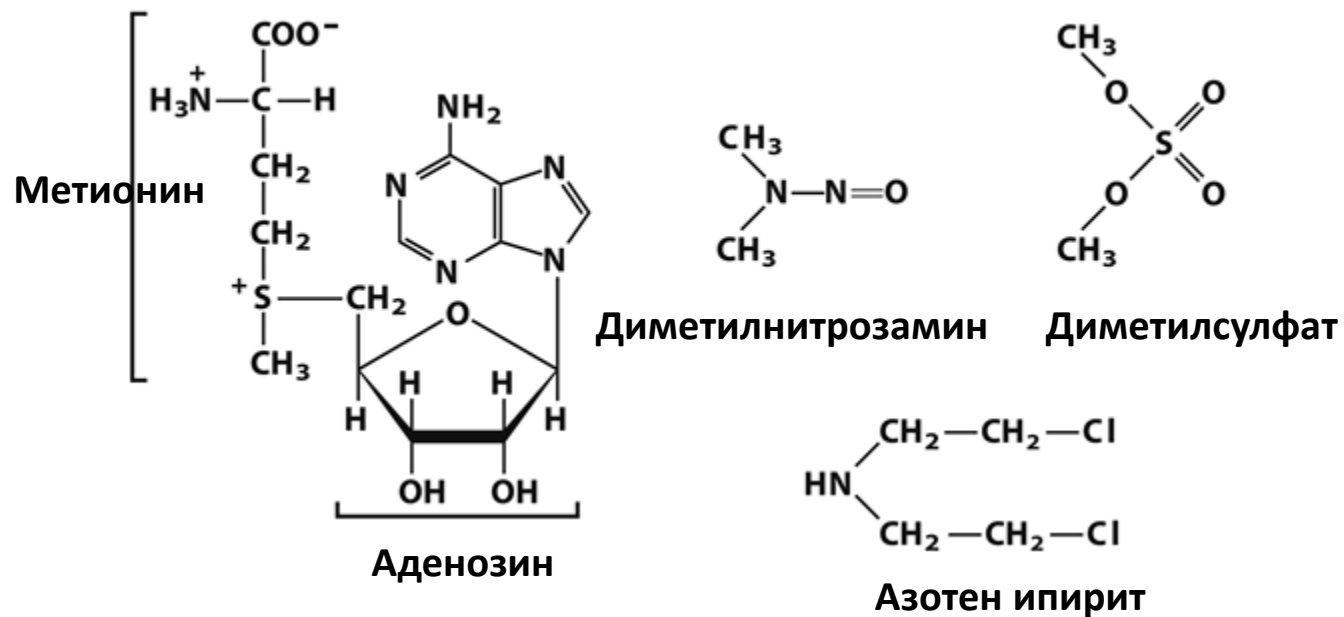
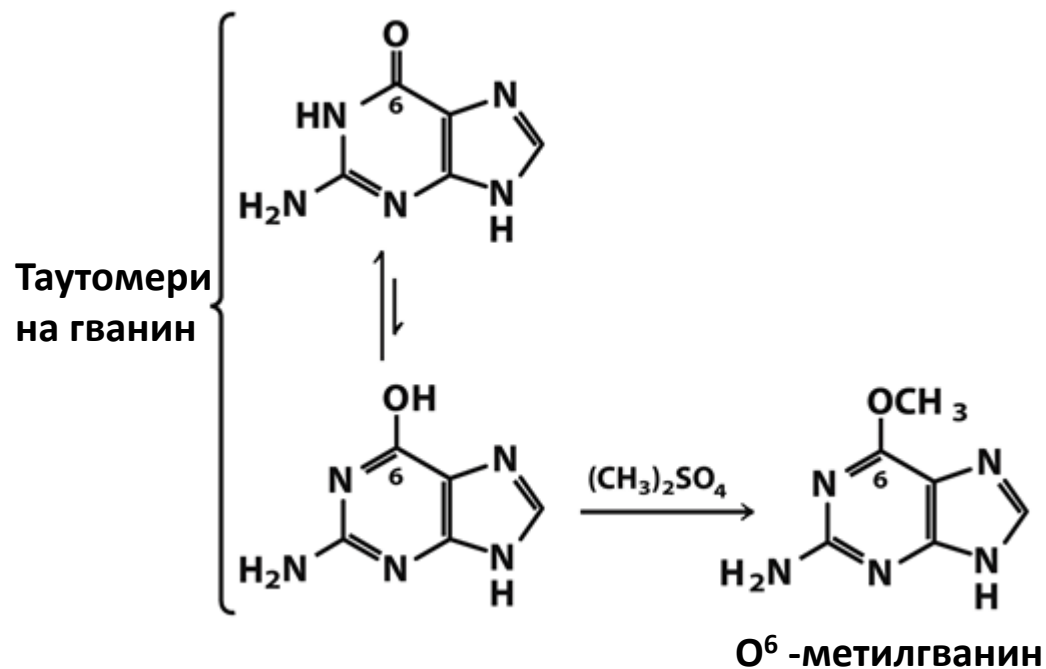
NaNO_3
Натриум нитрат



Нитрозамин

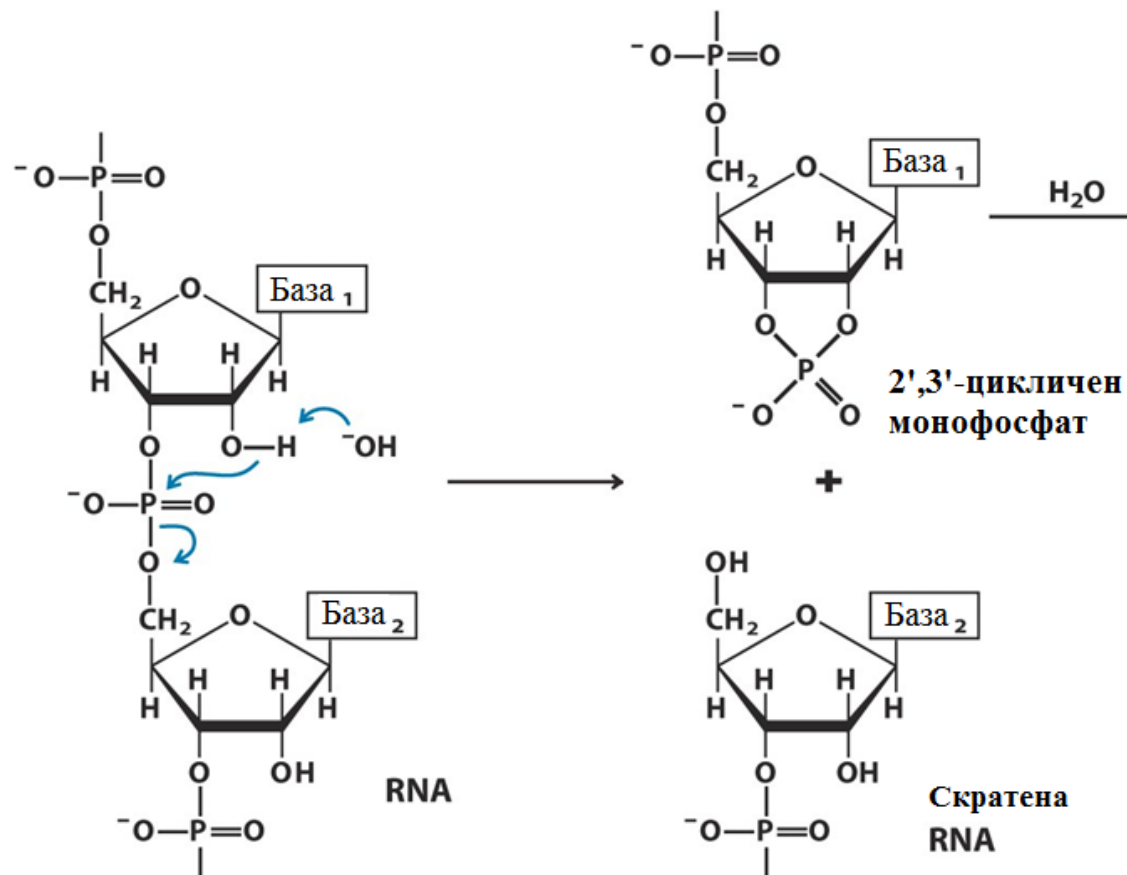
DNA И РЕАКТИВНИ ХЕМИСКИ АГЕНСИ

- Алкилирачки агенси
- Можат да ја изменуваат структурата на некои бази во молекулата на DNA.



- Диметилсулфат може да го метилира гванинот и да се добие O⁶-метилгванин, кој не може да се спарува со цитозинот.

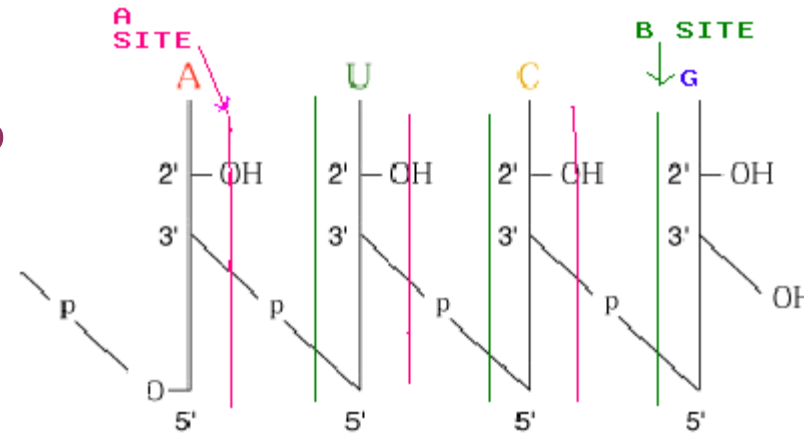
АЛКАЛНА ХИДРОЛИЗА НА НУКЛЕИНСКИ КИСЕЛИНИ



- При базно-катализирана хидролиза на RNA се раскинува фосфодиестерската врска меѓу рибонуклеотидите во шеќерно-фосфатната низа.
- Како прв продукт на хидролизата се формира 2',3'-цикличесен монофосфатен дериват, од кој при понатамоша хидролиза се добива смеса од 2'- и 3'- монофосфатни деривати.
- RNA е подложна на базно-катализирана хидролиза поради присуството на хидроксилната –OH група на рибозата во положба C- 2' .
- Во C- 2' кај DNA отсуствува –OH групата (разлика меѓу деоксирибоза и рибоза), поради што DNA е отпорна кон хидролиза во базна средина.

ХИДРОЛИЗА НА RNA

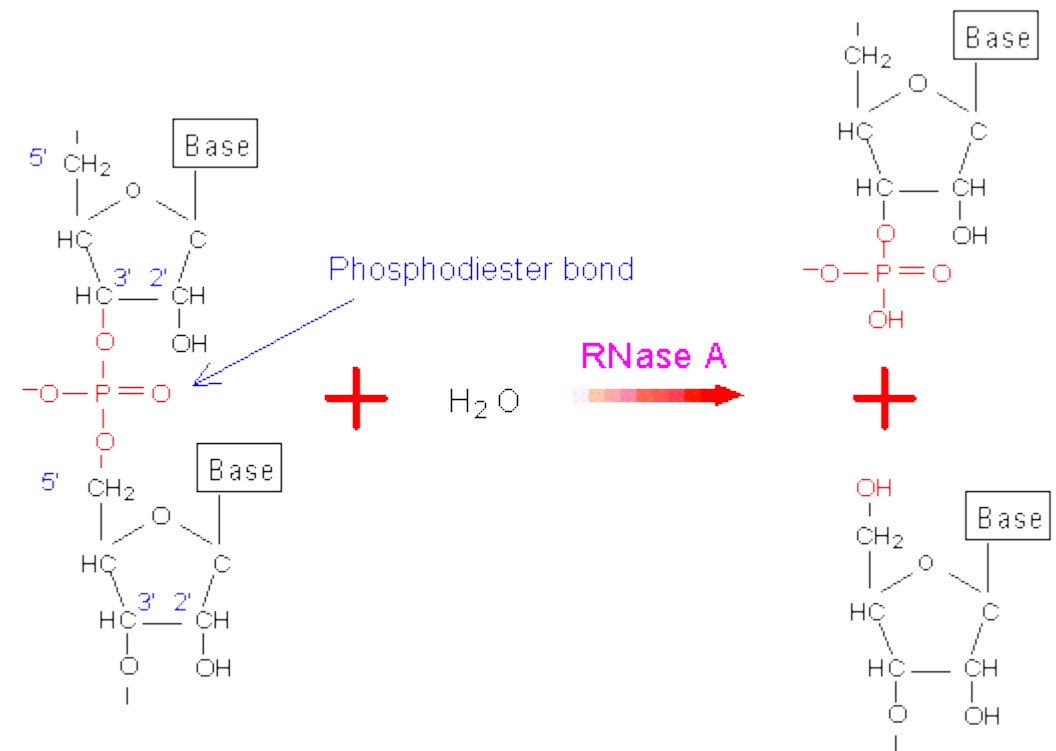
- Хидролизата на RNA може да се одвива на 3' страната (А страна) на секој диестер при што се добиваат 5' -PO_4 продукти.
- Кога хидролизата на RNA се одвива на 5' страната (В страна) од фосфодиестерската врска се образуваат 3' -PO_4 продукти.



ЕНЗИМСКА ХИДРОЛИЗА НА НУКЛЕИНСКИ КИСЕЛИНИ

- Фосфодиестерските врски меѓу нуклеотидите на нуклеинските киселини може да се раскинат под дејство на **ензими – нуклеази (фосфодиестерази)**.
- Во зависност од видот на нуклеинската киселина која ја хидролизираат, нуклеазите се **деоксирибонуклеази (деенази)** и **рибонуклеази (еренази)**.

(a)



ЕНЗИМСКА ХИДРОЛИЗА НА НУКЛЕИНСКИ КИСЕЛИНИ

- Нуклеазите според местото на “сечење” на нуклеинската киселина се делат на **ендонуклеази** и **егзонуклеази**, а некои ензими припаѓаат и на двете категории.
- **Егзонуклеазите** ги хидролизираат врските на двата **краја од полинуклеотидната низа** и се користат во методите за секвенционирање.
- **Ендонуклеазите** се ензими кои ја хидролизираат фосфодиестерската врска **во внатрешниот дел** на полинуклеотидната низа.
- Постојат стотина **рестрикциони ендонуклеази** кои ја хидролизираат DNA на специфични нуклеотидни секвенци, познати како **рестрикциони места**.
- При сечењето на DNA, рестриktivниот ензим прави два засека, по еднаш низ секоја шеќерно-фосфатна низа од двојниот хеликс.