



БИОМОЛЕКУЛИ

НУКЛЕИНСКИ КИСЕЛИНИ. III ДЕЛ

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

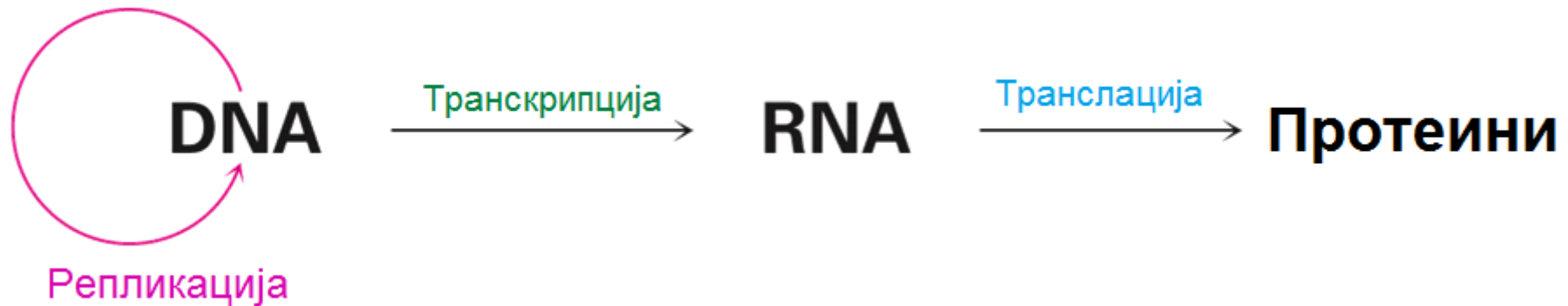


НУКЛЕИНСКИ КИСЕЛИНИ И НАСЛЕДНОСТ

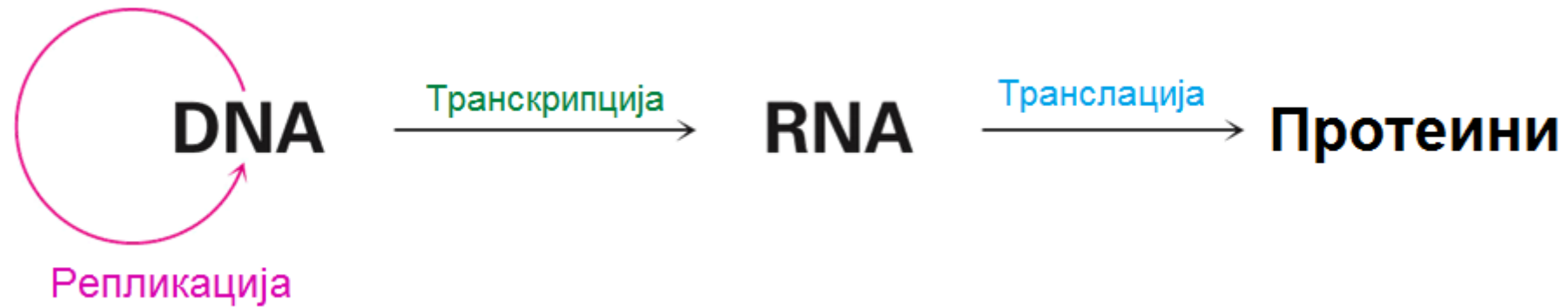


НУКЛЕИНСКИ КИСЕЛИНИ И НАСЛЕДНОСТ

- Генетските информации на организмите се содржани во секвенци од DNA.
- Како да се сочуваат овие информации и да се проследат до идните генерации?
- Според Crick-овата “централна догма на молекуларната генетика”,
- Функцијата на DNA е да ги складира информациите и да ги достави до RNA.
- Функцијата на RNA е да ги прочита, декодира и употреби информациите од DNA за синтеза на протеините.



ПРЕНЕСУВАЊЕ НА ГЕНЕТСКИТЕ ИНФОРМАЦИИ

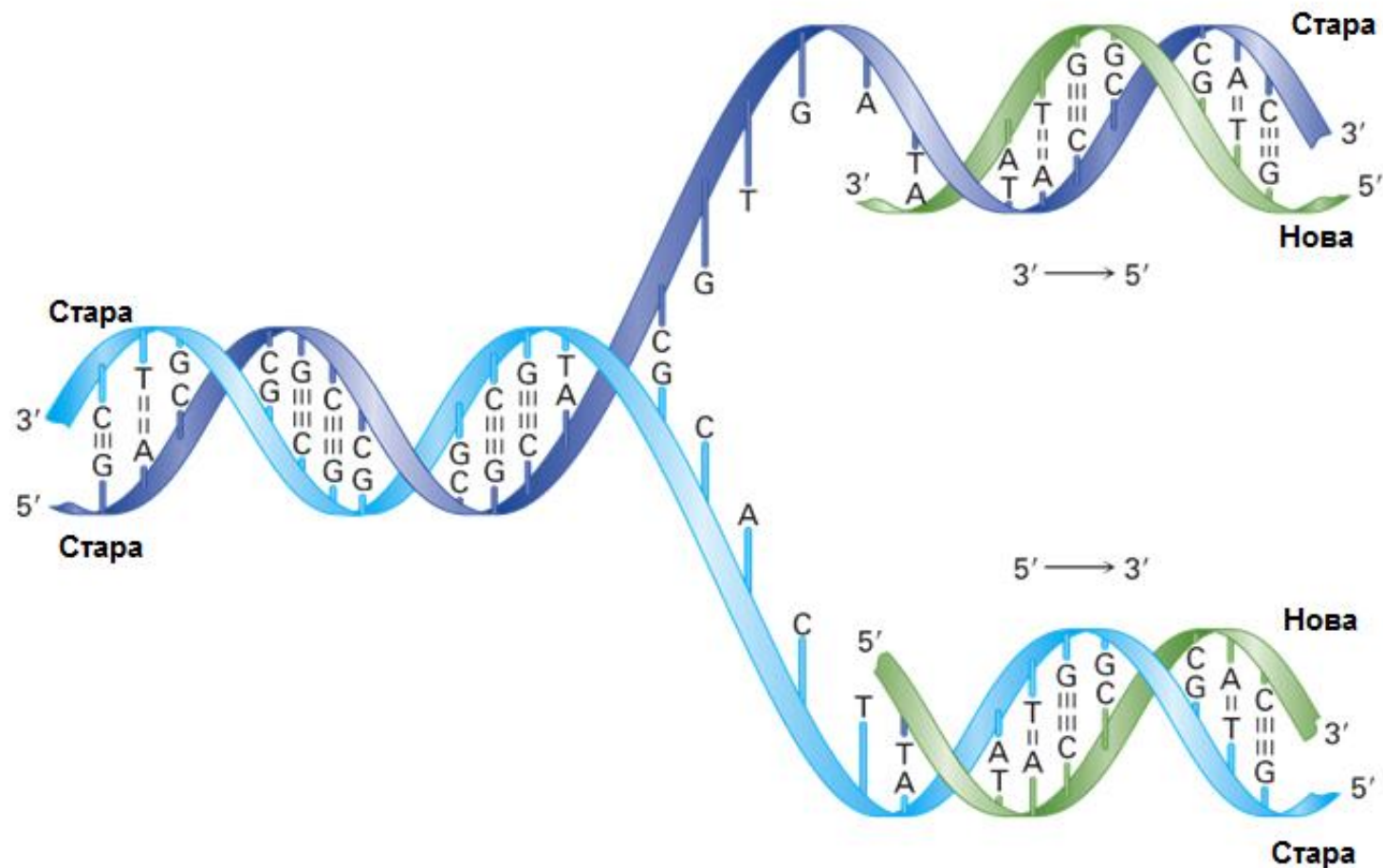


При пренесувањето на генетските информации се одвиваат три фундаментални процеси:

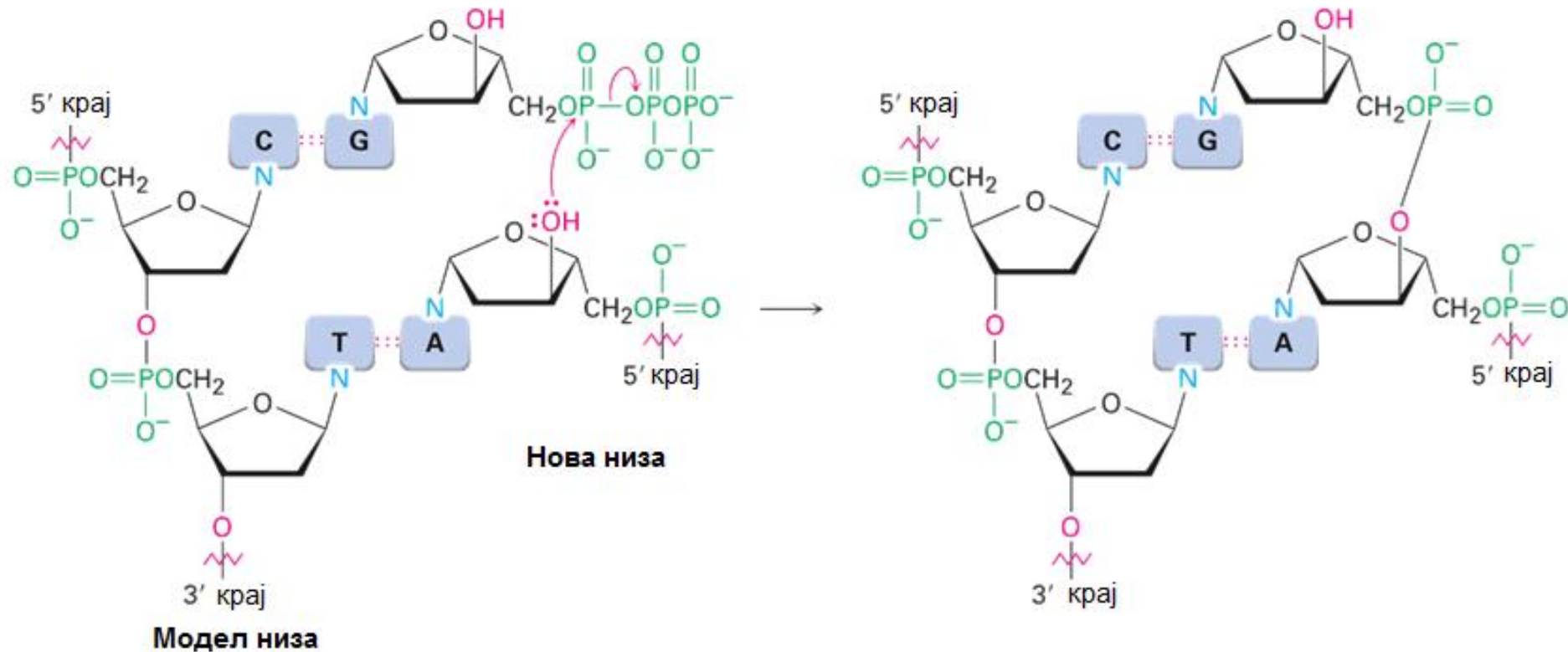
- **Репликација** – процес на добивање на идентични копии на DNA.
- **Транскрипција** – читање на генетските информации и нивно пренесување од јадрото на клетката до рибозомите, каде се одвива синтезата на протеини.
- **Транслација** – декодирање на генетската информација за синтеза на протеини.

РЕПЛИКАЦИЈА НА DNA

- Ензимски катализиран процес, кој започнува со **делумно отварање на двојната спирала** на DNA.
- Базите стануваат изложени и кога активираните форми на **комплементарните нуклеотиди ќе се сврзат** преку водородни врски (A со T и G со C), ќе започнат да раснат две нови DNA низи.
- Се добиваат **две идентични копии**.
- Секоја нова DNA молекула содржи една стара полинуклеотидна низа, поради што процесот се нарекува **семиконзервативна репликација**.



ПРОЦЕС НА РЕПЛИКАЦИЈА



- Додавањето на нуклеотиди се одвива во насока $5' \rightarrow 3'$, катализирано со DNA полимераза.
- Секој нуклеотид се сврзува преку водородна врска како 5'-нуклеозид трифосфат.
- Клучен чекор е додавањето на нуклеозид трифосфатот кон слободната 3' -ОН група од низата која расте, при што се отстранува дифосфат како истисната група.

ПРОЦЕС НА РЕПЛИКАЦИЈА

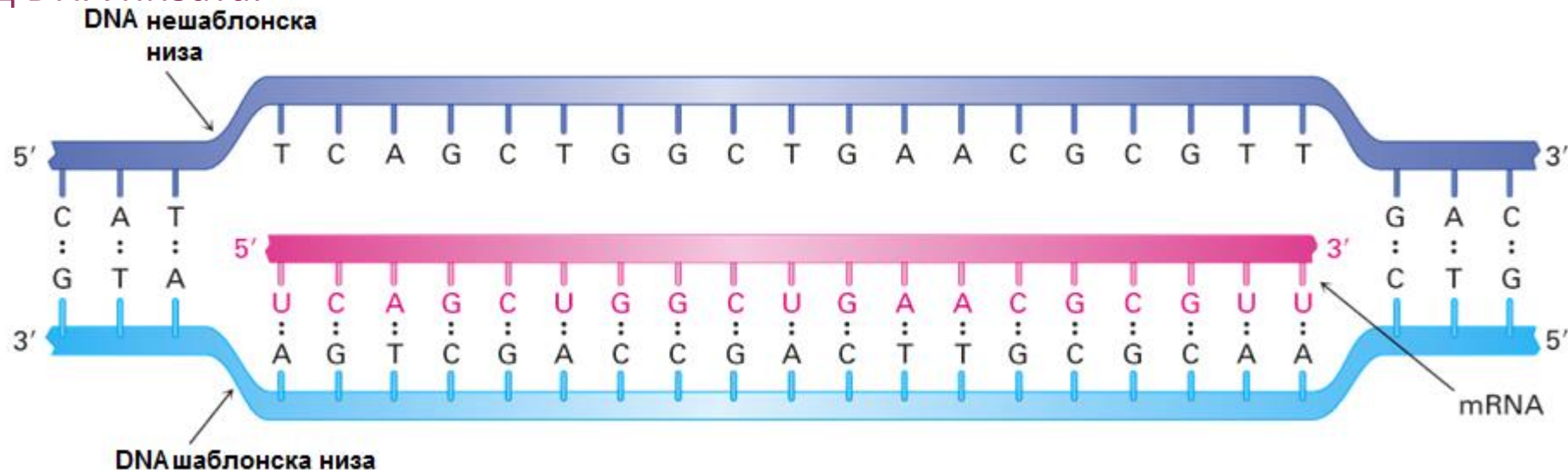
- Двете низи ќерки се синтетизираат во насока $5' \rightarrow 3'$. Делот од полинуклеотидната низа $5' \rightarrow 3'$ се синтетизира континуирано.
- Синтезата на DNA од $3' \rightarrow 5'$ антипаралелната низа се одвива **дисконтинуирано** во мали делови, кои потоа се **составуваат со ензимот DNA лигаза**.
- Процесот на репликација се одвива за минута, при што една DNA низа содржи и до 250 милиони парови бази, а грешки се прават на 10 од 100 милијарди бази.

ТРАНСКРИПЦИЈА НА DNA

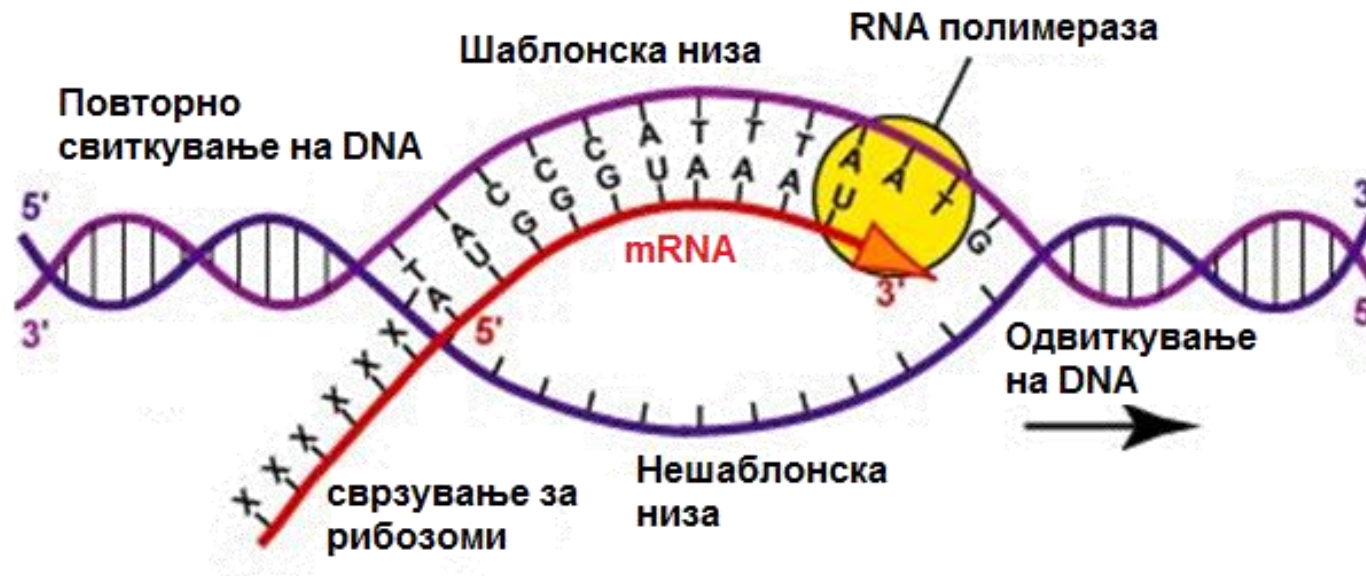
- Конверзијата на информациите од DNA за синтеза на протеини започнува **во јадрото на клетката.**
- Преку процесот на **транскрипција се копираат секвенците од DNA во информациона mRNA.**
- Потсетување: **карактеристики на RNA:** содржи рибоза наместо деоксирибоза, и урацил наместо тимин. Молекулата е многу помала од DNA и нејзината секундарна структура е единечна спирала, наместо двоја спирала кај DNA.
- Функцијата на mRNA е да ја пренесе информацијата за синтеза на протеините до рибозомите во цитоплазмата.

ПРОЦЕС НА ТРАНСКРИПЦИЈА

- Процесот на транскрипција започнува со **неколку одвртувања на двојната спирала на DNA**, формирање на **транскрипциони меури** и **изложување на базите** од двете полинуклеотидни низи.
- Рибонуклеотидите се надоврзуваат по правилен редослед, врз основа на **водородното сврзување меѓу комплементарните бази**.
- Врските се формираат во **насока $5' \rightarrow 3'$** .
- Откако ќе се формираат неколку парови бази од **хбридот RNA-DNA**, молекулата на **RNA се одвојува од DNA** низата.



ПРОЦЕС НА ТРАНСКРИПЦИЈА



- Само една од двете полинуклеотидни низи на DNA се транскрибира до mRNA.
- Низата подложна на транскрипција се нарекува **шаблонска** (матрична) низа, антипаметна низа.
- **Нешаблонската низа** ги содржи **гените** и се нарекува **кодирачка** или паметна низа.
- Со процесот на транскрипција на DNA се образува mRNA, која претставува еден вид копија на кодирачката (нешаблонска) низа, со таа разлика што наместо тимин T ја содржи базата урацил U.

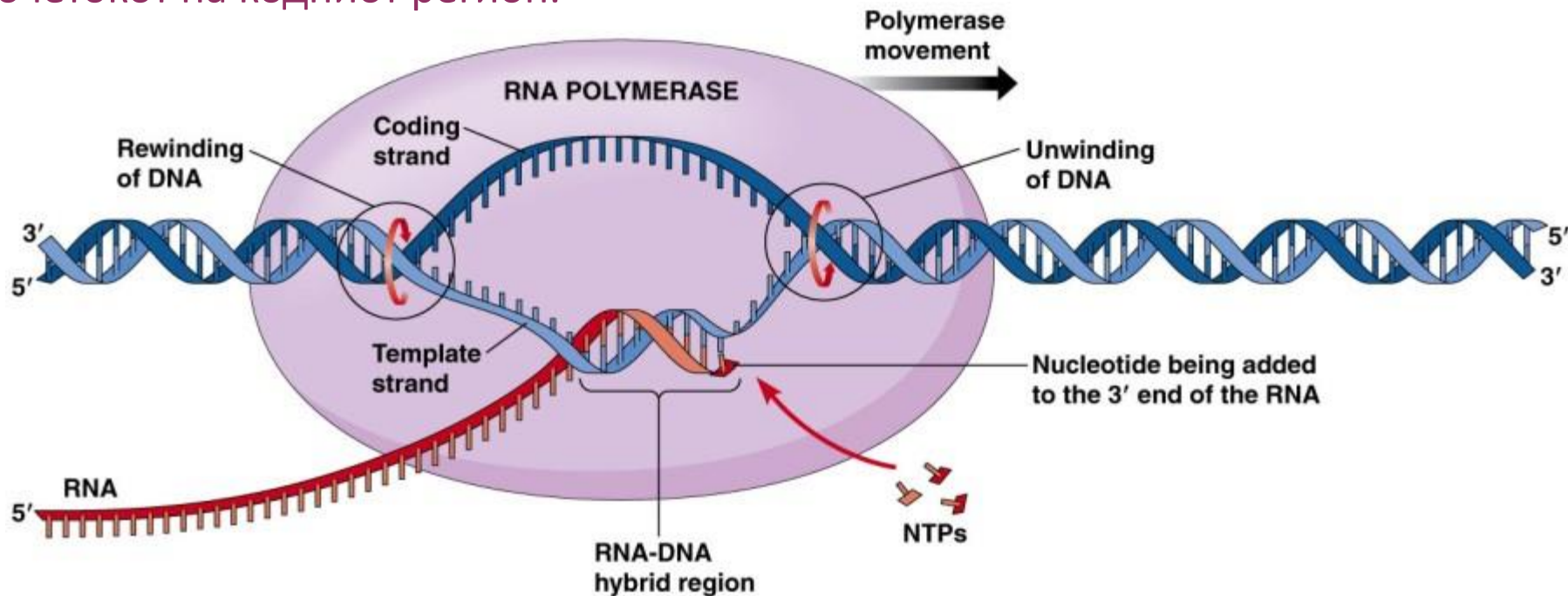
МЕХАНИЗАМ НА ТРАНСКРИПЦИЈА

Транскрипцијата се опишува преку 4 фази:

- **Иницијација** – определување на промоторната положба, специфична положба на DNA богата со паровите A=T.
- **Елонгација** – копирање на една низа од DNA (шаблонска)
- **Терминација** – завршување на преписот, препознавање на сигналот СТОП кај DNA од страна на сигналниот протеин ρ .
- **Процесирање** – кинење, отстранување и поврзување на делови од примарната RNA, под влијание на ензими, и формирање на биолошки зрела RNA.

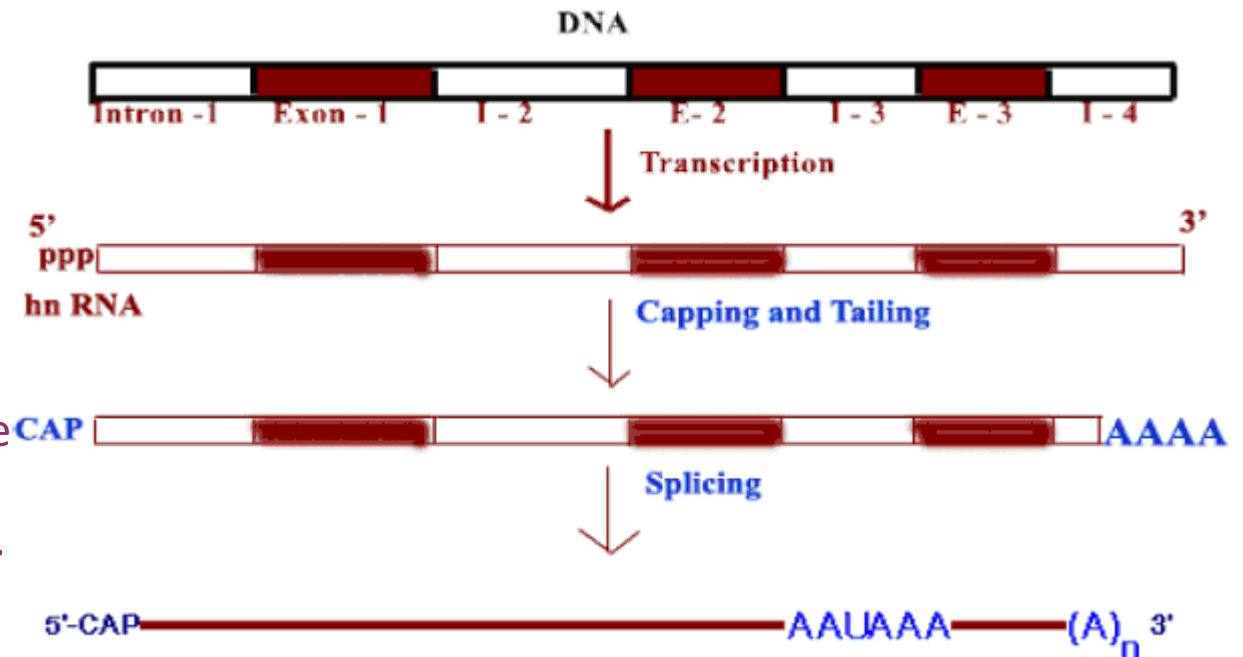
МЕХАНИЗАМ НА ТРАНСКРИПЦИЈА

- Како DNA знае од каде треба да се одврти? Каде во низата завршува едниот ген, а започнува наредниот? Каде е вистинското место да започне да расте mRNA, а каде да престане?
- **DNA содржи промоторни положби**, кои се наоѓаат на 10 (5')TATAAT(3') до 35 (5')TTGACA(3') парови бази од почетокот на кодниот регион.



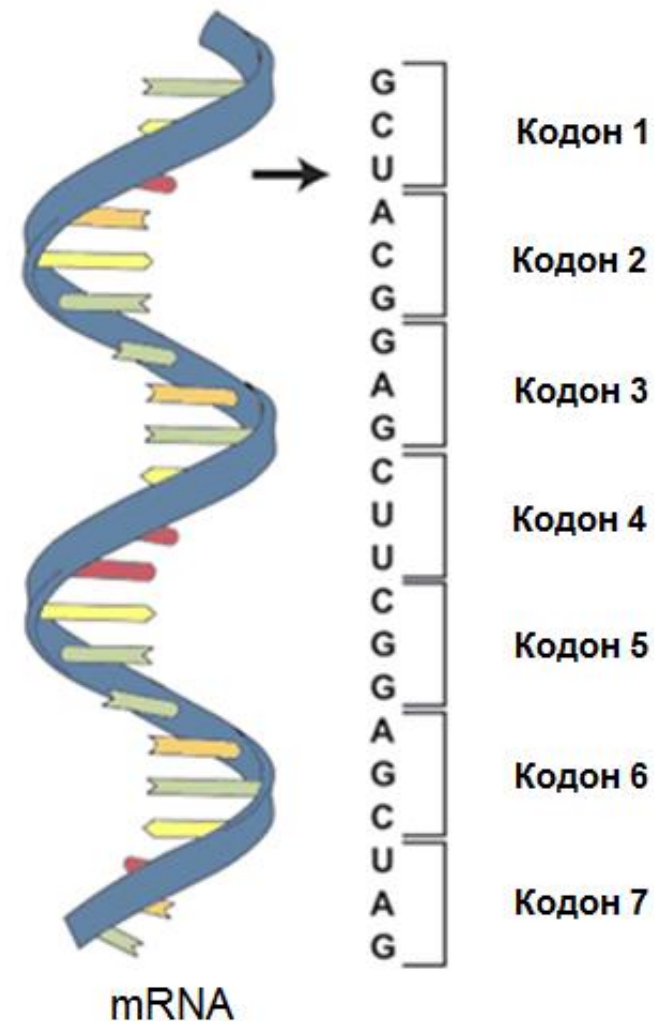
ПРОЦЕСИРАЊЕ НА RNA

- Новосинтетизираната RNA е наречена **примарен транскрипт**. Составен е од секвенци кои опфаќаат еден ген. Кодирачките сегменти се наречени **егзони**, а некодирачките кои имаат прекин во кодирачкиот регион на транскриптот се **интрони**.
- Еукариотичните mRNA се **модифицираат на краевите на низата**. Модифицираниот остаток **5' капа** (остаток од 7-метилгванозин сврзана за 5' крајот преку трифосфатна врска) се додава на крајот од 5' низата. 3' крајот се кине и кон него се додаваат 80-250 остатоци на А (аденин, постапка полиаденилација) и се образува **полиА - опашка**.
- **Конечната mRNA** се добива откако ќе се отстранат интроните од примарниот транскрипт, а преостанатите делови (**егзони**) се **спојуваат меѓусебе** и градат континуирана секвенца со која се дефинира функционалниот полипептид.



ТРАНСЛАЦИЈА НА RNA

- Во рибозомите mRNA има улога на **матрица** преку која се пренесуваат генетските информации транскрибирани од DNA.
- Специфичната рибонуклеотидна секвенца во mRNA содржи информација која **го определува редоследот на аминокиселинските остатоци** во полипептидната низа.
- Секвенцата од три рибонуклеотиди кои се специфични за дадена аминокиселина, се нарекува **кодон** (Триплет од бази).
- Пр. UUC е кодон на mRNA кој го диригира сврзувањето на аминокиселината фенилаланин кон полипептидната низа на протеинот.



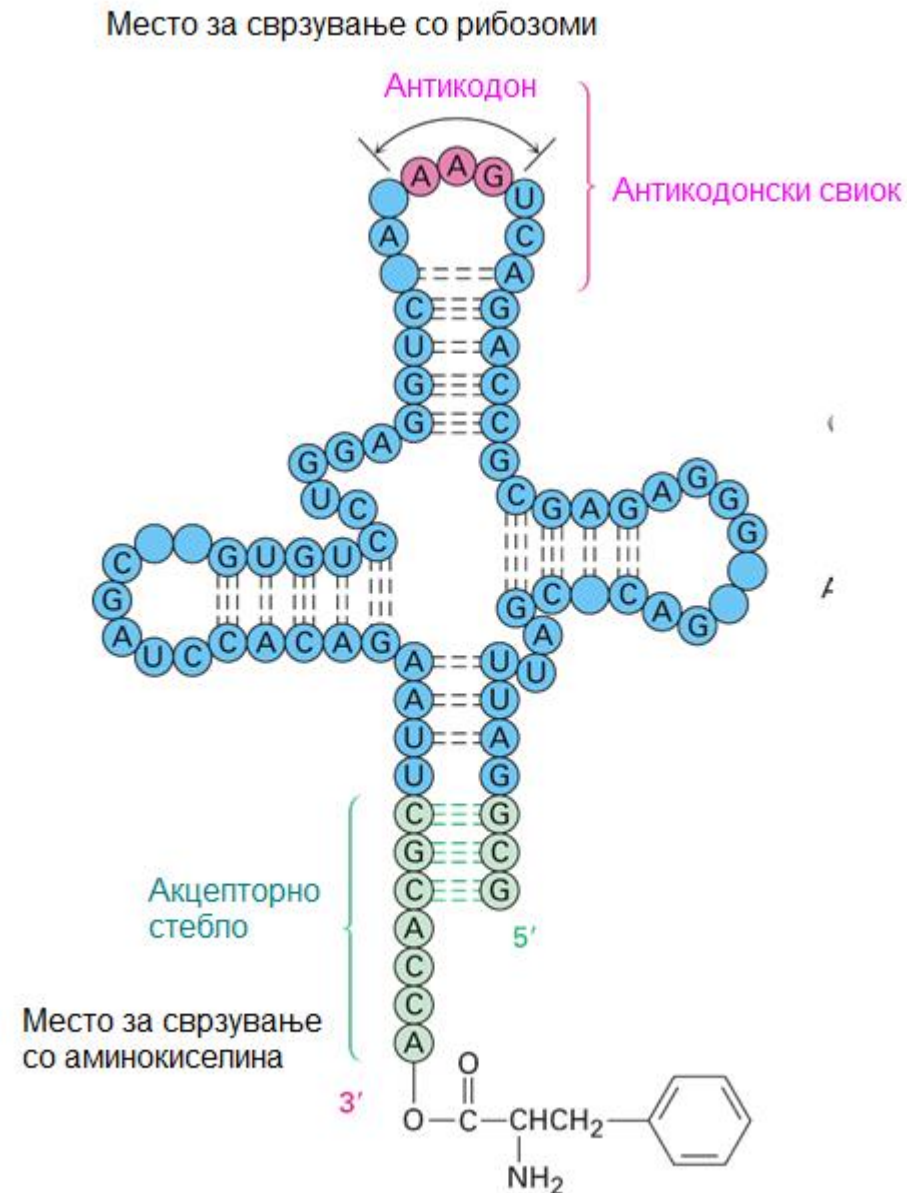
ОЗНАЧУВАЊЕ НА КОДОНИТЕ

- Можни се 4^3 кодони (**64 триплети**), од кои 61 кодон се специфични за 20-те аминокиселини, а 3 кодони се за прекинување на аминокиселинската секвенца.

First base (5' end)	Second base	Third base (3' end)			
		U	C	A	G
U	U	Phe	Phe	Leu	Leu
	C	Ser	Ser	Ser	Ser
	A	Tyr	Tyr	Stop	Stop
	G	Cys	Cys	Stop	Trp
C	U	Leu	Leu	Leu	Leu
	C	Pro	Pro	Pro	Pro
	A	His	His	Gln	Gln
	G	Arg	Arg	Arg	Arg
A	U	Ile	Ile	Ile	Met
	C	Thr	Thr	Thr	Thr
	A	Asn	Asn	Lys	Lys
	G	Ser	Ser	Arg	Arg
G	U	Val	Val	Val	Val
	C	Ala	Ala	Ala	Ala
	A	Asp	Asp	Glu	Glu
	G	Gly	Gly	Gly	Gly

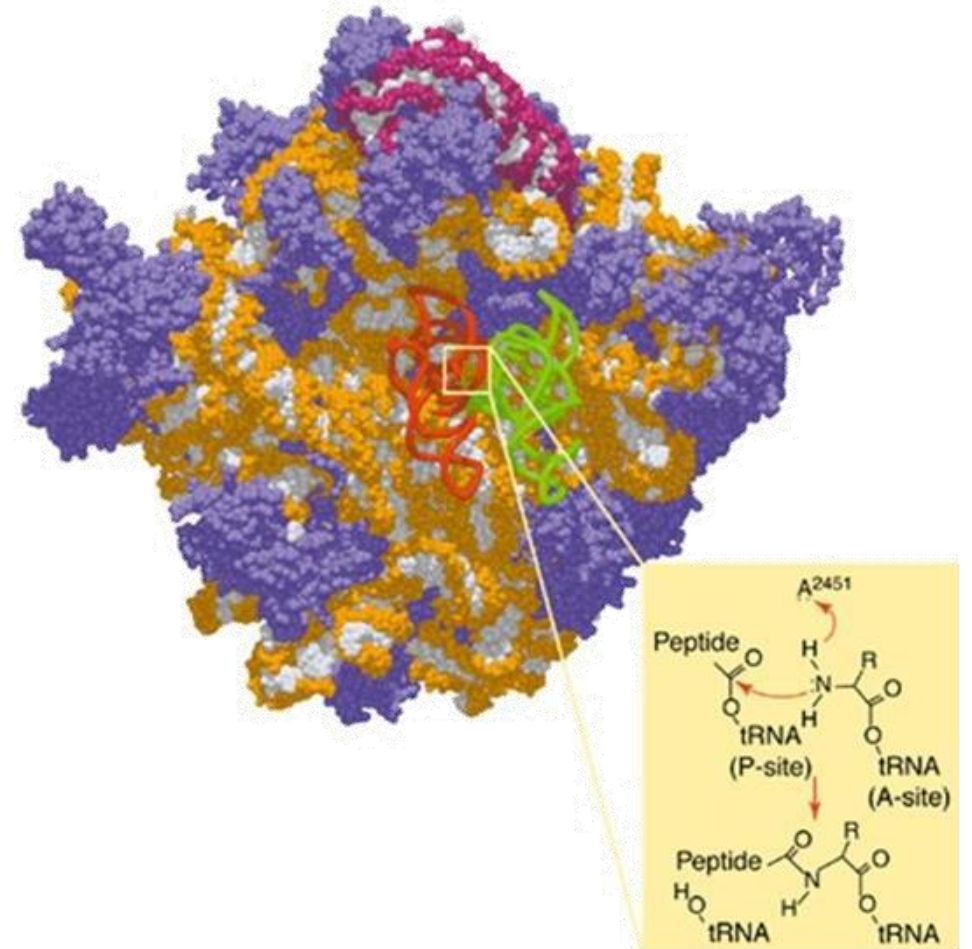
ТРАНСЛАЦИЈА НА RNA

- Под поимот транслација се подразбира **читање на пораката содржана во mRNA од страна на tRNA**.
- Секоја tRNA во средината на структурата (лист од детелина) содржи сегмент **антикодон, секвенца од три рибонуклеотиди комплементарни на кодонот од mRNA**.
- Постојат **61 различна tRNA**, по една за секој од 61 кодони, одговорни за специфична аминокиселина.
- Според антикодонот на tRNA, се определува која **аминокиселина преку естерска врска ќе се сврзе за слободната 3' –ОН група на рибозата од 3' крајот на tRNA**.
- Пр. Кодон секвенцата UUC од mRNA, има комплементарен антикодон – базна секвенца GAA и диригира сврзување со аминокиселината фенилаланин.



БИОСИНТЕЗА НА ПРОТЕИНИТЕ

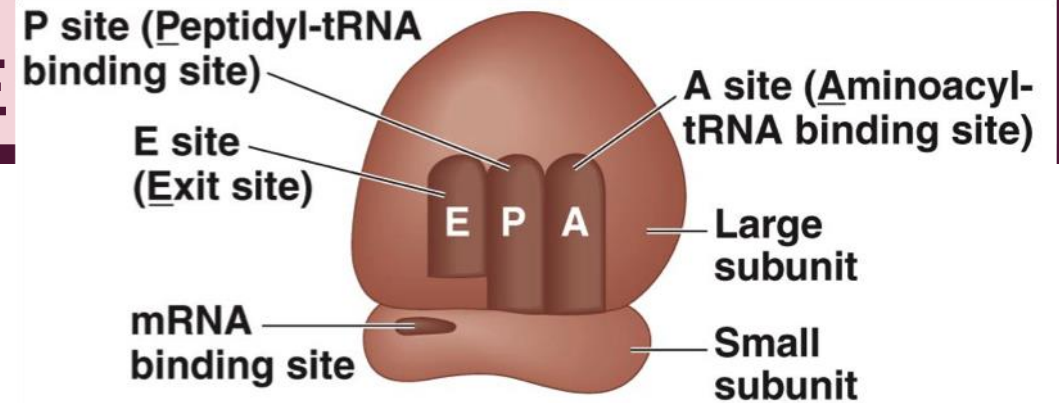
- Биосинтезата на протеини од аминокиселини и АТР се одвива во **рибозомите**.
- Рибозомите се нуклеопротеини: **комплекси на протеини и rRNA**.
- **Протеините** се обоени виолетово, **23S rRNA** со портокалово и бела и **5S rRNA** со бургунди црвена и бела, **A (аминоацил)-tRNA** со зелена и **растечката пептидна низа P- tRNA** со црвена боја.



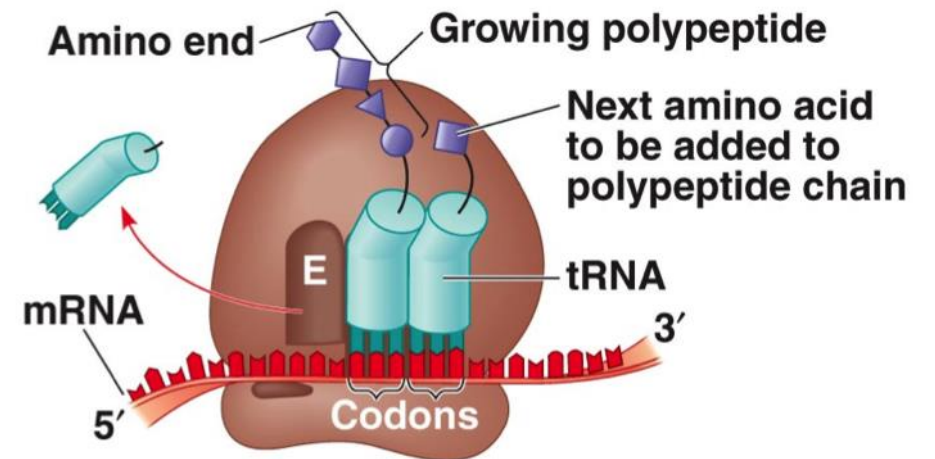
БИОСИНТЕЗА НА ПРОТЕИНИТЕ

Процесот на синтеза на протеините се одвива во 5 основни етапи:

- **Активација на аминокиселините:** препознавање на аминокиселините со специфични ензими аминокиселил tRNA-синтетази поврзување на образуваниот ензимски комплекс со специфичната tRNA преку естерска врска за слободната 3' –ОН група.
- **Иницијација на полипептидната синтеза** – дисоцијација на рибозомите до двете подединици, лесната формира иницијаторен комплекс со mRNA (5' капа – стартен AUG кодон) и со иницијаторната аминокиселил-tRNA (метионил tRNA).



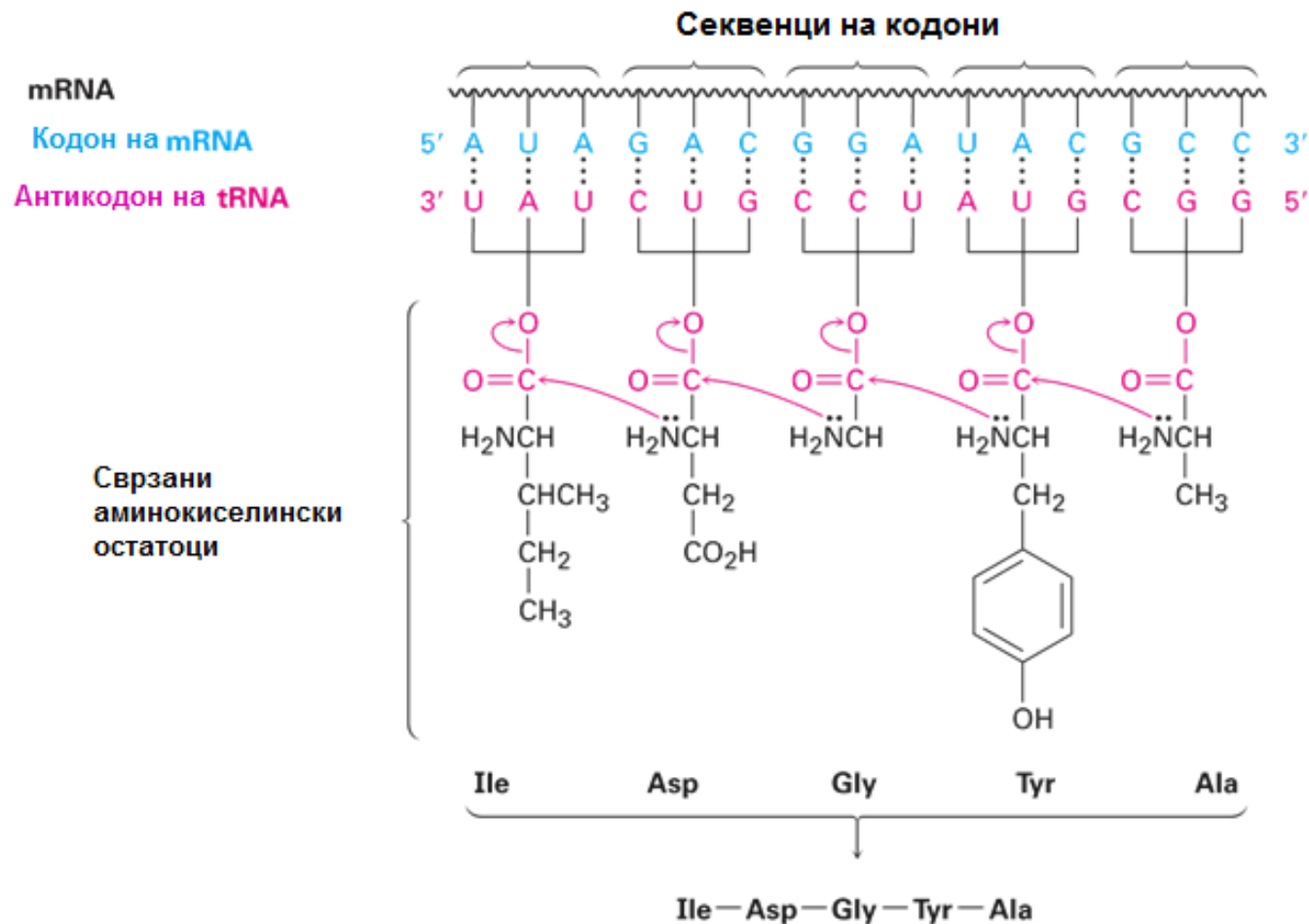
(b) Schematic model showing binding sites



(c) Schematic model with mRNA and tRNA

БИОСИНТЕЗА НА ПРОТЕИНИТЕ

- **Елонгација** – растење на полипептидната низа:
- Иницијаторната метионил tRNA се врзува за местото P. Откако кодонот од mRNA ќе биде прочитан, аминоксил tRNA се врзува за местото A, каде аминокиселинските остатоци се сврзуваат преку пептидни врски. Слободната tRNA го напушта местото P, пептидил- tRNA се поместува на ослободното место. Рибозомот се поместува долж mRNA и наредната аминоксил-tRNA се врзува за слободното место A.



БИОСИНТЕЗА НА ПРОТЕИНИТЕ

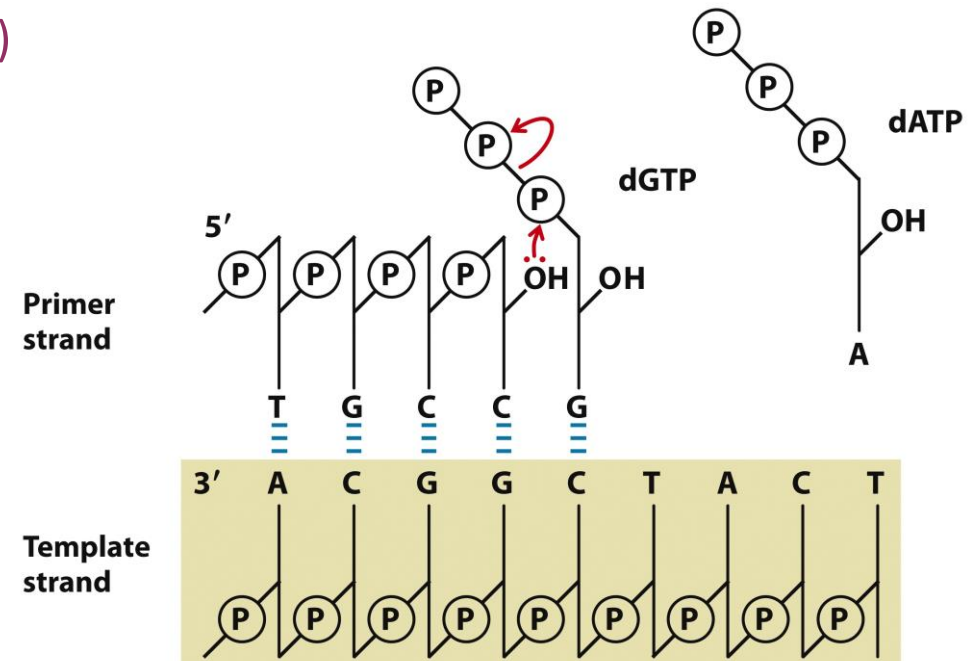
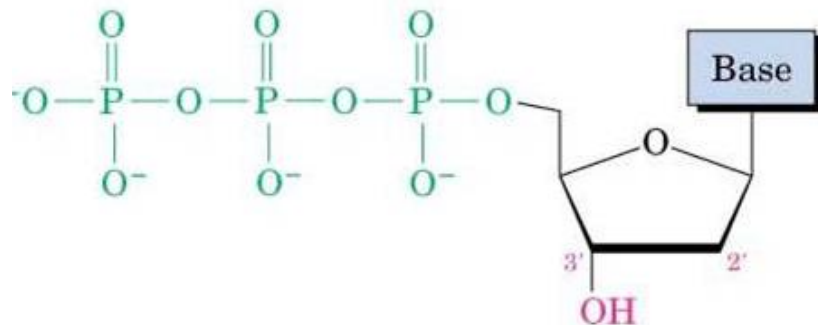
- **Терминација** – завршување на процесот на синтеза на полипептидна низа кога стоп кодонот од mRNA не го препознава ниту една tRNA, туку само протеини –releasing factors и протеинот се одвојува од рибозомот.
- **Посттранслациски модификации** на полипептидната низа - биолошко активирање на добиените протеини по транслацијата со ацеттирање, карбоксилување, метилирање, додавање на простетични групи, образување на дисулфидни мостови.

СЕКВЕНЦИОНИРАЊЕ НА DNA

- Редоследот на бази долж DNA ја содржи информацијата за генетското наследување.
- Определувањето на секвенцата се изведува со:
 - **Maxam–Gilbert** метод
 - **Sanger dideoxy** метод (користи ензимски реакции, DNA полимерази)
 - Широко применуван, автоматизиран, се користи и за секвенционирање на геноми.

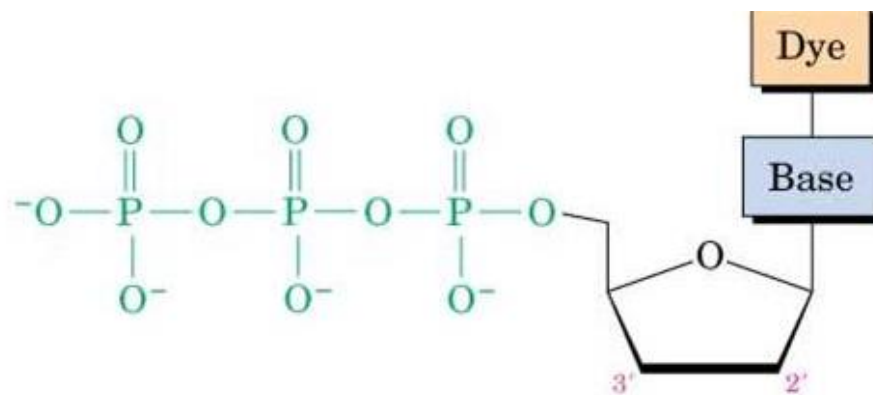
САНГЕРОВ МЕТОД

- Сангеровиот метод на секвенционирање на DNA го користи механизмот на DNA синтеза со помош на **DNA полимераза**.
- За секвенционирање на DNA низата потребни се:
 - **Прајмер** – кратка олигонуклеотидна низа, чија секвенца е комплементарна на 3' крајот од шаблонската низа.
 - **Четири 2'-деоксирибонуклеозид трифосфати (dNTP)**



ДИДЕОКСИ НУКЛЕОТИДИ

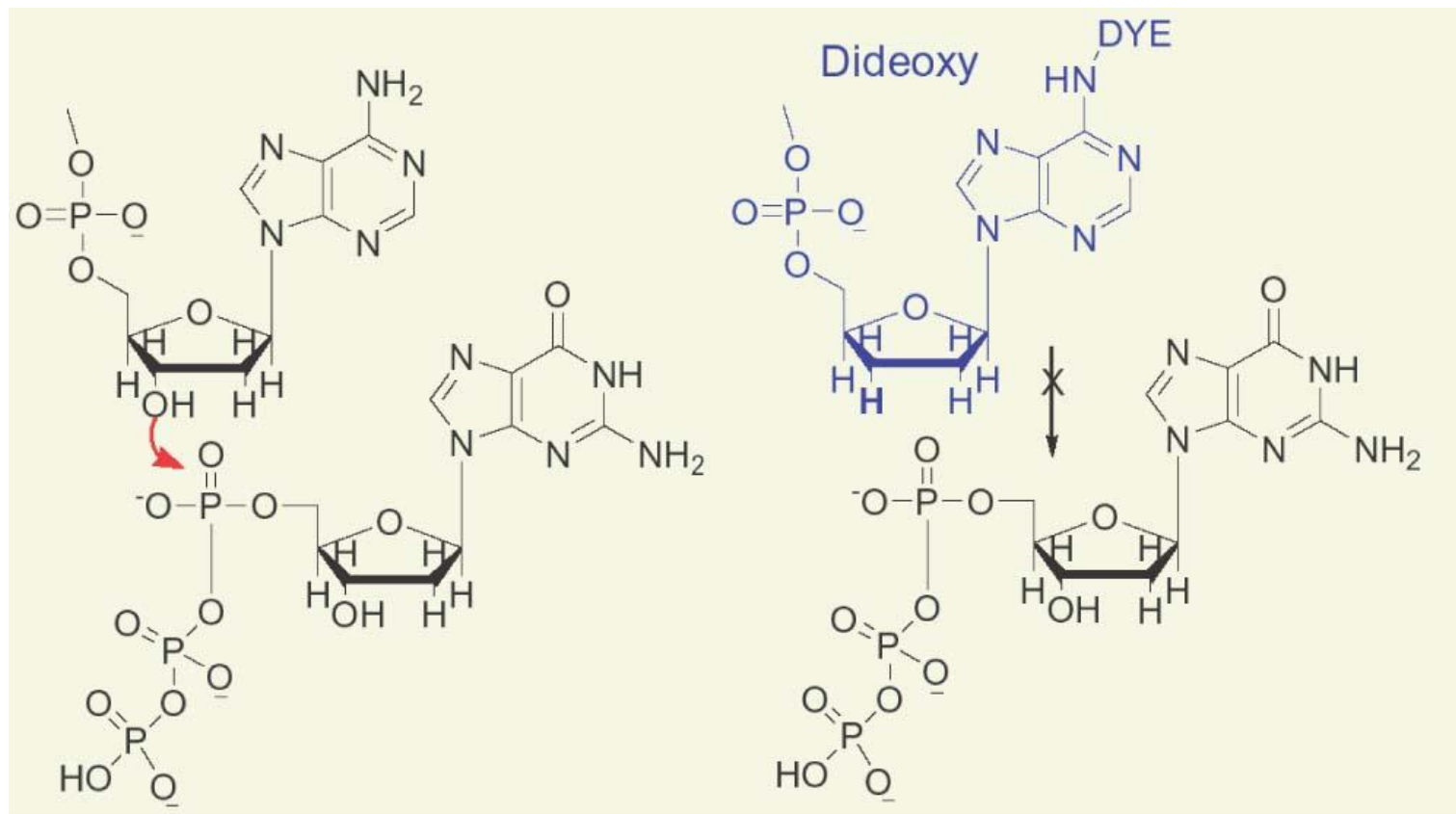
- Растворот содржи и мали количества на четири 2',3'-дидеоксирибонуклеозид трифосфати (ddNTP)
- Секој од нив е обележан со различна флуоресцентна боја.



A labeled 2',3'-dideoxynucleoside triphosphate (ddNTP)

ДИДЕОКСИ МЕТОД

- Се додава DNA полимераза и од крајот на прајмерот започнува да расте комплементарна низа од DNA на селектираниот фрагмент.
- 3' хидроксилната група од прајмерот реагира со деоксинуклеозид трифосфат, се формира фосфодиестерска врска и низата расне во насока 5' → 3'.
- Кога ќе се вметне дидеоксирибонуклеотид, низата ќе престане да расте.



ДИДЕОКСИ МЕТОД АНАЛИЗА

- Кога реакцијата е завршена, продуктот се состои од **смеса од DNA фрагменти со различни должини и флуоресцентен маркер**.
- Смесата од фрагменти се разделува со помош на **електрофореза** (според големина на молекулска маса), а идентификацијата се врши врз основа на нивната флуоресценција.
- Се добива секвенцата на **комплементарната низа на DNA** фрагментот.

