

Нуклеински киселини

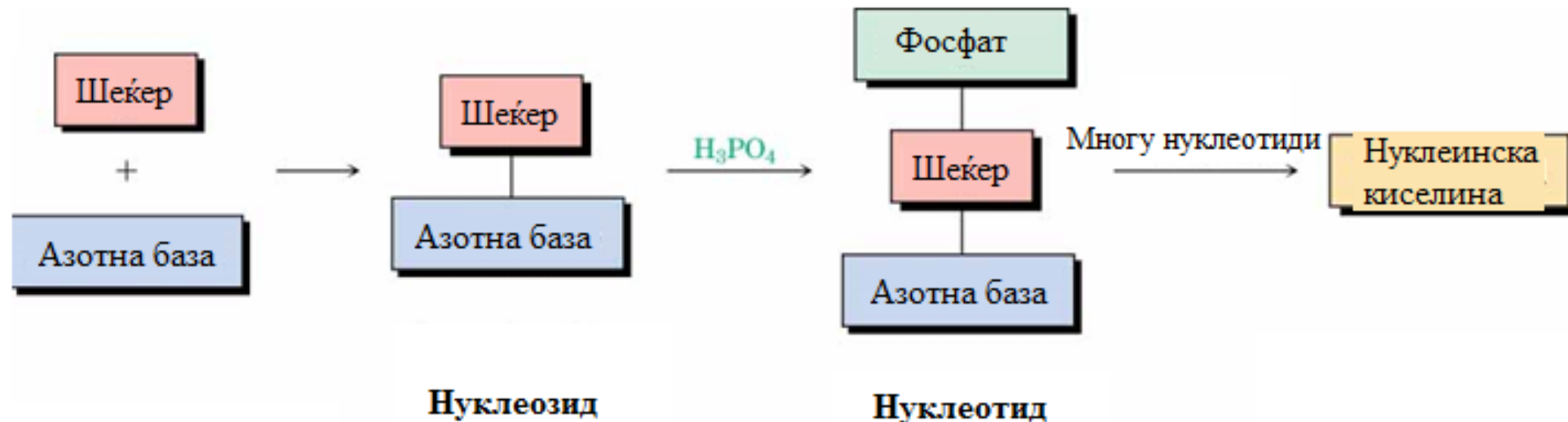
АДАПТИРАНО СПОРЕД

ЛЕНИНЏЕР ПРИНЦИПИ НА БИОХЕМИЈАТА , ДЕЈВИД НЕЛСОН, МАЈЛК КОКС И
ОРГАНСКА ХЕМИЈА, ЏОН МЕКМУРИ

проф д-р Наташа Ристовска, Институт за хемија, ПМФ-Скопје

Нуклеозиди и нуклеотиди

Нуклеотиди...

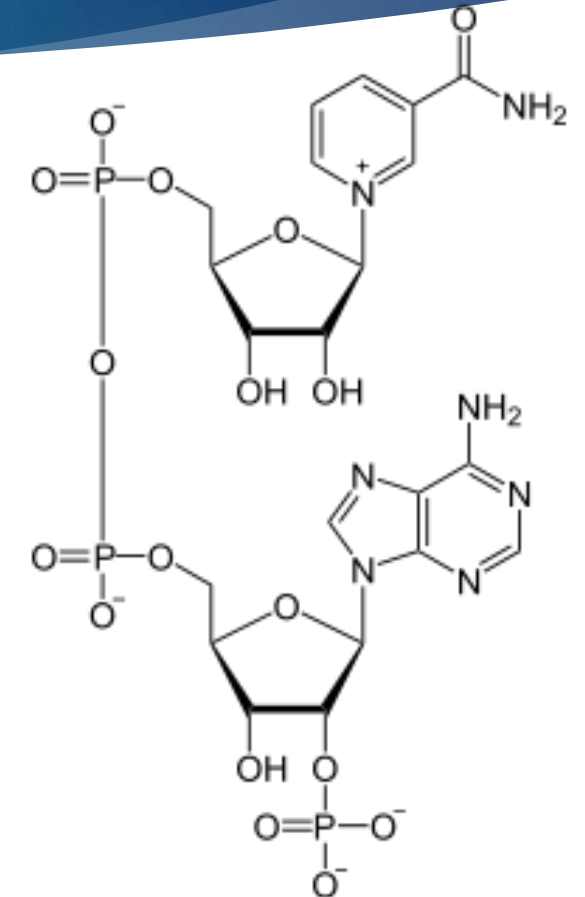
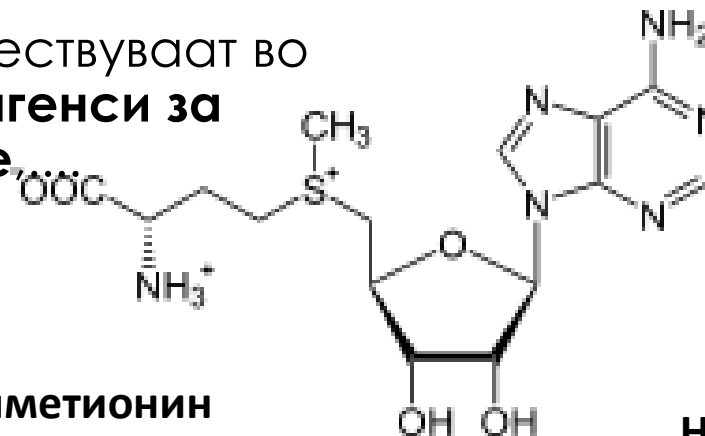


- ▶ **Нуклеотид** претставува мономер од кој се изградени биополимерите - **нуклеински киселини**.
- ▶ Нуклеотидот е изграден од шеќерна компонента, азотна органска база и фосфорна киселина.
- ▶ Алдопентозата е *N*- β -гликозидно сврзана за органската азотна база (пуринска или пиримидинска), а со фосфорната киселина е сврзана преку естерска врска.

Биолошка функција на нуклеотидите

- Карактеристични функции на нуклеотидите:
 - Ја **обезбедуваат потребната енергија** за метаболичките процеси (ATP, GTP, CTP, UTP)
 - **Пренесуваат сигнали** (cAMP, cGMP) како клеточен одговор на влијанието на хормоните и екстрацелуларните течности
 - Претставуваат **ензимски кофактори** (NAD⁺, NADP⁺, FAD)
 - Дериватите на нуклеотидите учествуваат во метаболичките процеси како **агенси за фосфорилирање, метилирање**

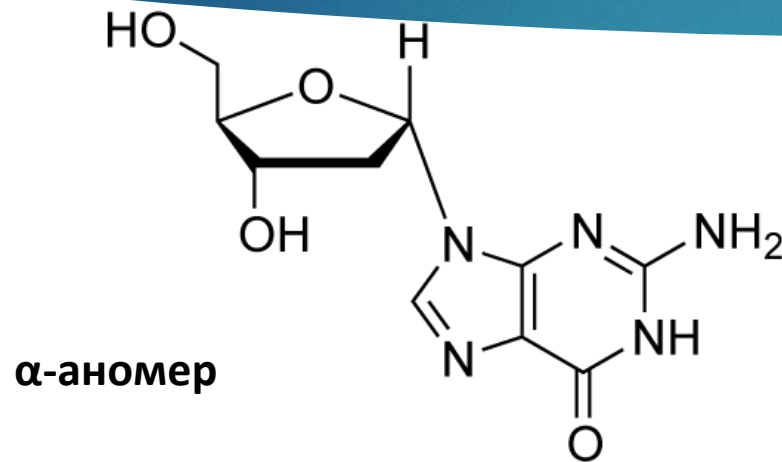
S-аденозилметионин



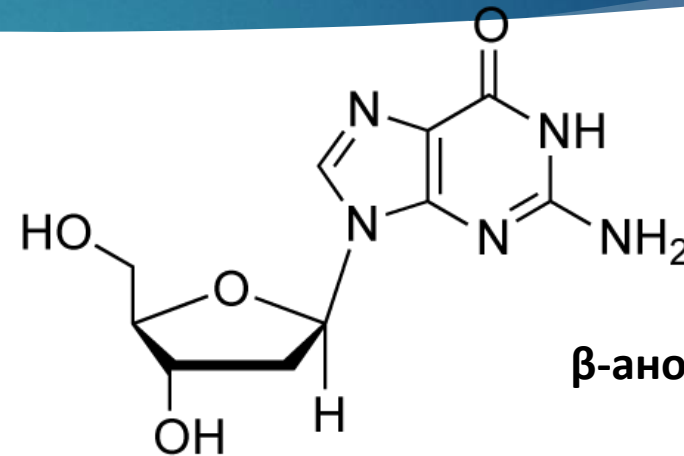
NADP⁺

Никотинамид динуклеотид фосфат

Нуклеозиди



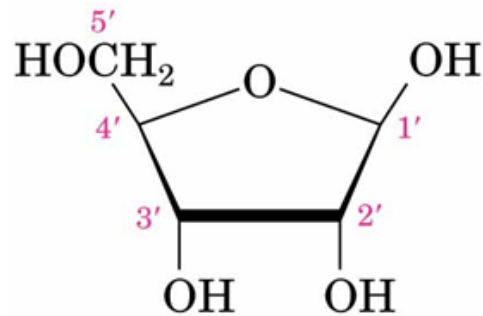
α -аномер



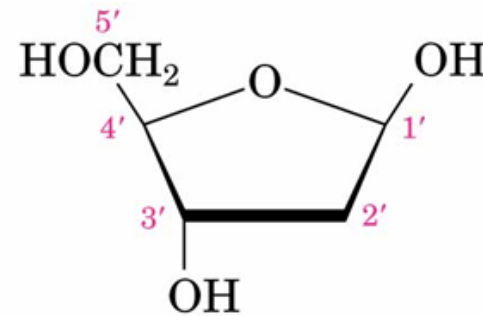
β -аномер

- ▶ **Нуклеозидите** се **гликозиламини**, кои може да се сметаат за нуклеотиди без фосфатна група. Нуклеозидите се составени од **азотна база и пентоза, поврзани со N- β -гликозидна врска**.
- ▶ **N- β -гликозидна врска** е ковалентна врска која се образува меѓу хемиацеталната група од јаглехидратот (рибоза или деоксирибоза) и аминскиот азот од органската база.
- ▶ Потсетување: кај β -аномерот во Haworth-овите проекциони формули на D-јаглехидратите, хемиацеталната –OH група се црта над рамнината на прстенот (фураноза) и се наоѓа од иста страна на рамнината со најодалечениот C-5' атом.

Шеќерна компонента

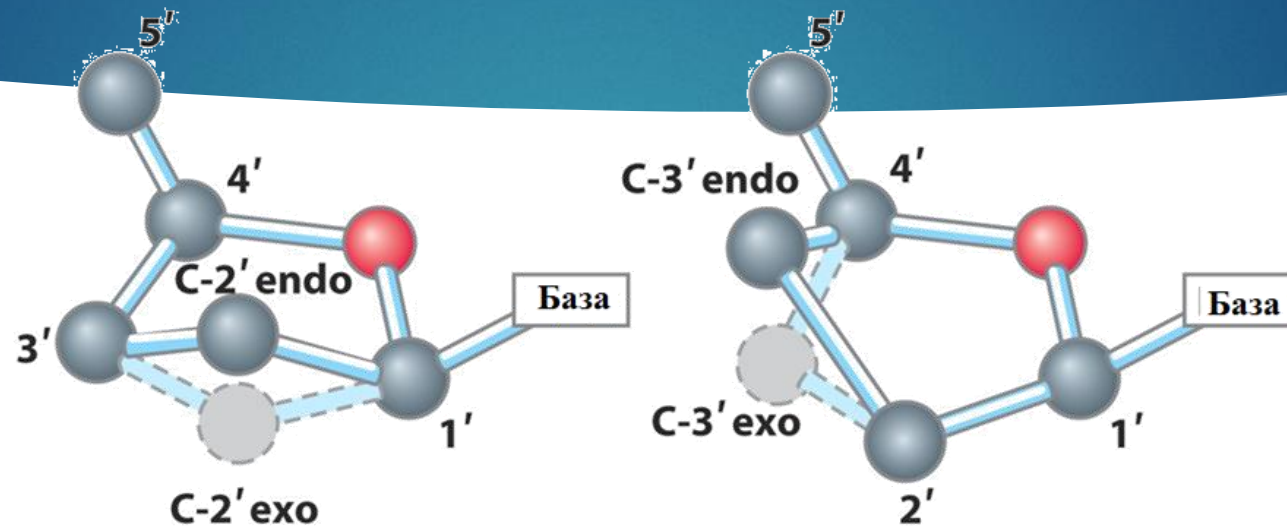


Рибоза



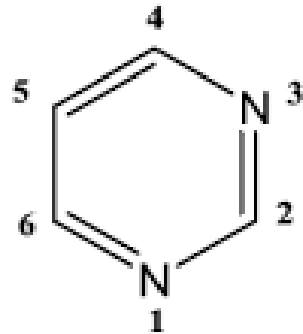
2'-деоксирибоза

- ▶ **Алдопентози во фуранозен облик:**
 - ▶ **Рибоза** – шеќерна компонента на RNA.
 - ▶ **2'-деоксирибоза** – шеќерна компонента на DNA.
- ▶ Пентозата го определува идентитетот на нуклеинската киселина.
- ▶ Кај нуклеинските киселини, при нумерирање на С-атомите од алдопентозата се додава ' (се прави разлика со нумерирањето на положбите во азотната база).

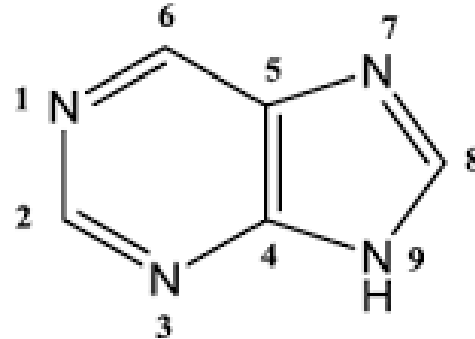


- ▶ Фуранозниот прстен не е планарен, туку постојат неколку **конформации на плик**: 4 атоми се во рамнина, а еден од атомите е над или под рамнина.
- ▶ Најважни се две конформации каде C-2' и C-3' атомите се надвор од рамнина.
- ▶ Се прави споредба помеѓу просторната ориентација на атомот што не е во рамнина (C-2' и C-3') со онаа на **C-5'**:
 - ▶ Ако се **од истата страна на рамнината** – **endo-** (ендо)
 - ▶ Ако се **од спротивна страна на рамнината** – **exo-** (егзо)

Азотни бази



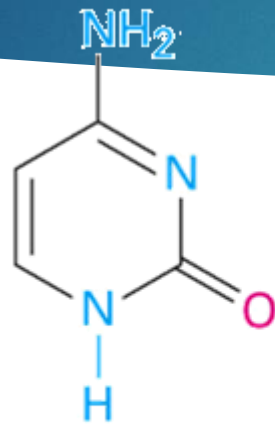
пиримидин



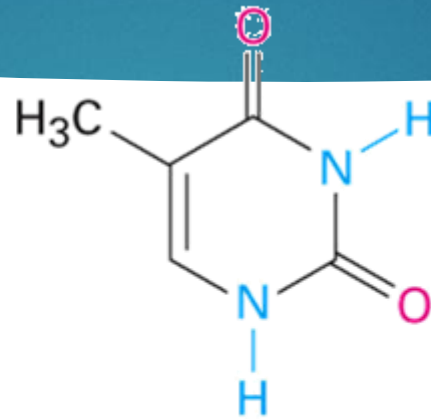
пурин

- ▶ Имаат **слабо базни својства** и **ароматичен карактер**, апсорбираат **UV** светлина.
- ▶ **Пиримидин** е органско соединение со шестчлен ароматичен прстен кој има два атоми на азот (пиридински)
- ▶ **Пурин** е ароматично соединение со два кондензирани прстени: **пиримидин** и **имидазол**. Има 4 атоми на азот, од кои еден е пирилов (N-9).

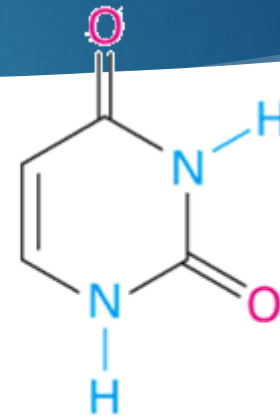
Пиримидински бази



Цитозин (C)
DNA, RNA



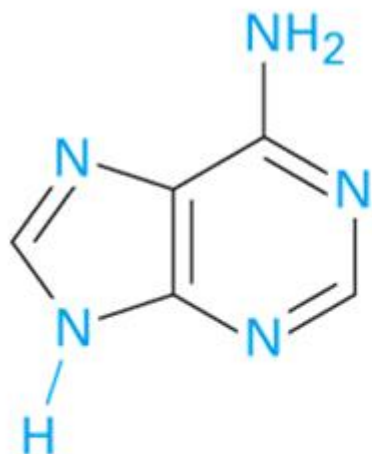
Тимин (T)
DNA



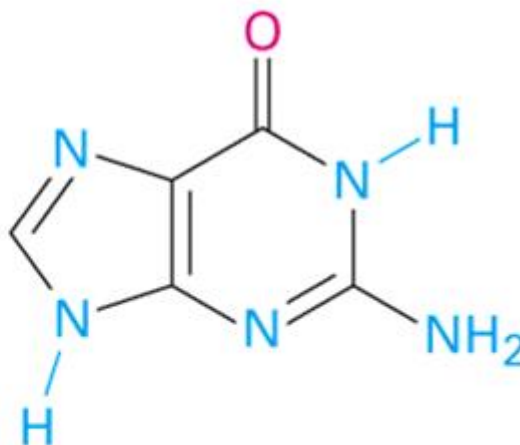
Урацил (U)
RNA

- **DNA:** цитозин (C) и тимин (T).
- **RNA:** цитозин (C) и урацил (U).
- **Цитозин** е 2-кето, 4-амино пиримидин;
- **Урацил** е 2,4-дикето пиримидин,
- **Тимин** има слична структура со урацил и дополнителна метил група во C-5.

Пурински бази



Аденин (A)
DNA, RNA

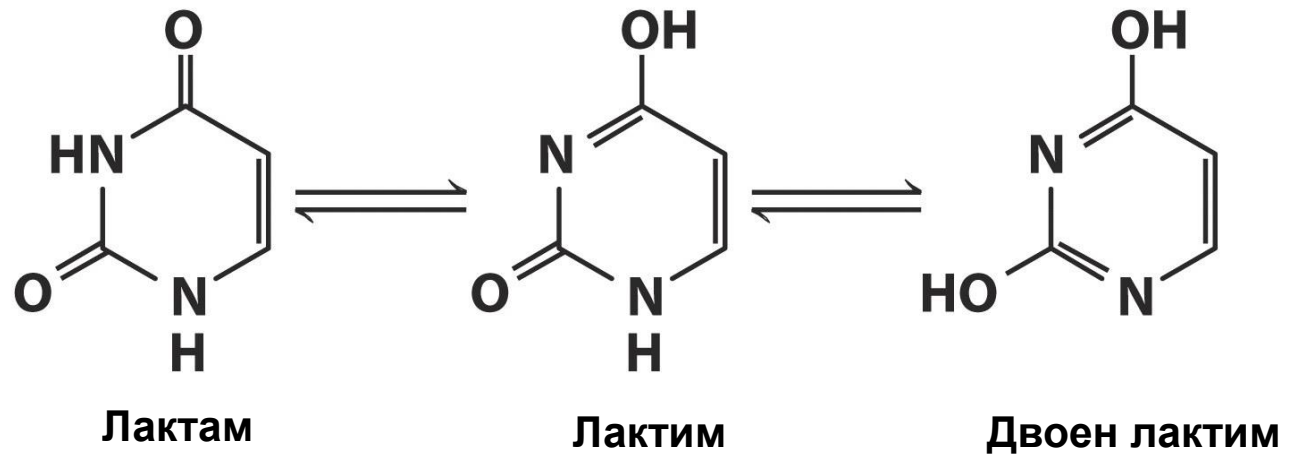


Гванин (G)
DNA, RNA

- ▶ **Аденин** е 6-амино пурин
- ▶ **Гванин** е 2-амино-6-кето пурин.

Влијание на азотните бази врз структурата

- ▶ Пурините и пиримидините ги нарекуваме **азотни бази**.
- ▶ Пурините и пиримидините во молекулите на DNA и RNA се **ароматични молекули**.
- ▶ Поради делокализацијата на електроните во цикличните структури, азотните бази имаат **планарни молекули**.
- ▶ Во зависност од вредноста на pH, слободните пиримидински и пурински бази можат да постојат во **две или повеќе таутомерни форми**.
- ▶ При pH = 7, **доминира лактамската форма (цикличен амид)** на урацил: доминантен е кето таутомерот во однос на енол.

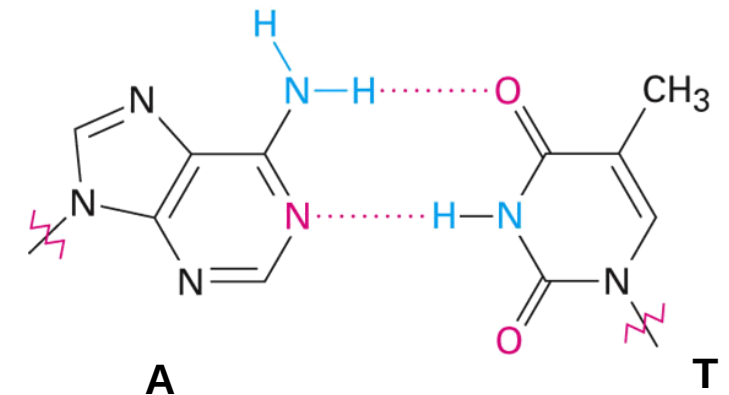
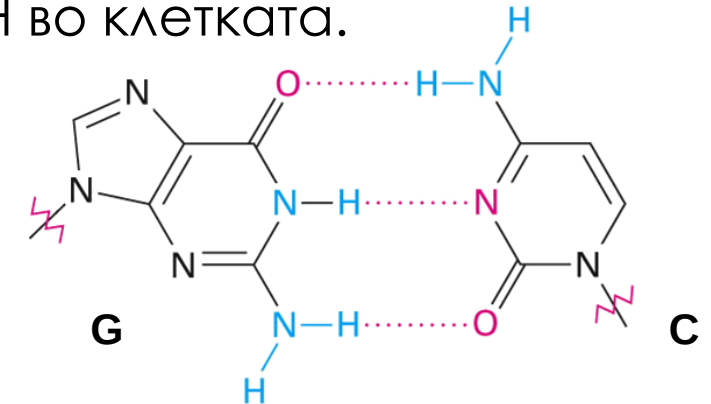


Влијание на азотните бази врз структурата

- ▶ Пуринските и пиримидинските бази се **хидрофобни и релативно нерастворливи во вода** при неутрални вредности на pH во клетката.

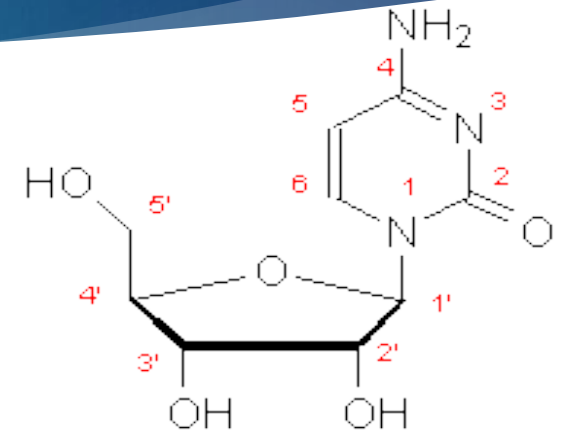
- ▶ **Видови интеракции меѓу азотните бази:**

- ▶ **Хидрофобни интеракции** - стабилизирањето на секундарната структура на нуклеинските киселини (бази подредени во паралелни рамнини (како парички)).
- ▶ **Ван дер Ваалсови сили и дипол-дипол интеракции** – минимизирање на контактот на базите со водата (подредување на базите).
- ▶ **Водородни врски** – стабилизирање на двојниот хеликс на DNA (се остваруваат **помеѓу аминоксислородните групи** помеѓу две комплементарни нити).

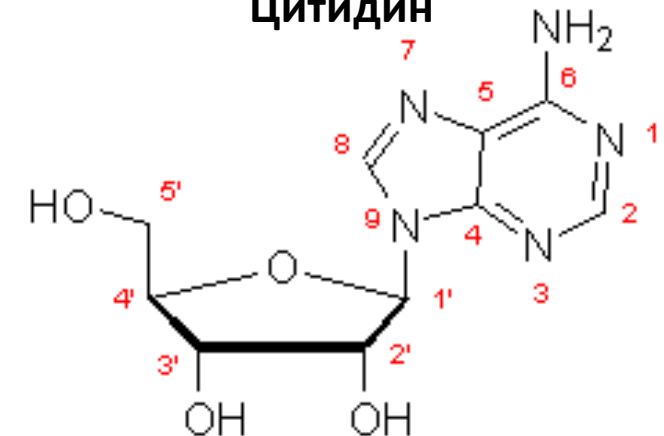


Именување на нуклеозиди

- ▶ **Нуклеозиди:** шеќерната компонента преку аномерниот атом на јаглерод **C-1'** во **β-конфигурација** е **N-гликозидно сврзана за N-атомот** од азотната база:
 - ▶ Во положба **N-1** кај **пиримидинските** бази и
 - ▶ Во положба **N-9** кај **пуринските** бази.
- ▶ Нуклеозидите во кои учествуваат **пиримидински бази** се именуваат со додавање на наставката **-ИДИН** кон основата на името на базата. (**урацил - ацил + идин = уридин**)
- ▶ Во нуклеозидите во кои учествуваат **пуринските бази**, имињата се образуваат од основата на името на базата и наставката **-ОЗИН**. (**гванин – ин + озин = гванозин**)
- ▶ **Деоксирибонуклеозиди** и **рибонуклеозиди**



Цитидин

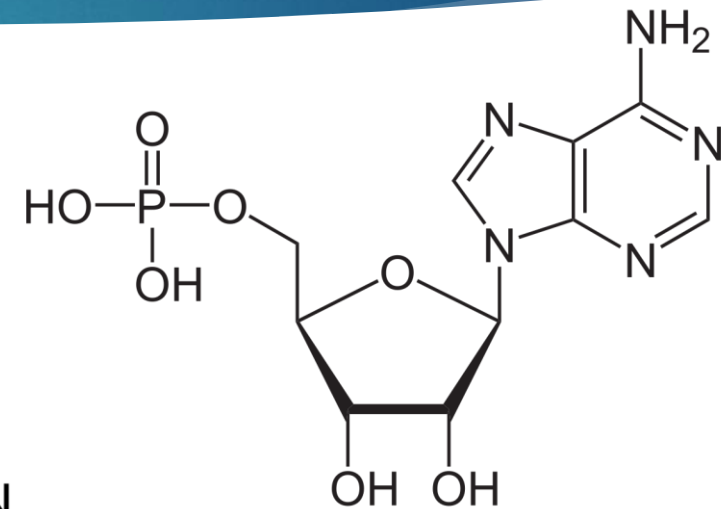
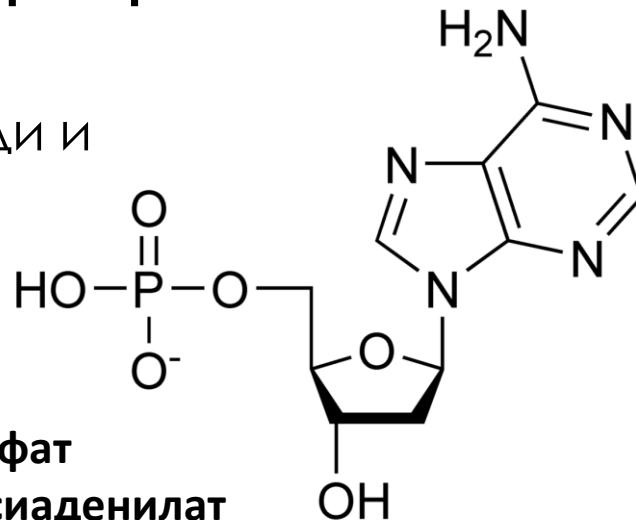


Деоксиаденозин

Именување на нуклеотиди

- ▶ **Нуклеотиди:** шеќерната компонента од нуклеозидот е **естерски** сврзана со фосфатен остаток.
- ▶ Кон името на соодветниот **нуклеозид** се додава **фосфат** со соодветниот **локант**.
- ▶ Деоксирибонуклеотиди и рибонуклеотиди

Деоксиаденозин 5'-фосфат
dA или dAMP или деоксиаденилат

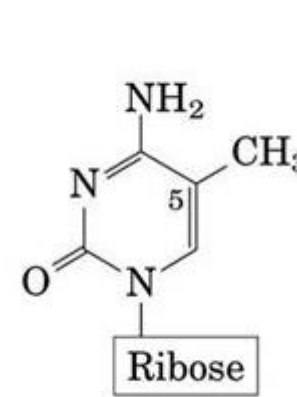


Аденозин 5'-фосфат
А или AMP или аденилат

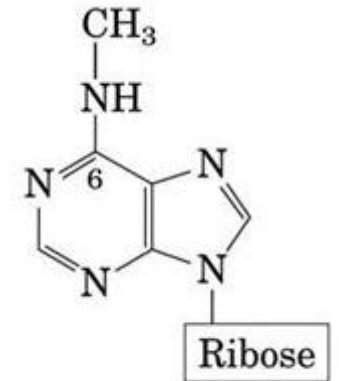
Азотна база	Нуклеозид	Нуклеотид	Нуклеинска киселина
Пурины			
Аденин	Аденозин Деоксиаденозин	Аденозин 5'-фосфат Деоксиаденозин 5'-фосфат	RNA DNA
Гванин	Гванозин Деоксигванозин	Гванозин 5'-фосфат Деоксигванозин 5'-фосфат	RNA DNA
Пиримидини			
Цитозин	Цитидин Деоксицитидин	Цитидин 5'-фосфат Деоксицитидин 5'-фосфат	RNA DNA
Тимин	Тимидин или Деокситимидин	Тимидин 5'-фосфат Деокситимидин 5'-фосфат	DNA
Урацил	Уридин	Уридин 5'-фосфат	RNA

Невообичаени нуклеотиди

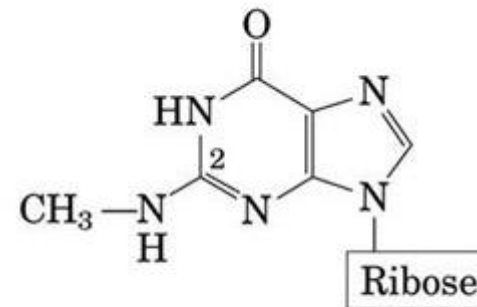
- **Модифицирани нуклеотиди** се наоѓаат кај некои вирални DNA и транспортна RNA.
- Овие модификации се резултат на метилирање, хидроксиметилирање, ацетирање и др.
- **Улога:** невообичаените бази ги **регутираат** или **заштитиваат** генетските информации во DNA.
- **Номенклатура:** означување на местоположбата на супституентот во пуринскиот или пиримидинскиот прстен:
 - **5-Метилцитидин** (животни и виши растенија)
 - **N⁶-метиладенозин** (бактерии)
 - **5-хидроксиметилцитидин** (инфицирани бактериите со бактериофаги)



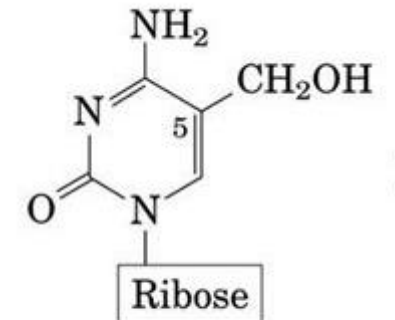
5-Methylcytidine



N⁶-Methyladenosine



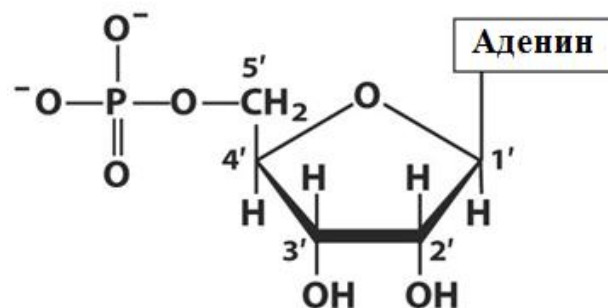
N²-Methylguanosine



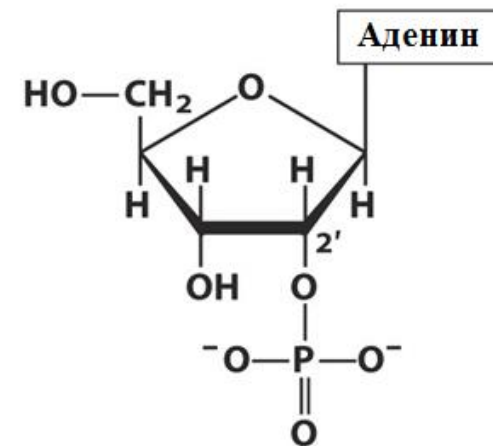
5-Hydroxymethylcytidine

Аденозин монофосфат

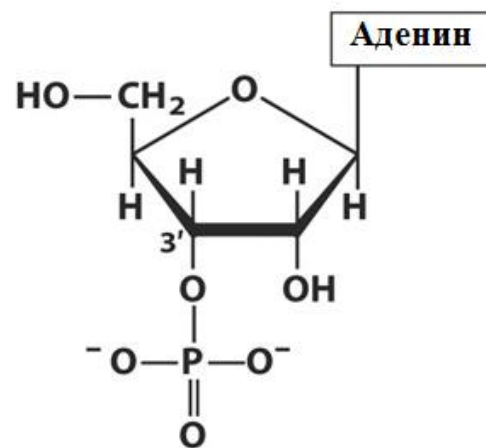
- ▶ **Нуклеозидот** може да формира **фосфатен моноестер** преку слободните -OH групи од шеќерната компонента: во положба **2', 3' или 5'**.
- ▶ При ензимската или алкална хидролиза на RNA како интермедијар се образува: **рибонуклеозид 2',3'-цикличен монофосфат** (сAMP и сGMP).



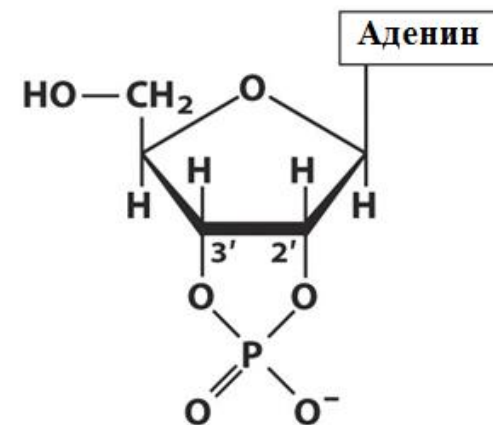
Аденозин 5'-монофосфат



Аденозин 2'-монофосфат



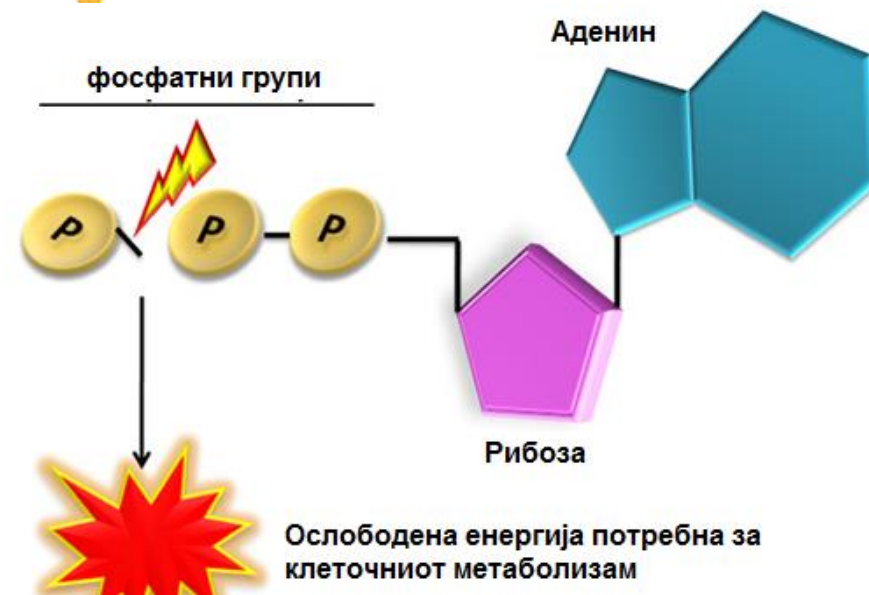
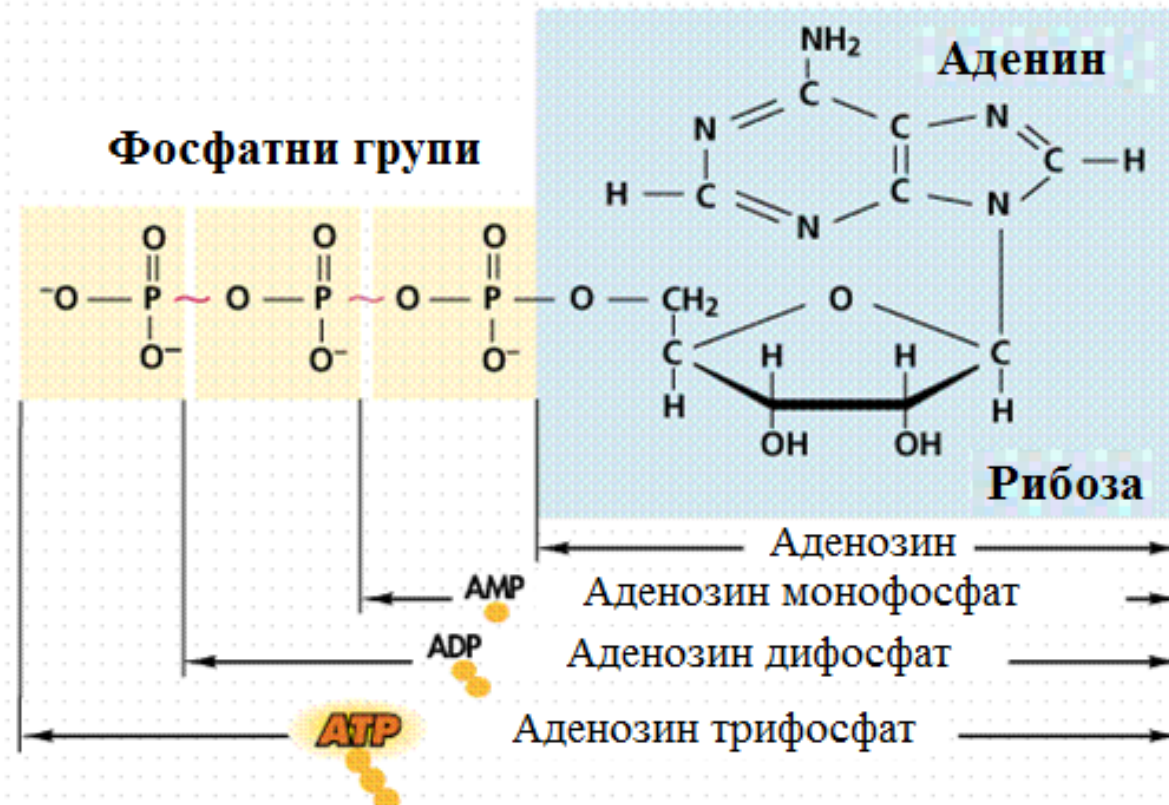
Аденозин 3'-монофосфат



Аденозин 2',3'-цикличен монофосфат

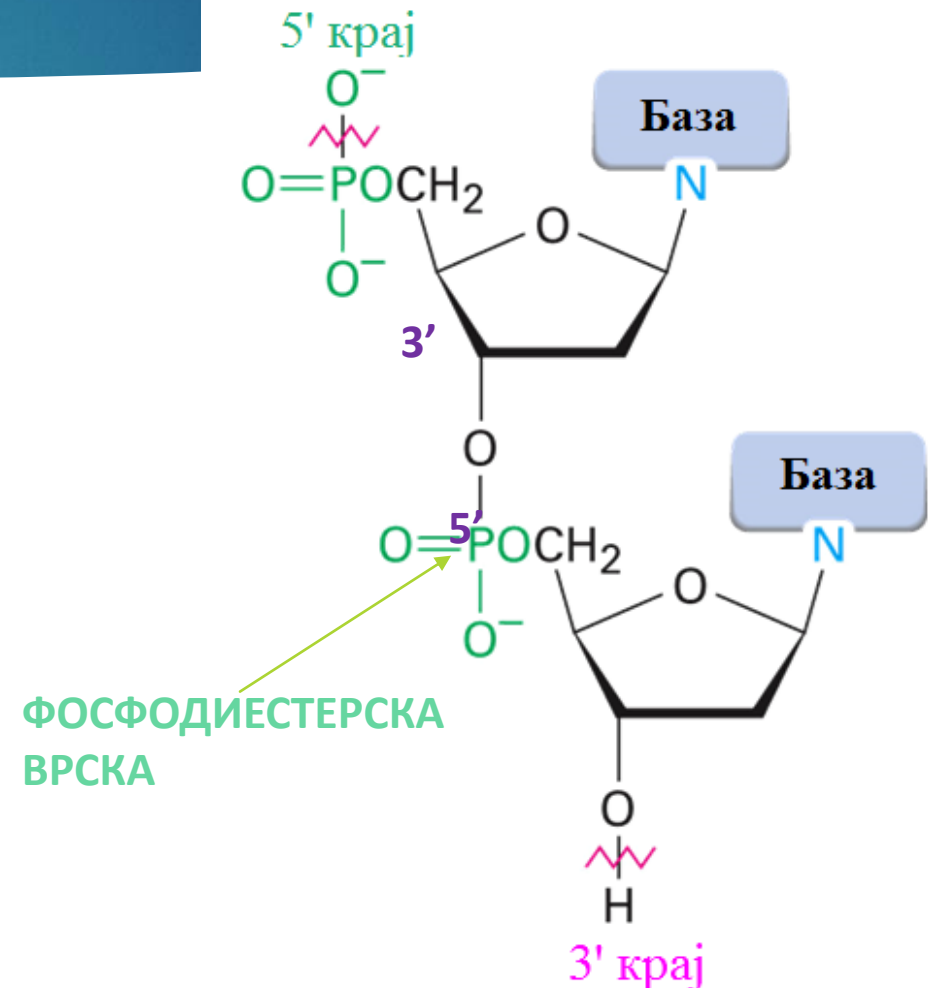
Аденозин фосфати

- ▶ Во зависност од **бројот на фосфатни остатоци сврзани за шеќерната компонента во положба 5' од нуклеозидот**, нуклеотидот може да биде: **монофосфат, дифосфат** или **трифосфат**.
- ▶ Врската помеѓу рибозата и α фосфатот е **естерска** ($\Delta H = -14 \text{ kJ/mol}$).
- ▶ Врските α , β и β , γ се **фосфоанхидриди** ($\Delta H = -30 \text{ kJ/mol}$).
- ▶ Со хидролиза на АТФ се ослободува големо количество енергија, неопходна за функционирање на клетката.



Полинуклеотиди

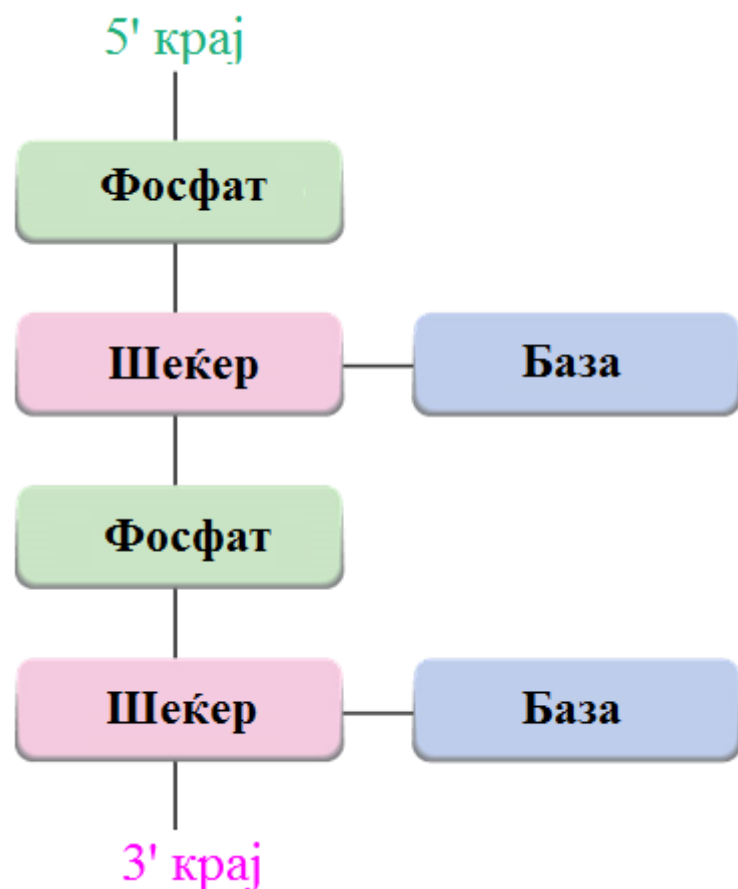
- ▶ **Нуклеотидите** меѓусебе ковалентно се сврзуваат преку фосфатен мост:
- ▶ 5'-фосфатната група на едната нуклеотидна единица е поврзана со 3'-хидроксилната група од соседниот нуклеотид.
- ▶ Се формира **фосфодиестерска врска**.
- ▶ Кратките нуклеински киселини се познати како **олигонуклеотиди** (полимерите кои содржат 50 или помалку нуклеотиди).
- ▶ Подолгите нуклеински киселини се нарекуваат **полинуклеотиди**.



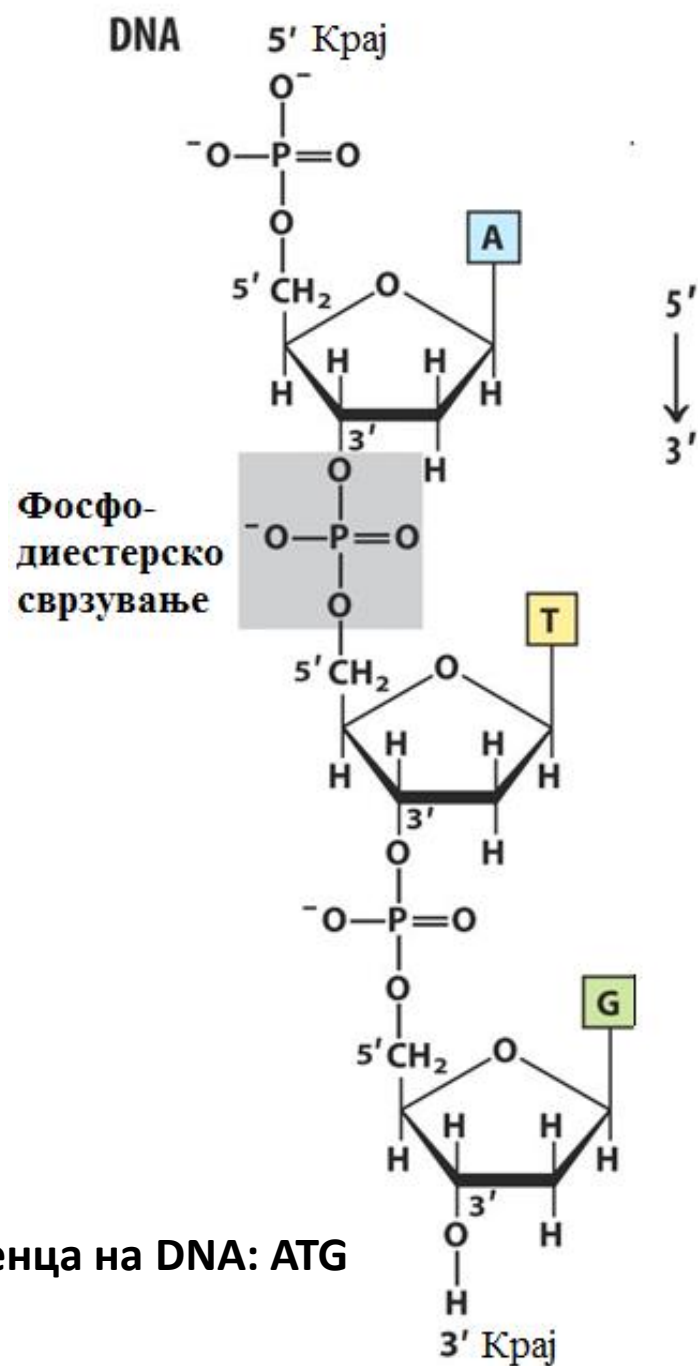
Нуклеински
киселини

ОПШТИ ПОИМИ

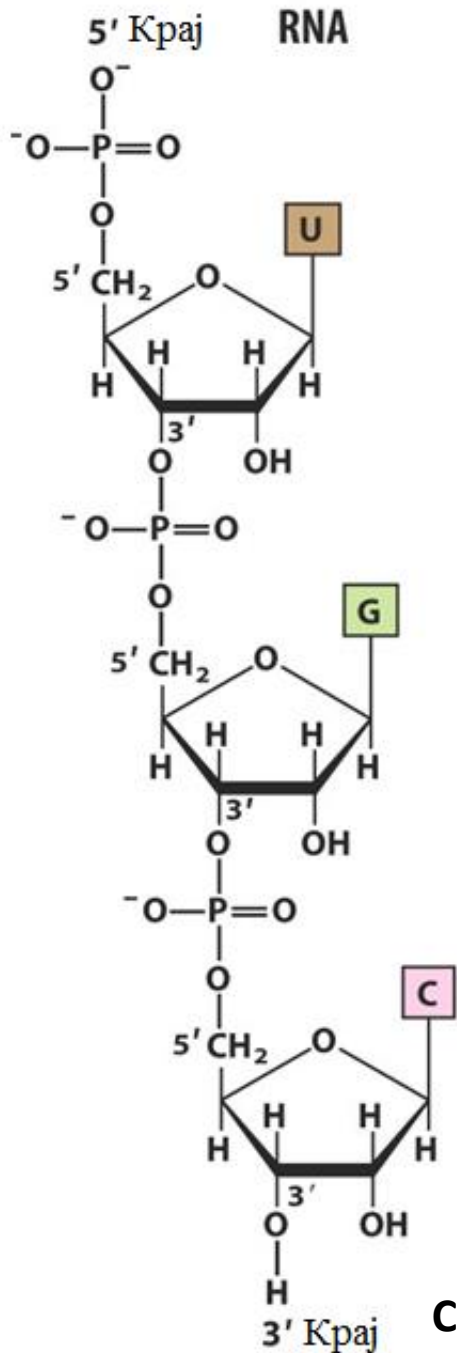
100



- ▶ **Ковалентниот скелет** на нуклеинските киселини е изграден од наизменични фосфатни и пентозни остатоци.
- ▶ Азотните бази може да се сметаат за **странични групи** кои се сврзуваат со скелетот во правилни интервали.
- ▶ Скелетот на нуклеинските киселини е хидрофилен.



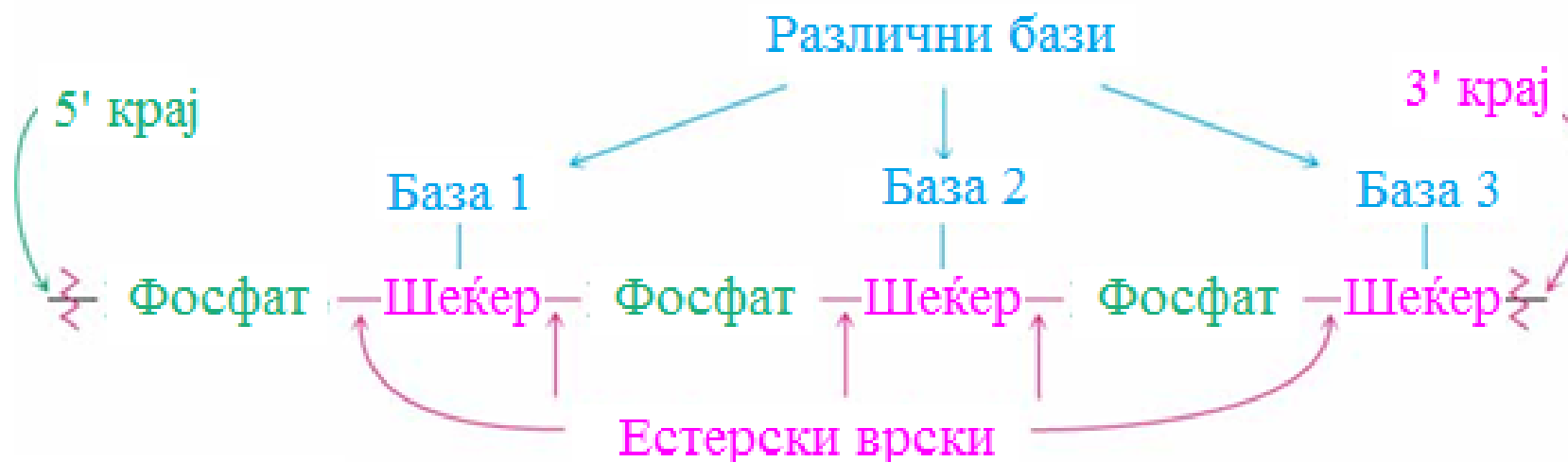
Секвенца на DNA: ATG



Секвенца на RNA: UGC

- На крајот во положба С3' (3' крај) молекулата има слободна хидроксилна група, а на С5' (5' крај) фосфатен остаток.
- Низата на нуклеинската киселина започнува со 5', а завршува со 3'. **Ознаката од 5' до 3' се однесува на почетокот и на крајот на низата.**
- **5' → 3'**

Нуклеинска секвенца

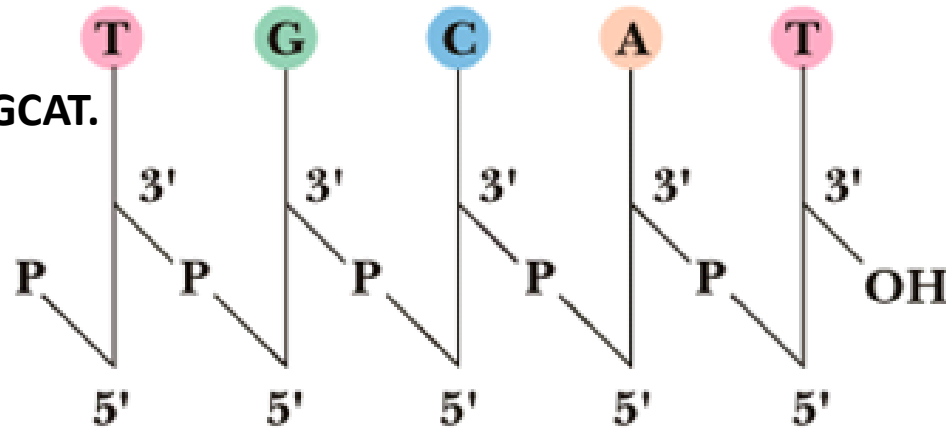


- Секвенцата на една полинуклеотидна низа секогаш започнува од 5' крајот 5'→3' (5' се пишува на левата страна, додека 3' крајот на десната).
- **Разликите меѓу нуклеинските киселини произлегуваат од редоследот на азотни бази.**
- Нуклеозидите поврзани преку фосфатен остаток се запишуваат со нивните кратенки: А за аденозин, Г –гванозин, Т-тимидин, С-цитидин, У-урудин.
- Пример за секвенца: **TAGGCT**

Претставување на нуклеински киселини

Шематски приказ на сегмент од DNA

pT-G-C-A-TOH, pTpGrCpApT или pTGCAT.



- Фосфатните групи се означуваат со P
- Деоксирибоза се претставува со вертикални линии, на врвот е C-1', најдолу C-5'.
- За C-1' N-гликозидно е сврзана азотната база, запишана со кратенка.
- Дијагоналните линии ги поврзуваат нуклеотидите.

Нивои на структурна организација

Кај нуклеинските киселини разликуваме неколку типови (нивои) на структурна организација:

- ▶ **Примарна структура:** нуклеотидна секвенца. Во секвенцата е содржана генетската информација што го определува редоследот на аминокиселини при биосинтеза на протеини.
- **Секундарна структура:** тридимензионална стабилна структура на нуклеотидите во полинуклеотидната низа (α –хеликс).
- **Терцијарна структура:** комплексни структури на пакување на нуклеинските киселини во јадрата на еукариотските и прокариотските клетки.

Примарна структура

- ▶ Примарна структура - **ковалентна структура на полинуклеотидната низа и нуклеотидната секвенца.**
- ▶ Нуклеотидната секвенца се претставува преку кратенките за органските азотни бази, започнувајќи со 5' крајот

Кратка форма : GTAC

- ▶ Проширена форма со вклучување на кратенка за фосфатна група (p):

pGrTrArC

pGrTrArCONH

- ▶ Може да се користат кратка и проширена формула со или без крајната 3'-ОН.
- ▶ При поврзување на нуклеотидите во антипаралелна насока од 3' кон 5', нуклеотидната секвенца на низата се пишува:

ArCrGrTrTr

- ▶ Примарната структура на нуклеинската киселина се определува со методи за секвенционирање.

Тридимензионална структура на DNA

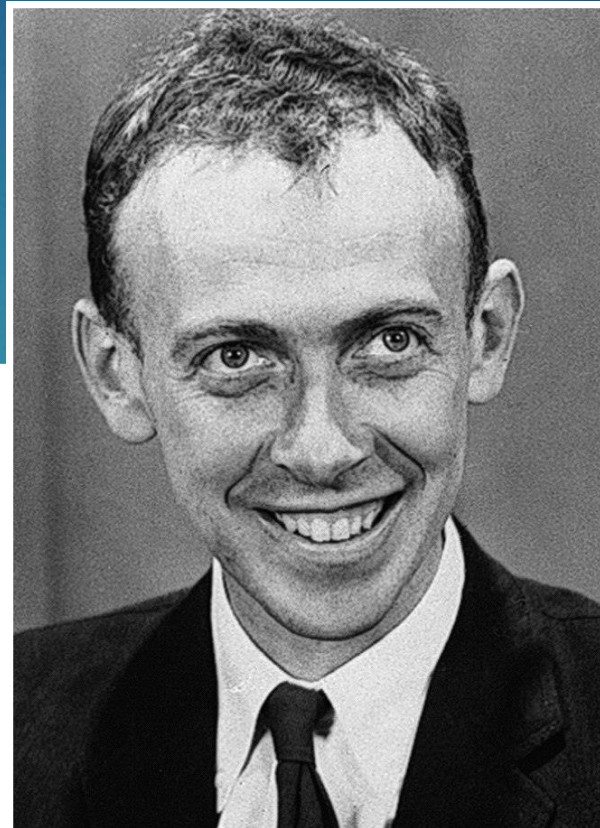
СЕКУНДАРНА СТРУКТУРА
ТЕРЦИЈАРНА СТРУКТУРА

DNA

- ▶ Изолација (**1868**) – **Фридрих Мишер** (Friedrich Miescher), ја нарекол „**нуклеин**“.
- ▶ Елементална анализа: супстанца покрај C, H и N, содржи **фосфор**.
- ▶ **Биолошка функција** (1940) – Освалд Т. Ејвери (Oswald T. Avery), Колин Меклеод (Colin MacLeod) и Меклин Меккарти (Maclyn McCarty: со инјектирање на вирулентна кон невирулентна нуклеинска киселина од истата бактерија (*Streptococcus pneumoniae*), дошло до **трансформација на невирулентната низа во вирулентна**.
 - ▶ **Заклучок:** DNA од вирулентната низа **ја носела генетската информација** за вирулентноста.
- ▶ Потврда во (**1952**) : Алфред Д. Херши (Alfred D. Hershey) и Марта Чејс (Martha Chase) – експерименти изведувани со радиоактивно обележана DNA или протеин.

Модел на Watson и Crick

- ▶ **James Watson и Francis Crick** во 1953 година, предложиле модел за тридимензионалната структура на DNA.
- ▶ Заедно со Maurice Wilkins се **добитници на Нобеловата награда за Физиологија во медицината во 1962 година**, за откритијата на молекулската структура на нуклеинските киселини и нивната важност во пренесувањето на информациите во живата материја.



James Watson



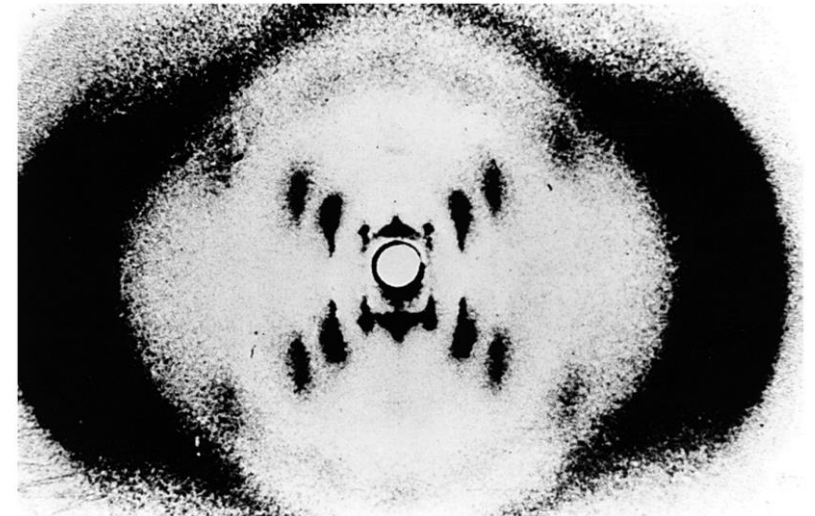
Francis Crick



DNA на задната страна од англиската монета за 2 фунти

Податоци познати за Watson и Crick

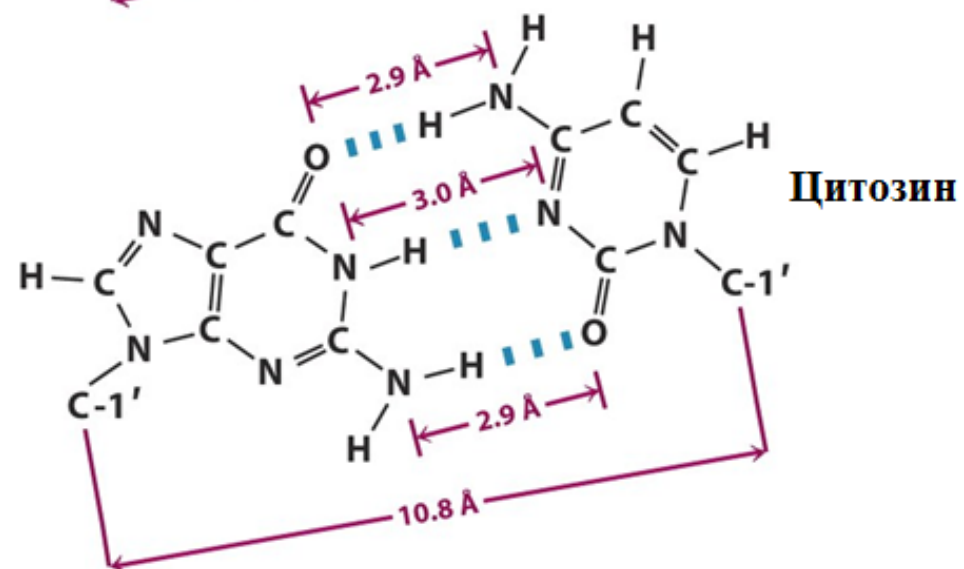
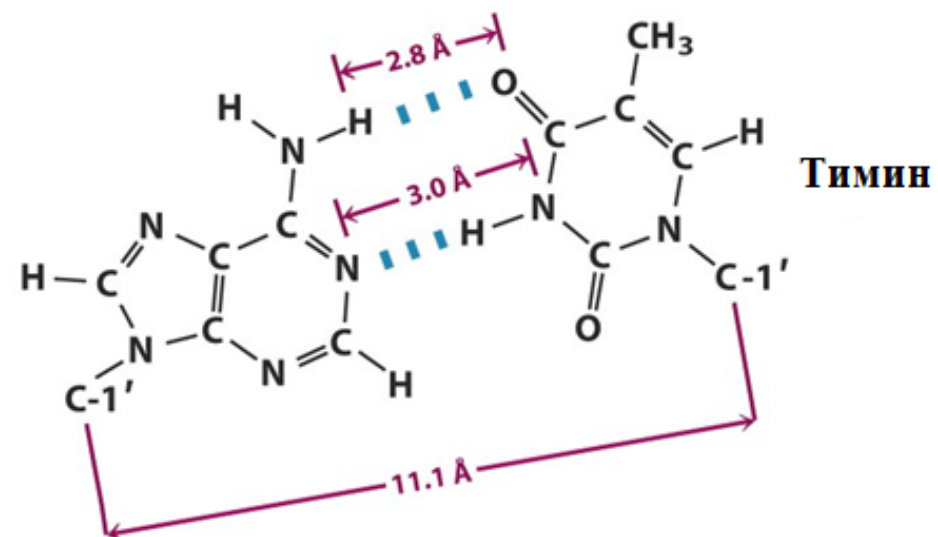
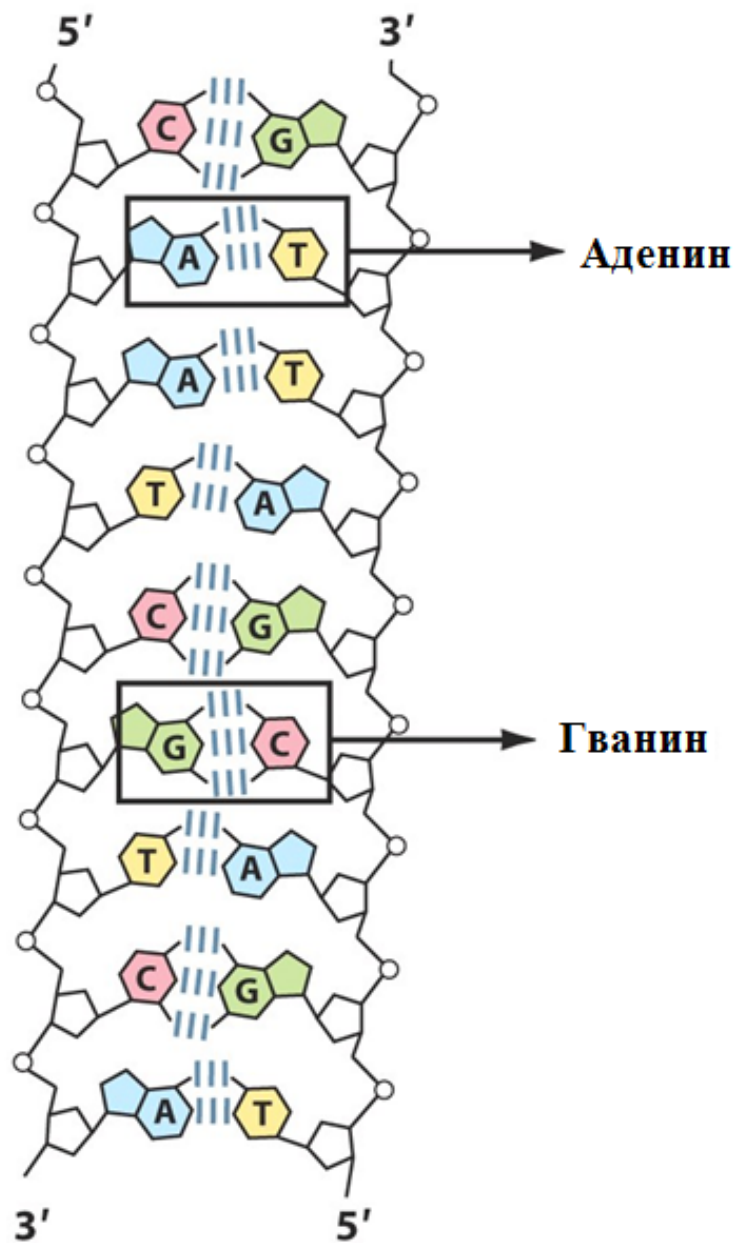
1. **Кристалографски податоци** добиени со рендгенска дифракција од **Rosalind Franklin** и **Maurice Wilkins**:
 - Молекулите на DNA имаат **структура на хеликс** која **периодично се повторува** по должина на нејзината оска. **Првото повторување е на 3,4 Å, а второто повторување е на 34 Å.**
2. **Правилата на Chargaff**, според кој четирите азотни бази се различно застапени во различни организми, а количествата на некои од нив се тесно поврзани.



дифрактограм на DNA

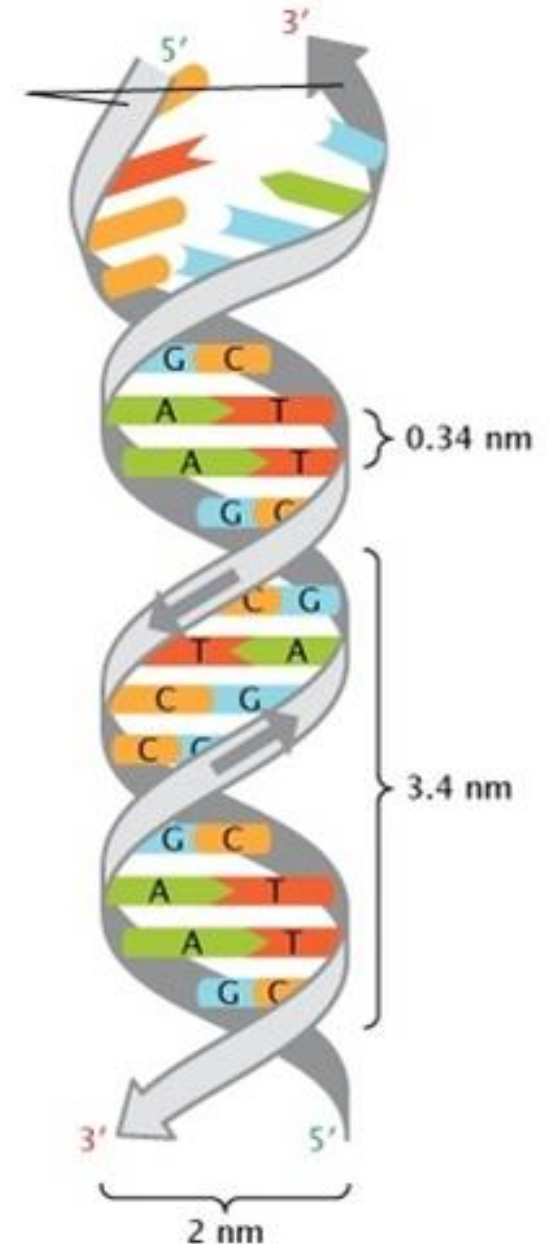
Правила на Чаргаф

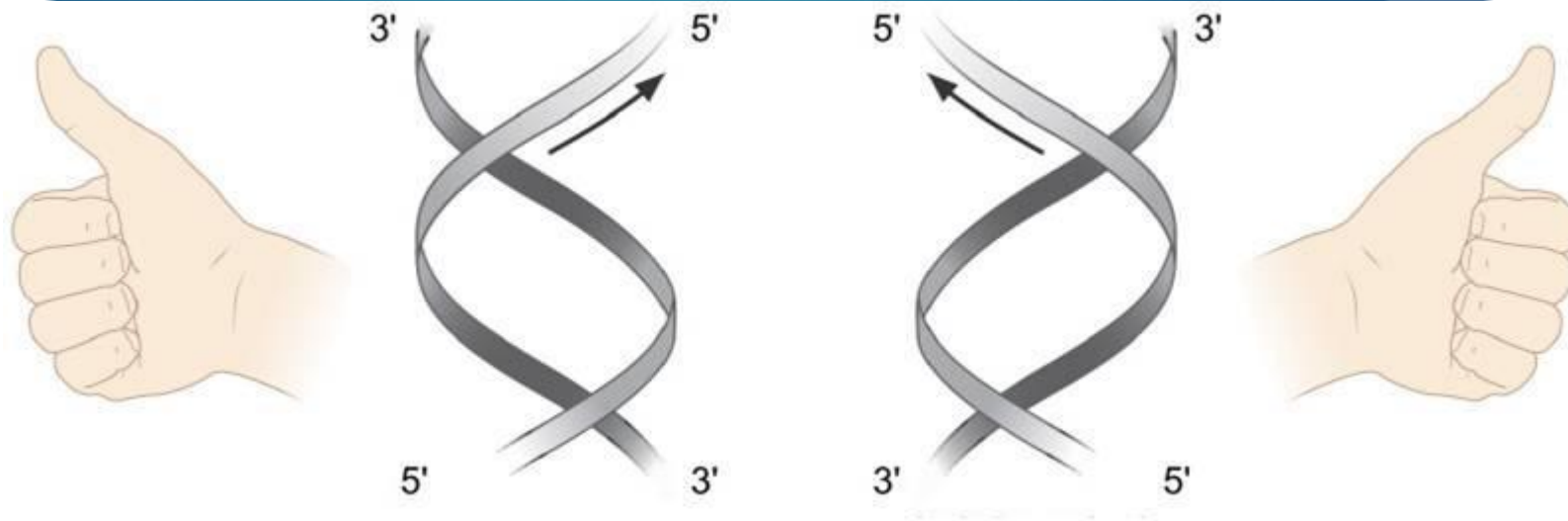
1. Составот на DNA бази е различен меѓу видовите.
 2. Различни ткива на ист вид имаат ист состав на базите во DNA.
 3. Составот на бази кај видовите не зависи од возраста, исхраната или промена на средината.
 4. Во секој вид клеточна DNA, $A=T$ и $G=C$, односно $[\text{пурини}] = [\text{пиримидини}]$, што значи $A+G = T+C$
- Правилата на Chargaff добиле смисол со нивната примена во структурата на DNA од Watson и Crick.



Модел на DNA според Вотсон и Крик

- ▶ Молекулата на DNA се состои од **две полинуклеотидни низи со спротивна насока** на протегање (антипаралелни: $5' \rightarrow 3'$ и $3' \rightarrow 5'$),
- ▶ Низите од деоксирибоза и фосфатни остатоци меѓусебно поврзани преку дифосфоестерски врски, спирално се извиткуваат околу иста оска и формираат двојна спирала (**двоен хеликс**).
- ▶ Двете низи се хоризонтално поврзани преку **водородни врски меѓу комплементарните парови бази**.
- ▶ **Дијаметарот** на хеликсот зависи од типот на DNA, просечно изнесува околу **2 nm** (18-26 Å).



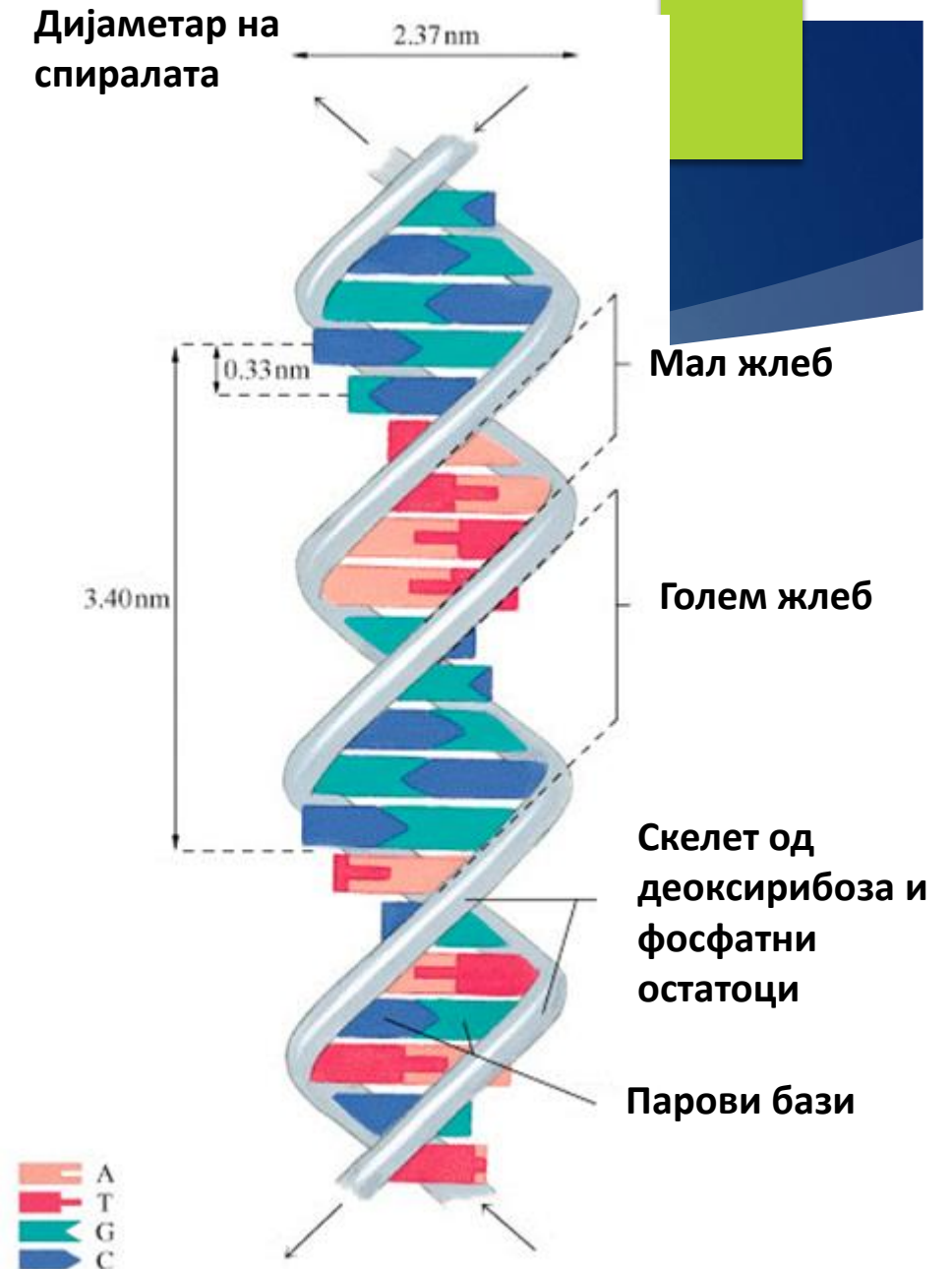


Десна форма

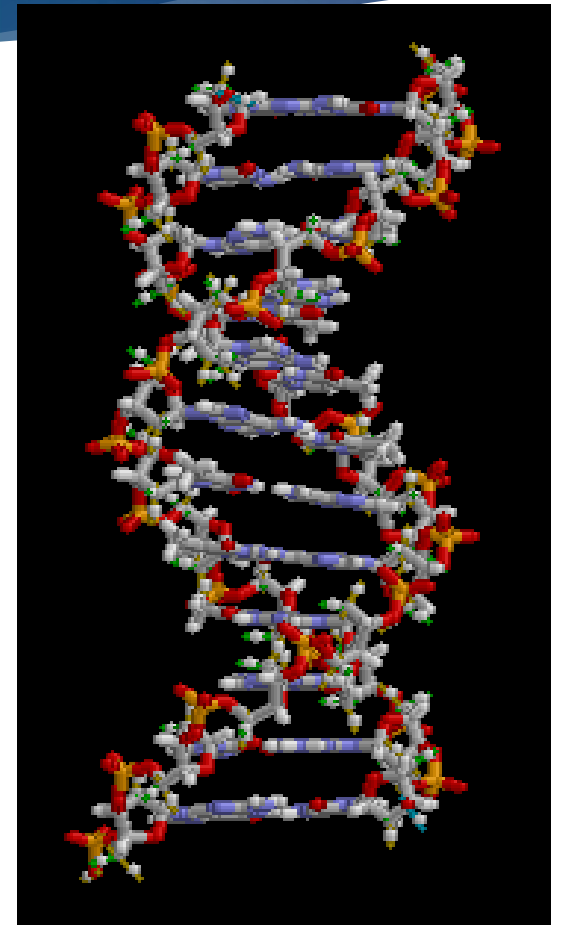
Лева форма

- ▶ Двете хеликални DNA низи, се извиткуваат околу иста оска при што формираат двојна **деснорака спирала**

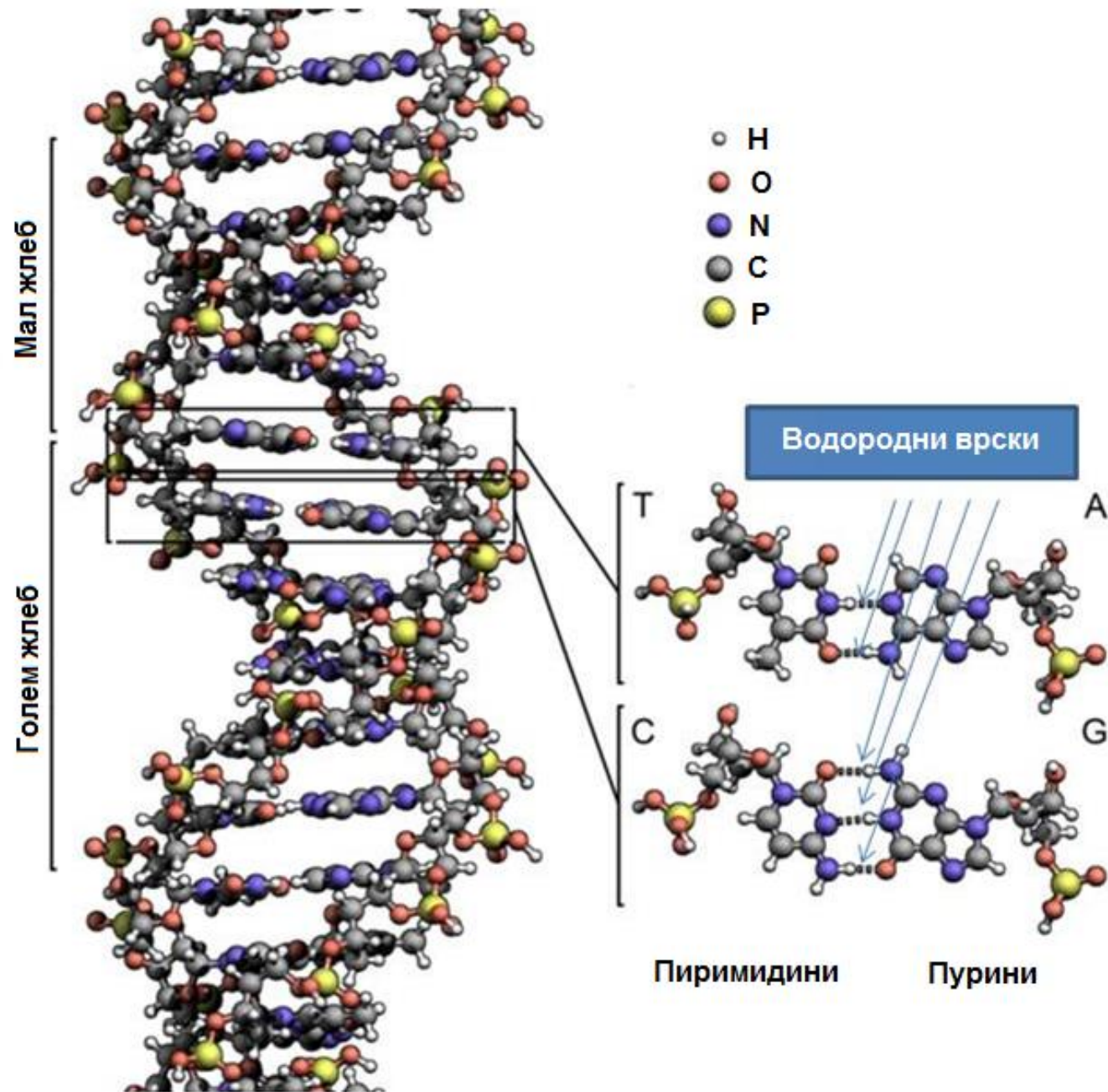
- ▶ Оригиналниот модел предложен од Вотсон и Крик содржел **10 парови бази** во еден свиок од спиралата.
- ▶ **Од на хеликсот** е 0,33 nm/нуклеотид.
- ▶ **Од на свиокот** е 3,4 nm/свиок.
- ▶ Со понатамошните мерења се открило дека има **10,5 парови бази или 36 Å (3,6 nm) во еден свиок**.
- ▶ Карактеристика на моделот на DNA е постоењето на **два жлеба: мал и голем**, одговорни за интеракцијата со други лиганди (особено со протеините) и за биосинтезата на протеините.



- ▶ Постојат разлики во поларноста на различни делови од молекулата на DNA:
 - ▶ **Хидрофилните скелети** на деоксирибоза и фосфатни групи се наоѓаат на **надворешната страна** од двојната спирала, свртени кон водата.
 - ▶ **Пуринските и пиримидинските бази** од двете низи се подредени **во внатрешноста** на двојниот хеликс.
- ▶ **Фуранозниот прстен** на секоја деоксирибоза се наоѓа во **C-2' ендоконформација**.
- ▶ Планарните структури на азотните бази се блиску една до друга, **нормално** поставени **во однос на долгата оска**.

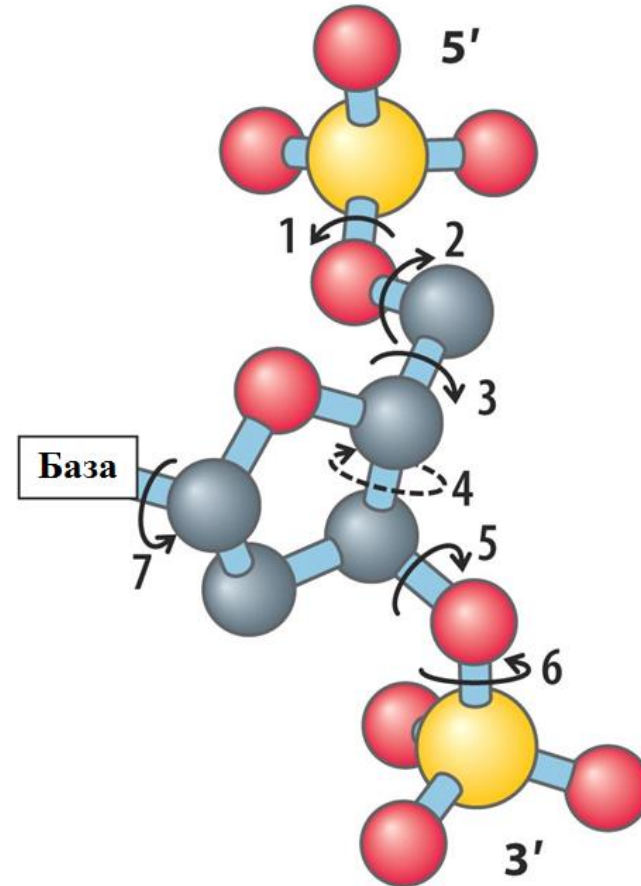


- ▶ Вотсон и Крик откриле дека водородното сврзување на паровите бази, односно G со C, и A со T, се случува **во внатрешноста на структурата**.
- ▶ **Комплементарноста** на полинуклеотидните низи се должи на **водородните врски** меѓу паровите азотни бази.
 - ▶ Гванин (**G**) и цитозин (**C**) формираат **три силни водородни врски** меѓу себе, но не со A или T.
 - ▶ Аденин (**A**) и тимин (**T**) формираат **две силни водородни врски** меѓу себе, но не со C или G.



Структурни варијации

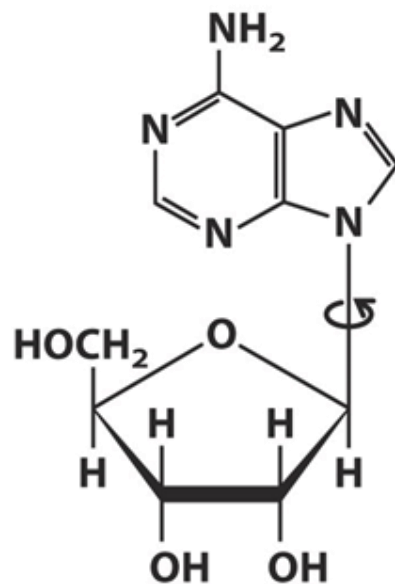
- ▶ Структурните варијации на DNA се предизвикани од **неспречената ротација околу единечните C-C, C-O, C-N и O-P врски.**
- ▶ Можни се различни конформации на деоксирибозата, ротацијата околу врските коишто го градат фосфодеооксирибозниот скелет и слободната ротација околу C-1'-N-гликозидната врска.



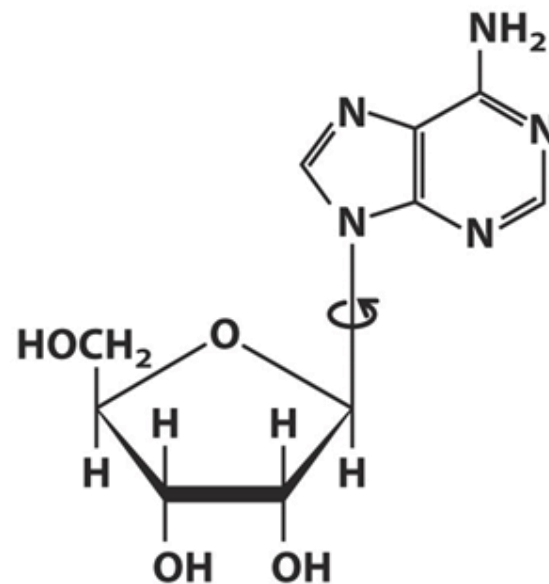
Структурни варијации

- ▶ Поради слободната ротација околу N-гликозидната врска, нуклеозидот постои во две стабилни конформации: **syn-** и **anti-**.
- ▶ Пуринските бази во нуклеотидите постојат во двете стерно можни конформации: *anti* и *syn*.

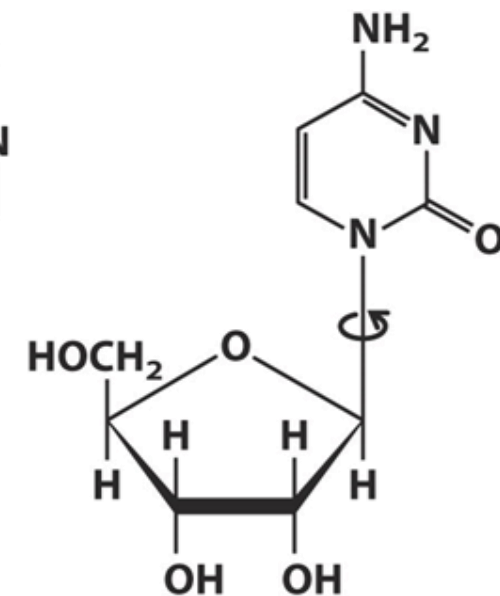
- ▶ Пиримидините главно се среќаваат во *anti* конформацијата.
Причина: стерни пречки помеѓу јаглехидратниот и карбонилниот кислород на C-2 атомот од пиримидинот.



syn-Аденозин



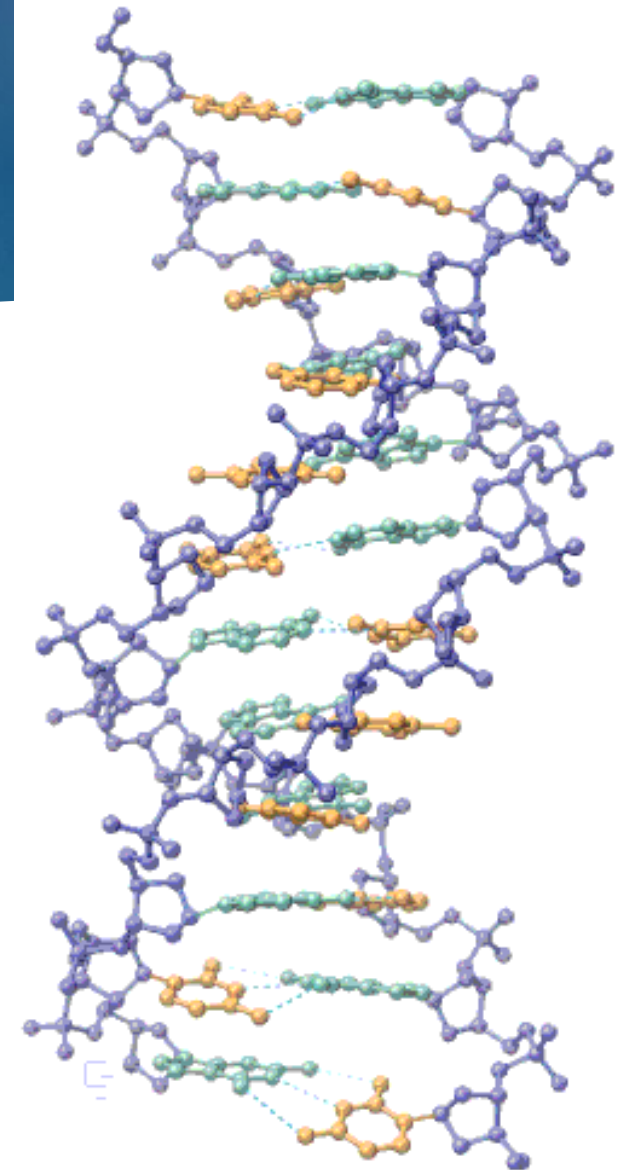
anti-Аденозин



anti-Цитидин

Вистинска структура на DNA

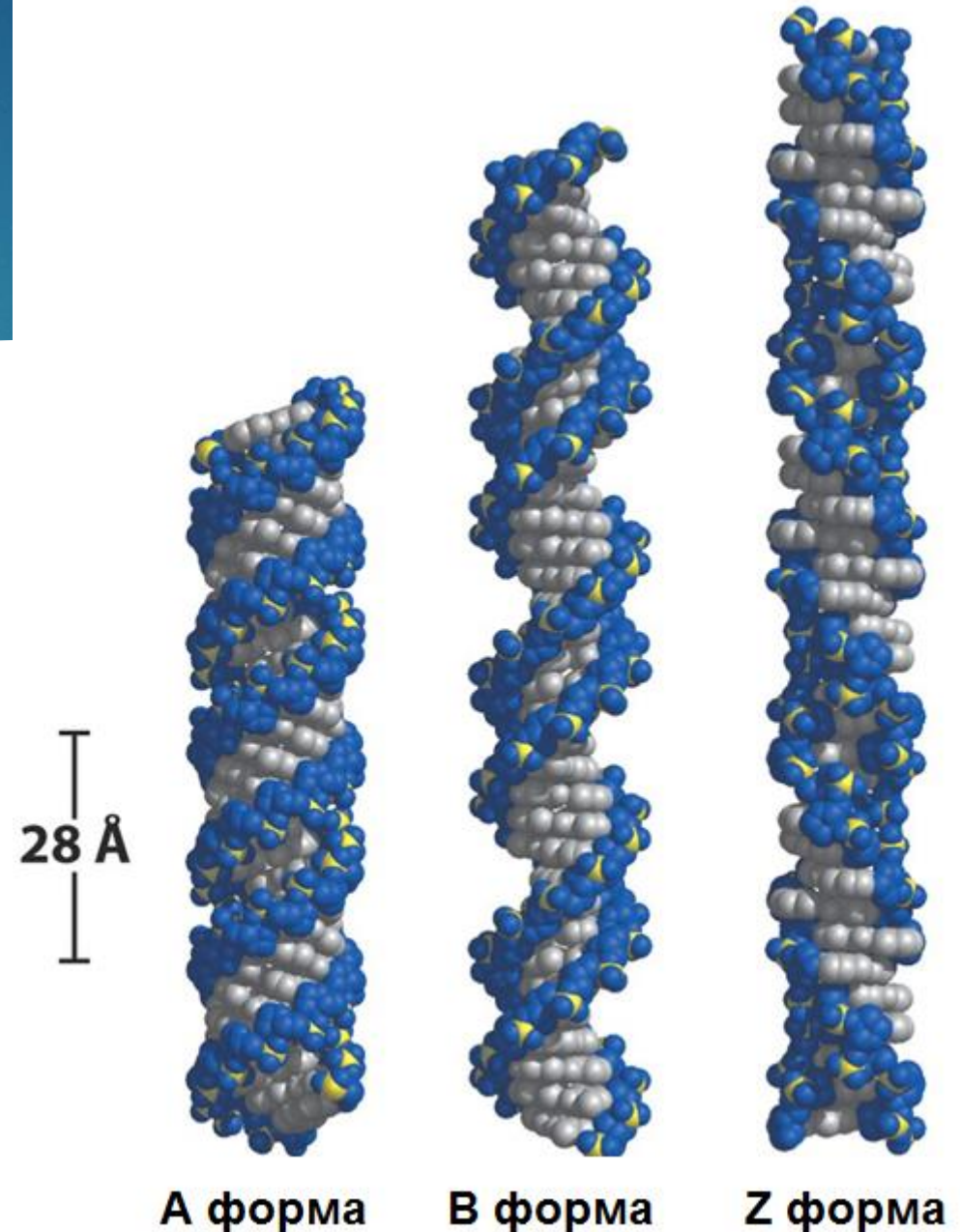
- ▶ Моделот на Ватсон и Крик се однесува на идеализирана структура на DNA, каде рамнината во која лежат паровите од конјугирани бази е нормална на оската на хеликсот.
- ▶ Вистинската структура на DNA се разликува од идеализираниот модел на Ватсон и Крик.
- ▶ **Моделот е деформиран:** Секој нареден пар од бази е свртен за определена на вредност на аголот.
- ▶ Кај различни типови DNA наклонот на паровите бази нормален на оската на спиралата е различен и претставува специфичен параметар.



B-DNA

Модели на реални структури на DNA

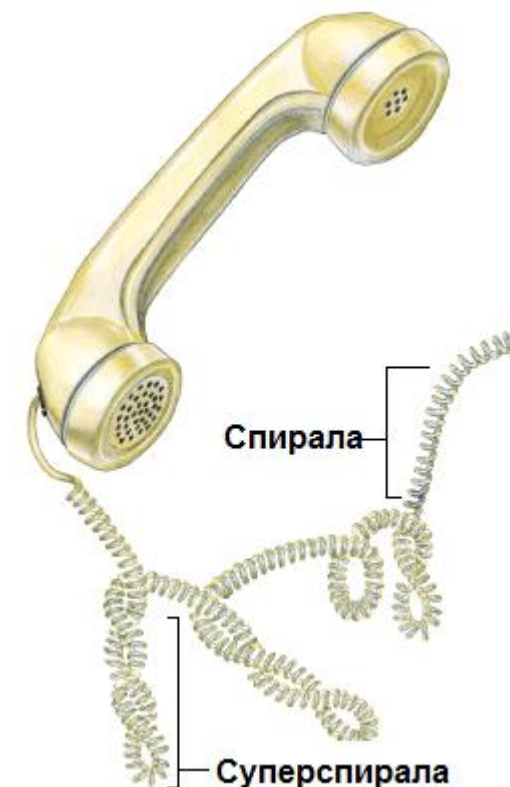
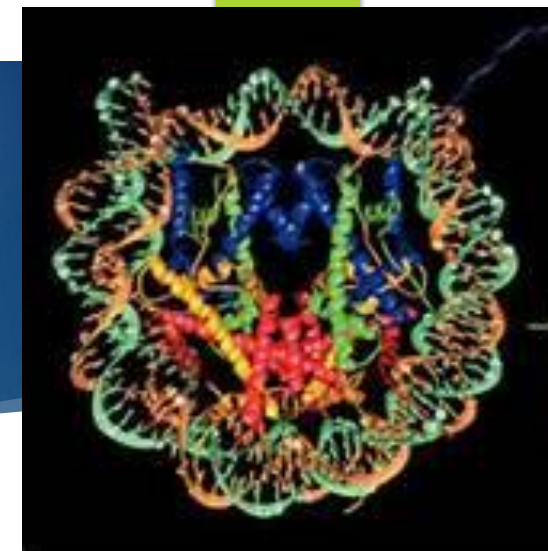
- ▶ Структурата на Вотсон и Крик се нарекува **В-форма на DNA** или B-DNA.
- ▶ Две структурни варијанти коишто се определени во кристалните структури се **A и Z формите**.
- ▶ А-формата најмногу е присутна во раствори во кои нема присуство на вода. Структурните промени во однос на В-формата, влијаат врз **продлабочување на големиот жлеб**, а малиот жлеб станува поплиток.
- ▶ Најочигледна разлика на **Z-формата** на DNA е **левораката** спирална ротација. Структурата е потенка и **издолжена**, големиот жлеб е едвај видлив, а малиот жлеб е тесен и вглабнат.

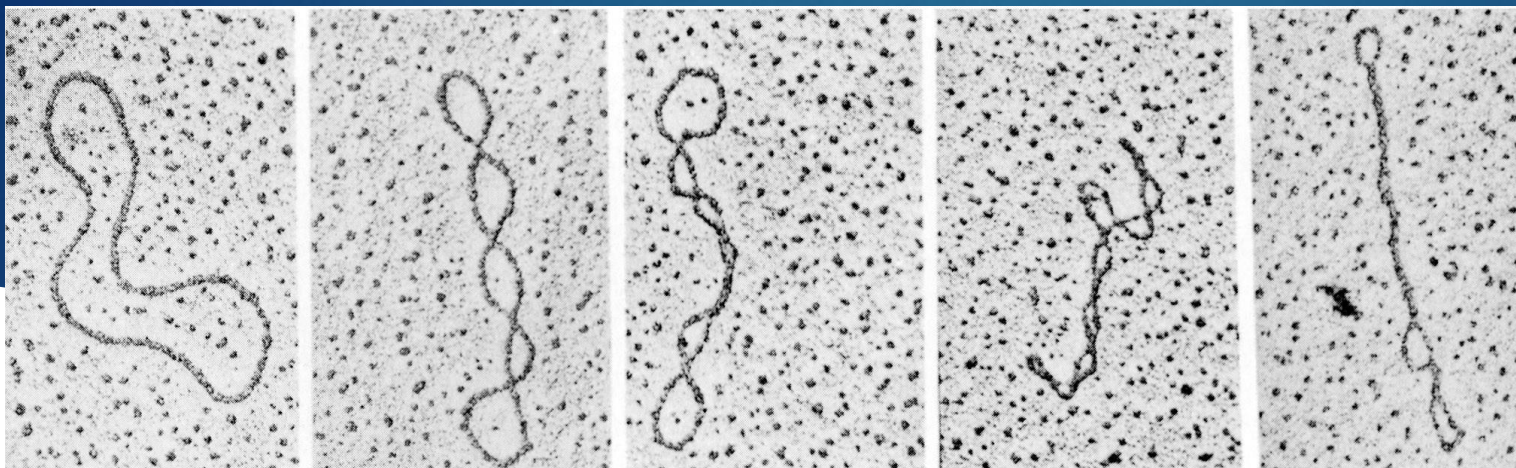


Форма на DNA	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Тип на спирала	деснорака	деснорака	леворака
Дијаметар	26 Å	20 Å	18 Å
Парови бази во еден хеликален завој	11	10,5	12 (димер)
Од на спирала/ нуклеотид	2,6 Å	3,4 Å	3,7 Å
Наклон на паровите бази, нормален на оската на спиралата	20°	6°	7°
Конформација на шеќерот	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo за пиримидини, C-3' endo за пурините
Конформација на N-гликозидната врска	anti	anti	anti за пиримидини, syn за пурини

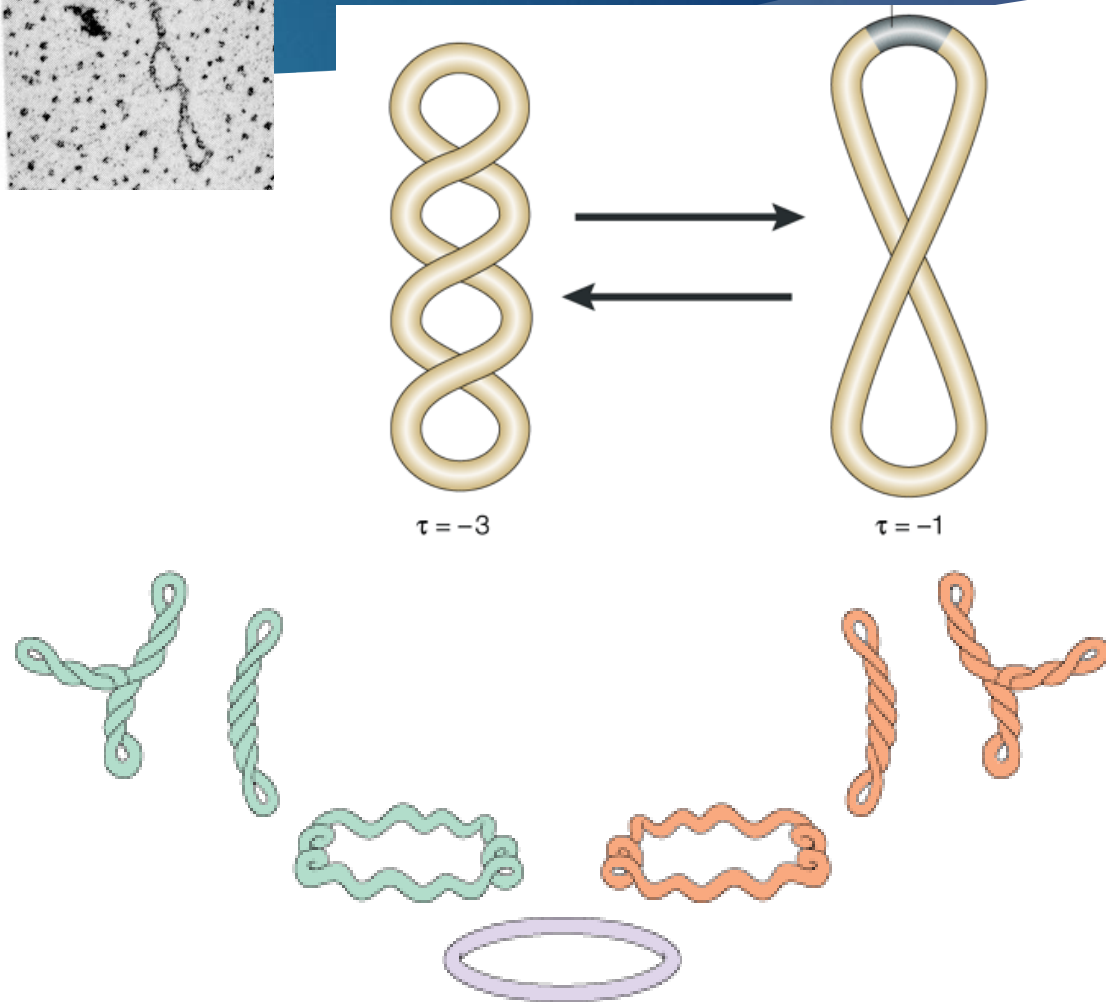
Терцијарна структура на DNA

- ▶ **Како е спакувана DNA во јадрото на клетката** имајќи ја предвид **енормната големина на молекулите?**
 - ▶ 23 пара хромозоми, секој со една молекула DNA, со повеќе од 2,9 билиони нуклеотиди, секој пар комплементарни бази со должина од 3,4 Å, или вкупно 2 m
 - ▶ Во човековиот организам има 10^{14} клетки, должината на вкупната DNA изнесува 2×10^{11} km, додека на пример оддалеченоста на Земјата од Сонцето е $1,5 \times 10^8$ km.
- ▶ Во вирусите, прокариотите и во јадрата на еукариотските клетки, долгата **молекула од DNA е густо "спакувана"** градејќи сложени структури.
- ▶ Таа може да биде **линеарна, во форма на тркало (прстен) т.н. циркуларна DNA**, во форма на **клопче** и.т.н.
- ▶ Исто така, таа може да биде едноспирална или двоспирална, во **форма на двојна спирала, односно суперспирала**.
- ▶ Суперспирализацијата претставува внатрешна карактеристика на терцијарната структура на DNA.





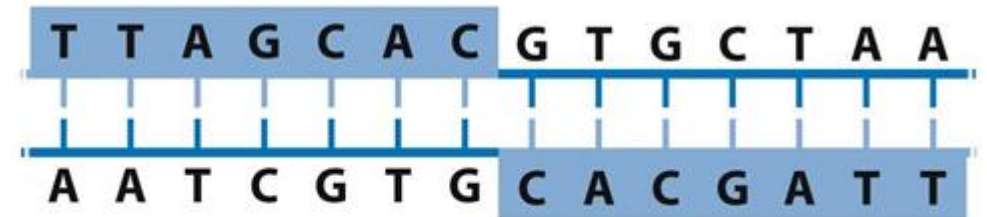
- ▶ Ковалентната пртсенеста структура на двете полинуклеотидни низи во молекулата на DNA, претставува **циркуларна DNA** со двоен хеликс.
- ▶ Суперспирализацијата на двоверижната DNA се објаснува преку нејзиното тополошко својство – **сврзувачки број**.
- ▶ Со расплетување или засукување на релаксираната DNA за одреден број свиоци, настанува негативно или позитивно суперспирализирање во однос на замислената оска.



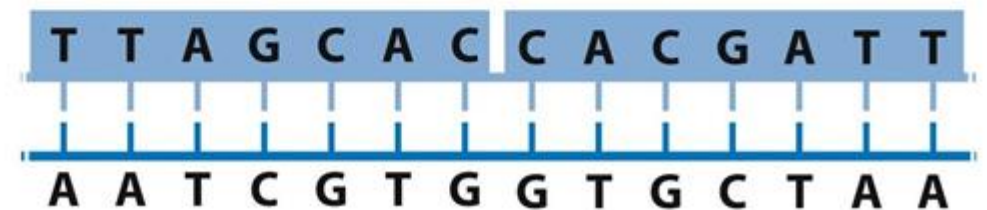
Невообичаени структури на DNA

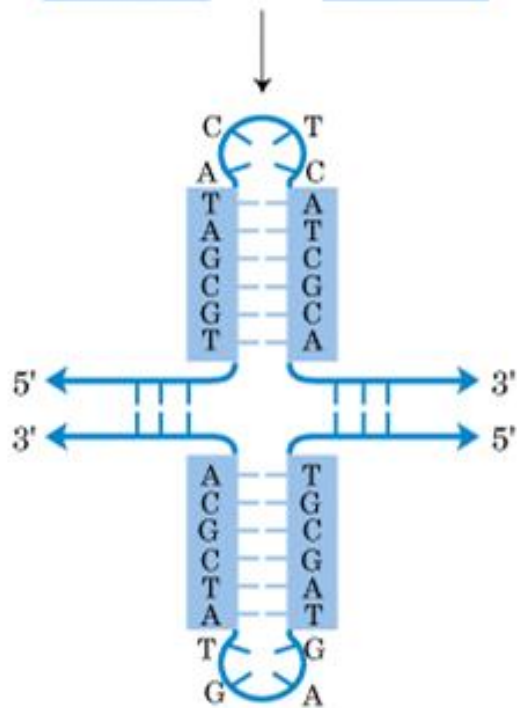
- ▶ Секвенца **ПАЛИНДРОМ**: делови од DNA имаат **инверзни периодични повторувања на основната секвенца на двете полинуклеотидни низи** и имаат симетрија од втор ред. (самокомплементарност)
- ▶ Секвенцата **ОГЛЕДАЛНО ПЕРИОДИЧНО ПОВТОРУВАЊЕ** подразбира дека инверзните периодични повторувања се среќаваат во секоја поединечна низа на DNA.

Палиндром

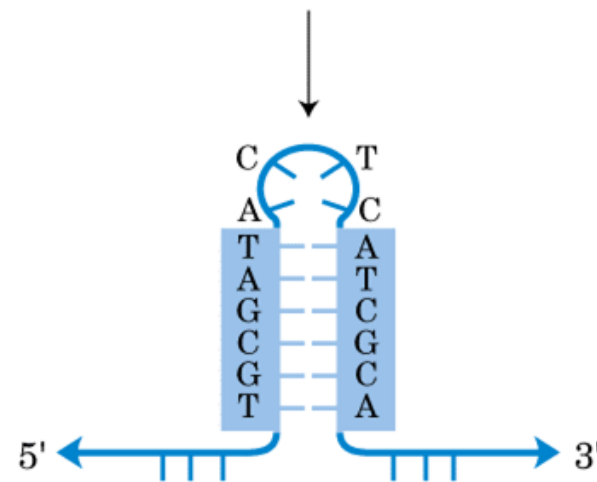


Огледално повторување





Крстовидна форма



Шнола

- Секвенците од типот палиндром имаат потенцијал да образуваат невообичаени структури **шноли** и **крстовидни структури**.

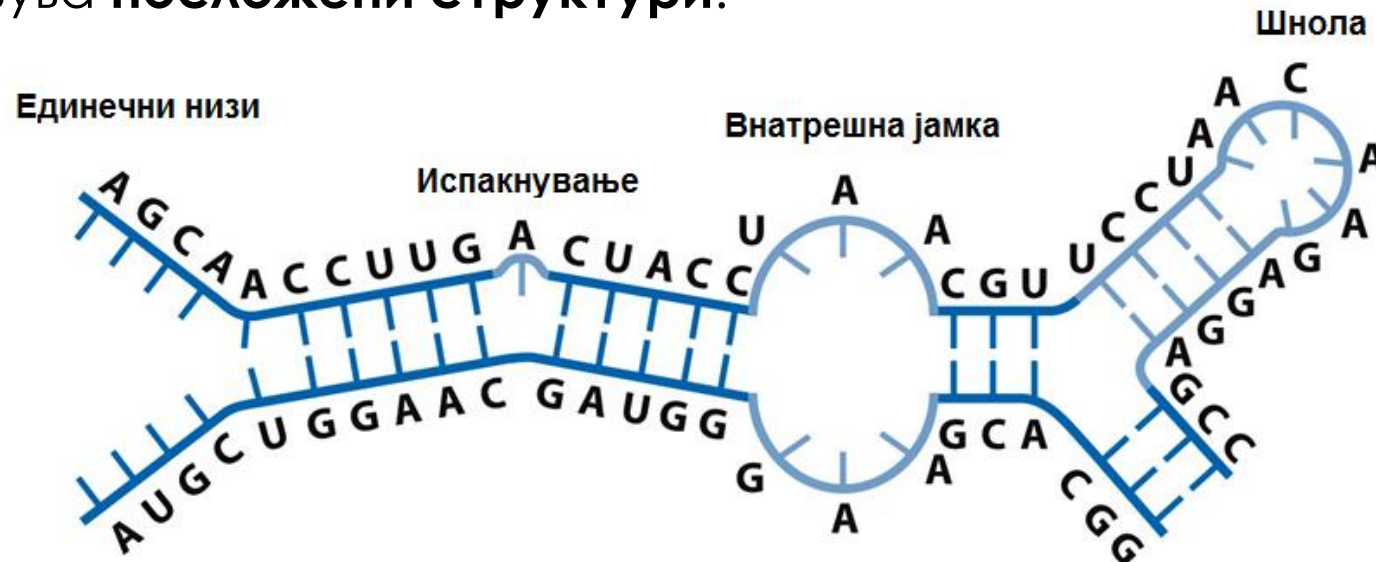
Рибонуклеински киселини

Рибонуклеински киселини

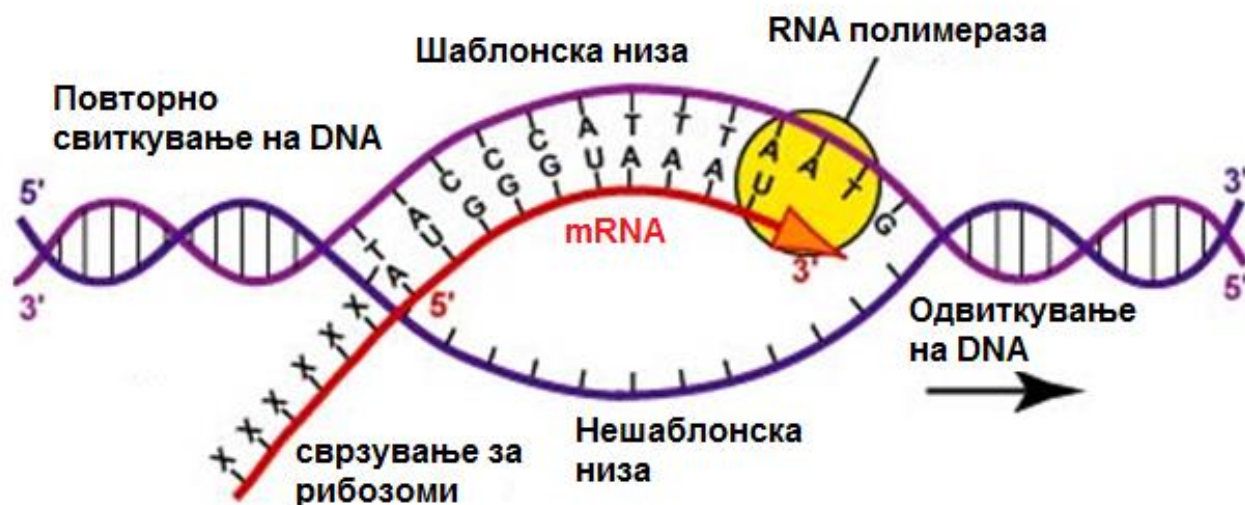
- ▶ DNA на еукариотите е сконцентрирана во јадрото, а синтезата на протеините се одвива на рибозомите во цитоплазмата, значи постои некоја друга молекула што ја пренесува генетската порака од јадрото до цитоплазмата, **молекулата на RNA.**
- ▶ RNA е пронајдена и **во јадрото (4-10%) и во цитоплазмата** на клетките на живите организми.
- ▶ Сите RNA молекули се добиени од информацијата која е трајно складирана во DNA.
- ▶ **Според функцијата** разликуваме три основни видови на рибонуклеински киселини:
 - ▶ **Информациона** или месинџер-гласничка RNA (iRNA или mRNA),
 - ▶ **Транспортна** RNA (tRNA) и
 - ▶ **Рибозомна** RNA (rRNA).
- ▶ Разлики **во однос на составот со DNA:**
 - ▶ Шеќерната компонента е **рибофураноза**
 - ▶ Наместо пиримидинската база тимин (DNA), RNA содржи **урацил.**

Структура на RNA

- ▶ RNA има само **една полинуклеотидна низа**. Единечната низа има тенденција да заземе **деснорака спирална конформација**.
- ▶ RNA може базно да се спарува со комплементарните делови било на RNA или на DNA.
- ▶ Секоја самокомплементарна секвенца во молекулата може да образува **посложени структури**.

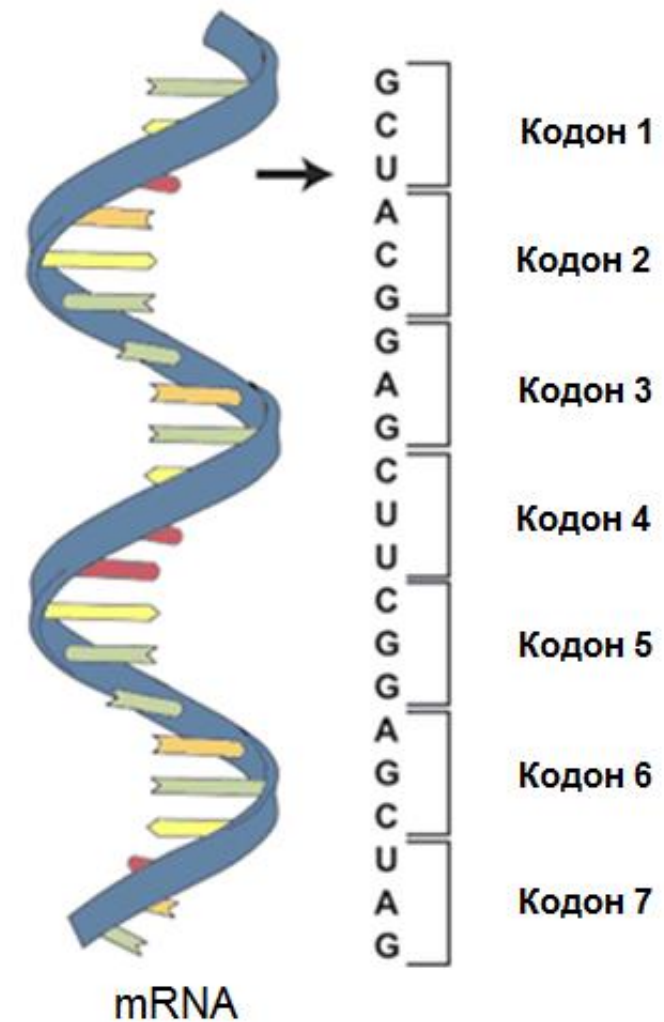


Информациона RNA (mRNA)



- ▶ Делот од клеточната RNA што ја пренесува генетската информација од DNA до рибозомите е **информациона RNA (mRNA)** или гласничка, месинџер.
- ▶ Нејзината секвенца е копија од DNA, која се образува во процесот **транскрипција**.
- ▶ За синтеза на низата на mRNA (комплементарна на шаблонската низа од DNA), **DNA молекулата привремено се одвиткува**.
- ▶ Во овој регион се гради хибридна RNA-DNA двојна спирала (околу 8 парови бази), во насока 5' → 3' од кој RNA брзо се одвојува.

- ▶ Постојат различни типови од mRNA коишто се разликуваат помеѓу себе по молекулската маса и редоследот на нуклеотидите. Должината на една mRNA е дефинирана со должината на полипептидната низа којашто ја кодира.
- ▶ **За синтезата на секој протеин постои посебна mRNA.**
- ▶ За синтеза на полипептидна низа од 100 аминокиселински остатоци, потребна е кодирачка секвенца на RNA од најмалку 300 нуклеотиди.
- ▶ Зошто? **Секоја аминокиселина е кодирана од нуклеотиден триплет.**
- ▶ Триплетот од бази се нарекува **кодон**.



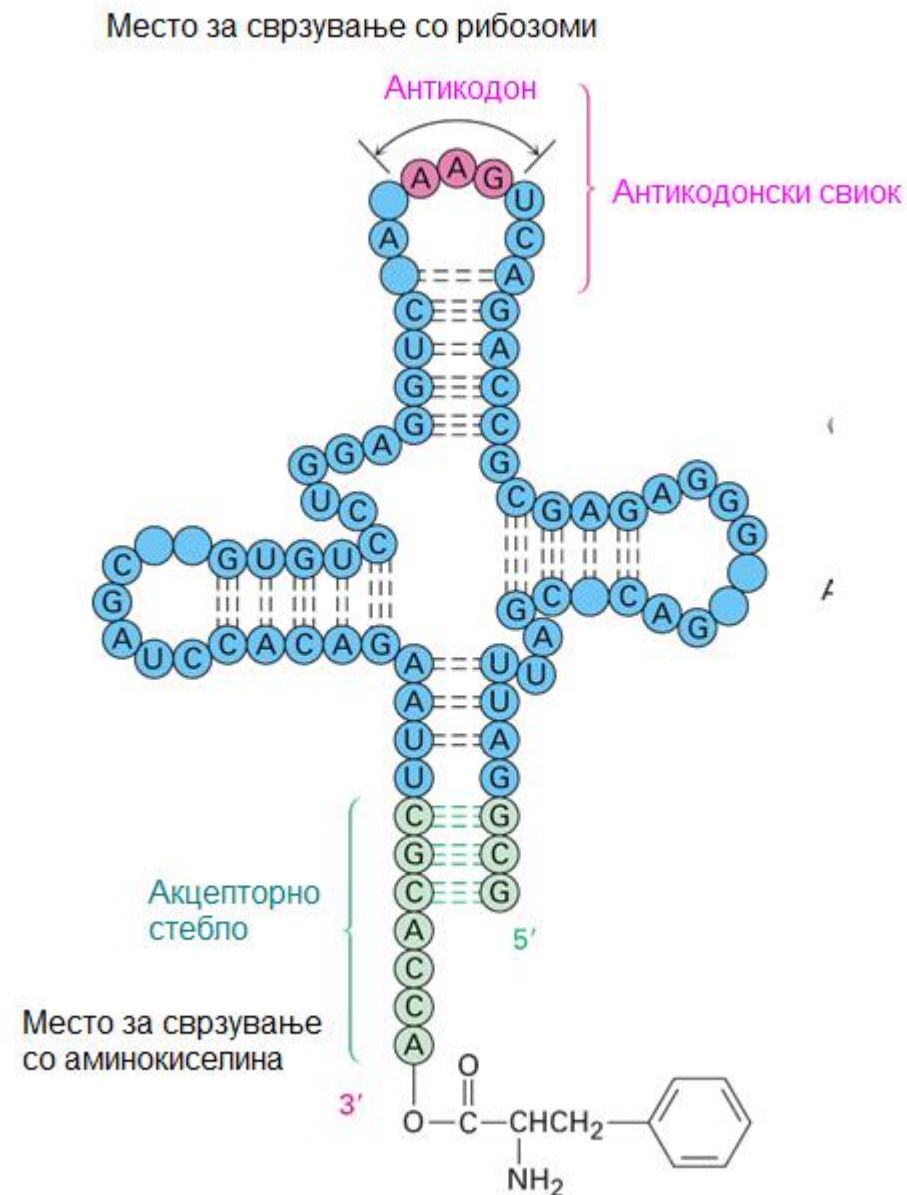
First base (5' end)	Second base	Third base (3' end)			
		U	C	A	G
U	U	Phe	Phe	Leu	Leu
	C	Ser	Ser	Ser	Ser
	A	Tyr	Tyr	Stop	Stop
	G	Cys	Cys	Stop	Trp
C	U	Leu	Leu	Leu	Leu
	C	Pro	Pro	Pro	Pro
	A	His	His	Gln	Gln
	G	Arg	Arg	Arg	Arg
A	U	Ile	Ile	Ile	Met
	C	Thr	Thr	Thr	Thr
	A	Asn	Asn	Lys	Lys
	G	Ser	Ser	Arg	Arg
G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

Означување на КОДОНИТЕ

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

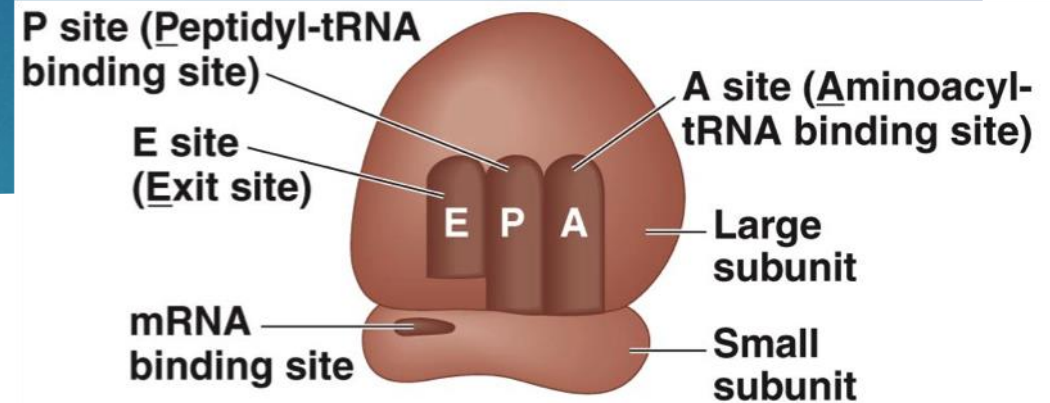
Транспортна RNA (tRNA)

- ▶ Транспортната RNA **ја чита информацијата за синтеза** на една или повеќе полипептидни секвенци, кодирана во mRNA, и **ги пренесува активираните аминокиселини** во рибозомите до определени места на полипептидната низа која расте за време на синтеза на протеините.
- ▶ За секоја аминокиселина има **специфична tRNA**.
- ▶ Транспортната RNA има **сложена структура** која што наликува на лист од детелина:
 - ▶ Се состои од 70 -100 рибонуклеотиди, сврзана за специфичната аминокиселина со естерска врска преку слободната -OH на 3' крајот.
 - ▶ Во средината содржи сегмент - **антикодон**, секвенца од три рибонуклеотиди комплементарни на кодонот од mRNA.

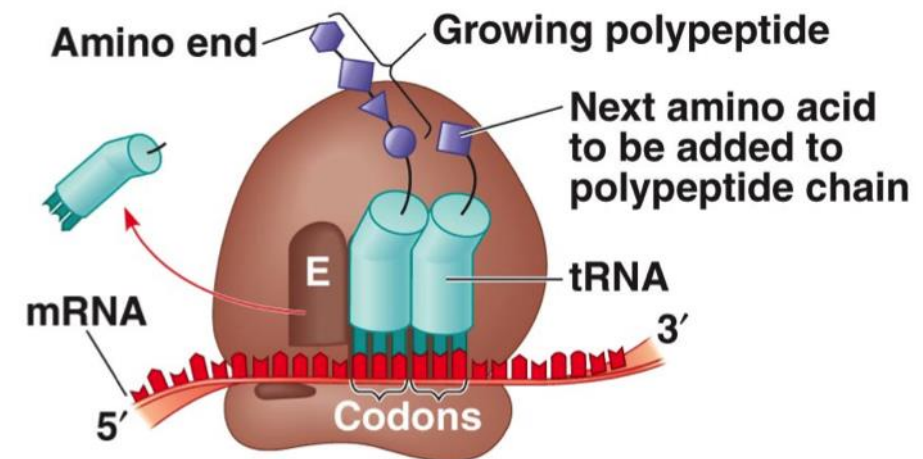


Рибозомна RNA (rRNA)

- ▶ Рибозомните RNA молекули се **составен дел на рибозомите** (сложени клеточни комплекси на протеини и rRNA - **нуклеопротеини**).
- ▶ Тука **се одвива синтезата на протеини** од аминокиселини и ATP.
- ▶ Двете поединици изградени од RNA и протеини (мала со 30S и голема со 50 S) се поврзуваат во 70S единица на рибозомот подготвен за процесот на транслација.
- ▶ Знакот S е мерка за брзината на седиментација при центрифугирање, која вообичаено се користи кај големите молекули како мерка за маса.
- ▶ Рибозомната RNA има двојна улога: структурна и каталитичка (рибозими со ензимска активност).



(b) Schematic model showing binding sites



(c) Schematic model with mRNA and tRNA

Физичко-хемиски својства на нуклеинските 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, **1 kb = 1000 бази** (за DNA базни парови bp). (kb – килобаза)
- ▶ За приближно обележување на големината на молекулата се користат **седиментациони единици -S (Swedberg-ови)**

Проценка на релативна 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	

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

An, Tn, Cn и Gn се однесуваат на бројот на соодветните деоксинуклеотиди

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

За DNA (двојна спирала) средната вредност за Mr на базниот пар е приближно 660 (649).

► **$Mr (dsDNA) = 660 \times N$** (N е број на базните парови)

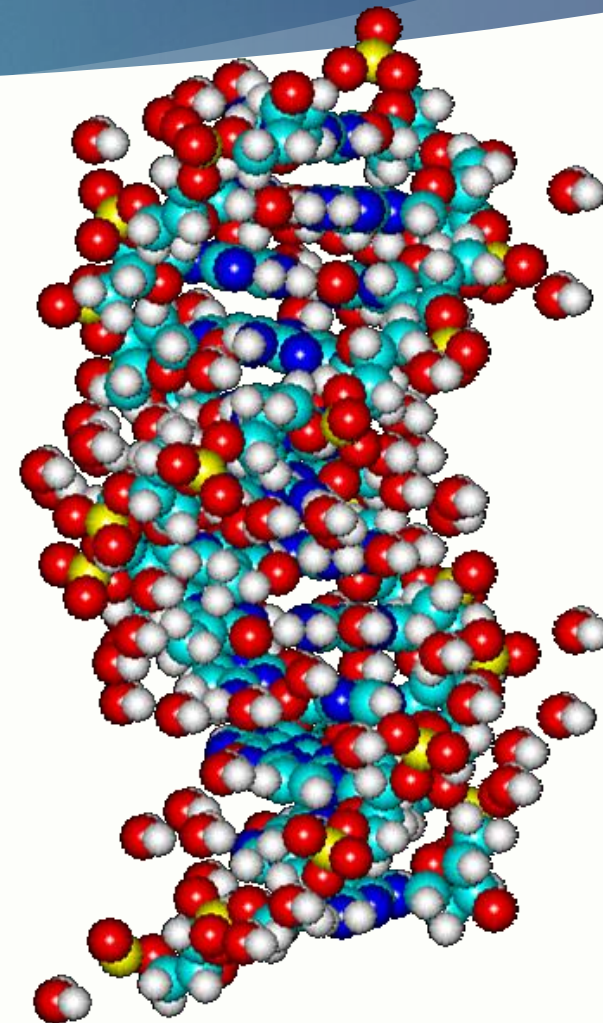
► **Пр.** хромозом на E.coli има $4,64 \times 10^6$ парови бази. Проценка за **$Mr = 3 \times 10^9$**

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	$1,6 \times 10^6$
Зажак		
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	$1,7 \times 10^6$

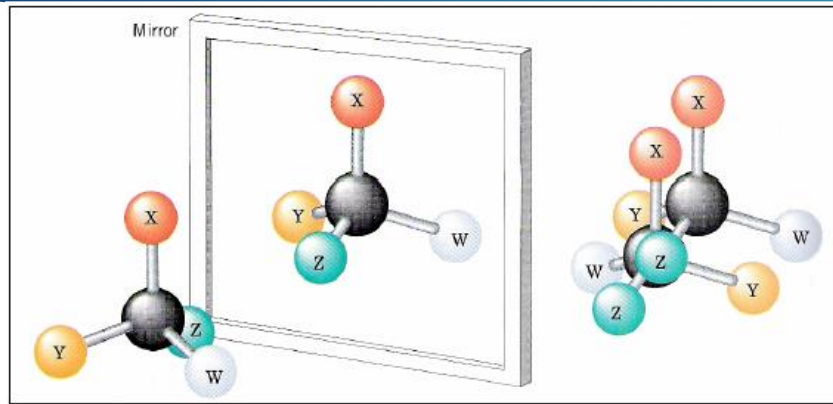
DNA	Должина	Големина	Проценка за Mr
Polyoma virus	0,6 μm	4500 bp = 4,5 kb	$2,97 \times 10^6$
Bacteriophage lambda	17 μm	48502 bp = 48,5 kb	$3,2 \times 10^7$
E.Coli chromosome	1,5 mm	4639221 bp = 4639,2 kb	$3,06 \times 10^9$
D. Melanogaster chromosome	20 mm	70000000 bp = 70000 kb	$4,62 \times 10^{10}$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

Растворливост на нуклеински киселини

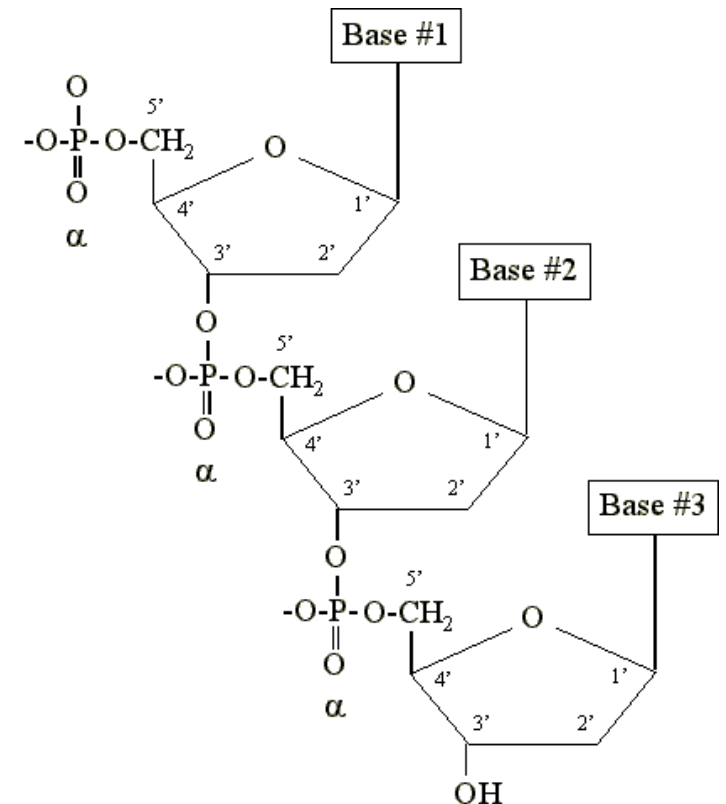
- ▶ Нуклеинските киселини **поради негативниот полнеж на фосфатните остатоци** долж шеќерно-фосфатниот скелет на полинуклеотидната низа се хидратирани.
- ▶ Олигонуклеотидите **се растворливи во вода (10mM)**.
- ▶ Нуклеинските киселини како високомолекуларни соединенија (над 200000 Da) се раствораат во **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 нуклеински киселини

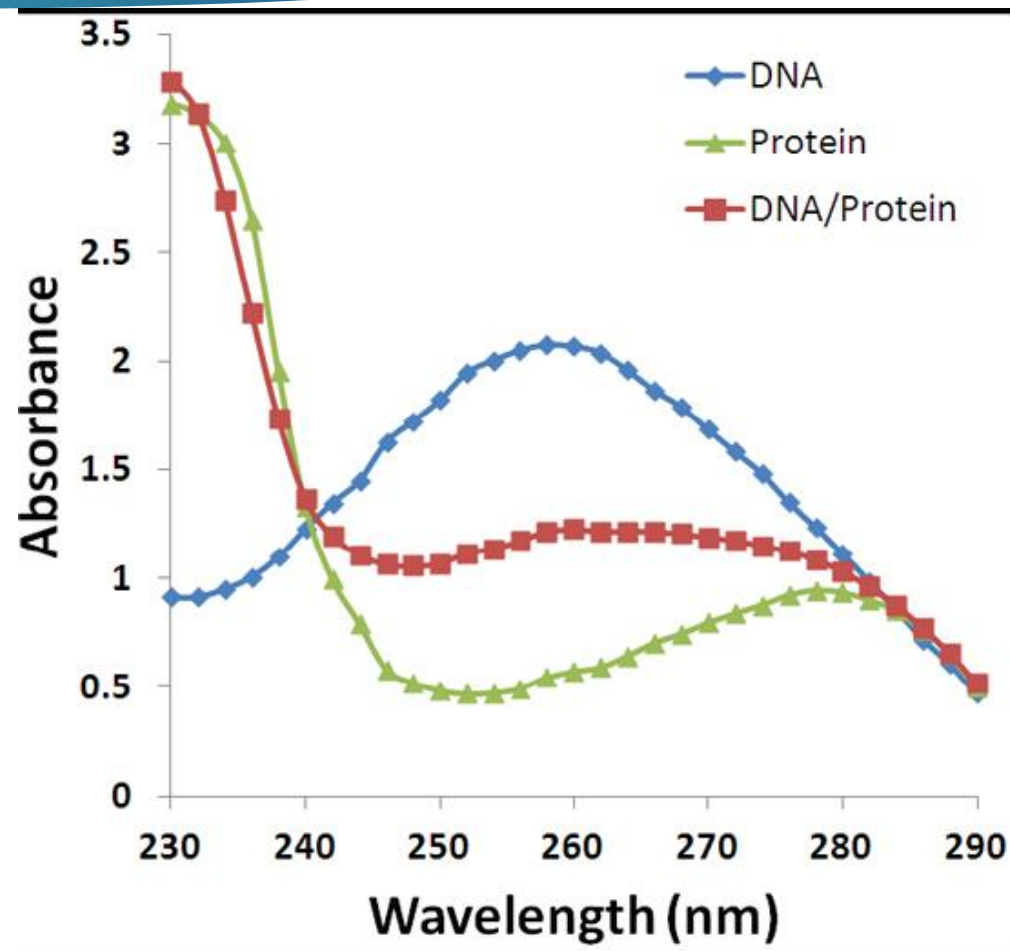


- ▶ Оптичката активност ја опишува појавата на **ротација (вртење) на рамнината на поларизираната светлина** во насока на стрелките на часовникот, или обратно.
- ▶ Ова својство го поседуваат супстанците со хирални молекули.
- ▶ Нуклеинските киселини имаат **хирални центри (кои?)**, поради што нивните раствори покажуваат оптичка активност.



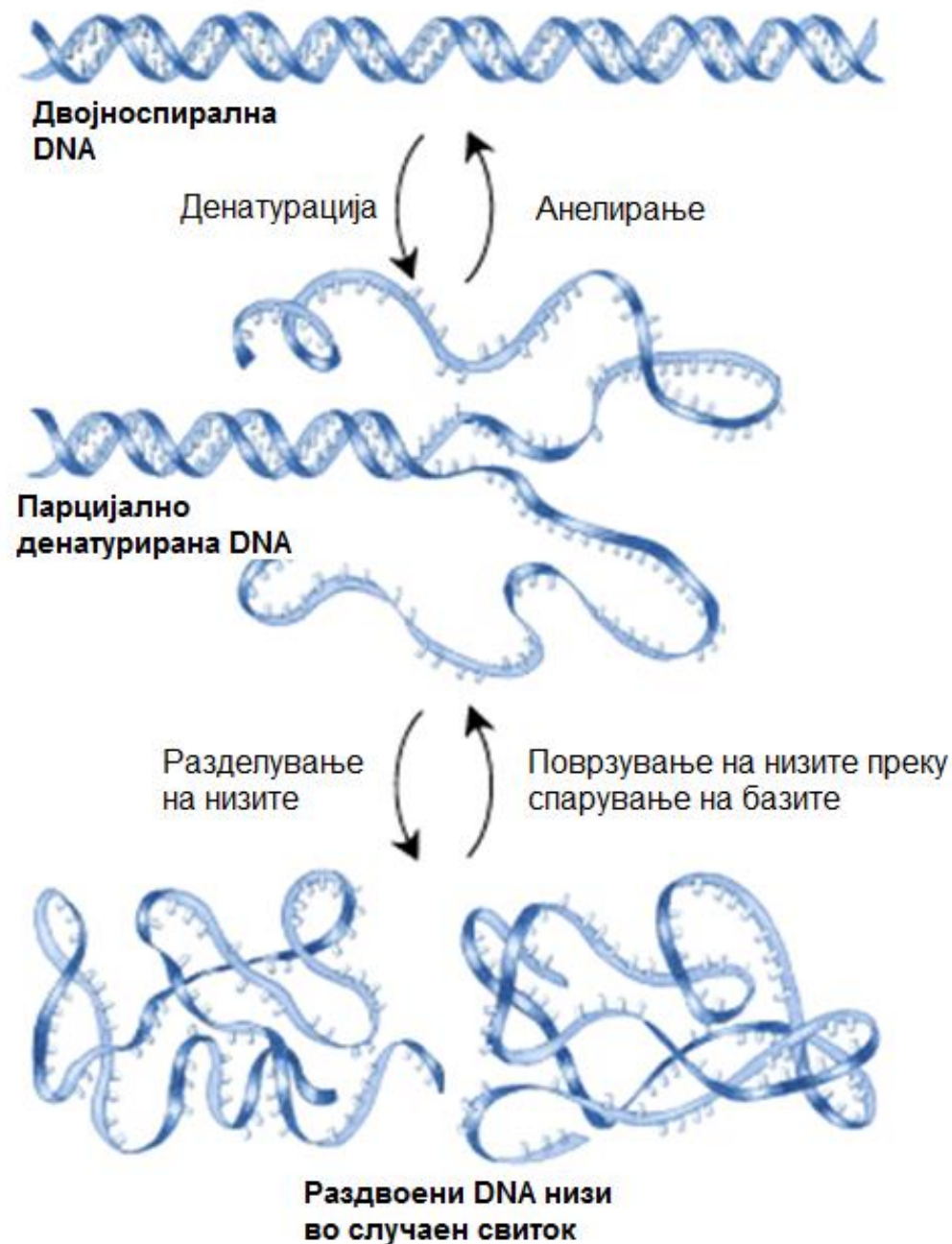
Апсорпција на UV светлина

- ▶ 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 **$\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$** .



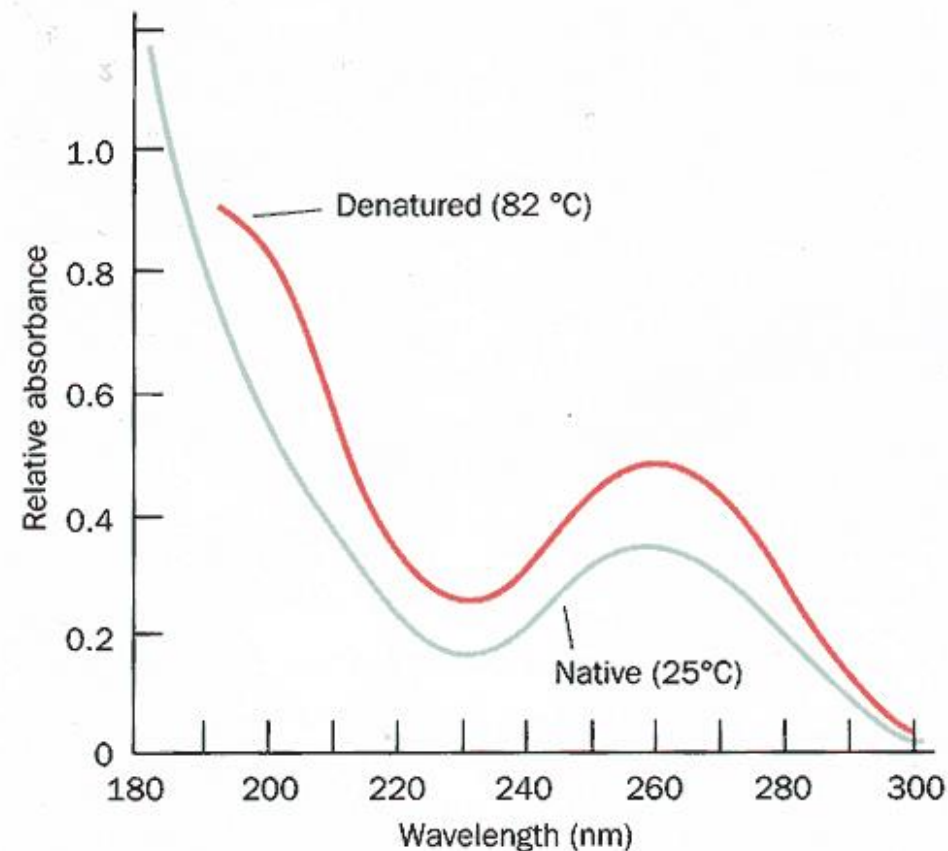
Денатурирање на DNA

- ▶ **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**.



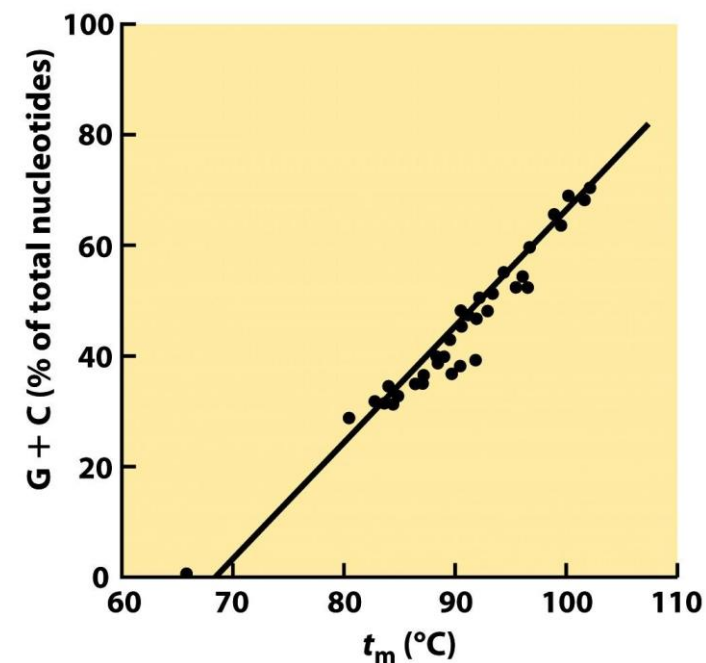
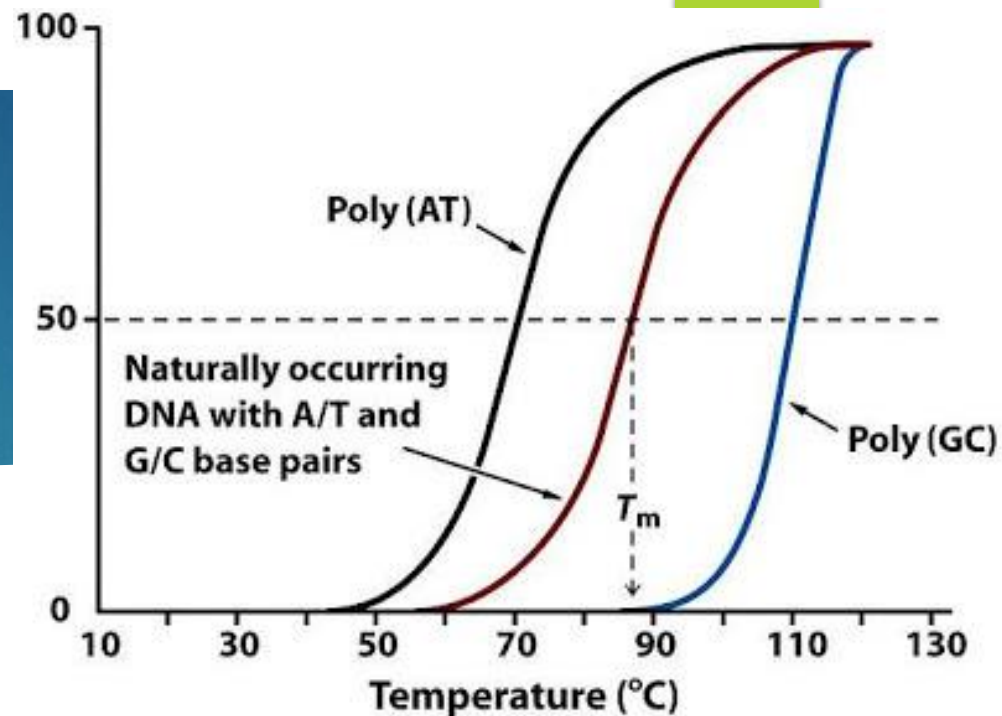
- ▶ Денатурацијата на нативната DNA е проследена со квалитативни промени на физичките својства:

- ▶ **Вискозноста се намалува.**
- ▶ **UV апсорпцијата се зголемува за 40% - хиперхромен ефект**



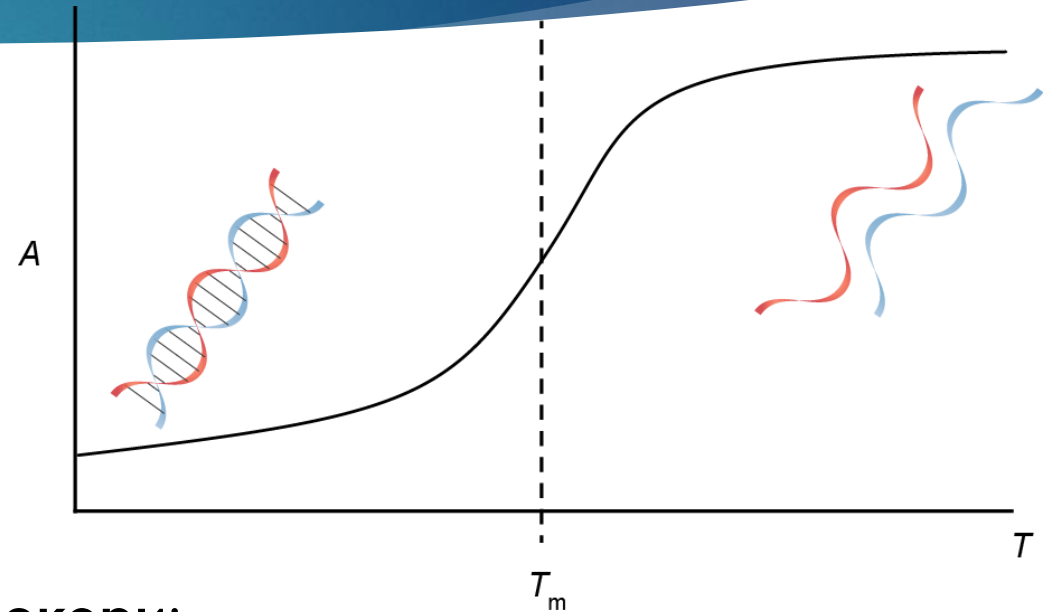
Температура на топење

- ▶ 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.



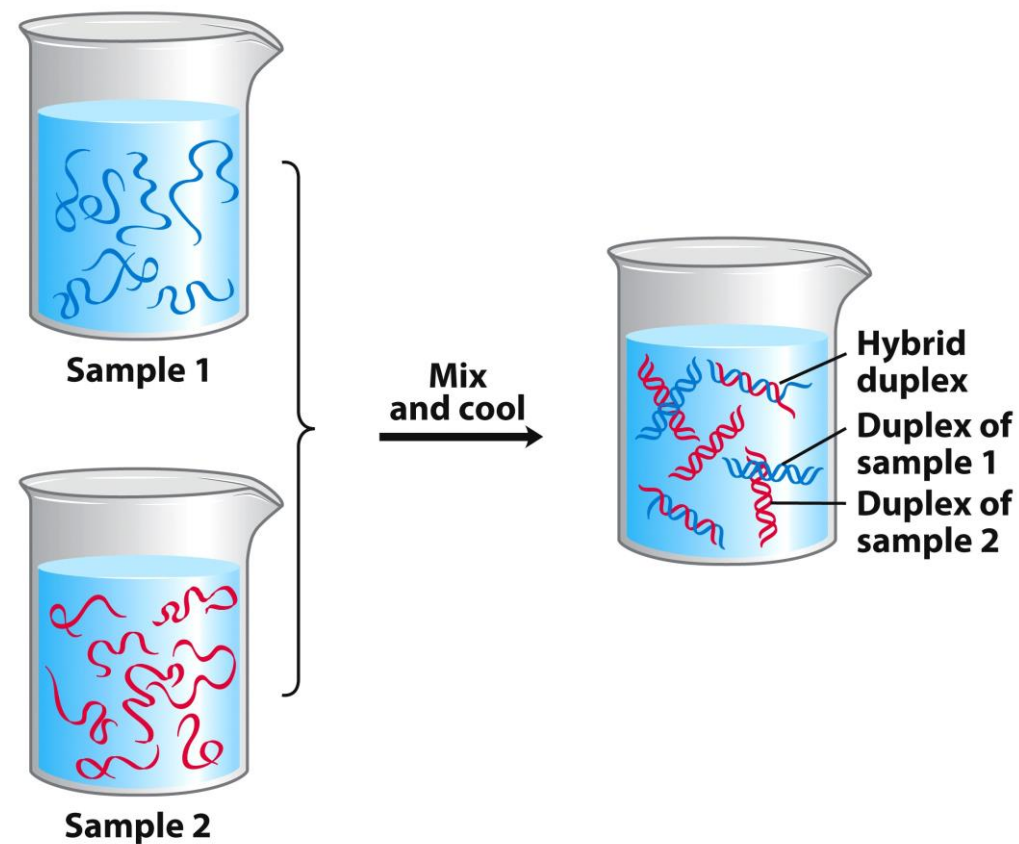
Ренатурација

- ▶ 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** .
- ▶ 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

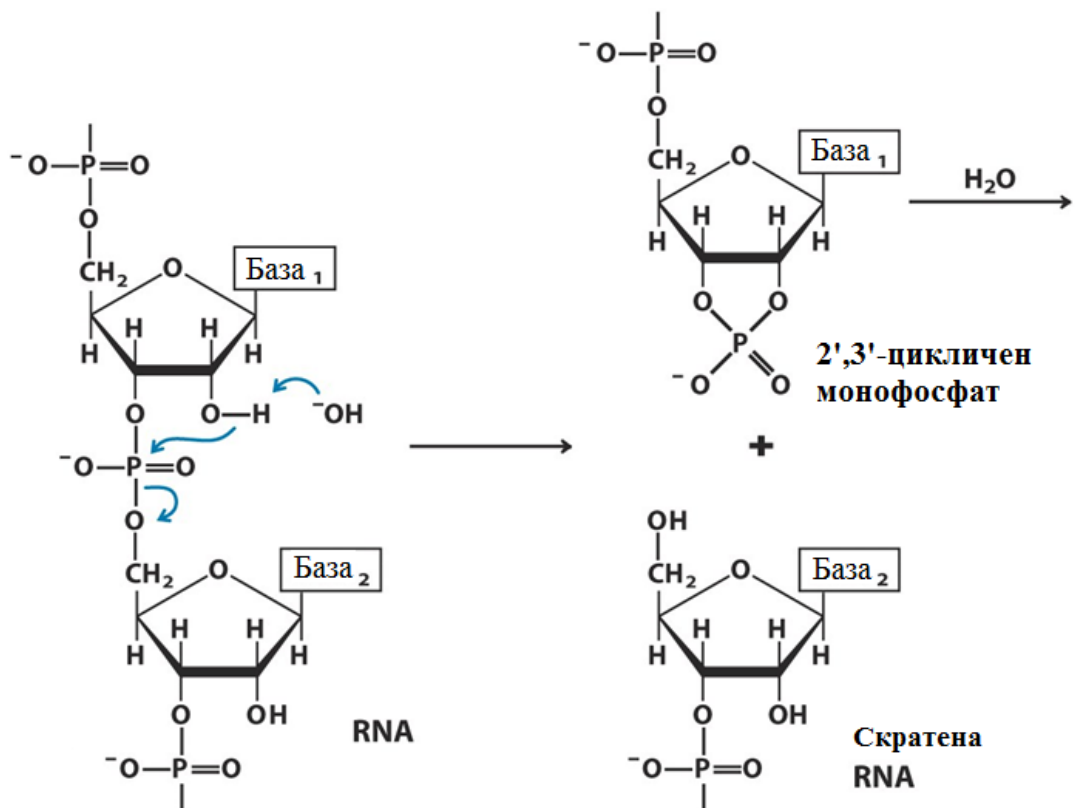
- ▶ Со загревање се врши целосна денатурација на примероците од DNA.
- ▶ Топлите раствори се мешаат и се оставаат бавно да се ладат.
- ▶ Поголем дел од комплементарните полинуклеотидни низи од ист вид ќе се анелираат до нативните DNA молекули.
- ▶ Доколку DNA молекулите од различните видови имаат **значителна сличност на нуклеотидната секвенца** (висок степен на комплементарност), постои тенденција за образување на **хибридни дуплекси**.
- ▶ **Нуклеинските киселини од различни видови можат да образуваат хибриди, а процесот се нарекува хибридизација.**



Хемиски својства на нуклеински киселини

- ▶ Неензимски промени:
 - ▶ Хидролиза со киселини и бази
 - ▶ 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.
- ▶ Ензимска хидролиза

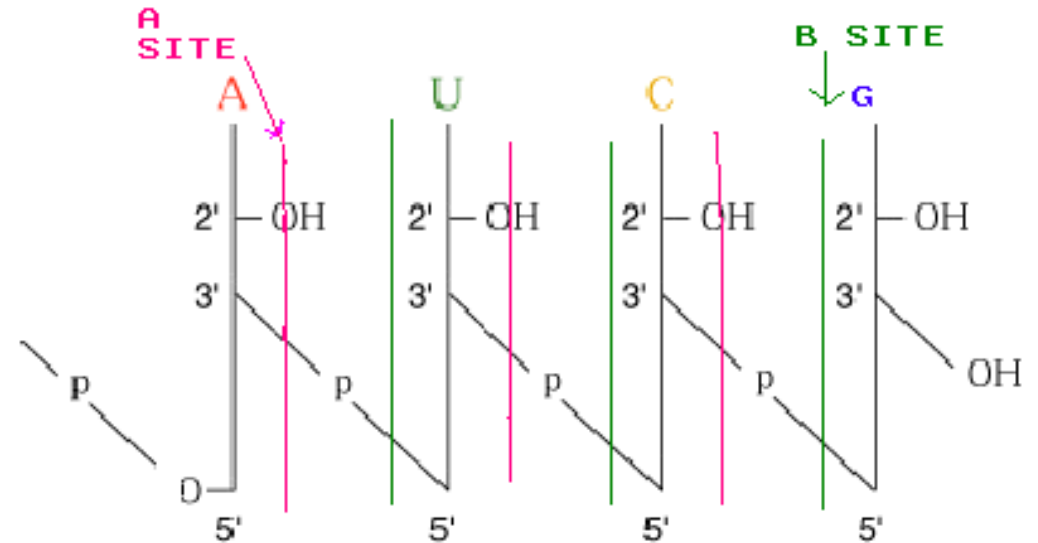
Алкална хидролиза



- ▶ При **базно-катализирана хидролиза на RNA** се **раскинува фосфодиестерската врска меѓу рибонуклеотидите** во шеќерно-фосфатната низа.
- ▶ Прв продукт на хидролизата е 2',3'-цикличесен монофосфатен дериват.
- ▶ Со понатамошна 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' .
- ▶ **DNA е отпорна кон алкална хидролиза.**

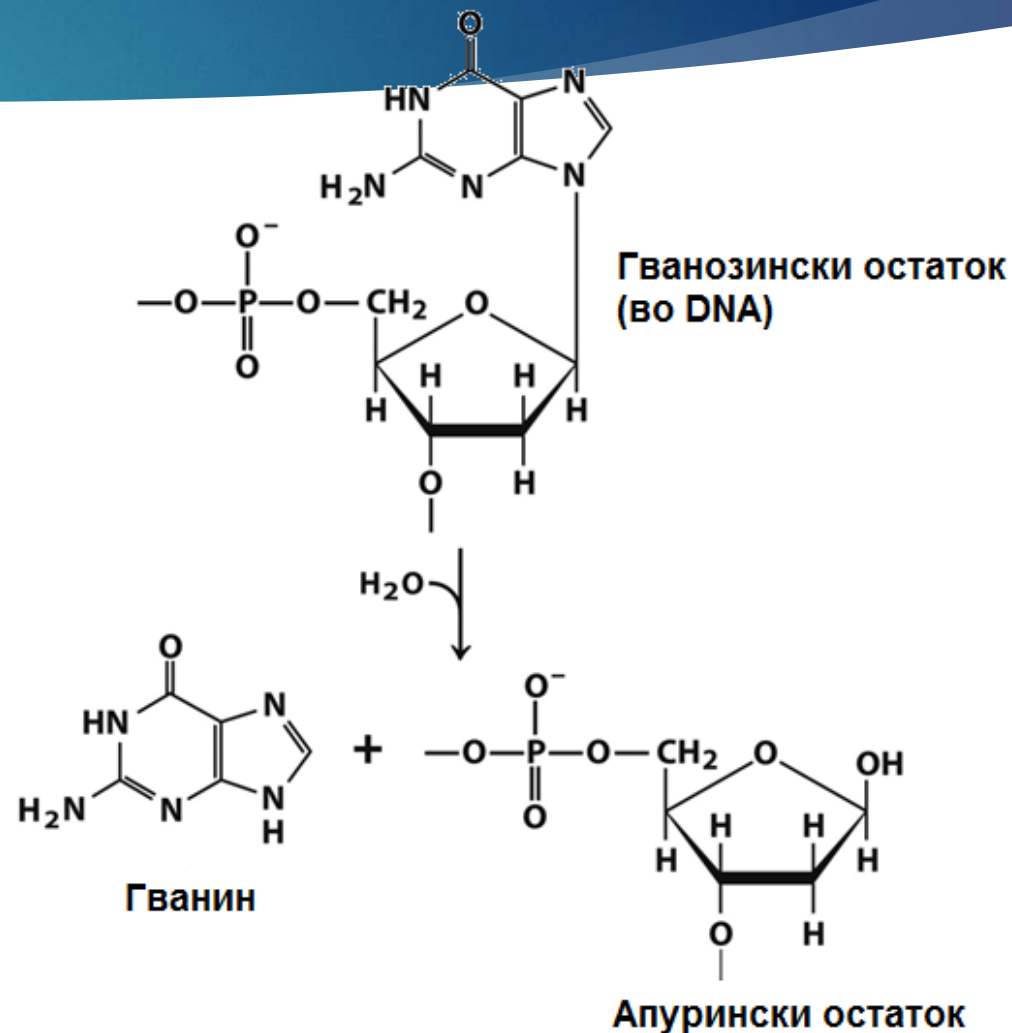
Хидролиза на RNA

- ▶ 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.



Хидролиза во кисела средина

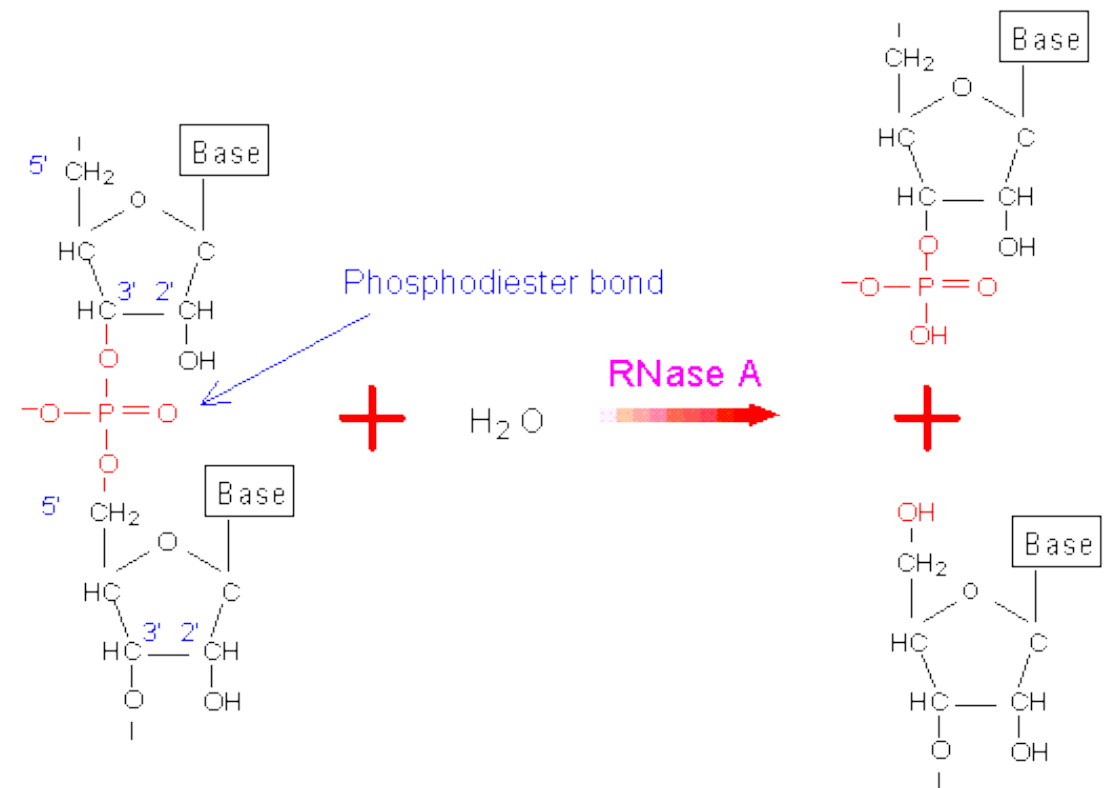
- ▶ Со хидролиза на *N*- β -гликозидната врска меѓу базата и пентозата се добиваат **абазни киселини** : **апурински** и **апириимидински киселини**.
- ▶ Експериментално, депуринацијата се забрзува со додавање на разредена киселина при pH = 3.
- ▶ По депуринацијата деоксирибозата преминува од фуранозна во алдехидна форма.

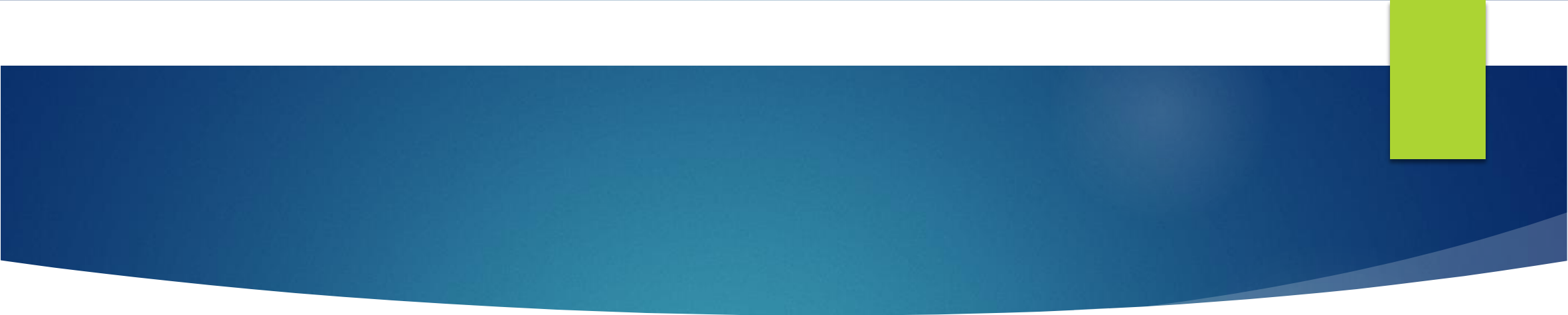


Ензимска хидролиза на нуклеински киселини

- ▶ Ковалентниот скелет во DNA и RNA бавно и неензимски хидролизира.
- ▶ 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)



- 
- ▶ 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.

Деаминирање на DNA

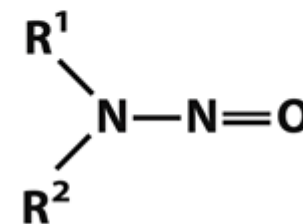
- ▶ Некои од продуктите на индустриските процеси претставуваат реактивни хемиски агенси кои може да предизвикаат оштетувања на DNA.
- ▶ Такви се **деаминирачките агенси: прекурсорите на азотеста киселина и бисулфатот**.
- ▶ Некои од овие реагенси се користат во прехранбената индустрија како конзерванси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



Натриум нитрит



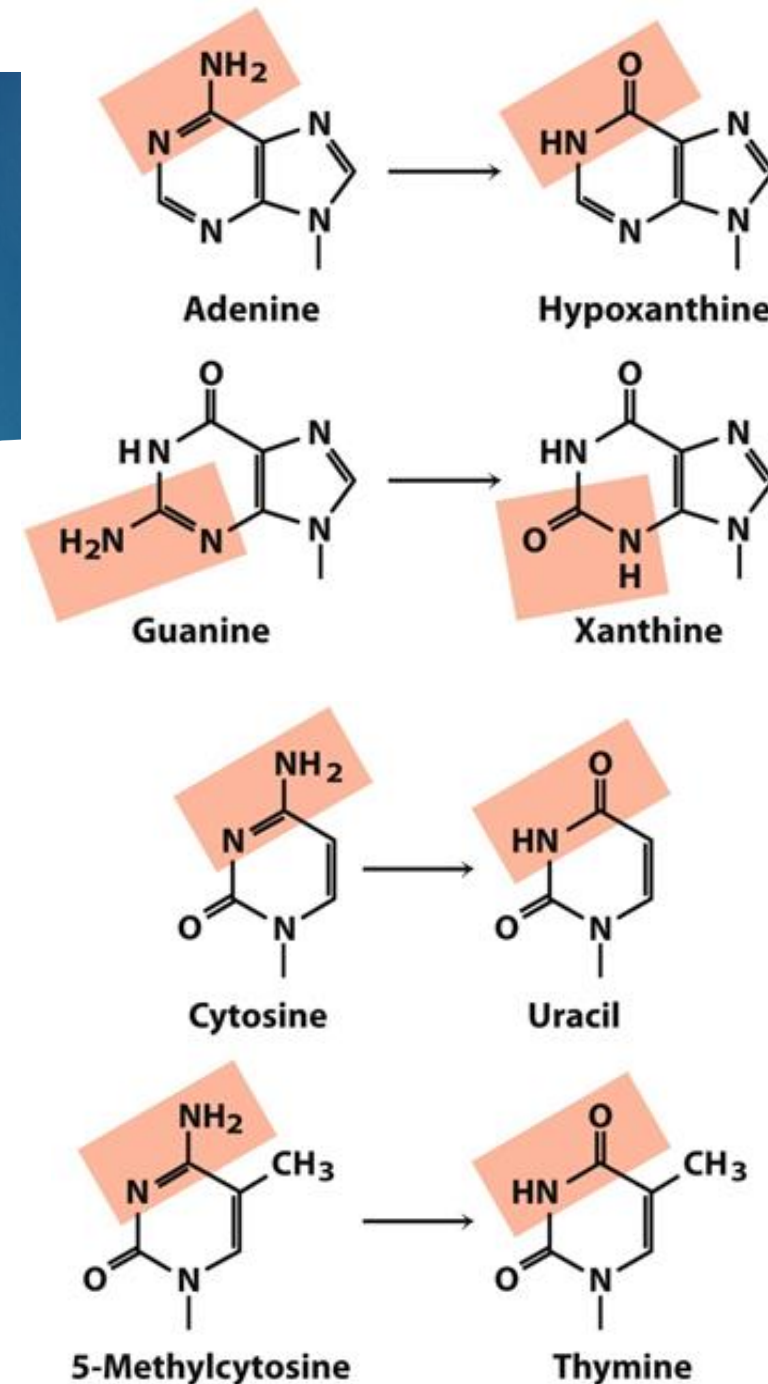
Натриум нитрат



Нитрозамин

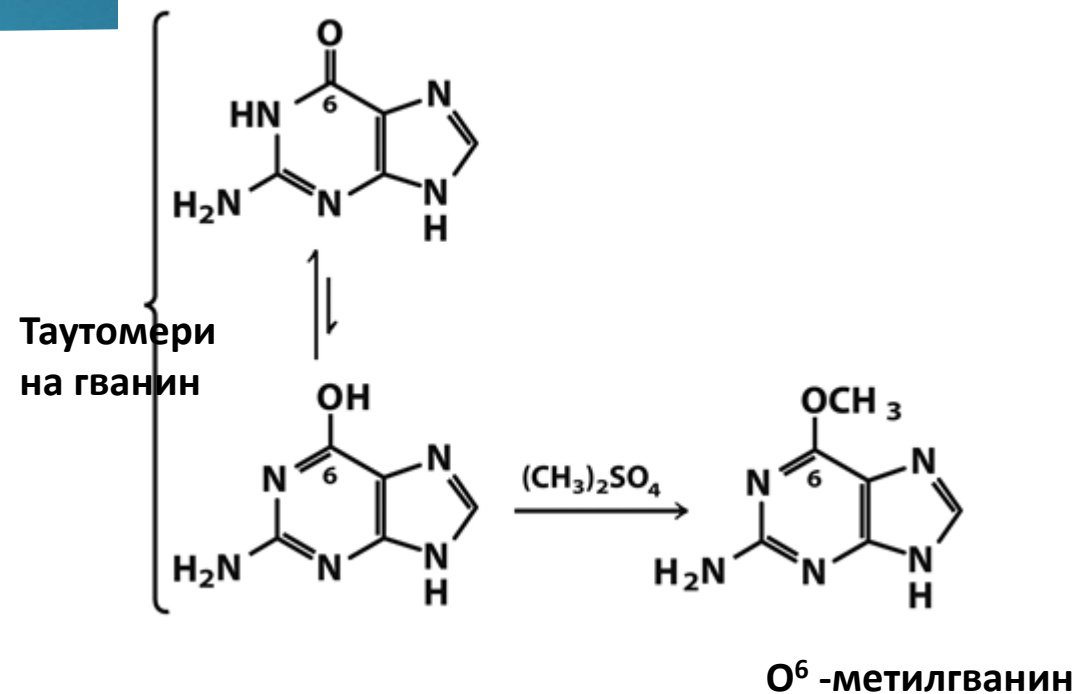
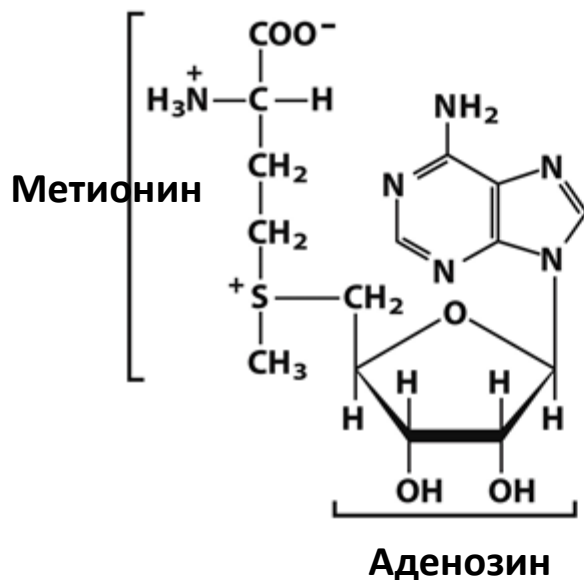
Деаминација на азотните бази

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



Алкилирање на DNA

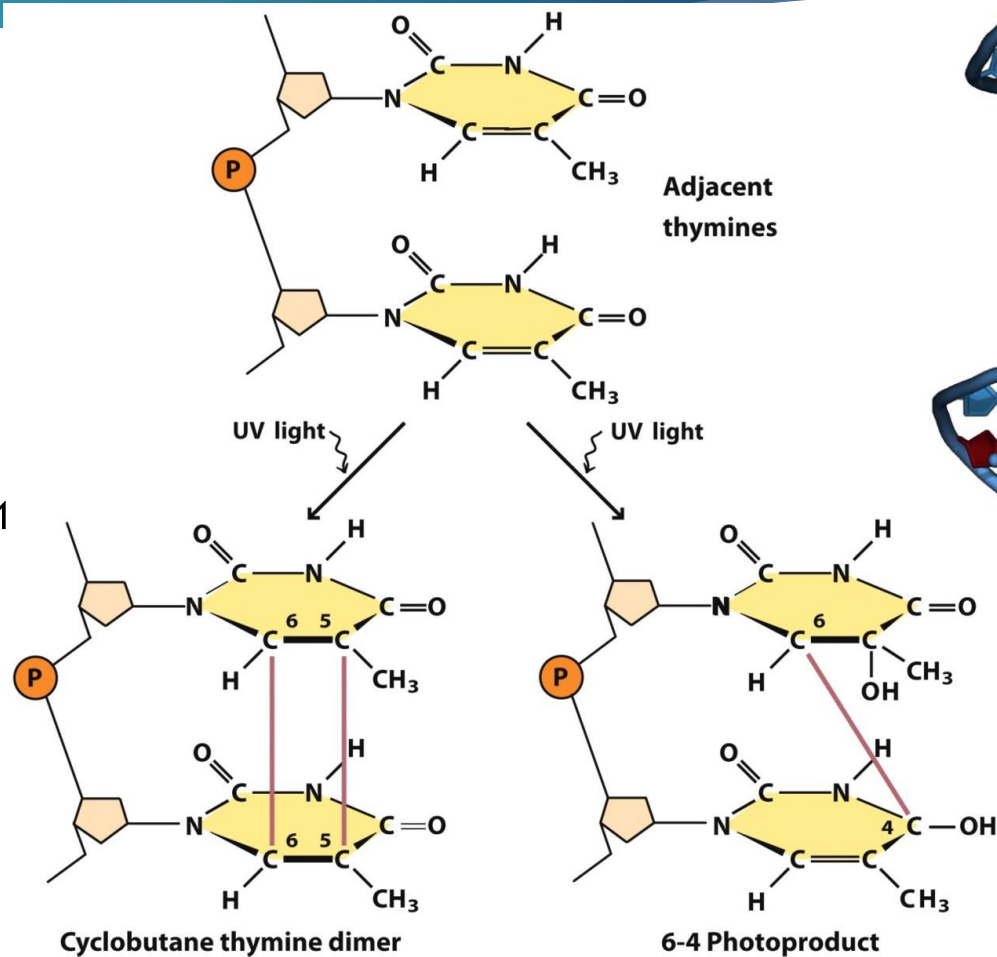
- ▶ **Алкилирачки агенси**
- ▶ Можат да ја изменуваат структурата на некои бази во молекулата на DNA.



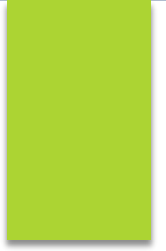
- ▶ Диметилсулфат може да го метилира гванинот и да се добие О⁶-метилгванин, кој не може да се спарува со цитозинот.

Димеризација на пиримидини

- 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.

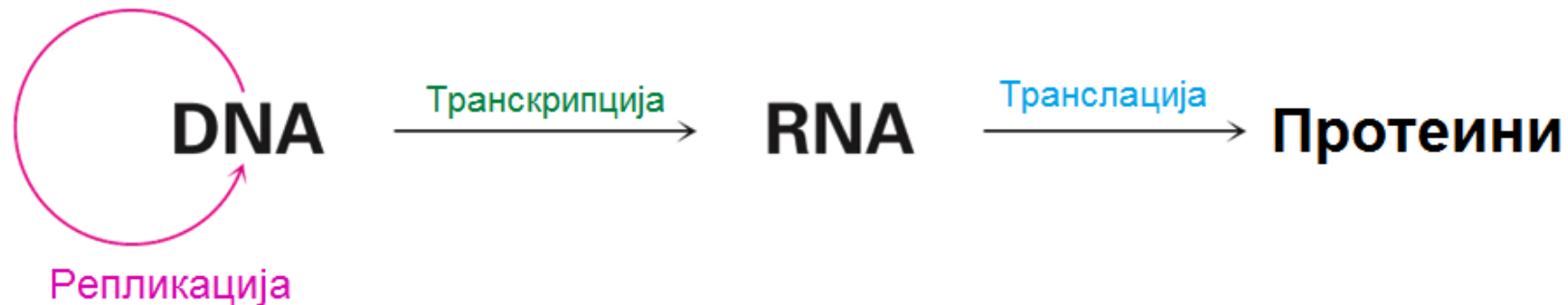


Нуклеински киселини: наследност и биосинтеза на протеини



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.



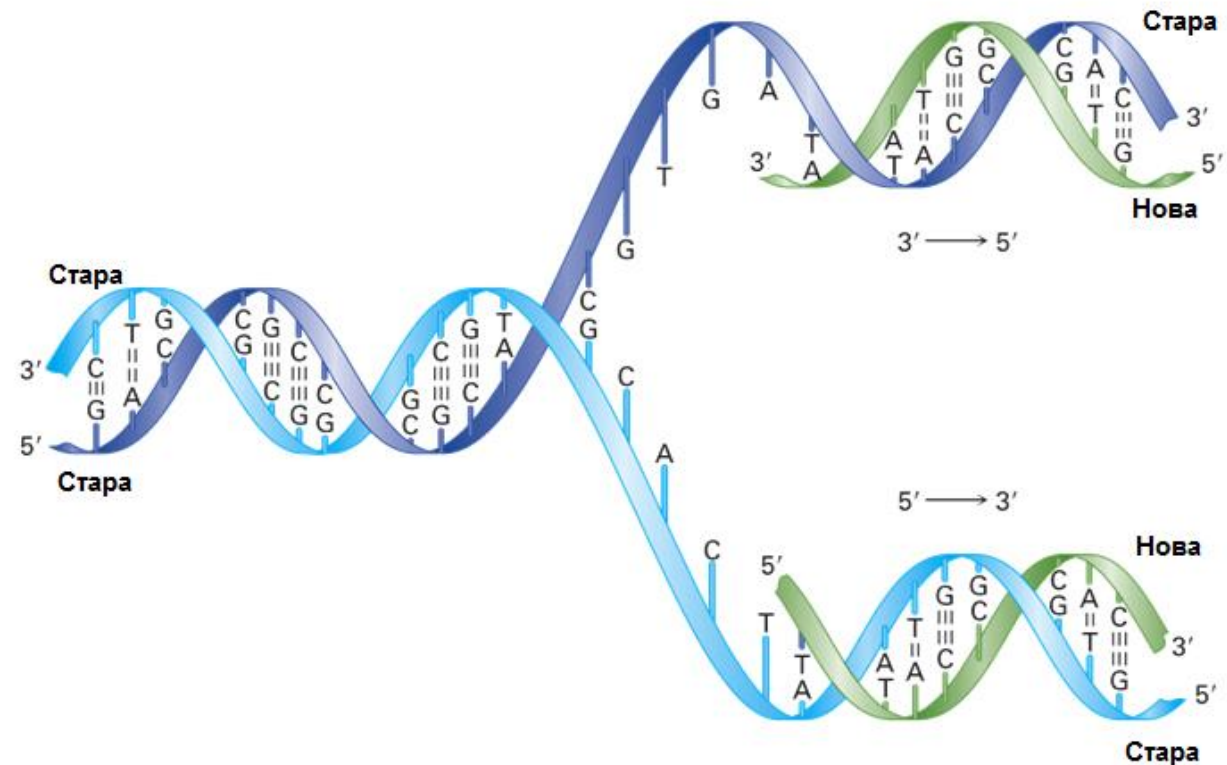
Пренесување на генетските информации

При пренесувањето на генетските информации се одвиваат три фундаментални процеси:

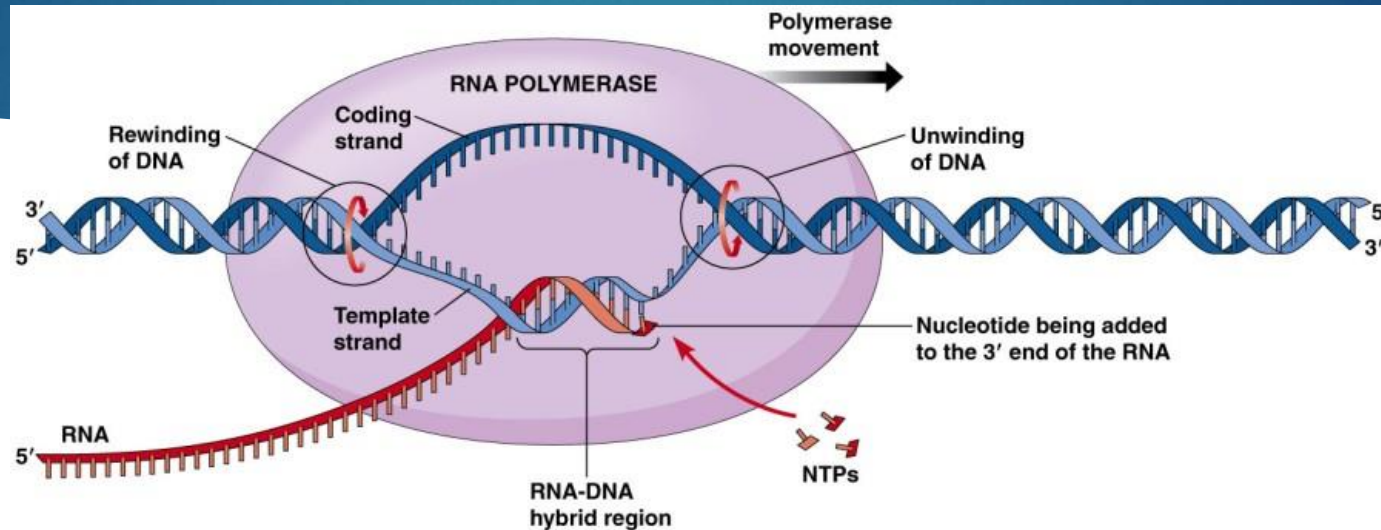
- ▶ **Репликација** – процес на добивање на идентични копии на DNA.
- ▶ **Транскрипција** – читање на генетските информации и нивно пренесување од јадрото до рибозомите, каде се одвива синтезата на протеини.
- ▶ **Транслација** – декодирање на генетската информација за синтеза на протеини.

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**.



Транскрипција на DNA



- ▶ Преку процесот на **транскрипција се копираат секвенците од DNA во информациона mRNA.**
- ▶ 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.
- ▶ Образованата mRNA, претставува еден вид копија на кодирачката (нешаблонска) низа, со таа разлика што наместо тимин T ја содржи базата урацил U.

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.**
- Според антикодонот на tRNA, се определува која **аминокиселина ќе се сврзе за слободната 3' –ОН група на рибозата преку естерска врска**, на 3' крајот од tRNA.
- Пр. Антикодон – базната секвенца GAA има комплементарен кодон UUC од mRNA, кој го диригира сврзувањето на аминокиселината фенилаланин кон полипептидната низа на протеинот.

