

Нуклеинови киселини

Цели

Цели на преподавателя: Да се разгледа значението, съставът и структурата на нуклеиновите киселини и да се дадат примери за приложението на тези познания в медицината.

След работа с този раздел студентите ще могат да постигнат следните учебни цели:

А. Знания

- 1) да дадат дефиниция за нуклеинови киселини;
- 2) да дефинират що е нуклеозид и нуклеотид и да изброят съставните им части;
- 3) да дефинират термина "минорни бази" и да дадат примери за минорни пуринови и пиримидинови бази;
- 4) да дефинират що е цикличен нуклеотид;
- 5) да дадат примери за ролята на свободните нуклеотиди;
- 6) да посочат примери за аналози на пуриновите и пиримидиновите бази като антивирусни и антитуморни агенти;
- 7) да дефинират фосфодиестерната връзка между нуклеотидите в нуклеиновите киселини;
- 8) да дефинират какво е първична структура на НК;
- 9) да опишат особеностите и конформацията на ДНК и на различните видове РНК (иРНК, рРНК, тРНК, мяРНК);
- 10) да обяснят накратко какво представляват хромозоми, хроматин, нуклеозоми, рибозоми;

Б. Разбирания

- 1) да обяснят лактим-лактамна тавтомерия при базите и нейното значение;
- 2) да обяснят значението на минорните бази;
- 3) да разбират каква е връзката между базата и пентозата в нуклеозида и каква е връзката между пентозата и фосфорната киселина в нуклеотида;
- 4) да обяснят разликата между моно-, ди- и три-нуклеозидфосфатите;
- 5) да разбират и обяснят защо аналози на пуриновите и пиримидиновите бази служат като антивирусни и антитуморни агенти;
- 6) да разбират и обяснят особеностите на полинуклеотидните вериги;
- 7) да разбират и обяснят причините за вариации в конформацията на ДНК;
- 8) да обяснят биологичната роля на различните видове РНК;

9) да обяснят какво представляват генетичните болести;

10) да обяснят какво представлява хибридикация;

В. Умения

1) да пишат формулите на пуриновите и пиримидиновите нуклеозидмоно-, ди- и трифосфати, вкл. и на циклични нуклеотиди, напр. 3',5'-цикличен АМФ и 3',5'-цикличен ГМФ;

2) да представят първичната структура на нуклеинови киселини посредством структурни формули и съкратено;

3) да могат да сравняват първична структура на нуклеинови киселини с тази на белтъци;

4) да визуализират конформацията на нуклеинови киселини в различни модели посредством програмата RasMol;

5) да прилагат знанията от този раздел за разбиране механизма и/или възможностите за потискане на злокачествен растеж и инфекции;

6) да прилагат изучената теория, за да обяснят първопричината за някои генетични болести, напр. сърповидноклетъчна анемия и фенилкетонурия;

7) да осъществяват търсене по биохимичен термин в рамките на сайта или извън сайта.

3.1. Резюме

ДНК съхраняват и предават наследствената информация от поколение на поколение. Тази информация, презаписана в РНК, се използва за синтеза на белтъци, тРНК и рРНК. Нуклеиновите киселини са хетеробиополимери, изградени от нуклеотиди, свързани помежду си с 3',5'-фосфодиестерни връзки. Нуклеотидът е производна органична структура, която съдържа база (пуринова или пиримидинова), пентоза и фосфорна киселина. При свързване на базата с пентоза чрез N-гликозидна връзка се образува нуклеозид. Връзката между пентозата на нуклеозида и фосфорната киселина е естерна. ДНК съдържат дезоксирибоза, а РНК - рибоза. Пуриновите бази са аденин (А) и гуанин (Г). Пиримидиновите бази са урацил (У), цитозин (Ц) и тимин (Т). В ДНК участват А, Г, Ц и Т. В РНК участват А, Г, Ц и У. Като свободни съединения нуклеотидите имат важна роля в метаболизма.

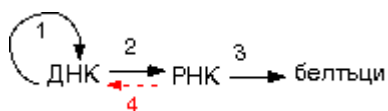
ДНК са високомолекулни структури, изградени от две комплементарни и антипаралелни вериги. Моделът на Watson и Crick за двойната спирала на ДНК обяснява откритите от Чаргаф закономерности за равенство в концентрацията на А и Т и на Г и Ц. Дезоксирибозо-фосфатният скелет на веригите е от външната страна на спиралата, а базите от двете вериги са насочени едни към други и свързани с водородни връзки (две между А и Т и три между Г и Ц). Денатурация на ДНК е процес, при който при увеличаване на температурата, снижаване на йонната сила, или други причини, веригите се разделят. При бавно охлаждане е възможна ренатурация. По-издържливи на денатурация са ДНК, в които двойките Г-Ц преобладават над А-Т. Вследствие вариации в конформацията на нуклеотидите, ДНК може да бъде в Z-, B- и A-форма. При физиологични условия преобладава B-формата. В ДНК има специфични (около 75 %) и повтарящи се (около 25 %) секвенции. Наличието на специфични мотиви (повтори) в ДНК може да е причина за вариации в конформацията като огъване, фуркетни и други форми, тройно- и четворноверижни участъци. Пакетирането на ДНК започва от нуклеозомите, минава през нишки с диаметър 10 и 30 nm и през други по-висши структури достига до митотичните хромозоми или интерфазния хроматин.

Разгледани са и характерните особености в структурата на иРНК, рРНК, тРНК, необходими за осъществяване на тяхната функция при реализиране на генетичната информация, както и структурата на малката и голямата субединица на рибозомите.

Структурни аналози на бази или техни производни имат приложение за потискане на туморен растеж или микробни инфекции.

3.2. Видове и биологична роля

Нуклеиновите киселини са хетеробиополимери с изключителна биологична роля, отразена в т.н. централна догма на молекулната биология, формулирана от Франсис Крик (фиг. 3-1).



Фиг. 3-1. "Централна догма", формулирана от Ф. Крик за ролята на нуклеиновите киселини за съхраняване и предаване на наследствената информация.

1- репликация на ДНК, 2 - транскрипция на ДНК; 3 - транслация на информацията; 4 - обратна транскрипция.

Дезоксирибонуклеиновите киселини (ДНК) съхраняват и предават наследствената информация от едно поколение на друго, а освен това определят свойствата на живата клетка чрез регулиране експресията на генетичната информация, главно чрез упражняване на контрол върху синтеза на рибонуклеинови киселини (РНК) и белтъци.

Синтезата на нова идентична ДНК или предаването на наследствената информация от едно поколение на друго (процес 1 на схемата) се означава като репликация на ДНК. Презаписването или транскрипцията на информацията (процес 2) представлява синтеза на РНК. Превеждането или транслацията на информацията (процес 3) представлява синтеза на белтъци. В някои вируси е възможен и обратен поток на информацията от РНК към ДНК (процес 4) -обратна транскрипция.

Различните видове РНК участват в белтъчната биосинтеза, някои от тях действат като катализатори. В някои вируси РНК, а не ДНК, са носители на генетичната информация - напр. ретровируси. Такъв е вирусът, причиняващ СПИН (HIV). Обмяната и функциите на нуклеиновите киселини са разгледани в глави 12-15.

3.3. Състав на нуклеиновите киселини. Структура на нуклеотидите

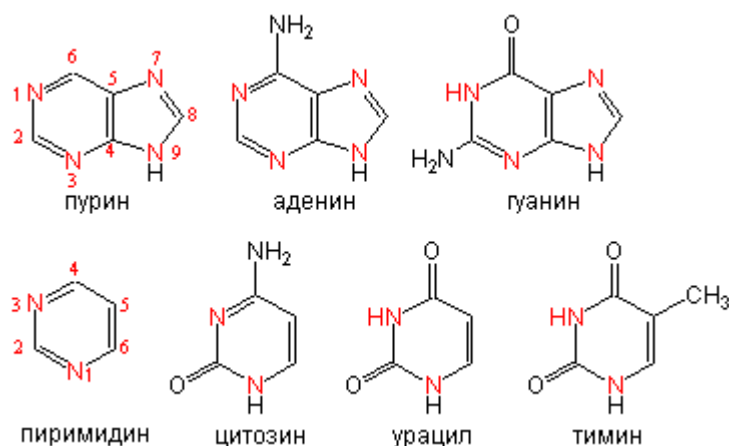
За разлика от белтъците, които са изградени от основни органични структури (аминокиселини), нуклеиновите киселини са изградени от нуклеотиди, които са производни органични структури.

Нуклеотидът е изграден от азотна база, пентоза и фосфорна киселина.

3.3.1. Пуринови и пиримидинови бази

На фиг. 3-2 са представени главните азотни бази в нуклеиновите киселини: две пуринови - аденин (А) и гуанин (Г) и три пиримидинови - цитозин (Ц), урацил (У) и тимин (Т).

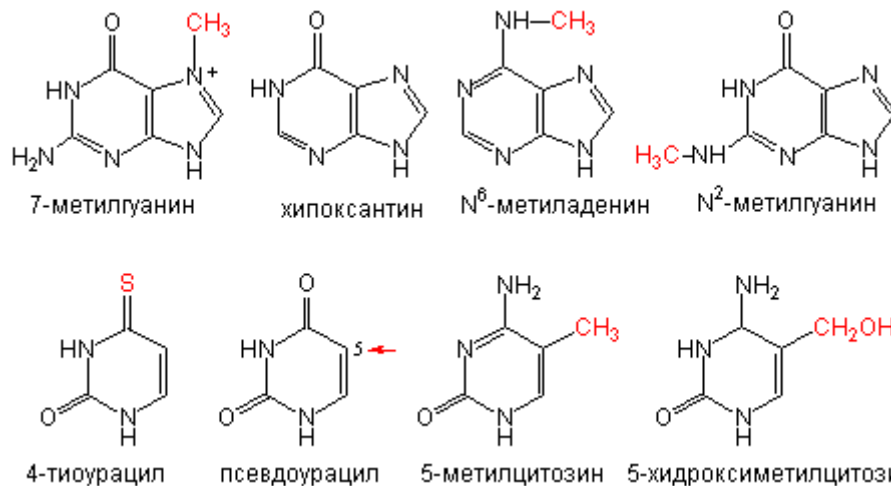
Номерацията на атомите в пуриновия пръстен е, както следва: в 6-атомния пръстен е обратно на часовниковата стрелка, а в 5-атомния пръстен по часовниковата стрелка. Номерацията в пиримидиновия пръстен е по часовниковата стрелка.



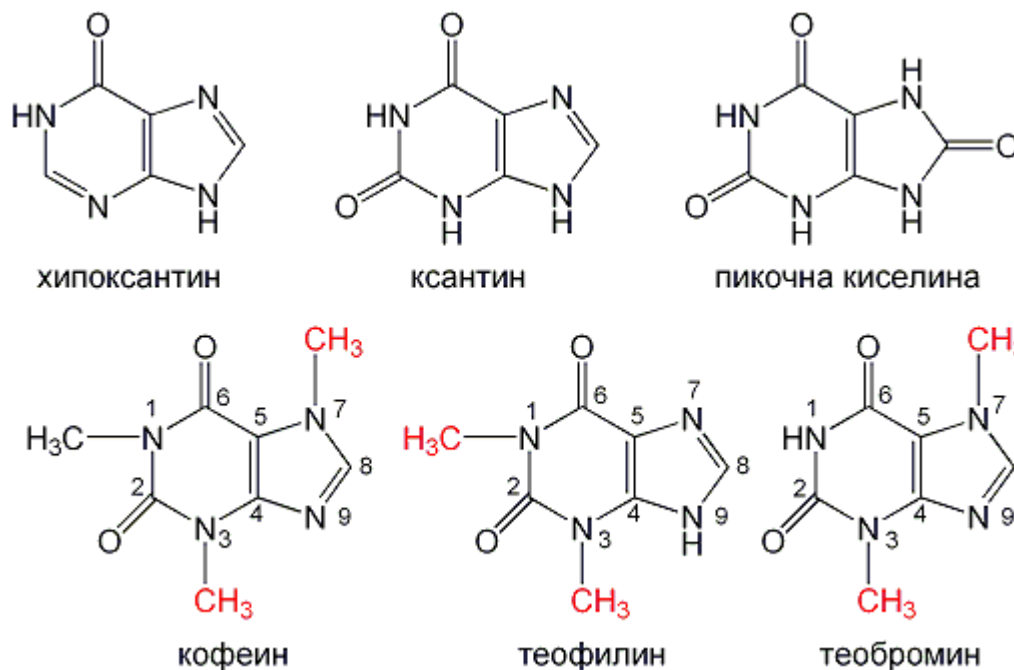
Фиг. 3-2. Пуринови и пиримидинови азотни бази в нуклеиновите киселини.

Освен главните бази, в нуклеиновите киселини има в значително по-малки количества и други - т. н. минорни бази (фиг. 3-3). Тези бази са химически модифицирани (метилювани и други) производни на главните бази. Те имат важно физиологично значение - служат за разпознаване на олигонуклеотиди, за регулиране полуживота на РНК, а също и за разпознаване на "свои" от "чужди" бази, т.е. в някои случаи метилирането има защитна функция - метилираните бази се възприемат от ДНК-разграждащи ензими (рестриктази) като свои. Разграждат се само неметилювани (чужди) бази. Метилирането в нуклеиновите киселини не е случайно, то се извършва в определени участъци под действие на специални ензими. По-често се метилират А и Ц, отколкото Г и Т. В състава на секвенцията 5'-ГАТ-3' А може да бъде метилиран и това е индикация за вярна/стара верига при поправяне на грешки при репликация на ДНК. В еукариоти около 5 % от Ц е метилиран, най-вече в ЦГ секвенции. Често степента на метилираните ГЦ участъци е обратно пропорционална на степента на генна експресия.

Съществуват и бази, които не участват в състава на нуклеиновите киселини, но имат значение в или за организма (фиг. 3-4). При разграждане на нуклеотиди се получават базите хипоксантин и ксантин, които се окисляват до крайния продукт пикочна киселина. В кафето, чая и какаото се съдържат базите кофеин, теофилин, теобромин.



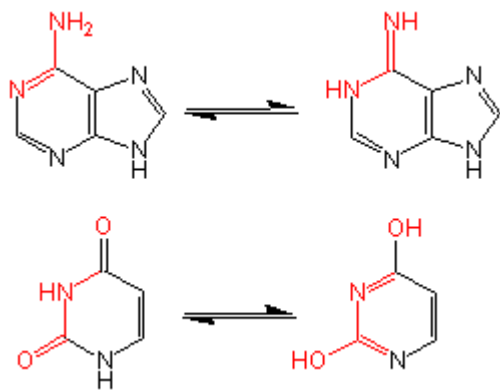
Фиг. 3-3. Примери за минорни бази в РНК (7-метилгуанин, хипоксантин, 4-тио-урацил, псевдоурацил) и в ДНК (N⁶-метиладенин, N²-метилгуанин, 5-метилцитозин и 5-хидроксиметилцитозин). Псевдоурацил е идентичен с урацил, но в нуклеозида псевдоуридин (вж т.3.3.4) за свързване с пентозата участва не N¹, а C⁵.



Фиг. 3-4. Примери за бази, които не участват в състава на нуклеиновите киселини, но имат значение в или за организма.

3.3.2. Тавтомерия при базите

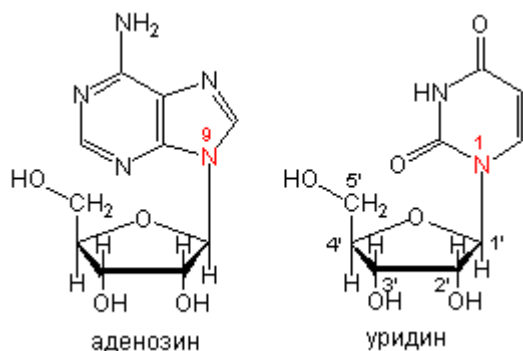
При наличие на кето (оксо) и amino-заместители в ароматните ядра на пурини и пиримидини се наблюдава лактам-лактимна (кето-енолна) и amino-имино тавтомерия, както е представено на фиг. 3-5. При физиологични условия преобладават лактамните и amino-формите. Докато в пуриновите бази при N⁹ има циклична група независимо в коя форма са, то при пиримидиновите циклична имино-група при N¹ има само в предпочетените тавтомери. А тези атоми са важни за свързване с пентозата.



Фиг. 3-5. Амино-имино и лактам-лактимна (кето-енолна) тавтомерия при пурина и пиримидини. При физиологични условия преобладават amino-формите и лактамните форми.

3.3.3. Син и анти-конформери при рибо- и дезоксирибонуклеозиди

При свързване на база и пентоза се получава нуклеозид. Атомите в пентозата се номерират с римове ('). Връзката между базата и пентозата е β -N-гликозидна. На фиг. 3-6 са дадени един пуринов нуклеозид (аденозин) и един пиримидинов нуклеозид (уридин).



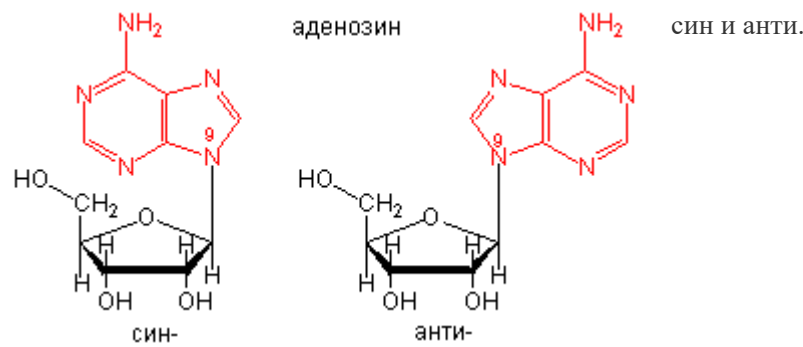
Фиг. 3-6. Пуринов нуклеозид (аденозин) и пиримидинов нуклеозид (уридин).

N-гликозидната връзка в нуклеозидите се получава при обезводняване на цикличната NH-група при N^9 в пуриновата база (или N^1 в пиримидиновата база) и гликозидната HO-група при $C^{1'}$ -атом в пентозата.

N-гликозидната връзка в пуриновите нуклеотиди се получава при обезводняване на NH-група при N^9 в базата и гликозидната HO-група при $C^{1'}$ -атом в пентозата. При пиримидиновите нуклеозиди връзката е между N^1 в базата и $C^{1'}$ -атом в пентозата. Пуриновите нуклеозиди имат окончание -озин (аденозин, гуанозин), а пиримидиновите имат окончание -идин (уридин, тимидин, цитидин).

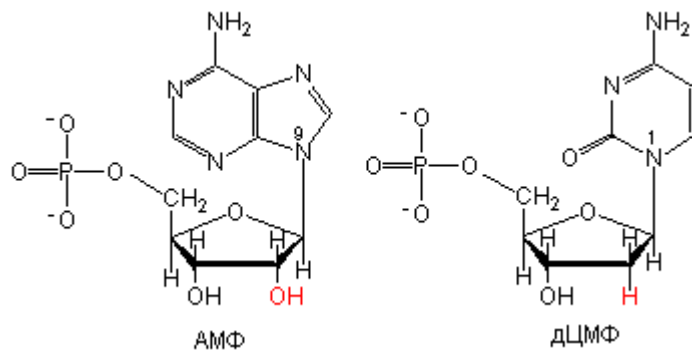
Нуклеозидите могат да съществуват в две конформационни форми (син и анти). Преобладават анти-конформерите. На фиг. 3-7 са дадени двете конформационни форми на аденозин.

Фиг. 3-7. Аденозин в конформация



3.3.4. Нуклеотиди - номенклатура, заряд, спектри

При свързване на нуклеозид с фосфорна киселина се получава нуклеотид. На фиг. 3-8 са дадени рибонуклеотидът АМФ и дезоксирибонуклеотидът дЦМФ. Връзката между пентозата и киселината е естерна. В рибонуклеозидите има три възможни позиции за фосфорилиране: при $C^{2'}$, $C^{3'}$ и $C^{5'}$ -атоми. В дезоксирибонуклеозидите има две възможни позиции за фосфорилиране: при $C^{3'}$ и $C^{5'}$ атоми.

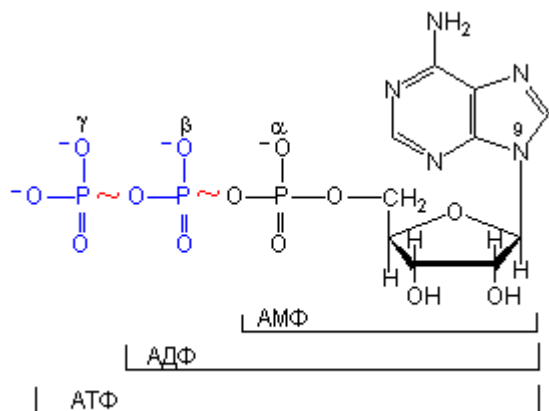


Фиг. 3-8. Структура на рибонуклеотида аденозин-5'-монофосфат (АМФ) и дезоксирибонуклеотида дезоксицитидин-5'-монофосфат (дЦМФ).

В природата преобладават нуклеозид-5'-фосфатите. В съкратеното название на нуклеотидите, напр. АМФ, буквата А вече означава не базата аденин, а нуклеозида аденозин. Ако не е указана позицията на фосфатната група, АМФ означава аденозин-5'-фосфат. Малката буква "д" пред съкращението на нуклеотида се чете "дезокси" и означава, че пентозата е дезоксирибоза, напр. дЦТФ (дезоксицитидин-5'-монофосфат).

Освен нуклеозид-монофосфати, съществат и нуклеозиддифосфати (АДФ, ГДФ, ЦДФ и пр), и нуклеозидтрифосфати (АТФ, ГТФ, ТТФ и пр.- вж фиг. 3-9), чиято биологична роля е разгледана накратко в т. 3.3.5 и в гл. 5.

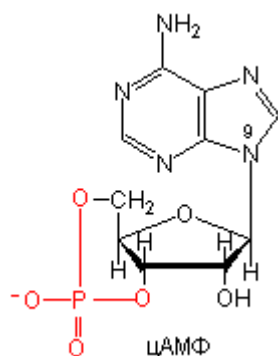
Фиг. 3-9. Структура на аденозинмонофосфат (АМФ),



аденозиндифосфат (АДФ) и аденозинтрифосфат (АТФ).

Трите фосфатни остатъка са означени с гръцките букви α , β и γ . Връзката между пентозата и α -остатъка е естерна, а връзките между α - β и β - γ остатъците са киселинно-анхидридни (макроергични или богати на енергия и затова са представени със символа \sim - вж гл. 5).

На фиг. 3-10 е представен цикличният нуклеотид 3',5'-АМФ (цАМФ), който, както и 3',5'-ГМФ (цГМФ), действа като вторичен посредник при предаване на хормонални сигнали (вж гл. 17).



Фиг. 3-10. Структура на цикличен 3',5'-АМФ (цАМФ).

Нуклеозидите не са заредени, но в мононуклеотидите pK_a -стойностите на двете кисели групи на фосфатния остатък са около 1.0 и 6.2. Затова при физиологично рН мононуклеотидите са заредени отрицателно.

Характерните спектри на пуриновите и пиримидиновите бази и на всички техни производни имат максимум на поглъщане при 260 nm в ултравиолетовата област. Те се използват за доказване и за определяне на нуклеотиди и нуклеинови киселини. Спектрите са рН-зависими. Поглъщането при 260 nm обяснява мутагенното действие на ултравиолетовата светлина.

Пуриновите и пиримидиновите бази лесно се разделят чрез различни техники: хартиена и йонообменна хроматография, електрофореза. С HPLC-хроматография лесно се разделят и определят дори наномоларни количества от базите.

3.3.5. Роля на нуклеотидите

Нуклеотидите са градивните единици на нуклеиновите киселини.

Освен това като свободни нуклеотиди те имат съществени функции:

1) Нуклеозид-дифосфатите и нуклеозид-трифосфатите са с висок потенциал на групов пренос (съдържат киселинно-анхидридни фосфатни връзки, които са макроергични или богати на енергия връзки - вж глава 5). Донатори са на енергия за осигуряване на многобройни биосинтези и други ендергонични процеси.

2) Участие в метаболизма, например:

- уридилите нуклеотиди са необходими за обмяна на въглехидрати;
- цитидилите нуклеотиди са необходими за обмяна на фосфолипиди;
- гуанилите са необходими за белтъчна биосинтеза и глюконеогенеза.

3) Участват в състава на по-сложни коензими, чиито формули са дадени в глава 5. Тези коензими са никотинамидаденин динуклеотид (НАД окислен и редуциран), никотинамидаденин динуклеотидфосфат (НАДФ окислен и редуциран), флавинадениндинуклеотид (ФАД окислен и редуциран) и коензим А (КоА).

4) Имат регулаторен ефект, напр. съотношението АДФ/АТФ регулира скоростта на окисление в митохондриятата дихателна верига.

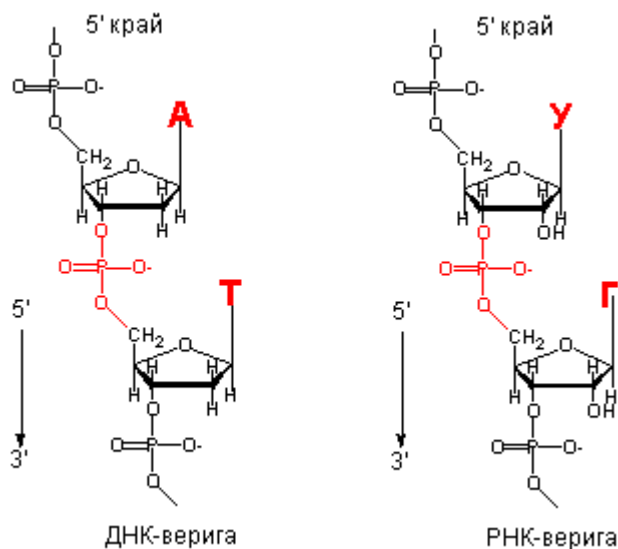
5) Някои нуклеотиди действат като алостерични ефектори (инхибитори или активатори) върху различни ензимни активности.

6) Цикличните нуклеотиди цАМФ и цГМФ участват в трансдукцията или препредаването на хормонални сигнали, а също и като активатори на транскрипция на някои гени.

3.4. Първична структура на нуклеиновите киселини

Първичната структура на нуклеиновите киселини се определя от последователността на нуклеотидите в полинуклеотидната верига. Първичната структура определя биологичните свойства на нуклеиновите киселини. В полинуклеотидните вериги нуклеотидите са свързани помежду си чрез ковалентни 3', 5'-фосфодиестерни връзки (фиг. 3-11).

Фиг. 3-11. Полинуклеотидни вериги в ДНК и РНК. Нуклеотидите са свързани чрез 3', 5'-фосфодиестерни връзки.



Полинуклеотидните вериги в еукариоти са отворени вериги с два различни края, линейни, неразклонени. Разнообразието в различните вериги се дължи на различното редуване на базите. Скелетът на всяка полинуклеотидна верига е еднакъв поради монотонно редуване на фосфатни и пентозни остатъци, свързани чрез 3',5'-фосфодиестерни връзки. Веригите са полярни (имат 2 различни края: 5'-край и 3'-край). В прокариоти нуклеиновите киселини могат да бъдат линейни или кръгови.

ДНК се отличават от РНК по молекулна маса, по пентозата, по пиримидиновите бази, по локализация в клетката и по функциите. Пентозата в ДНК е 2'-дезоксирiboза, а в РНК е рибоза. Цитозин, аденин и гуанин участват в ДНК и РНК. Като се изключат упоменатите в т. 3.3.1. минорни бази, като главна база урацил участва само в РНК, а тимин само в ДНК.

3.5. Особенности и конформация на ДНК

3.5.1. Размери и локализация на ДНК в клетката

Единствената хромозома на *E.coli* съдържа една двойно-верижна кръгова молекула на ДНК, съдържаща 4×10^6 двойки бази. Във висшите организми ДНК от различни тъкани на един и същи индивид е една и съща. Хаплоидният геном на всяка човешка клетка съдържа 3×10^9 двойки бази и е разделен в 23 хромозоми. Дължината на ДНК от 46-те хромозоми на соматична клетка от човек в опънато състояние би била около 2 м.

Около 99 % от ДНК в еукариоти се намира в ядрата на клетките. Ядрената ДНК в еукариоти е свързана с белтъци, образуващи комплекс, наречен хроматин, който се наблюдава през интерфазата или хромозоми по време на митозата (вж т. 3.5.8).

ДНК (около 1 %) има и в митохондриите. Човешките митохондрии съдържат 2 до 10 копия от нискомолекулна двойно-верижна циклична ДНК.

3.5.2. Модел на Watson и Crick

Появата на модела на Watson и Crick е обусловена от следните важни предпоставки:

1) Изследвайки два вида щамове на пневмококи: капсулирани (S-щам) и некапсулирани (R-щам), О. Ейвъри и сътр. показаха, че именно ДНК, а не друг компонент на капсулираните S-щамове, е носител на наследствената информация и трансформира некапсулираните R-щамове в S-щамове.

2) Изследванията на Е. Чаргаф показаха, че моларните съотношения аденин/тимин и гуанин/цитозин в ДНК са равни на единица.

Обобщавайки наличната информация и вземайки предвид рентгено-структурните изследвания на М. Уилкинс и Р. Франклин върху структурата на ДНК, Watson и Crick представиха своя модел за ядрената ДНК като линейна двуверижна молекула - двойна спирала (фиг. 3-12-I).



Фиг. 3-12-I. Модел на Watson и Crick за двойно-спиралната структура на ДНК.

> Ширината на дясно-въртящата двойна спирала е 2.0 nm, а ходът на спиралата е 3.4 nm. В един ход на спиралата има 10.5 нуклеотидни двойки. Дебелата вертикална линия представлява централната ос на спиралата. Веригите са антипаралелни и комплементарни.

А - аденин, Г - гуанин,

Ц - цитозин, Т - тимин,

Ф - фосфатен остатък,

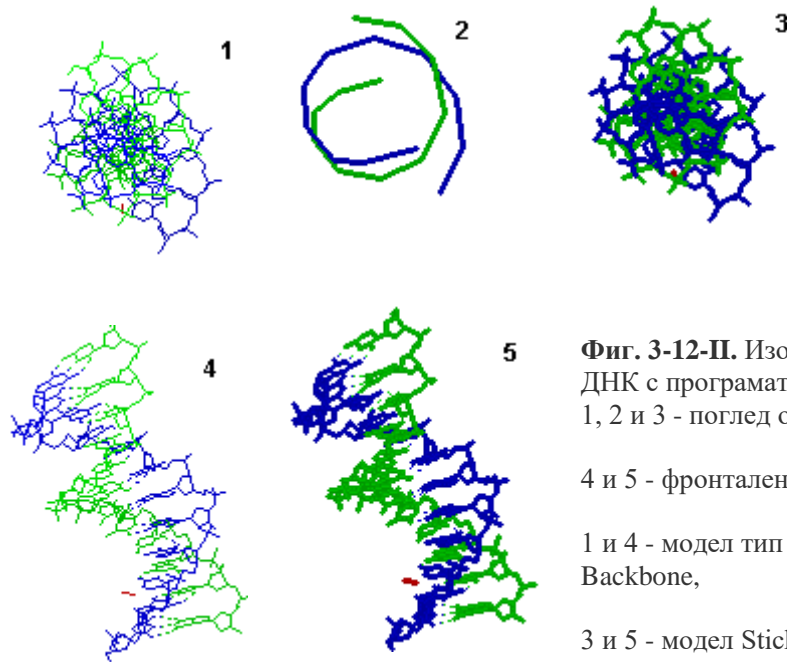
Д - дезоксирибозен остатък.

(По-късно е установено, че този модел съвпада с В-формата на ДНК - вж т. 3.5.4).

Дезоксирибозо-фосфатните скелети на двете вериги са от външната страна на спиралата, а базите от двете вериги са насочени едни срещу други във вътрешността на спиралата. Оформят се две различни бразди (вдлъбнатини) - малка и голяма, в които специфични белтъци взаимодействат с ДНК.

Две от киселинните групи на всеки фосфатен остатък са ангажирани в 3',5'-фосфодиестерните връзки, а третата киселинна група е свободна и дисоциира протон при физиологично рН. Затова всяка ДНК спирала има отрицателни заряди по повърхността.

На фиг. 3-12-II са дадени изображения на В-ДНК чрез програмата RasWin.



Фиг. 3-12-II. Изображения на част от В-ДНК с програмата RasWin [1].

1, 2 и 3 - поглед отгоре,

4 и 5 - фронтален изглед.

1 и 4 - модел тип Wireframe, 2 - модел тип Backbone,

3 и 5 - модел Sticks.

По отношение на репликацията всяка от веригите на ДНК служи като матрица за изграждане на новосинтезираща се верига.

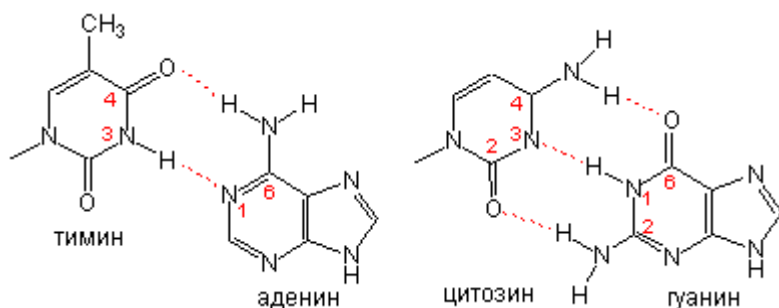
По отношение на транскрипцията само една от веригите служи като матрица за биосинтеза на РНК върху даден ген и се означава като матрична. В някои участъци на ДНК едната верига служи като матрична, а в други участъци другата верига служи като матрична, т.е. генетична информация за синтеза на РНК се ползва и от двете вериги. Комплементарната на матрицата верига се нарича кодираща и има идентична секвенция на базите с РНК, получаваща се при транскрипция, но вместо Т, в РНК има У.



На фона на изискването за максимална стабилност на двойната спирала, интересно е, че общият размер точно на двойката бази А-Т и Г-Ц е равен на диаметъра на двойната спирала. Различни фактори в двойната спирала на ДНК налагат ограничения и позволяват образуването на две водородни връзки между А и Т и три водородни връзки между Г и Ц (фиг. 3-13). От значение най-вече са:

- 1) предпочитаната анти-конфигурация на N-гликозидната връзка в нуклеотидите;
- 2) преобладаване на amino- и лактамните тавтомерни форми на базите.

Това обяснява защо комплементарни бази в двойната спирала на ДНК са именно аденин-тимин и гуанин-цитозин. Водородните връзки до голяма степен определят стабилността на двойната спирала.



Фиг. 3-13. Водородни връзки между комплементарните бази в двойната спирала на ДНК според Watson и Crick.

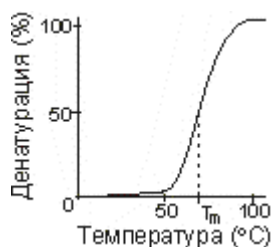
Във всяка от веригите базите, разположени в плоскости една над друга, взаимодействат помежду си чрез хидрофобни взаимодействия и чрез π -взаимодействия, което, в добавка към водородните връзки между двете вериги, също стабилизира двойната спирала.

Освен комплементарни, веригите в двойната спирала са и антипаралелни: едната верига върви в посока 5'-3', а другата в обратна посока 3'-5'.

В отсъствие на фосфодиестерази, фосфодиестерните връзки в ДНК са стабилни и изолирана ДНК може да се съхранява дълго време.

3.5.3. Денатурация и ренатурация на ДНК

Денатурацията на ДНК е процес, при който при увеличение на температурата, при снижаване солевата концентрация на разтвора, а също и в алкална среда, се разкъсват водородните връзки между базите и двете вериги се разделят. Нарушават се също и π -взаимодействията между базите във всяка верига и те остават съединени във веригата само чрез фосфодиестерните връзки. Денатурацията може да се проследи по увеличеното поглъщане на УВ светлина при 260 nm (хиперхромен ефект) или по намалението на вискозитета на разтвора. Кривата, отразяваща процента на денатурация от температурата, се нарича крива на топене (фиг. 3-14). Температурата, при която се достига 50 % денатурация, се означава като температура на прехода (T_m).



Фиг. 3-14. Крива за денатурация на ДНК в зависимост от температурата.

T_m - температура на прехода.

Денатурацията на изолирана ДНК дава сведения за относителния брой на двойките Г-Ц и А-Т. ДНК е по-устойчива на денатурация, ако съдържа повече двойки Г-Ц. Колкото е по-голям броят на двойки Г-Ц в ДНК, толкова е по-висока температурата на топене на ДНК.

Ренатурация, или обратното свързване на комплементарни, разделени при денатурация вериги, може да се извърши, ако температурата се понижи бавно. Ренатурацията е бавен процес, който зависи от срещата на комплементарни ДНК вериги.

Хибридизация се нарича специфичната реасоциация на комплементарни вериги от различен произход (напр. от различни ДНК-молекули или от ДНК и от РНК, или от различни РНК-молекули). Като експериментална техника позволява да се установяват хомологии между ДНК на различни видове (вж гл. 16).

3.5.4. Конформационни форми на ДНК вследствие вариации в конформацията на нуклеотидите

Поради вариации в конформацията на нуклеотидите, двойната спирала на ДНК е гъвкава структура, която може да съществува в няколко различаващи се форми (B, A, Z). Най-стабилна и преобладаваща при физиологични условия е форма B и моделът на Watson и Crick съвпада с тази форма. A-формата, която се образува при ниска влажност в лабораторията, прилича на B-формата, също е дясно-въртяща спирала, но е по-компактна (вместо 10 има 11 бази на един оборот). Z-ДНК е ляво-въртяща спирала. Тя може да присъства в клетката като малки участъци от общата ДНК, които съдържат редуващи се пуринови и пиримидинови нуклеотиди, включени между дълги участъци от B-ДНК. В Z-ДНК скелетът има зигзагообразен ход, а не спирален, както е в B-ДНК. И в трите форми на ДНК веригите са комплементарни и антипаралелни.

В т. 3.12 ще намерите Web-връзки към сайт с молекулни изображения на трите форми на ДНК.

3.5.5. Специфични и повтарящи се последователности в ДНК

Ориентировъчните проценти за специфичните и повтарящи се последователности в човешката ДНК са дадени в табл. 3-1.

Табл. 3-1. Специфични и повтарящи се последователности в човешка ДНК.

Последователности в ДНК	%
Общо:	100
1. Специфични	75
2. Повтори	25
2.1. Пръснати	15
2.2. Струпани	10

Повтарящите се последователности се наричат за по-кратко повтори. Повторите с висока честота са около 1 до 10 млн копия за хаплоиден геном. Те са транскрипционно неактивни

и имат структурна роля в хромозомите. Струпани са в теломерите и центромерите на хромозомите.

Повторите с умерена честота са до 1 млн копия. Към тях спадат известните като SINEs (short interspersed nuclear elements) и LINEs (long interspersed nuclear elements) секвенции в ДНК, всяка около 5 % от общата ДНК.

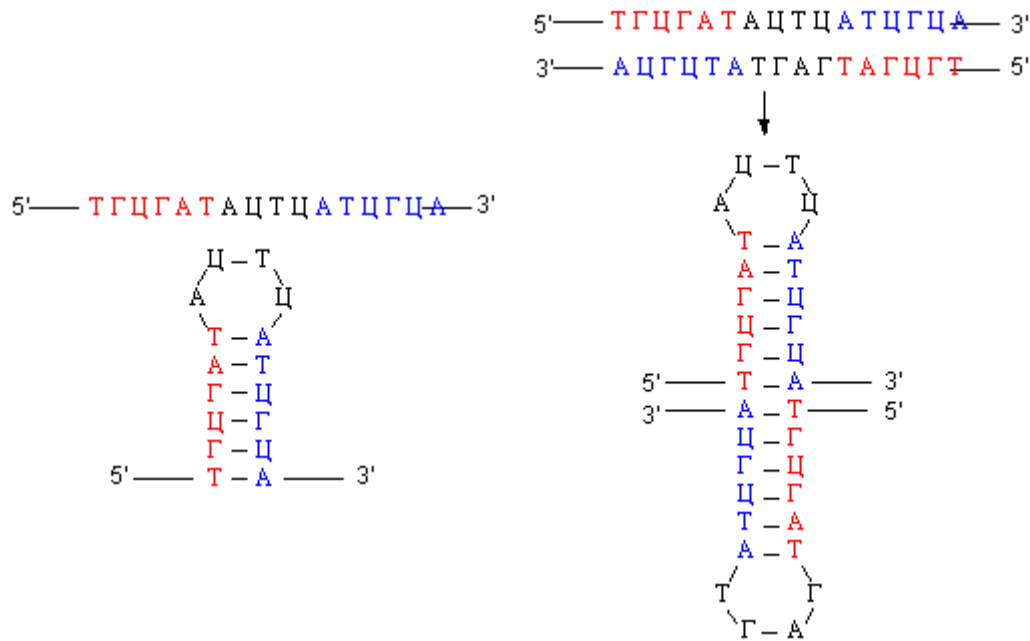
3.5.6. Вариации в конформацията на ДНК, причинени от специфични повтарящи се мотиви в секвенцията на ДНК

Наличието на специфични мотиви в некодиращата секвенция на ДНК, означавани като dos-ДНК (dos - defined ordered structures, или структури с дефиниран порядък) може да е причина за вариации в конформацията на ДНК като огъване, образуване на фуркетни и кръстовидни форми, тройно- и четворноверижни участъци. Тези мотиви включват симетрични елементи като обратни повтори, огледални повтори, прави повтори (вж табл. 3-2), а също и хомопуринови и хомопиримидинови секвенции, поли-А участъци и участъци, богати на Г.

Табл. 3-2. Видове повтори в ДНК.

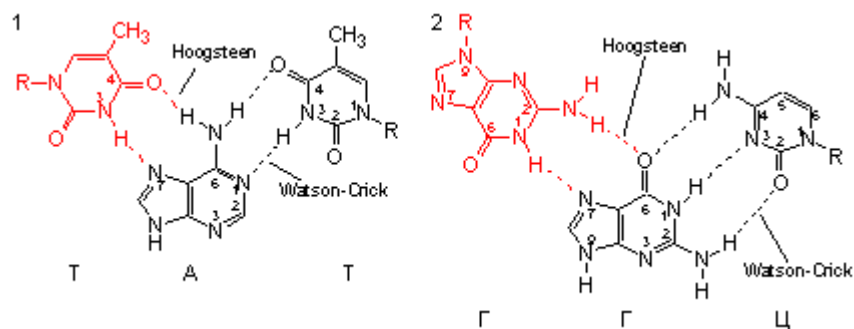
Секвенция в ДНК	Вид на повтор
5' -Г-Г-Ц-Ц- 3' 3' -Ц-Ц-Г-Г- 5'	палиндром (напълно симетричен обратен повтор)
5' <u>-Т-Т-А-Г-Ц-А-Ц-</u> <u>Ц-А-Ц-Г-А-Т-Т-</u> 3' 3' -А-А-Т-Ц- Г-Т- Г- Г -Т- Г-Ц-Т-А-А- 5'	огледален повтор
5' <u>-Т-Т-А- Г-Ц-А-Ц-</u> <u>Т-Т-А-Г-Ц-А-Ц-</u> 3' 3' -А-А-Т-Ц- Г-Т- Г-А-А-Т-Ц-Г-Т- Г- 5'	прав повтор (могат и да са отдалечени)

Секвенциите в изброените повтори са самокомплементарни и могат да образуват фуркетни форми в едната верига (фиг. 3-15 вляво) или кръстовидни форми в двете вериги (фиг. 3-15 вдясно).



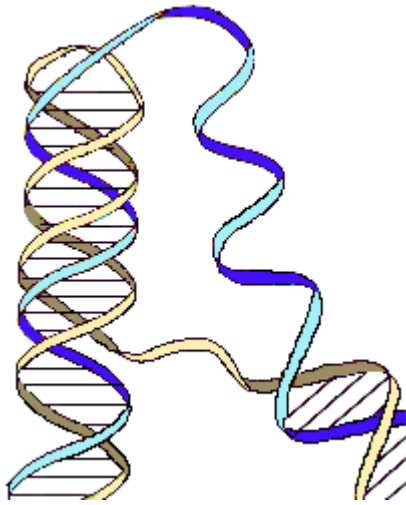
Фиг. 3-15. Образуване на фуркетни форми в една верига (вляво) и на кръстовидни форми в две вериги (вдясно) при вътрешноверижно комплементарно взаимодействие между базите от представените последователности.

Освен водородни връзки по Watson-Crick, между базите в ДНК могат да се образуват и така наречените водородни връзки по Hoogsteen (фиг. 3-16), които позволяват образуване на тройноспирални участъци в ДНК. Тези водородни връзки по Hoogsteen възникват между две полипуринови и една полипиримидинова верига, напр. Г-Г-Ц или А-А-Т, а също и между две полипиримидинови вериги и една полипуринова верига, напр. Т-А-Т или Ц-Г-Ц.



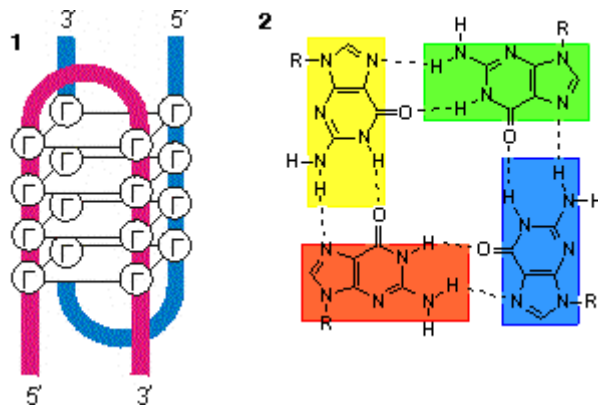
Фиг. 3-16. Водородни връзки между базите по Hoogsteen.

На фиг. 3-17 е представен тройно-верижен участък на ДНК (наричан Н-ДНК). Тройноверижни участъци от ДНК се разполагат в некодиращата част на генома и имат значение за генната регулация. Те могат да упражняват контрол върху репликацията и транскрипцията, да усилят стабилността на теломерите и да повлияват инициацията на генетична рекомбинация.



Фиг. 3-17. Тройно-верижен участък в ДНК, наричан H-ДНК.

Известни са и четворно-верижни участъци в ДНК (фиг. 3-17а). В теломерите може да се образува четворноверижна ДНК от паралелен или антипаралелен тип. Структури от паралелен тип се образуват по време на рекомбинация на ДНК, напр. в гените за тежката верига на имуноглобулини. Предпоставка за това е наличието на повтори с високо съдържание на Г. Водородните връзки между отделните вериги са от типа на Hoogsteen.



Фиг. 3-17а. Кватернерни структури в ДНК:

Вляво - Част от кватернерна структура (четворноверижен участък) в ДНК;

Вдясно - Взаимодействие между четири гуанинови бази в кватернерната структура чрез водородни връзки по Hoogsteen.

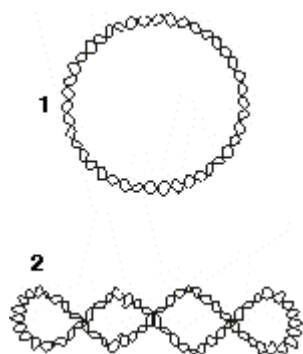
От изложеното се вижда, че ДНК не е изпъната, стабилна, монотонна и униформена структура. Обратно, ДНК образува необичайни кръстовидни структури, тройно-верижни или дори четворно-верижни участъци. При взаимодействие с хромозомни белтъци, ДНК също променя конформацията си. Тези промени в конформацията са важни за процесите на молекулно разпознаване на ДНК от ензимни и неензимни белтъци.

3.5.7. Суперспирализиране на ДНК

Суперспирализиране на ДНК възниква при огъване или извиване оста на двойната спирала на ДНК. Среща се в различна степен както при малки кръгови ДНК в прокариоти (фиг. 3-

18), така и при линейните ДНК в еукариоти. Суперспирализираната структура е напрегната за разлика от релаксираната.

Суперспирализирането е важно за постигане по-голяма компактност на ДНК (вж т. 3.5.8.) Освен това то настъпва при разтваряне на веригите при репликация (гл. 12) и транскрипция на ДНК (гл. 13). Суперспирализирането не е случаен, а регулиран процес във всяка клетка.



Фиг. 3-18. Суперспирализиране на ДНК в прокариоти.

1 - релаксирано състояние;
2 - суперспирализирано състояние.

3.5.8. Пакетиране на ДНК

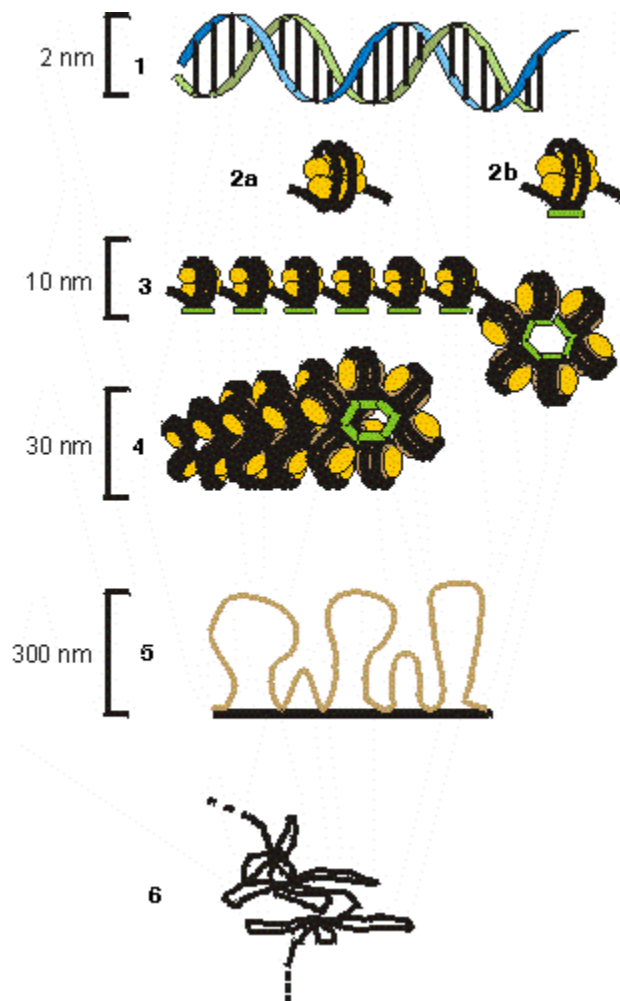
Ако ДНК в човешка клетка се изпъне, нейната дължина би била около 2 м. А диаметърът на ядрото, в което ДНК е пакетирана, е 0.006 mm.

ДНК в човешки клетки е свързана с белтъци в съотношение 1:2. Белтъците са три групи: хистоновы белтъци, нехистоновы хромозомни белтъци и ензимни белтъци, участващи в репликацията (глава 12) и транскрипцията (глава 13).

3.5.8.1. Роля на хистоновите белтъци за пакетиране на ДНК в нуклеозоми

Хистоните са консервативни белтъци, което подчертава важната им функция в еукариоти. Масата на хистоните е приблизителна равна на тази на ДНК. Има пет вида хистони: Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4. Те улесняват пакетирането на ДНК в по-малък обем, като се свързват с ДНК и изграждат по-компактни структури, наречени нуклеозоми. Организацията на нуклеозомите е представена на фиг. 3-19-2. Пакетирането на нуклеозомите в по-висши структури е описано в т. 3.5.8.2. За удобство фиг. 3-19 е представена в т. 3.5.8.1. и 3.5.8.2.

Фиг. 3-19. Пакетиране на ДНК в структури от по-висш порядък.
1 - ДНК;
2а - нуклеозома (Около октамер от хистони, съдържащ по два от хистони Н2А, Н2В, Н3 и Н4, е навита ДНК (1.75 оборота);



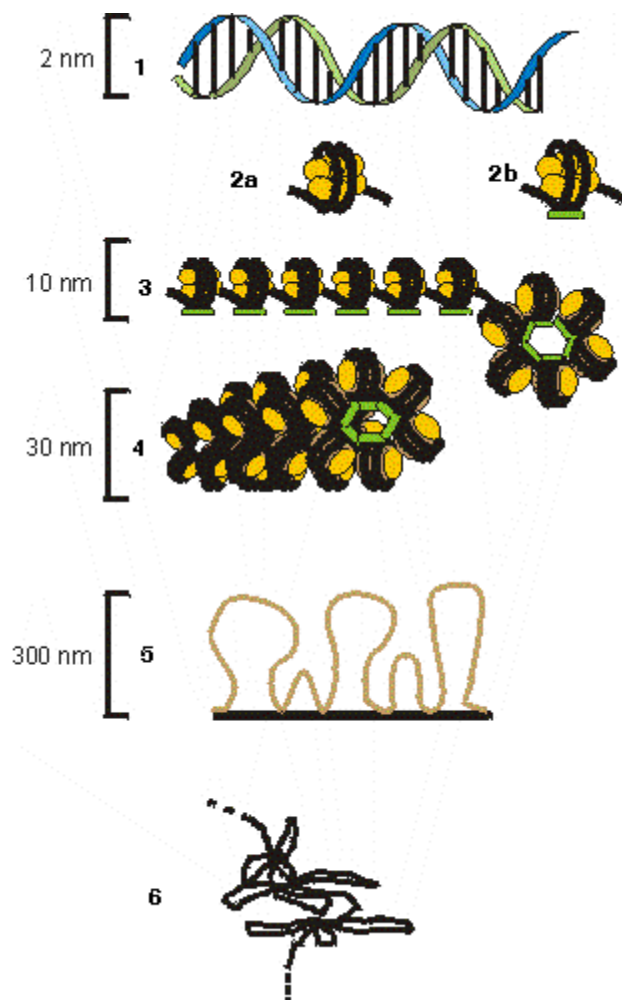
2b - хроматозома - (към нуклеозомата е прикрепен хистон Н1 (в зелен цвят);
 3 - нишка от нуклеозоми с диаметър 10 nm (по-компактна от В-ДНК 7 пъти);
 4 - нишка с диаметър 30 nm (по-компактна от В-ДНК 40 пъти);
 5 - структура с диаметър 300 nm (получава се чрез допълнително нагъване на нишки с диаметър 30 nm (в кафяво) и прикрепването им към скелета на митотична хромозома (в черно);
 6 - част от интерфазна хромозома (по-компактна от В-ДНК около 8 000 и повече пъти), диаметър 700 nm. Получава се при допълнително огъване на скелета заедно с прикрепените към него нишки от ДНК).

В нуклеозомата октамер от хистони, съдържащ по два от хистоните Н2А, Н2В, Н3 и Н4, формира белтъчна сърцевина, около която е навита ДНК (1.75. оборота от ДНК-спиралата). Хистоните Н2А и Н2В са богати на лизин, а Н3 и Н4 са богати на аргинин. При физиологично рН лизиновите и аргининовите остатъци са заредени положително и биха могли да участват в неспецифични електростатични взаимодействия с отрицателно заредените фосфатни остатъци от ДНК. За да се избегне това и да се направлява правилното образуване на нуклеозомите е важен т.н. белтък нуклеоплазмин [5]. Той е кисел пентамерен ядрен белтък, който не се свързва нито с хистоните, нито с ДНК. Предполага се, че той осигурява в ядрото йонно обкръжение, подходящо за специфично свързване между хистоните и ДНК.

В нуклеозомата 146 двойки бази от ДНК са защитени от нуклеази и са недостъпни за транскрипция. Нуклеозомите са разделени една от друга с къси участъци свързваща ДНК. Присъединяването на хистон Н1 към нуклеозомата води до получаване на т.н. хроматозома (фиг. 3-19-2). Н1 е най-лабилно свързан към ДНК и отделянето му чрез солева екстракция превръща хроматина в разтворим.

3.5.8.2. Пакетиране на нуклеозомите в митотични хромозоми

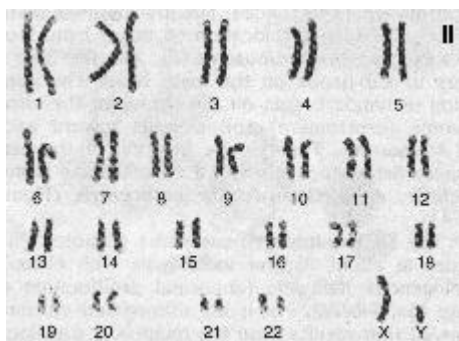
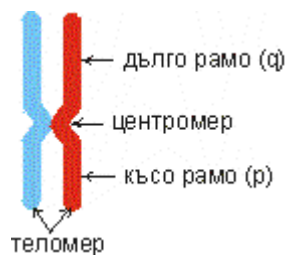
Предполага се, че взаимодействието на H1 със съседни нуклеозоми е от значение за по-нататъшно пакетиране на ДНК в структури от по-висок порядък. Нуклеозомите се пакетират в нишки с диаметър 10 nm, наподобяващи под електронен микроскоп наниз от мъниста (фиг. 3-19-3). Така организираната ДНК е около 7 пъти по-компактна структура от В-ДНК. По-нататъшното пакетиране на тези 10-nm нишки в розетка от шест нуклеозоми води до получаване на влакна с диаметър 30 nm (фиг. 3-19-4), наречени соленоиди. В тях ДНК е около 40 пъти по-компактна от В-ДНК.



Фиг. 3-19. Пакетиране на ДНК в структури от по-висш порядък.

1 - ДНК;
 2a - нуклеозома (Около октамер от хистони, съдържащ по два от хистони H2A, H2B, H3 и H4, е навита ДНК (1.75 оборота);
 2b - хроматозома - (към нуклеозомата е прикрепен хистон H1 (в зелен цвят);
 3 - нишка от нуклеозоми с диаметър 10 nm (по-компактна от В-ДНК 7 пъти);
 4 - нишка с диаметър 30 nm (по-компактна от В-ДНК 40 пъти);
 5 - структура с диаметър 300 nm (получава се чрез допълнително нагъване на нишки с диаметър 30 nm (в кафяво) и прикрепването им към скелета на митотична хромозома (в черно);
 6 - част от интерфазна хромозома (по-компактна от В-ДНК около 8 000 и повече пъти), диаметър 700 nm. Получава се при допълнително огъване на скелета заедно с прикрепените към него нишки от ДНК).

Не е добре изяснено как соленоидите се пакетират до митотични хромозоми, където дължината на молекулата на ДНК се съкращава спрямо В-ДНК около 8 000 -10 000 пъти. Предполага се, че ДНК образува извивки (бримки), всяка съдържаща около 100 000 нуклеотидни двойки. В соматичните клетки на човека по време на митозата, когато клетките са в процес на делене, хроматинът се пакетира в ясно видими отделни структури, наречени хромозоми, които по време на митозата са видими под светлинен микроскоп. Всяка хромозома съдържа два идентични хроматиди, свързани в т.н. центромер (фиг. 3-20-Г). Краищата на хромозомите се наричат теломери. Центромерът разделя хромозомата на два сегмента р (къс) и q (дълъг).



Фиг. 3-20.

Организация на ДНК в хромозоми по време на митоза.

1 - Хромозома в началния стадий на митоза;

Двата хроматида са представени с червен и син цвят.

2 - Набор от хромозоми на нормален мъж (46XY).

Соматичните клетки на човека съдържат 46 хромозоми или 23 двойки, от които 22 са еднакви в мъже и жени и се наричат автозомни хромозоми. Последната двойка (полови хромозоми) се означава като XX при жените и XY при мъжете. Автозомните хромозоми се номерират от 1 до 22 по намаляващ размер (1 е на-голямата и 22 е най-малката хромозома) (фиг. 3-20-II).

Местоположението на гените се означава с числа след буквите p или q. Напр. генът, означен като 15q23-q24, е разположен в дългия сегмент на 15 хромозома (цифрата 2 означава главната ивица, а числата 3 и 4 - подивици на ивица 2).

3.5.8.3. Интерфазен хроматин

По време на интерфазата, когато ДНК трябва да е достъпна за ензимите на репликацията и транскрипцията, тя е пакетирана по-слабо в структура, наречена хроматин. Известно е, че цялата ДНК не е пакетирана в еднаква степен. В повечето клетки се наблюдават поне три форми на пакетация на ДНК:

1) Хетерохроматин. Той представлява най-плътно пакетирания ДНК, така както е в митотичната хромозомна форма. Тук спадат около 90 % от ДНК, която е транскрипционно неактивна, свързана в нуклеозоми и нечувствителна към действието на нуклеази.

2) Еухроматин. В него степента на пакетирание е много по-слабо изразена. Тук спадат останалите 10 % от ДНК, която съдържа около 100 000 гена. Информацията на тези гени може да се презаписва, т.е се използва за биосинтеза на белтъци и РНК.

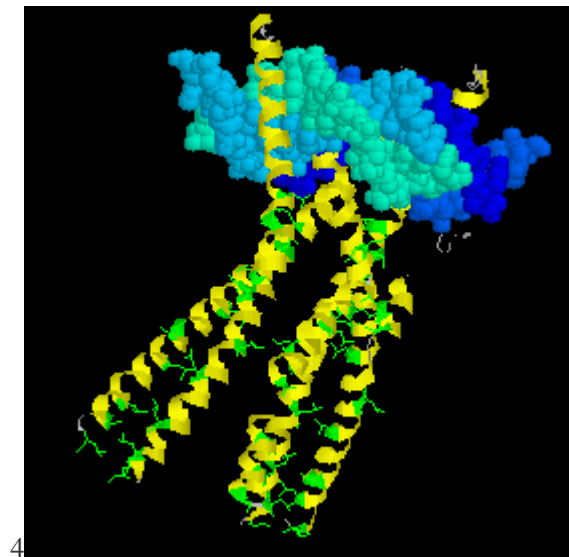
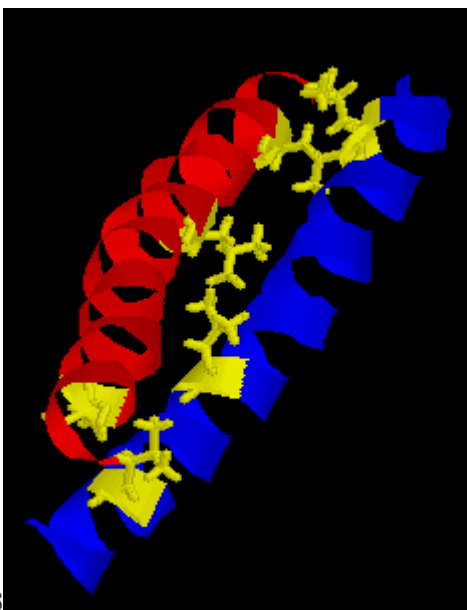
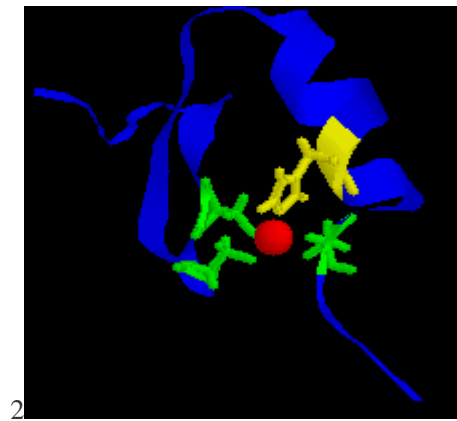
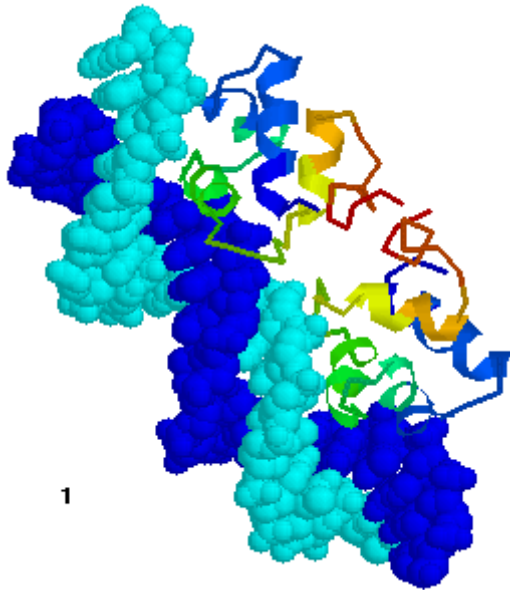
3) Домени с извивки (бримки). Има доказателства, че ДНК е прикрепена към матрикс с белтъчна природа: скелет в митотичните хромозоми и ядрен матрикс в интерфазното ядро. Извивки от ДНК се протягат навън от този матрикс, като се смята, че в тях има активни гени.

3.5.8.4. Структурни мотиви в нехистоновите хромозомни белтъци

Нехистоновите хромозомни белтъци имат структурна и регулаторна функция, а към тях принадлежи и целият ензимен набор за репликация и транскрипция на ДНК (вж глава 12 и 13). За целта особено важно е специфичното им свързване с ДНК.

В структурата на хромозомните белтъци има характерни мотиви като α -спирала-свивка- α -спирала, цинков пръст и левцинов цип (фиг. 3-21), които осигуряват специфично свързване на регулаторните белтъци с определен район от ДНК.

Мотивът α -спирала-свивка- α -спирала е първият и най-добре изучен мотив в хромозомните белтъци. Пример за такъв мотив има в димерния белтък "сго-репресор" (фиг. 3-21-1). Един от спиралните участъци в този мотив разпознава специфично място от 20 bp в голямата бразда на ДНК [2].



Фиг. 3-21. Структура на домени в хромозомни белтъци: 1 - домени, съдържащи α -спирала-свивка- α -спирала, 2 - цинков пръст; 3 и 4 - левцинов цип.

В мотива цинков пръст (фиг. 3-21-2) има серия от повтарящи се домени (от 2 до 9), в които по протежение на веригата Zn атом взаимодейства с общо 4 цистеинови и хистидинови остатъци [3]. Цинковите пръсти взаимодействат с 5 bp в голямата бразда на ДНК. Важността на този мотив за взаимодействието на стероидните хормони с ДНК личи от примера с единична мутация в който и да е от двата цинкови пръсти на рецептора за калцитриол. Такава мутация води до резистентност в действието на хормона и до клиничния синдром рахит.

При мотива "левцинов цип" (фиг. 3-21-3 и 4), открит в карбоксилния край на хромозомни белтъци, в последователност от около 30 остатъци има α -спирална структура, в която всеки седми остатък е левцин. Това позволява взаимодействие на тези левцинови остатъци с такива от друга подобна α -спирална структура, така че се получава "левцинов цип" [4, 5].

3.6. Роля и конформация на иРНК

Информационните или матрични РНК (иРНК) пренасят информацията за синтеза на белтъци от ДНК в ядрото към специални органели в цитоплазмата, наречени рибозоми, където се извършва белтъчната биосинтеза.

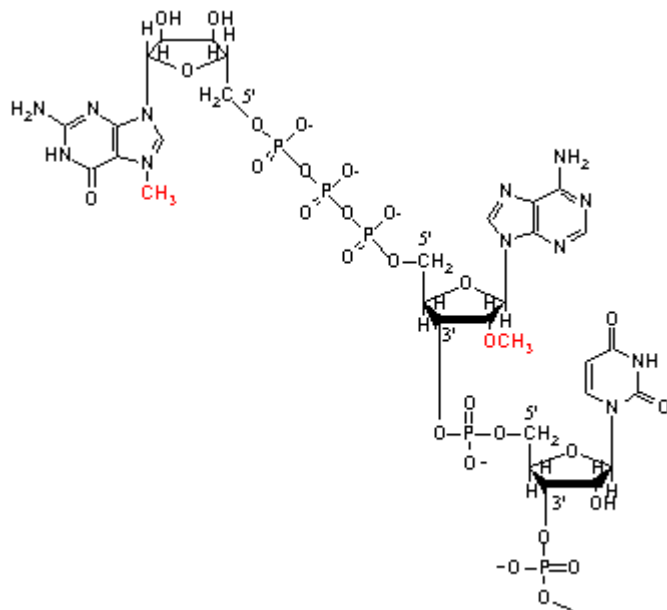
иРНК служи като матрица при белтъчната биосинтеза. Тя е комплементарна на матричната верига на ДНК и идентична с първичната структура на кодиращата верига в ДНК с тази разлика, че вместо Т, съдържа У и има различни нива на структуриране от ДНК. При свързването на няколко рибозоми с иРНК се получават полизоми.

За всички иРНК са характерни следните особености:

В 5'-края на иРНК има нестандартни нуклеотиди като напр. 7-метилгуанозинтрифосфат и 2'-О-метилрибонуклеотид и други. Този край се означава като шапка (фиг. 3-22). Шапката вероятно е необходима, за да бъде разпозната иРНК от апарата за белтъчна синтеза. Веднага след шапката следва т.н. лидерна секвенция, която не се превежда. След нея започва секвенция, която се превежда. Тя започва с инициращия кодон АУГ и завършва с терминаращ кодон (УАГ или УАА или УГА). След терминаращия кодон е разположена т.н. поли-А-опашка в 3'-края на иРНК, която представлява полимер от аденилатни остатъци (20-250 на брой). "Шапката" и "опашката" защитават иРНК от действието на специфични екзонуклеази.

В прокариотите иРНК са полицистронни, т.е. носят информация за повече от една полипептидна верига. В еукариоти иРНК са моноцистронни, т.е. съдържат информация само за една полипептидна верига. Тъй като информацията е заложена в линейната структура на иРНК, нейната цялост е от особено значение. Всяка промяна в секвенцията, напр. загуба или промяна в нуклеотидите, може да промени белтъка, който се синтезира при превеждане на генетичната информация.

Фиг. 3-22. Структура на участъка, наричан "шапка", прикрепен към 5'-края на иРНК.



Информационните рибонуклеинови киселини се синтезират в ядрото във вид на прекурсорни молекули, които са много хетерогенни по размер. Те са с по-високи молекулни маси от тези на зрелите иРНК. Съдържат екзони (кодиращи последователности) и интрони (некодиращи последователности). Синтезата и зреенето на иРНК са описани в глава 13.

3.7. Конформация на рРНК. Рибозоми

Рибозомните РНК (рРНК) са важни за белтъчната биосинтеза, защото заедно с белтъци изграждат рибозомите. Свързвайки иРНК и тРНК към рибозомите, те правят възможна транслацията на наследствената информация.

Рибозомните РНК са в преобладаващо количество в клетката в сравнение с останалите РНК. Те са метаболитно стабилни поради свързване с рибозомните белтъци и действат в продължение на много транслационни цикли. Метилирани са във висока степен. В пространствената им структура се редуват двойноспирални и едноверижни участъци. В двойноспиралните участъци, наречени фуркетни форми, взаимодействията между базите от различни участъци на веригата са комплементарни и антипаралелни.

Голямата субединица на рибозоми (60S) от бозайници се изгражда от 5S РНК, 28S РНК и 5.8S РНК и приблизително равно количество белтъци. В малката субединица на рибозоми (40S) от бозайници се съдържа 18S рРНК и белтъци. На фиг. 3-23 са представени голямата и малката субединици на рибозомите.

Фиг. 3-23. Структура на рибозоми



1 - голяма субединица; 2 - малка субединица; 3 - комплекс от малка и голяма субединица.

3.8. Структура на тРНК

В тРНК има повече минорни бази, отколкото в останалите РНК. Това увеличава специфичността на тРНК и улеснява разделянето им.

При огъване на тРНК се оформят четири двойноспирални сегменти (поради комплементарност на базите) и три едноверижни бримки. Това е т.н. модел за вторична структура на тРНК, наречен "детелинов лист" (фиг. 3-24).

Във всяка тРНК има четири важни участъци:

- 1) акцепторен участък (тройка нуклеотиди ЦЦА в 3'-края), където се свързва определена аминокиселина;
- 2) псевдоуридилова бримка (Т-ψ-Ц) - за свързване с 5.8S рРНК от рибозомите.
- 3) антикодонна бримка, съдържаща специфичен триплет от нуклеотиди, наречен антикодон, тъй като е комплементарен и антипаралелен на определен кодон в иРНК;
- 4) дихидроуридилова бримка (D). Тя се свързва с 28S рРНК от 60S рибозомната субединица.

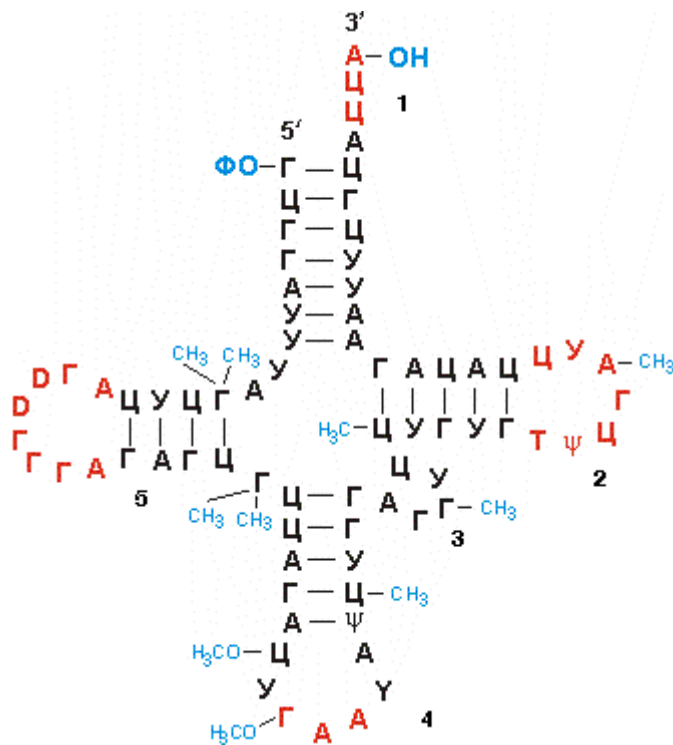
Първите два участъка са еднакви при всички тРНК. Последните два са специфични за всяка тРНК.

Освен споменатите три бримки, има и една допълнителна бримка, условно наричана мини-бримка или вариабилна бримка с дължина от 3-5 до 13-21 бази. Чрез тази бримка в тРНК се осигурява едно и също разстояние между аминокиселинния и антикодонния участъци в тРНК.

Фиг. 3-24. Вторична структура на тРНК за фенил-аланин - модел "детелинов лист".

1 - акцепторен участък (ЦЦА), свързващ аминокиселината;

2 - псевдоуридилова бримка за



свързване с 5.8 S рРНК от 60S
рибозомната субединица;

3 - вариабилна бримка;

4 - участък, съдържащ антикодон,
комплементарен на съответен
кодон в иРНК;

5 - дихидроуридинова бримка за
свързване с 28S рРНК от 60S
рибозомната субединица.

При пространственото огъване на тРНК (третична структура) псевдоуридилевата и дихидроуридилевата бримки са близко разположени, така че цялата молекула добива L-образна компактна конформация. Образуват се не само водородни връзки по Watson-Crick, но и между повече от два нуклеотида, както и между пентозо-фосфатния скелет и някои бази. 2'-ОН група на рибозата е важен донатор и акцептор на водород при образуване на водородни връзки.

3.9. Малки ядрени РНК

В еукариотното ядро има много копия на високо консервативни нискомолекулни РНК, наречени малки ядрени РНК (мяРНК или на английски snRNA). По състав са стабилни. Повечето от тях са под форма на рибонуклеопротеини, наречени snurps (small nuclear ribonucleoproteins) и означавани съкратено U1, U2 и т.н. В 5'-края на U1 има последователност, частично комплементарна на мястото между екзони и интрони в първичните иРНК-транскрипти (гл. 13). U1 и останалите "snurps" са необходими за процеса на зреене на иРНК, т.е. действат като рибозими - вж т. 3.10.

3.10. Рибозими

Освен белтъчните катализатори, на които е посветена гл. 4, известно е, че и някои РНК имат каталитична функция. Те катализират транс-естерификация и хидролиза на фосфодиестерни връзки в РНК молекули.

Тези РНК, за които са характерни присъщите за биологичните катализатори каталитична активност и висока специфичност по отношение на субстрата, се наричат рибозими.

Някои от тях (U1, U2, U4-U6, U5-snurps - т. 3.9) катализират отстраняването на интрони и съединяването на екзони при зрението на иРНК (вж гл. 13).

Друг пример дават 28S рРНК в еукариоти и 23S рРНК в прокариоти, действащи в белтъчната биосинтеза като рибозим с пептидилтрансферазна активност (гл. 14).

РНК с каталитична активност има и в състава на ензима теломераза (гл. 12).

3.11. Приложение на познанията върху нуклеинови киселини в клиничната практика

3.11.1. Пуринови и пиримидинови аналози като антиракови и антивирусни агенти

Голям брой синтетични аналози на естествените бази, нуклеозиди и нуклеотиди потискат злокачествен растеж и инфекции като или инхибират ензими, които са важни за синтезата на нуклеиновите киселини, или изместват естествените нуклеотиди в нуклеиновите киселини и с това значимо променят взаимодействията между базите.

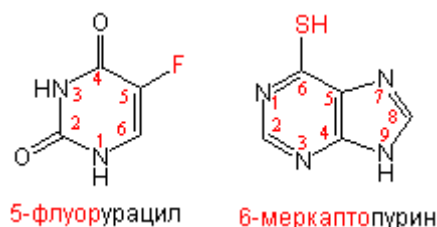
На фиг. 3-26 са дадени формулите на 6-меркаптопурин (пуринов аналог) и на 5-флуорурацил (пиримидинов аналог).

6-Меркаптопурин (6-МП) е полезен анти туморен агент при хора. В туморните клетки той се превръща в 6-меркаптопурин рибонуклеотид, който се натрупва в клетките и инхибира синтезата на пурины. Добавянето на алопуринол, инхибитор на ензима, който разгражда 6-МП, забавя неговото разграждане и усилва анти туморните свойства на 6-МП. По-подробно механизъм на действието на 6-МП е разгледан в глава 9.

5-флуорурацил сам по себе си не е активен агент. Но той се превръща от клетъчните ензими до активните метаболити 5-флуоруридин-5'-трифосфат (F-УТФ) и 5-флуор-2'-деоксиуридин-5'-фосфат (F-дУМФ). F-УТФ се включва в РНК и инхибира превръщането на прекурсорна рРНК в зрелите 28S рРНК и 18S рРНК. Освен това променя превръщането на прекурсорни иРНК в зрели иРНК.

F-дУМФ е мощен и специфичен инхибитор на ензима, който синтезира тимин, тъй като се свързва необратимо към него. Това води до образуване на ТМФ и смърт на клетката поради липса на тимин.

По-подробно механизъм на действието на F-УТФ и F-дУМФ е разгледан в глава 9.



Фиг. 3-26. Примери за синтетични пиримидинови и пуринови аналози с клинично приложение: 5-флуорурацил (пиримидинов аналог) и 6-меркаптопурин (пуринов аналог).

3.11.2. Генетични болести. Примери: сърповидно-клетъчна анемия и фенилкетонурия

Генетичните (или наследствени, генетично-обусловени) болести са заболявания, при които клиничните симптоми са свързани с промени в ДНК. Промените могат да бъдат твърде

различни: от точкови мутации до хромозомни увреждания. Поради това генетичните болести се разделят на четири групи: моногенни дефекти (напр. сърповидно-клетъчна анемия), мултифакторно-зависими заболявания вследствие на полигенни дефекти и фактори на околната среда (напр. захарен диабет), хромозомни увреждания (напр. синдром на Dawn), митохондрични болести. Допълнителна група са ненаследяващи се от поколението генетични дефекти в соматични клетки, като много видове рак.

При мутациите в единични гени се синтезира дефектен ензимен или структурен белтък с променена структура и активност, водещо до заболяване. Те могат да бъдат автозомални доминантни (напр. фамилна хипехорестеролемия) и автозомални рецесивни - напр. фенилкетонурия и сърповидно-клетъчна анемия, разгледани съответно в [т. 2.5.3](#) и [т. 2.5.7](#) от други гледни точки.

Тук е важно да разберем, че първопричината за всяко от тези заболявания е промяната в гена, кодиращ съответния белтък. Промяната в гена за фенилаланинхидроксилаза при фенилкетонурия и в гена за HbS при сърповидно-клетъчната анемия води до белтъци с променена структура. Това от своя страна води до отклонения във функциите и заболяване.

3.12. Насоки за самостоятелна работа

3.12.1. Примерни писмени задачи:

1. Напишете с формули част от полинуклеотидна верига, съдържаща в посока от 5'- към 3'- края четирите нуклеотида, характерни за РНК. Напишете и част от верига на ДНК с характерните за нея нуклеотиди.

С помощта на фиг. 3-2 и 3-11 проверете дали правилно сте написали скелета на полинуклеотидните вериги, нуклеотидите и връзките (N-гликозидни, естерни и фосфодиестерни).

3.12.2. Изберете [главната страница на "Интерактивни тестове"](#). От нея изберете теста: "Нуклеинови киселини" в желан от Вас режим.

3.12.3. Молекулна графика с компютърната програма RASMOL (RASWIN)

1. Свалете файла [rasmol3.zip](#) и го разархивирайте в отделна папка. Отворете програмата Rasmol, любезно предоставена за нашия сайт от нейния автор Roger Sayle, Bioinformatics group, Metaphorics, Santa Fe, New Mexico , и я разучете.

С програмата RasMol отворете файла bdna.ent, съдържащ атомните координати на част от В-ДНК.

Маркирайте с различен цвят двете вериги, базите, водородните връзки между базите. Разгледайте молекулата под различен ъгъл и я представете с различните модели: Wireframe, Sticks, Ball and Sticks, Spacefull, Ribbons.

3.12.4. Посетете Web-site:

"http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/home.html">[http://Human Genome Project information](http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/home.html) (http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/home.html), в който има информация за проекта за разшифроване на човешкия геном.

Ако някоя от връзките не работи поради промяна, извикайте търсачката Google (<http://www.google.com>) и напишете ключовите думи - напр. human genome project.

3.13. Литература

1. Sayle, R., BioMolecular Structures Group of Glaxo Research & Development, UK, RASWIN molecular graphics program, 1994.
2. Mondragon, A. and S. C. Harrison. J. Mol. Biol. 219, 1991, 321. The phage 434 Cro/Or1 complex at 2.5 Å resolution. PDB Id 3CRO, MMDB [3010].
3. C.K. Liew, K.Kowalski, A.H.Fox, A.Newton, B.K.Sharpe, M. Crossley & J.P.Mackay. Solution Structure Of The Ninth Zinc-Finger Domain Of The U- Shaped Transcription Factor. PDB Id.:1FU9, derived from ASN1.
4. Marti. D. N., I. Jelesarov and H. R. Bosshard. Nmr solution structure of a designed heterodimeric leucine zipper, PDB Id. 1FMH.
5. PDB Id.: IGD2 Leucine zipper
6. Kinniburg, A. J. Nucleic Acids Res. 17, 1989, 7771. A cis-acting transcription element of the *c-myc* gene can assume a H-DNA conformation
7. Pei, D., Corey, D. R. and Schulz, P. G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1990, 9858. Site specific cleavage of duplex DNA by a semisynthetic nuclease via triple-helix formation.