

Nukleozidi, nukleotidi i nukleinske kiseline

Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić

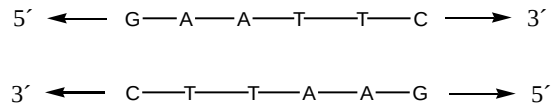
Određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje)

- Metoda cijepanja lanca DNA
- Slična metodi sekvenciranja proteina:
  - cijepanje na manje fragmente
  - za DNA su uključene samo 4 nukleotidne monomerne jedinice, dok je za proteine uključeno 20 AK
  - separacija DNA i proteina pomoću kromatografije prema veličini i naboju molekula
- Prvi stupanj je primjena restrikcijskih endonukleaza

→ cijepanje dvostruke uzvojnice DNA na mjestu određene baze

Određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje)

- Poznato je nekoliko stotina restrikcijskih endonukleaza, npr. *Alu*I cijepa sekvencu AGCT između G i C, *Eco*R1 cijepa GAATTC između G i A
- Većina sekvencija koje prepoznavaju enzimi imaju isti redoslijed baza za oba lanca sa smjerom čitanja 5´→ 3´ = palindromi

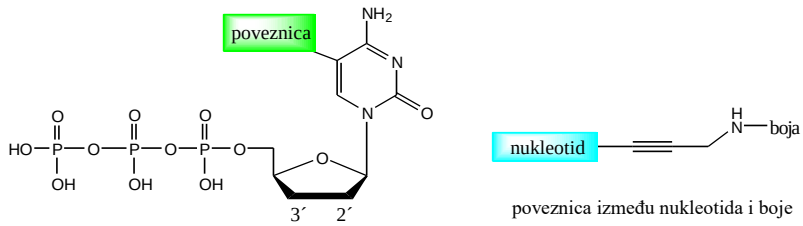


- Prvo kemijsko sekvenciranje fragmenata (A. Maxam, W. Gilbert)
- Metoda prekida (dideoksinukleotida) produljenja lanca (F. Sanger)

Metoda prekida rasta lanca DNA

- Uključuje replikaciju DNA i niske konc. neprirodnih nukleotida koji nakon što se ugrade u lanac DNA zaustavljaju njegov rast
- Primjena četiri 2´,3´-dideoksi analoga prirodnih nukleotida
- Zbog manjka 3´-hidroksilne skupine nije moguće povezivanje sa sljedećim nukleotidom fosfodiesterskom vezom
- Označavanje svakog zadnjeg nukleotida fluorescentnom bojom koja je različita za svaki nukleotid

Metoda prekida rasta lanca DNA

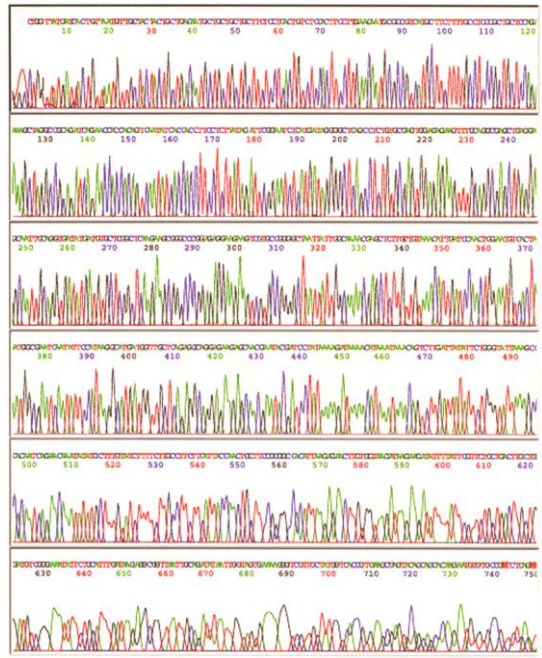


2´,3´-dideoksicitozin-trifosfat

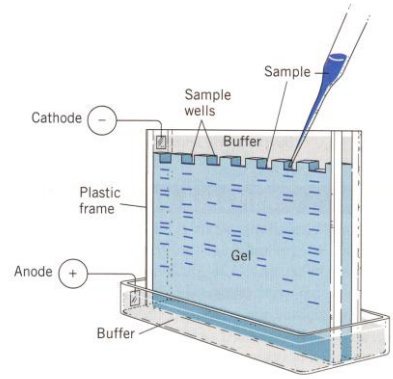
poveznica između nukleotida i boje

- Kapilarna elektroforeza je najčešća metoda za separaciju smjese nastalih fragmenata DNA
- Separacija prema veličini i naboju fragmenata DNA
- Detektor generira kromatogram u četiri boje, svaki sljedeći pik predstavlja fragment duži za jedan nukleotid, a boja označava odgovarajući krajnji nukleotid
- Omogućeno direktno čitanje sekvence nukleotida u DNA lancu

Automatizirano sekvenciranje DNA



- Manualna metoda primjene vertikalne gel-elektroforeze
- Nanošenje uzoraka u gornje utore gela – različito putovanje uzoraka primjenom promjenjivog napona
- Ovakva metoda omogućava sekvenciranje najviše nekoliko tisuća baza dnevno
- Automatizirana metoda primjenom paralelnih analiza može sekvencirati gotovo 3 milijuna baza po danu



Laboratorijska sinteza oligonukleotida

- Primjena sintetskih oligonukleotida:
  - kao početnice (engl. *primer*) za sekvenciranje nukleinskih kiselina i PCR (engl. *polymerase chain reaction*)
  - u razvoju i istraživanju "*antisense*" oligonukleotida – koji su sve značajniji za moguću primjenu u terapiji različitih oboljenja
- "*Antisense*" oligonukleotid = oligonukleotid koji ima sekvencu koja je komplementarna kodiranoj sekvenci DNA ili RNA
- Sintetski oligonukleotid koji se veže za sekvencu virusne ili bakterijske DNA ili mRNA → zaustavljena ekspresija ciljanih proteina → smrt virusa ili bakterije

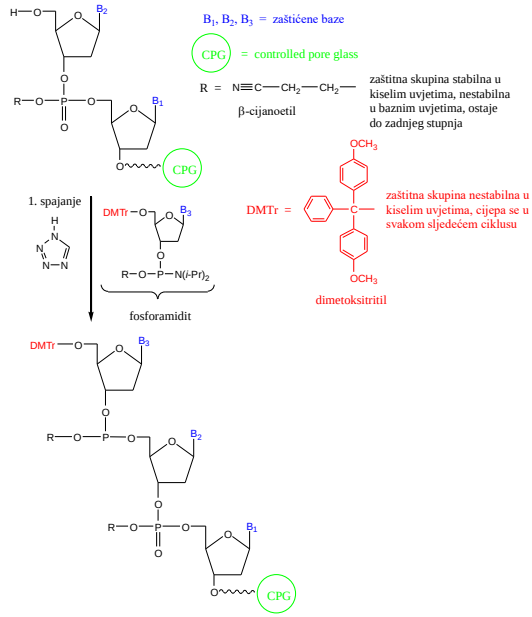
Laboratorijska sinteza oligonukleotida

- Npr. za sekvencu DNA ili RNA:
  A-G-A-C-C-G-T-G-G
- Antisense oligonukleotid je sljedeći:
  T-C-T-G-G-C-A-C-C
- Način deaktiviranja specifičnih gena virusa ili bakterija – velike mogućnosti u medicini
- U liječenju virusnih oboljenja (AIDS) ili karcinoma

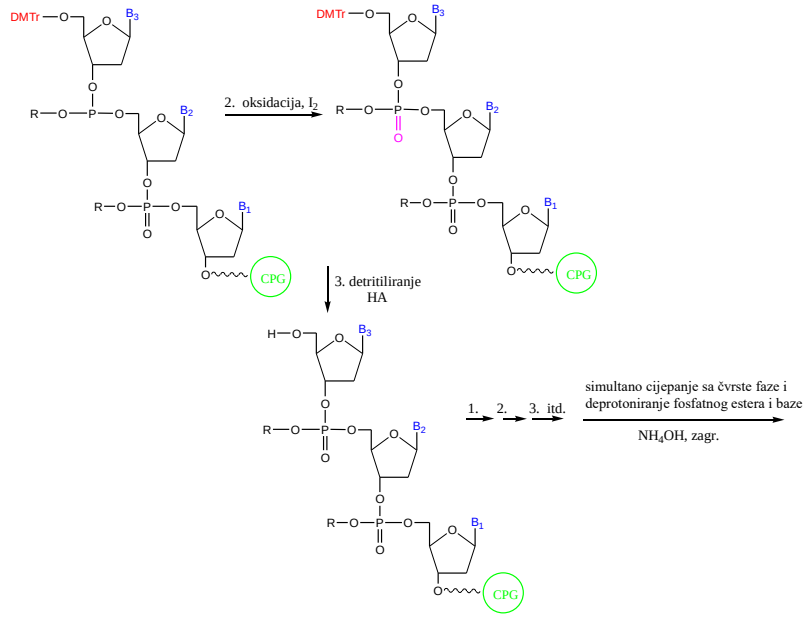
Laboratorijska sinteza oligonukleotida

- Metoda za sintezu oligonukleotida je slična automatiziranoj sintezi peptida na čvrstoj fazi
- Odgovarajući nukleotid sa zaštićenim funkcionalnim skupinama se veže na čvrstu fazu (CPG, controlled pore glass)
- Sljedeći zaštićeni nukleotid je u obliku fosforamidita - slijedi povezivanje pomoću reagensa 1,2,3,4-tetrazola
- Nastali fosfitni triester se oksidira primjenom joda do fosfatnog triestera → lanac produljen za jedan nukleotid
- Dimetoksitritilna skupina (DMTr) za zaštitu 5´-kraja dodanog nukleotida – skidanje u kiselim uvjetima

Laboratorijska sinteza oligonukleotida



Laboratorijska sinteza oligonukleotida



Laboratorijska sinteza oligonukleotida

- Ponavljanje stupnja povezivanja, oksidiranja i detritiliranja (u bezvodnim uvjetima)
- Automatizirani postupak može se ponavljati najmanje 50 puta, vrijeme cijelog ciklusa je oko 40 min
- Sinteza se prati spektrofotometrijski – asignacija dimetoksitritilnog kationa koji se oslobađa u svakom ciklusu (poput praćenja skupine Fmoc u sintezi peptida na čvrstoj fazi)
- Željeni oligonukleotid se oslobađa sa čvrstog nosača i preostale zaštitne skupine na bazi se skinu

Lančana reakcija polimeraze (PCR)

- Jednostavna i djelotvorna metoda za eksponencijalno povećanje broja kopija molekula DNA
- Jedna molekula DNA → 100 milijardi kopija za nekoliko sati
- Sekvenciranje humanog genoma
- Lančanom reakcijom polimeraze možemo u svega nekoliko sati dobiti milijarde identičnih kopija nekog ciljanog fragmenta DNA
- Primjena:
  - u prenatalnoj dijagnozi anemije srpastih stanica i drugih genetskih bolesti (distrofija mišića, cistična fibroza)
  - u detekciji SARS-CoV-2, citomegalovirusa i virusa uzročnika AIDS-a, karcinoma grlića maternice, hepatitisa, ospica…
  - forenzičkoj analizi (dokaza na mjestu zločina)
  - evolucijska istraživanja, antropologija
  - utvrđivanje obiteljskih veza

Lančana reakcija polimeraze (PCR)

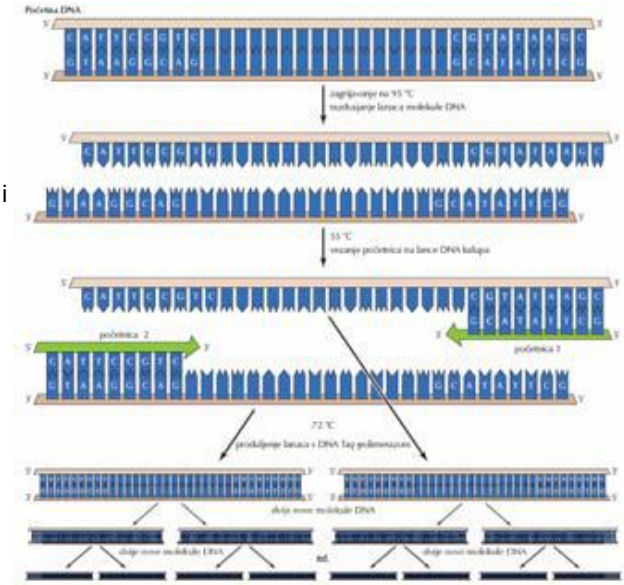
- Primjena enzima DNA-polimeraze – replikacija i popravak DNA
- Svojstvo povezivanja nukleotida na kraću oligonukleotidnu početnicu
- Komplementarni nukleotidi (G-C, A-T) se vezuju na 3´-kraj

Lančana reakcija polimeraze (PCR)

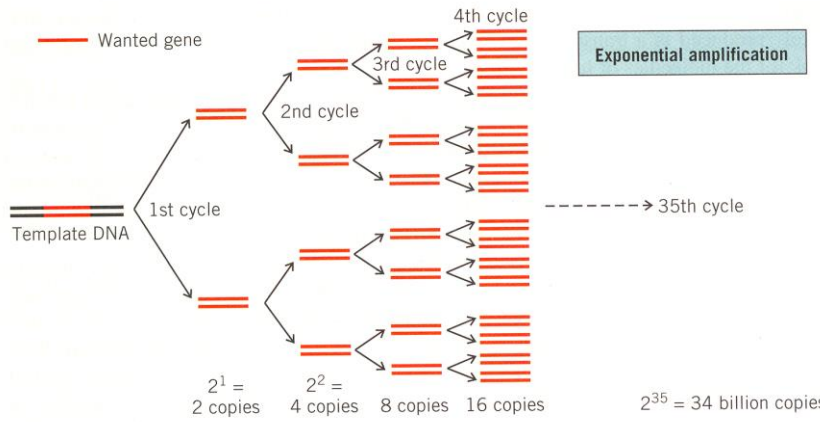
- Za provođenje lančane reakcije polimeraze potrebno je imati:
  - izoliranu željenu DNA (potrebna je vrlo mala količina)
  - smjesu četiri DNTP
  - dvije specifične početnice (10-20 nukleotida)
  - termostabilnu polimerazu koja katalizira reakciju
  - odgovarajući pufer i Mg^{2+}

Lančana reakcija polimeraze (PCR)

- Jedan ciklus:
- Zagrijavanje smjese na 95°C kratko vrijeme → odvajanje DNA lanaca (denaturacija)
- Hlađenje na 50-60°C → vezivanje dviju početnica i DNA-polimeraze na dva lanca
- Zagrijavanje na 70°C → produljenje lanaca vezanjem NTP
- Svaki ciklus udvostručavanja ciljane DNA traje nekoliko min.
- Broj ciklusa = n → 2^n kopija replicirane DNA (10 ciklusa-1000 kopija DNA)



Lančana reakcija polimeraze (PCR)



Lančana reakcija polimeraze (PCR)

- Primjena termički stabilne DNA-polimeraze, Taq-polimeraza izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus* iz vrućih izvora Nacionalnog parka Yellowstone



Sekvenciranje humanog genoma

- Do danas sekvencirani genomi:
  - virusi – 1383 genoma
  - bakterije i arhebakterije – 197 genoma (266 u tijeku)
  - gljive i kvasci – 8 genoma
  - eukarioti – 21 genom (dvadesetak u tijeku)
  - mitohondriji – 621 genom
  - plastidi – 41 genom

Genomika, proteomika

- Nema dvojbe da je biomedicinu 20. stoljeća obilježila 2000 god., kada je obznanjen kraj dešifriranja genoma čovjeka (*Human Genome Project i Celera Genomics Com*.) – sekvencirano 3 milijarde parova baza

- Nove znanosti koje nastaju na prijelazu iz 20. u 21. stoljeće jesu genomika i proteomika - naziv genomika javlja se u ranim 1990-tim godinama
- Fiziološka je genomika interdisciplinarno znanstveno područje koje povezuje discipline genomike i stanične, organske i integrativne fiziologije u cilju funkcionalne analize humanog genoma
- Proteomika je znanstvena disciplina koja detaljno proučava strukturu i funkciju bjelančevina

Genomika, proteomika

- Postgenomsku eru karakteriziraju počeci rada na tehnologiji DNA-čipova te na proteomici
- Što su zapravo DNA-čipovi? To su sičušne površine na kojima su mikrorobotskom tehnologijom fotolitografski utisnute tisuće odsječaka gena (DNA)
- Ovoga trenutka postoje čipovi sa desecima tisuća gena, no vrlo je blizu dan kada će se na čipu nalaziti cjelokupan genom čovjeka (dijagnostika i liječenje oboljenja)
- Nakon razdoblja genomike nastupit će **razdoblje proteomike**
- Na temelju podataka dobivenih proteomikom, možemo zaključiti o smještaju bjelančevina, o međusobnom međudjelovanju bjelančevina, te o molekularnom sastavu staničnih struktura

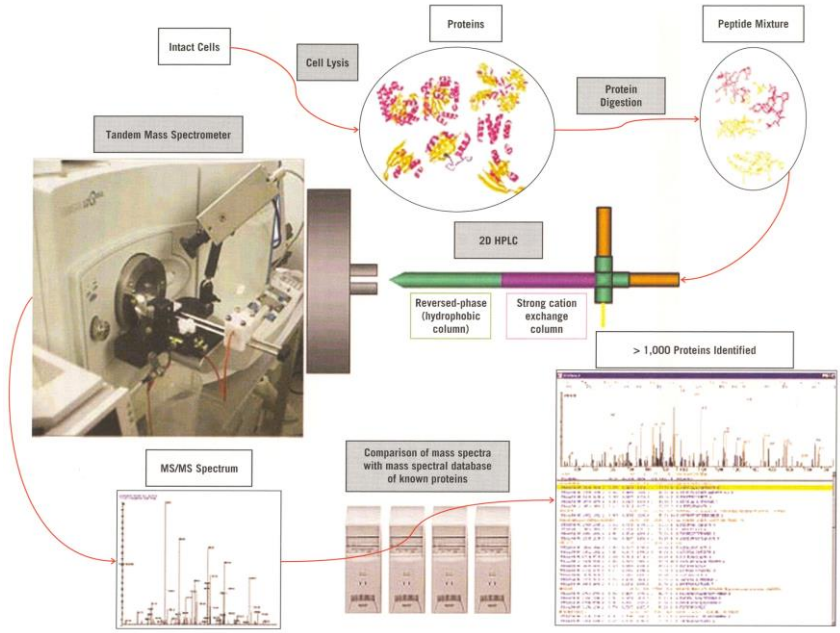
Genomika, proteomika

- **Proteomika** – istraživanja analize gena pomaknuta na **složene interakcije pojedinih gena tj. njihovih bjelančevina**
- U usporedbi sa standardnim metodama proteomika omogućava proučavanje složenih međudjelovanja velikog broja bjelančevina
- Promjene koje se događaju prilikom prevođenja poruke gena u poruku bjelančevine, mogu se analizirati upravo na ovaj način

Genomika, proteomika

- Nove kompjuterske metode na osnovu moćnih analitičkih eksperimentalnih postupaka analiziraju način na koji pojedine bjelančevine međusobno surađuju
- Razvoj novih metoda masene spektrometrije
- Dobiva se mreža funkcionalne povezanosti između proteina u stanicama
- Novi tip informacija o složenoj prirodi živih stanica

Proteomika


Intact Cells
Cell Lysis
Proteins
Protein Digestion
Peptide Mixture
Tandem Mass Spectrometer
2D HPLC
Reversed-phase (hydrophobic column)
Strong cation exchange column
> 1,000 Proteins Identified
MS/MS Spectrum
Comparison of mass spectra with mass spectral database of known proteins