

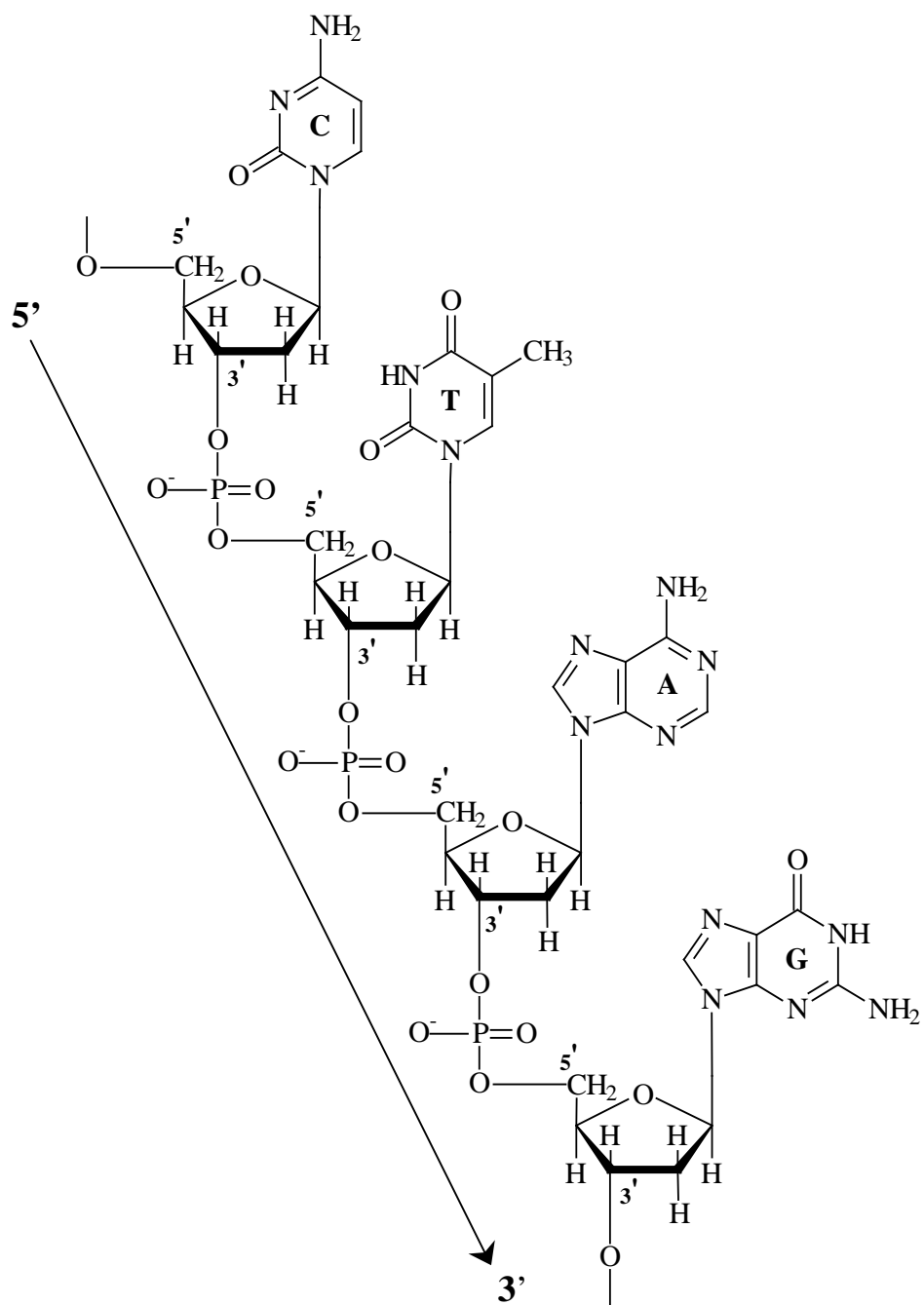
# 19. KWASY NUKLEINOWE

*Iwona Żak*

Kwasy nukleinowe, deoksyrybonukleinowy (DNA) i rybonukleinowy (RNA), są chemicznymi nośnikami informacji genetycznej w komórkach. Informację genetyczną stanowi chemicznie „zapisana” (alfabetem zasad azotowych) kolejność deoksyrybonukleotydów w łańcuchach DNA, która przechowywana jest głównie w jądrze komórkowym. Informacja genetyczna jest przepisywana (transkrypcja), po czym przekazywana do cytoplazmy w formie sekwencji polirybonukleotydowej łańcuchów RNA. Przepisana informacja genetyczna na jeden z kwasów rybonukleinowych (mRNA) służy do odczytania, przetłumaczenia na nowy „język” (o alfabecie aminokwasowym), tym samym stanowi bezpośrednią matrycę, na której „materializuje się” informacja genetyczna w formie specyficznej sekwencji aminokwasowej polipeptydów (translacja).

W jądrowym DNA zakodowany został unikatowy program genetyczny każdej komórki, kierujący biosyntezą enzymów i wszystkich innych białek potrzebnych do funkcjonowania komórek oraz kontrolujących wzrost, rozmnażanie, tym samym naturę każdego żywego organizmu.

Kwasy nukleinowe są nierozgałęzionymi łańcuchami polinukleotydowymi, w których kolejne mononukleotydy połączone są wiązaniami 3' 5' fosfodiesterowymi, tworzącymi obwodowy, ujemnie naładowany rdzeń fosfocukrowy, od którego sterczą na bok zasady azotowe. Ze specyfiki wiązania fosfodiesterowego wynika, że każdy łańcuch polinukleotydowy jest polarny, czyli ma dwa różne końce, koniec-5' i koniec-3'. **Koniec-5' polinukleotydu** oznacza, że przy piątym atomie węgla (C5') rybozy lub deoksyrybozy znajduje się fosforan (lub atom tlenu, gdy jest to tylko fragment całości). Z punktu widzenia powstawania polinukleotydu, koniec-5' jest rzeczywistym jego początkiem. **Koniec-3' polinukleotydu** oznacza, że przy trzecim atomie węgla (C3') rybozy lub deoksyrybozy znajduje się wolna grupa hydroksylowa (lub atom tlenu, gdy jest to tylko fragment całości). Koniec-3' jest rzeczywistym końcem polinukleotydu. Przyjęto, że sekwencję nukleotydów, czyli strukturę pierwszorzędową polinukleotydów, zapisuje się, poczynając od końca-5' z lewej strony, za pomocą skrótów jednoliterowych nazw nukleotydów.



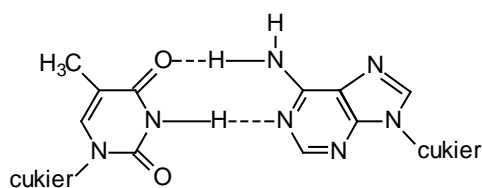
Polinukleotyd polarny o kierunku 5' → 3', z rdzeniem utworzonym z powtarzających się reszt fosfodeoksyrybozy, od którego sterczą na bok zasady azotowe

## Kwas deoksyrybonukleinowy

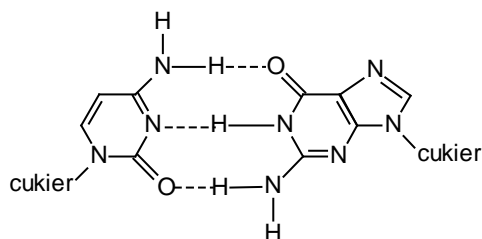
Polimer deoksyrybonukleotydów stanowi informację genetyczną we wszystkich organizmach żywych, z wyjątkiem niektórych wirusów typu RNA. Eukariotyczny DNA występuje w postaci łańcuchowego dwuniciowego polimeru, natomiast prokariotyczny DNA to z reguły struktura zamknięta, kolistą. Część DNA jedynie u bakteriofaga ( $\phi 174$ ) jest jednoniciowa, lecz w cyklu życiowym tego faga pojawia się struktura dwuniciowa DNA.

Cząsteczki DNA są olbrzymie, ich masy cząsteczkowe mogą sięgać  $1,9 \cdot 10^6$  daltonów, wielkość  $2,6 \cdot 10^6$  kilobaz (kb), a długość do 12 cm.

Obie nici DNA biegną w przeciwnych kierunkach, czyli są antyrównoległe w odniesieniu do ich  $5' \rightarrow 3'$  kierunków i mają komplementarną sekwencję. Komplementarność przeciwległych nici wynika ze struktury zasad azotowych i przestrzennych ograniczeń rdzenia fosfocukrowego DNA. Komplementarne pary pirymidyna – puryna o podobnej geometrii i wymiarach są utrzymywane wiązaniami wodorowymi. Tymina tworzy parę z adeniną, stabilizowaną dwoma wiązaniami wodorowymi.



Cytozyna łączy się z guaniną za pośrednictwem trzech wiązań wodorowych.



W obrębie dwuniciowego DNA wyróżnia się tzw. **pasmo matrycowe**, inaczej zwane nonsensownym lub wiodącym, które zaczyna się końcem  $3'$ , zawiera informację genetyczną i jest matrycą do transkrypcji cząsteczek RNA. Drugie, przeciwległe do matrycowego to tzw. **pasmo kodujące**, inaczej zwane, sensow-

nym lub opóźniającym, które zaczyna się końcem 5'. Sekwencja tego pasma odpowiada transkryptowi (początkowy produkt transkrypcji), który koduje białko (poza faktem, że zamiast T jest U) i stąd wywodzi się jego nazwa.

W latach 1949–1953 Erwin Chargaff wraz z współpracownikami przeprowadzili szczegółowe badania z zastosowaniem metod chromatograficznych nad zależnościami ilościowo-jakościowymi między zasadami azotowymi w hydrolizatach DNA, pochodzących z różnych źródeł. Wyniki tych analiz chemicznych (znane jako reguły Chargaffa) nie były zrozumiałe aż do czasu zaproponowania i zdefiniowania modelu dedukcyjnego dwuniciowej, helikalnej struktury drugorzędowej DNA przez Jamesa Watsona i Francisca Cricka w 1953 roku. Zaproponowany przestrzenny model Watsona-Cricka wyjaśnił, że reguły Chargaffa odzwierciedlają podstawowe cechy struktury DNA.

**Podstawowymi regułami Chargaffa** są następujące prawidłowości:

- ⇒ zawartość molowa A równa się T,
- ⇒ zawartość molowa G równa się C,
- ⇒ suma stężeń A+G równa się sumie stężeń C+T.

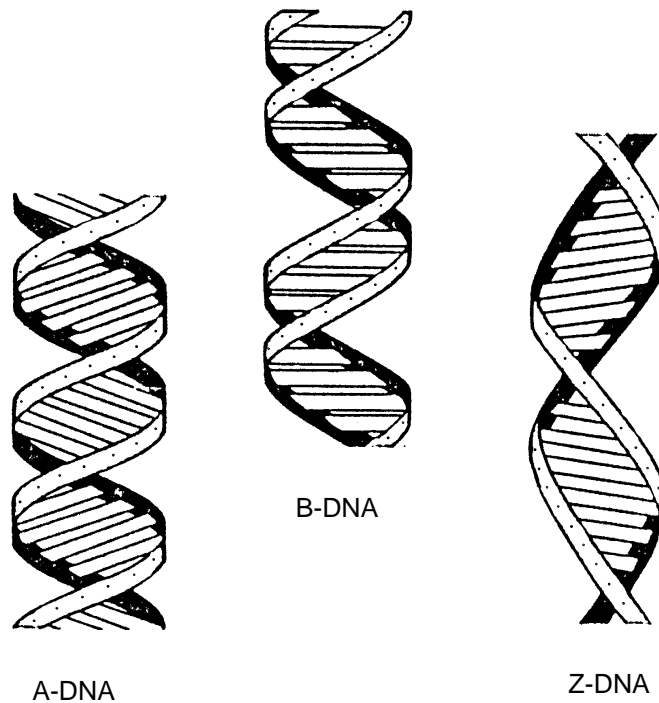
Z reguł tych wynika, że wystarczy znać udział procentowy tylko jednego z czterech nukleotydów (np. A), aby ustalić udział procentowy wszystkich pozostałych trzech nukleotydów (T, C, G) w analizowanej cząsteczce DNA.

Natomiast stosunek sumy stężeń molowych A+T do sumy stężeń G+C jest gatunkowo specyficzny, w związku z tym wszystkie cząsteczki DNA można sklasyfikować w trzy typy, mianowicie:

- ⇒ cząsteczki DNA, w których  $[A] + [T] > [G] + [C]$ ,
- ⇒ cząsteczki DNA, w których  $[A] + [T] < [G] + [C]$ ,
- ⇒ cząsteczki DNA, w których  $[A] + [T] = [G] + [C]$ .

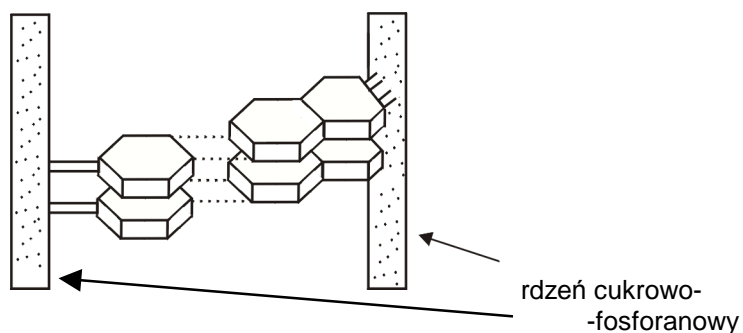
Cząsteczki DNA pierwszego typu są najbardziej powszechne, z reguły różnice między sumą AT a sumą GC okazują się stosunkowo niewielkie, przedstawicielami ich mogą być zarówno cząsteczki DNA pochodzące z wirusów (*Polyoma*), bakterii (*Mycoplasma*), drożdży, muszek (*Drosophila*), jak i z organizmu człowieka. Przedstawicielem DNA trzeciego typu mogą być cząsteczki DNA wywodzące się z *Echerichia coli*. Rzadko występują cząsteczki DNA drugiego typu, obecne np. u *Alcaligenes faecalis*.

Kwasy deoksyrybonukleinowe lub ich rejony mogą występować w trzech głównych formach przestrzennych (strukturach drugorzędowych) zwanych A, B i Z. Dominującą strukturą drugorzędową DNA jest forma B, będąca regularną prawoskrętną helisą, zgodną z modelem Watsona i Cricka. Oba antyrównoległe łańcuchy B-DNA związają się helikalnie wokół osi helisy, do której pary zasad azotowych układają się prostopadle.



Schematyczne diagramy głównych form: A-, B-, Z-DNA. (wg [12], zmodyfikowane)

W centrum helisy DNA znajdują się zasady azotowe obu nici, których płaszczyzny ułożone są jedna nad drugą w formie charakterystycznych dwóch stosów, stabilizowanych warstwowo oddziaływaniami hydrofobowymi. Na zewnątrz helisy DNA umiejscowione są oba rdzenie fosfocukrowe, pomiędzy którymi przebiegają helikalnie dwie bruzdy (rowki): mała o szerokości 6 Å i duża o szerokości 12 Å .



Obecność bruzd sprawia, że może mieć miejsce specyficzne rozpoznawanie, oddziaływanie lub wiązanie białek regulatorowych, np. kontrolujących ekspresję genów (poprzez ich moduły oddziaływujące bezpośrednio z DNA np. tzw. palce cynkowe lub typu helisa-zwrot-helisa, lub suwaka leucynowego) z określonymi (swoistymi) sekwencjami zasad azotowych, ukrytymi w centrum helisy, bez rozrywania dwupasmowej struktury DNA.

Przez bruzdy te mogą również wsuwać się różne płaskie aromatyczne cząsteczki policykliczne, które wślizgują się między pary zasad azotowych ułożone w stopy, czyli ulegają procesowi interkalacji. Zgodnie z tym mechanizmem działa wiele związków rakotwórczych, a także leków przeciwnowotworowych.

W **formie B** helisy DNA występują reszty deoksyrybozy C2'-endo, wiązania glikozydowe o konformacji *anty*, 10 par zasad azotowych przypada na każdy pełny skręt, który ma wysokość 34 Å, a średnica helisy wynosi 23,7 Å. W **formie A** prawoskrętnej helisy DNA występują reszty deoksyrybozy C3'-endo, wiązania glikozydowe o konformacji *anty*, 11 par zasad azotowych przypada na każdy pełny skręt, który ma wysokość 25 Å, średnica helisy zaś wynosi 25,5 Å. W formie A pary zasad azotowych nachylone są do osi helisy pod kątem 20°, zatem nie są do niej prostopadłe, jak w formie B. Występuje praktycznie tylko jedna głęboka bruzda duża. W sekwencji **formy Z** helisy DNA występują przemienne nukleotydy purynowe i pirymidynowe np. GC, AC. W tej formie DNA wszystkie nukleotydy purynowe mają wiązania glikozydowe konformacji *syn*, natomiast nukleotydy pirymidynowe zawierają wiązania glikozydowe konformacji *anty*. Obrót tych par zasad o 180° wokół wiązania N-glikozydowego powoduje, że Z-DNA jest helisą lewoskrętną. Sprawia to również, że obwodowe rdzenie fosfocukrowe tworzą wzór zygzakowaty i stąd wywodzi się nazwa tej formy Z-DNA. W formie Z-DNA pary zasad azotowych odchylone są od osi helisy o kąt 10°, zatem nie są do niej prostopadłe, jak w formie B. Forma Z jest najbardziej wydłużona spośród wszystkich trzech form DNA, na każdy pełny skręt przypada 12 par zasad azotowych, skok helisy wynosi 45,6 Å, a średnica 18,4 Å. Forma ta ma tylko małą głęboką bruzdę, która jest wąska. Z-DNA wymaga wysokiego stężenia soli lub specyficznych kationów, poliamin (spermina, spermidyna) do stabilizacji i nie tworzy struktur nukleosomowych.

Występowanie w obrębie DNA fragmentów o zróżnicowanej strukturze sprawia, że długie łańcuchy polideoksyrybonukleinowe nie są sztywnymi helikalnymi zwojami cylindrycznymi, lecz tworzą liczne zagięcia, struktury, tzw. spinki do włosów lub superhelikalne skręty. Różnorodność strukturalna fragmentów DNA zwiększa jego zdolność do rozpoznawania i oddziaływania z innymi składnikami komórki.

Większość sekwencji DNA eukariotycznego stanowi kompleks nukleoproteinowy, głównie w formie nukleosomów.

**Rdzeń nukleosomu** stanowi oktamer złożony z ośmiu histonów, mianowicie H2A, H2B, H3 i H4, z których każdego jest po dwa. **Oktamer** owinięty jest lewoskrętnie przez łańcuch 146 par zasad azotowych, stanowiący 1,75 skreću helisy DNA. Poszczególne nukleosomy połączone są fragmentem DNA, zwanym **łącznikiem**, zawierającym od 40 do 80 par zasad. Histon H1 znajduje się poza oktamerem, może zewnętrznie „ochraniać” krótkie fragmenty DNA nukleosomu w miejscach, od których zaczynają się łączniki. Histony neutralizują wzajemne odpychania ujemnych ładunków obecnych na rdzeniach cukrowo-fosforanowych. Ponadto, umożliwiają ciasne upakowywanie nici DNA do różnych form skondensowanej heterochromatyny, aż do chromosomu, który jest maksymalnie skondensowaną formą DNA. Rozwinięcie tych struktur ma miejsce wówczas, gdy DNA uczestniczy w replikacji lub transkrypcji. Właściwa organizacja nukleosomów i innych kompleksów białkowych z DNA wymaga działania również białek „opiekunich”, tzw. chaperonów (fonetycznie: czaperonów).

## Kwasy rybonukleinowe

Cząsteczki kwasów rybonukleinowych są znacznie mniejsze od cząsteczek DNA, ich masa cząsteczkowa osiąga 35 000 daltonów. Wszystkie cząsteczki RNA są formami jednoniciowymi, niektóre mogą tworzyć rejony dwuniciowe, stabilizowane wiązaniami wodorowymi między komplementarnymi zasadami azotowymi. Rejony dwuniciowe w obrębie pojedynczej nici polinukleotydowej powstają między sekwencjami komplementarnymi, które są rozmieszczone w różnych rejonach liniowej struktury pierwszorzędowej, oddziałują ze sobą parami i są stabilizowane wiązaniami wodorowymi. Oddziaływania te sprawiają, że pojawiają się „sparowane” rejony dwuniciowe w obrębie pojedynczej nici polinukleotydowej. Rejony sparowane nadają określoną strukturę przestrzenną cząsteczce.

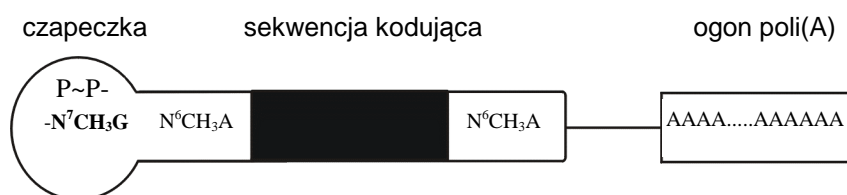
RNA zamiast deoksyrybozy zawiera rybozę, a zamiast tyminy uracyl. Wyróżnia się trzy główne typy RNA, z których każdy spełnia odmienne funkcje, są to: informacyjny RNA (mRNA), transportujący RNA (tRNA) i rybosomalny RNA (rRNA).

Wszystkie wymienione typy kwasów rybonukleinowych eukariotycznych są produktami różnorodnych modyfikacji chemicznych, które mają miejsce po transkrypcji i składają się na proces określany mianem „**dojrzewania**” RNA, któremu podlega większość **pierwotnych transkryptów** (bezpośrednich produktów transkrypcji). Proces dojrzewania RNA obejmuje następujące zmiany: 1) usuwanie pewnych sekwencji nukleotydowych przez endonukleazy, rybozomy i egzonukleazy; 2) dodawanie nukleotydów do końca 5' i 3' pierwotnego transkryptu lub produktu jego rozcięcia; 3) chemiczne modyfikacje (głównie metylacje) niektórych nukleotydów w obrębie zasad azotowych lub reszt monocukrowych. Kwasy rybo-

nukleinowe oddziałują z białkami, tworząc kompleksy rybonukleoproteinowe (RNP).

## mRNA

Informacyjny RNA służy jako matryca w syntezie białka. W komórce jest tyle specyficznych rodzajów cząsteczek mRNA, ile komórka syntetyzuje rodzajów łańcuchów polipeptydowych. Informacyjne RNA stanowią około 5% wszystkich kwasów rybonukleinowych w komórce. „Dojrzałe” cząsteczki mRNA mają podobny plan budowy w komórkach eukariotycznych.



Schematyczny plan budowy eukariotycznego mRNA

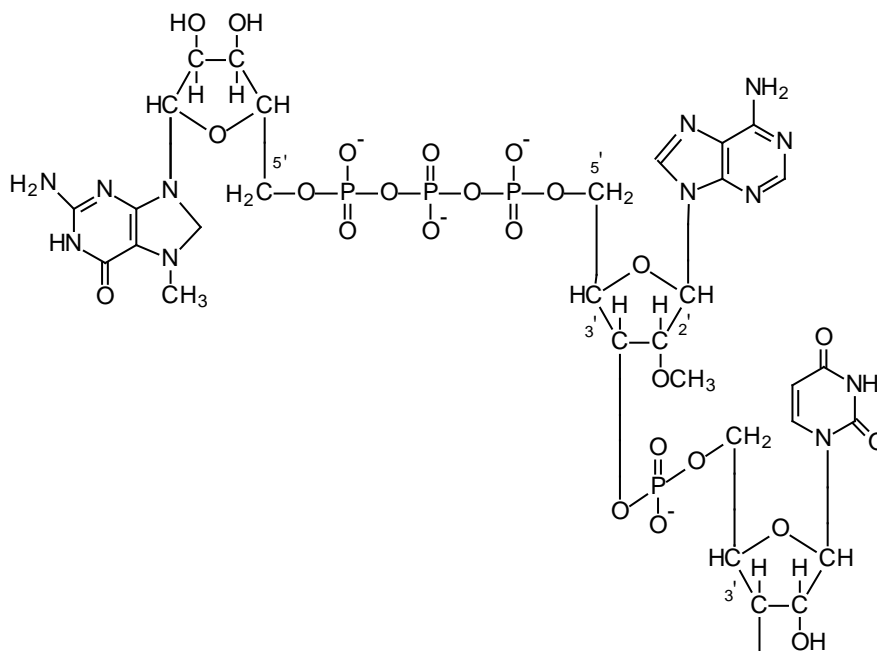
W budowie większości eukariotycznych mRNA charakterystyczne jest występowanie trzech stałych elementów, mianowicie czapeczki (ang. *cap*) znajdującej się na końcu 5', specyficznej sekwencji kodującej i „ogona poli(A)”, który występuje na końcu 3'.

**Czapeczkę** stanowi reszta N7-metyloguanozyny o odwróconej orientacji (w porównaniu z typowymi wiązaniami 3'5'-fosfodiestrowymi), która połączona jest mostkiem 5'-5'-trifosforanowym, najczęściej z N6-metyloadenozyną. Ta szczególna chemiczna modyfikacja powstaje kotranskrypcyjnie, zanim syntetyzowany RNA osiągnie długość 20–30 nukleotydów. Dwa pierwsze nukleotydy za czapeczką mogą być metylowane, zarówno w pozycji atomu azotu zasady azotowej (zwykle jest to N6 adeniny), jak i w pozycji C2 rybozy.

Funkcja czapeczki polega na ochronie pre-mRNA oraz mRNA przed działaniem 5'-egzonukleaz, ponadto uczestniczy w procesie dojrzewania mRNA (np. w splicingu), w transporcie mRNA z jądra do cytoplazmy i translacji.

**Sekwencja kodująca** (czyli rejon ulegający translacji) jest specyficzna dla każdego rodzaju mRNA, tym samym odmienne rodzaje mRNA różnią się sekwencją kodującą. Sekwencja kodująca mRNA jest komplementarna do sekwencji eksonów pojedynczej nici matrycowej DNA, przy czym U jest komplementarna do A w nici DNA. Tym samym sekwencja kodująca mRNA stanowi kopię eksonów nici kodującej DNA, jednak w mRNA występuje U wszędzie tam, gdzie w kodującej nici DNA występuje T.





Struktura chemiczna czapeczki mRNA i przyległych nukleotydów

W procesie dojrzewania sekwencja kodująca jest składana z eksonów pre-mRNA, po wycięciu sekwencji interweniujących, zwanych intronami (niekodującymi), które przerywają sekwencje kodujące zwane eksonami. Proces rozcinania pre-mRNA, wycinania intronów i składania eksonów nazywa się **składaniem mRNA** (ang. *splicing*). Reakcje te zachodzą w jądrze komórkowym i wymagają obecności w intronie sekwencji na końcu **5'-GU-3'**, a na końcu 3' sekwencji **5'-AG-3'**, poprzedzonej sekwencją bogatą w pochodne pirymidyny, zwaną **traktem polipirymidynowym**, przed którą ma znajdować się **sekwencja rozgałęzienia**.

Podczas składania mRNA, w wyniku ataku grupy 2'-hydroksylowej z reszty nukleotydu adeninowego sekwencji rozgałęzienia na wiązanie z udziałem G z 5' końca, powstaje charakterystyczna cząsteczka o kształcie lassa oraz wolny ekson 1. Po czym następuje rozcięcie po reszcie G w sekwencji AG na końcu 3' intronu, w wyniku czego intron zostaje uwolniony w postaci lassa i zdegradowany, a dwie sekwencje eksonowe łączą się ze sobą. Podczas dojrzewania alternatywnego może mieć miejsce przekształcanie pre-mRNA w więcej niż jeden rodzaj dojrzałego mRNA, dzięki różnym sposobom składania (tzw. alternatywne składanie). **Alternatywne składanie mRNA** wynika ze zróżnicowanego użycia miejsc „splicingowych” 5' i 3', dzięki wykorzystaniu różnych promotorów, użyciu różnych miejsc poli(A) i ostatecznie z pozostawienia jednych, a usunięcia innych eksonów.

W wyniku alternatywnego składania z jednego pre-mRNA powstają odmienne sekwencje kodujące w mRNA dzięki różnym kombinacjom połączeń eksonów. Za alternatywne składanie mRNA odpowiedzialne są czynniki swoiste dla określonych typów komórek. Proces ten katalizowany jest przez kompleksy białek z małymi jądrowymi RNA (snRNP).

Niezwykłą formą dojrzewania mRNA jest **redagowanie RNA**, w wyniku którego ulega zmianie sekwencja pierwotnego transkryptu. Przykładowo, podczas redagowania pre-mRNA apolipoproteiny-B w komórkach jelita u człowieka następuje pojedyncza zmiana zasady C na U, czego konsekwencją jest powstanie kodonu stop w mRNA i skrócenie sekwencji kodującej do 6666 nukleotydów z długości 14 500 nukleotydów, której produktem jest apolipoproteina B48 o wielkości 241 kDa. W komórkach wątroby pre-mRNA apolipoproteiny-B nie ulega redagowaniu, dlatego produktem sekwencji kodującej tego mRNA jest apolipoproteina B100 o wielkości 512 kDa.

**Ogon poli(A)** to sekwencja 200–250 nukleotydów adeninowych, znajdująca się na końcu 3' mRNA. Ogon poli(A) tworzy się posttranskrypcyjnie (w procesie dojrzewania mRNA), w wyniku cięcia pre-mRNA, a następnie dodania łańcucha reszt nukleotydów adeninowych, dzięki obecności specyficznej sekwencji w DNA (tym samym w odpowiednim transkrypcie pre-mRNA), zwanej sygnałem poliadenylacji. Niektóre mRNA mają więcej niż jedno miejsce poliadenylacji, tzw. alternatywne miejsca poli(A), dzięki temu różne miejsca mogą być użyte w odmiennych warunkach, np. w różnych typach komórek, dając ostatecznie różne dojrzałe mRNA.

Ogon poli(A) stabilizuje mRNA, umożliwia przyłączenie białek zabezpieczających ten kwas rybonukleinowy przed działaniem 3'-egzonukleaz. Ogon poli(A) może pomagać w translacji mRNA.

## tRNA

Cząsteczki tRNA pełnią funkcje cząsteczek adaptorowych, które dostarczają aminokwasy do rybosomów, gdzie tworzone są wiązania peptydowe między aminokwasami w kolejności określonej przez mRNA.

Transportujące RNA stanowią około 15% wszystkich kwasów rybonukleinowych w komórce. Istnieje przynajmniej jeden tRNA dla każdego z dwudziestu aminokwasów (łącznie 61 tRNA).

Cząsteczki tRNA są małe, jak na kwasy nukleinowe, ich liniowa sekwencja może mieć długość od 60 do 95 nukleotydów, zazwyczaj 76. Na końcu 5' cząsteczki znajduje się monofosforan, zwykle przy guanozynie, a na końcu 3' stała trójnukleotydomowa sekwencja 5'-CCA-3'. W sekwencji tej do grupy -OH przy C2' lub C3' rybozy nukleotydu adeninowego przyłącza się aminokwas wiązaniem estrowym. Sekwencja 5'-CCA-3' prokariotycznych tRNA jest zakodowana w genie, natomiast

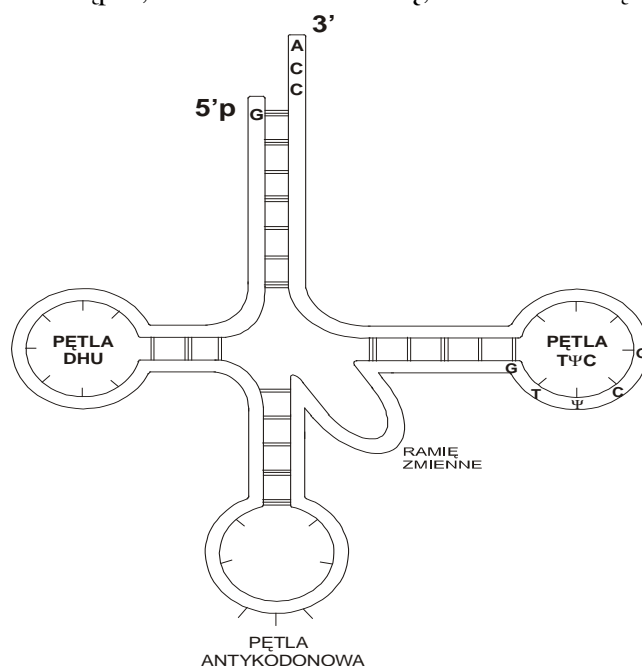
u eukariota dodawana jest enzymatycznie podczas posttranskrypcyjnego procesu dojrzewania pre-tRNA.

W strukturze pierwszorzędowej tRNA stwierdza się wiele zmodyfikowanych nukleozydów, które mogą stanowić nawet 20% wszystkich nukleotydów w cząsteczce. Zmodyfikowanymi nukleozydami, powszechnie występującymi w tRNA, są pseudorydina, rybotymina, dihydrourydina, inozyna, N<sup>6</sup>-izopentyloadenozy-na, 4-tiourydina, wszystkie wprowadzane są posttranskrypcyjnie w procesie dojrzewania. W cząsteczce tRNA znajduje się 15 niezmiennych nukleotydów.

Struktura pierwszorzędowa tRNA zawiera liczne, liniowo oddalone sekwencje komplementarne, umożliwiające powstawanie rejonów dwuniciowych, nadających określoną strukturę przestrzenną cząsteczce tRNA.

Struktura drugorzędowa typu liścia koniczyny jest charakterystyczna dla wszystkich tRNA. W strukturze tej rejon komplementarne cząsteczki oddziałują ze sobą, tworząc cztery ramiona i trzy pętle. Ramiona zawierają sparowane nukleotydy (połączone wiązaniami wodorowymi w komplementarne pary), natomiast pętle tworzą niesparowane i w większości niezmiennie nukleotydy.

Końce 5' i 3' poliribonukleotydu tRNA tworzą rejon (z 7 par nukleotydów) sparowany wiązaniami wodorowymi, który nazywa się **ramieniem akceptorowym** aminokwasu. Następne, bardzo krótkie **ramię**, które składa się z 3 lub 4 par kom-



plementarnych nukleotydów sparowanych wiązaniami wodorowymi, poprzedza **pętlę dihydrourydylową** (DHU). Jej nazwa wynika z obecności zmodyfikowanej zasady dihydrourycyli. Pętla ta może składać się z 7–10 nukleotydów. Po przeciwnej stronie ramienia akceptorowego znajduje się **ramię antykodonowe**, składające się z 5 par komplementarnych nukleotydów sparowanych wiązaniami wodorowymi, zakończone **pętlą antykodonową**. Pętla ta zawiera 7 nukleotydów, z których trzy centralne tworzą **antykodon**, komplementarny do trójnukleotydowego kodonu określonego aminokwasu, znajdującego się w sekwencji kodującej mRNA. Obecność inozyny w antykodonie umożliwia cząsteczce tRNA rozpoznawanie więcej niż jednego kodonu.

**Ramię zmienne (dodatkowe)** jest najbardziej zmiennym elementem w strukturze poszczególnych cząsteczek tRNA. Może mieć różną długość, od bardzo słabo zaznaczonej, składającej się z 3 nukleotydów do długiego ramienia utworzonego aż z 21 nukleotydów. Długie ramię zmienne może zawierać rejon sparowany, składający się z 7 par nukleotydów.

**Ramię TΨC**, składające się z 5 par nukleotydów sparowanych zakończone jest **pętlą TΨC**, utworzoną z 7 niesparowanych nukleotydów, wśród których niezmiennymi nukleotydami są GTΨC.

Większość niezmiennych nukleotydów znajduje się w pętlach i nie ma istotnego znaczenia w tworzeniu struktury drugorzędowej, lecz biorą udział w tworzeniu trzeciorzędowych wiązań wodorowych, które stabilizują **strukturę trzeciorzędową tRNA**. Tworzenie komplementarnych par między nukleotydami niezmiennymi pętli DHU i pętli TΨC umożliwia cząsteczce tRNA przybranie konformacji przestrzennej (struktury III-rzędowej), przypominającej odwróconą literę L, zawierającą na jednym końcu (dłuższym) antykodon, a na drugim (krótszym) miejsce akceptorowe dla aminokwasu.

Wszystkie dojrzałe tRNA powstają z dłuższych pierwotnych transkryptów, tzw. pre-tRNA, w procesie dojrzewania. Reakcje składające się na proces dojrzewania tRNA u eukariota polegają na 1) odcięciu sekwencji liderowej z końca 5'; 2) odcięciu dwóch nukleotydów z końca 3'; 3) dodaniu do końca 3' sekwencji CCA; 4) wycięciu centralnego intronu z cząsteczki pre-tRNA; 5) chemicznych modyfikacjach zasad azotowych. Procesy te katalizują egzonukleazy i endonukleazy (RNazy D, E, F, P) oraz enzymy modyfikujące zasady. RNaza P jest endonukleazą, składającą się z jednej cząsteczki RNA i jednej białka (jest więc RNP), za aktywność katalityczną odpowiedzialna jest cząsteczka RNA (rybozym), która przeprowadza dojrzewanie końca 5' tRNA.

**Rybozomy** to katalityczne cząsteczki RNA, czyli biokatalizatory, zdolne do katalizowania chemicznej reakcji w nieobecności białka. W przypadku RNazy P, jej składnik białkowy przypuszczalnie pomaga katalizować reakcję *in vivo*, ponie-

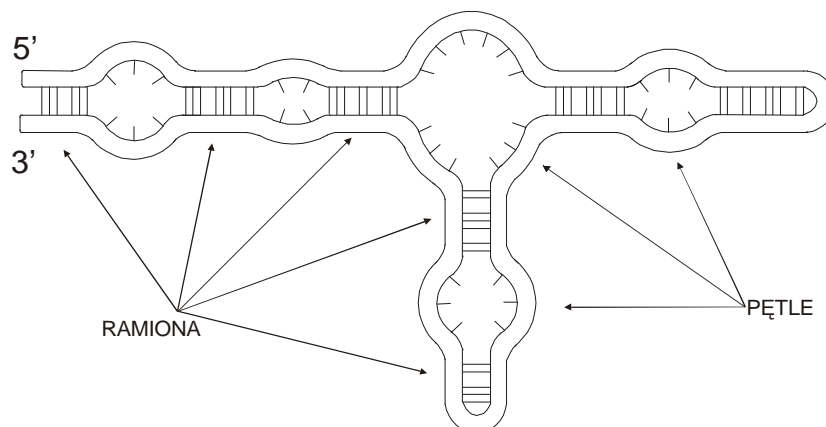
waż *in vitro* rybozym RNazy P wymaga większego stężenia jonów  $Mg^{2+}$  od stężenia magnezu obecnego w komórkach.

## rRNA

Rybosomalne RNA są jednoniciowymi polirybonukleotydami, występującymi w komórkach jako główne składniki rybosomów oraz jąderka. Stanowią około 80% komórkowego kwasu rybonukleinowego. Masa cząsteczkowa większości rRNA jest bardzo duża, ponieważ pojedyncza cząsteczka może zawierać kilka tysięcy nukleotydów, z wyjątkiem nielicznych, których pojedyncza cząsteczka posiada 121 lub 158 nukleotydów.

Charakterystyczną modyfikacją chemiczną dla cząsteczek rRNA stanowi metylacja, wykryto 24 swoiste metylacje zasad azotowych, przy czym grupa metylowa dodawana jest głównie do pierścienia adeniny. Ponadto, często obserwuje się metylację prowadzącą do 2'-O-metylorybozy, która może zachodzić w ponad 100 miejscach cząsteczki rRNA. Reakcje metylacji, zachodzące w jądrze komórkowym, przeprowadzają niskocząsteczkowe cząstki RNP, których snRNA są komplementarne do rejonów rRNA, z którymi tworzą pary, definiując w ten sposób miejsca metylacji. Aktywnym donorem grup metylowych jest S-adenozylometionina.

Struktura drugorzędowa wszystkich cząsteczek rRNA wyróżnia się obecnością sparowanych rejonów dwuniciowych, tzw. **ramion**, poprzedzielanych rejonami niesparowanymi, jednoniciowymi, tzw. **pętlami**. Obecność w



polirybonukleotydzie rejonów ramion i pętli sprzyja specyficznym oddziaływaniom i wiązaniu białek, tym samym tworzeniu kompleksów rybonukleoproteinowych RNP, mających istotne znaczenie w formowaniu rybosomów.

W komórkach eukariotycznych występują 4 rodzaje rRNA. Wielkocząsteczkowy rRNA, którego łańcuch polirybonukleinowy tworzy 4718 nukleotydów, określa się jako **28S rRNA**.

[Wielkość **S (Swedberg)** jest liczbową wartością współczynnika sedymentacji ( $s$ ), zdefiniowanego szybkością, z jaką makrocząsteczki sedymentują (opadają) w polu wirowania (przyspieszenia odśrodkowego, tysiącrotnie większego od pola grawitacji ziemskiej), osiąganego w ultrawirówkach. Wartości  $S$  są nieaddytywne, ponieważ zależą od masy i kształtu cząsteczki.]

Mniejszą cząsteczką jest **18S rRNA**, która składa się z 1874 reszt nukleotydowych. Niskocząsteczkowe rRNA są dwa, jeden z nich, mianowicie **5,8S rRNA** (składający się z 158 nukleotydów), występuje tylko u eukariota, drugi natomiast, **5S rRNA** (składający się z 121 nukleotydów), poza tym, że jest obecny w komórkach eukariotycznych, charakterystyczny jest również dla komórek prokariotycznych. W komórkach prokariotycznych występują 3 rodzaje rRNA, mianowicie: **23S rRNA, 16S rRNA i 5S rRNA**.

Dojrzałe cząsteczki rRNA powstają z pierwotnego transkryptu pre-rRNA, pojedynczego długiego prekursora, w wyniku serii modyfikacji i cięć w tzw. zewnętrznych transkrybowanych sekwencjach lub wewnętrznych transkrybowanych sekwencjach rozdzielających, składających się na proces dojrzewania. W komórkach ssaków pierwotny transkrypt o wielkości rzędu 13 500 nukleotydów zawiera po jednej kopii 18S rRNA, 5,8S rRNA i 28S rRNA. Natomiast eukariotyczny 5S rRNA powstaje z odrębnego genu w procesie transkrypcji katalizowanej przez polimerazę RNA (III), odmienną od polimerazy RNA (I), która transkrybuje pre-rRNA dla trzech pozostałych rybosomalnych kwasów rybonukleinowych. Proces dojrzewania transkryptu 5S rRNA jest znacznie ograniczony lub też nie zachodzi wcale. Wszystkie trzy prokariotyczne rRNA transkrybowane są przez jedną polimerazę RNA III w formie pojedynczej nici pierwotnego transkryptu, na której znajdują się również sekwencje pre-tRNA.

Proces dojrzewania pre-rRNA katalizowany jest enzymatycznie, w tym również przez rybozomy. Udowodniono (przynajmniej u jednego przedstawiciela eukariota), że występujący w pre-rRNA u *Tetrahymena thermophila* intron przeprowadza autokatalityczny splicing. W układzie *in vitro* intron ten wymaga kofaktora, którym jest guanozyna lub jej ufosforylowane pochodne, natomiast zupełnie nie potrzebuje obecności białek do wycięcia się z prekursora. Intron ten spełnia kryteria typowego rybozomu. Rybozym ten, poza własnością samowycinania, posiada zdolność katalizowania ligacji uwolnionych fragmentów rRNA. Rybozomy, czyli katalityczne, krótkie cząsteczki RNA, charakteryzują się minimalnymi wymogami sekwencyjnymi, koniecznymi do ujawnienia swych własności. Fakt ten stał się podstawą konstruowania syntetycznych rybozymów, które mogą rozcinać inne cząsteczki RNA, w nadziei, że będzie można je stosować w terapii, do inaktywacji odpowiednich mRNA, wirusów i do zabijania komórek nowotworowych.

Dojrzewające cząsteczki rRNA zwijają się w przestrzeni, łączą się z białkami rybosomowymi, podlegając samoorganizacji prowadzącej do wytworzenia rybosomów. Oznacza to, że informacje o strukturze rybosomów są zawarte w strukturze ich składników.

Rybosomy to typowe RNP, czyli kompleksy rybonukleoproteinowe o olbrzymiej masie cząsteczkowej, rzędu  $2,75 \cdot 10^6$  daltonów u prokariota (70 S) i rzędu  $4,5 \cdot 10^6$  daltonów u eukariota (80 S). Każdy rybosom składa się z dwóch podjednostek, większej i mniejszej.

**Rybosomy eukariotyczne** w swej dużej podjednostce (o wielkości 60S, czyli  $3 \cdot 10^6$  Da) zawierają trzy rodzaje rRNA (28S, 5,8S, 5S) i około 45 różnych białek, natomiast w małej podjednostce (o wielkości 40S, czyli  $1,5 \cdot 10^6$  Da) jeden rodzaj rRNA (18S) oraz około 30 różnych białek.

**Rybosomy prokariotyczne** w swej dużej podjednostce (o wielkości 50S, czyli  $1,7 \cdot 10^6$  Da) zawierają dwa rodzaje rRNA (23S, 5S) oraz około 31 różnych białek, natomiast w małej podjednostce (o wielkości 30S, czyli  $0,95 \cdot 10^6$  Da) jeden rodzaj rRNA (16S) oraz około 21 różnych białek.

## Własności chemiczno-fizyczne kwasów nukleinowych

Cząsteczki DNA są bardzo długie w porównaniu do swej średnicy i stosunkowo sztywne, dlatego roztwory ich mają dużą lepkość.

Kwasy nukleinowe wykazują różną wrażliwość na środowisko zasadowe i kwasowe.

Cząsteczki DNA są odporne na działanie mocnych zasad. Pozostawienie DNA w roztworze 1M NaOH przez 20–40 godzin w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  nie dostarcza żadnych produktów hydrolizy zasadowej. W tych warunkach RNA rozpada się całkowicie do mieszaniny 2'- i 3'- monofosfonukleozydów. Następuje to dzięki obecności grupy  $-\text{OH}$  przy atomie  $\text{C}2'$  rybozy, która w środowisku zasadowym uczestniczy w tworzeniu nietrwałych wewnątrzcząsteczkowych wiązań fosfodiestrowych w cyklicznych nukleozydo-2',3'-fosforanach. Wiązania te rozpadają się z równym prawdopodobieństwem do nukleozydo-2'- i nukleozydo-3'-fosforanów. Brak grupy  $-\text{OH}$  przy atomie  $\text{C}2'$  deoksyrybozy uniemożliwia powstanie cyklicznych fosforanów nukleozydów i jest podstawą oporności kwasów deoksyrybonukleinowych na działanie zasad.

Hydroliza kwasowa kwasów nukleinowych dostarcza różnych produktów zależnie od stężenia stosowanych kwasów, czasu trwania hydrolizy i temperatury. Wiązania glikozydowe różnią się wrażliwością na działanie kwasów, mianowicie: w nukleotydach purynowych wiązania glikozydowe są bardziej labilne niż w nukleotydach pirymidynowych.

Krótkotrwałe ogrzewanie (w 100°C), zarówno DNA, jak i RNA z kwasami (np. HCl) o niskich stężeniach (ok. 1M) początkowo dostarcza kwasów apurynowych, będących łańcuchami polinukleotydowymi, pozbawionymi zasad purynowych. W dalszym etapie tej hydrolizy kwasowej (po 1 godz.) powstają mononukleotydy pirymidynowe, pentozy i kwas fosforowy.

Pod wpływem działania mocnych kwasów mineralnych (np. 72% roztwór HClO<sub>4</sub>) i podwyższonej temperatury (100°C przez 1 godz.) zarówno z DNA, jak i z RNA uwolnione zostają zasady purynowe oraz pirymidynowe, pentozy, a także kwas fosforowy, tym samym ulegają całkowitej hydrolizie.

Hydroliza enzymatyczna kwasów nukleinowych polega na rozkładzie ich wiązań fosfodiesterowych przez enzymy z grupy endo- lub egzo- rybonukleaz lub deoksyrybonukleaz. W zależności od rodzaju uczestniczącego w reakcji enzymu powstają różne produkty, nukleozydo-5'-monofosforany lub nukleozydo-3'-monofosforany. Uwolnienie zasad azotowych z połączeń glikozydowych przeprowadzają specyficzne nukleazy.

Szczególną grupę endonukleaz stanowią **enzymy restrykcyjne**, zwane restryktazami. Są to enzymy syntetyzowane przez różnorodne szczepy bakterii, których zadaniem jest degradacja obcego (np. wirusowego) DNA w komórce bakteryjnej. Enzymy te charakteryzują się prawie absolutną specyficznością, rozpoznają w nici DNA sekwencję, zazwyczaj 4–8 nukleotydową, w obrębie której rozcinają specyficzne wiązanie fosfodiesterowe. W genomie bakteryjnym sekwencje te zwykle są metylowane na reszcie adeniny lub cytozyny, co zabezpiecza DNA gospodarza przed degradacją przez własne enzymy restrykcyjne. Enzymy restrykcyjne rozpoznają i rozszczepiają sekwencje palindromowe w DNA. Sekwencja palindromowa dwuniciowego DNA to taka sekwencja nukleotydów, która jest identyczna, gdy odczytuje się ją na obu niciach w kierunku 5'→3'. Niektóre restryktazy, w wyniku hydrolizy DNA, dostarczają fragmenty zakończone jednoniciowymi sekwencjami, zwanymi potocznie „końcami kohezyjnymi”. Końce kohezyjne fragmentów DNA wytworzonych skutkiem działania tego samego enzymu restrykcyjnego są zawsze komplementarne do siebie, niezależnie od źródła pochodzenia preparatu DNA poddawanego hydrolizie. Takie produkty hydrolizy DNA można połączyć ze sobą na zasadzie komplementarności poprzez jednoniciowe końce kohezyjne. Fakt ten sprawił, że enzymy restrykcyjne stały się ważnym narzędziem w biologii molekularnej, umożliwiającym nie tylko wycinanie, ale i łączenie fragmentów DNA w **rekombinowane** cząsteczki.

## Denaturacja i renaturacja DNA

Proces denaturacji kwasów nukleinowych polega na zniszczeniu ich struktury II- i III-rzędowej. Czynnikiem denaturującym DNA są: wysoka wartość pH, alkohole, fenole, wysoka temperatura, ultradźwięki, promieniowanie.

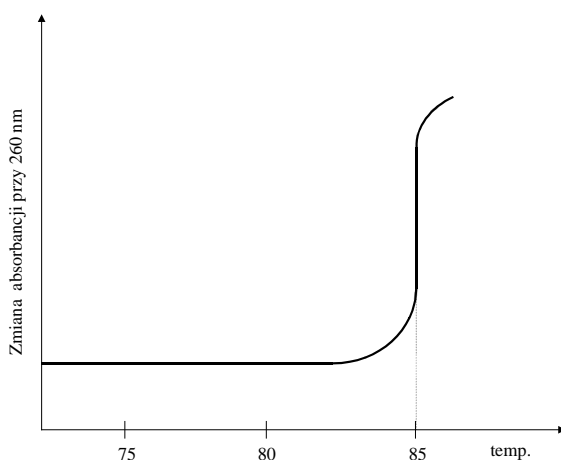


Związkami powszechnie stosowanymi w analizie kwasów nukleinowych w celu spowodowania denaturacji kwasów nukleinowych są formamid ( $\text{HCONH}_2$ ) i mocznik ( $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ ). Związki te powodują rozrywanie wiązań wodorowych większości cząsteczek wody i wykluczają umiejscawianie się wody pomiędzy zasocjowanymi warstwowo hydrofobowymi zasadami azotowymi, doprowadzając do denaturacji dwuniciowych struktur kwasów nukleinowych.

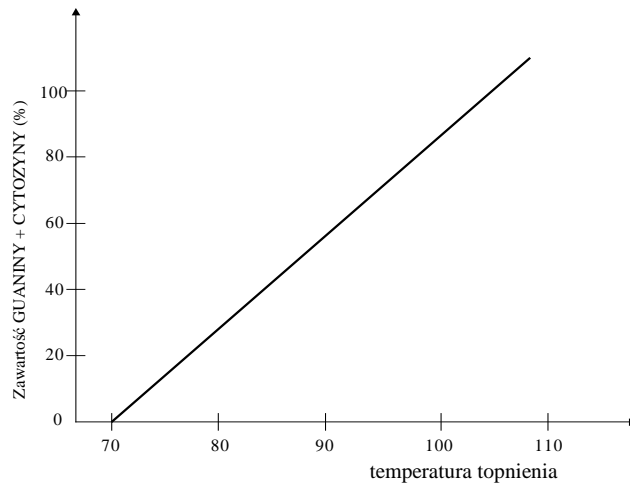
Wpływ środowiska zasadowego polega na zmianie tautomerycznych form zasad azotowych w kwasach nukleinowych, w kierunku form enolowych (laktymowych), ponieważ cząsteczka traci proton, a ładunek ujemny jest stabilnie zlokalizowany na atomie tlenu. Ma to wpływ na wiązania wodorowe między parami zasad azotowych, powodując ich rozerwanie, tym samym zniszczenie dwuniciowej struktury DNA, czyli jego denaturację.

Pod wpływem ogrzewania struktura podwójnej helisy DNA ulega podobnemu zniszczeniu i rozpada się na pojedyncze nici. Rozpad struktury helikalnej następuje w określonej temperaturze, zwanej temperaturą topnienia DNA.

Temperatura topnienia ( $T_m$ ) określonych cząsteczek DNA, to taka wartość, przy której dochodzi do utraty połowy helikalnej struktury DNA, z towarzyszącym nagłym wzrostem pochłaniania światła w ultrafiolecie (przy 260 nm). Na przed-

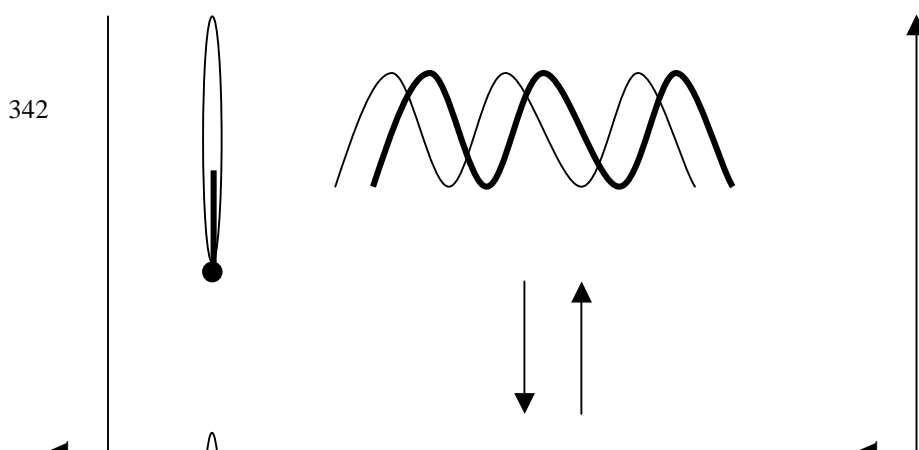


stawionym powyżej wykresie temperatura topnienia analizowanego preparatu DNA wynosi 85°C. Jej wartość zależy od składu zasad azotowych DNA, mianowicie im wyższa zawartość par CG, tym wyższa temperatura topnienia.



Denaturacja jest odwracalna, po usunięciu czynnika denaturującego, ma miejsce odtworzenie komplementarnej struktury podwójnej helisy DNA, a proces ten nazywa się **renaturacją**.

Zdenaturowany DNA w temperaturze nieco niższej od temperatury topnienia, po powolnym schłodzeniu w temperaturze pokojowej ulega prawie całkowitej renaturacji do struktury dwupasmowej. Szybkość renaturacji wyraża się jako iloczyn stężenia (mol/l) i czasu (s), u prokariota zazwyczaj jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości genomu. Jednocześnie szybkość renaturacji DNA okazuje się tym większa, im wyższa zawartość w nim powtarzających się sekwencji, np. mysiego satelitarny DNA (10% mysiego DNA) renaturuje w ciągu kilku sekund, znacznie szybciej od najmniejszych cząsteczek DNA (np. faga *T<sub>4</sub>*, lub *E.coli*). Natomiast DNA zawierający sekwencje unikatowe, nie powtarzające się (np. 70% mysiego DNA) renaturuje bardzo wolno. Podczas renaturacji łączenie w podwójne helisy pojedynczych łańcuchów polinukleotydowych, pochodzących z różnych kwasów nukleinowych (zarówno typu DNA-DNA, jak i DNA-RNA), nazywa się **hybrydyzacją**. Tworzenie hybryd jest możliwe między podobnymi (spokrewnionymi) łańcuchami polinukleotydowymi, które na długich odcinkach cząsteczki mają komplementarne sekwencje zasad azotowych. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych wykorzystywana jest jako metoda w biologii molekularnej.



<sup>0</sup>C

**dsDNA**

<sup>0</sup>C

<sup>0</sup>C

**ssDNA**

Denaturacja i renaturacja termiczna DNA

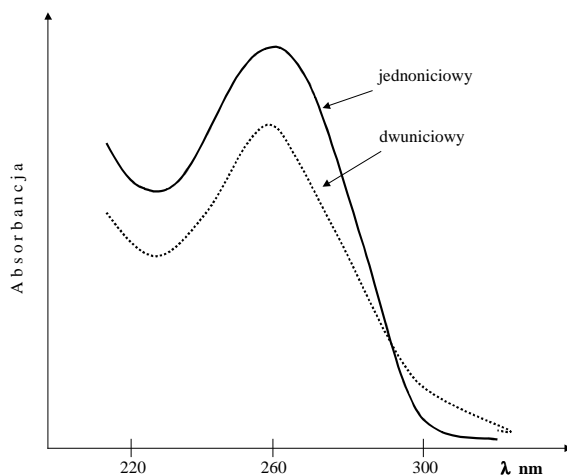
### **Spektroskopowe właściwości kwasów nukleinowych**

Kwasy nukleinowe, podobnie jak nukleotydy, nukleozydy i zasady azotowe, selektywnie pochłaniają światło w nadfiolecie (UV), z maksimum przypadającym na 260 nm. Właściwość ta wynika z obecności w omawianych związkach układów aromatycznych: purynowego i pirymidynowego, zawierających sprzężone wiązania podwójne oraz heteroatomy.

Zdolność kwasów nukleinowych do absorpcji światła wykorzystuje się do wykrywania, ilościowego oznaczania oraz określania stopnia czystości preparatów kwasów nukleinowych.

Absorbancja kwasów nukleinowych nie jest addytywną sumą absorbancji wszystkich zasad azotowych, wchodzących w ich skład, rzeczywista molowa absorpcja okazuje się niższa o około 40% od wartości teoretycznie obliczonej na podstawie składu. Zjawisko to nosi nazwę **efektu hipochromowego**, który wynika z helikalnego uporządkowania przestrzennego nici polinukleotydowych, opisanego strukturą drugorzędową i trzeciorzędową.

Widma absorpcyjne kwasów rybonukleinowych i deoksyrybonukleinowych są bardzo podobne. Absorbancja przy 260 nm jest najmniejsza dla dwuniciowego DNA (dsDNA), większa dla jednoniciowego DNA (ssDNA) lub RNA i największa dla wolnych nukleotydów.



Cząsteczki jednoniciowe DNA są produktami denaturacji dwuniciowych cząsteczek DNA i silniej absorbują światło o długości fali 260 nm niż cząsteczki dwuniciowe DNA. Zjawisko to nosi nazwę **efektu hiperchromowego**, który jest konsekwencją obniżenia uporządkowania przestrzennego nici polinukleotydowych.

Wielkość efektu hiperchromowego jest proporcjonalna do ilości nukleotydów znajdujących się w obrębie helikalnych fragmentów cząsteczki, które uległy w tym procesie zniszczeniu. Renaturacji całkowitej DNA do struktury dwupasmowej towarzyszy efekt hipochromowy. Szybkie schłodzenie zdenaturowanego preparatu DNA, raczej utrwała struktury jednoniciowe. Takie ssDNA mogą splatać się swymi krótkimi regionami komplementarnymi pojedynczej nici, w nieznacznym natomiast stopniu powstają dwuniciowe struktury, stabilizowane wiązaniami wodorowymi, dlatego w tych warunkach efekt hipochromowy jest raczej niewielki.

Denaturacji i renaturacji DNA, poza zmianą absorpcji światła w ultrafiolecie, towarzyszą zmiany innych własności fizycznych, jak lepkość i skręcalność optyczna.

Własności spektroskopowe makrocząsteczek pozwalają określić przybliżoną czystość preparatów kwasów nukleinowych, na podstawie wartości stosunku absorbancji przy 260 nm i 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Wolny od zanieczyszczeń dwuniciowy DNA ma wartość współczynnika  $A_{260}/A_{280}$  równą 1,8, czysty RNA około 2, czyste białka poniżej 1 (około 0,5). Preparat DNA, którego wartość współczynnika  $A_{260}/A_{280}$  jest większa od wartości 1,8, może być zanieczyszczony RNA. Jeśli współczynnik  $A_{260}/A_{280}$  ma wartość poniżej 1,8, to preparat zanieczyszczony może być białkami.