

Struktura i dinamika deoksiribonukleinske kiseline u vodenim otopinama

Sekondo, Periša

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:512975>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-11**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Periša Sekondo

**Struktura i dinamika deoksiribonukleinske kiseline u
vodenim otopinama**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2015.

*Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za fiziku i biofiziku Medicinskog
fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc.dr.sc. Sanje Dolanski Babić i
predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014./2015.*

Kratice

DNA (engl. deoxyribonucleic acid) – deoksiribonukleinska kiselina

ssDNA (engl. single-stranded DNA) – jednolančana DNA

dsDNA (engl. double-stranded DNA) – dvolančana DNA

RNA (engl. ribonucleic acid) – ribonukleinska kiselina

mRNA (engl. messenger RNA) – glasnička RNA

pre-mRNA (engl. precursor) – primarni RNA transkript

rRNA (engl. ribosomal RNA) – ribosomska RNA

tRNA (engl. transfer RNA) – prijenosna, transferna RNA

snRNA (engl. small nuclear ribonucleic acid) – mala nuklearna RNA

snRNP (engl. small nuclear ribonucleic proteins; izgovor „snurps”) – mali nuklearni ribonukleoproteini

H-veze – vodikove veze

Sadržaj

Sažetak

Summary

1. Uvod	1
2. Povijesni osvrt	2
3. Biološke uloge nukleinskih kiselina	10
4. Baze, nukleozidi i nukleotidi	14
4.1 Svojstva pirimidina i purina	18
4.2 Base-pairing i base-stacking.....	21
5. Kemijske i enzimatske metode u istraživanju DNA.....	23
5.1 Rekombinantna DNA tehnologija	27
5.2 Određivanje sekundarne i tercijarne strukture	28
6. Fizikalne metode u istraživanju DNA	30
6.1 Difrakcija X-zraka	30
6.2 Spektroskopija rendgenskim zračenjem	31
6.3 Nuklearna magnetska rezonancija	32
6.4 Elektronska i vibracijska spektroskopija	35
6.5 Računalne metode	35
7. Struktura deoksiribonukleinske kiseline	37
7.1 Sekundarna struktura.....	37
7.1.1 B-DNA.....	38
7.1.2 A-DNA.....	40
7.1.3 Z-DNA.....	41
7.2 Tercijarna struktura DNA	47
7.3 Kvarturna struktura DNA.....	52
7.4 Odnos struktura-funkcija	56
8. DNA u vodenim otopinama	58
8.1 Interakcije u DNA	60
8.2 Svojstva vode	63
8.3 Interakcija DNA s ionima.....	68
8.4 Hidracija.....	69
8.5 Prirodni produkti koji modificiraju DNA	70

9. DNA kondenzacija	71
9.1 Koncept DNA kondenzacije	72
9.2 DNA kondenzacija <i>in vitro</i>	73
9.2.1 Eksperimentalne metode	73
9.2.2 Kondenzirajući agensi	74
9.2.3 Morfologije kondenzirane DNA	76
9.2.4 Uvidi iz fizike	76
9.3 Primjena DNA kondenzacije	80
10. Literatura	83
11. Životopis	86
12. Zahvale	87

Sažetak

Struktura i dinamika deoksiribonukleinske kiseline u vodenim otopinama

Periša Sekondo

Genetska informacija je pohranjena u deoksiribonukleinskoj kiselini (DNA). Biološke funkcije nukleinskih kiselina su u konačnici povezane s njihovim trodimenzionalnim (3D) strukturama, uz prisutnost ili odsutstvo proteina u interakciji.

Metode difrakcije rendgenskim zrakama su među najefektivnijim načinima dobivanja informacije o 3D strukturama nukleinskih kiselina.

Prvi dokaz posebnosti strukture DNA je opažanje da je količina adenina gotovo jednaka količini timina u svakom tipu DNA. Isto vrijedi za gvanin i citozin.

Istraživanje DNA molekula je pokazalo da DNA može poprimiti nekoliko različitih konformacija. Najčešća forma je B-DNA (desnostrana rotacija uzvojnice; najstabilnija struktura za nasumični slijed DNA molekule u fiziološkim uvjetima, duga i tanka). A forma (desnostrana; baze nisu aranžirane pod pravim kutovima na os uzvojnice kao u B formi; kratka i široka) i Z forma (lijevostrana; DNA osnovica poprima „cik-cak“ izgled; izduljena i uska) detaljno su opisane u kristalnoj strukturi.

Kako bi se nosila s ograničenjima volumena unutar stanice ili virusne čestice, DNA se mora pakirati. U odgovarajućim uvjetima otopine, u prisustvu iona i drugih molekula, izduljeni DNA lanci se skupljaju u kompaktne, pravilne čestice koje sadrže samo nekoliko molekula. Ovaj proces je poznat kao DNA kondenzacija i opisan je *in vitro* i *in vivo*. Glavna potencijalna primjena DNA kondenzacije je dostava gena u genskoj terapiji.

Ključne riječi: DNA struktura; difrakcijske metode; DNA konformacija; DNA kondenzacija; genska terapija

Summary

Structure and dynamics of deoxyribonucleic acid in aqueous solutions

Periša Sekondo

Genetic information is stored in the deoxyribonucleic acid (DNA) found in the nucleus.

The biological functions of nucleic acids are ultimately coupled to their three-dimensional (3D) structures, either in the presence or absence of any interacting proteins.

Diffraction methods are among the most powerful means of obtaining information about the 3D structures of nucleic acids and other biological molecules. The first evidence of the special structure of DNA was the observation that the amounts of adenine (A) and thymine (T) are almost equal in every type of DNA. The same applies to guanine (G) and cytosine (C).

Investigations of synthetic DNA molecules have shown that DNA can adopt several different conformations. By far the most common form is B-DNA (right-handed helical rotation; the most stable structure for random sequence DNA molecule under physiological conditions; longer and thinner). The A form (right handed; bases are not arranged at right angles to the axis of the helix, as in the B form; short and broad) and Z form (left handed; the DNA backbone takes on "zigzag" appearance; elongated and slim) have been well characterized in crystal structure.

In order to cope with the volume constraints it faces inside a cell or virus particle, DNA has to pack itself. In the appropriate solution conditions with the help of ions and other molecules, extended DNA chains collapse into compact, orderly particles that contain only a few molecules. This process is known as DNA condensation and it has been described *in vitro* and *in vivo*. The main potential medical application of DNA condensation is gene delivery in gene therapy.

Key words: DNA structure; diffraction methods; DNA conformation; DNA condensation; gene therapy

1. Uvod

Nukleinske kiseline su centralne molekule u transmisiji, ekspresiji i pohrani genetske informacije.

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) je biopolimer velike molekularne mase koji sadrži genetsku informaciju organizma. Sve žive stanice na Zemlji, bez poznatih nam iznimki, pohranjuju svoju informaciju nasljeđa u obliku dvolančanih molekula DNA. Živi se organizmi reproduciraju transmisijom genetske informacije na svoje potomstvo. Ta ubikvitarnost DNA nam pruža mogućnost uzimanja fragmenta DNA iz ljudske stanice, njegovog unosa u bakteriju, ili izvršavanje obrnutog postupka, a da se informacija uspješno čita, interpretira i kopira.

Molekularni biolozi i biokemičari su definirali vrste nukleinskih kiselina, odredili im sekvence i predložili veze između niza nukleotida i biološke funkcije. Te veze se odnose ne samo na direktno kodiranje aminokiselinske sekvence u proteinima, već i na regulaciju transkripcije, translacije i replikacije i molekularnu evoluciju.

Sljedeći korak zahtjeva fizikalno-kemijske/kemijsko-fizikalne pristupe, a taj korak jest razumijevanje mehanizma na koji sekvenca nukleotida postiže svoju kodirajuću i regulacijsku funkciju. Za ovo nam je potrebno znanje o strukturi i dinamici DNA i ovisnosti tih svojstava o interakciji s ostalim molekulama.

2. Povijesni osvrt

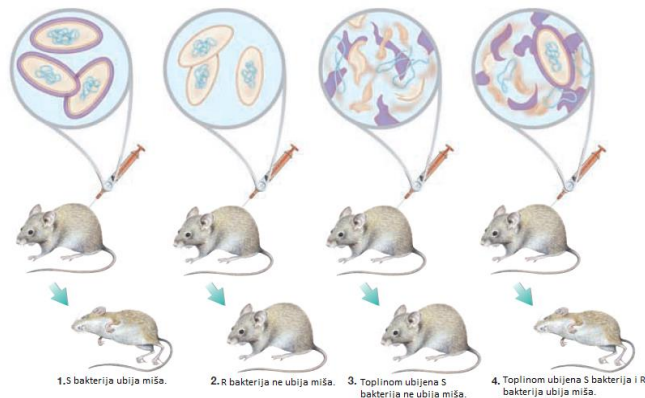
Otkriće strukture DNA od strane Watsona i Cricka je jedno od najmonumentalnijih u povijesti znanosti. Taj događaj je označio početak potpuno novih disciplina te je utjecao na smjer već uspostavljenih.

Gregor Mendel zasigurno nije bio prvi koji je primjetio da se karakteristike organizma (npr. oblik sjemenke ili boja cvijeta graška) prenose na njegovo potomstvo, ali je on 1865. bio prvi koji je opisao njihove predvidljive obrasce nasljeđivanja. Do 1903. Mendelovi faktori nasljeđivanja (sad zvan genima) prepoznati su kao dijelovi kromosoma („obojana tjelešca“) koji su pak vidljivi optičkim mikroskopom (Raven, Johnson, Mason, Losos, & Singer, 2010) .

Istraživanje DNA je započeo Friedrich Miescher koji je izveo prve sistematične kemijske studije staničnih jezgara. Miescher je 1868. iz jezgara stanica gnoja (leukocita) dobivenog od odbačenih kirurških poveza izolirao tvar koja sadrži fosfor te ju je nazvao nuklein. Otkrio je da nuklein sadrži kiseli dio, koji danas nazivamo DNA, i bazični dio, protein. Kasnije je pronašao sličnu kiselu tvar u glavama spermija lososa. Tad kad je postalo jasno da su kromosomi sastavljeni od proteina i nukleinskih kiselina, neki su odbacili nukleinske kiseline kao moguće nositelje genetske informacije zbog manjka kompleksnosti. Sadrže samo četiri različite strukturne jedinice (nukleotidi), dok su proteini sastavljeni od 20 različitih aminokiselina i pokazuju veliku raznolikost u sastavu, veličini i obliku-karakteristikama pa se činilo da su prikladniji za nositelje poruke nasljeđa. Iako je Miescher parcijalno purificirao nuklein i proučavao njegova svojstva, kovalentna (primarna) struktura DNA nije bila poznata sa sigurnošću do kasnih 1940-ih (Pratt & Cornely, 2013).

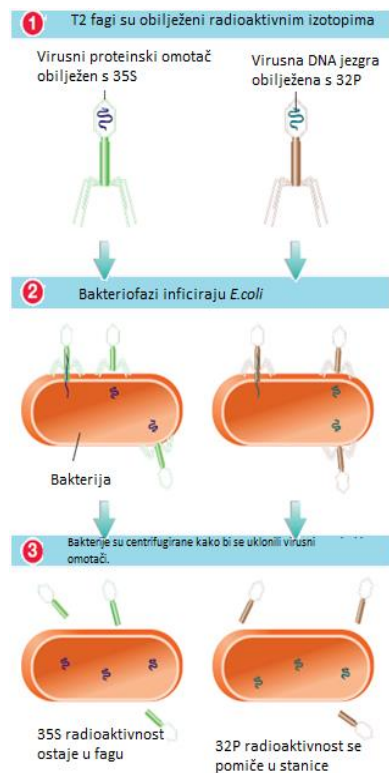
Miescher i mnogi drugi su sumnjali da je nuklein (nukleinska kiselina) na neki način povezan sa staničnim nasljeđivanjem, ali do prvog direktnog dokaza u prilog hipotezi da je upravo DNA nositelj genetske informacije trebali smo čekati 1944. i otkriće Oswalda T. Averya, Colina MacLeoda i Macyln McCarty. Oni su naime dokazali da DNA ekstrahirana iz virulentnog soja pneumokoka, genetički transformira nevirulentni soj ovog organizma u virulentnu formu. Avery i suradnici su zaključili da je DNA ekstrahirana iz virulentnog soja nositelj nasljedne genetičke poruke odgovorne za virulenciju (Dahm, 2005). Nisu se svi složili s njihovim zaključcima

navodeći prisutnost proteinskih onečišćenja u DNA kao mogućih nositelja genetske informacije. Ta mogućnost je uskoro eliminirana otkrićem da tretiranje DNA proteolitičkim enzimima ne uništava transformirajuću aktivnost, dok tretiranje s deoksiribonukleazama (DNA-hidrolizirajućim enzimima) ima takvu posljedicu (Pratt & Cornely, 2013).



Slika 2-1 Griffithovo otkriće transformacije iz 1928.. Griffith je otkrio da bezopasne bakterije mogu postati virulentne kad se pomiješaju s bakterijama koje uzrokuju bolest. (Raven, Johnson, Mason, Losos, & Singer, 2010, str. 191)

Alfred D. Hersheya i Martha Chase svojim su pokusom iz 1952. pružili drugi važan i neovisan dokaz da je DNA nositelj genetske informacije. Oni su naime koristili radioaktivni fosfor (^{32}P) i radioaktivni sumpor (^{35}S) kao biljege kako bi pokazali da pri infekciji *E. Coli* bakteriofagom T2, fosfor-sadržuća DNA virusne čestice, a ne njezin sumpor-sadržuća protein kapside, ulazi u stanicu domaćina i nosi genetsku informaciju za virusnu replikaciju (Hershey & Chase, 1952). Ovi važni rani pokusi te mnogi drugi su pokazali da je DNA ekskluzivna kromosomska komponenta nositeljica genetske informacije u živim stanicama.



Slika 2-2 Eksperiment Hersheyja i Chase. (Raven, Johnson, Mason, Losos, & Singer, 2010, str. 192)

Do tad se znalo da DNA sadrži lance polimeriziranih nukleotida (skraćeno prikazane kao početna slova pripadajućih dušičnih baza: A-adenin, C-citozin, G-gvanin, T-timin).

Za lance se mislilo da se pojavljuju u jednostavnim ponavljajućim tetranukleotidima (Nelson & Cox, 2004)



Najvažniji trag u otkrivanju strukture DNA je došao od rada Erwina Chargaffa i njegovih kolega u kasnim 1940-ima. Oni su otkrili da se nukleotidne baze pojavljuju u različitim omjerima u DNA molekulama iz različitih organizama i da su količine određenih baza blisko povezane (Kresge, Simoni, & Hill, 2005). Ovi podaci dobiveni iz DNA molekula mnogih vrsta naveli su Chargaffa da zaključi sljedeće:

1. Sastav baza DNA varira interspecijalno;
2. DNA uzorci izolirani iz različitih tkiva iste vrste imaju isti sadržaj baza;

3. Sadržaj baza DNA u određenoj vrsti se ne mijenja ovisno o starosti organizma, statusu uhranjenosti ili promjenjivom okolišu;
4. U svojoj staničnoj DNA, neovisno o vrsti, broj adenzinskih rezidua je jednak broju timidinskih ($A=T$), a broj gvanozinskih je jednak onom citidinskih ($G=C$). Iz ovog odnosa slijedi da je zbroj purinskih rezidua jednak broju pirimidinskih ($A+G=T+C$)

Ovi kvantitativni odnosi, ponekad nazivani „Chargaffova pravila“, su potvrđeni mnogim naknadnim istraživanjima te su bili ključni u promjeni mišljenja o DNA kao nedovoljno kompleksnoj, pružili su naznake o načinu prijenosa genetske informacije te pokretanju utrke za otkriće njezine trodimenzionalne strukture (Nelson & Cox, 2004).

Tablica 2-1 Molarni omjeri koji su doveli do Chargaffovih pravila (Chargaff, E., 1951. Federation Proceedings 10:654-659)

	A:G	T:C	A:T	G:C	Purini : pirimidini
Vol	1.29	1.43	1.04	1.00	1.1
Čovjek	1.56	1.75	1.00	1.00	1.0
Kokoš	1.45	1.29	1.06	0.91	0.99
Losos	1.43	1.43	1.02	1.02	1.02
Pšenica	1.22	1.18	1.00	0.97	0.99
Kvasac	1.67	1.92	1.03	1.20	1.0
Hemophilus influenzae	1.74	1.54	1.07	0.91	1.0
E. coli K-12	1.05	0.95	1.09	0.99	1.0
Bacil ptičje tuberkuloze	0.4	0.4	1.09	1.08	1.1
Serratia marcescens	0.7	0.7	0.95	0.86	0.9
Bacillus schatz	0.7	0.6	1.12	0.89	1.0

Radi boljeg uvida u strukturu DNA, Rosalind Franklin i Maurice Wilkins su koristili metodu difrakcije X-zraka u analizi vlakana DNA (DNA suha tvar ili DNA končići – engl. „DNA fiber“). Ranih 1950-ih su pokazali da DNA stvara karakterističan difrakcijski obrazac (Reece, i dr., 2010). Iz ovog obrasca se zaključilo da su DNA molekule spiralne (uzvojite, helikalne) s dva uzdužna ponavljanja, prvi duljine 3.4 Å i drugi duljine 34 Å. Evidentan problem je bio kako formulirati trodimenzionalni model DNA koji bi pokazivao takav difrakcijski obrazac i uz to zadovoljavao Chargaffove $A=T$ i $G=C$ jednakosti i bio u suglasju s drugim kemijskim svojstvima DNA.

1953. Watson i Crick su postulirali trodimenzionalni model koji je mogao jamčiti za sve prikupljene podatke. Sadrži dva lanca DNA koji se spiralno omataju oko iste osi time stvarajući desnostranu dvostruku uzvojnica (dvostruki heliks). Hidrofilne okosnice izmjeničnih deoksiriboza i fosfatnih grupa su izvan dvostruke uzvojnice, okrenute prema okolnoj vodi. Furanozni prsten svake deoksiriboze je u C-2' endokonformaciji. Purinske i pirimidinske baze obaju lanaca su poslagane unutar dvostruke uzvojnice pri čemu su njihove hidrofobne i gotovo planarne prstenaste strukture okomite na uzdužnu os. Savijanje dvaju lanaca stvara veliki i mali žlijeb na površini dupleksa. Svaka nukleotidna baza jednog lanca se sparuje u istoj ravnini s bazom drugog lanca. Watson i Crick su otkrili da su parovi baza povezanih vodikovim vezama, G sa C i A sa T, oni koji najbolje pripadaju unutar strukture, potvrđujući Chargaffovo pravilo da u svakoj DNA, $G=C$ i $A=T$. Važno je napomenuti da se tri vodikove veze mogu uspostaviti između G i C ($G\equiv C$), a samo dvije između A i T ($A=T$). Ovo je jedan od razloga težeg razdvajanja DNA lanaca s većim omjerom $G\equiv C$ na prema $A=T$. Drugi parovi baza (npr. G i T ili A i C) imaju različitu tendenciju destabilizaciji strukture dvostruke uzvojnice (Nelson & Cox, 2004).



Slika 2-3 Model Watsona i Cricka. Model dvostruke uzvojnice DNA uzima u obzir Chargaffova opažanja i obrasce Franklininih fotografija difrakcije X-zraka.

(Raven, Johnson, Mason, Losos, & Singer, 2010, str. 196)



Prilikom konstrukcije modela Watson i Crick su se morali odlučiti između paralelnosti ili antiparalelnosti lanaca, odnosno hoće li 5',3'-fosfodiesterne veze „teći“ u istom ili suprotnim smjerovima, pri čemu je antiparalelna orijentacija producirala najuvjerljiviji model, kasnije potvrđen radovima s DNA polimerazama i analizom s X-zrakama. Da bi pravilno prezentirali opaženu periodičnost Watson i Crick su u modelu vertikalno poslagane parove baza unutar dvostruke uzvojnice udaljili za 3.4 Å, a ponavljanja od 34 Å su dobivena prisutnošću 10 parova baza u svakom kompletnom okretu dvostruke uzvojnice. U vodenoj otopini struktura blago varira od one u vlaknima pa tako ima 10.5 parova baza po okretu. Polinukleotidni lanci u dvostrukoj uzvojnici (dupleksu) Watsona i Cricka nisu jednaki u svom nukleotidnom slijedu (sekvenci) i sastavu već su komplementarni: kad god se u jednom lancu nađe adenin, njemu nasuprot je timin, odnosno, kad je u jednom gvanin, u drugom je citozin. Dupleks na okupu drže dvije sile: vodikove veze između komplementarnih parova baza i sile između naslaganih baza unutar dupleksa (Reece, i dr., 2010).

Važne karakteristike modela dvostruke uzvojnice DNA su potvrđene nizom kemijskih i bioloških dokaza. Model je uz to predložio i mehanizam transmisije genetske informacije baziran na komplementarnosti lanaca. Watson i Crick su prije potvrđujućih opservacija predvidjeli replikaciju takve strukture (1) odvajanjem lanaca i (2) sintezom komplementarnog lanca za svaki, pri čemu postojeći lanac služi kao predložak. Ova predviđanja su eksperimentalno potvrđena, inaugurirajući revoluciju u našem razumijevanju biološkog nasljeđa (Garrett & Grisham, 2012). Tome svjedoči i sljedeća anegdota: nakon rješavanja modela strukture DNA Crick je proglasio gostima u pubu Eagle, prekoputa laboratorija Cavendish u Cambridgeu: „Otkrili smo tajnu života!“



Slika 2-4 Difrakcijski obrazac DNA. Točke što formiraju križ u sredini predstavljaju helikalnu strukturu. Tamne pruge desno i lijevo nastaju od ponavljanja baza. (Nelson & Cox, 2004, str. 282)

Tablica 1 Biografije znanstvenika zaslužnih za otkriće strukture DNA (Nobelprize.org, 2015; Profiles in Science, National Library of Medicine, 2015; Scitable, 2015)

	<ul style="list-style-type: none"> • Francis Harry Compton Crick • Rođen: 8. VI 1916., Northampton, Ujedinjeno Kraljevstvo • Umro: 28 VII 2004, San Diego, Kalifornija, SAD • Područja i obrazovanje: biofizika, molekularna biologija, neuroznanost • B.Sc.: fizika, University College, London, 1937. • PhD: „X-Ray Diffraction: Polypeptides and Proteins“; Gonville and Caius College of Cambridge University, 1953. • Radno mjesto u vrijeme nagrade: MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo • Motivacija za nagradu: „for their discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and its significance for information transfer in living material“ • Područje: genetika, molekularna biologija • Udio nagrade 1/3
	<ul style="list-style-type: none"> • James Dewey Watson • Rođen: 6 IV 1928., Chicago, Illinois, SAD • Područja i obrazovanje: molekularna biologija, genetika, zoologija • B.Sc.: zoologija, University of Chicago, 1947. • PhD: „The biological properties of X-ray inactivated bacteriophage“, Indiana University, 1950. • Radno mjesto u vrijeme nagrade: Harvard University, Cambridge, MA, SAD • Motivacija za nagradu: „for their discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and its significance for information transfer in living material“ • Područje: genetika, molekularna biologija • Udio nagrade 1/3



- **Maurice Hugh Frederick Wilkins**
- **Rođen:** 15. X 1916., Pongaroa, New Zealand
- **Umro:** 5. X 2004., London, Ujedinjeno Kraljevstvo
- **Područja i obrazovanje:** fizika, molekularna biologija
- **B.Sc.:** fizika, St. John's College, Cambridge, 1938.
- **PhD:** „on thermal stability of trapped electrons in phosphors, and of theory of phosphorescence, in terms of electron traps with continuous distribution of trap depths“¹ Birmingham University, 1940
- **Radno mjesto u vrijeme nagrade:** London University, London, Ujedinjeno Kraljevstvo
- **Motivacija za nagradu:** "for their discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and its significance for information transfer in living material"
- **Područje:** genetika, molekularna biologija
- **Udio nagrade** 1/3

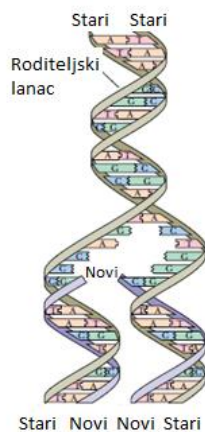


- **Rosalind Elsie Franklin**
- **Rođena:** 25. VII 1920., London, Ujedinjeno Kraljevstvo
- **Umrila:** 16. IV. 1958., London, Ujedinjeno Kraljevstvo
- **Područja i obrazovanje:** kemija, X-kristalografija
- **B.Sc.:** fizikalna kemija, Cambridge University, 1941
- **PhD:** „The physical chemistry of solid organic colloids with special reference to coal.“, Cambridge University, 1945.

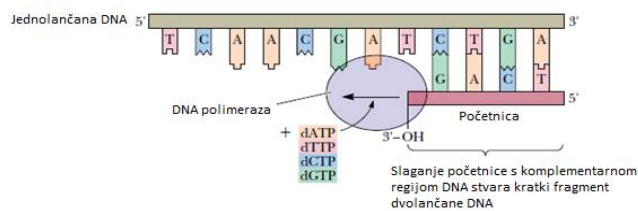
¹ Naziv doktorske teze nedostupan.

3. Biološke uloge nukleinskih kiselina

Genetska informacija je pohranjena u linearnom slijedu (sekvenci) nukleotida DNA. Svaka molekula DNA je dvostruka uzvojnica sastavljena od dva komplementarna lanca nukleotida koje na okupu drže vodikove veze između parova baza: gvanina i citozina, G i C, adenina i timina, A i T. Udvostručenje genetske informacije se događa prilikom polimerizacije novog komplementarnog lanca na svakom od starih lanaca dvostruke uzvojnice tijekom DNA replikacije. Mutacije, promjene u genetskom materijalu, rezultat su promjena u sekvenci baza, primjerice, zamjena (supstitucija) jednog nukleotida drugim, umetanje (insercija) ili gubitak (delecija) jednog ili više nukleotida.

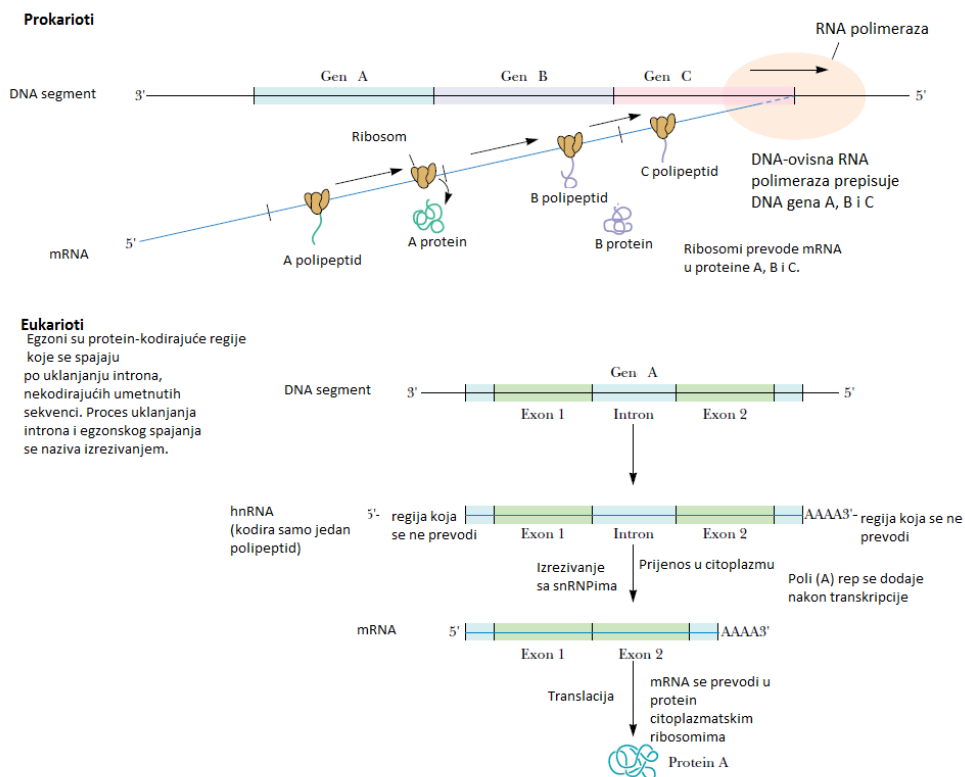


Slika 3-1 DNA replikacijom se dobivaju dva DNA dupleksa „kćeri“ identična „roditeljskoj“ DNA molekuli. Svaki od originalnih lanaca dvostruke uzvojnice služi kao „šablona“ dok se sekvenca nukleotida u svakom od njih kopira u novi komplementarni lanac DNA polimerazom. (Garrett & Grisham, 2012, str. 357)



Slika 3-2 DNA polimeraza kopira ssDNA *in vitro* uz četiri deoksinukleotidna monomera, uz artifično stvaranje dvolančane regije dodavanjem „primera“ (početnice). Početnica mora imati slobodnu 3'-OH kraj od kojeg će rasti nukleotidni lanac. (Garrett & Grisham, 2012, str. 358)

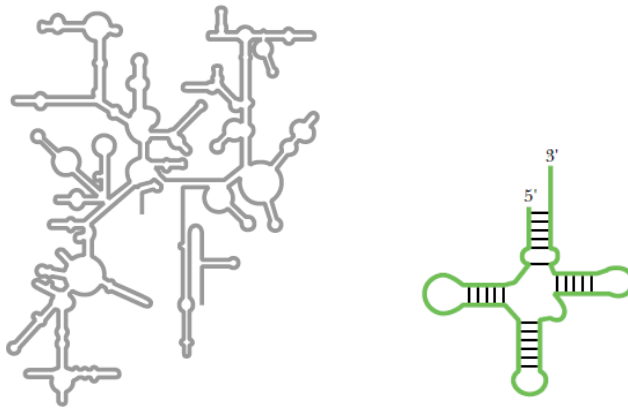
Ekspresija genetske informacije pohranjene u DNA uključuje translaciju linearne sekvence nukleotida u ko-linearnu sekvencu aminokiselina u proteinu, sa specifičnostima prokariotskih i eukariotskih stanica. Ograničeni segment DNA je prvo prepisan (transkribiran) u komplementarni niz RNA. Ovakav primarni RNA (pre-mRNA) transkript je potom podložen izrezivanju („splicing“; dorađivanje) intronskih sekvenci (intervenirajuće sekvence; protein nekodirajući dijelovi) djelovanjem stabilnih kompleksa malih nuklearnih ribonukleoproteina (snRNP) sastavljenim od malih nuklearnih RNA (snRNA) i specifičnih proteina, stvarajući glasničku RNA (mRNA) (Reece, i dr., 2010).



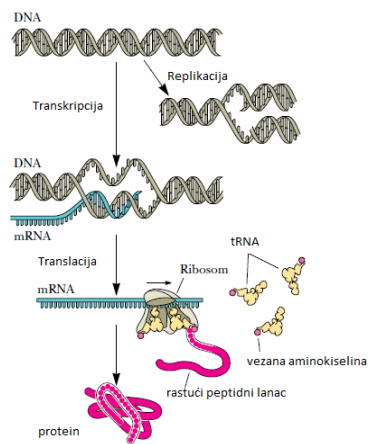
Slika 3-3 Svojstva mRNA molekula u prokariotskim i eukariotskim stanicama, tijekom transkripcije i translacije. (Garrett & Grisham, 2012, str. 342)

U konačnici se mRNA prevodi (translatira) u protein nizom reakcija na ribosomima. Aminokiseline koje se koriste za proteinsku sintezu su vezane za obitelj prijenosnih („transfer“) RNA (tRNA), svaka od kojih, komplementarnim interakcijama sparivanja baza, prepoznaje određeni set od tri nukleotida u mRNA (kodoni). Sekvenca nukleotida mRNA se prevodi od jednog do drugog kraja u setovima po tri nukleotida, prema univerzalnom genetskom kodu.

Druge RNA molekule u stanicama imaju funkciju katalizatora nalik enzimima. Takve RNA molekule se svijaju na način da na svojoj površini ostavljaju nukleotide koji postaju neobično reaktivni. Jedan od takvih katalizatora je i velika ribosomska RNA (rRNA), koja katalizira stvaranje peptidnih veza tijekom proteinske sinteze (Alberts, i dr., 2013).

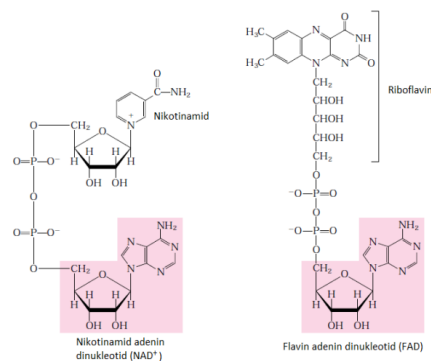
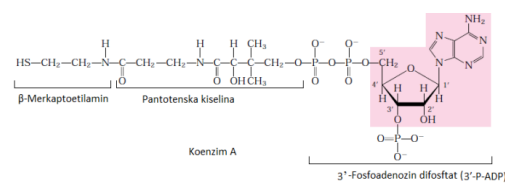


Slika 3-5 Sekundarna struktura ribosomske RNA i transferne RNA. (Garrett & Grisham, 2012, str. 343 i 344)



Slika 3-6 Fundamentalni procesi prijenosa informacije u stanicama. Informacija kodirana u nukleotidnoj sekvenci DNA se prepisuje sintezom RNA molekule čija sekvenca je diktirana DNA sekvencom. Čitanjem sekvence RNA (u grupama od tri susljedna nukleotida) komponentama odgovornim za proteinsku sintezu, RNA sekvenca se prevodi u slijed aminokiselina u proteinu. (Garrett & Grisham, 2012, str. 328)

Monomeri nukleinskih kiselina, nukleozidi i nukleotidi, imaju razne stanične uloge: energetske „valute“, koenzimi, drugi glasnici itd. (Bloomfield, i dr., 2000).



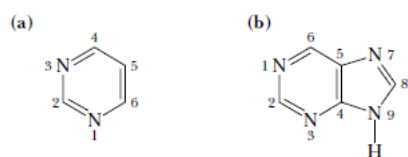
Slika 3-7 Neki koenzimi koji sadrže adenzin. Adenzinski dio je osjenčan svjetlo crveno. Koenzim A ima funkciju prijenosa acilnih grupa, NAD^+ ima ulogu u prijenosu hidrida, a FAD, aktivna forma vitamina B_2 (riboflavina) ima ulogu u prijenosu elektrona. (Nelson & Cox, 2004, str. 301)

4. Baze, nukleozidi i nukleotidi

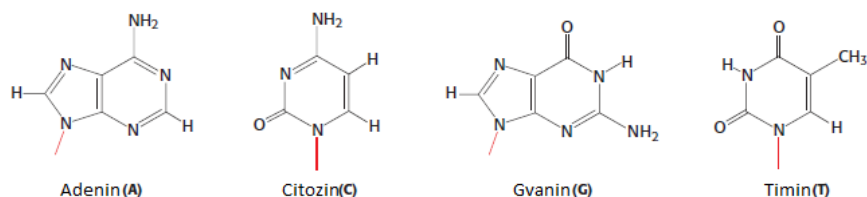
Sve nukleinske kiseline su sastavljene od nukleotida, koji su pak sastavljeni od baze, šećera (monosaharida pentoze) i fosfata.

Baze koje se nalaze u nukleinskim kiselinama su aromatske heterocikličke sastavnice derivirane od pirimidina ili purina. Pet ovakvih baza su glavne komponente nukleinskih kiselina u svih živih bića. Purinske baze adenin (skraćeno: Ade²) i gvanin (Gua) i pirimidinske baze citozin (Cyt) su prisutne i u RNA i u DNA. Naprotiv, uracil (Ura) se nalazi samo u RNA. U DNA, uracil je zamjenjen timinom (Thy), 5-metil derivatom uracila. Neobične (modificirane) baze pronalaze se u nekim vrstama DNA i RNA (primjerice tRNA) (Koolman & Roehm, 2004). Modifikacije baza uključuje metilaciju, glikozilaciju, acetilaciju i redukciju. Modificirana baza u nukleotidnom slijedu može pomoći njenoj prepoznatljivosti od strane specifičnih enzima ili njenoj zaštiti od razgradnje nukleazama (Ferrier, 2013).

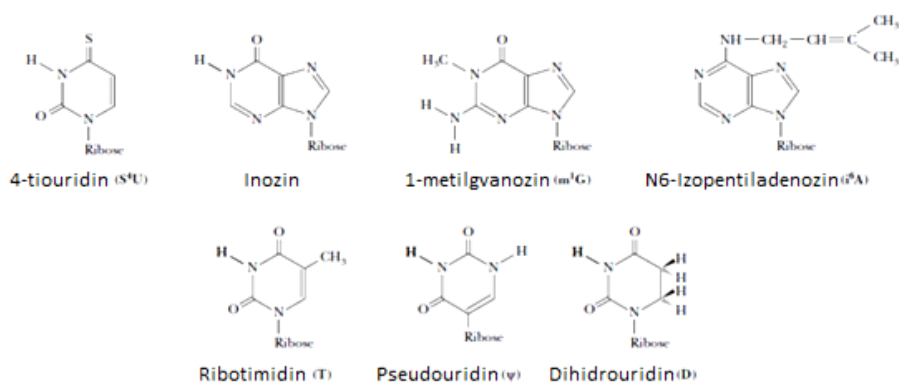
² Ovisno o literaturi, dušične baze se skraćeno prikazuju kao Ade, Gua, Cyt, Thy i Ura ili kao A, G, C, T i U. U ovom radu se u ostalim poglavljima koriste jednoslovne skraćenice.



Slika 4-1 a) sustav prstena pirimidina; b) sustav prstena purina. (Garrett & Grisham, 2012, str. 328)



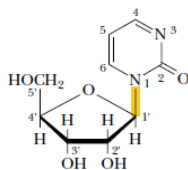
Slika 4-2 Dušične baze nukleinskih kiselina. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 4)



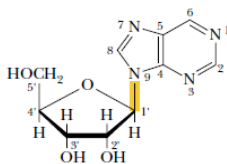
Slika 4-3 Neobične baze RNA- pseudouridin, ribotimidilčka kiselina, i ratne metilirane baze. (Garrett & Grisham, 2012, str. 344)

Kad se baza nukleinske kiseline N-glikozidno veže s ribozom ili 2-deoksiribozom, nastaje nukleozid. Primjerice nukleozid adenzin (skraćeno: A) formiran je na ovaj način od adenina i riboze. Odgovarajući derivati drugih baza su gvanozin (G), uridin (U), timidin (T) i citidin (C). Kad je šećerna komponenta 2-deoksiriboza, produkt je deoksiribonukleozid (dA). U stanici, 5'OH grupa šećera nukleozida je obično esterificirana fosfornom kiselinom. 2'-deoksitimidin (dT) prema tome daje 2'-deoksitimidin-5'-monofosfat (dTMP). Ako se 5' fosfatna rezidua veže preko kisele-anhidridne veze za dodatne fosfatne rezidue, nastaju nukleozidni

trifosfati-npr. ADP i ATP. Svi ovi nukleozidni fosfati se nazivaju nukleotidima. U nukleozidima i nukleotidima, pentozne rezidue, 2-deoskiriboza i riboza, su prisutne u furanoznom obliku. Šećeri i baze su vezani N-glikozidnom vezom između C-1 šećera u N-9 purinskog odnosno N-1 pirimidinskog prstena. Ova veza uvijek poprima β -konfiguraciju (Devlin, 1997).



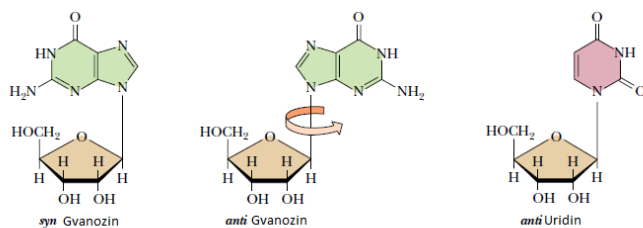
β -N1-glikozidna veza u pirimidinskim ribonukleozidima



β -N9-glikozidna veza u purinskim ribonukleozidima

Slika 4-4 β -glikozidne veza povezuje dušičnu bazu i šećer formirajući nukleozid. (Garrett & Grisham, 2012, str. 331)

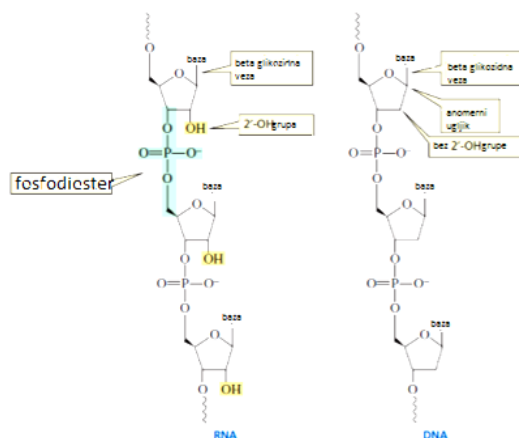
U nukleozidima, rotacija baze oko glikozidne veze je sterički ometana, uglavnom od vodikovog atoma na C-2' furanoze. Posljedično, nukleozidi i nukleotidi postoje u jednoj od dvije konformacije, koje se označuju sa syn (sin) i anti. Za pirimidine u syn konformaciji, supstituent kisika na poziciji C-2 leži neposredno iznad furanoznog prstena; u anti konformaciji, sterička interferencija je izbjegnuta. Stoga pirimidinski nukleozidi favoriziraju anti konformaciju. Purinski nukleozidi mogu poprimiti i syn i anti konformaciju. U svakoj od konformacija, gotovo planarni furanozni i bazični prstenovi nisu koplanarni već leže pod otprilike pravim kutom jedan prema drugom. (Garrett & Grisham, 2012)



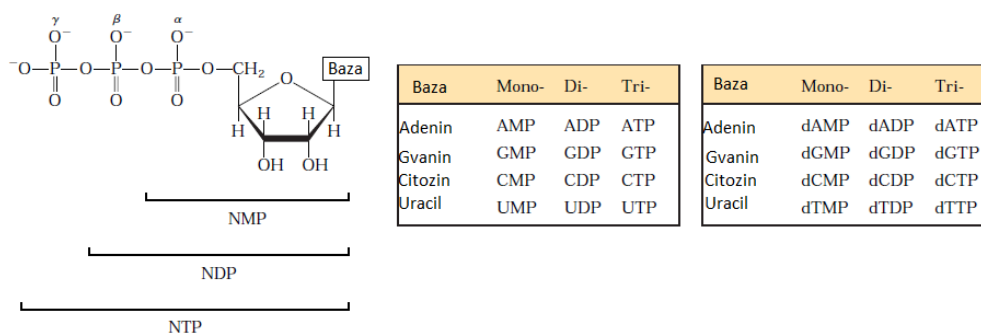
Slika 4-5 Rotacija oko glikozidne veze je sterički vođena. (Garrett & Grisham, 2012, str. 332)

Molekule fosforne kiseline mogu formirati kisele anhidridne veze među sobom pa je tako moguće dvama nukleotidima biti povezanima preko fosfatnih rezidua. Ovakvo nastaju dinukleotidi sa strukturom anhidrida fosforne kiseline. Ova grupa uključuje koenzime NAD(P)^+ i CoA, kao i flavinski derivat FAD . (Yurkanis Bruice, 2013)

Ako fosfatna rezidua nukleotida reagira s 3'-OH grupom drugog nukleotida, rezultat je dinukleotid sa strukturom diestera fosforne kiseline. Dinukleotidi ove vrste imaju slobodnu fosfatnu reziduu na 5' kraju i slobodnu OH grupu na 3' kraju. Prema tome, dinukleotidi mogu biti produljeni dodatnim mononukleotidima dodavanjem fosfornih diesterskih veza. Na ovaj način se sintetiziraju oligonukleotidi i u konačnici polinukleotidi, ribonukleotid sadržeće ribonukleinske kiseline (RNA), i kiseline sastavljene deoksiribonukleotidnih monomera (DNA). Za opisivanje strukture polinukleotida, skraćenice nukleozidnih komponenata se pišu s lijeva na desno 5'→3' smjeru. Pozicija fosfatne rezidue se katkad označava s „p“. Primjerice, „pUpG“ ili „UG“ (Koolman & Roehm, 2004).



Slika 4-6 Nukleinske kiseline se sastoje od lanca peteročlanih prstenova šećera povezanih fosfatnim grupama. Svaki od šećera (D-riboza u RNA, 2'-deoksi-D-riboza u DNA) je povezan s heterocikličkim aminom (bazom) β -glikozidnom vezom (Yurkanis Bruice, 2013, str. 1208)



Slika 4-7 Nukleozidni fosfati. Opća struktura nukleozid 5'-mono, di- i trifosfata (NMPi, NDPi i NTPi) i njihove standardne skraćenice. U deoksiribonukleozid fosfatima (dNMPi, dNDPi i dNTPi), pentoza je 2'-deoksi-D-riboza. (Nelson & Cox, 2004, str. 300)

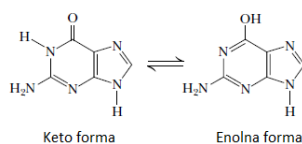
4.1 Svojstva pirimidina i purina

Aromatičnost pirimidinskih i purinskih prstenastih struktura i elektronski bogata priroda njihovih $-OH$ i $-NH_2$ supstituenata daje im kapacitet za keto-enolnu tautomerizaciju, tj. pirimidini i purini postoje u tautomernim parovima. Keto-tautomer se naziva laktamom, dok je enolna forma laktim. Laktam forma predominira pri

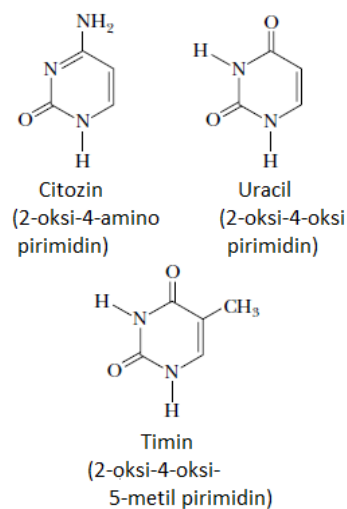
neutralnom pH. pK_a vrijednosti za dušikove atome 1 i 3 u uracilu, primjerice, su veće od 8. Za razliku od uracila, prema formi citozina koja prevladava pri pH 7, pK_a za N-3 u ovom pirimidinu je 4.5. Slično se tautomerne forme mogu prikazati za purine-gvaninski N-1 pK_a je 9.4 i manji od 5 za N-3. Ove pK_a vrijednosti specificiraju asociiranost vodikovog atoma s raznim dušikovim atomima pri neutralnom pH. Pri tom pomažu u određivanju uloge tih dušikovih atoma kao donora ili akceptora H-veze. Važne funkcionalne grupe koje participiraju u formaciji vodikovih veza su amino grupe citozina, adenina i gvanina; dušikovi atomi prstena na poziciji 3 pirimidina i poziciji 1 purina; jako elektronegativni atomi na poziciji 4 uracila i timina, poziciji 2 citozina i poziciji 6 gvanina. Još jedno svojstvo pirimidina i purina je jaka apsorpcija UV svjetlosti, koja je također posljedica aromatičnosti njihovih heterocikličkih prstenastih struktura. Ovo svojstvo je posebice korisno u kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi nukleotida i nukleinskih kiselina. (Nelson & Cox, 2004)

Tablica 4.1-1 Protonske disocijacijske konstante (pK_a vrijednosti) za nucleotide

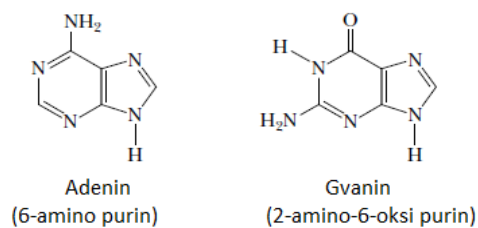
Nukleotid	pK_a N baze	$pK1$ Fosfata	$pK2$ Fosfata
5'-AMP	3.8 (N-1)	0.9	6.1
5'-GMP	9.4 (N-1) 2.4 (N-7)	0.7	6.1
5'-CMP	4.5 (N-3)	0.8	6.3
5'-UMP	9.5 (N-3)	1.0	6.4



Slika 4-8 Tautomerizacija purina, gvanina. (Garrett & Grisham, 2012, str. 330)

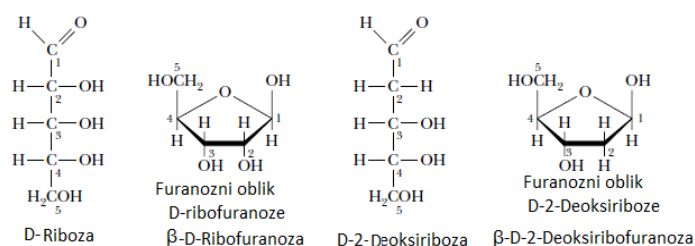


Slika 4-7 Pirimidinske baze – citozin, uracil, timin – u tautomernim formama predominantnim pri pH7. (Garrett & Grisham, 2012, str. 329)



Slika 4-8 Purinske baze – adenin i gvanin – u tautomernim formama predominantnim pri pH 7. (Garrett & Grisham, 2012, str. 329)

Pentozne nukleotida i nukleinskih kiselina su D-ribofuranaza za RNA i 2-deoksi-D-ribofuranaza za DNA. U nukleotidima se njihovi atomi numeriraju kao 1', 2',3' itd kako bi ih se razlikovalo od atoma prstena dušičnih baza. Naizgled mala razlika u hidroksilnoj grupi na 2'-poziciji ima učinke na sekundarne strukture dostupne RNA i DNA, kao i njihove relativne susceptibilnosti kemijskoj (baze i kiseline) i enzimatskoj hidrolizi.



Slika 4-9 Strukture furanoza – riboze i deoksiriboze. (Garrett & Grisham, 2012, str. 331)

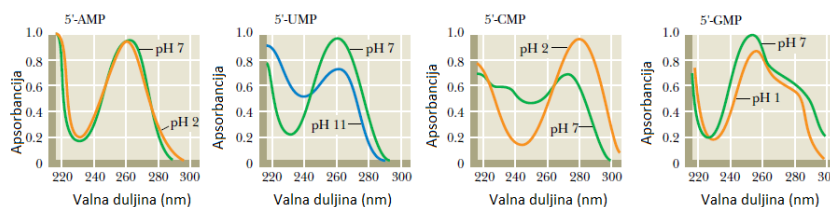
4.2 Base-pairing i base-stacking.

Dva lanca DNA se drže zajedno brojnim slabim interakcijama: vodikovim vezama, interakcijama slaganja baza („base stacking“) i elektrostatskim interakcijama (interakcijama naboj-naboj). Od nabrojanih, interakcije poslaganih parova baza su najznačajnije. Snaga tih interakcija ovisi o bazama. Najsnažnije su između „stogova“ G-C parova baza i najslabije za „stogove“ A-T parova baza. Hidrofobni efekt slaže parove baze jedne na druge. Poslagani parovi baza se privlače Van der Waalsovima silama, karakterističnih energija od 2 do 4 kJ/mol. Dodatno, „base stacking“ u DNA je favoriziran konformacijama donekle rigidnih peteročlanih šećera. Opisane interakcije između baza su slabe, ali njihov velik broj stabilizira ukupnu strukturu heliksa.

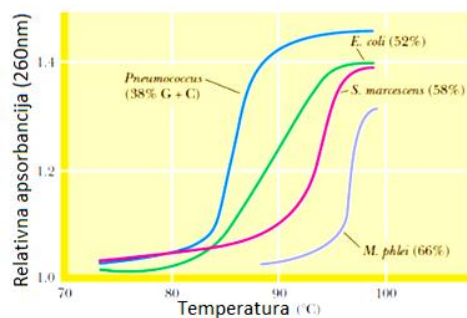
Watson i Crick su pronašli da su vodikovim vezama povezani parovi baza, G s C, A s T, oni koji najbolje pristaju DNA strukturi. Tri su takve veze između G i C te dvije između A i T. Zbog tog je teže razdvojiti DNA lance s više G-C parova nego A-T parova. S druge strane, A-T parovi destabiliziraju strukturu dvostruke uzvojnice.

Ultraljubičasto svjetlo može detektirati poslaganost („stacked“) ili neposlaganost („unstacked“) baza. Poslagane baze unutar dvostruke uzvojnice pod zaštitom su od svjetla, stoga je apsorpcija UV svjetla dvostruke uzvojnice DNA puno manje nego ona jednolančane DNA. Ova karakteristika je poznata kao hipokromni efekt: manje „boje“ (energije) je emitirano iz dvostruke uzvojnice DNA molekule. Temperatura taljenja (T_m) je temperatura na kojoj je 50% molekula DNA u konformaciji dvostruke uzvojnice, a ostatak jednolančano. T_m ovisi o kompoziciji baza pa je prema tom DNA s višim G-C udjelom ona s višom T_m nego ona s većim sadržajem A-T. Grijanjem dvolančane DNA, svaki lanac će se u konačnici separirati

(odvojiti) kidanjem vodikovih veza između parova- denaturacija DNA. Po denaturaciji, razdvojeni lanci se spontano povezuju formirajući dvostruki heliks-DNA prekaljivanje („annealing“). U biološkim sustavima mogu se odvijati denaturacija i prekaljivanje. Helikaze koriste kemijsku energiju (iz ATP-a) za prekidanje dvolančane DNA molekule. Istraživanja sposobnosti prekaljivanja DNA su važna u otkrivanju genske strukture i ekspresije. Vodikove veze također sudjeluju u formaciji kompleksnih struktura (tercijarnih), povezivanjem baza u istom lancu- često se u ovakvim strukturama dolazi do „krivo“ sparenih baza, što u konačnici rezultira destabilizacijom lokalne strukture. (Nelson & Cox, 2004)



Slika 4-10 UV apsorpcijski spektri za česte ribonukleotide. Spektri ribonukleotida, deoksiribonukleotida i nukleozida su u gotovo identični. (Garrett & Grisham, 2012, str. 330)



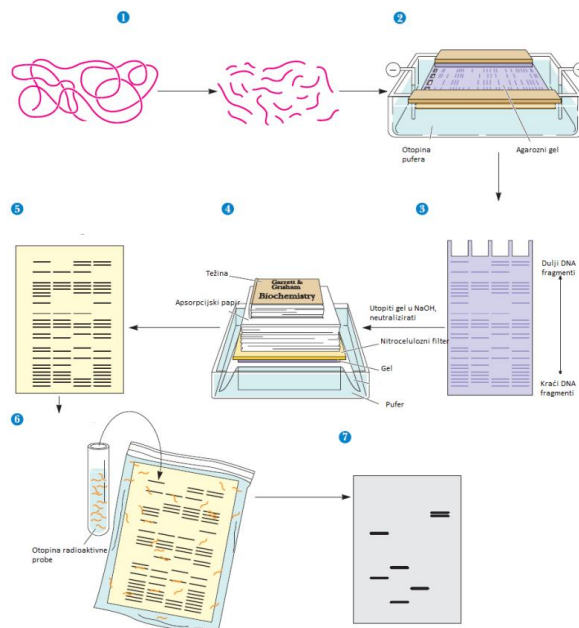
Slika 4-11 Mehanizam denaturacije DNA grijanjem. Temperatura pri kojoj je 50% parova baza denaturirano se naziva temperaturom taljenja, T_m . (Marmur, J., 1959. Nature 183:1427-1429)

5. Kemijske i enzimatske metode u istraživanju DNA

Sposobnost određivanja i konstruiranja DNA i RNA sekvenci te njihovo povezivanje s funkcijom, određuje se s nekoliko ključnih tehnika molekularne biologije.

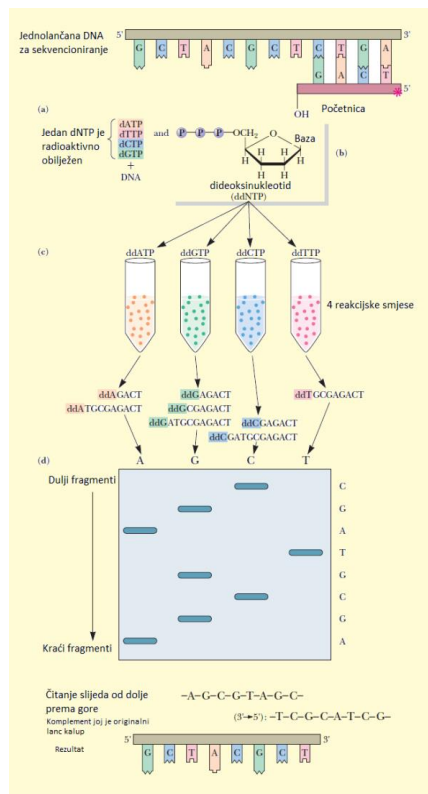
Prva od njih se zasniva na repertoaru enzima koji djeluju na nukleinske kiseline. Restriksijski enzimi su ključna grupa među njima. Ove endonukleaze prepoznaju specifične sekvence dvostruke uzvojnice DNA te režu oba lanca formirajući specifične ulomke (fragmente) DNA. Restriksijski fragmenti se potom mogu separirati i prikazati gel elektroforezom (Bloomfield, i dr., 2000).

Separacijski obrazac dobiven gel elektroforezom predstavlja specifičan otisak DNA molekule. DNA fragment koji sadrži određenu sekvencu se može identificirati hibridizacijom s označenom jednolančanom DNA probom („bugaćenje“ po Southernu; „Southern blotting“). Sličan postupak, tzv „northern blotting“ izvodi se s RNA fragmentima, dok se za karakterizaciju proteina koriste protutijela (tzv „western blotting“).

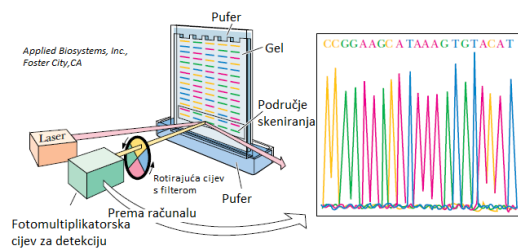


Slika 5-1 „Southern blotting.“ 1. Razgradnja DNA s restriksijskim endonukleazama; 2. Elektroforeza na agaroznom gelu DNA fragmenata; 3. DNA fragmenti se razdvajaju po veličini (vidljivi pod UV svjetlom ako gel sadrži etidijev bromid); 4. Prijenos (bugaćenje) gel na nitrocelulozni filter korištenjem tehnike po Southernu; 5. DNA fragmenti su vezani za filter na pozicijama identičnim onima na gelu; 6. Hibridizacija filtera s radioaktivno obilježenom probom; 7. Ekspozicija filtera na rendgenskom filmu. Rezultat je autoradiogram s prikazanim hibridiziranim DNA fragmentima. (Garrett & Grisham, 2012, str. 411)

Tehnike brzog sekvenciranja su razvijene s ciljem daljnje analize DNA molekula. DNA se može sekvencirati kontroliranim prekidanjem replikacije. Producirani fragmenti se razdvajaju gel elektroforezom i vizualiziraju autoradiografijom ^{32}P oznake na 5' kraju ili preko fluorescentnih oznaka („tags“).



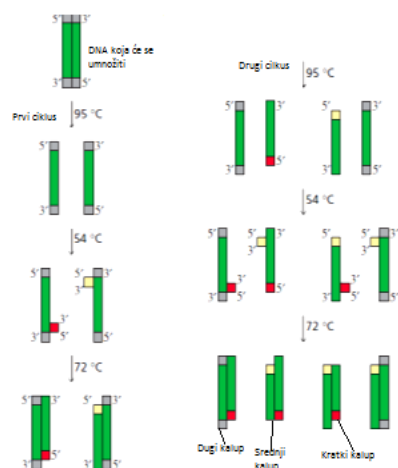
Slika 5-2 Sangerova metoda. Metoda prekidanja lanca ili dideoksi metoda DNA sekvencioniranja. (a) Reakcija DNA polimeraze. (b) Struktura dideoksinukleotida. (c) Četiri reakcijske smjese s nukleozid trifosfatima plus jedan dideoksinukleozid trifosfat. (d) Elektroforetogram. Nukleotidni slijed se čita od kraja prema početku gela u redoslijedu dodavanja nukleotida od strane DNA polimeraze.
(Garrett & Grisham, 2012, str. 359)



Slika 5-3 Shematski dijagram metodologije koja se koristi i u fluorescentnom obilježavanju i automatiziranom sekvenciranju DNA. (Garrett & Grisham, 2012, str. 363)

DNA probe za hibridizacijske reakcije, kao i novi geni se mogu sintetizirati metodom automatizirane solidne faze („automated solid phase“). Tehnika se zasniva na dodavanju deoksiribonukleozida 3'-fosforamidita jedan na drugi pri čemu se dobiva rastući lanac do nekoliko stotina nukleotida vezan za netopljivu podlogu (oligonukleotidni lanci redovito ne prelaze duljinu od dvjesto nukleotidnih rezidua zbog praktičnih ograničenja) (Beaucage & Iyer, 1992).

Lančana reakcija polimerazom („polymerase chain reaction“, PCR) omogućava značajno umnožavanje specifičnih segmenata DNA *in vitro*. Regija koju će se amplificirati se određuje postavljanjem para početnica (oligonukleotidne klice, primeri). Uz njih se ciljnoj DNA dodaju i termostabilna DNA polimeraza i deoksiribonukleozid trifosfati. Izvanredna osjetljivost PCR-a čine ga tehnikom izbora u genotipizaciji, detekciji patogena i tumorskih markera te čitanju DNA tisuće godina starih fosila (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010).



Slika 5-4 Dva ciklusa PCR-a. Oligonukleotidne početnice komplementarne ciljanoj sekvenci se koriste u ponavljajućim ciklusima denaturacije, poravnavanja i DNA replikacije. Broj kopija ciljane sekvence se udvostručuje u svakom ciklusu replikacije, u konačnici nadmašujući broj ostalih sekvenci koje mogu biti prisutne. (Yurkanis Bruice, 2013, str. 1230)

5.1 Rekombinantna DNA tehnologija

Rekombinantna DNA tehnologija (moderne tehnike genskog kloniranja u kojima se koristi rekombinantna DNA-DNA dobivena spajanjem genskih materijala iz različitih izvora; genski inženjering) revolucionalizirala je sve aspekte biologije.

Novi geni se mogu konstruirati u laboratoriju, unijeti u stanice domaćina i eksprimirati. Nove DNA molekule se rade spajanjem fragmenata koji imaju komplementarne kohezivne krajeve dobivene djelovanjem restrikcijskog enzima. DNA ligaza zatvara pukotine u DNA lancima. Vektori za propagiranje, kloniranje DNA uključuju plazmide, λ fag te arteficielne kromosome bakterija i kvasaca (Alberts, i dr., 2013). Specifični geni se mogu klonirati iz genomske biblioteke (od engl. „genomic library“) korištenjem DNA i RNA probi. Strana DNA se može eksprimirati po inserciji prikladnim vektorom u prokariotsku ili eukariotsku stanicu. Specifične mutacije se mogu generirati *in vitro* za dobivanje novih proteina. Mutantni protein sa samo jednom aminokiselinskom supstitucijom se može stvoriti pripremom DNA replikacije korištenjem oligonukleotida koji kodira novu aminokiselinu. Plazmidi se mogu pripremiti tako da dopuštaju laganu inserciju DNA kasete s bilo kojom željenom mutacijom.

Do danas su sekvencirani i analizirani kompletni genomi mnogih organizama, pri čemu su značajni genomi eksperimentalnih modela i značajnih patogena (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010).

Započelo se analizom genoma virusa, potom bakterija te u konačnici eukariota s 3 milijarde parova baza dugim humanim genomom. Zasad se čini da u humanom genomu postoji od 20 do 25 tisuća protein-kodirajućih gena, značajno manji broj nego što se procjenjivalo (Turnpenny, 2011) .

Komparativna genomika je postala značajno oruđe u istraživanju individualnih genoma i za istraživanje evolucije. Uz to, cjelogenomski obrasci genske ekspresije se mogu ispitati kroz upotrebu genskih čipova (Turnpenny, 2011).

Promjene u genskoj ekspresiji se mogu utvrditi korištenjem tehnika kvantitativnog PCR-a i hibridizacijom na mikropostroju („microarray“, mikročip).

Stvaranje transgeničnih miševa daje izvrstan uvid u patofiziologiju i moguće terapije (Reece, i dr., 2010).

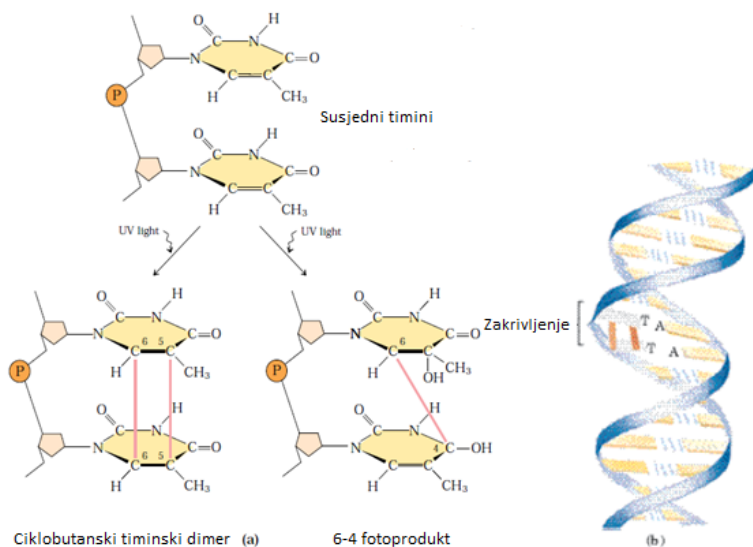
Funkcije određenih gena se mogu istraživati inaktiviranjem njegove ekspresije u eksperimentalnom modelu poput miša. Jedna od takvih metoda je RNA interferencija, koja ovisi o unosu specifične dvostruko-uzvojite RNA molekule u eukariotske stanice (Nelson & Cox, 2004). Nova DNA se može unijeti vektorima, jakim električnim poljima ili bombardiranjem DNA-omotanym mikročesticama. S tim povezana genska terapija puno obećava, no i dalje ostaju mnogi izazovi njezine primjene (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010).

5.2 Određivanje sekundarne i tercijarne strukture

S aspekta analize strukture DNA, gore su opisani postupci sekvencioniranja, određivanja primarne strukture. Kemijske i enzimatske metode nisu limitirane na određivanje sekvence, već se mogu upotrebljavati i za određivanje sekundarne i tercijarne strukture. Reaktivnost DNA i RNA molekula s kemijskim i enzimatskim probama ovisi o položaju nukleotida unutar ili van dvostruke uzvojnice (sekundarna struktura), a ponekad i o karakteristikama pakiranja („folding“) višeg reda (tercijarna struktura) (Bloomfield, i dr., 2000). Enzimatske probe su nukleaze – enzimi koji hidroliziraju fosfodiesterne veze, npr. DNAza I (nespecifična DNA endonukleaza) (Sambrook, i dr., 1989) i egzonukleaza slezene (fosfodiesteraza II) (5'DNA ili RNA egzonukleaza) (Bernardi i Bernardi, 1971). Endonukleaze prekidaju fosfodiesterne veze na specifičnom mjestu unutar polinukleotidnog lanca, dok egzonukleaze hidroliziraju veze između nukleotida na kraju DNA molekule (Devlin, 1997).

Reakcija s kemijskim reagensima je odlična metoda za ispitivanje pristupa svakog reaktivnog mjesta na svakom nukleotidu. Reaktivnost svake baze je jedinstvena, ali specifični okoliš svakog nukleotida modulira reaktivnost svakog atoma. Konformacija dvolančane DNA (A, B i Z) utječe na reaktivnost. Male promjene u strukturi, kao što su širenje ili suženje velikih ili malih utora uzrokovana specifičnim sekvencama, ujedno će promijeniti brzine reakcija. Precizne lokacije vezanja proteina ili lijekova se mogu odrediti razlikama u reaktivnosti vezanih i ogoljenih nukleinskih kiselina (Bloomfield, i dr., 2000). Za RNA, kovalentne reakcije mogu otkriti koje su baze jednolančane, odnosno nepovezane s komplementarnim bazama nasuprotnog

lanca, pa prema tome i obično najreaktivnije; koje su u sparenim sekundarnim strukturama te koje su uključene u tercijarne strukture (Bloomfield, i dr., 2000). Jednolančane regije se također mogu pojaviti u dvolančanoj DNA kad je sekvenca palindromaska (obrnuto ponavljanje) što vodi stvaranju struktura ukosnice na suprotnom lancu; takve omče se mogu detektirati reagensima specifičnim za jednolančane regije (Bloomfield, i dr., 2000). Nesparene baze se osim u opisanim kruciformnim regijama mogu pojaviti i u trolančanim i junkcijskim regijama te drugim koje su često posljedica negativnog super-uzvijanja. Dvije često korištene metode za određivanje relativne reaktivnosti nukleotida u nukleinskim kiselinama su kemijsko rezanje lanca s obilježenim krajem („end-labeled chain“) na mjestu modificirane baze i terminacija lanca reverznom transkriptazom na tom mjestu. Za određivanje DNA sekundarne strukture koristimo kemijske probe i nukleaze. Za određivanje tercijarne strukture DNA koristimo metode križnog povezivanja: kemijskog, psoralensko-svjetlosnog i ultraljubičasto-svjetlosnog križnog povezivanja („photocross“) (Nelson & Cox, 2004).



Slika 5-6 (a) Jedan tip reakcije (lijevo) rezultira formiranjem ciklobutilnim prstenom koji sadrži C-5 i C-6 susjednih pirimidinskih rezidua. Alternativna reakcija (desno) rezultira 6-4 fotoproduktom, s vezom između C-6 jednog pirimidina i C-4 njegovog susjeda (b) formiranje ciklobutanskog pirimidinskog dimera uvodi zakrivljenje u DNA. (Nelson & Cox, 2004, str. 295)

6. Fizikalne metode u istraživanju DNA

Osim prije opisanih kemijskih i enzimatskih metoda, za određivanje strukture i dinamike nukleinskih kiselina raspolažemo i s fizikalnim metodama difrakcije X-zraka (ogiba rendgenskih zraka), nuklearne magnetske rezonancije (NMR) te elektronske i vibracijske spektroskopije.

6.1 Difrakcija X-zraka

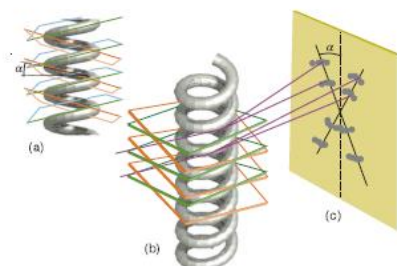
Položaj atoma u kristalnoj rešetci (obrascu čestičnog slaganja unutar kristalotrodimezionalne krutine formirane regularnim ponavljanjem pakiranja atoma, iona ili molekula) može se odrediti mjerenjem lokacije i intenziteta točaka produciranih na fotografskom filmu X-zrakama određene valne duljine, nakon difrakcije (ogiba) na elektronima atoma kristala. Primjerice, analiza X-zrakama pokazuje da su Na^+ i Cl^- ioni aranžirani u jednostavnu kubičnu rešetku. Za razliku od ovakvih jednostavnih kristala soli, tehnike za analizu kristala kompleksnih organskih molekula su puno zahtjevnije: kad je repeticijski obrazac kristala velika molekula, kao što je primjerice DNA, brojni atomi molekule daju tisuće difrakcijskih točaka koje potom zahtijevaju kompjutersku analizu (Nelson & Cox, 2004).

Za razumijevanje ovog proces poslužit će primjer stvaranja slike u svjetlosnom mikroskopu. Svjetlost iz točkastog izvor se fokusira na objekt. Svjetlosni valovi se raspršuju na objektu te se potom rekombiniraju nizom leća kako bi stvorili povećanu sliku obasjanog objekta. Najmanji objekt čija se struktura može odrediti takvim sustavom, odnosno rezolucijskom moći mikroskopa, određena je valnom duljinom svjetlosti, u ovom slučaju vidljive svjetlosti s valnim duljinama između 400 i 700 nm. Objekti manjih dimenzija od polovice valne duljine svjetlosti se ne mogu razlučiti. Za razlučivanje manjih objekata, primjerice proteina, potrebno je obasjati objekt svjetlošću valnih duljina u rasponu od 0.7 Å do 1.5 Å (0.07 do 0.15 nm). Međutim, ne postoje leće za rekombinaciju, skupljanje X-zraka i formiranje slike; umjesto toga difrakcijski obrazac X-zraka se izravno skuplja, a slika se potom rekonstruira matematičkim tehnikama.

6.2 Spektroskopija rendgenskim zračenjem

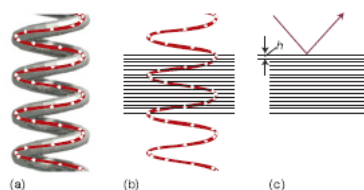
Općenito govoreći ogib valova je pojava kojom se opisuje širenje valova i iza prepreke. Različito ogibani valovi u prostoru iza prepreke interferiraju i grade interferencijske spektre, koji sadrže informacije o prepreci. (Brnjas Kraljević, 2001.) Informacije do kojih možemo doći na taj način su vjerodostojnije za slučajeve prepreka kao sistema s pravilnom prostornom raspodjelom detalja na kojima se val ogiba. Kristalna struktura, opisana kristalnom rešetkom, predstavlja pravilan razmještaj atoma u pojedinim smjerovima pa će izgled interferencijskih spektara ovisiti o smjeru promatranja kristala. X-zrake se raspršuju na elektronskim oblacima atoma u kristalnoj rešetki. Valna duljina elektromagnetskog zračenja treba biti manja od dimenzija detalja. Za proučavanje bioloških makromolekula uobičajeno se koriste rendgenske zrake valne duljine oko 0,1 nm, proizvedene sinkrotronskim zračenjem. Operativno, postoji nekoliko koraka u analizi strukture dobivene ogibom X-zraka. Jednom kad je kristal dobiven (za ilustraciju težine tog postupka kristalografiji su proces dobivanja proteinskih kristala usporedili s držanjem velikog broja kugli uz pomoć celofanske folije) postavlja se između izvora i detektora na putu X-zrake te se dobiva difrakcijska slika kristalne strukture kao pravilnog točkastog uzorka. Difrakcijska slika kristalne rešetke je dvodimenzijska projekcija pravilno razmještenih atoma u kristalu. Tako dobivena mapa elektronske gustoće se rekonstruira iz cjelokupnog difrakcijskog obrasca uporabom Fourierovog teorema (neharmonijska funkcija prikazuje se kao zbroj konačnog broja harmonijskih funkcija koje su definirane frekvencijom i amplitudom). Model strukture se gradi tako da bude konzistentan s mapom elektronske gustoće (Atkins & de Paula, 2011).

Fizikalni okoliš unutar kristala nije jednak onom u otopini ili u živoj stanici. Kristal predstavlja prostorni i vremenski prosjek strukture koja se dobiva iz njegove analize, a difrakcija X-zraka na kristalu daje malo informacija o molekularnim gibanjima unutar proteina. Konformacija makromolekula u kristalu mogu u principu biti pod utjecajem nefizioloških čimbenika kao što su slučajni intermolekularni kontakti unutar kristala. Međutim, kad se strukturne informacije dobivene različitim tehnikama (primjerice NMR-om) usporede, njihova analiza može rezultirati funkcionalnom konformacijom (Nelson & Cox, 2004).



Slika 6.2-1 Porijeklo obrasca dobivenog raspršenjem X- zraka na uzvojnici DNA. (a) Uzvojnici možemo opisati kao niz ravnina između kojih je kut α i ravnina između kojih je kut $-\alpha$ (b) Točke difrakcije jednog seta ravnina pojavljuju se pod kutom α u odnosu na vertikalu uzvojnice, dajući jedan krak difraktograma u obliku slova X, a točke drugog seta se pojavljuju pod kutom $-\alpha$, dajući drugi krak X-a . Donja polovica se pojavljuje jer uzvojnica ima simetriju gore-dolje u ovom aranžmanu. (c) Vanjski nizovi točaka uzduž kraka X-a odgovaraju prvom, drugom ... redu difrakcije ($n=1,2,\dots$)

(Atkins & de Paula, 2011, str. 424)



Slika 6.2-2 Učinak unutarnje strukture uzvojnice na obrascu difrakcije X-zraka (a) Strukturalne jedinice (rezidue) makromolekule su prezentirane točkama (b) paralelne ravnine u kojim leže residue su okomite na os molekule (c) ravnine daju jaku difrakciju s kutom koja nam omogućuje određivanje udaljenosti između ravnina h iz jednadžbe $\lambda=2h\sin\Theta$. (Atkins & de Paula, 2011, str. 424)

6.3 Nuklearna magnetska rezonancija

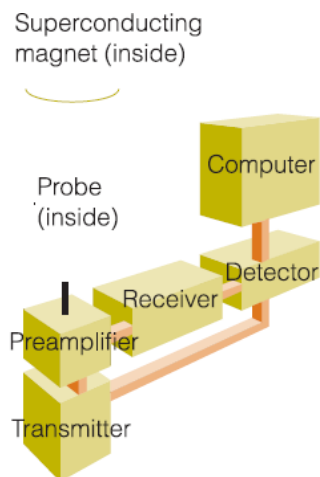
NMR je važna komplementarna metoda za određivanje trodimenzionalne strukture makromolekula. Moderne NMR tehnike se koriste za određivanje struktura makromolekula kao što su: ugljikohidrati, nukleinske kiseline, male i prosječno velike proteine. Prednost NMR studija je što se izvode na makromolekulama u otopini, dok je kristalografija X-zrakama ograničena na molekule koje se mogu kristalizirati. NMR može također dati uvid u dinamiku struktura, uključujući konformacijske promjene i interakcije s drugim molekulama.

NMR se temelji na interakciji magnetskog polja i spinskog angularnog momenta jezgre, kvantnomehaničke veličine. Samo određene jezgre, uključujući ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F i ^{31}P , posjeduju spin i njemu pripadajući spinski angularni moment. U cilju lakšeg razumijevanja tako složene pojave možemo zamisliti jezgru koja ima spinski angularni moment kao magnetski dipol. U toj slici možemo zamisliti kako jako, stalno magnetsko polje u otopini koja sadrži jedan tip makromolekule daje za posljedicu orijentiranje magnetskih dipola u smjeru polja, paralelno (niske energije) ili suprotno od smjera polja, antiparalelno (visoke energije). Kratki ($\approx 10\mu\text{s}$) puls elektromagnetske energije točno određene frekvencije, tzv. Larmorove frekvencije, omogućuje povećanje broja jezgara u višem energijskom stanju. Makroskopska magnetizacija je određena zbrojem spinskih magnetskih momenata i cijelo vrijeme precesira oko osi – smjera stalnog magnetskog polja. Primjenom pulsa elektromagnetskog zračenja longitudinalna komponenta (u smjeru stalnog magnetskog polja) raste. Za vrijeme trajanja relaksacije longitudinalna komponenta magnetizacije se smanjuje, a transverzalna raste. Detektirajući promjenu transverzalne komponente magnetizacije možemo dobiti informacije o koncentraciji odabranih jezgara. U skopiji je najčešće jezgra vodika. Također tehnika daje i informaciju o njihovom trenutnom kemijskom okolišu. Podaci iz velikog broja takvih pokusa na istom uzorku se usrednjuju, povećava se omjer signala/šum te se tako dobiva NMR spektar (Nelson & Cox, 2004).

^1H je od posebne važnosti za NMR eksperimente zbog svoje visoke osjetljivosti i prirodne pojavnosti. ^1H NMR spektri su izrazito komplicirani jer čak i mali proteini sadrže stotine ^1H atoma što rezultira time da je i jednodimenzionalni NMR spekar prekompleksan za analizu. Razvijanjem posebnih spektroskopskih dvodimenzionalnih NMR tehnika omogućena je strukturna analiza većih makromolekula. Takva je primjerice metoda NOESY - dvodimenzionalna spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije koja se temelji na mjerenju se udaljenosti ovisnog sparivanja nuklearnih spinova susjednih atoma u prostoru nuklearni Overhauserov efekt (NOE). Totalnom korelacijskom spektroskopijom (TOCSY) pak se mjeri sparivanje nuklearnih spinova u atomima povezanim kovalentnim vezama.

Prevođenje dvodimenzionalnog NMR spektra u kompletnu trodimenzionalnu strukturu je zahtjevan proces. NOE signali daju informacije o udaljenostima između pojedinih atoma, ali za valjano zaključivanje potrebno je identificirati koji atomi daju

svaki od signala. Komplementarni TOCSY eksperimenti pomažu u identifikaciji NOE signala koji odgovaraju atomima povezanim kovalentnim vezama. Određeni obrasci NOE signala su povezani sa sekundarnim strukturama kao što su α -uzvojnice. Genetički inženjering je koristan za pripremu proteina koji koriste rijetke izotope ^{13}C ili ^{15}N . Novi NMR signali producirani ovim atomima i sparivanje s ^1H signalima koji su rezultat ove supstitucije, omogućuju identifikaciju individualnih ^1H NOE signala. Za stvaranje trodimenzionalne strukture, u računalo se unose signalna NOE ograničenja udaljenosti atoma i poznata geometrijska ograničenja kao što su kiralnost (prostorni razmještaj atoma u molekuli koja ne može „poklopiti“ molekulu istog sastava, ali zrcalnog razmještaja atoma; molekula je akiralna kad njenu zrcalnu sliku ne razlikujemo od originala), van der Waalsovi radijusi, duljine veza i kutevi. Računalo generira skup bliskih struktura koje prezentiraju raspon konformacija konzistentan s ograničenjima. Za nesigurnost u strukture generirane NMR-om su dijelom zaslužne molekularne vibracije („disanje“) unutar strukture u otopini (Nelson & Cox, 2004).



Slika 6.3-1 Izgled tipičnog NMR spektrometra. (Atkins & de Paula, 2011, str. 519)

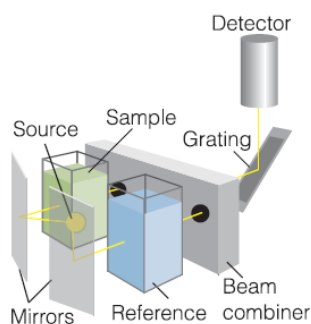
Strukture određene kristalografijom X-zrakama i NMR-om se općenito dobro podudaraju. Primjena obje tehnike je u srcu brze dostupnosti strukturnih informacija o makromolekulama živih stanica.

6.4 Elektronska i vibracijska spektroskopija

Elektronski spektri nastaju apsorpcijom ultraljubičastog i vidljivog dijela elektromagnetskog zračenja. Nakon što je molekula apsorbirala energiju može doći do porasta temperature otopine što je najčešća pojava ili djelomične pretvorbe energije fotona u kemijsku energiju – fotokemijske reakcije te fluorescencije ili fosforescencije. Fluorescencija i fosforescencija su tipovi molekularne (foto)luminiscencije. Emisijski spektar može pružiti kvalitativne i kvantitativne podatke. Pri fluorescenciji nastaje kratkoživi (10^{-5} s) pobuđeni elektron kojemu se ne mijenja spin. Tijekom fosforescencije nastaje pobuđeni elektron kojemu se mijenja spin.

Apsorpcijom infracrvenog zračenja nastaju vibracijski spektri, a kao tehniku vibracijske spektroskopije treba spomenuti i Ramanovu spektroskopiju (koristi raspršenje EM zračenja)-obje se koriste u određivanju strukture i sastava tvari.

(Hrvatska enciklopedija, 2015)



Slika 6.4-1 Izgled tipičnog apsorpcijskog spektrometra. Ekscitirajuće zrake zračenja prolaze izmjenično kroz uzorak i referentnu stanicu, a detektor se sinkronizira s njima kako bi se odredila relativna apsorpcija. (Atkins & de Paula, 2011, str. 465)

6.5 Računalne metode

Uz opisane tehnike rada u strukturalnoj biologiji, NMR spektroskopiju i kristalografiju X-zrakama, za atomsku rezoluciju koristimo i računalne modele. Strukture dobivene kristalografijom i NMR spektroskopijom su različito generirane: kristalografijom se direktno detektira pozicija atoma, a za izvođenje su nam potrebni kristali; NMR-om se pozicija indirektno detektira preko udaljenosti vodik-odik, a izvodi se u otopini. Međutim, kristalografija i NMR ne služe uvijek u determiniranju

strukture- problem predstavljaju kristalizacija, za kristalografiju, i ograničenje veličine za NMR. Zato se služimo računalnim metodama: molekularnim simulacijama koje predstavljaju konvertiranje eksperimentalnih podataka u strukture; predikcija učinaka mutacija, promjena u okolišu; uvid u molekularna kretanja; interpretacija struktura kao karakterizacija kemijskih svojstava (npr. površine) za pretpostavljanje funkcije; i predikcija strukture: sekundarne- algoritamski iz sekvence (Chazin, 2015).

Tablica 6.5-1 Usporedba metoda u analizi strukture DNA. (Chazin, 2015)

Kristalografija X-zrakama	NMR spektroskopija	Računalno modeliranje
<ul style="list-style-type: none"> • Strukture najviše rezolucije • Brža od NMR-spektroskopije 	<ul style="list-style-type: none"> • U otopini • Omogućuje različite uvjete • Može okarakterizirati dinamičke, slabo interagirajuće sustave i kretanja 	<ul style="list-style-type: none"> • Modelira bez eksperimenta • Vrlo brza • Fundamentalno razumijevanje strukture, dinamike i interakcija

7. Struktura deoksiribonukleinske kiseline

DNA je izvanredno savitljiva molekula. Značajne rotacije su moguće oko brojnih veza u šećerno-fosfatnoj (fosfodeoksiriboznoj) okosnici, a termičke fluktuacije mogu uzrokovati savijanje, istezanje i odvajanje (otapanje) lanaca. Mnoge značajne devijacije od DNA strukture Watsona i Cricka se nalaze u staničnoj DNA, od kojih neke (ili sve) imaju značajne uloge u DNA metabolizmu. Ove strukturne varijacije uglavnom ne djeluju na ključna svojstva DNA definirane od Watsona i Cricka: komplementarnost lanaca, antiparalelnost lanaca i ispunjenje zahtjeva za A=T i G≡C parova baza (Garrett & Grisham, 2012).

7.1 Sekundarna struktura

Rane difrakcijske studije X-zrakama različitih formi vlakana nukleinskih kiselina su rezultirale s nekoliko karakterističnih i posebnih difrakcijskih obrazaca. Njihova analiza je rezultirala s nekoliko predloženih skupina modela dvostruke uzvojnice. Od njih su se samo tri modela naknadno potvrdile provedenim difrakcijskim studijama jednog kristala („single -crystal“) oligonukleotidnih dupleksa. To su DNA forme A i B, te A-RNA forma. Četvrta, DNA-Z forma otkrila se prvo metodom difrakcije X-zrakama na jednom kristalu te je naknadno ponovno otkrivena difraktogramima vlakana DNA. Dakle, dvolančana DNA molekula poprima jednu od sekundarnih struktura koje nazivamo A, B ili Z (Bloomfield, i dr., 2000).

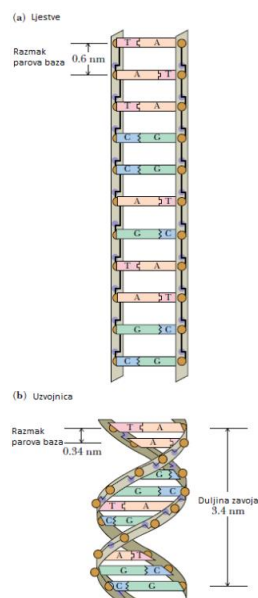
Strukturne varijacije u DNA reflektiraju tri preduvjeta: različite moguće konformacije deoksiriboze, rotacije oko kontinuteta veza koje čine fosfodeoksiribozni stup i slobodnu rotaciju oko C-1'-N glikozilne veze. Zbog steričkih (prostornih) ograničenja, purini su u purinskim nukleotidima ograničeni na dvije stabilne konformacije, sin i anti, u odnosu na deoksiribožu. Pirimidini su općenito ograničeni na anti konformaciju zbog steričkih interferencija između šećera i karbonilnog kisika na C-2 pirimidina.

U osnovi, dvolančana DNA je uobičajena dvolančana struktura s vodikovim vezama između nasuprotnih baza. Takve vodikove veze su moguće samo kod

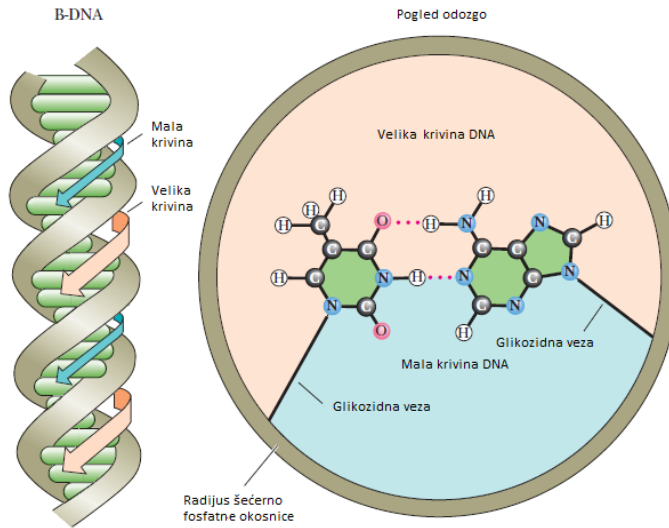
antiparalelnih lanaca. Polarni niz šećera i fosfata je izvana dok su baze naslagane unutar strukture; ove heterocikličke baze su, zbog svojih π -elektronskih oblaka, hidrofobne na svojim ploham. Jedna potpuno hipotetska konformacija dvolančanog ustroja bi bila struktura nalik ljestvama pri čemu su parovi baza, prečke, udaljeni na fiksnu udaljenost od 0,6 nm što odgovara udaljenosti između dvaju susjednih šećera. Ovakva konformacija je energetski nepovoljna jer bi molekulama vode bio omogućen pristup u prostor između hidrofobnih površina baza. Ova struktura nalik ljestvama se pretvara u uzvojnica jednostavnim desnostranim okretom. Tada dobivamo strukturu koja je veoma nalik na već opisani model dvostruke uzvojnice Watsona i Cricka s razmakom od 0,34 nm između baza, koja predstavlja najčešću konformaciju DNA u otopini (Nelson & Cox, 2004).

7.1.1 B-DNA

Model Watsona i Cricka se naziva i B-formom DNA ili B-DNA i najstabilnija je sekundarna struktura za nasumičnu sekvencu DNA molekule u fiziološkim uvjetima pa je stoga referentna točka u svakom istraživanju svojstava DNA. S njom se uspoređuju dvije gore spomenute, dobro okarakterizirane forme: A i Z (Koolman & Roehm, 2004).

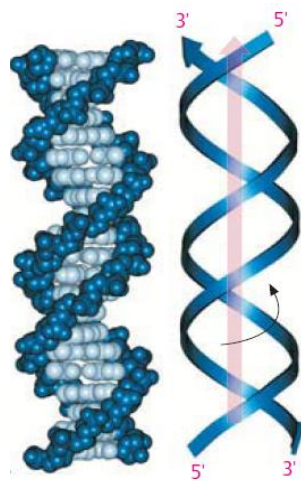


Slika 7.1.1-1 (a) Dvolančana DNA zamišljena kao struktura nalik ljestvama (b) jednostavni desnostrani okret ljestve pretvara u uzvojniciu. (Garrett & Grisham, 2012, str. 363)



Slika 7.1.1-2 Baze u paru baza nisu direktno jedna nasuprot drugoj u osi heliksa uzduž nekog promjera, već su lagano premještene. Ovo premještanje i relativna orijentacija glikozidnih veza koje povezuju baze za šećerno-fosfatnu osovinu, vodi stvaranju krivina različitih veličina u cilindru dvostruke uzvojnice.

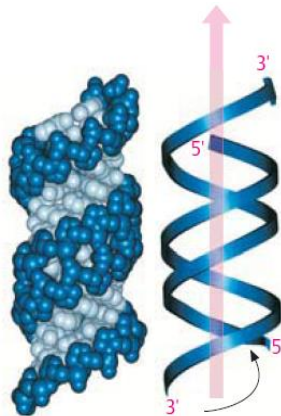
(Garrett & Grisham, 2012, str. 365)



Slika 7.1.1-3 B-DNA. (Koolman & Roehm, 2004, str. 87)

7.1.2 A-DNA

Alternativna forma desnostranoj dvostrukoj uzvojnici je A-DNA. A-DNA molekula se razlikuje od B-DNA u mnogo karakteristika. Nagib („pitch“), ili duljina koja je potrebna za jedan kompletni okret uzvojnice je različita. U B-DNA iznosi 3,4 nm, dok je u A-DNA 2,46 nm. Takav jedan okret u A-DNA zahtjeva 11 bp, dok u B-formi, ovisno o lokalnoj sekvenci, zahtjeva između 10 i 10,6 bp. U A-DNA, parovi baza nisu više gotovo okomito postavljeni na os heliksa, već su nagnuti za 19° u odnosu na os. Uzastopni parovi baza su postavljeni svakih 0,23 nm dok su u B-DNA svakih 0,332 nm. B-DNA je prema tome dulja i tanja u odnosu na kratku i zdepastu A-DNA, koja svoje parove baza ima smještene oko, a ne na, osi heliksa (Garrett & Grisham, 2012).



Slika 7.1.2-1 A-DNA. (Koolman & Roehm, 2004, str. 87)

Iako relativno dehidrirana DNA vlakna mogu poprimiti A-konformaciju u fiziološkim uvjetima, nejasno je poprima li ikad DNA ovu konformaciju *in vivo*. Međutim, dvostruko uzvojniti DNA:RNA hibridi vjerojatno poprimaju konformaciju nalik na A-DNA. 2'-OH u RNA sterički prevenira dvostruko uzvojnite regije RNA lanaca da poprime B-formu helikalnog ustroja. Uz to, dvolančane regije u RNA lancima poprimaju konformaciju nalik na A, s bazama jako nagnutim na os uzvojnice.

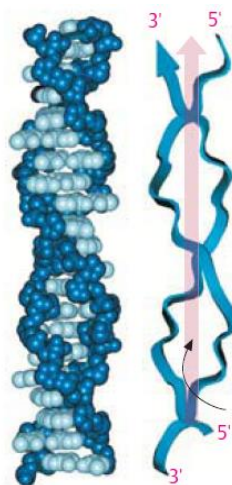
7.1.3 Z-DNA

Konformaciju Z-DNA je kao prvu otkrio Alexander Rich s kolegama s MIT-ja, analizom raspršenja X-zraka na sintetiziranom deoksinukleotidu dCpGpCpGpCpG, koji je bio kristaliziran u antiparalelnu dvostruku uzvojnica neočekivane konformacije. Izmjenična pirimidin-purinska (Py-Pu) sekvenca ovog nukleotida je ključna za njegova neobična svojstva. N-glikozilne veze gvaninskih G-rezidua u ovom izmjeničnom kopolimeru su rotirane 180° s obzirom na njihovu konformaciju u B-DNA, tako da je sad purinski prsten u **syn**, a ne u anti konformaciji. Citozinske rezidue ostaju u anti formi. Kako je G prsten „okrenut“, C prsten se mora također okrenuti kako bi se zadržalo normalno Watson-Crick sparivanje baza. Međutim, pirimidinski nukleozidi ne poprimaju lako sin konformaciju jer stvara steričke interferencije između pirimidinskog C-2 kisikovog atoma i atoma u pentozu. Citozinski prsten se ne rotira u odnosu na pentozu pa se stoga cijeli C-nukleozid (baza i šećer) mora rotirati za 180° . Topološki je moguće da G prijeđe u **syn** i da se C nukleozid rotira za 180° bez pucanja i ponovne uspostave G:C vodikovih veza. Drugim riječima, strukturni prijelaz iz B u Z se može odvijati bez kidanja veza između atoma.

Comment [S1]: nisam sigurna

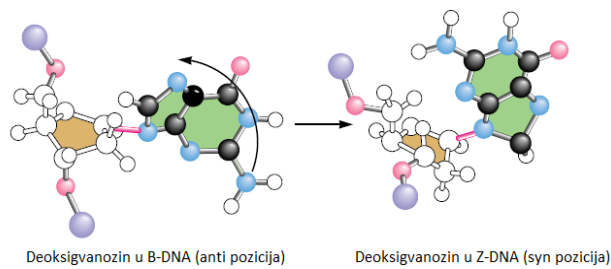
Comment [S2]: hrvatski

Comment [S3]: ? očito da ne znam što je to

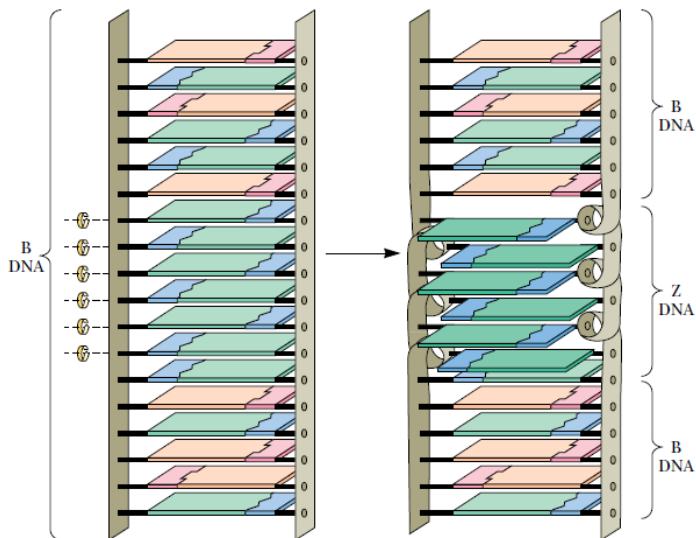


Slika 7.1.3-1 Z-DNA. (Koolman & Roehm, 2004, str. 87)

Izmjenični nukleotidi poprimaju različite konformacije, stoga je ponavljajuća jedinica zadanog lanca u Z-uzvojnici dinukleotid- za zadani broj baza n , uzduž jednog lanca, $n-1$ je broj dinukleotida. Primjerice, GpCpGpC podskup sekvence uzduž jednog lanca sastavljen je od tri uzastopne dinukleotidne jedinice: GpC, CpG i GpC. U B-DNA nukleotidne konformacije su u biti uniformne i ponavljajuća jedinica je mononukleotid. Iz tog slijedi da je CpG sekvenca konformacijski različita od GpC sekvence uzduž izmjeničnih lanaca Z-dvostruke uzvojnice. Konformacijske promjene u prijelazu iz B u Z prestrojavaju šećerno-fosfatnu os po „zigzag“ obrascu koji ima lijevostranu orijentaciju (po tom obrascu i naziv „Z-DNA“). Treba uočiti da u bilo kojem GpCpGpC podskupu, šećer-fosfati GpC formiraju horizontalni „zig“ dok GpC šećerni segment formira vertikalni „zag“. Srednji rotacijski kut oko osi heliksa je -15° za CpG korak i -45° za GpC korak (ukupno -60° za dinukleotidno ponavljanje). Minus označava lijevostranu, ili rotaciju u smjeru obrnutom od kazaljke na satu, oko osi heliksa. Z-DNA je izduljenija i tanja od B-DNA. Z konformacija može nastati i u sekvencama koje nisu „strogo“ sastavljene od izmjeničnih pirimidina i purina (Py-Pu). Primjerice, heksanukleotid m^5CGATm^5CG , Py-Pu-Pu-Py-Py-Pu sekvenca koja sadrži dva 5-metilcitozina (m^5C), kristalizira kao Z-DNA. Za *in vivo* metilaciju C na 5-poziciji se vjeruje da favorizira prijelaz B u Z, jer bi se u B-DNA ove hidrofobne metilne grupe pružale u vodeni okoliš velike krivine destabilizirajući njenu strukturu. U Z-DNA, iste metilne grupe mogu formirati stabilizirajući hidrofobni sloj. Vjerojatno se Z-konformacije prirodno događaju u specifičnim regijama stanične DNA, koja je inače predominantno u B-formi. Osim toga, metilacija je vezanu uz regulaciju gena, pa bi pojavnost Z-DNA mogla utjecati na ekspresiju genetske informacije (Garrett & Grisham, 2012).



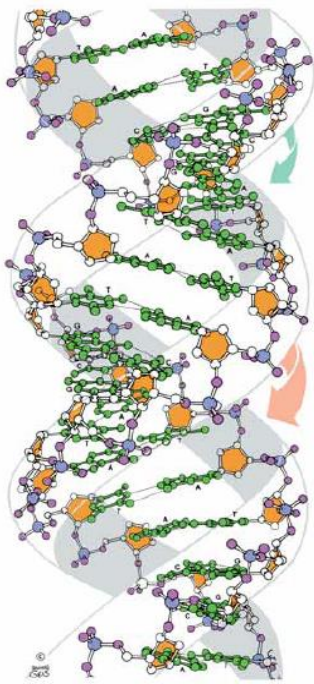
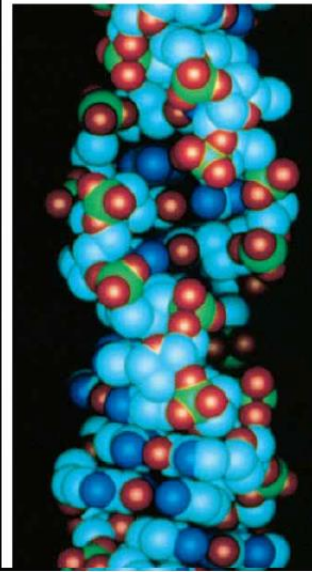
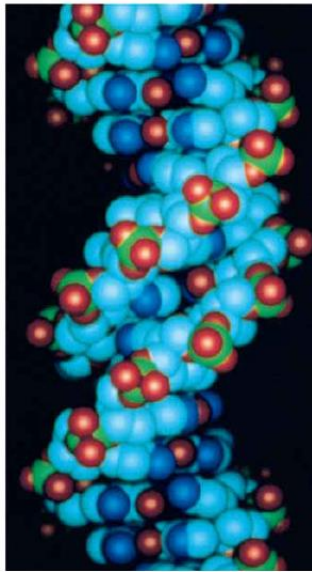
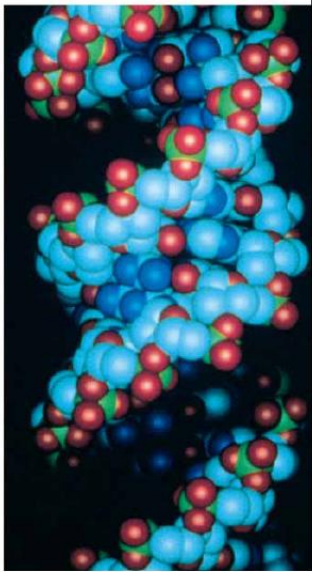
Slika 7.1.3-2 Usporedba deoksigrvanozinske konformacije u B- i Z-DNA. U B-DNA, C1'-N-9 glikozilna veza je uvijek u anti poziciji. U lijevostranoj Z-DNA strukturi, ova veza se rotira kako bi poprimila sin (syn) konformaciju. (Garrett & Grisham, 2012, str. 369)



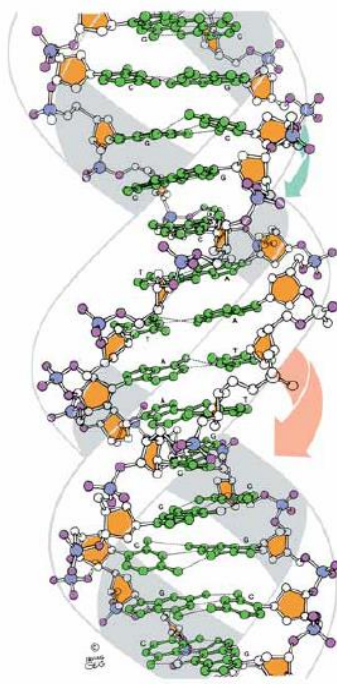
Slika 7.1.3-3 Promjena u topološkim odnosima parova baza iz B- u Z-DNA. Segment šest parova baza B-DNA je konvertiran u Z-DNA rotacijom parova baza. Purinski prstenovi (zeleno) deoksigrvanozinskih nukleozida se rotiraju promjenom konformacije gvanozin-deoksiribozne glikozidne veze iz anti u sin položaj; pirimidinski prstenovi (plavo) se rotiraju okretanjem cijelog deoksicitidinskog nukleozida. Posljedica ovih konformacijskih promjena jest ta da parovi baza u Z-DNA regiji ne dijele više π - π interakcije slaganja sa susjednim B-DNA regijama. (Garrett & Grisham, 2012, str. 369)

KONFORMACIJA*	A	B	Z
Opće proporcije	Kratka i široka	Dulja i tanja	Izduljena i tanka
Udaljenost između parova baza	2.3 Å	3.32 Å ± 0.19 Å	3.8 Å
Dijametar pakiranja uzvojnice	25.5 Å	23.7 Å	18.4 Å
Rotacija heliksa	Desnostrana	Desnostrana	Lijevostrana
Parovi baza po ponavljanju uzvojnice	1	1	2
Parovi baza po okretu uzvojnice	≈11	≈10	12
Srednja rotacija po paru baza	33.6°	35.9° ± 4.2°	-60°/2
Nagib po okretu uzvojnice	24.6 Å	33.2 Å	45.6 Å
Nagib para baza na okomicu	+19°	-1.2° ± 4.1°	-9°
Srednji propelerski okret para baza	+18°	+16° ± 7°	≈0°
Lokacija osi uzvojnice	Velika krivina	Kroz parove baza	Mala krivina
Proporcije velike krivine ³	Ekstremno uska i veoma duboka	Široka s intermedijarnom dubinom	Izravnana na površini heliksa
Proporcije male krivine	Veoma široka i plitka	Uska s intermedijarnom dubinom	Ekstremno uska i veoma duboka
Konformacija glikozilne veze	anti	anti	anti na C, syn na G

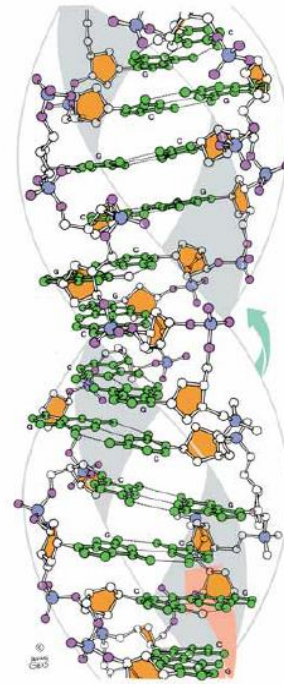
³ Krivina, žlijeb ili utor (od engl. „groove“); velika krivina – engl. „major groove“; mala krivina – engl. „minor groove“ * Tablica 7.1.3-1 Tip dvostruke uzvojnice. (Garrett & Grisham, 2012; Bloomfield, i dr., 2000)



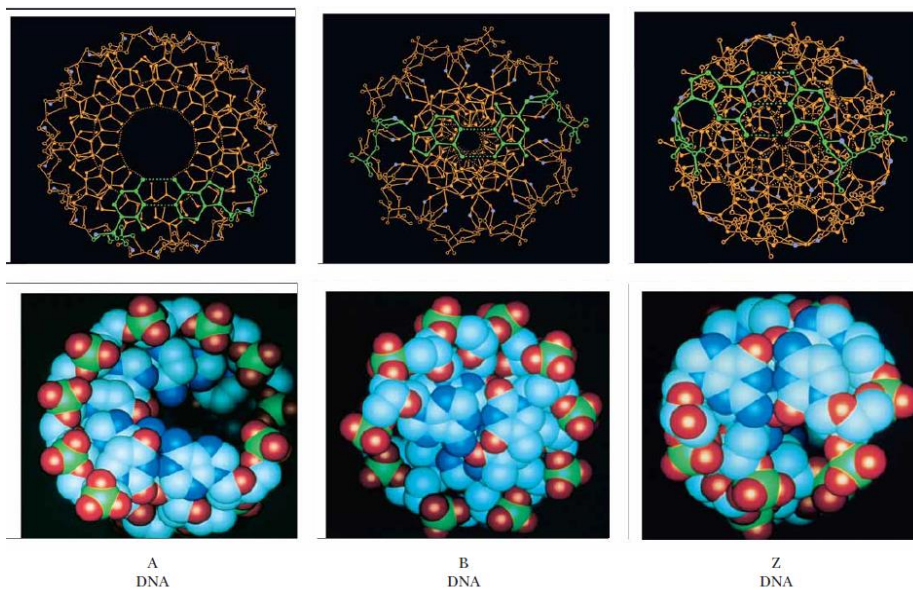
A
DNA



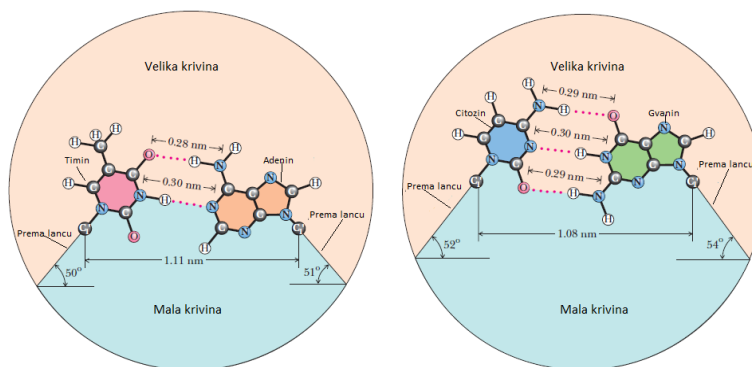
B
DNA



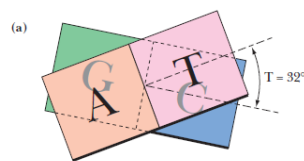
Z
DNA



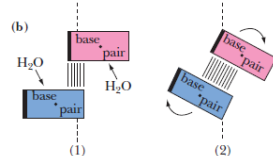
Slika 7.1.3-4 Usporedba A-, B- i Z-formi DNA dvostruke uzvojnice. Udaljenost potrebna za jedan kompletni okret je kraća u A-DNA nego u B-DNA. Izmjenična pirimidin-purinska sekvenca Z-DNA je ključna za lijevostranost uzvojnice. (Garrett & Grisham, 2012, str. 367)



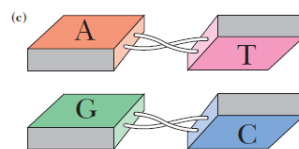
Slika 7.1.3-5 Watson-Crick A:T i G:C parovi baza. Sve H-veze u oba para baza su ravne, sa svakim atomom vodika H usmjerenim izravno prema njegovom atomu akceptoru, dušiku N ili kisiku O. Linearne H-veze su najsnažnije. Vezanje većih purina s manjim pirimidinima vodi stvaranju parova baza s identičnim dimenzijama, omogućujući dvama šećerno-fosfatnim okosnicama poprimanje identičnih konformacija uzvojnice. (Garrett & Grisham, 2012, str. 364)



Dva para baza s 32° stupnja desnostranog okreta uzvojnice: rubovi male krivine su označeni debljim linijama



Propelerski okret na slici (2) omogućuje veće preklapanje baza unutar jednog lanca i smanjuje površinu kontakta baza i vode.



Parovi baza u propelerskom okretu. Vodikove veze između baza su izvrnute ovim okretom, ali ostaju neprekinute. Bridovi baza u maloj krivini su osjenčani.

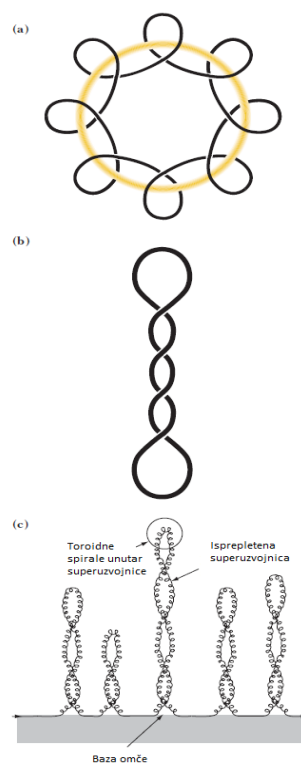
Slika 7.1.3-6 Okret uzvojnice i propelerski okret u DNA. (a) Uzastopni parovi baza u B-DNA su rotirani jedan prema drugom za otprilike 36° ; taj okret se zamjećuje pri pogledu niz cilindričnu os DNA. (b) Rotacija u drugoj dimenziji – propelerski okret – omogućuje bolje preklapanje parova baza. Pogled ovdje je s ruba dva uzastopna para baza u jednom DNA lancu (kao da su dvije baze u desnom DNA lancu DNA u slici (a) gledane s desne margine ove stranice; točkice predstavljaju pogled na glikozidne veze koje su usmjerene prema promatraču. Rotacija u smjeru kazaljke na satu (prikazana ovdje) ima pozitivni predznak. (c) Dvije baze lijevog lanca DNA na slici (a) također pokazuju pozitivni propelerski okret (rotacija u smjeru kazaljke na satu dvaju baza kad se gledaju s lijeve margine ove stranice). (Garrett & Grisham, 2012, str. 365)

7.2 Tercijarna struktura DNA

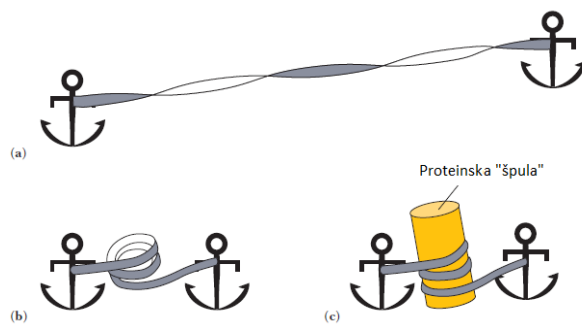
Dosad opisane konformacije DNA su varijacije koje dijele zajedničku sekundarnu strukturu temu, dvostruku uzvojnici, u kojoj je DNA u regularnoj, linearnoj formi. Međutim DNA može poprimiti pravilne strukture veće složenosti na nekoliko načina (Garrett & Grisham, 2012).

U dvolančanoj DNA, dva lanca se omataju jedan oko drugog jednom svakih 10 bp (duljina potrebna za jedan potpuni okret). Dvolančana kružna DNA (plazmidi,

bakterijski kromosomi, DNA raznih animalnih virusa) i linearni DNA duplexi čiji krajevi nisu slobodni za rotaciju, formiraju super-uzvojnice („supercoils“) ako su lanci nedovoljno (negativno super zavijeni; „negatively supercoiled“) ili previše zavijeni (pozitivno super zavijeni; „positively supercoiled“). Nedovoljno zavijeni duplexi DNA imaju manji broj zavoja, dok prezavijena DNA ima više. DNA super-zavijanje je analogno zavijanju ili odvijanju užeta čija su oba kraja fiksirana, što stvara torzijsko naprezanje. Negativno super-zavijanje stvara torzijsko naprezanje koje pogoduje odmatanju desnostrane B-DNA dvostruke uzvojnice, dok pozitivno super-zavijanje prezavija takav heliks. Obje vrste super-zavijanja kompaktiraju DNA tako da se brže sedimentira ultracentrifugacijski, odnosno pokreće brže u elektroforeznom gelu u usporedbi s relaksiranom DNA (DNA koja nije super-zavijena) (Hammond, i dr., 1997).



Slika 7.2-1 Toroidno i ispreplićuće („interwound“) varijacije DNA super-uzvijanja. (a) DNA je uzvijena spiralno oko zamišljenog toroida (objekt nalik uštipku, O-prsten; prstenasta forma elektromagnetske zavojnice). (b) DNA se isprepliće i zavija oko sebe. (c) Superuzvojnice u dugoj, linearnoj DNA organiziranoj u omče čiji su krajevi fiksirani – model kromosomske DNA. (Garrett & Grisham, 2012, str. 375)



Slika 7.2-2 Superuzvijena DNA na toroidni način se lako omata oko proteinskih „špula“. Zavijeni segment linearne DNA s dvije negativne superuzvojnice (a) se može spakirati u toroidnu konformaciju ako mu se krajevi približe (b). Omatanje DNA toroida oko proteinskih „špula“ stabilizira ovu konformaciju superuzvijene DNA (c). (Garrett & Grisham, 2012, str. 377)

DNA sekvence koje su obrnuta ponavljanja („inverted repeats“) ili palindromi, imaju potencijal formiranja križne (ukrižene, kruciformne; „cruciform“) tercijarne strukture (Devlin, 1997). Palindromi su riječi, fraze ili rečenice koje se jednako čitaju slijeva i zdesna („Ana voli Milovana“, „radar“, „neven“). Uvjet za takvu strukturu je zamjena normalnog međulančanog („inter“) povezivanja baza, onim unutar lanca („intrastrand“). To za posljedicu ima svijanje svakog DNA lanca na sebe samog, čime se formira struktura nalik ukosnici (hairpin) kako bi se omogućilo spajanje palinromskih sekvenci (Nelson & Cox, 2004). Takve križne strukture nikad nisu stabilne kao normalni DNA dupleksi zato što postoje nespareni segmenti u omći takve ukosnice. Međutim, negativno super-zavijanje uzrokuje lokalizirano prekidanje međulančanih H-veza i promociju formiranja križnih petlji. Kruciformne strukture imaju dvostruku rotacijsku simetriju oko svojih centara i vjerojatno stvaraju posebna mjesta prepoznavanja za DNA-vezuće proteine.

Uz navedene, postoje i brojne druge strukturne varijacije koje ovise o sekvenci te su takve otkrivene unutar većih kromosoma i za njih se misli da utječu na metabolizam i funkciju DNA segmenata u neposrednoj blizini (Nelson & Cox, 2004).

Primjerice, nagibi DNA se nalaze u DNA uzvojnica gdje god se uzastopce pojavi četiri ili više adenzinskih rezidua u jednom lancu. Šest adenzina u nizu uzrokuje savijanje od otprilike 18°. Svijanje („bending“) koji se uočava u ovakvih i

drugih sekvenci može imati ulogu u vezanju nekih proteina na DNA (Parekh & Hatfield, 1996).

Nekoliko neobičnih DNA struktura uključuje tri ili čak četiri DNA lanca. Ovakve strukturne varijacije imaju tendenciju pojavnosti na mjestima gdje započinju ili gdje se reguliraju značajni procesi DNA metabolizma (replikacija, rekombinacija, transkripcija). Nukleotidi koji sudjeluju u sparivanju parova baza mogu formirati brojne dodatne vodikove veze, posebice s funkcionalnim grupama prisutnim u velikom utoru. Primjerice, protonirana citidinska rezidua se može upariti s gvanozinskom reziduom $G \equiv C$ nukleotidnog para, a timidinska s adenozinom $A = T$ para (Nelson & Cox, 2004). N^7 , O^6 i N^6 purina, atomi koji participiraju u vodikovim vezama trostruke (tripleks) DNA, nazivaju se Hoogsteenovim pozicijama, a ne-Watson-Crickovo uparivanje se naziva Hoogsteenovim uparivanje (Karst Hoogsteen, 1963. prvi prepoznao potencijal za ovakva neobična sparivanja). Hoogstenovo sparivanje omogućuje formiranje tripleks DNA. Takvi tripleksi su najstabilniji pri niskom pH jer $G \equiv C \cdot C^+$ zahtjevaju protonirani citozin (Devlin, 1997). U tripleksima, pK_a citozina je >7.5 , veći u odnosu na normalnu vrijednost od 4.2. Tripleksi se lako formiraju unutar dugih sekvenci koje sadrže samo pirimidine ili samo purine u danom lancu. Neki tripleksi DNA sadrže dva pirimidinska lanca i jedan purinski; drugi sadrže dva purinska i jedan pirimidinski.

Posebno egzotična DNA struktura, poznata kao H-DNA, nalazi se u polipirimidinskim ili polipurinskim lancima koji inkorporiraju zrcalna ponavljanja. Jednostavan primjer je dugi niz izmjeničnih T i C rezidua. H-DNA struktura je trolančana: dva od tri lanca u H-DNA trostrukog heliksa sadrže pirimidine, a treći sadrži purine (Nelson & Cox, 2004).

U DNA živih stanica, mjesta koja prepoznaju sekvenca-specifični DNA-vezujući proteini su organizirana u palindrome, a polipirimidinske ili polipurinske sekvence koje mogu formirati trostruke uzvojnice ili čak H-DNA se mogu pronaći unutar regija uključenih u regulaciju ekspresije nekih eukariotskih gena (Jai, Wang, & Vasquez, 2008). U principu, sintetički DNA lanci dizajnirani za sparivanje s ovim sekvencama, mogu formirati triplekse DNA i uzrokovati smanjivanje genske ekspresije. Ovaj pristup kontrole staničnog metabolizma ima potencijalne aplikacije u medicini (Jai, Wang, & Vasquez, 2008).

7.3 Kvantarna struktura DNA

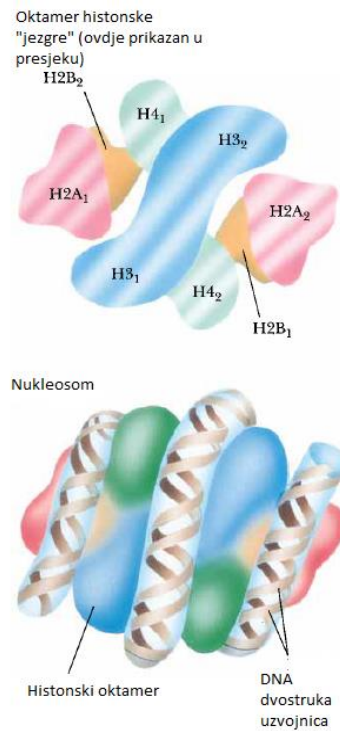
Kvantarnom strukturom DNA nazivamo kompleksno sklapanje (slaganje; „folding“) velikih kromosoma unutar eukariotskog kromatina i bakterijskog nukleoida.

Tipična humana stanica je 20 μm u promjeru. Njen genetski materijal sadrži 23 para dvolančane DNA (dsDNA) u formi kromosoma, prosječna duljina kojih je 3×10^9 bp/23 ili $1,3 \times 10^8$ nukleotidnih parova. Pri 0,34 nm/bp u B-DNA, ovakav kromosom sadrži DNA molekulu duljine 5cm. Zajedno ovakve 46 dsDNA molekule sadrže preko 2m DNA koja se mora pakirati u jezgru promjera 5 μm ! Jasno je da se DNA mora kondenzirati za faktor veći od 10^5 . Ovaj zadatak se postiže finim namatanjem DNA oko proteina histona pa dobivamo nukleosom; potom se ti nukleosomi pakiraju u helikalne filamente organizirane u omče vezane za nuklearni matriks, kostur ili skele proteina koji omogućuju strukturalnu mrežu unutar nukleusa (Garrett & Grisham, 2012)

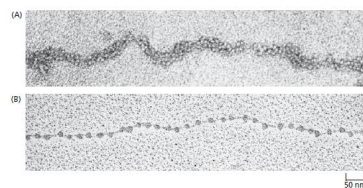
DNA u eukariotskim staničnim jezgrama tijekom interfaze postoji kao nukleoproteinski kompleks kromatin. Kromatinski proteini se mogu svrstati u dva razreda: histone i nehistske kromosomalne proteine. Histoni su strukturni proteini i ima ih u izobilju, dok proteina nehistskog razreda ima po nekoliko kopija različitih proteina uključenih u genetsku regulaciju (Alberts, i dr., 2013). Histoni su relativno mali, pozitivno nabijeni, argininom ili lizinom bogati proteini koji stupaju u interakciju preko ionskih veza s negativno nabijenim fosfatnim grupama stupa polinukleotida. Pet je različitih histona poznato: H1, H2A, H2B, H3 i H4. Parovi histona H2A, H2B, H3 i H4 agregiraju i stvaraju oktameru središnju strukturu nukleosoma oko koje se namata DNA uzvojnica. Kromatin naglo nabubri u vodenom okruženju i tako pripremljen za elektronsku mikroskopiju pokazuje nukleosome kao „perle na vrpci“ („nanizane kuglice“, „beads on a string“) pri čemu je vrpca dsDNA. Histonsku strukturu bez DNA je kristalografijom X-zrakama otkrio laboratorij E. N. Moudrianakisa, a s DNA T. J. Richmond i suradnici (Garrett & Grisham, 2012). Oktamer ima površinske oznake koje vode DNA oko oktamera; 146 bp B-DNA u ravnoj, lijevostranoj super-uzvojitoj konformaciji čini 1.65 okreta oko histonske jezgre, koja je sama proteinski superheliks koji sadrži spiralni postroj četiri histonska dimera. Histon 1, protein s tri domene, služi kao zatvarač krajeva DNA okreta oko

nukleosomske jezgre i za organizaciju dodatnih 40 do 60 bp duge DNA koja povezuje susjedne nukleosome („linker DNA“) (Mescher, 2003).

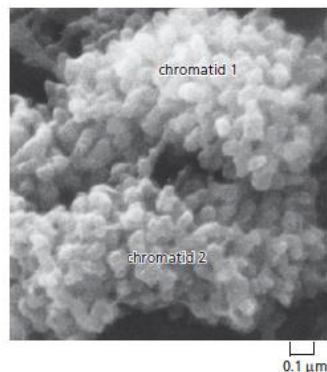
Comment [S4]: nukleosomske?



Slika 7.3-1 Histonski oktamer. Nukleosomi se sastoje od dva okreta DNA superuzvijene oko histonske oktamerne „jezgre“. (Garrett & Grisham, 2012, str. 341)

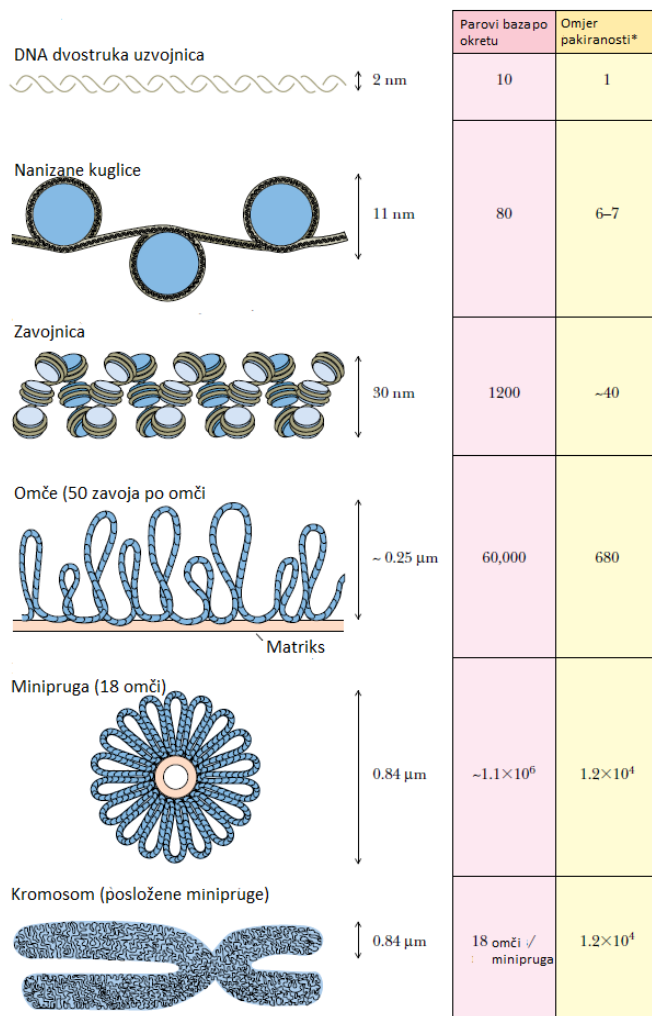


Slika 7.3-2 Nukleosomi su vidljivi elektronskim mikroskopom. (A) kromatin izoliran iz interfazne jezgre na elektronskom mikroskopu izgleda kao kromatinsko vlakno debljine oko 30 nm; dio tog vlakna je pokazan ovdje. (B) Ova elektron-mikroskopska slika pokazuje dio kromatinskog vlakna koje je eksperimentalno otpakirano, ili dekonenzirano, po izolaciji za prikaz izgleda „nanizanih kuglica“ nukleosoma. (Alberts, i dr., 2013, str. 185)

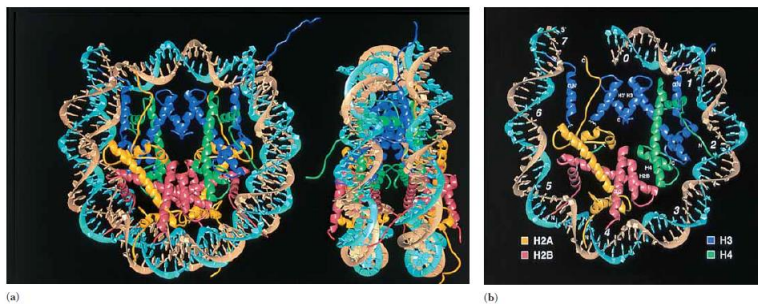


Slika 7.3-3 Mitotički kromosom sadrži kromatin koji je posebice gusto pakiran. Ova slika pretraživajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) pokazuje područje blizu kraja tipičnog mitotičkog kromosoma. Za svaku izbočinu se misli da predstavlja vršak odvojene omče kromatina. Kromosom se duplicirao, dajući dvije sestrinske kromatide koje su još uvijek jako blizu jedna drugoj. Krajevi kromatida se mogu raspoznati u desnom kraju slike. (Alberts, i dr., 2013, str. 188)

Viši stupanj kromatinske strukture se stvara kad se nukleosomi, u svojem karakterističnom motivu „perli na vrpci“, omataju šest nukleosoma po okretu, po motivu „solenoid“ (EM zavojnice). Rezultat je 30 nm debelo kromatinsko vlakno koje sadrži oko 1200 bp u svakom od svojih zavoja. Interakcije između H1 komponenti susljednih nukleosoma stabilizira 30 nm filament. Ovaj 30 nm filament formira duge DNA omče, petlje varijabilne duljine, od kojih svaka sadrži u prosjeku između 60 i 150 tisuća bp. Elektron-mikroskopska analiza humanog kromosoma 4 sugerira da je 18 takvih omči potom aranžirano u krug formirajući miniprugastu jedinicu („miniband unit“). Prema ovom modelu, otprilike 10^6 ovakvih minipruga je aranžirano oko središnje osi u svakoj od kromatida humanog kromosoma 4 u metafazi (Garrett & Grisham, 2012). Unatoč intenzivnim studijama, mnogo činjenica o kromosomskim strukturama višeg reda ostaje nepoznato.

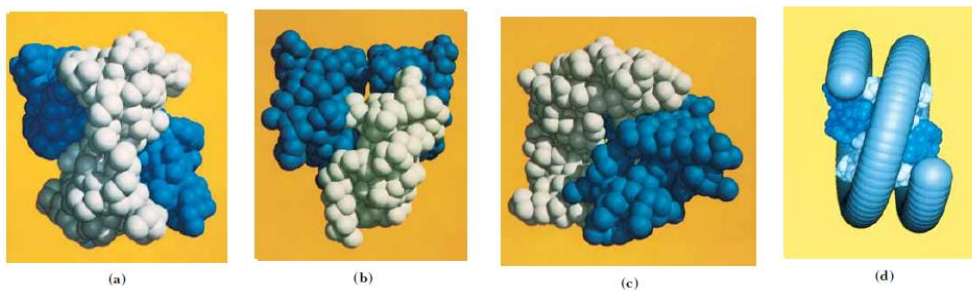


Slika 7.3-4 Model kromosomske strukture, humani kromosom 4. Dvostruki heliks DNA širine 2 nm se navija dva puta oko histonskog oktamera kako bi stvorio nukleosome od 10 nm, svaki od kojih sadrži 160 bp (80 po okretu). Potom se šest nukleosoma zavija i formira 30 nm široki filament. U ovom modelu, 30 nm filamenti formiraju duge DNA omče, svaka od kojih sadrži oko 60000 bp, povezanih svojom bazom za nuklearni matriks. Osamnaest ovakvih omči je potom radijalno nanizano oko opsega jednog okreta za formiranje jedinice minipruge kromosoma. Otprilike 10^6 ovakvih minipruga se pojavljuje u svakoj od kromatida humanog kromosoma 4 tijekom mitoze. (*koliko je puta određeni stupanj pakiranja DNA dvostruke uzvojnice gušće složen od početnog stupnja, odnosno dvostruke uzvojnice) (Garrett & Grisham, 2012, str. 381)



Slika 7.3-5 (a) Izvedena struktura nukleosomske jezgre omotane s 1.65 okreta DNA (146 bp). DNA je prikazana kao vrpca. (lijevo) Pogled niz os nukleosoma; (desno) pogled okomito na os. (b) Jedna polovica nukleosomske jezgre sa 73 bp DNA, pogled niz nukleosomsku os. DNA se ne omata u jednoličnom krugu oko histonske jezgre, već prati put koji se sastoji od donekle ravnih segmenata odvojenih svijanjima.

(Garrett & Grisham, 2012, str. 380)



Slika 7.3-6 Četiri pogleda na histonski oktamer pod pravim kutem jedan na drugi; određeni su kristalografijom X-zrakama: (a) sprijeda; (b) odozgo; i (c) tzv. „disk view“ – pogled niz dugu os kromatinskog vlakna. U perspektivi (c), DNA dvostruka uzvojnica se omata oko oktamera, pri čemu je os DNA superuzvojnice okomita na ravninu slike. (d) Opisani izgled nukleosoma s omotanom DNA. (Garrett &

Grisham, 2012, str. 379)

7.4 Odnos struktura-funkcija

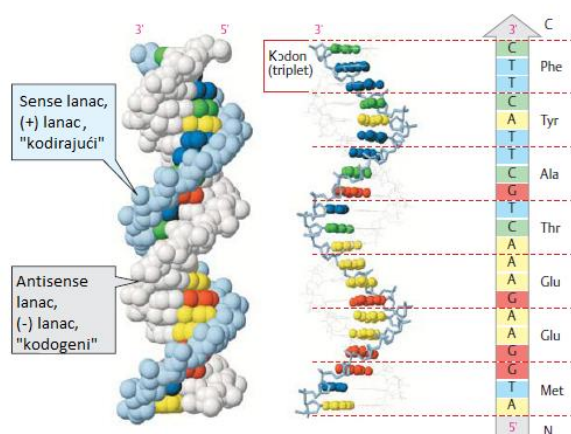
Struktura DNA snažno ilustrira osnovni zajednički princip svih bioloških makromolekula: blizak odnos između strukture i funkcije. Izvanredna svojstva ove kemijske tvari omogućuju joj funkciju veoma efikasnog i robusnog sredstva za pohranu informacija.

U strukturi DNA molekule, možemo prepoznati ispunjenje tri ključna zahtjeva pred genetskim materijalom (Bio-Nica.info, 2015).

1. Svaki genetski materijal mora imati sposobnost točne replikacije, tako da se informacija koju nosi precizno replicira i prosljeđuje u stanice kćeri. Osnova za to je komplementarno sparivanje baza što rezultira formiranjem dvije identične dvostruke uzvojnice u procesu replikacije.

2. Genetski materijal mora također imati kapacitet pohrane svih informacije potrebnih za upravljanje organizacijom i metaboličkim aktivnostima u stanici. Produkt većine gena je proteinska molekula - polimer aminokiselina. Pozicija aminokiselina u proteinu određuje njegova kemijska i fizikalna svojstva. Gen se eksprimira sintezom proteinskog produkta i jedan od zahtjeva pred materijalom genetskog nasljeđa je upravljanje redosljedom dodavanja aminokiselina na kraj rastućeg proteinskog lanca. U DNA, ovaj zahtjev je ispunjen postojanjem genetskog koda u kojem grupe od tri baze određuju aminokiseline.

3. Genetski materijal mora također biti sposoban prolaziti povremene mutacije u kojem se informacija koju nosi mijenja. Štoviše, kako bi mutacije bile nasljedne, mutirane molekule moraju se moći replicirati vjerno kao i roditeljske molekule. Ovo svojstvo je nužno za evoluciju raznolikih organizama sporom akumulacijom poželjnih mutacija. Watson i Crick su predložili da su heritabilne mutacije DNA moguće u rijetkim pogrešnim sparivanjem baza, s rezultatom inkorporacije pogrešnog nukleotida u novi DNA lanac tijekom replikacije.



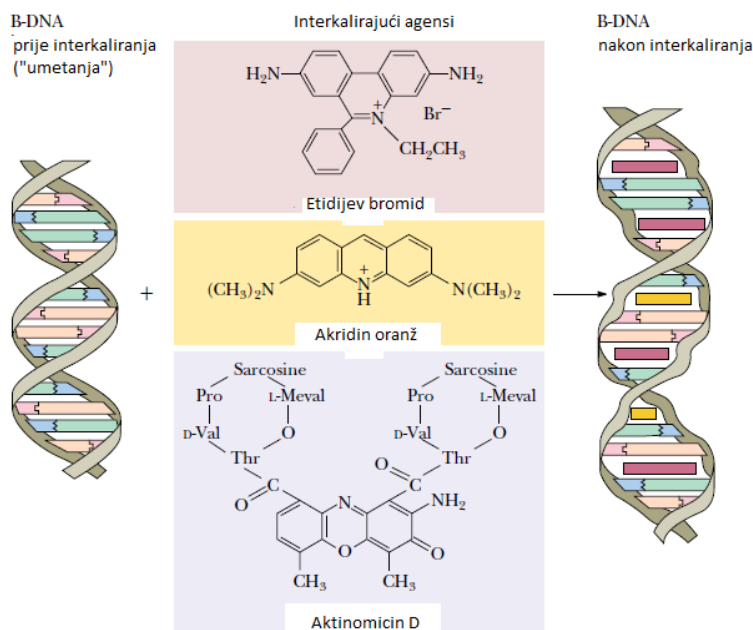
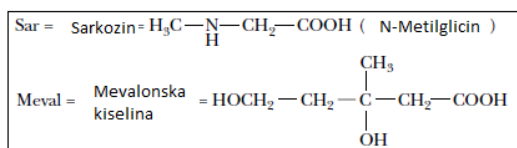
Slika 7.4-1 Kodiranje genetske informacije. (Koolman & Roehm, 2004, str. 85)

8. DNA u vodenim otopinama

Dugačka B-DNA u otopini nije rigidni, ravni štap. Naprotiv, DNA se ponaša kao dinamična, savitljiva molekula. Lokalizirane termičke fluktuacije privremeno izokreću i deformiraju DNA strukturu u njezinim segmentima. Baze i šećerno-fosfatna okosnica sastavljene od brojnih atoma, prolaze kroz elastične kretnje u vremenskom intervalu nanosekunda. Dijelom ovi efekti prezentiraju promjene u rotacijskim kutevima veza polinukleotidne okosnice. Na ove promjene utječu i o sekvenci ovisne varijacije slaganja baza („stacking“). Posljedica tog je da se uzvojnica blago savija pa možemo reći da je polusavitljivi štap za kojeg se čini da se nasumično uvija. Kad se spomenute varijacije uzmu u obzir na cijeloj duljini DNA molekule, očekivani konačan rezultat savijanja je dvostruka uzvojnica izgleda poput sfere (Garrett & Grisham, 2012).

Treba također napomenuti da se, pri pomnom pregledu površine dvostruke uzvojnice, ona ne čini glatkom i bezobličnom. Različita sekvenca baza se očituje različitim potpisima na izgledu molekule suptilnim promjenama u širini utora, kutu između osi uzvojnice i površina baza i mehaničkoj rigidnosti. Regulatorni proteini se vežu na jedinstvena mjesta na DNA zbog svoje sposobnosti prepoznavanja strukturnih karakteristika DNA ovisnih o lokalnoj nukleotidnoj sekvenci.

Interkalirajuće se tvari (aromatski makrociklici, plosnate hidrofobne molekule sastavljene od povezanih, heterocikličkih prstenova- etidijev bromid, aktinomicin D i dr.) umeću s lakoćom unutar dvostruke uzvojnice, razmičući poslagane baze i uzrokujući odmatanje uzvojnice u strukturu više nalik ljestvama (Devlin, 1997). Ovakvo lako umetanje tvari unutar dvostrukog heliksa pokazuje da se van der Waalsove sile koje se formiraju između tih tvari i baza, energetski favoriziraju u odnosu na slične veze između samih baza. Uz navedeno, daje se zaključiti, na osnovi „uklizavanja“ takvih agenasa, da se dvostruka uzvojnica mora privremeno odmotati i pritom prezentirati praznine za njihovo umetanje. To jest, DNA dvostruki heliks u otopini mora poprimiti oblik iz skupa metastabilnih alternativa standardnoj B-konformaciji (Bloomfield, i dr., 2000). Ove alternative stvaraju trepereći repertoar dinamičkih struktura.



Slika 8.1 Strukture etidijevog bromida, akridin oranža i aktinomicina D, tri interkalirajuća agensa, i njihovih učinaka na DNA strukturu. (Garrett & Grisham, 2012, str. 371)

I samo funkcioniranje DNA je vezano uz interakciju s molekularnim okolišem. Taj molekularni okoliš je sastavljen prije svega od **ubikvitarnih vode i iona**. Uz utjecaj iona na interakcije DNA s ostalim nabijenim ligandima, bitno je razmotriti utjecaj vode i iona na konformaciju, a time i svojstva DNA (Bloomfield, i dr., 2000).

Comment [S5]: ? poznato mi je, ali ne znam što je to

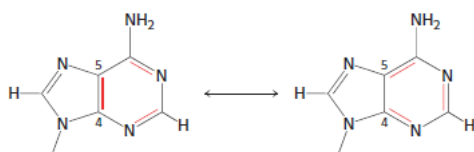
Taj utjecaj je takav da su Prive i ostali 1991. ustvrdili: „DNA je izgrađena od pet strukturnih elemenata, a ne od tri: poznatih nam bazi, šećera i fosfata, ali i od **uređenih vode i vezanih protuiona**.“ Studije u ekstremnim uvjetima visoke koncentracije soli ili „cosolventa“ (drugo otapalo koje se dodaje kako bi se povećala moć otapanja prvog) od važnosti su za ocrtavanje konformacijske raznolikosti nukleinskih kiselina. Uz to, takvi uvjeti mogu imati biološki značaj: neki halofili žive u jako slanim uvjetima, a aktivnost vode unutar stanice je značajno reducirana visokim koncentracijama proteina i nukleinskih kiselina. Takva varijabilnost se mora uzeti u obzir kad se razmatra odnos struktura-funkcija (Bloomfield, i dr., 2000).

Comment [S6]: padež

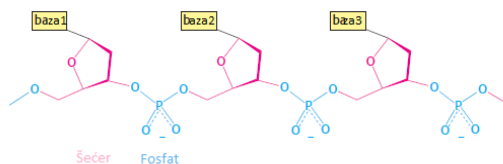
Prije no što razmotrimo interakcije DNA s njenim okolišem u otopini, ponovit ćemo uloge kovalentnih i nekovalentnih veza u njoj strukturi i stabilnosti kao i svojstva vode.

8.1 Interakcije u DNA

Najsnažnije veze su kovalentne veze, takve se veze nalaze između atoma unutar individualnih baza. Kovalentna veza je formirana dijeljenjem para elektrona između susjednih atoma. Tipična veza ugljik-ugljik (C-C) ima duljinu 1.54 Å s energijom veze od 355 kJ/mol (85 kcal/mol). Zbog takve jakosti veze, znatna energija se mora uložiti za njihovo razdvajanje. Više od jednog elektronskog para se može dijeliti između dva atoma za formiranje višestrukih kovalentnih veza, primjerice dvostruka kovalentna veza C=O s energijom od oko 730 kJ/mol (175 kcal/mol) i nešto kraćom duljinom. Za neke se molekule može napisati više od jednog obrasca kovalentnog vezanja, pa se tako adenin može napisati u dvije jednake rezonantne strukture. Ove adeninske strukture opisuju alternativne aranžmane jednostrukih ili dvostrukih veza koje su moguće unutar istog strukturnog okvira. Prava (kompozitna) adeninska struktura je složena od njegovih dvaju rezonantnih struktura. Duljina između dvaju susjednih atoma u takvoj kompozitnoj strukturi je između jednostruke i dvostruke veze. Molekula koja se može opisati kao nekoliko rezonantnih struktura otprilike jednakih energija ima veću stabilnost nego molekula bez takvih struktura (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010).



Slika 8.1-1 Rezonantna struktura adenina. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 7)

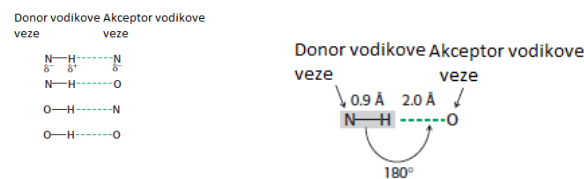


Slika 8.1-2 Kovalentna struktura DNA. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 4)

Nekovalentne veze su slabije od kovalentnih, ali ključne za biokemijske procese kao što je primjerice formiranje dvostruke uzvojnice (Wikibooks, 2015). Četiri osnovne vrste nekovalentnih veza su elektrostatske interakcije, vodikove veze, van der Waalsove interakcije i hidrofobne interakcije. Razlikuju se u geometriji, jakosti i specifičnosti. Osim toga, ove veze su pod značajno različitim utjecajima vode.

1. Elektrostatske interakcije. Nabijena grupa jedne molekule može privući suprotno nabijenu grupu druge molekule. Energija elektrostatske interakcije je opisana Coulombovim zakonom: $E = kq_1q_2/Dr$; gdje je E energija, q_1 i q_2 naboji dvaju atoma, r udaljenost dvaju atoma (izraženu u angstromima), D dielektrična konstanta sredstva i k konstanta proporcionalnosti ($k=1389$, za energije u kJ/mol, ili 332 kcal/mol). Po dogovoru, privlačnoj interakciji se pridjeljuje negativna energija. Elektrostatska interakcija dva jednovalentna iona suprotnog naboja na udaljenosti od 3 Å u vodi, dielektrične konstante 80, ima energiju od 5,8 kJ/mol. Za istovrsne ione na istoj udaljenosti u nepolarnom otapalu kao što je heksan, dielektrične konstante 2, energija interakcije iznosi -232 kJ/mol.

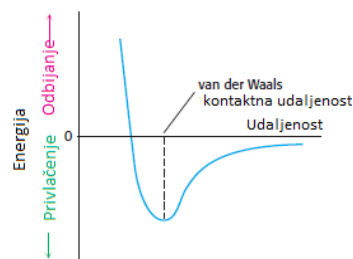
2. Vodikove veze. Ove interakcije su fundamentalno elektrostatske interakcije. Vodikov atom u vodikovoj vezi je djelomično podijeljen od strane dvaju elektronegativnih atoma kao što su dušik ili kisik. Donor vodikove veze je grupa koja uključuje i atom za kojeg je vodikov atom čvršće vezan te sam vodikov atom, dok je akceptor vodikove veze atom slabije povezan s vodikom. Elektronegativni atom povezan s vodikovim atomom kovalentnom vezom pomiče centar elektronske gustoće od vodikovog atoma, koji time razvija djelomično pozitivni naboj (δ^+). Prema tome, vodikov atom može stupiti u elektrostatsku interakciju s atomom koji ima parcijalni negativni naboj (δ^-). Vodikove veze su mnogo slabije od kovalentnih veza. Energija su od 4 do 20 kJ/mol. Nešto su dulje od kovalentnih; udaljenost između vodikovih veza je između 1,5 Å i 2,6 Å; prema tome, udaljenost između dvaju nevodikovih atoma u vodikovoj vezi je između 2,4 Å i 3,5 Å. Najjače vodikove veze imaju tendenciju biti ravne: donor, vodikov atom i akceptor vodikove veze leže na ravnoj liniji.



Slika 8.1-3 Vodikove veze. Vodikove veze su prikazane zelenim crticama. Pozicije parcijalnih naboja (δ^+ i δ^-) su prikazane. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 8)

3. . Van der Waalsove interakcije. Osnova van der Waalsove interakcije je u vremenskoj fluktuaciji distribucije elektronskog naboja atoma. U bilo kojem trenutku, distribucija naboja nije savršeno simetrična. Ova prolazna asimetrija elektronskog oblaka atoma elektrostatskim interakcijama inducira komplementarnu asimetriju elektronske distribucije u okolnim atomima. Tada dolazi do privlačenja između atoma i njegovih susjeda. Ovo privlačenje se pojačava približavanjem dvaju atoma, do njihovog razdvajanja na van der Waalsovoj udaljenosti. Na udaljenostima kraćim od van der Waalsove kontaktne udaljenosti, snažne odbojne sile dominiraju jer se vanjski elektronski oblaci preklapaju. Energije povezane s van der Waalsovima interakcijama su poprilično niske: od 2 do 4 kJ/mol po paru atoma. Međutim, približavanjem dvaju površina velikih molekula, velik broj atoma je u van der Waalsovom kontaktu, pa je ukupni efekt, zbrajanjem interakcija između velikog broja atomskih parova, može biti značajan

Comment [S7]: ne znam što je to

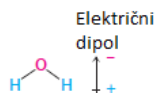


Slika 8.1-4 Energija van der Waalsove interakcije dok se dva atoma približavaju. Energija je najpovoljnija na van der Waalsovoj kontaktnoj udaljenosti. Zbog elektron-elektron odbijanja, energija brzo raste na udaljenostima kraćim od kontaktne udaljenosti. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 8)

8.2 Svojstva vode.

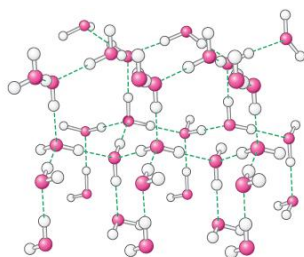
Voda je otapalo u kojem se većina biokemijskih reakcija odvija te su njezina svojstva ključna za formiranje makromolekularnih struktura i progresiju kemijskih reakcija (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010). Dva svojstva vode su posebice relevantna:

1. Voda je polarna molekula. Voda je savijena, ne linearna, prema tom je distribucija naboja asimetrična. Jezgra kisika odvlači elektrone od dvaju vodikovih jezgara, ostavljajući regiju oko svakog vodikovog atoma s ukupnim pozitivnim nabojem. To molekulu vode čini električni polarnom strukturom.



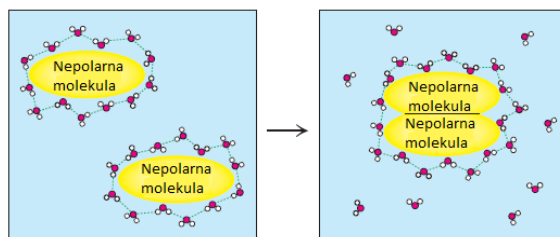
Slika 8.2-1 Električni dipol molekule vode. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 8)

2. Voda je jako kohezivna. Molekule vode su u snažnoj interakciji jedna s drugom preko vodikovih veza. Ove interakcije su osobito očite u strukturi leda. Mreža vodikovih veza drži strukturu na okupu; slične interakcije povezuju molekule vode i u tekućoj vodi premda je jedna četvrtina vodikovih veza prisutnih u ledu prekinuta. Polarna priroda vode je odgovorna za visoku dielektričnu konstantu iznosa 80. Molekule u vodenoj otopini interagiraju s molekulama vode formacijom vodikovih veza i preko ionskih interakcija. To vodu čini svestranim otapalom, s mogućnošću otapanja mnogo vrsta, osobito polarnih i nabijenih tvari koje mogu sudjelovati u ovim interakcijama.



Slika 8.2-3 Struktura leda. Vodikove veze (zelene crtice) se formiraju između molekula vode kako bi stvorile jako uređenu i otvorenu strukturu. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 9)

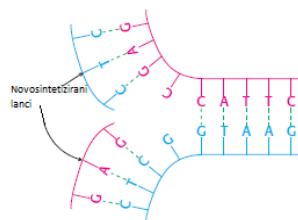
4. Hidrofobni efekt. Posljednja fundamentalna interakcija, koja se naziva hidrofobnim učinkom, je manifestacija svojstava vode. Neke molekule (nepolarne molekule) ne mogu participirati u vodikovim vezama ili ionskim interakcijama. Interakcije nepolarnih molekula s molekulama vode nisu tako energetski povoljne kao interakcije između samih molekula vode. Molekule vode u kontaktu s nepolarnim molekulama stvaraju „kaveze“ oko njih, postajući bolje uređenim nego slobodne molekule vode u otopini. Međutim, kad se takve dvije nepolarne molekule približe, nešto molekula vode se oslobađa, omogućujući im interakciju s ostatkom vode. Rezultat tog jest jača tendencija povezivanja nepolarnih molekula jednih s drugima u vodi, nego u drugim manje polarnim i manje samo-udružujućim (kohezivnim) otapalima. Ova tendencija se naziva hidrofobnim efektom, a s tim povezane interakcije hidrofobnim interakcijama.



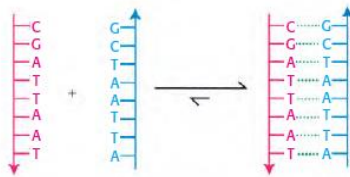
Slika 8.2-4 Hidrofobni efekt. Skupljanjem nepolarnih grupa u vodi, dolazi do otpuštanja molekula vode, koje su inicijalno bile u interakciji s nepolarnim grupama, u ostatak vodene mase. Otpuštanje molekula vode u otopinu čini agregaciju nepolarnih grupa povoljnom.

(Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 9)

Gore opisane nekovalentne interakcije djeluju zajedno u povezivanju dvaju lanaca DNA u dvostruku uzvojnici.

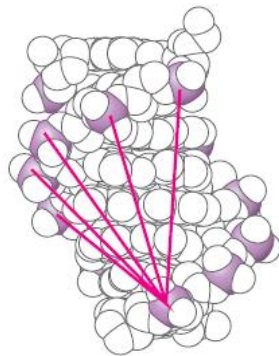


Slika 8.2-5 DNA replikacija. Ako se DNA molekula odvoji u dva lanca, svaki lanac može biti kalup za stvaranje svog partnerskog lanca. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 6)



Slika 8.2-6 Formiranje dvostruke uzvojnice. Kad se dva DNA lanca s prikladnim, komplementarnim sekvencama pomiješaju, oni se spontano povezuju stvarajući dvostruku uzvojnicu. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 6)

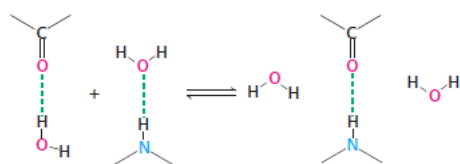
1. Svaka fosfatna grupa u DNA nosi negativni naboj. Ove negativno nabijene grupe su u nepovoljnoj međusobnoj interakciji niz DNA. Ove nepovoljne elektrostatske interakcije se odvijaju pri povezivanju dvaju lanaca DNA. Fosfatne grupe su udaljene više od 10 Å, ali broj tih interakcija je velik pa se protive formiranju dvostruke uzvojnice. Snaga ovih odbojnih elektrostatskih interakcija je smanjena visokom dielektričnom konstantom vode (obrnuto je proporcionalna dielektričnoj konstanti) i prisutnošću ionskih vrsta kao što su Na^+ i Mg^{2+} ioni u otopini. Ove pozitivno nabijene vrste interagiraju s fosfatnim grupama i djelomično neutraliziraju njihov negativan naboj.



Slika 8.2-7 Elektrostatske interakcije u DNA. Svaka jedinica unutar dvostruke uzvojnice sadrži negativno nabijenu fosfatnu grupu (atom fosfora je prikazan ljubičasto). Nepovoljne interakcije jednog fosfata s nekolicinom drugih su prikazane crvenim linijama. Ove odbojne interakcije se protive formiranju dvostruke uzvojnice. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 10)

2. Vodikove veze su važne u određivanju formacije specifičnih parova baza u dvostrukoj uzvojnici. Međutim, u jednolančanoj DNA, donori i akceptori vodikovih veza su izloženi otopini i mogu stvarati vodikove veze s molekulama vode. Povezivanjem dvaju lanaca, vodikove veze s vodom se prekidaju i nove vodikove

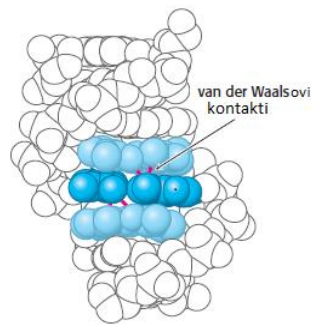
veze između baza se formiraju. Zbog formiranja istog broja vodikovih veza koliko ih se i prekida, vodikove veze ne pridonose značajno vođenju procesa formiranja dvostrukog heliksa. Međutim, značajno pridonose specifičnosti vezanja. Pretpostavimo da se povežu dvije baze koje ne mogu povezati u Watson-Crickove parove baze. Kontaktom baza vodikove veze s vodom se moraju prekinuti. Izostankom komplementarnosti baza po strukturi, ne može se većina veza baza-voda zamijeniti vodikovim vezama baza-baza. Zato je formiranje dvostruke uzvojnice između nekomplementarnih sekvenci nepovoljno.



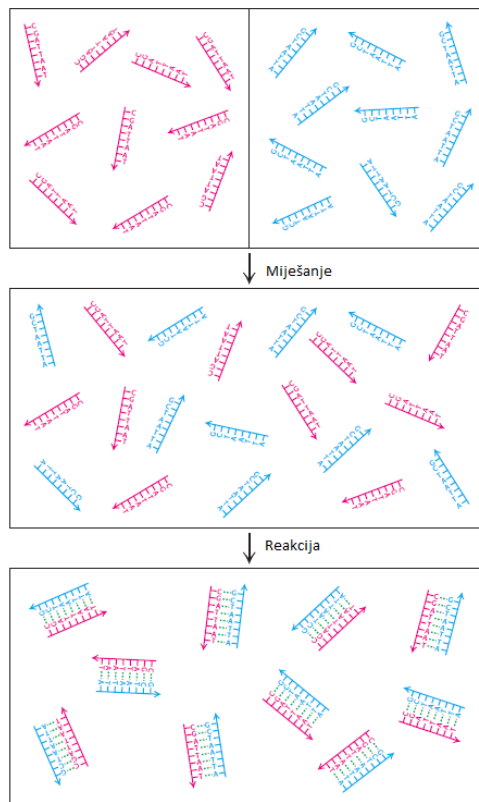
Slika 8.2-8 Formiranje vodikovih veza između parova baza. Formiranje dvostruke uzvojnice i entropija.
Kad se otopine koje sadrže DNA lance komplementarnih sekvenci pomiješaju, lanci se povezuju u dvostruke uzvojnice. Ovaj proces rezultira smanjenjem entropije sustava, indicirajući predaju topline okolini po drugom zakonu termodinamike. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 10)

3. Unutar dvostruke uzvojnice, parovi baza su paralelni i poslagani gotovo jedan na drugi (Wikibooks, 2015). Tipična udaljenost između dvaju ravnina susjednih baza je 3,4 Å, a udaljenosti između najbližih atoma su približno 3,6 Å. Ova separacijska duljina odgovara van der Waalsovoj kontaktnoj udaljenosti. Baze imaju tendenciju slaganja čak i u jednolančanim DNA molekulama. Međutim, „base stacking“ i vezane van der Waalsove interakcije su gotovo optimalne u strukturi dvostruke uzvojnice.

4. Hidrofobni efekt također pridonosi povoljnosti slaganja baza. Potpunije slaganje baza pomiče nepolarne površine baza od vode u međusobni kontakt. Komplementarnost površina je ključna karakteristika: kad se komplementarne površine nađu, donori vodikove veze slažu se s akceptorima, a nepolarne površine se povezuju maksimizirajući van der Waalsove interakcije i minimizirajući nepolarnu površinu eksponiranu vodenom okolišu. Svojstva vode igraju važnu ulogu u određivanju važnosti ovih interakcija.



Slika 8.2-9 Slaganje baza. U DNA dvostrukoj uzvojnici, susjedni parovi baza su poslagani gotovo jedan povrh drugog, i toliko mnogo atoma u svakom od parova baza je udaljeno za van der Waalsovu kontaktnu udaljenost. Centralni par baza je prikazan tamno plavom, a dva susjedna svijetlo plavom bojom. Nekoliko van der Waalsovih kontakata je prikazano crveno. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 10)



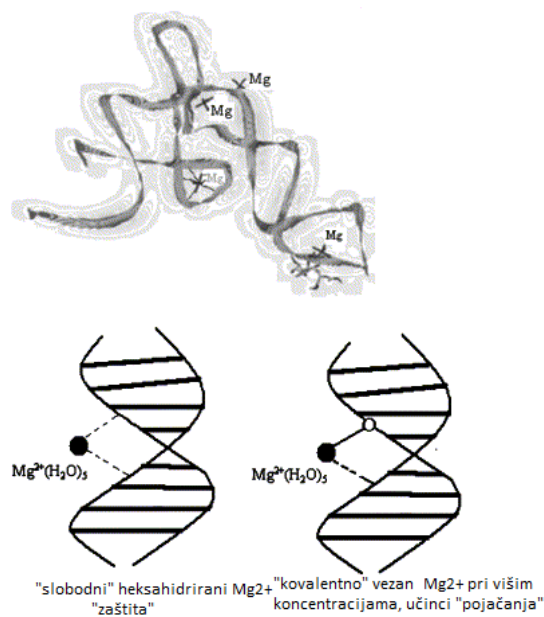
Slika 8.2-10 Formiranje dvostruke uzvojnice i entropija. Kad se otopine koje sadrže DNA lance komplementarnih sekvenci pomiješaju, lanci se povezuju u dvostruke uzvojnice. Ovaj proces rezultira smanjenjem entropije sustava, indicirajući otpuštanje topline u okoliš po drugom zakonu termodinamike. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010, str. 13)

8.3 Interakcija DNA s ionima

Od ranije opisanih studija difrakcije X-zraka na vlaknima, poznato je da DNA postoji u više od jedne konformacije u ovisnosti o koncentraciji soli, stupnju hidracije, metalnim ionima itd. Kako su nukleinske kiseline polianioni, one zahtjevaju protuione za neutralizaciju negativno nabijenih fosfatnih grupa. Eksperimentalni rezultati pokazuju da metalni ioni interagiraju *in vitro* s nukleinskim kiselinama i stabiliziraju ili destabiliziraju dvostruku uzvojnica. U ovim reakcijama vrsta metala, njegov naboj i veličina utječu na konformaciju i strukturu nukleotida direktno ili indirektno preko molekula vode. Pokazano je da ovim interakcijama metal-DNA, ioni metalnog iona stupaju u interakciju s N7 purina i N3 pirimidina, formirajući kemijsku vezu, M-N/ i/ili M-N3. Također interagiraju s fosfatnim grupama osnovice DNA, preko negativno nabijenih kisikovih atoma fosfatnih grupa i koordinacijskih molekula vode (Bloomfield, i dr., 2000).

Interakciju iona s DNA proučit ćemo na primjeru magnezija. Magnezij je član IIA grupe periodnog sustava elemenata i prema tome alkalni-zemljani element s $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2$ konfiguracijom. Zbog malog radijusa iona i bivalentnosti, Mg^{2+} formira stabilne komplekse do specifičnog stupnja. Ukupni tjelesni sadržaj magnezija u ljudi iznosi 1000mmol, od kojih je 50% u kostima, a 50% u stanicama, većinom u mišićima i tkivima, u slobodnoj i vezanoj formi. Magnezijevi ioni su esencijalni za određeni broj staničnih reakcija i različitih metaboličkih i fizioloških funkcija. Participiraju u gotovo svim anaboličkim i kataboličkim funkcijama. Magnezij aktivira mnoge enzimske sustave, s ključnim ulogama u metabolizmu, kao što su alkalna fosfataza, peptidaze i enzimi za prijenos fosfata. Hidroliza ATP-a u ADP je najznačajnija katalitička uloga magnezija u staničnom energetskom metabolizmu. Intracelularni magnezij postoji ponajviše u vezanoj formi. Magnezij je u kompeticiji za određena koordinacijska mjesta na DNA s drugim metalnim ionima. Spektroskopijom je nađeno da Mg^{2+} ioni imaju značajnu ulogu u stabilizaciji sekundarne i tercijarne strukture DNA i da se uspješno natječu za ta mjesta s monovalentnim ionima viših koncentracija. Kad se „slobodni“ heksahidrirani ($Mg(H_2O)_6^{2+}$) kation veže za DNA ili RNA, formira supermolekularnu strukturu. Veže se vodikovim vezama za nukleotid na N7 gvaninskom mjestu i O6, time blokirajući pristup denaturantima. Također time reducira lokalnu gustoću negativnog naboja i stabilizira DNA strukturu u prirodnoj

konformaciji, B-DNA. Ovaj efekt se naziva „protektivnim“. Međutim kad se (pentahidrirani) magnezij ($Mg(H_2O)_5^{2+}$) veže kovalentno za DNA, formira koordinacijski kompleks s Mg-O koordinativnom vezom u unutarnjoj sferi koordinacije. U ovom slučaju, lezija je jača i imamo lokalnu deformaciju DNA i prema tome „pojačanje“ distorzije svijanja dvostruke uzvojnice što može voditi destrukciji stanice. Pri višim koncentracijama magnezija, najvjerojatnije postoje oba efekta magnezija na DNA, s tim da je efekt „pojačanja“ jači, jer pri višim koncentracijama više magnezija kovalentno reagira s DNA (Anastassopoulo & Theophanides, 2002).



Slika 8.3-1 Magnezij i dvostruka uzvojnica. (Anastassopoulo & Theophanides, 2002)

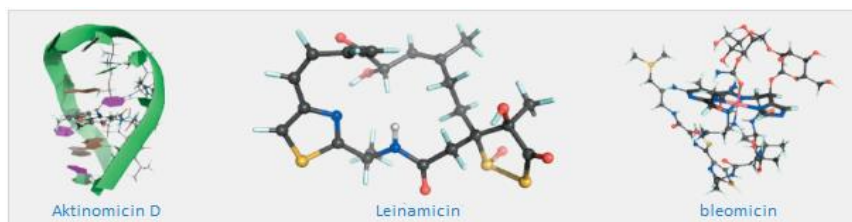
8.4 Hidracija

Voda je, kako je već opisano, glavno otapalo za nukleinske kiseline u svim biološki relevantnim situacijama: njezine koncentracije su oko 55 mol/L, dok su za većinu drugih vrsta manje od 1 mol/L. U ranim difrakcijskim studijama na vlaknima, pokazano je da sadržaj vode, ili relativna vlažnost („humidity“), utječe na DNA helikalnu strukturu. B forma se pojavljuje pri visokoj relativnoj vlažnosti (> 85%), A forma se pojavljuje pri relativnoj vlažnosti između 75 i 80%, a neorganizirane forme između 55 i 75% relativne vlažnosti. Kasnije je pokazano da sastav baza i soli utječe na ove vrijednosti. Interakcije vode s nukleinskim kiselinama služe kao prototip

utjecaja interakcija drugih molekula s DNA na njenu strukturu. IR spektroskopske studije i kristalografija X-zrakama služe u određivanju relativne snage interakcija vode s raznim mjestima na nukleinskim kiselinama te za određivanje mreža vodikovim vezama vezane vode s raznim mjestima na DNA, za koje se čini da su važne u stabilizaciji određenih helikalnih formi. Uz kristalografiju, za određivanje DNA hidracije koriste se i metode IR spektroskopije, gravimetrijske i hidrodinamske metode; služe određivanju hidracijskih mjesta i energetici vezanja vode, ulozi hidracije u kontroli geometrije uzvojnice, sparivanja hidracije i vezanja iona i liganada te važnosti strukture otapala u DNA kondenzaciji (Bloomfield, i dr., 2000).

8.5 Prirodni produkti koji modificiraju DNA

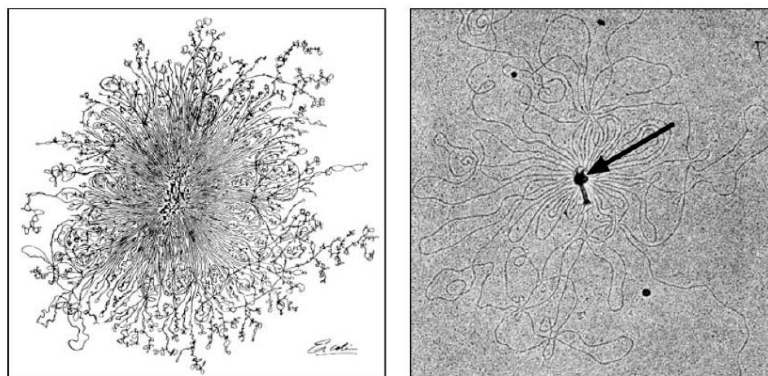
Više od tri četvrtine klinički odobrenih lijekova za rak su prirodni produkti, tvari derivirane iz biljaka, morskih organizama ili mikroba, koje interagiraju s DNA (Yurkanis Bruice, 2013). Zbog karakteristike nekontroliranog rasta stanica raka, tvari koje interferiraju s replikacijom ili transkripcijom DNA ga zaustavljaju. Ove tvari mogu interferirati s DNA vezajući se između parova baza (interkalacija) ili vezajući se za veliki ili mali utor. Interkalirajuće tvari se utiskuju između parova poslaganih baza DNA kao u sendviču, što proizlazi iz njihove planarne i često aromatske strukture. Vezanje DNA je često stabilizirano interakcijama slaganja sa susjednim parovima baza. Aktinomycin D je primjer interkalatora. Vezajući se za DNA, remeti dvostruku uzvojniciu, inhibirajući replikaciju i transkripciju. Aktinomycin D se koristi za liječenje raznih vrsta raka (Chemocare, 2015). Lijekovi koji se vežu za veliku ili malu krivinu čine to kombinacijom vodikovih veza, van der Waalsovih interakcija i elektrostatskih privlačnih sila što ih proteini koriste za vezanje supstrata. Leinamycin je primjer citostatika koji se veže na veliki utor DNA molekule. Jednom vezan, leinamycin alkilira N-7 poziciju purinskog prstena (Viswesh, Gates, & D., 2010). Bleomycin se veže za mali utor DNA. Tamo koristi atom vezanog atoma željeza za uklanjanje vodikovog atoma iz DNA, prvog koraka u cijepanju DNA. Odobren je za terapiju Hodgkinovog limfoma. Sva tri lijeka su izolirana iz bakterije *Streptomyces*, koju nalazimo u tlu (Yurkanis Bruice, 2013).



Slika 8.4-1 Prirodni produkti koji modificiraju DNA. (Yurkanis Bruice, 2013, str. 1217)

9. DNA kondenzacija

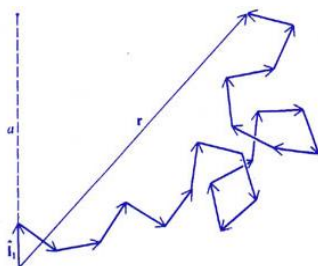
Pohrana i procesiranje genetske informacije kodirane u DNA, vođena je nizom stvari koje vežu, savijaju, petljaju i modificiraju DNA te se slažu na dvostrukoj uzvojnici, prepoznavaju se i ciljaju nove DNA vezuće stvari. Navedeni procesi se dodatno kompliciraju činjenicom njihovog *in vivo* odvijanja u jako kompaktnom, tzv. kondenziranom DNA stanju. Znanstvenici se bave proučavanjem kondenzirane DNA od otkrića nukleinskih kiselina. Međutim, od nedavnog razvoja adekvatnih alata, od analize jednog gena do analize cijelog genoma, omogućeno je povezivanje klasičnih eksperimenata s mehanicističkim detaljima genske regulacije *in vivo*. To je dovelo do brojnih novih koncepata i do re-evaluacije nekih starih (Teif & Bohinc, 2011).



Slika 9-1 *In vivo* je DNA jako kompaktna. Slika prikazuje DNA *E. Coli* i DNA T2 bakteriofaga nakon osmotskog šoka u destiliranoj vodi (niske ionske jakosti), što je omogućilo ekspanziju iz njihovih mnogo kompaktnijih *in vivo* konfiguracija. (Slika *E.coli* vlasništvo Ruth Kavenoff, Bluegenes Inc., Los Angeles (1994); T2 slika iz Kleinschmidt et al. *Biophys. Biochim. Acta* 1962, 61, 252.)

9.1 Koncept DNA kondenzacije

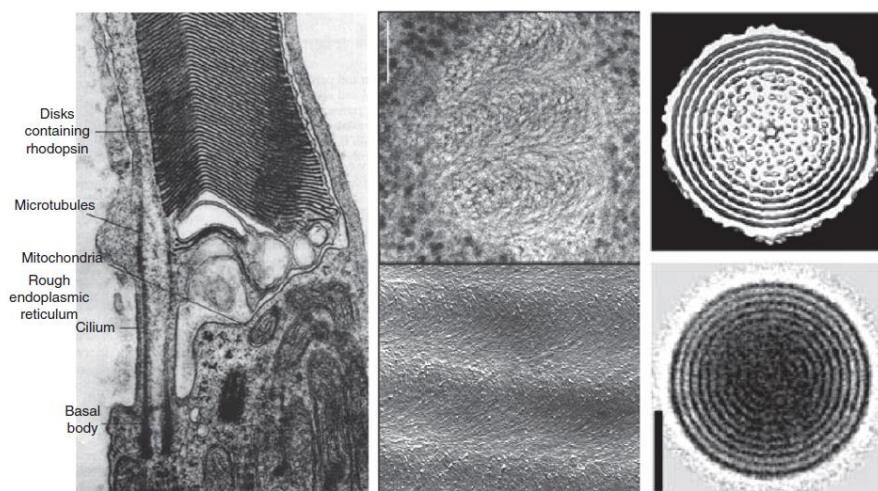
DNA je dug i jako nabijeni heteropolimer koji nosi u prosjeku jedan elementarni negativni naboj svakih 0,17 nm. Promjer joj je oko 2 nm, dok joj duljina, u ovisnosti o organizmu, može biti do nekoliko desetaka centimetara. Mnoge karakteristike DNA dvostruke uzvojnice pridonose njenoj jakoj krutosti: mehanička svojstva šećerno-fosfatne osnovice, elektrostatska odbijanja fosfata, interakcije slaganja baza svakog od lanaca i interakcije između lanaca. Mjera DNA krutosti je duljina ustrajnosti ili tvrdokornosti, što predstavlja duljinu uzvojnice koja zadržava krutost štapa. Duljina tvrdokornosti („persistence length“) dvolančane DNA u fiziološkim uvjetima jest oko 50 nm ovisno o DNA sekvenci. Ovako velika duljina tvrdokornosti čini DNA jednim od najkrućih prirodnih polimera, no ta vrijednost je u odnosu na cijelu tipičnu duljinu DNA prilično mala. Dakle, na duljinama mnogo većim od duljine tvrdokornosti DNA ponaša kao fleksibilno uže, a na malim skalama kao kruti štap. Poput crijeva za polijevanja vrta, DNA bi nasumce zauzimala puno veći volumen, nego kad je uređeno pakirana.



Slika 9.1-1 Duljina tvrdokornosti. Prosječna projekcija r na i_1 u ograničenju $n \rightarrow \infty$ daje duljinu tvrdokornosti. Lanac generičkog polimera je prikazan u određenoj konformaciji; vrijednost duljine tvrdokornosti je prosječna vrijednost koja se dobije iz svih konformacija.

Prostor dostupan DNA *in vivo* je mnogo manji od prostora kojeg bi zauzimala prilikom slobodne difuzije u otopini. Kako bi se nosila s ograničenjima volumena, DNA ima sposobnost pakiranja u prikladnim uvjetima u otopini uz pomoć iona i drugih molekula. Obično se DNA kondenzacija definira kao „kolaps izduljenih DNA lanaca u kompaktne, uređene čestice koje sadrže jednu ili nekoliko molekula.“

Postoje i druge definicije koje prikladnije opisuju različite vrste organizama, no konceptualno se pod DNA kondenzacijom razumijeva koncentrirana makromolekularna faza u kojoj su susjedni DNA segmenti odvojeni sa samo nekoliko slojeva molekula otapala. Prema tome, lokalno poravnavanje nije uvjet, već posljedica kondenziranog stanja.



Slika 9.1-2 Visoko uređeni sklopovi, zajednički svim biološkim strukturama, mogu se objasniti svojstvima malog broja fundamentalnih sila koje djeluju među makromolekulama. (lijevo) Elektronmikroskopska slika dijela stanice štapića ljudskog oka s prikazanim multilamelarnim dvoslojnim agregatima. (Kessel, R.G. i Kardon, R.H., *Tissues and Organs*, W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA, 1979.) (sredina) Elektronmikroskopska slika in-vivo kolesteričke faze DNA divljeg tipa *E. Coli*. (Prema Frankiel Krispin, D. et al.; *EMBO J.*, 2001, 20,1184.) Za usporedbu je ispod prikazan isti tip strukture DNA in vitro. (Prema Loforestier, A. i Livolant, F., *Biophys. J.*, 1993, 65, 56.) (desno) Kriomikroskopske i računalno procesirane slike glava T7 faga s prikazom uređenog DNA omatanja unutar glava virusa. (Prema Cerritelli, M.E., Cheng, N., Rosenberg, A.H., MCPerson, C.E., Booy, F.P. i Stevenes, A.C., *Cell*, 1997, 91,271.)

9.2 DNA kondenzacija *in vitro*

9.2.1 Eksperimentalne metode

Kondenzirana DNA stanja se *in vitro* proučavaju dodavajući različite kondenzirajuće agense, od jednostavnih anorganskih iona do velikih makromolekula, čime se dobivaju važni modeli za razumijevanje DNA funkcioniranja *in vivo* te također za postizanje kontrolirane dostave lijekova u genskoj terapiji. Tijekom četiri desetljeća takvih eksperimenata, DNA kondenzacija se proučavala metodama sedimentacije,

disperzije svjetlosti, viskozimetrije, osmotskim uravnoteženjem, IR, UV i Ramanove spektroskopije, elektronske mikroskopije, mikroskopije atomskim silama, kapilarne elektroforeze te optičkim i magnetskim tehnikama ispitivanja jedne molekule.

9.2.2 Kondenzirajući agensi

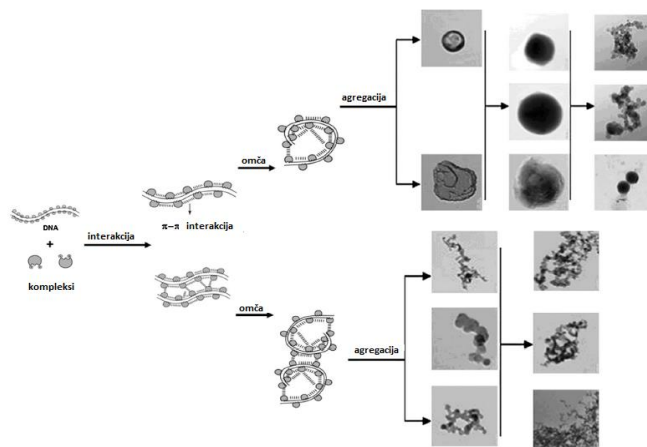
DNA kondenzacija *in vitro* se može inducirati primjenom vanjske sile (npr. osmotski tlak) za zbližavanje dvostukih uzvojnica ili indukcijom privlačnih interakcija između DNA segmenata (multivalentnim kationskim ligandima i li vanjskim promjenjivim električnim poljem). DNA kondenzacijske tvari u biološkim sustavima su neutralni polimeri kao što je polietilen glikol plus Na^+ ili multivalentni protuioni (ligandi). Uvjet pojave kondenzacije DNA u vodenim otopinama je prisutnost protuiona („counterions“) s nabojem od 3+ ili više. U eksperimentima se obično koriste tovalentni metalni ioni i anorganski kationi kao što je $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, prirodni poliamini i njihovi analozi, protamini, prirodni i sintetički peptidi, lipidi i liposomi, bakterijski nukleoid-asocirani proteini i eukariotski kromatinski proteini. Monovalentni protuioni kao što je Na^+ mogu inducirati kondenzaciju uz dodatni osmotski tlak induciran neutralnim polimerom (npr. PEG). Divalentni ioni ne mogu izazvati DNA kondenzaciju lineranih DNA molekula u vodenim otopinama, ali mogu uz prisutnost lipida koji odvajaju DNA molekule u lamelarne strukture nalik sendvičima, ili kad je DNA cirkularna, što govori u prilog DNA superuzvijanja kao faktora koji favorizira kondenzaciju.

Uspješnost indukcije kondenzacije ne ovisi samo o naboju metala već i njegovoj vrsti: prijelazni metali kao što je Mn^{2+} , koji stvara i elektrostatske interakcije s DNA fosfatima i kelatne komplekse i druge interakcije s DNA bazama, jesu jače kondenzirajuće tvari u usporedbi s alkalnim metalima, koji stvaraju interakcije samo s fosfatima.

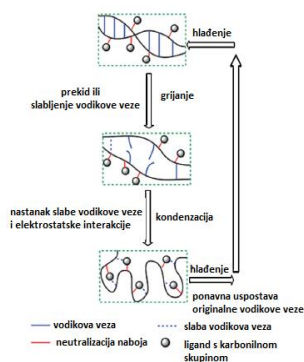
9.2.2.1 DNA kondenzacija inducirana metalnim kompleksima

$\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ je dobro poznati anorganski kation koji može inducirati DNA kondenzaciju; brojni drugi kompleksi su ispitivani kao DNA kondenzirajući agensi: $\text{Co}(\text{III})$, $\text{Co}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{II})$, $\text{Ca}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Ni}(\text{II})$, $\text{Zn}(\text{II})$, $\text{Ru}(\text{II})$, $\text{Pt}(\text{II})$ i $\text{La}(\text{III})$. Korisno je ove komplekse podijeliti u skupine ovisno o mehanizmu DNA kondenzacije: (i) kompleksi

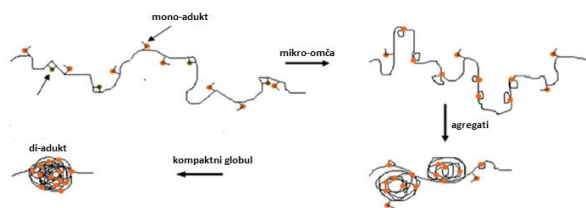
s jakim pozitivnim nabojima koji kondenziraju DNA elektrostatskim interakcijama, (ii) kompleksi s planarnim interkalativnim ligandima koji kondenziraju DNA preko π - π (van der Waalsovih) interakcija, (iii) kompleksi što vežu DNA vodikovim vezama, i (iv) kompleksi što se kovalentno vežu za DNA (Guan-Ying, Liang-Nian, & Hui, 2014).



Slika 9.2.2.1-1 Hipotetski model DNA kondenzacijskog mehanizma preko π - π interakcija. (Guan-Ying, Liang-Nian, & Hui, 2014)



Slika 9.2.2.1-2 Hipotetske model DNA kondenzacijskog mehanizma preko procesa povezivanja H vezama. (Guan-Ying, Liang-Nian, & Hui, 2014)



Slika 9.2.2.1-3 Hipotetski model DNA kondenzacijskog mehanizma preko procesa kovalentnog povezivanja. (Guan-Ying, Liang-Nian, & Hui, 2014)

9.2.3 Morfologije kondenzirane DNA

Nakon dobivanja kritičnih koncentracija kondenzirajućeg liganda, dvolančane DNA molekule se kondenziraju iz nasumičnih namotaja u toroide, štapiće ili sofisticiranije strukture. Morfologija kondenzata ovisi o svojstvima otopine i strukturi kondenzirajućeg agensa, a vrsta kondenzacije, monomolekularni kolaps ili multimolekularna agregacija, o duljini DNA. DNA molekule kraće od duljine tvrdokornostiformiraju uređene faze tekućeg kristala. Eksperimentalno, DNA kondenzati su stabilni unutar širokog intervala koncentracija kondenzirajućeg liganda. Povećavajući koncentracije liganda DNA kondenzacija je praćena obrnutim prijelazom: agregati se ponovno otope tzv. „reentrant“ kondenzacija.

9.2.4 Uvidi iz fizike

9.2.4.1 Prijelaz „coil-globule“

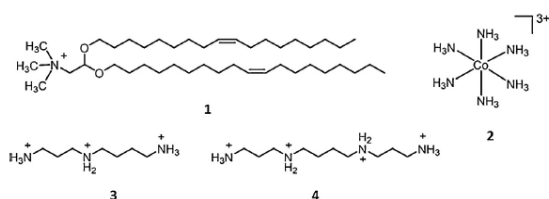
Kondenzacija dugačke dvostruko uzvojite DNA je oštra tranzicija faza, koja se odvija u uskom intervalu koncentracije liganda. Opća svojstva DNA „coil-globule“ tranzicije su većinom određena duljinom DNA, koncentracijama i vrstom otopljenih tvari u otopini i temperaturom, a njenom sekvencom, kao što je slučaj u proteina. DNA sekvenca određuje lokalne interakcije i prepoznavanje između dvostrukih uzvojnica u kondenziranoj DNA fazi. DNA je jako krut polimer pa je tranzicija iz forme namotaja („coil“) u kuglastu („globule“) formu brza.

9.2.4.2 Hidracijske sile

Kako dvostruke uzvojnice stoje jako blizu jedne drugima u kondenziranoj fazi, to vodi restrukturiranju molekula vode, čime nastaju hidracijske sile. Molekula vode je dipol koji se orijentira u električnom polju površine susjedne DNA. Dipoli se u otopini orijentiraju okomito na nabijenu površinu. Takvo orijentiranje se smanjuje eksponencijalno s udaljenosti od površine DNA. Te sile mogu biti privlačne ili odbojne, a njihova snaga ovisi o uređenju i vode na nabijenoj površini, dok brzina slabljenja i predznak, privlačenje ili odbijanje, ovisi o strukturi vode na dvama površinama. Privlačenje je rezultat komplementarnog, a odbijanje simetričnog strukturiranja.

9.2.4.3 Kondenzacija protuionima

DNA je jako nabijena negativna molekula, te ne može postojati u otopini bez drugih iona, pa tako DNA ustvari postoji kao sol Na^+ ili drugih alkalnih metala. Fiziološke otopine također sadrže velike količine divalentnih metalnih iona, koji su esencijalni za funkcioniranje enzima i imaju strukturne uloge u DNA, RNA i proteinima. Uz navedene okružena je i drugim nabijenim molekulama kao što su mali poliamini (spermidin $^{3+}$ i spermin $^{4+}$) i proteini. Distribucija multivalentnih iona u vodenoj otopini u blizini makroiona u većini je određena kompeticijom između elektrostatskih interakcija u sustavu i entropijom konstituenata otopine. U termodinamskoj ravnoteži protuioni su privučeni na nabijenu površinu, dok su koioni odvojeni iz te regije, te se stvara difuzni električni dvostruki sloj.



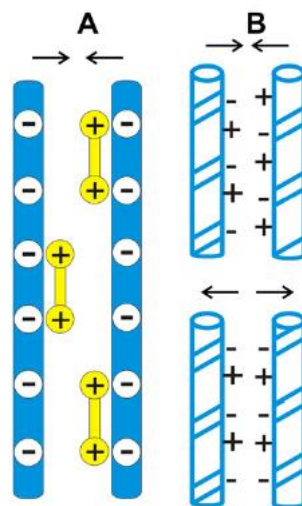
Slika 9.2.4.3-1 Kemijska struktura kondenzirajućih agenasa: lipidnog agenasa DOTMA (N-[1-(2, 3-dioleiloksi)propil]-N,N,N-trimetilamonijev klorid) (1), heksaminokobalt (III) (2), speridin $^{3+}$ (3) i spermidin $^{4+}$ (4). (Guan-Ying, Liang-Nian, & Hui, 2014)

Gerald Manning je opisao svojstva ionskog oblaka oko cilindrične površine koja predstavlja polielektrolit u otopini. Iznad kritične gustoće naboja na površini,

protuioni se kondenziraju na cilindru i reduciraju njegovu gustoću naboja do kritične vrijednosti. Kondenzacija protuionima je posljedica dominantne „pobjede“ Coulombove potencijalne energije nad entropijom. Iz tog koncepta slijedi da vezanjem liganda za DNA, ligand treba zamijeniti nekoliko monovalentnih iona u Manningovu sloju (područje uz valjak DNA).

9.2.4.4 Protuionske korelacije

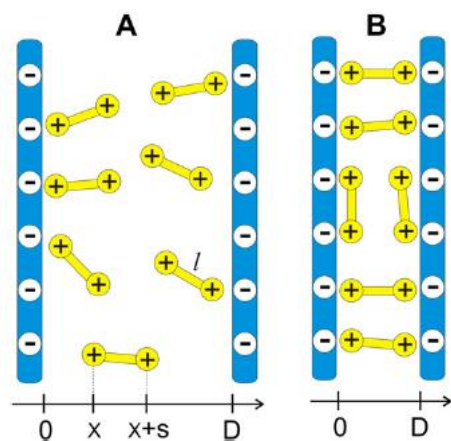
Za razumijevanje DNA-DNA privlačenja moramo razmotriti korelacije između protuiona. Jednostavna interpretacija mehanizma koji vodi privlačenju se može dobiti na temperaturi nula, kad se protuioni kondenziraju na nabijenu površinu. Izmjena pozitivnih i negativnih naboja na površini je dobivena Coulombovskim odbojnim međudjelovanjem.



Slika 9.2.4.4-1 Ilustracija DNA-DNA interakcija preko protuionskih korelacija. (A) DNA-DNA privlačenje proizlazi iz usklađenih postavljanja vezanih liganada. (B) Protuioni vežu DNA na koreliran način, kao na slici A, ali sad se u obzir uzima i helikalna priroda DNA. Segmenti DNA uzvojnica, u registru, se privlače, dok se oni van registra odbijaju. (Teif & Bohinc, 2011)

9.2.4.5 Protuionsko križno povezivanje/premoštenje („bridging“)

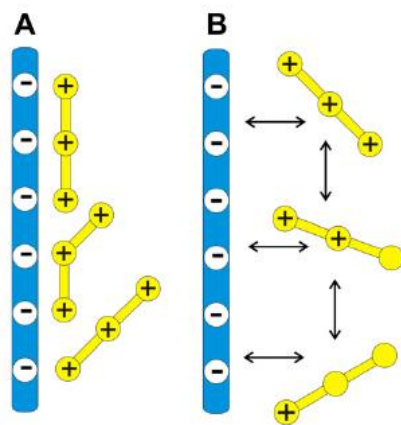
Ligande možemo prikazati kao točkaste, sferične, zvonolike i štapičaste naboje pri čemu posljednji aproksimiraju male protuione i DNA premoštavajuće proteine (neki bakterijski proteini). U prisutnosti štapičastog liganda, energetski najpovoljnija udaljenost između nabijenih površina dvaju DNA molekula odgovara duljini takvog liganda. Na ovoj udaljenosti postoje dvije najvjerojatnije orijentacije štapičastih čestica: paralelna ili okomita na nabijene površine. Takve orijentacije pokazuju tendenciju kontakta između pozitivnih naboja proteina i negativne DNA površine. Okomito postavljene čestice povezuju površine poput mostića. Ovakvo povezivanje može voditi privlačenju između DNA.



Slika 9.2.4.5-1 Ilustracija DNA križnog povezivanja štapičastim protuionima. (A) Dvije negativno nabijene površine su uronjene u elektrolitnu otopinu koja sadrži pozitivno nabijene štapičaste divalentne protuione. (B) Ioni se orijentiraju paralelno i okomito na makroionske površine. Okomito položeni ioni stvaraju premoštenja. (Teif & Bohinc, 2011)

9.2.4.6 DNA preokretanje naboja („charge reversal“)

U nukleoproteinskim kompleksima DNA i histona, negativni DNA naboj je u mnogim slučajevima preokrenut pozitivno nabijenim vezanim proteinima. Isto se može postići lipidima i proteinima *in vitro*, a za razumijevanje nam pomaže koncept frakcionalizacije naboja. Koncept je baziran na ideji da se dugački i fleksibilni protuioni u kontaktu s DNA ne vežu u stoihiometričkoj ravnoteži, već mogu raditi „četkice“ i sl. i njihov ukupni naboj može biti veći od naboja gole DNA.



Slika 9.2.4.6-1 Elektrostatski mehanizmi DNA resolubilizacije. (A) Nekompletno ionska disocijacija. Pri različitim koncentracijama iona u otopini, multivalentni ioni mogu mijenjati svoja disocijacijska stanja. Kompeticija za DNA vezanje između protuiona različitih naboja određuje je li DNA kondenzirana ili nije. (B) DNA preokretanje naboja vezanim multivalentnim protuionima. (Guan-Ying, Liang-Nian, & Hui, 2014)

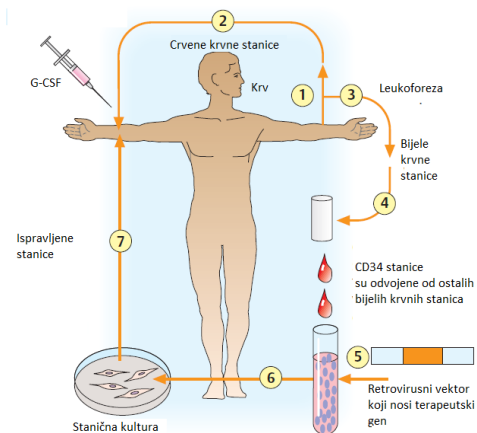
9.2.4.7 DNA-DNA prepoznavanje

Simetrija DNA uzvojnice može dati o sekvenci ovisne DNA-DNA interakcije. Za homopolimere, to znači da se DNA segmenti, u fazi, privlače, a oni van faze, odbijaju. Za heteropolimere, to znači da su sile između segmenata ovisne o DNA sekvenci. Ovi mehanizmi su potvrđeni *in vitro*.

9.3 Primjena DNA kondenzacije

Glavna potencijalna aplikacija DNA kondenzacije u medicini je njena upotreba za dostavu gena u genskoj terapiji.

Somatska genska terapija uključuje dostavljanje ispravnog gena u somatske stanice zahvaćenih tkiva. Dva su osnovna pristupa somatskoj genskoj terapiji, *ex vivo* i *in vivo*. U prvom se geni transferiraju stanice izvan tijela te se potom te stanice uvode u tkiva koja trebaju korekciju. U drugom pristupu gen se direktno dostavlja. Gen se može dostaviti virusnim vektorom ili ne-virusnom metodom. Prednost virusnih vektora je relativna lakoća ulaska u stanice domaćina. Međutim, kontrola produkcije virusa, kapacitet prijenosa, ovisnost o staničnoj proliferaciji i drugi aspekti čine aplikaciju teškom (Passarge, 2006).

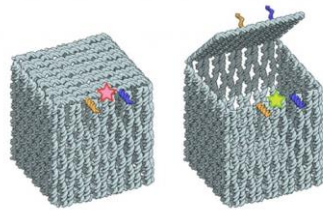


Slika 9.3-1 Osnove genske terapije na primjeru iz hematologije. (Passarge, 2006, str. 421)

Uz probleme s virusnim vektorima i drugim metodama dostave gena, u genskoj terapiji postoje i problemi vezani uz prepoznavanje mete (što se u genomu mora ciljati umjetnim DNA ili RNA konstruktima) i modifikacije mete (način promjene mete od strane konstrukta). Obično se potraga za dostavljače u genskoj terapiji odvija eksperimentalnim probirom u kombinatorijskim knjižnicama kationskih peptida, lipida, derivata šećera itd., koji variraju duljinom, gustoćom naboja, oblikom bočnog lanca, hidrofobnošću i prema tom efikasnosti DNA kondenzacije (Teif & Bohinc, 2011).

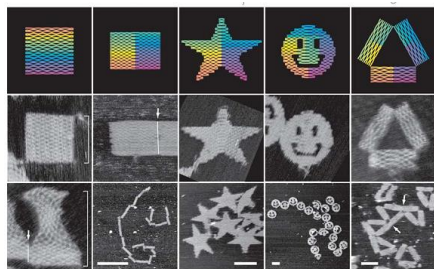
Kako bi se dobila učinkovita genska terapija, zahtjevni dizajn lijeka i potraga za dostavljačem se mora kombinirati s računalnom selekcijom potrebne kombinacije lijek-dostava-meta (Wu QW, 2004) .

U biotehnologiji, DNA se može iskoristiti i za stvaranje biosenzora te kao osnovna građevna jedinica nanostruktura u programiranom samosklapanju („self-assembly“).



Slika 9.3-2 Samosklapanje nanoskalarnih DNA kutija s poklopcem čije se otvaranje može kontrolirati.

(Andersen, 2009)



Slika 9.3-3 Sklapanje DNA za stvaranje nanoskalarnih oblika i obrazaca. (Rothemund, 2006)

Tablica 9.3-1 Koncepti u istraživanju kondenzirane DNA. DNA krutost i fleksibilnost određuju njezina svojstva kao polimera; naboj DNA joj određuje polielektrolitna svojstva. Na polielektrolitna svojstva su određena molekulama i ionima u otopini. Kao rezultat DNA kompakcije, nova pojavljuju se nova kolektivna svojstva. (Teif & Bohinc, 2011)

DNA svojstva polimera	Polielektrolitna svojstva	Svojstva u otopini
Tranzicija „coil-globule“	Neutralizacija naboja DNA	Kondenzacija protuionima
DNA tekući kristali	DNA preokretanje naboja	Protuionske korelacije
Stvaranje petlji i supeuzvijanje	Frakcionalizacija naboja	Inkompletna ionska disocijacija
1D vezuća rešetka	DNA-DNA privlačenje	Makromolekularno grupiranje

Zajednička svojstva		
Pozicioniranje u 3D-u	DNA-DNA prepoznavanje	Promjene brzina reakcija
„Facilitated site search“	Olakšani proteinski pristup	Radio/oksidansna zaštita

10. Literatura

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., . . . Walter, P. (2013). *Essential Cell Biology (4th edition)*. Garland Science.
- Anastassopoulou, J., & Theophanides, T. (2002). Magnesium–DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42(1), 79-91.
- Andersen, E. i. (2009). Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* 459, 73-76.
- Atkins, P., & de Paula, J. (2011). *Physical Chemistry for the Life Sciences (2nd edition)*. W.H. Freeman.
- Beaucage, S., & Iyer, R. (1992). Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron* 48(20), 2223-2311.
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2010). *Biochemistry (7th edition)*. W.H. Freeman.
- Bio-Nica.info*. (4. Lipanj 2015). Dohvaćeno iz <http://www.bio-nica.info/biblioteca/AnonimoxxxIntroductionMolecularGenetics.pdf>
- Bloomfield, V., Crothers, D., Tinoco, I., Hearst, J., Wemmer, D., Killman, P., & Turner, D. (2000). *Nucleic acids: structures, properties and functions (1st edition)*. University Science Books.
- Brnjas Kraljević, J. (2001.). *Struktura materije i dijagnostičke metode*. Medicinska naklada.
- Chazin, W. (31. Svibanj 2015). *Vanderbilt University Center for Structural Biology*. Dohvaćeno iz Vanderbilt University Center for Structural Biology: <http://structbio.vanderbilt.edu/chazin/classnotes>
- Chemocare*. (4. Lipanj 2015). Dohvaćeno iz Chemocare: <http://www.chemocare.com/chemotherapy/drug-info/actinomycin-d.aspx>
- Dahm, R. (2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology* 278(2), 274-288.
- Devlin, T. (1997). *Textbook of Biochemistry: With Clinical Correlations (4th edition)*. Wiley-Liss.
- Ferrier, D. (2013). *Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry (6th edition)*. LWW.
- Garrett, R., & Grisham, C. (2012). *Biochemistry (5th edition)*. Brooks Cole.
- Guan-Ying, L. R.-L., Liang-Nian, J., & Hui, C. (2014). DNA condensation induced by metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews* 281(1), 100-113.

- Hammond, R., Oana, H., Schweinfus, J., Bonadio, J., Levy, R., & Morris, M. (1997). Capillary Electrophoresis of Supercoiled and Linear DNA in Dilute Hydroxyethyl Cellulose Solution. *Analytical Chemistry* 69(6), 1192-1196.
- Hershey, A., & Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *Journal of General Physiology* 36(1), 39-56.
- Hrvatska enciklopedija*. (31. Svibanj 2015). Dohvaćeno iz Hrvatska enciklopedija: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=57380>
- Jai, A., Wang, G., & Vasquez, K. (2008). DNA Triple Helices: biological consequences and therapeutic potential. *Biochimie* 90(8), 1117-1130.
- Koolman, J., & Roehm, K. H. (2004). *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme.
- Kresge, N., Simoni, R. D., & Hill, R. L. (2005). Chargaff's Rules: the Work of Erwin Chargaff. *The Journal of Biological Chemistry* 280(21), 172-174.
- Mescher, A. (2003). *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas (10th edition)*. McGraw-Hill Education / Medical.
- Nelson, D., & Cox, M. (2004). *Lehninger's Principles of Biochemistry (4th edition)*. Prentice Hall.
- Nobelprize.org*. (4. Lipanj 2015). Dohvaćeno iz Nobelprize.org: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962/
- Parekh, B. S., & Hatfield, W. G. (1996). Transcriptional activation by protein-induced DNA bending. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Biochemistry* 93, 1173-1177.
- Passarge, E. (2006). *Color Atlas of Genetics (3rd edition)*. Thieme.
- Pratt, C., & Cornely, K. (2013). *Essential Biochemistry*. Wiley.
- Profiles in Science, National Library of Medicine*. (4. Lipanj 2015). Dohvaćeno iz Profiles in Science, National Library of Medicine: <http://profiles.nlm.nih.gov/ps/retrieve/Narrative/KR/p-nid/183>
- Raven, P., Johnson, G., Mason, K., Losos, J., & Singer, S. (2010). *Biology (9th edition)*. McGraw-Hill Science/Engineering/Math.
- Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P., & Jackson, R. (2010). *Campebell Biology (9th edition)*. Benjamin Cummings.
- Rothmund, P. i. (2006). Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* 440, 297-302.

- Scitable*. (4. Lipanj 2015). Dohvaćeno iz Scitable:
<http://www.nature.com/scitable/topicpage/rosalind-franklin-a-crucial-contribution-6538012>
- Teif, V. B., & Bohinc, K. (2011). Condensed DNA: condensing the concepts. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 105(3), 208-222.
- Turnpenny, P. (2011). *Emery's Elements of Medical Genetics (14th edition)*. Churchill Livingstone.
- Viswesh, V., Gates, K., & D., S. (2010). Characterization of DNA damage induced by a natural product antitumor antibiotic leinamycin in human cancer cells. *Chemical Research in Toxicology* 23(1), 99-107.
- Wikibooks*. (7. Lipanj 2015). Dohvaćeno iz Wikibooks:
http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Chemical_Bonding/Noncovalent_bonds
- Wikibooks*. (7. Lipanj 2015). Dohvaćeno iz Wikibooks:
http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Nucleic_Acid/DNA/DNA_structure#Base-stacking_interactions
- Wu QW, W. J. (2004). Computer aid design of antisense oligonucleotide in gene therapy--review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 12(3), 387-391.
- Yurkanis Bruce, P. (2013). *Organic Chemistry (7th edition)*. Prentice Hall.

11. Životopis

Rođen sam 28. kolovoza 1990. u Dubrovniku. Osnovnu školu sam završio u Dubrovniku. Srednjoškolsko obrazovanje sam stekao u Gimnaziji Dubrovnik, opći smjer, gdje sam maturirao 2009. godine. Iste godine sam upisao Medicinski Fakultet u Zagrebu.

12. Zahvale

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Sanji Dolanski Babić, asistentici Kristini Serec i prof.dr.sc. Ljiljani Šerman na velikoj pomoći pri izradi ovog rada.

Veliko hvala obitelji i prijateljima na podršci tijekom školovanja.