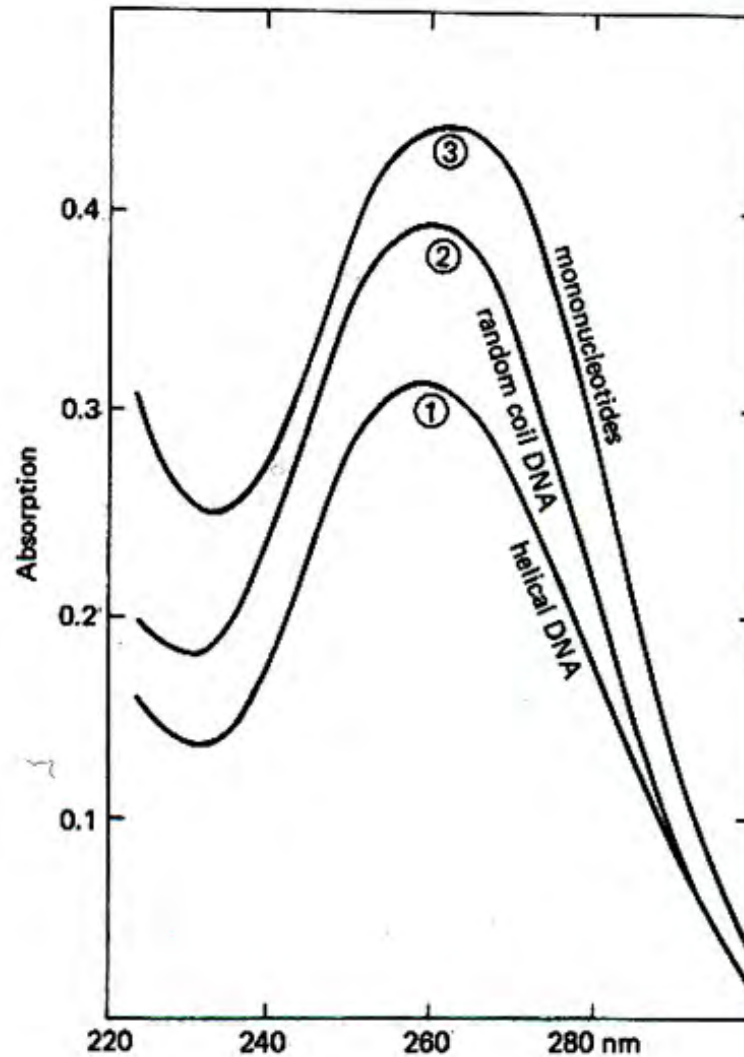


- Dinamika strukture DNK
 - helix – coil (razvijeni niz) prelazi (reversibilna denaturacija-renaturacija)
- Reakcije baza: mutacije/oštećenja DNK
- Interakcije molekula DNK sa
 - vodom
 - ligandima

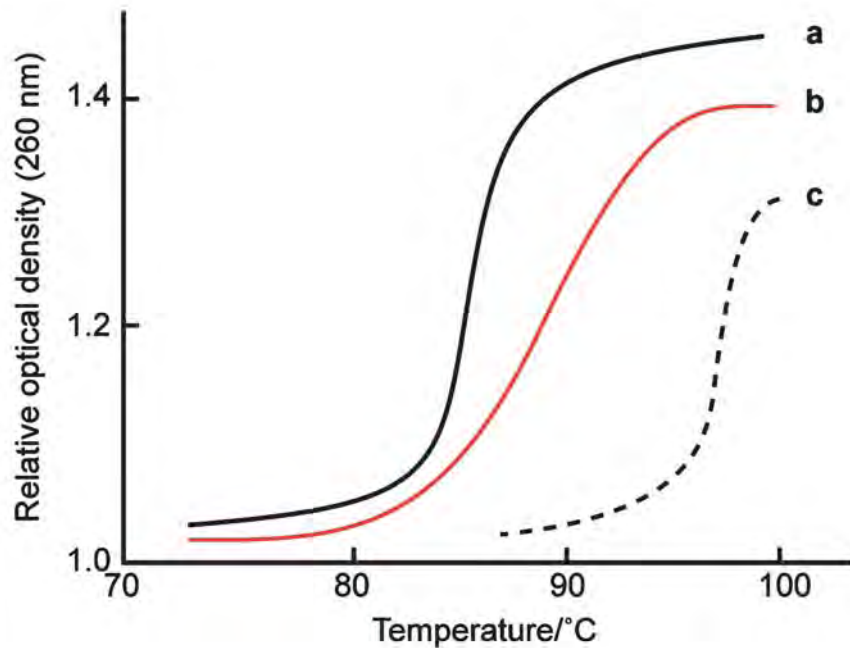
Reversibilna denaturacija i renaturacija DNK

- Denaturacija DNK vs denaturacija proteina
- UV spektar native i denaturisane DNK
- Krive topljenja DNK i T_m :
 - efekat baznog sastava DNK
 - efekat jonske sile rastvora
- Kooperativna priroda prelaza
- Primena: hibridizacija
PCR

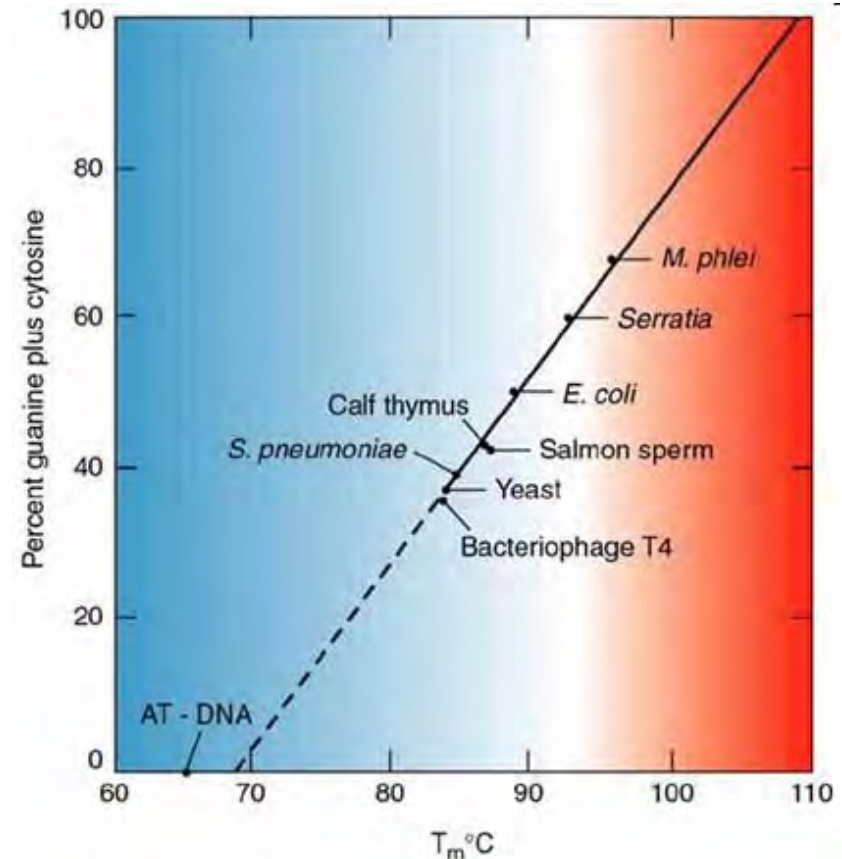
UV spektrar native i denaturisane DNK



Krive topljenja DNK

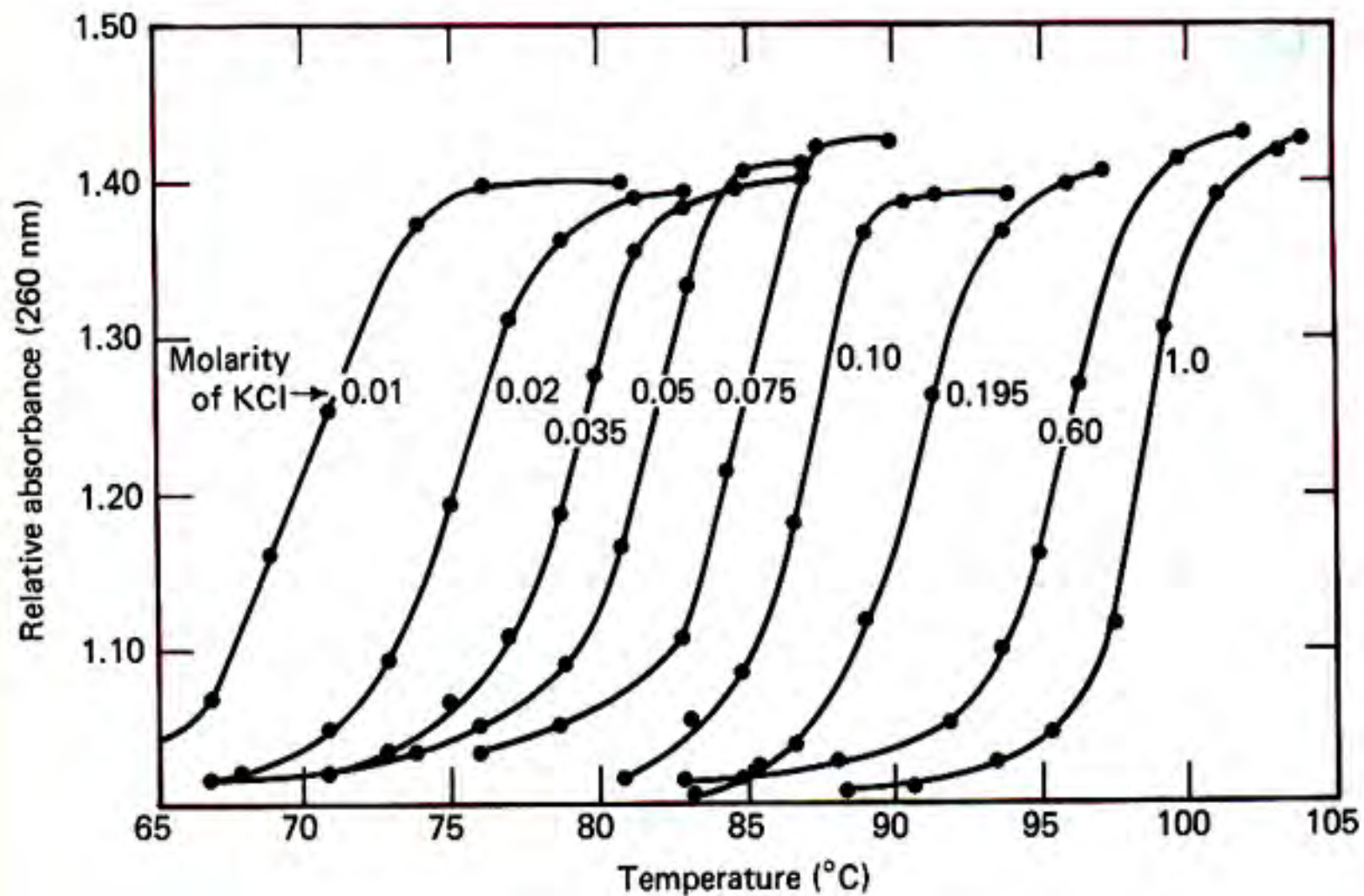


Termalna denaturacija DNK kao funkcija sastava baza (kao % GC) za tri vrste bakterija: (a) *Pneumococcus* (38% GC). (b) *E. coli* (52% GC). (c) *M. phlei* (66% GC)

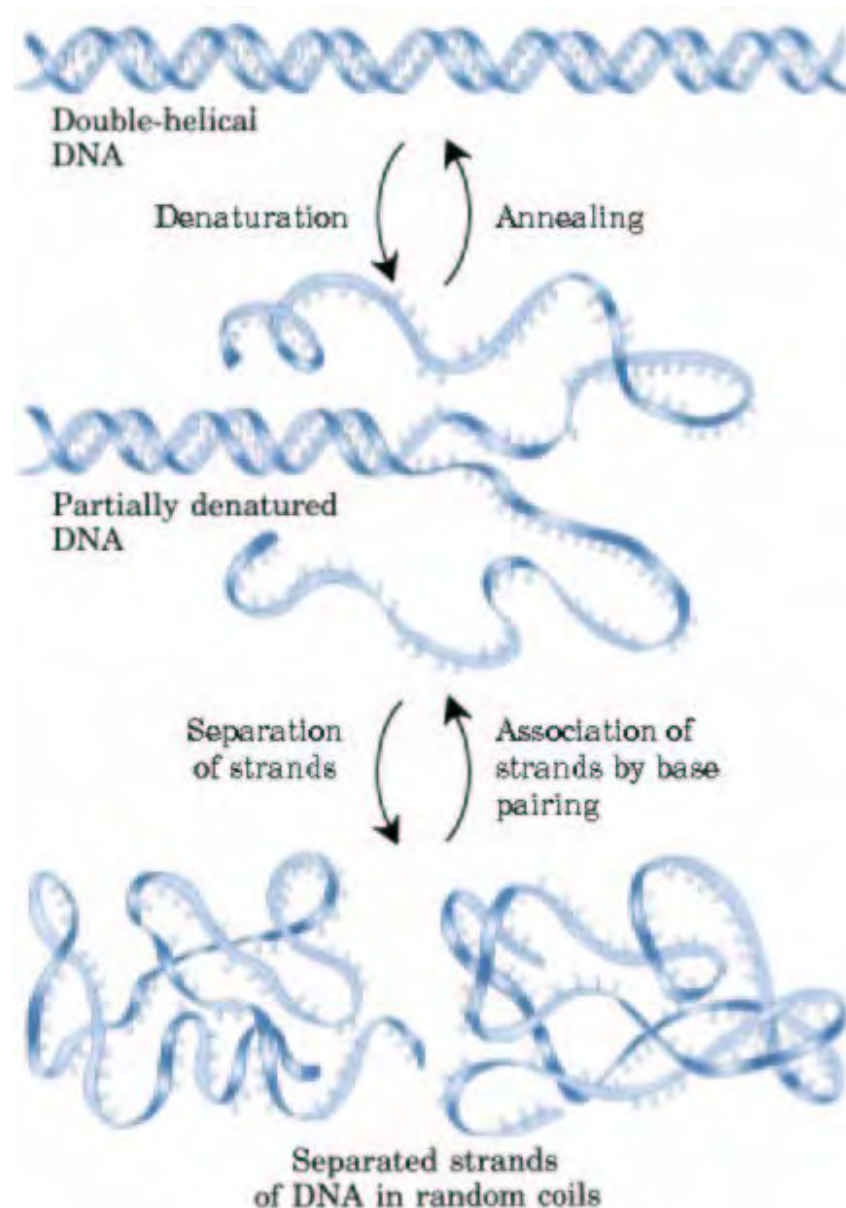


Zavisnost Tm od baznog sastava:
$$T_m = 69.3 + 0.41(\%C)$$

Zavisnost T_m od jonske sile rastvora

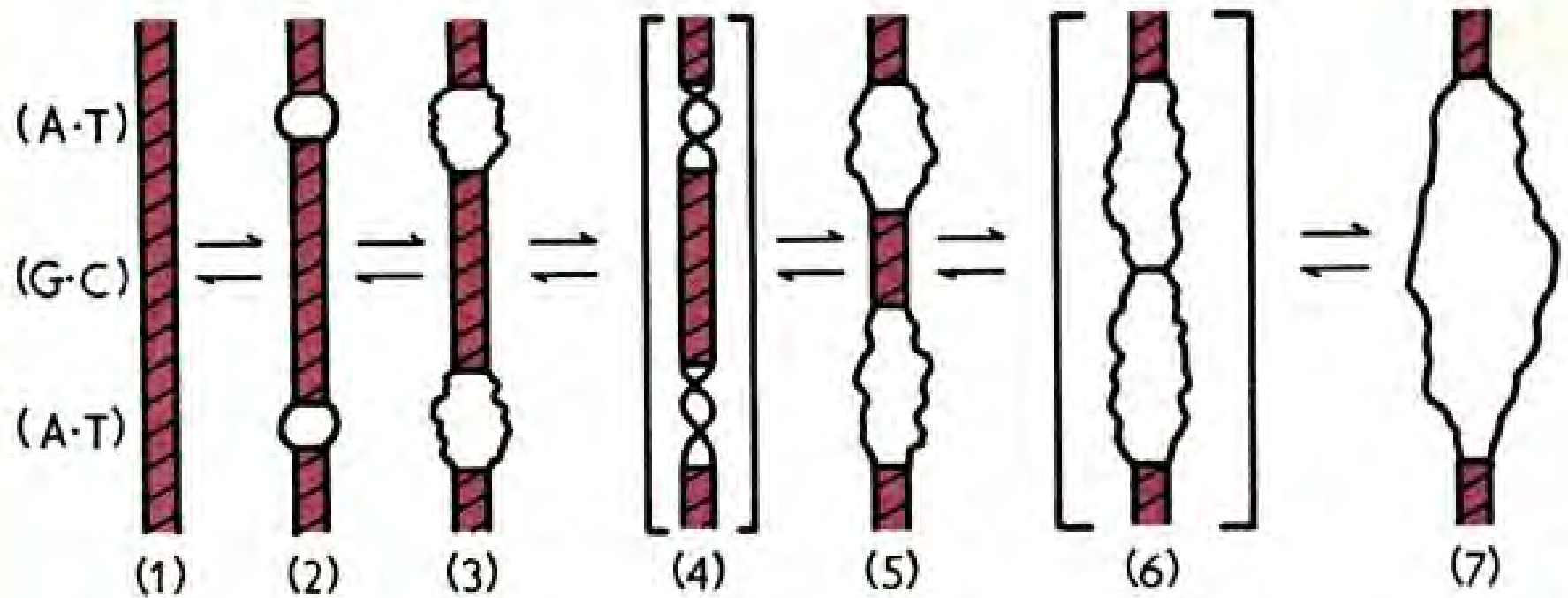


Denaturacija DNK vs denaturacija proteina

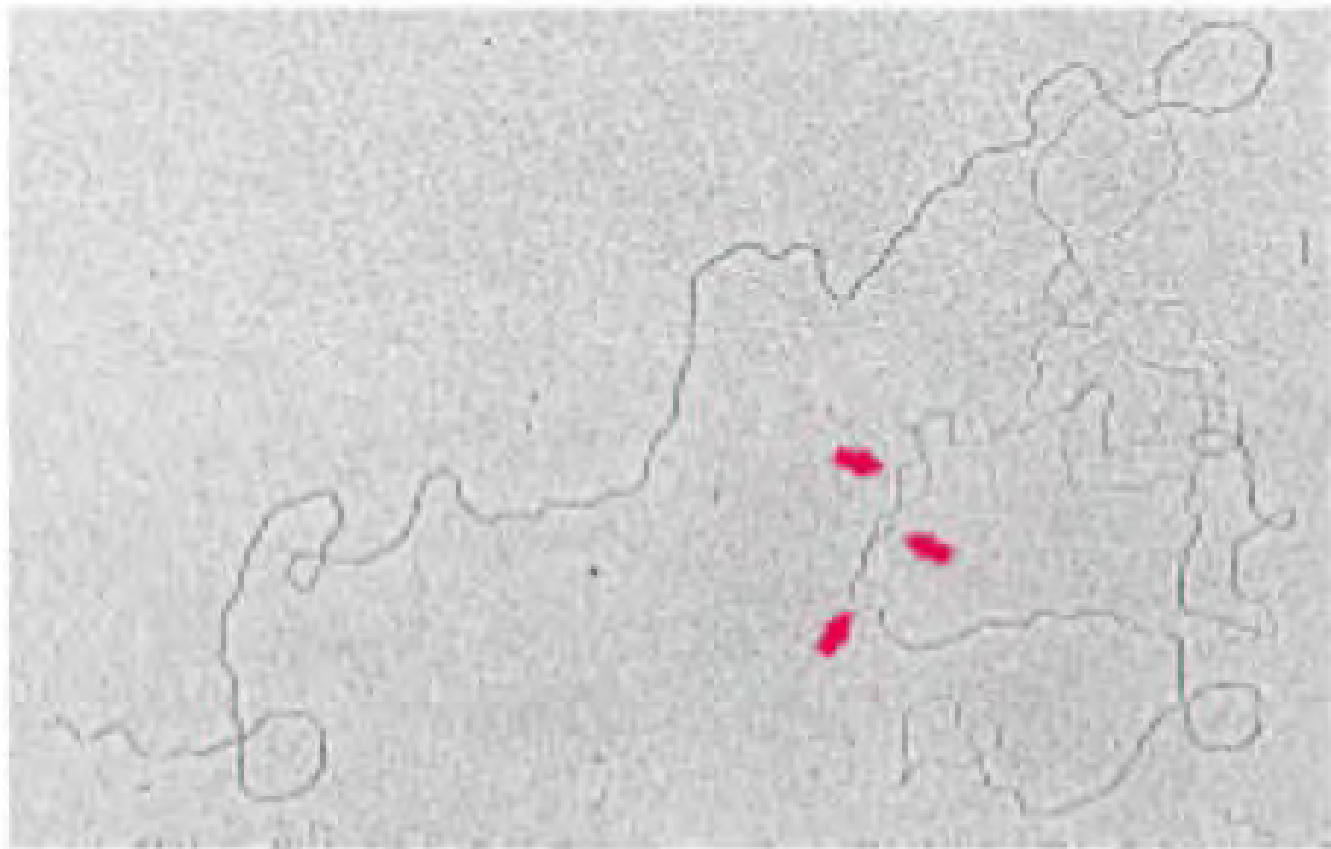


Sredstva za
denaturaciju:

“Topljenje” DNK

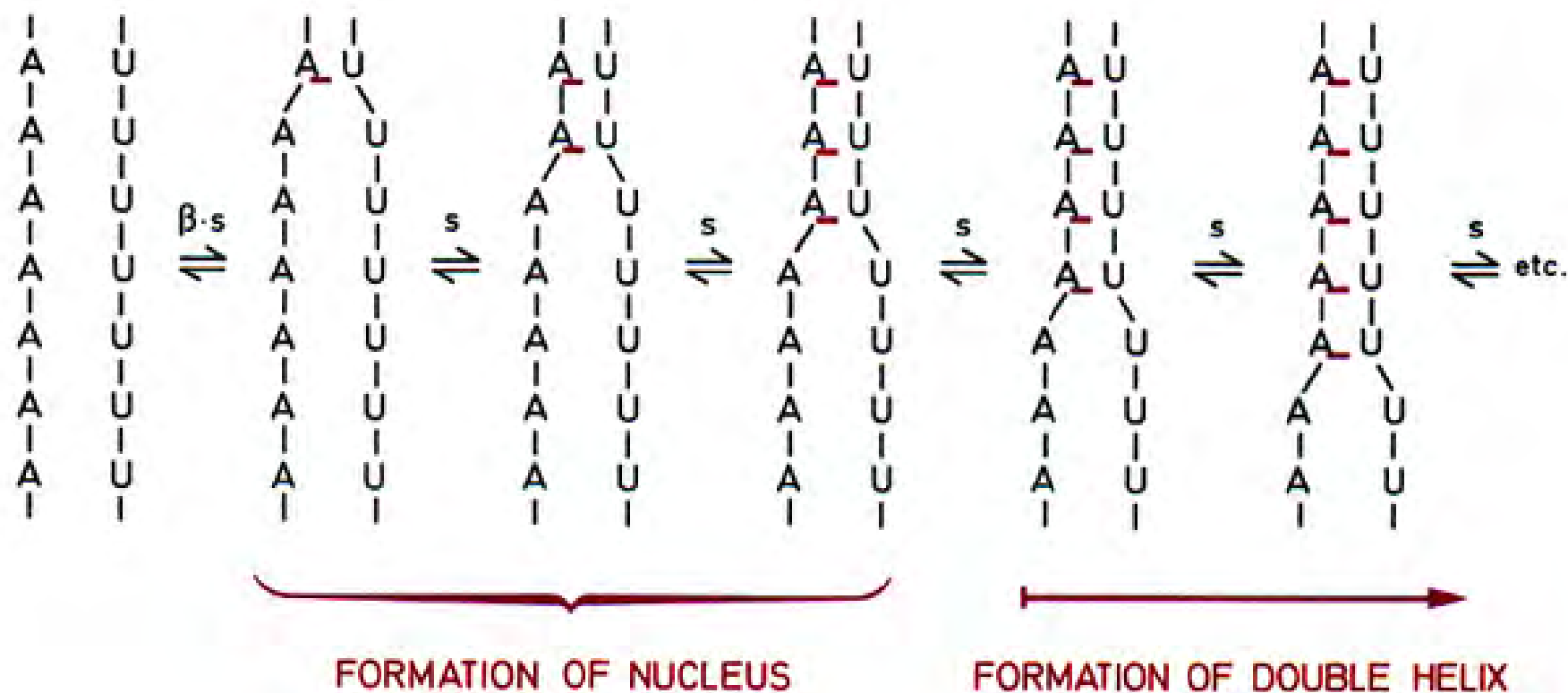


Delimično denaturisana DNK

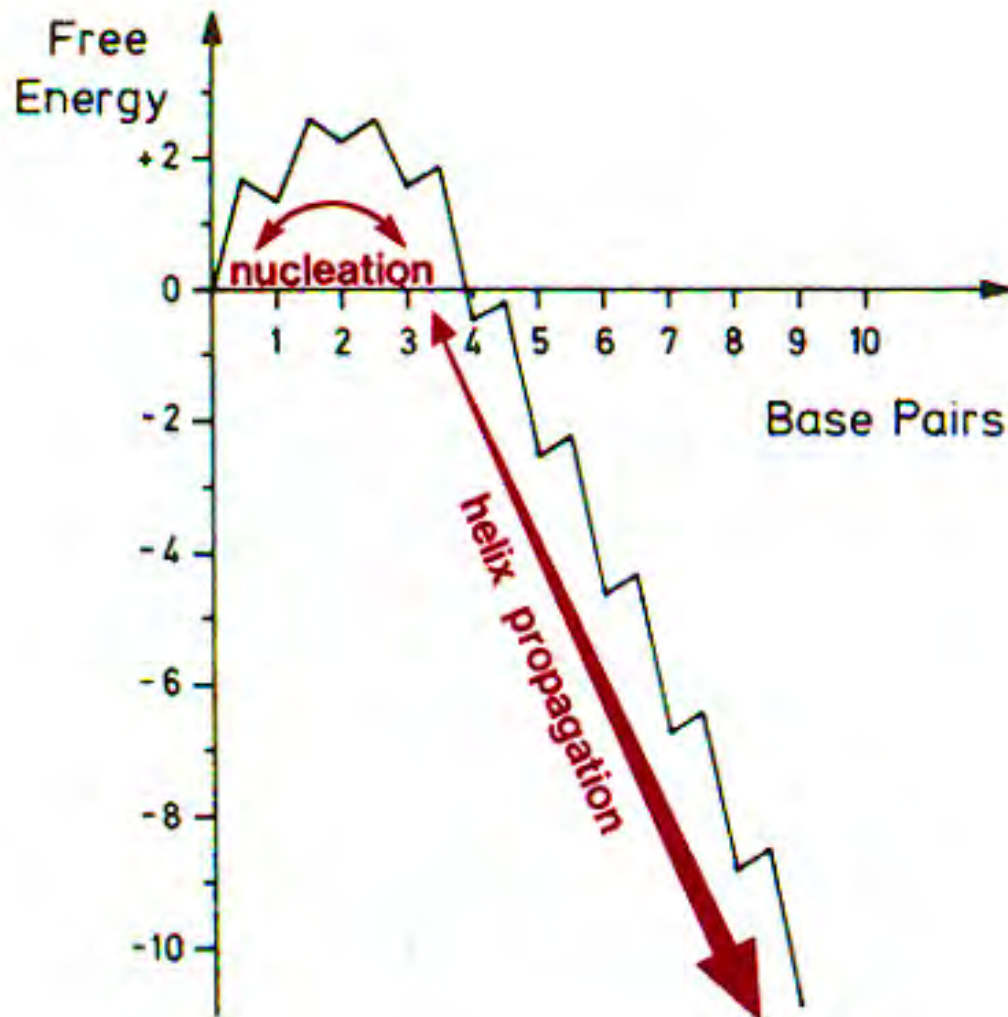


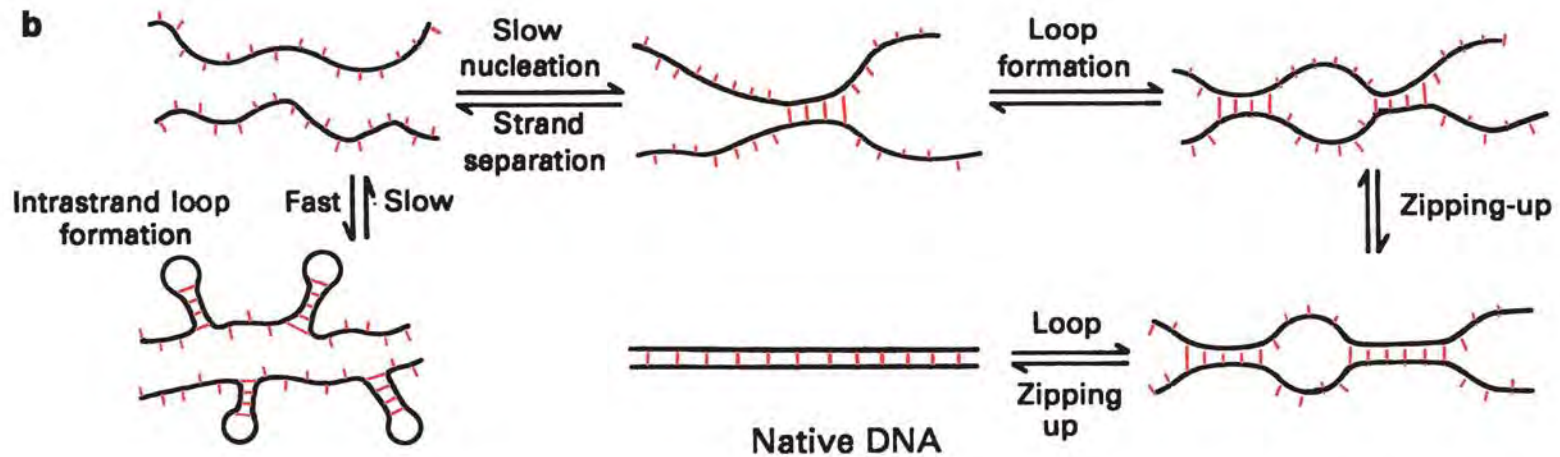
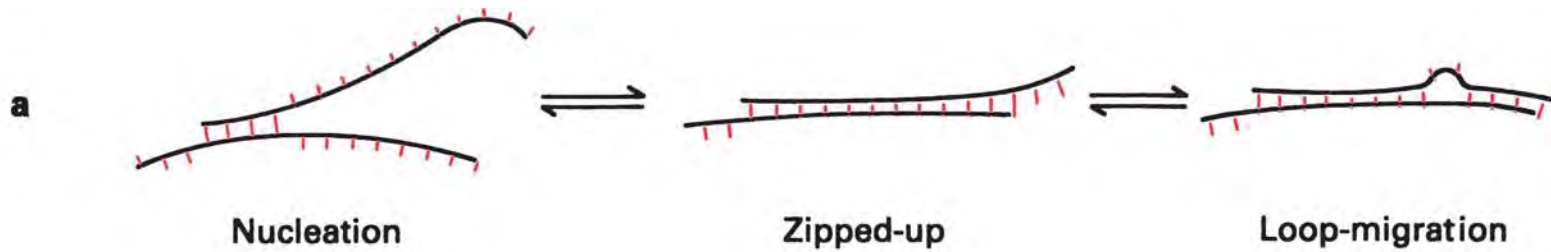
3 μm

Kooperativna priroda prelaza (na model sistemima!)



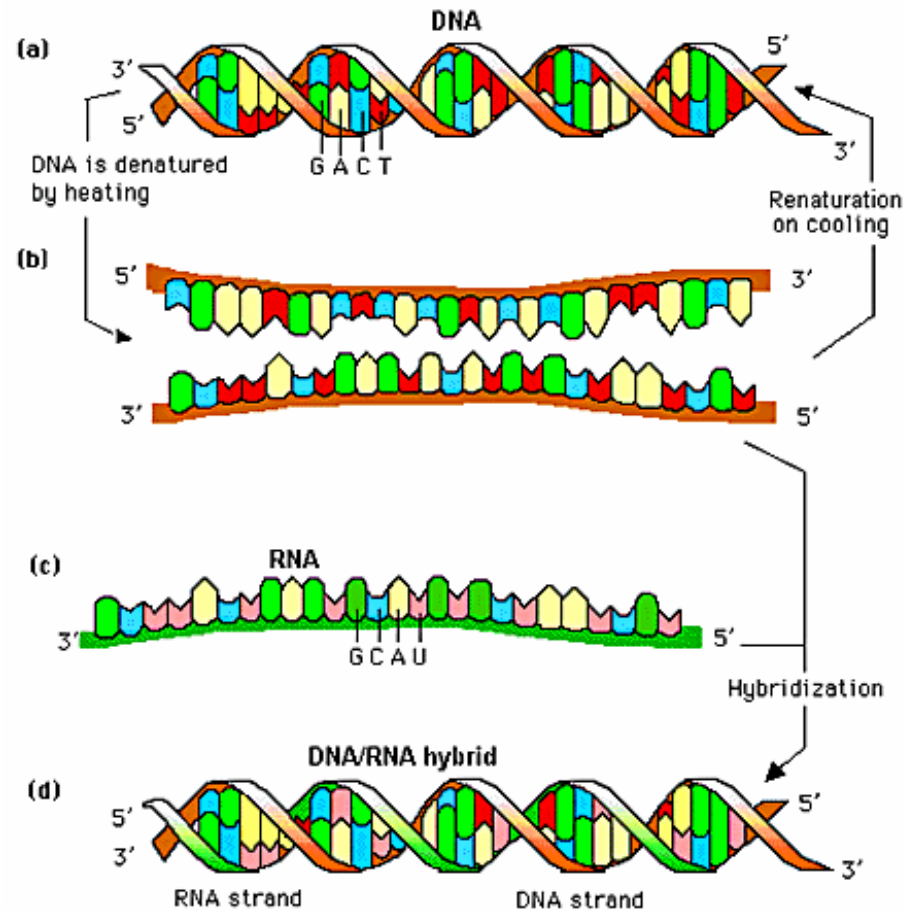
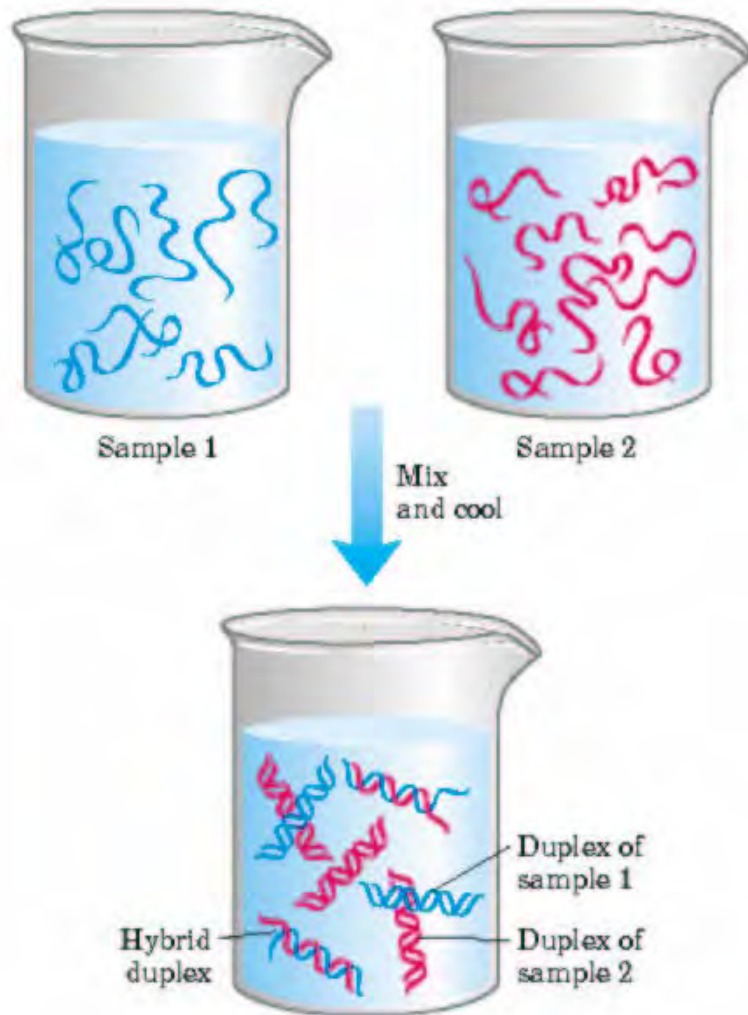
Kooperativna priroda prelaza





Renaturacija za (a) kratke oligonukleotide i dugačke homo-polimere i (b) za native DNA nizove

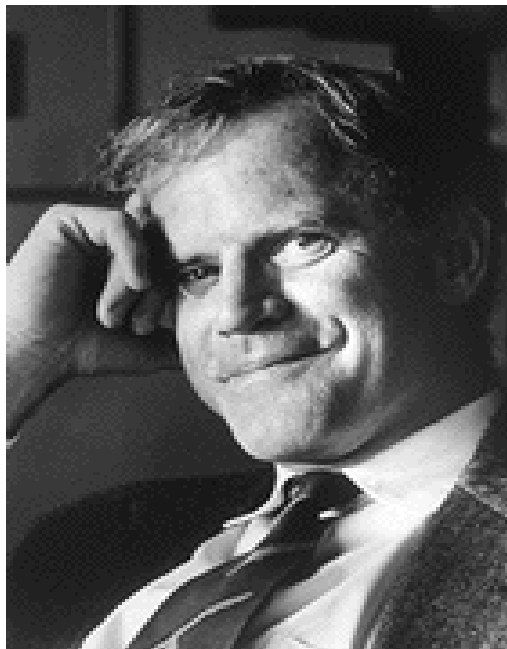
Primena: hibridizacija (DA/DNA; DNA/RNA)



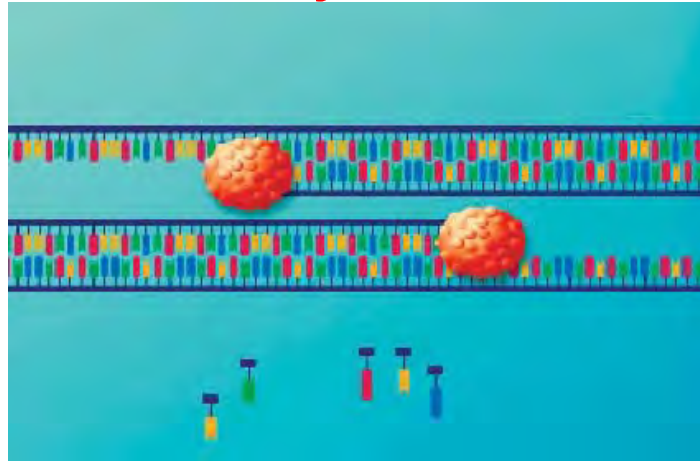
Nucleic Acid Hybridization

Kary B. Mullis

Nobelova nagrada 1993



PCR: Polymerase Chain Reaction



ctgcatctgaagccgctgaa
ctgcatctgaagccgctgaa
ctgcatctgaagccgctgaa

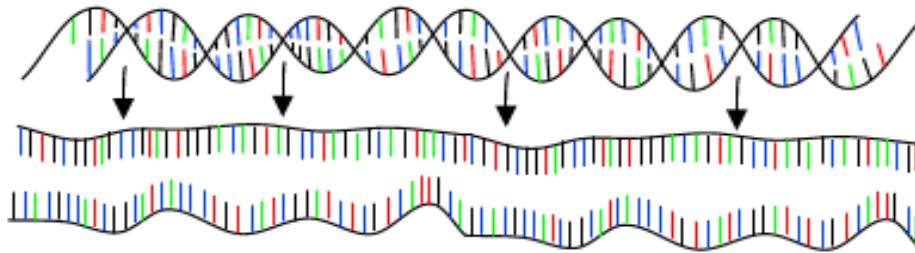
ctgcatctgaagccgctgaa
ctgcatctgaagccgctgaa
ctgcatctgaagccgctgaa
ctgcatctgaagccgctgaa

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31



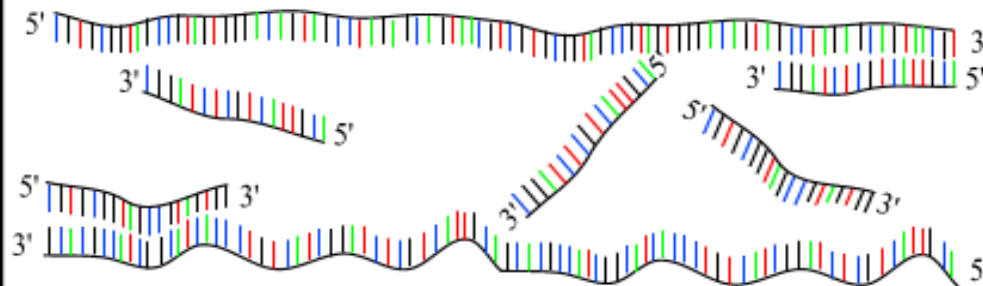
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

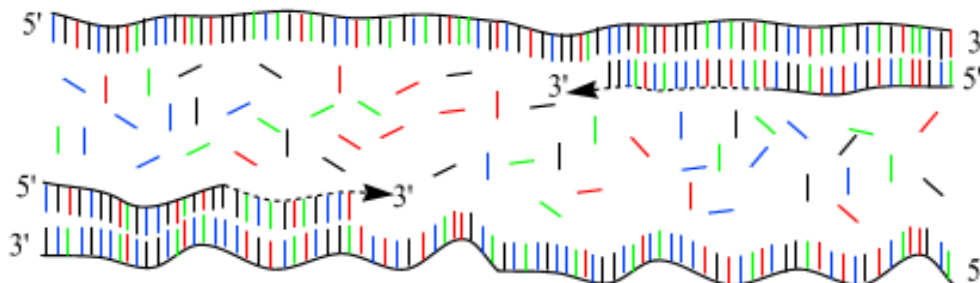
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

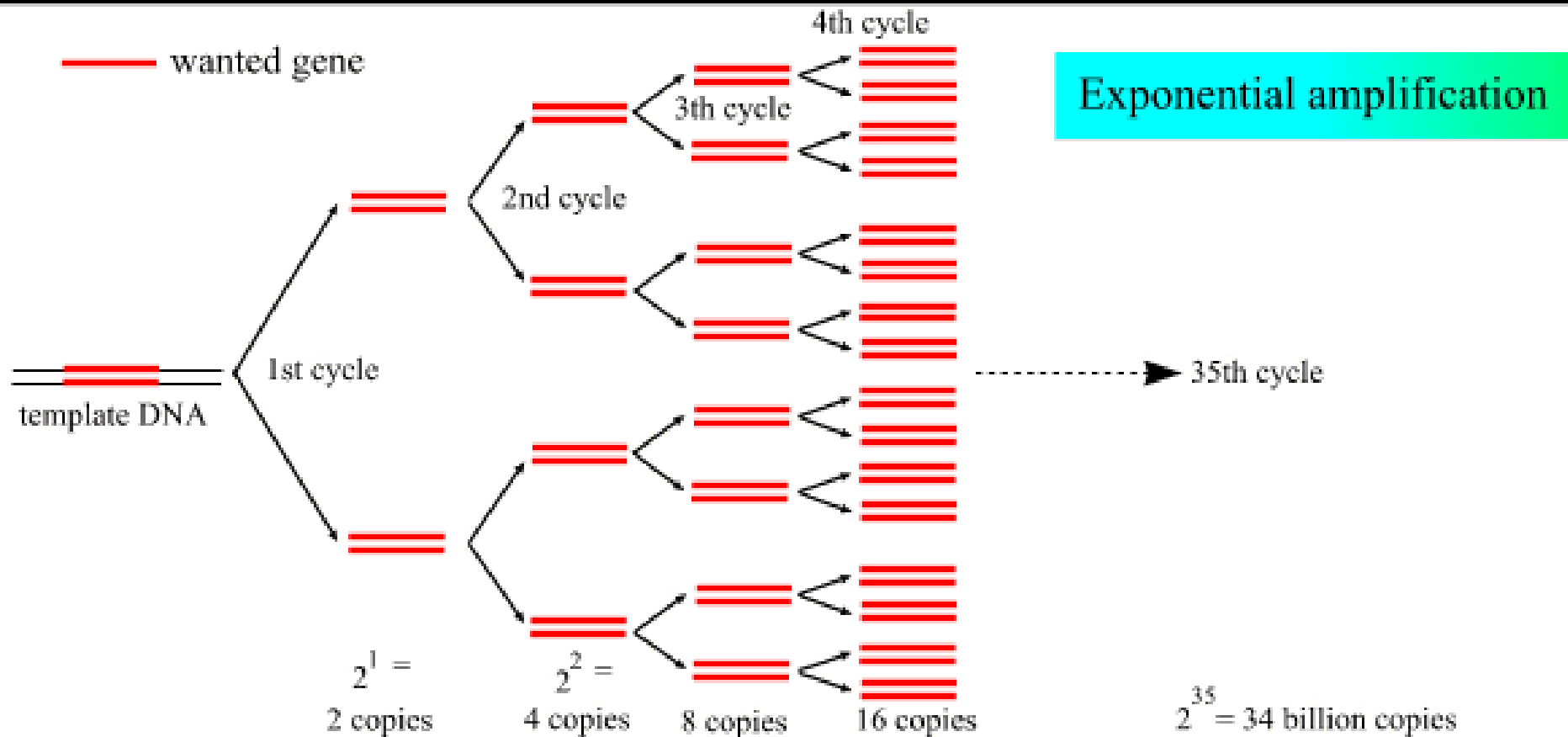
forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's

Amplifikacija



Primena PCR-a

- Detekcija infektivnih bolesti
- Detekcija varijacija i mutacija u genima:
 - detekcija urođenih bolesti, kancera...
- Detekcija bolesti u prošlosti
 - detekcija od čega su ljudi u prošlosti bolovali
(John Dalton je bio daltonista jer mu je nedostajao gen za jedan pigment!)
- PCR i zakon!!

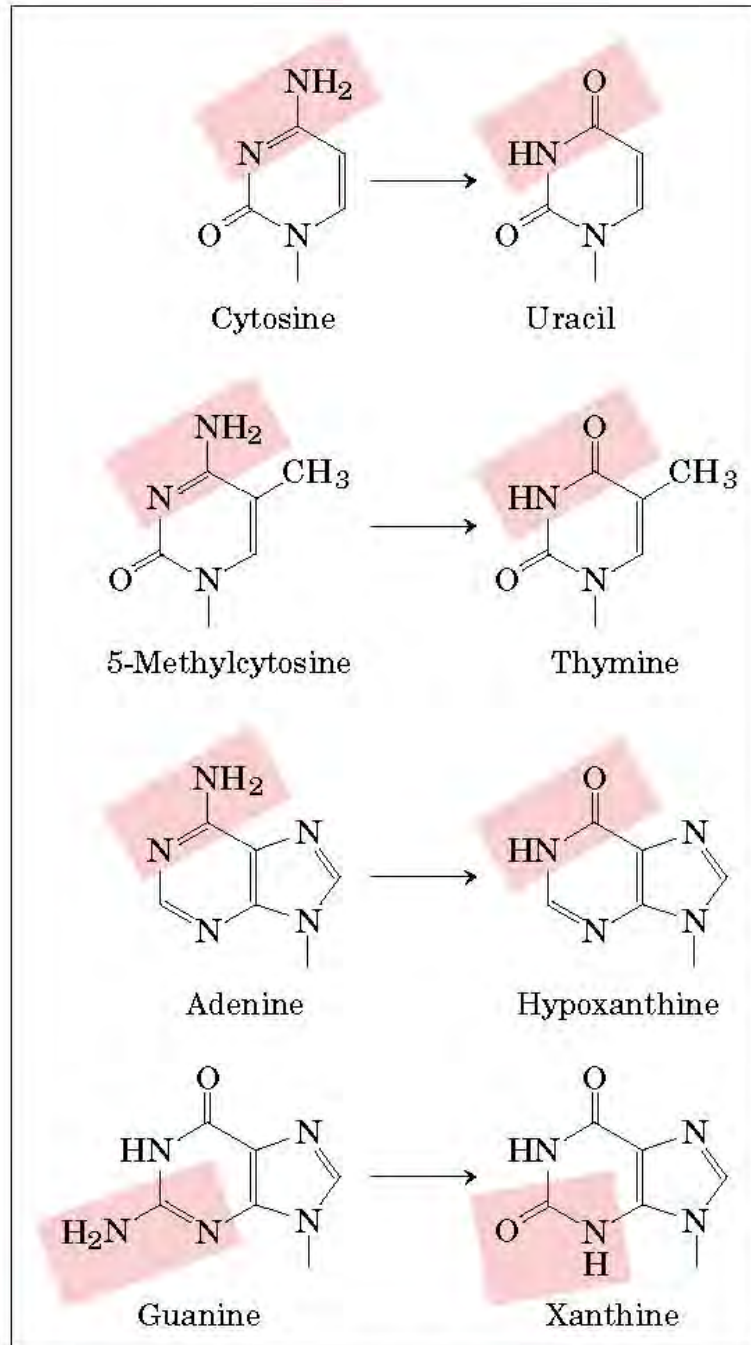
Reakcije baza: mutacije/oštećenja DNK

Endogeni izvori oštećenja DNK

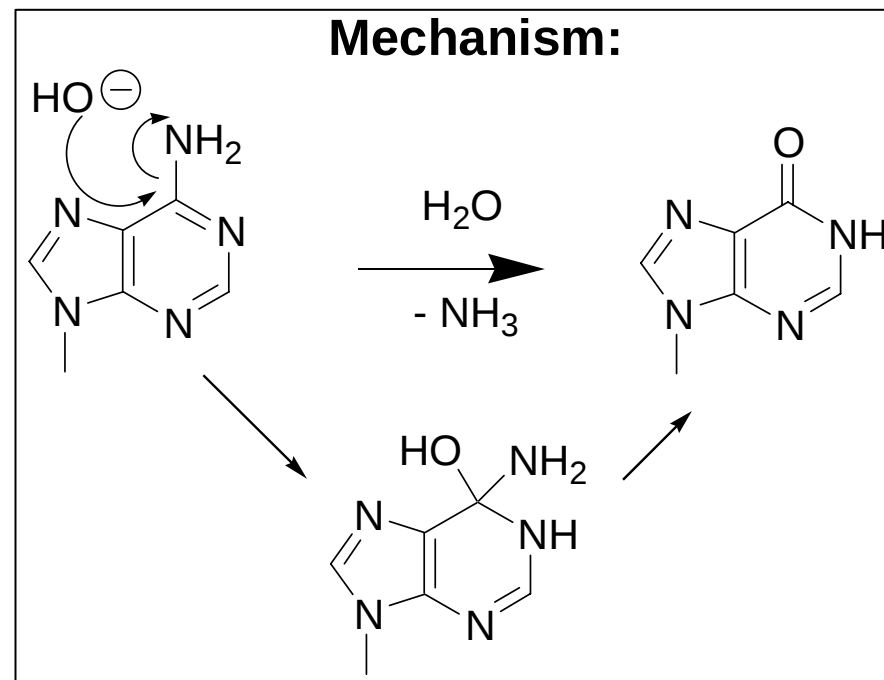
1. Dezaminacija
2. Depurinizacija: 2,000 - 10,000 oštećenja/ćelija/dan
3. Oksidativni stres: 10,000 lezija/ćelija/dan

Egzogeni (iz okoline) izvori oštećenja DNK

1. Alkilujućí agensi
2. X-zraci
3. Karcenogeni iz hrane
4. UV-zraci
5. Pušenje

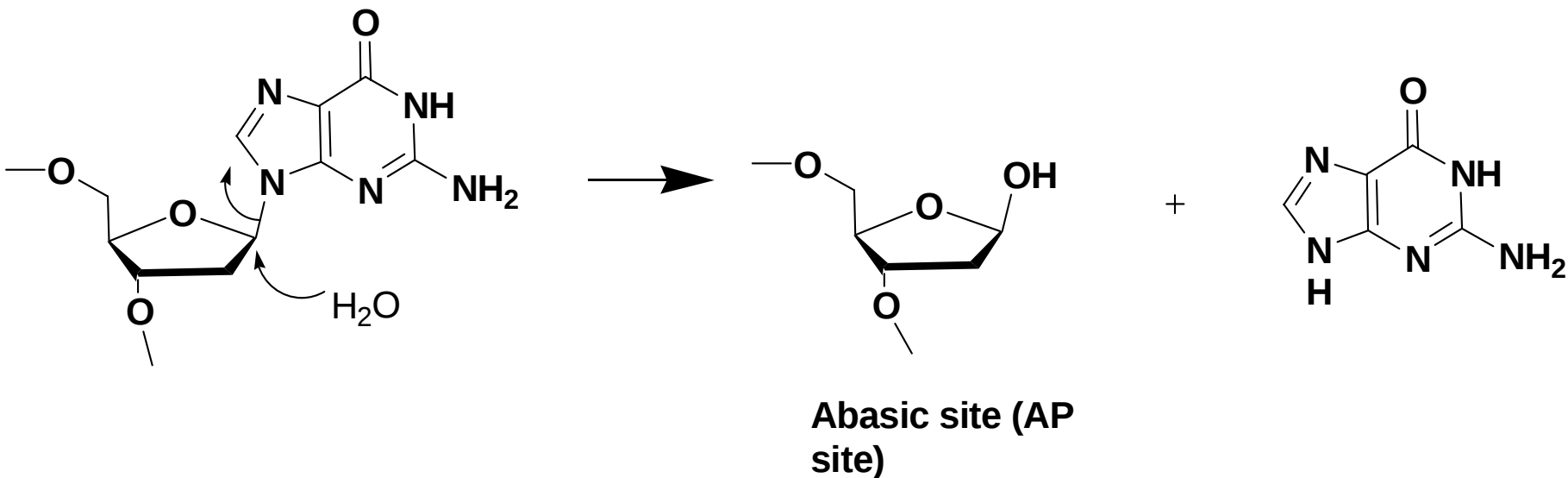


Deamination
(a)



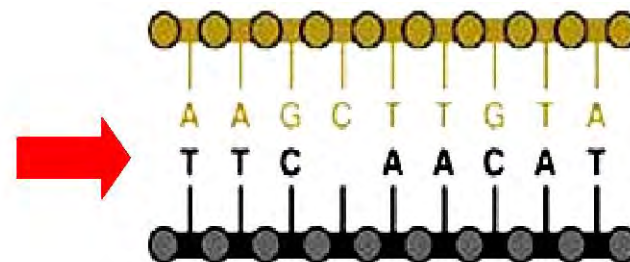
Reakcija dezaminacije citozina u uracil (iako spora) objašnjava zašto se u DNK nalazi timin, a ne uracil!!!!

Depurinizacija u abazni centar



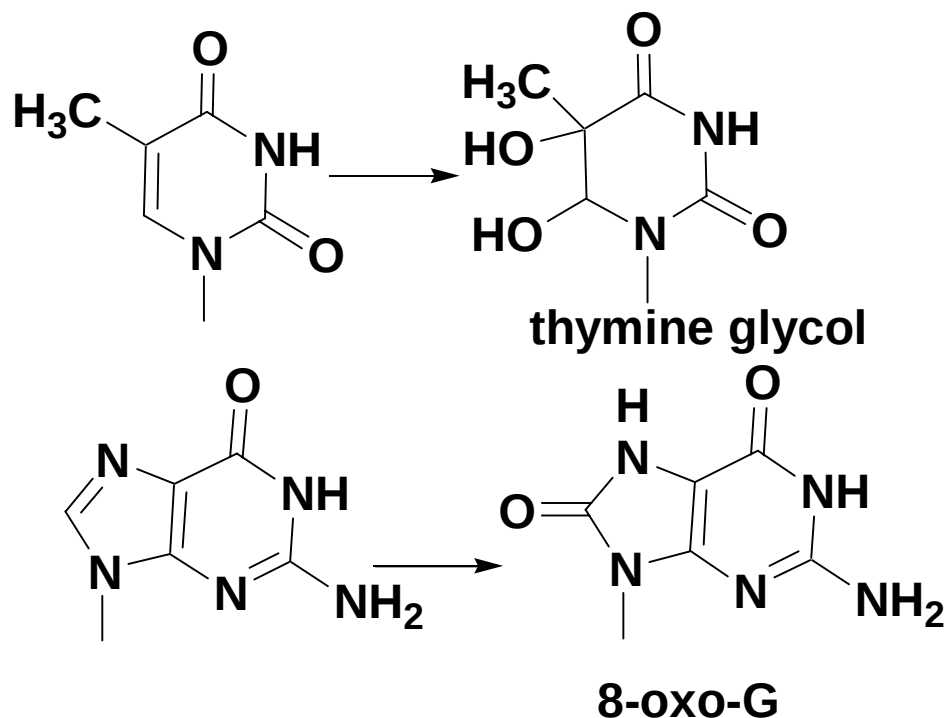
2 000 – 10 000 lezija/ćelija/dan

**Depurinizacija
generiše AP
centar**



Oksidacija baza u DNK

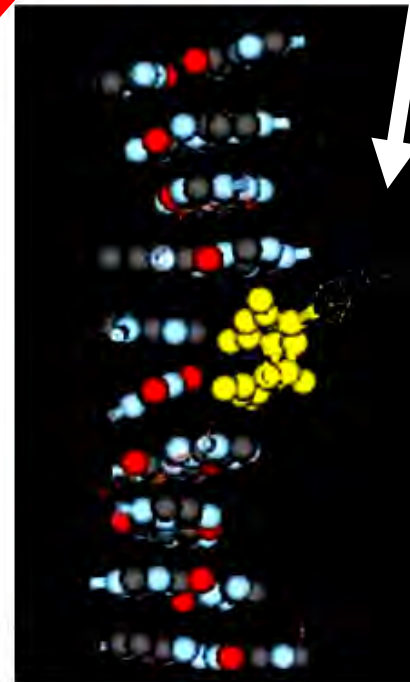
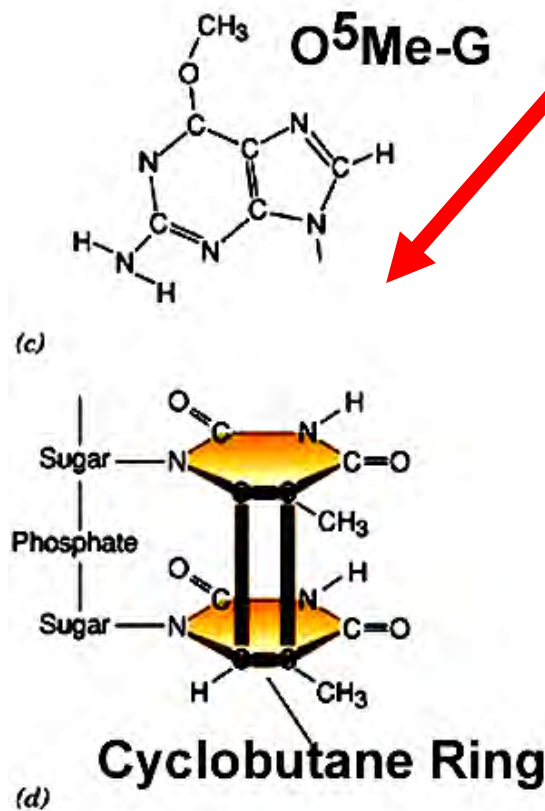
Reaktivne vrste kiseonika: $\text{HO}^\bullet$, H_2O_2 , ONOO^-



Kod ljudi: 10 000 oksidativnih lezija/ćelija/dan

UV zranci izazivaju oštećenje DNK

UV-zranci izazivaju nastajanje dimera susednih pirimidina (timina)

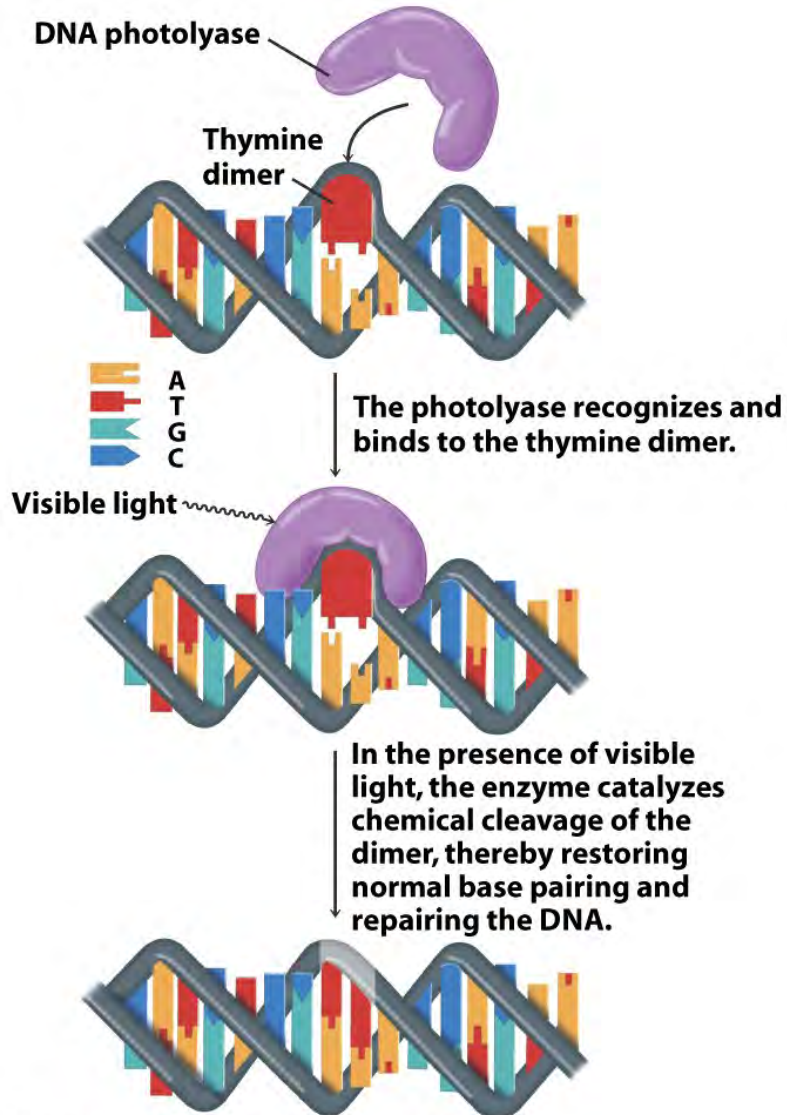


(e)

Opravka (“repair”) DNK

- ▶ DNK je jedini biološki makromolekul koji se opravlja. Svi ostali se zamenjuju!!!
- ▶ Čak i u organizmima sa vrlo malim genom nalazi se više od 100 gena za opravku DNK!
- ▶ Kancer je posledica neadekvatne opravke DNK!

Primer: DNK fotoliza



Fotoliza postoji
kod mnogih organizama,
ali ne i kod čoveka!!!

Interakcije DNK sa ligandima:

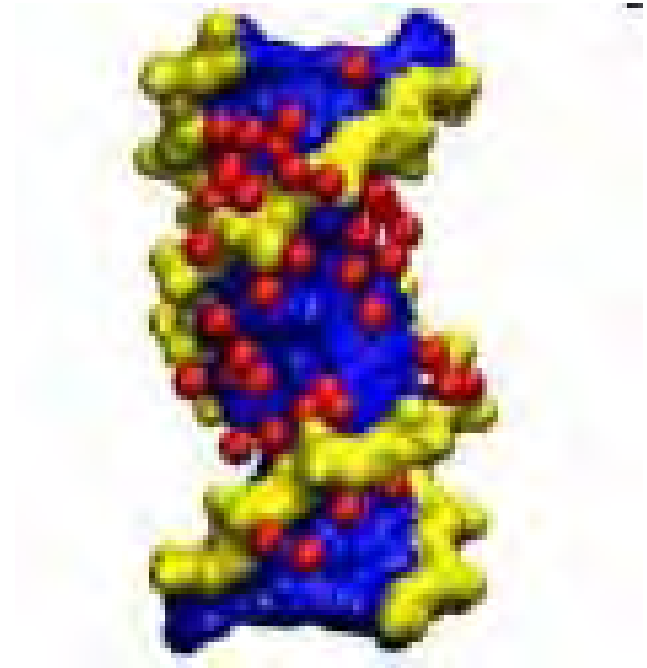
Interakcije DNK sa vodom

Interakcije DNK sa:

- metalnim jonima
- malim molekulima
- proteinima

Nukleinske kiseline i voda

- Voda je neophodna za stabilizaciju sekundarne i tercijerne strukture NK
- Smanjuje odbijanje medju fosfatima
- Step en hidratacije se razlikuje kod kanonskih A i B DNK-konformacija



Vrste hidratacije

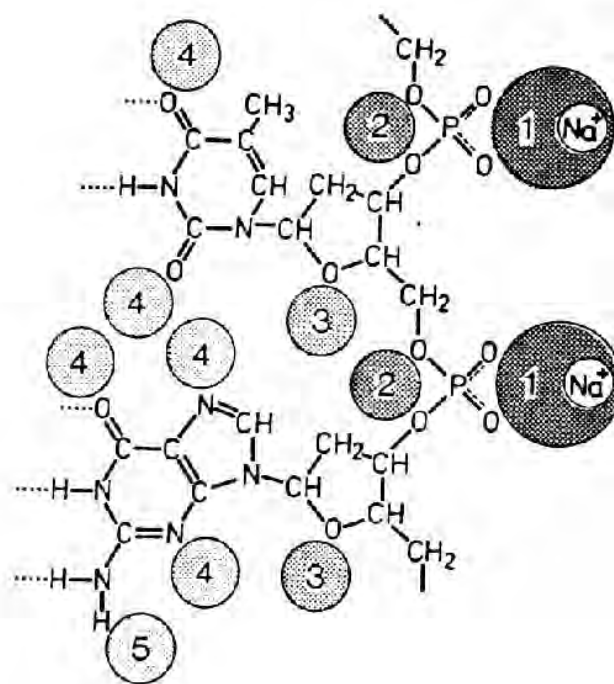
Primarna i sekundarna hidrataciona ljuska

Primarna hidrataciona ljuska:

- nije propustljiva za katjone
- 20 molekula H_2O /nukleotid u dvostrukom heliksu DNA:

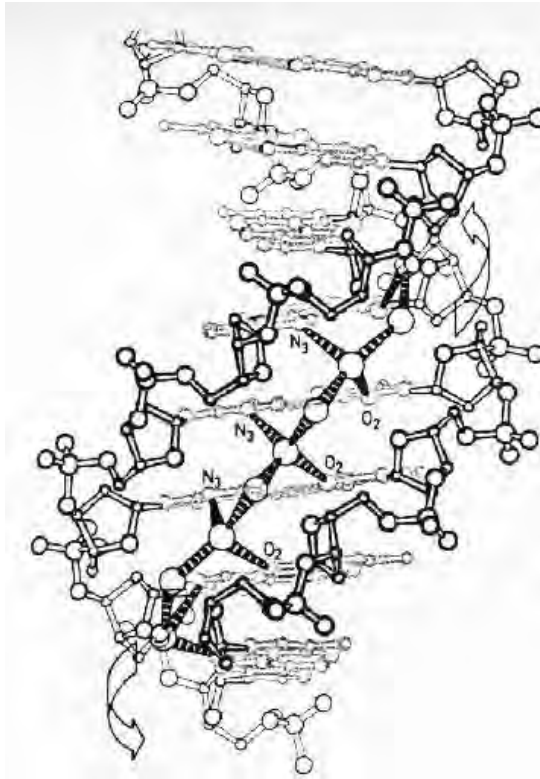
- (5-6 H_2O hidratiše fosfatne kiseonike,
- 5-6 H_2O hidratiše fosfodiesterske O i furanozne O',
- 8-9 H_2O hidratiše funkcionalne grupe u bazama (amino, imino, keto)

Sekundarna hidrataciona ljuska:
skoro se ne razlikuje od okolne vode, propustljiva je za jone



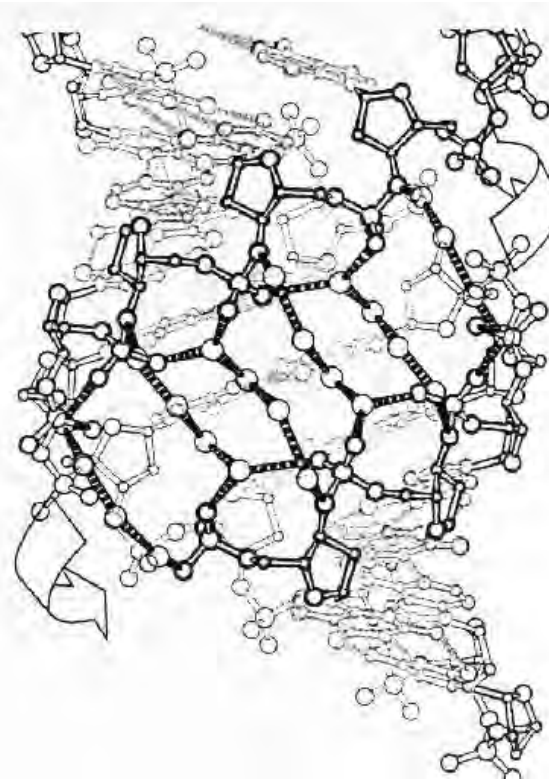
Preferentna mesta za vezivanje vode

„Hidrataciona kičma“



d(CGCGAATTCGCG) B-DNK

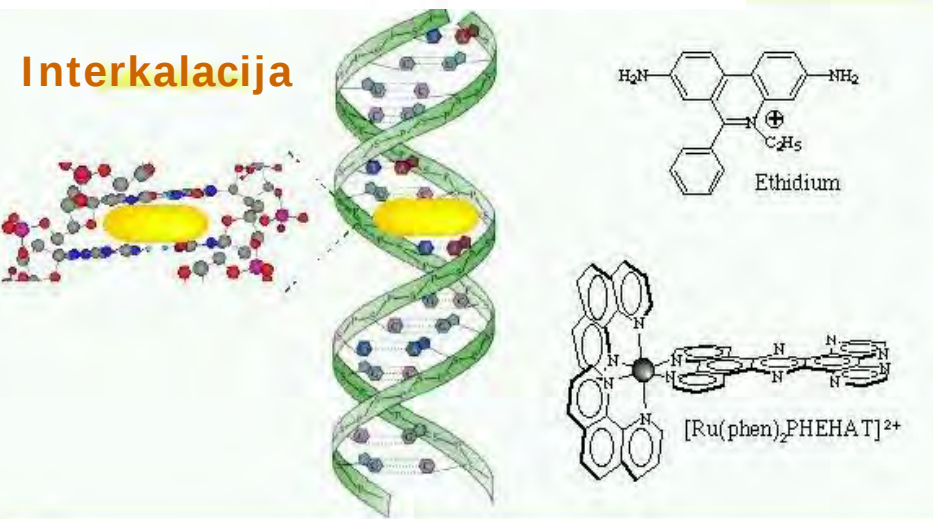
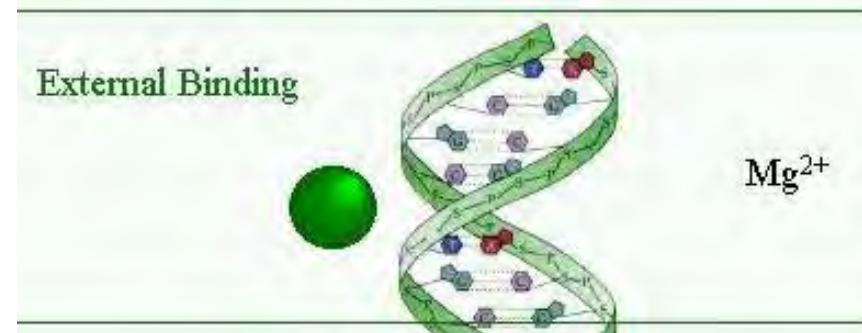
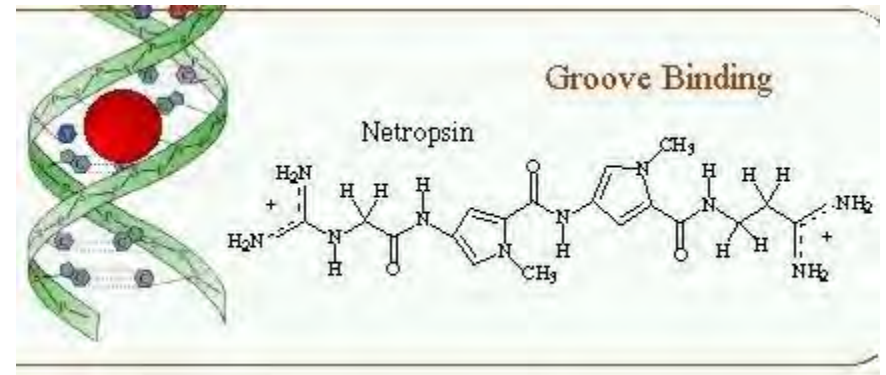
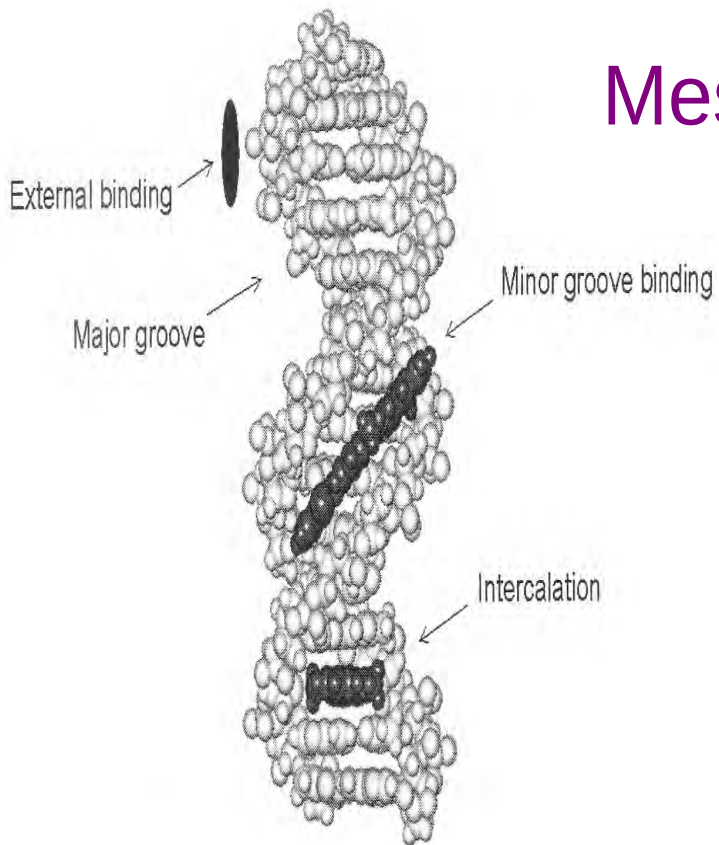
Molekuli H_2O
povezuju/premošćuju O_2
timina i N_3 adenina u susednim
parovima baza



d(CGCG) A-DNK

Molekuli H_2O premošćuju
fosfate u velikoj brazdi

Mesta vezivanja liganada za DNK



Razni molekuli
(metalni joni, lekovi, ksenobiotici, proteini.....)
interaguju sa DNK
i utiču na njenu strukturu i funkciju!

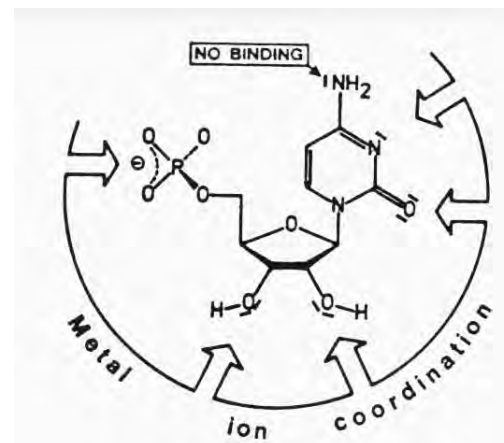
Preferentna mesta za vezivanje metalnih jona

Koji se metalni joni vežu?

Alkalni metali: joni Li, Na, K, Rb, Cs

Zemnoalaklani metali: joni Mg, Ca, Sr, Ba

Joni prelaznih metala: Mn(II), Ru(III), Os (VI), Co(III), Co(II), Ni(II),
Pd(II), Pt(II), Cu(II), Ag(I), Au(III), Zn(II),
Cd(II), Hg(II)



Gde se vežu?

Baze

fosfati

Hidroksilne grupe
šećera

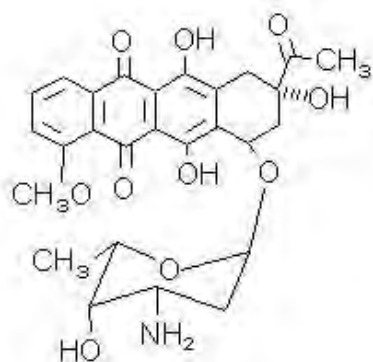
Joni prelaznih metala

Joni alkalnih i zemnoalaklnih metala

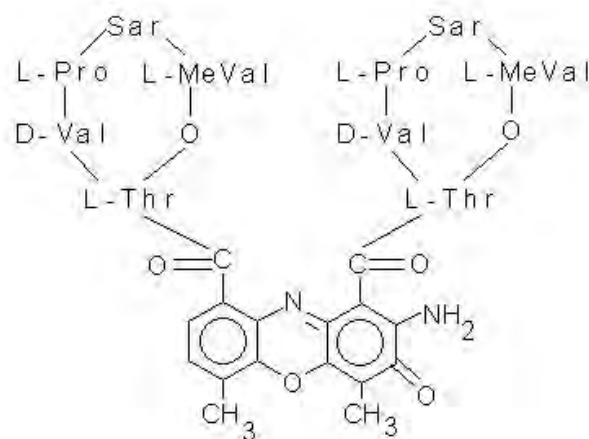
Interkalacija

Umetanje planarnih aromatičnih molekula izmedju 2 susedne baze pri čemu dolazi do deformacije fosfodiesterarske kičme!

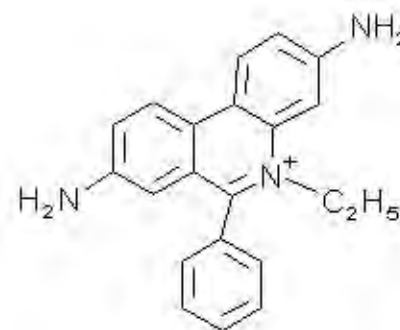
Primeri interkalatora



Daunomicin
(grupa
antraciklina)

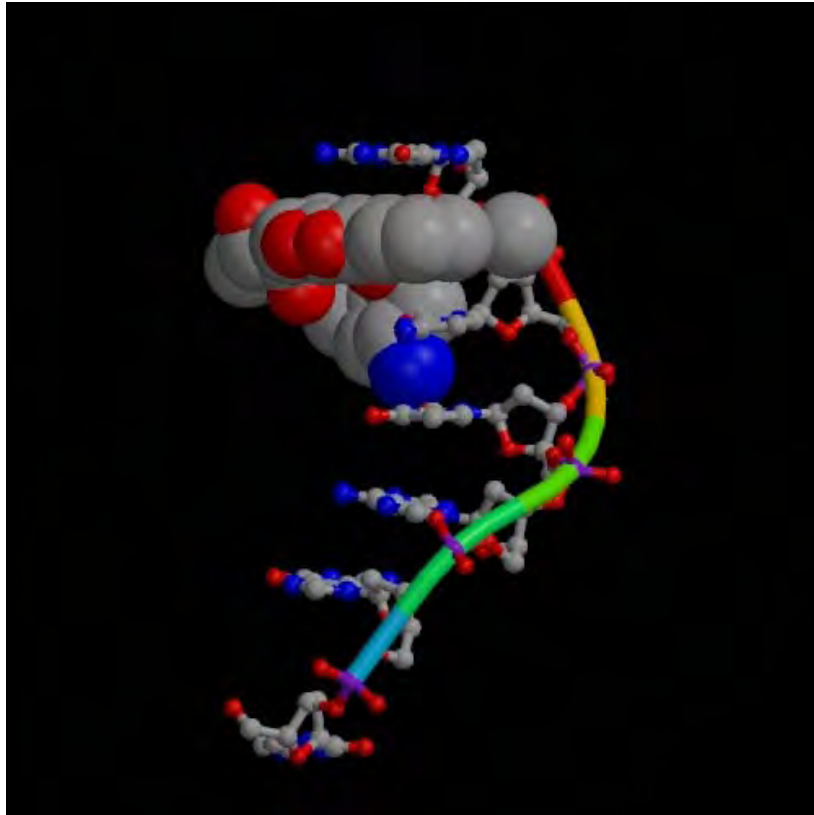


Aktinomycin D
(peptidni antibiotik)



Etidium bromid
(eksperimentalni rad sa
DNK!!!)

DNK - daunomicin



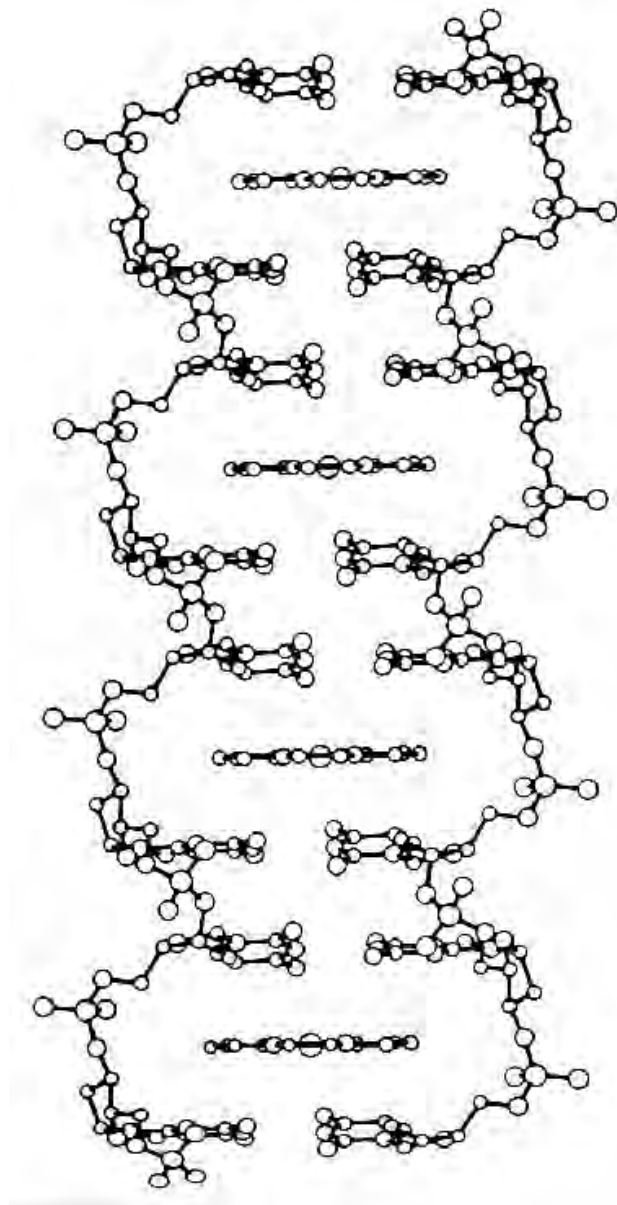
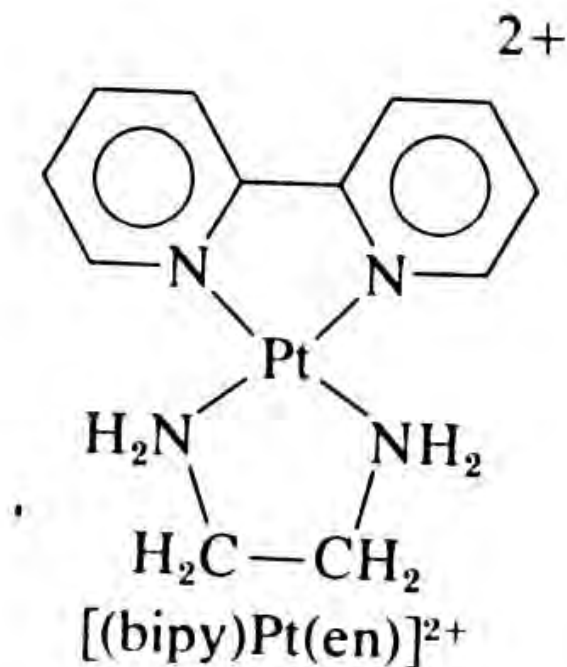
DNK – daunomicin kompleks:

- sprečava se replikacija DNK
- specifičan za sekvence d(CpG) $\Rightarrow$ distorzija helixa, što sprečava interakcije DNK sa DNK-helikazom, topoizomerazom i DNK-polimerazom.

Moore, M. H., Hunter, W. N., d'Estaintot, B. L., Kennard, O.: DNA-drug interactions. The crystal structure of d(CGATCG) complexed with daunomycin. J Mol Biol 206 pp. 693 (1989)

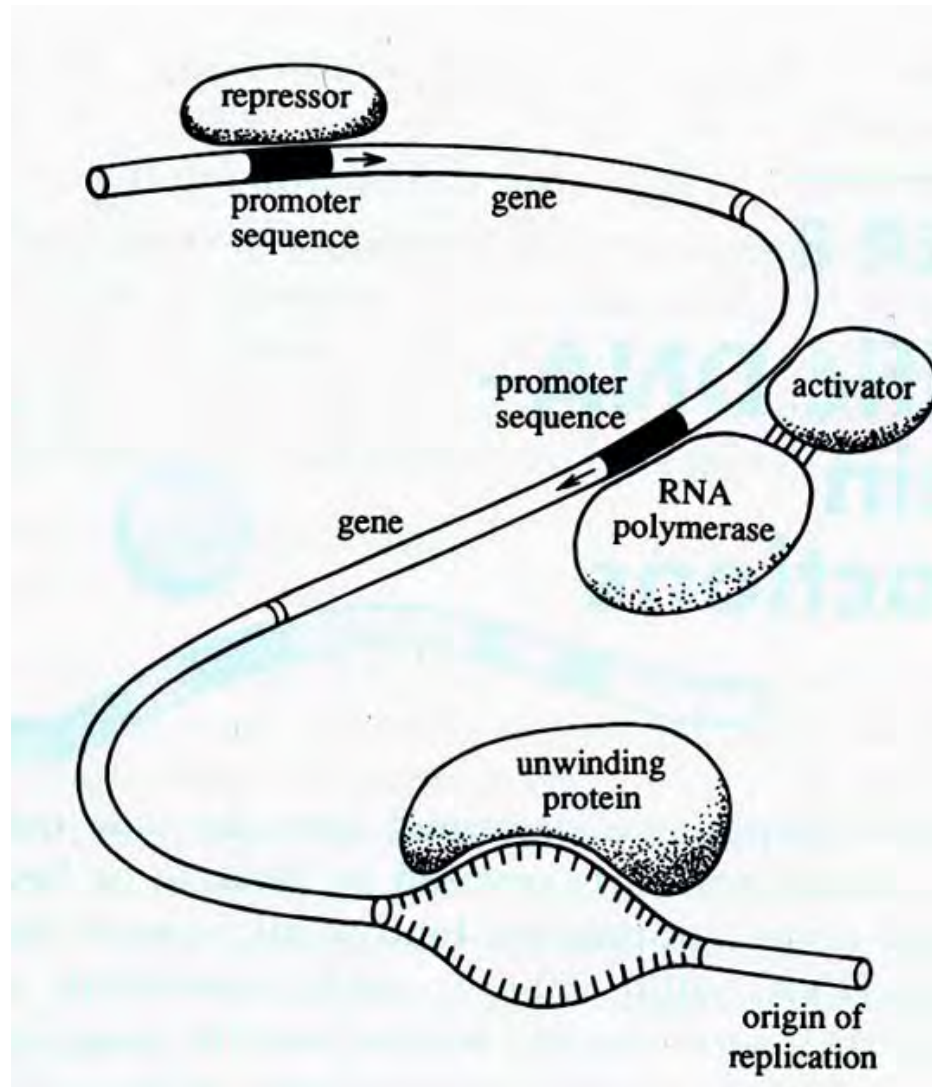
L-DNK

DNK zasićena kompleksom platine:
nastaje L („ladder“) L-DNK



$[(bipy)Pt(en)]^{2+}$ etilendiamin-(2,2'-bipiridin)platina(II)

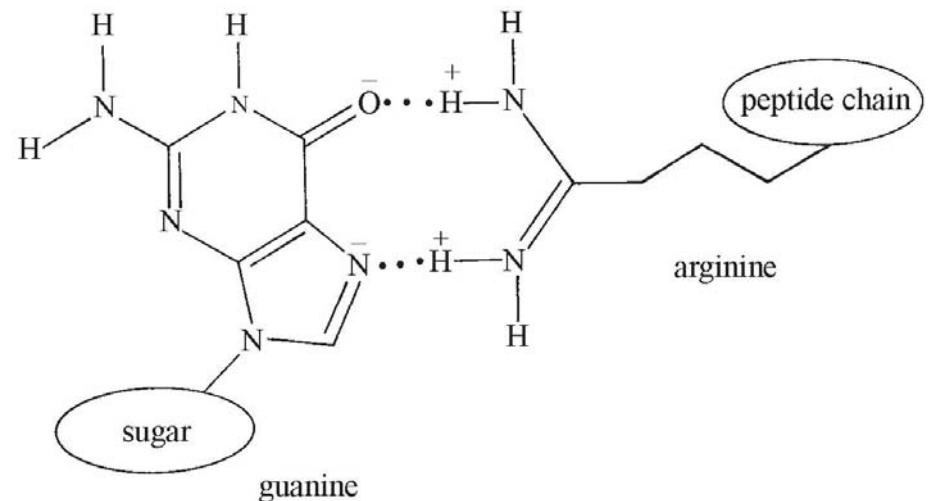
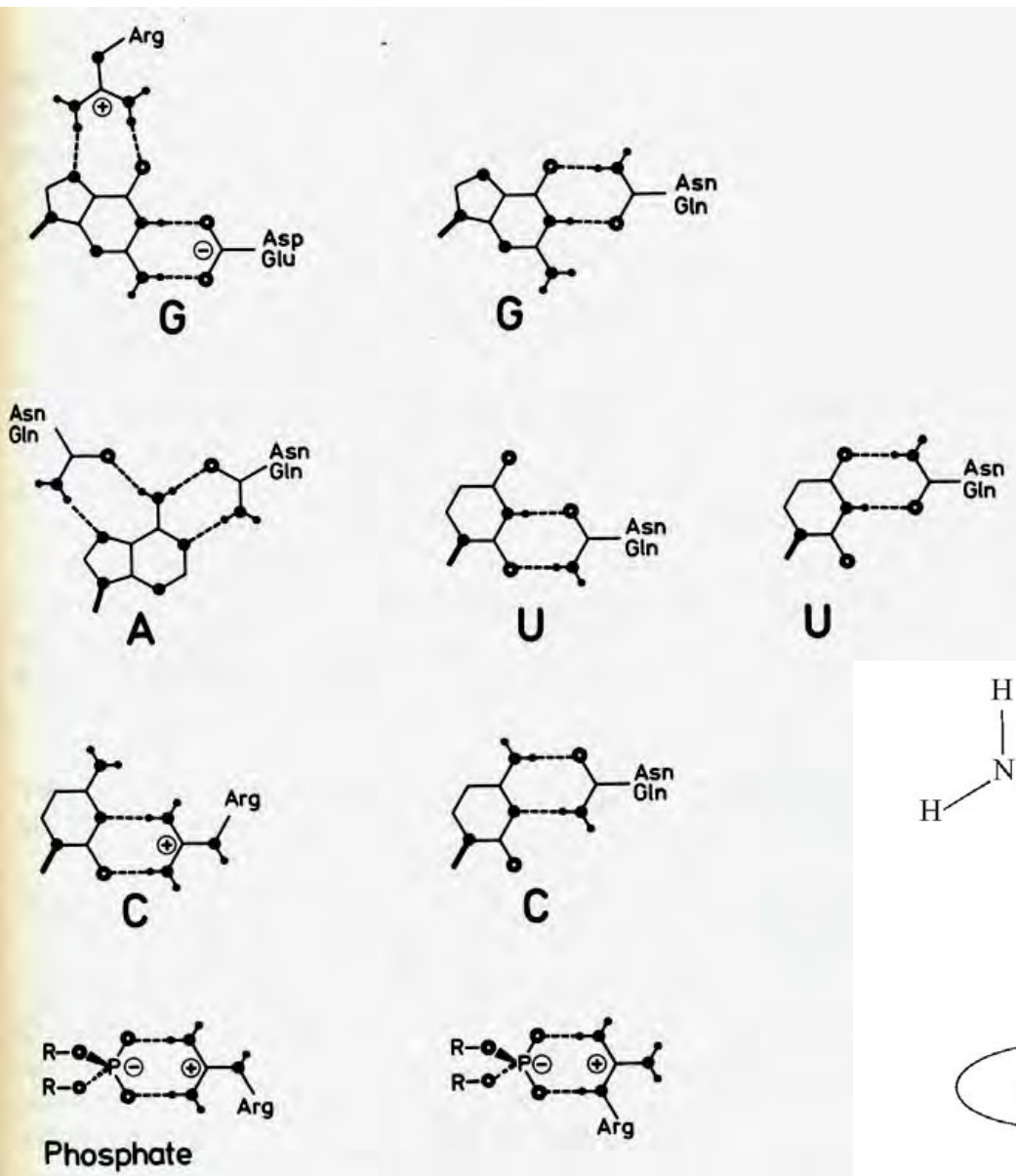
Kako proteini prepoznaju određene sekvence baza u DNK?



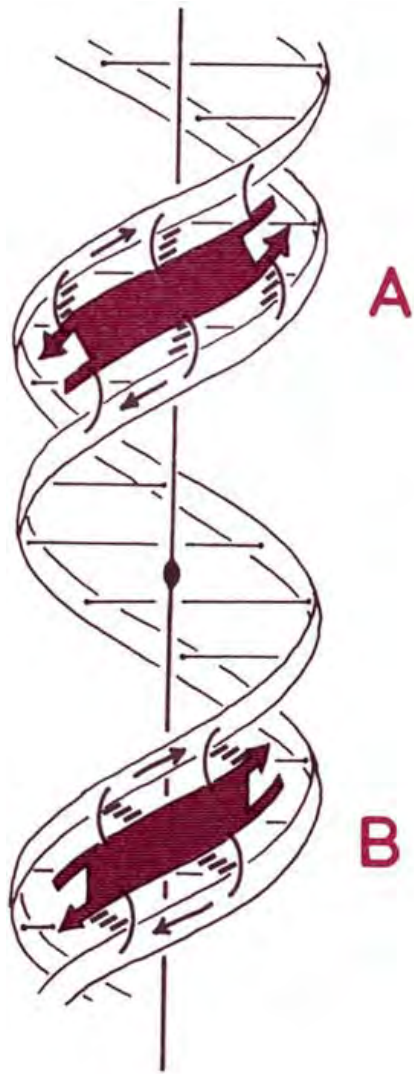
Interakcije između proteina i nukleinskih kiselina

- Sóni mostovi između fosfata i baznih ak ostataka
- **Vodonične veze** između fosfata, šećera i baza u NK i peptidnih veza i **hidrofilnih ak. ostataka**
- “Stacking” interakcije između aromatičnih ak. ostataka (Phe, Tyr, His i Trp) i nukl. baza
- Hidrofobne interakcije (efekat) između nukleinskih baza i nepolarnih aminokiselinskih ostataka

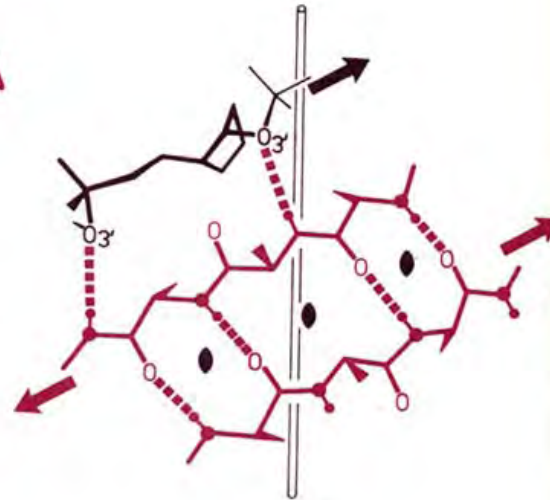
Interakcije aminokiselinskih ostataka sa nukleinskim bazama i fosfatom



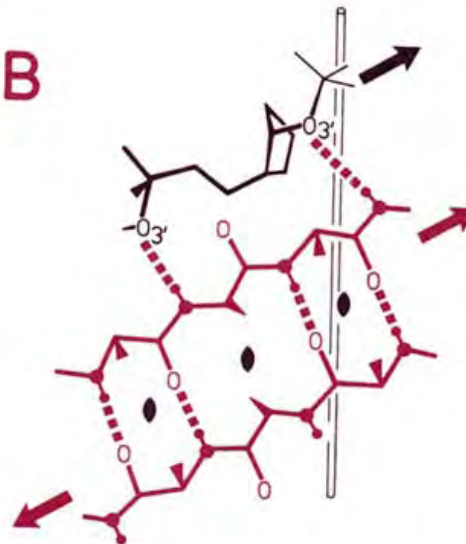
Vezivanje β -pločica



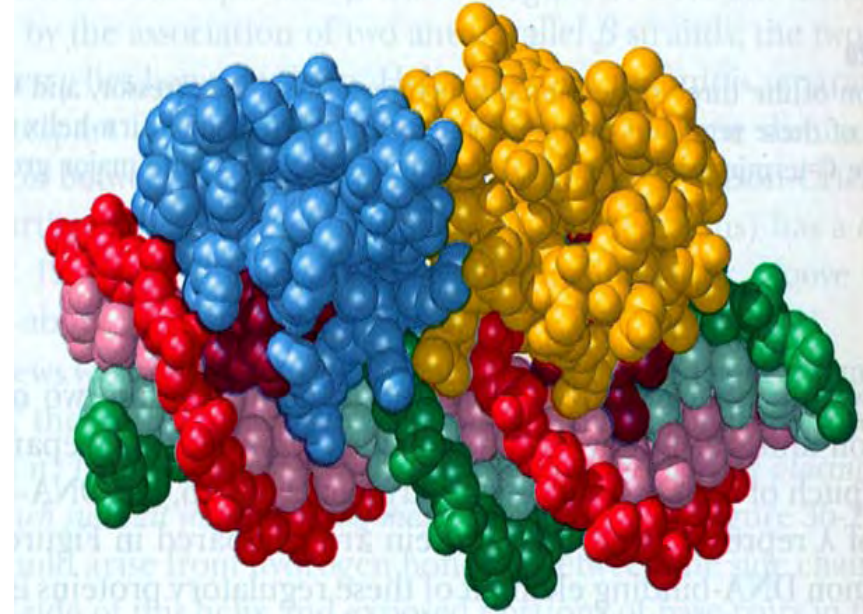
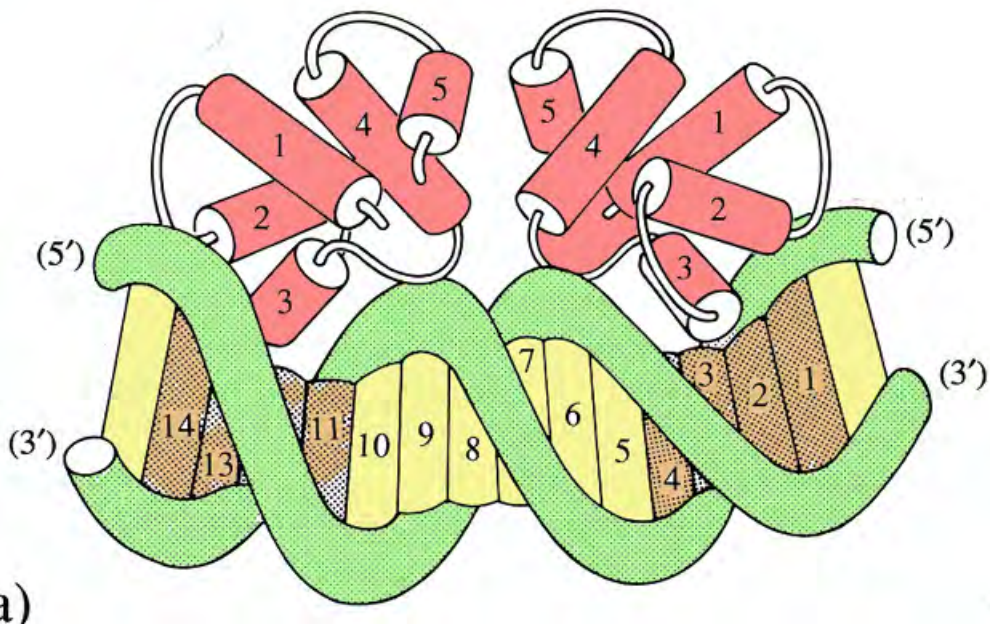
A



B

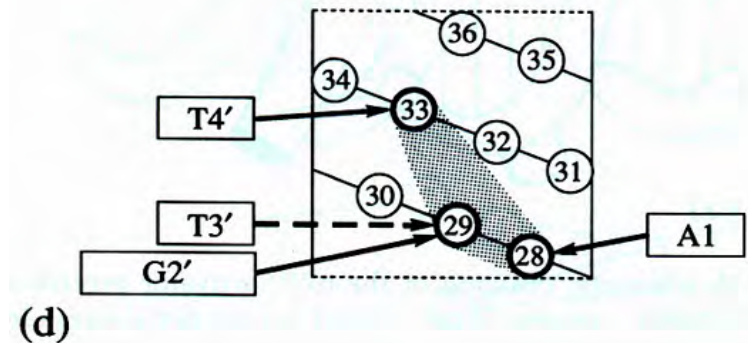
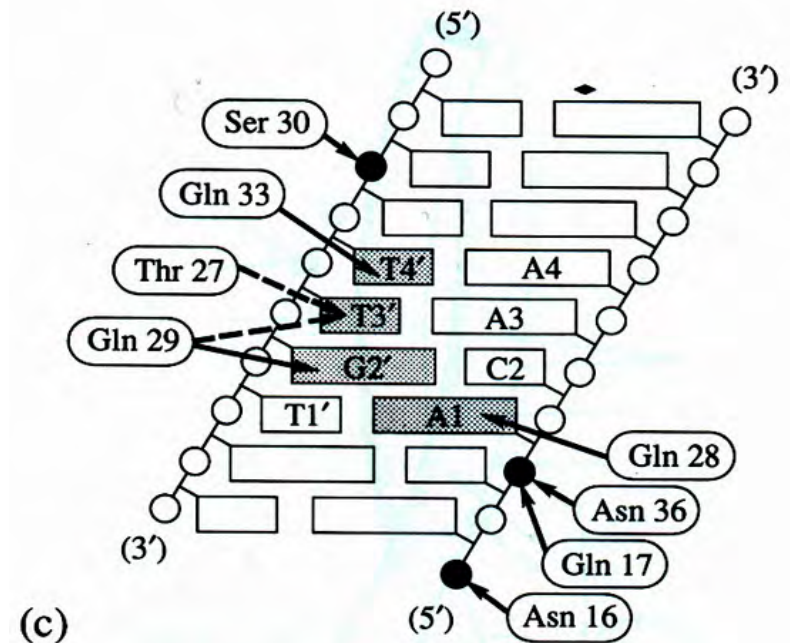
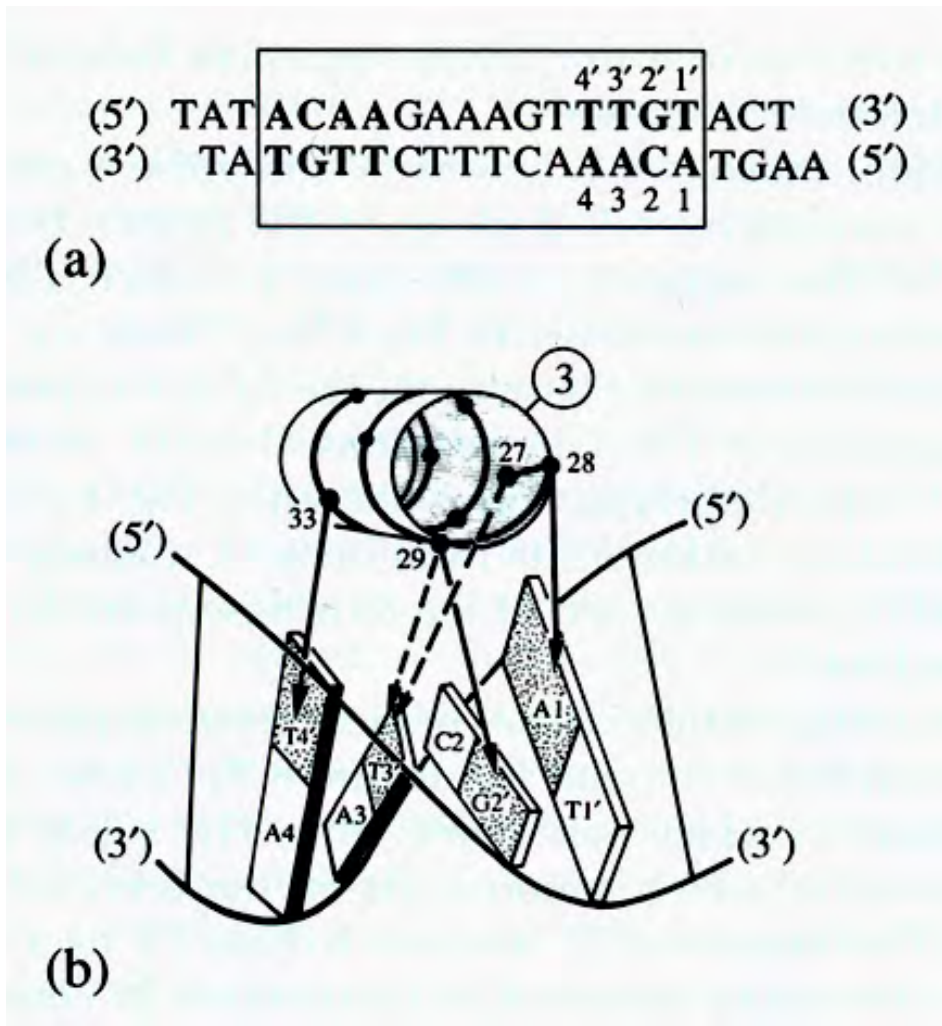


Vezivanje α -heliksa



434 represorni protein

Kontakti između baza i ak u 434



Leu “zipper”

