

## NUKLEIINHAPPED

### Kirjandus:

- 1) W. Saeger, **Principles of Nucleic Acid Structure** Springer Verlag 1984; 1988  
vene k. "Mir" 1987
- 2) Ch. Cantor, P. Schimmel **Biophysical Chemistry**. Freeman, San Francisco, CA 1980  
vene k. "Mir" 1987
- 3) Z.A. Shabarova, A.A. Bogdanov **Himija Nukleinovõh Kislot** "Himija" 1987
- 4) R. R. Sinden, **DNA structure and function**. Academic Press 1994 (Molbi õppetoolis, T. Tenisoni isiklik koopia)
- 5) V. A. Bloomfeld, D. M. Crothers, Tinoco, I. Jr. **Nucleic Acids Structures, properties, and functions**. University Science Books. Sausalito, CA. 2000 (Molbi õppetoolis)
- 6) **The RNA world** 2 edition. R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins (eds) ColdSpring Harbor Laboratory Press 1999 (Molbi õppetoolis)

### Bookmargid:

üldine sait nukleiinhapete struktuuri kohta näitlike õppematerjalidega:

[http://www.imb-jena.de/ImgLibDoc/nana/IMAGE\\_NANA.html](http://www.imb-jena.de/ImgLibDoc/nana/IMAGE_NANA.html)

DNA struktuur:

<http://www.umass.edu/microbio/chime/dna/>

<http://www.worthpublishers.com/lehninger3d/index.html>

aluspaarid:

[http://www.imb-jena.de/RNA\\_TINOCO.html](http://www.imb-jena.de/RNA_TINOCO.html)

mittekanoonilised aluspaarid RNAs:

<http://chem.bgsu.edu/rna/>

kasulik link nii aluspaaride kui paljude muude nukleiinhapete struktuuri puudutavates küsimustes on Jena (Saksa) Molekulaarse biotehnoloogia instituudi saidis:

<http://www.imb-jena.de/RNA.html>

RNA-d sisaldavate kristallstruktuuride loetelu koos PDB lühiaadressidega:

[http://www.imb-jena.de/IMAGE\\_RNA.html](http://www.imb-jena.de/IMAGE_RNA.html)

RNA webring sisaldab linke RNA ja RNA laborite kohta:

<http://homepages.ed.ac.uk/jeanb/RNAwebring.html>

## Sissejuhatus

Nukleiinhapped avastas F. Misher 1869 a. (DNA) ja nimetas selle nukleiiniks (leiti tuumast) hiljem osutus aine happeks.

Nukleiinhapete osa päriliku info säilitamisel selgus XX saj. 30. aastatel, veenvad katsed Avery (1944), Hershey ja Chase (1952).

DNA struktuurimudel, mis on klassikaliseks näiteks, kuidas molekuli struktuuri tundmine viib tema bioloogiliste funktsioonide mõistmisele: Watson ja Crick, 1953 (vt. J. D. Watson Kaksikspiraal, Loomingu Raamatukogu, 1972?).

Nukleiinhapped struktuurse komponendina (rRNA) 50. aastatel  
Nukleiinhapete osa informatsiooni ülekandel 50. lõpp

mRNA Jacob & Monod

tRNA Zamecnick, Hoghland

Katalüütiline funktsioon T.Cech 80.aastate algul

Ribosoomi struktuur 2000: T. Steitz, P. Moor (50S subühik *Haloarcula marismortui*)

V. Ramakrishnan (30S)

A. Yonath, F. Franceschi, F. Schluenzen (30S)

H. Noller, J. Cate, M. Yusupov (70S) kõik *Thermus thermophilus*

Nende töödega selgus lõplikult, et valke sünteesib RNA komponent ribosoomis, mis kinnitab RNA maailma hüpoteesi.

## Nukleiinhapete komponendid

Nukleotiid- lämmastikalus, suhkur, fosfaat

Nukleosiid

Nukleotiidid ja nukleosiidid osalevad paljudes ensümaatilistes reaktsioonides koensüümidena, olles katalüütiliseks komponendiks (NAD, FAD, etc)

Nukleotiidsed antibiootikumid (arabinotsütidiin, kordütsepiin, puromütsiin)

## Aatomite numeratsioon,

Keemilised sidemed ja valentsnurgad

## Nukleiinhapete uurimise füüsikalised meetodid

X-kiirte difraktsioon-analüüs

Tuumamagnetresonants ja Elektron- paramagnetresonants

NMR: prooton-NMR ja stabiilsete isotoopide kasutamine, metalliioonide sidumine

Tuumaresonants võrreldes valkudega vähem informatiivne (G ja U imidasoolse lämmastiku vesinikside, suhkru konformatsioon, Me<sup>+</sup> ionide sidumine etc.)

muud spektroskoopia meetodid: UV ja IR spektroskoopia

mikrokalorimeetria

neutronite hajumine

### **Vesiniksidemed nukleotiidide vahel**

vesiniksidemed on põhiline stabiliseeriv jõud nukleiinhapete sekundaarstruktuuris

vesiniksideme tüübid:

üldskeem X-H.....Y doonor-aktseptor

C-H.....O

N-H.....O

N-H.....N

(N-H.....S)

O-H.....N

H-sideme pikkus nukleotiidide vahel 2.82-2.95 Å

võrdluseks C<sup>4</sup>-C<sup>3</sup> 1.52Å

C<sup>3</sup>'-O<sup>3</sup>' 1.47Å

seega vesiniksidemed on vähemstabiilsed

Vesinikside lamastikaluste vahel, vesiniksideme tekkimise ja stabiliseerimise kooperatiivne iseloom vastavalt skeemile lk 137 Saengeri v.k. raamatus

### **Lämmastikaluste paardumine:**

Watson-Crick paarid:

A-T ja G-C paarid ühesuguse geomeetriaga, vahe C<sup>1'</sup> aatomite vahel on mõlemal paaril võrdne (10.85Å)

WC paaridel moodustuvad H-sidemed Py O<sup>4</sup>, N<sup>4</sup>; N<sup>3</sup>; O<sup>2</sup> ja Pu N<sup>6</sup>, O<sup>6</sup>; N<sup>1</sup>; N<sup>2</sup> vahel (skeem) antiparalleelne WC paardumine

pööratud WC paar

Hoosteen paar

teised paardumise võimalused (kolme ja enama aluse vahelised paarid)

Aluspaaride stabiilsus:

WC paarid	kcal/mol
G-C	16.79
A-T	7.00
A-U	7.21
Hoogsteen	
A-U	6.61
A-U (rev)	6.85
-----	
A-A	5.6
U-U	5.42
G-G	16.04
C-C	10.73
A-G	9.40
G-U	7.78

Aluspaaride stabiilsus seega on erinev ja Watson-Crick paarid ei ole kõige stabiilsemad.

Heeliksi moodustumise seisukohalt on kõige olulisem aluspaaride geomeetria, W-C paaridel geomeetria sarnane ja seetõttu on võimalik kooperatiivne heeliksi moodustumine, kui on tekkinud nukleatsiooni tsepter (3 paari)

### Stacking

Poly(A) ja AMP neeldumisspektreid võrreldes selgub, et poly(A) neelab vähem ja tema neeldumismaksimum on 3 nm väiksem. see on seletatav vertikaalse interaktsiooniga, kuna temp. tõustes poly(A) neeldumine suureneb

Paardumist nimetatakse ka horisontaalseks interaktsiooniks lämmastikaluste vahel, kuna stackingut kutsutakse vertikaalseks interaktsiooniks. Stacking põhineb Van Der Waalsi jõududel, diipol-diipol interaktsioonil aluspaaride vahel. Diipol-diipol vastastoimed: orientatsioonilised  $1/r^3$ ; induktsioonilised  $1/r^6$ ; dispersioonilised  $1/r^6$  (Londoni jõud) Stackingu stabiilsus sõltub aluste omavahelisest orientatsioonist ja on maksimaalne siis kui ühe nukleotiidi laetud grupp asub teise nukleotiidi hüdrofoobse osa kohal, laetud tuumaga alused ei stacku, stacking puriinide vahel on stabiilsem, Py->Pu ja Py-Py on vähemstabiilsed. Oluline on aluspaaride vaheline kaugus, 3.4 Å on harilikult. Kui 3' suunas on Pu on stacking selle suunaline, järelikult sõltub stacking lisaks nukleotiidsest koostisest ka järjestusest. C->G stack -14.59 kcal/mol kaheaheelalises nukleiin happes



Üheaheelalises nukleiin happes tekitab stacking spiraalseid struktuure.

Paardumine	Stacking
entalpia	entroopia
kooperatiivne	aditiivne
sõltub koostisest`	sõltub järjestusest ja koostisest

### **Kaksikahela vormid:**

heeliksi parameetrid

P - 360° rotatsioon

P - spiraali samm

n - korduvate elementide arv ühe pöörde kohta

h - kaugus kahe elemendi vahel

t - pöördenurk mööda spiraali kahe järjestikuse elemendi vahel

$$t=360^\circ/\pi$$

$$P=nh$$

A,B,C,D, P ja Z vormid DNA'l, tekkimise tingimused ja konformatsioonilised iseärasused

A,B, C vormid järjestusest sõltumatud

D, E, P ja Z vormid on järjestusest sõltuvad

aluste asend heeliksi telje suhtes, sümmeetria, suhkru konformatsioon erinevates vormides ja fosfaatide vaheline kaugus

suur ja väike vagu, aluspaaride asend suures või väikeses vaos

erinevate heeliksi tüüpide võrdlus

Erinevate vormide stabiilsus

DNA looduses (B ja Z vormid)

Superheeliks ja DNA topoloogilised probleemid  $L_k = L_n + W_r$

Superheeliksi tähtsus DNA stabiliseerimisel

DNA bending ja selle sõltuvus järjestusest ning bioloogiline tähtsus

Nukleiinhapped:

DNA struktuur

heeliksi parameetrid:

P - spiraali samm

n - korduvate elementide arv ühe pöörde kohta

h - kaugus kahe elemendi vahel

t - pöördenurk mööda spiraali kahe järjestikuse elemendi vahel

$$t=360^\circ/\pi$$

$$P=nh$$

DNA on paljudes eri vormides (tabel 9-1 Saengerist)

sekundaarstruktuuri vorm oleneb tingimustest, põhiline looduslik vorm on B-vorm heeliksi sümeetria  $10_1$

RNA on põhiliselt A või A' vormis ( $11_1$  või  $12_1$ )

RNA-DNA hübriid on A-vormis

Nagu tabelis näha sõltub kristalse DNA struktuur vee konstretratsioonist ja ioonsetest tingimustest aga põhiliselt siiski DNA nukleotiidses koostisesest ja mõnel juhul ka järjestusest (D, E, Z vormid).

A ja B vormide võrdlus:

	Suhkru konform	fosfaatide kaugus	aluste rotats	kaugus
A vorm	$C_3'$ endo	5,9 Å	30-32,7°	2.56-3.29 Å
B vorm	$C_2'$ endo	7 Å	36-45°	3.0-3.37 Å

Erinev arv paare ühe täispöörde kohta tähendab aluspaaride erinevat pöördenurka (tilt vt. joonis), mis omakorda viib erineva stackingu tekkimisele: mida lähemal on aluspaarid üksteisele, seda suurem on stacking. Järelikult A-vorm on stabiilsem kui B vorm, kuna seda stabiliseerib suurem stacking. Teisest küljest on fosfaatide vaheline tõukejõud vastupidise toimega. Ka DNA-RNA hübriid on stabiilsem kui DNA.

Teisest küljest on B-DNA'l ahelate vaheline stacking stabiilsem kui A-vormil

B-DNA on kõige painduvam vorm, kõverdumine ühe täispöörde kohta kuni 19 kraadi järjestusest sõltuvalt on konformatsiooni vabadus erinev. B-vormis DNA'l võib tekkida üle- ja alapöördumine.

Jooniselt 11-2 ja 11-3 sek str. ja Cantor & Schimmel (displacement)

Suur ja väike vagu B-DNA'l, suur vagu lahusele ja ligandidele kättesaadav (ka interkaleeruvad värvid EtBr näiteks)

A-vormil on suur ja väike vagu sarnasemad, vahe on põhiliselt sügavuses.

A-vormis on suur vagu kättesaadav ainult  $Me^+$  ionidele ja solvendile

B-vormis DNA on kõige painduvam konformatsioon, ka suhkru konformatsioonis esineb suuri erinevusi (hiljem bent või kaldunud DNA). Ühe täispöörde peale on võimalik pöördenurk 19°. Seega on looduslik DNA kompromiss stabiilsuse ja painduvuse vahel.

Vasakpoolse vindiga DNA Z-DNA

mudeljärjestus poly(dG-dC) 0,7 M  $MgCl_2$  või 2,5 M NaCl või alkoholi manulusel paardumine syn-Pu/anti-Py

dC 2' endo anti

dG 3' endo syn

WC paarid antiparalleelsed

Intra-ahelaline stack on normaalne

Inter-ahelaline stack dG stackub O4' ga

Fosfaatide vaheline kaugus on vahelduv 6,2 või 7,6 Å

Z-vormil on ainult väike vagu, suures vaos asuvad alused

Z-vormi stabiliseerivad natiivses DNA's polüamiinid

$dm^5C$ , mis esineb sageli eukarüootses DNA's stabiliseerib Z-vormi

Looduses esineb Z-DNA nii supehelikaalsetes plasmiidides kui kromosoomides (antiZ-DNA antikehad reageerivad polüteensete kromosoomidega)  
Z-vorm ei moodusta nukleosoomi ega seo histooni  
Z-DNA ja B-DNA üleminekul tekivad üheaahelised osad, mida saab spetsiifiliselt määrata bromoatsetaldehyüdi, kloroatsetaldehyüdi, osmium tetroksiidi või hüdroksüülamiiniga reageerimise järgi.  
dietüülpürokarbonaat reageerib eelistatult puriinidega (N7) Z-DNA's  
ka fenantroliini derivaadid on spetsiifilised Z-vormile, aga see tuleb hiljem RNA juures

Bent-DNA ehk kõverdunud DNA

esineb promotore ja enhanserite läheduses sageli UAS'na

Kõverdumine tekib perioodilise kaldumise tulemusena, mis omakorda on põhjustatud ebakorrapärasest stackist (vt. Sinden lk. 64)

DNA kõverdumine põhjustab aberratiivset liikuvust PAAGis (aeglasem liikumine, mida seletatakse DNA paindumise vähenemisega ja seega geeli võrgustiku halvema läbivusega).

Valgud indutseerivad DNA kõverdumist (AraC seondub kolme kohaga operaatorjärjestuses) vt. Sinden lk. 76

SV40 T antigeeni sidumist soodustab kõverdus, mis on tekitatud kahe 5bp sidumiskoha vahel paikneva A-trackti poolt

$\lambda$ -faagi replikatsiooniks on vajalik O-valgu sidumine, mida stabiliseerib nelja sidumiskoha vaheliste A-tracktide poolt indutseeritud kõverdumised.

rRNA operonide UAS sisaldab fis-valgu sidumiskohti, mida stabiliseerib seal paiknev kõverdus

## DNA kõrgemat järku struktuurid

Tihedalt pakkunud DNA  $\Psi$ DNA

B-DNA biheeliksid on 38 Å vahega.

Etanooliga sadestamisel tekivad saranased struktuurid olenevalt ioonsest jõust.

Kromosoomides on DNA superkoilitult (kuni  $10^{10}$  aluspaari)

Bakteri kromosoomis on tuumaks RNA ja aluselised valgud, kromosoomidel perioodiline side membraanidega.

Inimese kromosoomistik  $3 \times 10^9$  aluspaari, DNA/histoon 1/1 vahekorras

Nukleosoom on 160-250 bp, millest DNAasiga tekivad 146 bp jupid

nukleosoomid moodustavad supervinte, iga nukleosoom sisaldab 1,75 pööret ja selle südamik on 45 Å

## Topoloogia

Ahelate seotus Lk või L (parempoolne vint positiivne)

Pööre Tw

Homogeenses kaheaahelises  $L=T$

Supervint  $L=T+W$ , ka see võib olla negatiivne kui on vasakpidine.

vt. Sinden lk 102

negatiivse L numbriga Z-DNA'l on DNA topoloogias suur tähtsus, kuna see aitab supevinte tekitada ilma topoisomeraaside abita

Topoisomeraasid ja helikaasid

DNA riststruktuurid (cruciforms)

DNA järjestuse sümmeetria tüübid:

pööratud järjestused e. palindroomid

peegeljärjestused

otsesed kordused

(joon. lk. 135 Sinden)

palindroomsed järjestused võivad tekitada risstruktuure (joon. lk. 142 Sinden)

risti tekkeks on vajalik aktivatsiooni energia, mis tuleb neaktiivsest supekoilist, see on kõik või mitte midagi protsess ja juhul kui näiteks plasmidi järjestus võimaldab risti teket siis teatud arvu supervintide puhul, tekib rist kõigil molekulidel.

Riststruktuuride bioloogiline roll

Paljude restriктаaside ja ka muude valkude sidumiskohad on palindroomsed

(dimeersed repressorid)

paljude plasmiidide ja viiruste ori piirkondades esineb palindroome

### **Nukleiinhapete kolmikahelalised vormid:**

H-vorm: Hoogsteen + WC paarid

Järjestusest sõltuv: Pu motiiv ja Py motiiv kolmikahela tekkes.

Kolmas ahel stabiliseerib struktuuri, aga 3. ahela seondumine on nõrgem võrreldes W-C paardumisel tekkiva 2-ahelaga.

Kolmikahel on ligandidele halvemini kättesaadav, ei seo järjestuse spetsiifilisi ligande (regulaatorvalgud)

### **Kaksik- ja kolmikahelaliste vormide stabiilsus:**

Paardumist mõjutavad keskkonna tegurid: temperatuur, pH, ühe- ja kahevalentsete ionide kontsentratsioon, H... sidemete konkurents, keskkonna polaarsus (vee kontsentratsioon), NA'ga seonduvad ligandid: polüamiinid, interkaleeruvad ligandid.

Valguse neelamine ja selle sõltuvus olenevalt aluspaaride koostisest, paardumisest ja stackingust. Neeldumisspekter tuleneb osalaengute jaotusest lämmastikaluste tuumades, mida ühtlasem laengute jaotus, seda suurem aromaatsus ja seega neelduvus 260 nm juures. Vesiniksidemete moodustumisel tekib ebahühtlane osalaengute jaotus, mis viib aromaatsuse ja neelduvuse vähenemisele.

Hüpokroomne efekt  $H_y(\%) = 100(A_{den} - A_{nat})/A_{den}$  on absorptsiooni (valguse neeldumise) vähenemine nukleiinhappe lämmastikaluste interaktsioonide tulemusena. Näiteks

kaksikahelalise struktuuri teke alusparandumise tulemusel, mille juures valguse neeldumine 260 nm juures väheneb 25-30%.

Neeldumisspektri alusel nukleiinhappe omaduste määramine: sulamiskõver näitab nii nukleotiidset koostist kui paardumist. A-T ja G-C paaridel on hüpokroomne efekt erinev 260 ja 280 nm juures, mis võimaldab määrata eri paaride osa nukleiinhappe struktuuris.

Termodünaamilised parameetrid:

Vant'Hoffi seadus

### **DNA oligonukleotiidide keemiline süntees:**

Forfotriester meetod

Fosforamidiit meetod

### **Metalliioonide sidumine RNA'le**

Üheaheelaline RNA seob  $Me^{2+}$  ioone  $K_d=0.1-10$  mM, NMP  $K_d>10$  mM mis näitab, et polinukleotiid seob  $Me^{2+}$  ioone spetsiifiliselt, tõenäoliselt kahe järjestikuse fosfaadi vahele. Juba väikestes kontsentratsioonides ( $< 10$  mM) tõstavad  $Me^{2+}$   $T_m$ 'i. Struktureeritud RNA'del on nõrgad ja tugevad sidumiskohad, viimased näitavad sidumistaskute olemasolu.

Kõige paremini tuntud tRNA  $Me^{2+}$  sidumiskohad (Tabel 3) Erinevatel ioonidel on erinevad sidumiskohad (joonis 2) Tugevad seondumiskohad moodustuvad koordinatiivsete sidemete abil fosfaatide hapnikuga (joon. 1)

### **RNA hüdrolyüs $Me^{2+}$ vahendusel**

2'-OH on nukleofiil, mis tekitab 2'-3' tsüklilise fosfaadi ja 5'OH. Selline mehhanism on iseloomulik aluselisele hüdrolyüsile ja paljudele RNAsidele. Metallioonid koordineerivad hapniku aatomeid. (joon. 4)

### **Ribosüümid**

T. R. Cech, 90 Annu. Rev. Biochem, R. H. Symons, ibid. 92, T. R. Cech ..... A. M. Pyle, JBC, 92

valgusüntees: P. Nissen, et al., 2000 Nature **286**, 920-930

Ribosüümid poolt katalüüsitud reaktsioonid:

-RNA fosfodiesterideme hüdrolyüs (*in cis* ja *in trans*)

- RNA ligeerimine
- RNA polümeerisatsioon
- RNA replikatsioon
- 2'3' tsüklofosfaadi hüdroolüüs
- fosfomonoestersideme reaktsioonid
- karbonüülse süsiniku reaktsioonid
- valgu biosüntees

### **Spalisingu tüübid** (Cech, 90, joon 1)

Grupp I self-spicing, enamuuritud (esimesena) *Tetrahymena termophila* tuuma rRNA intron (Neurospora ja *Saccaromyces*'e mt-mRNA ja rRNA intronid), T4, SP01 pre-mRNA jt. Iseloomulik on tsüklilise RNA teke ja G kofaktori lülitumine, mille järgi neid kõige sagedamini otsitakse.

Reaktsioonid (Cech, joon 2) kaks järjestikust transesterifitseerimist. 5' sait on UpA, mida G atakeerib, see side on iseenesest nõrk. Ligeerumistsentri fosfaat on pärit GpU. Vaheühend sisaldab introni 3' eksoni küljes, mis on leitud nii *in vitro* kui *in vivo*. GI introni sek ja ters struktuur, konserveerunud tuum ja variaabel väline osa, konserveerunud üksteisest kaugel (prim str.) asuvad osad, mis ei ole intron-ekson piiri lähedal.