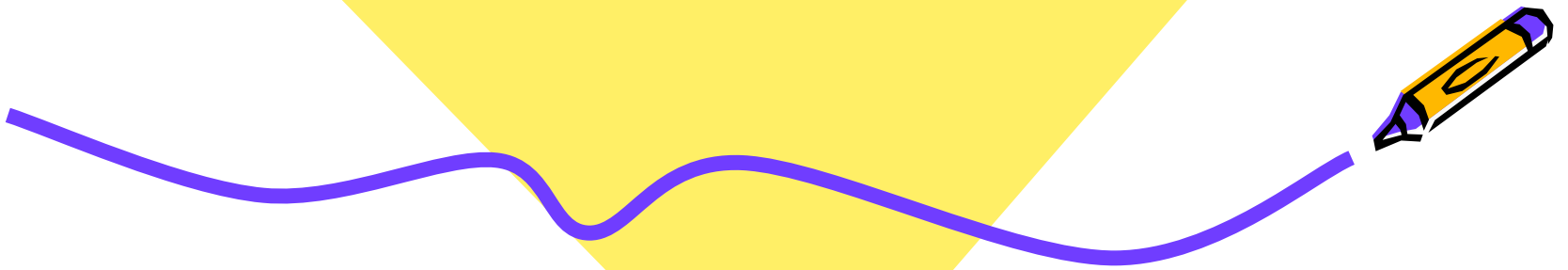




DNK
STRUKTURA





- **1865.** Gregor Mendel - Klasični principi genetike
- **1900** - pretpostavljena uloga hromozoma kao nosilaca genetske informacije
- **Do 1915.godine** skoro sto gena je mapirano na 4 hromozoma *Drosophila-e*
- **1909.godine** prva pretpostavka o postojanju veze između gena i enzima (fenilketonurija)
- **1941.** George Beadle and Edward Tatum Dokaz povezanosti gena sa sintezom enzima-problem prihvatanja da DNK predstavlja genetski materijal obzirom na jednostavnost njene strukture





- **Crick and Watson** su 1953. godine opisali strukturu DNK kao dvostruki uvijeni heliks u kome parovi baza (adenin - timin i citozin -guanin) održavaju dva lanca zajedno.

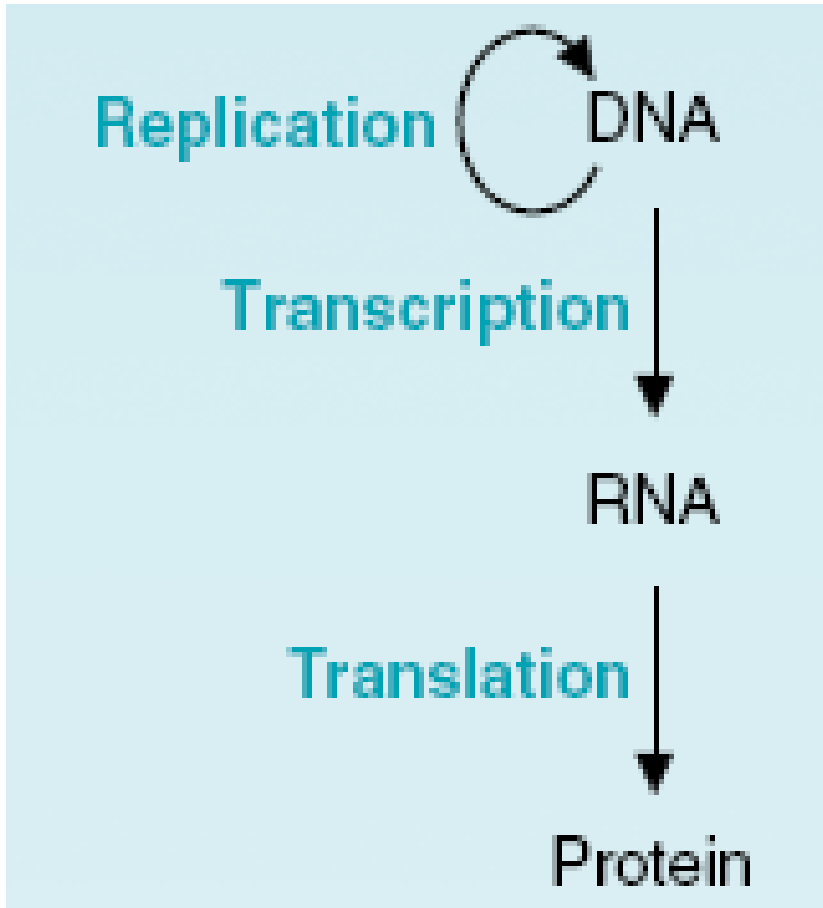




- *Nukleotidi su monomerne jedinice nukleinskih kiselina, DNK i RNK. Svaki nukleotid se sastoji od heterociklične azotne baze, šećera i fosfata.*
- *DNK sadrži purinske baze adenin (A) i guanin (G) i pirimidinske baze citozin (C) i timin (T). RNK sadrži A, G, i C, uz uracil (U) umesto timina. U DNK, šećer je deoksiriboza, dok je u RNK to riboza.*



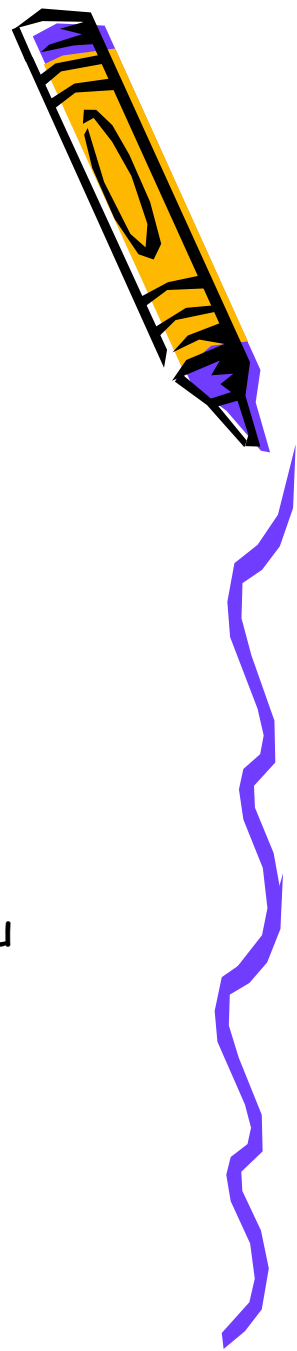
DNK - struktura



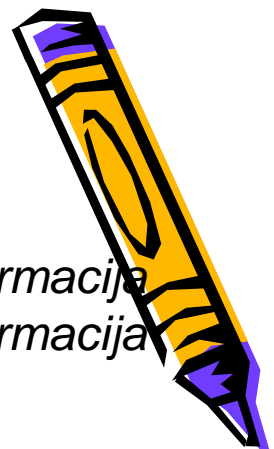
Replikacija:
DNK služi kao matrica za
dobijanje kopija DNK.

Transkripcija:
DNK služi kao matrica za
sintezu RNK.

Translacija:
RNK obezbeđuje informaciju
za sintezu proteina

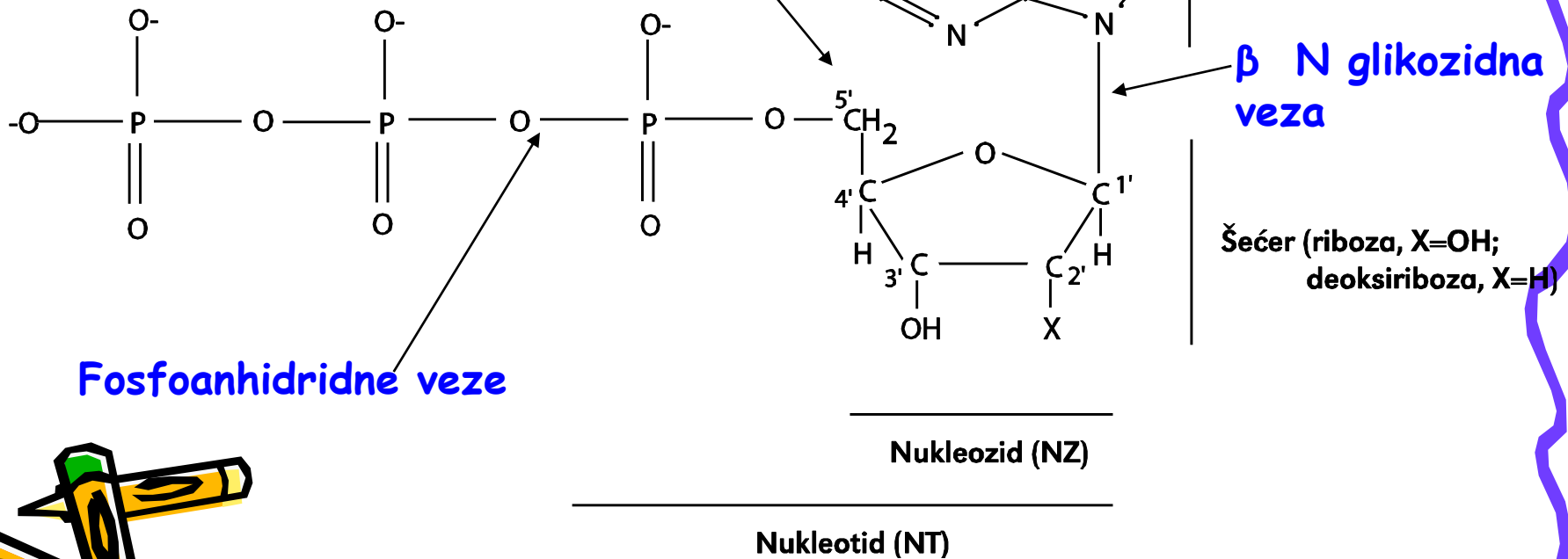


Šema nukleotida



Syn konformacija
Anti konformacija

H_3PO_4 najčešće esterifikuje OH grupu u položaju 5

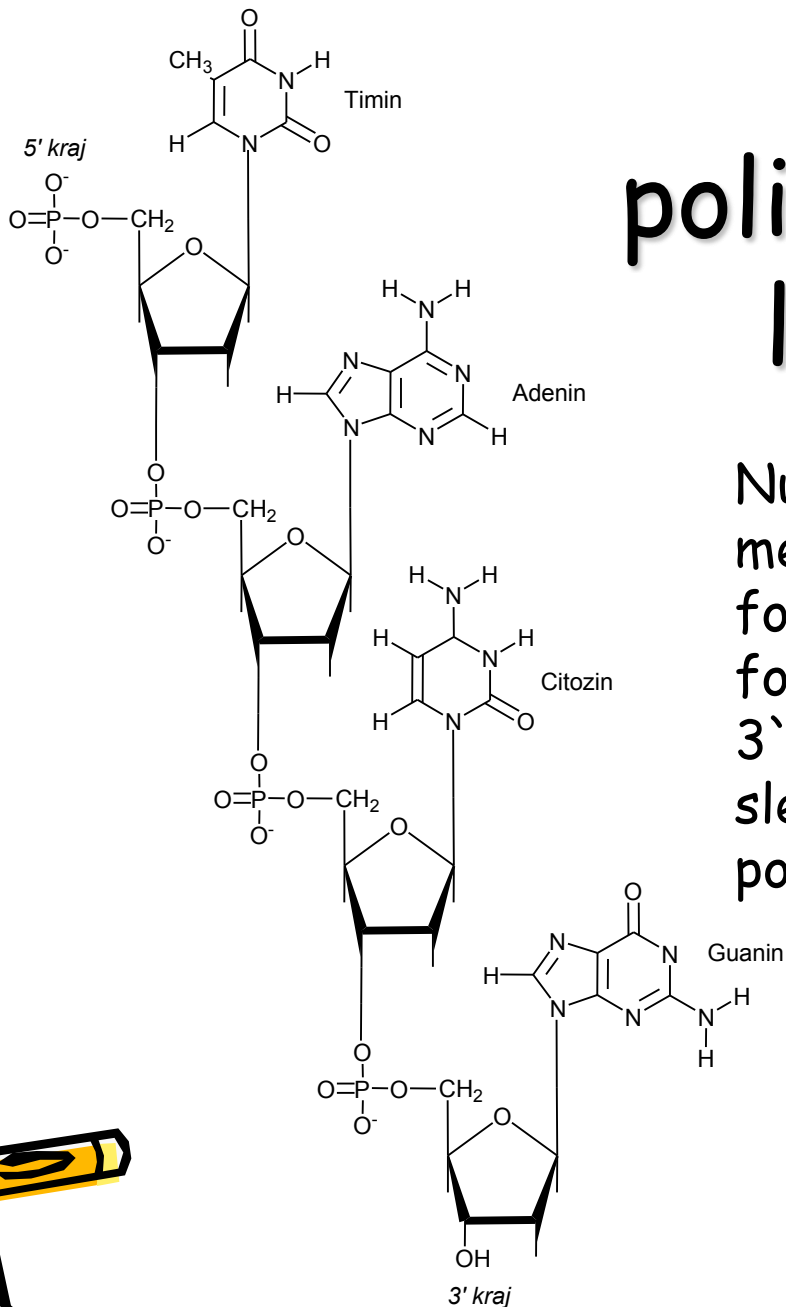


Uloga nukleotida u organizmu:

- Nukleotidi su prekursori nukleinskih kiselina
- Derivati nukleotida su intermedijeri u mnogim procesima biosinteze (UDP glukoza)
- ATP je univerzalni izvor energije u biološkim sistemima
- Nukleotidi ulaze u sastav koenzima (NAD, NADP, FAD)
- Nukleotidi imaju ulogu fizioloških medjatora (adenozin, ADP, cAMP, cGMP, GTP)



Segment polinukleotidnog lanca DNK

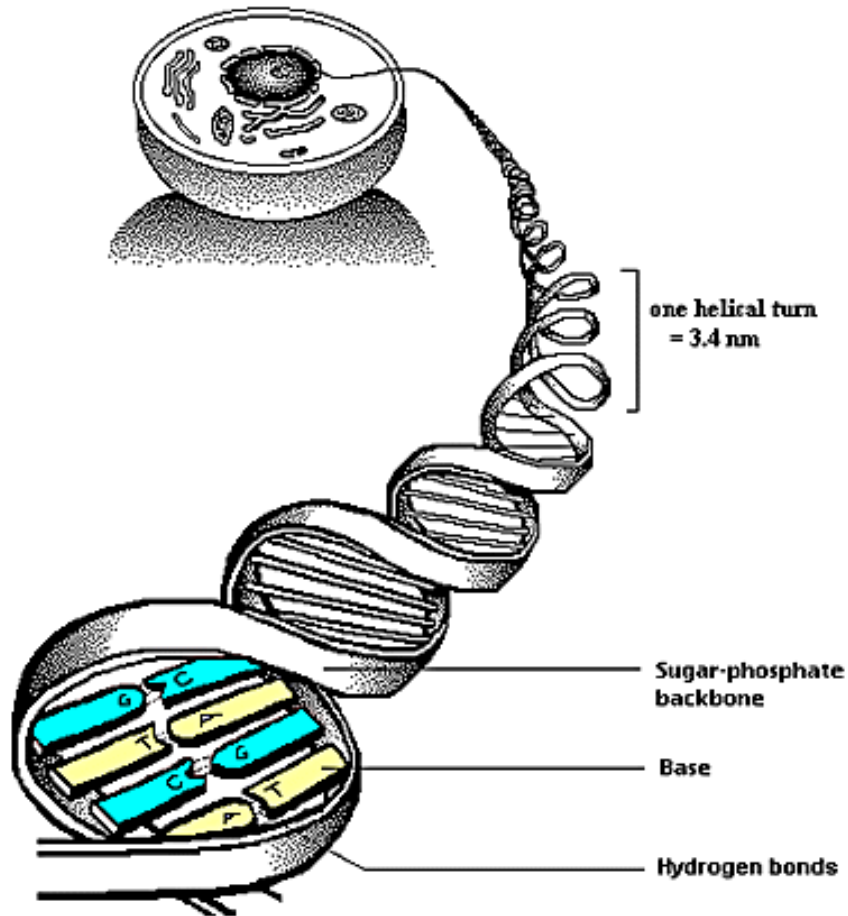


Nukleotidni monomeri su međusobno povezani preko fosfata, koji grade fosfodiesterasku vezu između 3` C jednog šećera i 5` C sledećeg šećera duž polinukleotidnog lanca

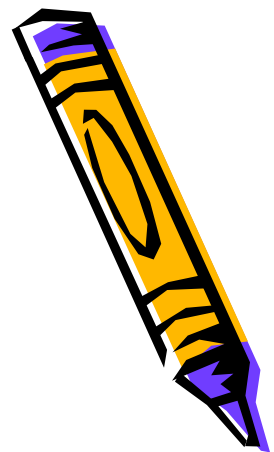


Struktura DNK

THE STRUCTURE OF DNA

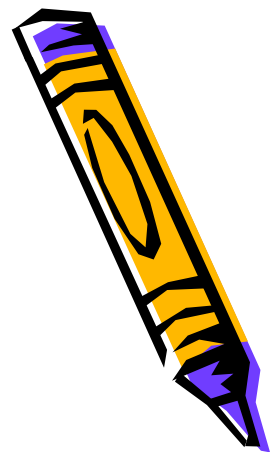
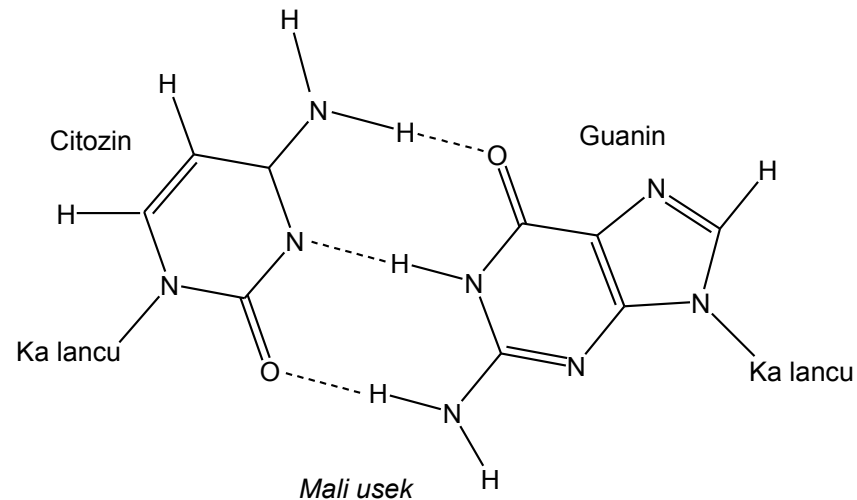
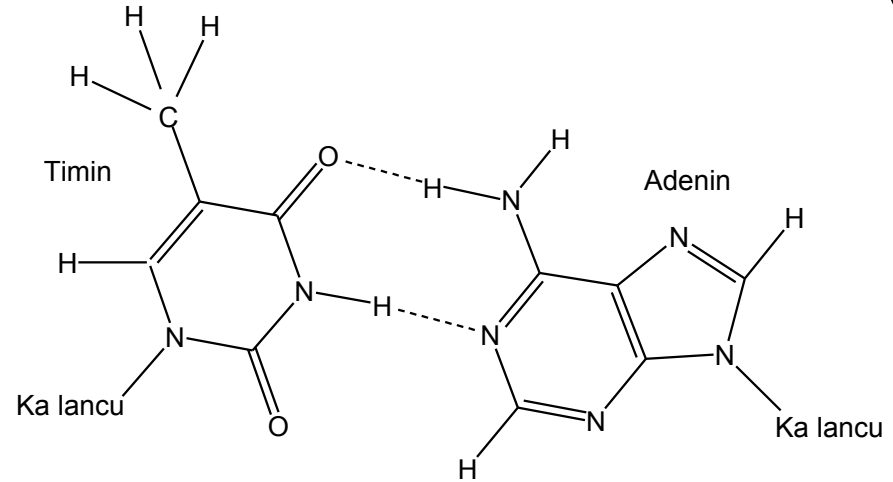


- Molekul DNK se sastoji od dva duga polinukleotidna lanca građena od deoksinukleotida.



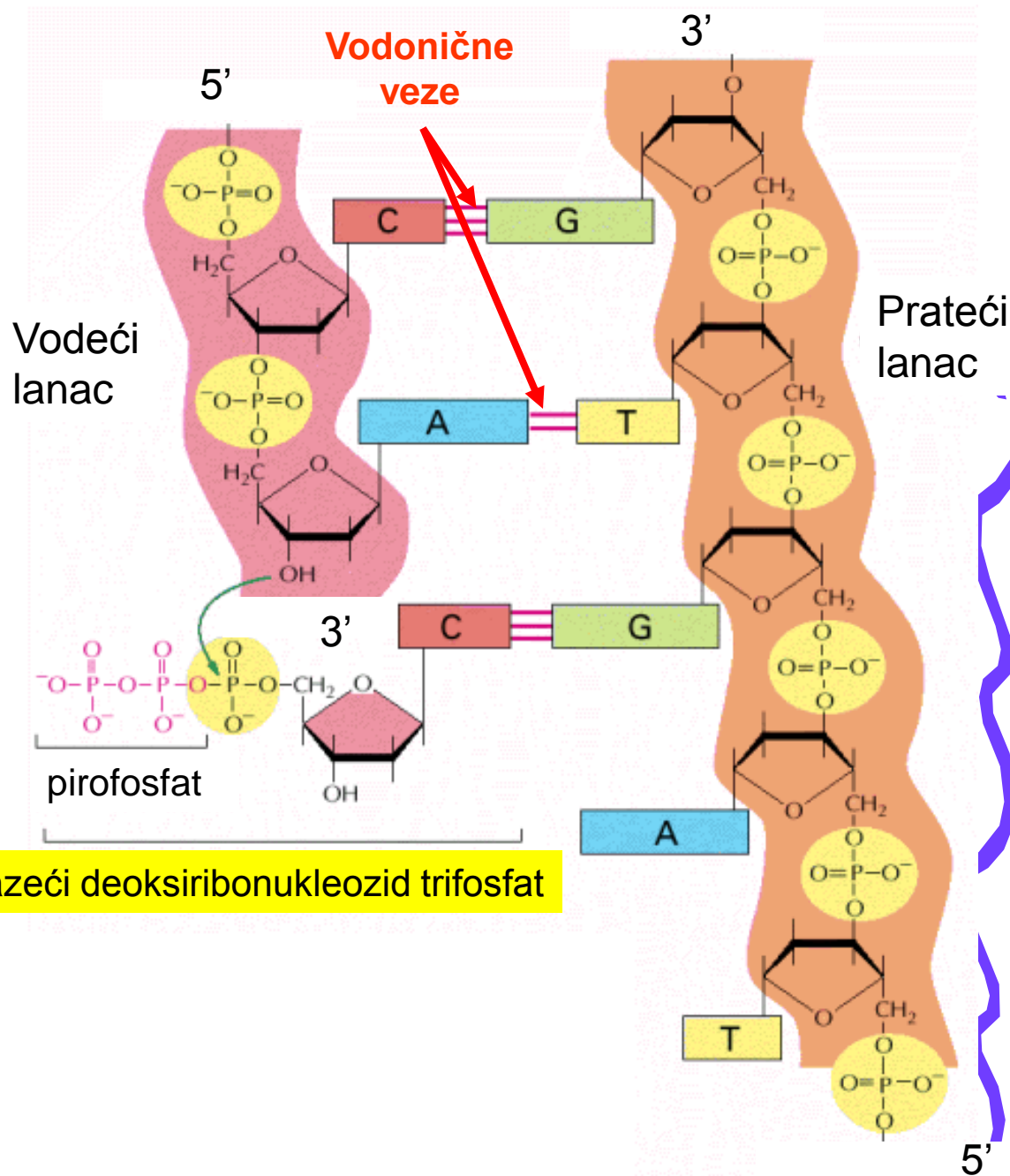
DNK - sparivanje baza

- Dva polinukleotidna lanca su međusobno povezana vodoničnim vezama koje se uspostavljaju između baza (purin se pirimidinom)
- Zahvaljujući komplementarnosti u sparivanju baza, dva lanca DNK su komplementarna
- Koncept komplementarnosti u sparivanju baza je od suštinske važnosti za replikaciju, transkripciju i translaciju

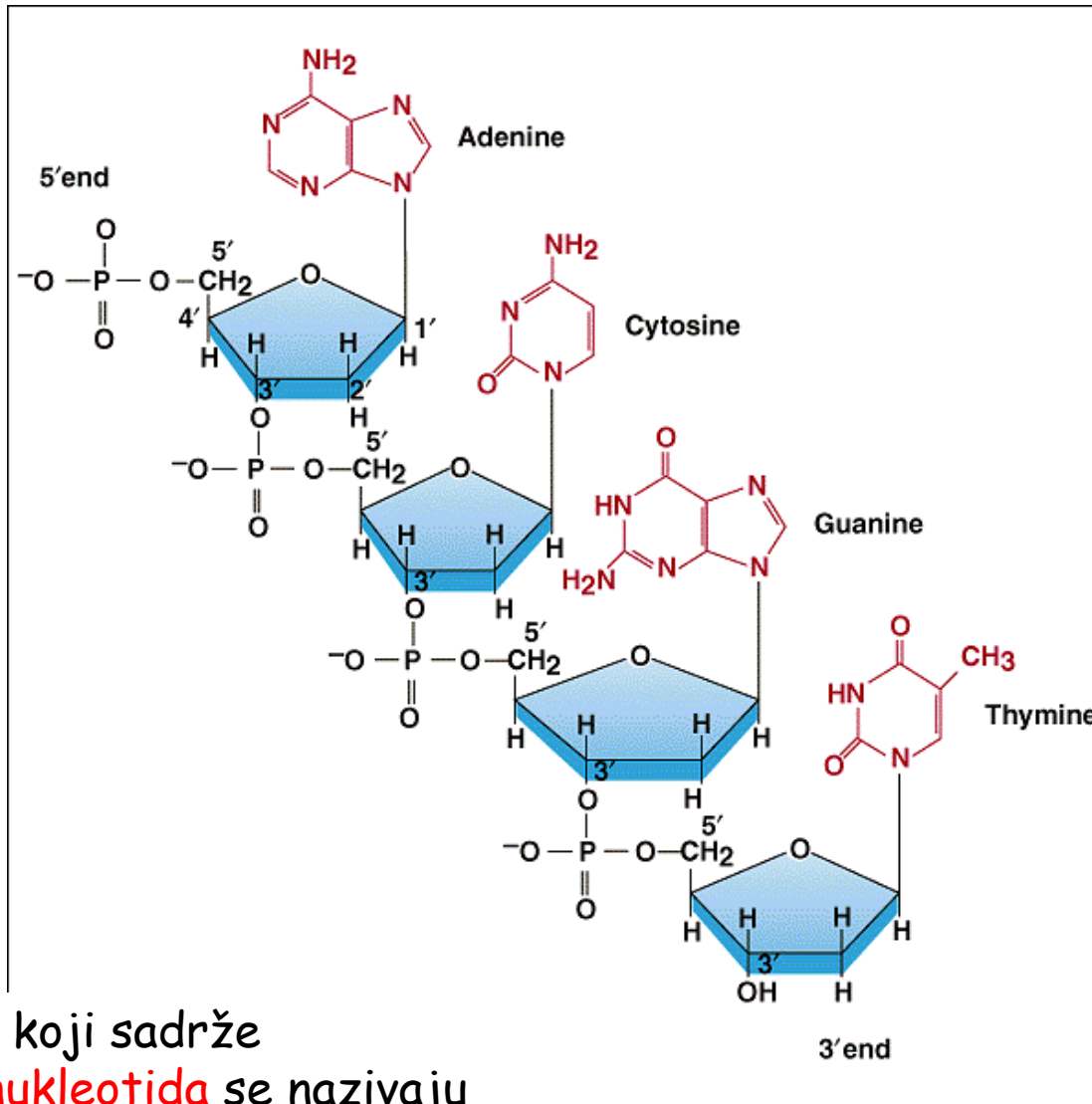
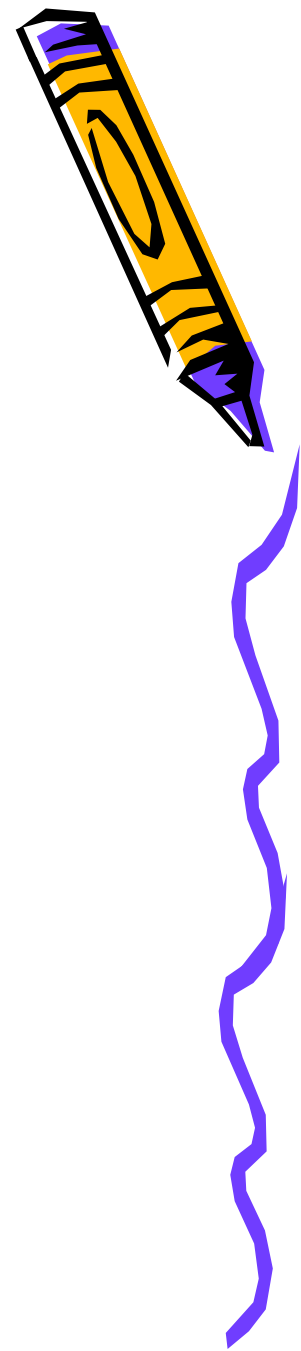


Nukleinske kiseline su polimeri nukleozid monofosfata koji su međusobno povezani fosfodiesterarskim vezama.

Specifično sparivanje baza (A i T; C i G) u molekulu DNK označava se kao **komplementarnost**

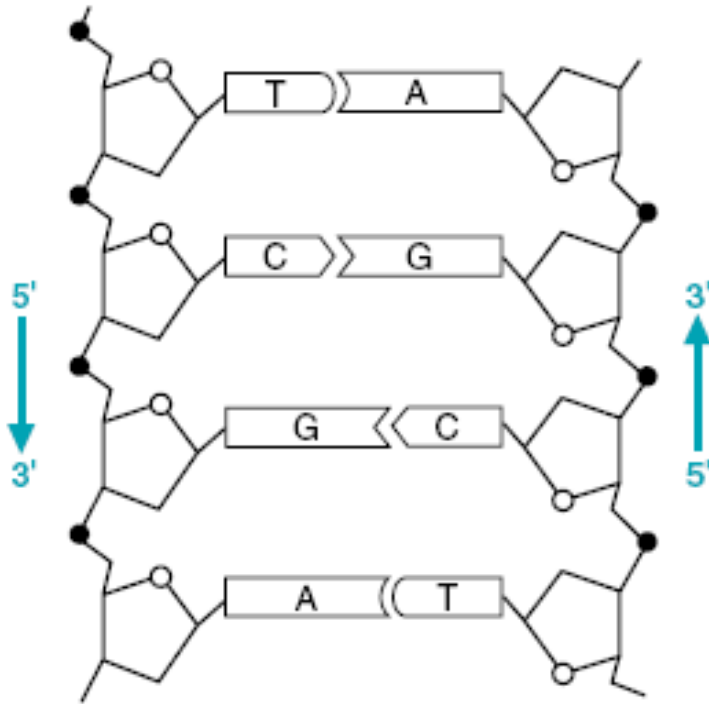


Struktura polinukleotidnog segmenta DNK



Polimeri koji sadrže
manje od 20-30 nukleotida se nazivaju
oligonukleotidi

DNK - lanci su postavljeni antiparalelno



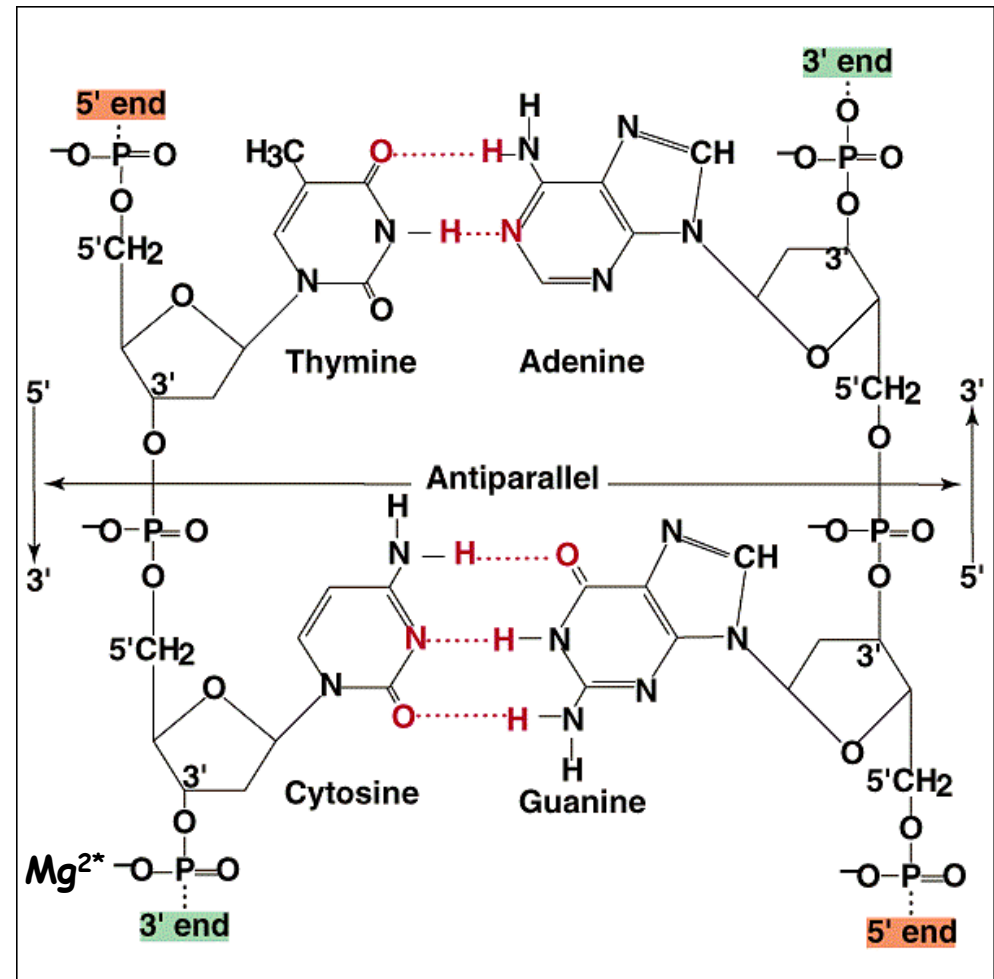
Dva komplementarna lanca su suprotno orijentisana. U jednom lancu, 5'C šećera je iznad 3'C (5'C → 3'C pravac). U drugom lancu, 3'C je iznad 5'C (3'C → 5'C pravac).

Kako je u svakom paru purinska veza povezana sa pirimidinskom, lanci DNK se nalaze podjednako udaljeni celom svojom dužinom

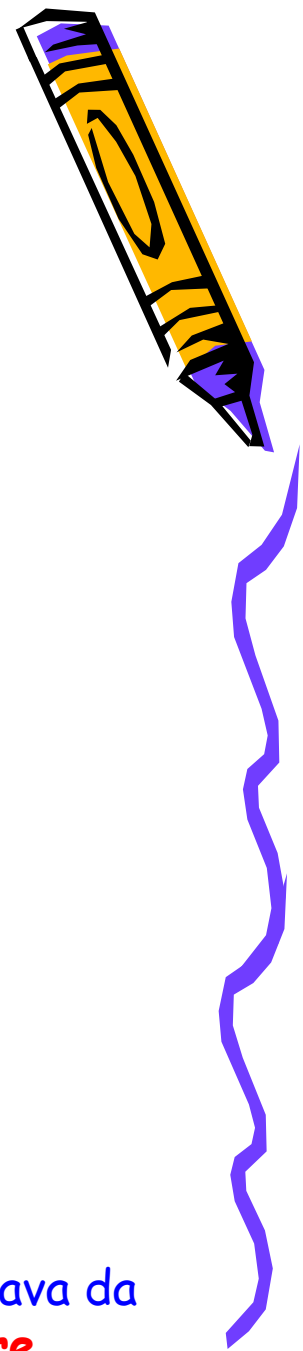
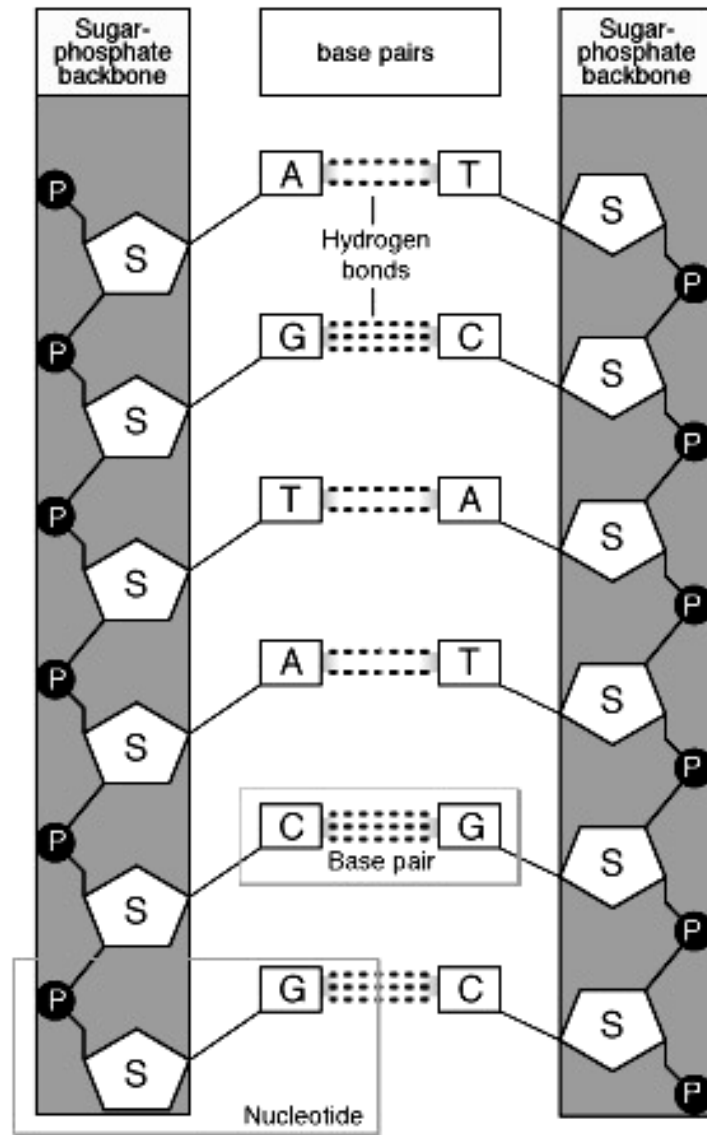


Na stabilnost molekula DNK utiču:

1. Hidrofobne interakcije između parova baza
2. van der Waals-ove sile između naslaganih parova baza
3. Vodonične veze između parova baza
4. Interakcije fosfodiesterne kičme sa katjonima



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.



Periodičnost u primarnoj strukturi makromolekula uslovljava da **HELIKS** bude najčešći oblik njihove **sekundarne strukture**.

DNK - struktura

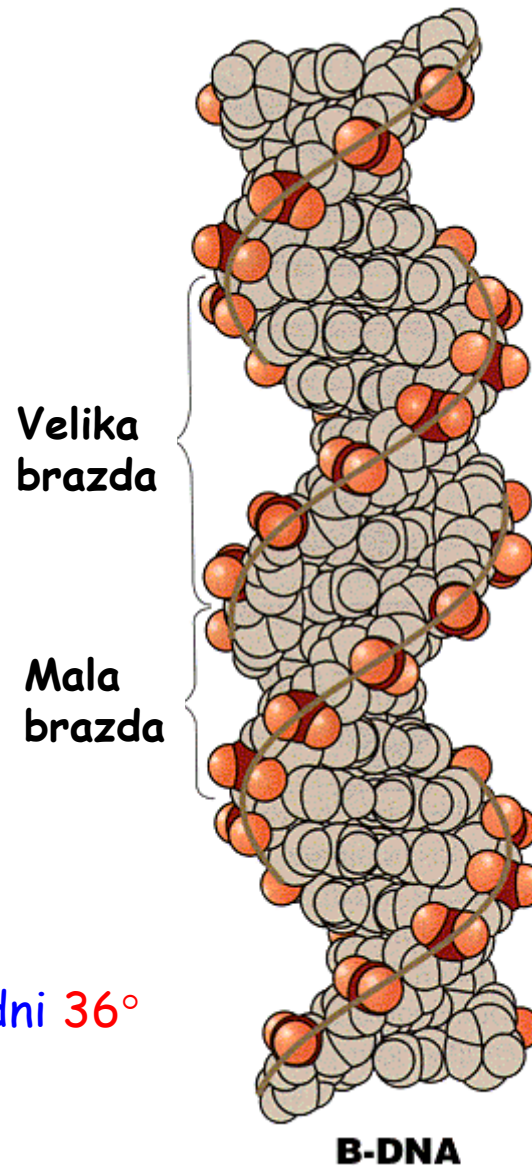
- Kod eukariota, svaki hromozom sadrži jedan kontinuiran, linearan DNK heliks.
- DNK najdužeg ljudskog hromozoma je dugačka više od 7 cm.
- Ukoliko bi se DNK svih 46 hromozoma u humanoj diploidnoj ćeliji povezala nastavljajući kraj jednog n početak sledećeg hromozoma, naša **ukupna DNK bi se iznosila oko 2 m u dužinu.**
- Naša ukupna DNK sadrži oko 6×10^9 baznih parova.



Sekundarna struktura koju su opisali **Watson i Crick** je najčešći oblik DNK i opisuje se kao **B oblik**.

Karakteristike B oblika

- Desnoorijentisano uvijanje heliksa
- Kompletan navoj se sastoji od 10 parova baza
- Dužina navoja 3.4 nm
- Rastojanje između parova baza 0.34 nm
- Prečnik heliksa 2.0 nm
- Svaki par baza je pomeren u odnosu prethodni 36°
- Obrazovanje dve vrste brazdi
- Slaganje baza pod pravim uglom u odnosu na uzdužnu osu heliksa

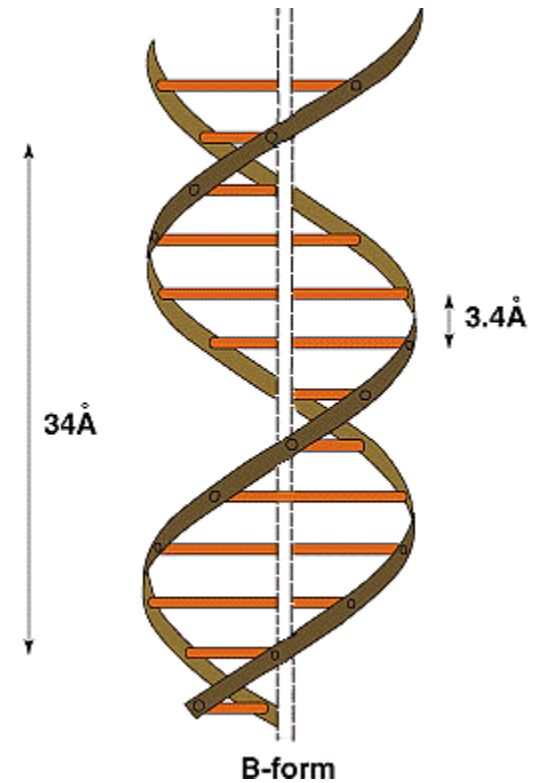


Osobine A-, B- i Z-DNK

	<i>Tip heliksa</i>		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>Z</i>
Oblik	Najširi	Srednji	Najuži
Uspon po baznom paru	23 nm	34 nm	38 nm
Prečnik heliksa	255 nm	237 nm	184 nm
Pravac uvrtanja	Desni	Desni	Levi
Broj baznih parova po obrtu heliksa	11	10,4	12
Odstupanje nagiba baza u odnosu na normalu na osu heliksa	19°	1°	9°
Veliki usek	Uzak i veoma dubok	Širok i prilično dubok	Pljosnat
Mali usek	Veoma širok i plitak	Uzak i prilično dubok	Veoma uzak i dubok

A oblik DNK

- desnoorijentisani heliks
- kompletan navoj - 11 parova baza
- dužina navoja 2.82 nm
- parovi baza nagnuti u odnosu na uzdužnu osu heliksa

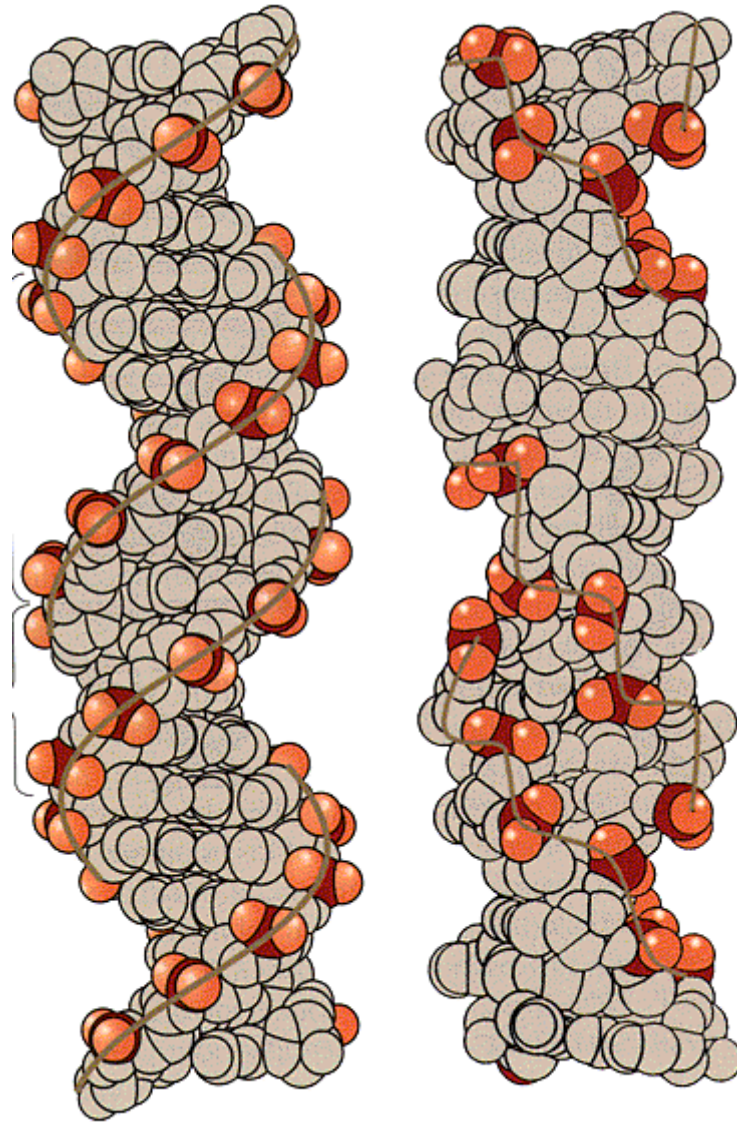


C oblik DNK

- sličan B obliku
- desnoorijentisani heliks
- kompletan navoj - 9 parova baza
- dužina navoja 3.3 nm

Z oblik

- levoorijentisani heliks
- fosfodiesterarska kičma ide cik- cak duž molekula
- kompletan navoj - 12 parova baza
- dužina navoja - 5.7 nm
- navoji obrazuju samo jednu vrstu brazdi
- slaganje baza na spoljnoj strani



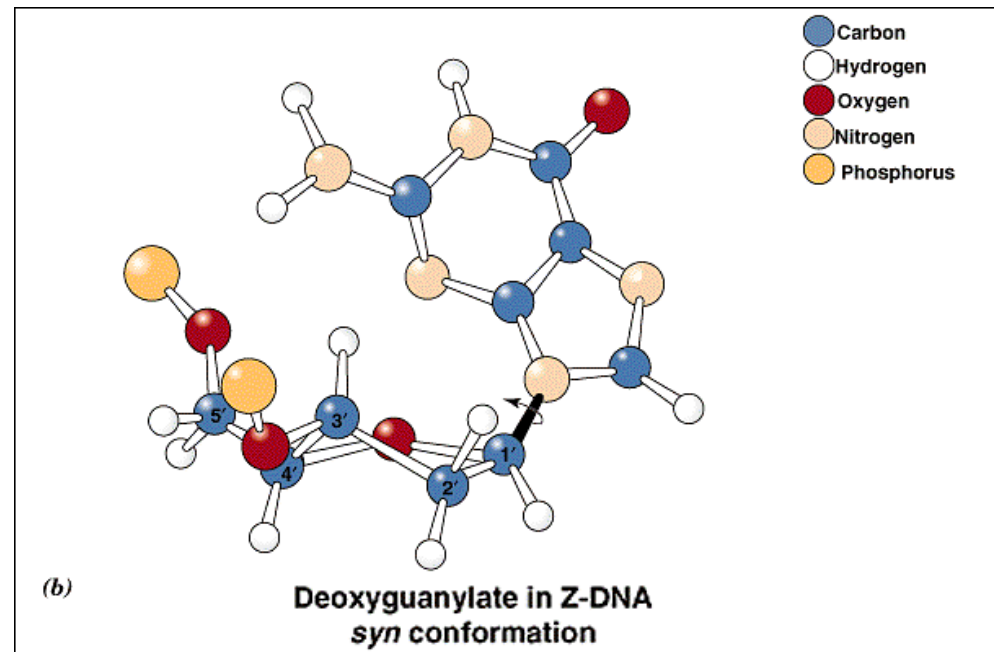
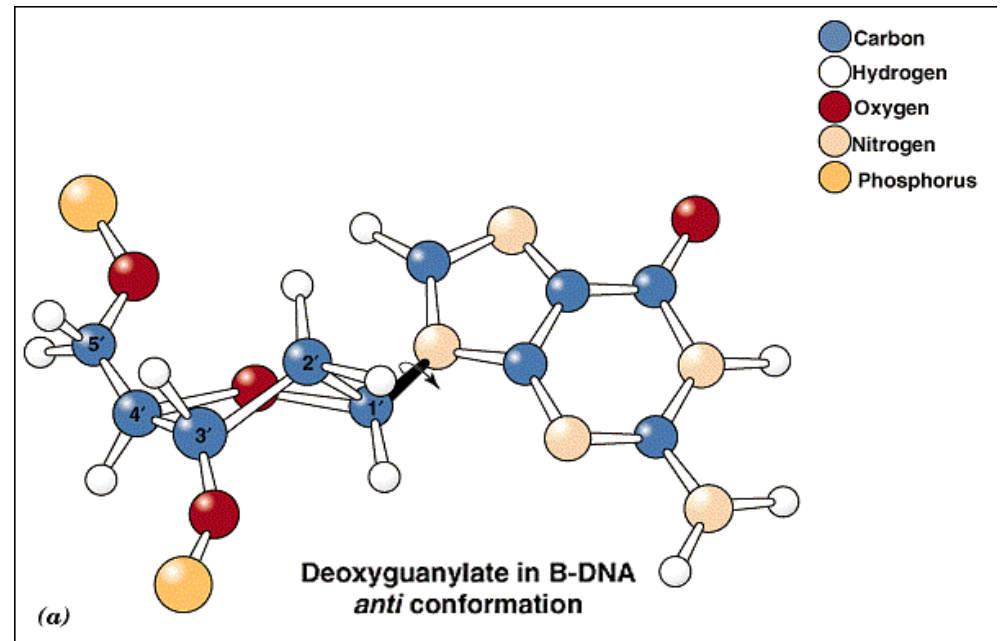
B-DNA

Z-DNA

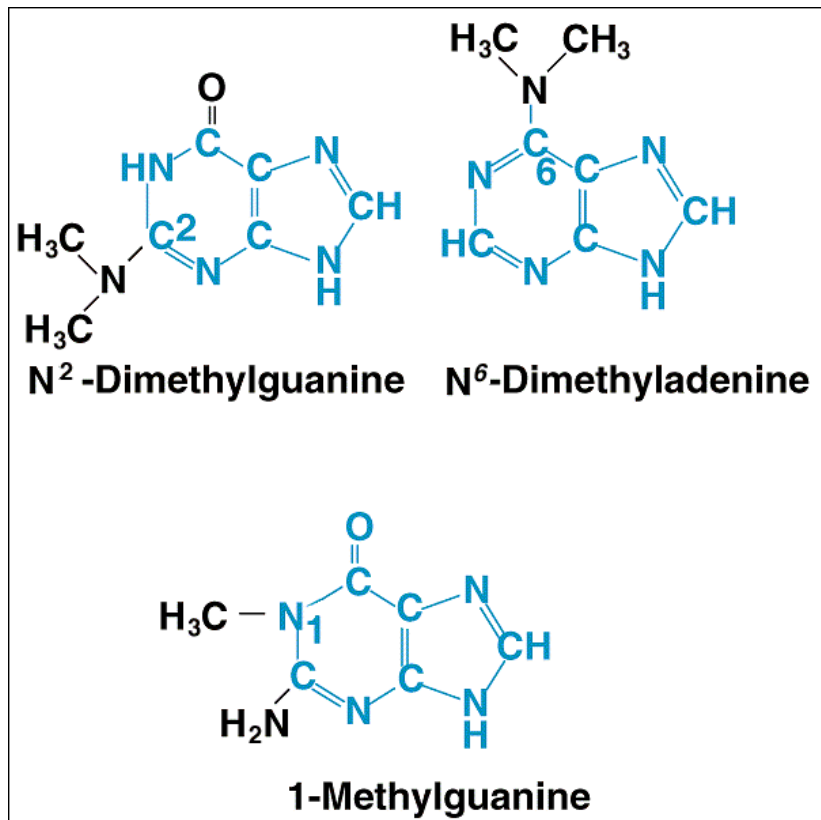
- **Z oblik** zauzimaju sekvence koje sadrže **naizmenične C-G** nukleotide. Glikozidna veza **guanina u *syn*** - a **citozina *anti*** - konformaciji .

- Alternativni oblici DNK (**A,C,Z** forme) prisutne u ćeliji bar u kratkim regionima molekula DNK.

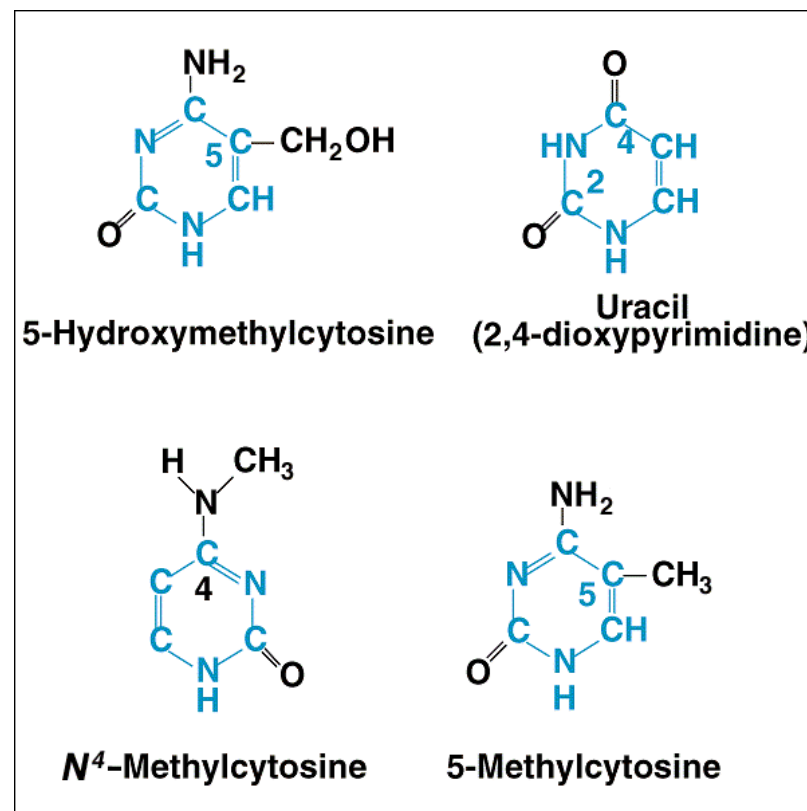
- Imaju uticaja na vezivanje različitih tipova regulatornih proteina - značajno za regulaciju ekspresije gena.



Struktura baza koje se ređe pojavljuju u DNK



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

- Najčešća modifikacija DNK ćelija eukariota je **metilacija C rezidua** koje prethode **G** na istoj strani lanca DNK.
- Javlja se u manje od **10% C rezidua**.
- U korelaciji je sa transkripciono **inaktivnim genima**.
- U sekvencama naizmeničnih C-G parova **favorizuje prelazak B u Z formu**.

Denaturacija DNK

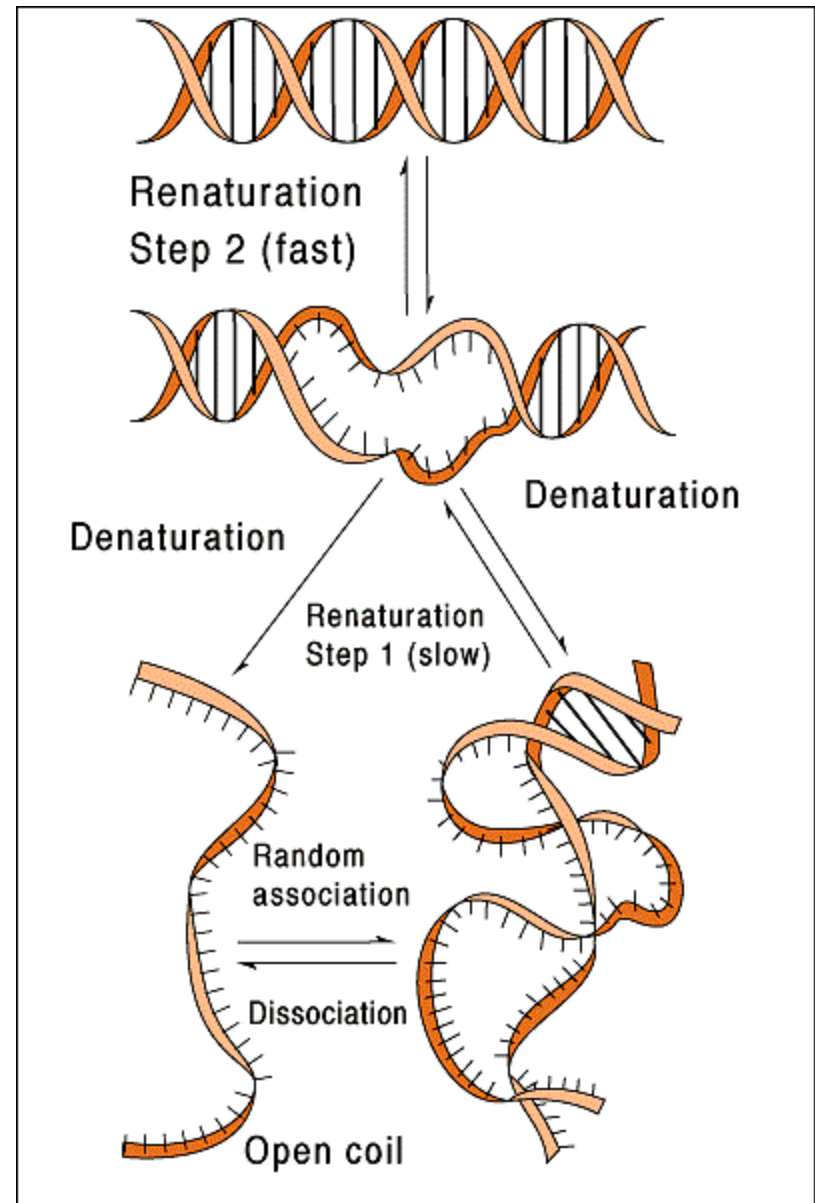
- proces razdvajanja dva lanca molekula DNK u *in vitro* uslovima

Denaturaciju DNK mogu uzrokovati:

- **Visoka temperatura (topljenje)**
Temperatura topljenja **T_m** - temperatura na kojoj je polovina molekula DNK denaturisana.
- **Izlaganje bazama (bazna denaturacija)**
povećanje pH iznad 11,3
- **Smanjenje jonske jačine**
- **Različiti denaturišući agensi**

Renaturacija DNK

- komplementarni lanci DNK razdvojeni denaturacijom mogu pod odgovarajućim uslovima ponovo formirati dvostruki heliks ($\pm 10-15^\circ\text{C}$ niža od T_m).

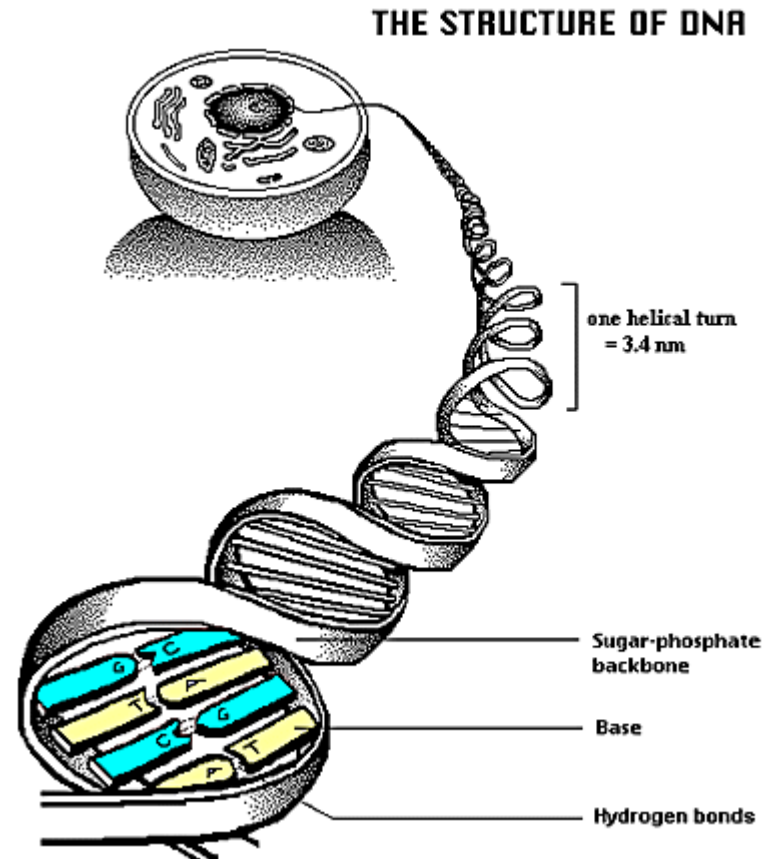


Hibridizacija nakon denaturacije

Svaka humana ćelija sadrži oko **2m DNK**.

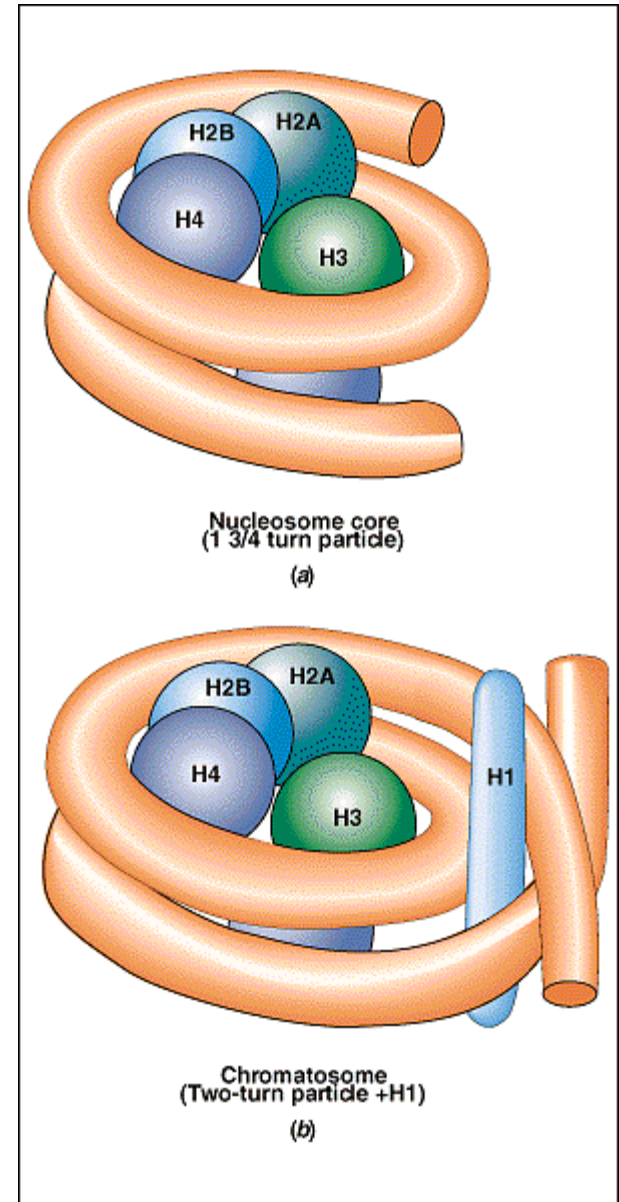
Jedro ima prečnik oko **6 μm**.

Geometrijski ekvivalentno pakovanju 40 km finog vlakna u tenisku lopticu.



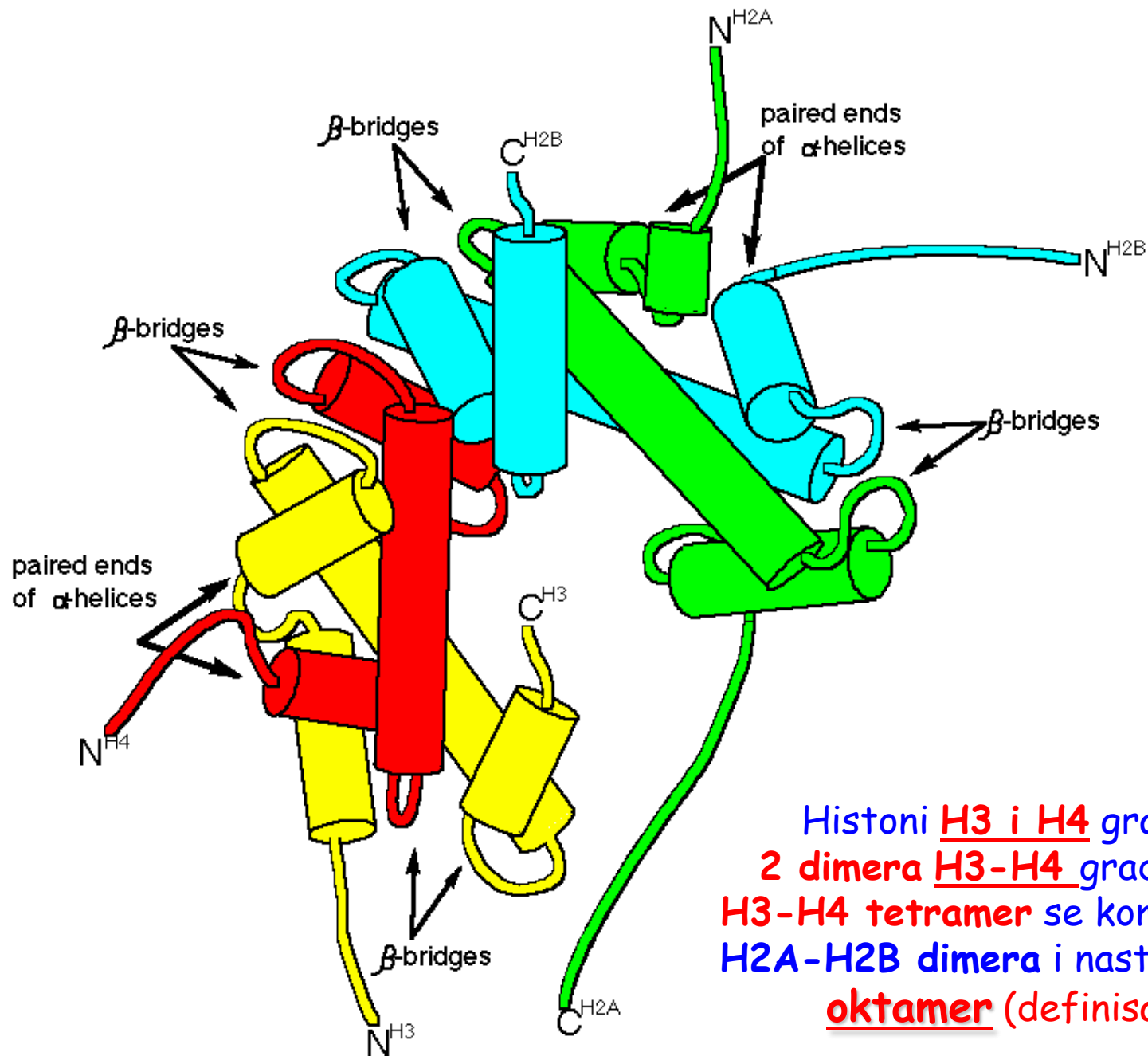
Pakovanje DNK u jedro se postiže **pomoću specijalizovanih proteina** koji vezuju i organizuju DNK formirajući sve više nivoe strukturne organizacije.

- **Proteini** koji vezuju DNK i grade hromosome eukariota se tradicionalno dele na:
 - **histonske** i
 - **nehistonske** proteine.
- Kompleks obe klase proteina sa nuklearnom DNK ćelija eukariota se naziva **hromatin**.
- **Histoni** se nalaze u ćeliji u količini koja je ekvivalentna količini DNK - 60 miliona molekula svakog tipa po jednoj humanoj ćeliji.
- **Nehistonski proteini** (postoji više od 1000 tipova) su prisutni u istoj količini kao i histoni.
- Dakle u jedru ima **2 puta više proteina nego DNK**.
- Klase histona: **H1, H2A, H2B, H3 i H4**.



Tipovi histona

<i>Tip</i>	<i>Odnos Lys/Arg</i>	<i>Broj AK</i>	<i>Masa (kD)</i>	<i>Lokalizacija</i>
H1	20,0	215	21,0	Spojni deo
H2A	1,25	129	14,5	Jezgro nukleozoma
H2B	2,5	125	13,8	Jezgro nukleozoma
H3	0,72	135	15,3	Jezgro nukleozoma
H4	0,79	102	11,3	Jezgro nukleozoma



Histoni H3 i H4 grade dimer
 2 dimera H3-H4 grade tetramer
 H3-H4 tetramer se kombinuje sa dva
 H2A-H2B dimera i nastaje kompaktni
oktamer (definisan 1997)

Dodirna površina između DNK i histona je velika:

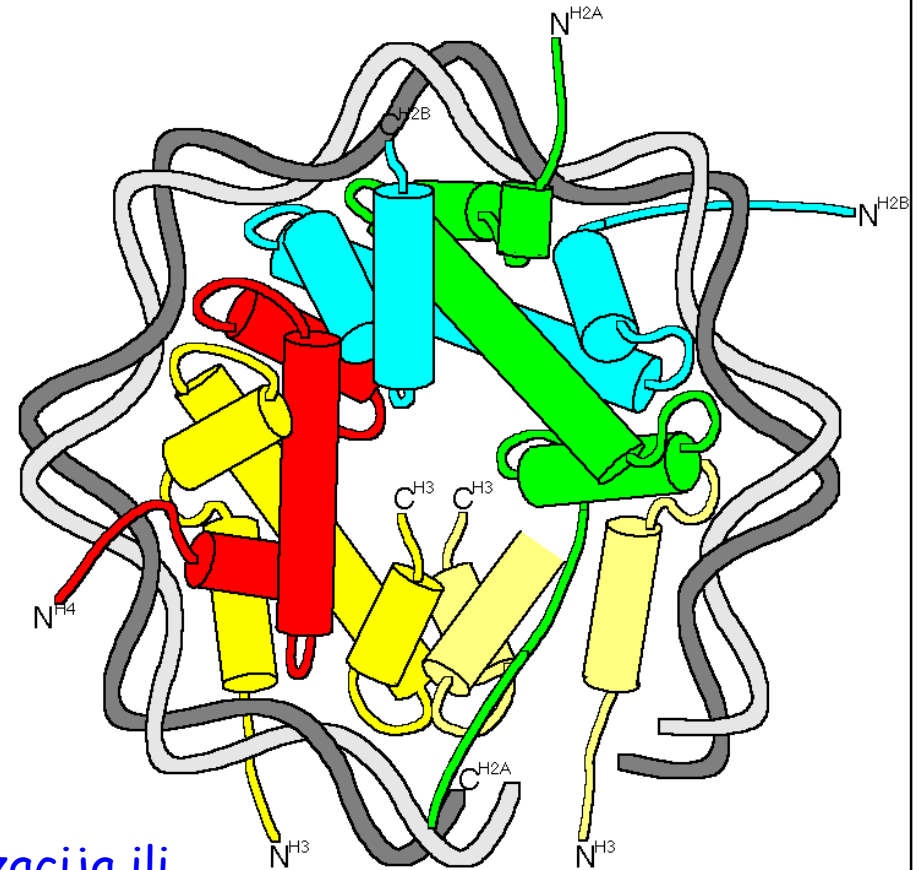
- 142 **vodonične veze** između DNK i histona (skoro polovina između bočnih lanaca AK i fosfodiesterne kičme)
- **hidrofobne interakcije**
- **veze tipa soli**

N terminalni krajevi histona mogu biti kovalentno modifikovani

- acetilacija lizina
- metilacija lizina
- fosforilacija serina

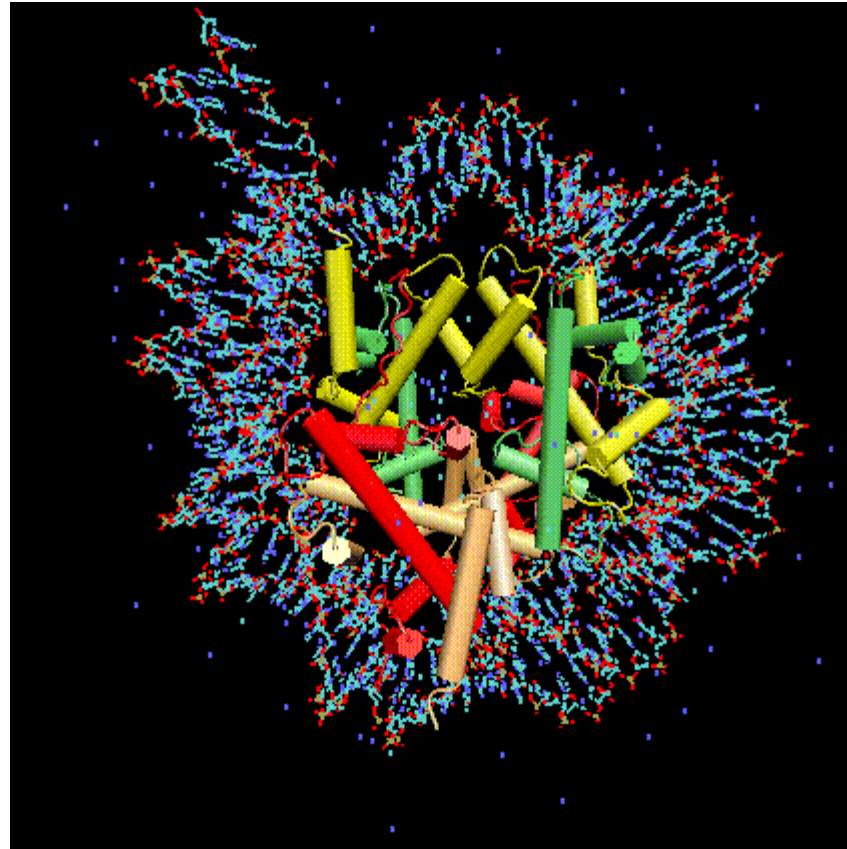
- **Utiče na stabilnost 30 nm vlakna**
- **Privlače druge proteine** (dalja kondenzacija ili dekonkondenzacija, čime utiču na **gensku ekspresiju**)

HISTONI- najkonzerviraniji proteini, sintetišu se u citosolu



Na poziciju nukleozoma u DNK utiču:

- **Sekvenca DNK**
(mala krivina,
A-T bogate sekvence se lakše komprimuju)
- **Prisustvo i priroda drugih proteina**
tesno vezanih za DNK-neki olakšavaju a
drugi otežavaju formiranje nukleozoma



HISTONI

Neke od modifikacija se dešavaju po sintezi a pre organizovanja u nukleozoma ili po formiranju nukleozoma

1. acetilacija- destabilizacija hromatina (gubi se + naelektrisanje lizina pa je otežana neutralizacija - naelektrisanja DNK
2. Vezivanje proteina- modifikacija proteina koji čine hromatin kompaktnijim ili olakšavaju pristup DNK

Kondenzacija hromatina

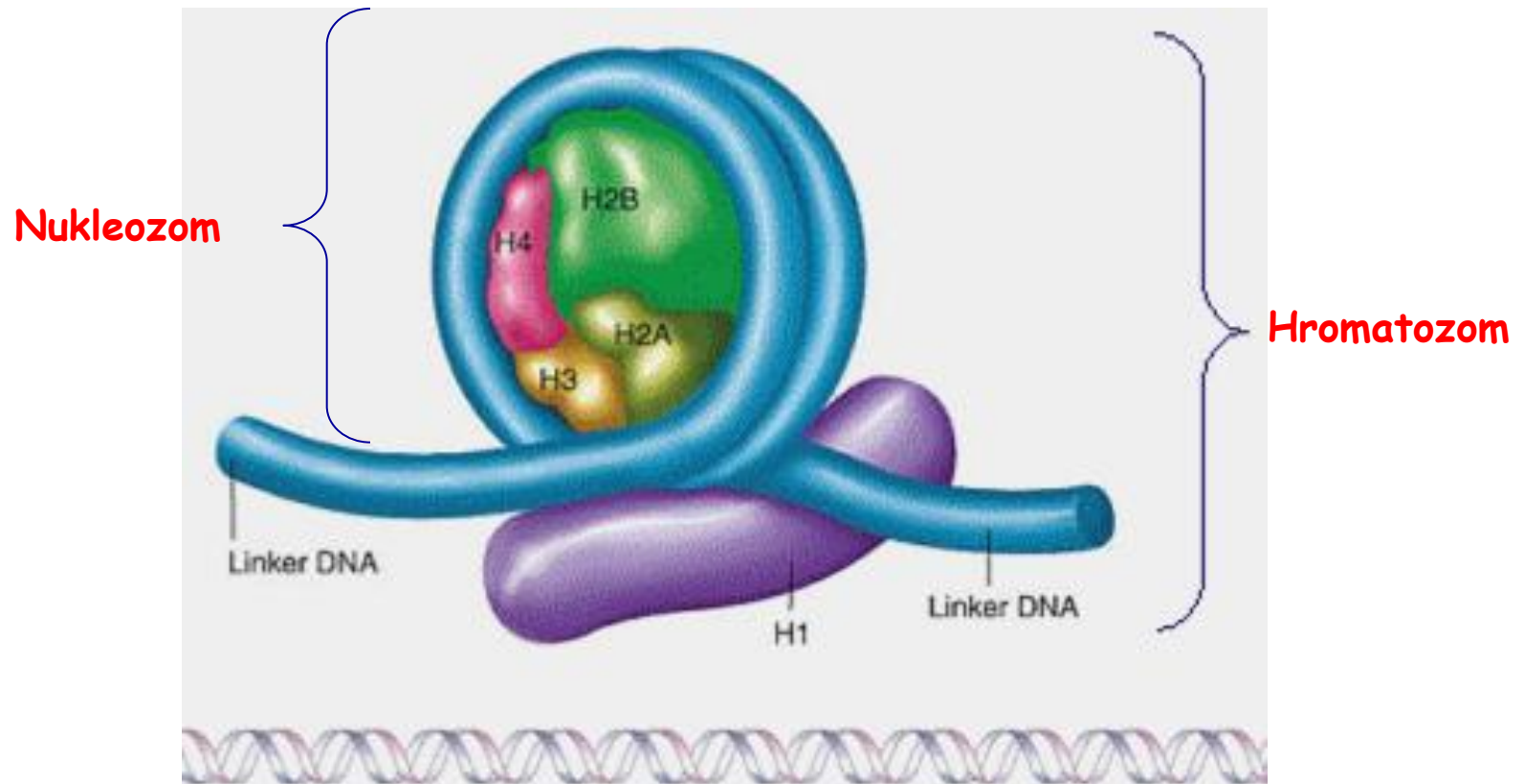
- Prvi nivo: nukleozom (1974)

Nukleozom

- osnovna strukturna jedinica hromatina
- 146 parova baza DNK koje su
- 1,75 puta obmotane oko histonskog jezgra

Hromatozom

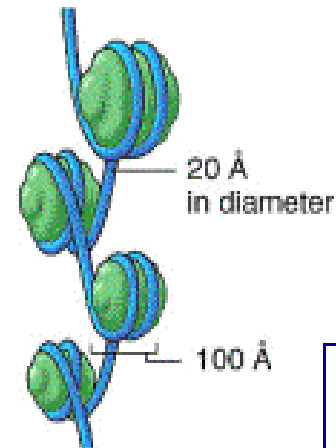
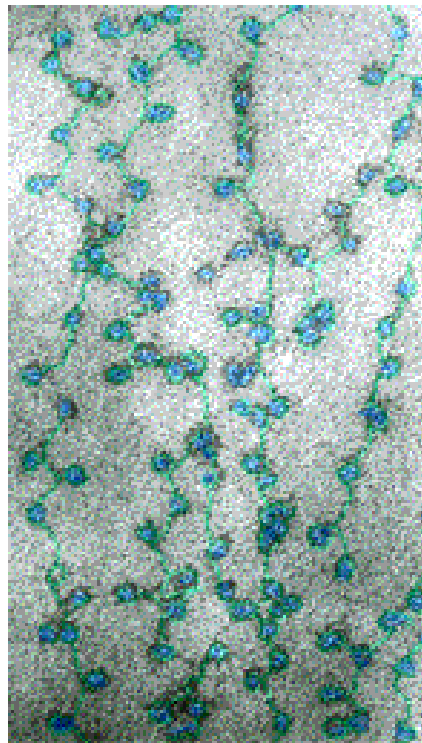
- vezivanje jednog H1 na mestu gde DNK ulazi i izlazi iz nukleozoma
- 166 parova baza DNK



Kondenzacija hromatina

- Prvi nivo: nukleozom

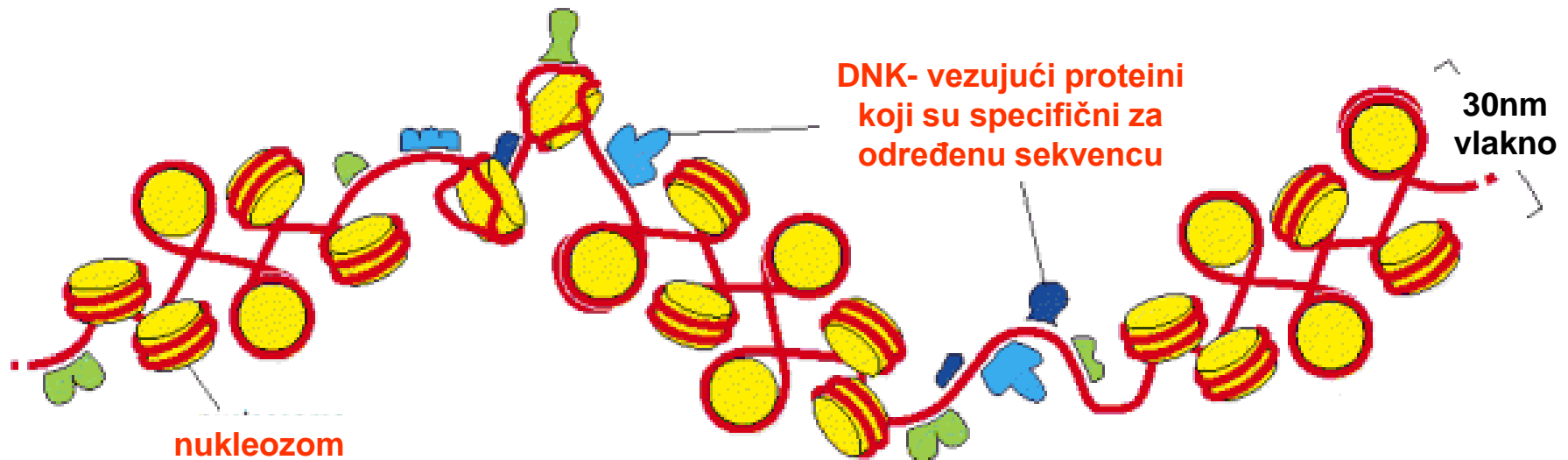
- DNK se kondenzuje **7x**, na vlakno širine **10nm**
- Dužina ukupne ćelijske DNK se skraćuje sa **2m** na **~ 25cm**



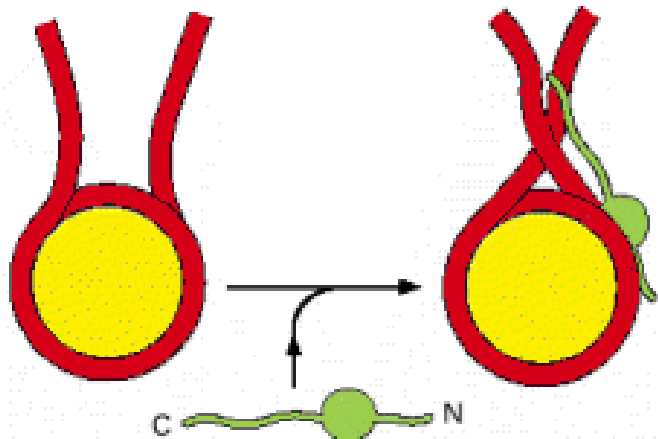
status:
confirmed by
crystal structure



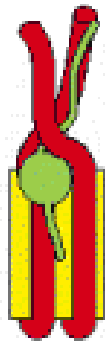
“Perle” zajedno sa DNK koja je oko njih je obmotana nazivamo **nukleozomi**, a same “perle” jezgra nukleozoma. Centar jezgra nukleozoma čine po 2 molekula iz svake od 4 klase histona (histoni H2A, H2B, H3, i H4) oko njih je obmotan deo dvolančane DNK od približno 140 baznih parova



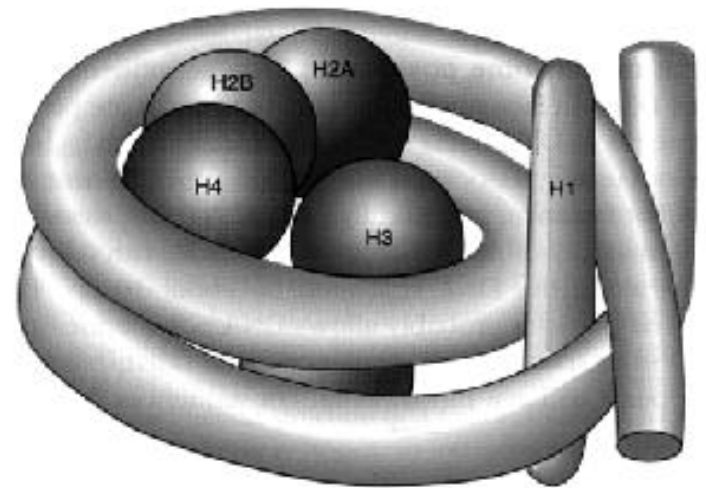
DNK obmotana oko jezgra nukleozoma je kontinuirana i povezuje jedno jezgro nukleozoma sa sledećim. DNK koja povezuje jezgra nukleozoma je u kompleksu sa petim tipom histona, H1 i N-terminalnim fragmentima histona (privlačenje susednog nukleazoma) i dužina ovog segmenta DNK (linker DNA) varira i omogućava formiranje cik-cak strukture i dalje pakovanje DNK.



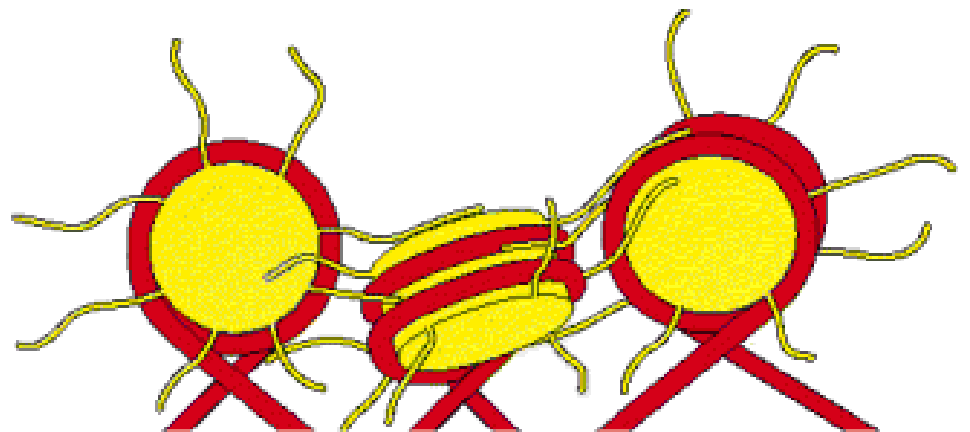
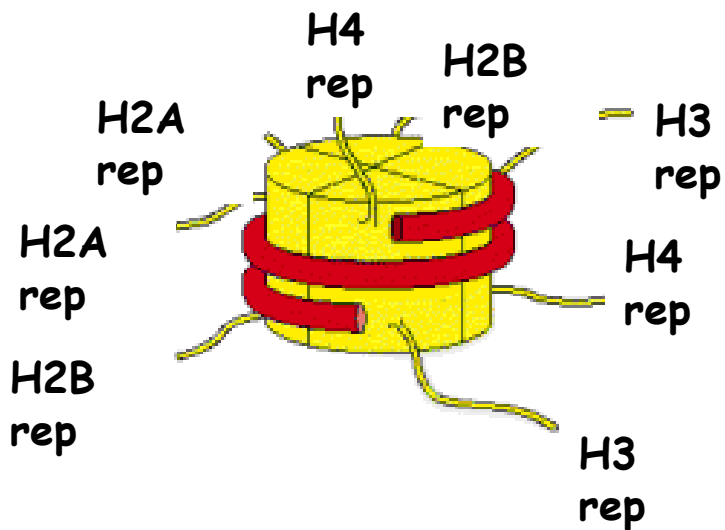
Histon
H1



Bočni prikaz



HROMATOZOM
(dva namotaja DNK oko nukleozoma + H1)



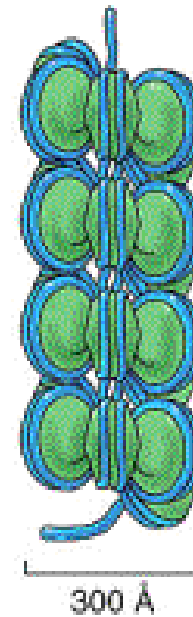
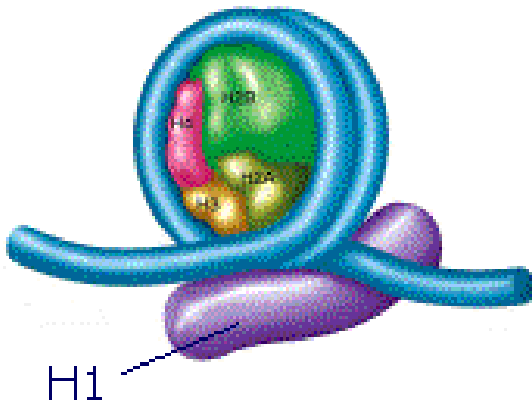
(B)

Kondenzacija hromatina

· Drugi nivo: vlakno od 30-nm

- Histon H1 približava nukleozome - menja pravac izlaska iz nukleozoma
- N - terminalni krajevi proteinskih lanaca histona pomažu u međusobnom povezivanju nukleozoma

DNK još 6x kompaktnija (~40x ukupno) -- ~50 nm ukupna dužina

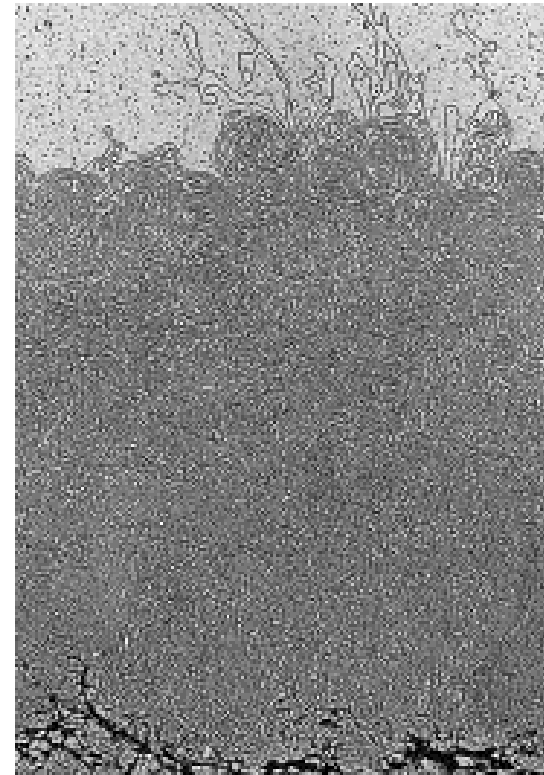
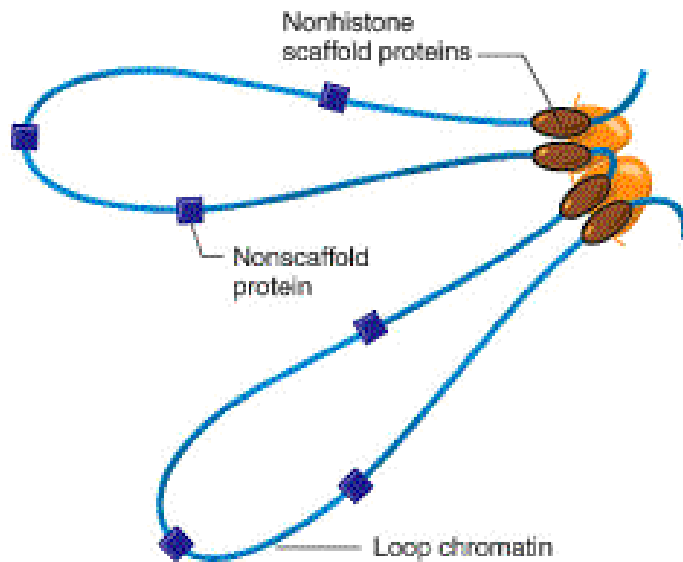


status:
seen by EM

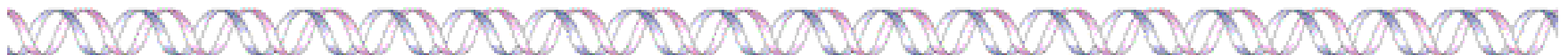
Kondenzacija hromatina

· Treći nivo: radijalne petlje

- **Specifični proteini** učestvuju u obrazovanju **petlji** od 30 nm vlakana
- **Specifične ponovljene sekvence** reaguju sa proteinima



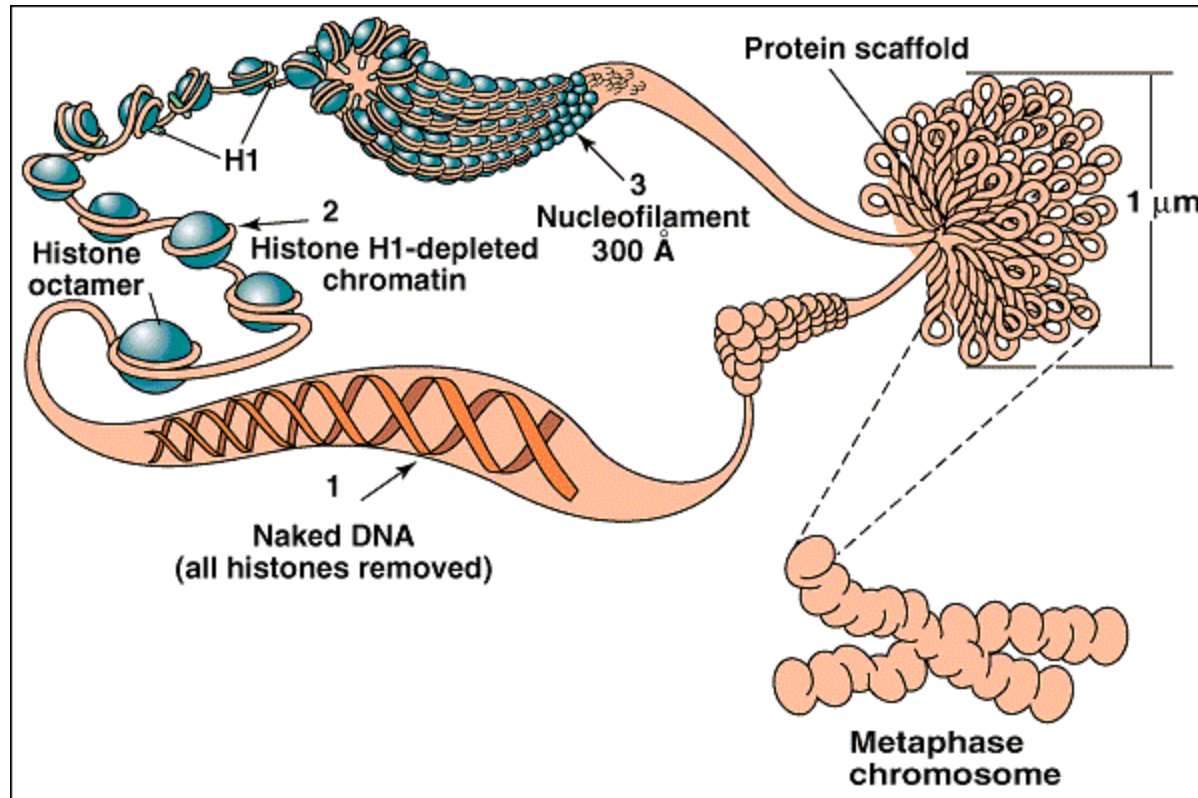
status:
hypothetical; some
experimental support



Kondenzacija hromatina

- Treći nivo: radijalne petlje

Sada je DNK dovoljno kompaktna da može da stane u nukleus

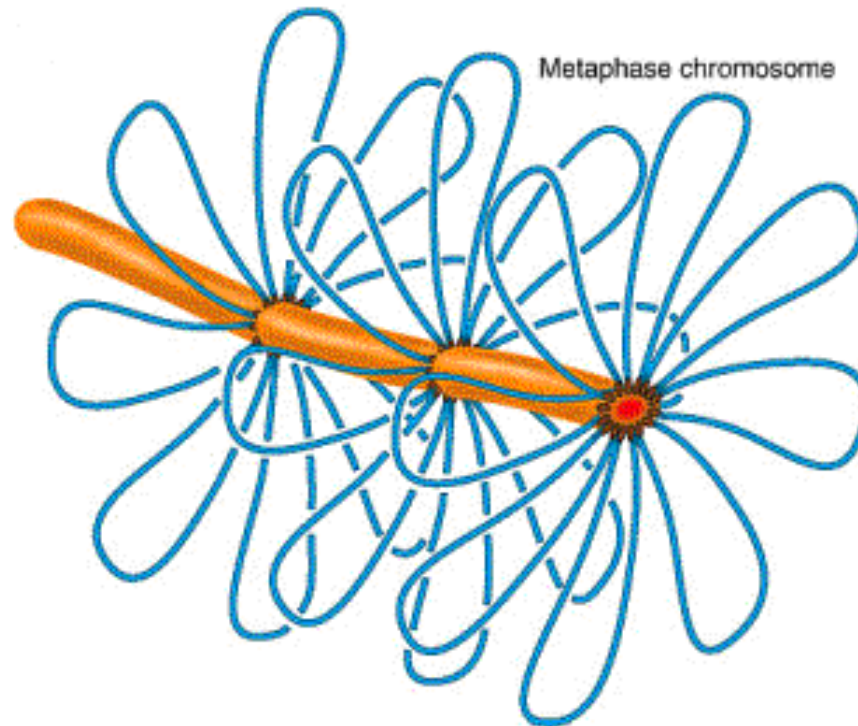


Kondenzacija hromatina

- Četvrti nivo: dalja kondenzacija u M fazi

Stvaraju se nove petlje koje se udružuju

250 x komprimovanija DNK (10,000 puta ukupno) u metafazi



status:
hypothetical



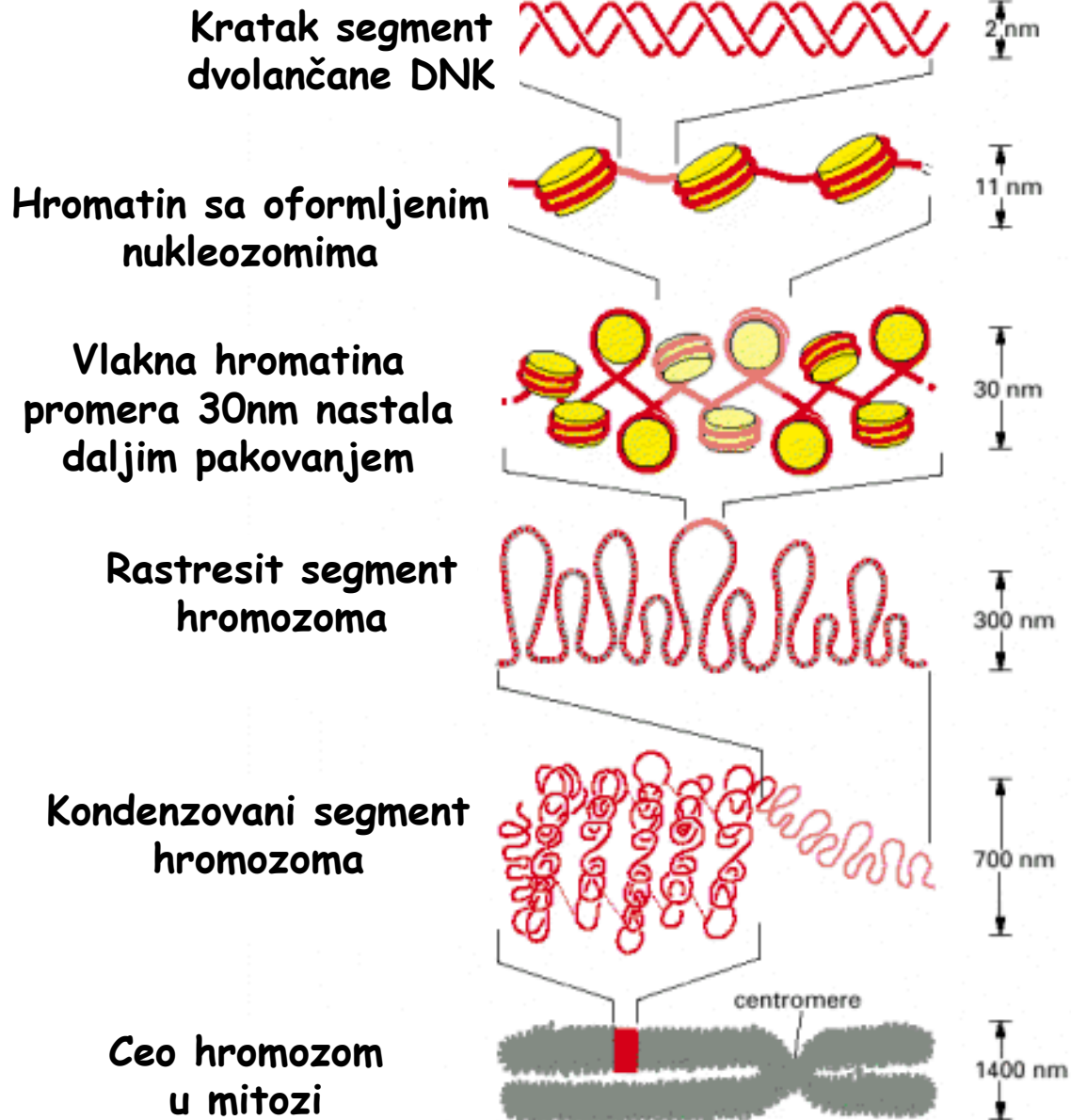
Eukariote:

Proteinski kompleksi za remodeliranje hromatina (troše ATP za svoju aktivnost). Mogu da sadrže i po 10 subjedinica:

- H2A i H2B dimer-promena pozicije
- H3 i H4 tetramer je stabilan

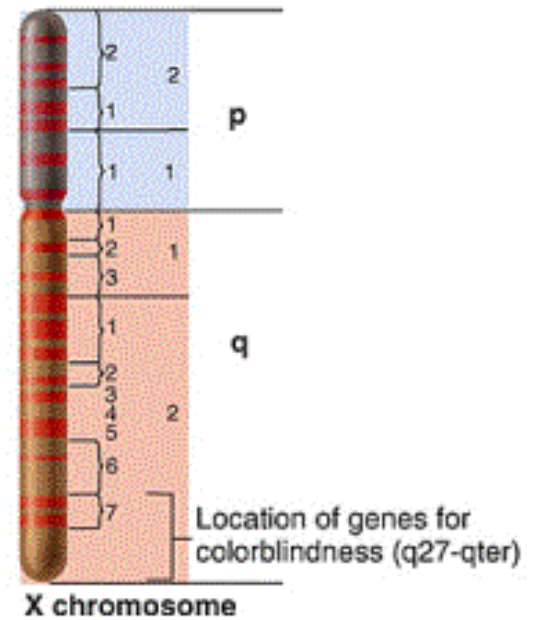
Posledice remodeliranja:

- Nukleozomalna DNK postaje dostupna drugim proteinima (uključenim u ekspresiju gena, replikaciju i popravku)
- Promene u poziciji nukleozoma duž DNK



Sumarno, DNK molekul se pakovanjem u hromosome skrati 10 000 puta

Struktura hromozoma



Višim organizovanjem strukture hromatina formira se *euhromatin* odnosno *heterohromatin*

- **Euhromatin** - nekondenzovan i transkripciono aktivan.
-
- **Heterohromatin** - gusto spakovan (kondenzovan) i transkripciono nenaktivan
 - *konstitutivni heterohromatin* je uvek kondenzovan i zato uvek neaktivan,
 - *fakultativni heterohromatin* povremeno kondenzovan i neaktivan, a povremeno dekondezovan i aktivan.

Na krajevima hromozoma-specijalni oblik heterohromatina sa proteinom Sir2-histon deacilaza koji olakšava dalje pakovanje telomera. Kofaktor ovog enzima je NAD.

- Haploidni humani genom sadrži $3,3 \times 10^9$ parova baza DNK.
- Manje od 10 % DNK molekula kodira odgovarajuće produkte.

DNK ćelija eukariota sadrži tri glavne klase sekvenci:

- 1. jedinstvene sekvence** - ~60% DNK eukariota, jedna ili nekoliko kopija u genomu.
 - Najveći broj sekvenci koje kodiraju proteine (mogu pripadati i klasama većine repetitivnih sekvenci DNK).
- 2. umereno ponavljane sekvence** - ~30% DNK eukariota, 1 - 100 kopija
- 3. visoko ponavljane sekvence** - ~ 10% DNK eukariota, stotinu do nekoliko stotina hiljada puta.

Na osnovu funkcije i strukture **ponavljane sekvence** se mogu podeliti na:

- a. **uzastopno ponovljene gene**, identične kopije gena,
 - ponavljaju se **sto do hiljadu puta**,
 - razdvojene nekim nekodirajućim, **razdvojnim**, (engl. *spacer*) sekvencama.
 - geni za **rRNK**, **tRNK** i **geni za histone** (u nekih eukariota) pripadaju ovoj grupi.

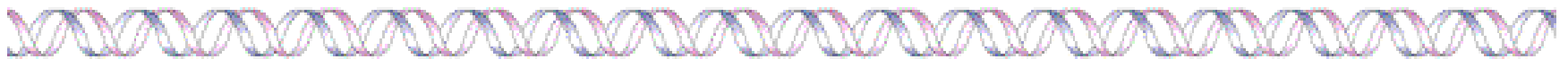
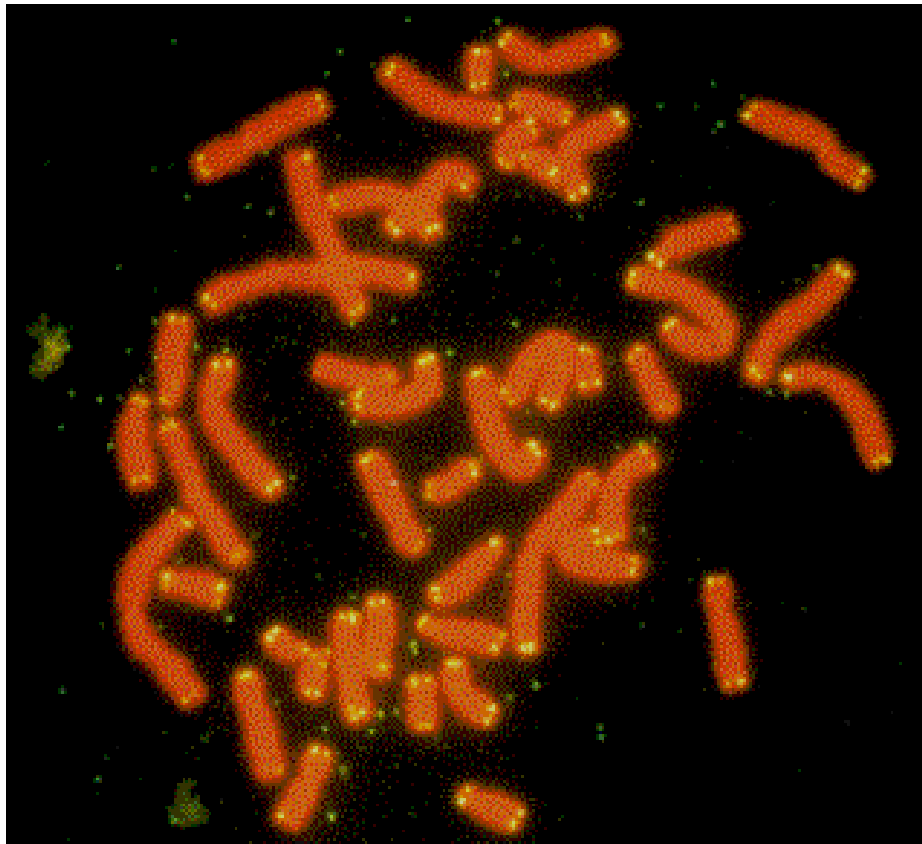
- b. **kratke uzastopno ponovljene sekvence (satelitska DNK)**
 - koje obuhvataju **5–200 parova baza**
 - nalaze se u **1–10 miliona kopija**.
 - Sekvence ove klase ulaze u sastav **centromera** i **telomera** hromozoma.
 - prisutne su i u drugim različitim regionima hromozoma.
 - broj ponavljanja ovih sekvenci karakteristika je svake jedinke.

- c. **rasute ponavljane sekvence**
 - kratke rasute sekvence koje se ponavljaju**,
građene iz **150–300 parova baza**
 - duge rasute sekvence koje se ponavljaju (1000–6000 parova baza)**
Rasute ponovljene sekvence se mogu pojaviti i u **500 000 kopija**.
 - mnoge su *pokretni* elementi.

Struktura hromozoma

Telomere

- Telomere rešavaju problem replikacije krajeva DNK lanca
- Produžava ih telomeraza
- Sadrže ponavljajuće AT sekvence
- Zaštita hromozoma

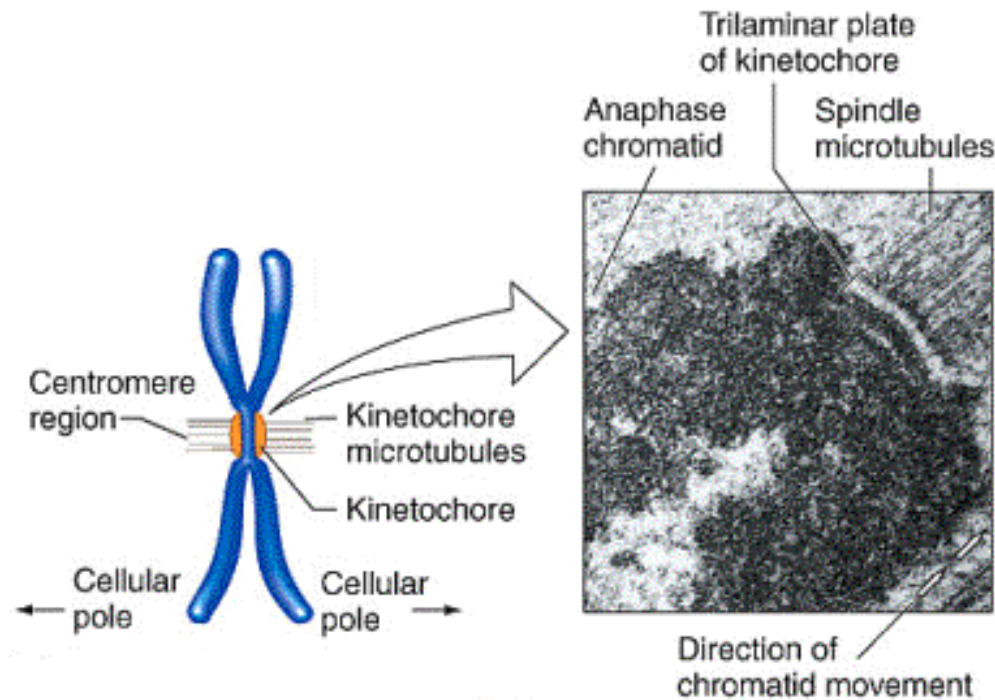


Struktura hromozoma

Centromere

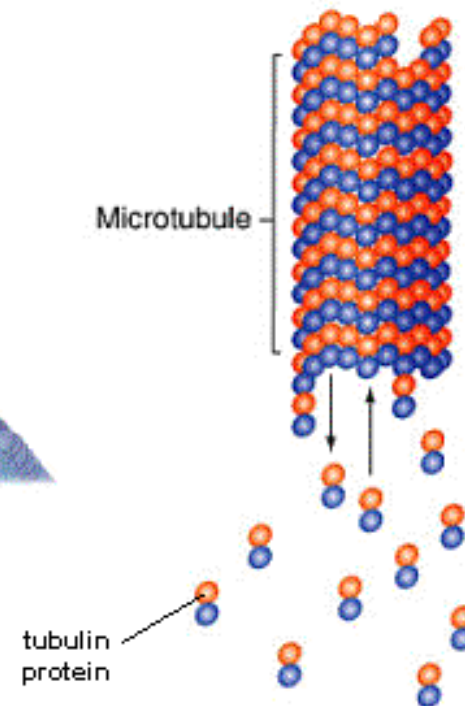
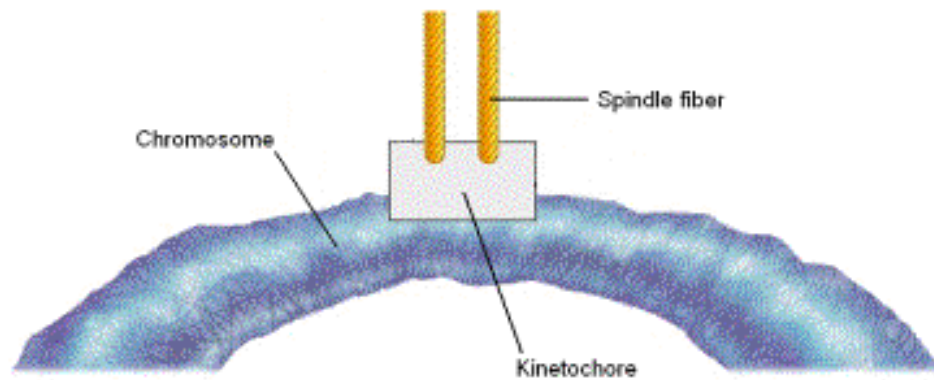
Centromere učestvuju u deobi ćelije

- Drže sestre hromatide zajedno
- Vezuju se za mitotičko vreteno (kinetohorni proteini), omogućavaju razdvajanje
- Sadrže 10-1000 parova NT



Struktura hromozoma

Centromere

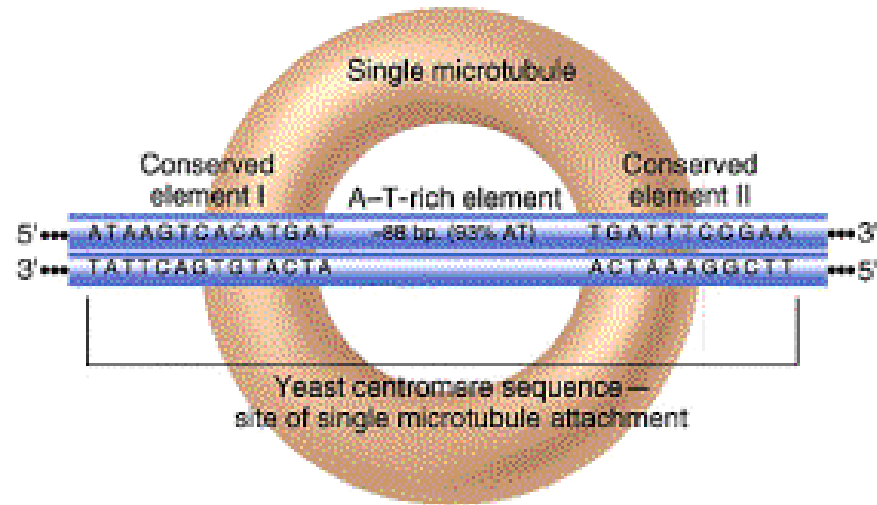


Struktura hromozoma

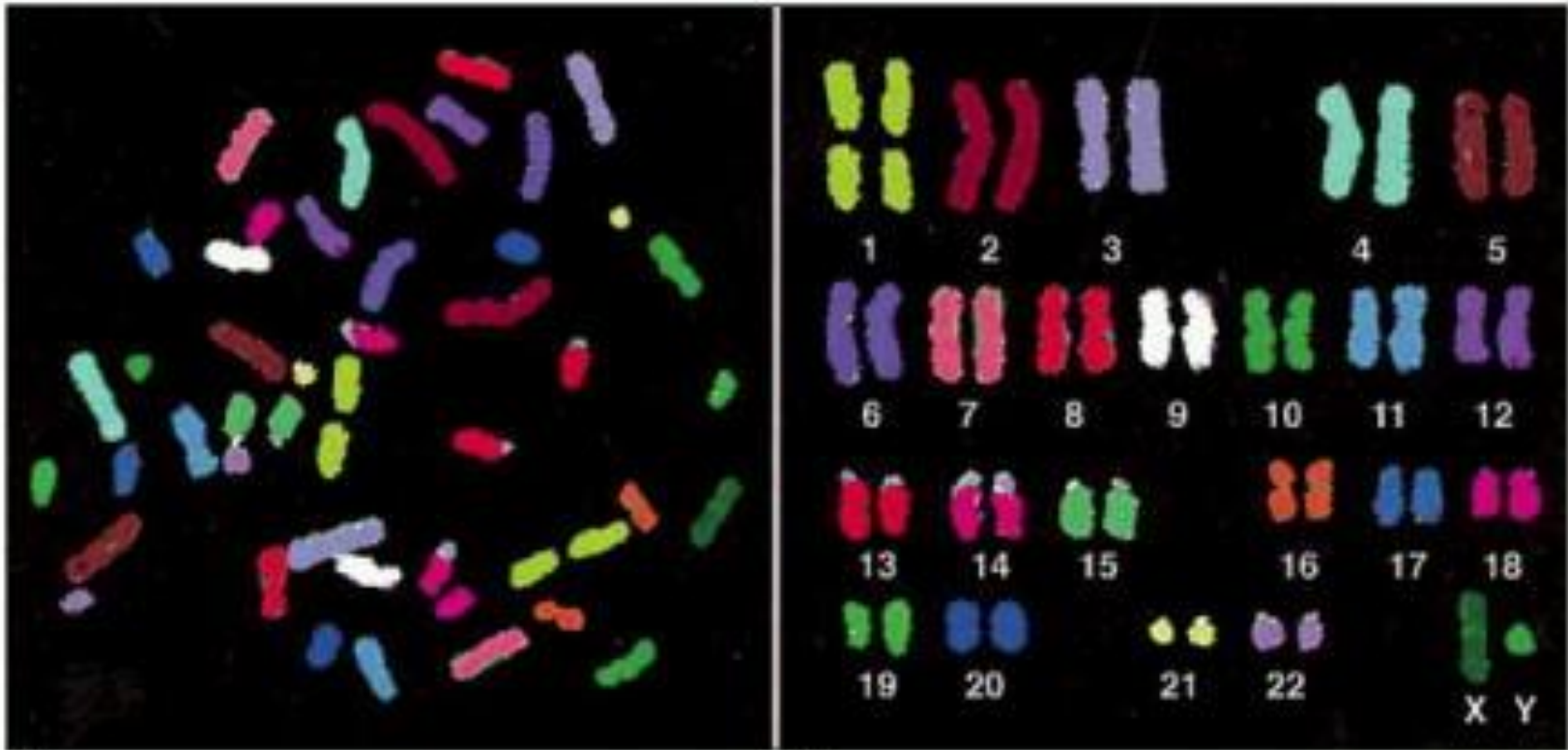
Centromere

Centromere učestvuju u deobi ćelije

- Blokovi ponovljenih sekvenci (ponavljajuća satelitska DNK)



DNK – humani genom

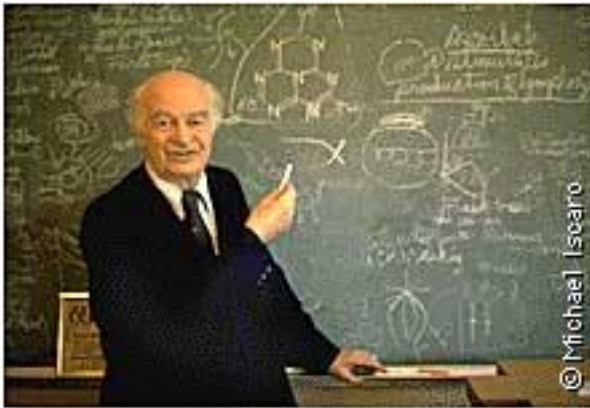


(A)

(B)



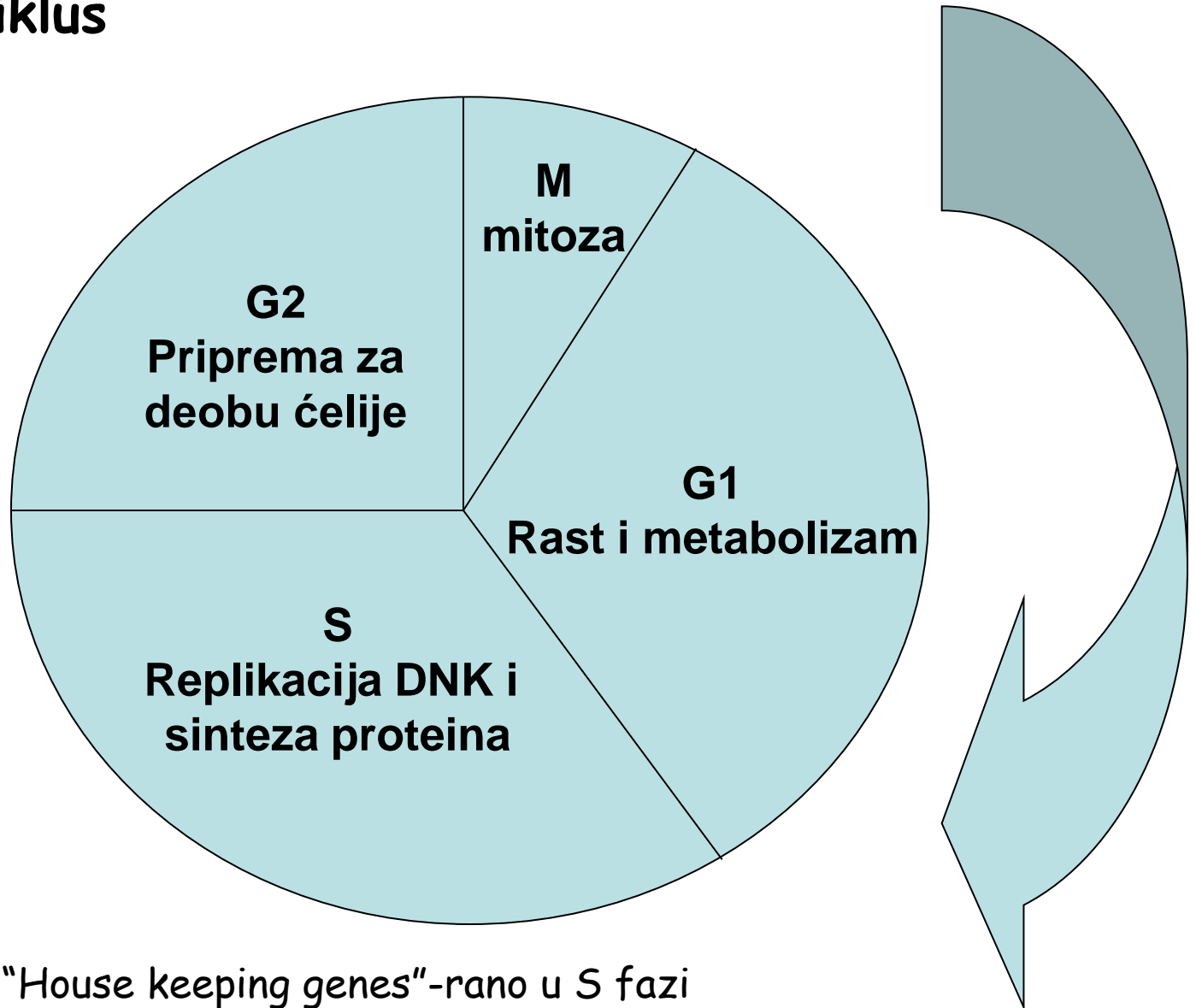
Rosalind Franklin (1920 - 1958)



James Dewey Watson (1928 -)

Crick, Watson, and Wilkins su dobili Nobelovu Nagradu 1962 godine.

Ćelijski ciklus



"House keeping genes"-rano u S fazi

Heterohromatin-kasno u S fazi