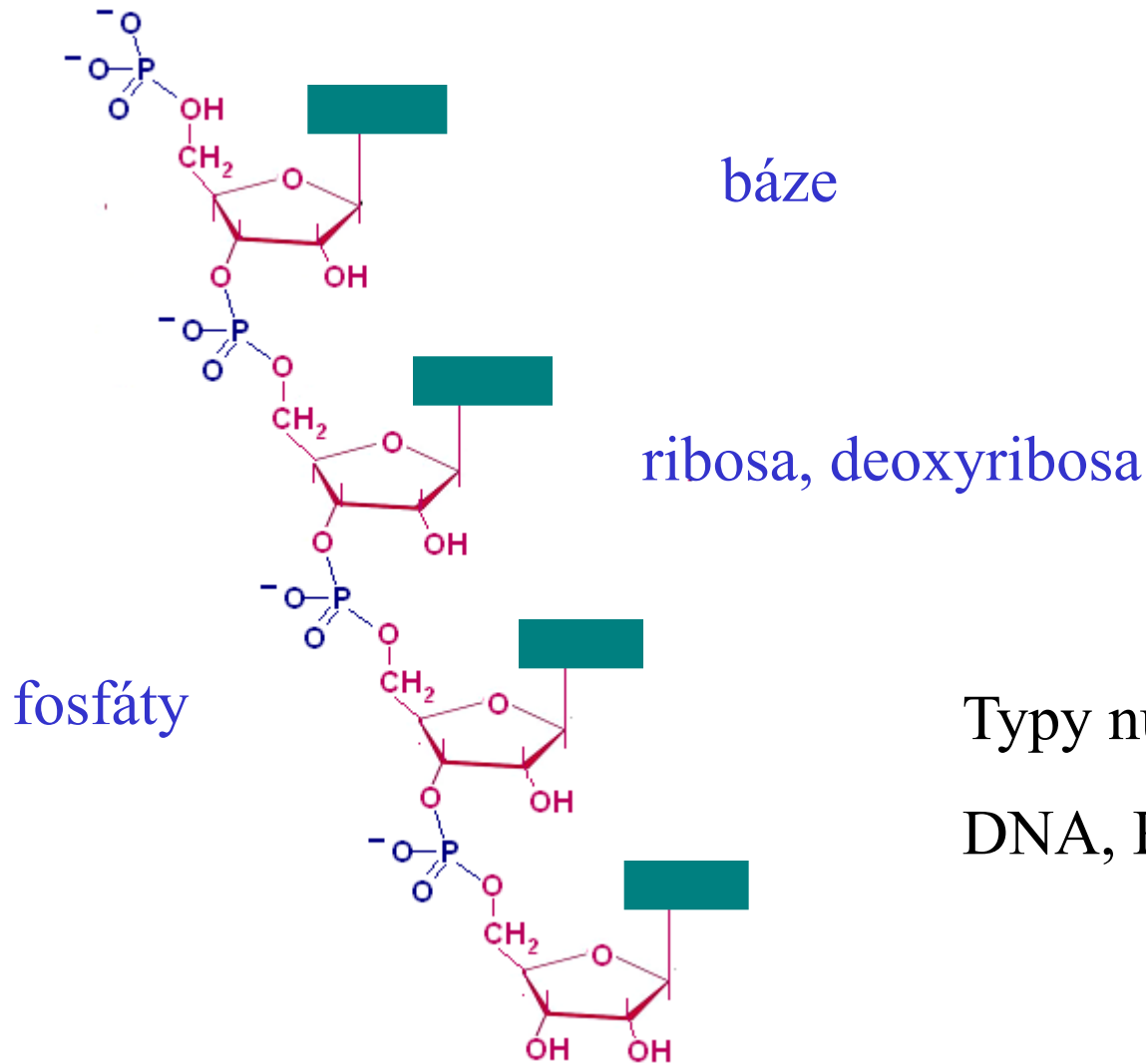


# **Metabolismus purinových a pyrimidinových nukleotidů, struktura nukleových kyselin**

© Biochemický ústav LF MU 2013  
(E.T.)

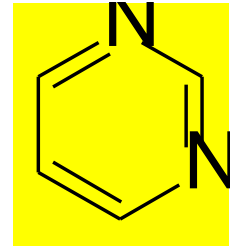
# Polynukleotidy

## Základní komponenty polynukleotidů



Typy nukleových kyselin:  
DNA, RNA

# Pyrimidinové báze



cytosin

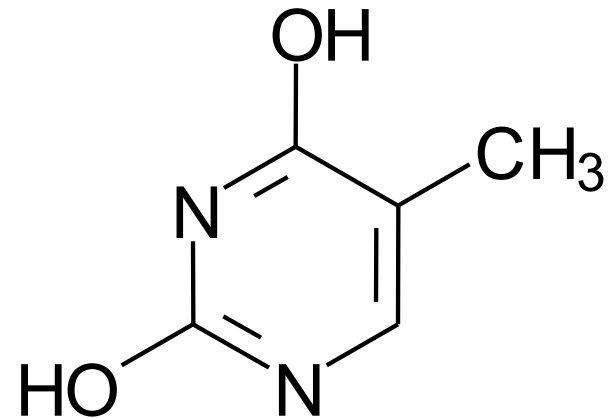
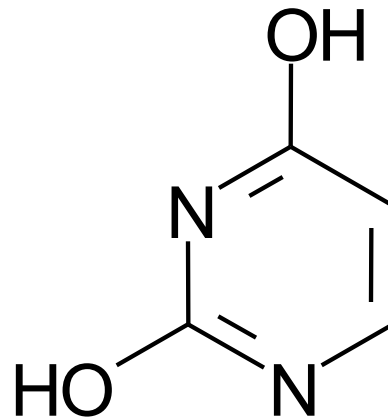
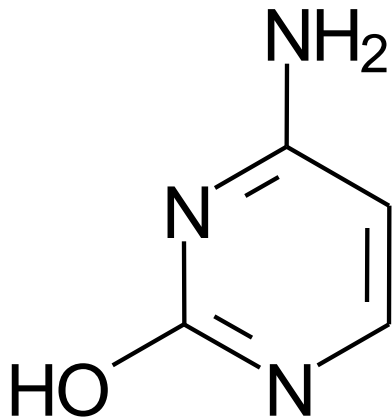
uracil

thymin

2-hydroxy-4-aminopyrimidin

2,4-dihydroxypyrimidin

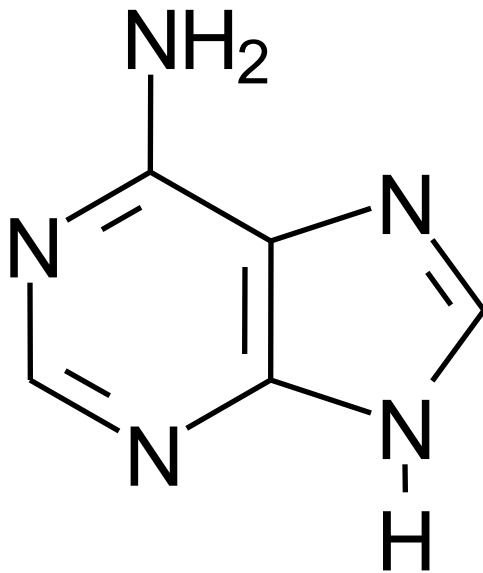
2,4-dihydroxy-5-methylpyrimidin



# Purinové báze

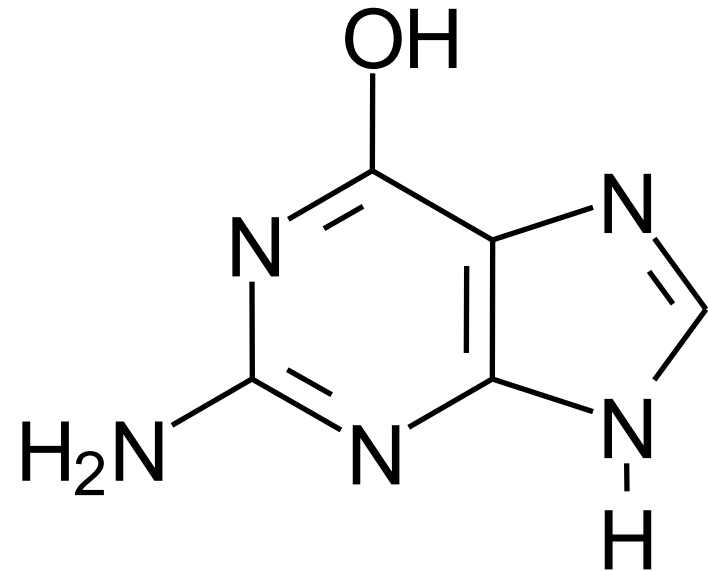


adenin



6-aminopurin

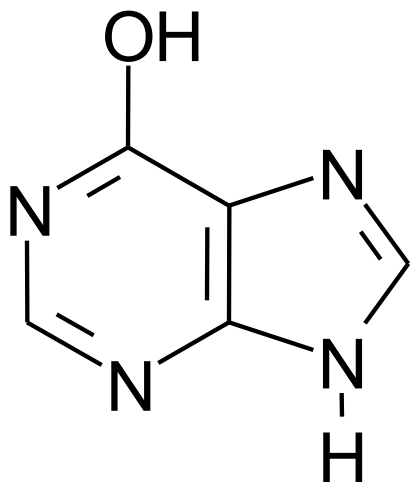
guanin



2-amino-6-hydroxypurin

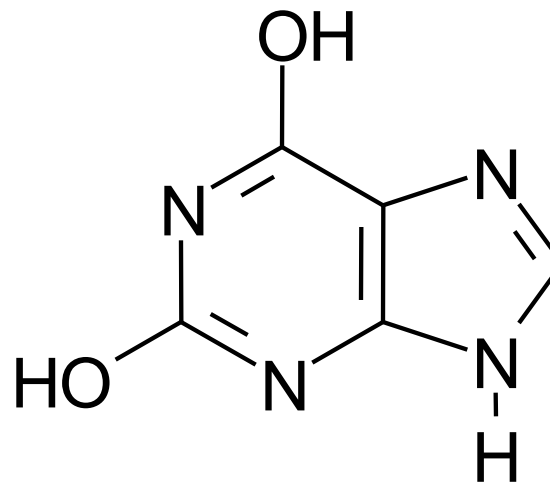
# Purinové báze

## hypoxantin



6-hydroxypurin

## xantin



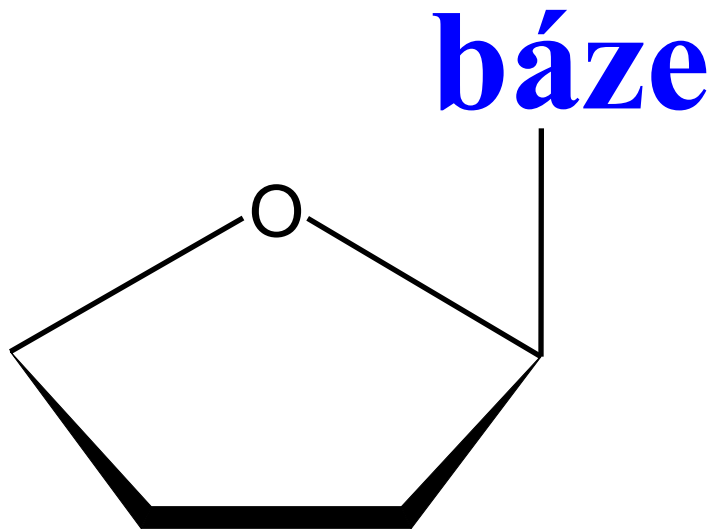
2,6-dihydroxypurin

Vznikají při metabolismu purinových bází

# Nukleosidy

báze + ribosa

base + 2-deoxyribosa

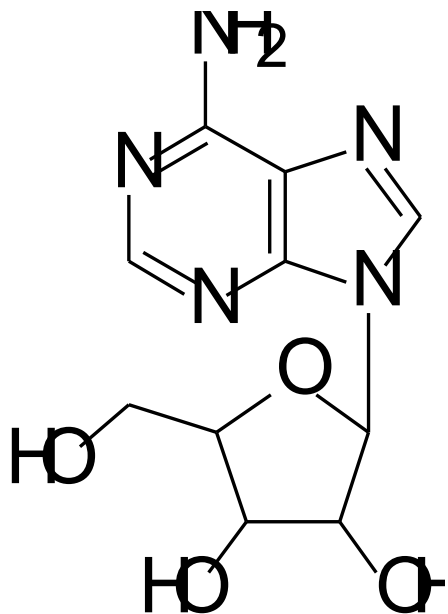


Názvy:

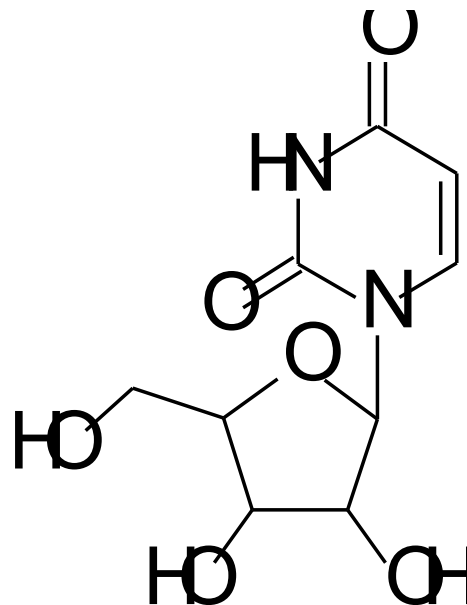
Adenosin, guanosin

Uridin, cytidin, thymidin

## Příklady nukleosidů



adenosin

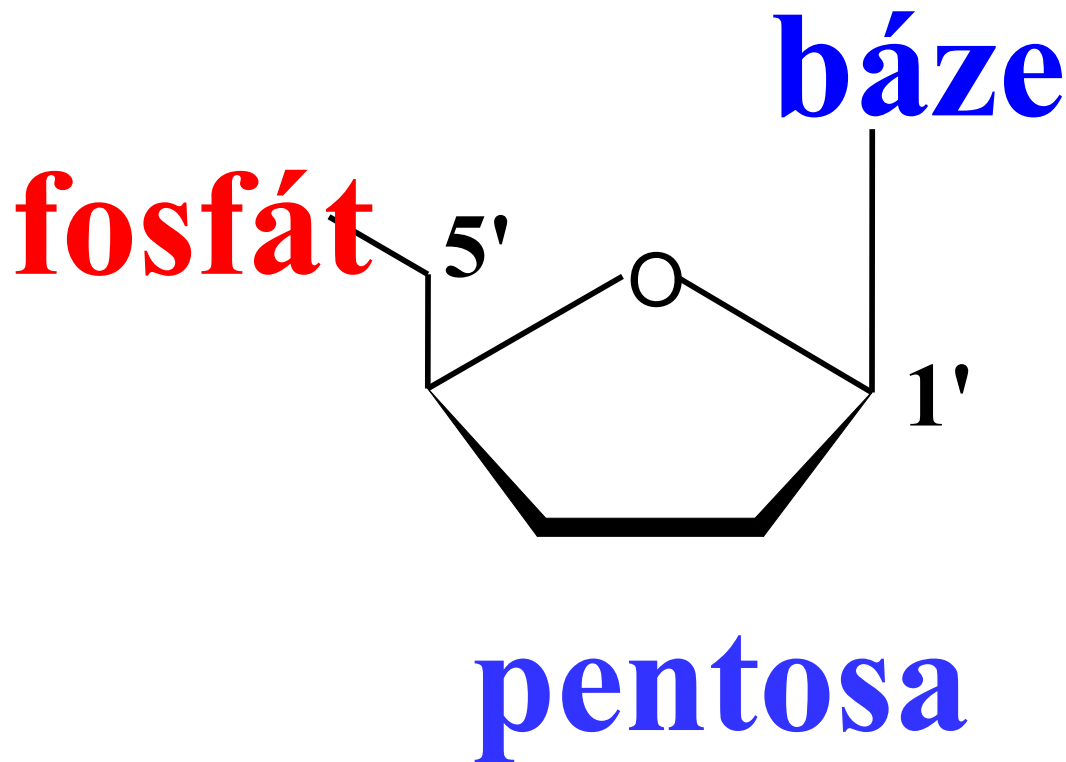


uridin

# Nukleotidy (Nukleosidfosfáty)

Nukleosid + kyselina fosforečná

esterově vázaná na: ribosu, deoxyribosu



Názvy:

Adenosin fosfát (AMP),

Guanosinfosfát (GMP)

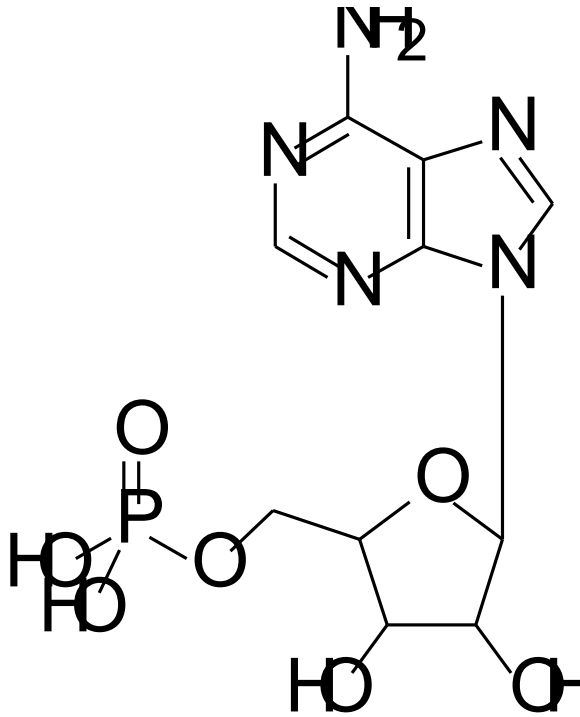
Uridinfosfát (UMP)

Cytidinfosfát (CMP),

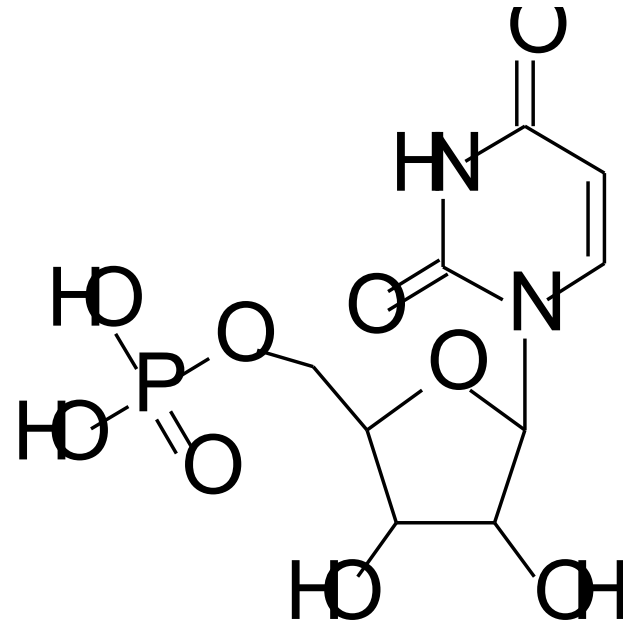
Thymidinfosfát (TMP)



## Příklady nukleotidů



Adenosin monofosfát AMP



Uridin monofosfát UMP

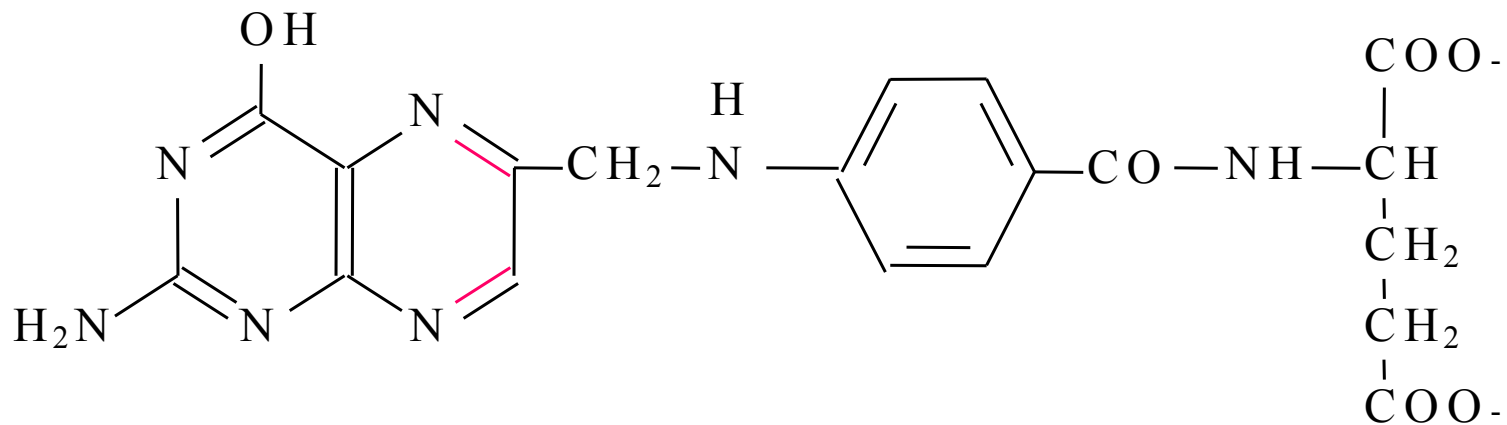
# Biosyntéza purinových a pyrimidinových nukleotidů

- Všechny buňky potřebují ribonukleosidy, deoxyribonukleosidy a jejich fosfáty pro syntézu nukleových kyselin, uchování energie a další reakce
- Purinové a pyrimidinové báze přijaté potravou (nukleoproteiny) prakticky nejsou využívány pro syntézu – biosyntéza musí probíhat v buňkách
- Syntéza purinových a pyrimidinových nukleotidů je koordinována

# Význam kyseliny listové (folátu) pro syntézu nukleotidů

Zdroj: listová zelenina, játra, kvasnice, žloutek

Folát

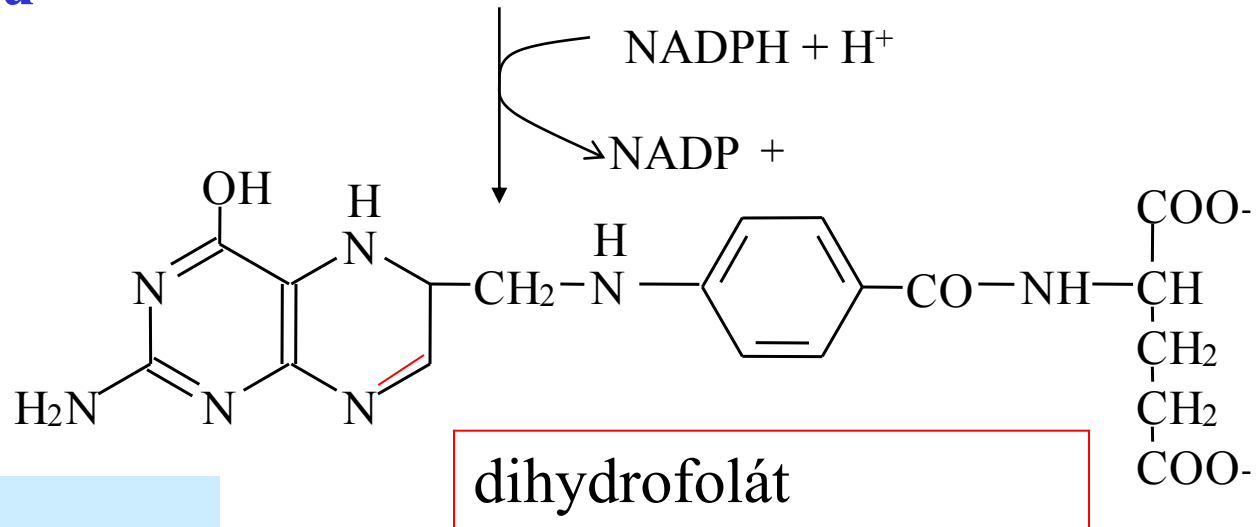


Účinnou formou v organismu člověka je tetrahydrofolát.

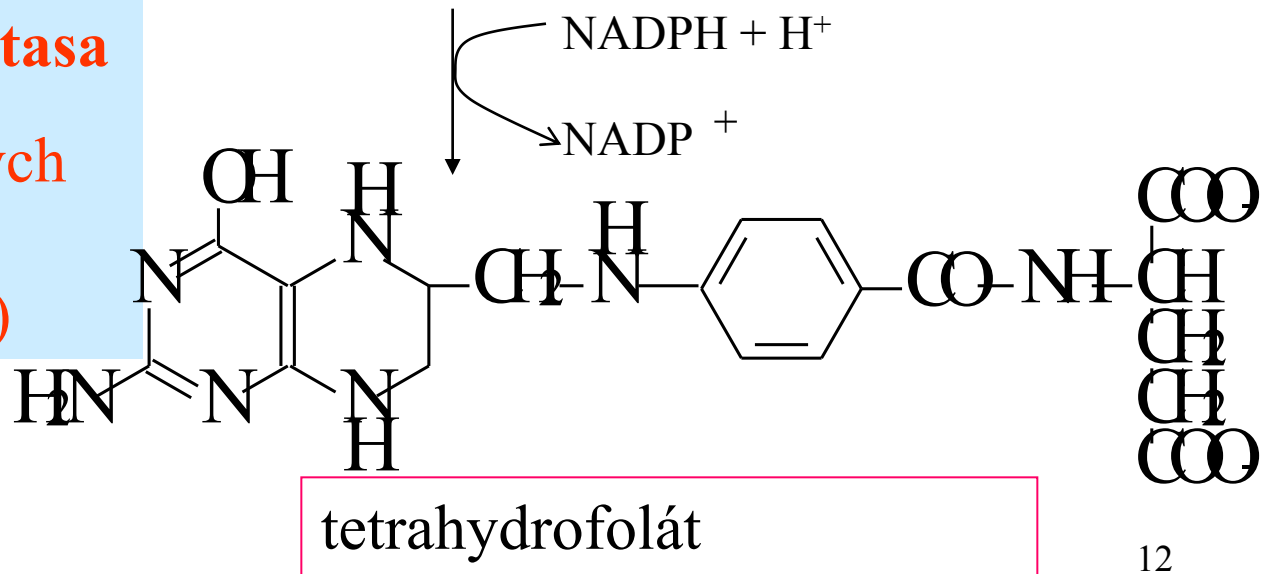
Tetrahydrofolát přenáší jednouhlíkaté skupiny (viz předn. Kofaktory enzymů)

# Vznik tetrahydrofolátu

Folát

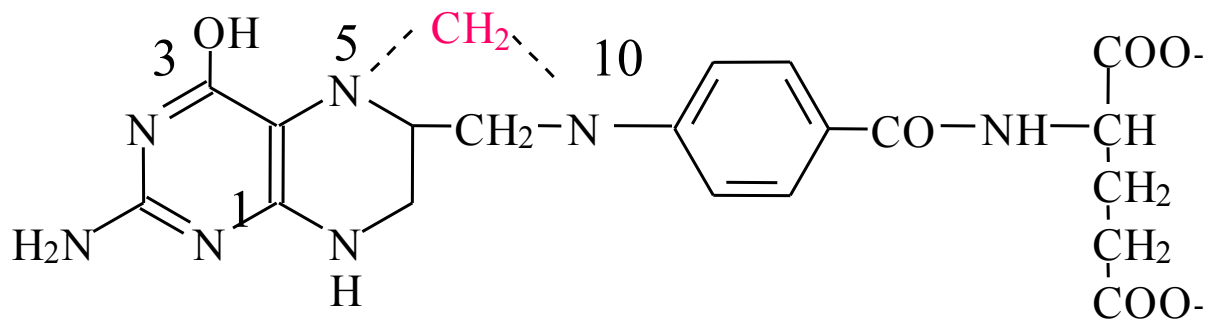


Enzym  
**(dihydro)Folátreduktasa**  
(u živočichů a některých mikroorganismů, katalyzuje obě reakce)

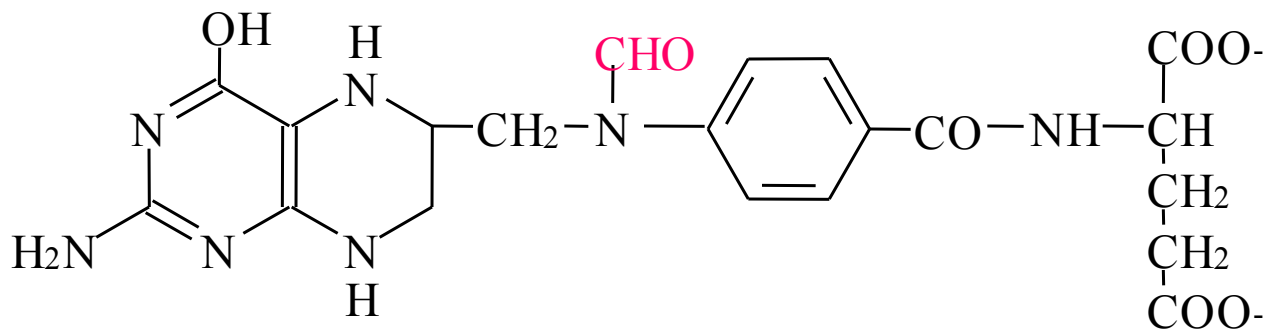


# Využití tetrahydrofolátu – přenos skupin $-\text{CH}_2$ a $-\text{CHO}$ potřebných při syntéze bází

## N-5,N-10- methylen $\text{H}_4\text{F}$ - syntéza thyminu

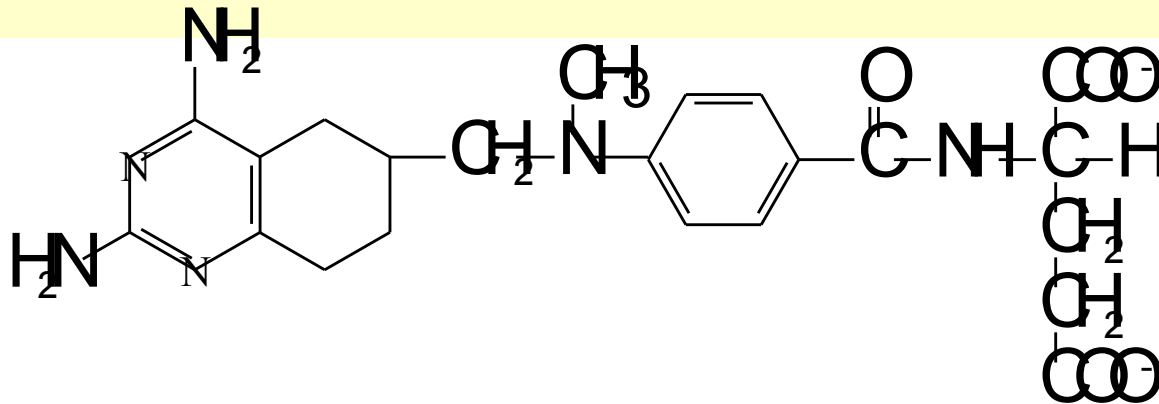


## N-10-formyl $\text{H}_4\text{F}$ - syntéza purinů



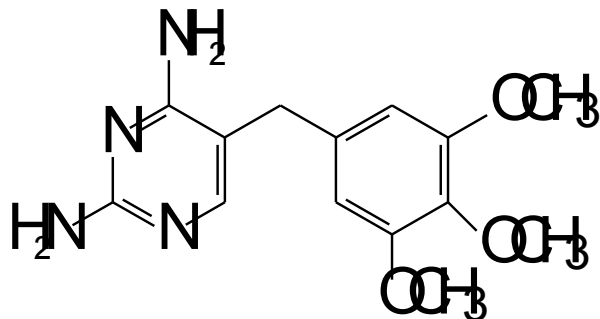
# Inhibitory (dihydro)folátreduktasy:

Methotrexát (protinádorové léčivo)



Trimethoprim (bakteriostatikum)

inhibuje bakteriální dihydrofolátreduktasu



# Dihydrofolátreduktasa - cíl protinádorové terapie.

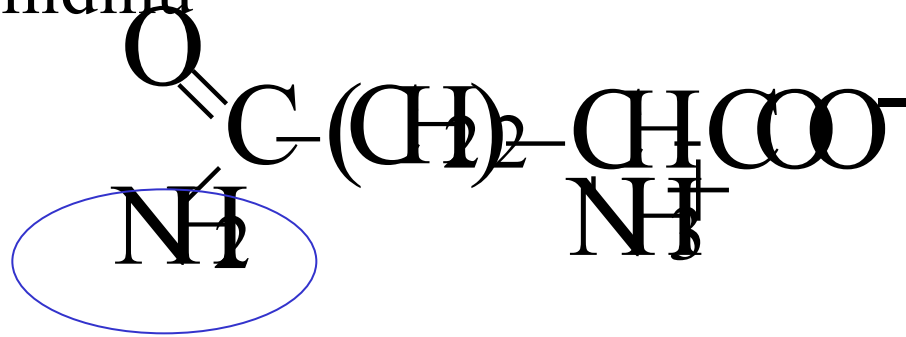
- Dihydrofolát reduktasa byla prvním enzymem, na nějž se zaměřila protinádorová terapie.  
První používaný inhibitor byl aminopterin.  
Váže se k enzymu 1000x pevněji než folát, působí jako kompetitivní inhibitor.  
V současné době užíván **methotrexát** a podobné deriváty (**pemetrexed**).
- Inhibitory syntézy purinů poškozují všechny rychle se dělící buňky – kromě nádorových i buňky kostní dřeně, GI-traktu, imunitní, vlasové folikly.

## **Makrocytární anemie**- důsledek léčby metotrexátem

Deficience tetrahydrofolátu způsobuje nedostatečnou syntézu DNA. Prekursory erytrocytů zvyšují svou velikost, avšak nemohou se dělit, protože nemají prekursorů pro DNA replikaci. Celkový počet erytrocytů klesá (anemie), erytrocyty uvolňované do cirkulace jsou větší.

# Význam glutaminu pro biosyntézu purinů a pyrimidinů

- je hlavním donorem aminoskupiny při syntéze purinů i pyrimidinů



Proč mají rychle dělicí se buňky velkou spotřebu glutaminu ?

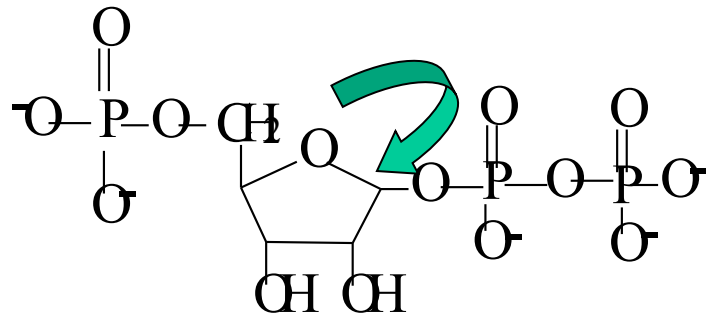




# Rozdíly v biosyntéze purinů a pyrimidinů

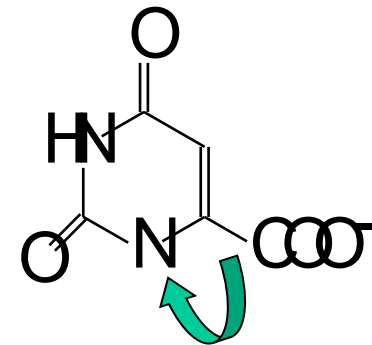
## Puriny

Základem fosforylovaná ribosa, na ni se postupně navazují další skupiny



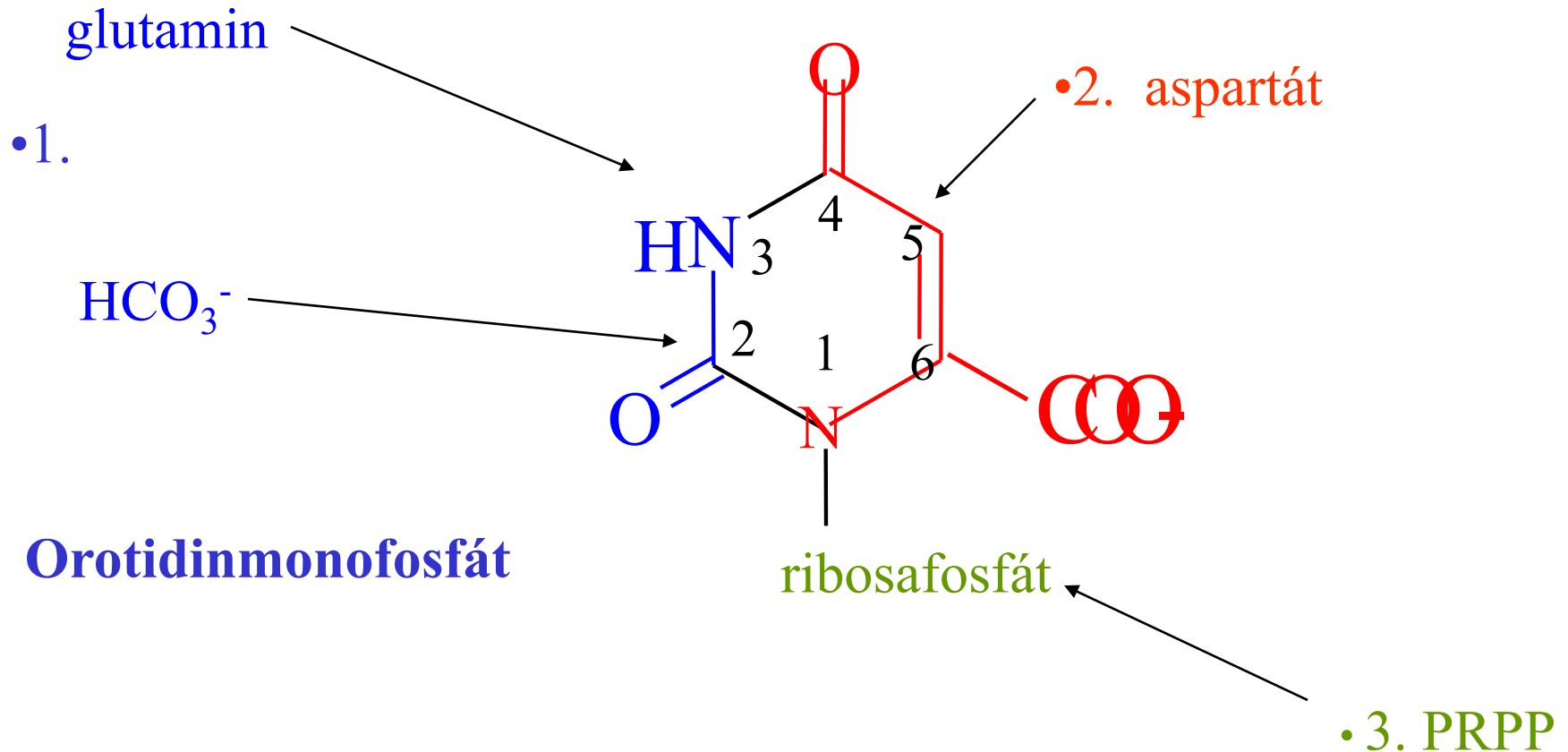
## Pyrimidiny

Nejprve syntéza heterocyklu, po té navázání ribosa-P



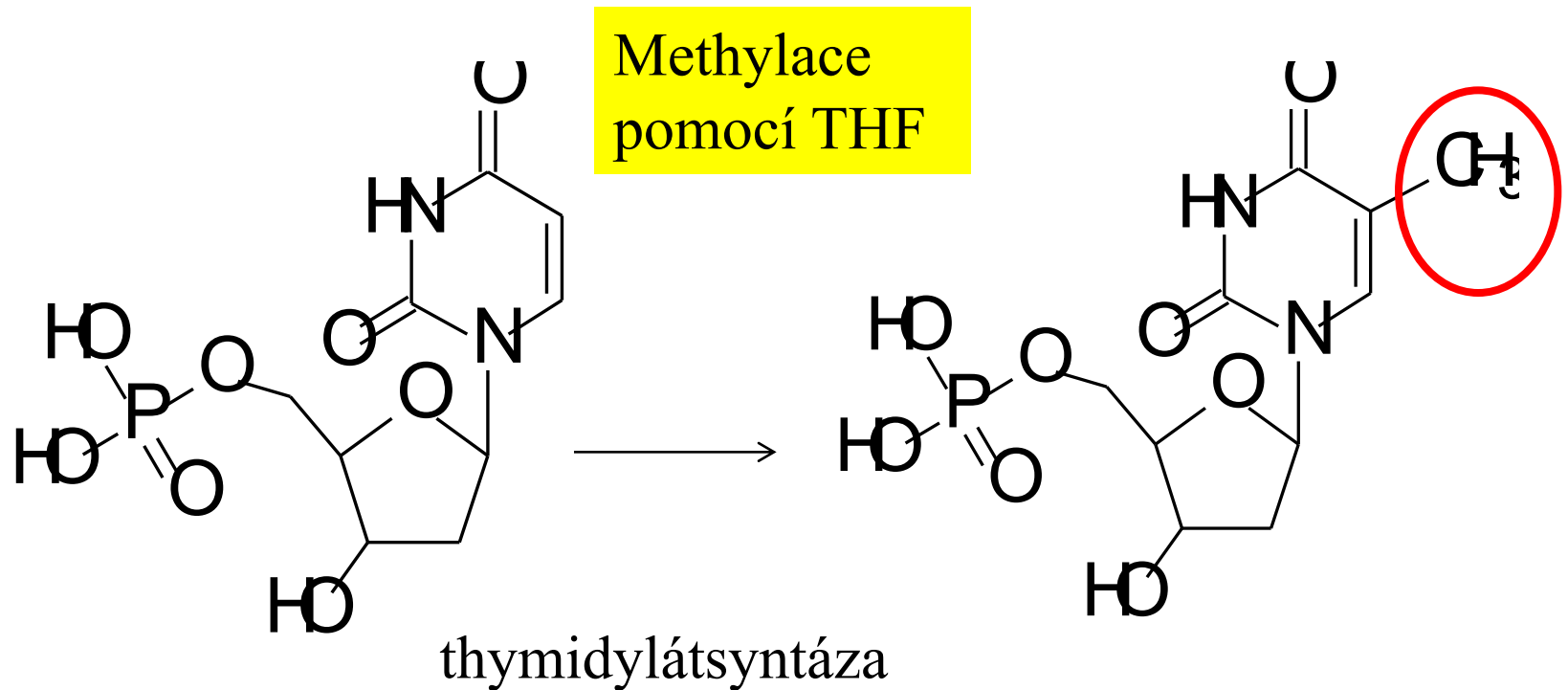
# BIOSYNTÉZA PYRIMIDINŮ

původ atomů v pyrimidinových derivátech



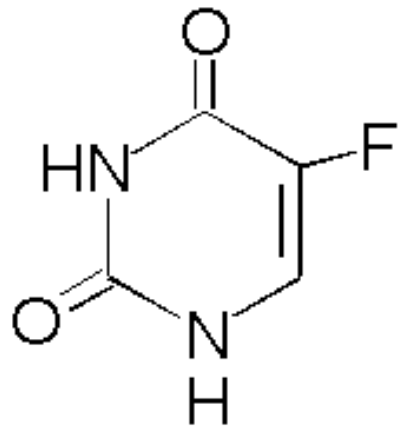
**Dekarboxylací vzniká uridinmonofosfát (UMP) a z něj pak další nukleotidy**

# Syntéza deoxythymidinu (TMP)



Je potřeba aktivní folátreduktasa, pokud je inhibována, syntéza neprobíhá

# Také thymidylát synthasa může být inhibována



5-fluorouracil

Podávání fluorouracilu



v organismu přeměna na

**5-fluorodeoxyuridin monofosfát**



Inhibice thymidylátsynthasy – sebevražedný inhibitor

**Cytostatický účinek léčiva**

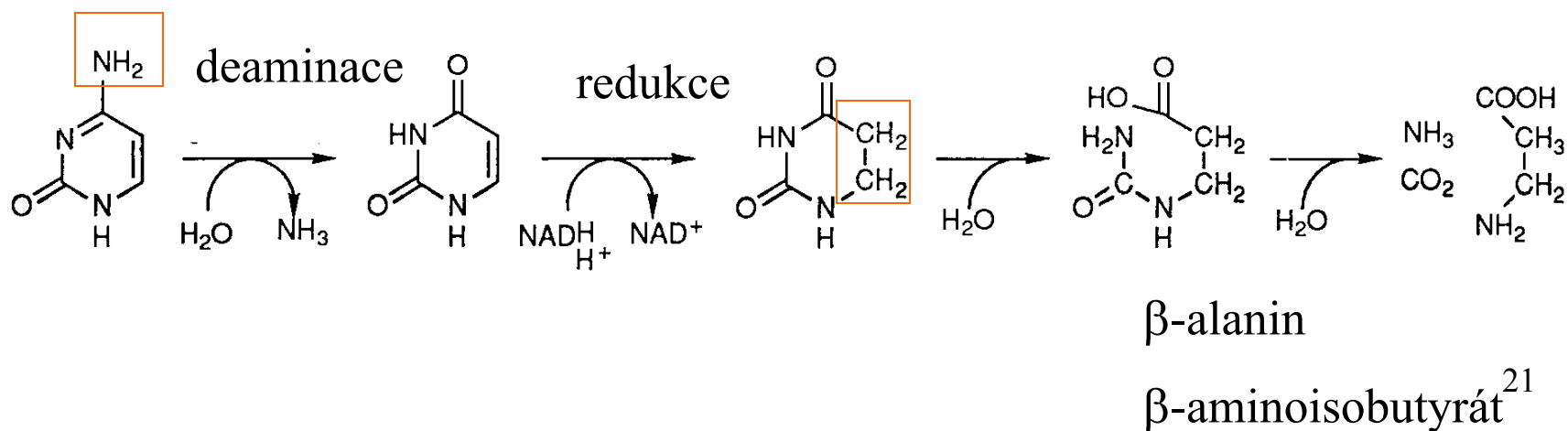
# Odbourávání pyrimidinových nukleotidů

Odštěpení fosfátu a cukerné složky.

Konečné produkty štěpení bází:

$\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\beta$ -alanin, ( $\beta$ -aminoisobutyrát)

rozpuslné metabolity – vyloučeny močí

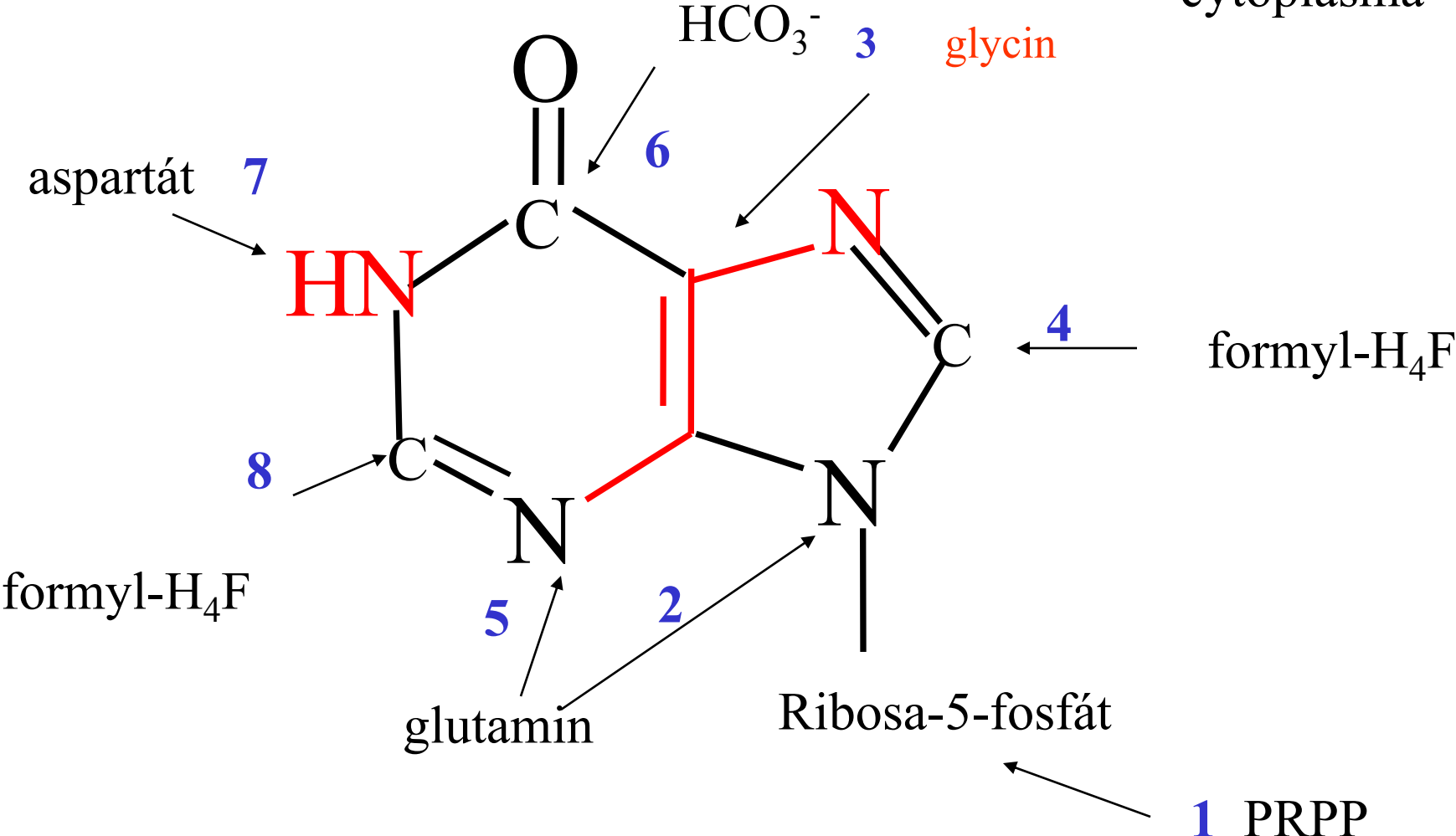


# Biosyntéza purinových nukleotidů

Převážně játra

(multienzymový komplex)

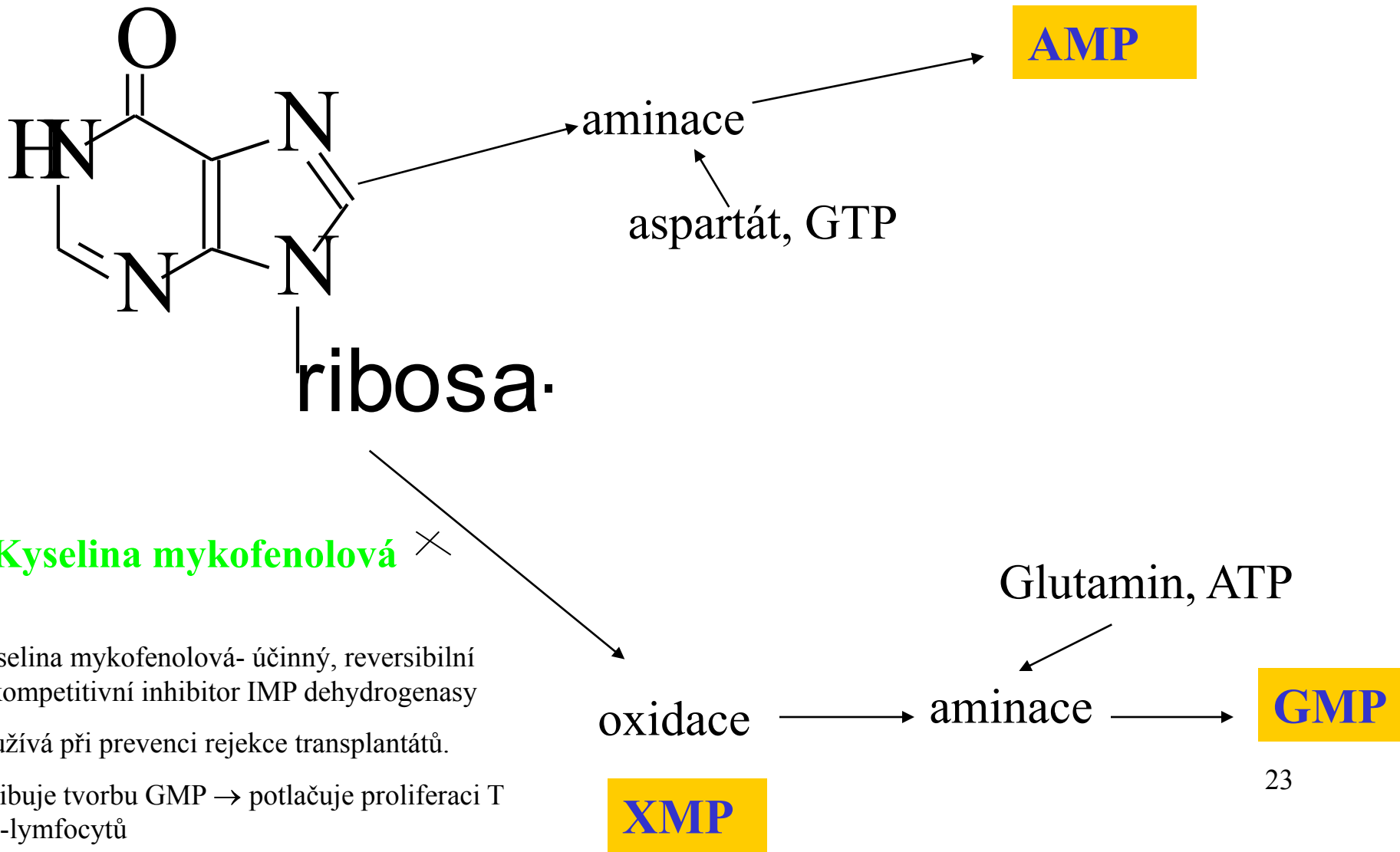
cytoplasma



**Inosin-5-P (IMP)**

# Inosin-5-P (IMP)

## výchozí látka syntézy purinových bází



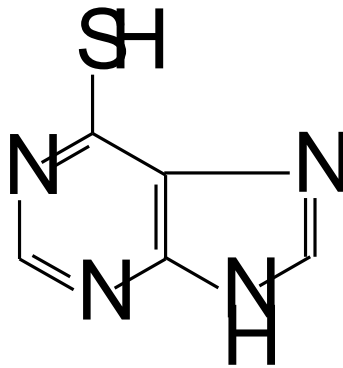
Kyselina mykofenolová- účinný, reversibilní nekompetitivní inhibitor IMP dehydrogenasy

Používá při prevenci rejekce transplantátů.

Inhibuje tvorbu GMP → potlačuje proliferaci T a B-lymfocytů

## Inhibitory syntézy purinů (cytostatika)

- inhibitory dihydrofolátreduktasy
- analogy glutaminu (azaserin)
- 6-merkaptopurin- inhibice přeměny IMP na AMP a GMP



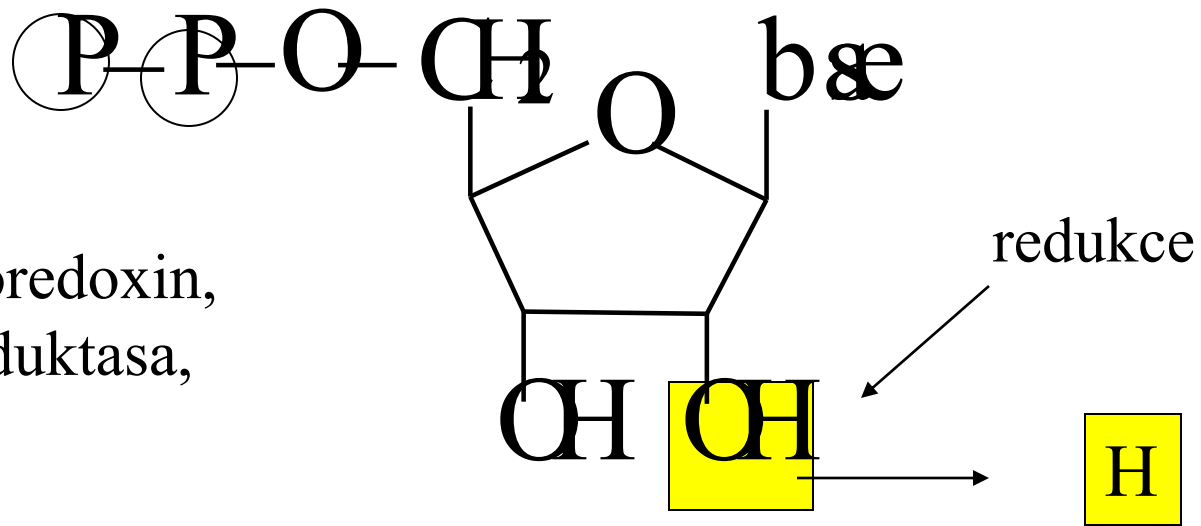
merkaptopurin

Inhibitory jsou extrémně toxické pro tkáně, zejména vyvíjející se (fetus) nebo rychle se dělící (kostní dřeň), kůže, GI trakt, imunitní systém, vlasové folikly. Tyto tkáně jsou při léčbě nádorů postiženy vedlejšími účinky



# Vznik 2-deoxyribonukleotidů (purinových i pyrimidinových)

Nukleosidifosfát → 2-deoxynukleosidifosfát



je potřeba thioredoxin,  
thioredoxinreduktasa,  
NADPH

Thioredoxinreduktasa obsahuje selen

# Hydroxymočovina (hydroxyurea)

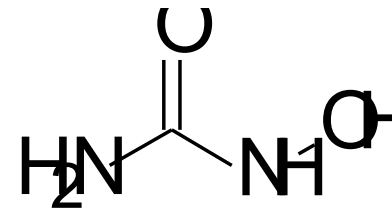
Inhibuje ribonukleotidreduktasu



Syntéza deoxyribonukleotidů je blokována

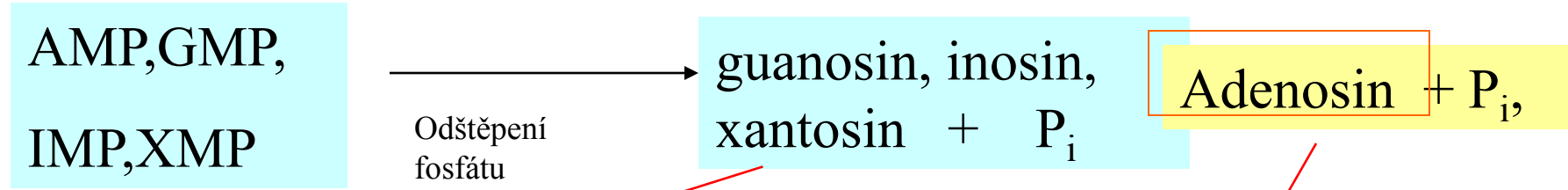


Léčba některých druhů rakoviny



# Odbourání purinových nukleotidů a deoxynukleotidů na hypoxantin a xantin

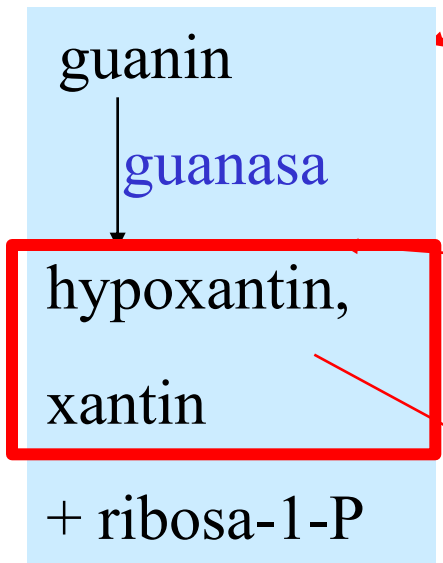
5-nukleotidasa



nukleosidfosforylasa

adenosindeaminasa

Odštěpení ribosy



nukleosidfosforylasa

Odštěpení ribosy



xantinoxidasa



## Deficit adenosindeaminasy

Deficit enzymu → hromadění adenosinu v buňkách (zejména lymfocyty) → přeměna na AMP, dAMP, ADP.....



Inhibice ribonukleotid reductasy v lymfocytech



Klesá produkce dalších nukleotidů



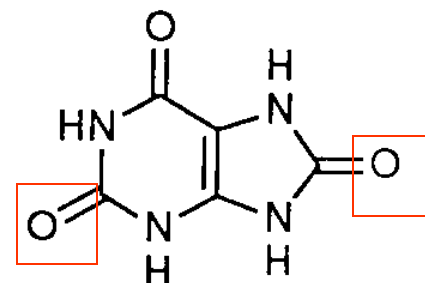
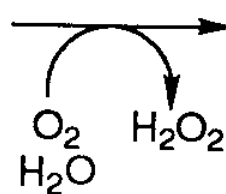
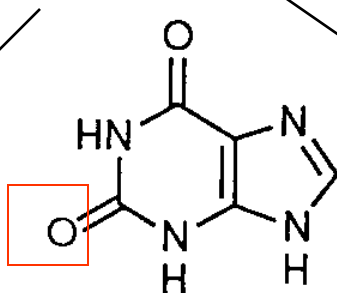
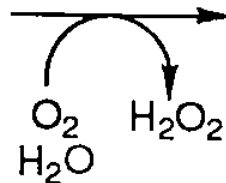
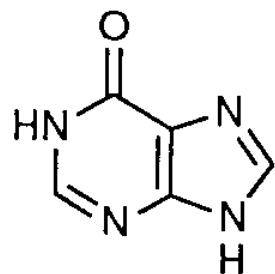
Buňka nesyntetizuje DNA, klesá produkce T- a B- lymfocytů

Jedna z příčin těžkého kombinovaného imunodeficitu (severe combined immunodeficiency disease -SCID).

# Odbourání purinových bází

Inhibice  
allopurinolem

xantinoxidasa



hypoxantin

xantin

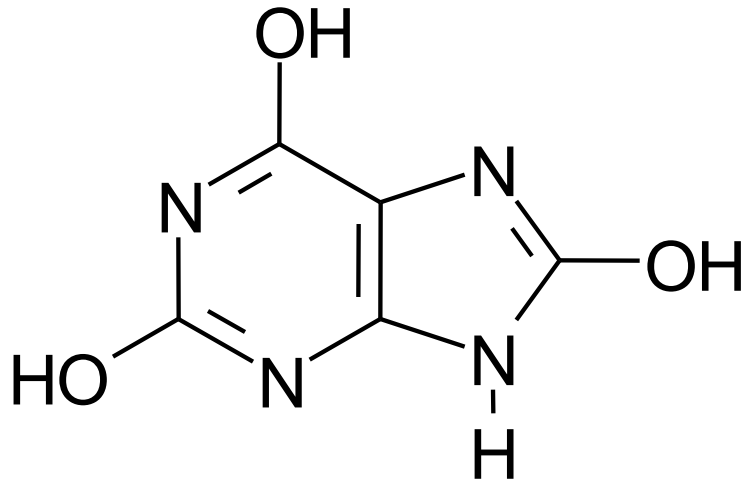
Kyselina močová

(400-600 mg /den)

guanin

guanasa

# Kyselina močová (acidum uricum)



2,6,8-trihydroxypurin

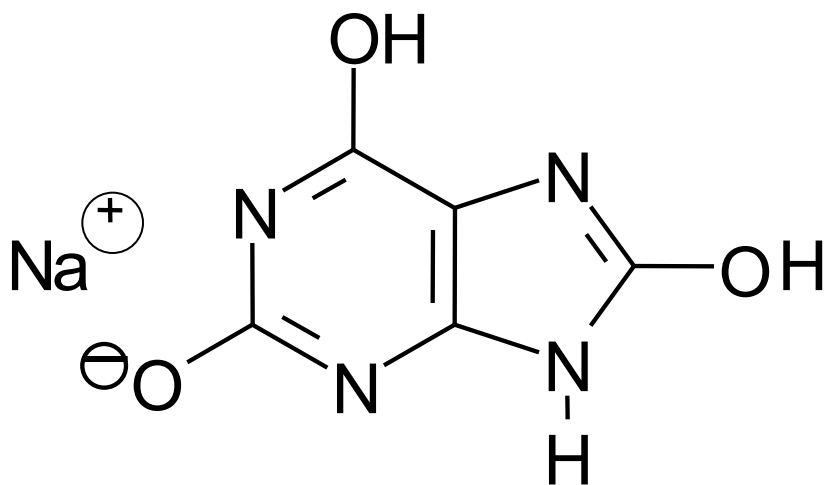
U savců: konečný metabolit purinových bází

U urikotelních organismů (většina plazů a ptáků): vzniká i z aminokyselin.

# Kyselina močová je velmi málo rozpustná v kyselém a neutrálním prostředí

Rozpouští se v alkalickém prostředí za vzniku urátů a hydrogenurátů

Při pH 7,0 je rozpustnost kyseliny močové více než desetinásobně vyšší než při pH 5,0.



hydrogenurát sodný

## Koncentrace kyseliny močové

v lidské plazmě:

muži < 420  $\mu\text{mol/l}$

ženy < 340  $\mu\text{mol/l}$

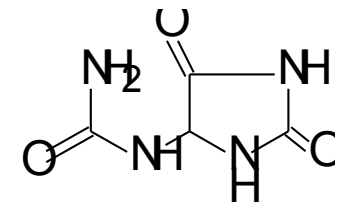
je řádově vyšší než v plazmě většiny savců

Proč?

Chybí nám enzym oxidačně štěpící kyselinu močovou za vzniku rozpustnějšího allantoinu, *urát oxidáza* (= *urikáza*)

***Poznámka:***

Nález allantoinu v biologických tekutinách člověka je ukazatelem oxidačního stresu – vzniká z kyseliny močové působením volných radikálů





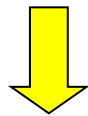
## Důsledky omezené rozpustnosti kys. močové za patologických stavů

- tvorba močových kamenů (kys.močová, urát amonný a sodný) ve vývodných močových cestách (**urátová urolitiáza**)
- při zvýšené tvorbě ukládání do kloubů a tkání, následná zánětlivá reakce (dna)
- akutní nefropatie kys.močové (srážení krystalů kys. močové v ledvinných tubulech při její nadprodukci (např. po chemoterapii))

# Dna

## Příčiny:

- zvýšená produkce kys. močové
- hromadění kys. močové v důsledku metabolických poruch v šetřícím procesu
- snížená clearance kys. močové v ledvinách



**ukládání krystalů kyseliny močové ve tkáních**

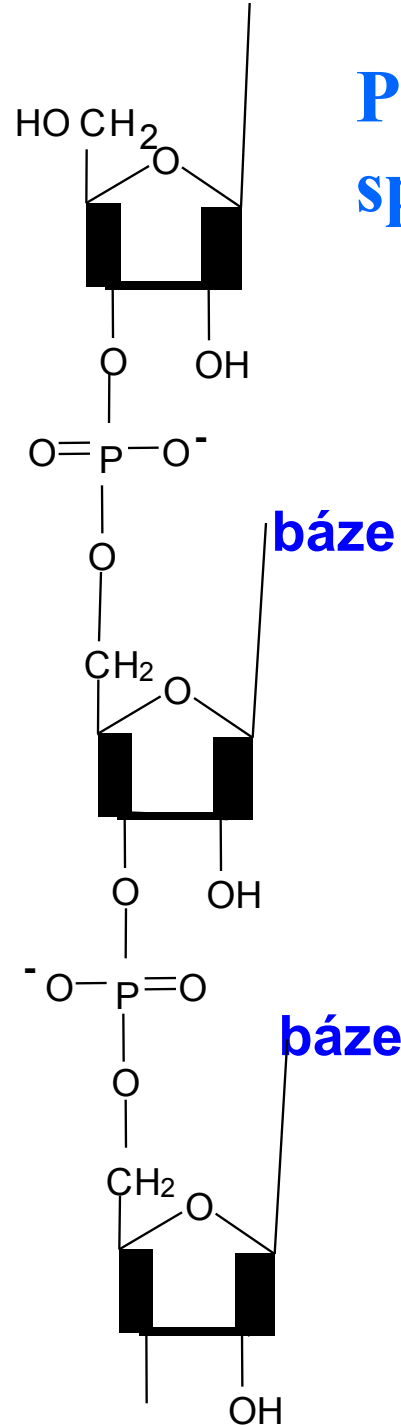
# Nukleové kyseliny

- Polymery s molekulovou hmotností  $10^8$  g/mol
- Polynukleotidy

## Typy nukleových kyselin

	DNA	RNA
Pentosa:	deoxyribosa	ribosa
Báze:	A,G,C,T	A,G,C,U

# Polynukleotidy – nukleotidy spojené fosfodiesterovou vazbou



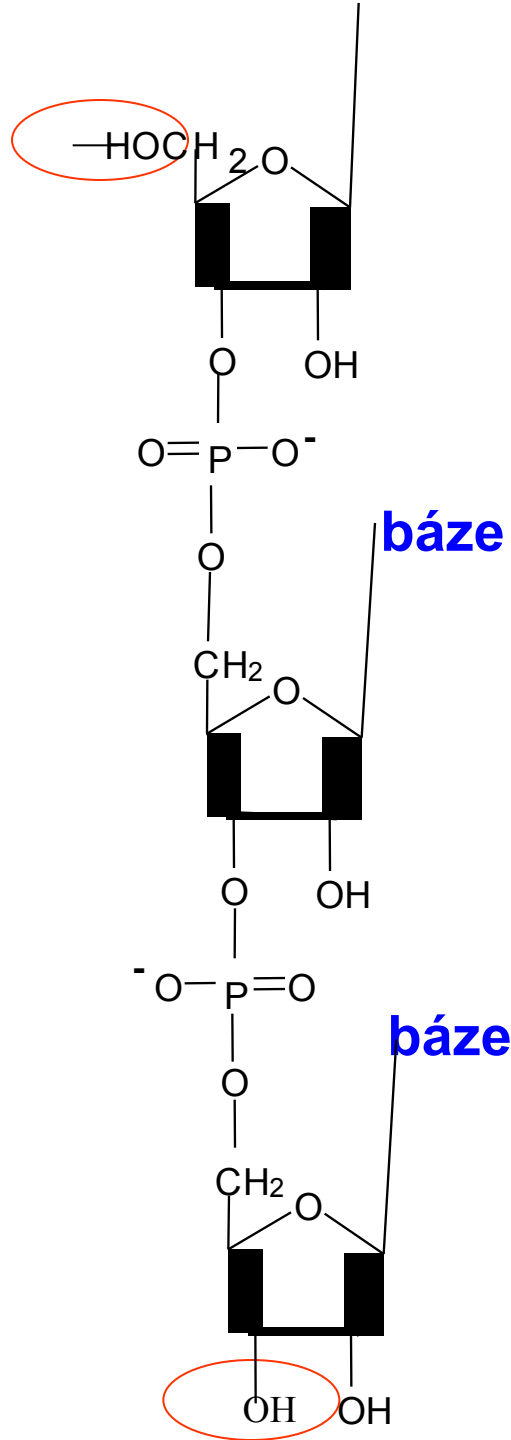
- kovalentní páteř:  
pentosa...kys.fosforečná

- postranní řetězce:  
báze připojené na  
pentosové zbytky N –  
glykosidovou vazbou

Oligonukleotidy  $\leq 50$  nukleotidů

Polynukleotidy  $> 50$  nukleotidů

5' -konec



## Polarita řetězce

rozlišení 5' a 3' konce

### Primární struktura:

pořadí nukleotidových  
zbytků ve směru 5' → 3'

(v tomto směru probíhá vždy  
syntéza)

3' -konec

# DNA

- DNA je nositelem genetické informace
- trojice bází (triplet) v DNA kóduje jednu aminokyselinu
- úsek DNA nesoucí informaci o syntéze jednoho polypeptidového řetězce - **strukturní gen**
- u eukaryontů je DNA organizována v chromatinu (chromosomech)
- Jeden chromosom = 1 molekula DNA

## Velikost molekul

Molekuly DNA jsou největší kovalentní molekuly v organismu.

Velikost se udává počtem párů bází (bp)

### Organismus

### Počet párů bází (bp)

*Borrelia burgdorferi* (bakterie)

946 000

*Escherichia coli* (bakterie)

4 639 221

*Saccharomyces cerevisiae* (kvasinka)

12 070 521

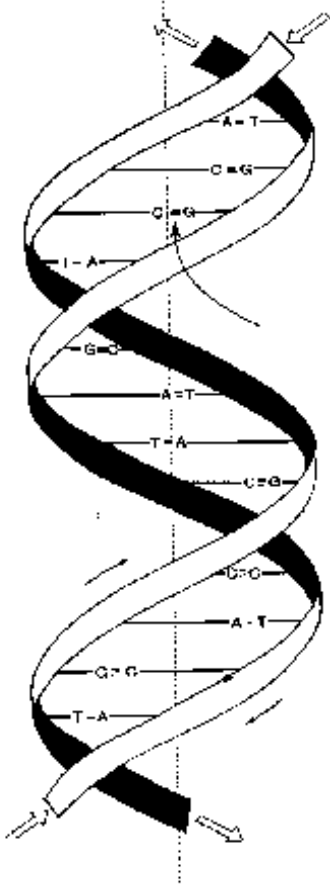
Člověk

3 000 000 000

*Bufo bufo*

6 900 000 000<sup>39</sup>

# Sekundární struktura DNA



nejčastěji dvouvláknová, pravotočivá šroubovice

řetězce uspořádány kolem společné osy

vlákna mají opačnou polaritu

vlákna jsou komplementární

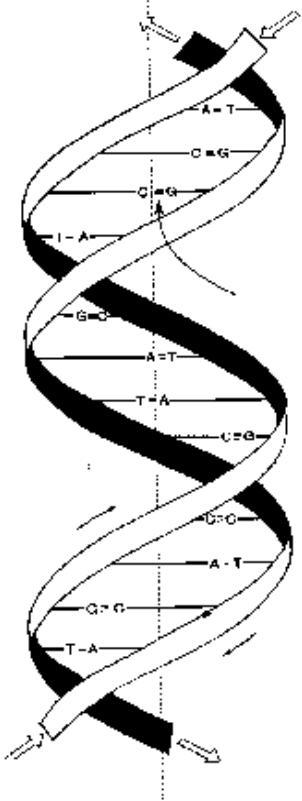
$A=T, G = C$  (Chargaffovo pravidlo)

poměr  $dAMP+dTMP / dGMP+dCMP$   
charakteristický pro každou DNA



# Fosfátové zbytky, ribosa

- tvoří vnější část šroubovice („páteř“)
- hydrofilní charakter
- fosfátové zbytky mají při fyziologickém pH záporný náboj - vážou kationty z roztoku nebo kladně nabitě zbytky proteinů



## Báze

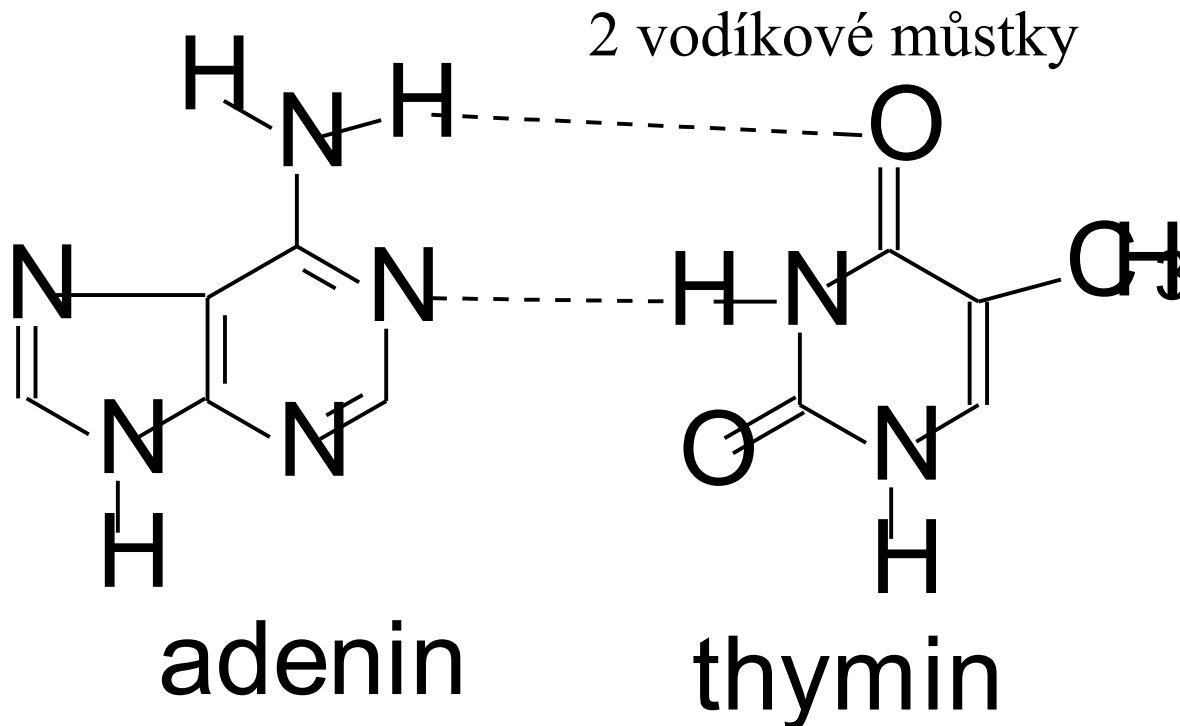
- leží uvnitř dvoušroubovice
- jsou navzájem rovnoběžné (stohování bází)
- komplementární báze se vážou vodíkovými můstky

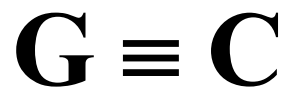
# Párování bází - princip komplementarity

Párování bází je neenzymová, spontánní reakce

Umožňuje párům bází zaujmout energeticky nejvýhodnější konformaci v rámci dvojšroubovice

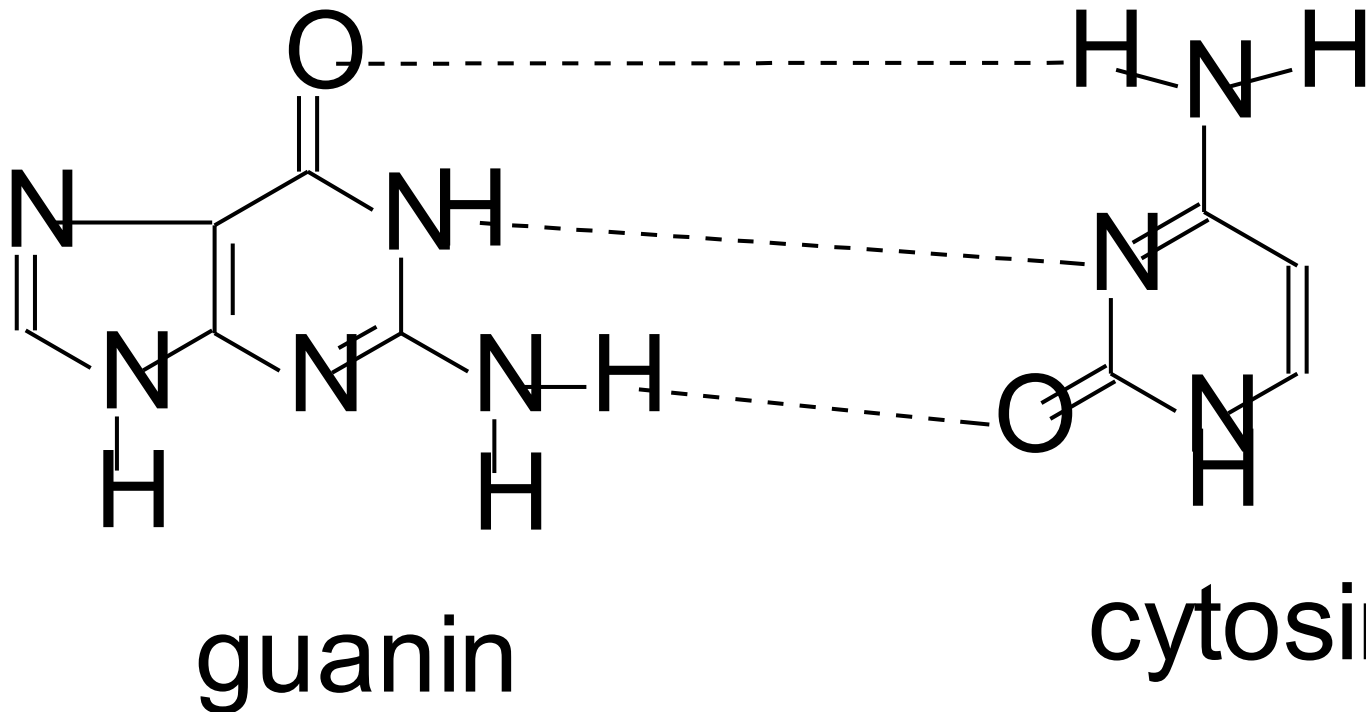
**A=T**





3 vodíkové můstky

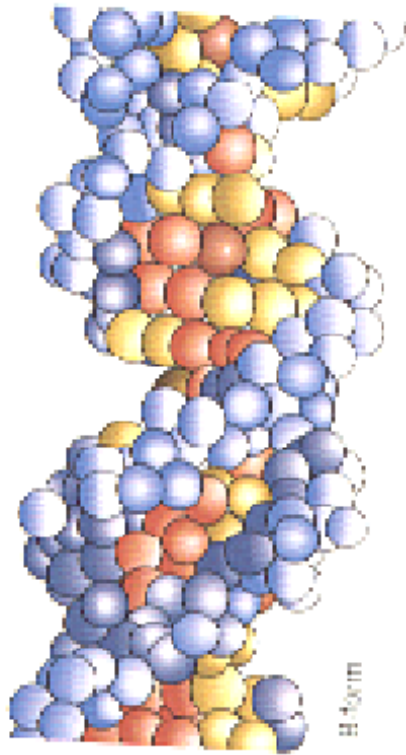
→ Vazba  $G \equiv C$  je silnější než vazba  $A=T$



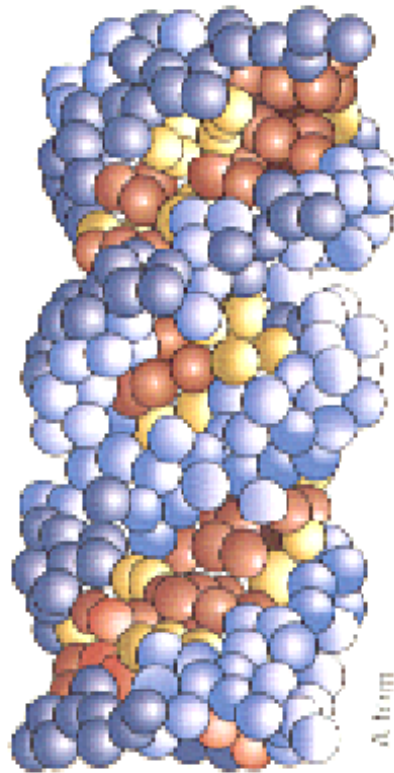
Pro párování jsou významné laktamové formy bází

# Konformační formy DNA

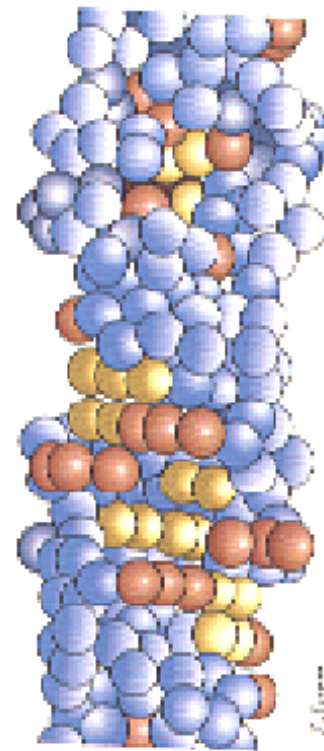
liší se hustotou závitů, mírou hydratace, směrem otáčení šroubovice



B-forma

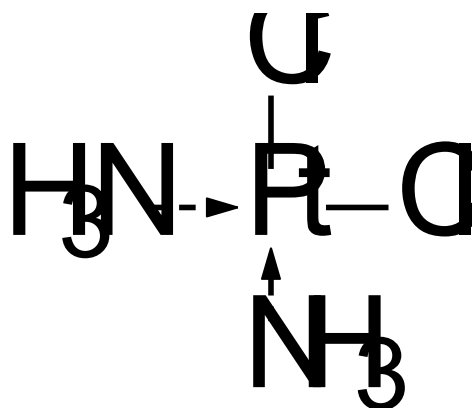


A-forma



Z-forma

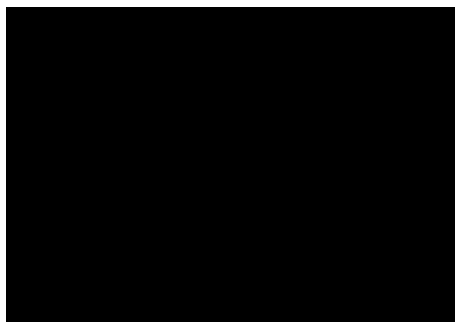
# Protinádorové léky mohou měnit tvar DNA



Cis-platina

(cis-diammin-dichloroplatina (II))

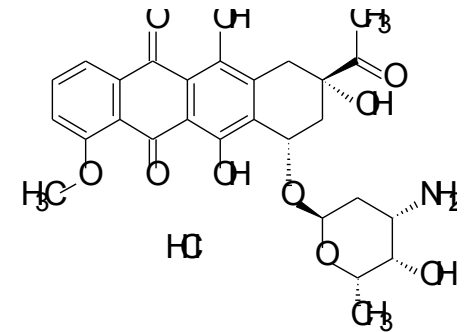
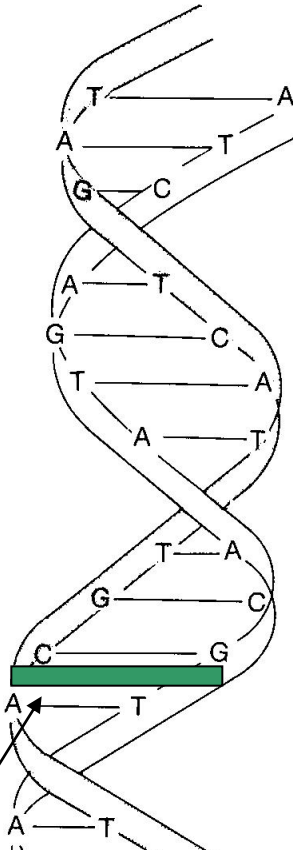
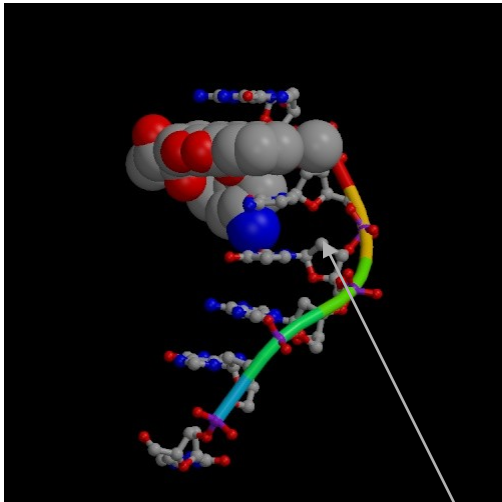
Atomy chloru jsou nahrazeny dusíky bází, lék se váže na DNA, mění její prostorovou strukturu. Vznikají interkalační vazby mezi řetězci, je zabráněno replikaci, nastává apoptóza.



Nověji též karboplatina

# Interkalace

- vmezeření mezi báze DNA



daunorubicin

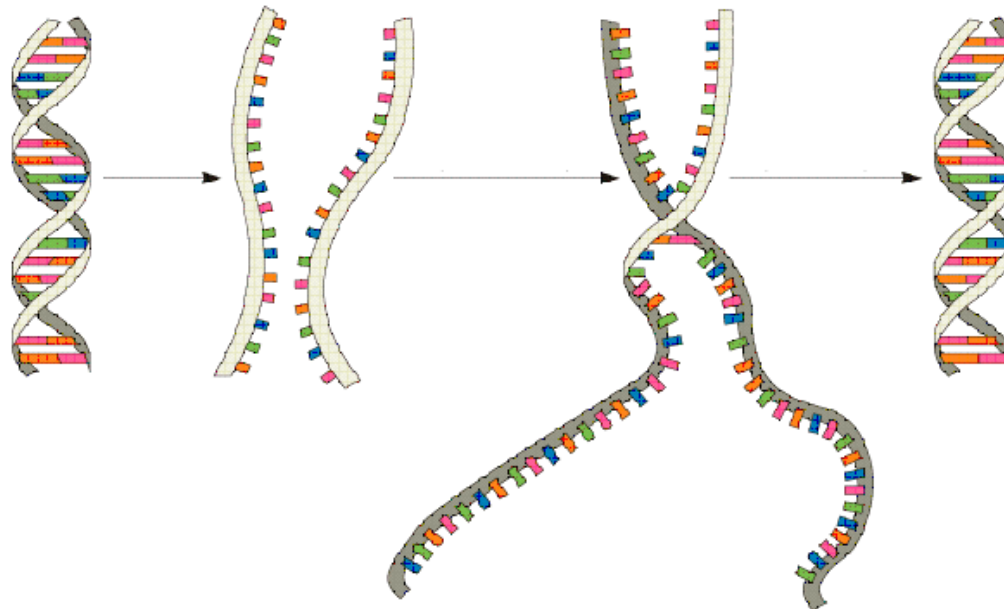
Interkalace cytostatika do dvojité šroubovice DNA.

Struktura DNA je tím narušena a dochází k poruchám při transkripci a replikaci (např. doxorubicin, daunorubicin – protinádorové léky)

Též barvení DNA (ethidium bromid)

# Denaturace a renaturace DNA

- Dvouvláknová DNA je nativní formou DNA
- Přeměna na jednovláknovou formu - **denaturace**
- Denaturace probíhá jen in vitro
- Dochází k přerušení vodíkových můstků mezi bázemi
- Zpětná přeměna jednovláknové DNA do dvoušroubovice - **renaturace**



# Vlivy vyvolávající denaturaci (tání) = vlivy vyvolávající přerušování H-vazeb

- vysoká teplota
- nízká koncentrace solí (větší odpuzování fosfátových zbytků)
- změna pH
- dvouvláknová DNA s vyšším obsahem G≡C má vyšší odolnost vůči denaturaci

Teplota tání  $T_m$  – teplota při níž 50 % DNA je odděleno

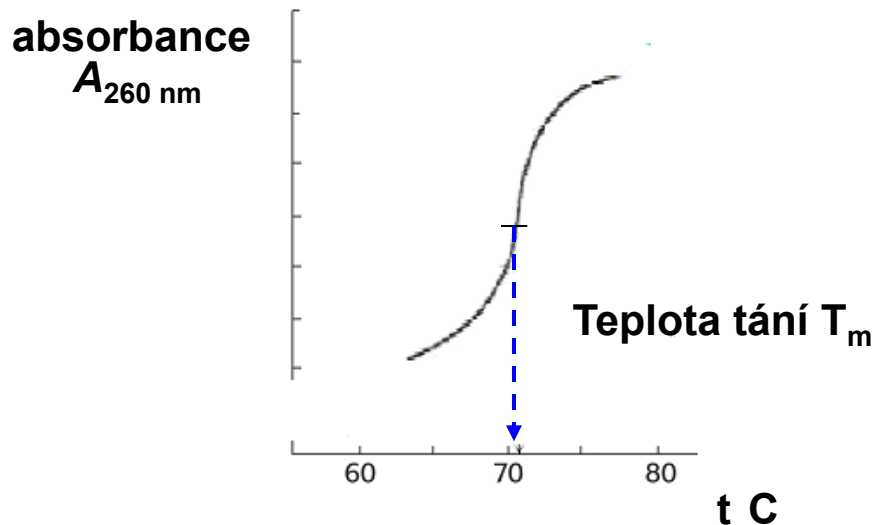


# Sledování denaturace DNA

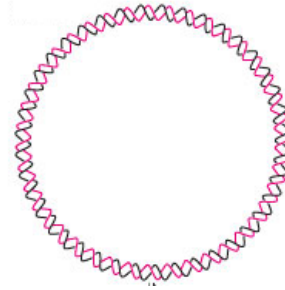
- konjugované dvojné vazby v bázích DNA vyvolávají absorpci roztoku při 260 nm
- absorpce jednovláknové DNA je vyšší než dvouvláknové (hyperchromní posun)



- denaturace DNA může být sledována na základě měření absorpce při 260 nm



# Kružnicová DNA



- viry, plasmidy, prokaryontní chromosomy, chromosomy mitochondrií
- dvoušroubovice a opačná polarita řetězců jsou zachovány, nejsou volné 3'- a 5'- OH skupiny
- často superstáčení
- může být i jednovláknová



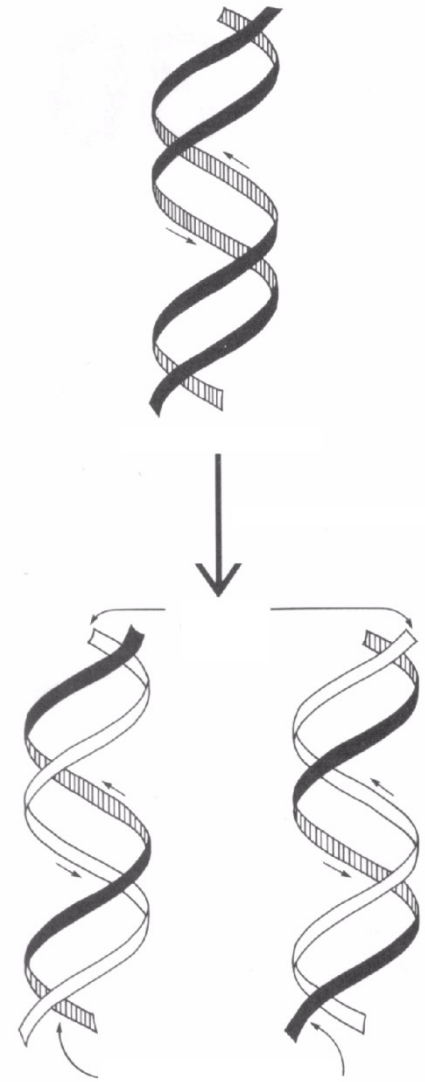
# Syntéza DNA - replikace

Replikace (reduplikace) = zdvojování

Každé ze dvou mateřských vláken DNA slouží jako templát pro syntézu komplementárních vláken

V nových řetězcích se báze řadí na principu komplementarity vůči bazím v templátovém řetězci

U eukaryontů probíhá v jádře



# Velikost DNA x velikost buňky

Eukaryotická buňka = 20  $\mu\text{m}$  průměr

jádro = 5 – 10  $\mu\text{m}$

Lidská haploidní b. = 23 chromosomů =  $3 \times 10^9$  párů bází

$1.3 \times 10^8$  párů bází/ chromosom

1 pár bází v B formě - 0.34 nm  $\rightarrow$  1 chromosom = 5 cm

23 chromosomů = 115 cm

Diploidní b. = 46 chromosomů = 2 m délka !!!



**??? Jak se DNA může směstnat do jádra ?**

# Vyšší struktury DNA

- chromatin - komplex DNA (40 %) a proteinů (60 %)
- základní jednotkou chromatinu je nukleosom

# Nukleosomy



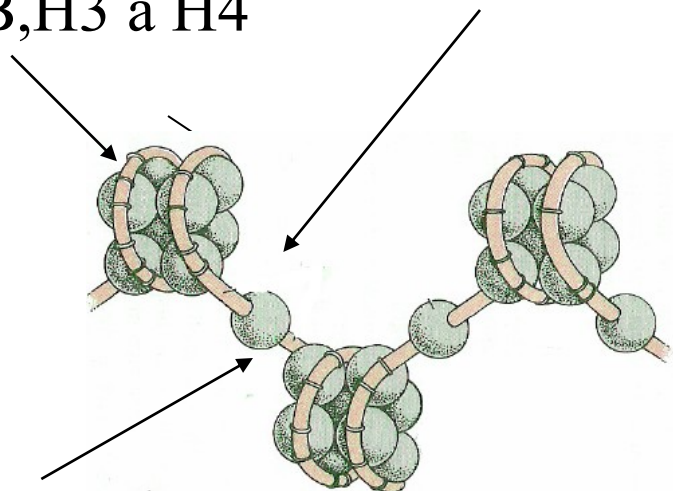
Stočení dvou závitů dihelixu DNA ( $\approx 140$  bází) kolem oktameru histonu  
zkrácení molekuly DNA na  $1/3$

oktamer histonů

H2A, H2B, H3 a H4

spojovací úsek DNA ( $\approx 60$  bází -  
„volná DNA“ - linker DNA)

histon H1



Histony:

bazické bílkoviny, vysoce konzervovaná struktura

$\approx 100$ AK, 25% Lys a Arg

Kladně nabitě skupiny Lys a Arg reagují se záporně nabitými fosfáty

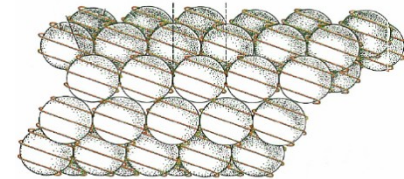
Typy: H1, H2A, H2B, H3 a H4

# Úrovně kondenzace chromatinu

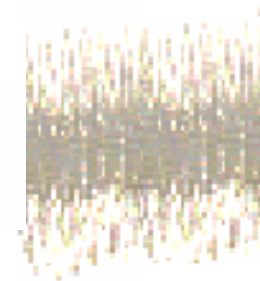
- dvoušroubovice DNA obtočená kolem nukleosomu - „korálková“ forma – vlákno 10 nm



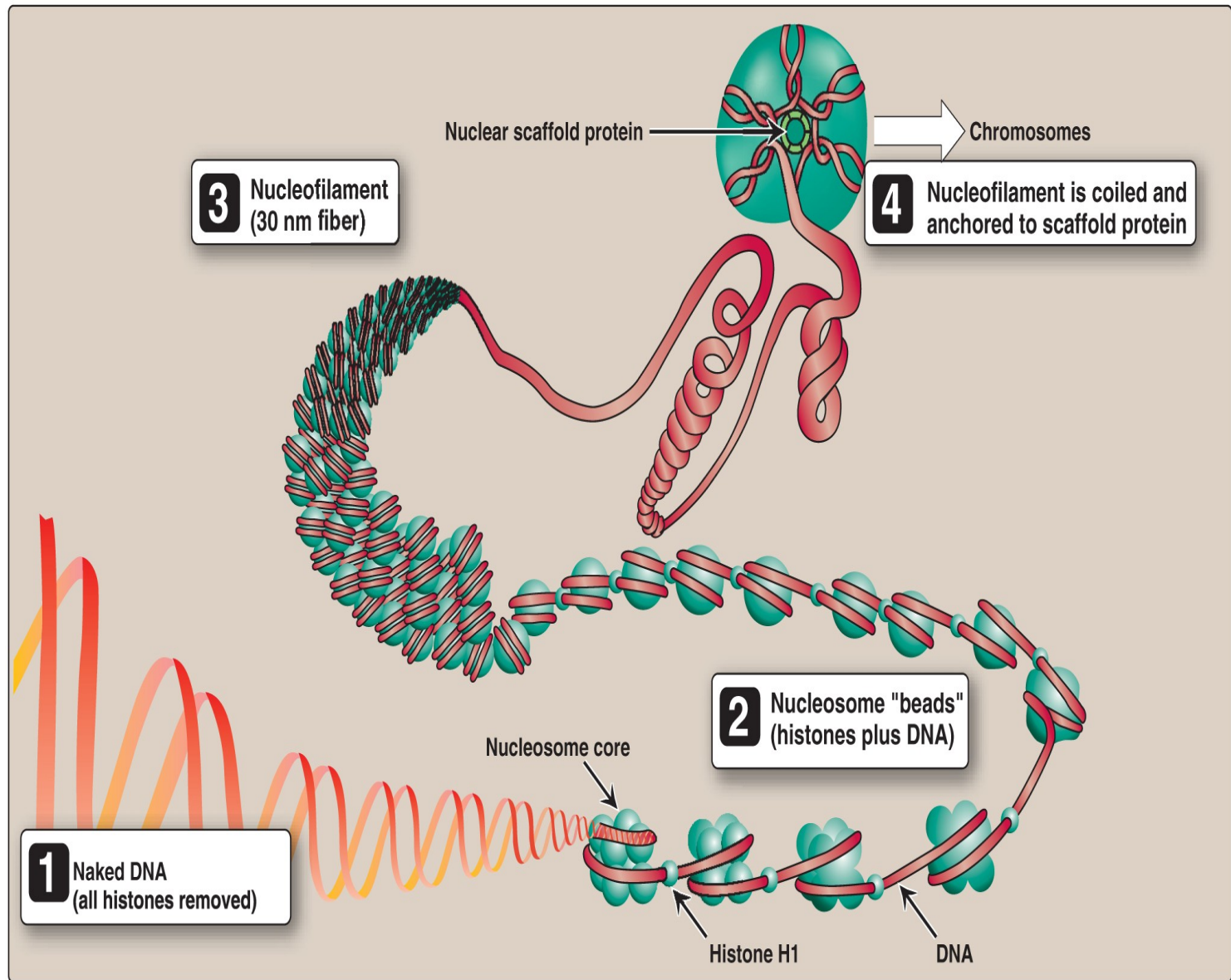
- z kondenzovaných nukleosomů - vlákno 30 nm



- kondenzace vláken do smyček (tyčinky 700 nm)

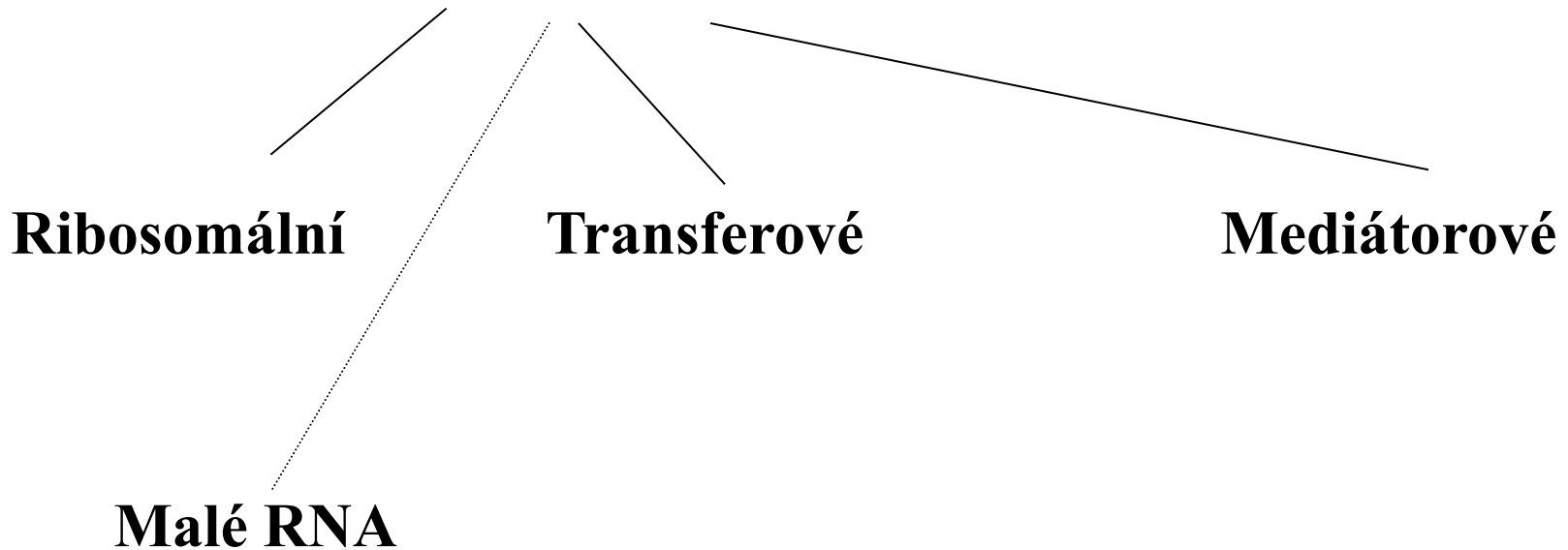


- Smyčky (20 000-80 000 párů bází) jsou v jádře zakotveny k podpůrné matrix (nebazické proteiny)





# Ribonukleové kyseliny



## Složení RNA

- cukerná složka : ribosa
- báze: A,G,C,U

není obsažen thymin

častý výskyt modifikovaných bází

# Sekundární struktura RNA

Molekuly jsou kratší

Zpravidla jednovláknové  
poměr A/U  $\neq$  G/C

Výskyt dihelikálních struktur (stopky a smyčky)

Párování: A-U, C-G (U-G)- neperfektní párování

## Terciární struktura RNA

Prostorové uspořádání molekul RNA

Vzájemná interakce mezi různými částmi molekuly – vodíkové vazby,  
van der Waalsovy síly

Interakce s proteiny

# Transkripce

Proces tvorby RNA na podkladu struktury DNA

Je přepisován pouze jeden řetězec dvoušroubovice DNA –  
**templátový řetězec**

Druhý řetězec se nazývá **kódující** (jeho sekvence bází odpovídá transkriptu, pouze místo U je T)

**Enzym zodpovědný za transkripci je DNA-dependentní RNA polymerasa (transkriptasa)**



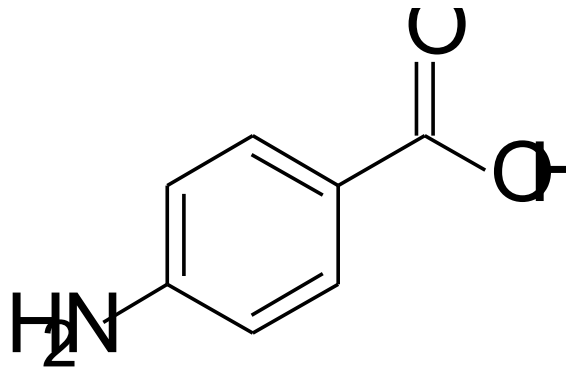
# Sulfonamidy x folát

- Chemoterapeutika (např. Sulfamethoxazol)

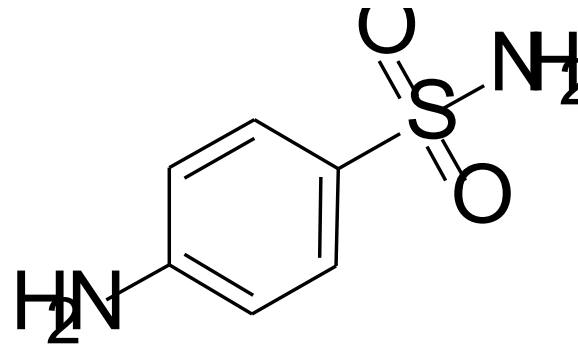
Strukturní analogy kyseliny p-aminobenzoové, deriváty sulfanilamidu.

Kompetice při syntéze kyseliny listové v bakteriích (růstový faktor).

Sulfonamidy jsou proto účinné na bakterie, které syntetizují kys.listovou (streptokoky, hemofily ad.)



p-aminobenzoová kyselina (PABA)



sulfanilamid

Kombinace trimethoprim + sulfamethoxazol 1:5 (kotrimoxazol) inhibuje dva stupně v metabolismu bakteriální kys.listové