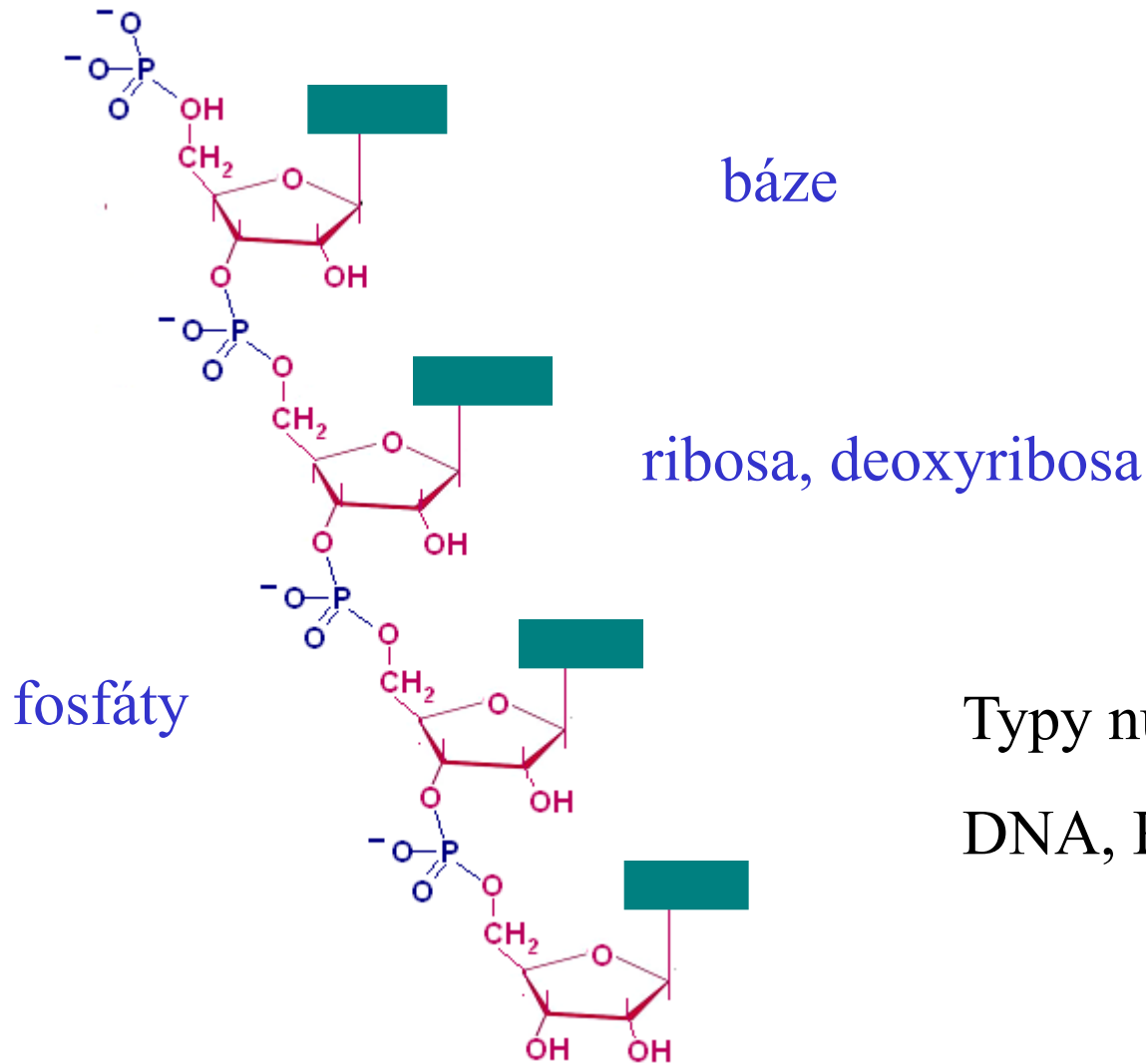


Metabolismus purinových a pyrimidinových nukleotidů, struktura nukleových kyselin

© Biochemický ústav LF MU 2013
(E.T.)

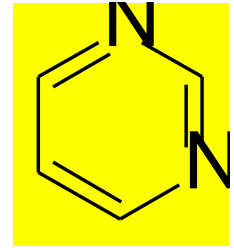
Polynukleotidy

Základní komponenty polynukleotidů



Typy nukleových kyselin:
DNA, RNA

Pyrimidinové báze



cytosin

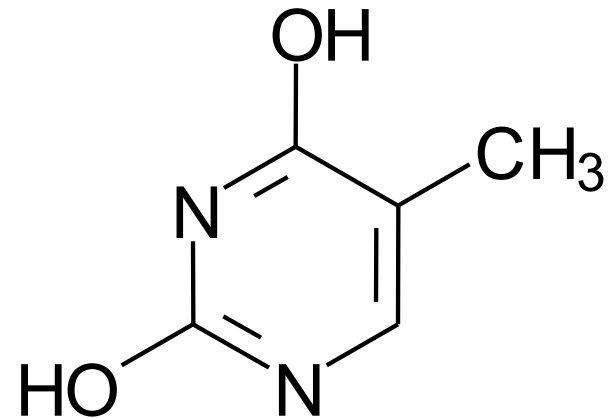
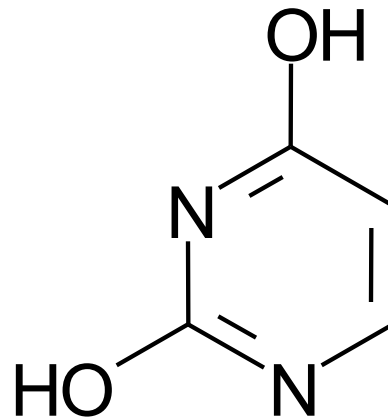
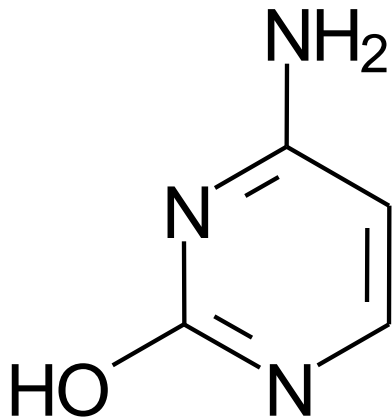
uracil

thymin

2-hydroxy-4-aminopyrimidin

2,4-dihydroxypyrimidin

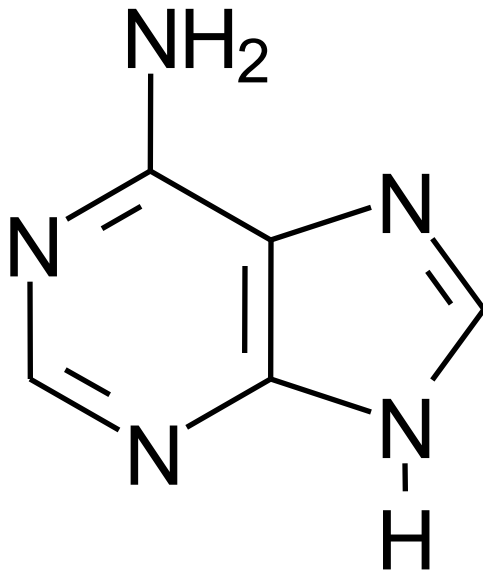
2,4-dihydroxy-5-methylpyrimidin



Purinové báze

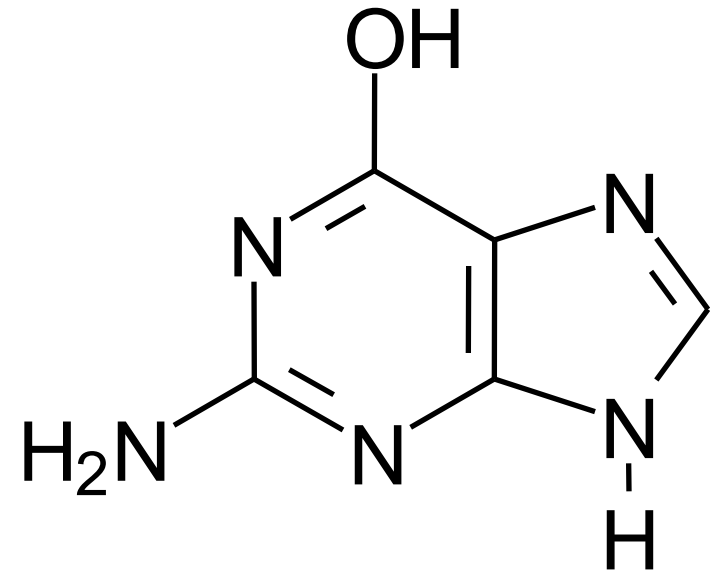


adenin



6-aminopurin

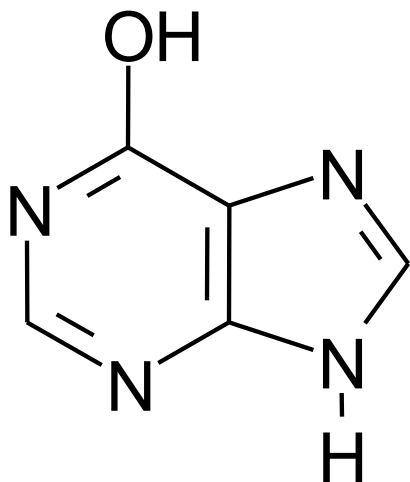
guanin



2-amino-6-hydroxypurin

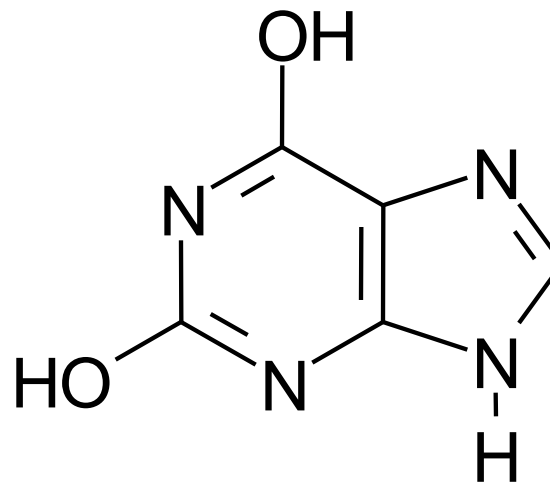
Purinové báze

hypoxantin



6-hydroxypurin

xantin



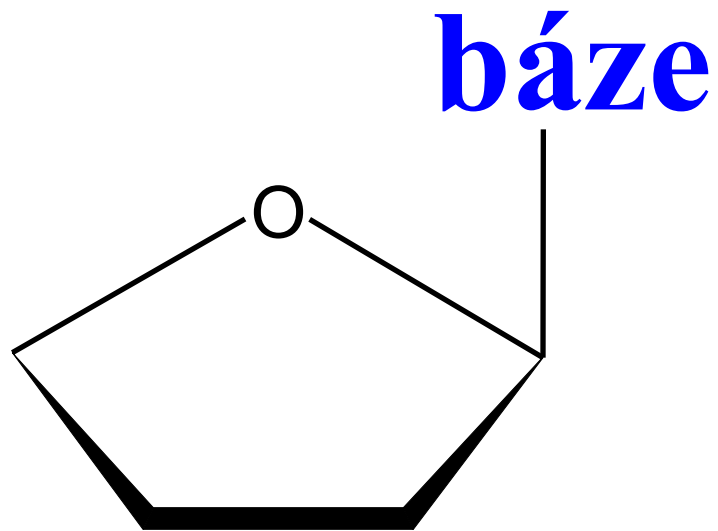
2,6-dihydroxypurin

Vznikají při metabolismu purinových bází

Nukleosidy

báze + ribosa

base + 2-deoxyribosa

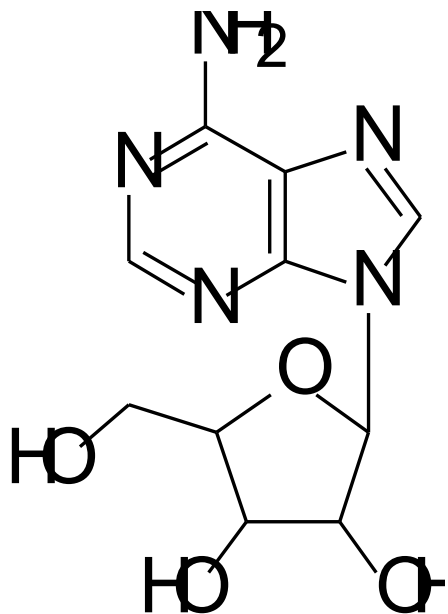


Názvy:

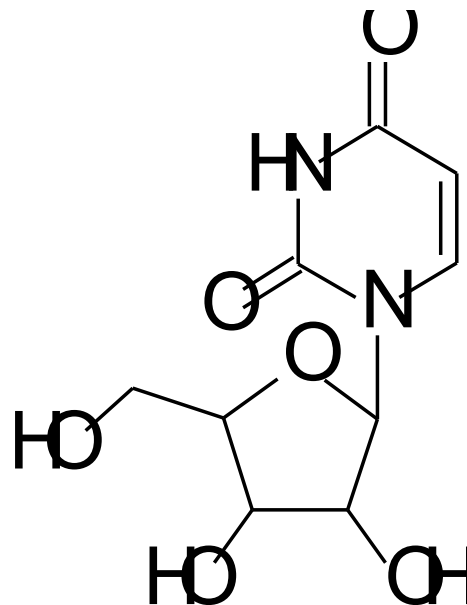
Adenosin, guanosin

Uridin, cytidin, thymidin

Příklady nukleosidů



adenosin

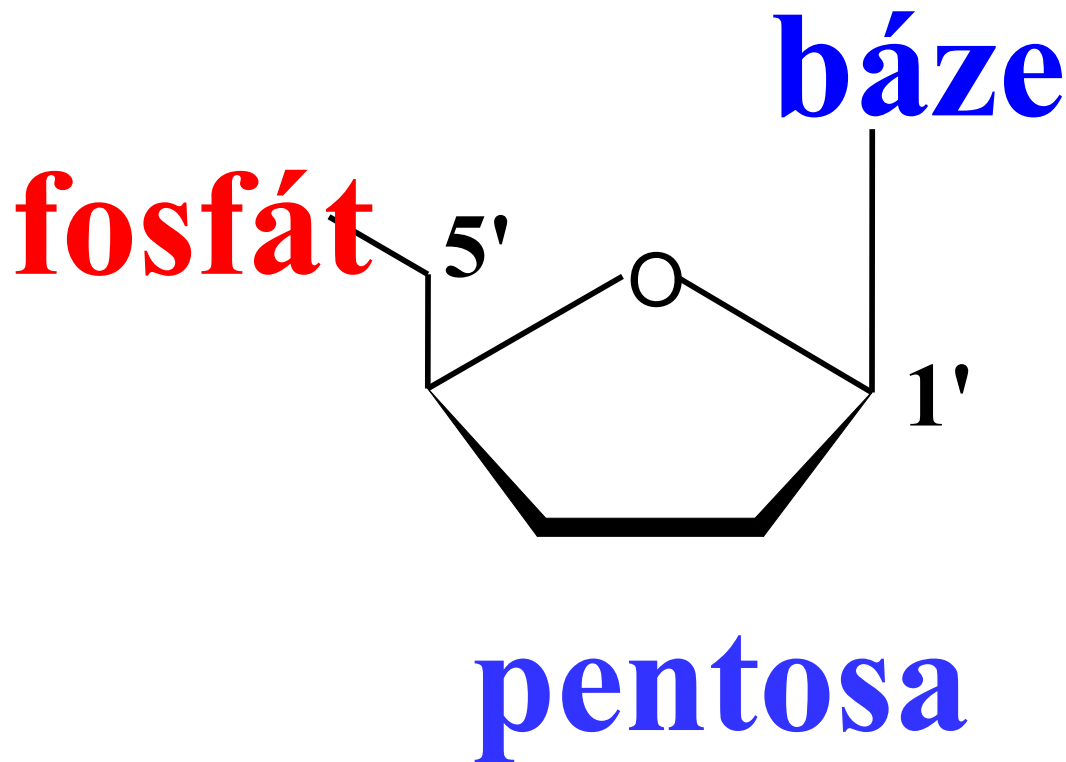


uridin

Nukleotidy (Nukleosidfosfáty)

Nukleosid + kyselina fosforečná

esterově vázaná na: ribosu, deoxyribosu



Názvy:

Adenosin fosfát (AMP),

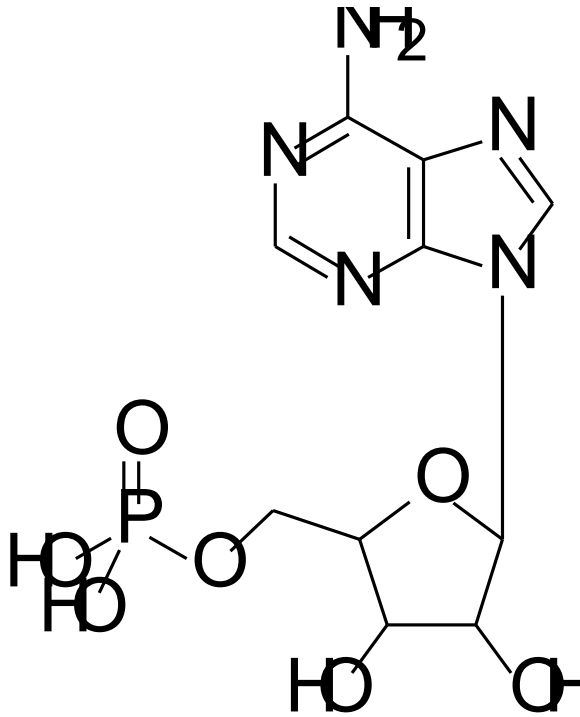
Guanosinfosfát (GMP)

Uridinfosfát (UMP)

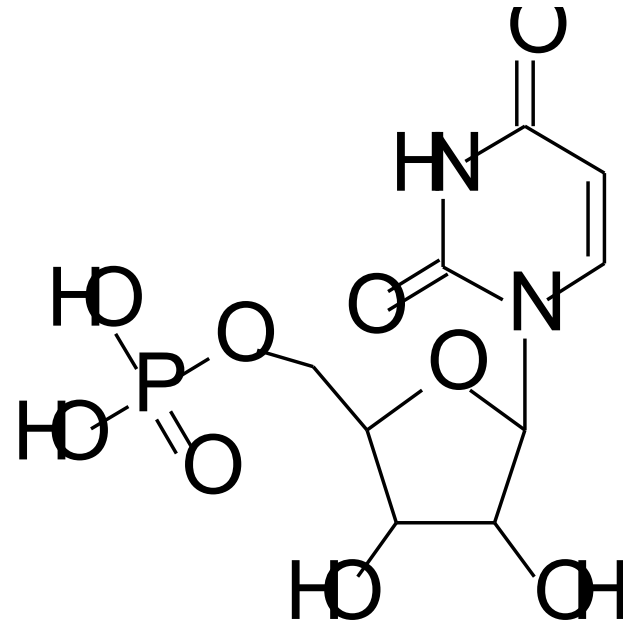
Cytidinfosfát (CMP),

Thymidinfosfát (TMP)

Příklady nukleotidů



Adenosin monofosfát AMP



Uridin monofosfát UMP

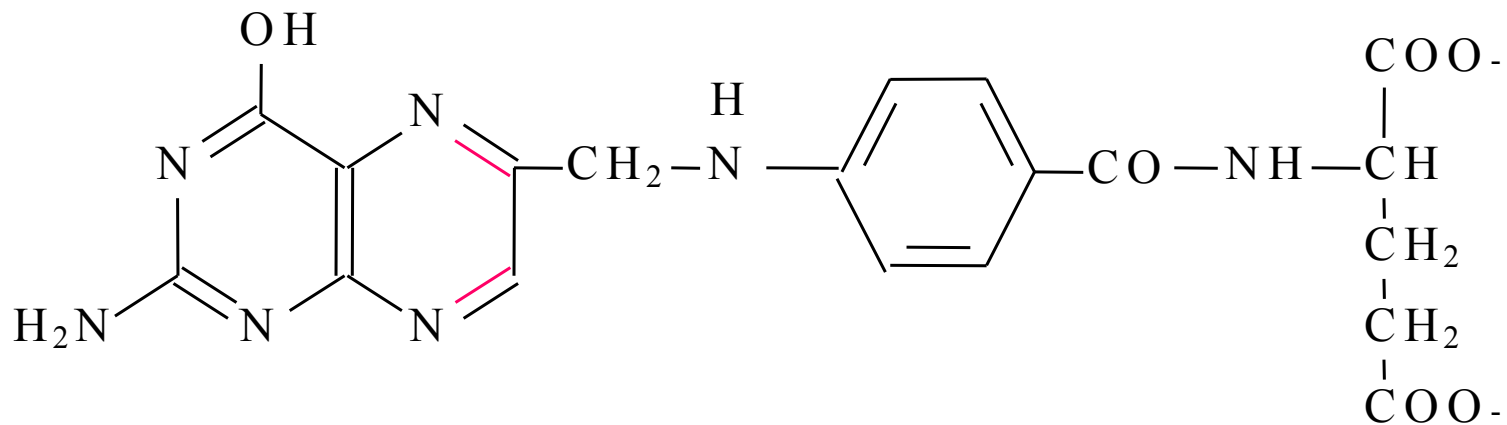
Biosyntéza purinových a pyrimidinových nukleotidů

- Všechny buňky potřebují ribonukleosidy, deoxyribonukleosidy a jejich fosfáty pro syntézu nukleových kyselin, uchovávání 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

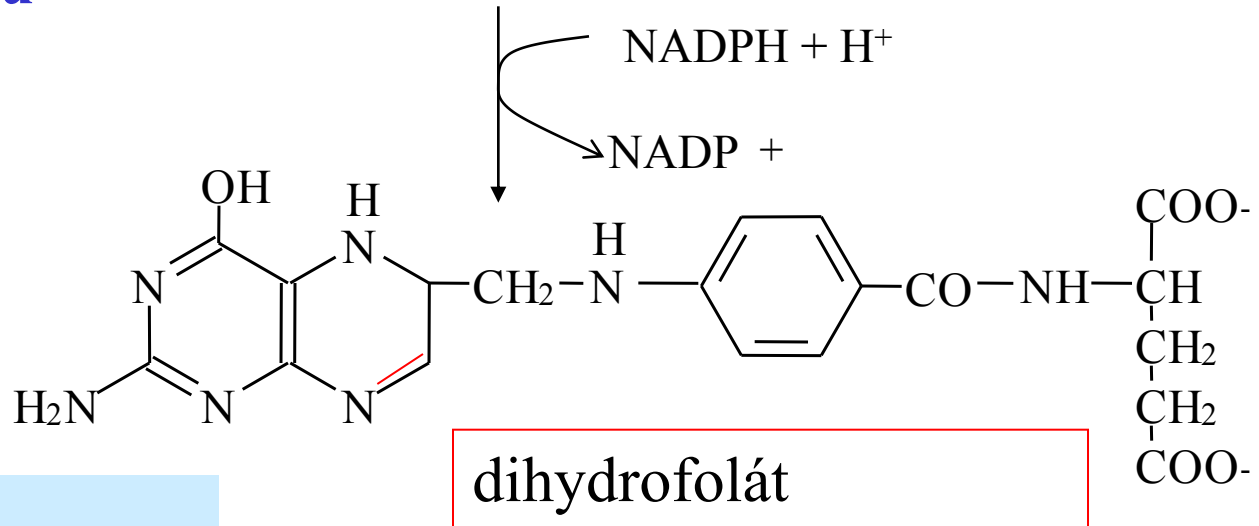
Folát



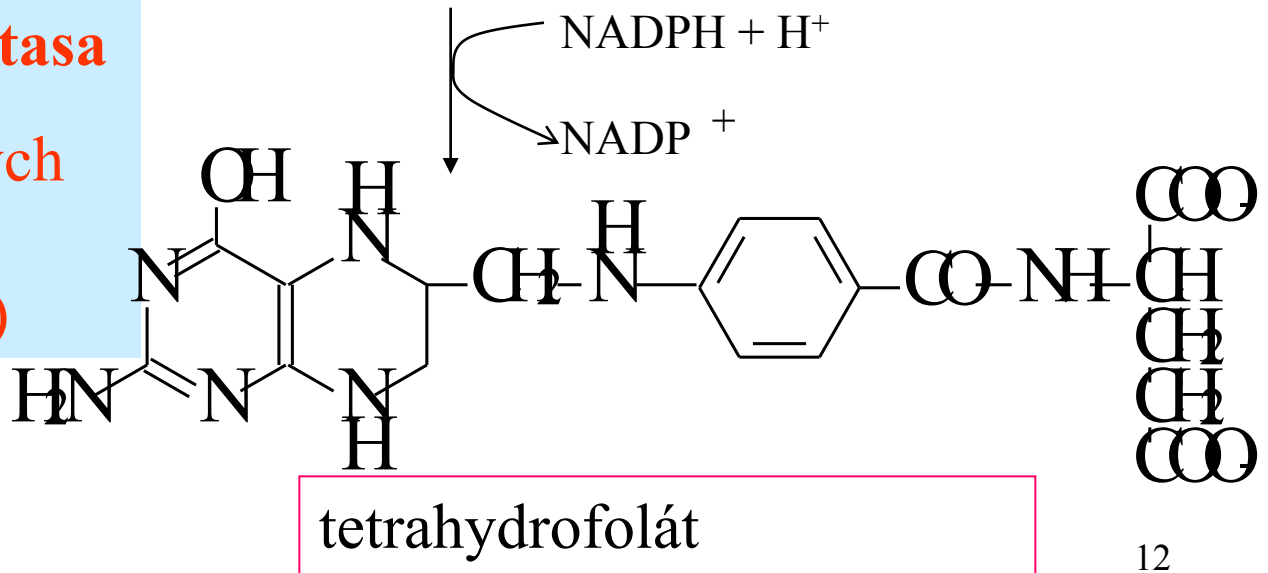
Účinnou formou v organismu člověka je tetrahydrofolát.

Tetrahydrofolát přenáší jednouhlíkaté skupiny (viz předn. Kofaktory enzymů)

Vznik tetrahydrofolátu

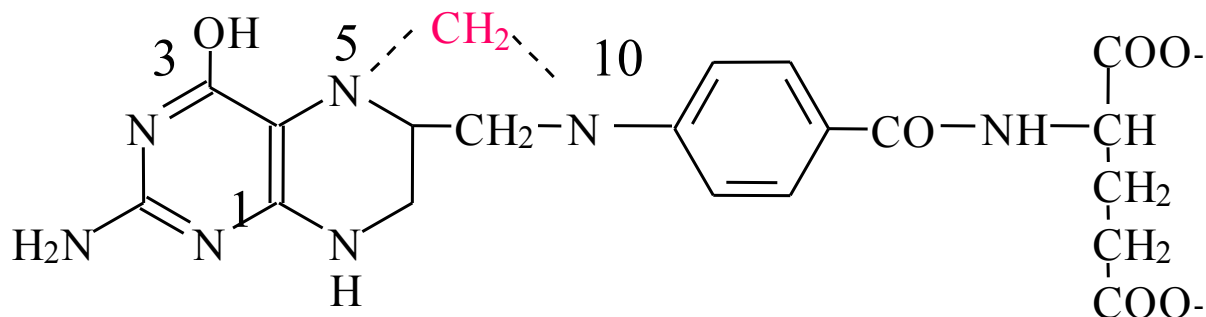


Enzym
(dihydro)Folátreduktasa
(u živočichů a některých mikroorganismů, katalyzuje obě reakce)

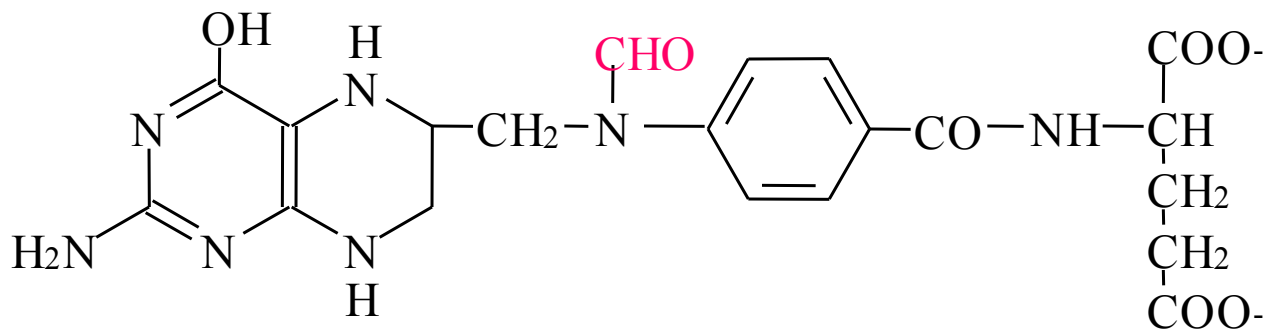


Využití tetrahydrofolátu – přenos skupin $-\text{CH}_2$ a $-\text{CHO}$ potřebných při syntéze bází

N-5,N-10- methylen H_4F - syntéza thyminu

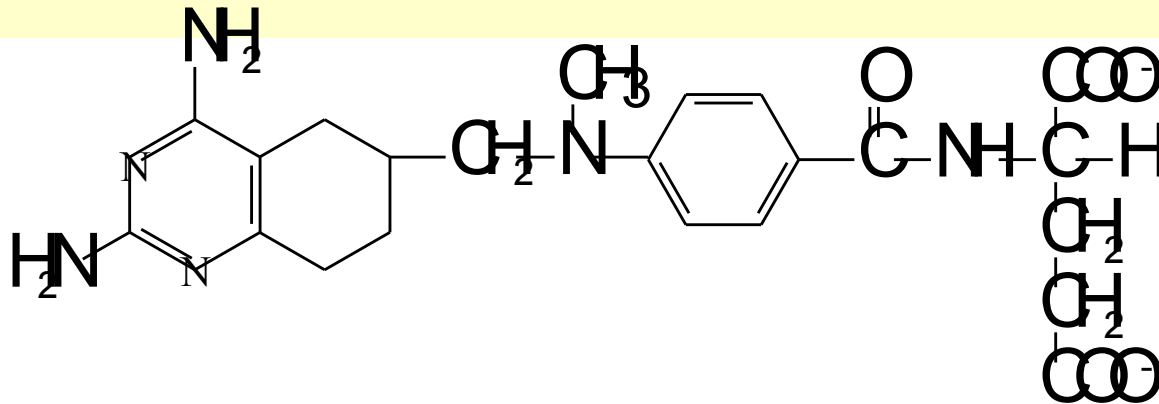


N-10-formyl H_4F - syntéza purinů



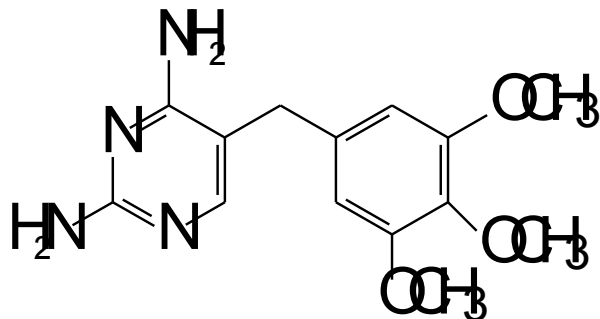
Inhibitory (dihydro)folátreduktasy:

Methotrexát (protinádorové léčivo)



Trimethoprim (bakteriostatikum)

inhibuje bakteriální dihydrofolátreduktasu



Dihydrofolátreduktasa - cíl protinádorové terapie.

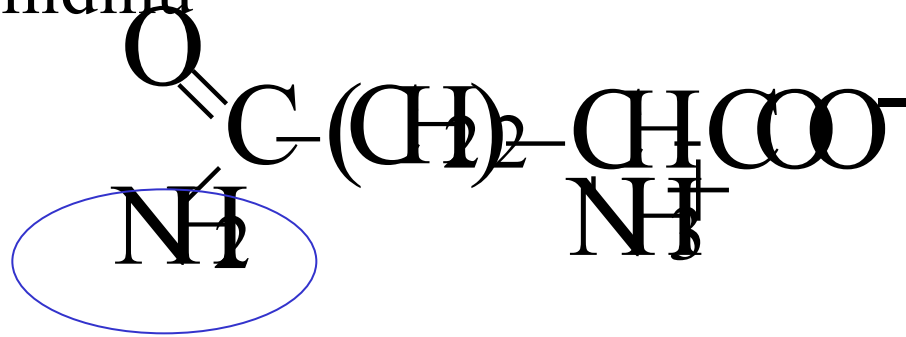
- Dihydrofolát reduktasa byla prvním enzymem, na nějž se zaměřila protinádorová terapie.
První používaný inhibitor byl aminopterin.
Váže se k enzymu 1000x pevněji než folát, působí jako kompetitivní inhibitor.
V současné době užíván **methotrexát** a podobné deriváty (**pemetrexed**).
- Inhibitory syntézy 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 prekursor 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



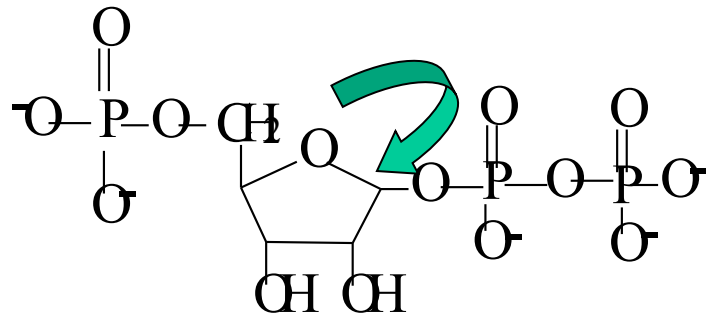
Proč mají rychle dělicí se buňky velkou spotřebu glutaminu ?



Rozdíly v biosyntéze purinů a pyrimidinů

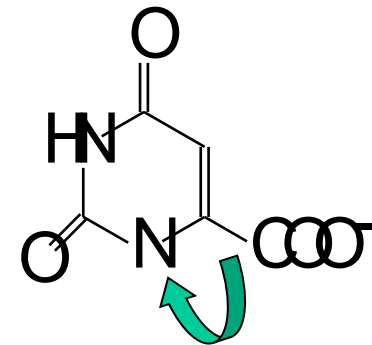
Puriny

Základem fosforylovaná ribosa, na ni se postupně navazují další skupiny



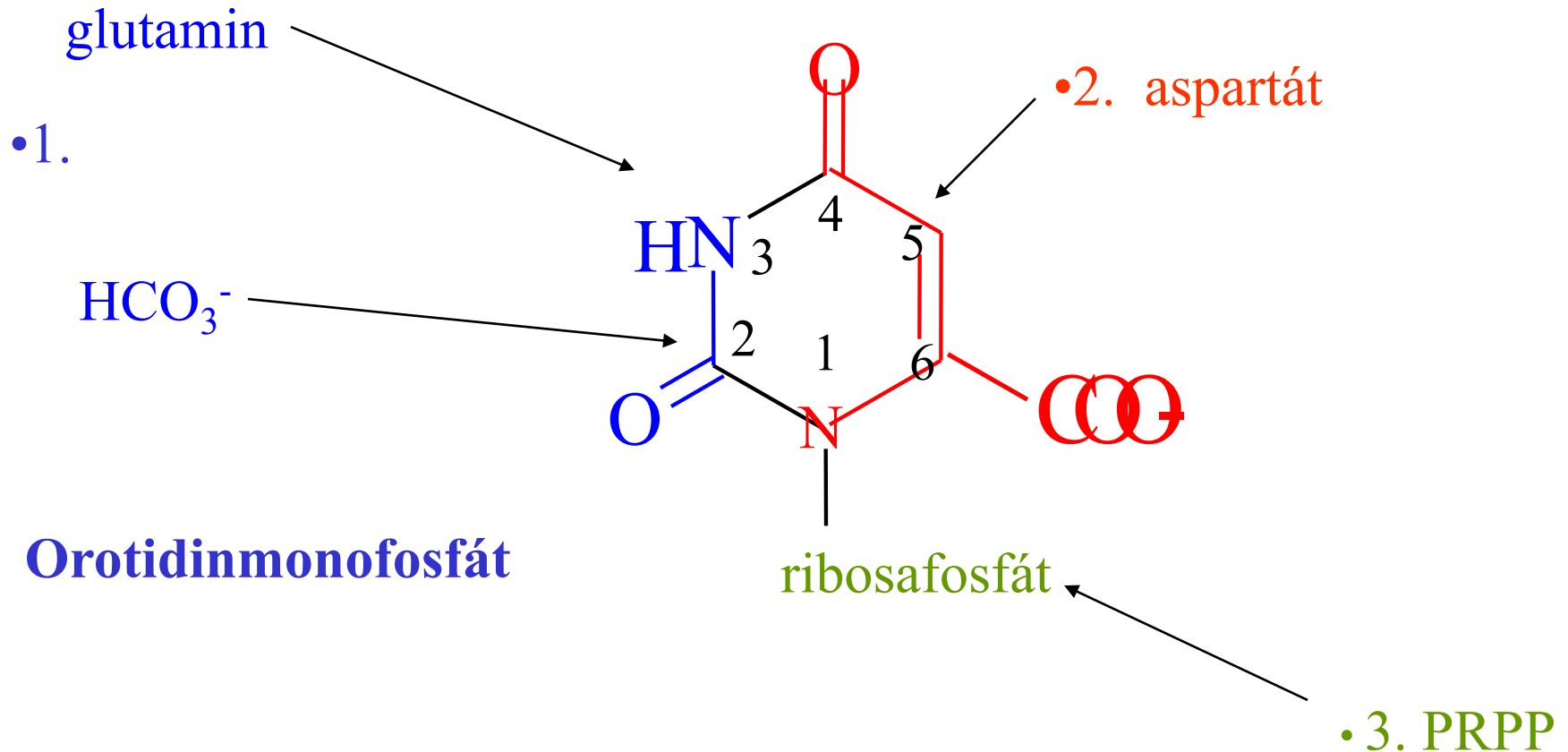
Pyrimidiny

Nejprve syntéza heterocyklu, po té navázání ribosa-P



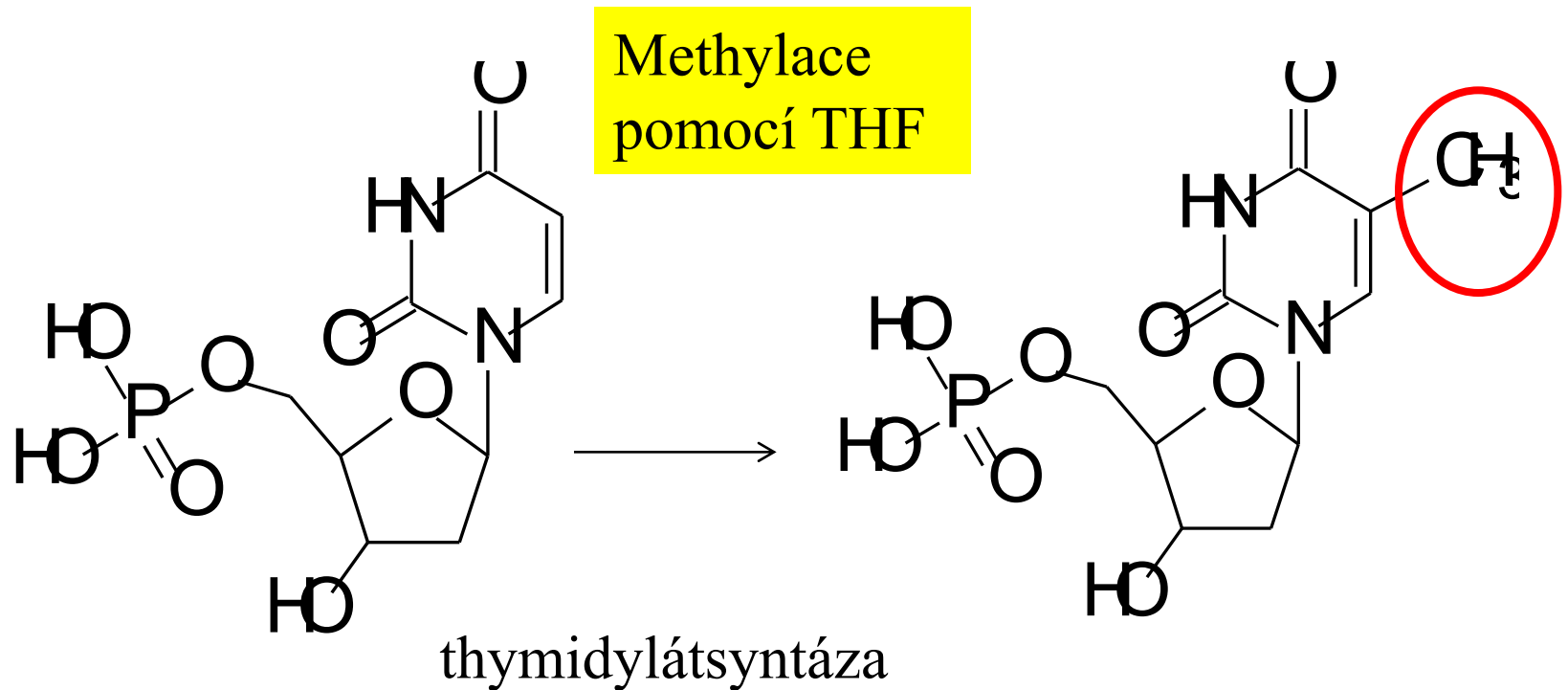
BIOSYNTÉZA PYRIMIDINŮ

původ atomů v pyrimidinových derivátech



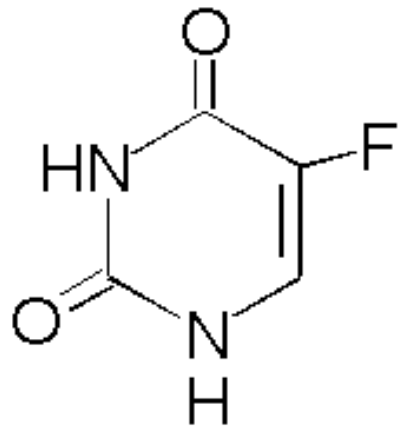
Dekarboxylací vzniká uridinmonofosfát (UMP) a z něj pak další nukleotidy

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

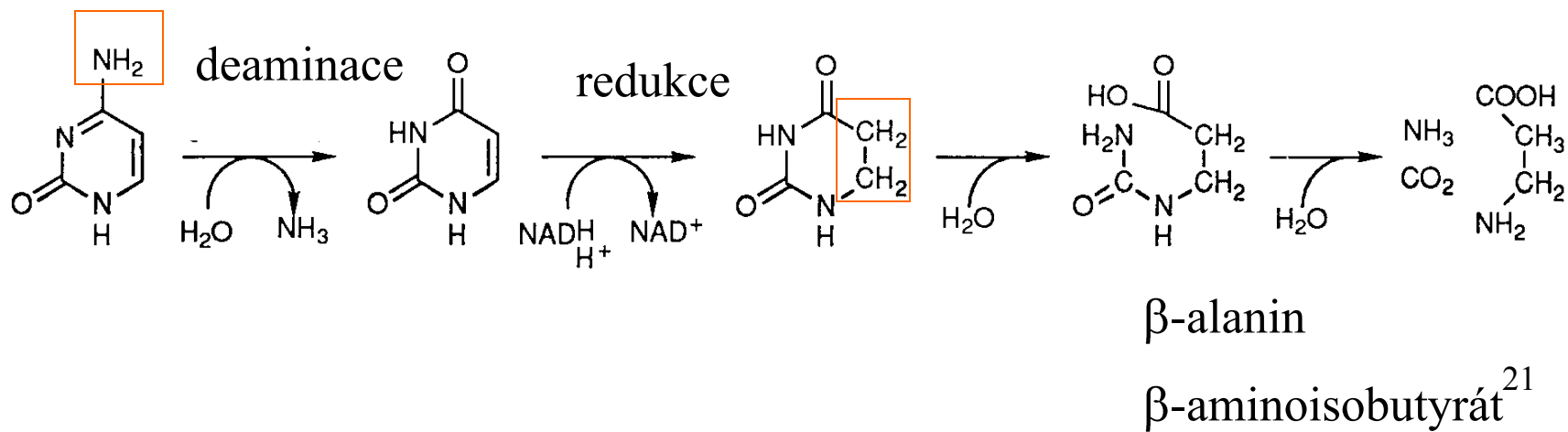
Odbourávání pyrimidinových nukleotidů

Odštěpení fosfátu a cukerné složky.

Konečné produkty štěpení bází:

NH_3 , CO_2 , β -alanin, (β -aminoisobutyrát)

rozpuslné metabolity – vyloučeny močí

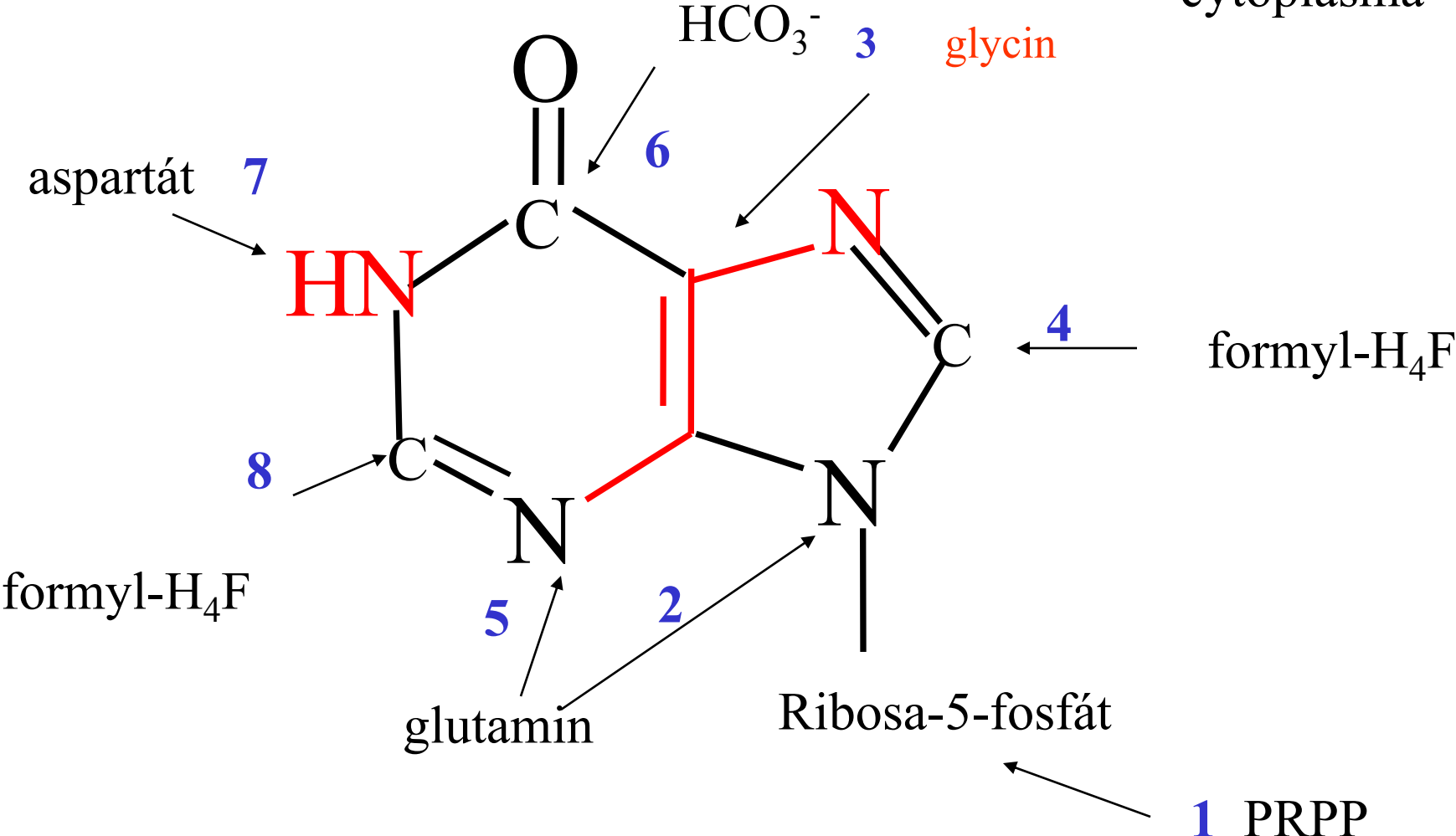


Biosyntéza purinových nukleotidů

Převážně játra

(multienzymový komplex)

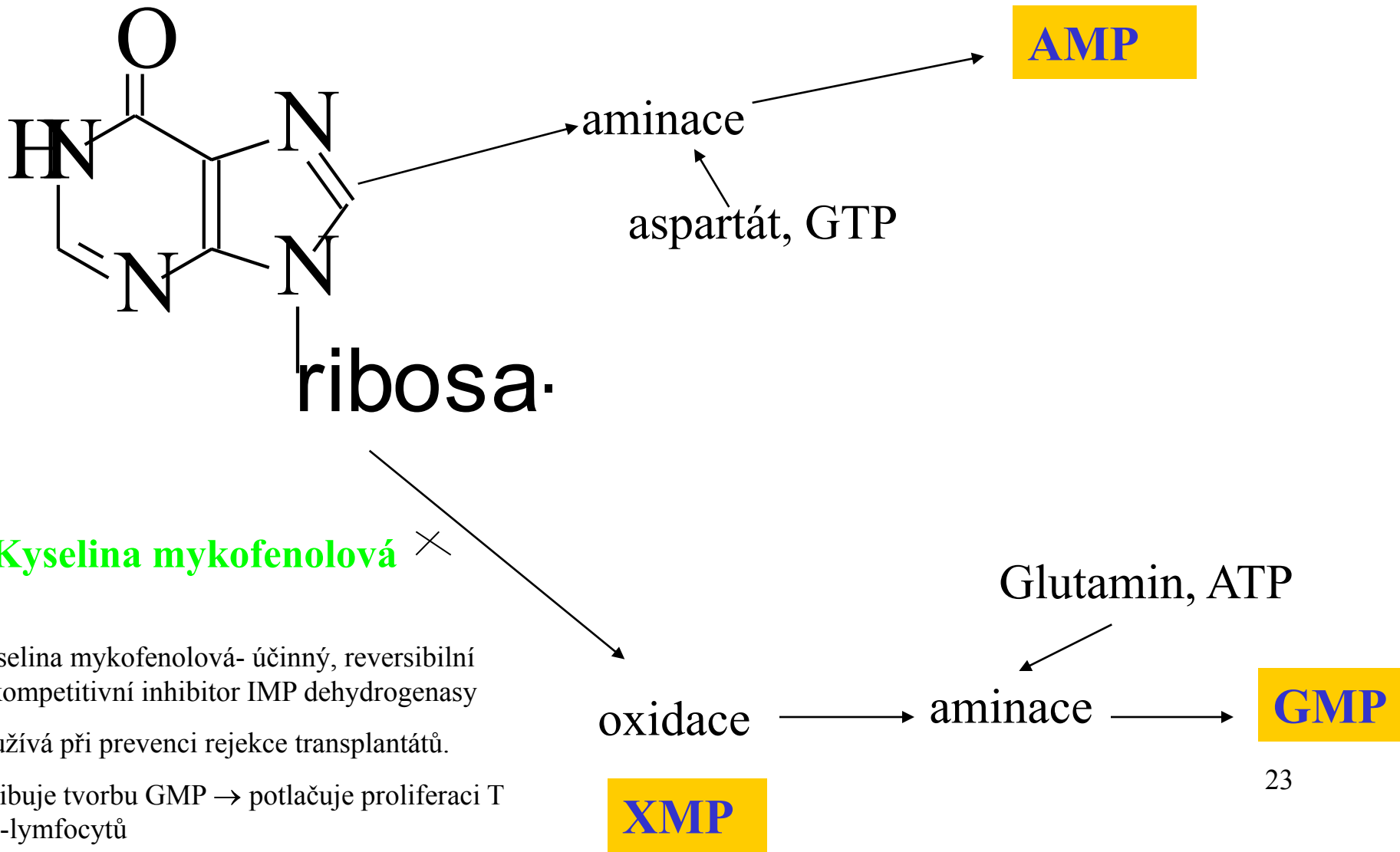
cytoplasma



Inosin-5-P (IMP)

Inosin-5-P (IMP)

výchozí látka syntézy purinových bází



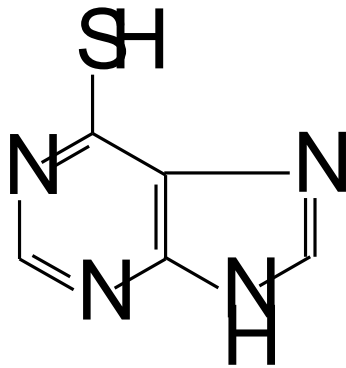
Kyselina mykofenolová- účinný, reversibilní nekompetitivní inhibitor IMP dehydrogenasy

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

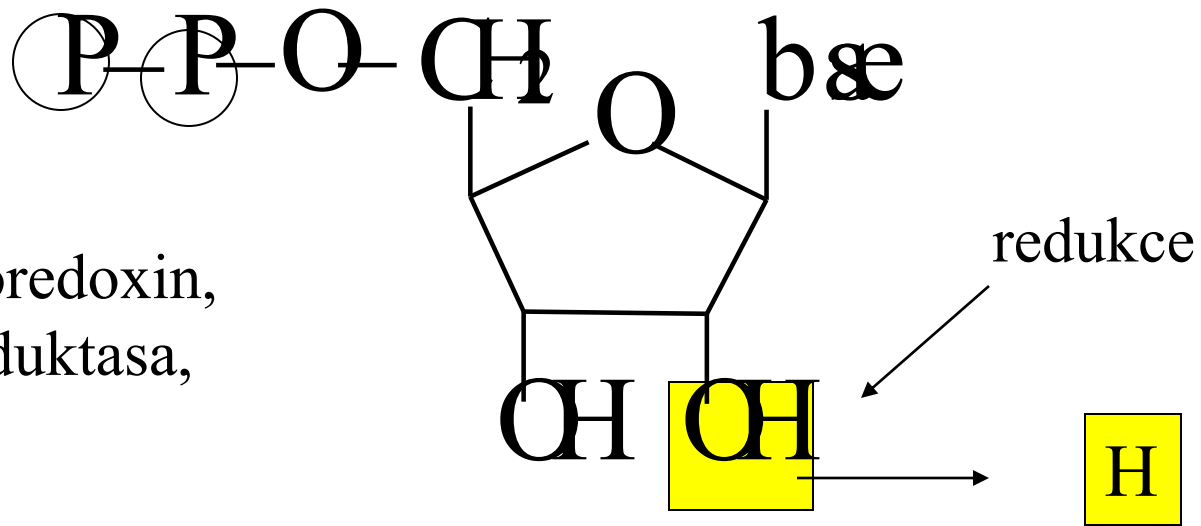


merkaptopurin

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)

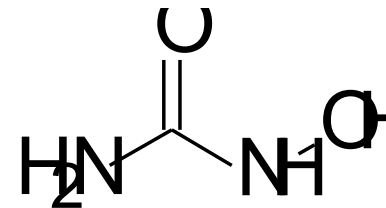
Inhibuje ribonukleotidreduktasu



Syntéza deoxyribonukleotidů je blokována



Léčba některých druhů rakoviny



Odbourání purinových nukleotidů a deoxynukleotidů na hypoxantin a xantin

5-nukleotidasa

AMP, GMP,
IMP, XMP

→
Odštěpení
fosfátu

guanosin, inosin,
xantosin + P_i

Adenosin + P_i

guanin
↓
guanasa

nukleosidfosforylasa
Odštěpení
ribosy

adenosindeaminasa

hypoxantin,
xantin

nukleosidfosforylasa
Odštěpení
ribosy

inosin

+ ribosa-1-P

xantinoxidasa

Kyselina močová

Deficit adenosindeaminasy

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



Inhibice ribonukleotid reductasy v lymfocytech



Klesá produkce dalších nukleotidů

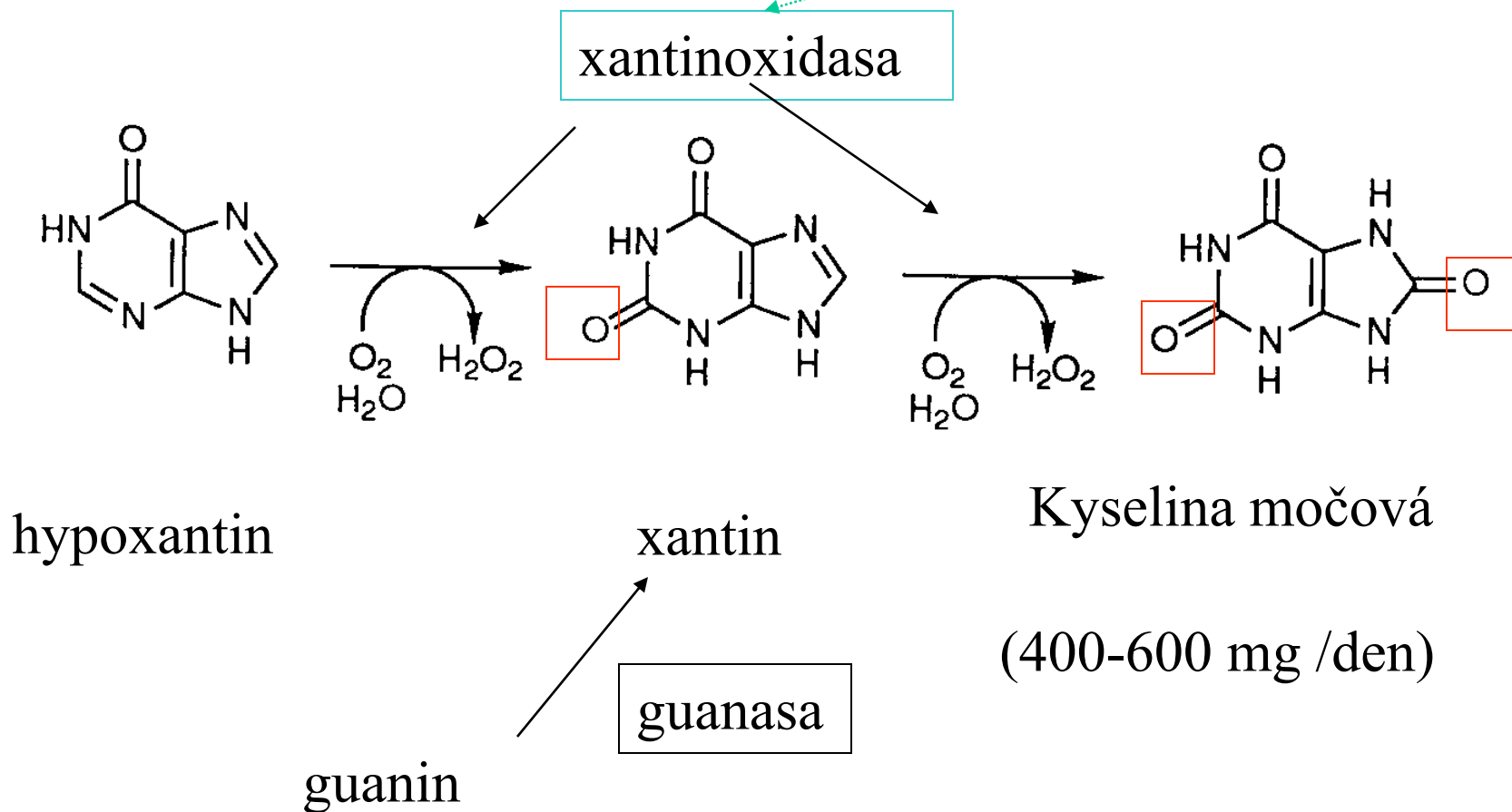


Buňka nesyntetizuje DNA, klesá produkce T- a B- lymfocytů

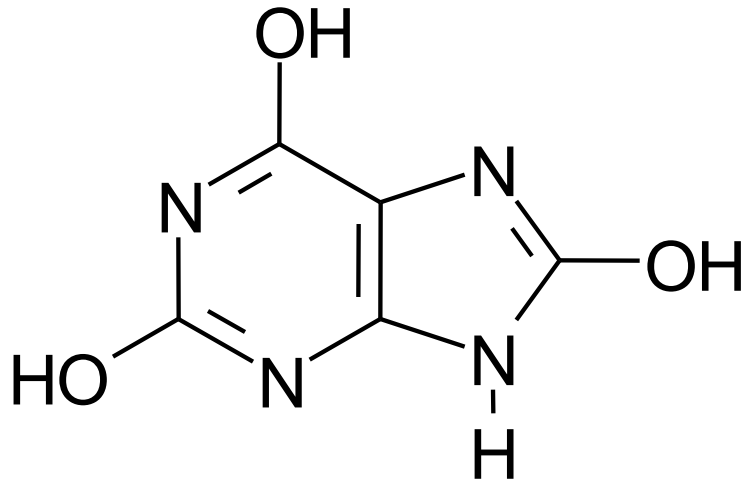
Jedna z příčin těžkého kombinovaného imunodeficitu (severe combined immunodeficiency disease -SCID).

Odbourání purinových bází

Inhibice
allopurinolem



Kyselina močová (acidum uricum)



2,6,8-trihydroxypurin

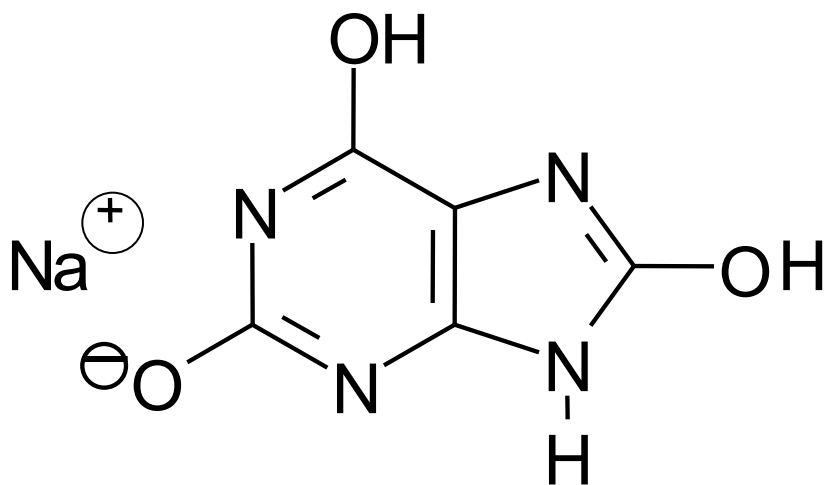
U savců: konečný metabolit purinových bází

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:

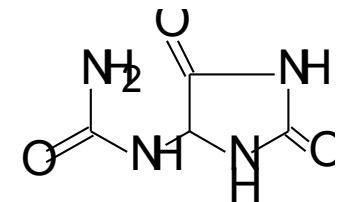
muži < 420 $\mu\text{mol/l}$

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

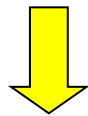
Důsledky omezené rozpustnosti kys. močové za patologických stavů

- 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

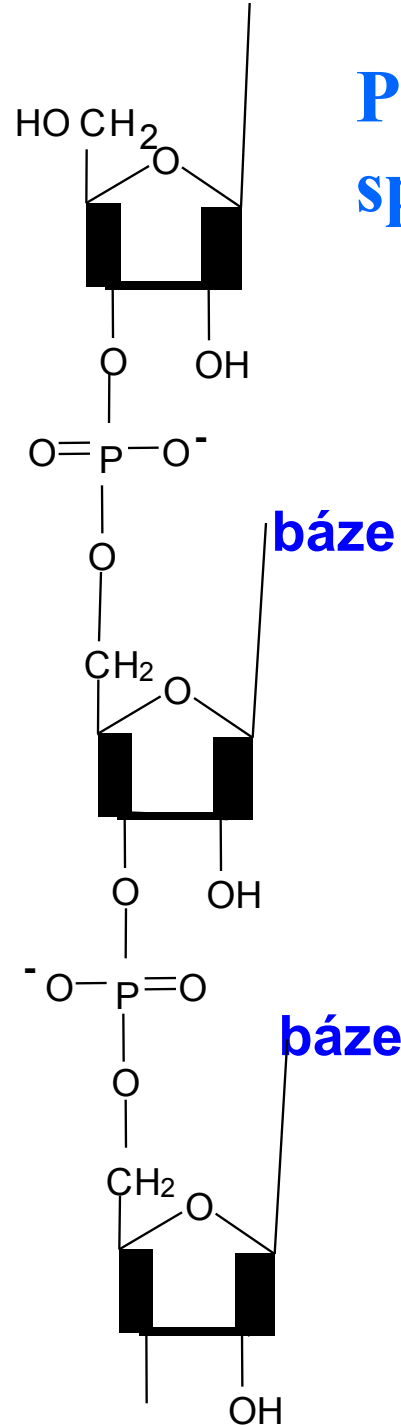
Nukleové kyseliny

- 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

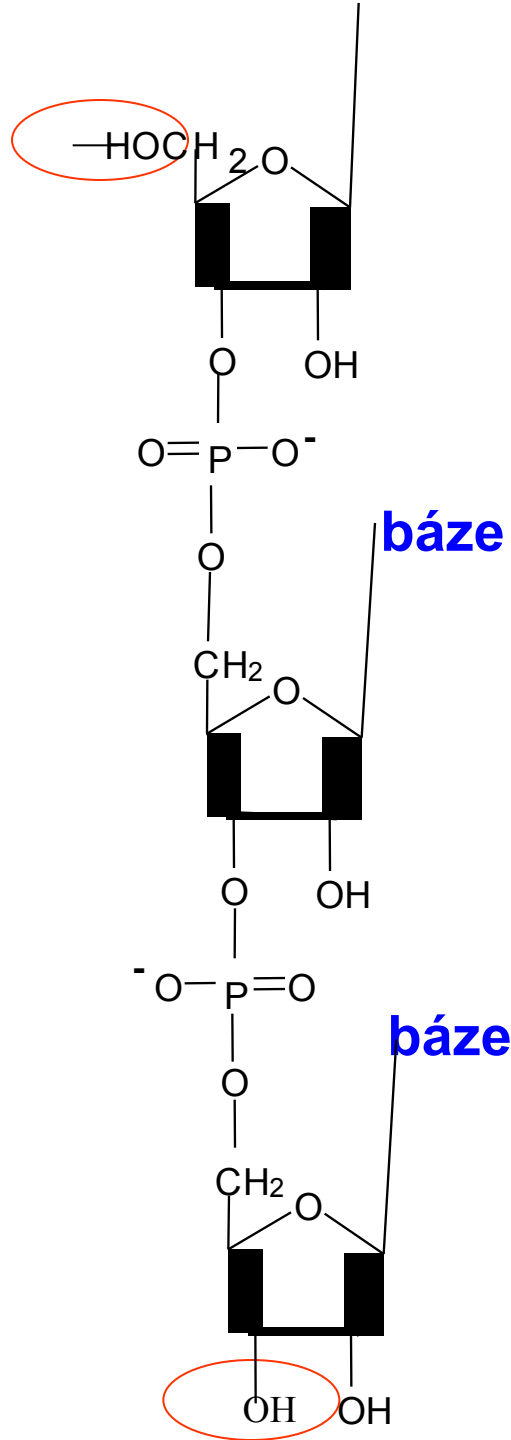
- postranní řetězce:

báze připojené na
pentosové zbytky N –
glykosidovou vazbou

Oligonukleotidy ≤ 50 nukleotidů

Polynukleotidy > 50 nukleotidů

5' -konec



Polarita řetězce

rozlišení 5' a 3' konce

Primární struktura:

pořadí nukleotidových
zbytků ve směru 5' \rightarrow 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

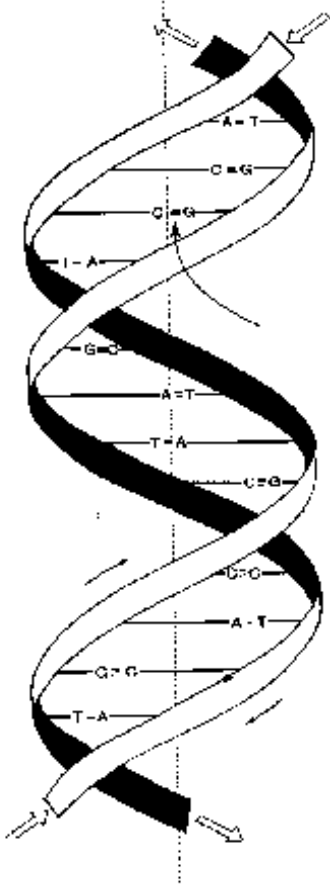
Člověk

3 000 000 000

Bufo bufo

6 900 000 000³⁹

Sekundární struktura DNA



nejčastěji dvouvláknová, pravotočivá šroubovice

řetězce uspořádány kolem společné osy

vlákna mají opačnou polaritu

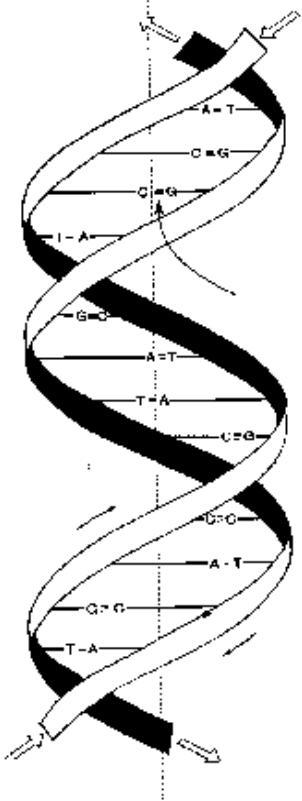
vlákna jsou komplementární

$A=T, G = C$ (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

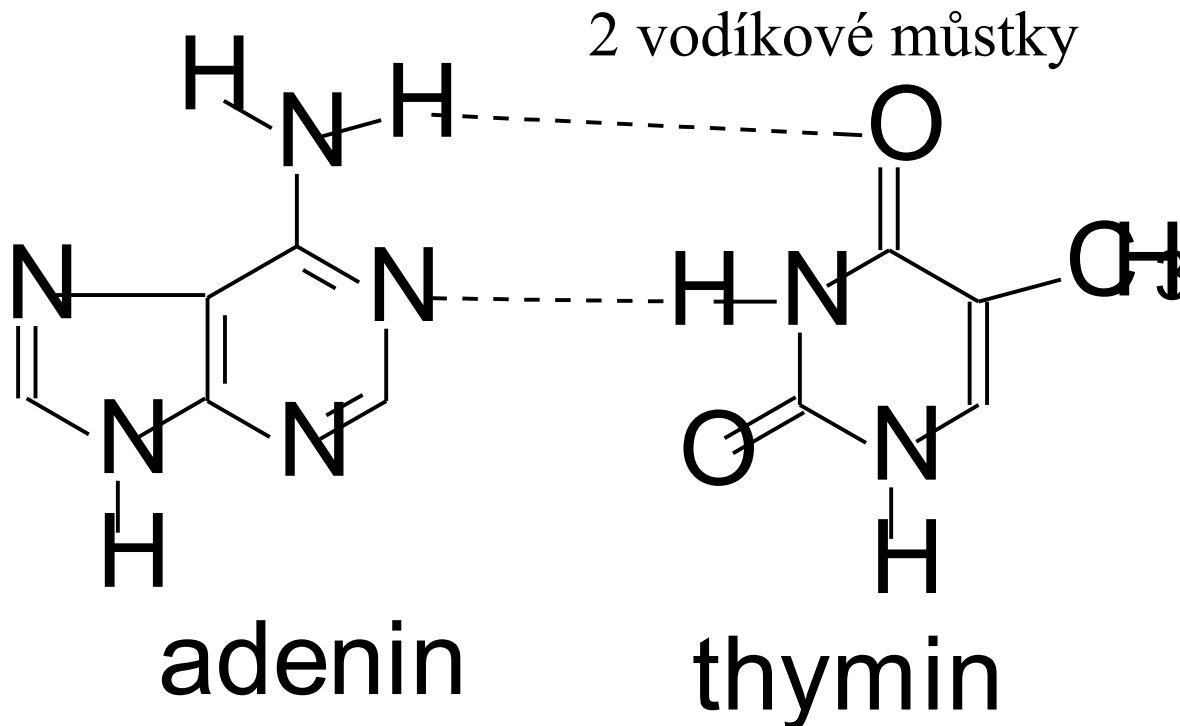
- leží uvnitř dvoušroubovice
- jsou navzájem rovnoběžné (stohování bází)
- komplementární báze se vážou vodíkovými můstky

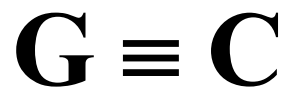
Párování bází - princip komplementarity

Párování bází je neenzymová, spontánní reakce

Umožňuje párům bází zaujmout energeticky nejvýhodnější konformaci v rámci dvojšroubovice

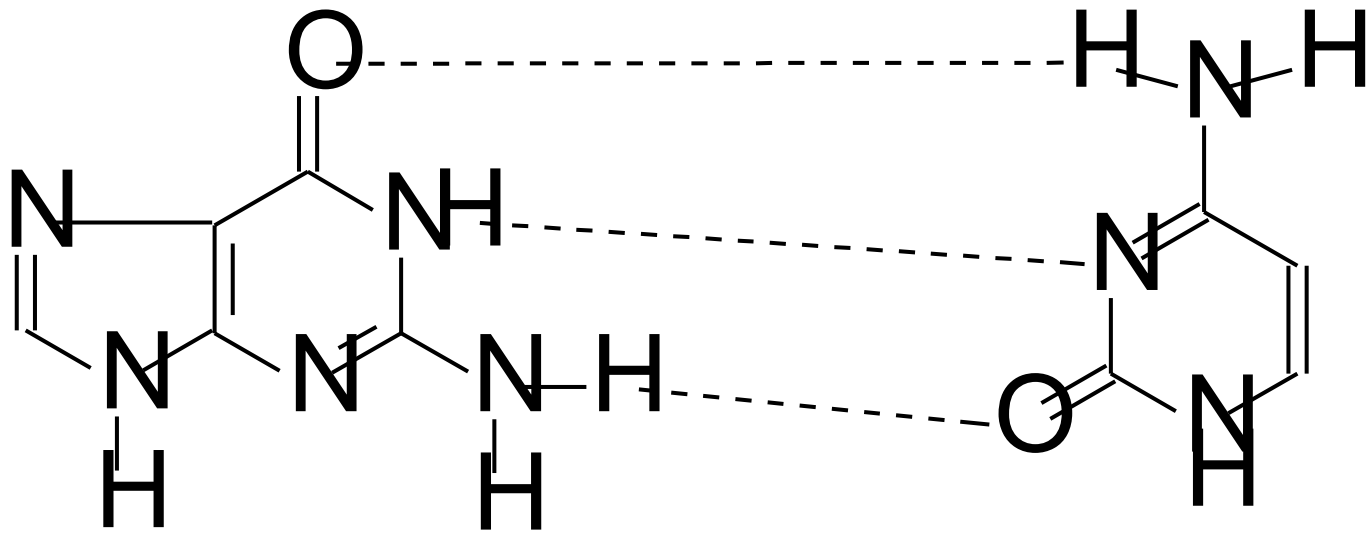
A=T





3 vodíkové můstky

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



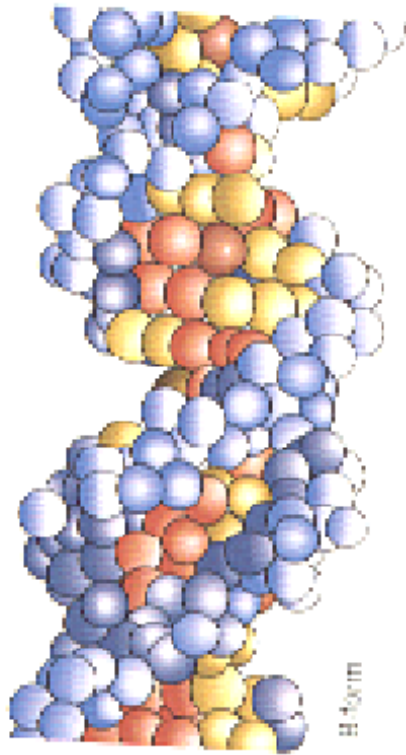
guanin

cytosin

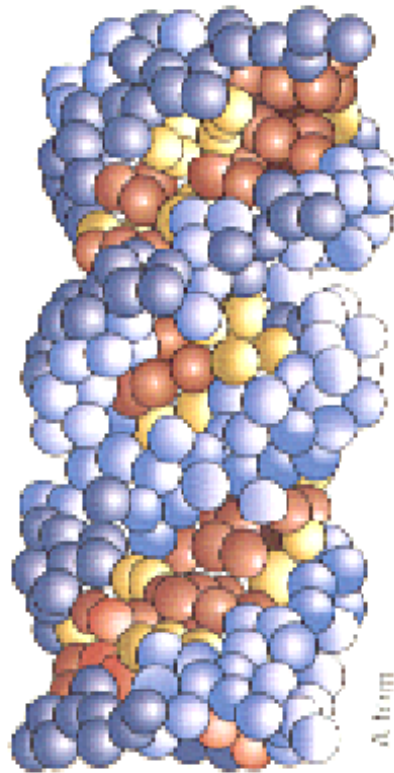
Pro párování jsou významné laktamové formy bází

Konformační formy DNA

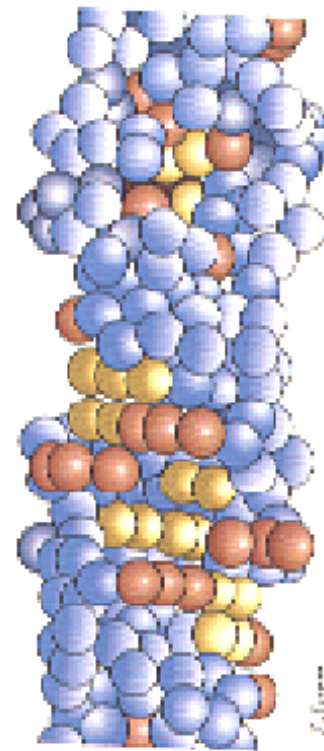
liší se hustotou závitů, mírou hydratace, směrem otáčení šroubovice



B-forma

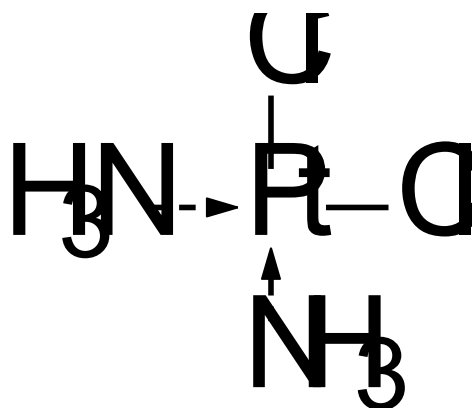


A-forma



Z-forma

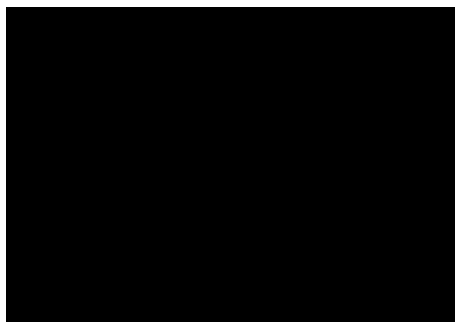
Protinádorové léky mohou měnit tvar DNA



Cis-platina

(cis-diammin-dichloroplatina (II))

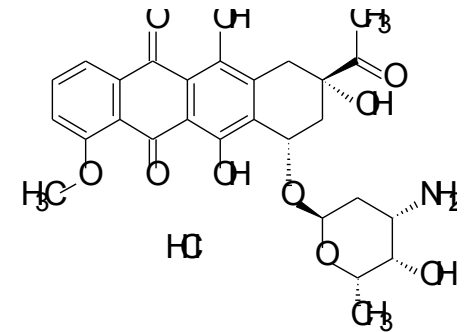
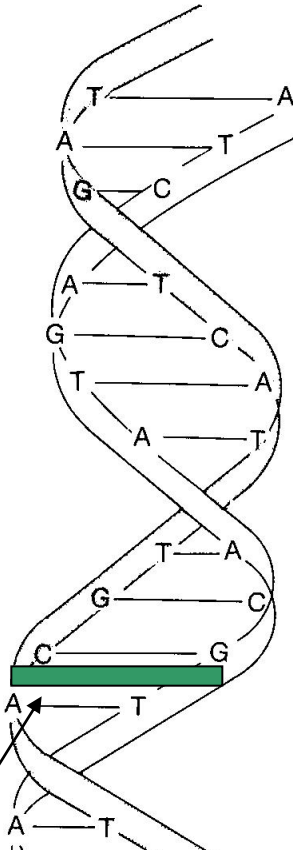
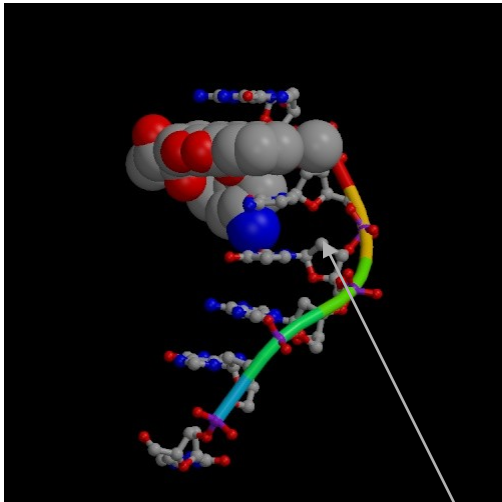
Atomy chloru jsou nahrazeny dusíky bází, lék se váže na DNA, mění její prostorovou strukturu. Vznikají interkalační vazby mezi řetězci, je zabráněno replikaci, nastává apoptóza.



Nověji též karboplatina

Interkalace

- vmezeření mezi báze DNA



daunorubicin

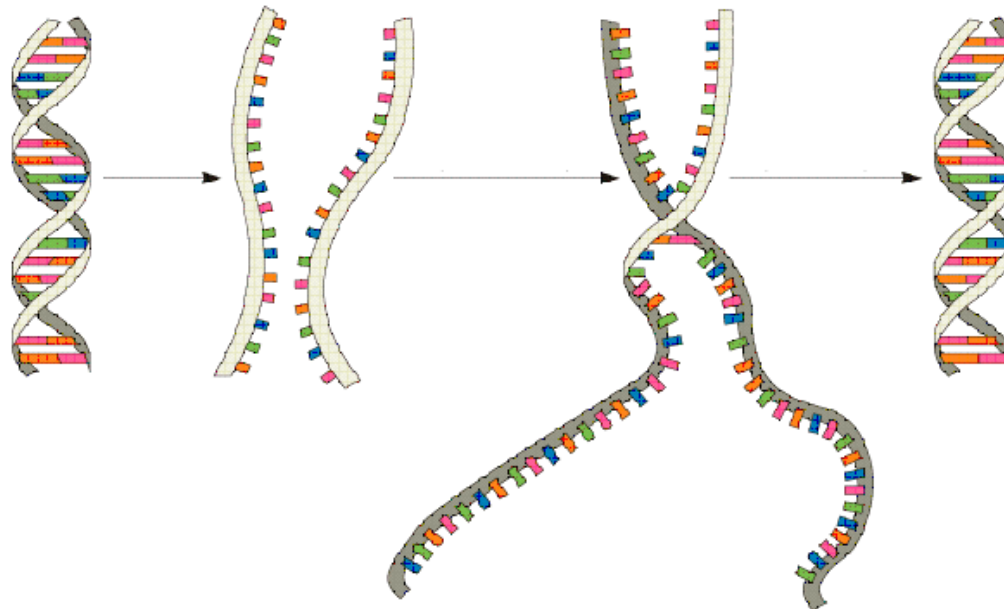
Interkalace cytostatika do dvojité šroubovice DNA.

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

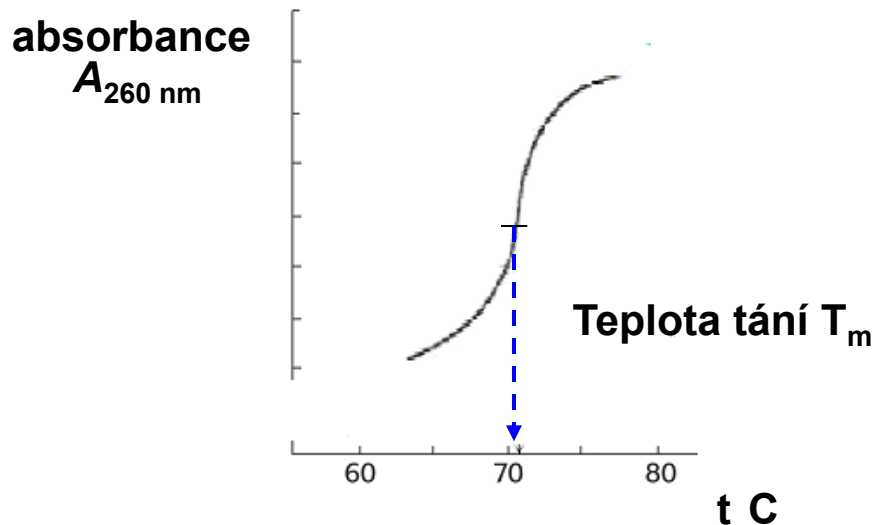
Teplota tání T_m – teplota při níž 50 % DNA je odděleno

Sledování denaturace DNA

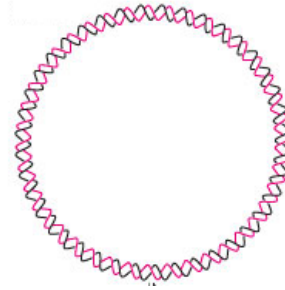
- konjugované dvojné vazby v bázích DNA vyvolávají absorpci roztoku při 260 nm
- absorpce jednovláknové DNA je vyšší než dvouvláknové (hyperchromní posun)



- 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



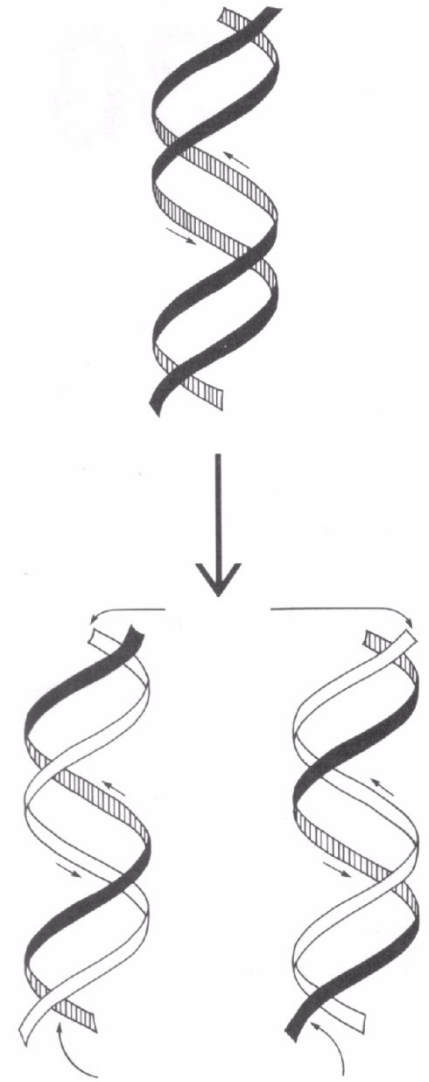
Syntéza DNA - replikace

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 μm průměr

jádro = 5 – 10 μm

Lidská haploidní b. = 23 chromosomů = 3×10^9 párů bází

1.3×10^8 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 !!!

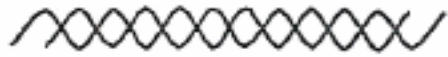


??? Jak se DNA může směstnat do jádra ?

Vyšší struktury DNA

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

Nukleosomy



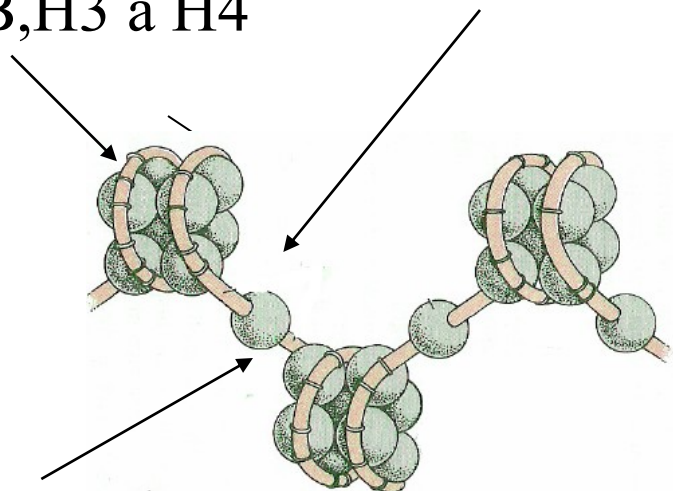
Stočení dvou závitů dihelixu DNA (≈ 140 bází) kolem oktameru histonu zkrácení molekuly DNA na $1/3$

oktamer histonů

H2A, H2B, H3 a H4

spojovací úsek DNA (≈ 60 bází - „volná DNA“ - linker DNA)

histon H1



Histony:

bazické bílkoviny, vysoce konzervovaná struktura

≈ 100 AK, 25% Lys a Arg

Kladně nabitě skupiny Lys a Arg reagují se záporně nabitými fosfáty

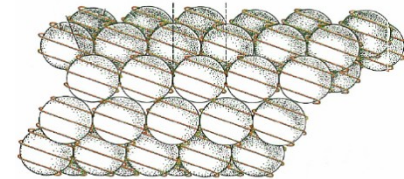
Typy: H1, H2A, H2B, H3 a H4

Úrovně kondenzace chromatinu

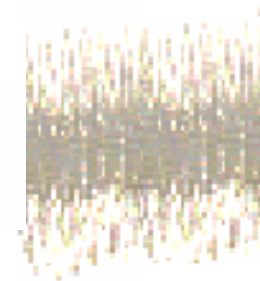
- dvoušroubovice DNA obtočená kolem nukleosomu - „korálková“ forma – vlákno 10 nm



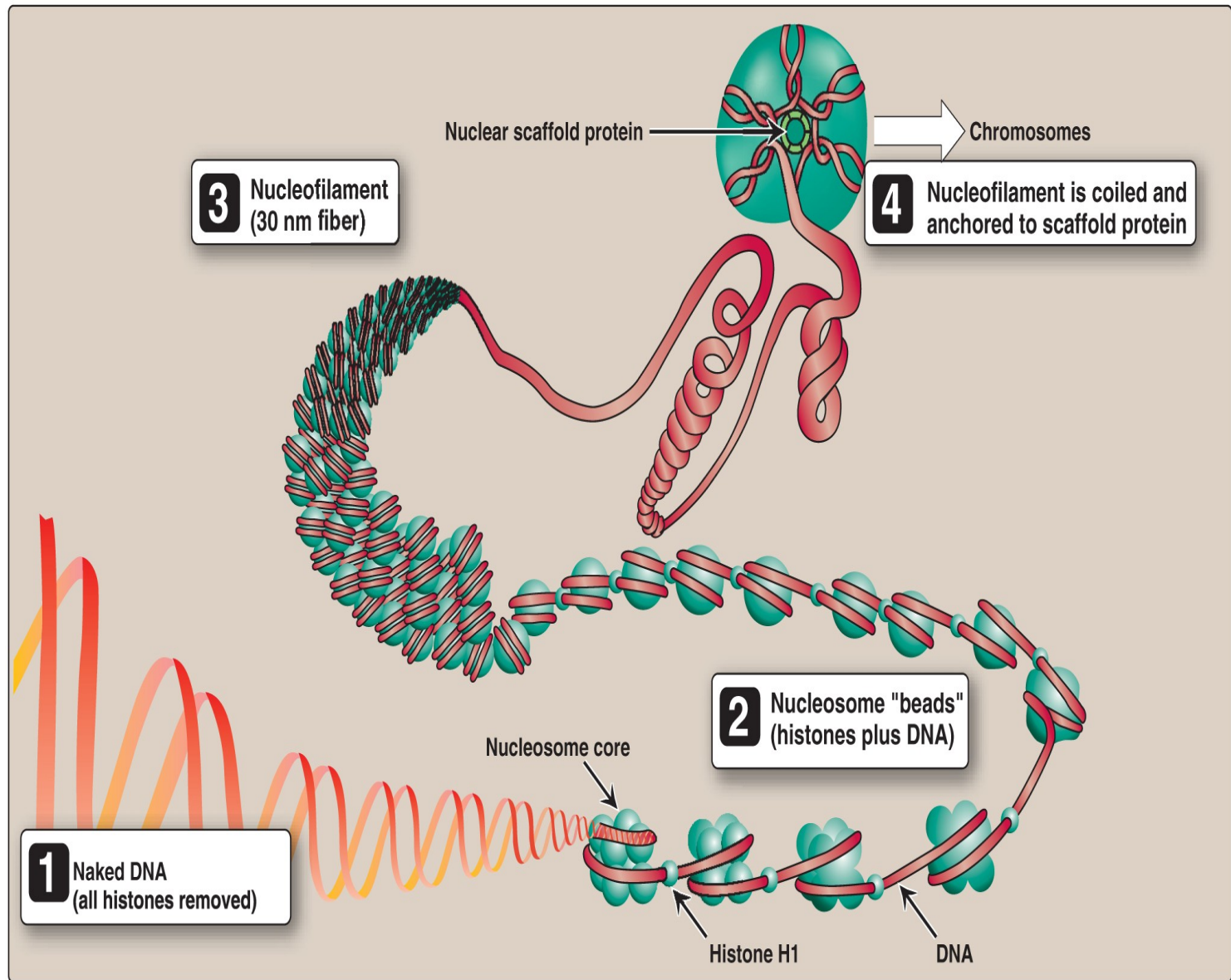
- z kondenzovaných nukleosomů - vlákno 30 nm



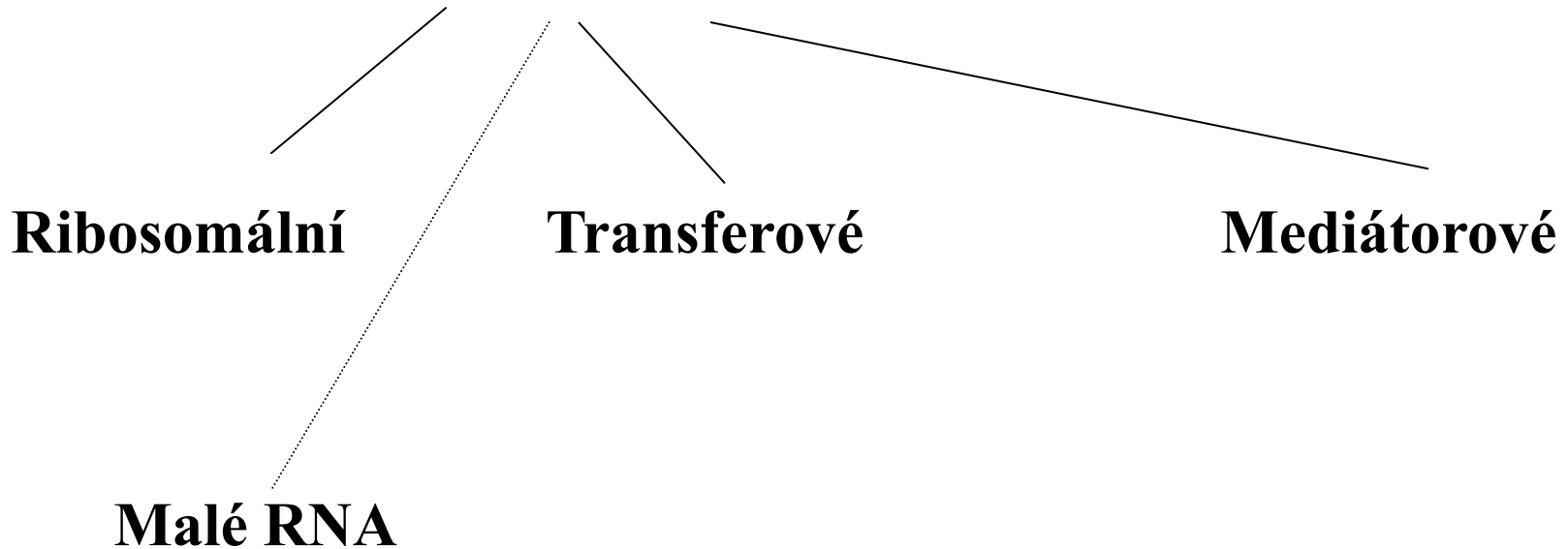
- kondenzace vláken do smyček (tyčinky 700 nm)



- 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)

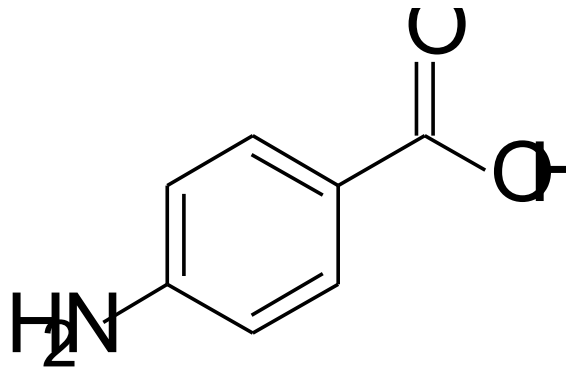
Sulfonamidy x folát

- Chemoterapeutika (např. Sulfamethoxazol)

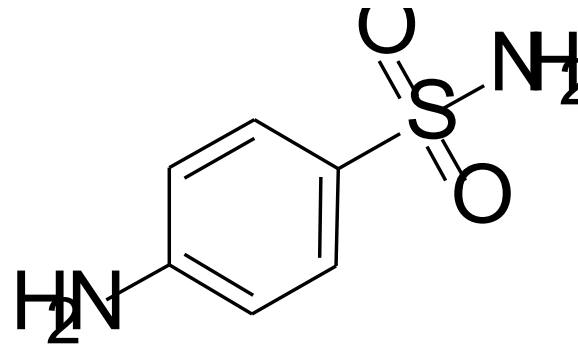
Strukturní analogy kyseliny p-aminobenzoové, deriváty sulfanilamidu.

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