

27.04.2024

Curs 5 – Structura acizilor nucleici

Structura chimică a ADN-ului



- în 1869 Friedrich Miescher izolează din nucleii o substanță albă pe care o denumește **nucleină**. Datorită caracterului ușor acid capătă mai apoi denumirea de **acid nucleic**.
- funcția și structura acestei substanțe rămâne necunoscută până în jurul anilor 1920.

Acizii nucleici sunt **polimeri** rezultați în urma legării prin **legături fosfodiesterice** unui număr mare de **nucleotide**. Funcție de tipul de nucleotide, acizii nucleici se clasifică în:

- **acid ribonucleic (ARN)** – conține în structura sa riboză;
- **acid dezoxiribonucleic (ADN)** - conține în structura sa deoxiriboză;

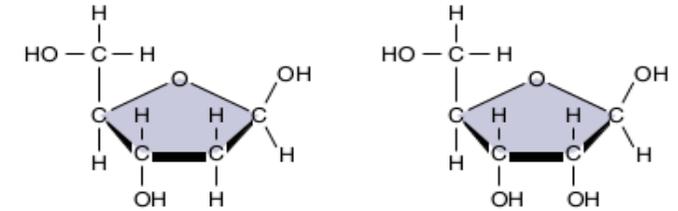
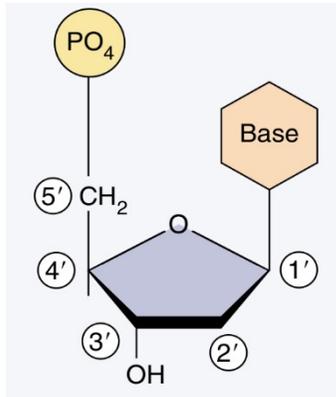
O **nucleotidă** este alcătuită din

- un **glucid** cu 5 atomi de C (**riboza sau deoxiriboza**) în formă furanozică;
- o **grupare fosfat (PO₄)** legată de atomul C 5 al glucidului;
- **bază azotată** legată de atomul C1 al glucidului;

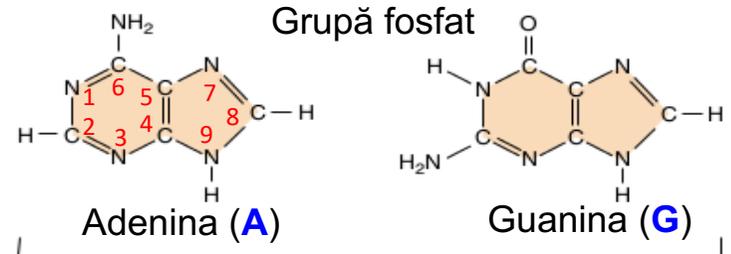
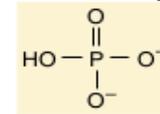
Bază azotată se leagă printr-o legătură glicozidică de pentoză formând un **nucleozid**. **O nucleotidă se definește astfel ca fiind un ester fosforic al nucleozidului corespunzător.**

În acizii nucleici se întâlnesc două tipuri de baze azotate:

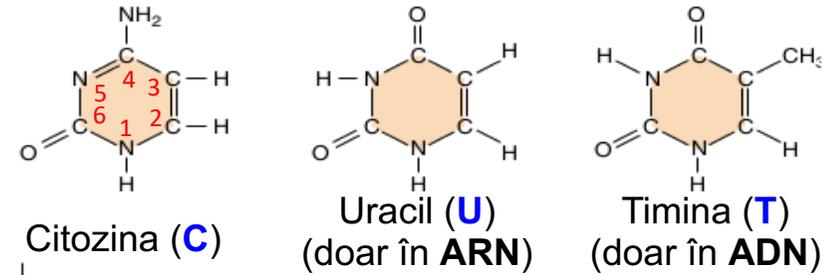
- **purinice** - două heterocicluri cu N: **Adenina (A)** și **Guanina (G)** în ADN și ARN
- **pirimidinice** – un heterociclu cu N: **Citozină (C)** și **Timină (T)** în ADN și **C** și **Uracil (U)** în ARN



2'-deoxi-β-D-ribofuranoză (ADN)
β-D-ribofuranoză (ARN)

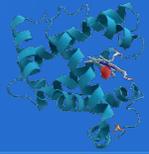


Purine (R)

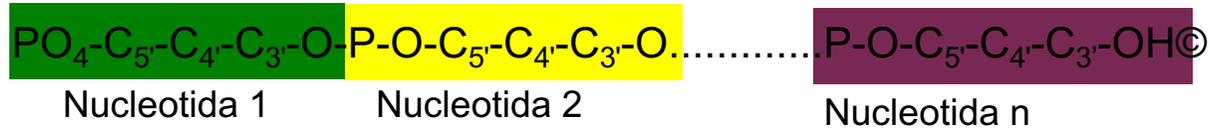


Pirimidine (Y)

Structura primară a ADN-ului



Între gruparea $-PO_4$ de pe carbonul 5 (poziția 5') al unei nucleotide și gruparea $-OH$ de pe carbonul 3 (poziția 3') al altei nucleotide se poate elimina o moleculă de apă cu formarea unei **legături fosfodisterice** ($-O-P-O-$). Se pot astfel forma astfel catene lungi de nucleotide al căror schelet are structura:



Aproape toate moleculele de ADN au două capete diferite:

- capătul 3' cu o grupare $-OH$ liberă;

- capătul 5' cu o grupa $-PO_4$ liberă.

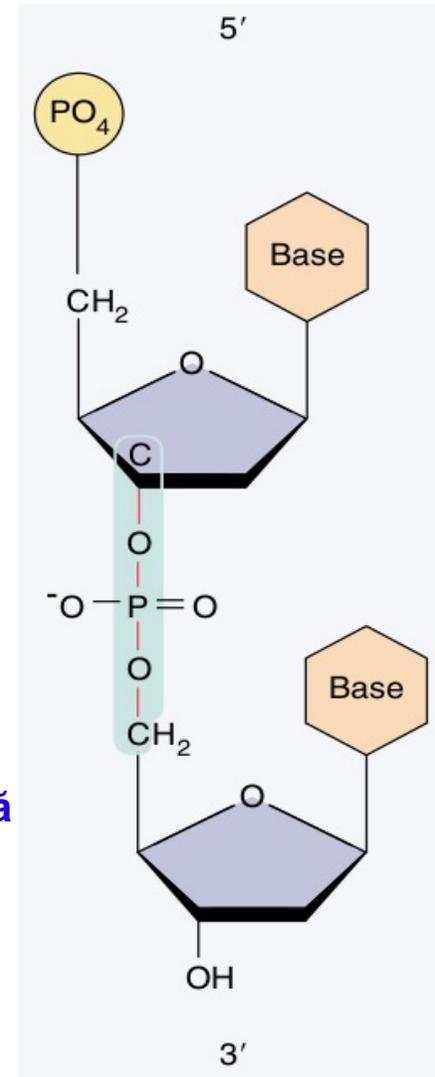
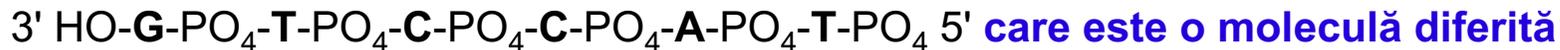
Ce molecule de ADN nu respectă această regulă?

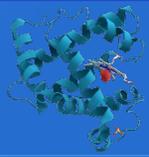
Prin convenție, secvența de nucleotide a ADN-ului se notează în direcția 5' → 3'

Secvența de nucleotide **GTCCAT** se referă la o catenă cu structura:



Și nu la





Compoziția în baze azotate a ADN-ului

Analiza lui Chargaff privind compoziția în baze azotate a ADN-ului

Organism	Procente molare			
	A	T	G	C
<i>Escherichia coli</i> tulpina K12	26.0	23.9	24.9	25.2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15.1	14.6	34.9	35.4
Drojdia de bere	31.3	32.9	18.7	17.1
Hering	27.8	27.5	22.2	22.6
Șobolan	28.6	28.4	21.4	21.5
Om	30.9	29.4	19.9	19.8

De ce procentele nu sunt perfect egale?

Regulile lui Chargaff:

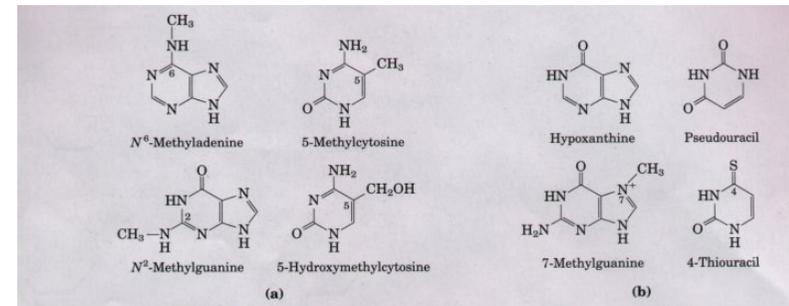
Într-o moleculă de ADN au loc întotdeauna următoarele relații:

- proporția de A este întotdeauna egală cu cea de T, iar cea de G cu cea de C

$$A=T; G=C$$

- proporția de baze azotate purinice este întotdeauna egală cu cea de baze pirimidinice

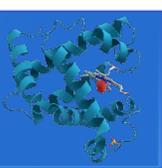
$$A+G=T+C$$



ADN

ARN

Structura tridimensională a ADN-ului



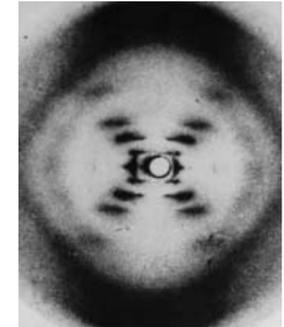
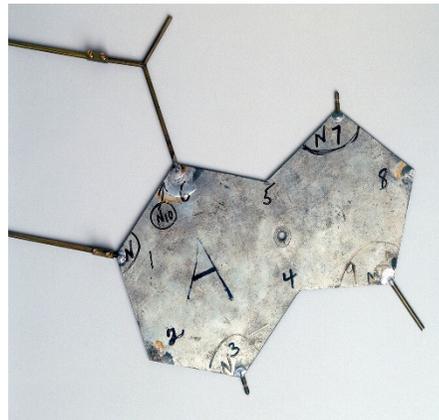
- Analizând modul în care razele X sunt difractate de o fibră cristalizată de ADN, **Franklin** propune în 1953 că **molecula de ADN are forma de tirbușon**, cu diametrul de 2 nm și o spiră de 3.4 nm;
- Watson and Crick** propun în 1953 un model al structurii ADN-ului ce are la bază un **dublu helix**;



Rosalind Elsie Franklin (1920 - 1958)



Wilkins Maurice (1916 - 2004)



no. 2055 April 25, 1953 NATURE 737

equipment, and to Dr. G. E. R. Duncanson and the captain and officers of R.R.S. *Discovery II* for their part in making the observations.
 *Young, F. R., Duncanson, G., and Jones, W. *Phil. Mag.*, 44, 145 (1952).
 *Lengyel, S., M. S., *Ann. Real. Soc. Espan. Fis. Quim. Supp.*, 4, 175 (1954).
 *Van Arman, W. S., *Wood's Hole Papers in Phys. Oceanogr. Meteor.*, 11 (1950).
 *Eliasson, V. W., *Acta. Bot. Linn. Soc. (Stockholm)*, 2 (1) (1965).

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid
 WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey¹. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Frensdorff (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining 3'-deoxyribofuranose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain, loosely resembling Furberg's model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There



The figure is purely diagrammatic; the two ribbons represent the two chains. The circles represent the bases. The lines between the circles represent the hydrogen bonds between the bases. The vertical line marks the fibre axis.

is a residue on each chain every 3.4 Å, in the z-direction. We have assumed an angle of 30° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure would become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The places of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-coordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configuration) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on those assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally^{2,3} that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data^{4,5} on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

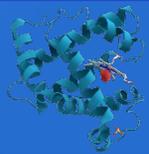
It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

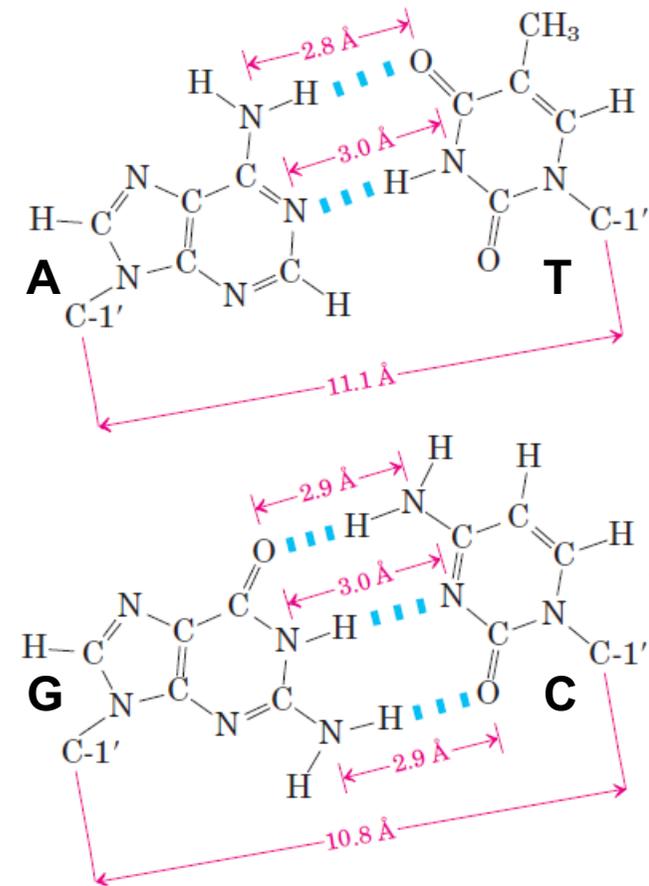
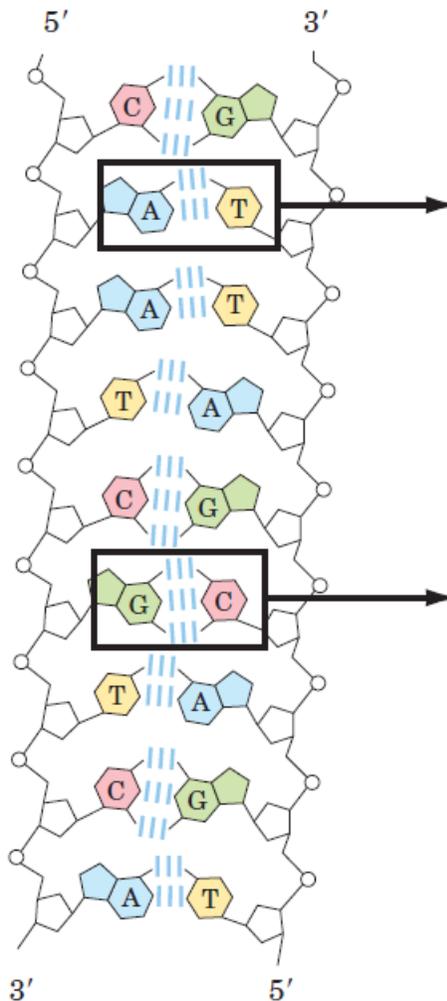
We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at

Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738 (1953)

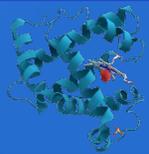
Structura tridimensională a ADN-ului



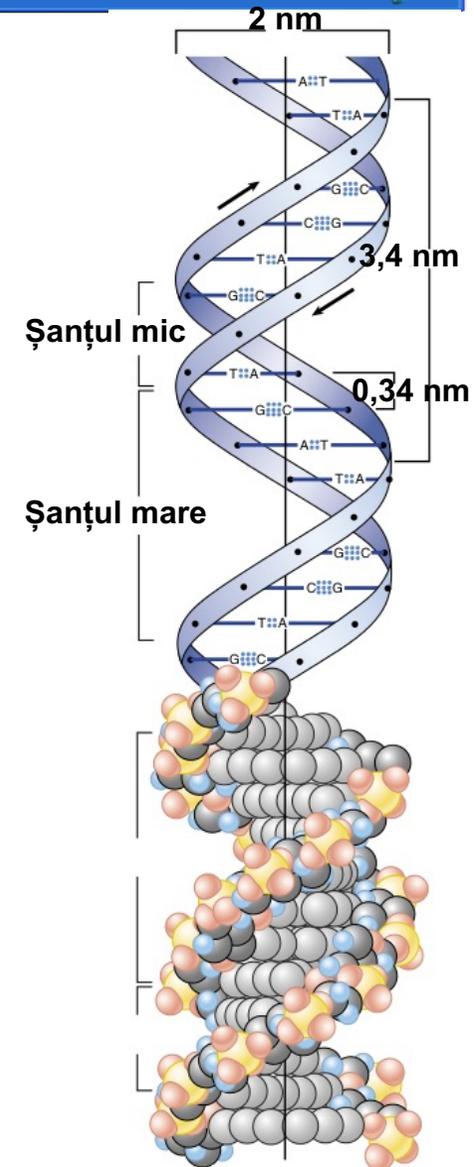
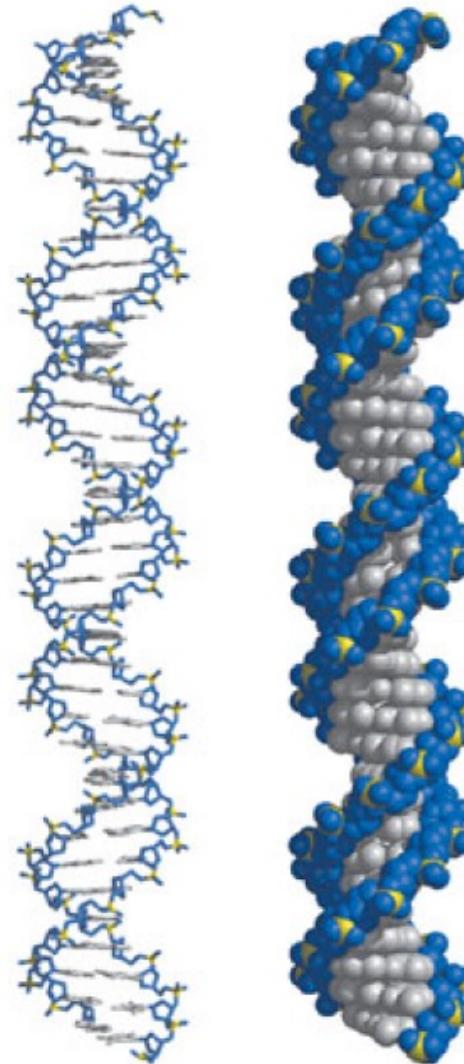
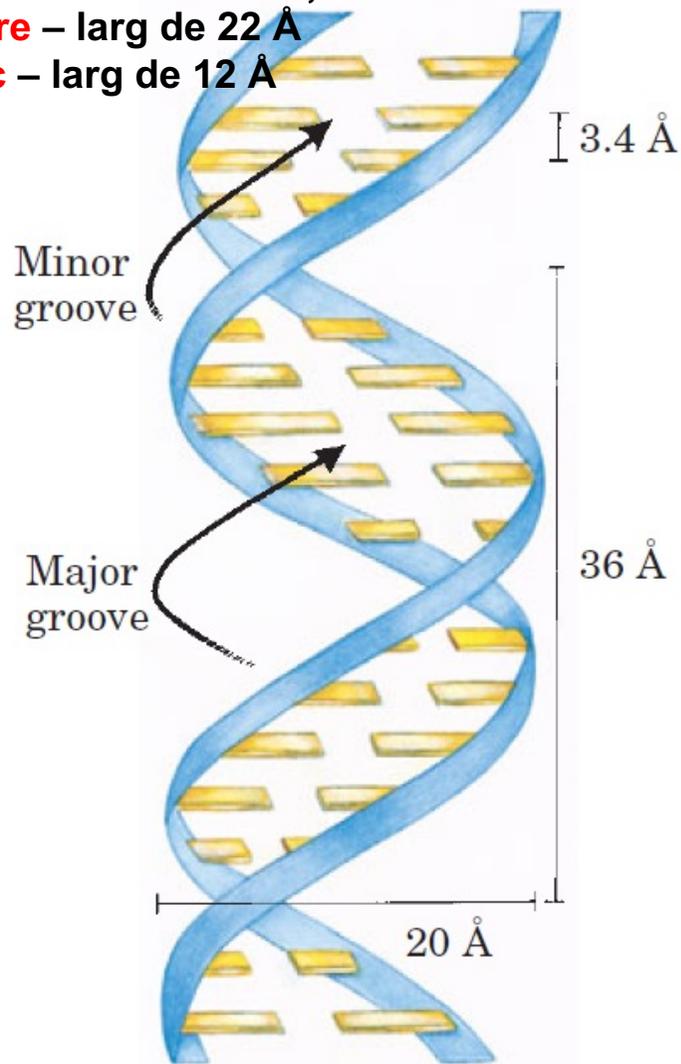
- Scheletul moleculei este reprezentat de catenele cu legături fosfodiesterice ce formează **un dublu helix** spre dreapta. Catenele sunt **antiparalele**, una are orientare $5' \rightarrow 3'$ iar cealaltă $3' \rightarrow 5'$
- **Bazele azotate** sunt orientate **spre interior**. Între bazele de pe o catenă și formează legături de hidrogen pe bază de **complementaritate: A-T (2 legături G-C (3 legături))**. O pereche de baze azotate complementare formează un plan perpendicular pe catenă. **Distanța dintre 2 perechi de baze (pb) consecutive** este de **0.34 nm**.
- Legăturile se formează întotdeauna între o bază purinică și una pirimidinică - dimensiunea unei perechi de baze complementare (pb) și deci diametrul helix-ului dublu este constant – **2 nm**



Structura tridimensională a ADN-ului



- O spiră completă a dublul helix-ului are 10 pb - 3.4 nm
- Au fost descrise două șanțuri:
 - șanțul mare – larg de 22 Å
 - șanțul mic – larg de 12 Å

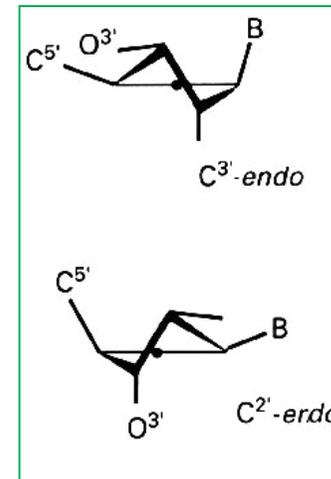
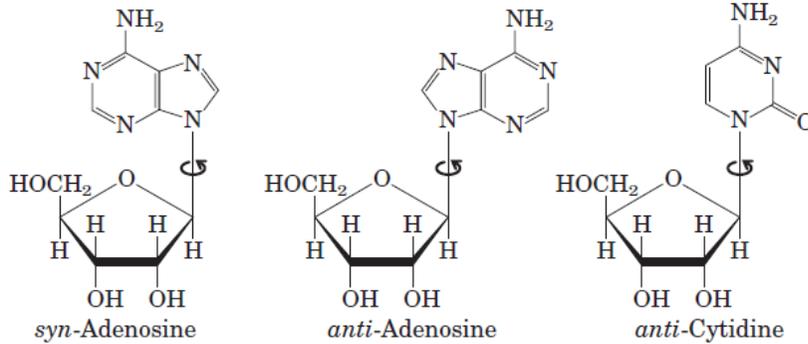
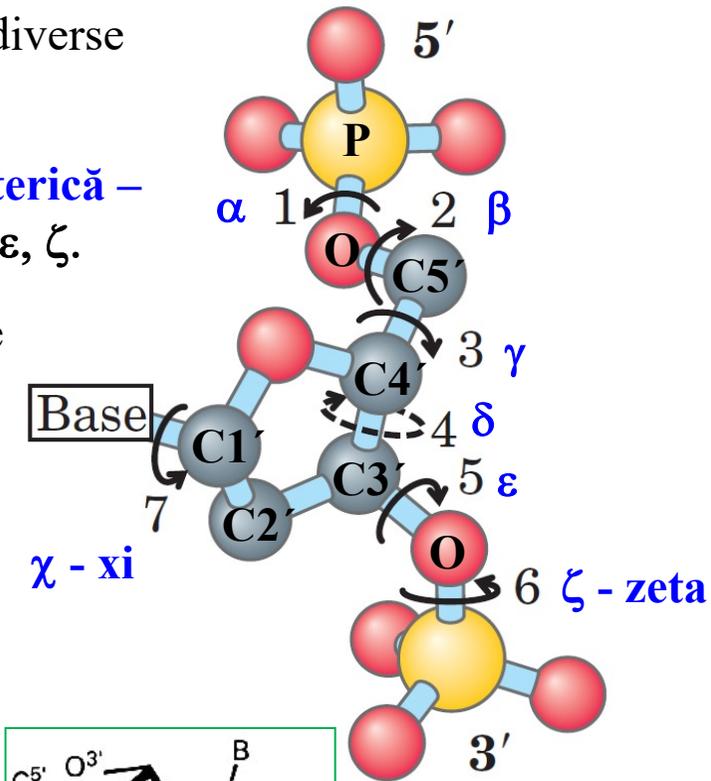


Conformații ale moleculei de ADN



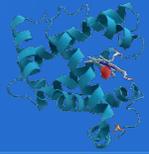
Catena de ADN (și ARN) este deosebit de flexibilă și poate adopta diverse **conformații**. Această flexibilitate rezultă din:

1. **rotația liberă a covalențelor ce alcătuiesc legătura fosfo-diesterică** – au fost descrise 6 unghiuri posibile de rotație, notate: α , β , γ , δ , ϵ , ζ .
2. **rotația liberă a legăturii glicozidice C1' - N** - al 7-lea unghi de rotație, notat χ . O serie de constrângeri sterice fac ca acest unghi să ia valori limitate, în raport cu glucidul bazele azotate putând avea 2 orientări distincte: **syn** și **anti** (pentru purine doar **anti**)



3. **conformațiile posibile ale restului glucidic -**

Conformații ale moleculei de ADN

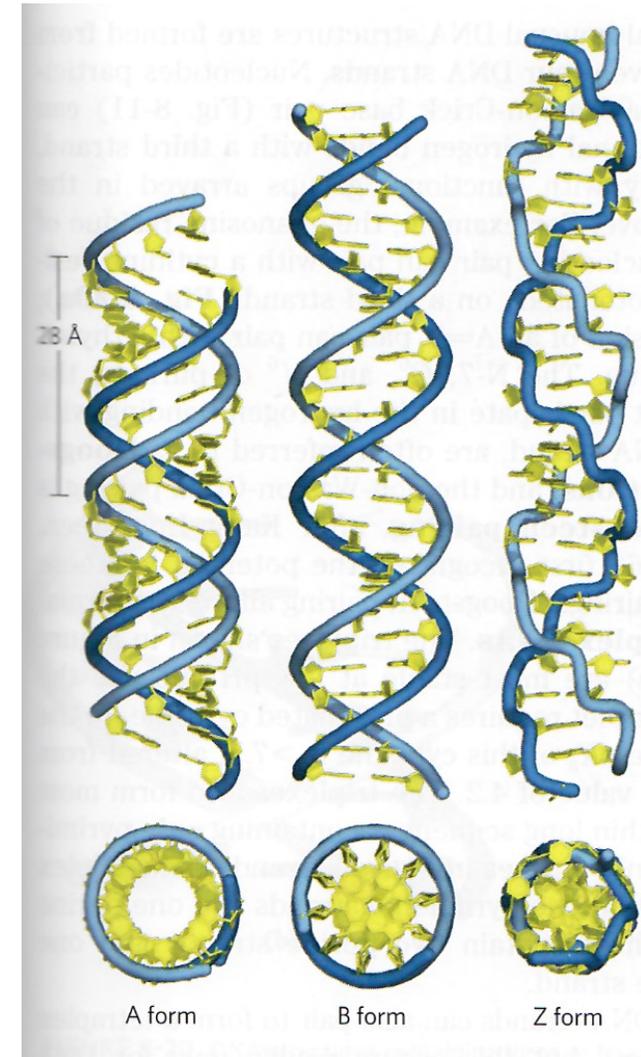


Funcție de valorile pe care le iau cele 7 unghiuri și conformația restului de deoxiriboză au fost descrise 3 forme majoritare diferite ale moleculei de ADN:

1. Conformația sau forma B (ADN-ul B) – este structura descrisă de Watson-Crick, forma în care ADN-ul este cel mai stabil în condiții fiziologice, o spiră completă este alcătuită din **10,5 baze**;

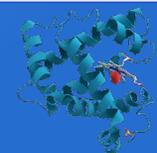
2. Conformația sau forma A (ADN-ul A) - forma în care ADN-ul este cel mai stabil în medii ne-apoase; helix-ul este mai larg, bazele nu sunt perpendiculare pe catene ceea ce face ca sanțul mare să fie mai adânc, o spiră completă conține **11 baze** ;

3. Conformația sau forma Z (ADN-ul Z) – helix-ule este spre stânga, o spiră completă conține **12 baze**.



	A form	B form	Z form
Helical sense	Right handed	Right handed	Left handed
Diameter	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Base pairs per helical turn	11	10.5	12
Helix rise per base pair	2.6 Å	3.4 Å	3.7 Å
Base tilt normal to the helix axis	20°	6°	7°
Sugar pucker conformation	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo for pyrimidines; C-3' endo for purines
Glycosyl bond conformation	Anti	Anti	Anti for pyrimidines; syn for purines

Stabilirea structurii primare a ADN-ului



Secvențierea ADN-ului - procesul de identificare a ordinii precise a nucleotidelor (ATCG) într-o moleculă de ADN – structura primara a ADN-ului.

În prezent există numeroase metode de secvențializare a ADN-ului clasificate în:

- metode derivate de la **metoda chimică** a lui **Maxam și Gilbert**;
- metode derivate de la **metoda enzimatică** a lui **Sanger**;
- **metode de "nouă generație (next-gen)"** sau mai corect **metode de secvențiere în masă (high throughput)** – **pirosecvențiere, ion-torrent, etc.**

Metoda enzimatică Sanger

- una din primele metode de secvențializare a fost descrisă în 1977 de Frederick Sanger care a primit cel de-al doilea premiu Nobel pentru descoperirea sa;

- se bazează tot pe reacția de replicare a ADN-ului catalizată de o **polimerază ADN-dependentă**;

Elementele esențiale realizării unei reacții de secvențiere prin metoda Sanger

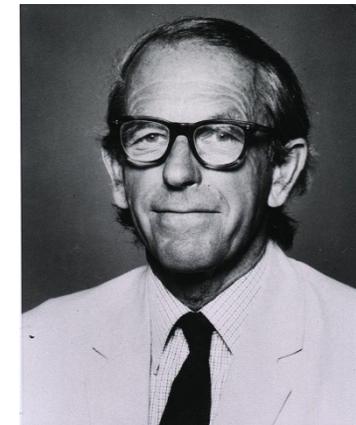
a) **fragment ADN de secvențiat** – o moleculă de ADN monocatenară;

b) **polimeraza ADN**;

c) cele **4 deoxinucleotide** obișnuite (dNTP: A, T, C, G);

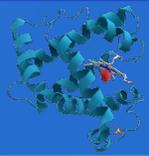
c) o **oligonucleotide amorsă** (primer) complementare cu molecula de secvențiat marcată radioactiv și care oferă un capăt 3' liber;

d) **4 di-deoxinucleotide** (ddNTPs: ddA, ddC, ddG, ddT) – nucleotide ce nu au gruparea hidroxil în pozițiile **2'** (**deoxi**) și **3'** (**di**).



Frederick Sanger - 13 August 1918 – 19 November 2013

Etapetele reacției de secvențializare ADN prin metoda Sanger

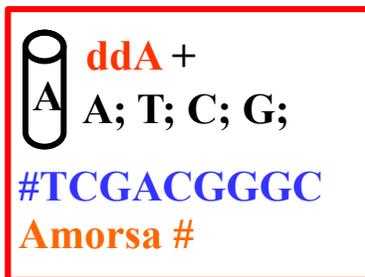


1) Legarea oligonucleotidului primer



Oligonucleotidă primer marcată radioactiv

2) **Elongarea** primerului prin acțiunea ADN polimerazei în prezența dNTP și ddNTP cu sinteza unei catene noi. Reacția se realizează în **4 eprubete diferite**, fiecare conținând un singur tip de ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP sau ddTTP). **Încorporarea unui ddNTP în noua catenă face ca sinteza acesteia să se oprească** (ddNTP sunt "terminatori" de catenă). Încorporarea unui ddNTP de către ADN-polimeraza este un proces statistic ceea ce face ca prin elongare să se genereze în fiecare eprubetă câte o colecție de catene ADN nou sintetizate de dimensiuni diferite.



#ddA

#AGCTGCCCCG



#AGddC

#AGCTGddC

#AGCTGCddC

#AGCTGCCddC

#AGCTGCCCCG

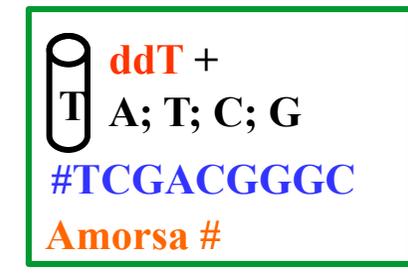


#AddG

#AGCTddG

#AGCTGCCCCddG

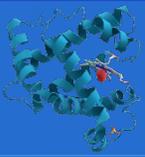
#AGCTGCCCCG



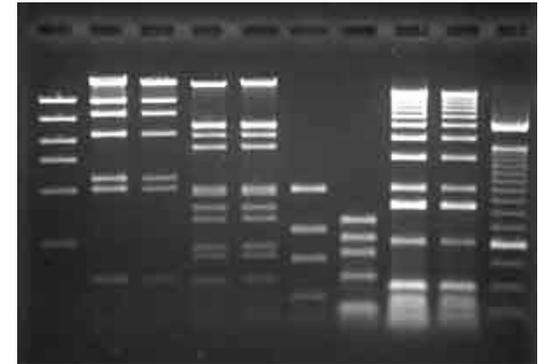
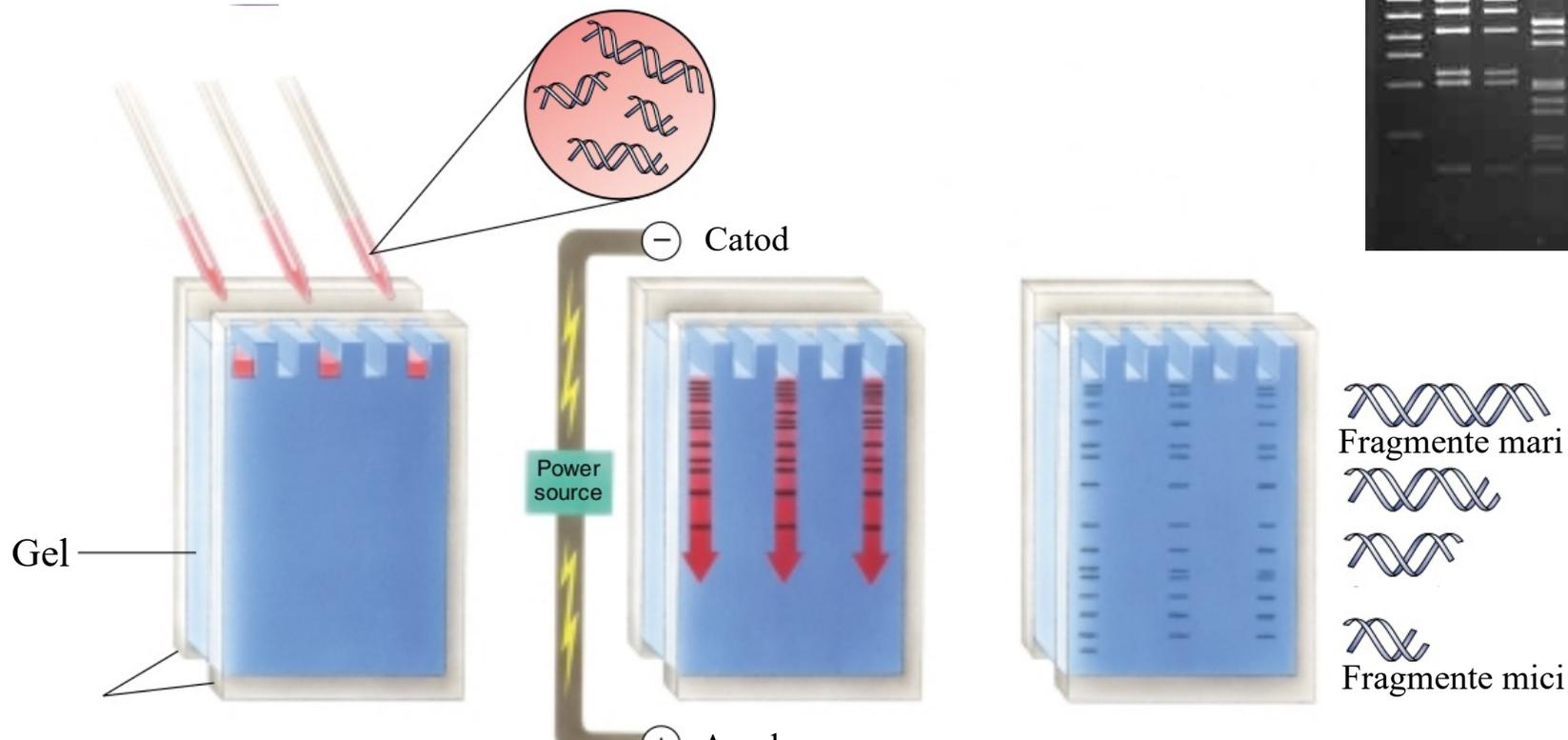
#AGCddT

#AGCTGCCCCG

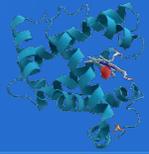
Etapele reacției de secvențiere ADN prin metoda Sanger



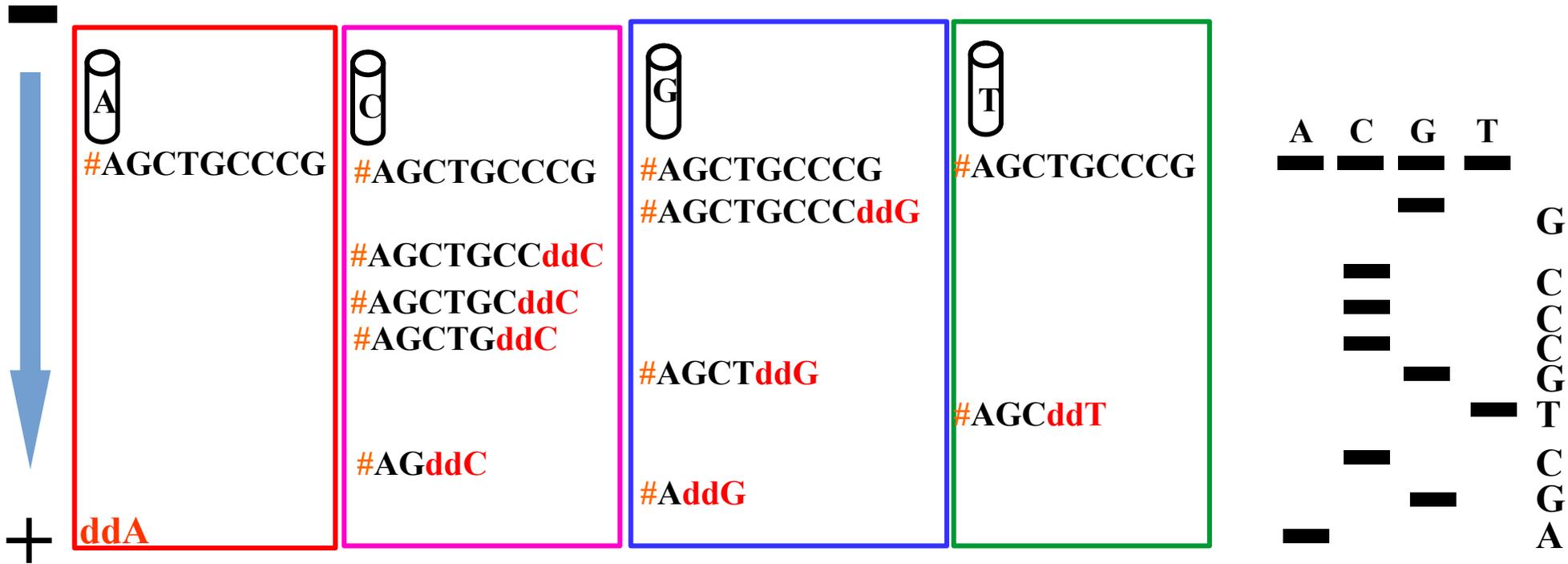
3) Separarea catenelor nou sintetizate funcție de dimensiune – se realizează prin **electroforeză** – moleculele de ADN sunt încărcate negativ și la aplicarea unui curent vor migra spre polul pozitiv. Electroforeza se realizează în geluri de poliacrilamidă ce acționează ca o sită, frânând moleculele mari, astfel încât moleculele mici vor migra mai mult iar cele mari mai puțin.



Etapele reacției de secvențiere ADN prin metoda Sanger

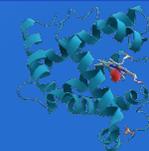


4) **Vizualizarea catenelor nou sintetizate** – se realizează prin **autoradiografie** – pe baza marcajului radioactiv al oligonucleotidului amorsă.



Schema autoradiografiei unui gel de secvențializare

Secvențierea ADN-ului



Care este secvența fragmentului de ADN prin a cărui secvențiere Sanger se obține gelul de alături?

Secvența citită de pe gel:

5' -GCAGAAATAAGTAC-3' deci secvența catenei de secvențiat era:
3' -CGTCTTTATTCATG-3'

Secvențierea ADN-ului

