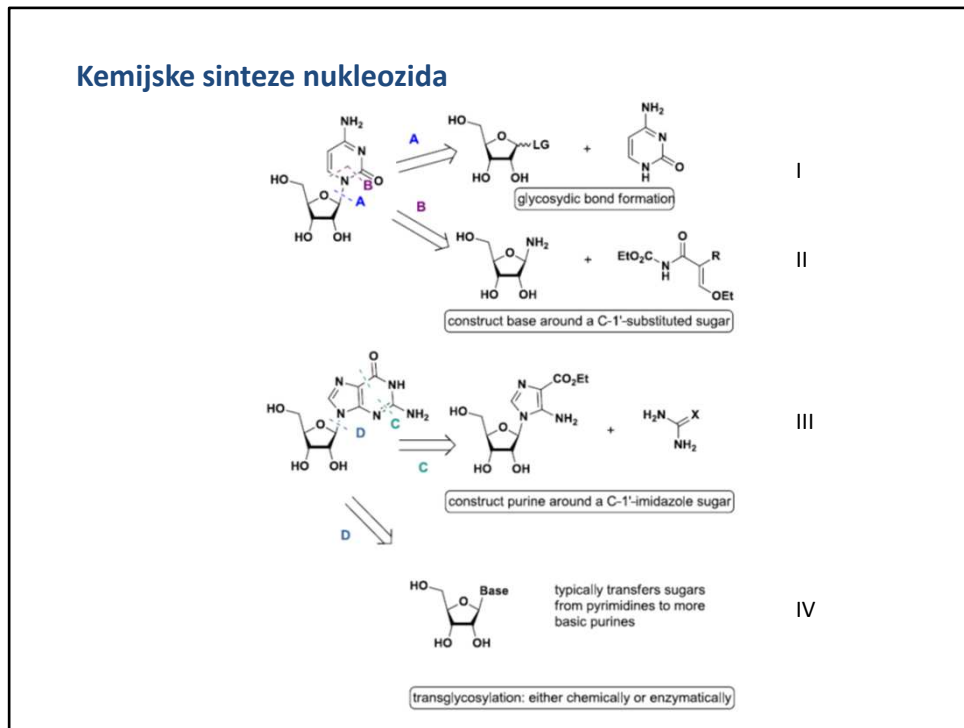


Osnove kemije prirodnih organskih spojeva

2. Nukleozidi, nukleotidi i polinukleotidi

Konformacija, sinteza i biosinteza nukleozida. Nukleotidi.
Sinteza i biosinteza nukleotida. Oligo- i polinukleotidi.
Sinteza i biosinteza oligo- i polinukleotida.

doc. dr. sc. Đani Škalamera



U nastavku kemije nukleobaza i DNA bavit ćemo se metodama njihove kemijske sinteze.

Kada razmišljamo o sintezi neke molekule, uobičajen je pristup razmatrati sintezu u obrnutom smjeru - od kraja prema početku. Taj pristup naziva se retrosinteza i najčešće rezultira puno logičnijim sastavnim dijelovima (sintonima) nego kad se sinteza razmatra od početka prema kraju. Tako zapravo krećemo od konačne molekule, a dvostruka strelica znači retrosintetski korak (sintetski korak koji će biti proveden je upravo obrnut). Tako nukleotide možemo najjednostavnije retrosintetski rastaviti na dva sintona – šećer i nukleobazu. Nekad je nukleobazu zgodnije graditi iz acikličkih sintona, nego uvoditi bazu čija je struktura unaprijed definirana. Neke od ovih metoda pokazane su na slajdu (I-IV).

- I. Sinteza nukleotida iz (deoksi)riboze i nukleobaze – koristi pristup sinteze glikozida kakav smo vidjeli kod ugljikohidrata. Bit je anomernu skupinu prevesti u dobru odlazeću skupinu (npr. halogenid ili trikloroacetimidat) čime se olakšava/omogućuje napad nukleofila.
- II. Ovaj način sinteze koristi aminošećere, gdje je anomerna skupina amin, koji napadom na odgovarajući aciklički spoj kroz dvije uzastopne reakcije može ciklizirati u odgovarajuću nukleobazu. *Pokušajte raspisati korake / mehanizam krećući od ovoga što je napisano.

- III. Sinteza purinskih nukleotida na način da se koristi riboza s derivatom imidazola kao aglikonom. Ovdje je potrebno izgraditi drugi prsten, a to se može upotrebom odgovarajućeg derivata uree/gvanidina. Metoda je vrlo pogodna kad želimo sintetizirati skupinu derivata koji će se razlikovati samo u strukturi šesteročlanog prstena nukleobaze.
- IV. Najjednostavnija metoda – krećemo s nukleotidom i vršimo supstituciju jedne baze drugom. Ovu reakciju je vrlo pogodno provoditi uz pomoć enzima.

Kemijske sinteze nukleozida

Kondenzacije šećera i nukleobaze (sinteza glikozida)

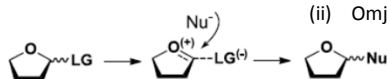
1. Metoda teških metala (Königs-Knorr)
2. Fuzija (Helferich)
3. Hilbert-Johnsonova i sililna metoda

Sinteze građenjem heterocikličke baze

Ovdje su navedeni nazivi nekih češćih metoda. Na sljedećim slajdovima detaljnije o ovim sintezama.

Kemijske sinteze nukleozida

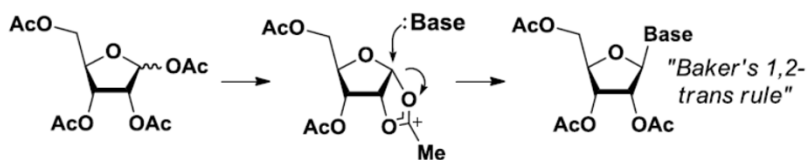
Stvaranje glikozidne veze



Problemi:

- (i) Regioselektivnost supstitucije na bazi (baza ima više nukleofilnih centara!)
- (ii) Omjer α,β anomera

Sudjelovanje susjedne skupine u reakciji – usmjeravanje stereokemije reakcije:



U prvoj reakciji može se kao LG (eng. leaving group, hrv. Izlazeća skupina) nalaziti primjerice Br, pa se reakcija s nukleofilom (u ovom slučaju s nukleobazom) provodi u uvjetima tipičnim za Königs-Knorr sintezu glikozida (koristi se Ag(I) sol da se olakša izlazak halogenida kod napada nukleofila). Ova sinteza ima nedostataka (navedeni na slajdu).

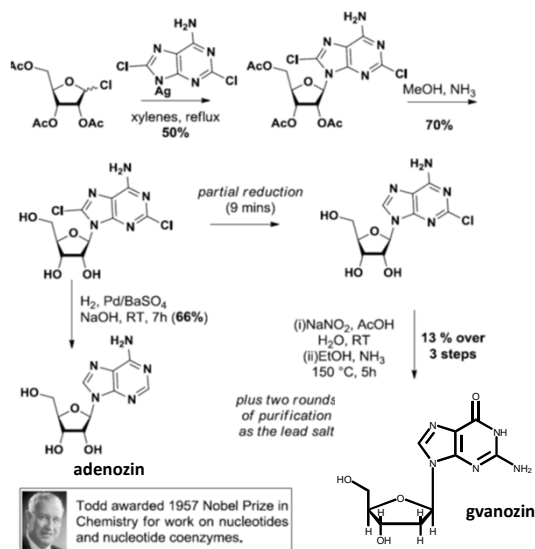
Donja reakcija - sintezu nukleozida provodimo iz riboze kojoj su OH skupine zaštićene acetatnim skupinama (ili općenito, nekim skupinama vezanim esterskom vezom, mogu biti i benzoatne skupine, PhC(O)). Ovdje se radi o izravnoj metodi sinteze glikozida. Kod takve metode koristimo peracetilirane ili perbenzilirane šećere (per znači da su sve OH skupine prevedene u acetatni ili benzoatni ester), nukleobazu kao nukleofil i BF_3 kao katalizator. Dobra strana esterskih zaštitnih skupina je da one mogu sudjelovati u stabilizaciji nastalog karbokationa na anomernom centru, tako da karbonilni kisik esterske skupine intramolekulski napadne na taj kation pa se pozitivan naboj preseli u acetatnu skupinu (struktura dolje u sredini). Acetatnu skupinu zbog toga nazivamo participirajuća skupina. Sada nukleobaza nukleofilni napad može izvršiti isključivo s gornje strane pa će nastati isključivo beta-anomer (ili bar u velikom suvišku u odnosu na alfa). Nastanak alfa anomera nije povoljan jer da bi došlo do njegovog stvaranja, do napada nukleofila (nukleobaze) mora doći s donje strane. No tu se nalazi susjedna acetatna skupina koja smeta tom nukleofilnom napadu. Može se izvesti i pravilo – nova skupina će na anomerni položaj ući u trans-položaju u odnosu na položaj OH skupine na

susjednom C-atomu (C-atom broj 2).

*Pokušajte pravilo primijeniti ako se slična reakcija provodi na glukozi i manozu.

Kemijske sinteze nukleozida

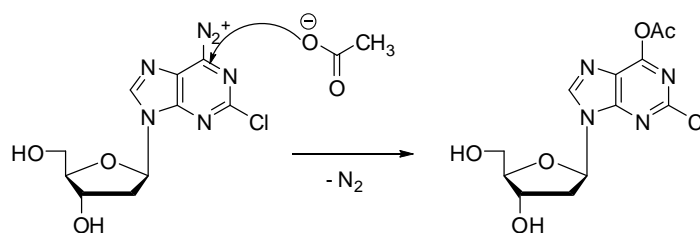
Primjer 1: reakcija metalne soli s C1' halogeniranim šećerom (Fischer-Helferich)



Fischer-Helferichovom glikozilacijom možemo pripremiti nukleozide na način da koristimo srebrne soli nukleobaza. U prvom koraku istaloži AgCl, što je povoljno i reakciju pomiče u desno. Nedostatak je nestabilnost srebrnih soli, osjetljive su na vlagu (hidroliza) i svjetlo (uobičajeno za srebrne soli). Na slajdu su prikazani i daljnji koraci ove sinteze, gdje je dikloro-derivat nukleobaze modificiran. U prvom koraku se uklanjaju zaštitne acetilne skupine sa šećernog dijela. Od dobivenog derivata sinteza se grana na dva smjera – on je međuprodukt u dva sintetska puta. U prvom je provedena redukcija – hidrogeniranje uz katalizator, pri čemu su uklonjeni atomi halogena (zamijenjeni s H). Na taj način može se dobiti adenzin. Drugi smjer – redukcija je provedena tek djelomično. Ako se reakcija hidrogeniranja prekine dovoljno rano nakon početka, može se izolirati derivat u kojem je uklonjen samo jedan atom klora. U sljedećem koraku, amino-skupina se s NaNO₂ u kiselim uvjetima prevodi u diazo-skupinu (R-N₂⁺AcO⁻), nakon čega slijedi napad acetata (nukleofila) i izlazak dušika (izuzetno dobra izlazeća skupina) → prikazano na sljedećem slajdu. Nakon toga, acetatna skupina se hidrolizira amonijakom → ostane OH skupina, ali dolazi do tautomerizacije. *prikažite to! U ovom koraku također dolazi do supstitucije klora s amonijakom. Konačni produkt je adenzin.

Kemijske sinteze nukleozida

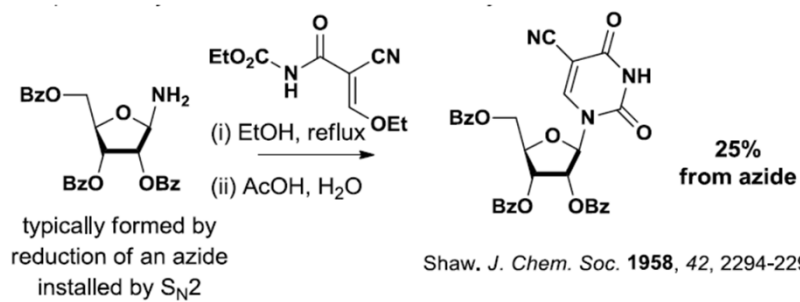
Primjer 1: reakcija metalne soli s C1' halogeniranim šećerom (Fischer-Helferich)



Primijetite da će acetat napasti tamo gdje je dušik izlazeća skupina. Drugo moguće mjesto napada bio bi ugljik na kojeg je vezan klor, ali klor je daleko lošija izlazeća skupina od dušika, N_2 . Za supstituciju klora amonijakom u sljedećem stupnju, potrebni su nešto žešći reakcijski uvjeti ($150\text{ }^\circ\text{C}$ kroz 5h). Pošto je temperatura iznad temperature vrelišta amonijaka i etanola, zadnji stupanj odvija se i pri povišenom tlaku (inače ne bismo nikad postigli $150\text{ }^\circ\text{C}$, kao što ni tekuću vodu ne možete zagrijati na preko $100\text{ }^\circ\text{C}$).

Kemijske sinteze nukleotida

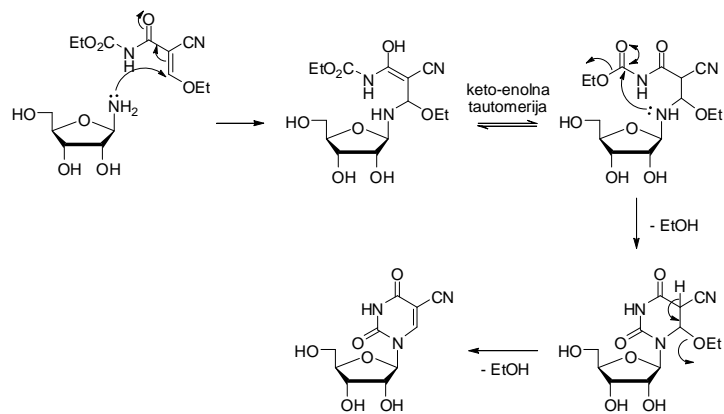
Primjer 2: građenje heterocikla oko C1' dušika aminošećera



Prikazan je primjer sinteze nukleozida građenjem nukleobaze iz acikličkog spoja. Bz su benzoične skupine, PhC(O) (esteri)
Mehanizam ove reakcije prikazan je na sljedećem slajdu.

Kemijske sinteze nukleotida

Primjer 2: građenje heterocikla oko C1' dušika aminošećera

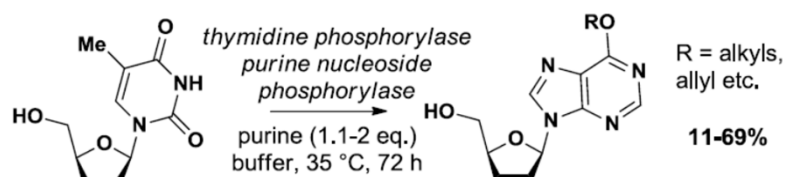


Prvi korak je konjugirana adicija amina. Potom dolazi do ciklizacije jer je nastanak šesteročlanog prstena energetski povoljan proces. U zadnjem koraku dolazi do eliminacije etanola, razlog za to je što će nova dvostruka veza biti u konjugaciji s postojećom karbonilnom skupinom, a također i aromatski karakter nukleobaze (prikažite rezonancijske strukture, delokalizirajte slobodne elektronske parove s dušikovih atoma).

Kemijske sinteze nukleotida

Primjer 3: transglikozilacija

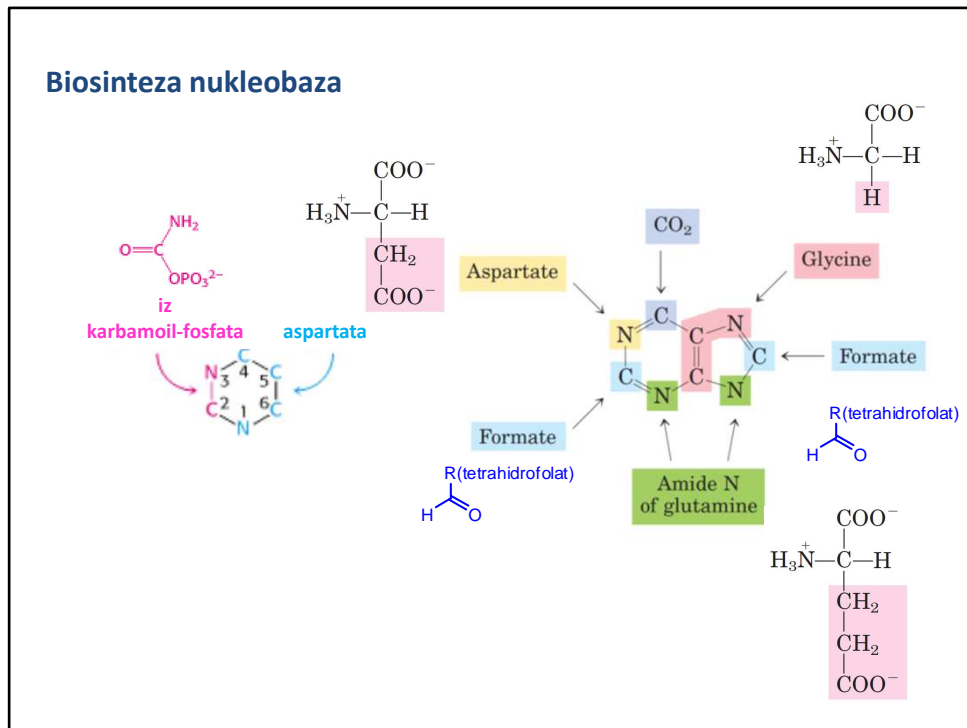
- enzimska reakcija
- vrlo korisna metoda ukoliko želimo transferirati modificirani šećer na neku drugu bazu



Burns. *J. Med. Chem.* **1983**, 36, 378-384.

➤ kemijske sinteze nukleozida vrlo su važne jer omogućuju pripravu, ne samo prirodnih nukleozida, već i njihovih neprirodnih analoga, od kojih su mnogi našli primjenu kao lijekovi

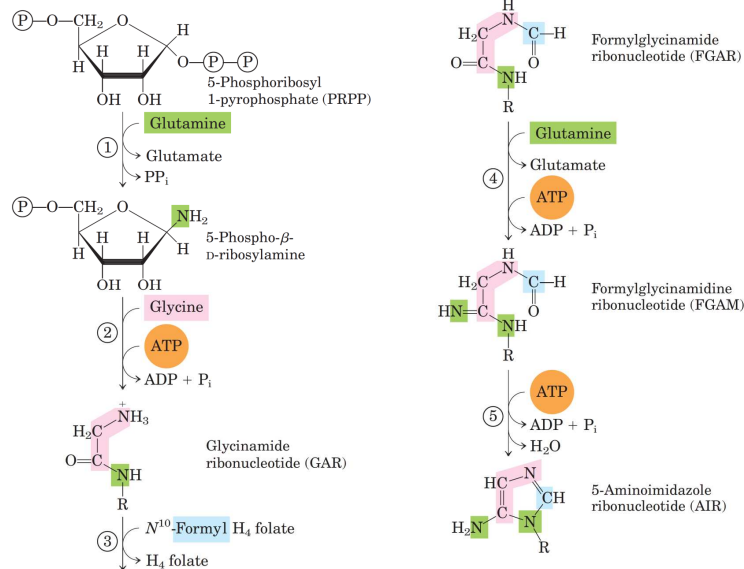
Biosinteza nukleobaza



Biosinteza nukleobaza kreće iz acikličkih fragmenata. U pirimidinima su to karbamoil-fosfat i aspartat, dok je kod purina nukleobaza veća i sastoji se od dijelova koji potječu od nekoliko drugih metabolita: aspartata, formijata (prenosi se iz tetrahidrofolata, derivata vitamina B9), CO₂, glicina, i glutamina.

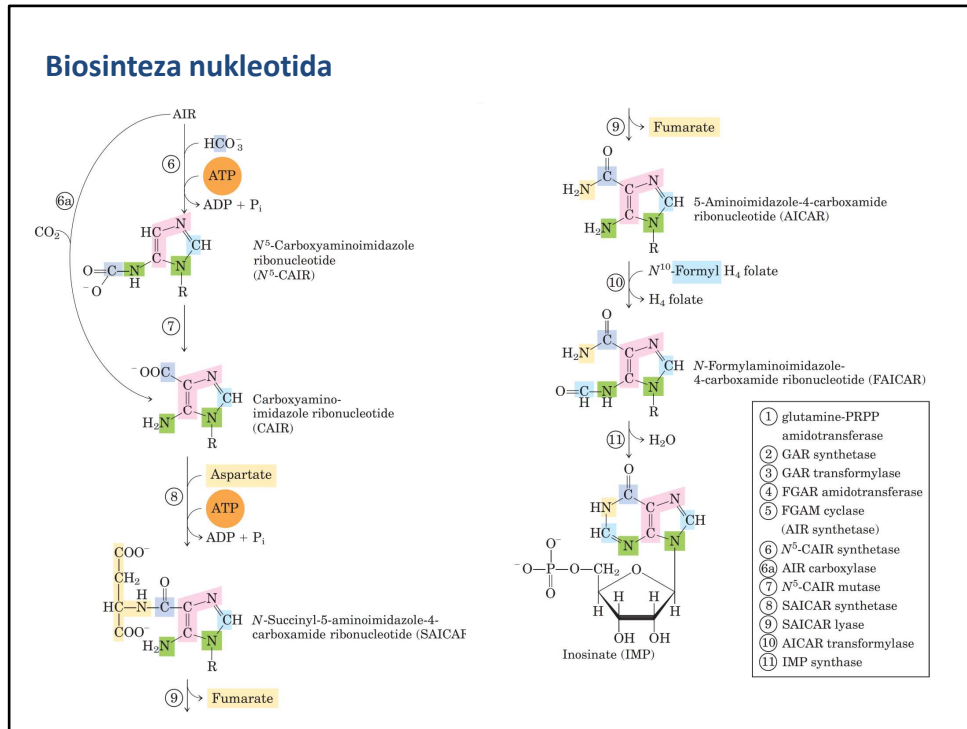
Do ovih saznanja došlo se radioaktivnim obilježavanjem supstrata koji ulaze u metabolički put biosinteze nukleobaza.

Biosinteza nukleotida



Biosinteza nukleotida kreće iz PRPP-a. Jedna od uloga glutamina u metabolizmu je prijenos amino-skupine. Reakcija je slična kemijskim glikozilacijama s kojima smo se do sada sreli, s time da ovdje kao dobra izlazeća skupina na šećeru služi pirofosfat. Enzimi reakcije provode vrlo stereoselektivno pa je amino-skupina koja se ugradila u konfiguraciji beta. Nadalje, oko te amino skupine gradi se heterociklička baza, polazeći iz acikličkih fragmenata. Prvo nastaje amid s karboksilnom skupinom glicina. Energija za tu reakciju dobiva se hidrolizom ATP-a. Nakon toga prenosi se formijatna skupina s folata na amino-skupinu vezanog glicina. Potom se prenosi još jedna amino skupina iz glutamina te dolazi do ciklizacije. Tako je dobiven peteročlani prsten purinskog sustava.

Biosinteza nukleotida



6. Nadalje, amino skupina reagira s CO_2 dajući karbamat, nakon čega se skupina prenosi na susjedni C-atom dajući karboksilnu skupinu (7). Aspartat s karboksilnom skupinom tvori amidnu vezu, nakon čega izlazi kao fumarat, a iza sebe ostavlja amid (CONH_2). Nakon ovog koraka prenese se još jedna formilna skupina i konačno dolazi do ciklizacije. Sve ove reakcije enzimski su katalizirane. Za reakcije koje su endergone, energija se dobiva hidrolizom ATP-a.

Konačni produkt ove biosinteze je inozinat.

Biosinteza nukleotida

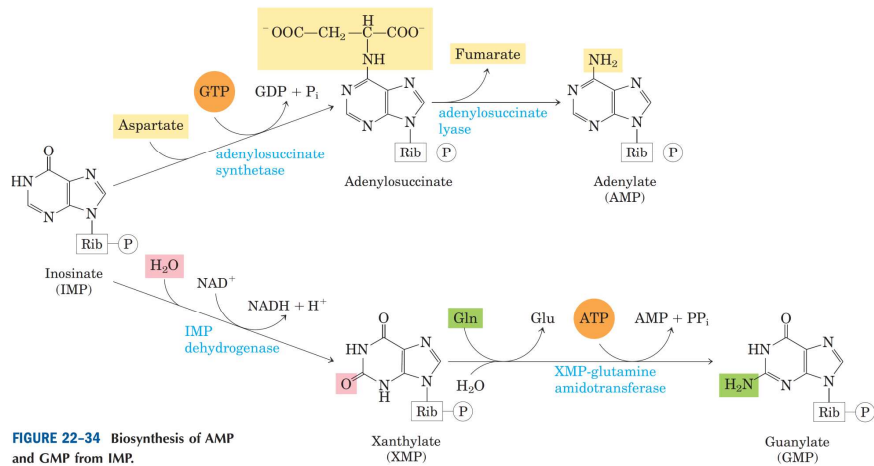
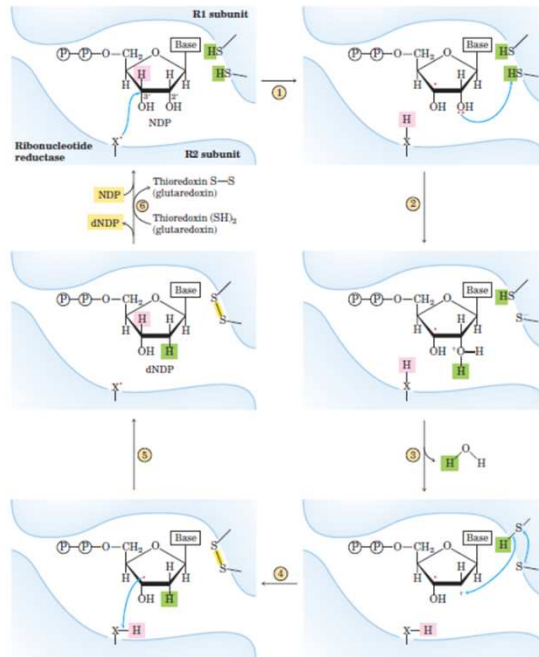


FIGURE 22-34 Biosynthesis of AMP and GMP from IMP.

Adenozin i gvanozin se sintetiziraju u metabolizmu iz istog prekursora – inozinata. Amino skupina adenina se uvodi iz aspartata, a amino skupina gvanina iz glutamina.

Biosinteza nukleotida

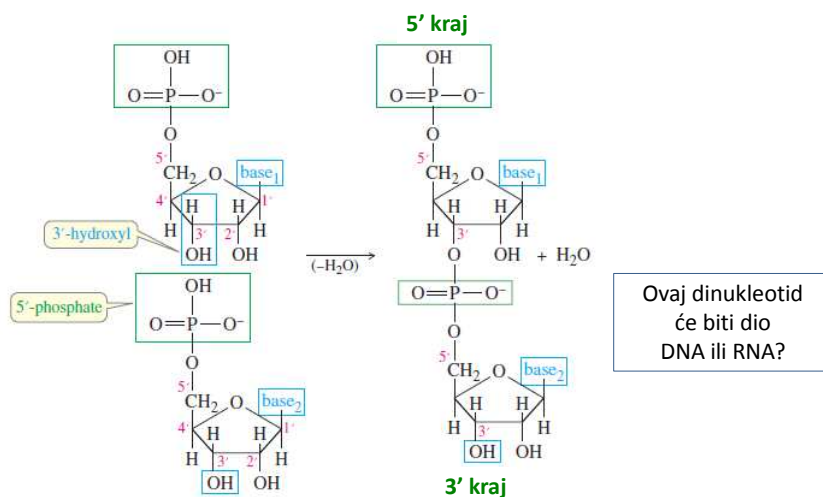
- biosinteza deoksinukleotida iz nukleotida



Deoksinukleotidi se u metabolizmu sintetiziraju iz već gotovih nukleotida. U aktivnom mjestu nalaze se SH skupine koje potječu iz aminokiseline cisteina. Mehanizam ove reakcije uključuje nastanak radikala. (u literaturi ćete pronaći izraz „slobodni radikali”, koji se još jako puno koristi, iako je IUPAC još 1950-ih godina odlučio da se ovi međuprodukti nazivaju jednostavno „radikali”)

Oligo i polinukleotidi

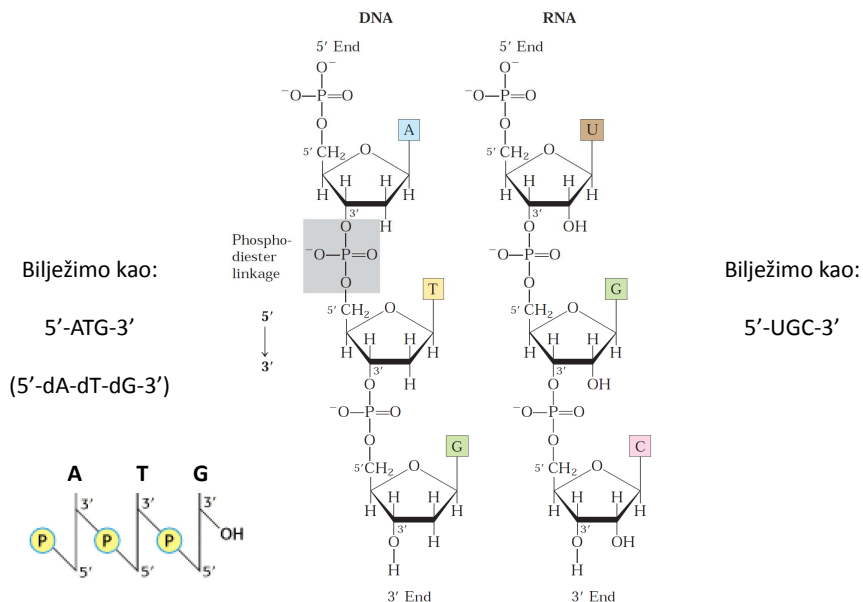
- oligonukleotidi 2-50 monomernih jedinica
- polinukleotidi >50 monomernih jedinica



Oligonukleotidi i polinukleotidi su polimeri nukleotida. U njima su nukleotidi međusobno povezani preko fosfatnih skupina. Tako su u nukleotidima fosfatne skupine u obliku monoestera, a u dinukleotidima (gdje su povezana 2 nukleotida) su u obliku diestera. Teorijski razmatrano, fosfatne skupine mogle bi tvoriti i triester, neki jednostavni derivati se mogu nabaviti, npr. trietil-fosfat, $(\text{EtO})_3\text{PO}$.

Pogledajmo sada strukturu dinukleotida pokazanog na slajdu. Možemo uočiti da gornji nukleotid ima fosfatnu skupinu na 5'-C-atomu u obliku monoestera (nekad se naziva i slobodnom fosfatnom skupinom, ali to može zbuniti jer može značiti i PO_4^{3-}). To inače zovemo jednostavno 5'-kraj. Donji nukleotid ima slobodnu svoju OH skupinu na položaju 3', te se može povezivati s nekim sljedećim, trećim, nukleotidom preko fosfatne skupine novog nukleotida.

Oligo i polinukleotidi

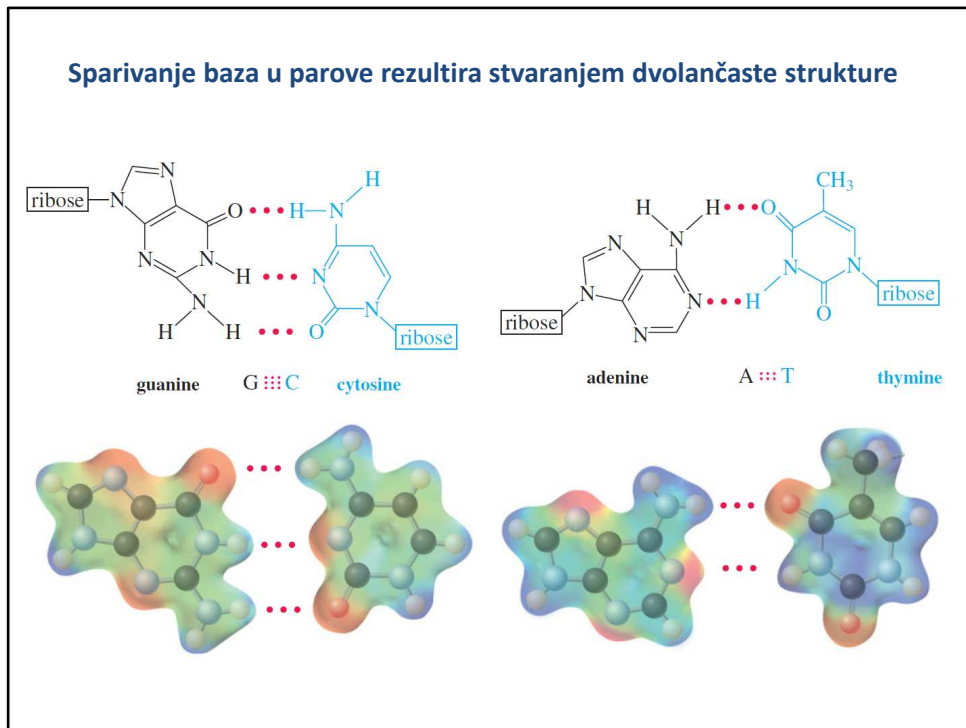


Kad se puno nukleotida poveže u lanac, dobivamo polinukleotidni lanac. Njega možemo bilježiti skraćeno, početnim slovima imena baza. Ako se baš želi naglasiti da se radi o deoskinukleotidima, onda se može pisati dAdTdG, no nije nužno.

Potrebno je navesti koji nukleotid je početak, a koji kraj lanca. To radimo na način da prije i nakon kratice imena stavimo oznake 3' i 5'. 5'-označava da je na tom nukleotidu fosfatna skupina u obliku monoestera, dok je na 3'-kraju slobodna OH skupina riboze.

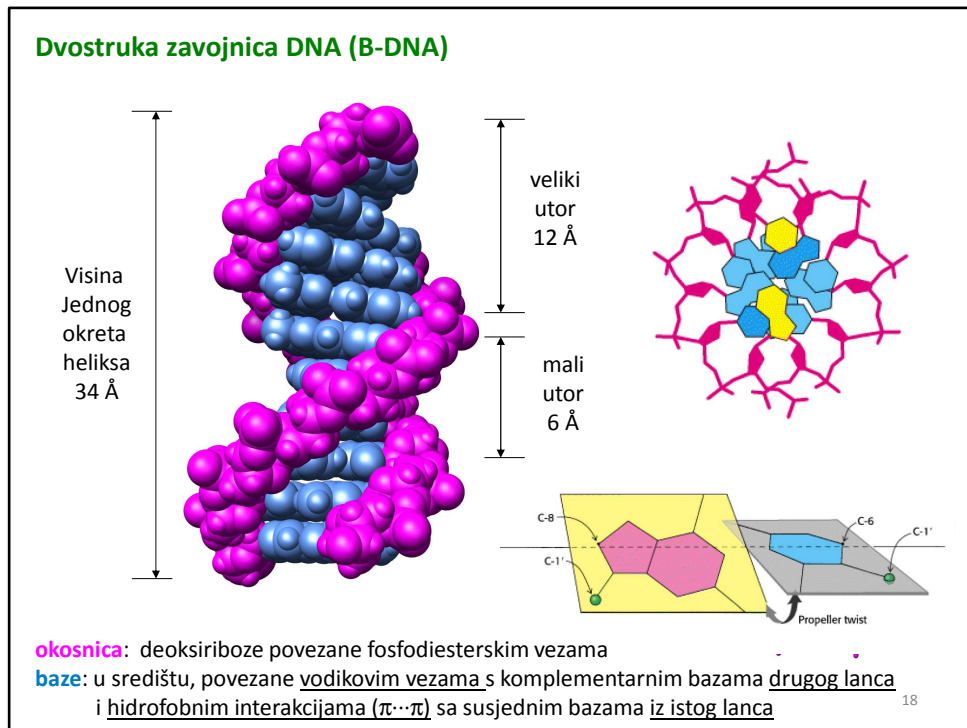
Dakle, 5'-ATG-3' nije isto što i 3'-ATG-5'. *Nacrtajte!

Sparivanje baza u parove rezultira stvaranjem dvolančaste strukture



Nukleobaze mogu ostvativati vodikove veze, koje su izuzetno važne za više razine strukture koje susrećemo kod polinukleotida (RNA, DNA). Mogli bi zamisliti vodikove veze (i druge interakcije) između bilo kojih parova baza, ali najstabilnije nastaju između gvanina i citozina te adenina i timina. Baze iz ovih parova zovemo komplementarne. Kad imamo lance oligodeoksinukleotida, npr. 5'-ACGT-3' i 3'-TGCA-5' oni će se spariti upravo zbog povoljnih interakcija između komplementarnih parova baza. Lanci će se sparivati tako da će se 5'-kraj jednog lanca poklapati s 3'-krajem drugog lanca, tj. antiparalelni su s obzirom na smjer.

* Napišite lanac koji je komplementaran ovom lancu DNA: 5'-ATGCTTAGCA-3'



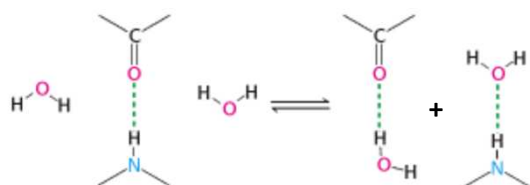
Dva sparena komplementarna polideoksinukleotidna poprimaju strukturu zavojnice. To je vrlo prepoznatljiv strukturni motiv deoksiribonukleinske kiseline ili DNA. Iako je DNA prvi put izolirana 1869. (F. Miescher), struktura joj nije bila poznata do 1953. kad su Watson, Crick, Wilkins i Franklin riješili njezinu strukturu. 9 godina poslije, prva trojica podijelila su Nobelovu nagradu za ovo značajno otkriće. Rosalind Franklin preminula je 1958, pa nije mogla primiti Nobelovu nagradu koja se ne dodjeljuje posthumno, iako se na brojnim mjestima u literaturi navodi kao najzaslužnija za ovo otkriće.

Na slajdu je pokazan isječak strukture. Ružičasto su prikazane deoksiriboze povezane fosfodieterskim vezama, a baze (prikazane plavo) vidimo da su okrenute prema sredini, gdje tvore interakcije s komplementarnom bazom iz drugog lanca. Također, one tvore i interakcije u smjeru osi zavojnice. Te interakcije zovemo π - π interakcijama (privlačne interakcije pi-orbitala aromatskih prstenova nukleobaza). Nekad se također nazivaju hidrofobne interakcije. Dvostruki lanac ima dva utora, koji su vrlo važni za interakciju s proteinima i drugim unutarstaničnim molekulama. Neki lijekovi međudjeluju s molekulom DNA na način da ostvaruju interakcije s nukleobazama u malom ili velikom utoru.

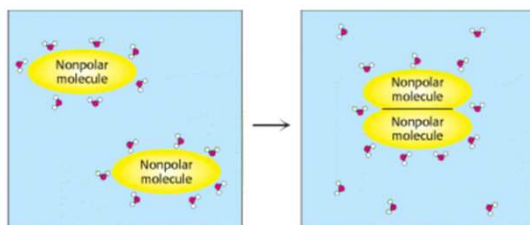
Na slajdu je također pokazan pogled na lanac DNA odozgo, gdje se vidi na koji način baze unutar zavojnice popunjavaju prostor.

Sparivanje baza u parove rezultira stvaranjem dvolančaste strukture

- Riboza, fosfat i nukleobaza mogu tvoriti vodikove veze s vodom. Zašto ipak preferiraju međusobno stvoriti vodikove veze i formirati lančaste strukture?



Na koju stranu očekujete da će biti pomaknuta ova ravnoteža i zašto?



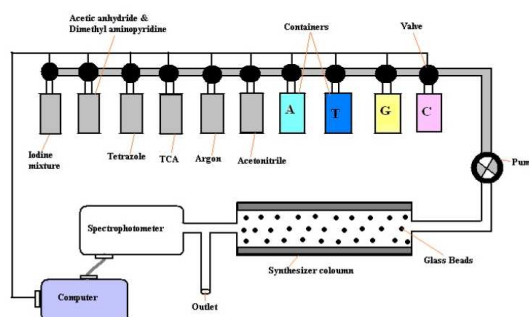
Pitanje je zašto se baze sparuju međusobno, kad bi isto tako mogle osvariti jednak broj vodikovih veza s molekulama vode, kojih u stanici ima u izobilju.

Pitanje je zašto je ravnotežna reakcija na slajdu pomaknuta prema lijevo. To je očito iz donjeg crteža, gdje se vidi da interakcijom između dviju velikih molekula u vodi dio molekula vode biva otpušten u okolinu, čime se povećava entropija sustava. Upravo je to pogonska sila pri nastanku strukture dvostruke zavojnice. Osim Watson-Crickovog sparivanja među komplementarnim bazama (vodikove veze), baze ostvaruju i hidrofobne interakcije duž osi DNA. Razglog nastanka takvih interakcija je isti – povećanje entropije sustava, što snižava ukupnu energiju i čini dvostruku zavojnicu DNA stabilnom strukturom.

Važno svojstvo DNA molekule je temperatura mekšanja, T_m (*melting temperature*). Naime, ukoliko otopinu koja sadrži DNA zagrijemo, dovest ćemo dovoljno energije da se prevladaju interakcije između lanaca pa će se oni međusobno odvojiti. To se događa u relativno uskom rasponu temperatura pa je krivulja ovisnosti koncentracije dvolančane DNA o temperaturi obično sigmoidalna. Točka infleksije te krivulje je temperatura mekšanja.

Kemijska sinteza oligonukleotida

- vrlo važna, jer omogućuje brz i jeftin pristup nukleotidnim slijedovima sa slijedovima baza koje god želimo
- nema ograničenja da sinteza mora ići iz smjera 5' prema 3' kao u biosintezi
- sinteza na **čvrstom nosaču** → u potpunosti automatizirana još od 1970-ih



Vidjeli smo ranije na koji se način mogu sintetizirati nukleozidi. Te metode su vrlo važne jer omogućuju sintezu analoga nukleotida, koji nalaze primjenu kao lijekovi (kemoterapeutici, antivirusni lijekovi)

Osim samih nukleozida, mogu se sintetizirati i polinukleotidi te manje molekule DNA. Te metode su poznate još od 70-ih i automatizirane su. Uređaj (DNA synthesizer) se opskrbi odgovarajućim reagensima – nukleotidima koji su na odgovarajući način derivatizirani i spremni za sintezu te reagensima koji omogućuju njihovo povezivanje. Uređaj će sam provesti sintezu onako kako ga isprogramiramo.

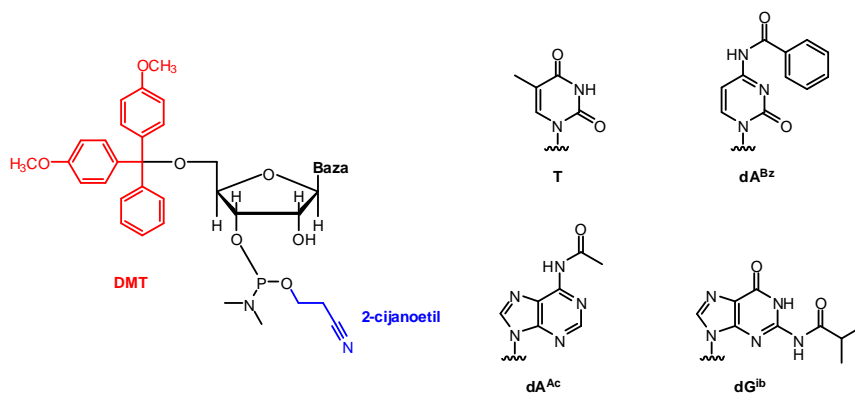
Kemijska sinteza oligonukleotida

Zašto je sinteza na čvrstom nosaču bolja od sinteze u otopini?

- Ova strategija razvijena je ponajprije za sintezu peptida, ali našla je primjenu i u sintezi oligonukleotida
- netopljivi polimer (modificirani polistiren), silikagel – čvrsta faza
- sinteza na površini polimera, produkti su kovalentno vezani za polimer
- nečistoće i nusprodukti nisu vezani za polimer pa se lako ispiru
- najveća prednost je čistoća procesa i što ne postoji potreba za pročišćavanjem svih međuprodukata
- lako se automatizira
- do oligonukleotida od ~200 nukleotidnih jedinica (broj grešaka u sintezi akumulira se kako duljina oligonukleotida raste)
- Nobelova nagrada za kemiju 1984. godine – Robert Bruce Merrifield

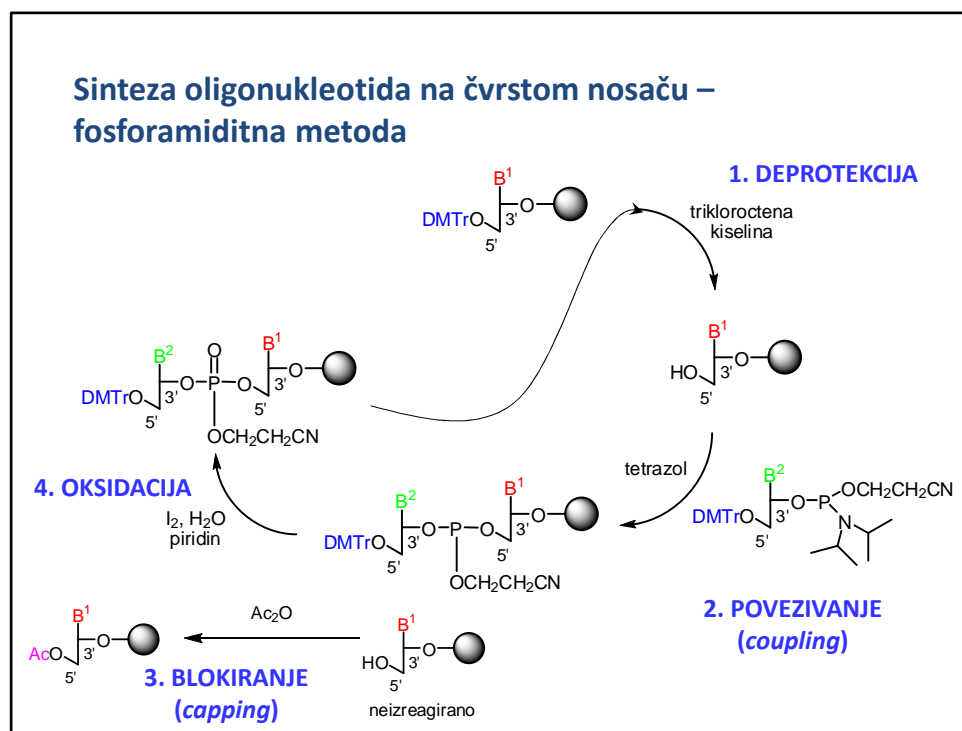
Sinteza oligonukleotida na čvrstom nosaču – fosforamiditna metoda

Gradivni blokovi



U automatiziranoj sintezi na čvrstom nosaču koriste se derivati u kojima je na šećer vezana nukleobaza čije su reaktivne skupine blokirane odgovarajućim zaštitnim skupinama. Zaštitne skupine uklone se na kraju sinteze. OH skupina na položaju 5'-šećera zaštićena je tritilnim eterom (dimetoksifenilmetanom), dok je OH skupina na položaju 3'-aktivirana za reakciju u obliku fosforamiditnog estera.

Sinteza oligonukleotida na čvrstom nosaču – fosforamiditna metoda

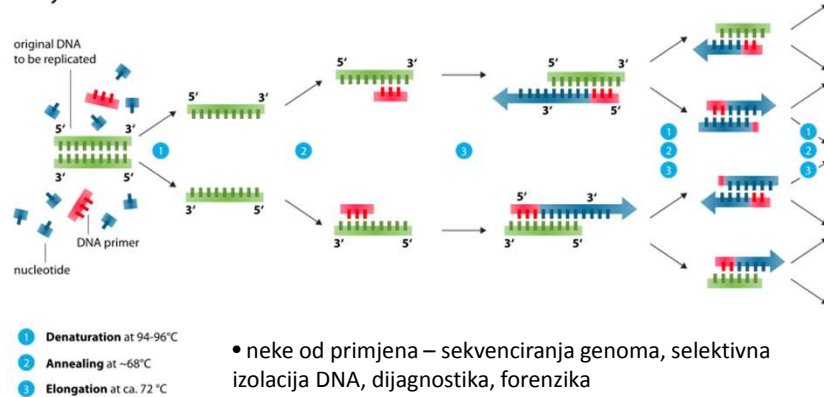


Automatizirana sinteza na čvrstom nosaču provodi se po shemi prikazanoj na slajdu. U prvom koraku se pomoću trikloroctene kiseline se ukloni zaštitna skupina s OH skupine na položaju 5'-šećera. Potom se dodaje drugi nukleotid, zaštićen na 5'-kraju s DMT-eterom i OH skupinom na položaju 3' aktiviranom u obliku fosforamiditnog estera. Sada smo povezali dva nukleotida, ali oksidacijsko stanje fosfora nije odgovarajuće (sad je 3, treba biti 5). Prije sljedećeg stupnja provodi se blokiranje. Naime, niti jedna reakcija nije 100% efikasna, pa uvijek ostane pokoja OH skupina neizreagirana, što bi na kraju rezultiralo smjesom polinukleotida s N, N-1, N-2, ... nukleotida u lancu. Poliukleotid od interesa bi izuzetno teško pročistili iz takve smjese. Da bi izbjegli rast lanca u idućem stupnju, tamo gdje OH skupina nije izreagirala, provodimo blokiranje preostalih OH skupina jednostavnim acetiliranjem. Na taj način takvi lanci više neće rasti i značajno će se razlikovati u duljini od ciljnog polinukleotida, što znači da će ih biti lakše ukloniti, tj. znači lakše pročišćavanje polinukleotida od interesa.

U zadnjem stupnju provodi se oksidacija fosfita u fosfat pomoću joda u piridinu. Nakon toga se cijeli ciklus može ponoviti dok se ne dobije polinukleotid željene duljine lanca. Nakon toga se on uklanja s polimera, uklone se sve zaštitne skupine (sa šećernog dijela i s nukleobaza), pročisti se dobiveni polinukleotid (HPLC) i potvrdi mu se struktura (npr. masenom spektrometrijom visoke rezolucije, HRMS ili se žrtvuje mala količina pa se napravi sekvenciranje).

Sinteza oligo i polinukleotida lančanom reakcijom polimeraze

Polymerase chain reaction - PCR



PCR je izuzetno puno korištena metoda u umnožavanju molekule DNA. Ovom metodom se iz vrlo male količine DNA može u razmjerno kratkom vremenu stvoriti ogroman broj kopija. Da bi se DNA mogla umnožiti, moramo imati njezin mali fragment, s kojim će započeti sinteza. Taj fragment se zove početnica i komplementaran je s početkom dijela DNA kojeg želimo kopirati. Njega možemo sintetizirati npr. automatiziranom sintezom polinukleotida. Metoda PCR je potpuno automatizirana – dodaju se svi reagensi u otopinu (DNA, početnica i enzim) te nakon nekoliko sati u instrumentu, DNA je umnožena jako puno puta. Instrument povisuje/snizuje temperaturu, kako bi omogućio razdvajanje lanaca DNA i prepisivanje lanca. Uočite da se svaki lanac prepisuje u svoj komplementarni lanac!

Sinteza kreće tako da se podigne temperatura, pri čemu se lanci DNA u otopini razdvoje (toplina dovedena povišenjem temperature nadvlada interakcije među lancima). Nakon toga se temperatura spusti na 68°C, pri čemu se spare početnice s početkom lanca DNA (svojim komplementarnim dijelom). Početnica je zapravo kratki dio DNA na kojem enzim započinje sintezu. Enzim ne može početi sintezu „iz ničega“, izravno s DNA, bez početnice. Nakon toga se temperatura podigne na 72°C pri čemu se DNA prepisuje. U tome sudjeluju enzimi iz termofilnih bakterija, za koje je idealna ovako visoka temperatura. Nakon toga imamo kopije DNA u obliku dvostrukih zavojnica. Sad opet ponovimo cijeli postupak pa dobijemo još kopija DNA. Broj molekula DNA eksponencijalno raste s brojem provedenih ciklusa. Tako se nakon 30 ciklusa jedna DNA

može umnožiti čak milijardu puta.

Zadatak

Nacrtajte strukturu sljedećih nukleotida:

- (a) gvanozin trifosfat (GTP)
- (b) deoksicitidin monofosfat (dCMP)
- (c) ciklički gvanozin monofosfat (cGMP)

Domaća zadaća

1. Nacrtajte strukturu tetranukleotida koji je dio DNA, te ima sljedeću sekvencu:

3'-G-T-A-C-5'

2. Erwin Chargaff je otkrio da DNA sadrži ekvimolarne količine gvanina i citozina, te također i ekvimolarne količine adenina i timina. To je poznato kao Chargaffovo pravilo:

$G = C$ i $A = T$

- (a) Što nam Chargaffovo pravilo govori o međusobnom odnosu količine gvanina i adenina u DNA? Da li vrijedi $G = A$?
- (b) Da li Chargaffovo pravilo tvrdi da je suma količine purinskih baza jednaka sumi pirimidinskih, tj. $A + G = C + T$?
- (c) Da li se Chargaffovo pravilo odnosi samo na DNA u obliku dvostruke zavojnice ili se može primijeniti i na svaki lanac zasebno, ukoliko se dvostruka zavojnica razdvoji na svoje komplementarne lance?