

Inżynieria genetyczna

Wykład 1: makromolekuły biologiczne

Tymon Rubel

Zakład Elektroniki Jądrowej i Medycznej
Instytut Radioelektroniki i Techniki Multimedialnych PW

Makromolekuły biologiczne

Makromolekuły (makrocząsteczki) to duże cząsteczki chemiczne, złożone z więcej niż tysiąca atomów. Często mają one postać **polimerów** powstałych poprzez łączenie (polimeryzację) mniejszych jednostek, zwanych **monomerami**.

Dla życia w znanej nam postaci podstawowe znaczenie mają 4 grupy makromolekuł:

- węglowodany;
- lipidy;
- kwasy nukleinowe;
- białka.

W zakresie zainteresowania inżynierii genetycznej pozostają przede wszystkim dwa rodzaje biopolimerów: **kwasy nukleinowe (zbudowane z nukleotydów)** oraz **białka (składające się z aminokwasów)**.

Inżynieria genetyczna

Wykład 1: kwasy nukleinowe (DNA)

Tymon Rubel

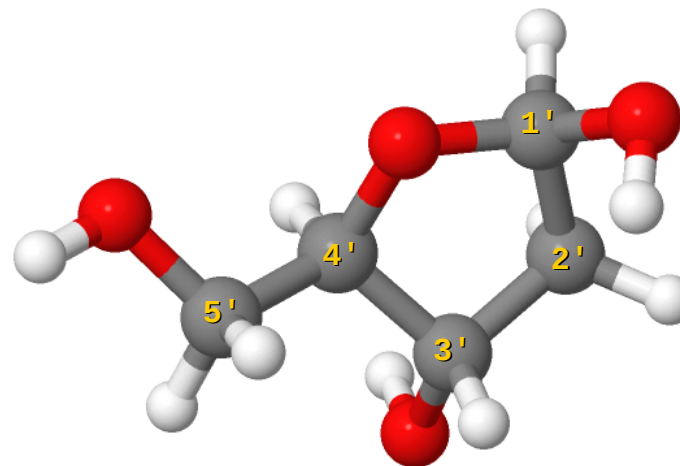
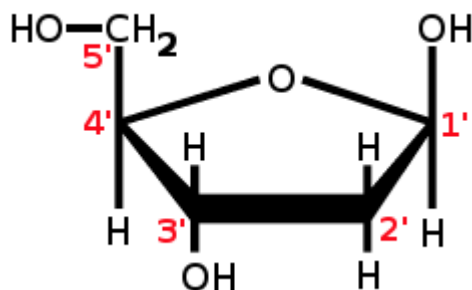
Zakład Elektroniki Jądrowej i Medycznej
Instytut Radioelektroniki i Techniki Multimedialnych PW

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA)

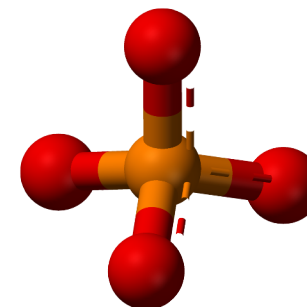
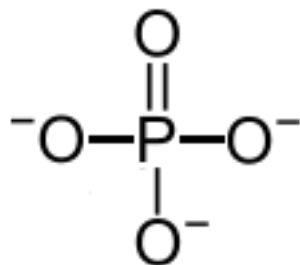
Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) jest liniowym, nierozgałęzionym polimerem złożonym z czterech rodzajów **deoksyrybonukleotydów**.

Elementami składowymi każdego z deoksyrybonukleotydów są:

- **2'-deoksyryboza** (cukier prosty o pięciu atomach węgla, czyli tzw. pentoza);



- **grupa fosforanowa** (złożona z jednej, dwóch lub trzech reszt fosforanowych);

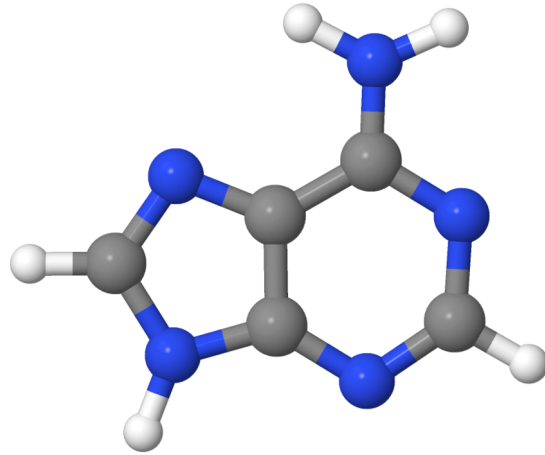
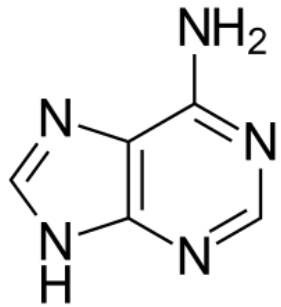


Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA)

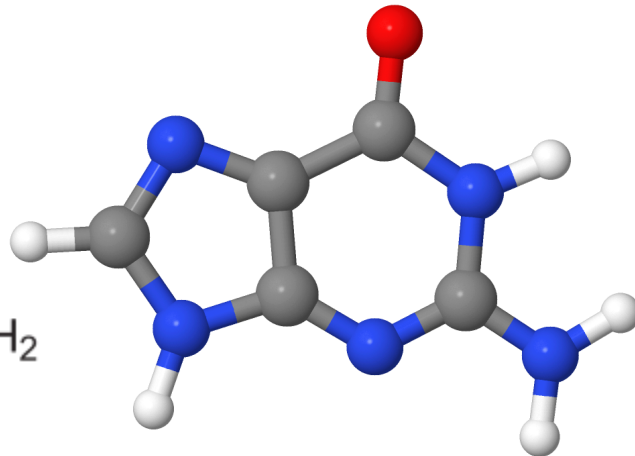
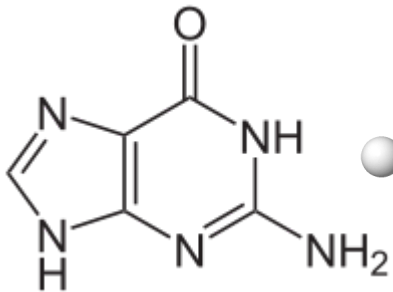
▪ jedna z czterech **zasad azotowych**.

Zasady purynowe

Adenina (A)

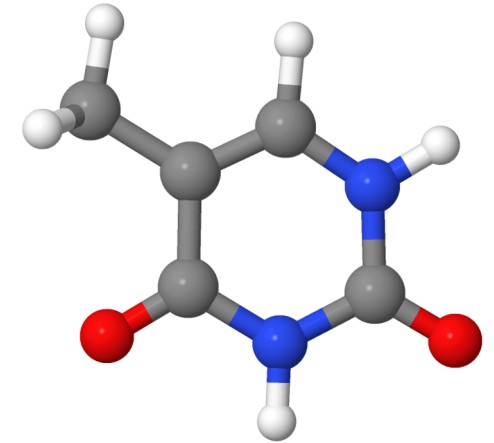
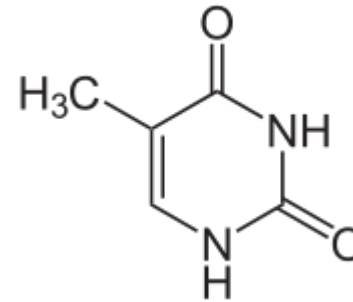


Guanina (G)

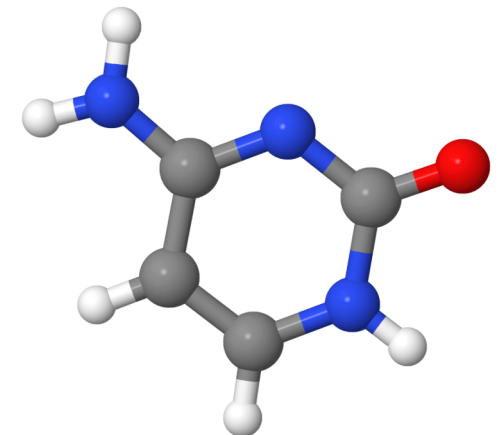
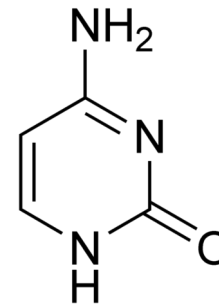


Zasady pirymidynowe

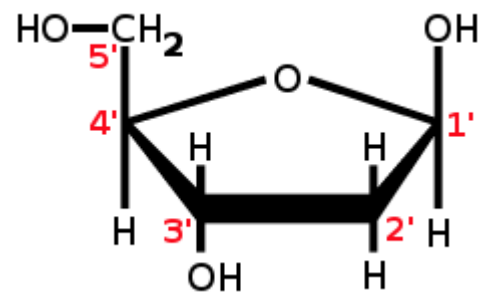
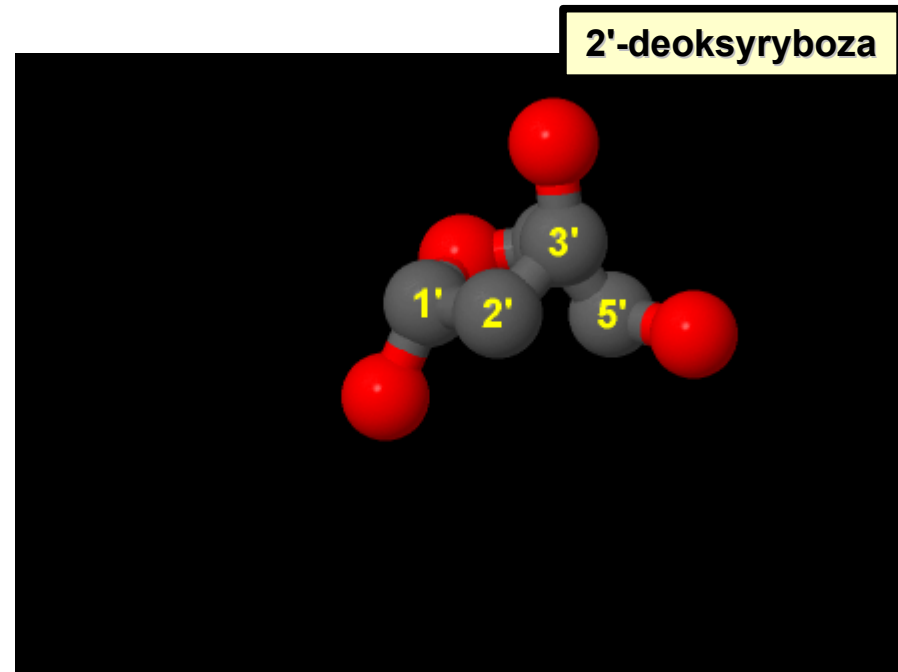
Tymina (T)



Cytozyna (C)

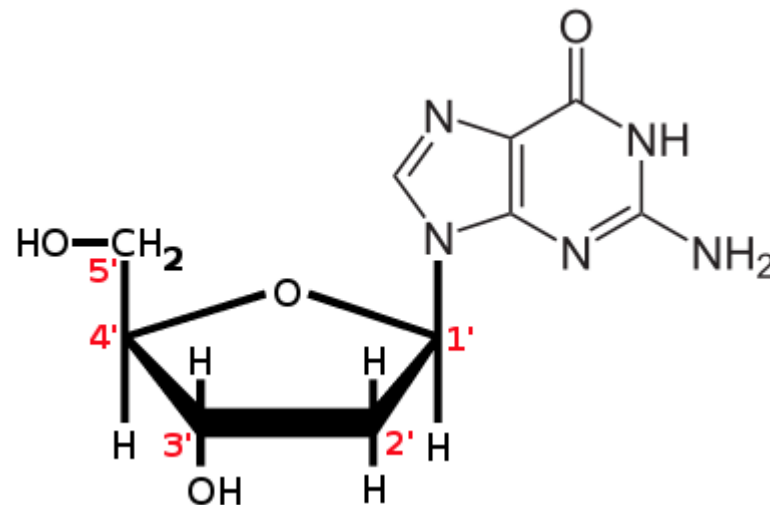
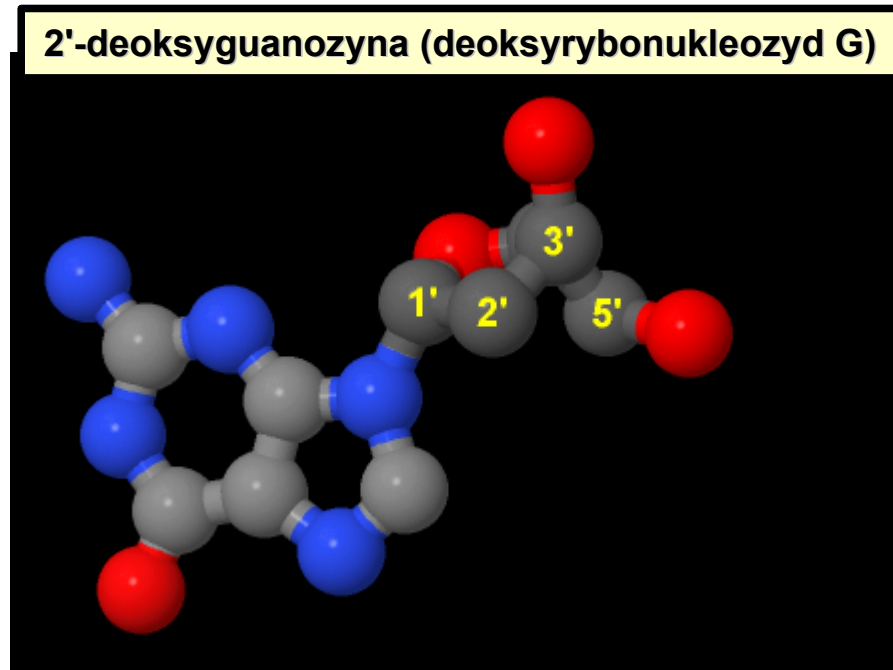


Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): nukleotydy



Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): nukleotydy

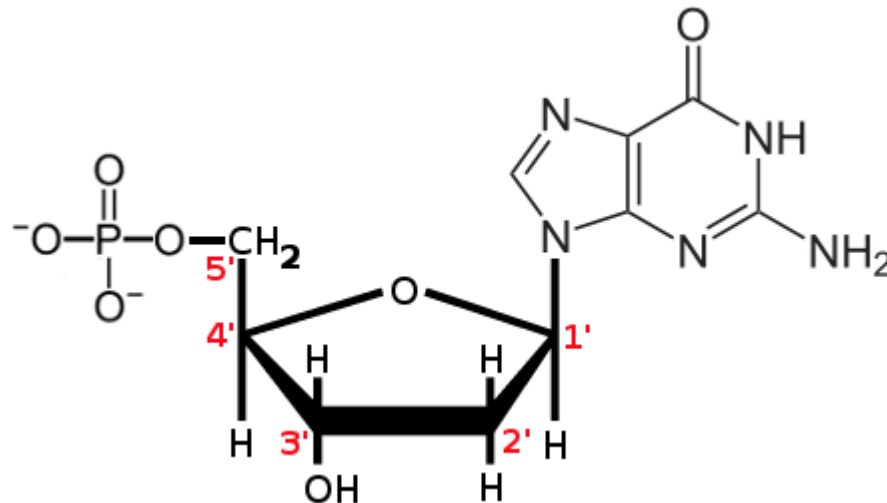
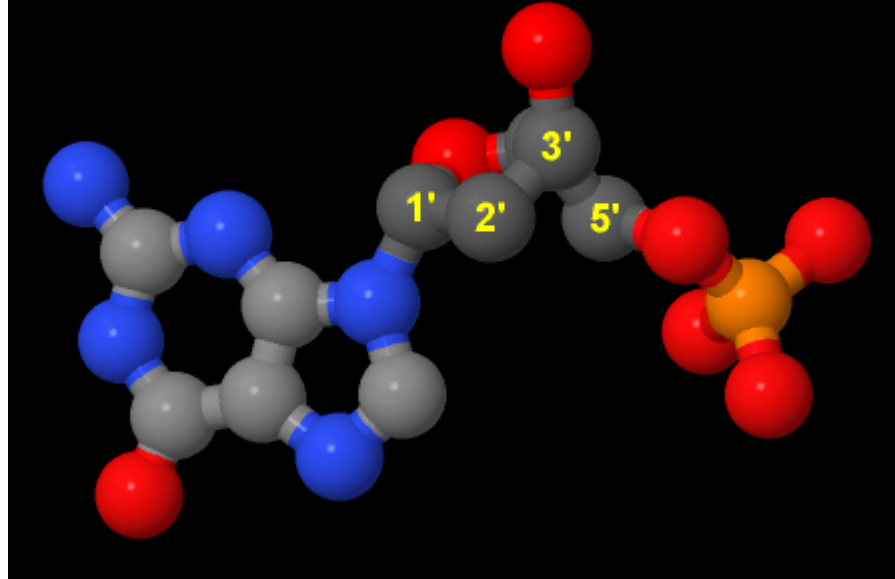
Cząsteczka złożona z cukru i zasady azotowej (w tym przykładzie guaniny) nazywa się **nukleozydem**.



Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): nukleotydy

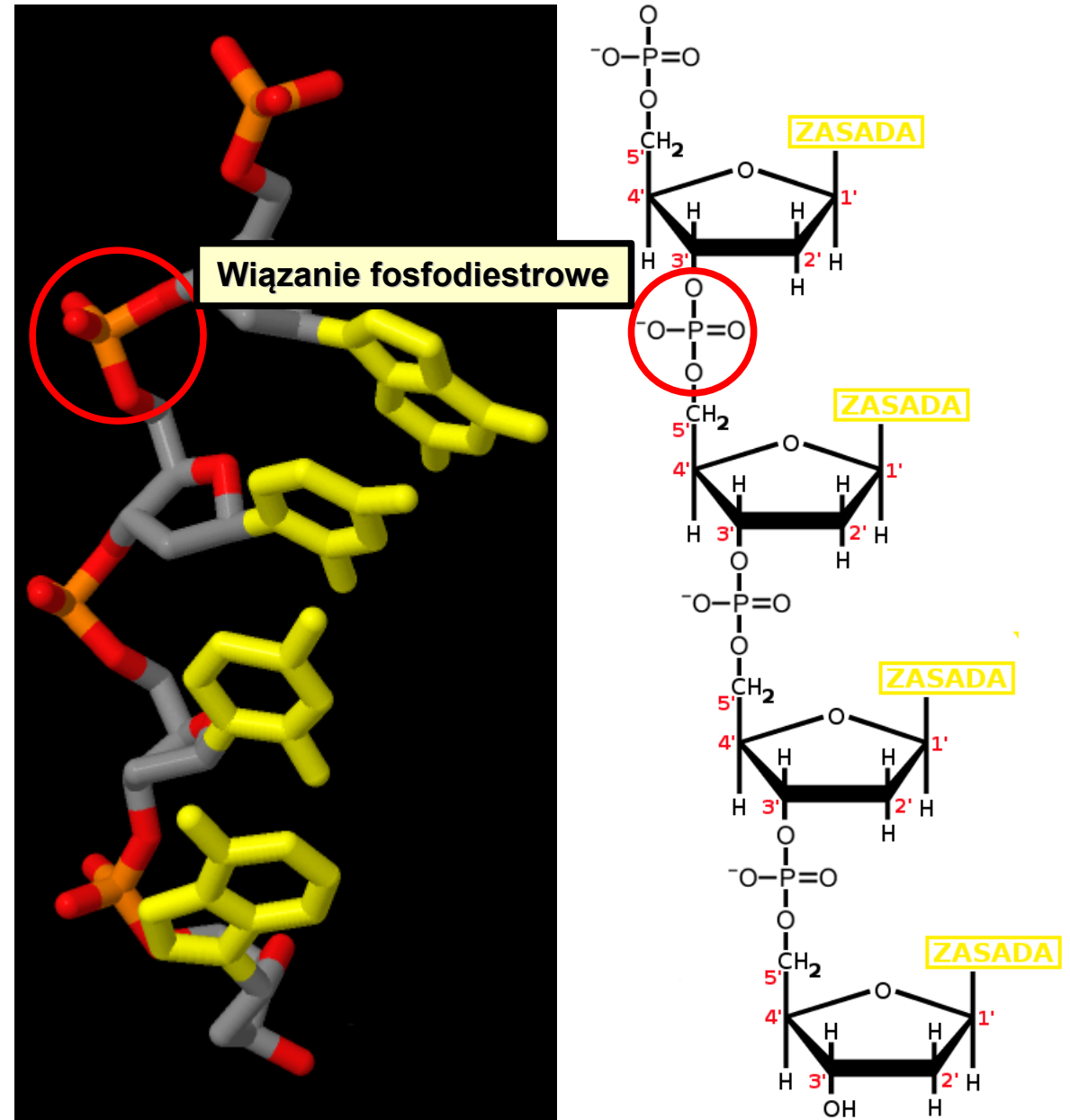
W wyniku przyłączenia reszty fosforanowej do nukleozydu powstaje nukleotyd.

2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforan (deoksyrybonukleotyd G, dGMP)



Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): łańcuchy polinukleotydydowe

Łańcuch polinukleotydydowy powstaje dzięki **wiązaniom fosfodiesterowym** łączącym atomy węgla 5' i 3' deoksyrybozy sąsiednich nukleotydów.



Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): łańcuchy polinukleotydowe

Łańcuch polinukleotydowy powstaje dzięki **wiązaniom fosfodiesterowym** łączącym atomy węgla 5' i 3' deoksyrybozy sąsiednich nukleotydów.

Łańcuch ma dwa różne końce:

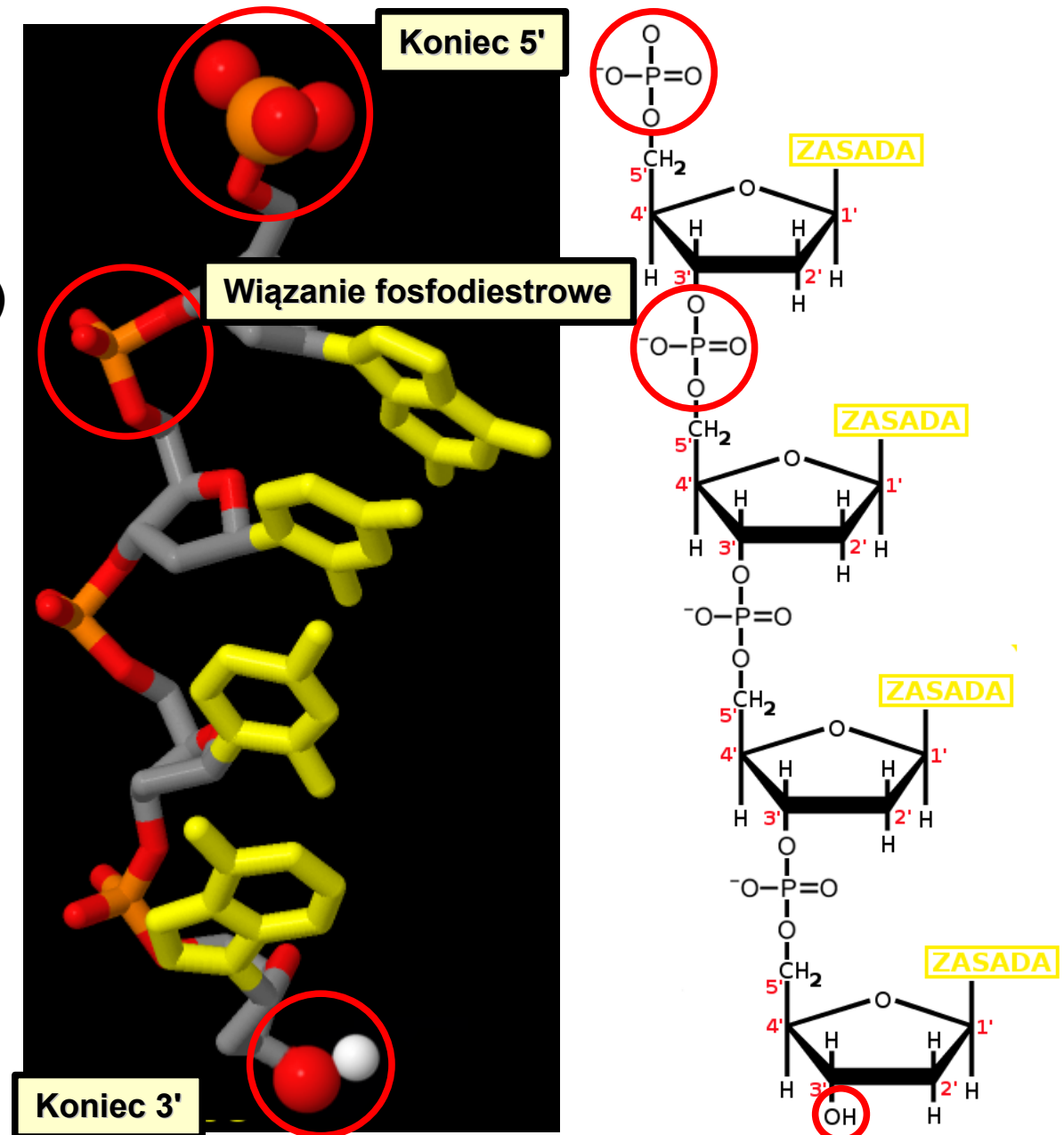
koniec 5' (z grupą fosforanową)

koniec 3' (z grupą hydroksylową)

Tym samym może on mieć dwie różne orientacje:

od końca 5' do końca 3' (**5' → 3'**)

od końca 3' do końca 5' (**3' → 5'**)



Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): łańcuchy polinukleotydowe

Łańcuch polinukleotydowy powstaje dzięki **wiązaniom fosfodiesterowym** łączącym atomy węgla 5' i 3' deoksyrybozy sąsiednich nukleotydów.

Łańcuch ma dwa różne końce:

koniec 5' (z grupą fosforanową)

koniec 3' (z grupą hydroksylową)

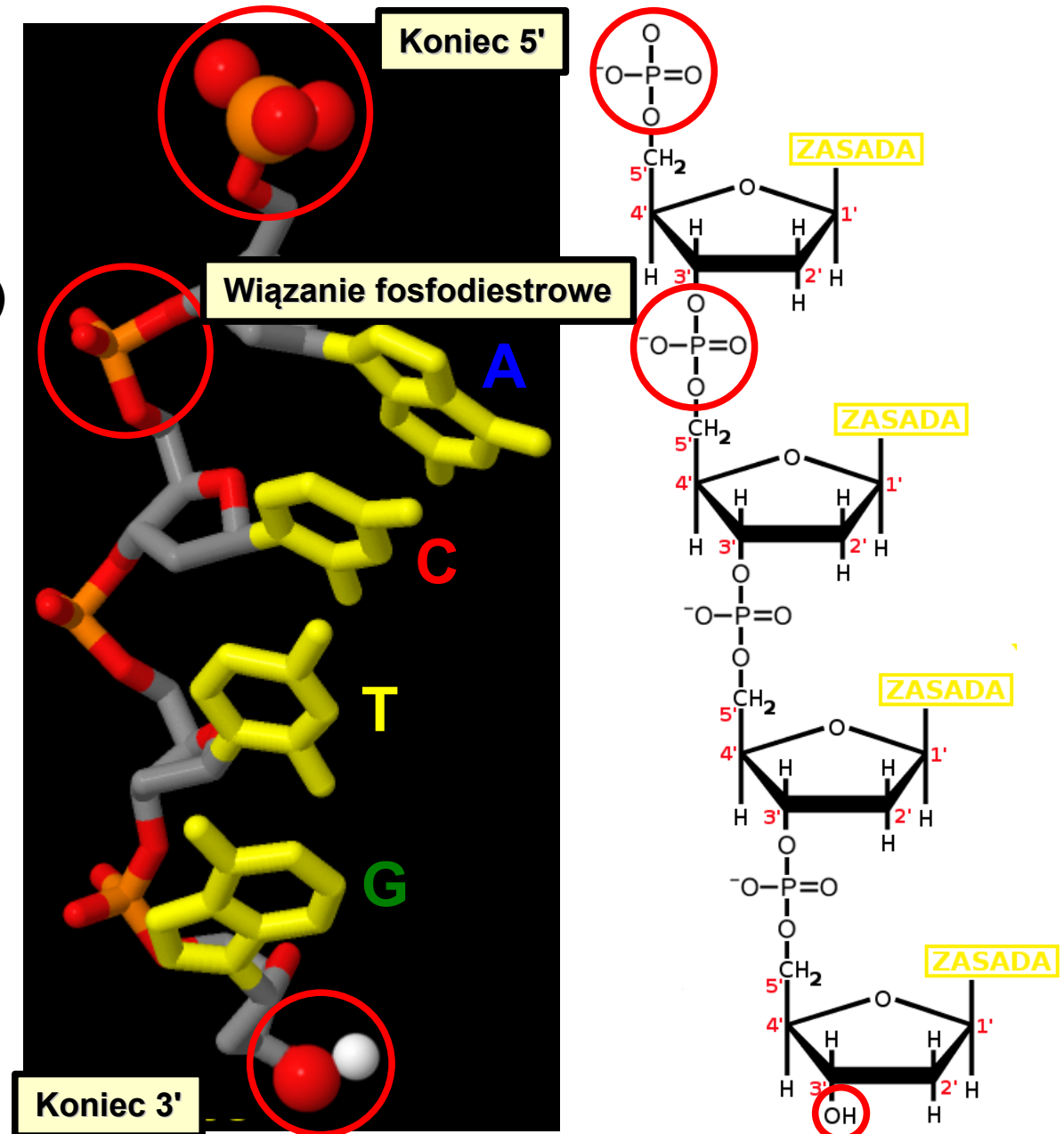
Tym samym może on mieć dwie różne orientacje:

od końca 5' do końca 3' (**5' → 3'**)

od końca 3' do końca 5' (**3' → 5'**)

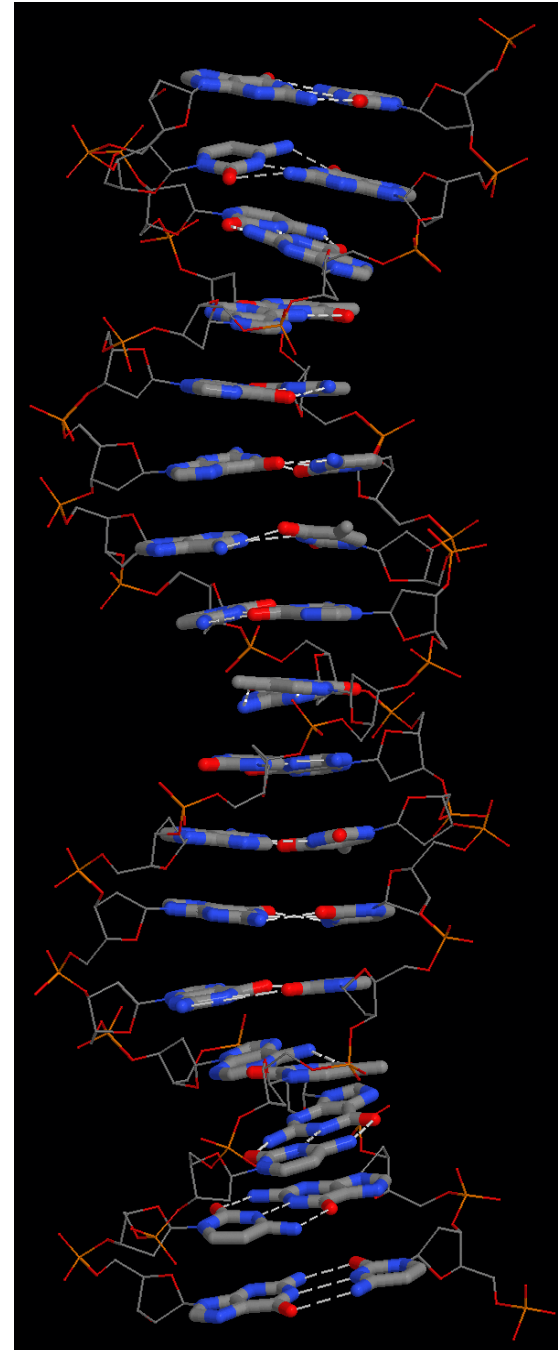
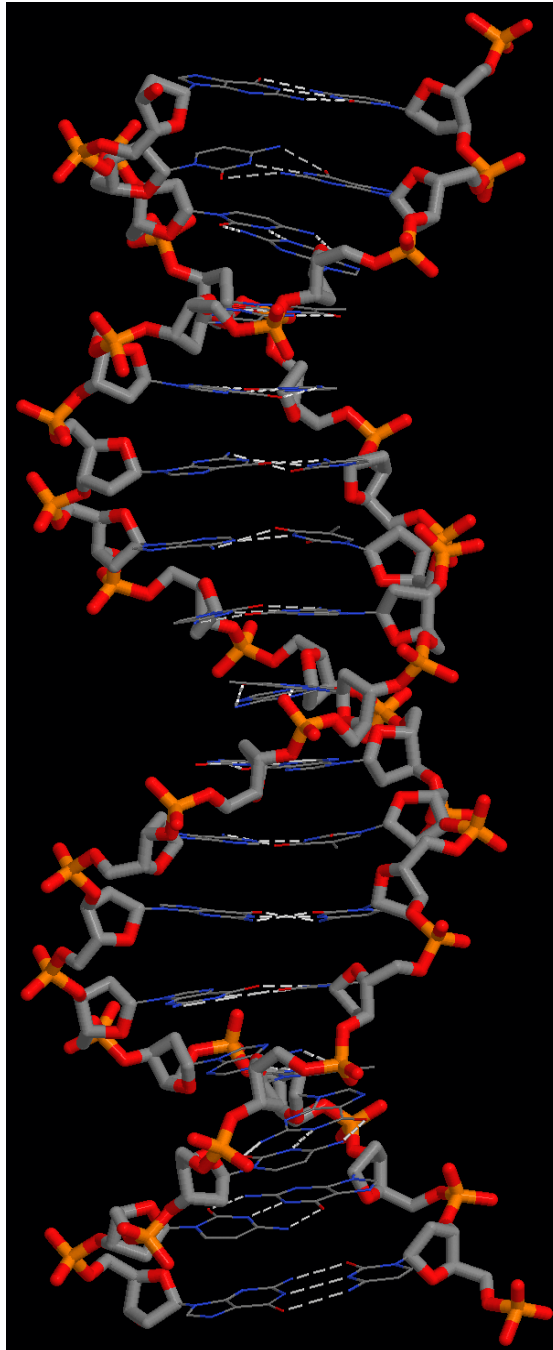
Sekwencja zasad zapisywana jest w kierunku **5' → 3'**:

(koniec 5') **ACTG** (koniec 3')



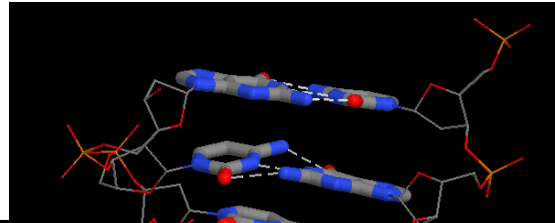
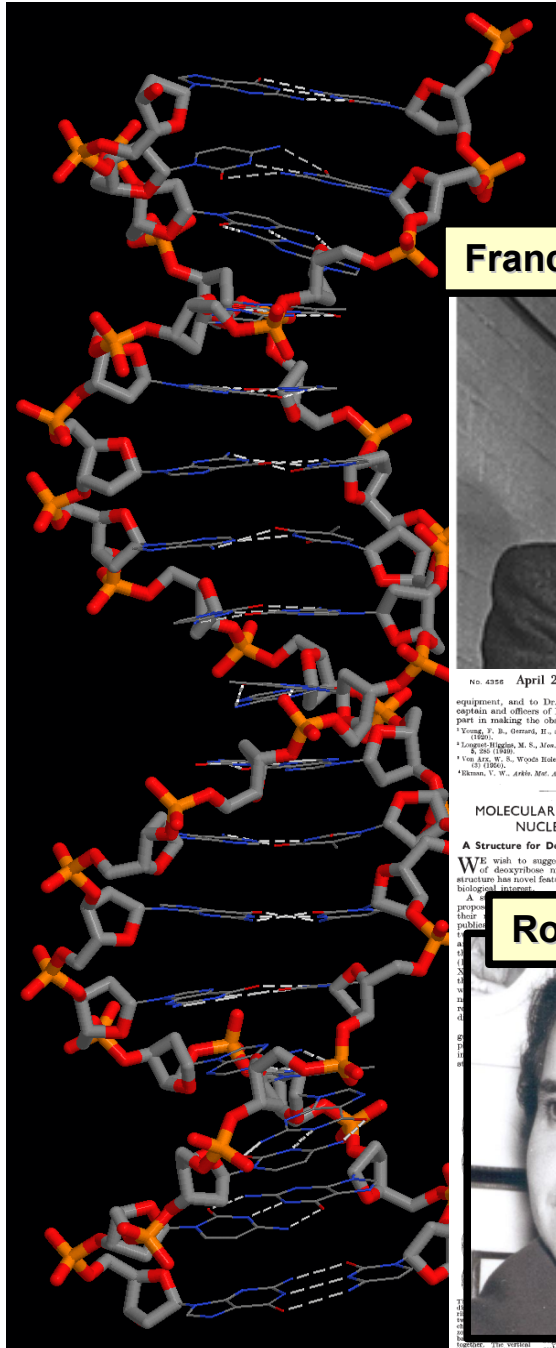
Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): dwuniciowa helisa DNA

Cząsteczki DNA najczęściej występują w postaci **dwuniciowej helisy**.



Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): dwuniciowa helisa DNA

Cząsteczki DNA najczęściej występują w postaci **dwuniciowej helisy**.



Francis Crick



April 25, 1953 NATURE 737

equipment, and to Dr. G. E. R. Doreon and the captain and officers of R.R.S. *Discovery II* for their part in making the observations.

¹Young, T. B., Gerstel, H., and Zevans, W., *Phil. Mag.*, **46**, 149 (1953).

²Logsdon-Higgin, M. S., *Mon. Not. Roy. Astr. Soc., Geophys. Suppl.*, **4**, 205 (1954).

³Von Arz, W. S., *Woods Hole Papers in Phys. Geogr. Notes*, **11**, 10 (1954).

⁴Shimizu, Y. W., *Archiv. Med. Naturh. Forsch.* (Stoekholm), **2**(11) (1954).

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

propos

tion

is

that

the

struc

ture

is

the

fol

low

ing

the

struc

ture

is

the

fol

low

ing

the

struc

ture

is

the

fol

low

ing

the

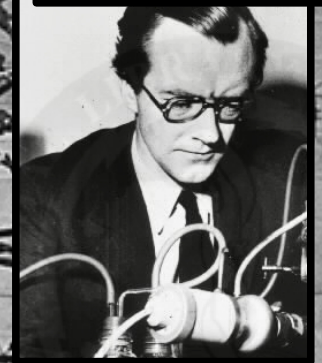
struc

ture

Rosalind Franklin



Maurice Wilkins



James Watson

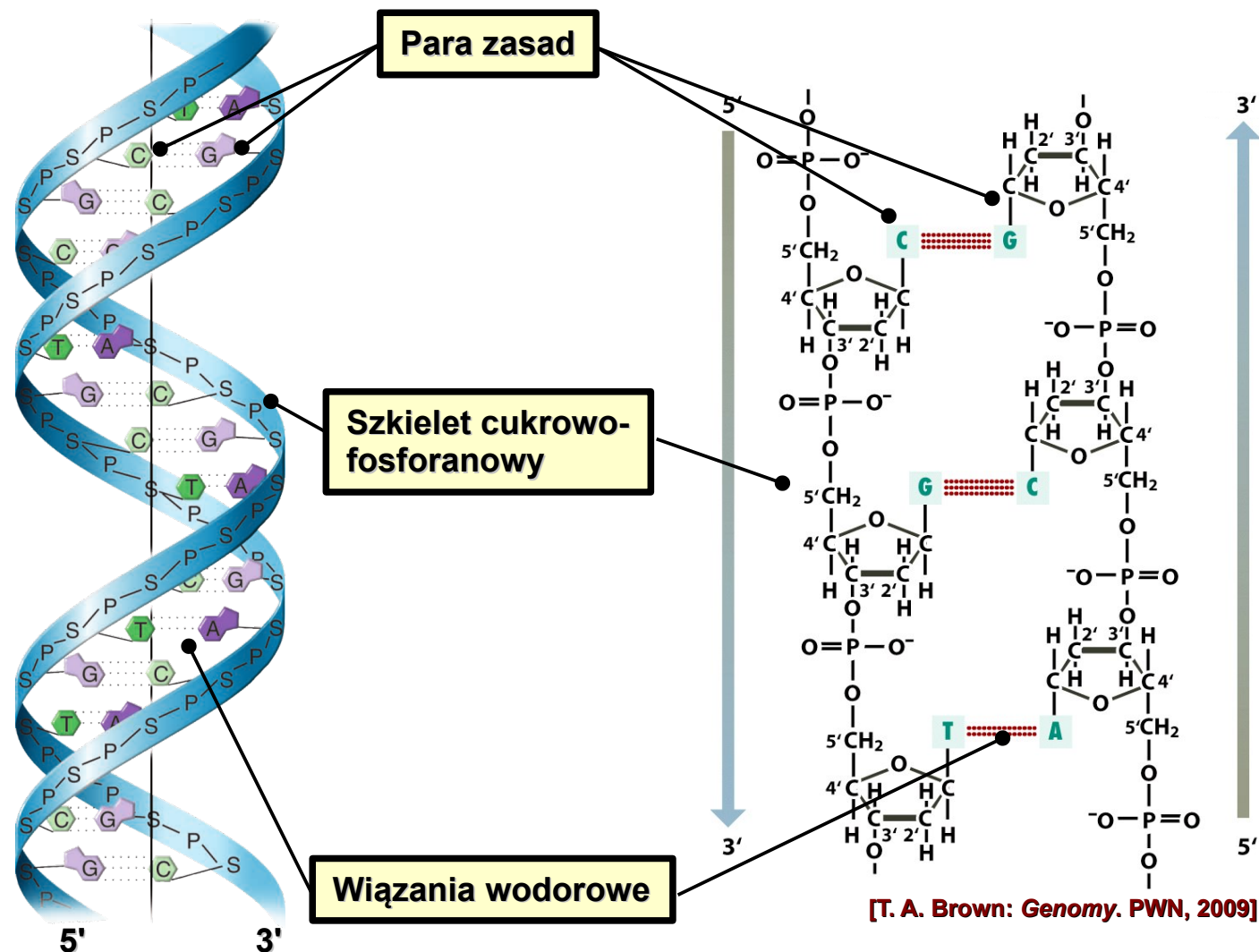


[www.wikipedia.org]

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): dwuniciowa helisa DNA

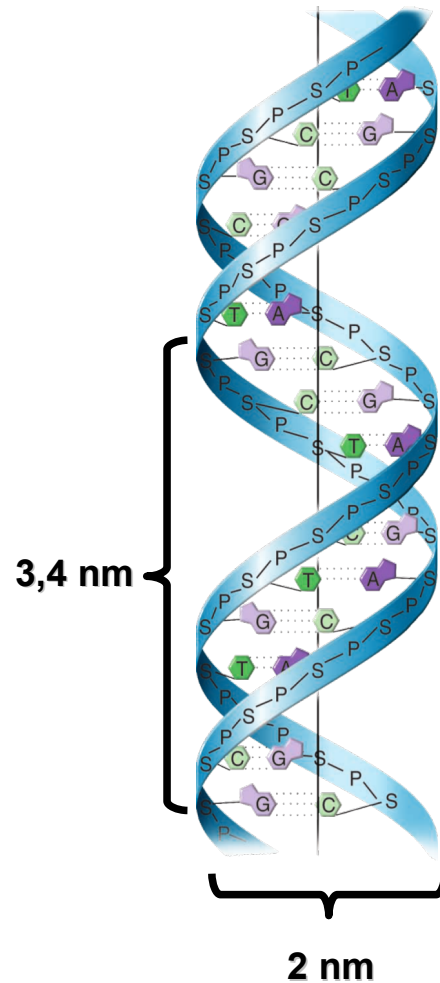
Nici polinukleotydowe (pasma) w podwójnej helisie DNA ułożone są antyrównolegle (jedna biegnie w kierunku $5' \rightarrow 3'$, druga w kierunku $3' \rightarrow 5'$).

Cukrowo-fosforanowe części nukleotydów tworzą zewnętrzny szkielet helisy. Zasady skierowane są do wewnątrz, a wiązania wodorowe pomiędzy nimi łączą obie nici.



Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): dwuniciowa helisa DNA

Najczęściej spotykaną i pierwszą opisaną postacią helisy jest tzw. **forma B-DNA**. Jest ona prawoskrętna i nie w pełni symetryczna. Na jeden pełny skręt helisy o długości 3,4 nm przypada w niej średnio 10,5 par nukleotydów. Średnica wynosi około 2 nm.

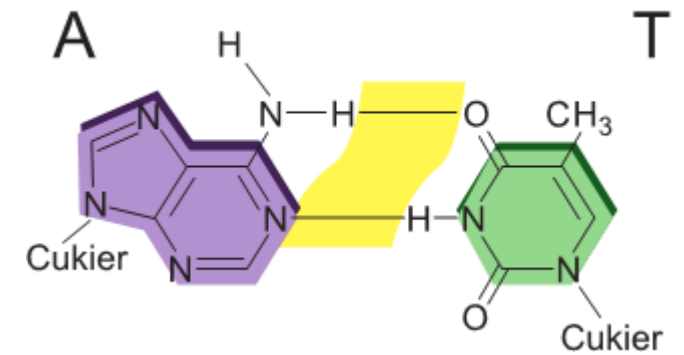
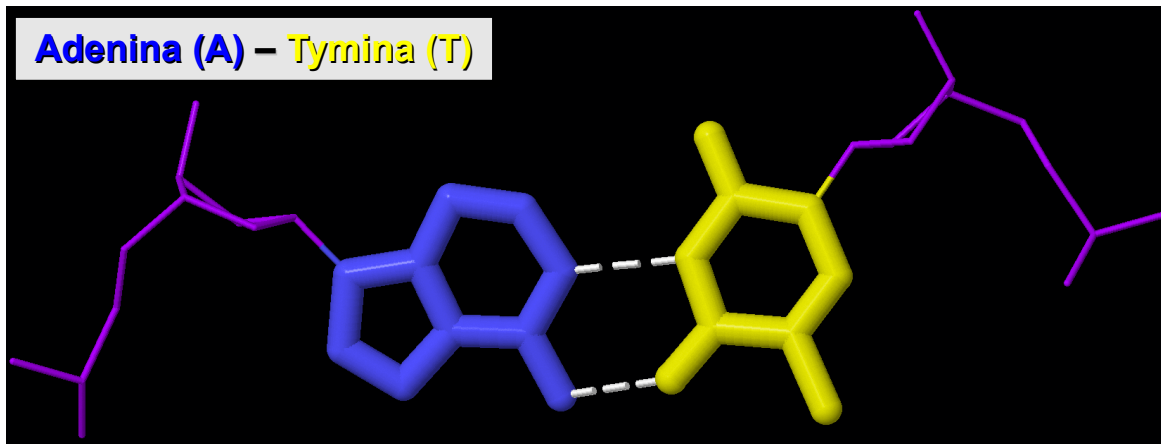


Struktura helisy wykazuje pewną elastyczność i w szczególnych warunkach może przyjmować jeszcze dwie inne formy: A-DNA i Z-DNA (ta druga jest lewoskrętna).

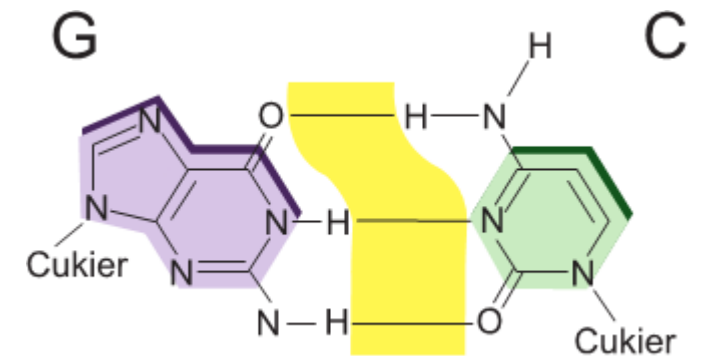
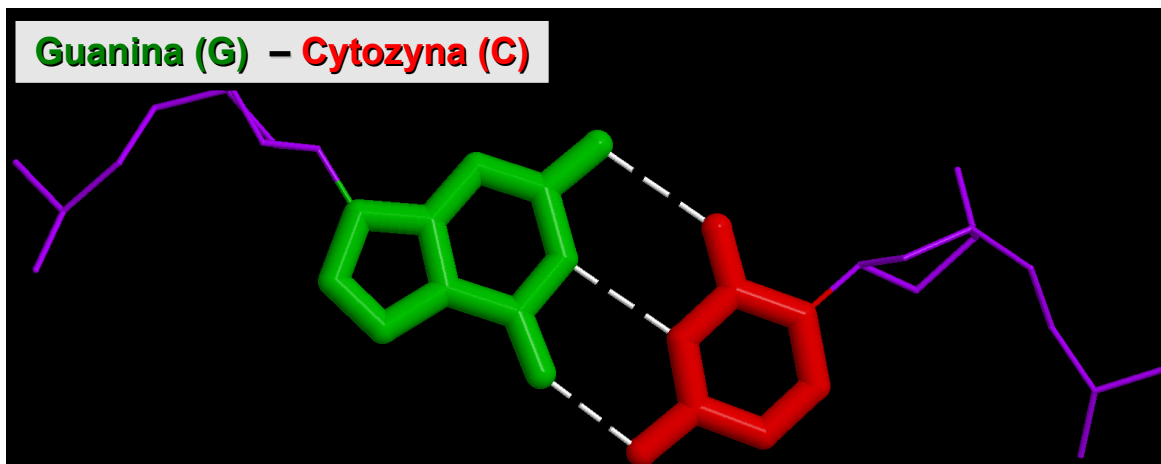
Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): komplementarność par zasad

Oba łańcuchy podwójnej helisy połączone są wiązaniami wodorowymi pomiędzy **komplementarnymi parami zasad azotowych**:

- **adenina łączy się z tyminą,**

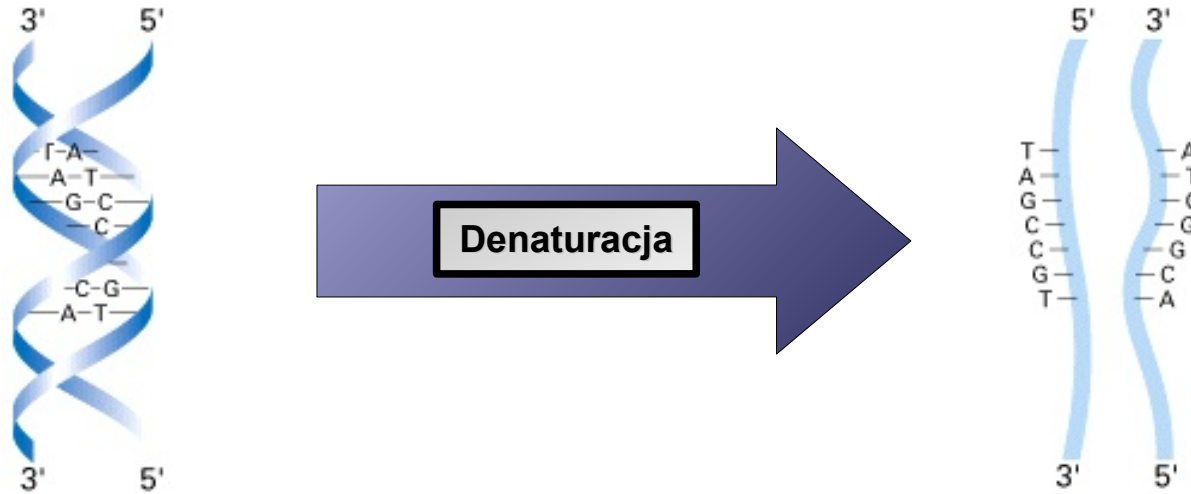


- **guanina łączy się z cytozyną.**

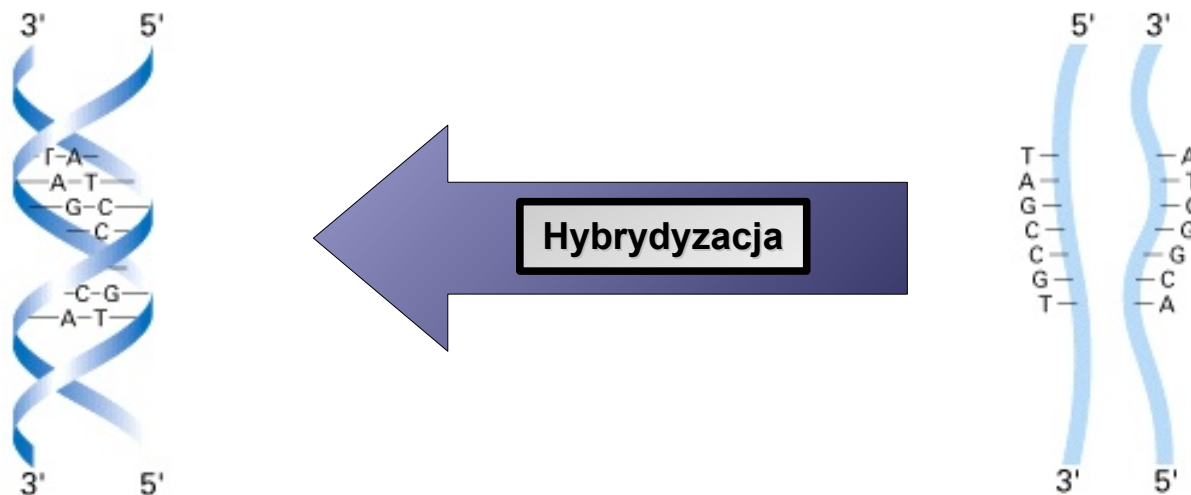


Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): komplementarność par zasad

Nici DNA mogą ulec rozdzieleniu (**denaturacji**) pod wpływem wysokiej temperatury (około 80-90°C) lub czynników chemicznych.



Po usunięciu czynnika denaturującego następuje **hybrydyzacja (renaturacja)**, czyli samoistne łączenie się nici, w sposób zgodny z regułami komplementarności.



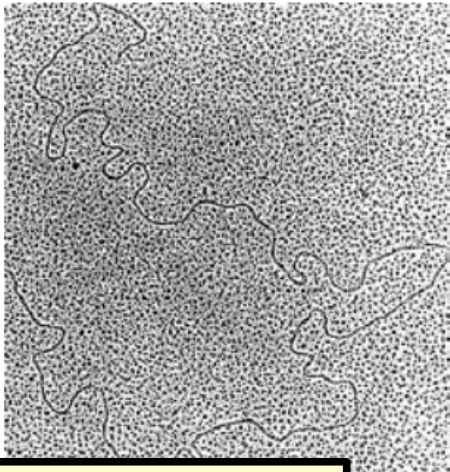
Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA): rola w organizmach żywych

DNA jest nośnikiem informacji genetycznej o budowie i funkcjonowaniu wszystkich znanych organizmów komórkowych oraz znacznej części wirusów i bakteriofagów.

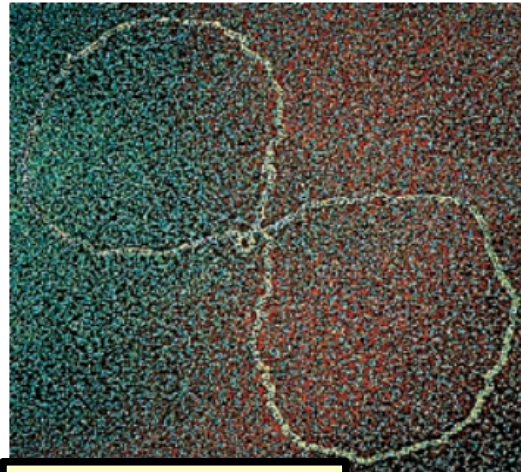
Cząsteczki DNA mogą mieć długość dochodzącą nawet do setek milionów **par zasad (bp, base pairs)**. Przykładowo najdłuższa cząstka DNA w komórkach człowieka ma ponad 250 mln bp, zaś całkowita długość DNA człowieka to około 3,2 mld bp.

W zależności od rodzaju organizmu cząsteczki DNA mogą być liniowe bądź koliste.

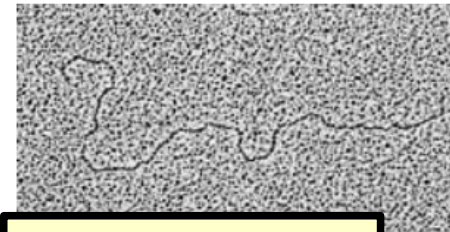
Jakkolwiek DNA najczęściej przyjmują formę podwójnej helisy, to znane są wirusy i bakteriofagi, których materiałem genetycznym jest jednoniciowe DNA.



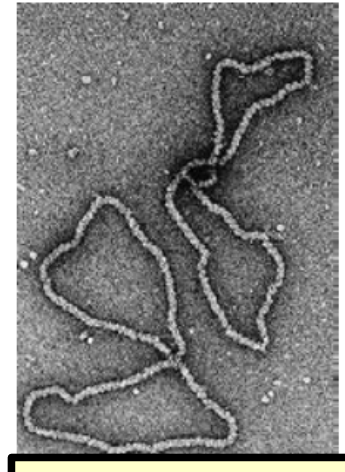
Dwuniciowe liniowe



Dwuniciowe koliste



Jednoniciowe liniowe



Jednoniciowe koliste

Inżynieria genetyczna

Wykład 1: kwasy nukleinowe (RNA)

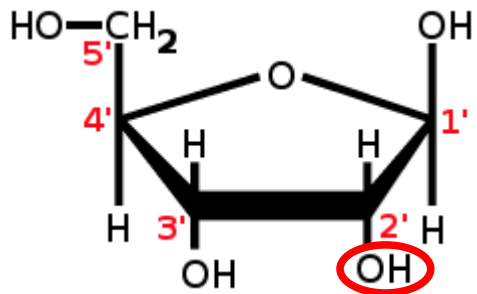
Tymon Rubel

Zakład Elektroniki Jądrowej i Medycznej
Instytut Radioelektroniki i Techniki Multimedialnych PW

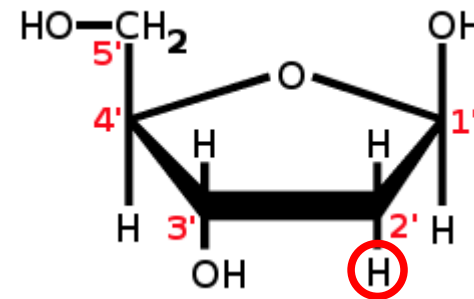
Kwas rybonukleinowy (RNA)

Kwas rybonukleinowy (RNA) jest polinukleotydem o strukturze podobnej do DNA, jednak z dwoma wyjątkami:

▪ cukrem wchodzącym w skład rybonukleotydów jest **ryboza**, a nie deoksyryboza;

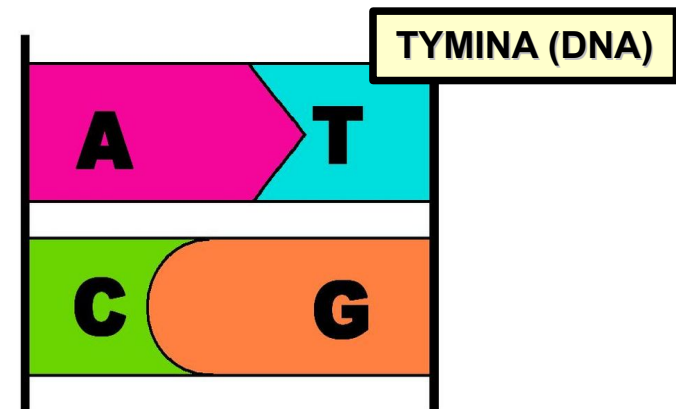
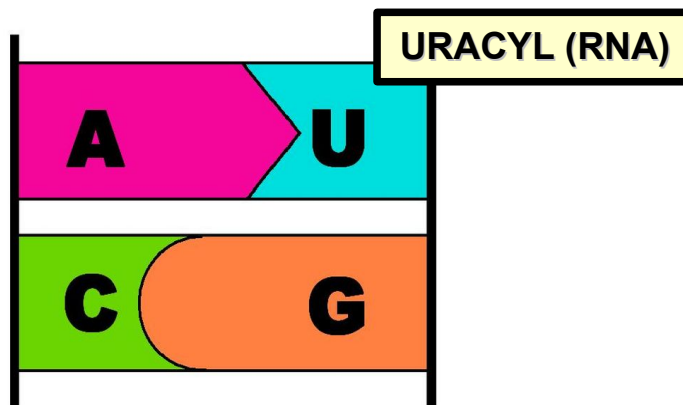


RYBOZA (RNA)



DEOKSYRYBOZA (DNA)

▪ występującą w DNA tyminę (T) zastępuje **uracyl (U)**, zasada pirymidynowa, która może tworzyć parę komplementarną z adeniną (A).



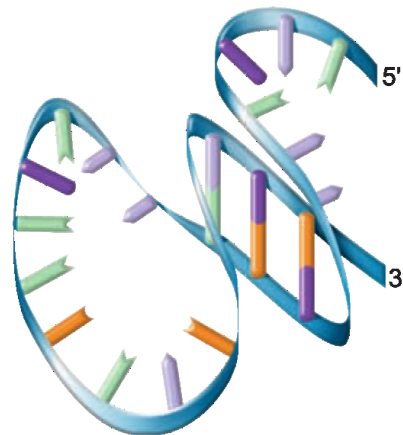
Kwas rybonukleinowy (RNA)

Rybonukleotydy również mogą łączyć się poprzez wiązania fosfodiesterowe tworząc łańcuchy polinukleotydowe.

Cząsteczki RNA najczęściej mają postać pojedynczych łańcuchów polipeptydowych, które są mniej stabilne od podwójnej helisy DNA. Dlatego też cząstki RNA zwykle są krótsze i łatwiej ulegają degradacji.

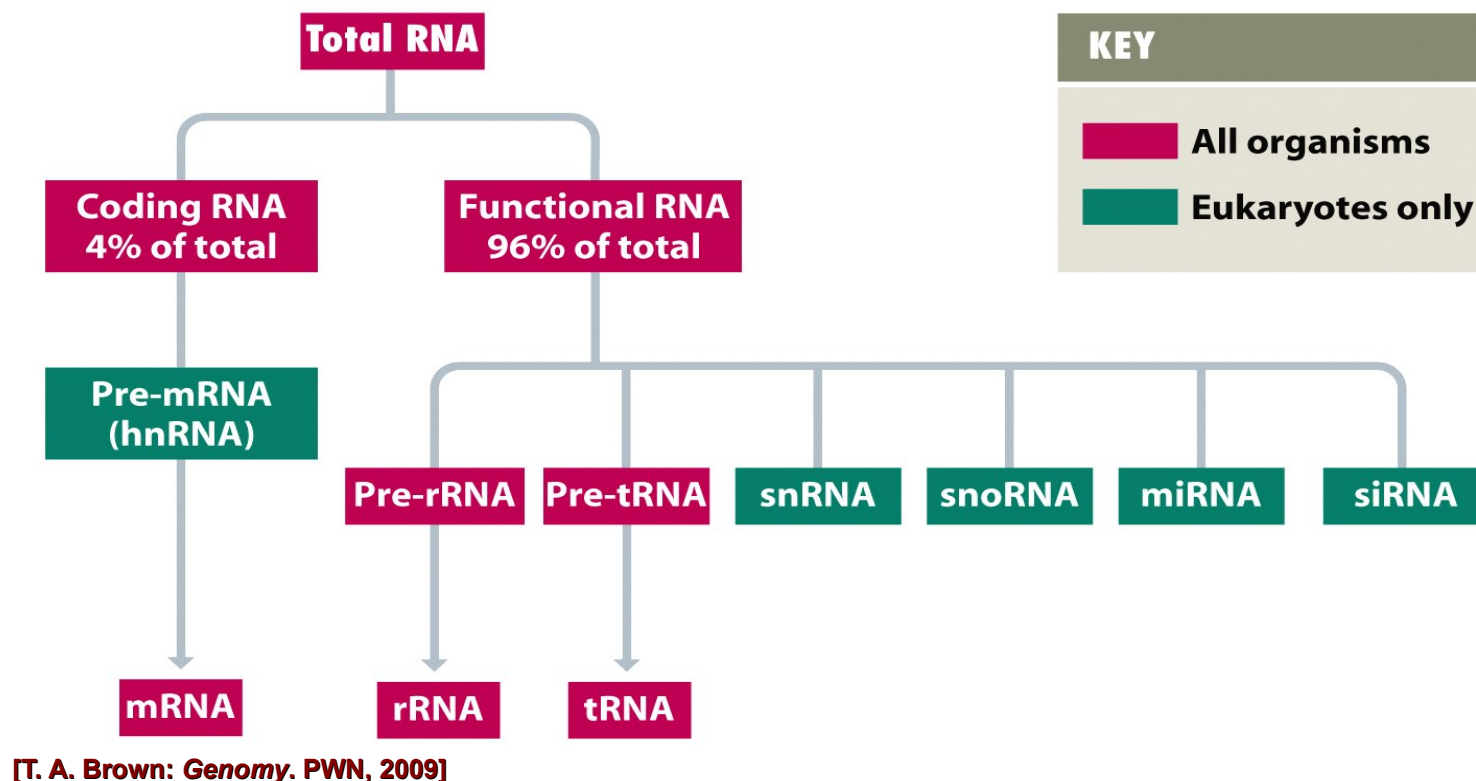


Mogą jednak posiadać strukturę przestrzenną, powstałą poprzez tworzenie regionów helikalnych pomiędzy komplementarnymi odcinkami tego samego łańcucha.



Kwas rybonukleinowy (RNA): rola w organizmach żywych

W komórkach organizmów żywych istnieje wiele rodzajów RNA, z których większość pełni funkcje w procesie syntezy białek oraz regulacji sposobu odczytu informacji genetycznych zawartych w DNA.



U niektórych wirusów i bakteriofagów RNA (jedno- lub dwuniciowe) zastępuje DNA w roli nośnika informacji genetycznej.

Inżynieria genetyczna

Wykład 1: białka

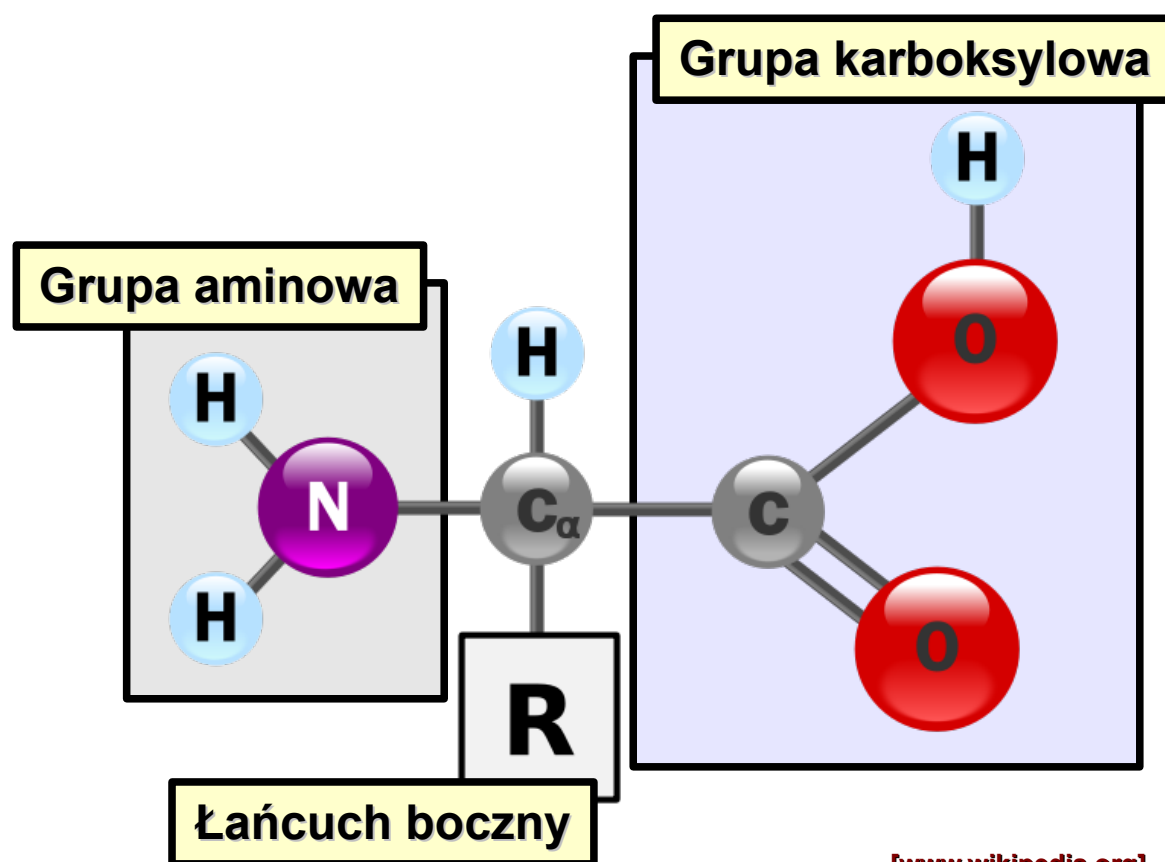
Tymon Rubel

Zakład Elektroniki Jądrowej i Medycznej
Instytut Radioelektroniki i Techniki Multimedialnych PW

Struktura białek: aminokwasy

Białka są cząstkami polimerowymi, których monomerami są **aminokwasy**.

Każdy aminokwas zbudowany jest z grup karboksylowej (COOH) i aminowej (NH₂), atomu wodoru (H) oraz łańcucha bocznego (R), związanych kowalencyjnie z atomem węgla, nazywanym węglem C_α.



[www.wikipedia.org]

Struktura białek: aminokwasy

W skład białek wszystkich organizmów żywych wchodzi **20 rodzajów aminokwasów**.

nazwa	symbol	skrót
alanina	A	Ala
arginina	R	Arg
asparagina	N	Asn
kw.asparaginowy	D	Asp
cysteina	C	Cys
glutamina	Q	Gln
kw.glutaminowy	E	Glu
glicyna	G	Gly
histydyna	H	His
izoleucyna	I	Ile

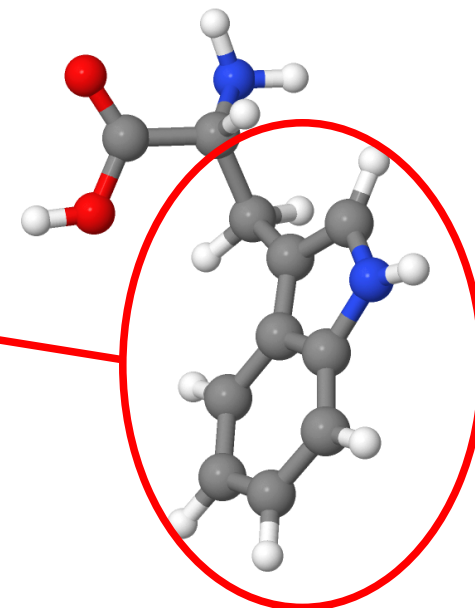
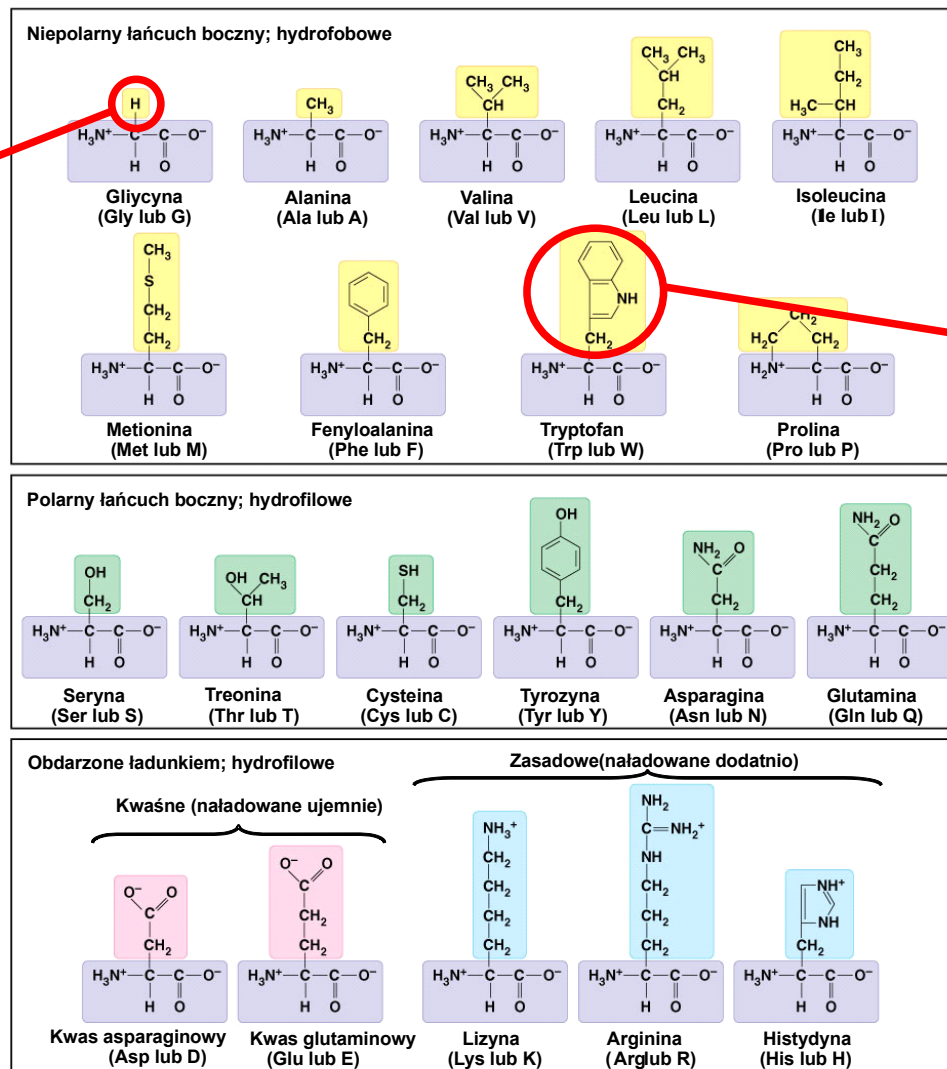
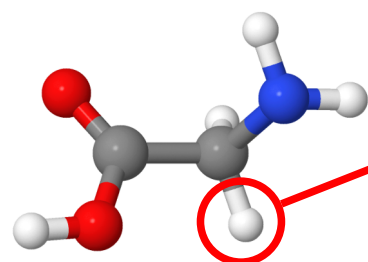
nazwa	symbol	skrót
leucyna	L	Leu
lizyna	K	Lys
metionina	M	Met
fenyloalanina	F	Phe
prolina	P	Pro
seryna	S	Ser
treonona	T	Thr
tryptofan	W	Trp
tyrozyna	Y	Tyr
walina	V	Val

Rzadziej spotykane są dwa dodatkowe aminokwasy:

- **selenocysteina (U, Sec)**, wchodzi w skład tzw. selenoprotein wielu organizmów,
- **pirolizyna (O, Pys)**, najprawdopodobniej występuje tylko w białkach archeonów.

Struktura białek: aminokwasy

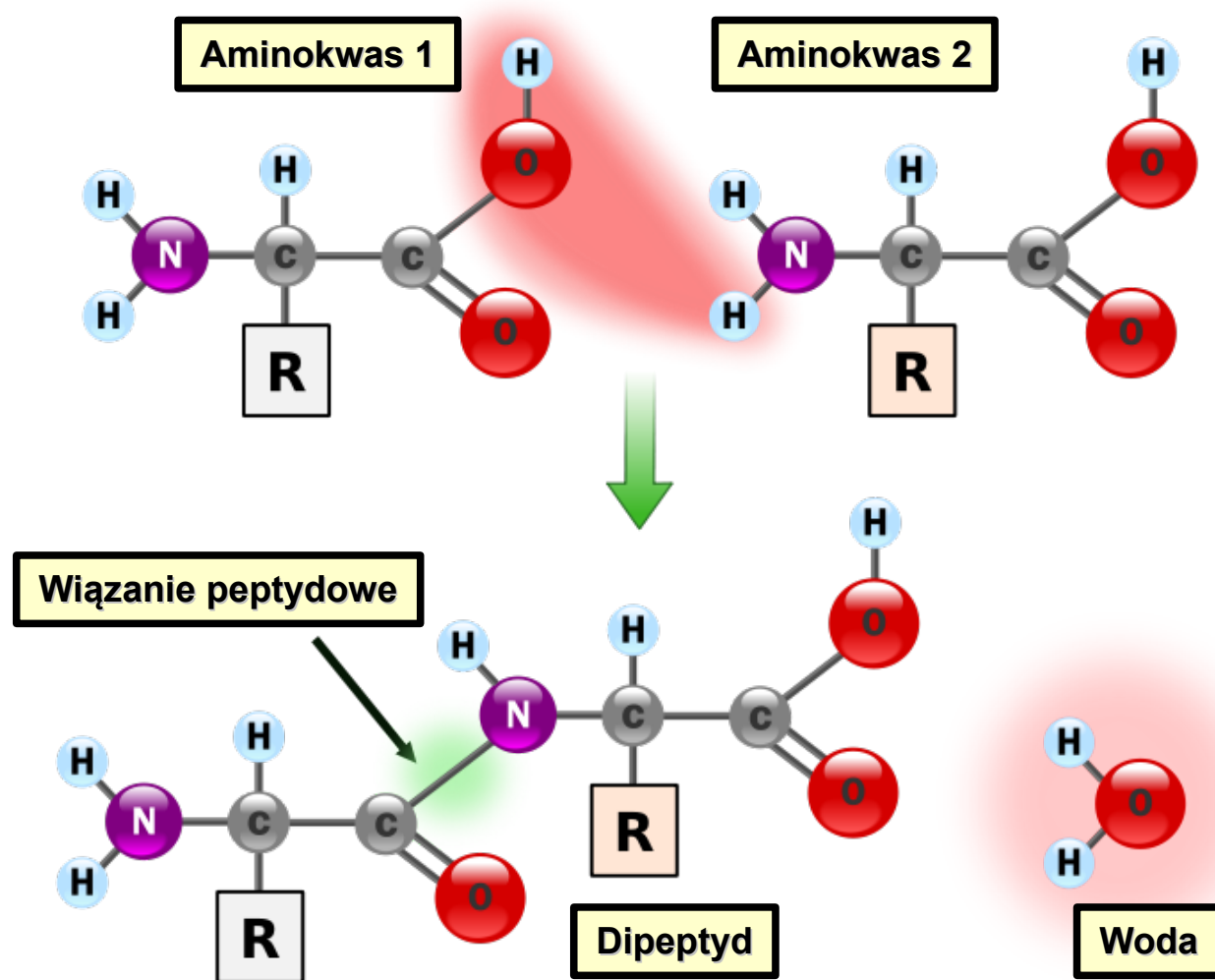
Łańcuchy boczne aminokwasów mogą w znaczący sposób różnić się zarówno składem, jak i właściwościami chemicznymi, co przekłada się na dużą różnorodność właściwości utworzonych z nich białek.



Struktura białek: peptydy

Podstawową cechą aminokwasów jest ich zdolność do łączenia się ze sobą za pośrednictwem **wiązania peptydowego** pomiędzy grupami aminową i karboksylową.

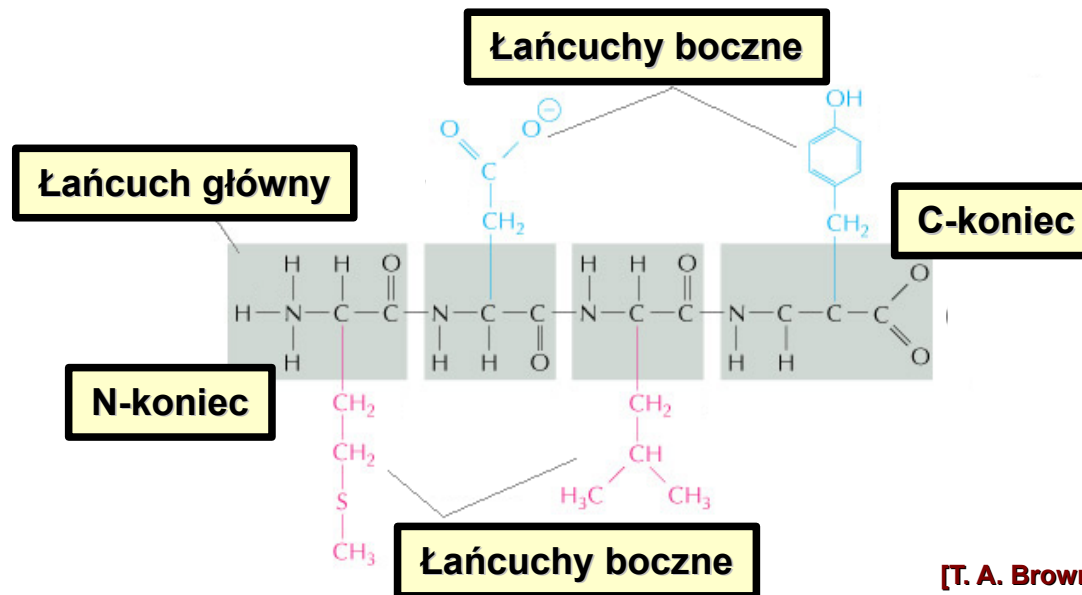
Cząstkę złożoną z dwóch lub więcej aminokwasów nazywamy **peptydem**.



Struktura białek: łańcuchy polipeptydowe

Wiele aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi tworzy strukturę liniowego **łańcucha polipeptydowego**. Połączone w łańcuchu aminokwasy nazywane są **resztami aminokwasowymi**.

Reszta aminokwasowa zawierająca wolną grupę aminową nazywana jest **N-końcem** łańcucha, podczas gdy reszta z wolną grupą karboksylową jest jego **C-końcem**.



[T. A. Brown: *Genomy*. PWN, 2009]

Sekwencje łańcucha zapisuje się rozpoczynając od N-końca lewej strony i kończąc C-końcową resztą aminokwasową z prawej (zgodnie z kierunkiem syntezy białek).

(N-końiec) M A D Y (C-końiec)

Struktura białek

Białka zbudowane są z jednego lub większej liczby łańcuchów polipeptydowych. Długości sekwencji typowych białek wahają się od kilkudziesięciu do nawet kilkudziesięciu tysięcy reszt aminokwasowych.

Insulina (hormon peptydowy): 51 aminokwasów w dwóch łańcuchach

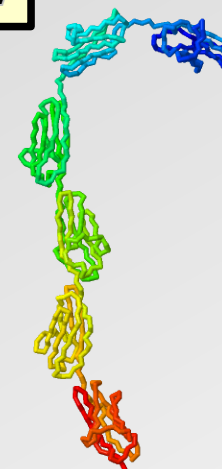
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT GIVEQCCTSICSLYQLENYCN



Tytyna (białko mięśni poprzecznie prążkowanych): 34 350 aminokwasów

MTTQAPTFTQPLQSVVVLEGSTATFEAHISGFPVPEVSWFRDQVISTSTLPGVQISFSD
GRAKLTIPAVTKANSGRYSLKATNGSGQATSTAELLVKAETAPPNFVQRLQSMTVRQGSQ
VRLQVRVTGIPTPVVKFYRDGAEIQSSLDQISQEGDLYSLLIAEAYPEDSGTYSVNATN
SVGRATSTAELLVQGEVPA ...

... LRTSGDTSLQGSFSSQSVQMSASKQEASFSSFSSSSAS
SMTMKFASMSAQSMSSMQESFVEMSSSSFMGISNMTQLESSTSKMLKAGIRGIPPKIEA
LPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIIMDV
QKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI



Białka proste (proteiny) zbudowane są jedynie z aminokwasów. **Białka złożone (proteidy)** zawierają w swojej strukturze również składniki nieaminokwasowe, zarówno organiczne (np. cukry czy lipidy), jak i nieorganiczne (np. jony metali).

Struktura białek

Białka zbudowane są z jednego lub większej liczby łańcuchów polipeptydowych. Długości sekwencji typowych białek wahają się od kilkudziesięciu do nawet kilkudziesięciu tysięcy reszt aminokwasowych.

Insulina (hormon peptydowy): 51 aminokwasów w dwóch łańcuchach

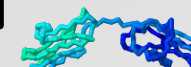
FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT GIVEQCCTSICSLYQLENYCN



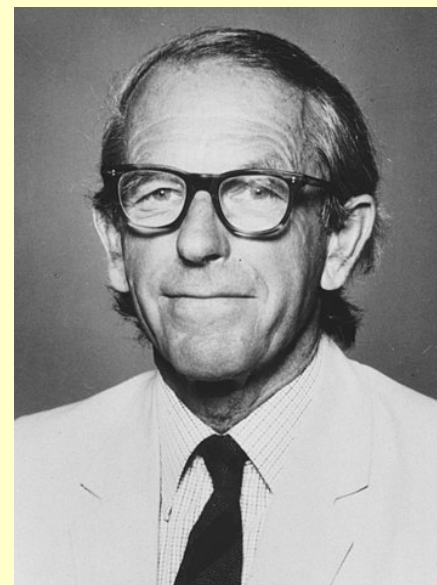
Tytyna (białko mięśni poprzecznie prążkowanych): 34 350 aminokwasów

MTTQAPTFTQPLQSVVVLEGSTATFEAHISGFPVPEVSWFRDGGVISTSTLPGVQISFSD
GRAKLTIPAVTKANSGRYSLKATNGSGQATSTAELLVKAETAPPNFVQRLQ
VRLQVRVTGIPTPVVKFYRDGAEIQSSLDFQISQEGDLYSLLIAEAYPEDS
SVGRATSTAELLVQGEVPA ...

... LRTSGDTSLQGSFSSQSVQMSASKQEAS
SMTMKFASMSAQSMSSMQESFVEMSSSSFMGISNMTQLESSTSKMLKAG
LPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIHSQEQGRFHIENTDI
QKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI



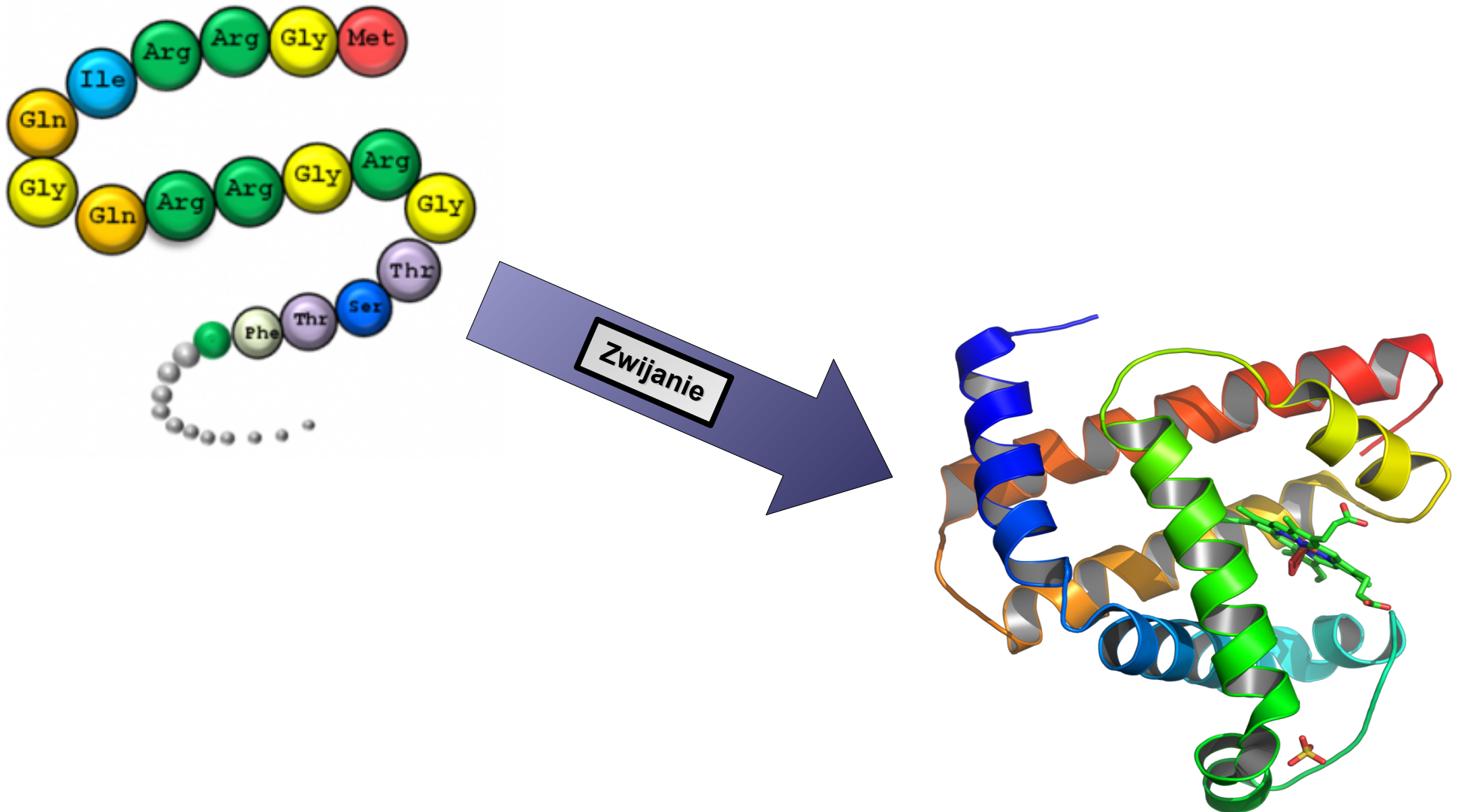
Frederick Sanger: nagroda Nobla w dziedzinie chemii za ustalenie sekwencji insuliny (1958)



Białka proste (proteiny) zbudowane są jedynie z (proteidy) zawierają w swojej strukturze również zarówno organiczne (np. cukry czy lipidy), jak i nieor

Struktura białek

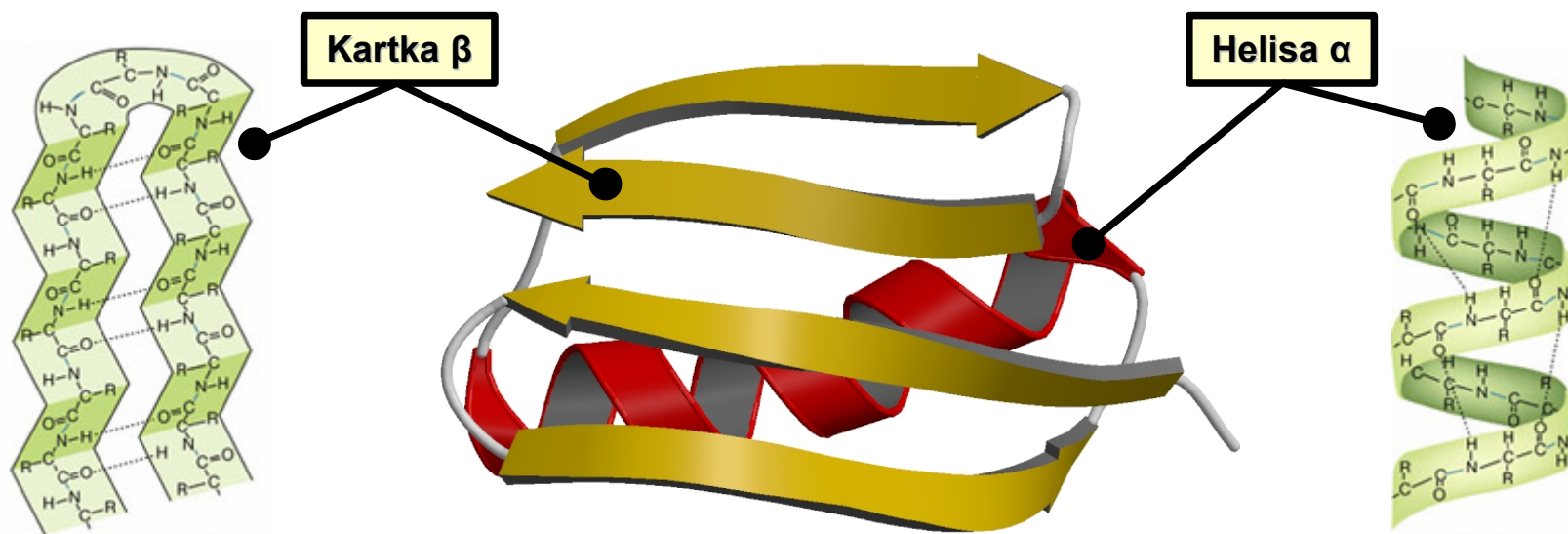
Rozciągnięty lub ułożony przypadkowo łańcuch polipeptydowy zwykle pozbawiony jest aktywności biologicznej. Aktywność ta pojawia się dopiero wraz z odpowiednią **konformacją**, czyli przestrzennym ułożeniem łańcucha. Przyjmowanie właściwej struktury przestrzennej nazywane jest **zwijaniem** lub **fałdowaniem (*fold*ing)** białka.



Struktura białek: cztery poziomy organizacji

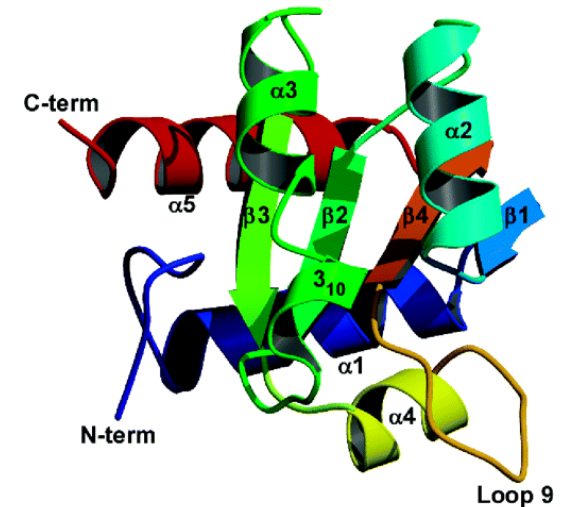
Budowa białek opisywana jest przez cztery poziomy organizacji.

- **Struktura pierwszorzędowa** określa kolejność reszt aminokwasowych w sekwencji liniowej białka. Jest ona wynikiem wiązań peptydowych pomiędzy aminokwasami.
- **Struktura drugorzędowa** charakteryzuje wzajemne przestrzenne ułożenie sąsiadujących ze sobą w sekwencji reszt aminokwasowych. Przykładami struktur drugorzędowych są **helisa α** (helikalna prawoskrętna śruba) lub **kartka β** (inaczej – arkusz β , na który składają się dwa lub większa liczba odcinków łańcucha występujących obok siebie w orientacji równoległej lub antyrównoległej). Struktury drugorzędowe stabilizowane są przez wiązania wodorowe pomiędzy atomami tlenu w grupach karboksylowych a atomami azotu w grupach aminowych.

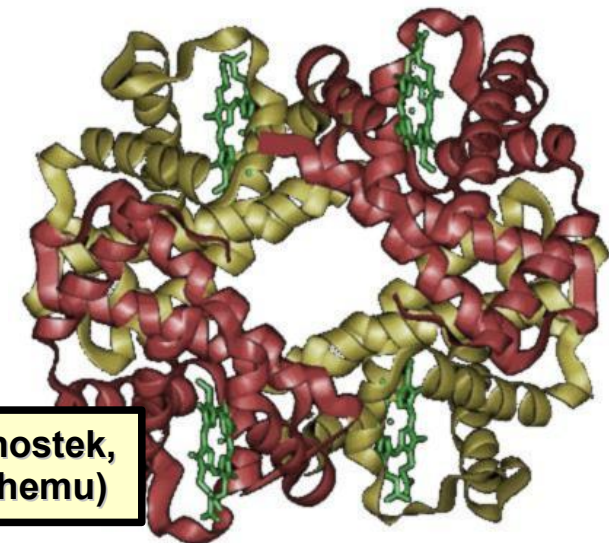


Struktura białek: cztery poziomy organizacji

- **Struktura trzeciorzędowa** opisuje trójwymiarową budowę cząsteczki białka, czyli wzajemne położenie lokalnych struktur drugorzędowych. Powstaje na skutek sił van der Waalsa, mostków dwusiarczkowych lub wiązań wodorowych między resztami oddalonymi od siebie w sekwencji liniowej.



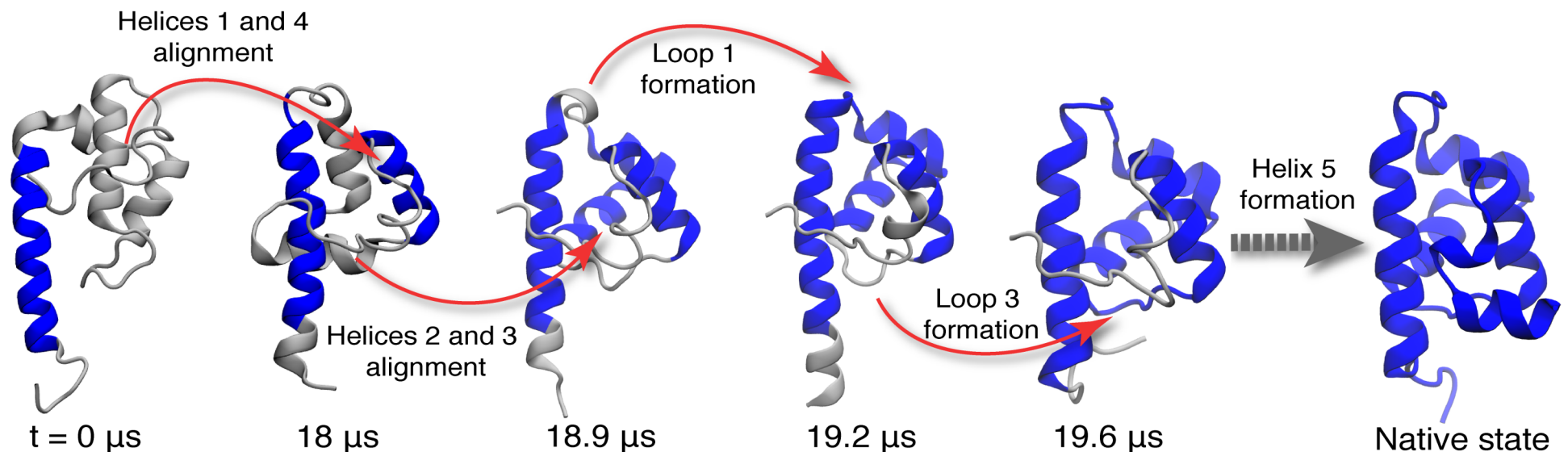
- Jeżeli w budowie cząsteczki białka można wyróżnić dwa lub większą liczbę łańcuchów polipeptydowych lub zawiera ono elementy niebiałkowe, wówczas ich konformacja nazywana jest **strukturą czwartorzędową**.



Hemoglobina – białko zbudowane z czterech podjednostek, (każda z nich zawiera nieaminokwasową cząsteczkę hemu)

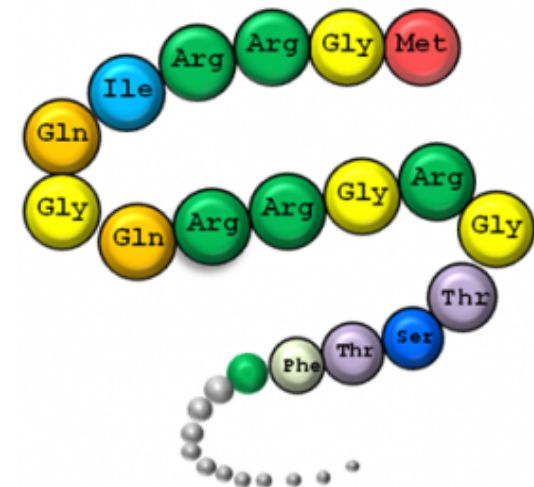
Struktura białek: cztery poziomy organizacji

Lokalne struktury drugiego rzędu tworzą się samoistnie nawet już w trakcie syntezy łańcucha polipeptydowego. Następnie – na skutek wzajemnych oddziaływań struktur drugorzędowych – w czasie od części milisekund do minut (w zależności od białka) powstaje struktura trzeciego rzędu. Etap ten może być wspomagany przez tzw. białka opiekuńcze, które pomagają osiągnąć prawidłową konformację.

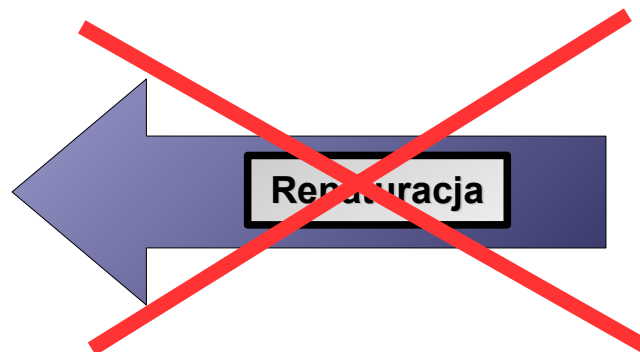
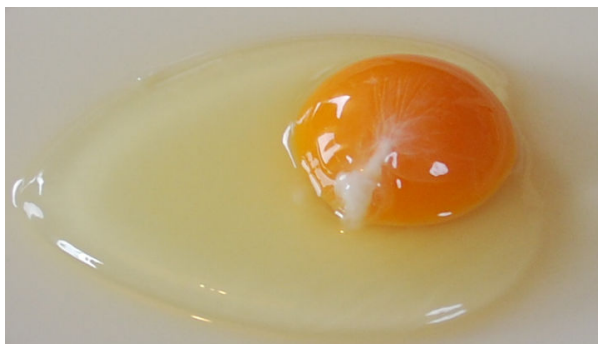


Struktura białek: cztery poziomy organizacji

Właściwości biologiczne białek są ściśle zależne od ich formy przestrzennej. Dlatego **denaturacja**, czyli zmiana II-, III- lub IV-rzędowej struktury białka (przy zachowaniu struktury pierwszego rzędu) zwykle prowadzi do utraty aktywności biochemicznej. Może ona nastąpić np. przez podgrzanie do około 50°C.

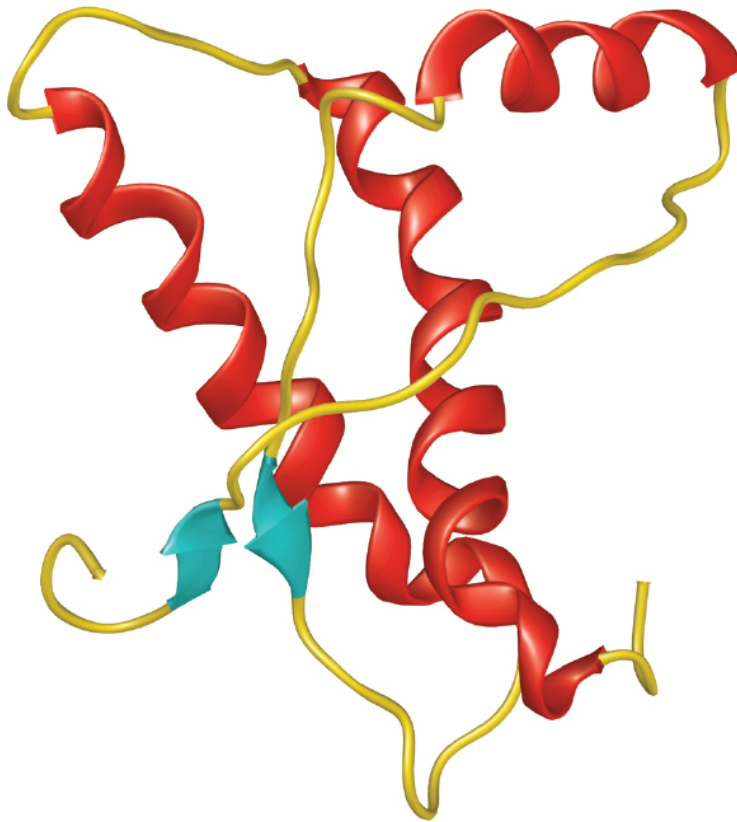


Inaczej niż to ma miejsce w przypadku DNA, denaturacja białek najczęściej jest procesem nieodwracalnym.

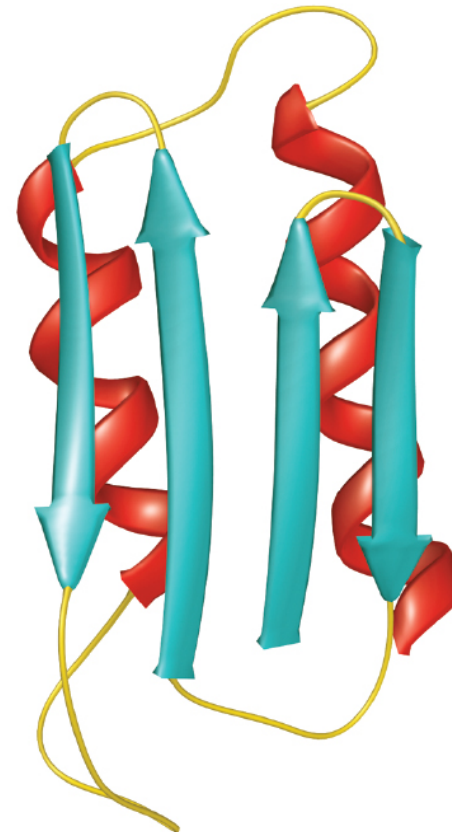


Struktura białek: cztery poziomy organizacji

Zmiana konformacji prowadzi do powstania białka o odmiennych właściwościach, często szkodliwych dla organizmu: przykładami mogą być priony odpowiedzialne za chorobę Creutzfeldta-Jakoba (CJD) oraz agregaty nieprawidłowych form białkowych obecne w wielu schorzeniach neurodegeneracyjnych (np. chorobie Alzheimera).



Prawidłowa konformacja

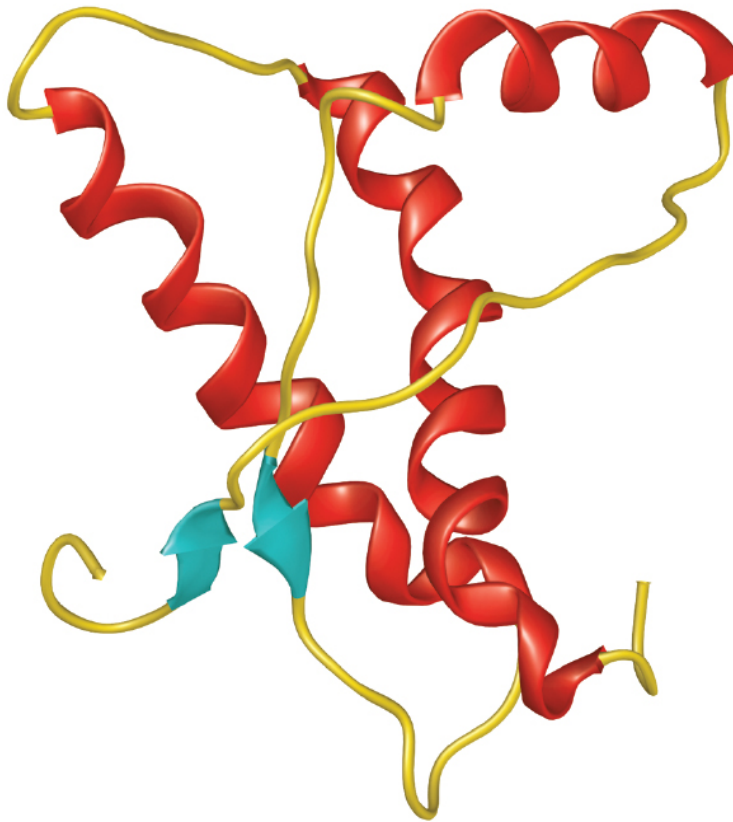


Nieprawidłowa konformacja (prion CJD)

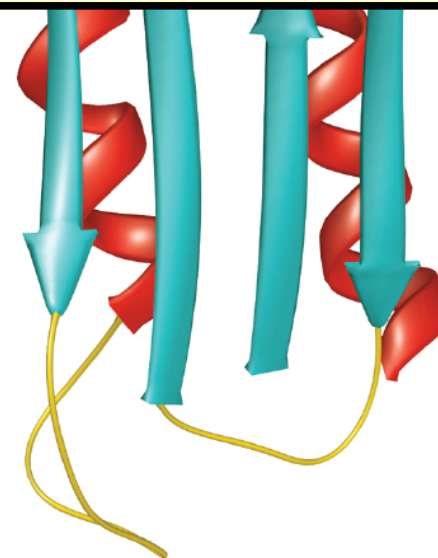
Struktura białek: cztery poziomy organizacji

Zmiana konformacji prowadzi do powstania
często szkodliwych dla organizmu: przykładem
chorobę Creutzfeldta-Jakoba (CJD) oraz agregacje
obecne w wielu schorzeniach neurodegeneracji

Stanley Prusiner: nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii
i medycyny za odkrycie prionów (1997)



Prawidłowa konformacja



Nieprawidłowa konformacja (prion CJD)

ŻYCIE JEST FORMĄ ISTNIENIA BIAŁKA (Fryderyk Engels)

Białka odgrywają kluczową rolę w praktycznie wszystkich procesach biologicznych, zarówno w skali pojedynczej komórki, jak i całego organizmu.

Przykładowe funkcje białek:

- **katalityczne** (prawie wszystkie znane enzymy są białkami);
- **regulacyjne** (część hormonów jest białkami lub peptydami, np. insulina);
- **strukturalne i mechaniczne** (np. miozyna wchodząca w skład mięśni);
- **transportowe** (np. hemoglobina, której podstawową funkcją jest transport tlenu);
- **magazynujące** (np. ferrytyna odpowiedzialna za magazynowanie żelaza w wątrobie);
- **immunologiczne** (wszystkie przeciwciała są białkami);
- **kontrola wzrostu i różnicowania.**