

Κεφάλαιο 1

Βασικές αρχές

Οι ιοί και τα βακτήρια επιβιώνουν εδώ και εκατομμύρια χρόνια χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές που επιτρέπουν τη σύνθεση, τη θραύση και την επανένωση του δεοξυνουκλεϊκού (DNA) και του ριβονουκλεϊκού (RNA) οξέος. Τα τελευταία χρόνια οι μοριακοί βιολόγοι κατάφεραν να αναπαράγουν τις φυσιολογικές διεργασίες στο εργαστήριο, γεγονός που οδήγησε σε σημαντική πρόοδο ως προς την κατανόηση της μοριακής βάσης των ασθενειών του ανθρώπου. Σήμερα γνωρίζουμε και χρησιμοποιούμε πάρα πολλές τεχνικές για τον χειρισμό των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA), ενώ και η μεθολογία που αφορά στις πρωτεΐνες αναπτύσσεται ραγδαία. Αυτό το κεφάλαιο αποτελεί μια σύντομη παρουσίαση των κύριων μορίων που συμμετέχουν στις διεργασίες αυτές, έμφαση όμως δίδεται στην κατανόηση οριομένων βασικών αρχών που διέπουν τις ταχύτατα εξελισσόμενες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη ασθενειών. Η κατανόηση των επιτευγμάτων της Μοριακής Ιατρικής και των βασικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται θα βοηθήσει στη σωστή εκτίμηση των πιθανοτήτων ανάπτυξης νέων διαγνωστικών δοκιμασιών και θεραπειών αλλά και των περιορισμών που υπάρχουν για την ανάπτυξη αυτών.

Οι οργανισμοί συγκροτούνται από κύτταρα

Οι ζωντανοί οργανισμοί αποτελούνται από κύτταρα. Μερικοί οργανισμοί, μεταξύ των οποίων τα βακτήρια, οι άλγες και οι ζύμες, είναι μονοκύτταροι, ενώ τα φυτά και τα ζώα αποτελούνται από ομάδες κυττάρων. Τα νέα κύτταρα, που απαιτούνται για την ανάπτυξη ενός υπάρχοντος οργανισμού ή τη δημιουργία νέων οργανισμών, προκύπτουν από τη διαίρεση των κυττάρων που ήδη υπάρχουν.

Οι λειτουργίες των κυττάρων εξαρτώνται από πρωτεΐνες

Όλες οι κυτταρικές λειτουργίες βασίζονται σε πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούνται από αλυσίδες αμινοξέων. Στις πρωτεΐνες όλων των οργανισμών υπάρχουν μόνο 20 διαφορετικά αμινοξέα. Οι δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ των αμινοξέων μιας αλυσίδας ονομάζονται πεπτιδικοί δεσμοί και οι αλυσίδες πολυπεπτίδια. Οι πρωτεΐνες περιέχουν ένα ή περισσότερα πολυπεπτίδια και η δομή καθώς και η λειτουργία κάθε πρωτεΐνης εξαρτάται από την αλληλουχία των αμινοξέων που απαρτίζουν τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες.

Οι πρωτεΐνες έχουν πολλές διαφορετικές λειτουργίες. Διατηρούν την κυτταρική δομή και παρέχουν κινητικότητα, δρουν ως ενδο-και εξωκυτταρικά σήματα και προσδένονται σε μόρια, όπως το οξυγόνο, τα λιπίδια και άλλες πρωτεΐνες, και τα μεταφέρουν. Πολλές πρωτεΐνες είναι ένζυμα, τα οποία καταλύουν (επιταχύνουν) χημικές αντιδράσεις. Σχεδόν όλες οι χημικές αντιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που συμμετέχουν στη σύνθεση λιπών και υδατανθράκων, καταλύονται από ένζυμα.

Ορισμένες πρωτεΐνες, για παράδειγμα τα ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό της γλυκόζης, υπάρχουν στα περισσότερα κύτταρα. Αντίθετα, τα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών μπορεί να εξειδικευτούν, ώστε να παράγουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες που τους προσδίδουν πολύ εξειδικευμένες λειτουργίες. Κύτταρα που παράγουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες συνήθως συγκεντρώνονται σε μια ομάδα, ώστε να σχηματίσουν πιο σύνθετους ιστούς ή όργανα. Για παράδειγμα, τα μυϊκά κύτταρα παράγουν πρωτεΐνες, όπως η τροπομούσινη και η μυοσίνη, οι οποίες συμμετέχουν στον

σχηματισμό των μυϊκών ινιδίων, τα κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος συνθέτουν την πολυπεπτιδική ορμόνη ινσουλίνη και τα ηπατοκύτταρα περιέχουν ένζυμα που υπάρχουν αποκλειστικά στο ήπαρ, όπως εκείνα που απαιτούνται για τη σύζευξη της χολερυθρίνης σε υδατοδιαλυτές μορφές.

Το DNA περιέχει τις πληροφορίες που απαιτούνται για την κωδικοποίηση των πρωτεΐνων

Τα κύτταρα επομένως χρειάζονται:

- την πληροφορία για να παράγουν πρωτεΐνες με έναν ρυθμιζόμενο τρόπο,
- την ικανότητα να μεταβιβάζουν αυτήν την πληροφορία στα θυγατρικά κύτταρα κατά την κυτταρική διαίρεση.

Οι ανάγκες αυτές καλύπτονται πλήρως από τη διπλή έλικα του DNA, η οποία περιλαμβάνει δύο αλυσίδες DNA που συγκρατούνται μεταξύ τους με ασθενείς χημικές αλληλεπιδράσεις.

Η Βασική Δομή του DNA

Κάθε αλυσίδα του DNA έχει έναν σκελετό από σάκχαρα και φωσφορικές ομάδες, με μία αζωτούχο βάση συνδεμένη σε κάθε σάκχαρο. Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές βάσεις στο DNA. Η κυτοσίνη (C) και η θυμίνη (T) είναι πυριμιδίνες και περιέχουν έναν αζωτούχο δακτύλιο, ενώ η αδενίνη (A) και η γουανίνη (G) είναι πουρίνες και περιέχουν δύο. Οι βάσεις κάθε αλυσίδας συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας «ακτίνες» στο εσωτερικό της έλικας, με τέτοιον τρόπο ώστε η A να μπορεί να ζευγαρώσει μόνο με την T και η C να μπορεί να ζευγαρώσει μόνο με την G (Εικόνα 1.1). Στο RNA το σάκχαρο είναι η ριβόζη, η ουρακίνη αντικαθιστά την T και το νουκλεϊκό οξύ που προκύπτει είναι μονόκινων.

Οι αλυσίδες είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους – η αλληλουχία βάσεων της μιας αλυσίδας μπορεί να προσδιοριστεί από την αλληλουχία της άλλης αλυσίδας. Κατά την κυτταρική διαίρεση κάθε αλυσίδα σχηματίζει ανεξάρτητα μια νέα συμπληρωματική αλυσίδα και η έλικα του DNA έχει την ικανότητα να κατευθύνει τον διπλασιασμό του μορίου.

Η αλληλουχία των βάσεων στο μόριο του DNA φέρει την πληροφορία που καθορίζει τη σειρά των αμινοξέων κατά μήκος μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Καθένα από τα 20

αμινοξέα κωδικοποιείται από κωδικές υπομονάδες, ή κωδικόνια, τα οποία αποτελούνται από τρεις διαδοχικές βάσεις. Προκειμένου να διαβαστεί αυτός ο κωδικας και να μεταφραστεί σε πρωτεΐνη, απαιτείται το RNA.

Γονίδιο είναι ένα τμήμα DNA που φέρει την πληροφορία που απαιτείται για την κωδικοποίηση ενός συγκεκριμένου πολυπεπτιδίου. Για να ανακτηθεί αυτή η πληροφορία δημιουργείται ένα μονόκλωνο αντίγραφο του γονιδίου υπό μορφή αγγελιαφόρου RNA (mRNA) και η αλληλουχία βάσεων του mRNA μεταφράζεται στη συνέχεια σε μια γραμμική αλληλουχία αμινοξέων, που συνθέτουν ένα πολυπεπτιδίο. Συνεπώς η γενετική πληροφορία αποθηκεύεται στα κύτταρα στο DNA. Κατά την έκφραση ενός γονιδίου ένα κομμάτι του DNA μεταγράφεται αρχικά σε RNA κι έπειτα μεταφράζεται από RNA σε πρωτεΐνη. Κατά την κυτταρική διαίρεση το DNA αντιγράφεται, ώστε να σχηματιστούν δύο πανομοιότυπες έλικες DNA.

DNA

Το DNA αποτελείται από τρία βασικά συστατικά:

- 1 βάσεις,
- 2 σάκχαρα,
- 3 φωσφορικές ομάδες.

Αυτά τα συστατικά συγκρατούνται μέσω τριών βασικών τύπων σύνδεσης:

- 1 ομοιοπολικός δεσμός,
- 2 δεσμός υδρογόνου,
- 3 εστερικός δεσμός.

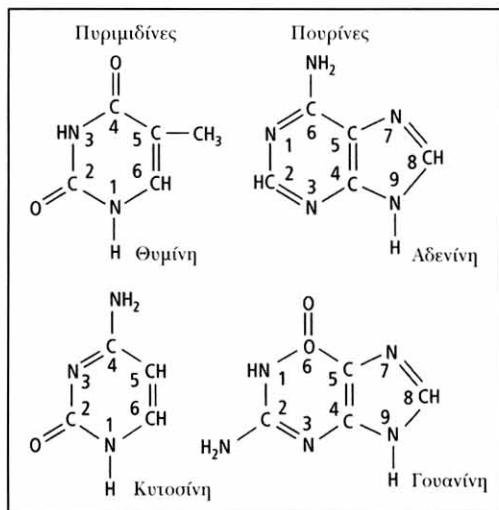
Οι παίκτες

Βάσεις

Βάση είναι ένα μόριο που προσλαμβάνει ιόντα υδρογόνου σε διάλυμα. Οι βάσεις του DNA είναι δακτύλιοι που περιέχουν άζωτο (το άζωτο καθιστά αυτά τα μόρια βασικά). Οι πυριμιδίνες (C, T) έχουν έναν δακτύλιο, ενώ οι πουρίνες (A, G) δύο.

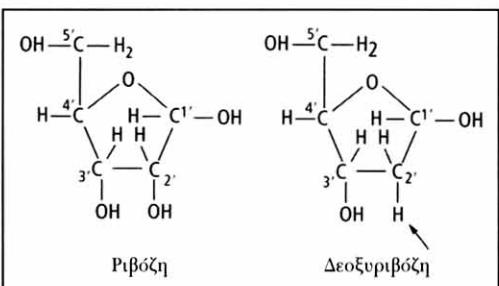
Σάκχαρα

Τα σάκχαρα του DNA είναι πεντόζες (μόρια σακχάρων που περιέχουν πέντε άτομα άνθρακα). Στο DNA η πεντόζη είναι πάντα η δεοξυριβόζη, που σημαίνει ότι δεν φέρει την υδροξυλομάδα που περιέχει οξυγόνο και η οποία υπάρχει στη ριβόζη, το αρχικό συστατικό. Η ριβόζη δεν θα μπορούσε να χω-



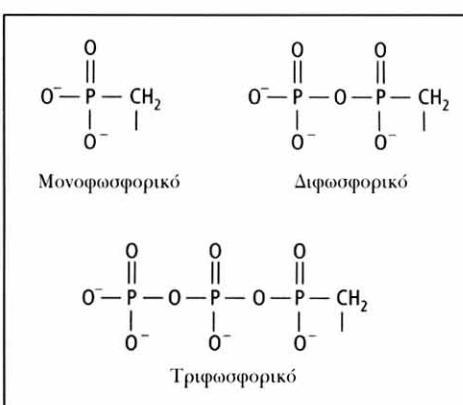
ρέσει σε μια έλικα DNA καθώς δεν υπάρχει αρκετός χώρος για τη 2'-OH ομάδα.

Κατά σύμβαση τα άτομα άνθρακα της ριβόζης και της δεοξυριβόζης συμβολίζονται με τονούμενους αριθμούς (1' μέχρι 5') όταν αποτελούν τμήμα ενός νουκλεοτιδίου. Αυτός ο συμβολισμός είναι σημαντικός για να καταλάβει κανείς πώς συναρμολογείται το μόριο του DNA.



Φωσφορικές ομάδες

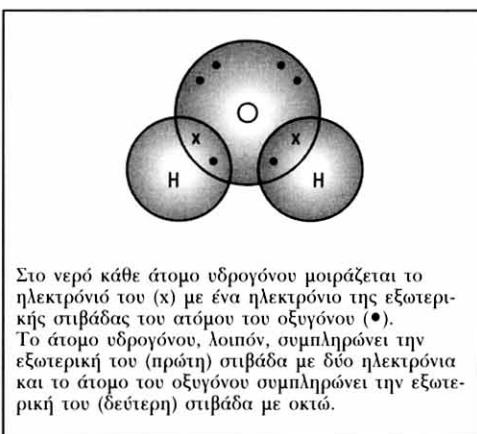
Οι φωσφορικές ομάδες του DNA είναι είτε μονο- είτε δι- ή τριφωσφορικά. Ο δξινος χαρακτήρας του νουκλεϊκού οξέος οφείλεται στην παρουσία των φωσφορικών εστέρων, οι οποίοι είναι σχετικά ισχυρά οξέα (μόρια που απελευθερώνουν ένα ιόν υδρογόνου σε διάλυμα). Σε ουδέτερο pH απελευθερώνονται τα ιόντα υδρογόνου κι έτσι φυσιολογικά αναφέρονται με την ιονισμένη τους μορφή:



Οι δεσμοί

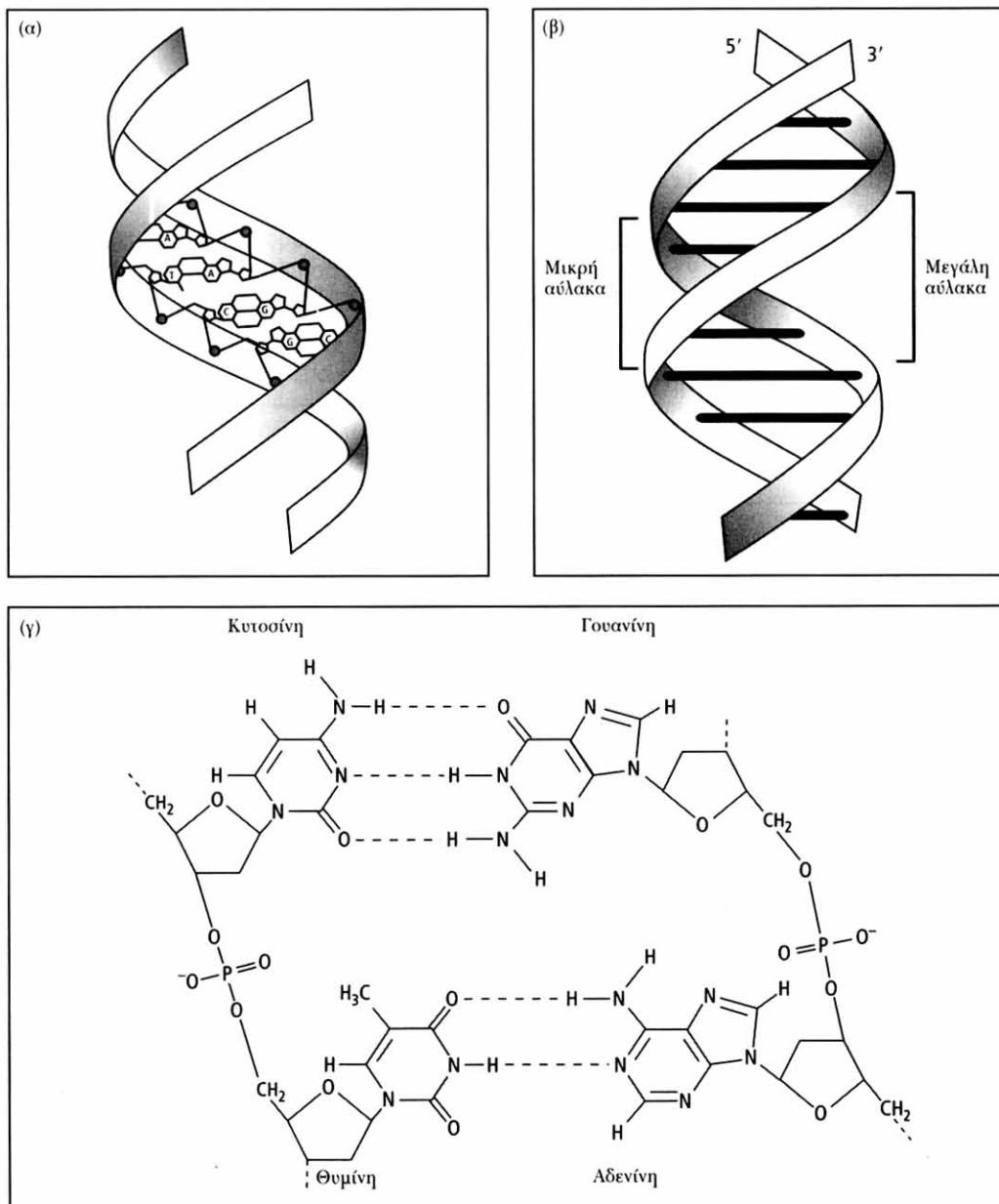
Ομοιοπολικοί δεσμοί

Ομοιοπολικός δεσμός σχηματίζεται μεταξύ ατόμων που μοιράζονται ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα. Τα ηλεκτρόνια που συμμετέχουν στον δεσμό κινούνται ελεύθερα γύρω και από τους δύο πυρίνες, οι οποίοι συγκρατούνται κοντά ο ένας στον άλλο λόγω του ισχυρού δεσμού – όταν σχηματίζονται οι δεσμοί απελευθερώνεται ενέργεια και απαιτείται το ίδιο ποσό ενέργειας για να σπάσει ο δεσμός.

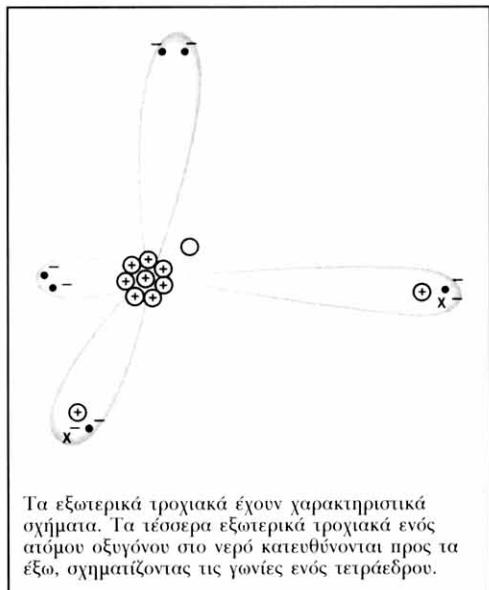


Δεσμός υδρογόνου

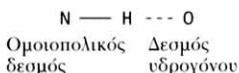
Ένα άτομο υδρογόνου μπορεί συνήθως να σχηματίσει μόνο έναν ομοιοπολικό δεσμό με ένα άλλο άτομο. Ένα ομοιοπολικά συνδεδεμένο (απογυμνωμένο από ηλεκτρόνια) άτομο υδρογόνου μπορεί, όμως, να σχηματίσει μια ασθενή ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση



Εικόνα 1.1 (α) Διαγραμματική αναπαράσταση της έπικας του DNA. (β) Η μεγάλη και η μικρή αύλακα της έπικας του DNA. (γ) Ζευγάρωμα των βάσεων CG/TA.



(δεσμός υδρογόνου) με ένα ηλεκτραρνητικό (πλούσιο σε ηλεκτρόνια) άτομο (συνήθως άζωτο ή οξυγόνο), για παράδειγμα,



Εστερικός δεσμός

Ένας εστερικός δεσμός περιλαμβάνει ομοιοπολικό δεσμό. Σχηματίζεται όταν ενώνονται μια αλκοδλή κι ένα οξύ με την απελευθέρωση ενός μορίου νερού.

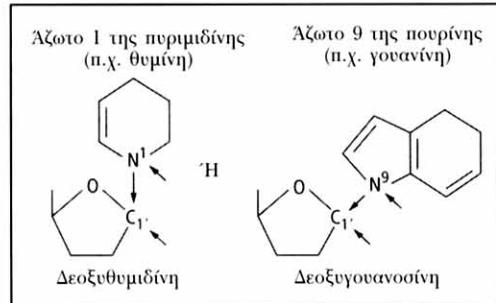
Ισχύς δεσμού

Η ισχύς των δεσμών είναι σημαντική για να κατανοήσεις κανείς τη σταθερότητα των διαφορετικών τμημάτων του τελικού μορίου DNA. Ισχυροί ομοιοπολικοί δεσμοί συνδέουν τα νουκλεϊκά οξέα μιας αλισσίδας DNA, ενώ πιο ασθενείς δεσμοί υδρογόνου συγκρατούν τις δύο συμπληρωματικές αλισσίδες DNA μαζί.

Ο σχηματισμός του DNA

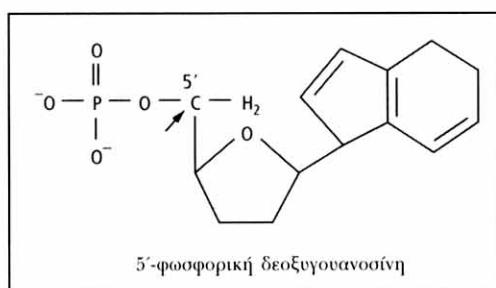
Βάση + σάκχαρο = νουκλεοσίδιο

Ο 1' άνθρακας του δακτυλίου της πεντόζης συνδέεται με το άζωτο 1' της πυριμιδίνης ή το άζωτο 9' της πουρίνης.



Βάση + σάκχαρο + φωσφορική ομάδα = νουκλεοτίδιο

Η φωσφορική ομάδα συνδέεται με τον 5'-άνθρακα του δακτυλίου της πεντόζης.



Τα νουκλεοτίδια ως αποθήκες ενέργειας

Τα νουκλεοτίδια μπορεί να συνδέονται είτε με δύο είτε με τρεις φωσφορικές ομάδες. Εκτός από το να συμμετέχουν στον σχηματισμό του DNA, τα δι- και τρι-φωσφορικά νουκλεοτίδια αποτελούν σημαντικές αποθήκες χημικής ενέργειας. Η αποκοπή της ακραίας διφωσφορικής ομάδας απελευθερώνει ενέργεια, η οποία χρησιμοποιείται για να πραγματοποιηθούν οι θειτουργίες του κυττάρου. Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) είναι ο ευρύτερα χρησιμοποιούμενος φορέας ενέργειας στο κύτταρο.

Νουκλεοτίδια ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν νουκλεϊκά οξέα

Η υδροξυλομάδα, που βρίσκεται προσδεδεμένη στο 3'-άτομο άνθρακα της πεντόζης ενός νουκλεοτιδίου, σχηματίζει έναν εστερικό δεσμό με τη φωσφορική ομάδα ενός άλλου μορίου, απελευθερώνοντας ένα μόριο νερού. Ο δεσμός μεταξύ των νουκλεοτιδίων είναι γνωστός ως φωσφοδιεστερικός δεσμός.