

Лекция-8
Биомакромолекулы
Нуклеиновые кислоты 2-
часть

Уотсон-криковские пары

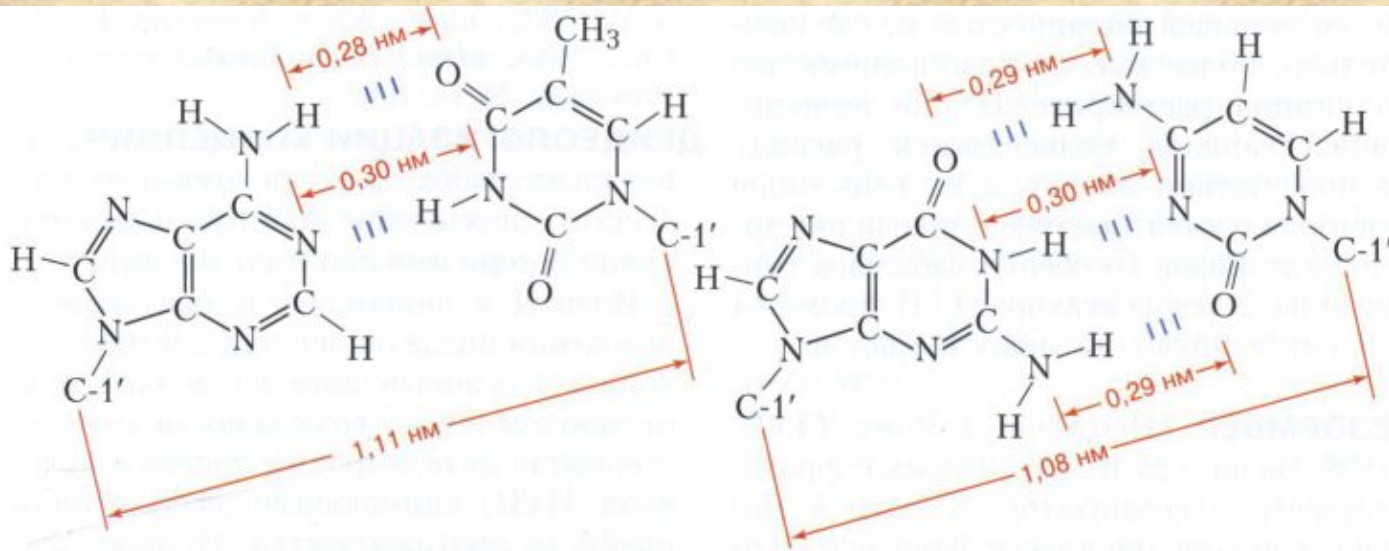


Рис. 2. Комплементарные уотсон-криковские пары в двуспиральной молекуле ДНК. Слева – пара аденин – тимин; справа – пара гуанин – цитозин. Приведены расстояния между атомами, связанными специфическими водородными связями, а также расстояния между С-1'атомами остатков дезоксирибозы.

пары близки по форме, связаны водородными связями и имеют одинаковые размеры

- G-Спары прочнее, чемА-Т(в ДНК) илиА-U(в РНК).

- псевдосимметрия второго порядка: при повороте оси на 180° совпадают толькоС1'-атомы(расстояние между ними 1.085 нм)

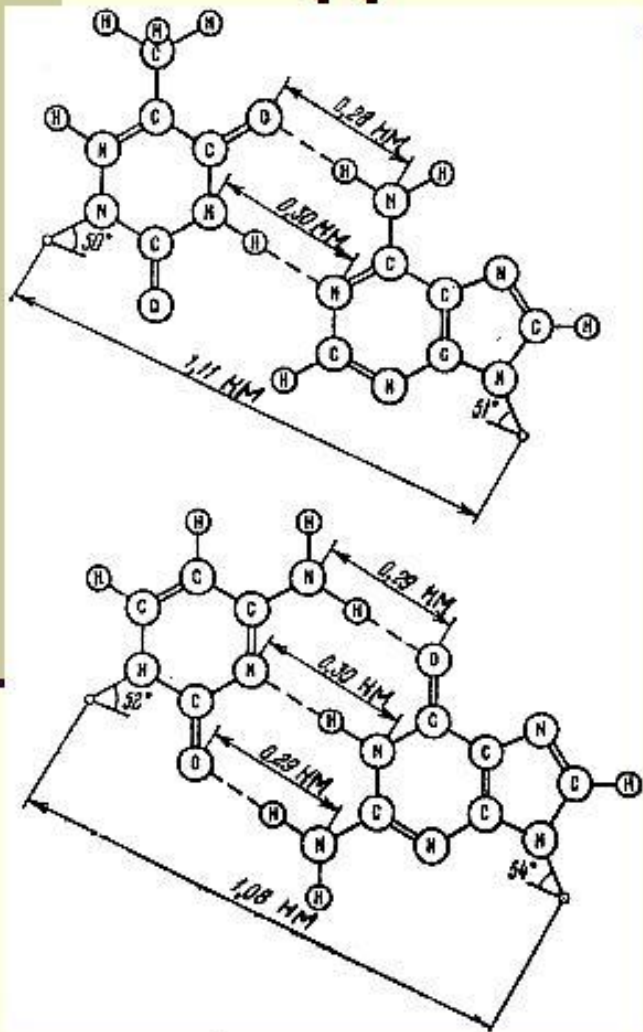
- энергетически наиболее выгодны

- стабилизируются

электростатическими

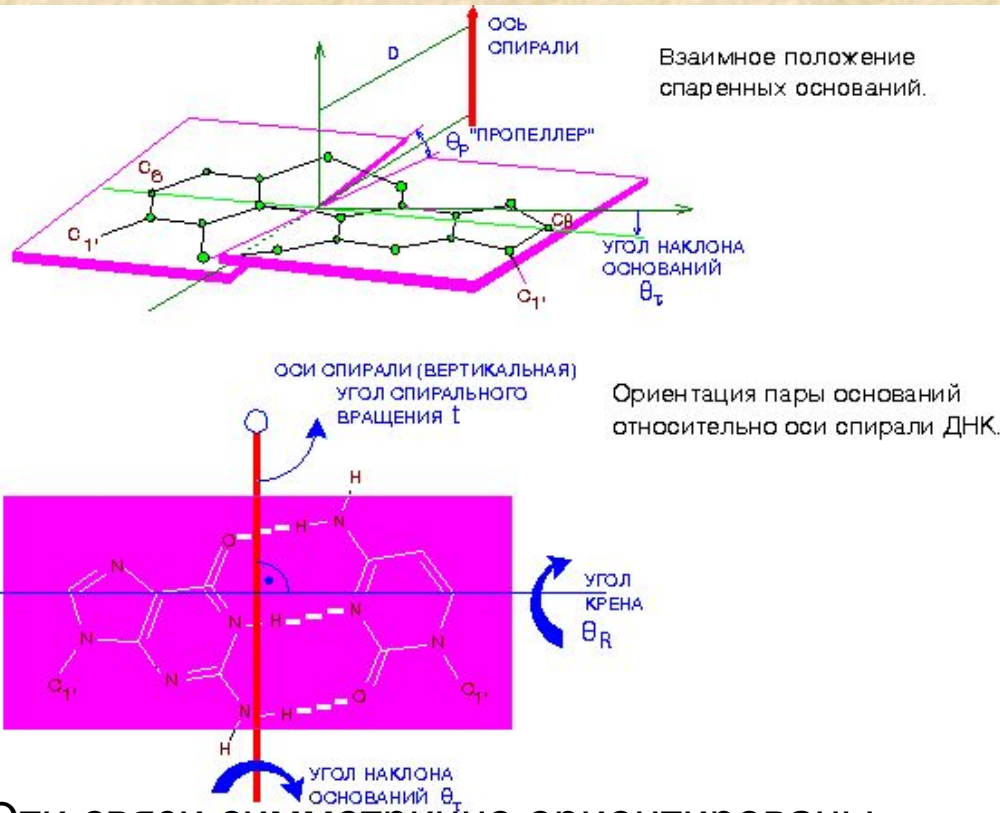
взаимодействиями

"Уотсон-криковские пары" в двойной спирали ДНК



Следует отметить, что в парах азотистых основ АТ и особенно в парах ГЦ значительная роль принадлежит диполь-дипольным (Ван-дер-Ваальсовским) взаимодействиям. Эти взаимодействия становятся очень заметными, когда двойная спираль разделяется с образованием двух отдельных цепей. При этом водородные связи между азотистыми основаниями заменяются на связи с молекулами воды.

Уотсон-криковские пары . •



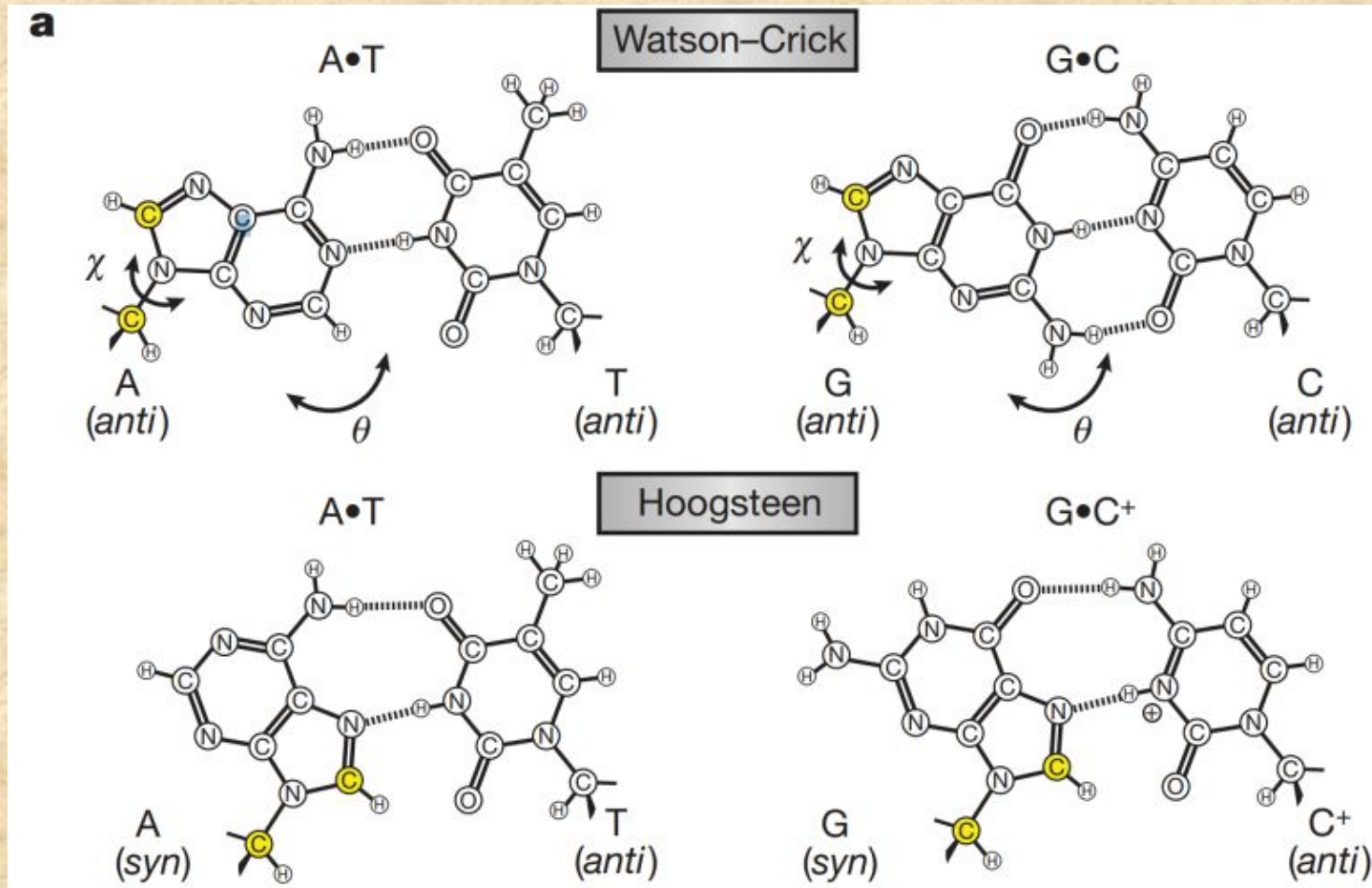
Важнейшей особенностью этих пар оснований является не просто хорошая геометрия водородных связей между каждой аминогруппой и примыкающей к ней кетогруппой, а тот факт, что расстояния между гликозидными связями, соединяющими пары оснований с сахаро- фосфатным остовом, одинаковы для каждой пары (10,85 А).

Уотсон-криковские А-У и G-С пары изоморфны, т.е. близки по форме и имеют одинаковые размеры. В А - У паре расстояние $C1'...C1'$ равно 10.44 А, что примерно на 0.3 А меньше, чем в паре G - С, а углы между прямой, соединяющей эти атомы, и гликозидными связями $C1'- N$ лежат в интервале 54,4 - 57.4 °. Если пренебречь этой незначительной разницей в 3,0, то можно считать, что гликозидные связи связаны друг с другом псевдоосью симметрии второго порядка.

Два основания в уотсон-криковских парах некомпланарны, они повернуты друг относительно друга, подобно лопастям пропеллера. Угол пропеллера в паре А - У равен 12 °, а в паре G - С равен 7°

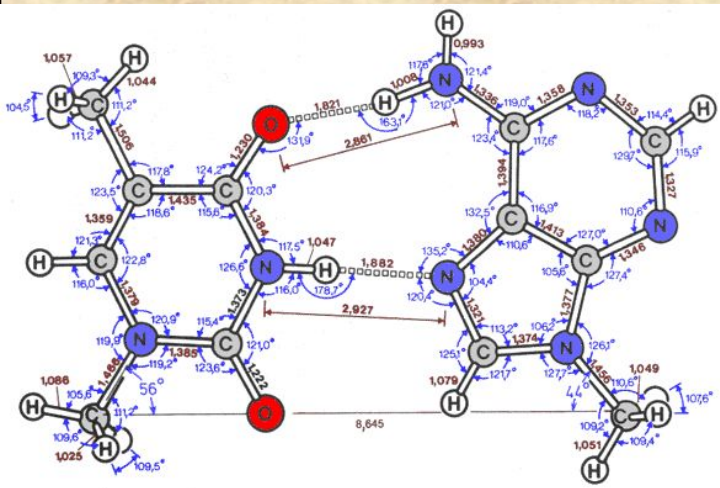
• Эти связи симметрично ориентированы относительно псевдооси симметрии второго порядка, расположенной в плоскости пары. Из существования этих осей и в АТ-, и в GC-парах следует, что геометрия АТ-, ТА-, GC- и CG-пар одинакова. Таким образом, соединения между двумя $C1'$ - атомами на одном и том же уровне спирали могут быть образованы любой из четырех пар оснований А-Т, Т-А, G-С или С-Г.

Хугстиновские пары



Хугстиновские пары — альтернативный вариант связывания нуклеотидов — альтернативный вариант связывания нуклеотидов на комплементарных — альтернативный вариант связывания нуклеотидов на комплементарных цепях нуклеиновых кислот — альтернативный вариант связывания нуклеотидов на комплементарных цепях нуклеиновых

Пары оснований

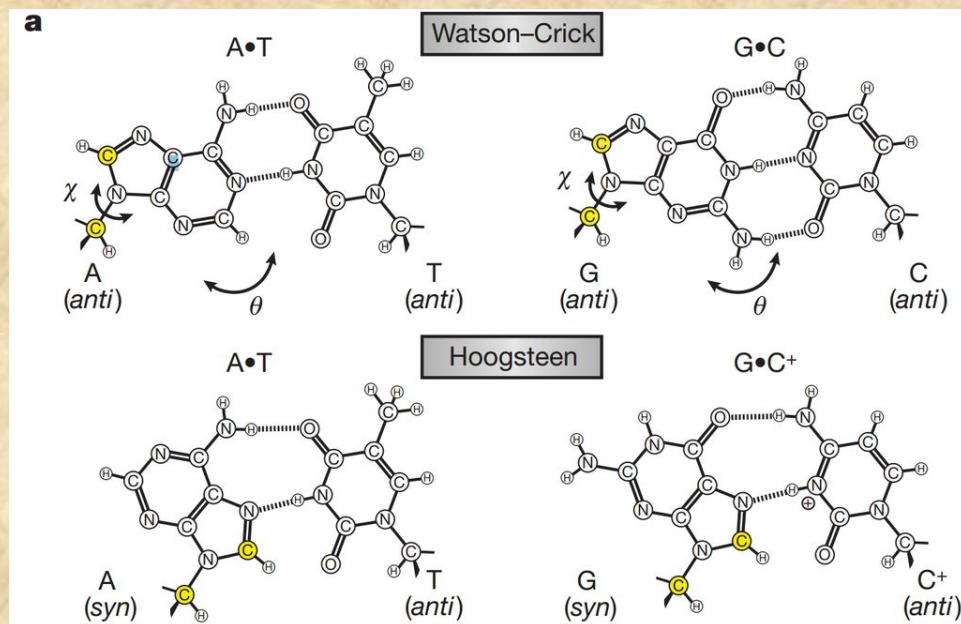


В хугстиновской паре расстояние $C1'...C1'$ на $2A$ меньше, чем в уотсон-криковской, и составляет 8.654 Å, а угол между соответствующей прямой и гликозидной связью $C1'-N$ для пуриновых и пиримидиновых оснований различается более, чем на 10° , т.е. псевдоось симметрии второго порядка отсутствует.

Для Хугстиновских пар, две антипараллельные нуклеиновые цепи образуют водородные связи по большой бороздке.

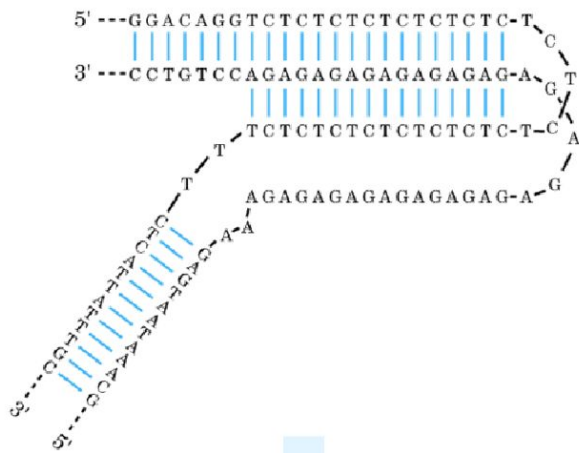
Пурины поворачиваются на 180°

Хотя Хугстиновские пары наблюдаются редко, в некоторых последовательностях ДНК, особенно в динуклеотидах $5'-CA-3'$ и $5'-TA-3'$ [1], они существуют в равновесии со стандартными Уотсон-Криковскими парами оснований.

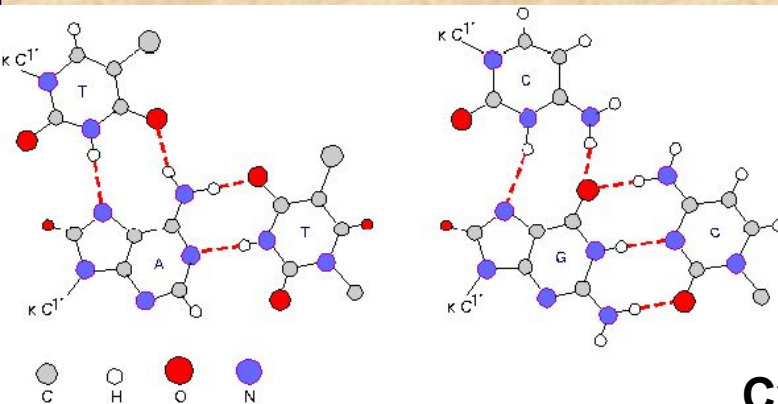


Тройная спираль ДНК

Тройная спираль

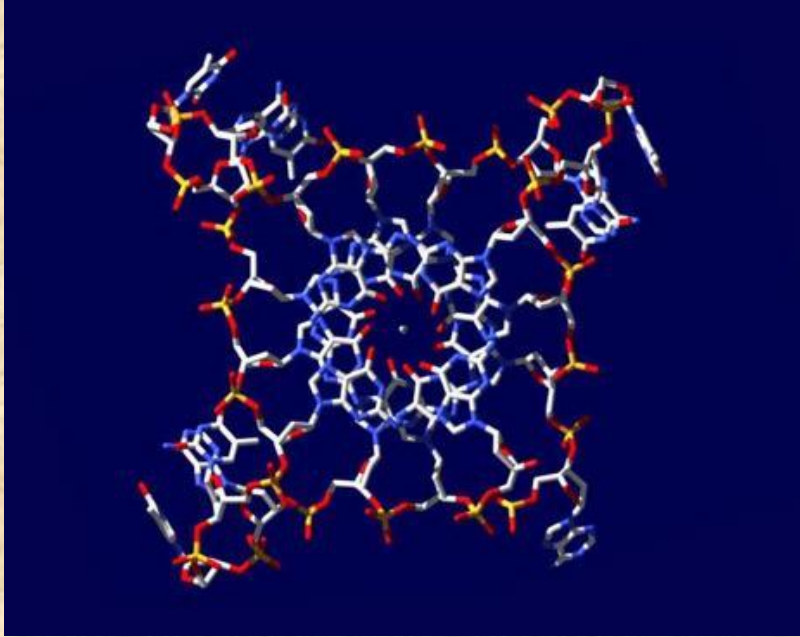


Тройная спираль - спираль, которую образуют три цепи ДНК. Экспериментально наблюдалась тройная спираль из двух цепей поли(dT) и одной поли(dA). Этой спирали поли(dA) и одна из цепей поли(dT) образуют обычную двойную спираль, структура которой ближе к А-форме, а вторая цепь поли(dT) уложена в негликозидный желобок двойной спирали. При этом второй тимин образует дополнительные водородные связи с АТ- парой.



Схемы водородных связей в тройках оснований

G-квадруплексы



Цепи нуклеиновых кислот из гуанозиновых олиго- и полинуклеотидов способны связываться друг с другом при наличии моновалентного катиона небольшого размера, чаще всего --- калия. С помощью дифракционного анализа было показано, что такие поли(G)-нити представляют собой новый тип укладки ДНК, четырёхцепочечную спираль, где четыре гуаниновых основания из разных цепей образуют плоскую структуру, удерживаемую G-G-парными взаимодействиями.

Нуклеиновые кислоты, содержащие G-тетрадный мотив чрезвычайно широко представлены во всех открытых на данный момент геномах. Такие мотивы были обнаружены в промоторных регионах, сайтах переключения в составе последовательности генов иммуноглобулинов, «горячих точках» рекомбинации и др.

Нуклеиновые кислоты, так же как и белки, способны к избирательному связыванию различных молекул. Такие способные к специфическому связыванию олигонуклеотиды называют аптамерами. Относительно большой процент аптамеров содержит в своей структуре квадруплекс, который выполняет функцию стабилизации всей молекулы

Структура G-квадруплекса

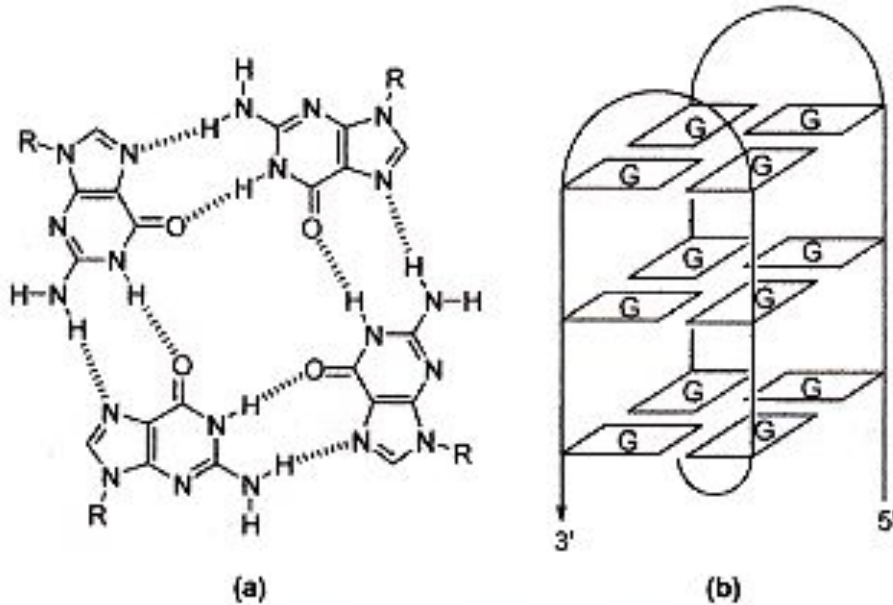


Figure 1. (a) Structure of a G-quartet and (b) a schematic representation of a G-quadruplex.

G-квартет

Межмолекулярный

G-квадруплекс

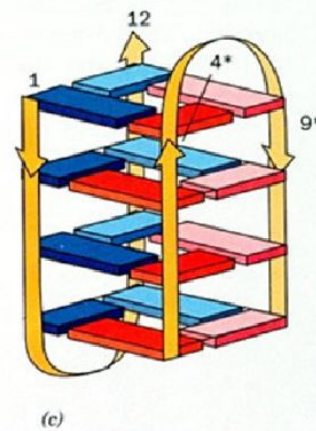
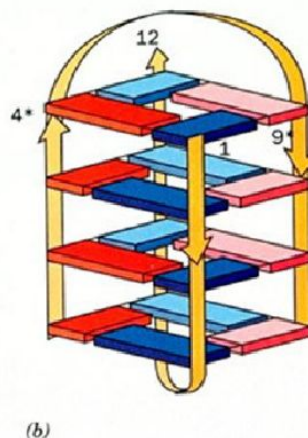
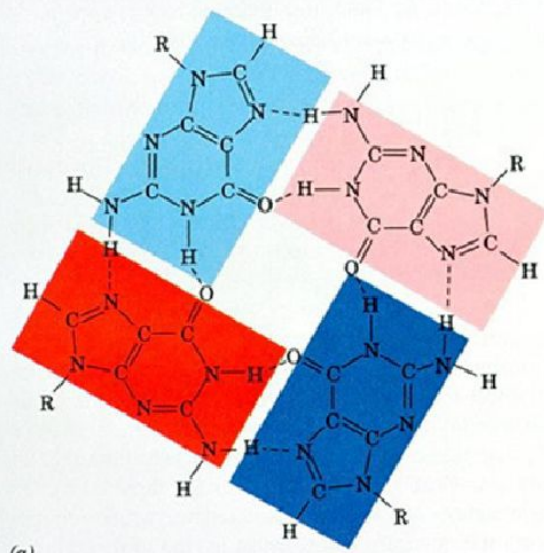
Поли(G)-нити представляют собой новый тип укладки ДНК — четырехцепочечную спираль, где четыре гуаниновых основания из разных цепей образуют плоскую структуру, удерживаемую G-G-парными взаимодействиями.

Такие структуры отличаются высокой стабильностью в растворе и называются гуаниновыми (G)-квартетами, или G-тетрадами. Каждый G-квартет скреплен в сумме восемью водородными связями, образованными взаимодействием Уотсон-Криковской стороны одного гуанинового основания с Хугстиновской стороной другого.

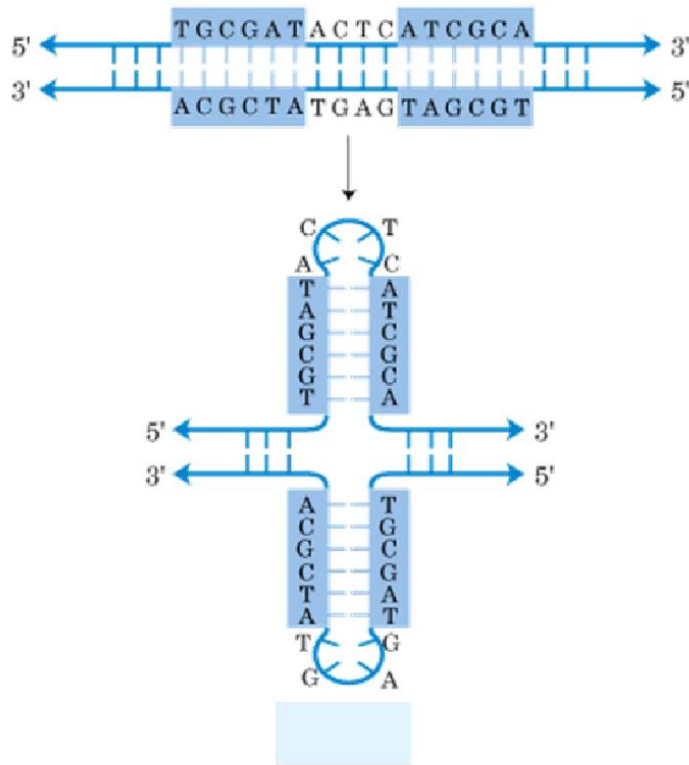
G-квадруплексы могут быть также образованы короткими олигонуклеотидами с соответствующей последовательностью, которую можно схематически записать как $G_m X_n G_m X_o G_m X_p G_m$, где m — количество гуанинов в G-блоке. Эти гуанины обычно непосредственно задействованы в образовании G-тетрад. X_n , X_o и X_p могут быть комбинацией любых остатков, включая G; такие участки формируют петли между G-тетрадами

Квадриплексная ДНК

часто присутствует в теломерах, в том числе у человека



Палиндромы

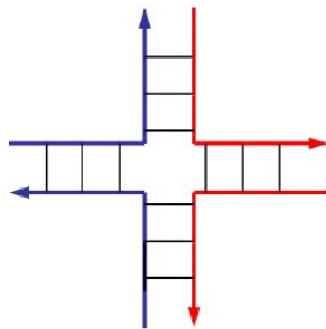


Обращенные повторы могут образовывать петли

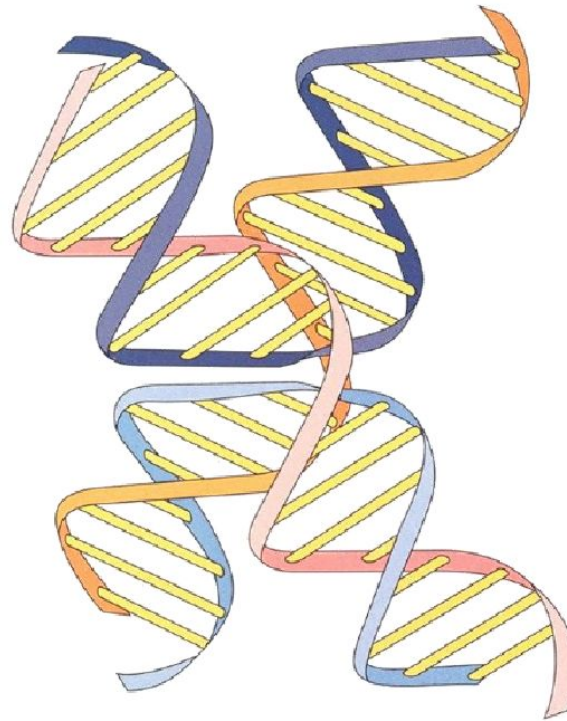
Палиндромы (обращенные повороты) – последовательности в двунигчатой ДНК, в которой одинаковые основания расположены в противоположных направлениях

ДНК: крестообразные СТРУКТУРЫ

Крестообразные структуры в ДНК

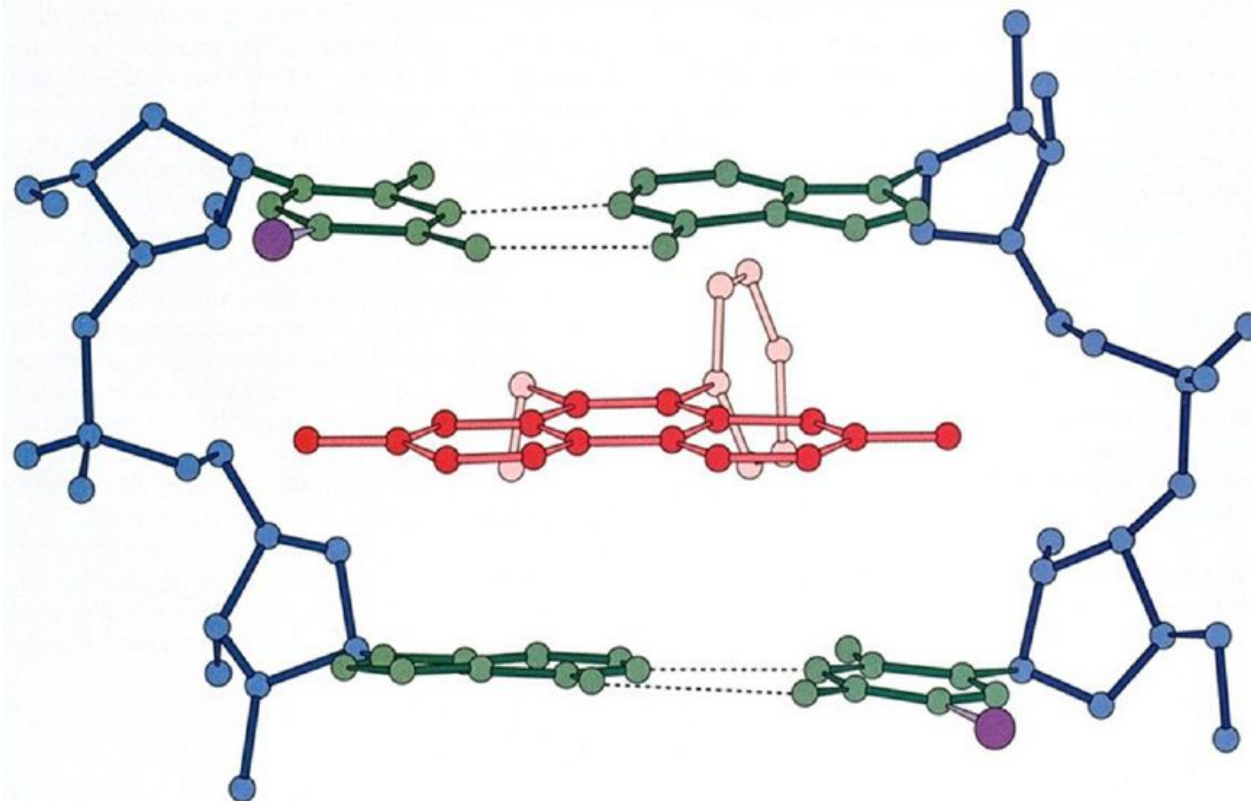


Структура Холлидея



Крестообразные структуры - структуры, состоящие из двух шпилек на регулярной двойной спирали ДНК.

Бромид этидия интеркалирует в ДНК,
уменьшая спирализацию ~ на 26°
(разворачивает двойную спираль)

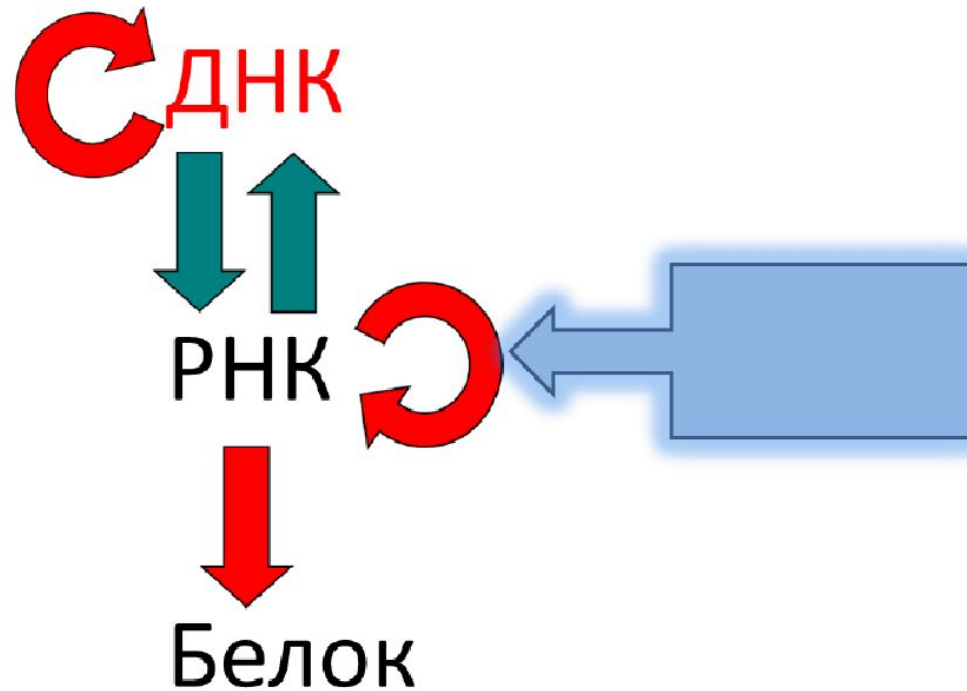


Интеркаляция — это обратимое включение молекулы или группы между другими молекулами или группами, что приводит к увеличению расстояния между ними и возникновению мутации типа “сдвига рамки”

ДНК —
«хранитель информации»

РНК — «посредник
информации»

Белок —
«рабочая лошадка —
исполнитель информации»



Предисловие:

После установления роли ДНК в передаче наследственных признаков и ее строения в 1944 – 1953 гг. ДНК была провозглашена "главной молекулой жизни", "нитью жизни", началом всего живого.

Молекулам РНК отводилась второстепенная роль – считалось, что РНК, в основном, выполняет функцию посредника, воспринимающего генетическую информацию от ДНК с помощью транскрипции и реализующего ее в виде биосинтеза белков.

Однако на самом деле – это не так!!!

Роль РНК в жизнедеятельности клетки:

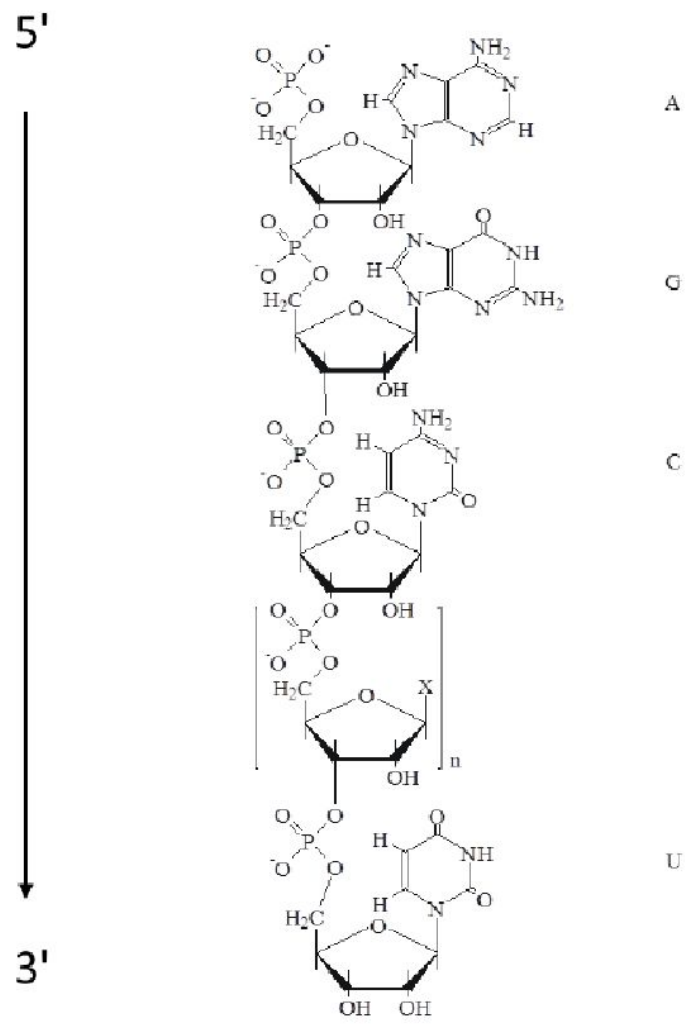
- рибонуклеотид АТФ - универсальный источник энергии;
- кофакторы НАДН, НФДФН, ФАД, СоА – производные рибонуклеотидов;
- производные рибонуклеотидов являются ключевыми сигнальными молекулами в клетках, например, цАМФ, цГМФ;
- РНК необходима для запуска процесса репликации молекул ДНК – выполняет роль «затравки»;
- РНК выполняет роль генома у вирусов и виридов;
- три типа РНК – мРНК, тРНК и рРНК участвуют в синтезе белка;
- РНК выполняет роль матрицы в обратной транскрипции;
- РНК участвует в наращивании теломерных концов хромосом;
- РНК способна самостоятельно созревать – обладает способностью к самосплайсингу;
- рРНК участвует в построении рибосом (различные типы рРНК);
- тРНК молекулы участвуют в нематричном синтезе белка (без участия рибосом);
- тРНК адапторы для аминокислот;
- тРНК участвует как затравка в обратной транскрипции;
- РНК способна к кодированию;
- РНК способна к рекомбинации;
- РНК- регулятор экспрессии генов (6S РНК);
- антисмысловые РНК;
- РНК – хелаторы ионов металлов;
- РНК имеет ферментативную активность – рибозимную;
- РНК может выполнять роль аптамеров (присоединять аминокислоты, пептиды, антибиотики);
- РНК выполняют роль транспортеров биологических молекул между отдельными компартментами клеток;
- РНК способна к гибридизации;
- РНК может редактироваться (исправлять ошибки в своей молекуле).

ПРИНЦИПЫ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ РНК

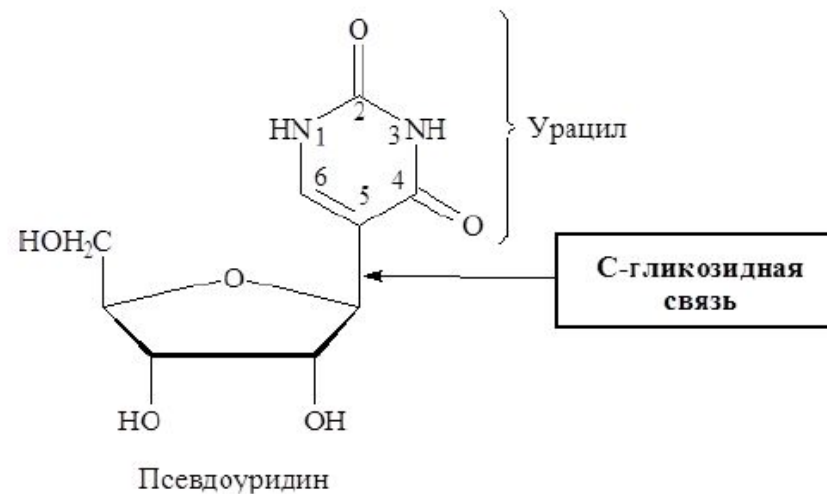
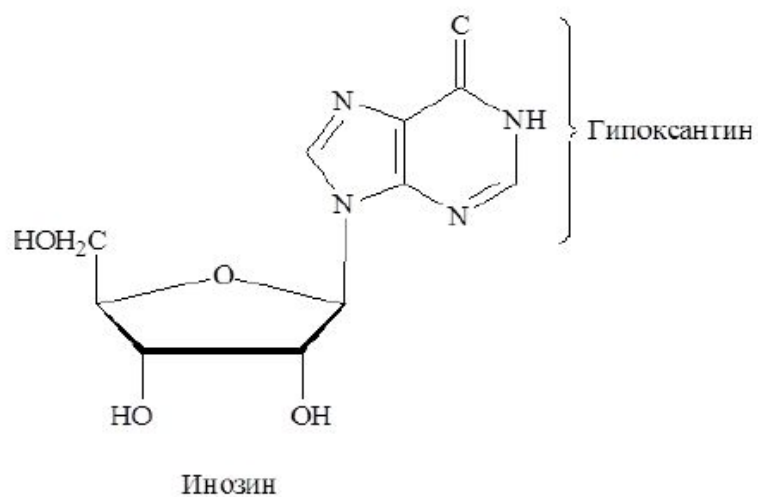
(1960 - 1962)

- 1) РНК, в отличие от ДНК, **одноцепочечна**.
- 2) Высокомолекулярные РНК представляют собой **ковалентно непрерывные цепи**.
- 3) РНК формирует **вторичную структуру** за счет в основном попарного антипараллельного взаимодействия смежных участков цепи.
- 4) РНК способна образовывать **компактные структуры** за счет дальних парных взаимодействий внутри цепи и межспиральных взаимодействий.
- 5) РНК обладает значительной конформационной подвижностью (**конформационные переходы**).

ПОЛЯРНОСТЬ ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДНОЙ ЦЕПИ



НУКЛЕОЗИДЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ РНК (РИБОНУКЛЕОЗИДЫ)



Главные отличия в

макромолекулярной структуре ДНК и РНК

1. РНК – одноцепочечный полимер в отличие от ДНК, которая существует в основном в виде всем известной двойной спирали, в которой две цепи ДНК удерживаются вместе за счет образования водородных связей между комплементарными нуклеотидами, а жесткость спирали обеспечивается гидрофобными «стэкинг» взаимодействиями между азотистыми основаниями.

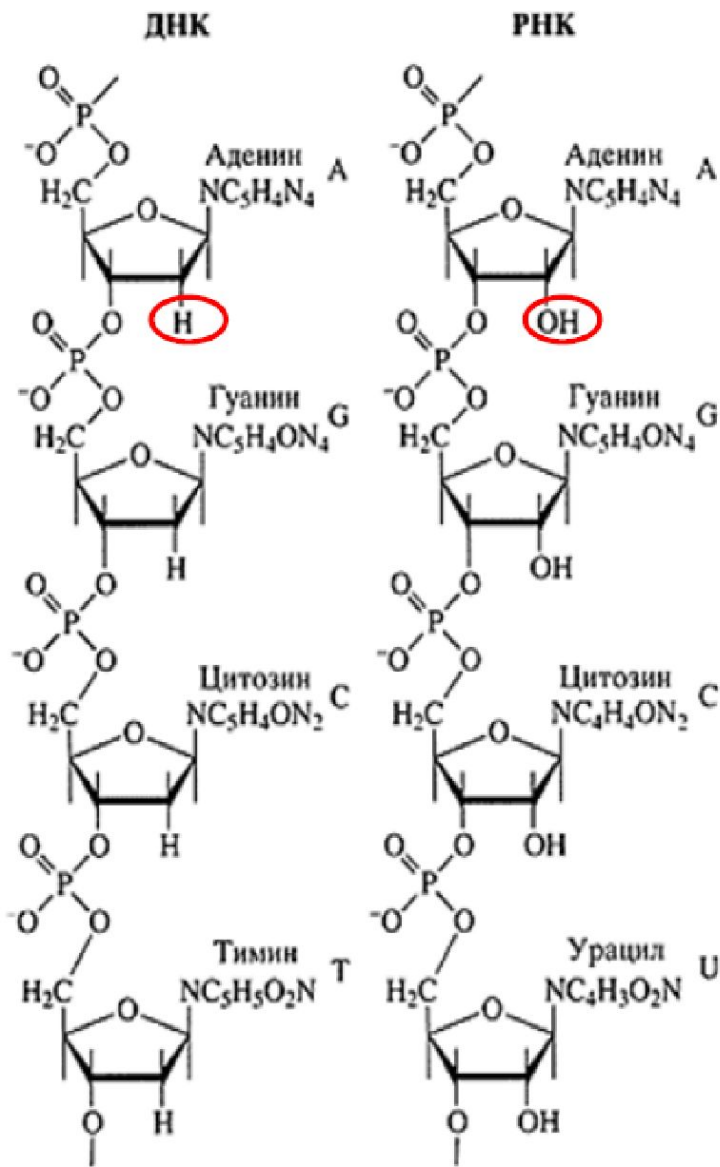
Объясняется это двумя причинами. Во-первых, у всех клеточных организмов отсутствует фермент для катализа реакции образования РНК на матрице РНК. Такой фермент есть лишь у некоторых вирусов, геном которых представлен молекулой РНК. Остальные организмы могут синтезировать РНК только на ДНК-матрице в ходе транскрипции.

Во-вторых, из-за потери метильной группы урацилом связь между ним и аденином получается малоустойчивой, поэтому "удержание" второй (комплементарной) нити для молекулы РНК является существенной проблемой.

В силу указанных причин, РНК не имеет постоянной двухспиральной структуры, а образование двойных участков небольшой протяженности связано с наличием в ее составе комплементарных зон (дуплексов или «шпилек»).

Главные отличия в строении молекул ДНК и

РНК:



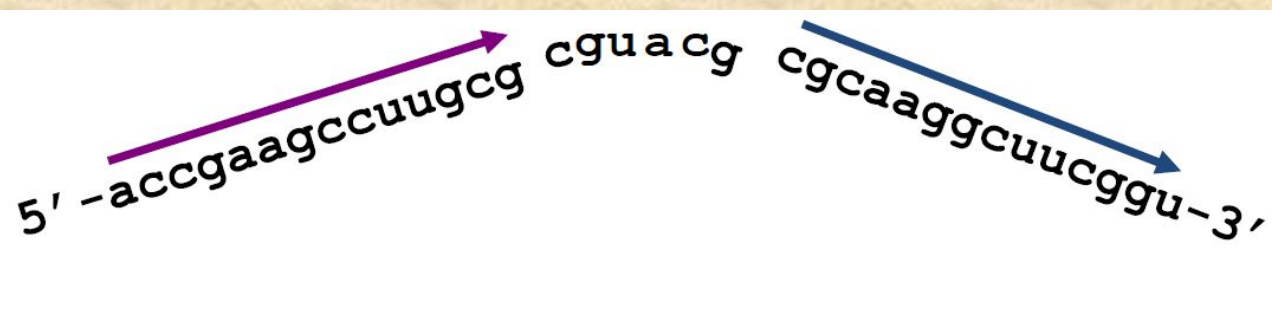
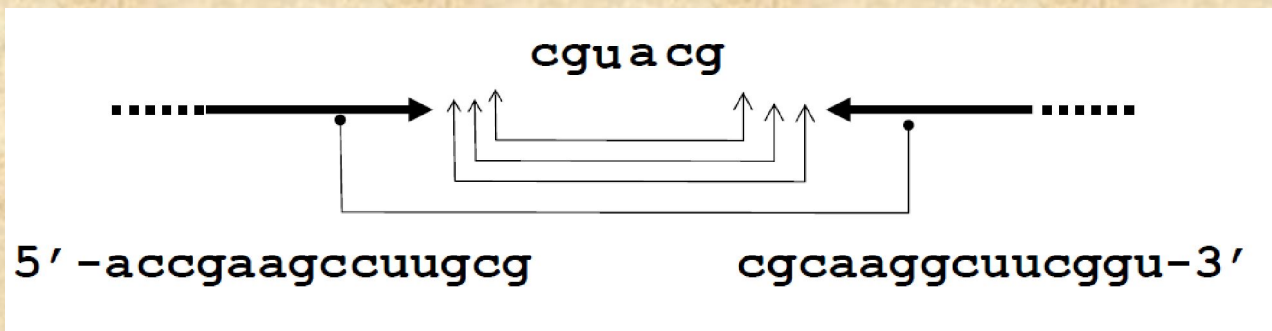
1. В состав сахарофосфатного остова РНК входит сахар рибоза, а ДНК – дезоксирибоза, являющаяся производным рибозы.

2. В дезоксирибозе при втором углеродном атоме (С2') находится атом водорода (H), в рибозе – гидроксильная группа (OH). Эта группа изменяет свойства РНК - увеличивает вероятность гидролиза молекулы РНК, то есть уменьшает ее стабильность

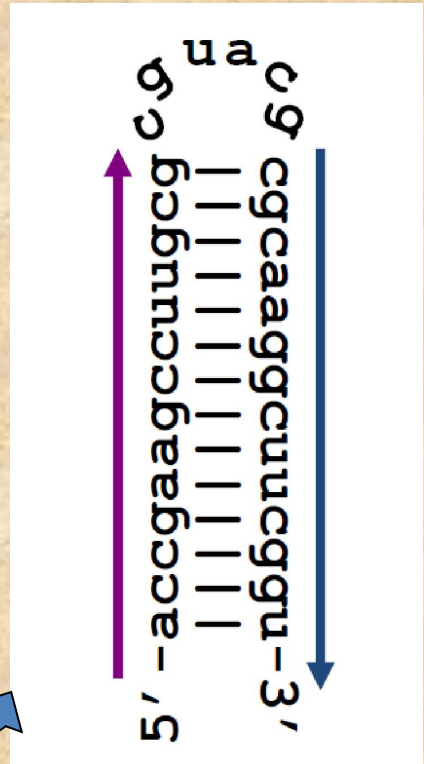
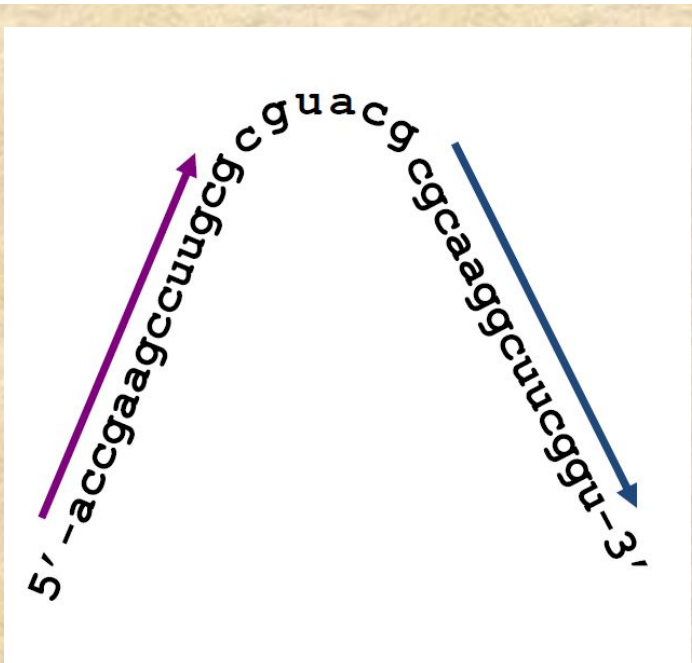
3. В РНК вместо тимина входит урацил, который отличается от тимина лишь тем, что у него отсутствует боковая метильная группа (-CH₃). Урацил – биосинтетический предшественник тимина.

4. Некоторые виды РНК имеют в своем составе большое число модифицированных оснований (сегодня известно около 100 различных модификаций). Например, молекулы тРНК содержат инозин, псевдоуридин, 7-метилгуанозин, 5-метилцитозин и др., что значительно увеличивает их стабильность и, соответственно, «продолжительность жизни».

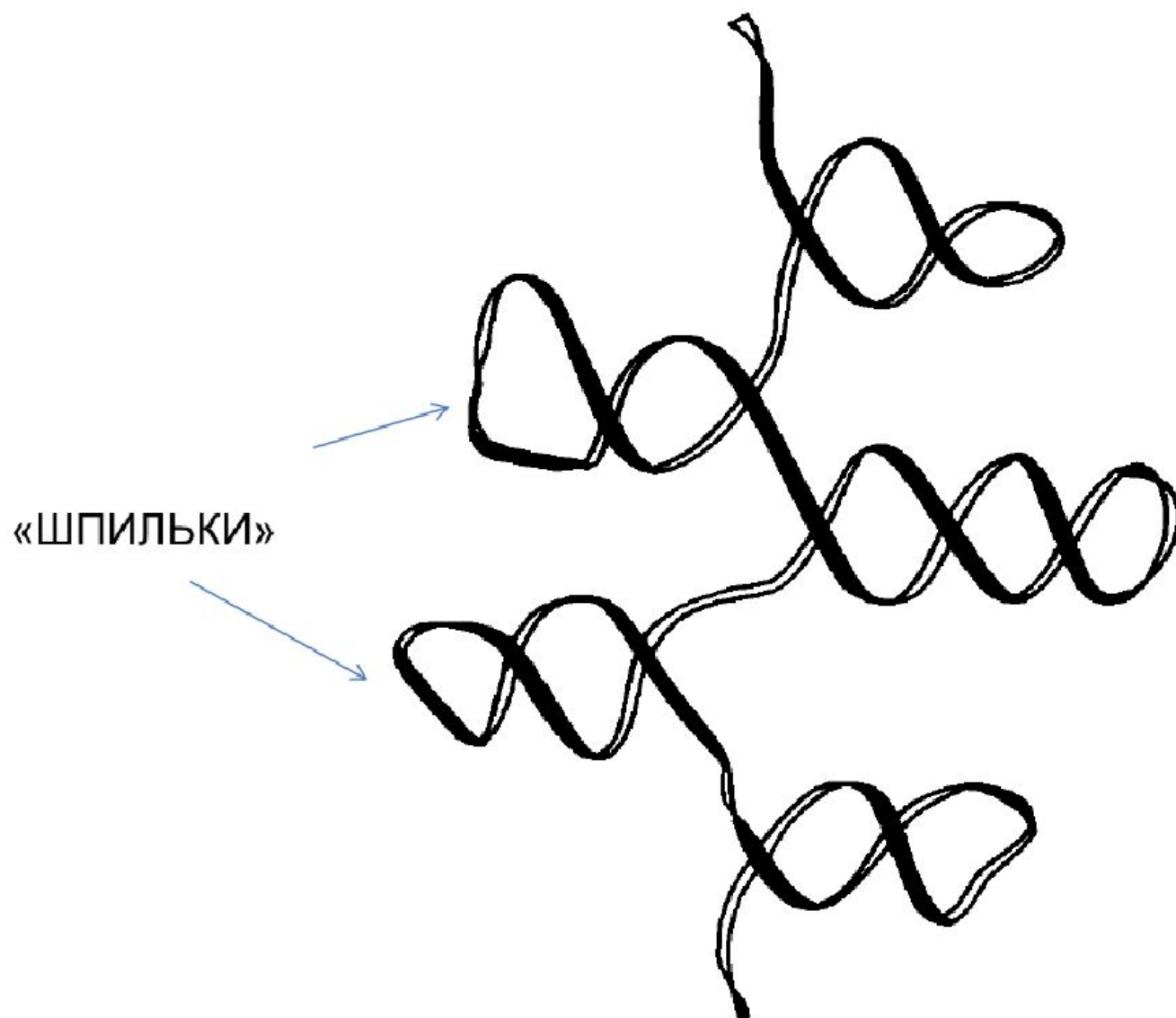
Однонитевая цепь



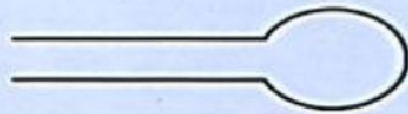
Шпилька



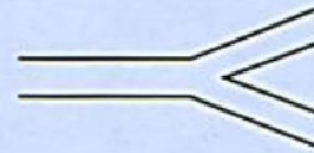
ОДНОЦЕПОЧЕЧНОСТЬ РНК И ФОРМИРОВАНИЕ КОРОТКИХ ДВОЙНЫХ СПИРАЛЕЙ ВНУТРИ ЦЕПИ



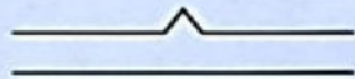
Структурные мотивы РНК



шпилька



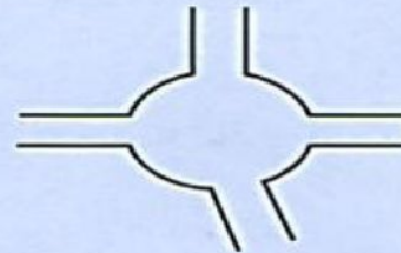
Y-образное
разветвление



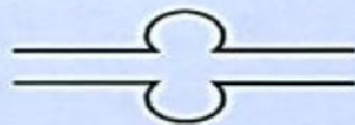
выпетливание
нуклеотида



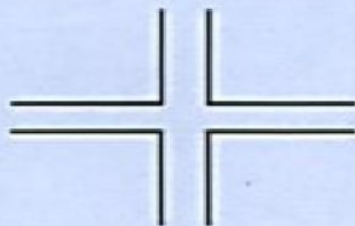
выпетливание
шпильки



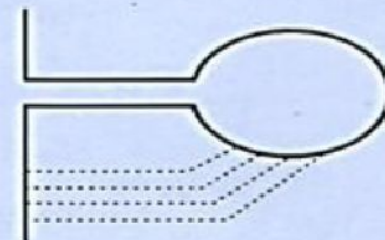
шпилька с
разветвлениями



выпетливание двух
шпилек

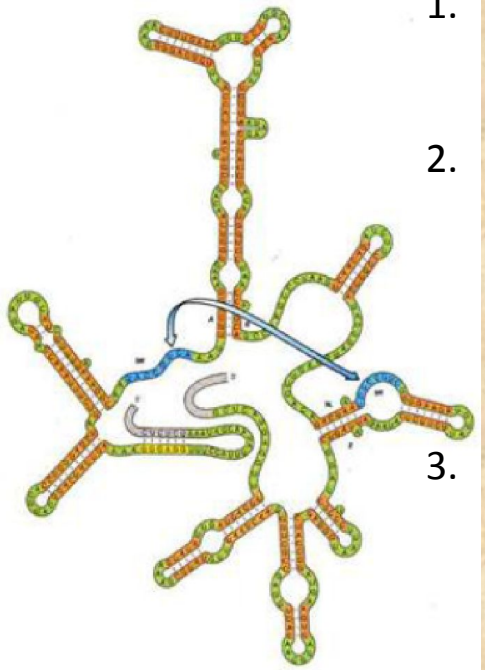


разветвление



псевдоузел

Помимо «шпильки» дуплексные участки РНК имеют вид структур типа "головки молотка", петель, крестов, клубков и др.

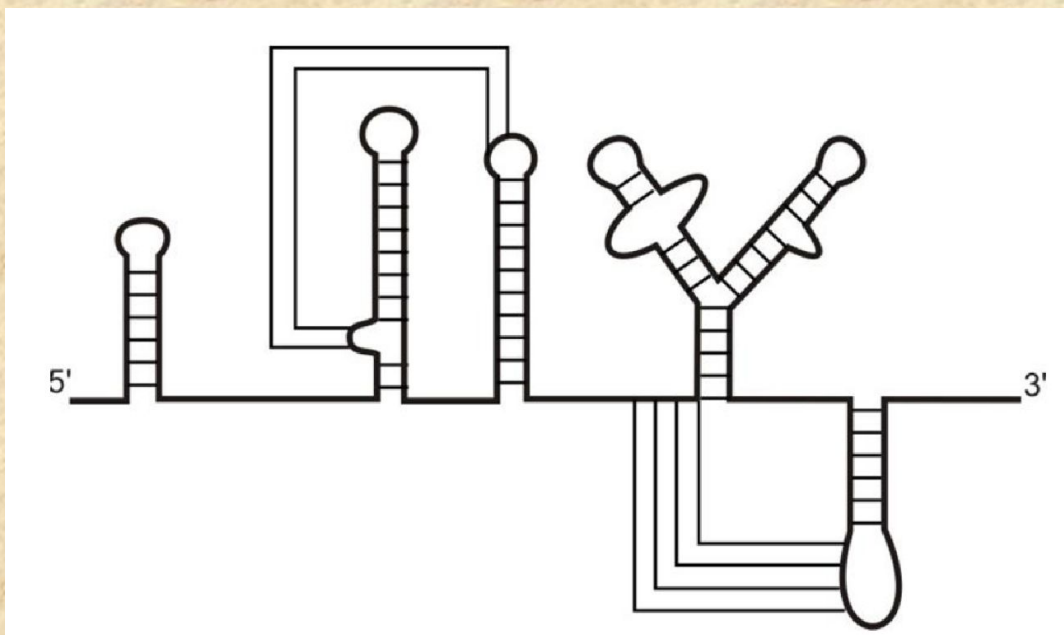


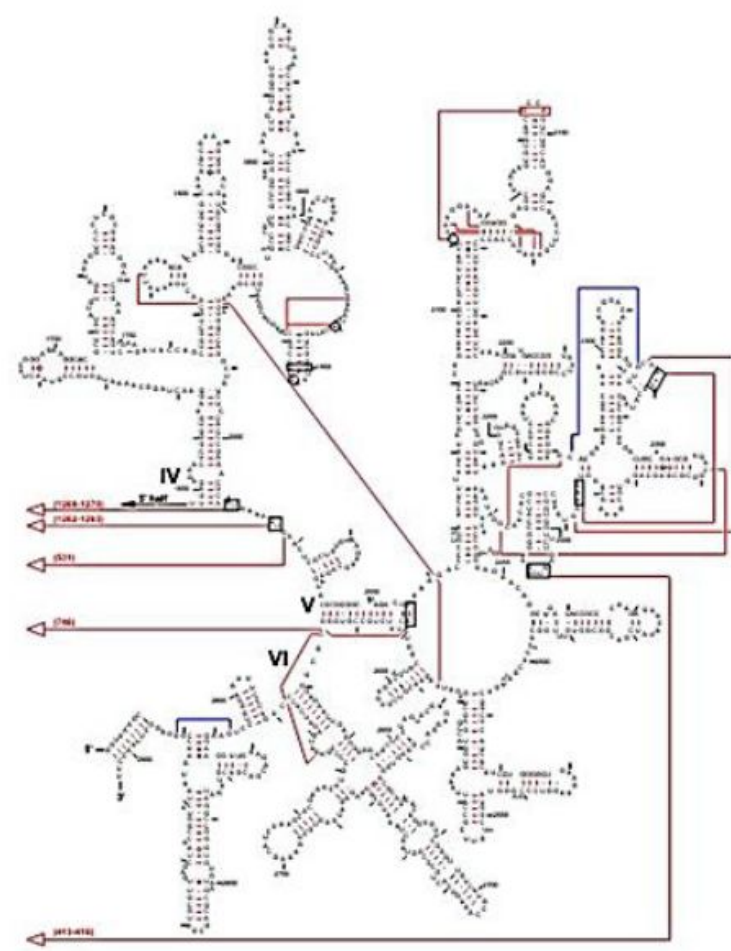
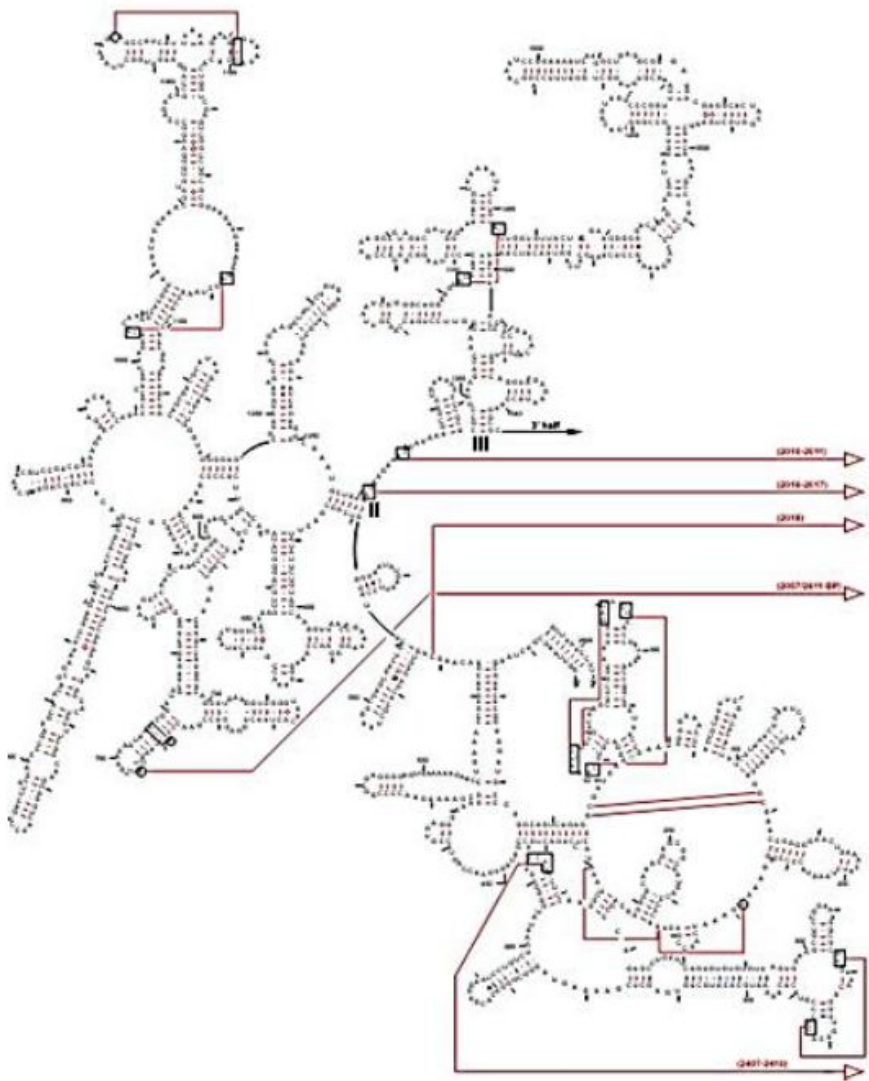
1. Ввиду того, что в С2' положении рибозы находится гидроксильная группа (напомним еще раз, что в ДНК там находится ион водорода), в дуплексных участках РНК образует А-форму двойной спирали.
2. Кроме того, С2'-ОН группа делает РНК не только более конформационно пластичной, но также обеспечивает способность образовывать дополнительные водородные связи (что делает возможным образование трехцепочечных участков) и дает возможность взаимодействовать не только с фосфорной кислотой, но и ионами металлов.
3. Благодаря наличию ОН-группы, РНК может атаковать другие фосфатные связи и их расщеплять. Примером тому служит молекула рибосомальной РНК простейшего организма *Tetrahymena*. Взаимодействие отдаленных друг от друга участков (на рисунке обозначены стрелками) приводит к формированию сложной трехмерной пространственной структуры, обладающей каталитической активностью.

Рис. 2. Молекула рРНК простейшего организма *Tetrahymena*. Видны двухцепочечные участки. Стрелками выделены области, обладающие ферментативной активностью

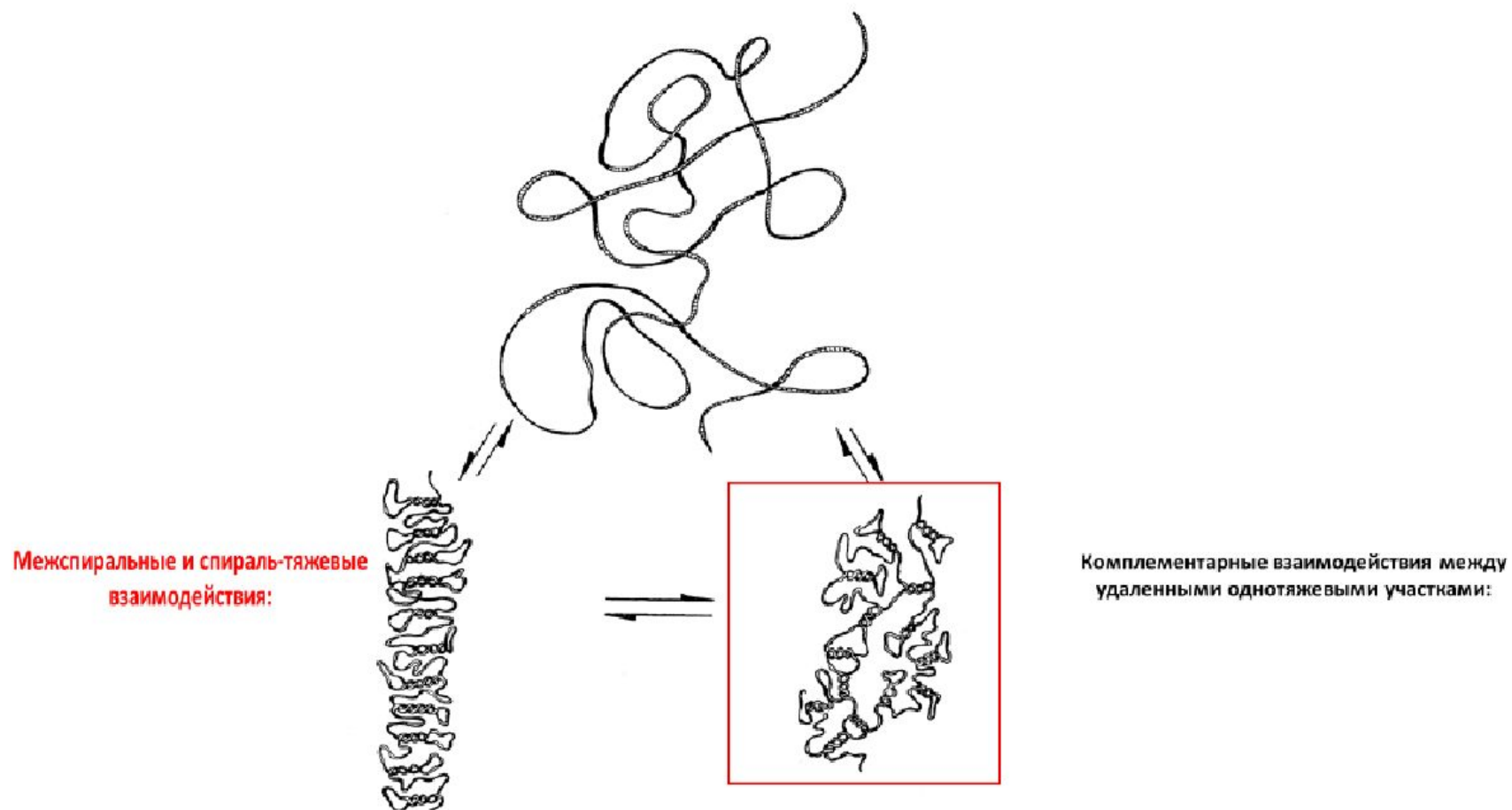
4. Способность молекулы РНК к формированию компактных структур, как и в случае белков, дает основу для специфического взаимодействия с другими макромолекулами. Сворачивание молекулы РНК в специфическую глобулу создает на ее поверхности уникальные пространственные узоры, которые обладают способностью к специфическому молекулярному узнаванию нужными молекулами (подобно белкам), а также обеспечивают высокоизбирательный катализ, на манер ферментативного катализа, свойственного белкам.

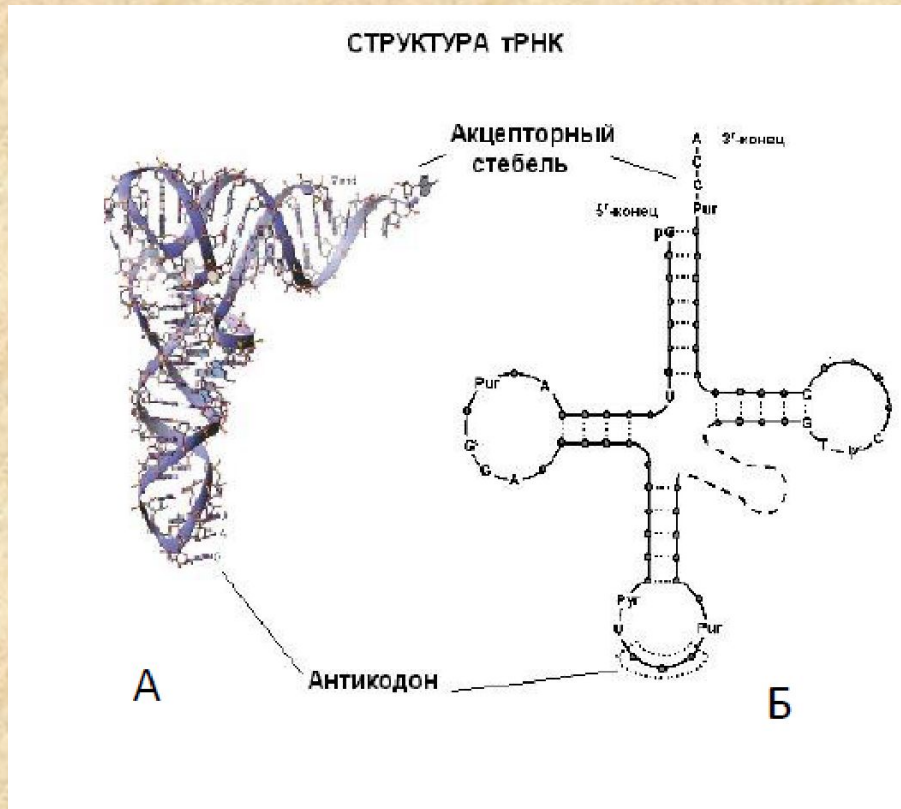
	А-форма	В-форма	Гибрид ДНК и РНК
Тип спирали (правая или левая)	Правозакрученная	Правозакрученная	Правозакрученная
Шаг спирали (Å)	28	34	28
Число оснований на виток	11	10	11
Диаметр молекулы (Å)	20	23	23
Угол наклона оснований относительно плоскости	20°	0°	20
Угол спирального обращения	32,7°	36°	32,7°





КОМПАКТНОЕ СВОРАЧИВАНИЕ ВЫСОКОПОЛИМЕРНОЙ РНК





Впервые образование таких сложных компактных структур обладающих уникальной способностью «узнавать» другие молекулы было описано на примере тРНК . Была получена картина компактного глобулярного ядра, сформированного тРНК , из которого под прямым углом торчат два выступа, один из которых – акцепторный участок тРНК (3 ' - конец) для присоединения аминокислоты, а другой – антикодоновая петля, предназначенная для комплементарного взаимодействия с мРНК . Только такая компактная структура является биологически активной и обладает способностью специфически взаимодействовать с ферментом аминоксил -тРНК - синтетазой , навешивающей аминокислоту на тРНК , а также с рибосомой в процессе трансляции .

Транспортная РНК (тРНК)

Транспортная РНК (тРНК) переносит аминокислоты к рибосомам, где они соединяются пептидными связями в определенной последовательности, которую задает мРНК

Назначение тРНК в клетках – транспорт аминокислот на рибосомы. На долю тРНК приходится около 10-15% общего количества клеточной РНК. Молекулы тРНК в некотором смысле пионеры среди нуклеиновых кислот. Из-за сравнительно небольших размеров (от 74 до 95 нуклеотидов), они ранее других раскрыли исследователям секреты своего строения. Впервые нуклеотидная последовательность молекулы тРНК – дрожжевой аланиновой-тРНК – была расшифрована в 1965 году в лаборатории **Роберта Холли**. С тех пор были опубликованы данные о нуклеотидной последовательности (называемой первичной структурой) более чем 1700 видов тРНК из различных



тРНК

Для всех молекул тРНК характерно присутствие большого числа (до 25%) разнообразных модифицированных нуклеотидов, часто называемых минорными. Они находятся в различных местах молекул, во многих случаях четко определенных, в результате модификации обычных нуклеотидов с помощью специальных ферментов. Общий список выявленных в тРНК модифицированных нуклеотидов превышает 60 названий. Среди них большое количество метилированных производных, часто встречаются псевдоуридин (5-рибофуранозилурацил), 5,6-дигидроуридин, 4-тиоуридин, инозин и многие другие. Все тРНК имеют одинаковый 3'-конец, построенный из двух остатков цитозина и одного – аденозина (ССА-конец).

Все тРНК имеют общие черты, как в их первичной структуре, так и в способе складывания молекулы тРНК во вторичную структуру – клеверного листа. Анализ нуклеотидной последовательности тРНК выявил возможность складывания цепи во вторичную структуру за счет комплементарного взаимодействия нуклеотидов. Кроме того, 5'-конец комплементарен участку, близкому к 3'-концу цепи, при их антипараллельном расположении; они формируют так называемый акцепторный стебель. В результате образуется структура, содержащая четыре стебля и три петли, которая получила название "клеверного листа".

Пространственная структура одноцепочечных тРНК



РНК – длинные одноцепочечные полирибонуклеотида

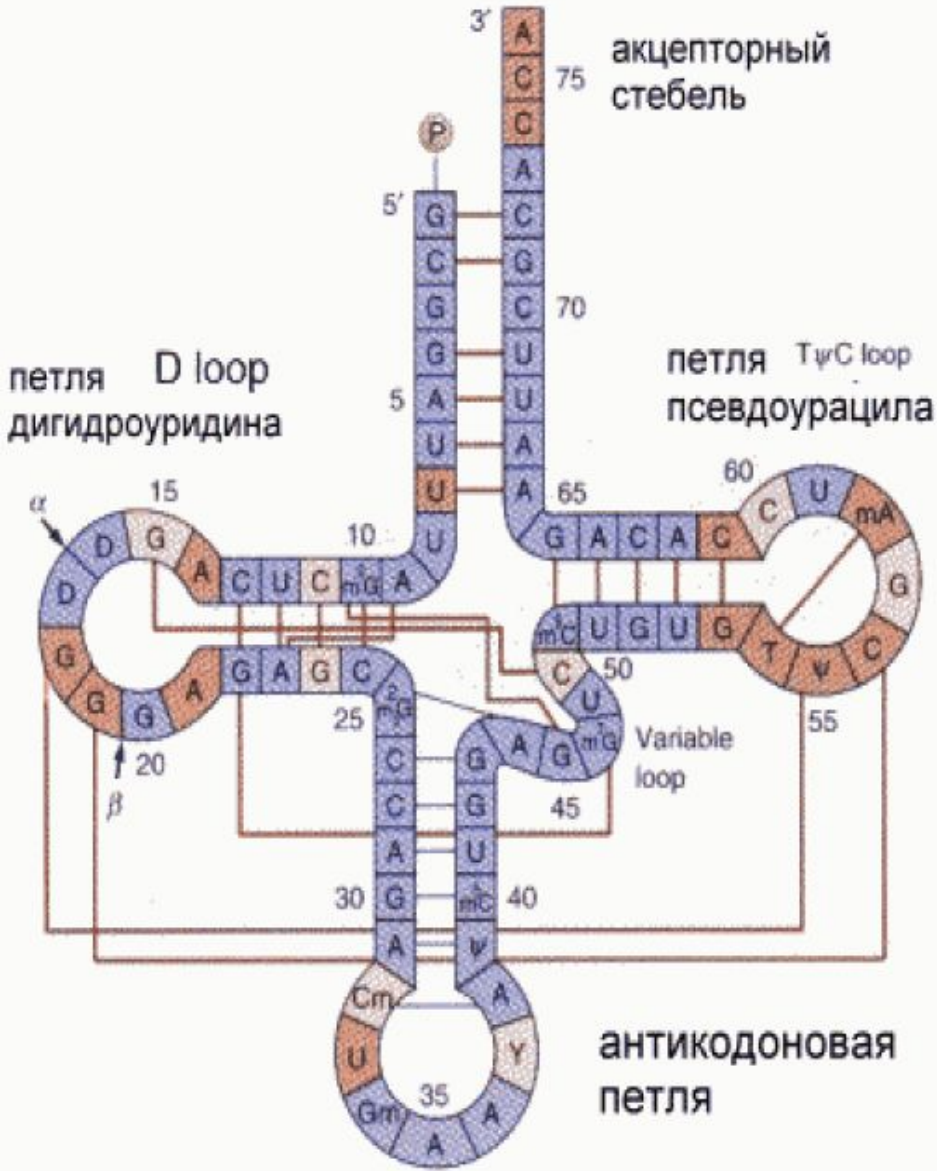
тРНК – молекулы из ~ 100 рибонуклеотидов – участвует в биосинтезе белка

3Д структура тРНК фен определена методом рентгеноструктурного анализа монокристаллов [A.Rich, M.Sundaralingam, A.Klug 1974-75]

Вторичная структура – распределение структур рибозофосфатного скелета вдоль цепи.

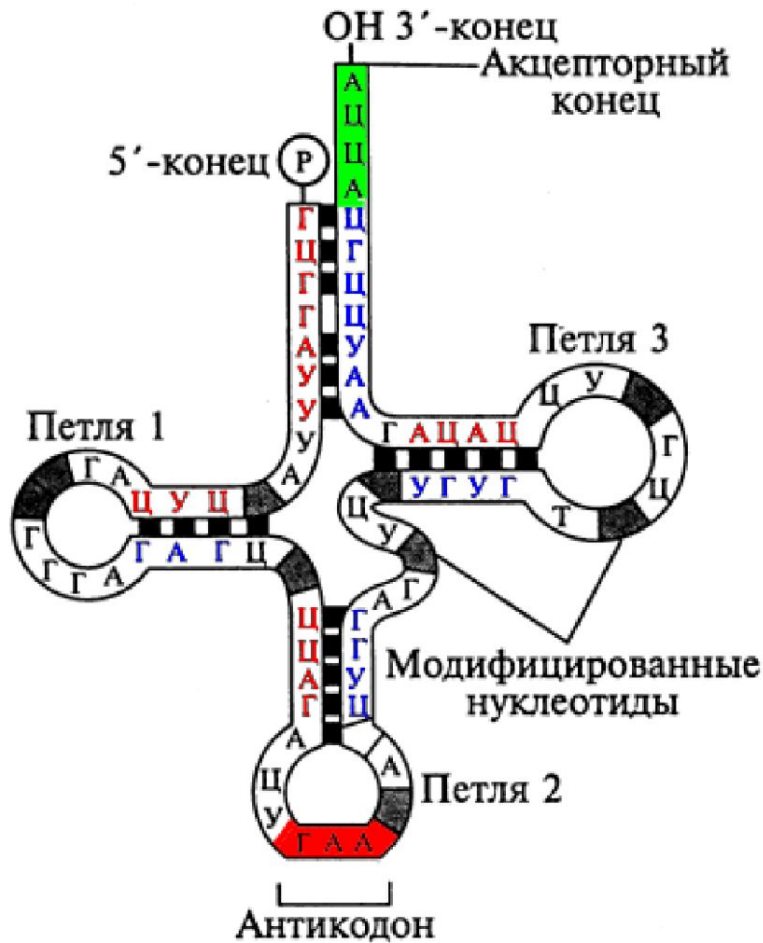
Третичная структура – 3Д структура тРНК – фен - вторичная структура - клеверный лист

тРНК



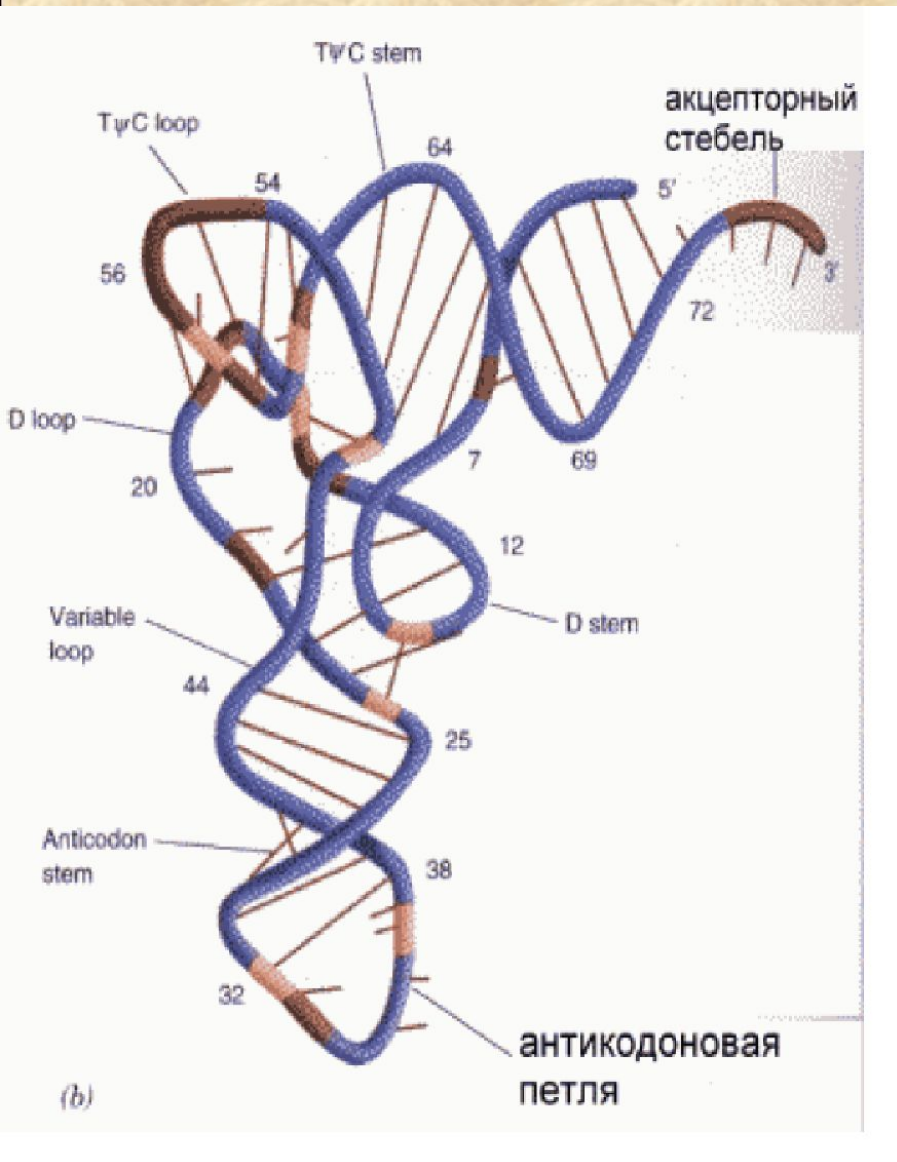
Внизу расположена антикодоновая петля, содержащая триплет (антикодон), специфичный и комплементарный к соответствующему кодону на мРНК, причем оба они являются антипараллельными в своей комплементарности. Слева от нее расположена D-петля (дигидроуридиловая), названная из-за присутствия в ней необычных модифицированных оснований – дигидроуридинов. Эта петля необходима для узнавания специфическим ферментом – аминоацил-тРНК-синтетазой. Справа находится T-петля, соответственно, названная так из-за присутствия в ней тимидина, псевдоуридина и цитидина. Функция ее – связывание нагруженной аминокислотой тРНК с поверхностью рибосомы.

тРНК



Изображение тРНК в виде клеверного листа на плоскости имеет такое же отношение к реальной пространственной структуре молекулы, как развертка куба, изображенная на листе бумаги, к трехмерному кубу. Впервые трехмерная структура тРНК была установлена в 1974 г. для дрожжевой тРНК с помощью рентгеноструктурного анализа. С тех пор удалось закристаллизовать и расшифровать пространственную структуру еще почти десятка тРНК

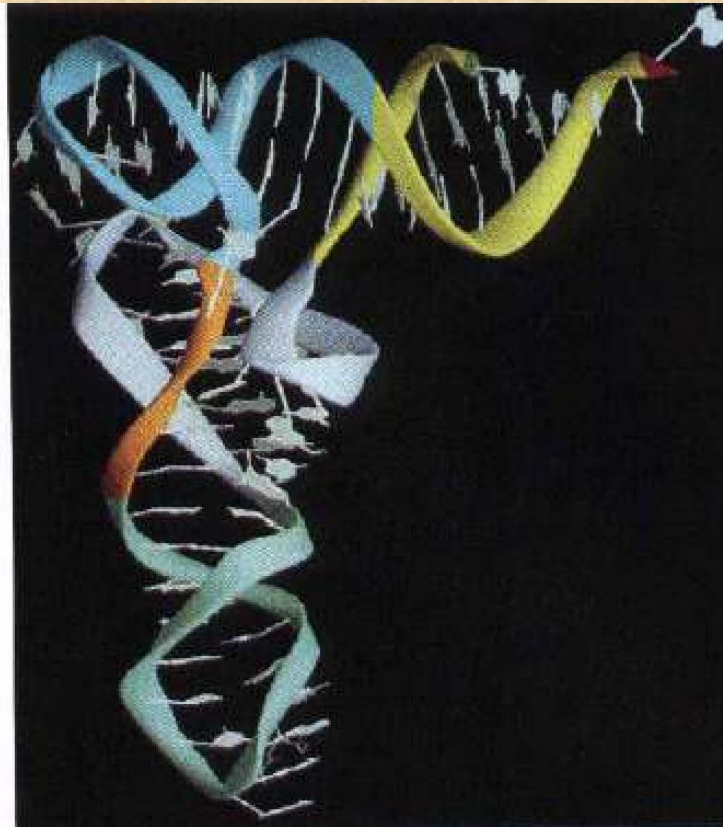
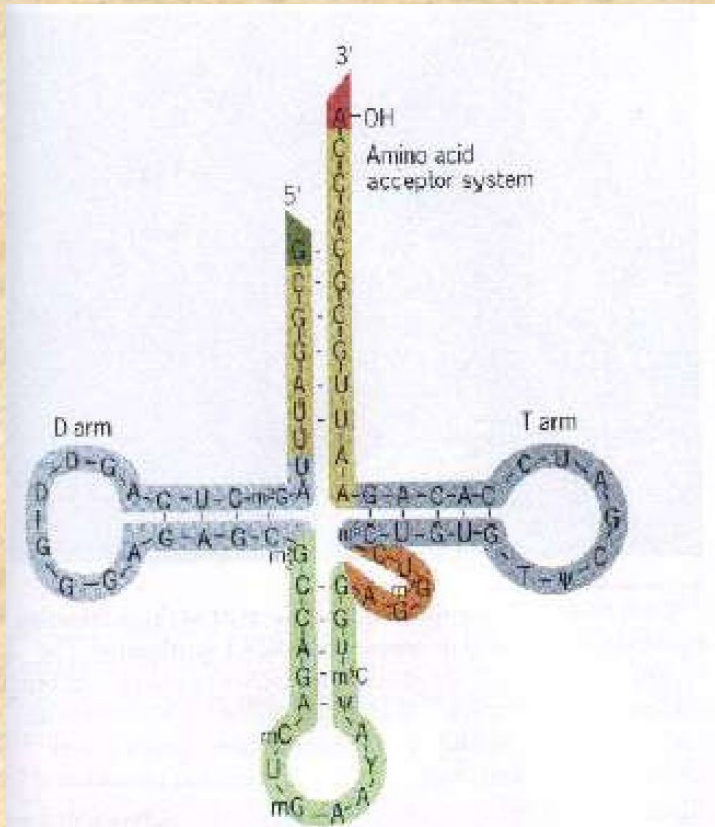
тРНК



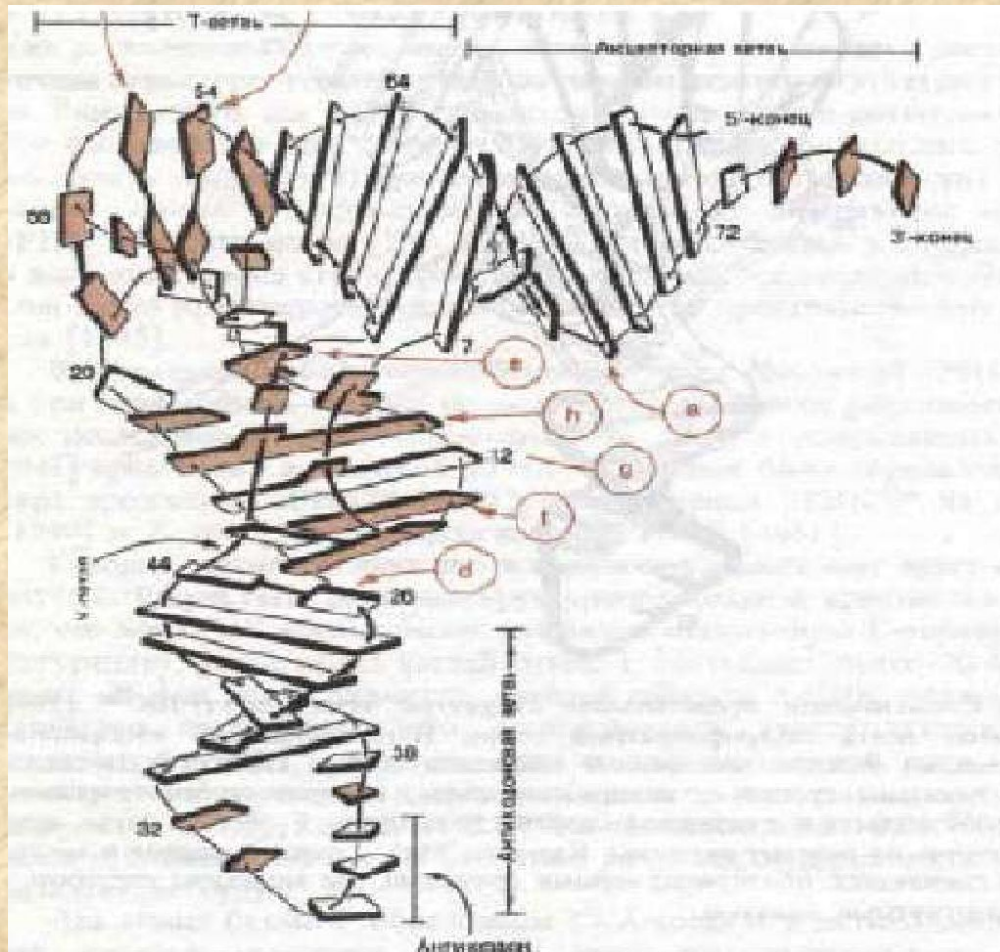
Общие принципы сворачивания цепей различных тРНК в компактную третичную структуру оказались универсальными. За счет взаимодействия элементов вторичной структуры формируется третичная структура, которая получила название L-формы из-за сходства с латинской буквой L. При этом D- и T-петли оказываются сближенными и скрепляются между собой путем образования дополнительных, часто необычных пар оснований. ССА-конец тРНК и ее антикодоновый триплет находятся на максимальном удалении один от другого (расстояние около 8 нм), причем основания антикодона обращены внутрь угла L-образной молекулы.

ЗД – структура - L - образная форма

- два двух-цепочечных домена под углом 90



Вторичная и третичная структуры тРНК кодированы одним цветом



Инвариантные основания (по серии тРНК) – **выделены.**

Взаимодействие оснований петель Обеспечивает стабилизацию третичной структуры:

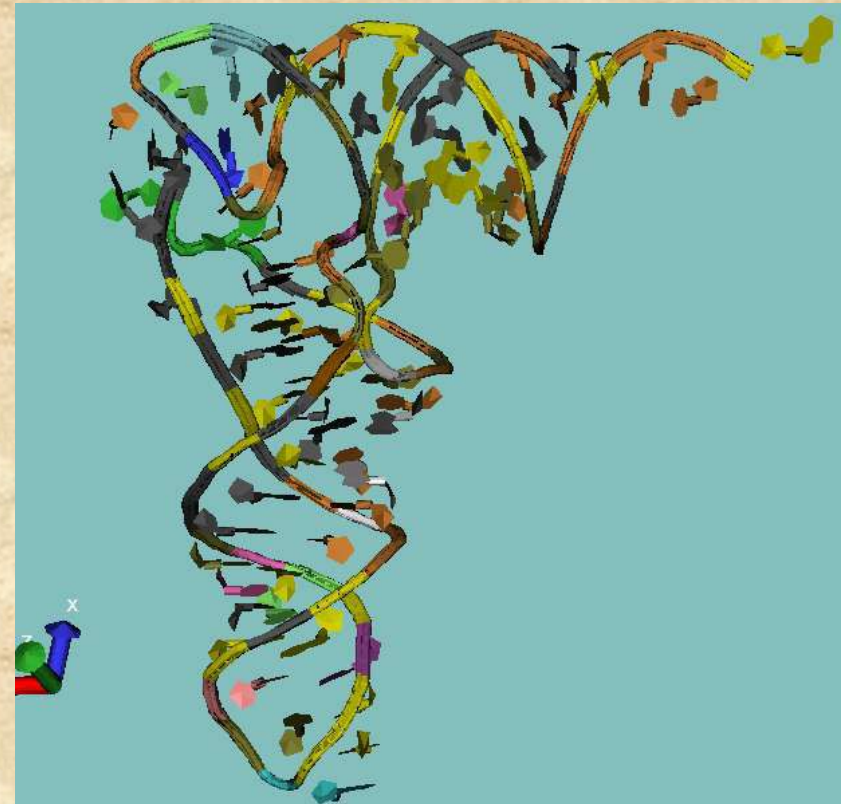
- неканонические копланарные взаимодействия **пар оснований** и
- **триплетов** оснований

Принципы пространственного строения одноцепочечных РНК, основные энергетические детерминанты структуры

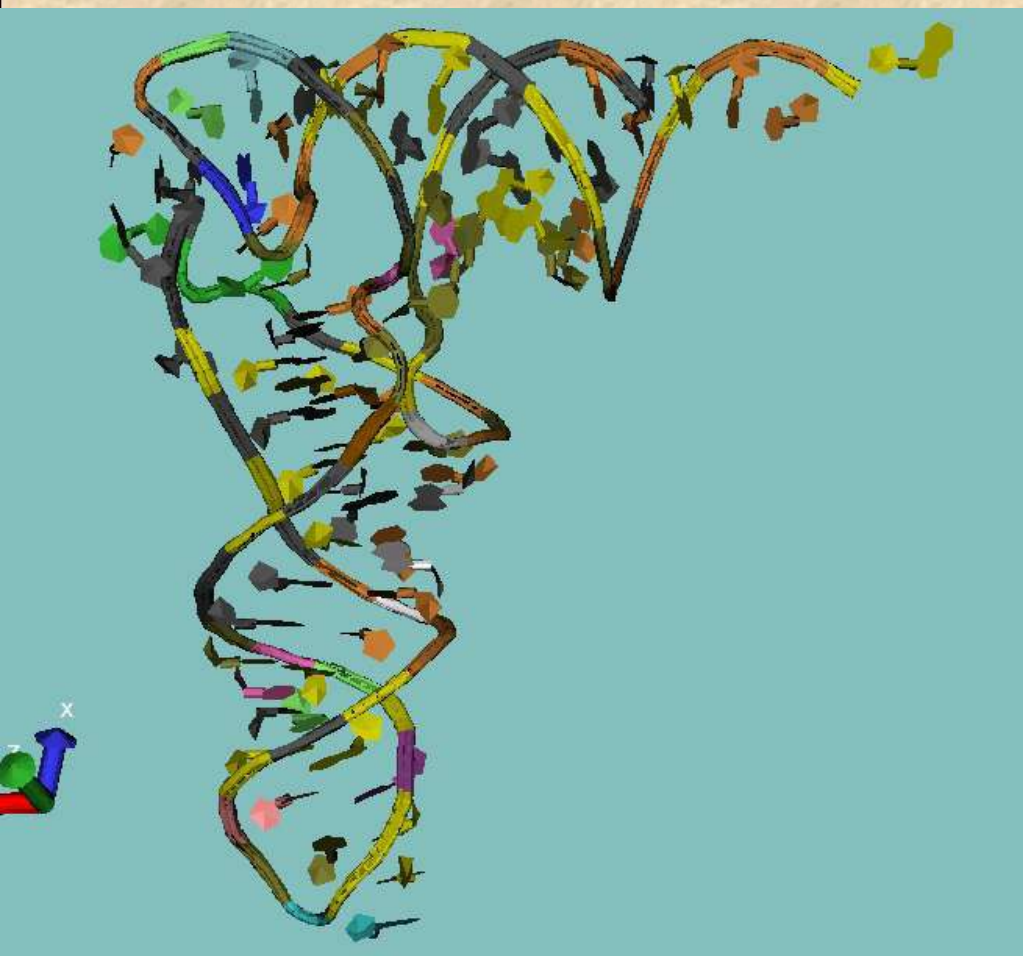
- **копланарные взаимодействия пар оснований**
- - канонические У-Криковские в двухспиральных стеблях
- - образование триплетов оснований X с Уотсон-Криковской парой
 $X \cdot W = C : A9 \cdot A23 - U12 , G46 \cdot G22 - C13$
в переходной области между Д-стеблем и акцепторным стеблем
- - неканонические, Хугстиновские пары в области петель

- сильная развитость неканонических копланарных взаимодействий для оснований в петлевых областях:

- 4 основания из 5 в вариательной петле,
- 4 основания Д-петли,
- 4 основания Т-петли, вовлечены в копланарные взаимодействия с 2-мя Н-связями



СТОПОЧНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОСНОВАНИЙ



- развитая система стопочных взаимодействий оснований, часто более

эффективные стопочные взаимодействия чем в двойной спирали

- практически все основания вдоль цепи находятся в стопочном взаимодействии с соседними по цепи основаниями

- **интеркаляция** основания удаленного по цепи в пространство между

соседними основаниями для оптимизации стопочных взаимодействий

Основание G18 интеркалирует между G57 и A58. Основание G57 интеркалирует между G18 и G19 Д-петли. Получаются хорошие стопочные взаимодействия в системе G19 G57 G18 A58

- В пространственной структуре тРНК находят подтверждение
- основные принципы строения 3Д структуры нуклеиновых кислот –
- - локальные конформации нуклеотидов близки к оптимальной
- канонической для 85% нуклеотидов, остальные 15% находятся в
- одной из более напряженной канонической конформации –
- согласованность локальных и дальних по цепи взаимодействий
- - насыщенность **копланарными** взаимодействиями оснований
- - максимальное развитие **стопочных взаимодействий**,
формирование
- локальных структур коротких одноцепочечных участков, которые
- способны взаимодействовать между собой путем
- **взаимной интеркаляции**,

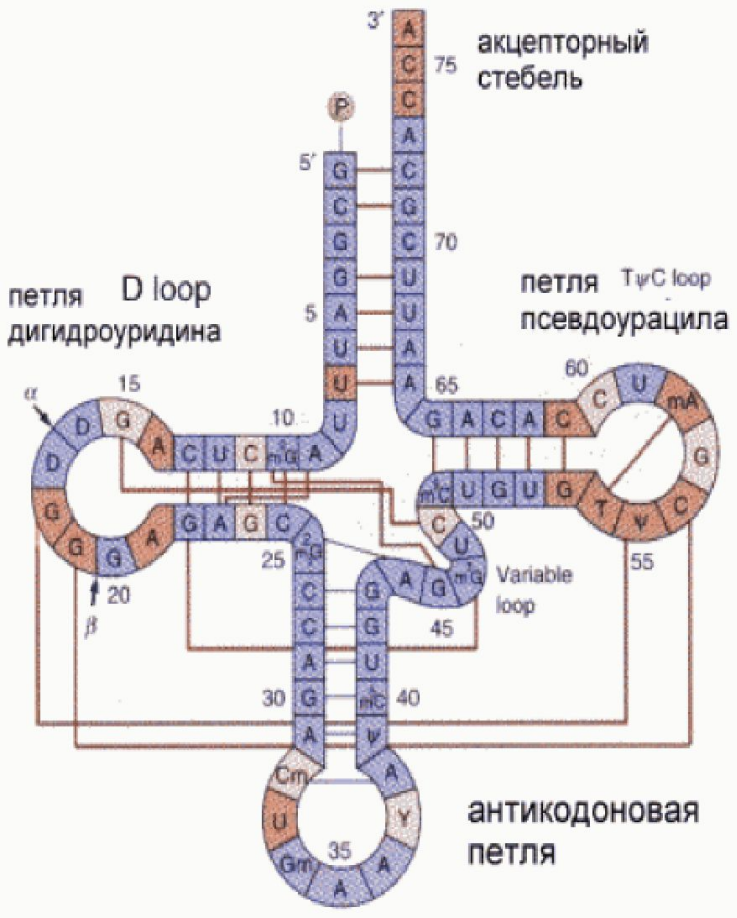
Функции тРНК

1. Акцепторная функция. Процесс аминоацилирования тРНК.

2. Адапторная функция. Адапторная функция тРНК заключается в том, что она выполняет роль посредника при переводе смысла, записанного в виде последовательности нуклеотидов в мРНК на «язык» белков (последовательность аминокислот в белке).

В соответствии со специализацией тРНК – переносом аминокислот на рибосомы в процессе биосинтеза белка, различают две ее основные функции: акцепторную – способность ковалентно связываться с аминокислотой с помощью ферментативной реакции, осуществляемой аминоацил-тРНК-синтетазой, и адапторную – способность узнавать триплет на мРНК и обеспечивать поступление аминокислоты на законное место в растущей цепи белка. Некоторые тРНК выполняют также другие функции в метаболизме клетки, в частности, принимая участие в биосинтезе клеточной стенки, хлорофилла и гема и выступая в роли затравки при синтезе ДНК по матрице РНК у ретровирусов (в том числе вируса иммунодефицита человека)

На сегодняшний день ученые знают набор нуклеотидов, существенных для аминокислотирования "своих" тРНК аминокислот-тРНК-синтетазой. Этот набор выглядит следующим образом:



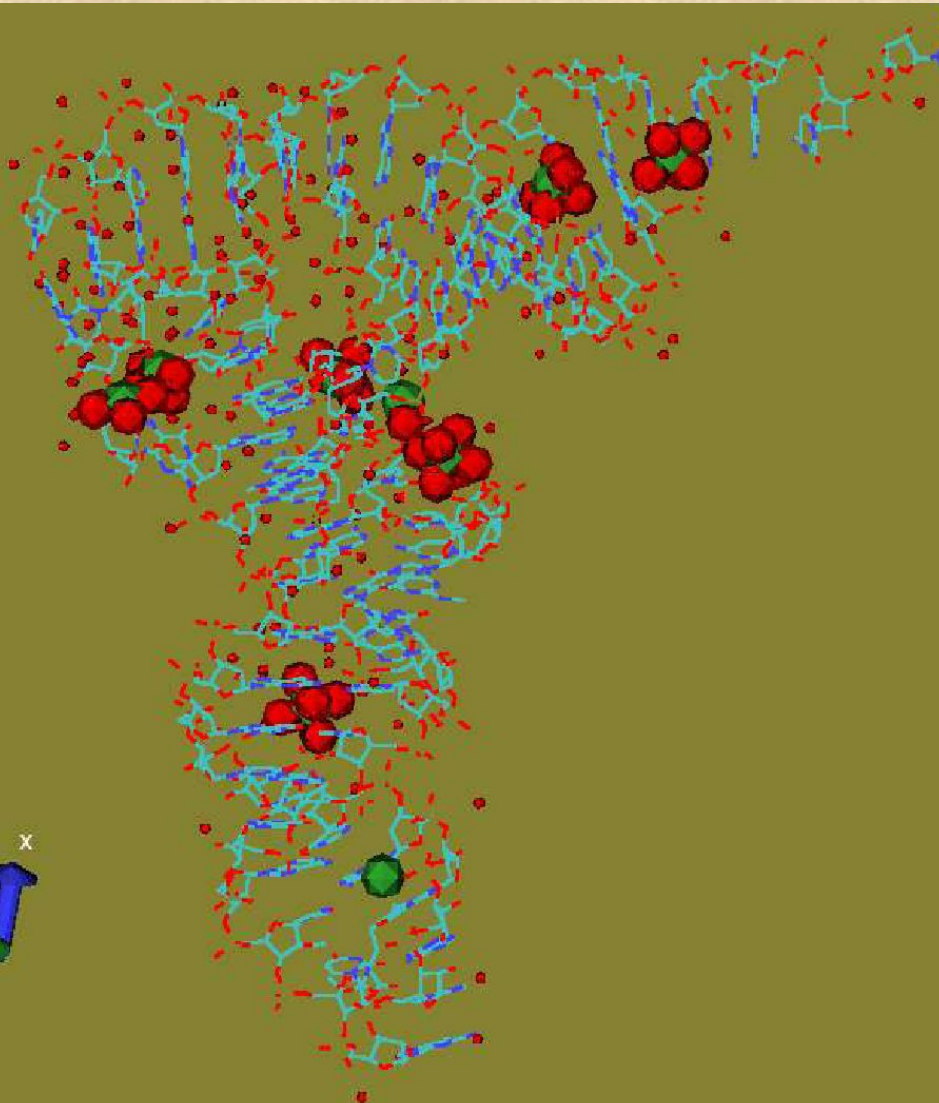
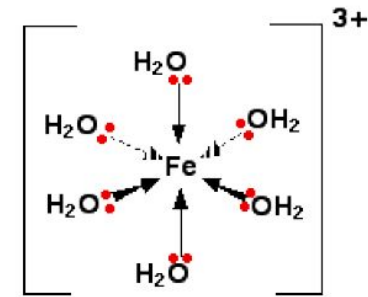
1. Антикодоновый участок (нуклеотиды 34–36).
2. Нуклеотид 73, предшествующий CCA-концу. Присутствие в этом положении того или другого пуринового нуклеотида (А или G) коррелирует с типом аминокислот, присоединяемых к тРНК. Если в этом положении находится А, то тРНК акцептирует гидрофобные аминокислоты, а если G – то полярные.
3. Первые три пары нуклеотидов акцепторного участка. В разных случаях в узнавании аминокислот-тРНК-синтетазой может вовлекаться от одной до трех пар нуклеотидов акцепторного участка.

4. В случае некоторых тРНК к элементам узнавания относят также отдельные модифицированные нуклеотиды D- и T-петель (в первую очередь, 20-й нуклеотид D-петли).

Взаимодействие нуклеиновых кислот с водой и противоионами.

Кристаллическая вода и ионы Mg^{+2} связанные с тРНК-фен

дистанция $Fe - O \sim 2.3$
А характерна для ионов Mg^{+2} , Mn^{+2} , Na^{+}
 $\sim 2.2 - 2.4$ А



Взаимодействие гидратированного иона с РНК, ДНК

- **комплекс внешней сферы**
ион не теряет своей гидратной оболочки воды ,
взаимодействие с гидрофильными атомами ДНК осуществляется через воду гидратной оболочки иона
- **слабая связь – иона с НК**
- **комплекс внутренней сферы,**
атомы O, N из химических групп НК или аминокислот белка,
замещает одну (или несколько) молекул воды из гидратной оболочки иона
- **сильная связь – иона с НК**

Закономерности гидратации РНК

- - основания расположены во внутренней части молекулы, **заряженный сахарофосфатный остов формирует гидрофильную поверхность молекулы**
- - Большая концентрация зарядов фосфатных групп в нерегулярной структуре тРНК нейтрализуется противоионами и двухвалентными
- **ионами Mg^{+2}**
- - **ионы Mg^{+2}** связаны в центральной части молекулы и координируют фосфорильные кислороды соседних фосфатных групп
- - одновалентные ионы мобильны при $T=300K$, т.е. комнатной температуре

Уменьшение концентрации соли ниже 0.1 М приводит к разрушению нативной структуры тРНК

Гидратация ДНК

В- форма наиболее устойчива в водном растворе.

При дегидратации $RH < 92\%$ или объемной концентрации спирта в воде выше 70-75%, В-форма переходит в А-форму. При дегидратации ниже $RH = 75\%$, начинается разрушение регулярной структуры А-ДНК, полностью разупорядочивается при $RH = 55\%$, отсутствует дифракционная картина.

- Экспериментальными методами показано, что фосфорильные кислороды – это наиболее гидратированные места ДНК. В среднем на фосфатную группу приходится 2 молекулы воды.

- Далее по способности гидратации идут:

Атомы кислорода (фосфодиэфирные) P-O-C и рибозы C-O-C

- атомы N,O оснований выходящие в малую и большую бороздки.

Хорошо организованная структура ДНК при $RH > 75\%$ имеет 4,5 молекул воды гидратирующих каждую пару оснований. Вода заполняет монослоем малую и большую бороздки ДНК при $RH \sim 75\%$, образуя структурированную сетку H-связей

Далее накапливается в бороздках как менее структурированная, объемная вода.

АТ пары гидратируются сильнее чем GC пары.

АТ пары способны формировать водные мостики между $N3(A)...W...O2(T)$ соседних пар оснований. Поэтому поли(A)*поли(T) последовательности или тракты более устойчивы в В-форме, остаются в В-форме при большем высушивании, чем GC последовательности

Взаимодействие ионов с ДНК

Теория конденсации –

- вокруг полиона ДНК формируется слой мобильных гидратированных однозарядных ионов в слое $\sim 7 \text{ \AA}$. Концентрация ионов в этом слое относительно независима от объемной концентрации ионов. Ионы поверхностного слоя нейтрализуют $\sim 76\%$ заряда фосфатных групп.

- мобильные ионы производят электростатическое дебаевское экранирование электростатических взаимодействий фосфат-фосфат и увеличивают изгибные флуктуации оси ДНК и способность к суперспирализации ДНК.

Электростатический потенциал ДНК

Наиболее сильный в малой бороздке – между двумя нитями PO₄⁻ групп

Atom	EP, kcal/mol	SAS, Å ²
G: N3	-670.0	0.05
N7	-686.0	4.1
O6	-654.0	2.7
C8	-630.0	1.0
C: O2	-645.0	0.16
N4	-602.0	0.19
C5	-569.0	0.32
A: N3	-668.0	0.7
N7	-650.0	2.6
C8	-610.0	0.9
T: O2	-663.0	0.9
O4	-612.0	2.2
PO4- : O1	-609.0	9.1
O2	-609.0	4.2
O3'		0.0
O5'		1.9

Белково-нуклеиновые взаимодействия.

Принципы взаимодействия ДНК с глобулярными белками

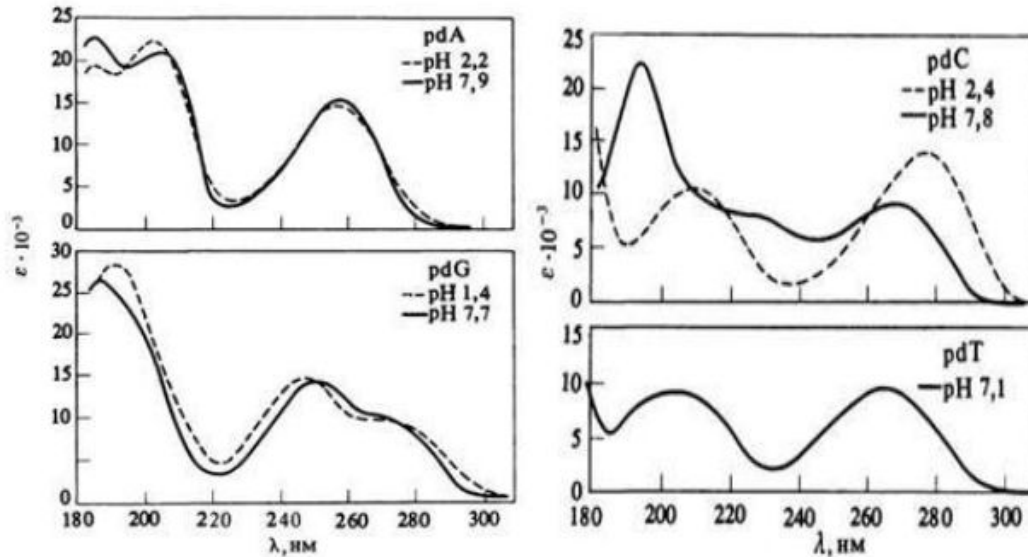
- 1. **Солевые мостики** PO_4^- - с основными (+) группами аминокислот
- 2. **Водородные связи** атомы НК – атомы аминокислот – множество возможностей
- 3. **Столпчатые взаимодействия** ароматических боковых групп аминокислот с нуклеиновыми основаниями
- 4. **Ван дер Ваальсовы и гидрофобные взаимодействия**

Химические свойства

- ДНК и РНК - нуклеиновые кислоты, кислоты, слабые, но кислоты
- Молекулы нуклеиновых кислот содержат множество отрицательно заряженных фосфатных групп и образуют комплексы с ионами металлов; их калиевая и натриевая соли хорошо растворимы в воде.
- 2' гидроксил делает РНК уязвимой к щелочному и кислотному гидролизу
- Концентрированные растворы нуклеиновых кислот очень вязкие и слегка опалесцируют, а в твердом виде эти вещества белые.
- Нуклеиновые кислоты сильно поглощают ультрафиолетовый свет, и это свойство лежит в основе определения их концентрации. С этим же свойством связан и мутагенный эффект ультрафиолетового света.

Оптические свойства ДНК

- Поглощение нуклеиновых кислот в ближней УФ-области почти целиком обязано пуриновым и пиримидиновым основаниям.
- Сахарофосфатный остов РНК и ДНК дает незначительный вклад в спектр поглощения при длинах волн, превышающих 200 нм.



- Спектры всех четырех нуклеозидов чувствительны к рН. Протонирование С и G приводит к значительному сдвигу поглощения в сторону больших длин волн (красное смещение). Депротонирование U или T при щелочных рН также приводит к существенному красному смещению максимума поглощения. Протонирование А сопровождается гораздо меньшими спектральными изменениями.

Оптические свойства ДНК

- Наиболее часто измерения поглощения проводят для определения концентрации.
- Это можно делать, если известен коэффициент молярной экстинкции и соблюдается закон Ламберта-Бера. Например, для двухцепочечной ДНК $D_{260}=1$ соответствует 50 мкг/мл, для РНК – 40.

Молекулярный коэффициент экстинкции.

OD - единица измерения количества олигонуклеотидов, соответствует количеству, которое в 1ml на пути 1см дает $A_{260}=1$

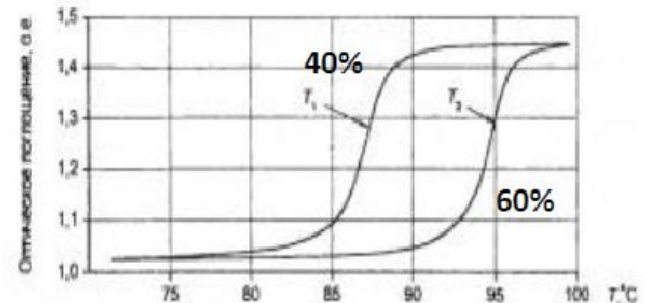
$C [\mu\text{mol/ml}] = OD/E$ олигонуклеотида
 E олигонуклеотида = сумма всех (Енуклеотидов)

	$E [\text{ml}/\mu\text{mol}]$
dG	7
dC	12
dA	16
dT	9,6
dN	10,8

Плавление ДНК

Денатурация или **плавление** - расхождение цепей ДНК при нагревании ДНК или при повышении pH.

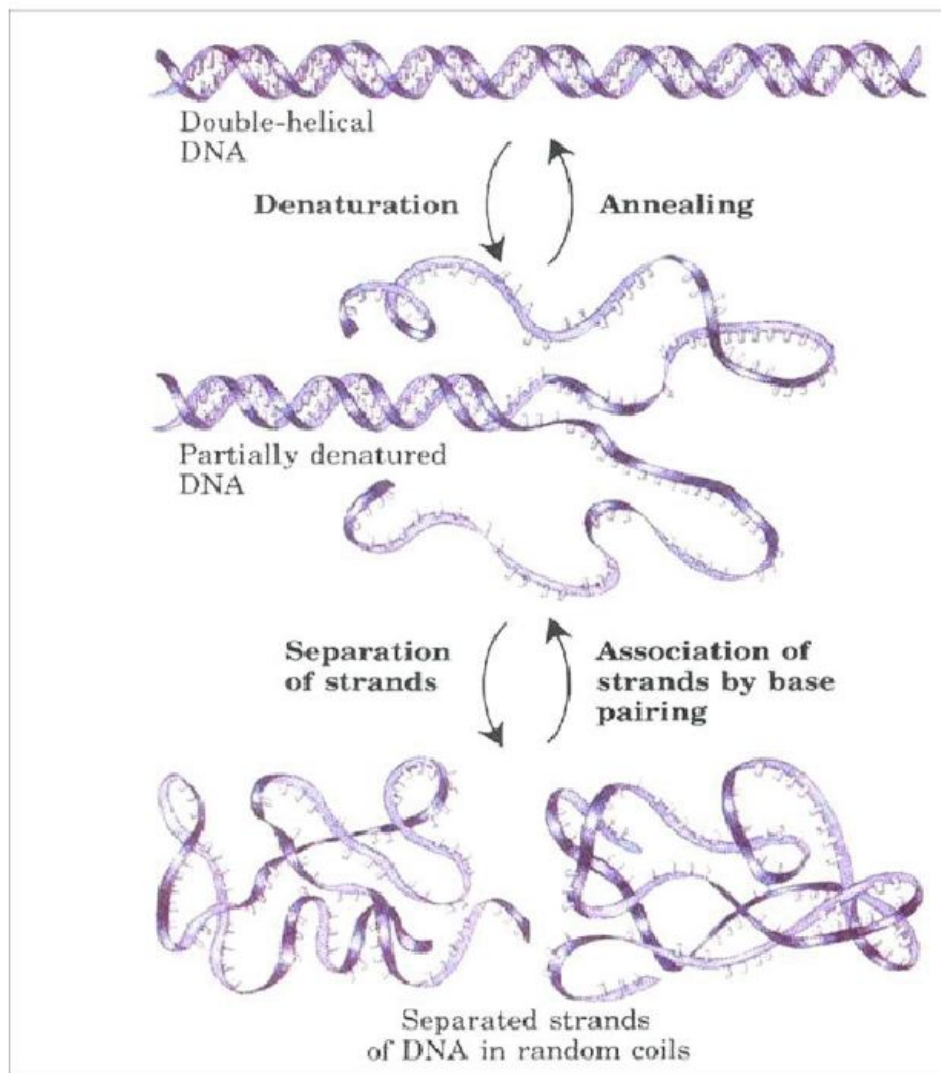
- Расхождение цепей происходит из-за разрушения слабых водородных связей и плоскостных взаимодействий между основаниями.
- На денатурацию также влияют: ионы одно- и двухвалентных металлов, белки, нейтрализующие отрицательные заряды фосфатных групп.
- Температура плавления GC выше чем AT.



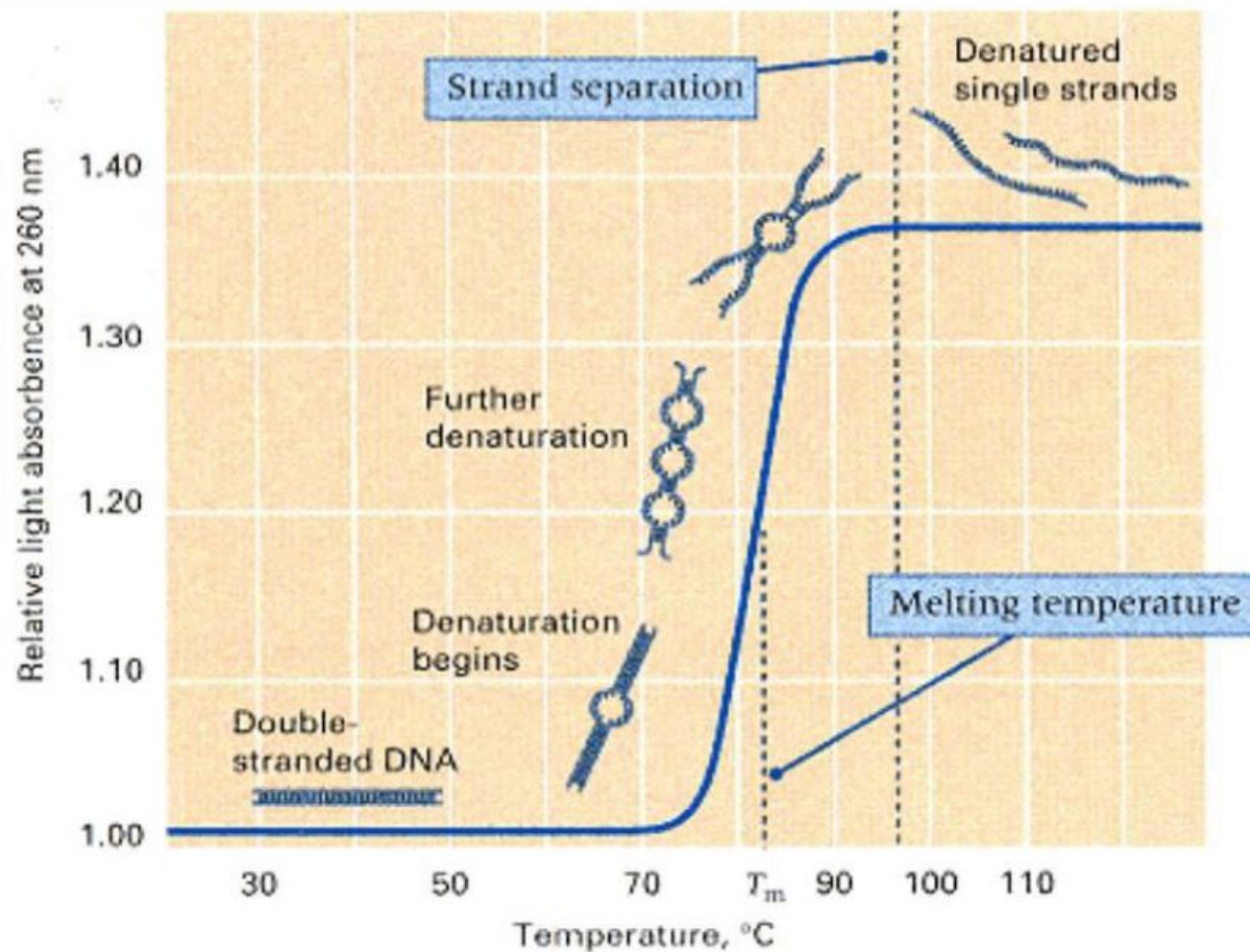
- Денатурация – процесс обратимый, последующее восстановление двухцепочечной структуры ДНК может происходить даже при полном расхождении цепей. Процесс воссоединения, называемый **ренатурацией**, **реассоциацией** или **отжигом**, происходит при
 - понижении температуры или pH
 - При резком понижении температуры или pH правильное воссоединение комплементарных цепей затрудняется из-за спаривания оснований локально комплементарных участков в пределах одной или разных цепей.
 - При ренатурации сначала соединяются участки цепей с повторенной ДНК и затем с уникальными участками
 - Если совместно отжигают одноцепочечные ДНК, происходящие из различных точников, то формирование двухцепочечной структуры ДНК называют **гибридизацией**.

Плавление ДНК

- Плавление ДНК - процесс перехода регулярной двойной спирали линейной молекулы ДНК в клубкообразное состояние.
- При переходе ДНК из спирального состояния в клубкообразное поглощение раствора А в области 250-270 нм увеличивается на 30-40%
- Суммарная длина различных присутствующих в геноме последовательностей, оценивается по их реассоциации в процессе ренатурации ДНК
- Метод реассоциации ДНК позволяет судить о близком родстве по способности денатурированных отдельных нитей ДНК одних бактерий реассоциировать перекрестно при инкубации в определенных условиях с нитями ДНК других, образуя спиральную гибридную молекулу.



Плавление ДНК



T_m — температура, при которой половина ДНК-матриц имеет двухцепочечную структуру

Методы исследования ДНК

Секвенирование ДНК



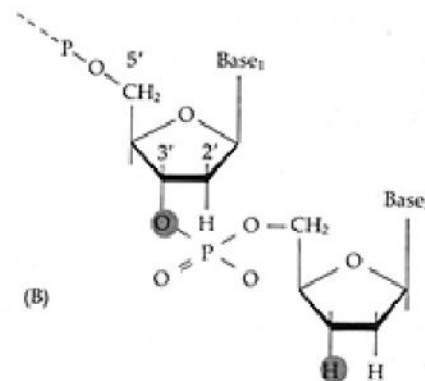
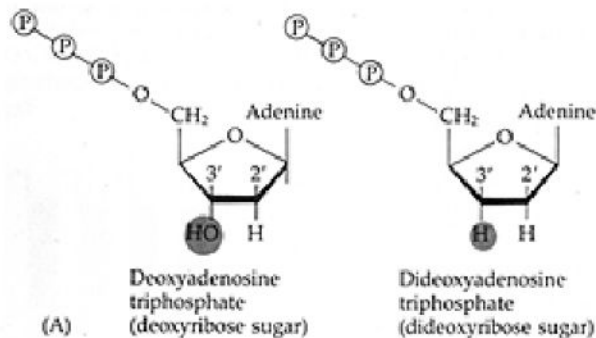
1980г
Вторая Нобелевская
премия по химии:
«for their contributions
concerning the
determination of base
sequences in nucleic acids»



Фредерик Сенгер

Терминаторы элонгации цепи


Дидезоксинуклеотиды



Метод Сэнгера

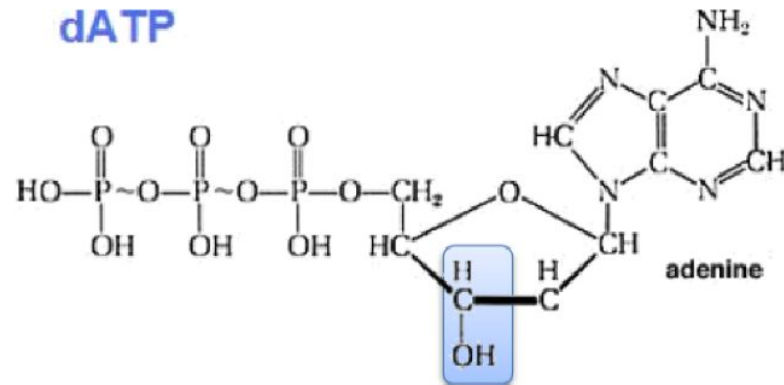
- В классическом варианте метода Сэнгера одна из цепочек анализируемой ДНК выступает в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепочки ферментом ДНК-полимеразой. Реакцию с одной и той же матрицей проводят в четырёх разных пробирках, каждая из которых содержит:
 - праймер — небольшую одноцепочечную молекулу ДНК, комплементарную началу участка, который нужно отсеквенировать. Праймер необходим потому, что ДНК-полимеразы не могут начинать синтез цепи «с пустого места», они только присоединяют следующий нуклеотид к уже имеющейся 3'-гидроксильной группе предыдущего. Праймер, таким образом, представляет собой «затравку» при синтезе ДНК;
 - небольшое количество радиоактивно меченного дезоксинуклеотида (например, [32P]-дАТФ), который включается в состав ДНК во время синтеза и позволяет впоследствии визуализировать продукты реакции;
 - смесь трёх дезоксинуклеотидов в оптимальных для протекания реакции концентрациях, четвёртый дезоксинуклеотид в более низкой концентрации и дидезоксипроизводное четвёртого нуклеотида.
 - У дидезоксирибонуклеотидов отсутствует 3'-гидроксильная группа, поэтому после их включения в цепь дальнейший синтез обрывается. Таким образом, в каждой пробирке образуется набор фрагментов ДНК разной длины, которые заканчиваются одним и тем же нуклеотидом (в соответствии с добавленным дидезоксинуклеотидом). После завершения реакции содержимое пробирок разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле.

Метод Сэнгера («терминаторов»)

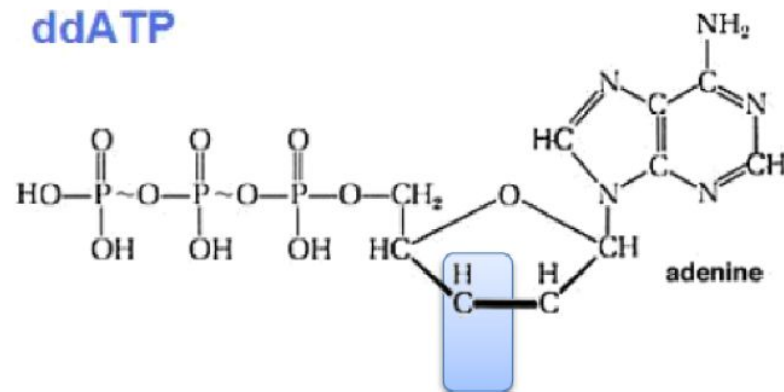
- Терминирующий агент – ddNTP
 - 4 пробирки содержат все компоненты для копирования ДНК:
 - Матрицу ДНК,
 - праймер,
 - DNA-pol,
 - dNTP's (один из которых радиоактивно мечен по α -положению фосфата)
 - Один из ddNTP
- 

Метод «терминаторов»

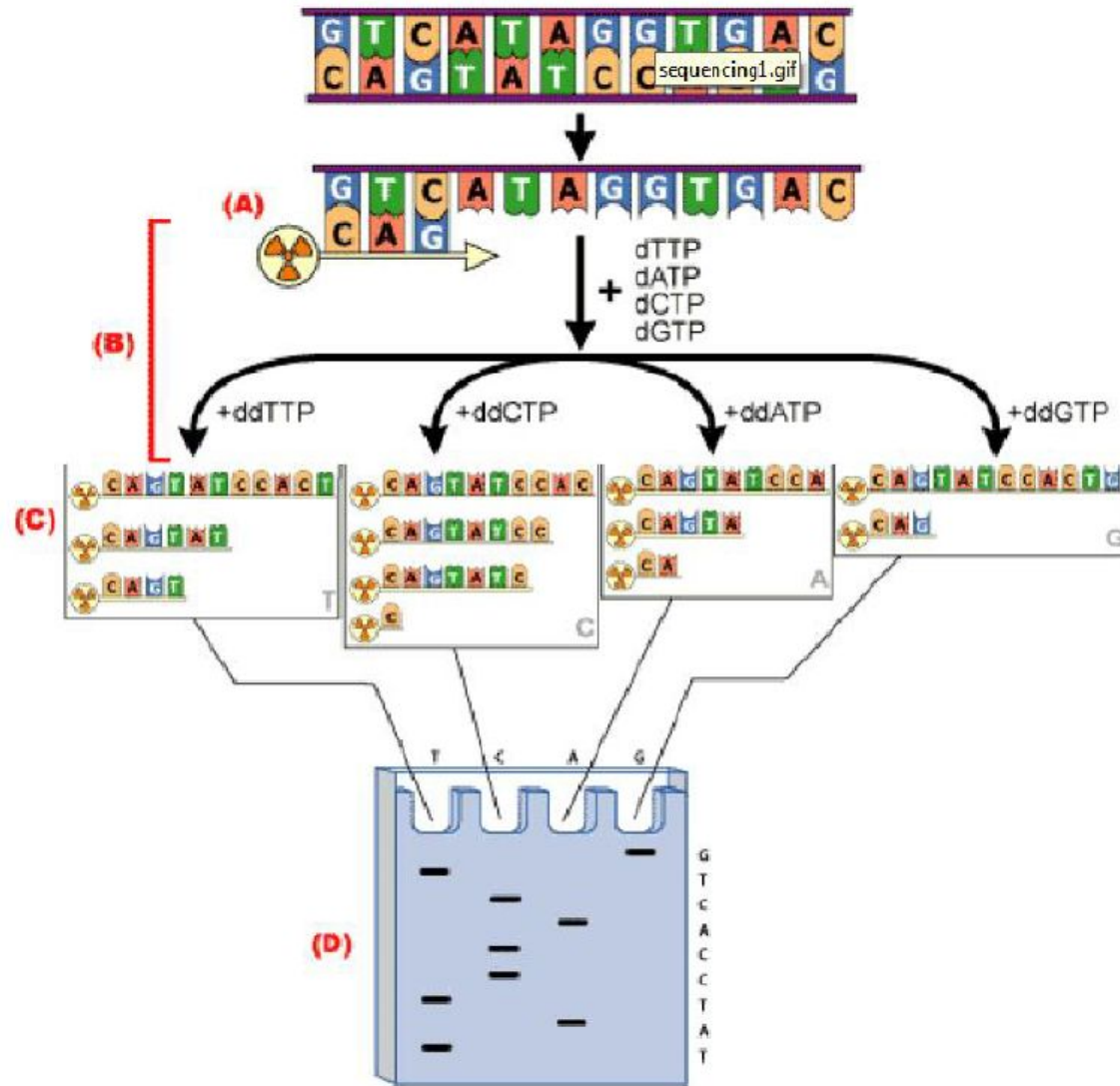
dATP



ddATP



Метод «терминаторов»

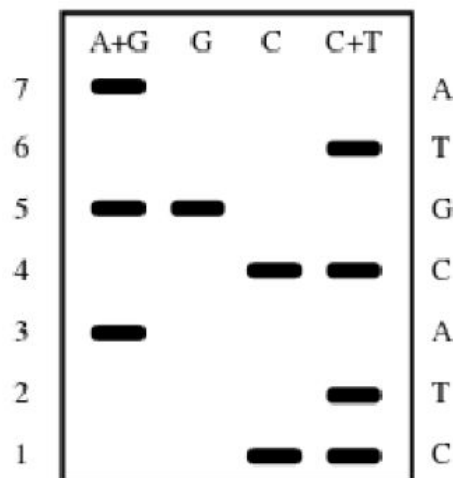
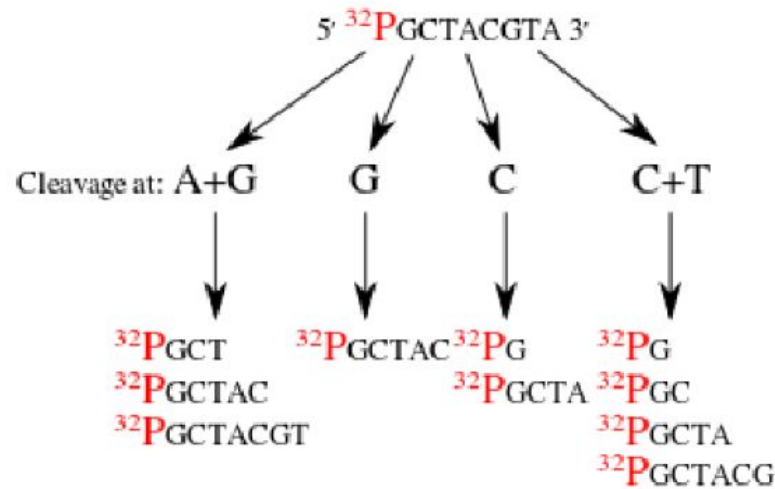


Метод «терминаторов»

- Можно заменить радиоактивную метку 4 флуоресцентными и ставить реакцию в одной пробирке
- Форез можно проводить в капилляре



Метод Максама-Гилберта



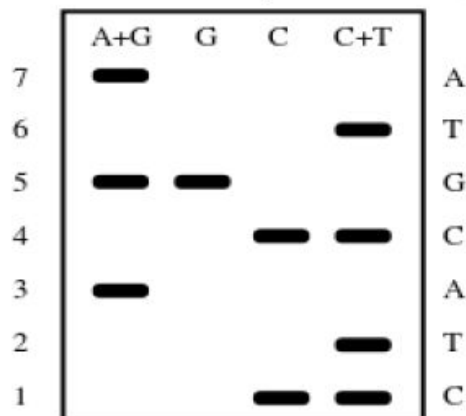
Sequencing Gel

В основе метода секвенирования ДНК путем химической деградации лежит ограниченное расщепление меченого фрагмента ДНК под действием специфических реагентов. Непременным условием проведения секвенирования этим методом является наличие фрагмента ДНК, меченного только по одному концу. Определение нуклеотидной последовательности – методом ЭФ в ПААГ в последующей автордиографией.

На начальном этапе секвенирования необходимо ввести радиоактивную метку

Введение ^{32}P -метки

1. Выступающие 5'-концы – эффективность мечения сравнима с одноцепочечной ДНК.
2. Выступающие 3'-концы очень трудно пометить.
3. Тупые концы - эффективность мечения ниже, чем для одноцепочечной ДНК, обычно используется специальный буфер.



Химическая модификация азотистых основание заключается в:

- Депуризации (A+G) с использованием муравьиной кислоты
- Метилированию гуанина с использованием диметилсульфата
- Гидролизе пиримидинов (C+T) с использованием гидразина. При этом, добавление NaCl в реакцию с гидразином ингибирует гидролиз цитидина.

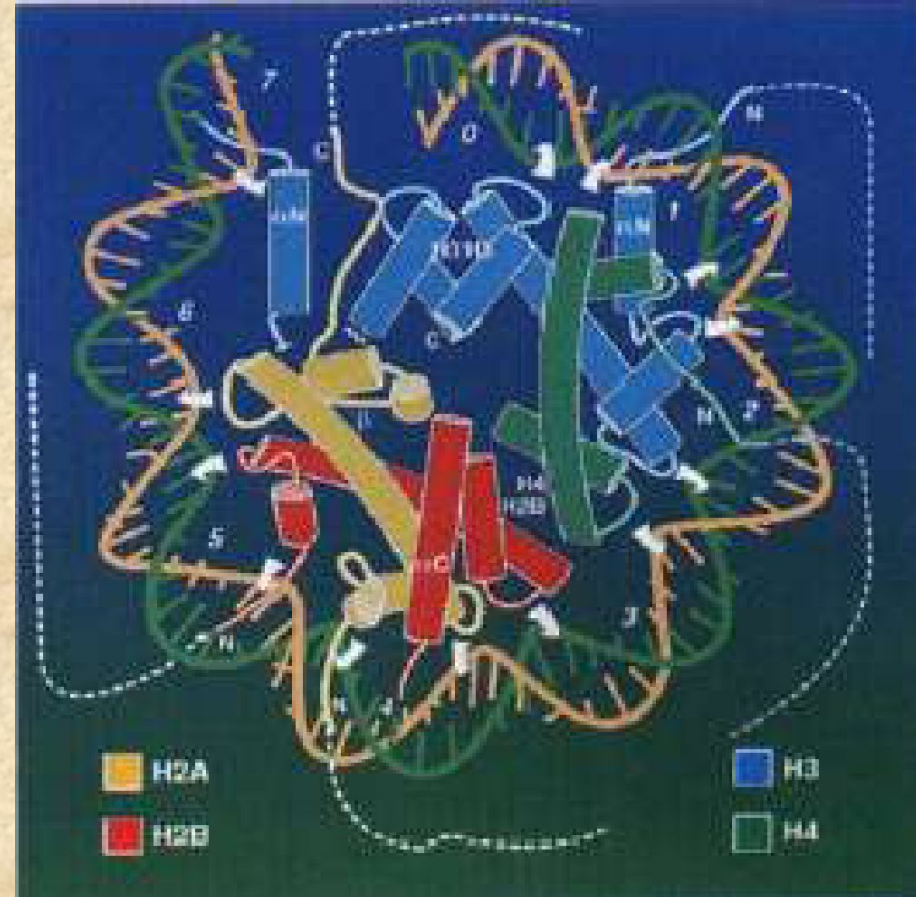
Модифицированные основания удаляются либо при повышении температуры, либо под действием кислоты или др. хим агентов (напр., пиперидин).

Образуются олигонуклеотиды, длины которых определяется методом ЭФ.

Структура нуклеогистона

146 пар ДНК накручены на комплекс из четырех гистоновых белков H2A, H2B, H3, H4
1.5 витка на цилиндр 120 А диаметр
60 А высота

взаимодействие –
электростатическое PO_4^- - ДНК с заряженными аминокислотами гистоновых белков



•Спасибо за внимание!

BANG!
BANG!
BANG!
BANG!

<http://biocomical.blogspot.com>

