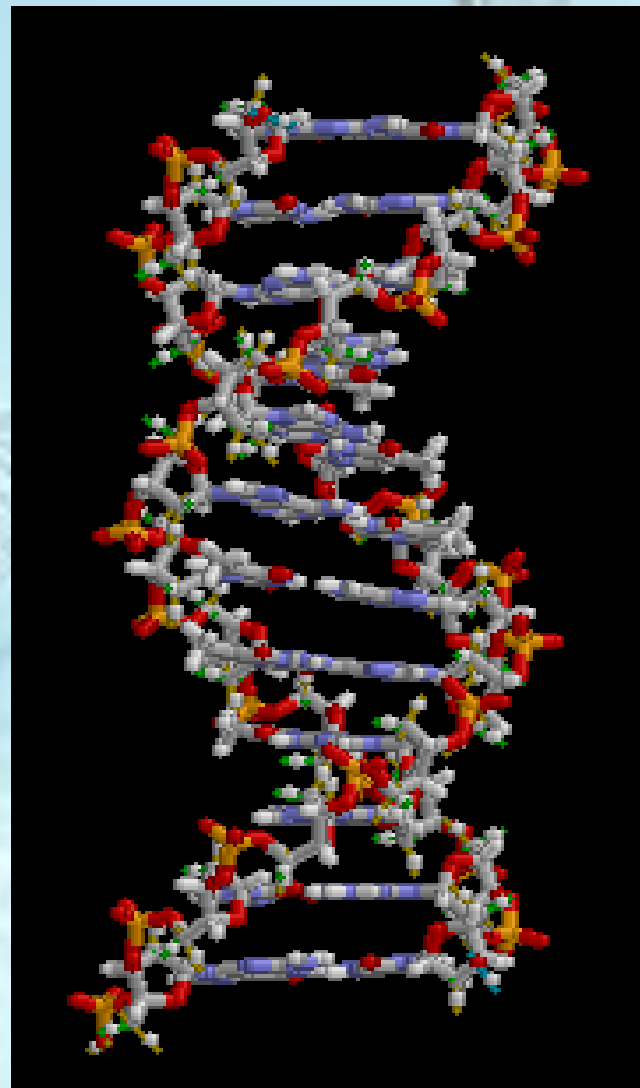




Межфакультетский курс лекций  
Химический факультет МГУ  
имени М.В. Ломоносова



**«Геном человека: страхи и надежды»**

nature



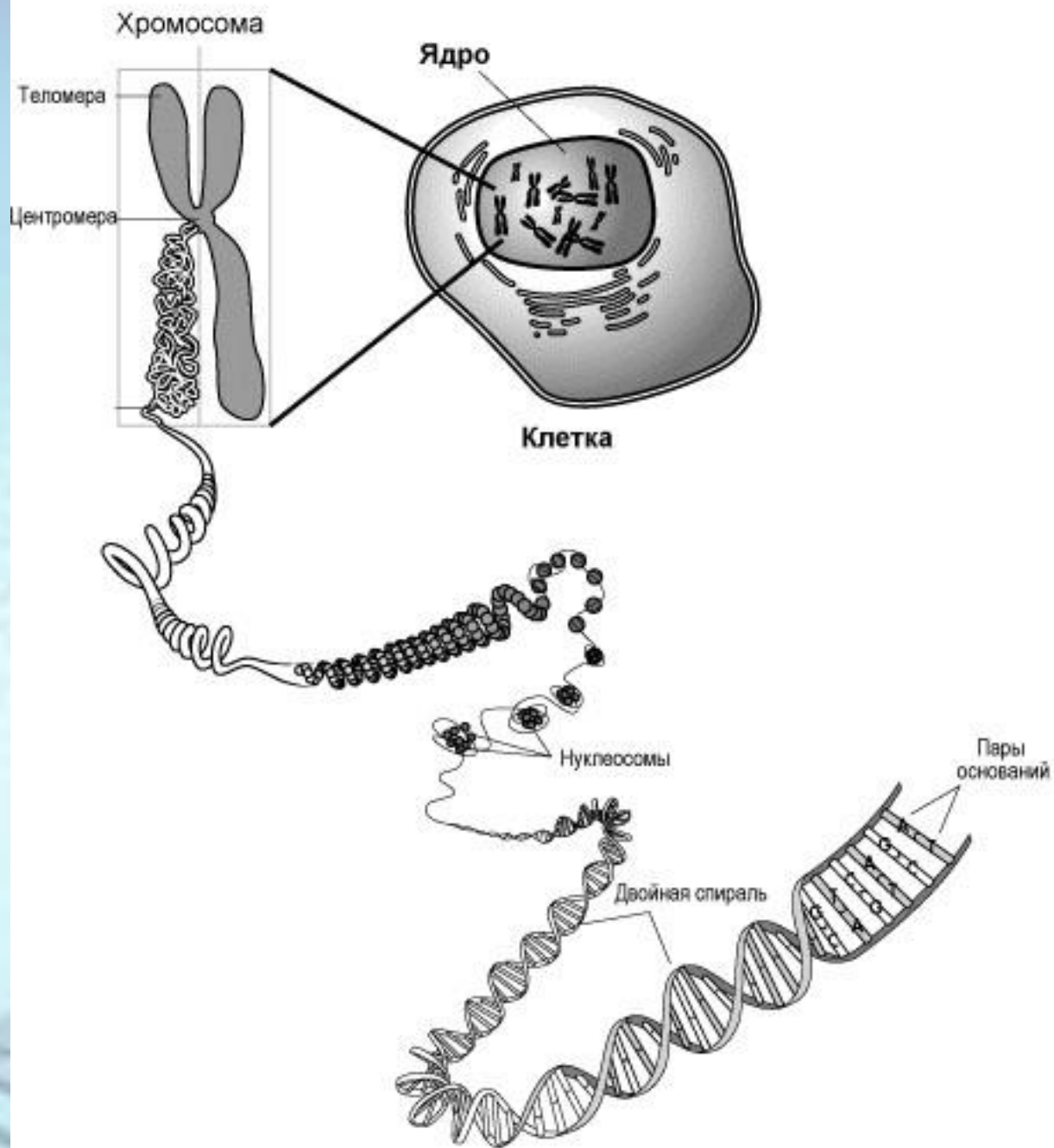
50  
years

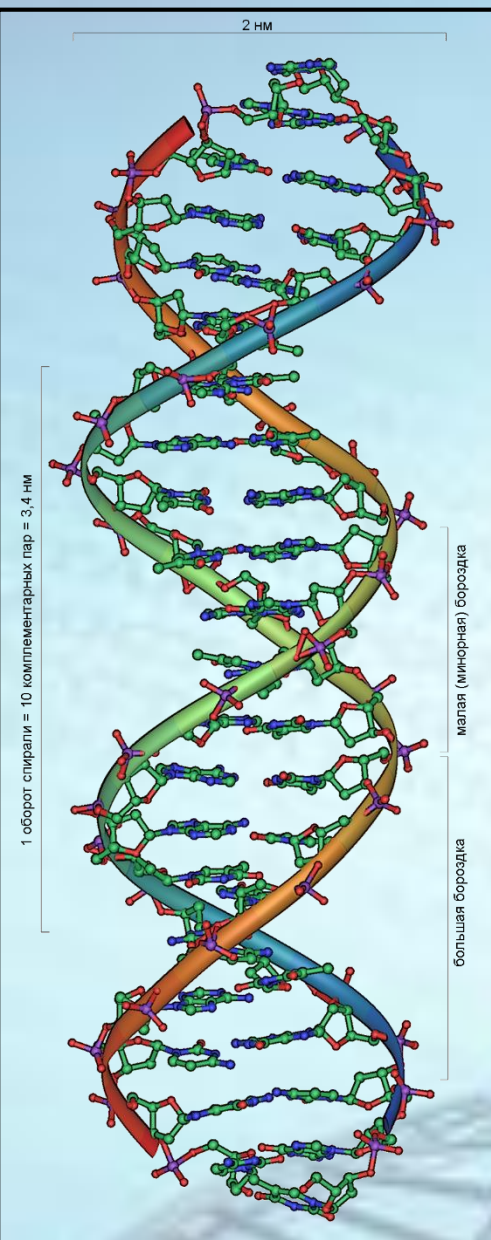


Produced with support from FfOche

**Канонические и  
неканонические  
структуры  
нуклеиновых кислот**

**Ведущий научный сотрудник  
д.х.н. Н.Г. Долинная**





## Дезоксирибонуклеиновая кислота

Знаменитая двойная спираль ДНК – на самом деле 2 отдельные молекулы ДНК, закрученные относительно друг друга.

Состав ДНК одинаков для ВСЕХ живых организмов.

Она состоит из:

фрагментов фосфорной кислоты, дезоксирибозы – (класс сахаров), азотистых оснований:

**A** аденин

**G** гуанин

**T** тимин

**C** цитозин

Это самая длинная из всех известных макромолекул!

Длина геномной ДНК человека в длину около 2 метров!

«ДНК кодирует биологическую информацию, по крайней мере, двумя способами

- через нуклеотидную последовательность

-через структурные особенности».

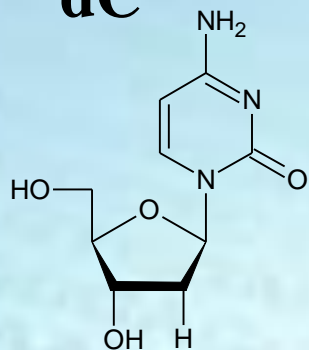
**А. Рич**

**Нобелевский лауреат**

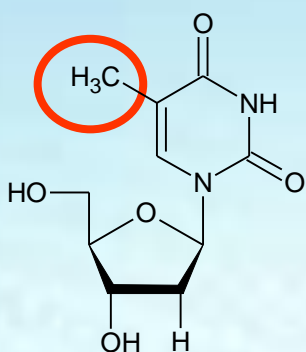
# Структура нуклеозидов

## ДНК

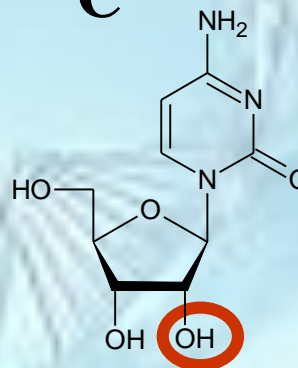
**dC**



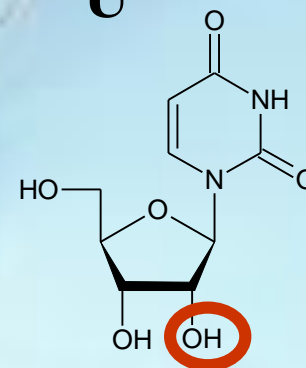
**T**



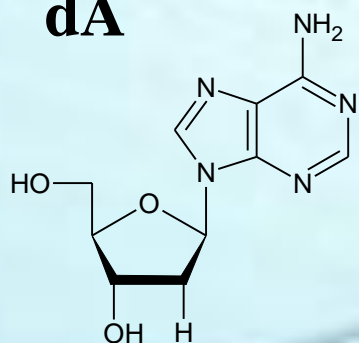
**C**



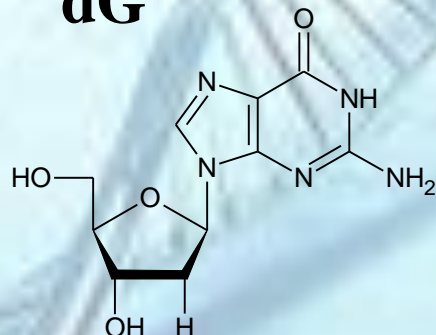
**U**



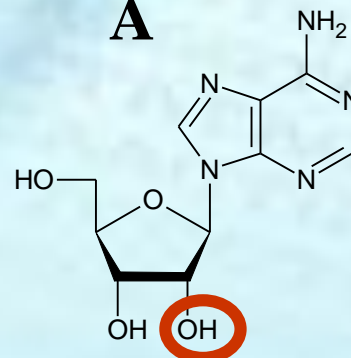
**dA**



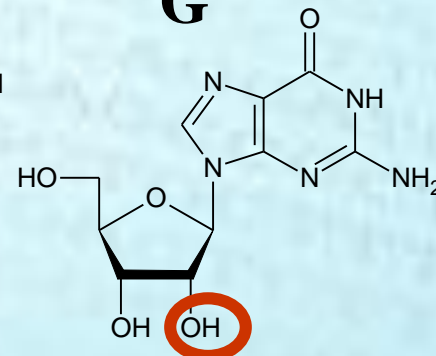
**dG**



**A**



**G**



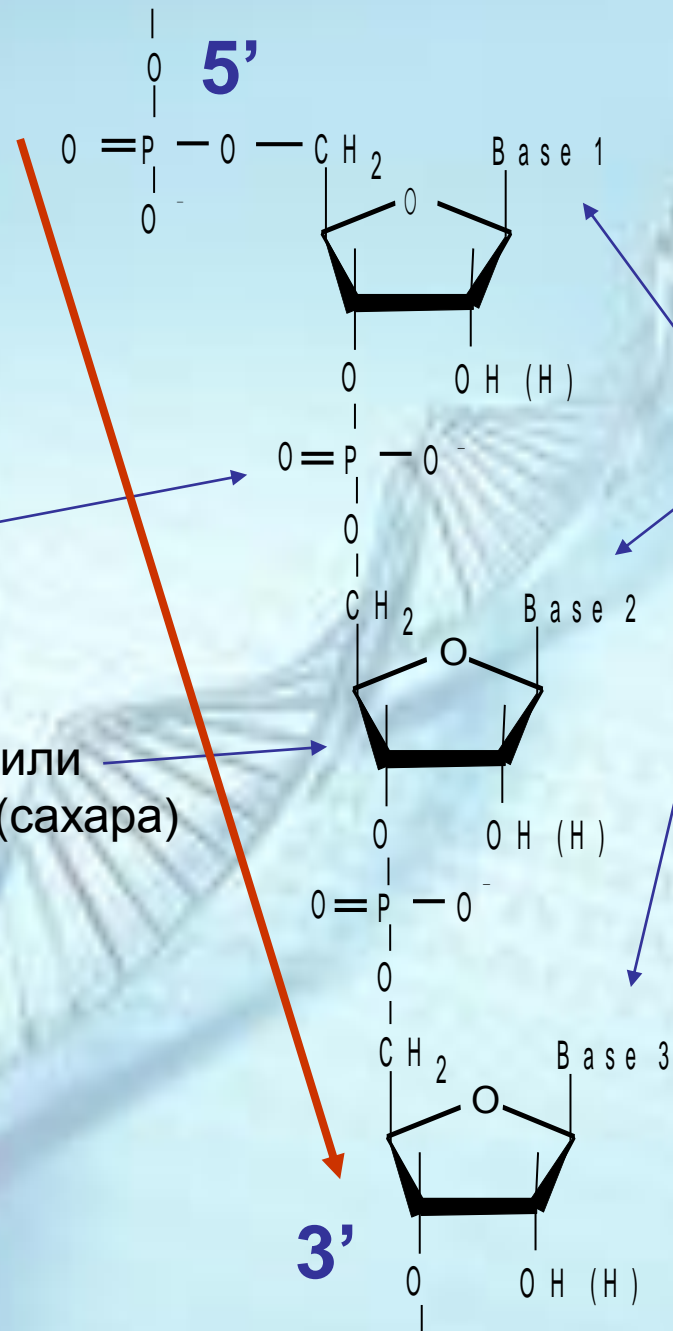
Нумерация атомов азотистых оснований – 1, 2, 3 и т.д., нумерация атомов остатков сахара – 1', 2', 3' и т.д.

# Структура полинуклеотидной цепи в НК

межнуклеотидная  
фосфатная группа

остаток рибозы или  
дезоксирибозы (сахара)

Азотистое  
основание



**3'**

## Конформация дезоксирибозного (рибозного) кольца в нуклеозидах

Сахарное кольцо никогда не бывает плоским.

Из-за несимметричности заместителей имеется два кластера энергетически выгодных конформаций с выведенными из плоскости атомами C2' и C3' :

**N (C3'-эндо)** и **S (C2'-эндо)**, которые находятся в равновесии.

Относительный вес S- и N-конформаций в нуклеозидах - около 0,5.

В структурах, образованных полимерными цепочками нуклеиновых кислот, равновесие "замораживается" либо в S-, либо в N-конформациях.

Изменение конформации сахарного кольца служит переключателем, регулирующим вторичную структуру полимерных нуклеиновых кислот.

**Вторичная структура** отражает пространственное взаимоотношение мономерных нуклеотидов, сближенных друг с другом в линейной цепочке.

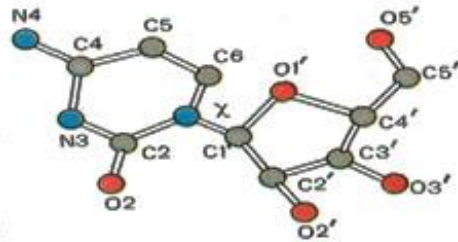
S (C2'-эндо)



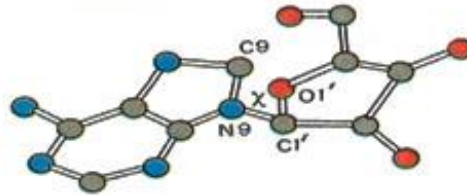
N (C3'-эндо)

# Относительное расположение азотистого основания и остатка сахара в нуклеозидах

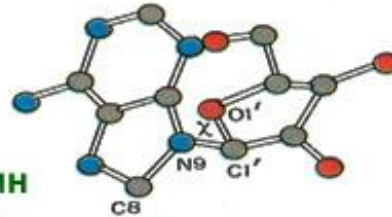
Пиримидин



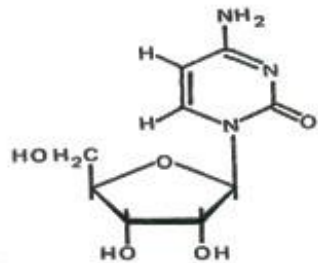
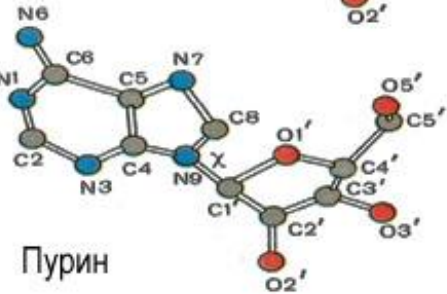
Анти



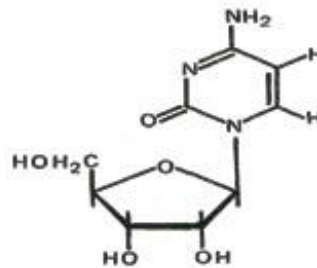
Син



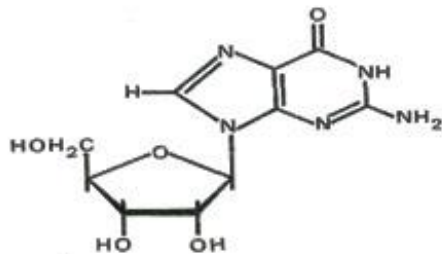
Пурин



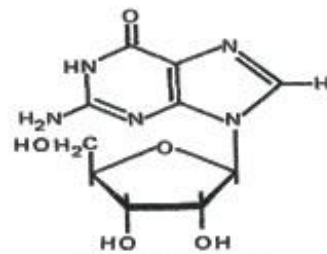
Анти-цитидин



Син-цитидин



Анти-гуанозин



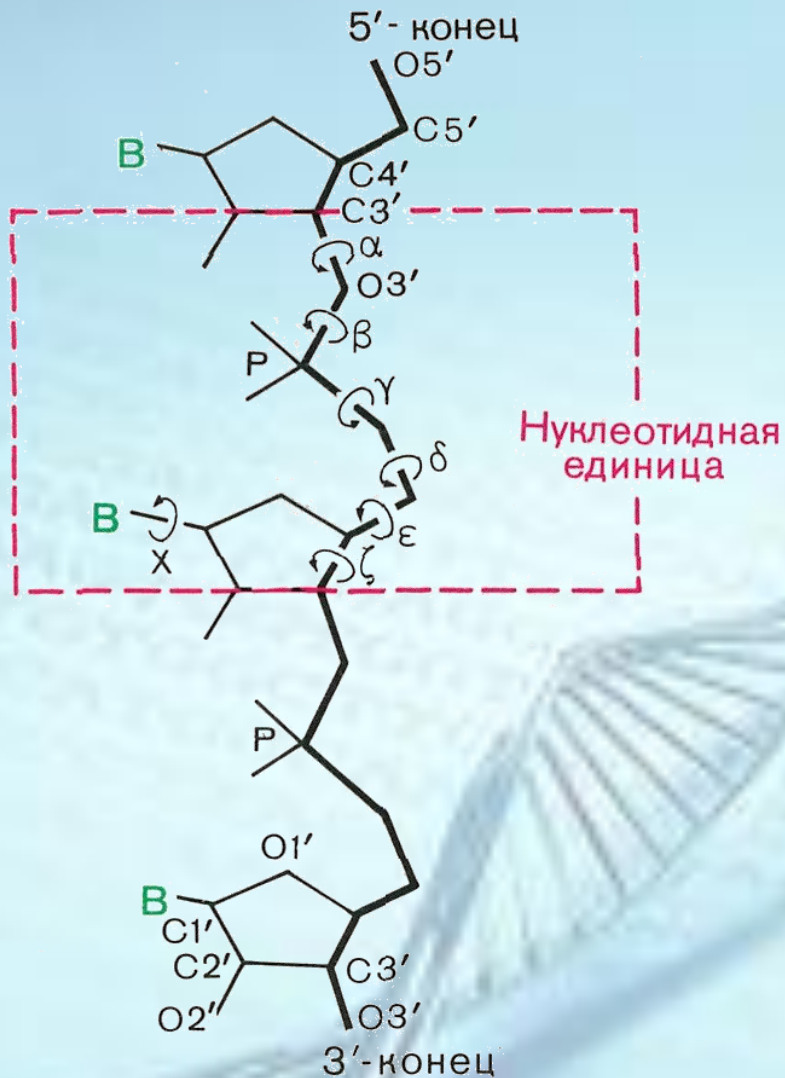
Син-гуанозин

Энергетически выгодные конформации – син и анти, которые описываются углом поворота вокруг N-гликозидной связи.

Предпочительней является анти-конформация, особенно для пиримидиновых нуклеозидов.

В структурах, образованных полимерами нуклеиновых кислот, «замораживается» либо син-, либо анти-конформация.



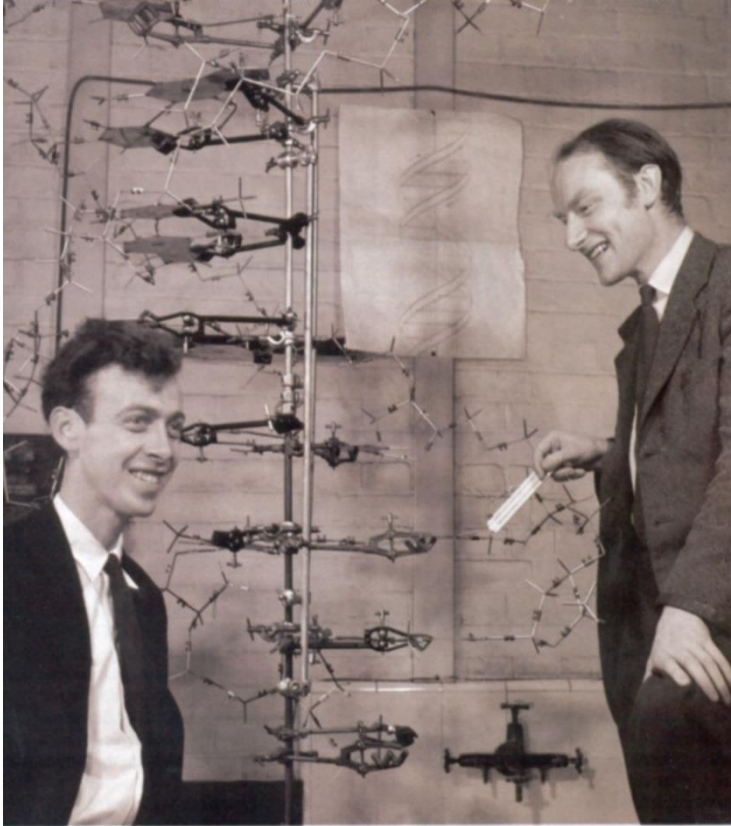


Конформация сахаро-фосфатного остова в полимерной цепи определяется шестью торсионными углами

Фрагмент нуклеотидной цепи.  
Нуклеотидная единица выделена рамкой.

# Двойная спираль Д. Уотсона и Ф. Крика

Предпосылки ее открытия в 1953 г.



Anthony Barrington Brown's photograph of Watson and Crick with their model of DNA at the Cavendish Laboratory in Cambridge, 21 May 1953.

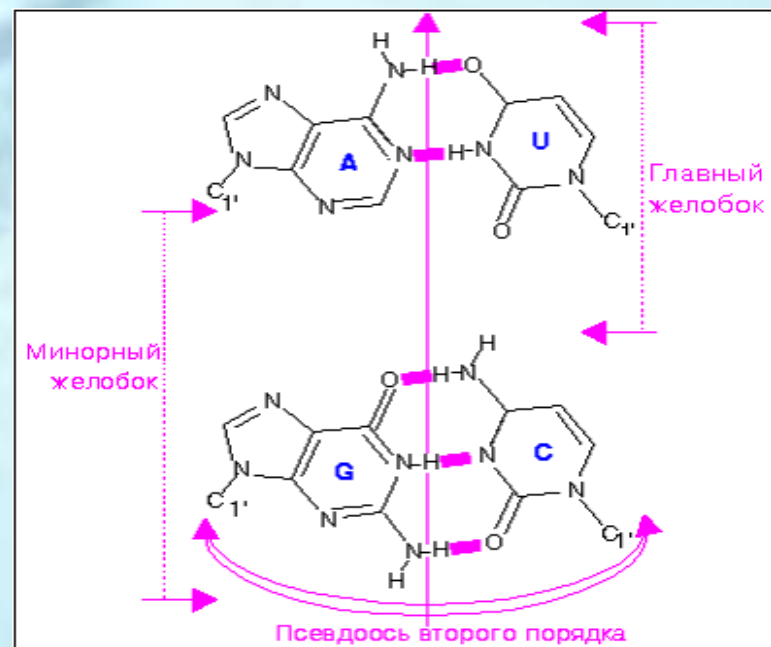
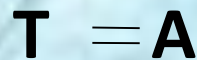
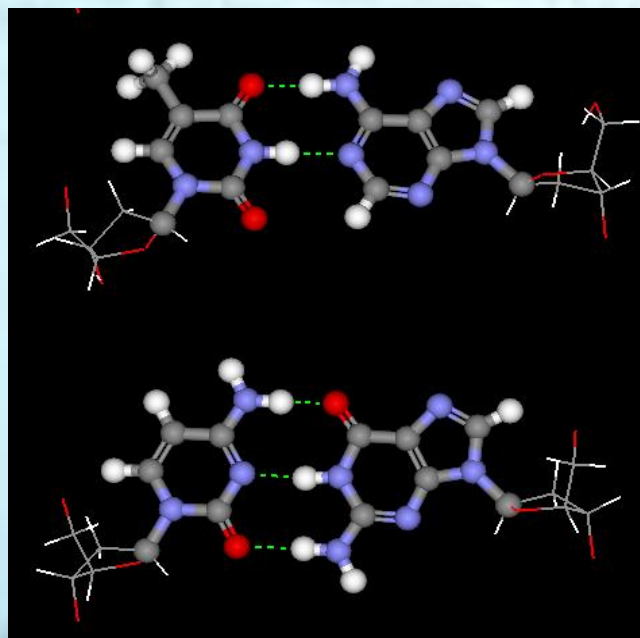
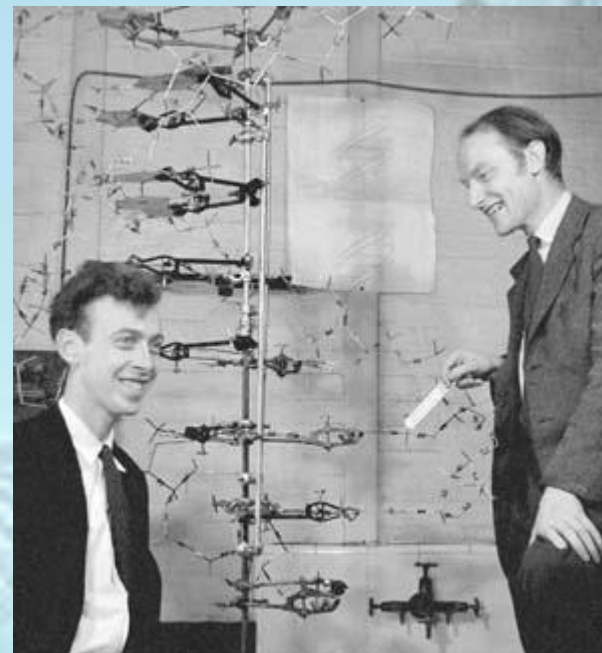
- Доказательство генетической функции ДНК.
- Несмотря на то, что нуклеотидный состав ДНК у разных организмов различен и не зависит от возраста организма, условий питания и внешней среды, во всех ДНК количество  $A = T$  и  $G = C$  (правило Чаргаффа).
- Установлены таутомерные формы гетероциклических оснований, характер связи между мономерами и конфигурация N-гликозидной связи.
- Получены рентгено-структурные данные о размерах и конформации пуриновых и пиримидиновых оснований и нуклеозидов.
- Скачкообразное изменение свойств ДНК при изменении условий среды.
- Данные дифракция рентгеновских лучей на ориентированных волокнах ДНК (Р. Франклин, М. Уилкинс); установление двух периодов повторяемости –  $3.4 \text{ \AA}$  и  $34 \text{ \AA}$ , в регулярной структуре.
- Открытие  $\alpha$ -спирали в белках (на основании данных РСА).

Способность к сохранению и передаче генетической информации есть следствие структурной комплементарности цепей ДНК.

## Комплементационные (горизонтальные) взаимодействия азотистых оснований (водородные связи между NH---N и NH---O)

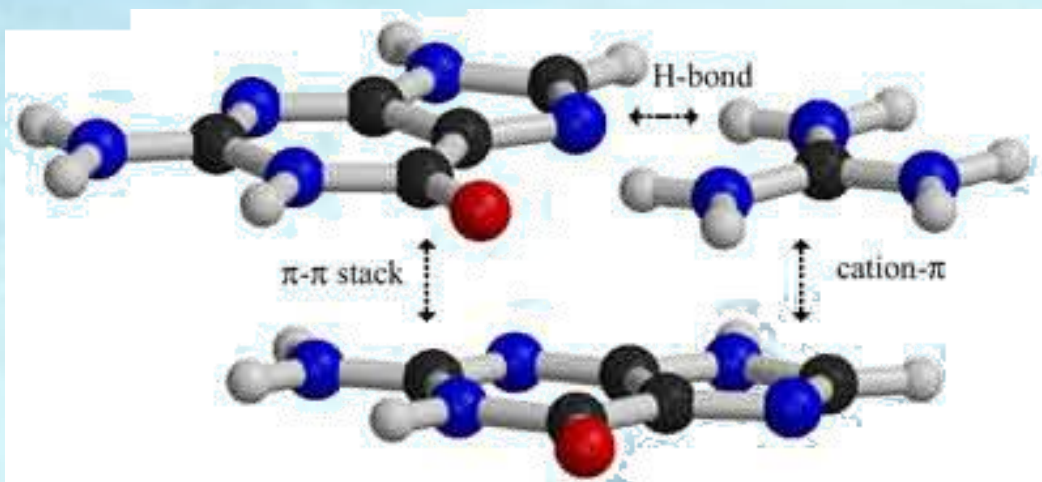
При изучении взаимодействия между различными и одинаковыми основаниями (в кристаллическом состоянии или в органических растворителях) были выявлены 28 пар оснований с числом водородных связей  $\geq 2$ , в том числе и пары А·Т и G·C, постулированные Уотсоном и Криком.

Природа отобрала именно эти пары в качестве универсальных строительных кирпичиков (хотя они и не самые стабильные) из-за одинаковых геометрических параметров.

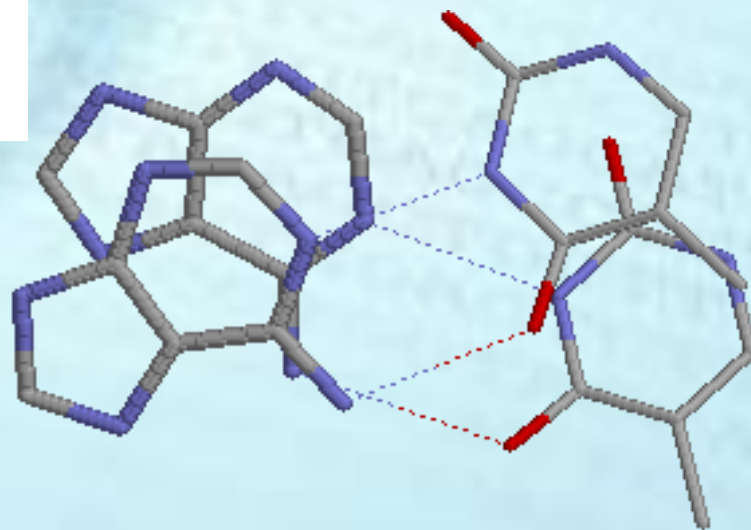


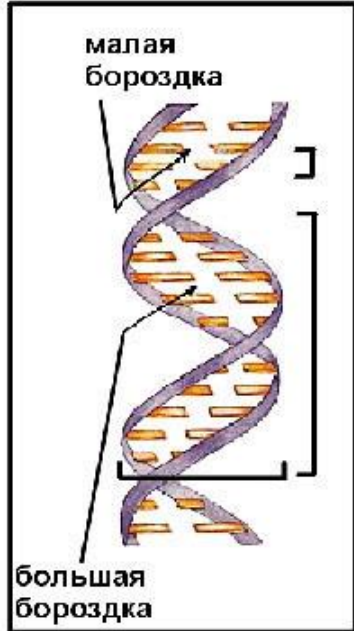
# Стэкинг – взаимодействия (межплоскостные взаимодействия азотистых оснований, уложенных стопкой)

Расстояния между основаниями –  
3.4 Å.



Полярные заместители нависают над ароматическими кольцами соседних молекул, сообщая закручивающий эффект. Геометрия стэкинга зависит от природы взаимодействующих партнеров.





**В-ДНК – основная биологически активная форма существования генетического материала**

Ориентация цепей в В-ДНК антипараллельная, гидрофобные пары оснований находятся внутри двойной спирали и располагаются почти перпендикулярно оси спирали, а гидрофильный сахарофосфатный остов проходит по периферии дуплекса. На поверхности В-формы находятся большой и малый желобки (бороздки).

**ПАРАМЕТРЫ СПИРАЛИ**

**Вид спирали**

**В-ДНК**

**правая**

**Угол спирального вращения**

**34.6°**

**Пар оснований на виток**

**10.5**

**Расстояние между основаниями, А**

**3.3**

**Шаг спирали, А**

**34.0**

**Диаметр, А**

**23.7**

**Конформация**

***анти***

**гликозидной связи**

**Конформация сахара**

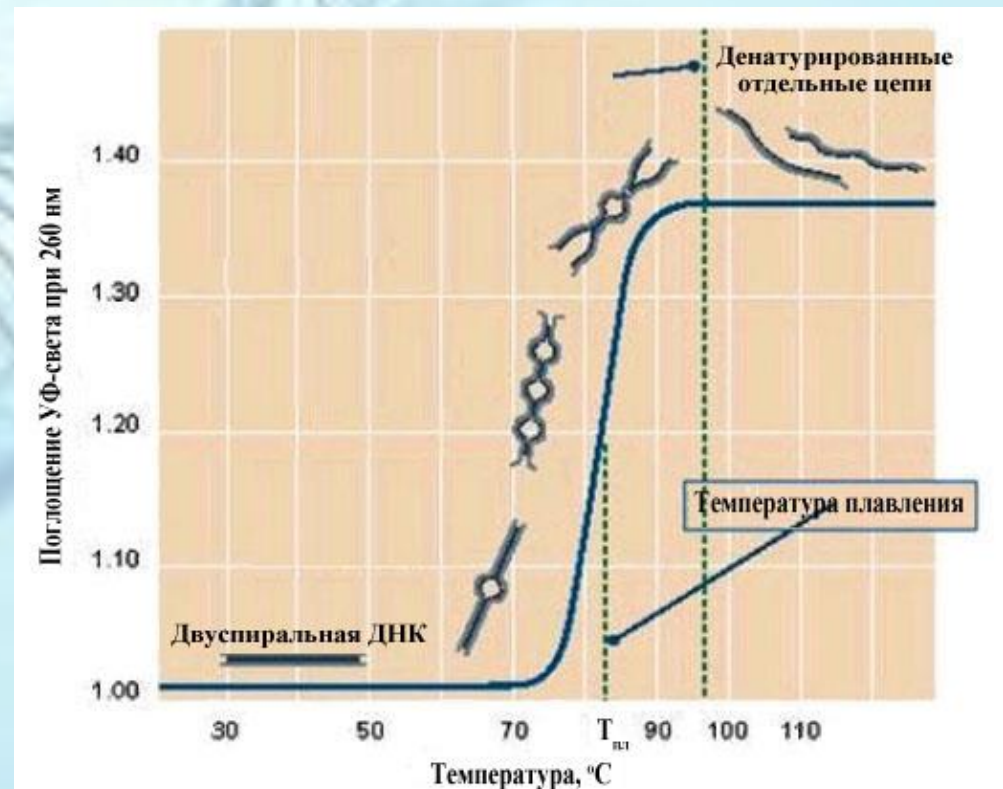
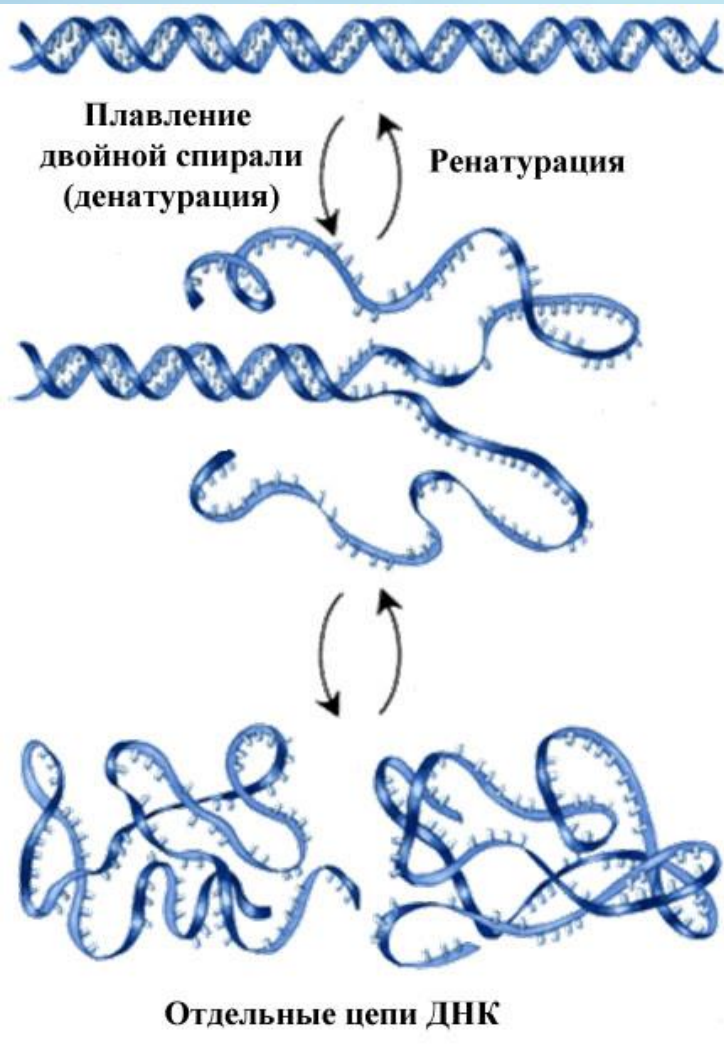
**S**

# Плавление двуспиральной ДНК

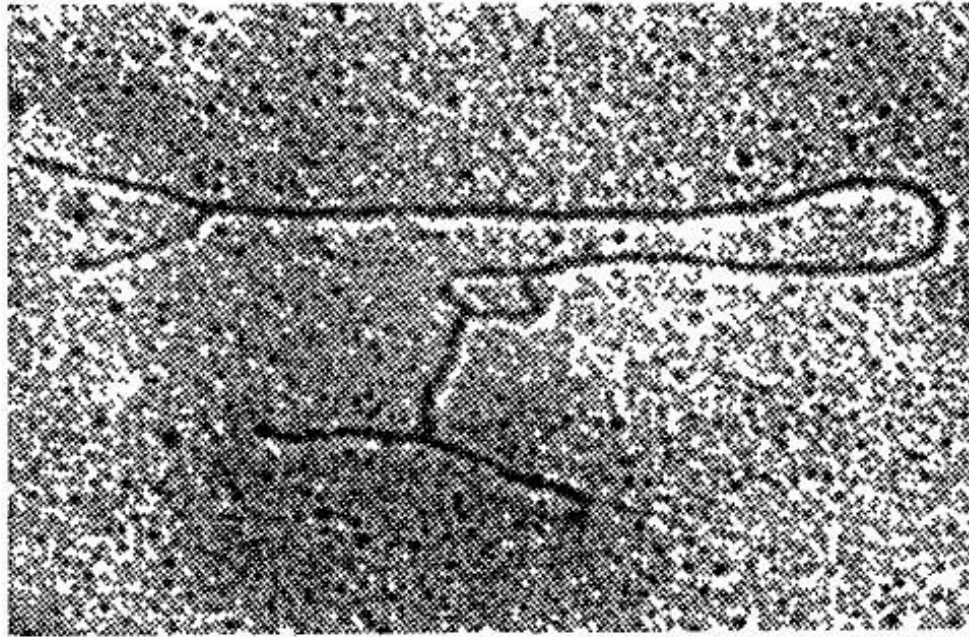
Физики рассматривают двойную спираль ДНК как аperiодический одномерный кристалл, прозрачный для видимого света и поглощающий УФ-свет.

Как кристаллическое тело, ДНК плавится, согласно

- модели набора состояний (для полимерной ДНК) и
- модели двух состояний или все-или-ничего (для олигонуклеотидных ДНК-дуплексов).



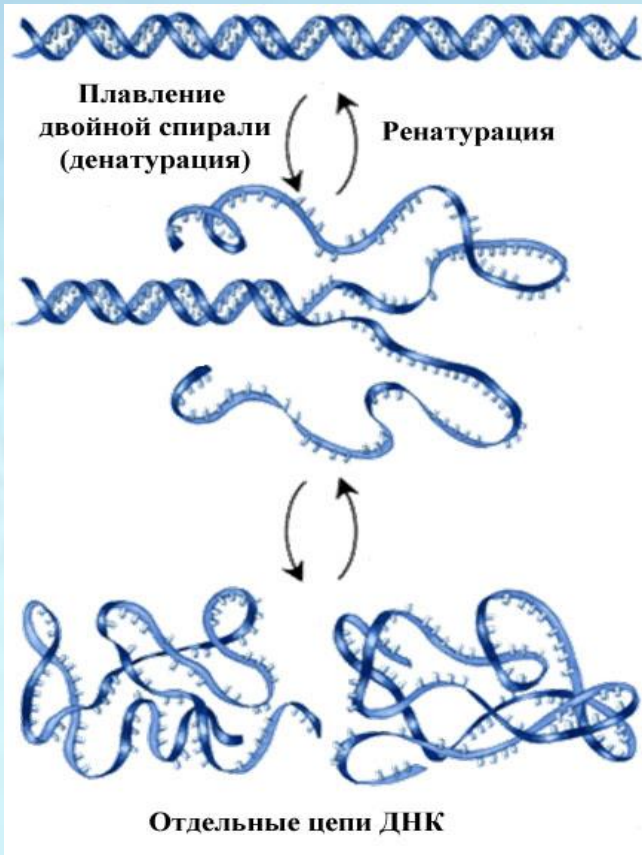
# Электронная микроскопия плавления ДНК-дуплекса



Так выглядит ДНК СоIE1 под электронным микроскопом, после того, как ее состояние зафиксировали при температуре 72 °С. Ясно видны три раскрытых, расплавленных участка — два на концах и один в середине.

Ю.Любченко, Ю.С.Лазуркин, А.Александров

# Ренатурация ДНК



## Зависит от

- длины фрагмента
- температуры
- скорости охлаждения
- ионной силы раствора
- концентрации ДНК
- сложности молекулы

$$-\frac{dC}{dt} = kC^2$$
$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0t}$$

$C$  – концентрация  
одноцепочечных  
участков

$k$  – константа  
скорости второго  
порядка

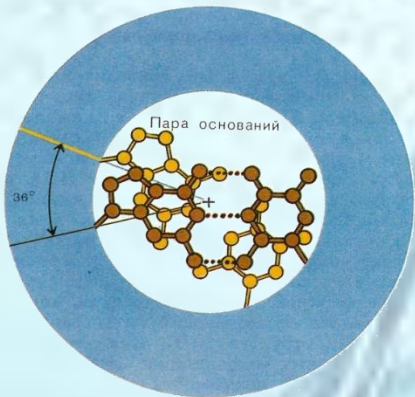
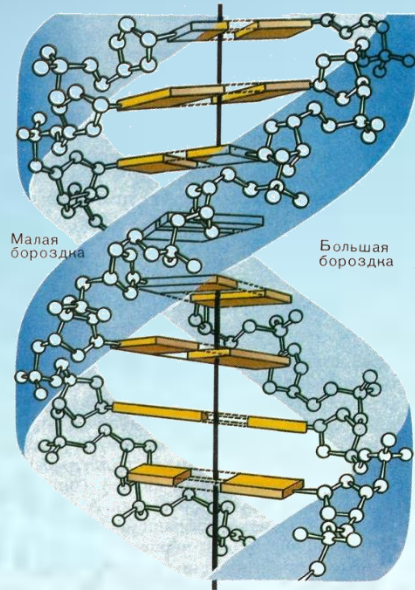
$t$  – время (сек)

$C_0$  – начальная  
концентрация ДНК

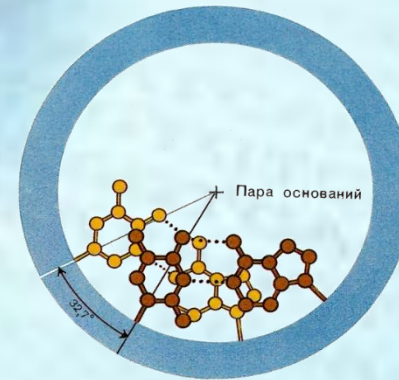
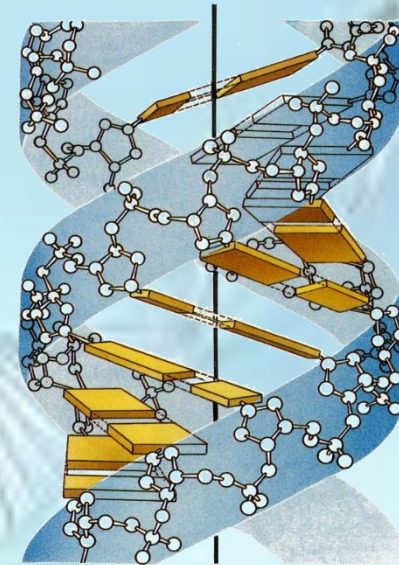
Процессы локального плавления и ренатурации ДНК постоянно происходят в клетке, поэтому их изучение имеет большое биологическое значение. В частности, РНК-полимераза играет роль «утюга», способного расплавлять участки ДНК при транскрипции.



## ***В-форма ДНК***

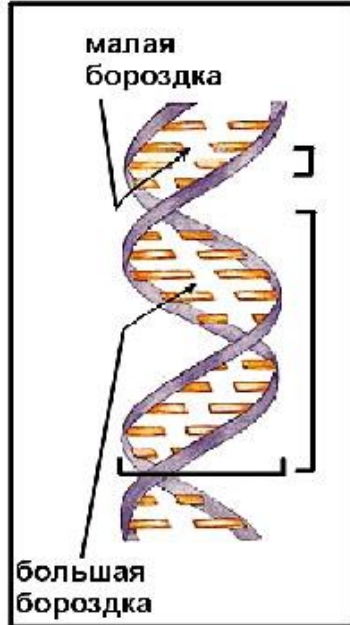


## ***А-форма ДНК***



**ДНК могут принимать и А-, и В-форму двойной спирали.**

**РНК и гибридные ДНК/РНК – только А-форму.**



**ПАРАМЕТРЫ СПИРАЛИ**

**A-ДНК**

**B-ДНК**

**Вид спирали**

**правая**

**правая**

**Угол спирального вращений**

**32.7°**

**34.6°**

**Число пар оснований на виток**

**11**

**10.5**

**Расстояние между основаниями, А**

**2.3**

**3.3**

**Шаг спирали, А**

**24.6**

**34.0**

**Диаметр, А**

**25.5**

**23.7**

**Конформация**

***анти***

***анти***

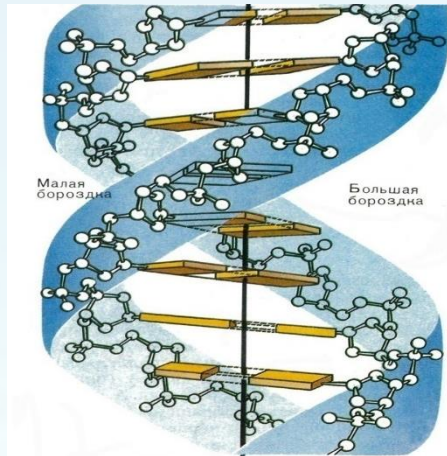
**гликозидной связи**

**Конформация сахара**

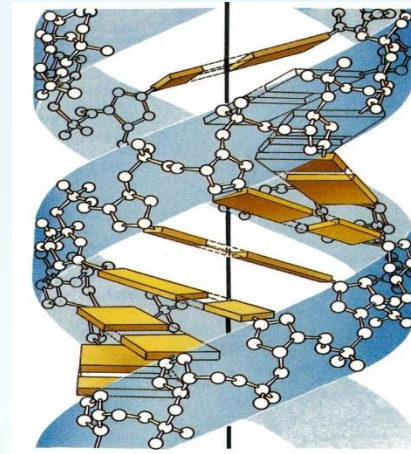
**N**

**S**

# Канонические структуры ДНК



**В-форма**



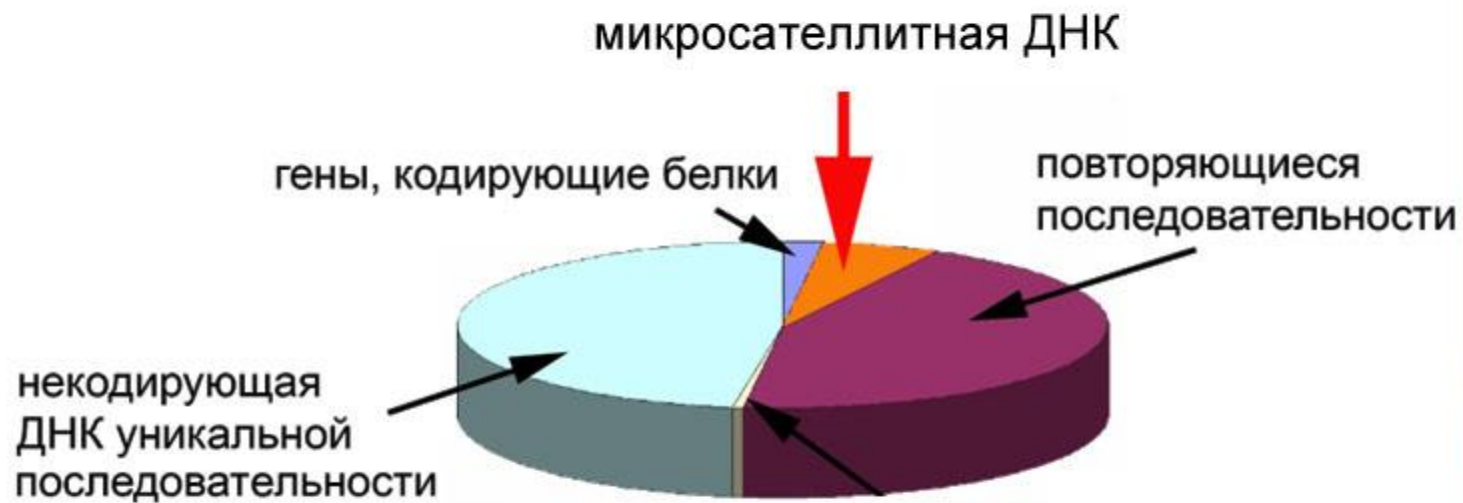
**А-форма**

- ▶ линейные (неразветвленные) двойные спирали
- ▶ антипараллельная ориентация цепей
- ▶ правозакрученные
- ▶ стабилизированы Уотсон-Криковскими парами оснований (А · Т, G · С)
- ▶ плектонимичные дуплексы (для разделения цепей необходимо раскрутить двойную спираль)
- ▶ вторичная структура не зависит от нуклеотидной последовательности

## Последовательности ДНК, склонные к образованию неканонических форм

- повторяющиеся моно-, ди- и тринуклеотидные последовательности, включая пурин-пиримидиновые и пурин-пуриновые повторы
- гомопуриновые–гомопиримидиновые цепи
- палиндромные последовательности
- зеркально-симметричные последовательности
- двойные спирали, содержащие только А·Т пары
- oligoA-тракты, oligoG-тракты, oligoC-тракты
- более сложные типы внутренней симметрии

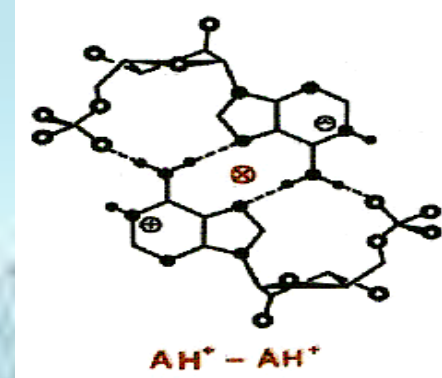
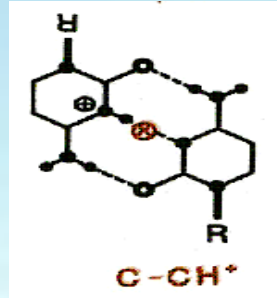
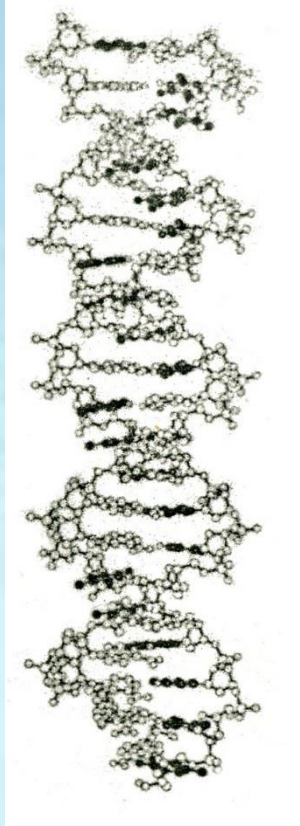
# Распространение повторяющихся последовательностей ДНК в геноме эукариот



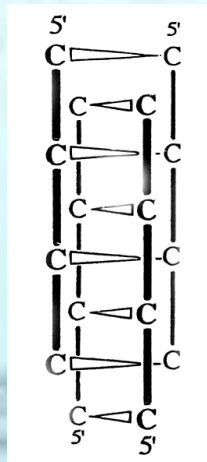
**Последовательности, образующие неканонические формы ДНК, относительно редки в прокариотах, но широко распространены в эукариотических организмах. Обычно они локализованы в важных участках генома:**

- ❖ **теломеры хромосом**
- ❖ **центромерная область**
- ❖ **мини- и микросателлитные повторы**
- ❖ **длинные концевые повторы ретротранспозонов**
- ❖ **горячие точки мутаций**
- ❖ **промоторные участки генов (часто онкогенов)**
- ❖ **локусы экспансии тринуклеотидных повторов**
- ❖ **гены рибосомных РНК**
- ❖ **интроны генов**
- ❖ **горячие точки рекомбинации**

# Параллельные дуплексы и квадруплексы, образованные *oligo(dA)* или *oligo(dC)*

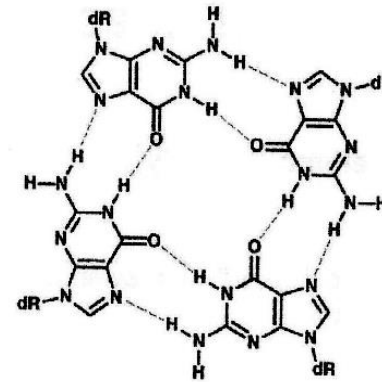
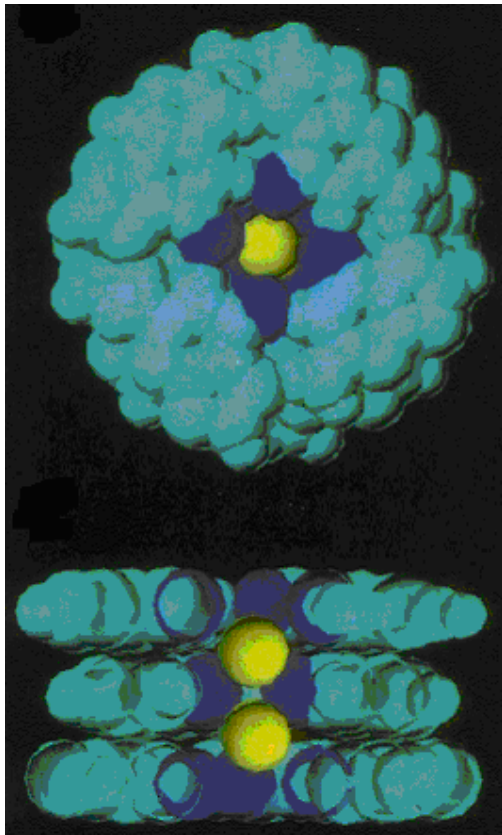


## Интеркаляционная четырехспиральная ДНК (*i*-ДНК)



Два параллельных дуплекса, стабилизированных парами  $C \cdot CH^+$ , интеркалируют (внедряются) друг в друга во взаимно антипараллельной ориентации. Водородные связи в соседних парах  $C \cdot CH^+$  перпендикулярны друг другу и находятся на расстоянии 3.1 Å

# Структура G-квадруплексов



1 цепь



2 цепи



3 цепи



4 цепи

Квадруплексы стабилизируются ионами  $\text{Na}^+$  и, особенно, ионами  $\text{K}^+$ , которые располагаются между G-тетрадами, образуя 8 координационных связей с оксо-группами остатков гуанина. Олигонуклеотидные G-квадруплексы отличаются ориентацией трактов oligoG и количеством молекул, из которых они формируются.

В. Гюшльбауэр, Д. Сен, В. Гилберт

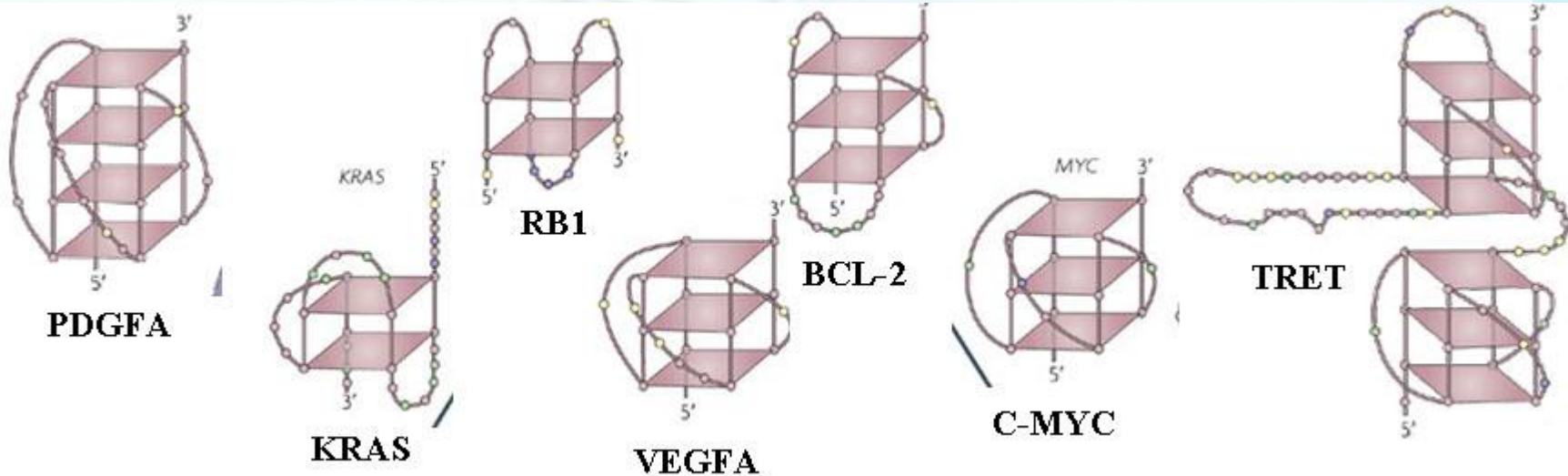


# Многообразие форм G-квадруплексов

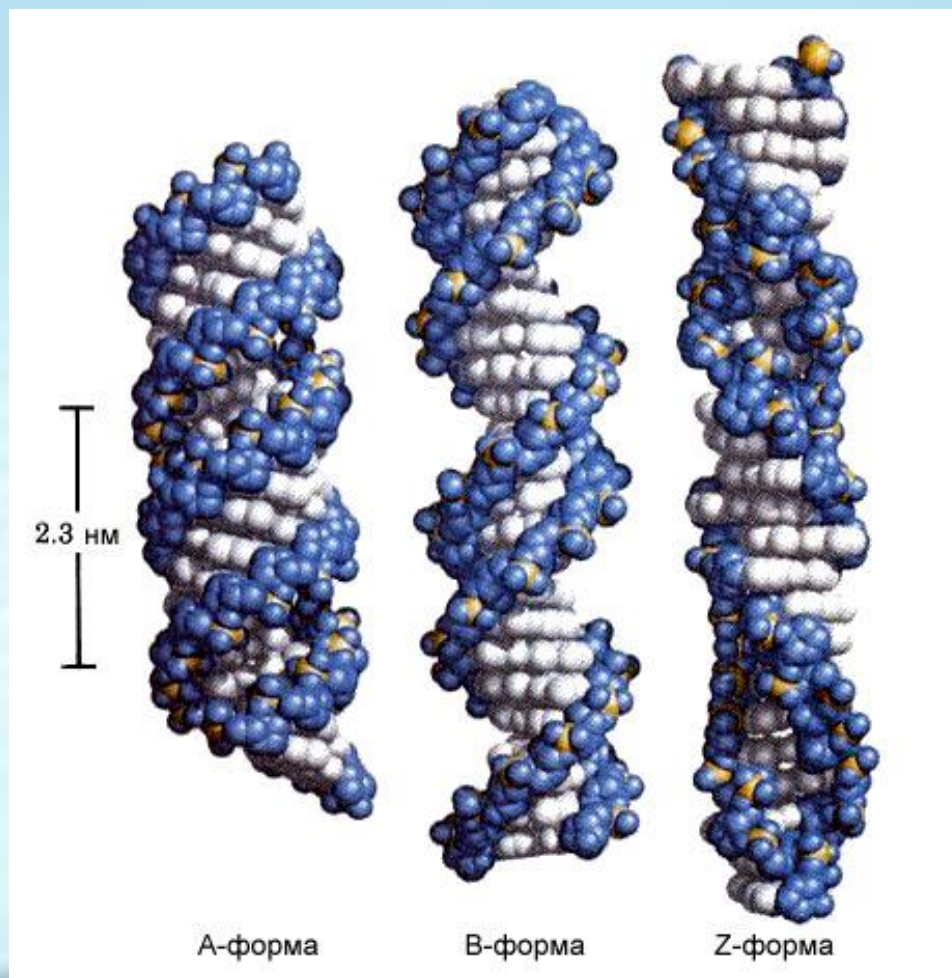
В клетке в подавляющем большинстве образуются внутримолекулярные G-квадруплексы. Последовательности, формирующие такие структуры, можно представить как



**Внутримолекулярные G-квадруплексы разной топологии, образуемые в промоторах генов, главным образом, онкогенов**



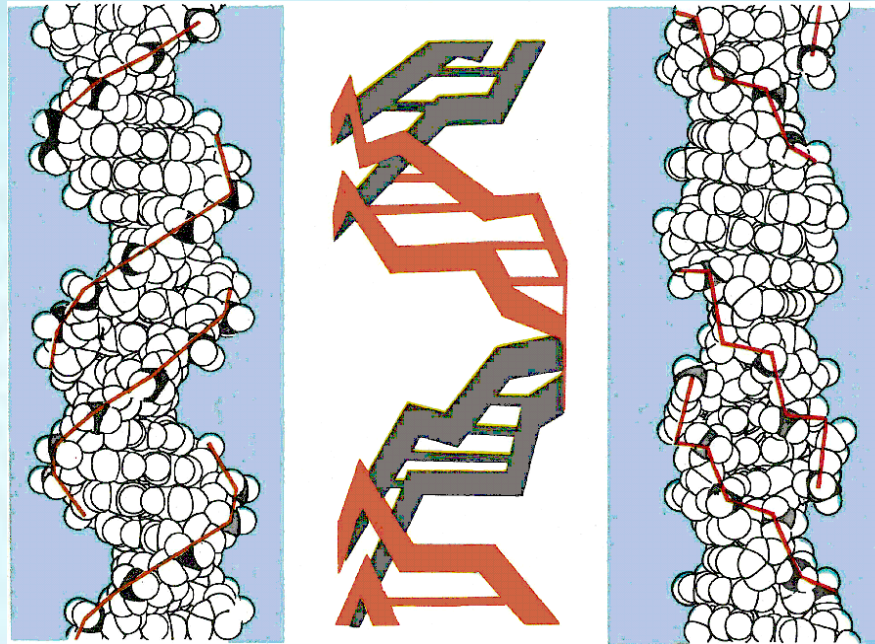
## Сравнительная структура канонических А- и В-форм ДНК и неканонической левозакрученной Z-ДНК



Z-ДНК впервые охарактеризована А.Ричем при исследовании кристаллической структуры самокомплементарного олигонуклеотида  $d(\text{GCGCGC})$

# Z-ДНК

Молекулы ДНК, содержащие повторяющиеся пурин-пиримидиновые последовательности, могут образовывать левозакрученную зигзагообразную Z-форму, которая сохраняет Уотсон-Криковский тип спаривания и антипараллельную ориентацию цепей с 12 парами нуклеотидов на виток спирали. Пуриновый нуклеозид в Z-ДНК имеет син-конформацию, а пиримидиновый – анти; конформация сахара, соответственно, N и S.



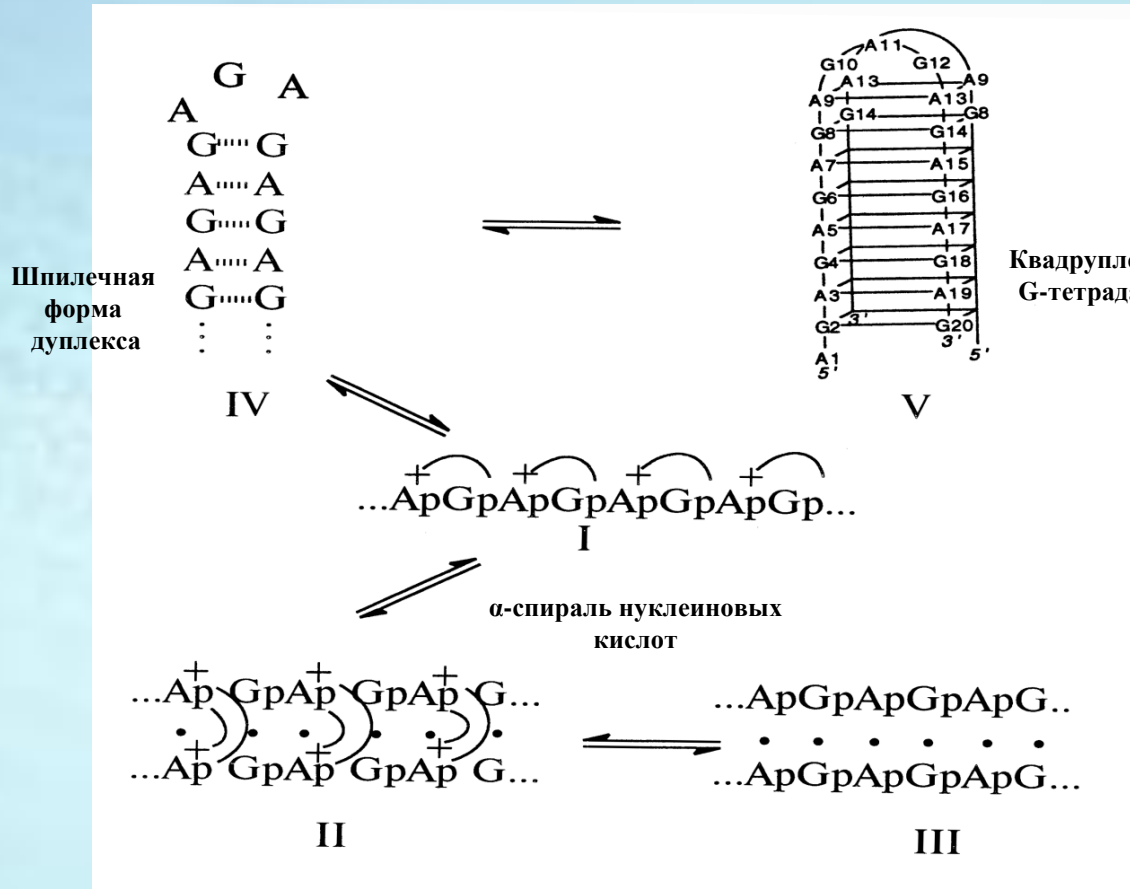
B-ДНК

Z-ДНК

$$d(CG)_n / d(CG)_n > d(TG)_n / d(AC)_n > d(TA)_n / d(TA)_n$$

Для нейтрализации отрицательных зарядов фосфатных групп, которые слишком сближены с Z-ДНК, требуется высокая ионная сила (до 5 М NaCl).

# Повторяющаяся последовательность $d(AG)_n$ образует 5 различных неканонических конформаций



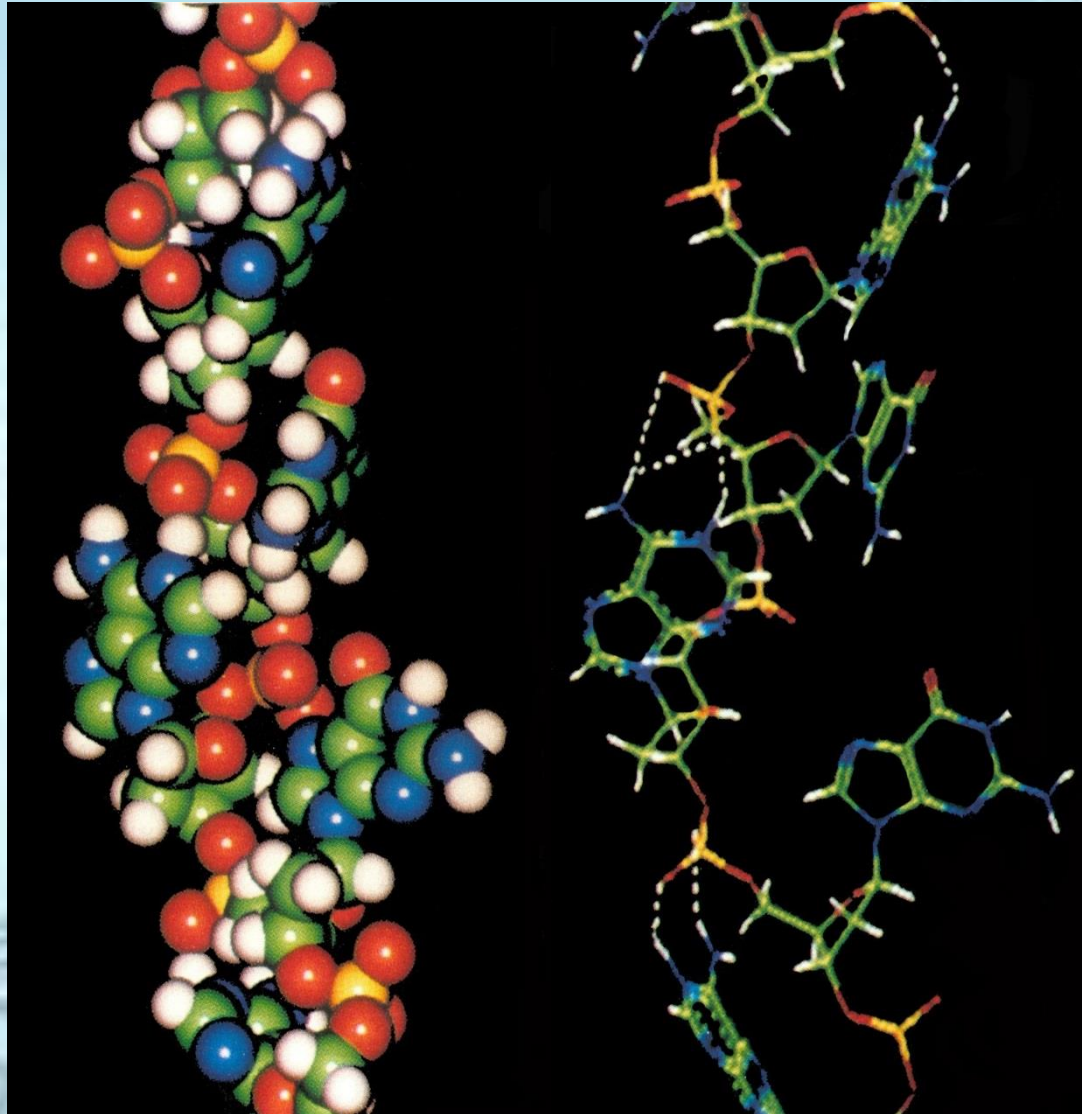
Их существование зависит от особой комбинации

- рН
- ионной силы
- длины повтора
- концентрации ДНК
- типа катионов
- температуры

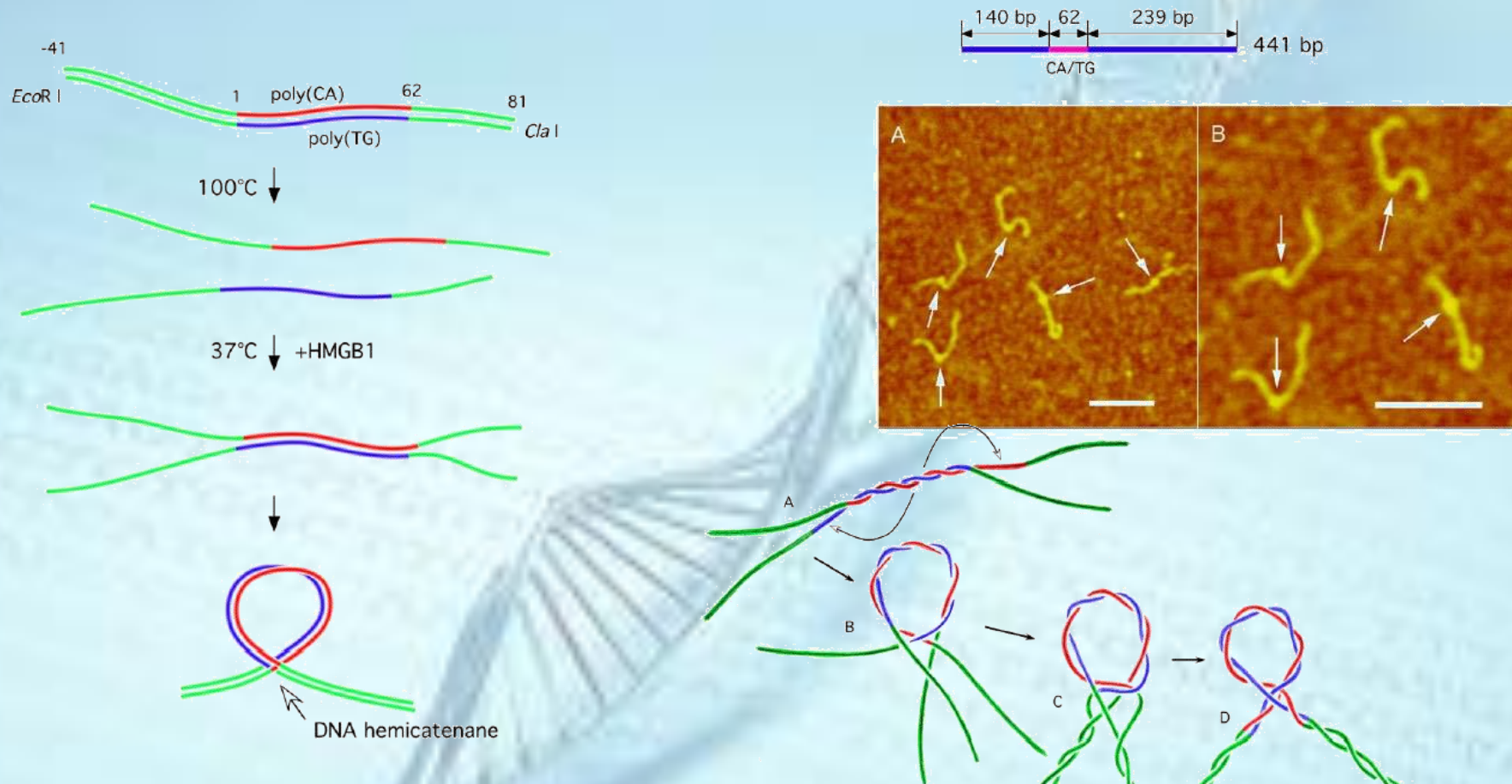
рН-зависимый параллельный дуплекс с  $A^+ \cdot A^+$  and  $G \cdot G$  парами оснований

рН-независимый параллельный дуплекс с  $A \cdot A$  and  $G \cdot G$  парами оснований

Одноцепочечная спираль, образованная  
 $d(AG)_{10}$  ( $\alpha$ -DNA)



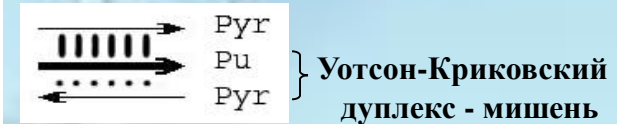
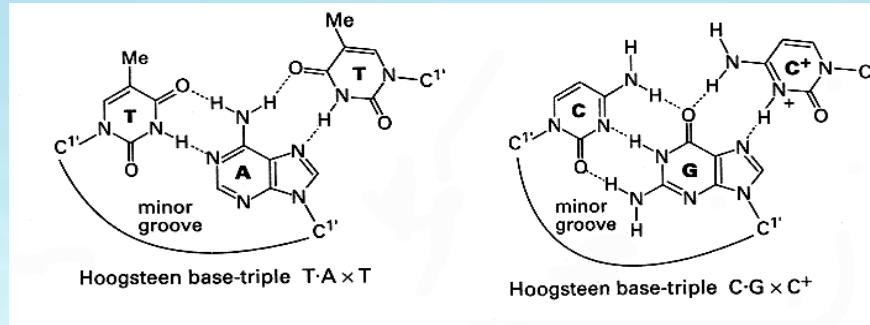
# Полукатенаны, образованные повторами d(CA/TG)



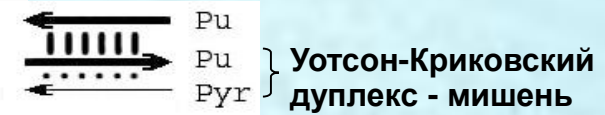
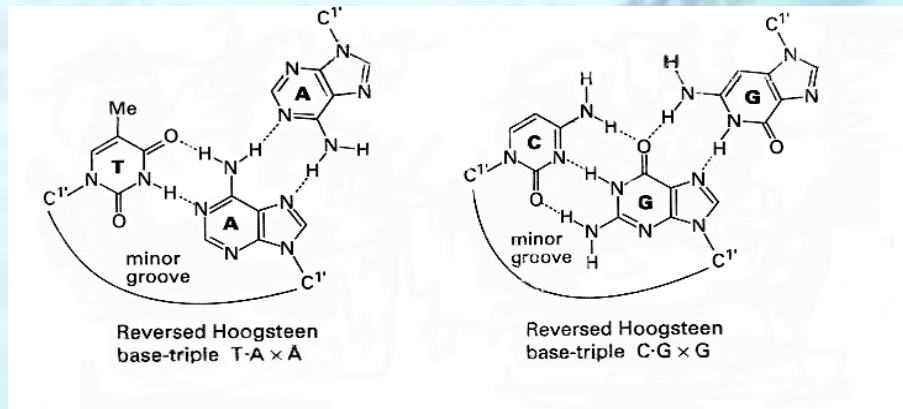
Образование колечек (полукатенанов) наблюдается после плавления ДНК, содержащей 31 повтор d(CA/TG) в окружении случайных последовательностей, и последующей ренатурации получившихся цепей в присутствии архитектурного белка HMGB1. Их наблюдали методом атомной силовой микроскопии.

# Трехспиральные структуры ДНК

**Пиримидиновая третья цепь** связывается параллельно к пуриновой цепи дуплекса за счет Хугстеновских водородных связей. Протонирование цитозина третьей цепи делает стабильность этой системы рН-зависимой.



**Пуриновая третья цепь** связывается антипараллельно к пуриновой цепи дуплекса через обратные Хугстеновские водородные связи, формируя рН-независимые и геометрически различные триплеты.



**Сродство и специфичность связывания третьей цепи** зависит от ряда факторов:

- длина и нуклеотидный состав дуплекса мишени
- присутствие пурин-пиримидиновых инверсий в ДНК-дуплексе
- состав растворителя (концентрация одно- и двухвалентных ионов)

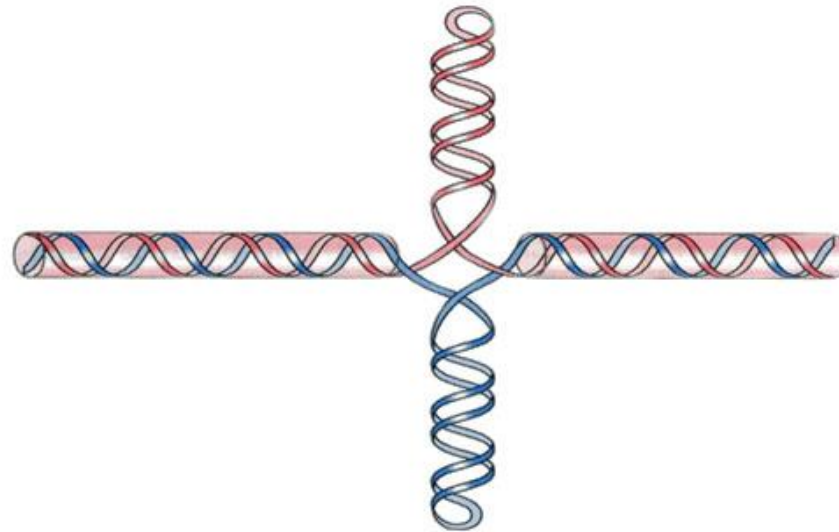
## Крестообразные формы ДНК



Двойная спираль ДНК, содержащая участок с палиндромной последовательностью



Локальное плавление



Крестообразная конформация

Палиндромные последовательности – те, которые читаются одинаково по «верхней» и «нижней» цепям ДНК-дуплекса, например,

5' d(CGCGAATTCGCG)  
3' d(GCGCTTAAGCGC)



# Prophase I Meiosis



# Prophase I Meiosis



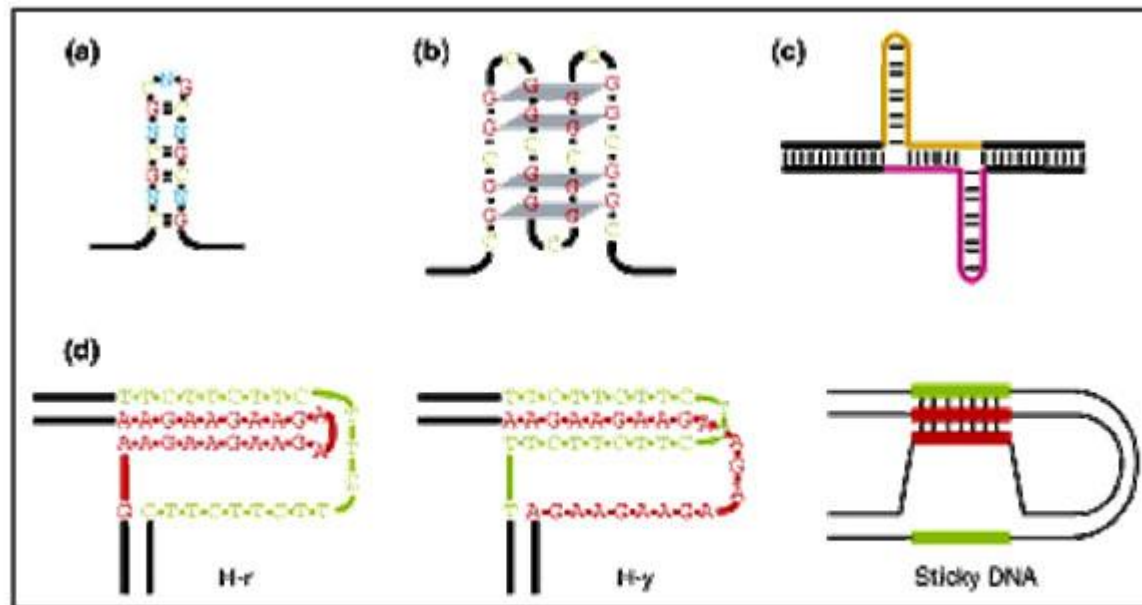
# Неканонические структуры ДНК, образуемые тринуклеотидными повторами

$d(\text{CGG})_n/d(\text{CCG})_n$ ,  $d(\text{CAG})_n/d(\text{CTG})_n$ ,  $d(\text{GAA})_n/d(\text{TTC})_n$  и др. могут подвергаться экспансии (увеличению числа повторов) *in vivo*, что приводит к развитию тяжелых нейродегенеративных заболеваний:

- Болезнь (хорея) Хантингтона
- Атаксия Фредерика
- Мускульная атрофия
- Синдром ломкости X-хромосом (>15 болезней).

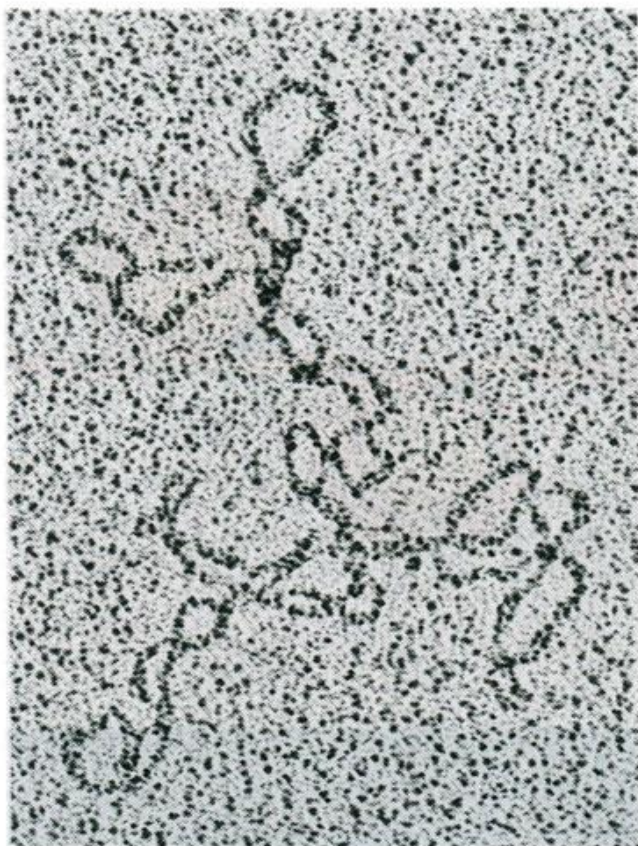
Они проявляются, когда количество повторов превысит патологический барьер.

Имеется прямая связь между экспансией тринуклеотидных повторов и их способностью образовывать неканонические структуры.



Неканонические структуры ДНК, образованные тринуклеотидными повторами:  
(a) несовершенный шпильчатый дуплекс [ $d(\text{CNG})_n$ ]; (b) G-квадруплекс [ $d(\text{CGG})_n$ ];  
(c) дуплекс, содержащий "шпильки" в комплементарных цепях;  
(d) ДНК-триплексы разного вида [ $d(\text{GAA})_n$ ]

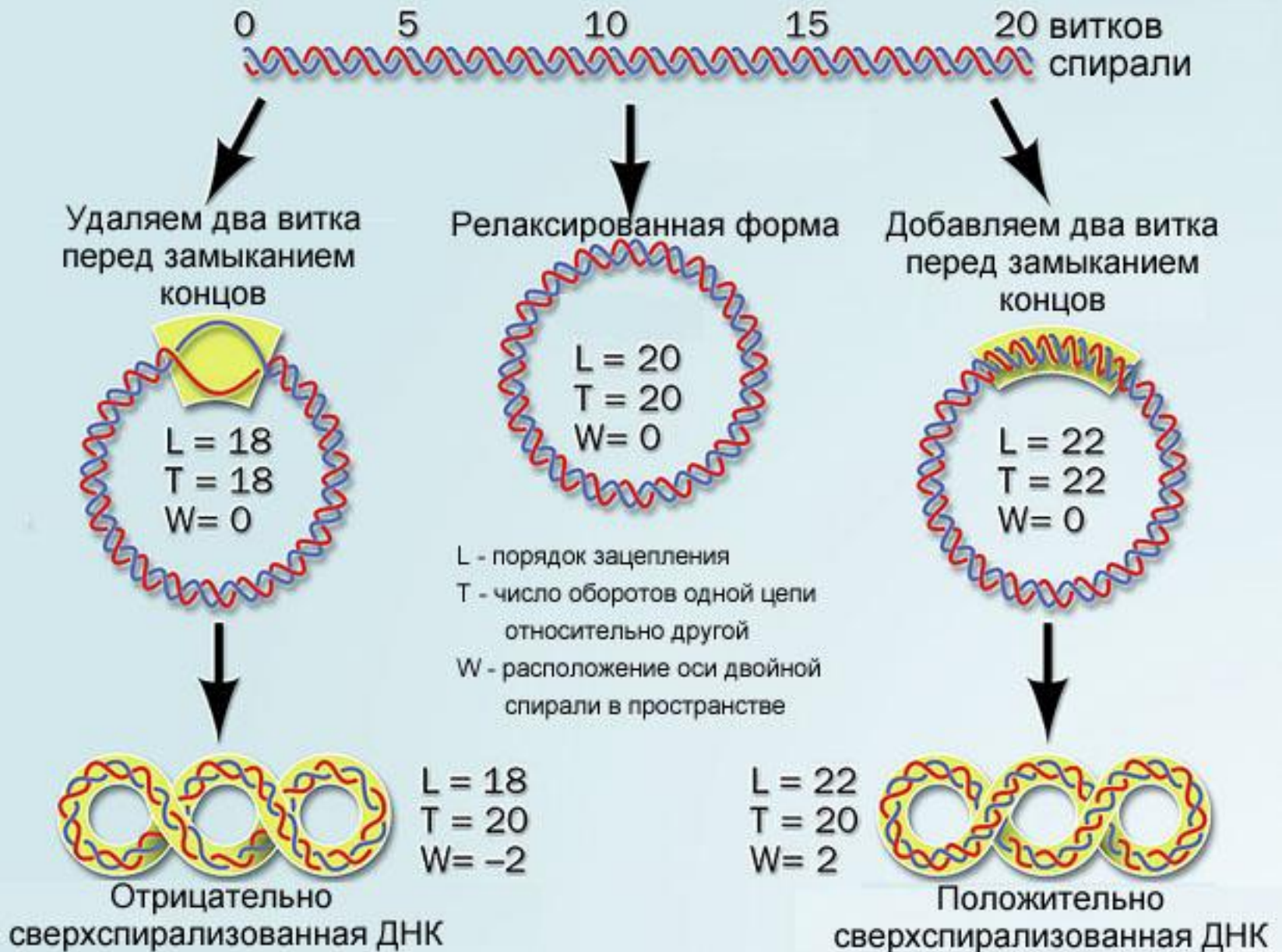
## Сверхспирализованная ДНК



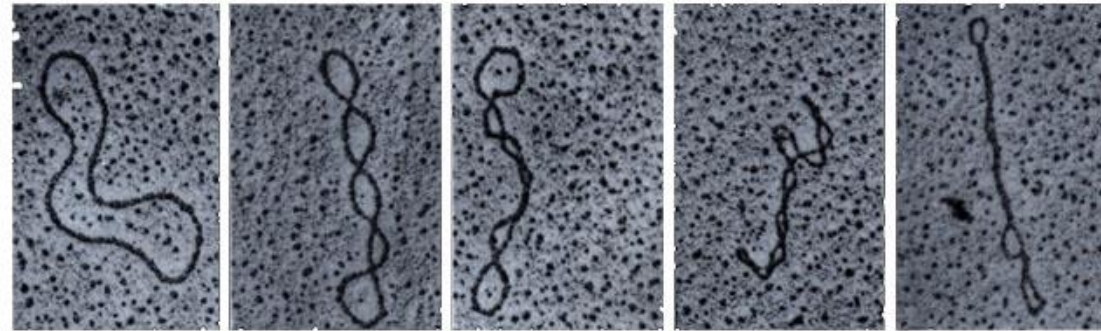
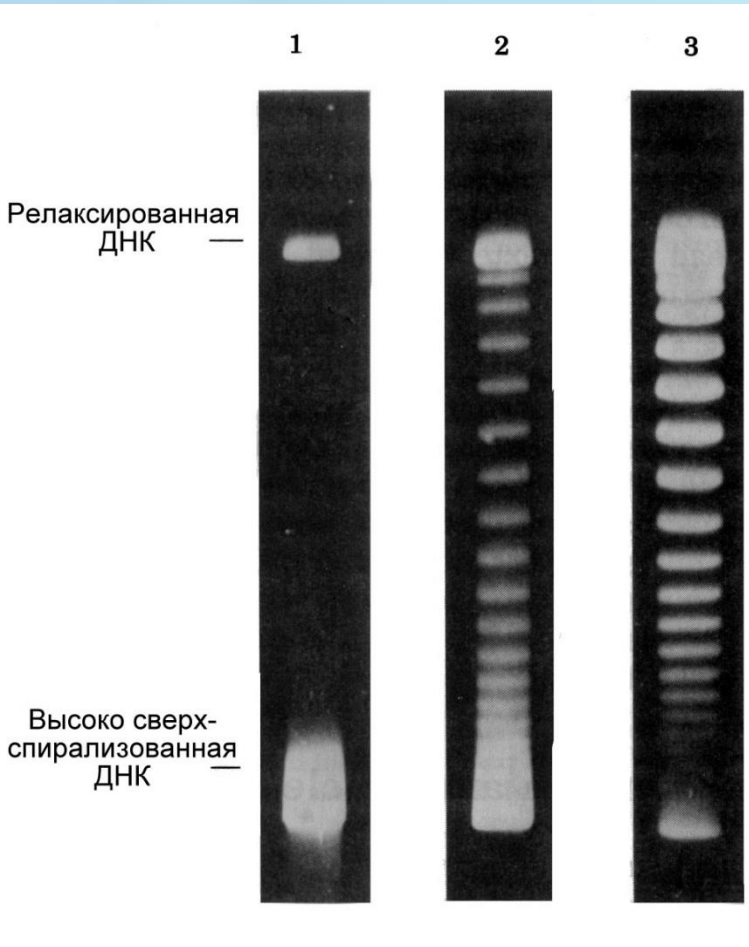
Сверхспирализация играет ключевую роль в функционировании генома, влияя на структурную динамику нуклеосом и способствуя образованию неканонических форм ДНК.

Д. Вонг, Дж. Виноград, М. Геллерт

# Схема, объясняющая возникновение отрицательно и положительно сверхспирализованных ДНК

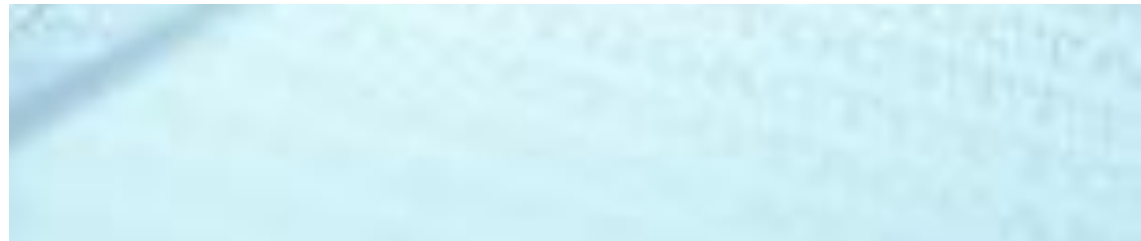


# Идентификация сверхспирализованной ДНК методом электрофореза в агарозном геле



Нет  
сверхспирализации

Высокая степень  
сверхспирализации



Разделение топоизомеров в ковалентно-связанных кольцевых ДНК.

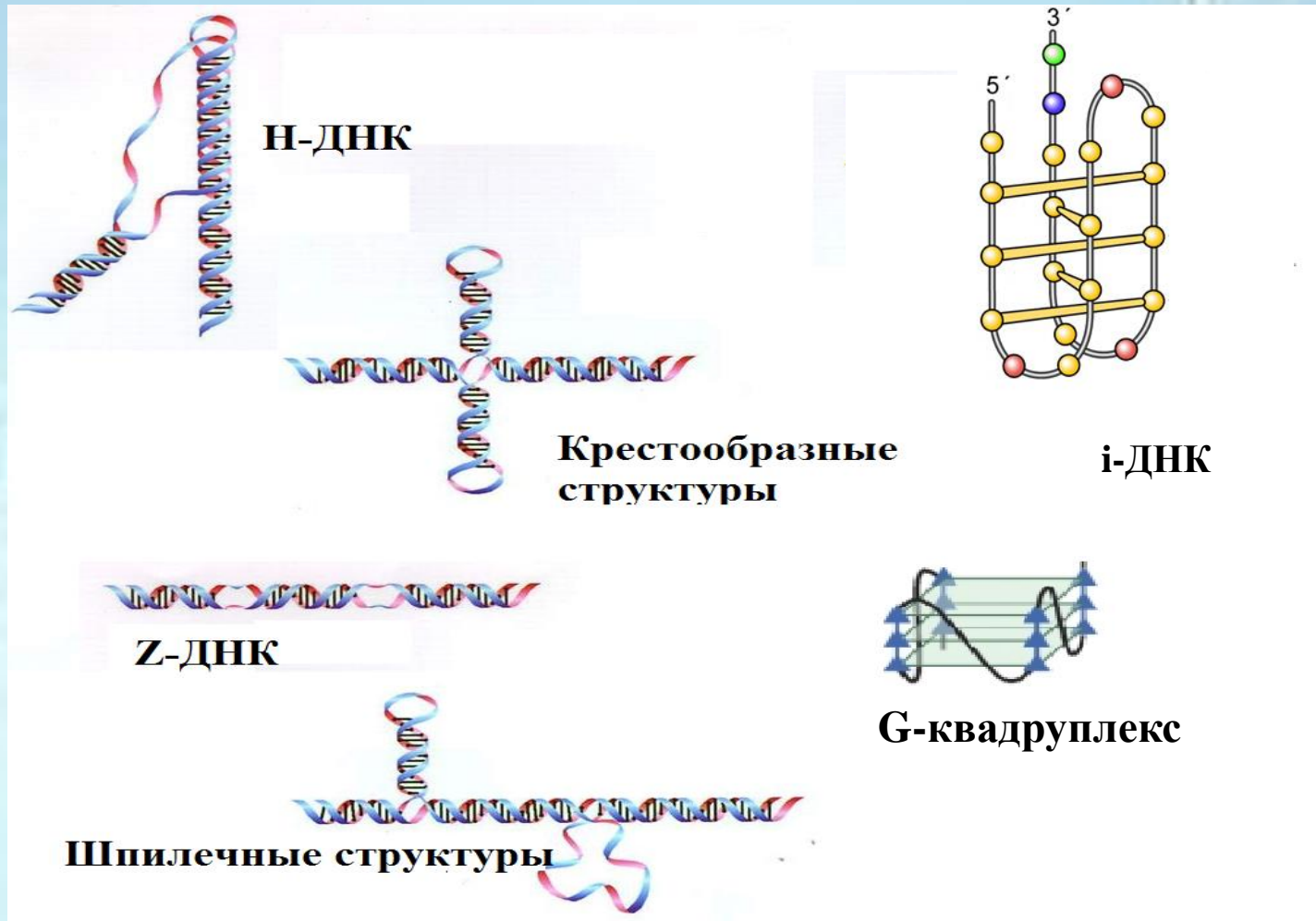
## Область элонгации транскрипции



### Динамическая модель организации хроматина

С ростом отрицательной сверхспирализации быстро увеличивается вероятность раскрытия пар оснований (локального плавления двойной спирали), что способствует снятию отрицательных сверхвитков.

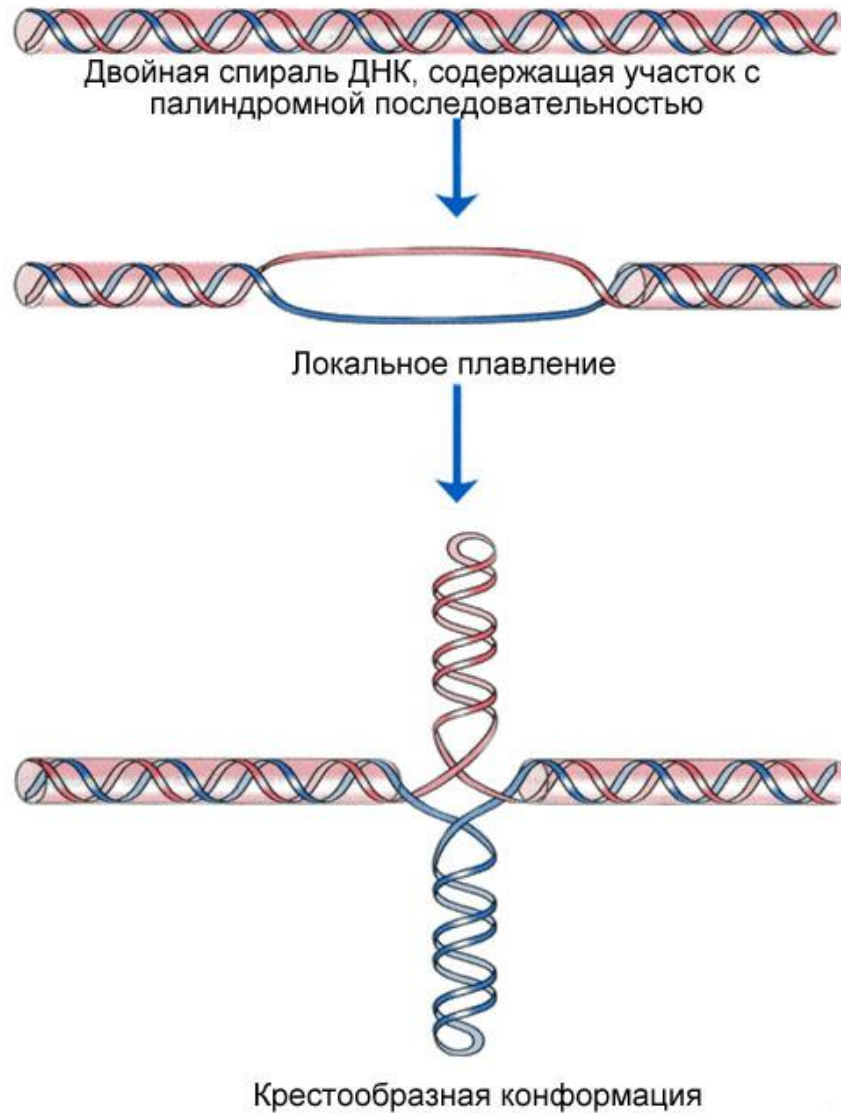
## Неканонические структуры ДНК, образованию которых способствует отрицательная сверхспирализация



При определенной плотности отрицательных сверхвитков повторяющаяся пурин-пиримидиновая последовательность самопроизвольно переходит в Z-форму, снимая напряжение сверхспирализации, даже при физиологических значениях ионной силы.



## Крестообразные формы ДНК



Палиндромные последовательности (инвертированные повторы) – те, которые читаются одинаково по «верхней» и «нижней» цепям ДНК-дуплекса, например,

5' d(CGCGAATTCGCG)

3' d(GCGCTTAAGCGC).

Если достаточно длинные вставки подобных последовательностей внедрены в плазмидную ДНК, то при определенной плотности сверхспирализации ( $\sigma = \tau / L_0$ ) они могут переходить в крестообразную форму. Время релаксации «крестов» (их растворения в В-форме) сильно зависит от температуры.

Инвертированные повторы – обычная черта вирусных, прокариотических и эукариотических регуляторных районов (промоторов, терминаторов и ориджинов репликации).

# Формирование G-квадруплекса и i-ДНК из цепей, связанных в дуплексную структуру

Последовательность ДНК, образующая неканонические формы



G-квадруплекс



# H-форма ДНК

В условиях отрицательной сверхспирализации H-ДНК могут образовывать гомопурин-гомопиримидиновые последовательности, имеющие зеркальную ось симметрии. Образующийся одноцепочечный район используется как диагностический маркер на H-форму (обработка S1-нуклеазой).

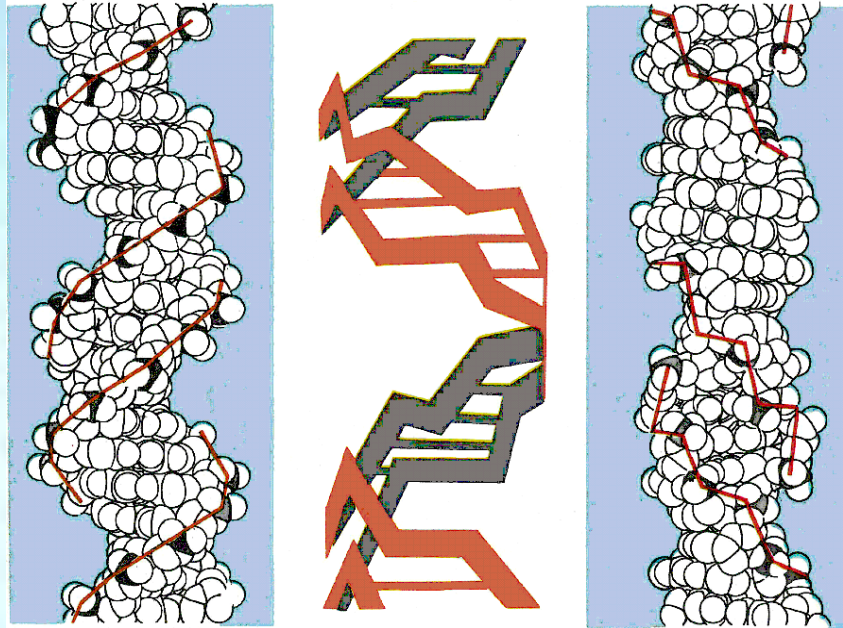


Последовательности, формирующие H-ДНК, найдены в промоторах многих эукариотических генов, в центромерных районах хромосом и горячих точках рекомбинации. Полагают, что H-ДНК может вызывать паузы в работе полимераз во время репликации и транскрипции, участвовать в регуляции гомологичной рекомбинации ДНК и сборке хроматиновых доменов.

**В. Лямичев, С. Миркин, М. Франк-Каменецкий**

# Z-ДНК

Молекулы ДНК, содержащие повторяющиеся пурин-пиримидиновые последовательности, могут образовывать левозакрученную зигзагообразную Z-форму, которая сохраняет Уотсон-Криковский тип спаривания и антипараллельную ориентацию цепей с 12 парами нуклеотидов на виток спирали. Пуриновый нуклеозид в Z-ДНК имеет син-конформацию, а пиримидиновый – анти; конформация сахара, соответственно, N и S.



**B-ДНК**

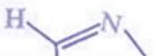
**Z-ДНК**

$$d(CG)_n / d(CG)_n > d(TG)_n / d(AC)_n > d(TA)_n / d(TA)_n$$

При определенной плотности отрицательных сверхвитков ( $\sigma = \tau / L_0$ ) повторяющаяся пурин-пиримидиновая последовательность самопроизвольно переходит в Z-форму, снимая напряжение сверхспирализации, даже при физиологических значениях ионной силы. Переход в левозакрученную Z-форму снимает вдвое больше сверхвитков, чем переход в крестообразную структуру. Z-ДНК локализована главным образом в регуляторных областях генома и ассоциирована с высокой транскрипционной активностью. Кроме того, она может облегчать гомологичную рекомбинацию ДНК и влиять на организацию и динамику хромосомных доменов.

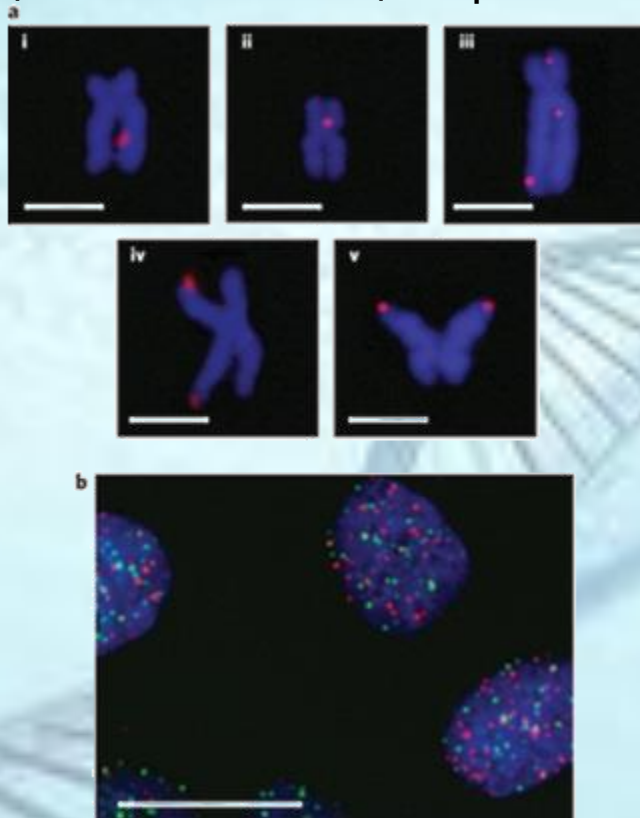
Неканонические формы ДНК узнаются и связываются с многочисленными белками и ферментами (которые стабилизируют или разрушают их). Модулируя активность этих белков, неканонические структуры могут влиять на ключевые клеточные процессы

- ▶ репликации
- ▶ транскрипции
- ▶ рекомбинации
- ▶ защиты хромосомных концов
- ▶ организации хроматина
- ▶ репарации геномных повреждений
- ▶ метилирования ДНК
- ▶ мутагенеза



## Визуализация G-квадруплексов в живой клетке

Для выявления G-квадруплексов были получены антитела, которые не реагируют на одно-, двух- или трех-цепочечные формы ДНК, а специфически связываются с квадруplexами. Антитела были помечены специальной флуоресцентной меткой, благодаря которой с помощью электронного микроскопа можно было увидеть расположение G-квадруплексов в ядрах клеток. Было показано, что квадруплексы находятся как на концах хромосом, так и внутри них.

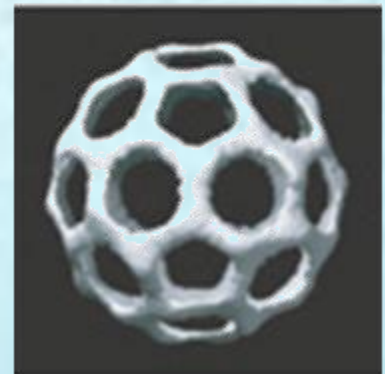
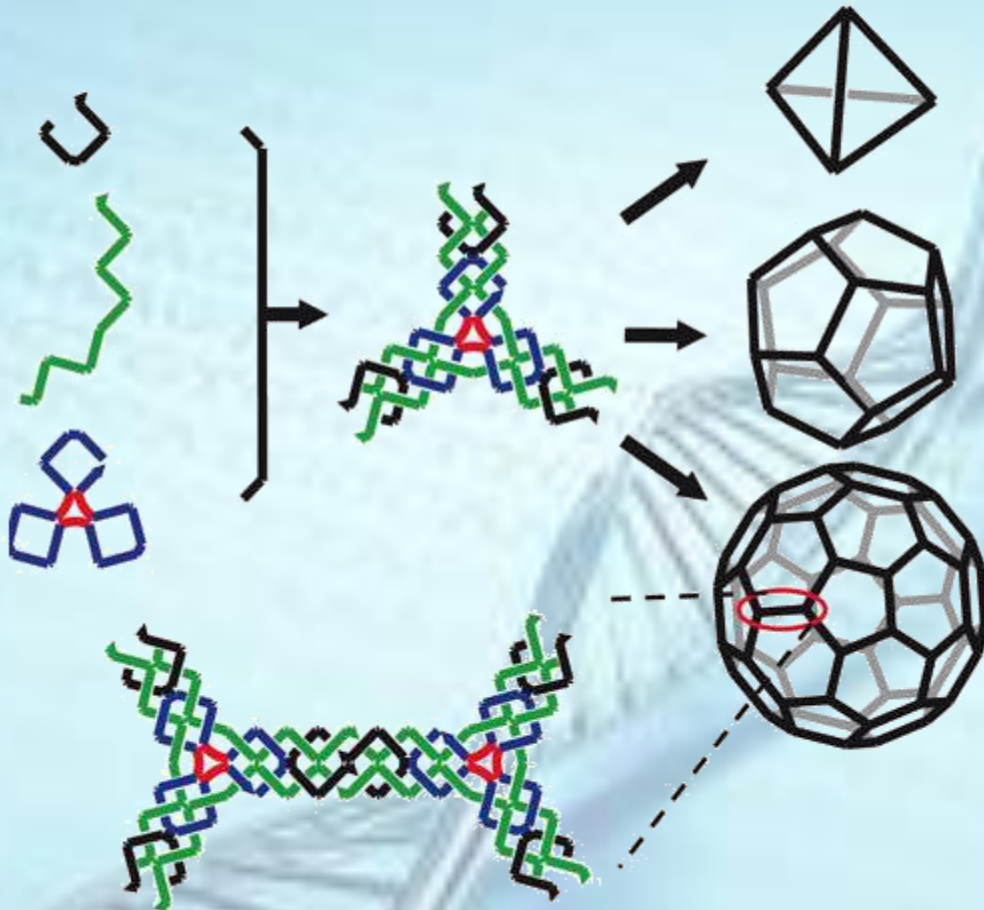


При этом, в зависимости от стадии клеточного цикла, их распределение меняется. Наибольшее количество G-квадруплексов было обнаружено в S-фазе клеточного цикла, то есть в период активной репликации (удваивания) ДНК перед делением клетки.

## Биологическая роль неканонических структур ДНК находится в стадии активного изучения. Что известно в настоящее время?

- Последовательности, образующие неканонические формы, являются эволюционно консервативными.
- Они расположены в самых важных участках эукариотических геномов и представляют собой мощную сеть новых регуляторных механизмов.
- Показано, что некоторые неканонические формы образуются в живой клетке и влияют на биологические процессы. Они выполняют свои функции, иногда полезные, иногда вредные для клетки, а потом снова растворяются в море В-ДНК.
- Образование этих структур путем перестройки участков двойной спирали является термодинамически невыгодным процессом, но все энергетические затраты покрываются энергией сверхспирализации.
- Большую роль в сдвиге равновесия в сторону образования неканонических форм ДНК играют белки, которые узнают и стабилизируют такие структуры.

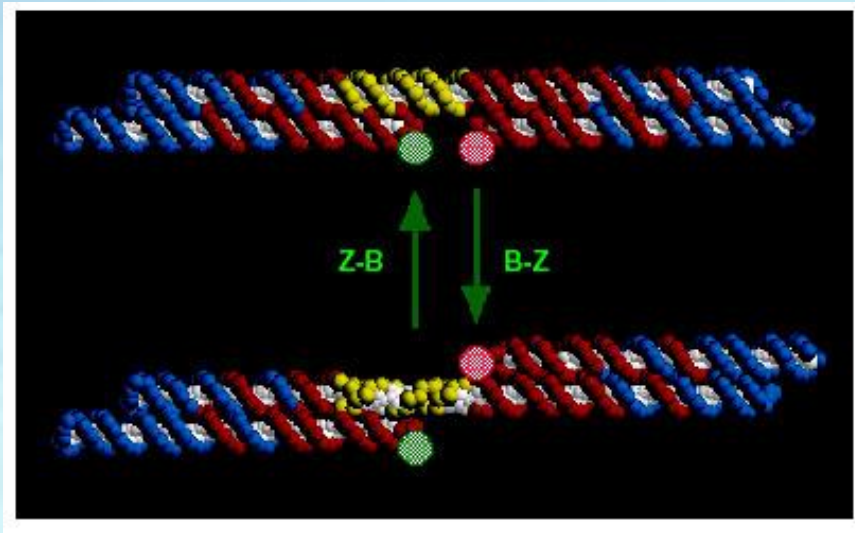
# Наноструктуры, образуемые молекулами ДНК





# Неканонические ДНК в биотехнологии

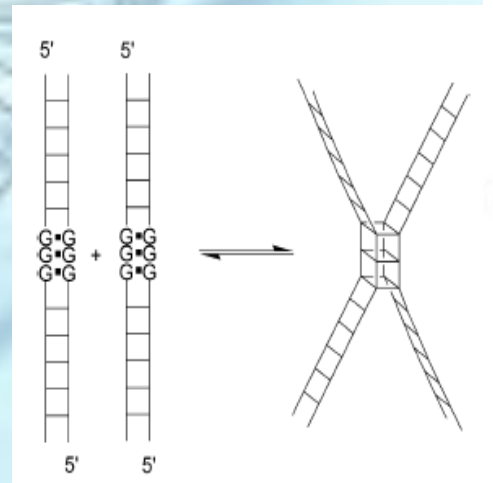
Неканонические структуры ДНК показывают свой потенциал для использования в биотехнологии как компоненты наноструктур, ионных каналов, биосенсоров, наномеханических устройств и переключаемых молекулярных машин.



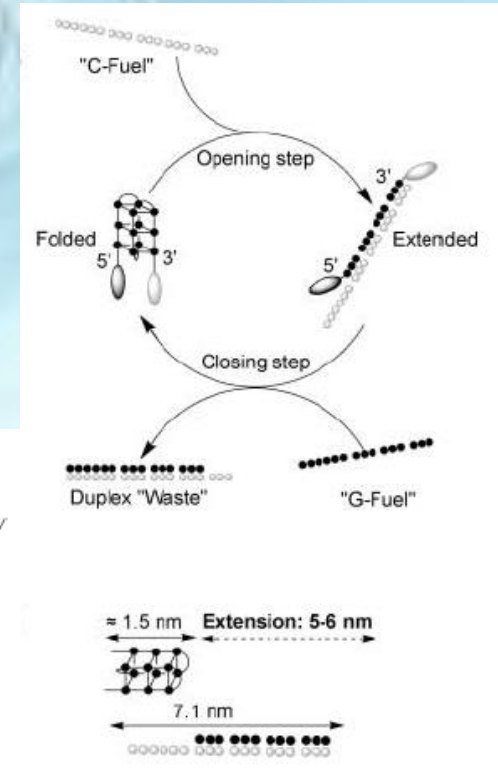
B-Z переход стимулирует поворот цепи ДНК на 180°



Сверхструктуры, образованные G-богатыми олигонуклеотидами



Объединение дуспиральных структур за счет образования G-квадруплекса.



G-квадруплексные наномашинны



# ***Рекомендуемая литература***

- В. Зенгер «Принципы структурной организации нуклеиновых кислот». М., Мир. 1987.
- М. Франк-Каменецкий «Королева живой клетки». М.: Аст-пресс книга. 2010.
- Ч. Кантор, П. Шиммел «Биофизическая химия». 1 том. М., Мир. 1984.
- Lehninger, Nelson, Cox, "Principles of biochemistry", 5 edition, Worth Publishers.
- «Нуклеиновые кислоты от А до Я» (ред. С.Мюллер). М., БИНОМ. Лаборатория знаний. 2012.

Спасибо за внимание!

