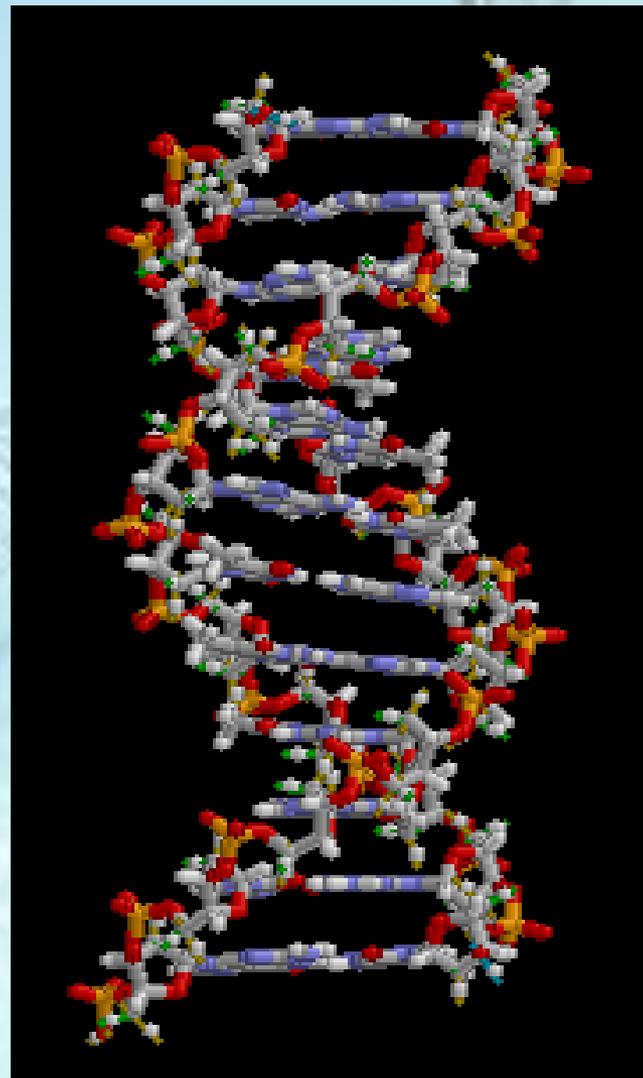




Межфакультетский курс лекций
Химический факультет МГУ
имени М.В. Ломоносова



«Геном человека: страхи и надежды»

nature



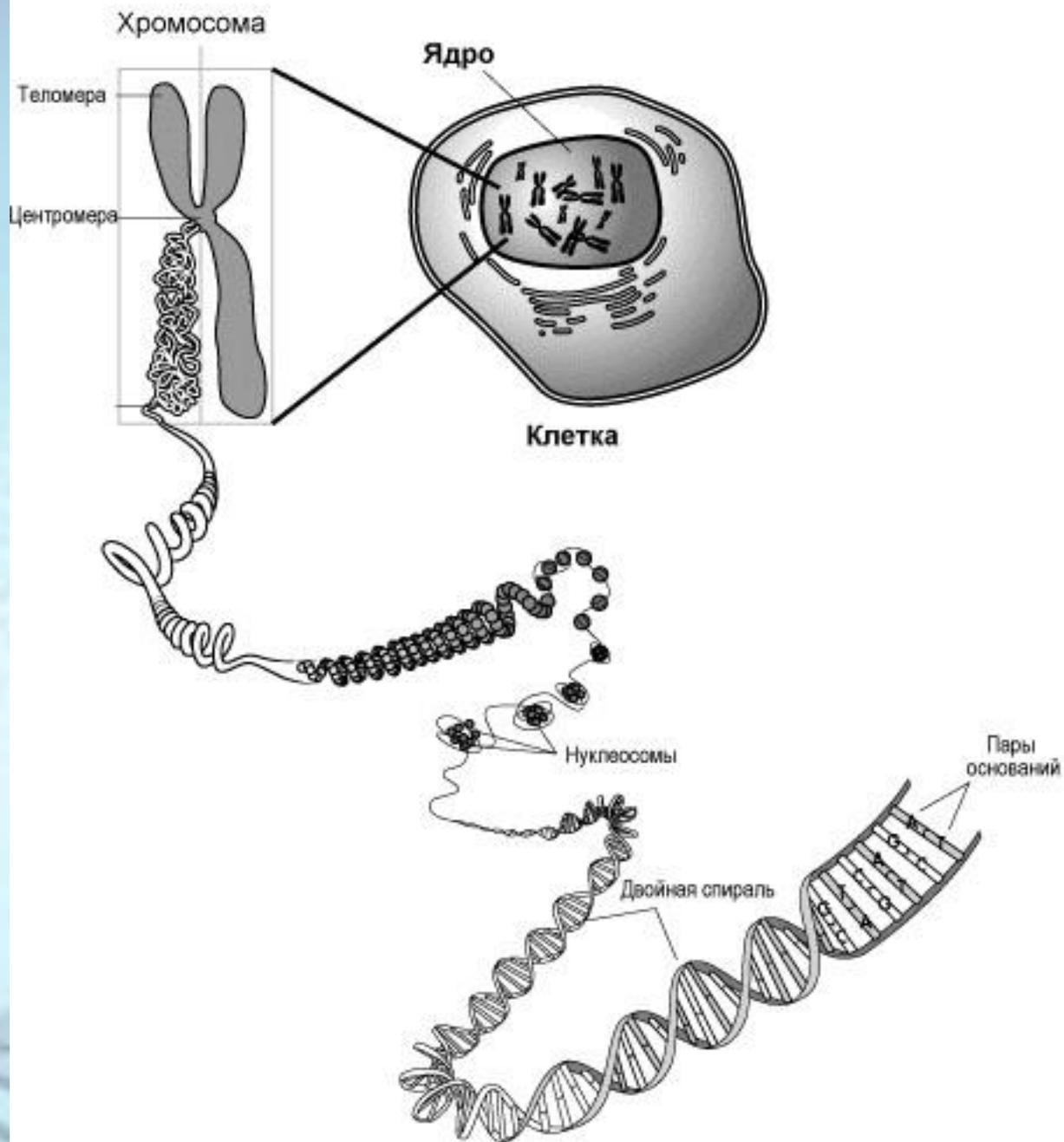
50
years

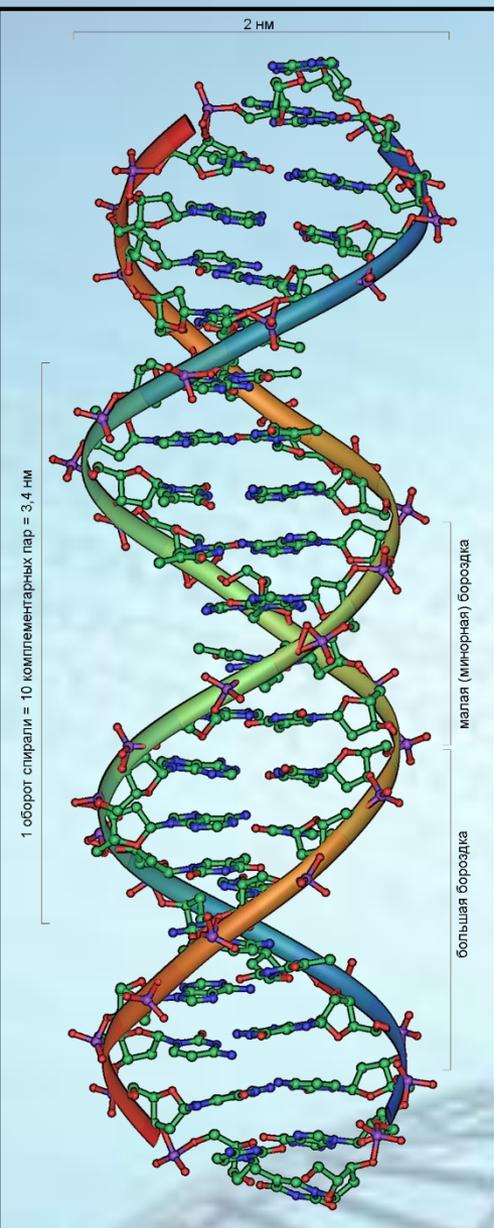


Produced with support from FfOche

**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».

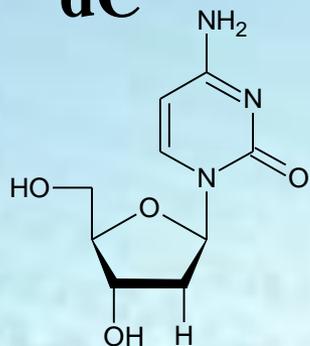
А. Рич

Нобелевский лауреат

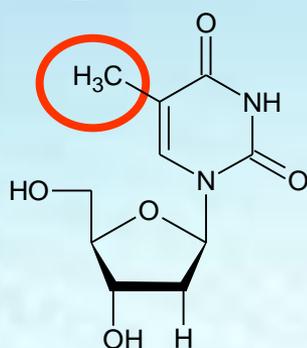
Структура нуклеозидов

ДНК

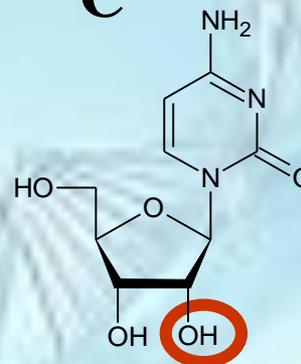
dC



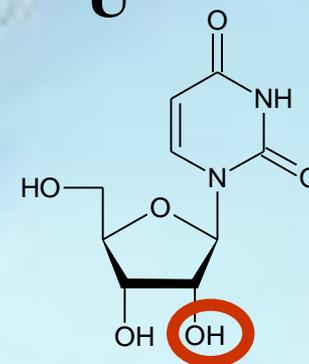
T



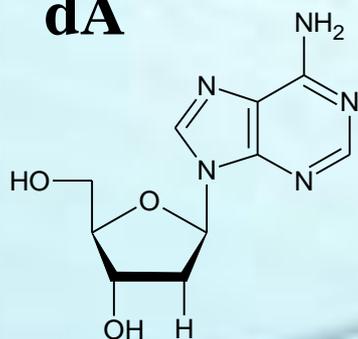
C



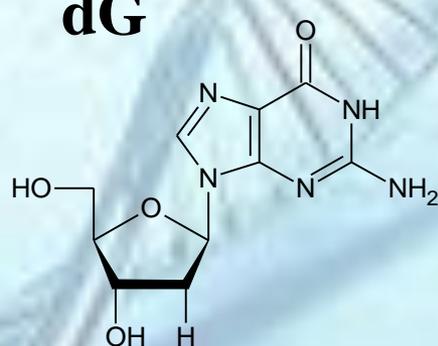
U



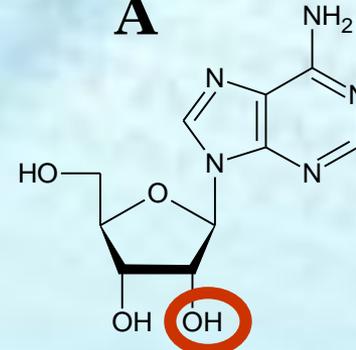
dA



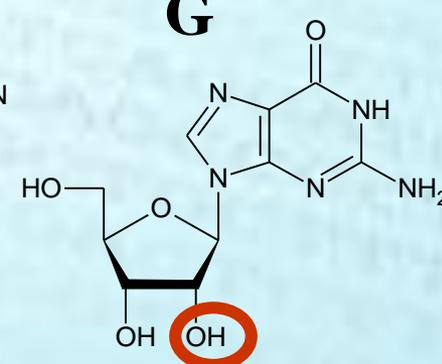
dG



A



G



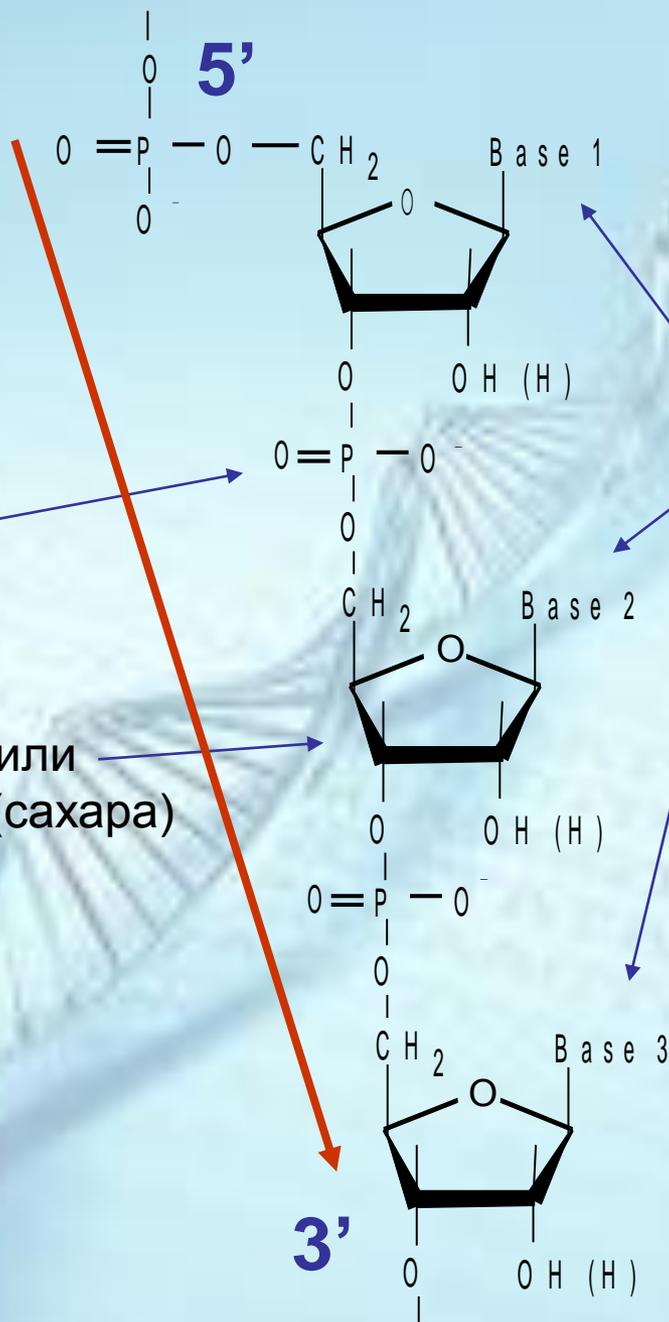
Нумерация атомов азотистых оснований – 1, 2, 3 и т.д., нумерация атомов остатков сахара – 1', 2', 3' и т.д.

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.

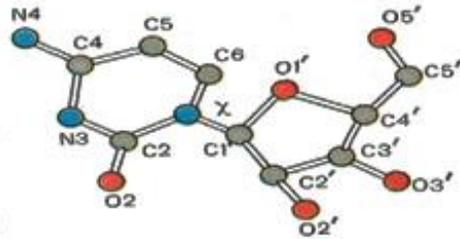
S (C2'-эндо)



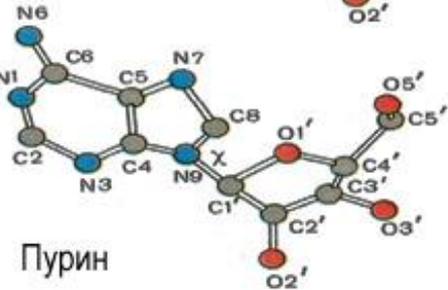
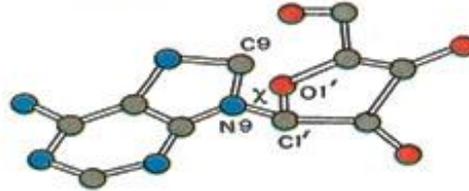
N (C3'-эндо)

Относительное расположение азотистого основания и остатка сахара в нуклеозидах

Пиримидин

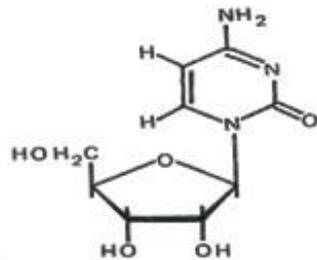
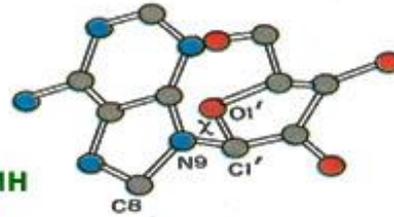


Анти

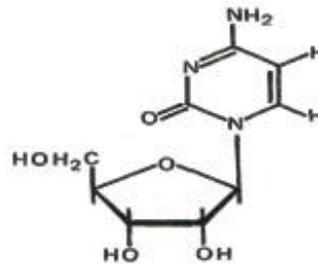


Пурин

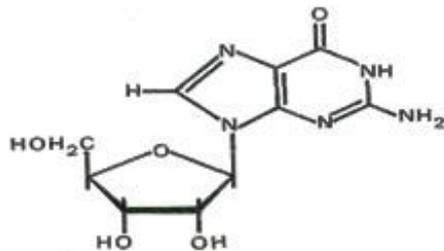
Син



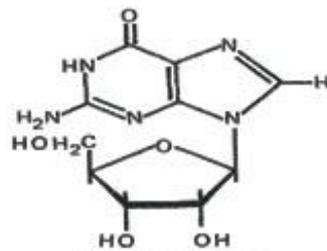
Анти-цитидин



Син-цитидин



Анти-гуанозин

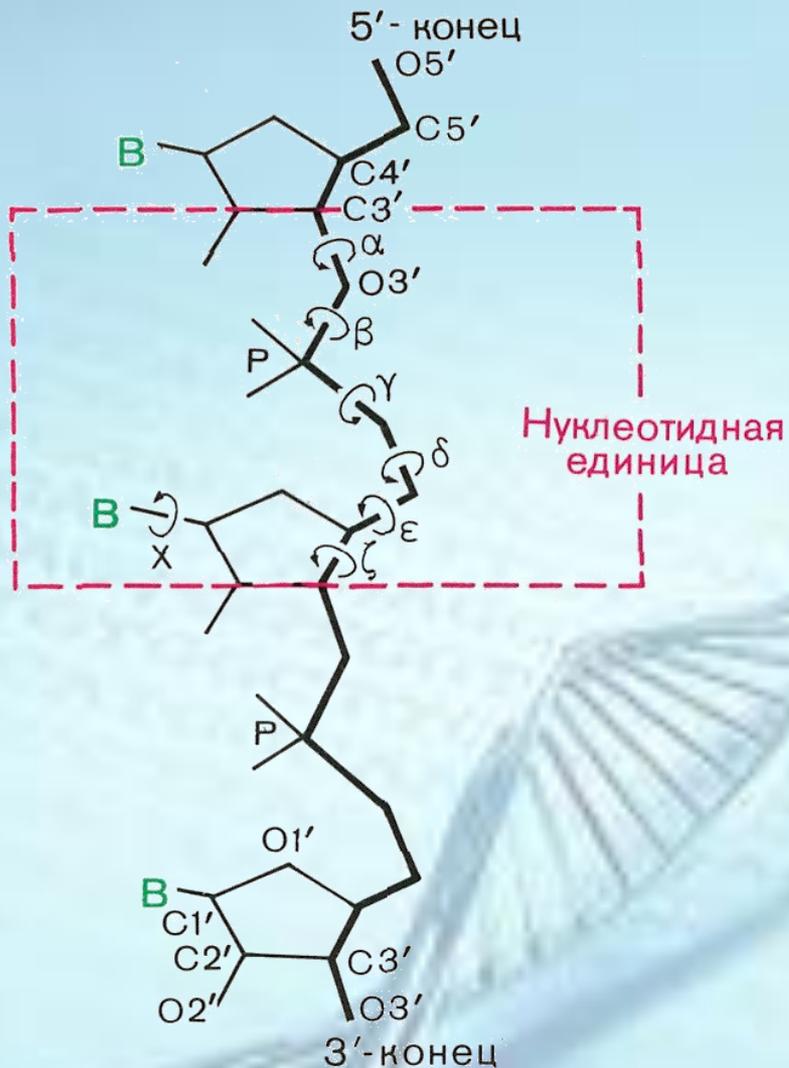


Син-гуанозин

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

Предпочтительней является анти-конформация, особенно для пиримидиновых нуклеозидов.

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

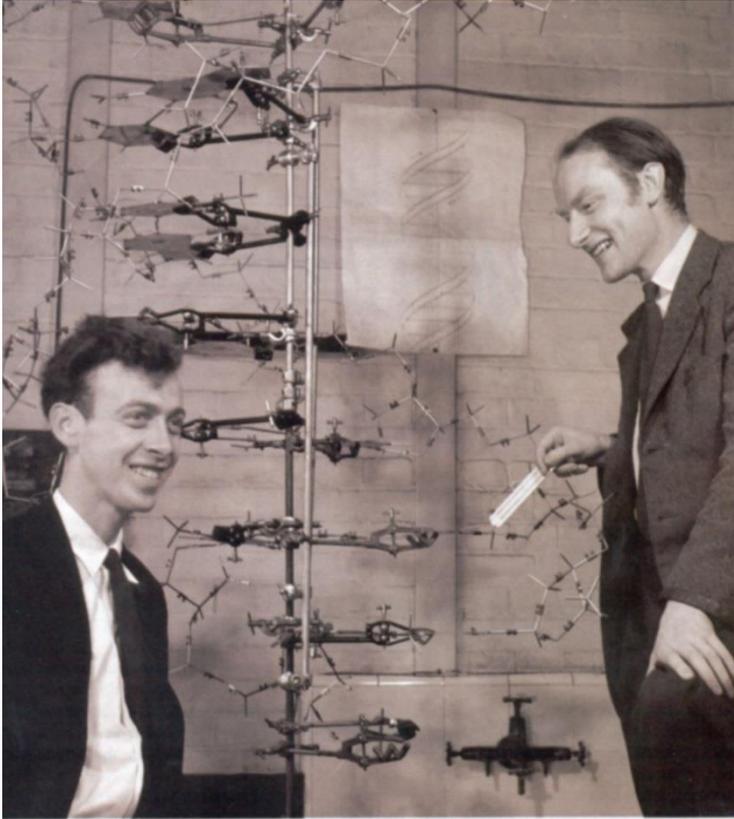


Конформация сахаро-фосфатного остова в полимерной цепи определяется шестью торсионными углами

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.

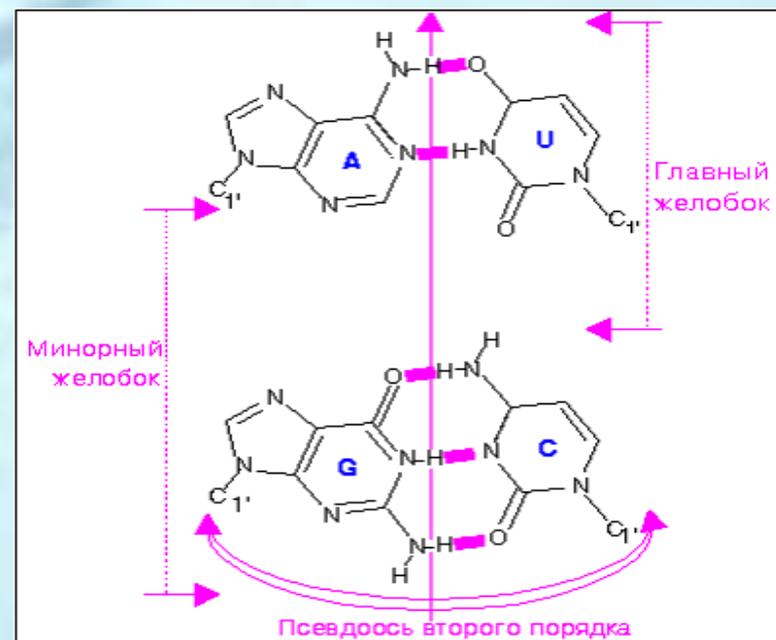
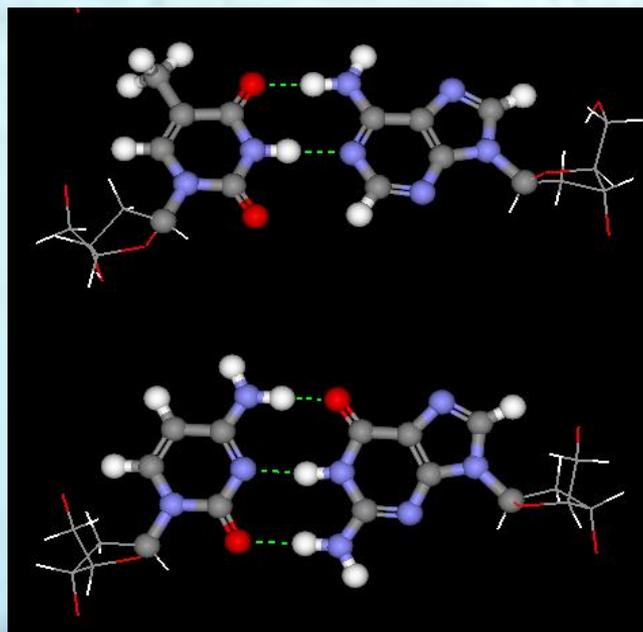
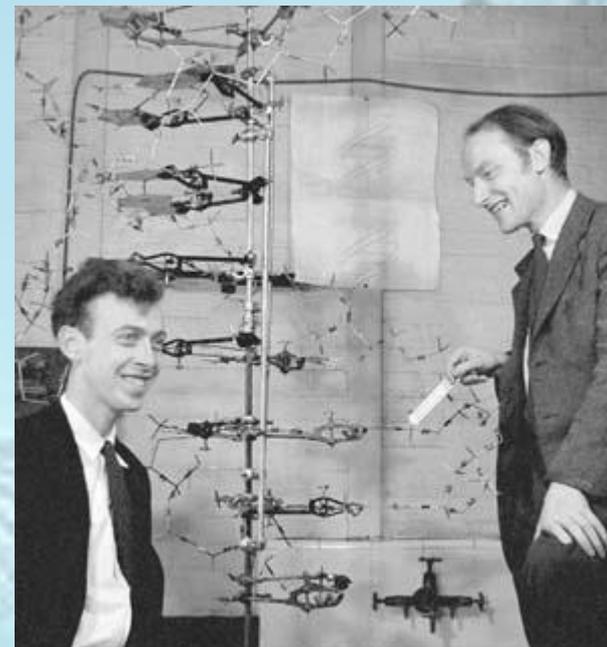
- Доказательство генетической функции ДНК.
- Несмотря на то, что нуклеотидный состав ДНК у разных организмов различен и не зависит от возраста организма, условий питания и внешней среды, во всех ДНК количество $A = T$ и $G = C$ (правило Чаргаффа).
- Установлены таутомерные формы гетероциклических оснований, 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 \AA и 34 \AA , в регулярной структуре.
- Открытие α -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)

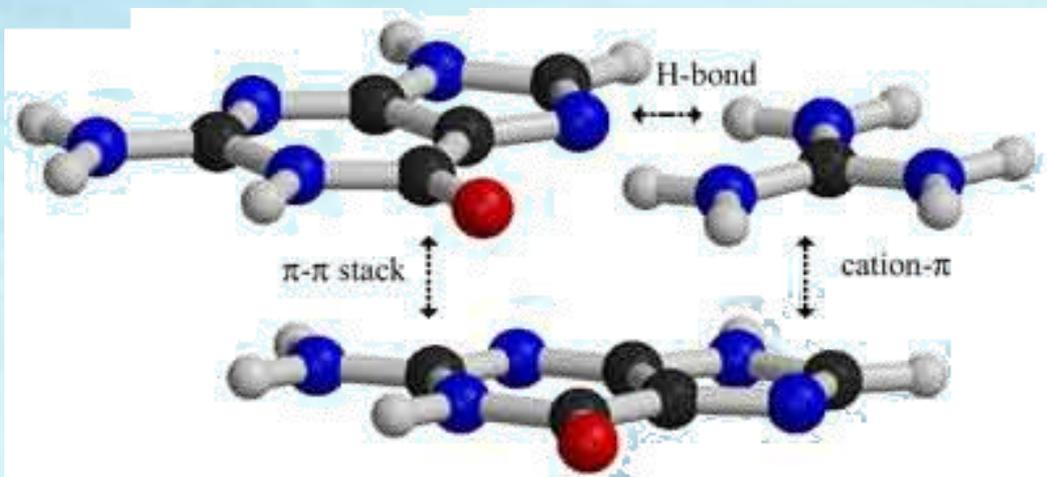
При изучении взаимодействия между различными и одинаковыми основаниями (в кристаллическом состоянии или в органических растворителях) были выявлены 28 пар оснований с числом водородных связей ≥ 2 , в том числе и пары А·Т и G·C, постулированные Уотсоном и Криком.

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

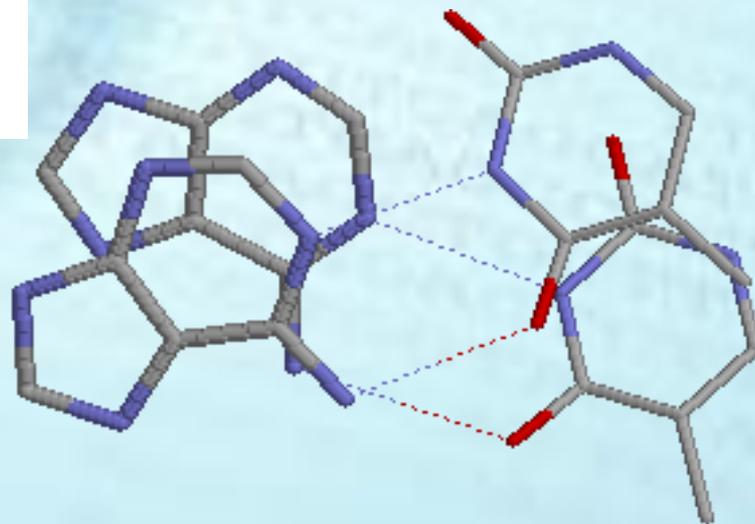


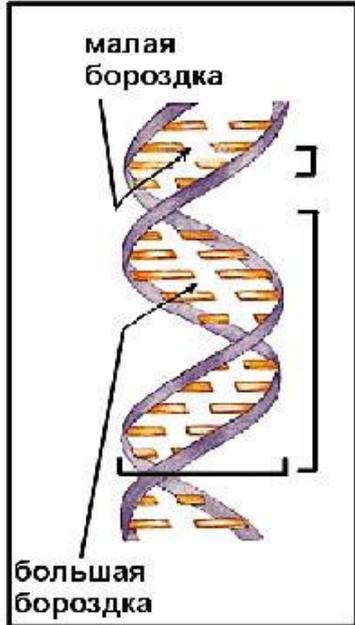
Стэкинг – взаимодействия (межплоскостные взаимодействия азотистых оснований, уложенных стопкой)

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

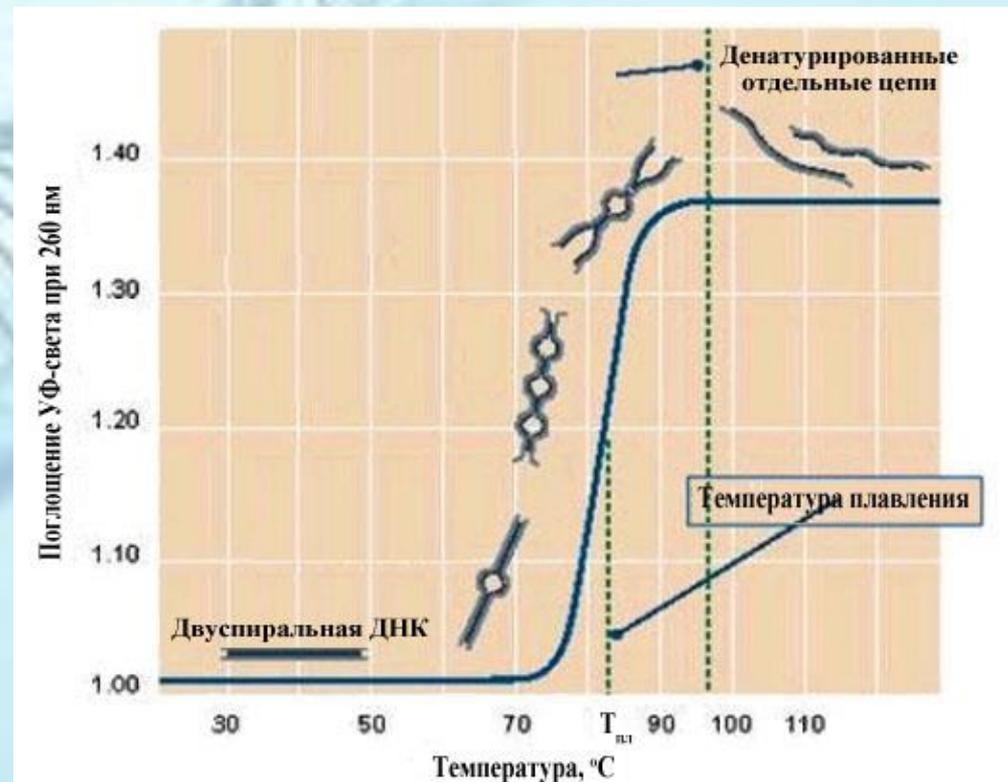
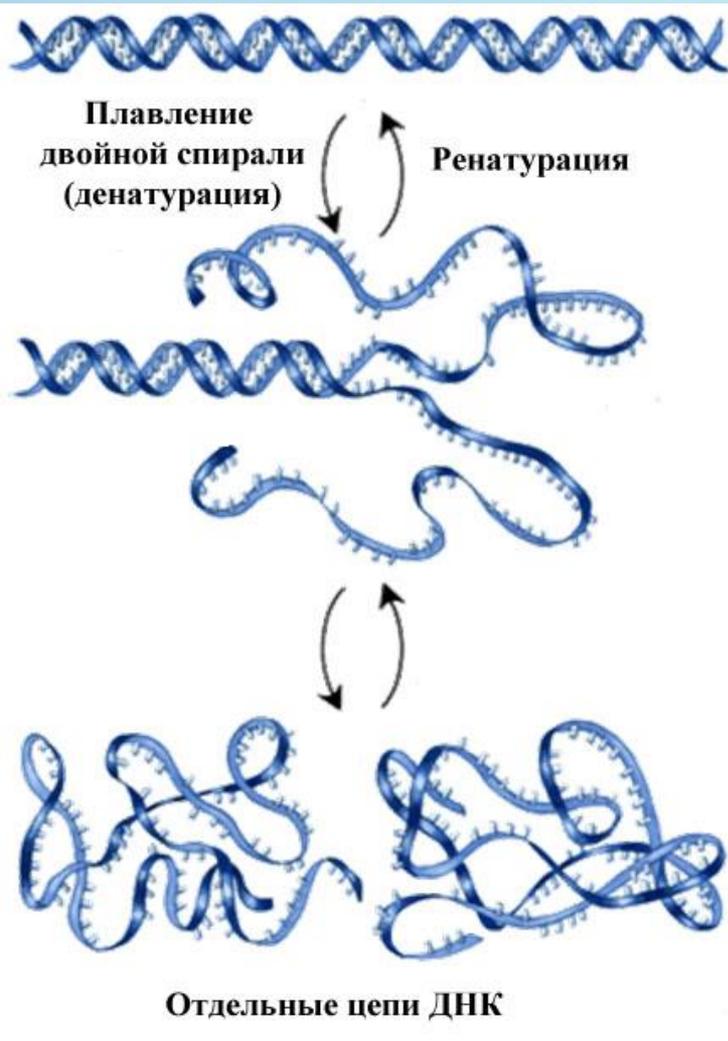
S

Плавление двуспиральной ДНК

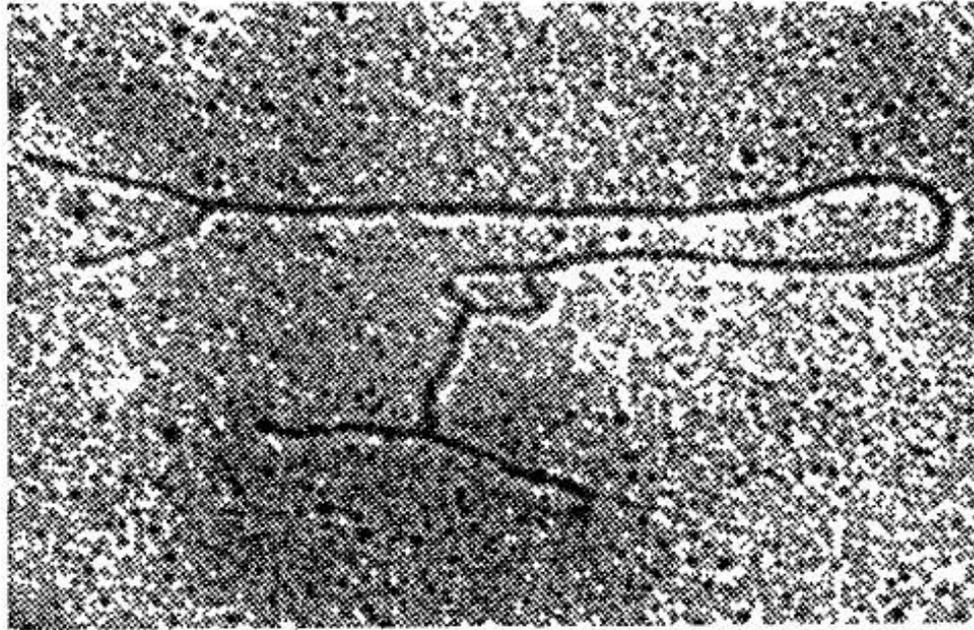
Физики рассматривают двойную спираль ДНК как аperiодический одномерный кристалл, прозрачный для видимого света и поглощающий УФ-свет.

Как кристаллическое тело, ДНК плавится, согласно

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



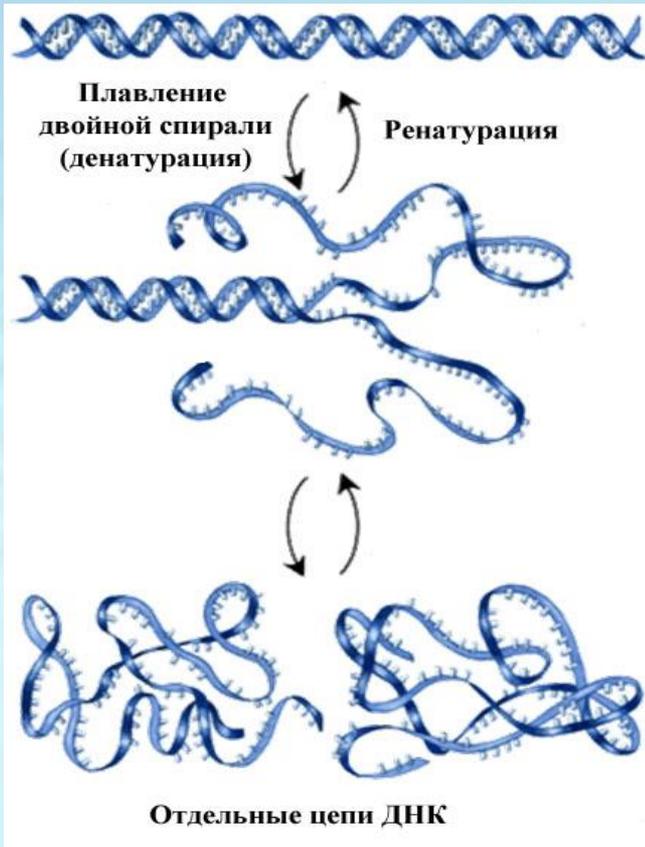
Электронная микроскопия плавления ДНК-дуплекса



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

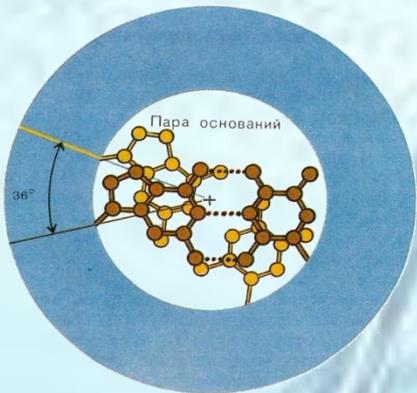
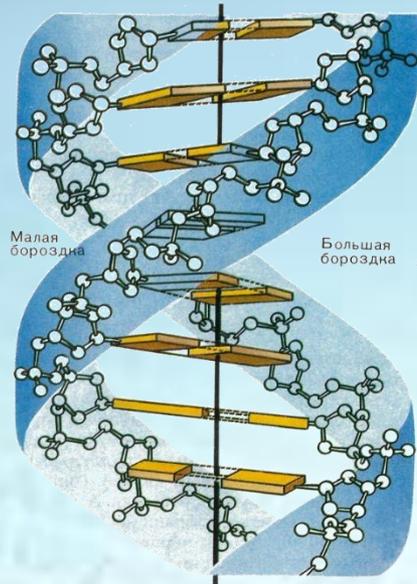
k – константа скорости второго порядка

t – время (сек)

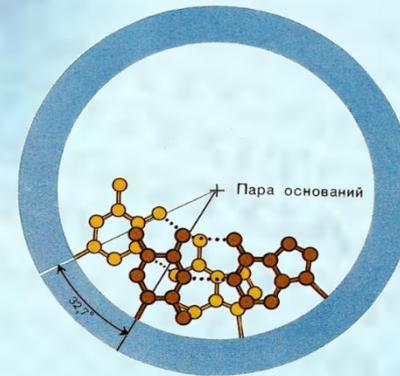
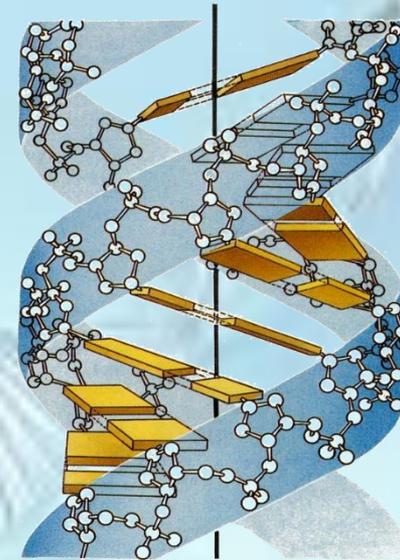
C_0 – начальная концентрация ДНК

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

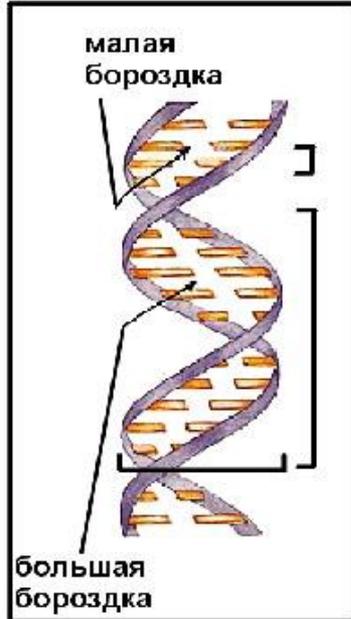


А-форма ДНК



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

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



ПАРАМЕТРЫ СПИРАЛИ

Вид спирали

A-ДНК

правая

B-ДНК

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

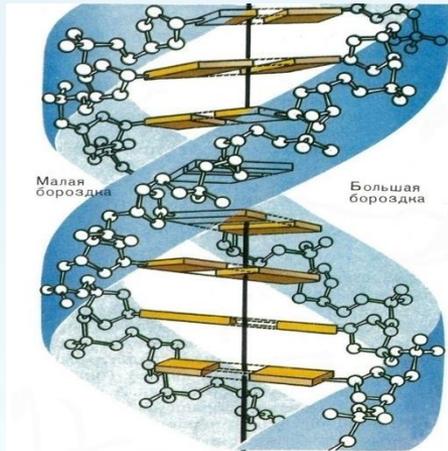
гликозидной связи

Конформация сахара

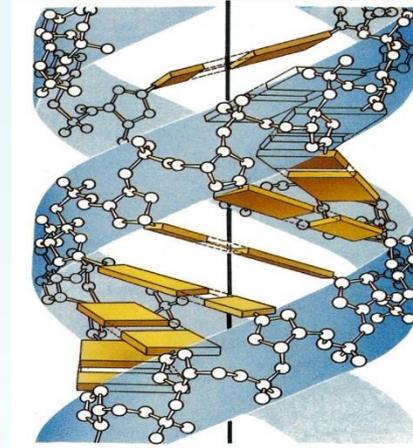
N

S

Канонические структуры ДНК



В-форма



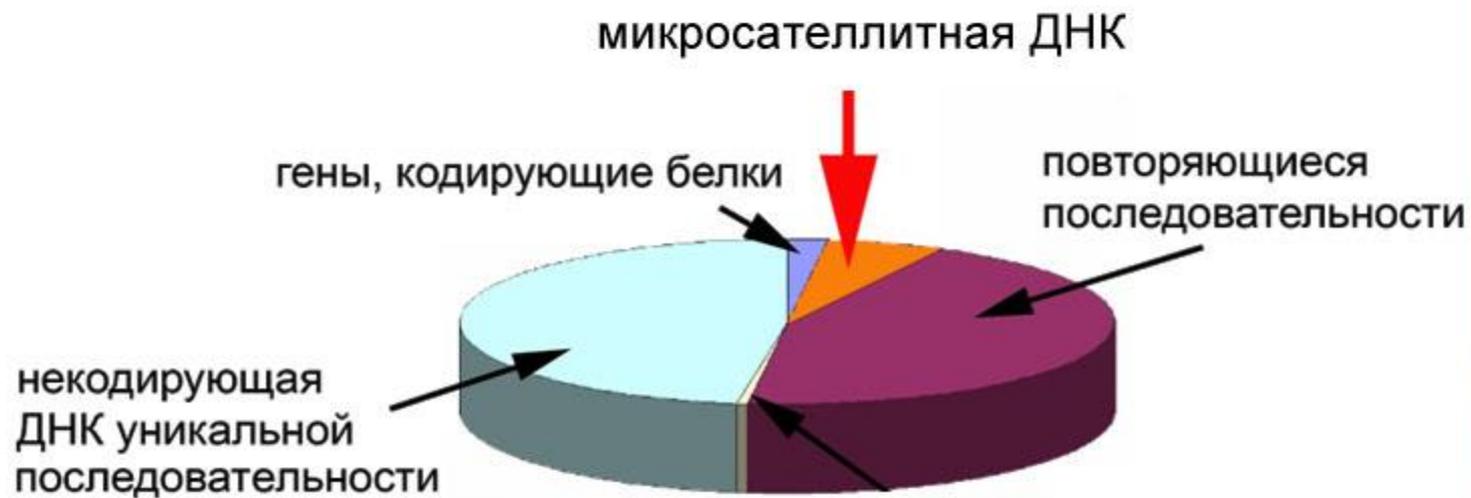
А-форма

- ▶ 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

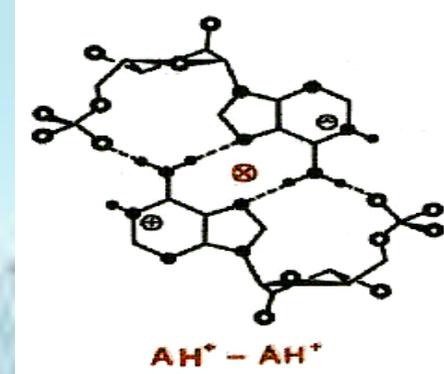
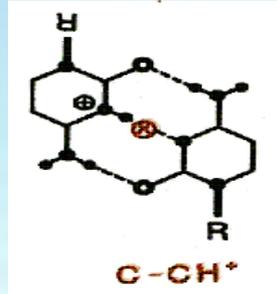
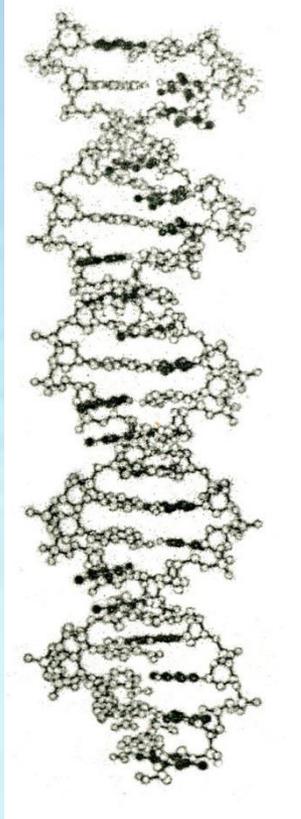
Распространение повторяющихся последовательностей ДНК в геноме эукариот



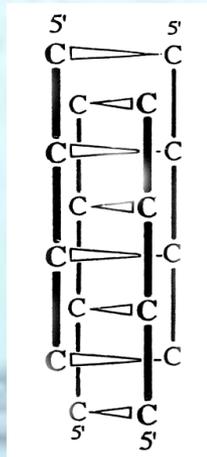
Последовательности, образующие неканонические формы ДНК, относительно редки в прокариотах, но широко распространены в эукариотических организмах. Обычно они локализованы в важных участках генома:

- ❖ **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)*

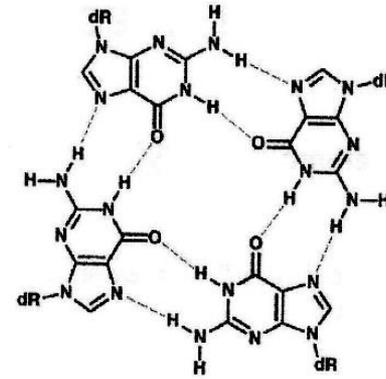
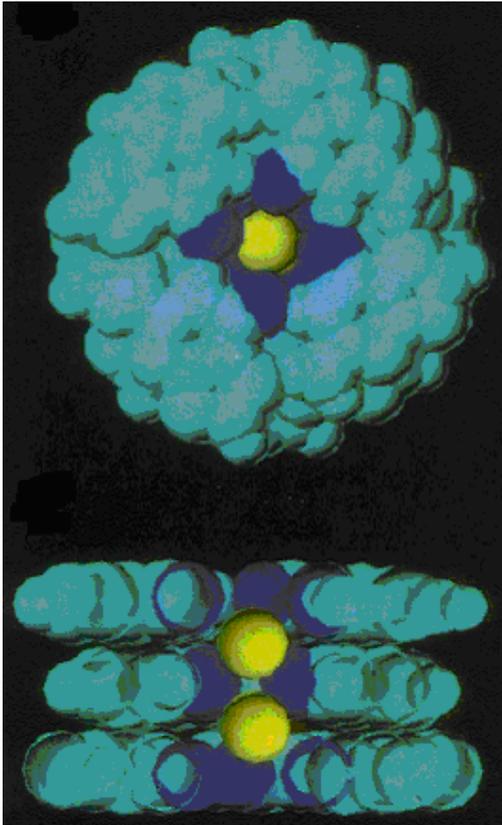


Интеркаляционная четырехспиральная ДНК (*i*-ДНК)



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 \AA

Структура G-квадруплексов



1 цепь



2 цепи



3 цепи



4 цепи

Квадруплексы стабилизируются ионами Na^+ и, особенно, ионами 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.

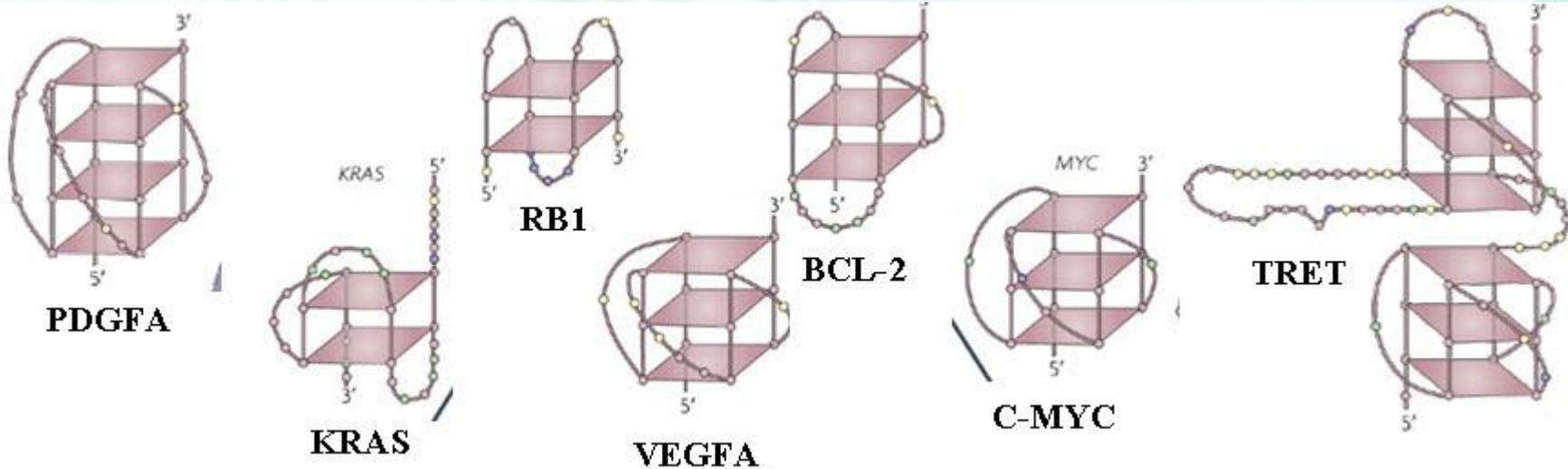
В. Гюшльбауэр, Д. Сен, В. Гилберт

Многообразие форм G-квадруплексов

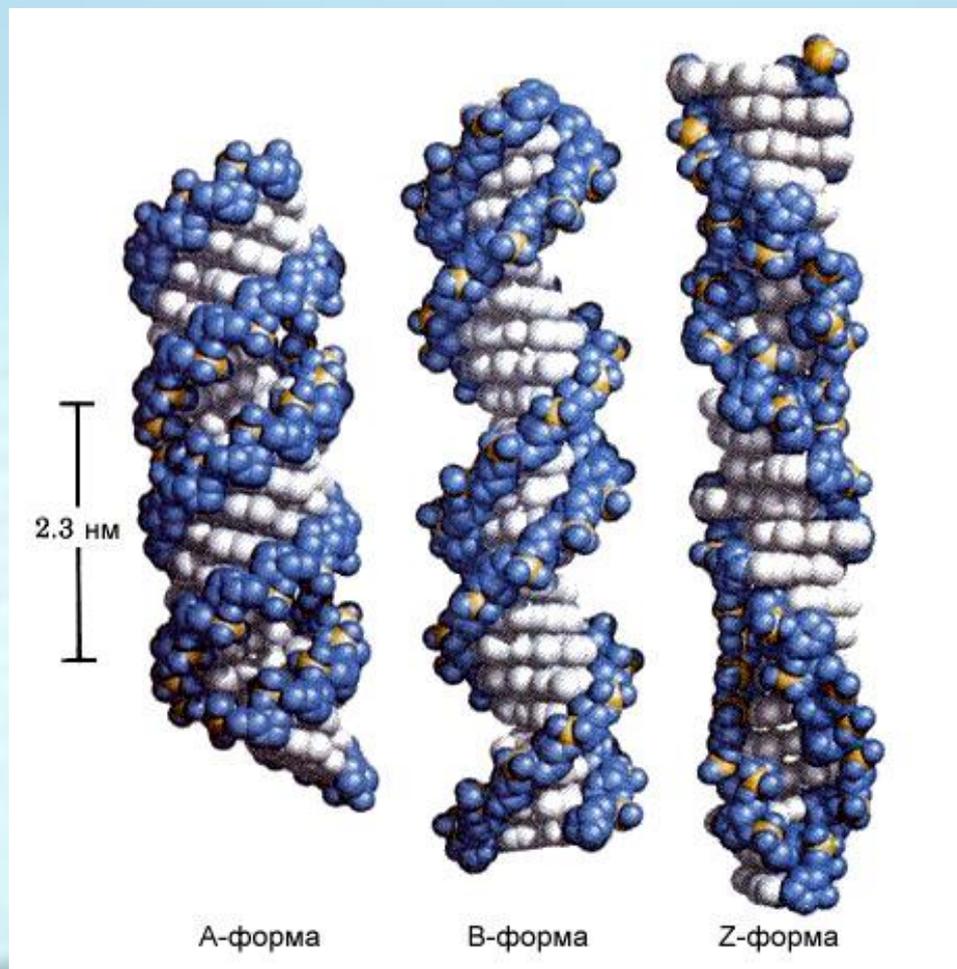
В клетке в подавляющем большинстве образуются внутримолекулярные G-квадруплексы. Последовательности, формирующие такие структуры, можно представить как



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



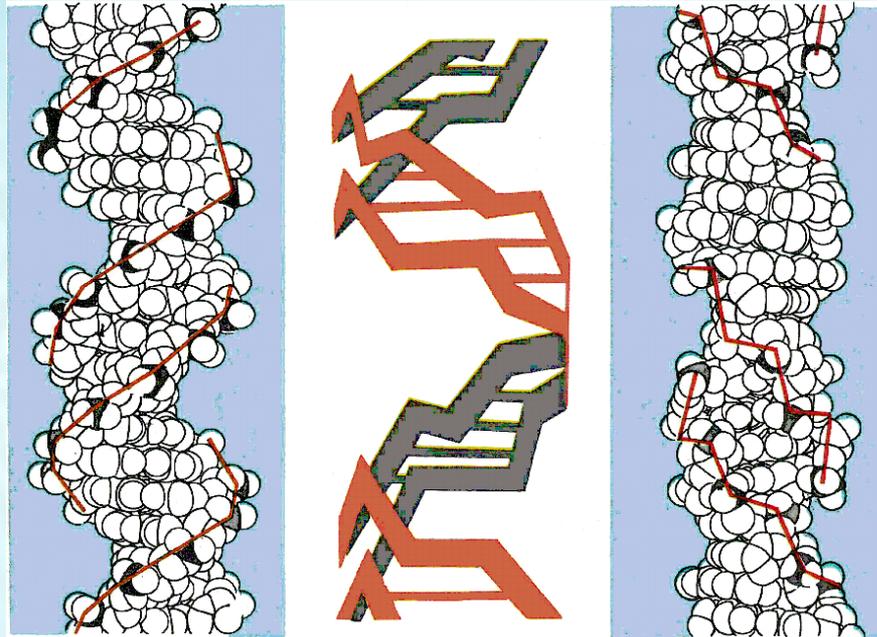
Сравнительная структура канонических А- и В-форм ДНК и неканонической левозакрученной Z-ДНК



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.



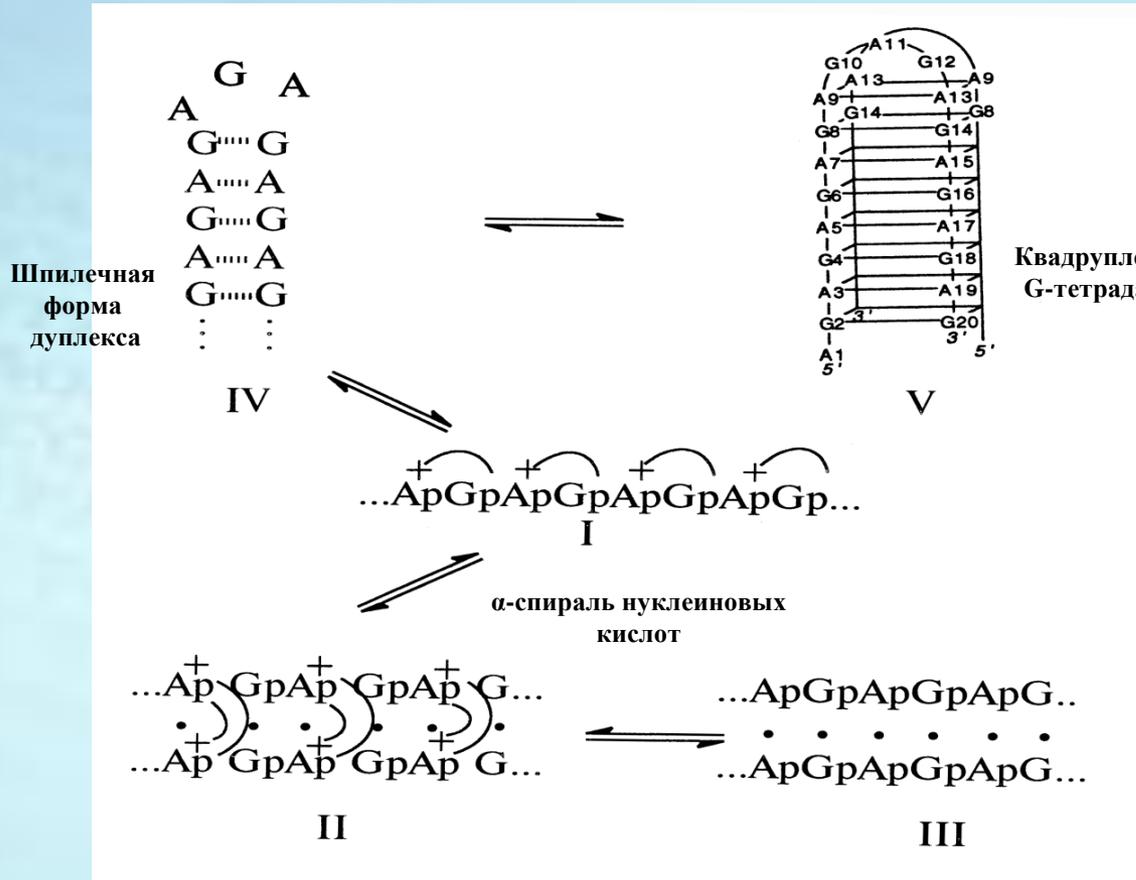
B-ДНК

Z-ДНК

$$d(\text{CG})_n / d(\text{CG})_n > d(\text{TG})_n / d(\text{AC})_n > d(\text{TA})_n / d(\text{TA})_n$$

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



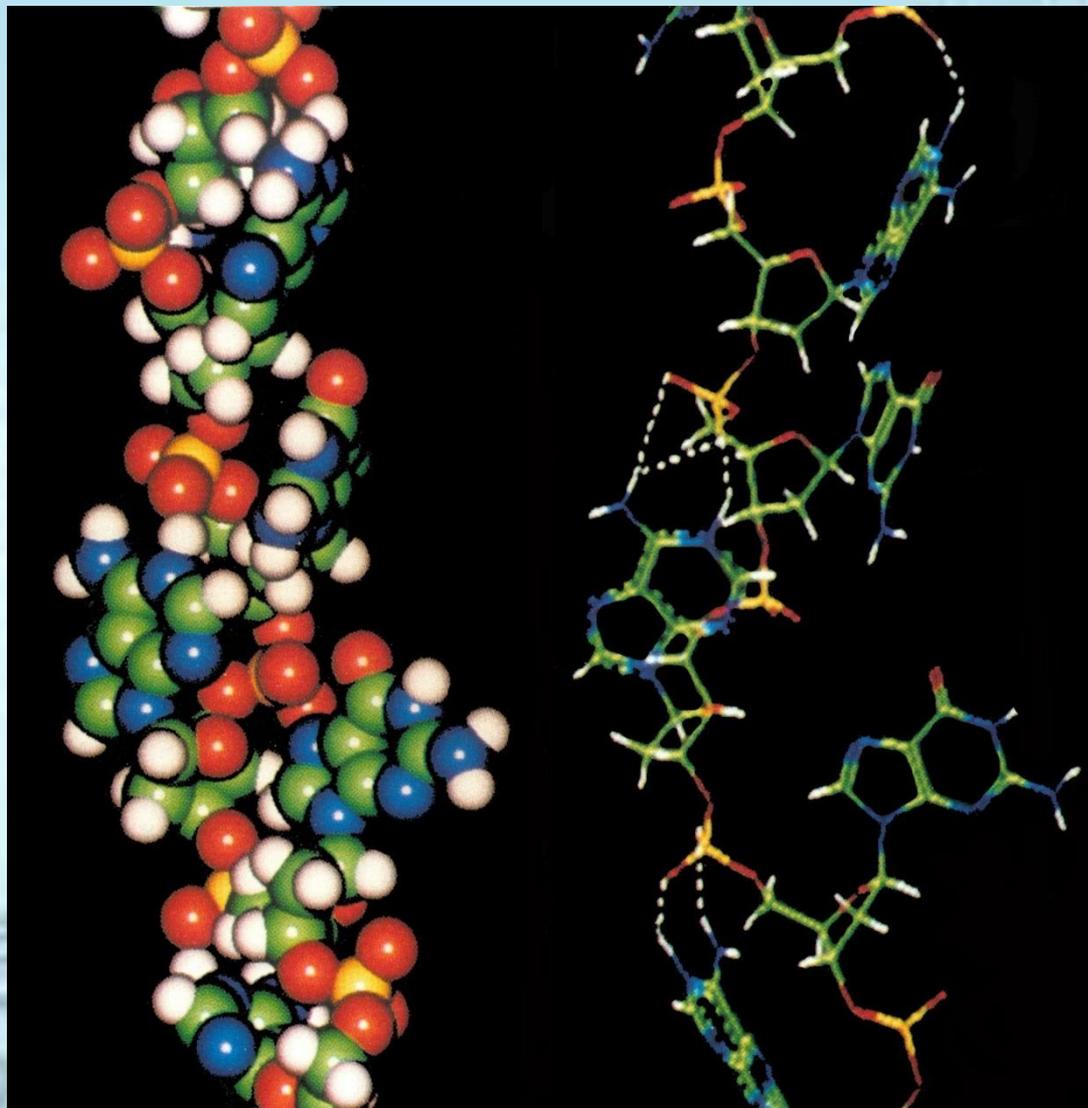
Их существование зависит от особой комбинации

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

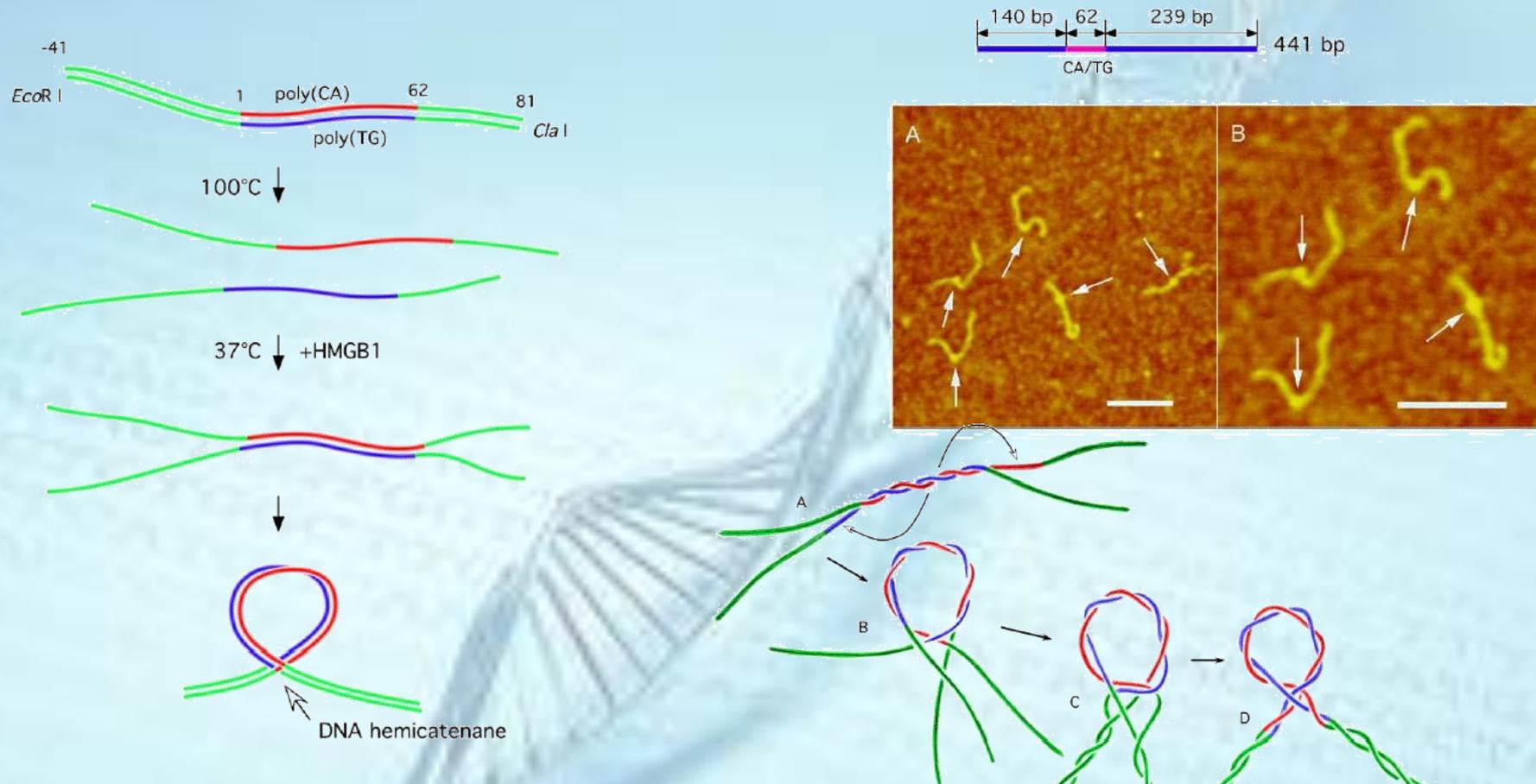
рН-зависимый параллельный дуплекс с $A^+ \cdot A^+$ and $G \cdot G$ парами оснований

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

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



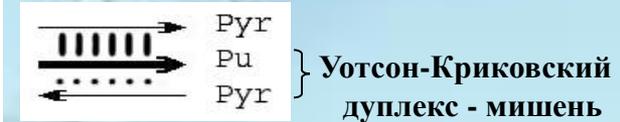
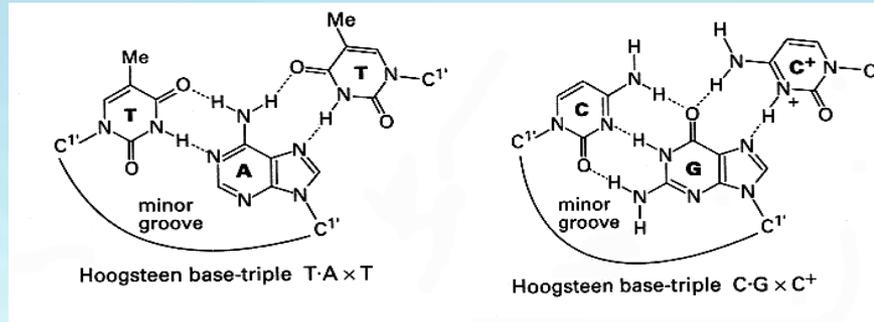
Полукатенаны, образованные повторами d(CA/TG)



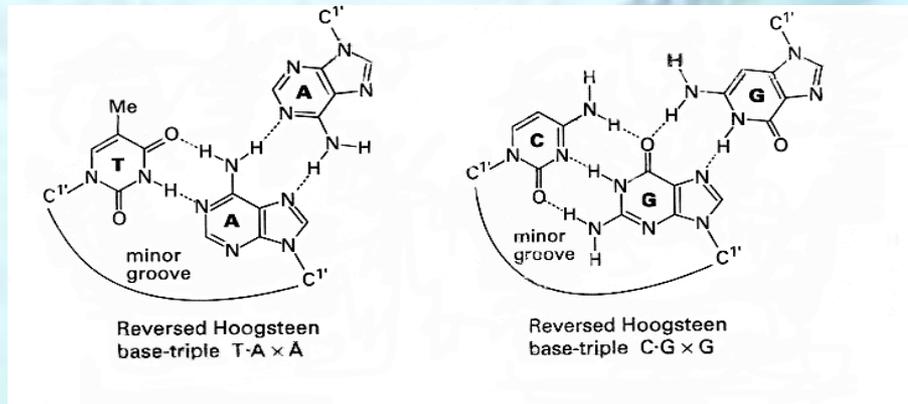
Образование колечек (полукатенанов) наблюдается после плавления ДНК, содержащей 31 повтор d(CA/TG) в окружении случайных последовательностей, и последующей ренатурации получившихся цепей в присутствии архитектурного белка HMGB1. Их наблюдали методом атомной силовой микроскопии.

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)

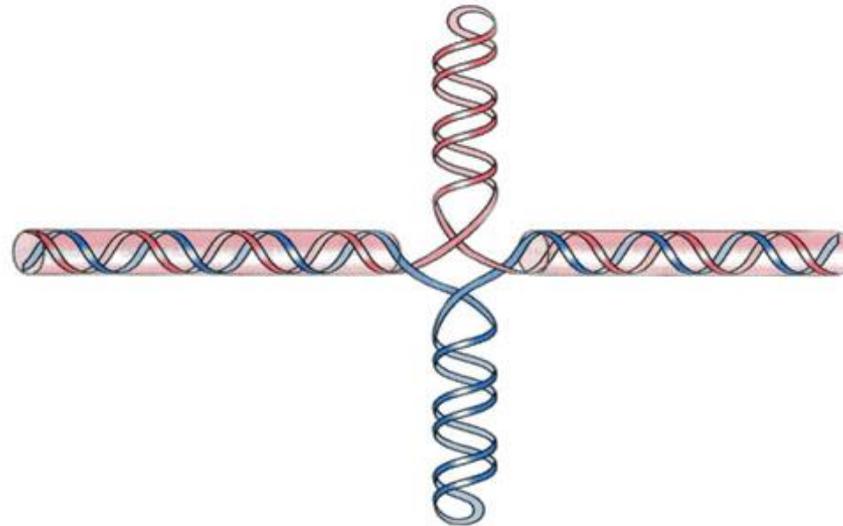
Крестообразные формы ДНК



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



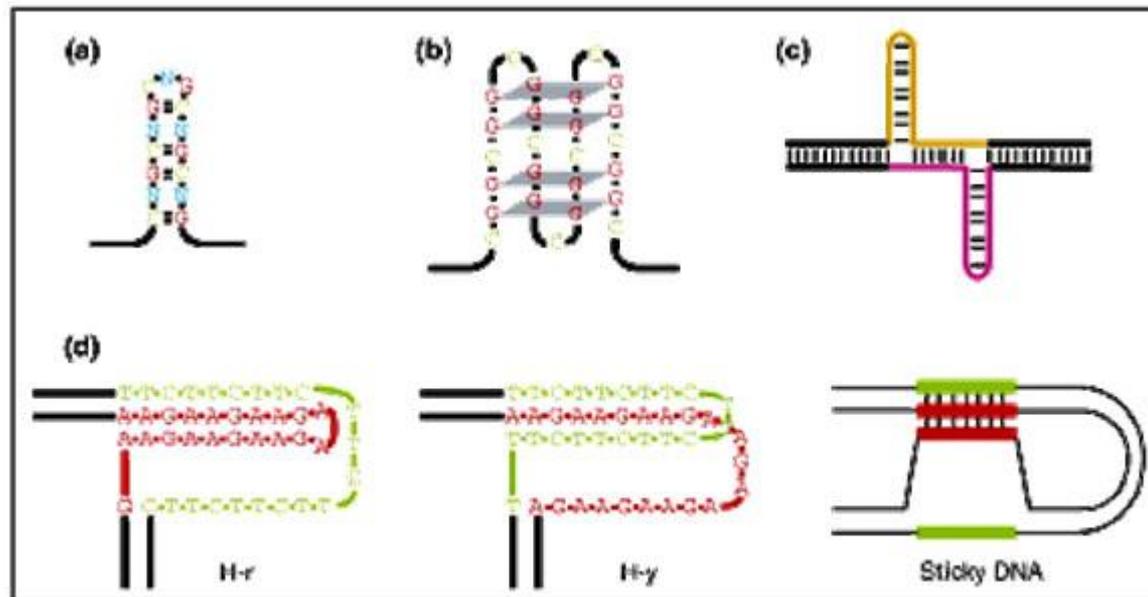
Неканонические структуры ДНК, образуемые тринуклеотидными повторами

$d(\text{CGG})_n/d(\text{CCG})_n$, $d(\text{CAG})_n/d(\text{CTG})_n$, $d(\text{GAA})_n/d(\text{TTC})_n$ 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).

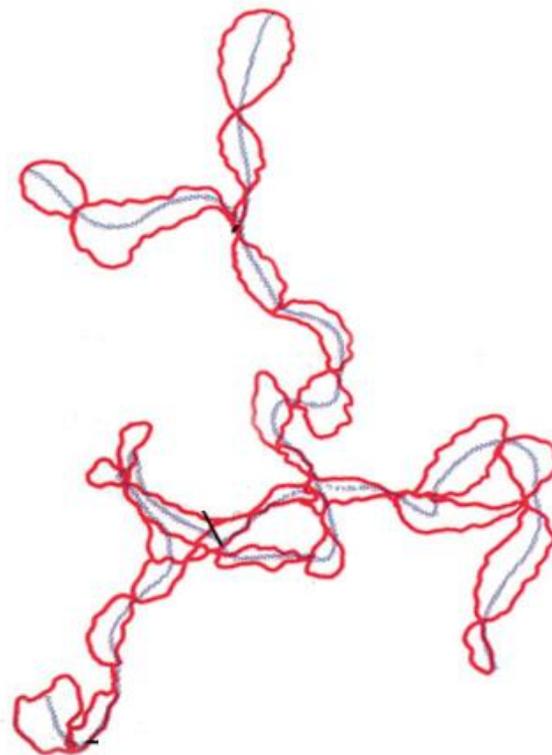
Они проявляются, когда количество повторов превысит патологический барьер.

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 [$d(\text{GAA})_n$]

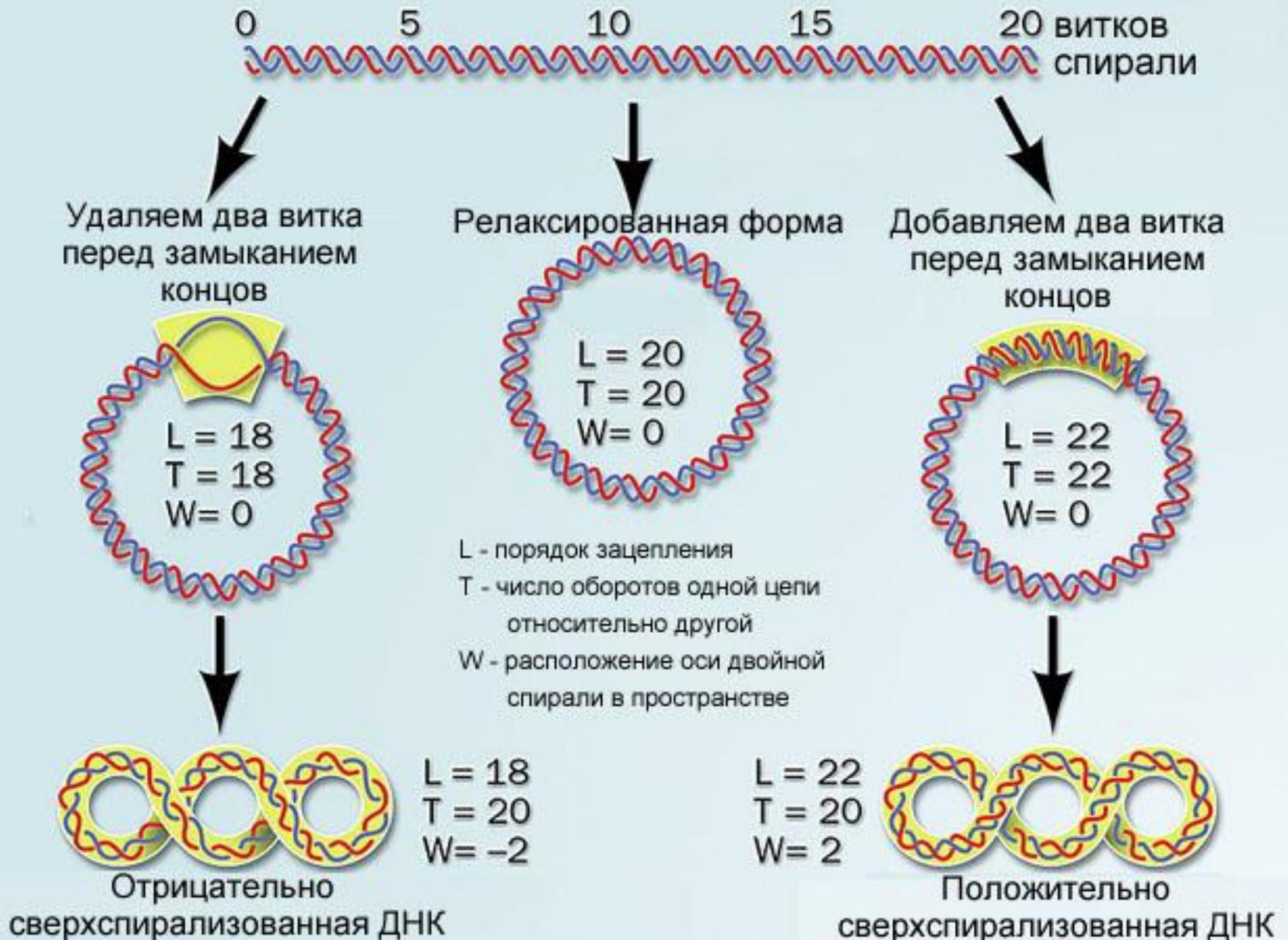
Сверхспирализованная ДНК



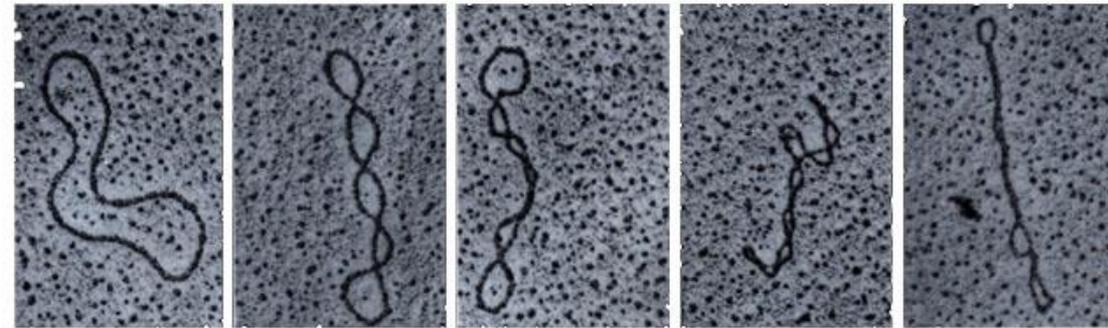
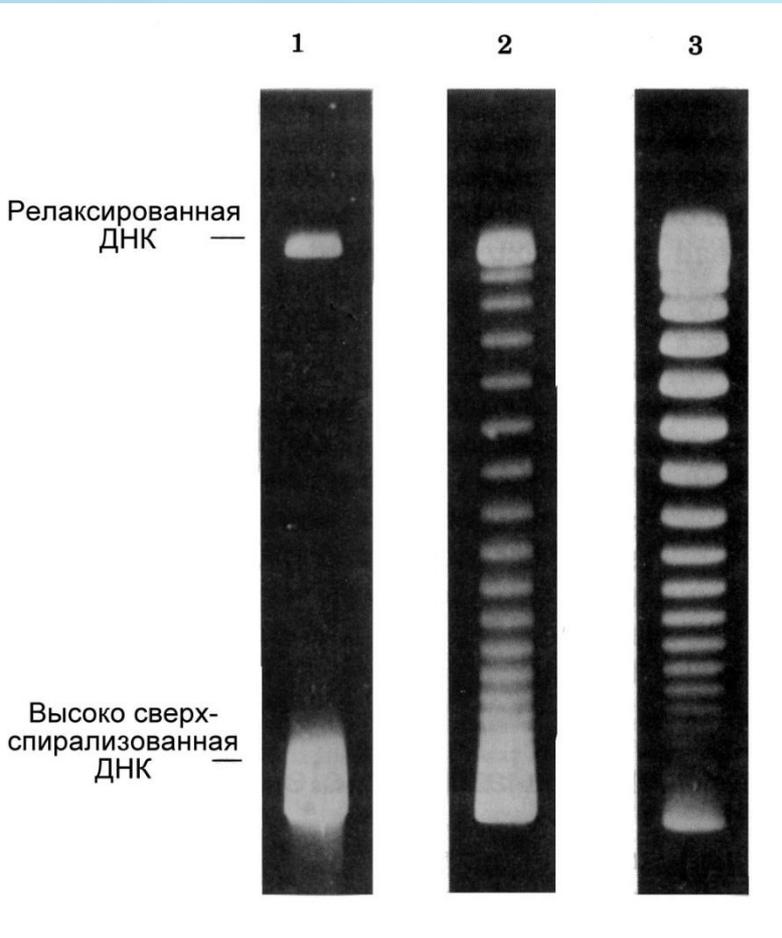
Сверхспирализация играет ключевую роль в функционировании генома, влияя на структурную динамику нуклеосом и способствуя образованию неканонических форм ДНК.

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.

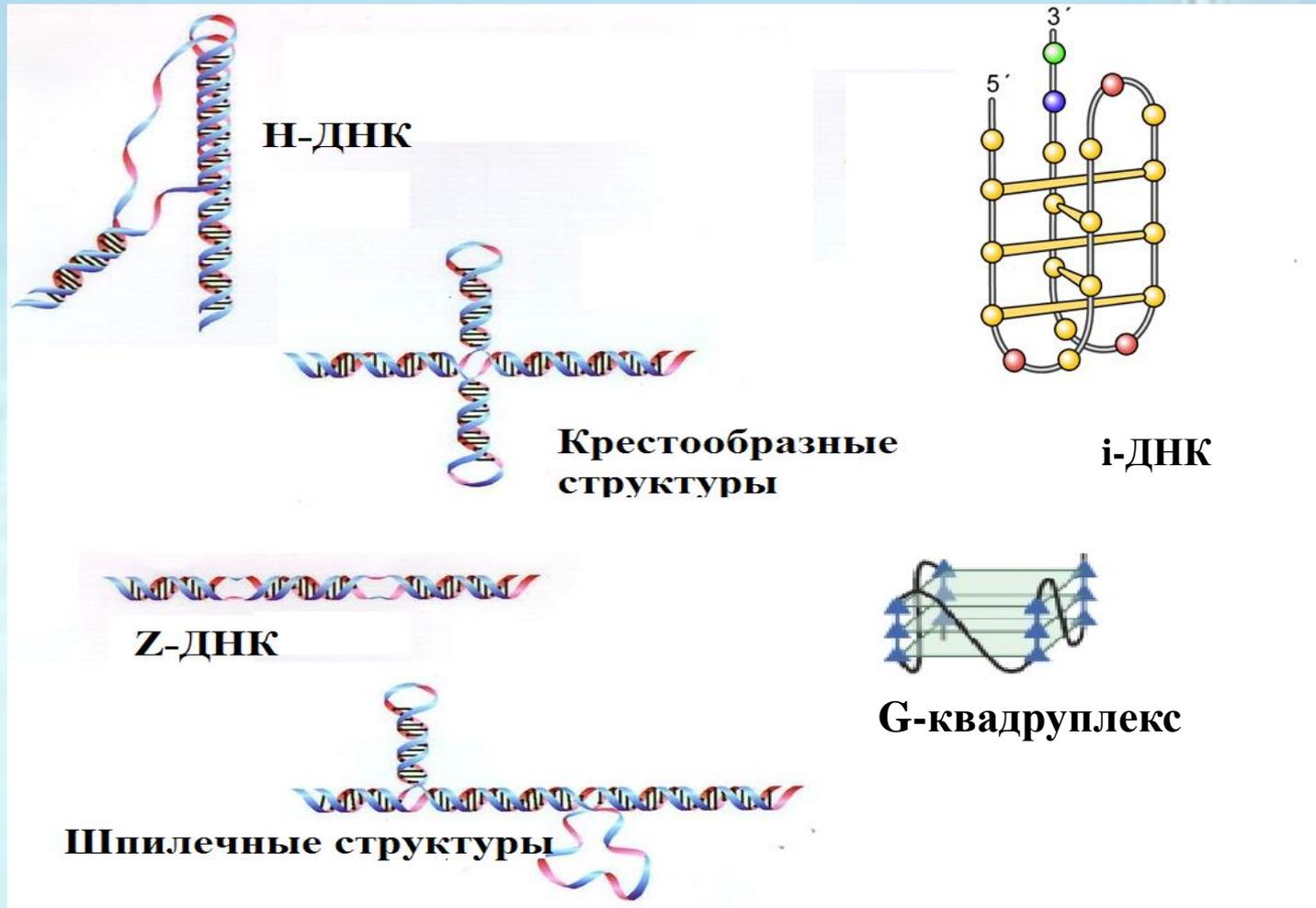
Область элонгации транскрипции



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



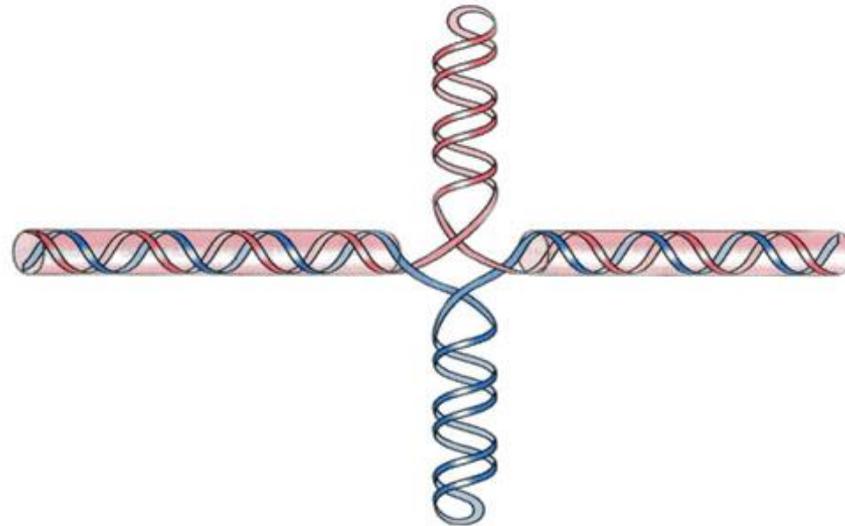
При определенной плотности отрицательных сверхвитков повторяющаяся пурин-пиримидиновая последовательность самопроизвольно переходит в Z-форму, снимая напряжение сверхспирализации, даже при физиологических значениях ионной силы.

Крестообразные формы ДНК

Двойная спираль ДНК, содержащая участок с палиндромной последовательностью



Локальное плавление



Крестообразная конформация

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

5' d(CGCGAATTCGCG)

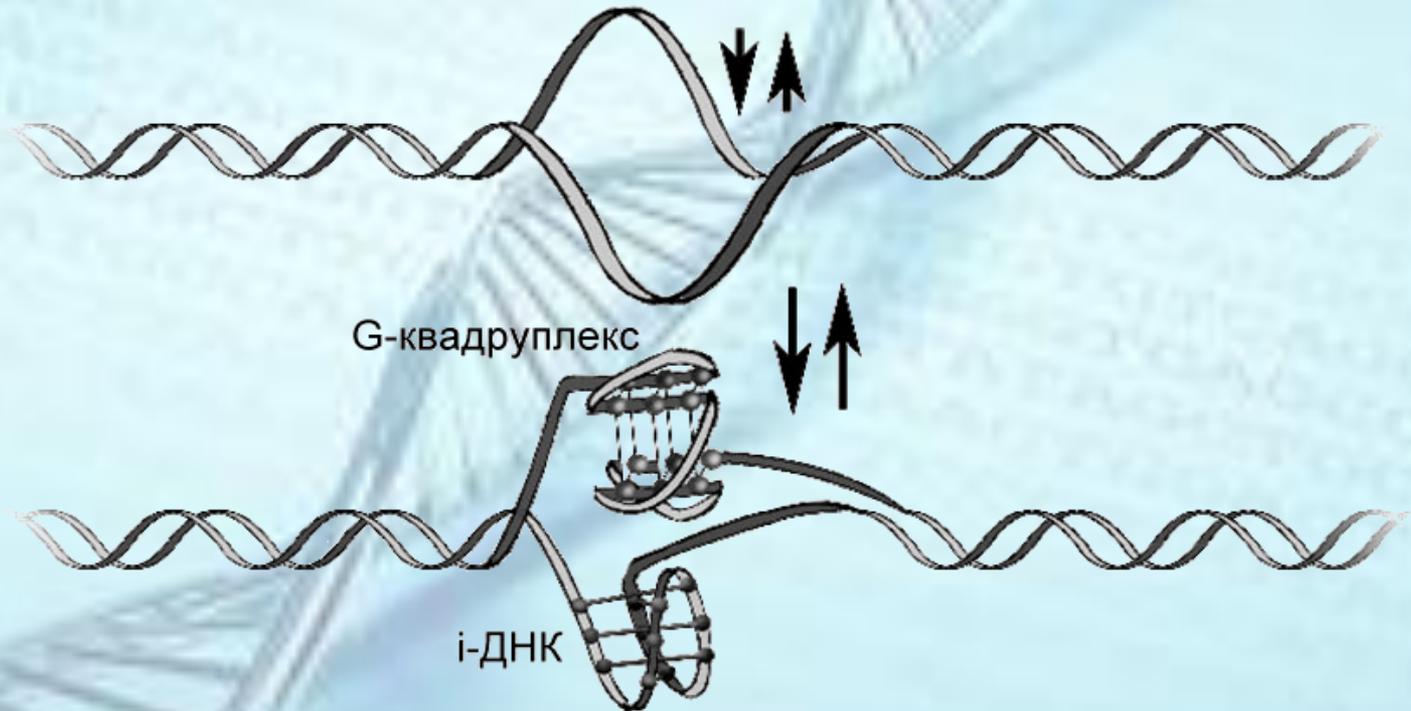
3' d(GCGCTTAAGCGC).

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).

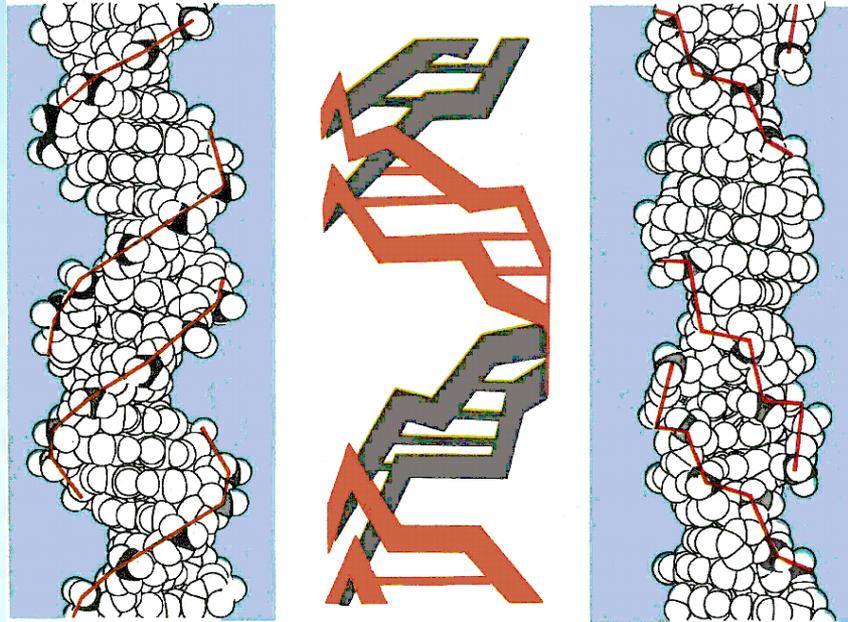
Формирование G-квадруплекса и i-ДНК из цепей, связанных в дуплексную структуру

Последовательность ДНК, образующая неканонические формы



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. Пуринный нуклеозид в Z-ДНК имеет син-конформацию, а пиримидиновый – анти; конформация сахара, соответственно, N и S.



B-ДНК

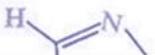
Z-ДНК

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

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.

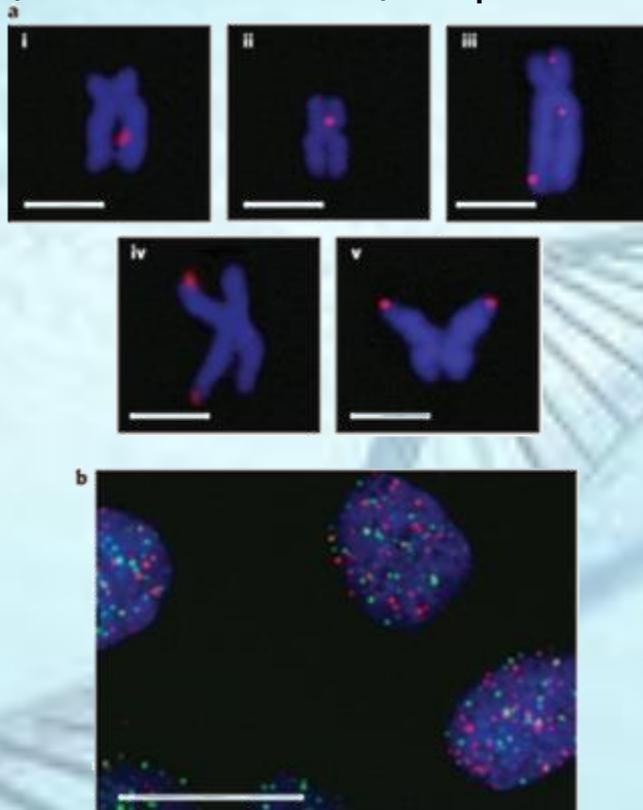
Неканонические формы ДНК узнаются и связываются с многочисленными белками и ферментами (которые стабилизируют или разрушают их). Модулируя активность этих белков, неканонические структуры могут влиять на ключевые клеточные процессы

- ▶ 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.

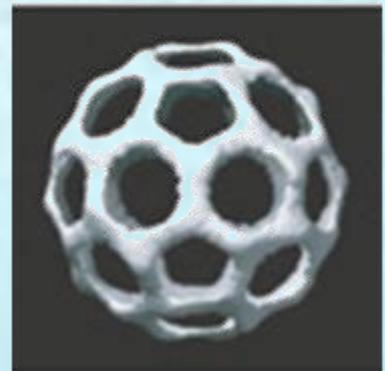
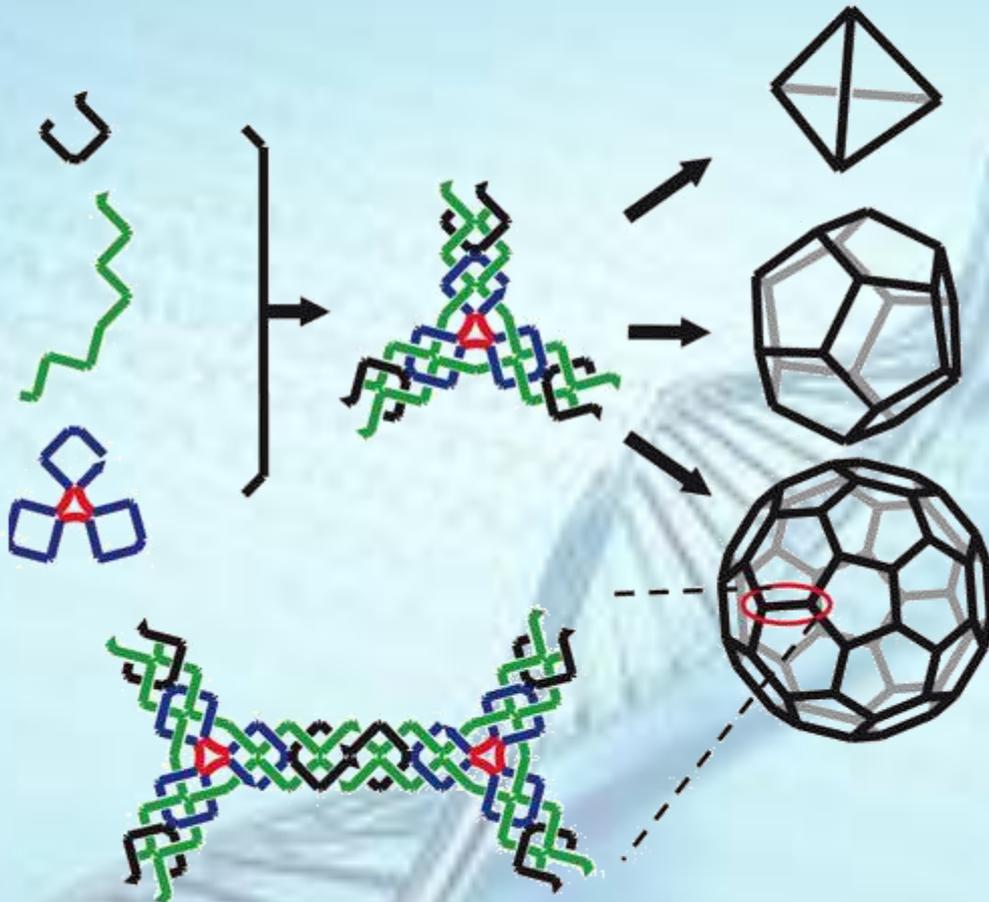


При этом, в зависимости от стадии клеточного цикла, их распределение меняется. Наибольшее количество G-квадруплексов было обнаружено в S-фазе клеточного цикла, то есть в период активной репликации (удваивания) ДНК перед делением клетки.

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

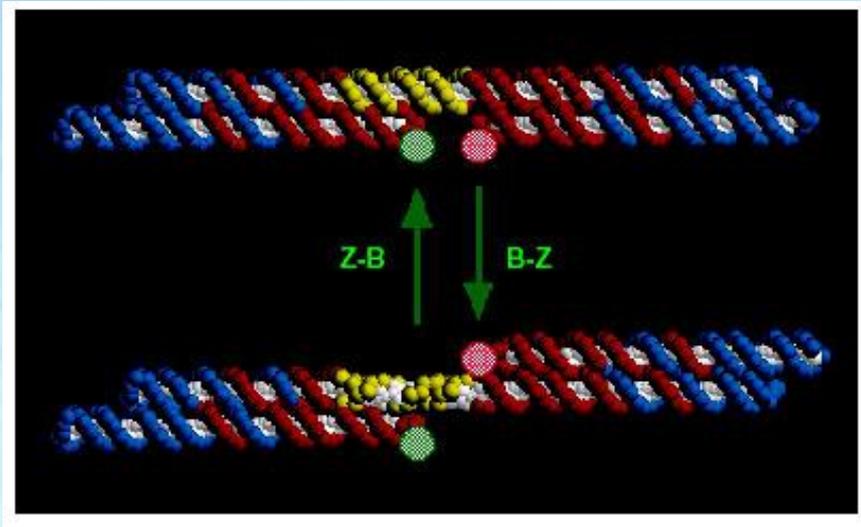
- Последовательности, образующие неканонические формы, являются эволюционно консервативными.
- Они расположены в самых важных участках эукариотических геномов и представляют собой мощную сеть новых регуляторных механизмов.
- Показано, что некоторые неканонические формы образуются в живой клетке и влияют 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

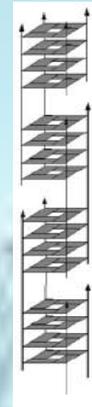


Неканонические ДНК в биотехнологии

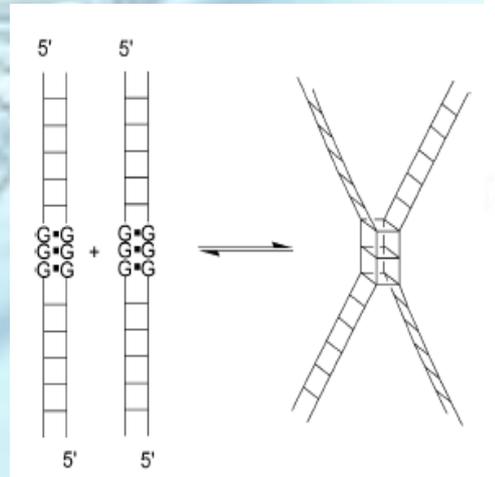
Неканонические структуры ДНК показывают свой потенциал для использования в биотехнологии как компоненты наноструктур, ионных каналов, биосенсоров, наномеханических устройств и переключаемых молекулярных машин.



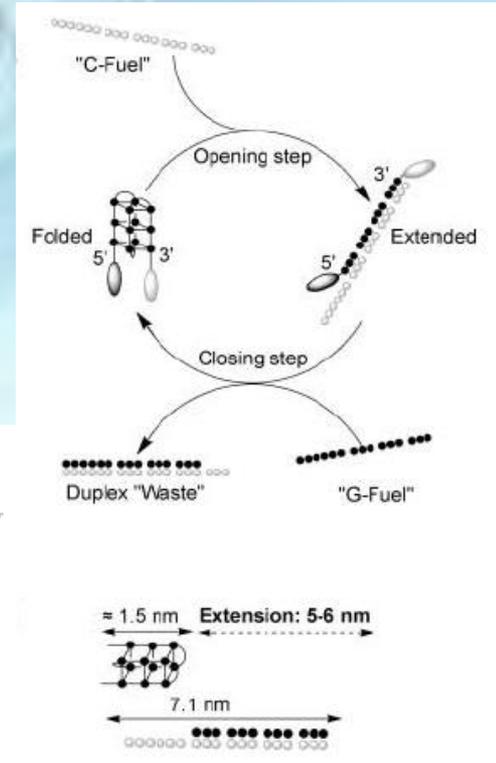
B-Z переход стимулирует поворот цепи ДНК на 180°



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!

