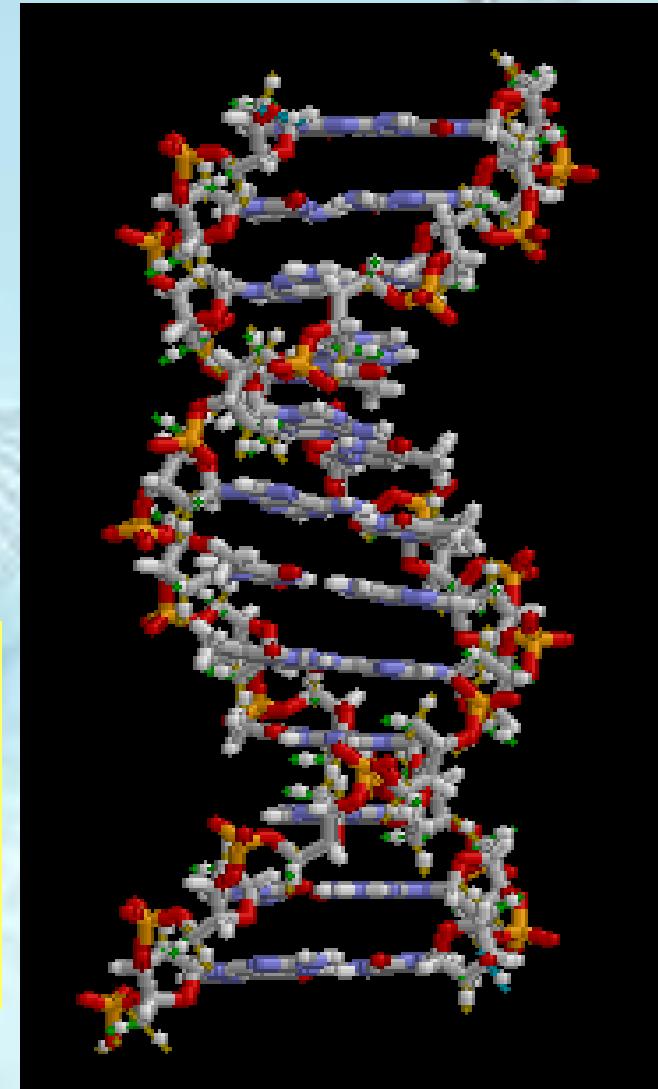




Межфакультетский курс лекций
Химический факультет МГУ
имени М.В. Ломоносова
Проф. Орецкая Татьяна Семеновна



«Геном человека: страхи и надежды»

№	Дата	Лектор	Название лекции
1	7.10	Орецкая Т.С.	Общие сведения о структуре нуклеиновых кислот. Установление структуры нуклеиновых кислот. РНК и ДНК: что общего и в чем различия.
2	14.10	Готтих М.Б.	Что такое ген и геном человека. Кодирующие и некодирующие области генома.
3	21.10	Долинная Н.Г.	Канонические и неканонические структуры нуклеиновых кислот.
4	28.10	Рубцова М.Н.	Передача генетической информации. Репликация, транскрипция, трансляция. Альтернативный сплайсинг.
5	11.11	Готтих М.Б.	Определение нуклеиновых кислот, ДНК-зонды и ДНК-чипы. Выявление наследственных и инфекционных заболеваний.
6	18.11	Кубарева Е.А.	Как мы сами портим свои гены и как природа пытается их «починить». Система репарации ДНК.
7	25.11	Метелев В.Г.	Лекарства на основе нуклеиновых кислот. Регулирование активности белков, «ловушки», аптамеры.
8	2.12	Готтих М.Б.	Воздействие на геном с помощью олигонуклеотидов – создание медицинских препаратов направленного действия.
9	9.12	Орецкая Т.С.	Лекарства, не действующие на геном. Противоинфекционная терапия
10	16.12	Готтих М.Б.	Судебно-экспертный генетический анализ. Что это такое и как наши знания о ДНК позволяют установить родство и поймать преступника.
11	23.12		Зачет

«Геном человека: страхи и надежды»

Лекция

«Общие сведения о структуре нуклеиновых кислот. Установление структуры нуклеиновых кислот. Рибо- и дезоксирибонуклеиновые кислоты: что общего и в чем различия»

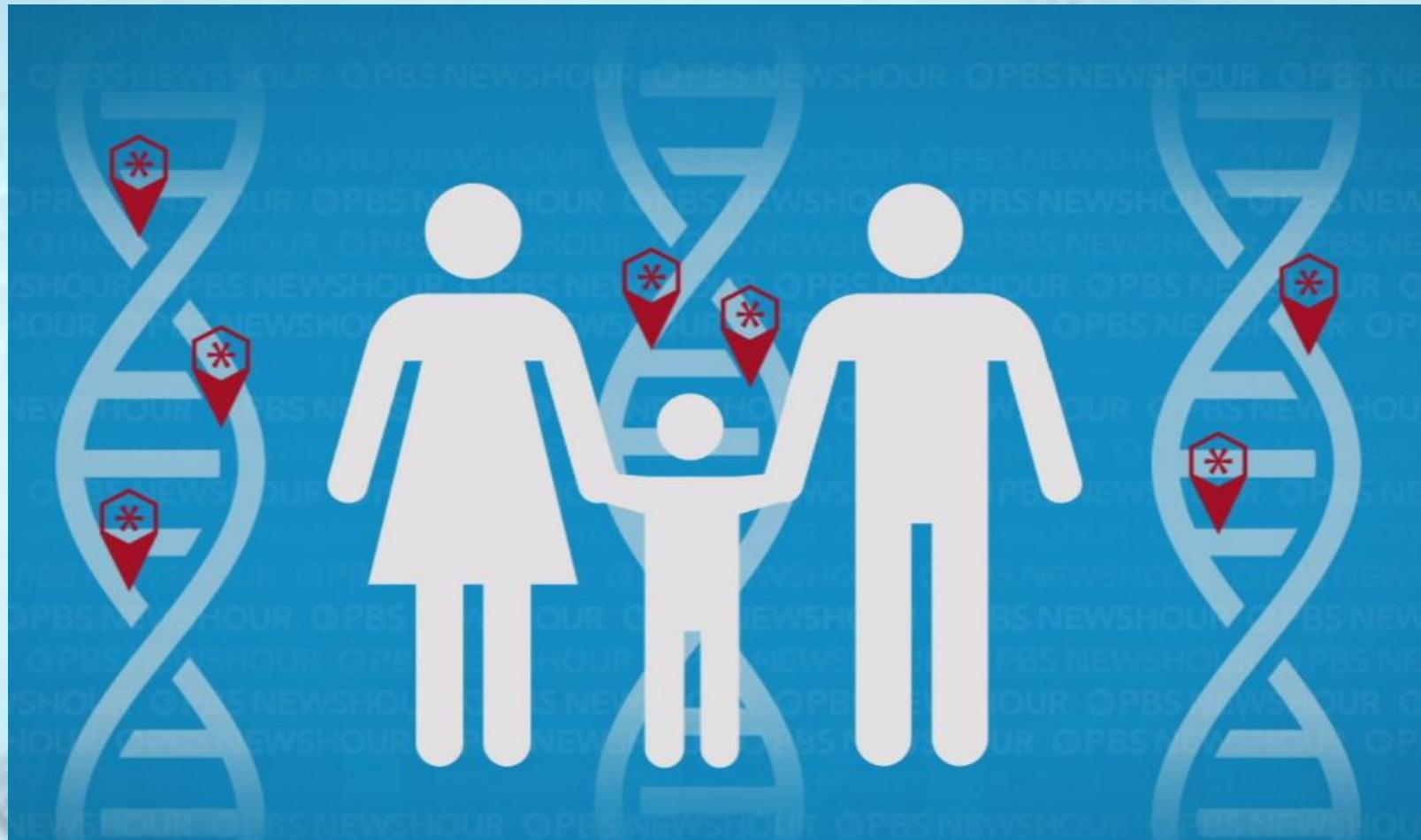


Геном человека — совокупность наследственного материала, заключенного в клетке человека. Человеческий геном состоит из 23 пар хромосом, находящихся в ядре, а также митохондриальной ДНК

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота – отрицательно заряженный линейный полимер, состоящий из определенным образом соединенных звеньев и хранящий определенную информацию

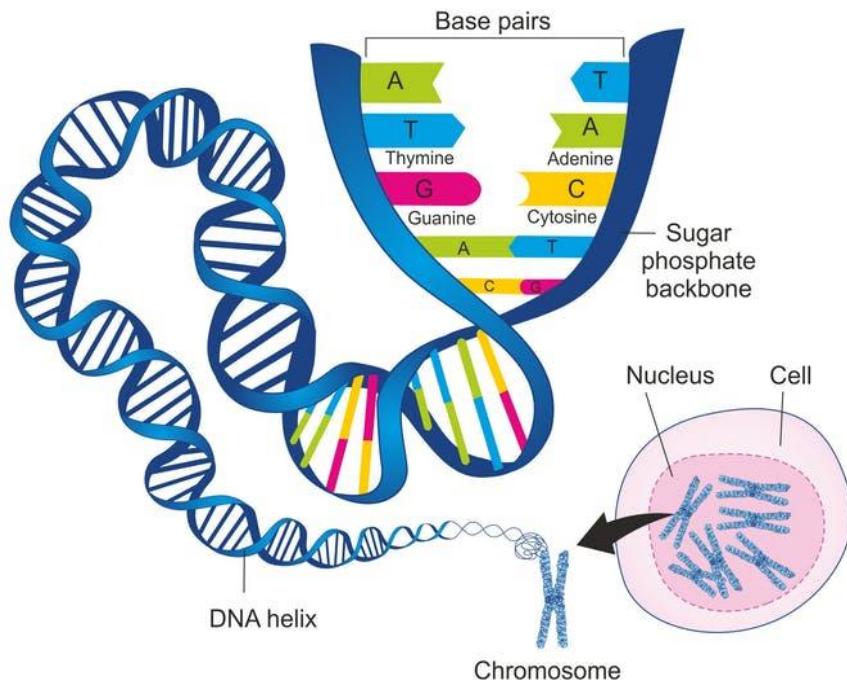
РНК – рибонуклеиновая кислота - отрицательно заряженный линейный полимер, состоящий из определенным образом соединенных звеньев и выполняющий в живой клетке разнообразные функции

Самая главная молекула – **дезоксирибонуклеиновая кислота** – отрицательно заряженный линейный полимер, состоящий из определенным образом соединенных звеньев и хранящий определенную информацию

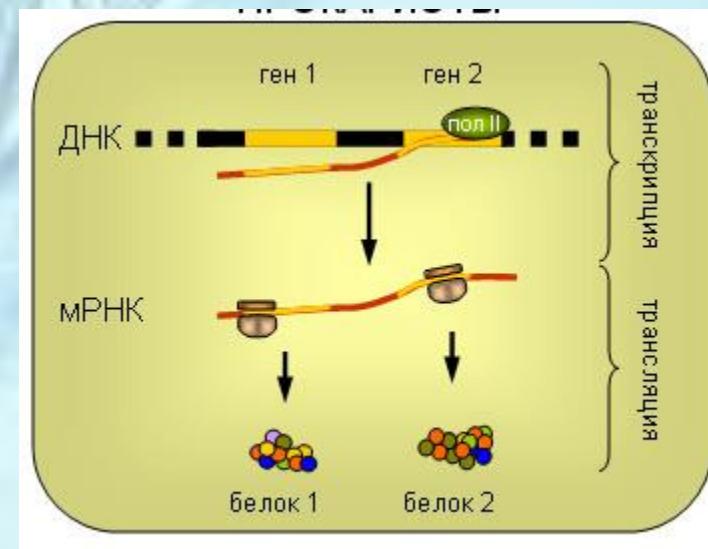


Биологическая роль ДНК

Дезоксинуклеиновые кислоты имеют фундаментальное биологическое значение, поскольку содержат в закодированном виде всю генетическую информацию любого живого организма, от человека до бактерий и вирусов, и передают эту информацию от одного поколения другому



ДНК способны передавать закодированную в них информацию от одной молекулы к другой



Почему ДНК способны хранить и точно передавать по наследству генетическую информацию? Как происходит передача информации?

Лекарственные препараты на основе природных и модифицированных мономеров и олигомеров ДНК:

Деринат - активным веществом является дезоксирибонуклеат натрия, активирующий в организме человека клеточный и гуморальный иммунитет, стимулирующий процессы регенерации, способствующий заживлению язв, ран, ожогов и т.д.

Ацикловир - блокирует синтез ДНК у размножающихся вирусов герпеса.

Зидовудин (Zidovudine) - противовирусное средство, применяемое в составе комбинированной антиретровирусной терапии, активное в отношении ВИЧ.

Пуромицин, Тойокамицин, Сангивамицин и другие антибиотики широкого спектра действия.

Витравен – препарат, действие которого направлено на борьбу с цитомегаловирусом.

Кинамро/Купамто (мипомерсен/mipomersen) - средство предназначено для лечения пациентов с гомозиготной семейной гиперхолестеринемией.

Макуген - предотвращает неоваскулярную (влажную) форму возрастной макулодегенерации.

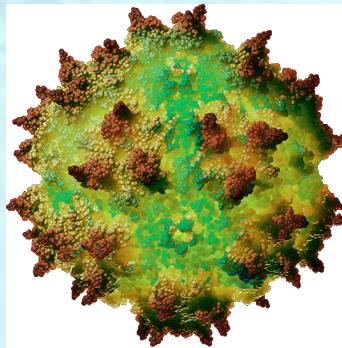
Этеплирсен(Зарепта) – препарат направлен на лечение мышечной дистрофии Дюшенна.

Спинальная мышечная атрофия — группа редких (9,1 случай на 100 тыс.) генетических заболеваний, характеризующихся прогрессирующей дегенерацией спинного мозга и моторных нейронов ствола мозга, что отражается гипотонией, атрофией скелетных мышц и общей слабостью. Патология вызывается потерей или дисфункцией (делецией, перестройкой или мутацией) в гене выживаемости моторных нейронов 1 (SMN1). Почти все пациенты (95–98%) гомозиготны по дефектному гену SMN1, то есть оба родителя являются носителями рецессивного генетического нарушения.

Спинраза (Нусинерсен). Нусинерсен увеличивает долю транскриптов матричной РНК (мРНК). Связываясь с ним, АСО вытесняет факторы сплайсинга, в норме подавляющие его. После синтеза мРНК SMN2 может происходить ее трансляция в белок SMN с полной длиной цепи и сохранённой функциональной активностью. Стоимость одного уколов 125 000 \$.



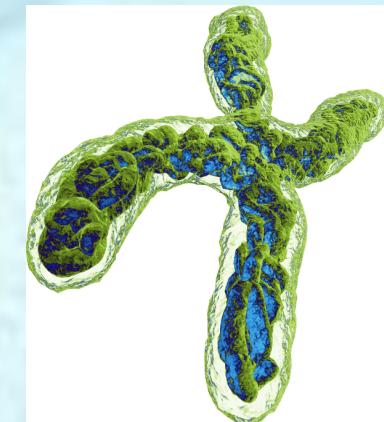
Золгенсма. Генотерапия при помощи онасемногена абепарвовека (Золгенсма) предполагает аденоавирусную доставку в организм трансгена SMN, кодирующего полностью функциональный белок SMN и встраивающегося в ядра моторных нейронов. Благодаря способности пересекать гематоэнцефалический барьер подтверждена экспрессия SMN в мотонейронах во всех отделах головного и спинного мозга. Использование энхансера цитомегаловируса и куриного бета-актина в качестве гибридного промотора определяет быструю и устойчивую экспрессию SMN.



Капсид нереплицирующегося рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора



гибридный промотор, составленного из энхансера цитомегаловируса и куриного бета-актина, определяет непрекращающуюся и стабильную экспрессию SMN.

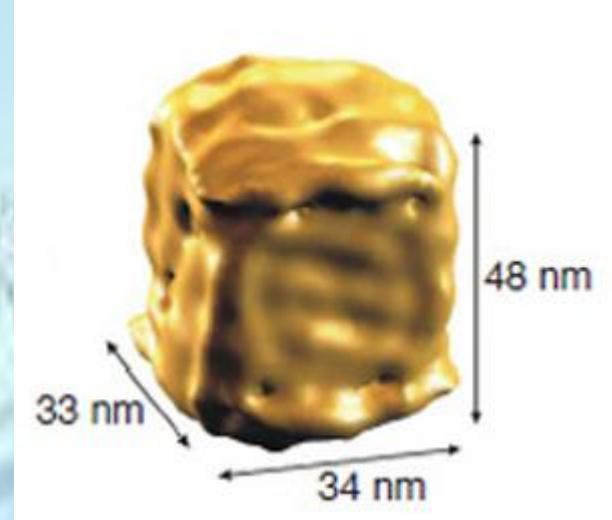
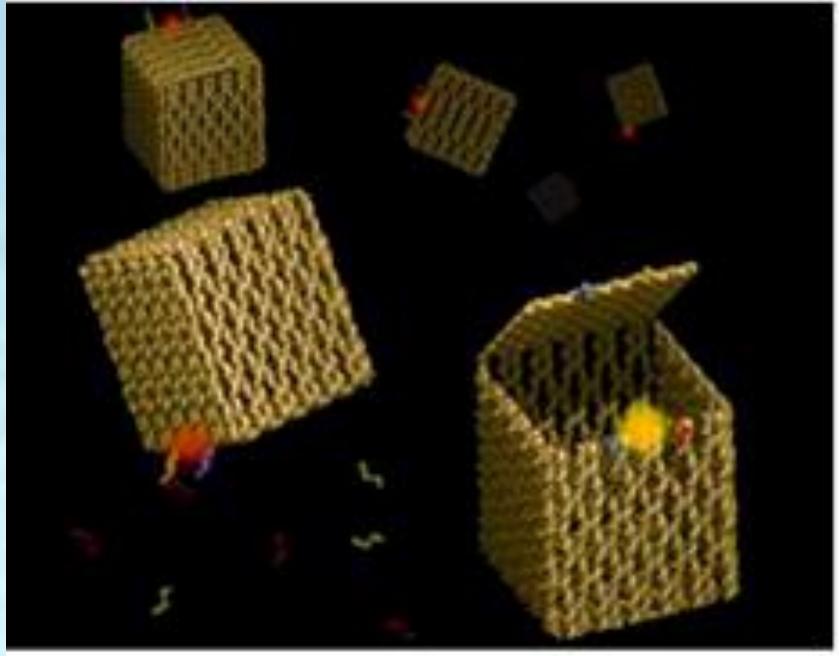


Стабильный трансген полностью функционального гена SMN встраивается в ядра моторных нейронов.

2,125 млн долларов за внутривенную инъекцию

Создание наноструктур на основе НК

ДНК-оригами (японский) - искусство складывания фигурок из бумаги



Трёхмерная реконструкция
nanoшкатулки, собранной методом
ДНК-оригами

С точки зрения нанотехнологии важным качеством молекул НК является их способность к самосборке, а также стабильность образуемых ими структур

Чем определяется эта способность к самосборке, какие структуры могут собираться и от чего зависит их стабильность?

ДНК-диагностика:

- наследственные заболевания;
- генетическая предрасположенность;
- бесплодие и вынашивание беременности;
- онкологические заболевания;
- определение совместимости донора и реципиента;
- установление биологического родства, генетическая экспертиза отцовства;
- ПЦР-диагностика инфекционных заболеваний

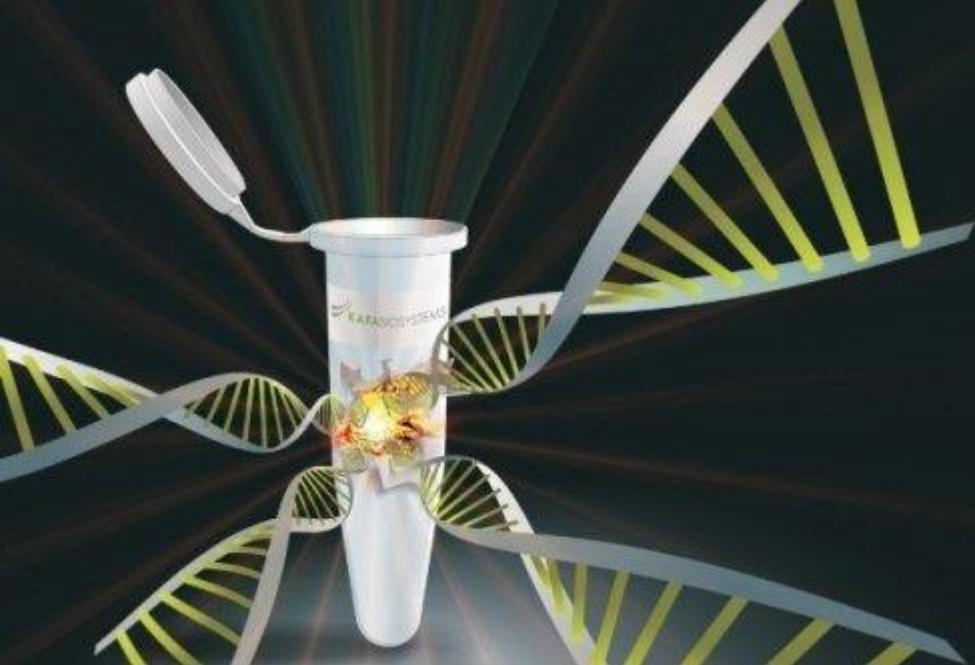
Генетически модифицированные организмы - включают различные гены, вводимые различными путями.

«We eat mutations every day. All the vegetables, grains, fruits and meat humans consume as part of their diet are jam-packed with DNA speckled with mutations and beneficial variations.»



For instance, a glass of milk in the United States today has only one-third the carbon footprint of a glass of milk from 1944. Improved genetics are a key component of sustainability.

Например, стакан молока в Соединенных Штатах сегодня имеет только одну треть углеродного «следа» стакана молока 1944 года. Улучшенная генетика является ключевым компонентом устойчивости.



Концепция сохранения ДНК и превращения сохранённой ДНК обратно в живую сущность достаточно популярна в научной фантастике. Но можно ли её действительно реализовать? На сегодняшний день существует множество компаний «Сохранения ДНК», которые обещают сделать именно это.

Они берутся сохранить вашу ДНК до того дня, когда учёные смогут восстановить вашу личность, используя всего лишь вашу ДНК. И в то время, как компании вроде Prevention Genetics и DNA Diagnostics Center обязуются сохранить вашу ДНК ровно столько, на сколько хватит ваших денег, другие, вроде DNA Live Forever, заявляют, что будут хранить её столько, сколько потребуется. Разумеется, когда вы уже фактически мертвы, вы вряд ли сумеете подать на них в суд за выбрасывание вашей ДНК.



1. Фердинанд I (1503–1564) – император Священной Римской империи;
2. Рудольф II (1552–1612) – император Священной Римской империи;
3. Карл II (1661–1700) – король Испании.

Среди большого разнообразия наследственных аномалий у человека особый интерес представляет «габсбургская губа». Представители императорской династии Габсбургов имели толстую (выпяченную) нижнюю губу и узкую выступающую нижнюю челюсть. Рот при этом оставался полуоткрытым. Первым обладателем этой аномалии был Эрнст Лион (1377–1424). На протяжении более чем 500 лет этот признак наследовался потомками Габсбургов.

Потрясающие вещи происходят в биологии. Мне кажется, Джим Уотсон сделал открытие, сравнимое с тем, что сделал Резерфорд в 1911 году (открытие атомного ядра)

Из письма Макса Дельрука Нильсу бору от 14 апреля 1953 года

Особое место в молекулярной биологии занимают нуклеиновые кислоты. Собственно само возникновение молекулярной биологии обязано работам по нуклеиновым кислотам. Именно в этой области сделаны открытия, позволившие расшифровать механизм важнейшей стороны жизни – наследственности. Эти открытия принадлежат к величайшим достижениям науки XX в., и их значение по праву сравнивают с открытиями радиоактивности и расщепления атомного ядра. Результаты проведенных работ поражают тем, что еще совсем недавно решение вопроса, каким образом происходит передача свойств от клетки к клетке в ряду поколений, представлялось делом невообразимо отдаленного будущего.

Nucleic acids as drugs and targets

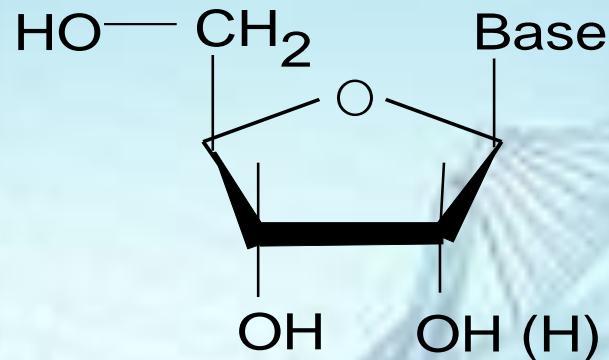


Функции нуклеиновых кислот:
объекты исследования;
инструменты исследования;
инструменты воздействия на другие макромолекулы

Основные события века науки о живом

- 1865 – Гены – это отдельные факторы
- **1871 – Открытие нуклеиновых кислот**
- 1903 – Хромосомы – это единицы наследственности
- 1910 – Гены находятся на хромосомах
- 1913 – Гены расположены на хромосомах линейно
- 1927 – Мутации – это физические изменения в генах
- 1931 – Рекомбинация происходит в результате кроссинговера
- 1944 – ДНК – это генетический материал
- 1945 – Ген кодирует белок
- 1951 – Первая белковая последовательность
- **1953 – ДНК – это двойная спираль**
- 1958 – Репликация ДНК полуконсервативна
- 1961 – Генетический код триплетен
- 1977 – Эукариотические гены прерывисты
- 1977 – Можно определить последовательность ДНК
- 1995 – «Прочтение» бактериального генома
- 2001 – «Прочтение» генома человека

Нуклеозид состоит из **углеводного остатка** и
гетероциклического основания



Структура нуклеозидов определяется:

- 1). Структурой гетероциклического основания
- 2). Структурой углеводного остатка
- 3). Типом связи между ними

Где в природе встречаются нуклеозиды?

- В составе нуклеиновых кислот: РНК и ДНК
- В мономерном состоянии, преимущественно в виде нуклеозидных антибиотиков
- Входят в состав нуклеозидполифосфатов и нуклеотидных коферментов

Нуклеозиды в составе ДНК и РНК

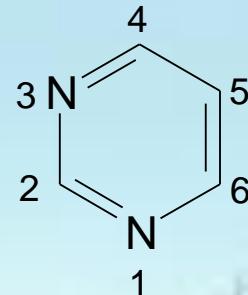
содержат

**гетероциклические основания двух типов:
пурины и пиримидины**

**углеводные остатки:
D-рибозу и 2-дезокси-D-рибозу**

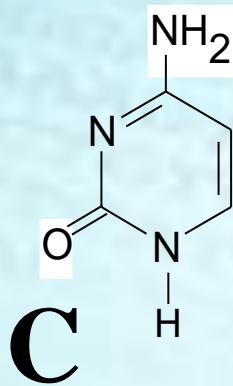
Структура пиримидиновых оснований

Pyr; Py

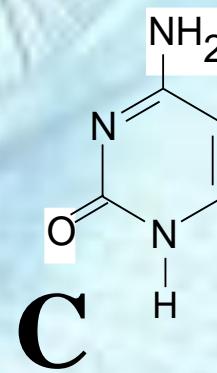


ДНК

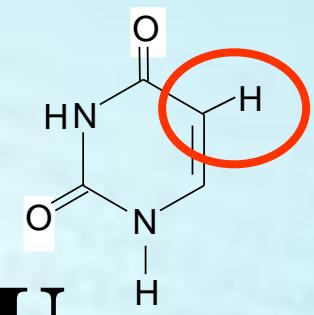
РНК



T



U



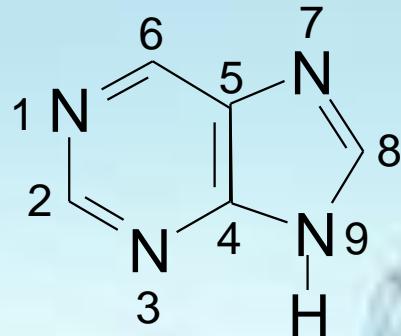
T, Thy - **тимин**; 2,4-диоксо-5-метилтетрагидропиридин

U, Ura - **урацил**; 2,4-диоксотетрагидропиридин

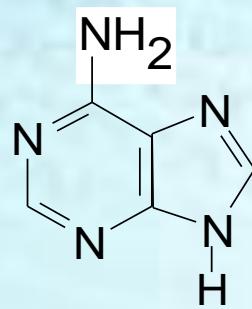
C, Cyt – **цитозин**; 2-оксо-4-аминодигидропиридин

Структура пуриновых оснований

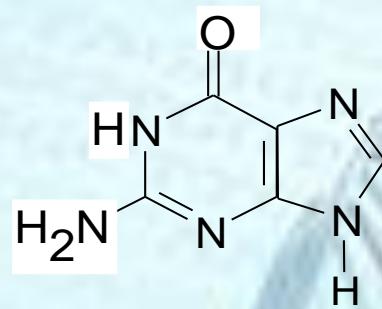
Pur; Pu



ДНК

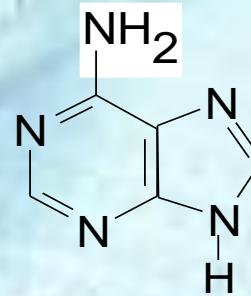


A

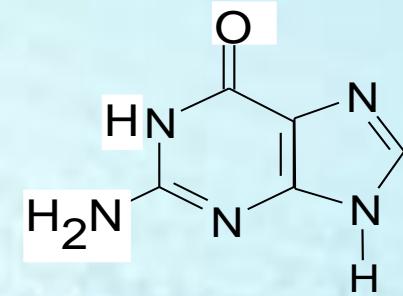


G

РНК



A



G

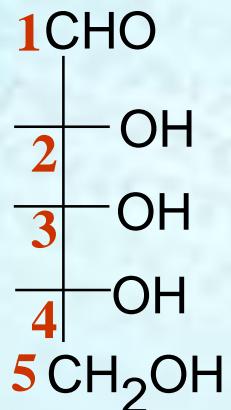
A, Ade - аденин; 6-аминопурин

G, Gua - гуанин; 2-амино-6-оксодигидропурин

Структура углеводного фрагмента

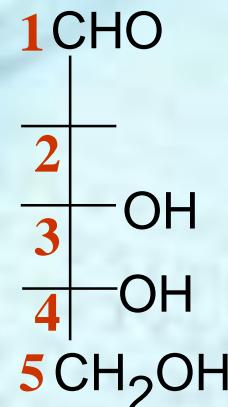
Тип нуклеиновой кислоты определяется
структурой сахара

РНК



D-рибоза

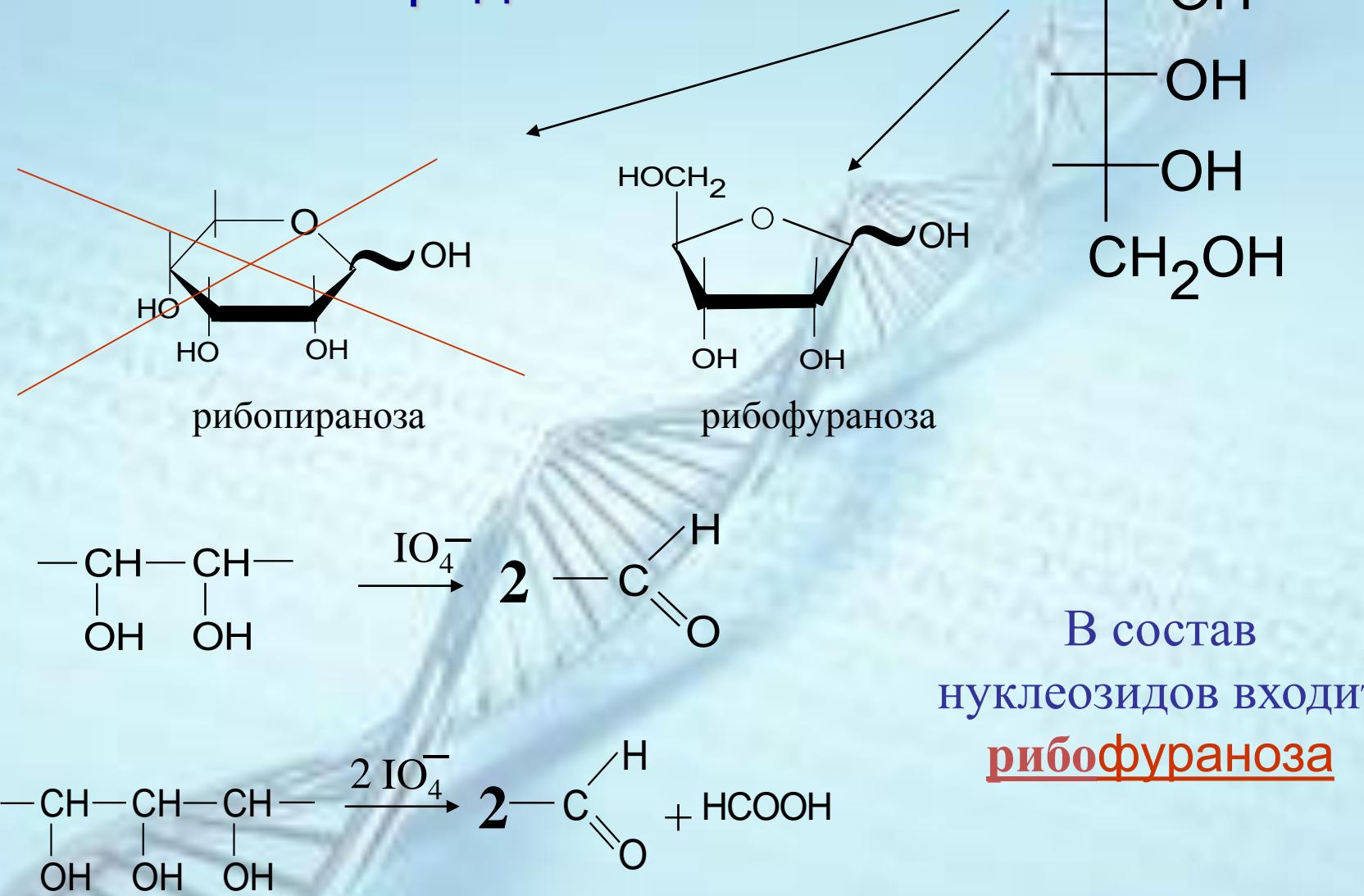
ДНК



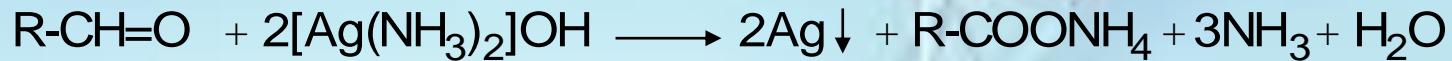
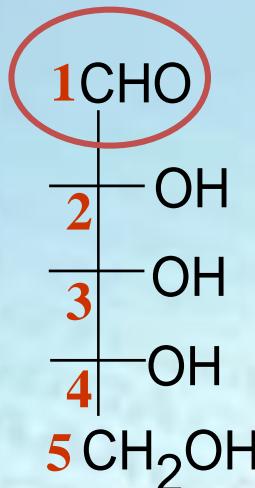
2-дезокси-D-рибоза

D-рибоза впервые охарактеризована Ф. Левеном, синтезирована Э. Фишером

Размер окисного кольца моносахарида



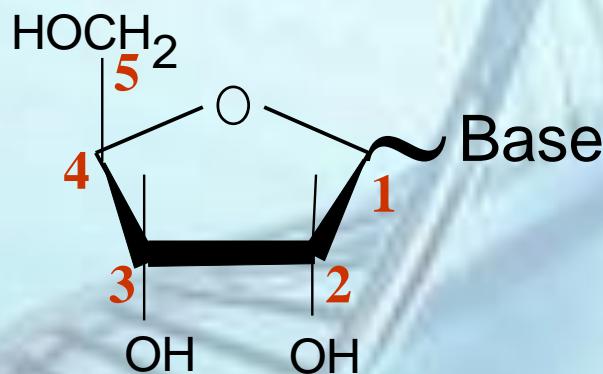
Тип связи сахара с основанием



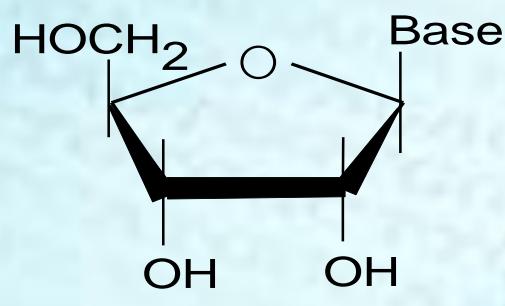
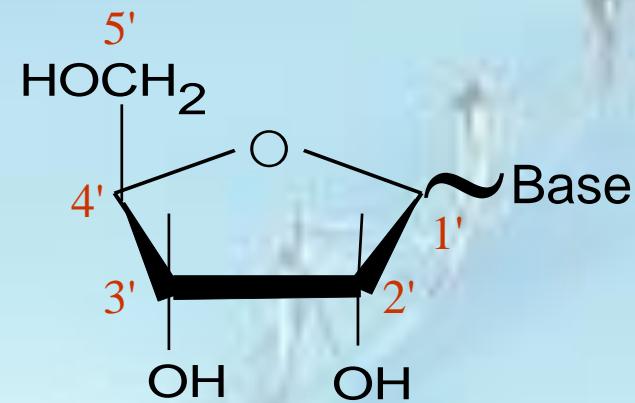
Нуклеозиды **Не дают** реакций по альдегидной группе



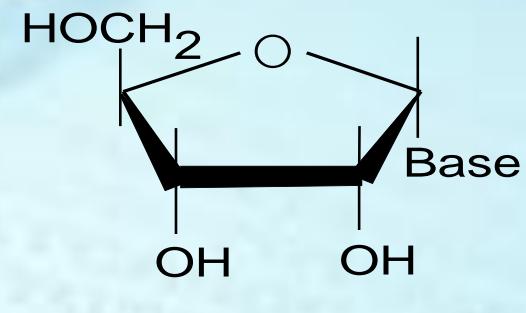
Связь сахара с основанием - гликозидная



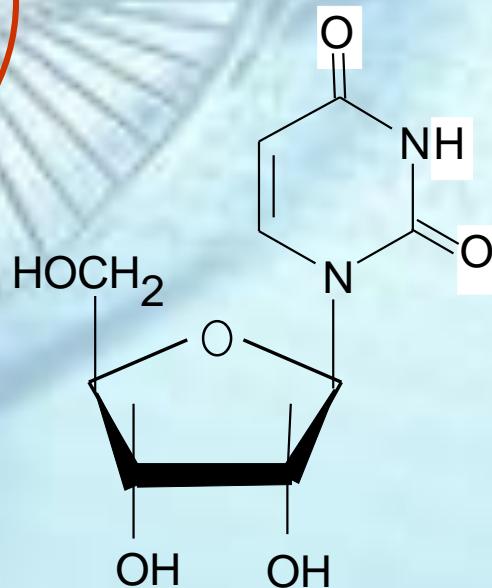
Конфигурация гликозидного центра



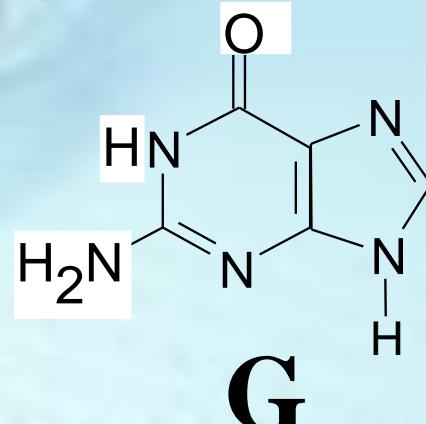
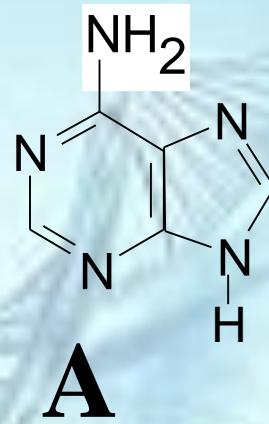
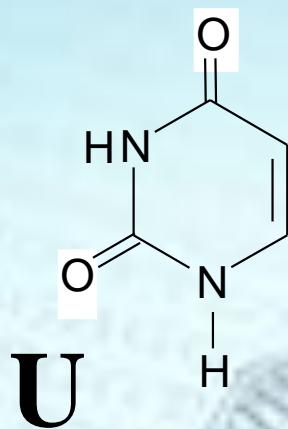
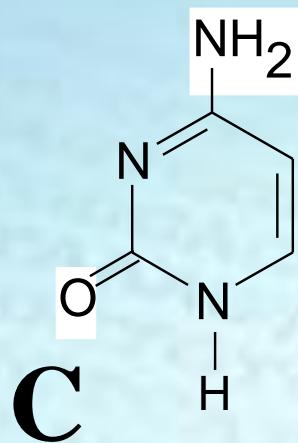
β -аномер



α -аномер



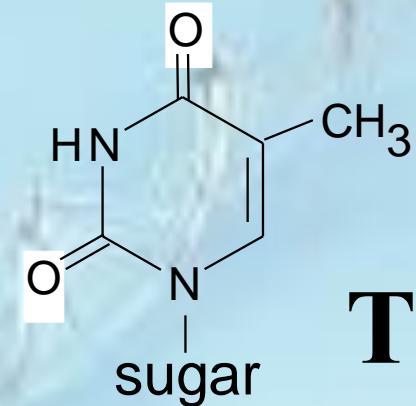
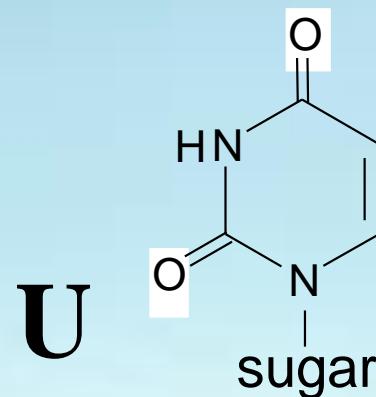
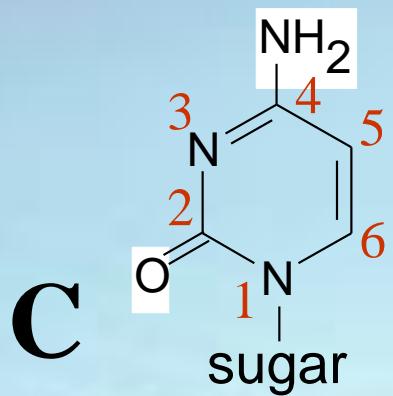
Какой атом участвует в образовании гликозидной связи со стороны основания?



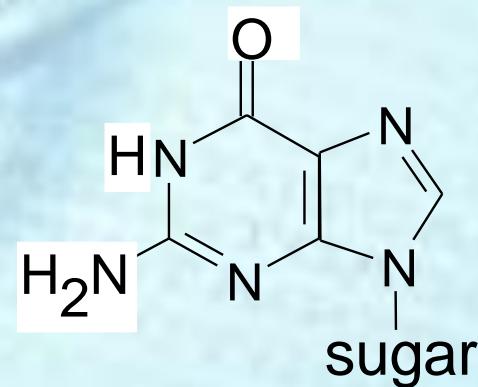
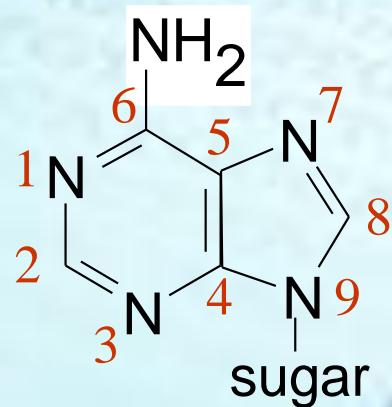
О-гликозиды

С-гликозиды

N-гликозиды



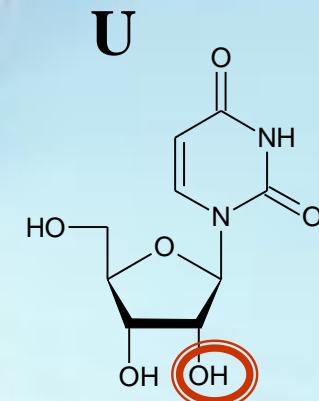
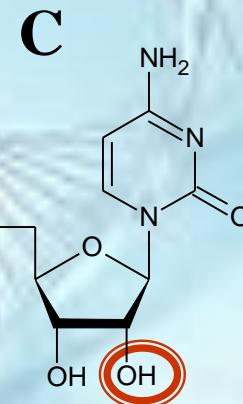
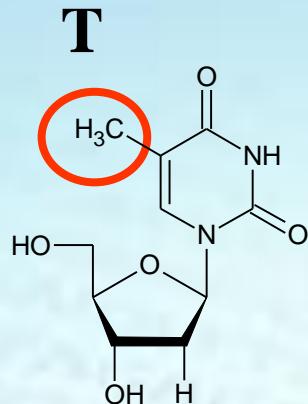
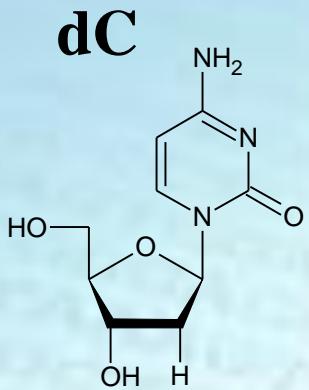
Пиридиновые нуклеозиды – **N1** гликозиды



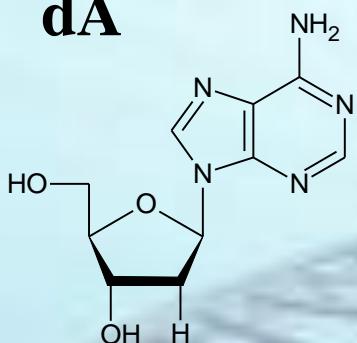
Пуриновые нуклеозиды – **N9** гликозиды

Структура нуклеозидов

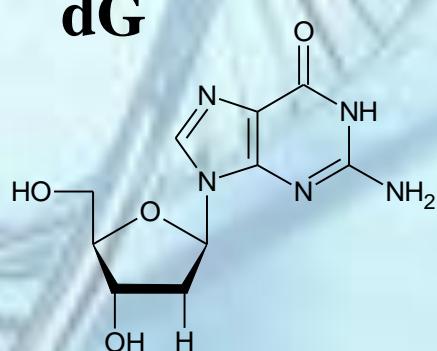
ДНК



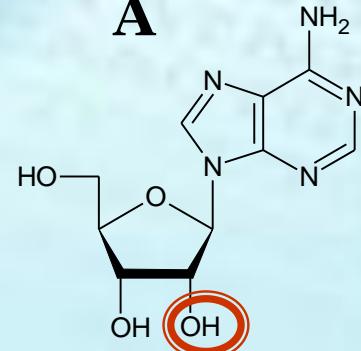
dA



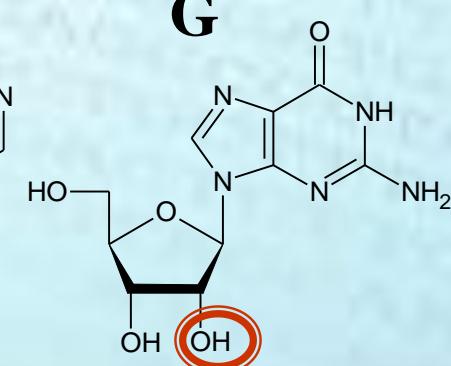
dG



A



G



Номенклатура нуклеозидов

рибонуклеозиды

U, Urд - уридин; 1- β -D-рибофуранозилурацил

C, Cyd – цитидин; 1- β -D-рибофуранозилцитозин

A, Ado - аденоzin; 9- β -D-рибофуранозиладенин

G, Guo - гуанозин; 9- β -D-рибофуранозилгуанин

2'-дезоксирибонуклеозиды

T, Thd - тимидин; 1- β -2'-дезокси-D-рибофуранозилтимин

dC, dCyd - 2'-дезоксицитидин; 1- β -2'-дезокси-D-рибофуранозилцитозин

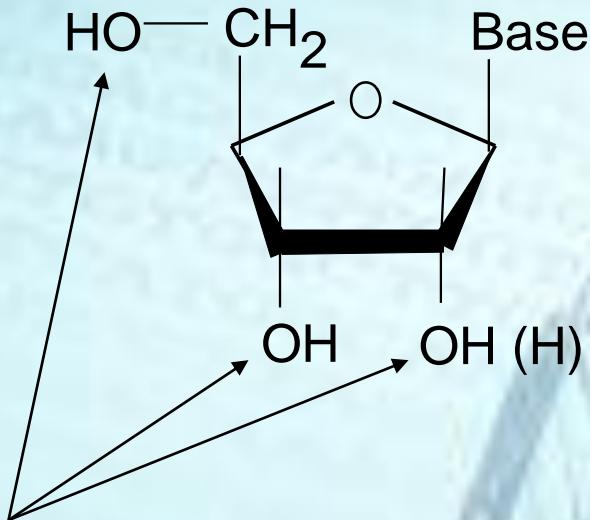
dA, dAdo - 2'-дезоксиаденоzin; 9- β -2'-дезокси-D-рибофуранозиладенин

dG, dGuo - 2'-дезоксигуанозин; 9- β -2'-дезокси-D-рибофуранозилгуанин

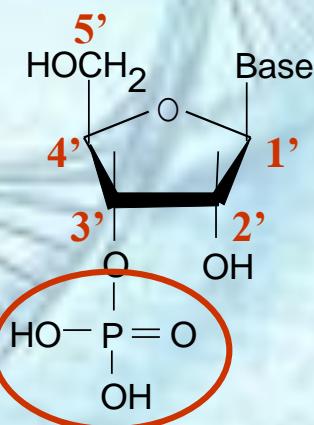
Нуклеотиды

Нуклеотид = нуклеозид + фосфатная группа =

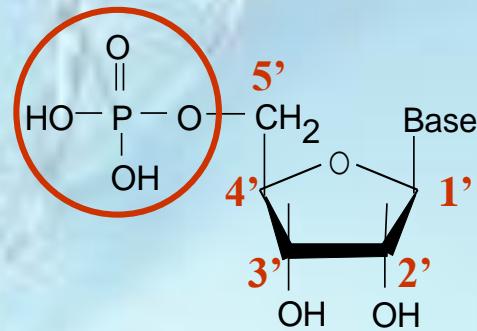
моноэфир фосфорной кислоты



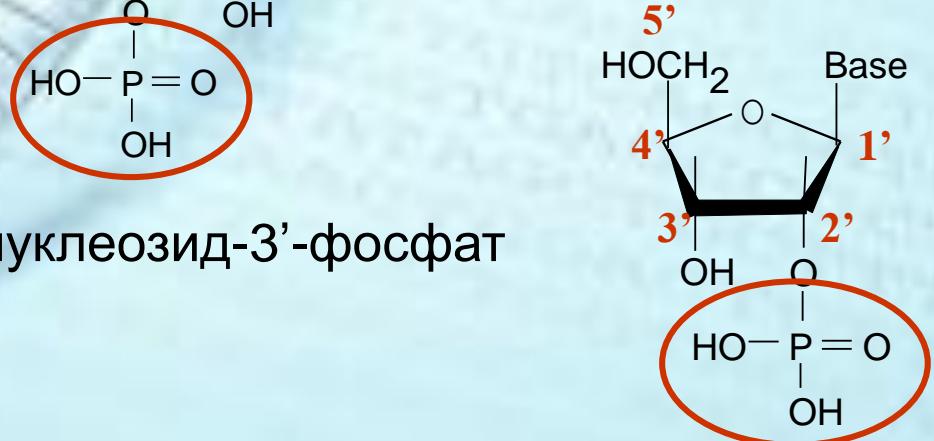
Возможные места
присоединения фосфатного
остатка



нуклеозид-5'-фосфат

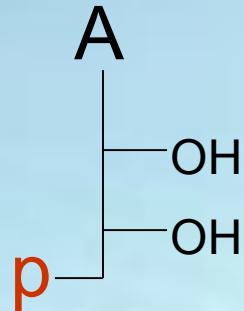


нуклеозид-5'-фосфат



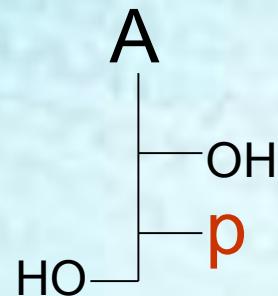
нуклеозид-2'-фосфат

Сокращенные формулы нуклеотидов



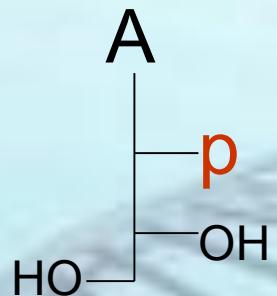
pA

аденозин-5'-фосфат = 5'-адениловая кислота



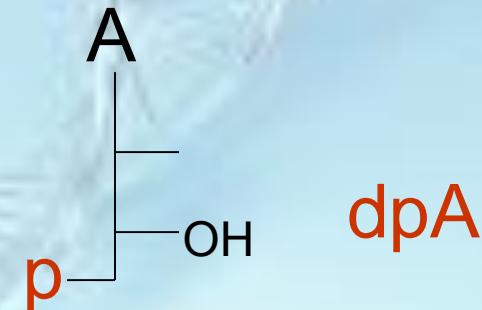
Ap

аденозин-3'-фосфат = 3'-адениловая кислота



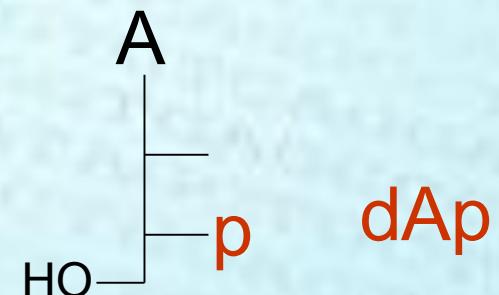
A 2' p

аденозин-2'-фосфат = 2'-адениловая кислота



dAp

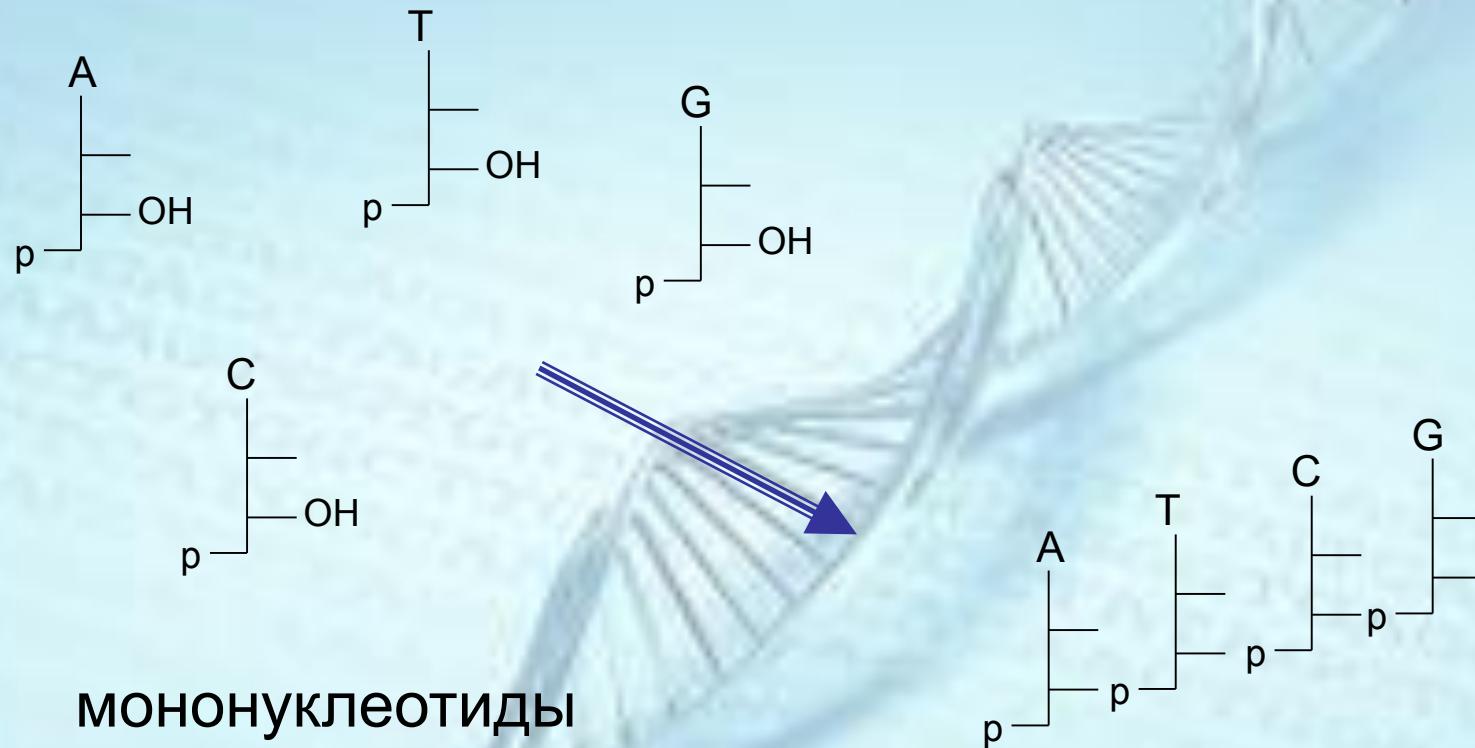
2'-дезоксиаденозин-5'-фосфат



dAp

2'-дезоксиаденозин-3'-фосфат

Мононуклеотид – мономер НК



МОНОНУКЛЕОТИДЫ

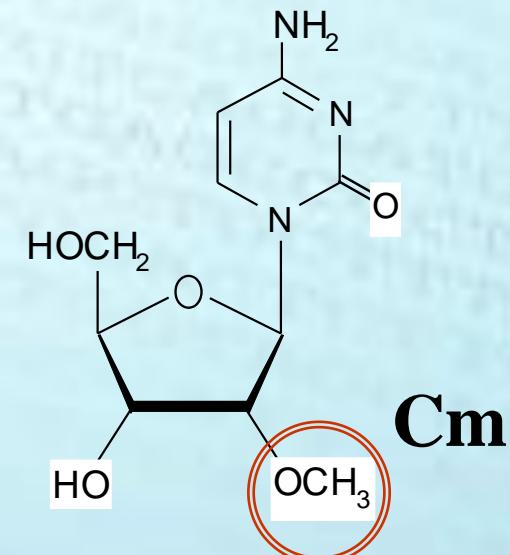
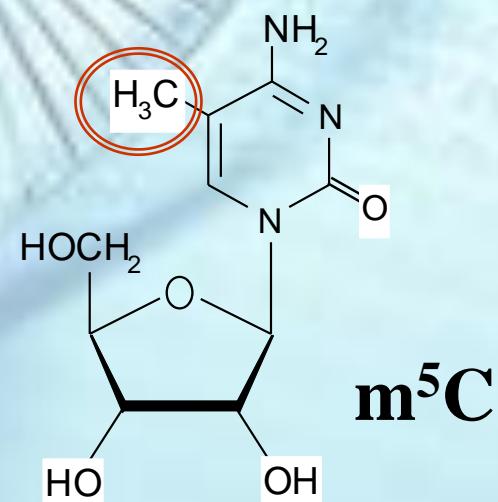
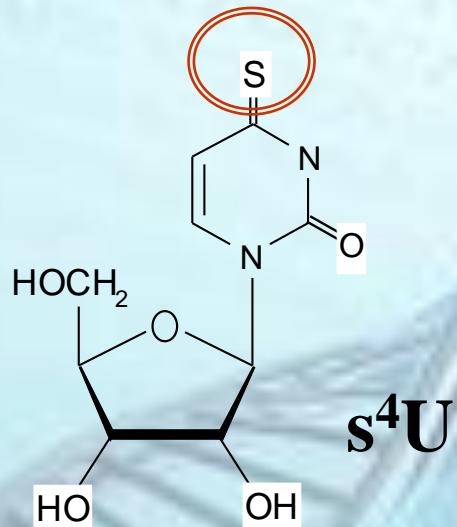
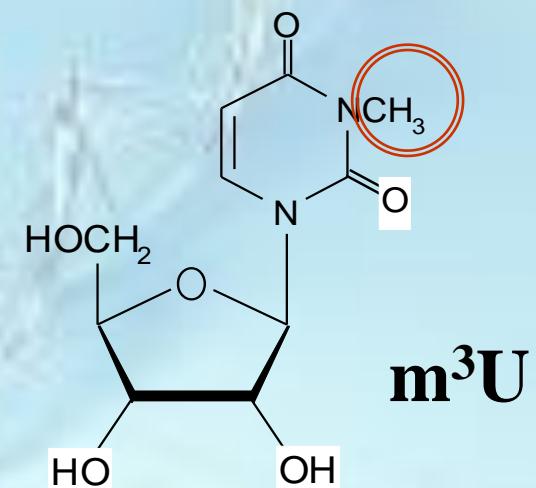
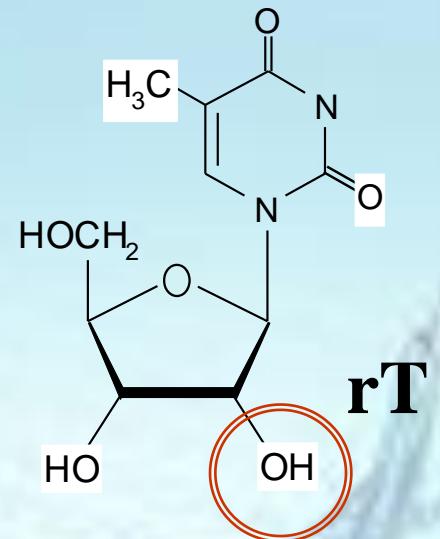
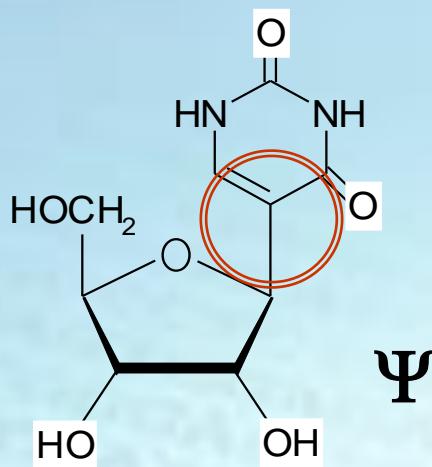
олигонуклеотид

5'- r(CUA GGA CGG AGU CAC ACA GAA) - 3'
5'- d(CTA GGA CGG AGT CAC ACA GAA) - 3'

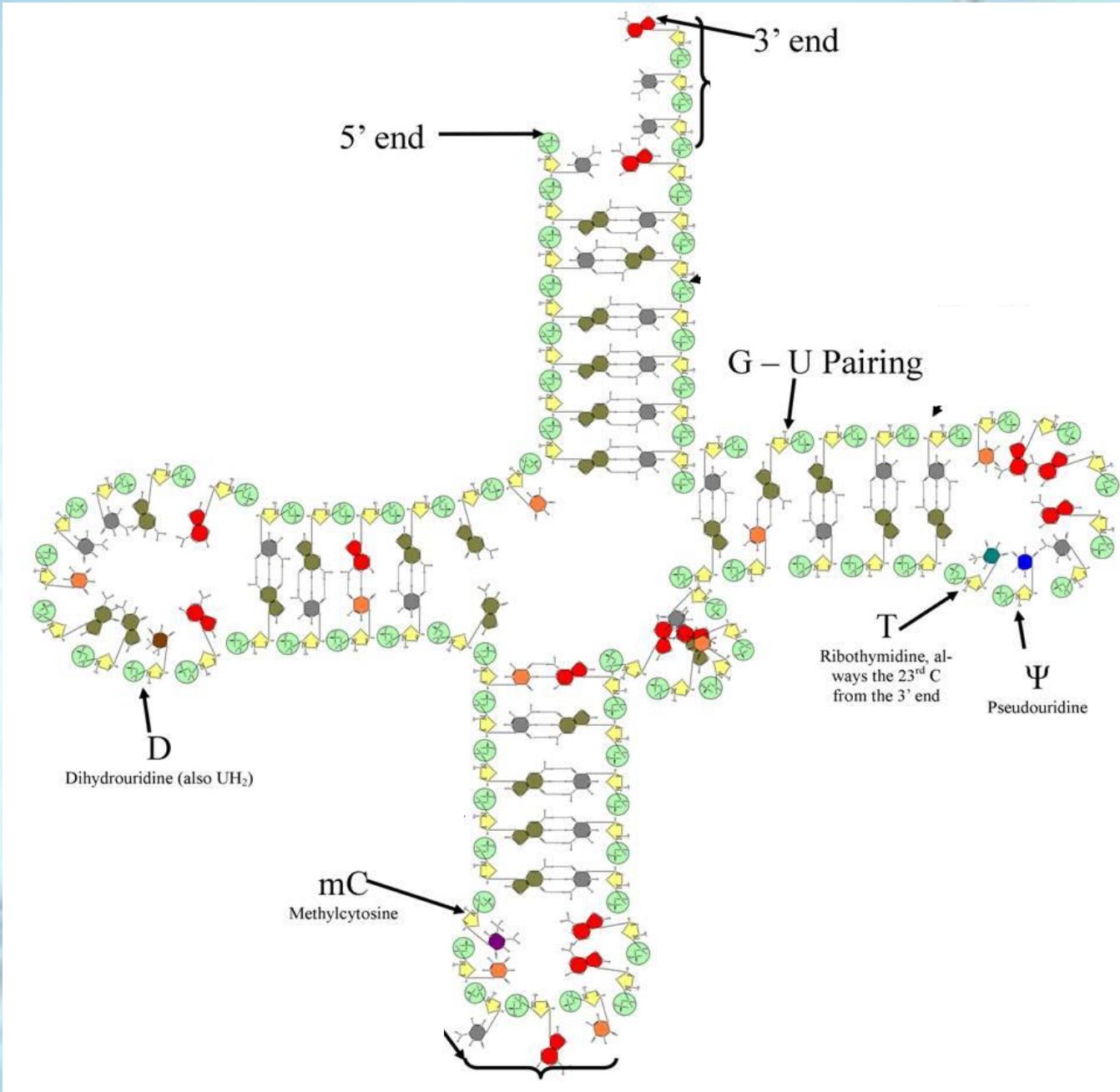
«Необычные» нуклеозиды и их биологическая роль

1. Минорные нуклеозиды в составе НК
2. Нуклеозидные антибиотики

Минорные нуклеозиды

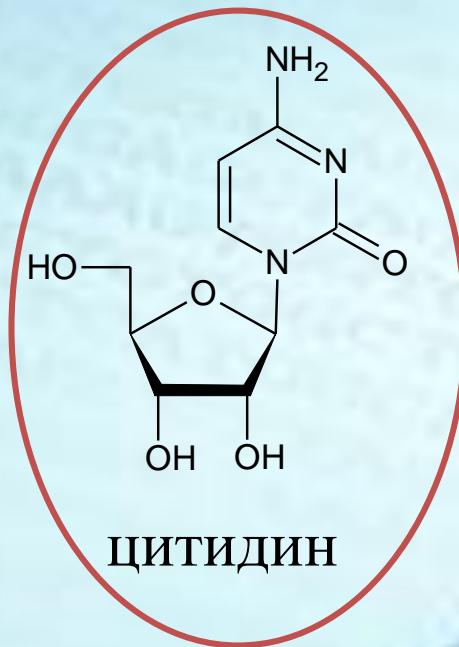


Минорные нуклеозиды в составе tРНК

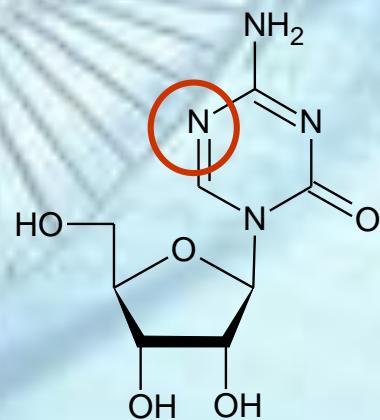


Нуклеозиды-антибиотики

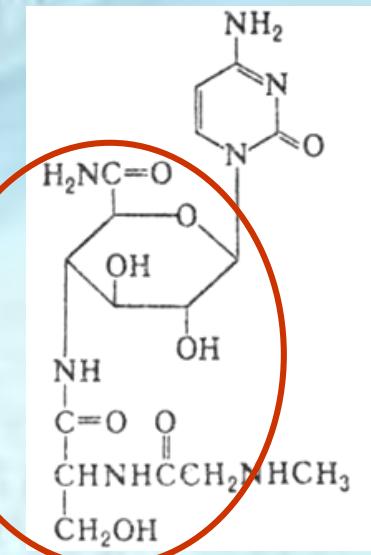
Нуклеозиды-антибиотики отличаются от обычных нуклеозидов в строении либо углеводной части, либо гетероциклического основания. Это позволяет им выступать в качестве антиметаболитов, чем и объясняется их антибиотическая активность.



ЦИТИДИН

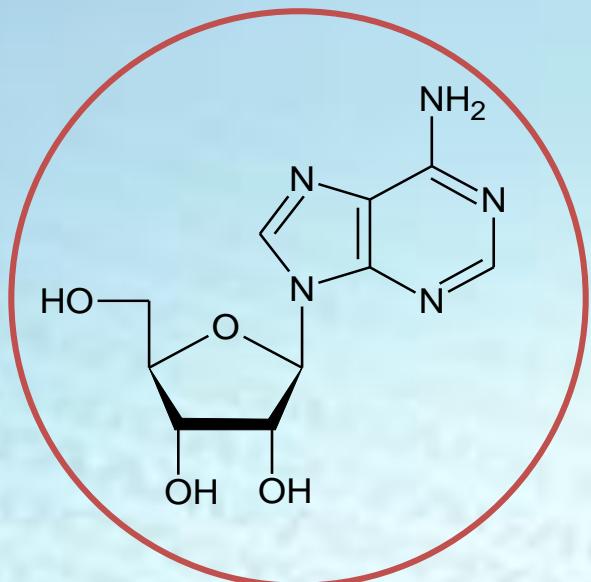


5-азацитидин - пртиволейкозный препарат фосфорилируется в клетке и включается в НК

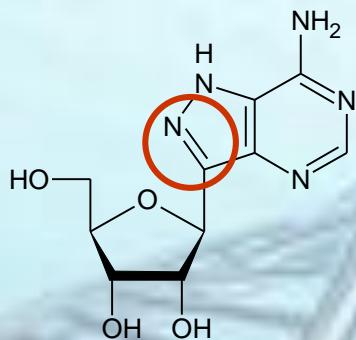


Гуттергин - ингибитирует рибосомальную пептидилтрансферазу, что останавливает синтез белка

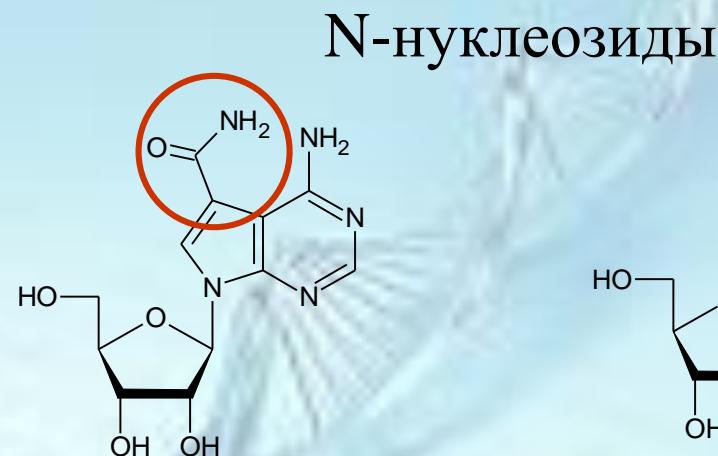
Нуклеозидные антибиотики – аналоги аденоцина



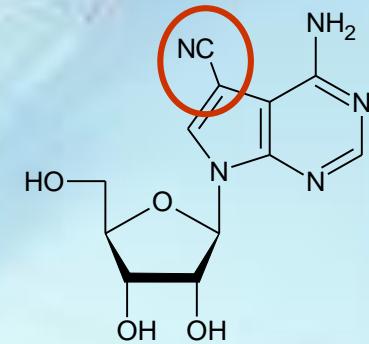
С-нуклеозиды



формицин

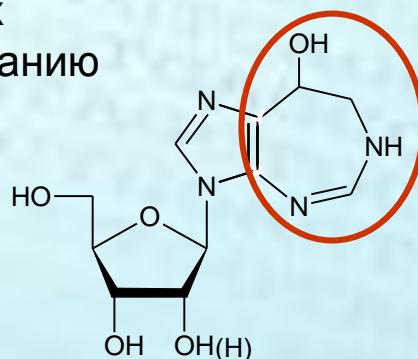


тойокамицин



сангивамицин

включаются в НК и нуклеотиды-коферменты, препятствуя их нормальному функционированию

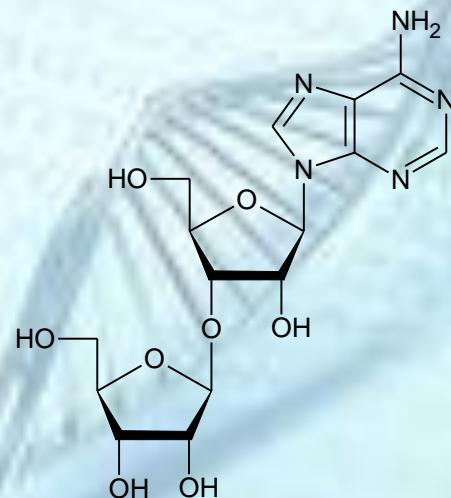


Коформицин - ингибитор
аденозин-дезаминазы

Участие нуклеозидов в защитных функциях растений

При заражении культур арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) и томата (*Lycopersicon esculentum*) фитопатогенными бактериями *Pseudomonad syringae* образуется

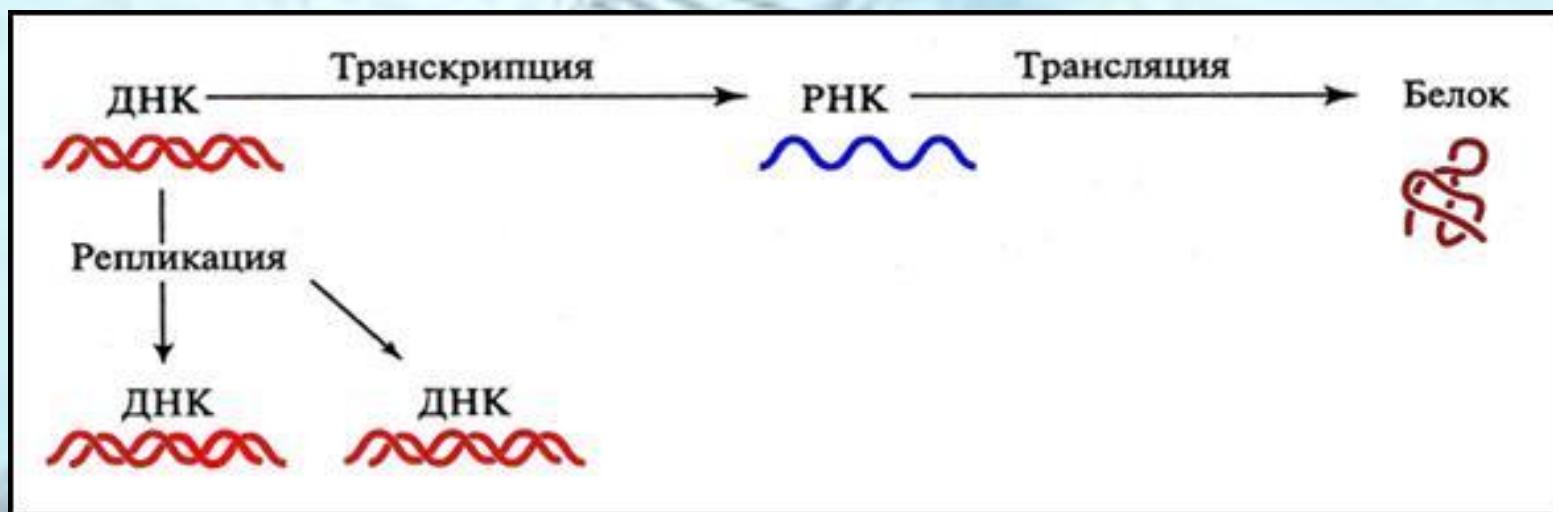
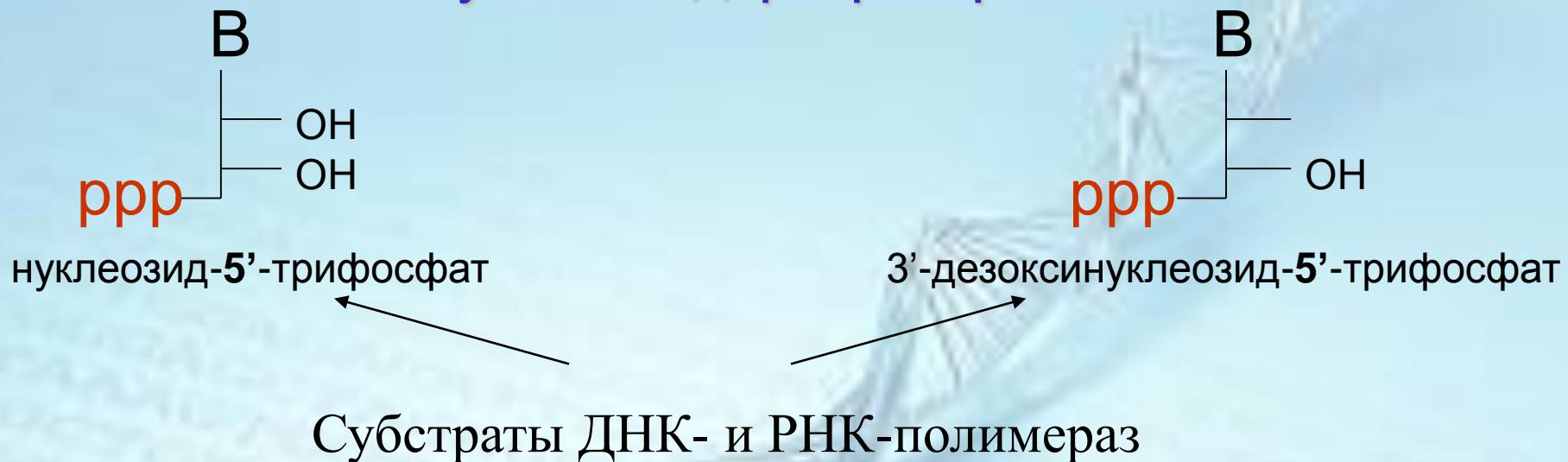
3'-О-β-D-рибофuranозиладенозин (3'RA)



3'RA – вторичный метаболит, участвующий в защитном ответе растения на инфекцию

Bednarek P. et al 2004, *Planta*, 668-672

Нуклеозиды – составная часть нуклеозидтрифосфатов



История открытия нуклеиновых кислот

- 1869 – **Фридрих Мишер** выделил из ядер клеток новое вещество, которое назвал **нуклеином**.
- 1879 - **Альбрехт Коссель** обнаружил в нуклеине гетероциклическое основание **гуанин**. Позднее он же выделил **тимин** из клеток вилочковой железы, или тимуса, быка (отсюда название), **цитозин** (от греч. cytos — клетка) и **аденин** (от греч. aden — железа). В 1910 г. Косселю за его открытия вручили Нобелевскую премию по медицине.
- 1889 – **Фридрих Мишер** выделил из молоки рейнского лосося вещество, содержащее фосфор и обладающее кислыми свойствами, и назвал его **нуклеиновой кислотой**.
- 1889 - **Рихард Альтман** выделил из дрожжей нуклеиновую кислоту, которая содержала **урацил** вместо тимина.
- 1891 - **Лильенфельд** выделил «тимонуклеиновую» кислоту из зобной железы теленка.
- 1909 - **Фоэбус Левен** выделил углевод - **рибозу** при изучении нуклеиновой кислоты из дрожжей. Через 20 лет он выделил **2-дезоксирибозу** из тимонуклеиновой кислоты.
- 1902 – **Эмиль Фишер** получил Нобелевскую премию по химии за исследование структуры сахаров и их синтез.
- 1909 – **Гулланд** определили природу нуклеозидных звеньев, ввел понятие **нуклеозид** и **нуклеотид**.

- 1936 - **А. Н. Белозерский** впервые препаративно выделил ДНК в чистом виде из растительного материала – из ростков конского каштана.
- 1940 – правила **Эрвина Чаргаффа**. Тетрануклеотидная теория ДНК. Попарная эквивалентность содержания тимидина – аденоцина и цитидина – гуанозина
- 1942 - **Александр Тодд** изучал нуклеиновые кислоты и нуклеотидные коэнзимы. Тодд и один из его сотрудников прояснили важные особенности химической структуры и механизмов реакций нуклеиновых кислот.
- 1944 – **Освальд Эвери** показал, что веществом наследственности является именно ДНК.
- 1951 – **Дан Браун** определил, что рибоза и дезоксирибоза существует в нуклеозидах в виде пятичленного цикла и гетероциклическое основание находится по отношению к углеводному фрагменту в бета-конфигурации.
- **Донохью** предположил, что в тимине и гуанине кислород находится в кето-форме

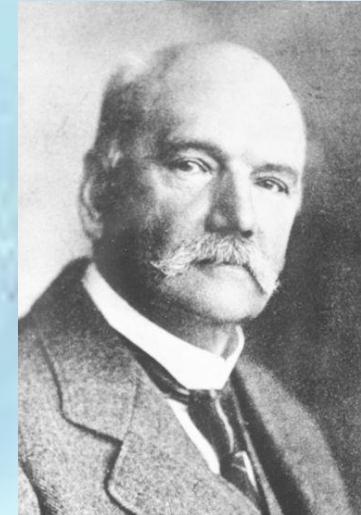


Фридрих Мишер в лаборатории Феликса Хоппе-Сейлера в Тюбингене получил задание изучить состав белых кровяных клеток (лейкоцитов).

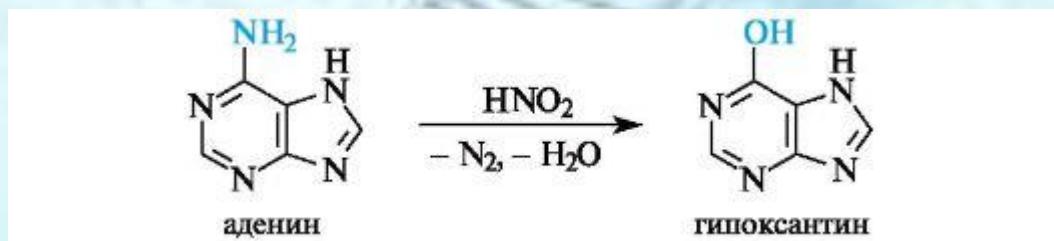
В 1869 году Фридрих Мишер выделил из спермы лосося и из гноя, собранного с повязок, закрывавших открытые раны, некое вещество и назвал его **нуклеином**, поскольку оно происходило из клеточных ядер (nuclei). Говоря современным языком, он выделил хроматин. Мишер установил, что нуклеин состоит из атомов **водорода, кислорода, азота и фосфора**, причем имеет **уникальное соотношение азота и фосфора** ($N/P \approx 1.67$). Мишер был первым, кто идентифицировал ДНК как отдельную молекулу.

Впоследствии нуклеин переименовали в **нуклеиновую кислоту**, а затем — в **дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК)**. В 1914 году Роберт Фельген установил, что ДНК окрашивается фуксином. После этого ДНК нашли в ядрах всех эукариотических клеток.

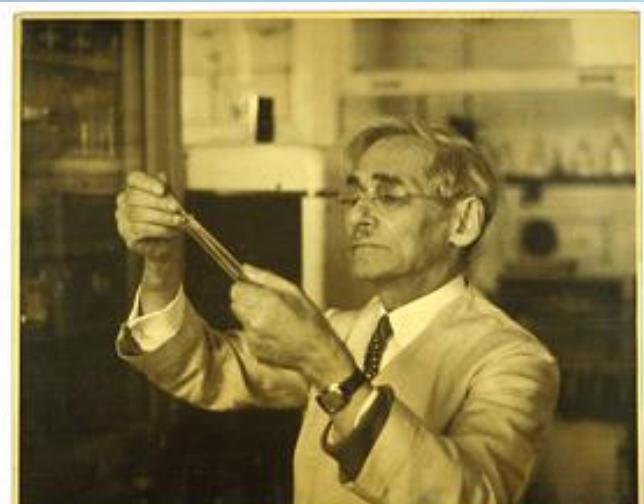
Альбрехт Коссель, почётный профессор физиологии в Университете Гейдельберга, в 1881 году определил ДНК как нуклеиновую кислоту. За свои исследования ДНК он получил Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1910 году.



В одном из экспериментов он кипятил нуклеин в воде с целью получить фосфор. Среди многочисленных продуктов расщепления он идентифицировал существенное количество **гипоксантина**. Итак, он нашел первое **азотсодержащее гетероциклическое основание**.



А в 1893 году Коссель обнаружил, что нуклеиновые кислоты содержат углевод. Он сообщил о присутствии **восстанавливающего сахара (пентозы)** в нуклеине дрожжей.



Courtesy of the Rockefeller Archive Center. Noncommercial, educational use only.

В течение 1920-х годов биохимик **Фоэбус Арон Теодор Левен** (наст. имя Фишель Аронович Лёвин) изучал состав молекулы ДНК.

Он обнаружил, что ДНК содержит 4 азотистых основания (цитозин, тимин, аденин и гуанин), дезоксирибозу и фосфатные группы. Он сделал вывод: **структурная единица ДНК — это блок из азотистого основания, сахара и фосфата** (первое определение нуклеотида). Кроме того, он нашел различия между ДНК и РНК: первая содержит дезоксирибозу, а вторая — рибозу.

Однако он ошибочно посчитал, что количество всех азотистых оснований одинаково, а ДНК состоит из одинаковых тетрануклеотидов.

Ошибочное мнение:

молекулы нуклеиновых кислот,
несмотря на их большую длину,
имеют слишком простую
повторяющуюся структуру, чтобы
нести достаточно информации и
служить генетическим материалом.

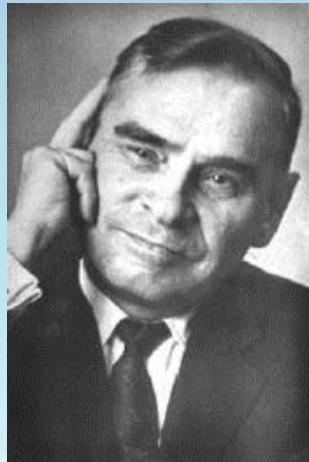
**ФИШЕР (Fischer), Эмиль Герман
(1852 – 1919)**



В 1902 г. Фишеру была вручена Нобелевская премия по химии «в качестве признания его особых заслуг, связанных с экспериментами по синтезу веществ с сахаридными и пуриновыми группами». Говоря об исследованиях сахаров, Фишер в Нобелевской лекции заявил, что «постепенно завеса, с помощью которой Природа скрывала свои секреты, была приоткрыта в вопросах, касающихся углеводов. Несмотря на это, химическая загадка Жизни не может быть решена до тех пор, пока органическая химия не изучит другой, более сложный предмет – белки».



А.Р. Кизель (1882 – 1942)



А.Н.Белозерский
(1905- 1972)

В **1934** году в журнале "Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie", затем в **1935** году в "Ученых записках МГУ" появились статьи **Александра Робертовича Кизеля и Андрея Николаевича Белозерского**, в которых доказывалось присутствие в растительных клетках тимонуклеиновой кислоты.

А.Н. Белозерскому первому удалось выделить и идентифицировать тимин в проростках семян гороха, а затем в семенах других бобовых, из семян конского каштана он выделил саму ДНК. Впоследствии наличие РНК и ДНК было подтверждено в почках липы, луковицах лука, зародышах пшеницы. **Полученными результатами было отвергнуто деление НК на "животные" и "растительные" и утверждено представление об универсальном присутствии ДНК как в растительных, так и в животных клетках.**

Исследования протоплазмы. V. О дезоксирибонуклеиновой кислоте и нуклеопротеидах из проростков

160

Untersuchungen über Protoplasma. V.
Über die Nucleinsäure und die Nucleoproteide der Erbsenkeime.
Von
A. Kiesel und A. Belozersky.

(Aus dem Laboratorium für Pflanzen-Biochemie der Universität Moskau.)
(Der Schriftleitung zugegangen am 5. September 1934.)

Die Untersuchung der Nucleoproteide und ihrer beiden Komponenten, der Nucleinsäure und des mit ihr gepaarten Eiweißstoffes, bietet ein ganz besonderes Interesse bei pflanzlichen Organismen. Einerseits ist hier diese Gruppe der fundamentalsten Protoplasmabestandteile noch gänzlich unbekannt, andererseits zwangen aber die einzelnen Angaben über die sogenannte „pflanzliche“ Nucleinsäure eine vielleicht im allgemeinen ganz falsche Vorstellung über die Zusammensetzung des pflanzlichen Zellkerns auf.

Vor beinahe einem Vierteljahrhundert sprach A. Kossel in seinem Nobelpreisvortrag¹⁾ die Meinung aus, daß „sich bei den Nucleinsäuren dieselbe Erscheinung wiederholt, die wir an den Proteinstoffen, den Fetten, den Gallensäuren und vielen anderen biochemischen Produkten kennen: das Auftreten einer ganzen Reihe verschiedenartiger Stoffe, welche die gleiche architektonische Idee in vielfach variierender Ausführung zeigen“. Dabei ließ A. Kossel nur die Frage offen, ob „der Inosinsäure und Guanylsäure dieselbe große Bedeutung für das Leben der Zelle zuzuschreiben ist, die den komplizierteren Nucleinsäuren zukommt“, und „ob der Sitz der beiden letztgenannten Säuren im Chromatin des Zellkerns zu suchen ist“. Zu gleicher Zeit bestanden aber für A. Kossel keine Zweifel darüber, daß die damals für Pflanzen einzig bekannte Nucleinsäure, die sogenannte Hefenucleinsäure, einen wirklichen Zellkernbestandteil bildet, also die tierische Thymonucleinsäure in Pflanzen vertritt und somit der letzteren ihrer Bedeutung und Lage nach gleichkommt, wenngleich sie auch ihrem physikalischen Verhalten nach von dieser stark abweicht und niemals als Nucleidkomponente experimentell erkannt worden war.

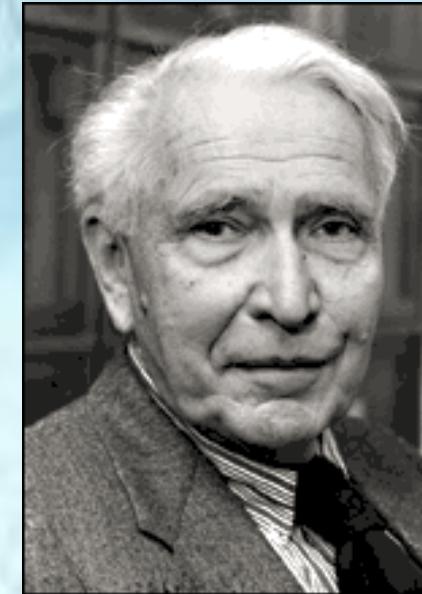
Diese lange Zeit tief eingebürgerte Vorstellung, nämlich daß der pflanzlichen Kernsubstanz ein Nucleoproteid zugrunde

¹⁾ Münch. med. Wschr. 1911, Nr. 2.

Исследование структуры ДНК

До середины 40-х гг. господствовала «тетрануклеотидная» теория, согласно которой ДНК состоит из повторяющихся блоков по четыре разных азотистых основания: А, Т, С и Г.

Организм	Нуклеотидный состав, мол. %			
	Аденин	Гуанин	Тимин	Цитозин
Человек	30,9	19,9	29,4	19,8
Овца	29,3	21,4	28,3	21,0
Курица	28,8	20,5	29,2	21,5
Черепаха	29,7	22,0	27,9	21,3
Лосось	29,7	20,8	29,1	20,4
Морской еж	32,8	17,7	32,1	17,3
Саранча	29,3	20,5	29,3	20,7
Пшеница	27,3	22,7	27,1	22,8
Дрожжи	31,3	18,7	32,9	17,1
<i>Escherichia coli</i> (бактерия)	24,7	26,0	23,6	25,7
Бактериофаг фХ174 (вирус)	24,6	24,1	32,7	18,5



Erwin Chargaff

Эрвин Чаргафф в 1951 году обнаружил, что количество аденина в ДНК разных организмов примерно равно количеству тимина, а количество гуанина примерно равно количеству цитозина. Это — правило Чаргаффа. Вывод: **ДНК не является полимером с регулярным чередованием звеньев**, Лёвен ошибся.

1949—1951 гг. группе Эрвина Чаргаффа удалось разделить нуклеотиды ДНК при помощи бумажной хроматографии и определить точные количественные соотношения нуклеотидов разных типов. Они значительно отличались от эквимолярных, которых можно было бы ожидать, если бы все четыре основания были представлены в равных пропорциях. Оказалось, что:

$$A=T, G=C$$

$$A+G=T+C, \text{ т.е. Pur=Pyr}$$

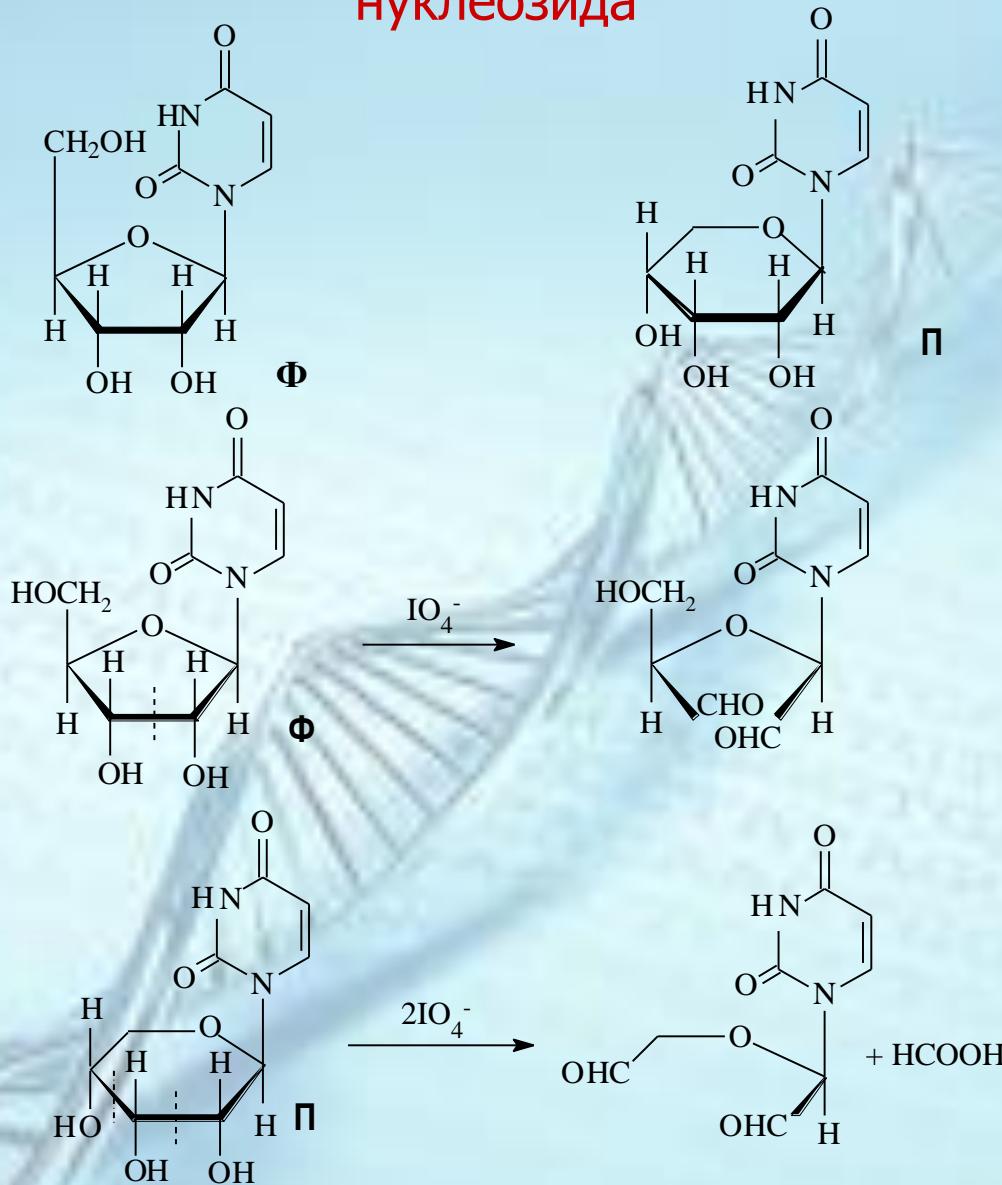
$A+C=G+T$, т.е. количество оснований с аминогруппами в положении 6 равно количеству оснований с кетогруппами в положении 6

Соотношение $(A+T):(G+C)$ может быть различным у ДНК разных видов.

Почему?

1944 г. – эксперимент Освальда Эвери, Колина Маклауда и Маклина Маккарти доказал, что веществом, вызывающим трансформацию бактерий, является ДНК. Это явилось первым материальным доказательством роли ДНК в наследственности

Доказательство размера окисного кольца углеводного фрагмента нуклеозида



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

¹ Young, F. B., Gerald, H., and Jevons, W., *Phil. Mag.*, **40**, 149 (1920).

² Longuet-Higgins, M. S., *Mon. Not. Roy. Astro. Soc., Geophys. Suppl.* **5**, 285 (1949).

³ Von Arx, W. S., Woods Hole Papers in Phys. Oceanogr. Meteor., **11** (3) (1956).

⁴ Ekman, V. W., *Arkiv. Mat. Astron. Fysik.* (Stockholm), **2** (11) (1905).

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey¹. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe X-ray diagrams of the acidic hydroxyl groups would hold the negatively charged phosphate groups too close together, and repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining β -D-deoxyribofuranose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's² model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There

This figure is purely diagrammatic. The two vertical lines symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the two chains together. The vertical line marks the fibre axis.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at

is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-coordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine to thymine, and guanine

one member of
se assumptions
; similarly for

guanine to cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally^{3,4} that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data^{3,4} on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely upon published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at

Wilkins, Stokes and Wilson

April 25, 1953 VOL. 171

Dr. M. H. F. WILKINS, J. D. WILSON, J. D. SIMON, L. Hamilton, J. C. White and G. R. Wyatt for supplying material without which this work would have been impossible; also Drs. J. D. Watson and Mr. F. H. C. Crick for stimulation, and our colleagues R. E. Franklin, R. G. Gosling, G. L. Brown and W. E. Seeds for discussion. One of us (H. R. W.) wishes to acknowledge the award of a University of Wales Fellowship.

M. H. F. WILKINS
Medical Research Council Biophysics
Research Unit,

A. R. STOKES
H. R. WILSON
Wheatstone Physics Laboratory,
King's College, London.
April 2.

¹ Astbury, W. T., Symp. Soc. Exp. Biol., **1**, Nucleic Acid (Cambridge Univ. Press, 1947).

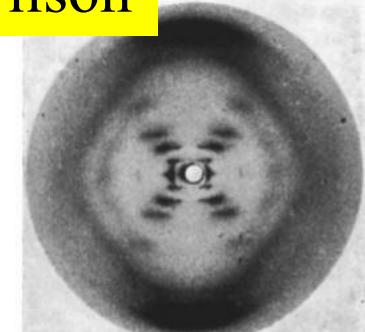
² Riley, D. P., and Oster, G., *Biochim. et Biophys. Acta*, **7**, 526 (1951).

³ Wilkins, M. H. F., Gosling, R. G., and Seeds, W. E., *Nature*, **167**, 759 (1951).

⁴ Astbury, W. T., and Bell, F. O., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **6**, 109 (1938).

Cochran, M., Crick, F. H. C., and Vand, V., *Acta Cryst.*, **5**, 681 (1952).

Wilkins, M. H. F., and Randall, J. T., *Biochim. et Biophys. Acta*, **10**, 192 (1953).



Sodium deoxyribose nucleate from calf thymus. Structure *B*

molecules, each unit being shielded by a sheath of water. Each unit is then free to take up its least-energy configuration independently of its neighbours and, in view of the nature of the long-chain molecules involved, it is highly likely that the general form will be helical². If we adopt the hypothesis of a helical structure, it is immediately possible, from the X-ray diagram of structure *B*, to make certain deductions as to the nature and dimensions of the helix.

The innermost maxima on the first, second, third and fifth layer lines lie approximately on straight lines radiating from the origin. For a smooth single-strand helix the structure factor on the *n*th layer line is given by:

$$+ \frac{1}{2}\pi)$$

Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate

SODIUM thymonucleate fibres give two distinct types of X-ray diagram. The first corresponds to a crystalline form, structure *A*, obtained at about 75 per cent relative humidity; a study of this is described.

A different degree of range of *n* is given for structure *B* is revealed. Fibres which are dried from 40–50 per cent to several hundred per cent of the dry weight. Moreover, some fibres never show structure *A*, and in these structure *B* can be obtained with an even lower water content.

The X-ray diagram of structure *B* (see photograph) shows in striking manner the features characteristic of helical structures, first worked out in this laboratory by Stokes (unpublished) and by Crick, Cochran and Vand¹. Stokes and Wilkins were the first to propose such structures for nucleic acid as a result of direct studies of nucleic acid fibres, although a helical structure had been previously suggested by Furberg (thesis, London, 1949) on the basis of X-ray studies of nucleosides and nucleotides.

While the X-ray evidence cannot, at present, be taken as direct proof that the structure is helical, other considerations discussed below make the existence of a helical structure highly probable.

Structure *B* is derived from the crystalline structure *A* when the sodium thymonucleate fibres take up quantities of water in excess of about 40 per cent of their weight. The change is accompanied by an increase of about 30 per cent in the length of the fibre, and by a substantial re-arrangement of the molecule. It therefore seems reasonable to suppose that in structure *B* the structural units of sodium thymonucleate (molecules or groups of molecules) are relatively free from the influence of neighbouring

functions of *u*, *r* and *ϕ* are the radial distance, the angle of rotation in space and the angle of refraction in space²; this expression leads to an approximately linear array of intensity maxima of the type observed, corresponding to the first maxima in the functions *J*₁, *J*₂, *J*₃, etc.

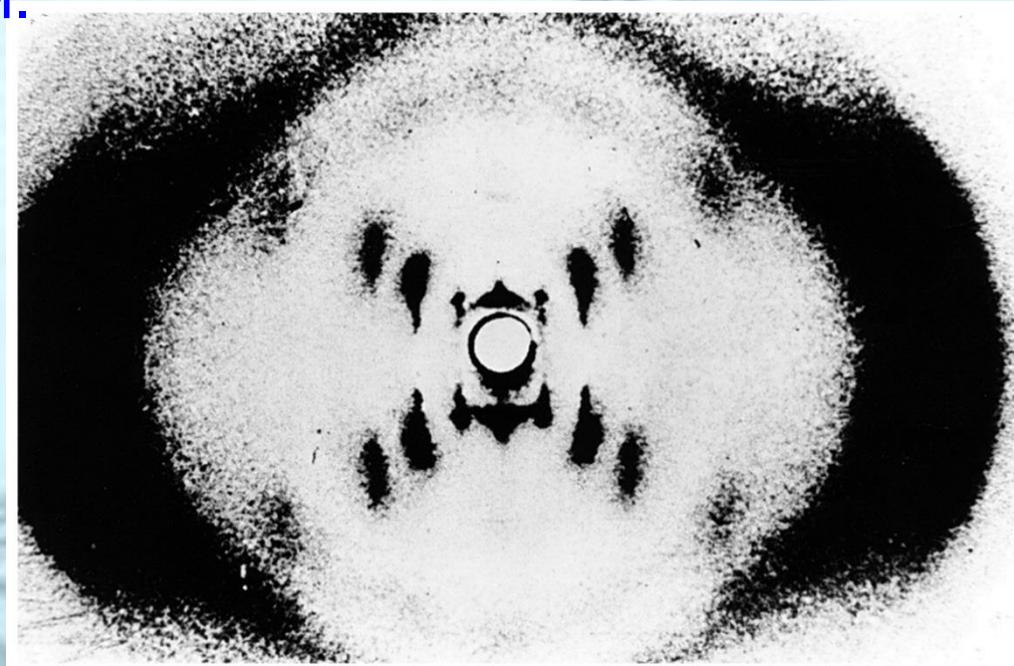
If, instead of a smooth helix, we consider a series of residues equally spaced along the helix, the transform in the case treated by Crick, Cochran and Vand is more complicated. But if there is a whole number, *m*, of residues per turn, the form of the transform is as for a smooth helix with the addition, only, of the same pattern repeated with its origin at heights *mc*, *2mc*, . . . etc. (*c* is the fibre-axis period).

In the present case the fibre-axis period is 34 Å. and the very strong reflexion at 3.4 Å. lies on the tenth layer line. Moreover, lines of maxima radiating from the 3.4-Å. reflexion as from the origin are visible on the fifth and lower layer lines, having a *J*₁ maximum coincident with that of the origin series on the fifth layer line. (The strong outer streaks which apparently radiate from the 3.4-Å. maximum are not, however, so easily explained.) This suggests strongly that there are exactly 10 residues per turn of the helix. If this is so, then from a measurement of *R*₁ the position of the first maximum on the *n*th layer line (for *n* ≤ 5), the radius of the helix, can be obtained. In the present instance, measurements of *R*₁, *R*₂, *R*₃ and *R*₄ all lead to values of *r* of about 10 Å.

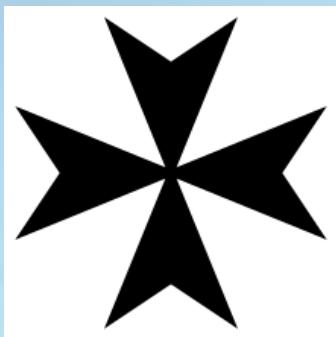
Franklin and Gosling

Дифракция рентгеновских лучей образца ДНК

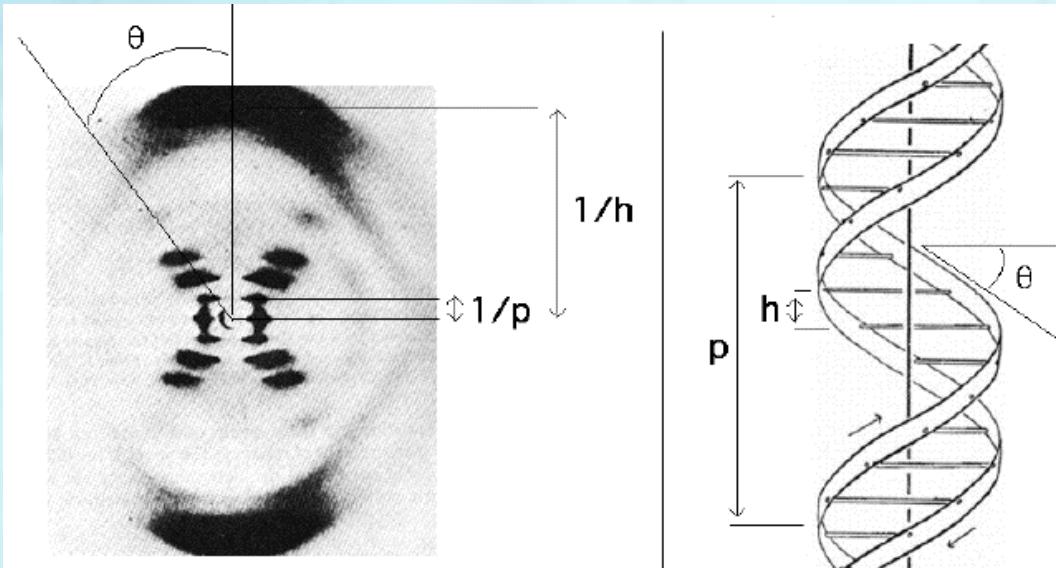
Пятна, образующие крест в центре, свидетельствуют о спиральной структуре. Тяжелые пятна сверху и снизу (на рисунке справа и слева) соответствуют повторяющимся основаниям.



«Мальтийский крест» на рентгенограмме



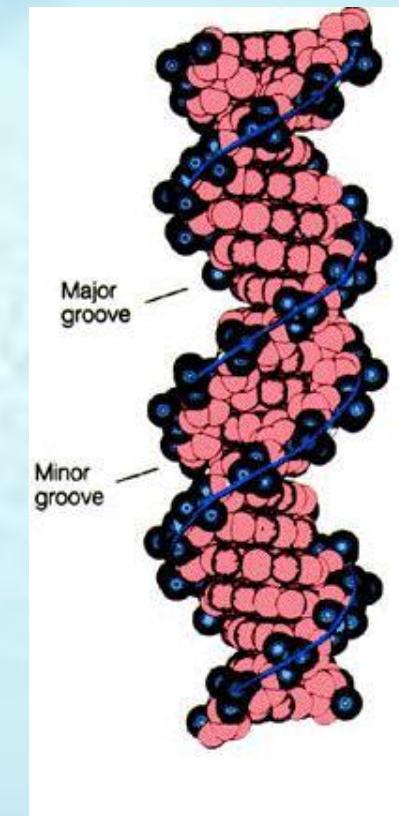
Анализ пятен, полученных при рассеянии рентгеновских лучей на ДНК, позволил определить основные параметры двойной спирали.



θ - tilt of helix (angle from perpendicular to long axis)

$h = 3.4 \text{ \AA}$ (Distance between bases)

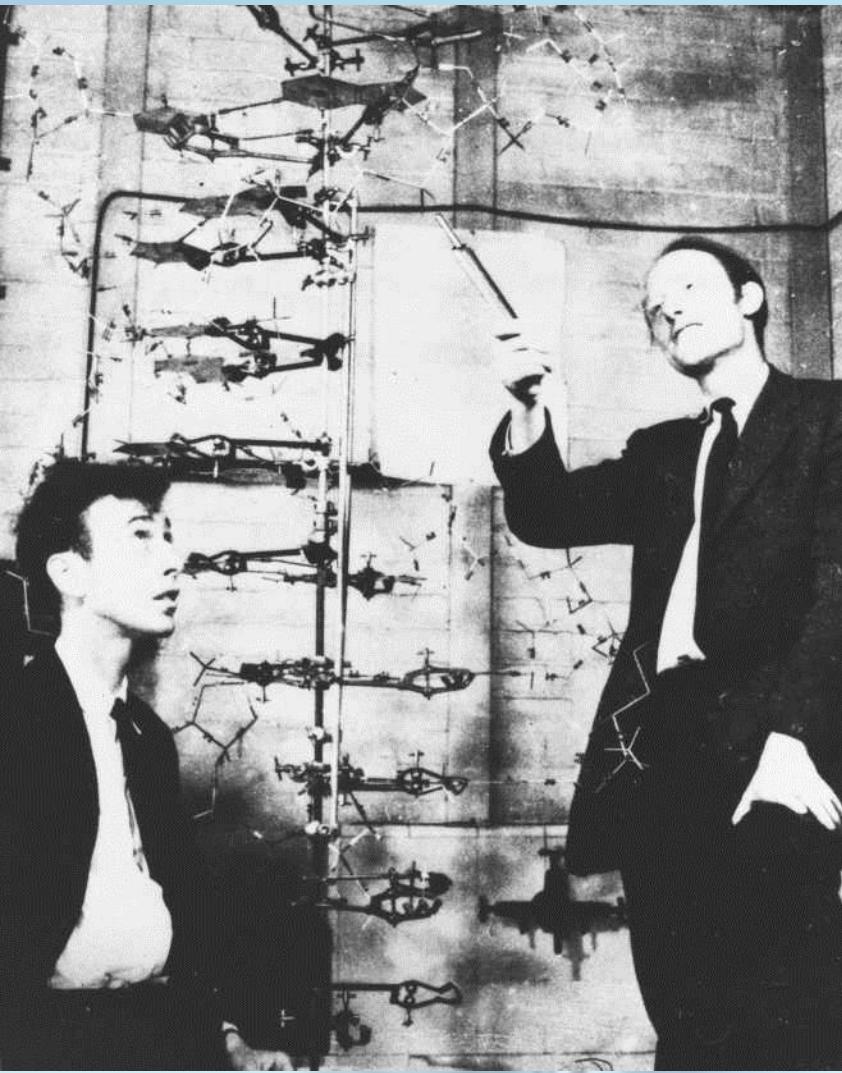
$p = 34 \text{ \AA}$ (Distance for one complete turn of helix;
Repeat unit of the helix)



«Гонка за лидером» по определению структуры ДНК

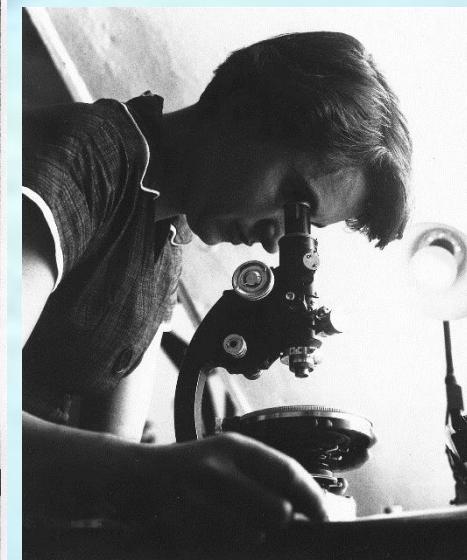
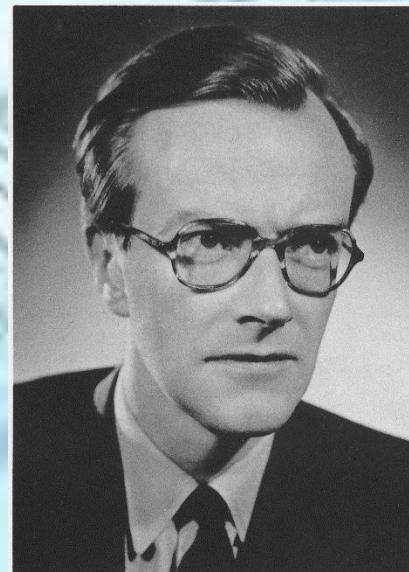
Проблема состояла в том, чтобы построить трехмерную модель молекулы ДНК, которая соответствовала данным, полученным из дифракции рентгеновских лучей, а также

- двусpirальная структура должна удовлетворять правилам Чаргаффа ($A=T$, $C=G$);
- соответствовать известным химическим свойствам ДНК

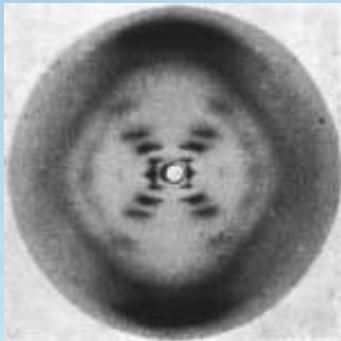


April 25th 2003

50th Anniversary of publications in
Nature on the structure of the DNA
double helix
Watson and Crick
Franklin and Gosling
Wilkins, Stokes and Wilson

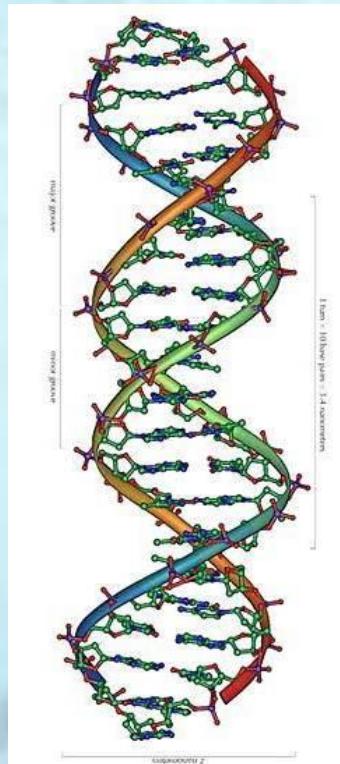


Открытие двойной спирали ДНК



Начало 50-х гг. Морис Уилкинс и Розалинд Франклин провели рентгеноструктурный анализ молекул ДНК и показали, что они представляют собой двойную спираль, напоминающую винтовую лестницу

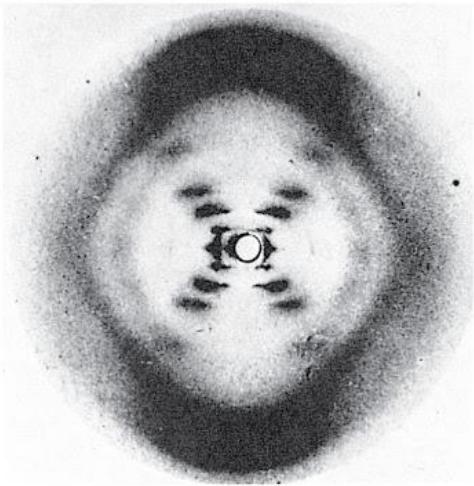
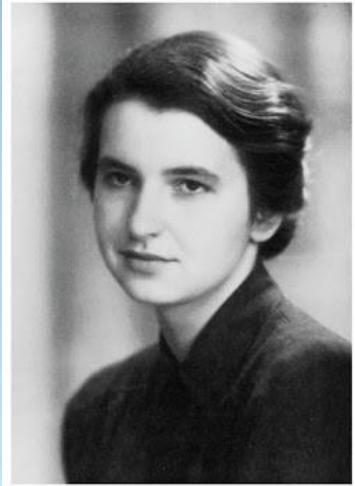
1953 год



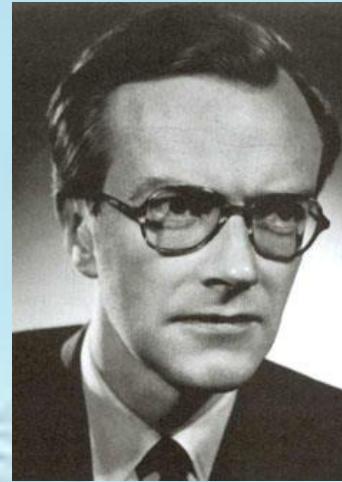
Джеймс Уотсон и Френсис Крик предложили трехмерную модель молекулы ДНК – **двойную спираль**

С помощью этой модели можно было проследить репликацию самой молекулы ДНК: две части молекулы ДНК отделяются друг от друга в местах водородных связей, из каждой половины прежней молекулы синтезируется новая молекула ДНК. Последовательность оснований функционирует как матрица, или образец, для образования новых молекул ДНК.





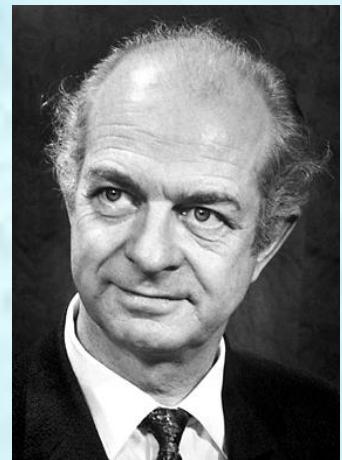
Розалинд Франклин (Кингс-колледж, Лондон)
и полученная ею рентгенограмма ДНК



Морис Уилкинс
(Кингс-колледж, Лондон)



Фрэнсис Крик Джеймс Уотсон
(Кавендишская лаборатория, Кембридж)



Лайнус Полинг первым
выдвинул гипотезу, но ошибся
(тройная спираль с основаниями,
смотрящими наружу)

В 1953 году Уотсон и Крик установили, что

Она состоит из двух цепей ДНК, закрученных вокруг одной оси, образуя правозакрученную двойную спираль. Две цепи ДНК находятся в двойной спирали в противоположных направлениях.

Пространственная структура, образованная двумя цепями такова, что между ними образуется малая и большая бороздки.

Предложенная модель ДНК подтверждает правила Чаргаффа

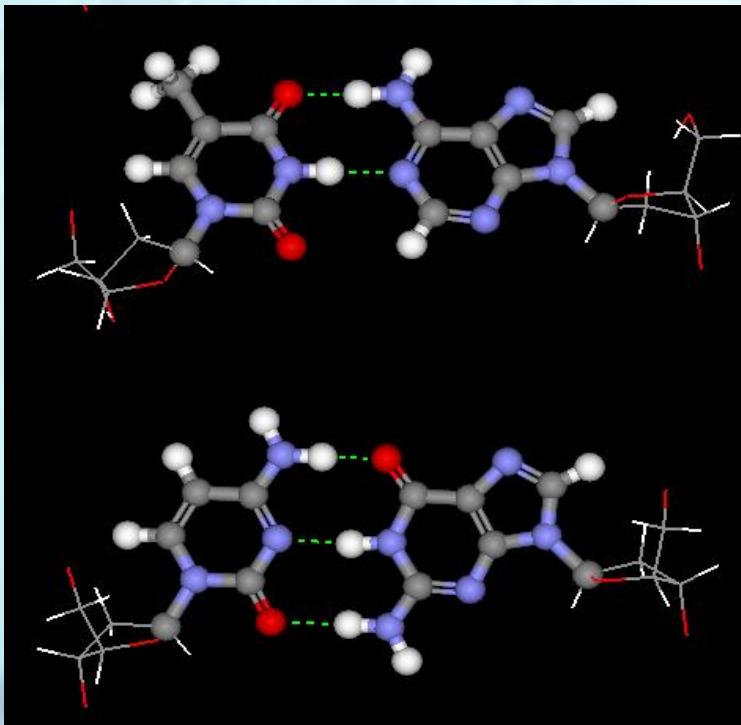
Модель структуры ДНК Уотсона и Крика

Уотсон и Крик постулировали, что ДНК – это двойная спираль, где

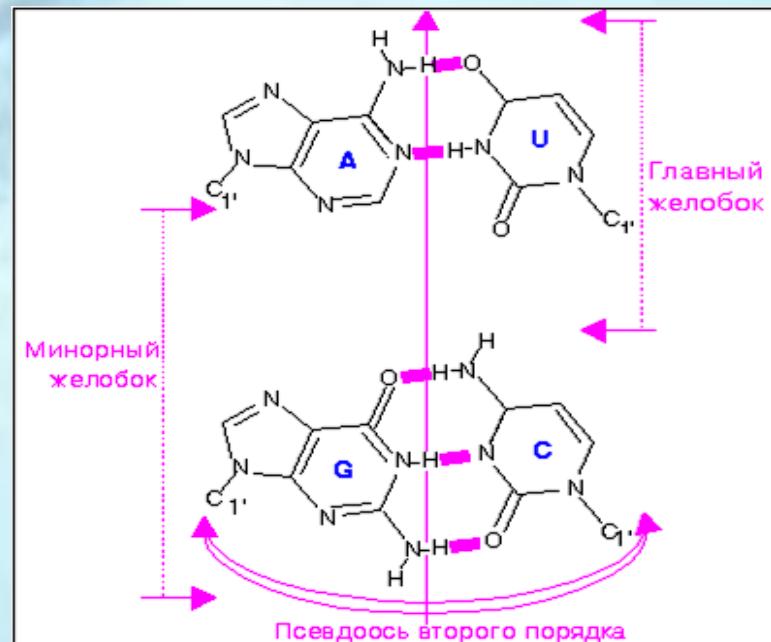
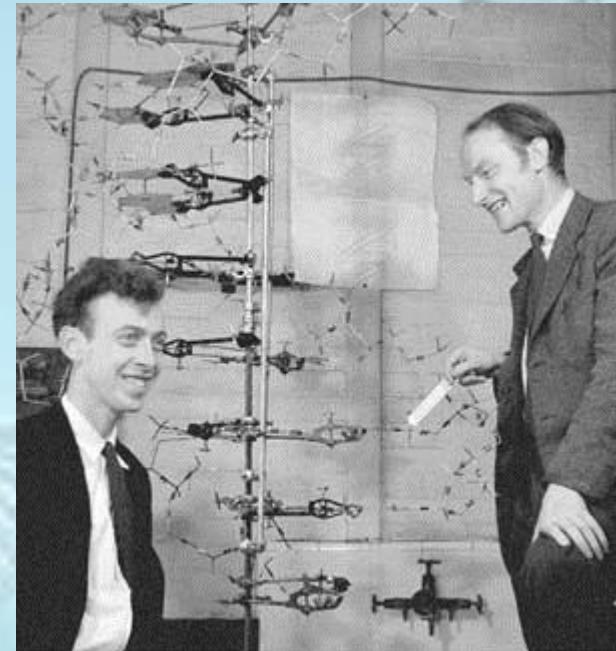
- две цепи закручены вокруг одной оси, образуя правозакрученную двойную спираль;
- гидрофильные углеводо-фосфатные фрагменты нуклеозидов расположены на внешней стороне молекулы ДНК и экспонированы в воду;
- гидрофобные основания (комплементарные пары оснований) находятся в стэкингे внутри молекулы. Водородные связи между парами оснований удерживают цепи ДНК в двойной спирали;
- цепи антипараллельны

Комплементарные пары оснований водородные связи по типу Уотсон-Крик

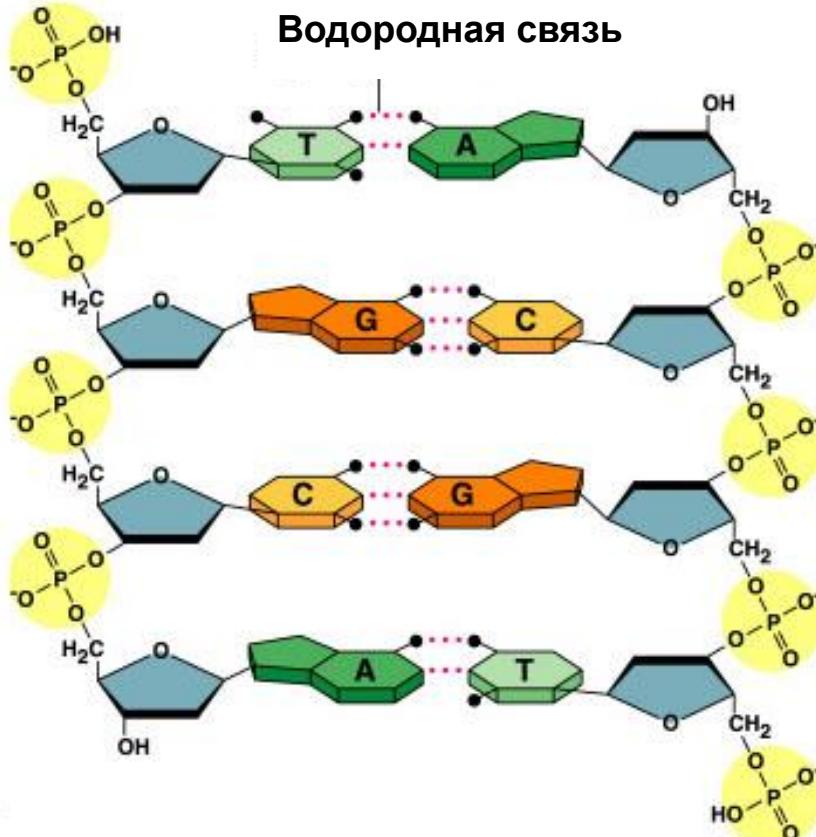
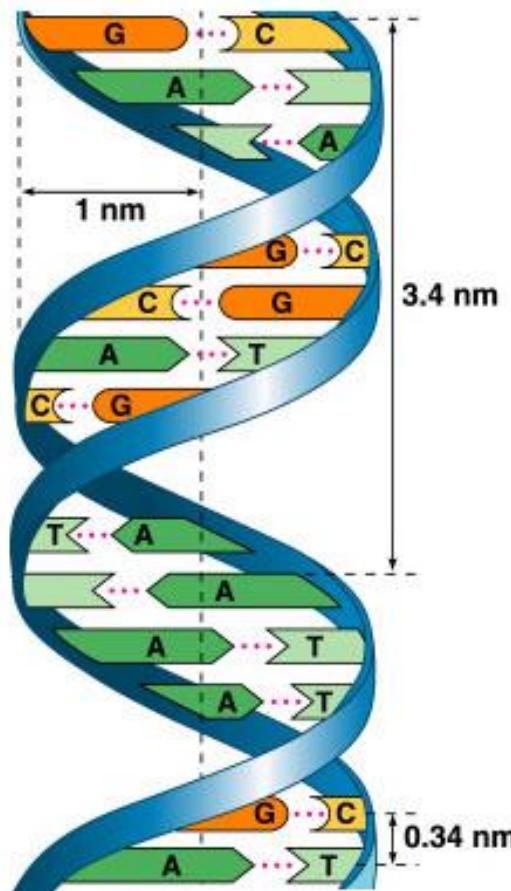
- Образование водородных связей между пурином и пиримидином
- Основной тип связей при образовании двойной спирали (дуплекса)



$$T = A$$
$$C \equiv G$$

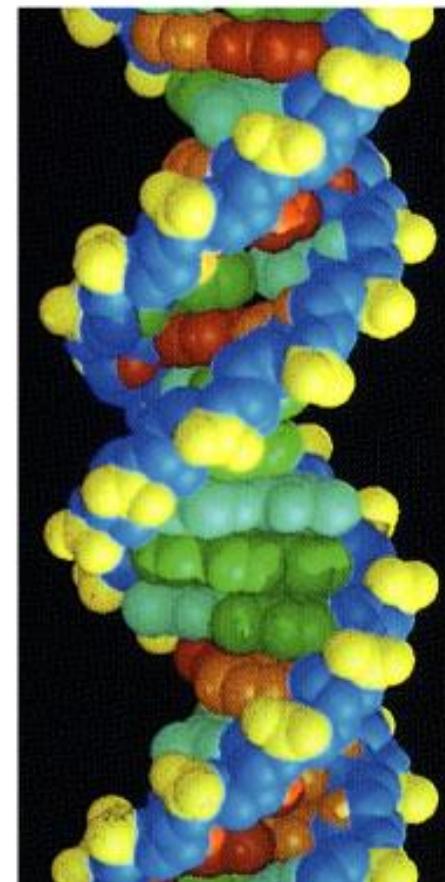


Комплементарность азотистых оснований в ДНК



(a) Key features of DNA structure

Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



(b) Partial chemical structure

(c) Space-filling model

Основные выводы:

- Две цепи ДНК в двойной спирали антипаралельны
- Две цепи ДНК не ИДЕНТИЧНЫ, а КОМПЛЕМЕНТАРНЫ

Нобелевская премия по физиологии и медицине 1962

Фрэнсис Крик, Джеймс Уотсон, Морис Уилкинс



Фрэнсис Гарри
Комптон Крик



Джеймс Дьюи
Уотсон



Морис Уилкинс
Хью Фредерик

*"за открытия, касающиеся молекулярной структуры
нуклеиновых кислот и их значение для передачи
информации в живой материи".*



DNA : 50 years of the Double Helix



Herbert Wilson



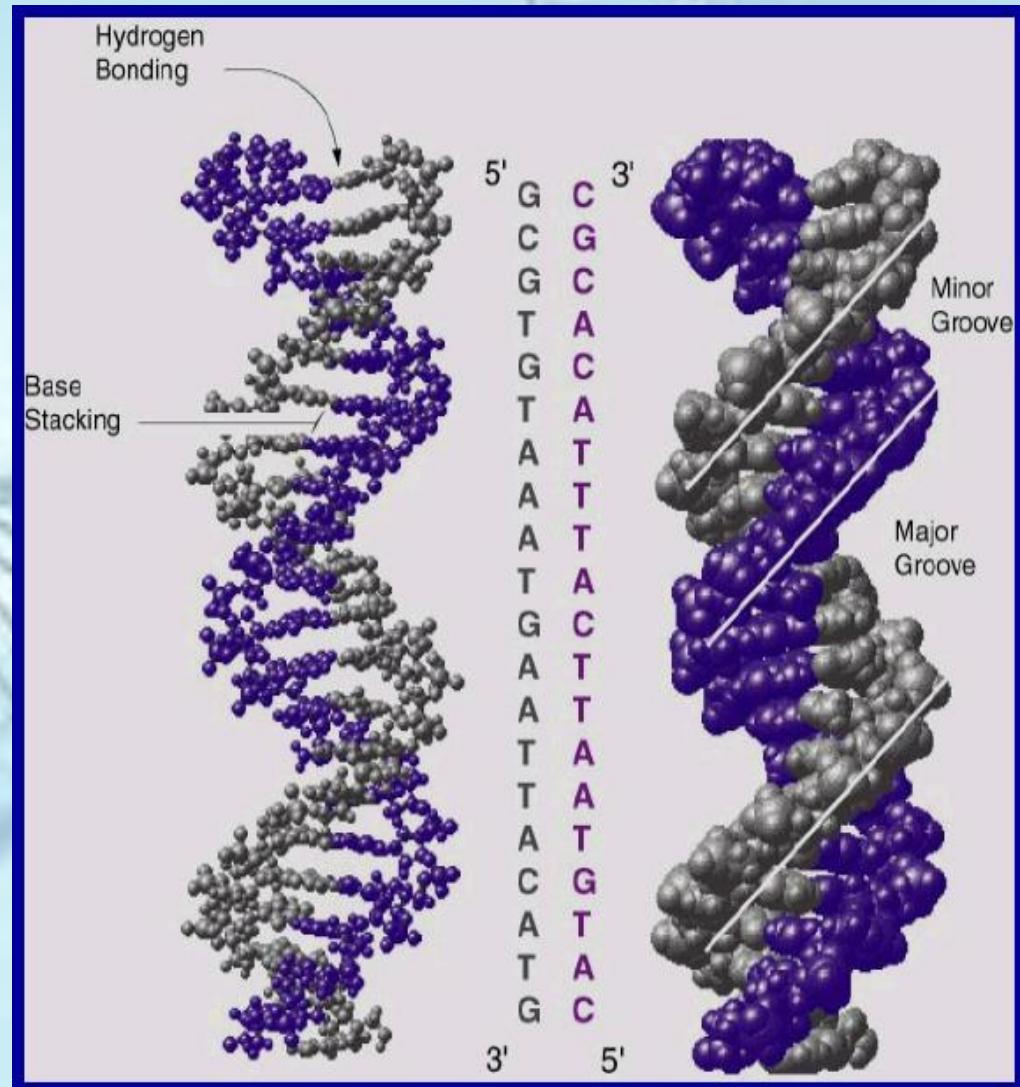
James Watson



Jennifer Glynn (as
Rosalind Franklin)

Нуклеиновые кислоты – это биополимеры, состоящие из остатков фосфорной кислоты, сахаров и азотистых оснований (пуринов и пиримидинов).

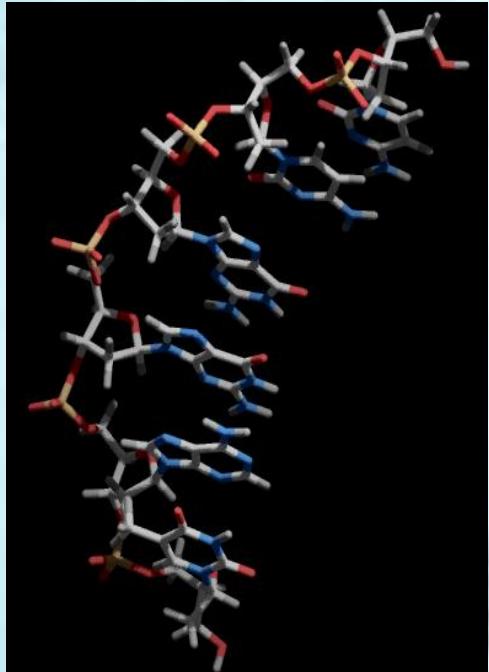
Существует два типа нуклеиновых кислот:
дезоксирибонуклеиновая (**ДНК**)
и рибонуклеиновая (**РНК**).
ДНК присутствует в ядрах всех растительных и животных клеток, где она находится в комплексе с белками и является составной частью хромосом.
ДНК также содержится в митохондриях.
Некоторое количество РНК присутствует в клеточном ядре, основная же ее масса находится в цитоплазме



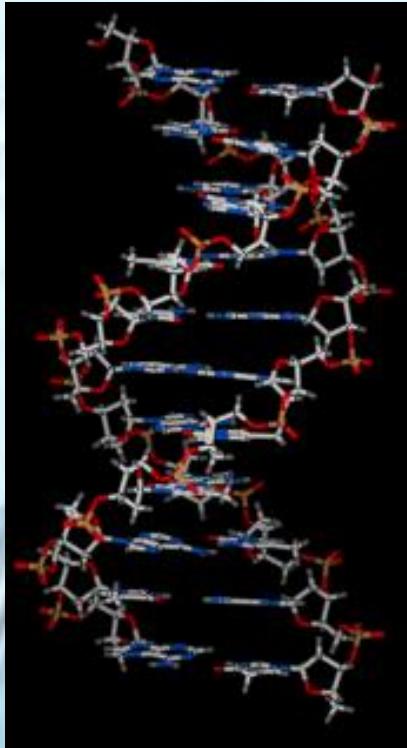
Как устроена ДНК и РНК?

Структурная организация НК имеет несколько уровней:
первичная, вторичная, третичная структура

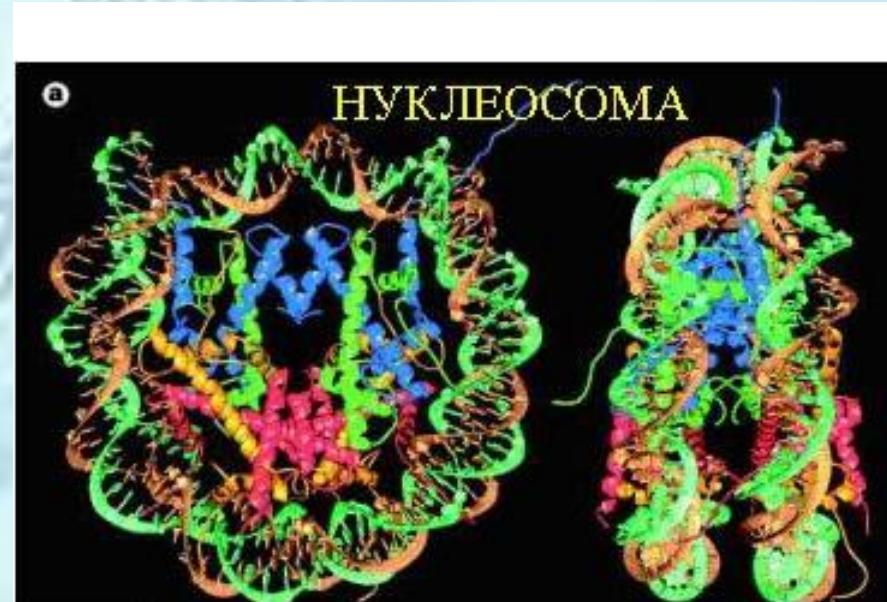
первичная



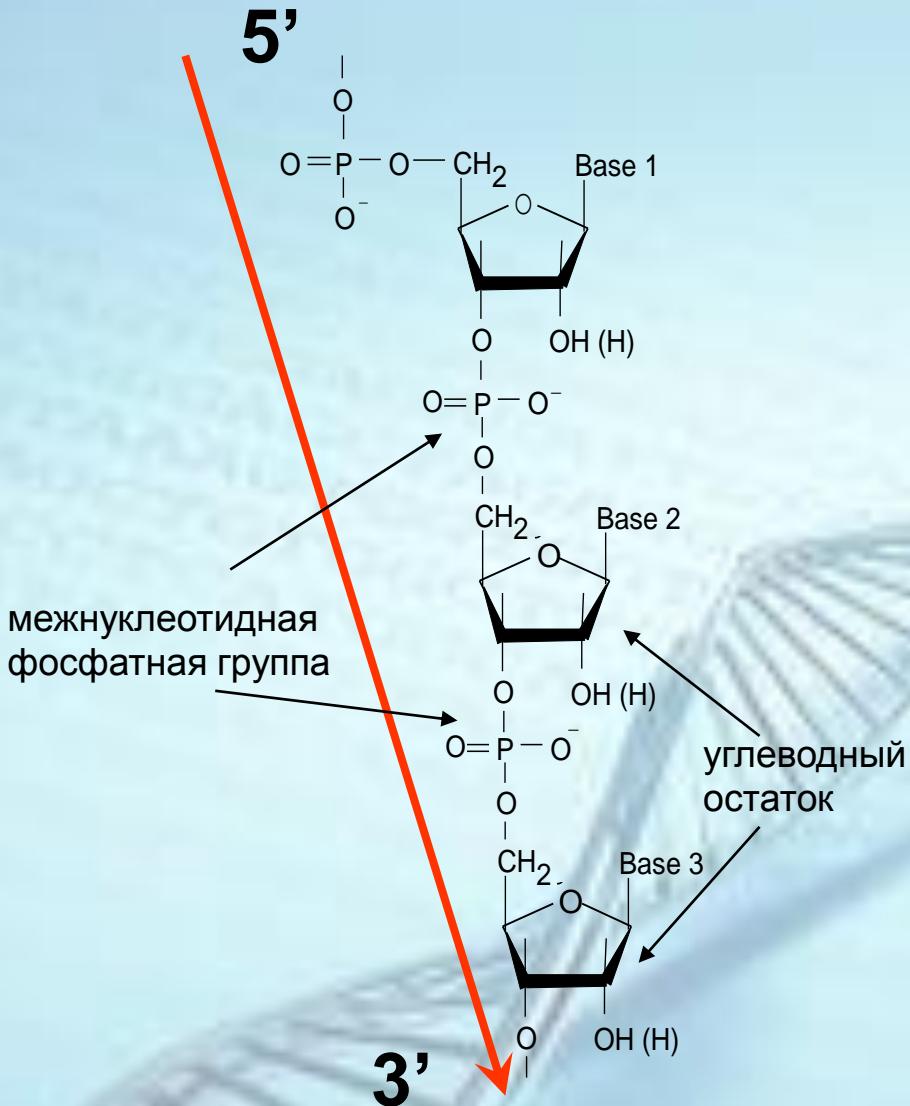
вторичная



третичная

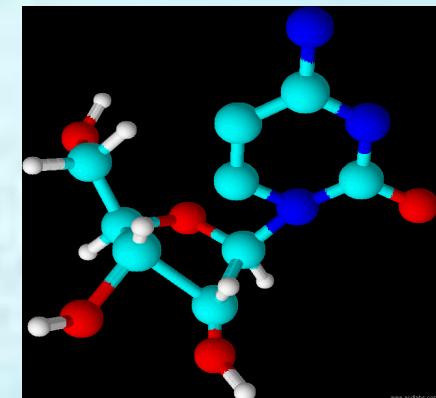


Принципы структурной организации НК



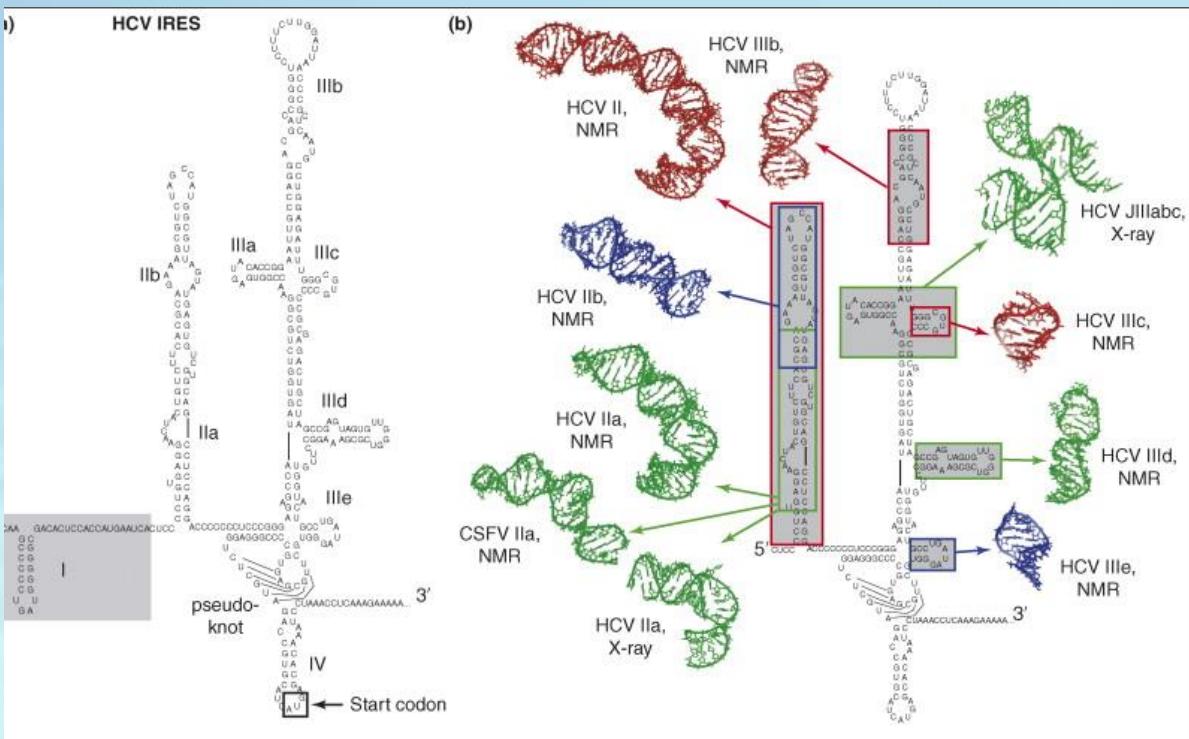
Первичная структура НК

определяется последовательностью нуклеотидных звеньев, связанных между собой ковалентными связями, и типом связи между ними

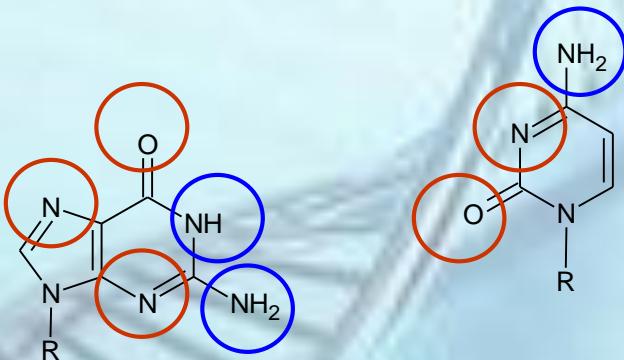


Тип НК, ДНК или РНК, определяется типом углеводного остатка

Принципы структурной организации НК



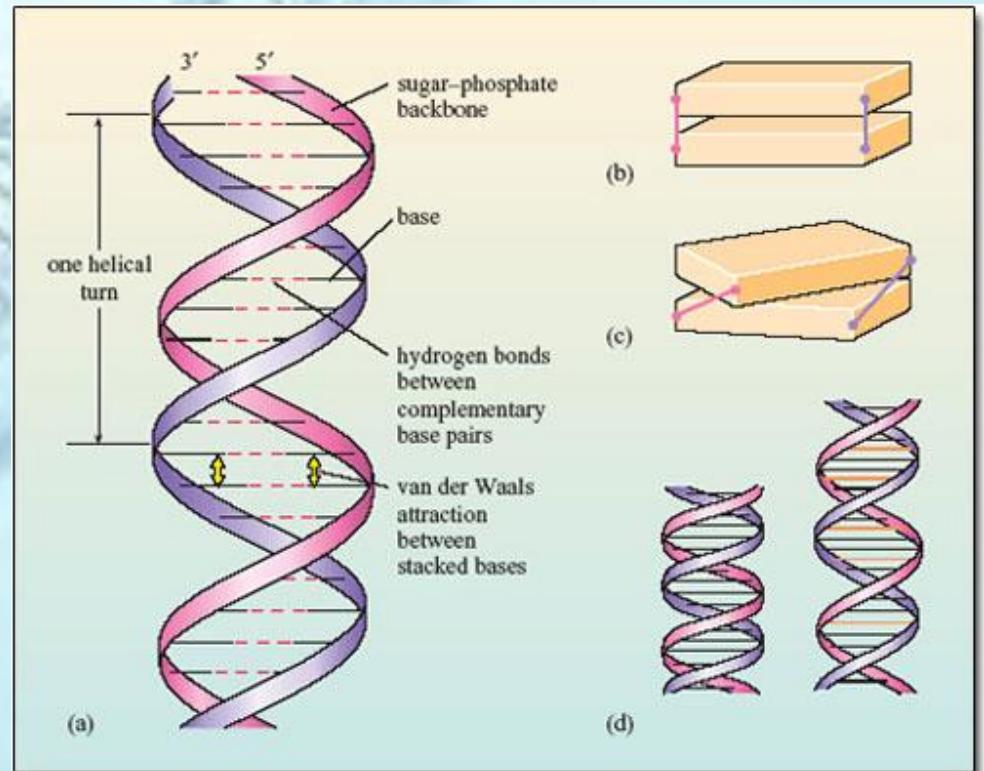
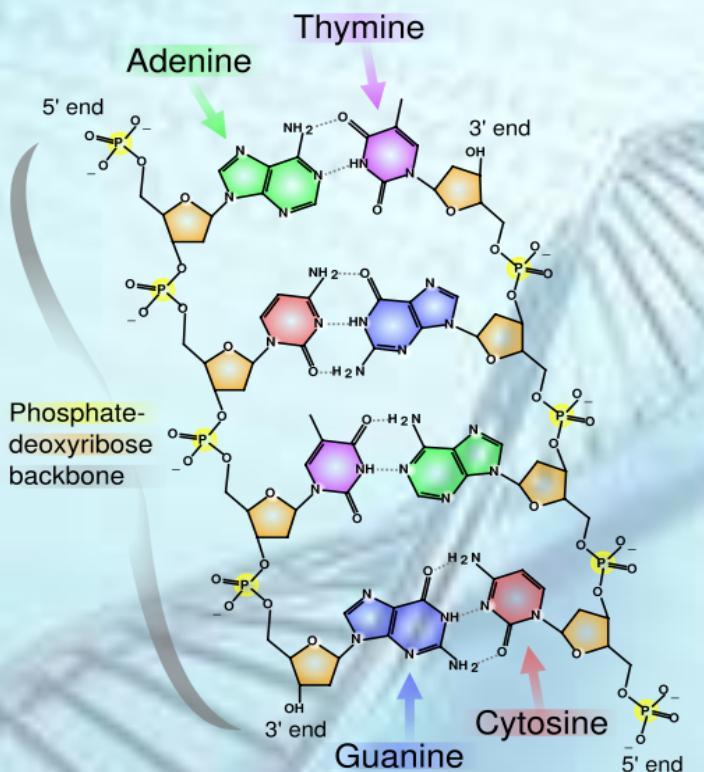
Макромолекулярная (вторичная, третичная) структура НК представляет собой пространственную организацию полинуклеотидных цепей и в основном определяется взаимодействием между основаниями различных нуклеотидов



Многообразие структур, образуемых НК, обусловлено возможностью формирования различных типов водородных связей между гетероциклическими основаниями

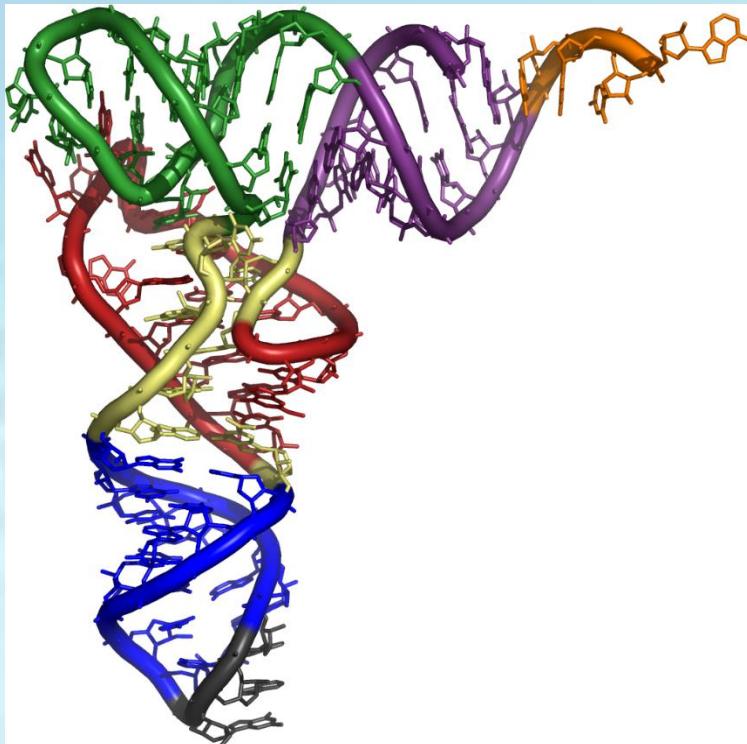
Принципы структурной организации НК

- Двойная спираль нуклеиновой кислоты стабилизируется за счет
- **водородных связей** — 2–3 ккал/моль (что примерно вдвое меньше, чем у обычных водородных связей — например, между молекулами воды),
- **стэкинга, или межплоскостных взаимодействий** (гидрофобных контактов и сил ван-дер-Ваальса между плоскими кольцами азотистых оснований) — 4–15 ккал/моль на динуклеотид.

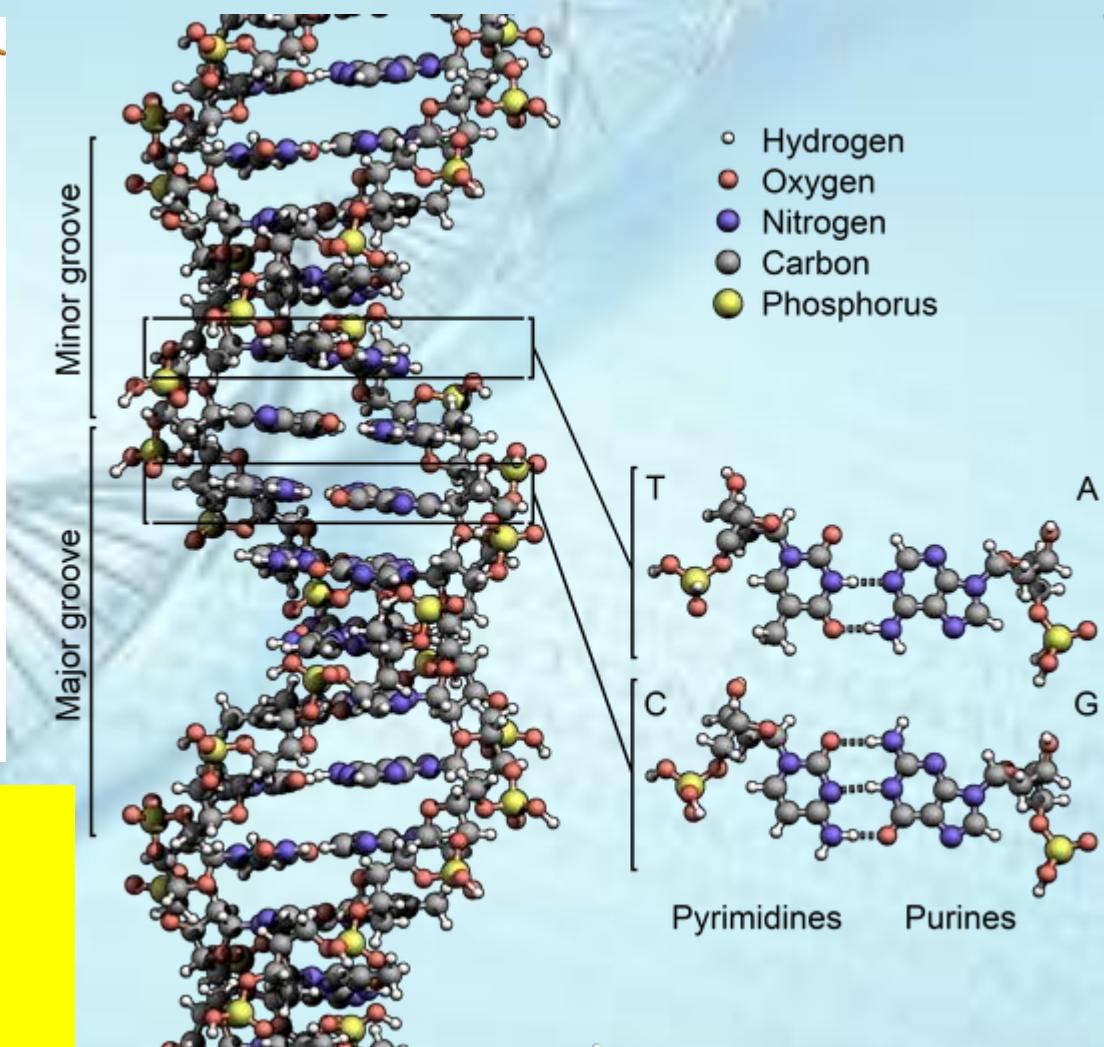


Что в результате?

При относительной схожести первичной структуры, ДНК и РНК имеют различную вторичную структуру и выполняют разные функции.



Структура транспортной РНК.
тРНК — РНК, функцией которой является транспортировка аминокислот к месту синтеза белка



ДНК – подвижная молекула. Важно понять, как она изгибается.

Почему это важно? Одна из причин, которая наиболее часто приводится:

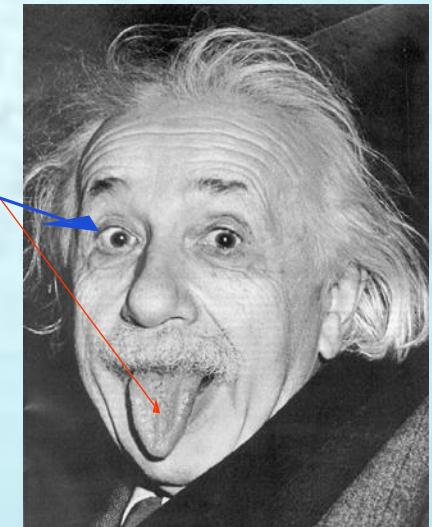


~0,36 метра

ДНК в клетке должна быть свернута

Одна из причин (не единственная), почему важно знать, какую структуру ДНК образует в клетке

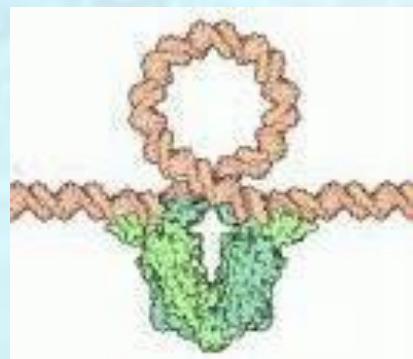
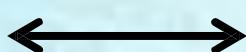
ДНК во всех клетках одинакова, тем не менее клетки – разные. Например, ДНК клеток глаза абсолютно такая же, как языка. Но упакованы они по-разному, делая доступными различные участки для «прочтения» клеткой в процессе развития и функционирования. Проще говоря, способ укладки ДНК делает клетки одного и того же организма отличающимися друг от друга. Очевидно, что фолдинг (способ сворачивания) будет зависеть от подвижности ДНК.



Плотно упакованная ДНК – это реально существующее явление

$\sim 100 \text{ \AA}$

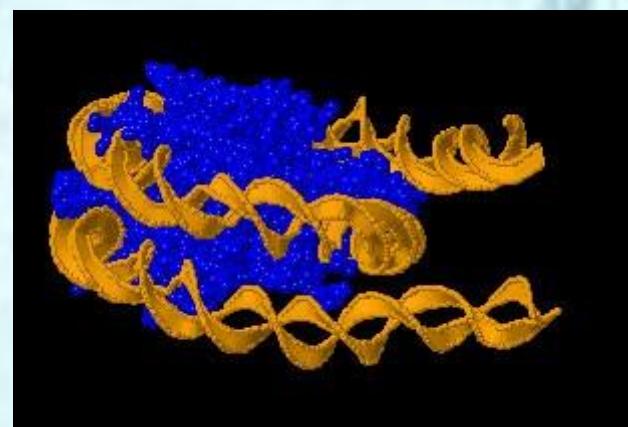
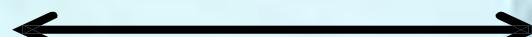
$\sim 30 \text{ bp}$



ДНК, свернутая
транскрипционным
фактором

$\sim 80 \text{ \AA}$

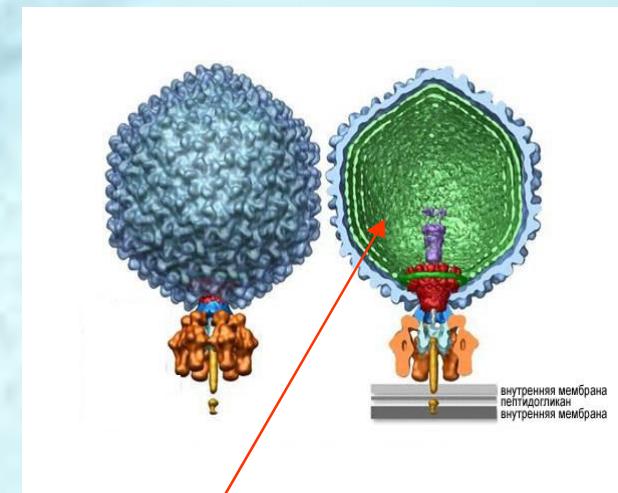
$\sim 25 \text{ bp}$



ДНК, упакованная
в нуклеосоме

$\sim 500 \text{ \AA}$

$\sim 145 \text{ bp}$



ДНК, упакованная
внутри вируса

- **Двухцепочечная нуклеиновая кислота (НК)** состоит из двух комплементарных **антипаралльных** цепей.
- Цепи НК держатся вместе за счет **водородных связей** между комплементарными азотистыми основаниями (одно пуриновое, другое пиrimидиновое):
пара АТ — 2 водородных связи,
пара GC — 3 водородных связи.
- Нуклеотиды в ДНК связаны друг с другом концами (5'-конец к 3'-концу).
- Состав **нуклеотида**:
азотистое основание — пуриновое (аденин или гуанин) или пиrimидиновое (цитозин или тимин),
рибоза и 2-дезоксирибоза,
фосфатная группа.

Американские исследователи А. Даунс и Дж. Гамов предположили, что структура белков каким-то образом закодирована в нуклеиновых кислотах, а к 1965 году эта гипотеза была подтверждена многими исследователям:

Ф. Криком в Великобритании, М. Ниренбергом и С. Оча в США, Х. Кораной в Индии.

Все эти открытия, результат столетнего изучения нуклеиновых кислот, произвели подлинную революцию в биологии. Они позволили объяснить феномен жизни в рамках взаимодействия между атомами и молекулами.



Спасибо за внимание!