4. Нуклеиновые кислоты

Нуклеиновые кислоты являются модулярными линейными цепями длиной *до сотен миллионов* нуклеотидов. Наиболее широко распространены две формы нуклеиновых кислот: рибонуклеиновые кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК). ДНК отличается отсутствием одной гидроксильной группы в каждом нуклеотиде, что делает её немного более стабильной при физиологических условиях. Нити нуклеиновых кислот гораздо более гибкие по сравнению с белковыми цепями, поэтому для нуклеиновых кислот достижим гораздо более широкий диапазон конформаций.

Структура нуклеиновой кислоты определяется взаимодействиями оснований каждого нуклеотида. Поскольку нуклеиновые основания имеют *ароматическую* структуру, то они располагаются *стопкой* одно над другим в водном растворе.

Такой процесс *формирования стопок* из плоских циклических органических молекул называется *стэкинг*.

Кроме того, нуклеиновые основания способны *спариваться* друг с другом, образуя *водородные* связи.

Такая комбинация *двух* типов взаимодействий: *нормальных* взаимодействий, формирующих стопки оснований (стэкинг) и перпендикулярных им *латеральных* взаимодействий между нуклеиновыми основаниями посредством водородных связей формируют известную структуру двойных спиралей ДНК и определённых участков РНК (рисунок 71).

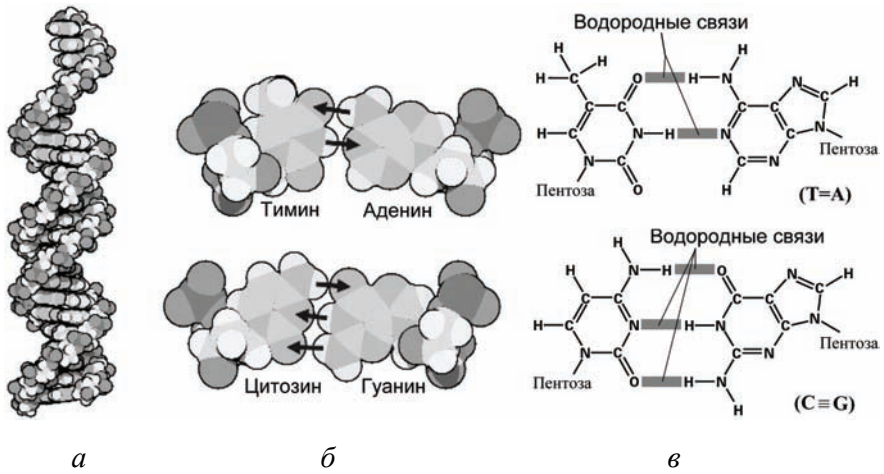


Рисунок 71 – Структура ДНК: *а* – двойная спираль ДНК; *б* – уотсон-криковские пары оснований; *в* – схема связей в парах азотистых оснований

4.1. Строение нуклеотидов

В нуклеиновых кислотах встречаются, в основном, пять *нуклеиновых* (*азотистых*) *оснований* (рисунок 72):

- три пиримидиновых – *урацил*, *тимин* и *цитозин*,
- два пуриновых – *аденин* и *гуанин*.

Нуклеозиды представляют собой гликозиды, в которых либо D-рибофураноза (в рибонуклеозидах), либо дезокси-D-рибофураноза (в дезоксирибонуклеозидах) связана гликозидной связью *с атомом* N1 пиримидиновых или *атомом* N9 пуриновых оснований (рисунок 73).

Рибонуклеозиды входят в состав *рибонуклеиновых кислот* (РНК), а дезоксирибонуклеозиды – в состав *дезоксирибонуклеиновых кислот* (ДНК).

Азотистым основаниям *урацил*, *тимин*, *цитозин*, *аденин* и *гуанин* соответствуют нуклеозиды *уридин*, *тимидин*, *цитидин*, *аденозин* и *гуанозин*.

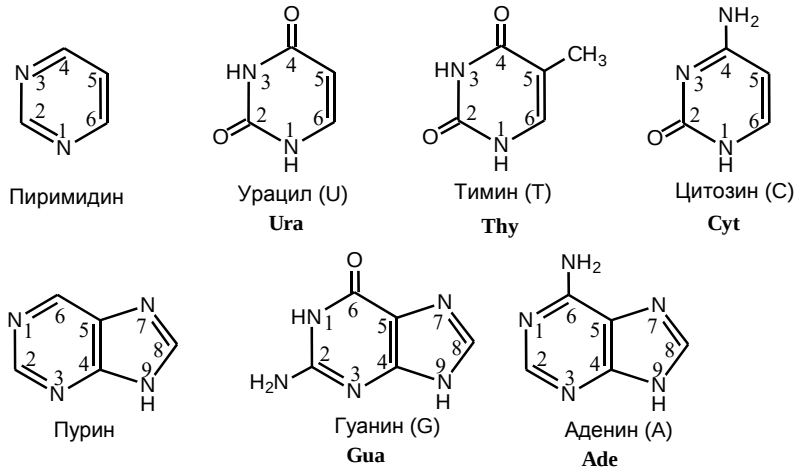


Рисунок 72 – Строение нуклеиновых оснований

Нуклеотиды являются фосфорными эфирами нуклеозидов. Фосфорная кислота присоединена к одному из гидроксилов рибозного (или дезоксирибозного) остатка.

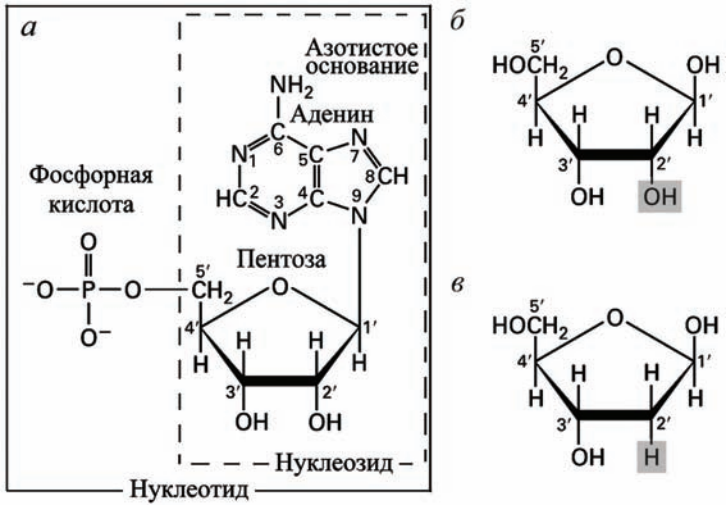


Рисунок 73 – Строение нуклеотидов: *а* – аденозин-5'-монофосфат (AMP); *б* – рибоза; *в* – дезоксирибоза

В зависимости от места присоединения различают 2'-, 3'- и 5'-нуклеотиды. Символ «'» (произносится как "штрих" или "прим") показывает, что соответствующий номер нумерует атомы пентозного кольца; атомы азотистого основания нумеруются без штрихов.

Мононуклеотиды представляют собой эфиры ортофосфорной кислоты и, следовательно, содержат один атом фосфора на молекулу.

Нуклеотид = нуклеозид + фосфорная кислота =
= азотистое основание + пентоза + фосфорная кислота,

где пентоза в РНК – рибоза, а в ДНК – дезоксирибоза.

В природе широко распространены *моно-* и *диэфиры* пирофосфорной (дифосфорной) и трифосфорной кислот (рисунок 74).

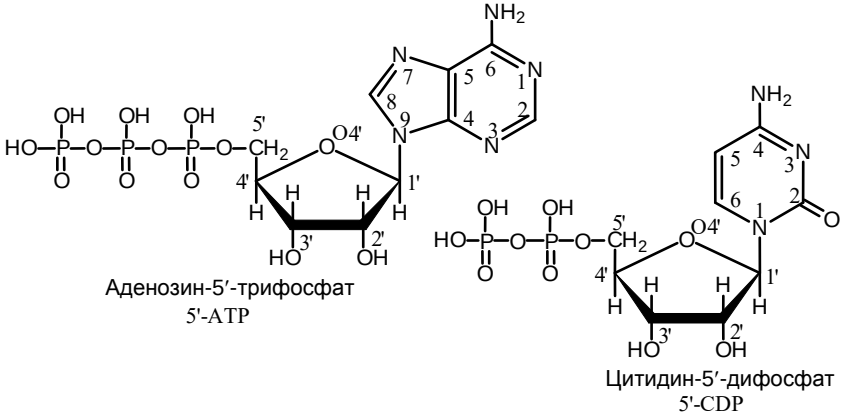


Рисунок 74 – Строение ди- и трифосфатов

Нуклеозиды обладают либо слабыми основными (цитидин, аденозин), либо слабыми кислотными (уридин, тимидин и гуанозин) свойствами.

Многочисленные физико-химические исследования позволили определить величины pK_a и места преимущественного отщепления или присоединения протона (рисунок 75).

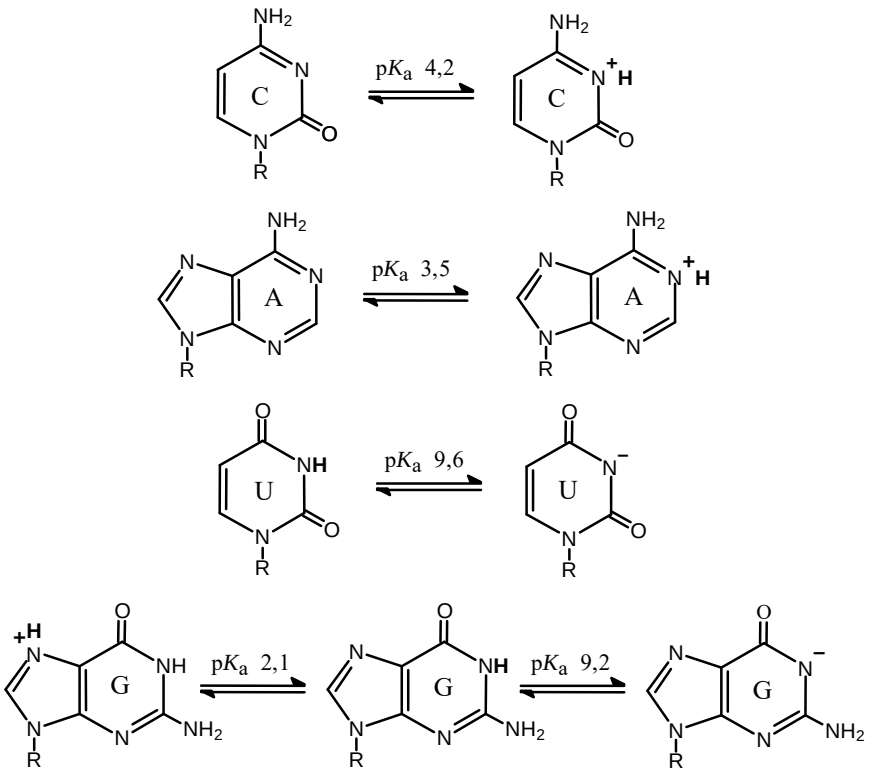


Рисунок 75 – Кислотно-основные равновесия в растворе нуклеозидов (R – пентоза)

Нуклеотиды (как моно-, так и диэфиры фосфорной кислоты) являются кислыми водорастворимыми соединениями. Фосфатный остаток мононуклеотидов имеет два протона, способных к диссоциации (рисунок 76).

Наличие фосфата приводит к увеличению значений pK_a нуклеиновых оснований (рисунок 75) на несколько десятых. Этот сдвиг обусловлен стабилизацией положительно заряженных форм нуклеиновых оснований в нуклеотидах GMP, AMP и CMP или дестабилизацией отрицательно заряженных форм UMP, TMP и GMP за счет взаимодействия с отрицательным зарядом фосфатной группы (MP означает монофосфат).

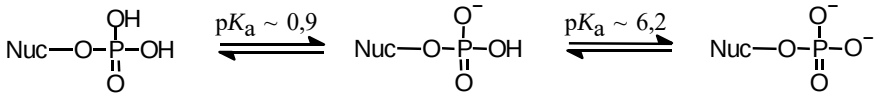


Рисунок 76 – Ионизация фосфатной группы нуклеотидов. Остаток нуклеозида обозначен Nuc

Значения pK_a 2'-дезоксирибонуклеотидов на несколько десятых больше, чем у соответствующих рибонуклеотидов.

4.2. Структура нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты являются нерегулярными полимерами, состоящими из мономеров – нуклеотидов.

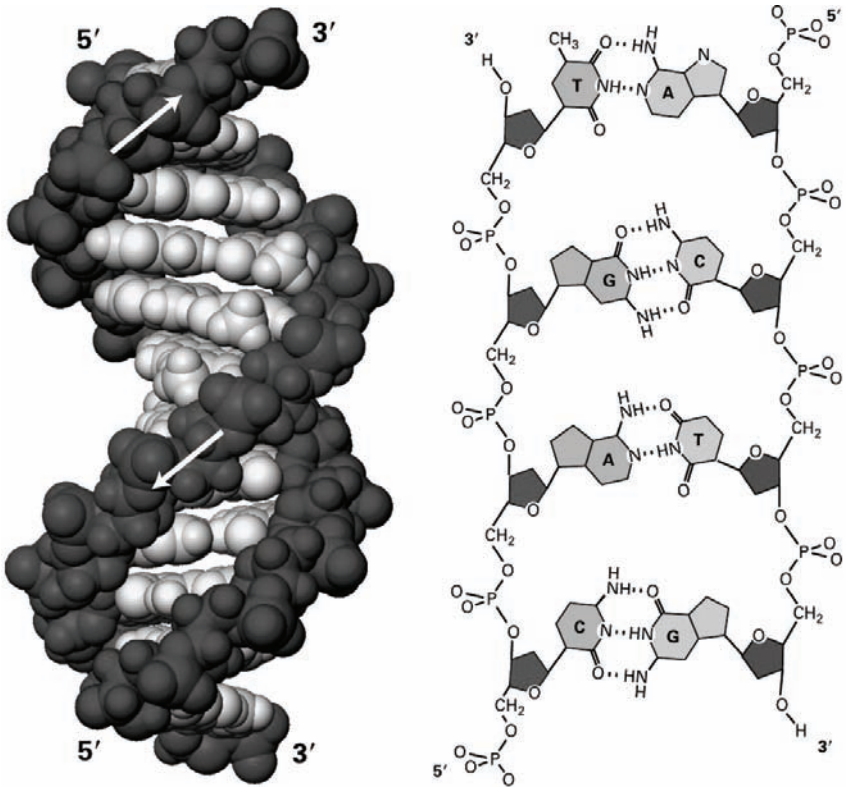
Нуклеотиды *соединяются друг с другом* в полимерную цепочку с помощью *фосфодиэфирных* связей (рисунок 77). Азотистые основания не принимают участия в соединении нуклеотидов одной цепи.

В природных полинуклеотидах, будь то дезоксирибополимеры или рибополимеры, остаток фосфорной кислоты всегда связывает 3'- и 5'-гидроксигруппы соседних нуклеозидов (3'→5'-связь). Таким образом, полинуклеотидные цепи имеют определённую направленность и каждая полинуклеотидная цепь имеет 5'- и 3'-концы. Ковалентный остов нуклеиновой кислоты состоит из монотонно чередующихся фосфатных и пентозных групп, и несет отрицательный заряд, поскольку фосфатные остатки ионизованы при физиологических значениях pH (~7).

Молекула ДНК, имеющая вид двойной спирали, состоит из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей: одна из них имеет направление 3'→5', другая 5'→3'. следовательно, если в одной из цепей имеется нуклеотидная последовательность 5'-TAGGCAT-3', то ей соответствует комплементарная последовательность 3'-ATCCGTA-5' во второй цепи. В этом случае двухцепочечная форма будет выглядеть следующим образом:

5'-TAGGCAT-3'
3'-ATCCGTA-5'.

В такой записи 5'-конец верхней цепи всегда располагают слева.



а *б*

Рисунок 77 – Схема строения ДНК: *а* – ван-дер-ваальсовая модель; *б* – схема химических связей в ДНК

Каждая из нитей двойной спирали состоит из пентоз и фосфатных групп, нуклеиновые основания ориентированы *внутрь* двойной спирали. В ДНК обычно используются *четыре* нуклеиновых основания: аденин, гуанин, цитозин и тимин. *Аденин* образует пару с *тимином*, формируя две водородные связи. *Гуанин* спаривается с *цитозином*, формируя три водородные связи. В РНК *тимин* заменён *урацилом*. Нуклеиновые основания имеют подобные химические свойства и различаются, главным образом, ориентацией акцепторов и доноров водородных связей по периметру оснований.

Кроме двух основных (стандартных) уотсон-криковских пар (рисунок 71) возможны и *другие типы* спаривания (рисунок 78), кроме того, в специальных случаях для расширения диапазона возможных типов спаривания нуклеотидов используются также и *модифицированные* азотистые основания. (На рисунках 78 и 79 рибоза обозначена R).

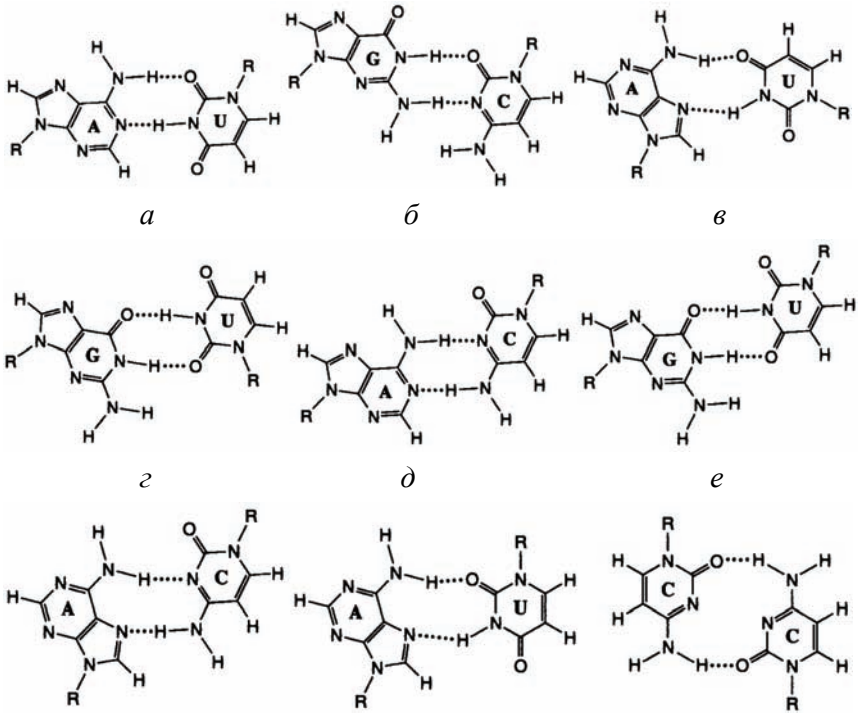


Рисунок 78 – Некоторые примеры нестандартного спаривания нуклеотидов: *а* и *б* – обратные уотсон-криковские пары; *в* – хугстеновская A=U пара; *г* – G=U wobble-пара; *д* – A=C обратная wobble-пара; *е* – обратная G=U wobble-пара; *ж* – обратная хугстеновская A=C пара; *з* – обратная хугстеновская A=U пара; *и* – C=C карбонил-аминная симметричная пара

Образование нестандартной пары может привести к мутациям.

Кроме пар оснований могут связываться три и даже четыре основания (рисунок 79). Такие конструкции возникают как в многонитевых ДНК, так и в ДНК-РНК гибридах, и при формировании третичной структуры РНК, например, в рибосомах.

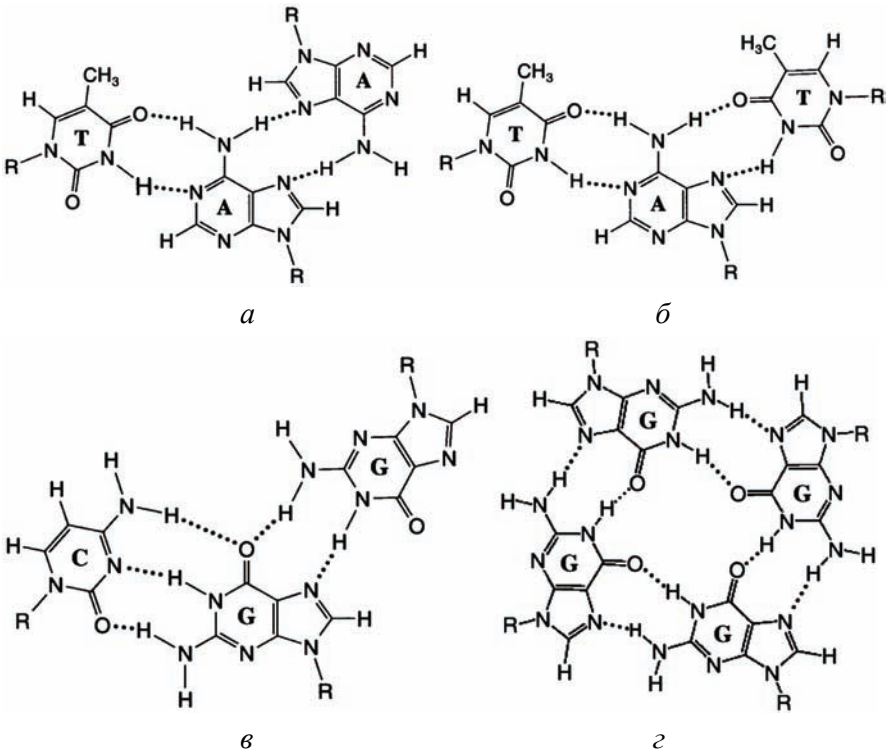


Рисунок 79 – Некоторые примеры мультимеров нуклеотидов: *а* – уотсон-крик–хугстеновский (T=A)=A тример; *б* – уотсон-крик–хугстеновский (T=A)=T тример; *в* – уотсон-крик–хугстеновский (C≡G)=G тример; *г* – G-тетрамер

Топология спаривания азотных оснований характеризуется набором углов, которые характеризуют взаимное расположение оснований, как в паре, так и взаимную ориентацию пар. Относительное расположение нуклеиновых оснований в паре определяется *углом раскрытия* (*opening angle*,

рисунок 80(а)), *углом пропеллера* (*propeller twist*, рисунок 80(б)) и *углом продольного изгиба* (*buckle angle*, рисунок 80(в)).

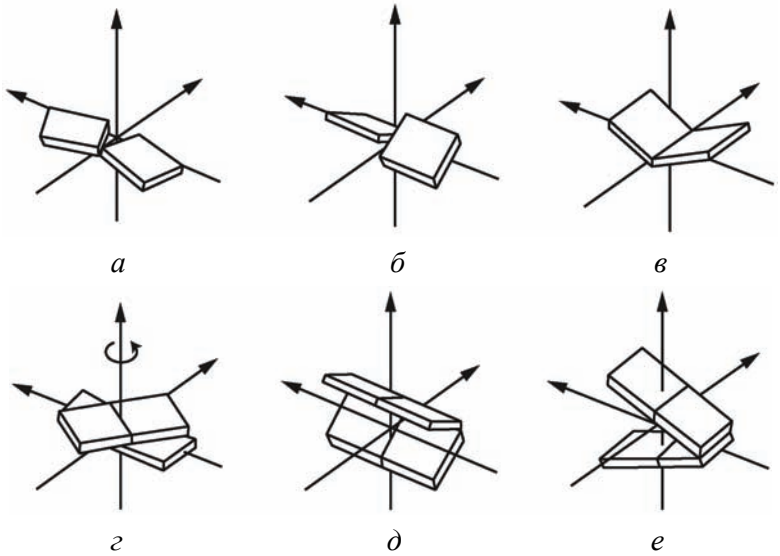
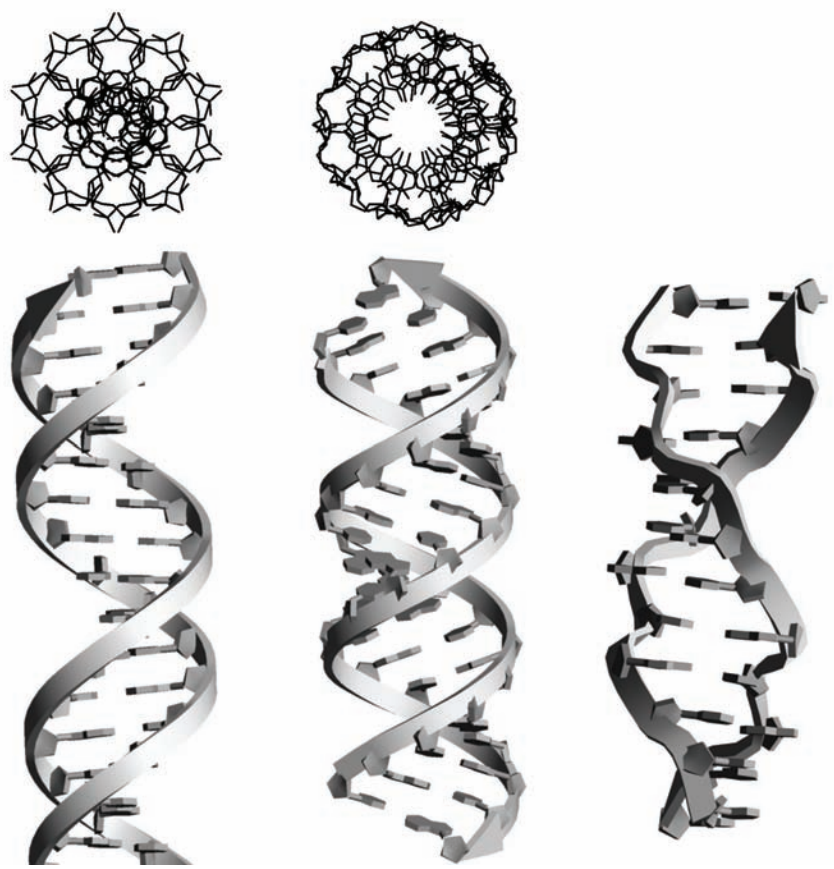


Рисунок 80 – Угловые параметры взаимной ориентации нуклеиновых оснований в ДНК

Взаимная ориентация соседних оснований на одной нити характеризуется *углом закручивания* (*twist angle*, рисунок 80(г)), *углом крена* (*roll angle*, рисунок 80(д)), и *углом наклона* (*tilt angle*, рисунок 80(е)).

Главная функция нуклеиновых кислот – хранение и обработка генетической информации. В то же время, *рибосома*, которая является наиболее сложной и важной молекулярной машиной в клетке, состоит преимущественно из РНК. Отсепарированные и высушенные рибонуклеиновые кислоты имеют фибриллярную форму и похожи на волокна хлопка.

Двойная спираль ДНК может существовать в различных *конформациях* – нескольких *правых* спиралей (например, A и B спирали) и только одна *левая* Z-спираль, сахарофосфатный остов которой имеет характерную *зигзагообразную* форму (рисунок 81).



а *б* *в*

Рисунок 81 – Формы двойной спирали ДНК: *а* – В-форма; *б* – А-форма; *в* – Z-форма

В-форма ДНК (основная), несмотря на достаточно высокую стабильность структуры, обеспечиваемую множественными водородными и гидрофобными взаимодействиями, обладает *значительной гибкостью*. Это свойство обеспечивает необходимую модификацию структуры ДНК при связывании белков со специфическими участками ДНК. В ДНК, в отличии от белковых α-спиралей, *нет водородных связей, параллельных ос-*

новной оси. Это свойство позволяет молекуле ДНК *изгибаться* при объединении с белками, управляющими эволюцией ДНК (рисунок 82).

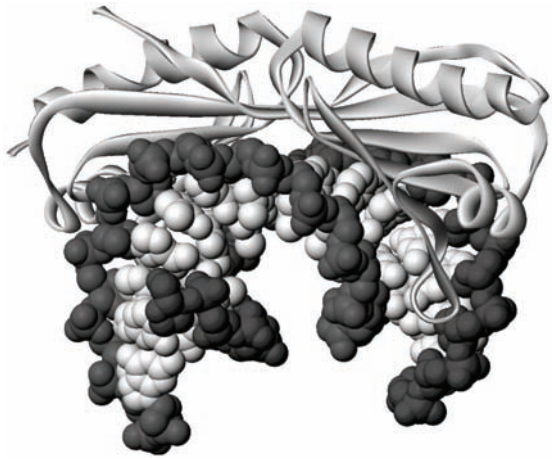


Рисунок 82 – Изгиб ДНК при связывании с С-доменом ТАТА-связывающего белка (ТАТА *box-binding protein* (TBP))

В таблице 5 приведены структурные и геометрические параметры А и В форм двойной спирали ДНК.

Таблица 5 – Структурные параметры молекулы ДНК

Форма ДНК	A	B
Число звеньев на виток спирали	11	10
Шаг спирали (нм)	2,82	3,46
Расстояние между парами азотистых оснований (нм)	0,255	0,346
Угол закручивания (*twist angle*) (град)	32,7	36
Угол между перпендикуляром к оси спирали и плоскостью оснований, φ (град)	20	2

Конформация полинуклеотидной цепи определяется набором углов поворота вдоль межатомных связей, показанных на рисунке 83.

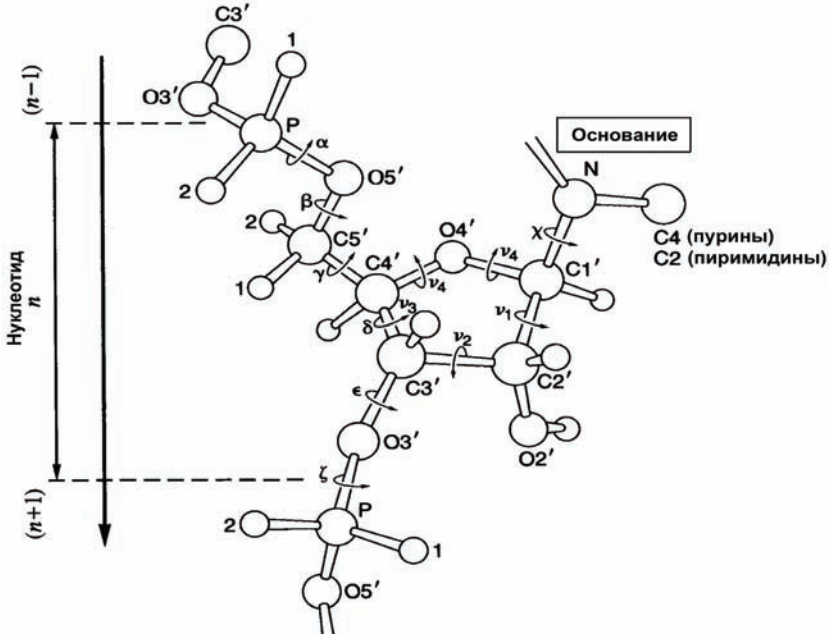


Рисунок 83 – Торсионные углы в звене полинуклеотидной цепи

Значения торсионных углов для разных конформаций ДНК приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Значения торсионных углов (в градусах) для разных конформаций ДНК

Форма	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
A	−52	175	42	79	−148	−75	−157
B	−30	136	31	143	−141	−161	−98
Z	−140	−137	51	138	−97	82	−154

Конформация полинуклеотидной цепи зависит от конформации рибозы. Рибоза встречается в четырёх конформациях, различающихся тем, какой из атомов пятичленного цикла, C2' или C3' (рисунок 83), выведен из плоскости остальных четырёх атомов. Если атом C2' или C3' находится с той же стороны от плоскости, что и атом C5', то такая конформация называется *эндо*-, если с другой стороны, то – *экзоконформация*. Следовательно, возможны C2'-*эндо*-, C3'-*эндо*-, C2'-*экзо*- и C3'-*эндо*-формы. Первые две встречаются чаще (рисунок 84).

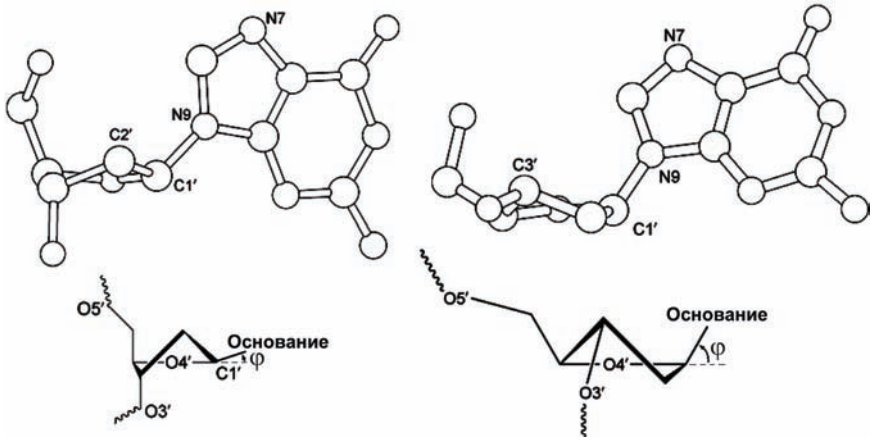


Рисунок 84 – C2'-*эндо*- и C3'-*эндо*- конформации рибозы в гуанозине

В зависимости от конформации пентозы, различают *два семейства* конформаций ДНК:

1) A-семейство (C3'-*эндо*-конформация) – A-форма ДНК,
2) B-семейство (C2'-*эндо*-конформация) – B-, C- и T-формы ДНК.

В C2'-*эндо*-конформации угол φ невелик (φ = 2–6°), поэтому в B-семействе ДНК пары нуклеотидов расположены почти перпендикулярно к оси спирали. Для C3'-*эндо*-конформации φ = 20° (таблица 5).

Конформационные переходы ДНК *внутри* одного семейства происходят *плавно*, а переход из A- в B-форму – *скачкообразно*, сопровождаясь изменением конформации рибозы от C3'-*эндо*- к C2'-*эндо*-форме.

Стимулировать конформационный B→A переход можно добавлением в водный раствор этанола. Конформационные переходы происходят также при изменении концентрации солей в растворе.

Между нуклеиновыми основаниями наряду с горизонтальными водородными связями, образующими пару, существуют и *вертикальные взаимодействия* оснований, принадлежащих соседним парам оснований, которые называют *стэкингом* оснований (*stacking*).

Стэкинг представляет собой взаимодействие между двумя или более гетероциклическими основаниями, имеющими параллельные ароматические кольца.

В стэкинг вносят вклад дисперсионные, диполь-дипольные и гидрофобные взаимодействия между основаниями соседних пар. Сила стэкинга уменьшается в следующем порядке:

пурин-пурин > пиримидин-пурин > пиримидин-пиримидин.

Азотистые основания представляют собой π-электронные системы. Между плоскими π-электронными циклами, расположенными параллельно друг другу, возникают значительные дисперсионные силы. Именно поэтому плоские молекулы гетероциклических красителей в водном растворе образуют *стопкообразные агрегаты*. А в случае ДНК стэкинг нуклеиновых оснований проявляется в эффекте *гипохромизма* поглощения раствора однонитевых ДНК по сравнению с раствором мономеров нуклеотидов такой же концентрации.

4.3. Денатурация ДНК

Процесс раскручивания двойной спирали и разъединения двух спиралей называется *денатурацией* (или плавлением) ДНК. Денатурация может быть индуцирована искусственно *in vitro* нагреванием раствора, содержащего ДНК. *При повышении температуры* усиливается тепловое движение в молекулах и разрушаются слабые нековалентные связи (водородные связи и стэкинг, рисунок 85), которые формируют двойную спираль.

Спирали разъединяются и расходятся вследствие *электростатического отталкивания* между отрицательно заряженными сахарофосфатными остовами. Вблизи температуры денатурации небольшое увеличение

температуры раствора вызывает *резкое*, *практически одновременное*, разрушение множественных слабых нековалентных взаимодействий (которые удерживают двойную спираль) вдоль всей длины ДНК, что проявляется в резком изменении ультрафиолетового поглощения раствором (рисунок 86(а)).

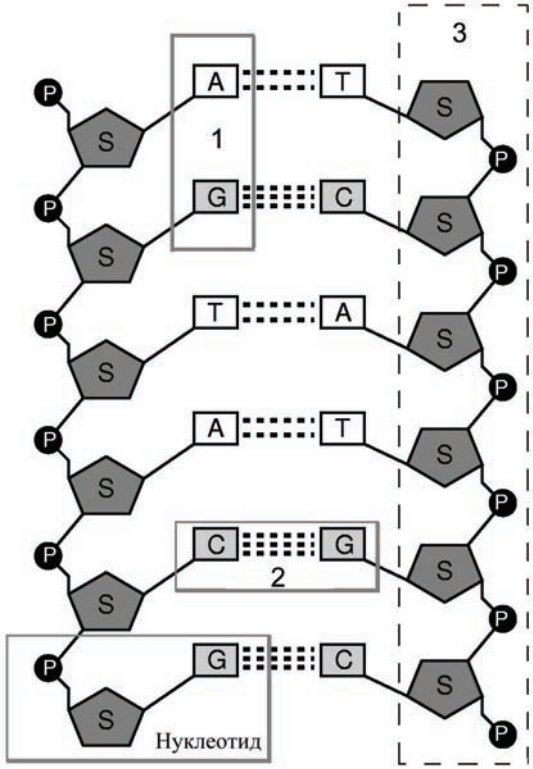
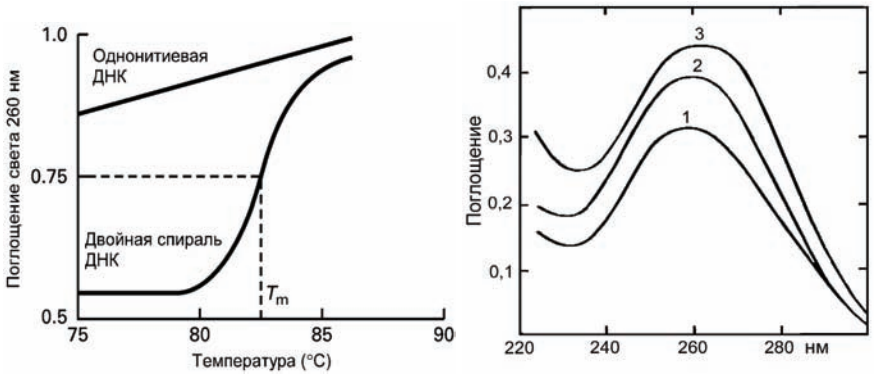


Рисунок 85 – Схема межатомных связей в ДНК: 1 – стекинг; 2 – водородные связи; 3 – сахарофосфатный остов

При денатурации ДНК оптическая плотность раствора увеличивается примерно на 30%. Явление увеличения оптической плотности нуклеиновых кислот называется *гиперхромным* эффектом.

Обратное явление, т. е. уменьшение поглощения раствора ДНК при ренатурации называется *гипохромным* эффектом.

На рисунке 86(б) представлены спектры поглощения ДНК в разных состояниях. Из рисунка видно, что денатурация нативной ДНК (1) сопровождается гиперхромным эффектом (поглощение увеличивается), но, поскольку некоторые стэкинг-взаимодействия между нуклеиновыми основаниями в однонитевых ДНК сохраняются, то интенсивность спектра поглощения однонитевых ДНК (2) меньше интенсивности спектра поглощения мономеров (3), стэкинг между которыми отсутствует (концентрация мономеров такая же, как в нативной ДНК).



а *б*

Рисунок 86 – Денатурация ДНК: *а* – поглощение ультрафиолета; *б* – спектр поглощения: 1 – нативной ДНК; 2 – денатурированной ДНК; 3 – мономерных нуклеотидов, из которых состоит ДНК

Температура плавления, T_m, при которой разъединяются две спирали ДНК, определяется несколькими факторами. Молекулы, которые содержат *большее количество* C≡G *пар* плавятся при более высокой температуре, поскольку пары C≡G, имеющие *три* водородные связи, более стабильны, чем пары A=T, в которых только *две* водородные связи. Таким образом, по температуре плавления можно оценить концентрацию C≡G пар (рисунок 87).

Справедливо эмпирическое соотношение

$$T_m = T_{AT} + (T_{CG} - T_{AT}) \cdot x,$$

где x – доля C≡G пар, $T_{AT} \approx 70°C$ и $T_{CG} \approx 110°C$ – температуры плавления полинуклеотидов, состоящих исключительно из A=T или C≡G пар при значениях $x = 0$ и $x = 1$, соответственно.

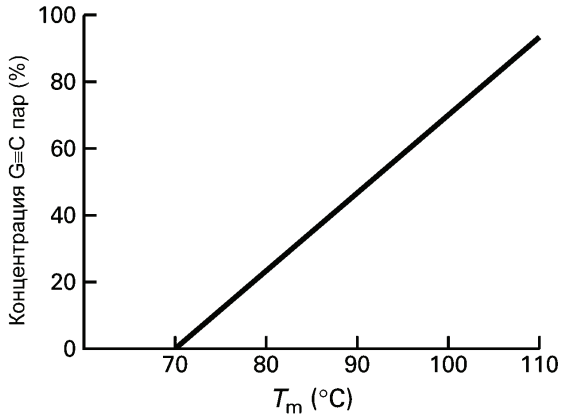


Рисунок 87 – Зависимость концентрации G≡C пар от T_m

Концентрация ионов в растворе также влияет на T_m, поскольку отрицательно заряженные фосфатные группы обеих спиралей экранированы положительными ионами. Если *снизить концентрацию положительных ионов* в растворе, то уменьшается и степень экранирования. Это увеличивает силы отталкивания между сахарофосфатными остовами и снижает T_m.

Наконец, резкое *изменение* pH (рисунок 75) денатурирует ДНК даже при низких температурах. При *низких* значениях pH (кислая среда) нуклеиновые основания протонируются, приобретая положительный заряд, и, следовательно, отталкиваются друг от друга. При *высоких* значениях pH

(щелочная среда) основания теряют протоны, становятся отрицательно заряженными и опять-таки отталкиваются друг от друга.

Одноцепочечные молекулы ДНК, которые получаются в результате денатурации, образуют случайным образом сформированные *клубки* без определённой структуры. Понижение температуры, увеличение ионной концентрации или нейтрализация pH вызывают *самопроизвольную ренатурацию* двух цепей ДНК в двойную спираль. При этом, однако, *важно*, что две *некомплементарные* цепи ДНК *не ренатурируют*, а остаются в виде хаотичных клубков. Ещё более важно, что они *не мешают* двум комплементарным цепям ДНК найти друг друга в растворе и ренатурировать.

Процессы денатурации и ренатурации ДНК являются основами *гибридизации* ДНК – методики, которая используется для определения взаимного соответствия двух ДНК-образцов, и для детектирования и изолирования специфических молекул ДНК в растворе, содержащем различные ДНК последовательности.

1. Как называются мономеры, из которых состоит ДНК?
2. В чём отличие нуклеотида от нуклеозида?
3. Перечислите пиримидиновые нуклеиновые основания.
4. Перечислите пуриновые нуклеиновые основания.
5. Перечислите стандартные уотсон-криковские пары нуклеиновых оснований.
6. Что такое нестандартное спаривание?
7. Какими углами характеризуется взаимное расположение азотистых оснований в паре?
8. Какими углами характеризуется взаимное расположение соседних пар оснований в ДНК?
9. Какие формы строения спиралей ДНК вы знаете? Какая из них является основной?
10. Какие две конформации рибозного кольца являются основными?
11. Что такое стэкинг? Какую роль играют стэкинг-взаимодействия в ДНК?

12. Какой процесс называется денатурацией ДНК?
13. Какая температура называется температурой плавления ДНК?
14. Как связана температура плавления ДНК с содержанием в ней гуанин-цитозиновых пар?
15. Каким образом изменение pH влияет на температуру плавления ДНК?
16. Почему изменение концентрации ионов в растворе изменяет температуру плавления ДНК?
17. Что называется ренатурацией ДНК, и какие процессы стимулируют ренатурацию ДНК?