

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОТ АВТОРОВ.....	15
ВВЕДЕНИЕ. Кто открыл ДНК?	17
ГЛАВА 1. Компоненты нуклеиновых кислот	21
1.1. Структура и свойства нуклеозидов	21
1.1.1. Структура и номенклатура нуклеозидов. Минорные нуклеозиды	21
1.1.1.1. Структура основных нуклеозидов в составе нуклеиновых кислот	21
1.1.1.2. Минорные нуклеозиды.....	30
1.1.2. Химические свойства гетероциклических оснований в нуклеозидах.....	31
1.1.2.1. Распределение электронной плотности в основаниях	31
1.1.2.2. Кислотно-основные свойства гетероциклических оснований	34
1.1.2.3. Реакции с электрофильными реагентами	35
1.1.2.4. Реакции с нуклеофильными реагентами	44
1.1.2.5. Реакции по экзоциклическим аминогруппам	50
1.1.3. Реакции по углеводному фрагменту	54
1.1.3.1. Замещение атома водорода в гидроксильных группах.....	54
1.1.3.2. Окисление гидроксильных групп.....	61
1.1.3.3. Замещение гидроксильных групп.....	61
1.1.3.4. Реакции, в которых затрагиваются гетероциклическое основание и углеводный фрагмент	65
1.1.4. Синтез нуклеозидов.....	72
1.1.4.1. Синтез нуклеозидов конденсацией углеводного фрагмента и гетероциклического основания	73
1.1.4.2. Получение 2'-дезоксинуклеозидов дегидратацией по Бартону.....	81
1.1.4.3. Другие методы синтеза производных нуклеозидов	81
1.1.4.4. Конструирование гетероцикла после гликозилирования.....	83
1.1.4.5. Трансгликозилирование.....	83
1.1.5. Устойчивость гликозидных связей. Особые свойства псевдоуридина	86
1.1.5.1. Влияние природы гетероциклического основания на скорость гидролиза N-гликозидной связи	87
1.1.5.2. Влияние природы углеводного фрагмента на скорость гидролиза N-гликозидной связи	87
1.1.5.3. Механизм гидролиза N-гликозидных связей в нуклеозидах.....	88
1.1.5.4. Особые свойства псевдоуридина.....	89
1.2. Структура и свойства мононуклеотидов	92
1.2.1. Структура и номенклатура нуклеотидов	92
1.2.2. Кислотно-основные свойства нуклеотидов.....	93
1.2.3. Свойства фосфатной группы в составе нуклеотидов	94
1.2.3.1. Основные представления о строении и реакционной способности фосфатной группы	94
1.2.3.2. Реакции фосфатной группы в составе нуклеотидов.....	96

1.2.4. Синтез и свойства производных нуклеотидов	100
1.2.4.1. Нуклеозидциклофосфаты	100
1.2.4.2. Смешанные ангидриды нуклеотидов	102
1.2.4.3. Амиды нуклеотидов	106
1.2.4.4. Эфиры нуклеотидов	109
Литература к главе 1	115
ГЛАВА 2. Олигодезоксирибо- и олигорибонуклеотиды	118
2.1. Структура и свойства олигонуклеотидов	118
2.1.1. Структура и номенклатура олигонуклеотидов	118
2.1.2. Свойства олигонуклеотидов	120
2.1.2.1. Гидролитическая устойчивость нуклеиновых кислот	120
2.1.2.2. Реакции фосфатных групп в олигонуклеотидах	122
2.1.2.3. Реакции гетероциклических оснований в составе олигонуклеотидов	128
2.1.2.4. Реакции углеводных остатков в составе олигонуклеотидов	128
2.2. Химический синтез олигодезоксирибонуклеотидов	130
2.2.1. Общая стратегия химического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов	132
2.2.1.1. Защитные группы для мономерного синтона олигонуклеотидного синтеза	133
2.2.1.2. Введение фосфатов	133
2.2.1.3. Способы образования межнуклеотидной связи	136
2.2.2. Твердофазный синтез фрагментов нуклеиновых кислот	140
2.2.2.1. Иммобилизация первого 2'-дезоксирибонуклеозида на твердофазном носителе	140
2.2.2.2. Нарастивание олигонуклеотидной цепи	142
2.2.2.3. Деблокирование и удаление олигонуклеотидов с полимерного носителя	143
2.2.2.4. Выделение (очистка) олигонуклеотидов	144
2.3. Синтез олигорибонуклеотидов	144
2.3.1. Синтез полностью защищенного 3'-амидофосфита рибонуклеозида	144
2.3.1.1. Блокирование гетероциклических оснований	144
2.3.1.2. Защита 2'-гидроксильной группы	145
2.3.2. Процедура синтеза олигорибонуклеотидов	146
2.3.3. Удаление защитных групп после завершения автоматического твердофазного синтеза	146
2.4. Синтез олигонуклеотидов на чипах	147
2.5. Синтез модифицированных олигонуклеотидов	149
2.5.1. Модификация гетероциклического основания	149
2.5.2. 3'-/5'-Концевые модификации	152
2.5.3. Модификация межнуклеотидной фосфатной группы	154
2.5.3.1. Тиофосфаты	154
2.5.3.2. Метилфосфонаты	156
2.5.3.3. Амидофосфаты (фосфамиды)	156
2.5.4. Модификация углеводного фрагмента	158
2.5.4.1. 2'-Амино-2'-дезоксинуклеозиды в составе олигонуклеотидов	158
2.5.4.2. Олигонуклеотиды с включением 2'-О-алкилрибонуклеозидов и 2'-дезоксид-2'-фтор-β-D-рибофуранозидов	161
2.5.4.3. Ковалентно-замкнутые нуклеиновые кислоты	163

2.5.4.4. Пептидо-нуклеиновые кислоты	164
2.5.4.5. Диамидофосфатные морфолиновые олигонуклеотиды.....	165
Литература к главе 2.....	167
ГЛАВА 3. Пространственная структура нуклеиновых кислот.....	169
3.1. Основные принципы структурной организации нуклеиновых кислот и их компонентов.....	169
3.1.1. Методы изучения конформации нуклеиновых кислот	169
3.1.2. Структурные особенности нуклеозидов и нуклеотидов	169
3.1.2.1. Конформация гетероциклических оснований	170
3.1.2.2. Конформации фуранозного кольца нуклеозидов и нуклеотидов	170
3.1.2.3. Относительное расположение остатков рибозы (дезоксирибозы) и гетероциклического основания	171
3.1.2.4. Ориентация групп атомов вокруг связи C4', C5' в нуклеозидах и нуклеотидах	172
3.1.2.5. Конформация сахаро-фосфатной цепи мономерного звена в полинуклеотидах	172
3.1.3. Основные типы нековалентных взаимодействий, стабилизирующих вторичную структуру нуклеиновых кислот	173
3.2. Макромолекулярная структура ДНК.....	176
3.2.1. Структурные характеристики двойной спирали ДНК в В-форме	176
3.2.2. Физические свойства двуспиральной ДНК в В-форме	176
3.2.2.1. Денатурация ДНК	177
3.2.2.2. Ренатурация ДНК	179
3.2.3. Конформационный полиморфизм ДНК	179
3.2.4. Неканонические формы ДНК.....	181
3.2.4.1. ДНК-дуплексы с параллельным расположением цепей	181
3.2.4.2. Одноцепочечная α -ДНК	182
3.2.4.3. Левозакрученная Z-форма ДНК.....	183
3.2.4.4. Структуры Холлидея — четырехлучевые ДНК	185
3.2.4.5. Тройные спирали ДНК	187
3.2.4.6. Квадруплексные структуры ДНК	187
3.2.5. Сверхспирализованная ДНК.....	189
3.2.6. Отрицательная сверхспирализация как фактор, способствующий стабилизации неканонических структур ДНК.....	191
3.3. Макромолекулярная структура РНК	194
3.3.1. Особенности организации макромолекулярной структуры РНК	195
3.3.2. Первичная и вторичная структура РНК.....	195
3.3.3. Третичная структура РНК	201
3.3.3.1. О физических методах определения третичной структуры РНК.....	201
3.3.3.2. Банки данных, в которых хранится информация о третичной структуре РНК.....	202
3.3.3.3. Основные элементы третичной структуры РНК.....	203
3.3.3.4. Взаимодействие двуспиральных элементов и одноцепочечных участков РНК друг с другом.....	209
3.3.3.5. Некоторые особенности укладки одноцепочечных элементов в третичной структуре РНК.....	212
Литература к главе 3.....	215

ГЛАВА 4. Методы исследования первичной структуры нуклеиновых кислот	218
4.1. Основные принципы определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК	218
4.1.1. Химический метод определения первичной структуры олигонуклеотидов: секвенирование по Максаму — Гилберту	218
4.1.1.1. Секвенирование олигодезоксирибонуклеотидов	219
4.1.1.2. Секвенирование олигорибонуклеотидов	223
4.1.2. Специфичные РНКазы и ферментативный метод секвенирования РНК	223
4.1.3. Ферментативное секвенирование ДНК (метод Сэнгера)	224
4.1.4. Использование флуоресцентно-меченых соединений для секвенирования ДНК. Автоматическое секвенирование ДНК	226
4.1.5. Принципы секвенирования протяженных двухцепочечных ДНК	228
4.1.5.1. Эндонуклеазы рестрикции	229
4.1.5.2. Методы введения концевых меток в ДНК	230
4.1.5.3. Общие принципы секвенирования протяженных двухцепочечных ДНК. Метод «дробовика»	231
4.1.6. Особенности секвенирования РНК	232
4.2. Методы секвенирования РНК и ДНК второго и третьего поколения	233
4.2.1. Общие принципы тотального секвенирования нуклеиновых кислот	233
4.2.2. Секвенирование ДНК методами второго поколения	233
4.2.2.1. Подготовка библиотеки образцов ДНК	233
4.2.2.2. Применение полимеразной цепной реакции для амплификации фрагментов ДНК	234
4.2.2.3. Секвенирование ДНК путем лигирования (SOLiD)	236
4.2.2.4. Ионное полупроводниковое секвенирование (Ion Torrent)	237
4.2.2.5. Секвенирование с использованием обратимых флуоресцентно-меченых терминаторов (Solexa/Illumina)	238
4.2.3. Секвенирование ДНК методами третьего поколения	241
4.2.3.1. Одномолекулярное секвенирование в реальном времени	242
4.2.3.2. Нанопоровое секвенирование ДНК	242
4.2.4. Основные принципы секвенирования клеточных РНК	245
4.2.4.1. Методы секвенирования клеточных мРНК	245
4.2.4.2. Принципы секвенирования клеточных некодирующих РНК	248
4.2.4.3. Прямое секвенирование РНК	248
4.2.5. Анализ минорных нуклеозидов в РНК и ДНК	250
Литература к главе 4	252
ГЛАВА 5. Химические и ферментативные методы исследования пространственной структуры нуклеиновых кислот и белково-нуклеиновых комплексов	256
5.1. Использование методов химической модификации (химический пробинг) для изучения пространственной структуры НК	256
5.1.1. Влияние пространственной структуры нуклеиновых кислот на реакционную способность гетероциклических оснований	256
5.1.2. Использование методов химической модификации для определения пространственной структуры ДНК	257
5.1.2.1. Идентификация одноцепочечных участков в составе ДНК	258

5.1.2.2. Анализ наличия трехспиральных структур в ДНК	260
5.1.2.3. Анализ наличия квадруплексных структур в ДНК	261
5.1.2.4. Использование ферментов для анализа вторичной структуры ДНК	261
5.1.3. Анализ пространственной структуры РНК с помощью химических реагентов и ферментов	262
5.1.3.1. Анализ пространственной структуры РНК с помощью ферментативного гидролиза	262
5.1.3.2. Анализ пространственной структуры РНК с помощью химических реагентов	263
5.1.4. Исследование РНК–РНК взаимодействий методом ковалентных «сшивок»	266
5.2. Использование методов химической модификации для изучения взаимодействий НК с белками	270
5.2.1. Методы исследования устойчивости и специфичности НК-белковых комплексов	272
5.2.2. Определение участков НК, взаимодействующих с белком, методом ковалентного связывания	274
5.2.2.1. Определение участков ДНК, взаимодействующих с белком, методом ковалентного связывания	74
5.2.2.2. Определение участков РНК, взаимодействующих с белком, методом ковалентного связывания	276
5.2.3. Изучение контактов в НК-белковом комплексе	279
5.2.3.1. Футпринтинг ДНК-белковых комплексов	279
5.2.3.2. Метод интерференции для исследования ДНК-белковых комплексов	282
5.2.3.3. Исследование контактов в РНК-белковых комплексах	282
Литература к главе 5	285
ГЛАВА 6. Применение модифицированных олигонуклеотидов	288
6.1. Применение модифицированных олигонуклеотидов для изучения белково-нуклеиновых взаимодействий	288
6.1.1. Модификации НК, используемые для выявления контактов с белком	288
6.1.2. Модификации НК, используемые для выявления аминокислотных остатков, участвующих в белково-нуклеиновых взаимодействиях	291
6.2. Применение модифицированных олигонуклеотидов для детекции нуклеиновых кислот	295
6.2.1. Метод гибридизационного анализа	295
6.2.1.1. Блот-гибридизация	295
6.2.1.2. Гибридизация на чипах	298
6.2.1.3. Особенности гибридизационного анализа при выявлении мутаций в ДНК	301
6.2.1.4. Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i>	304
6.2.2. Использование методов ПЦР для детекции НК	306
6.3. Модифицированные олигонуклеотиды как основа лекарственных препаратов нового поколения	312
6.3.1. Подходы к конструированию и требования к терапевтическим средствам на основе нуклеиновых кислот	312
6.3.2. Антисенсовая технология	313
6.3.3. Модифицированные олигонуклеотиды, регулирующие сплайсинг мРНК	319
6.3.4. Малые интерферирующие РНК — миРНК (siRNA)	321

6.3.5. «Ловушки» факторов транскрипции (decoys).....	325
6.3.6. Аптамеры	327
6.3.7. Нерешенные несинтетические проблемы	329
Литература к 6 главе.....	333
Приложения к главе 3	338
Приложение 1.....	338
Приложение 2.....	339