

"25" июня 2011 г.

**ПРОГРАММА**  
**вступительного экзамена**  
**для поступающих в аспирантуру**  
**по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.**

*Предмет биоорганической химии.* Объекты изучения. Методы исследования. Основные задачи.

**I. СТРОЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

*Генетически кодируемые аминокислоты.* Номенклатура. Сокращенные обозначения. Стереохимия  $\alpha$ -аминокислот. Серин как предшественник селеноцистеина. Кислотно-основные свойства аминокислот.

*Пептиды и белки.* Геометрия пептидной связи. Первичная структура белков как последовательность расположения мономерных звеньев в линейной полимерной цепи. Неисчерпаемость числа мыслимых первичных структур белков. Основные типы нековалентные взаимодействий в белках: электростатические взаимодействия; водородные связи; ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Гидрофобные и гидрофильные группы в белках. Взаимодействия гидрофобных групп в водных растворах (гидрофобные взаимодействия). Межплоскостные взаимодействия между ароматическими структурами (стекинг-взаимодействия). Дисульфидные мостики. Понятие о вторичной, третичной и четвертичной структуры белков. Домены. Пространственная структура пептидов. Низкомолекулярные пептиды с типично белковой структурой. Низкомолекулярные пептиды с нетипичными для белков структурными особенностями. Методы исследования пространственного строения белков и пептидов в растворе. Спектральные и электрохимические характеристики пептидной связи и боковых групп аминокислот.

*Структура нуклеозидов и нуклеотидов.* Гетероциклические основания. Пиримидины и пурины. Номенклатура. Сокращенные обозначения. Таутомерия. Углеводные компоненты нуклеозидов. Характер связи углеводного остатка с гетероциклическим основанием. Конфигурация гликозидного (аномерного) центра. Номенклатура, сокращенные формулы нуклеозидов. Минорные компоненты нуклеиновых кислот как продукт модификации. Псевдоуридин. Рибо- и дезоксирибонуклеотиды. Номенклатура. Нуклеозид-5'-фосфаты. Нуклеозид-5'-трифосфаты. Нуклеозид-3'- и 2'-фосфаты. Нуклеозидциклофосфаты. Нуклеозид-3'-(2'),5'-дифосфаты. Конформация нуклеозидов и нуклеотидов.

*Основные типы нуклеиновых кислот (ДНК и РНК).* Природа межнуклеотидных связей. Номенклатура, сокращенные формулы и сокращенные обозначения. Первичная структура нуклеиновых кислот, как последовательность расположения мономерных звеньев в линейной полимерной цепи. Неисчерпаемость числа мыслимых первичных структур нуклеиновых кислот. Основные типы нековалентных взаимодействий в нуклеиновых кислотах: водородные связи; ван-дер-ваальсовы взаимодействия; электростатические взаимодействия. Гидрофобные и гидрофильные группы в нуклеиновых кислотах. Взаимодействия гидрофобных групп в водных растворах (гидрофобные взаимодействия). Межплоскостные взаимодействия между ароматическими структурами (стекинг-взаимодействия). Пространственная структура ДНК и РНК. Комплементарные основания в нуклеиновых кислотах. Комплементарные взаимодействия между участками одной полинуклеотидной цепи и их роль в формировании пространственной структуры однонитевых полинуклеотидов. Электрохимические и спектральные характеристики нуклеиновых кислот и их компонентов.

*Конформационная лабильность биополимеров и молекулярное узнавание* - два главных общих свойства функционально значимых биополимеров, необходимых для их функциони-

рования в живых организмах. Взаимодействие комплементарных последовательностей олиго- или полинуклеотидов, как пример взаимного узнавания структур. Нативное и денатурированное состояния. Потеря способности к специфическим взаимодействиям при денатурации. Обратимость перехода между нативным и денатурированным состояниями. Множественность функционально значимых состояний биополимеров. Денатурация и ренатурация белков. Направленные конформационные переходы в биополимерах при взаимодействии с низкомолекулярными лигандами и их функциональное значение. Роль молекулярного узнавания в функционировании белков.

*Биологическая роль белков.* Белки - ферменты. Общая характеристика ферментов. Принципы ферментативной кинетики. Химия ферментов. Молекулярная асимметрия и прохиральность. Факторы, определяющие специфичность ферментов. Внутримолекулярный катализ. Полифункциональный катализ и простые модели.  $\alpha$ -Химотрипсин: тетраэдрические интермедиаты; абсолютная конформация связанного субстрата. Другие гидролитические ферменты: РНКазы А; ацетилхолинэстераза. Стереоселективный контроль в реакциях гидролиза.

Белки - регуляторы физиологических процессов. Биосинтез гормонов. Механизм действия пептидно-белковых гормонов: взаимодействие гормонов с рецепторами; структура и свойства аденилатциклазной системы. Представители белковых гормонов: инсулин, соматотропин, пролактин, гликопротеиновые гормоны аденогипофиза.

Белки - средство защиты организма. Белки иммунной системы: структура и функция антител. Антигены тканевой совместимости. Система комплемента: медиаторы иммунного ответа; интерфероны; лимфокины и монокины; фактор некроза опухолей (TNF). Белки систем свертывания крови и фибринолиза.

Двигательная функция белков. Белки мышц и соединительных тканей. Коллаген.

Строительная и энергетическая функции белков.

*Биологическая роль пептидов.* Нейропептиды: энкефалины и эндорфины; окситоцин и вазопрессин; адренотропный гормон; меланоцитстимулирующие гормоны; либерины и статины; вещество Р; пептиды-коннекторы; пептиды, действующие на сон; липотропины. Пептидные гормоны: тканевые гормоны; кальцитонин; глюкагон; гормоны желудочно-кишечного тракта. Пептидные токсины: пептиды из бледной поганки; пептидные токсины из яда пчел; нейротоксины из яда змей и скорпионов; пептидные токсины морских беспозвоночных. Пептидные антибиотики: грамицидин S; бацитрацины; полимиксины; актиномицины; эхиномицин. Пептиды - регуляторы иммунитета: циклоспорин А; тафцин; тимические гормоны. Пептиды с вкусовыми качествами: аспартам.

*Матричный биосинтез биополимеров.* Наследственная информация и реализация ее в клетке: репликация, транскрипция и трансляция. Основные компоненты системы матричного биосинтеза: фермент, матрица и набор мономеров. Основные стадии матричного биосинтеза: инициация, элонгация и терминация. Сигналы инициации и терминации. Основные стадии каждого цикла элонгации: отбор мономера, присоединение его к растущей цепи и перемещение программирующей матрицы на одно звено относительно активного центра фермента (транслокация).

Программирование первичной структуры белков в первичной структуре информационных РНК (мессенджер РНК или мРНК). Генетический код. Активация аминокислот: тРНК и аминоацил-тРНК-синтетазы.

## II. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ, ОЧИСТКИ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

*Разделение белков и нуклеиновых кислот центрифугированием.* Фракционирование клеточных структур методом центрифугирования. Выделение белков и нуклеиновых кислот в градиенте плотности.

*Выделение и фракционирование белков методом осаждения.* Изoeлектрическое осаждение. Солевое фракционирование белков. Разделение белков с помощью органических растворителей. Осаждение белков органическими полимерами.

*Хроматографические методы разделения и анализа белков и нуклеиновых кислот.* Метод гель-хроматографии. Ионообменная хроматография. Распределительная хроматография. Аффинная хроматография.

*Разделение белков и нуклеиновых кислот методом гель-электрофореза.*

### III. ХИМИЯ КОФЕРМЕНТОВ

*Реакции окисления - восстановления.* Ферменты, участвующие в окислительно-восстановительных процессах: дегидрогеназы; оксидазы; оксигеназы; пероксидазы и каталазы.

$\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ . Неферментативная регенерация коферментов и некоторые примеры использования коферментов в органическом синтезе.

*Химия флавинов. Реакции оксенов.*

*Липоевая кислота.* Пируватдегидрогеназный комплекс.

*Пиридоксальфосфат.* Биологическая роль пиридоксальфосфата. Модельные системы. Самоуничтожающиеся инактиваторы ферментов и аффинные метки.

*Тиамин.* Конструирование моделей тиамина.

*Биотин.* Модельные исследования

### IV. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ БЕЛКОВ

*Проблемы пептидного синтеза.* Термодинамические аспекты синтеза. Проведение сопряженных термодинамически выгодных процессов - основной путь преодоления термодинамических затруднений при образовании пептидных связей в процессе конденсации аминокислот. Механизмы рацемизации производных аминокислот и пептидов.

*Способы активации карбоксильной группы в аминокислотах и пептидах.* Карбодиимидный метод синтеза пептидов. Метод активированных эфиров для получения пептидов. Метод смешанных ангидридов: хлорангидридный метод синтеза пептидов; метод смешанных ангидридов аминокислот с угольной кислотой; карбоксиангидридный метод синтеза пептидов; азидный метод синтеза пептидов.

*Защита функциональных групп аминокислот.* Требования, предъявляемые синтезом пептидов к защитным группам. Временная и постоянные защиты. Сравнительный анализ по получению пептидов с использованием в качестве временной защиты *трет*-бутилоксикарбонильной и 9-флуоренилметилоксикарбонильной групп. Общая стратегия выбора защитных групп при синтезе пептидов.

*Блокирование аминогрупп.* Комплекс аминокислот с ионами меди - как одно из решений проблемы селективного введения защитных групп по  $\epsilon$ -аминогруппе лизина. Защитные группы, удаляемые кислотами: группы уретанового типа - карбобензилокси и *трет*-бутилоксикарбонильная группы; группы ацильного типа - формильная, *о*-нитрофенильная и дифенилфосфинамидная группы. Основные способы введения, удаления защитных групп и механизмы соответствующих процессов. Влияние заместителей на скорость отщепления защитных групп уретанового типа.

Защитные группы, удаляемые основаниями: трифторацетильная и 9-флуоренилметилоксикарбонильная группы. Основные способы введения, удаления защитных групп и механизмы соответствующих процессов.

Защитные группы, удаляемые каталитическим гидрированием: трифторацетильная и карбобензилоксикарбонильная группы. Основные способы введения, удаления защитных групп и механизмы соответствующих процессов.

Защитные группы, удаляемые УФ-облучением: карбобензилокси- и *о*-нитробензилоксикарбонильная группы. Основные способы введения и удаления защитных групп. Механизмы соответствующих процессов.

*Защита карбоксильной группы.* Защитные группы, удаляемые основаниями. Метилловые, этиловые, бензиловые, 9-флуоренилметилловые и 2-*n*-(толуолсульфо)этиловые эфиры. Основные способы введения и удаления сложноэфирных защитных групп. Присоединение аминокислотного остатка к полимеру как один из вариантов защиты. Требования, предъяв-

ляемые к нерастворимому полимеру. Способы присоединения C-концевой аминокислоты к полимерному носителю и снятия синтезированного пептида с полимера.

Защитные группы, удаляемые кислотами: *трет*-бутильная и 2-(адамантил)-пропан-2-иловая группы. Основные способы введения и удаления защитных групп. Механизмы соответствующих процессов.

Защитные группы, удаляемые каталитическим гидрированием: бензильные и *n*-нитробензильные защитные группы. Основные способы введения и удаления защитных групп. Механизмы соответствующих процессов.

Защитные группы, удаляемые облучением: 5-бром-7-нитроиндольная защита. Основные способы введения и удаления защитной группы. Механизмы соответствующих процессов.

*Защита боковых функциональных групп.* Основные способы введения и удаления защитных групп, механизмы соответствующих процессов.

Защита боковых функциональных групп дикарбоновых аминокислот: бензиловый и трет-бутиловый эфиры. Другие защитные группы: бензилоксикарбонильная, *трет*-бутилоксикарбонильная, тозильная, трифторацетильная группы. Условия избитательного блокирования карбоксильных групп боковых радикалов.

Защита гуанидиновой группы аргинина:  $\omega$ -нитрогруппа, тозильная.

Защита имидазольного кольца гистидина: *трет*-бутилокси-карбонильная,  $N^T$ -бензилоксиметильная,  $N^T$ -*трет*-бутоксиметильная, 2,4-динитрофенильная группы.

Защита гидроксильной группы тирозина: бензильная, 2,6-дихлорбензильная, *трет*-бутильная.

Защита гидроксильной группы серина и треонина: бензильная, *трет*-бутильная.

Защита меркаптогруппы цистеина: бензильная, тритильная, ацетамидометильная.

Защита индольного фрагмента триптофана: формильная, 2,4,6-триметоксибензолсульфонильная.

Защита боковой группы метионина: сульфоксидная.

Блокирование амидосодержащих аминокислот - 4-диметоксидифенил метильная защита.

*Классический синтез пептидов.* Примеры синтеза пептидов и белков. Синтез циклопептидов.

*Твердофазный метод синтеза пептидов (метод Меррифилда)* - как модель синтеза белка на рибосомах. Автоматизирование процесса. Требования к реагентам и методам при синтезе биологически активных пептидов. Выбор оптимальной стратегии синтеза. Зависимость степени рацемизации модельного пептида в присутствии нуклеофильных добавок.

*Жидкофазный способ синтеза пептидов.*

*Синтез гетеродетных пептидов.* (S-S)-Пептиды. S-Пептиды. Депсипептиды.

*Ферментативный синтез пептидов и белков.* Посттрансляционная модификация белков.

## V. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТ В ПЕПТИДАХ И БЕЛКАХ

*Задачи,* на решение которых направлено определение первичной структуры пептидов и белков. Корреляция между структурой и биологической активностью белков.

*Общая стратегия определения первичной структуры белков.* Основные этапы определения последовательности аминокислот в белках: выделение белка; получение кислотного гидролизата белка и определение мольного соотношения входящих в него аминокислот; определение молекулярной массы и вычисление количества всех присутствующих аминокислотных остатков; определение количества входящих в молекулу полипептидных цепей; разделение полипептидных цепей и расщепление каждой из них на фрагменты; секвенирование пептидных фрагментов. Метод перекрывающихся блоков и метод неполного гидролиза - основные подходы для восстановления порядка расположения фрагментов в исходной цепи белка.

*Определение состава белковых олигомеров:* получение мономеров и полипептидных цепей. Методы идентификации олигомеров: электрофорез в полиакриламидном геле, гель-фильтрация. Идентификация индивидуальных полипептидных цепей. Определение состава

олигомера по молекулярным массам мономеров. Определение числа мономеров в олигомере путем “сшивания” субъединиц бифункциональными реагентами.

*Фрагментация полипептидной цепи ферментативными методами.* Гидролиз протеазами с высокой специфичностью (трипсин, тромбин, протеаза V8, клострипаин и др.). Гидролиз белка протеазами с низкой специфичностью (химотрипсин, термолизин, пепсин, папаин, эластаза и др.). Использование химических методов для изменения специфичности ферментативного гидролиза.

*Фрагментация полипептидов химическими методами.* Частичный кислотный гидролиз. Расщепление связи Asp-Pro. N→O-ацильная миграция.

Расщепление пептидной связи по остатку триптофана. Окислительное галогенирование. Расщепление с помощью BNPS-скатола. Расщепление по остатку триптофана в системе ДМСО-галогенводородные кислоты. Расщепление по остатку триптофана бромцианом в гептафтормасляной кислоте. Расщепление *o*-иодозобензойной кислотой. Озонирование.

Расщепление пептидной связи по остатку тирозина. Расщепление с помощью *N*-бромсукцинимиды и *N*-иодосукцинимиды

Расщепление по остатку цистеина. Цианирование с помощью 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислоты. Превращение цистеина в дегидроаланин с последующим расщеплением пептидной связи по  $\alpha$ -углеродному атому дегидроаланилпептида.

Бромциановый метод расщепления по остаткам метионина.

Другие методы расщепления пептидных связей. Расщепление связи Asn-Gly гидроксиламинном. Расщепление по остатку гистидина под действием *N*-бромсукцинимиды. Превращение серина в дегидроаланин с последующим расщеплением пептидной связи по  $\alpha$ -углеродному атому дегидроаланилпептида.

Расщепление дисульфидных связей.

*Определение аминокислотного состава.* Исчерпывающий гидролиз белков для аминокислотного анализа. Колоночная хроматография аминокислот. Постколоночная и предколоночная модификация. Газожидкостная хроматография аминокислот. Этерификация карбоксильных групп и ацилирование других реакционноспособных групп с целью получения летучих производных аминокислот. Определение триптофана в интактном белке. Методы анализа фосфорилированных аминокислот и  $\gamma$ -карбокси-глутаминовой кислоты. Определение ацетильной и формильной группы. Анализ остатков амидов дикарбоновых кислот.

*Идентификация N- и C-концевых аминокислотных остатков.* Реагент Сэнгера для определения N-концевой аминокислоты. Дансильирование. Определение C-концевых групп. Селективное введение трития. Гидразиолиз. Селективное восстановление. Определение C-концевых аминокислот в виде альдегидов. Определение C-концевых аминокислот путем алкоголиза оксазолов.

*Методы анализа аминокислотной последовательности пептидов.* Метод Эдмана для секвенирования пептидов. Определение последовательности пептидного фрагмента в ручном варианте. Автоматический анализ аминокислотной последовательности: жидкофазный вариант секвенатора; газофазный вариант секвенатора; твердофазный вариант секвенатора. Методы присоединения пептидов к носителю. Присоединение лизилсодержащих пептидов с помощью *p*-фенилендиизоцианата. Присоединение пептида по карбоксильной группе с использованием *N,N'*-замещенных карбодиимидов. Присоединение по лактону гомосерина.

*Идентификация и локализация цистинсодержащих пептидов.* Расщепление дисульфидных связей. Идентификация по известной аминокислотной последовательности. Идентификация дисульфидных связей у белков с неизвестной аминокислотной последовательностью.

*Применение масс-спектрометрии для определения аминокислотной последовательности пептидов и белков.* Особые случаи применения метода. Пептиды с защищенной N-концевой аминокислотной группой. Определение N-концевой аминокислотной последовательности. Белки, содержащие остатки  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты. Роль масс-спектрометрии при секвенировании пептидов с модифицированными остатками аминокислот.

*Установление первичной структуры белков по кодирующей последовательности в ДНК. Скрининг банков генов. Секвенирование кодирующей последовательности. Сопоставление структуры пептидов с кодирующими последовательностями. Анализ посттрансляционного процессинга методом масс-спектропии.*

## VI. ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

*Селективная модификация аминокислотных остатков. Аналитическое применение.*

Модификация аминогруппы. Взаимодействие с нингидрином. Отличительные особенности первичной и вторичной аминогрупп. Механизм реакции. Взаимодействие нуклеофильных центров белков с реагентом Сэнгера и реагентом Бергмана. Модификация флуоресцирующими реагентами.

Модификация групп, содержащих серу. Взаимодействие с *n*-хлормеркурийбензоатом. Взаимодействие с реагентом Элмана.

Модификация индольного остатка триптофана. Взаимодействие с 2-гидрокси-5-нитробензилбромидом.

Модификация гуанидиниевой группы в аргинине. Взаимодействие с  $\alpha$ -нафтолом. Взаимодействие с *n*-нитрофенилглиоксалем.

Модификация имидазольного остатка в гистидине. Взаимодействие с реагентом Паули.

*Модификация белков с целью изменения биологической функции.*

Взаимодействие белков с диэтилпиракарбонатом. Инактивация РНказы А - как следствие модификации остатков гистидина.

Взаимодействие белков с циклофосфаном. Использование его в химиотерапии злокачественных опухолей.

Модификация функциональных групп белков флуостигмином. Взаимодействие его с ацетилхолинэстеразой.

Взаимодействие белков с 2,4-пентадионом. Дискриминация остатков аргинина и лизина на примере модификации фенилаланин-тРНК-синтетазы. Механизмы реакций.

*Модификация белков с целью структурно-функциональных исследований.*

Введение метки по остаткам тирозина и лизина.

Бифункциональные реагенты. Выбор спейсера, соединяющего реакционноспособные группы бифункционального реагента. Типы реакционноспособных групп. Реагенты на аминогруппы. Реакции с имидазоэфирами. Взаимодействие с *N*-гидроксисукцинимидом. Реагента на HS-группы белков. Алкилирующие реагенты. Взаимодействие с малеимидами. Фотохимические реакции с генераторами нитренов и карбенов. Реакции синглетного и триплетного нитренов.

## VII. МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СИСТЕМ

*Биомиметический подход. Создание высокоэффективных химических нуклеаз с использованием технологии комбинаторной химии.*

## VIII. СИНТЕЗ НУКЛЕОЗИДОВ

*Синтез нуклеозидов конденсацией углевода и гетероциклического основания.* Реакция Кеннигса-Кнорра. Метод Хильберта-Джонсона и «силильный» метод синтеза. Метод Гельфериха.

*Трансгликозилирование.* Получение 2'-модифицированных пуриновых нуклеозидов через реакцию трансгликозилирования.

*Создание гетероциклического основания после гликозилирования.* Использование Д-рибопиранозиламина и гликозилмочевина в качестве предшественников при синтезе пиримидиновых нуклеозидов. Синтез пуриновых нуклеозидов через пиримидиновые. Синтез пуриновых нуклеозидов через гликозиды имидазола.

*Взаимопревращения природных нуклеозидов.* Получение инозина и уридина методом дезаминирования аденозина и цитидина. Аминирование как способ превращения уридина в цитидин, тимидина в 5-метил-2'-дезоксцитидин и инозина в аденозин.

*Получение 2'-дезоксирибонуклеозидов из рибонуклеозидов.*

*Получение циклонуклеозидов (ангидронуклеозиды).* Синтез и превращения пиримидиновых циклонуклеозидов. Внутримолекулярное алкилирование гетероциклического основания по кислороду, связанному с С2. Галогенангидриды 2-ацетоксиизомасляной кислоты и хлорангидриды 2-ацилизомаляных кислот как циклизующие агенты. Синтез и превращения пуриновых циклонуклеозидов.

#### IX. СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДОВ

*Методы фосфорилирования нуклеозидов.* Фосфорилирующие агенты - производные фосфорной кислоты. Фосфорилирование нуклеозидов с конденсирующими агентами. Фосфорилирование соединениями трехвалентного фосфора. Активация гидроксила нуклеозидов. Ферментативное фосфорилирование нуклеозидов.

*Способы активации фосфатной группы нуклеотидов:* реагенты окислительно-восстановительного типа; карбодиимидный метод; эфиры фосфорной кислоты; ацилфосфаты; амидофосфаты. Механизмы соответствующих процессов.

*Методы получения нуклеозид-5'-трифосфатов (NTP).* Синтез NTP с использованием в качестве активирующего реагента трифторуксусного ангидрида.

#### X. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

*Методы образования фосфодиэфирной связи:* химические и ферментативные методы синтеза. Фосфодиэфирный и фосфотриэфирный методы синтеза олигонуклеотидов. Твердофазный фосфотриэфирный метод синтеза олигонуклеотидов (фосфитный вариант). Н-фосфонатный синтез олигорибонуклеотидов.

Характер защитных групп при химическом синтезе олигонуклеотидов. Основные требования к защитным группам.

*Блокирование и деблокирование аминогрупп гетероциклических оснований:* бензоильная и изобутирильная защиты. Основные способы введения и удаления защитных групп, механизмы соответствующих процессов.

*Блокирование и деблокирование гидроксильных групп остатков пентозы:* диметокситрильная защита (5'-ОН-группы); ацильная (3'-ОН-группы); тетрагидропиранильная и диметилбутилсилильная защиты (2'-ОН-группы). Основные способы введения и удаления защитных групп, механизмы соответствующих процессов.

*Приготовление нуклеозидного и нуклеотидного компонентов.* Способы присоединения первого нуклеозидного остатка к полимерному носителю и снятия синтезированного олигонуклеотида с полимера.

*Схема синтеза фосфодиэфирной связи твердофазным фосфамидитным методом.* Образование связи между Р- и ОН-компонентами. Роль тетразола. Стадия эквипирование. Окисление фосфиттриэфирного фрагмента. Деблокирование и выделение синтезированного олигонуклеотида.

*Создание микрочипов.* Одновременный синтез набора олигонуклеотидов на твердой подложке с использованием фотолabileй временной защиты.

*Химико-ферментативный синтез фрагментов ДНК.* Клонирование синтетических полидезоксирибонуклеотидов. Два подхода к получению двухцепочечных полинуклеотидов: использование для соединения отдельных фрагментов реакции, катализируемой Т4 ДНК-лигазой; применение репаративной достройки частичного дуплекса с помощью ДНК-полимеразы. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) как вариант амплификации двухцепочечных полинуклеотидов. Введение реакционноспособных и репортерных групп при синтезе ДНК.

#### XI. МОЛЕКУЛЯРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ (SELEX)

Библиотеки олигонуклеотидов. Аптамеры, получение и применение. Каталитические РНК и ДНК.

Принципы получения пептидных библиотек. Фаговый дисплей. Рибосомный дисплей.

#### XII. ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

*Реакции гетероциклических оснований в составе моно- и олигонуклеотидов.* Общие представления. Природа реакционных центров. Влияние пространственной структуры НК на реакционную способность.

*Реакции присоединения и замещения по атомам углерода.* Галоидирование в неводной среде как пример реакций электрофильного замещения по положению 5. Реакция присоединения-отщепления по двойной связи С5-С6 пиримидинов: галоидирование и меркурирование в водной среде; взаимодействие с бисульфитом натрия. Окисление четырехокисью осмия. Действие гидразина и его производных.

Реакции переаминирования как способ введения реакционноспособных групп и меток по 4-положению цитидина.

Модификация пуринов по С8-положению.

*Реакции присоединения по атомам азота пиридинового типа.* Реакции алкилирования diazometаном; действие азотистых ипритов (например, циклофосфана). Механизм алкилирования ароматическими и алифатическими ипритами. Реакция с диэтилпинокрбонатом.

*Реакции по атомам азота пиррольного типа и экзоциклическим аминогруппам.* Взаимодействие с азотистой кислотой. Ацилирование. Взаимодействие с diazometаном.

*Реакции расщепления и перегруппировки гетероциклических оснований нуклеиновых кислот и их производных.* Расщепление имидазольного цикла пуриновых производных. Раскрытие пиримидинового цикла.

### ХIII. ПОДХОДЫ К УСТАНОВЛЕНИЮ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В ДНК И РНК

*Метод перекрывающихся блоков* - основной подход для восстановления порядка расположения фрагментов в исходной цепи ДНК. Расщепление ДНК ферментами рестрикции по специфическим сайтам. Физические карты ДНК.

*Метод Максама-Гилберта* (определение последовательности ДНК методом неполных специфических расщеплений). Введение меченых фосфатных групп в 5'-концевые звенья олиго- и полинуклеотидов. Химические реакции, лежащие в основе метода Максама-Гилберта. Расщепление ДНК по гуанозиновым звеньям через модификацию диметилсульфатом. Фрагментация ДНК по остаткам пурина после обработке муравьиной кислотой. Расщепление по цитозину гидразином при высокой концентрации NaCl. Дегградация ДНК по остаткам пиримидинов после обработке гидразином в отсутствие NaCl.

*Метод Сэнгера* (определение последовательности ДНК методом ДНК-полимеразного копирования в присутствии терминирующих аналогов дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов). Использование в качестве терминаторов репликации дидезоксинуклеотидов с флуоресцентными метками. Донорно-акцепторные пары для одноволнового возбуждения флуоресцентного красителя с последующей многоволновой детекцией.

*Методы быстрого определения последовательности РНК.* Прямые методы секвенирования РНК. Введение меченых фосфатных групп в 5'- или 3'-концевые звенья РНК. Ферменты, специфически расщепляющие РНК. Секвенирование РНК через кДНК.

*Проблема определения минорных компонентов нуклеиновых кислот.* Роль масс-спектрометрии при секвенировании нуклеиновых кислот с модифицированными гетероциклическими остатками.

*Секвенирование нуклеиновых кислот гибридизацией на олигонуклеотидных чипах.*

*Применение ПЦР в секвенировании.* Детекция инфекционных агентов, мутировавших генов.

### ХIV. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ И ИММОБИЛИЗАЦИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Введение различных меток (радиоактивные, флуоресцирующие, биотин) и реакционно-способных групп (арилазиды, алкилирующие группы) в биополимеры. Производные нуклеиновых кислот и олигонуклеотидов и их применение в гибридизационном анализе. Иммуобилизация биополимеров. Аффинная хроматография на иммобилизованных нуклеиновых кислотах и олигонуклеотидах. Иммобилизованные ферменты. Иммуносорбенты. Получение



конъюгатов антител с ферментами и использование их в иммуноанализе (иммуноферментный анализ).

#### XV. ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

Открытые и скрытые остатки в белках и нуклеиновых кислотах и различие в их поведении при химической модификации. Подходы к локализации модифицированных остатков. Сравнительное изучение доступности участков биополимеров в свободном состоянии и в комплексах, как подход к изучению областей контактов. Футпринтинг нуклеиновых кислот. Алкилирование по фосфатным группам. Устойчивость фосфотриэфиров. Расщепление РНК и ДНК после удаления гетероциклических оснований. Изучение областей контактов между биополимерами с помощью бифункциональных химических реагентов.

#### XVI. АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ И НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

*Основные характеристики метода, критерии аффинной модификации.* Модификация фермента реакционноспособными аналогами субстратов, соответствующая классической схеме аффинного мечения. Примеры невыполнения критериев аффинной модификации. Анализ причин множественного мечения. Соотношение между модификацией и инактивацией биополимера.

*Общие принципы конструирования аффинных реагентов.* Типы реакционноспособных групп в аффинных реагентах. Способы их введения и механизмы модификации.

Фотоаффинная модификация. Типы фотоактивируемых групп. Ароматические азиды. Фотоактивируемые группы - предшественники карбенов. Реакции ароматических азидов с функциональными группами белков.

*Пути повышения селективности аффинной модификации.* Дифференциальное мечение. Каталитически компетентное мечение. Использование суицидных субстратов. Фотосенсибилизированная модификация.

*Аффинная модификация как инструмент изучения механизма функционирования надмолекулярных комплексов.* Аффинная модификация репликационного, транскрипционного комплексов и рибосом.

#### АНТИСМЫСЛОВЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

Антисмысловые воздействия на однонитевые нуклеиновые кислоты. Антисмысловые олигонуклеотиды и нуклеиновые кислоты, как потенциальные противоопухолевые и противовирусные препараты. Использование производных олигонуклеотидов в антисмысловой технологии. Реакционноспособные производные антисмысловых олигонуклеотидов. Производные антисмысловых олигонуклеотидов, стабилизирующие образование дуплексов. Гидрофобные производные и аналоги антисмысловых олигонуклеотидов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987.
2. Шабарова З.А., Богданов А.А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978.
3. Общая органическая химия / Под ред. Н.К. Кочеткова. М.: Химия, . Т. 10.1986.
4. Практическая химия белков / Под ред. А. Дарбе. М.: Мир, 1989.
5. Органическая химия нуклеиновых кислот / Под ред. Н.К. Кочеткова. М.: Химия, 1970.
6. Дюга Г., Пенни К. Биоорганическая химия. М.: Мир, 1983.
7. Химия полипептидов / Под ред. П. Катсоянса. М.: Мир, 1977.
8. Пептиды. Основные методы образования пептидных связей / Под ред. В.Т. Иванова. М.: Мир, 1983.
9. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. М.: Высшая школа, 1992.
10. Тюкавкин Н.А., Бауков Ю.И. Биоорганическая химия М. Дрофа, 2010.
11. Кнорре Д.Г., Годовикова Т.С., Мызина С.Д., Федорова О.С. Новосибирск. НГУ, 2011.