

ПРОГРАММА

спецкурса “Биоорганическая химия” для химиков 4 курса ФЕН. Лектор – доц. Т.С. Годовикова. (58 час).

1. Организационно-методический раздел.

- 1.1. **Название курса.** Биоорганическая химия белков и нуклеиновых кислот. Специальность – 02.00.10 – биоорганическая химия.
- 1.2. **Цели и задачи курса.** Дисциплина “Биоорганическая химия” предназначена для исследования химических компонентов живой клетки, осуществляющих ее внутриклеточный гомеостаз и межклеточные взаимодействия, с использованием химических методов и подходов, часто с помощью молекулярных моделей, полученных синтетическим путем. Основной целью освоения дисциплины является донесение до студентов, именно с точки зрения химика, подходов, концепций, деталей и обобщений, направленных на решение проблемы нуклеиново-белковых и белок-белковых взаимодействий. Для достижения поставленной цели выделяется главная задача курса – показать, что все, что изучают биоорганики – это химическая реакционная способность разных уровней надмолекулярных структур, и изучают ее химически одинаково, с точки зрения принципов, будь то белок или нуклеиновые кислоты. Эти принципы следующие: а) структура; б) изменение структуры и связанные с нею эффекты; в) сравнение структур (сюда входит и синтез); г) основанные на а–в выводы о функциях (по Гегелю а–в – анализ, г – синтез).
- 1.3. **Требования к уровню освоения содержания курса.** По окончании изучения указанной дисциплины студент должен:
 - иметь представления о химических и биологических подходах, а также о концепции построения моделей для изучения и разделения различных параметров сложного биологического процесса;
 - знать методические аспекты синтеза и структурного анализа белков, нуклеиновых кислот и их надмолекулярных комплексов;
 - уметь отобрать среди изобилия методов и подходов белково-нуклеиновой химии для работы только те из них, которые наиболее всего подходят для решения конкретной задачи.
- 1.4. **Формы контроля.** Для контроля усвоения дисциплины учебным планом предусмотрен экзамен. В течение семестра для проверки знаний студентов проводятся собеседования по результатам научных исследований в рамках выполняемых студентами курсовых работ.

2. Содержание дисциплины.

- 2.1. **Новизна курса.** Изучение разделов биоорганической химии, которые позволяют проследить, как меняются свойства в зависимости от структуры и стремление связать химические свойства с механизмами функционирования надмолекулярных комплексов это путь к переходу на новый уровень химического мышления. В связи с этим освоение такой дисциплины как “Биоорганическая химия” сегодня особенно актуально. В связи с отсутствием современных учебников, включающих важные достижения биоорганической химии, большая часть курса построена по результатам научных исследований, опубликованных в реферируемых журналах.

2.2. Тематический план курса.

Наименование разделов	Количество часов		
	Лекции	Самост. Работа	Всего
Строение и биологические функции белков и нуклеиновых кислот.	4	2	6
Химия коферментов	2	1	3
Биосинтез и химический синтез белков	4	2	6
Определение последовательности аминокислот в пептидах и белках	4	2	6
Химическая и посттрансляционная модификация белков	4	2	6
Моделирование ферментативных	4	2	6

систем			
Синтез нуклеотидов	4	2	6
Химический и ферментативный синтез нуклеиновых кислот	4	2	6
Молекулярная селекция (SELEX)	4	2	6
Химическая модификация нуклеиновых кислот	4	2	6
Подходы к установлению нуклеотидной последовательности в ДНК и РНК	4	2	6
Химическая модификация как инструмент исследования пространственной структуры биополимеров, их комплексов и изучения функционально значимых областей в биополимерах	4	2	6
Аффинная модификация ферментов и надмолекулярных комплексов	4	2	6
Антисмысловые нуклеиновые кислоты и олигонуклеотиды	4	2	6
Получение производных белков и нуклеиновых кислот и иммобилизация биополимеров на твердой фазе	4	2	6
Итого по курсу	58	29	87

2.3. Содержание отдельных разделов и тем.

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

Строение и биологические функции белков и нуклеиновых кислот.

Генетически кодируемые аминокислоты. Номенклатура. Сокращенные обозначения. Стереохимия α -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 нековалентных 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. Углеродные компоненты нуклеозидов. Характер связи углеродного 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 функционирования 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. α -Химотрипсин: тетраэдрические интермедиаты; абсолютная конформация связанного субстрата. Другие гидролитические ферменты: РНКаза 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; аденокортикотропный 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.

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. Изоэлектрическое осаждение. Солевое фракционирование белков. Разделение белков с помощью органических растворителей. Осаждение белков органическими полимерами.

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

Разделение белков и нуклеиновых кислот методом гель-электрофореза.

Химия коферментов

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

NAD⁺, 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

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. Карбодимидный 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 ϵ -аминогруппе лизина. Защитные группы, удаляемые кислотами: группы уретанового типа - карбобензилокси и *трет*-бутил-оксикарбонильная 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, предъявляемые 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, тозилльная, трифторацетильная группы. Условия избирательного блокирования карбоксильных групп боковых радикалов.

Защита гуанидиновой группы аргинина: ω -нитрогруппа, тозилльная.

Защита имидазольного кольца гистидина: трет-бутилокси-карбонильная, N^{π} -бензилоксиметильная, N^{π} -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.

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 \rightarrow 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*-бромсукцинимид и *N*-

иодосукцинимид

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

Бромциановый метод расщепления по остаткам метионина.

Другие методы расщепления пептидных связей. Расщепление связи Asn-Gly гидроксиламином. Расщепление по остатку гистидина под действием *N*-бромсукцинимид. Превращение серина в дегидроаланин с последующим расщеплением пептидной связи по α -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 γ -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. Дансилирование. Определение *C*-концевых групп. Селективное введение трития. Гидразинолиз. 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 *n*-фенилендиизоцианата. Присоединение пептида по карбоксильной группе с использованием *N,N'*-замещенных карбодимидов. 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 аминогруппой. Определение *N*-концевой аминокислотной последовательности. Белки, содержащие остатки γ -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-спектроскопии.

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 α -нафтолом. Взаимодействие с *n*-нитрофенилглиоксалем.

Модификация имидазольного остатка в гистидине. Взаимодействие с реагентом Паули.

Модификация белков с целью изменения биологической функции.

Взаимодействие белков с диэтилпирокарбонатом. 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 аминокислоты. Реакции с имидоэфирами. Взаимодействие с *N*-гидроксисукцинимидом. Реагенты на SH-группы белков. Алкилирующие реагенты. Взаимодействие с малеимидами. Фотохимические реакции с генераторами нитренов и карбенов. Реакции синглетного и триплетного нитренов.

Моделирование ферментативных систем

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

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.

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). *N*-фосфонатный синтез олигорибонуклеотидов.

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

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

Блокирование и деблокирование гидроксильных групп остатков пентозы: диметокситриэтильная 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 кэпирования. Окисление фосфиттриэфирного фрагмента. Деблокирование и выделение синтезированного олигонуклеотида.

Создание микрочипов. Одновременный синтез набора олигонуклеотидов на твердой подложке с использованием фотолabile 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.

Молекулярная селекция (SELEX)

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

Принципы получения пептидных библиотек. Фаговый дисплей. Рибосомный дисплей.

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 четырёхокисью 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 диазометаном; действие азотистых ипритов (например, циклофосфана). Механизм алкилирования ароматическими и алифатическими ипритами. Реакция с диэтилпиорокарбонатом.

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

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

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.

Получение производных и иммобилизация биополимеров

Введение различных меток (радиоактивные, флуоресцирующие, биотин) и реакционноспособных групп (арилазиды, алкилирующие группы) в биополимеры. Производные нуклеиновых кислот и олигонуклеотидов и их применение в гибридизационном анализе. Иммобилизация биополимеров. Аффинная хроматография на иммобилизованных нуклеиновых кислотах и олигонуклеотидах. Иммобилизованные ферменты. Иммуносорбенты. Получение конъюгатов антител с ферментами и использование их в иммуноанализе (иммуноферментный анализ).

Химическая модификация как инструмент исследования пространственной структуры биополимеров и их комплексов

Открытые и спрятанные 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 фосфотриэфилов. Расщепление РНК и ДНК после удаления гетероциклических оснований. Изучение областей контактов между биополимерами с помощью бифункциональных химических реагентов.

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 одонитевые 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 дуплетов. Гидрофобные производные и аналоги антисмысловых олигонуклеотидов.

2.4. Перечень примерных контрольных вопросов и заданий для самостоятельной работы определяется тематикой преддипломной практики.

3. Учебно-методическое обеспечение дисциплины

Образцы вопросов для подготовки к экзамену.

Билет 1.

1. Определение первичной структуры ДНК методом Максама-Гилберта.
2. Модификация белков с целью структурно-функциональных исследований. Бифункциональные реагенты.

Билет 2.

1. Химическая модификация гетероциклических оснований нуклеотидов (пиримидинов).
2. Определение аминокислотной последовательности по Эдману.

Билет 3.

1. Химическая модификация гетероциклических оснований нуклеотидов (пуринов).
2. Фрагментация полипептидов химическими и ферментативными методами.

Билет 4.

1. Реакции присоединения по атомам азота пиридиниевого типа. Реакции алкилирования диазометаном; действие азотистых ипритов. Механизм алкилирования ароматическими и алифатическими ипритами. Реакция с диэтилпирокарбонатом.
2. Модификация аминокислот, содержащих серу. Взаимодействие с реагентом Элмана. Бромциановый метод расщепления по остаткам метионина.

Билет 5.

1. Реакции по атомам азота пиррольного типа и экзоциклическим аминогруппам. Ацилирование. Взаимодействие с диазометаном.
2. Применение масс-спектрометрии для определения аминокислотной последовательности пептидов и белков.

Билет 6.

1. Реакции расщепления и перегруппировки гетероциклических оснований нуклеиновых кислот и их производных.
2. Химическая модификация основных аминокислот.

Билет 7.

1. Реакции присоединения и замещения по атомам углерода гетероциклических оснований в нуклеозидах, нуклеотидах и нуклеиновых кислотах.
2. Химический синтез пептидов. Методы избирательного введения защитных групп по карбоксильным и аминогруппам боковых радикалов аминокислот.

Билет 8.

1. Общие принципы конструирования аффинных реагентов. Типы реакционноспособных групп в аффинных реагентах.
2. Защита α -аминогруппы. Защитные группы уретанового типа. Основные способы введения, удаления защитных групп и механизмы соответствующих процессов. Влияние заместителей на скорость отщепления защитных групп уретанового типа.

Билет 10.

1. Методы образования фосфодиэфирной связи: химические и ферментативные методы синтеза. Твердофазный фосфотриэфирный метод синтеза олигонуклеотидов.
2. Модификация белков с целью структурно-функциональных исследований. Введение метки по остаткам тирозина и лизина.

Билет 11.

1. Изучение областей контактов между биополимерами с помощью бифункциональных химических реагентов.
2. Химический синтез олигонуклеотидов. Блокирование и деблокирование аминогрупп гетероциклических оснований. Механизмы соответствующих процессов.

Билет 12.

1. Бифункциональные реагенты. Выбор спейсера, соединяющего реакционноспособные группы бифункционального реагента. Типы реакционноспособных групп. Использование при изучении надмолекулярных комплексов.
2. Химический синтез олигонуклеотидов. Приготовление нуклеозидного и нуклеотидного компонентов.

Билет 13.

1. Определение аминокислотной последовательности в белках.
2. Химический синтез олигонуклеотидов. Блокирование и деблокирование гидроксильных групп остатков пентозы. Основные способы введения и удаления защитных групп, механизмы соответствующих процессов.

Билет 14.

1. Химическая модификация функциональных групп аминокислот. Взаимодействие с нингидрином. Отличительные особенности первичной и вторичной аминогрупп. Механизм реакции. Взаимодействие нуклеофильных центров белков с реагентом Сэнгера. Модификация флуоресцирующими реагентами.
2. Способы активации фосфатной группы в нуклеотидах и олигонуклеотидах: реагенты окислительно-восстановительного типа, карбодиимидный метод. Механизмы соответствующих процессов.

Билет 15.

1. Молекулярная селекция нуклеиновых кислот.

2. Химический синтез пептидов. Защита имидазольного кольца гистидина.

Билет 16.

1. Антисмысловые нуклеиновые кислоты и олигонуклеотиды.

2. Химия коферментов нуклеотидной природы.

3.1. *Список основной и дополнительной литературы.*

Ю.А. Овчинников, "Биоорганическая химия", изд-во "Просвещение", М. 1987 г.

З.А. Шабарова, А.А. Богданов, "Химия нуклеиновых кислот и их компонентов", изд-во "Химия", М., 1978 г.

Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина, "Биологическая химия", изд-во "Высшая школа", М., 1992 г.

"Общая органическая химия" под ред. Н.К. Кочеткова, т. 10, изд-во "Химия", М. 1986.

"Практическая химия белков" под ред. А. Дарбе, изд-во "Мир", М. 1989.

"Органическая химия нуклеиновых кислот" под ред. Н.К. Кочеткова

Г. Дюга, К. Пенни "Биоорганическая химия", изд-во "Мир", М. 1983.

"Химия полипептидов" под ред. П. Катсояниса, изд-во "Мир", М. 1977.

"Пептиды. Основные методы образования пептидных связей" под ред. В.Т. Иванова, изд-во "Мир", М. 1983.