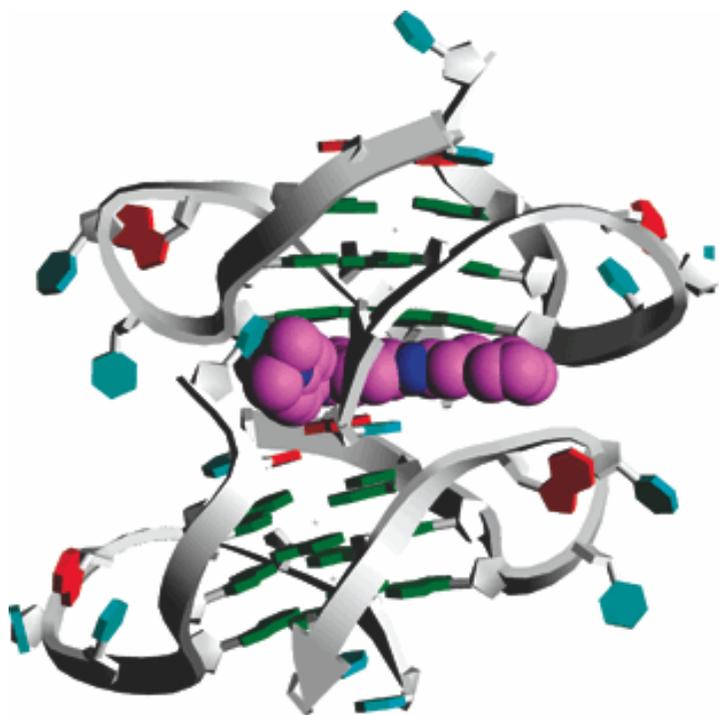


Синтез нуклеиновых кислот и белков

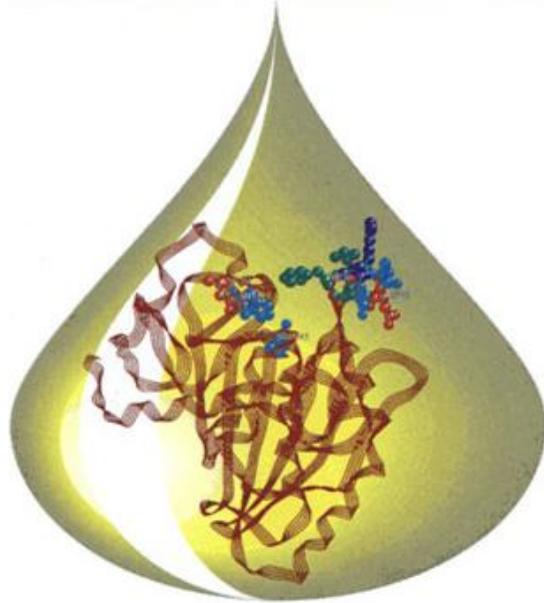


Лекция 1

План

- I. Строение нуклеиновых кислот.
Репликация (синтез ДНК).
- II. Репарация ошибок и повреждений ДНК.
Биосинтез РНК (транскрипция).
- III. Трансляция (биосинтез белка).
Ингибиторы матричных биосинтезов.
- IV. Регуляция биосинтеза белков.
Полиморфизм белков.
Образование белков иммунной системы.
- V. Наследственные болезни.
Использование ДНК-технологий в медицине.

Введение



Наибольшее биологическое значение в жизни клеток — в их обмене веществ — имеют **белки** и **нуклеиновые кислоты**. С этими веществами связаны все основные проявления жизни.

Нуклеиновые кислоты - сложные высокомолекулярные соединения, имеющиеся во всех клетках живых организмов и являющиеся материальными носителями наследственной информации, играющие ведущую роль не только в хранении, но и в передаче наследственной информации потомкам и реализации ее в ходе индивидуального развития каждого организма.

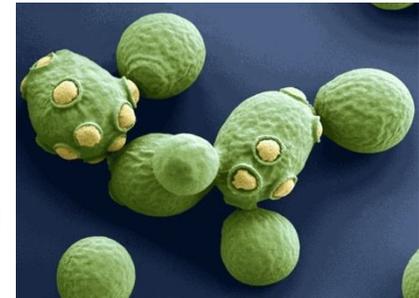
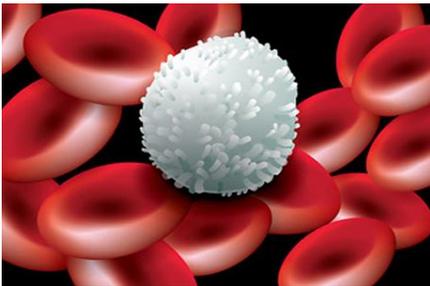


Фридрих Мишер

(13 августа 1844 —
26 августа 1895)

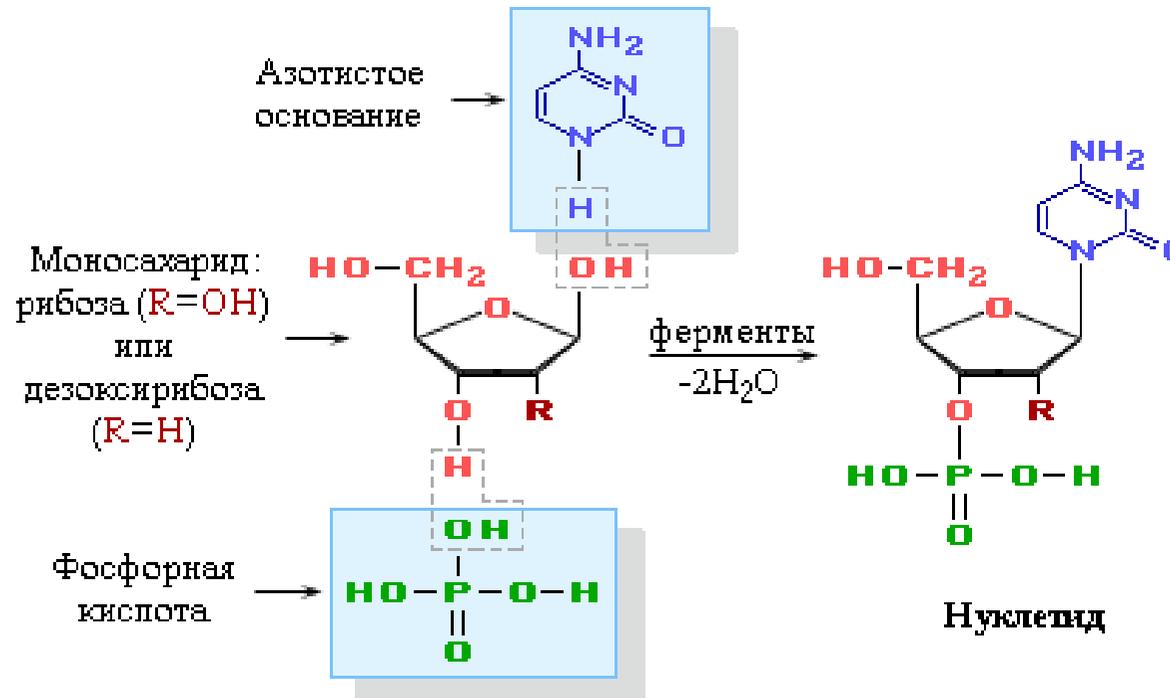
швейцарский физиолог,
гистолог и биолог

В 1869 году швейцарский исследователь Ф. Мишер впервые выделил из ядер лейкоцитов человека не известное ранее вещество. Он назвал это вещество нуклеином (от лат. «nucleus») ядро. Затем в лаборатории под руководством Мишера подобные вещества были выделены из эритроцитов птиц, рептилий, из дрожжей и ряда природных объектов. Позднее Ф. Мишер установил, что открытый им нуклеин представляет собой смесь нуклеиновых кислот. Так были открыты нуклеиновые кислоты и новая группа сложных белков – нуклеопротеины.

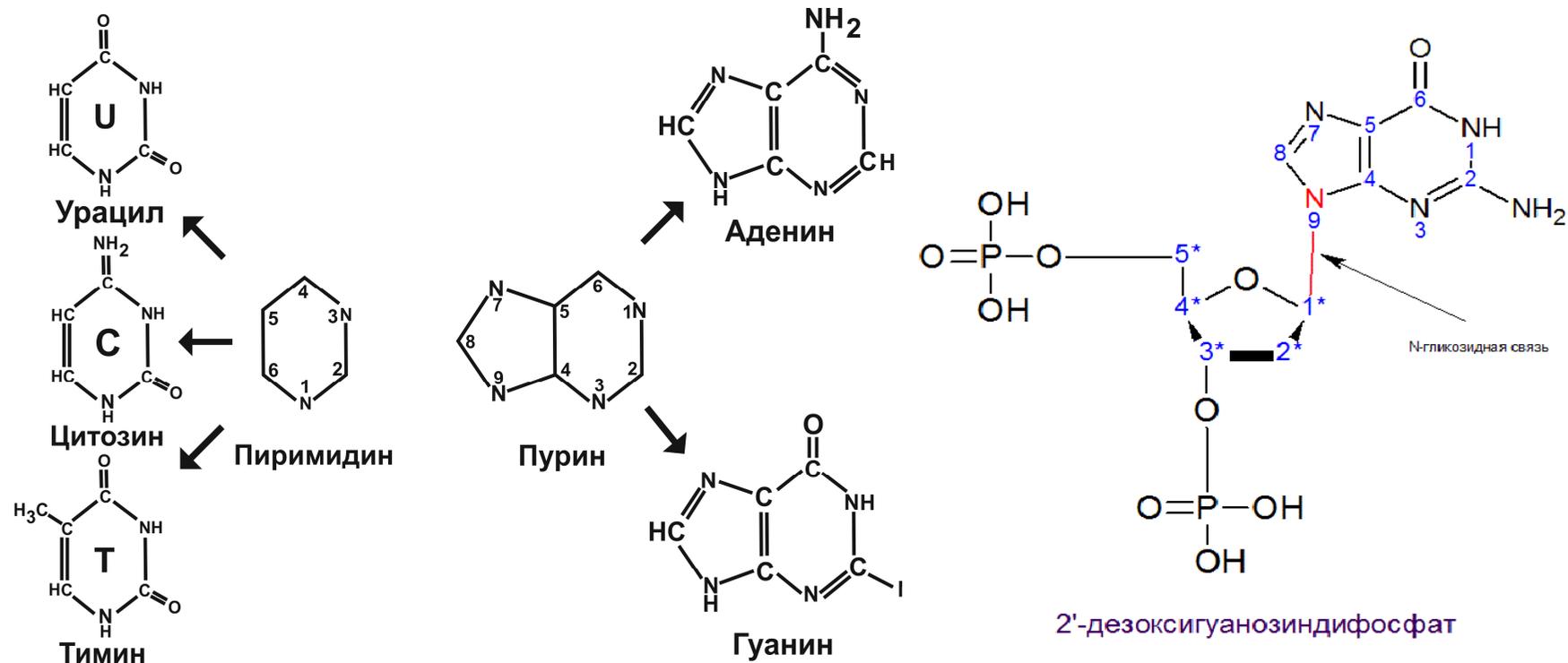


Строение нуклеиновых кислот

Строение и составные части нуклеотида



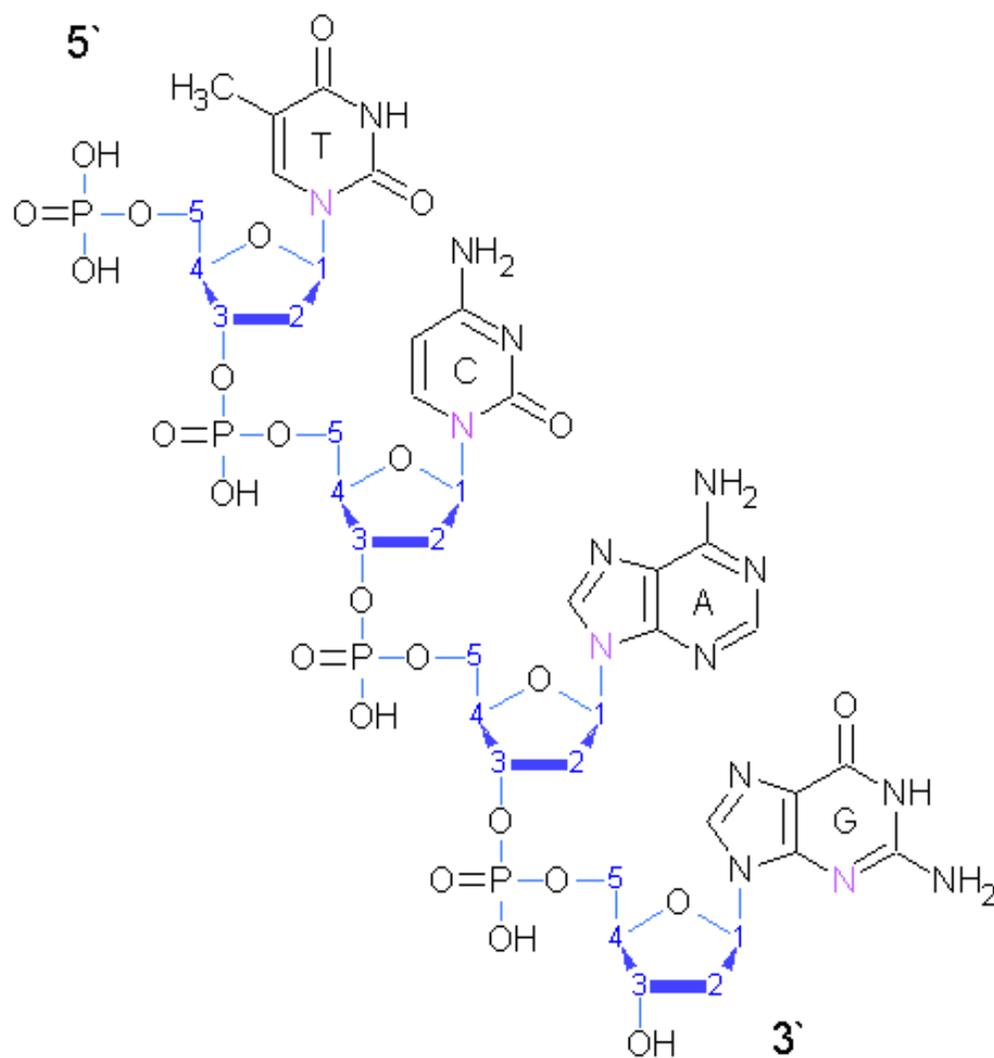
ДНК и **РНК** представляют собой линейные полимеры, построенные из нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из трех компонентов: **азотистого основания**, являющегося производным **пурина** или **пиримидина**, **пентозы** (рибозы или дезоксирибозы) и остатка **фосфорной кислоты**.



В состав нуклеиновых кислот входят два производных пурина: аденин и гуанин, и три производных пиримидина: цитозин, урацил (в РНК) и тимин (в ДНК).

Углеродный атом в первом положении пентозы связывается N-гликозидной связью с атомом азота в 1 положении пиримидина или 9 положении пурина. Образующие соединения называют нуклеозидами. Углеродные атомы пентоз в отличие от атомов азотистых оснований обозначают номерами со штрихами (1?, 2?, 3?, 4?, 5?). Присоединение фосфата в 5?-положении пентоз приводит к образованию нуклеотидов.

Первичная структура нуклеиновых кислот



Это порядок чередования нуклеотидов в полинуклеотидной цепи, связанных между собой 3', 5' - фосфодиэфирной связью. В результате образуются полимеры с фосфатным остатком на конце 5' - конце и свободной -ОН группой пентозы на конце.

Номенклатура основных азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов

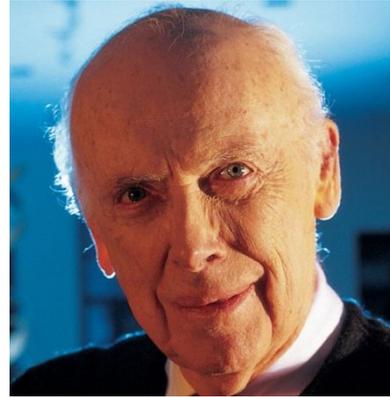
Азотистое основание	Нуклеозид (азотистое основание + пентоза)	Однобуквенный код	Мононуклеотид (нуклеозид+фосфат)	Обозначения нуклеотидов
ДНК: Аденин Гуанин Цитозин Тимин	Дезоксиаденозин Дезоксигуанозин Дезоксицитидин Тимидин	дА дГ дЦ Т	д-Аденозинмонофосфат д-Гуанозинмонофосфат д-Цитидинмонофосфат д-Тимидинмонофосфат	дАМФ дГМФ дЦМФ дТМФ
РНК: Аденин Гуанин Цитозин Урацил	Аденозин Гуанозин Цитидин Уридин	А Г Ц У	Аденозинмонофосфат Гуанозинмонофосфат Цитидинмонофосфат Уридинмонофосфат	АМФ ГМФ ЦМФ УМФ

Для краткого изображения последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах пользуются однобуквенным кодом. При этом запись осуществляется слева направо, так что первый нуклеотид имеет свободный 5'-фосфатный конец, а последний – ОН-группу в 3'-положении рибозы или дезоксирибозы.

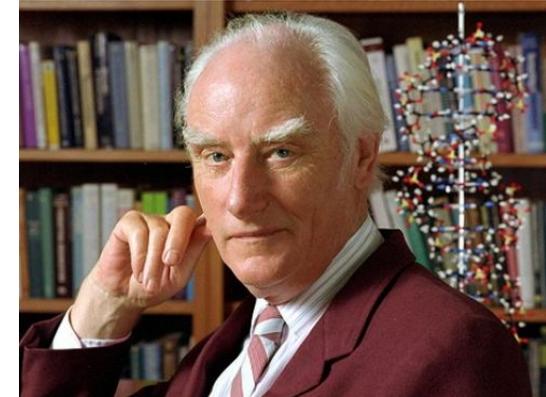
5'CGT AAG TTG ATA- 3'

Открытие пространственной структуры ДНК

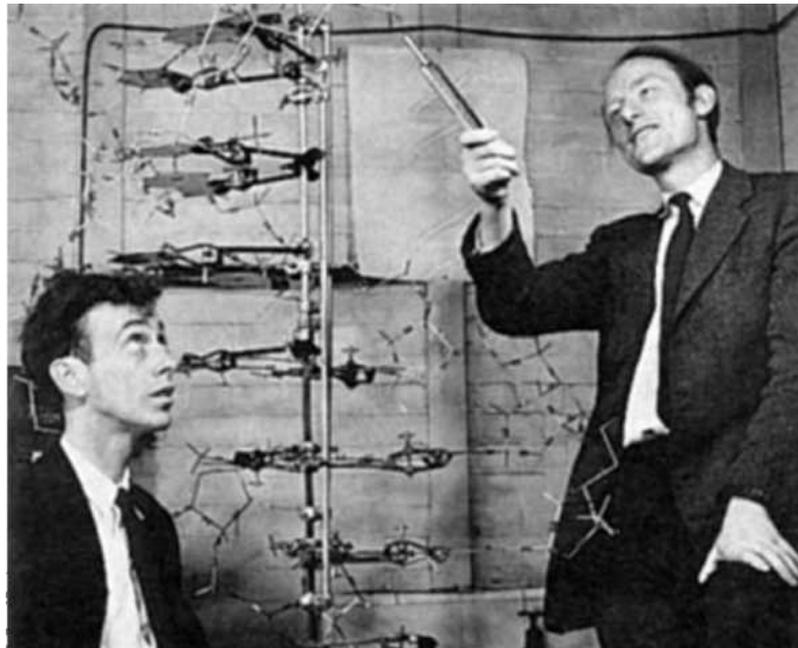
Структура двойной спирали ДНК была предложена американским биологом Фрэнсисом Криком и английским физиком Джеймсом Уотсоном в 1953 году



Джеймс Дьюи Уотсон
(6 апреля 1928 г.)



Фрэнсис Крик
(8 июня 1916 г. — 28 июля 2004 г.)



за открытие структуры молекулы ДНК совместно Ф. Крик, Д. Уотсон и М. Уилкинсон получили в 1962 году Нобелевскую премию по физиологии и медицине

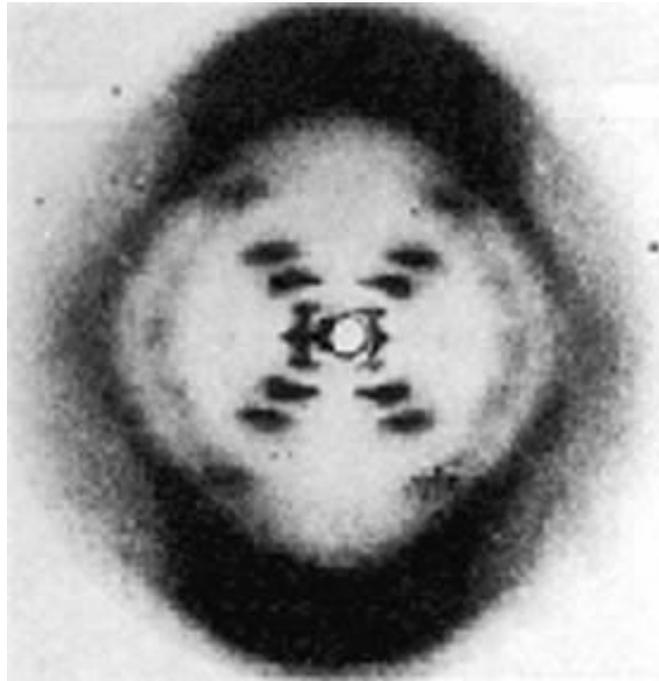
Данная модель была основана на следующих фактах:

- Данные химического анализа (ДНК полинуклеотид);
- работа Эрвина Чаргаффа о равном соотношении в ДНК аденина и тимина, цитозина и гуанина;
- Рентгенограмма ДНК, полученная Розалиндой Франклин и Морисом Уилкинсом.

Рентгенограмма ДНК



Розалинд Франклин
(25 июля 1920 — 16 апреля 1958)
— английский биофизик и
учёный-рентгенограф,
занималась изучением
структуры ДНК.



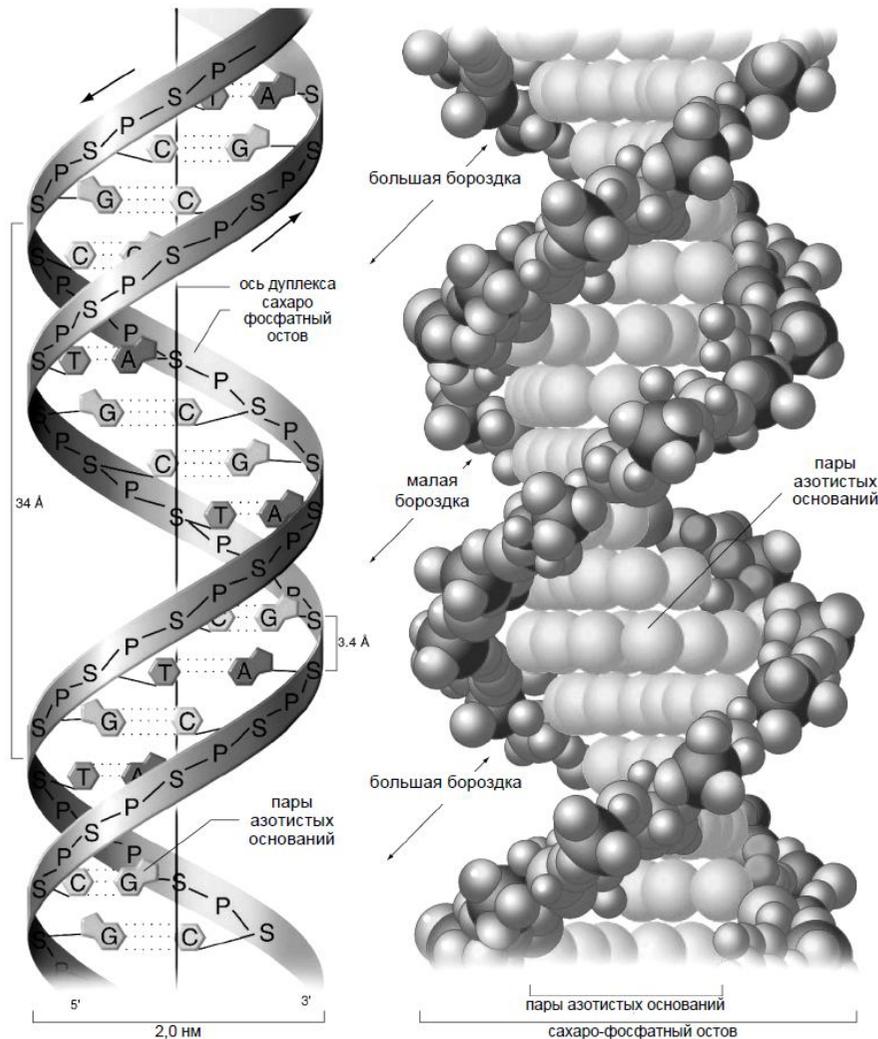
Рентгенограмма ДНК



**Морис Хьюг Фредерик
Уилкинс**
(15 декабря 1916 — 5
октября 2004) — биофизик

Рентгенограмма дала очень важную информацию для построения двойной спирали. Идеализированная дифракционная картина имеет вид креста из рефлексов (пятен), образующего из-за регулярности структуры ДНК. Расстояние между слоевыми линиями отвечает периоду 3,4 нм, т.е. шагу двойной спирали, а сильный рефлекс на 10-й слоевой линии – периоду 0,34 нм, т.е. расстоянию между парами оснований.

Пространственная структура ДНК



Пространственная модель В-формы ДНК
(цит. по Hartwell, et al., 2003)

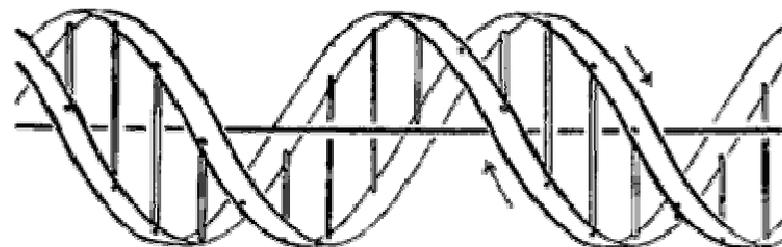
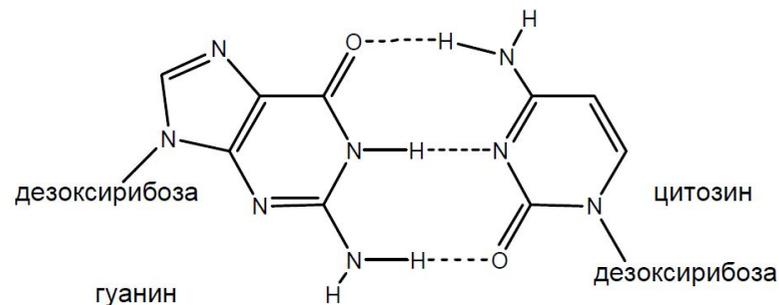
В соответствии с моделью, предложенной Дж. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 году, она представлена правозакрученной спиралью, в которой две полинуклеотидные цепи расположены антипараллельно и удерживаются относительно друг друга за счет взаимодействия между комплементарными азотистыми основаниями.

Комплементарность — способность азотистых оснований образовывать водородные связи между собой. Данная закономерность очень важна для репликации ДНК.

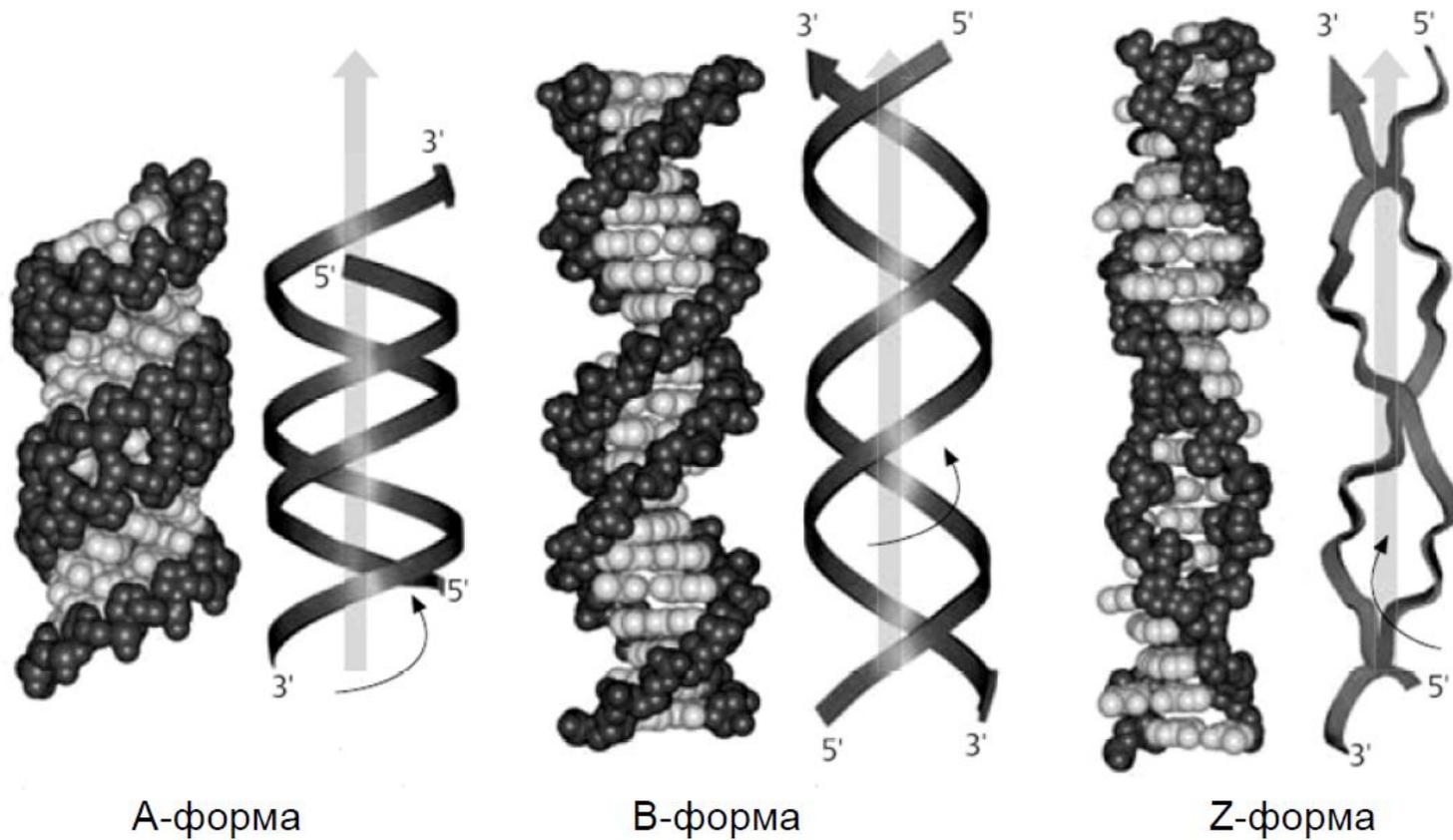
Комплементарные взаимодействия азотистых оснований

- Водородные связи между комплементарными парами азотистых оснований. Между аденином и тиминем могут образовываться две, а между гуанином и цитозином – три водородных связи. Комплементарные пары азотистых оснований одинаковы по размерам и форме, обращены внутрь молекулы ДНК и лежат в одной плоскости.

- Между основаниями в ДНК возникают гидрофобные взаимодействия, обеспечивающие стабилизацию структуры спирали.

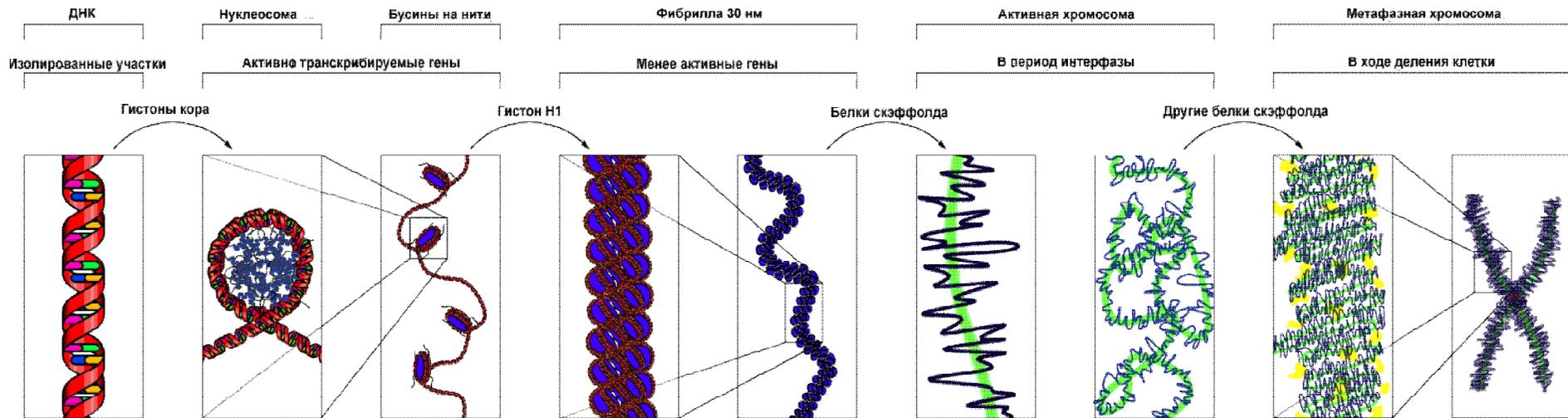


На основе данных анализа рентгенограмм установлено, что двойная спираль ДНК может существовать в виде нескольких форм: А-, В-, С- и Z-. Указанные формы ДНК различаются диаметром и шагом спирали, числом пар оснований в витке, углом наклона плоскости оснований по отношению к оси молекулы.

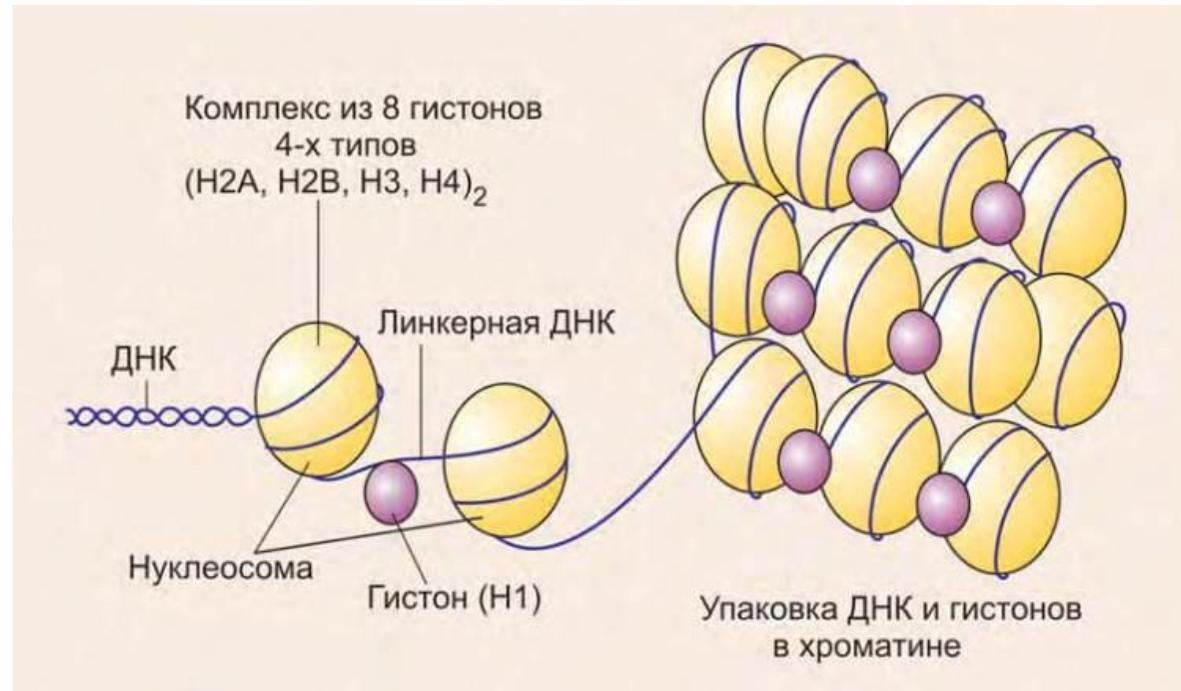


Формы ДНК (цит. по Koelman, 2005)

Третичная структура ДНК

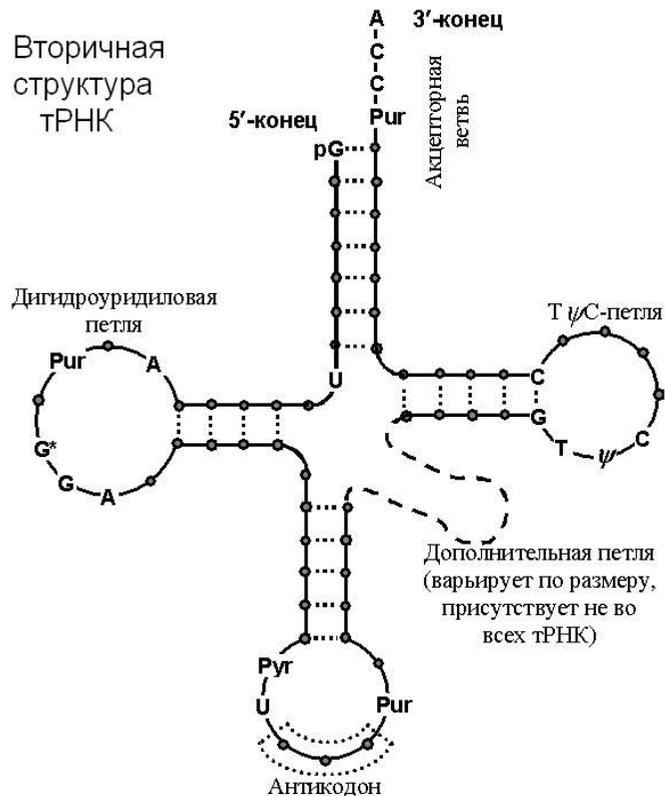


Третичная структура ДНК эукариот формируется в результате ее взаимодействия с белками. Каждая молекула линейной ДНК упакована в отдельную хромосому, в составе которой разнообразные белки связываются с отдельными участками ДНК и обеспечивают суперспирализацию и компактизацию молекулы. Общая длина ДНК гаплоидного набора из 23 хромосом человека составляет $\sim 3,5 \times 10^9$ пар нуклеотидов. Хромосомы образуют компактные структуры только в фазу деления. В период покоя комплексы ДНК с белками распределены равномерно по объему ядра, образуя **хроматин**. Белки хроматина включают две группы: **гистоны** и **негистоновые белки**.



В состав хроматина входят ДНК и **гистоны** — белки с высоким содержанием лизина и аргинина. Предполагают, что аминокислотные радикалы этих аминокислот взаимодействуют с кислотными группами ДНК. Цепи ДНК обвивают кор, состоящий из 8 гистонов, образуя четковидную структуру **нуклеосом**, которые связаны между собой линкерной цепочкой ДНК. В дальнейшем эти нуклеосомы упаковываются в крупные хроматиновые структуры, благодаря чему достигается компактная их укладка в хромосомах

Пространственная структура РНК



На рисунке приведена структура тРНК, у которой спирализованные участки определяют специфическую пространственную конформацию — фигуру клеверного листа. тРНК имеет на 3'-конце ЦЦА для связывания аминокислоты, а в средней части молекулы — антикодоновый участок — последовательность нуклеотидов, обеспечивающую взаимодействие тРНК с кодоном мРНК.

Вторичная структура РНК несколько иная. Молекула РНК состоит из одной полинуклеотидной цепи. Отдельные участки этой цепи (до 20—30 нуклеотидных пар) могут быть комплементарны между собой и образуют спиральную структуру за счет связей между аденином и урацилом (пара **А—У**) и гуанином и цитозином (пара **Ц—Г**). Между спирализованными участками располагаются одноцепочечные петли.

Третичная структура РНК образуется за счет дополнительных водородных связей между нуклеотидами, полинуклеотидной цепью и белками, обеспечивает дополнительную компактизацию и стабилизацию.

Основные виды РНК

Матричная РНК (мРНК)

Содержание мРНК в клетках составляет 2-6% от общего количества РНК. Так как каждая молекула мРНК является матрицей в синтезе соответствующего белка их количество соответствует числу белков в организме. мРНК разнообразны по первичной структуре и являются точной копией отдельного гена. Размер молекулы зависит от размера кодируемого ею белка. мРНК обладают сложной вторичной структурой, обеспечивающей выполнение ими матричной функции в ходе трансляции. Показано, что в целом в линейной молекуле мРНК формируется несколько двухспиральных шпилек, на концах которых располагаются «сайты» инициации и терминации трансляции.

Основные виды РНК

Транспортная РНК (тРНК)

Составляет 10-20% от общего количества РНК клетки. тРНК участвуют в синтезе белка, являясь посредниками (адапторами) в трансляции мРНК: переводят последовательность нуклеотидов мРНК в последовательность аминокислотных остатков белковой молекулы. Каждой из 20 аминокислот соответствует своя тРНК, а для некоторых аминокислот существует несколько тРНК. Это самые мелкие молекулы РНК, построенные из 70-93 нуклеотидов с молекулярной массой 24000-31000 Да. тРНК содержат различные минорные модифицированные основания, многие из которых представляют собой метилированные пуриновые или пиримидиновые основания. Обязательными минорными нуклеотидами для всех тРНК являются псевдоуридин и нуклеотиды, содержащие дигидроуридин. У большинства тРНК на 5'-конце находится остаток гуаниловой кислоты, а на 3'-конце всех тРНК обязательным является тринуклеотид-ЦЦА.

Основные виды РНК

Рибосомные РНК (рРНК)

Составляют около 80% всей РНК клетки и входят в состав рибосом. рРНК выполняет структурную и ферментативную функции, обеспечивают правильное взаимодействие рибосом с мРНК и тРНК. Рибосомы состоят из двух субъединиц: большой и малой. По размерам и молекулярной массе рибосомы делят на 3 группы: 70S рибосомы прокариот, состоящие из малой 30S и большой 50S субъединиц; 80S рибосомы эукариот, состоящие из 40S малой и 60S большой субъединиц; и рибосомы митохондрий и хлоропластов, которые в общем относят к классу 70S, однако они различаются по коэффициентам седиментации у разных групп эукариот. Малая субъединица 80S рибосом образована одной молекулой рРНК (18S около 1900 нуклеотидов) и 33 молекулами различных белков. Большая субъединица образована тремя молекулами рРНК (5S, 5,8S и 28S более 5000 нуклеотидов) и примерно 50 белками. Прокариотические рибосомы и рибосомы митохондрий и пластид содержат меньше компонентов, но структурно и функционально очень сходны с эукариотическими: малая субъединица состоит из 16S рРНК (более 1500 нуклеотидов) и 21 белка, а большая субъединица из двух молекул рРНК (5S, 23S около 3000 нуклеотидов) и 34 белков

Основные виды РНК

Информационная РНК, матричная (и- РНК) несёт информацию о первичной структуре белка из ядра в цитоплазму, состоит из 300-30000 нуклеотидов, занимает 5% от общего количества РНК в клетке

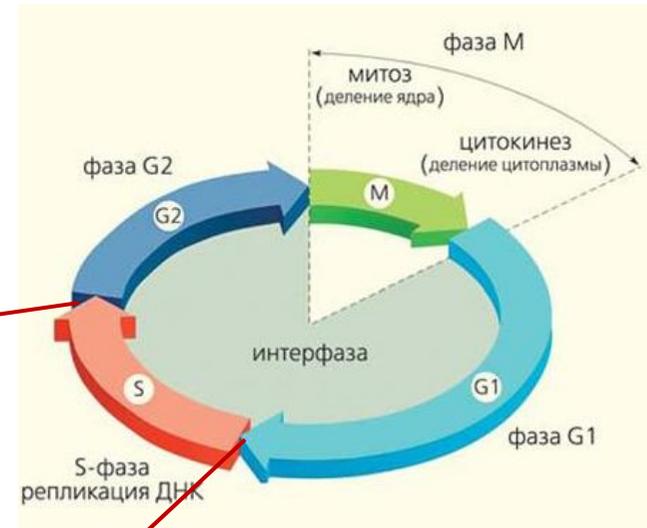
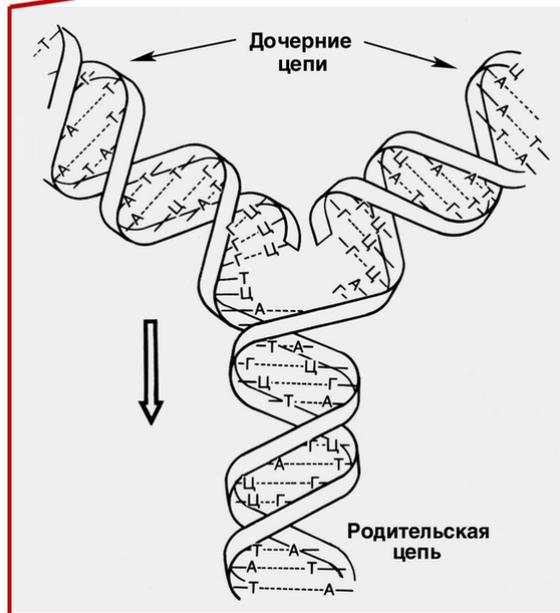
Транспортная РНК (т- РНК) переносит аминокислоты к рибосомам при биосинтезе белка, состоит из 76-85 нуклеотидов, занимает 10% в клетке

Рибосомная РНК (р- РНК) определяет структуру рибосом, состоит из 3000-5000 нуклеотидов, занимает большую часть РНК в клетке- 80-85%

Репликация (синтез ДНК)

Репликация – это процесс самоудвоения ДНК

Синтез ДНК протекает в ядре в S-фазу клеточного цикла и предшествует делению клетки.



Синтез ДНК происходит одновременно на обеих цепях ДНК. В основе – принцип **комплементарности**. Процесс является полуконсервативным, так как по завершении репликации каждая дочерняя молекула ДНК содержит одну родительскую и одну вновь синтезированную цепь.

Репликация (синтез ДНК)

Для реализации репликации необходимы: матрица – расплетенная цепь ДНК, субстраты, участвующие в полимеризации ДНК (нуклеозидтрифосфаты), ферменты, катализирующие этот процесс, ионы Mg^{2+} (кофактор), а также белковые факторы, обеспечивающие деспирализацию двухнитевой ДНК.

Клетка эукариот содержит несколько ДНК-полимераз
(необходимых для процесса синтеза ДНК):

1 - Обладающие только полимеразной активностью:

ДНК-полимераза α – находится в ядре, основной фермент репликации;

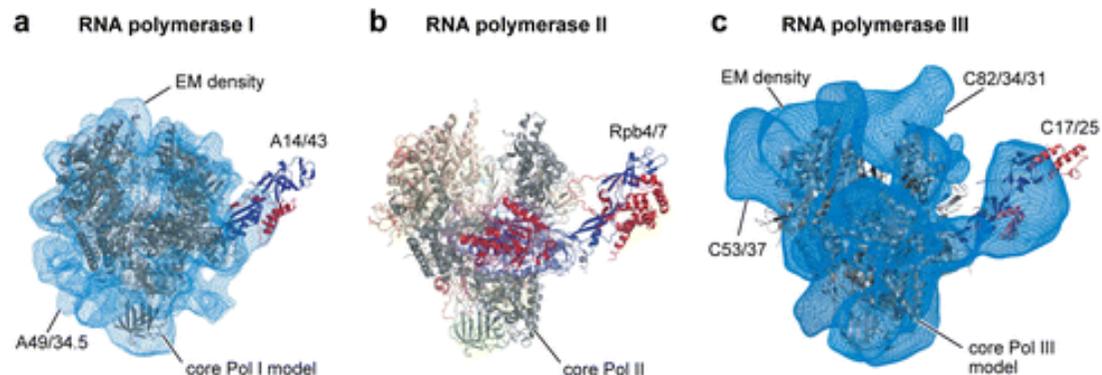
ДНК-полимераза β - локализована в ядре, является репарирующей ДНК-полимеразой;

ДНК-полимераза γ - осуществляет репликацию ДНК в митохондриях и хлоропластах;

2 - Обладающие полимеразной и 3'→5'-экзонуклеазной активностями:

ДНК-полимераза δ - принимает участие в репликации отстающей цепи;

ДНК-полимераза ϵ - принимает участие в синтезе лидирующей цепи ДНК.

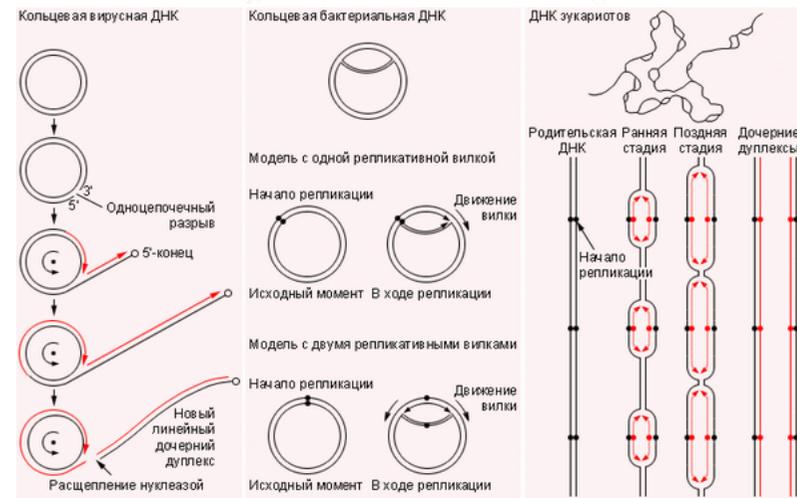
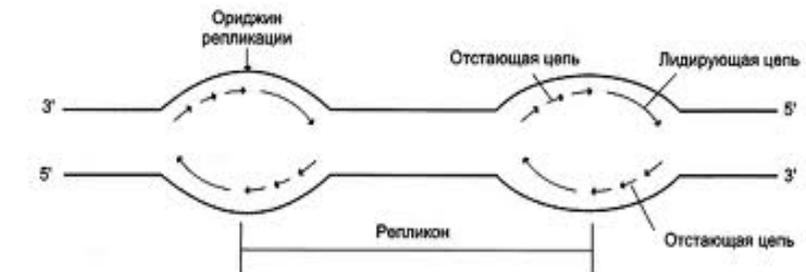


Точка начала репликации

Инициация репликации ДНК в клетках эукариот регулируется на уровне кластера репликонов, причем число репликонов в кластере изменяется от нескольких единиц до нескольких десятков.

Репликон – единица генома, в которой содержатся точка начала репликации (origin) – точка *ori* – последовательность ДНК, в которой иницируется процесс удвоения ДНК, и точка окончания репликации (terminus) – сегмент ДНК, в котором процесс удвоения ДНК останавливается.

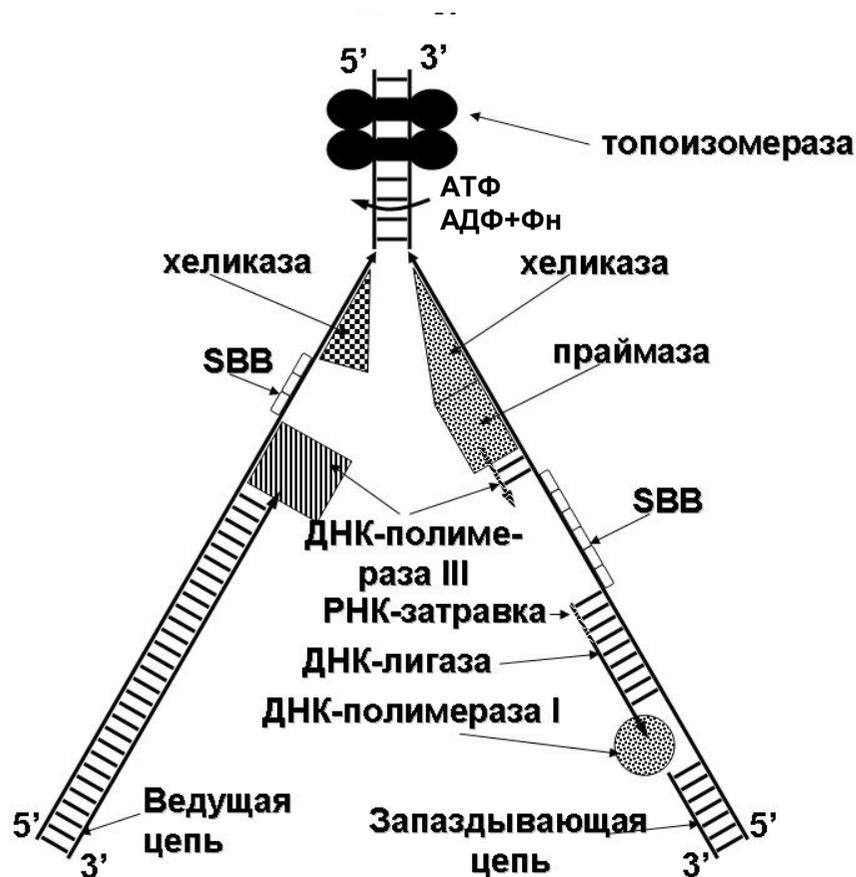
Репликативная вилка – область репликации ДНК, перемещающаяся от *ori* вдоль родительской ДНК, которая расплетается и служит матрицей для синтеза дочерней ДНК.



Механизмы репликации одинаковы для прокариот и эукариот.

Процесс синтеза ДНК включает стадии: **инициации**, **элонгации** и **терминации**.

Инициация репликации



Репликация начинается с расплетения двойной спирали ДНК и образования **репликативной вилки**. Это осуществляется при помощи ферментов **хеликаз**, которые перемещаются вдоль цепей ДНК и раскручивают их. Процесс расплетения двойной спирали ДНК является энергозависимым и требует затраты АТФ. Далее SSB-белки (single strand binding) специфично связываются с одноцепочечной ДНК и препятствуют образованию двойных спиралей (ренатурации ДНК) и шпилечных структур.

Праймаза комплементарно из **рибонуклеозидтрифосфатов** синтезирует на матрице **ДНК праймер**, или РНК-затравку – короткий фрагмент РНК (10-12 нуклеотидов), 3'-ОН-конец которого используется для дальнейшего синтеза ДНК ключевым ферментом репликации ДНК у прокариот - ДНК-полимеразой III.

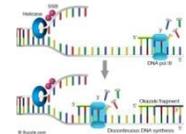
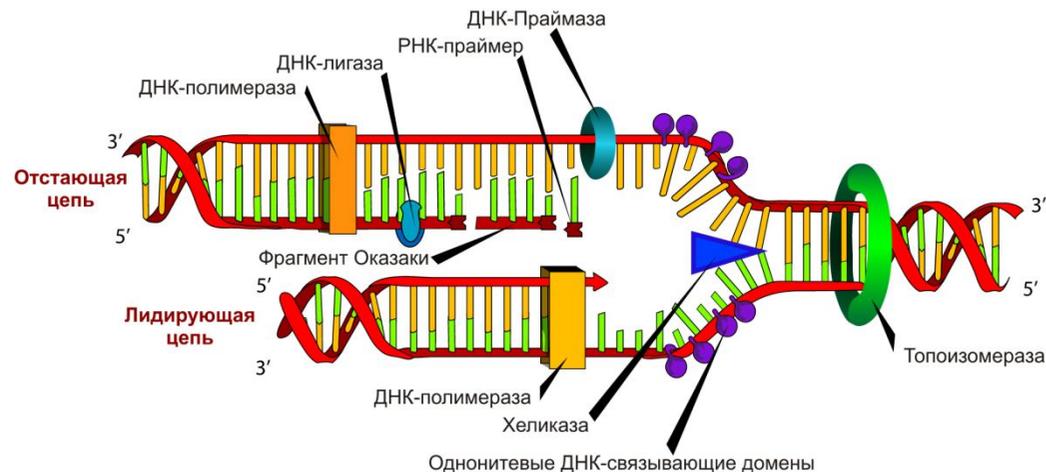
Элонгация репликации

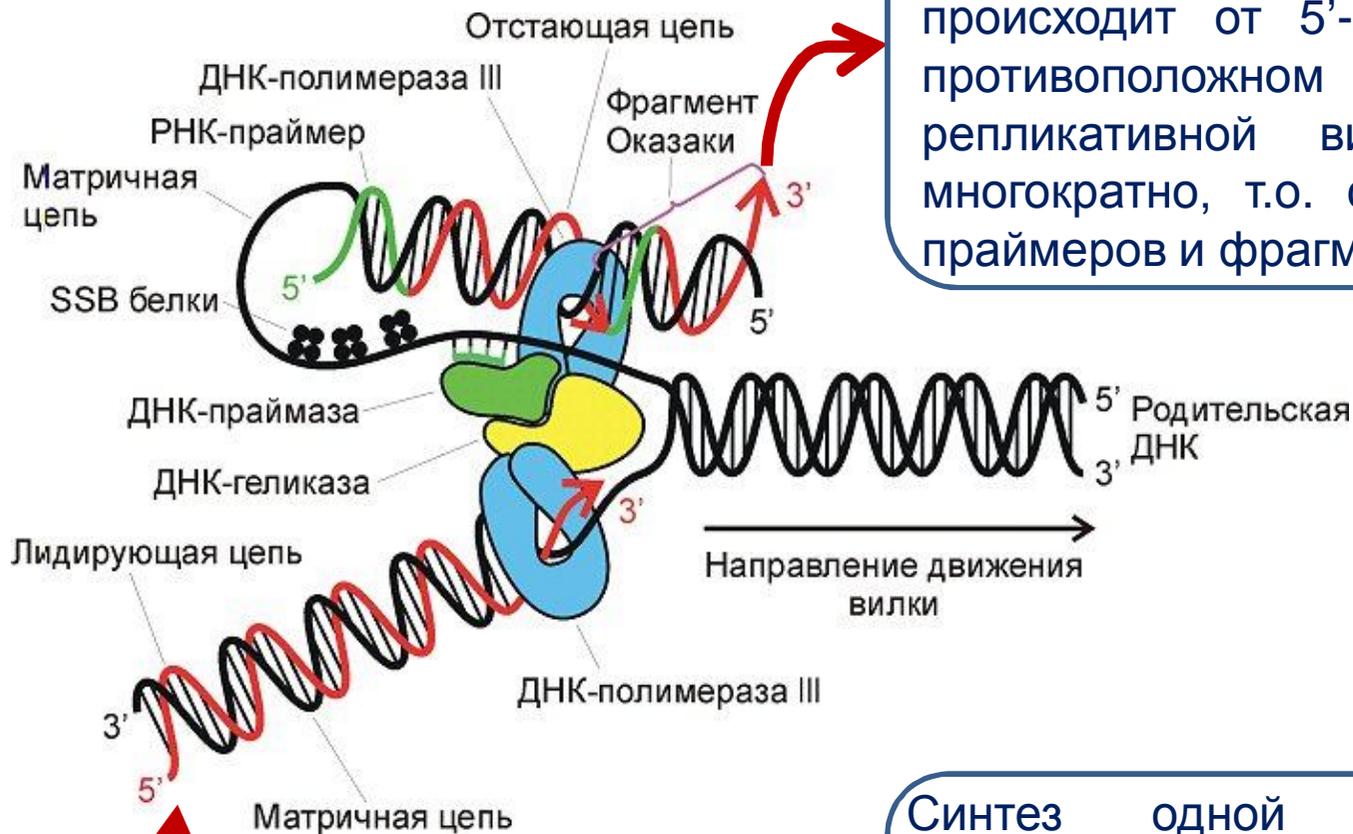
Субстратами для синтеза дочерних цепей являются четыре **дезоксинуклеозидтрифосфата** (дНТФ): дАТФ, дТТФ, дЦТФ, дГТФ. С 3'-ОН-конца праймера ДНК-полимераза III начинает синтезировать новую цепь ДНК присоединением каждого последующего дНТФ только к 3'-ОН-концу имеющейся цепи с выделением пирофосфата.

Синтез дочерних цепей ДНК идет в направлении 5'→3' одновременно на обеих цепях матрицы ДНК. Однако, так как цепи ДНК антипараллельны, а ДНК-полимеразы синтезируют ДНК присоединением каждого последующего нуклеотида только к 3'-концу имеющейся цепи, в 1960-х гг. Рейжи Оказаки экспериментально доказал, что синтез одной цепи ДНК происходит фрагментарно, прерывисто. Эти фрагменты были названы фрагментами **Оказаки**.



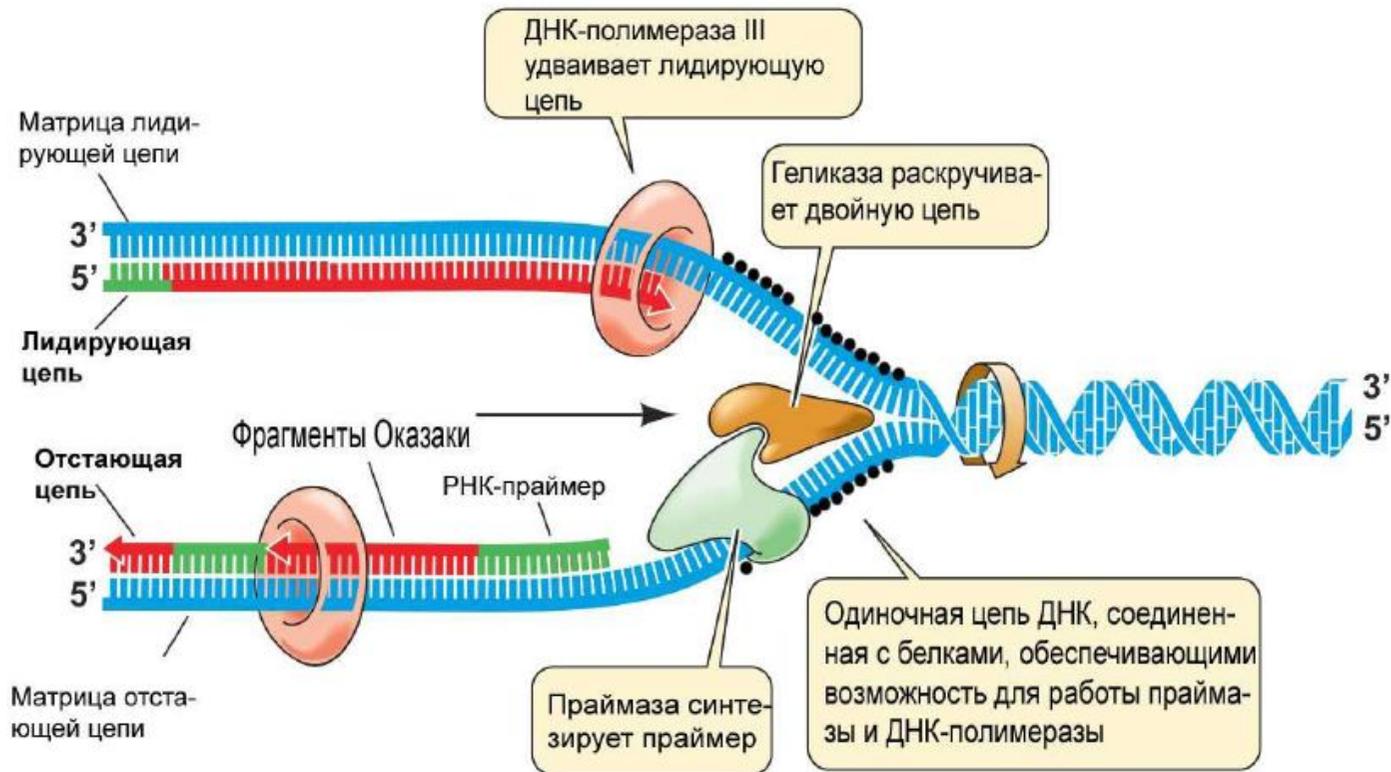
Рейджи Оказаки



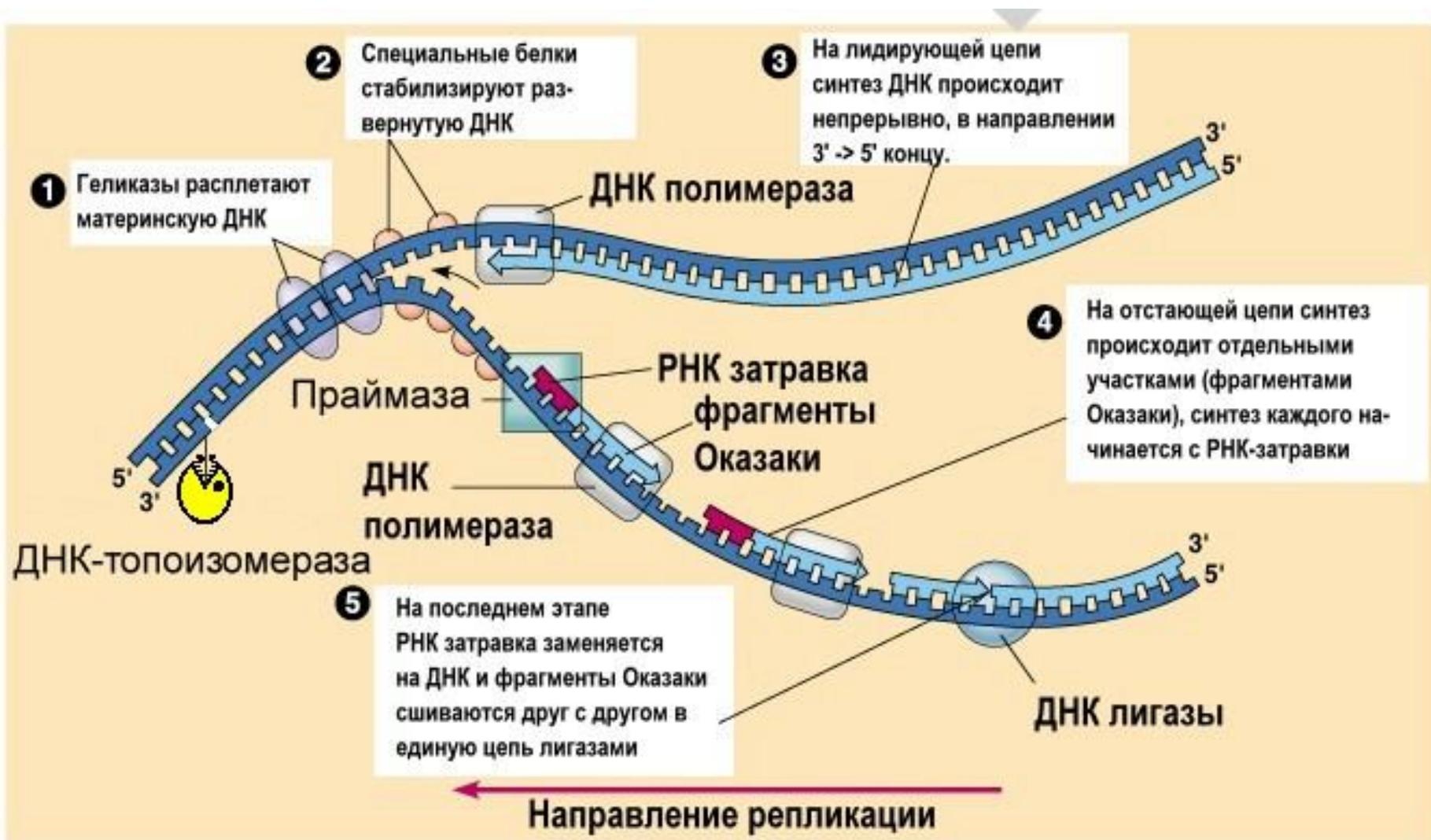


Синтез второй цепи ДНК, которая называется **отстающей**, также происходит от 5'- к 3'- концу, но в противоположном направлении репликативной вилки, инициируется многократно, т.о. синтезируется много праймеров и фрагментов **Оказаки**

Синтез одной цепи происходит непрерывно от 5'- к 3'-концу в направлении движения репликативной вилки и необходим только 1 акт инициации и один праймер. Эта цепь называется **лидирующей**



ДНК-полимераза III синтезирует цепь ДНК до следующей затравки. Далее ДНК-полимераза I удаляет праймер с 5'-конца и одновременно замещая рибонуклеотиды дезоксирибонуклеотидами, а ДНК-лигаза сшивает фрагменты Оказаки в непрерывную цепь. При включении неправильного нуклеотида ДНК-полимеразы I и III удаляют ошибочный нуклеотид с 3'-конца, гидролизуя фосфодиэфирную связь. В результате образуются дочерние цепи, комплементарные и антипараллельные цепям материнской ДНК.



1 Геликазы расплетают материнскую ДНК

2 Специальные белки стабилизируют развернутую ДНК

3 На лидирующей цепи синтез ДНК происходит непрерывно, в направлении 3' → 5' концу.

4 На отстающей цепи синтез происходит отдельными участками (фрагментами Оказаки), синтез каждого начинается с РНК-затравки

5 На последнем этапе РНК затравка заменяется на ДНК и фрагменты Оказаки сшиваются друг с другом в единую цепь лигазами

← Направление репликации

5'
3'

3'
5'

3'
5'

ДНК полимеразы

РНК затравка
фрагменты Оказаки

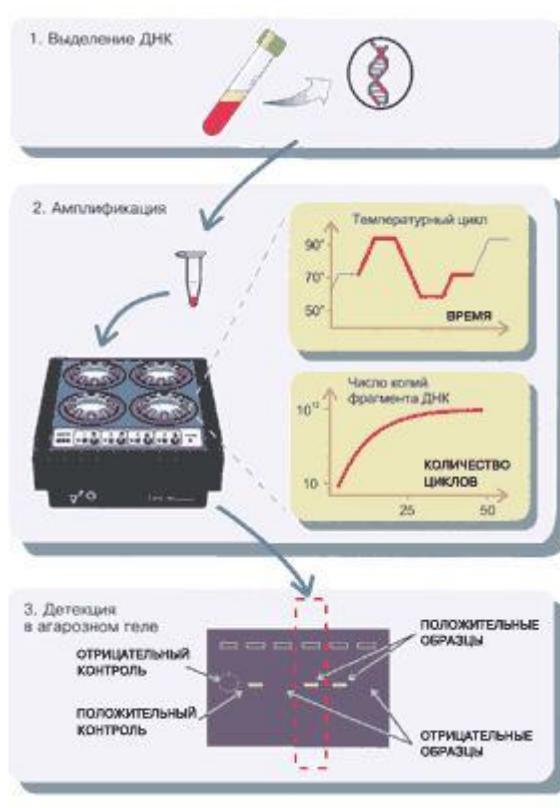
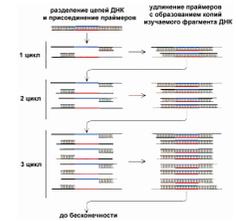
Праймаза

ДНК полимеразы

ДНК лигазы

ДНК-топоизомераза

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)



Впервые была осуществлена в 1985 г на фирме Cetus. ПЦР – осуществляемая *in vitro* – специфическая амплификация нуклеиновой кислоты, инициируемая синтетическими праймерами. Цикл состоит из температурной денатурации ДНК, её отжига с праймером и элонгации. Смена этих этапов происходит в результате изменения температуры. В ПЦР используют термостабильную ДНК-полимеразу *Taq (Thermus aquaticus)*.

