

Лекция №5

Молекулярные основы живых систем. Нуклеиновые кислоты, классификация, строение, свойства.

Биомакромолекула – это гигантская молекула полимера (биополимера), построенная из многих повторяющихся единиц – мономеров. Существует три типа биомакромолекул: белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды. Мономерами для них служат, соответственно, аминокислоты, нуклеотиды и моносахариды. Молекулы нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) являются носителями генетической информации, без которой невозможно существование и размножение живых клеток. Белки выступают в роли действующего начала молекул ферментов, которые катализируют разнообразные химические реакции в клетке. ДНК, РНК, белки образуют систему биомакромолекул, ответственных за генетическую информацию и выполняющих над ней различные операции: копирование, хранение, изменение, считывание, исполнение.

Нуклеиновые кислоты были впервые выделены Ф.Мишером в 1869 году из ядер клеток гноя в виде соединения с белком – нуклеина (от лат. *nucleus* – ядро); термин «нуклеиновые кислоты» предложен А.Косселем в 1889 г. К концу XIX века нуклеиновые кислоты были получены Р.Альтманом в свободном от белка состоянии из животных тканей и дрожжей, а в 1936 г. А.Н.Белозерским и сотрудниками были получены нуклеиновые кислоты из растительных тканей.

1. Нуклеопротеины

Нуклеопротеины – сложные белки, которые состоят из белковой части и небелковой части – простетической группы, которая представлена *нуклеиновыми кислотами*. Существует 2 типа нуклеопротеинов, которые отличаются по *составу, размеру и физико-химическим* свойствам: *дезоксирибонуклеопротеины* (простетическая группа ДНК) и *рибонуклеопротеины* (простетическая группа РНК). Дезоксирибонуклеопротеины преимущественно локализованы в ядре клеток и в митохондриях. Рибонуклеопротеины – в цитоплазме, ядре и ядрышках.

Функция ДНК состоит в хранении генетической информации, РНК – передаче наследственной информации.

Белковая часть нуклеопротеинов представлена *гистонами* и *негистоновыми* белками. Различают 5 классов гистонов (Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4), которые различаются по размерам, аминокислотному составу и заряду. Гистоновые белки имеют положительный заряд, который обусловлен наличием положительно заряженных аминокислот – аргинина и лизина. Негистоновые белки представлены сложными белками-ферментами, а также регуляторными белками и являются кислыми, т.е. имеют отрицательный заряд.

2. Виды и функции ДНК

Основные функции ДНК по А. Ленинджеру: 1) хранение запаса генетической информации, необходимой для кодирования структуры всех белков и всех РНК каждого вида организма; 2) регуляция во времени и пространстве биосинтеза компонентов клеток и тканей; 3) определение деятельности организма в течение его жизненного цикла; 4) обеспечение индивидуальности данного организма.

Различают следующие основные виды ДНК: 1) ядерные (хромосомные) ДНК; 2) ДНК плазмид; 3) ДНК хлоропластов; 4) ДНК митохондрий; 5) ДНК вирусов.

Ядерная ДНК локализована в ядре эукариотической клетки. Аналогом ядерной ДНК у бактерий служит *генофор*, или *нуклеоид*, который представляет собой кольцевидно замкнутую ДНК, не отделенную от цитоплазмы мембраной. Нередко

генофор называют *бактериальной хромосомой*.

Молекулы ядерных ДНК содержат основной объем информации обо всех наследственных признаках организма. Их функция – хранение этой информации, обеспечение ее экспрессии и рекомбинации, а также воспроизводство при делении клетки и передача последующим поколениям организма.

Нуклеотиды в нуклеиновых кислотах связаны 3',5'-фосфодиэфирной связью, которая возникает между 3'-ОН группой углевода одного нуклеотида и 5'-ОН группой углевода другого нуклеотида (рис. 1)..

РНК – одноцепочечная молекула. Однако при наличии в цепи РНК участков с комплементарной последовательностью единичная цепь РНК способна сворачиваться с образованием так называемых «шпилек», структур, имеющих двуспиральные характеристики

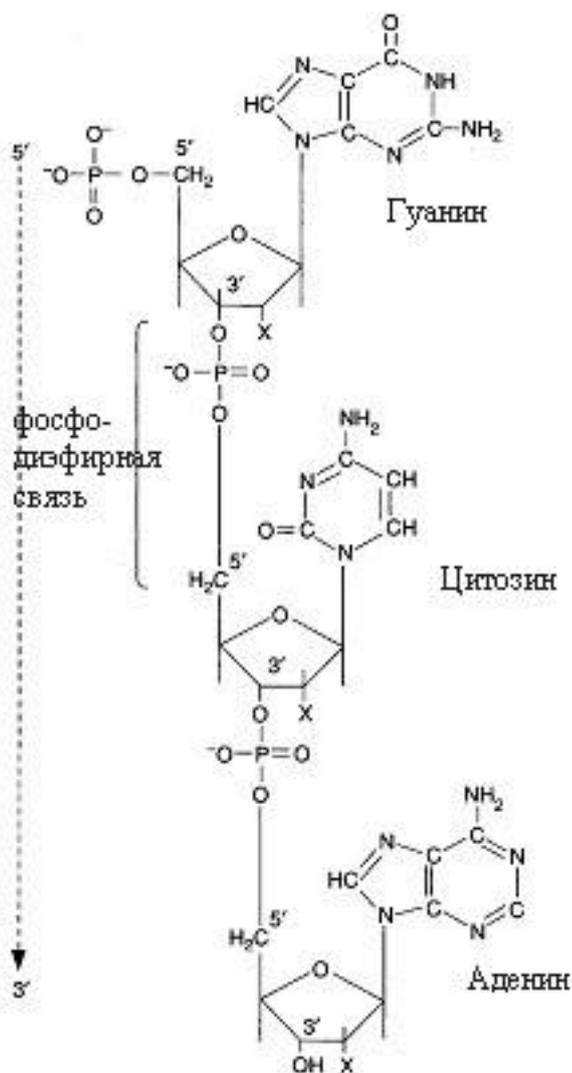


Рис. 1. Первичная структура нуклеиновых кислот

Для понимания ряда особенностей вторичной структуры ДНК важное значение имеют закономерности количественного содержания азотистых оснований, установленные впервые Э.Чаргаффом в 1949 году и названные правилами Чаргаффа:

1. Количество пуриновых оснований равно количеству пиримидиновых оснований

$$A + G = Ц + Т \text{ или } \frac{A + G}{Ц + Т} = 1$$

2. Количество аденина и цитозина равно количеству гуанина и тимина:

$$A + Ц = Г + Т \text{ или } \frac{A + Ц}{Г + Т} = 1$$

3. Количество аденина равно количеству тимина, а количество гуанина равно количеству цитозина:

$$A = Т \text{ и } Г = Ц; \text{ соответственно } \frac{A}{Т} = 1; \frac{Г}{Ц} = 1$$

4. Коэффициент специфичности, который отражает $\frac{Г + Ц}{A + Т}$; для эукариот этот коэффициент ниже единицы (0,54 – 0,94), для прокариот – выше единицы.

В соответствии с моделью Дж. Уотсона и Ф. Крика, предложенной в 1953 г. на основании ряда аналитических данных, а также рентгеноструктурного анализа, молекула ДНК состоит из 2-х цепей, образуя *правовращающую спираль*, в которой обе полинуклеотидные цепи закручены вокруг одной и той же оси. Удерживаются полинуклеотидные цепи *водородными* связями, образующимися между комплементарными азотистыми основаниями: между *A* и *T* – две *водородные* связи, *Ц* и *Г* – три *водородные* связи.

Азотистые основания расположены внутри спирали, а фосфорные остатки и углеводные компоненты – снаружи. Кроме водородных связей в стабилизации молекулы ДНК принимают участие силы *гидрофобного* («стэкинг») взаимодействия, образующегося между плоскостями оснований внутри двойной спирали ДНК (рис. 2).

Обе цепи в молекуле ДНК имеют *противоположную полярность* (антипараллельны). Это означает, что одна цепь имеет направление $5' \rightarrow 3'$, а другая $3' \rightarrow 5'$. Подобная направленность цепей играет важную биологическую роль при репликации и транскрипции молекулы ДНК.



Рис.2. Двойная спираль ДНК

Конфигурация двойной спирали ДНК меняется в зависимости от количественного содержания в ней воды и ионной силы окружающей среды. В настоящее время известно шесть форм ДНК (от А до Е и Z-форма). При физиологических условиях доминирующим структурным типом ДНК является *B-форма*. Расстояние между витками спирали (или шаг спирали) равно *3,4 нм*. На этом

участке укладывается 10 нуклеотидных остатков, размер одного нуклеотида составляет 0,34 нм, диаметр биспиральной молекулы 1,8 нм. В молекуле ДНК встречаются последовательности, которые называются *палиндромами*. Палиндром – это слово, фраза или предложение, которые читаются одинаково слева направо и справа налево. Например, «ротатор», «я иду с мечем судия». Этот термин используется к области ДНК с обратимой последовательностью нуклеотидов, имеющих двойную симметрию внутри двухцепочечной ДНК. Такие последовательности комплементарны сами себе внутри каждой цепи и поэтому в этих местах могут образовываться шпильки или крестообразные структуры.

Среди разнообразных конформаций ДНК различают линейную ДНК и кольцевидно замкнутую ДНК. Кольцевидная структура ДНК характерна для бактерий и некоторых вирусов.

Третичная структура ДНК: ДНК в клетке имеет длину 1,74 м, поэтому понятно, что в ядре происходит упаковка ДНК. Третичная структура ДНК прокариот может образовываться в результате дополнительного скручивания в пространстве двуспиральной молекулы с образованием *суперспирали* или *суперкольца*.

У высших организмов ДНК находится в *хромосомах*, которые при митозе видны в световой микроскоп. В каждой хромосоме находится молекула ДНК, которая составляет основу хроматина. *Хроматин* – комплекс ДНК с РНК и белками (ДНК 30-45%, гистоны 30-50%, негистоновые белки 4-30%, РНК до 10%). Структурная организация хроматина такова, что позволяет использовать одну и ту же генетическую информацию ДНК по-разному в специализированных клетках. При этом основная часть хроматина не активна. Активный хроматин составляет в разных клетках от 2 до 11%. Различают несколько уровней укладки (компактизации) ДНК.

1. *Нуклеосомы*. В электронном микроскопе изображение хроматина напоминает бусы: шаровидные утолщения размером около 10 нм, разделенные перемычками. Каждая нуклеосома содержит отрезок двуспиральной ДНК, равный по протяженности примерно 145-150 парам оснований, обернутый в 1,5 оборота вокруг ядра, состоящего из гистонов (2 H2A, 2 H2B, 2 H3 и 2 H4). Свободные от контакта с белками участки ДНК называют линкерными (или связующими). Их длина варьирует в зависимости от типа клеток (от 15 до 100 нм). Линкерные участки ДНК либо свободны, либо контактируют с гистонами H1. Степень компактизации в 5 раз. Примерно 90% ДНК входит в состав нуклеосом, 10% содержится в перемычках между нуклеосомами. Считают, что нуклеосомы содержат фрагменты «молчащего» хроматина, а перемычки – активного. При разворачивании весь хроматин активный.

Межнуклеосомный разрыв ДНК - способ запрограммированной гибели клеток – апоптоз.

Из нуклеосом образуются фибриллы (рис. 3).

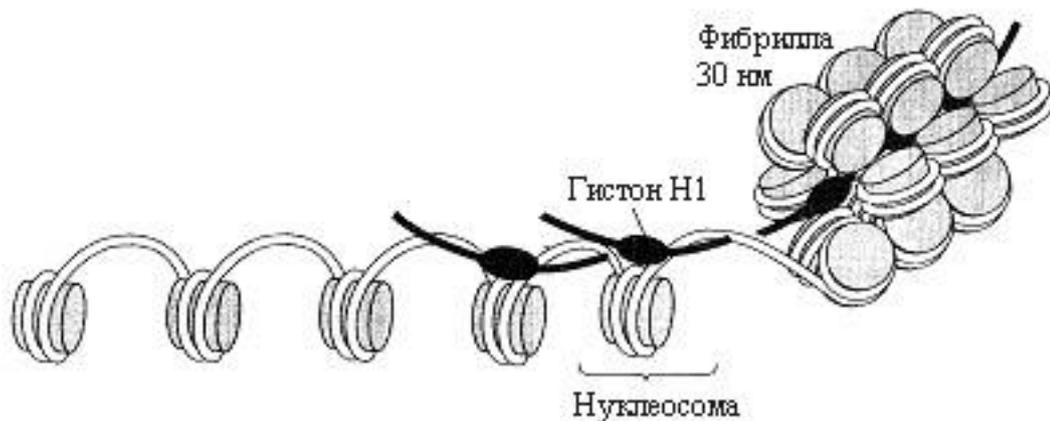


Рис. 3. Нуклеосомы

2. *Фибриллы* толщиной 10 нм состоят из ряда нуклеосом, касающихся друг друга своими краями и ориентированных плоскими поверхностями вдоль оси фибриллы. Эта структура называется *соленоид*. Компактизация в 40 раз.

3. Фибриллы скручиваются в спираль, на виток которых приходится 6-7 нуклеосом. Этому способствуют гистоны Н1, которые сближают соседние нуклеосомы, формируя регулярную структуру. В результате образуется *хроматиновое волокно* диаметром 30 нм.

4. Для того, чтобы образовалась митотическая хромосома нормального размера, волокно диаметром 30 нм должно подвергнуться дополнительной компактизации с результирующим уменьшением длины еще в 100 раз. В этом процессе участвуют ДНК-связывающие белки.

Транскрипционно-неактивный хроматин (*гетерохроматин*) плотно упакован и поэтому соответствующие области интенсивно окрашиваются. Участки транскрипционно-активного хроматина (*эухроматина*) имеют более слабую окраску.

3. Денатурация и ренатурация ДНК

Двухцепочечные структуры ДНК при нагревании, экстремальных значениях pH, обработке мочевиной и др. могут переходить в форму неупорядоченных клубков - денатурация ДНК. Раствор нативной ДНК при 260 нм имеет оптическую плотность на 40% ниже оптической плотности смеси нуклеотидов или отдельных цепей ДНК. Это явление называют *гиперхромным эффектом*. Поэтому о денатурации ДНК судят по увеличению поглощения ультрафиолета при 260 нм. Гиперхромный эффект проявляется в узком диапазоне температур - *точка плавления* (80-85 °С). Денатурация обратима, если остались спирализованные участки ДНК. Восстановление структуры ДНК после удаления денатурирующего фактора (за счет комплементарного спаривания оснований нуклеотидов) называется ренатурацией (ренативация ДНК, отжиг ДНК). На явлении денатурации-ренативации основан метод гибридизации. Известны гибридные двухцепочечные молекулы: ДНК-РНК, образуются как промежуточные формы при действии обратной транскриптазы; ДНК-РНК на короткое время в процессе транскрипции ДНК. В процессе трансляции и транскрипции происходит разделение цепей ДНК.

4. Виды и функции РНК

Все типы РНК предназначены для снятия информации о структуре белка с ДНК и обеспечения биосинтеза белка в соответствии с этой информацией. РНК является одиночной полинуклеотидной цепью, построенной из четырех основных типов рибонуклеотидов - АМФ, ГМФ, ЦМФ и УМФ. Для РНК характерны минорные

нуклеотиды с необычными азотистыми основаниями - дигидроурацил, 3-метилурацил, 1-метилгуанин и др. (до 50 типов). Особенно их много в аминоацил-т-РНК (до 10% от всех нуклеотидов). В РНК содержание аденина и гуанина не соответствует содержанию урацила и цитозина.

Различают следующие типы РНК:

1. *Матричная, или информационная, РНК* (м- или и-РНК), м.м. 25000-1000000. Да, состоит из 75-300 нуклеотидов, синтезируется в ядре из пре-м-РНК; составляет 5-7% от всей клеточной РНК. Период полужизни несколько минут. На 5'-конце всех эукариотических мРНК имеется особая структура, называемая *кэпом*. Кэп представляет собой 7-метилгуанозинтрифосфат. Образование кэпа происходит ферментативным путем в ядре еще до завершения транскрипции. Считается, что кэп, с одной стороны, предохраняет 5'-конец мРНК от ее расщепления 5'-экзонуклеазами, с другой стороны, используется для специфического узнавания в системе трансляции. За кэпом следует *нетранслируемый участок* (от 3-15 нуклеотидов до иницирующего кодона), в котором располагается последовательность нуклеотидов, комплементарная последовательности рРНК. Ее роль – обеспечение правильного взаимодействия 5'-конца с рибосомой. Завершается транслируемый участок *терминирующим кодоном*, за которым часто следует гексануклеотид ААУААА. У большинства мРНК 3'-конец содержит полиаденилатную цепочку из 20-250 адениловых нуклеотидов, не являющуюся результатом транскрипции, а присоединяющуюся ферментативным путем к мРНК в ходе ее созревания в ядре. Предполагается, что полиаденилатная последовательность отвечает за поддержание внутриклеточной стабильности мРНК, определяет ее время существования. *Кодовым элементом является триплет нуклеотидов (кодон), кодирующий аминокислоту*. Во вторичной структуре - изогнутая цепь; по некоторым данным в третичной структуре полинуклеотидная цепь связана (намотана) с транспортным белком информофером.

2. *Транспортные РНК* (тРНК) – около 15%. Транспортные РНК обладают небольшой молекулярной массой (~ 25 000) и содержатся в растворимой фракции цитоплазмы, выполняя функцию переноса аминокислот к месту синтеза белка – рибосоме. Первичные структуры тРНК содержат около 75 нуклеотидов. В клетке насчитывается не менее 20 видов молекул тРНК. Каждый или несколько видов тРНК соответствуют одной из 20 аминокислот, необходимых для биосинтеза белка. Вторичная структура всех тРНК напоминает «*клеверный лист*» и имеет 2 основных участка:

1. *Акцепторный* участок имеет на 3' конце последовательность нуклеотидов ЦЦА. К 3'-гидроксильной группе рибозы аденозильного остатка происходит присоединение карбоксильной группы аминокислоты. Транспортные РНК, соединенные с аминокислотами, называют *аминоацил-тРНК* (аатРНК). Они выполняют *адаптерную функцию* при переводе трехбуквенного кода нуклеиновых кислот в 20-буквенную последовательность аминокислот в полипептидной цепи (всего 61 аминоацил-тРНК).

2. *Антикодоновая петля* содержит специфический для каждой тРНК триплет нуклеотидов (антикодон) и служит для спаривания с соответствующим кодоном мРНК.

Третичная структура представлена пространственной структурой в виде локтевого сгиба (L-форма).

3. *Рибосомные РНК* (рРНК) – 80-85%, имеют разную и значительно большую молекулярную массу (35000-1000000, что соответствует 100-3100 нуклеотидам), являются структурными компонентами рибосом. Вторичная структура представлена спиральными участками, соединенными изогнутой одиночной цепью. Третичная структура рРНК – скелет рибосомы, имеет форму палочки или клубка; снаружи

находятся рибосомальные белки.

Рибосомы обеспечивают специфический контакт мРНК и тРНК, в результате которого и происходит трансляция нуклеотидной последовательности, считанной с определенного гена, в аминокислотную последовательность соответствующего белка. Рибосомы млекопитающих состоят из 2-х нуклеопротеиновых субъединиц – большой с константой седиментацией 60S и малой – 40S (у прокариот – соответственно 50S и 30S). 60S-субъединица содержит 5S-рибосомную РНК (рРНК), 5,8S-рРНК и 28S-рРНК. Малая, 40S-субъединица включает единственную 18S-рРНК и около 30 полипептидных цепей. Все рибосомные РНК, за исключением 5S-РНК, имеют общего предшественника – 45S-РНК, локализованную в ядрышке. В ядрышке происходит упаковка высокометилированных рибосомных РНК с рибосомными белками.

4. *Гетерогенные ядерные РНК (предшественник цитоплазматической мРНК)*, которые являются первичными транскриптами, образуются в эукариотических клетках, подвергаются процессингу в ядре. В результате образуются зрелые мРНК, которые поступают в цитоплазму и служат матрицей для биосинтеза белка. Молекулярная масса 10^7 .

5. *Малые ядерные РНК (мя) РНК*, которые непосредственно не участвуют в синтезе белка, но могут оказывать влияние на процессинг РНК, в частности на этапе вырезания неинформационных участков пре-мРНК.

Единица измерения 1 kb – это 1000 пар оснований двойной спирали ДНК или 1000 оснований одиночной полинуклеотидной цепи. 1 kb двойной спирали ДНК имеет длину 0,34 мкм и массу около 660 кДа.

5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей (Kary Mullis; США, патент 4683202). Их амплификация (иногда в миллионы раз) осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса. Для ПЦР необходимы:

- два синтетических олигонуклеотидных праймера (длиной примерно по 20 нуклеотидов), комплементарные участкам ДНК из противоположных цепей, фланкирующим (ограничивающим) отрезок последовательности-мишени; 3'-гидроксильные группы праймеров после отжига с ДНК должны быть ориентированы навстречу друг другу (таким образом, отмечаются начальный и конечный участки нужного фрагмента на ДНК-матрице);

- ДНК-мишень длиной от 100 до 35000 п.н.;

- термостабильная ДНК-полимераза *Taq*, выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*, которая не теряет своей активности при температуре 95°C и выше;

- четыре дезоксирибонуклеотида;

- буфер, содержащий ионы магния.

Этапы ПЦР:

1. Денатурация (плавление). Для денатурации ДНК (расхождение цепей) ее выдерживают до 1 мин. при 95°C. Помимо ДНК, в реакционной смеси содержатся в избытке два праймера, термостабильная ДНК-полимераза и четыре типа дезоксирибонуклеотидов.

2. Ренатурация (отжиг). Температуру смеси медленно понижают до 55°C, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК.

3. Синтез (элонгация). Температуру повышают до 75°C, т.е. температурного оптимума для ДНК-полимеразы *Taq*. Начинается синтез комплементарной цепи ДНК,

инициируемой 3'-гидроксильной группой праймера. Все реакции проводятся в регулируемом термостате с повторением циклов, продолжительностью 3–5 мин. Эти циклы повторяют до 30 раз.

Применение метода ПЦР:

– Идентификация патогенных микроорганизмов и вирусов, возбудителей заболеваний человека, животных и растений. Для синтеза праймеров, специфичных в отношении исключительно ДНК-мишени, необходимо знать нуклеотидную последовательность ДНК предполагаемого патогенного микроорганизма. В этом случае в ходе ПЦР будет амплифицироваться только фрагмент ДНК, длина которого равна суммарной длине двух праймеров и фрагмента ДНК между ними.

– Получение кДНК (ДНК, комплементарные информационной РНК, мРНК). С помощью обратной транскриптазы на матрице мРНК синтезируется цепь кДНК. На матрице синтезированной цепи кДНК синтезируется вторая цепь и затем в последовательных циклах ПЦР с введением «внутренних праймеров» накапливаются значимые количества кДНК, комплементарной 3'-концу мРНК.

– Синтез генов с помощью ПЦР.

– Выделение делеций или вставок в генах, ответственных за то или иное наследственное заболевание. Образцы наносят на узкие полоски нитрата целлюлозы и обрабатывают мечеными олигонуклеотидами, содержащими нормальную или мутантную последовательность. Радиоавтографически оценивают, с какой из проб преимущественно связывается ДНК пациента.

- Исследование индивидуального паттерна (спектра, соотношения) генов при диагностике и контроле лечения опухолевых заболеваний и отборе тканей (органов) для трансплантации.

ДНК является носителем генов. *Ген* – единица наследственности, представляющая собой часть молекулы ДНК, кодирующей последовательность аминокислот одной полипептидной цепи. Экспрессией гена называют синтез белка или РНК по программе гена.

Существует 3 вида передачи наследственной информации (матричных синтезов):

1) ДНК → ДНК – репликация; 2) ДНК → РНК – транскрипция и 3) РНК → белок – трансляция.

ДНК является макромолекулой, которая переносит генетическую информацию от поколения к поколению. Одна клетка млекопитающих содержит только несколько пикограммов (10^{-12} г) ДНК.

6. Репликация

Репликация - процесс передачи генетической информации от ДНК к ДНК. Протекает в *S-фазу* клеточного цикла.

Репликация происходит *полуконсервативным* способом. Полуконсервативный способ означает, что цепи материнской молекулы ДНК расходятся и каждая служит матрицей для синтеза новой комплементарной последовательности. Две образовавшиеся двуспиральные молекулы ДНК, каждая из которых состоит из одной родительской и одной вновь синтезированной комплементарной цепи, распределяются между двумя дочерними клетками. Таким образом, каждая из дочерних клеток получают информацию, идентичную той, которой обладала родительская клетка.

Механизм репликации. Механизм репликации у прокариот изучен лучше, чем у эукариот. Основные условия и компоненты репликации ДНК одинаковы у прокариот, таких как *E.coli*, и эукариот, включая человека. Основное *функциональное значение*

процесса репликации ДНК заключается в снабжении потомства генетической информацией. Для обеспечения генетической стабильности организма и вида ДНК должна реплицироваться полностью и с очень высокой точностью.

7. Условия, необходимые для репликации:

1. *Матрица*, которой является неспаренная цепь ДНК.

2. *Субстраты синтеза*, которыми являются дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, ТТФ). Синтез идет по схеме: $d(\text{НМФ})_n + d\text{НТФ} = d(\text{НМФ})_{n+1} + \text{PP}_n$, где $d(\text{НМФ})_n$ – ДНК до удлинения, $d(\text{НМФ})_{n+1}$ – ДНК после удлинения, $d\text{НТФ}$ – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, PP_n – пирофосфат. Нуклеозидтрифосфаты необходимы в качестве источника энергии, т.к. при расщеплении пирофосфата выделяется энергия для образования фосфодиэфирных связей.

3. *Ферменты и белковые факторы*, участвующие в синтезе ДНК:

1. *ДНК-полимеразы I и III* (у прокариот), которые участвуют в образовании 3',5'-фосфодиэфирных связей и обладают 3'→5' и 5'→3' экзонуклеазными активностями; ДНК-полимераза II является минорной ДНК-полимеразой, которая может участвовать в процессе репарации; ДНК-полимеразы IV и V, идентифицированные в 1999 г., участвуют в специфической репарации; у эукариот найдено пять типов ДНК-полимераз: α , ϵ , β , γ и δ .

2. *DnaA-белок* – узнает участок начала репликации.

3. *DnaB-белок (хеликаза)* – расплетает двойную спираль ДНК.

4. *DnaC-белок* – необходим для присоединения хеликазы к месту инициации синтеза.

5. *Гистонподобный белок* – стимулирует инициацию.

6. *ДНК-связывающий белок* – стабилизирует расплетенные одноцепочечные участки ДНК и повышает активность хеликазы.

7. *ДНК-гираза* (топоизомераза II) вводит отрицательные супервитки в ДНК, выполняя функцию шарнира при продвижении репликационных вилок.

8. *Праймаза* (ДНК-зависимая РНК-полимераза, *dnaG-белок*) синтезирует РНК-затравку (праймер).

9. *ДНК-лигаза* - соединяет концы фрагментов ДНК.

10. *Dat метилаза* – метилирует (5')УАТЦ последовательность в *oriC*.

Все ферменты и белковые факторы, участвующие в репликации, образуют макромолекулярный комплекс, называемый *реписомой*.

Различают 3 стадии репликации: *инициации, элонгации и терминации*.

8. Стадия инициации

1. Репликация ДНК у *E.coli* начинается в области начала репликации, который называется *oriC* и состоит из 245 пар оснований.

2. Основным белком, участвующим в инициации является *DnaA-белок*.

3. *dnaB-белки* присоединяются к каждой цепи ДНК и действуют как *хеликазы* (helix - спираль), расплетая в обоих направлениях ДНК. На разделение каждой пары оснований расходуется энергия гидролиза двух молекул АТФ.

3. Как только небольшой участок ДНК оказывается расплетенным, к каждой из разделившихся цепей прочно присоединяются несколько молекул *ДНК-связывающего белка* (SSB белок – single strand binding), которые препятствуют образованию комплементарных пар и обратному восстановлению цепей.

4. У прокариот хеликазе помогает фермент *ДНК-гираза* (семейство топоизомераз). Гириза выполняет функцию шарнира: он обеспечивает кратковременный разрыв одной из цепи ДНК, быстро восстанавливаемый с высокой точностью после одного или нескольких оборотов вокруг второй цепи. Этот фермент

не только позволяет ДНК вращаться, но и активно закручивает ее в направлении, благоприятствующем расплетению цепей матрицы.

В результате расплетения молекулы ДНК образуется репликационный пузырь, который состоит из 2 репликативных вилок. Процесс репликации происходит в обеих репликативных вилках, но имеет противоположное направление, что обусловлено антипараллельностью двух полинуклеотидных цепей ДНК.

5. В каждой репликативной вилке выделяют 3' и 5' концы. Синтез дочерних нитей ДНК происходит всегда в направлении 5'→3'. Стадия инициации завершается синтезом *праймера* - короткого фрагмента РНК, состоящего из 10-60 рибонуклеотидов, комплементарных одной из цепи матричной ДНК. Синтез праймера осуществляется ферментом ДНК-зависимой-РНК-полимеразой или праймазой. Синтез праймера необходим для фермента ДНК-полимеразы III, который не может начать синтез дочерней нити ДНК на "пустом" месте; 3'-ОН группа концевого рибонуклеотида праймера служит затравкой для синтеза ДНК под действием ДНК-полимеразы III.

9. Стадия элонгации

1. К 3'-ОН группе праймера присоединяется ДНК-полимераза III которая по *принципу комплементарности* синтезирует дочернюю цепь ДНК в направлении 5'→3'. Точность синтеза определяется тем, что фермент ДНК-полимераза III катализирует образование фосфодиэфирной связи только в том случае, если основание предыдущего нуклеотида комплементарно соответствующему основанию матрицы. Если не произошло образование водородных связей между присоединенным нуклеотидом и матрицей, фермент возвращается, вырезает неправильный нуклеотид с 3'-конца цепи за счет экзонуклеазной активности, после чего ДНК-полимераза продолжает присоединять правильные нуклеотиды в направлении 5'→3'. В результате достигается высокая точность матричного синтеза. У *E.coli* частота ошибок составляет 1 на 10^9 - 10^{10} присоединенных нуклеотидов. Хромосомы *E.coli* содержат $4,6 \times 10^6$ пар нуклеотидов. Следовательно, частота ошибок составляет 1 на 1 000 – 10 000 репликаций.

Если направление синтеза дочерней цепи ДНК и направление движения репликативной вилки совпадают, то цепь синтезируется непрерывно и называется *лидирующей*. Если направление синтеза ДНК и движение репликативной вилки не совпадают – цепь синтезируется фрагментами и называется *запаздывающей*. Фрагменты, синтезированные в запаздывающей цепи, называются фрагментами Рейджи Оказаки и состоят из 1000-2000 нуклеотидов у прокариот и 100-200 нуклеотидов у эукариот.

2. После завершения синтеза фрагмента Оказаки РНК-затравка (праймер) удаляется нуклеотид за нуклеотидом с помощью 5'→3' экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы I. По мере отщепления рибонуклеотидных мономеров каждый из них замещается на соответствующий дезоксирибонуклеотид в ходе полимеразной реакции, осуществляемой *ДНК-полимеразой I* (при этом в качестве затравки используется 3'-конец предыдущего фрагмента Оказаки). Новый фрагмент Оказаки присоединяется к запаздывающей цепи ДНК с помощью фермента *ДНК-лигазы*. Источником энергии для этой реакции у эукариот служит АТФ. ДНК-лигаза не может соединить две молекулы одноцепочечной ДНК. Цепи ДНК, соединяемые ДНК-лигазой, должны быть частью двухцепочечной молекулы ДНК.

Терминация синтеза ДНК наступает вследствие исчерпания матрицы. У хромосомы *E.coli* две репликативные вилки содержат область терминации, состоящий из копий 20 пар нуклеотидов и называемый *Ter (terminus)*. Репликационные пузыри сливаются, молекулы дочерней цепи ДНК сшиваются ДНК-лигазой и на каждой матрице образуется дочерняя цепь ДНК.

Общие механизмы репликации у эукариот аналогичны таковым у прокариот.

Как и у прокариот, репликация у эукариот происходит одновременно на обеих цепях. Единицей репликации у эукариот является *репликон*, размеры которого колеблются от 50 до 120 мкм. В клетках млекопитающих содержится от 10 000 до 100 000 репликонов. Эукариотические клетки содержат несколько типов ДНК-полимераз. В репликации ядерных хромосом участвует ДНК-полимераза α и ДНК-полимераза δ . Основным ферментом синтеза ДНК у эукариот является ДНК-полимераза δ .

Для репликации генома человека необходимо около 8 ч. Скорость репликации у *E.coli* составляет 1000 нуклеотидов в секунду. Репликация у эукариот происходит в 10 раз медленнее, чем у прокариот и составляет 100 пар оснований в секунду. Каждый репликон синтезируется приблизительно 1 час. Низкая скорость репликации у эукариот обусловлена, вероятно, формированием нуклеосом и наличием хромосомных белков.

10. Повреждения ДНК

При исследовании процессов повреждения ДНК в живой клетке следует учитывать, что ДНК в них связана с белками, в эукариотических клетках организована в виде нуклеосом с последующими уровнями компактизации до стадии хромосом. При нормальных значениях рН, температуры и давления в клетке возможны несколько типов повреждения ДНК.

1. Возможно *гидролитическое отщепление аминогрупп* от цитозина, аденина и гуанина с образованием урацила, гипоксантина и ксантина, соответственно. Наиболее часто происходит дезаминирование цитозина с образованием урацила: примерно 1000 на животную клетку в сутки (дезаминирование пуринов происходит в 50-100 раз реже). Дезаминирование цитозина выше на два порядка в одноцепочечной ДНК. *Гидролиз N-гликозидных связей* ведет к образованию свободных от оснований сайтов за счет отщепления пуриновых и пиримидиновых оснований. Пурины менее устойчивы к гидролизу – возможно до 10000 депуринизаций на животную клетку в сутки (депиримидинация в 20 раз реже). Апуриновые и апиримидиновые сайты не участвуют в матричных синтезах.

2. *Оксидативные повреждения* связаны с действием свободно-радикальных форм кислорода, синглетного кислорода и пероксидов. Оксидативные повреждения могут приводить к разрыву полинуклеотидной цепи за счет повреждения дезоксирибозы, разрыв конечных 3'5'-фосфодиэфирных связей, что нарушает присоединение следующего нуклеотида ДНК-полимеразой III. В настоящее время описано 40-60 различных типов повреждений азотистых оснований (насыщение двойных связей в циклических структурах, разрывы колец, присоединение новых групп к кольцам оснований и т.п.). Особенно мутагенным является 8-оксогуанин. Все эти изменения могут привести к серьезным нарушениям информационной роли полинуклеотидных цепей ДНК.

3. *Метилирование ДНК* в клетке происходит ферментативным и неферментативным путями. Малые молекулы (пептиды, полиамины и S-аденозилметионин способны к неферментативному метилированию с образованием 7-метилгуанина и 3-метиладенина. Если 7-метилгуанин нетоксичен, то 3-метиладенин способен блокировать репликацию. Считают, что в сутки может образовываться 600 остатков 3-метиладенина на человеческую клетку. Бактериальные и животные ферменты – метилтрансферазы обеспечивают метилирование цитозина с образованием 5-метилцитозина. Это основание в полинуклеотидной цепи является одним из маркеров для действия рестриктаз.

ДНК является мишенью для действия многих неблагоприятных факторов внешней среды.

1. Действие ультрафиолетовых лучей. Солнечный ультрафиолет подразделяют на три вида по длинам волн: УФ-А (длинноволновой), УФ-В (средневолновой) и УФ-С

(коротковолновой). УФ-С абсорбируется в стратосфере озоновым слоем. У человека УФ-В может вызывать рак кожи. При действии ультрафиолета возможно образование *тиминовых димеров* (УФ-С или при хроническом действии УФ-В).

2. Ионизирующее излучение повреждает ДНК посредством образования свободных радикалов. Ионизирующее излучение способно вызывать «летальные» *разрывы обеих цепей* ДНК. Особенно опасны трансураниевые элементы, альфа-частицы которых при тесном контакте с молекулами ДНК способны повреждать различные химические связи полинуклеотидных цепочек. Отметим, что максимальное влияние трансураниевых элементов, загрязнивших территории после аварии на ЧАЭС, предсказывается через 25-40 лет.

3. ДНК является *мишенью* для эндогенных химических веществ и ксенобиотиков. К таким веществам относятся вещества, определяющие неферментативные превращения метаболитов «реактивные» молекулы, чаще всего обеспечивающие электрофильную атаку нуклеофильных центров в дуплексах ДНК. К неферментативным повреждающим ДНК веществам относят алкилирующие агенты (например, метил-метановые сульфонаты. Другим примером метаболической активации ДНК является повреждение бензапиреном, который является ароматическим углеводородом, поступающим в организм при курении и употреблении в пищу копченостей. В организме он гидроксилируется микросомальной монооксигеназной системой (цитохром Р-450) и превращается в продукт, повреждающий ДНК.

Повреждения ДНК выявляют с помощью эндо- и экзонуклеаз с последующим анализом нуклеотидных последовательностей образованных коротких полинуклеотидов автоматизированным секвенированием, методом иммунологического анализа, газовой хроматографией с масс-спектрометрией, полимеразной цепной реакции, методом капиллярного электрофореза с лазеро-индуцированной флуоресценцией.

11. Репаративный синтез ДНК

Как сказано выше, множество химических и физических агентов (ионизирующая радиация, УФО, алкилирующие агенты) вызывают в ДНК повреждения 4 основных типов.

1. Затрагивающие единичные нуклеотиды: депуринизация; дезаминирование цитозина до урацила; дезаминирование аденина до гипоксантина; алкилирование оснований; вставка или делеция нуклеотида; включение основания-аналога.

2. Затрагивающие пару нуклеотидов: УФ-индуцируемое образование тиминового димера; поперечные сшивки бифункциональным алкилирующим агентом.

3. Разрывы цепей: ионизирующая радиация; радиоактивная дезинтеграция каркаса ДНК.

4. Поперечные сшивки: между основаниями одной цепи или разных цепей; между ДНК и молекулами белка (например, гистонами).

Поврежденные участки могут быть подвергнуты репарации, замещены путем рекомбинации или остаться без изменений. В последнем случае возникают мутации, потенциально ведущие к гибели клетки.

Основной путь репарации включает 3 этапа:

1. Измененный участок ДНК распознается и удаляется при помощи ферментов ДНК-репарирующих эндонуклеаз.

2. ДНК-полимераза I связывается с 3'-концом поврежденной цепи ДНК и заполняет брешь, присоединяя нуклеотиды друг за другом комплементарно неповрежденной цепи ДНК.

3. ДНК-лигаза сшивает фрагменты ДНК и, тем самым, завершает

восстановление структуры ДНК.

Системы репарации могут восстановить повреждения ДНК только при наличии интактной комплементарной цепи ДНК.

12. Транскрипция

Синтез РНК на матрице ДНК называется *транскрипцией*. Последовательность рибонуклеотидов в молекуле РНК *комплементарна последовательности дезоксирибонуклеотидов* одной из цепи ДНК. Та из двух цепей ДНК, по которой непосредственно идет транскрипция РНК-молекул, называется *кодирующей цепью*. Другую цепь называют некодирующей цепью соответствующего гена.

Единицей транскрипции является *оперон* (у прокариот) и *транскриптон* (у эукариот). По функциональному признаку в опероне выделяют регуляторные и структурные области:

1) *промотор* - место инициации транскрипции, к которому присоединяется фермент РНК-полимераза; в ДНК *E. coli* имеется 2000 промоторов на $4,8 \times 10^6$ пар оснований;

2) *ген-оператор* (или акцепторная зона у эукариот) - место связывания регуляторных белков, например, белка-репрессора;

3) *структурные гены*, включающие информативные участки - экзоны и неинформативные участки - интроны;

4) *терминатор* - последовательность нуклеотидов, сигнализирующая о завершении транскрипции.

РНК-полимераза должна найти и транскрибировать гены на протяженной молекуле ДНК. Для этого она находит промотор и связывается с ним. У бактерий функцию промотора выполняют две последовательности нуклеотидов на 5'-конце молекулы. Одна из них называется блок Прибнова (ТАТААТ), центр которого располагается в положении -10 (10 нуклеотидов на 5'-конце от первого транскрибируемого нуклеотида, обозначаемого +1). Другая последовательность, называемая -35 область, имеет последовательность ТТГАЦА. Это идеализированные последовательности, более характерные для промоторов клеток-прокариот. Первым транскрибируемым нуклеотидом является пуриновый нуклеотид.

Эукариотические гены, кодирующие белки, имеют блок Хогнесса (ТАТААА) в положении -25, а также ЦААТ-блок (ГГНЦААТЦТ) в положении -75. Транскрипция у эукариот регулируется энхансерными (усиливающими) последовательностями, которые могут отстоять на несколько kb от стартового нуклеотида.

2. Промоторы отличаются по эффективности. *Гены со строгими промоторами в клетке E. coli транскрибируются каждые 2 секунды, а транскрибирование генов со слабыми промоторами происходит один раз за 10 минут*. Мутации в областях -1 или -35 подавляют активность промотора. Расстояние между этими областями оптимально в 17 нуклеотидов. Эффективность промоторов регулируется особенностями их нуклеотидного состава, а также регуляторными белками, связывающимися с ДНК рядом с областью промоторов.

3. Терминацию синтеза РНК вызывают длинные блоки АТ-последовательностей нуклеотидов в ДНК - терминатор (стоп-сигнал); у ряда прокариот обнаружен белок, называемый р-фактором, который в участке терминации освобождает РНК от матрицы ДНК.

13. Факторы, необходимые для транскрипции

1. *Матрица*, которой является неспаренная цепь ДНК. В отличие от репликации транскрипция происходит на определенном фрагменте ДНК.

2. *Субстраты*. Для синтеза РНК необходимы четыре типа рибонуклеозид-5'-

трифосфатов: АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ. Разрыв макроэргической связи между α и β -остатками фосфорной кислоты обеспечивает процесс синтеза энергией.

3. Транскрипция происходит с участием фермента *ДНК-зависимой РНК-полимеразы*. Для синтеза РНК, комплементарной одной из цепи ДНК, спиральная молекула ДНК расплетается на коротком участке с формированием транскрипционного «пузыря». Во время транскрипции у *E.coli* расплетенный фрагмент составляет около 17 пар нуклеотидов. Поскольку ДНК является двуспиральной молекулой, движение транскрипционного пузыря вызывает закручивание молекулы ДНК. Спирализация ДНК ограничивается ДНК-связывающими белками. В результате движения РНК-полимеразы образуются положительные супервитки впереди транскрипционного пузыря и отрицательные супервитки позади. Этот процесс наблюдается *in vivo* и *in vitro* у бактерий.

РНК-полимераза *E.coli* состоит из 5 субъединиц ($\alpha_2\beta\beta'\omega$, м.м. 390 000) и шестой σ -субъединицы. Фермент, состоящий из 6 субъединиц, называется *холоферментом*. Установлено, что β -субъединица участвует в связывании рибонуклеозидтрифосфатов, β' -субъединица – в связывании фермента с ДНК-матрицей, α -субъединица участвует в инициации транскрипции; функция ω -субъединицы не известна. Структура фермента без σ -субъединицы называется *кор-ферментом*. Этот фактор находит строго определенные последовательности нуклеотидов в промоторе, способствует более прочному связыванию полимеразы со специфической промоторной последовательностью ДНК и участвует в раскрытии двойной спирали ДНК, так чтобы одна из цепей могла служить матрицей. σ -Субъединица не участвует в стадии элонгации. Различные σ -субъединицы узнают различные последовательности нуклеотидов в промоторе. Большинство σ -субъединиц являются σ^{70} (м.м. 70 000).

В эукариотических клетках присутствуют 3 ядерные РНК-полимеразы – I, II, III. РНК полимеразы I находится в ядрышке и участвует главным образом в биосинтезе рРНК; РНК-полимераза II – осуществляет синтез мРНК, а РНК-полимераза III отвечает за синтез тРНК и 5S-рРНК.

14. Механизм транскрипции

Синтез РНК включает 3 стадии: *инициации, элонгации и терминации*.

1. *На стадии инициации* РНК-полимераза с помощью σ -субъединицы через серию случайных актов ассоциации-диссоциации находит промотор и происходит присоединение всей молекулы РНК-полимеразы. После синтеза цепочки РНК примерно из 8 рибонуклеотидов σ -субъединица отделяется от холофермента и присоединяется к другой молекуле РНК-полимеразы. Синтезируемые цепи РНК имеют на 5'-конце обычно остаток ГТФ или АТФ (pppA, либо pppG). В отличие от синтеза ДНК *затравка* в этом случае *не нужна*. Следовательно, новообразованная цепь РНК имеет трифосфатную группу на 5'-конце и свободную ОН-группу на 3'-конце.

2. *На стадии элонгации* РНК полимеразы синтезирует цепь РНК в направлении 5'→3' антипараллельно матричной цепи ДНК (т.е. матричная ДНК копируется в направлении 3'→5'). В ходе транскрипции новосинтезированная цепь РНК временно образует короткие отрезки гибридной спирали ДНК-РНК. По мере того, как расплетается очередной участок ДНК, транскрибированный участок восстанавливает свою двуспиральную конформацию.

Максимальная скорость элонгации составляет примерно 50 нуклеотидов в секунду. В отличие от ДНК-полимеразы РНК-полимераза не проверяет правильности новообразованной полинуклеотидной цепи. В связи с этим надежность транскрипции значительно ниже, чем надежность репликации. Частота ошибок при синтезе РНК составляет примерно одну ошибку на 10^4 - 10^5 нуклеотидов, что в 10^5 раз выше, чем при

синтезе ДНК. Гораздо более низкую надежность синтеза РНК клетка обходит тем, что с одного гена синтезируется много копий РНК-транскриптов.

3. *Сигнал терминации* синтеза молекулы РНК представляет собой определенную последовательность нуклеотидов, расположенную в рамках кодирующей цепи ДНК. Процесс терминации у эукариот не достаточно изучен. У *E.coli* существует два механизма терминации: 1) с участием специфического белка, называемого *ρ-фактором* и 2) *ρ-независимый механизм*.

После терминации синтеза данной цепи РНК кор-фермент отделяется от ДНК-матрицы и, связавшись с новой молекулой σ -фактора, может узнавать соответствующие промоторные участки и приступать к синтезу новой молекулы РНК. Одну и ту же кодирующую цепь могут одновременно считывать несколько молекул РНК-полимеразы, но процесс отрегулирован таким образом, что в каждый данный момент каждая молекула транскрибирует различные участки ДНК.

15. Посттранскрипционная модификация РНК

В результате транскрипции образуются *три типа предшественников РНК (первичные транскрипты)*: предшественник мРНК, или гетерогенная ядерная РНК (пре-мРНК или гяРНК), предшественники рРНК (прерРНК), содержащие 5,8S РНК, 18S РНК и 28S РНК у эукариот и, соответственно 5S, 16S РНК и 23S РНК у прокариот, предшественники тРНК (пре-тРНК). Они *представляют собой копию оперона* и содержат *информативные и неинформативные последовательности*. Образование функционально активных молекул РНК называется *процессингом* и продолжается после завершения транскрипции.

Процессинг включает в себя: вырезание неинформативных участков, сшивание информативных участков (*сплайсинг*) и модификацию 5' и 3'-концов РНК.

1. Вырезание неинформативных участков пре-мРНК происходит с помощью *рибонуклеаз* и/или *рибозимов* (содержат РНК, обладающие ферментативной активностью). При вырезании интронов важную роль играют *малые ядерные РНК (мяРНК)*, нуклеотидные последовательности которых комплементарны последовательностям на концах каждого из интронов. В результате спаривания оснований, содержащихся в мяРНК и на концах свернутого в петлю интрона, два экзона сближаются, интроны вырезаются, а экзоны сшиваются *лигазой*. Таким образом, молекулы мяРНК играют роль временных матриц, удерживающих близко друг от друга концы двух экзонов для того, чтобы сплайсинг произошел в правильном месте.

2. Далее в ядре происходит *модификация 5' и 3'-концов мРНК*. К 5'-концу мРНК присоединяется олигонуклеотид, называемый «кэпом» (сар) или колпачком, состоящий из 2-3 метилированных нуклеотидов, причем концевым является 7-метилгуанозин. Эти «колпачки» способствуют стабилизации мРНК, защищая 5'-концы от разрушения фосфатазами и нуклеазами, а также связываются со специфическим белком и могут участвовать в связывании мРНК с рибосомой для инициации трансляции.

К 3'-концу фермент поли-А-полимераза присоединяет полиадениловую последовательность (поли-А), состоящую из 50-200 нуклеотидов. Функция полиаденолового «хвоста» мРНК неизвестна. Предполагается, что он также защищает мРНК от ферментативного разрушения. Затем мРНК связывается с белком *информофером* и транспортируется в цитоплазму к рибосомам.

3. В клетках прокариот и эукариот молекулы *рРНК* транскрибируются в виде большого *общего первичного транскрипта* (пре-рРНК). Процессинг рибосомных РНК происходит в *ядрышке*, где локализованы гены рибосомных РНК. У бактерий 16S, 23S и 5S рРНК образуются из 30S предшественника; у эукариот из 45S пре-рРНК синтезируются 18S, 28S и 5,8S рРНК. Синтезированная пре-рРНК (45S) подвергается

ферментативной модификации и расщеплению и дает зрелые 18S, 5,8S и 28S-рРНК. Вначале примерно 100 нуклеотидов метилируется по 2'-гидроксильной группе рибозных остатков, более 100 остатков уридина изомеризуются в остатки псевдоуридина. *Метилирование* идет только на участках, *формирующих в дальнейшем зрелые молекулы рРНК*. Затем 45S-предшественник подвергается нуклеолитическому процессингу. В ходе процессинга РНК в ядрышках происходит дальнейшее метилирование. 5,8S-рРНК и 28S-рРНК, связываясь с рибосомными белками в ядрышках, формирует большую 60S-субъединицу рибосомы. Молекула 18S-рРНК в комплексе с соответствующими полипептидами образует малую субъединицу рибосомы. 5S РНК синтезируется отдельно.

4. Молекулы тРНК первоначально транскрибируются в виде больших предшественников, которые часто содержат более одной молекулы тРНК, подвергающихся нуклеолитическому процессингу при действии специфических рибонуклеаз. Дальнейшие модификации молекул тРНК включают *алкилирование нуклеотидов* и *присоединение характерного ЦЦА-триплета* к 3'-концу молекулы (акцепторный участок), к которому будет присоединяться соответствующая аминокислота. Метилирование предшественников тРНК млекопитающих происходит, вероятно, в ядре, в расщепление и присоединение ЦЦА-триплета – в цитоплазме.

16. Обратная транскрипция

Некоторые РНК-содержащие вирусы (ретровирусы), которые инфицируют животных, имеют Zn^{2+} -содержащий фермент РНК-зависимую ДНК-полимеразу, часто называемой *обратной транскриптазой* или *ревертазой*. Существование обратных транскриптаз в РНК-содержащих онкогенных вирусах было предсказано еще в 1962 г. Говардом Теминым и Дэвидом Балтимором. Обратной транскриптазе приписывают 3 вида ферментативной активности: 1) *РНК-зависимой ДНК-полимеразной* (строит по матрице РНК дочернюю цепь ДНК); 2) *рибонуклеазной* (обеспечивает удаление цепи РНК); 3) *ДНК-зависимой ДНК-полимеразной* (строит на матрице комплементарной ДНК вторую цепь ДНК).

Обратная транскриптаза не обладает 3'→5' экзонуклеазной активностью и поэтому частота ошибок синтеза составляет 1 на 20 000 нуклеотидов, что является необычно высокой для синтеза ДНК и является характерным для большинства ферментов, реплицирующих геном вируса. Следствием этого является быстрая скорость эволюции вирусов, что может быть фактором появления новых признаков заболеваний, вызываемых ретровирусами. В результате этого этапа образуется гибридная молекула РНК-ДНК. На втором этапе происходит разрушение исходной вирусной РНК из комплекса гибридной молекулы под действием обратной транскриптазы. Наконец, на третьем этапе на матрице цепи ДНК комплементарно синтезируются новые цепи ДНК.

В результате образуется ДНК, которые содержат гены, обуславливающие рак; эта ДНК часто встраивается в геном эукариотической клетки хозяина, где она может в течение многих поколений оставаться в скрытом, т.е. неэкспрессируемом состоянии. При определенных условиях такие бездействующие вирусные гены (онкогены) могут активироваться и вызывать репликацию вируса; при других же условиях они могут способствовать превращению такой клетки в раковую.

17. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА (трансляция)

Генетическая информация, хранящаяся в ДНК, передается на РНК:
ДНК- нематричная цепь (кодирующая, или смысловая) 5'-ГГАТГЦАТ-3'
ДНК- матричная цепь (некодирующая, несмысловая) 3'-ЦЦТАЦГТА-5'

Цепь мРНК

5'-ГГАУГЦАУ-3'

У вирусов часто матричную цепь называют (-)-цепью, а нематричную (+)-цепью. Биосинтез полипептида или белка на матрице РНК называется *трансляцией*.

18. Строение рибосом

Внутриклеточный компонент, в котором сходятся и взаимодействуют все элементы механизма трансляции белка, называется *рибосомой*. Несколько рибосом могут одновременно транслировать одну и ту же цепь мРНК, образуя *полисомы* (полирибосомы). Шероховатый эндоплазматический ретикулум – это компартмент клетки, в котором мембраносвязанные полисомы продуцируют как мембранные белки, так и белки, подлежащие транспорту и экскреции. Рибосомы эукариот в 2 раза больше рибосом прокариот.

Химически рибосомы представляют собой нуклеопротеины, состоящие из РНК и белков в соотношении 1:1 у 80S рибосом эукариот и 2:1 у 70S рибосом прокариот. Рибосомные РНК синтезируются в ядрышке, белки образуются в цитоплазме и переносятся в ядрышко. Здесь спонтанно образуются рибосомные субчастицы путем объединения белков с соответствующими рРНК. Рибосомы состоят из 2-х субъединиц. Большая (50S у прокариот и 60S у эукариот) и малая (30S у прокариот и 40S у эукариот) субъединицы рибосом через поры ядерной оболочки переносятся в цитозоль. Большая субъединица рибосом эукариотической клетки содержит 41 белок, 5S, 5,8S и 28S рРНК, малая субъединица – 30 белков и 18S рРНК. Согласно представлениям Дж. Уотсона существует «*рибосомный цикл*»: в начале синтеза полипептидной цепи субъединицы рибосом объединяются в функционирующую рибосому на мРНК для осуществления трансляции, а в конце синтеза диссоциируют.

19. Генетический код

Информация о последовательности аминокислот в полипептидной цепи записана на мРНК в виде трехбуквенного нуклеотидного кода.

Свойства генетического кода:

1. *Триплетность* – каждая аминокислота кодируется 3 нуклеотидами (кодоном).
2. *Вырожденность (избыточность)* – каждая аминокислота кодируется несколькими триплетами. Последовательность первых двух нуклеотидов определяет в основном специфичность каждого кодона, третий нуклеотид имеет меньшее значение. Данное свойство повышает устойчивость генетической информации к воздействию неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды.
3. *Специфичность* – каждому кодону соответствует только 1 аминокислота.
4. *Неперекрываемость* – нуклеотид, входящий в состав одного триплета не может входить в состав соседнего.
5. *Однонаправленность* – считывание информации идет в направлении 5'→3'.
6. *Коллинеарность* – соответствие последовательности аминокислот в белке последовательности триплетов в мРНК.
7. *Универсальность* – соответствие аминокислот триплетному коду у всех живых организмов.

Среди 64 триплетов мРНК выделяют 3 типа: 1) *инициирующий* – АУГ: кодирует включение формилметионина у прокариот или метионина у эукариот, если стоит вначале мРНК, и определяет стадию начала (инициации) синтеза белковой молекулы; если находится в середине – то является смысловым; 2) *смысловые кодоны* – кодируют включение аминокислот в синтезируемую полипептидную цепь; 3) *терминирующие*

кодона не кодируют включение аминокислот, это нонсенс-кодона, которые определяют завершение (терминацию) синтеза полипептидной цепи.

20. Биосинтез белка

В процессе биосинтеза белка выделяют 5 основных стадий.

Стадия 1 - активация аминокислот. Этот процесс протекает в *цитозоле*, а не в рибосоме. Каждая из 20 аминокислот ковалентно присоединяется к определенной тРНК, используя для этого энергию АТФ. Значение стадии: 1) активация СООН-группы аминокислоты, которая может участвовать в образовании пептидной связи; 2) аминокислоты сами не могут узнавать кодона мРНК, а переносятся к рибосомам тРНК, которые посредством специфических *антикодонов* узнают *кодона* мРНК и выполняют, таким образом, роль адапторных молекул.

Необходимые компоненты:

1) 20 аминокислот; 10 аминокислот являются незаменимыми и должны поступать с пищей; если отсутствует хотя бы одна аминокислота, процесс биосинтеза белка прекращается;

2) ферменты *аминоацил-тРНК-синтетазы*;

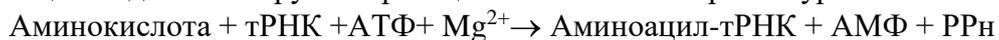
3) тРНК;

4) АТФ;

5) Mg^{2+} .

Активация аминокислот и их присоединение к тРНК осуществляется специфическими *аминоацил-тРНК-синтетазами*, которые называют активизирующими ферментами.

Общий вид катализируемой реакции может быть выражен уравнением:



Фермент *аминоацил-тРНК-синтетаза* обладает специфичностью к аминокислоте и к тРНК. Фермент имеет 4 центра связывания: 1) для тРНК; 2) для АТФ; 3) для аминокислоты; 4) для воды. Гидролитическая активность фермента необходима для удаления «неправильной» аминокислоты с последующим присоединением «правильной» аминокислоты к тРНК. Аминокислоты, для которых имеется две и более тРНК, активируются обычно одним ферментом.

Стадия II: инициация полипептидной цепи

Необходимые компоненты:

1) мРНК;

2) *иницирующая аминокацил-тРНК* (N-формилметионил-тРНК);

3) иницирующий кодон мРНК (АУГ)

4) 30S и 50S субъединицы рибосом;

5) ГТФ;

6) Mg^{2+} ;

7) *факторы инициации (IF-1, IF-2, IF-3)*.

На *стадии инициации* требуется разместить рибосому на 5'-конце мРНК и связать с иницирующим кодоном антикодон формилметионин-тРНК. Этот процесс включает следующие этапы:

1. 30S субъединица рибосомы связывается с 2-мя факторами инициации *IF-1* и *IF-3*. Фактор *IF-3* препятствует объединению 30S и 50S субъединиц рибосом с образованием непродуктивного 70S комплекса. К малой субъединице присоединяется мРНК.

Расположение иницирующего кодона мРНК (5')АУГ определяется специфической последовательностью Shine-Dalgarno в мРНК. Эта последовательность состоит из 4-9 пуриновых нуклеотидов и располагается на расстоянии 8-13 нуклеотидов от иницирующего кодона. Нуклеотиды этой последовательности

образуют водородные связи с комплементарными пиримидиновыми нуклеотидами вблизи 3'-конца 16S рРНК в 30S субъединице рибосомы. Взаимодействие мРНК-рРНК определяет расположение иницирующего кодона мРНК в 30S-субъединице рибосомы, где начинается трансляция.

2. Комплекс, состоящий из 30S субъединицы, IF-3 и мРНК связывается с комплексом ГТФ-IF-2 и иницирующей N-формилметионин-тРНК. Антикодон тРНК образует водородные связи с иницирующим кодоном тРНК.

3. Образовавшийся комплекс взаимодействует с 50S-субъединицей рибосомы. Белковый фактор IF-2 способствует соединению малой и большой субъединиц рибосом. После присоединения большой субъединицы рибосом происходит гидролиз ГТФ и высвобождение всех факторов инициации – IF-1, IF-2, IF-3.

Полностью собранная рибосома содержит 3 функциональных участка, образованных благодаря специфическому сочетанию областей 30S и 50S субъединиц рибосом.

Пептидилный участок (Р-участок) имеет сродство к пептидам и содержит в процессе синтеза растущую полипептидную цепь. Аминоацильный участок (А-участок) содержит аминоацил-тРНК, соединенную с соответствующим кодоном мРНК. Е-участок является местом в 50S субъединице, откуда тРНК покидают рибосому во время элонгации.

Фактор инициации IF-1 связывается с А-участком и предотвращает присоединение к нему аминоацил-тРНК во время инициации синтеза полипептидной цепи.

N-Формилметионин-тРНК является единственной аминоацил-тРНК, которая связывается с Р-участком; во время элонгации остальные аминоацил-тРНК связываются вначале с А-участком и затем переходят в Р-участок и Е-участок.

В результате стадии инициации синтеза полипептидной цепи образуется функциональная 70S рибосома, которая называется *инициаторным комплексом*.

Инициация у эукариот. Механизм трансляции у эукариот аналогичен трансляции у бактерий и основные различия касаются стадии инициации. Эукариотические мРНК связываются с рибосомой в виде комплекса со специфическими ферментами. Полагают, что некоторые из них связывают вместе 3' и 5' концы мРНК. 3' конец мРНК связывается белком, который называется поли(А)-связывающий белок (poly(A) binding protein, PAB). Эукариотические клетки имеют не менее 9 факторов инициации.

Стадия III – элонгация полипептидной цепи

Необходимые компоненты для элонгации:

- 1) инициаторный комплекс, образованный на предыдущей стадии;
- 2) полный набор аминоацил-тРНК;
- 3) Mg^{2+} ;
- 4) факторы элонгации (*EF-T_u*, *EF-T_s* и *EF-G* у бактерий);
- 5) пептидилтрансфераза.
- 6) ГТФ

Цикл элонгации включает 3 этапа: 1) связывание аминоацил-тРНК; 2) образование пептидной связи; 3) траслокацию.

1 этап – связывание аминоацил-тРНК. Фактор элонгации *EF-T_u* образует комплекс с ГТФ, который связывается со всеми аминоацил-тРНК в цитоплазме. Тройной комплекс, аминоацил-тРНК-*EF-T_u*-ГТФ, взаимодействует антикодоном с кодоном мРНК в А-участке рибосомы по принципу комплементарности. Фактор элонгации *EF-T_u* обладает ГТФ-азной активностью и гидролизует ГТФ. Комплекс *EF-T_u*-ГТФ уходит из 70S рибосомы. Комплекс *EF-T_u*-ГТФ восстанавливается при помощи *EF-T_s* и ГТФ.

2 этап – образование пептидной связи. Пептидная связь образуется между двумя аминокислотами, которые связаны с тРНК в А- и Р-участках рибосомы. Происходит перенос иницирующей N-формилметионильной группы от тРНК на аминогруппу второй аминокислоты, находящейся в А-участке. α -Аминогруппа аминокислоты в А-участке действует как нуклеофильная группа, замещая тРНК в Р-участке для образования пептидной связи. В результате образуется дипептидил-тРНК в А-участке и деацилированная тРНК остается связанной с Р-участком. Образование пептидной связи катализируется ферментом *пептидилтрансферазой* (составная часть 50S субъединицы рибосомы)

3 этап - *транслокация*. При участии фактора *EF-G (транслоказа)* и за счет энергии ГТФ происходит процесс *транслокации* – рибосома перемещается на один кодон мРНК в направлении 5'→3', пептидил-тРНК перемещается в Р-участок, а тРНК из Р-участка перемещается в Е-участок, а затем высвобождается в цитозоль. В результате транслокации в А-участок рибосомы приходит следующий новый кодон мРНК. К нему методом случайного подбора присоединяется комплементарная аминоацил-тРНК. Между дипептидом Р-участка и аминокислотным остатком в А-участке замыкается пептидная связь. Образующийся трипептид транслоцируется в Р-участок, а в А-участок приходит следующий новый кодон мРНК и т.д. Таким образом, процесс повторяется пока в Р-участок не придет один из терминирующих кодонов.

Элонгационный цикл у эукариот подобен циклу у прокариот. Факторы элонгации eEF1 α , eEF1 β и eEF2 выполняют функции аналогичные функциям EF-Tu, EF-Ts EF-G, соответственно. Эукариотические рибосомы не имеют Е-участка. Ненагруженная тРНК

Стадия IV – терминация

Необходимые компоненты стадии:

- 1) АТФ;
- 2) *терминирующий (нонсенс-кодон)*;
- 3) *факторы терминации (релизинг-факторы) – RF₁, RF₂ и RF₃*;
- 4) *пептидилтрансфераза*;

1. После многих циклов элонгации, в результате которых синтезируется полипептидная цепь белка, в А-участке появляется *терминирующий или нонсенс-кодон* (УАА, УАГ, УГА).

2. В норме отсутствуют молекулы тРНК, способные узнавать нонсенс-кодона. Факторы терминации узнают данные кодона: RF₁ узнает кодона УАА и УАГ, RF₂ – УАА и УГА.

3. Связывание релизинг-фактора с терминирующим кодоном в А-участке активирует пептидилтрансферазу, которая гидролизует связь между полипептидом и тРНК в Р-участке. После гидролиза и высвобождения синтезированного полипептида и тРНК рибосома диссоциирует на малую и большую субъединицы, готовых к синтезу новой полипептидной цепи.

Специфическая функция RF₃ установлена неточно и предполагают, что он участвует в диссоциации рибосомы на субъединицы.

У эукариот в терминации участвует фактор eRF, который узнает все три кодона терминации.

Энергетические затраты белкового синтеза

1. При образовании каждой аминоацил-тРНК используется энергия двух высокоэнергетических фосфатных групп.

2. АТФ затрачивается каждый раз, когда неправильно активированная аминокислота гидролизуетс я аминоацил-тРНК-синтетазой.

3. ГТФ расщепляется на ГДФ и P_n во время первого этапа элонгации и во время

транслокации.

Таким образом, более 4-х высокоэнергетических связей затрачивается на образование каждой пептидной связи в полипептиде.

Стадия V - посттрансляционная модификация полипептидной цепи

Многие полипептиды, образующиеся при трансляции мРНК подвергаются модификации различными способами и включают следующие процессы:

1. Модификация N-конца и C-конца. Удаление формильной группы и формилметионина на N-конце бактериальных белков катализируется *деформилазами*. Под действием аминопептидазы может произойти отщепление одного или нескольких N-концевых остатков. У прокариот и эукариот концевой метионин иногда отщепляется в то время, когда синтез остальной полипептидной цепи еще продолжается.
2. Удаление сигнальных последовательностей. Некоторые белки содержат на N-конце дополнительную полипептидную последовательность, которая направляет этот белок к месту его назначения в клетке. Такие сигнальные последовательности удаляются с помощью особых пептидаз.
3. Образование дисульфидных мостиков, которые помогают уберечь нативную конформацию от денатурации.
4. Модификация боковых цепей аминокислот:
 - 4.1) гидроксילирование остатков пролина и лизина в коллагене;
 - 4.2) фосфорилирование гидроксильных групп серина, треонина и тирозина (увеличение отрицательного заряда, например, в казеине молока для связывания с ионами кальция или для активации некоторых ферментов, например, гликоген-фосфорилазы);
 - 4.3) карбоксилирование (белок свертывания крови протромбин, содержит в своей N-концевой области несколько остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты, которые включаются в белок при помощи фермента, зависящего от витамина К);
 - 4.4) метилирование групп (мышечные белки и цитохромы);
 - 4.5) присоединение боковых углеводных цепей (протеогликаны).
5. Присоединение простетических групп (например, молекула биотина, ковалентно связанная с ацетил-КоА-карбоксилазой).
6. Частичный протеолиз (например, при превращении проколлагена в коллаген и проинсулина в инсулин).

21. Сравнительная характеристика синтеза белков у прокариот и эукариот.

Кратко подытожим особенности трансляции у эукариот и прокариот. Общий план биосинтеза белков у эукариот аналогичен таковому у прокариот. Однако, у эукариот участвуют большее количество факторов регуляции и некоторые этапы являются более сложными. Основные признаки сходства и различий:

1. *Рибосомы*. Рибосомы эукариот больше по размеру по сравнению с рибосомами прокариот и имеют молекулярную массу 4200 кДа (рибосома 70S прокариот имеет молекулярную массу 2700 кДа).

2. *Иницирующая aa-тРНК*. У эукариот иницирующей аминокислотой является метионин и иницирующей аминокислотой тРНК выступает метионин-тРНК.

3. *Инициация*. Иницирующим кодоном мРНК у эукариот всегда выступает АУГ. Эукариоты, в отличие от прокариот, не используют специфический обогащенный пуринами участок мРНК на 5'-конце мРНК дистальнее иницирующего кодона АУГ. Однако, именно с этого иницирующего кодона мРНК начинается процесс трансляции. Малая субъединица рибосомы (40S) связывается с кэпом на 5'-конце молекулы мРНК и поиск иницирующего кодона АУГ идет при передвижении по мРНК к 3'-концу молекулы. Этот процесс сканирования у эукариот обеспечивается энергией каталитического гидролиза АТФ (хеликазы). В большинстве случаев эукариотические мРНК имеют только одно место старта простой полипептидной цепи, одного белка. У

прокариот имеется несколько последовательностей Shine-Dalgarno в мРНК и, следовательно, несколько мест начала синтеза полипептидных цепей. У эукариот используется большее количество белковых факторов инициации (*eIF*), чем у прокариот. Например, *eIF-4E* является белком, который связывает напрямую 7-метилгуанозин (кэп), а *eIF-4A* является хеликазой. Различия механизмов инициации между прокариотами и эукариотами касаются и процессинга мРНК. У прокариот 5'-конец мРНК, синтезируемой при транскрипции, способен немедленно связываться с рибосомой для начала трансляции. У эукариот предшественник мРНК должен подвергнуться созреванию (сплайсинг, образование кэп, полиА), транспортироваться в цитозоль и лишь затем связываться с рибосомами для трансляции.

4. *Элонгация и терминация.* Факторы элонгации у эукариот *EF1* и *EF1* аналогичны *EFTu* и *EF-Ts* у прокариот. ГТФ-*EF1* обеспечивает поступление аа-тРНК в А-участок рибосомы, а *EF1* катализирует гидролиз ГТФ до ГДФ. Эукариотический фактор *eEF2* опосредует ГТФ-зависимую транслокацию по механизмам, аналогичным действию *EF-G* у прокариот. Терминация у эукариот определяет фактор *eRF1*, а у прокариот – 2 фактора. И, наконец, фактор *eIF3*, как и у прокариот *IF3*, препятствует реассоциации субъединиц рибосомы при отсутствии инициаторного комплекса, соответствующего иницирующему кодону мРНК.

22. Регуляция биосинтеза белка

Живые клетки имеют точно запрограммированные механизмы, регулирующие синтез различных белков таким образом, что в любой клетке присутствует определенное количество молекул каждого белка, позволяющее ей осуществлять свои метаболические процессы плавно и с максимальной эффективностью.

В клетке существует 7 процессов, которые определяют концентрацию белков и каждый из этих процессов подвергается регуляции:

1. Синтез первичного РНК транскрипта.
2. Посттранскрипционный процессинг
3. Разрушение мРНК.
4. Синтез белка (трансляция).
5. Посттрансляционная модификация белка.
6. Разрушение белка.
7. Транспорт белка.

Основным механизмом регуляции биосинтеза белка является регуляция инициации транскрипции.

Гены для белков, которые требуются постоянно, экспрессируются на относительно постоянном уровне в каждой клетке организма. Гены ферментов основных метаболических путей (например, цикла трикарбоновых кислот) относятся к этой категории генов и называются *конститутивными* генами. Неизменная экспрессия генов называется *конститутивной экспрессией генов*. Внутриклеточный уровень некоторых белков повышается или снижается под действием различных сигналов. Белки, концентрация которых повышается, называются *индуцибельными*. Процесс повышения экспрессии генов называется *индукцией*. Например, экспрессия генов, кодирующих ферменты репарации ДНК, индуцируется при повреждении ДНК. Белки, концентрация которых снижается в ответ на молекулярные сигналы, называются *репрессибельными*, а процесс подавления экспрессии генов – *репрессия*. Например, достаточное поступление триптофана приводит к подавлению генов для ферментов, которые участвуют в синтезе триптофана у бактерий.

Скорость и объем синтеза белка определяется концентрацией аминокислоты, присутствующей в наименьшем количестве.

23. Фолдинг и разрушение полипептидной цепи. Оценим характеристики биосинтеза белков в клетках кишечной палочки (*E. coli*). Для удвоения числа клеток за 40 мин при 37 °С требуется синтез примерно 1000 полипептидов со средней молекулярной массой 40 кДа за секунду. Эти полипептиды локализуются в минимальном объеме цитоплазмы, менее чем 1мкм³. Общая концентрация макромолекул в цитозоле клеток *E. coli* достигает 340 г/л (напомним, что в сыворотке крови человека концентрация общего белка не превышает 85 г/л). Таким образом, синтезированная полипептидная цепь оказывается в пространстве, заполненном белками и другими макромолекулами при наличии протеолитических ферментов, способных ее гидролизовать. Возможны три негативных варианта судьбы полипептидной цепи: 1) протеолитическая деградация; 2) преципитация со снижением растворимости белка и 3) неправильное складывание полипептидной цепи. Все вышесказанное позволяет утверждать, что в процессе эволюции должны были отобраться механизмы, способные 1) сформировать правильную третичную (нативную) структуру белковой молекулы и 2) гидролизовать белки с неправильной конформацией полипептидной цепи. Для реализации таких механизмов используются белки *шапероны*, которые относятся к белкам теплового шока (hsp60, hsp70, hsp90, hsp100). Свое название эти белки получили потому, что их синтез возрастает при повышении температуры и других формах стресса. Параллельно они выполняют функцию защиты белков клетки от денатурации. Шапероны участвуют в трех процессах: 1) hsp60, hsp70, hsp90 определяют зависимое от АТФ правильное формирование третичной структуры белковой молекулы; 2) hsp70 и hsp100 определяют процессы агрегации-деагрегации полипептидных цепей и 3) hsp70 обеспечивает разрушение неправильных полипептидов после мечения их *убиквитином* в протеасомах.