

Основы молекулярной биологии. Поток генетической информации: клеточный уровень. Нуклеиновые кислоты: строение, свойства, функции.



СОСТАВИТЕЛЬ:

Доцент кафедры биологии ОмГМУ,
к.б.н.

Лазуткина Екатерина Александровна

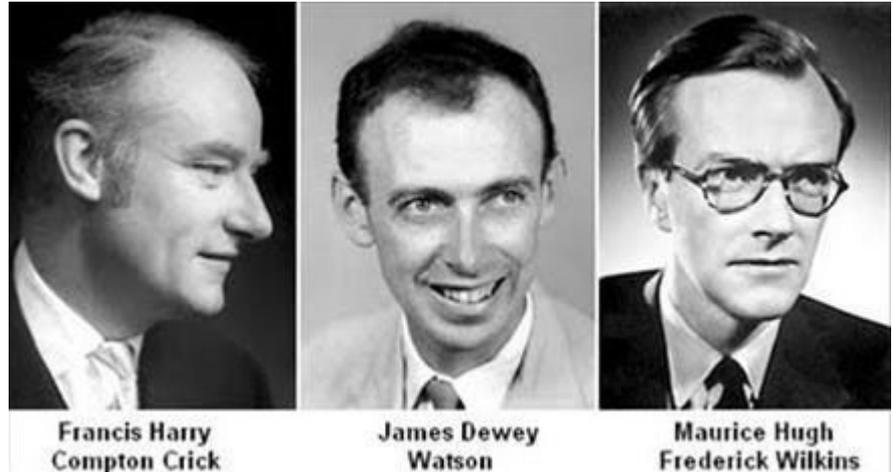
План

- 1. Строение ДНК и РНК**
- 2. Генетический код и его свойства**
- 3. Репликация ДНК**
- 4. Защита искажения генетической информации на уровне ДНК, или репарация ДНК**

Строение ДНК

Структура молекулы ДНК была расшифрована *в 1953 г.*

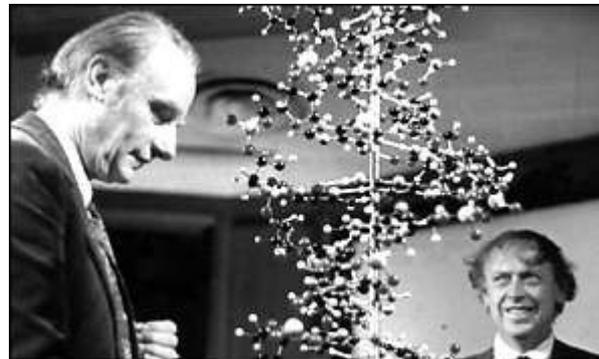
*Джеймсом Уотсоном,
Френсисом Криком,
Морисом Уилкинсом*



Нобелевская премия по физиологии и медицине 1962 г.



Ф. Крик и Д. Уотсон



Ф. Крик и Д. Уотсон возле модели ДНК
<http://www.diletant.ru/articles/13604722>

Строение ДНК

В основу постулата о комплементарной двуспиральной структуре были положены **правила Чаргаффа**:

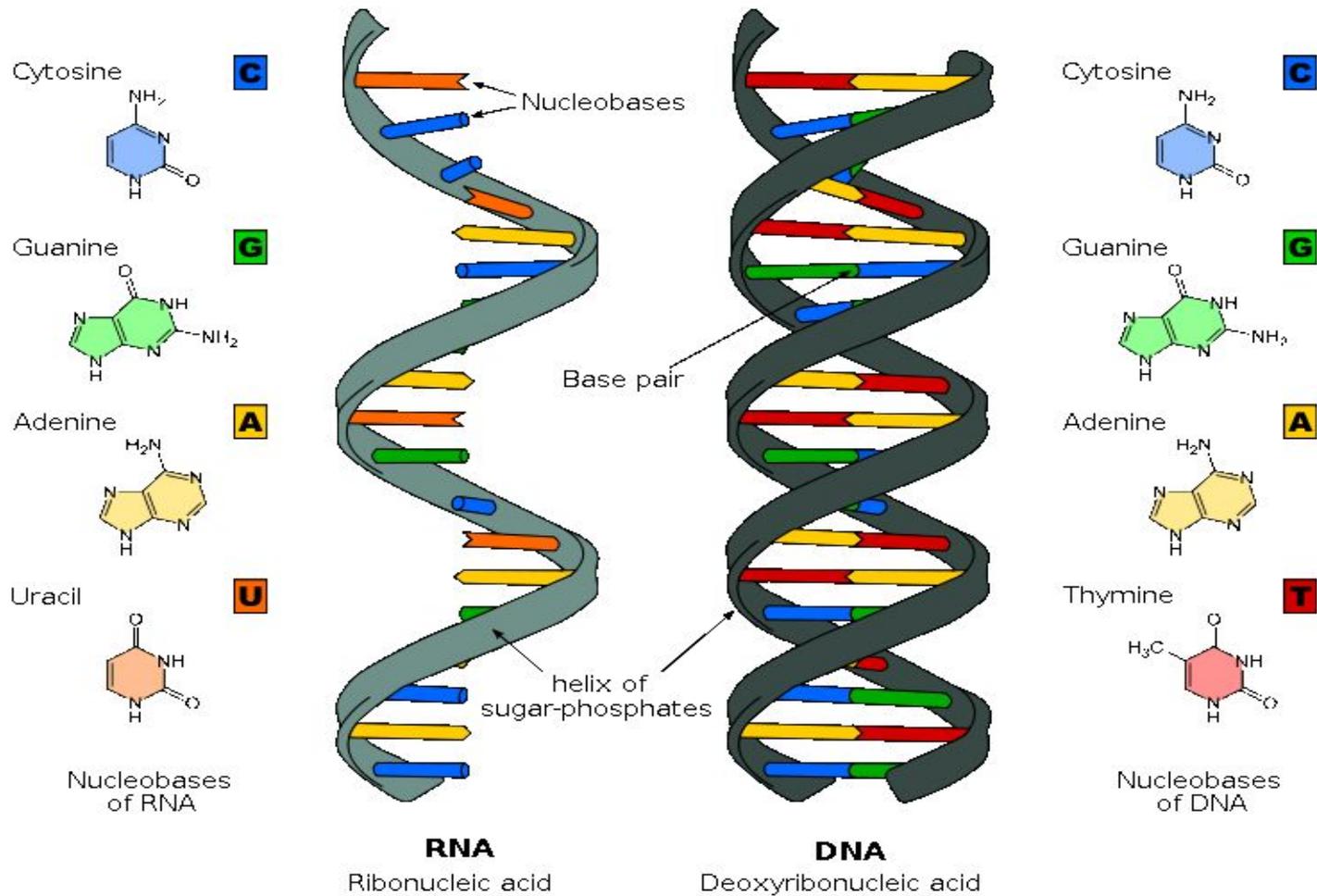
1. Количество аденина равно количеству тимина; а гуанина – количеству цитозина;

$$A = T, G = C$$

2. Количество пуринов равно количеству пиримидинов: $A+G=C+T$

$$A+G=C+T$$

Строение ДНК и РНК



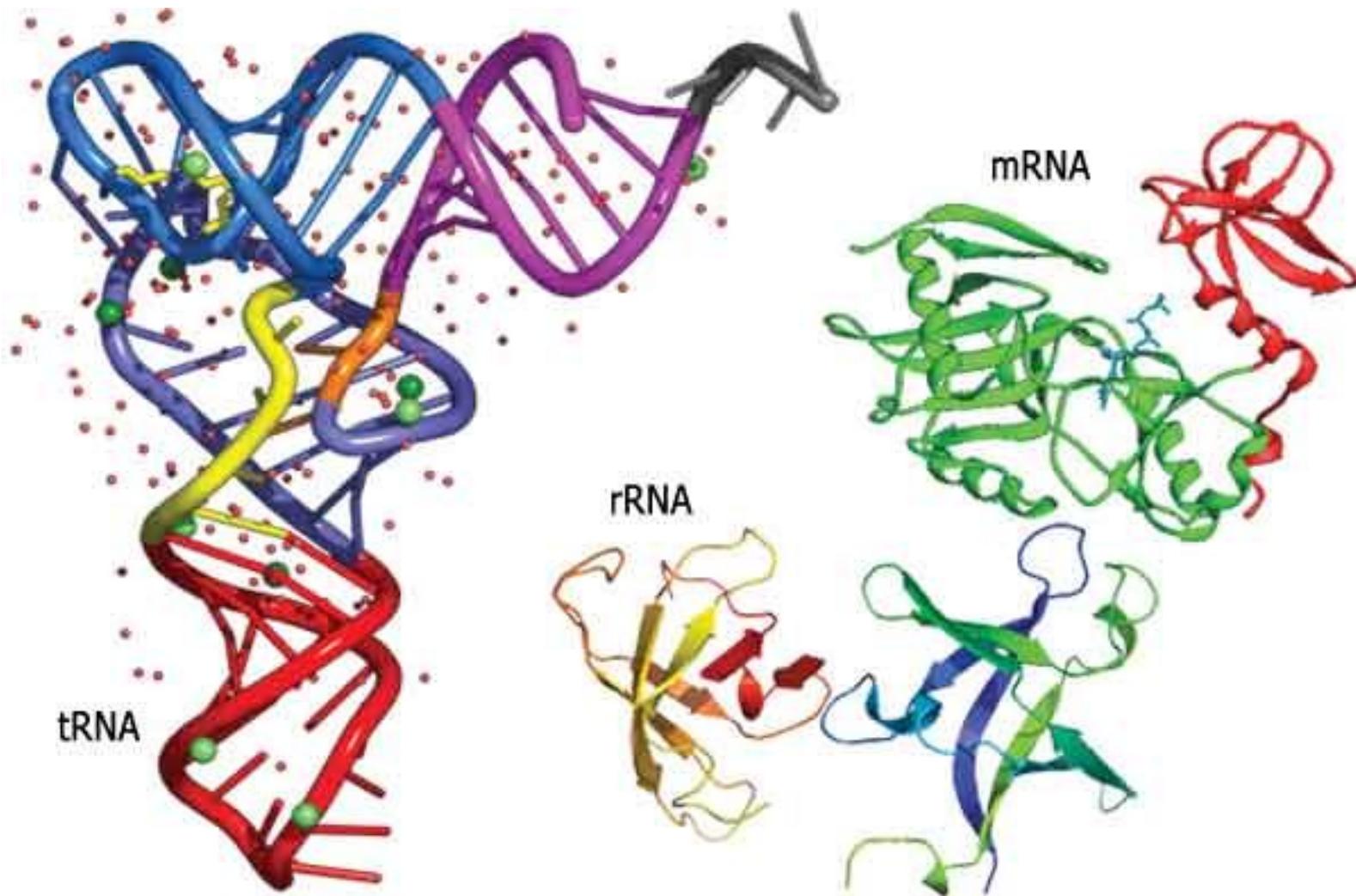
Строение ДНК и РНК

Отличия РНК от ДНК:

- 1) вместо дезоксирибозы в состав нуклеотидов РНК входит пятиуглеродный сахар — рибоза;
- 2) вместо азотистого основания тимина – урацил;
- 3) молекула РНК обычно представлена одной цепочкой (у некоторых вирусов – двумя);
- 4) молекулы ДНК могут быть кольцевыми (прокариоты) и линейными, РНК – линейные, либо тРНК – форма клеверного листа

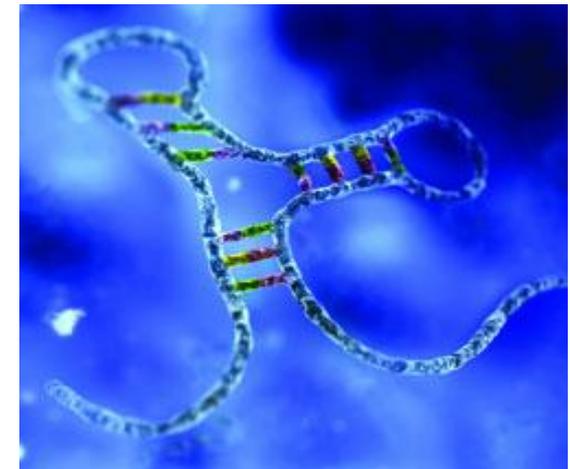
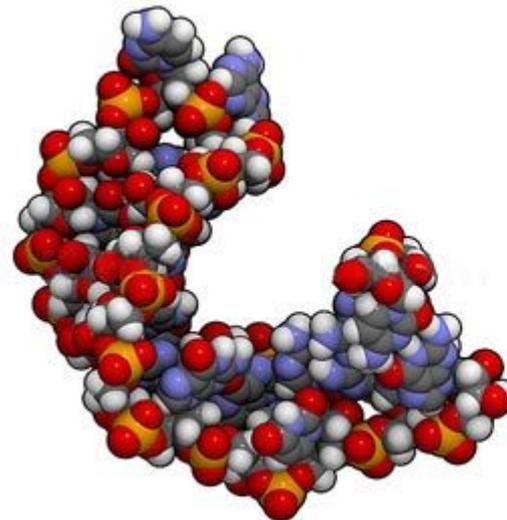
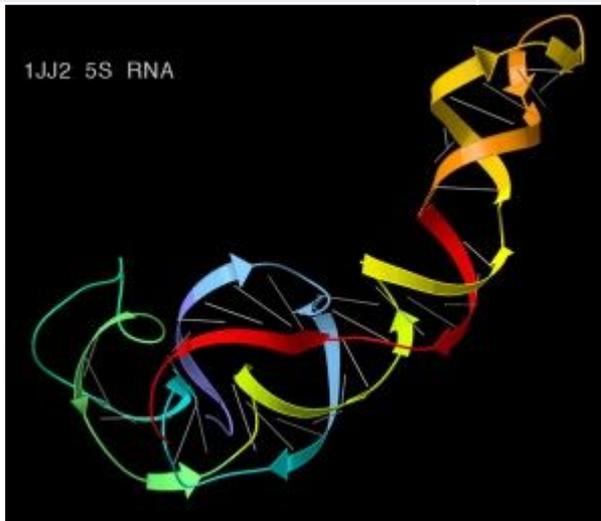
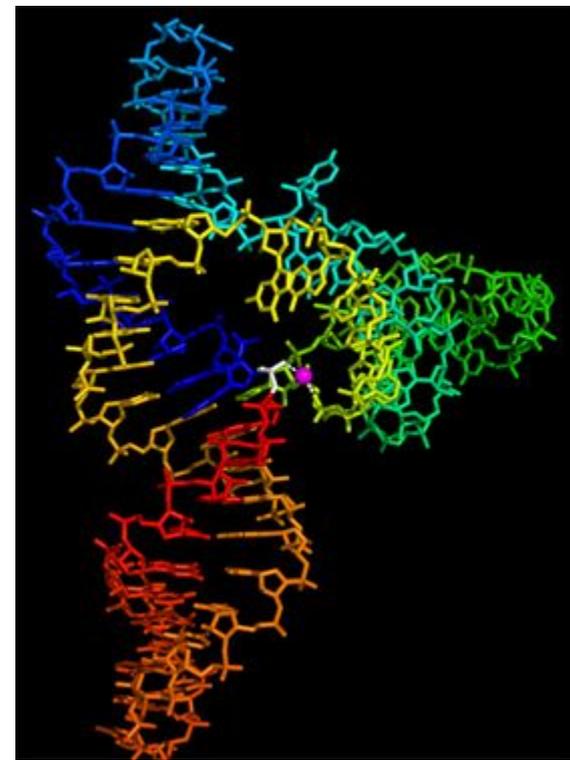
Признак	ДНК	РНК
САХАР	дезоксирибоза	рибоза
АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ	А Т Г Ц	А У Г Ц
КОЛ-ВО ЦЕПЕЙ В МОЛЕКУЛЕ	99,99% двойная спираль	99,99% одноцепочечная
ФОРМА МОЛЕКУЛЫ	Большинство двуцепочечные – линейные, часть - кольцевые	Линейные молекулы или в форме клеверного листа

Типы РНК



Виды РНК

Виды РНК	Размер в нуклеотидах (число пар)
mRNA – и(м) РНК	100-100000
tRNA – тРНК	70-90
rRNA – рРНК	Несколько дискретных классов от 100 до 500000
siRNA – малые РНК	100-300



<http://www.dddmag.com/products/2010/07/lentiviral-micrnas>

<http://www.creative-biogene.com/Product/MicroRNA>

<http://www.microbe.net/fact-sheet-ribosomal-rna-rna-the-details/>

<http://arstechnica.com/uncategorized/2008/12/journal-requires-peer-reviewed-wikipedia-entry-to-publish/>

Свойства генетического кода

1. Триплетность



3. Специфичность

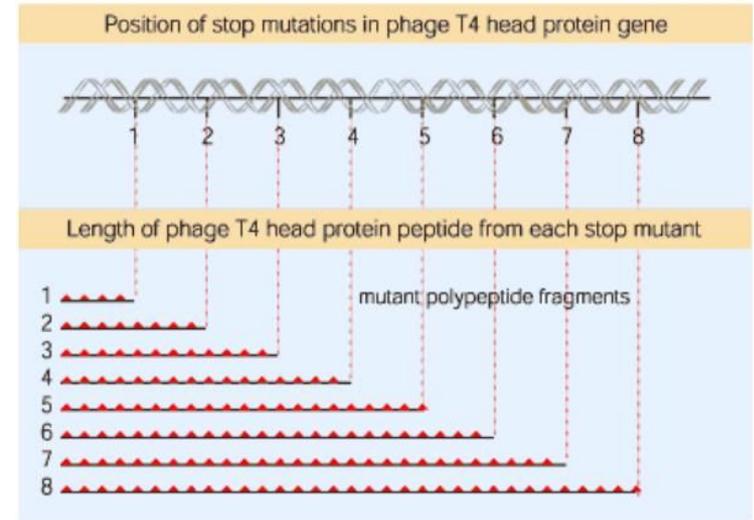
4. Неперекрываемость

5. Универсальность

6. Вырожденность (избыточность)

7. Однонаправленность

2. Коллинеарность

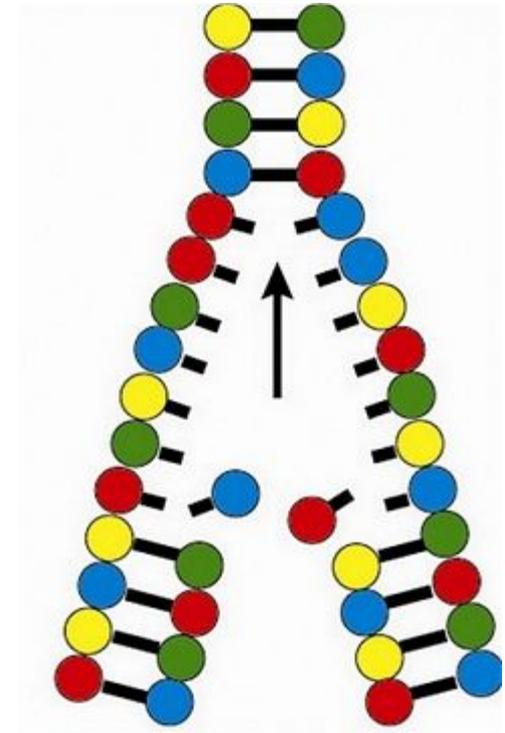
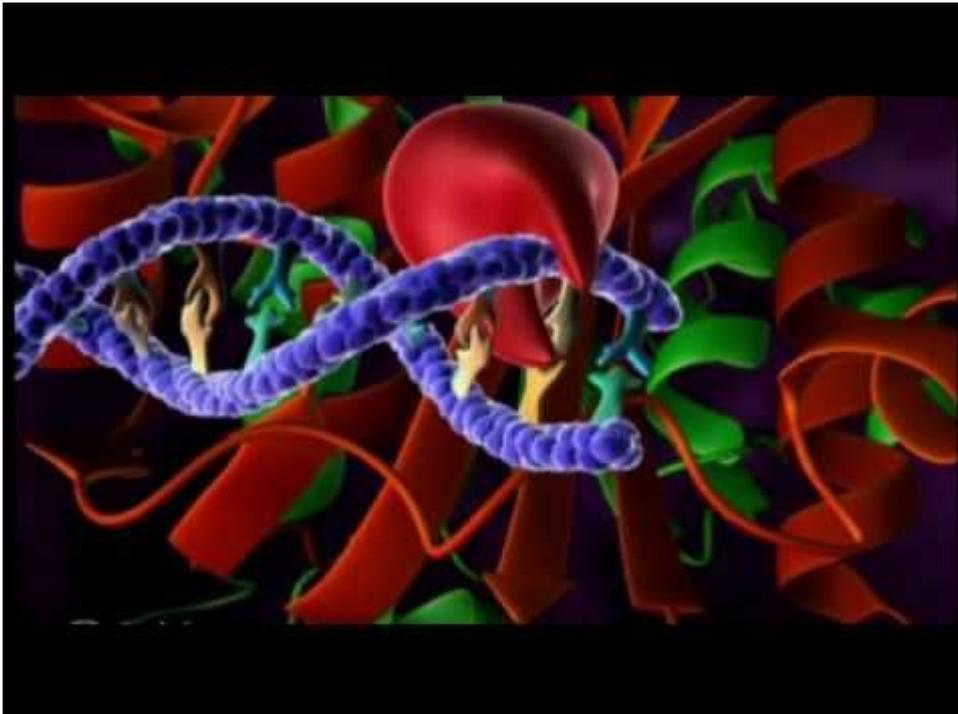


Репликация ДНК

Репликация молекулы ДНК – это процесс образования идентичных копий ДНК, осуществляемый комплексом ферментов и структурных белков.

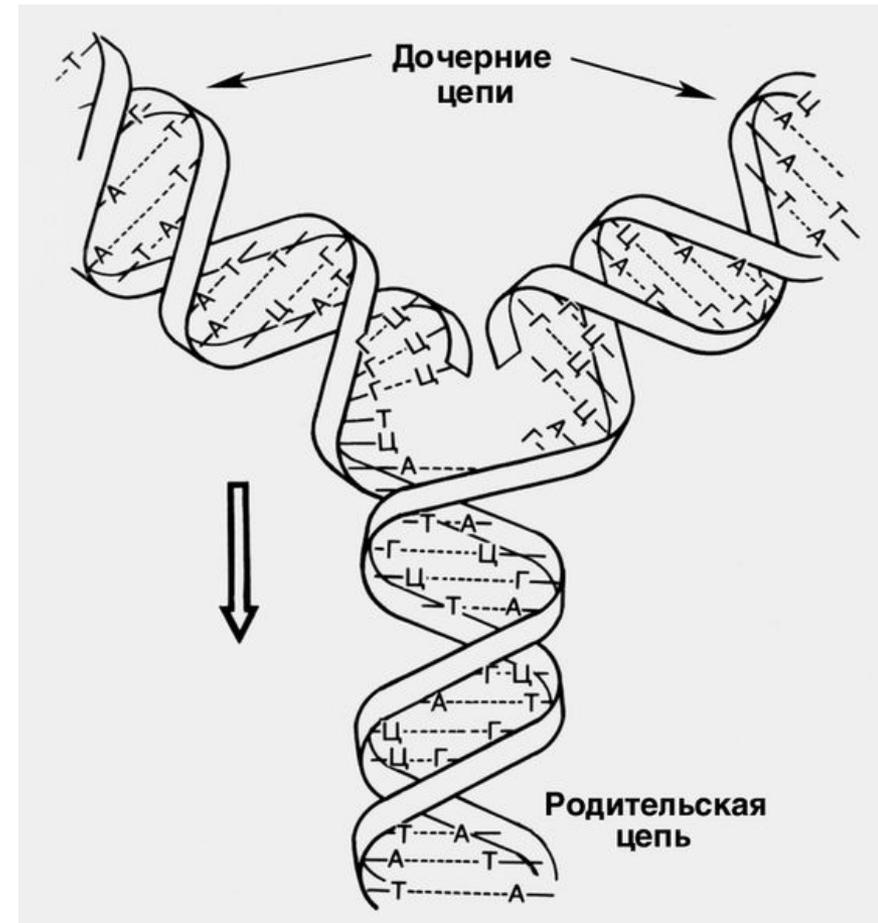
Репликация ДНК лежит в основе:

- Воспроизведения генетической информации при размножении живых организмов
- Передачи наследственных свойств из поколения в поколение
- Развития многоклеточного организма из зиготы



Принципы репликации ДНК

1. Комплементарность - пространственная взаимодополняемость (взаимное соответствие) поверхностей взаимодействующих молекул или их частей, приводящая, как правило, к образованию вторичных водородных связей между ними. Комплементарность проявляется в структуре двуспиральных ДНК и РНК, где две полинуклеотидные цепи образуют в результате комплементарного взаимодействия пар пуриновых и пиримидиновых оснований (А-Т, Г-Ц) двуспиральную молекулу.

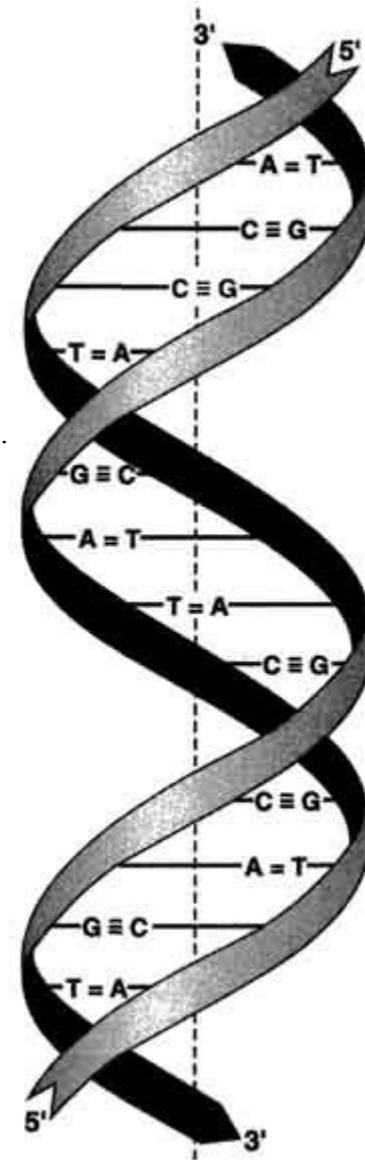
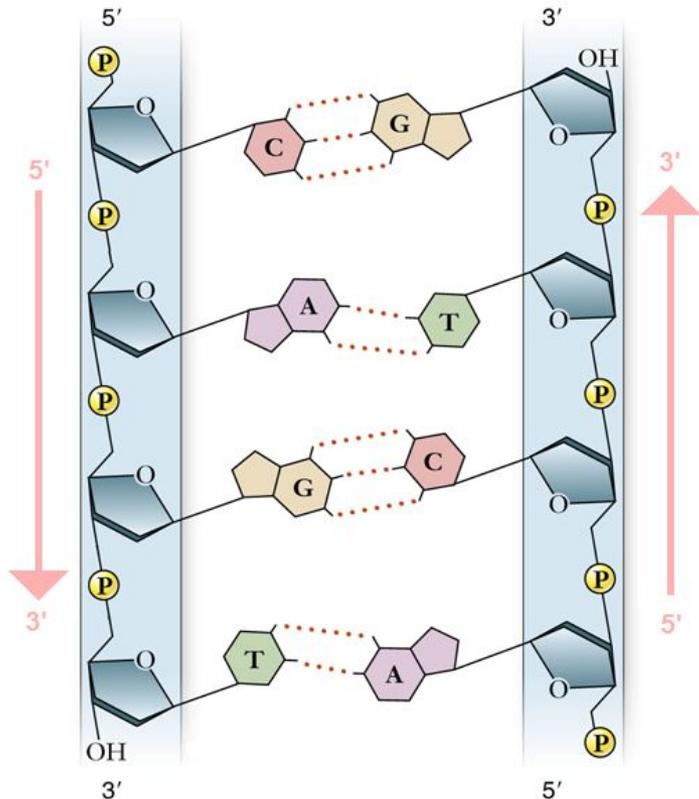


Принципы репликации ДНК

2. Антипараллельность - противоположная направленность двух нитей

двойной спирали ДНК; одна нить имеет направление от 5' к 3', другая - от 3' к 5'.

Каждая цепь ДНК имеет определенную ориентацию. Один конец несет гидроксильную группу (-ОН), присоединенную к 3'-углероду в сахаре дезоксирибозе, на другом конце цепи находится остаток фосфорной кислоты в 5'-положении сахара. Две комплементарные цепи в молекуле ДНК расположены в противоположных направлениях - антипараллельно: одна нить имеет направление от 5' к 3', другая - от 3' к 5'. При параллельной ориентации напротив 3'-конца одной цепи находился бы 3'-конец другой.



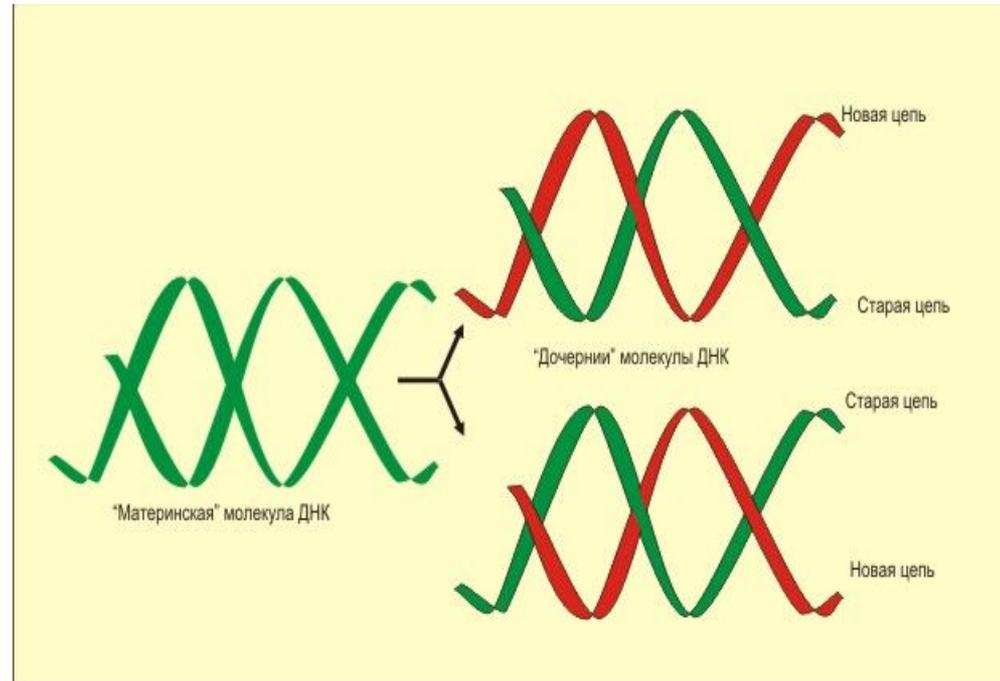
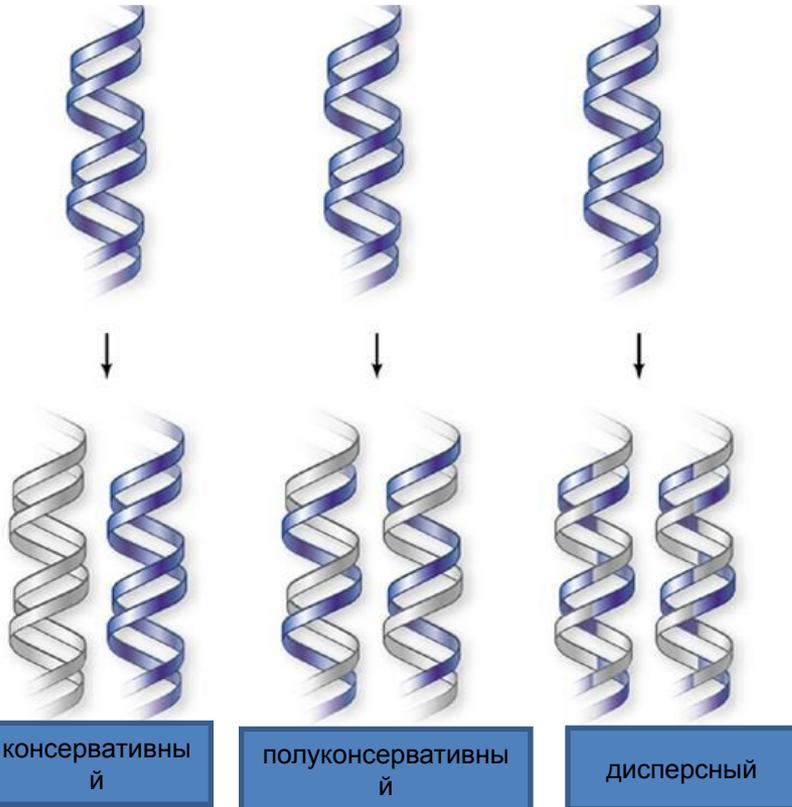
http://www.biochemistry.ru/biohimija_severina/B5873Part25-141.html

Принципы репликации ДНК

3. Полуконсервативность

Две цепи исходной молекулы ДНК расходятся вследствие разрыва слабых водородных связей между азотистыми основаниями. Каждая из них служит матрицей для образования новой цепи ДНК, а возникающие между азотистыми основаниями водородные связи соединяют старую и новую цепи, восстанавливая целостность молекулы.

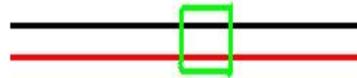
В результате каждая новая клетка получает гибридную молекулу ДНК, состоящую из одной старой и одной новой цепи.



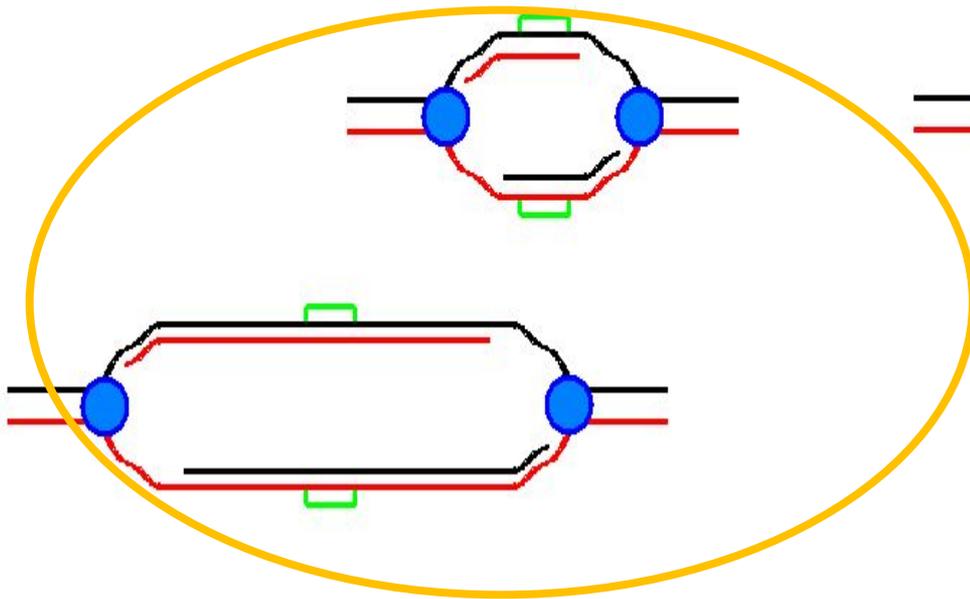
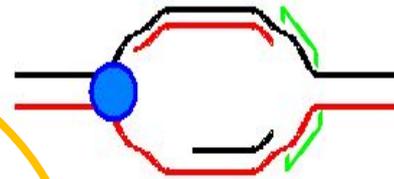
Принципы репликации ДНК

4. **Двунаправленность** - в каждой точке начала репликации формируются две репликационные вилки, которые движутся в противоположных направлениях. Продвижение вилки прекращается, когда она столкнется с репликационной вилкой соседнего репликона.

двунаправленная
репликация



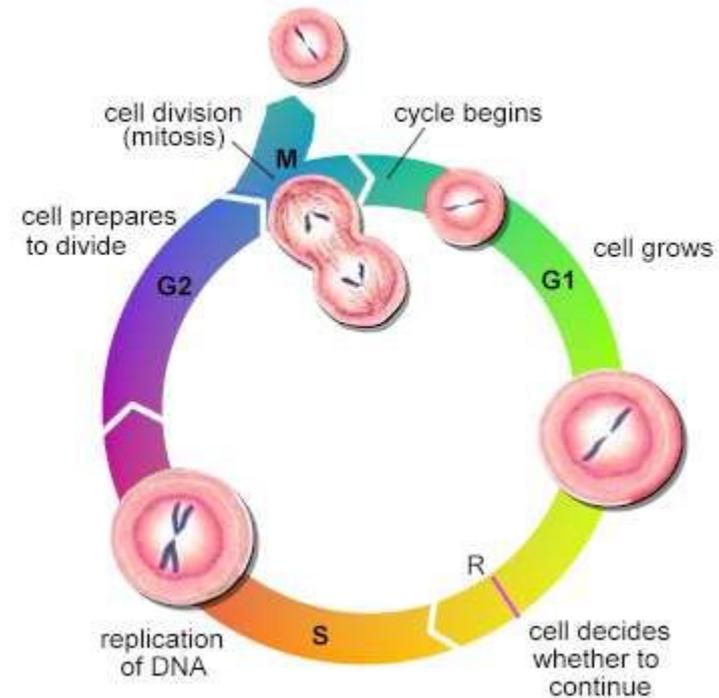
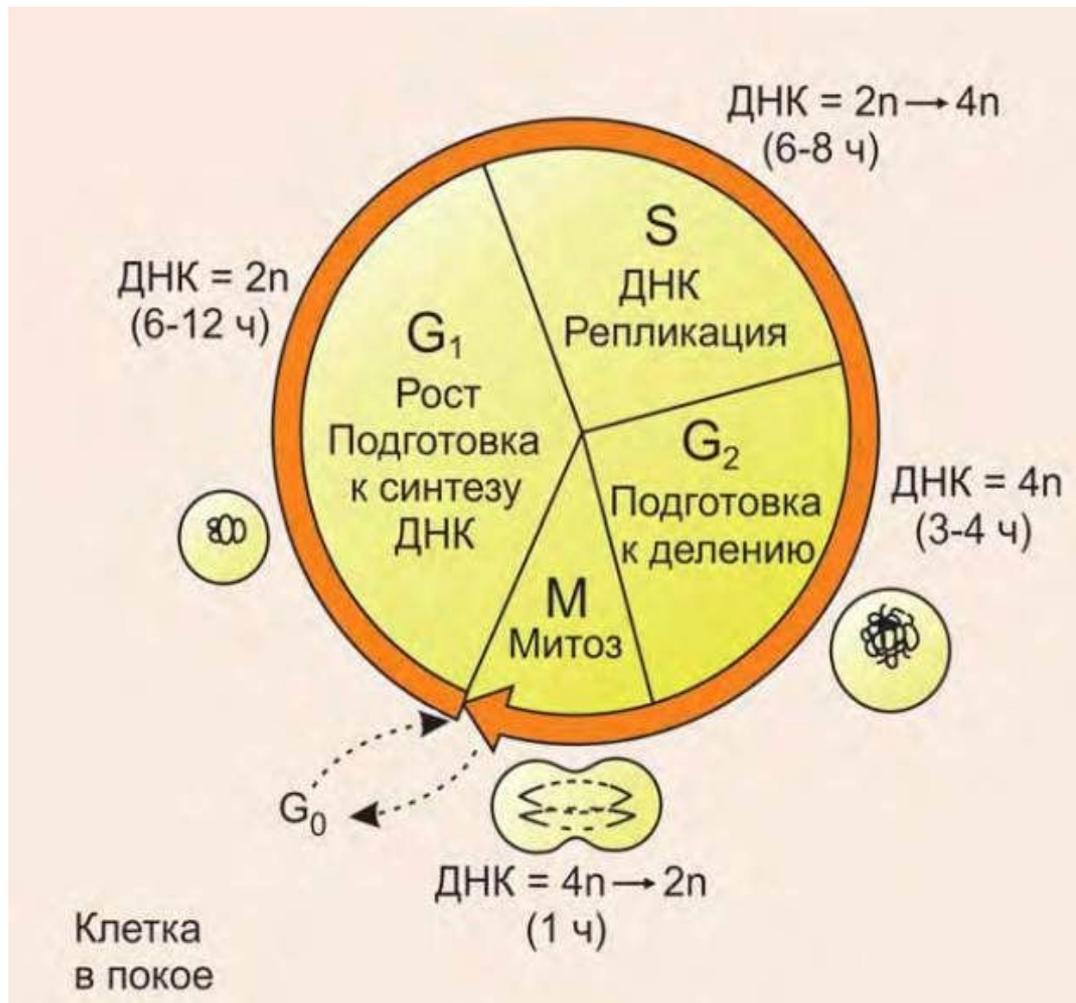
однонаправленная
репликация



Принципы репликации ДНК

5. Согласованность репликации и клеточного цикла

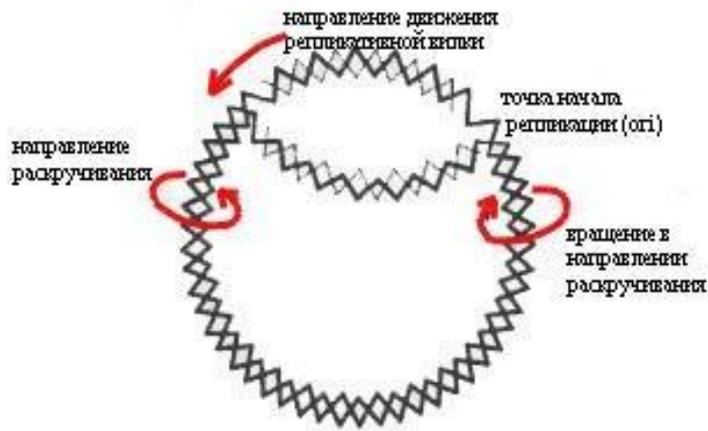
Репликация молекулы ДНК происходит в S период интерфазы



Репликация ДНК

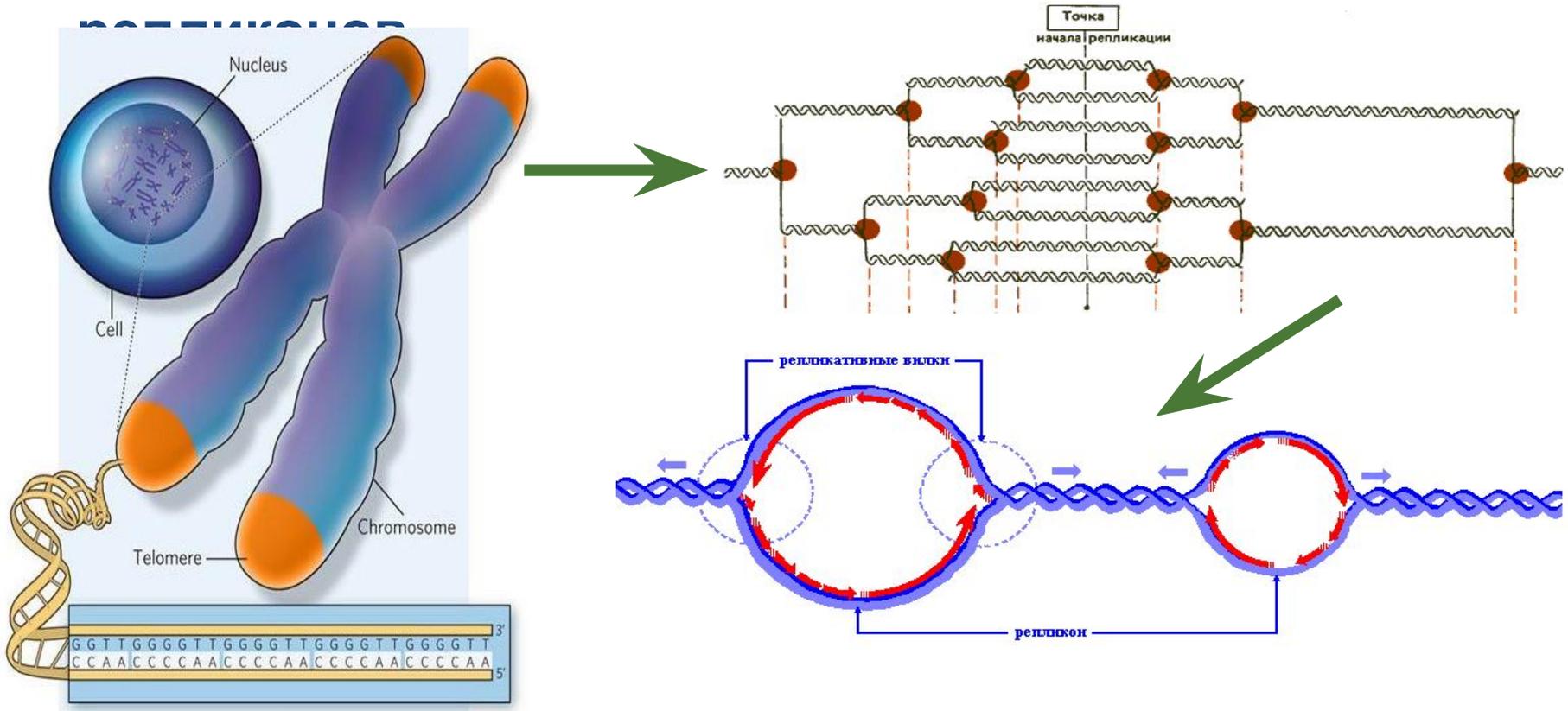
Участок молекулы ДНК от точки начала одной репликации до точки начала другой называется **репликоном**.

Бактериальная хромосома содержит один репликон.



Репликация ДНК

Эукариотическая хромосома содержит много



многих

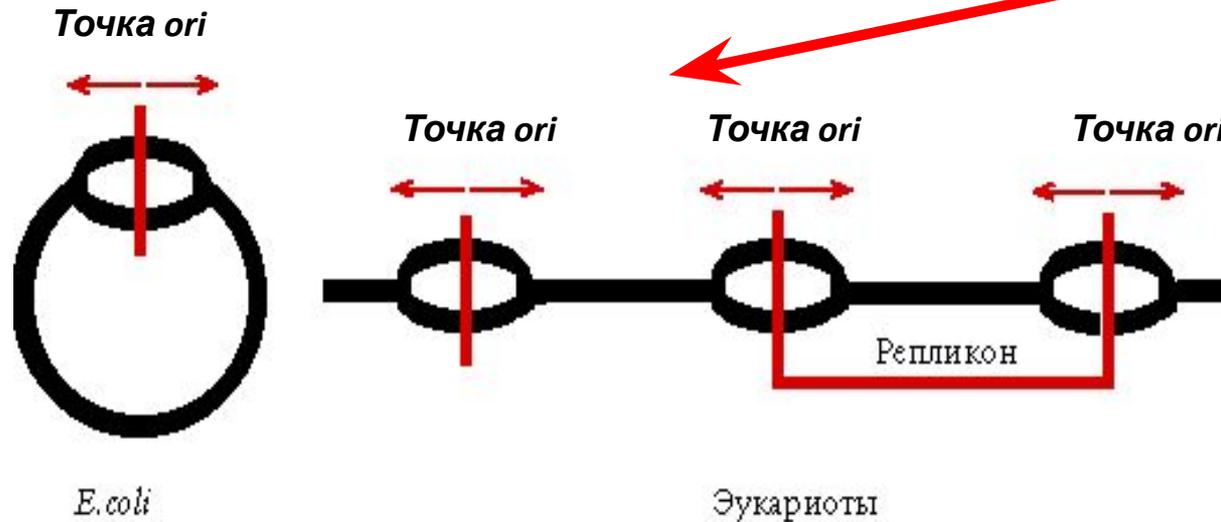
Репликация ДНК эукариотической хромосомы. Показан один из репликационных. Репликативные вилки движутся в противоположных направлениях от точки начала репликации

Каждая эукариотическая хромосома -

полирепликация

Репликация ДНК

- Репликация начинается в точке «origin» (начало репликации)
- У бактерий в кольцевом геноме имеется только одна точка «origin», тогда как у эукариотических хромосом их множество

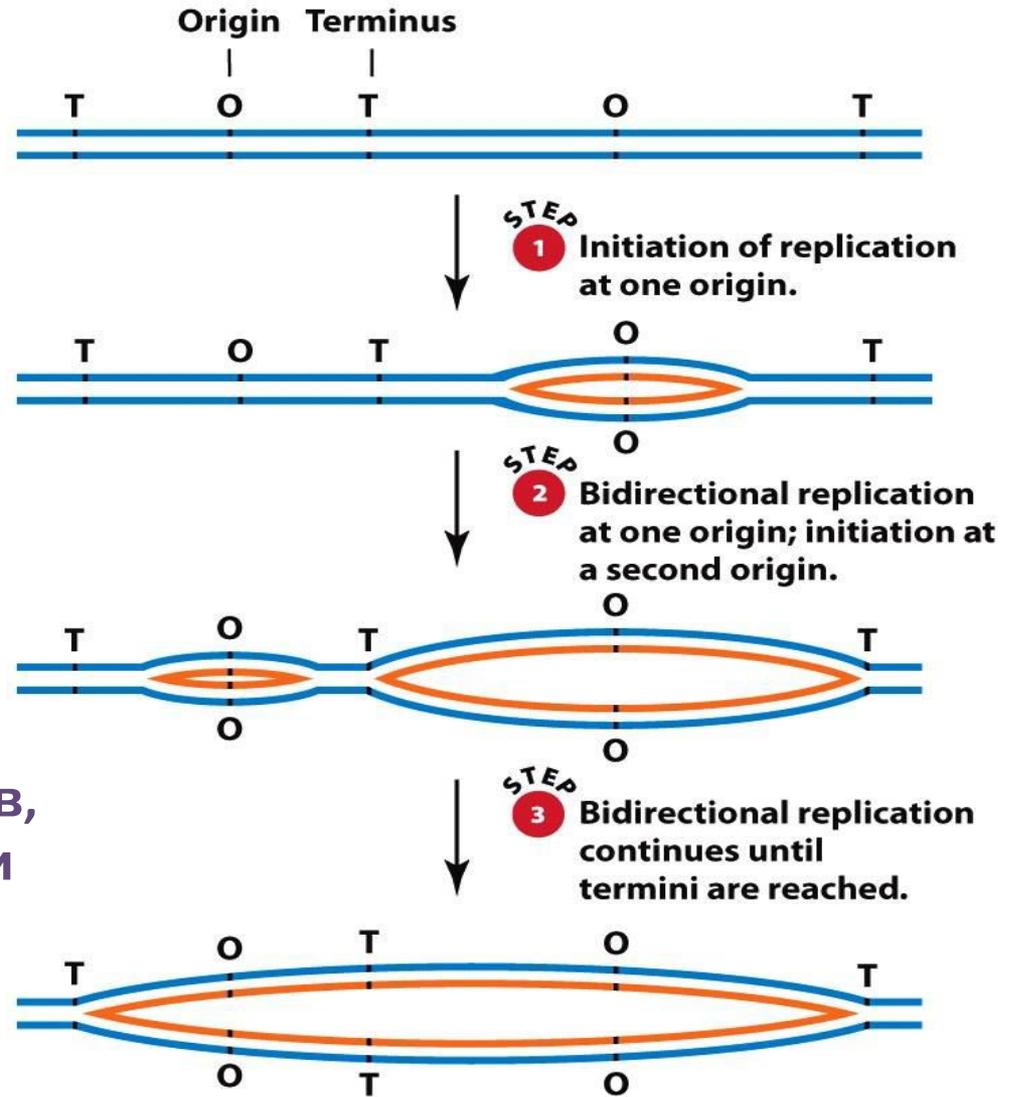


- Репликон - участок ДНК между двумя «ориджинами» репликации.

Репликоны у эукариот

Репликация у эукариот начинается на хромосоме во многих точках «origin»-репликации

Так как геномы эукариот состоят из большого числа самостоятельных репликонов, суммарное время репликации отдельной хромосомы значительно сокращается.



Diagrammatic interpretation of the replication of the DNA molecules visualized in (a) and (b).

Число и длина репликонов у разных организмов

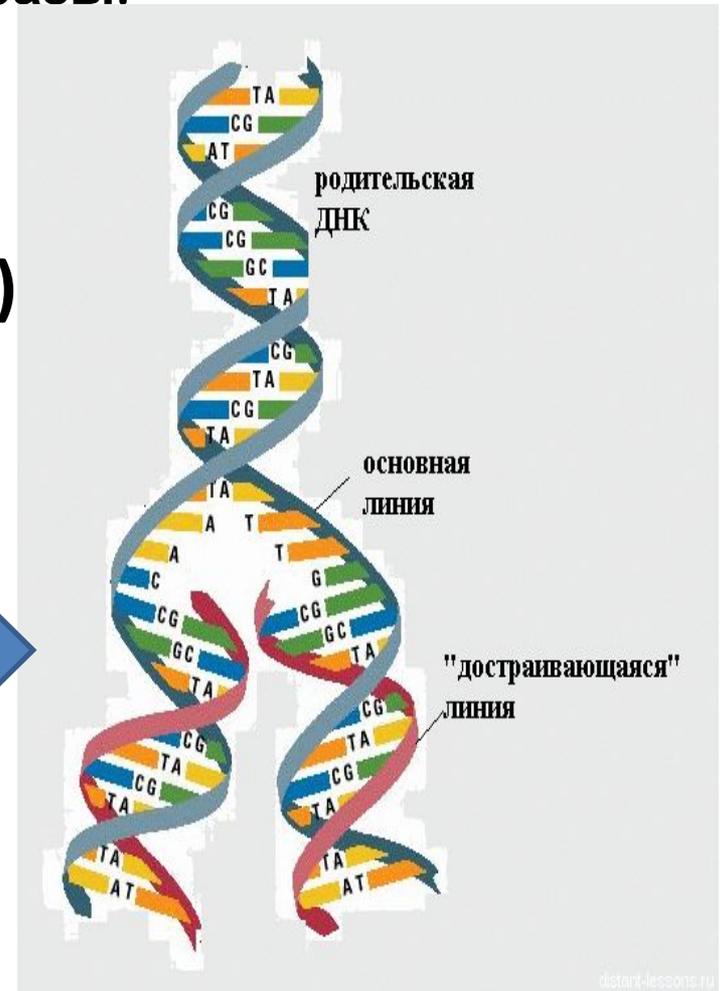
Организмы	Число репликонов	Средняя длина репликонов (тысяч пар нуклеотидов)	Скорость движения репликативной вилки (т.п.н.)
Бактерии (E. coli)	1	4200	50
Дрожжи	500	40	3,6
Дрозофила	3500	40	2,6
Тритон	15000	200	0,5
Млекопитающие (Mus musculus)	25000	150	2,2

Репликоны у эукариот распределены в геноме не случайно, они расположены группами (replicon foci). В этих группах собираются ферменты репликации, которые удлиняют вилки репликации одновременно 10-100 соседних репликонов длиной примерно по 100тпн каждый. Репликация в них завершается за 45–60 мин. Кроме этого существуют очень длинные репликоны (более 1000тпн) – столь большие, что репликация в них продолжается по несколько часов.

Репликация ДНК

В процессе репликации ДНК выделяют фазы:

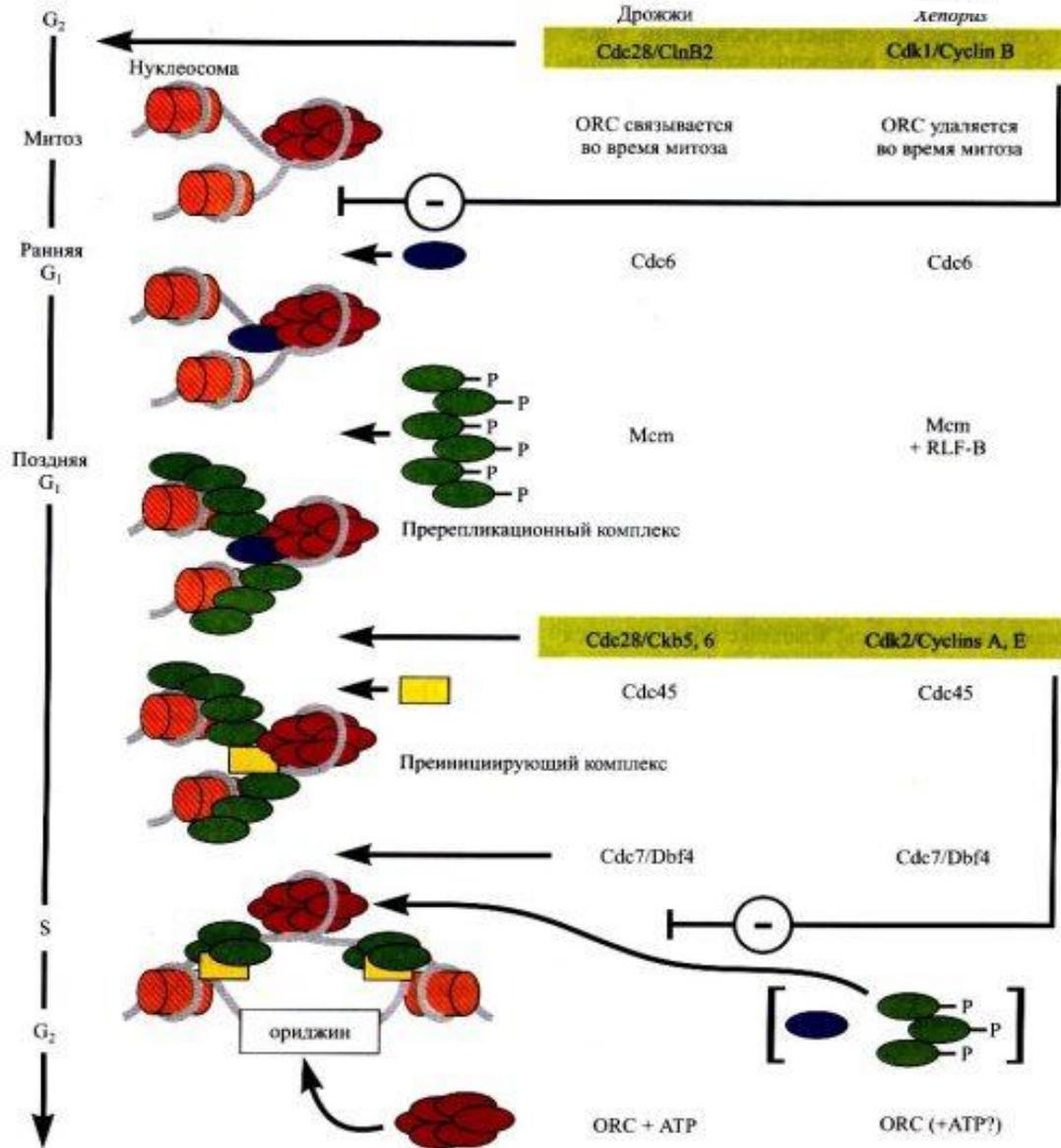
- – инициации (начало),
- – элонгации (удлинение),
- – терминации (завершение)



Инициация репликации

схема инициации репликации у эукариот

Инициация репликации ДНК эукариот начинается с образования комплекса пререпликативного (post-RC) и белка-инициатора репликации. Этот комплекс называется пререпликативным (post-RC). Он служит платформой для сборки структур более высокого порядка, которые переводят хроматин в состояние, компетентное для репликации. Последовательные стадии образования комплексов инициации репликации показаны на рисунке

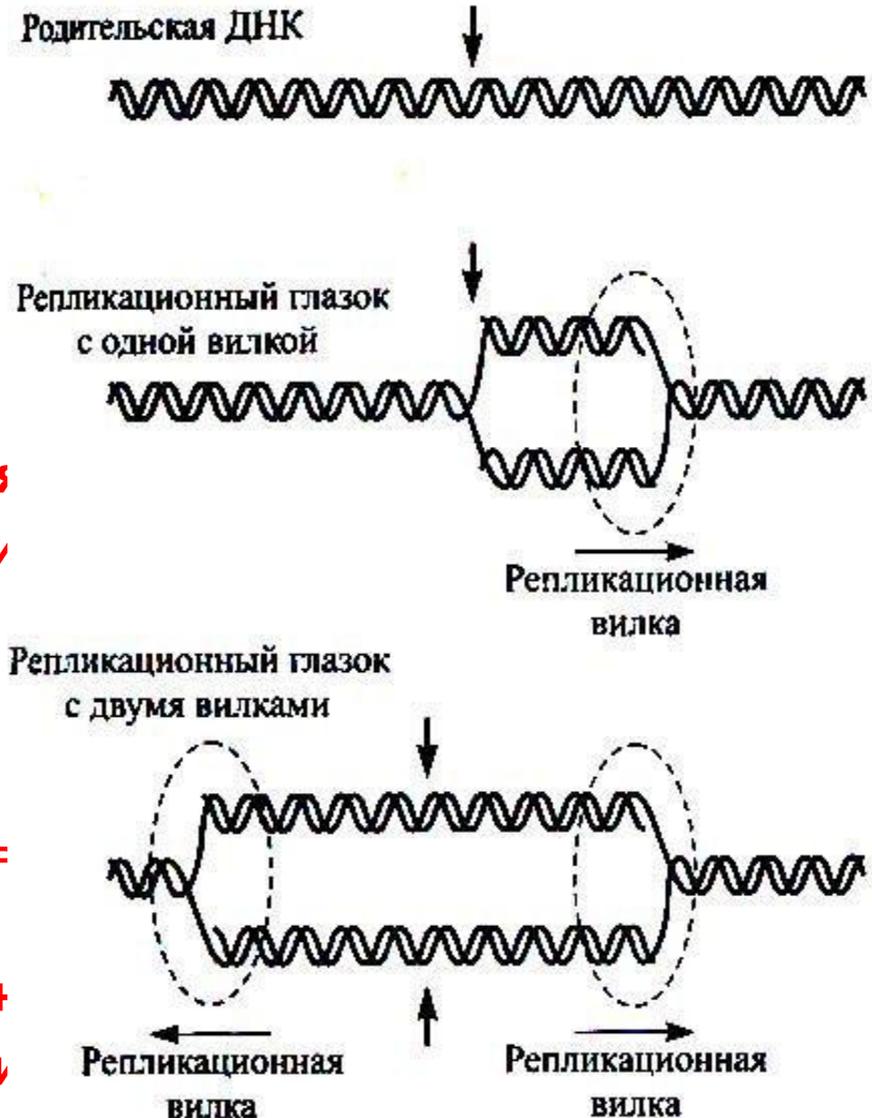


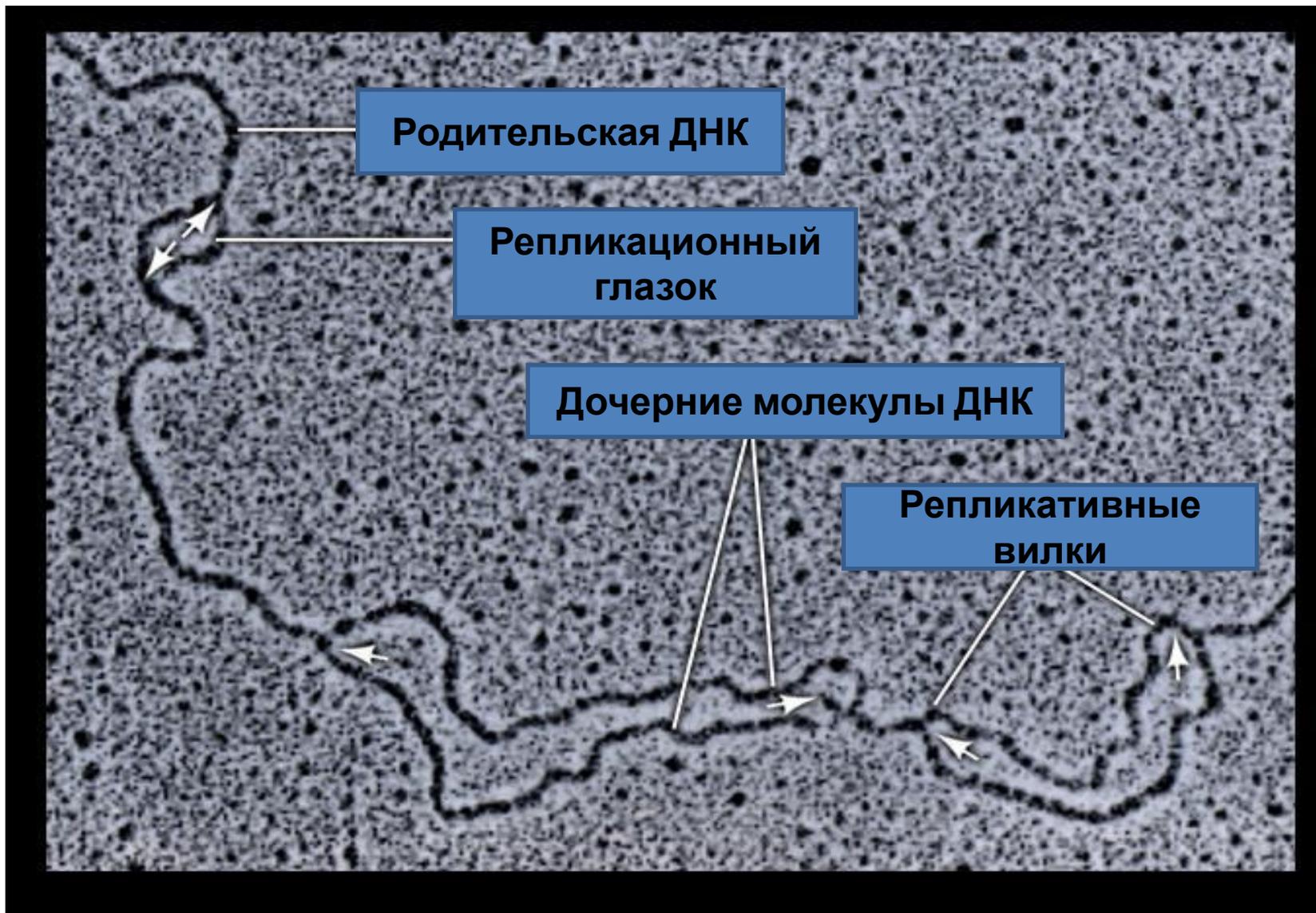
Репликация ДНК

Биологический смысл репликации ДНК:

копирование генетической информации для переноса ее следующему поколению:

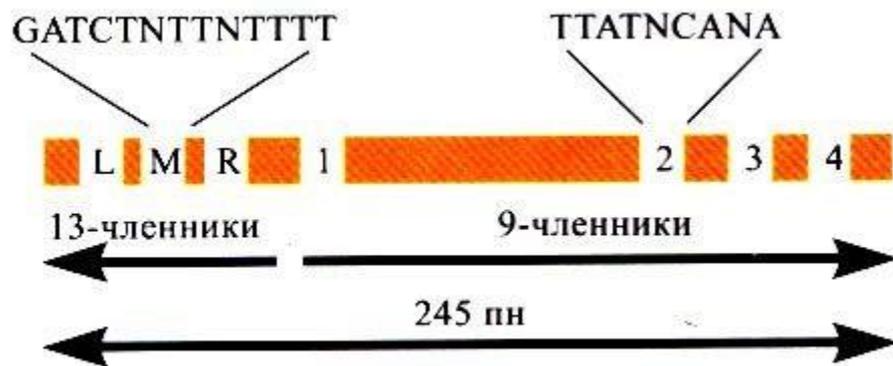
- * двойная спираль раскручивается;
- * каждая родительская цепь служит в качестве матрицы для синтеза новой дочерней цепи;
- * в ходе синтеза дочерних цепей возникают новые комплементарные пары;
- * в результате репликации образуются новые одинаковые дочерние цепи





Ориджин репликации (точки ori)

Область начала репликации хромосомы, **oriC (origin of chromosome)**, включает в себя участки со специфическими последовательностями, так называемыми ДНК-боксами, и расположенными между ними короткими последовательностями. ДНК-боксы со специфическим «мотивом» нуклеотидов, преимущественно в 9 пар нуклеотидов, перемежаются



В С

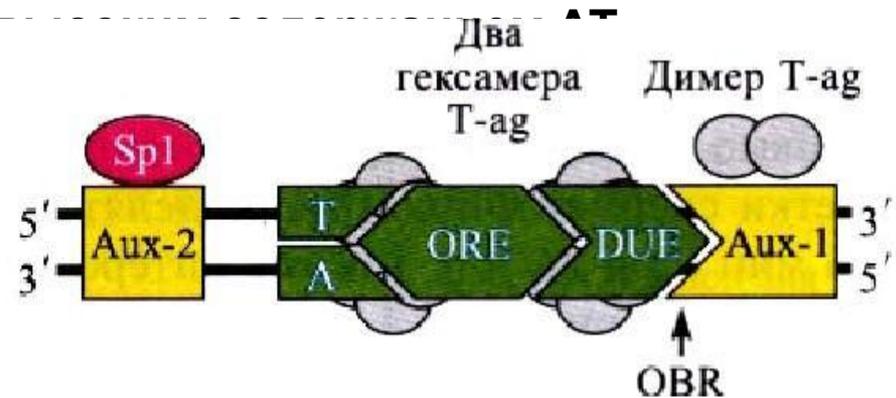


Схема минимального о



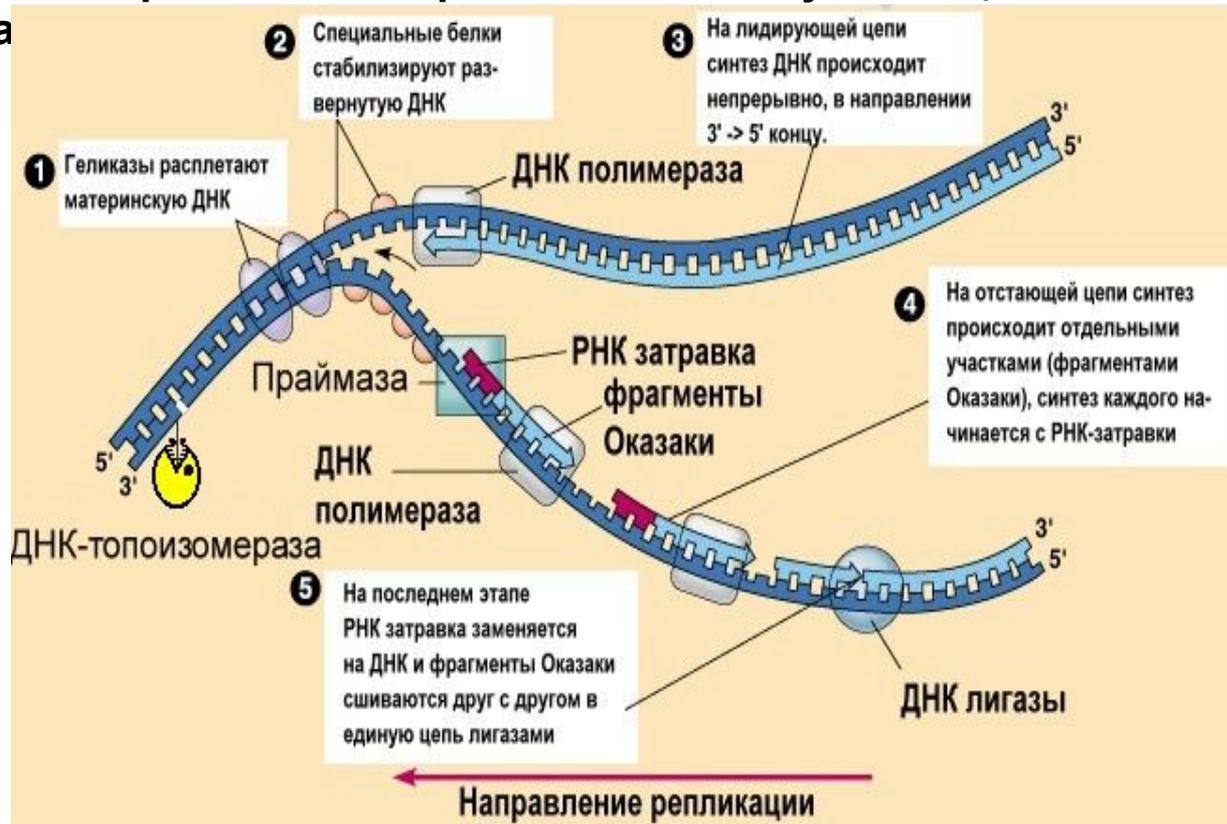
Схема ориджина *Shizosaccharomyces pombe* (дрожжи)

Ориджин репликации

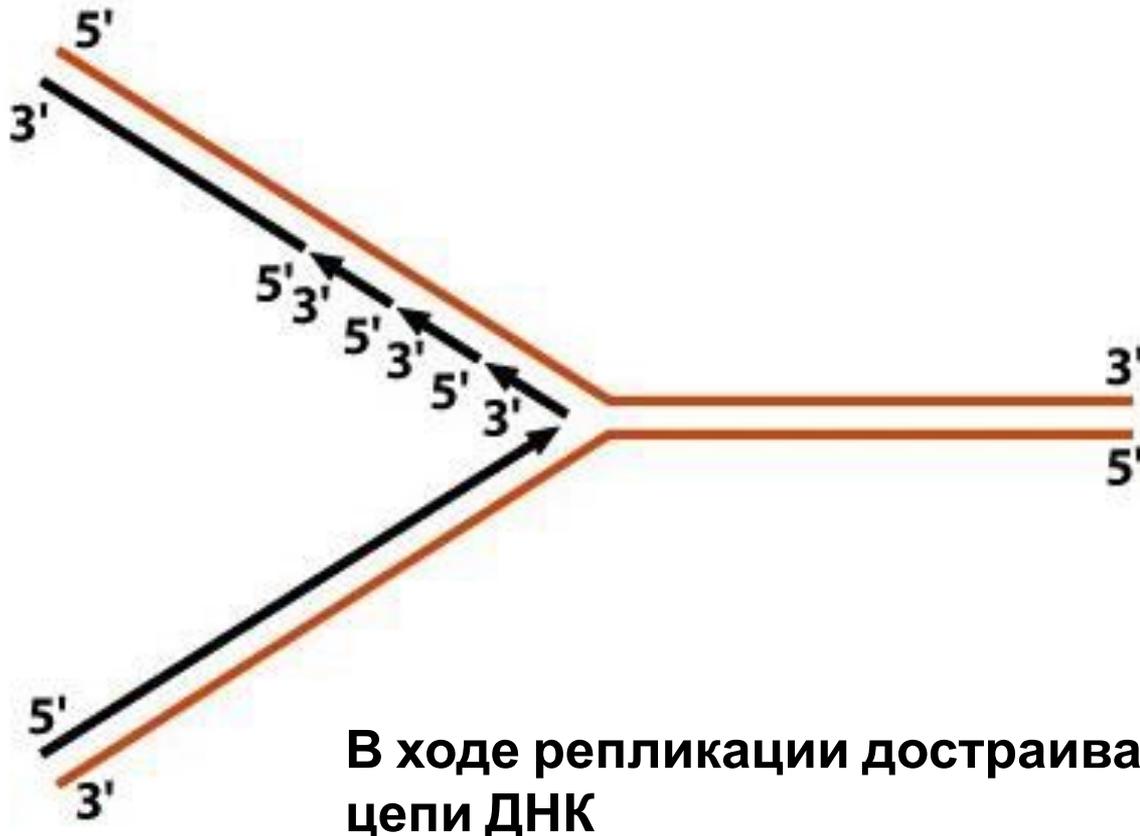
В каждой точке 'origin' образуется «глазок» репликации.

Общие свойства ориджинов репликации:

1. Точки начала репликации – это уникальные сегменты ДНК, содержащие множественные короткие повторы;
2. Эти повторы узнаются мультимерными ориджин-связывающими белками, которые играют ключевую роль в сборке ферментативных комплексов в участках начала репликации;
3. Области ориджина содержат АТ-богатые участки (аденин-тимин богатые уча



Направление движения репликативной ВИЛКИ

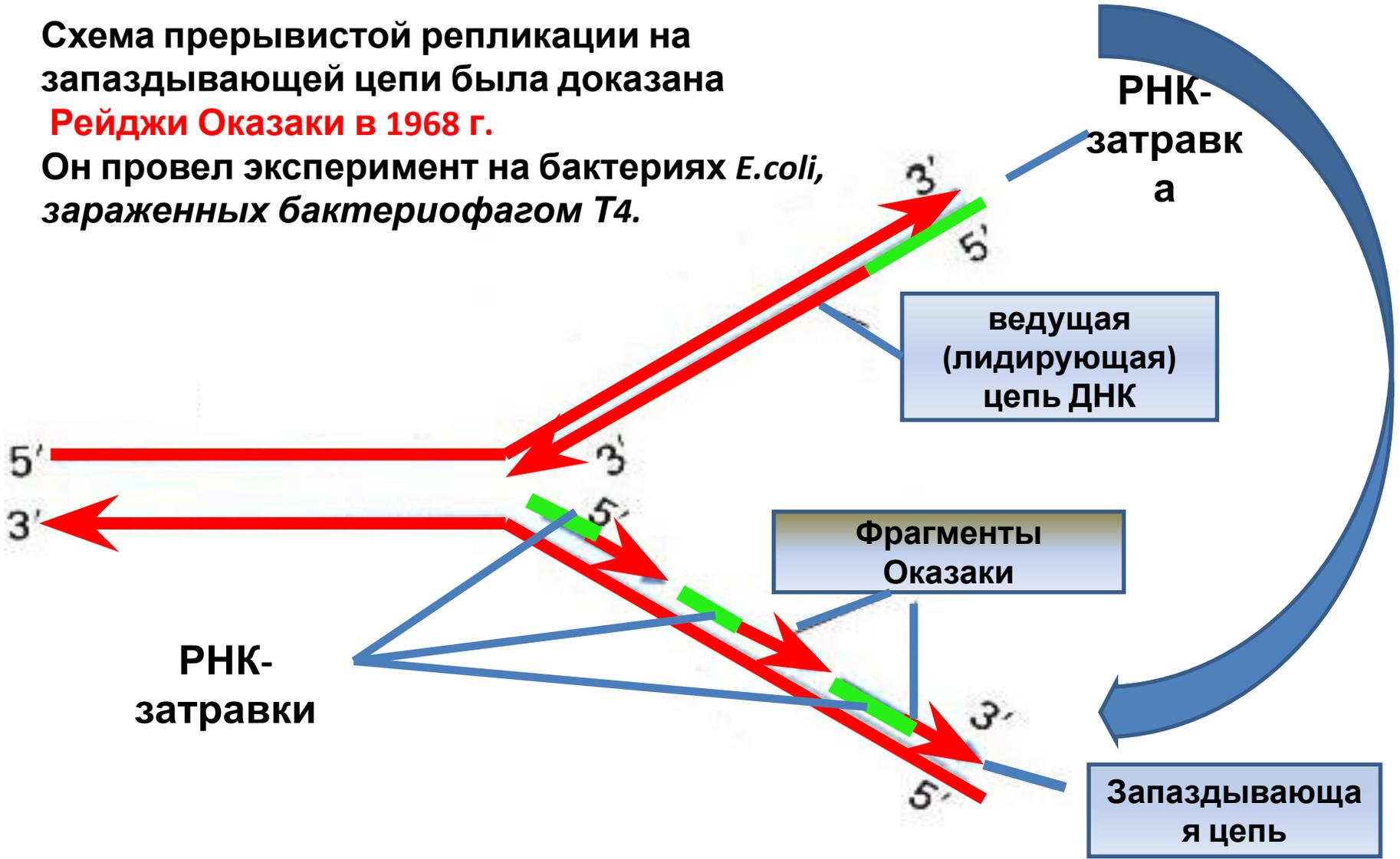


Прерывистость синтеза ДНК на запаздывающей цепи

Схема прерывистой репликации на запаздывающей цепи была доказана

Рейджи Оказки в 1968 г.

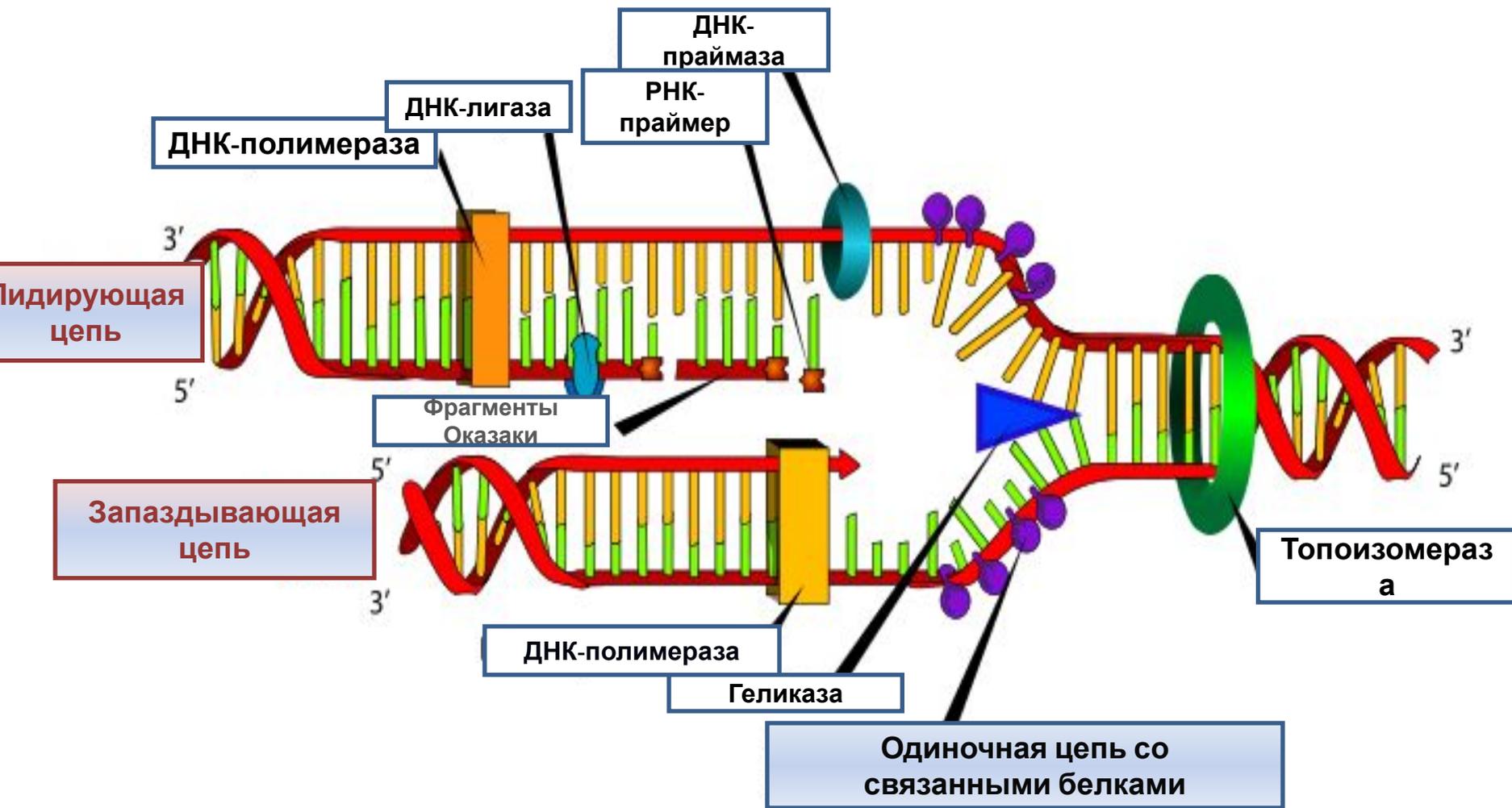
Он провел эксперимент на бактериях *E.coli*, зараженных бактериофагом T4.

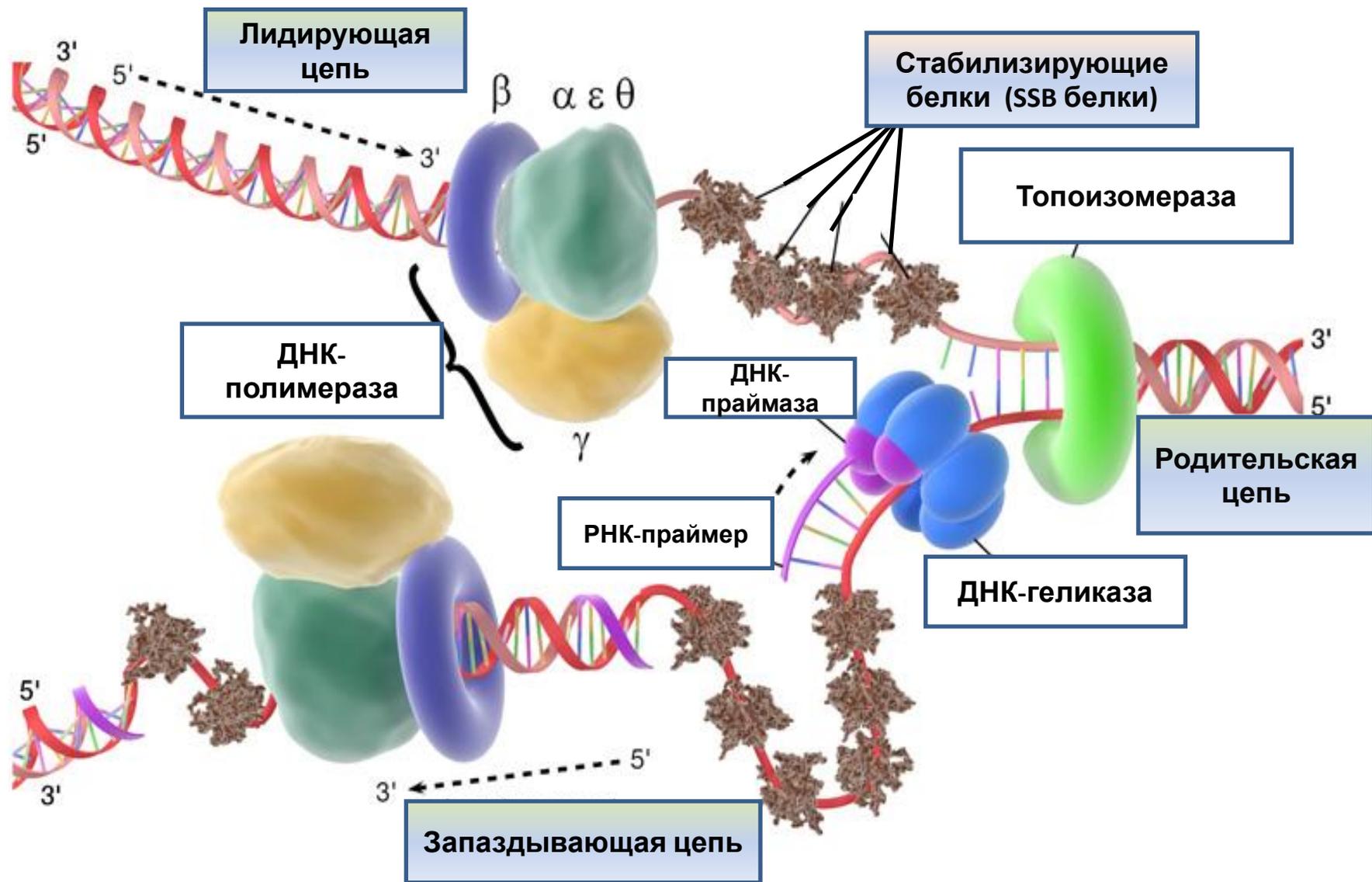


Фрагменты Оказаки

1. Синтез запаздывающей цепи осуществляется с помощью отдельных фрагментов, которые называются фрагментами Оказаки.
2. Фрагменты Оказаки у бактерий имеют длину 1 000 – 2 000 нуклеотидов. У эукариотических организмов в 10 раз меньше – 100 – 200 нуклеотидов.
3. Каждый фрагмент Оказаки состоит из небольшого участка РНК (10-12 нуклеотидов), который называется РНК-праймером или РНК-затравкой, и участка ДНК. При дальнейшем «созревании» запаздывающей цепи РНК-праймеры удаляются и замещаются участком ДНК.
4. Фрагменты Оказаки между собой сшивает ДНК-лигаза.

Репликация ДНК





Ферменты репликации

В репликации молекулы ДНК принимают участие ферменты:

- **ДНК-топоизомеразы** - ферменты изменяющие степень сверхспирализации ДНК
- **ДНК-хеликаза (геликаза)** - фермент разделяющий цепи двухцепочечной ДНК на одинарные цепи.
- **ДНК-праймаза** - это фермент РНК-полимераза, синтезирующий короткий фрагмент РНК, называемый праймером, комплементарный одноцепочечной матрице ДНК.
- **ДНК-полимеразы** - ферменты катализирующие синтез дочерних цепей на матрице ДНК по принципу комплементарности.
- **ДНК-лигаза** - фермент катализирующий сшивание одноцепочечных фрагментов ДНК.

Топоизомеразы

ДНК-топоизомеразы, находясь перед репликативной вилкой, разрезают молекулу ДНК для облегчения ее расплетания и раскручивания молекулы ДНК, после чего непрерывность ее восстанавливается.

ДНК-топоизомеразы действуют в процессе репликации ДНК, создавая временного одностороннего или двустороннего разрыва в молекуле ДНК, проведения сквозь разрыв другого, целого сегмента цепи и восстановления цепи в месте разрыва. В результате такого ферментативного акта целостность цепей сохраняется, но их топологическое состояние может измениться.

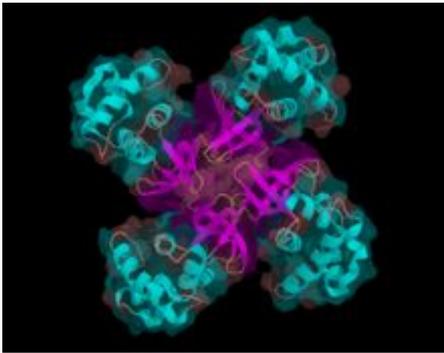


Схема строения человеческого топоизомеразы I в комплексе с ДНК.

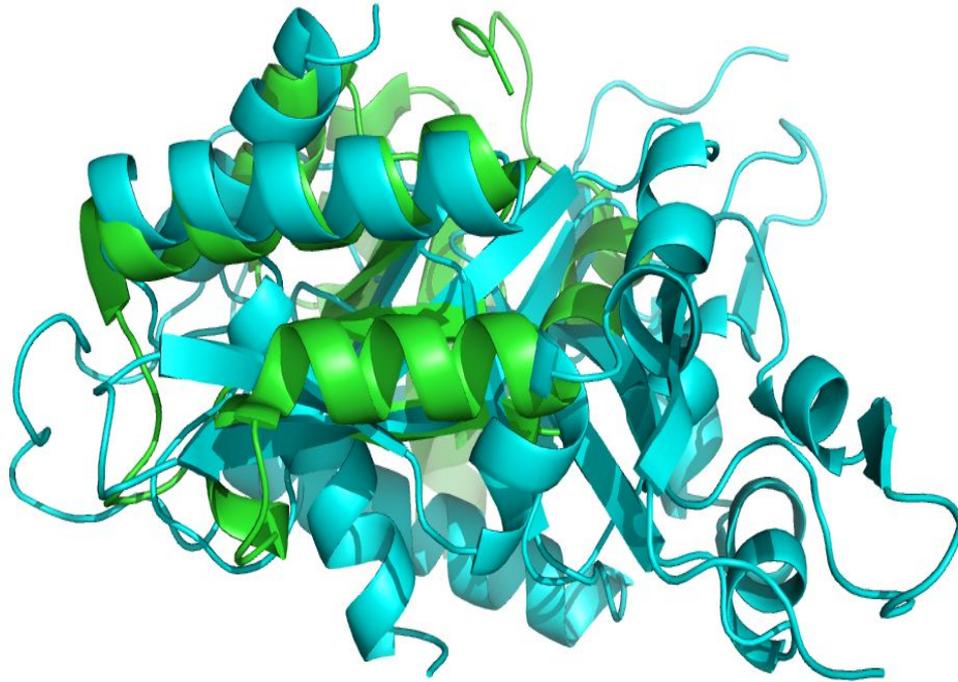
Топоизомеразы убирают суперспирализацию ДНК

Хеликазы (геликазы)

Разделение закрученных в биспираль полинуклеотидных цепей ДНК осуществляется ферментом *геликазой* при участии дестабилизирующего белка.



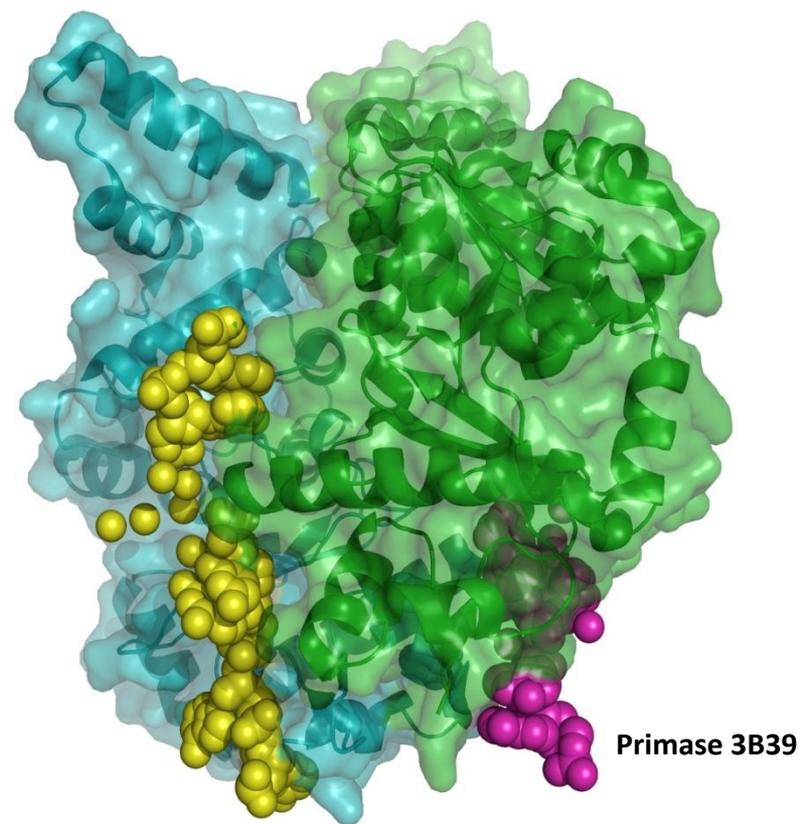
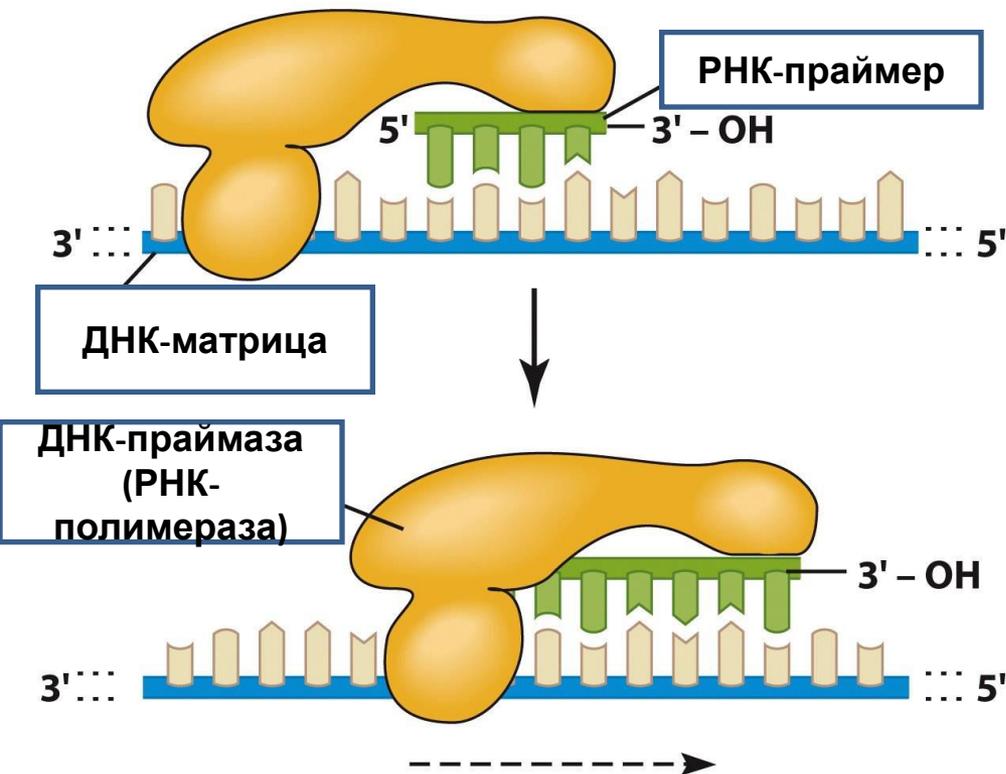
Структура геликазы RuvA



Хеликазы – это ферменты, способные расплетать две комплементарные нити в ДНК с использованием энергии, полученной при гидролизе АТФ. Продвижение хеликаз идет в направлении вместе с репликативной вилкой.

Праймаза

ДНК-праймаза (РНК-полимераза) необходима для инициации

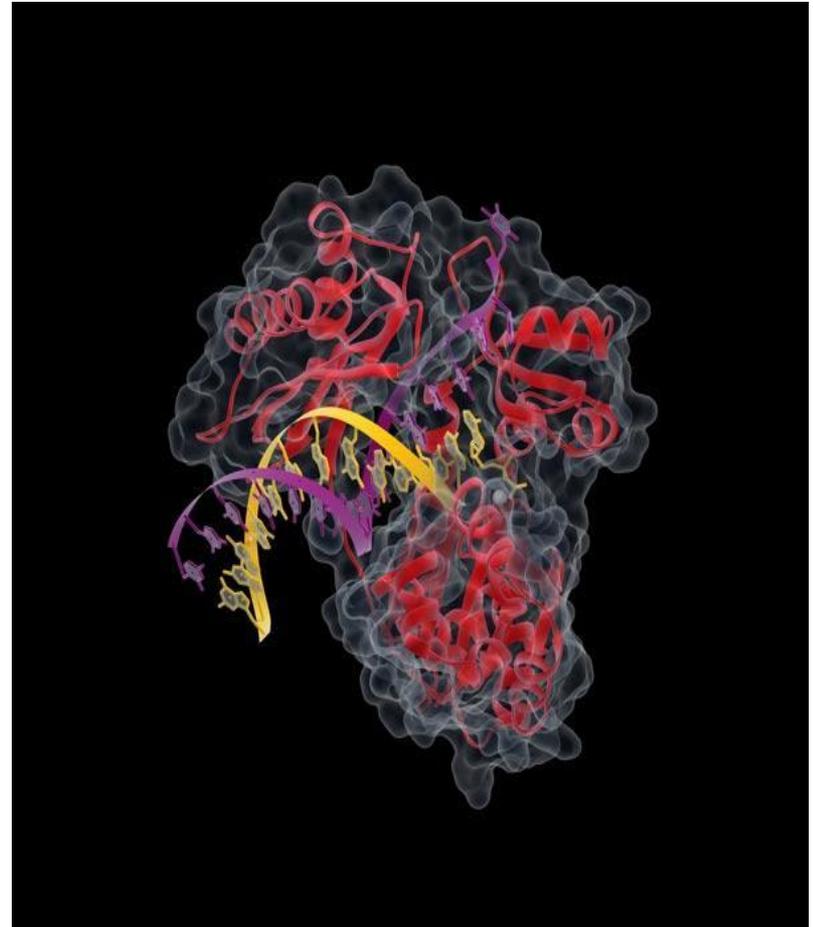
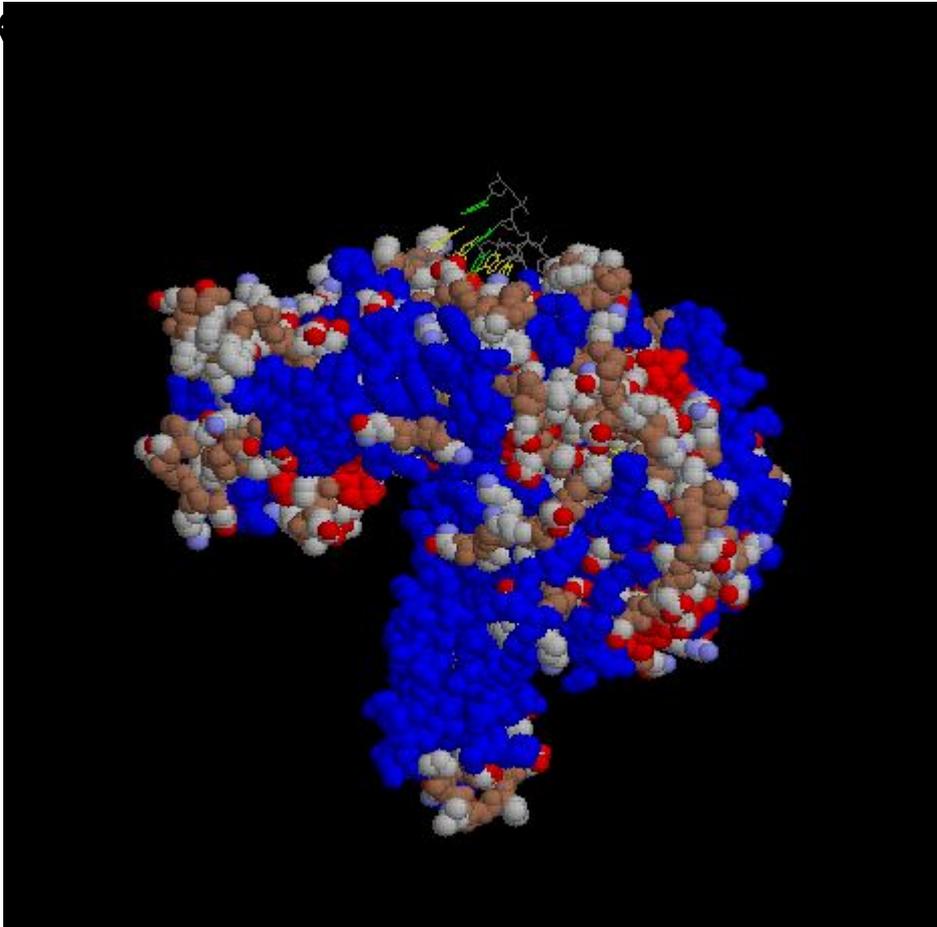


Праймаза – фермент, синтезирующий РНК-праймеры для запуска синтеза ведущей цепи ДНК и запуска синтеза фрагментов Оказаки на запаздывающей цепи ДНК.

Праймаза активируется ДНК-хеликазой и находится с ней в комплексе, который называется праймасомой. Без РНК-праймеров синтез ДНК начаться не может.

ДНК-полимераза

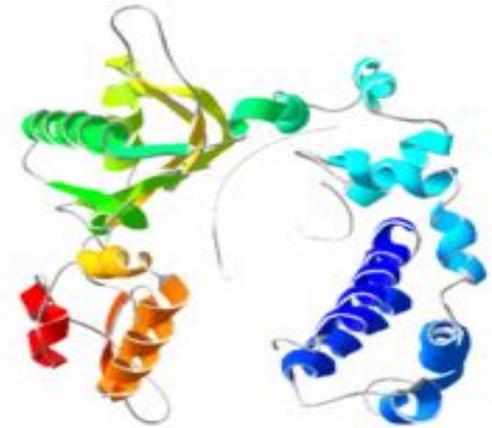
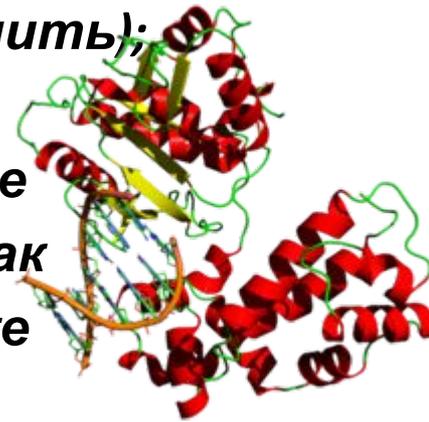
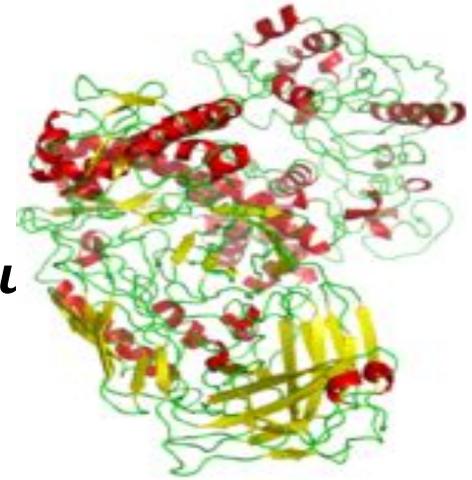
Ферментом, катализирующим образование дочерних полинуклеотидных цепей, является **ДНК-полимераза**, представляющая собой сложный мультимакромолекулярный



ДНК-полимераза

Общие свойства ДНК-полимераз:

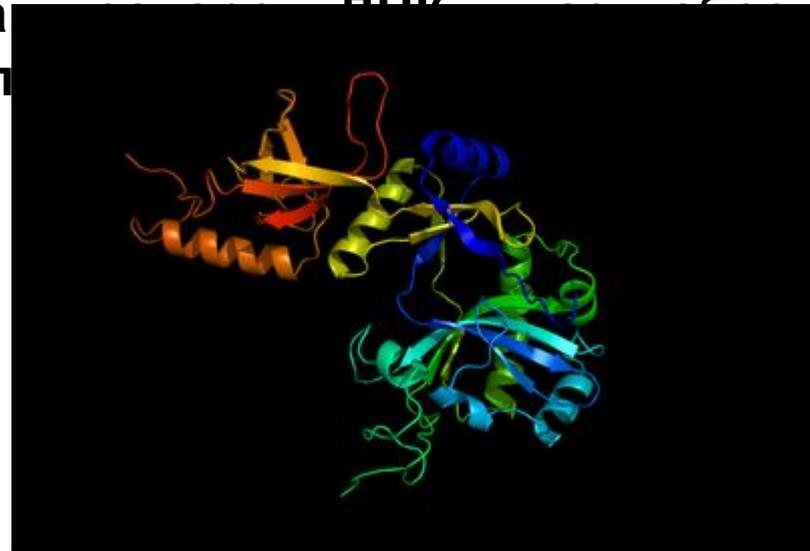
1. для работы нуждаются в **однонитевой матрице** (не способны расплести двойную нить);
2. могут только **удлинять** предсуществующую нить ДНК, но не способны **инициировать синтез** – так называемая **потребность в затравке** (праймере);
3. **Однонаправленность (униполярность) синтеза**: синтез каждой дочерней цепи ДНК происходит всегда в направлении **5' → 3'**.



Лигаза

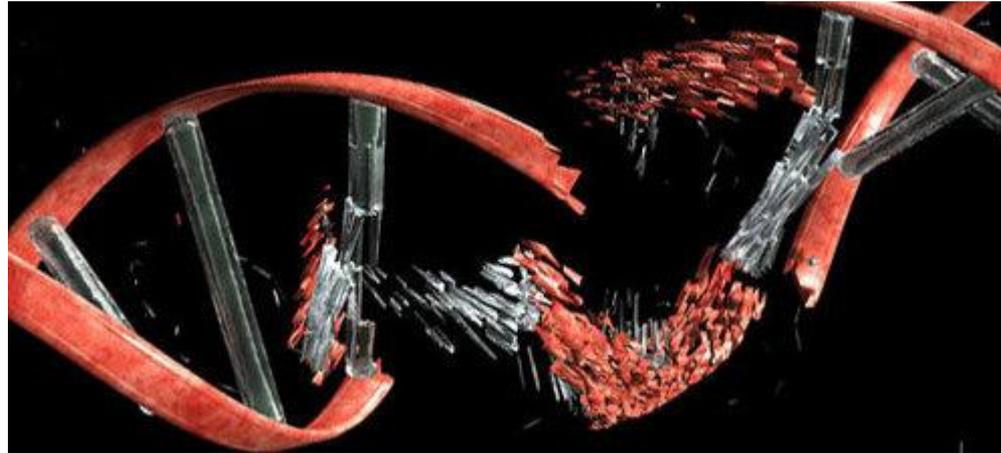
В 1961 г. М. Мезельсон и Ф. Вейгл на примере фага показали, что рекомбинация включает разрыв и последующее воссоединение молекул ДНК. Это положило начало поискам фермента, участвующего в сшивании фрагментов ДНК. В 1967 году такой фермент был найден и получил название **ДНК-лигаза**. Он катализирует синтез фосфодиэфирной связи в 2-х цепочечной молекуле нуклеиновой кислоты.

ДНК-лигазы сшивают рядом расположенные нуклеотиды, образуя связь между остатками фосфатной группы одного нуклеотида и 3'-гидроксильной группой соседнего нуклеотида. Эти ферменты необходимы в процессах репликации ДНК.



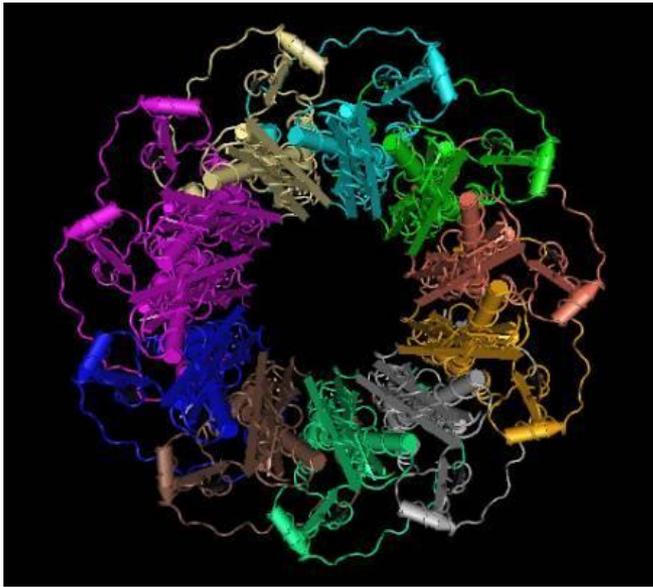
Репарация ДНК

РЕПАРАЦИЯ (от лат. reparatio — восстановление), свойственный клеткам всех организмов процесс восстановления природной (нативной) структуры ДНК, повреждённой при нормальном биосинтезе ДНК в клетке, а также физическими или химическими агентами.

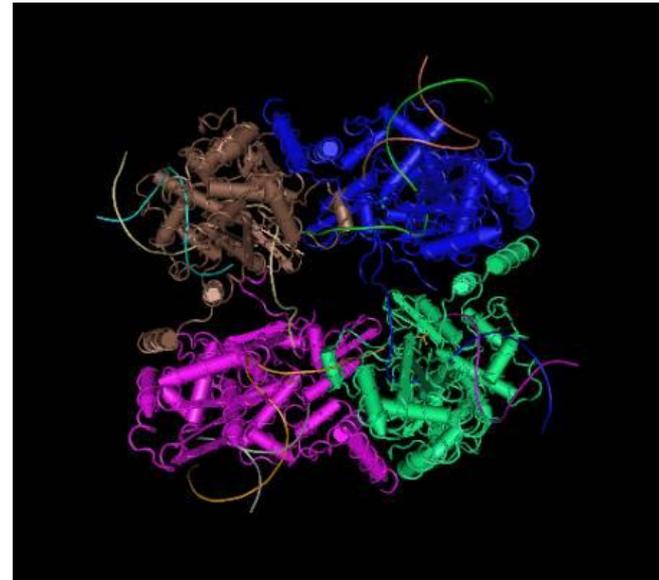


1. Вся информация о механизмах репарационных процессов, закодирована в ДНК.
2. Репарация осуществляется специальными ферментными системами клетки.

3. В основе процессов репарации лежит принцип спаривания



**Инструмент репарации ДНК, *белок-перстень*
Rad52. Изображение: NCBI**

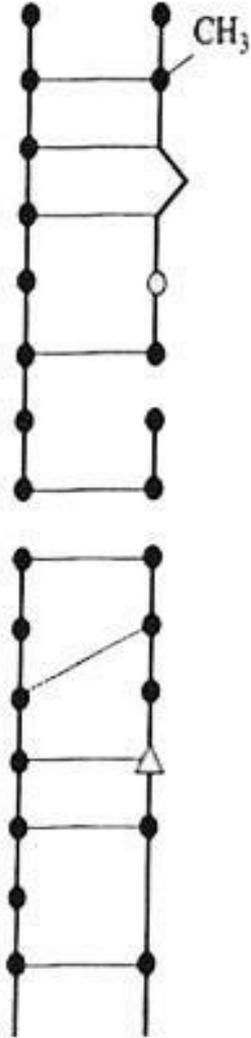


**Инструмент репарации ДНК Fip. Изображение:
NCBI**

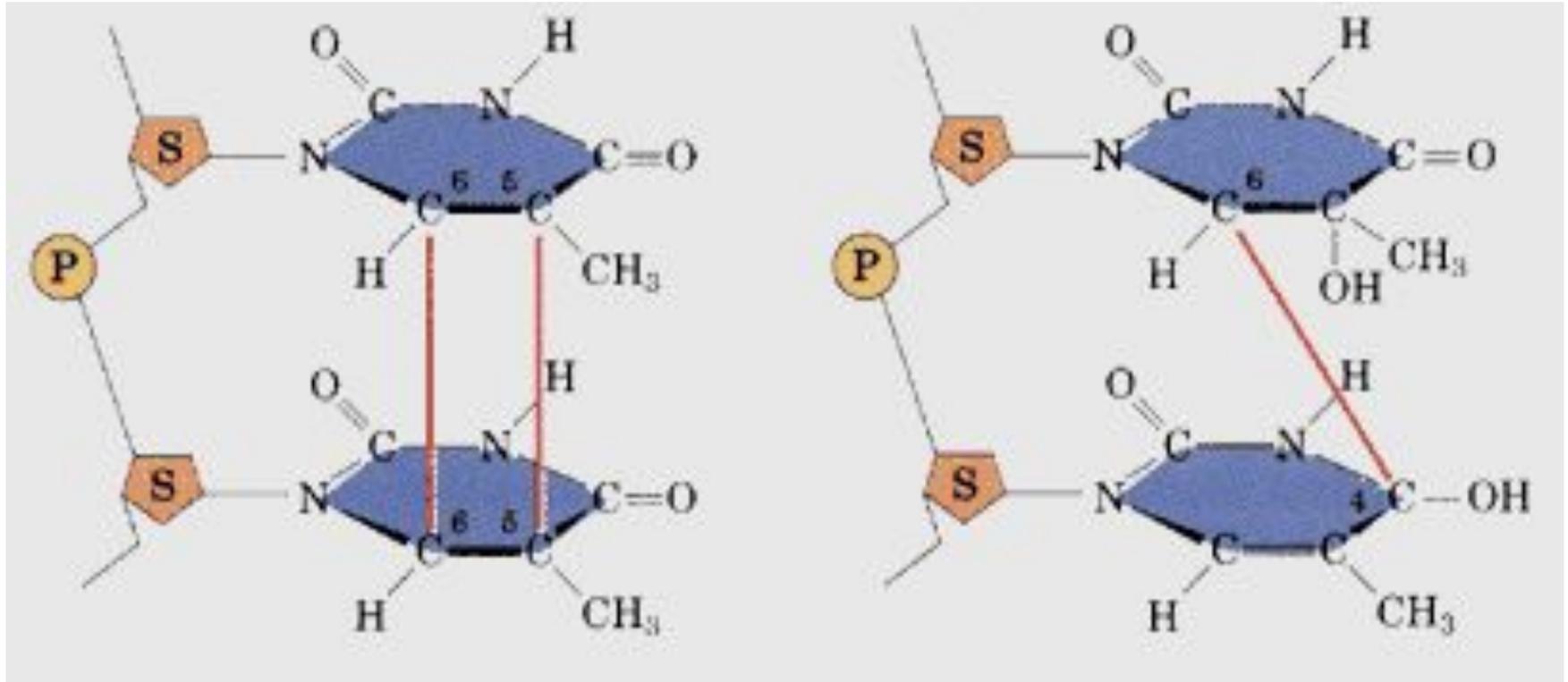


Инструмент репарации ДНК Integrase. Изображение: NCBI

Основные типы повреждений ДНК

ДНК	Повреждение	Воздействие
	<p>Алкилирование</p> <p>Пиримидиновый димер</p> <p>Аддукт</p> <p>Однонитевой разрыв</p> <p>Двунитевой разрыв</p> <p>Межнитевая сшивка</p> <p>8-оксигуанин</p> <p>Апуриновая (апиримидиновая) брешь</p>	<p>Химические агенты (мутагены)</p> <p>УФ-излучение</p> <p>Радиация, химические агенты</p> <p>Радиация, химические агенты</p> <p>ионизирующая радиация</p> <p>Химические агенты</p> <p>Токсичные радикалы</p> <p>Спонтанные (t°, pH), химические агенты</p>

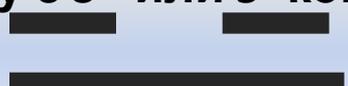
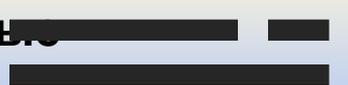
Повреждения, вызываемые УФ-облучением: *пиримидиновые димеры (на примере тиминового димера) и 6-4-фотопродукт*



Тиминовый димер

6-4-фотопродукт

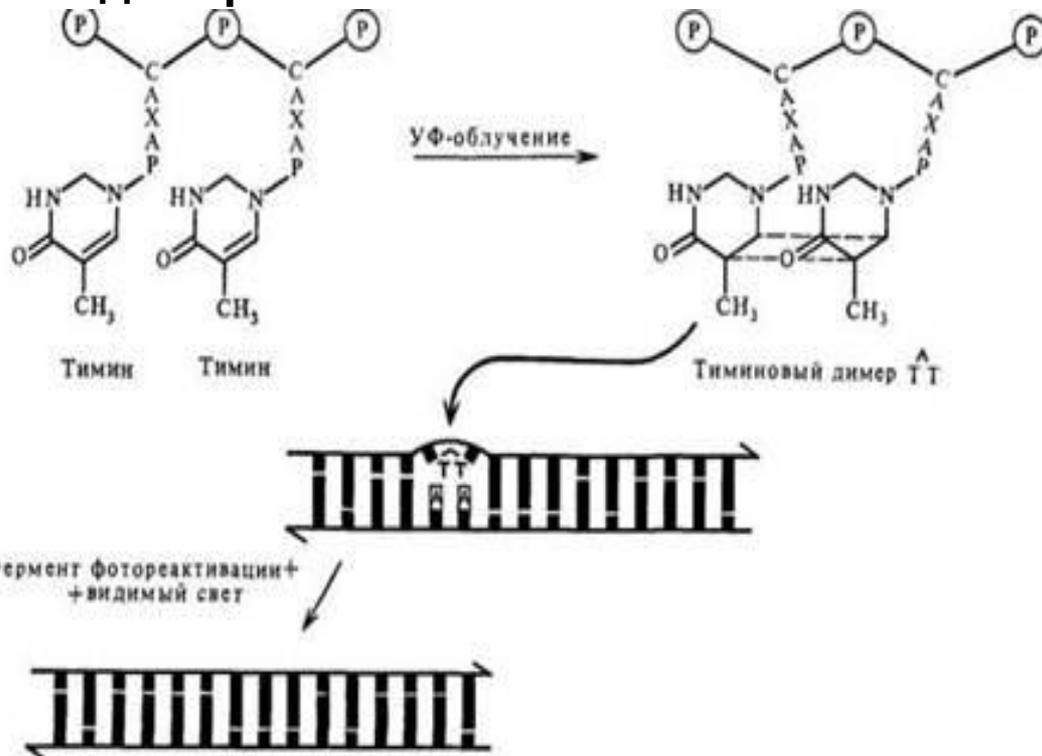
Основные ферменты, участвующие в репарации

Фермент	Свойства
Эндонуклеазы	Гидролизуют фосфодиэфирную связь внутри одной из цепей ДНК, образуя односторонний разрыв 
Экзонуклеазы	Удаляют нуклеотиды по одному с 3'- или 5'-конца полинуклеотидной цепи 
ДНК-полимеразы	Заполняют бреши, образованные экзонуклеазами 
ДНК-лигаза	Восстанавливает разорванную фосфодиэфирную связь 
ДНК-хеликазы	Расплетают цепи ДНК
ДНК-гликозилазы	Удаляют поврежденное основание с образованием АП-сайта 



Фотореактивация

Фотореактивация служит мощным инструментом исследования летальных и мутационных повреждений, так как их репарация под влиянием света может быть использована в качестве критерия для решения вопроса о том, обусловлена ли инактивация ДНК образованием пириmidиновых димеров

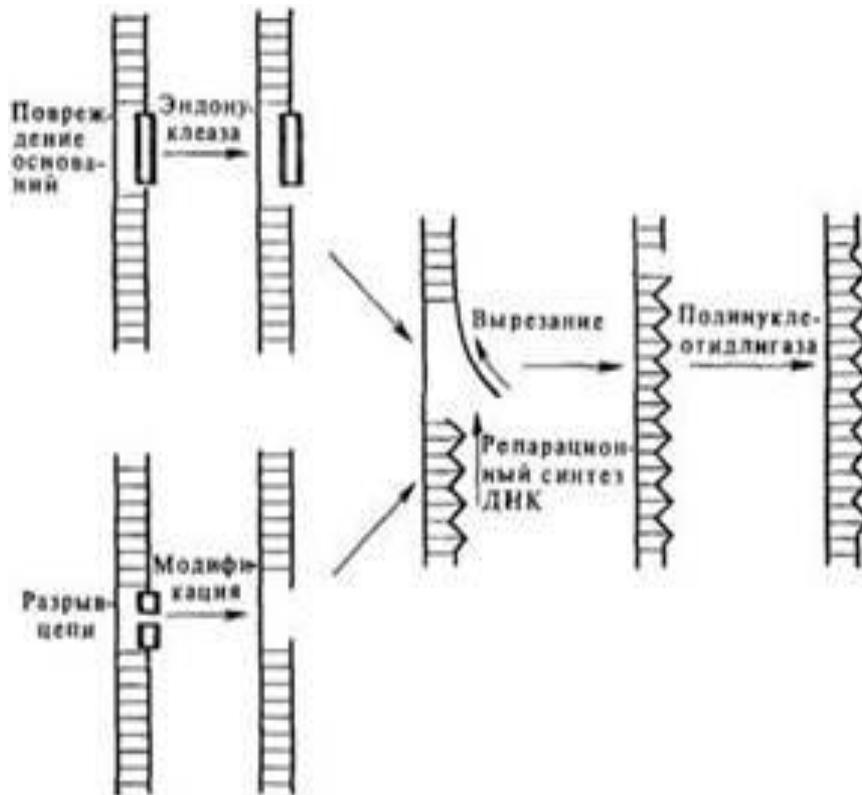


*Механизм фотореактивации действует только на димеры. В этом процессе участвует фермент фотореактивации, который связывается с пириmidиновыми димерами. Образующийся фермент-субстратный комплекс активируется видимым светом, что приводит к мономеризации димеров *in situ*. Таким образом, летальный эффект УФ-облучения существенно снижается, если облученные клетки подвергаются затем воздействию видимого света (длина волн от 360 до 420 нм).*

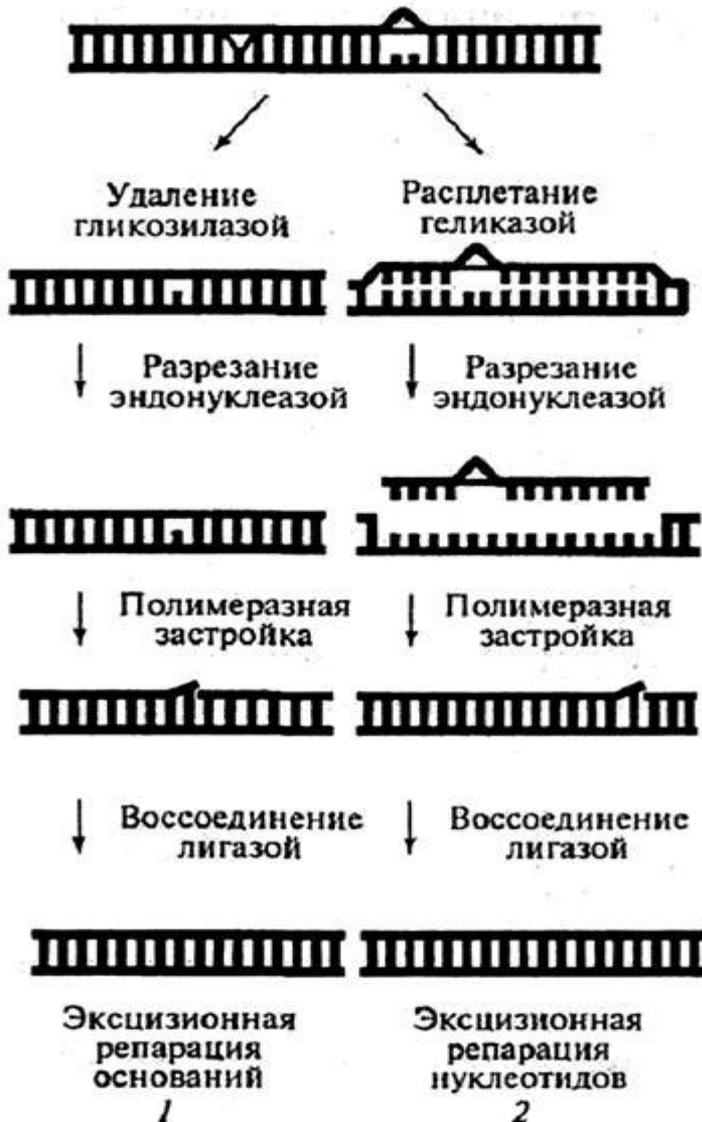
<http://www.bioinformer.ru/binfs-113-1.html>

Темновая репарация

Под «темновой репарацией» понимают репарацию без участия света. В настоящее время известны две системы такого типа: эксцизионная репарация и пострепликативная рекомбинационная репарация. Репарация первого типа требует присутствия ферментов, которые узнают нарушения структуры ДНК, удаляют затронутые участки, замещая их нормальными нуклеотидными последовательностями, и, наконец, восстанавливают первоначальную структуру ДНК, замыкая



Эксцизионная репарация



Этапы эксцизионной репарации:

1. разрыв цепи ДНК вблизи повреждения под действием эндонуклеазы, узнающей нарушения структуры ДНК;

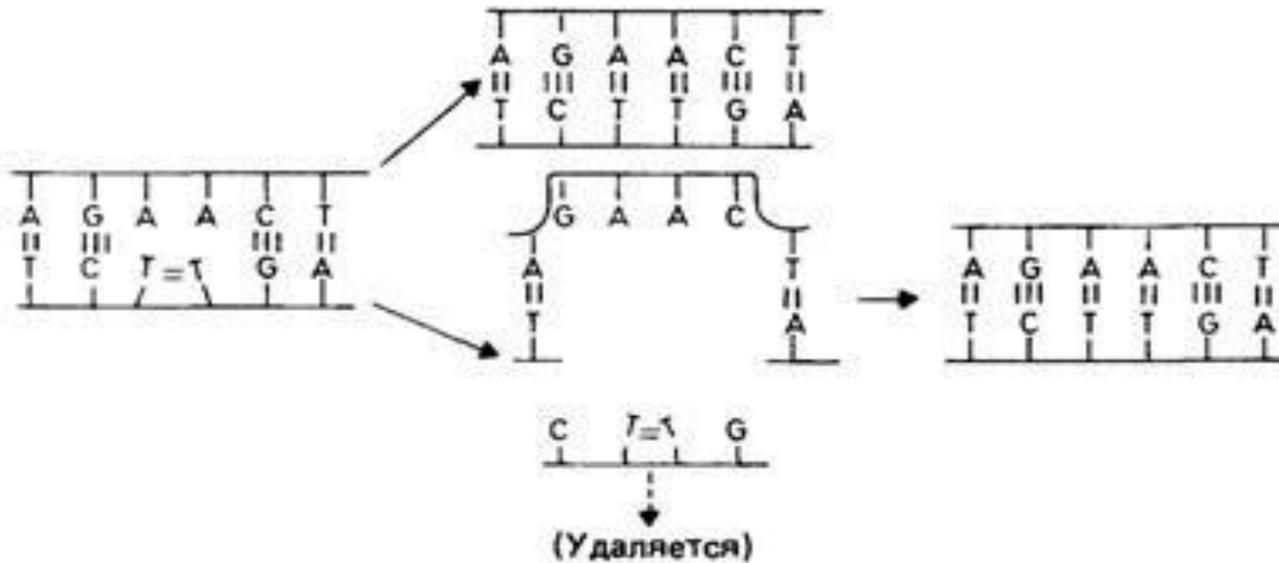
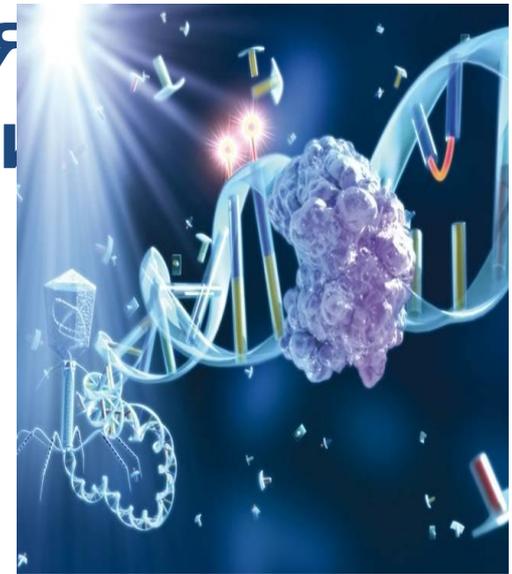
2. удаление пиримидиновых димеров, осуществляемое экзонуклеазой. Удаление димеров сопровождается дополнительной деградацией ДНК с образованием брешей, размеры которых варьируют от 20 до 400 нуклеотидов;

3. заполнение брешей с помощью ДНК-полимеразы, использующей в качестве матрицы комплементарную цепь ДНК;

4. восстановление целостности полинуклеотидной цепи в результате сшивания разрыва лигазой.

Пострепликативная репарация

а) рекомбинационная репарация



Пострепликативная (рекомбинационная) репарация. Полухроматидная последовательность вырезается, репарация происходит после репликации с участием другого продукта деления.

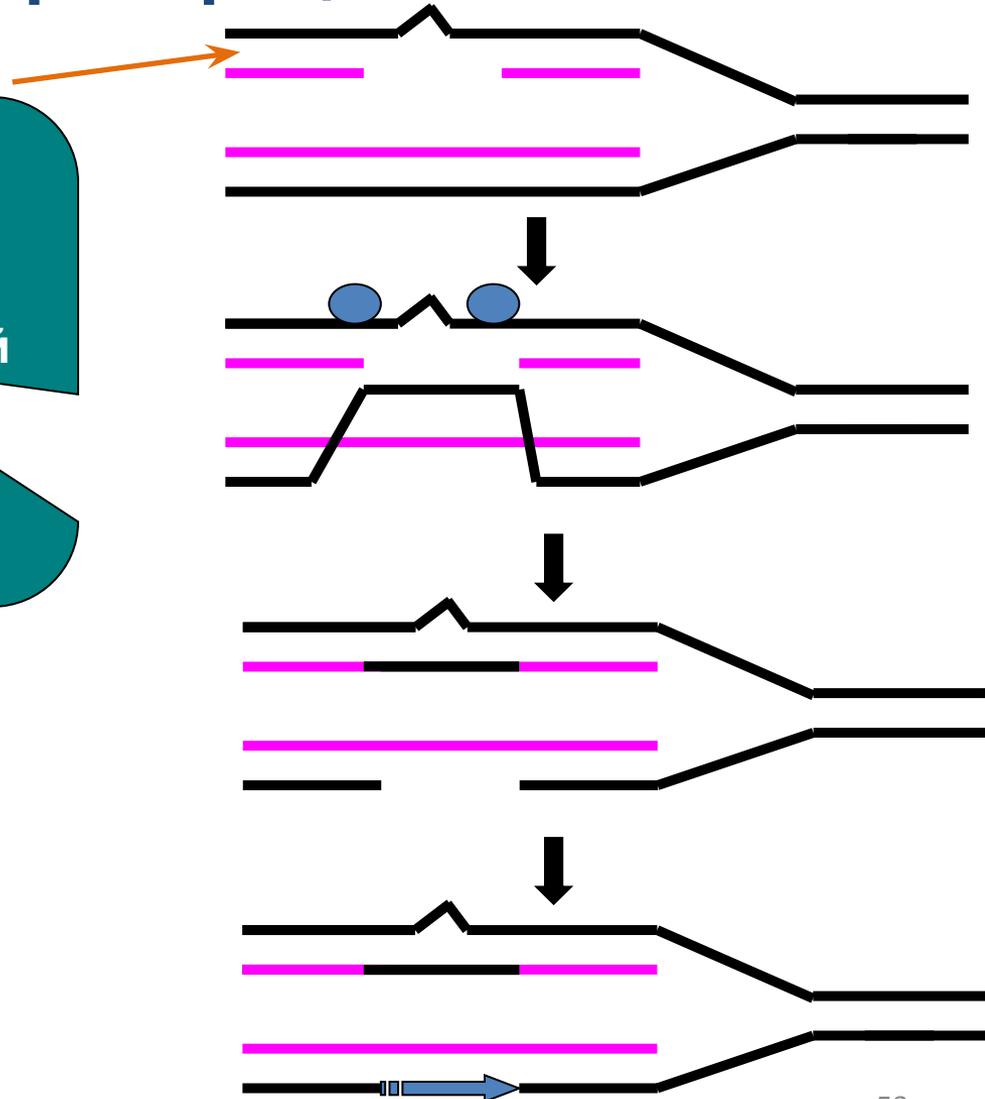
Пострепликативная (внутрирепликативная) репарация - тип репарации, имеющей место в тех случаях, когда процесс эксцизионной репарации недостаточен для полного исправления повреждения: после репликации с образованием ДНК, содержащей поврежденные участки, образуются одноцепочечные бреши, заполняемые в процессе рекомбинационной или репарационной репликации.

Пострепликационная репарация

а) рекомбинационная репарация

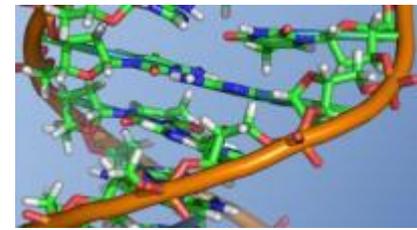
Синтез ДНК (ДНК-полимераза III) «проскакивает» участок, содержащий повреждение. В результате участок дочерней цепи ДНК содержит брешь длиной до нескольких тысяч нуклеотидов.

Эта брешь репарируется с помощью рекомбинации.



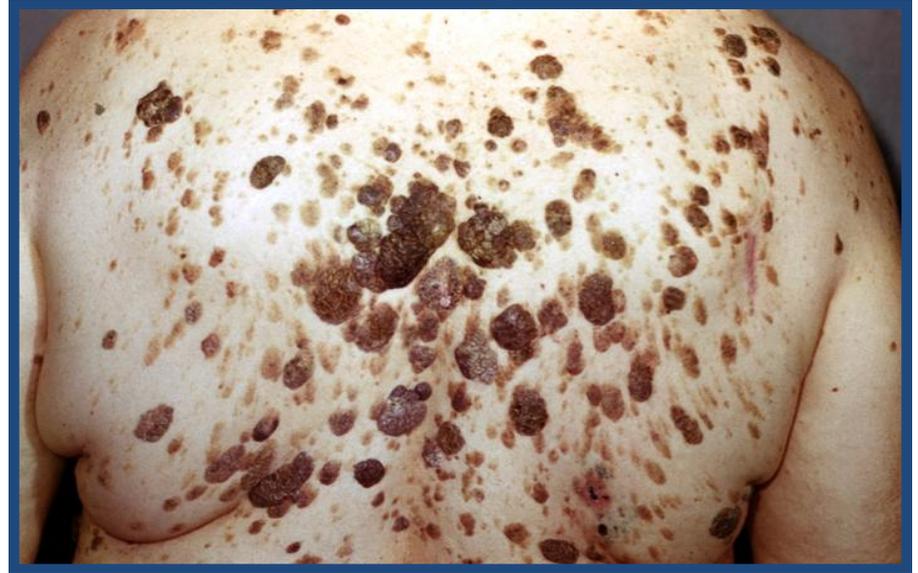
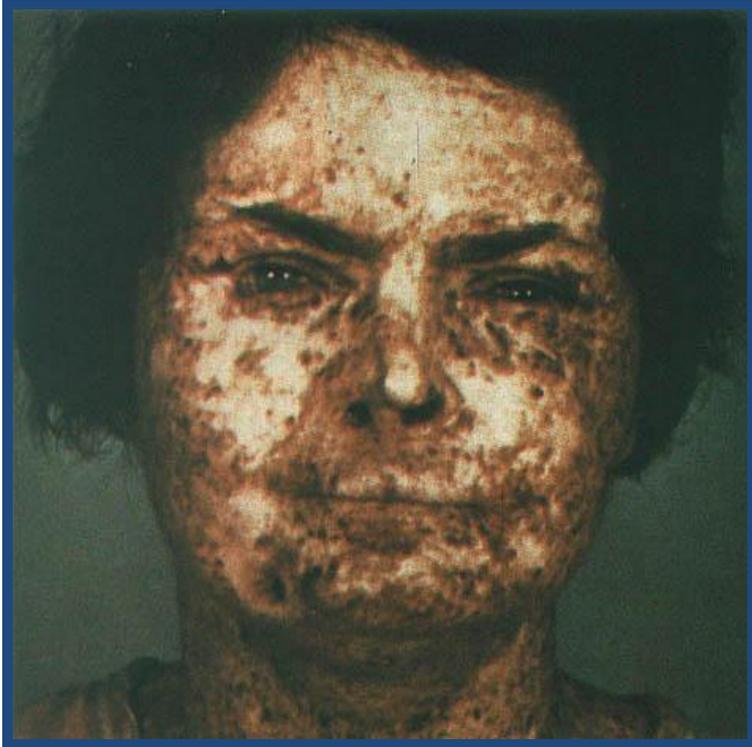
Пострепликативная репарация

б) SOS-репарация



1. Многие мутагены повреждают основания ДНК, что приводит к невозможности специфического спаривания оснований. В результате репликация блокируется.
2. У про- и эукариотических организмов репликационные блоки обходятся с помощью встраивания неспецифических оснований.
4. У *E.coli* этот процесс нуждается в индукции SOS-системы.
5. Ключевая роль в SOS-индукции принадлежит белку RecA. Он связывается с белком SSB и с однонитевой ДНК и образует ДНК-белковые филаменты, представляющие собой активную форму белка, обозначаемую как RecA*.
6. RecA* является сигналом, запускающим индукцию SOS-регулона (около 30 генов), продукты которых необходимы для выживания клетки при массовых повреждениях ДНК.
7. В SOS-регулон входят гены UmuD, UmuC и DinB, продукты которых необходимы для «обходной» (translesion) репликации.
8. Обходная репликация является неточной, склонной к ошибкам. В результате повышается частота мутаций.

Заболевания, обусловленные дефектами системы репарации



Пигментная ксеродерма

Нарушена эксцизионная репарация.

Клинические проявления:

- дерматозы под действием солнечного света
- рак кожи
- неврологические нарушения
- дефекты роста и развития
- преждевременное старение различных систем

Заболевания, обусловленные дефектами системы репарации



Синдром Блума

Подавлен репаративный синтез.

Дефект ДНК-хеликазы.

Высокая частота хромосомных aberrаций.

Клинические проявления:

- задержка роста и развития
- нарушения иммунной системы
- предрасположенность к раковым заболеваниям
- предрасположенность к инфекционным заболеваниям
- свето-индуцируемое поражение капилляров кожи

Общие принципы репарации

Процессы репарации являются одним из основных механизмов поддержания стабильности генетического материала.

Чем серьезнее повреждение, тем большее количество ресурсов клетки привлекается на исправление ошибок.

Принцип «меньшее из зол»: репарация ценой жертв, например, с мутагенным эффектом.

Системы репарации не функционируют со 100% эффективностью. В результате часть предмутационных повреждений реализуется в

