

Репликация ДНК: образование копий ДНК, передаваемых от клетки к клетке, от родителя потомку

Структура и организация генома



Доказательство генетической роли ДНК

- Наследственный материал должен удовлетворять следующим требованиям:
 - 1. **Информативность**: должен содержать информацию о строении и функции всего организма
 - 2. **Передача**: должен передаваться от родителей потомству
 - 3. **Репликация**: должен копироваться
 - Для передачи потомству
 - 4. **Изменчивость**: должен иметь способность изменяться
 - В соответствие с известным фенотипическим варьированием в пределах вида

Идентификация молекулы ДНК в качестве генетического материала

- Данные многих генетиков, включая Г. Менделя, согласуются с четырьмя перечисленными свойствами
 - Однако, химическая природа генетического материала не может быть определена только на основе генетических скрещиваний
- И в самом деле, идентификация ДНК в качестве генетического материала потребовала проведения серии экспериментов

Все началось с Г. Менделя...

Эксперименты Ф.Гриффитца с бактерией *Streptococcus pneumoniae*

- Гриффитц (1928) изучал бактерию (пневмококка) сейчас известную как *Streptococcus pneumoniae*
- *S. pneumoniae* делится на два штамма
 - S тип □ Гладкие
 - Имеют полисахаридную капсулу, защищающую бактерию от иммунной системы животных
 - Образуют гладкие колонии на питательной среде
 - R тип □ Шероховатые
 - Не способны формировать капсулу
 - Образуют колонии с шероховатым внешним видом

■ В 1928, Гриффитц провел эксперименты с использованием двух штаммов *S. pneumoniae*: тип III S и тип II R

- 1. При инфицировании мышей живыми бактериями III S
 - Мыши погибали
 - Бактерии III S типа обнаруживали в крови мыши
- 2. При инфицировании мышей живыми бактериями II R
 - Мыши выживали
 - В крови живых бактерий не обнаруживали
- 3. При инфицировании мышей бактериями III S убитыми нагреванием
 - Мыши выживали
 - В крови живых бактерий не обнаруживали
- 4. При инфицировании мышей живыми бактериями II R в смеси с III S убитыми нагреванием
 - Мыши погибали
 - Бактерии III S типа обнаруживали в крови мыши

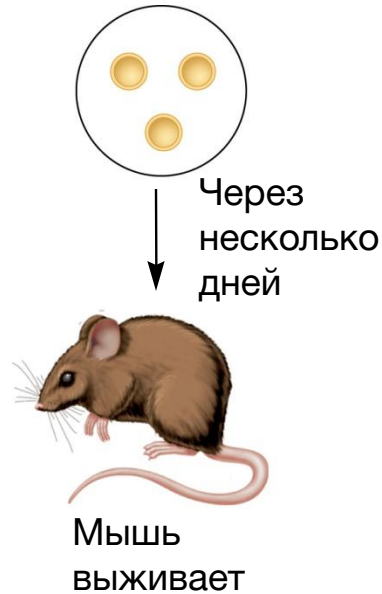
Инфицирование мышей живыми бактериями **S** типа



Бактерия S типа была выделена из крови мертвой мыши

(a) Живые бактерии типа S

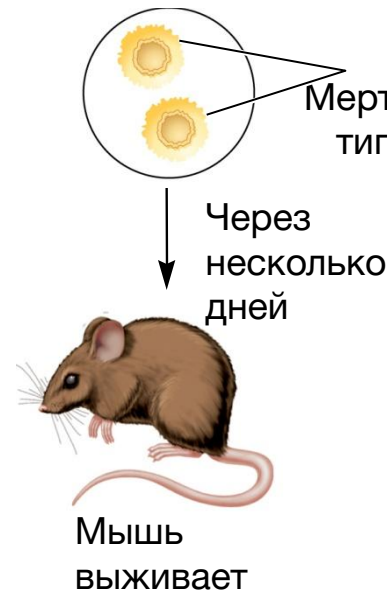
Инфицирование мышей живыми бактериями **R** типа



Живые бактерии не были обнаружены в крови мыши

(b) Живые бактерии типа R

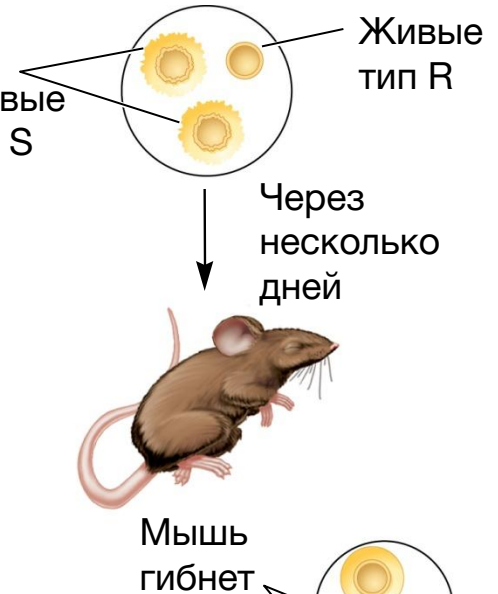
Инфицирование мышей бактериями **S** убитыми нагреванием



Живые бактерии не были обнаружены в крови мыши

(c) Мертвые бактерии типа S

Инфицирование мышей живыми бактериями **R** в смеси с **S** убитыми нагреванием



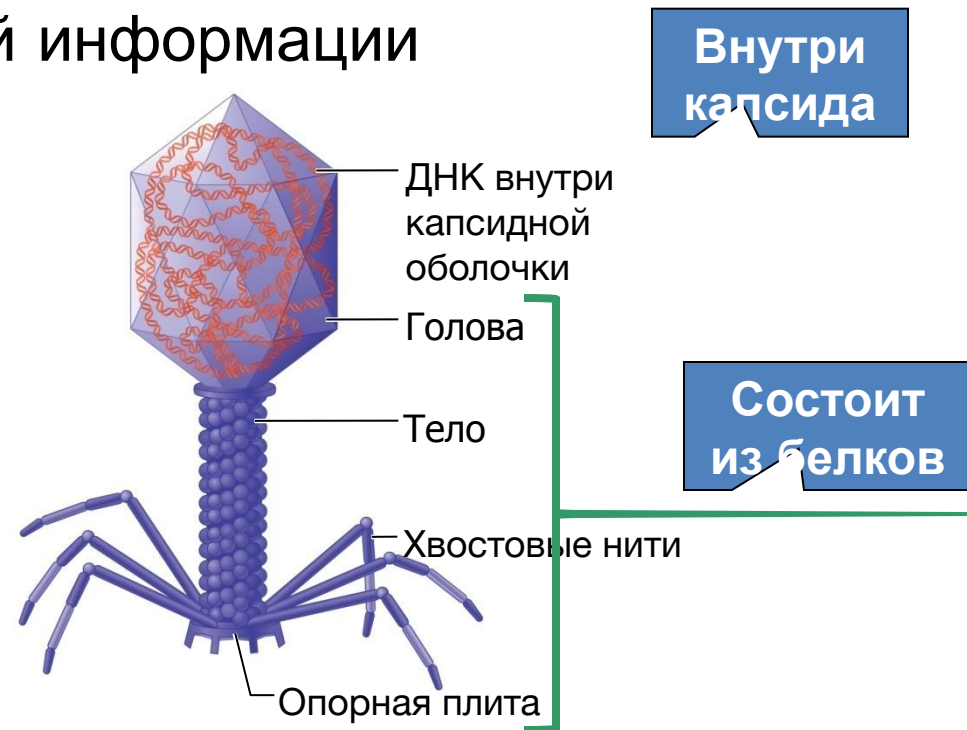
Бактерия S типа была выделена из крови мертвой мыши

(d) Живые типа R + мертвые бактерии типа S

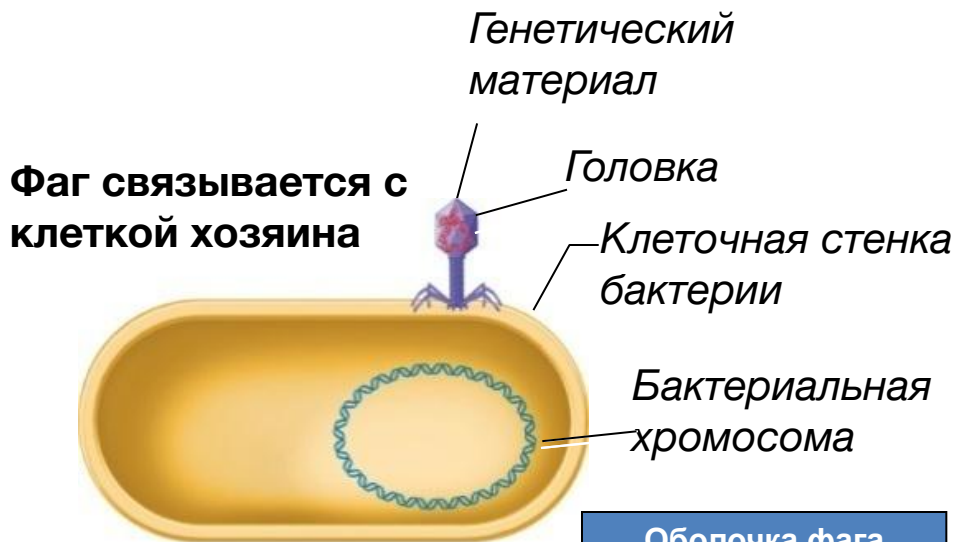
- Гриффитц пришел к выводу, что что-то из мертвой бактерии S типа трансформировало бактерии R типа в S тип
 - Он назвал данный процесс **трансформацией**
- Субстанцию позволившую этому произойти называли трансформационным элементом
 - Гриффитц не знал, что это за вещество
 - Предположил, что молекулы с генетической информацией устойчивы к высоким температурам
 - Большинство белков деградирует при нагревании

Эксперимент Херши и Чейза с бактериофагом T2

- В 1952, А.Херши и М.Чейз представили еще одно доказательство того, что ДНК ответственна за передачу наследственной информации
- Они исследовали бактериофага T2
 - С простой организацией – состоит из
 - ДНК и белка



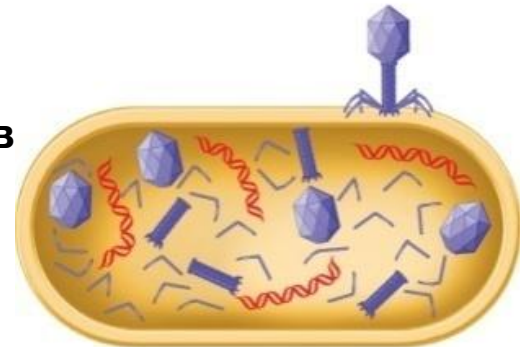
Жизненный цикл бактериофага T2



Оболочка фага (белок) связывается с бактериальной клеткой

ДНК внутри клетки

Экспрессия генов фага приводит к синтезу фаговых компонентов



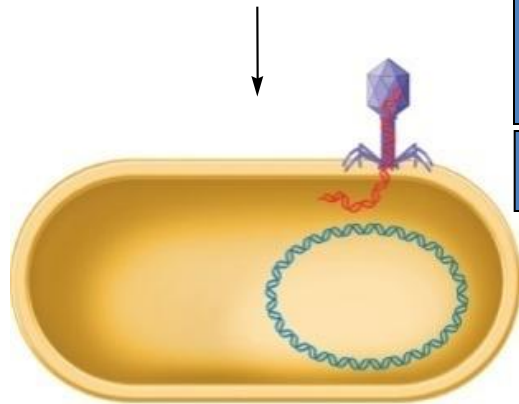
Осуществляется сборка фаговых компонентов



Клеточная стенка бактерии лизируется и новые фаги освобождаются



Фаг впрыскивает свою ДНК в клетку хозяина



- **Краткое описание эксперимента Херши и Чейза:**
 - Использование радиоизотопов для дифференциации ДНК и белка
 - ^{32}P специфично меченая ДНК
 - ^{35}S специфично меченный белок
 - Радиоактивно меченные фаги использовали для инфицирования нерадиоактивные клетки *Escherichia coli*
 - Через время, необходимое для заражения разделяли остатки фаговых частиц и клетки *E. coli*
 - Оценивали их радиоактивность по отдельности

Результат:

Отделенные белковые оболочки имели ^{35}S изотоп

Бактерии содержали ^{32}P изотоп

Некоторые из вновь образованных фаговых частиц содержали ^{32}P изотоп, но ни одна не содержала в оболочке ^{35}S изотоп

Вывод: для образования новых копий фага необходима ДНК-фага, а белки не передаются им следовательно не несут генетических функций

РНК является генетическим материалом у некоторых вирусов

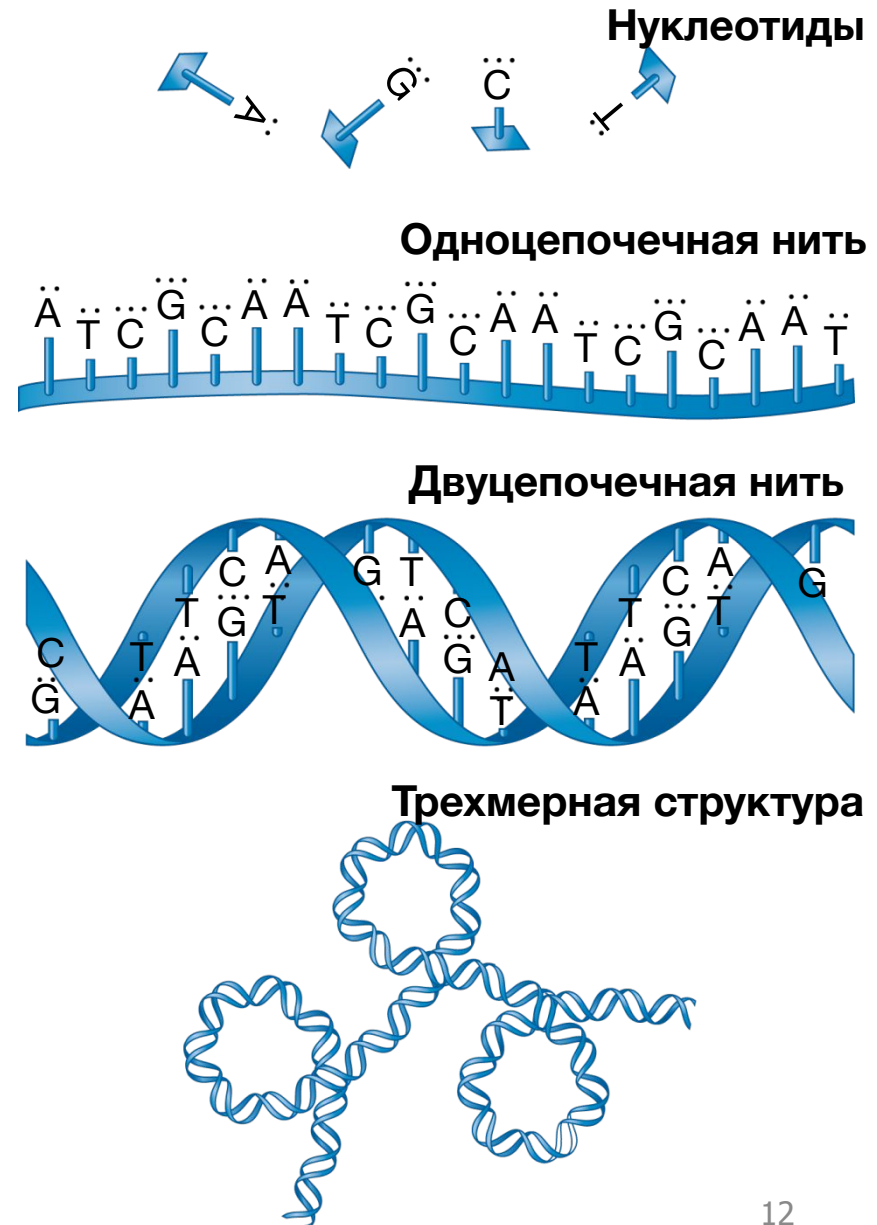
- В 1956, А. Gierer и G. Schramm выделили РНК из вируса табачной мозаики (ВТМ)
 - Очищенная РНК вызывала такие же симптомы поражения как и первоначальный ВТМ вирус

Virus	Host	Nucleic Acid
Tomato bushy stunt virus	Tomato	RNA
Tobacco mosaic virus	Tobacco	RNA
Influenza virus	Humans	RNA
HIV	Humans	RNA
φ2	<i>E. coli</i>	RNA
Qβ	<i>E. coli</i>	RNA
Cauliflower mosaic virus	Cauliflower	DNA
Herpesvirus	Humans	DNA
SV40	Primates	DNA
Epstein-Barr virus	Humans	DNA
T2	<i>E. coli</i>	DNA
M13	<i>E. coli</i>	DNA

Структура нуклеиновой кислоты

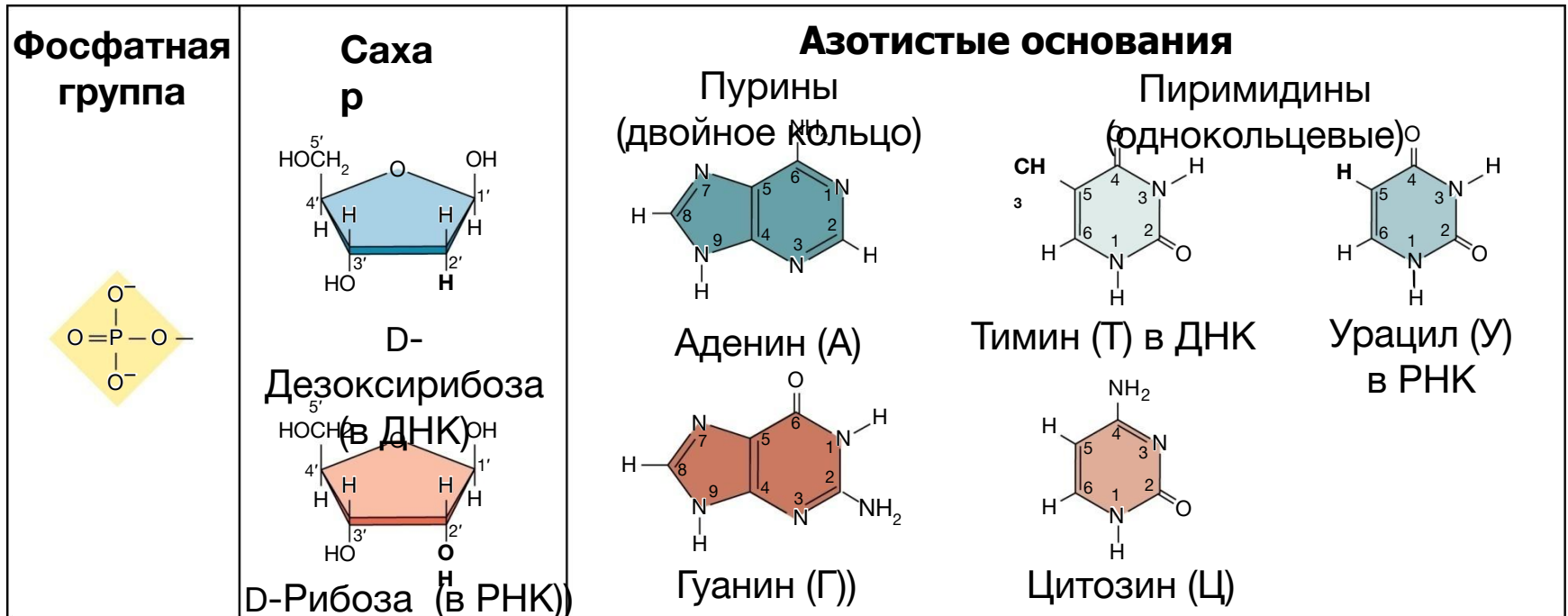
- ДНК и РНК – огромные молекулы с несколькими уровнями сложности

- 1. **Нуклеотиды** – основные структурные единицы нуклеиновой кислоты
- 2. Нуклеотиды связаны и формируют линейную структуру РНК и ДНК
- 3. Две цепи могут взаимодействовать и образовывать **двухцепочечную структуру**
- 4. 3-D структура ДНК образуется в результате спирализации цепей. Взаимодействие ДНК с белками образует **хромосомы** у живых организмов

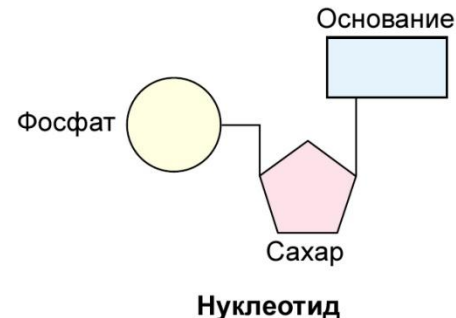


Нуклеотиды

- **Нуклеотид** это основной структурный элемент ДНК и РНК

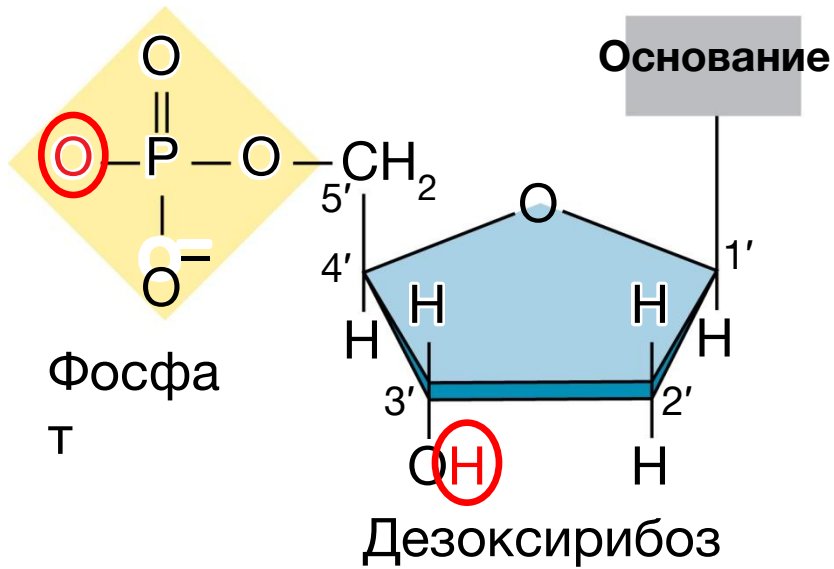


- Содержит три компонента
 - Фосфатную группу
 - Пентозный сахар
 - Азотистое основание



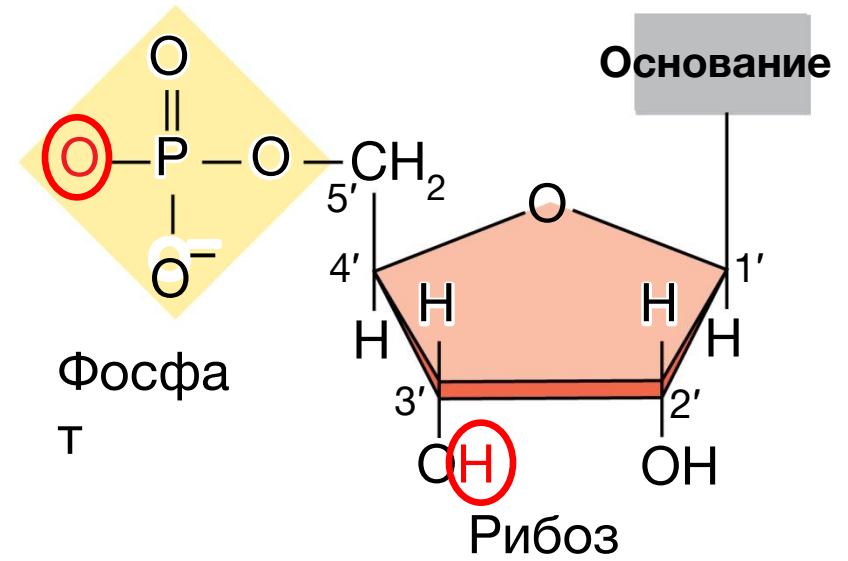
Структура нуклеотидов (а) ДНК и (b) РНК

А, Г, Ц или Т



а
(а) Основная структурная единица дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)

А, Г, Ц или У



а
(b) Основная структурная единица рибонуклеиновой кислоты (РНК)

- Гидроксильная (ОН) группа одного нуклеотида (при 3' конце) атакует трифосфат (при 5' конце) другого ДНТФ в результате чего происходит присоединение нуклеотидов друг к другу с образованием цепочек ДНК и РНК

- Основание + сахар □ нуклеозид
 - Пример
 - Аденин + рибоза = Аденозин
 - Аденин + дезоксирибоза = Дезоксиаденозин
- Основание + сахар + фосфат(ы) □ нуклеотид
 - Пример
 - Аденозин монофосфат (АМФ)
 - Аденозин дифосфат (АДФ)
 - Аденозин трифосфат (АТФ)

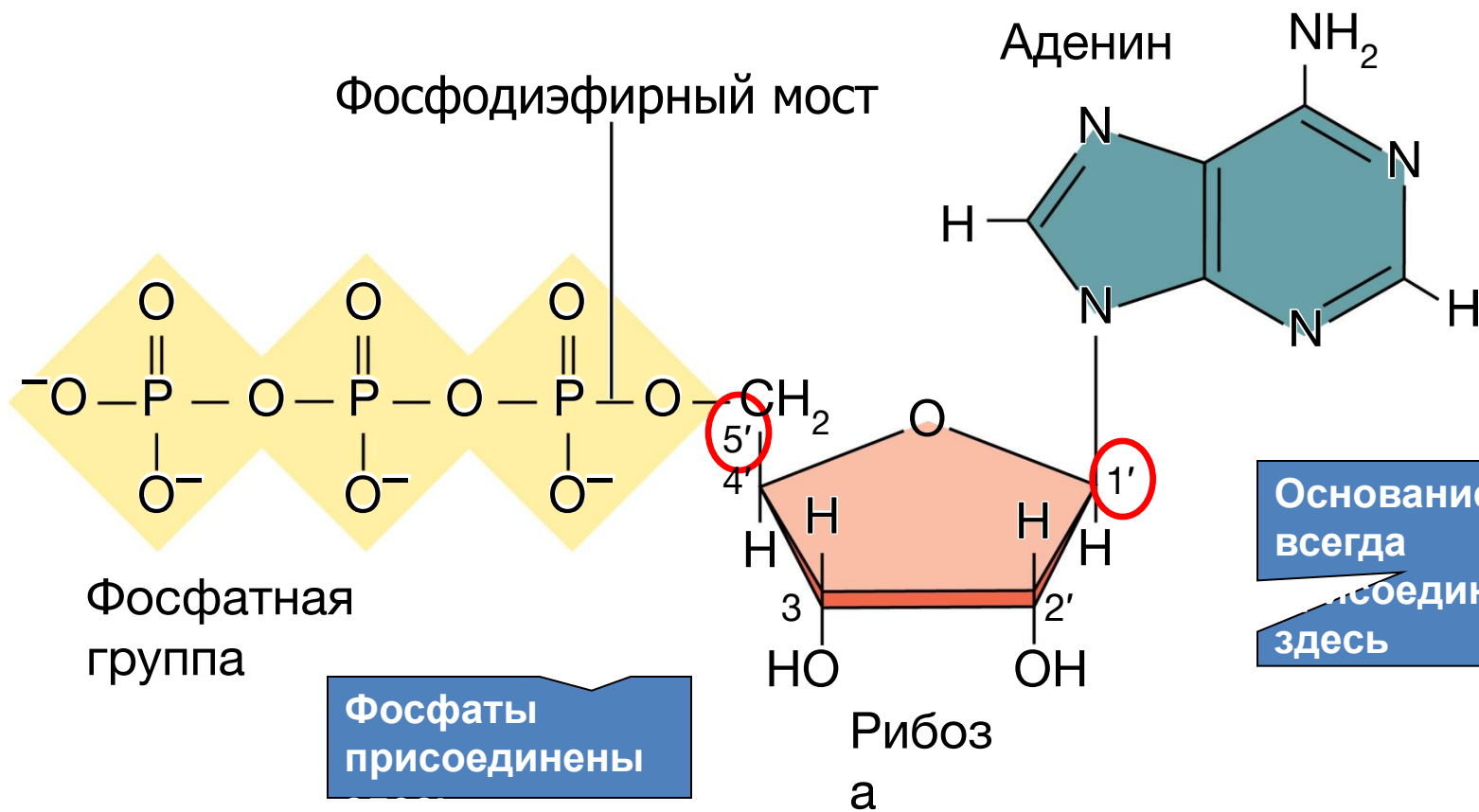
Аденозин

трифосфат

Аденозин дифосфат

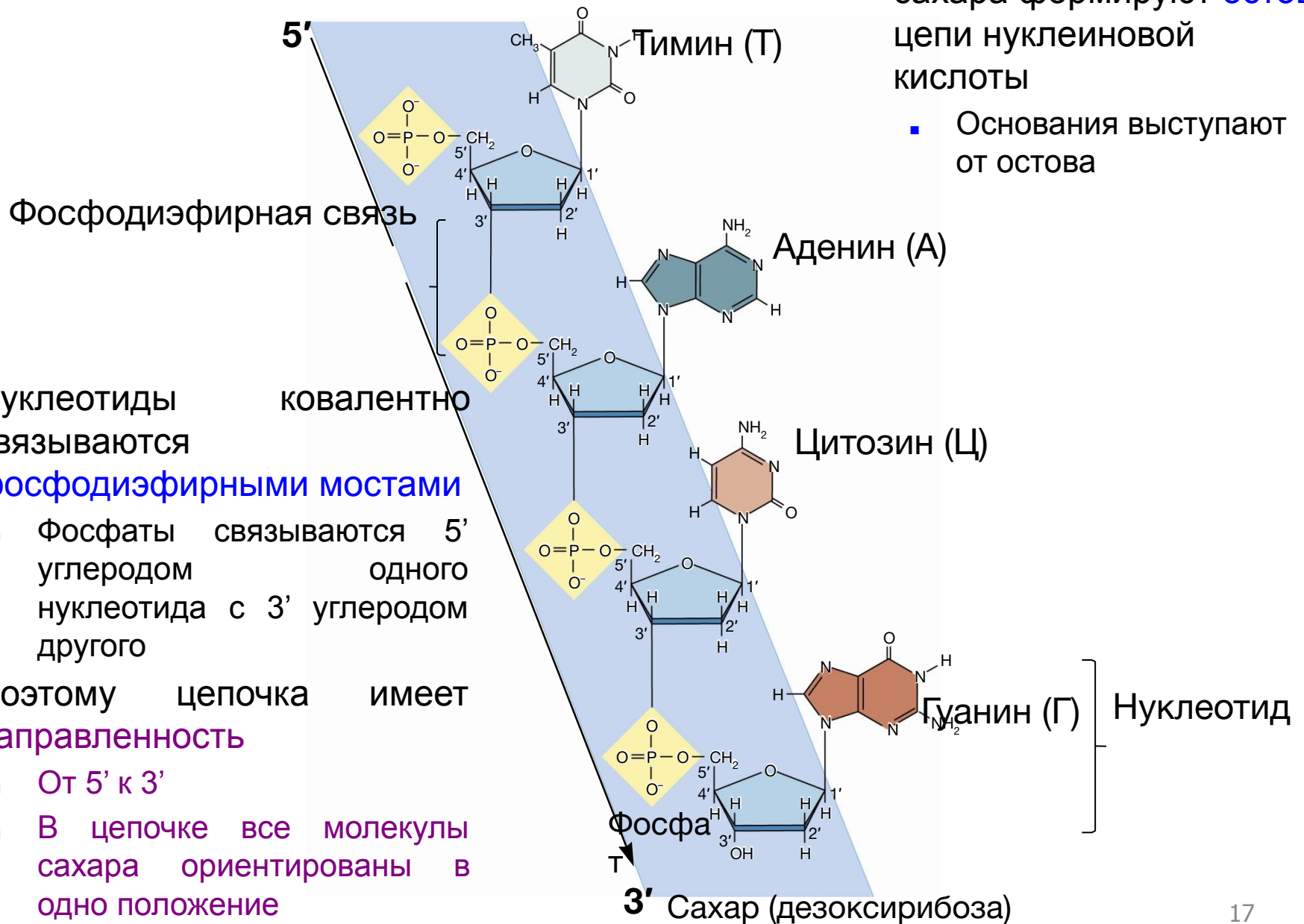
Аденозин монофосфат

Аденозин



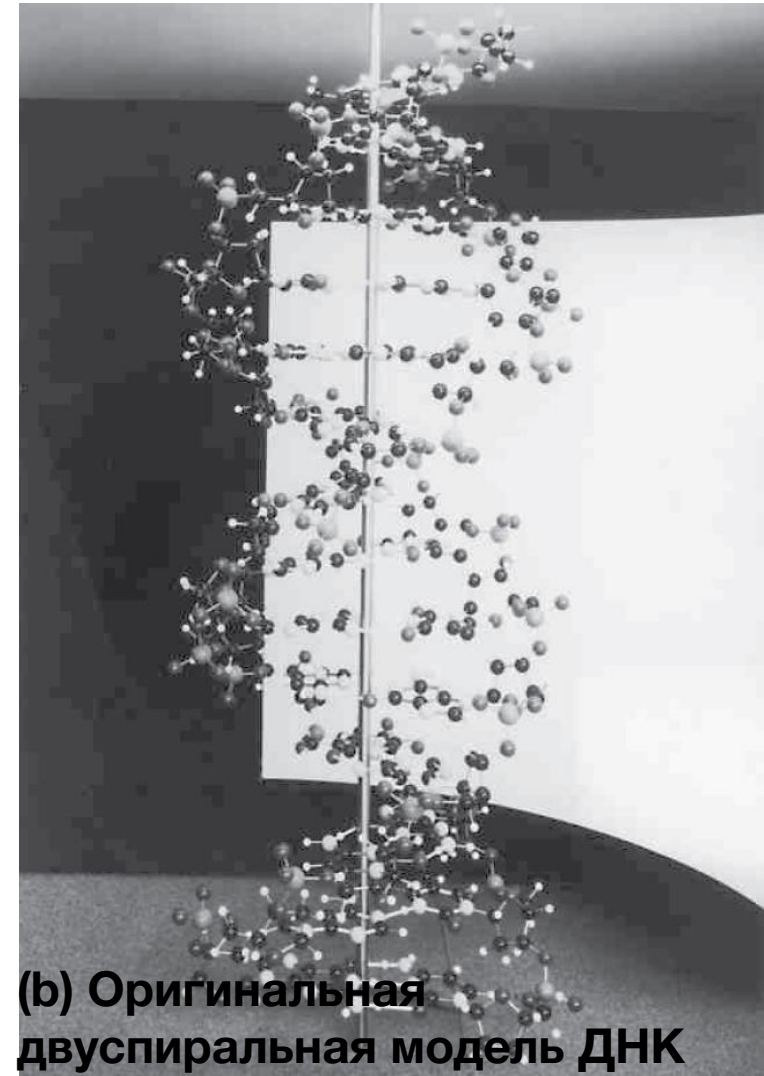
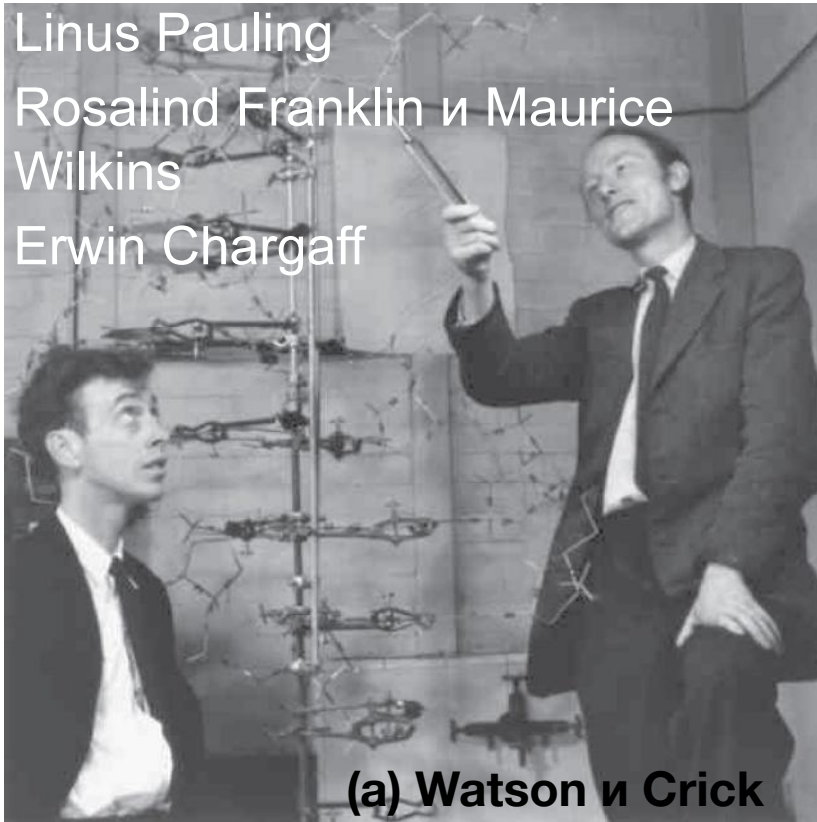
Остов Основание

- Молекулы фосфатов и сахара формируют **ОСТОВ** цепи нуклеиновой кислоты
 - Основания выступают от остова



Открытие структуры ДНК

- В 1953 Джеймс Ватсон и Френсис Крик открыли двуспиральную структуру ДНК
- Научные основы для прорыва были обеспечены исследованиями:
 - Linus Pauling
 - Rosalind Franklin и Maurice Wilkins
 - Erwin Chargaff



Двухспиральная модель ДНК

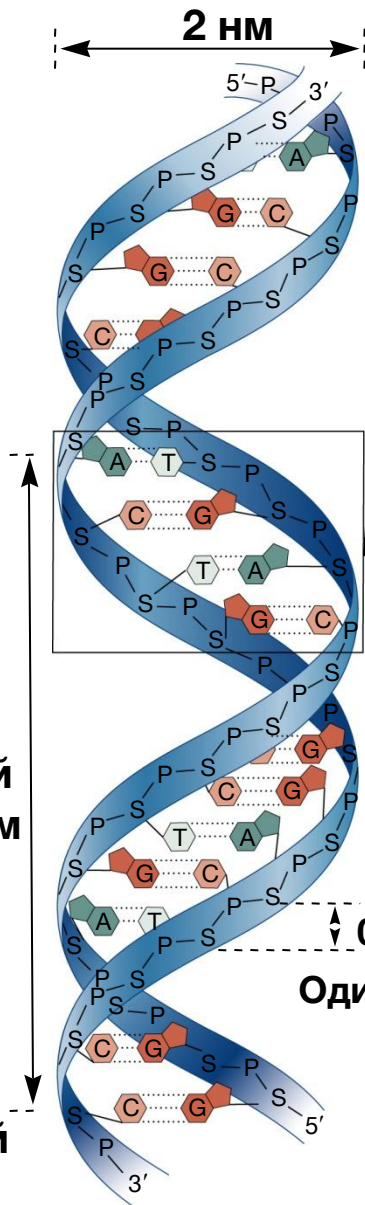
- Основные структурные особенности
 - Две цепочки закручиваются вокруг общей оси
 - 10 оснований и 3.4 нм на один виток вокруг оси
 - Две цепочки являются антипараллельными
 - Одна имеет 5' - 3' направление, а другая 3' - 5'
 - Спираль правозакрученная
- Двухцепочечная структура стабилизирована
 - 1. Водородными связями между комплементарными основаниями
 - А связывается двумя водородными связями с Т
 - Ц связывается тремя водородными связями с Г
 - 2. Расположение оснований
 - В ДНК основания расположены таким образом, что их плоские части соприкасаются друг с другом

Ключевые признаки

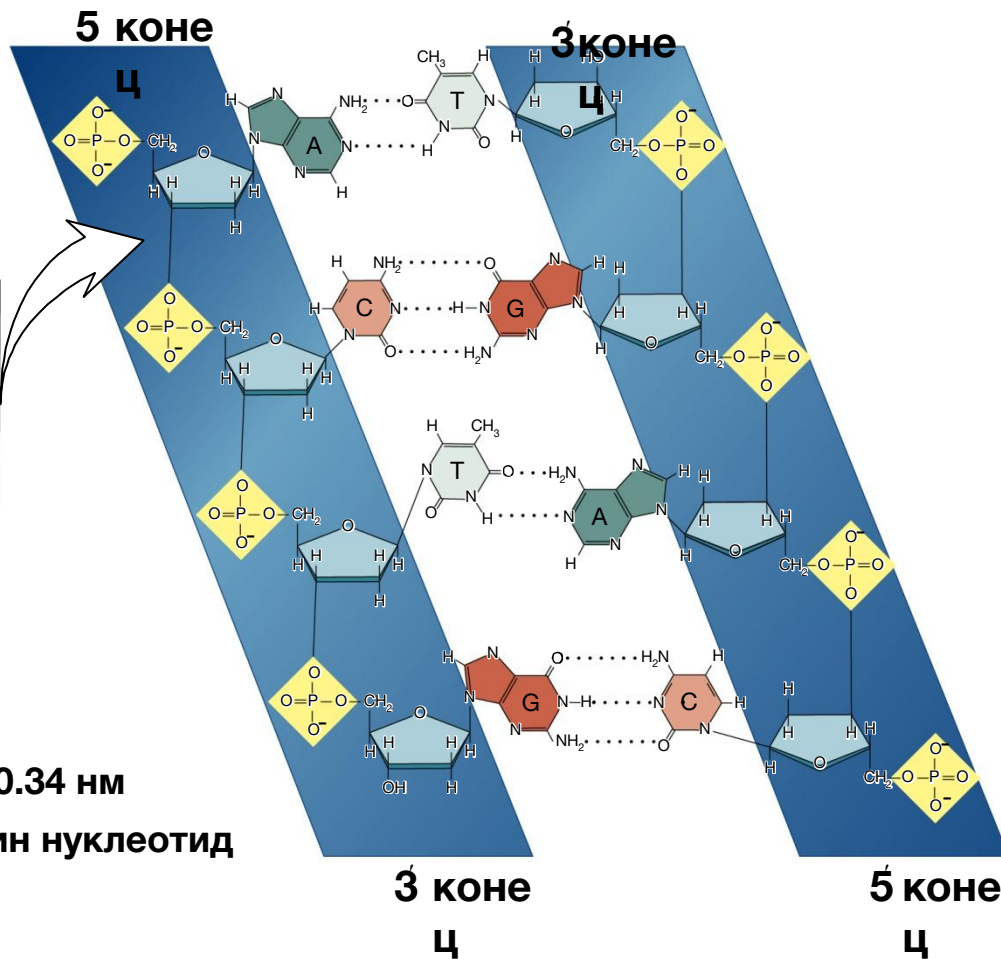
Две цепочки ДНК формируют правозакрученную спираль.

Один полный оборот 3.4 нм

Около 10 нуклеотидов в каждой цепи составляют полный 360° оборот спирали

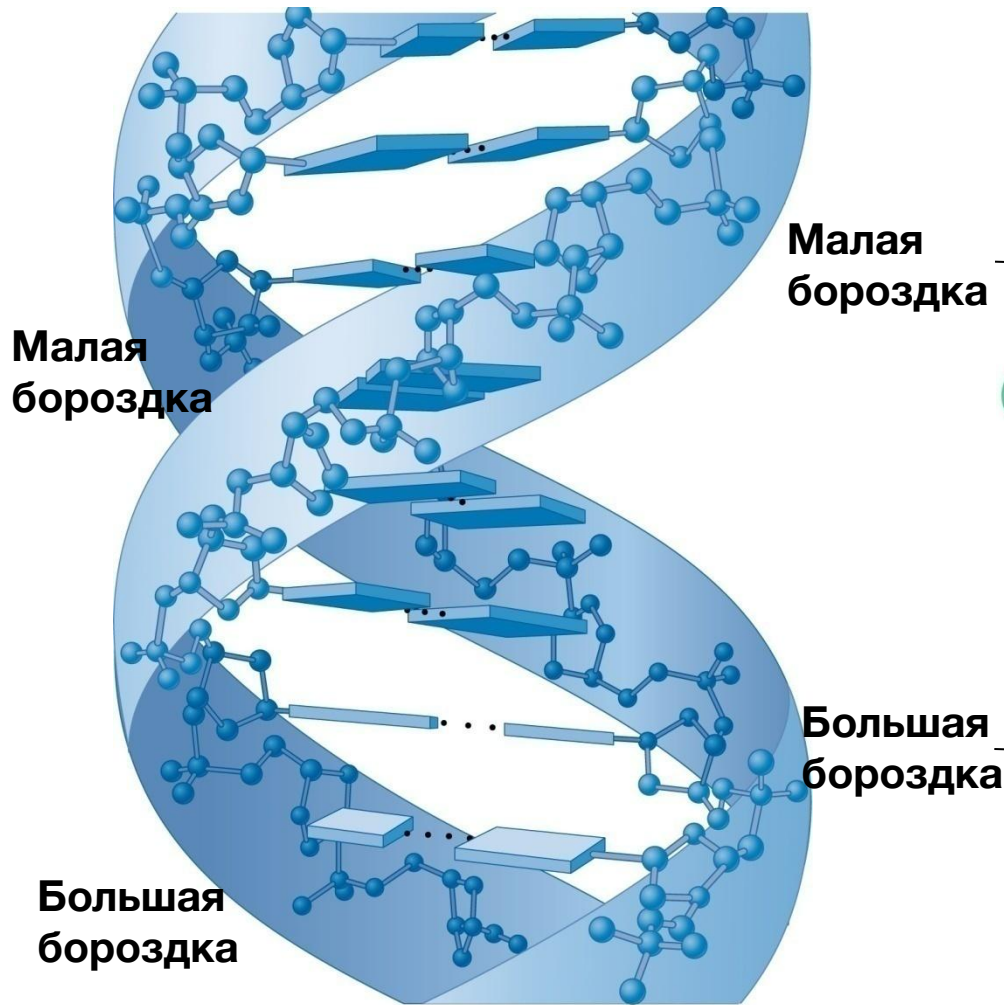


Основания противоположных цепей связываются в соответствии с правилом комплементарности АТ/ГЦ

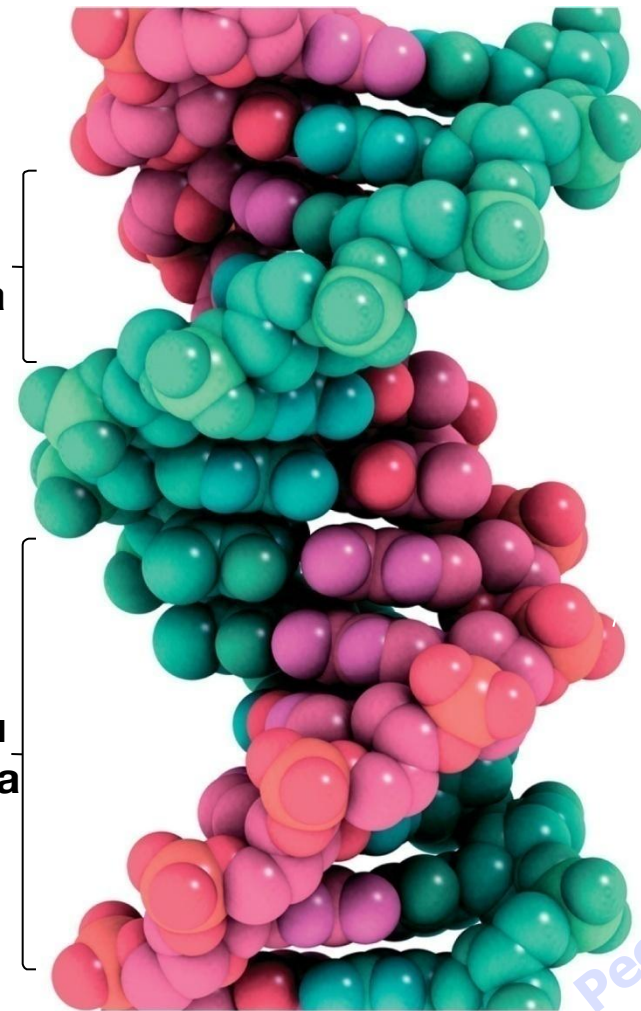


Две цепи являются антипараллельными в отношении направления 5' - 3'

- Спираль имеет две ассиметричные бороздки:
 - 1. Большая бороздка
 - 2. Малая бороздка



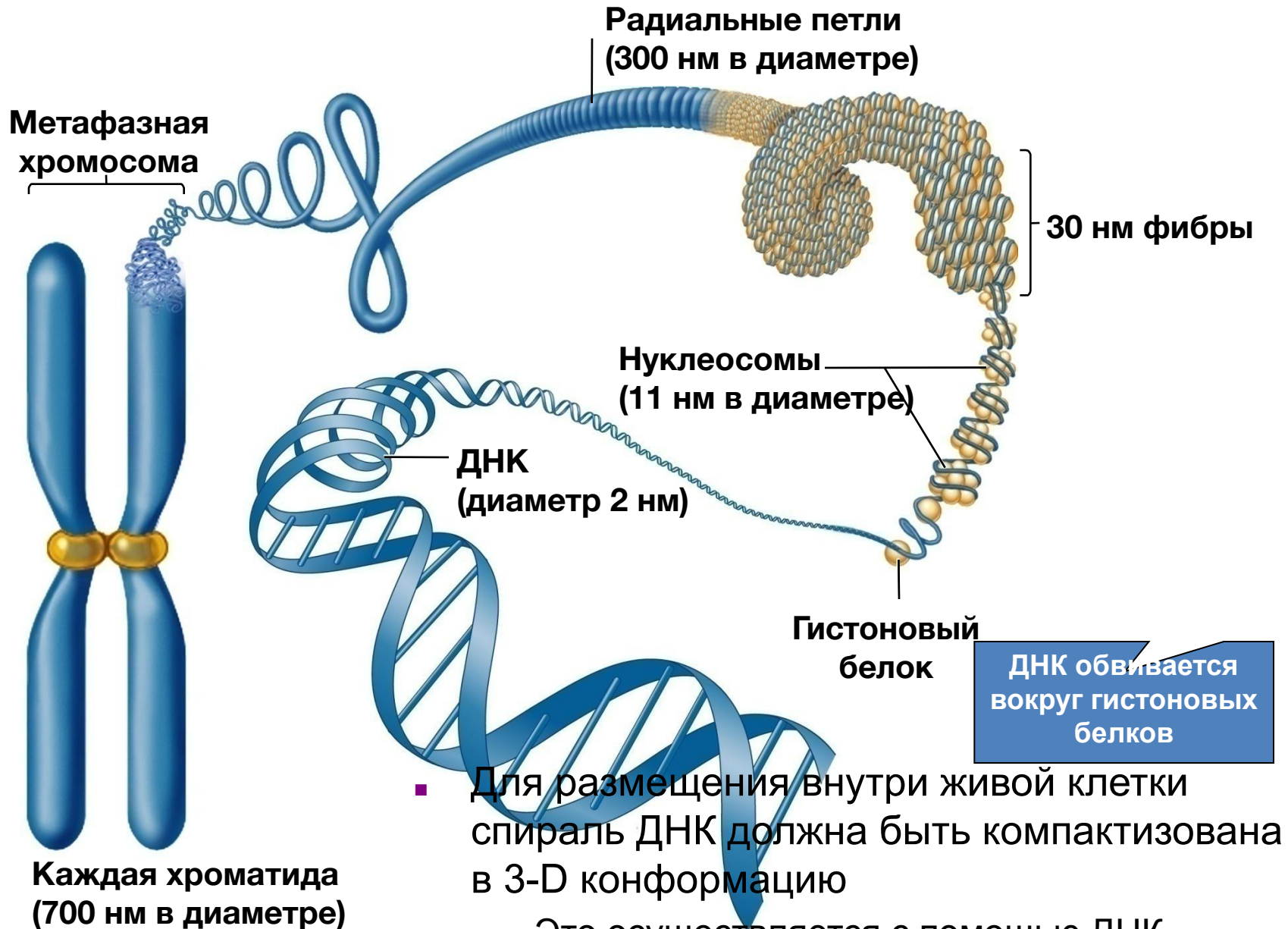
(a) Шарико-палочковая модель ДНК



(b) Модель ДНК с заполненным пространством

- Определенные белки связываются с этими бороздками

Трёхмерная структура ДНК



- Для размещения внутри живой клетки спираль ДНК должна быть компактизована в 3-D конформацию
 - Это осуществляется с помощью ДНК-связывающих белков

3 метра ДНК/клетка
 10^{13} клеток/человек
 3×10^{13} метров ДНК/человек
 3.8×10^8 метров от Земли до Луны

**В развернутом состоянии ДНК одного человека
может быть растянута
от Земли до Луны и обратно $\sim 40,000$ раз!!**

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Когда Уотсон и Крик предложили модель двойной спирали ДНК, то эта модель должна была содержать в себе идею того как воспроизводится ген.

То есть каким образом наследственная информация хранителем которой является молекула ДНК воспроизводится в ряду поколений и передаётся от материнской клетки к дочерней.

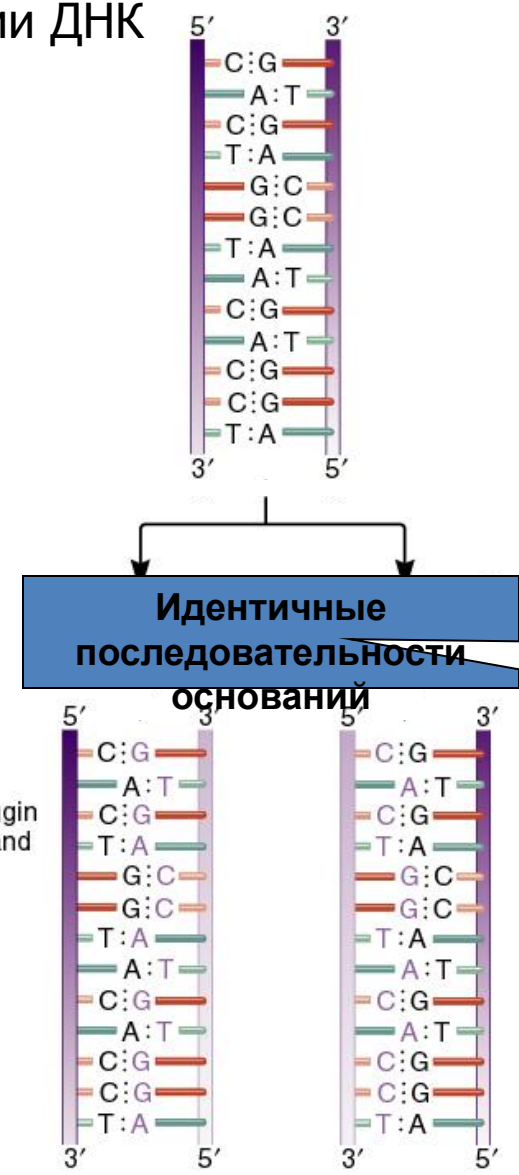
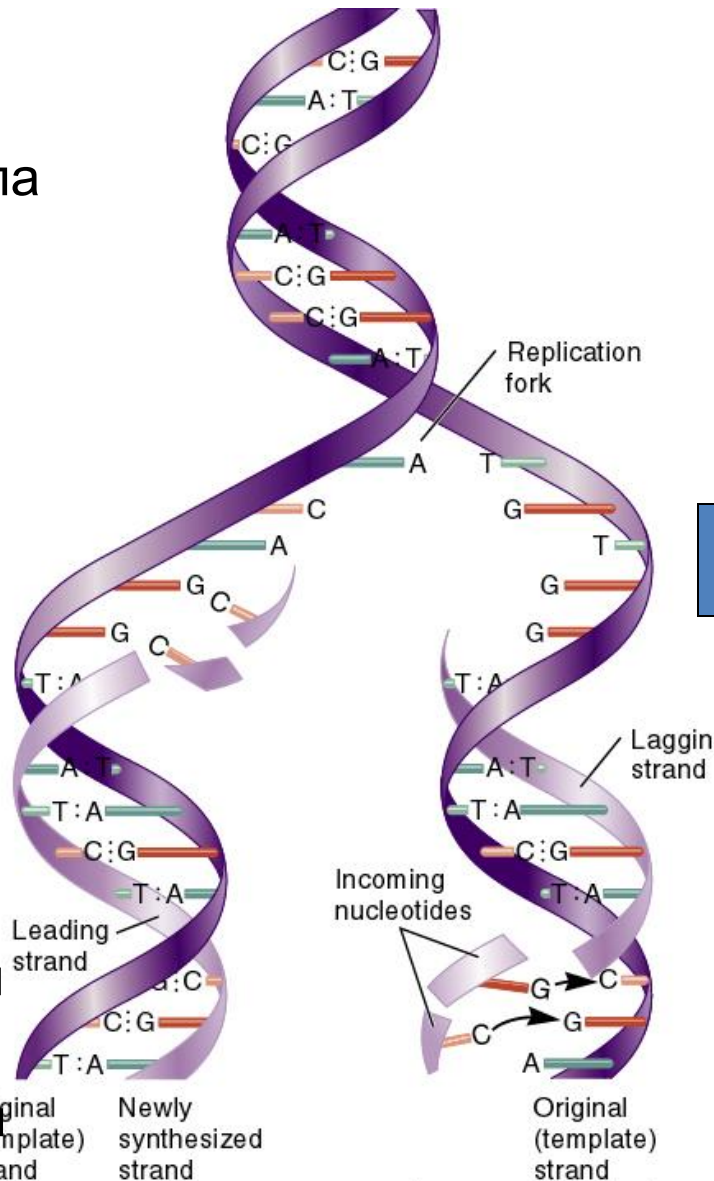
Их модель была хороша именно тем, что она объясняла этот факт. То есть она содержала в себе идею воспроизведения гена.

В основе воспроизведения гена лежит процесс удвоения или репликации ДНК.

Репликация ДНК

а) Механизм репликации ДНК

- Репликация ДНК – это процесс удвоения генетического материала
- Репликация проходит очень быстро и очень аккуратно в S-периоде клеточного цикла
- Репликация основывается на комплементарности цепочек ДНК
 - АТ/ГЦ правило
 - Чаргаффа
- Цепочки ДНК разъединяются, каждая цепь служит матрицей для синтеза новой цепи



б) Результат репликации

DNA of 1 chromatid

БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ.
РЕПЛИКАЦИЯ ДНК.

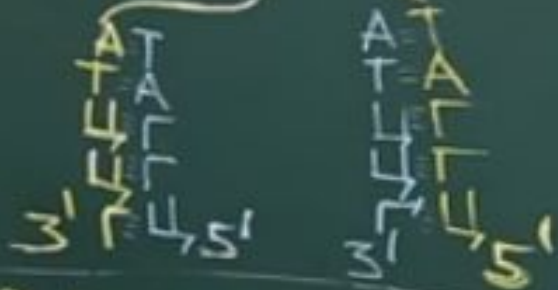
МАТРИЧНЫЙ СИНТЕЗ

ПРИНЦИПЫ:

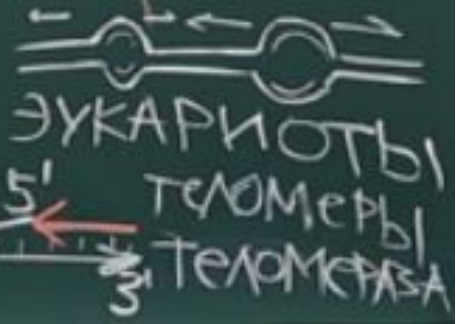
- КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ
- АНТИПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ

ПОЛУ-
КОНСЕРВАТИВ-
НОСТЬ
РЕПЛИКАЦИИ

5' 3' ДЕНАТУРАЦИЯ
(ПЛАВЛЕНИЕ)
ДНК



5' 3' ЗАТРАВКА
= РИБОНУКЛЕОТИД
МАТРИЦА



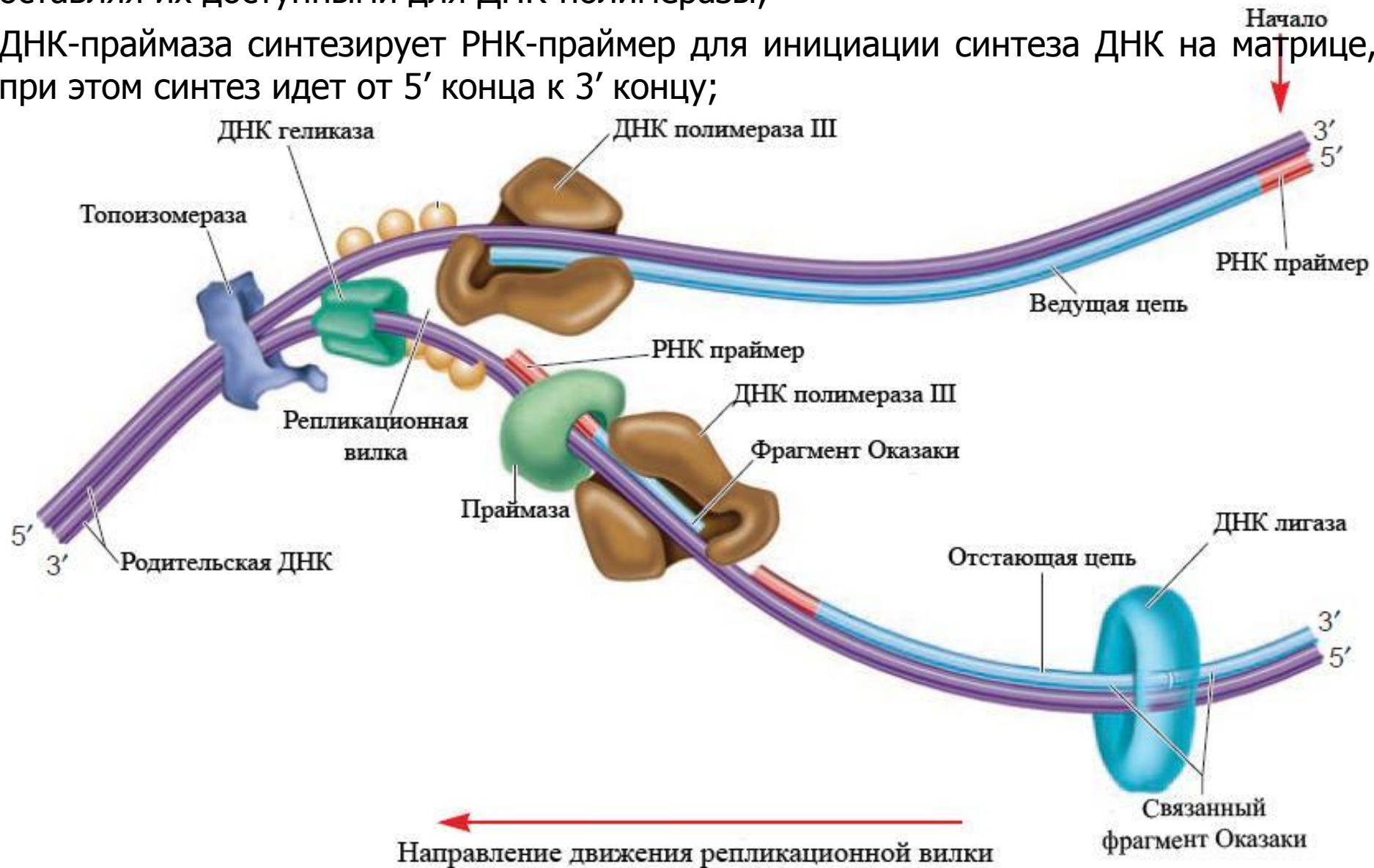
Уотсон и Крик предложили следующее:

Поскольку ДНК содержит две нити, две цепи связанные между собой более слабыми водородными связями, то можно сообщив молекуле энергию разорвать водородные связи (этот процесс называется плавлением или денатурацией ДНК).

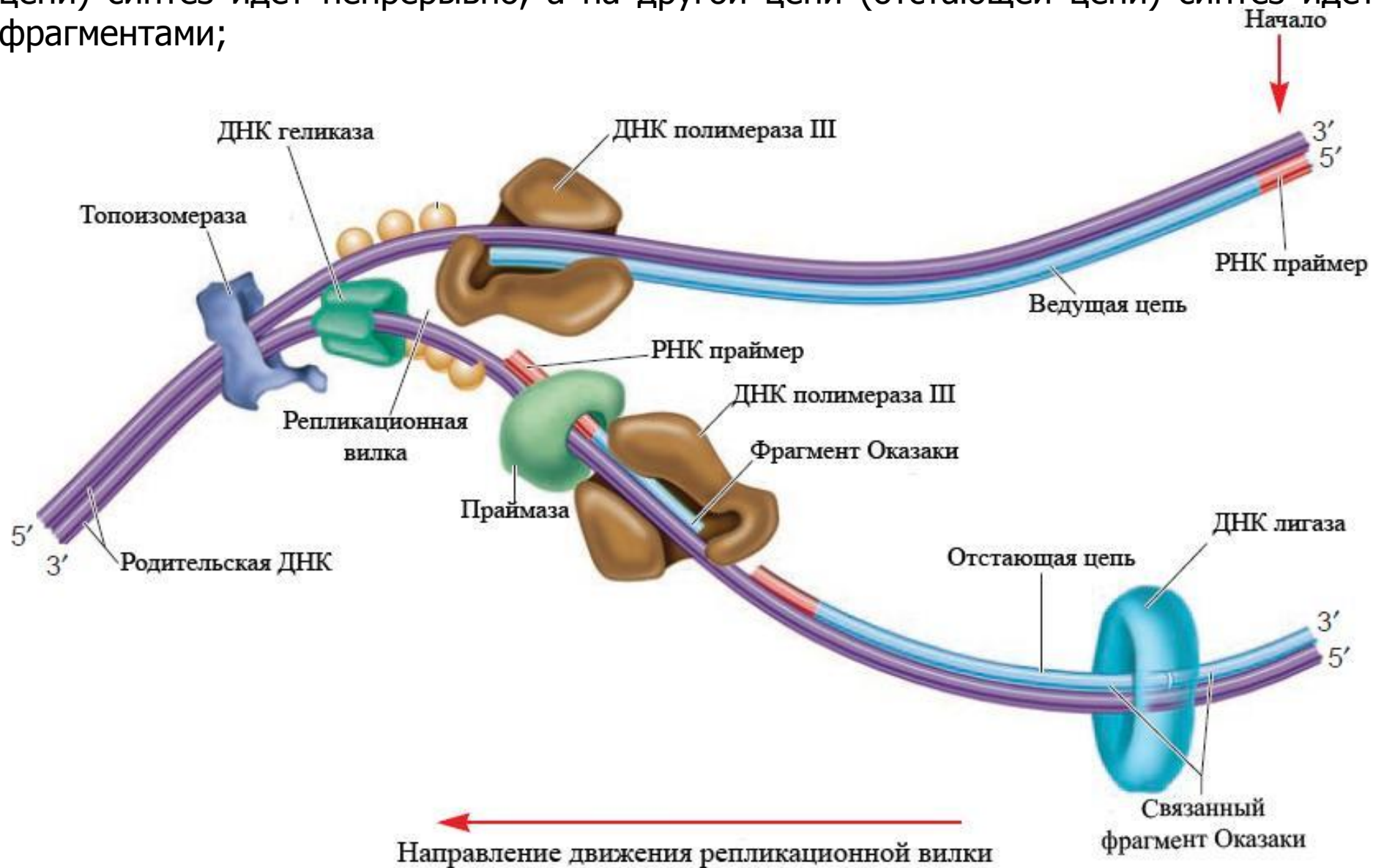
При этом освобождаются две цепи и у них обнажаются азотистые основания которые в них содержатся. В результате этого можно каждую из этих цепей использовать как матрицу для синтеза новой цепи.

Этот синтез управляется двумя основными принципами, которые и лежат в основе структуры ДНК – это комплементарность и антипараллельность.

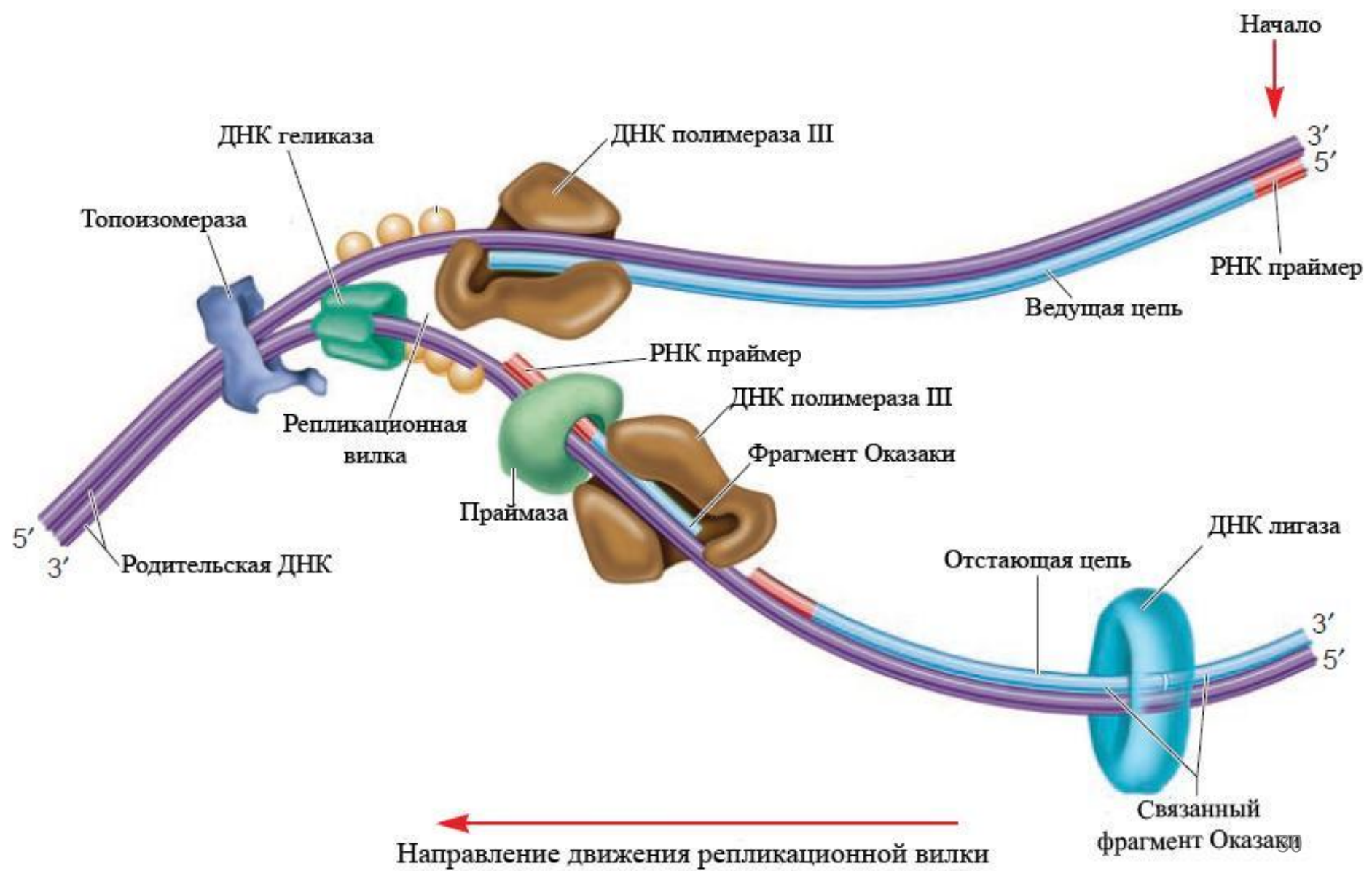
- ДНК геликаза разрушает водородные связи между комплементарными цепями;
- Топоизомераза снимает положительную сверхспирализацию ДНК;
- белки SSB связываются с одиночными цепями, стабилизируют их состояние, оставляя их доступными для ДНК-полимеразы;
- ДНК-праймаза синтезирует РНК-праймер для инициации синтеза ДНК на матрице, при этом синтез идет от 5' конца к 3' концу;



ДНК-полимераза III осуществляет на одиночных цепях синтез комплементарных цепей ДНК; для начала синтеза ДНК-полимеразе III необходимо наличие нуклеотидной затравки, поэтому на одной из родительских цепей ДНК (ведущей цепи) синтез идет непрерывно, а на другой цепи (отстающей цепи) синтез идет фрагментами;

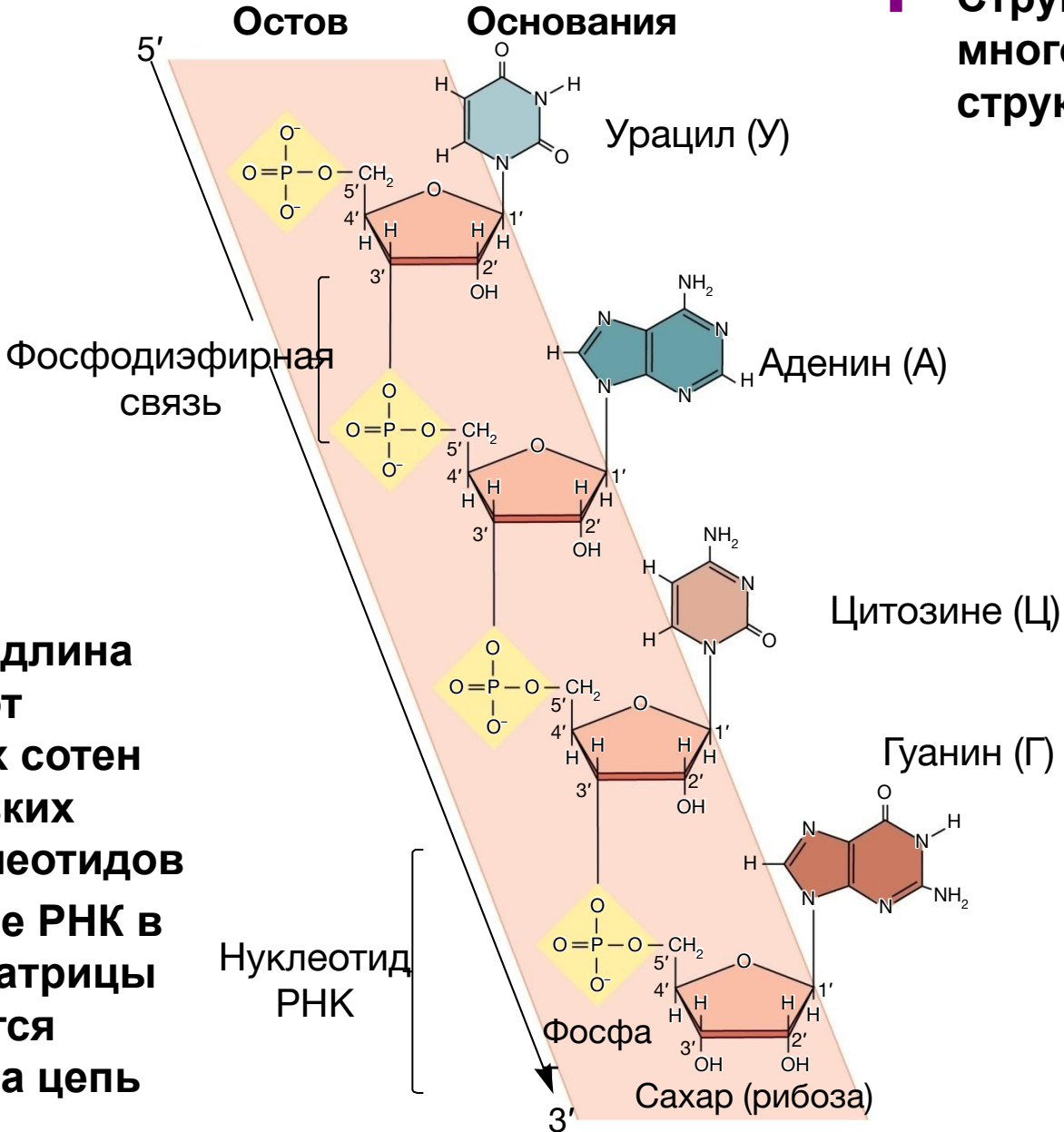


- ДНК-полимераза III продолжает синтез цепи, постепенно заменяя нуклеотиды РНК между фрагментами;
- ДНК-лигаза сшивает фрагменты отстающей цепи



Структура РНК

- Структура РНК во многом схожа со структурой ДНК



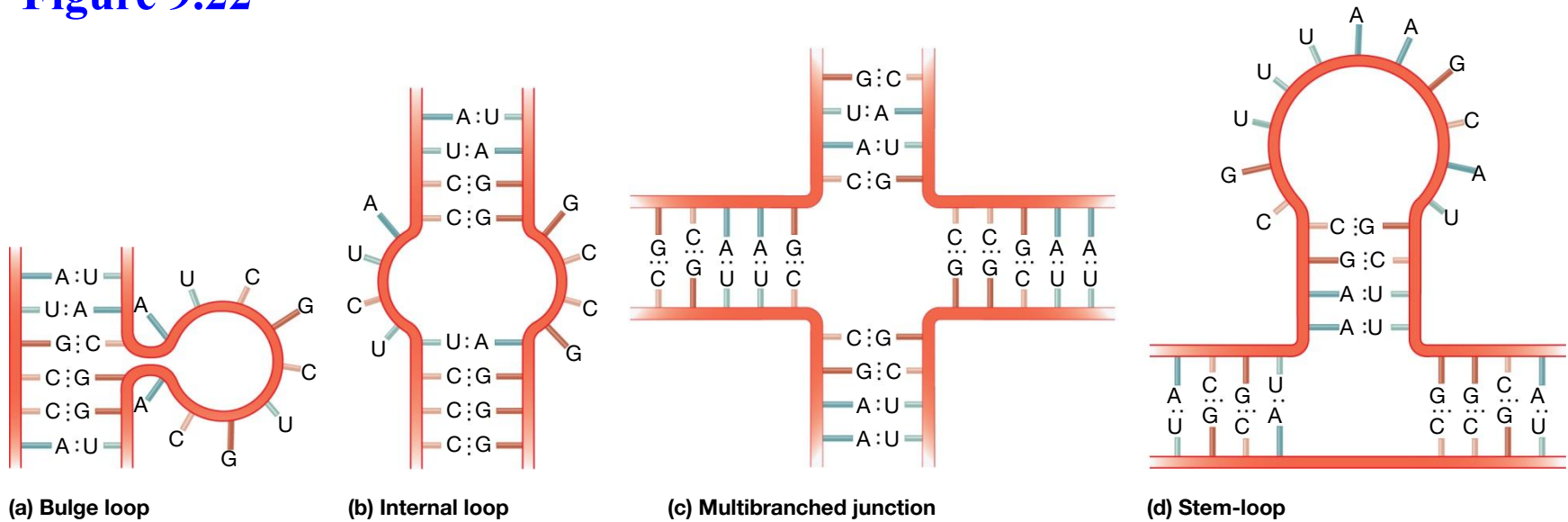
- В среднем длина цепи РНК от нескольких сотен до нескольких тысяч нуклеотидов
- При синтезе РНК в качестве матрицы используется только одна цепь ДНК

- Обычно РНК молекулы являются одноцепочечными, но могут формировать короткие двуцепочечные участки
 - Вторичные структуры образуются в следствие **комплементарного спаривания оснований**
 - А с У и Ц с Г
 - This allows short regions to form a double helix
- RNA double helices typically
 - Are right-handed
 - Have the A form with 11 to 12 base pairs per turn
- Different types of RNA secondary structures are possible
 - Refer to Figure 9.22

Complementary regions
Held together by
hydrogen bonds

Figure 9.22

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



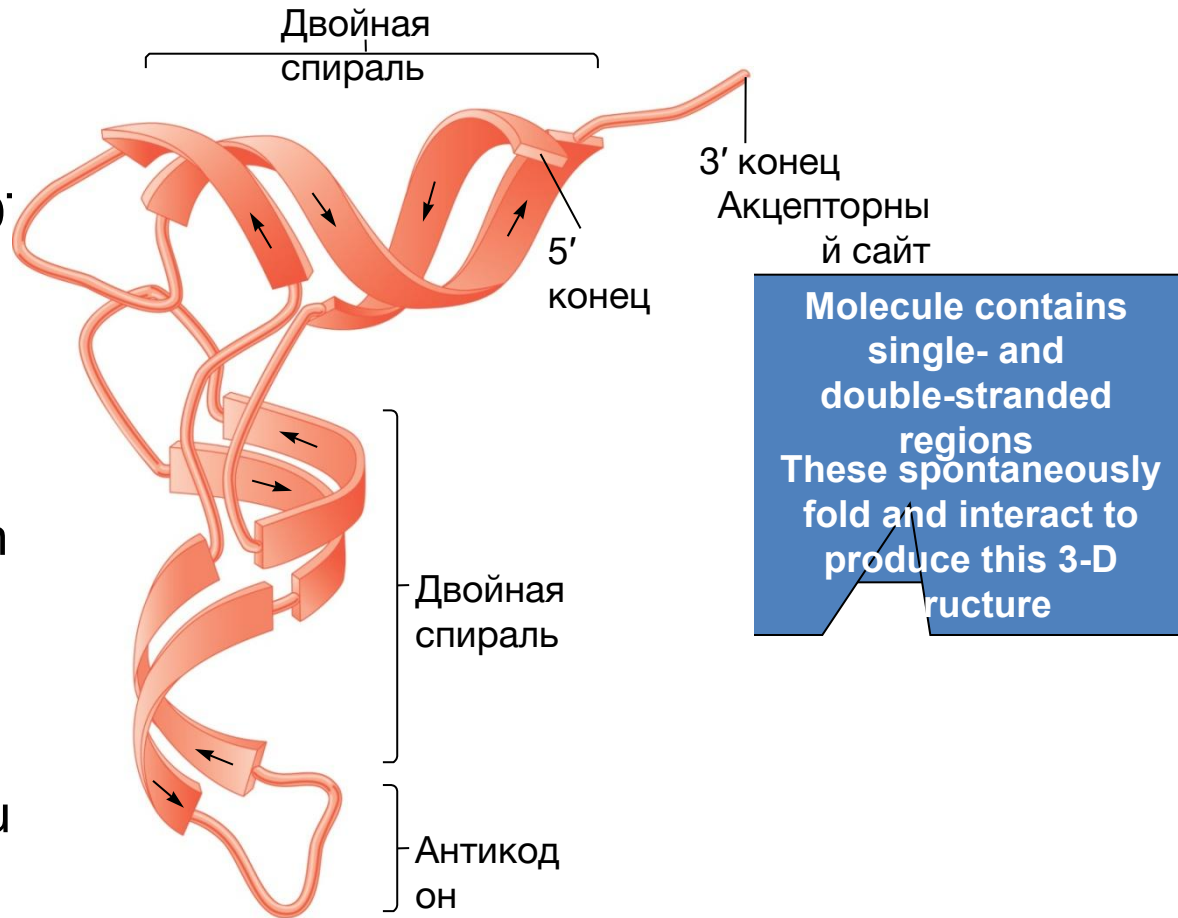
Non-complementary regions
Have bases projecting away
from double stranded regions

Also called
hair-pin

- Many factors contribute to the tertiary structure of RNA

- For example

- Base-pairing and base stacking with the RNA itself
- Interactions with ions, small molecules and large proteins



(a) Ribbon model

Figure 9.23

- Figure 9.23 depicts the tertiary structure of tRNA^{phe}
 - The transfer RNA that carries phenylalanine

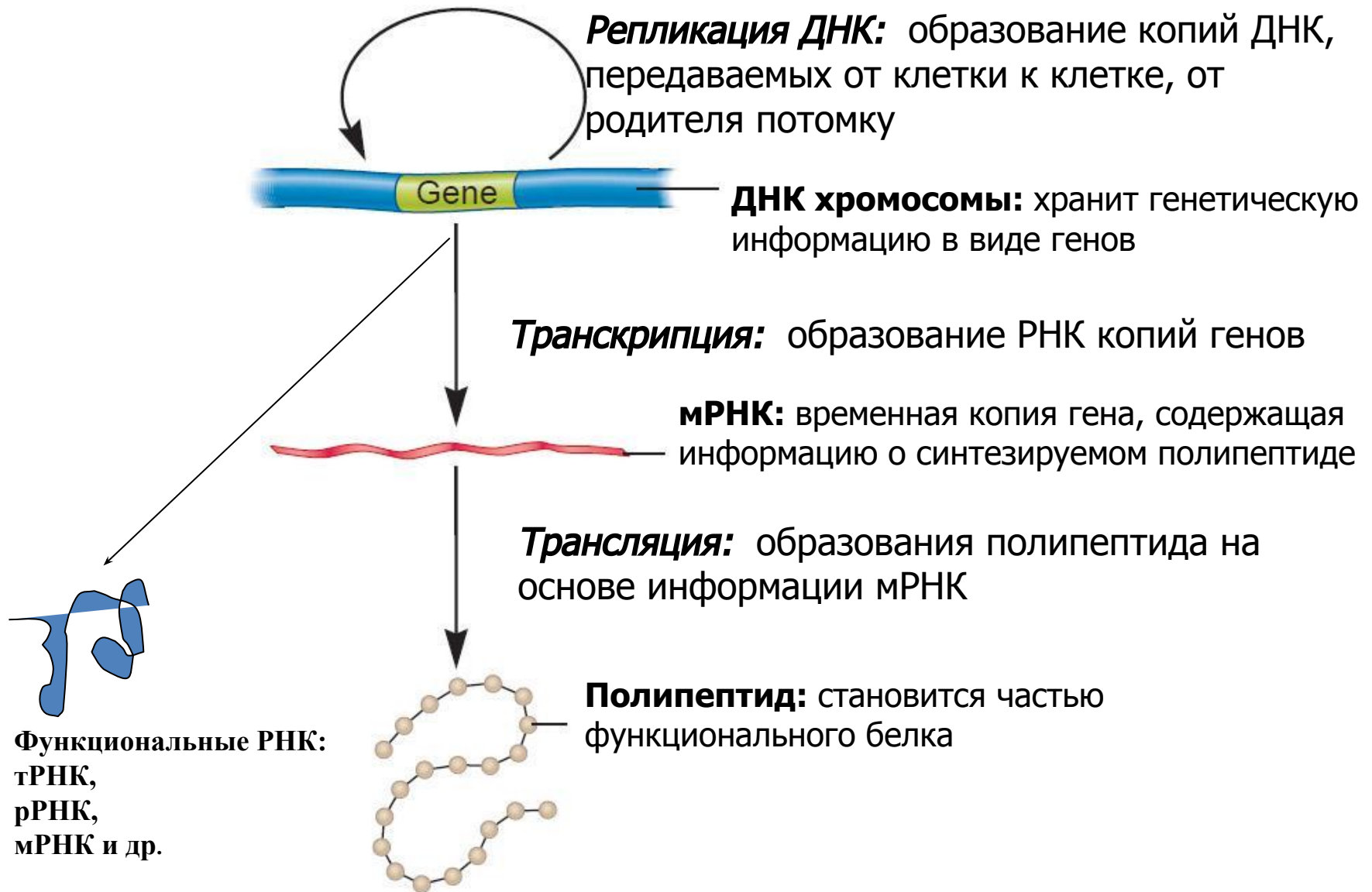
Транскрипция гена



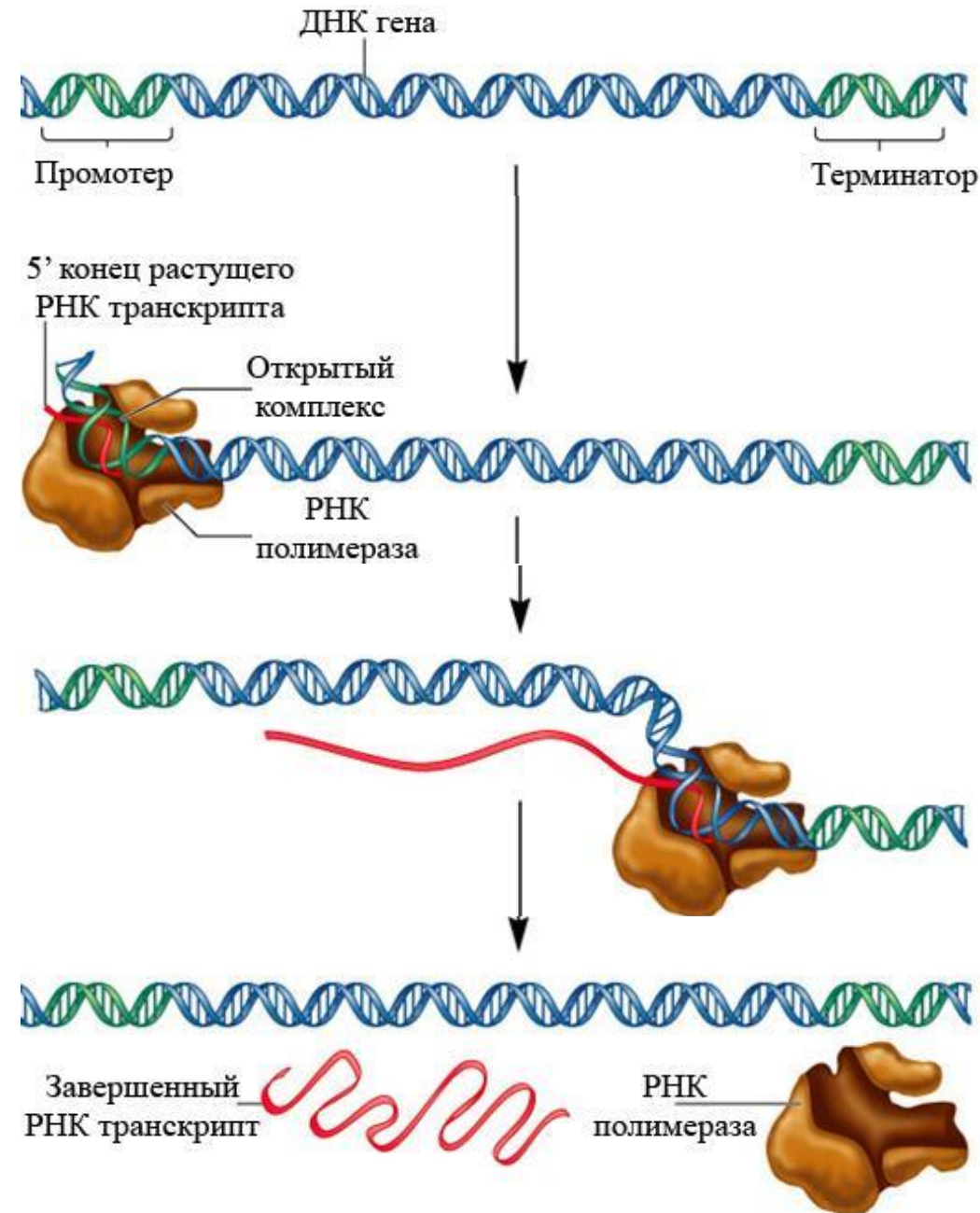
ВВЕДЕНИЕ

- ДНК хранит информацию
 - Для построения механизма (организма) обеспечивающего
 - Не является самодостаточной молекулой
- Для построения и поддержания организма информация ДНК должна быть *декодирована*
 - Конечная цель: Образование активных молекул РНК и белков, которые выполняют структурную функцию в клетке и катализируют химические реакции
- Два шага: *транскрипция и трансляция*

Центральная догма генетики



Стадии транскрипции



Инициация

- Функция промотора – место определения транскрипционных факторов
- Транскрипционные факторы обеспечивают связь РНК полимеразы с промотором, формирующей **закрýтый промоторный комплекс**
- Вслед за связыванием ДНК денатурирует образуя **открытый промоторный комплекс**

Элонгация

- РНК полимеразы скользит вдоль ДНК в открытом комплексе и синтезирует РНК транскрипт

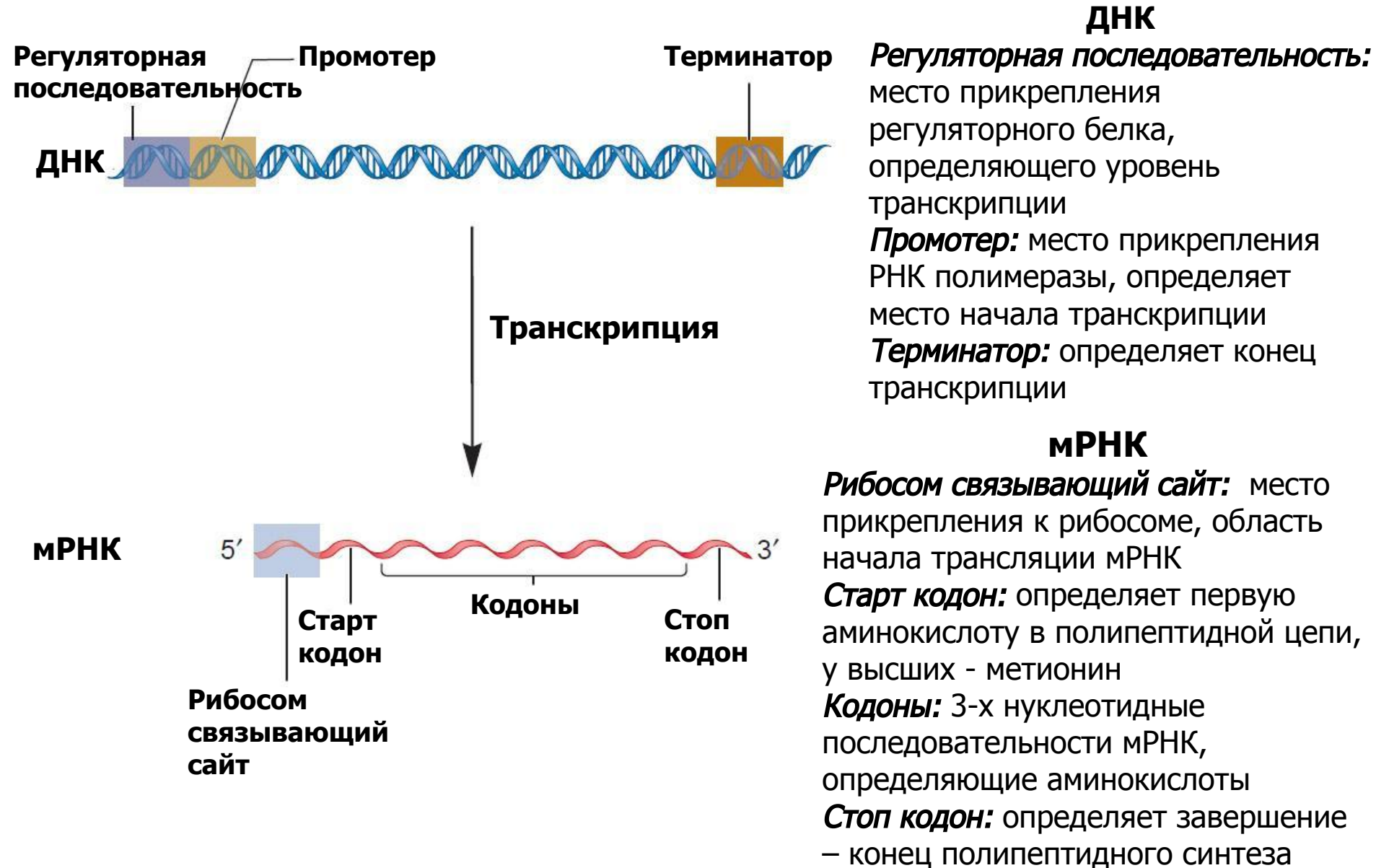
Терминация

- По достижению терминаторного сайта РНК полимеразы отсоединяется от ДНК

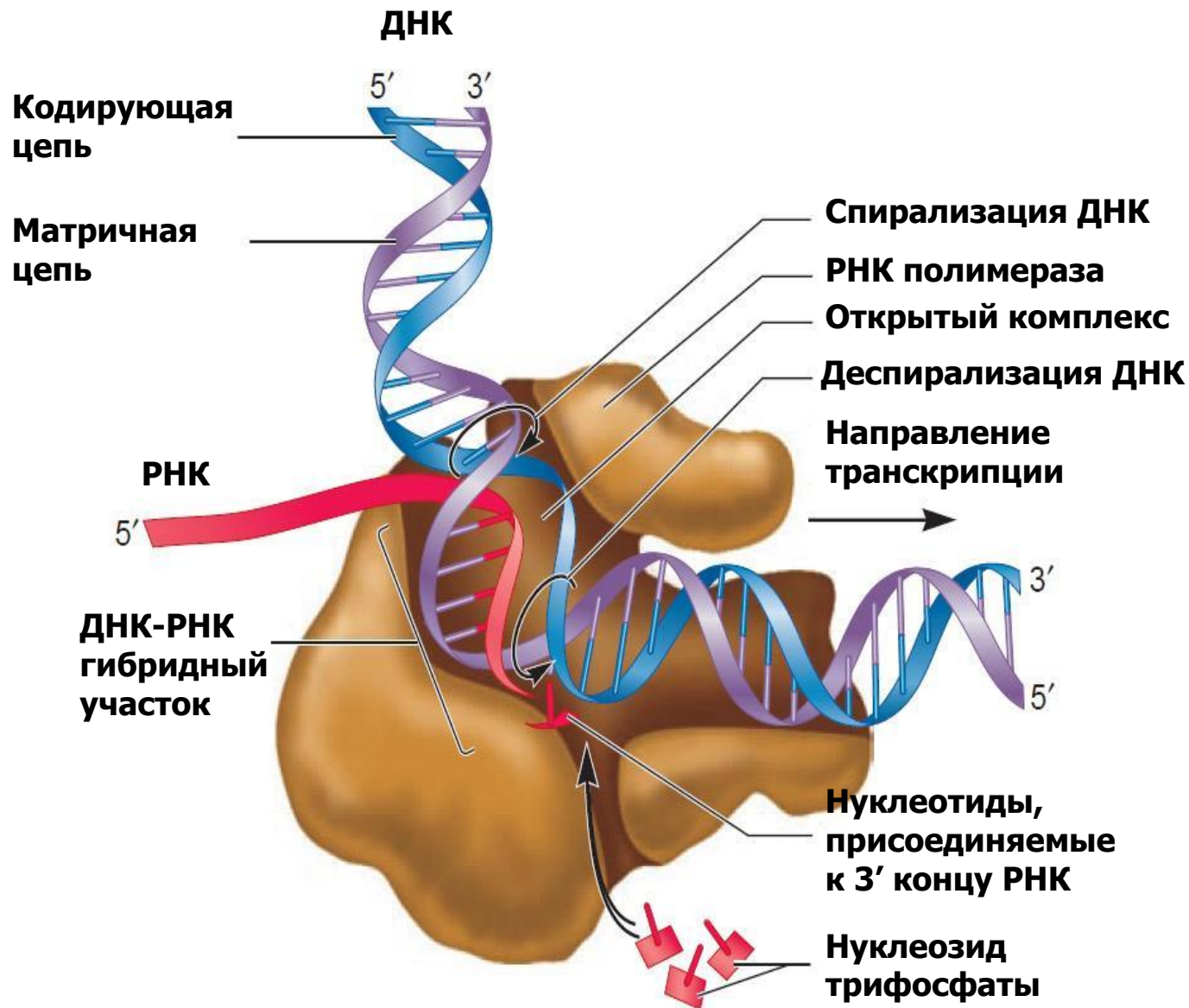
Структура гена

- Ген может быть определен как дискретный участок ДНК транскрибируемый в РНК
 - Ген так же называют *транскрипционной единицей*
 - Молекула РНК образующаяся на основе гена называется *транскрипт*
- В процессе экспрессии гена, последовательности ДНК окружающие его определяют:
 - Силу экспрессии гена
 - Время экспрессии
 - Место (ткань или тип клеток) экспрессии гена
- Транскрипция осуществляется большим ферментативным комплексом называемым *РНК полимераза*
- В большинстве случаев РНК полимераза связывается со специфической последовательностью ДНК перед геном, называемой *промотером*
 - *Промотер привлекает РНК полимеразу к гену и «сообщает» ферменту о гене*

Организация гена и транскрипта простейших



Синтез РНК транскрипта



РНК полимераза скользит вдоль ДНК, создавая открытый комплекс.

Матричная цепочка ДНК используется в качестве основы для синтеза комплементарной цепи мРНК

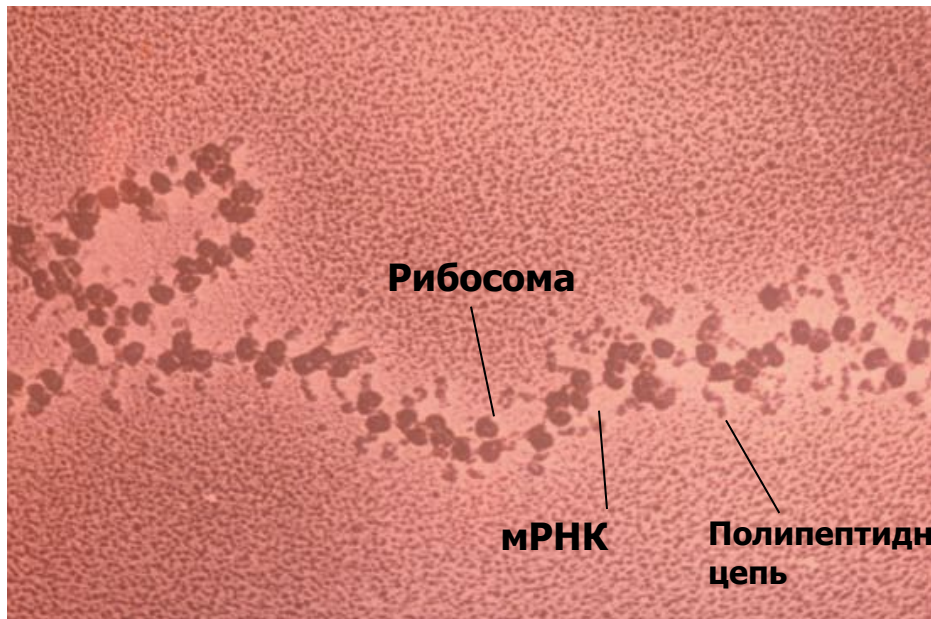
Правило комплементарности АУ/ГЦ

Полипептидный синтез

- Процесс синтеза белка на матричной мРНК называется **трансляцией**, его основные этапы:
- активизация определенной аминокислоты и её присоединение к тРНК, образование молекулярного комплекса: аминокислота-фермент аминоксил-тРНК-синтетаза -тРНК;
- образование пептидных связей между отдельными аминокислотами, происходящее с участием рибосом: рибосома присоединяется к 5' концу молекулы мРНК и считывает информацию от 5' конца к 3' концу; тРНК, несущие аминокислоту внутри рибосомы связываются своими антикодонами с соответствующими кодонами мРНК; в результате выстраивается цепочка аминокислот в соответствии с закодированной генетической информацией мРНК;
- когда рибосома доходит до стоп-кодона на мРНК, синтез белковой молекулы прекращается и она отделяется от рибосомы. При этом освободившаяся мРНК и рибосома могут быть снова вовлечены в процесс биосинтеза новой белковой молекулы. При значительной длине мРНК на ней одновременно могут работать несколько рибосом (полисом), находящихся на разных стадиях синтеза соответствующего белка;
- после освобождения от рибосомы белковая молекула приобретает вторичную структуру, скручиваясь в альфа или бета-спирали; третичную структуру белки приобретают, когда отдельные спирали объединяются в глобулы; четвертичная структура белка представляет собой ассоциации из различных глобул; эти преобразования белковых молекул происходят с участием особых ферментов – **шаперонов**.

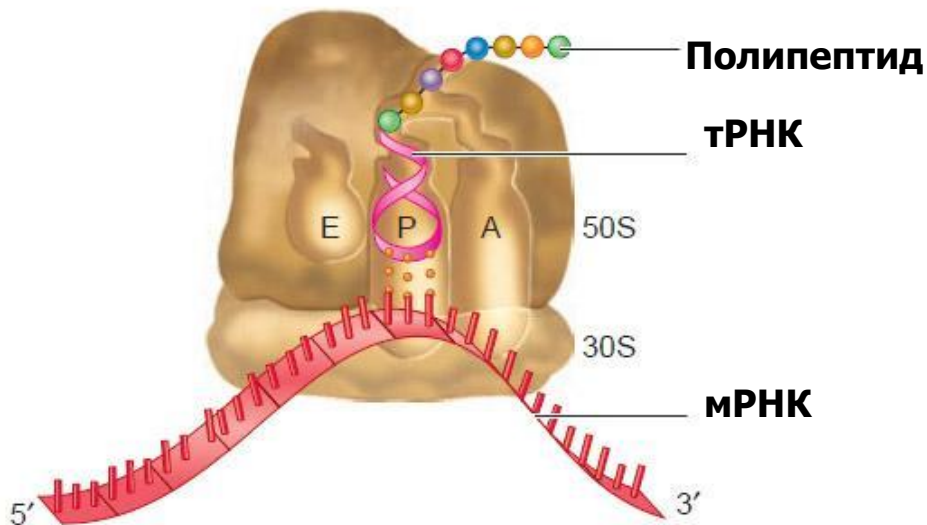
Рибосомная РНК (рРНК):

рибосома содержит 64% рРНК и 36% белка,
состоит из малой 30S и большой 50S субъединиц;
в цитоплазме рибосомы расположены группами, образуя полисомы

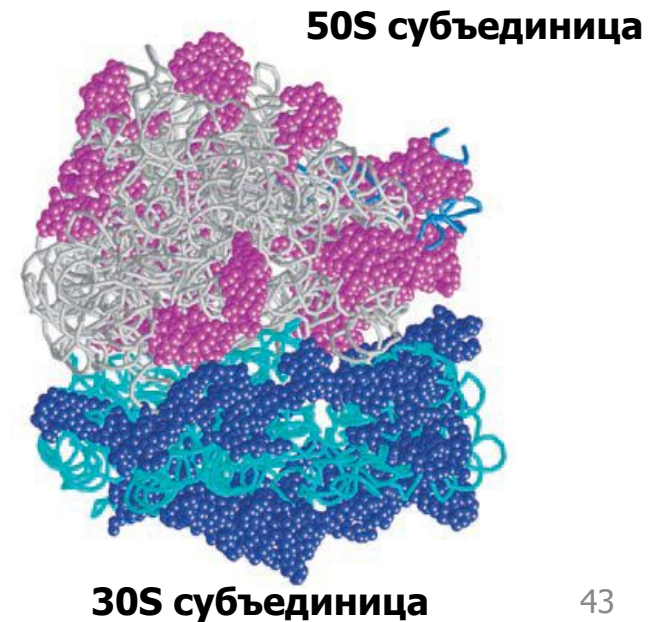


Рибосомы видимые с помощью электронного микроскопа

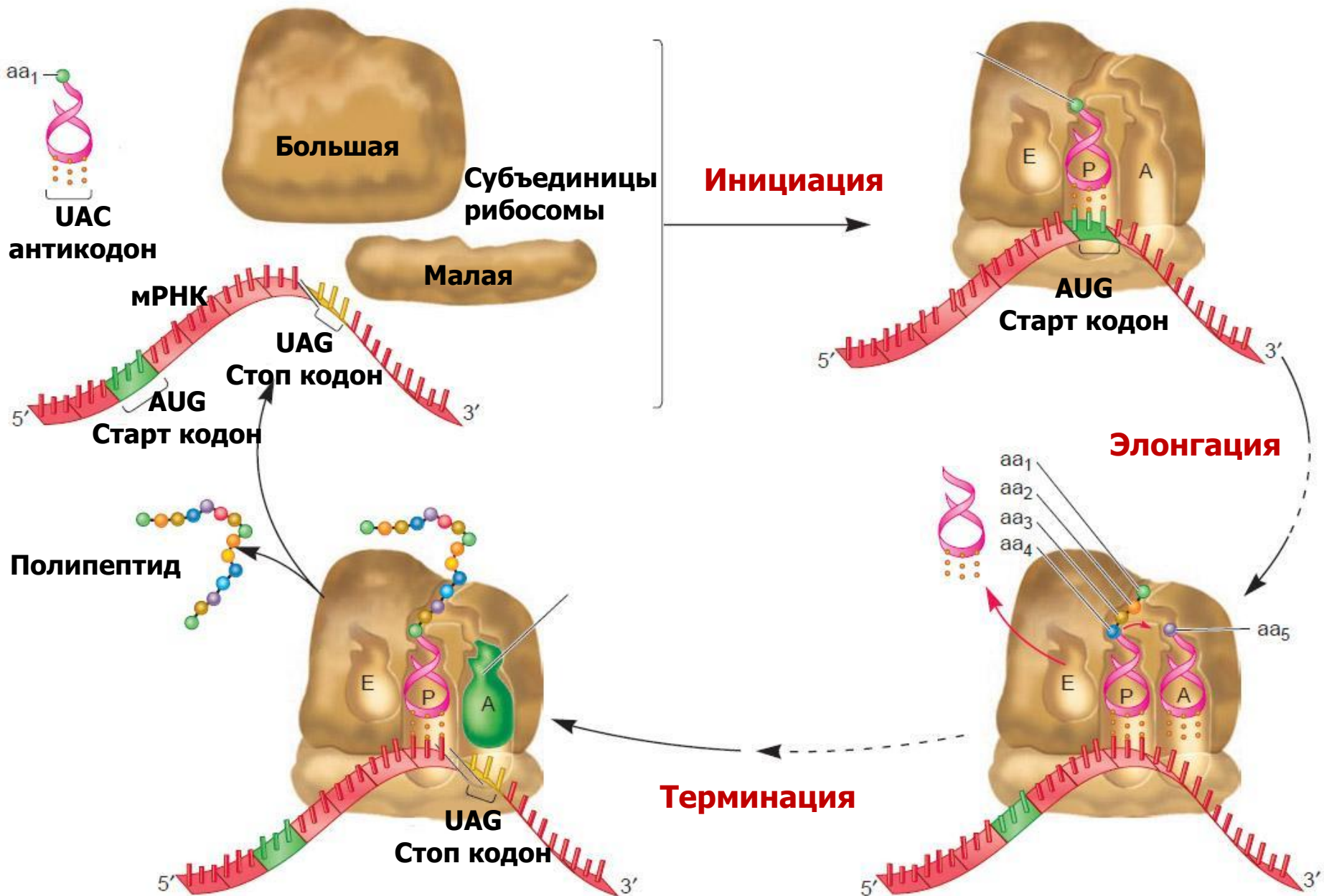
Модель структуры рибосомы



Модель бактериальной рибосомы



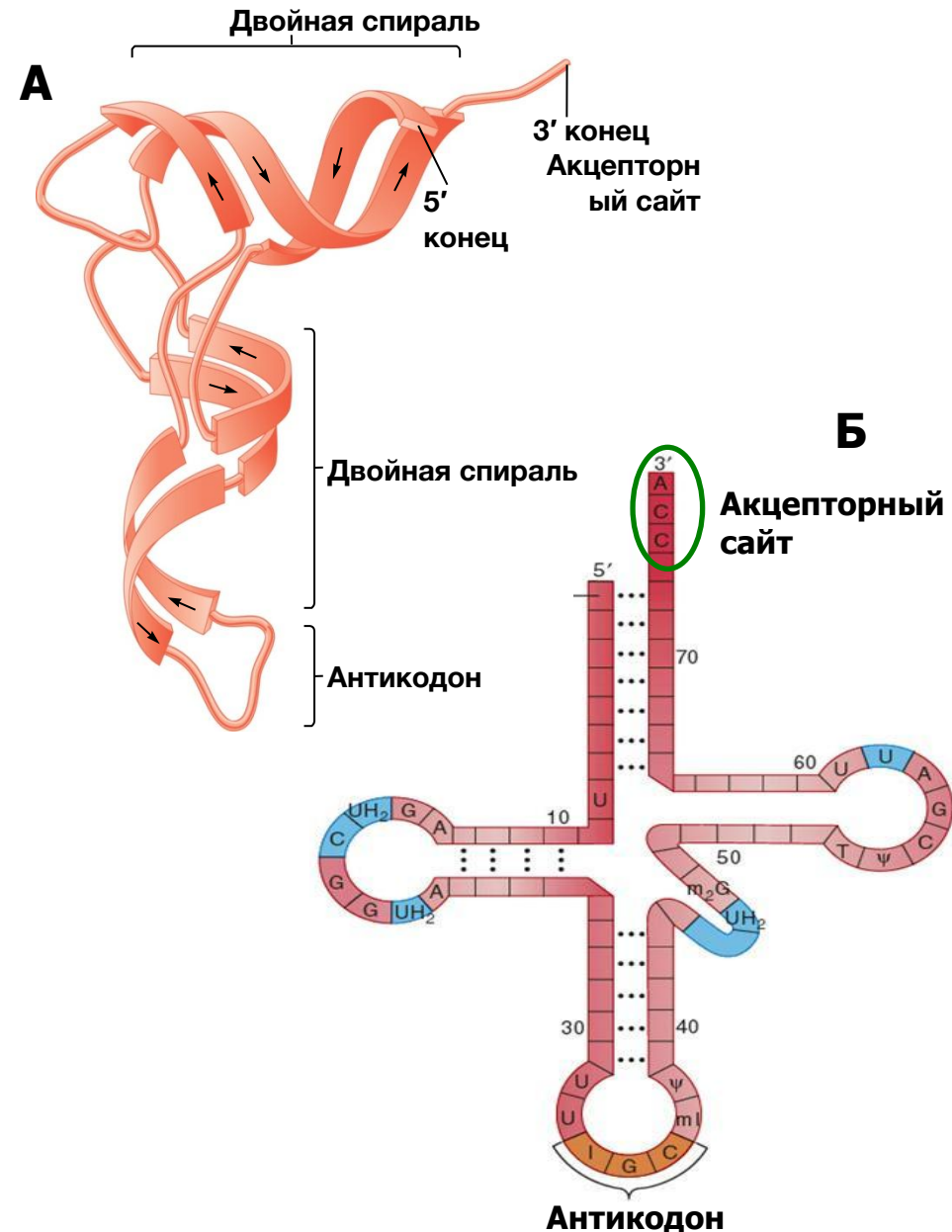
Трансляция



Транспортная РНК (тРНК):

- Осуществляет транспортировку аминокислот к рибосоме
- По трехмерной структуре тРНК напоминает форму клеверного листа
- Для каждой из 20 аминокислот своя тРНК
- Длина молекулы тРНК примерно 80 нуклеотидов
- Антикодона определяет связываемую аминокислоту
- Акцепторный сайт удерживает аминокислоту
- Присоединение аминокислот к тРНК обеспечивает фермент аминоацил-тРНК-синтетаза.

Структура тРНК



Структурные уровни формируемые белками

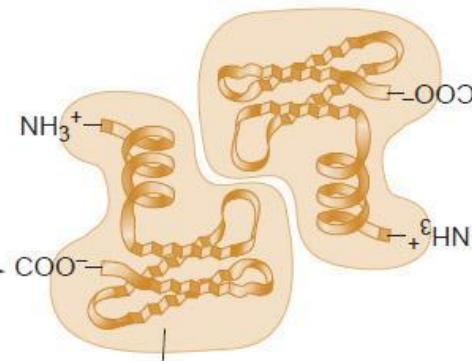
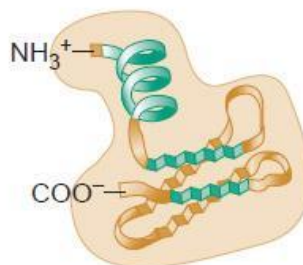
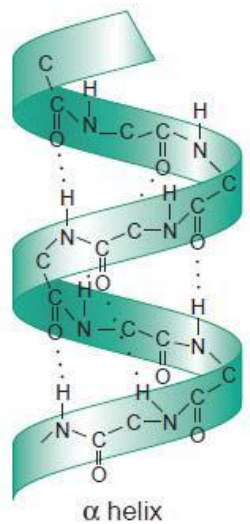
Первичная

Вторичная

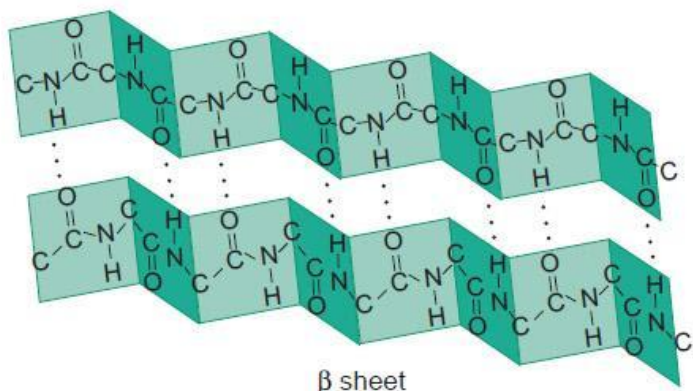
Третичная

Четвертичная

Ala
Val
Phe
Glu
Tyr
Leu
Iso
Ala



(a)



(b)

(c)

(d)

**Белковая
субъединица**

**В зависимости от
аминокислотной
последовательности**

Генетический код

Генетический код триплетный - каждая из 20 входящих в состав белков аминокислот кодируется тремя нуклеотидами (кодоном)

Ген. код вырожденный - одна аминокислота может быть закодирована не одним, а несколькими триплетами нуклеотидов, например, метионин кодируется одним кодоном АУГ, а валин - четырьмя кодонами ГУА, ГУЦ, ГУГ, ГУУ

Ген. код неперекрывающийся - началом старта считывания любого гена является кодон АУГ, задающий состав нуклеотидов последующих триплетов

Ген. код универсален для практически всех живых организмов, от бактерий до человека

		Второй нуклеотид				
		U	C	A	G	
U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	
	UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	C	
	UUA } Leu	UCA } Ser	UAA стоп	UGA стоп	A	
	UUG } Leu	UCG } Ser	UAG стоп	UGG Trp	G	
C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U	
	CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C	
	CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A	
	CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G	
A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	
	AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	C	
	AUA } Ile	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	A	
	AUG Met/старт	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	G	
G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U	
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C	
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A	
	GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G	