

Курс «Молекулярная биология клетки»

Основные концепции современной молекулярной биологии.

- Структура и стабильность генома. Структура ДНК, процессы репликации ДНК, репарации и пространственной организации генома.
- Реализация наследственной информации. Процессы, лежащие в основе "работы" (экспрессии) генов — транскрипция, трансляция. Жизненный цикл мРНК и посттрансляционная судьба белковых молекул.
- Клетка и окружающая среда. Взаимодействие клетки с окружающими её клетками через прямые межклеточные контакты и химические сигналы. Обмен веществ (метаболизм) и клеточный цикл.

Источники:

Курсы лекций и презентации:

«Молекулярная биология и генетика»

«Молекулярная биология клетки»

<https://stepik.org>

<https://lectoriy.mipt.ru/course/Biology-Molecular-14L>

Дейч К.О "О геномах" СФУ.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.
Molecular Biology of the Cell; издание 5-ое или 6-ое.

(«Молекулярная биология клетки», в 2-х томах,
переведено на русский язык издательством НИЦ
"Регулярная и хаотическая динамика").

<https://www.coursera.org/>

<https://stepik.org/>

<http://postnauka.ru/>

<http://vk.com/molbio>

<http://icg.nsc.ru/lectures/>

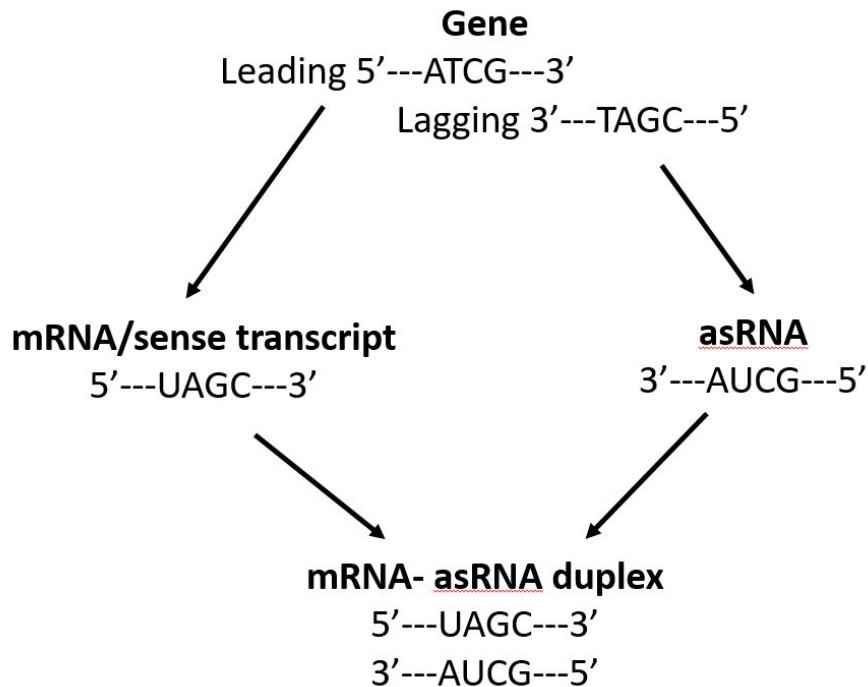
«Кто» такие?

Типы генов	Gencode	Ensembl	RefSeq	CHES
Белок-кодирующие гены	19 901	20 376	20 345	21 306
Гены длинных некодирующих РНК	15 779	14 720	17 712	18 484
Антисмысловые РНК	5501	—	28	2694
Другие некодирующие РНК	2213	2222	13 899	4347
Псевдогены	14 723	1740	15 952	—
Общее число транскриптов	203 835	203 903	154 484	323 827

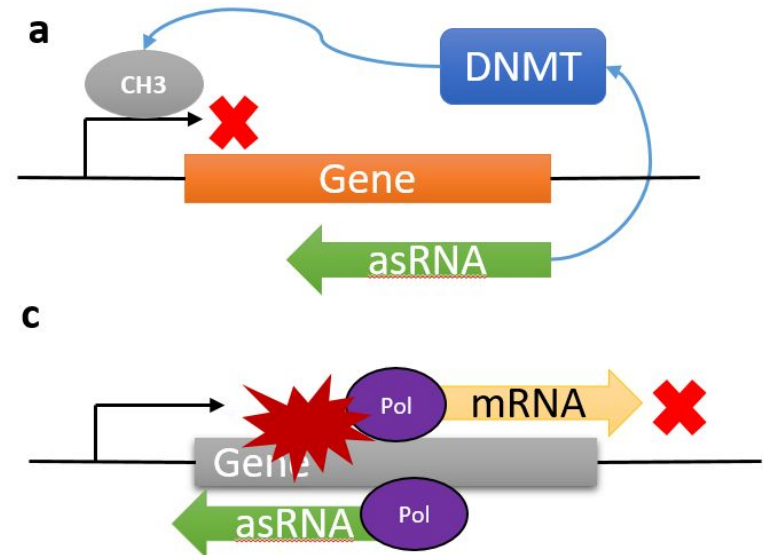
Антисмысловые РНК (AsRNA)

(англ. Antisense RNA)

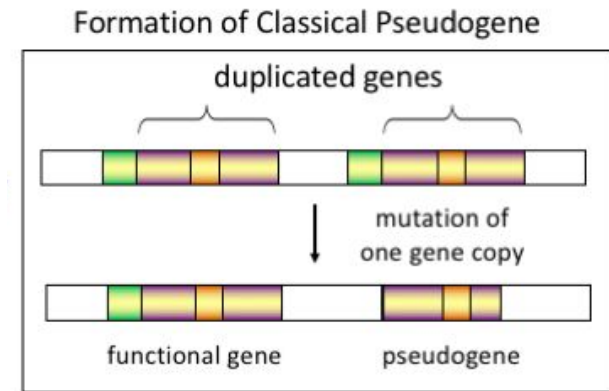
- одноцепочечные РНК, которые комплементарны мРНК.
- AsRNA могут подавлять и активировать экспрессию гена-мишени.
- AsRNA - регуляторные элементы со специфическим действием (метилирование ДНК; столкновение РНК-полимераз – стоп транскрипция).



Используют для **нокаута генов**.



Псевдогены (англ. pseudogenes)



- **Псевдогены** — нефункциональные аналоги структурных генов, утратившие способность кодировать белок и не экспрессирующиеся в клетке. Термин «**псевдоген**» был предложен в 1977 году.
- Псевдогены происходят от обычных функциональных генов, однако утрачивают способность экспрессии в результате появления **стоп-кодонов, сдвига рамки считывания**.
- Пример — семейство **Alu-повторов**. В геноме человека более 1 млн Alu-повторов (или около 11% генома).
- Анализ генетической последовательности псевдогенов и сравнение их с предковыми генами может быть использовано при изучении родственных связей между различными видами живых существ и их происхождения.

Лекция 3.

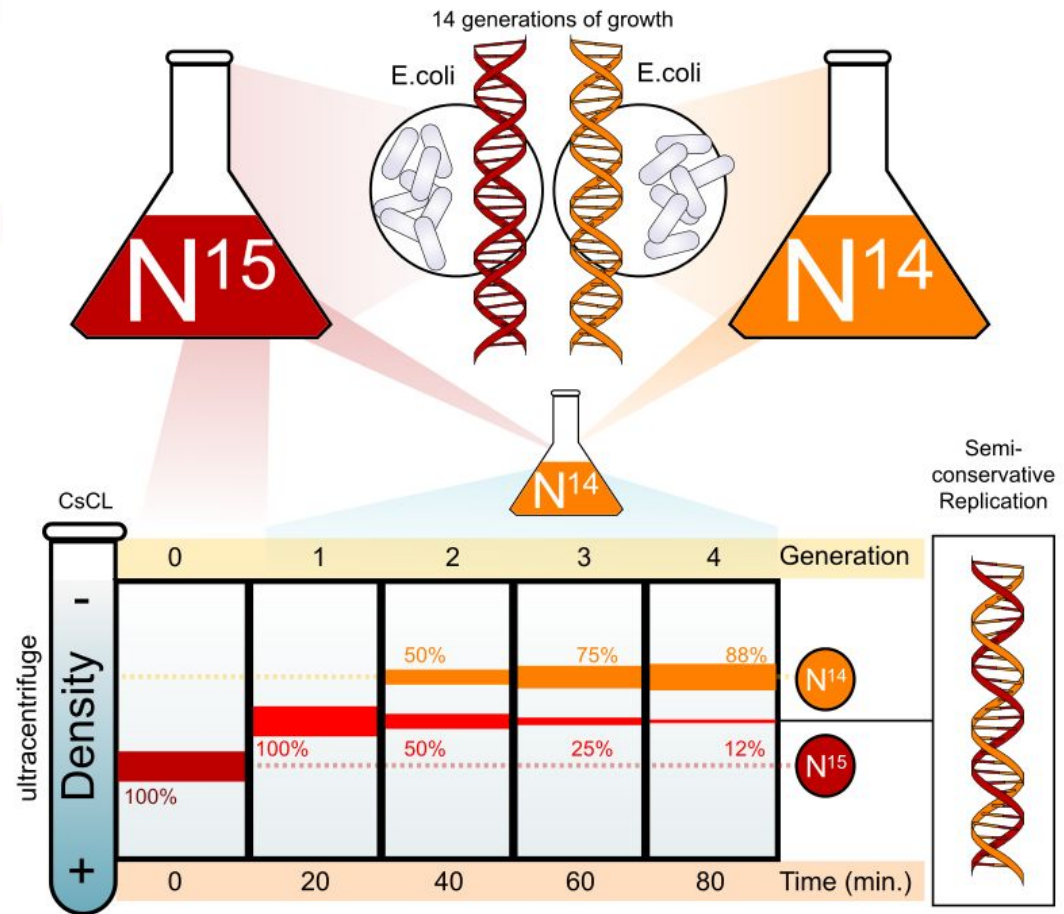
Репликация ДНК

- как инициируется репликация у про- и эукариот, что такое ориджин репликации;
- почему при репликации одна цепь воспроизводится непрерывно, а другая — фрагментами;
- какие основные виды ДНК-полимераз встречаются и в чем их основные отличия.
- терминация процесса репликации

Эксперимент Мезельсона и Сталля

(1957 г.)

- Репликация ДНК протекает по полуконсервативному механизму (каждая дочерняя молекула содержит одну исходную и одну новую цепь)
- Механизм доказан с использованием тяжелых изотопов азота Мезельсоном и Сталем



ДНК полимераза

В 1956 г. Корнберг выделил из клеток бактерии *E. coli* фермент ДНК-полимеразу (ДНК-полимераза I).

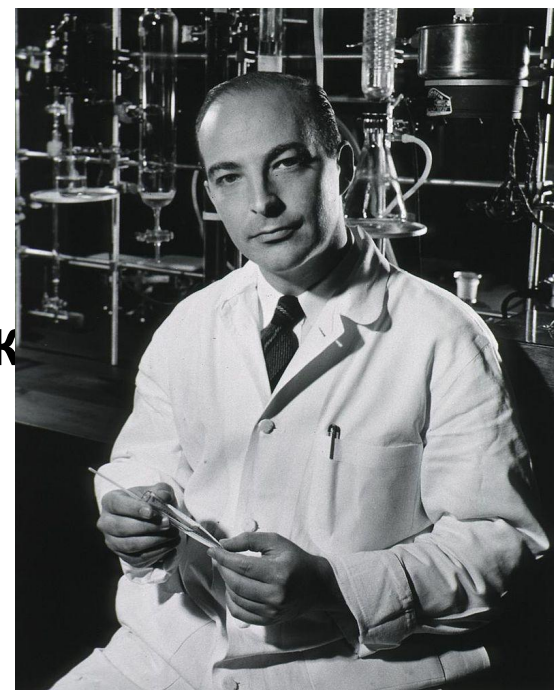
- Этот фермент осуществлял синтез ДНК при наличии в реакционной смеси

- АТФ (энергия)

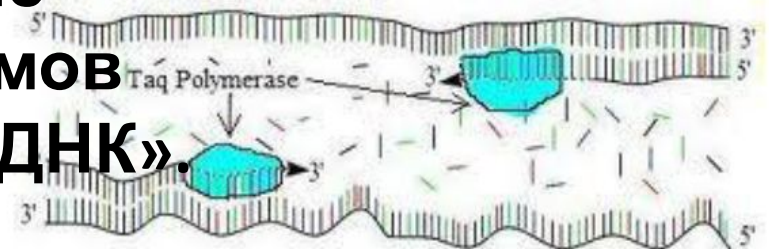
- 4 нуклетотида (А, Т, Г, Ц)

- ДНК (праймер для новой цепи)

- В 1959 г. получил Нобелевскую премию «За открытие механизмов биологического синтеза РНК и ДНК».



Артур
Корнберг
(1918-2007)



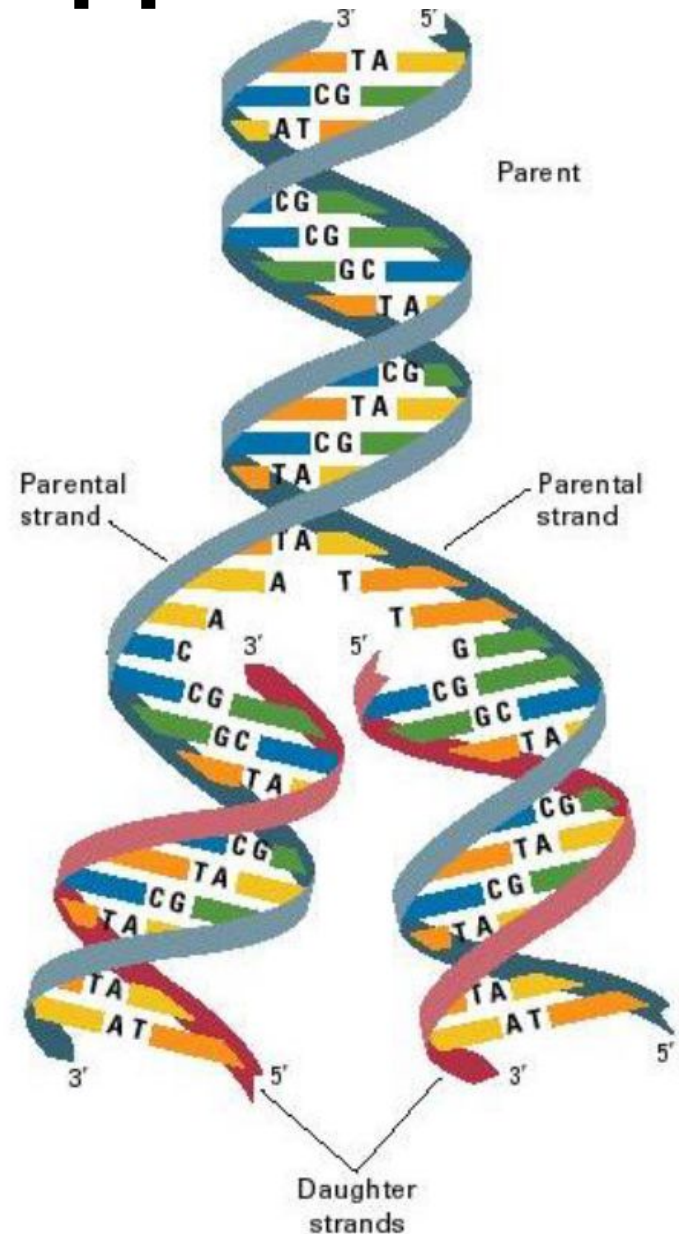
Репликация ДНК

Репликация ДНК — процесс синтеза дочерней молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты на матрице родительской молекулы ДНК.

«Каждая цепь двуцепочечной ДНК служит матрицей при синтезе комплементарной цепи и в результате образуются две пары цепей, в каждой из которых только одна является родительской» – Уотсон и Крик.

Основные этапы репликации:

1. Инициация
2. Элонгация
3. Терминация



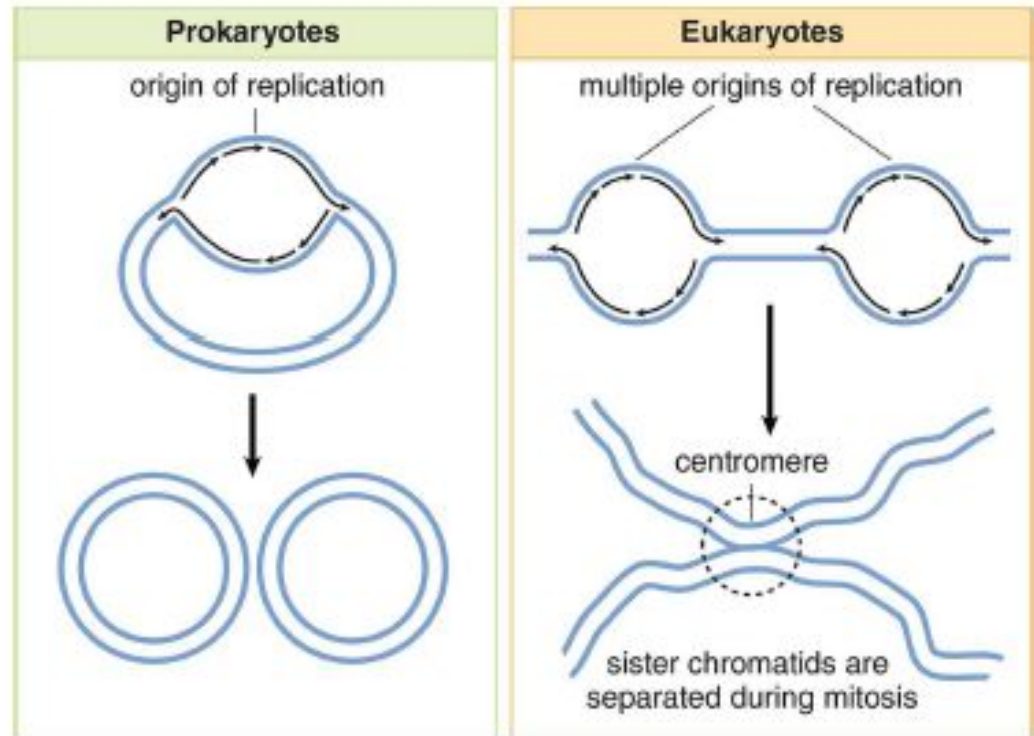
Основные ферменты

репликации

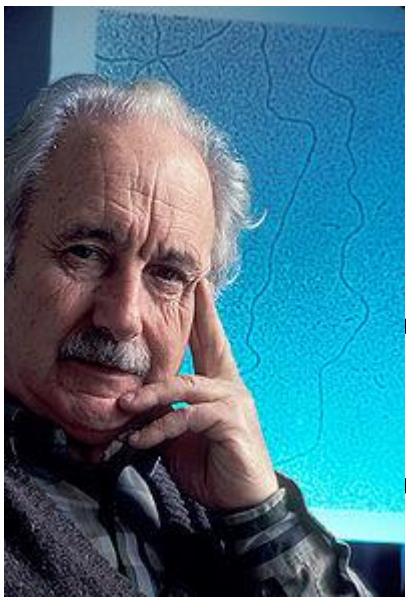
1. **ДНК-полимераза** - фермент катализирующий полимеризацию дезоксирибонуклеотидов на матрице ДНК по принципу комплементарности
2. **ДНК-лигаза** – фермент катализирующий образование фосфодиэфирных связей между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксинуклеотидов в местах разрыва двуцепочечной ДНК
3. **ДНК-хеликаза** – фермент разделяющий цепи двухцепочечной ДНК на одинарные.
4. **ДНК-топоизомераза** - фермент изменяющий степень сверхспиральности ДНК, путем внесения одноцепочечных разрывов в ДНК.
5. **ДНК-праймаза** — синтезирует короткий фрагмент РНК праймер («затравка»), с которого начинается синтез ДНК.

Ориджин репликации

- Ориджин репликации - регион хромосомы, в котором начинается процесс репликации ДНК
- Бактериальные хромосомы чаще содержат один ориджин, эукариотические - много



Количество точек начала репликации в геноме



Теодор Динер,
открыл
вириоды
(1971 г.)

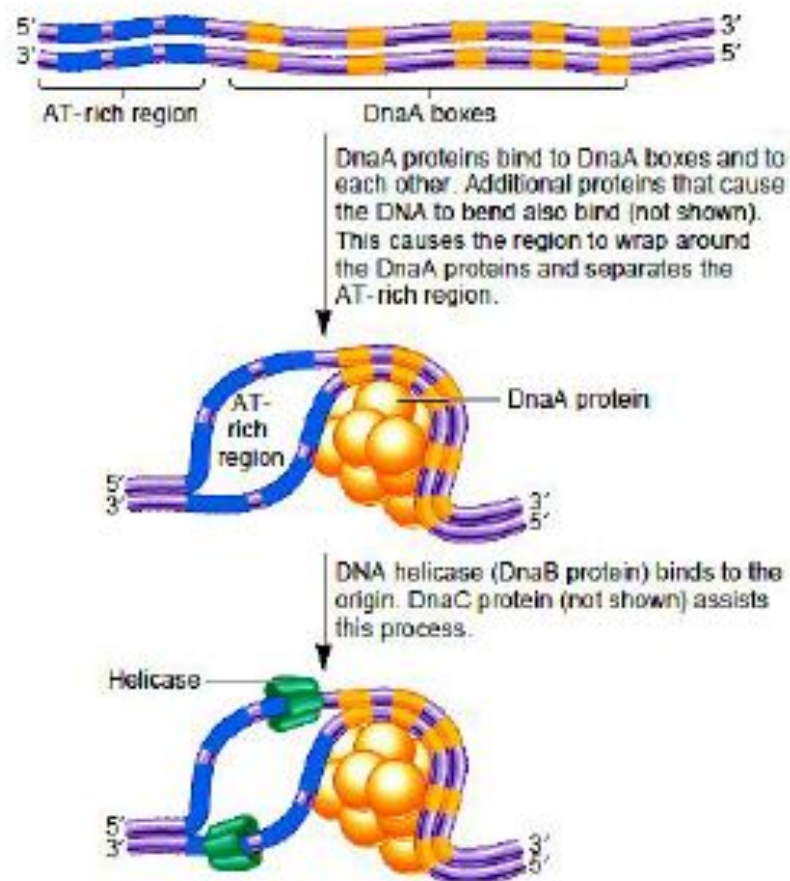
- Геном вириодов (1 РНК) - по две точки начала репликации.
- Геном бактерий (1 ДНК) - одна точка начала репликации.
- Геном архей (1 ДНК) - от одной до четырёх точек начала репликации.
- Геномы эукариот - множество точек начала репликации в каждой хромосоме (до 100 тыс в одной клетке человека).

ori

Большое количество точек начала репликации помогает ускорить процесс удвоения значительно большего, относительно прокариот, генетического материала.

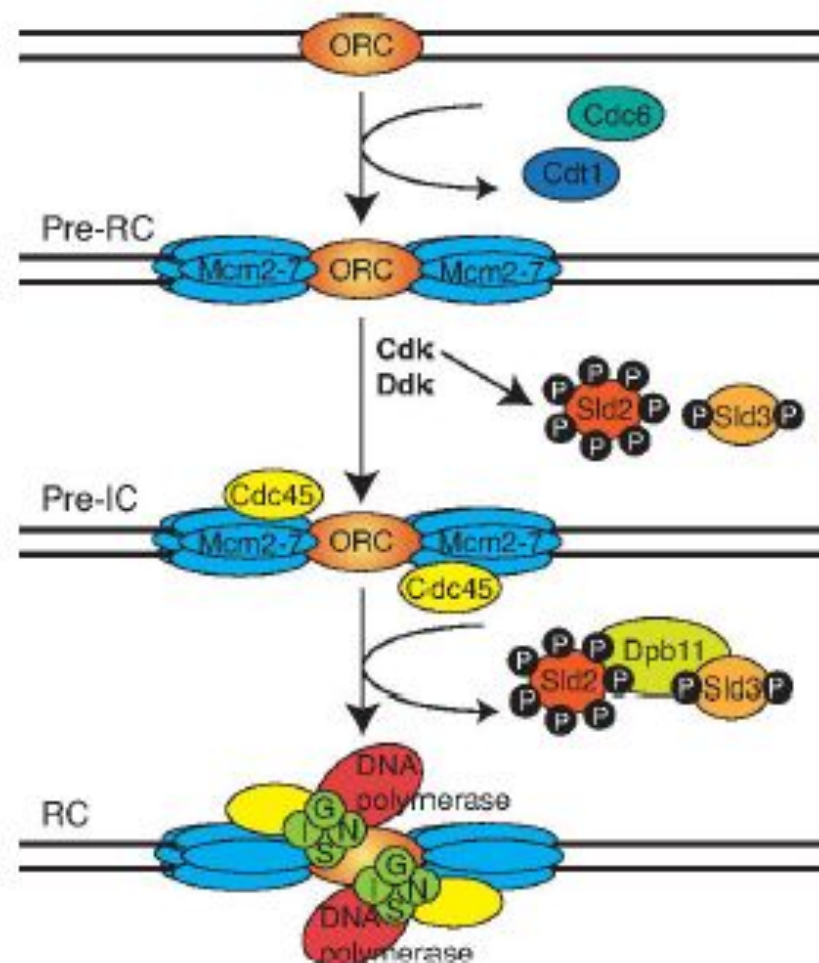
Инициация репликации у прокариот

- Инициация репликации у *E. coli* происходит в регионе *oriC*
- Основной белок-инициатор - DnaA
- После распознавания ориджина происходит локальное плавление ДНК и привлечение ДНК-геликаз



Инициация репликации у эукариот

- В отличие от прокариот, у эукариот нет консенсусной последовательности ориджина
- Собранный пререпликационный комплекс (preRC) остается неактивным до наступления нужной фазы клеточного цикла



?

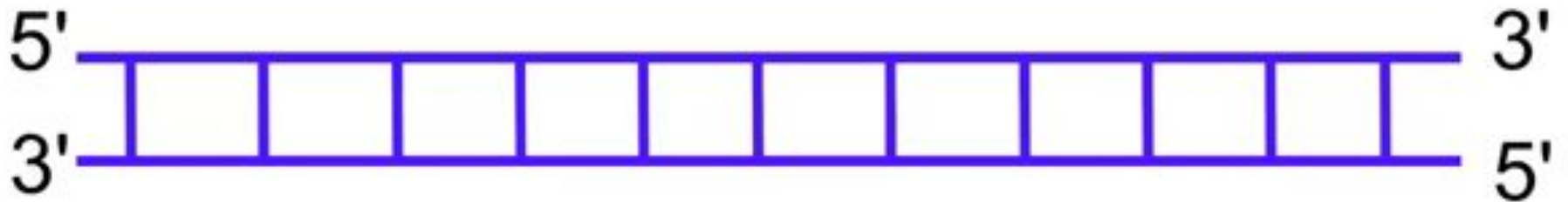
Как соотносится число ориджинов репликации в хромосомах бактерий и эукариот?

1. У эукариот на одну хромосому приходится много ориджинов репликации, а у бактерий — один
2. У бактерий на одну хромосому приходится несколько ориджинов репликации, а у эукариот — один
3. И у эукариот, и у прокариот на одну хромосому приходится много ориджинов репликации
4. У эукариот, в отличие от прокариот, нет ориджина репликации

?

Выберите все верные утверждения, касающиеся инициации репликации у про- и эукариот:

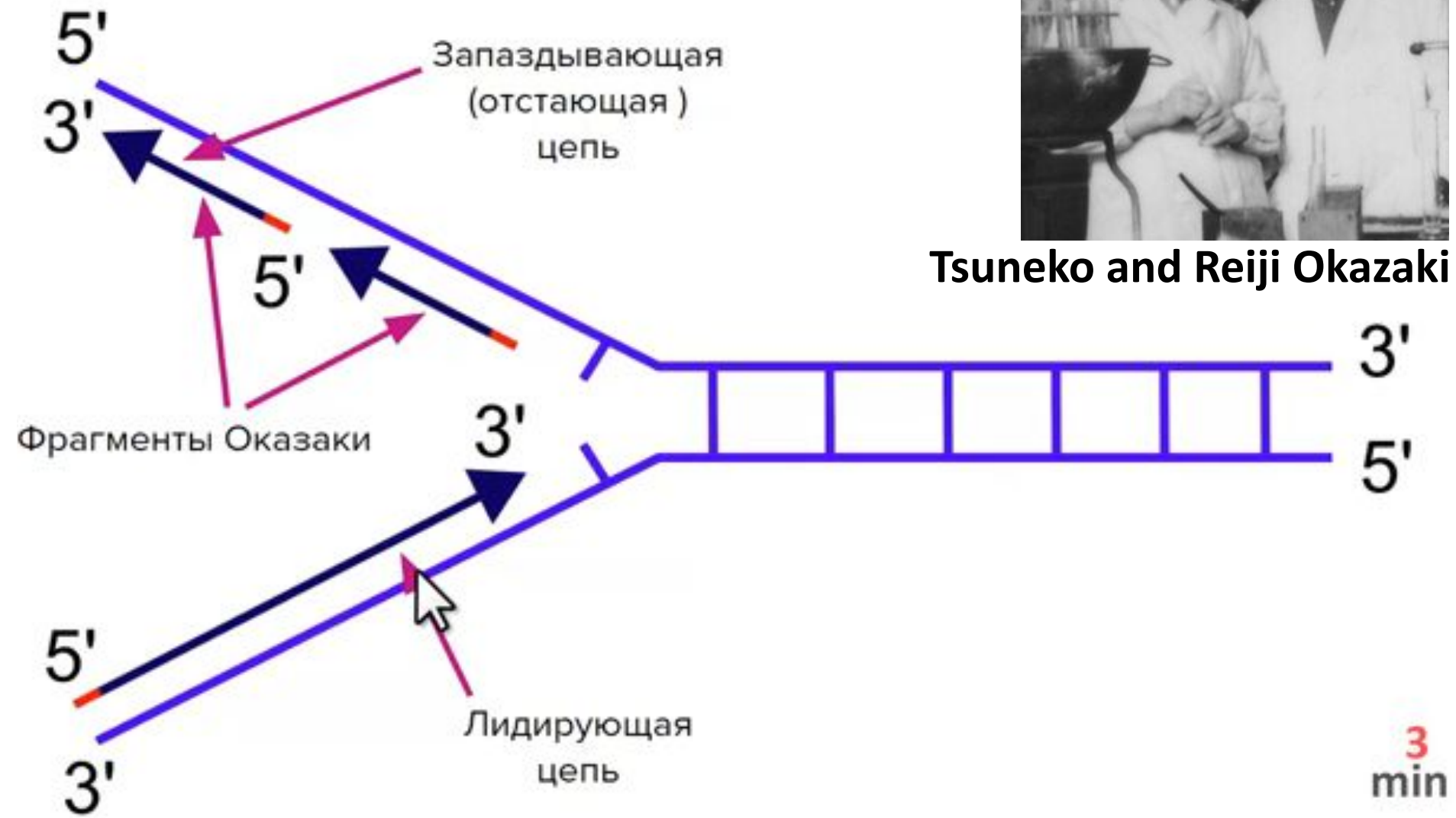
1. У эукариот инициация репликации происходит за счет активации ДНК-геликазы под воздействием специфических сигналов
2. Для нормальной инициации репликации совершенно не важна последовательность нуклеотидов в ориджине репликации
3. У бактерий для инициации репликации не нужны белковые факторы
4. Вилка репликации перемещается по хромосоме за счет активности ДНК-геликазы

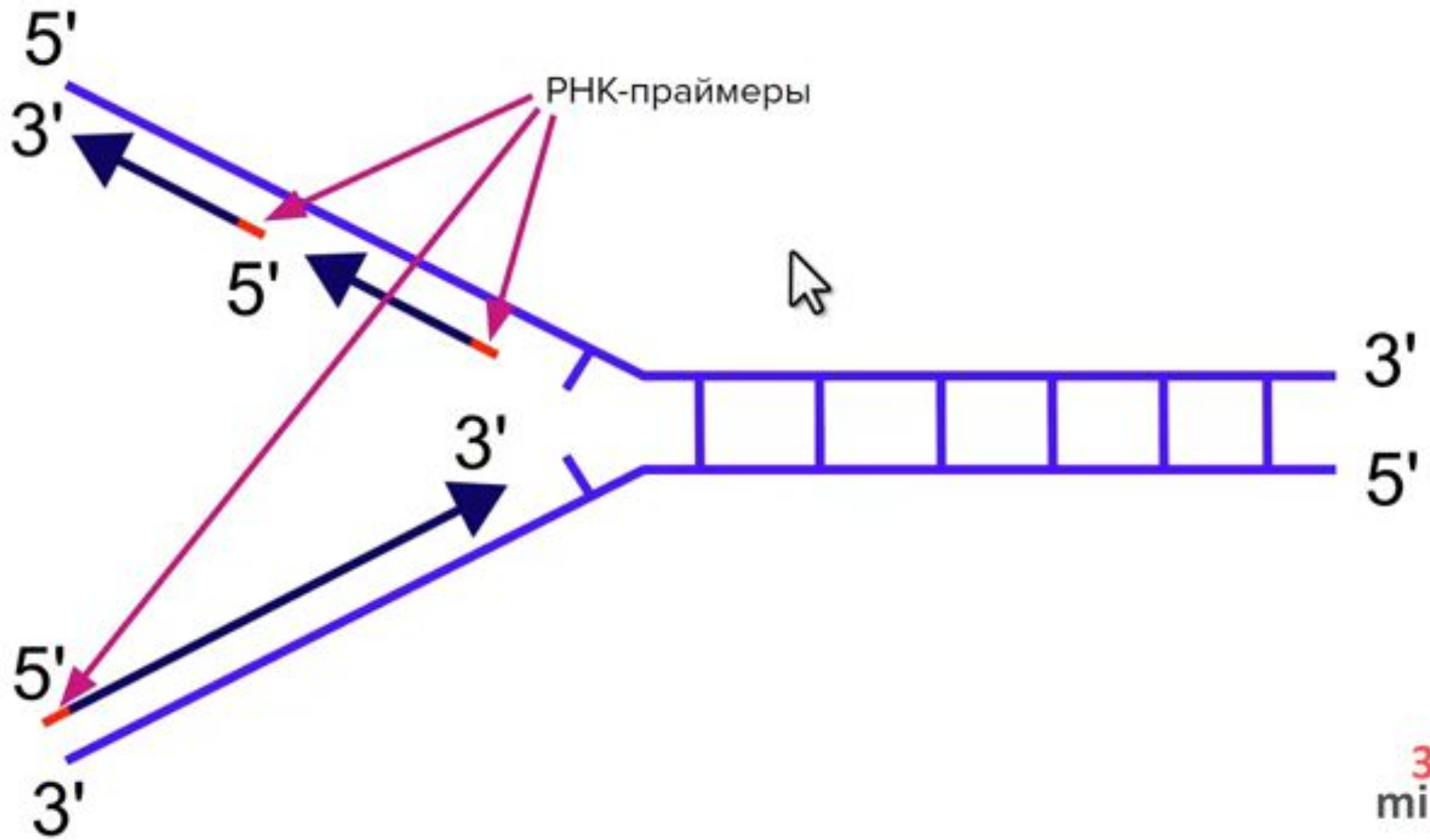


Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K, Sugimoto K. Mechanism of DNA replication possible discontinuity of DNA chain growth // Jpn J Med Sci Biol. 1967 Jun;20(3):255-260.

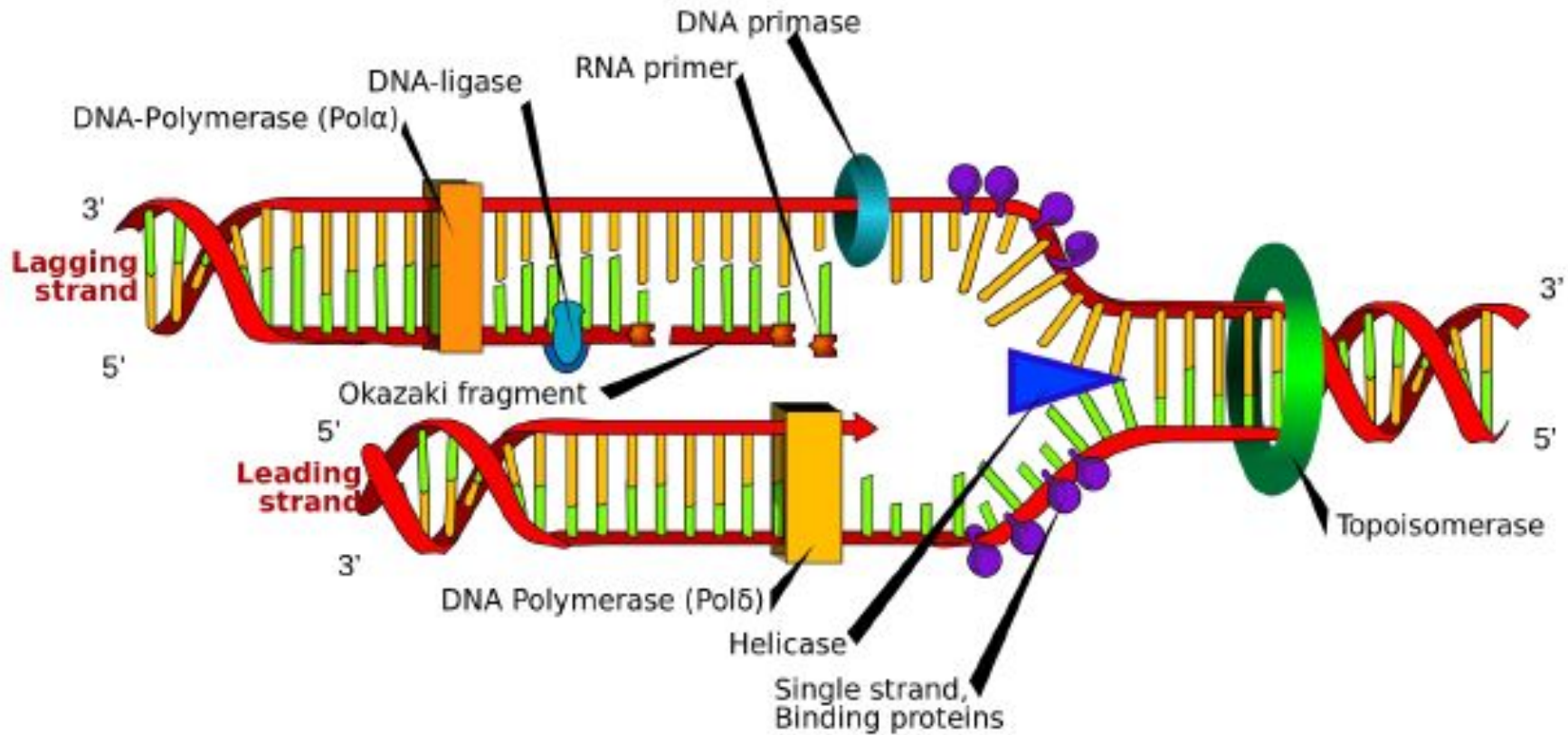


Tsuneko and Reiji Okazaki





Элонгация репликации



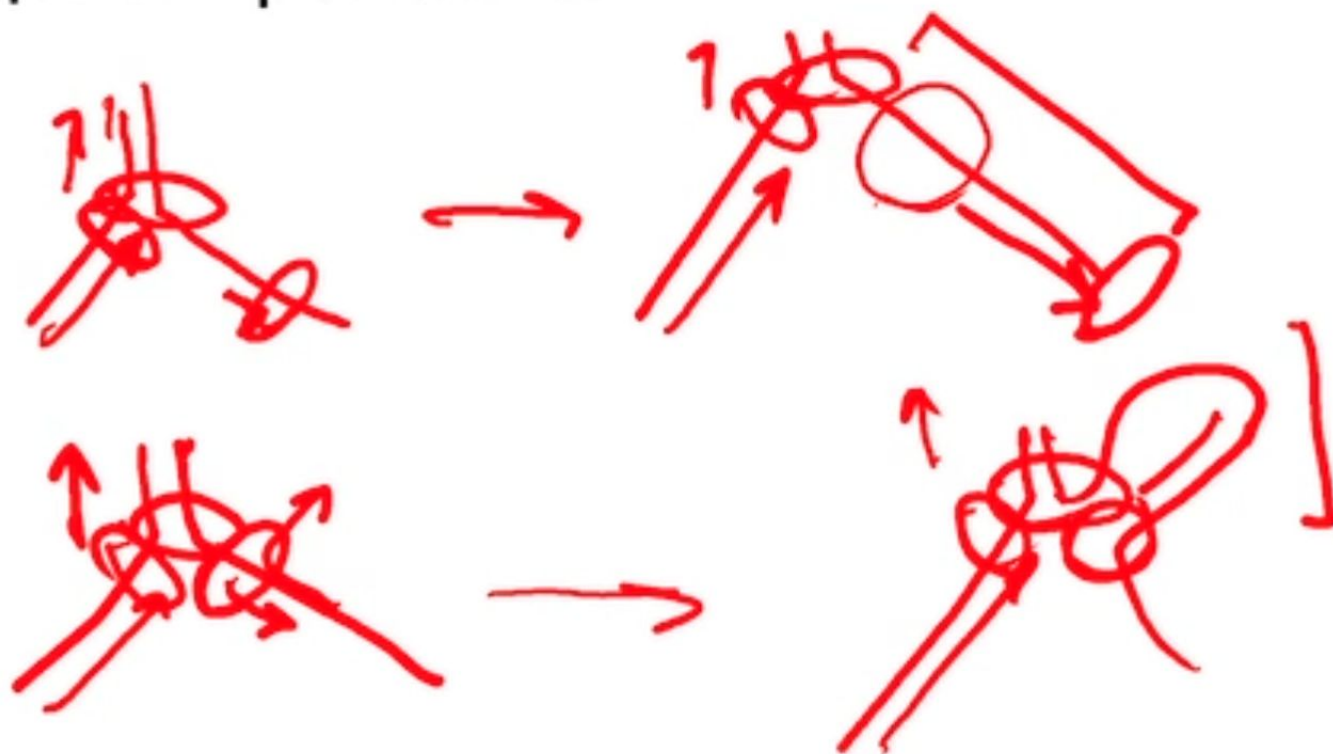
**Репликация идет однонаправленно, от 5'-конца к 3'-концу
НОВОЙ ЦЕПИ**

?

Почему репликация на одной цепи ДНК идет непрерывно, а на другой — прерывисто?

1. ДНК-полимераза способна синтезировать новую цепь только от ее 3'-конца к 5'-концу
2. Две матричные цепи ДНК содержат разное количество нуклеотидов
3. Одна из цепей формирует вторичные структуры, мешающие прохождению полимеразного комплекса
4. ДНК-полимераза способна синтезировать новую цепь только от ее 5'-конца к 3'-концу

Модель "тромбона"



Модель "тромбона"



- Полимеразные комплексы на лидирующей и отстающей цепях сближены в пространстве
- Расплетенный, но еще не реплицировавшийся фрагмент отстающей цепи выпетливается

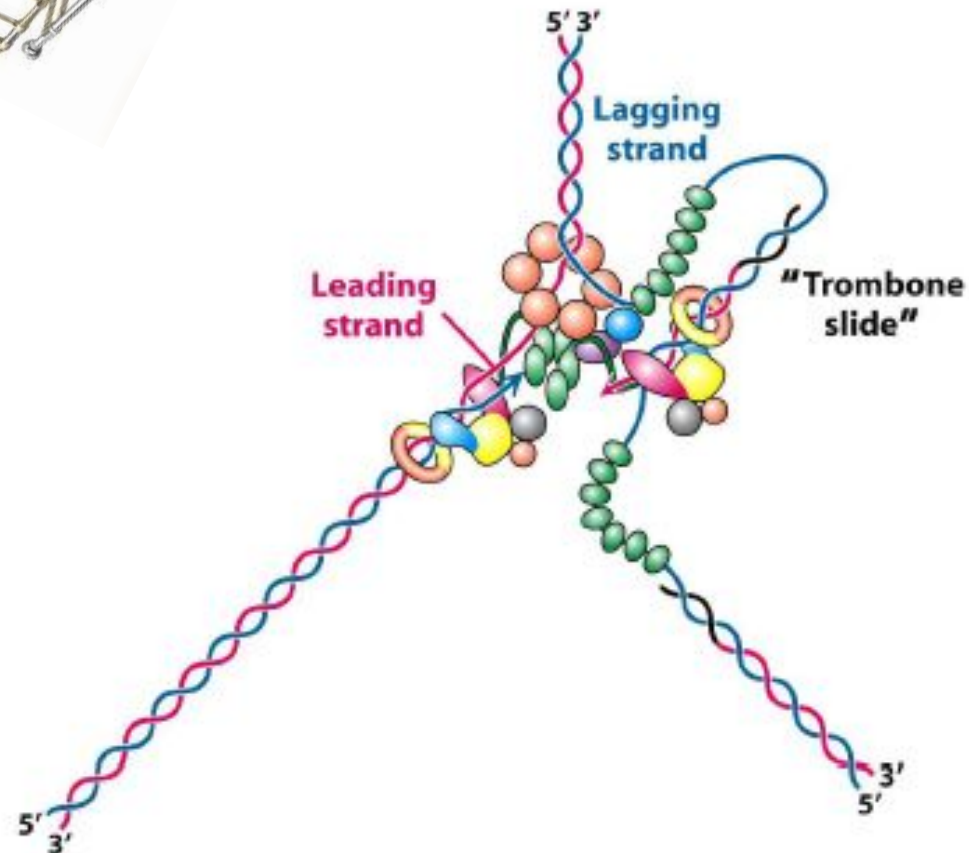


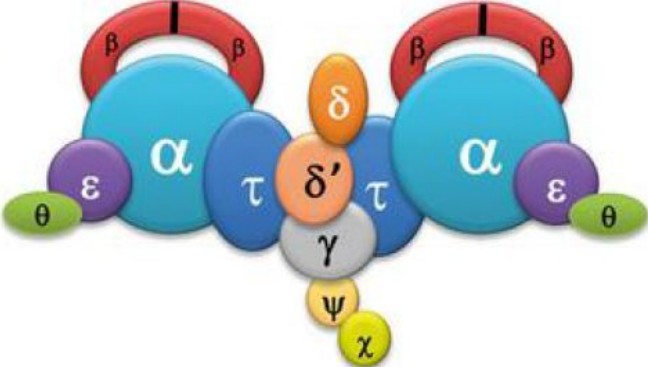




Figure 28.23
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

ДНК-полимеразы бактерий

	Pol I	Pol II	Pol III	Pol IV	Pol V
DNA polymerase family	A	B	C	Y	Y
Activity	5'-3' polymerase 3'-5' exonuclease 5'-3' exonuclease	5'-3' polymerase 3'-5' exonuclease	5'-3' polymerase 3'-5' exonuclease	5'-3' polymerase	5'-3' polymerase
					
Number of molecules/cell					
- SOS	400	50 - 75	10 - 20	150 - 250	< 15
+ SOS	400	350 - 1000	10 - 20	1200 - 2500	200
Biological functions in the cell	DNA replication, Okazaki fragment maturation, DNA repair	DNA replication (backup DNA polymerase), DNA repair, TLS	DNA replication DNA repair	TLS	TLS

Семейства ДНК-полимераз

Polymerase family	Bacteria (<i>E. coli</i>)	Eukaryotes (human)	Archaea	Viruses	3' to 5' exonuclease activity	**Error rate (fidelity)	Enzymes used in assays
A	Pol I [<i>pol A</i>]	Pol γ (p140/p55/p55) Pol θ (p100/p90/p80) Pol ν	N.A.	T3, T5, T7	Yes	$\sim 10^{-5}$ – 10^{-7}	Klenow, KlenTaq, Taq, Bst, Bsu, T7
B	Pol II [<i>pol B</i>]	Pol α /primase (p180/p68/Pri2/Pri1) Pol δ (p125/p66/p50/p12) Pol ϵ (p260/p59/p17/p12) Pol ζ (p350/p24)	Pol BI Pol BII Pol BIII	HSV-1, RB69, T4, ϕ 29	Yes	$\sim 10^{-6}$	T4, ϕ 29, 9°N, KOD1, Pfu, Vent
C	Pol III [<i>pol C</i>] core ($\alpha/\epsilon/\theta$)	N.A.	N.A.	N.A.	Yes	$\sim 10^{-6}$	N.A.
D	*N.A.	N.A.	Pol D (DP2/DP1)	N.A.	Yes	10^{-4} – 10^{-5}	N.A.

In the bacterial column, the gene for each corresponding protein is indicated in the bracket. In the eukaryotic and archaeal column, the components of each holoenzyme are listed in the parentheses. *N.A. denotes "not applicable." **The unit for "Error Rate" is one error per incorporated base.

?

Отметьте верные утверждения, касающиеся ДНК-полимераз бактерий.

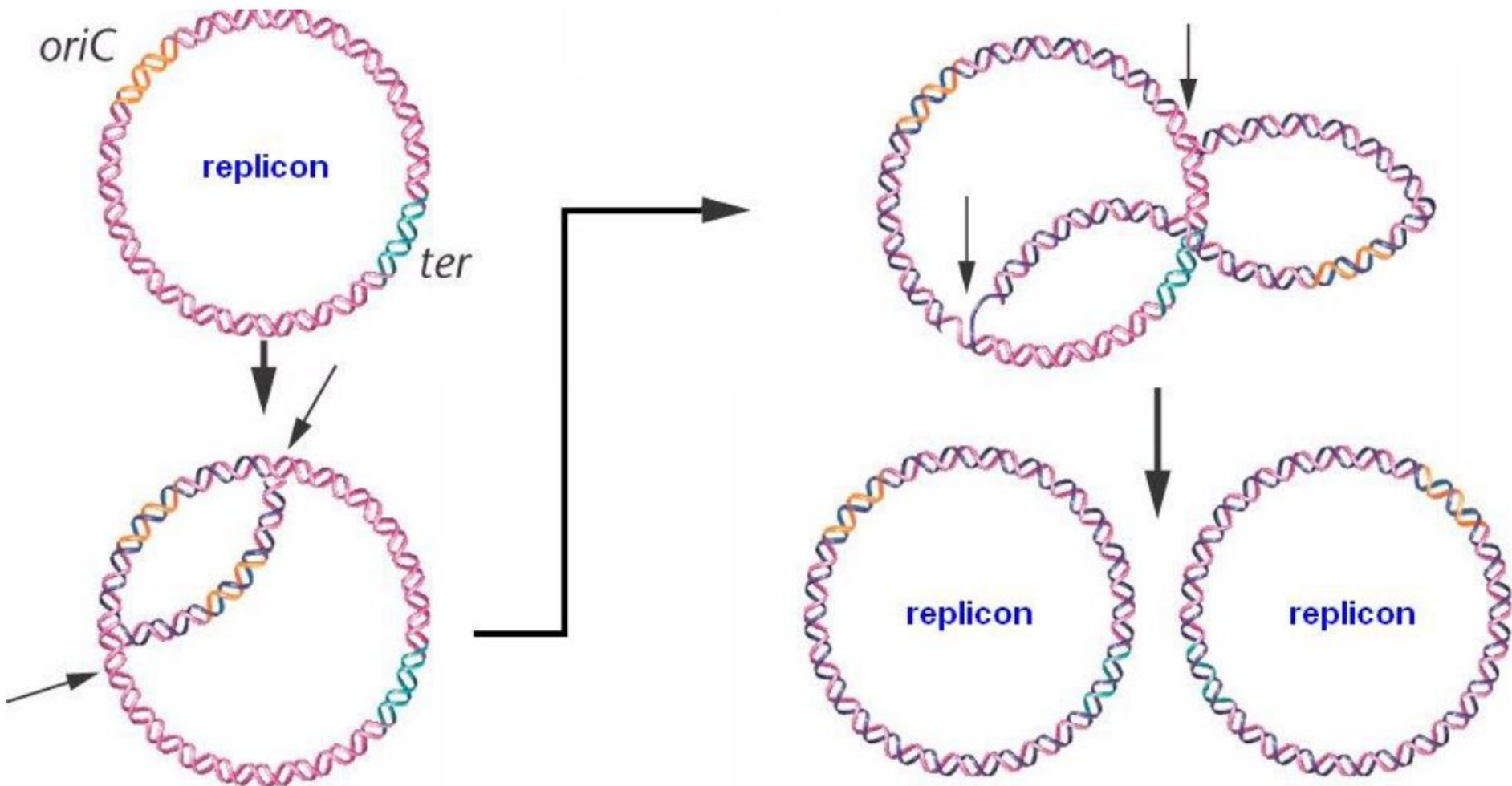
1. Процессивность ДНК полимеразы III зависит от бета-субъединицы
2. Все ДНК-полимеразы являются мультисубъединичными комплексами
3. Альфа субъединица ДНК полимеразы III выполняет основную каталитическую функцию

?

Соотнесите разные бактериальные ДНК-полимеразы с их функциями в клетке

PolII/PolIII	Синтез ДНК в ходе репликации
PolIII	Синтез в обход повреждений, на поврежденной ДНК
PolIV/PolV	Синтез ДНК при исправлении небольших повреждений

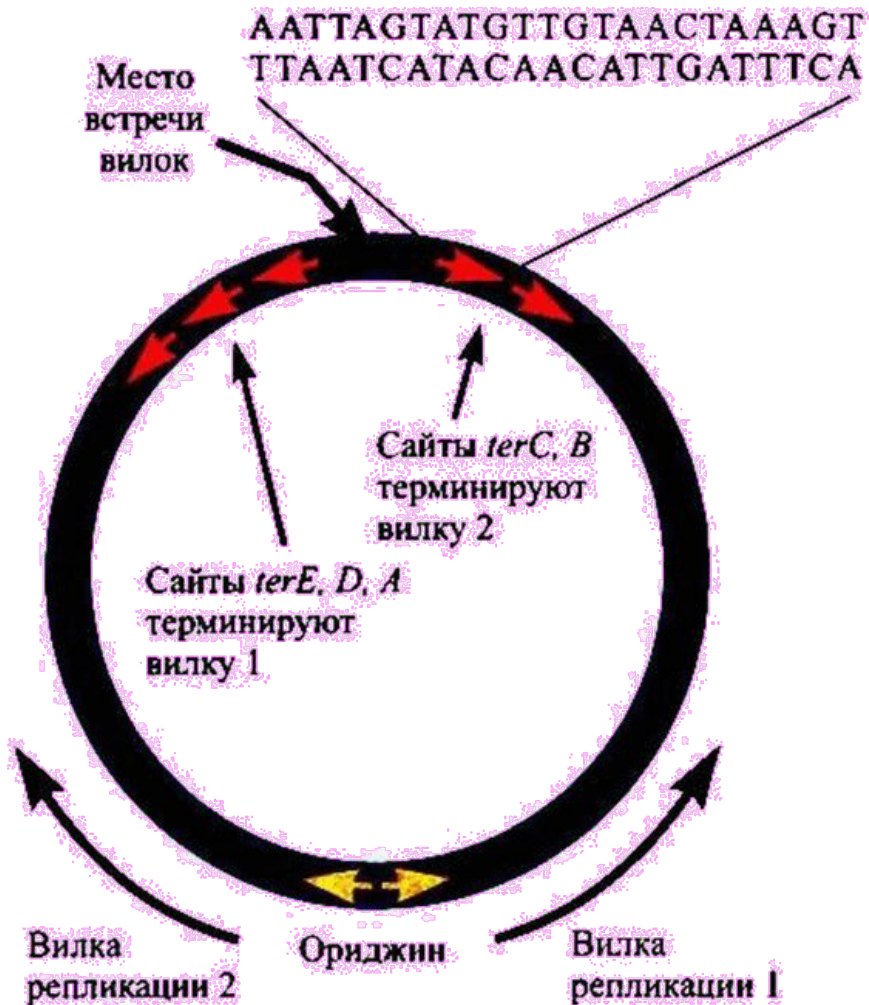
Репликация ДНК у *E.coli*



Различия репликации у прокариот и эукариот

№	Признак	Прокариоты	Эукариоты
1	Скорость синтеза	500 н.п./сек	50 н.п./сек
2	Длина фрагментов Оказаки	1000 - 2000 нуклеотидов	100 – 200 нуклеотид
3	Форма ДНК	Кольцевая молекула	Линейная молекула
4	Количество репликативных вилок	2	Множество

Терминация репликации у прокариот



E.coli

- У прокариот есть участок *TerC*, на котором заканчивается репликация ДНК.
- На кольцевой хромосоме несколько *Ter*-участков (A-G). Полная остановка репликации проходит на центральном *TerC*-сайте.
- *Ter*-сайты содержат в составе консенсусные последовательности, с которыми связывается белок *tus*.
- Только прочный комплекс белка *tus* с последовательностью *C6* в составе *TerC* полностью останавливает репликативный комплекс.

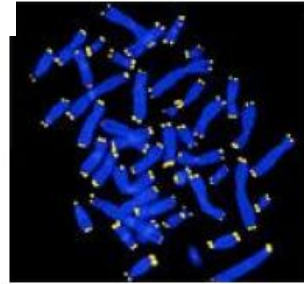
Терминация репликации у эукариот

- У эукариот нет специфического сайта для терминации. Терминация происходит, когда сливаются репликационные пузырьки (вилки репликации встречаются).
- В терминации репликации принимает участие фермент РНКазы H (у человека) или экзонуклеаза (у дрожжей), которая удаляет РНК праймер, а ДНК-лигаза сшивает получившуюся брешь.
- В отличие от лидирующей цепи, которая реплицируется полностью, праймер, находящийся у 3'-конца отстающей цепи, разрушается и не реплицируется при помощи ДНК-полимераз.
- Для предотвращения укорачивания цепи на концах хромосомы находятся *теломеры* — участки нереплицируемой ДНК. На этом участке ДНК может

Репликация

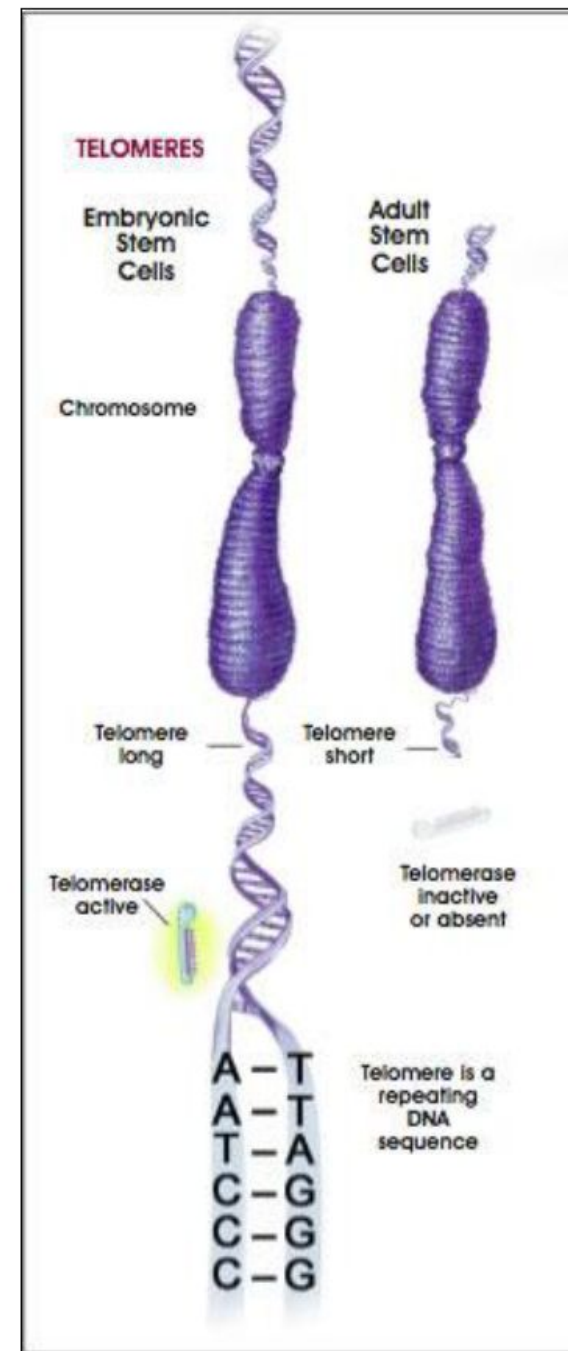
теломер

Теломеры (от др.-греч. τέλος — конец и μέρος — часть) — концевые участки хромосом

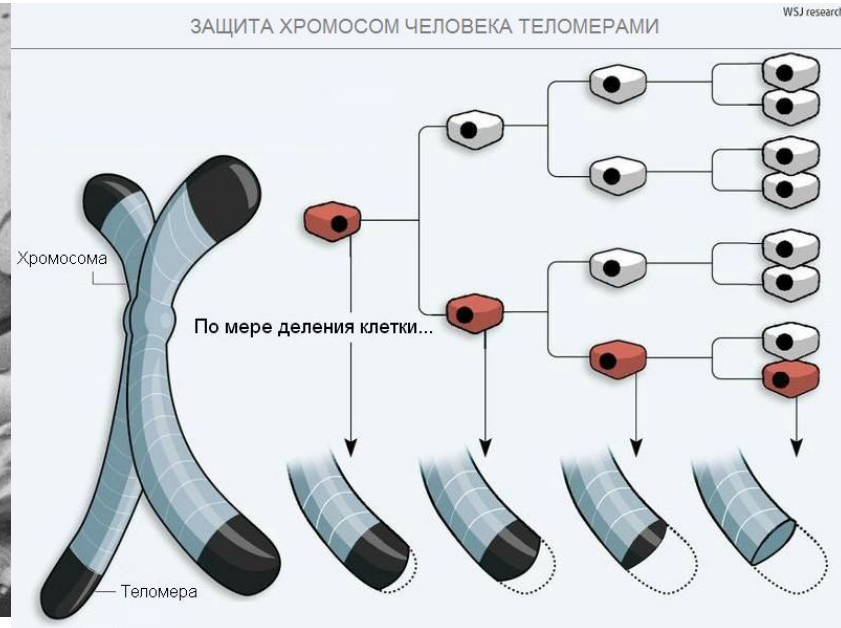
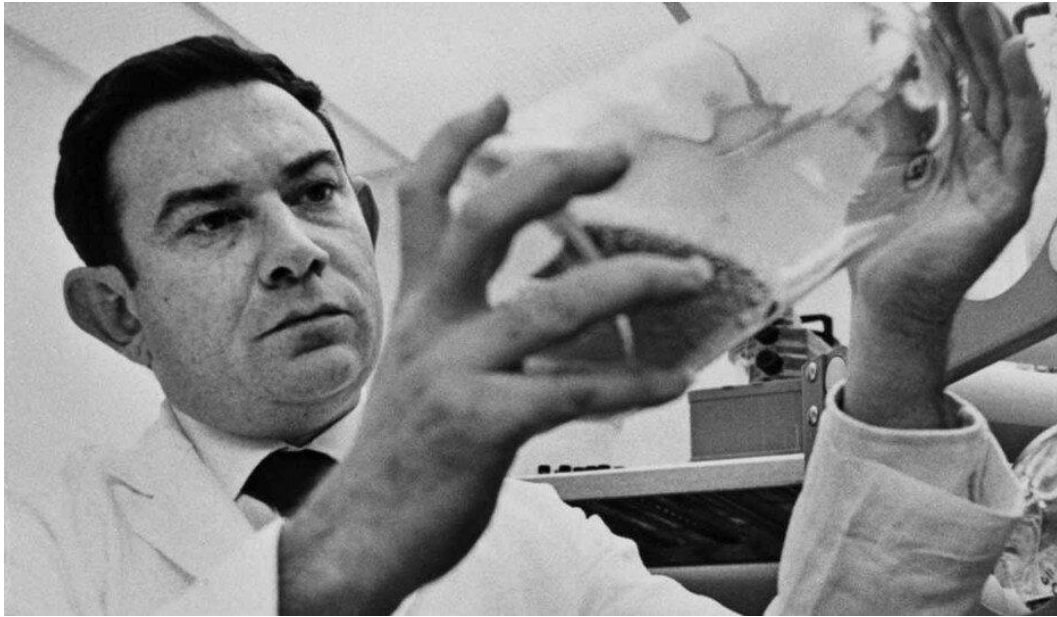


Оловников А.

Нобелевская премия по физиологии и медицине 2009 года американских учёных Элизабет Блэкбёрн (Elizabeth H. Blackburn), Кэрл Грейдер (Carol W. Greider) и Джек Шостак (Jack W. Szostak) «за открытие того, как теломеры и фермент теломераза защищают хромосомы»



Леонард Хейфлик



В 1960-е годы открыл ограничение числа делений у клеток человека в клеточной культуре: клетки умирают приблизительно после 50 делений, и имеют признаки старения при достижении данной границы
(предел Хейфлика)

Резюме

- Репликация ДНК начинается в особом участке, называемом *ориджином репликации*. В случае прокариотической клетки имеется лишь один ориджин, тогда как эукариотическая клетка располагает несколькими ориджинами более сложной структуры.
- OriC – АТ-богатый регион, являющийся ориджином репликации у прокариот. АТ-пары облегчают плавление водородных связей в этом месте. Белок DnaA инициирует начало репликации, а также привлекает ДНК-геликазы (DnaB), расплетающие цепи ДНК.

Резюме

- В эукариотических клетках инициация репликации начинается со сборки пререпликационного комплекса посредством присоединения к ориджину (без явной консенсусной последовательности) белков ORC вместе с геликазой Mcm2-7. Важно отметить, что переход к репликации, в отличие от прокариот, запускается особыми белками (Cdk, Ddk).
- Синтез новой цепи ДНК в ходе элонгации производится ферментом *ДНК-полимеразой*, которая может работать только в направлении 5' → 3', что приводит к неравной скорости синтеза ДНК на двух цепочках. На *лидирующей цепи* ДНК синтезируется непрерывно, а на противоположной (*отстающей*) прерывисто (*фрагментами Оказаки*).

Резюме

- Процесс элонгации вовлекает множество других белков и ферментов. ДНК-полимеразе необходима затравка (*праймер*) для начала репликации, наличие этой затравки обеспечивается *праймазой*, которая синтезирует короткий РНК-праймер, который в дальнейшем будет удален при репликации. Топоизомеразы снимают напряжение, возникающее при сверхспирализации, *ДНК-лигаза* сшивает фрагменты Оказаки в единую молекулу, *SSB(Rpa)*-белки стабилизируют одноцепочечные фрагменты ДНК.
- Для координации репликационного комплекса необходимо близкое расположение ферментов синтеза ДНК на обоих цепях, что достигается путем

Резюме

- Основной репликативной полимеразой у бактерий является ДНК-полимераза III — мультисубъединичный комплекс, ДНК-полимераза I задействована в синтезе фрагментов Оказаки, а также в репарации ДНК вместе с полимеразой II. IV и V полимеразы обеспечивают синтез ДНК при стрессовых воздействиях.
- ДНК-полимеразы различаются по процессивности и уровню ошибок. Все ДНК-полимеразы можно отнести к нескольким семействам. Главная репликативная полимеразы бактерий (III) относится к семейству C, а репликативные полимеразы эукариот к семейству B. При этом для обоих этих полимераз нормальная частота ошибок составляет около 10^{-6} .

Спасибо за внимание!

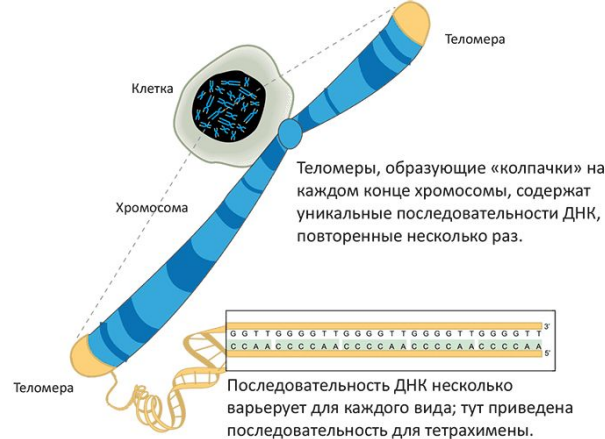
Теломера

функции и синтез

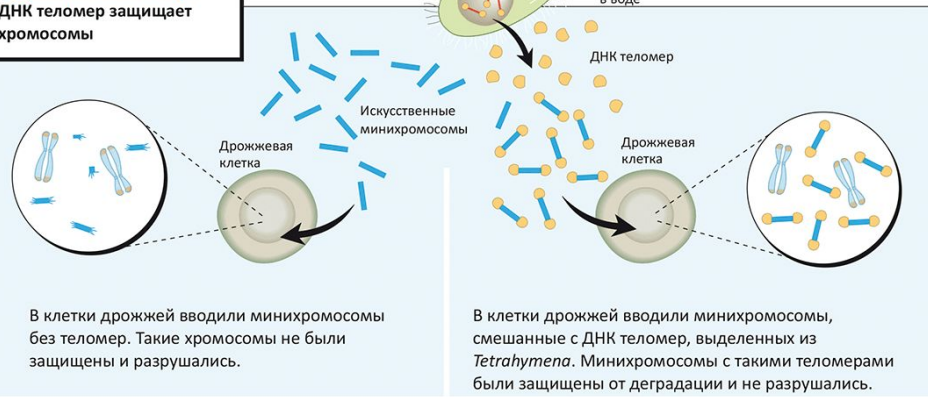
1. Таинственная теломера

Теломеры защищают хромосомы от повреждений. Но как?

«Теломера» с греческого:
«конец» (*telos*) + «часть» (*meros*)

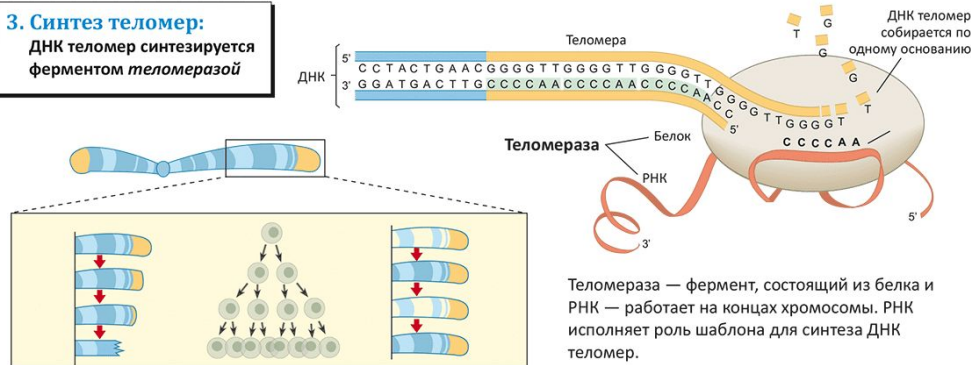


2. Функции теломер: ДНК теломер защищает хромосомы



3. Синтез теломер: ДНК теломер синтезируется ферментом теломеразой

ДНК теломер синтезируется ферментом *теломеразой*



Без теломеразы, хромосома укорачивается при каждом делении, пока теломера не разрушится и не начнёт деградировать хромосома.

Теломераза поддерживает длину теломер постоянной, что позволяет копировать хромосому целиком, — включая концы.