

Лекции № 1 (4-6)

Тема: Реализация наследственной информации (репликация, транскрипция, трансляция)

План лекции:

1. Центральная догма молекулярной биологии (основной постулат Крика). Типы переноса генетической информации в живых системах: общий, специализированный, запрещенный.
2. Репликация. Основные принципы и типы репликации ДНК. Понятие о репликоне.
3. Транскрипция. Механизмы транскрипции у про- и эукариот. Процессинг и сплайсинг. Альтернативный сплайсинг.
4. Проблема концевой недорепликации и ее решение.
5. Генетический код, понятие, свойства.
6. Трансляция. Механизмы трансляции (биосинтеза белка).
7. Посттрансляционная модификация белков.

Summary: replication, transcription, translation

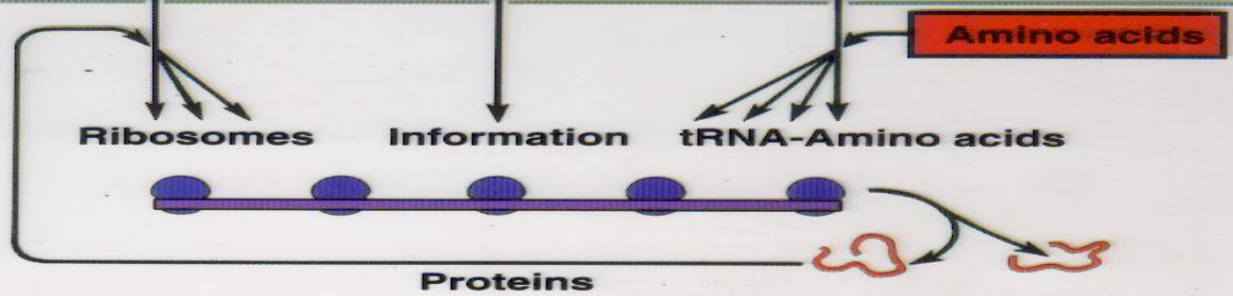
Replication



Transcription

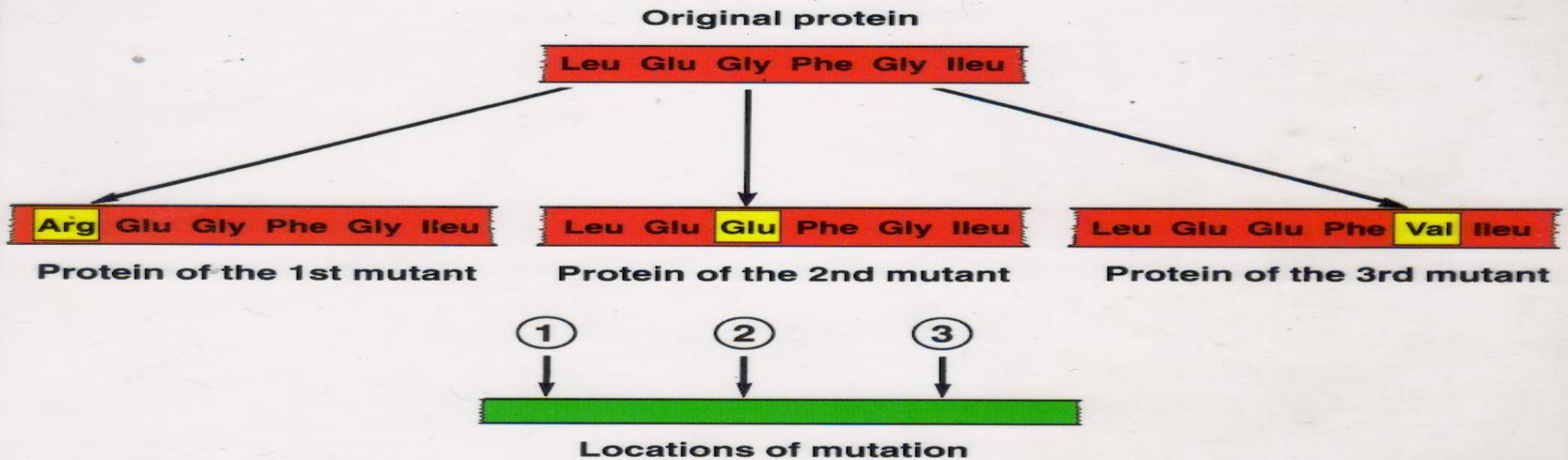


Translation



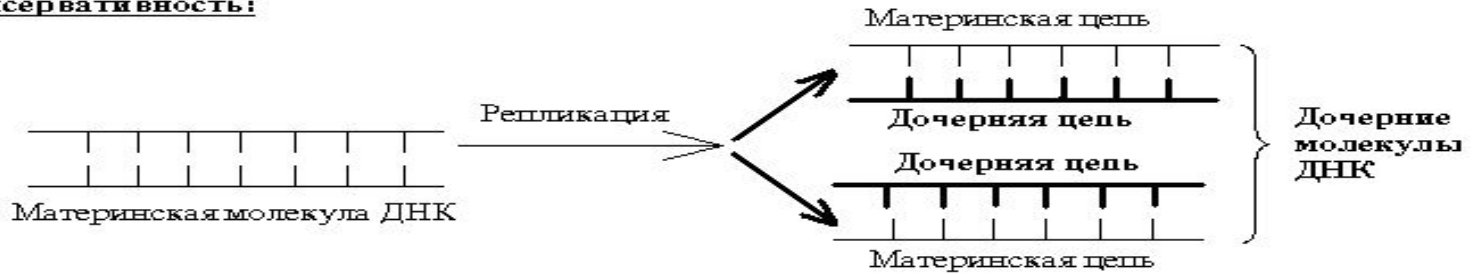
a

Colinearity between nucleotide- and amino-acid sequence

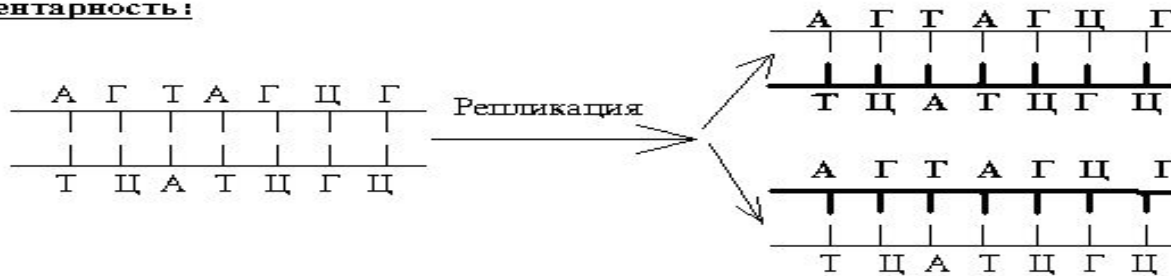


Принципы репликации ДНК

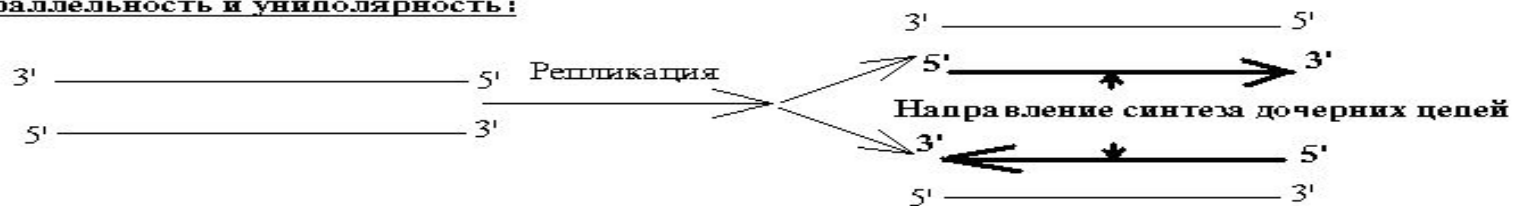
А. Полуконсервативность:



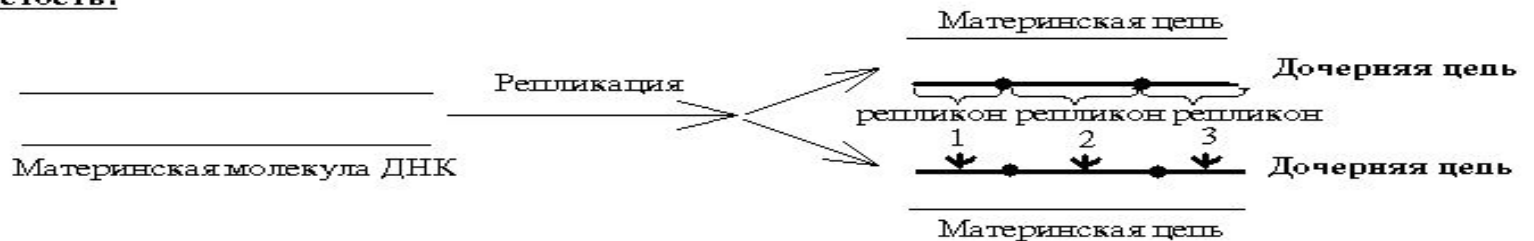
Б. Комплементарность:

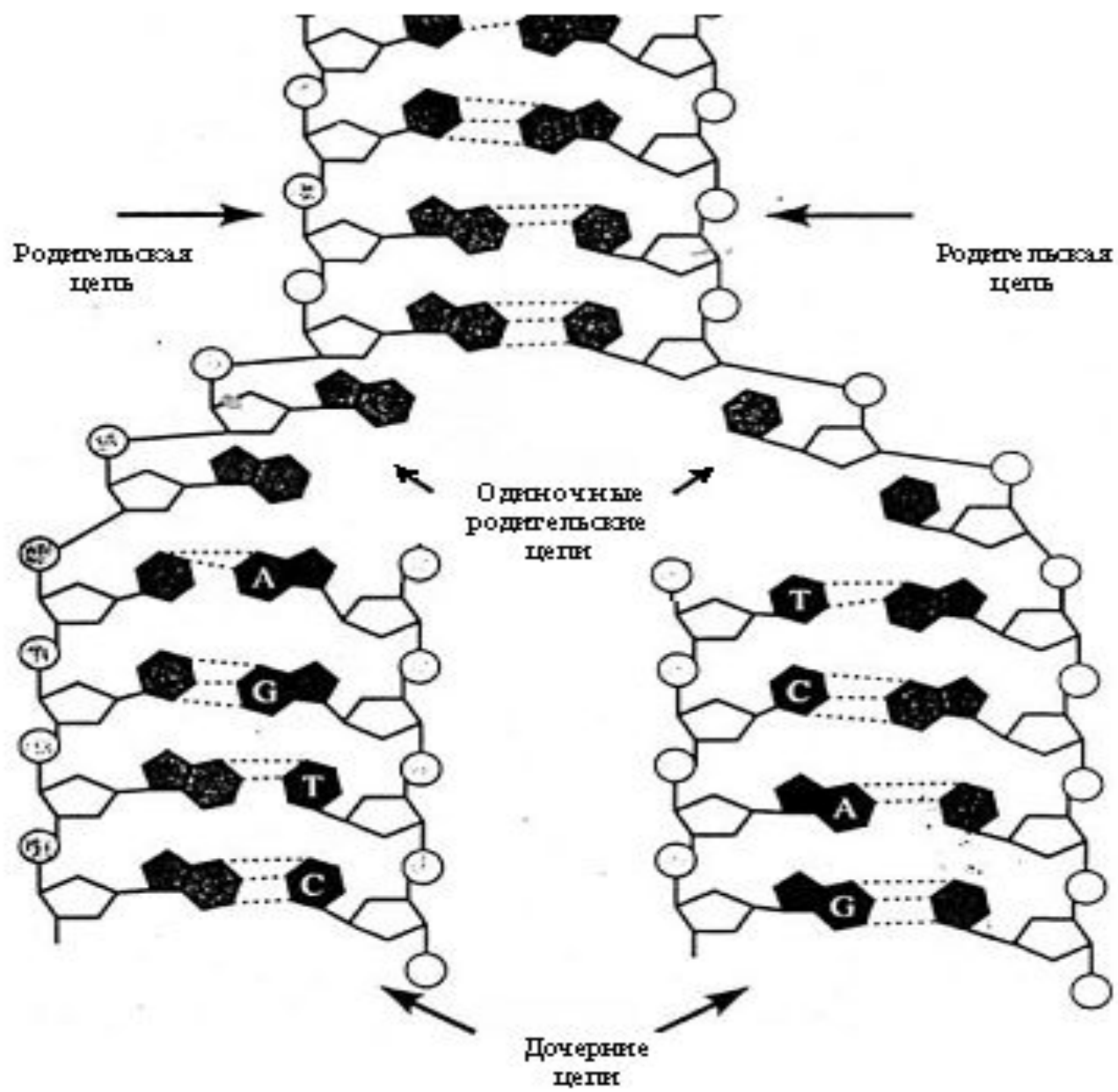


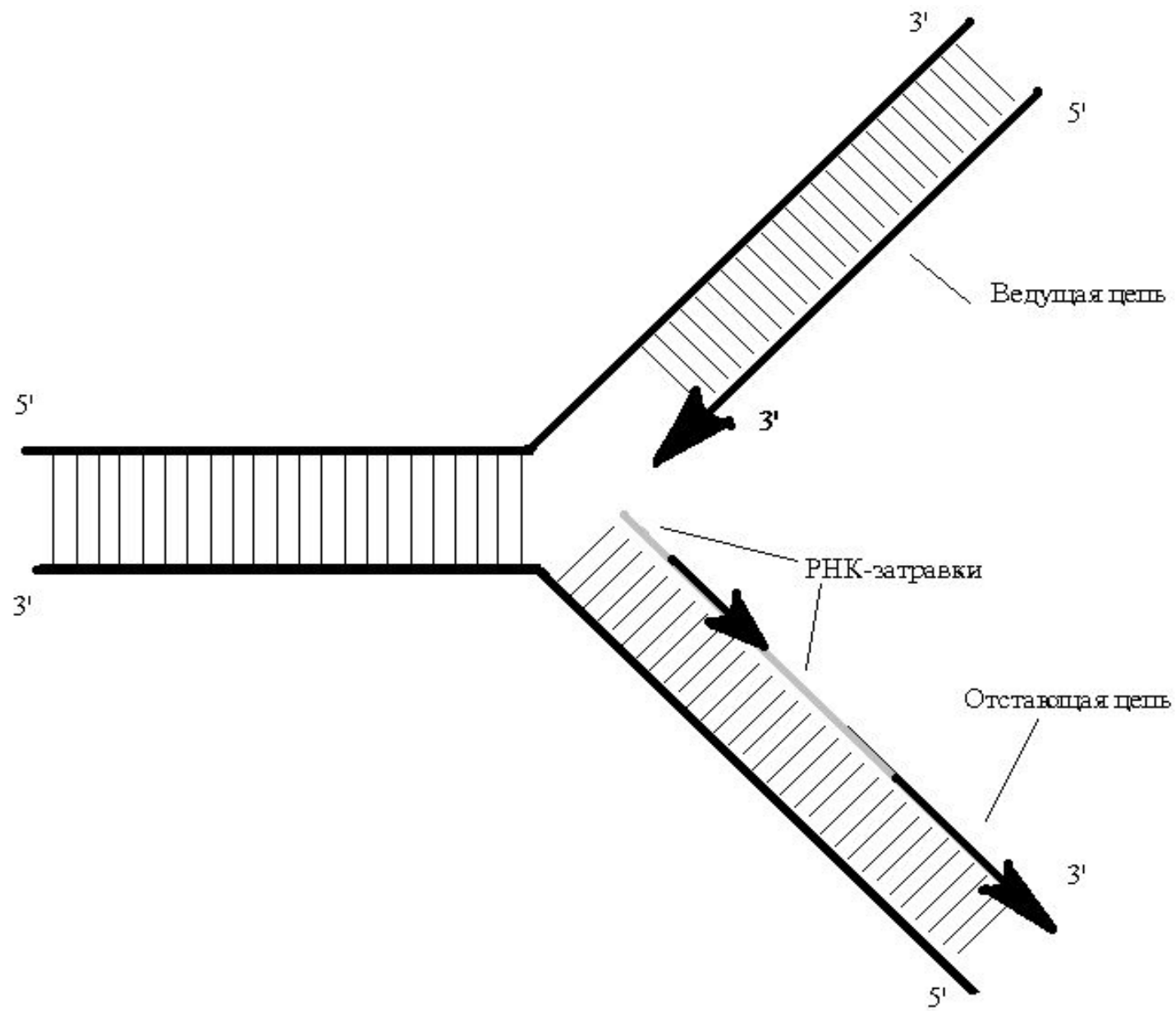
В. Антипараллельность и униполярность:

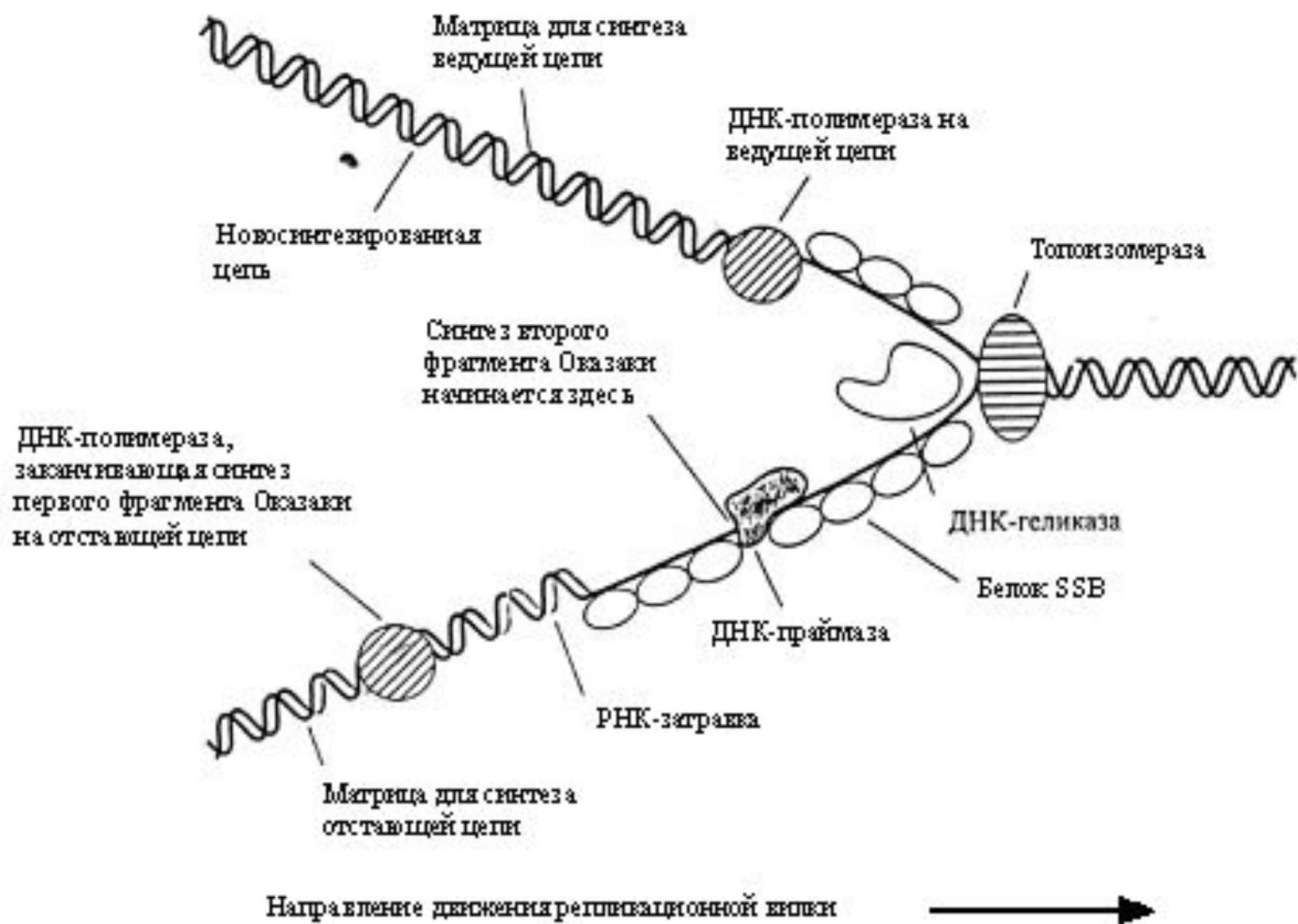


Г. Прерывистость:

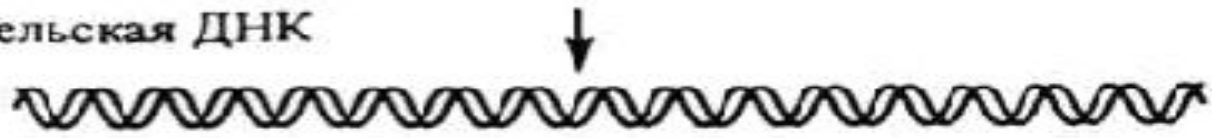




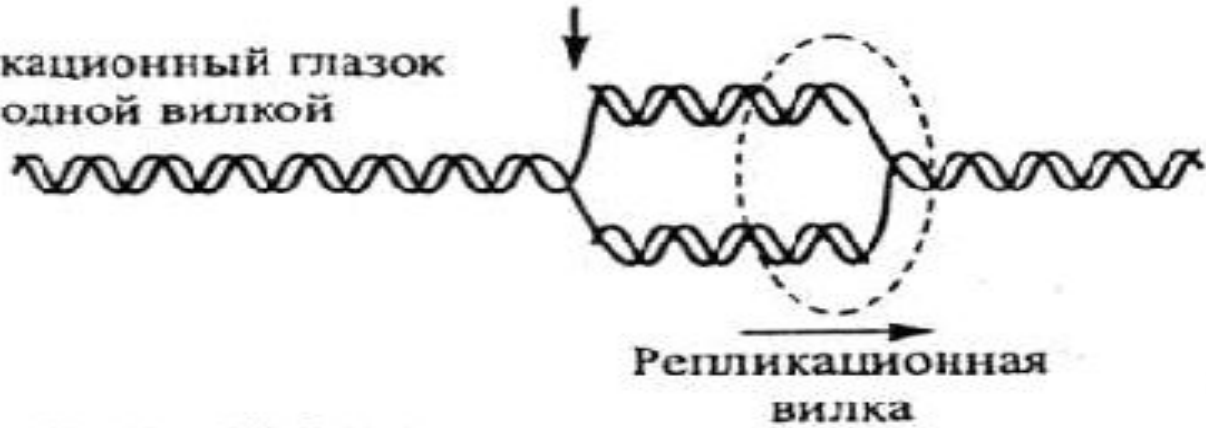




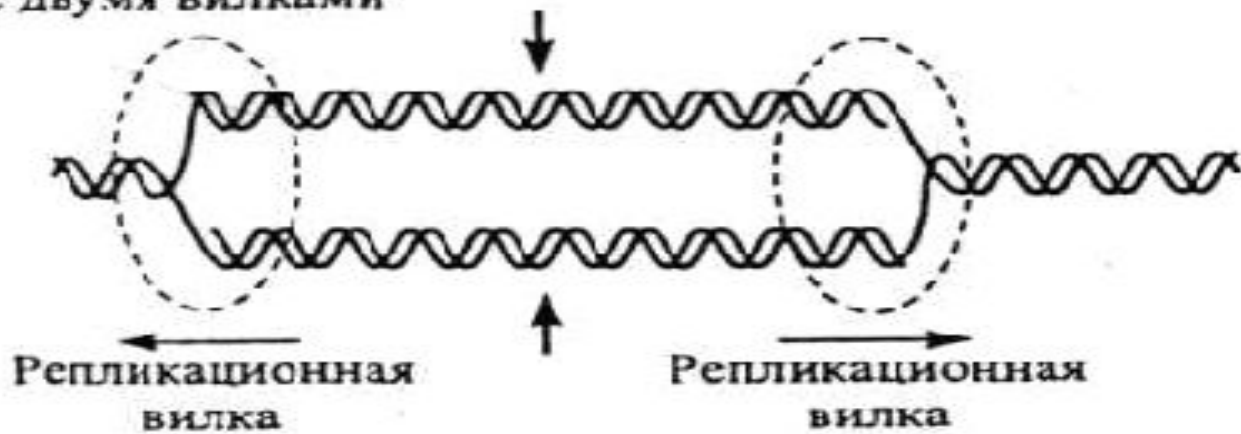
Родительская ДНК



Репликационный глазок
с одной вилкой

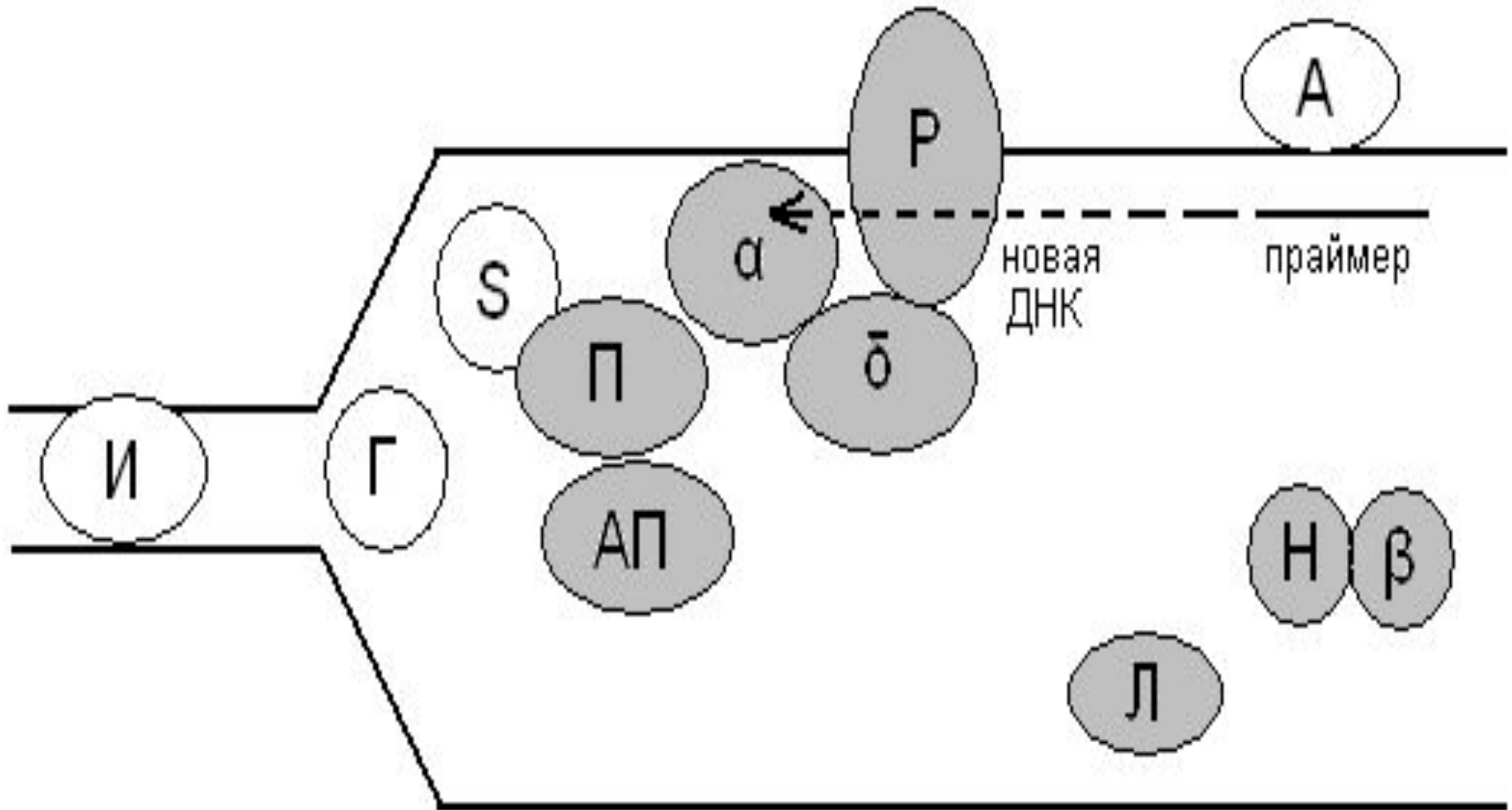


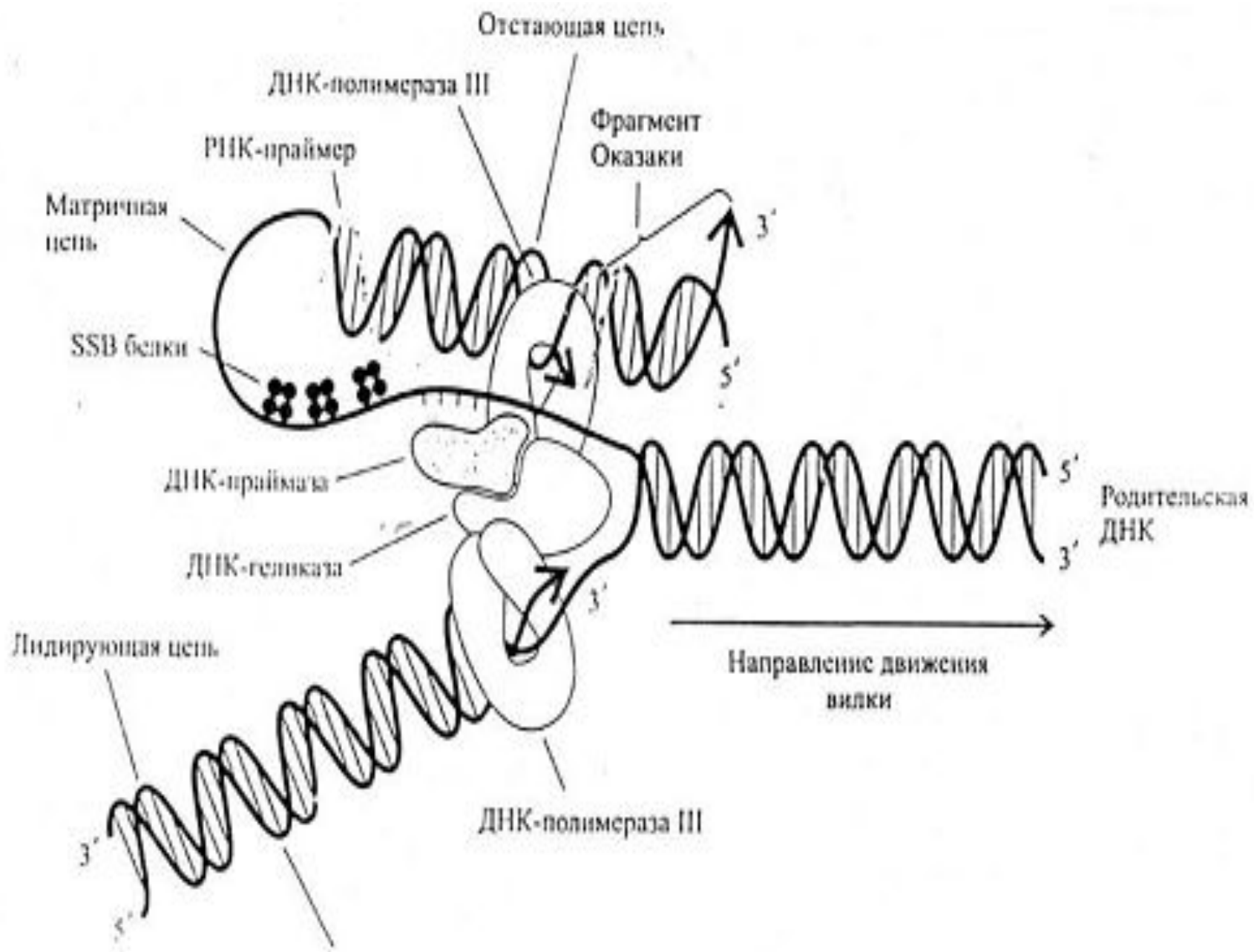
Репликационный глазок
с двумя вилками



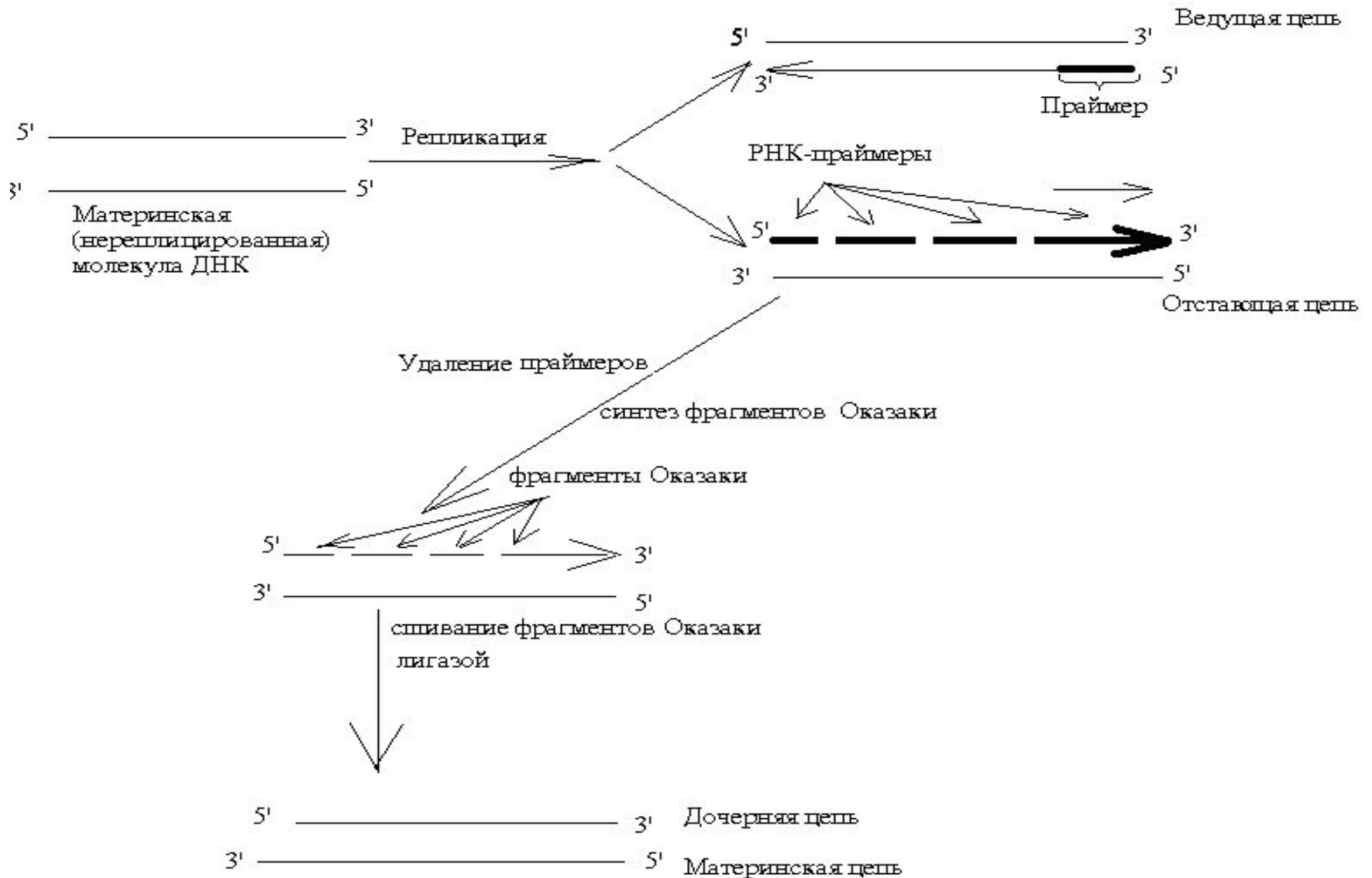
Компоненты ДНК – реплицирующего комплекса

А – узнающий белок, Г – геликаза, И – топоизомераза, S – SSB-белок, П – праймаза, АП – активатор праймазы, α - β - и δ – ДНК-полимеразы, Р – PCNA-белок, Н – нуклеаза, Л – ДНК-лигаза

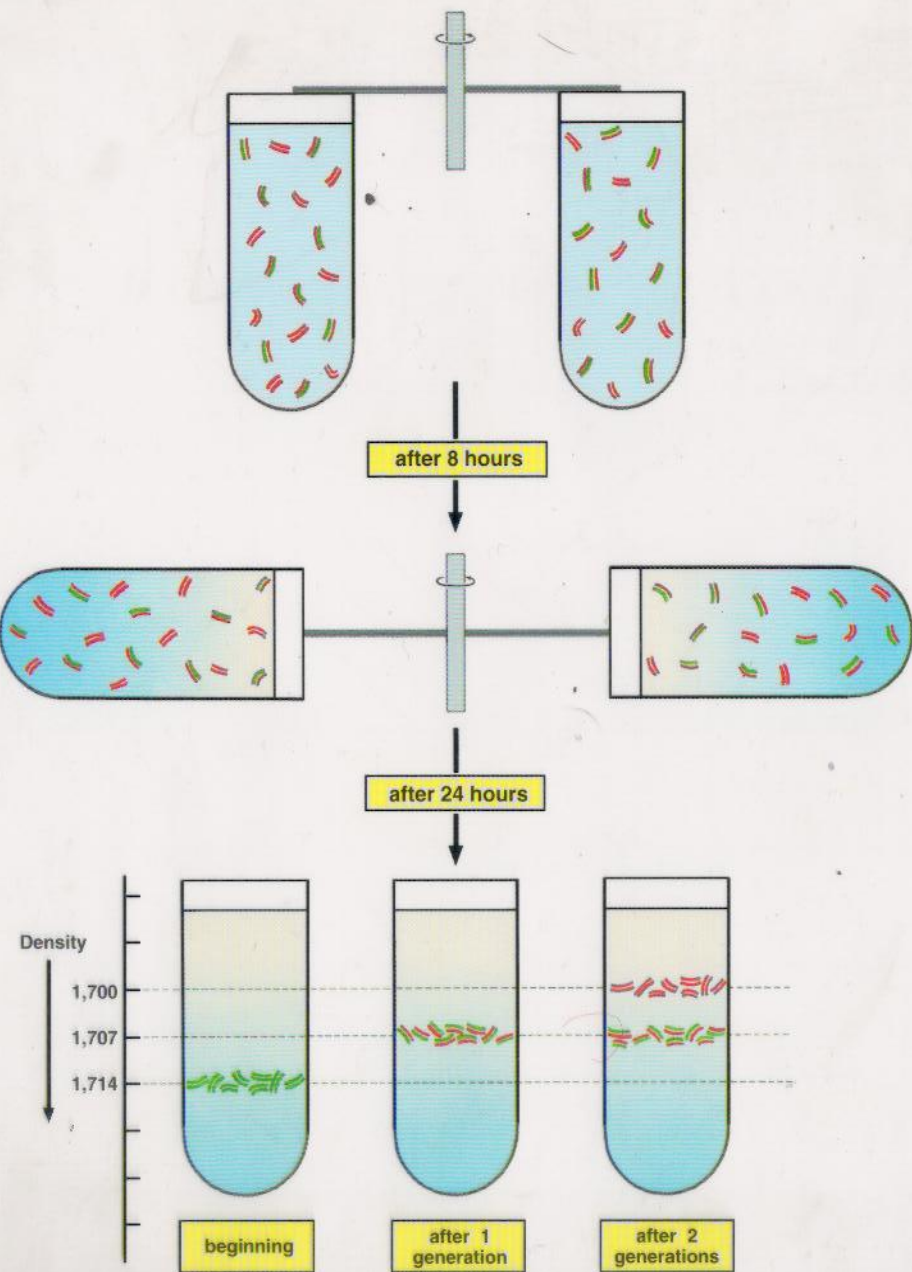




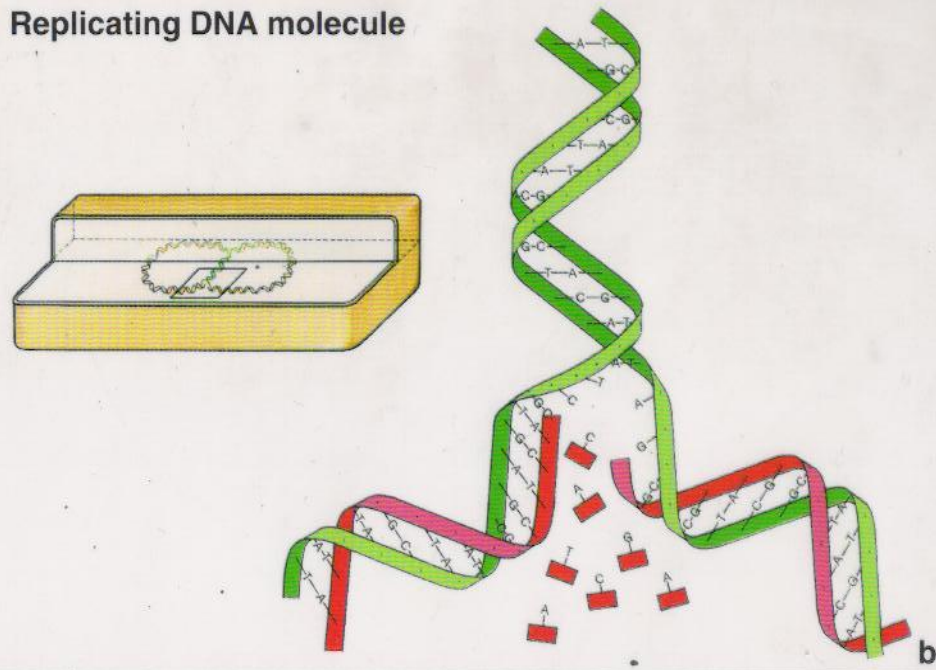
Репликация отстающей цепи ДНК



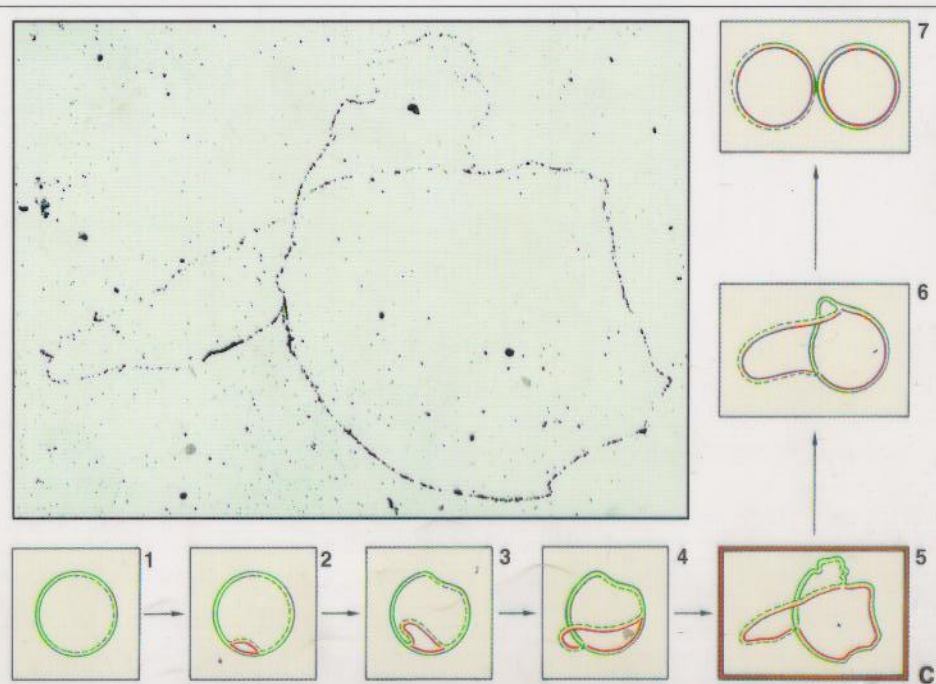
Density gradient centrifugation



Replicating DNA molecule



a



b

c

Models of replication. Prediction of density of replicated DNA

Semiconservative

Conservative

Dispersive

Beginning



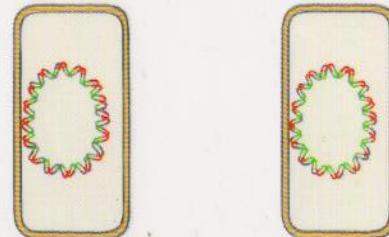
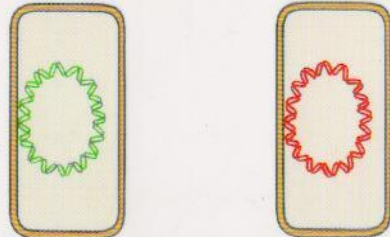
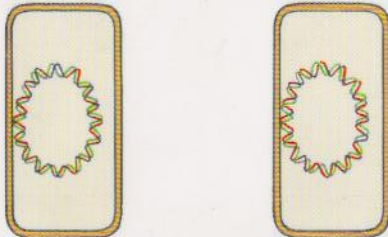
Density of DNA:

100% 1,714

100% 1,714

100% 1,714

After 1 generation



Prediction of density of replicated DNA:

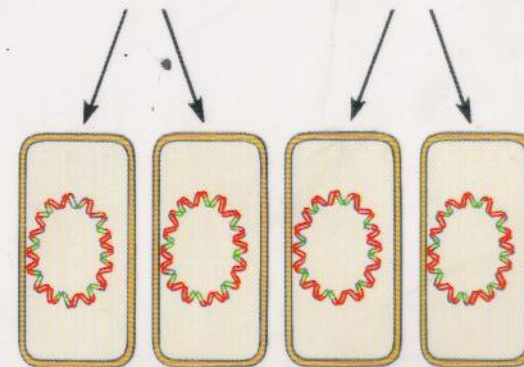
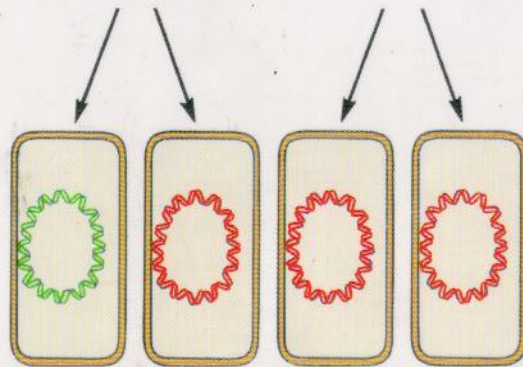
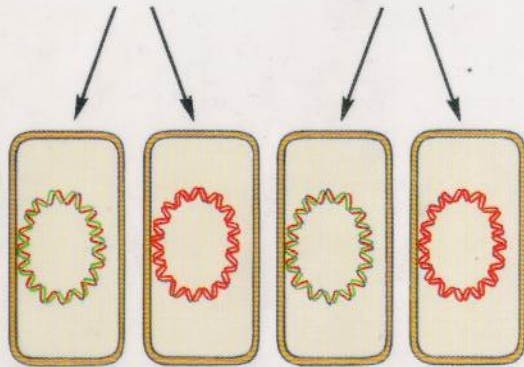
100% 1,707

50% 1,714

50% 1,700

100% 1,707

After 2 generations



Prediction of density of replicated DNA:

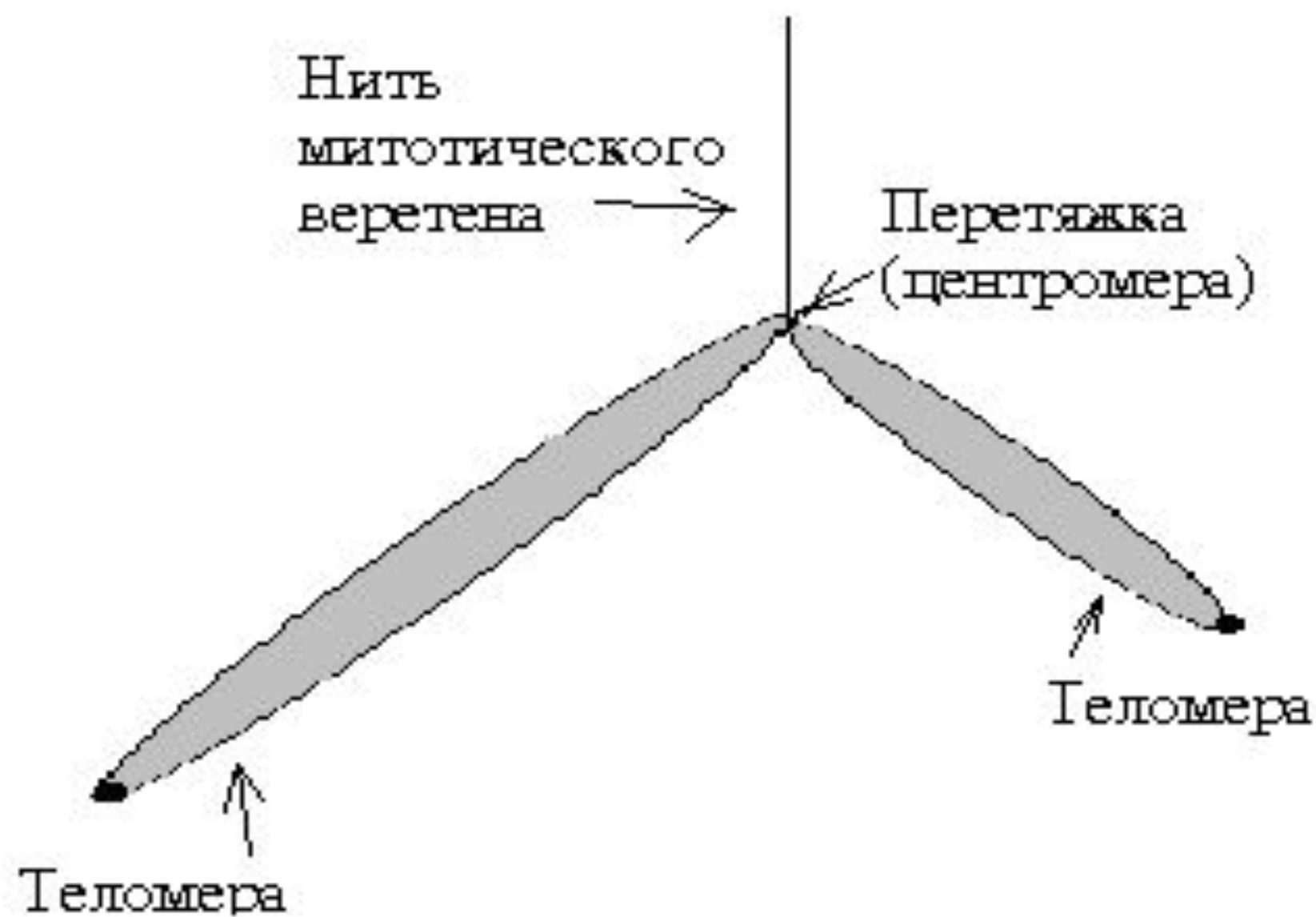
50% 1,707

50% 1,700

25% 1,714

75% 1,700

100% 1,703



TELOMERES

Embryonic Stem Cells

Adult Stem Cells

Chromosome

Telomere long

Telomere short

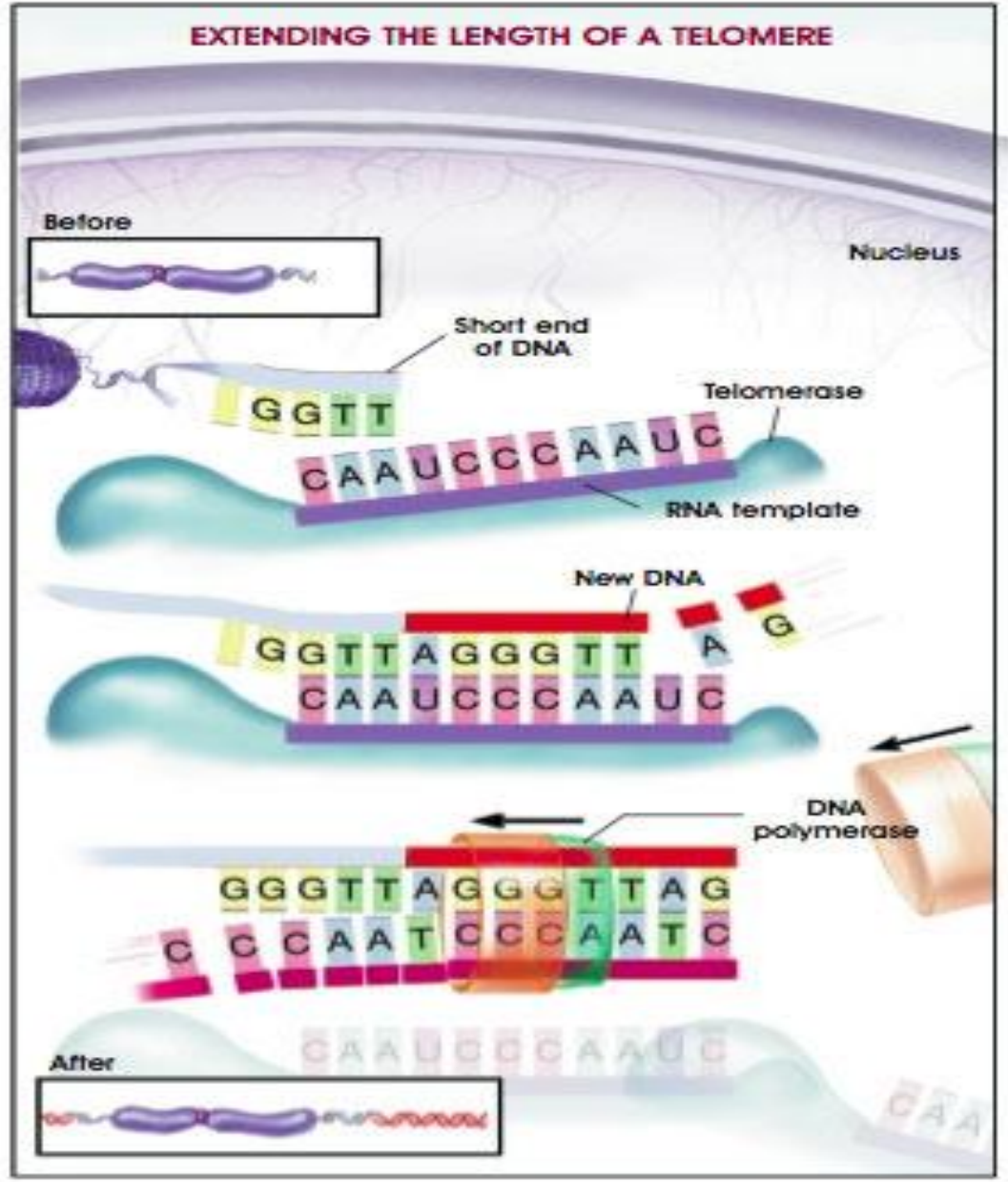
Telomerase active

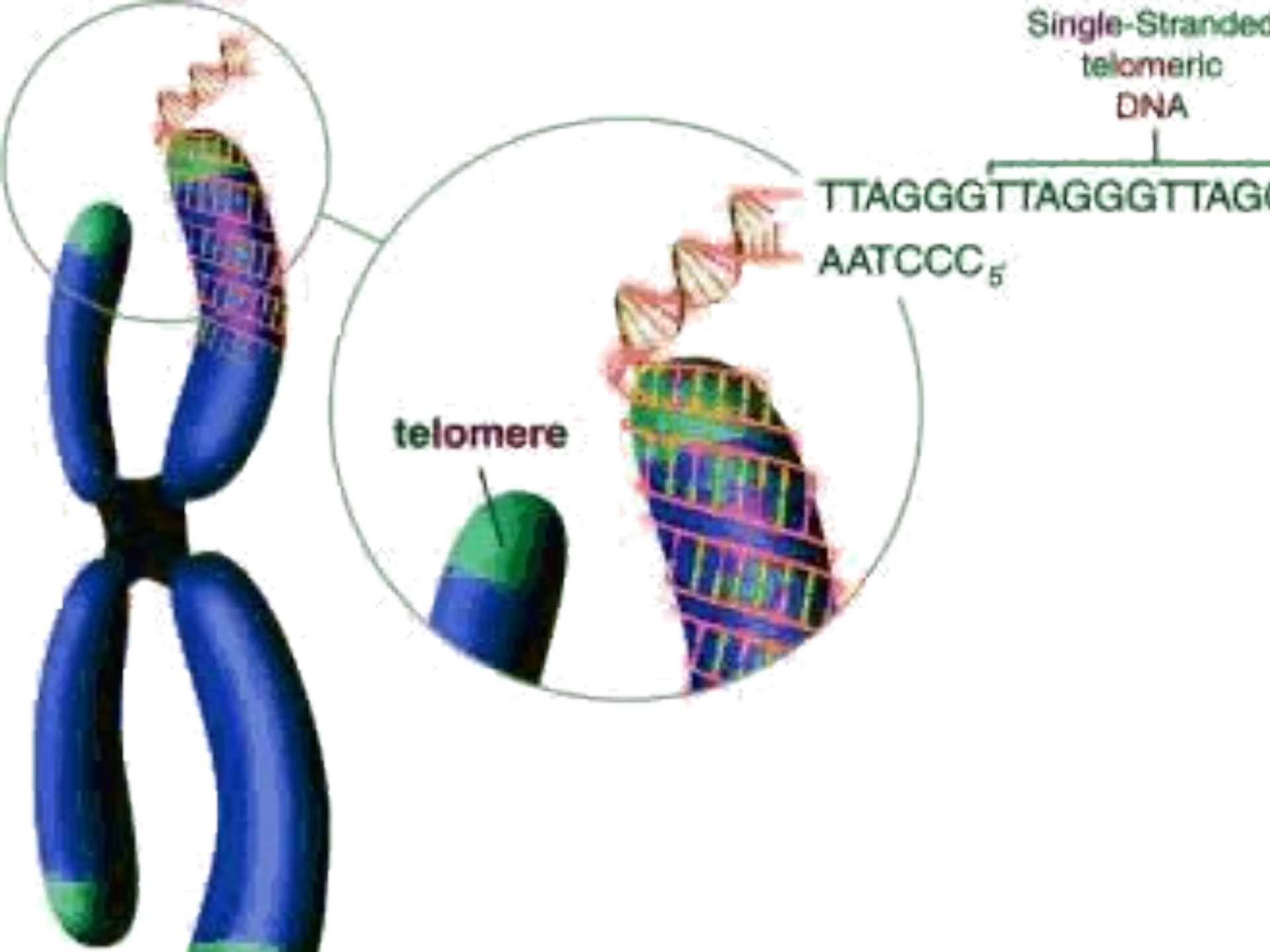
Telomerase inactive or absent

A - T
A - T
C - G
C - G

Telomere is a repeating DNA sequence

EXTENDING THE LENGTH OF A TELOMERE

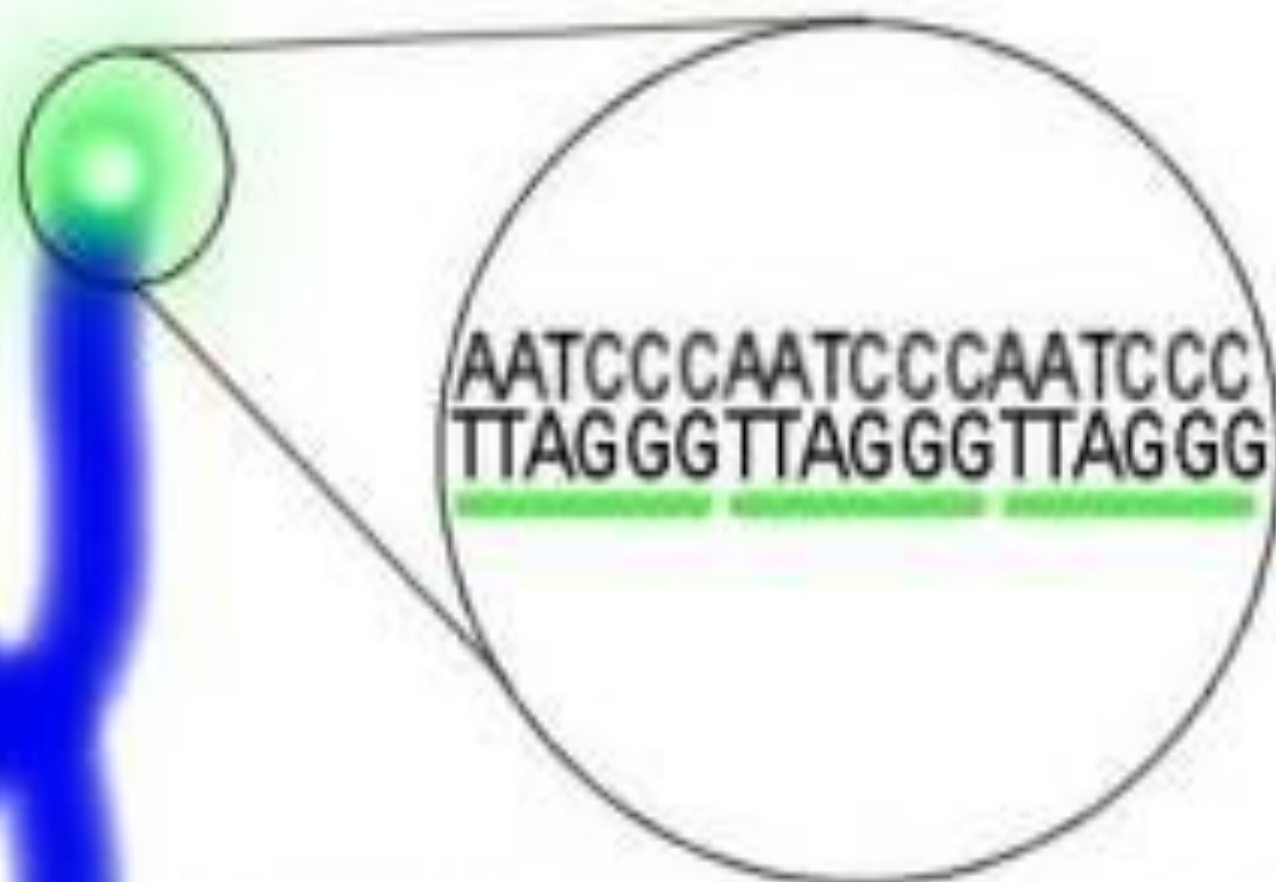




Single-Stranded
telomeric
DNA

TTAGGGTTAGGGTTAGG
AATCCC₅

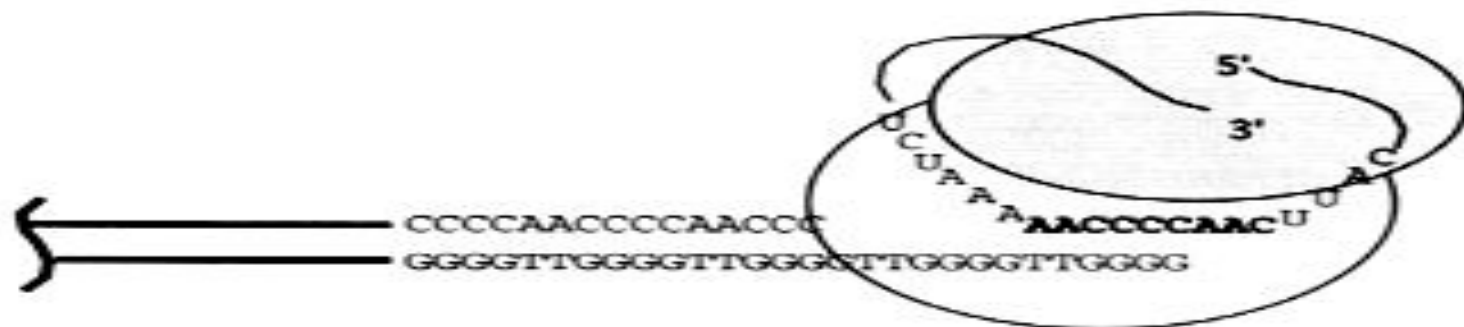
telomere



Human telomeres contain thousands of repeats of the six nucleotide sequence, TTAGGG

Теломерные повторы в хромосомах некоторых видов
 [Telomeres, 1995. P. 12 – 13]

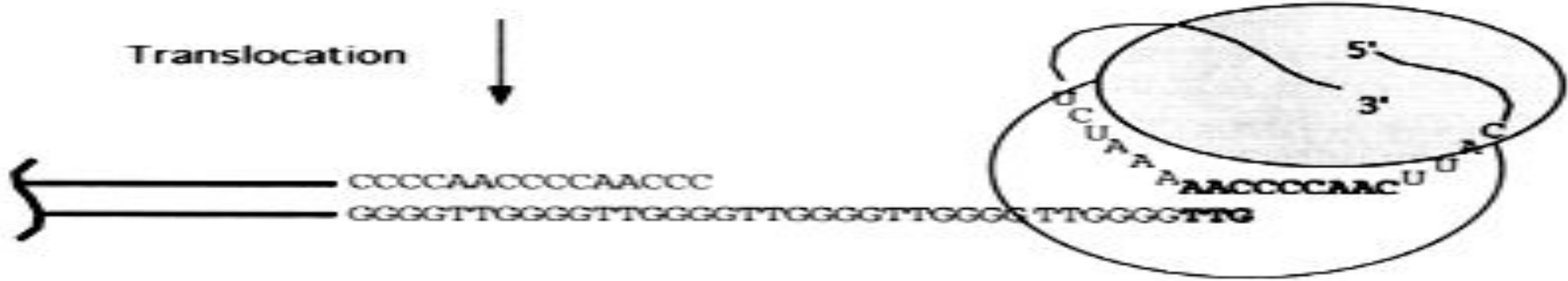
Таксон, виды		Последовательности нуклеотидов (5' → 3')
Простейшие	<i>Euplotes</i>	TTTTGGGG
Слизневые грибы	<i>Phusarum</i>	TTAGGG
Жгутиковые	<i>Trypanosoma</i>	TTAGGG
Споровики	<i>Plasmodium</i>	TT(T/C)AGGG
Грибы	<i>Neurospora</i>	TTAGGG
Нематоды	<i>Candida</i>	ACGGATGCACTCGCTTGGTGT
Насекомые	<i>Ascris</i>	TTAGGC
Водоросли	<i>Bomdyx mori</i>	TTAGC
Высшие растения	<i>Cylamidomonos</i>	TTTTAGGG
Позвоночные	<i>Arabidopsis</i>	TTTAGGG
животные	<i>Homo sapiens</i>	TTAGGG



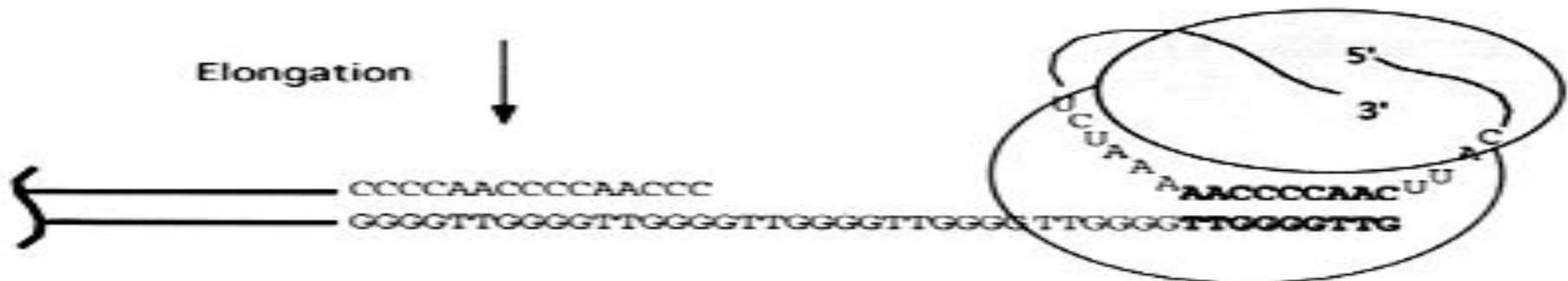
Elongation



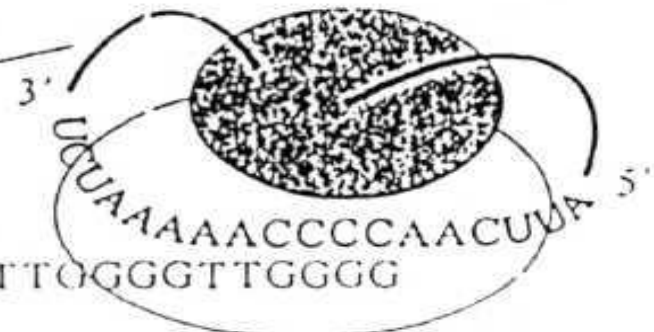
Translocation



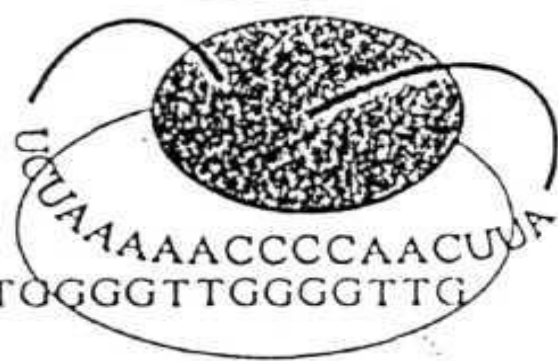
Elongation



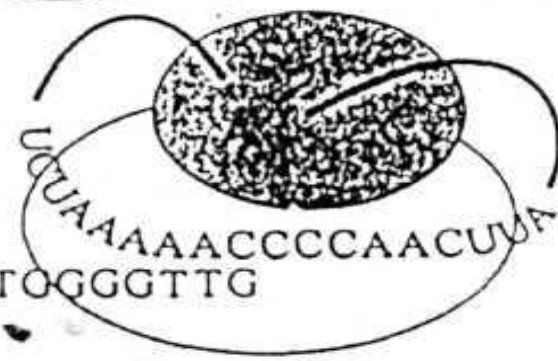
Теломеразная РНК



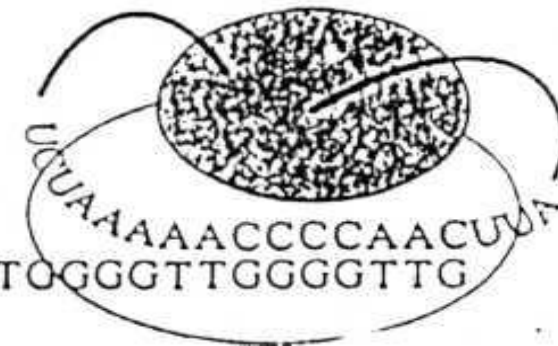
Удлинение



Перемещение

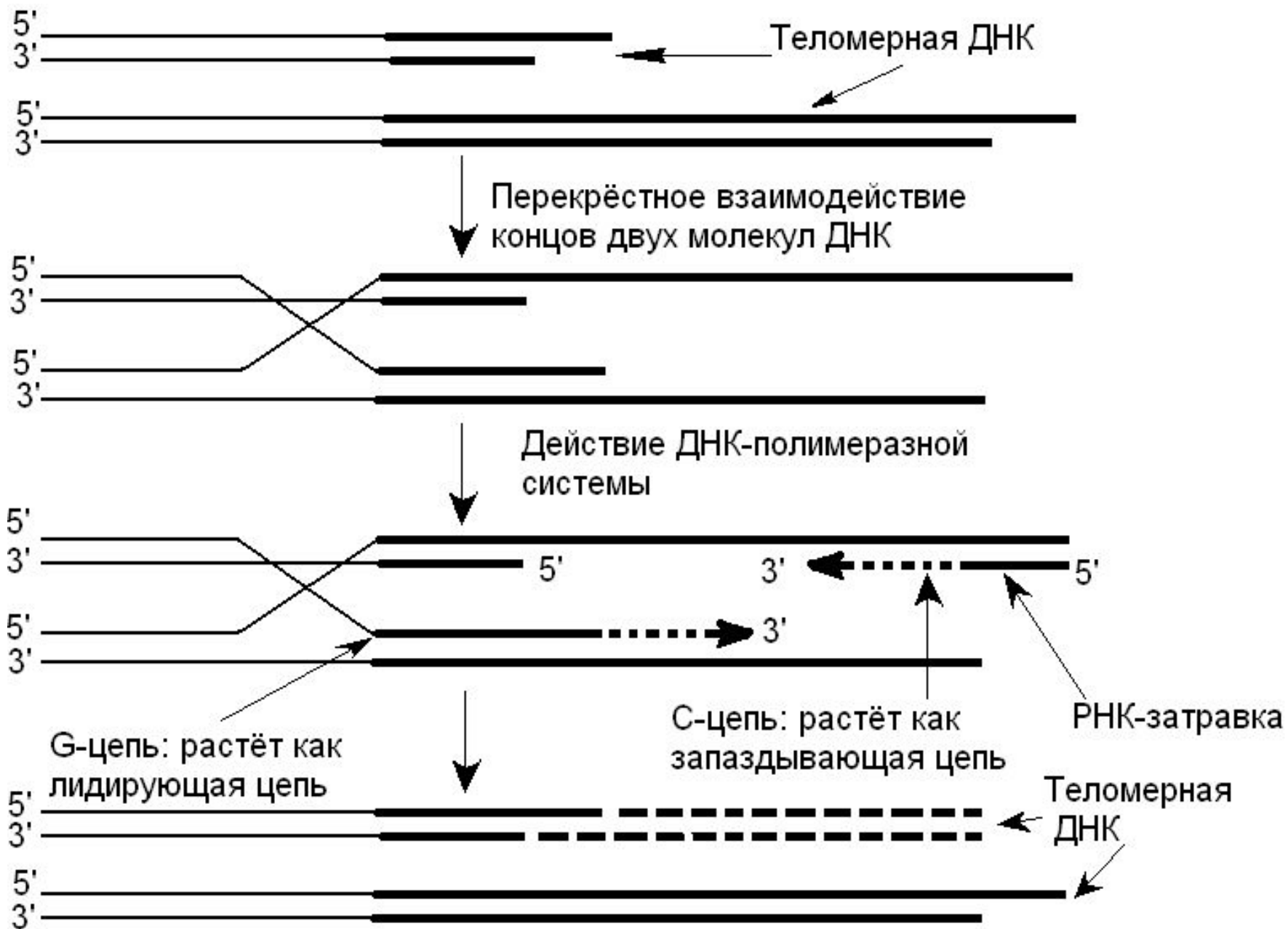


Удлинение



Распространенность теломеразы в клетках и тканях организма

1. Митотические клетки:	Вероятность обнаружения теломеразной активности, %
а) лимфоциты	100%
б) эндометрий	60%
в) эпидермис	50% (при инсоляции возрастает)
г) слизистая толстой кишки	35%
д) яичники (фолликулярные клетки и ооциты)	25%
е) слизистая желудка	15%
ж) слизистая мочевого пузыря	5%
2. Условно постмитотические клетки:	16%
а) эпителий легких	14%
б) поджелудочная железа	8%
в) печень	0%
г) щитовидная железа	0%
д) предстательная железа (зрелые клетки)	(обнаруживается в столовых клетках)
3. Постмитотические клетки:	0
а) мозг	0
б) мышечные клетки (косвенные данные)	0



Транскрипция

- Реализация генетической информации о структуре определенного белка включает два этапа: **транскрипцию и трансляцию.**
- Транскрипция - это первый этап реализации генетической информации, при котором в клетках осуществляется биосинтез РНК на матрице ДНК, т.е. переписывание информации о структуре белка с ДНК на специальный посредник – м РНК.

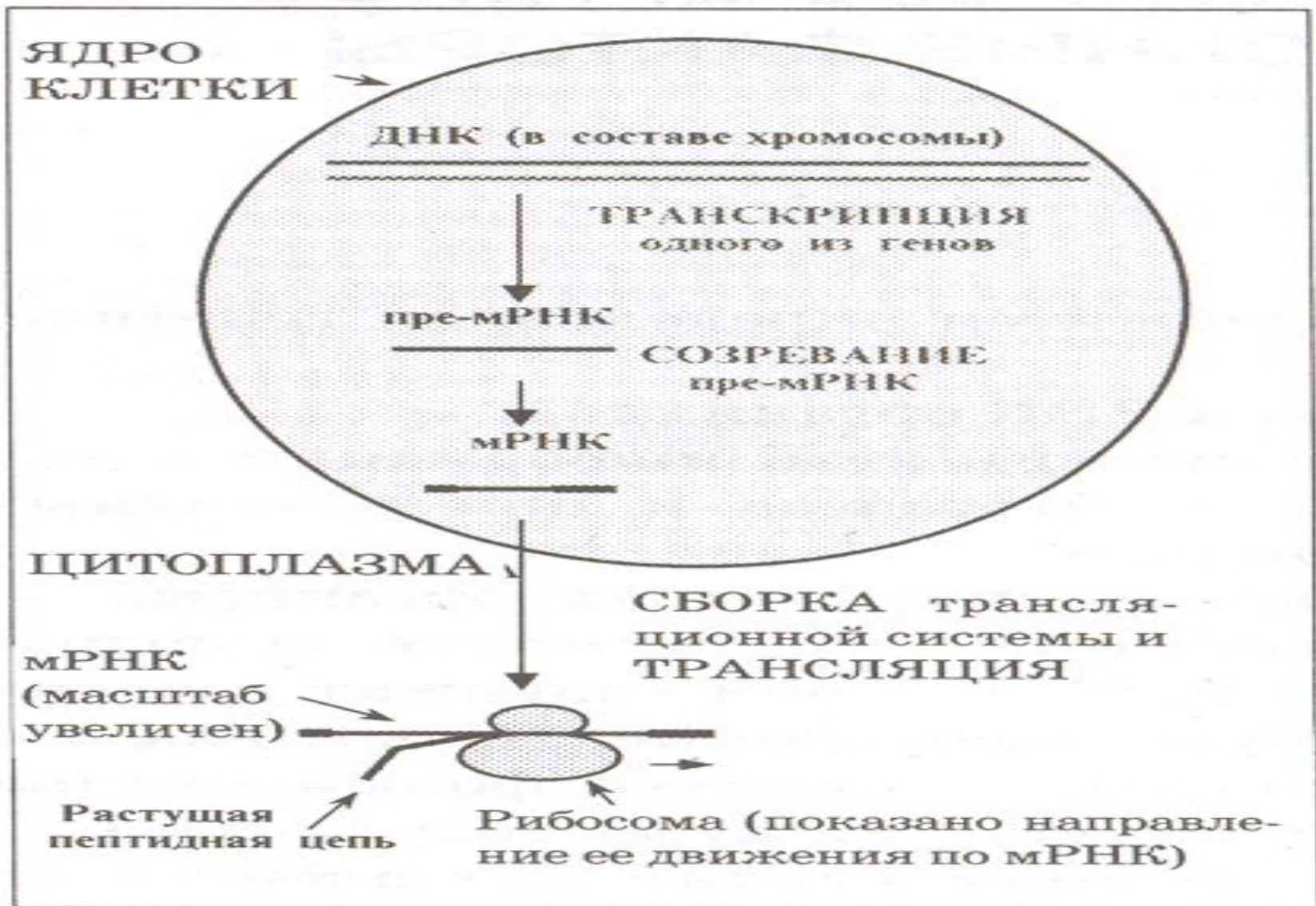


Рис.1 Основные этапы экспрессии гена.

Смысловая цепь

ТТЦАГТЦАГГАЦГАТАЦГ

5' _____ 3'

ААГТЦАГТЦЦТГЦ

3' _____ 5'

Матричная цепь

Транскрипция



УУЦАГУЦАГГАЦТАУАЦГ

Информационная 5' _____ 3'
РНК (и-РНК)

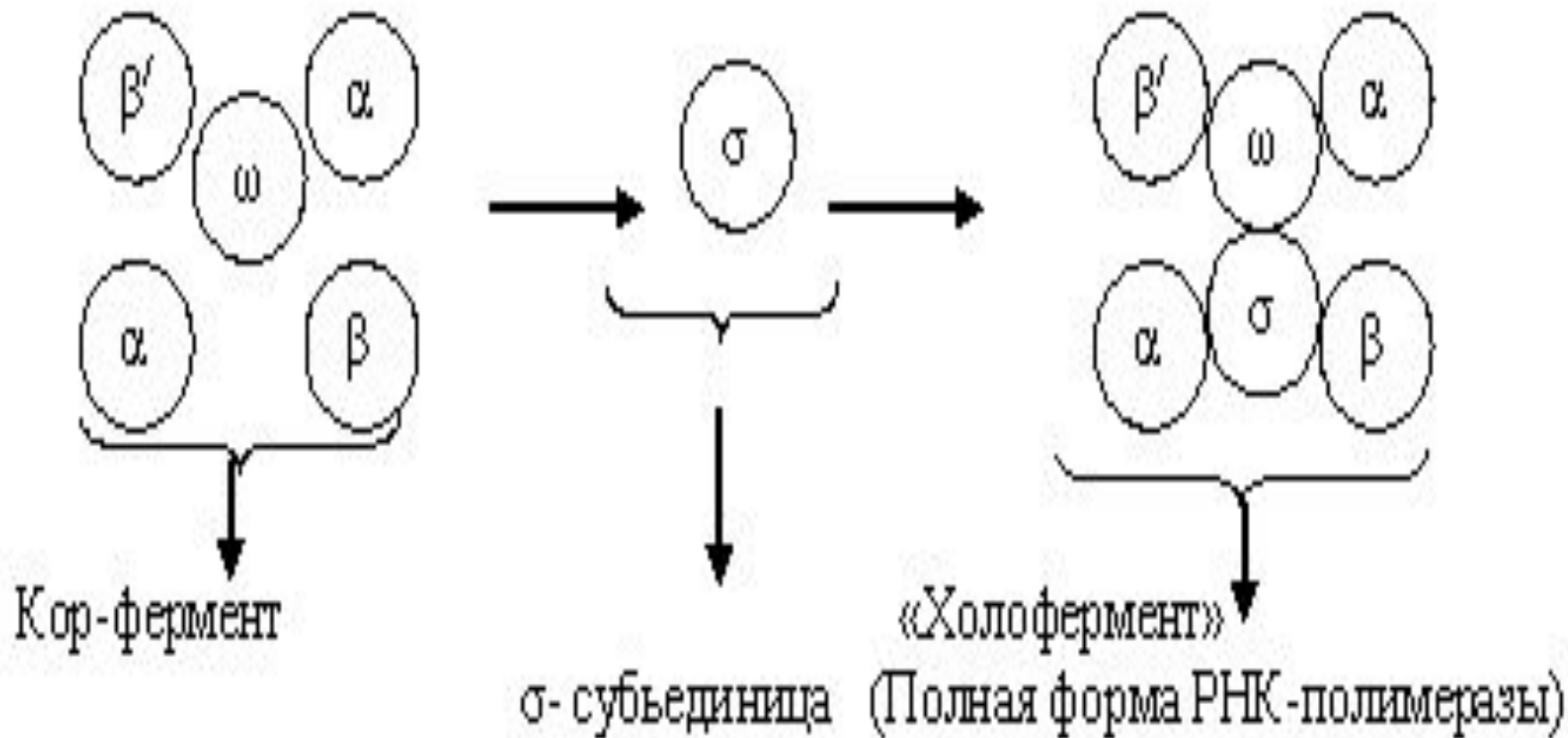
- Характерные особенности фермента РНК – полимеразы:
 - 1). способность, с помощью σ -субъединицы выбирать цепь ДНК, с которой будет производиться транскрипция и точку ее начала.
 - 2). отсутствие потребности затравки, что резко отличает его от всех ДНК-полимераз.
 - 3). отсутствие механизма самокоррекции. Вследствие этого точность ее работы ниже чем у ДНК –полимераз, но так как клеточная РНК – полимераза не способна к самовоспроизведению, возникающие при транскрипции ошибки не затрагивают потомство.

- У прокариот функционирует одна единственная РНК-полимераза, которая принимает участие в синтезе всех видов РНК: мРНК, тРНК и рРНК. Содержание РНК – полимеразы в клетках бактерий варьирует от 500 до 7000 на клетку (Matzura Н.1973).

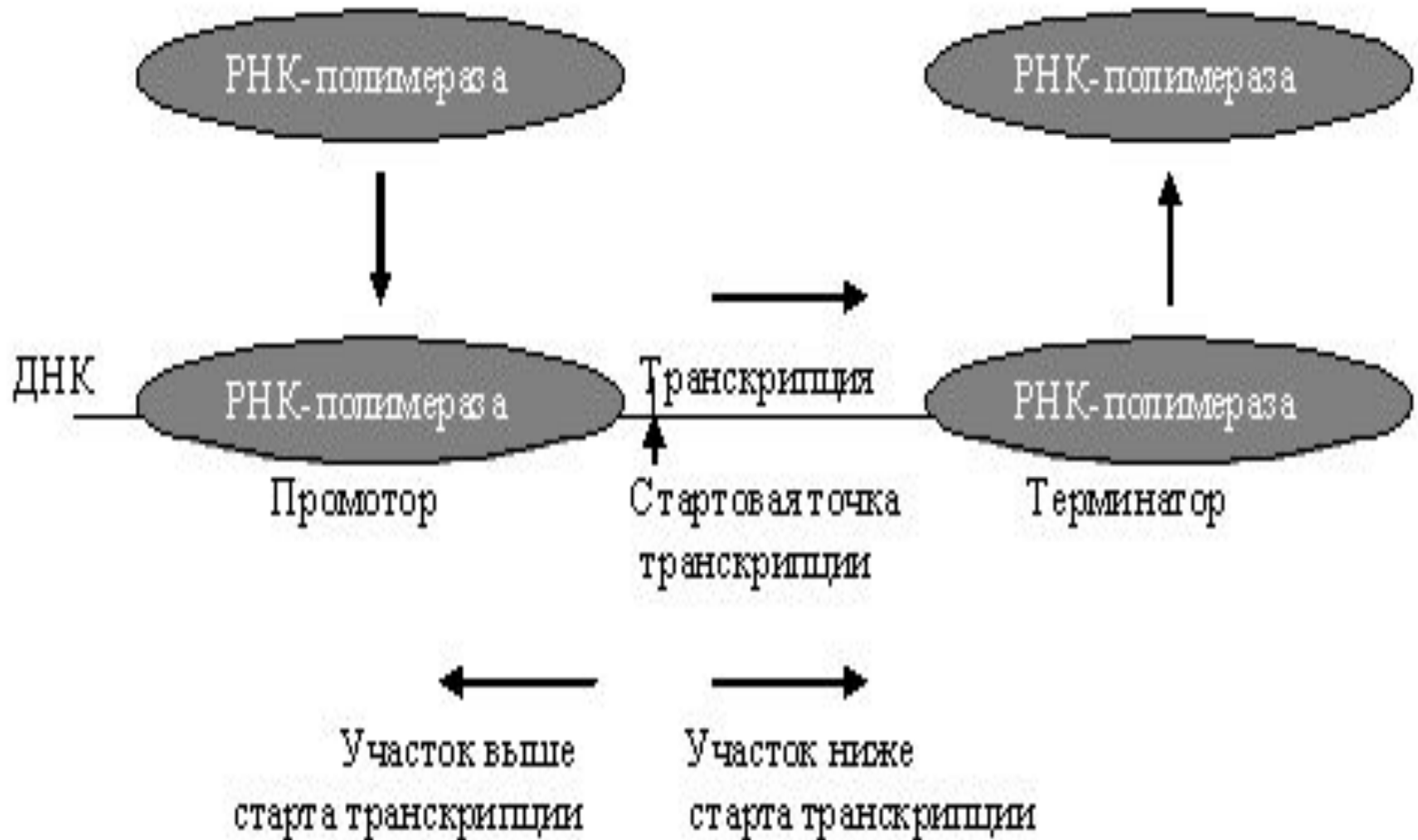
**Некоторые основные характеристики различных субъединиц (= полипептидов)
РНК – полимеразы E. coli. (по Гарднеру, Симмонсу и Снустаду, 1991).**

	Субъединица	Ген	Молекулярная масса (дальтон)	Локализация	Функция
1.	α_2	gro A	41 000 каждая	Кор-фермент	Связь с промотором
2.	β	gro B	150000	Кор-фермент	Присоединение нуклеотидов
3.	β'	gro C	165000	Кор-фермент	Присоединение к матричной ДНК
4.	ω	-	12000	Кор-фермент	-
5.	σ	gro D	95000	Сигма-фактор	Инициация синтеза и-РНК

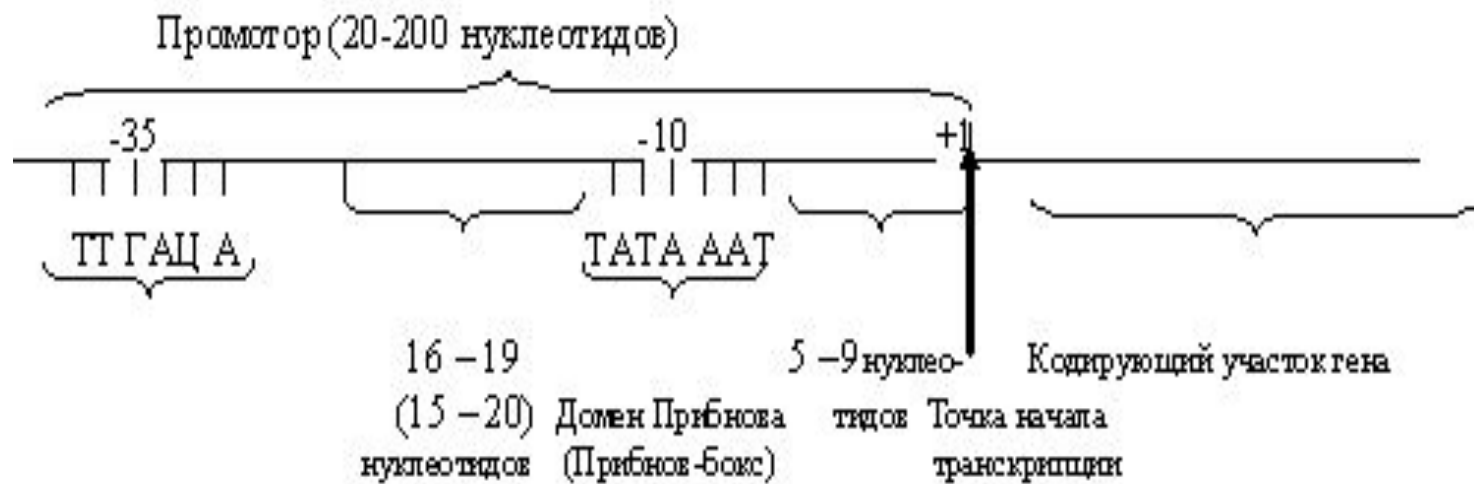
Пространственная организация РНК – полимеразы:
(по Гарднер с соавт., 1991).

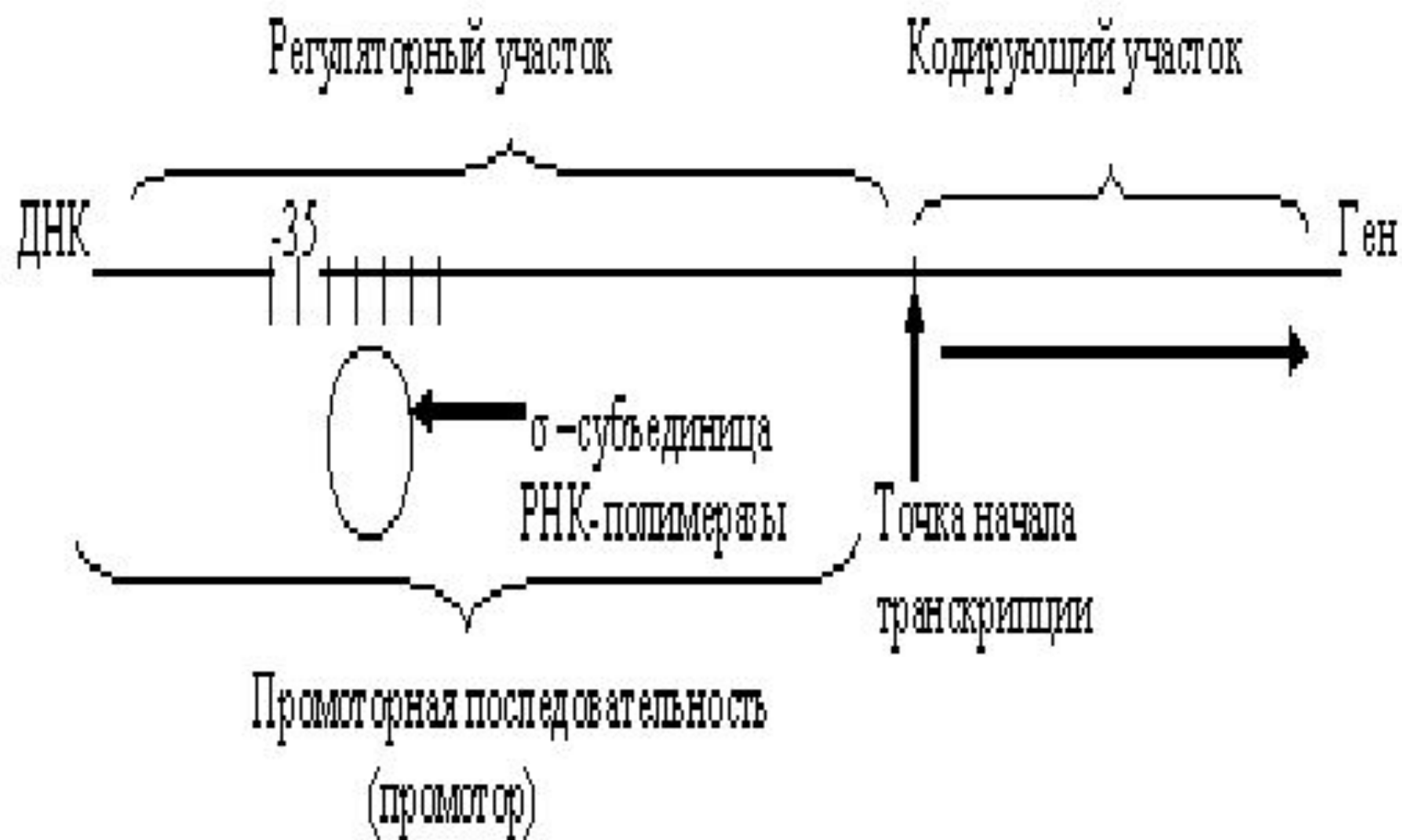


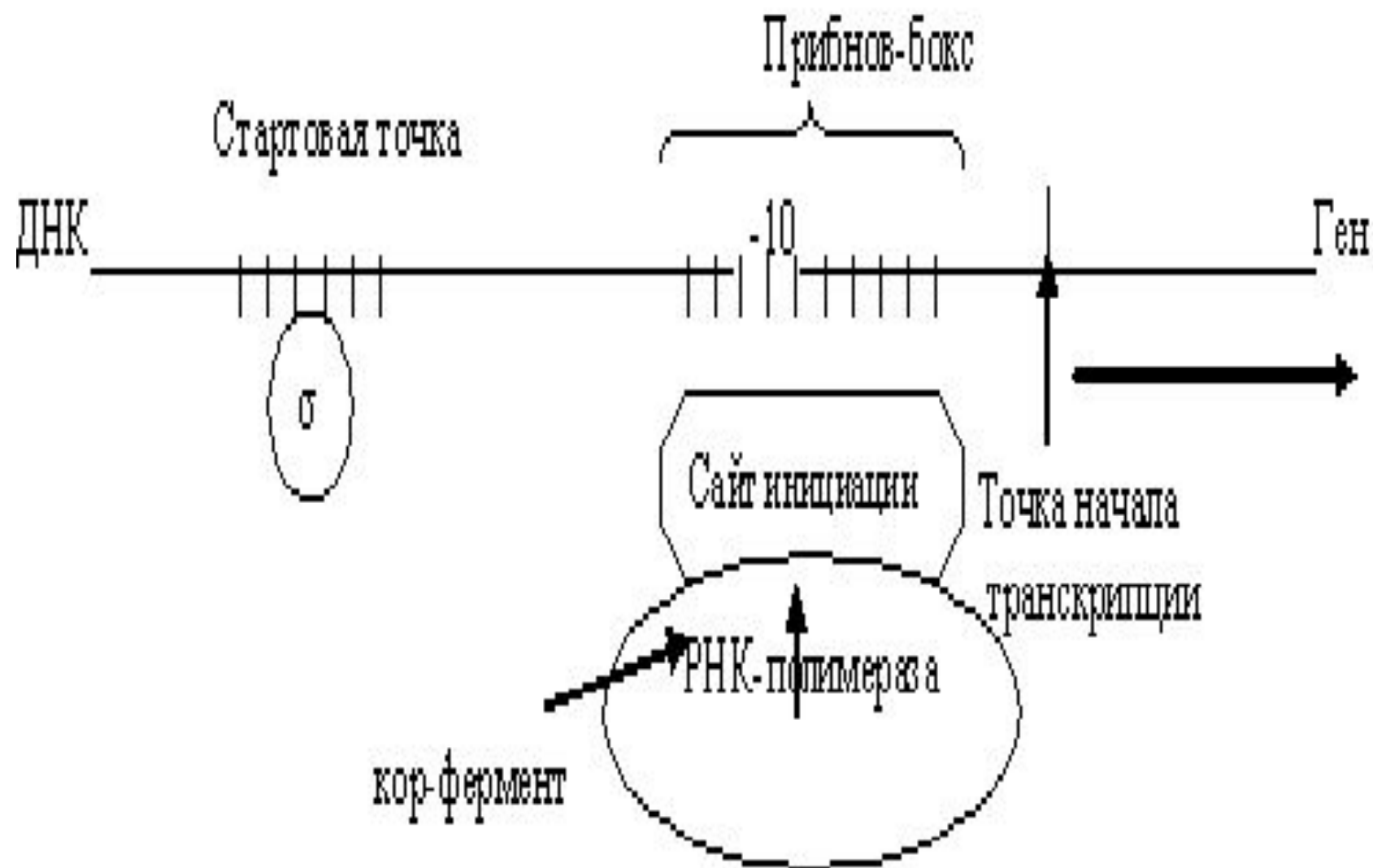
Единица транскрипции, содержащая различные элементы гена
[Lewin, 2000.P.234]



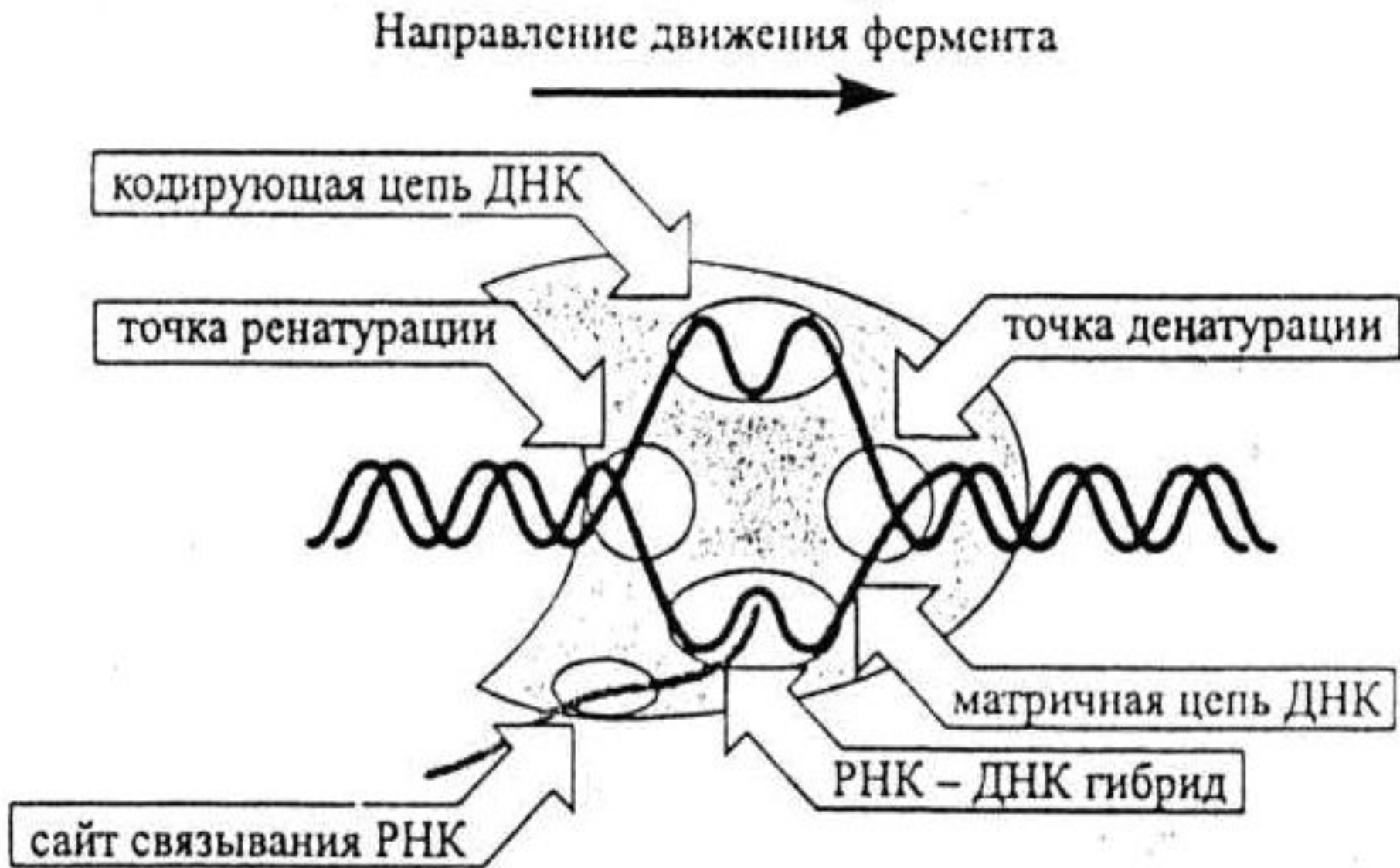
Типичная организация промотора прокариот (Lewin, 2000)







Транскрипционный «пузырек» [Lewin, 2000. p. 235].



Начало транскрипции у прокариот

Комплекс инициации

-50 -40 -30 -20 -10 1 +10 +20 +30

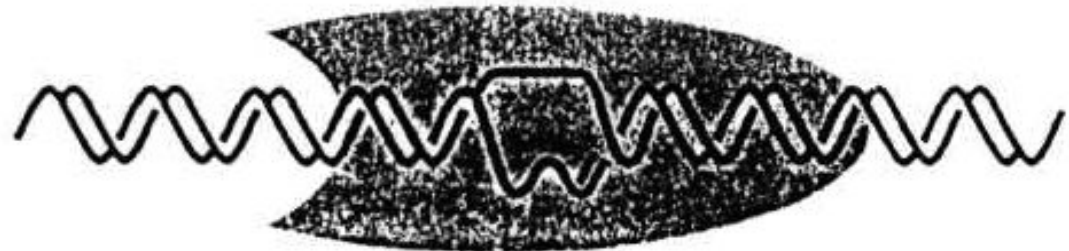
содержит σ -фактор
и связывается с участком
ДНК длиной 75–80 пп



Первоначальный комплекс
элонгации

-50 -40 -30 -20 -10 1 +10 +20 +30

утрачивает σ -фактор
и контакты с ДНК
в районе от -35 до -55



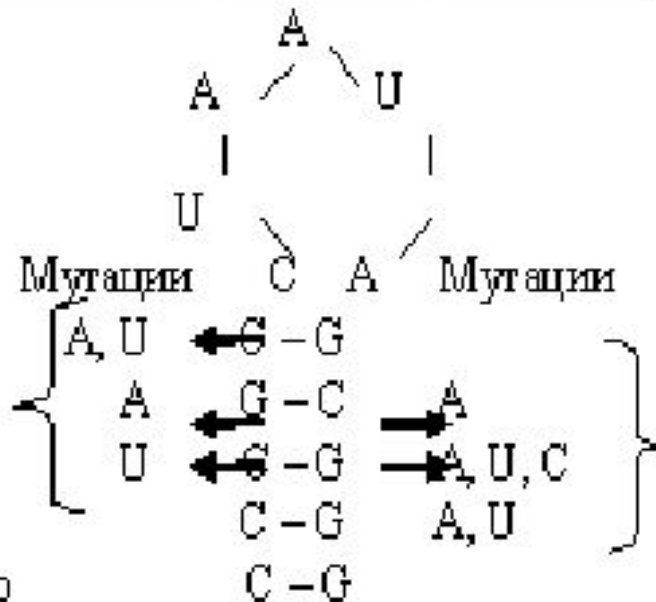
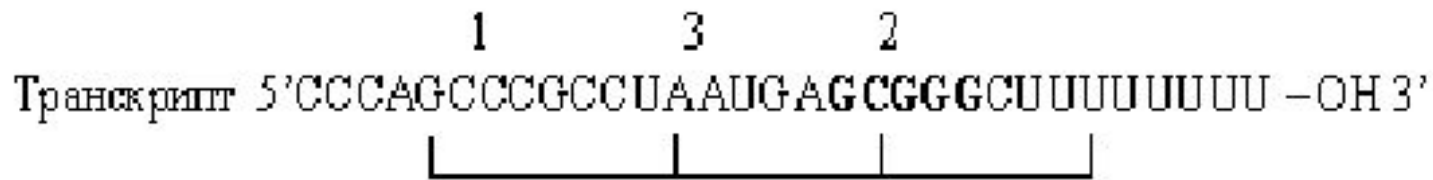
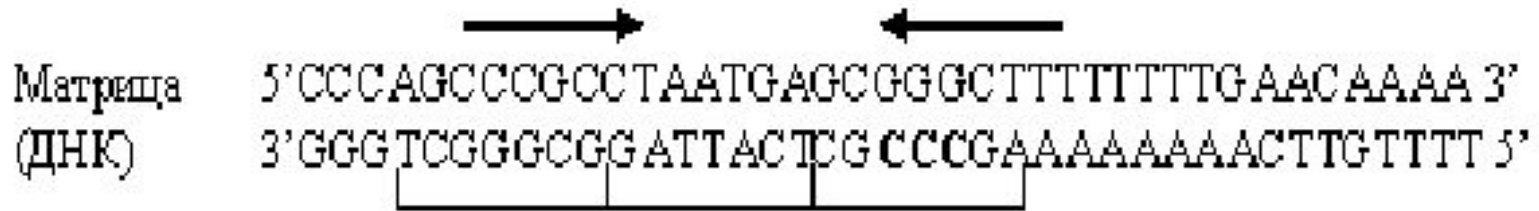
Общий комплекс элонгации :

-50 -40 -30 -20 -10 1 +10 +20 +30

связывается с участком
ДНК длиной 30–40 пп



Механизм терминации первого типа обусловлен структурной особенностью терминаторного участка гена



Транскрипт образует терминирующую

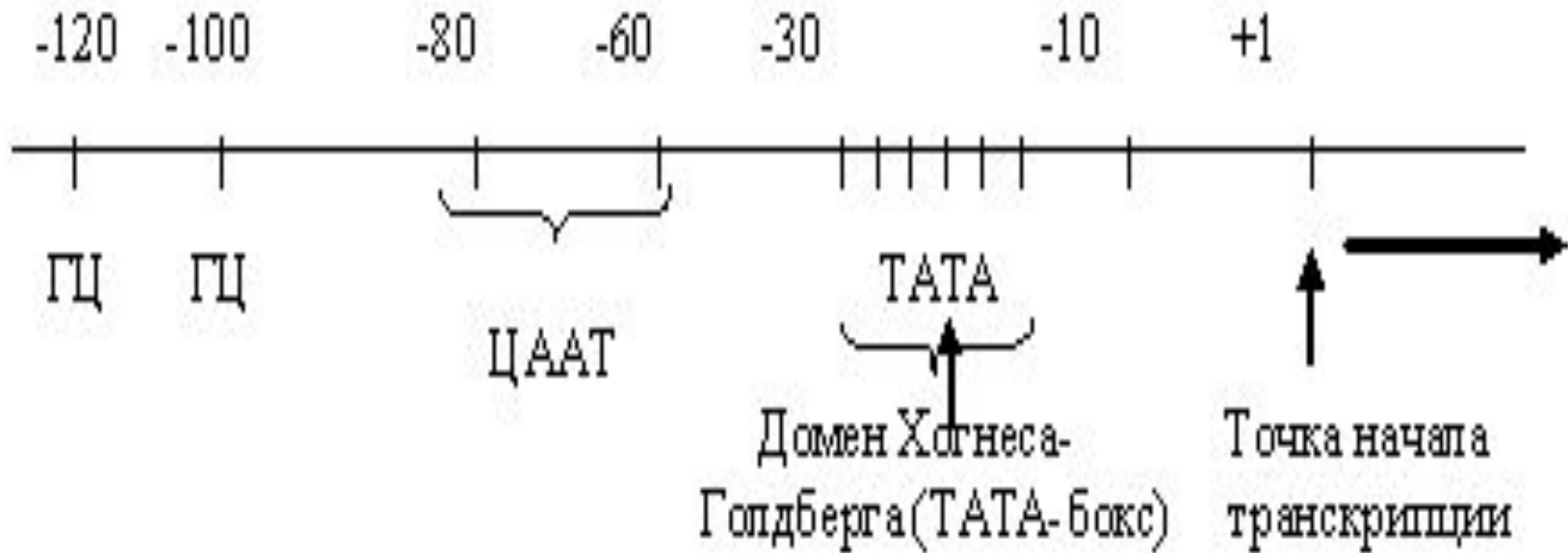
шпильку

G -

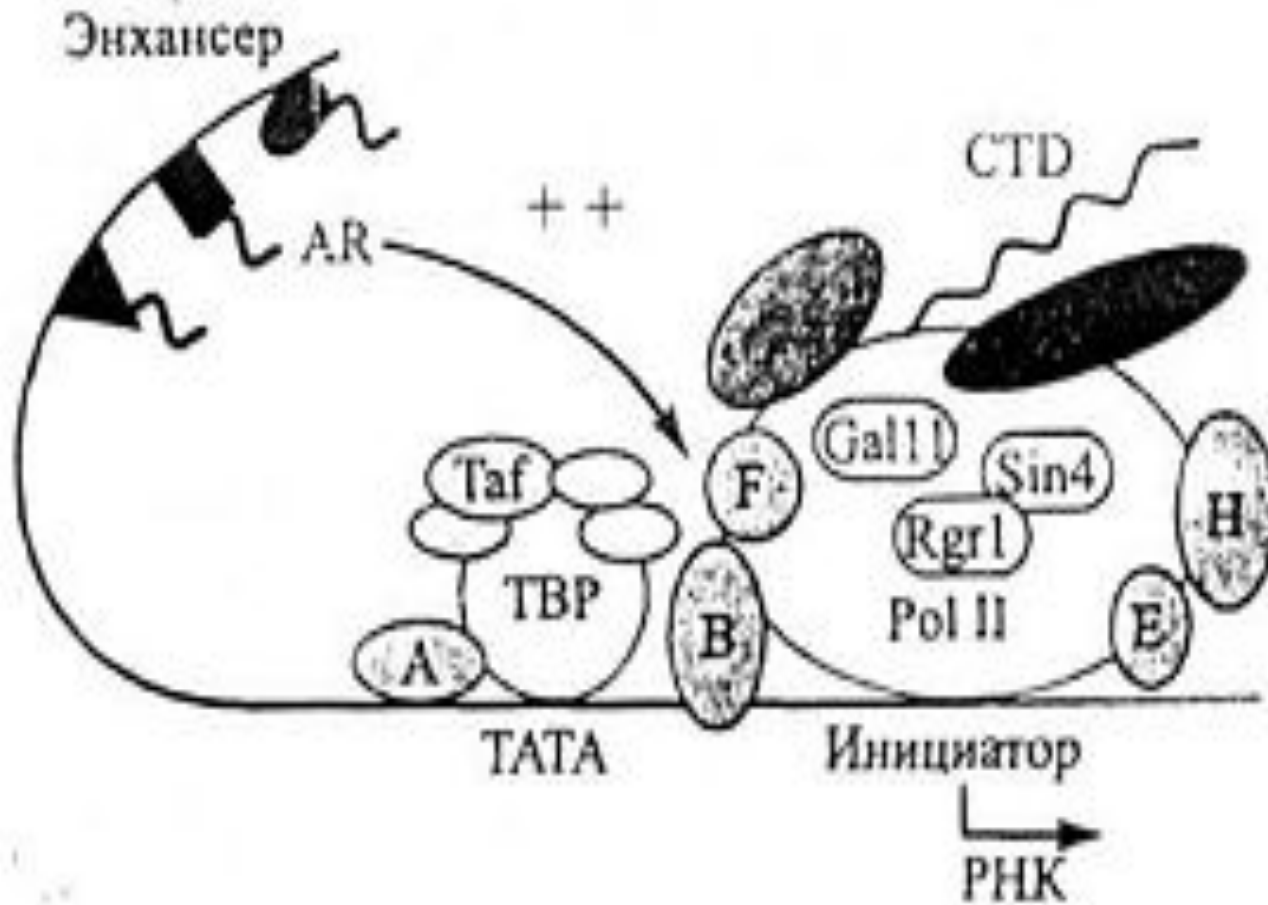
Характеристика трех различных классов ядерных РНК – полимераз (РНК – П).

Фермент	Локализация	Продукт	Чувствительность к α -амантину
РНК – полимеразы I	Ядрышко	р-РНК (50-70%), за исключением 5S р- РНК	нечувствительная
РНК – полимеразы II	Нуклеоплазма	гя-РНК (20-40%)	чувствительная
РНК – полимеразы III	Нуклеоплазма	т-РНК (~10%), +5S РНК у животных	Ингибирована у животных, активна у дрожжей и насекомых

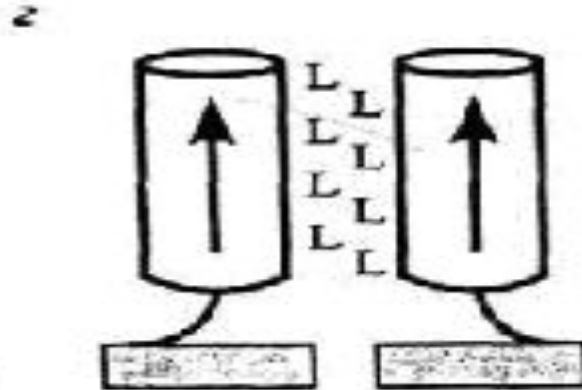
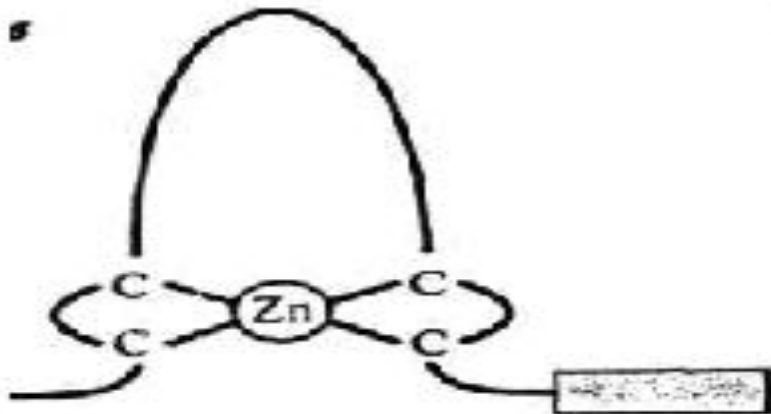
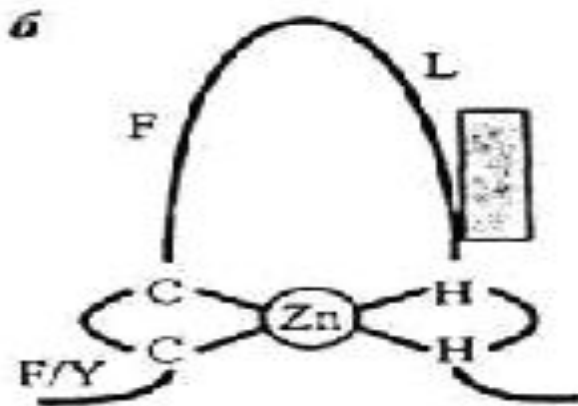
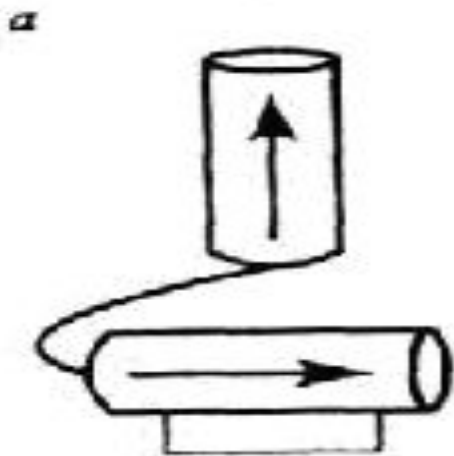
Структура промотора у эукариот (Russel, 1998)



Расположение белков в типичном промоторе эукариот [Strule,1996]

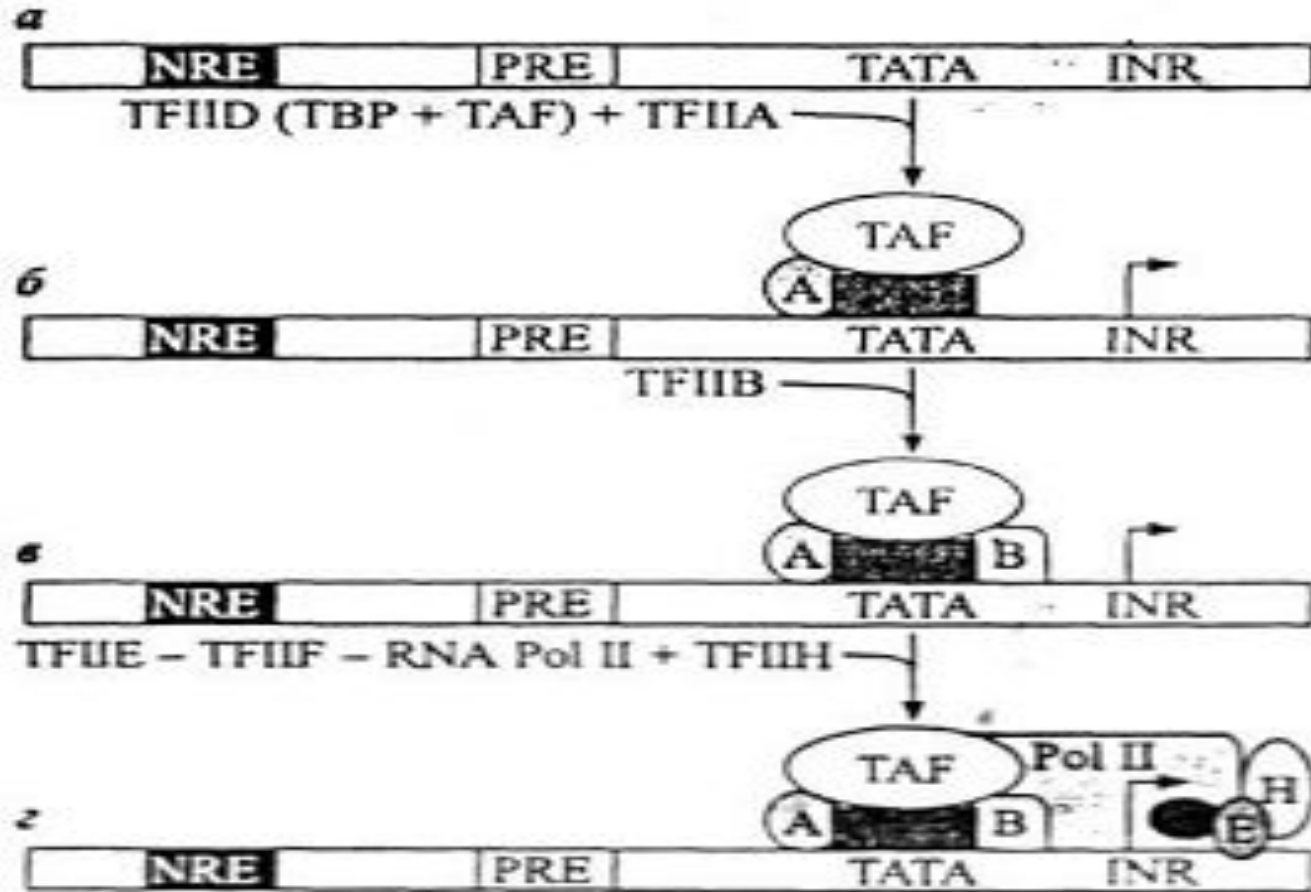


Схематическое изображение выявляемых в белках структурных доментов связывания с ДНК [Struhl, 1989]: а – спираль-поворот-спираль, б,в - «цинковые пальцы», г – «лейциновая застежка».

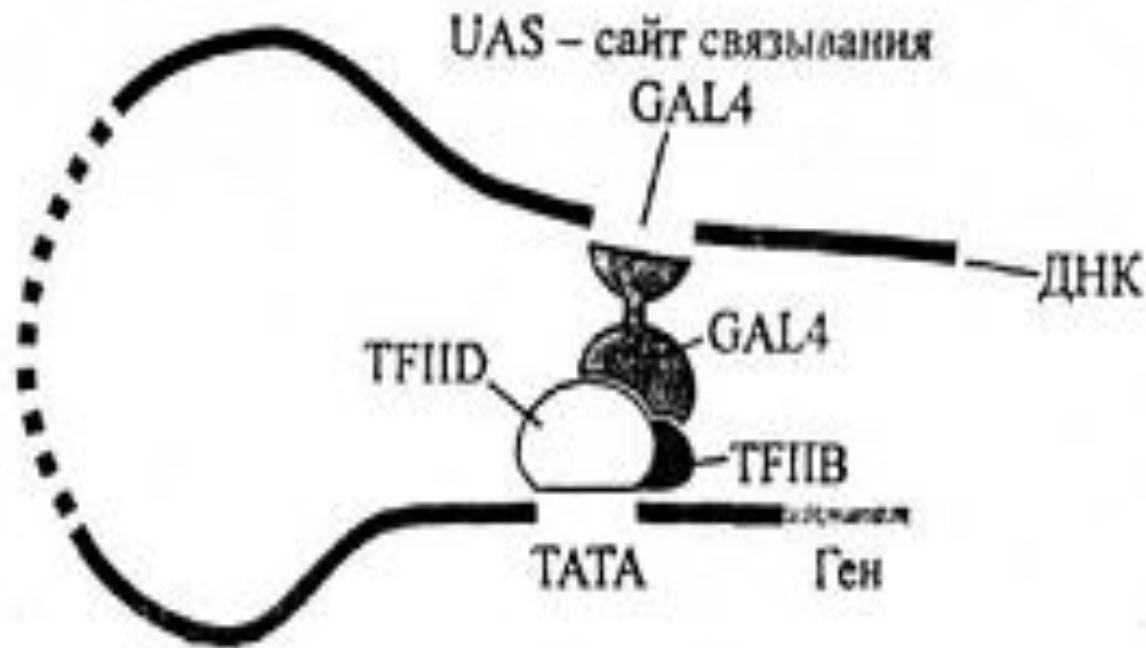


Сборка общего транскрипционного комплекса [Hanna-Rose, Hansen, 1996]:

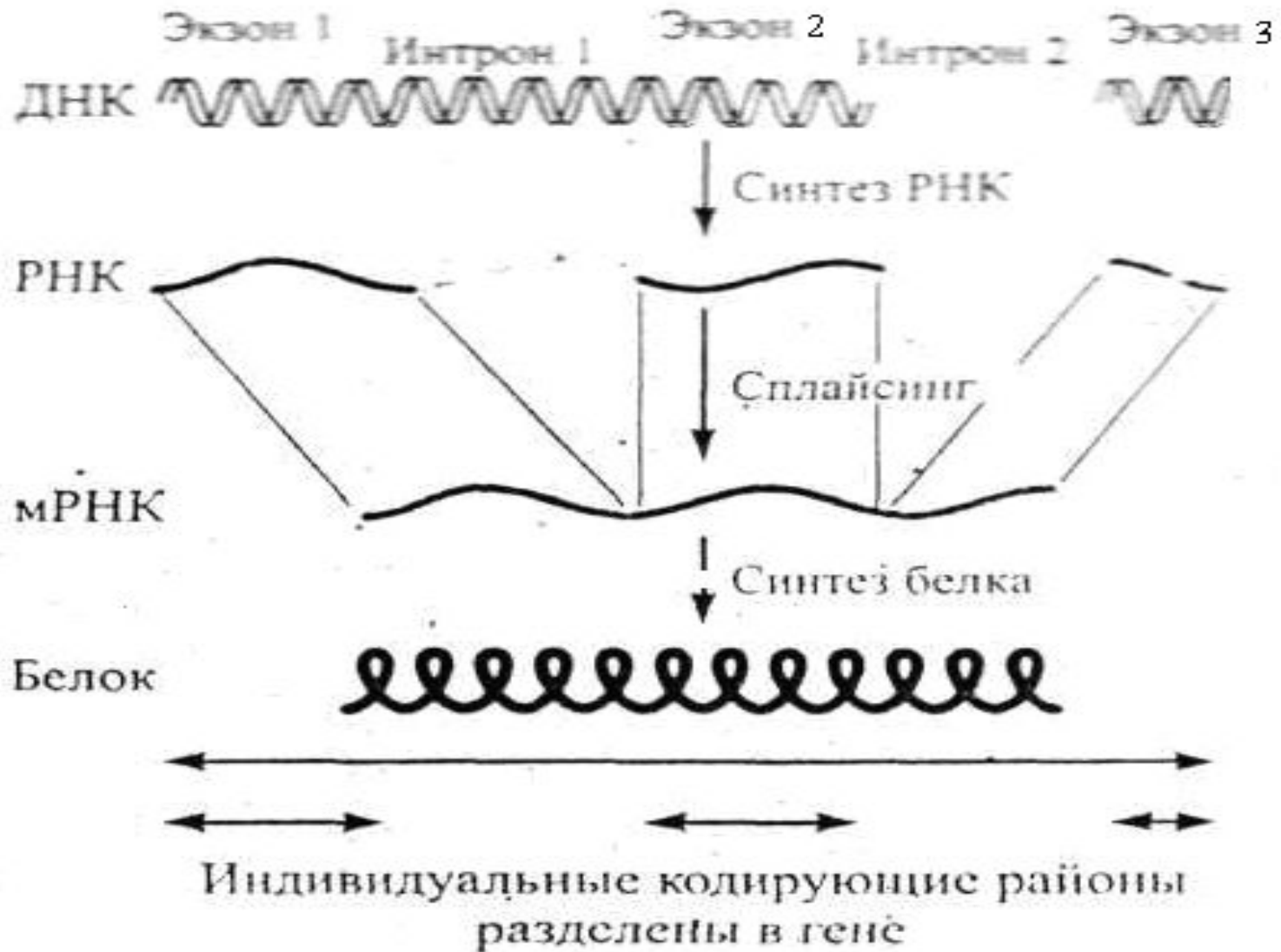
а – типичный промотор гена эукариот, содержащий элемент инициации транскрипции (INR) и TATA – домен, а также некоторое число позитивных (PRE) и негативных регуляторных элементов (NRE); б-г – порядок сборки общих факторов транскрипции и РНК-полимеразы II в промоторе.



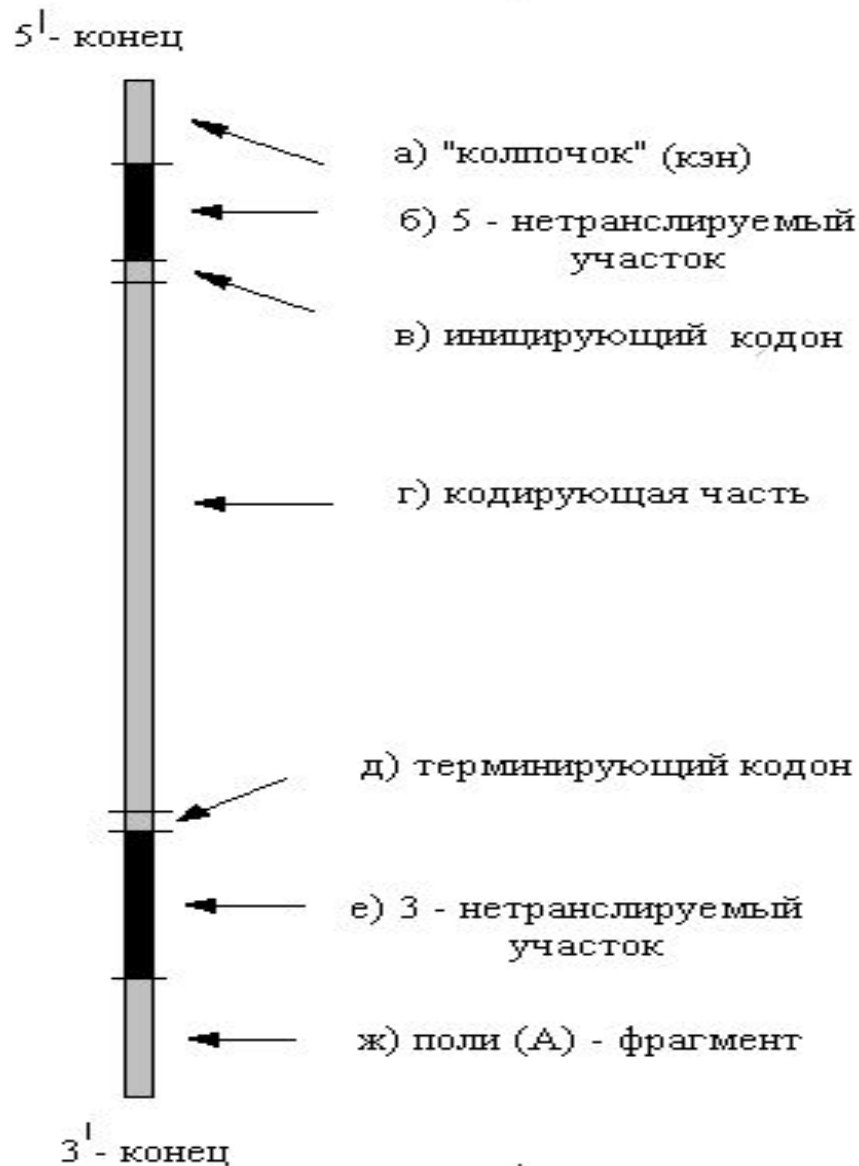
Взаимодействие белка GAL4 с участком UAS и транскрипционным комплексом, в результате чего облегчается присоединение к комплексу фактора транскрипции TFIIB. Это увеличивает скорость транскрипции примерно в 1000 раз [Alberts et al., 1994. P. 425].



Процессинг и сплайсинг гетерогенной ядерной РНК (гя РНК). (Lewin, 1994, p.150)



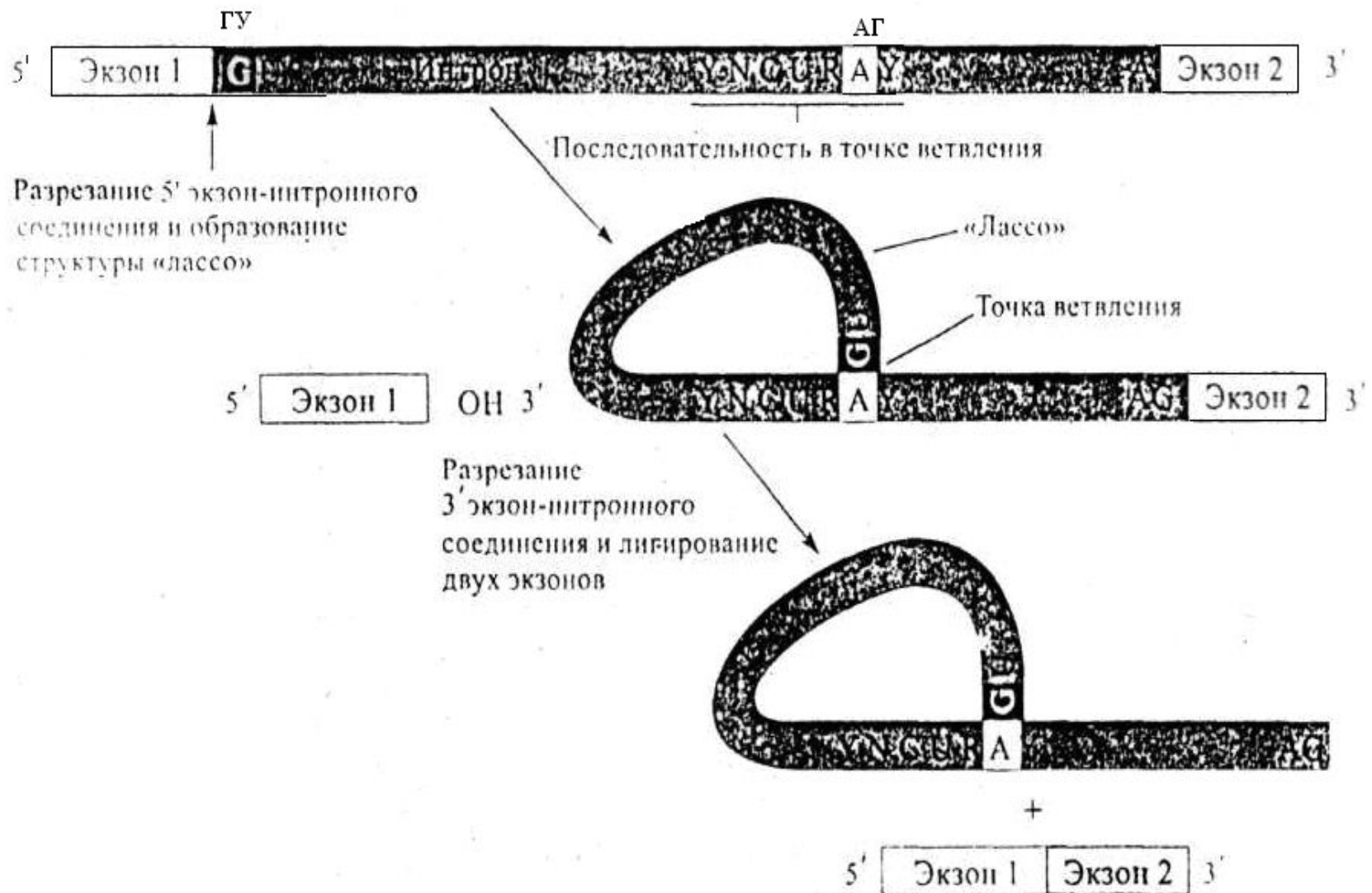
Структура зрелой и-РНК



Транслируемые эукариотические гены, в которых показаны интроны

№	Ген	Кол-во интронов
1.	α – глобин	2
2.	Иммуноглобин –L – цепь	2
3.	Иммуноглобин –H – цепь	4
4.	Митохондриальный цитохром дрожжей	6
5.	Овомукоид	6
6.	Овальбумин	7
7.	Овотрансферин	16
8.	Кональбумин	17
9.	α – коллаген (проколлаген α)	52

Процесс удаления интрона из молекулы пре-м-РНК [Russel, 1998. P. 398]



Модель формирования сплайсеосомы и удаления интрона [Russel, 1998. P. 399]

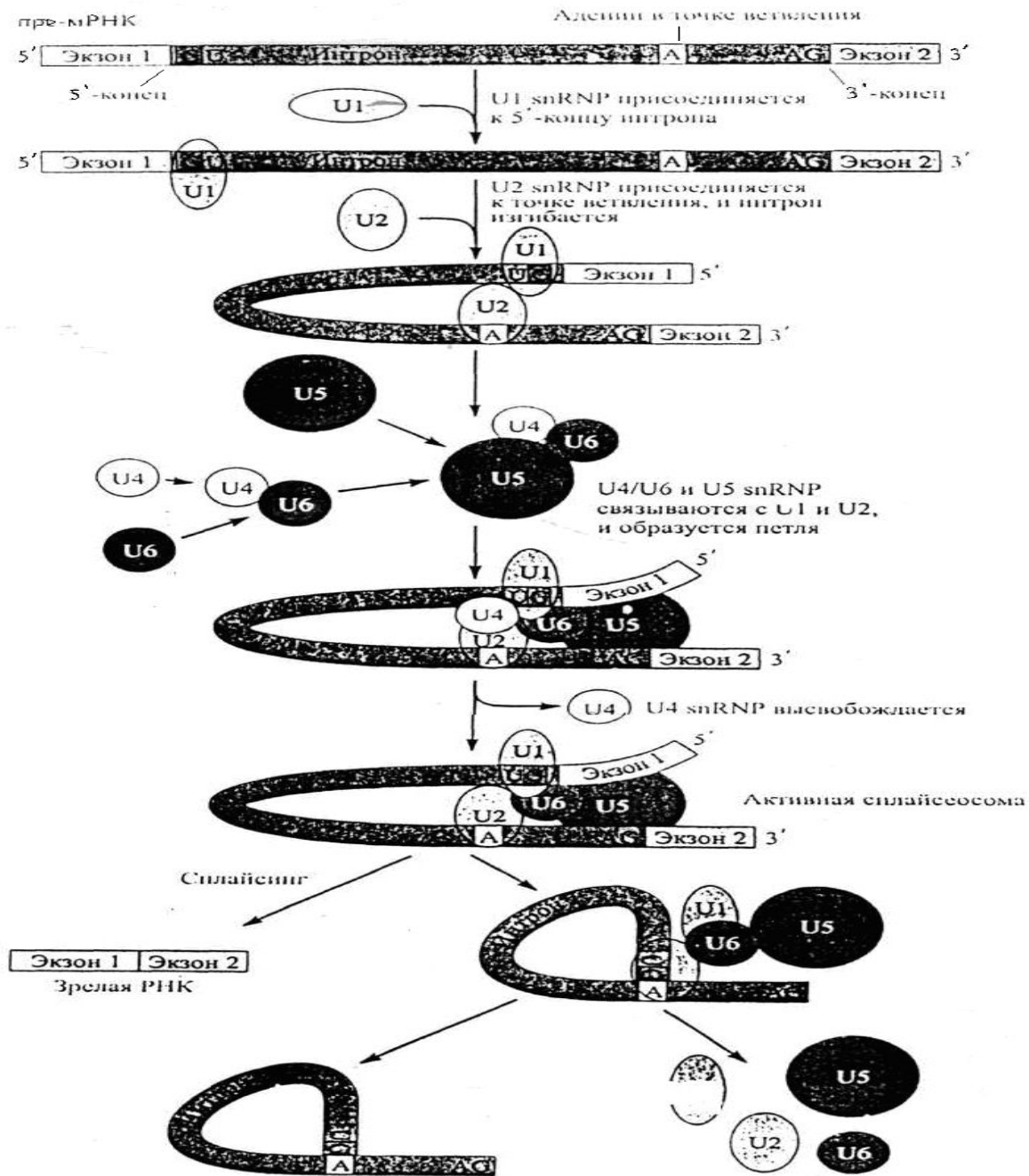


Схема возможных вариантов альтернативного сплайсинга

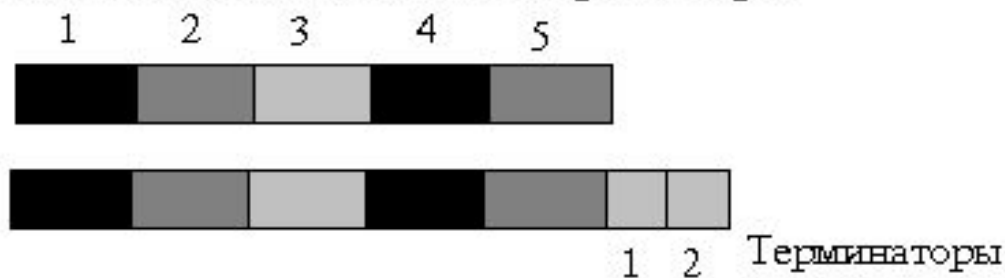
[Lewin, 1994. P.688]



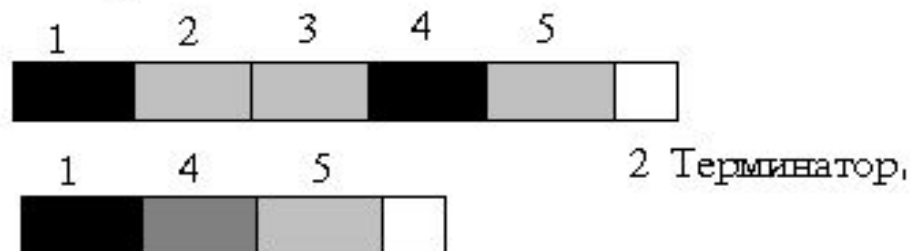
Использование альтернативных промоторов



Использование альтернативных терминаторов



Альтернативный сплайсинг



2 Терминатор

Аминокислоты, их условные обозначения (трех- и однобуквенные символы) и соответствующие им кодоны

A	Ala	Аланин	GCA GCC GCG GCU
C	Cys	Цистеин	UGC UGU
D	Asp	Аспарагиновая кислота	GAC GAU
E	Glu	Глутаминовая кислота	GAA GAG
F	Phe	Фенилаланин	UUC UUU
G	Gly	Глицин	GGA GGC GGG GGU
H	His	Гистидин	CAC CAU
I	Ile	Изолейцин	AUA AUC AUU
K	Lys	Лизин	AAA AAG
L	Leu	Лейцин	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
M	Met	Метионин	AUG
N	Asn	Аспарагин	AAC AAU
P	Pro	Пролин	CCA CCC CCG CCU
Q	Gln	Глутамин	CAA CAG
R	Arg	Аргинин	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
S	Ser	Серин	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
T	Tre	Треонин	ACA ACC ACG ACU
V	Val	Валин	GUA GUC GUG GUU
W	Trp	Триптофан	UGG
Y	Tyr	Тирозин	UAC UAU

Разрешенные комбинации оснований в гипотезе качания Крика (King, 1986)

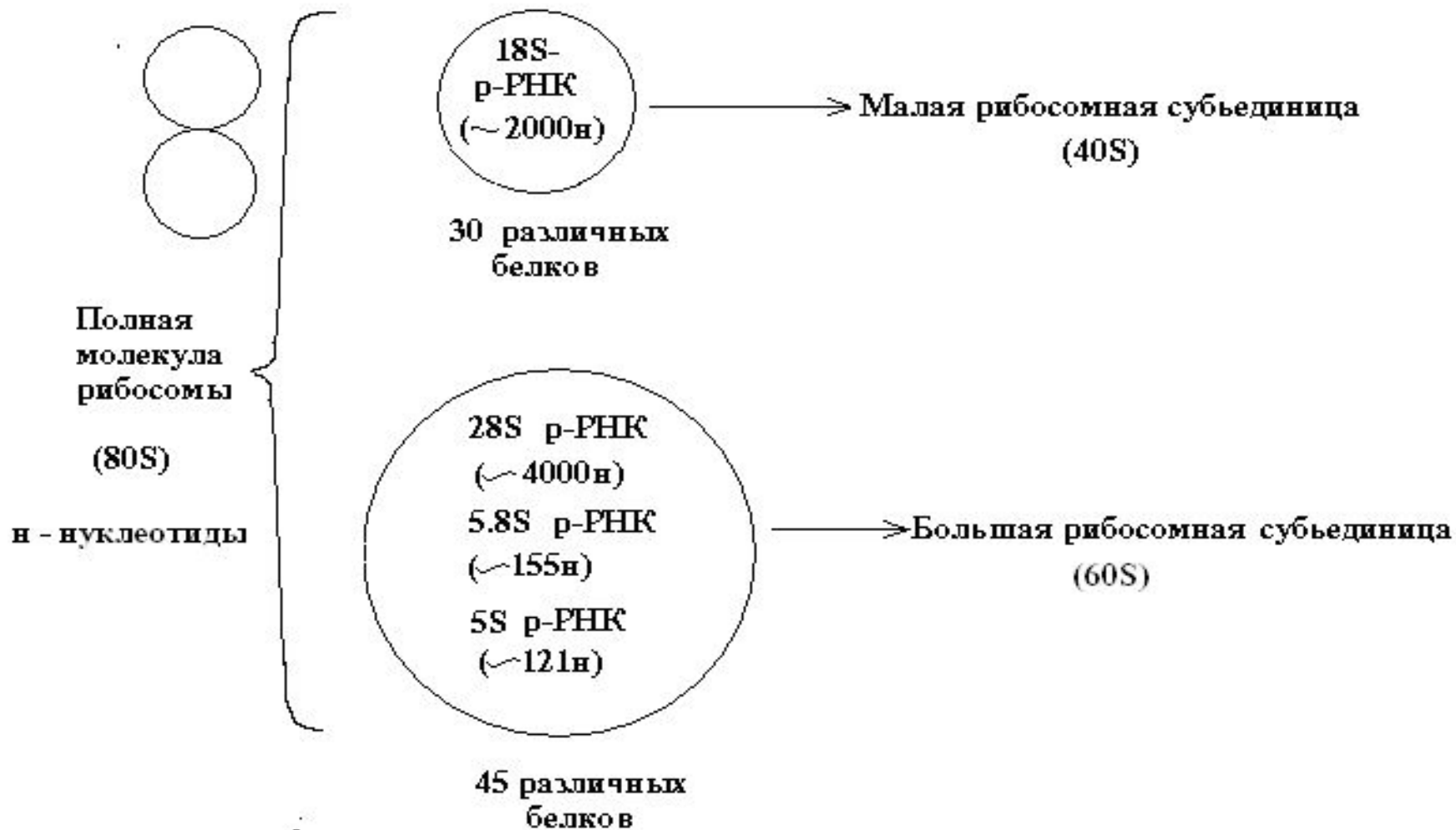
Основание в 5'- положении кодона (и- РНК)	Основание в 3'- положении антикодона (т-РНК)
Ц	Г
А	У
У	А или Г
Г	У, Ц или А
І	У, Ц или А

Отклонения от «универсального» генетического кода

Геном	Организм	Кодон	Универсальное значение	Обычное значение
Митохондрии	Позвоночные, дрозофила, дрожжи, плесени, трипаносомы	UGA	Stop	Trp
	Сахаромицеты	CUU CUC CUA CUG	Leu	Thr
		GGG	Arg	Trp
	Позвоночные дрозофила сахаромицеты	AUA	Ile	Met
	Морская звезда	AAA		Asn
	Позвоночные	AGA AGG	Arg	Stop
	Морская звезда, дрозофила	AGA AGA*	Arg	Ser
	Аскарида, нематода	UUG	Leu	Start
		AUU	Ile	Start
	Нематода	AUA	Ile	Start
	Млекопитающие	AUU AUC AUA	Ile	Start
	Ядро	Микоплазма	UGA	Stop
Цилиаты		UAA	Stop	Gln
Гриб кандиды цилиндрика		CUG	Leu	Ser

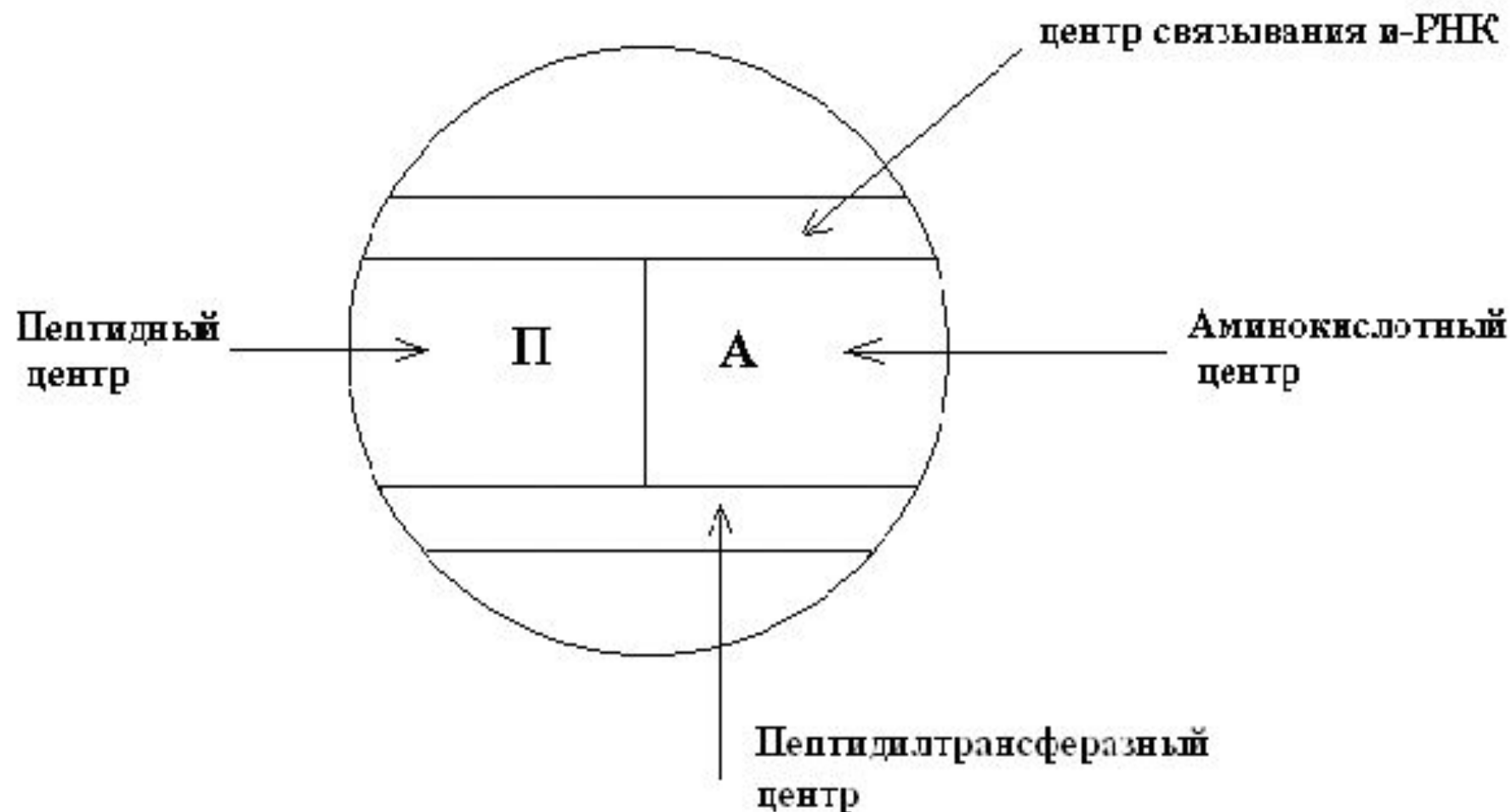
Примечание: A* - модифицированный аденин

Структура рибосомы эукариот

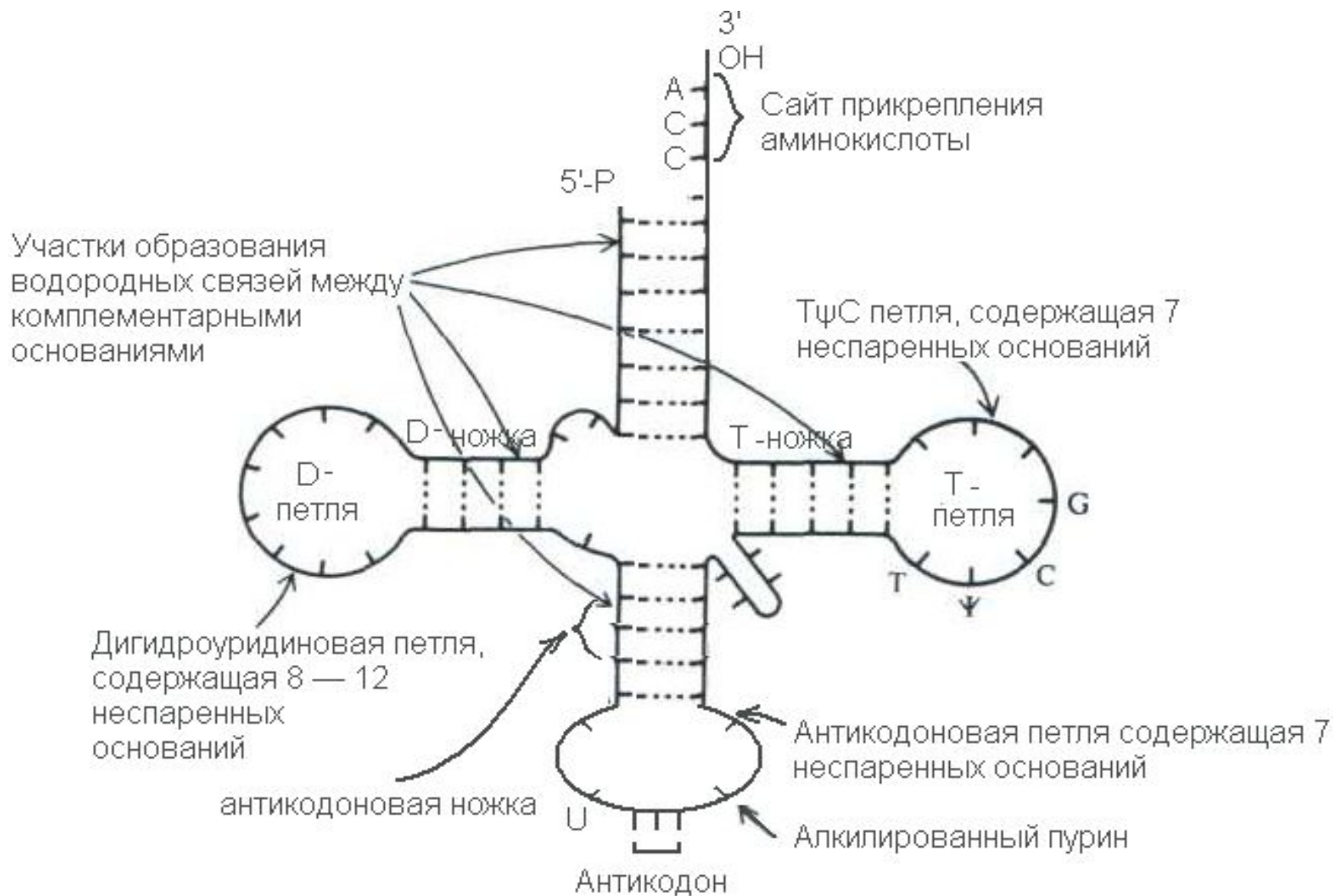


* - в скобках указано количество нуклеотидов, содержащихся в рибосомальных субъединицах (н)

Функциональные центры в большой рибосомальной субъединице

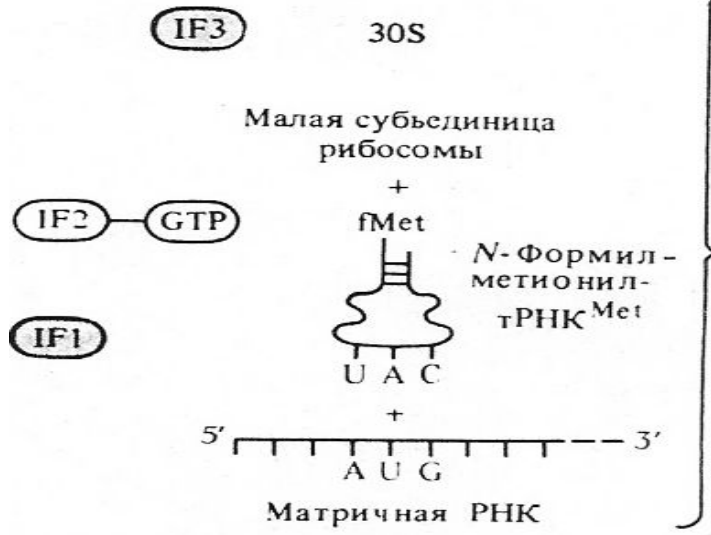


Типичная вторичная структура типа клеверного листа, характерная для молекул т-РНК.

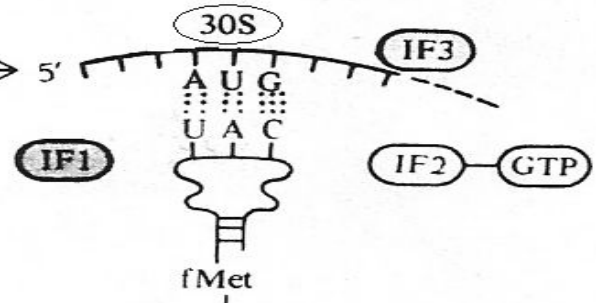


Инициация трансляции

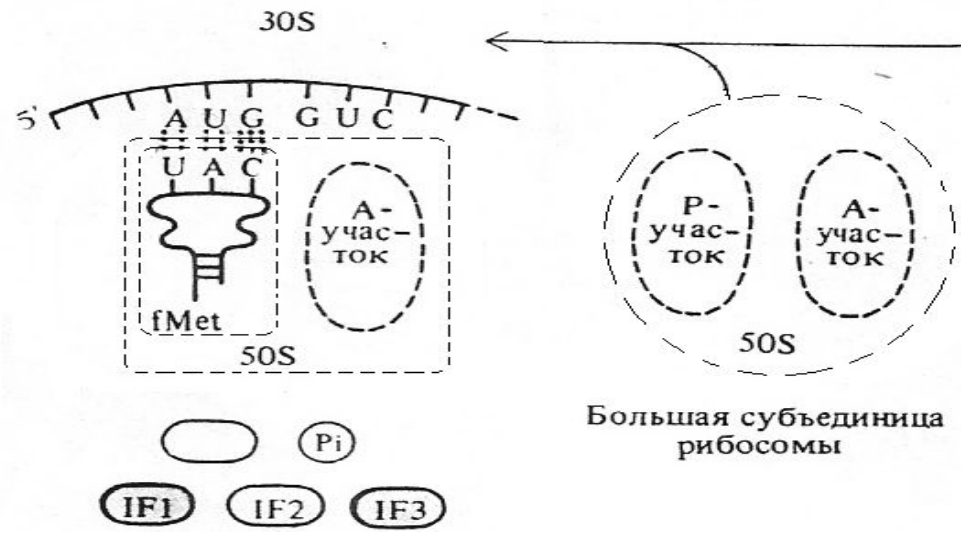
А Свободные компоненты
(преинициаторный комплекс)



Б Инициаторный комплекс

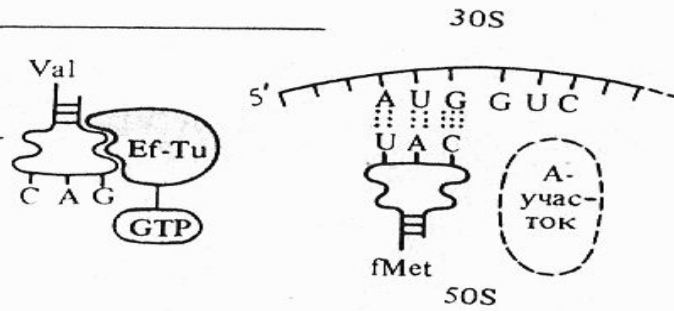


В Полностью собранная рибосома



Элонгация трансляции

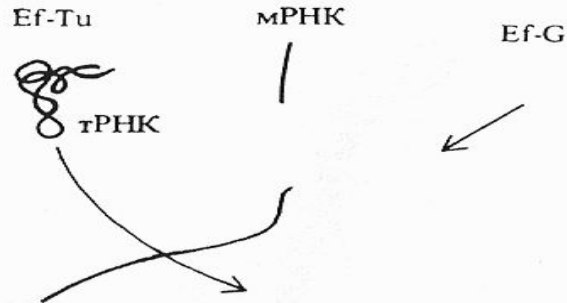
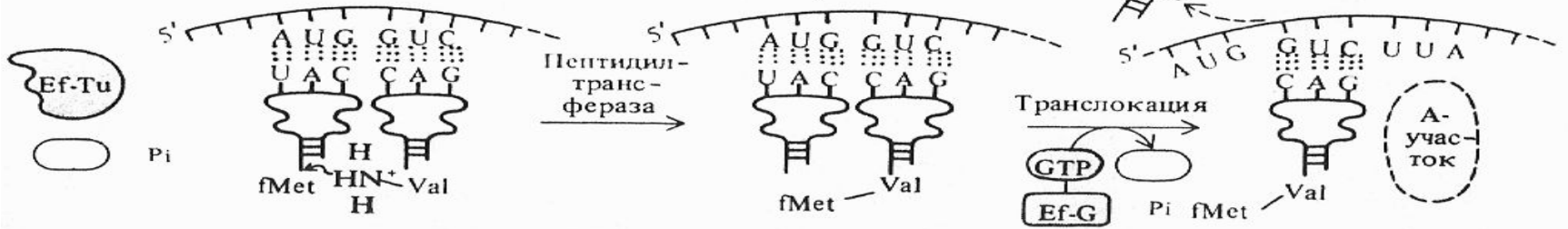
А Полностью собранная рибосома



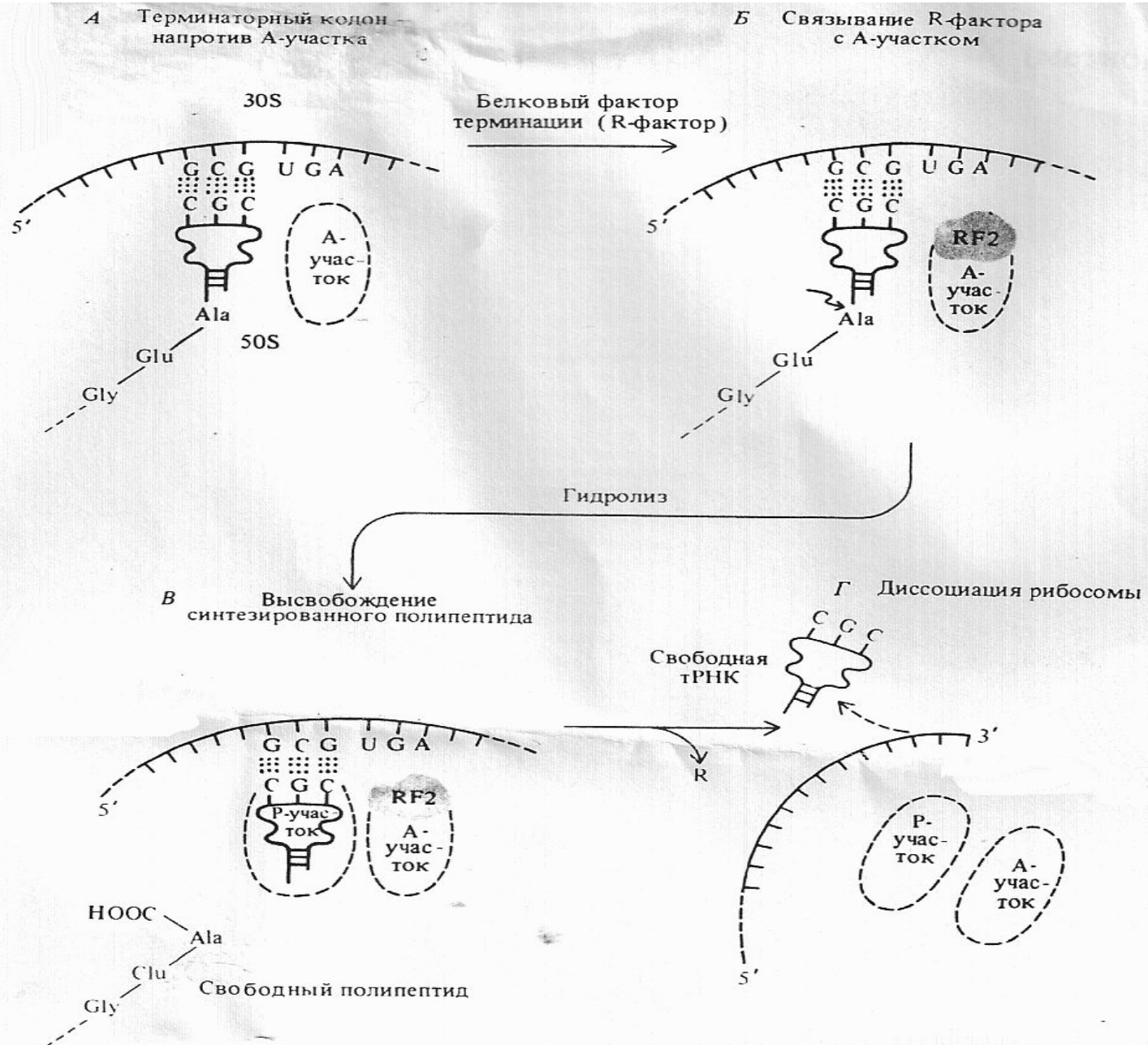
Б Заполнен А-участок

В Образовалась пептидная связь

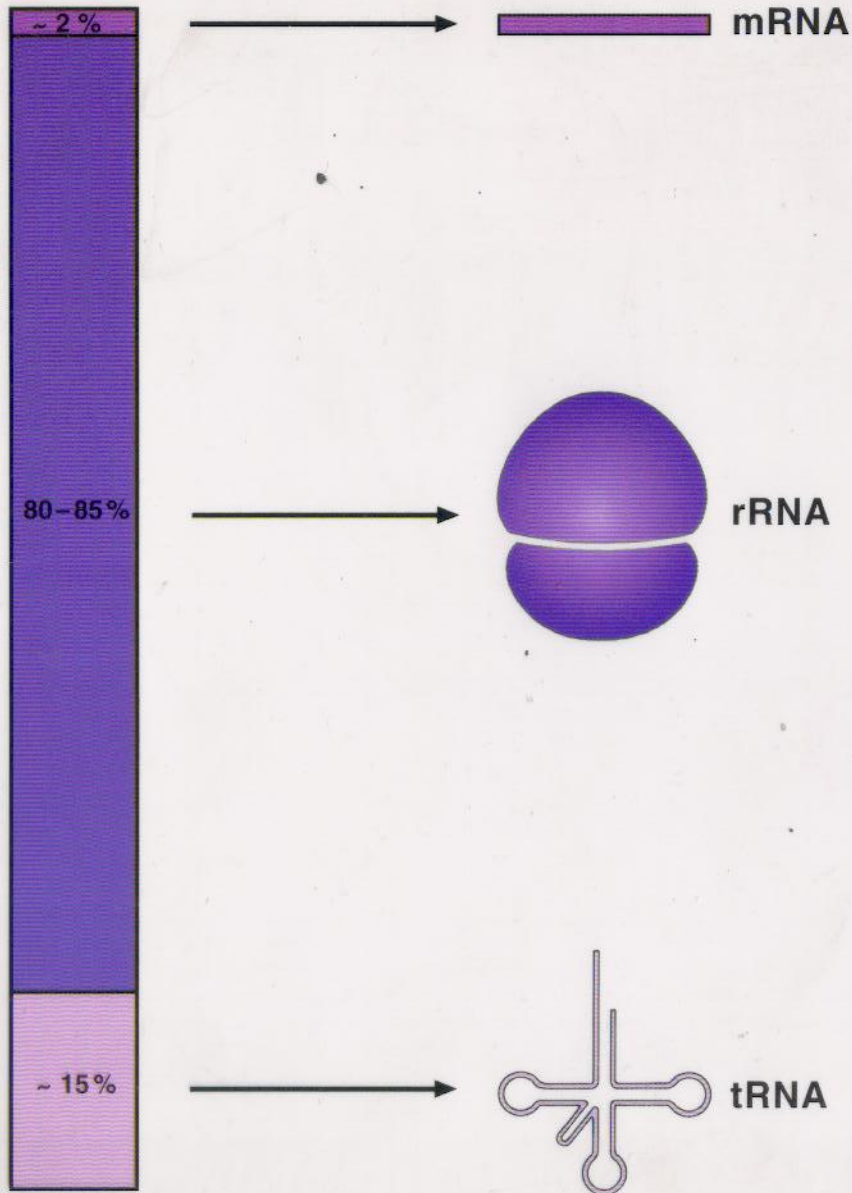
Г Осуществилась транслокация



Терминация трансляции



Kinds of RNA in the cell



a

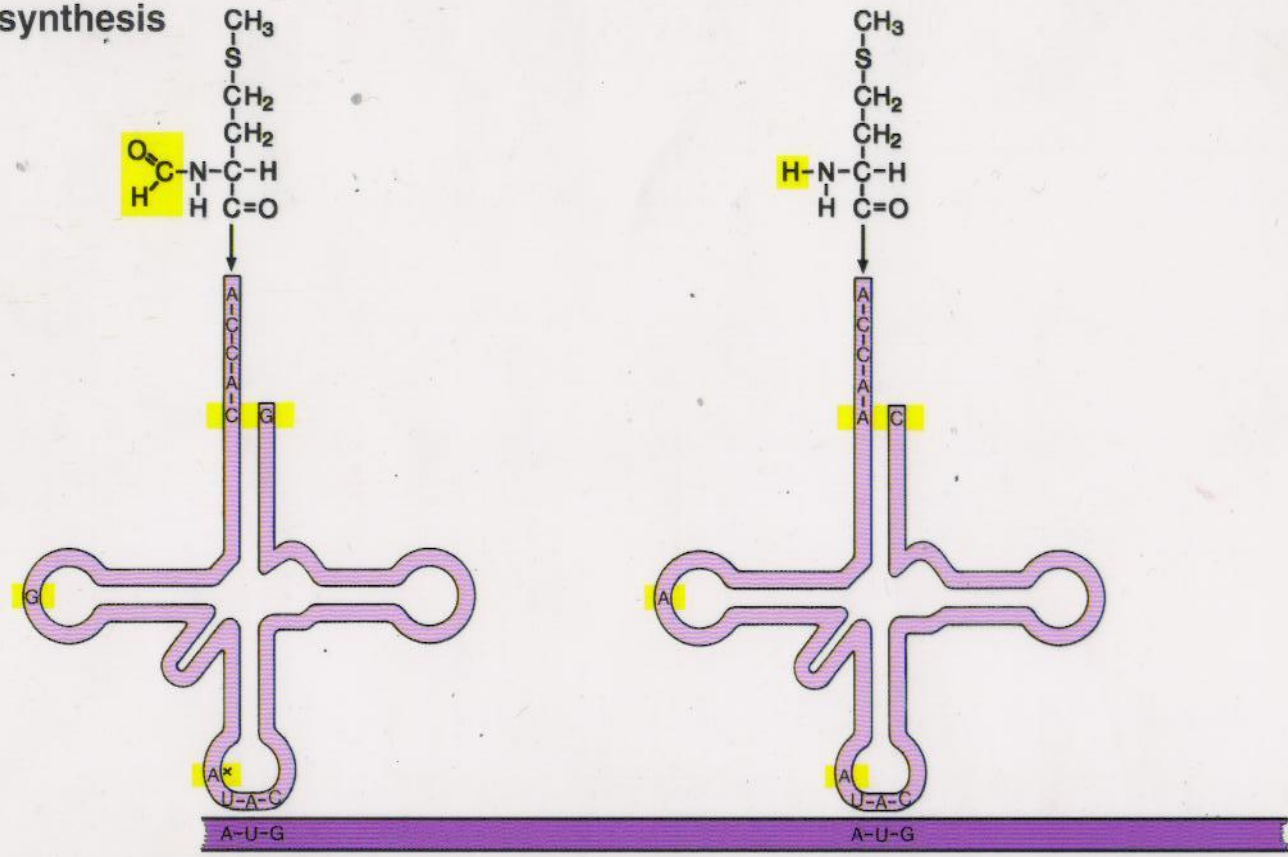
Experiments with artificial messengers

Poly-U <i>plus</i>	Impulses per mg protein & minute
Phenylalanine	38 800
Mixture of glycine, alanine, serine, asparagine, and glutamine	33

Phenylalanine <i>plus</i>	Impulses per mg protein & minute
Poly-U	39 800
Poly-A	50
Poly-C	38
No polyribonucleotide	44

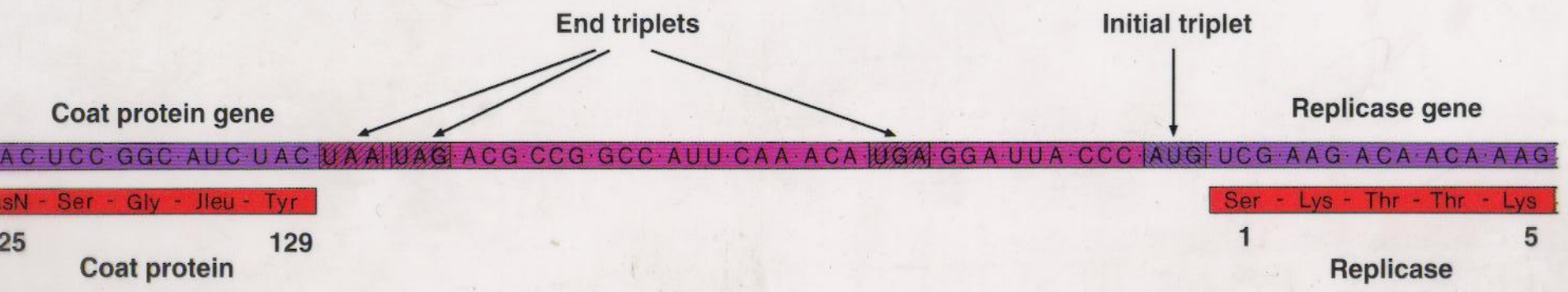
b

beginning of protein synthesis



a

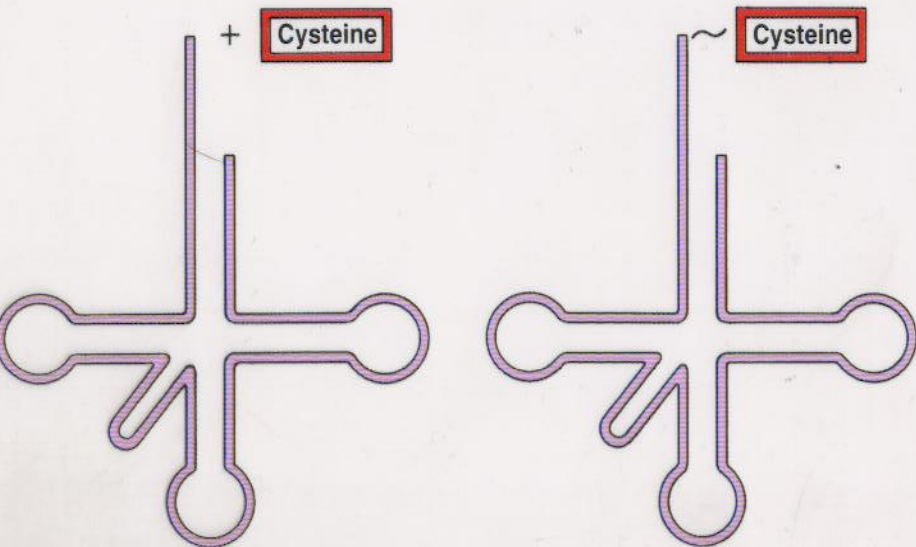
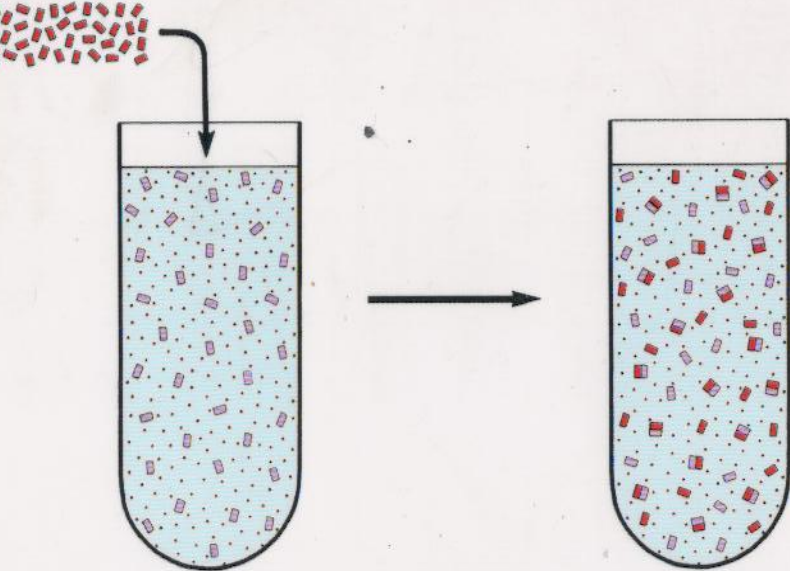
function of phage RNA



b

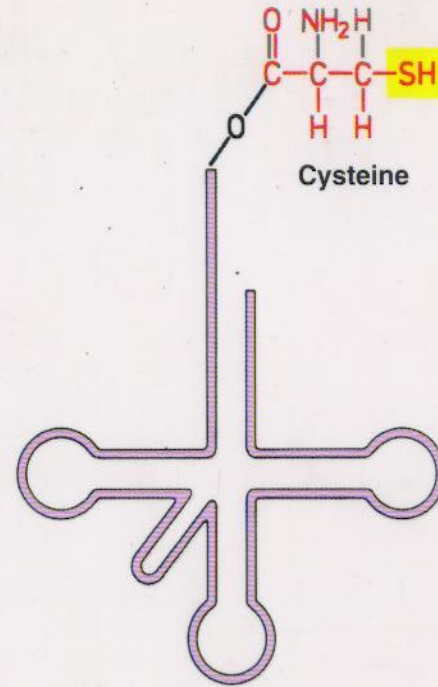
Amino acid -tRNA-complexes

Amino acids

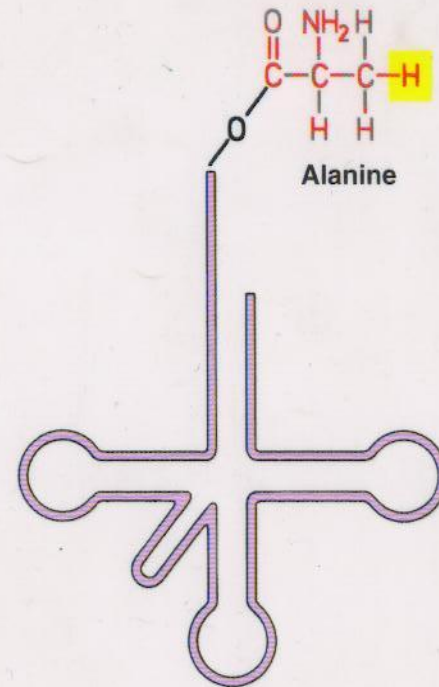


a

Specificity of tRNA



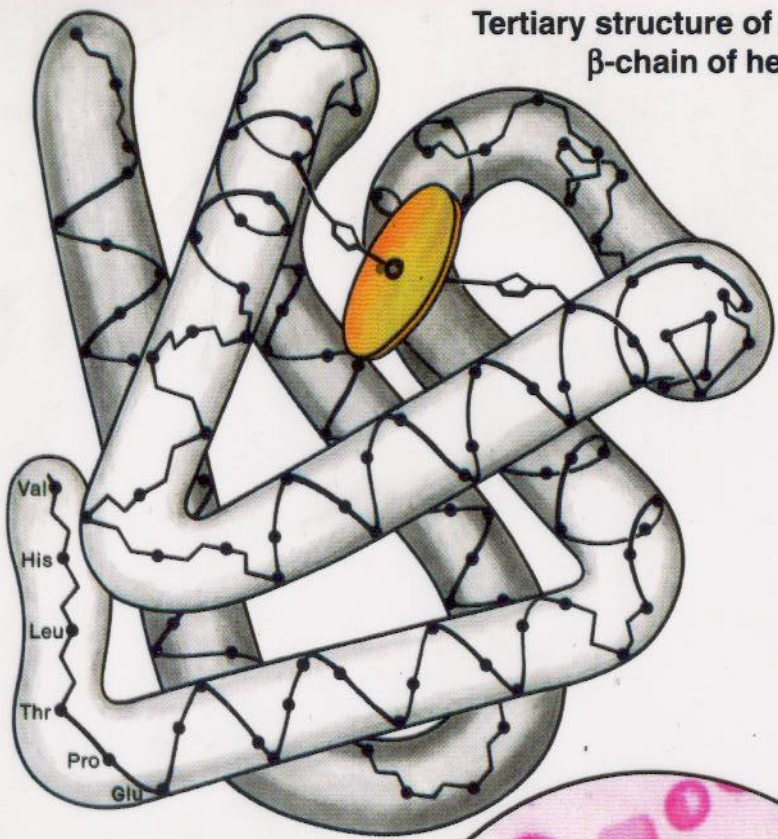
Cysteine-specific tRNA
with cysteine



Cysteine-specific tRNA
with alanine

b

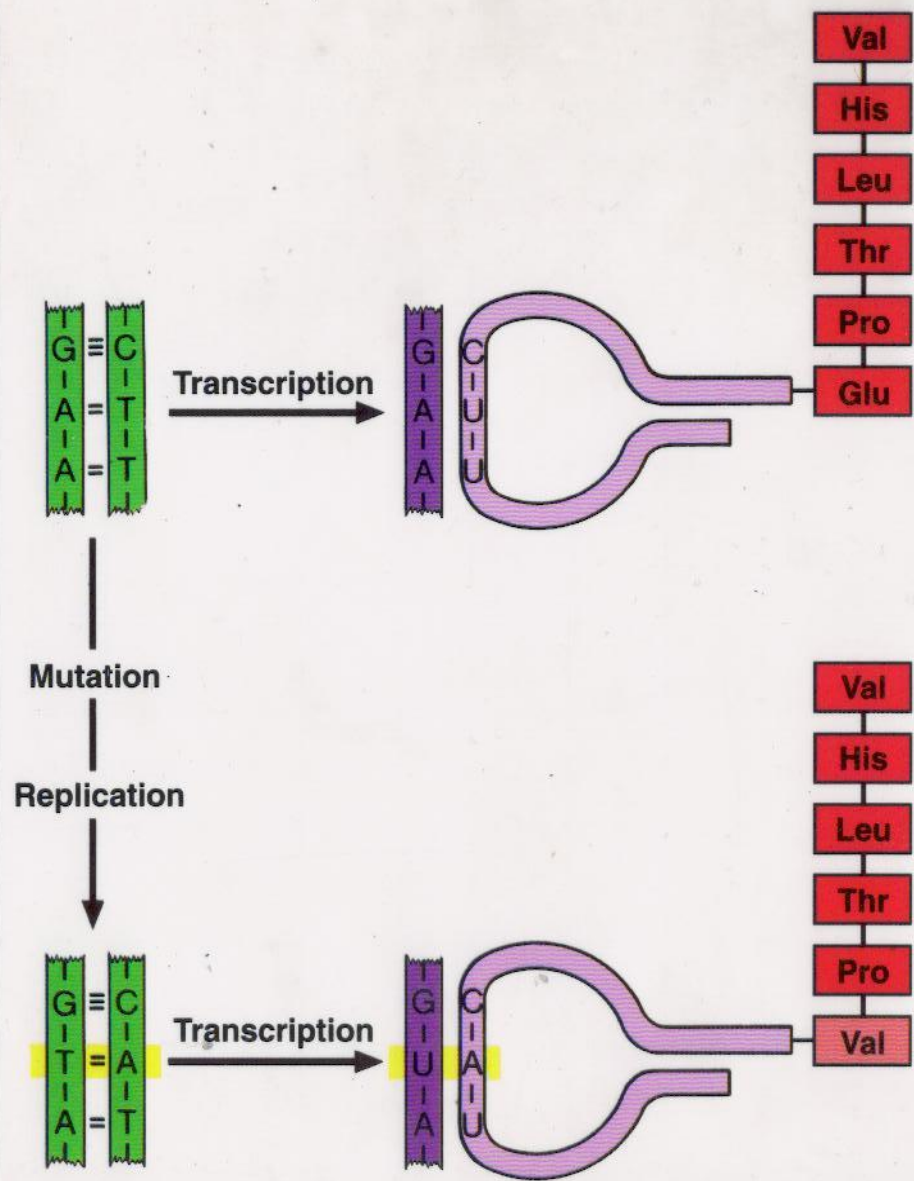
Tertiary structure of a protein:
β-chain of hemoglobin



Sickle cell anemia,
erythrocytes



Molecular interpretation

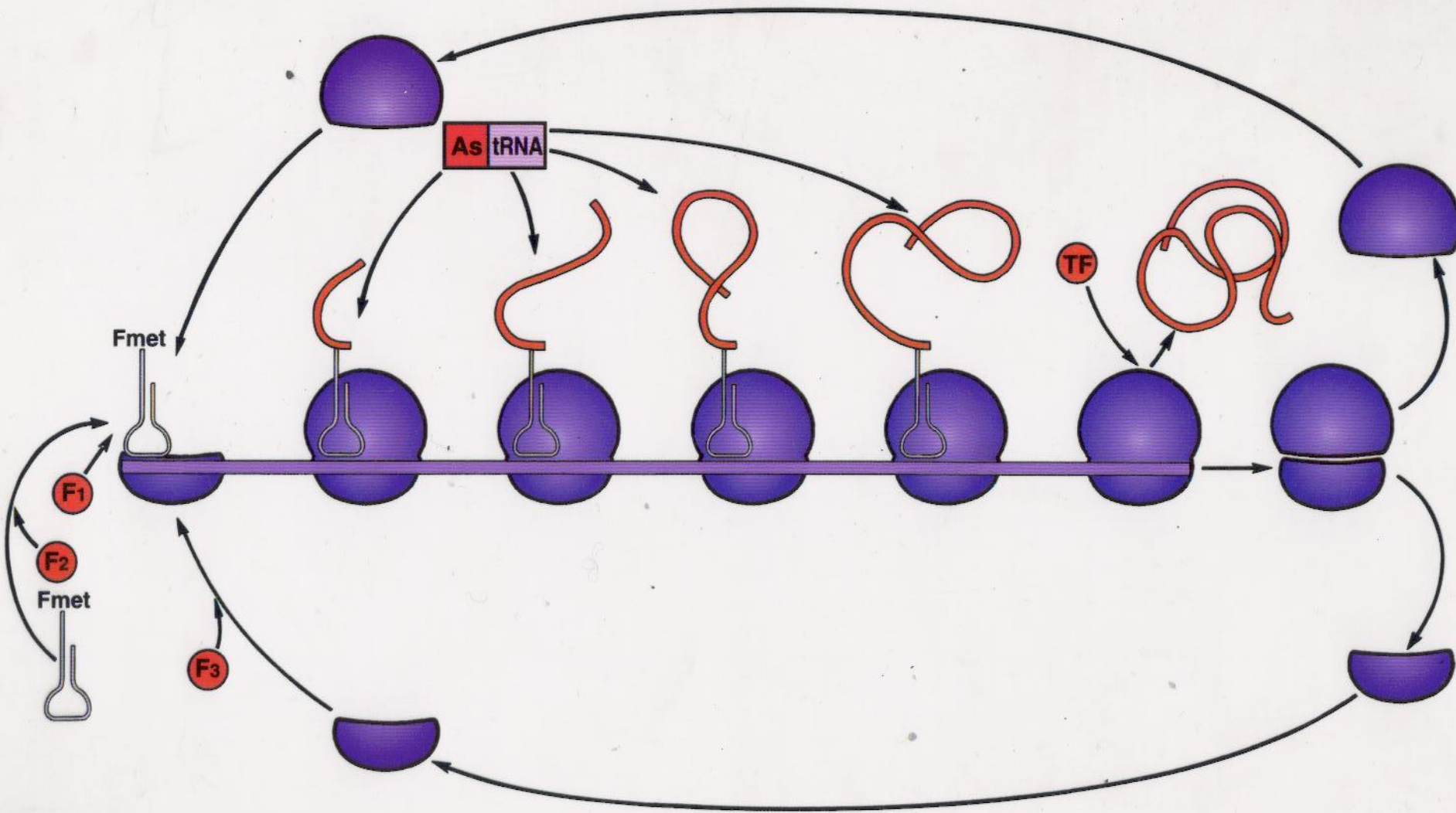


a

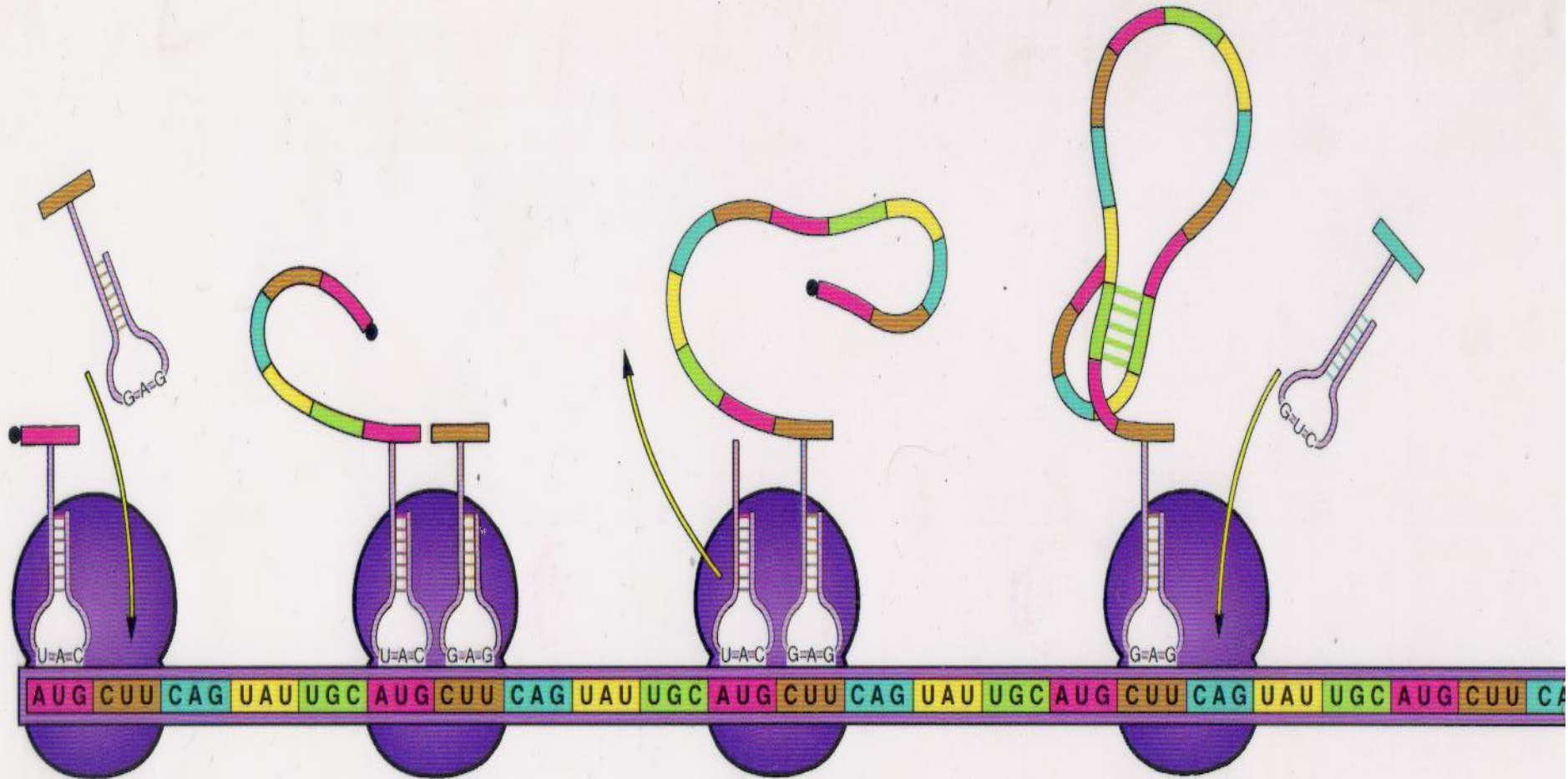
b

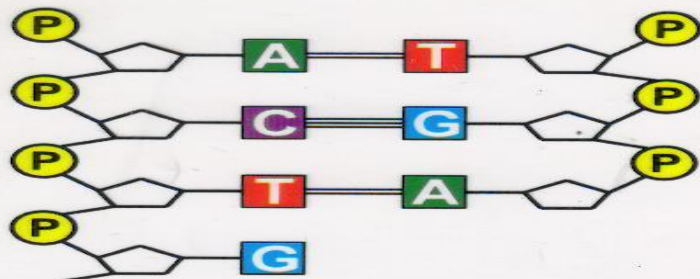
c

Protein-synthesizing complex I

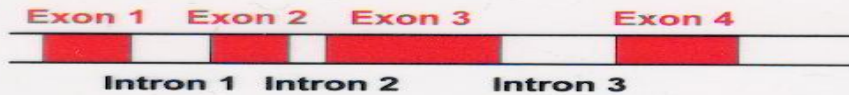


Protein-synthesizing complex II



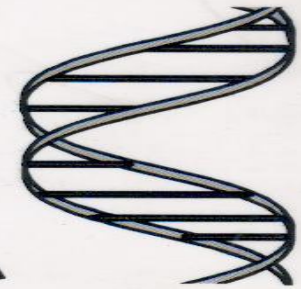


Grundstruktur der DNA
(komplementäre Basenpaarung)



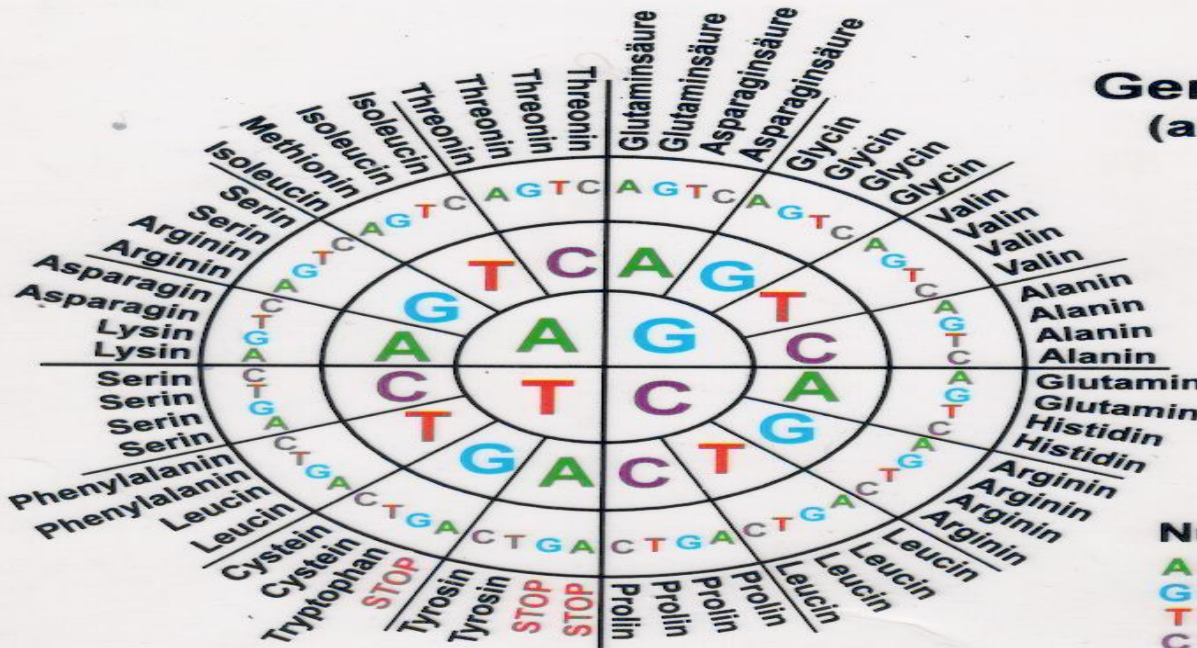
Aufbau eines Gens
(ein Gen kann aus tausenden Basenpaaren bestehen)

DNA-Doppelhelix



Chromosom
(auf einem Chromosom liegen tausende von Genen)

a

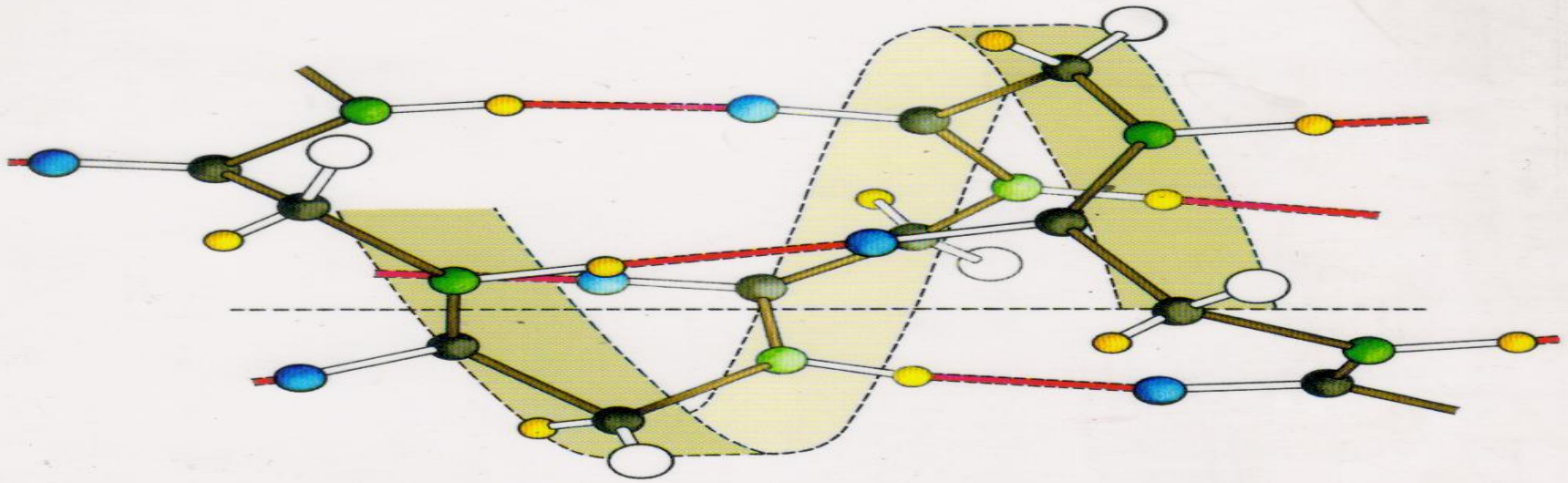


Genetischer Code
(auf cDNA-Ebene)

Nucleotidbausteine:
A = Adenin
G = Guanin
T = Thymin (in RNA Uracil)
C = Cytosin

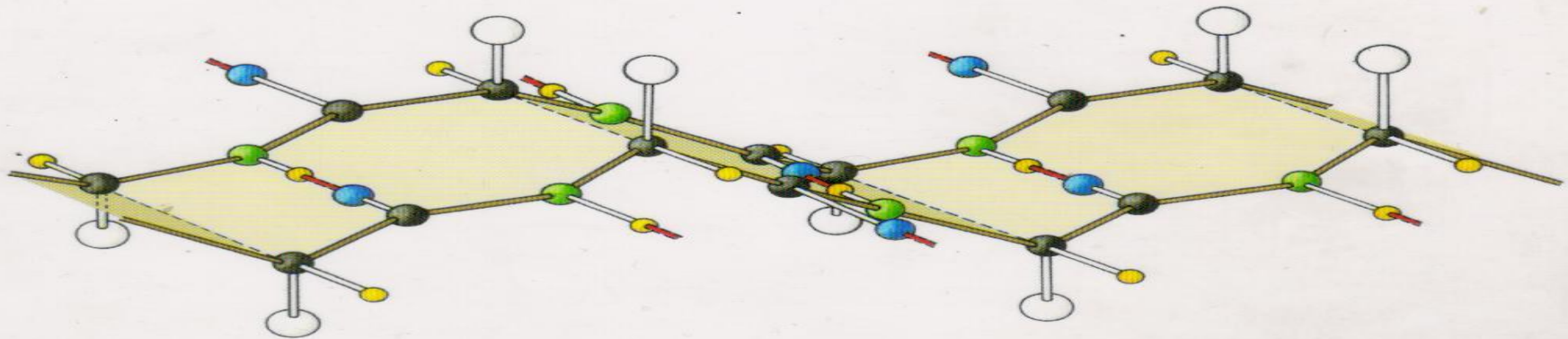
b

Secondary structure of proteins: α -helix



a

Secondary structure of proteins: β -pleated sheath



b

Литература:

1. Албертс Б., Брей Д. и др. Молекулярная биология клетки. М., 1994.
2. Введение в молекулярную медицину. Под ред. Пальцева М.А. М., 2004.
3. Генетика. Под ред. Иванова В.И. М., 2006.
4. Гинтер Е.К. Медицинская генетика. М., 2003.
5. Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология. М., 1983.
6. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М., 1987.
7. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск, 2006.
8. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. М., 1989.
9. Казымбет П.К., Мироедова Э.П. Биология. Астана, 2006.
10. Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология. М., 2005.
11. Льюин Б. Гены. М., 1997.
12. Медицинская биология и генетика. Под ред. проф. Куандыкова Е.У. Алматы, 2004.
13. Муминов Т.А., Куандыков Е.У. Основы молекулярной биологии (курс лекций). Алматы, 2007.
14. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М., 2003.
15. Уилсон Дж., Хант Т. Молекулярная биология клетки. Сборник задач. М., 1994.
16. Фаллер Д.М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. М., 2003.

Контрольные вопросы (обратная связь):

1. Типы переноса наследственной информации.
2. Принципы репликации.
3. Особенности репликации ведущей и отстающей цепи ДНК.
4. Особенности транскрипции эукариотических генов.
5. Что такое процессинг, сплайсинг?
6. Что представляет собой альтернативный сплайсинг и его значение.
7. Свойства генетического кода.
8. Особенности трансляции у прокариот.
9. Особенности трансляции генов у эукариот.