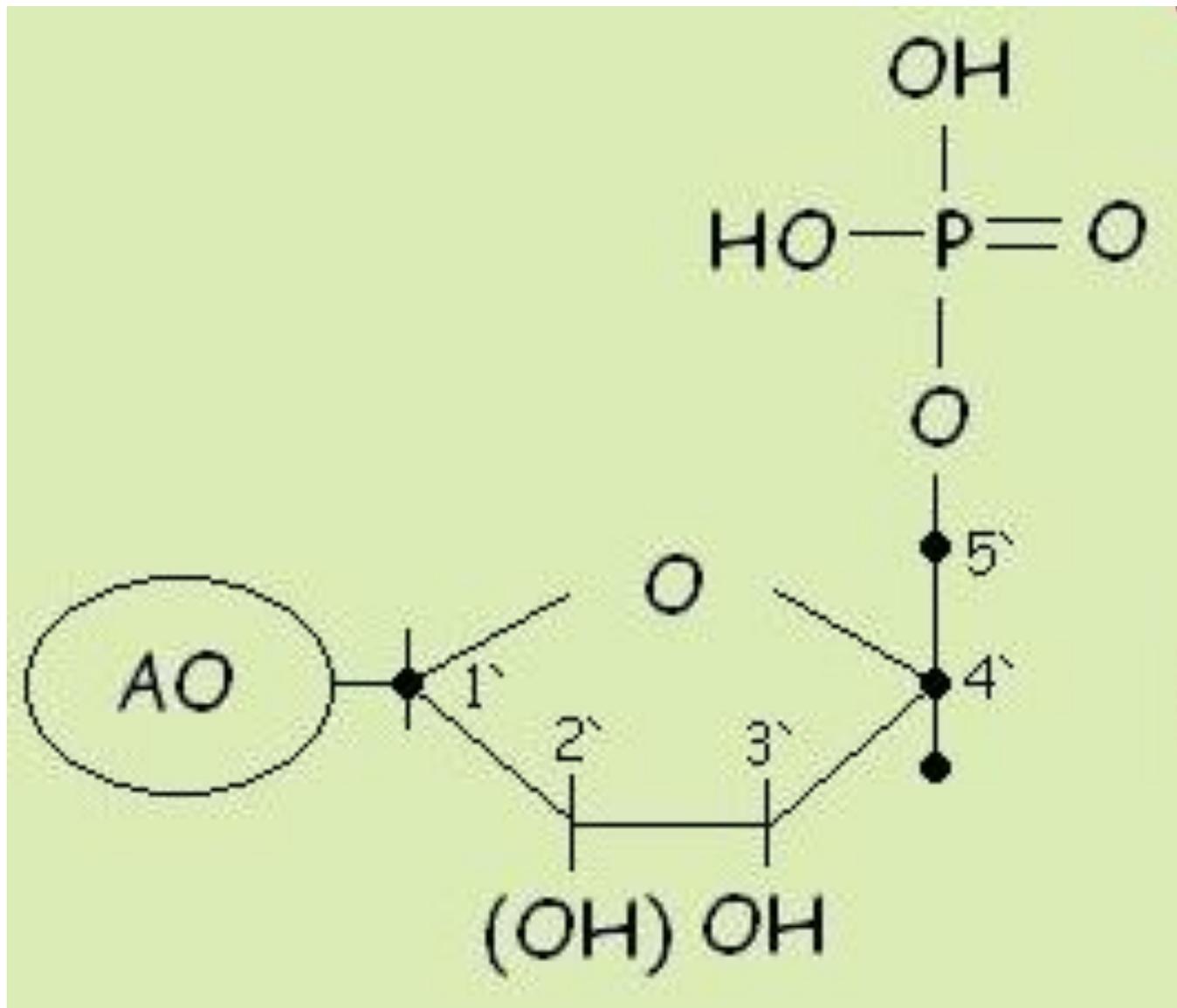


# Основы молекулярной биологии клетки

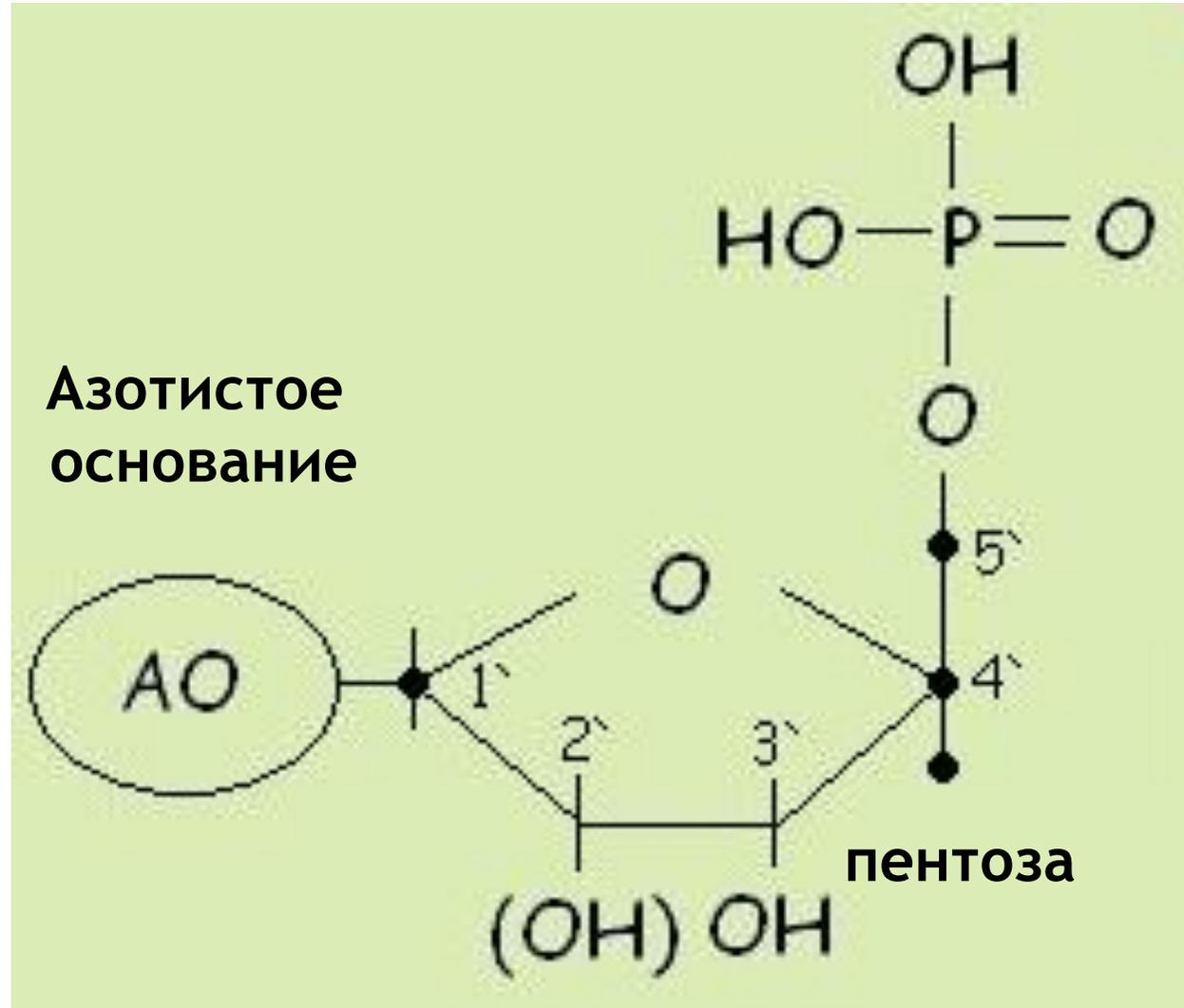
# Что такое молекулярная биология?

- ▶ Жизнь — способ существования биополимеров, из которых основными являются белки и нуклеиновые кислоты.
- ▶ Молекулярная биология исследует основные свойства и проявления жизни на молекулярном уровне. Выясняет, каким образом и в какой мере рост и развитие организмов, хранение и передача наследственной информации, превращение энергии в живых клетках и другие явления обусловлены структурой и свойствами биологически важных макромолекул (главным образом белков и нуклеиновых кислот).
- ▶ Отличительная черта молекулярной биологии — изучение явлений жизни на неживых объектах или таких объектах, которым присущи самые примитивные проявления жизни.

**Как называется вещество  
и из каких частей состоит?**



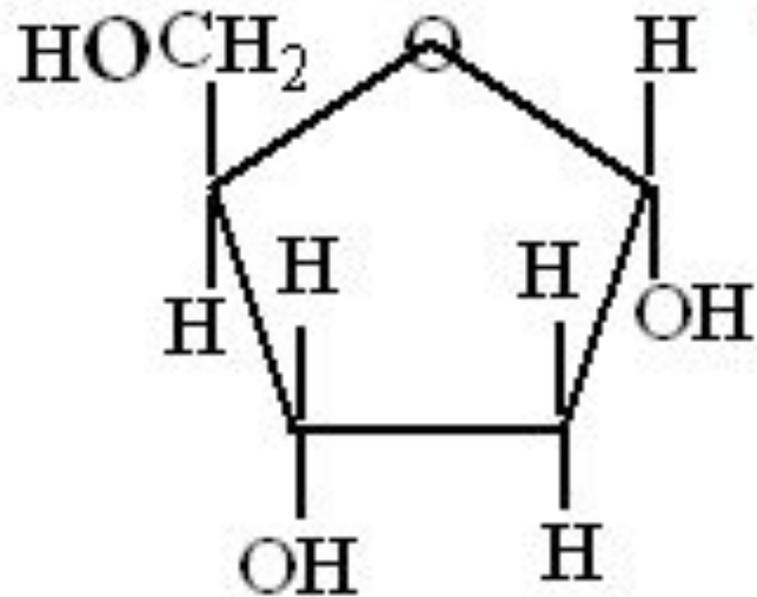
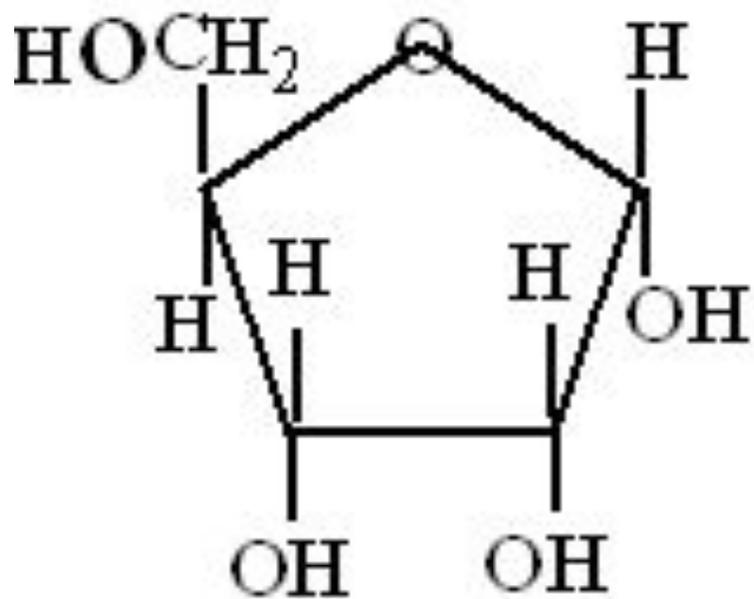
# НУКЛЕОТИД



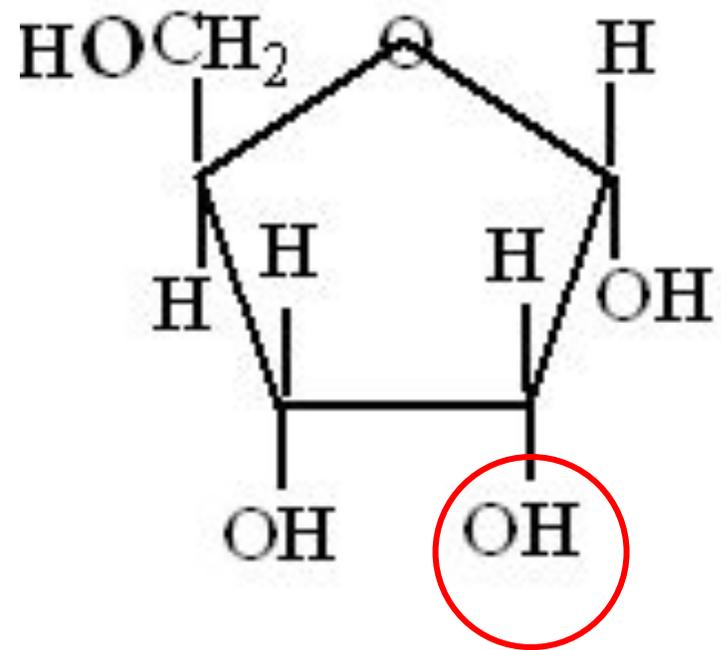
Азотистое  
основание

Остаток  
фосфорной  
кислоты

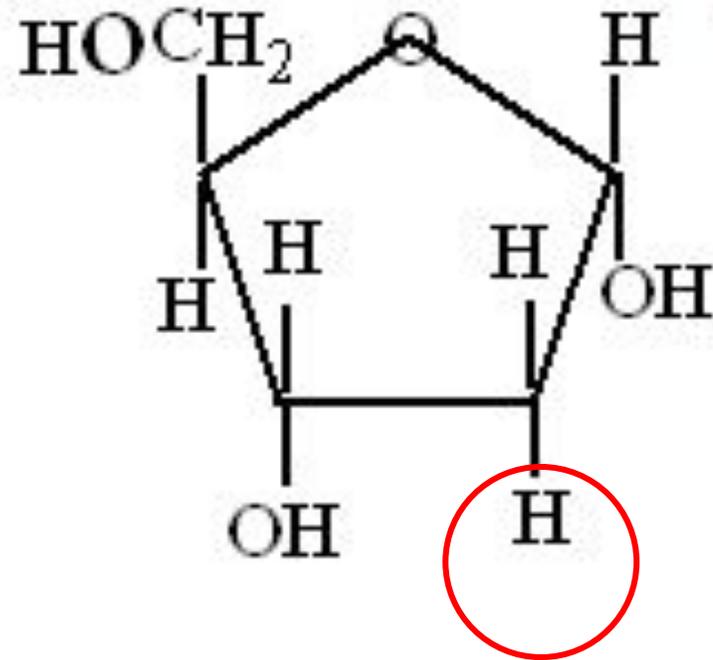
**Какие вещества  
представлены  
и чем они отличаются?**



Рибоза



Дезоксирибоза



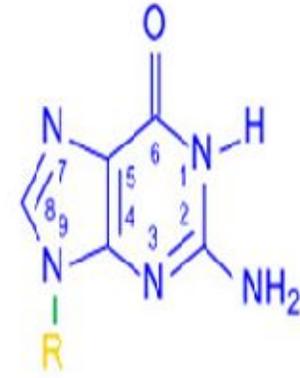
# Нуклеиновые кислоты

- ▶ Нуклеиновые кислоты выполняют генетическую функцию (ДНК) и участвуют в реализации генетической информации (РНК).
- ▶ Молекулы ДНК и РНК сходны по строению. Это полинуклеотиды (нуклеотид–мономер), отличающиеся по углеводу (рибоза и дезоксирибоза) и одному из четырех азотистых оснований (Т-ДНК; У-РНК).
- ▶ ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, а РНК — из одной.

# Пурины



Аденин

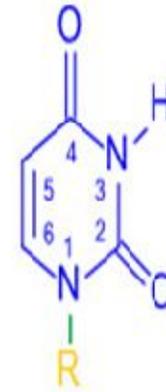


Гуанин

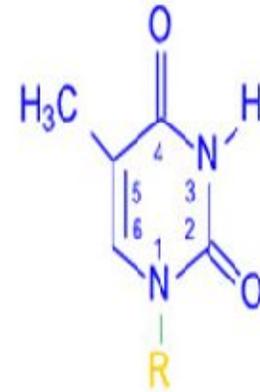
# Пиримидины



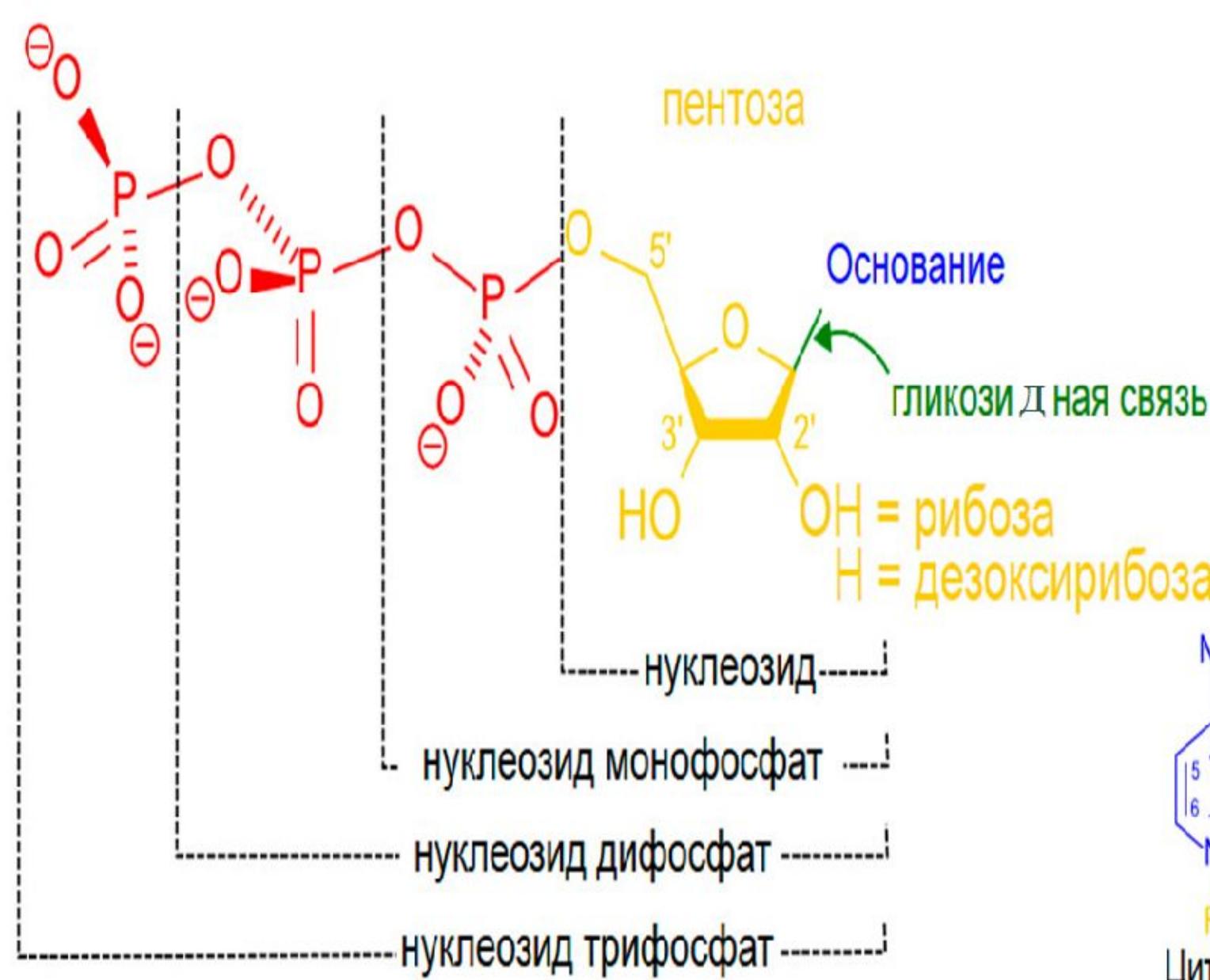
Цитозин



Урацил



Тимин



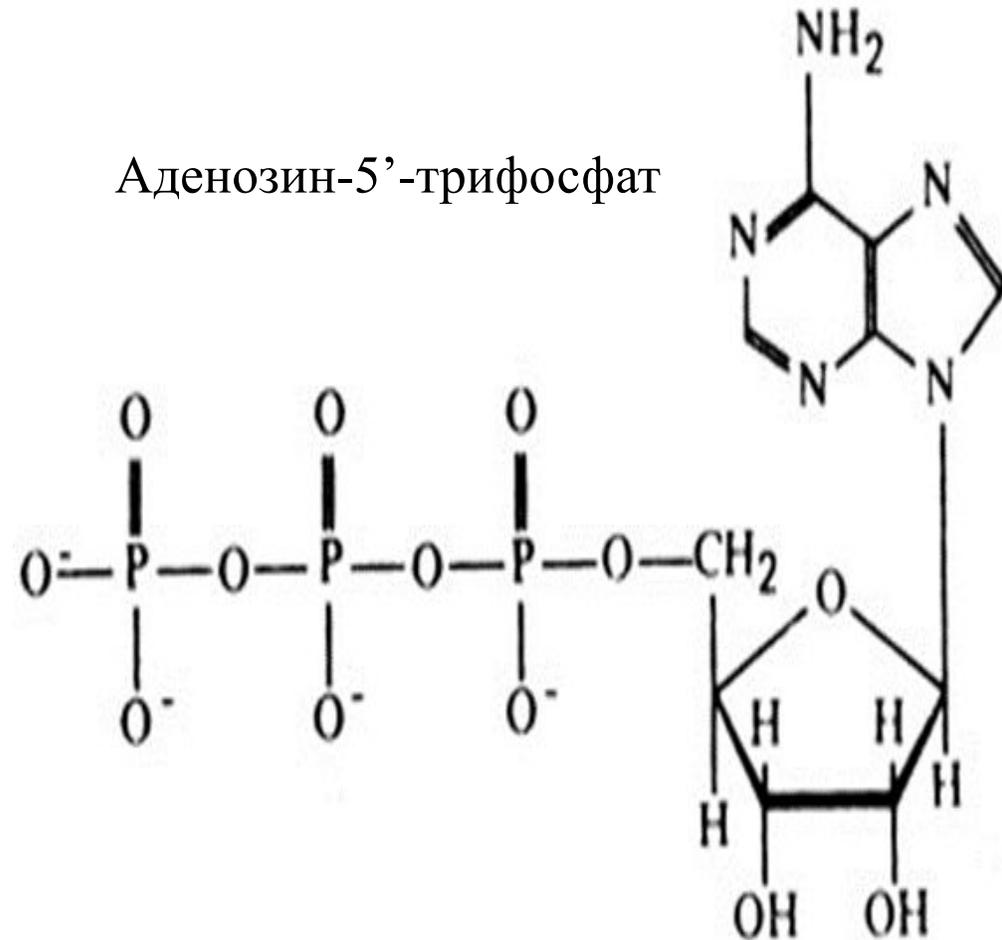
# СВЯЗИ В НУКЛЕОТИДАХ

- ▶ Гликозидная связь— это тип ковалентной связи, которая соединяет молекулу сахара с другой молекулой. Гликозидная связь образуется между полуацетальной группой сахара и гидроксильной группой органического соединения, например, спирта. В нуклеозидах и нуклеотидах N-гликозидная связь - это связь между 1-м углеродным атомом сахара - пентозы и атомом N1 пиримидина (1.52 A) или N9(1.46 A) пурина. N-гликозидная связь имеет бета- конфигурацию.
- ▶ Фосфодиэфирная связь — высокоэнергетическая совокупность ковалентных связей, образуемая атомом фосфора в фосфатной группе и двумя молекулами посредством двух эфирных связей.

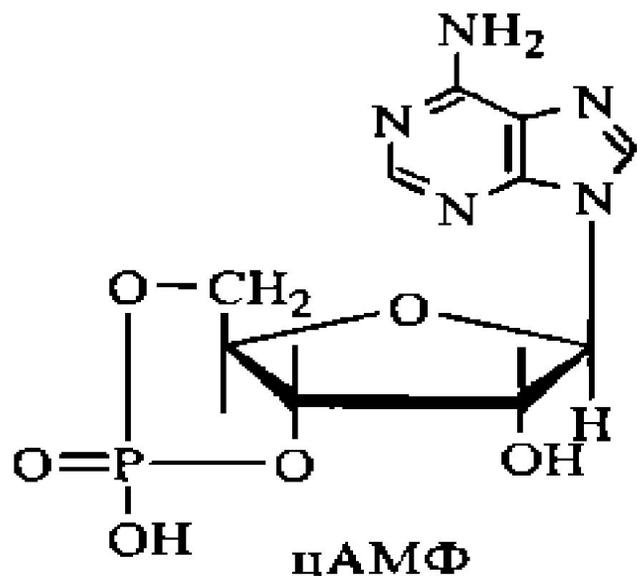
# Производные нуклеотидов

- ▶ Нуклеотиды, помимо того, что являются мономерами ДНК и РНК, участвуют в большом количестве других важных функций:
  1. Служат источником энергии в реакциях по переносу фосфатных групп-АТФ;
  2. Являются простетической группировкой ферментов-NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FAD, coA;
  3. Контролируют ряд ферментативных процессов посредством аллостерических влияний на соответствующие ферменты;
  4. Являются предшественниками в биосинтетических процессах.

Аденозин-5'-трифосфат

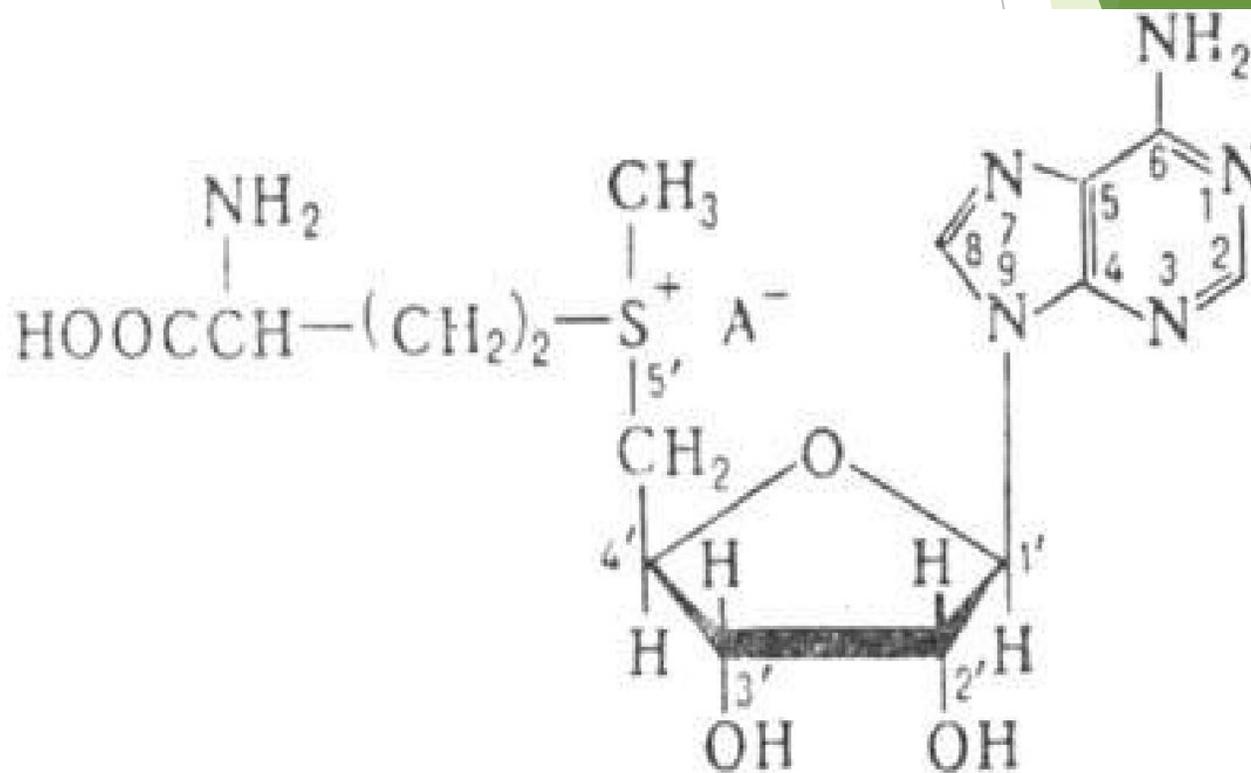


# Примеры. Производные аденозина

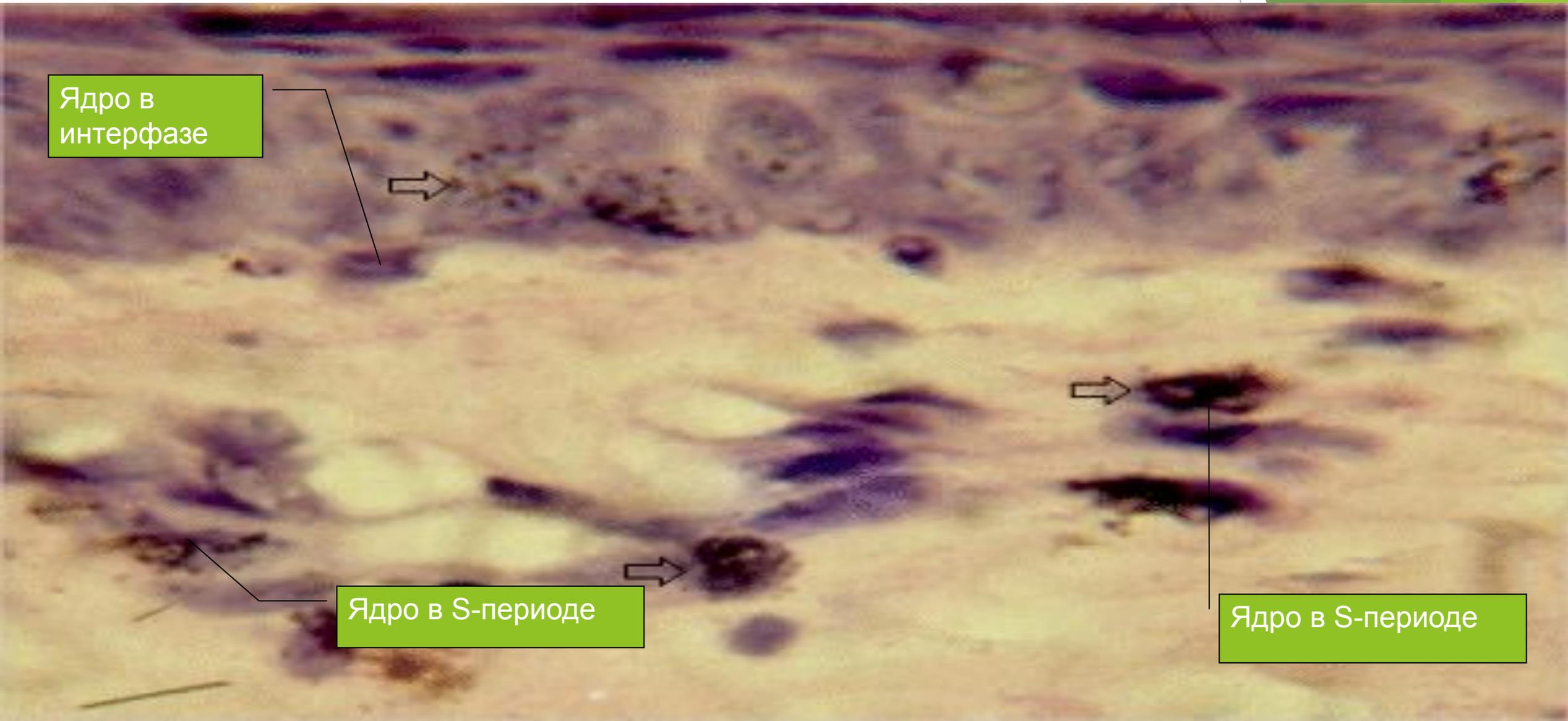


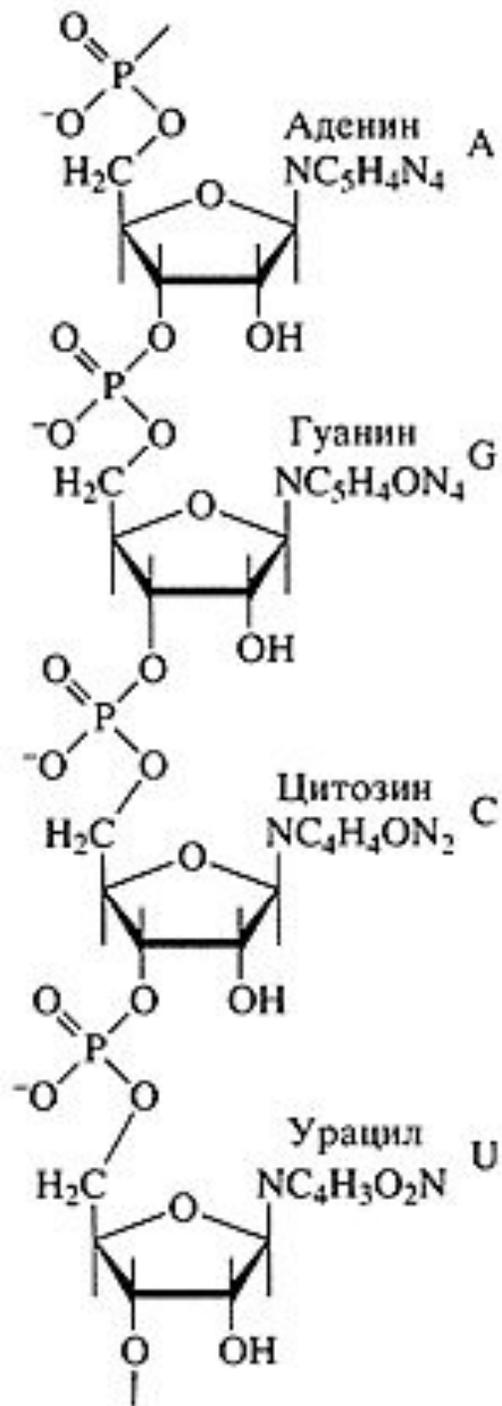
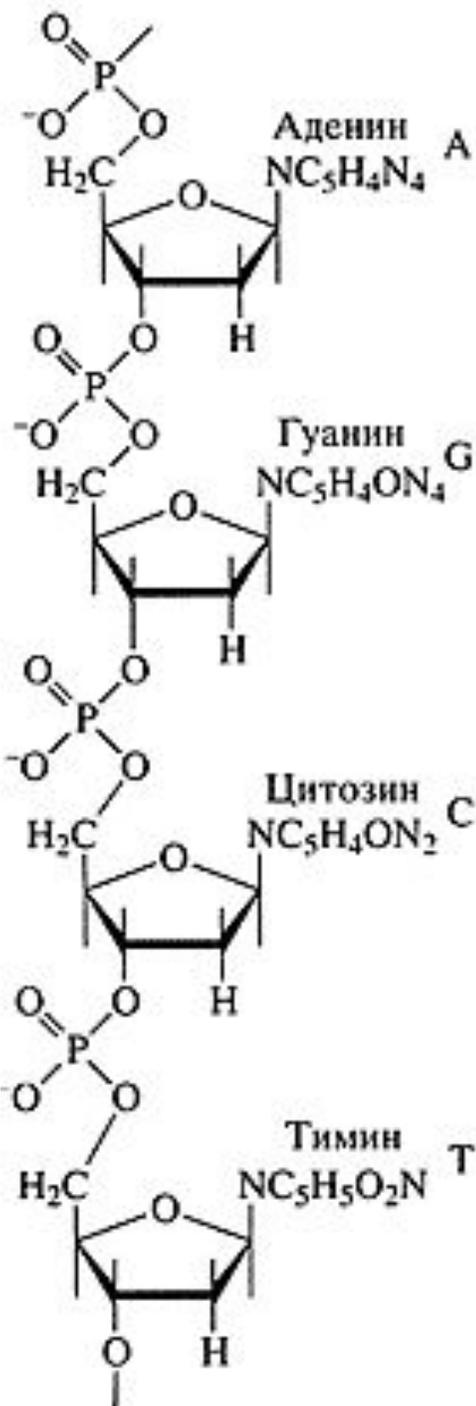
- ▶ Циклический АМФ-производная аденозина участвующая в передаче сигнала с поверхности клетки на внутриклеточные белки путем фосфорилирования. цАМФ также способен взаимодействовать с белками ионных каналов, регулируя их активность.

- ▶ S-аденозилметионин-активная форма метионина, служит донором метильных групп в реакциях метилирования и источником пропиламина в синтезе полиаминов (путресцин-регенерация клеток).



Препарат . **Метод авторадиографии с введением <sup>3</sup>H-тимидина (кожа спины крысы)**. Черные точки - зерна восстановленного серебра, являющиеся показателями включения в ядра тимидина, меченного по тритию.





Какие вещества  
 представлены  
 и чем они отличаются?

дезоксирибоза

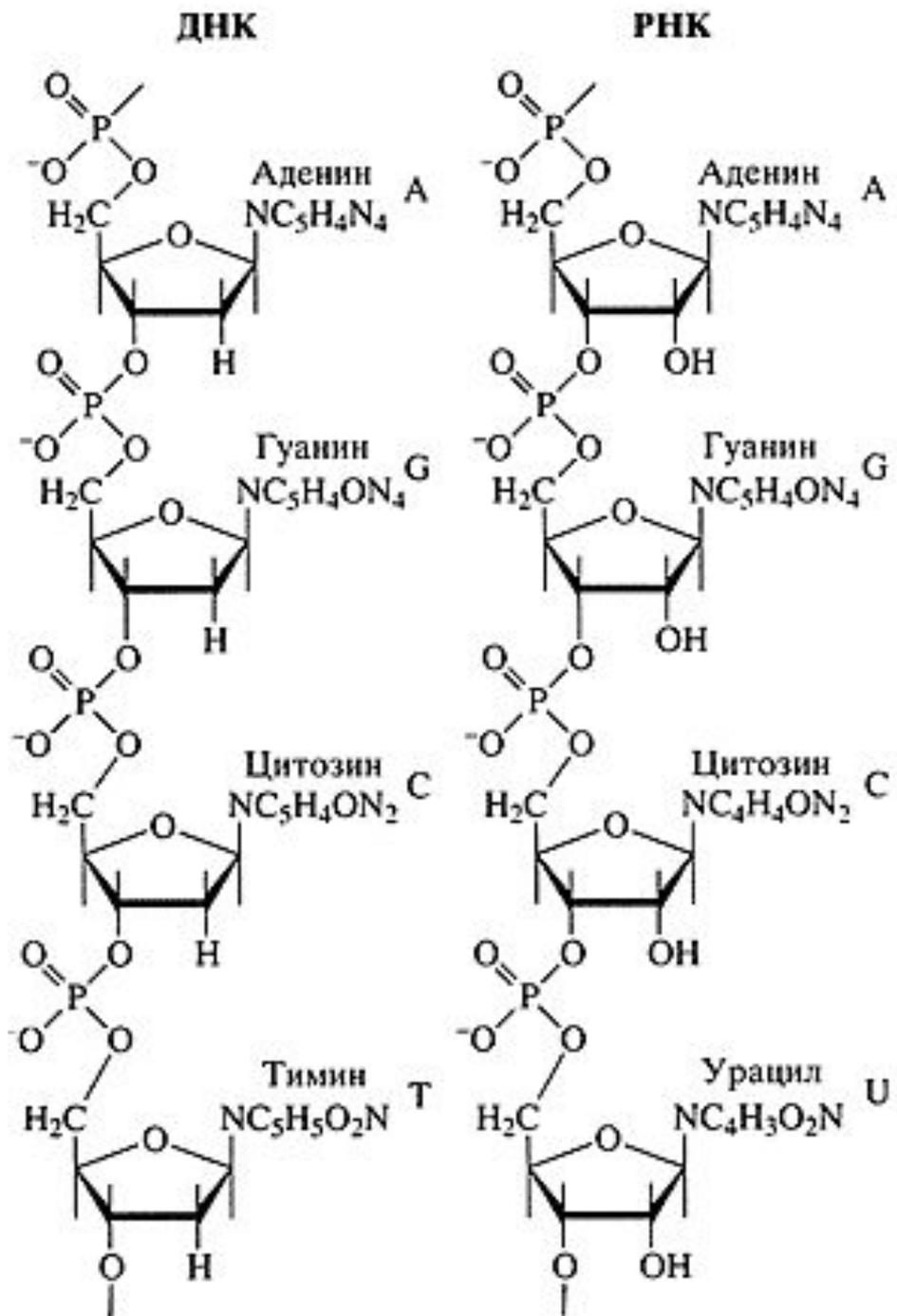
Азотистые  
основания:

Тимин

Аденин

Цитозин

Гуанин



рибоза

Азотистые  
основания:

Урацил

Аденин

Цитозин

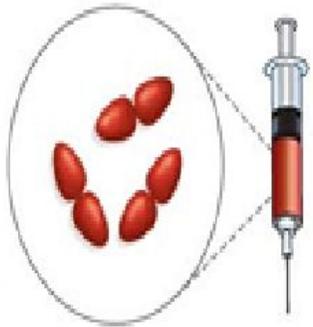
Гуанин

# Историческая справка

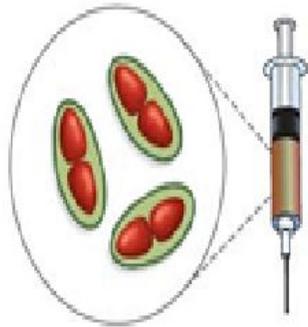
- ▶ ДНК открыта в 1868 г швейцарским врачом *И. Ф. Мишером* в клеточных ядрах лейкоцитов, отсюда и название – нуклеиновая кислота (лат. «*nucleus*» - ядро). В 20-30-х годах XX в. определили, что ДНК – полимер (полинуклеотид), в эукариотических клетках сосредоточенный в хромосомах. Предполагали, что ДНК играет структурную роль.
- ▶ В 20-30-х годах XX века Э. Чаргаф сформулировал два правила, получивших его имя. Первое правило касалось специфического баланса пуриновых и пиримидиновых остатков в ДНК. Второе правило указывало на видоспецифичность нуклеотидного состава ДНК.
- ▶ В 1928 году Фредерик Гриффит, доказывает, что бактерии способны передавать генетическую информацию по механизму трансформации.
- ▶ В 1944 году Освальда Эвери, Колин Маклауд и Маклин Маккарти по средствам химического анализа доводят до конца эксперимент Гриффита и доказывают, что веществом, вызывающим трансформацию бактерий, является ДНК. Это явилось первым материальным доказательством роли ДНК в наследственности.

# Эксперимент Гриффита на пневмококках

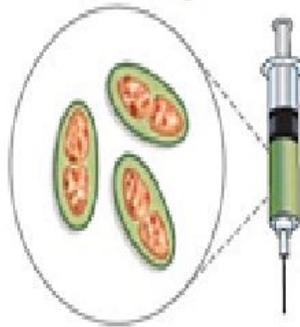
II-R штамм



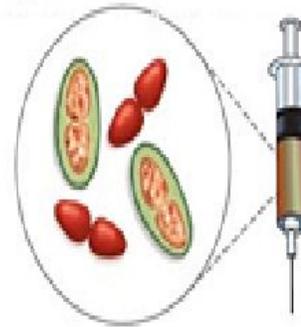
III-S штамм



Клетки III-S штамма, убитые нагревом



II-R штамм + убитые нагревом III-S бактерии



Мыши выжили



Мыши погибли



Мыши выжили

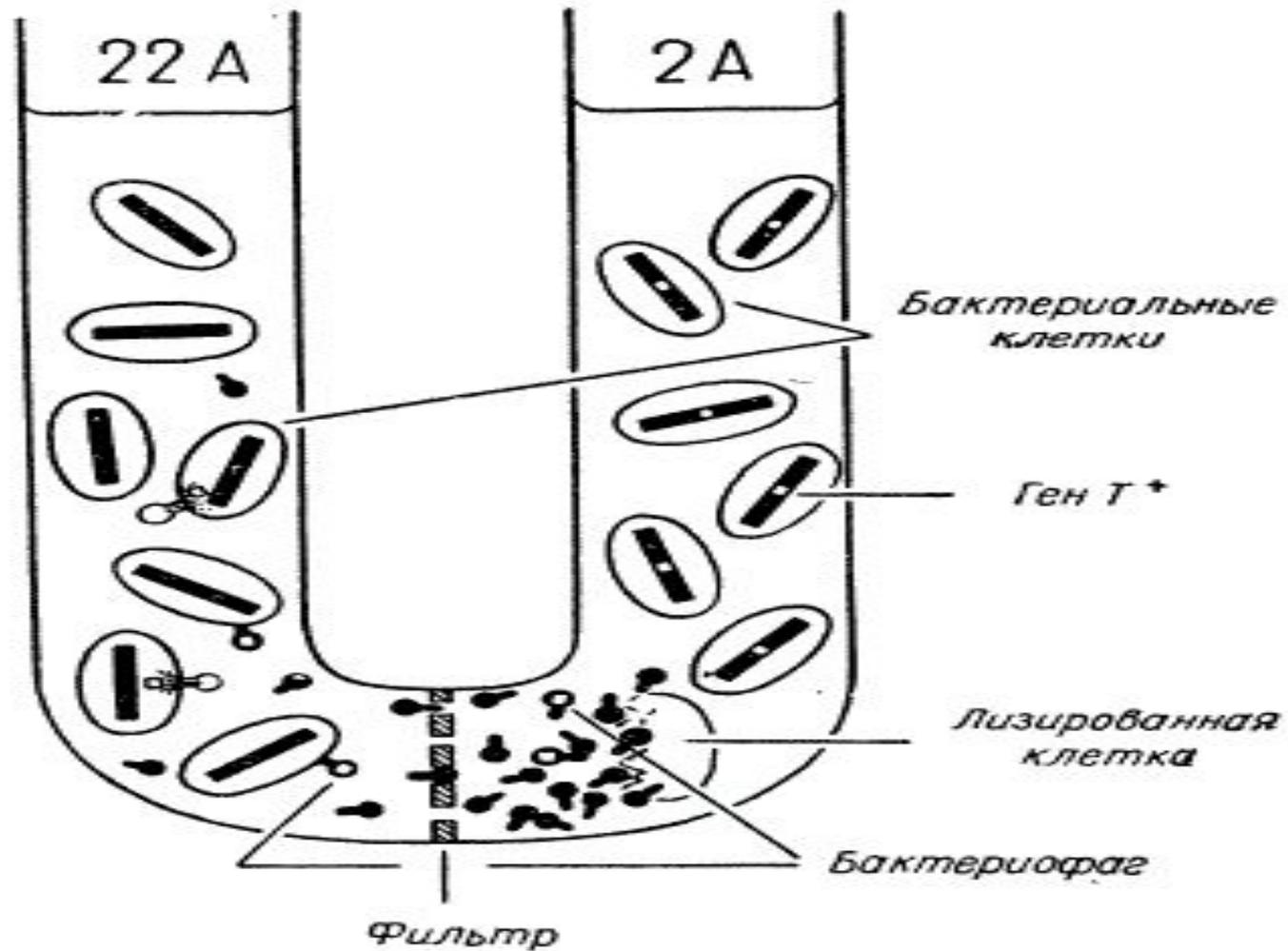


Вирулентный S штамм

Мыши погибли

- ▶ В 1944 году Е.Р.Дж.А. Шредингер опубликовывает книгу “What is life”, где в которой дискутировались вопросы негативной энтропии живых систем, и высказывалась концепция о комплексе молекул со свойствами генетического кода для живых молекул. Данный труд, предположительно, оказал решающее влияние на мировоззрение Дж. Уотсона и Ф. Крика относительно хранения генетической информации в биологических молекулах.
- ▶ В 1952 году Херши и Чейз доказали существование трансдукции, показав тем самым, что информация, необходимая для синтеза новых вирусных частиц содержится в вирусной ДНК.
- ▶ 1950 г.-Розалинда Франклин установила, двухцепочечность ДНК.

# Трансдукция



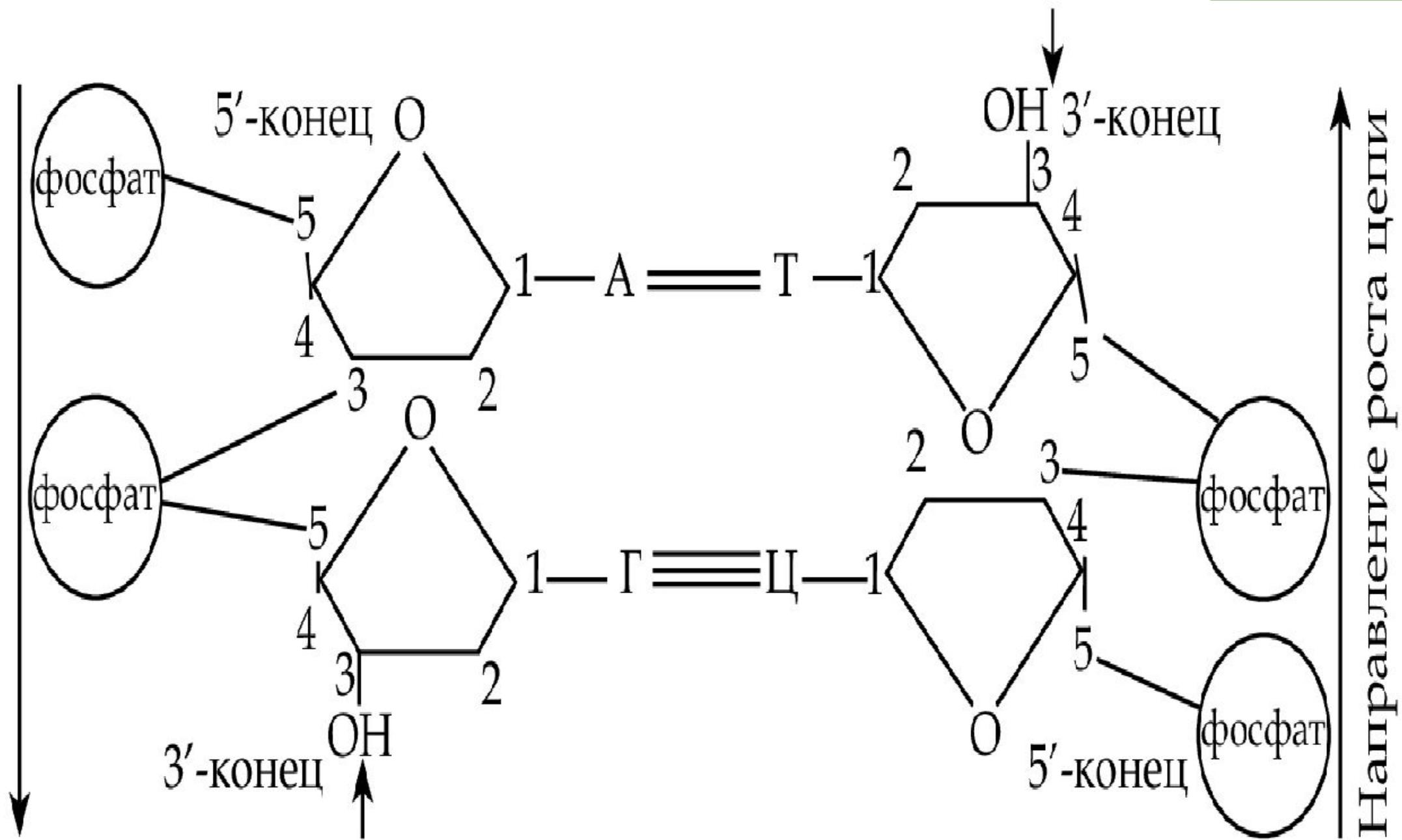
22A — штамм бактерий, не способный синтезировать триптофан ( $T^-$ ); 2A — штамм бактерий, способный синтезировать триптофан ( $T^+$ ).

# Модель ДНК Уотсона и Крика - 1953 г

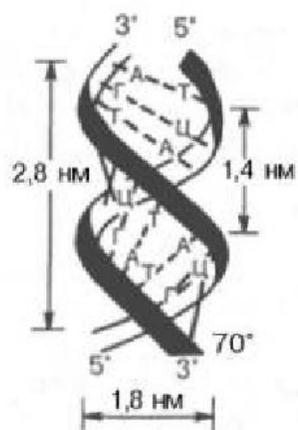
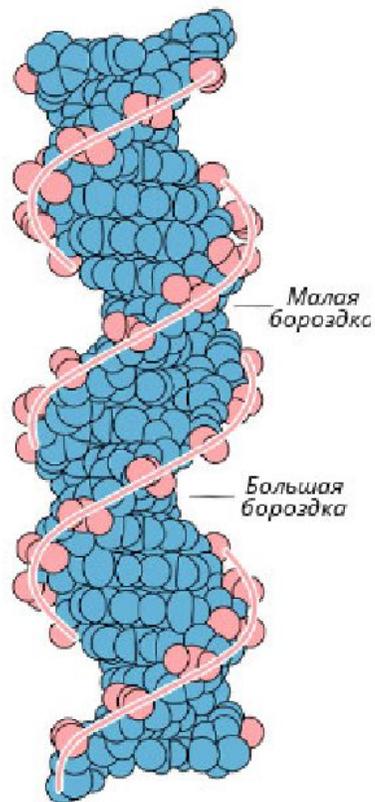
- ▶ ДНК – двойная спираль, в которой 2 полинуклеотидные цепи удерживаются водородными связями между комплементарными основаниями.
- ▶ Данная модель была основана на следующих фактах:
  1. Данные химического анализа (ДНК – полинуклеотид);
  2. Работа Эрвина Чаргаффа о равном соотношении в ДНК аденина и тимина, цитозина и гуанина;
  3. Рентгенограмма ДНК, полученная Розалиндой Франклин и Морисом Уилкинсом.
- ▶ Именно модель Уотсона-Крика позволила объяснить, каким образом при делении клетки в каждую дочернюю клетку попадает идентичная информация, содержащаяся в материнской клетке. Это происходит в результате удвоения молекулы ДНК, то есть в результате репликации.

# Строение ДНК

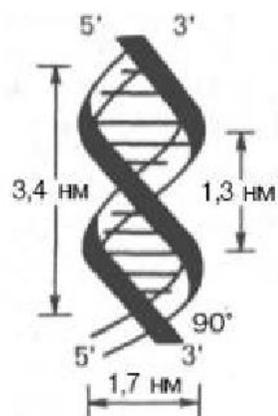
- ▶ Нуклеотиды одной цепи соединяются связями, возникающими между остатком фосфорной кислоты и углеводом через фосфат, причем углерод в положении 5 последующего нуклеотида соединяется с углеродом в положении 3 предыдущего.
- ▶ Фермент ДНК-полимераза присоединяет нуклеотиды только в одном направлении, а именно: 2-й — к 1-му, 3-й — ко 2-му. Таким образом, удлинение (рост) цепи идет всегда в одном направлении от 5' → 3', начало цепи обозначается как 5'-конец, а окончание — 3'-конец (5'-pApGpC...-3').
- ▶ В молекуле ДНК цепи антипараллельны, нуклеотиды противоположных цепей связаны между собой по правилу комплементарности (А–Т; Г–Ц).



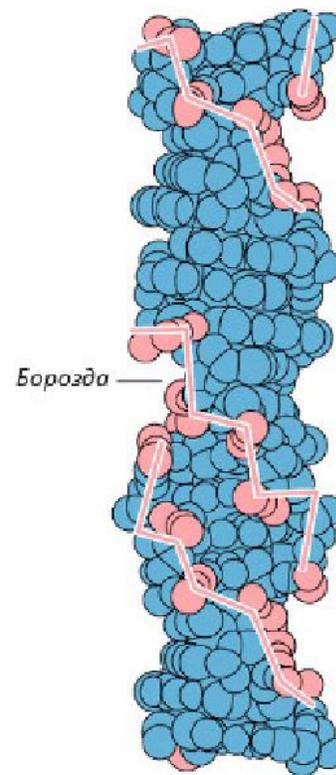
# Двойная спираль ДНК



**А-форма**

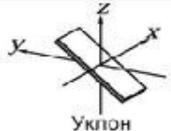


**В-форма**



**Z-форма ДНК**

## Параметры двойных спиралей ДНК

Параметр	А-ДНК	В-ДНК	Z-ДНК
Спираль	Правая	Правая	Левая
Форма	Широкая, сплюснутая	Релаксированная	Удлиненная, утонченная
Повторяющаяся единица	1 пара нуклеотидов	1 пара нуклеотидов	2 пары нуклеотидов
Количество нуклеотидов на шаг спирали	11	10.4	12
Угол спирального вращения ( $\delta$ )	+33.6°	+35.9°	-30°
Уклон	+19°	~ 0°	-9°
 Уклон			
 Пропеллер	+18°	+16°	0°
Расстояние между звеньями вдоль оси ( $z_0$ )	0.24 нм	0.34 нм	0.37 нм
Шаг спирали (P)	2.5 нм	3.5 нм	4.6 нм
Конформация нуклеозида	Анти	Анти	Ц – анти Г – син
Конформация фуранозного кольца	C3'-эндо	C2'-эндо	Ц - C2'- эндо Г - C3'- эндо
Диаметр спирали (d)	~ 2.6 нм	~ 2.0 нм	~ 1.8 нм
Большой желобок	Узкий глубокий	Широкий глубокий	Плоский неглубокий
Малый желобок	Широкий неглубокий	Узкий глубокий	Очень узкий глубокий
Примеры	Поли-А, шпильки ДНК, гибрид ДНК-РНК, спираль РНК-РНК	Основная форма ДНК	Поли-ГЦ

# Комплементарность и правила Чаргаффа

- ▶ Комплементарность - это принцип взаимного соответствия парных нуклеотидов или способность нуклеотидов объединяться попарно
- ▶ Согласно правилам Эдвина Чаргаффа :
  1. Молярная доля пуринов равна молярной доле пиримидинов- $A+G=C+T$ ;
  2. Количество аденина и цитозина равно количеству гуанина и тимина  $A+C=G+T$ ;
  3. Количество аденина равно количеству тимина, а количество гуанина равно количеству цитозина- $A = T$  и  $G = C$ ;
  4. Существенным для характеристики вида (таксономическое значение) оказался так называемый коэффициент специфичности, отражающий отношение.

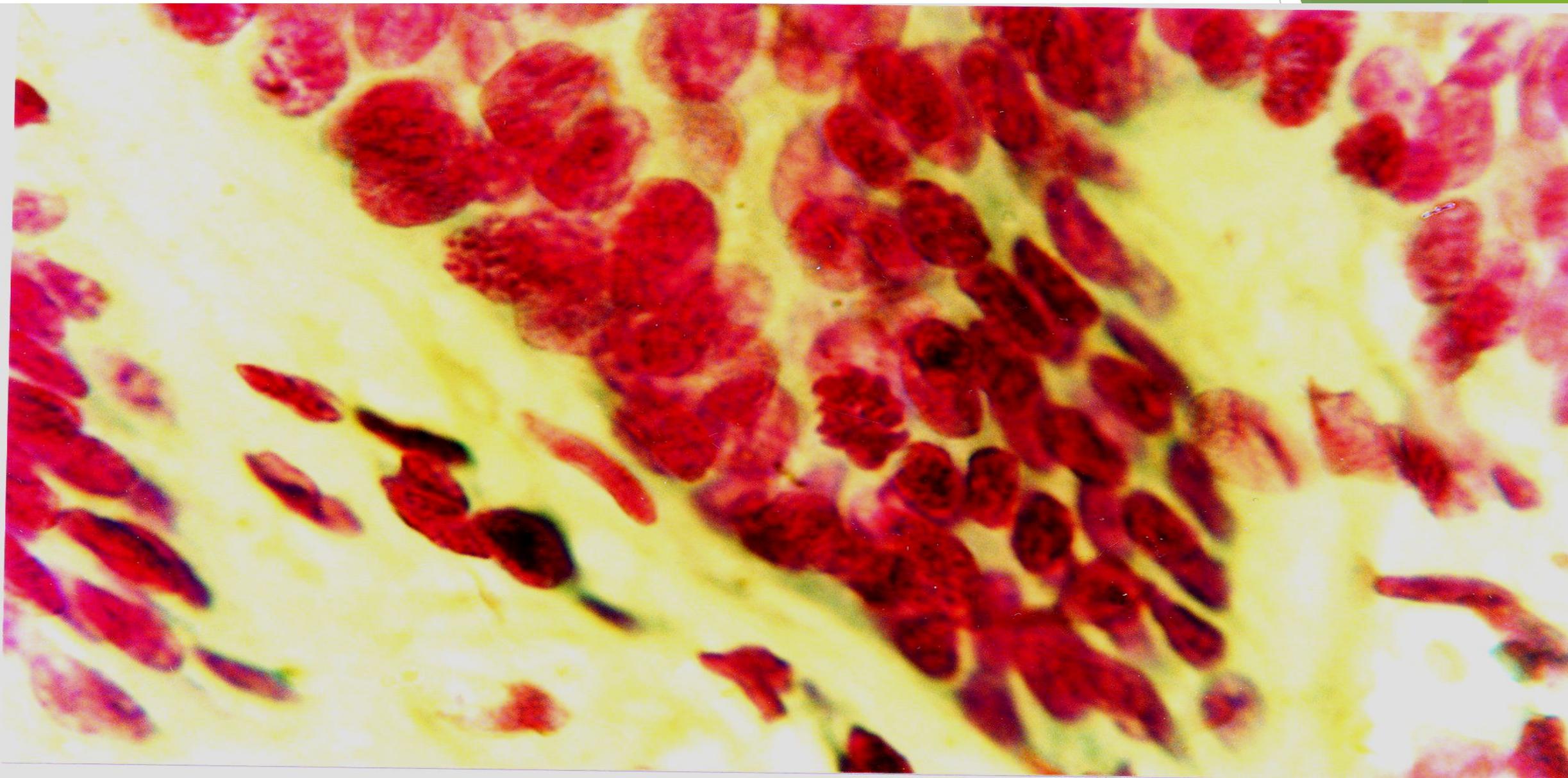
$$\frac{G + C}{A + T}$$

# Функции ДНК

Молекула ДНК выполняет следующие функции:

- а) хранение генетической информации (информация зашифрована в структуре ДНК);
- б) передача генетической информации (первый этап биосинтеза белка – транскрипция);
- в) самовоспроизведение (репликация);
- г) восстановление своей структуры после повреждения (репарация).

Препарат . "ДНК в ядрах клеток" (метод Фельгена)



# РНК

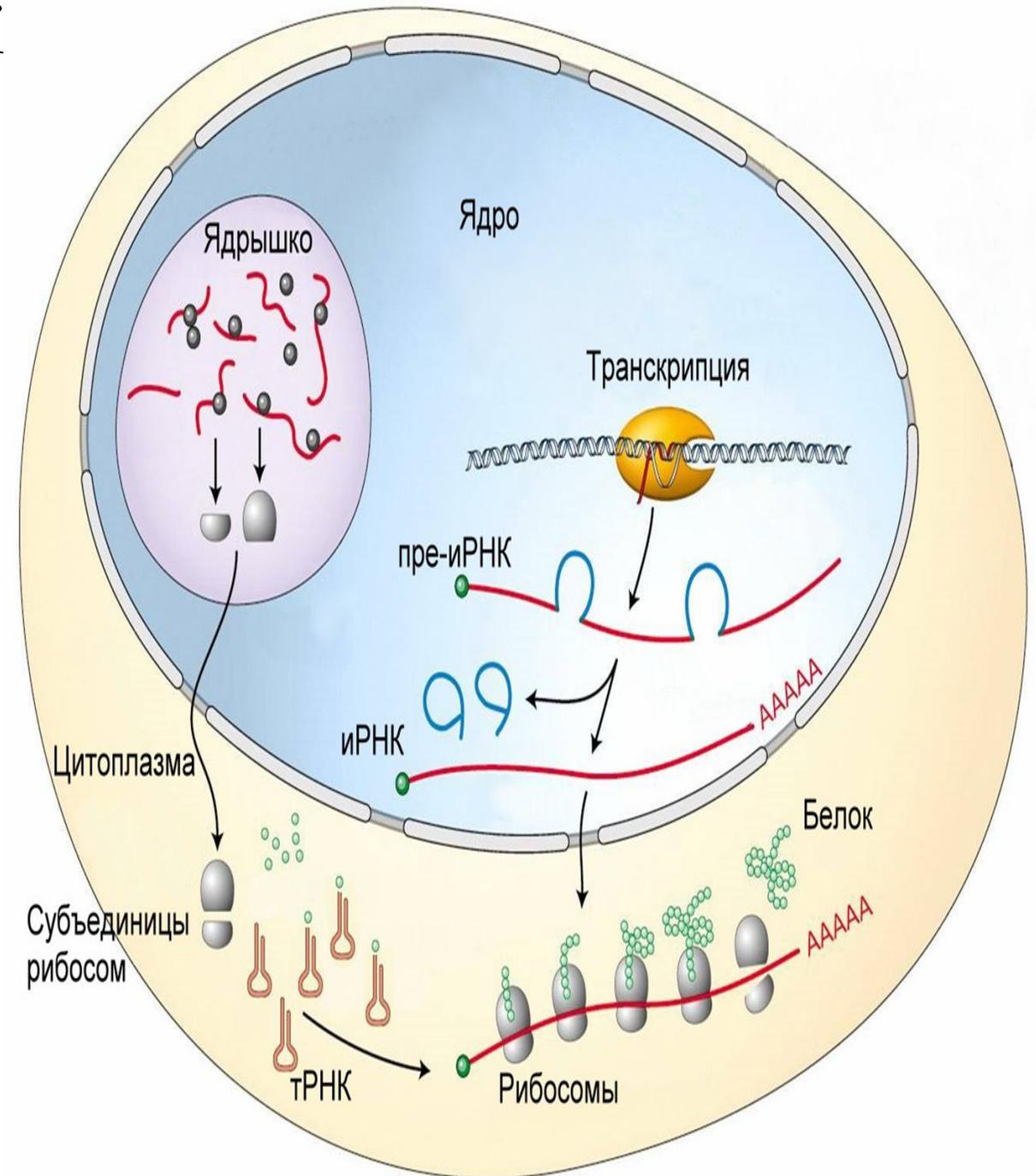
- ▶ Молекула РНК представляет собой неразветвленный полинуклеотид, который может иметь первичную структуру – последовательность нуклеотидов, вторичную – образование петель за счет спаривания комплементарных нуклеотидов, или третичную структуру – образование компактной структуры за счет взаимодействия спирализованных участков вторичной структуры.
- ▶ Водородные связи в молекуле РНК являются внутренними, а не межцепочечными соединениями комплементарных нуклеотидов.
- ▶ Цепи РНК значительно короче цепей ДНК.
- ▶ Информация о структуре молекулы РНК заложена в молекулах ДНК. Синтез молекул РНК происходит на матрице ДНК с участием ферментов РНК-полимераз и называется транскрипцией.
- ▶ Если содержание ДНК в клетке относительно постоянно, то содержание РНК сильно колеблется. Наибольшее количество РНК в клетках наблюдается во время синтеза белка.

# Виды РНК

► Существует три основных класса рибонуклеиновых кислот:

1. Информационные (матричные) РНК — иРНК (5%);
2. транспортные РНК — тРНК (10%);
3. рибосомальные РНК — рРНК (85%).

► Все виды РНК обеспечивают биосинтез белка.



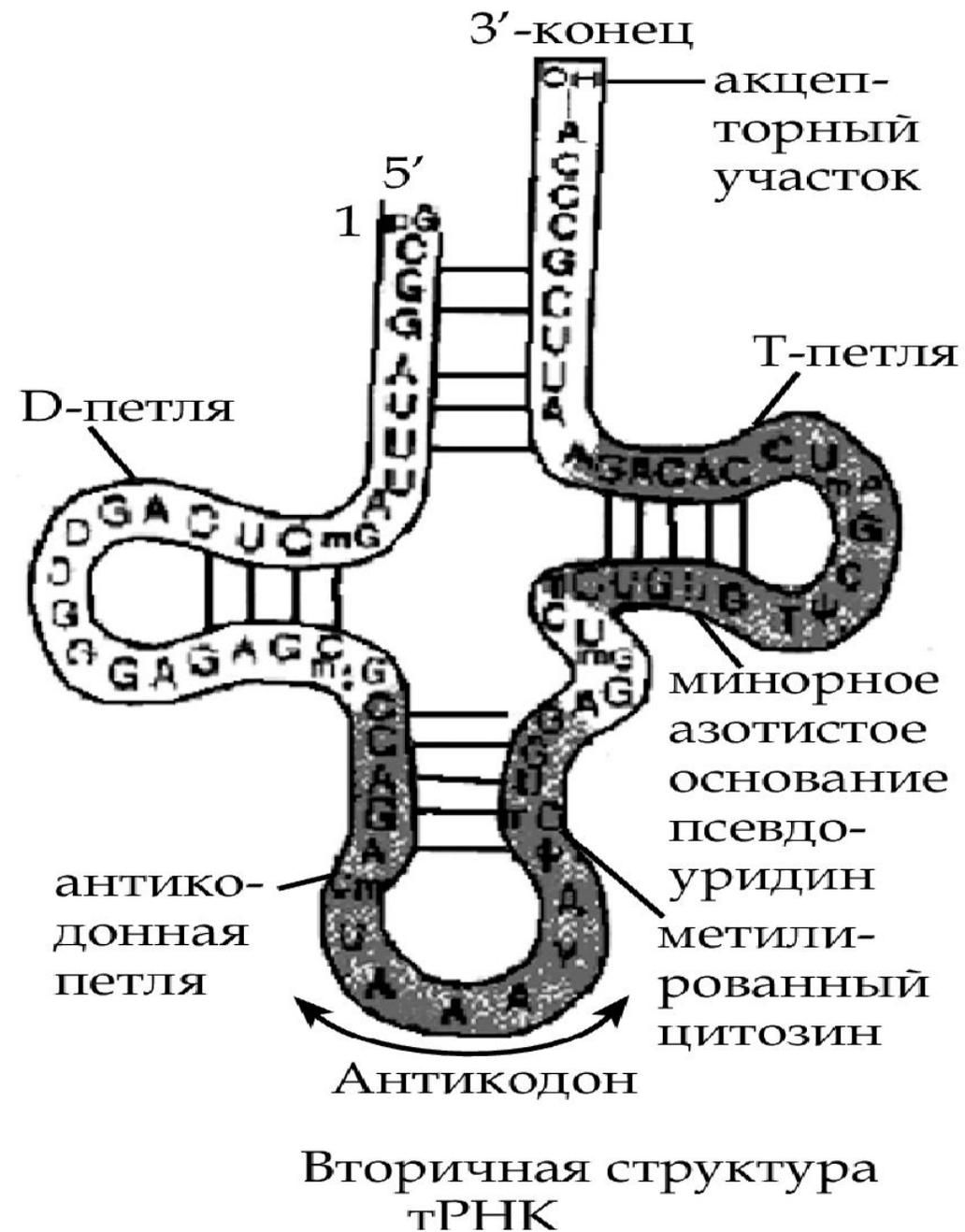
# Информационная РНК.

- ▶ Наиболее разнообразный по размерам и стабильности класс. Все они являются переносчиками генетической информации из ядра в цитоплазму. Они служат матрицей для синтеза молекулы белка, т.к. определяют аминокислотную последовательность первичной структуры белковой молекулы. Размеры – в зависимости от размеров белка – до 30 000 нуклеотидов.
- ▶ На долю иРНК приходится до 5% от общего содержания РНК в клетке.

# тРНК

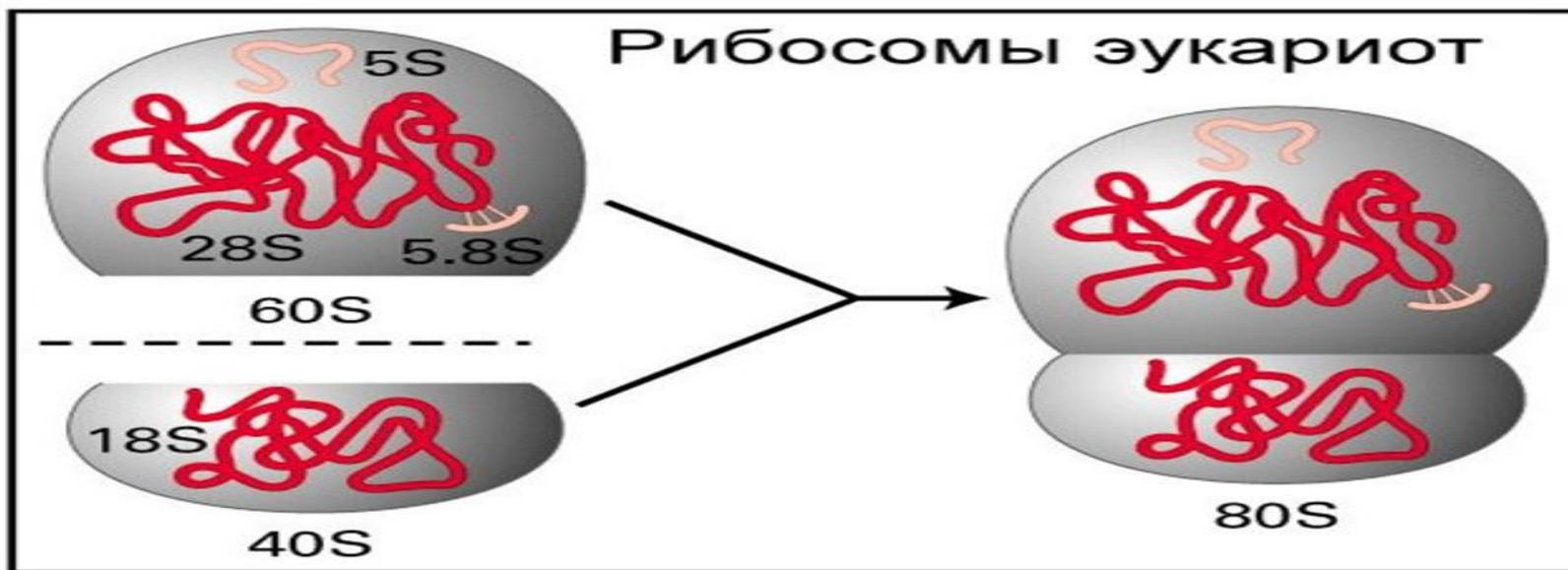
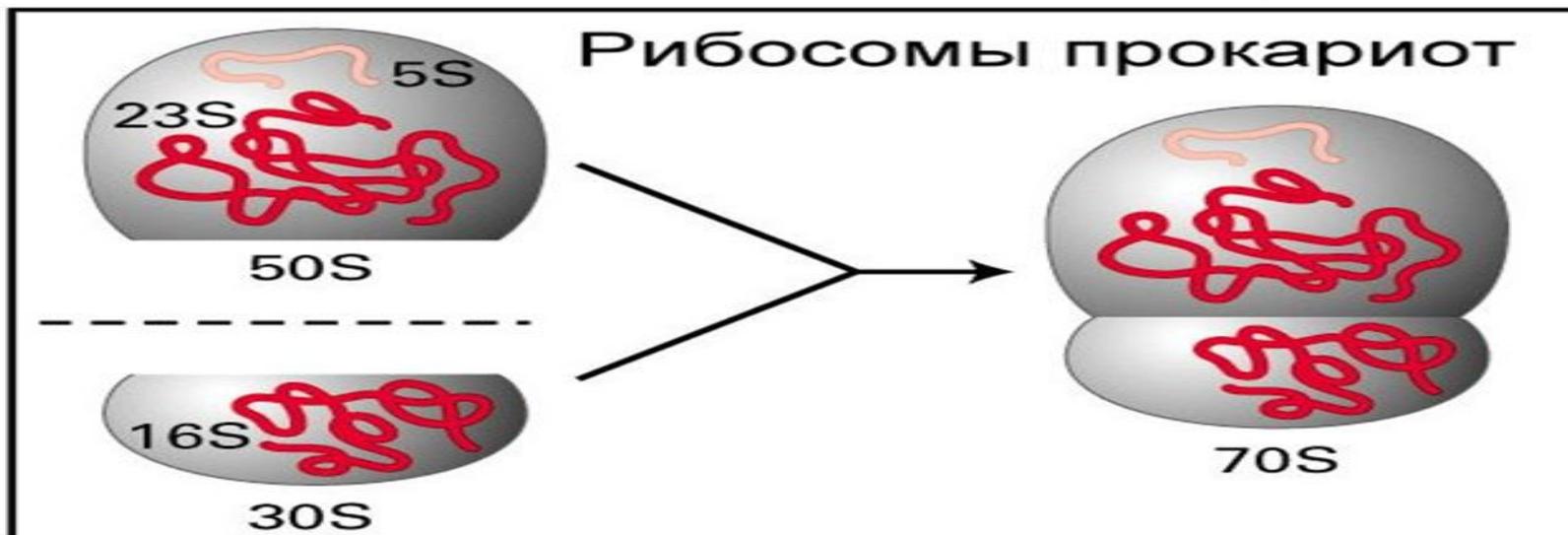
- ▶ Молекулы тРНК— сравнительно короткие молекулы, состоящие из 71–94 нуклеотидов.
- ▶ тРНК приходится до 10% от общего содержания РНК в клетке.
- ▶ Функции: они доставляют аминокислоты к месту синтеза белка, в рибосомы;
- ▶ В клетке содержится более 30 видов тРНК. Каждый вид тРНК имеет характерную только для него последовательность нуклеотидов.

- ▶ В состав тРНК входят несколько необычных азотистых оснований (минорных): инозин (Y), псевдоуридин (Ψ), дигидроуридин (D); часто встречаются метилированные обычные азотистые основания.
- ▶ Внутримолекулярные комплементарные связи приводят к образованию конфигурации молекулы «клеверный лист». Сдвоенные участки — ветви (стебли), а одноцепочечные участки — петли.
- ▶ Таким образом, формируются 4 ветви и 3 петли. Ветви: акцепторная, D (включает основание D), антикодонная, T (включает псевдоуридин). Петли: D, T и антикодонная.

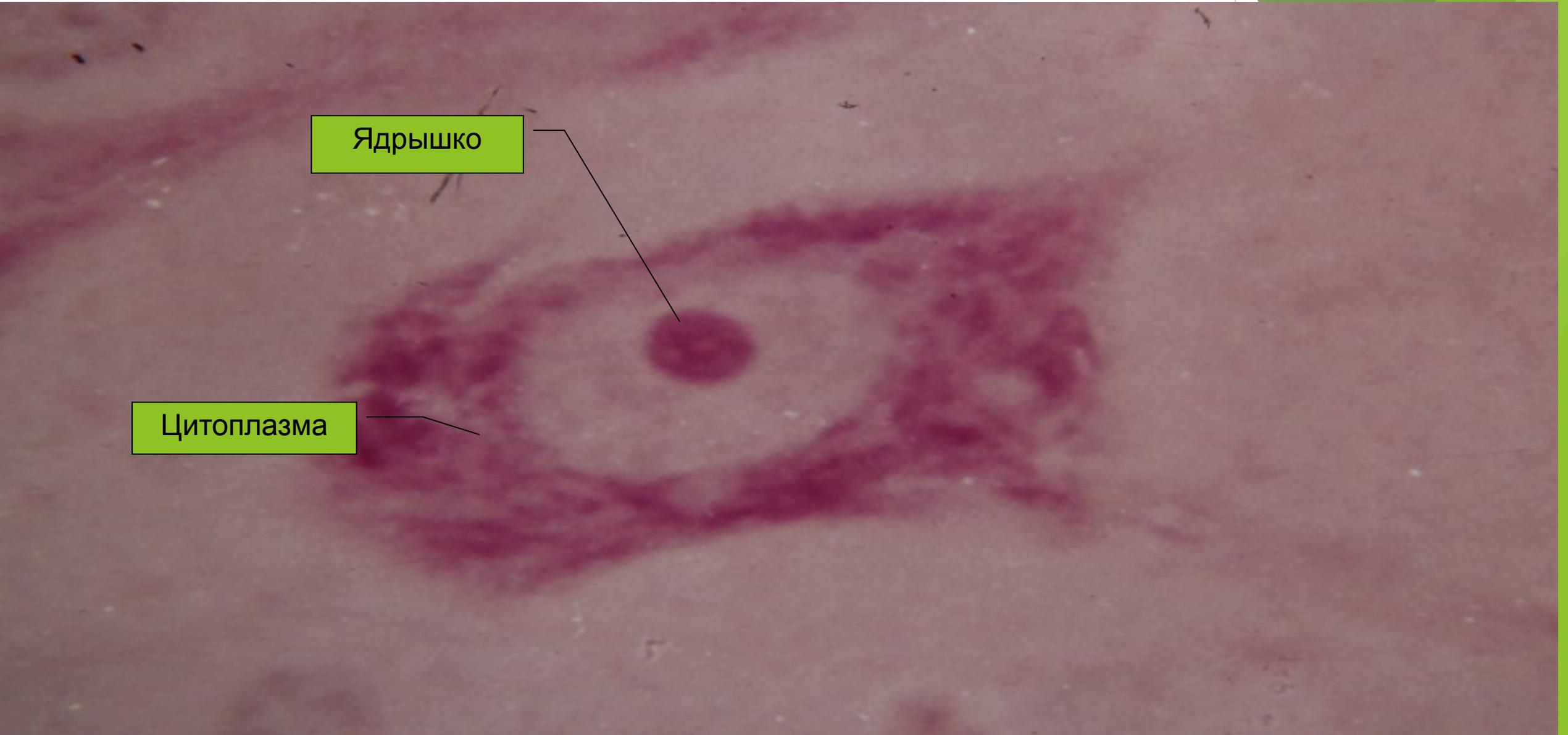


# Рибосомы

- ▶ В состав субъединиц рибосом входят разнообразные рРНК, различающиеся по константе седиментации (единица Сведберга — S). Так, в состав малой субъединицы у прокариот входит рРНК 16S, а у эукариот — рРНК 18S, а в состав большой субъединицы у прокариот входят рРНК 5S и 23S, а у эукариот 5S, 5,8S и 28S. Кроме того, в состав рибосом входят разнообразные белки (у прокариот — более 50 уникальных молекул, у эукариот — более 70).
- ▶ На долю рибосомальной РНК (рРНК) приходится 80-85% от общего содержания РНК в клетке, состоят из 3 000 – 5 000 нуклеотидов.
- ▶ Набор рРНК и белков определяет константу седиментации (S) малой и большой субъединиц рибосом (у прокариот 30S и 50S, у эукариот 40S и 60S) и общую константу седиментации (S) рибосом (у прокариот 70S, у эукариот 80S).



# РНК в цитоплазме и ядрышке окраска – пиронин



# Репликация

- ▶ Самовоспроизведение ДНК (процесс, приводящий к удвоению молекул ДНК), называется репликацией.
- ▶ Репликация необходима перед делением клетки, чтобы каждая дочерняя клетка обладала таким же объемом информации, как и материнская. Репликация — реакция матричного синтеза, матрицей является материнская ДНК, процесс протекает по правилу комплементарности, поэтому дочерние молекулы идентичны материнской. В каждой новой молекуле одна цепь — старая (материнская), которая служила матрицей, а вторая — вновь синтезированная, дочерняя (полуконсервативный способ).
- ▶ Таким образом, биологическое значение репликации ДНК — структурная и функциональная преемственность клеток (сохранение специфичности клеток) при воспроизведении себе подобных.

- ▶ Участок молекулы ДНК, на котором идет репликация, называется репликон. У прокариот репликон один, а у эукариот на одной молекуле ДНК может быть несколько репликонов. В области репликона цепи разъединены; участки, ограничивающие репликон— репликативные вилки.
- ▶ Процесс репликации идет по-разному на противоположных цепях, а также вправо и влево от точки инициации на одной цепи. Это определяется несколькими моментами:
  1. Направление разъединения цепей одно для обеих цепей.
  2. Цепи ДНК антипараллельны.
  3. Разъединение цепей идет в обе стороны от точки инициации (середины репликона).
  4. Фермент ДНК-полимераза работает только в одном направлении, соединяя нуклеотиды от 5-го положения последующего нуклеотида к 3-му предыдущего.
- ▶ Иногда в клетке проходит многократная репликация ДНК без последующего деления клетки и возникают «многонитчатые» гигантские хромосомы, содержащие сотни и тысячи молекул ДНК. Такие хромосомы называются политенными. Биологический смысл политении — резкое увеличение количества определенных генов и, как следствие, резкая интенсификация синтеза определенного белка.

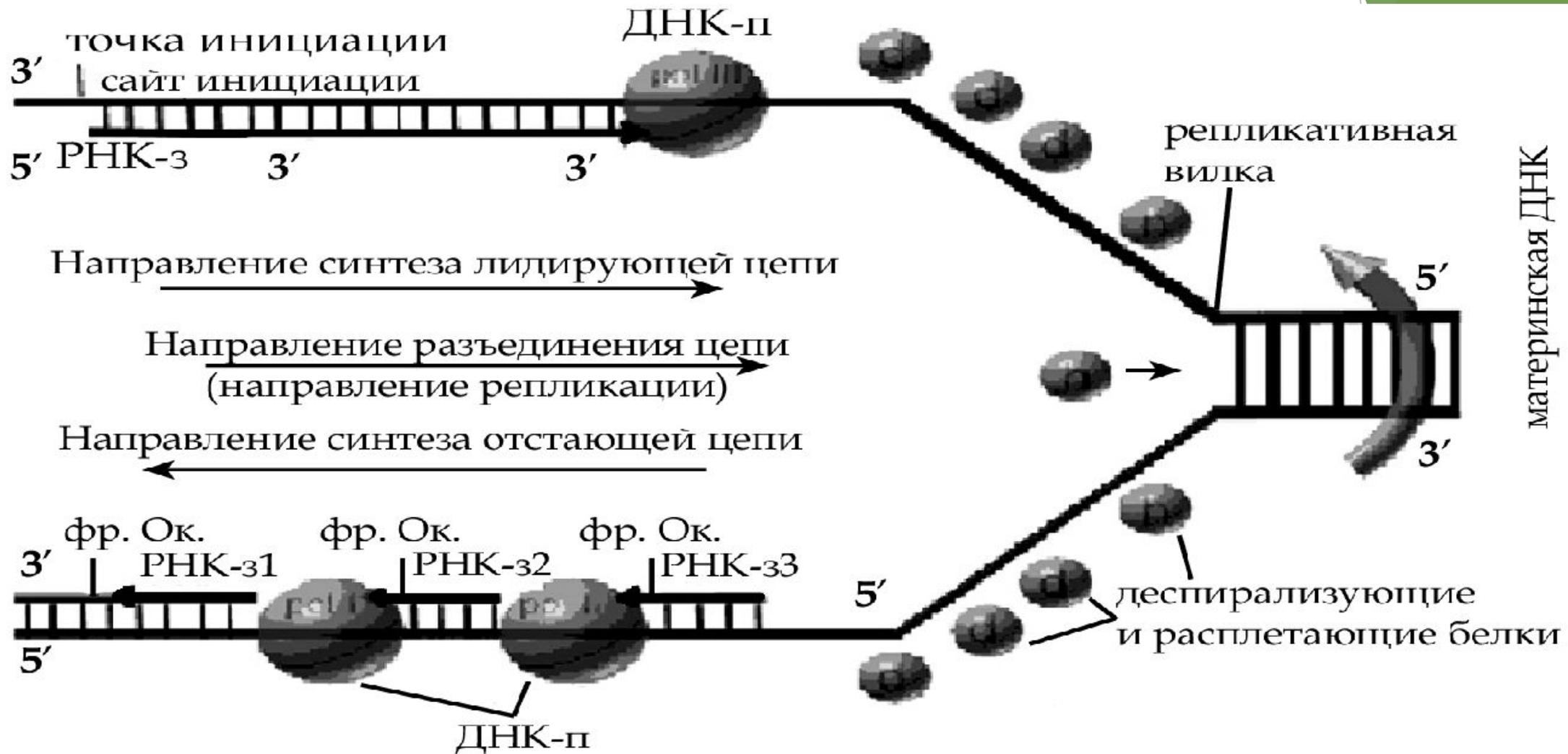


Схема репликации ДНК (половина репликона):  
 ДНК-п – ДНК-полимераза; фр. Ок. – фрагмент Оказаки;  
 РНК-з – РНК-затравка

- ▶ **Начинается процесс с разрыва водородных связей между азотистыми основаниями ДНК на участке, включающем около 300 пар нуклеотидов - это место называется точка инициации.** Так как разъединение цепей ДНК от точки инициации идет вправо и влево одновременно, цепи ДНК антипараллельны, а фермент ДНК-полимераза может работать только в одном направлении, то синтез дочерних цепей идет по-разному на разных участках одного репликона. **Одна цепь - лидирующая, синтезируется непрерывно, а вторая - отстающая, синтезируется фрагментарно.**
- ▶ На цепи 3'-5' рядом с точкой инициации есть особая последовательность нуклеотидов - сайт инициации, на котором синтезируется небольшая молекула РНК (РНК-затравка). У РНК-затравки свободен 3' - конец, к которому присоединяется первый нуклеотид ДНК, к нему второй и т. д. В результате синтезируется лидирующая дочерняя цепь. На противоположной, антипараллельной цепи (5' – 3') сайта инициации нет и проходит время, пока в результате разрыва водородных связей обнаружится такой сайт;
- ▶ РНК-затравка синтезируется и от неё в сторону противоположную направлению разъединения ДНК синтезируется небольшой фрагмент дочерней цепи. После разъединения следующего участка молекулы ДНК, следующая молекула РНК-затравка находит свой сайт и синтезируется новый фрагмент дочерней цепи ДНК в направлении 5' -3' и т.д. Таким образом, эта цепь синтезируется небольшими фрагментами (фрагменты Оказаки) и отстаёт во времени.

- ▶ На другой половине репликаона, где разъединение цепей ДНК идёт в другую сторону, также, в одном направлении дочерняя цепь синтезируется непрерывно, в другом - фрагментарно. Затем рестриктазы вырезают РНК-затравки (одну - из лидирующей цепи и от каждого фрагмента Оказаки на отстающей цепи), ДНК-полимераза достраивает молекулу ДНК на местах вырезанных РНК-затравок, а лигазы соединяют фрагменты в непрерывную цепь. В каждой новой молекуле ДНК одна цепь старая (материнская), а вторая - новая (дочерняя). Такой способ репликации называется полуконсервативным.

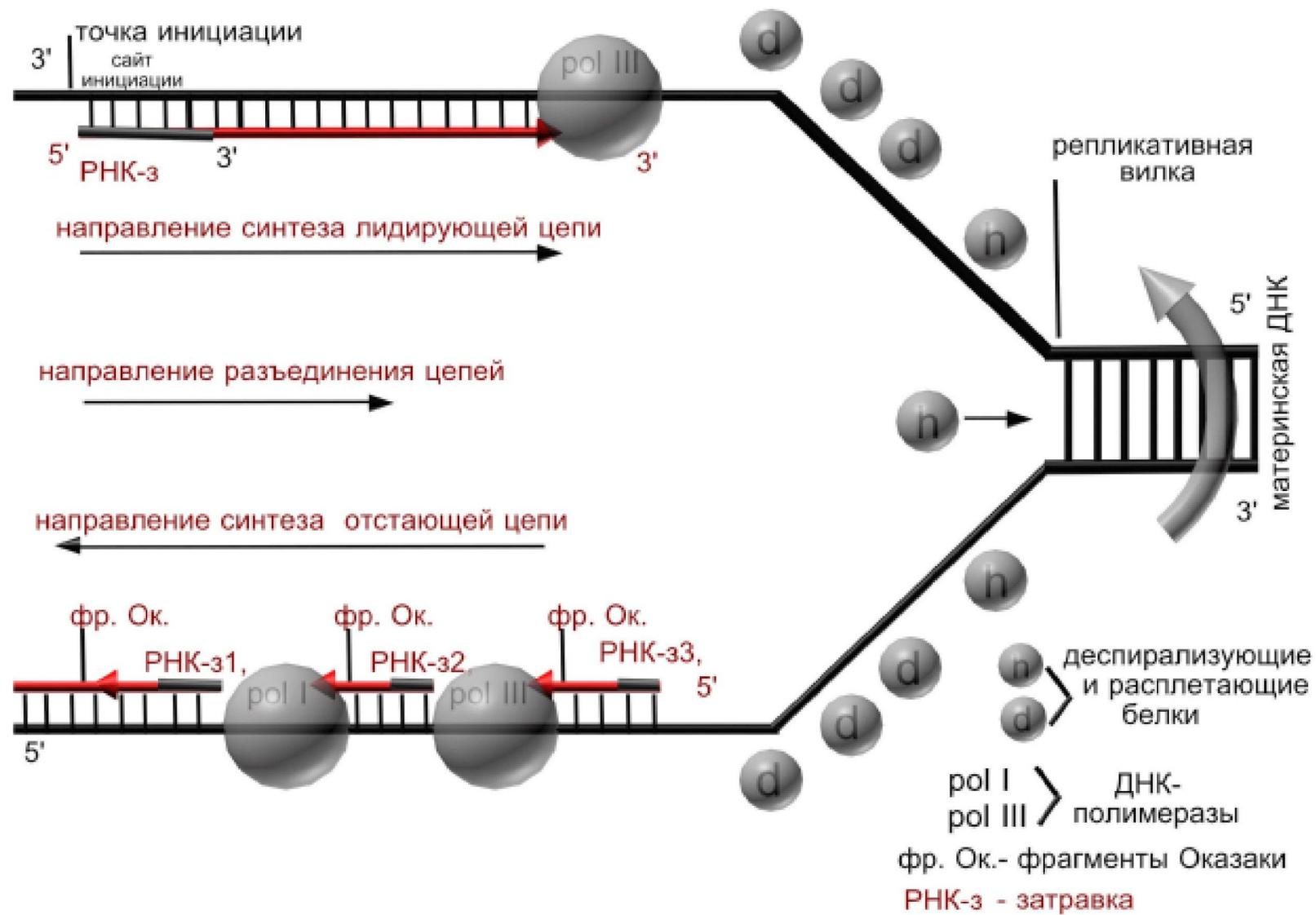


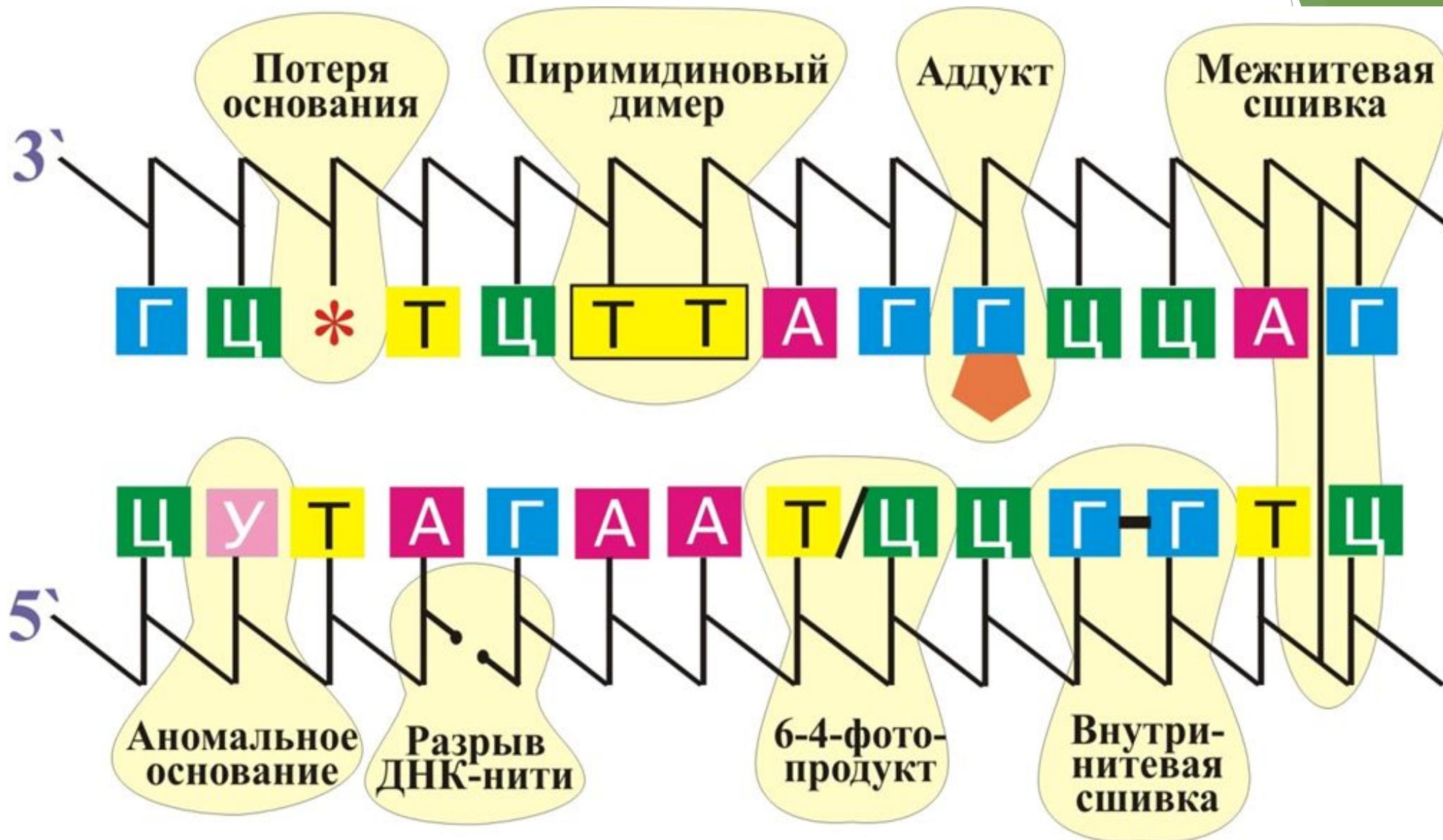
Схема репликации ДНК (половина репликона).

# Репарация

- ▶ Репарация – способность молекулы ДНК исправлять возникающие в её цепях изменения.
- ▶ С позиций молекулярного механизма первичные повреждения в молекулах ДНК могут быть устранены тремя путями:
  1. Прямым возвращением к исходному состоянию;
  2. Вырезанием поврежденного участка и заменой его нормальным;
  3. Рекомбинационным восстановлением в обход поврежденного участка.
- ▶ По отношению к процессу репликации различают два основных типа репарации ДНК:
  1. Дорепликативную (фотореактивация и эксцизионная форма);
  2. Пострепликативную (рекомбинационная).

# Повреждения ДНК

- ▶ Спонтанные повреждения ДНК:
  1. Ошибки репликации (появление некомплементарных пар нуклеотидов);
  2. Апуринизация (отщепление азотистых оснований из нуклеотида);
  3. Дезаминирование (отщепление аминогруппы).
- ▶ Индуцированные повреждения ДНК:
  1. Димеризация (сшивание соседних пиримидиновых оснований с образованием димера);
  2. Разрывы в ДНК: однонитевые и двунитевые;
  3. Поперечные сшивки между нитями ДНК.



# Фоторепарация

1. Нормальная молекула ДНК



Облучение УФ-светом



2. Мутантная молекула ДНК – образование пиримидиновых димеров



Действие видимого света



3. Синтез фермента фотолиазы



4. Расщепление димеров пиримидиновых оснований



5. Восстановление нормальной структуры ДНК



# Экцизионная репарация

- ▶ 1. Узнавание повреждения ДНК эндонуклеазой;
- ▶ 2. Инцизия (надрезание) цепи ДНК ферментом по обе стороны от повреждения;
- ▶ 3. Эксцизия (вырезание и удаление) повреждения при помощи геликазы;
- ▶ 4. Ресинтез: ДНК-Полимераза застраивает брешь
- ▶ 5. Лигаза соединяет концы ДНК;



# Пострепликативная репарация ДНК

- ▶ Пострепликативная репарация осуществляется в тех случаях, когда повреждение доживает до фазы репликации (слишком много повреждений, или повреждение возникло непосредственно перед репликацией) или имеет такую природу, которая делает невозможным его исправление с помощью эксцизионной репарации (например, сшивка цепей ДНК).
- ▶ Эта система играет особенно важную роль у эукариот, обеспечивая возможность копирования даже с поврежденной матрицы (хотя и с увеличенным количеством ошибок). Одна из разновидностей этого типа репарации ДНК - рекомбинационная репарация.

