

Биохимия

Матричные синтезы

Матричные синтезы

Основной фигурой матричных биосинтезов являются нуклеиновые кислоты РНК и ДНК. Они представляют собой полимерные молекулы, в состав которых входят азотистые основания пяти типов, пентозы двух типов и остатки фосфорной кислоты. Азотистые основания в нуклеиновых кислотах могут быть пуриновыми (**аденин, гуанин**) и пиримидиновыми (**цитозин, урацил** (только в РНК), **тимин** (только в ДНК)).

Термин "**матричные биосинтезы**" подразумевает способность клетки синтезировать полимерные молекулы, таких как **нуклеиновые кислоты и белки**, на основе шаблона – **матрицы**. Это обеспечивает точную передачу сложнейшей структуры от уже существующих молекул к новосинтезируемым.

Основной постулат молекулярной биологии

Основной постулат молекулярной биологии: перенос генетической информации осуществляется только от нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК). Получателем информации может быть другая нуклеиновая кислота (ДНК или РНК) и белок.

- Передача наследственной информации от материнской клетки к дочерней осуществляется при помощи ДНК (репликация).
- Для использования генетической информации самой клеткой необходимы РНК, образуемые на матрице ДНК (транскрипция).
- Далее РНК непосредственно участвуют на всех этапах синтеза белковых молекул (трансляция).



Репликация

Синтез (репликация, удвоение) ДНК происходит в S-фазу клеточного цикла, когда клетка готовится к делению. Механизм репликации, **полуконсервативный**, т.е. на каждой нити материнской ДНК синтезируется дочерняя копия



Необходимые компоненты репликации

Как любой матричный биосинтез, репликация требует наличия нескольких компонентов:

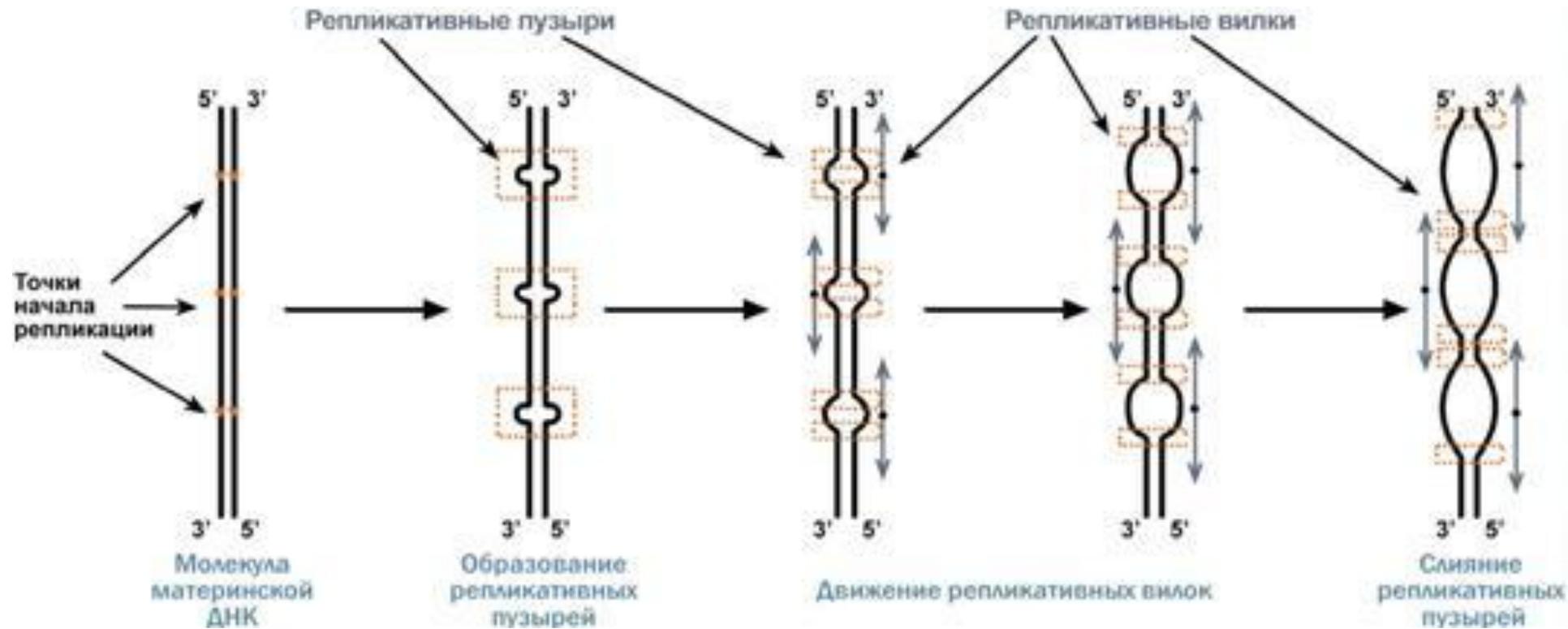
- *матрица* – в ее роли выступает материнская нить ДНК,
- *растущая цепь* – дочерняя нить ДНК,
- *субстраты для синтеза* – dATФ, dГТФ, dЦТФ, ТТФ,
- *источник энергии* – dATФ, dГТФ, dЦТФ, ТТФ,
- *ферменты*.

Начало репликации

Синтез ДНК начинается в определенных участках, получивших название точка *ori* (англ. *origin* – начало). На каждой ДНК млекопитающих точек *ori* насчитывается до 100.

Репликация распространяется от этих участков в обе стороны по нитям ДНК с образованием репликативных "**пузырей**". В каждом таком "пузыре" имеются **две** репликативные "вилки", в которых происходит расплетание, раскручивание и непосредственный синтез ДНК. При этом репликативные вилки **удаляются** друг от друга.

Начало репликации



Синтез новой цепи

Синтез новой цепи ДНК идет в направлении от 5'-конца к 3'-концу, каждый **следующий** нуклеотид своей 5'-гидроксильной группой присоединяется к 3'-гидроксильной группе **предыдущего** нуклеотида со скоростью порядка 100 штук в секунду.

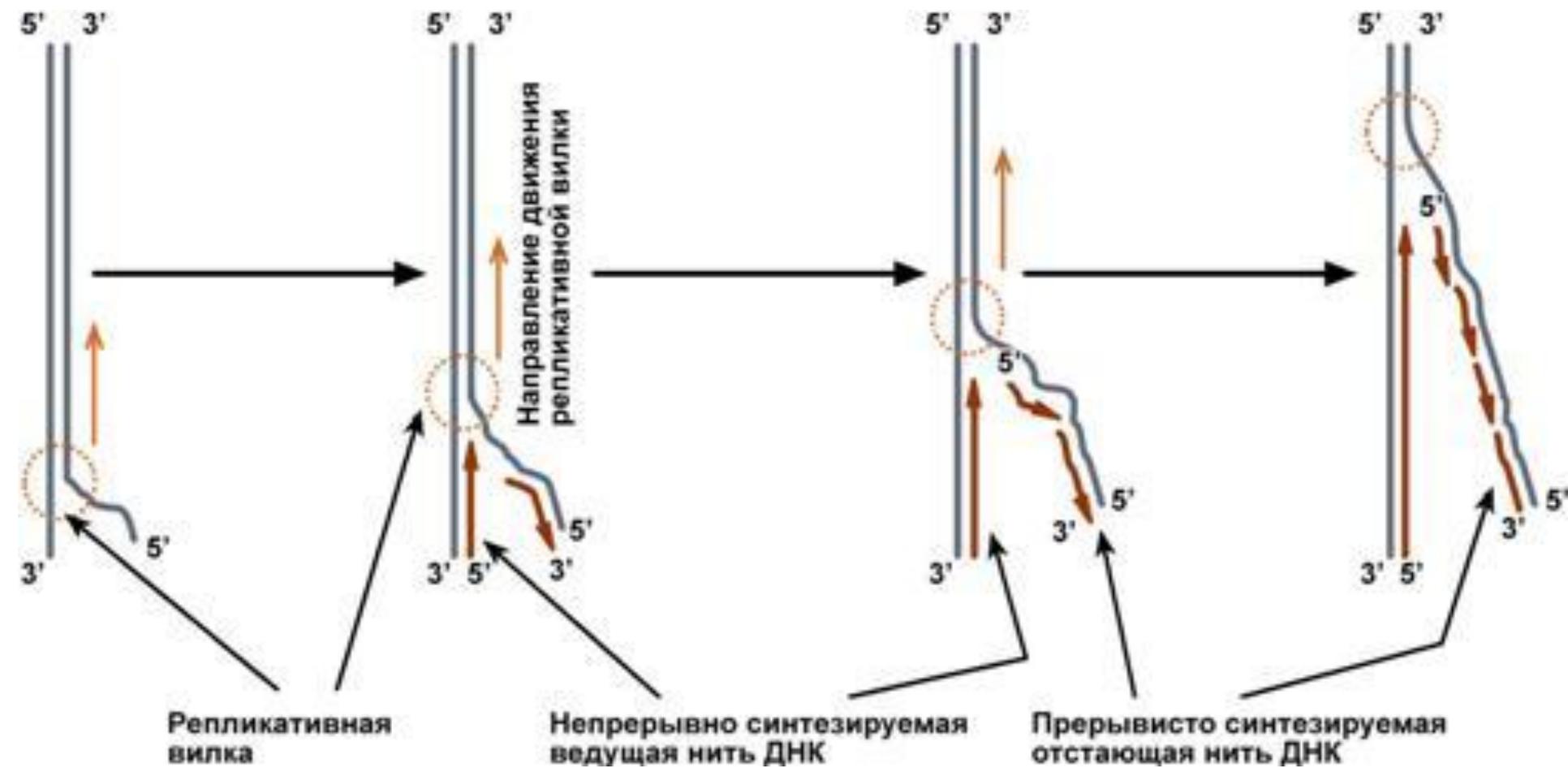
В репликативной вилке в направлении 5'→3' **непрерывно** синтезируется только одна нить, а именно та, для которой направление синтеза совпадает с направлением движения репликативной вилки и соответствует направлению **материнской** нити 3'→5' – **ведущая дочерняя нить**.

Синтез новой цепи

Направление $5' \rightarrow 3'$ для другой дочерней нити ДНК противоположно движению репликативной вилки. Поэтому синтез этой отстающей нити (в направлении $5' \rightarrow 3'$) возможен только после расплетания части ДНК и освобождения участка для синтеза.

Таким образом, синтез дочерней ДНК идет фрагментарно. По имени японского исследователя синтезируемые на отстающей цепи отрезки ДНК называли **фрагменты Оказаки**.

Синтез новой цепи



Механизм репликации ведущей дочерней ДНК

Синтез ведущей дочерней цепи:

- 1. **ДНК-топоизомеразы**, находясь перед репликативной вилкой, разрезают молекулу ДНК для облегчения ее расплетания и раскручивания.
- 2. **ДНК-хеликазы**, следуя за топоизомеразами, раскручивают и расплетают молекулу ДНК.
- 3. **ДНК-связывающие белки (ДСБ)** связывают расплетенные нити ДНК и стабилизируют их, не допуская обратного "слипания" друг с другом.
- 4. **ДНК-полимераза δ** (греч.: δ – дельта), согласовано со скоростью движения репликативной вилки, осуществляет синтез **ведущей** цепи **дочерней ДНК** в направлении $5' \rightarrow 3'$ на матрице **материнской** нити ДНК по направлению от ее 3'-конца к 5'-концу (скорость до 100 пар нуклеотидов в секунду).

Этим события на данной материнской нити ДНК ограничиваются.

Механизм репликации отстающей дочерней ДНК

- 5. Непосредственно сразу после расплетания и стабилизации другой нити материнской молекулы к ней присоединяется **ДНК-полимераза-α** и в направлении $5' \rightarrow 3'$ синтезирует **праймер** (РНК-затравку) – последовательность РНК на матрице ДНК длиной от 10 до 200 нуклеотидов. После этого **фермент** удаляется с нити ДНК.

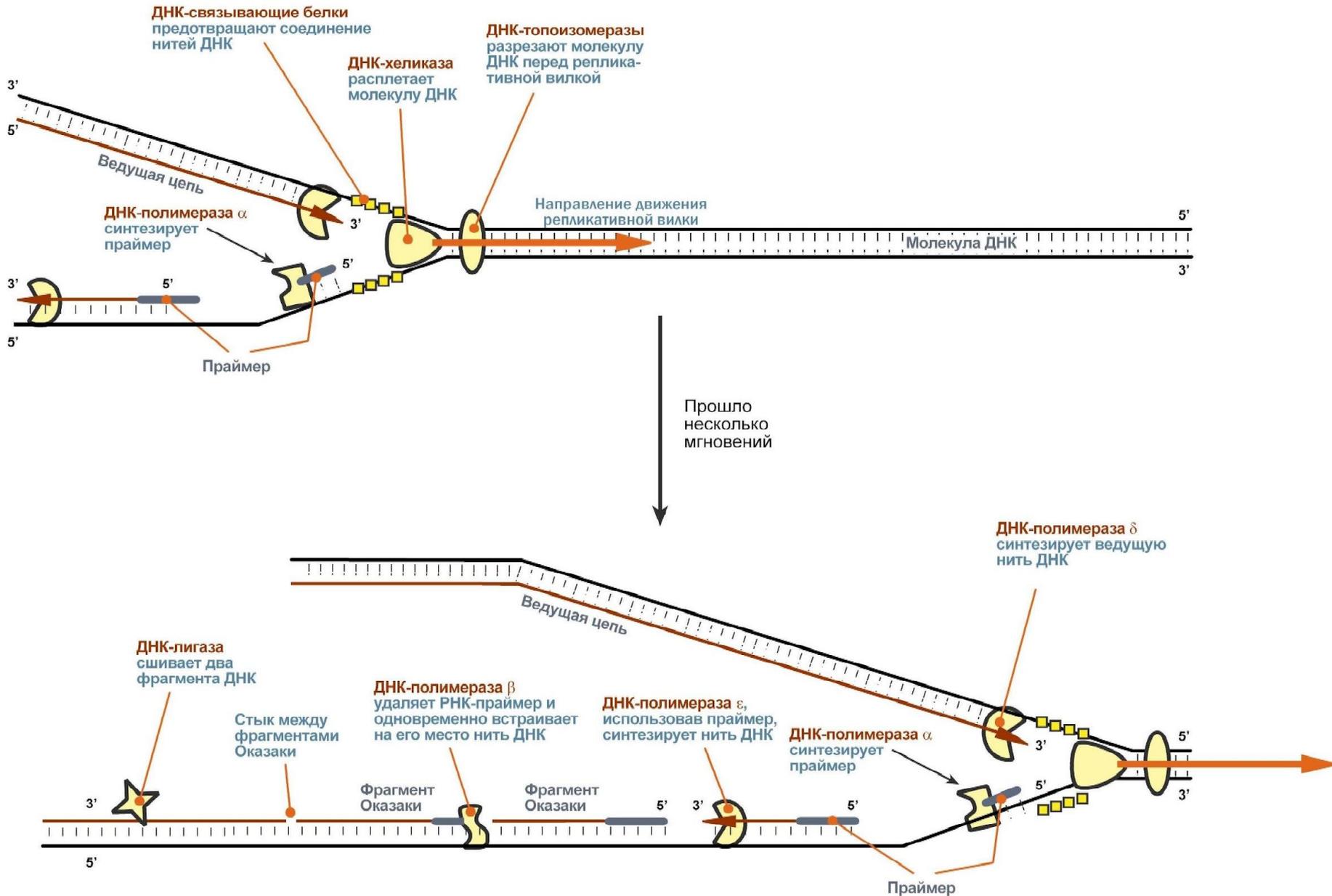
Вместо ДНК-полимеразы α к 3'-концу праймера присоединяется ДНК-полимераза ε.

- 6. **ДНК-полимераза-ε** продолжает удлинять праймер, но в качестве субстрата встраивает **дезоксирибонуклеотиды** (в количестве 150-200 нуклеотидов). В результате образуется цельная нить из двух частей – **РНК** (т.е. праймер) и **ДНК**. ДНК-полимераза ε работает до тех пор, пока не встретит праймер предыдущего фрагмента Оказаки. После этого данный фермент удаляется с цепи.

Механизм репликации отстающей дочерней ДНК

- 7. **ДНК-полимераза β** встает вместо ДНК-полимеразы ϵ , движется в том же направлении ($5' \rightarrow 3'$) и удаляет рибонуклеотиды праймера, одновременно встраивая **дезоксирибонуклеотиды** на их место. Фермент работает до полного удаления праймера, т.е. пока на его пути не встанет дезоксирибонуклеотид. Связать результат своей работы и впереди стоящую ДНК фермент не в состоянии, поэтому он сходит с цепи. В результате на матрице материнской нити "лежит" фрагмент дочерней ДНК. Он называется **фрагмент Оказаки**.
- 8. **ДНК-лигаза** производит сшивку двух соседних фрагментов Оказаки, т.е. 5'-конца отрезка, синтезированного ДНК-полимеразой ϵ , и 3'-конца цепи, встроенного ДНК-полимеразой β .

Механизм репликации



Повреждения и репарация ДНК

Так как на геном любой неделящейся клетки постоянно оказывает влияние окружающая среда, то вполне вероятны повреждения в составе нуклеотида, также возможно встраивание неправильного нуклеотида при репликации. Такие нарушения быстро определяются специальными ферментами, пораженный участок удаляется **эксонуклеазами**, заполняется **ДНК-полимеразой β** и сшивается **ДНК-лигазой**.

В случае изменения структуры основания (например, его дезаминирование) это основание удаляется **ДНК-Н-гликозидазой**, затем другими ферментами удаляется дезоксирибоза и на ее место **ДНК-полимеразой β** и **ДНК-лигазой** встраивается нужный нуклеотид.

Отрыв пуриновых и пиримидиновых оснований от дезоксирибозы устраняется **ДНК-инсертазами**, которые присоединяют к оставшейся дезоксирибозе соответствующие основания.

Транскрипция

Прежде чем начнут синтезироваться белки, информацию об их строении необходимо перенести из ДНК и доставить ее к месту синтеза белков. Этим занимаются **информационные** или **матричные РНК**. Одновременно клетке нужны транспортеры аминокислот – **транспортные РНК** и структурные компоненты органелл, синтезирующих белок, – **рибосомальные РНК**. Вся информация о строении транспортных и рибосомальных РНК также находится в ДНК.

Поэтому существует процесс **транскрипции** (англ. *transcription* – *переписывание*) – биосинтез РНК на матрице ДНК.

Необходимые элементы транскрипции

Как в любом матричном биосинтезе в транскрипции выделяют 5 необходимых элементов:

- матрица – одна из цепей ДНК,
- растущая цепь – РНК,
- субстрат для синтеза – рибонуклеотиды (УТФ, ГТФ, ЦТФ, АТФ),
- источник энергии – УТФ, ГТФ, ЦТФ, АТФ.
- ферменты РНК-полимеразы и белковые факторы транскрипции.

Факторы транскрипции - белки, взаимодействующие с определёнными регуляторными участками ДНК и ускоряющие или замедляющие процесс транскрипции.

Стадии транскрипции

Биосинтез РНК происходит в участке ДНК, который называется **транскриптон**, с одного края он ограничен **промотором** (начало), с другого – **терминатором** (конец).

Выделяют три стадии транскрипции:

- инициация,
- элонгация,
- терминация.

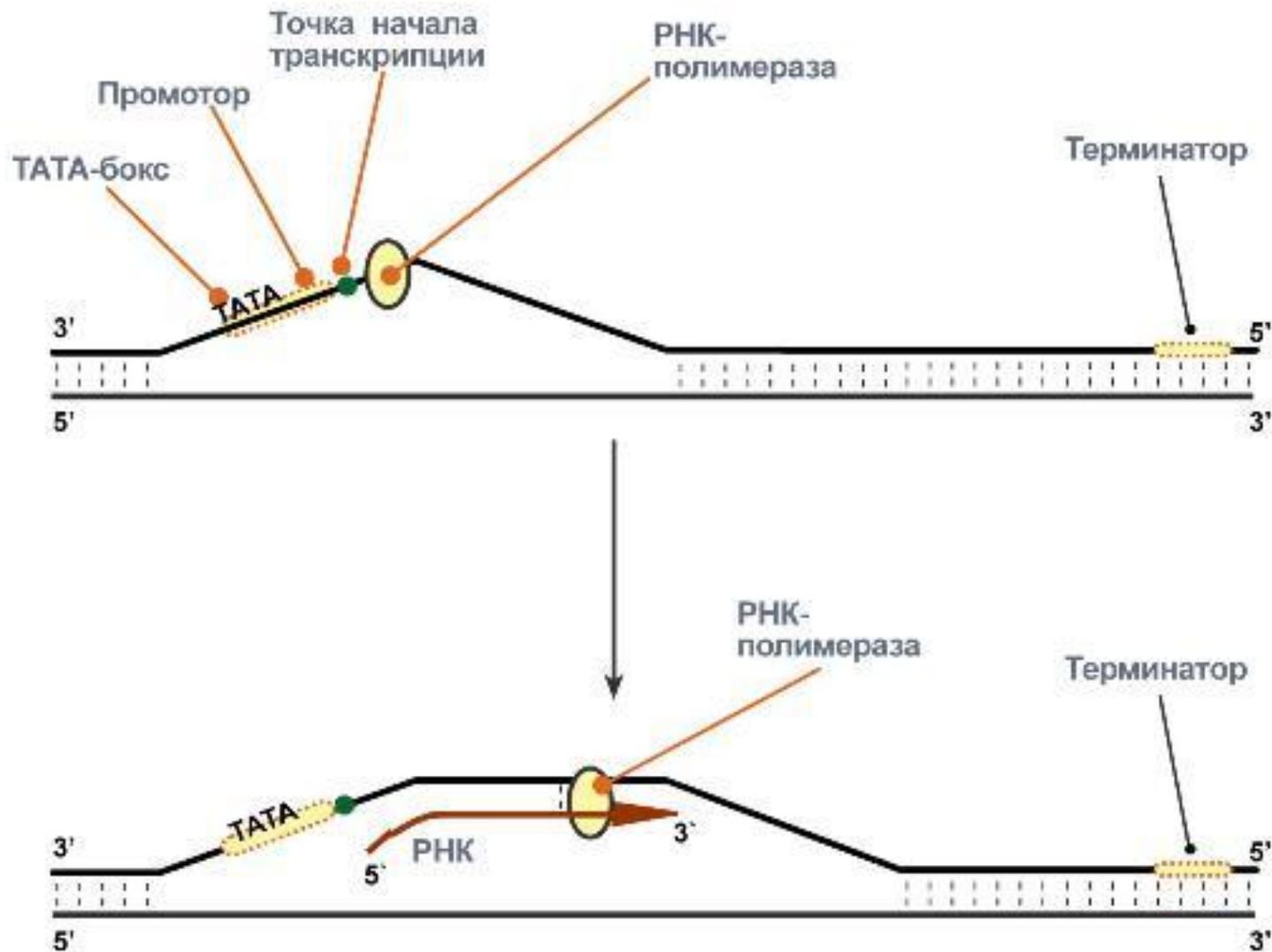
Инициация транскрипции

Промотор содержит стартовый сигнал транскрипции – **ТАТА-бокс**. Так называется определенная последовательность нуклеотидов (**Тимин-Аденин-Тимин-Аденин-Аденин**) ДНК, связывающая первый фактор инициации **ТАТА-фактор**. Этот ТАТА-фактор обеспечивает присоединение **РНК-полимеразы** к той нити ДНК, которая будет использоваться в качестве шаблона для транскрипции (матричная нить ДНК).

Так как промотор ассиметричен ("ТАТА"), то он связывает РНК-полимеразу только в одной ориентации, что определяет направление транскрипции от 5'-конца к 3'-концу.

Другие факторы инициации раскручивают спираль ДНК перед РНК-полимеразой. В результате формируется т.н. **вилка транскрипции**.

Инициация транскрипции



Элонгация

Белковые факторы элонгации обеспечивают продвижение РНК-полимеразы вдоль ДНК и расплетают молекулу ДНК на протяжении примерно 17 нуклеотидных пар.

РНК-полимераза продвигается со скоростью 40-50 нуклеотидов в секунду в направлении $5' \rightarrow 3'$.

По мере продвижения РНК-полимеразы по матрице в направлении от $3'$ - к $5'$ -концу впереди неё происходит расхождение, а позади - восстановление двойной спирали ДНК.

Фермент использует АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ одновременно в качестве субстрата и в качестве источника энергии.

Терминация и процессинг

РНК-полимераза остановится, когда достигнет терминирующих кодонов. С помощью белкового фактора терминации, так называемого ρ -фактора (греч. ρ – "ро"), от матрицы ДНК отделяются фермент и синтезированная молекула РНК, которая является **первичным транскриптом**, предшественником: мРНК, тРНК или рРНК.

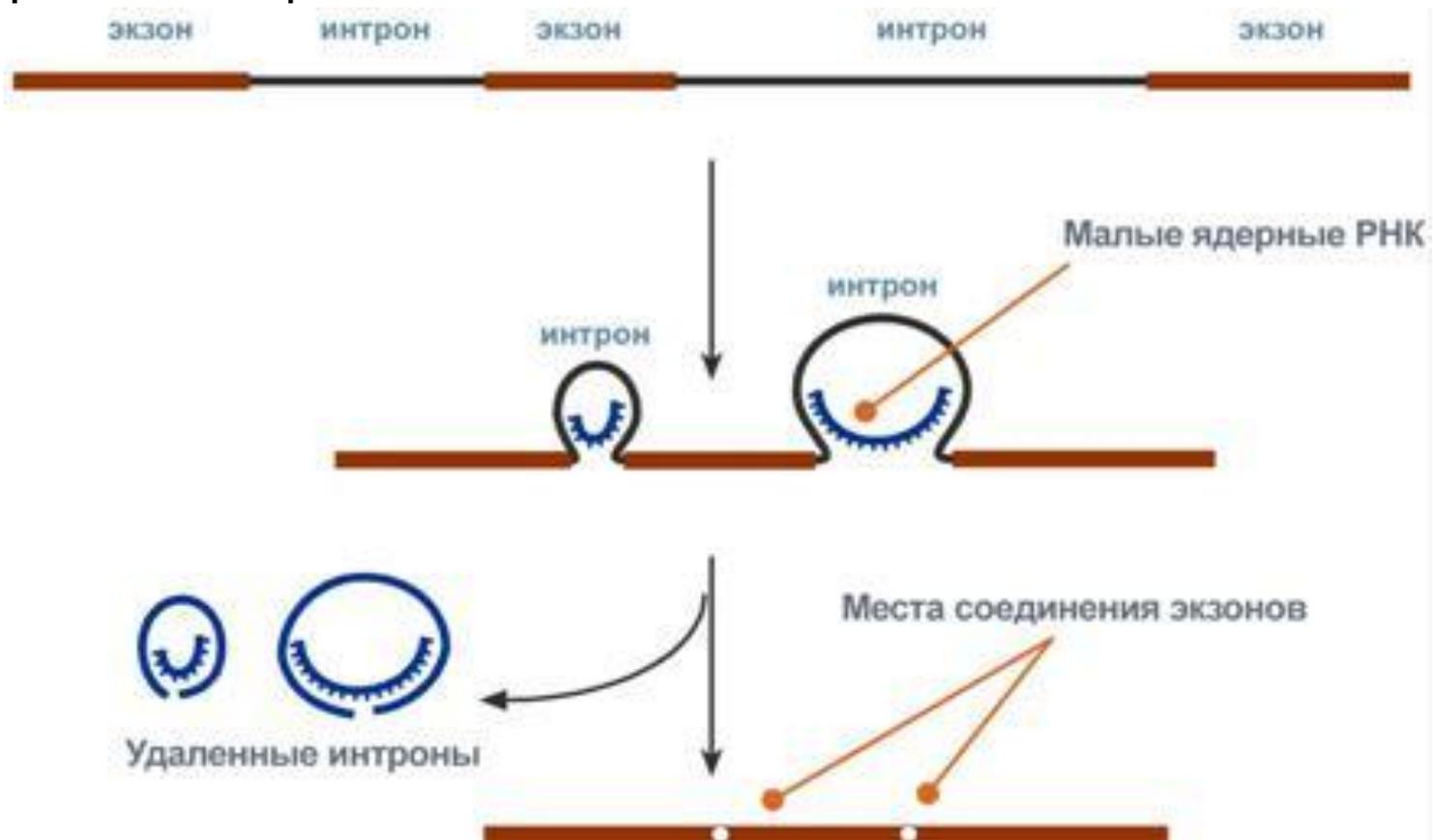
Сразу после синтеза первичные транскрипты РНК по разным причинам еще не имеют активности, являются "незрелыми" и в дальнейшем претерпевают ряд изменений, которые называются **процессинг**.

Процессинг матричной РНК

При транскрипции участков ДНК, несущих информацию о белках, образуются гетерогенные ядерные РНК, по размеру намного превосходящие мРНК. Дело в том, что из-за мозаичной структуры генов эти гетерогенные РНК включают в себя информативные (**экзоны**) и неинформативные (**интроны**) участки.

Процессинг мРНК: сплайсинг

Сплайсинг (англ. *splice* – склеивать встык) – особый процесс, в котором при участии **малых ядерных РНК** происходит удаление интронов и сохранение экзонов.

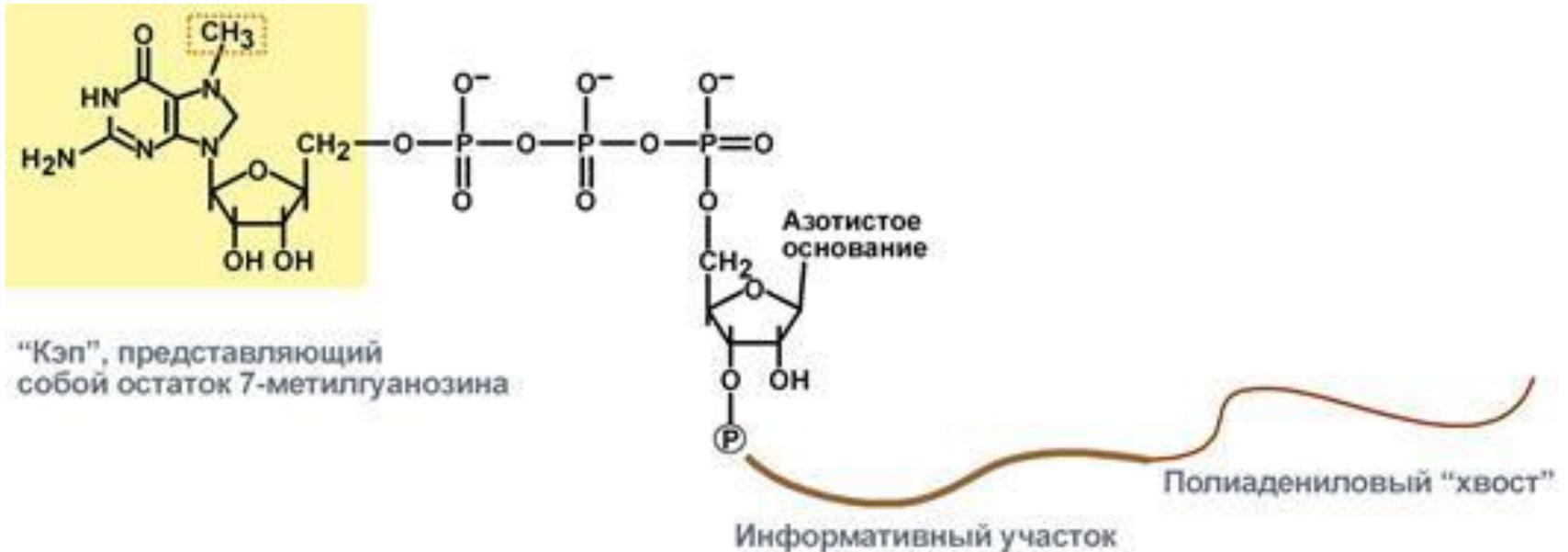


Процессинг мРНК: кэпирование и полиаденилирование

Кэпирование (англ. *cap* – шапка) – происходит еще во время транскрипции. Процесс состоит в присоединении к 5'-трифосфату концевой нуклеотида пре-мРНК 5'-углерода N⁷-метил-гуанозина.

«Кэп» (шапка) необходим для защиты молекулы РНК от экзонуклеаз, работающих с 5'-конца, а также для связывания мРНК с рибосомой и для начала трансляции.

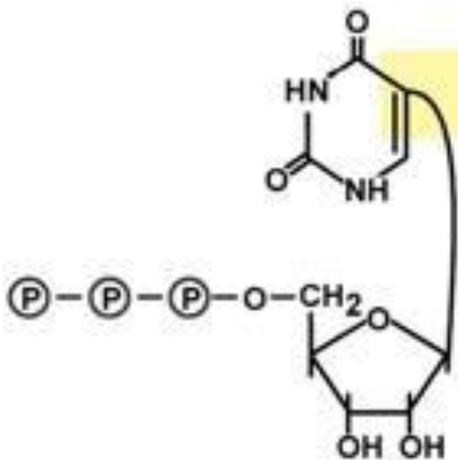
Процессинг мРНК: кэпирование и полиаденилирование



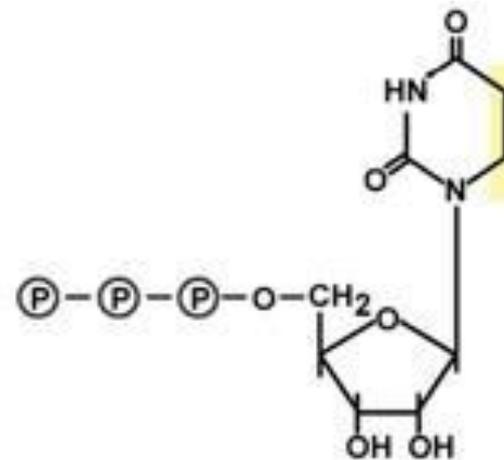
Полиаденилирование – при помощи полиаденилат-полимеразы с использованием молекул АТФ происходит присоединение к 3'-концу РНК от 100 до 200 адениловых нуклеотидов, формирующих полиадениловый фрагмент – поли(А)-хвост. Поли(А)-хвост необходим для защиты молекулы РНК от экзонуклеаз, работающих с 3'-конца.

Процессинг предшественника транспортной РНК

1. Модификация нуклеотидов в молекуле путем дезаминирования, метилирования, восстановления. Например, образование псевдоуридина и дигидроуридина.



Псевдоуридиловый нуклеотид

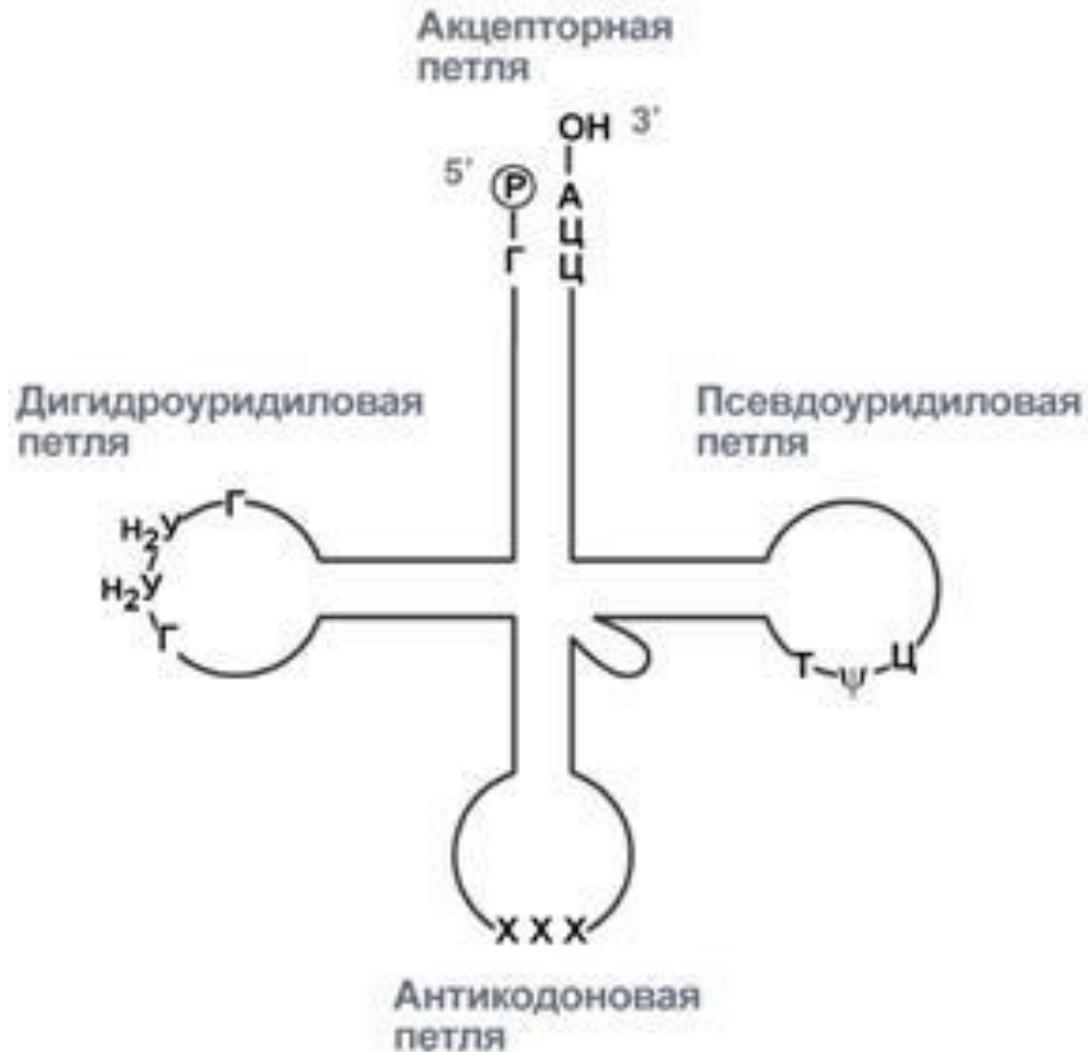


Дигидроуридиловый нуклеотид

Процессинг предшественника транспортной РНК

2. Формирование антикодоновой петли происходит путем сплайсинга и удаления интрона в средней части пре-тРНК.
3. Формирование на 3'-конце последовательности **ЦЦА**. Для этого у одних пре-тРНК с 3'-конца удаляются лишние нуклеотиды до "обнажения" триплета **ЦЦА**, у других идет присоединение этой последовательности.

Внешний вид вторичной структуры тРНК после процессинга



Кодировка аминокислот

Информация в ДНК хранится в виде последовательности, закодированной **4 символами** (нуклеотидами), а белки состоят из **20 различных символов** (аминокислот).

Если попытаться использовать сразу все четыре символа для кодировки аминокислот, то получится всего 16 сочетаний, в то время как протеиногенных аминокислот насчитывается 20. Не хватает...

Карточная аналогия кодирования

"Возьмем, например, колоду игральных карт, в которой мы обращаем внимание только на масть карты. Сколько триплетов одного и того же вида можно получить? Четыре, конечно: трое червей, трое бубен, трое пик и трое треф. Сколько триплетов с двумя картами одной и той же масти и одной другой? Пусть мы имеем четыре выбора для третьей карты. Поэтому мы имеем $4 \times 3 = 12$ возможностей. В дополнение мы имеем четыре триплета со всеми тремя различными картами. Итак, $4 + 12 + 4 = 20$, а это и есть точное число аминокислот, которое мы хотели получить" (Г.А.Гамов).

Генетический код

Для каждой аминокислоты имеется по два обязательных нуклеотида и третий переменный, менее специфичный ("**эффект качания**"). В случае, если брать три символа из четырех, то получится 64 комбинации, что намного перекрывает число аминокислот.

Таким образом любая аминокислота кодируется тремя нуклеотидами. Эта тройка получила название **кодон**. Их, как уже сказано, существует 64 варианта. Три из них не кодируют никакой аминокислоты, это так называемые "**нонсенс-кодоны**" (франц. *non-sens* - бессмыслица) или "стоп-кодоны".

Генетический код

Генетический (биологический) код – это способ кодирования информации о строении белков в виде нуклеотидной последовательности. Он предназначен для перевода четырехзначного языка нуклеотидов (А, Г, У, Ц) в двадцатизначный язык аминокислот. Он обладает характерными особенностями:

- **Триплетность** – три нуклеотида формируют кодон, кодирующий аминокислоту. Всего насчитывают 61 смысловой кодон.
- **Специфичность (или однозначность)** – каждому кодону соответствует только одна аминокислота.
- **Вырожденность** – одной аминокислоте может соответствовать несколько кодонов.

Генетический код

- **Универсальность** – биологический код одинаков для всех видов организмов на Земле (однако в митохондриях млекопитающих есть исключения).
- **Коллинеарность** – последовательность кодонов соответствует последовательности аминокислот в кодируемом белке.
- **Неперекрываемость** – триплеты не накладываются друг на друга, располагаясь рядом.
- **Отсутствие знаков препинания** – между триплетами нет дополнительных нуклеотидов или каких-либо иных сигналов.
- **Однонаправленность** – при синтезе белка считывание кодонов идет последовательно, без пропусков или возвратов назад.

Трансляция

Трансляция (англ. translation – перевод) – это биосинтез белка на матрице мРНК.

Биосинтез белков или трансляция происходит на **рибосомах**, **внутриклеточных** белоксинтезирующих органеллах, и включает 5 ключевых элементов:

- матрица – матричная РНК,
- растущая цепь – полипептид,
- субстрат для синтеза – 20 протеиногенных аминокислот,
- источник энергии – ГТФ,
- рибосомальные белки, рРНК и белковые факторы.

Выделяют три основных стадии трансляции: *инициация, элонгация, терминация.*

Инициация трансляции

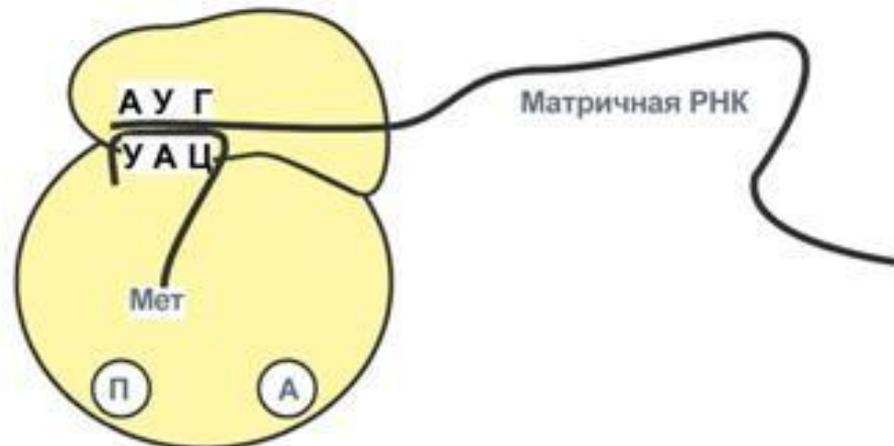
Для инициации необходимы мРНК, ГТФ, малая и большая субъединицы рибосомы, три белковых фактора инициации (ИФ-1, ИФ-2, ИФ-3), метионин и тРНК для метионина.

В начале этой стадии формируются два тройных комплекса:

- первый комплекс – мРНК + малая субъединица + ИФ-3,
- второй комплекс – метионил-тРНК + ИФ-2 + ГТФ.

После формирования тройные комплексы объединяются с большой субъединицей рибосомы. В этом процессе активно участвуют белковые факторы инициации, источником энергии служит ГТФ. После сборки комплекса **инициирующая** метионил-тРНК связывается с первым кодоном АУГ матричной РНК и располагается в П-центре (пептидильный центр) большой субъединицы. А-центр (аминоацильный центр) остается свободным, он будет задействован на стадии элонгации для связывания аминоксил-тРНК.

Инициация трансляции



Энлогация

Для этой стадии необходимы все 20 аминокислот, тРНК для всех аминокислот, белковые факторы элонгации, ГТФ. Удлинение цепи происходит со скоростью примерно 20 аминокислот в секунду.

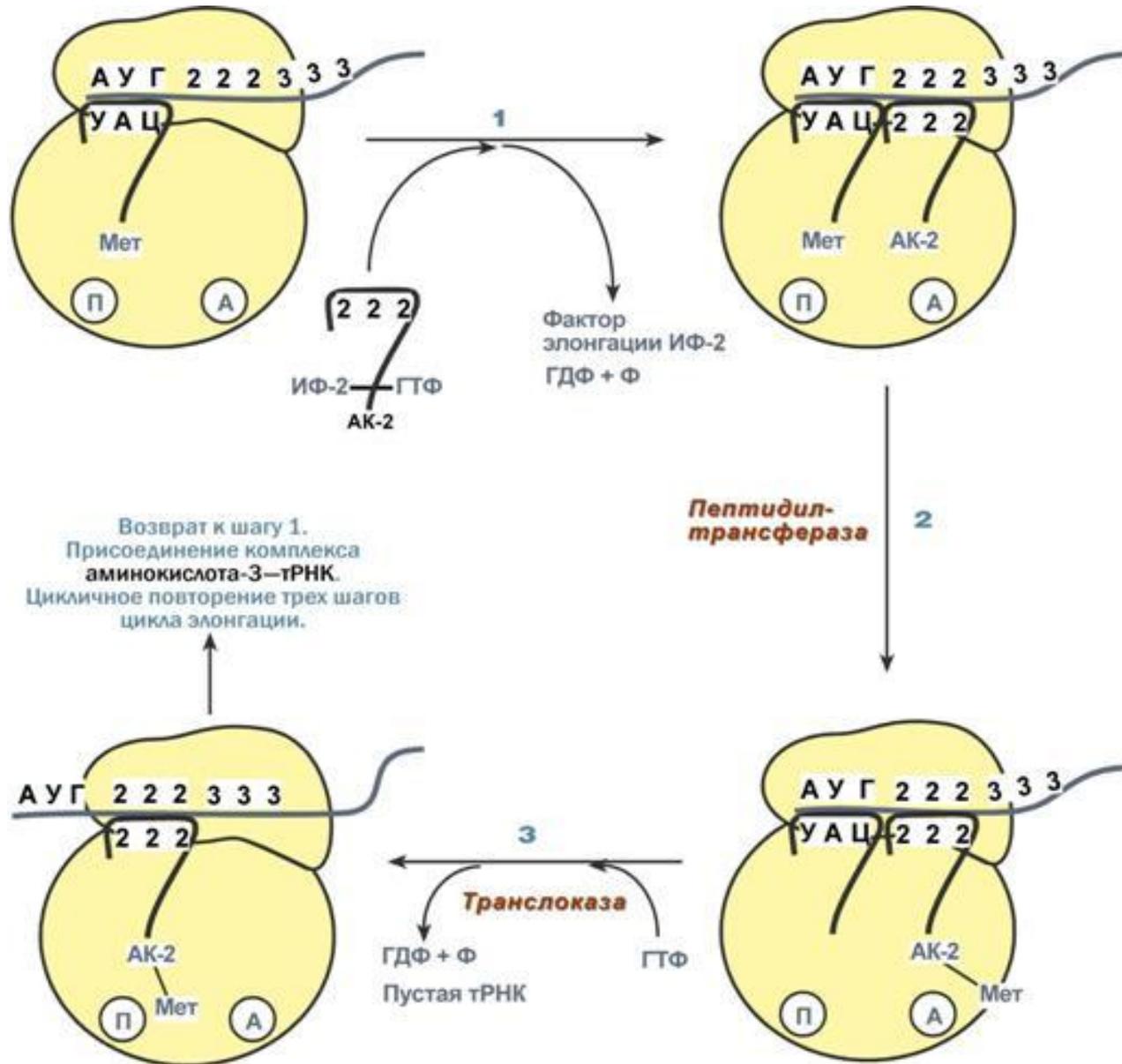
Элонгация представляет собой циклический процесс. Первый цикл (и следующие циклы) элонгации включает три шага:

1. Присоединение аминоацил-тРНК (еще второй) к кодону мРНК (еще второму), аминокислота при этом встраивается в А-центр рибосомы. Источником энергии служит ГТФ.

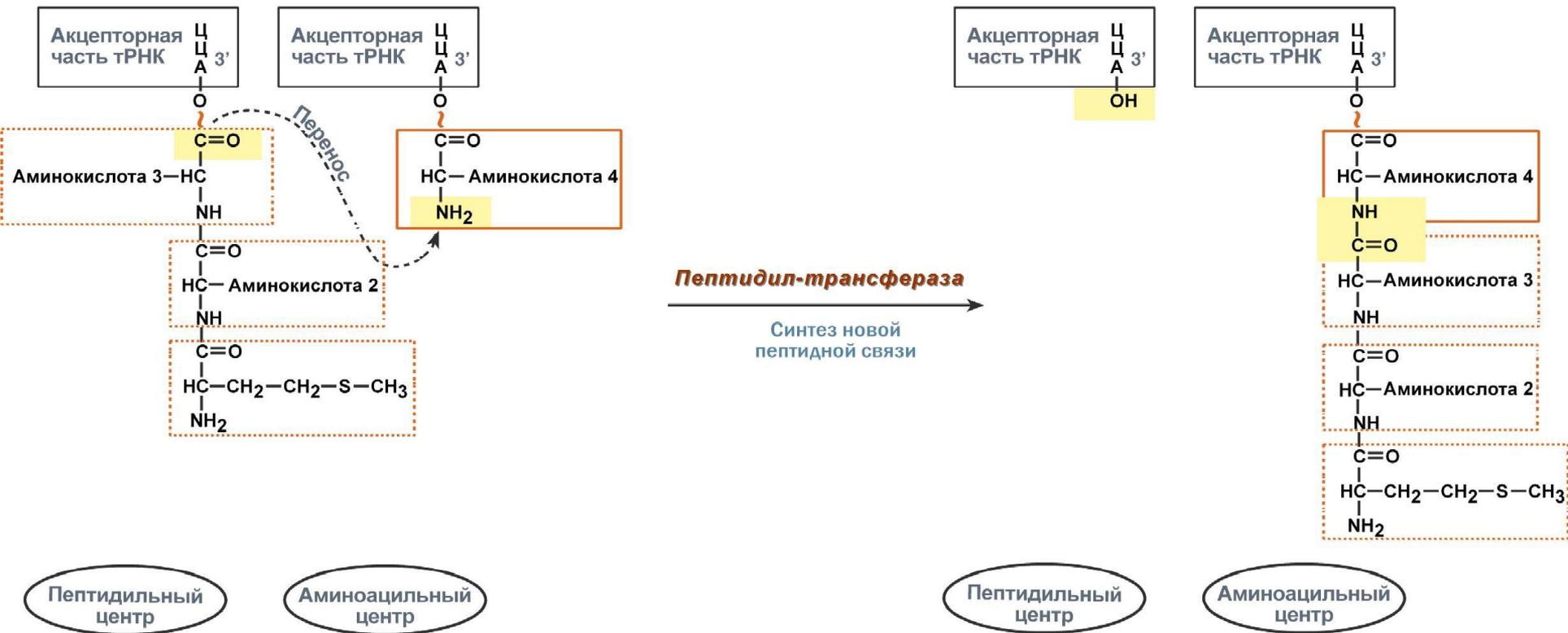
Энлогация

2. Фермент **пептидилтрансфераза** осуществляет перенос метионина с метионил-тРНК (в П-центре) на вторую аминоацил-тРНК (в А-центре) с образованием пептидной связи между метионином и второй аминокислотой. При этом уже активированная СООН-группа метионина связывается со свободной NH_2 -группой второй аминокислоты. Здесь источником энергии служит макроэргическая связь между аминокислотой и тРНК.
3. Фермент **транслоказа** перемещает мРНК относительно рибосомы таким образом, что первый кодон АУГ оказывается вне рибосомы, второй кодон (на рисунке) становится напротив П-центра, напротив А-центра оказывается третий кодон (на рисунке). Для этих процессов необходима затрата энергии ГТФ. Так как вместе с мРНК перемещаются закрепленные на ней тРНК, то иницирующая первая тРНК выходит из рибосомы, вторая тРНК с дипептидом помещается в П-центр.

Энлогация



Дальнейшие циклы

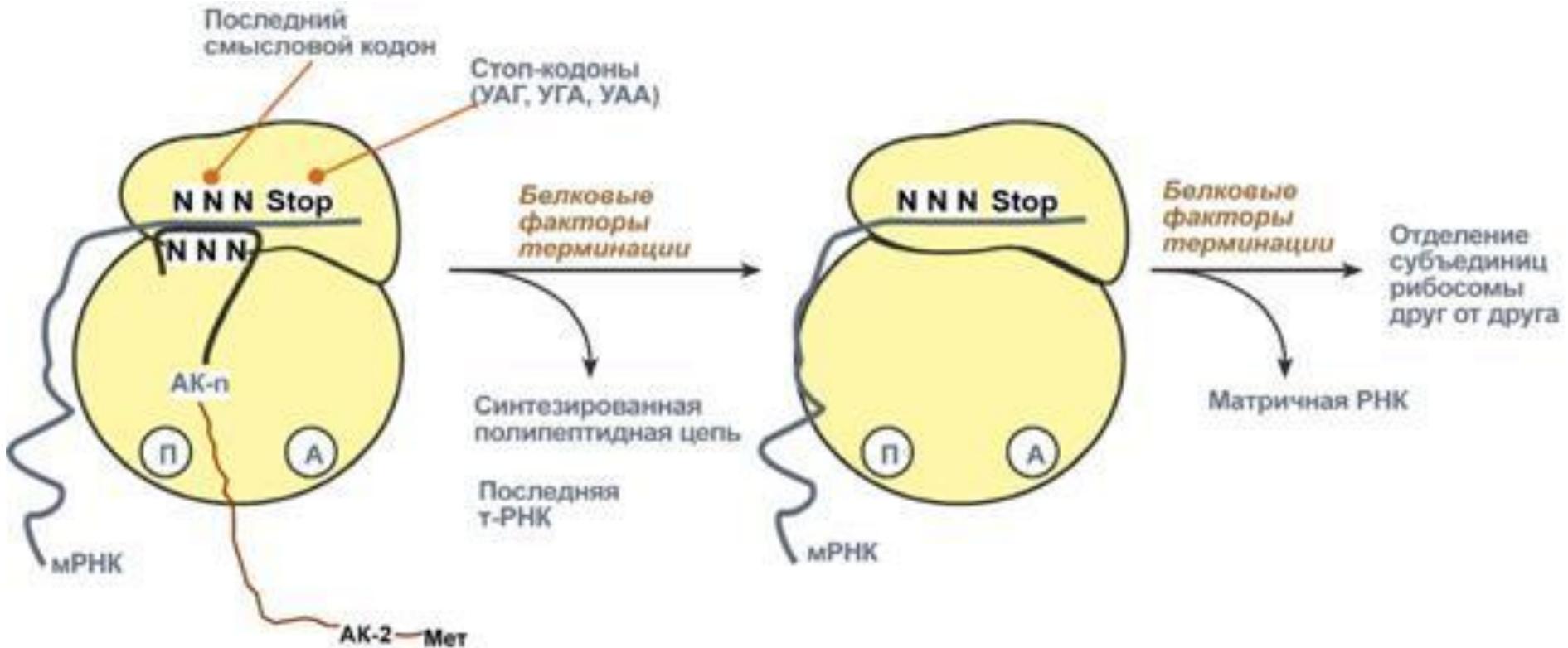


Терминация

Синтез белка продолжается до тех пор, пока рибосома не достигнет на мРНК особых терминирующих кодонов – стоп-кодонов УАА, УАГ, УГА. Данные триплеты не кодируют ни одной из аминокислот, их также называют **нонсенс-кодонами**. При вхождении этих кодонов внутрь рибосомы происходит активация белковых факторов терминации, которые последовательно катализируют:

- Гидролитическое отщепление полипептида от конечной тРНК.
- Отделение от П-центра последней, уже пустой, тРНК.
- Диссоциацию рибосомы.

Терминация



Полирибосомы

По причине того, что продолжительность жизни матричной РНК невелика, перед клеткой стоит задача использовать ее максимально эффективно, т.е. получить максимальное количество "белковых копий". Для достижения этой цели на каждой мРНК может располагаться не одна, а несколько рибосом, встающих последовательно друг за другом и синтезирующих пептидные цепи. Такие образования называются **полирибосомы**.