

Матричные биосинтезы

Репликация
(репарация)

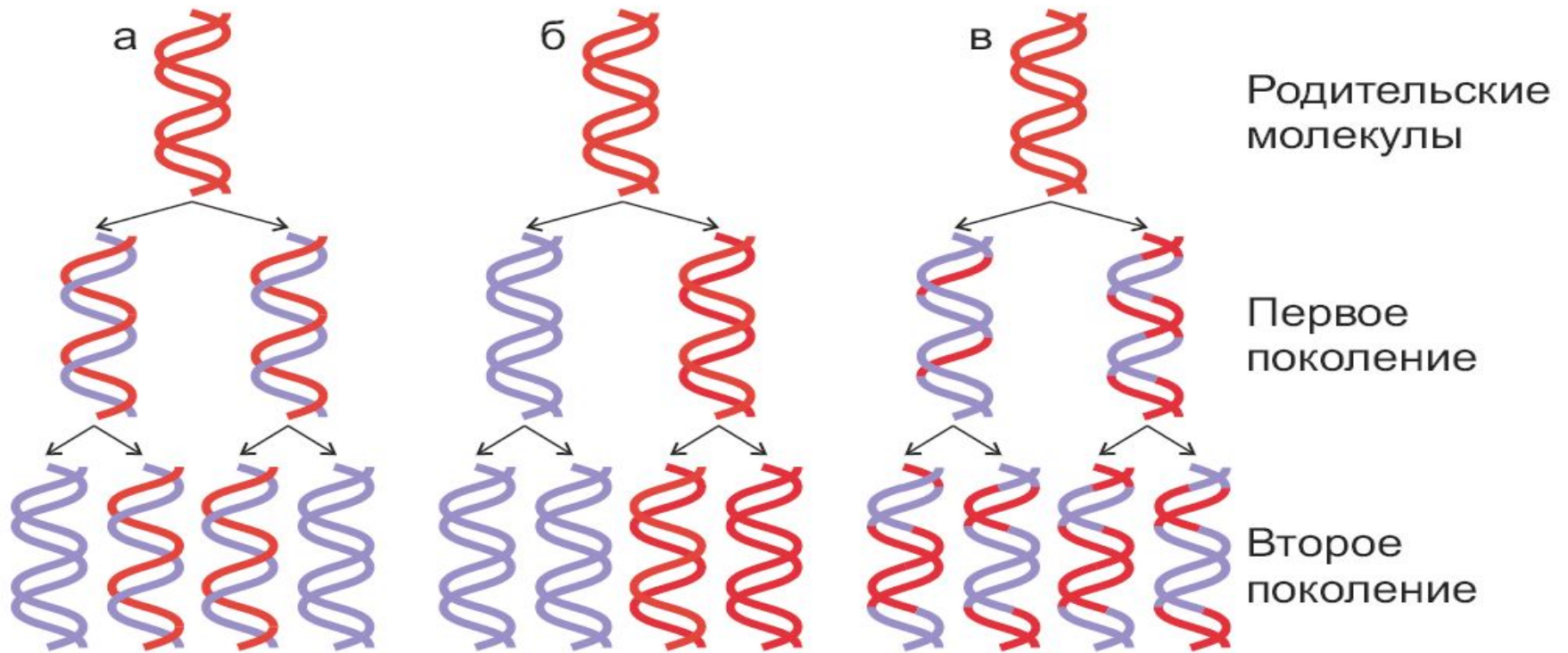
Транскрипция

Трансляция

Репликация ДНК

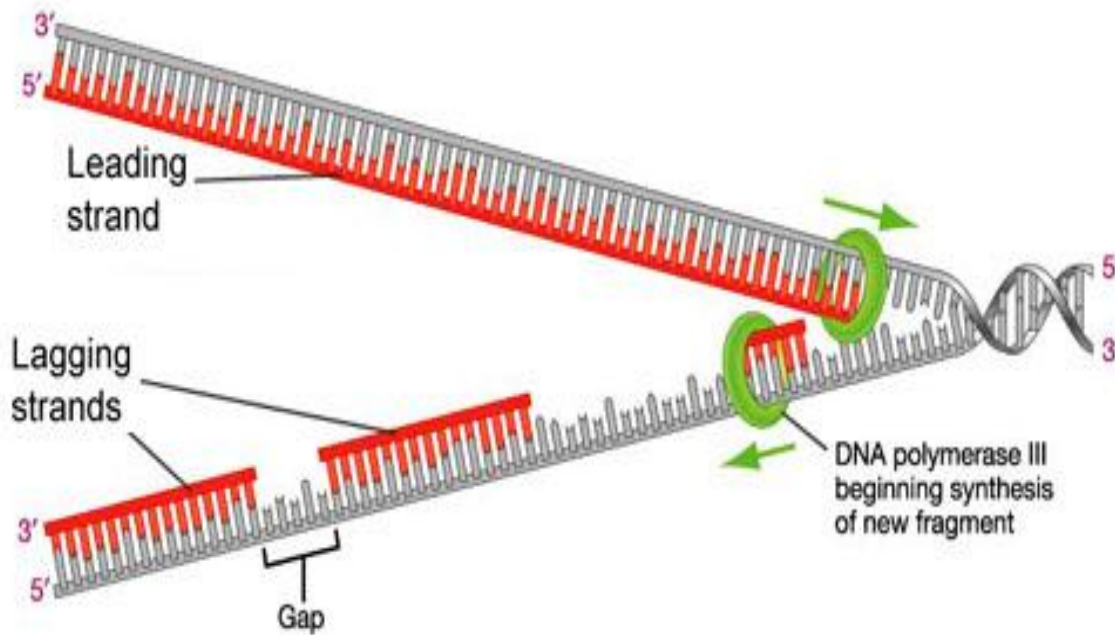
- Основные принципы репликации ДНК
- Компоненты реплисомы
- Репликация ДНК *E.coli*
- Репликация ДНК у эукариот
- Репарация ДНК

Три механизма репликации ДНК



а) полуконсервативная; б) консервативная; в) дисперсивная

Репликация ДНК – полуконсервативный прерывистый механизм



Каждая цепь ДНК служит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепи.

Лидирующая цепь ДНК – синтез дочерней ДНК – идет непрерывно в направлении $5' \rightarrow 3'$, совпадающим с движением репликативной Вилки.

Отстающая цепь – синтез прерывистый, в виде фрагментов Оказаки.

Для биосинтеза ДНК необходимо:

- 1) неспаренная цепь – как матрица и цепь затравка;
- 2) полный набор дезоксирибонуклеотидфосфатов, которые служат субстратом и источником энергии для дочерней ДНК молекулы;
- 3) ферменты и белки - репликасома

Репликация осуществляется сложным комплексом ферментов и белков – реплисомой

РЕПЛИСОМА – сложный и эффективно работающий репликативный комплекс, состоящий примерно из 40 белков и включающий:

- ДНК-полимеразу;
- хеликазу (гер-белок);
- топоизомеразу;
- ssb-белок;
- праймазу;
- ДНК-лигазу;
- множество дополнительных белков.

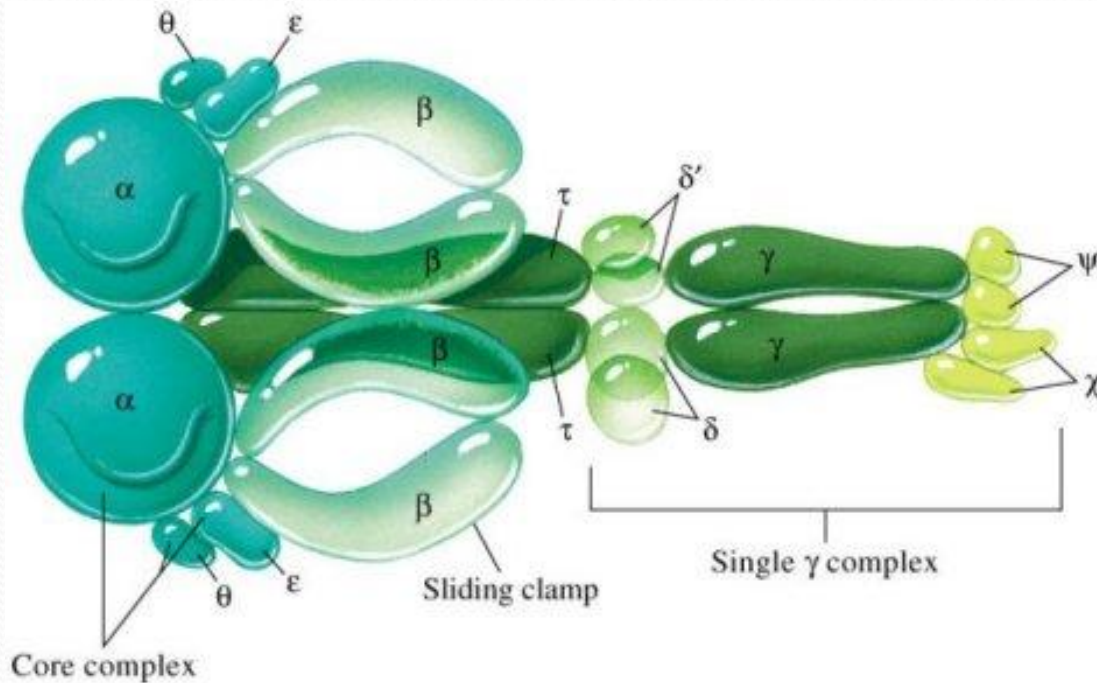
ДНК-полимеразы прокариот

- У прокариот есть три ДНК-полимеразы – Pol I (1), Pol II (2) и Pol III (3)

В репликации ДНК участвуют Pol I и Pol III

- (1) обладает полимеразной и ($3' \rightarrow 5'$, $5' \rightarrow 3'$) экзонуклеазной активностью; участвует в удалении праймера, застройки образовавшейся бреши, коррекции ошибок
- (2) осуществляет репаративный синтез ДНК
- (3) обладает полимеразной и $3' \rightarrow 5'$ – экзонуклеазной активностью; синтезирует лидирующую и отстающую цепь ДНК, обладает корректорской функцией (основной фермент репликации ДНК)

ДНК-полимераза III *E.coli*

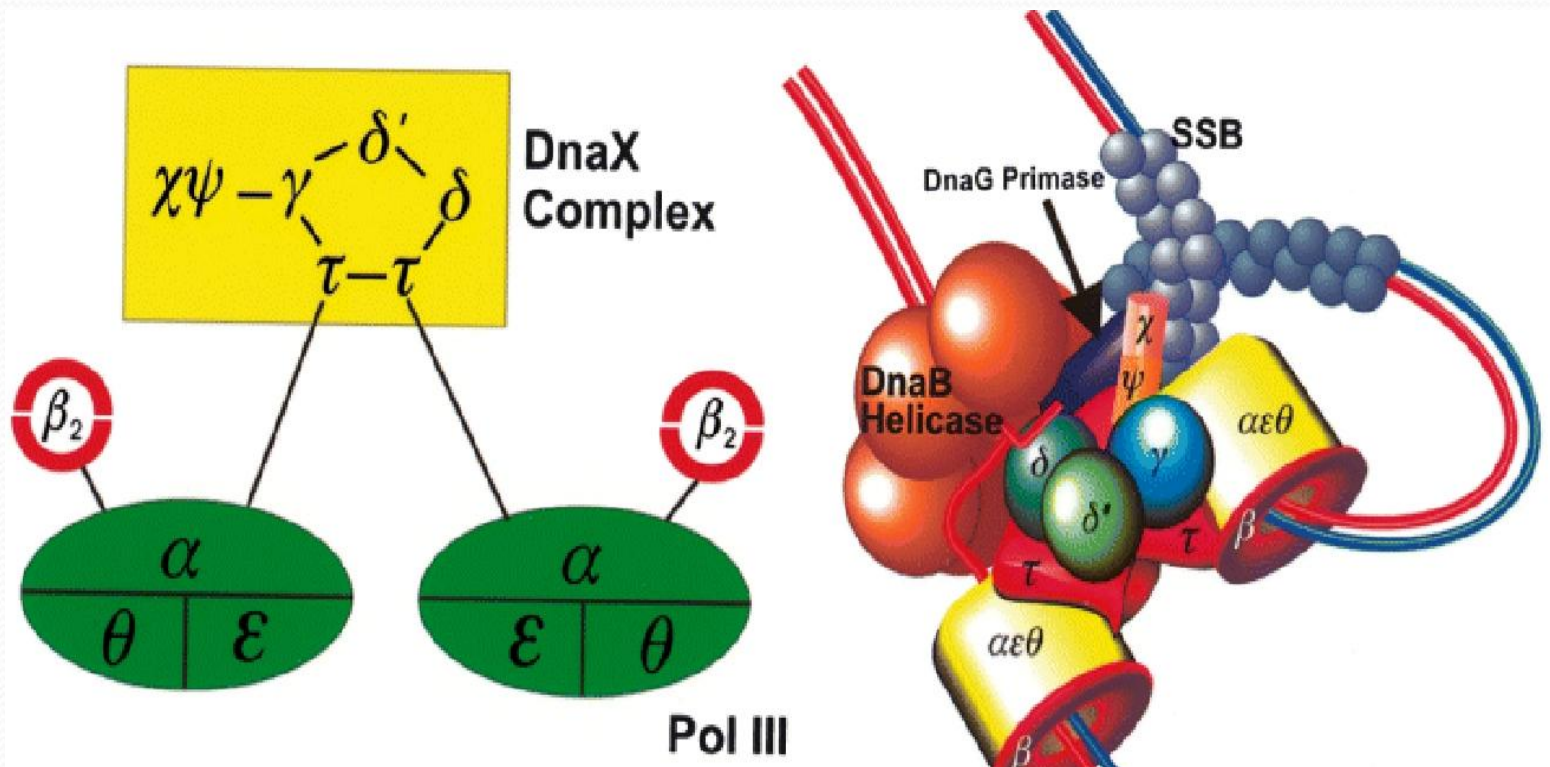


Кор-фермент ($\alpha\theta\epsilon$)
 β -белок выполняет функцию «скользящего зажима».
 τ - белок – сборка и димеризация холофермента ДНК-полимеразы
 γ -комплекс ($\gamma, \delta, \delta', \chi, \psi$) – ДНК-зависимая АТРаза, связывание затравки с матрицей, активация ДНК-полимеразы.

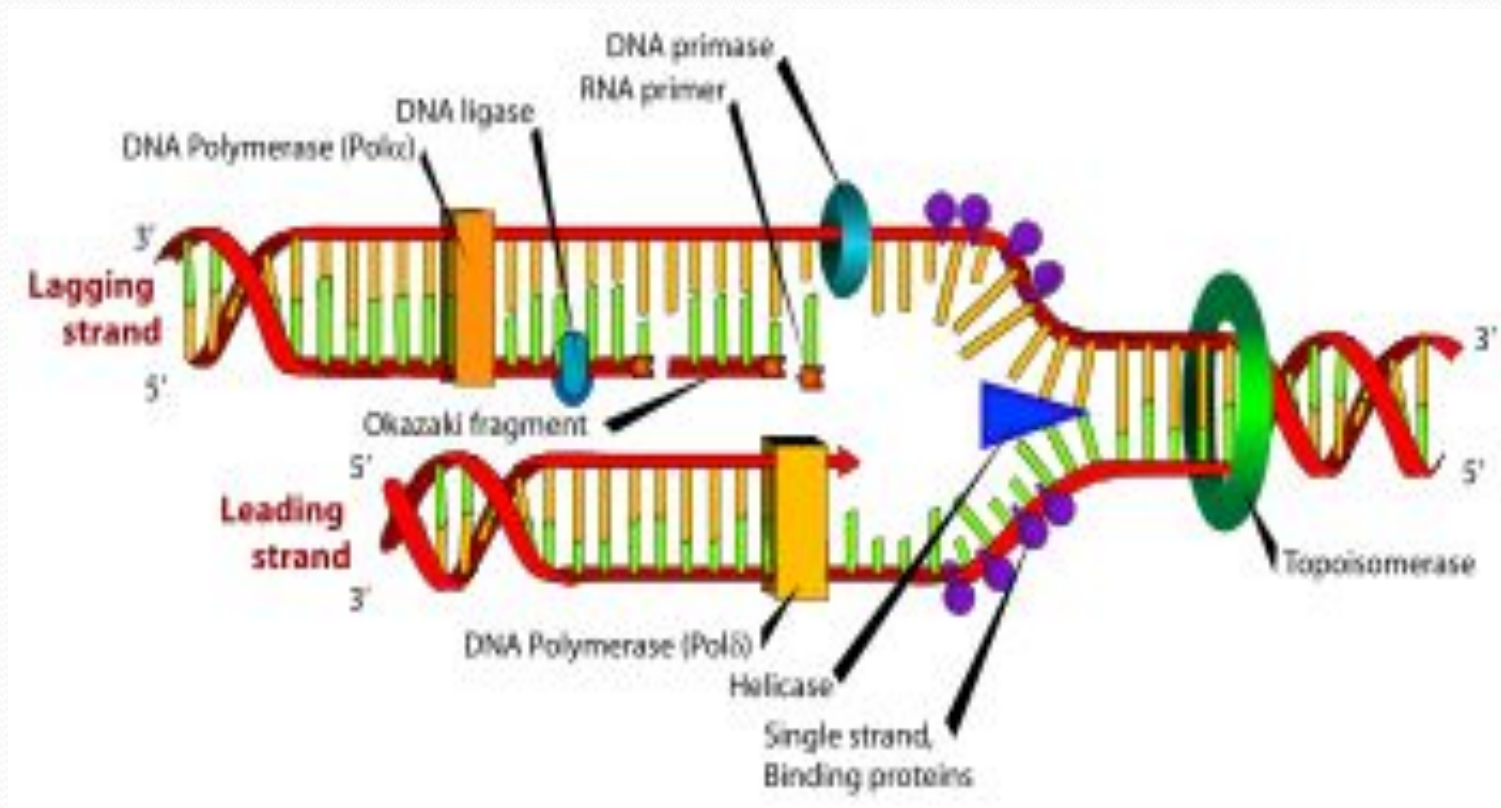
Белки, входящие в состав репликативного комплекса

- Dna A – узнавание области начала репликации, привлечение к месту сборки остальных белковых компонентов
- Dna B – ДНК-хеликаза – разделение цепей ДНК в репликативнойвилке
- Dna C – обеспечение взаимодействия хеликазы и праймазы с ДНК
- Гистоноподобный белок – стимулирует инициацию
- ДНК-связывающий белок (ssb) – стабилизирует расплетенные одноцепочечные ДНК, связываясь с ними, и повышает активность хеликазы
- Dna G – праймаза – синтез РНК-затравок
- ДНК-лигаза – соединяет концы фрагментов ДНК
- Топоизомераза I – релаксирование отрицательной суперспирализации
- Топоизомераза II (ДНК-гираза) – индуцирование образования отрицательных сверхвитков.
- Dam метилаза – метлирует (5')УАТЦ последовательность в oriC.

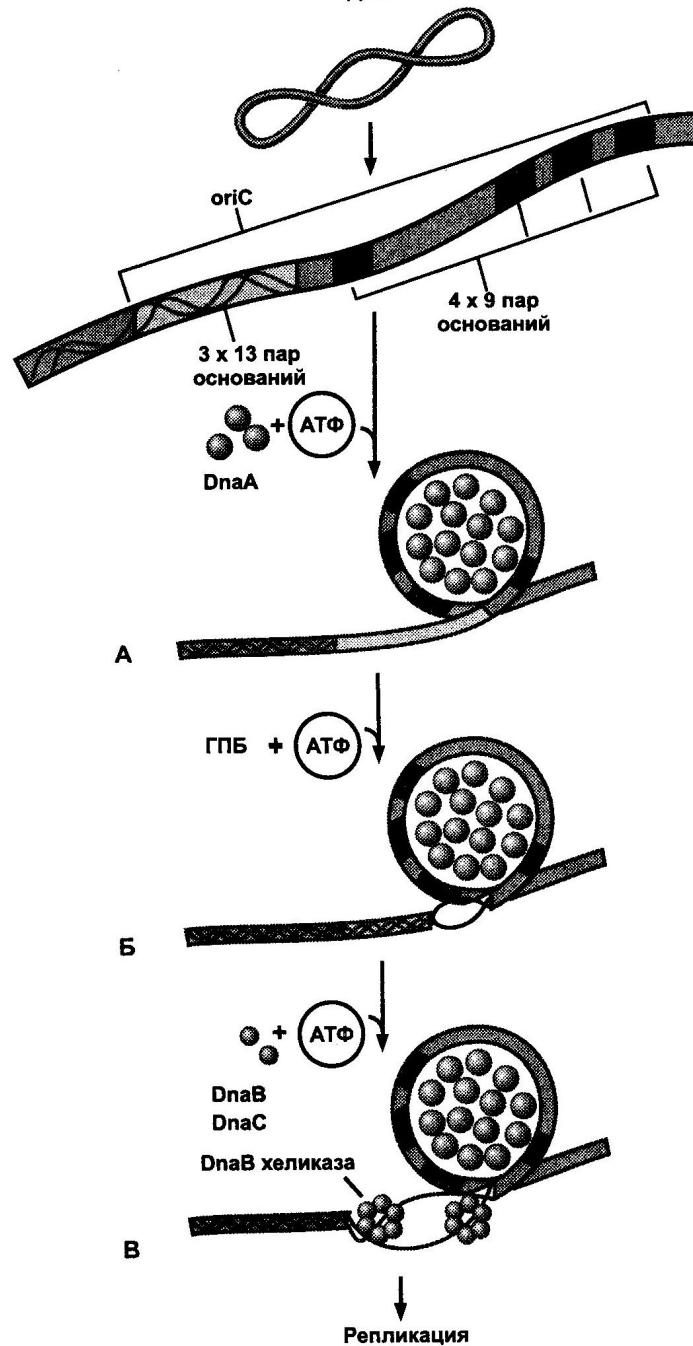
Архитектура репликационного комплекса ДНК-полимеразы III E.coli



Действие ДНК-полимеразы

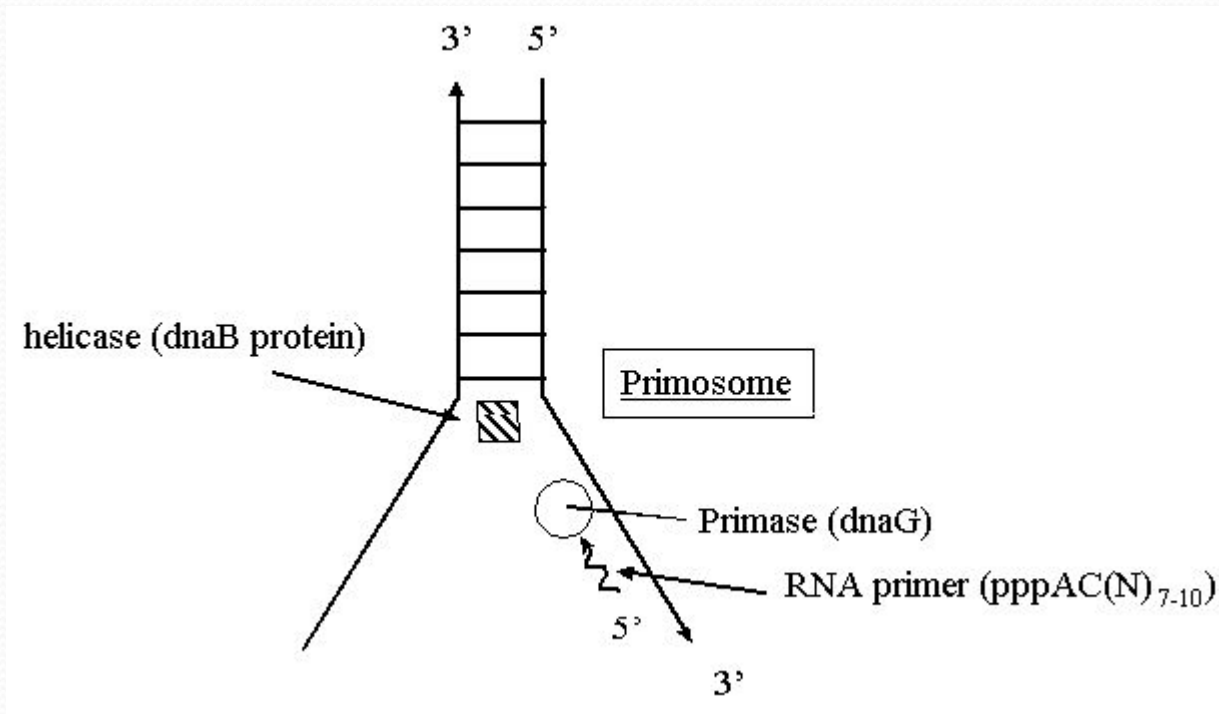


Суперспирализованная ДНК

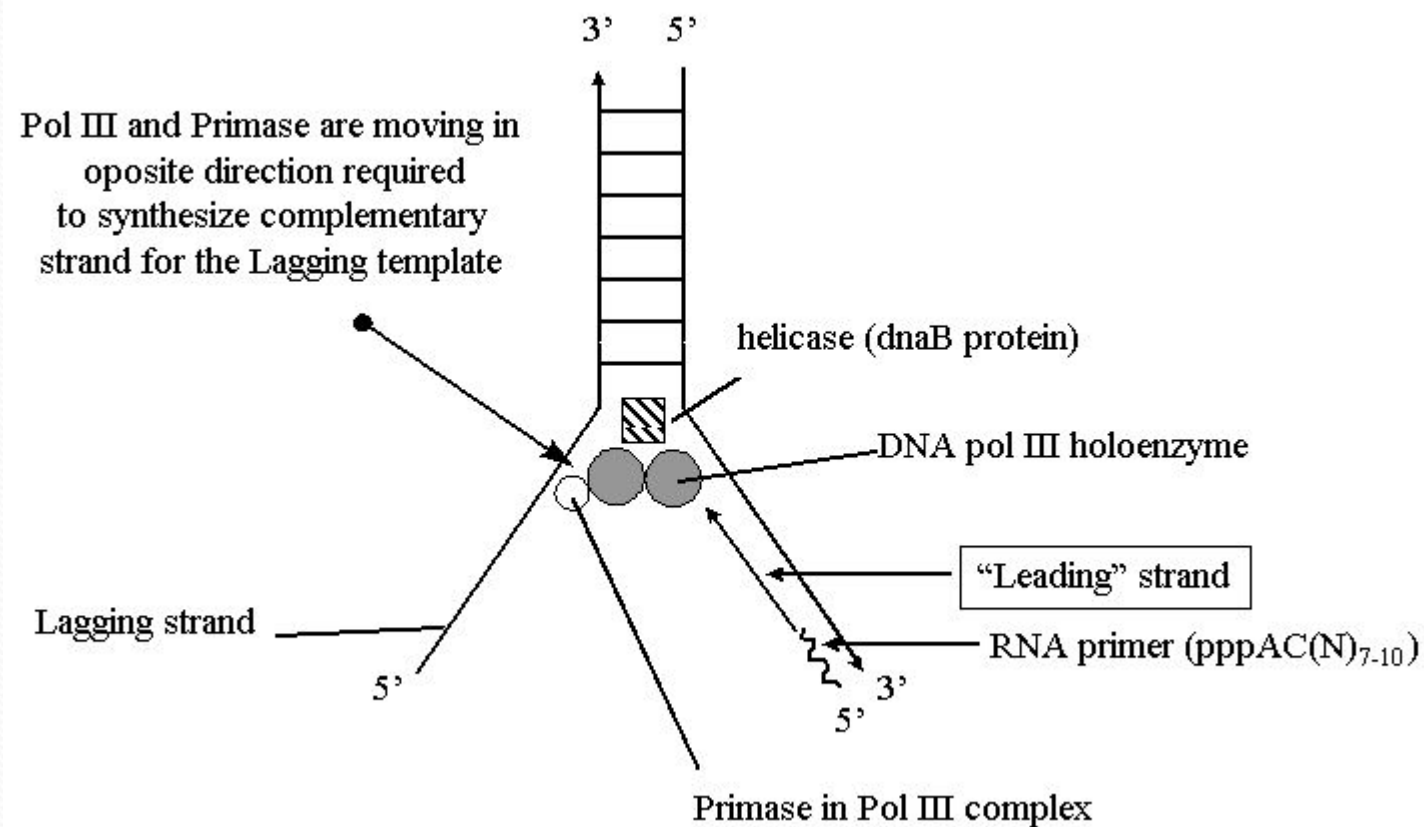


Стадия инициации

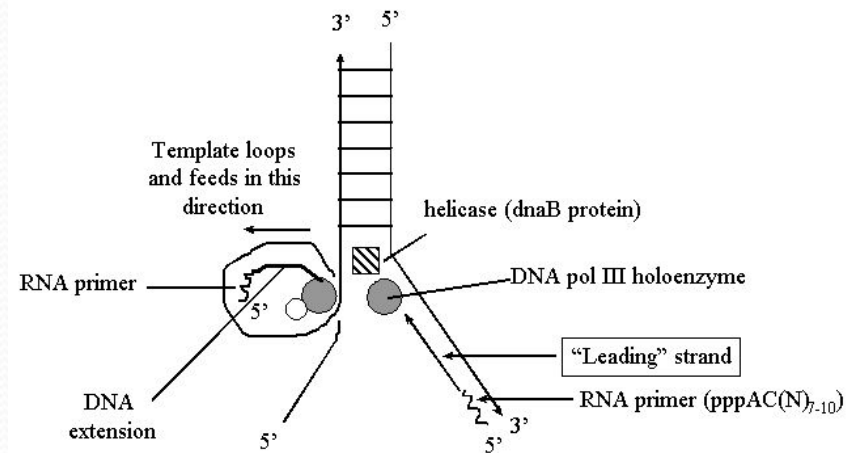
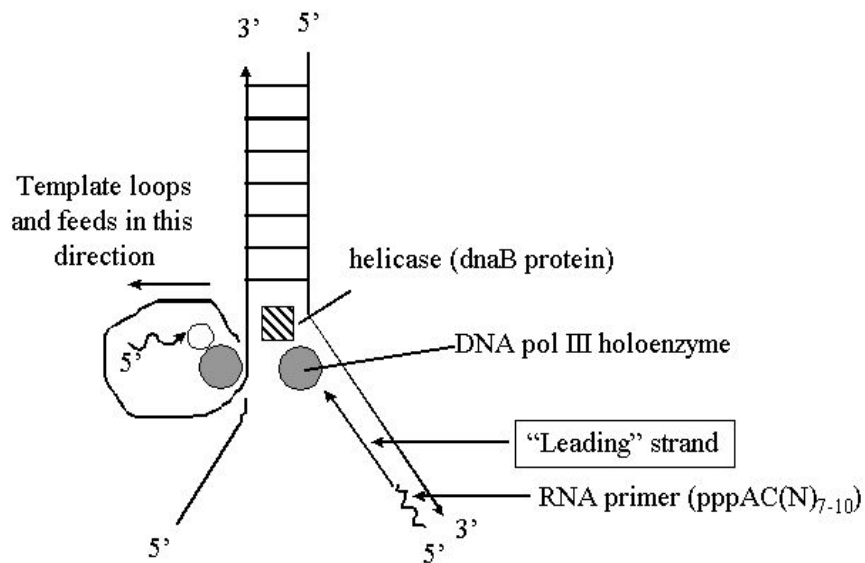
Синтез праймера на лидирующей цепи ДНК РНК-полимеразой (праймазой)



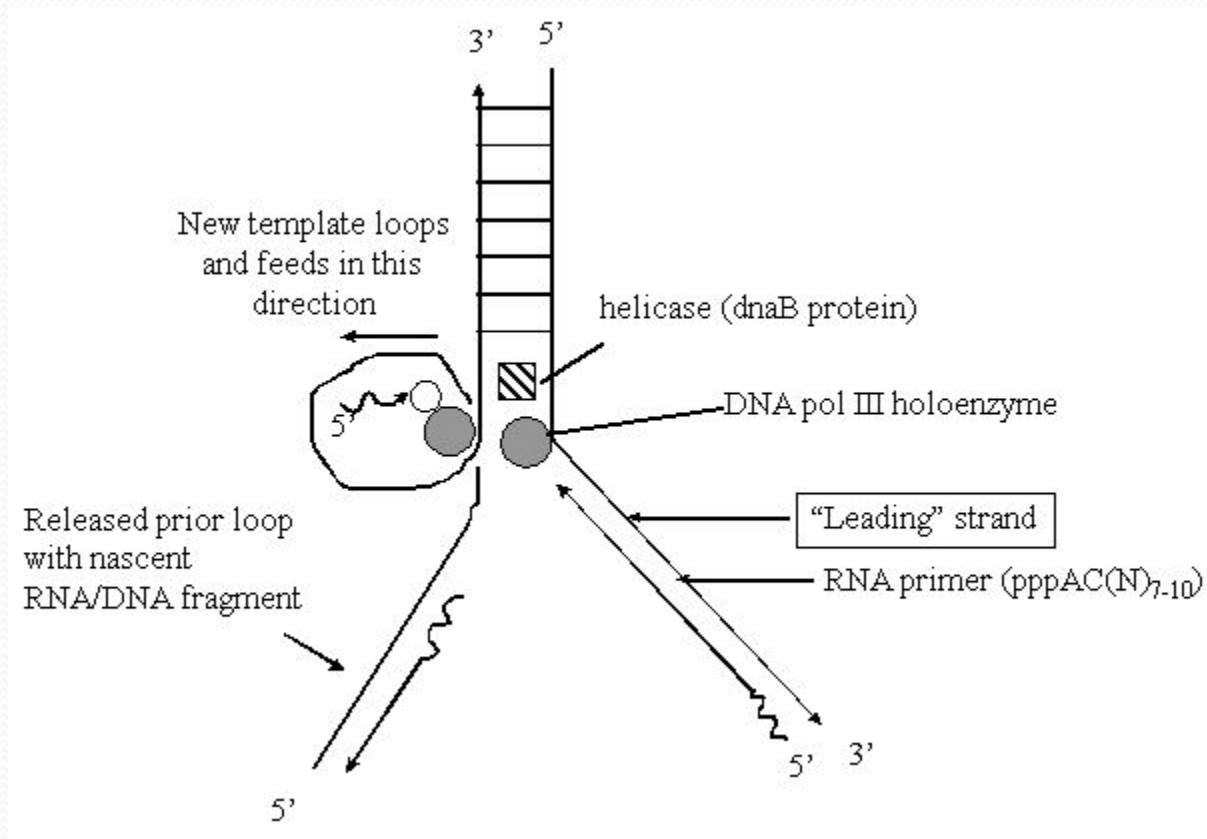
ДНК-полимераза и праймаза – переход на отстающую цепь ДНК



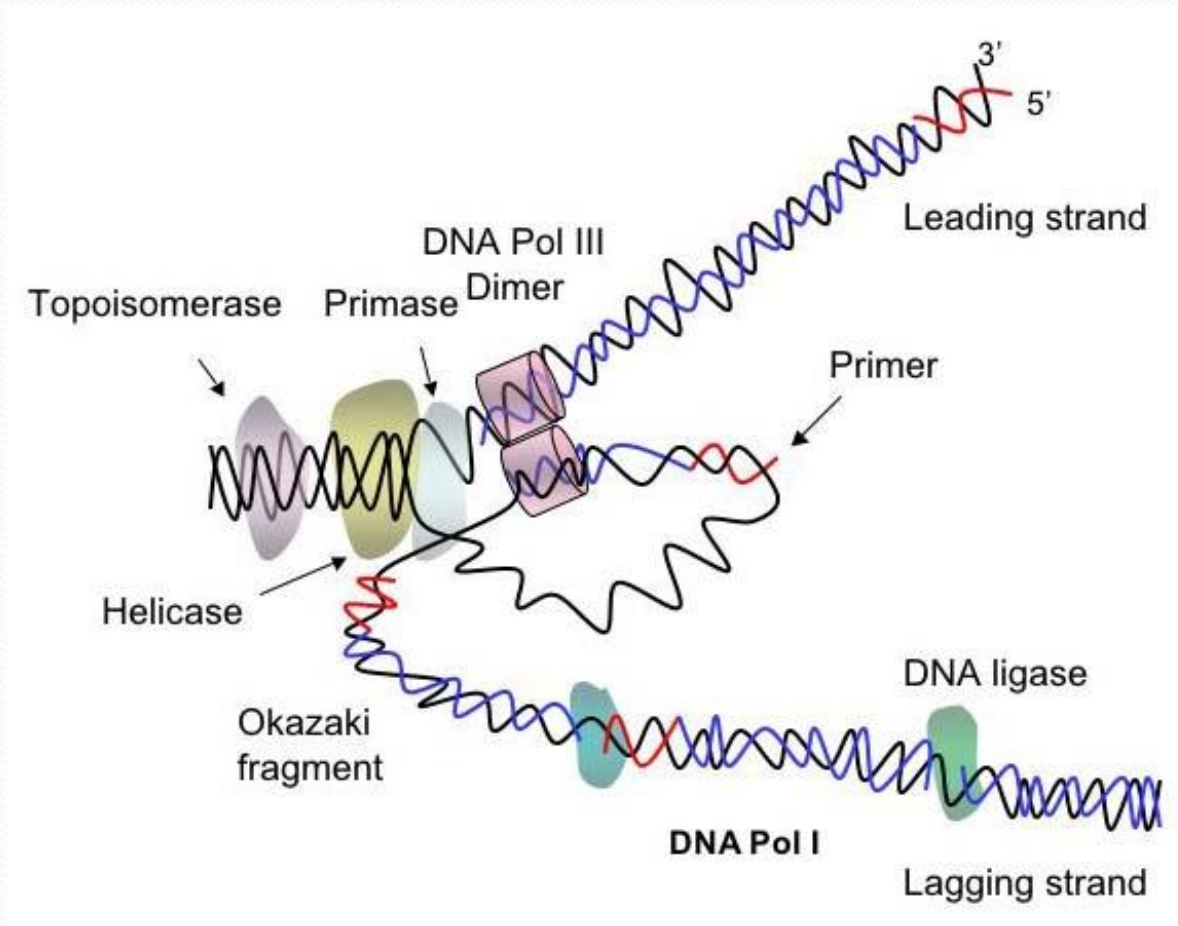
Преодоление антипараллельности цепей при репликации за счет возникновения петли



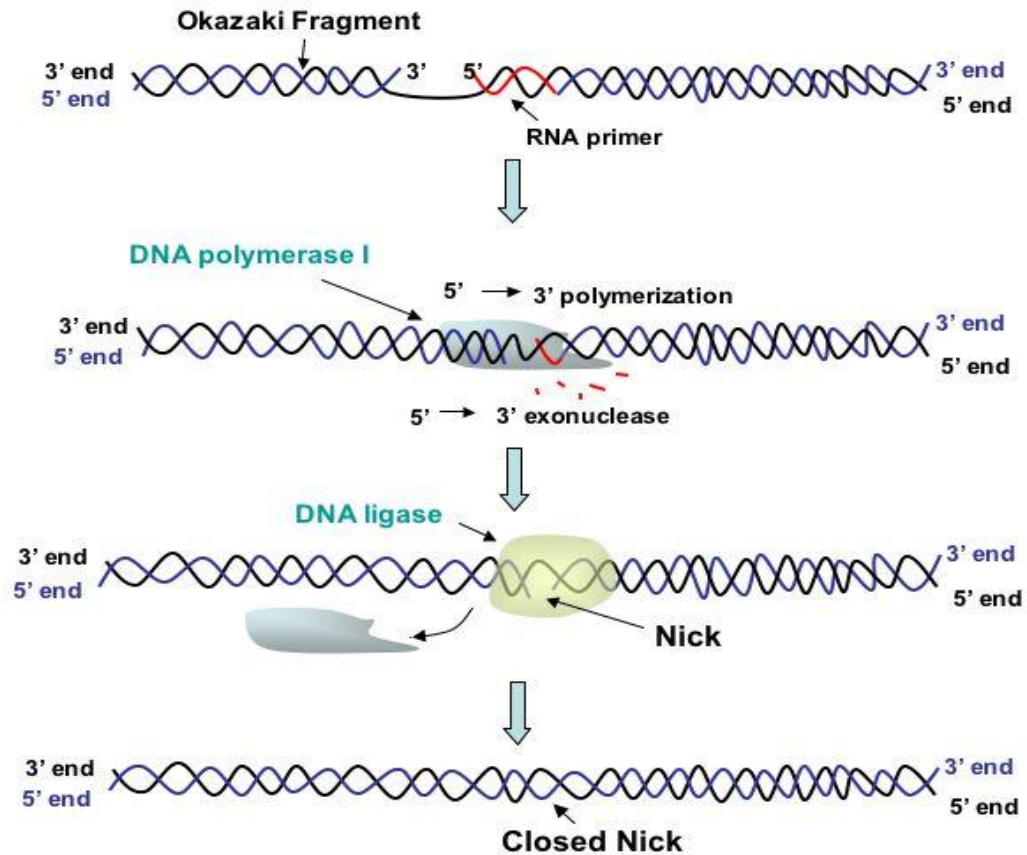
Образование фрагмента Оказаки на отстающей цепи ДНК

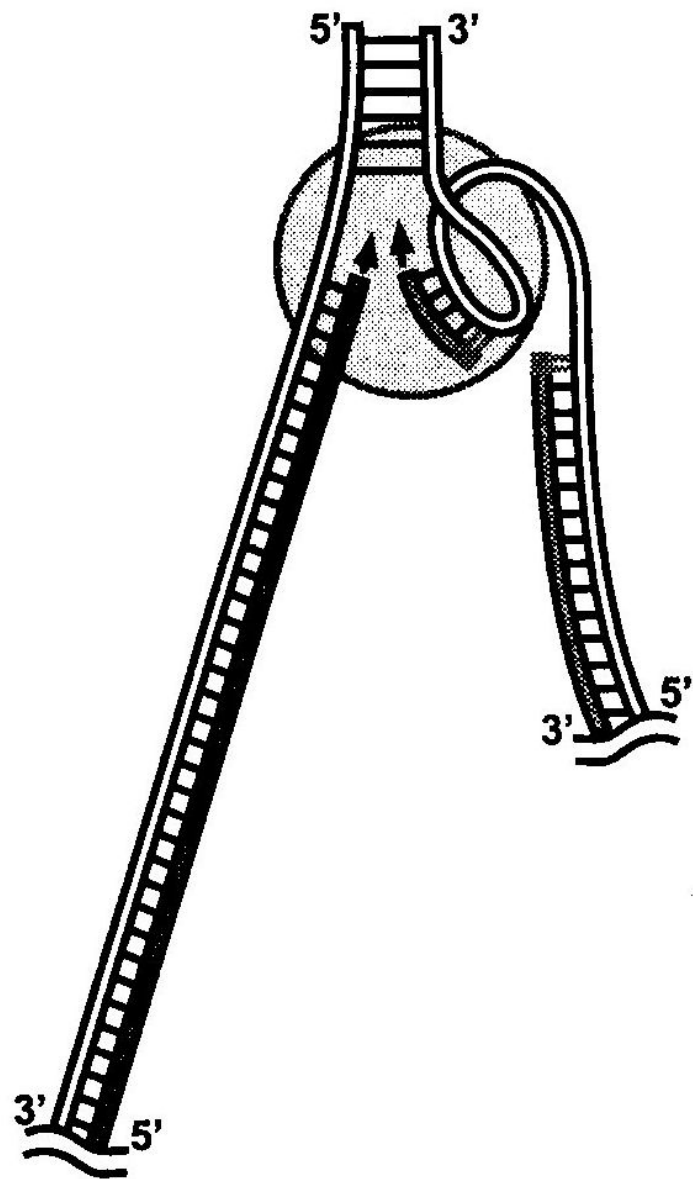


Элонгация репликации

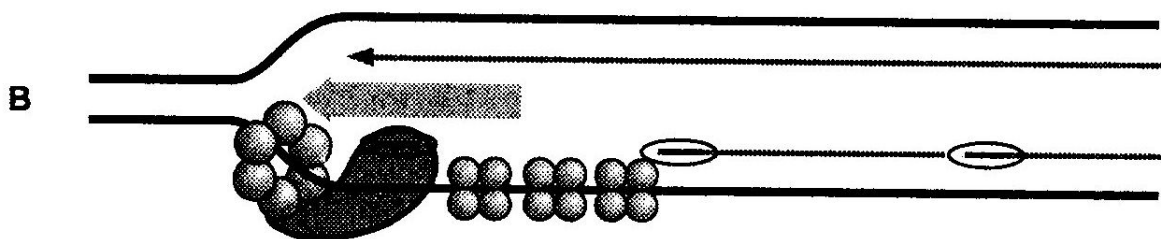
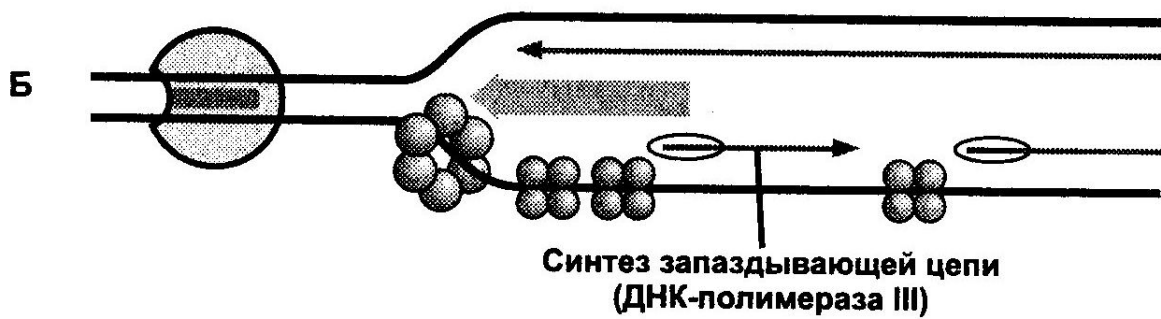
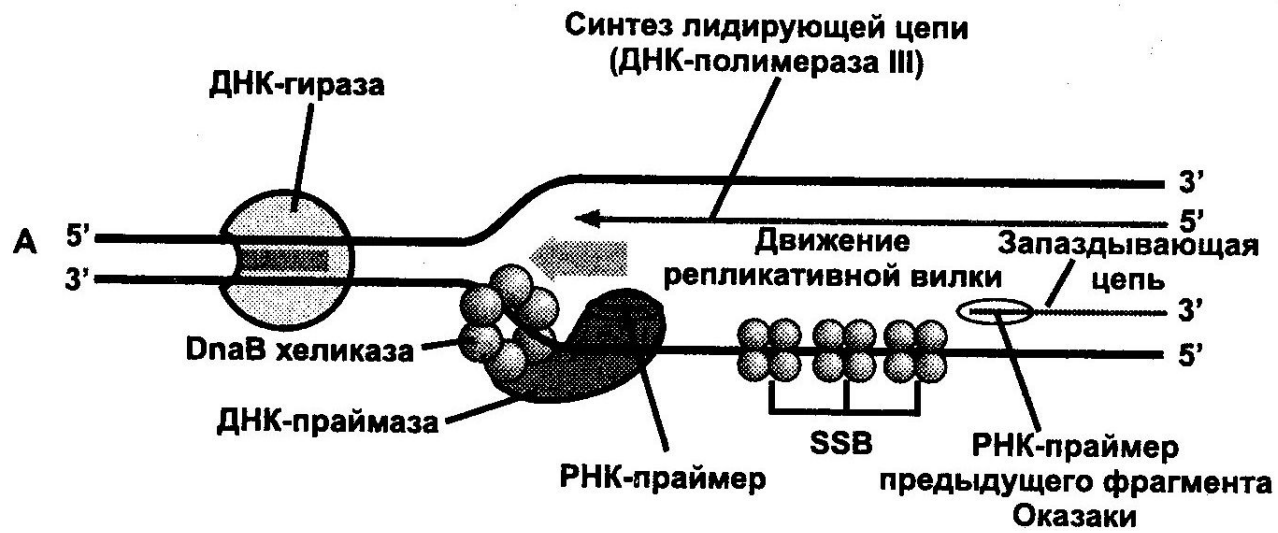


Элонгация репликации (процессинг фрагментов Оказаки)

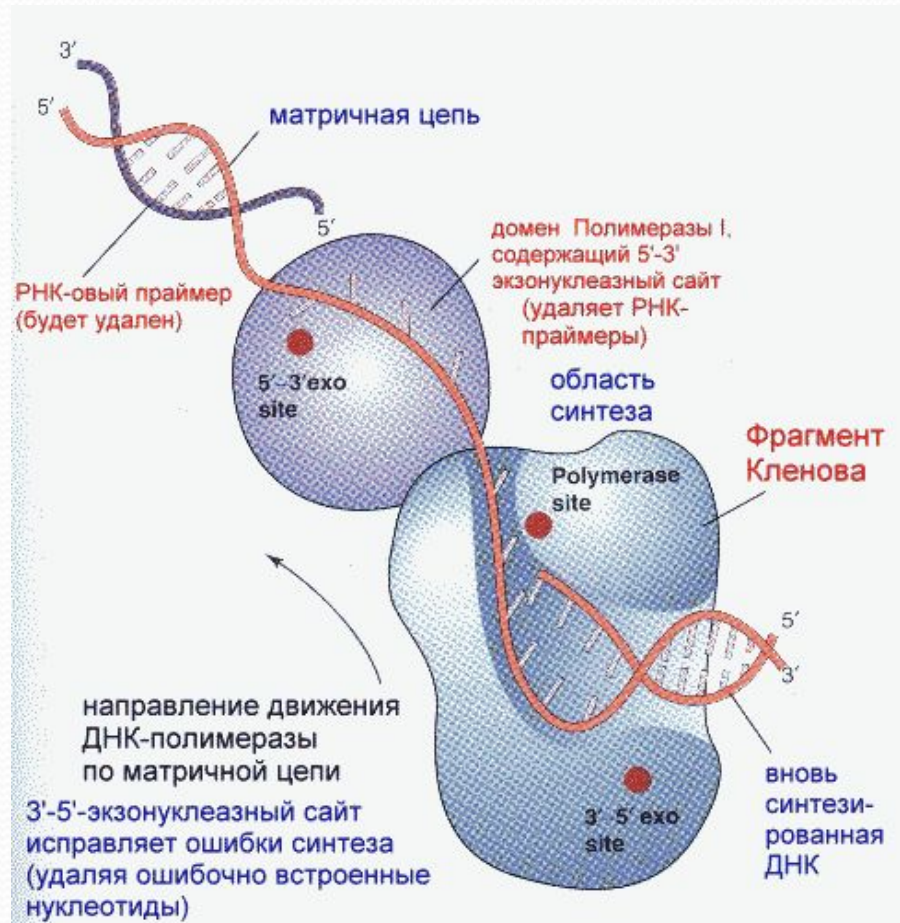




Образование
фрагментов Оказаки
за счет образования
петли на
запаздывающей цепи



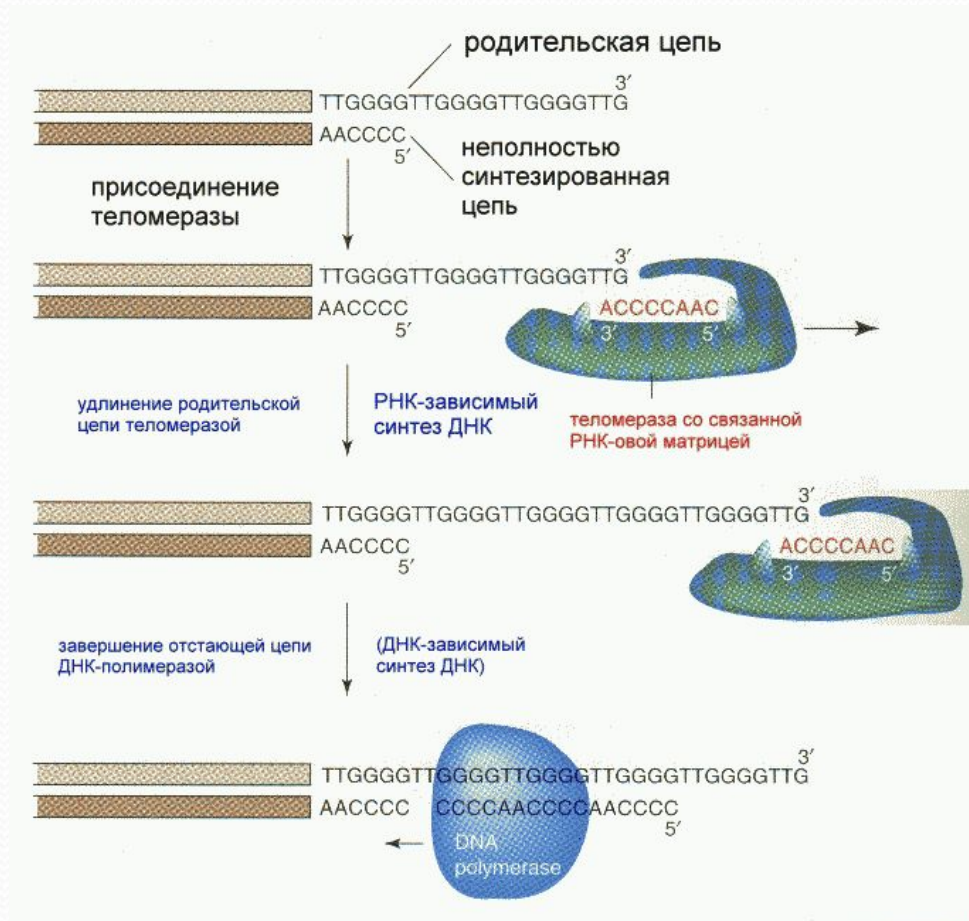
Функции ДНК-полимеразы I



Белки, входящие в состав репликативного комплекса эукариот

- ДНК-зависимые ДНК-полимеразы – α , β , δ , ϵ , γ , ζ
- ДНК-полимеразы α , β , δ , ϵ – непосредственно участвуют в репликации ДНК
- ДНК-полимераза α представлена в клетке в виде прочного комплекса с ДНК-праймазой – ферментов, осуществляющих синтез РНК-затравок; не обладает корректорской $3' \rightarrow 5'$ – экзонуклеазной активностью
- ДНК-полимераза β – репарация ядерной ДНК, процессинг фрагментов Оказаки
- ДНК-полимераза δ – синтез лидирующей цепи геномной ДНК
- ДНК-полимераза ϵ – синтез отстающей цепи геномной ДНК
- ДНК-полимераза γ – репликация и репарация митохондриальной ДНК
- ДНК-полимераза ζ – синтез ДНК на поврежденной матрице при SOS-ответе

Репликация теломерных участков хромосом



Скорость репликации:

1000–2000 нуклеотидов в секунду у прокариот;
100–200 нуклеотидов в секунду у эукариот.

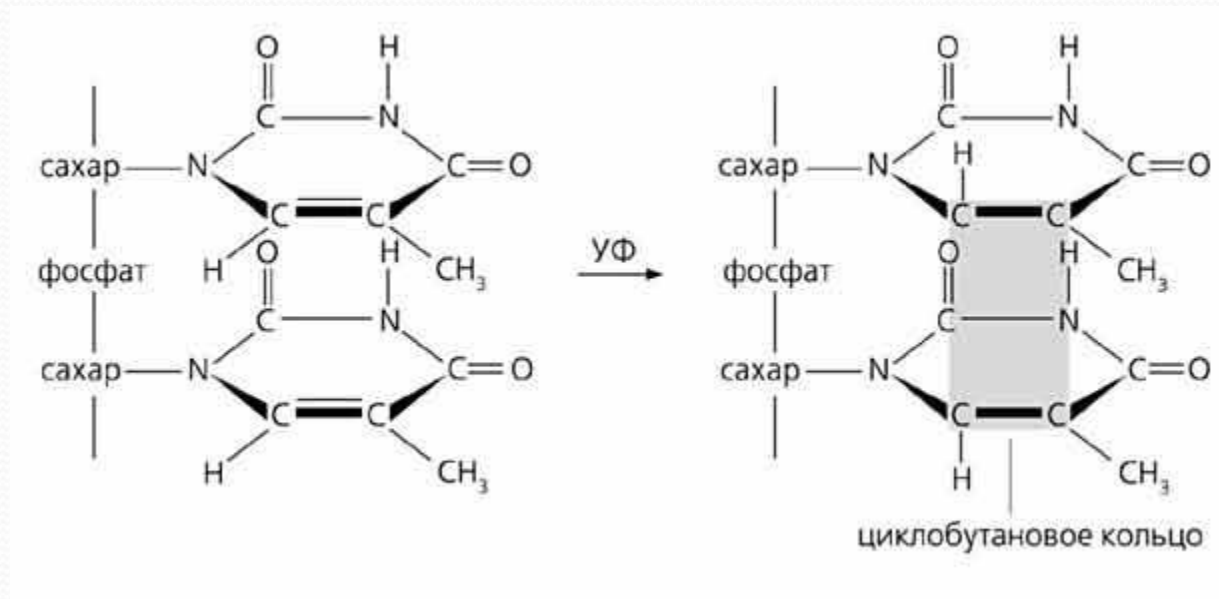
Точность репликации:

один ошибочно встроенный нуклеотид на 10^9 –
 10^{11} нуклеотидов.

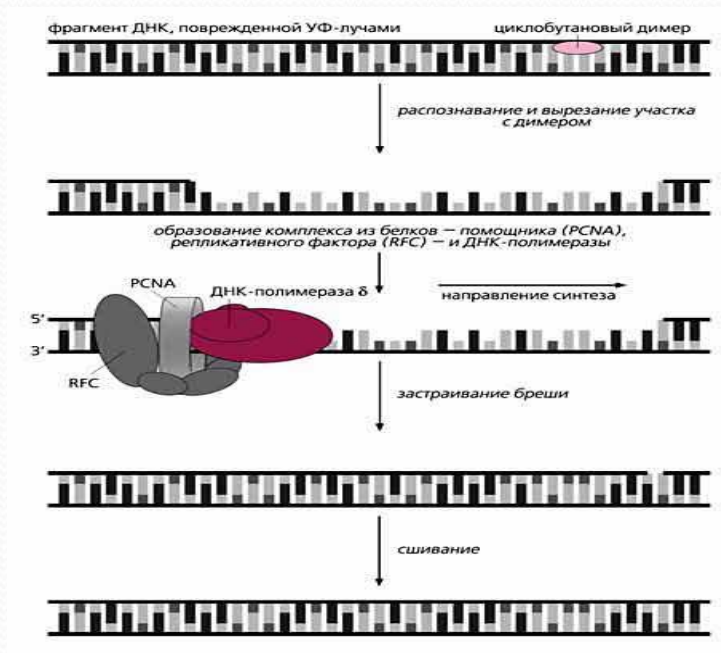
Основные типы повреждений ДНК

- Повреждение одиночных оснований (дезаминирование цитозина в урацил, аденина в гипоксантин; алкилирование оснований; включение аналогов оснований; инсерции и делеции нуклеотидов.
- Повреждение пары оснований, например, индуцированное УФ-излучением образование тиминовых димеров.
- Разрывы цепей при действии ионизирующей радиации.
- Образование перекрестных связей между основаниями, а также между ДНК и белками, например, гистонами.

Образование тиминовых димеров



Репарация тиминовых димеров у эукариот



Транскрипция (биосинтез РНК)

- Транскрипция – общие представления
- РНК-полимеразы
- Этапы транскрипции
- Регуляция транскрипции
- Процессинг первичных транскриптов РНК

- Транскрипция – биосинтез РНК на матрице ДНК
- Транскрипция – начальная стадия реализации генетической информации в клетке
- Основой транскрипции является фундаментальный принцип комплементарности азотистых оснований полинуклеотидных цепей ДНК и РНК
- В процессе транскрипции синтезируются мРНК, тРНК, рРНК и другие виды РНК, выполняющие структурные, регуляторные и каталитические функции
- Процесс транскрипции осуществляется ДНК-зависимыми РНК-полимеразами

- Единица транскрипции – транскриптон
- Транскриптоны бактерий называют оперонами
- В транскриптоне присутствует последовательность, которая называется промотором (зона начала транскрипции) и терминатором (зона остановки транскрипции)
- У прокариот один фермент синтезирует все виды РНК, у эукариот разные виды РНК синтезируются различными РНК-полимеразами

Транскрибируется только одна из комплементарных цепей ДНК, а именно матричная цепь. Другая цепь ДНК называется кодирующей цепью (смысловой), поскольку ее последовательность идентична последовательности РНК.

Нематричная (кодирующая) цепь: TACGGATA

Матричная цепь:
ATGCSTAT

РНК, которая синтезируется
на основе этого участка:

UACGGAUA

Бактериальная РНК-полимераза

Состоит из 5 субъединиц: $2\alpha\beta\beta'\delta$

Коровый фермент:

$2\alpha\beta\beta'\delta$

(α – каждая по 40 кДа), (β – 155 кДа), (β' – 160 кДа)

Холофермент:

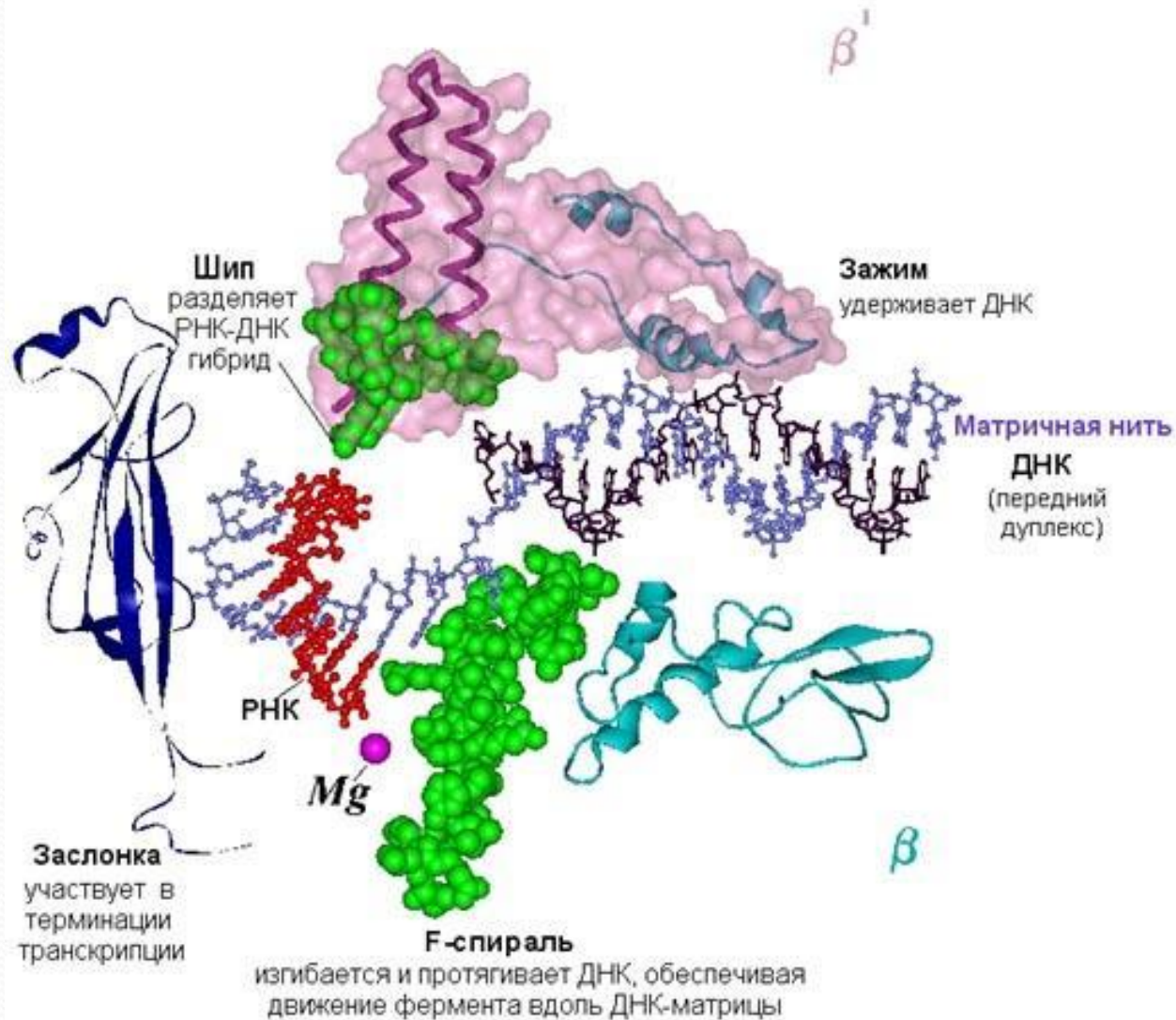
$2\alpha\beta\beta'\delta\omega$

(δ – 70 кДа), (ω – ?)

480 кДа

Бактериальная РНК-полимераза

СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ



Эукариотические РНК-полимеразы

РНК-полимераза I

18S, 5.8S и 28S рРНК

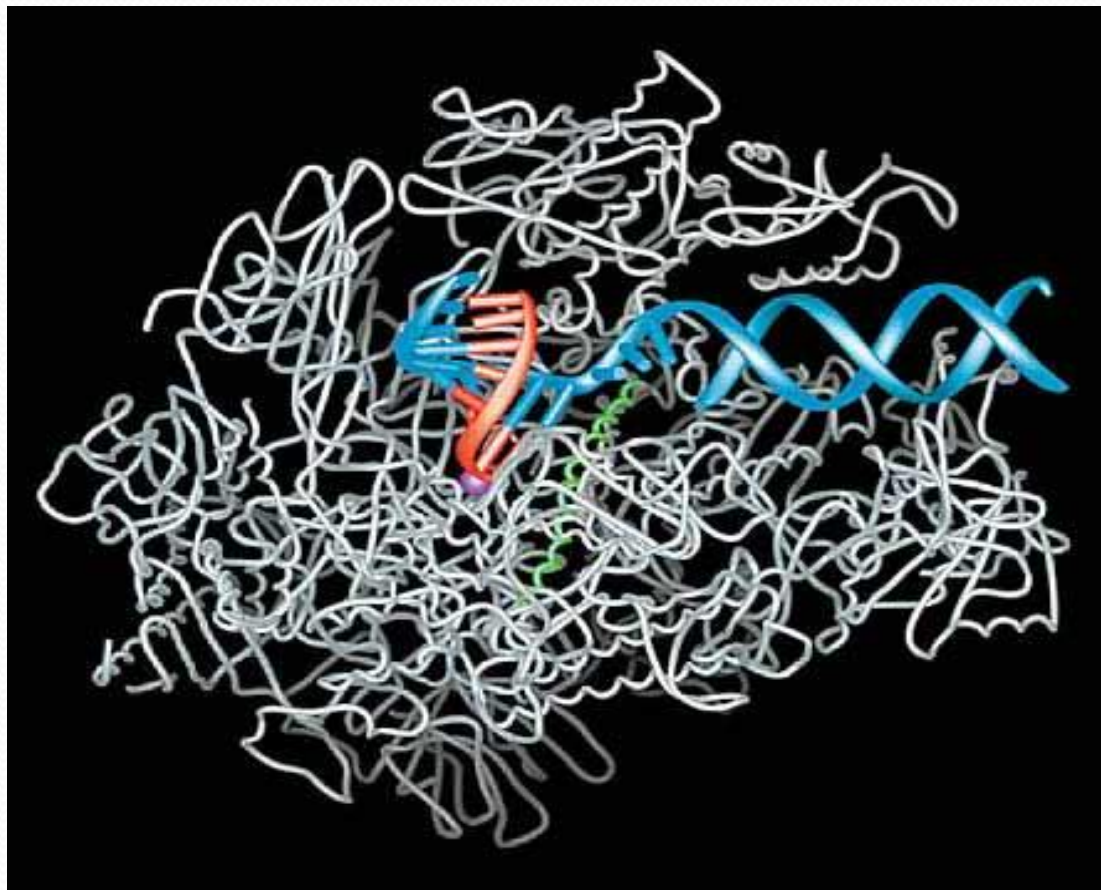
РНК-полимераза II

мРНК, некоторые мяРНК

РНК-полимераза III

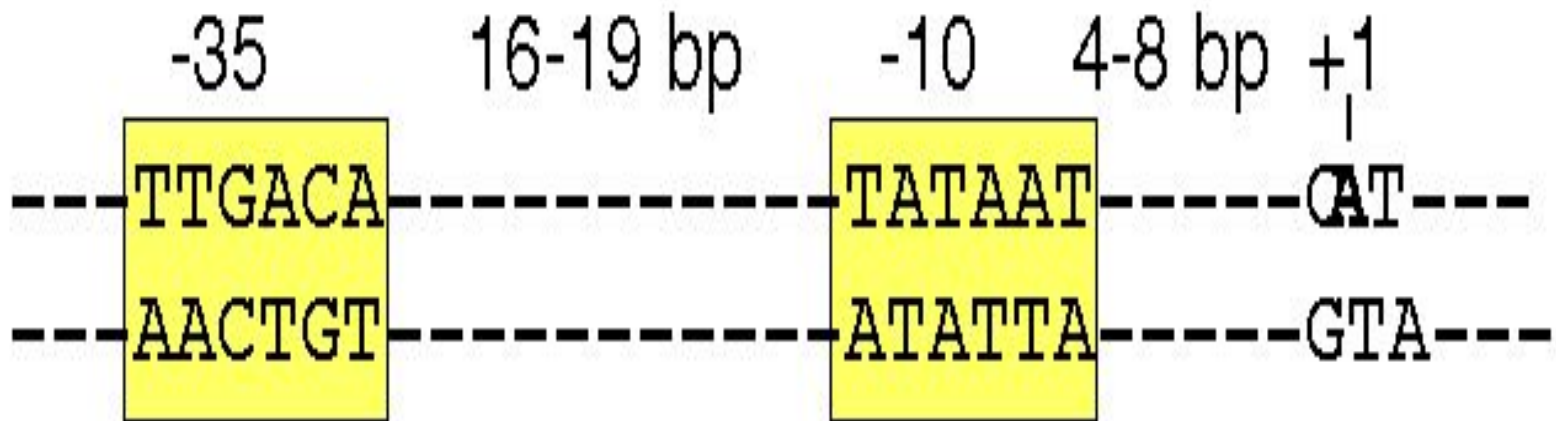
5S рРНК, тРНК, некоторые мяРНК

Фрагмент структуры РНК-полимеразы II

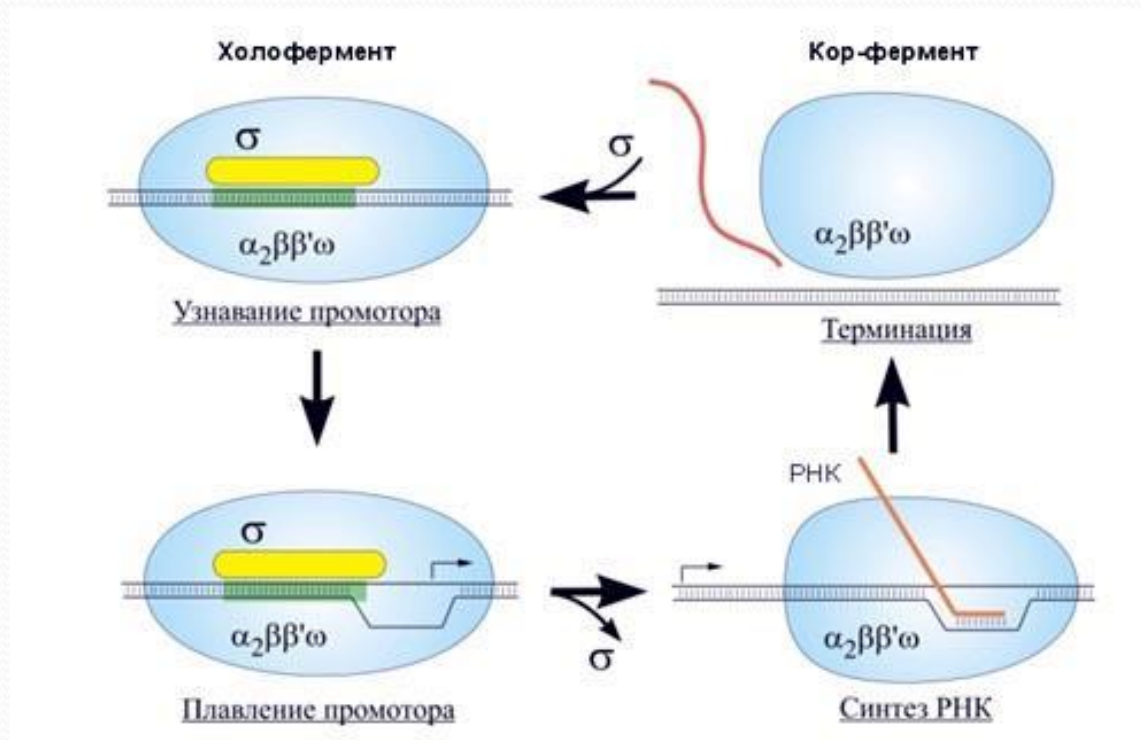


Спираль ДНК (*синяя*),
растущая цепь РНК
(*красная*), ион металла
в активном центре
в виде *фиолетовой* сферы
и «мостиковая»
α-спираль (*зеленая*).

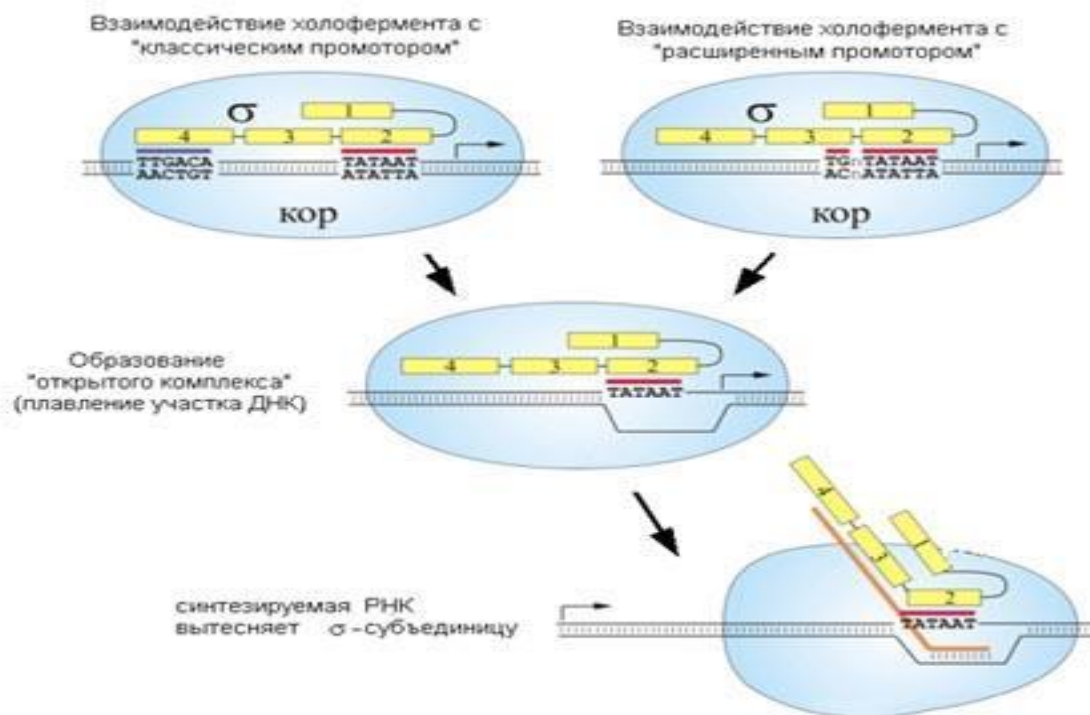
Структура промотора



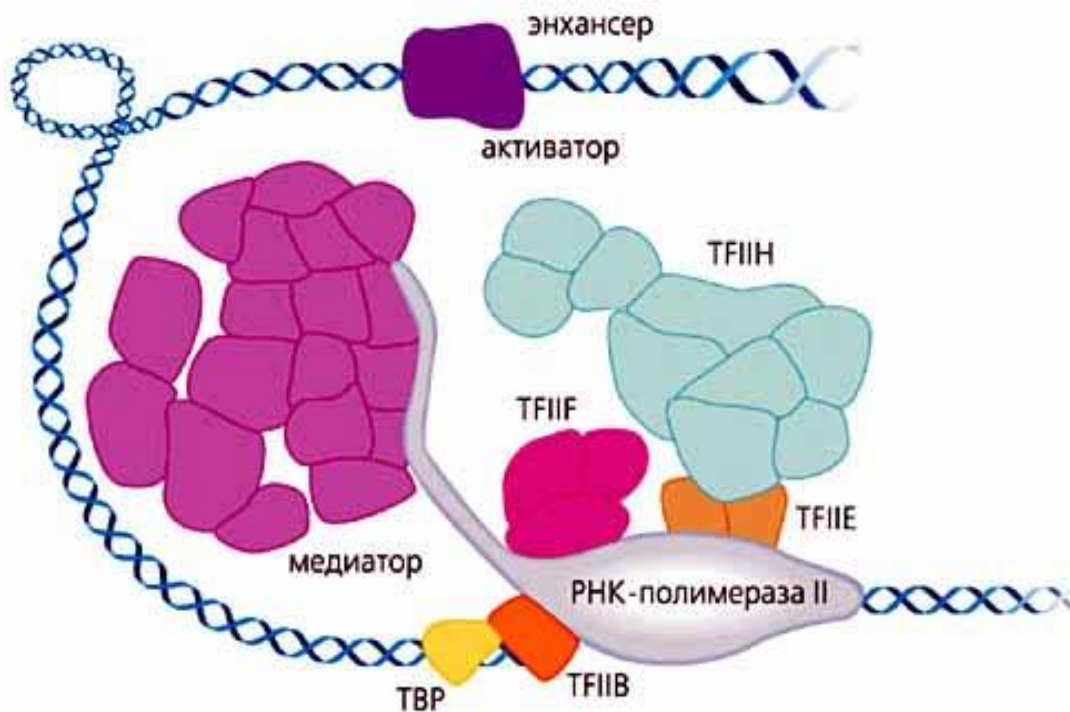
Общая схема транскрипционного цикла



Инициация



Комплекс инициации транскрипции у эукариот

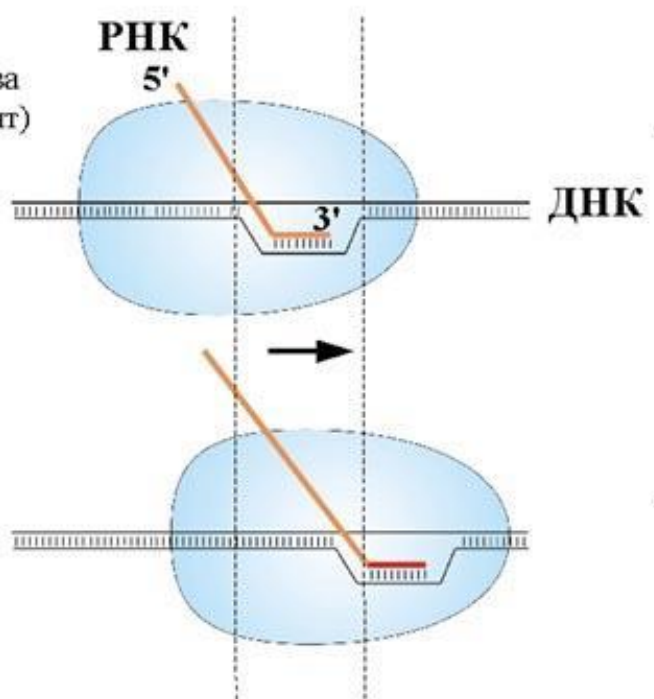


В составе комплекса приведены общие факторы транскрипции (TFIIB, E, F, H и TBP), РНК-полимераза II, медиатор и специфический фактор транскрипции, связанный с энхансером.

ЭЛОНГАЦИЯ

ЭЛОНГАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ

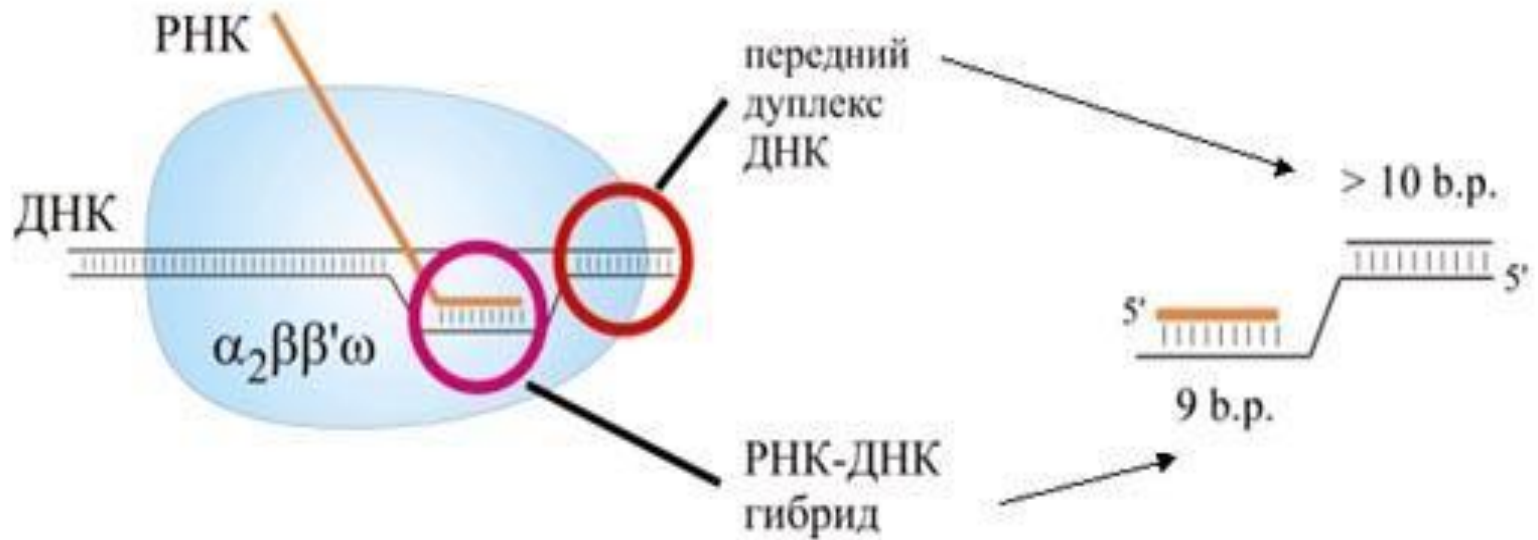
РНК-
полимераза
(кор-фермент)



Синтез РНК:
наращивается
3'-конец
молекулы РНК

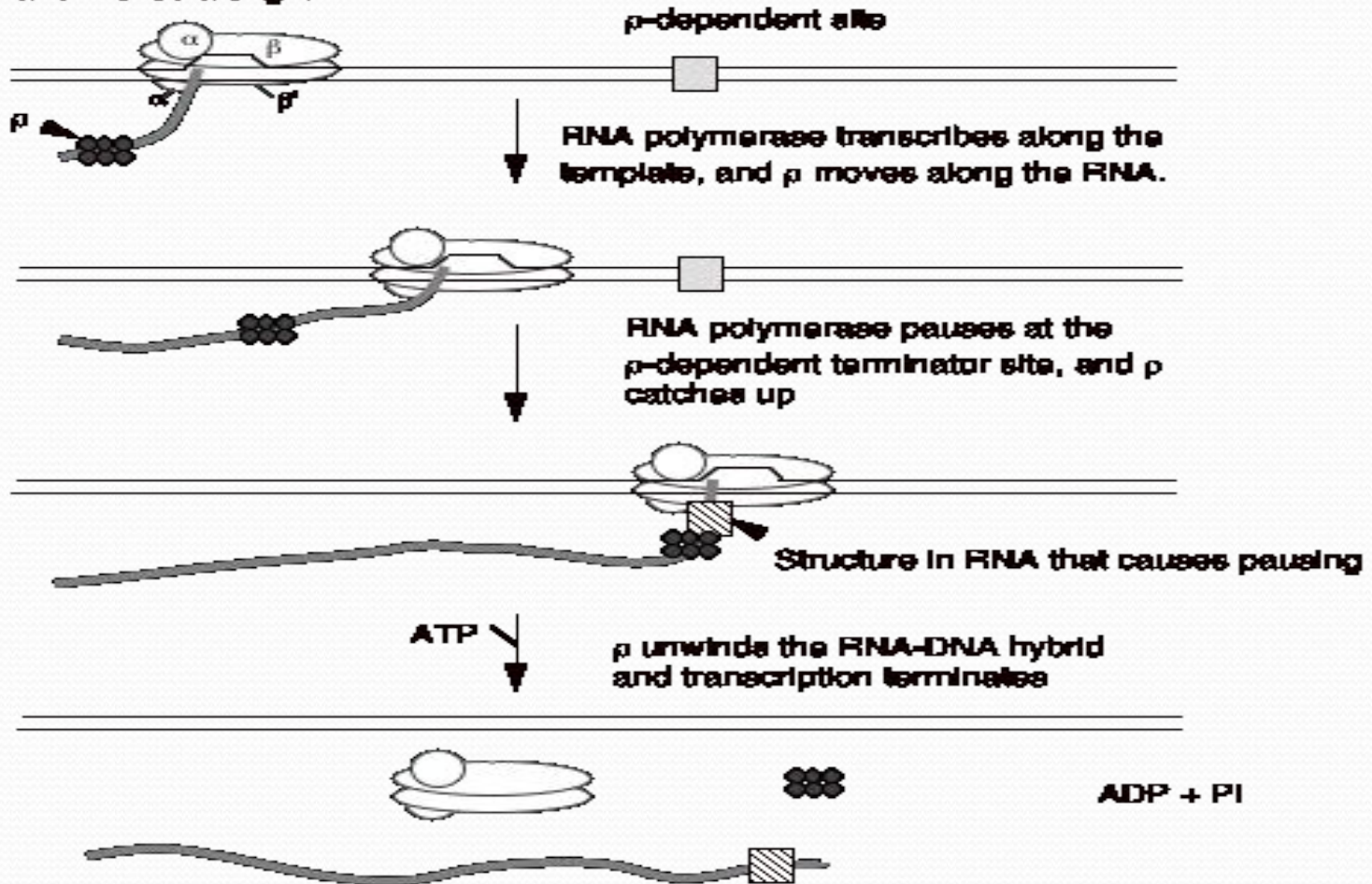
ЭЛОНГАЦИОННЫЙ КОМПЛЕКС

Элонгационный комплекс

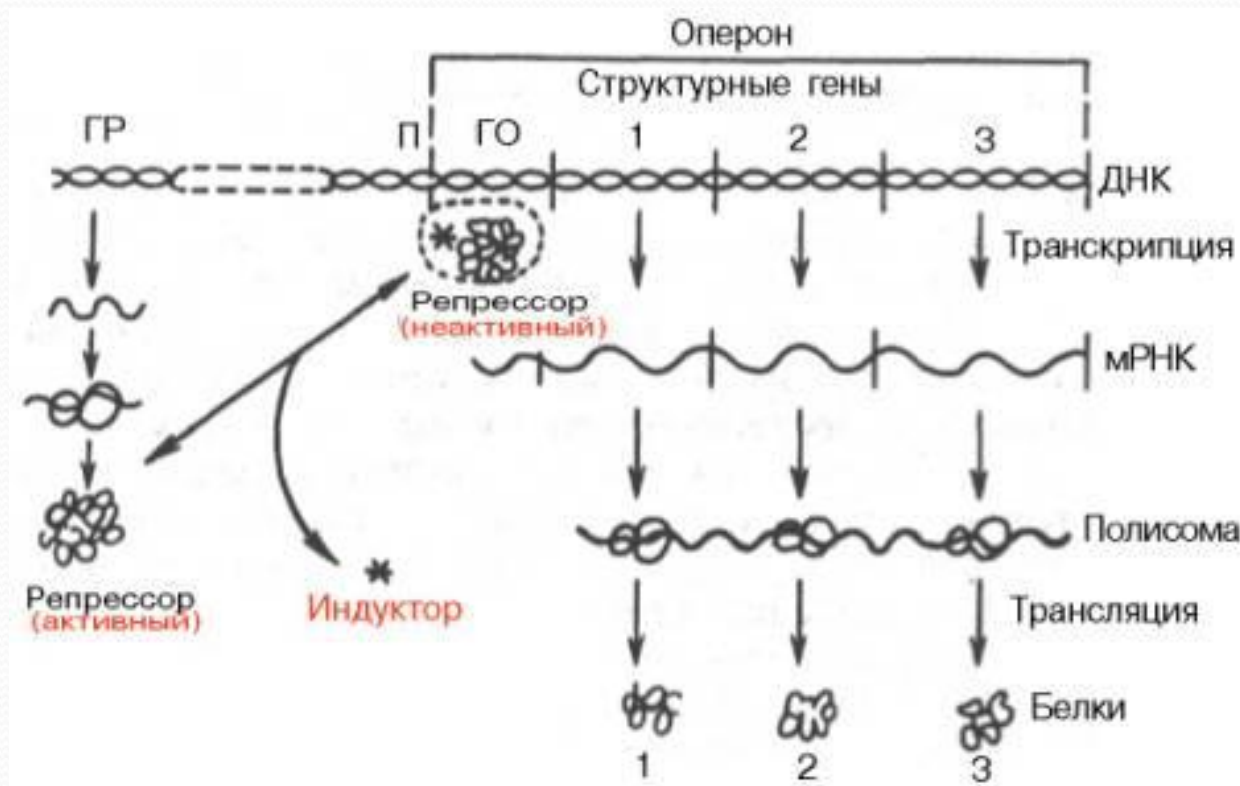


ТЕРМИНАЦИЯ

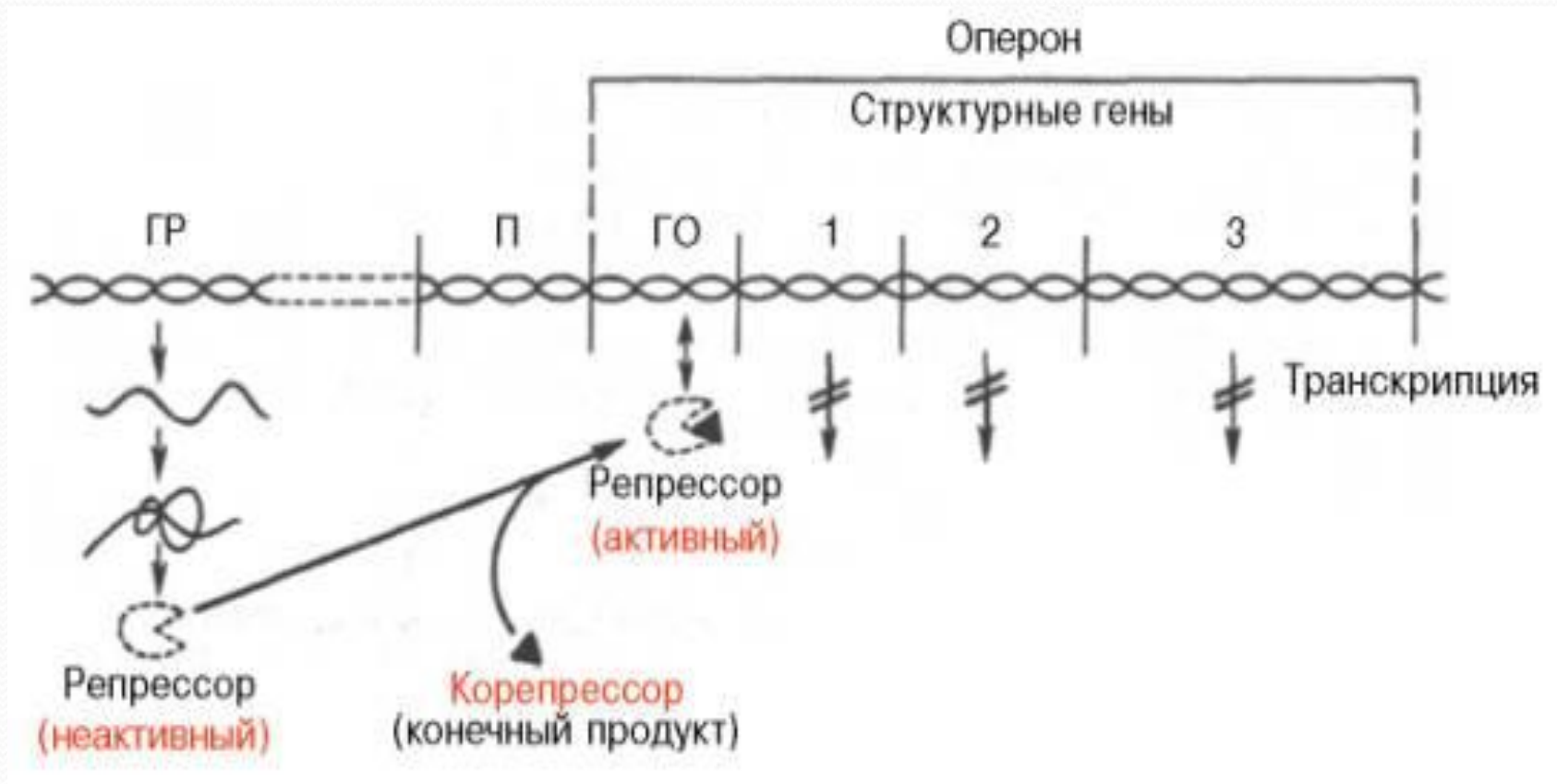
ρ hexamer binds to protein-free RNA and moves along it.



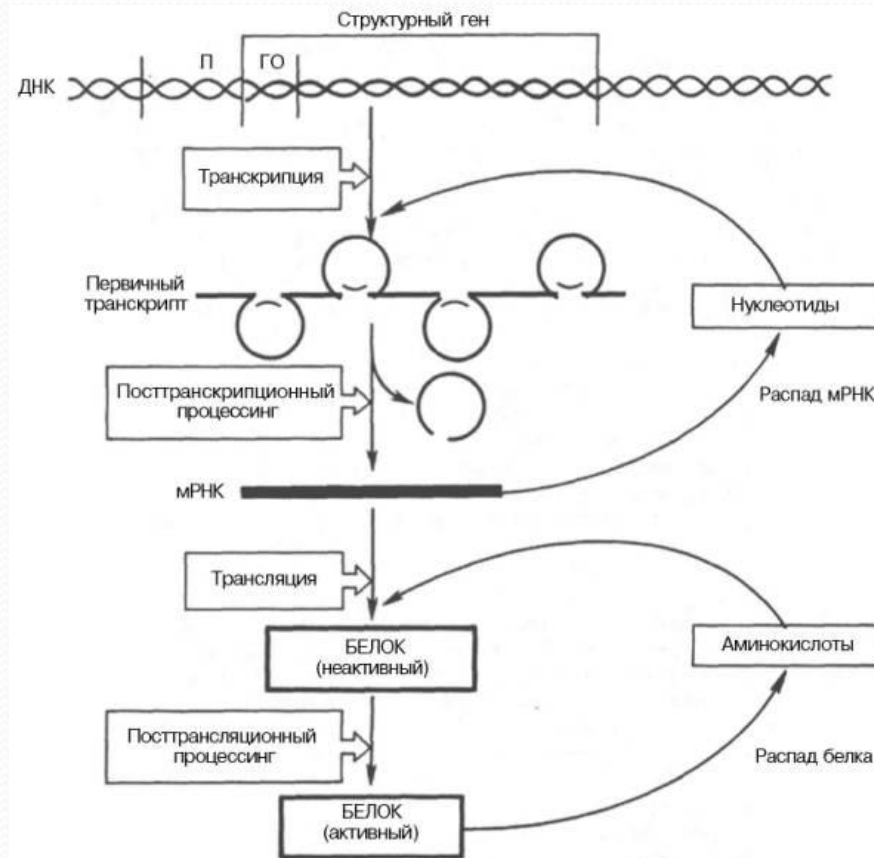
Регуляция экспрессии генов путем индукции



Регуляция экспрессии генов путем репрессии



Регуляция экспрессии гена у эукариот



Сплайсинг – вырезание копий интронов из про-мРНК и сшивание копий экзонов с образованием мРНК.

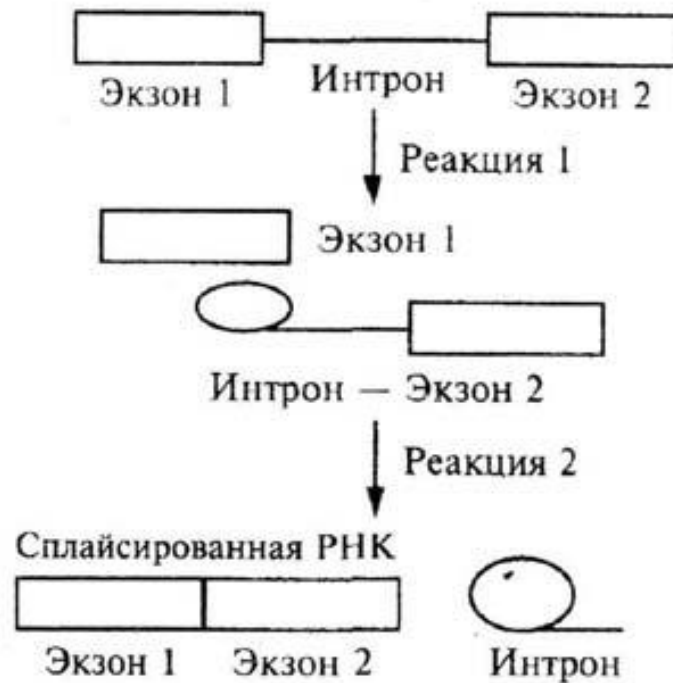
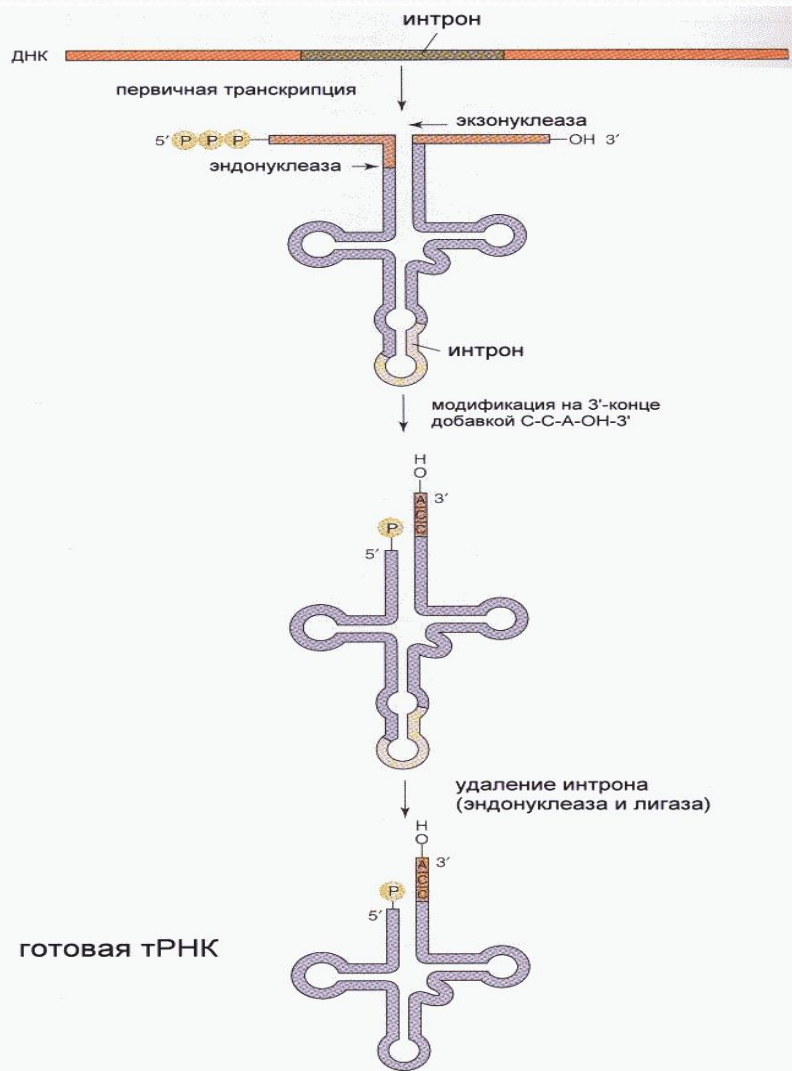


Рис. 2. Основные этапы сплайсинга и-РНК эукариот (по: Георгиев, 1989, с изменениями).

Процессинг первичных транскриптов РНК



Образование зрелой, функционально активной молекулы тРНК.

Модификация 3'-ОН конца и присоединение ССА-триплета.

Удаление из антикодонной ветви интронной последовательности с помощью эндонуклеазы и лигазы.