

# Пространственно-конформационная структура ДНК

## План.

- Молекулярная биология – цель, задачи и связь с другими отраслями биологии, химии, физики.
- Доказательства генетической функции ДНК и РНК. Структура нуклеотидов. Принцип комплементарности.
- Коды ДНК. Гибкость двойной спирали.
- Ассоциации ДНК с олигонуклеотидами.
- Ассоциация ДНК с белками. Организация хроматина эукариот.

**другими отраслями биологии, химии, физики.**

**МБ** - отрасль естествознания, изучающая внутреннюю организацию жизненных процессов на молекулярном уровне.

**Задача** - объяснение тончайших механизмов таких основных жизненных явлений, как

- наследственность,
- рост и развитие,
- дифференцировка,
- раздражимость,
- движение,
- память.

Термин молекулярная биология возник в связи с интенсивным изучением макромолекул: их химии и физики, синтеза и распада, локализации и

Источниками молекулярной биологии являются:

- **органическая химия**, занимающаяся изучением химической структуры макромолекул;
- **биохимия**, целью которой является изучение реакций обмена веществ в биологических системах;
- **биофизика и физика**, позволяющие с пом. различ. физич. и физико-химических методов исследования (спектроскопия, рентгеноструктурный анализ и т. д.) судить о физических свойствах макромолекул;
- **генетика**, дающая возможность судить о генетической функции макромолекул, в первую очередь нуклеиновых кислот;
- **цитология**, изучающая ультраструктуру клетки;
- **математика**, позволяющая моделировать биологические процессы,

## **осн. класса макромолекул - белки и нуклеиновые кислоты:**

**Белкам** присущи такие важнейшие биологич. функции, как ферментативный катализ, связывание и перенос жизненно важных в-в, иммунологич. активность, способность к сокращению и др.

**Нуклеиновые кислоты** - материальный носитель наследственности;

Их изучение с пом. методов МБ позволяет выяснять осн. механизмы передачи и реализации наследств. информации, сущность процессов изменчивости.

Благодаря успехам, достигнутым МБ, многочисл. биологич. механизмы можно свести к молекулярным процессам и объяснять их, исходя из строения и св-в химич. молекул, а также особенностей и типов химич.

## **2. Доказательства генетической функции ДНК и РНК.**

### **Структура нуклеотидов.**

### **Принцип комплементарности.**

История изучения нуклеиновых кислот начинается с 1869 г., когда швейцарский химик Ф. Мишер обнаружил в клеточном ядре особые вещества, обладающие свойствами кислот.

Он дал им название нуклеиновых кислот (от лат. *nukleus* - ядро).

Долгое время нуклеиновые кислоты не привлекали внимания исследователей.

1. Английский. бактериолог Ф.Гриффит (1928) продемонстрировал следующий опыт:

**способность пневмококков к трансформации. Было выдвинуто предполож. о том, что «трансформирующий агент», отождествляемый с «в-вом наследственности», наход. в ядре.**

Суть эксперимента Гриффита заключ. в следующем:

При введении мышам непатогенных штаммов пневмококков (рис. IV.1) животные не заболели (Б). При введении патогенных штаммов мыши гибли (А), однако при введении патогенных микробов, убитых нагреванием, мыши оставались здоровыми (В). Лживых непатогенных и убитых

Гриффит заключил, что живые микробы непатогенного штамма в присутствии клеток штамма патогенного приобретают наследственно закрепленные св-ва патогенности (трансформируются).

Путем такой трансформации невирулентные клетки бактерий штамма R, лишенные оболочки, превращались в клетки бактерий с оболочкой, которые обладали вирулентными свойствами штамма S.

В последующем было доказано, что трансформация происходит не только в живом организме, но и *in vitro*, т. е. в пробирке.

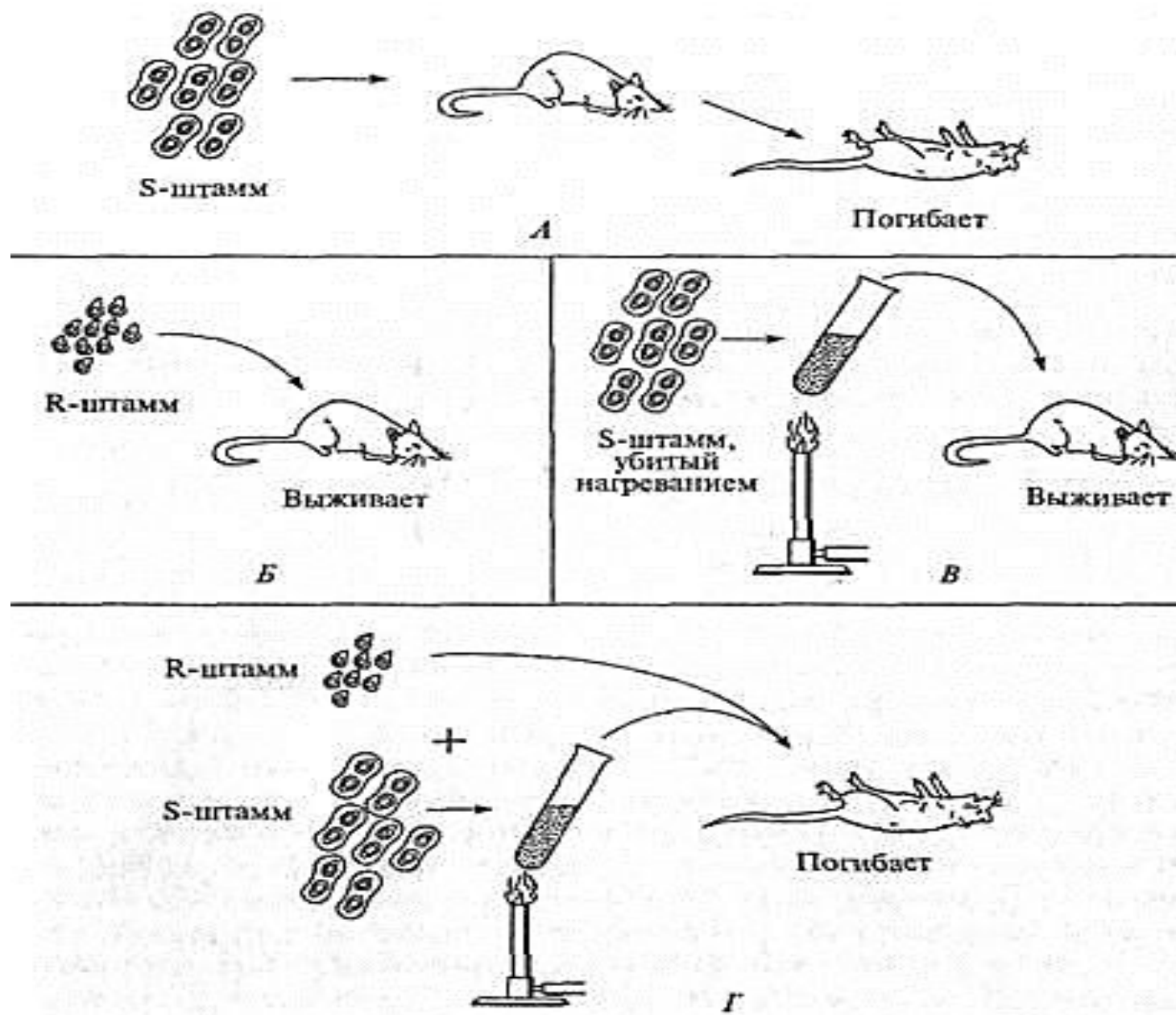


Рис. IV.1. Схема эксперимента Ф. Гриффита



**2.О. Звери, К. Мак-Леод и М. Мак-Карти, в 1944 г. точно определили химич. природу «трансформирующего агента» и идентифицировали его как дезоксирибонуклеиновую кислоту.**

Чистая ДНК, выделенная из клеток патогенного штамма, при добавлении в культуру непатогенных клеток трансформировала последние, придавая им свойства патогенности.

Это новое свойство передавалось при дальнейшем размножении.

При обработке трансформирующего агента специфическими веществами, разрушающими ДНК, трансформация не осуществлялась.

3. В 1950 г. американский биохимик Э.Чаргафф установил важнейшую закономерность химич. строения ДНК, согласно кот. сумма пуриновых оснований равна сумме пиримидиновых оснований. Причем кол-во аденина равно количеству тимина:  $A=T$  или  $A/T=1$ ; количество цитозина равно кол-ву гуанина:  $G=C$  или  $G/C=1$ . Эти кол-венные соотношения азотистых оснований в ДНК стали называть **правилом Чаргаффа**. Установленная закономерность свидетельствовала о том, что в молекулах ДНК определенный пурин и определенный пиримидин связаны в пары (пары оснований).

Таким образом было получено прямое

**В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик на основании результатов рентгеноструктурного анализа и биохимич. данных предложили пространственную модель структуры ДНК, объясняющую все ее св-ва.**

Согласно предложенной модели молекула ДНК сост. из 2 комплементарных (соответствующих) нитей.

М. Мезельсон и Ф. Сталь доказали полуконсервативный механизм репликации (удвоения) ДНК.

# К настоящему времени :

- обнаружено, что ДНК мож. повреждаться и мож. восстанавливаться,
- молекулы ДНК мог. обменив. др. с др. частями, закручиваться и раскручиваться.
- ДНК служит матрицей для синтеза РНК,
- ДНК сама способна синтезироваться в процессе обратной транскрипции с РНК.
- ДНК функционирует в ядре и в митохондриях.
- В наст. вр. исследователи способны определять послед-сть нуклеиновых оснований в ДНК и осуществлять ее синтез.

**Нуклеиновые кислоты** – это биологич. высокомолекуляр. полимерн. соединения, мономерами кот. явл. нуклеотиды.

**Нуклеотиды** – это сложные органич. соединения, в состав кот. входят молекулы азотистого основания, пентозного сахара и фосфорной кислоты.

Нуклеотид состоит из 3 хим. разных частей:

- 1) остатка сахара пентозы;
- 2) азотистого основания (в виде производного пиримидина или пурина);
- 3) остатка фосфорной кислоты.

В зависимости от особенностей химического строения нуклеиновые кислоты разделяют на две группы – дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновые кислоты (РНК).

В нуклеиновых кислотах сахар представлен пентозой.

В РНК пентоза является **рибозой**, а в ДНК – **дезоксирибозой**.

Они состоят из 5 атомов углерода и определённого числа атомов **Н** и **О**.

4 атома углерода и 1 атом кислорода образуют пятичленное кольцо, а пятый атом углерода включен в группу **НО–СН<sub>2</sub>**

Изучая нуклеотидный состав ДНК различ. видов орг-мов, сделали след. **ВЫВОДЫ:**

1. нуклеотидный состав ДНК разн. тканей одного и того же вида одинаков;

2. нуклеотид. состав ДНК у разн. видов различен;

3. нуклеотид. состав не завис. от возраста и питания;

4. в составе ДНК число остатков аденина всегда равно числу остатков тимина, а число остатков гуанина равно числу остатков цитозина. Из этого следует, что сумма пуриновых оснований равна сумме пиримидиновых –  $A+G=T+C$ .

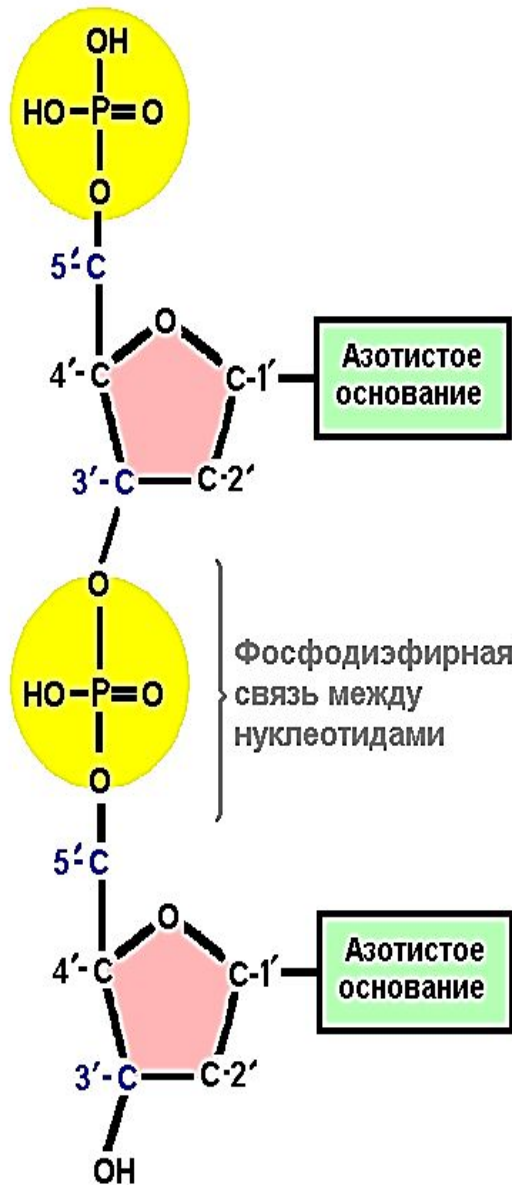
# Первичная структура нуклеиновых кислот

представляет собой порядок чередования нуклеотидов в полинуклеотидной цепи.

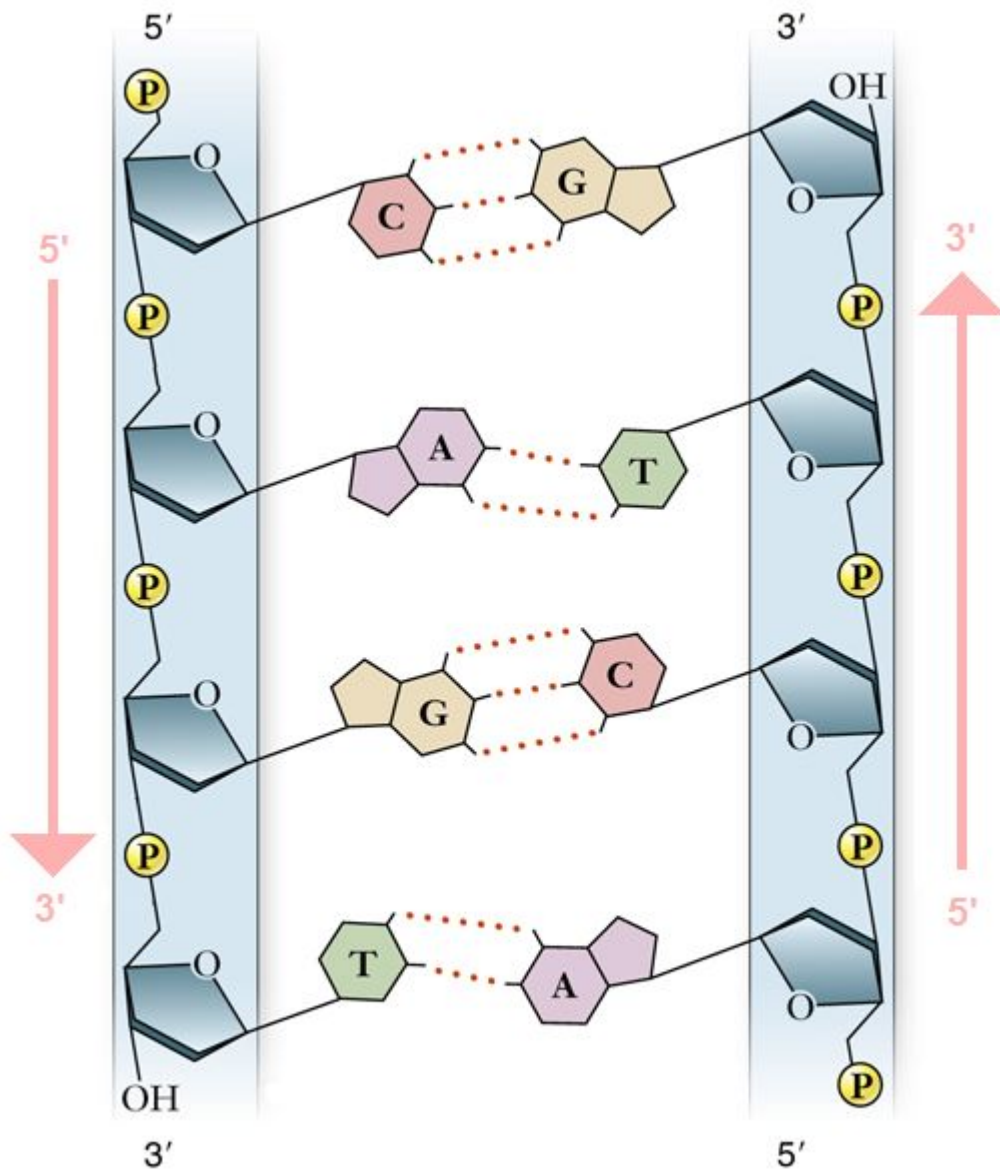
Нуклеотиды в молекулах ДНК и РНК связаны др. с др. фосфодиэфирными мостиками между 3'- и 5'-углеродными атомами остатков пентоз.

Цепи ДНК и РНК облад. Полярностью, кажд. цепь им. 5' и 3'-концы.

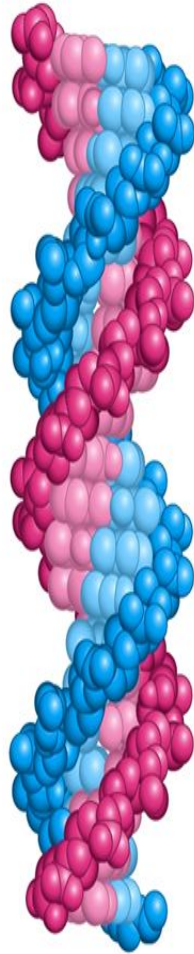
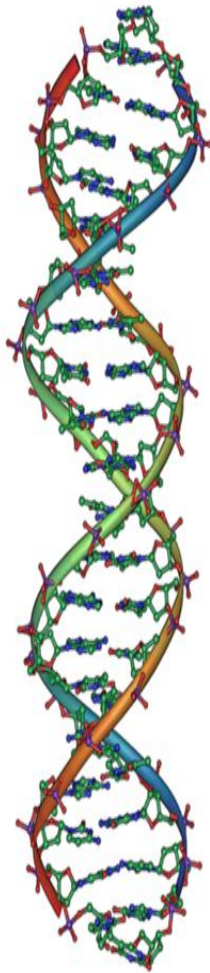
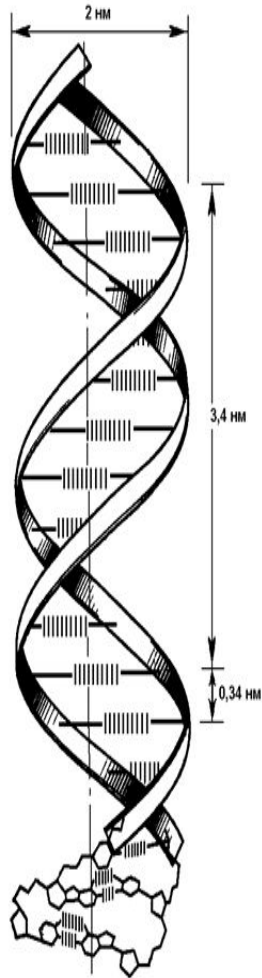
Послед-сть нуклеотидов в одиночной цепи ДНК и РНК записывается в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Нумерация







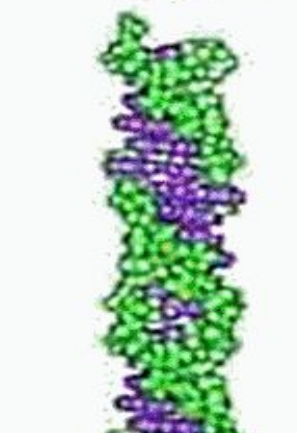
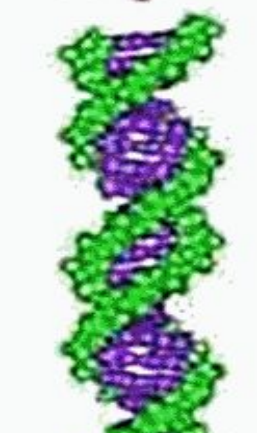
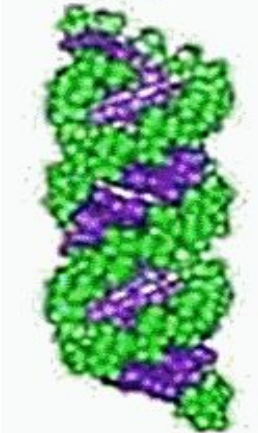
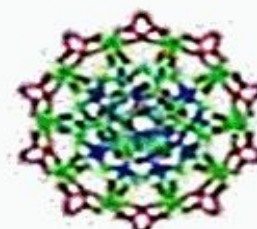
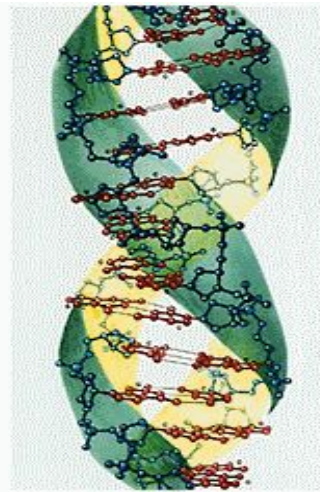
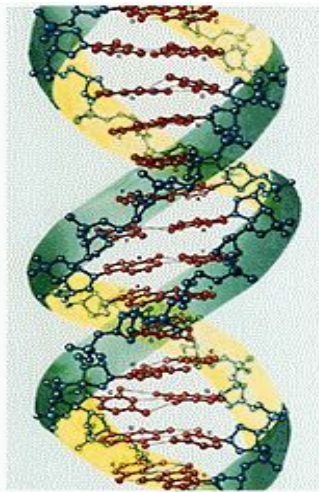
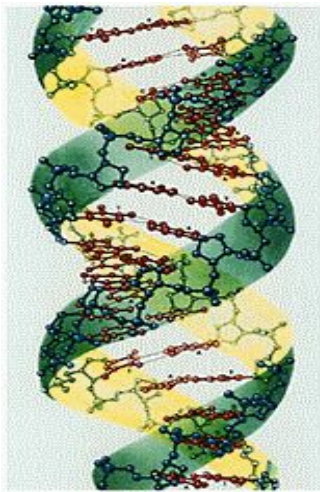
***Вторичная  
структура ДНК***  
(двойная спираль)  
была предложена  
амер. генетиком Д.  
Уотсоном и англ.  
физиком Ф. Криком  
в 1953 г.



**Третичная структура ДНК**  
Ковалентные связи между атомами в углеводно-фосфатной цепи полинуклеотида им. определённую пространственную ориентацию, обусловленную так назыв. торсионными углами вращения химич. связей. В результате этой пространственной ориентации ковалентных связей в обоих углеводно-фосфатных антипараллельных цепях полинуклеотидов, вся молекула ДНК закручивается в

# Формы ДНК

- **A-форма ДНК:** двухспиральная ДНК, содержащая прим. 11 остатков на 1 оборот спирали. В этой правозакруч. спирали плоскости пар оснований повернуты примерно на  $20^\circ$  относительно перпендикуляра к оси спирали. Образуется при дегидратации В-формы ДНК.
- **В-форма ДНК:** классическая уотсон-криковская двойная спираль, содерж. примерно 10 остатков на 1 оборот спирали. В этой правозакруч. спирали плоскости пар оснований перпендикулярны оси спирали.
- **Z-форма ДНК:** левозакруч. двухспиральная форма ДНК, содерж. ок. 12 остатков на 1 оборот. Эта структура предложена Александром Ричем и его сотрудн. на основе изучения кристаллич. структуры.



**A-ДНК**

**B-ДНК**

**Z-ДНК**

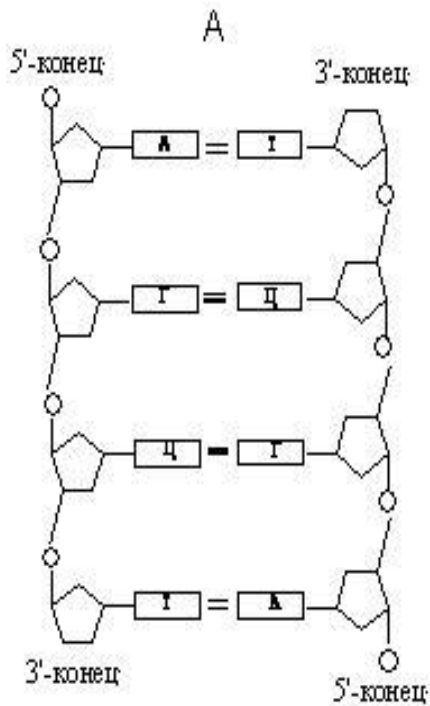
**Комплементарность** – это пространственная взаимодополняемость молекул или их частей, приводящая к образованию водородных связей. Комплементарность каждой отдельной пары оснований создаёт комплементарность 2 полинуклеотидных цепей в целом.

Напр., если в одной цепи им. порядок нуклеотидов  
....– Т – Ц – Г– Г – Т – Ц – Ц – ....  
то в другой этот порядок будет им. следующий вид:

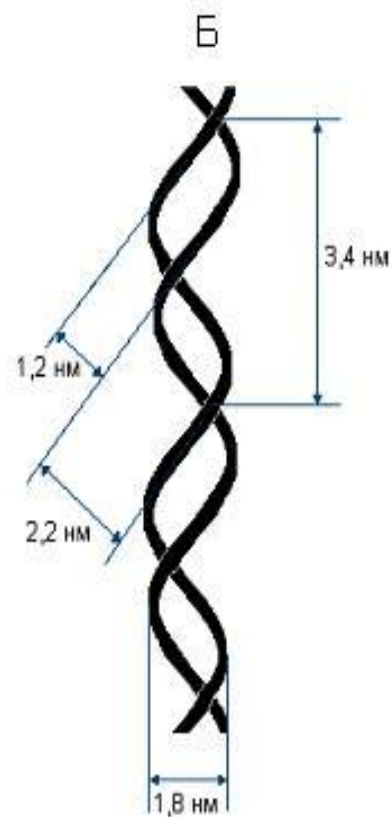
....– А – Г– Ц – Ц – А – Г – Г – ....

Причиной спаривания именно пуринов с пиримидинами является то, что пара из 2 пуринов была бы слишком велика, а пара из 2 пиримидинов – слишком мала для укладки в правильную спираль

Водородные связи, возникающие между пуринами и пиримидинами, удерживают комплементарные полинуклеотидные цепи в системе единой молекулы. Поскольку каждый остаток фосфорной кислоты удерживается фосфодиэфирными связями с 5'-углеродом одного остатка сахара и 3'-углеродом другого остатка сахара, молекулы нуклеиновой кислоты обладают полярностью, кот. условно обозначается как направление  $5' \rightarrow 3'$ . В молекулах ДНК две полинуклеотидные цепи имеют противоположное направление в отношении связей  $5'-3'$  и  $3'-5'$ , т.е. они **антипараллельны**.



Схе матическое изображение развёрнутых цепей ДНК



Цепи ДНК (модель Уотсона и Крика) при закручивании в двойную спираль образ. большую и малую борозды, шир. большой борозды – 2,2 нм, малой – 1,2 нм.

На один виток спирали приход. 10 нуклеотид. остатков.

Полный виток спирали им. длину 3,4 нм. Диамет. двойной спирали 1,8 нм.

### 3. Коды ДНК. Гибкость двойной спирали.

В 1954 г. амер. физик-теоретик Г.А. Гамов предпол., что кодирование информации в молекулах ДНК должно осуществляться сочетаниями неск. нуклеотидов.

В сам. Разнообр. белках, существующих в природе, было обнаруж. всего ок. 20 различ. аминок-т.

Для шифровки такого кол-ва аминокислот 4 различ. нуклеотидами достаточен **триплетный код**.

В таком коде каждая аминок-та шифруется тремя стоящими рядом нуклеотидами. В этом случае из 4-х нуклеотидов образуется  $4^3 = 64$  триплета.

Код, состоящий из 2-х нуклеотидов, дал бы возможн. зашифровать только  $4^2 = 16$  различ.



кодирующие триплеты следуют один за другим.

Генетич. код явл. универсальн. и использ. одинаково как про- и эукариотами.

Кодирующие триплеты нуклеотидов получ. назв. **КОДОНОВ**.

Все аминок-ты, кроме триптофана и метионина, кодируются более чем 1 кодоном.

Наиб. важны первые 2 нуклеотида кажд. кодона. 3-ий нуклеотид неспецифичен.

Полная расшифровка генетич. кода проведена в 60-х гг. XX в. Из 64 возмож. триплетов ДНК 61 кодирует различ. аминок-ты, оставшиеся 3 получили назв. бессмысленных, или **«нонсенс-триплетов»**.

Они не шифруют аминок-т и вып. функцию знаков препинания (стоп-кодонов) при считывании наследств. информации.

К **стоп-кодонам** относ. триплеты АТТ, АТЦ, АЦТ в

## Характеристика кода:

**1. вырожденность (избыточность)** - аминок-ты шифруются неск. триплетами. Вырожденность генетич. кода позволяет при мутационной замене в триплете 3-го нуклеотида сохранять смысл закодирован. информации. Возникш. таким обр. нов. сочетание из 3-х нуклеотидов будет кодировать ту же самую аминок-ту.

**2. специфичность** - кажд. триплет способен кодировать только 1 определенную аминок-ту.

Следует подчеркнуть, что в любом данном участке ДНК только 1 из 2-х нитей ДНК кодирует аминок-ты. Поэтому генетический код — это послед-сть нуклеотидов, а не пар нуклеотидов.

**3. однонаправленность считывания ( $5' \rightarrow 3'$ ), т. е. считывание информации с мРНК при синтезе белка происходит с её 5'-конца в направлении 3'-конца).**

**4. Генетич код – универсален (у различ. видов живых орг-мов совершенно одинаков.).**

**5. непрерывность и неперекрываемость** - послед-сть нуклеотидов считывает триплет за триплетом без пропусков. При этом соседние триплеты не перекрывают др.друга, т.е. кажд. отдельн. нуклеотид вход. в состав только 1 триплета при заданной рамке считывания.

## 4. Ассоциации ДНК с олигонуклеотидами

Олигонуклеотид - короткая однонитевая молекула ДНК и РНК (16-30 пар нуклеотидов).

### Триплексные структуры ДНК

Тройная спираль ДНК представл. соб. комплекс уотсон-криковской двойной спирали с третьей одноцепочечной нитью ДНК, кот. укладывается в ее большой желобок.

Вперв. тройные спирали были обнаруж. бол. 30 л. н.

Структура триплексов представлялась след. образом:

уотсон-криковские связи в двойной спирали сохраняются, а основания третьей нити образуют водород. связи с пуринами двойной спирали. Этот тип связей назв. хугстиновским, Hoogsteen K., 1963 .

Каноническими триадами Pu-Pu-Pu триплексов считаются изоморфные CGG и TAA триады.

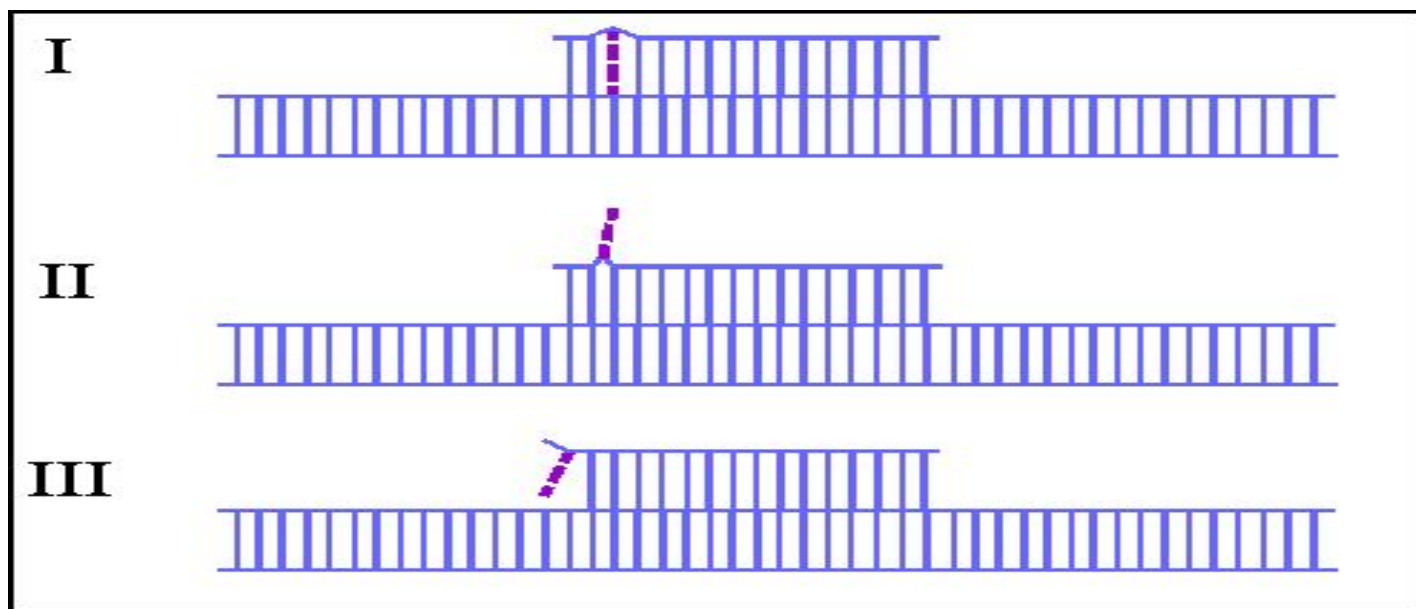
## **Триплексы: специфичность образования**

Часто для прикладных задач необходимо, чтобы олигонуклеотид связался с ДНК в одном или неск. соответствующих его послед-сти сайтах и, по-возможности, не образовывал комплексы с ДНК ни в каких других местах.

Но реально олигонуклеотид связывается с полностью специфическим сайтом, а также с сайтами, отличающимися от него на 1 или неск. нуклеотидов, что может привести к нежелательным эффектам. Возможность избавиться от неспецифического связывания зависит от того, насколько триплекс дестабилизируется неправильными триадами

Выделяют 3 основных типа ошибок в узнавании олигонуклеотидом двухцепочечной ДНК.:

1. неправильное спаривание в середине сайта, при этом образуется неправильная триада,
2. образуется тройная спираль со всеми правильными триадами, но одно из оснований олигонуклеотида выпетливается.
3. неправильная триада находится на конце сайта.



Существует неск. подходов к проблеме неспецифичности связывания олигонуклеотидов.

1. скорость образования специфич. комплексов больше, чем неспецифич., а связывание обычно проводят при большом избытке олигонуклеотида по отнош. к сайтам, мож. проводить реакцию не до конца, не дожидаясь полного заполнения специфич. сайта. Тогда % неспецифич. связывания будет меньшим.
2. когда необходимо связать олигонуклеотид с двухцепочечной ДНК в единств. месте, может состоять в использовании олигонуклеотида намного больш. длины, чем статистически уникальная длина сайта для данной молекулы. При этом с большой вероят-стью сайты с одной или несколькими ошибками на этой ДНК вообще не встретятся.

3. специфичный комплекс еще достаточно стабилен, а неспецифич. уже нет. Напр. при температурах, близких к темпер. плавления, или используя дестабилизацию ДНК формальдегидом. Но диапазон таких условий оказыв. узким и время жизни специфич. комплексов в таких условиях также оказывается малым.

4. Метод повышения специфич-сти межмолекуляр. триплексов, основанный на конкуренции (Робертс и Кровер, 1991). Чтобы исключить образование комплекса олигонуклеотида с неспецифич. сайтом, связывание проводилось в услов., когда олигонуклеотид мог обратимо участвовать в образовании конкурирующей структуры, мен. энергетич. Выгодной, чем полностью специфичный триплекс, но бол. выгодной чем триплекс с неправ. триадами. В кач



**Антисмысловой олигонуклеотид (antisense oligonucleotide)** - олигонуклеотид, кот. комплементарен фрагменту мРНК, благодаря чему способен образовывать с ней гибрид и ингибировать ее нормальную трансляцию на рибосомах.

Это ингибирование в отлич. от выключения гена в результате его нокаута или деградациии РНК при РНК-интерференции обратимо и требует продолжительного присутствия А.о.

Различ. химич. модификации А.о. повышают его стабильность в клетке и усиливают связывание с РНК-мишенью.

Преимущество антисмысловой технологии, основанной на А.о., сост. в том, что она позволяет конструировать специфические ингибиторы экспрессии любого

**Хугстиновское спаривание оснований (Hoogsteen base pairing)** (по им. К. Хугстина) - вариация спаривания нуклеотидов в нуклеиновых кислотах.

Примером Х.с.о. явл. взаимодействие аденозина с тимином, при кот. атомы тимина в положении 3 и 4 взаимодействуют с атомами аденозина в положении 6 и 7, а не 1 и 6.

В результ. расстояние, «покрываемое» хугстиновской парой, равно 0,88 нм, что существенно меньше значения 1,08 нм, характерного для пар, образующихся при уотсон-криковском взаимодействии.

В двуспиральных структурах таких пар не обнаружено, однако не исключается возможность образования тройных спиралей, в кот. присоединяемое к паре третье основание участвует в Х.с.о. Кроме того, Х.с.о. могут реализоваться при внутримолекуляр. фолдинге молекул транспортной РНК, а также ДНК- и РНК-аптамеров. Известна лишь одна ДНК-полимераза (ДНК-полимераза йота), кот. при репликации (репарации) ДНК млекопитающих может вставлять нуклеотиды напротив пуринов матрицы с использованием Х.с.о.

Термин произошел от имени К. Хугстина, который в 1963 г впервые описал возможность

## ДНК: Н-форма

Н-форма ДНК – неканонич. структура в гомопурино-гомопиримидиновых участках ДНК.

В нач. 80-х годов было обнаруж., что гомопурино-гомопиримидиновые послед-сти в отрицательно сверхспирализованной ДНК обладают гиперчувствительностью к эндонуклеазе S1, специфически расщепляющей одноцепочечную ДНК.

В работе Лямичев В.И. и др., 1986 было показано, что в гомопурино-гомопиримидиновых участках действительно происх. образование неканонич. структуры - на электро-фореграммах кольцевых ДНК с соответствующими вставками наблюдался скачок подвижности, обусловленный конформационными изменениями в этих участках. Образование этой

Кроме того используют методы:

1. Двумерный электрофорез Н-формы ДНК
2. Н-форма ДНК модели с помощью зондирования различными химическими агентами
3. Гель-электрофорез нуклеиновых кислот.

Существенной областью применения ДНК-олигонуклеотидов явл. дородовая (пренатальная) диагностика наследств. заболеваний. Бол. 500 наследств. болезней человека связаны с нарушением какого-то 1 гена. В большинстве случаев эти мутации рецессивны. Это означ., что болезнь развив., если человек получает дефектные копии гена сразу от обоих родителей.

Одна из задач соврем. медицины сост. в том, чтобы выявлять такие аномальные эмбрионы до рождения, информировать об этом мать и дать ей возможн. прекратить беременность.

## 5. Ассоциация ДНК с белками

**Транскрипционные факторы: Принципы классификации**

Специфич-сть взаимодействия транскрип-ционных факторов с распознаваемыми ими регуляторными послед-ствиями генов определяется преимущ-но особенностями их ДНК-связывающих доменов.

Мн. факторы связываются с ДНК в виде димеров (мультимеров), и состав этих комплексов также может влиять на специфичность связывания с ДНК.

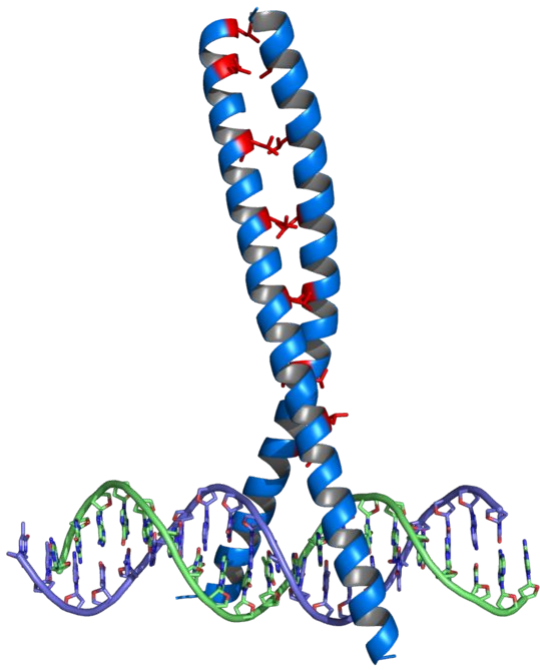
ДНК-связывающих доменов разделены на 4 суперкласса:

Суперкласс 1. Факторы, ДНК-связывающий домен кот. обогащен положит-но заряженными аминок-тными остатками ([basic domain](#) 284 фактора).

Суперкласс 2. Факторы, у кот. ДНК-связывающий домен формируется с участием координированных ионов цинка ([zinc-coordinated DNA-binding domain](#), 148 факторов).

Суперкласс 3. Факторы, имеющие ДНК-связывающий мотив типа спираль-поворот-спираль ([helix-turn-helix DNA binding motif](#), 369 факторов ).

Суперкласс 4. Факторы, у кот. поверхность, контактирующая с ДНК, представлена в виде слож. обр. организованного скэффолда из бета-нитей. Контакты с ДНК в этом случае осуществляются по малой бороздке



**Лейциновая застёжка-молния** (англ. *leucine zipper*) - тип белковой структуры, белковый мотив.

Часто встреч. в ДНК-связывающих факторах транскрипции.

В лейциновой застёжке аминок-та лейцин наход- приблизит-но в

каждом 8-м положении альфа-спирали, в результате чего

лейциновые остатки оказываются на 1 её стороне, образуя

амфипатическую спираль, в кот. 1 сторона обладает гидрофоб. св-

вами. Лейциновая застёжка образует димерный белок благодаря

Комплекс лейциновой застёжки (показана синим цветом) с ДНК.

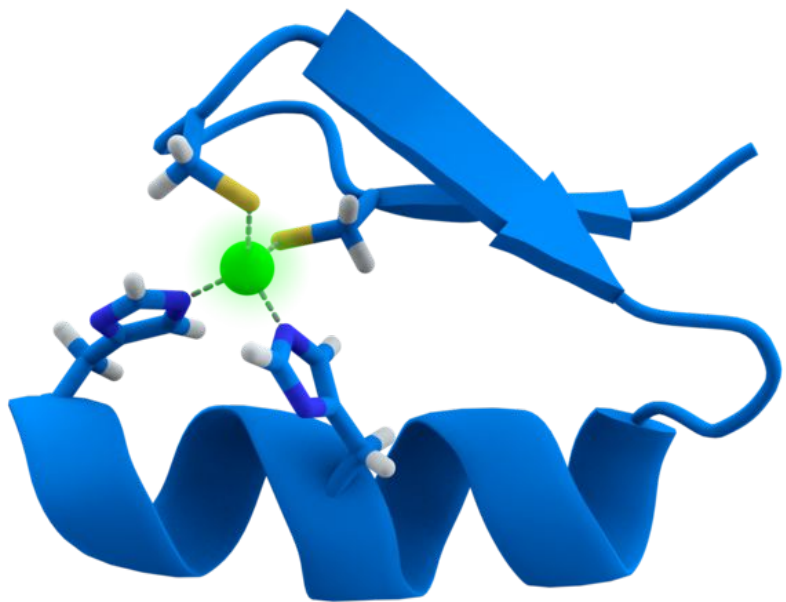
Остатки лейцина, обеспечивающ. закрепление белков. спиралей обознач. красным цв.



**Цинковый палец** (от. англ. *цинк. палец*) - тип **белковой** структуры, небольш. белковый мотив, или одним стабилизированный двумя ионами **цинка**, связанными **координационными** **связями** с аминокислотными остатками сайт Белка.

Цинк. палец включ. ок. 20 аминокислот. Ион цинка связывает 2 **гистидина** и 2 **цистеина**. Цинк. пальцы явл. Белков. модулями, с взаимодействующими **ДНК, РНК**, др. белками или небольшими молекулами.

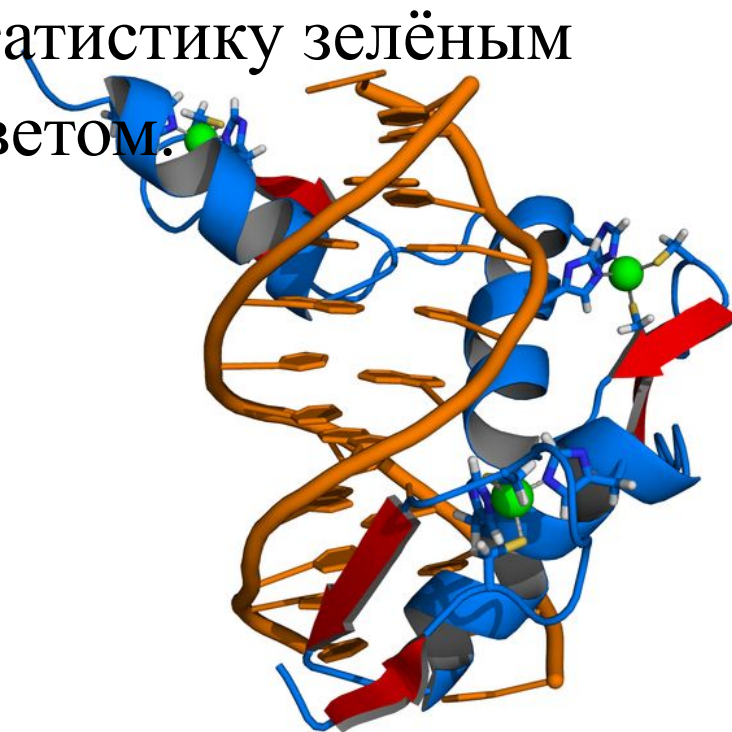
Основн. группами белков с цинк. пальцами явл. ДНК-связывающие **факторы транскрипции**, искусственные **ферменты рестрикции**, получаемые слиянием ДНК-связывающего домена цинк. пальца с ДНК-разрезающим доменом нуклеазы. Домен цинкового



Цинк. палец типа Cys 2 Egr 2 включает альфа-спираль и антипараллельную бета-структуру.

Ион цинка связан координацион. связями с 2 гистидина и остатками 2 остатками цистеина

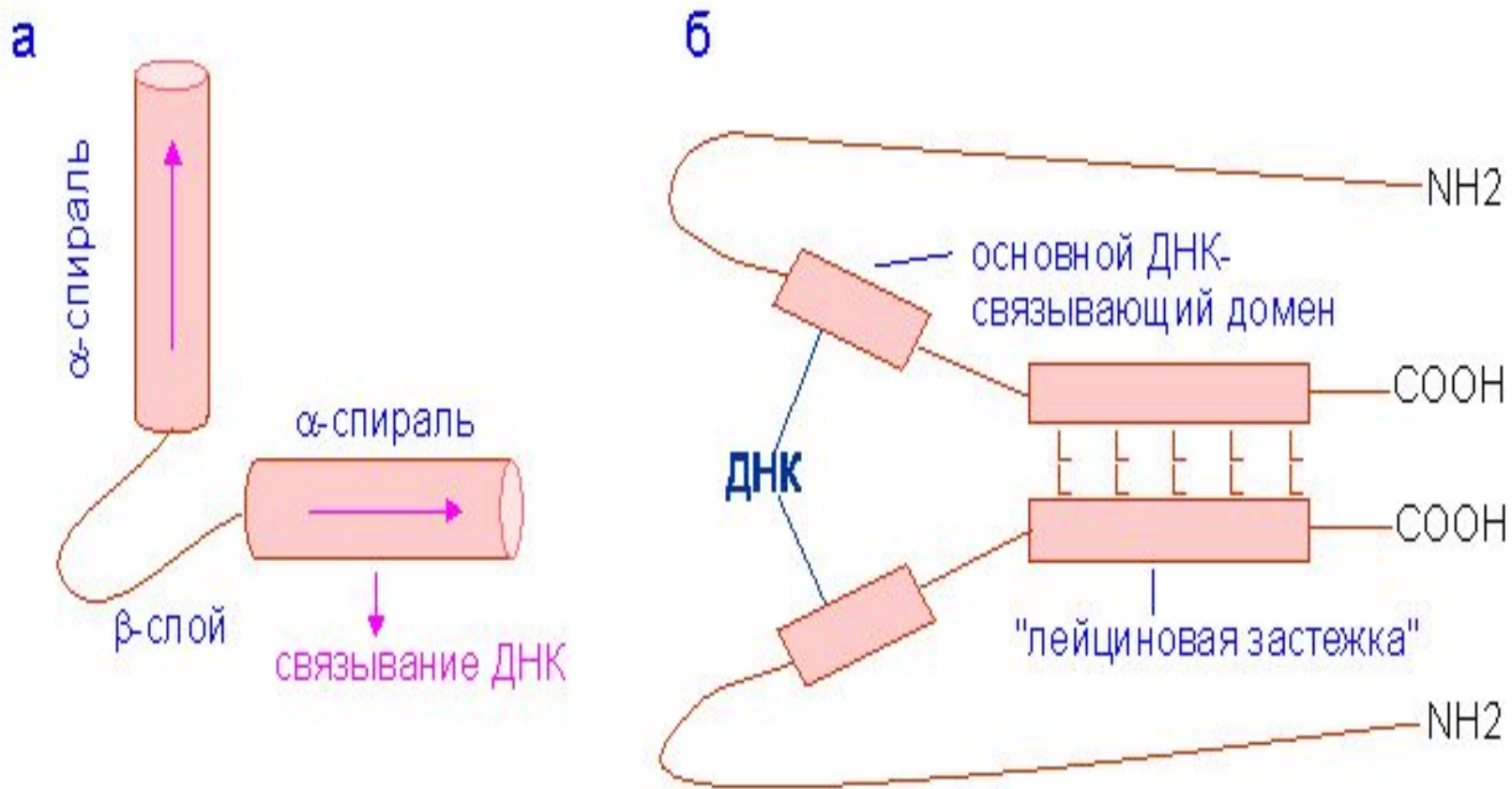
Комплекс трёх «цинк. пальцев» egr1 Комплекс трёх «цинк. пальцев» egr1 (синий) и ДНК (красный). Ионы цинка показаны статистикой зелёным цветом.



## Факторы транскрипции с доменом "спираль-поворот-спираль»

Тип пептидных доменов, специфически распознающих регуляторные послед-сти на ДНК, характерен для белковых продуктов гомеотических (гомеозисных) генов, вперв. обнаруженных у дрозофилы. Гомеотические гены позвоночных и растений играют ключевую роль в морфогенезе. Полипептидные цепи белков, кодируемых этими генами, содержат высококонсервативную послед-сть длиной в 60 аминок-тных остатков, (гомеобокс или гомеодомен), кот. определяет специфичность взаимодействия белков с регуляторными послед-стями ДНК.

Анализ третич. структуры гомеодоменов показал, что они образуют структуру типа "спираль-поворот-спираль" (helix-turn-helix) в кот за альфа-спиральным



Структуры полипептидных доменов типа

(а) "спираль-поворот-спираль"

(б) "лейциновая застёжка" L - остатки Leu

# Транскрипционные факторы: краткое определение

Факторы транскрипции (transcription factors) - белки или белковые комплексы, непосредственно не участвующие в каталитическом акте образования РНК, но необходимые для прохождения РНК-полимеразой всех этапов транскрипции гена и обеспечивающие избирательность этого процесса.

- По функциональному признаку различают три класса транскрипционных факторов:**
- а) основные,** обеспечивающие нерегулируемый базальный уровень транскрипции и функционирующие в клетках всех типов;
  - б) специфические,** взаимодействующие с определенными нуклеотидными послед-ствиями ДНК, которые являются основными регуляторами транскрипции и обеспечивают тканеспецифическую и стадиеспецифическую экспрессию генов
  - в) белки-коактиваторы** транскрипции, которые действуют согласованно с основными и специфическими транскрипционными факторами, обеспечивая более тонкую регуляцию

Транскрипционный фактор – это белок, кот. после его перемещения в ядро клетки регулирует транскрипцию, специфически взаимодействуя с ДНК, либо стехиометрически взаимодействуя с др. белком, кот. может образовывать специфичный к послед-сти ДНК комплекс "белок-ДНК".

ТФ не являются:

- Регуляторные ферменты, кот. осуществляют свое влияние посредством каталитич. активности, а не через стехиометрические взаимодействия,
- гистоны, для кот. характерен низкий уровень специфичности при взаимодействии с ДНК.

Что касается группы ядерных белков НМГ, то они содержат как неспецифически связывающиеся с ДНК

## **Антигены: силы взаимодействия с антителами (электростатическое притяжение)**

В основе взаимодействия антиген - антитело лежат те же законы термодинамики, что и в основе любой обратимой бимолекулярной реакции связывания. Сразу же следует подчеркнуть, что и силы, удерживающие вместе антиген и антитело, ничем не отличаются от сил, участвующих в неспецифических взаимодействиях между любыми макромолекулами.

Это:

**1. Электростатические силы, обусловленные притяжением между двумя противоположно заряженными ионизированными группами.**

**2. Водородные связи, образованные между гидрофильными группами. Водородные связи**



**3. Гидрофобные взаимодействия** между неполярными гидрофобными группами, обеспечивающие по некоторым оценкам до 50% сродства между антителом и антигеном.

**4. Вандерваальсовы силы,** возникающие в результате взаимодействия внешних электронных облаков.

Все эти силы возрастают при уменьшении расстояния между молекулами антигена и антитела, особенно если из среды, в которой находятся взаимодействующие аминокислотные остатки, удаляются молекулы воды.

## **Организация хроматина эукариот.**

Вопрос о структурной организации хроматина в интерфазных ядрах далек от своего разрешения. Это связано со сложностью и динамичностью его структуры, кот. легко меняется даже при незначит-ных экзоген. воздействиях. Большинство знаний о структуре хроматина было получено *in vitro* на препаратах фрагментированного хроматина, структура кот. значит-но отличается от таковой в нативных ядрах.

**Различают три уровня структурной организации хроматина у эукариот:**

- 1) нуклеосомная фибрилла ;
- 2) соленоид, или нуклеомер ;
- 3) петлеобразно-компактная структура ;

основу хромосом.

В состав Х. входят: ДНК (30-40% по массе), гистоны (30-50%), негистоновые белки (4-33%) и РНК. Кол-во негистоновых белков, РНК, а также разм. молекул ДНК колебл. в широк. пределах в завис. от метода выделения Х. и природы объекта. Взаимод. между гистонами и ДНК гл. обр. ионное.

Структуру Х. формирует элементар. фибрилла диам. 10 нм. Известны 4 уровня укладки в бол. сложные структуры. Важнейший этап в структурных исслед-ях Х. - открытие в 1973 осн. структ. единицы Х.-нуклеосомы.

Она **сост.** из универсальной кор-частицы, образованной ДНК (146 нуклеотидных пар), октамером из 4 гистонов (Н2А, Н2В, Н3 и Н4 - по 2 молекулы каждого) и линкерной ДНК переменной длины (0-80 нуклеотидных пар), связанной с гистоном Н1.

Послед. эти исследования показали, что гистоны образуют молекулы ДНК

Согласно пространств. модели А. Круга кор-частица выглядит как плоский диск диам. 11 нм, толщ. 5,7 нм, с осью симметрии 2-го порядка, на внеш. пов-сть кот. навита двойная спираль ДНК в В-форме, образующая 1,75 витка левой суперспирали.

Для фибриллы диам. 10 нм предложена модель бусы на нитке со специфич. по отношению к нуклеотидной послед-сти ДНК расположением нуклеосом (т. наз. фазированием).

След. уровень организации представлен толстой фибриллой диам. 30 нм. Ее описывают две альтернативные модели: регулярная спираль - соленоид, на один виток кот. приходится от 3 до 7-8 нуклеосом и менее признанная глобулярная, где каждые 6-12 нуклеосом образуют глобулу.

Важн. роль в наднуклеосомной организации Х. играет

находятся примерно в том же кол-ве, что и ДНК.

Гистоны 1 классов прямо взаимодействуют с ДНК и образуют в хроматине серию частиц перв. уровня организации. Консервативность типов гистонов на протяжении эволюции можно объяснить необходимостью сохранения этой важнейшей реакции.

Пятый класс гистонов принимает участие во взаимодействиях между частицами. Постоянство классов гистонов позволяет предполагать, что взаимодействия типа ДНК-гистоны, гистон-гистоны и гистон-

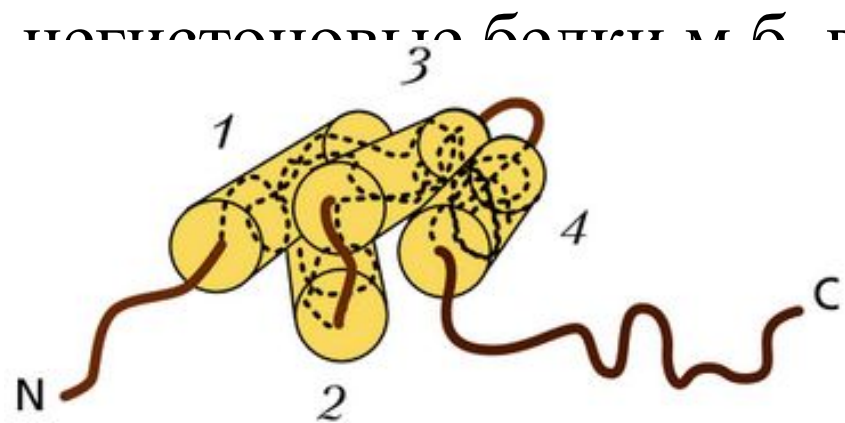


Схема третич. структуры белка гистона H1: спиральные участки (1-4) и фибриллярные С- и N-концы полипептидной цепи.

Гистоны первых четырех классов им. значительное кол-во как кислых, так и основных аминок-т. Поэтому эти белки несут высокий заряд. Отношение основных аминок-т к кислым находится в диапазоне 1,4-2,5.

**Эти гистоны подразделяются на две группы.**

- I. К аргинин-богатым относятся два вида гистонов: H3 и H4. Они принадлежат к наиб. консервативным из всех известных белков.
- II. К гистонам, умеренно обогащенным лизином, относ. 2 белка. Их назыв. H2A и H2B (в противоположность их номенклатурному обозначению это не родственные, а независимые белки).

У различ. эукариот находят те же самые 2 типа гистонов, но у них обнаружены заметные межвидовые вариации в аминокислотной последовательности.

Пятый класс представлен гистонами, оч. богатыми лизином; он сост. из неск. достаточно близко-родственных белков с перекрывающимися послед-ствиями аминок-т.

Это гистоны H1 (в эритроцитах птиц существует вариант, названный H5).

У этих гистонов обнаружены значительные межвидовые и межтканевые вариации (у дрожжей, по-видимому, гистонов данного класса нет).

Хотя эти гистоны являются самыми основными гистонами, их легко можно выделить из хроматина, полностью растворив в солевом растворе (0,5M).

негистоны - это все др. белки хроматина.

Предполагается поэтому, что они облад. большими видовыми и тканевыми различиями, хотя строгих данных о степени их разнообразия пока нет.

Эти белки составл. меньшую долю от всей массы белков хроматина, чем гистоны. Кроме того, сюда относ. намного большее число белков, так что люб. индивидуальный белок присутствует в значит-но меньшем кол-ве, чем любой гистон.

В класс негистоновых белков мог. попасть белки, связанные с экспрессией генов, и белки, участвующие в организ. структур высшего порядка.

Так, в числе наиб. выдающихся негистонов мож. назвать **РНК-полимеразу**. **НМГ-белки** (высокомобильная группа) составл. отдельный, хорошо различим. подкласс негистонов. Осн. проблема, возникающая при работе с др. негистоновыми белками - их загрязнение



# Упаковка генетич. материала достигается путем спирализации (конденсации)

- **Первый уровень упаковки ДНК** - нуклеосомный. Нуклеосома предст. собой глобулу (октамер), содерж. по две молекулы кажд. из четырех гистонов - (вокруг кот. двойная спираль ДНК образует ок. двух витков и переходит на следующую глобулу. Дл. молекулы ДНК уменьш. в 5-7 раз.
- **Второй уровень упаковки** - соленоидный (супернуклеосомный). Нуклеосомная нить конденсируется, ее нуклеосомы «сшиваются» гистоном H1 и образ. спираль диам. ок. 25 нм. Один виток спирали содержит 6-10 нуклеосом.

**Третий уровень упаковки** - хроматидный (петлевой). Супернуклеосомная нить спирализуется с образованием петель и изгибов. Она составляет основу хроматиды и обеспечивает хроматидный уровень упаковки.

**Четвертый уровень упаковки** - уровень метафазной хромосомы, Хроматиды в метафазе способны спирализоваться с образованием эухроматиновых (слабо спирализованных) и гетерохроматиновых (сильно спирализованных) участков; происходит укорочение в 20 раз.

**Общий итог конденсации** - укорочение нити ДНП в 10000 раз.

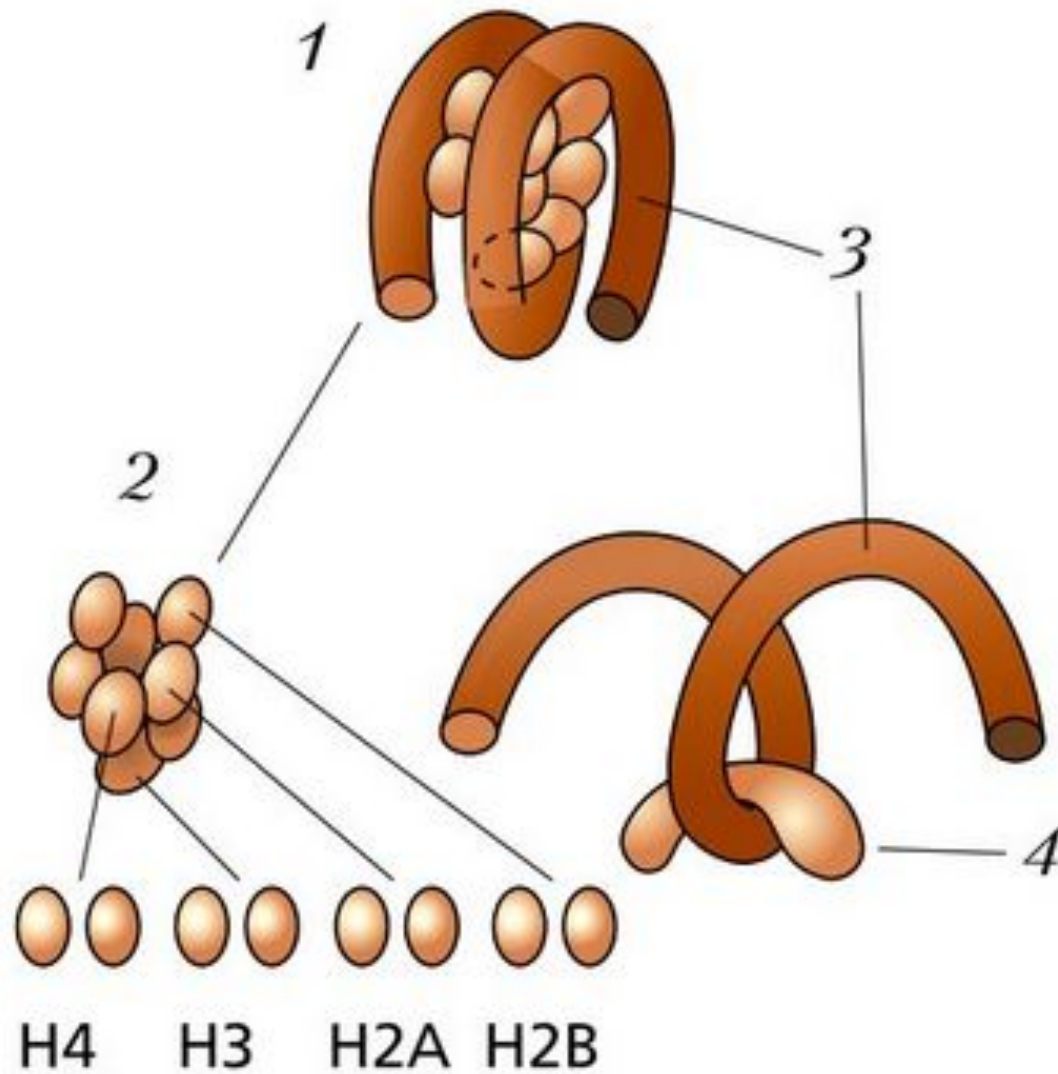


Схема строения нуклеосомы: 1 – нуклеосомная частица; 2 – октамер, охватывающий четыре пары гистонов; 3 – фрагмент ДНК дл. в 146 пар оснований; 4 – гистон H1

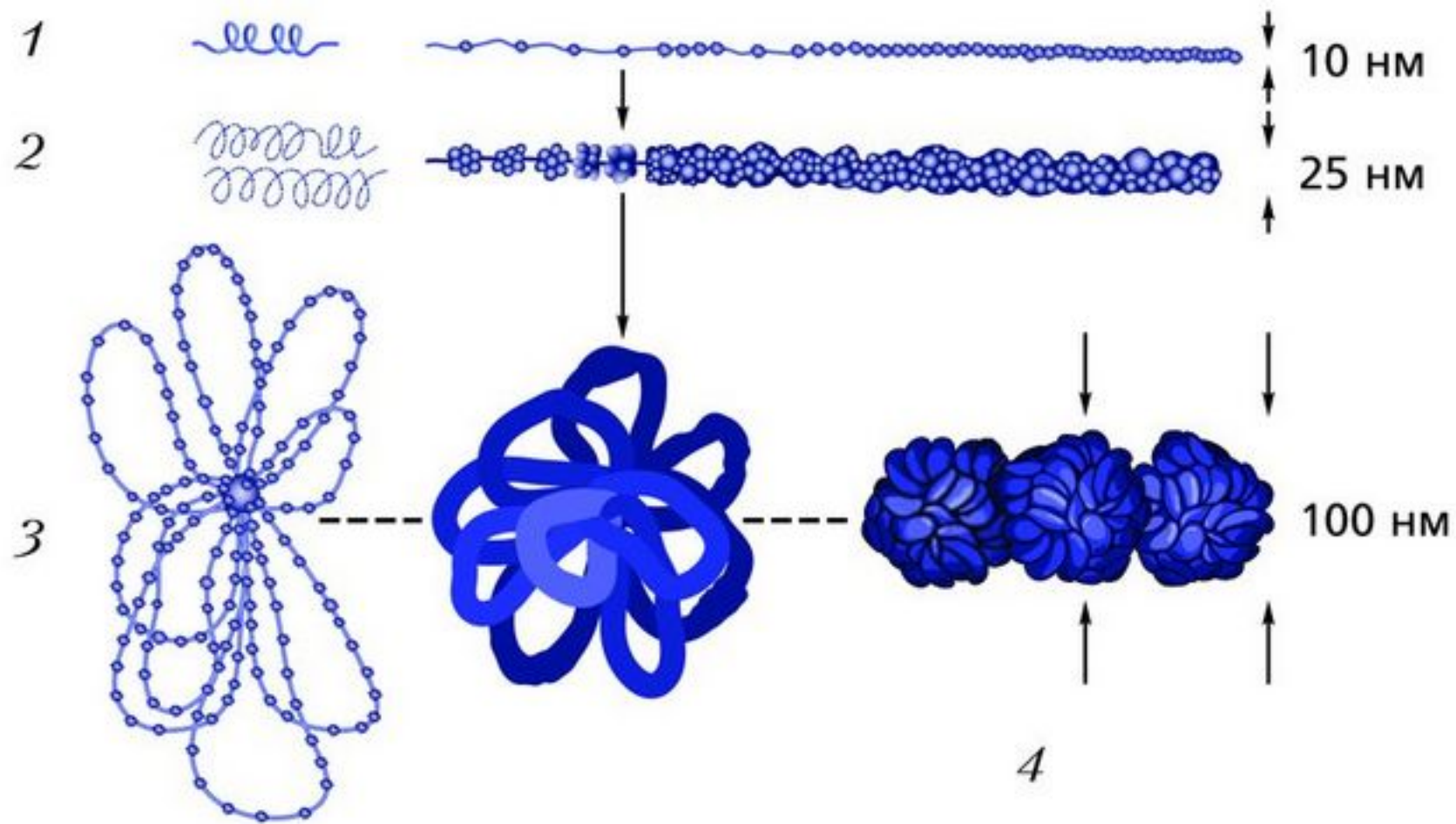


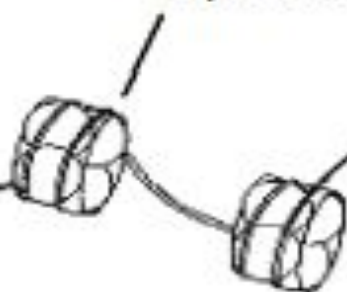
Схема начальных уровней компактизации хроматина:

1 – нуклеосомный; 2 – нуклеомерный; 3 – хромомерный (петлевой домен); 4 – хромонемный

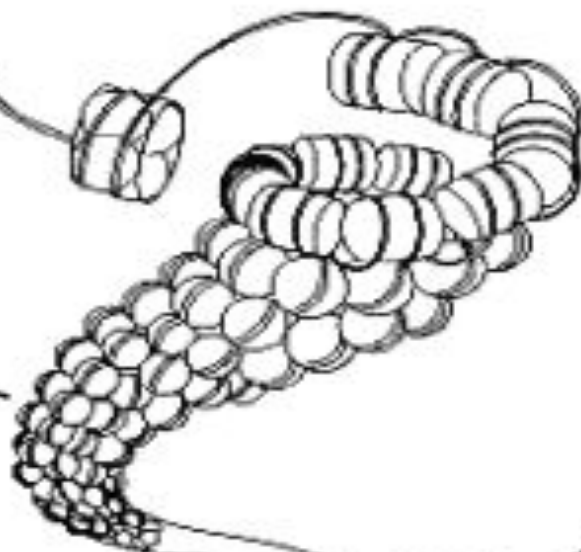
Спираль ДНК



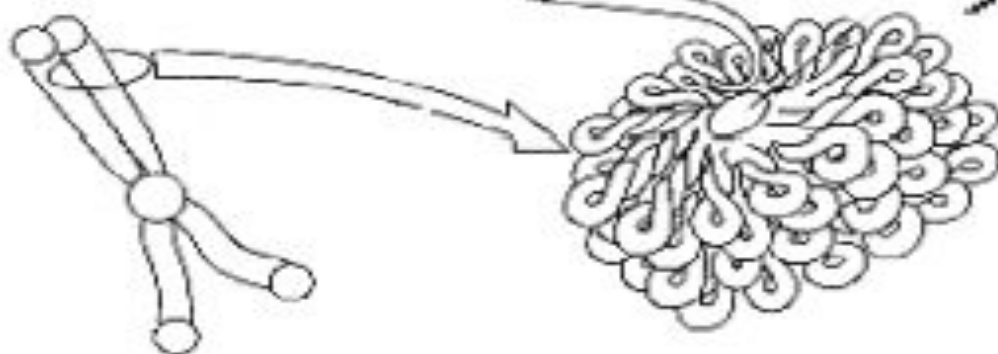
Нуклеосома



Соленоидная спираль



Петли



Хромосома на стадии  
деления ядра

## Сборка нуклеосом

**1 способ.** обусловлен способностью тетрамера  $H3H4$  организовывать ДНК в частицы, которые несколько напоминают минимальную нуклеосому. При добавлении димера  $H2A * H2B$  эти тельца могут превращаться в минимальную нуклеосому

**2. способ.** Данные получены при использовании поперечно-сшитых гистоновых октамеров, которые не могут диссоциировать на отдельные белки, но тем не менее сохраняют способность связывать ДНК с образованием минимальной нуклеосомы. Это говорит о том, что в принципе ДНК может обвиваться вокруг предварительно сформированного октамера. Это белок, преобладающий в ооцитах, и локализован он в нуклеоплазме

Антитела, полученные против этого белка, реагируют с белками нуклеоплазмы многих эукариот. След-но, можно предположить, что этот белок соответствует эволюционно какой-то универсальной функции, закрепленной в процессе эволюции. Он был назван нуклеоплазмином.

В присутствии нуклеоплазмина гистоны могут связываться с ДНК.

## Фейзинг.

Терм. "фазирование" обознач. неслучайное располож. нуклеосом относительно конкретной послед-сти нуклеотидов ДНК в определенных участках генома. Позиционирование идет в т.ч. при пом. спец. послед-стей ДНК, кот. обладают тем св-вом, что они более податливы к изгибу двойной спирали ДНК в этом месте. Перед активацией гена нуклеосомы присутствуют как в вышерасположенных регуляторных послед-стях ДНК, так и в самом промоторе.

Во время индукции транскрипции такого гена регуляторные факторы (ТФ, связывающиеся с ТАТАбоксом), связываясь с ДНК, прямо или косвенно вызывают разрушение нуклеосомной структуры соответствующих участков ДНК.



## **Во время транскрипции часть нуклеосомных белков остается связанной с ДНК.**

Нуклеосомы как частицы видны на хроматиновых фибриллах как до места отхождения транскрипта, так и после него при редкой посадке РНК-полимеразы - фермента, вдвое большего, чем нуклеосома.

При частой посадке этого фермента и частицы РНК-полимеразы располагаются тесно др. к др. и между ними нуклеосомы не видны.

Нуклеосомные белки при прохождении РНК-полимеразы не теряют связи с ДНК, а сама ДНК в составе нуклеосомы разворачивается.

Предлагаются 2 варианта изменения структуры нуклеосом при синтезе РНК:

1. нуклеосома «расщепляется» на 2 полунуклеосомы, а ДНК разворачивается;
2. нуклеосома, частично декомпактизируясь, сохраняет тетрамер  $(H3-H4)_2$ , а 2 димера  $H2A-H2B$  временно отходят, а затем, после прохождения РНК-полимеразы, возвращаются, при этом восстанавливается исходная нуклеосома.

# НЕКОДИРУЮЩИЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Геном животных и человека - сложнейшая система с многоуровневой системой регуляции.

Важную роль в процессах регуляции играют некодирующие последовательности - энхансеры, сайленсеры, инсуляторы.

Активность этих послед-стей определяет уровень транскрипции Активность этих послед-стей определяет уровень транскрипции генов, а сл-но и уровень синтезируемого с них белка.

Транскрипция регулируется с пом. промотора, на кот. собираются белки транскрипционного комплекса, и энхансера, кот. с пом. регуляторных белков усилив. транскрипцию генов.

# Энхансеры

высших эукариот

высших эукариот способны активировать гены на больших расст. (до десятков тыс. пар нуклеотидов). Они действуют вне зависимости от положения относительно направления транскрипции. Существует неск. моделей функционирования энхансеров, больш. из них заключ. в том, что белки, связанные с энхансером, непосредственно взаимодействуют с белками, собранными на промоторе, а ДНК между ними выпетливается. Энхансеры практич. не обладают специфичностью действия, поэтому в геноме есть др. регуляторы, кот. определяют активность и специфичность энхансеров.

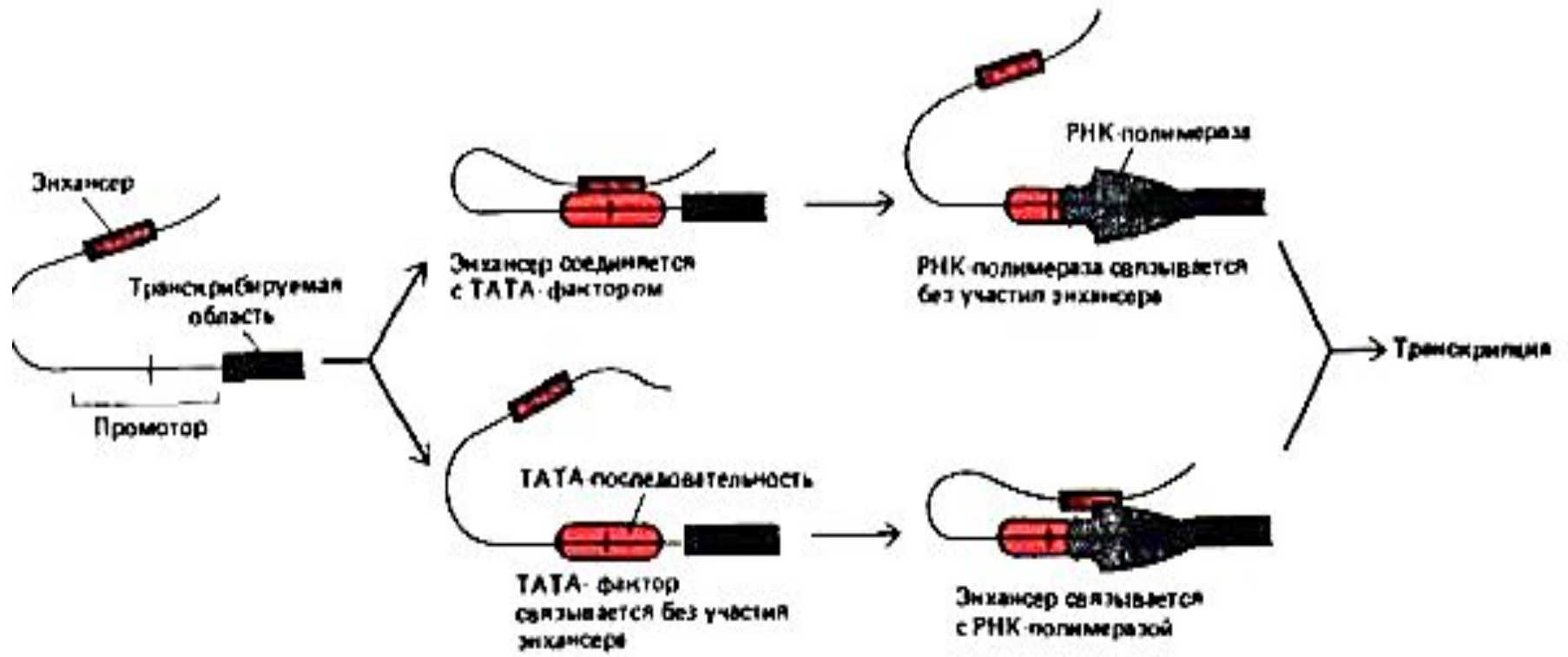


схема двух вариантов действия энхансера с образованием петли

**Активаторы (Activators)** - белки, кот. связываются с энхансерами, кот. помогают РНК-полимеразе правильно начать транскрипцию.

**Репрессоры (Repressor)** - белки, кот. связывают активаторы, чем снижают или прекращают транскрипцию.

**Основные факторы (Basal factors)** - белки, кот. ориентируют РНК-полимеразу на начало структурной части гена.

**TATA box (или Pribnow box)** - часть промотора, являющаяся сайтом связывания для белковых факторов.

**Транскрипционные факторы (Transcription factors)** - помогают занять правильную позицию активаторам и РНК-полимеразе.

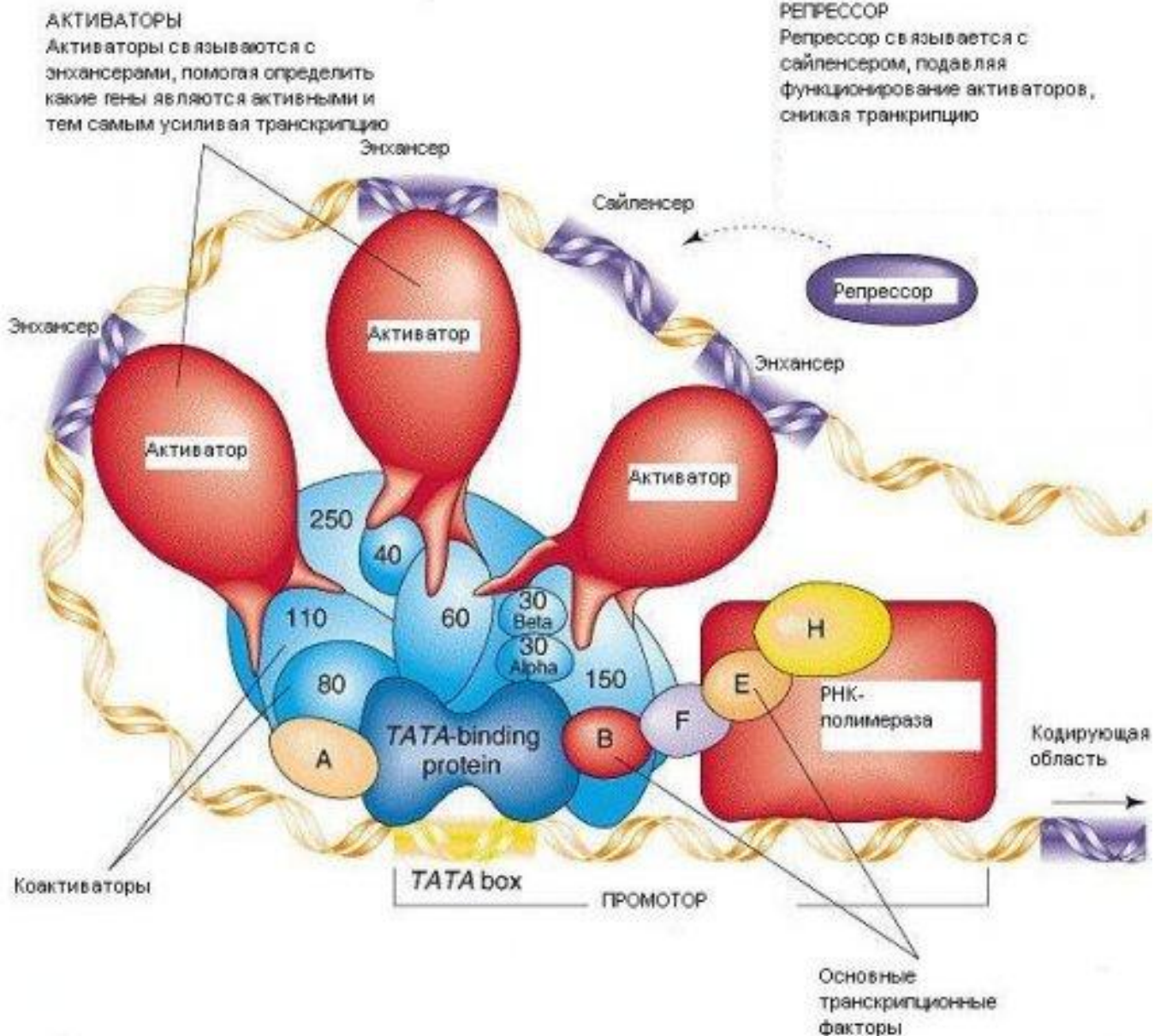
Транскрипцию нужно не только активировать, но и подавлять.

Для этого существуют сайленсеры.

**Сайленсеры** репрессируют активность генов, они действуют вне зависимости от их положения относительно направления транскрипции и не обладают специфичностью действия. Предполагается, что специфичность действия энхансеров и сайленсеров определяется инсуляторами, кот. блокируют активность энхансера/сайленсера, но это происх. в том случае, если инсулятор наход. между промотором и энхансером/инсулятором

При этом инсуляторы не влияют непосредственно на активность энхансера/сайленсера и промотора-энхансер/сайленсер мож. влиять на незаблокир.

инсулятором промотор в промотор может быть



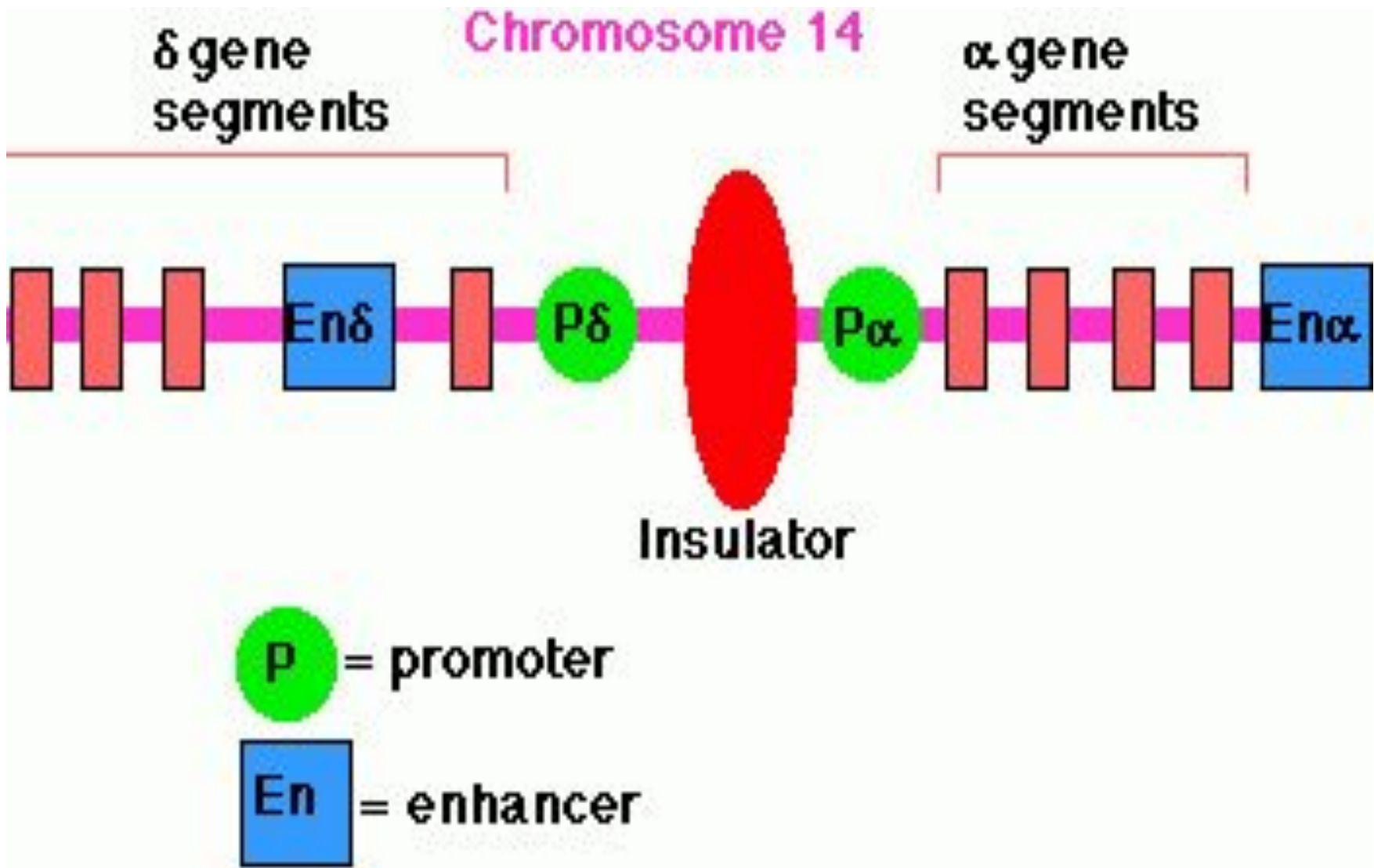
В этом случае происх. прямое подавление инициации транскрипции путем разрушения транскрипцион. Комплекса на промоторе или посредством его инактивации



**Инсуляторы** (англ. *insulate* - изолировать) - послед-сти ДНК, особ. регуляторные элементы, кот. облад. способ-стью блокир. сигналы, исходящие от окружения.

Введение одного из таких элементов между энхансером и промотором регулируемого гена приводит к функциональной изоляции энхансера и подавлению экспрессии гена, а фланкирование гена пограничными послед-стями предохраняет его от инактивирующего действия окружающего конденсированного гетерохроматина, т.е. снимает эффект положения.

У высших эукариот энхансер может активировать промотор на расст., достигающем неск. сотен тысяч пар нуклеотидов, что явл. одной из особ-стей регуляции транскрипции высших эукариот.



На схеме показ. действие инсулятора на функционирование энхансера с пом. образования нового хромосомного домена.

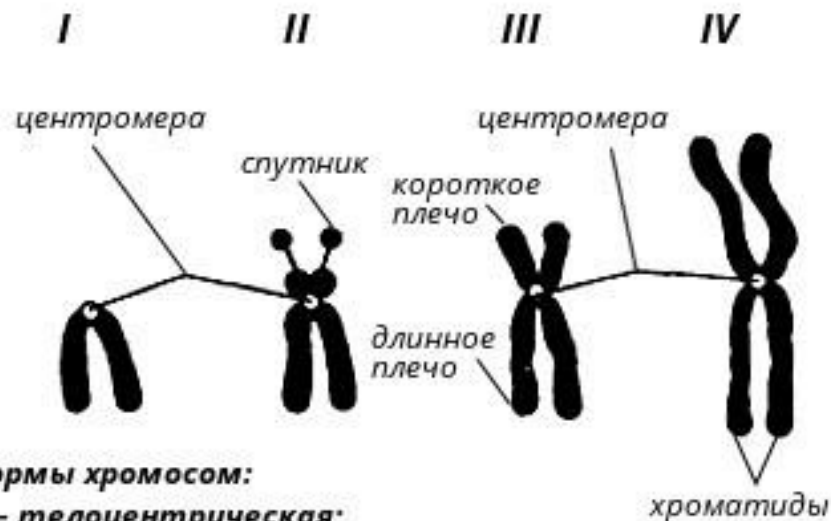
# Внутриядерная архитектура хромосом. Явление трансвекции

Клетки тела многоклеточ. эукариот им. Диплоид. (двойной) набор хромосом, складывающийся из гаплоидных наборов хромосом отца и матери.

В тканях зародышевого пути при образ. гамет гомологич. хромосомы в процессе мейоза конъюгируют др. с др., что обеспеч. последующий процесс обмена участков хромосом - кроссинговер.

Однако и в соматических клетках, в особенности у насекомых, наблюдали спаривание гомологичных хромосом.

Уже в начале XX века высказывали предположение, что такое взаимодействие хромосом необходимо для функционирования генов в попарной, парной

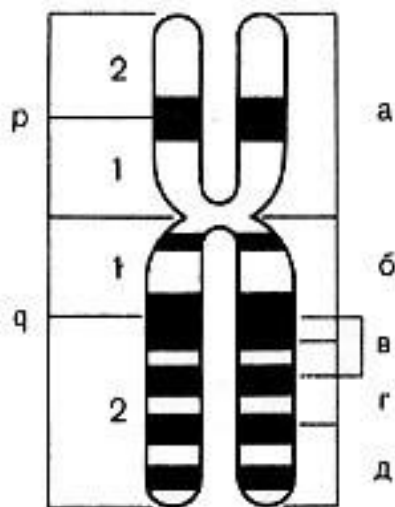


**Формы хромосом:**

*I — телоцентрическая;*

*II — акроцентрическая;*

*III — субметацентрическая; IV — метацентрическая*



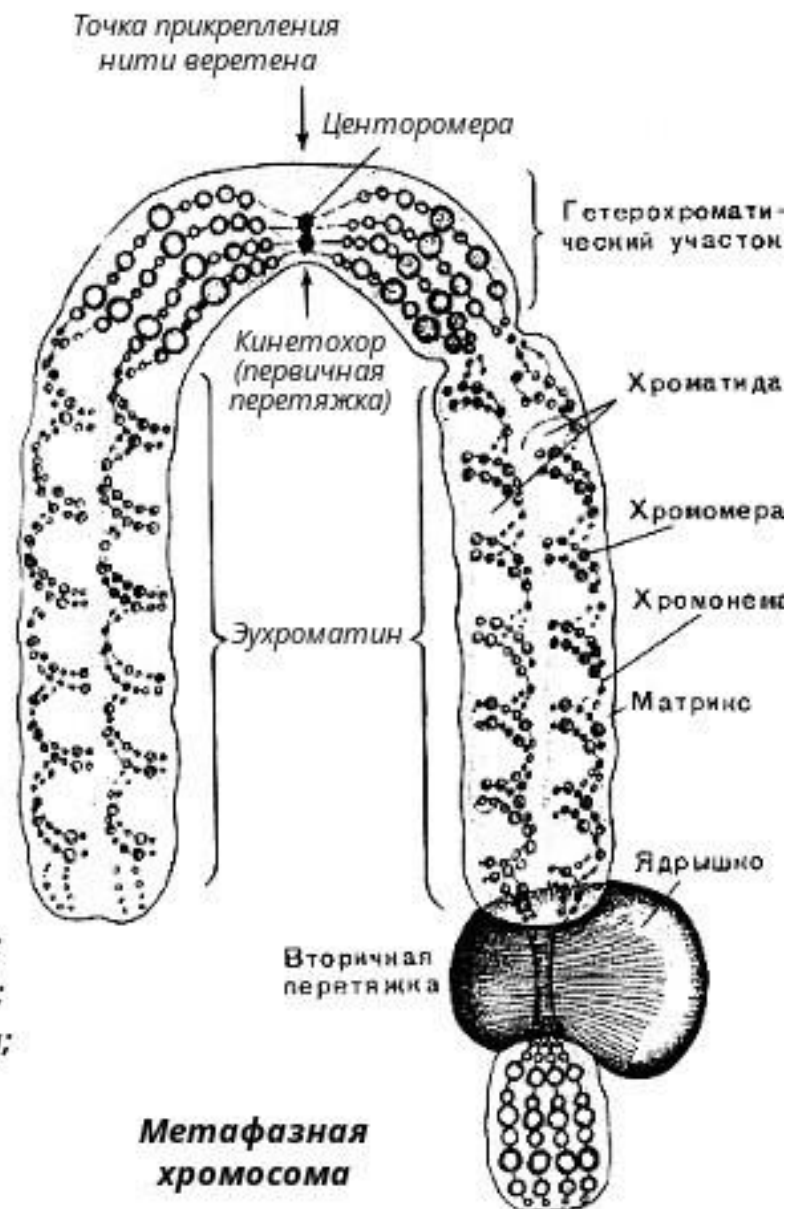
**Карта X-хромосомы человека**

*Справа показано расположение генов:*

*а — сцепленных с локусами группы крови Xg;  
б-г — синтеза некоторых ферментов;*

*д — цветовой слепоты и гемофилии А;*

*Слева: p — короткое плечо хромосомы;  
q — длинное плечо Р хромосомы;  
1,2 — сегменты плечей хромосом.*



**Метафазная хромосома**

# ТРАНСВЕКЦИЯ

Явл. трансвекции обнаружено у дрозофилы.

Т. назыв. случаи восстановления нормального фенотипа в результате взаимодействия по-разному поврежден. генов, находящихся в разн. хромосомах, если нет препятствий для спаривания гомологич. хромосом и сближения поврежден. генов в соматических клетках.

Конъюгация хромосом предотвращается структурными перестройками, напр. инверсиями, когда участок одной из гомологичных хромосом разворачивается на  $180^\circ$ .

Явления Т., наблюдаемые в соматич. клетках, были описаны сравнительно недавно.

В то же время генетики давно знали, что конъюгация хромосом в мейозе и последующ. обмен участками хромосом (кроссинговер) предотвращается при структурных