Тема: Молекулярные основы наследственности. Реализация наследственной информации

План лекции:

1. Нуклеиновые кислоты – классификация, строение, функции.
2. Макромолекулярная структура ДНК
3. РНК: виды, структура, функции

4.Центральная догма молекулярной биологии (Основной постулат Крика). Типы переноса генетической информации в живых системах.

5. Репликация. Основные принципы и типы репликации ДНК. Понятие о репликоне.

6. Проблема концевой недорепликации и ее решение.

7. Транскрипция; ее краткая характеристика.

8. Строение и функции РНК – полимераз у про- и эукариот.

9. Этапы транскрипции.

10. Процессинг мРНК.

11. Понятие о генетическом коде

12. Трансляция мРНК:

а). рекогниция. Аминоацилирование тРНК.

б). структура рибосом про- и эукариот.

в). Этапы трансляции.

13. Общие представления о фолдинге белков.

Нуклеиновые кислоты (НК)

Два вида НК:

ДНК (хранение наследственной информации)

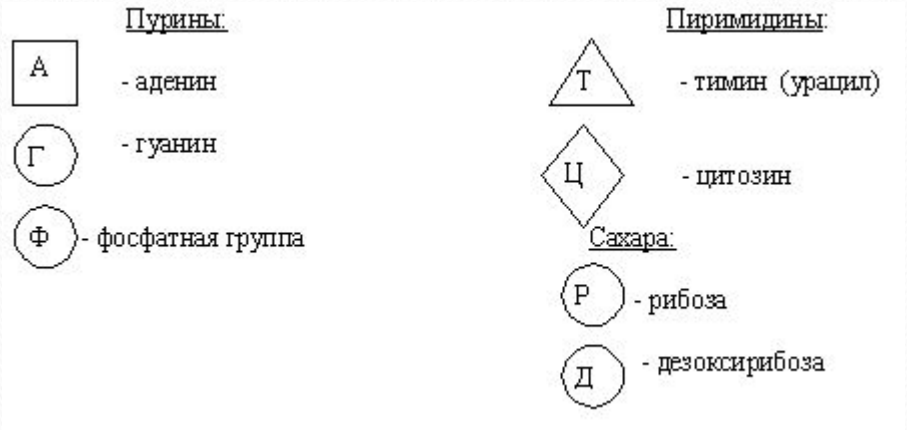
РНК (реализация наследственной информации)

Нуклеиновые кислоты (НК)

Н.К.- биологические полимеры

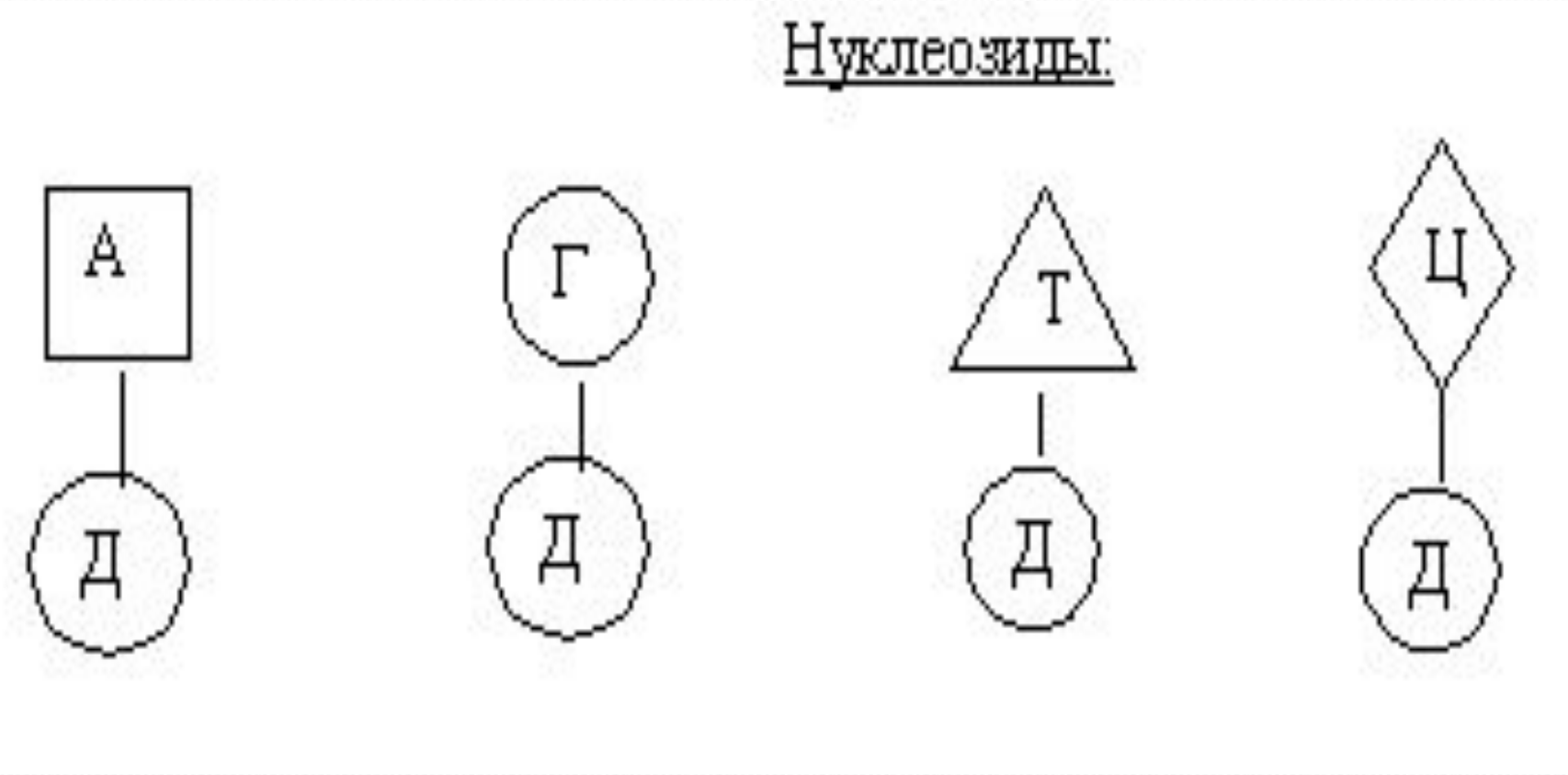
Мономеры- нуклеотиды

Состав нуклеотида

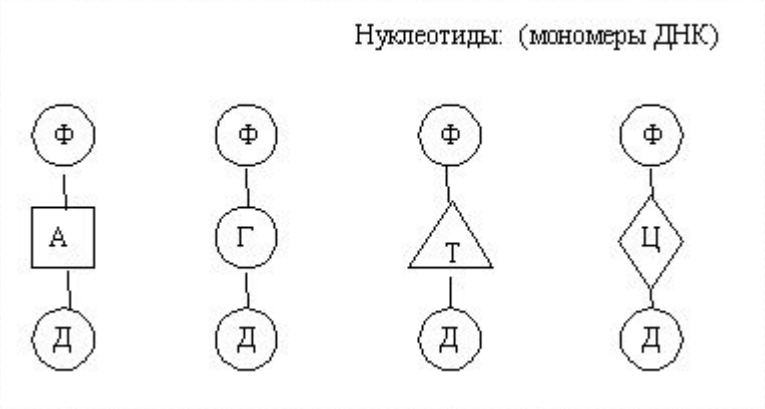


Компоненты нуклеотида, входящего в ДНК

Нуклеозиды

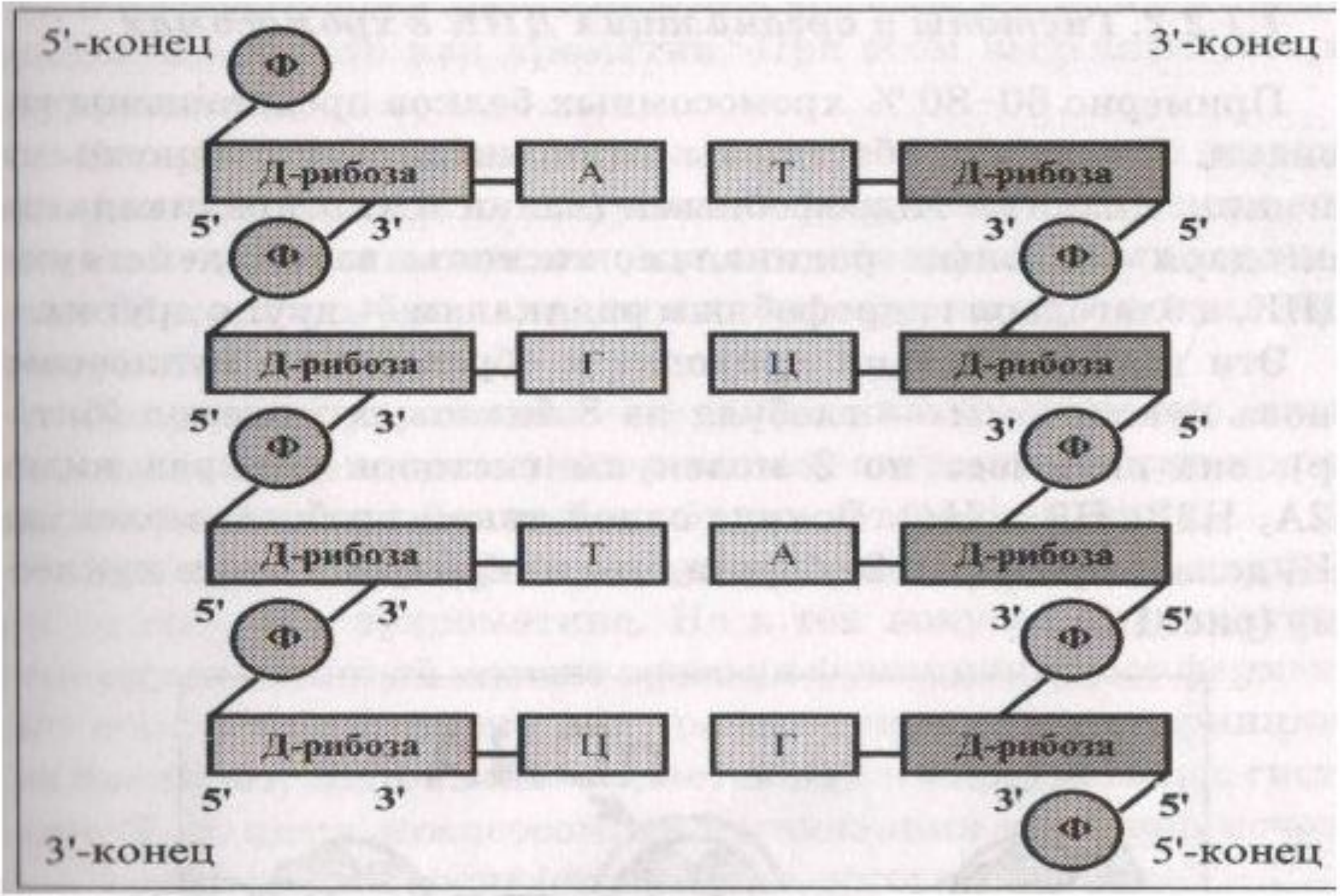


Нуклеотиды

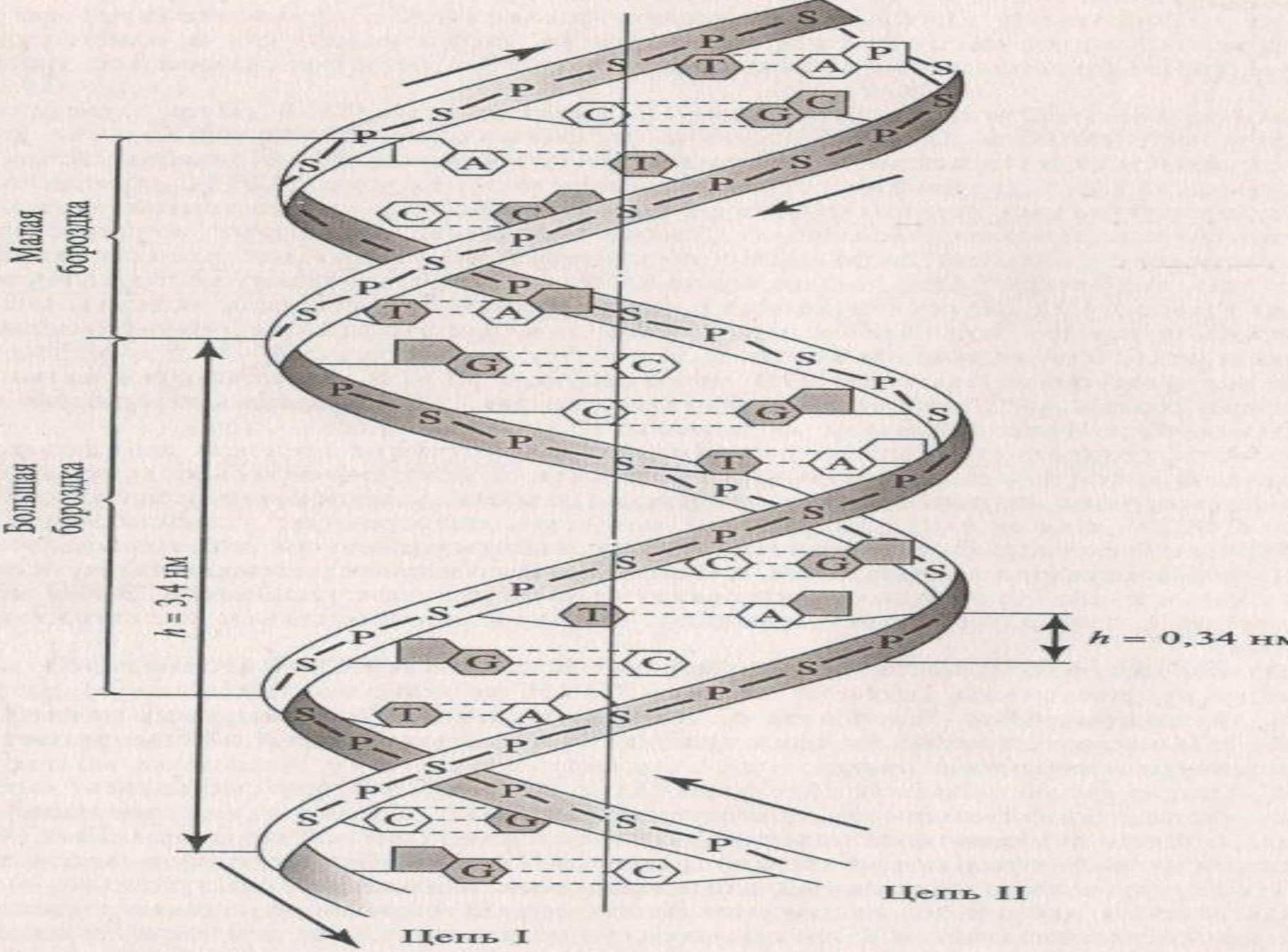


Модель Уотсона-Крика (1953)

1. ДНК-полимер из нуклеотидов, соединенных 3-5 фосфодиэфирными связями
2. Состав нуклеотидов ДНК подчиняется **правилам Чаргаффа**: в любой ДНК содержание пуриновых оснований (А+Г) всегда равно содержанию пиримидиновых (Т+Ц); число остатков А всегда равно числу остатков Т, число остатков Г – числу остатков Ц.
3. Молекула ДНК имеет 2 полинуклеотидные цепи, образующие двойную спираль
4. Стабилизация структуры природной (нативной) молекулы ДНК обеспечивается водородными связями
5. Трехмерная модель ДНК: правильная правовинтовая спираль, образованная двумя полинуклеотидными цепями, закрученными относительно друг друга и вокруг общей цепи
6. Две цепи **антипараллельны** друг друга
7. Цепи ДНК обладают **полярностью или направлением**: каждая цепь имеет 5’-конец и 3’-конец
8. Азотистые основания цепей соединяются по принципу **комплементарности**: А с Т, Г с Ц. Комплементарность – ключевое свойство ДНК.

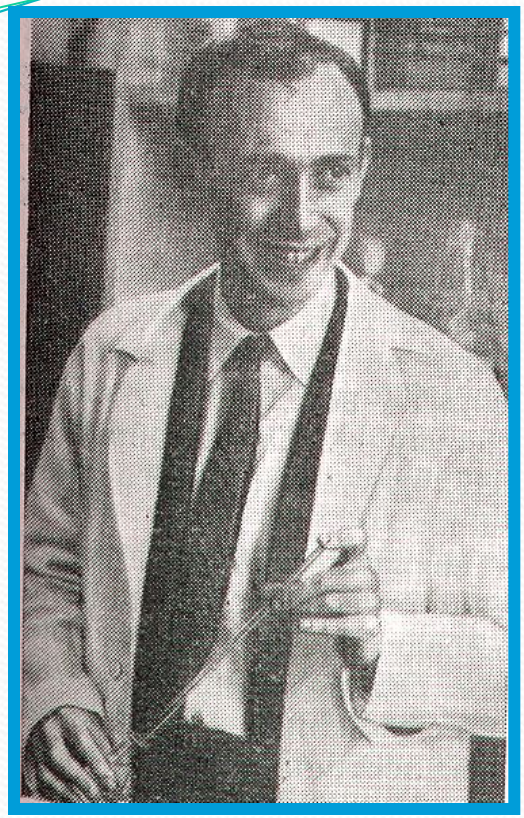


Структура ДНК

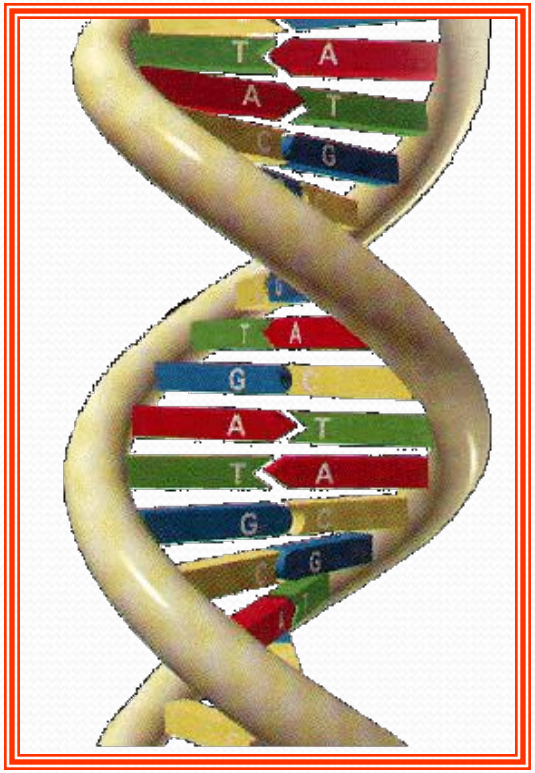


B-форма двойной спирали ДНК:
P — фосфат; S — дезоксирибоза

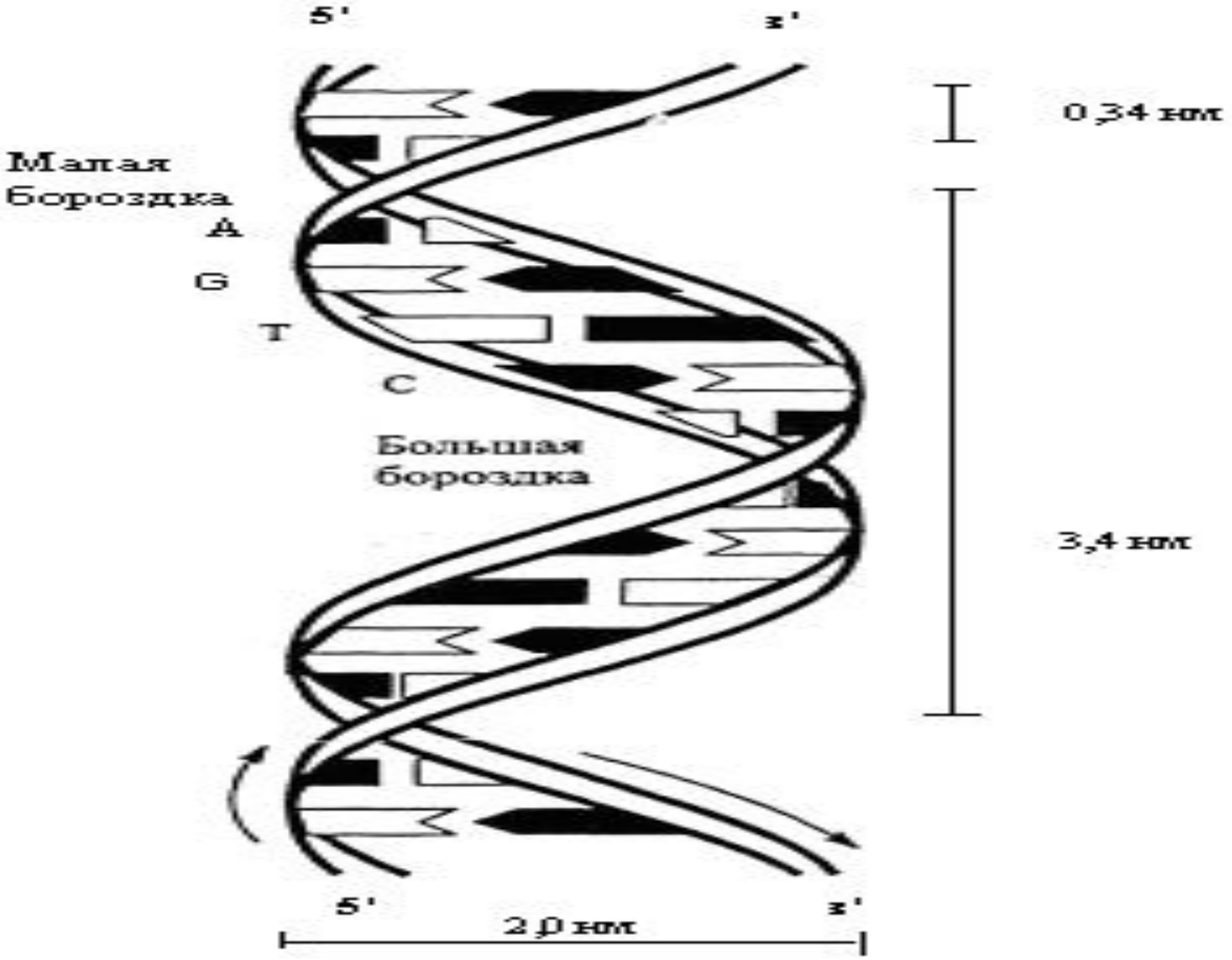
Нобелевская премия (1962 г.)



Джеймс Уотсон (р. 1928 г.)



Френсис Крик (1916-2004 гг)


5'
3'
0,34 нм
Малая
бороздка
A
G
T
C
Большая
бороздка
3,4 нм
5'
3'
2,0 нм

ДНК

При горизонтальном изображении:

5---АТТГАЦАГГЦ---3

3---ТААЦТГТЦЦГ---5

В ядре человеческой клетки – 46 молекул ДНК
Общая длина их – 190 см

Разнообразие форм ДНК

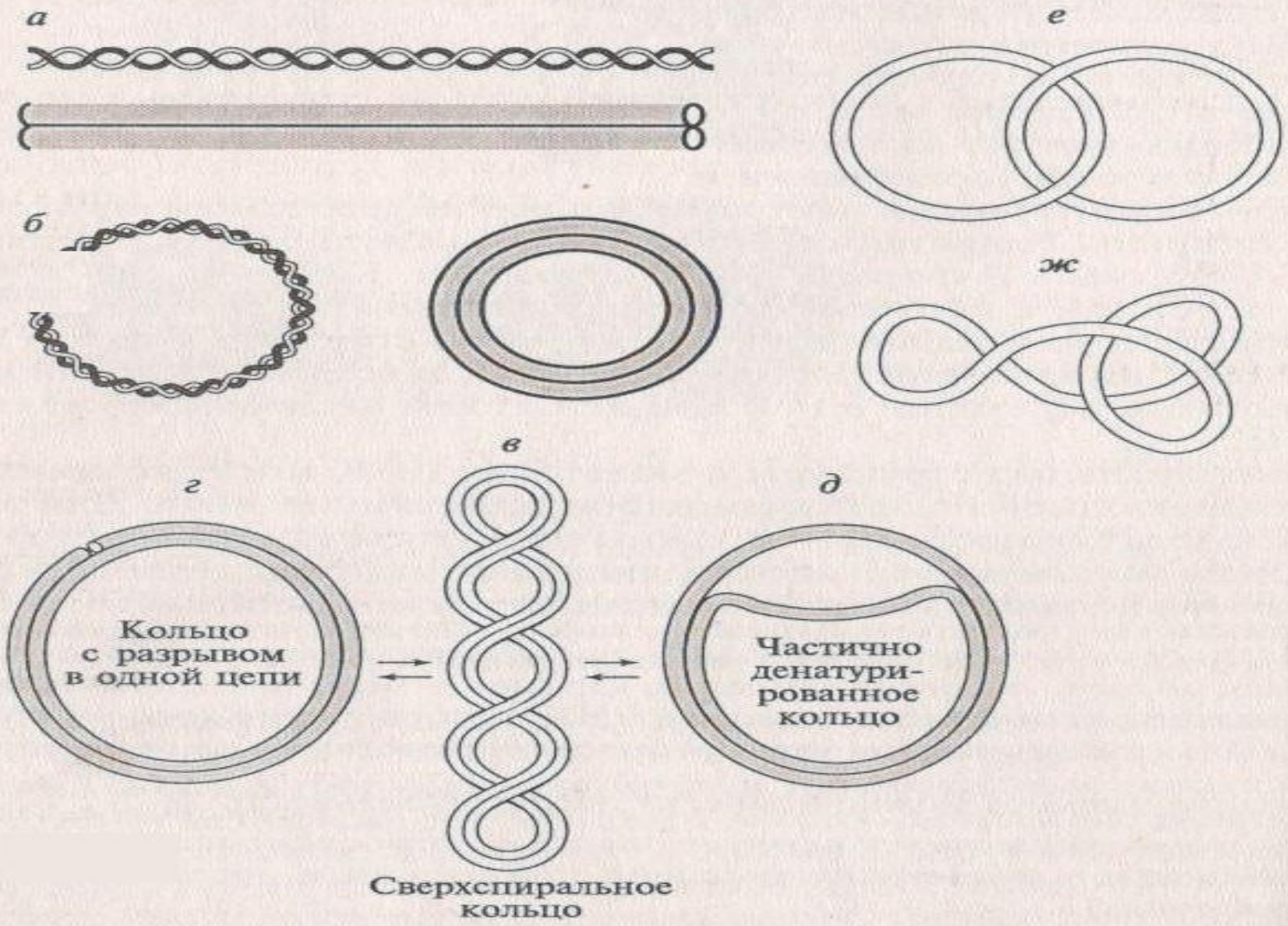
Не все ДНК являются двуцепочечными. Геномы некоторых мелких вирусов бактерий, растений и животных представлены кольцами из одной цепи.

Формы ДНК

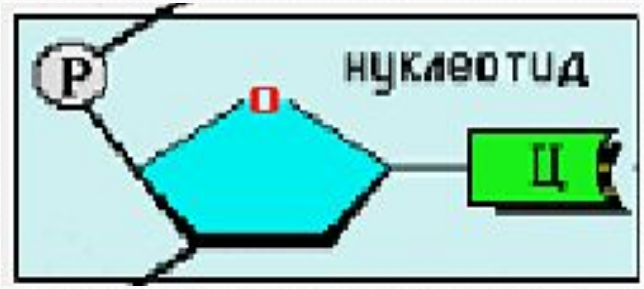
B-форма (правозакрученная спираль)- основная форма существования ДНК

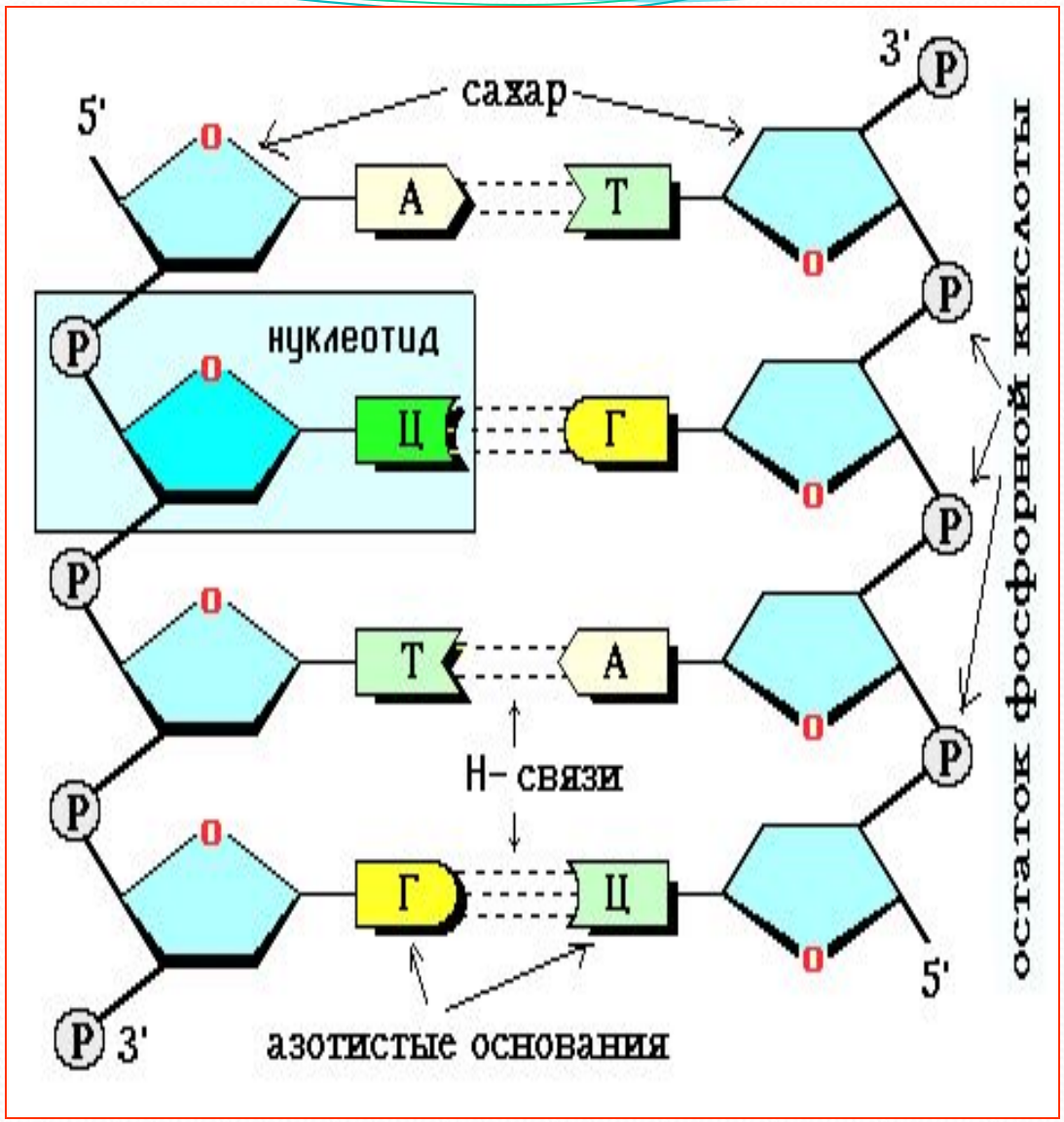
Z –форма (левозакрученная спираль), содержит последовательности Г-Ц

Обе формы могут переходить друг в друга при изменении ионной силы раствора или концентрации катионов, расхождения цепей для этого не требуется.



Схематическое изображение ДНК — линейной (*а*), кольцевой двуцепочечной (*б*) и сверхспиральной кольцевой (*в*); релаксированных кольцевых форм, полученных либо в результате разрыва одной из двух цепей (*г*), либо в результате локального расхождения двух цепей (*д*); катенана (*е*) и узла (*ж*)


нуклеотид
Р
О
Ц


3'
Р
сахар
5'
О
А
Т
нуклеотид
Ц
Г
Т
А
Н- связи
Г
Ц
5'
3'
азотистые основания
остаток фосфорной кислоты

РНК: структура и функции

Р-РНК(80-85%)

Т-РНК (около10%)

М(И)-РНК (5%)

Мя-РНК (2%)

Р-РНК

Р-РНК-структурная основа рибосом

Р-РНК взаимодействуют с м-РНК и аминоацил-тРНК в процессе трансляции

Это стабильные, нерастворимые РНК.

У эукариот 4 типа р-РНК:

28 S; 18 S ; 5,8 S; 5 S.

У прокариот 3 типа р-РНК: 23S; 16S; 5S.

М-РНК

М-РНК несет информацию о синтезе белка на ней самой, а также информацию о времени, количестве, месте и условиях синтеза этого белка.

Термин «матричная» РНК был предложен Жакобом и Моно.

Образование м-РНК происходит в результате транскрипции (переписывания) с одной из двух цепей ДНК.

Строение М-РНК

- **1.Информативная зона** - транслируемая область, работает как матрица в процессе биосинтеза белка
- **2.Неинформативная зона:**
- кэп,
- 5’-нетранслируемая область (5’-НТО),
- 3’ -нетранслируемая область (3’-НТО), полиаденилоый фрагмент

Строение М-РНК

КЭП 5’-НТО AUG ТРАНСЛИРУЕМАЯ ОБЛАСТЬ СТОП 3’-НТО ПОЛИ (А)

КЭП (от англ.*cap- кепка,шапка*)- нуклеотидная последовательность для защиты м-РНК от экзонуклеаз и для присоединения м-РНК к рибосоме

Поли(А)- длина от 50 до 400 н.п. Участвует в процессе созревания м-РНК, предопределяет время жизни м-РНК, способствует переносу м-РНК из ядра в цитоплазму и принимает участие в трансляции

НТО- элементы нестабильности м-РНК, в них запрограммированы время полужизни м-РНК в клетке и момент их деградации

Т-РНК

Т-РНК переносят аминокислоты в белоксинтезирующий аппарат клетки и выступают в роли затравки (праймера) в процессе обратной транскрипции.

Вторичная структура т-РНК в виде клеверного листа.

Различают акцепторный, антикодоновый, дигидроуридиловый, псевдоуридиловый и добавочный стебли.

Акцепторный стебель содержит 3’ и 5’-концы полинуклеотидной цепи. К 3’-концу присоединяется специфическая аминокислота

Т-РНК, особенности

1.По сравнению с р-РНК и м-РНК имеют меньшие размеры

2.Соотношение А:У и Г:Ц близко к 1. Г-Ц пары преобладают над А-У парами

3. В составе т-РНК есть необычные нуклеотиды: псевдоуридин, инозин, дигидроксиуридин и др.

4.т-РНК – растворимая РНК

Т-РНК

Содержит в своей структуре:

1.Сайт прикрепления аминокислоты (акцепторный конец)

2.Сайт связывания с рибосомой

3.Антикодон

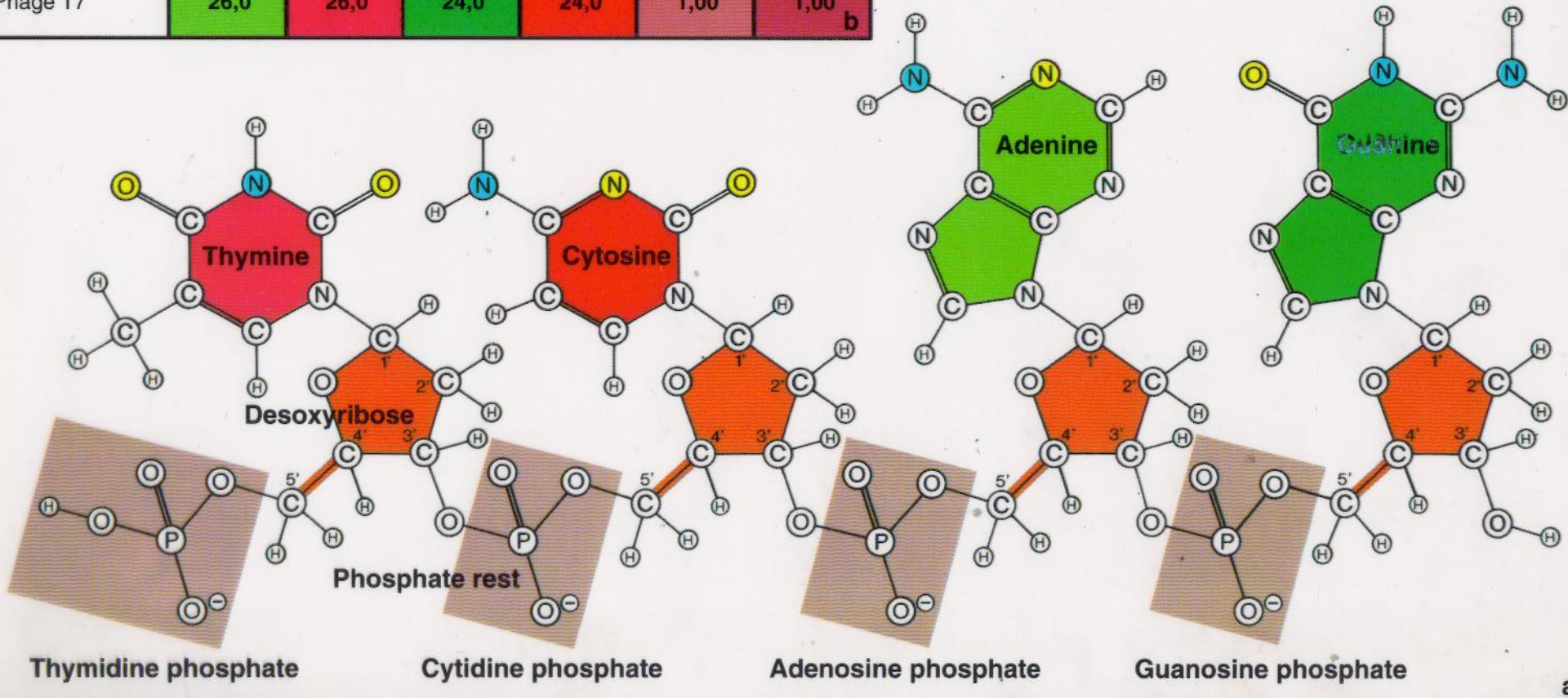
© JOHANNES LIEDER, Ludwigsburg, Germany as 8220 E Transparency No. 28

Relative components of bases in various DNA

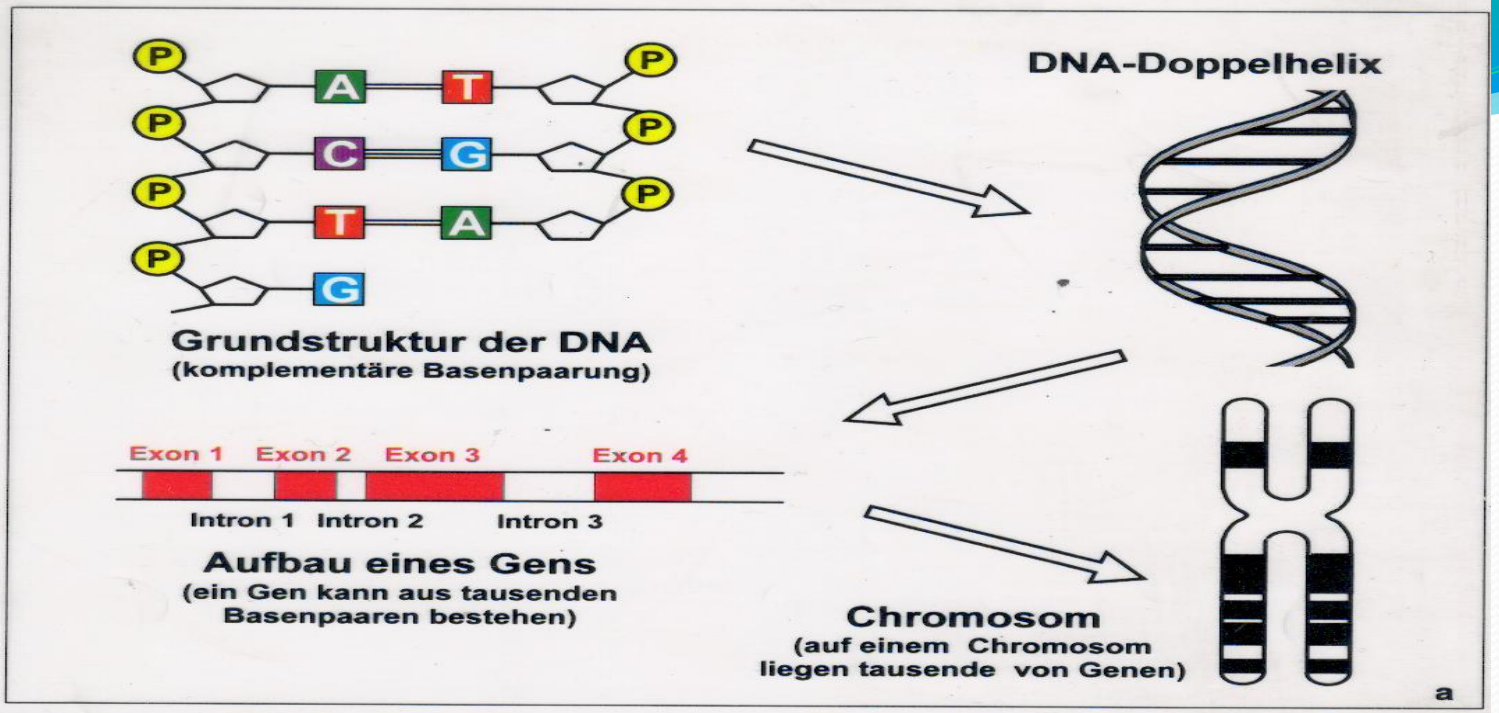
	Frequency of bases in %				Parts	
DNA from	A	T	G	C	A/T	G/C
Human, thymus	30,9	29,4	19,9	19,8	1,05	1,00
Chick, erythroyyte	28,8	29,2	20,5	21,5	0,99	0,95
Wheat	27,3	27,1	22,7	22,8	1,01	1,00
Yeast	31,3	32,9	18,7	17,1	0,95	1,09
Escherich. coli W	24,7	23,6	26,0	25,7	1,04	1,01
Phage T7	26,0	26,0	24,0	24,0	1,00	1,00

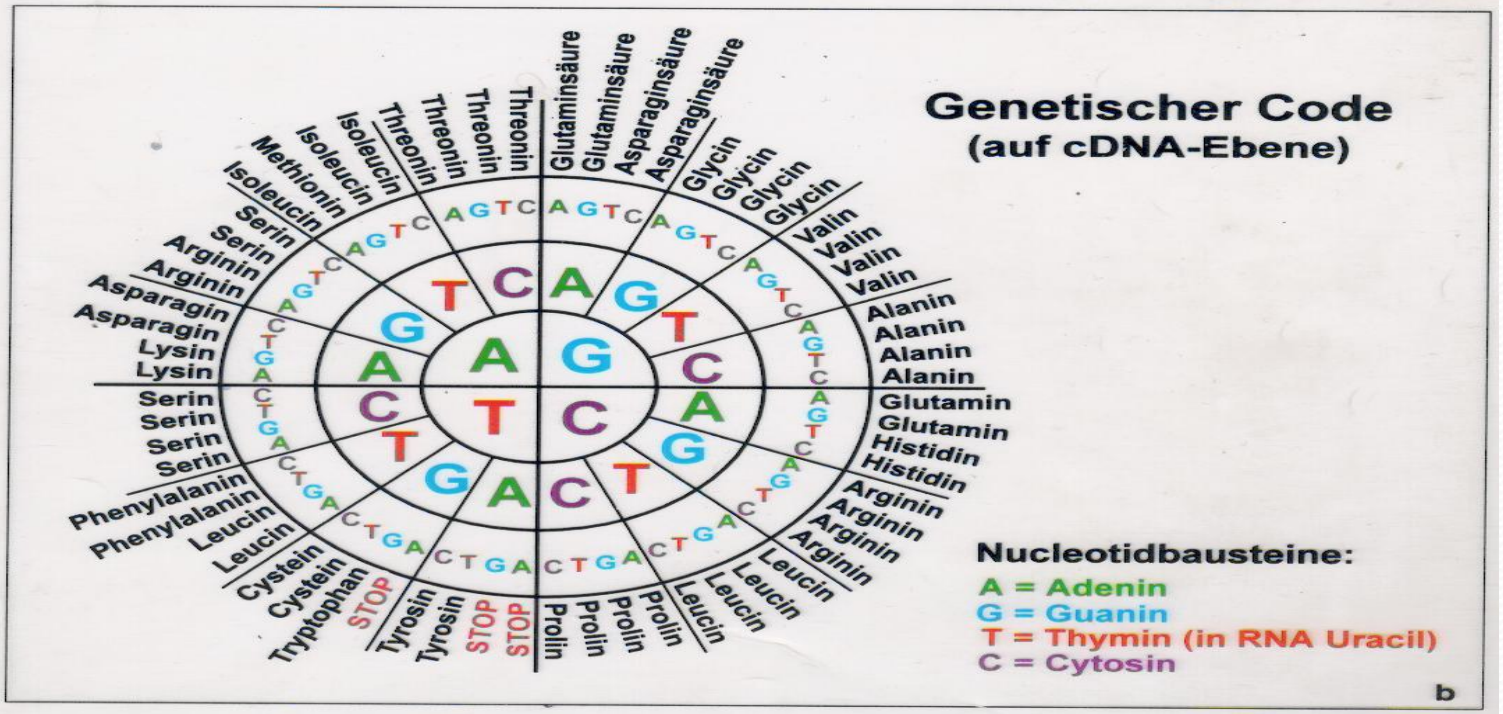
b

Nucleotides and their components

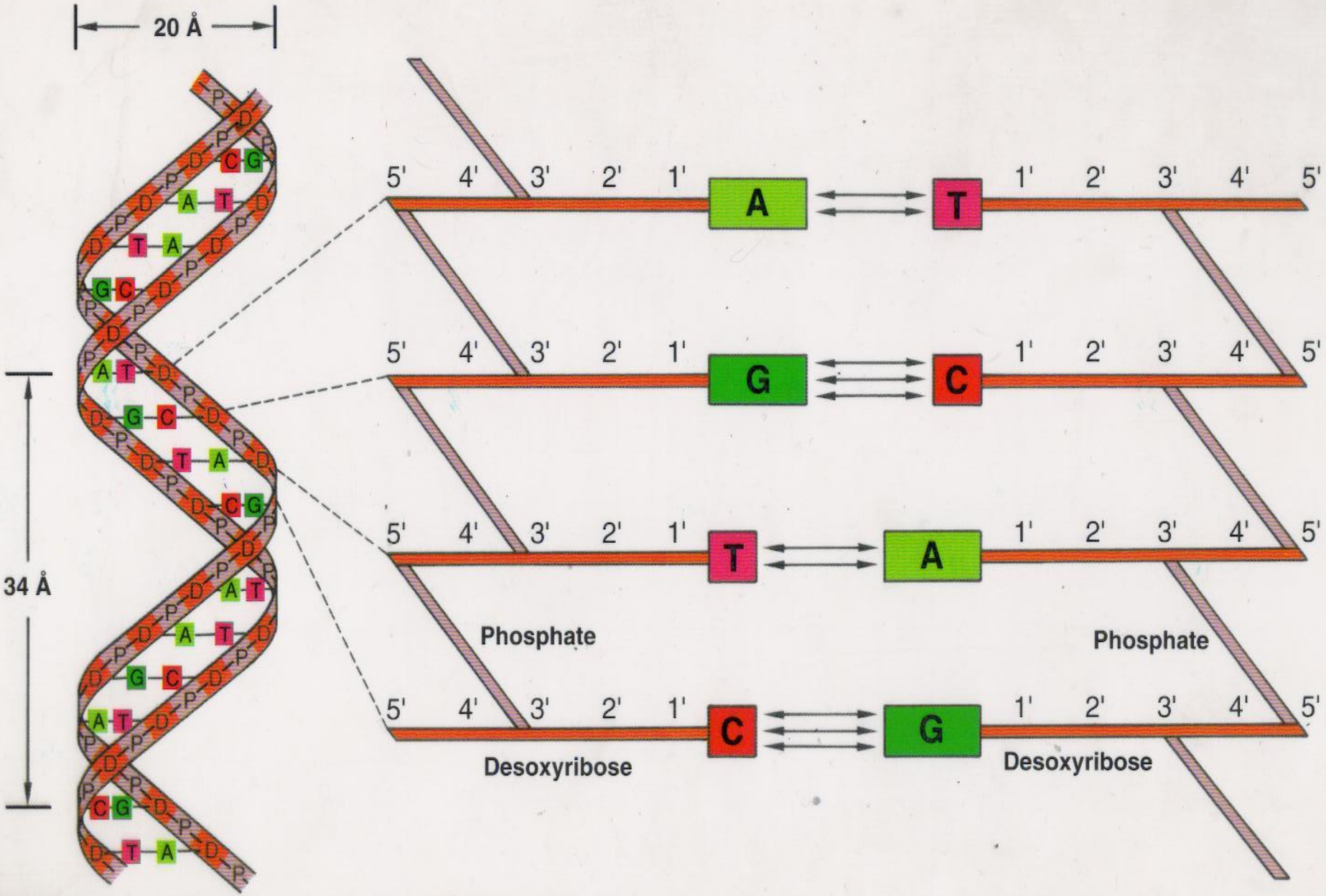


a

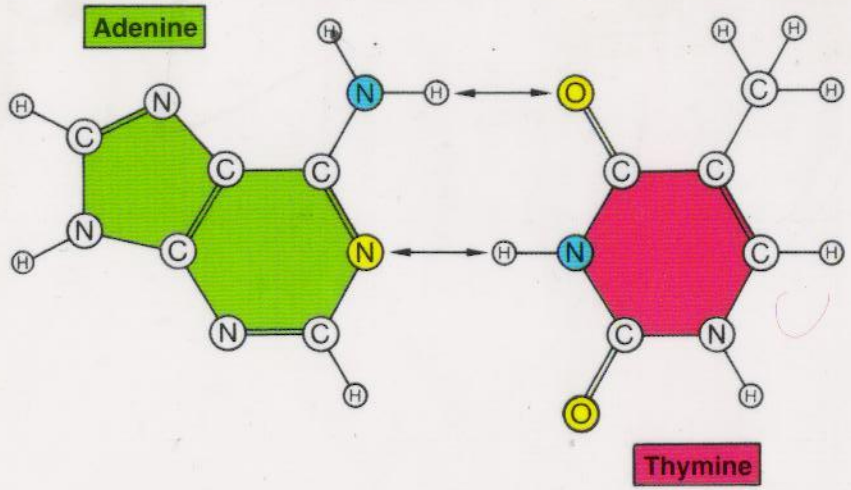

DNA-Doppelhelix
Grundstruktur der DNA
(komplementäre Basenpaarung)
Exon 1
Exon 2
Exon 3
Exon 4
Intron 1
Intron 2
Intron 3
Aufbau eines Gens
(ein Gen kann aus tausenden Basenpaaren bestehen)
Chromosom
(auf einem Chromosom liegen tausende von Genen)
a

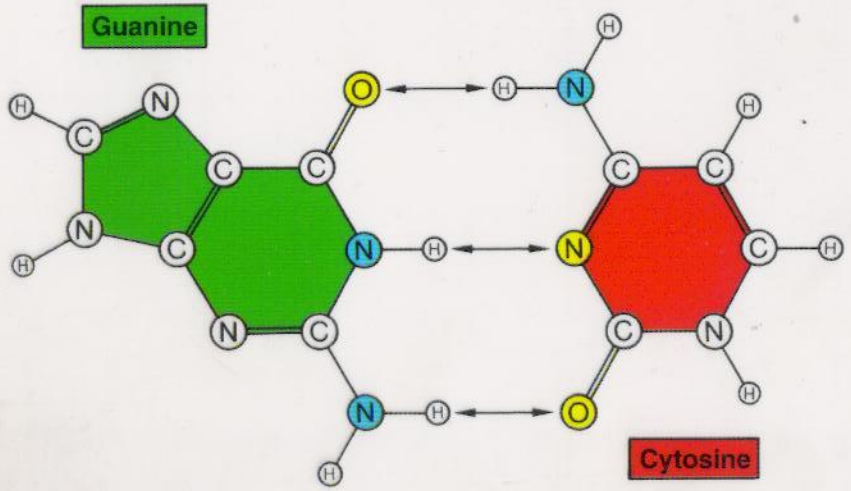

Genetischer Code
(auf cDNA-Ebene)
Nucleotidbausteine:
A = Adenin
G = Guanin
T = Thymin (in RNA Uracil)
C = Cytosin
b

Structure of the double helix



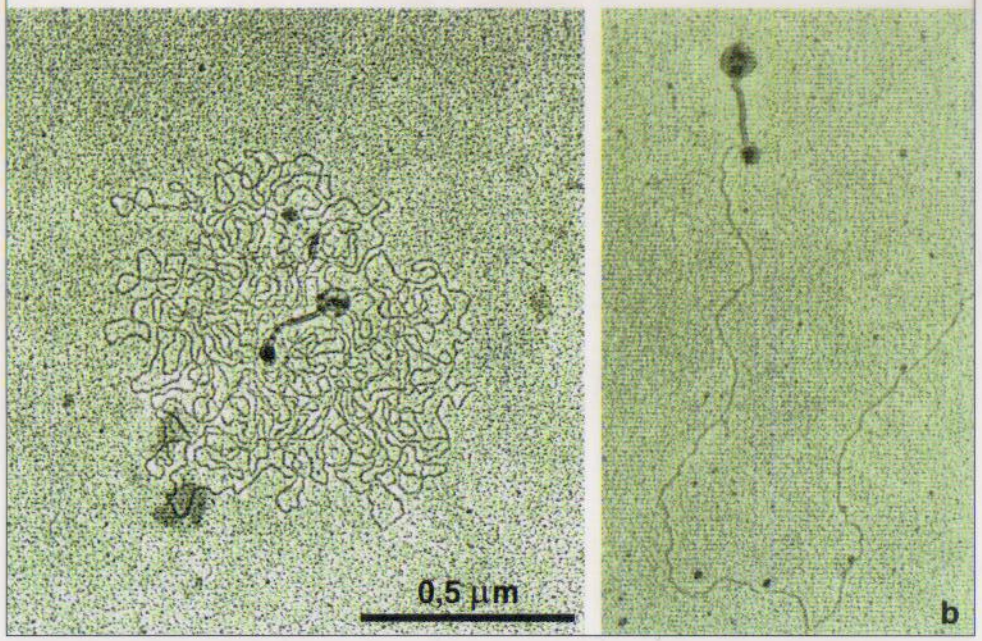
Hydrogen bonding between bases



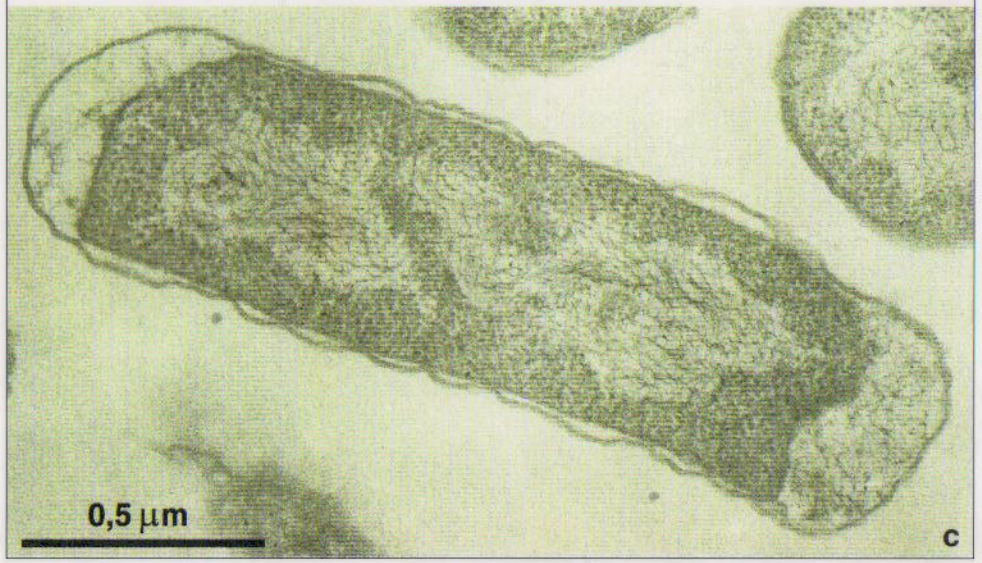


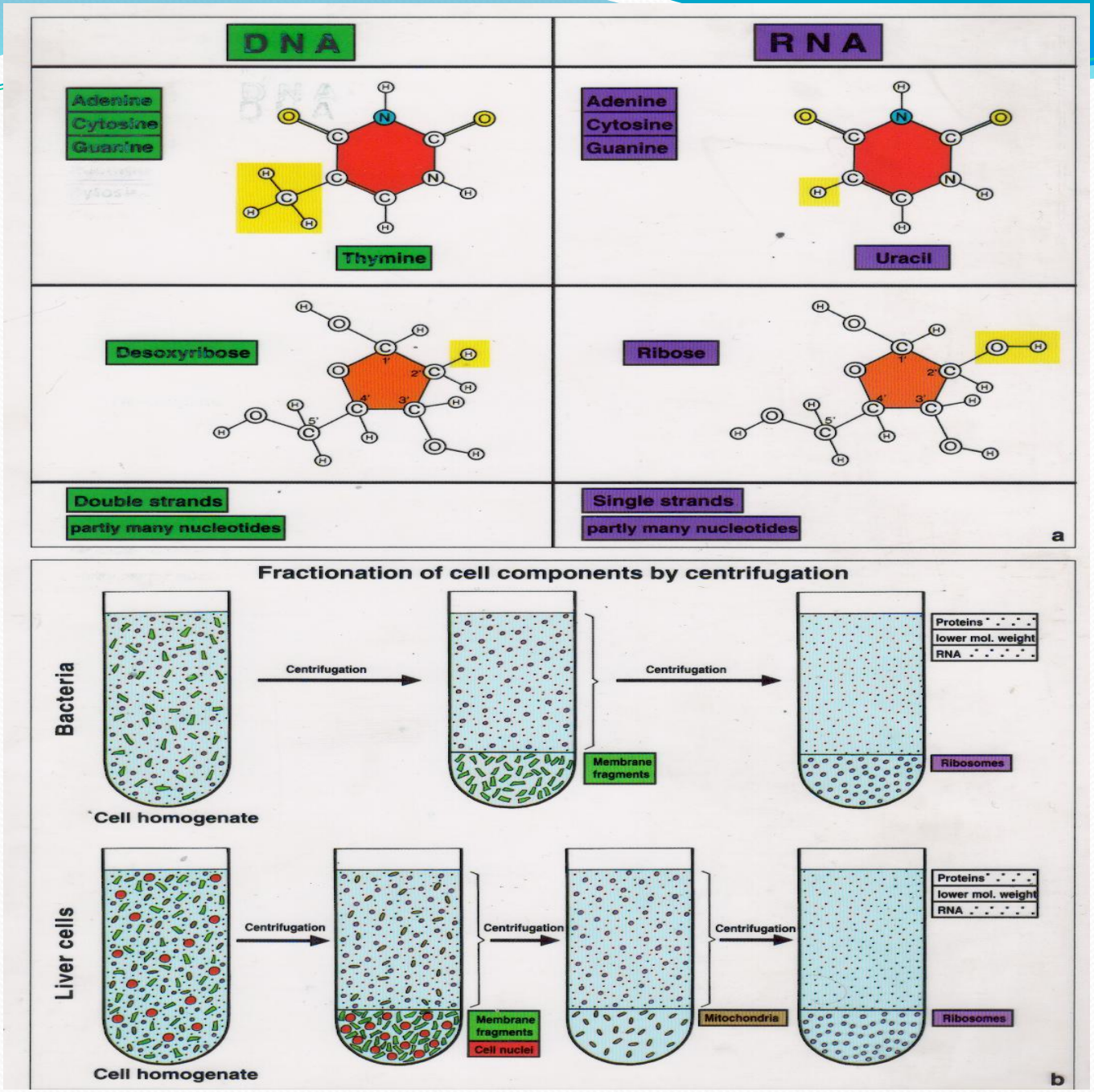
a

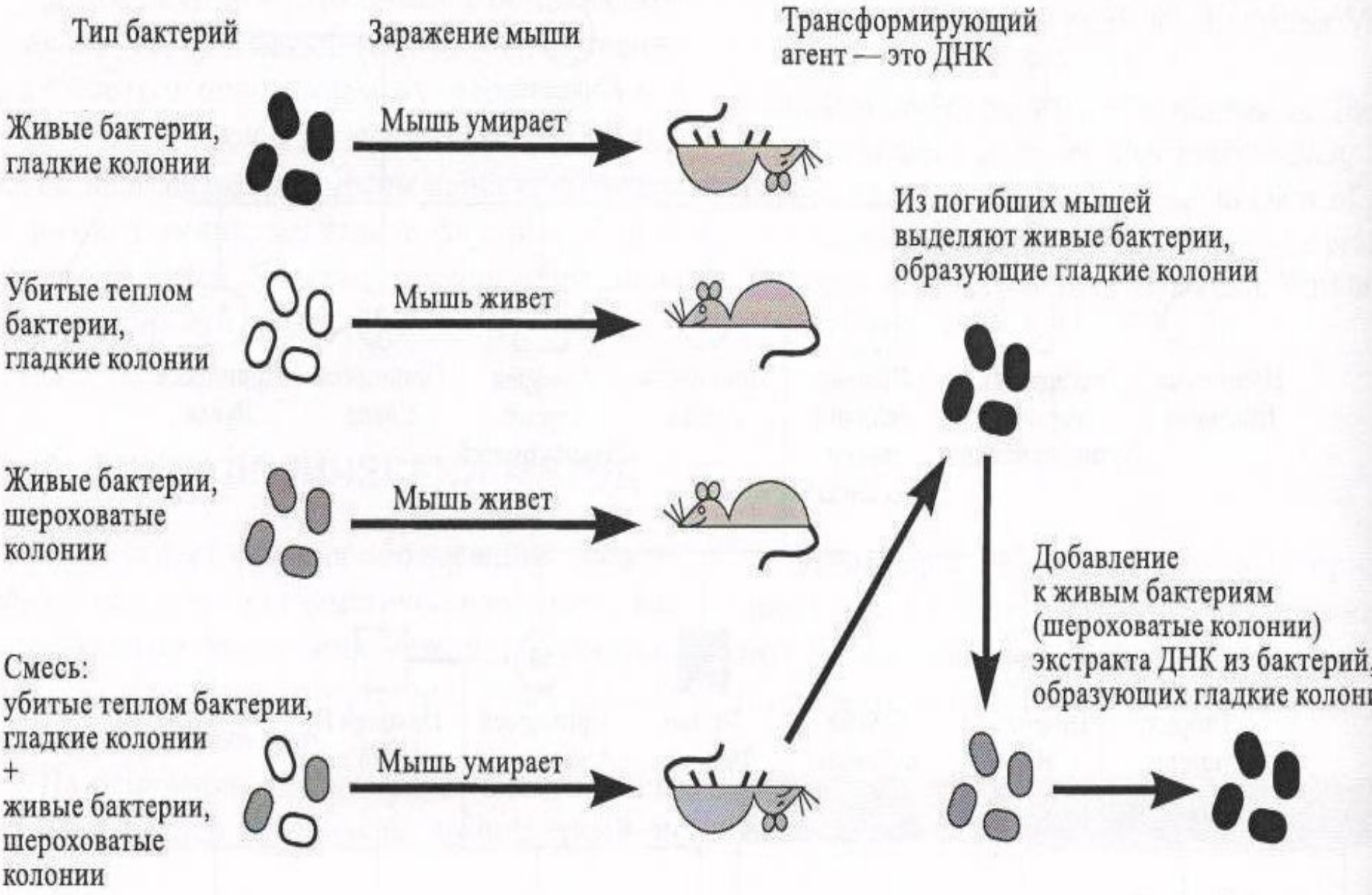
Electron micrograph of phage-DNA



Electron micrograph of sections through bacterial cells *(Escherichia coli)*

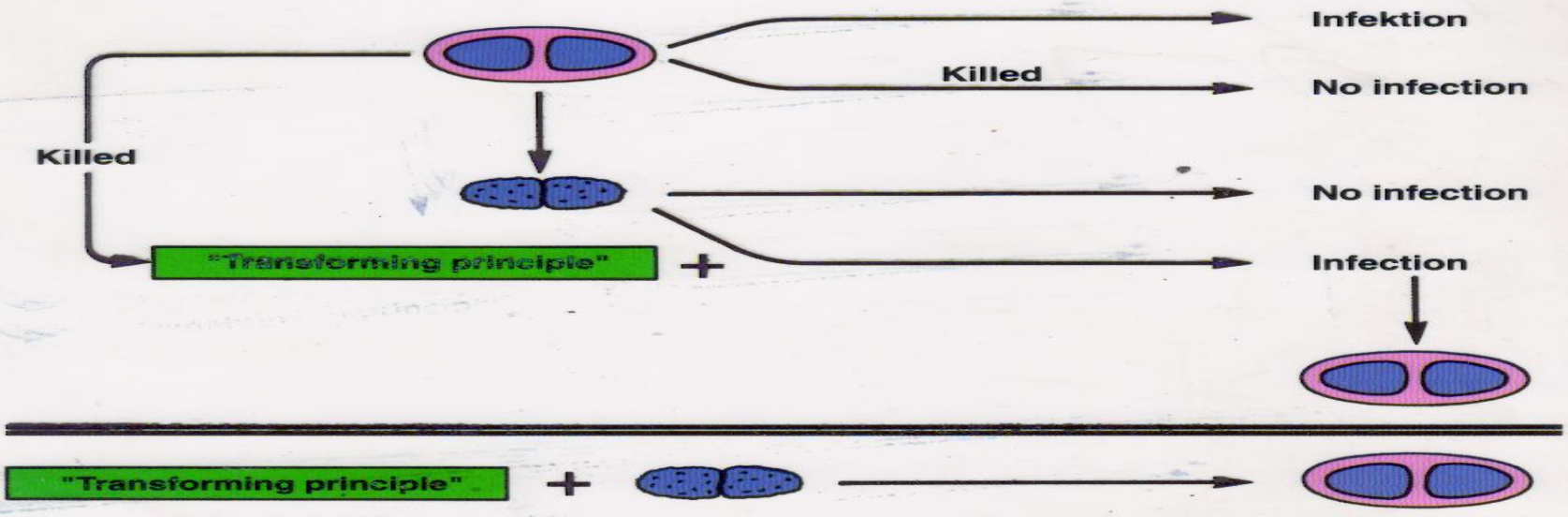



DNA
Adenine
Cytosine
Guanine
Thymine
Desoxyribose
Double strands
partly many nucleotides
RNA
Adenine
Cytosine
Guanine
Uracil
Ribose
Single strands
partly many nucleotides
a
Fractionation of cell components by centrifugation
Bacteria
Centrifugation
Centrifugation
Membrane fragments
Proteins
lower mol. weight
RNA
Ribosomes
Cell homogenate
Liver cells
Centrifugation
Centrifugation
Centrifugation
Membrane fragments
Cell nuclei
Mitochondria
Proteins
lower mol. weight
RNA
Ribosomes
Cell homogenate
b



Трансформация у бактерий *Pneumococcus*

Transformation in *Diplococcus pneumoniae*



a

DNA-content of various tissues of rat (in 10^{-12} g / cell)

	Brain	6,1		Pancreas	7,2
	Kidney	6,6		Spleen	6,4
	Heart	6,3		Bone marrow	6,8

DNA-content of various animals (in 10^{-12} g / cell)

		Somatic cells	*Germ cells*			*Somatic cells*	*Germ cells*
	Cow	5,9 – 6,9	3,3		Toad	7,3	3,7
	Cat	6,4 – 6,8	2,8		Carp	3,3	1,6
	Chicken	2,4 – 2,6	1,3		Pike	1,7	0,8

Постулат Крика

- **Центральная догма молекулярной биологии**: передача наследственной информации происходит только в одном направлении – от нуклеиновых кислот к белку
- ДНК--р-- ДНК--т--РНК--т– белок

- 3 типа переноса генетической информации:
- 1.общий (идет во всех клетках)
- 2.специализированный (идет при особых обстоятельствах):
- А)РНК---РНК . Происходит в клетках, зараженных вирусами, генетический материал которых представлен РНК. Например, вирус табачной мозаики

Типы переноса наследственной информации

- Б) РНК---ДНК (обратная транскрипция). Происходит в клетках животных, зараженных вирусами определенного типа

- В) ДНК---белок (прямая трансляция). Происходит только в лабораторных условиях, когда например под воздействием антибиотиков вместо И-РНК в качестве матрицы используется ДНК.

Типы переноса наследственной информации

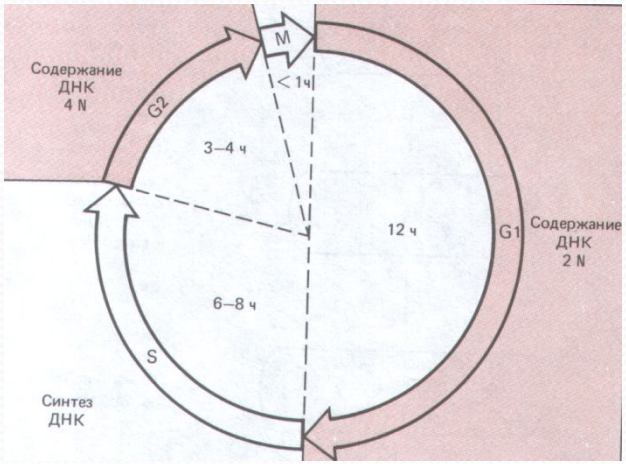
- 3. Запрещенный перенос (это процессы не зарегистрированные нигде и никогда). Это:
- Белок---ДНК, Белок---РНК, Белок---Белок

Репликация ДНК – процесс самоудвоения, самовоспроизведения, самокопирования наследственной информации.

Суть репликации ДНК - образование идентичных копий для передачи наследственной информации из поколения в поколение.

Репликация ДНК связана с репликацией хромосом и с делением клетки.

Репликация ДНК – сложный процесс, осуществляемый комплексом белков и ферментов.



Репликация ДНК идет на основе следующих пр

- **Полуконсервативность**

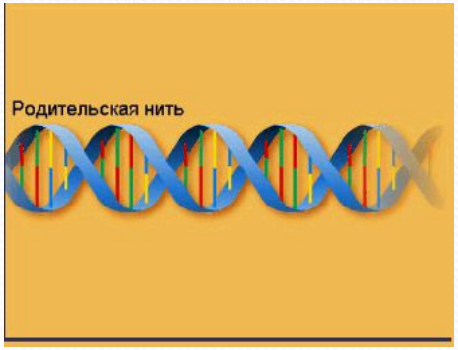
Синтез ДНК начинается с расхождения цепей, каждая из которых служит матрицей для синтеза дочерней цепи. В итоге репликации образуются две дочерние двухцепочечные молекулы, каждая из которых состоит из одной родительской (исходной) и одной (вновь синтезированной) дочерней цепи. Т.о., от одного поколения к другому передается одна из двух цепей, составляющих родительскую молекулу ДНК. Такой способ репликации называется полуконсервативным

Консервативный способ репликации – когда после удвоения одна молекула состоит из двух старых цепей, другая – из двух новых.

Дисперсный способ – когда каждая из двух новых цепей содержит как новые, так и старые участки.

- **Комплементарность**

Вновь синтезируемая (дочерняя) цепь ДНК строится по принципу комплементарности. В состав растущей цепи включается тот нуклеотид , который комплементарен нуклеотиду родительской цепи.



- **Антипараллельность**

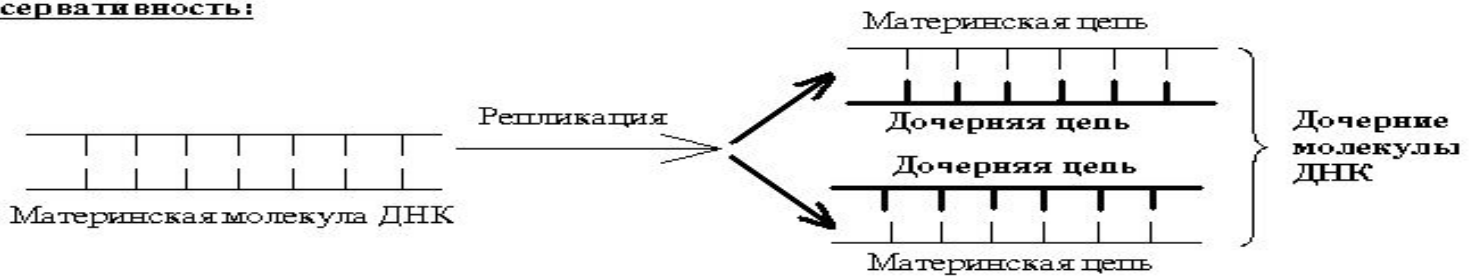
В молекуле ДНК две комплементарные цепи антипараллельны, поэтому растущая цепь антипараллельна матричной цепи и считывается в направлении 3`□5`

Униполярность

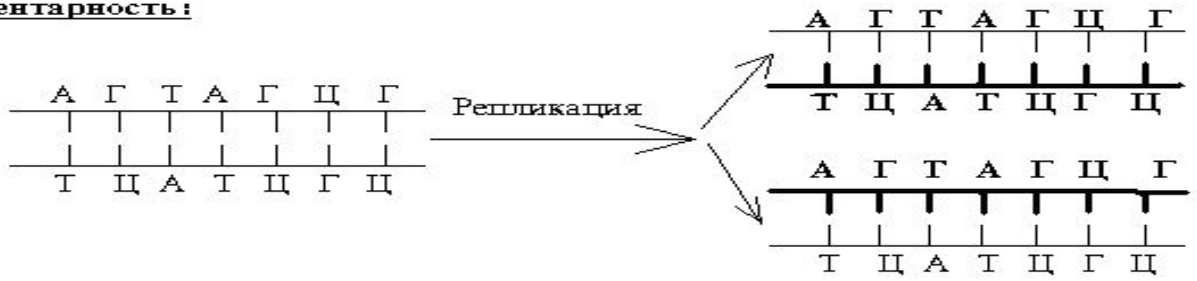
Удвоение цепи ДНК идет в направлении от 5` конца к 3` концу, следовательно новый нуклеотид присоединяется к 3 ` концу растущей цепи.

Прерывистость – репликация может идти одновременно в нескольких местах молекулы ДНК.

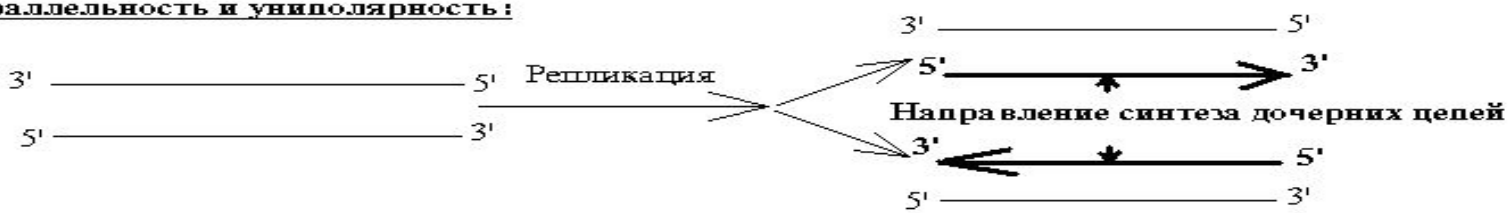
А. Полуконсервативность:



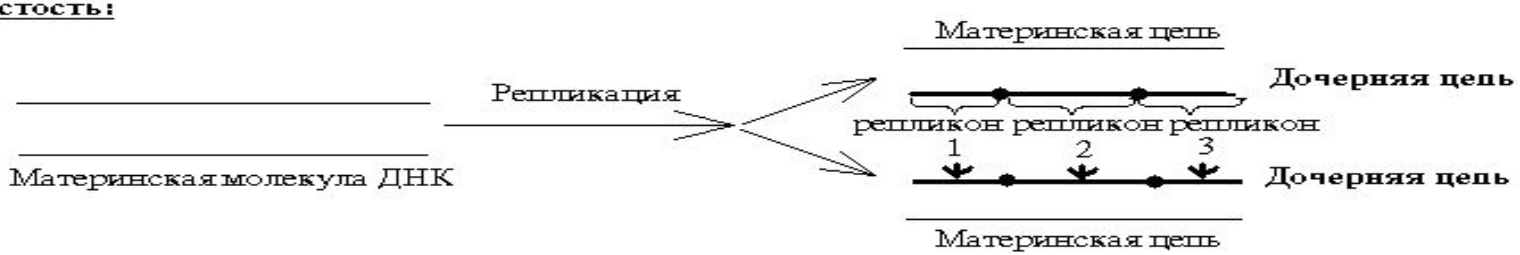
Б. Комплементарность:



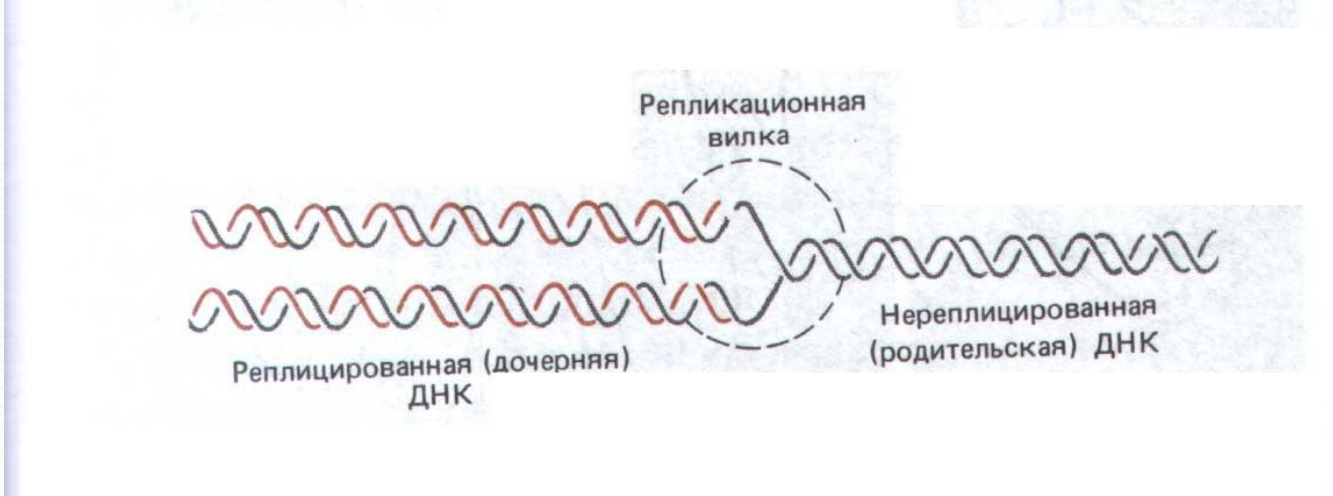
В. Антипараллельность и униполярность:



Г. Прерывистость:

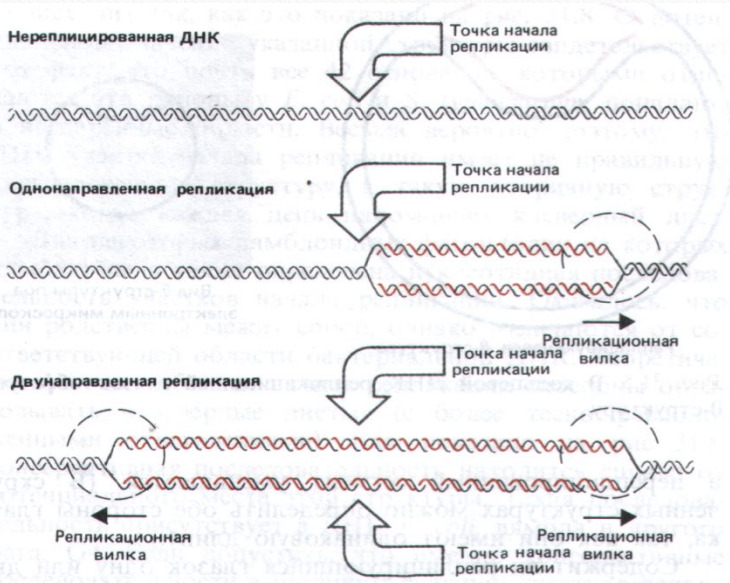


Участок ДНК в пределах которого репликация начинается и заканчивается называется *репликоном.*
В репликоне различают точку начала (origin), где инициируется репликация и точку окончания (terminus), где репликация останавливается.
В эукариотической хромосоме - большое число репликонов.
В бактериальной хромосоме - один репликон.
За один клеточный цикл все репликоны эукариотической хромосомы должны быть активированы, однако они не становятся активными одновременно. Это происходит на протяжении определенного периода. В то же время каждый из этих репликонов в течение клеточного цикла должен быть активирован *только один раз.*



Точка, в которой происходит репликация называется *репликационной вилкой* (иногда наз. точкой роста). Репликационная вилка движется последовательно вдоль ДНК от ее стартовой точки.

Репликация может идти либо в одном направлении, либо в двух направлениях.

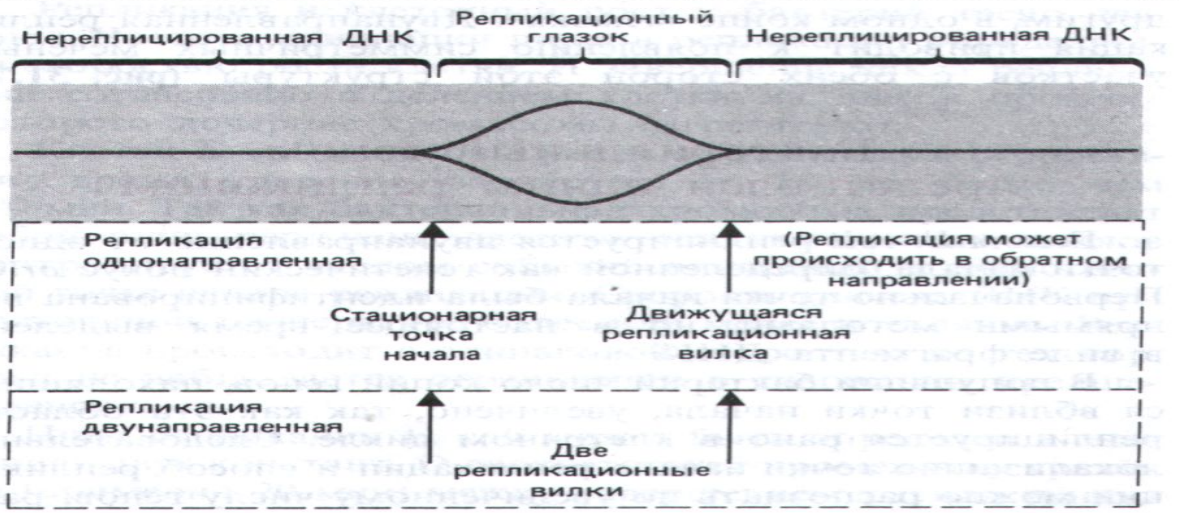


Это зависит от количества репликационных вилок, которые отходят от точки начала репликации .

При однонаправленной репликации вдоль ДНК движется одна репликационная _вилка.

При двунаправленной репликации от точки начала в противоположных направлениях расходятся 2 репликационные вилки.

Область, которая уже реплицирована, имеет вид «глазка» внутри нереплицировавшейся ДНК. Этот глазок выглядит одинаково при однонаправленной и двунаправленной репликации.



При однонаправленной репликации глазок имеет фиксированную точку начала и движущуюся репликационную вилку.
При двунаправленной репликации он представлен двумя репликационными вилками. В любом случае продолжающаяся репликация расширяет глазок до тех пор, пока он не включит в себя весь репликон.

У прокариот один репликационный глазок, у эукариот количество репликационных глазков большое (сотни тысяч) и зависит от размеров молекулы ДНК.

Этапы репликации:

1.Инициация идет с участием белков и ферментов, которые должны обеспечить:

1)Раскручивание ДНК

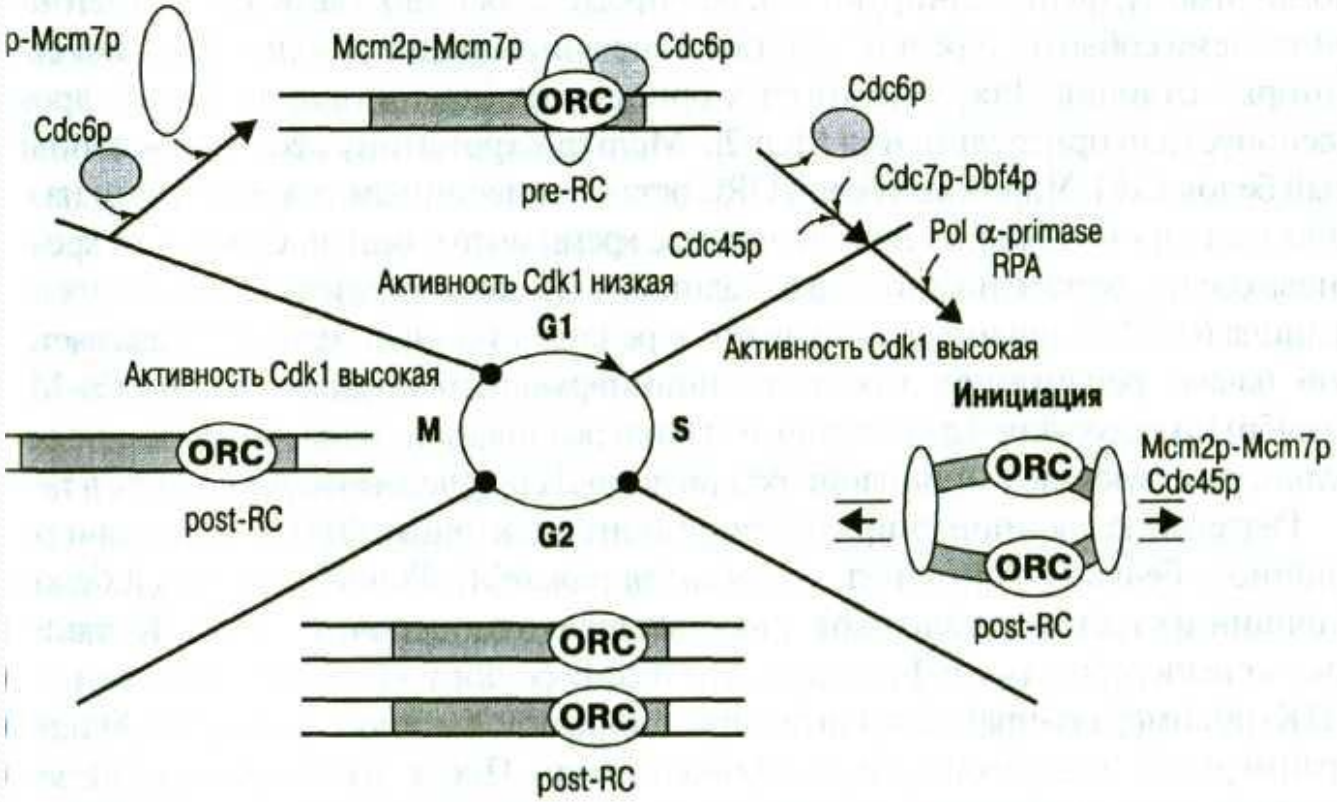
2)Связь инициирующих белков с точками начала репликации

3)Координацию репликации и клеточного цикла

При этом цепи ДНК разделяются и начинает работать геликаза – основной расплетающий белок. Также принимают участие белки SSB, топоизомеразы. Фермент праймаза синтезирует РНК праймеры на лидирующей и отстающей цепях.

Точки начала репликации богаты парами А-Т.
Геликаза (от helix - спираль) расплетает двойную цепь родительской ДНК на одноцепочечные участки в районе репликационной вилки. Расплетение спирали приводит к суперспирализации, возникает структурное напряжение, которое мешает дальнейшему расплетению спирали (молекула ДНК зафиксирована на ядерном матриксе и поэтому она не может свободно вращаться при расплетении и возникает супернапряжение).
Топоизомераза снимает суперспирализацию.
Топоизомеразы делятся на 2 класса в соответствии с природой механизмов, которые они используют.
Топоизомераза I временно надрезает одну из цепей ДНК
Топоизомераза II временно надрезает обе цепи ДНК.
SSB-белки (от англ. Single Strand Binding Proteins) стабилизируют одноцепочечные участки ДНК.

Инициация репликации и клеточный цикл у дрожжей.



Инициация репликации у эукариот.

Белки инициации и происходящие процессы сходны с прокариотами.

Отличия:

1.Участие дополнительного белка Cdt1 для присоединения Mcm2p-Mcm7p к хроматину.

2.Белки ORC у позвоночных во время митоза отделяются от хроматина и соединяются с ним в стадии G1.

3.Разделение двойной спирали идет с помощью ДНК-геликазы и репликационного белка RPA. RPA выполняет ту же функцию, что и SSB белки у кишечной палочки.

Т.о., инициация репликации завершается формированием репликационной вилки и синтеза РНК праймера.

2. Элонгация.

Идет при помощи ферментов ДНК-полимераз. Все полимеразы обеспечивают синтез новых цепей ДНК, новая цепь растет в направлении от 5’ конца к 3’ концу. Присоединение нуклеотидов возможно только в присутствии одноцепочечной матрицы и короткого двухцепочечного участка со свободным 3’ концом - праймера. Первый нуклеотид присоединяется к 3’ концу праймера, затем ДНК-полимераза присоединяет нуклеотиды один за другим.

Так как ДНК-полимеразы могут строить цепь только в одном направлении от 5’ к 3’ концу, то на одной цепи синтез будет идти непрерывно. Эту цепь называют лидирующей. Направление движения лидирующей цепи совпадает с направлением движения репликационной вилки и для ее элонгации необходим только один акт инициации.

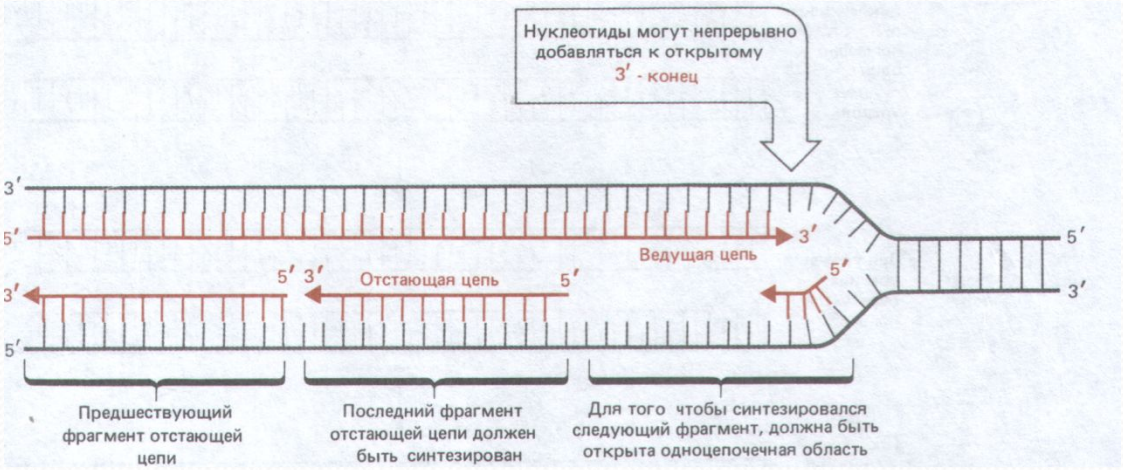
Синтез другой цепи идет короткими фрагментами – фрагментами Оказаки. Эта цепь называется запаздывающей.

Длина ФО у прокариот 1000-2000 п.н.

Длина ФО у эукариот 100-200п.н.

Направление роста запаздывающей цепи противоположно направлению движения репликативной вилки, для ее элонгации необходимо много актов инициации.

Ферменты ДНК-лигазы сшивают ФО после удаления РНК праймеров.



ДНК-полимеразы. У прокариот известно 3 вида ДНК-полимераз:

1) ДНК-П I
2) ДНК-П II
3) ДНК-П III

У кишечной палочки в репликации участвуют ДНК-полимераза I и ДНК-полимераза III. Главным является ДНК-П III с тремя субъединицами:

1) α(альфа) – имеет полимеразную активность
2) ε(эпсилон) – имеет 3’ □ 5’ экзонуклеазную активность
3) θ(тэта) – функция не ясна

ДНК-полимераза I – участвует в синтезе отстающей цепи, состоит из одной полипептидной цепи и имеет 3 ферментативные активности:

1)5’ □ 3’экзонуклеазная активность: удаляет РНК праймер.
2)Полимеразная активность: наращивает цепь ДНК предыдущего фрагмента.
3)3’ □ 5’ экзонуклеазная активность: контролирует правильность присоединения нуклеотилов и удаляет ошибочно вставленные нуклеотиды с растущего конца цепи.

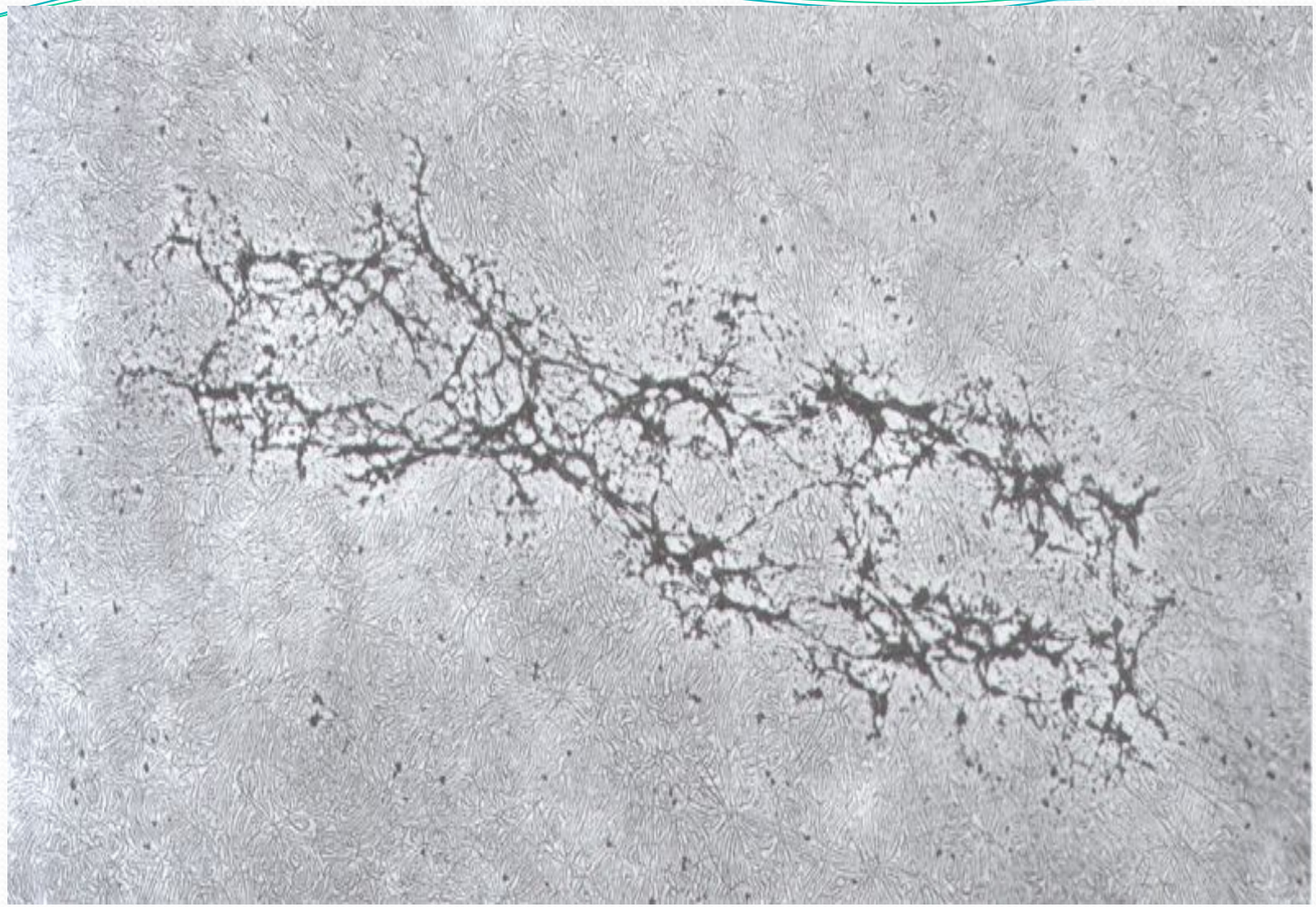
ДНК-П I открыта в 1960 году А. Корнбергом и поэтому её называют ферментом Корнберга.
ДНК-П II очень похожа на ДНК-П I и участвует в репарации ДНК

У эукариот известно 5 видов ДНК-полимераз:

1) α – в репликации ядерной ДНК. Это цитоплазматическая полимераза или большая.
2) β – в репарации ДНК. Это нуклеазная полимераза или малая.
3) δ (дельта) – в репликации ядерной ДНК, найдена в клетках млекопитающих..
4) ε – в репарации ДНК, сходна с δ.
5) γ – в репликации митохондриальной ДНК, митохондриальная полимераза.

3. Терминация репликации.

У кишечной палочки есть ter-сайты, где происходит терминация репликации.
У эукариот терминация репликации происходит при встрече двух репликационных вилок.



В 80-х годах 20 века было установлено, что на концах хромосом есть особые структуры – теломеры, которые не несут генетической информации, предотвращают объединение концов и защищают материал хромосомы от потерь при репликации. Теломеры у многих организмов имеют сходное строение и состоят из многократно повторяющихся фрагментов, у человека это: TTAGGG.

Во время деления теломеры теряют от 5 до 20 фрагментов и с каждым делением становятся короче, что в конечном итоге привело бы к гибели клетки. Было обнаружено, что существует некий лимит на число делений. Американский ученый Хейфлик Л. в 1965 году установил, что у человека клетки новорожденных делятся 80-90 раз, а клетки 70-летних делятся только 20-30 раз. Ограничение на число клеточных делений называется барьером Хейфлика. Оловников связывает длину теломерной ДНК со сроком жизни клетки.

Проблема концевой недорепликации.

Репликация на отстающей цепи ДНК начинается с синтеза коротких РНК-праймеров или затравок, с 3’ концов которых синтезируются короткие фрагменты Оказаки.

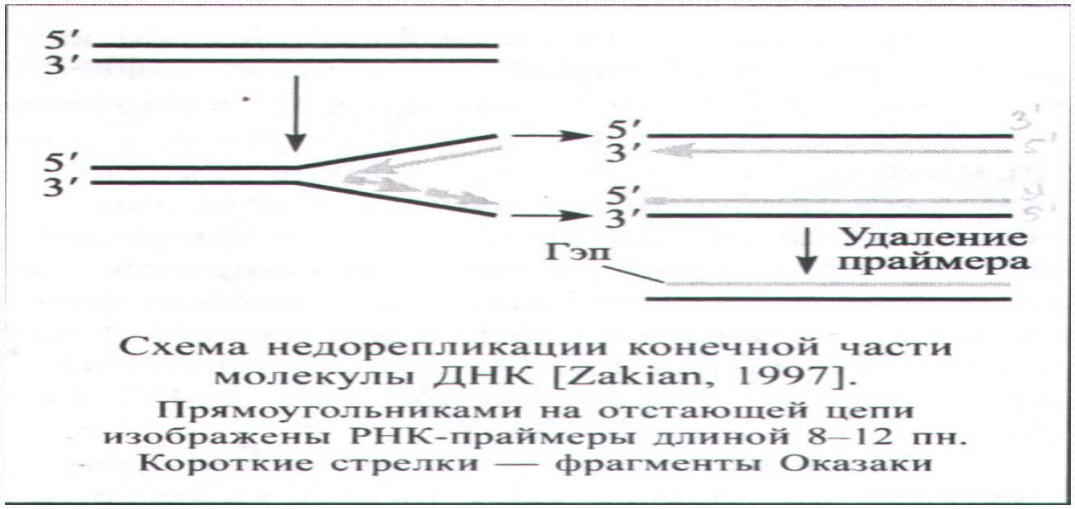


Схема недорепликации конечной части молекулы ДНК [Zakian, 1997].
Прямоугольниками на отстающей цепи изображены РНК-праймеры длиной 8–12 пн. Короткие стрелки — фрагменты Оказаки

Затем РНК-затравки удаляются, а образовавшиеся пустоты (бреши, гэпы) заполняются фрагментами ДНК. Причем при синтезе фрагментов ДНК используются в качестве праймеров 3’ концы фрагментов Оказаки. Так как для синтеза крайнего фрагмента нет праймера, то вновь синтезированная цепь на

8-12 нуклеотидов короче исходной. Таким образом, если в клетке нет механизмов, которые могли бы компенсировать потерю нуклеотидов, хромосома станет укорачиваться и в конечном итоге это приведет к гибели клетки..

Т.о., к началу 90-х годов XX века молекулярная структура теломеры была открыта, а проблема неполной репликации на конце линейной молекулы ДНК осталась нерешенной. В 1985г. Ученые Грейдер и Блакберн установили существование в природе фермента теломеразы, который обеспечивает удлинение конца хромосомы или теломерного концевого повтора. Теломераза – это рибонуклеопротеид, содержит короткую молекулу РНК (150 нуклеотидов с двумя копиями теломерного повтора 5` – CAACCC – 3`).

Перед репликацией ДНК теломераза добавляет несколько копий теломерных повторов на 3` конец ДНК.

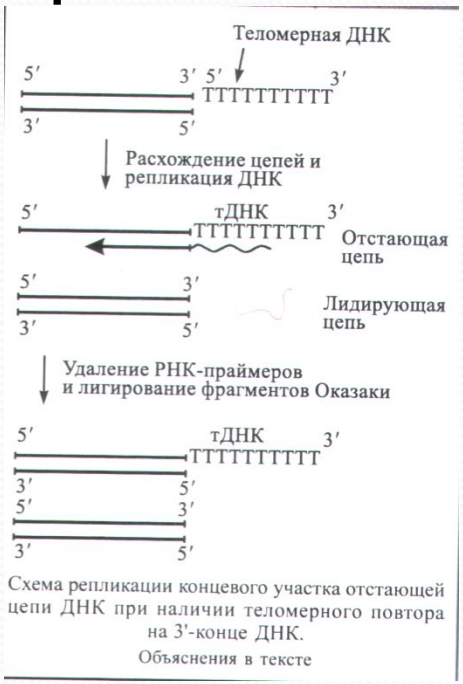


Схема репликации концевого участка отстающей цепи ДНК при наличии теломерного повтора на 3'-конце ДНК.

Объяснения в тексте

Теломераза удлиняет не новую, укороченную цепь, а старую – более длинную. Далее репликация идет по стандартной модели. На отстающей цепи синтезируются РНК-затравки и важно, чтобы концевая затравка синтезировалась на теломерном повторе.

По окончании репликации остается незаполненным только участок РНК-затравки, синтезированный на теломерной последовательности. В итоге дочерние цепи ДНК имеют такую же длину, как и родительские.

Альтернативный механизм удлинения теломер (ALT – Alternative Lengtheiming of Telomeres) без участия теломеразы (встречается у дрозофилы, в линиях некоторых опухолевых клеток). Один из ALT – рекомбинация между теломерными участками разных хромосом: при этом две молекулы ДНК взаимодействуют своими теломерными концами и образуют гибридные теломеры, где цепь от одной ДНК намного длиннее, чем цепь от другой ДНК. Затем более длинная цепь служит матрицей, по которой ДНК-полимераза достраивает короткую цепь.

Однако теломераза должна постоянно удлинять теломерные повторы, чтобы недорепликация не затронула гены. Нарушения в механизме удлинения теломерного повтора приводят к злокачественным новообразованиям и старению.

Транскрипция

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

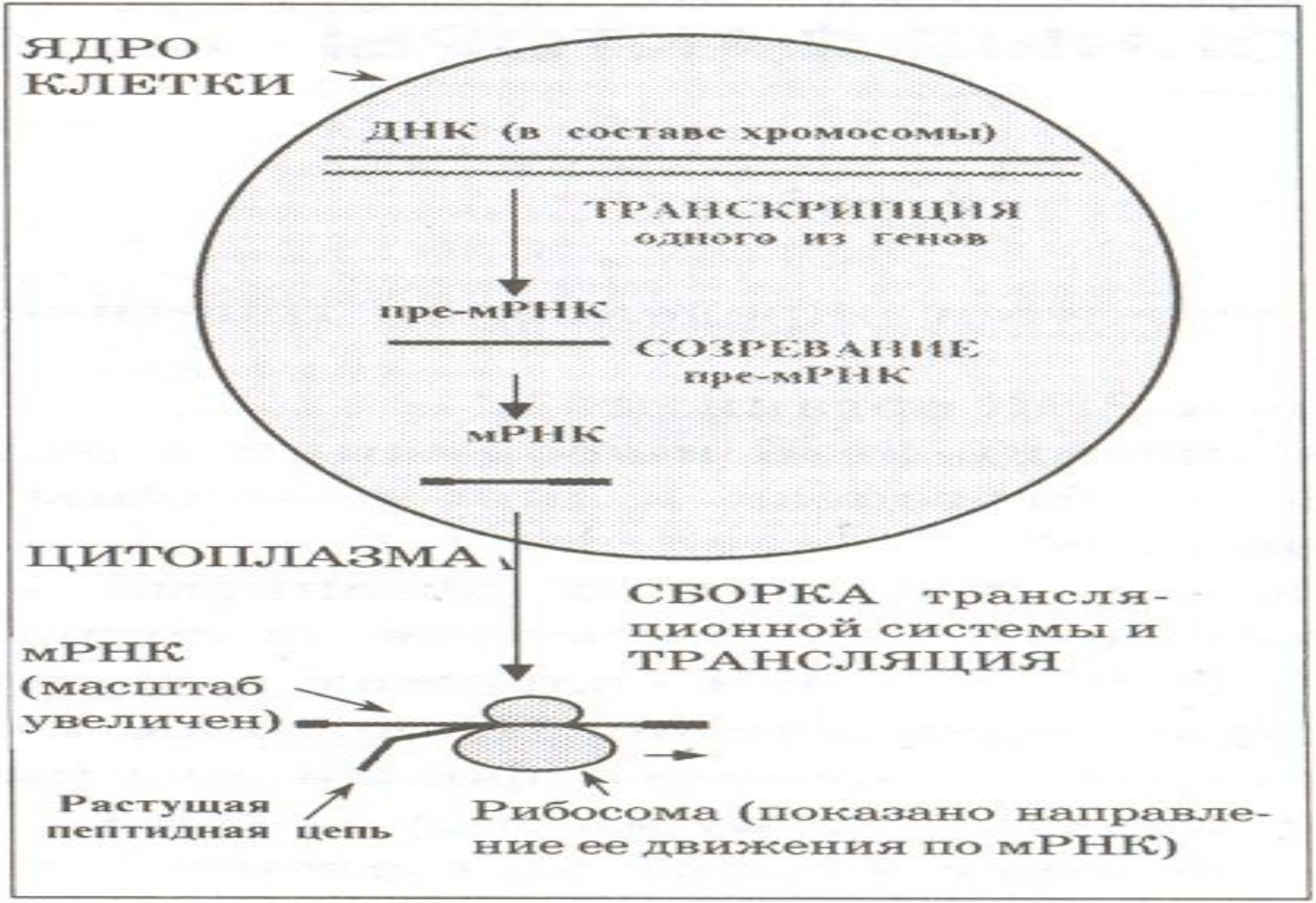


Рис.1 Основные этапы экспрессии гена.

- Транскрипция ДНК происходит отдельными участками, в которые входит один или несколько генов. (см.например, оперон). Каждый ген состоит из **регуляторной** части, с которой начинается транскрипция, **кодирующей** части, где записана информация о структуре белка, и **терминирующей** части, где завершается транскрипция.

Транскриптон

- Транскрипции подвергается не вся молекула ДНК, а только ее определенный участок – транскриптон. Начало транскриптона – промотор, конец-терминатор. Транскриптон бактерий называется опероном.

- **Транскрипция осуществляется специальным ферментом РНК–П.**
- **РНК- П узнает начало транскрибируемого участка (промотор), присоединяется к нему, расплетает двойную спираль ДНК и копирует, начиная с этого места, одну из ее цепей.**
- **Когда РНК - П достигает конца копируемого участка (терминатора), РНК отделяется от матрицы.**

Строение и функции РНК-П

- РНК- П обнаружена во всех про- и эукариотических организмах. Наиболее изучен фермент РНК – П, выделенный из кишечной палочки (E. coli).
- Он представляет собой сложный белковый комплекс и состоит из пяти белковых субъединиц: двух α, β, β’ и δ фактора.

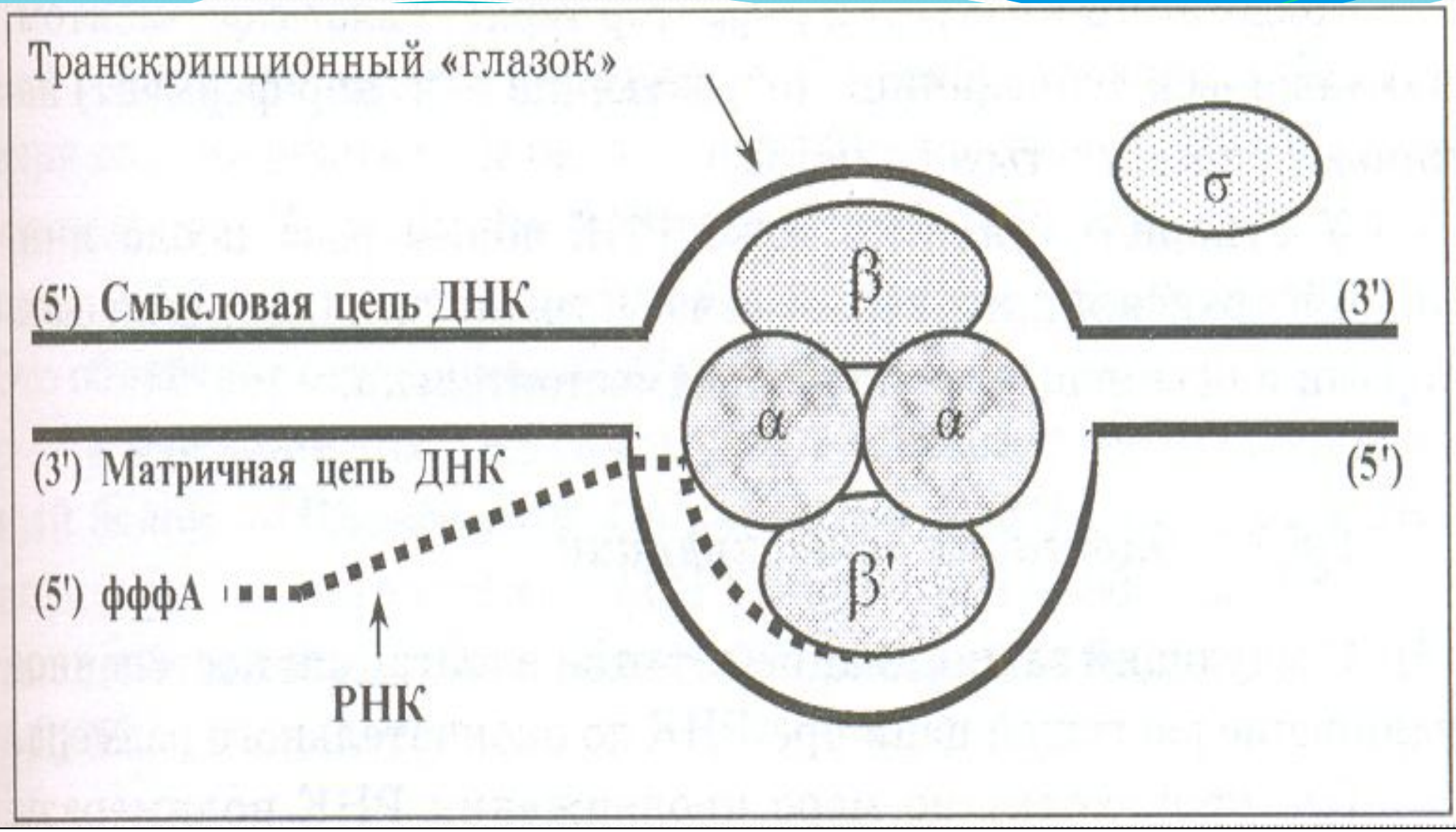


Рис.2 Транскрипция ДНК бактериальной РНК -полимеразой

- **Сигма** – субъединица необходима для распознавания РНК-П специфического участка - промотора на ДНК, с которого начинается транскрипция, т.е. для инициации транскрипции.
- Комплекс субъединиц α2, β, β’ , получивший название core-фермента (от англ. Core-сердцевина) или минимального фермента предназначен для элонгации этого процесса.

- Взаимодействие core-фермента с δ-субъединицей приводит к формированию холоэнзима РНК-П.
- Сигма –фактор после начала синтеза РНК, сразу же освобождается из комплекса холоэнзим РНК, и может повторно использоваться для образования холоэнзима , обладающего всеми ее свойствами.

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

- Характерные особенности фермента РНК-П:

1). способность с помощью δ-субъединицы выбирать цепь ДНК, с которой будет производиться транскрипция и точку ее начала.

2). отсутствие потребности в затравке, что резко отличает ее от всех ДНК-П.

3). отсутствие механизма самокоррекции. Вследствие этого точность ее работы ниже чем у ДНК-П.

- **В клетках эукариот существуют три различные РНК-П (I,II,III), каждая из которых представлена самостоятельными полипептидами. Эукариотические РНК-П имеют более сложное строение,число субъединиц в них может достигать 10-15.**

Функции РНК-полимераз у эукариот:

РНК –полимераза I сосредоточена в основном в ядрышке и транскрибирует гены предшественников рРНК: 18 S, 28 S, 5,8 S РНК являющиеся структурными компонентами рибосом.

РНК –полимераза II находится в нуклеоплазме и синтезирует пре –мРНК- информационные или матричные РНК, выполняющие роль матриц при синтезе белка рибосомами и некоторые мяРНК.

РНК –П III содержится в нуклеоплазме и транскрибирует в основном гены пре - тРНК т. е. транспортные РНК.

Этапы транскрипции

- **Инициация**-это первый этап транскрипции, где у прокариот РНК-П с участием δ-фактора узнает промотор и присоединяется к нему.
- Промотор у прокариот длиной около 80 пар нуклеотидов содержит две характерные шестинуклеотидные последовательности, необходимые для связывания РНК – полимеразы .

- **Элонгация** транскрипции.

  РНК-полимераза перемещается вдоль структурных генов оперона, соответственно перемещается и «транскрипционный глазок», синтезируется молекула РНК комплементарная матричной цепи ДНК.

- Нити ДНК перед транскрипционным комплексом (ДНК – РНК полимераза- РНК) разделяются, а позади него вновь соединяются, вытесняя 5-конец синтезированной РНК
- Средняя скорость транскрипции в клетках у бактерий составляет 30-50 нуклеотидов в секунду на 1 молекулу РНК – полимеразы.

- **Терминация - завершающий этап транскрипции. Сигналом терминации служат специальные ГЦ богатые участки в конце генов.**

- **Сила взаимодействия пар ГЦ довольно велика, локальная денатурация таких участков в ДНК происходит трудней. Это замедляет продвижение РНК – полимеразы и служит для нее сигналом к прекращению транскрипции.**

- **У бактерий, специальный белок RhO-фактор также обладает расплетающей активностью и облегчает расхождение цепей РНК и ДНК.**

- **Каждая завершенная цепь РНК отделяется от ДНК матрицы в виде свободной одноцепочечной молекулы, в которой число нуклеотидов колеблется от 70 до 10000.**

- **Обычно на каждом транскрибируемом гене работают , двигаясь друг за другом несколько молекул РНК – полимераз конвеерным способом.**

- **Расстояние между ними в среднем 300-500 н.п. Соответственно одним геном одновременно связано несколько растущих цепей пре-РНК.**

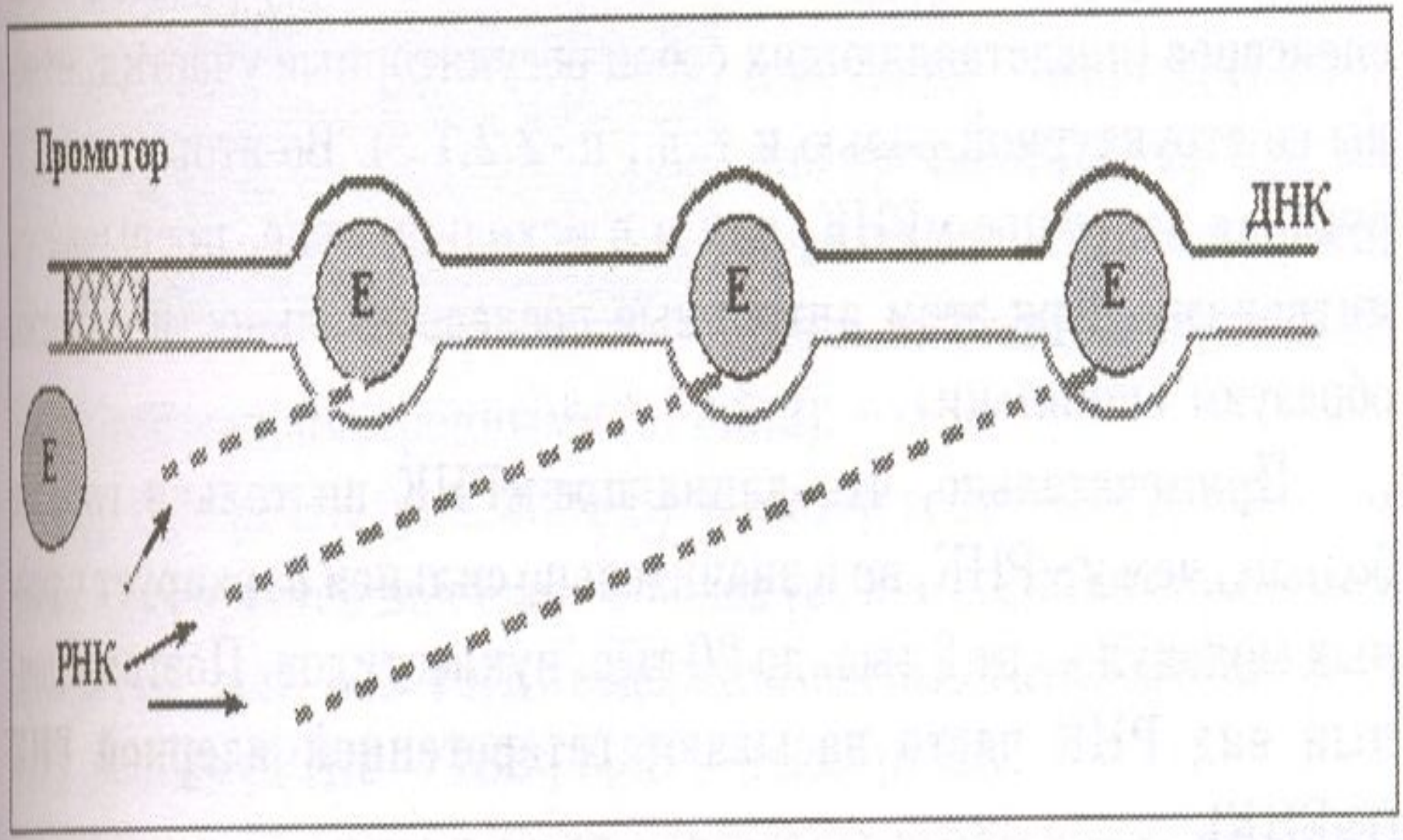


Рис.7 Транскрипция ДНК одновременно несколькими молекулами РНК-полимеразы

Особенности транскрипции у эукариот:

- Хромосомы эукариот имеют нуклеосомное строение, поэтому необходимы приспособления для освобождения ДНК от гистонов в месте ее транскрипции. (Попенко и др.1981г.)
- В геноме у эукариот отсутствуют операторы (Комарев ,1982г.). В регуляции транскрипции участвуют общие транскрипционные факторы.

- .
- К настоящему времени выделены шесть общих транскрипционных факторов: TFIIA, TFIIB, TFIIД, TFIIE, TFIIF, TFIIH.

- .
- Для активации транскрипции необходимо участие также специфических факторов транскрипции – **энхансеров**.
- Энхансеры располагаются достаточно далеко от регулируемого гена, на расстоянии нескольких тысяч нуклеотидных пар.

- ДНК образует петли благодаря чему энхансеры сближаются с промоторной зоной и влияют на активность транскрипционного комплекса.
- Причем, для некоторых ключевых генов в клетке имеется несколько энхансеров.
- Все они в результате изгибов ДНК собираются в одном месте пространства.

- Параллельно энхансерам, усиливающим транскрипцию, в геноме существуют специфические последовательности- **сайленсеры**.
- Сайленсеры также связываются с комплексом специфических и неспецифических транскрипционных факторов и геном,но снижая транскрипционные возможности.

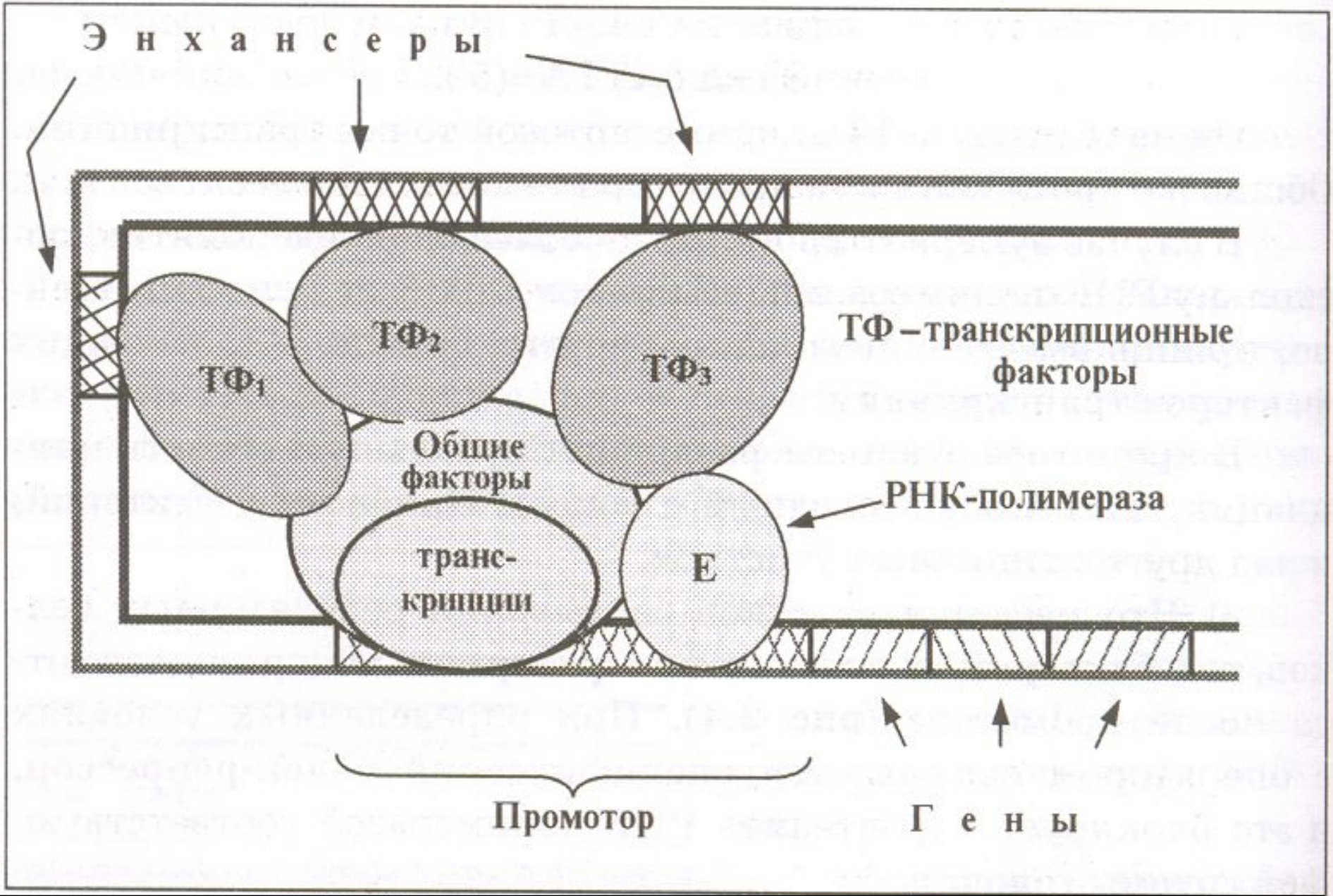

Энхансеры
ТФ1
ТФ2
ТФ3
ТФ – транскрипционные факторы
Общие факторы
транс-крипции
РНК-полимераза
Е
Промотор
Гены

Рис.11

Продукты транскрипции.

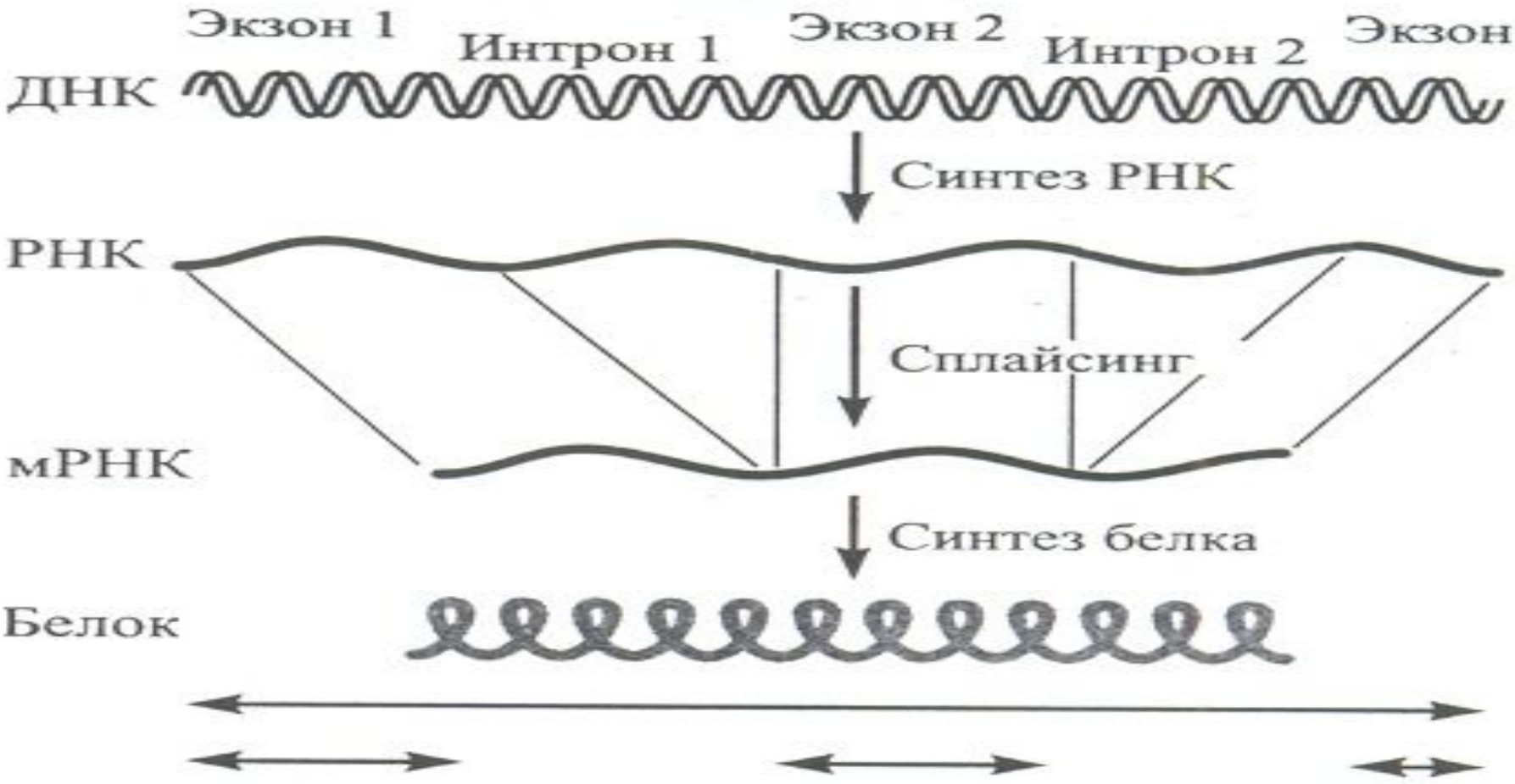
- В результате транскрипции у эукариот образуются предшественники тех или иных РНК: м РНК,рРНК,и тРНК.
- Пре – м РНК имеют такую же длину,что и транскрибируемый участок ДНК В них включены спейсеры, кодирующие участки - экзоны, а также интроны, которые подобно межгенным спейсерам не содержат генетической информации.
- Интронные последовательности нередко образуют «шпильки».

- Длина таких пре м- РНК у разных молекул варьирует от 2 тыс. до 20 тысяч нуклеотидов.
- Данный вид РНК называют гетерогенной ядерной РНК (гя РНК).
- Кроме того в пре м – РНК отсутствует на 5’ – конце колпачок (КЭП), а на 3’ – конце – поли (А) – фрагмент.
- Пре – мРНК эукариот несут информацию о синтезе лишь одной полипептидной цепи, т.е. дают при созревании только одну молекулу мРНК.

Процессинг (созревание) мРНК

- Процессинг включает следующие преобразования:
- кэпирование
- полиаденилирование
- сплайсинг

Рис.13



Индивидуальные кодирующие районы разделены в гене

Процесс передачи информации от ДНК к белку, кодируемому расщепленным геном [Lewin, 1994. P. 150]

- Эукариотические мРНК стабильны в течение часов и суток.Это объясняется,во-первых, стабилизацией 5’- и 3’- концов, а во-вторых, связыванием мРНК с белками и образованием информосом, выполняющими защитную и транспортную функции.
- В результате удаления «лишних» нуклеотидов, цепь мРНК укорачивается примерно на 87 % и остается лишь 13% от исходной длины. Это зрелая мРНК.

Альтернативный сплайсинг -

- это соединение экзонов одного гена в разных комбинациях с образованием различных зрелых мРНК.
- При альтернативном сплайсинге с одного гена считывается более одного типа зрелых молекул мРНК, отличающихся набором экзонов и выполняющих сходные или различные функции.

Механизмы альтернативного сплайсинга

- 1.Использование разл. промоторов.
- При этом образуются транскрипты с разным количеством экзонов, имеющие разные по длине 5’ концы.
- 2.Изменение сайта полиаденилирования первичного транскрипта. При этом изменяются размеры и структура 3’ конца пре-м РНК.

- 3.Выбор различных экзонов из одинаковых пре-мРНК. При этом для формирования зрелых РНК могут использоваться различные экзоны, а часть из них не включается в сплайсинг. Выбор экзона зависит от стадии развития организма.

Понятие о генетическом коде

- Систему расположения нуклеотидов в ДНК, определяющую последовательность расположения аминокислот в белке называют **генетическим кодом.**
- Две цепи ДНК в гене различаются по функциональной роли: одна из них является **кодирующей**(обычно верхняя 5'-концом слева), а вторая- **матричной**(3'-концом слева).
- Считывание гена происходит с матричной цепи ДНК, следовательно при транскрипции воспроизводится в структуре РНК генетическая информация кодирующей цепи ДНК.

- **Свойства генетического кода:**

1. Триплетность. Единицей информации в кодирующей цепи ДНК является триплет-последовательность из трех нуклеотидов. Один триплет (кодон) кодирует одну аминокислоту
2. Вырожденность. Число кодонов(61) преобладает над числом аминокислот(20). Все аминокислоты кроме метионина и триптофана кодируются от 2 до 6 триплетами.

3. Однозначность. Каждый триплет кодирует только одну определенную аминокислоту.

4. Непрерывность. Код внутри гена не содержит знаков препинания, и кодирующие триплеты следуют один за другим.

5. Неперекрываемость. Каждый нуклеотид входит в состав лишь одного кодона

6. Коллинеарность. Последовательность триплетов в экзонах гена соответствует последовательности аминокислот в белке.
7. Универсальность. Генетический код един для всех живущих на Земле существ.

Трансляция- это второй этап реализации генетической информации. Она заключается в синтезе полипептидов на рибосоме.

В трансляции участвуют мРНК, тРНК, рибосомы, аминокислоты.

- **Исходными материалом, из которого строится белок, являются аминокислоты. Однако свободные аминокислоты не используются рибосомой. Для того чтобы служить субстратом для рибосомы, аминокислота должна быть активирована с помощью фермента аминоацил-т-РНК-синтетазы.**

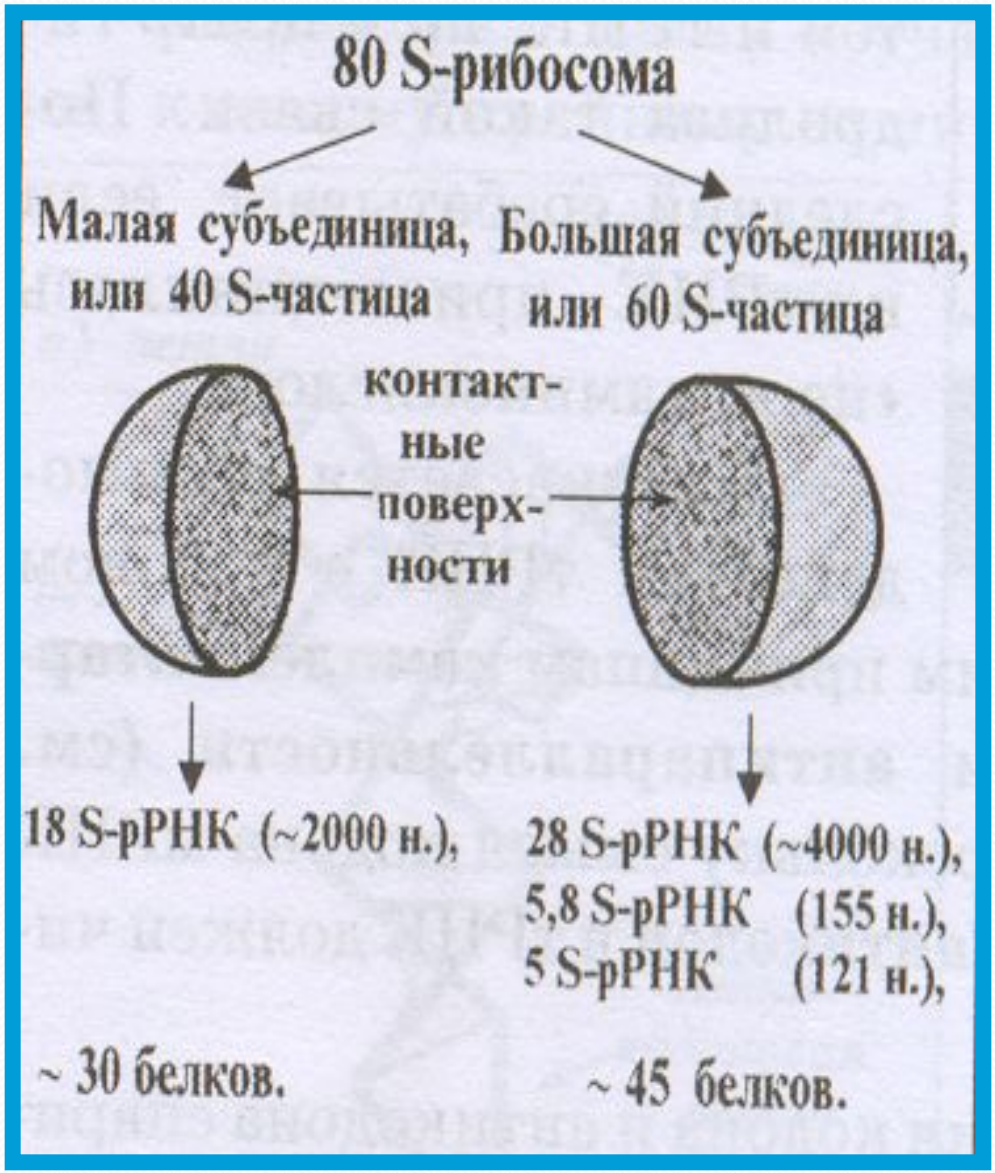
Этапы трансляции

- 1. Инициация
- 2. Элонгация
- 3. Терминация

Инициация

- К малой субъединице рибосомы присоединяются т-РНК с метионином, инициирующий кодон АУГ. Антикодон т-РНК с метионином комплементарно соединяется с кодоном АУГ м-РНК и затем присоединяется большая субъединица рибосомы.
- Рибосома имеет 2 центра: пептидильный и аминоацильный

Состав цитоплазматической рибосомы эукариот



В состав каждой рибосомы с коэффициентом седиментации 80S, входит малая 40S и большая 60S субъединицы.

Малая субъединица содержит 1 молекулу 18 S - р РНК и около 30 молекул различных белков.

Большая субъединица содержит 3 молекулы 28 S - р РНК, 5,8 S - р РНК, 5 S - р РНК и около 45 молекул различных белков.

Каждая субъединица рибосомы – это свернутый рибонуклеопротеидный тяж.

Процесс трансляции начинается со сборки активной рибосомы – инициации трансляции.
Сборка происходит строго упорядоченным образом, что обеспечивается функциональными центрами рибосом.

Функциональные центры рибосом

Собранная рибосома напоминает форму сердца (без полостей), правые отделы образованы малой субъединицей, а левые – большей субъединицей, между ними находится серия небольших полостей – углублений в контактирующих поверхностях. В этих полостях рибосомы располагаются другие участники трансляции – м РНК, пептидил-т-РНК, и очередная аминоцил-т-РНК.

Выполнение функций рибосомы связано с наличием на ней определенных функциональных центров:

а) Центр связывания м РНК (М-центр);

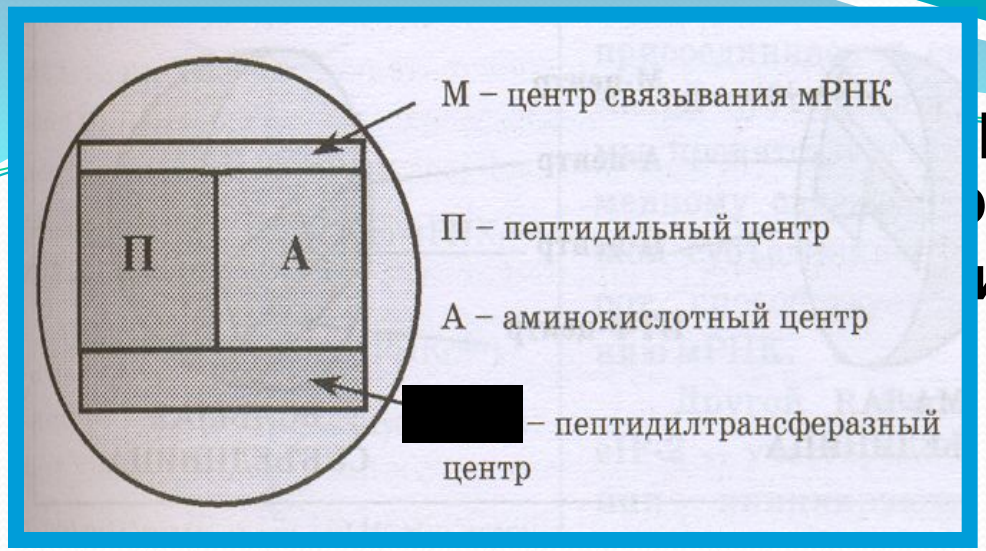
б) Пептидильный центр (П-центр);

в) Аминокислотный центр (А-центр);

г) Пептидилтрансферазный центр (ПТФ-центр).

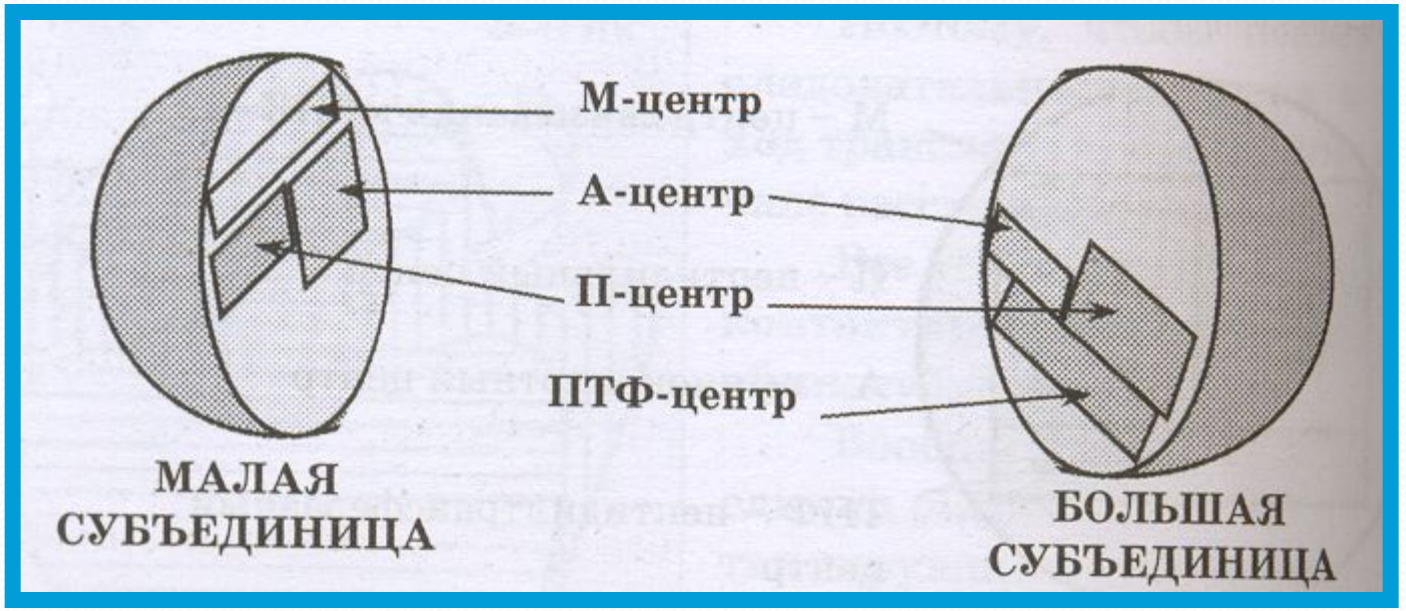
в) Аминокислотный центр (А-центр):
место связывания очередной аа-т-РНК

г) Пептидилтрансферазный центр (ПТФ-центр):
он катализирует перенос пептидила из состава пептидил-т-РНК на поступившую в А-центр очередную аа-тРНК. При этом образуется еще одна пептидная связь и пептидил удлиняется на одну аминокислоту.



роекция
ункциональных центров
ибосомы

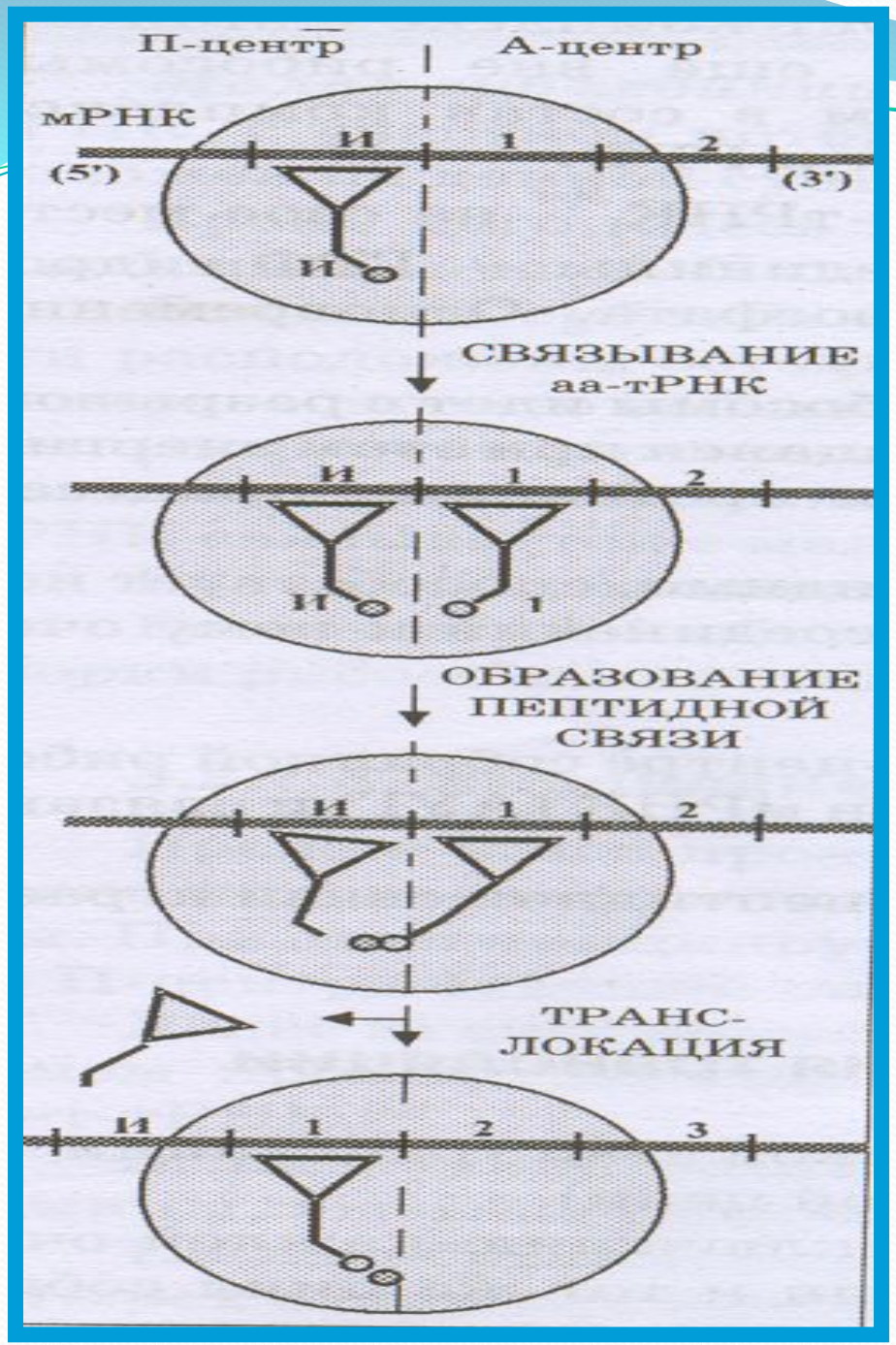
Распределение функциональных центров между субъединицами рибосомы



Элонгация

- Включает 3 процесса:
- 1.В рибосому, у которой в П-центре находится Мет-тРНК, в А-центр присоединяется первая аа-тРНК. Выбор аа-тРНК определяется строением кодона мРНК, поскольку между кодоном мРНК и антикодоном тРНК возникает комплементарное взаимодействие.

- 2.Образование пептидной связи
- 3.Транслокация (продвижение рибосомы). Рибосома перемещается на один кодон в направлении от 5 к 3 концу мРНК.



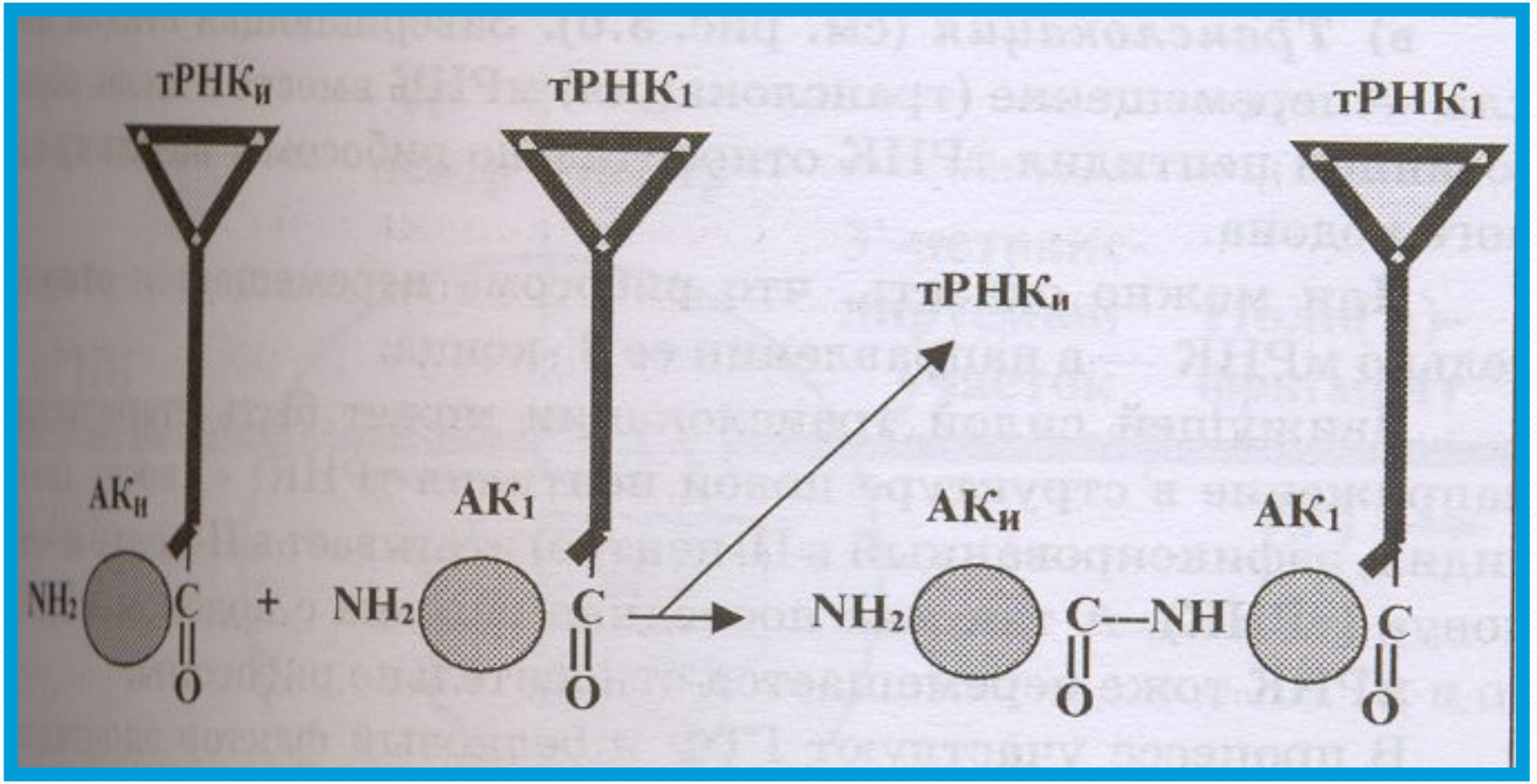
Стадии цикла элонгации:

а) Связывание аа-тРНК со свободным А-участком. Путем спаривания нуклеотидов антикодона с тремя нуклеотидами мРНК в А-участке.

б) Карбоксильный конец полипептидной цепи отделяется в П-участке от молекулы тРНК и образует пептидную связь с аминокислотой присоединенной к молекуле тРНК в А-участке.

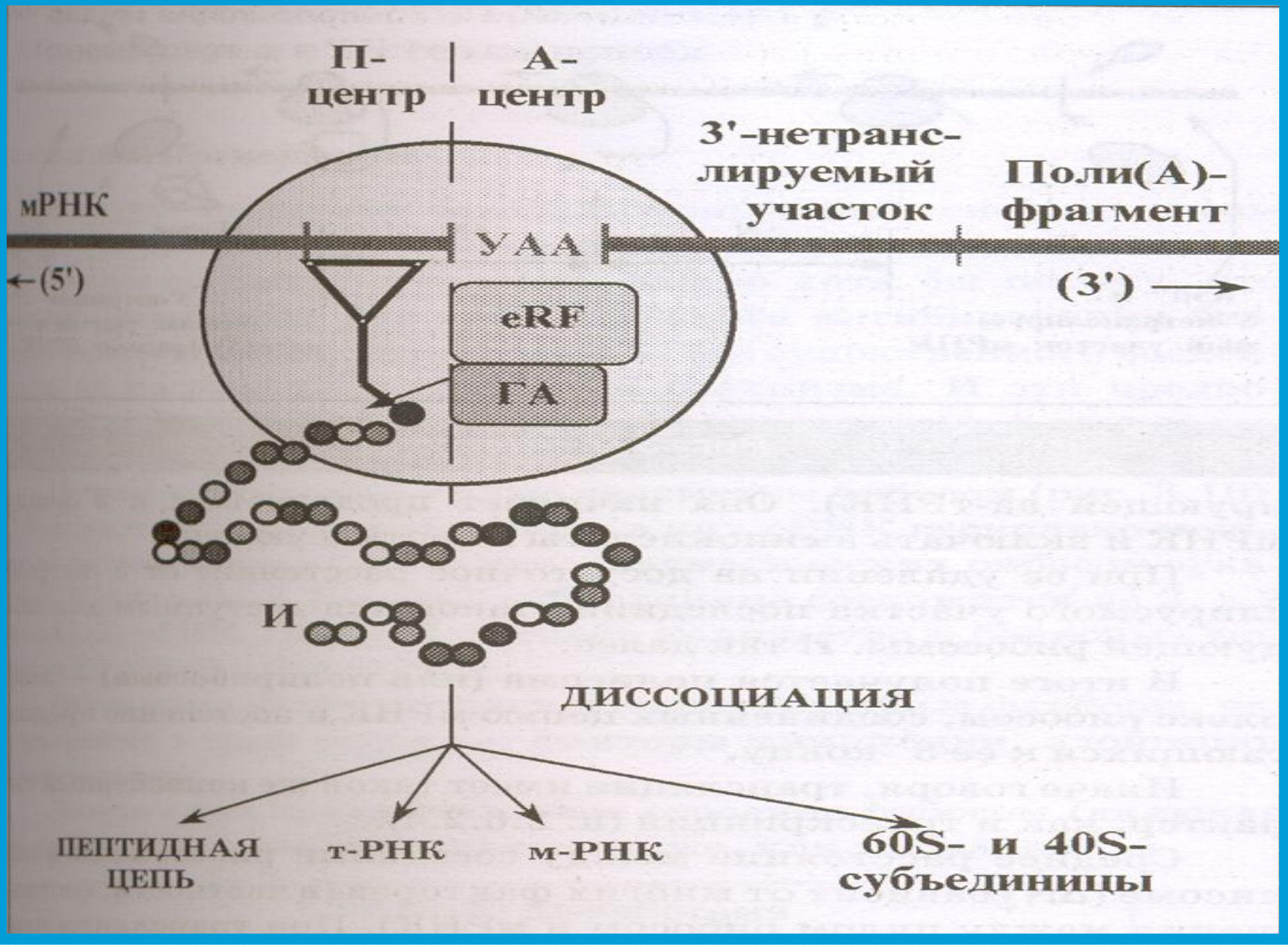
в) Транслокация.Новая пептидил-тРНК переносится в П-участок рибосомы, а рибосома продвигается вдоль молекулы мРНК ровно на 3 нуклеотида. Не занятый А-участок может принять новую молекулу тРНК, нагруженную очередной аминокислотой.

Образование пептидной связи в ходе пептидилтрансферазной реакции.



Терминация трансляции

- Сигналом об окончании трансляции служит появление в рибосоме одного из бессмысленных кодонов мРНК- УАА, УАГ или УГА.
- Этот кодон узнается белковыми факторами терминации- eRF.


П-
центр
А-
центр
3'-нетранс-
лируемый
участок
Поли(А)-
фрагмент
мРНК
←(5')
УАА
(3') ⟶
eRF
ГА
И
ДИССОЦИАЦИЯ
ПЕПТИДНАЯ
ЦЕПЬ
т-РНК
м-РНК
60S- и 40S-
субъединицы

G=A=G
U=A=C
U=A=C
G=A=G
U=A=C
G=A=G
G=A=G
G=U=C
AUG CUU CAG UAU UGC AUG CUU CAG UAU UGC AUG CUU CAG UAU UGC AUG CUU CAG UAU UGC AUG CUU CA

Особенности трансляции у прокариот:

1) Субъединицы рибосом несколько меньше по размеру чем у эукариот(30S и 50S)
2) В большой субъединице содержится не три, а две молекулы рРНК.
3) Меньшее количество белковых молекул в каждой субъединице рибосом.

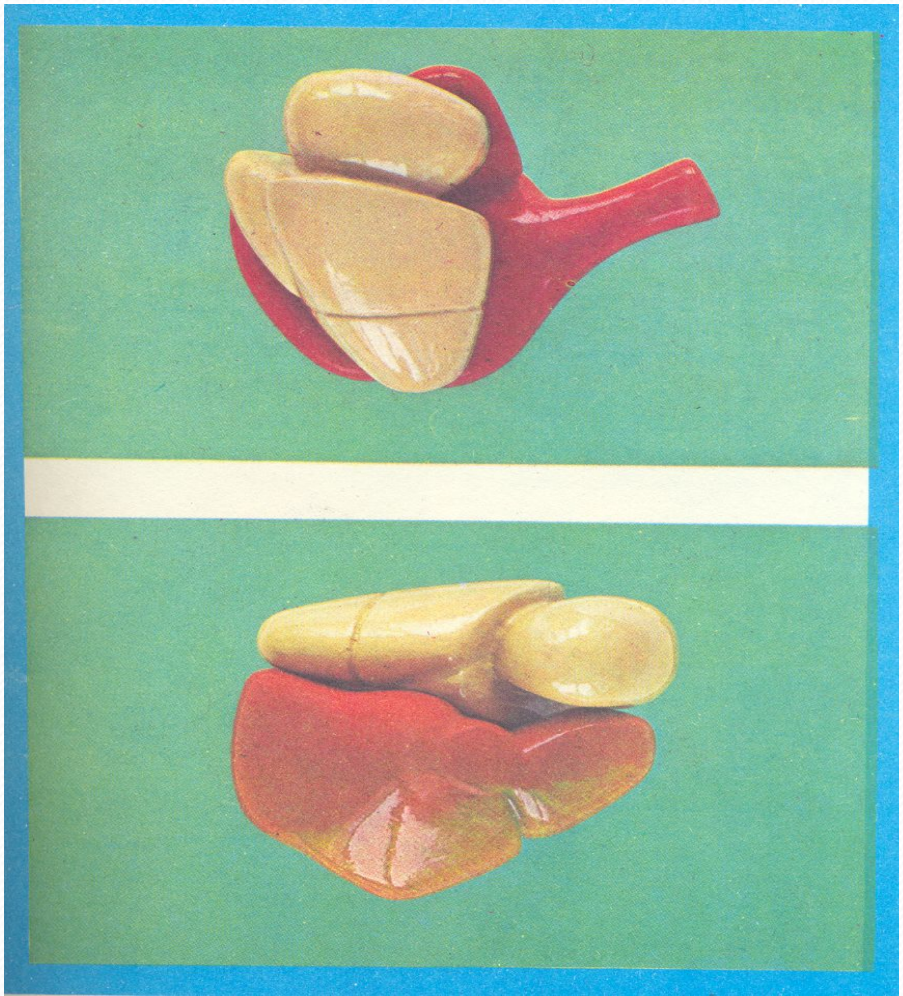
4) Сопряжение трянсляции с транскрипцией.

5) Сопряжение синтеза нескольких пептидных цепей.

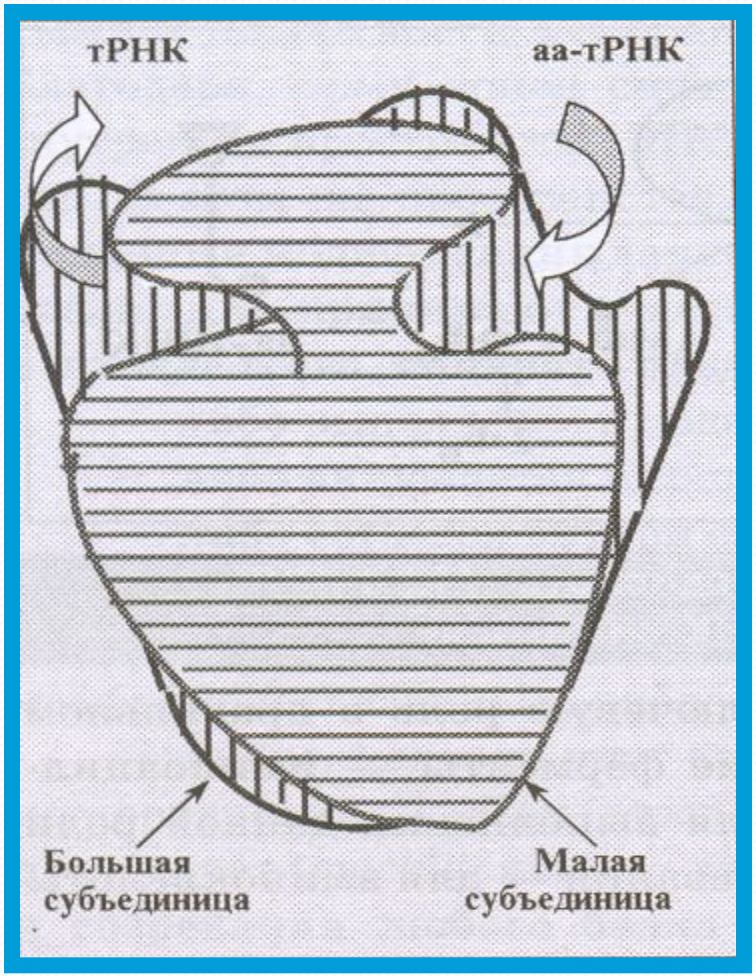
6) Инициаторная аа-тРНК в виде формилМЕТ-тРНК.

Модели рибосом:

Форма рибосомы прокариот 70 S

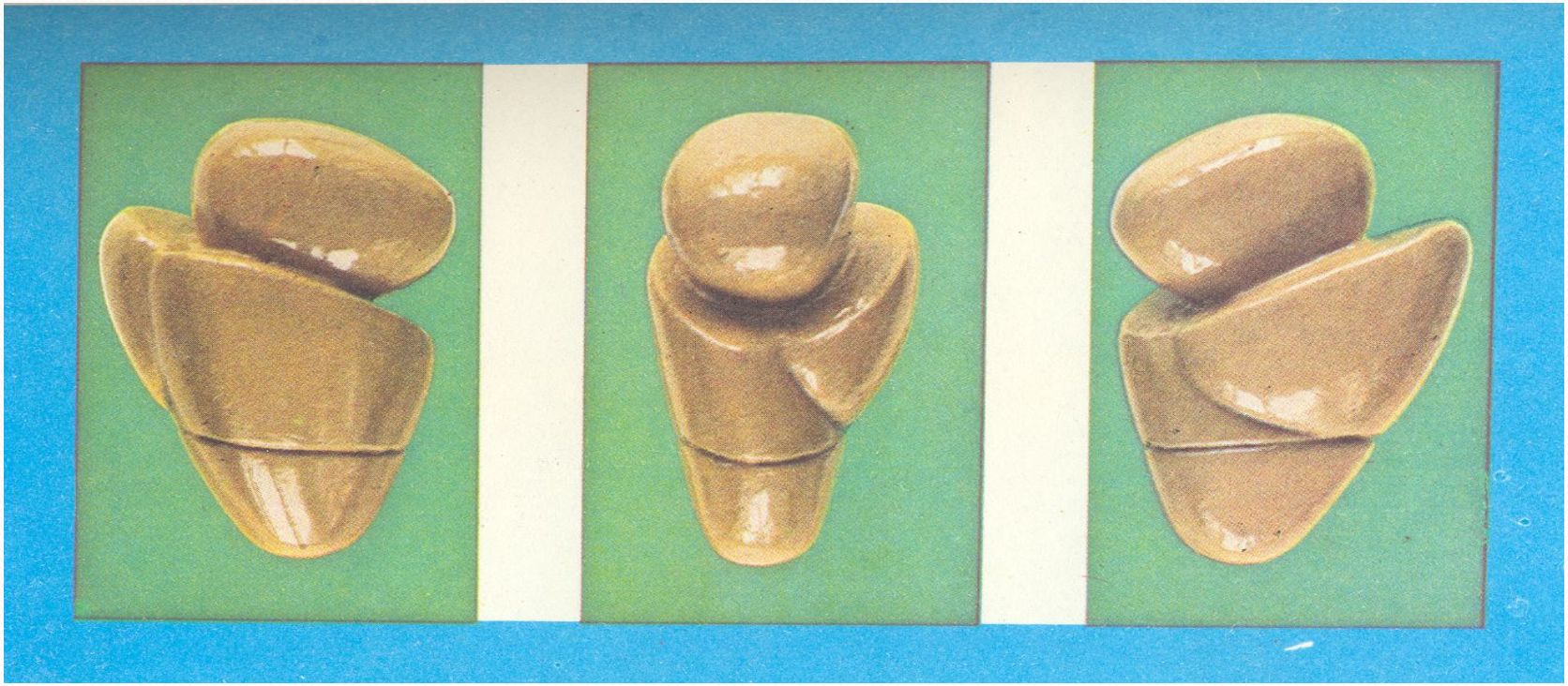


Форма рибосомы эукариот 80 S

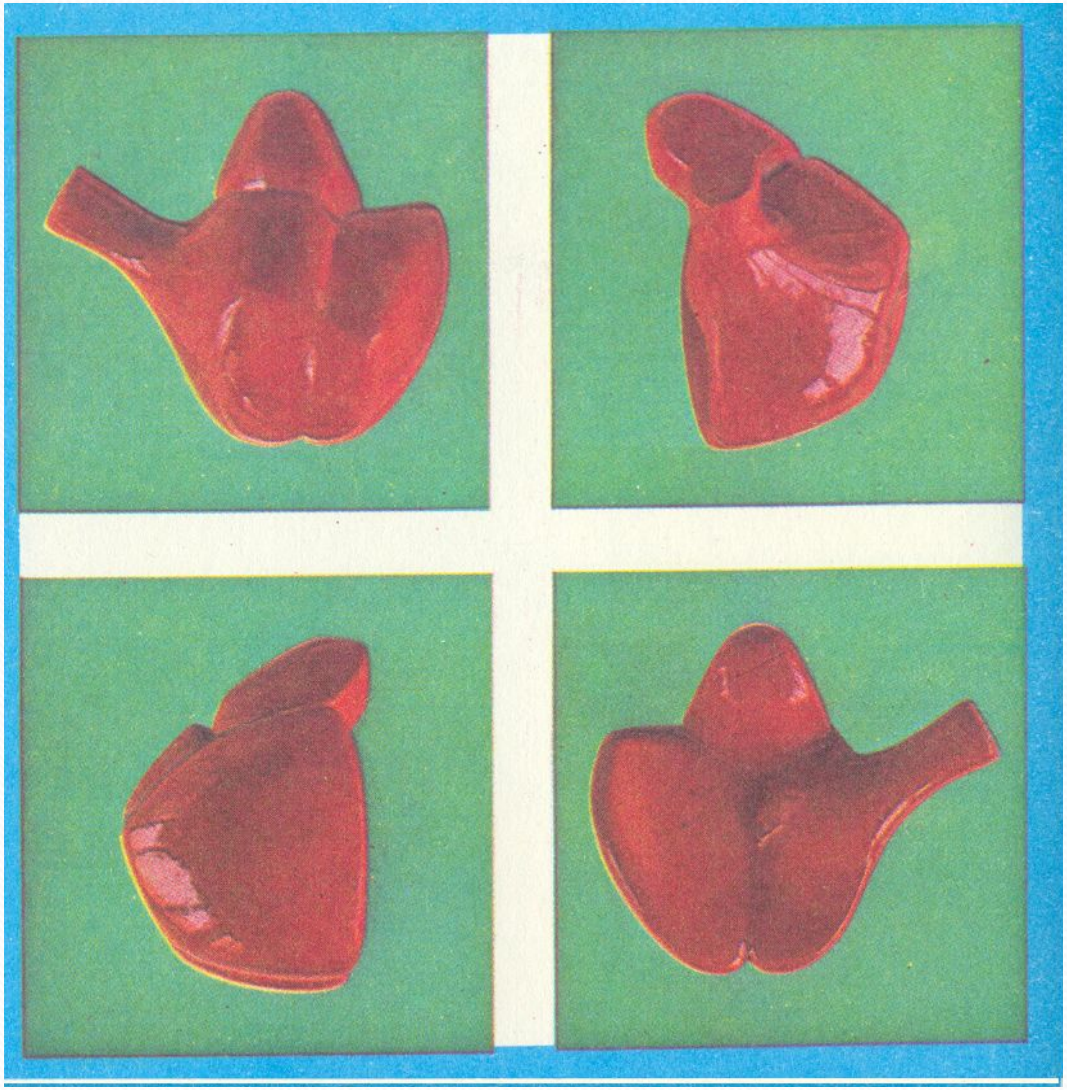


Модели субчастицы 30S рибосомы: три различные проекции (прокариот)

Субчастица 30 S содержит 1 молекулу 16 S - р РНК и 21 белок



Модели субчастицы 50S рибосомы : четыре различные проекции (прокариот)



Субчастица 50 S включает 2 молекулы 23 S – р РНК, 5 S – р РНК и 34 различных белка.

Общие представления о фолдинге белков

- Трансляция мРНК приводит к образованию пептидной цепи со строго определенной последовательностью аминокислот.
- Далее происходит формирование белка-**фолдинг**, т.е сворачивание пептидной цепи в правильную трехмерную структуру.
- Если белок состоит их нескольких субъединиц, то фолдинг включает и объединение их в единую макромолекулу.

Вспомогательные факторы фолдинга:

а) Фолдазы – белки с каталитической активностью: протеиндисульфидизомераза,

пептидилпролилизомераза.

б) Молекулярные шапероны. К ним относятся белки с самыми разными механизмами действия.

Литература:

1.Албертс Б., Брей Д. и др. Молекулярная биология клетки. М., 1994.
2. Введение в молекулярную медицину. Под ред. Пальцева М.А. М., 2004.
3. Генетика. Под ред. Иванова В.И. М. 2006.
4. Гинтер Е.К. Медицинская генетика. М., 2003.
5. Казымбет П.К., Мироедова Э.П. Биология. Астана, 2006.
6. Льюин Б. Гены. М., 1997.
7. Медицинская биология и генетика. Под ред. проф. Куандыкова Е.У. Алматы, 2004.
8. Муминов Т.А., Куандыков Е.У. Основы молекулярной биологии (курс лекций). Алматы, 2007.
9. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М., 2003.
10. Фаллер Д.М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. М., 2003.