Лекция 3

План лекции

- Структура ядра эукариотической клетки
- Функции ядра
- Репликация ДНК

Ядро

1.Ядерная оболочка

2. Нуклеоплазма

3. Хроматин

4.Ядрышки

5.Ядерный матрикс

- Большинство клеток содержат одно ядро, но существуют многоядерные (зрелые клетки мышц) и безъядерные клетки (например, зрелые эритроциты, тромбоциты, клетки хрусталика глаза).

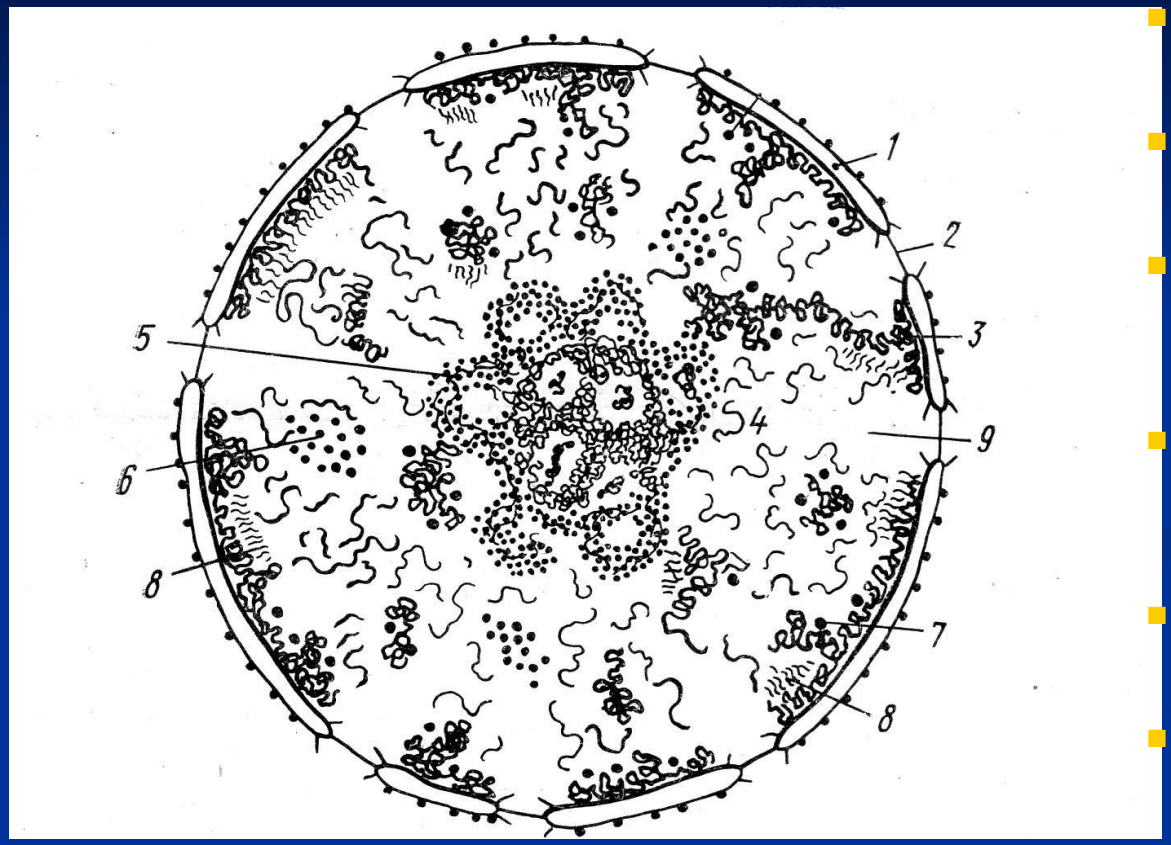
- Форма и вид ядра клетки являются факторами позволяющими отличать разные типы клеток между собой.

- Ядро защищает ДНК и участвует в сложных процессах регуляции.
- Размеры ядра зависят от количества содержащегося в нем ДНК.

Функции ядра

- **Хранение генетической информации** (репликация, репарация)
- **Реализация генетической информации** (транскрипция, трансляция)

Ядро



- 1 – ядерная оболочка
- 2- ядерная пора
- 3 – конденсированный хроматин
- 4 – диффузный хроматин
- 5 – ядрышко
- 6 – хроматиновые гранулы (РНП)
- 8 – перихроматиновые фибриллы

9 – кариоплазма (ядерный сок).

Ядерная оболочка

- Ядерная оболочка представляет собой двойную мембрану, окружающую ядро.
- Между ядерными мембранами – **перинуклеарное пространство.**

- **В ядерной оболочке находятся поры** (мелкие, крупные, открытые, закрытые).
- Через поры транспорт веществ из ядерного матрикса в цитоплазматический матрикс.

- Ядерная оболочка выполняет сложную барьерно-рецепторную, а также транспортную и каркасную функцию.

- Число ядерных пор зависит от метаболической активности клеток: чем выше синтетические процессы в клетках, тем больше пор на единицу поверхности клеточного ядра.

-

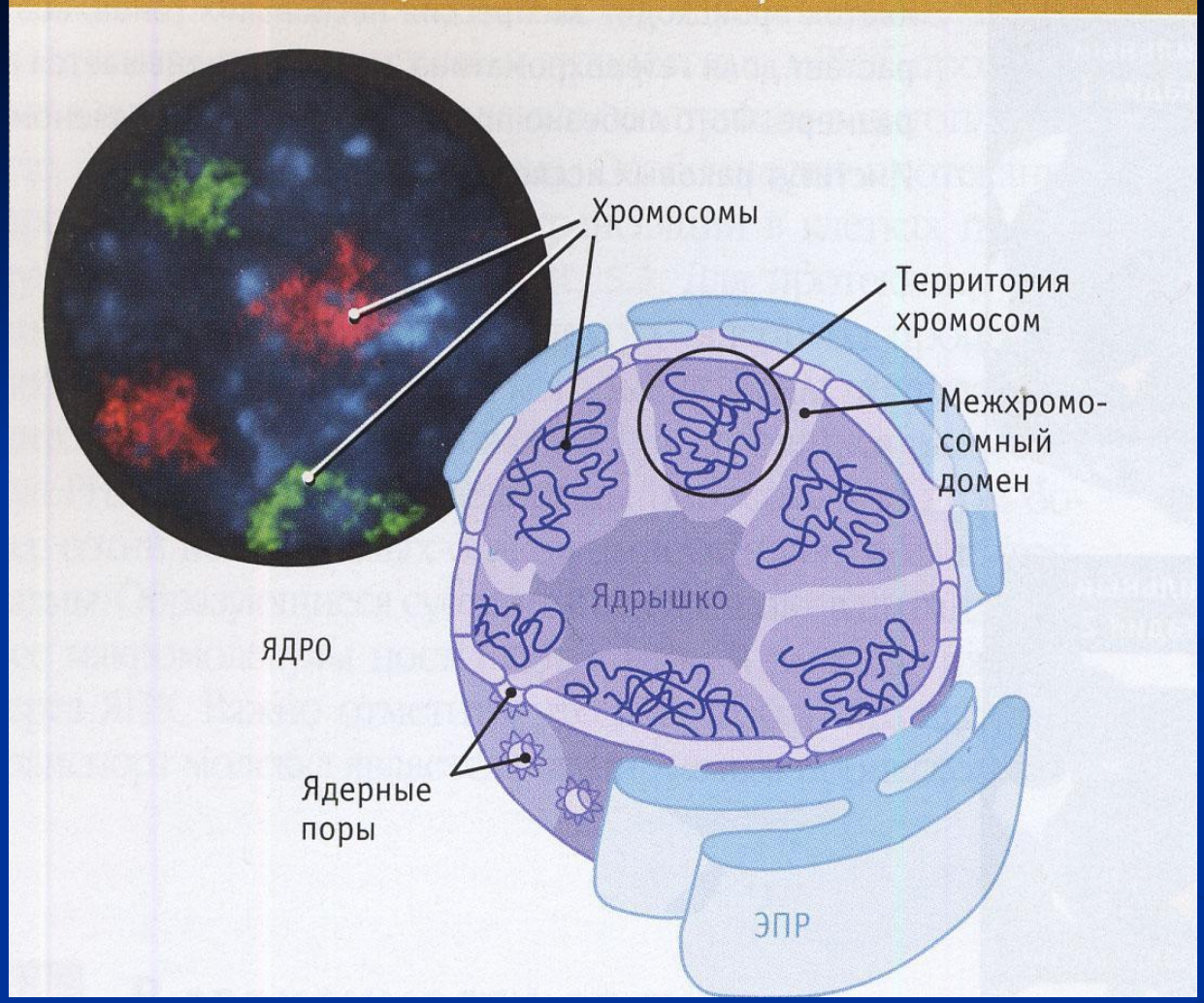
- Хроматин - сложный нуклеопротеидный комплекс, из которого и состоят эукариотические хромосомы.

- В состав ядер эукариот входят несколько физически не связанных хромосом, каждая из которых содержит одну линейную гигантскую молекулу ДНК.

Главными компонентами хроматина являются ДНК и белки, среди которых основную массу составляют гистоны и негистоновые белки.

- В среднем в хроматине около 40% приходится на ДНК и около 60 % на белки, среди которых специфические ядерные белки-**гистоны**.
- **В неделящихся (интерфазных) ядрах хроматин может равномерно заполнять объем ядра, находясь в деконденсированном состоянии. Этот диффузный хроматин (эухроматин) генетически активен.**
- **Существуют постоянные участки конденсированного хроматина (гетерохроматина)**

В ядре находятся области хромосом



Отдельные хромосомы занимают в ядре определенные области, которые называются территориями хромосом. С разрешения Company of Biologists Ltd из: Spector, D. L. *J. Cell Sci.* 2001. 114: 2891–2893. Фотография любезно предоставлена Томасом Рейдом

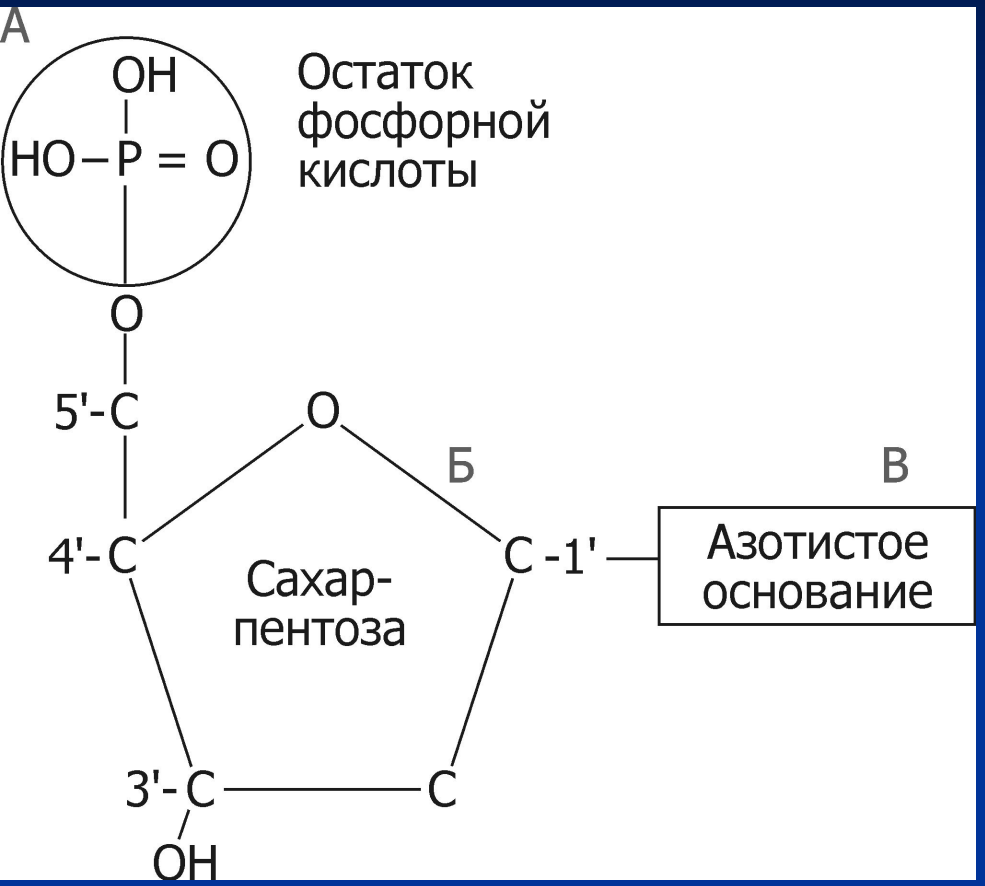
Нуклеиновые кислоты

- Высокополимерные макромолекулярные соединения.
- Основная структурная единица нуклеиновых кислот – **нуклеотид.**

ДНК –полимер, состоящий из мономеров

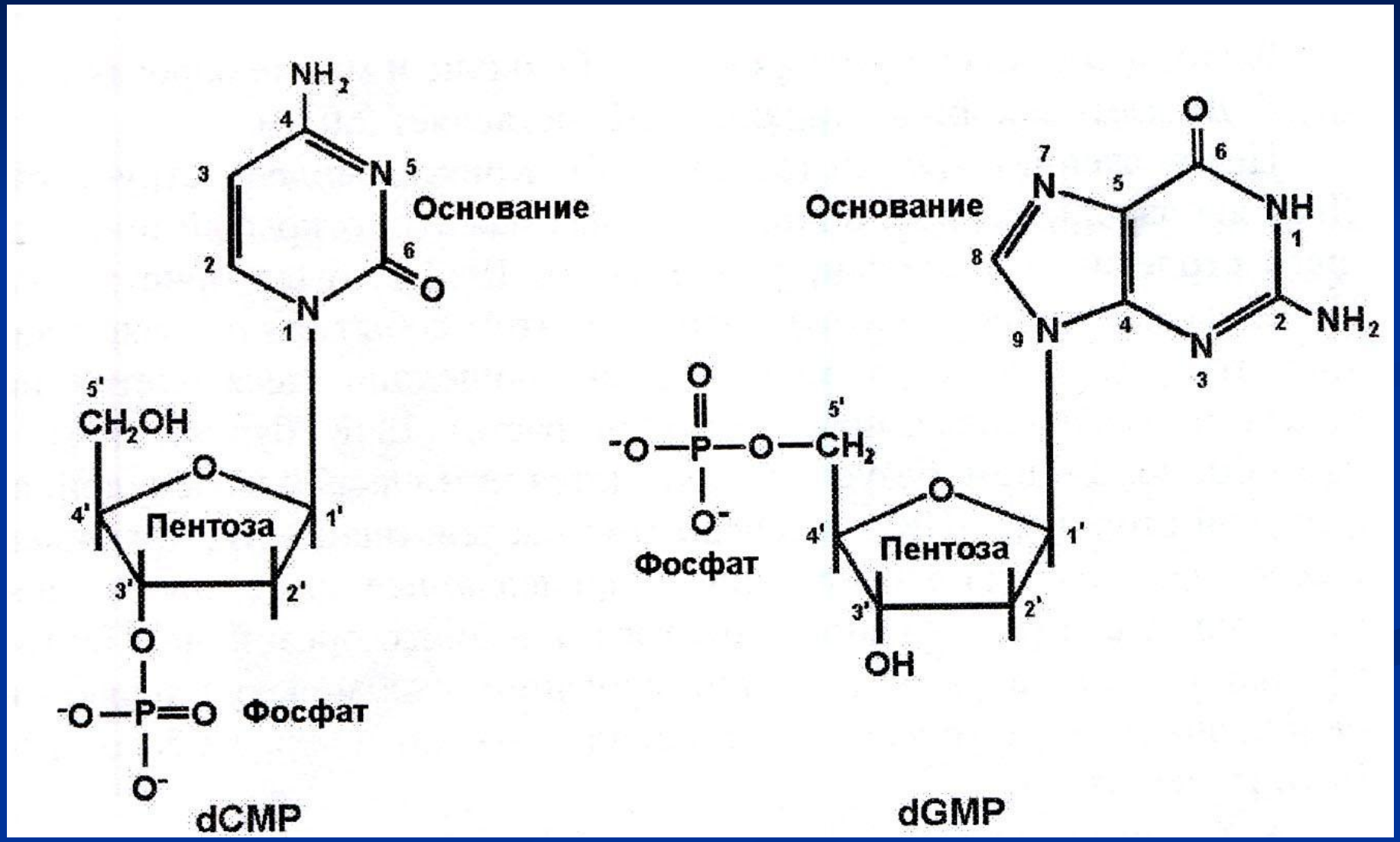
мономер - **нуклеотид**

НУКЛЕОТИД



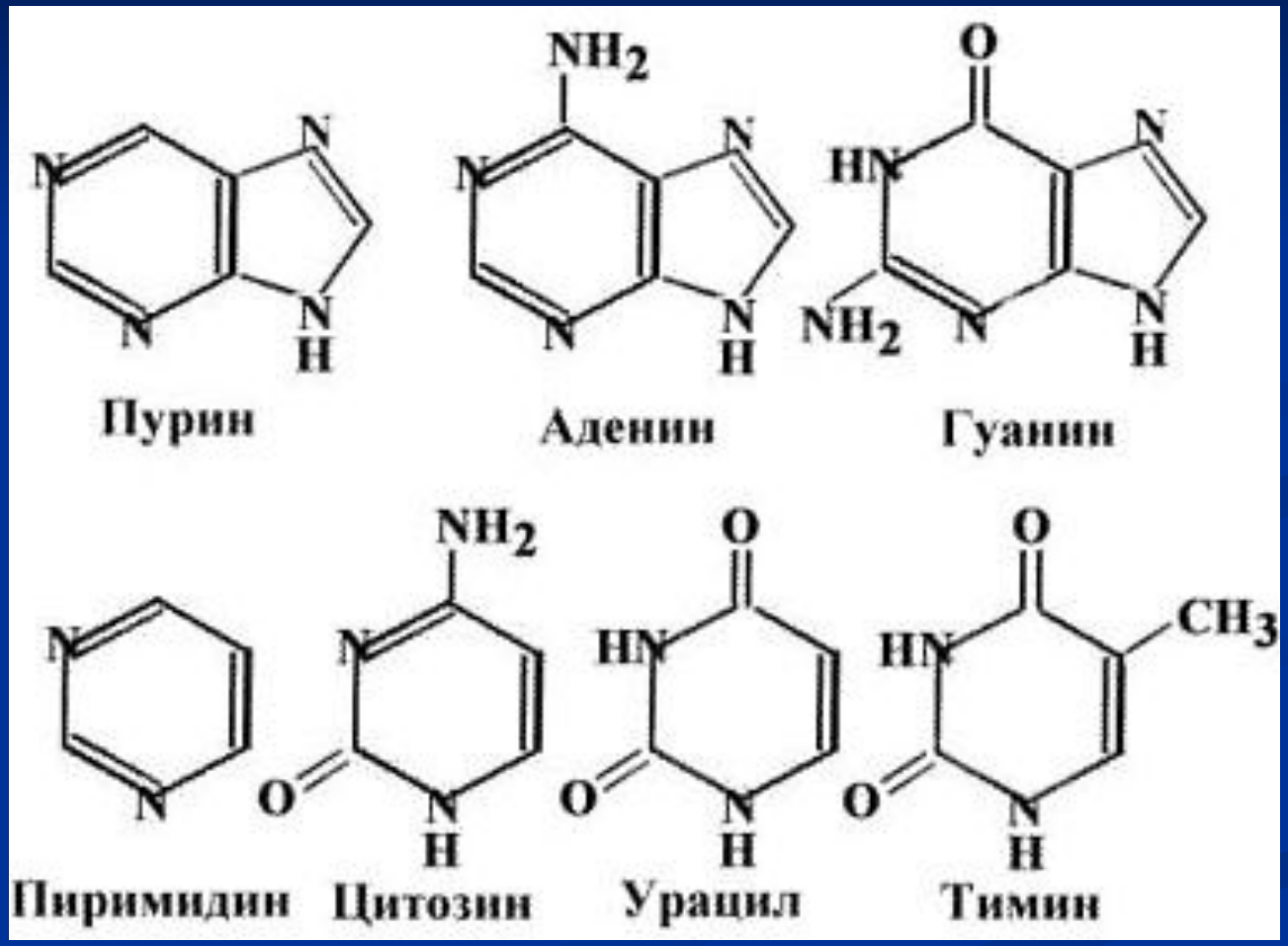
- Каждый нуклеотид состоит из трех химически различных частей, соединенных ковалентными связями. Пятиуглеродное сахарное кольцо, пуриновое или пиримидиновое азотистое основание, фосфатная группа.

Дезоксирибонуклеотиды – строительные блоки ДНК



- Аденин и гуанин – пурины
- Цитозин, тимин – пиримидины.
- Плоские азотсодержащие гетероциклические молекулы обладающие основными свойствами.

Азотистые основания



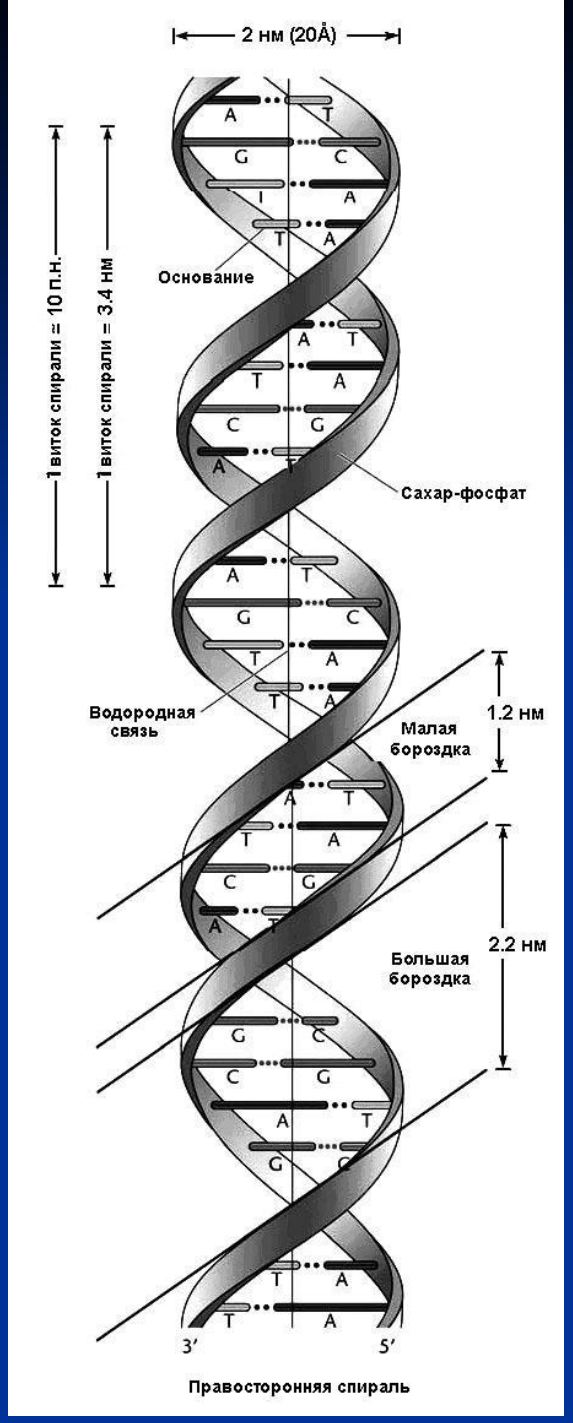
Сахар +азотистое основание = нуклеозид

- Нуклеотиды соединены в полинуклеотидную цепь остов которой состоит из перемежающихся остатков сахара и фосфата.

Через фосфатную группу, атом в $5^{!}$-положении одного пентозного кольца соединен с атомом в $3^{!}$-положении следующего пентозного кольца.

ДНК

- Имеет структуры:
- первичную
- вторичную
- третичную



С химической точки зрения ДНК – это полинуклеотидная цепь, состоящая из дезоксирибонуклеотидов

Первичная структура ДНК

заключается в том, что ДНК состоит из нуклеотидных цепей, у которых скелетную основу составляют чередующиеся сахарные и фосфатные группы, объединенные ковалентными 3'-, 5'-фосфодиэфирными скелетными связями, а боковые группы представлены тем или иным основанием (одним из четырех) и присоединяются одна к другой молекулой сахара.

Для состава ДНК характерны закономерности известные как правила А. Чаргаффа

1. Сумма нуклеотидов, содержащих пуриновые азотистые основания, равна сумме нуклеотидов, содержащих пиримидиновые азотистые основания.

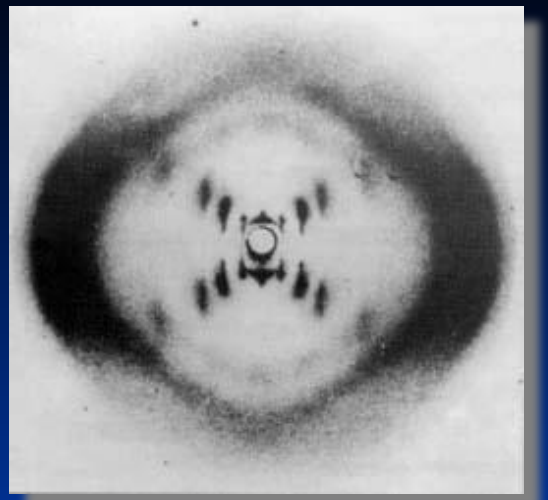
- Содержание аденина равно содержанию тимина, а гуанина — цитозину:

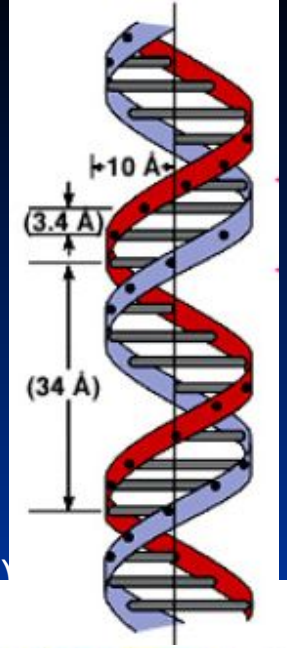
Вторичная структура ДНК

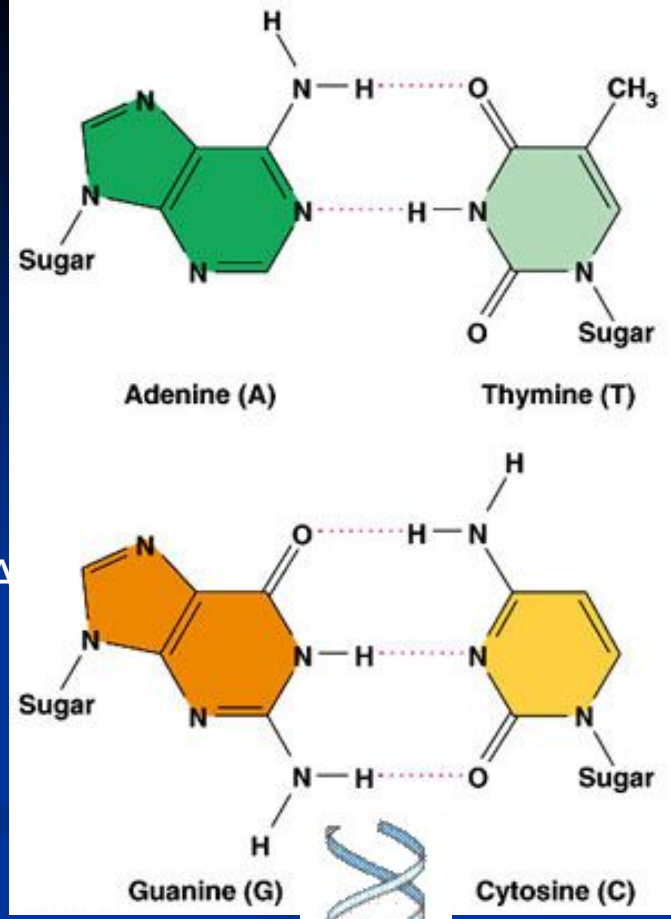
- Молекула ДНК построена из двух скрученных направо спиралевидных полинуклеотидных цепей, причем каждый виток спирали соответствует 10 азотистым основаниям или расстоянию в 3,4 нм

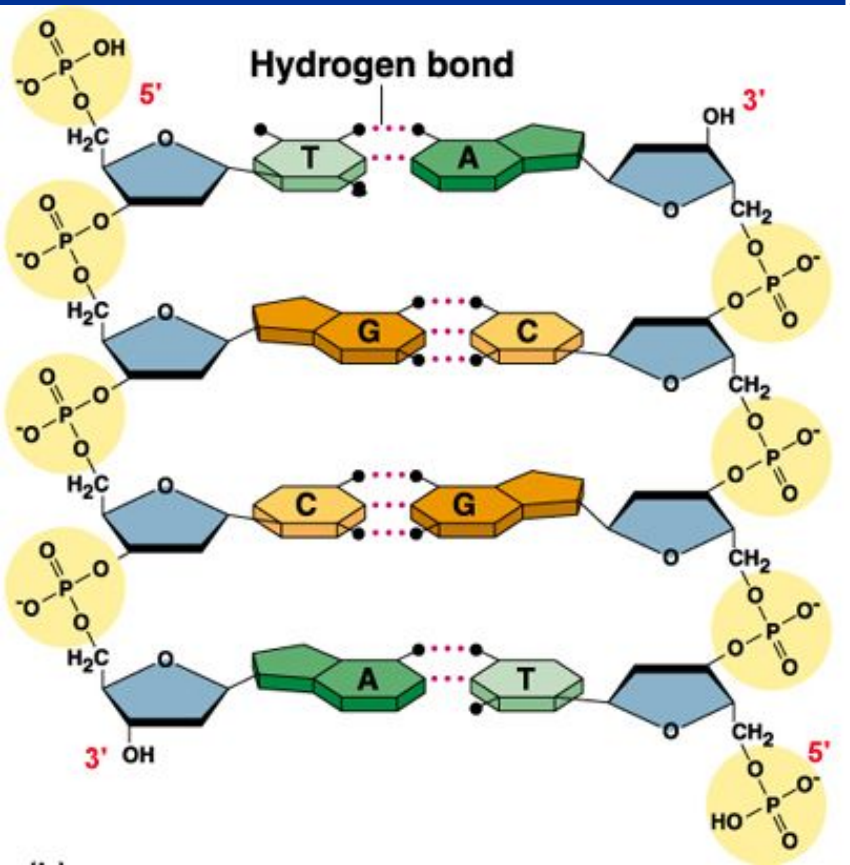
- Обе цепи объединены в результате закручивания одной цепи вокруг другой по общей оси. Цепи антипаралелльны. 3'—> 5' для одной цепи и 5'—> 3' для другой.
- 3. Сахарофосфатные группы располагаются на внешней стороне двойной спирали, тогда как основания находятся внутри спирали под прямым углом и вдоль ее оси

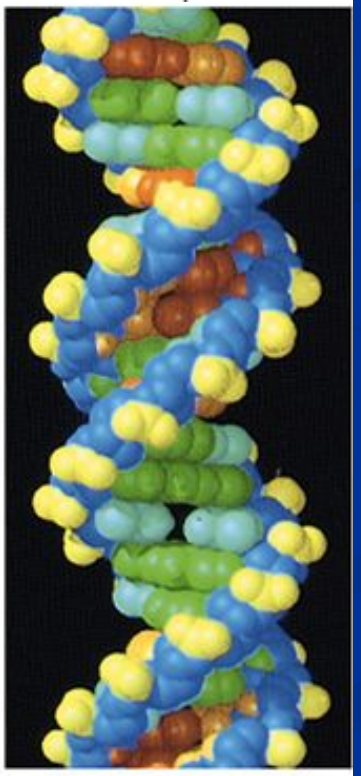
Таким образом, ДНК представляет собой скрученную в правостороннем направлении двойную спираль, в которой пары азотистых оснований А—Т и Г—Ц в комплементарных полинуклеотидных цепях подобны перекладинам в лестнице, а сахарофосфатные цепи являются каркасом этой лестницы.

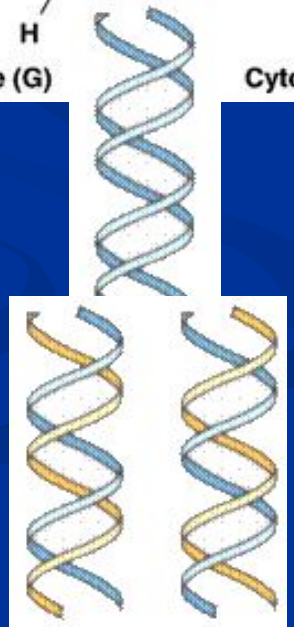



10 Å
(3.4 Å)
(34 Å)

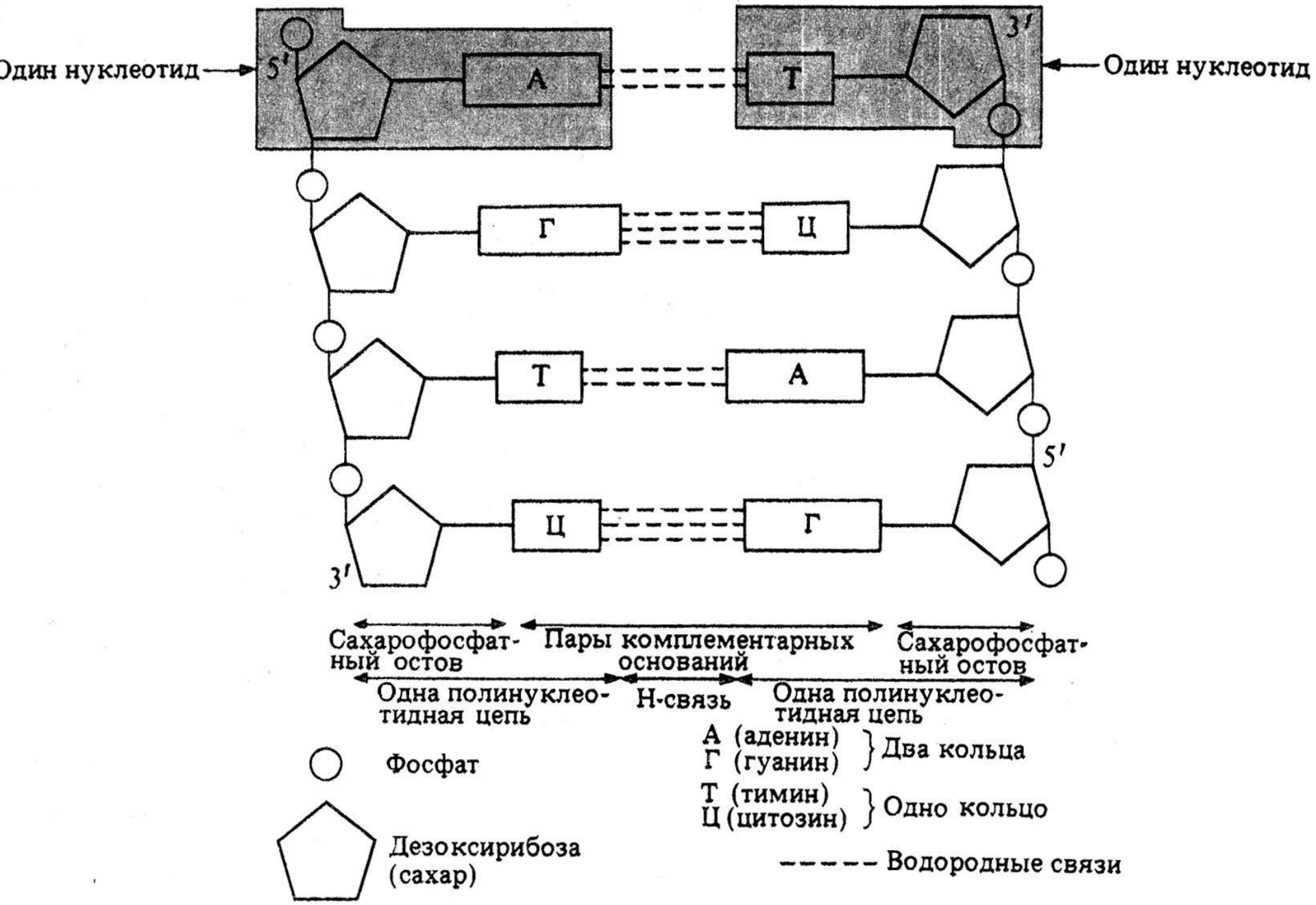

Sugar
Adenine (A)
Thymine (T)
Guanine (G)
Cytosine (C)

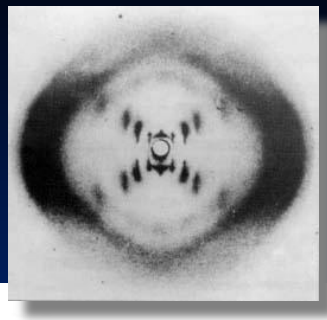

Hydrogen bond
5'
3'
T
A
G
C
C
G
A
T



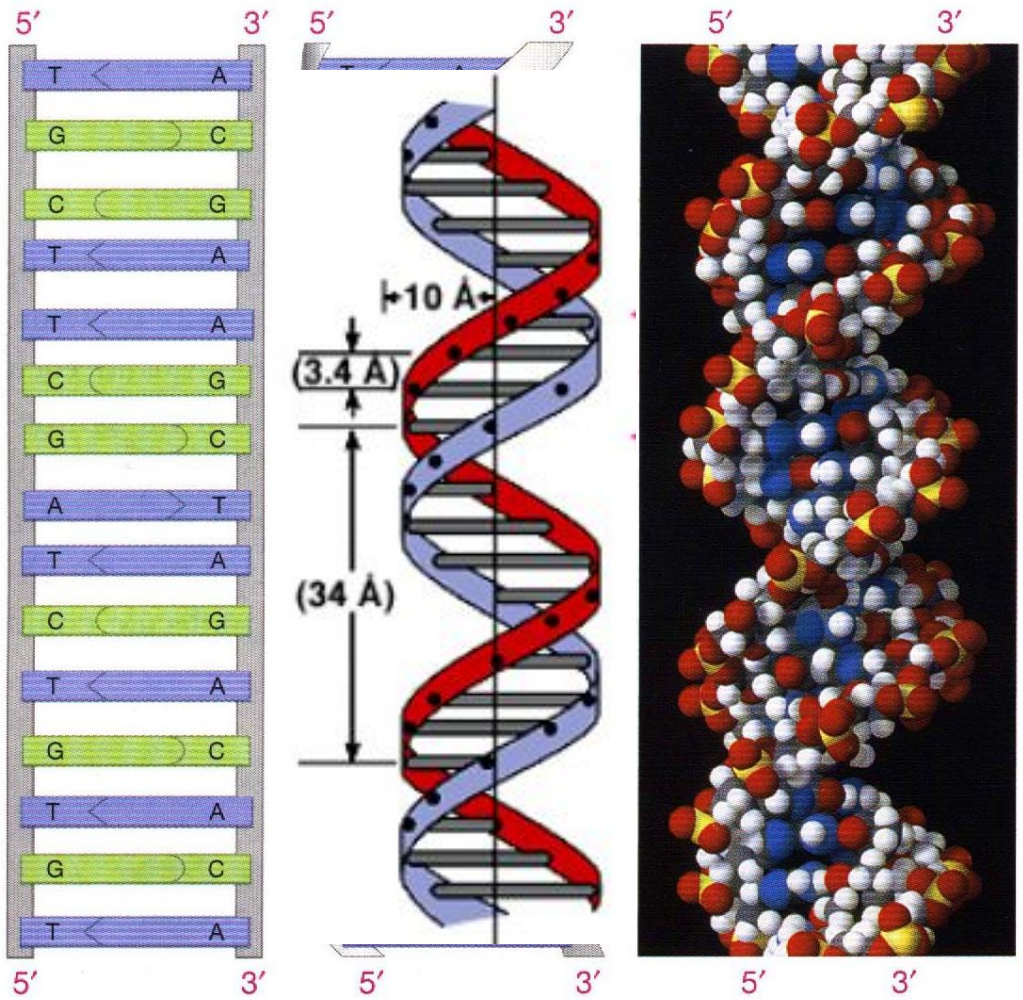


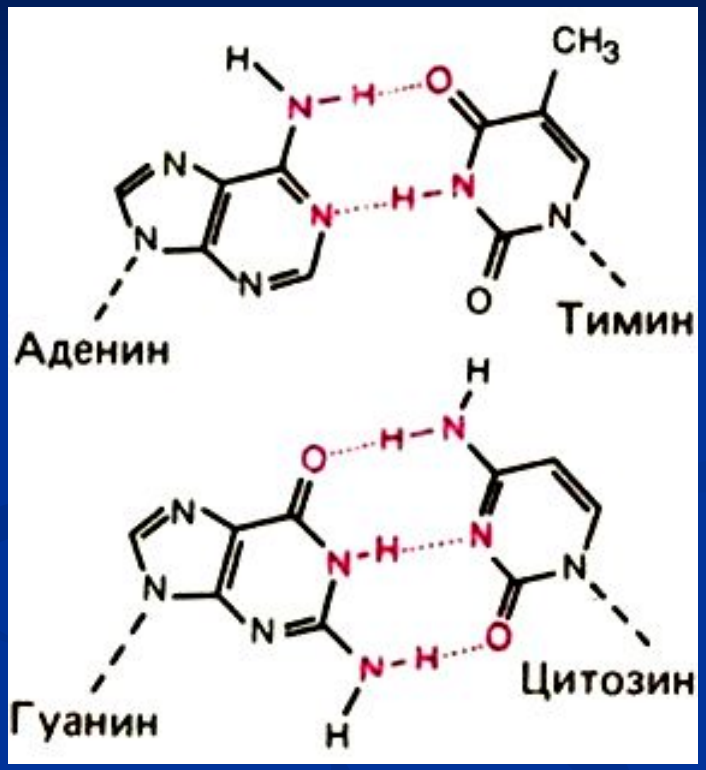
Г)


Один нуклеотид
5'
A
T
3'
Один нуклеотид
Г
Ц
T
A
5'
Ц
Г
3'
Сахарофосфатный остов
Пары комплементарных оснований
Сахарофосфатный остов
Одна полинуклеотидная цепь
Н-связь
Одна полинуклеотидная цепь
Фосфат
А (аденин)
Г (гуанин)
Два кольца
Т (тимин)
Ц (цитозин)
Одно кольцо
Дезоксирибоза (сахар)
Водородные связи

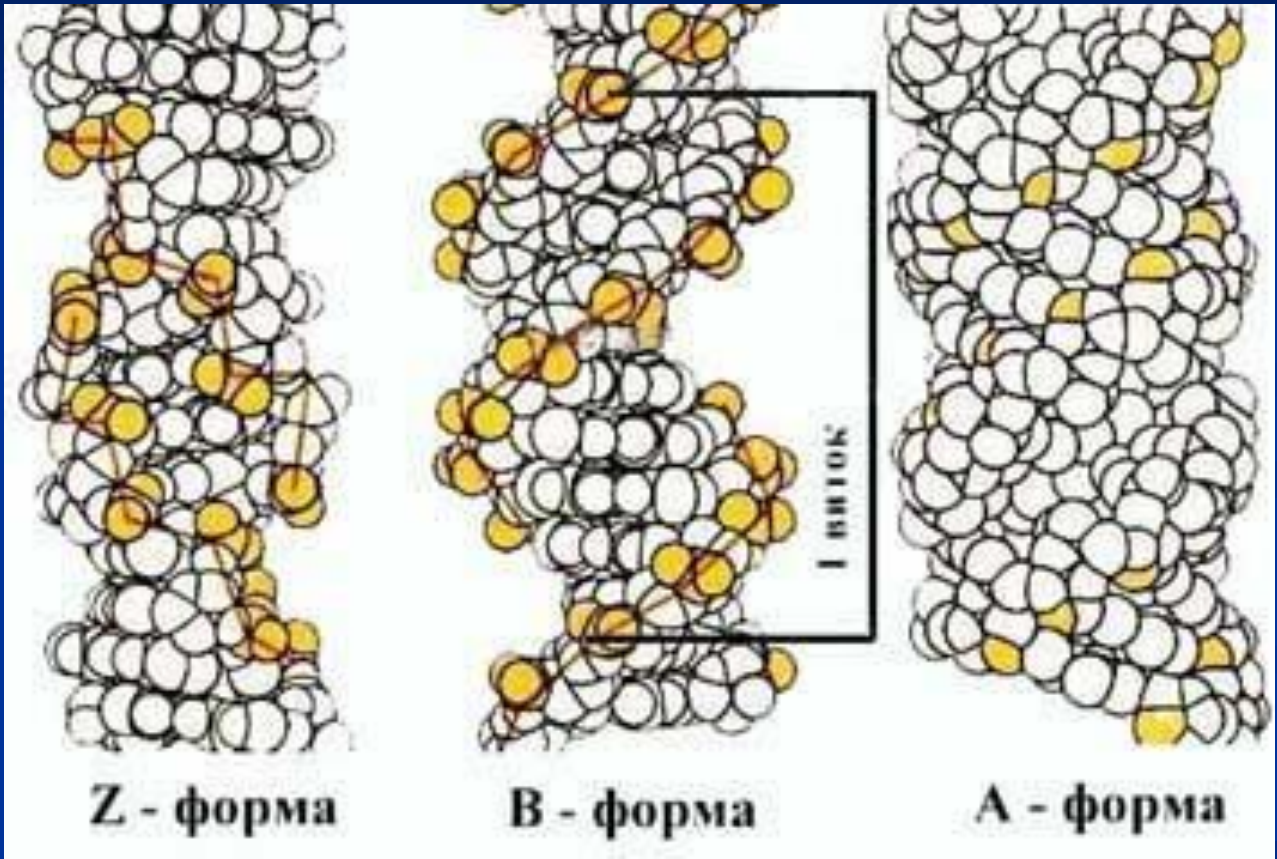


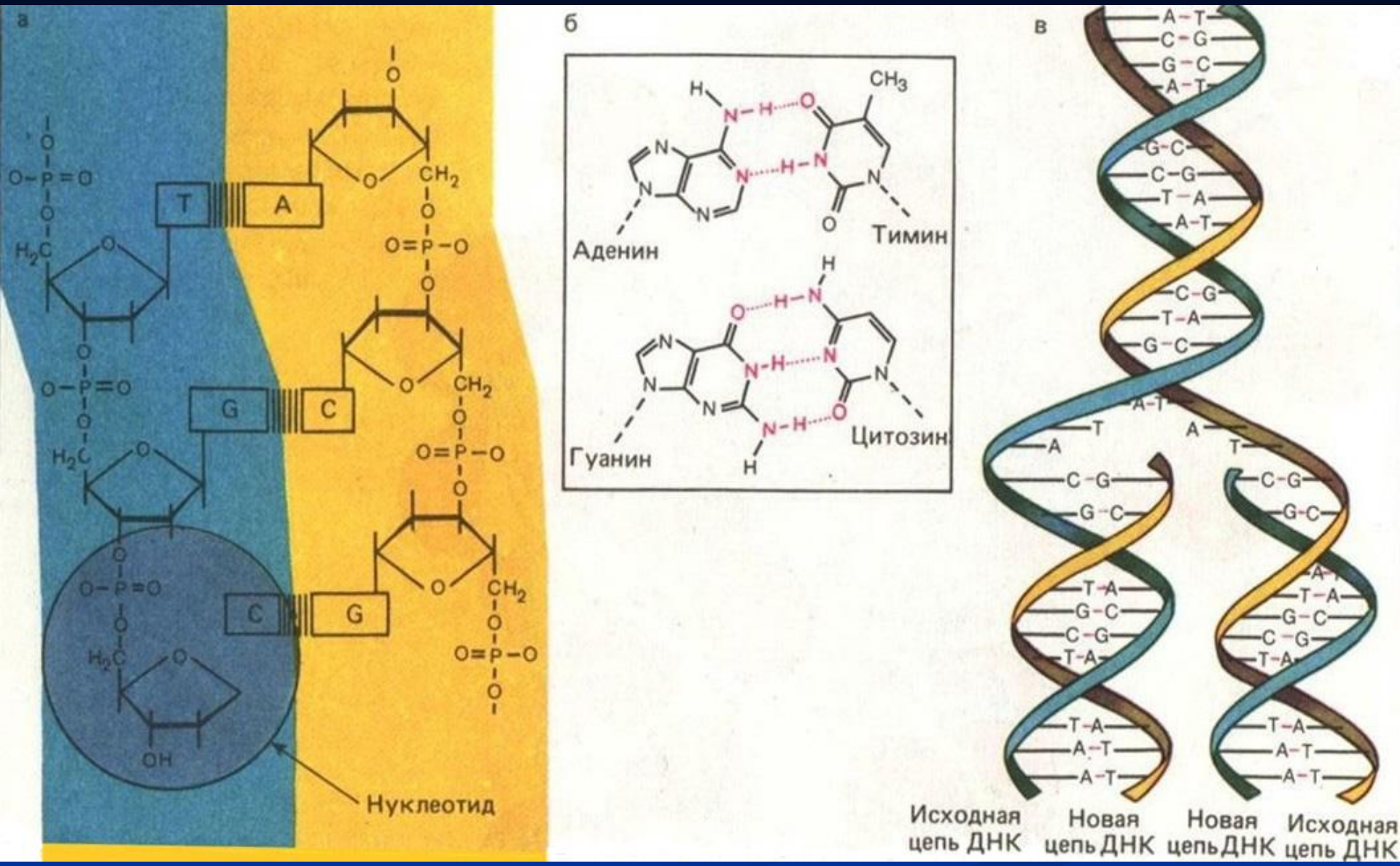
Комплементарность азотистых оснований





Формы двойной спирали ДНК



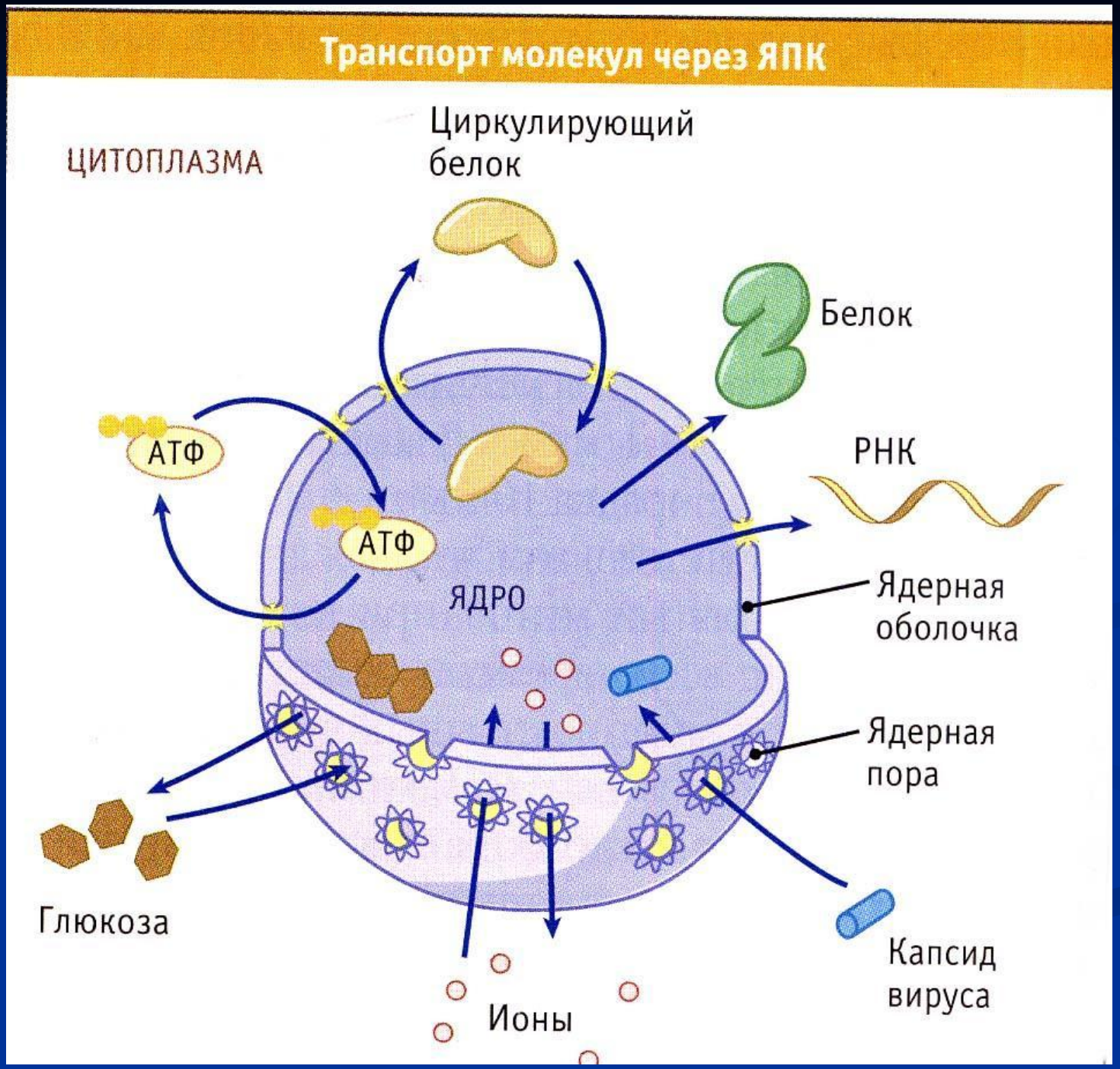

а
T
A
G
C
C
G
Нуклеотид
б
Аденин
Тимин
Гуанин
Цитозин
в
Исходная цепь ДНК
Новая цепь ДНК
Новая цепь ДНК
Исходная цепь ДНК

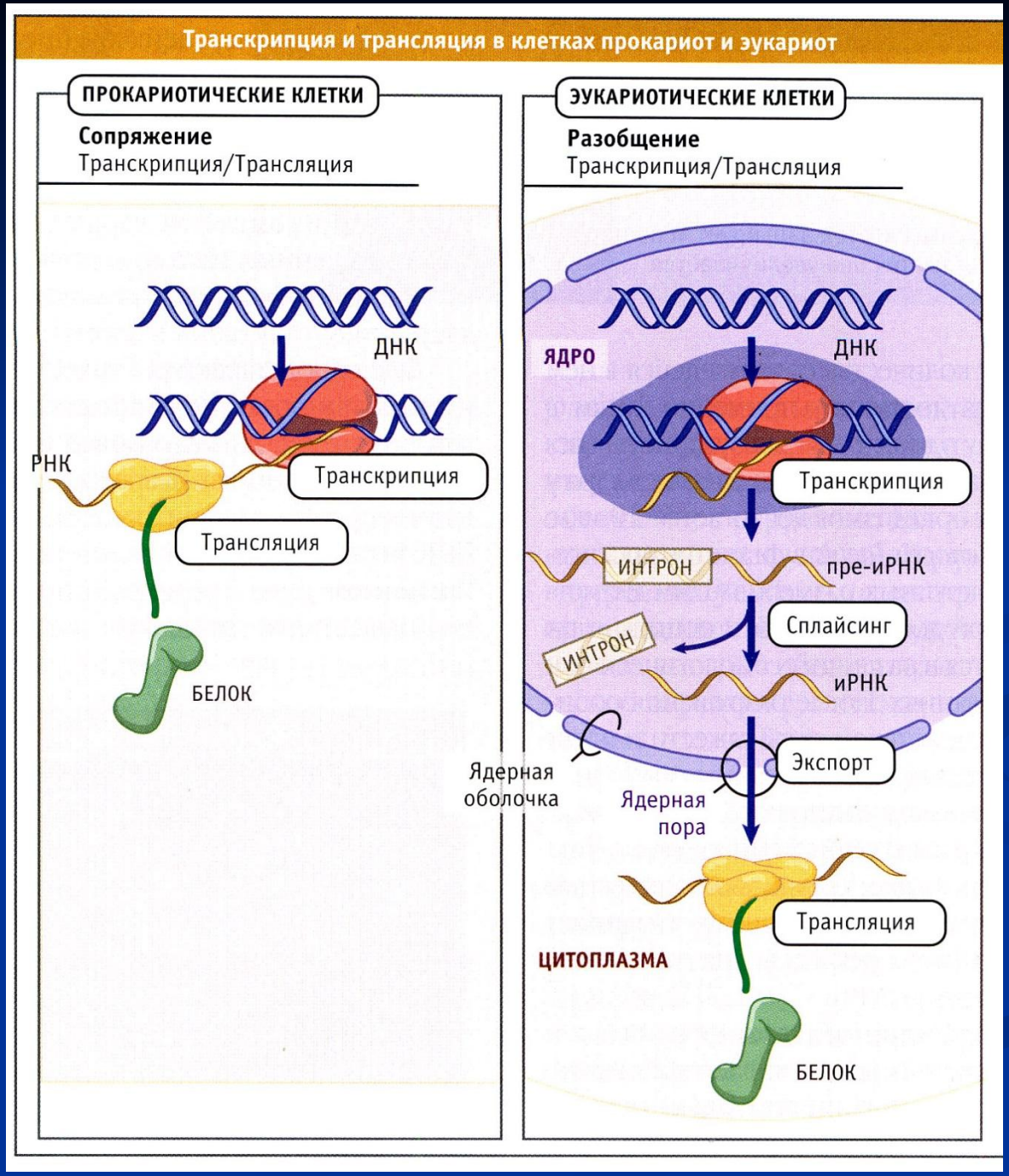
ДНК ЭУКАРИОТ СОДЕРЖИТ

- **Часто повторяющиеся** последовательности нуклеотидов (сателлитная ДНК)
- **Умеренно повторяющиеся** последовательности, кодируют РНК, гистоны и т.д.
- **Уникальные последовательности** несущие информацию о белках

- Нуклеоплазма включает кариоплазму – сложный коллоидный раствор (в воде растворены белки, углеводы и т.д.).

- В кариоплазме протекают многие процессы, связанные как с ядерным метаболизмом, так и с внутриядерным транспортом белков и РНК.


Транспорт молекул через ЯПК
ЦИТОПЛАЗМА
Циркулирующий белок
Белок
РНК
АТФ
АТФ
ЯДРО
Ядерная оболочка
Ядерная пора
Глюкоза
Ионы
Капсид вируса


Транскрипция и трансляция в клетках прокариот и эукариот
ПРОКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ
Сопряжение
Транскрипция/Трансляция
ДНК
РНК
Транскрипция
Трансляция
БЕЛОК
ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ
Разобщение
Транскрипция/Трансляция
ЯДРО
ДНК
Транскрипция
ИНТРОН
пре-иРНК
Сплайсинг
ИНТРОН
иРНК
Ядерная оболочка
Экспорт
Ядерная пора
Трансляция
ЦИТОПЛАЗМА
БЕЛОК

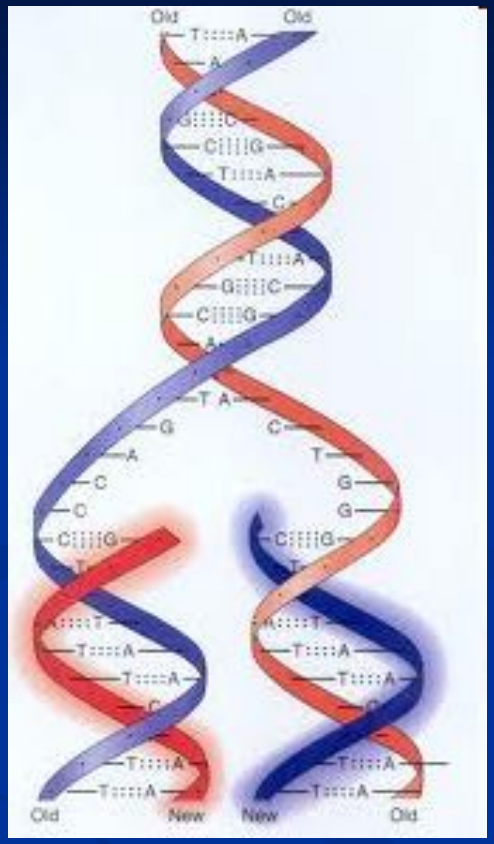
Хроматин

- ДНК + белки = ДНП (дезоксирибонуклеопротеид)
- 46 линейных молекул ДНК
- Белки хроматина – гистоны и негистоновые белки
- Эухроматин – активно транскрибируемый в интерфазе.
- Гетерохроматин – конденсированный (неактивный) хроматин

Репликация ДНК

- Сложный многоступенчатый процесс, происходящий при участии большого количества ферментов.

- Происходит в S-период интерфазы.



Упаковка ДНК в ядре

- Для выполнения основных функций ДНК в ядре должна иметь четкую пространственную организацию.

- Ведущая роль в упорядочивании организации принадлежит ядерным белкам.

БЕЛКИ

ГИСТОНЫ

НЕГИСТОНОВЫЕ БЕЛКИ

Гистоны – белки характерные только для хроматина.

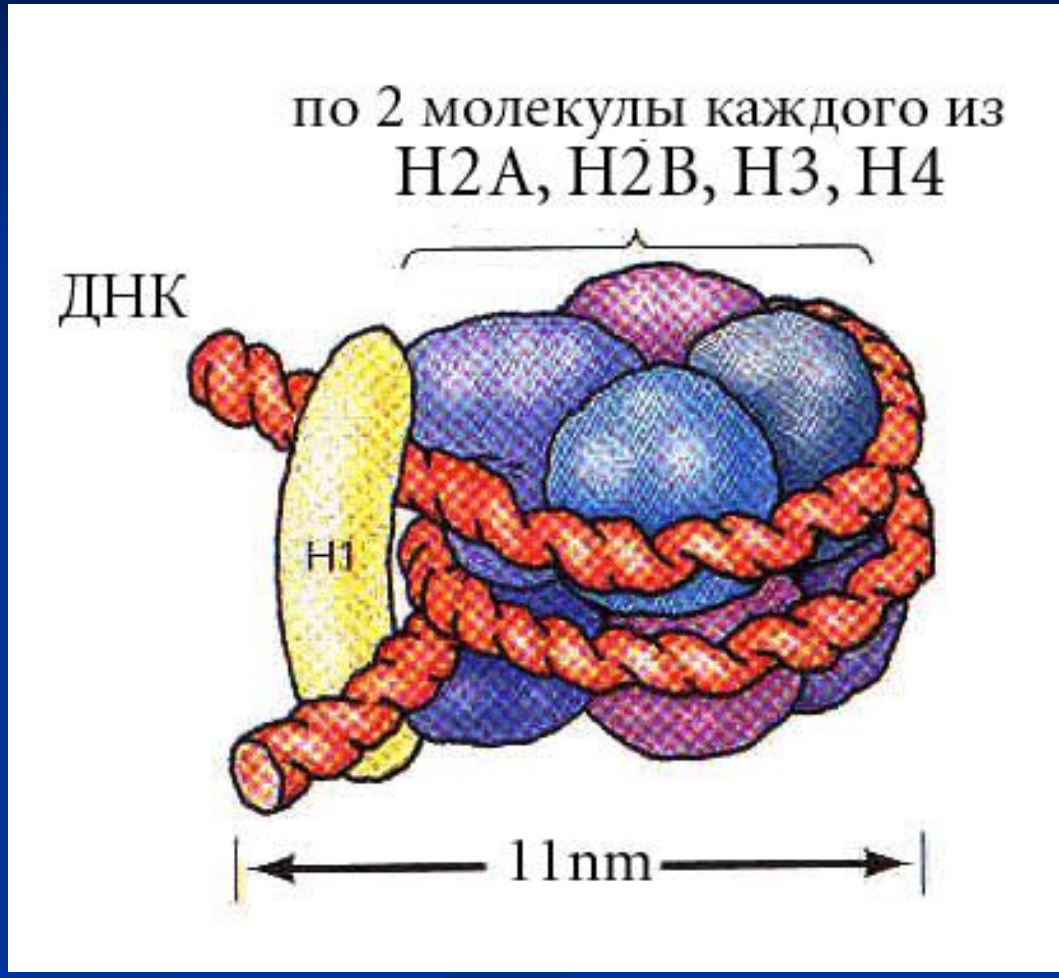
Это основные или щелочные белки.

Гистоны выполняют регуляторную и структурную роль.

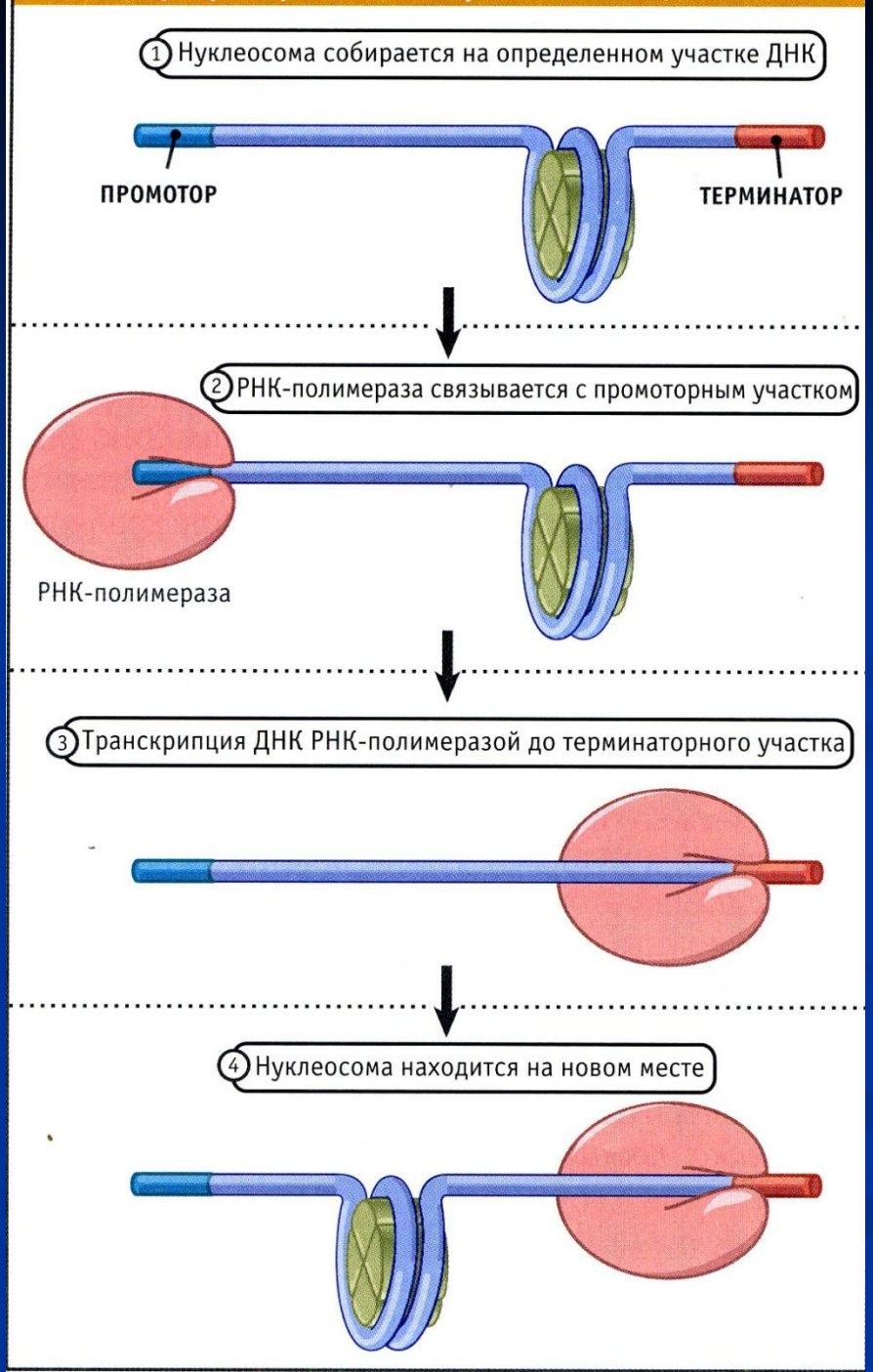
Первый уровень компактизации ДНК - нуклеосомный

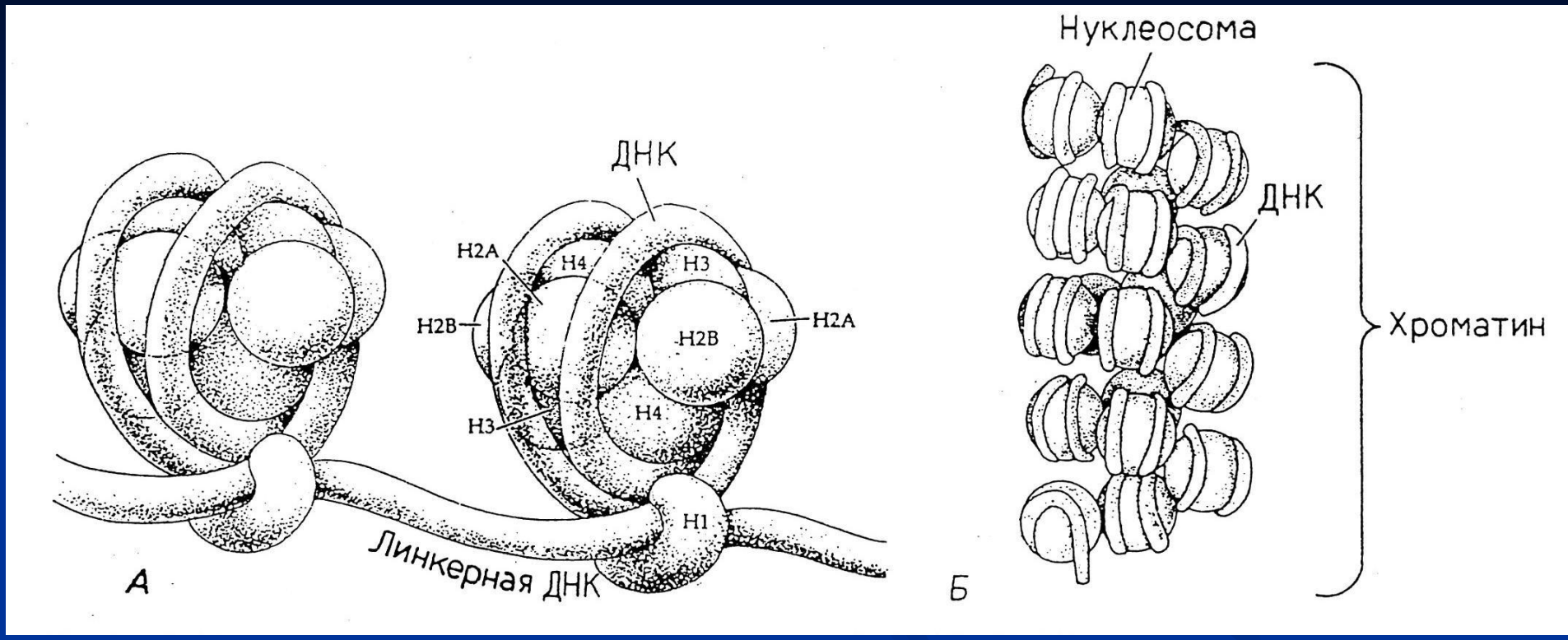
- Непосредственно с октамером контактирует 145 п.н. и 20-30-40 п.н. между нуклеосомными корами.

- Нуклеосомный уровень упаковки свойственен всей эукариотической ДНК, он дает укорочение в 7 раз. Диаметр увеличивается с 20 Å до 110 Å.



При транскрипции октамер гистонов смещается



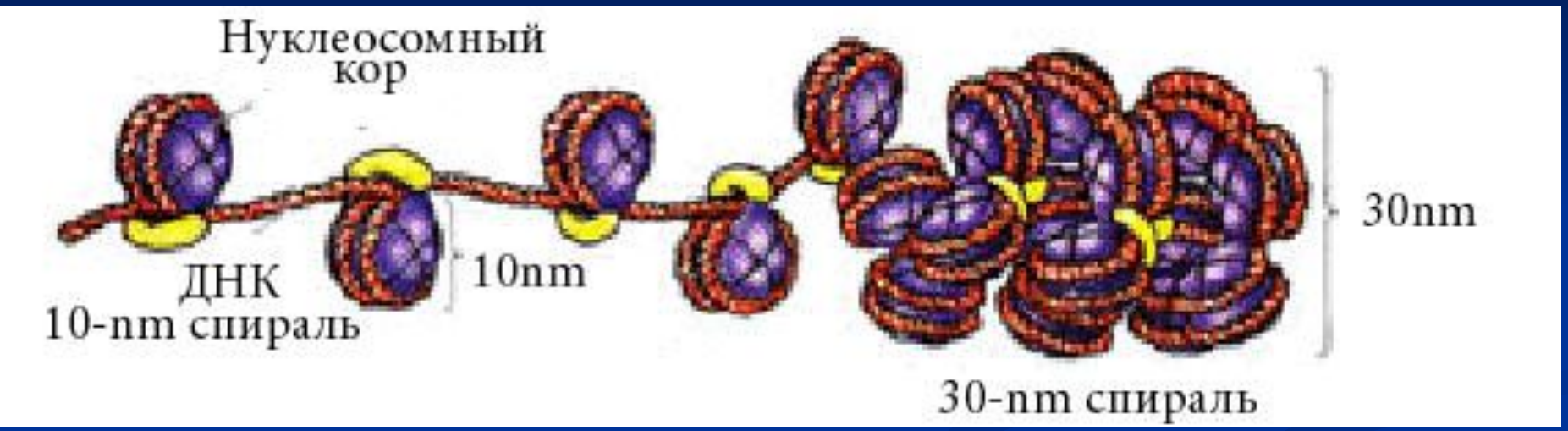


- А) Две нуклеосомы соединенные линкерной ДНК.
- Б) Модель укладки нуклеосом в компактную структуру хроматина.

Второй уровень компактизациии –

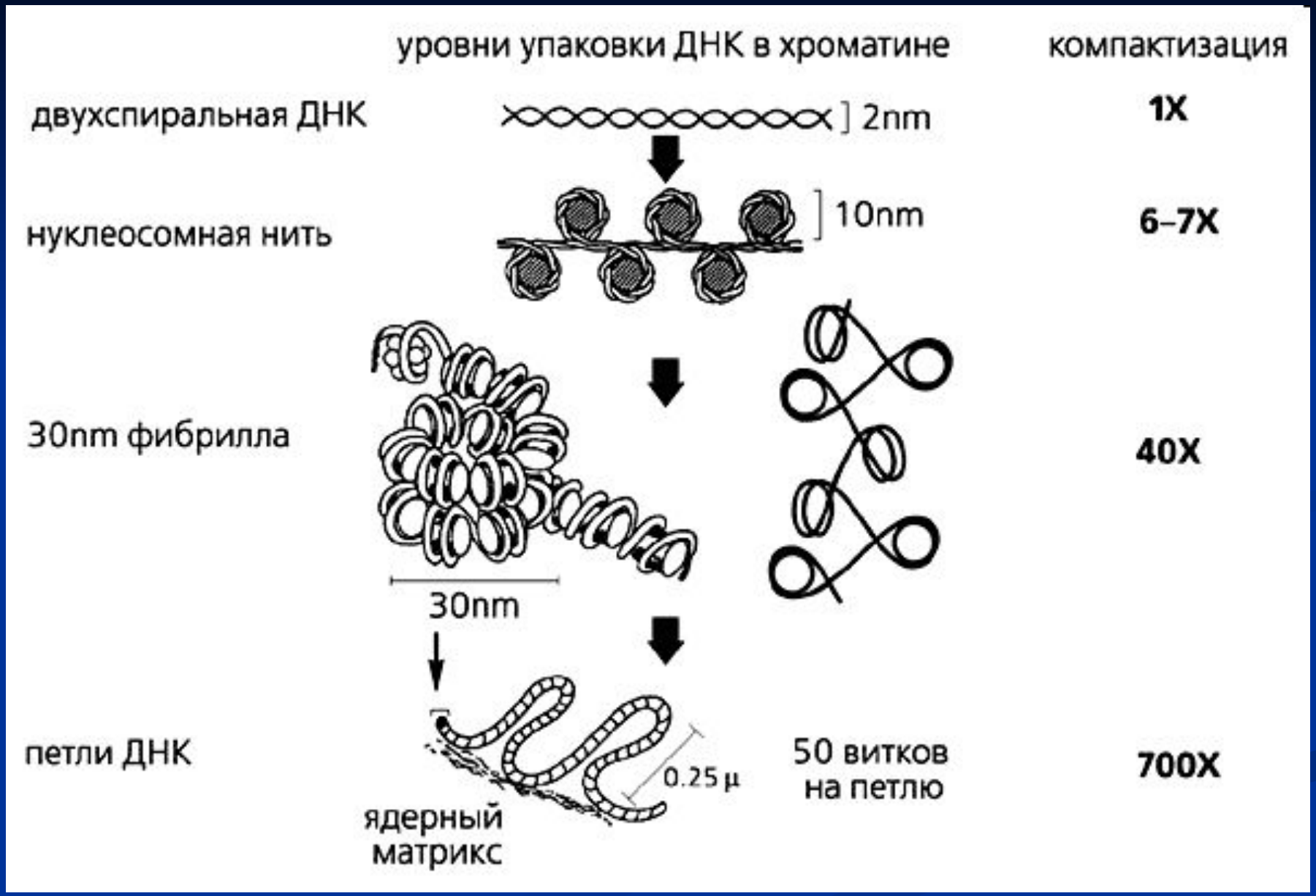
30 нм фибрилла

Соленоидный уровень упаковки обеспечивается Н1 гистоном.



- **Н1 взаимодействует с октамерами, сближает их, и еще на него наматывется ДНК.**
- ***Происходит сокращение линейного размера ДНК в 6-10 раз. Диаметр увеличивается до 300Å.***

- Этот уровень компактизации, как и первый, не зависит от первичной структуры ДНК.


уровни упаковки ДНК в хроматине
компактизация
двухспиральная ДНК
2nm
1X
нуклеосомная нить
10nm
6–7X
30nm фибрилла
40X
30nm
петли ДНК
0.25 μ
50 витков
на петлю
700X
ядерный
матрикс

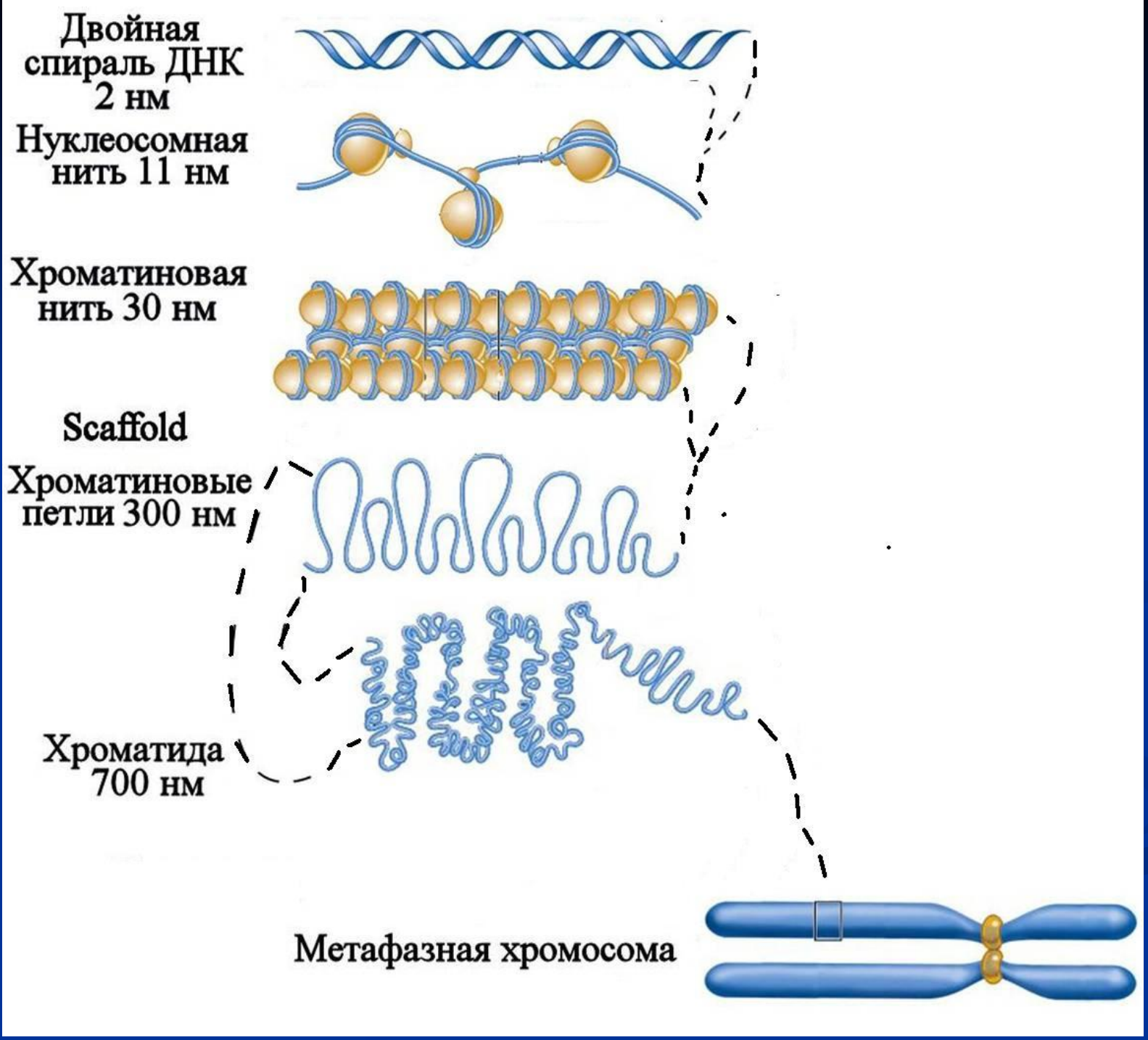
Все остальные уровни компактизации связаны с **негистоновыми** белками.

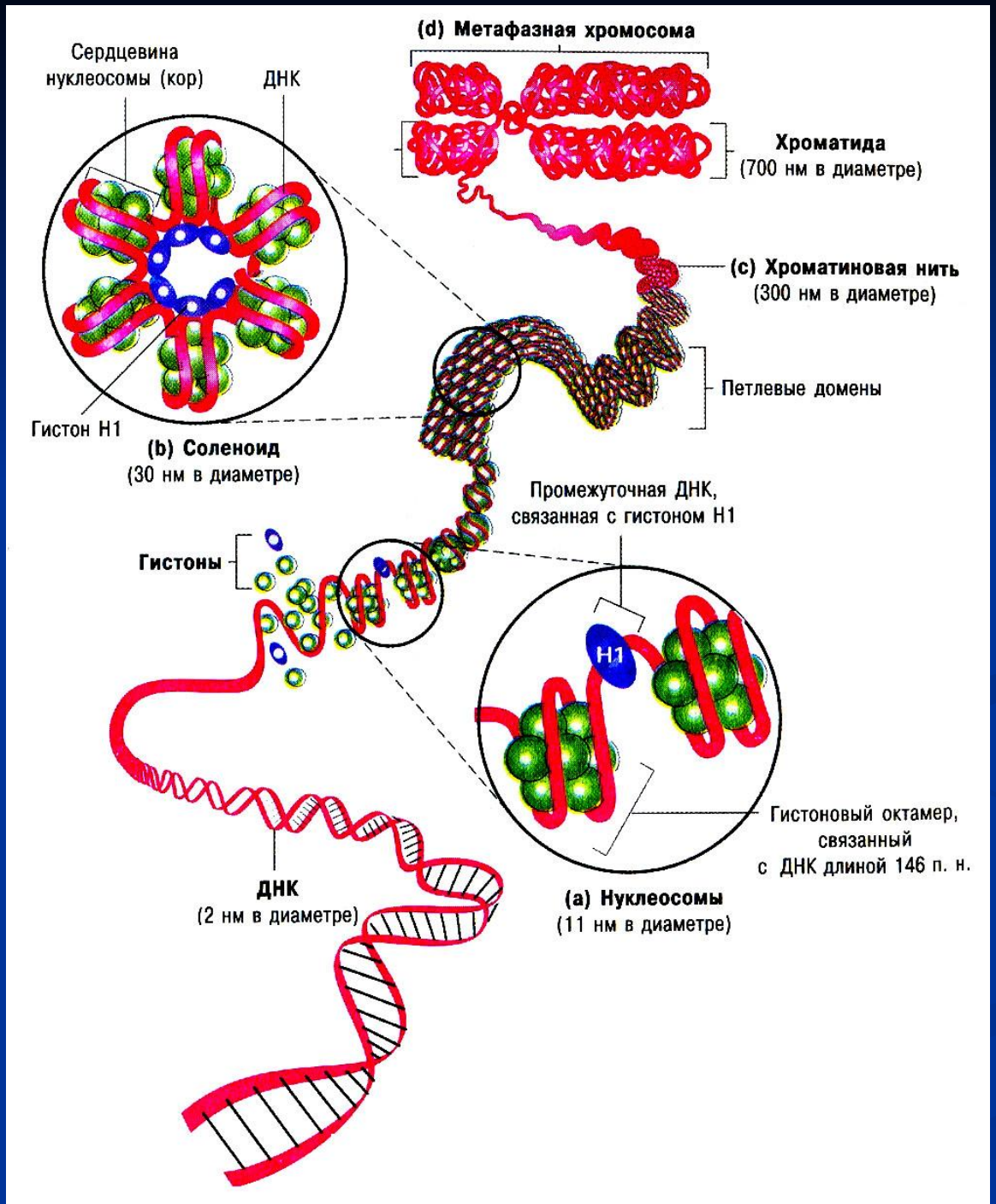
Третий уровень структурной организации хроматина -

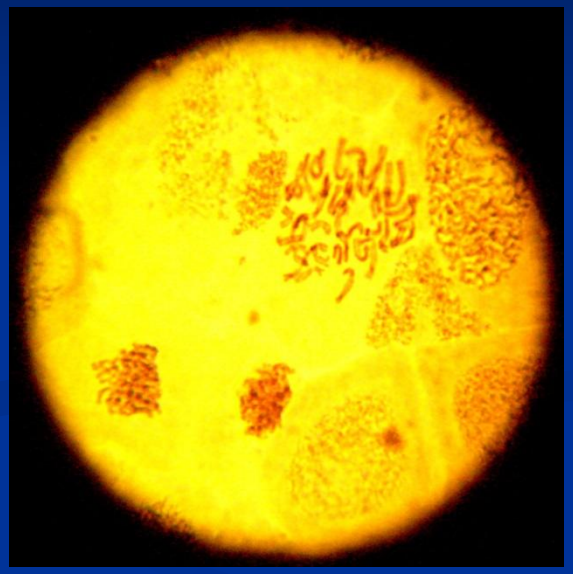
петлевые домены ДНК

Петельно-доменный уровень компактизации хроматина

- **Обеспечивается негистоновыми белками.**
- **Они узнают определенные последовательности ДНК и связываются с ними и друг другом, образуя петли по 20-80 тыс. п.н.**


Двойная спираль ДНК 2 нм
Нуклеосомная нить 11 нм
Хроматиновая нить 30 нм
Scaffold
Хроматиновые петли 300 нм
Хроматида 700 нм
Метафазная хромосома


(d) Метафазная хромосома
Сердцевина нуклеосомы (кор)
ДНК
Хроматида
(700 нм в диаметре)
(c) Хроматиновая нить
(300 нм в диаметре)
Петлевые домены
Гистон H1
(b) Соленоид
(30 нм в диаметре)
Промежуточная ДНК, связанная с гистоном H1
Гистоны
H1
Гистоновый октамер, связанный с ДНК длиной 146 п. н.
ДНК
(2 нм в диаметре)
(a) Нуклеосомы
(11 нм в диаметре)



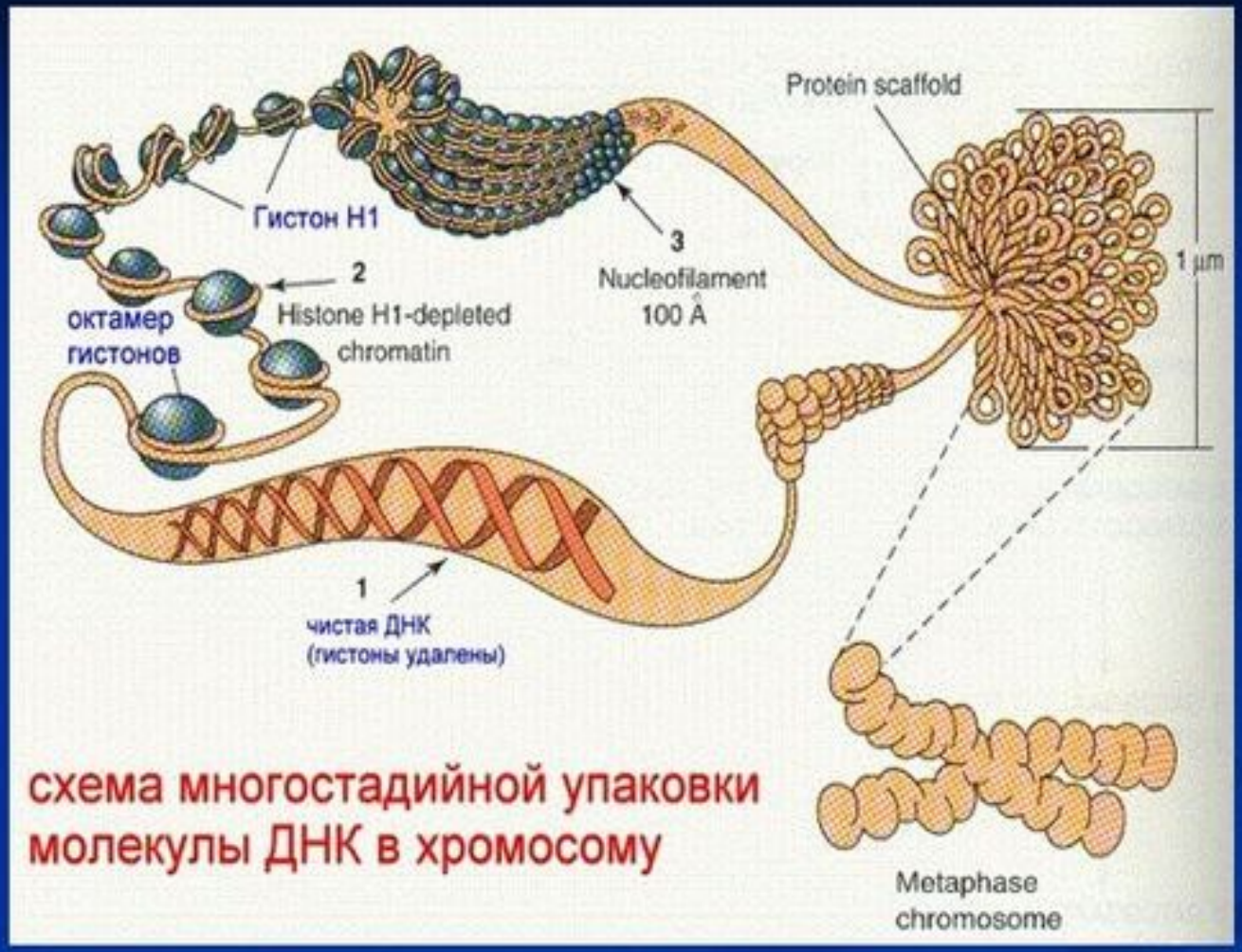
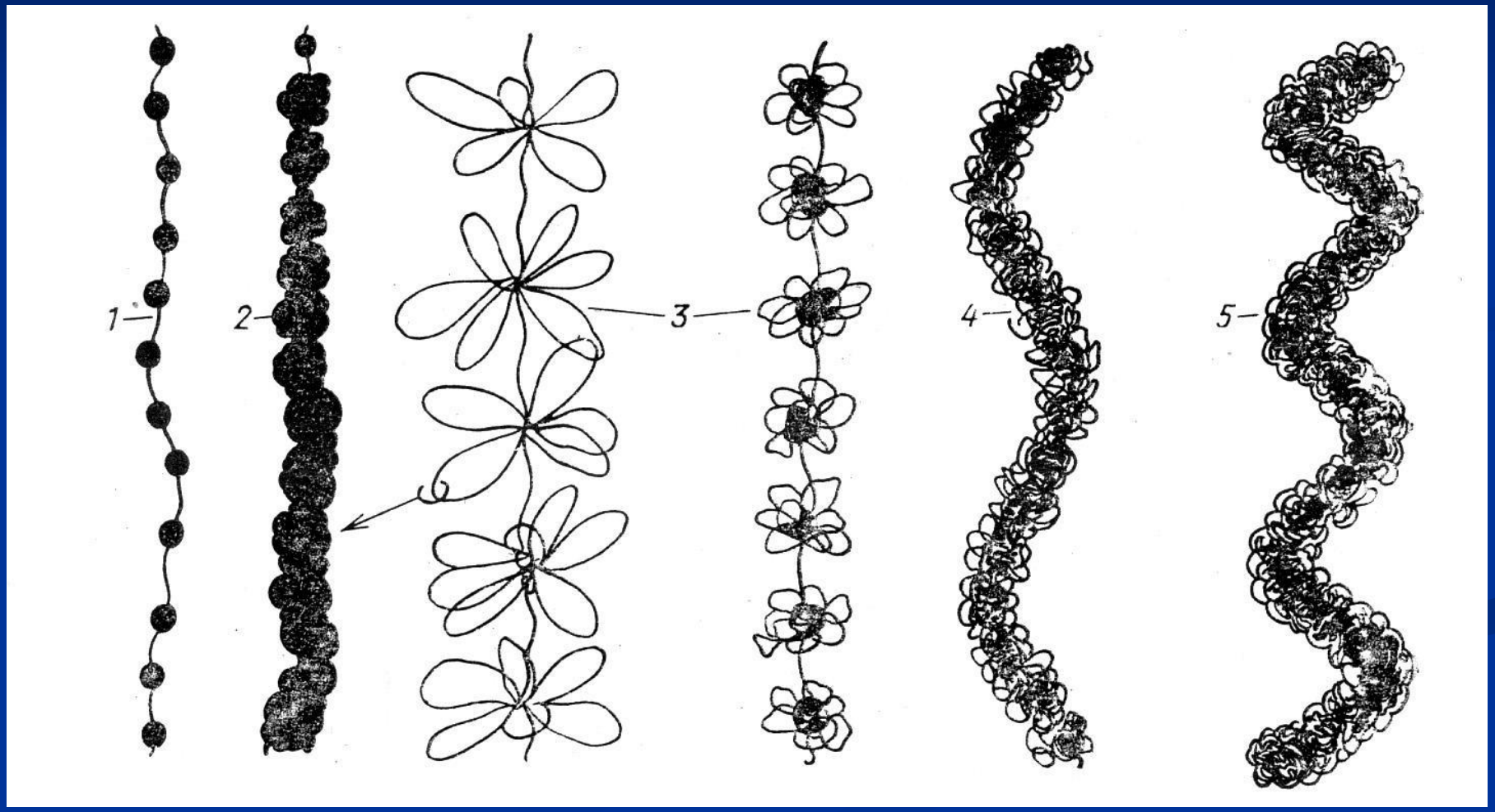
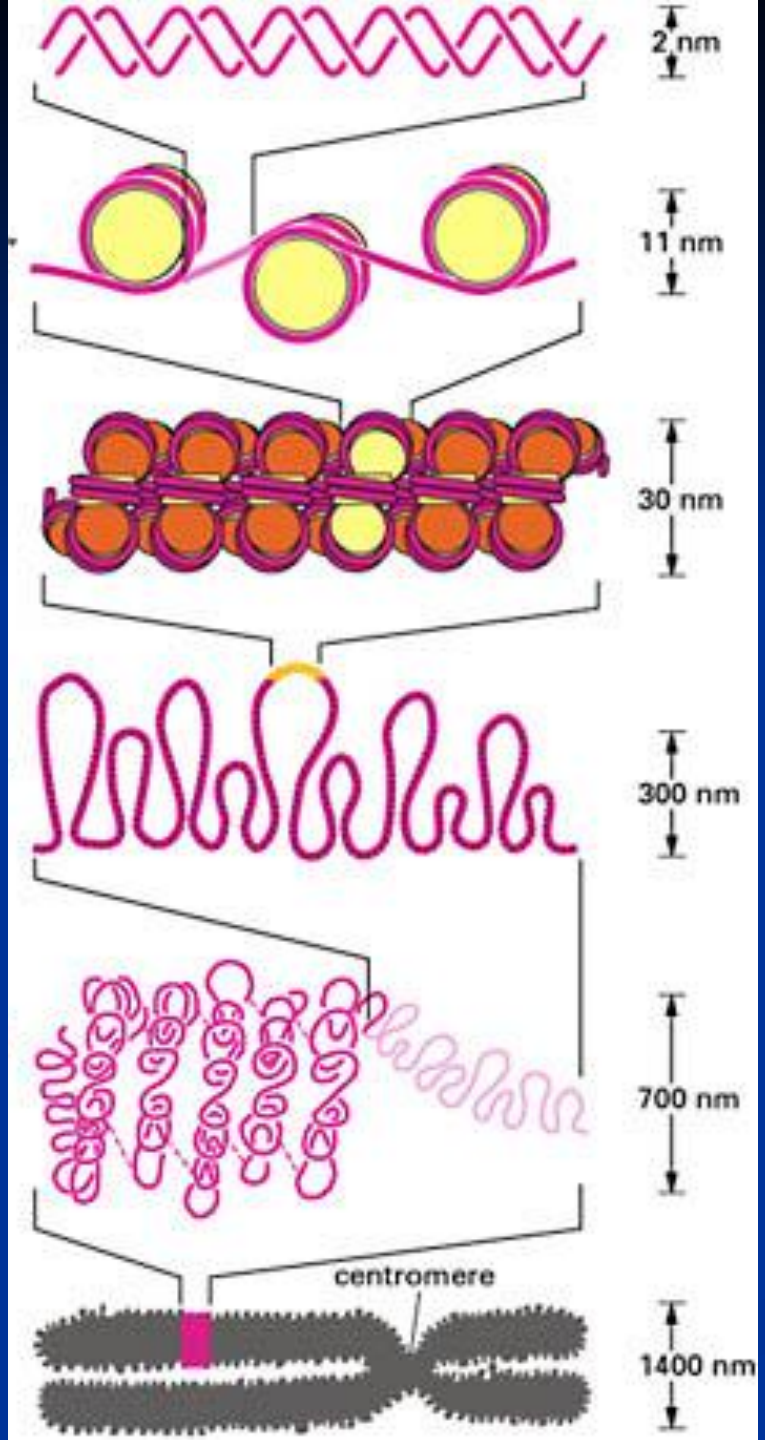
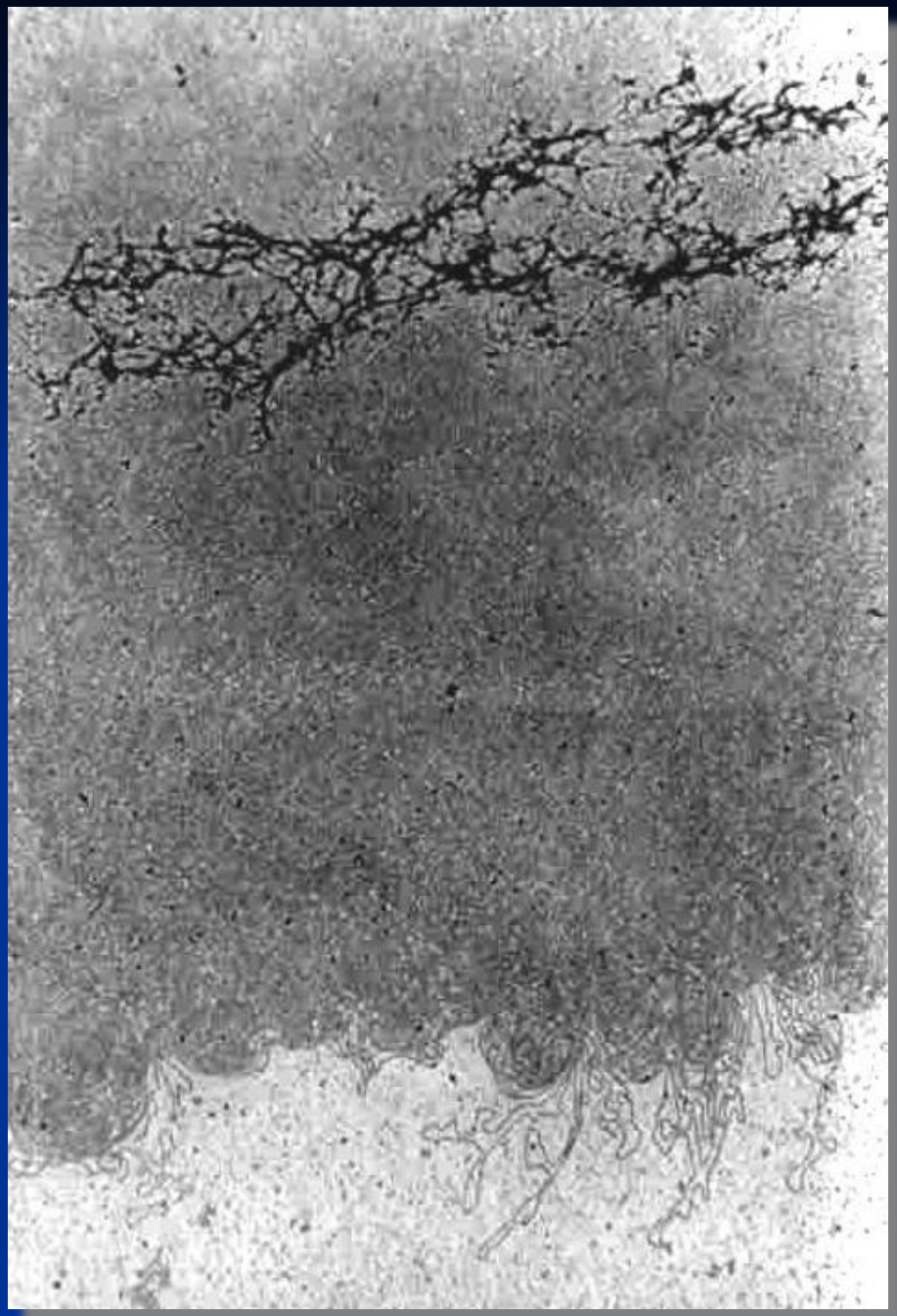


схема многостадийной упаковки молекулы ДНК в хромосому

Схема различных уровней компактизации хроматина.




2 nm
11 nm
30 nm
300 nm
700 nm
centromere
1400 nm



Упорядоченная организация хромосомы в трехмерном пространстве ядра необходима:

1. Для разделения хромосом в митозе.

2. Для упорядочения процессов репликации и транскрипции.

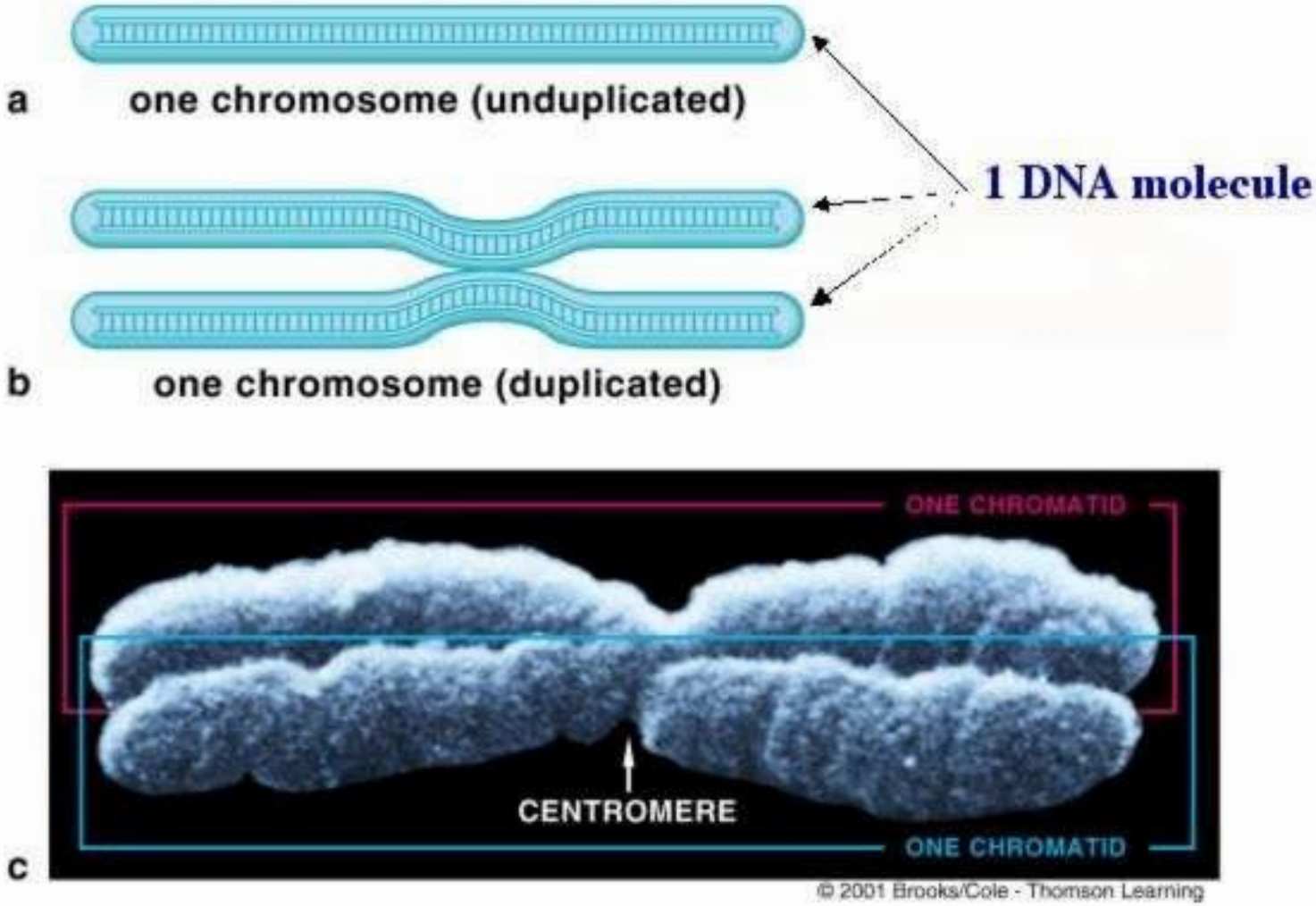
Четвертый уровень упаковки хроматина – хромонемный

Метафазная хромосома

- Метафазная хромосома. ДНК уже удвоена.

Хромосома состоит из двух хроматид. Каждая из них содержит одну молекулу ДНК.

Chromosomes are made of DNA molecules



© 2001 Brooks/Cole - Thomson Learning

Ядрышки

- обязательный компонент ядра, обнаруживаются в интерфазных ядрах и представляют собой мелкие тельца, шаровидной формы
- Синтез рРНК +белки =РНП рибонуклеопротеид рибосомы

Функции ядра

- **Хранение генетической информации** (репликация, репарация)
- **Реализация генетической информации** (транскрипция, трансляция)

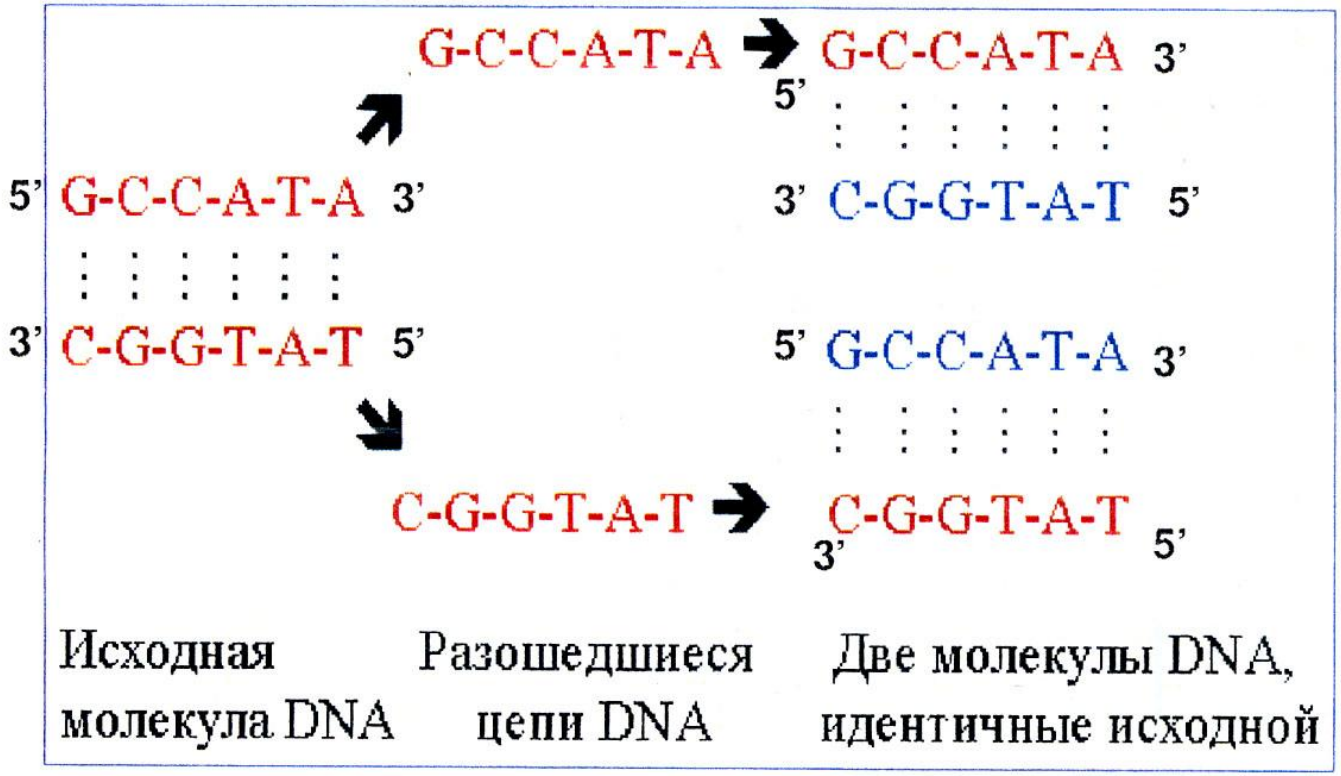
Репликация ДНК

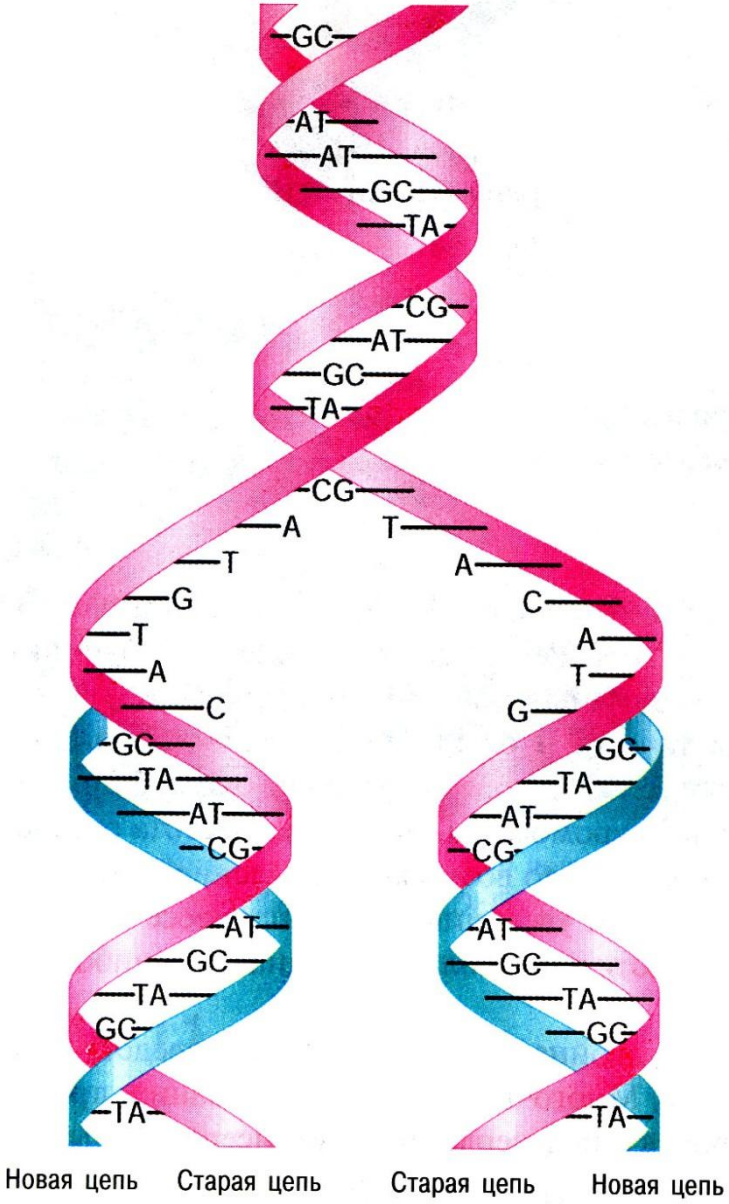
- Сложный многоступенчатый процесс, происходящий при участии большого количества ферментов.
- Происходит в S-период интерфазы.

- **Репликативная вилка** – это точка в которой разделяются цепи материнской ДНК.
- В отдельно взятый момент в ДНК расплетен только маленький участок.

Принципы репликации ДНК

1. Комплементарность
2. Антипараллельность
3. Полуконсервативность





Общая модель полуконсервативной репликации ДНК. Вновь синтезированные цепи выделены синим.

Репликация ДНК – процесс образования идентичных копий ДНК, осуществляемый комплексом ферментов и структурных белков

Репликация ДНК лежит в основе:

- воспроизведения генетической информации при размножении живых организмов
- передачи наследственных свойств из поколения в поколение
- развития многоклеточного организма из зиготы.

Общие принципы репликации ДНК применимы, с небольшими модификациями, ко всем организмам.

Различные ферменты и типы ферментативной активности, вовлеченные в биосинтез ДНК

Название фермента (белка)	Функция
Хеликаза	Функция раскручивания двойной спирали
SSB-белок	Белок, связывающийся с одно-цепочечной ДНК
Топоизомераза	Удаление супервитков спирали
ДНК-полимераза	Рост цепи ДНК за счет поликон-денсации дезоксирибонуклеозид трифосфатов
Праймаза	Синтез РНК-затравки (праймера)
5' → 3'' эндонуклеаза	Удаление РНК-затравки, репарация
3' → 5' эндонуклеаза	Исправление ошибок репликации
ДНК-лигаза одноцепочечного разрыва	Соединение 3'-OH и 5'-PO_4 концов
Эндонуклеаза	Репарация
Гликозилаза	Репарация

Общие свойства ДНК-полимераз

- Не способны расплетать ДНК-дуплекс – нуждаются в однонитевой матрице.
- Могут только удлинять предсуществующую нить ДНК или РНК, но не способны инициировать синтез - потребность в затравке (праймере).
- Однонаправленность (униполярность) синтеза: синтез каждой дочерней цепи ДНК происходит всегда в направлении 5'->3': нуклеотид добавляется к 3'-ОН концу растущей цепи.
- Однонитевая матрица считывается в направлении 3'->5'.

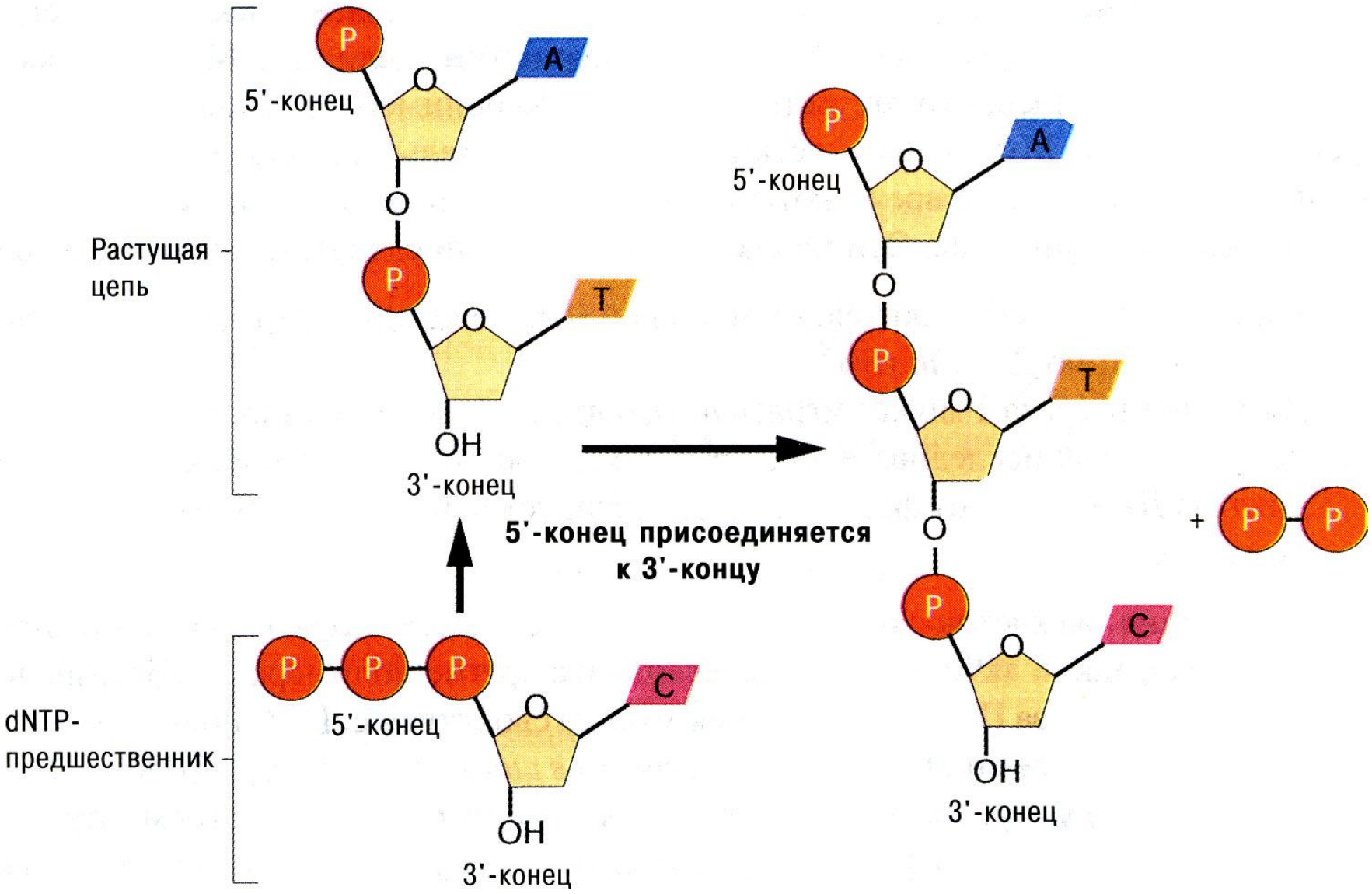
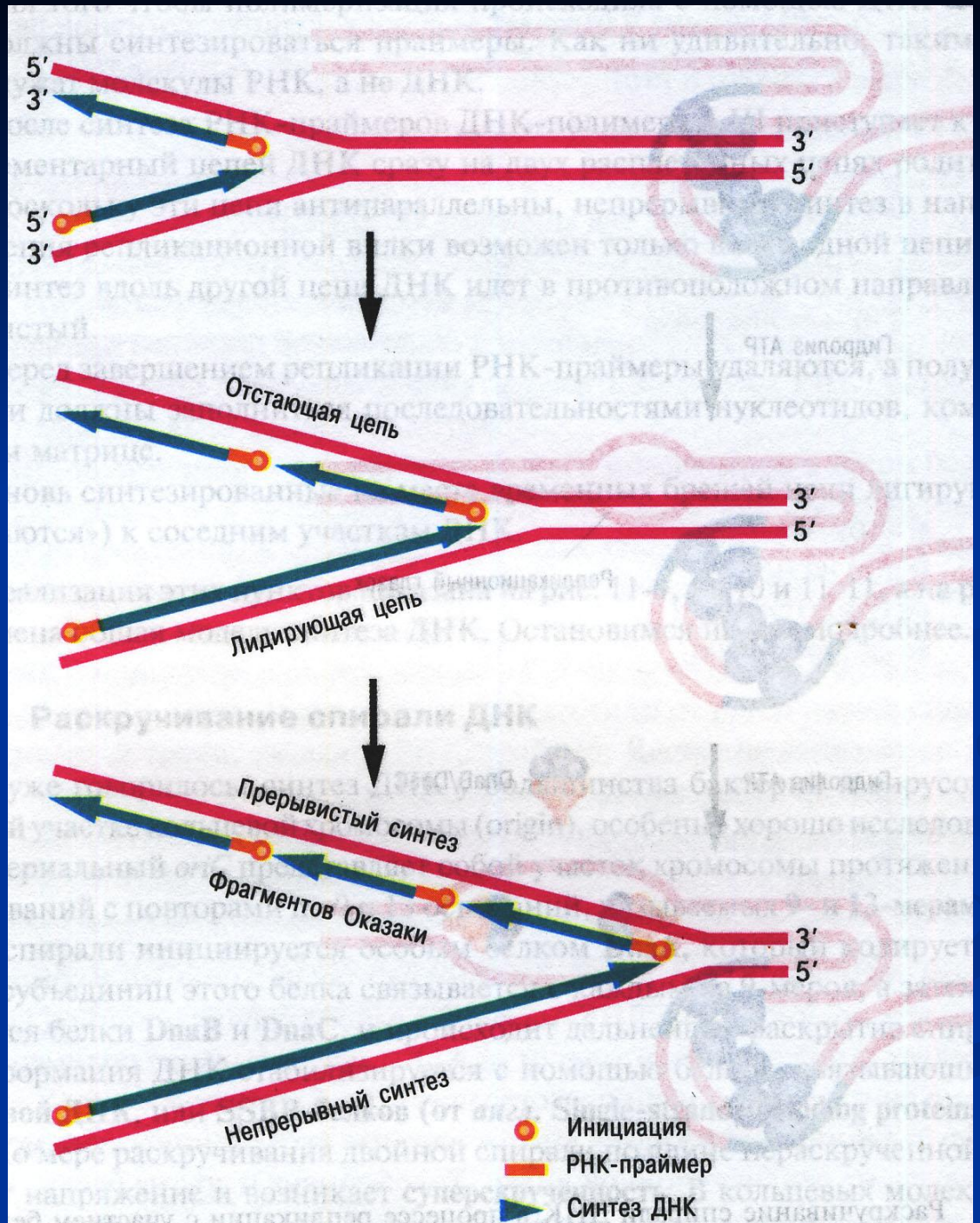


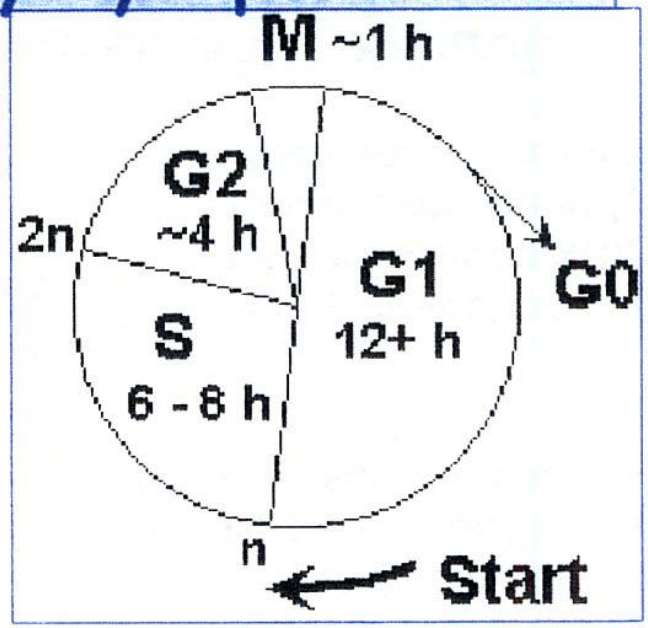
Рис. 11-8. Синтез ДНК в направлении от 5'- к 3'-концу.

Репликационная вилка


5′
3′
3′
5′
5′
3′
Отстающая цепь
3′
5′
Лидирующая цепь
Прерывистый синтез
Фрагментов Оказаки
3′
5′
Непрерывный синтез
Инициация
РНК-праймер
Синтез ДНК

Согласованность репликации и клеточного деления у эукариот

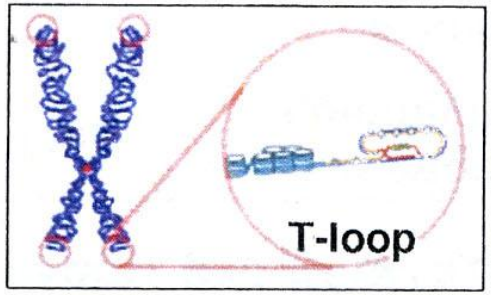
- Каждый репликон должен реплицироваться один – и только один - раз за клеточный цикл.
- Группы репликонов эукариот (т.н. репликационные единицы, содержащие 20-80 репликонов) инициируются и проходят репликацию упорядоченно, примерно в течение 1 час.
- Удвоение генома (репликация всей ДНК) происходит в S-фазе цикла, а разделение пополам – в митозе (М-фазе).

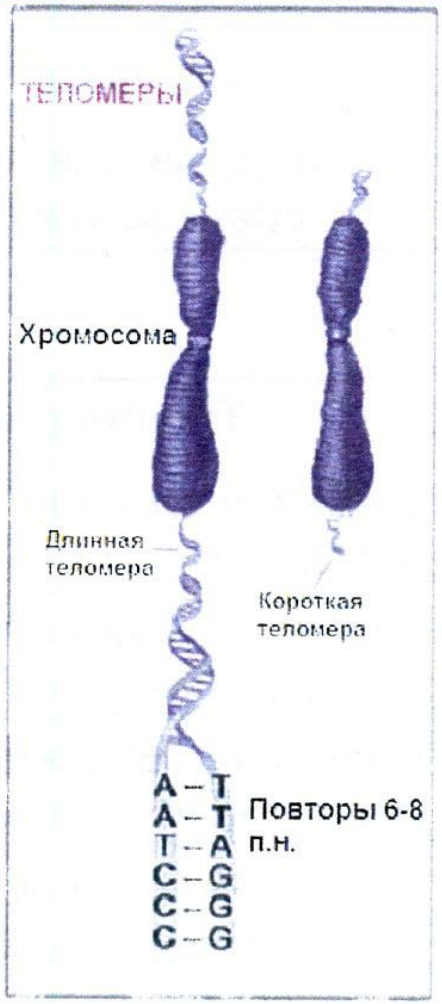


Контроль репликации ядерной ДНК

- Позитивный: переход G1/S;
- Негативный: переход - G2/M.

Проблема репликации теломер – концов эукариотических хромосом





- Репликация конца запаздывающей цепи не может пройти полностью: после удаления РНК-затравки ни одна ДНК-полимераза **не сможет восстановить ее 5'-конец**. В хромосоме остаются выступающие 3'- концы.
- В каждом цикле деления **теломеры клетки укорачиваются.** Этот феномен носит название концевой недорепликации и является одним из важнейших факторов биологического старения.
- Теломеры имеют особое строение: они содержат простые некодирующие **G-богатые повторяющиеся последовательности** из 6-8 п.о. с выступающим 3'-концом, способные сворачиваться с образованием петли (T-loop).

Репарация, или исправление повреждений в ДНК

- Репарация генетических повреждений - способность живых организмов восстанавливать повреждения, возникшие в ДНК уже после ее синтеза.
- От того, как клетки справляются с повреждениями, зависят такие кардинальные процессы, как появление наследственных болезней и раковых опухолей, старение.
- Ферментативные системы репарации по сложности приближаются к репликационному ферментативному аппарату.
- Системы репарации и репликации имеют много общих компонентов.
- Ферменты репарации исправляют ошибки, возникшие при репликации в уже синтезированной ДНК (первичный и редактирующий отбор допускают примерно 1 ошибку на 10^9 включенных в ДНК нуклеотидов).
- Ферменты репарации исправляют также ошибки, не зависящие от репликации.

Репарация повреждений одной цепи ДНК

Прямая реактивация повреждений

Эксцизионная репарация (excision – отсекание, вырезание):

- Вырезание основания (base excision repair)
- Вырезание нуклеотидов (nucleotide excision repair) (в случае повреждений, заметно нарушающих вторичную структуру).

При увеличении количества повреждений в ДНК блокируется деление клеток и происходит индукция дополнительных репаративных ресурсов клетки.

Индуцируемая репарация с исправлением ошибок:

- Например, индукция SOS–системы при УФ-облучении

Индуцируемая репарация с мутагенным эффектом.

- Именно она определяет мутагенный эффект УФ-облучения и химического мутагенеза: мутагенез – активный процесс.

Общие принципы репарации:

- чем серьезнее повреждение, тем большее количество ресурсов клетки привлекается на исправление ошибки;
- Принцип «меньшего из зол»: репарация ценой жертв, например, с мутагенным эффектом