

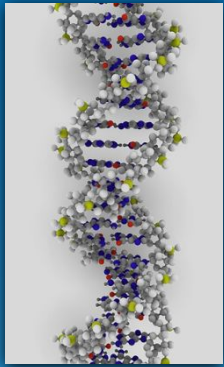
Структура наших ДНК – загадка жизни островка.
Нет дна и крыши, нет сторон,
Все это жизни вечной трон.
Все это Миг и Вдохновенье, нерукотворное круженье...

Лекция **16-17.**

Матричные биосинтезы

- Репликация
- Транскрипция
- Трансляция

Дисциплина: С.2.Б.4. Биохимия
Специальность: 060101 лечебное дело
НГМУ, кафедра медицинской химии
Д.б.н., доцент Суменкова Дина Валерьевна



История исследований в молекулярной биологии

Апрель 1953 г. - предложена модель пространственной структуры ДНК - двойная спираль (журнал "Nature" "Структура ДНК" Д. Уотсон и Ф. Крик)

В биологии начался новый отсчет времени – **развитие молекулярной биологии**

На этом пути сделаны серии блестящих открытий, большинство из которых отмечены Нобелевскими премиями

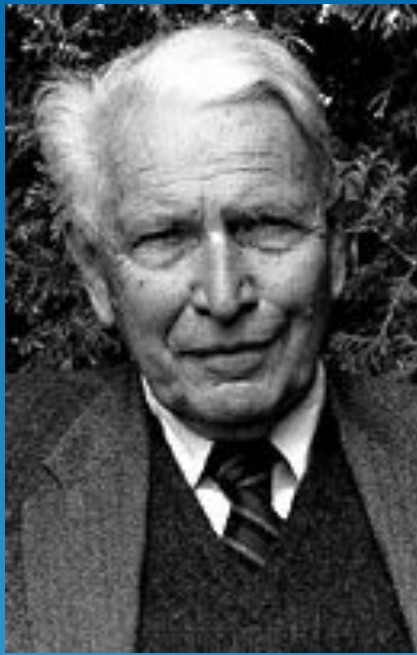
Джеймс Уотсон (р. 1928) Френсис Крик (1916-2004)



1952 г
работа над моделированием ДНК

Основа: правило Чаргаффа
и рентгенограммы Р. Франклин
и М. Уилкинса

1953 г – публикация результатов
1962 г – Нобелевская премия



Е. Чаргафф

*"...выдающийся харизматический символ
нашего времени - спиральная лестница,
ведущая, я надеюсь, в небеса, - была
разрекламирована с поистине выдающейся
интенсивностью. Она использовалась как
эмблема, ее рисовали на галстуках, она
украшала фирменные бланки, ее
устанавливали перед зданиями.... Она даже
вторглась в высокие формы изящного
искусства" .*

Апрель 2013 г – 60 лет с момента открытия структуры ДНК
**Какова роль молекулярной биологии в развитии
современной медицины?**

Актуальность темы лекции:

открытия молекулярной биологии играют важную роль в развитии современной медицины

Использование ДНК-технологий

- выявление мутаций генов
- выявление наследственных заболеваний
- определение особенностей генома
- установление родства
- диагностика бактериальных и вирусных заболеваний
- производство рекомбинантных белков, гормонов....
- производство лекарственных препаратов – ингибиторов матричных биосинтезов в опухолевых и бактериальных клетках
- расшифровка генома человека (международный проект под рук. Д. Уотсона, 1990-2003 г) с целью ранней диагностики и лечения заболеваний

Генная и клеточная терапия – «небеса», к которым привела спиральная лестница ДНК

Генная терапия – лечение путем введения в клетки пациентов генов, устраняющих генные дефекты или придающие им новые функции

Первый клинический опыт

1990 г, США, 4-х летняя девочка с иммунодефицитным состоянием

Причина заболевания:

мутация гена аденозиндезаминазы → нарушение обмена нуклеотидов → нарушение пролиферации и созревания лимфоцитов

Лечение: пересадка собственных лимфоцитов с предварительно введенным *in vitro* ретровирусом, содержащим нормальный ген фермента

Клеточная терапия

Терапия с использованием стволовых клеток

С помощью определенных генов можно перепрограммировать клетку и изменить путь ее дифференцировки

Разработана технология получения плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов кожи человека с помощью генов Мус, Oct3/4, Sox2, Klf4 и их дальнейшая дифференцировка в кардиомиоциты

(Шинья Яманака, Япония, Нобелевская премия 2012)

Цель лекции

- Знать:
 - строение и функции нуклеиновых кислот
 - химико-биологическую сущность процессов репликации, транскрипции, трансляции
- Использовать знания о матричных биосинтезах для понимания химико-биологической сущности
 - процессов роста и развития организма
 - механизмов устойчивости организма к воздействиям внешней среды
 - механизмов действия противоопухолевых и антибактериальных препаратов
- Использовать знания о матричных биосинтезах для формирования представлений
 - о принципах ДНК-технологий в диагностике и терапии
 - о механизме действия некоторых ядов и бактериальных токсинов
 - о генетических аспектах полиморфизма генов и белков, наследственных заболеваний и канцерогенеза

План лекции

- 1. Строение и функции ДНК и РНК (повторение курса химии)
- 2. Репликация и репарация
- 3. Транскрипция
- 4. Трансляция

Строение нуклеиновых кислот

Функция: хранение, передача, реализация наследственной информации

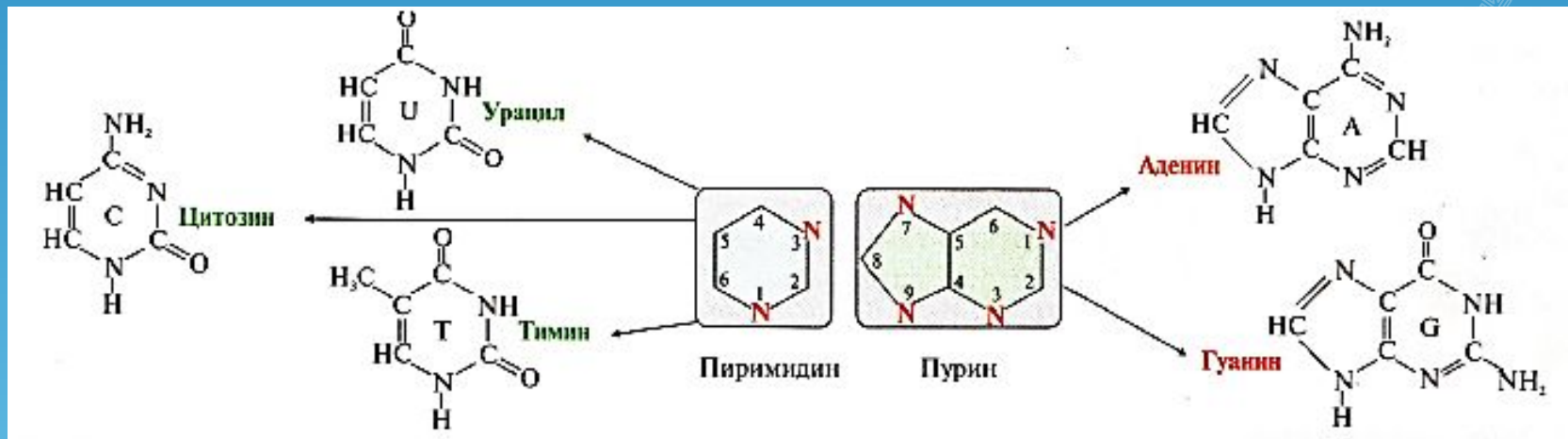
Нуклеиновые кислоты (НК) - биополимеры

Мономер – нуклеотиды

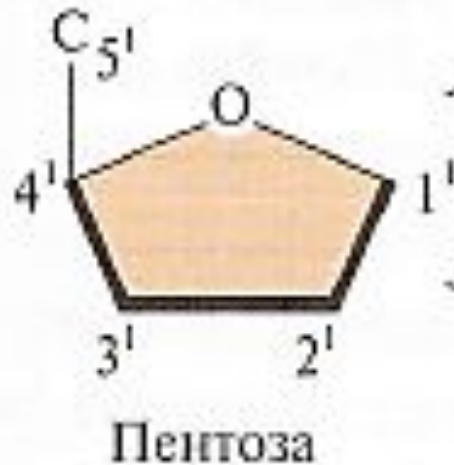
Строение нуклеотида:

азотистое основание + пентоза + остаток фосфорной кислоты

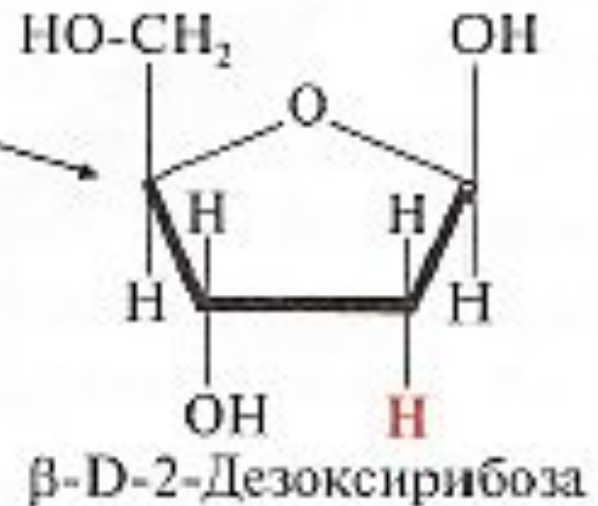
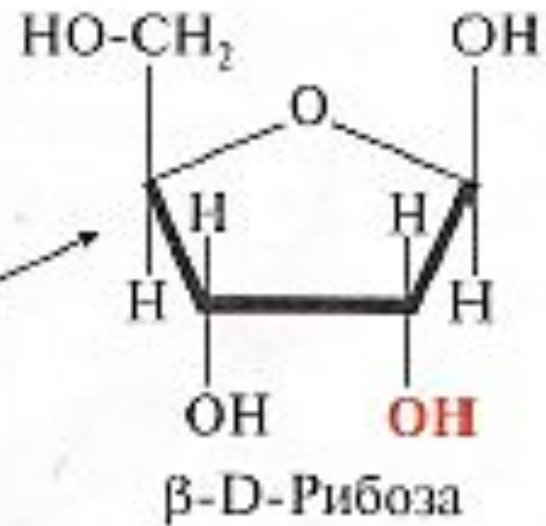
Азотистые основания (АО)

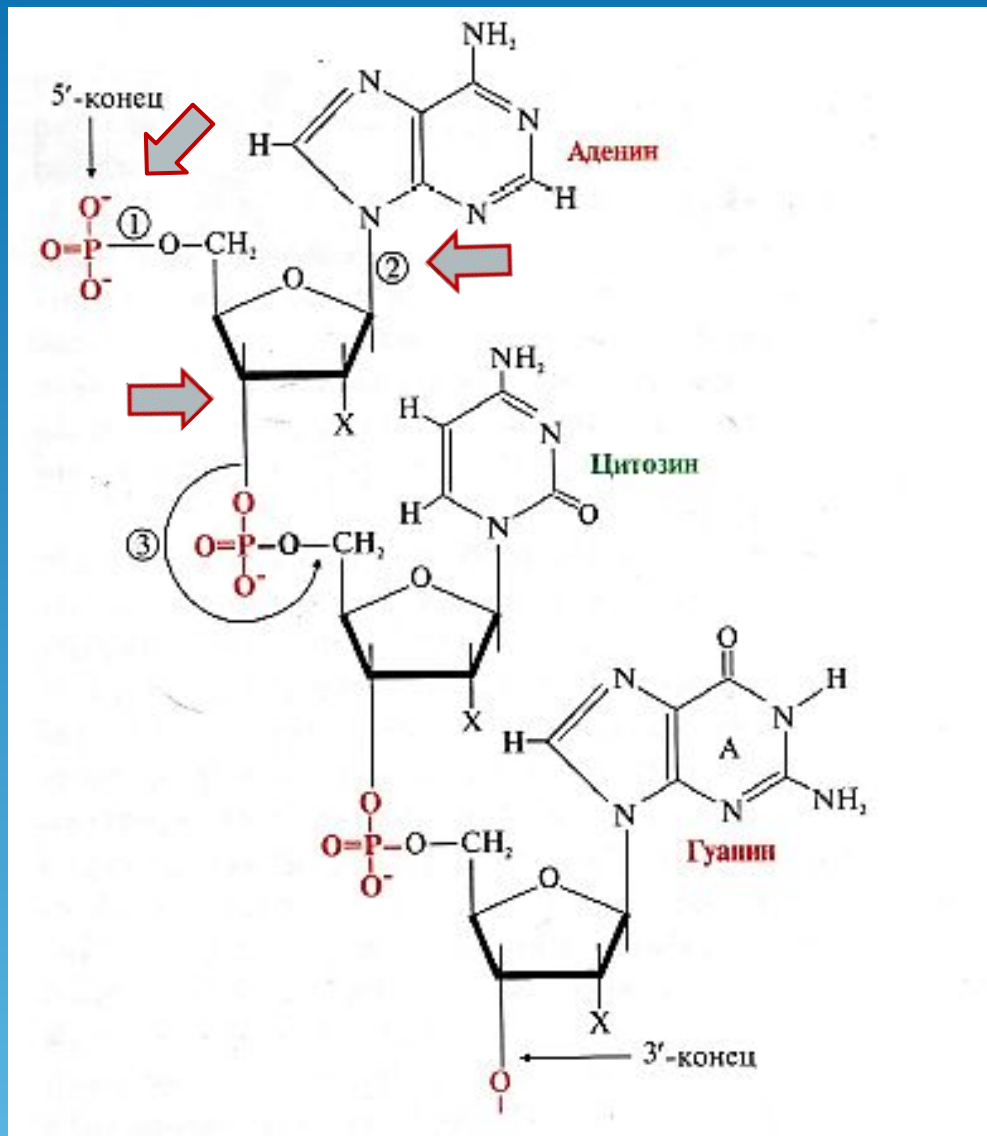


Пентозы в структуре нуклеиновых кислот



Два вида





Первичная структура НК:
последовательность
нуклеотидов

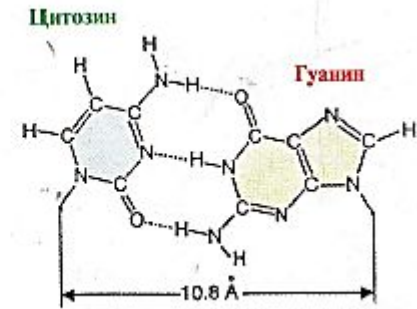
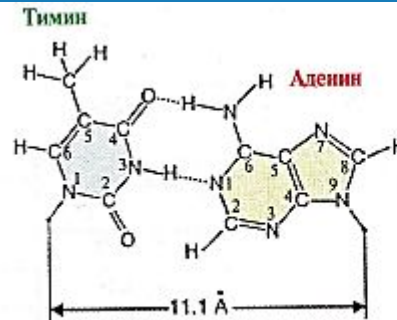
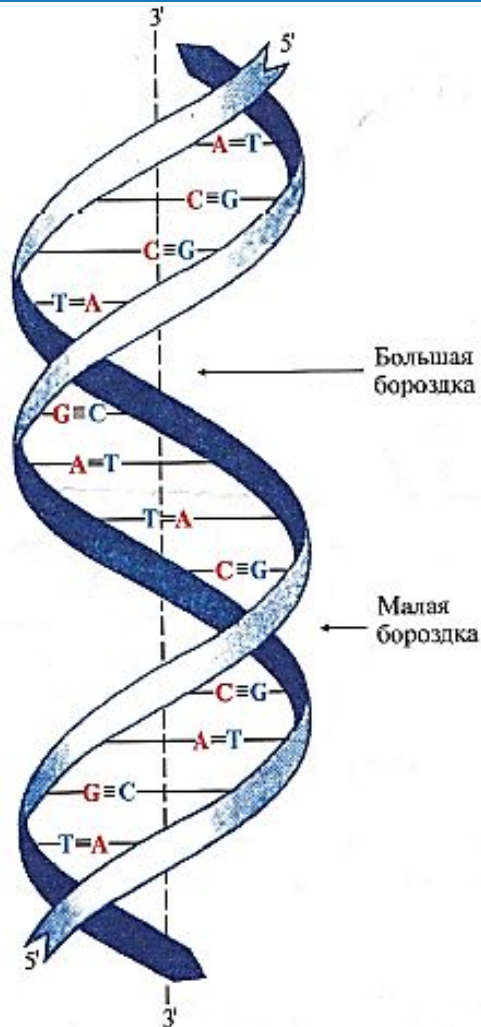
Химические связи:

- 1 - 5'-фосфоэфирная
- 2 - N-гликозидная
- 3 - 3',5' - фосфодиэфирная

Условные обозначения:

X – водород в ДНК
или -ОН в РНК

Вторичная структура ДНК: двойная спираль



- **Правозакрученная спираль**
(виток = 10 н.п.)
- **Цепи антипараллельны:** 5'→3' и 3'→5'
- **Водородные связи** между АО цепей
- **Стэкинг-взаимодействия**
(гидрофобные) между АО «в стопке»
- **Комплементарность цепей** (А-Т, Г-Ц)
- **Правило Чаргаффа:** А=Т, Г=Ц,
А+Т / С+Г – характеристика вида

Третичная структура ДНК: нуклеопротеидные комплексы (хромосомы)

- **Гистоновые белки:** белки с высоким содержанием лиз и арг
- 5 типов: H1, H2A, H2B, H3, H4
- **Негистоновые белки:** белки и ферменты, участвующие в матричных биосинтезах
- **Роль белков:** обеспечивают суперспирализацию и компактизацию ДНК

Нуклеосома

ДНК (≈ 146 н.п.) + 8 молекул гистонов (H2A, H2B, H3, H4)₂

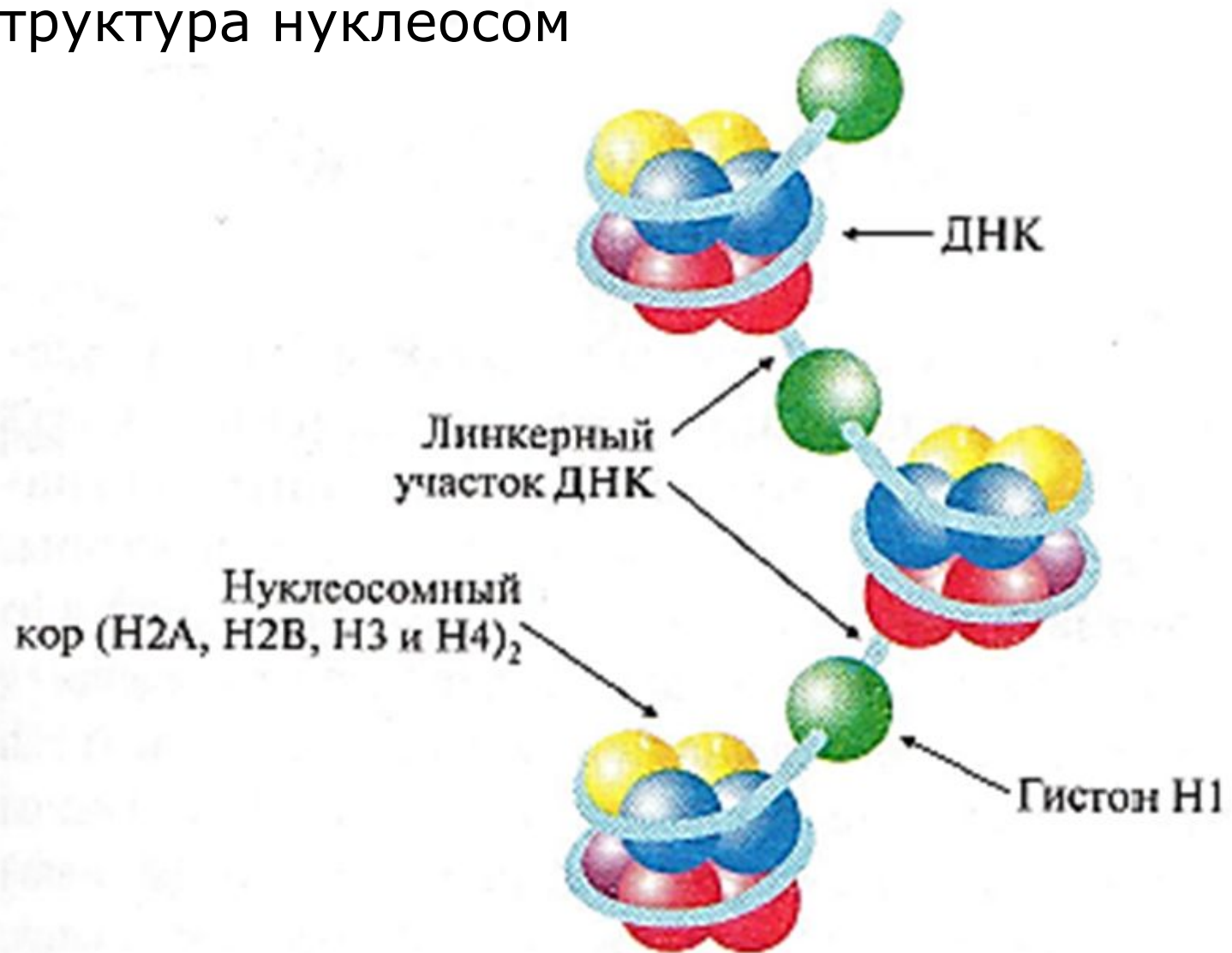
Структура удерживается ионными связями между лиз, арг и остатками фосфорной кислоты

Линкерные участки

Участок ДНК (≈ 30 н.п.) между нуклеосомами, с которым связаны молекулы гистона H1

Гетерохроматин – «компактный» хроматин, транскрипционно неактивный
Эухроматин – деспирализованный хроматин с низким содержанием гистонов и высоким содержанием негистоновых белков (период транскрипции)

Структура нуклеосом



Пространственная структура РНК

- Одноцепочечная
- Шпильки – спирализованные участки (водородные связи)
- Не соблюдается правило Чаргаффа

• Виды РНК:

◆ мРНК

- матрица в синтезе белка
- 2-4% от общего количества РНК, разнообразная первичная структура
- 5' - «кэп»-конец: 7-метил ГТФ (защита от нуклеаз, участие в инициации трансляции)
- 3' - поли(А)-«хвост»: 150-200 остатков АМФ (выход из ядра, защита от нуклеаз)

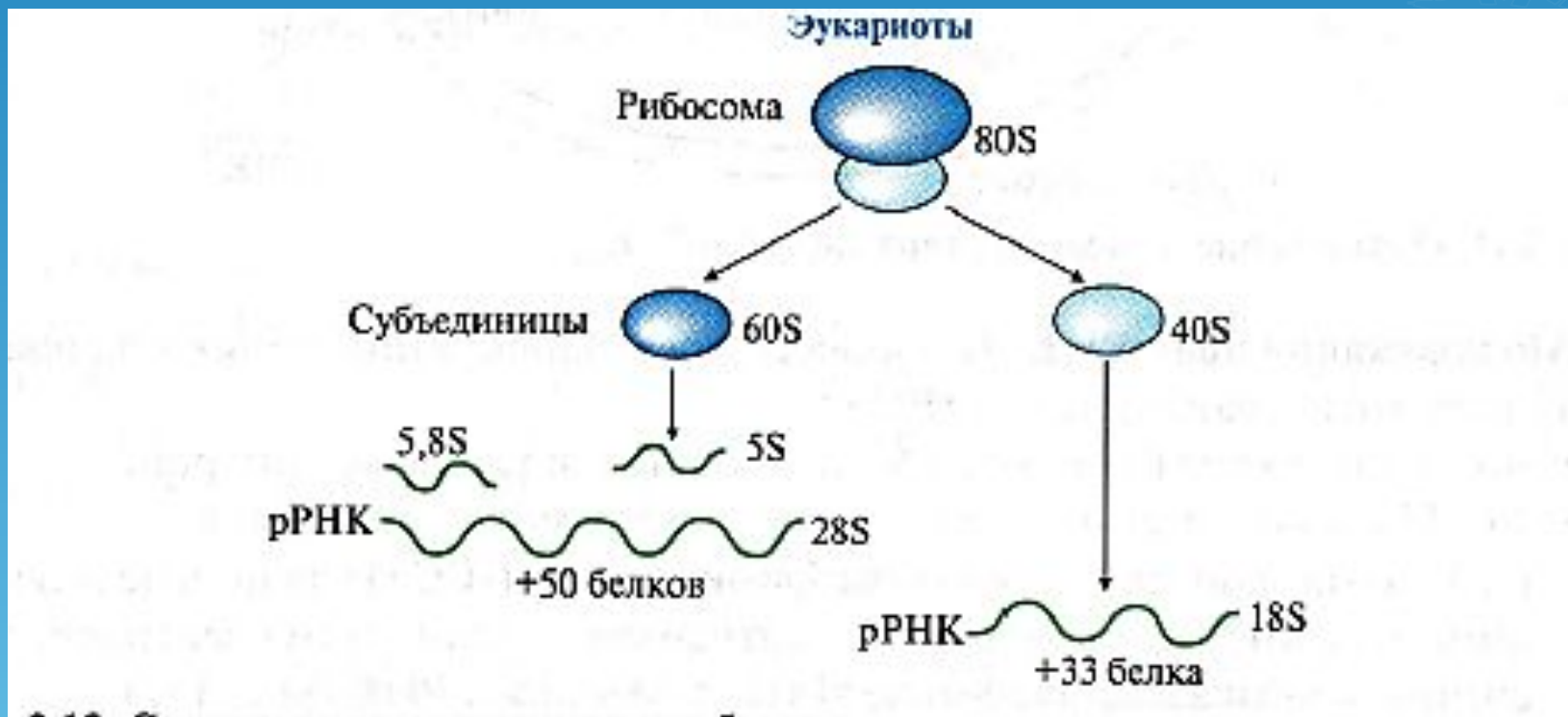
❖ тРНК

- молекулы-адапторы: переводят информацию мРНК в последовательность аминокислот в белке
- 15%
- содержат минорные нуклеотиды (например, метилированные АО)



❖ рРНК

- структурный компонент рибосом
 - 80% от общего количества РНК в клетке
 - 4 типа у эукариот: 5S, 5,8S, 18S, 28S
- S – единица Сведберга,
скорость осаждения при центрифигировании



РЕПЛИКАЦИЯ: синтез ДНК

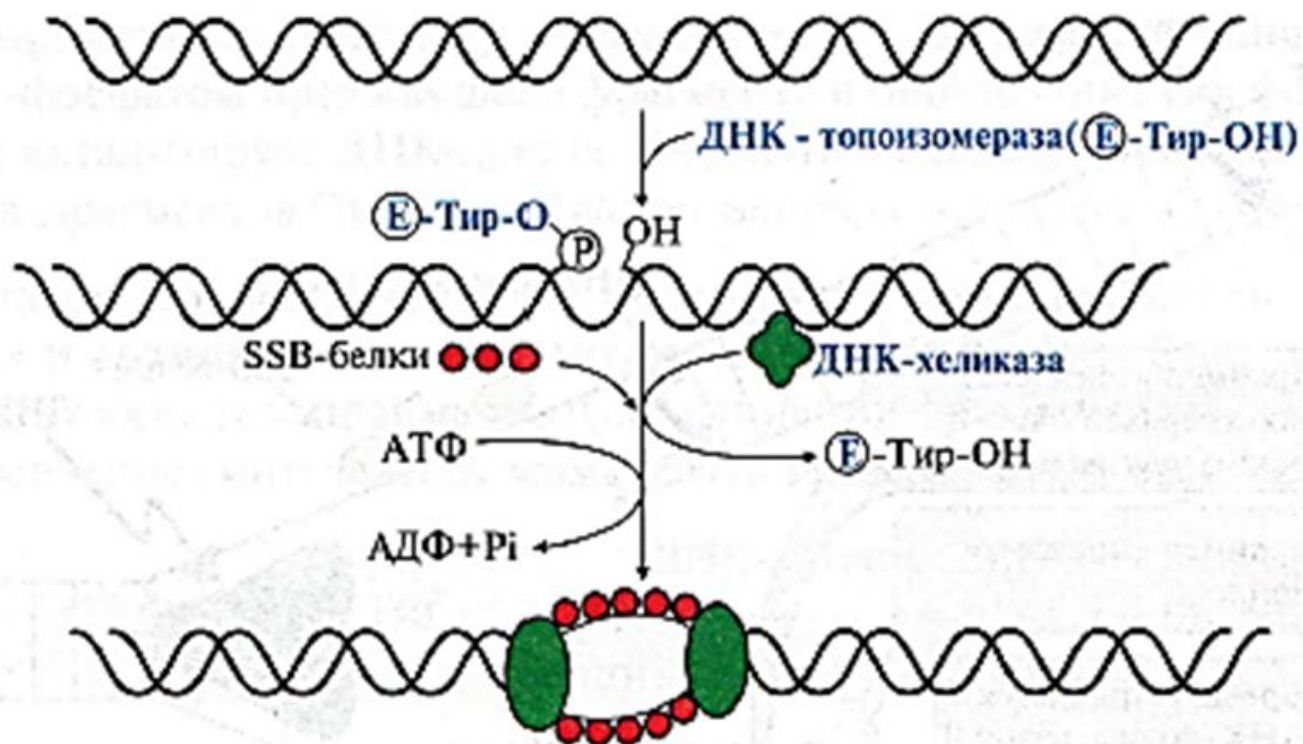
- Протекает **в ядре** в S-фазу клеточного цикла перед митозом
- Стимулы: гормоны, ростовые факторы, белки-циклины
- **Матрица:** обе нити ДНК, образуются **2 репликативные вилки**
- **Направление синтеза** новых цепей: 5' - 3' **по принципу комплиментарности и антипараллельности**
- Участки синтеза – *ориджины репликации*
- Участок ДНК между соседними ориджинами - *репликон*
- Этапы репликации: инициация, элонгация, терминация
- **Субстраты и источники энергии:** дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ
- Кофактор: Mg^{2+}
- Полуконсервативный процесс синтеза: каждая дочерняя молекула ДНК содержит одну родительскую нить и одну синтезированную
- **Образуется идентичная молекула ДНК** (клетка $4n$)

1 этап репликации: инициация

Формирование репликативной вилки:

1. **ДНК-топоизомераза** гидролизует 3',5'-фосфодиэфирную связь в одной из цепей ДНК и присоединяется к 5'-концу в точке разрыва
2. **ДНК-хеликаза**, используя энергию АТФ, разрывает водородные связи и обеспечивает локальное разделение двойной спирали ДНК
 - **ДНК-топоизомераза** восстанавливает 3',5'-фосфодиэфирную связь и отделяется
 - **SSB (single strand binding)–белки** связываются с одноцепочечными участками, препятствуя комплементарному скручиванию цепей

Схема инициации репликации



2 этап репликации: элонгация

Синтез новых цепей ДНК

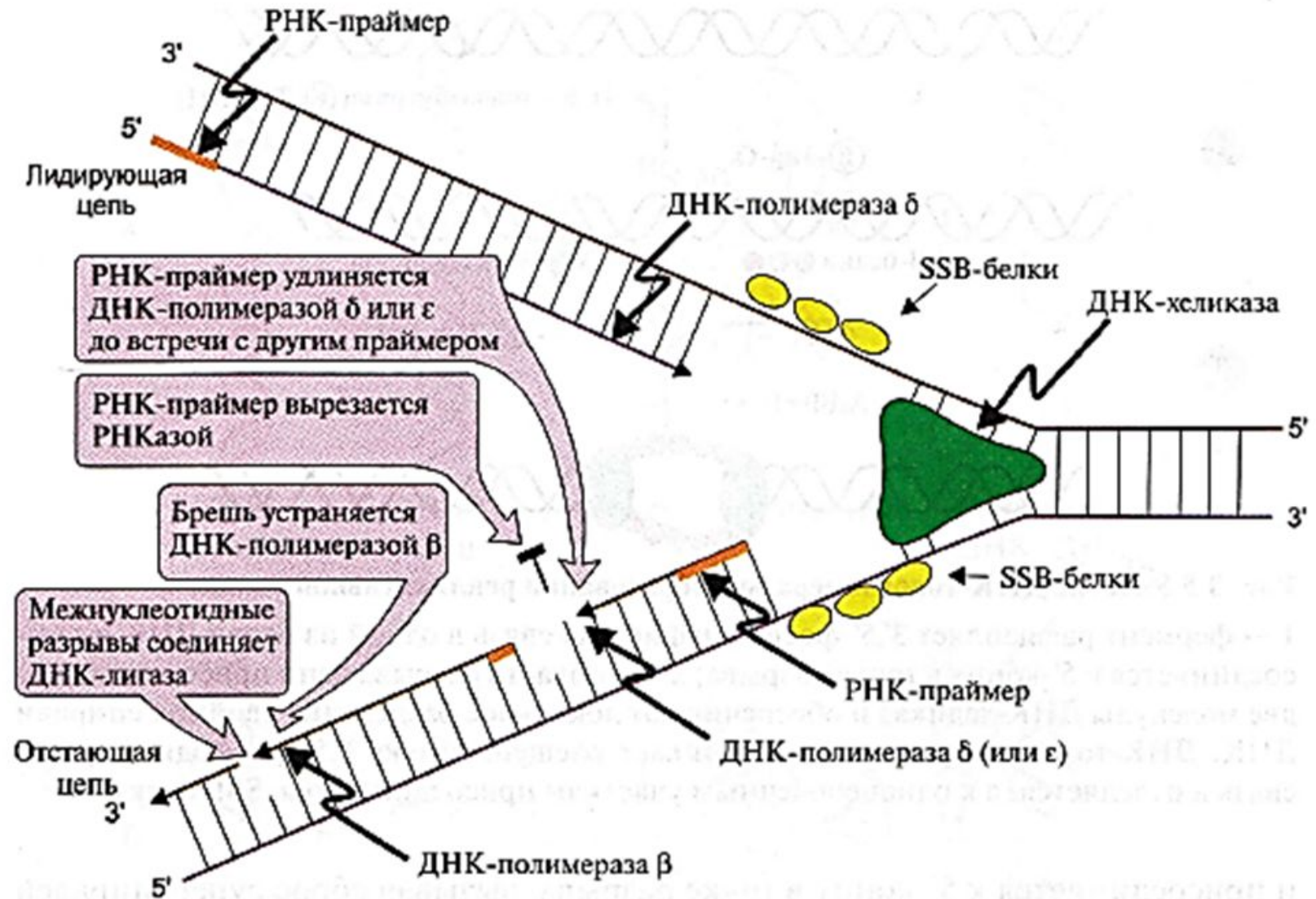
- Лидирующая цепь: 3' - 5' (синтез непрерывный по ходу движения репликативной вилки)
 - Отстающая цепь: 5' - 3' (рост этой цепи начинается после того, как на лидирующей цепи синтезируется участок из ≈ 200 нуклеотидов, синтез идет против движения репликативной вилки в виде фрагментов Оказаки)
 - Синтез цепей начинается с образования «затравки» (РНК-праймера из ≈ 10 нуклеотидов)
- ❑ **Ферменты:**
- ✓ **ДНК-полимераза α** синтезирует РНК-праймер и небольшой участок ДНК
 - ✓ **ДНК-полимераза δ** удлиняет лидирующую цепь
 - ✓ **ДНК-полимераза δ или ε** удлиняют отстающую цепь

3 этап репликации: терминация

Исключение праймеров Завершение формирования отстающей цепи ДНК

- **Эндонуклеаза (РНКаза)** удаляет РНК-праймер
- **ДНК-полимераза β** заполняет «брешь»
- **ДНК-лигаза** объединяет фрагменты, затрачивая энергию АТФ

Схема репликативной вилки



Репарация ошибок и повреждений ДНК

□ Причина повреждений ДНК:

действие факторов окружающей и внутренней среды

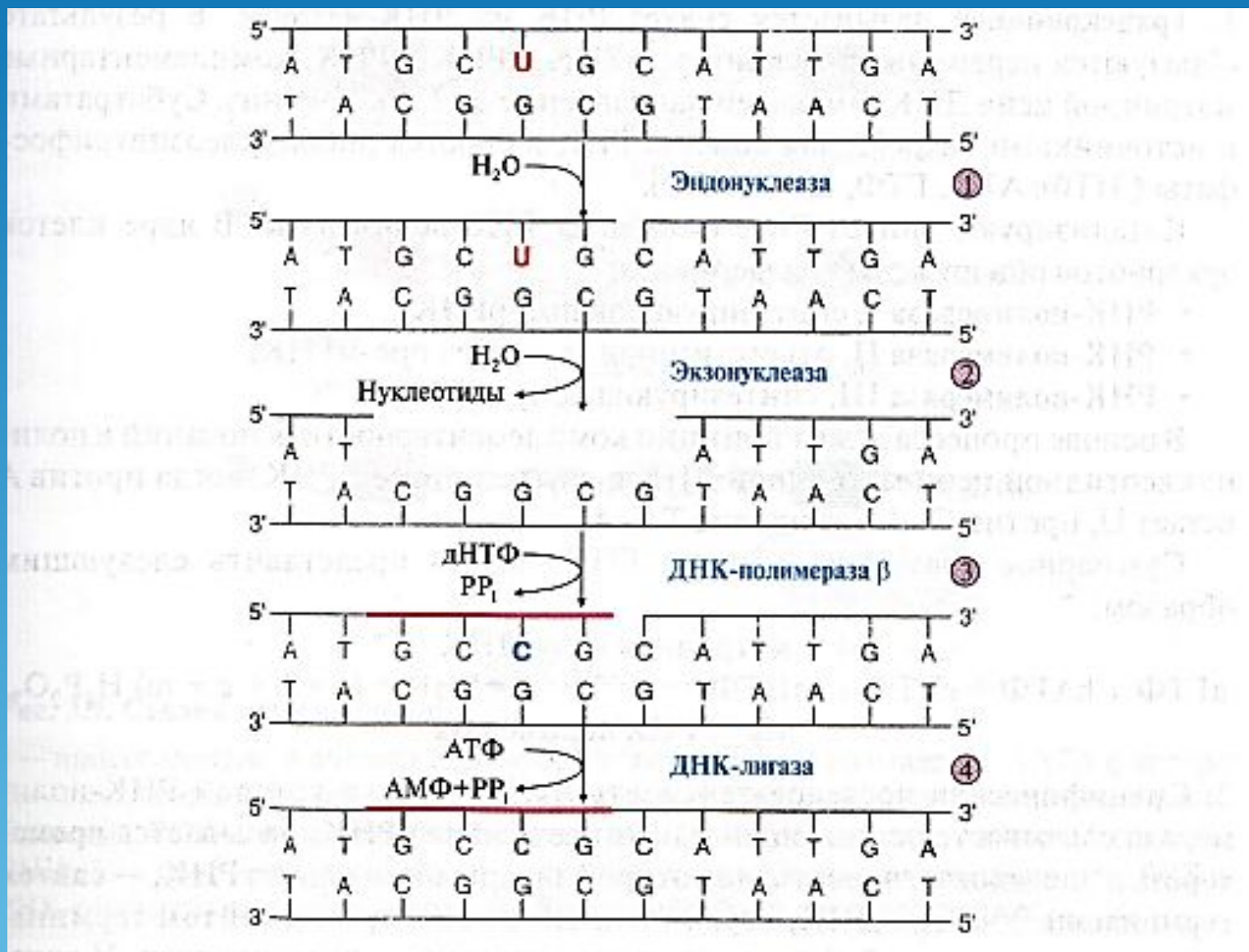
- Повреждение ДНК происходит с частотой от нескольких сотен до 1000 случаев в каждой клетке, каждый час

□ Виды повреждений:

- дезаминирование АО (цитозин превращается в урацил), метилирование АО
- депуринизация, депиримидинизация
- образование пиримидиновых димеров (действие УФО)
- разрыв цепей, ковалентные сшивки между цепями
- ошибки репликации

Система репарации – ферменты (нуклеазы, полимеразы, лигазы)

Схема работы системы репарации ДНК



Роль системы репарации

Репарация необходима для сохранения генома и возможна благодаря существованию 2-х цепей ДНК

Снижение активности ферментов репарации приводит к накоплению мутаций

Полагают, что от 80 % до 90 % всех раковых заболеваний связаны с нарушением репарации ДНК

ПРИМЕР: пигментная ксеродерма – наследственное заболевание, связанное с мутацией генов системы репарации ДНК; УФО таких больных приводит к накоплению мутаций в клетках кожи и развитию рака

ТРАНСКРИПЦИЯ: синтез РНК

- Протекает **в ядре** вне зависимости от фаз клеточного цикла
- **Матрица:** нить ДНК 3' - 5'
- **Субстраты и источники энергии:** АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ
- **Направление синтеза:** 5' - 3' по принципу комплиментарности и антипараллельности
- Этапы: инициация, элонгация, терминация
- Участвуют факторы инициации, элонгации и терминации
- **Образуются комплиментарные матрице продукты:** мРНК, тРНК, рРНК
- **Ферменты:**
 - РНК-полимераза I (синтез пре-рРНК)
 - РНК-полимераза II (синтез пре-мРНК)
 - РНК-полимераза III (синтез пре-тРНК)

1 этап транскрипции: инициация

- Промотор – последовательность ДНК (ТАТА), с которой связывается РНК-полимераза
 - Сайт терминации – участок завершения синтеза РНК
 - Транскриптон – участок ДНК ограниченный промотором и сайтом терминации
1. «Активация» промотора с помощью ТАТА-фактора
 2. Взаимодействие промотора с РНК-полимеразой и факторами инициации

Факторы инициации обеспечивают расплетение двойной нити ДНК длиной в один виток (10 н.п.)

2 этап транскрипции: элонгация и терминация

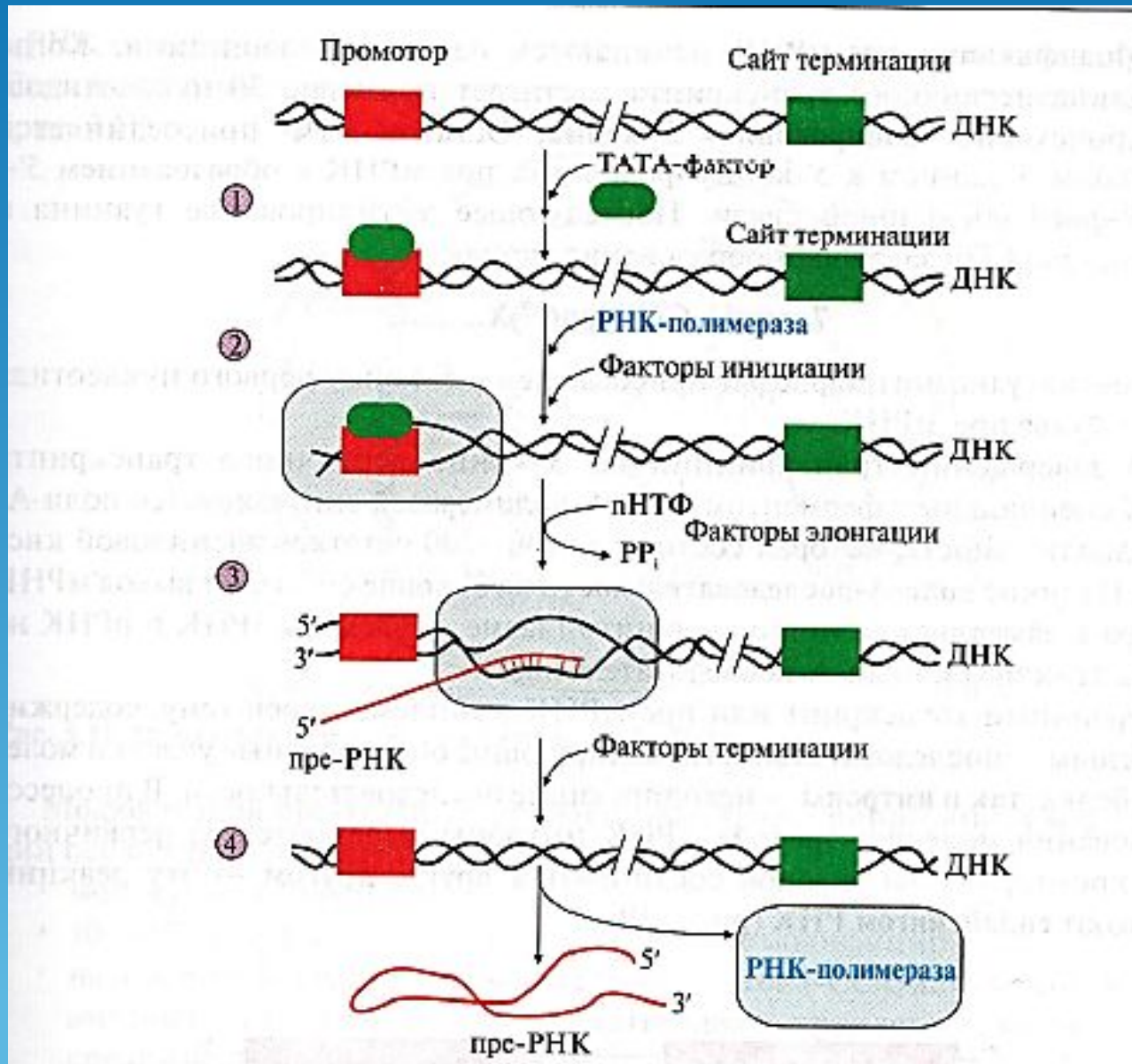
□ Элонгация: рост нити пре-РНК

Факторы элонгации (Е, Н, F) повышают активность РНК-полимеразы и облегчают расхождение цепей. Один ген может одновременно транскрибироваться несколькими молекулами РНК-полимеразы

□ Терминация: прекращение транскрипции

Факторы терминации облегчают отделение пре-РНК и РНК-полимеразы от матрицы ДНК

Схема транскрипции



Посттранскрипционные модификации пре-РНК

«Созревание» пре-мРНК

- «Кэпирование» на стадии элонгации
- Образование поли(А)- «хвоста» после транскрипции
- Сплайсинг – удаление интронов (некодирующих последовательностей) и соединение экзонов

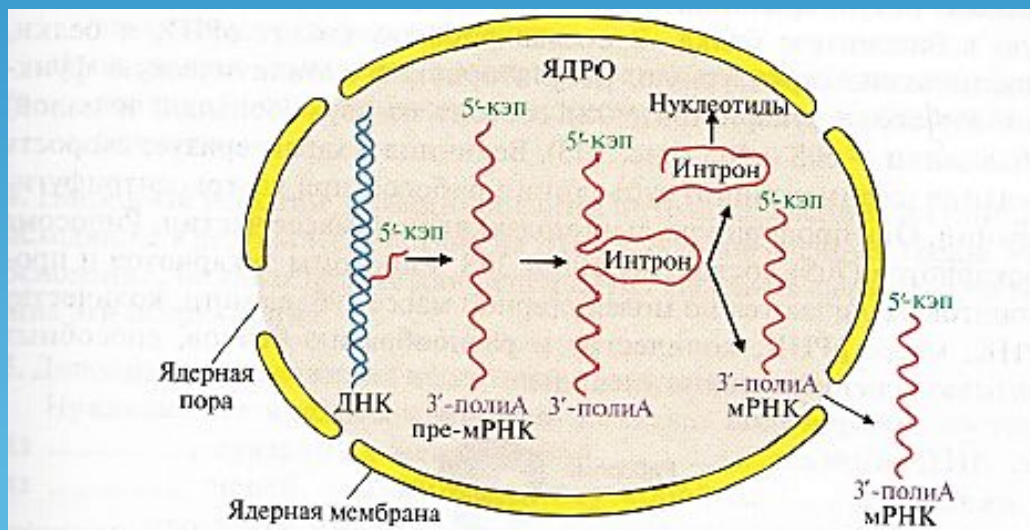
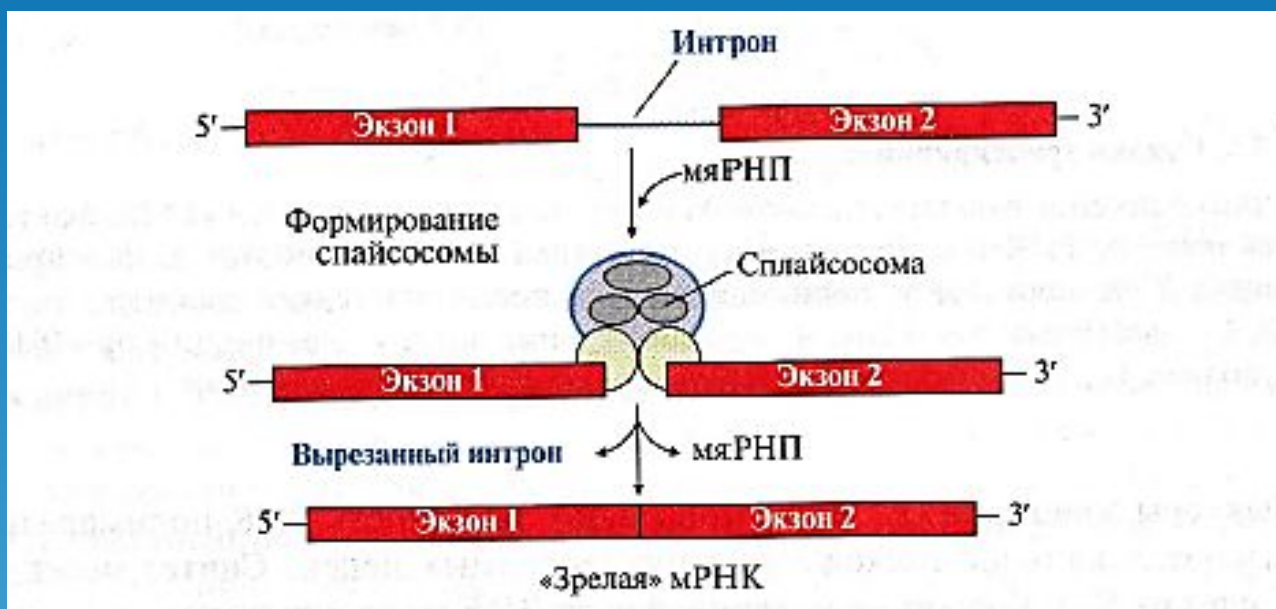
Участвуют малые ядерные рибонуклеопротеины (мяРНП), образующие комплексы – **сплайсосомы**

- Выход «зрелой» мРНК в цитоплазму

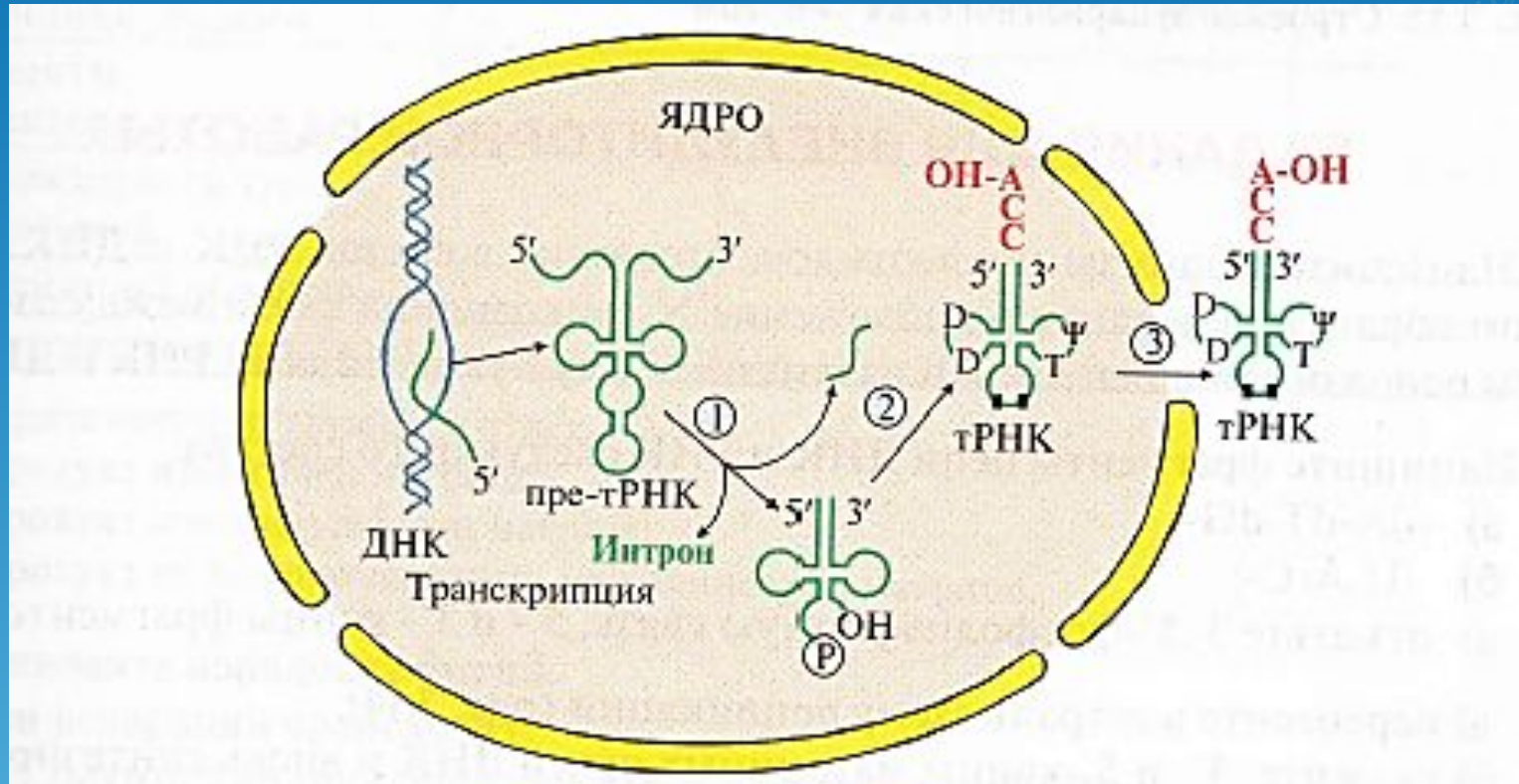
Альтернативный сплайсинг – механизм образования различных видов «зрелой» мРНК из одной и той же молекулы пре-мРНК в разных тканях

В результате в разных тканях при считывании информации с одного и того же гена образуются различные мРНК, а соответственно и различные белки

Схема «созревания» пре-мРНК



«Созревание» пре-тРНК



1. Удаление интронов
2. Модификация азотистых оснований (10-15%)
Формирование акцепторного участка и антикодона
3. Выход зрелых тРНК в цитоплазму



ТРАНСЛЯЦИЯ: синтез белка

- **Место синтеза:** рибосомы **Матрица:** мРНК
- **Субстраты:** аминокислоты (АК) Адапторы: тРНК
- **Источники энергии:** АТФ, ГТФ
- Кофактор: Mg^{2+} (стабилизирует структуру рибосом)
- Факторы инициации (IF), элонгации (EF), терминации (RF)
- **Активация АК:** связывание с тРНК (аминоацил-тРНК-синтетазы)
- **Иницирующая аминоксил-тРНК (аа-тРНК):** мет-тРНК
- **Иницирующий кодон мРНК:** AUG
- Этапы: инициации, элонгации, терминации
- **Образуется коллинеарный матрице продукт** – белок
(последовательность АК соответствует последовательности кодонов мРНК)
- **Биологический код:** запись информации о последовательности АК в белке с помощью последовательности нуклеотидов

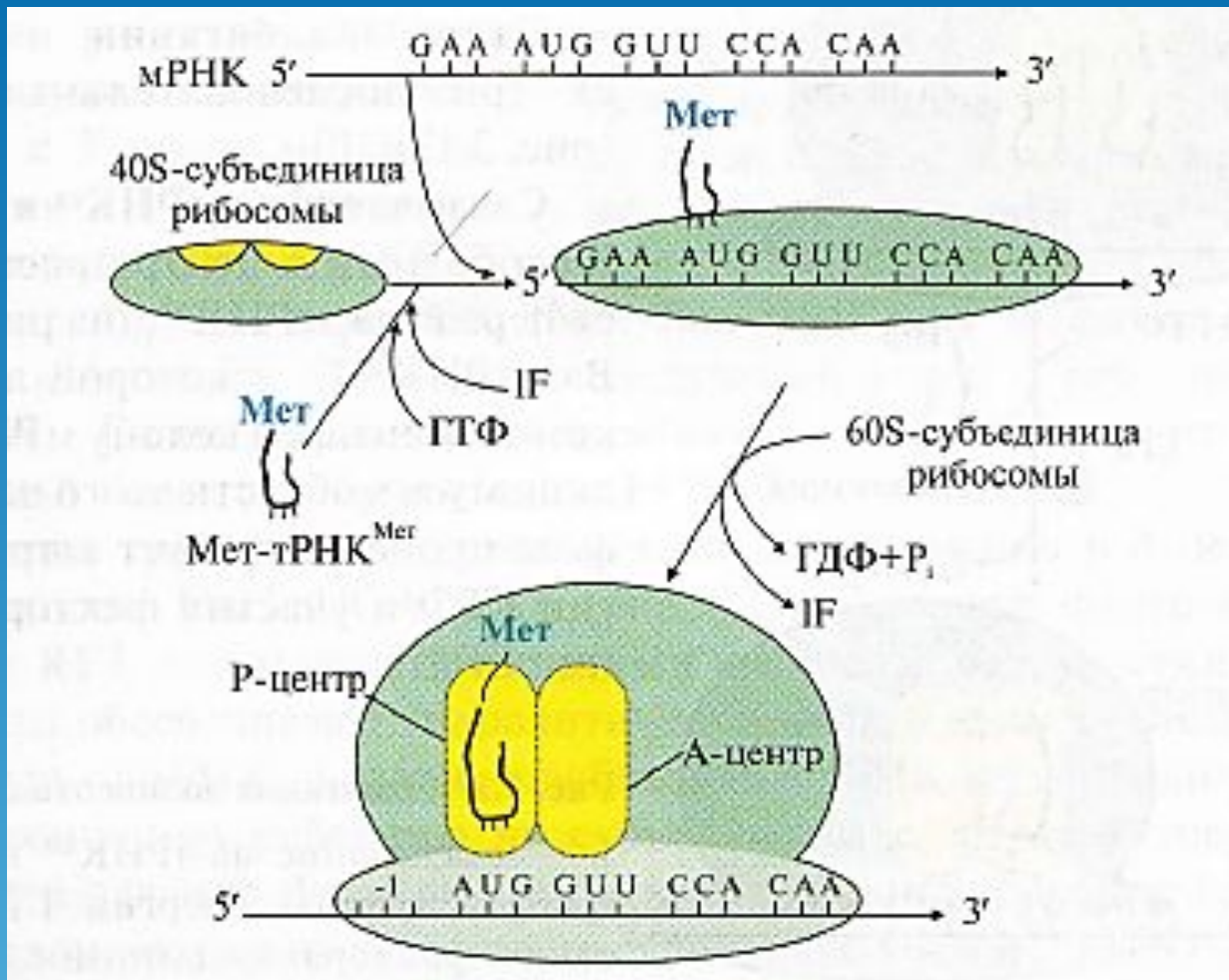
Из школьного курса биологии вспомните и объясните свойства биологического кода!

Свойства биологического кода

- Триплетность
- Наличие терминирующих кодонов (UAA, UAG, UGA)
- Специфичность
- Вырожденность
- Универсальность
- Однонаправленность
- Колинеарность

Активация аминокислот





1 этап трансляции: инициация

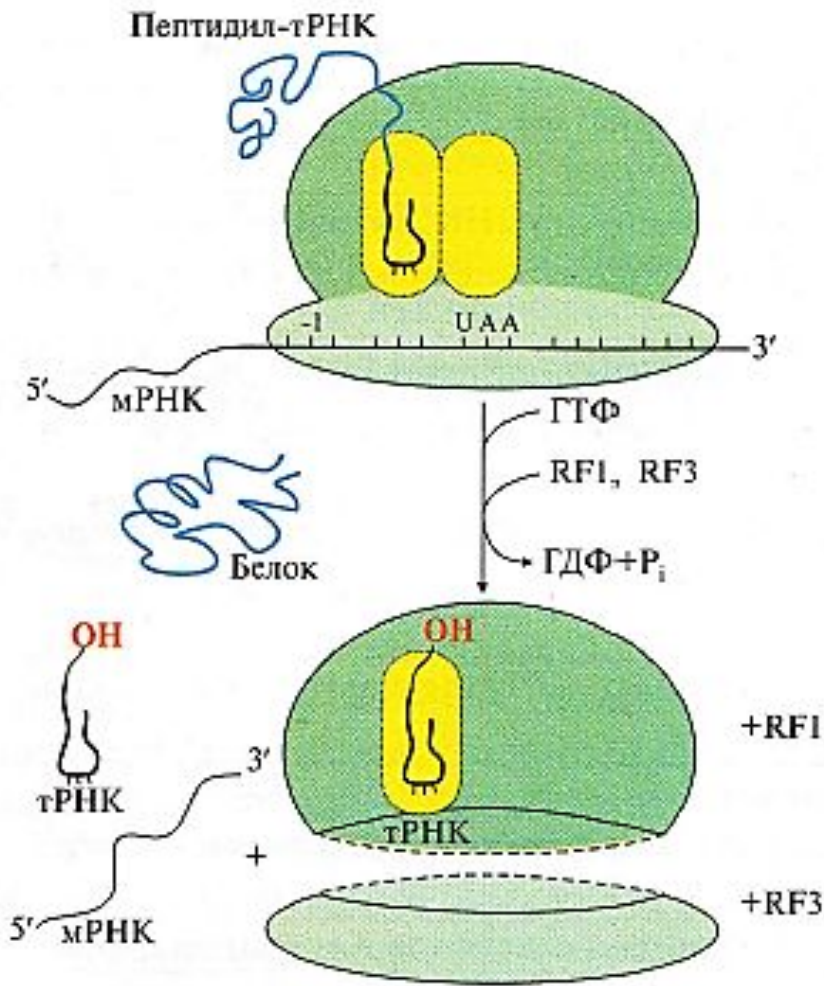
К мРНК присоединяется малая субъединица рибосомы, фактор инициации IF, мет-тРНК и ГТФ. Когда комплекс свяжется с кодоном AUG, происходит присоединение большой субъединицы рибосомы, что сопровождается гидролизом ГТФ и отделением IF. Формируется полноценная рибосома с пептидильным (Р) и аминокатильным (А) центрами

2 этап трансляции: элонгация (рост пептидной цепи)

□ Стадии элонгации:

- Связывание aa-тРНК в А-центре при участии фактора элонгации EF1 и с затратой энергии ГТФ
- Образование пептидной связи между АК Р-центра и АК А-центра при участии **пептидилтрансферазы**
- Перемещение рибосомы по мРНК (транслокация) в направлении от 5'- к 3'-концу с использованием энергии ГТФ и при участии фактора элонгации EF2
- Многократное повторение стадий

3 этап трансляции: терминация



Высвобождение пептида из связи с тРНК и рибосомой:

- Стоп-кодона UAA, UAG, UGA попадают в А-центр
- Высвобождение полипептида при участии факторов терминации RF1, RF3 и энергии ГТФ

Посттрансляционные модификации белков – образование функционально активных белков

- Частичный протеолиз
- Фолдинг – формирование пространственной структуры (II, III) при участии белков-шаперонов
- Модификация аминокислот (гликозилирование, фосфорилирование, ацилирование, метилирование.....)
- Образование дисульфидных связей (цистеин-цистеин)
- Присоединение простетической группы (сложные белки)
- Сборка протомеров в олигомерные белки (формирование IV структуры)

Регуляция матричных биосинтезов

- **Экспрессия генов** — процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок
- Гены белков «домашнего хозяйства» (конститутивные) экспрессируются с постоянной скоростью и обеспечивают жизнеспособность клеток (например, гены ферментов энергетического обмена)

□ **Адаптивная регуляция** обеспечивает изменение скорости экспрессии генов в ответ на меняющиеся условия среды (индуцибельная экспрессия). Осуществляется при участии:

- регуляторных белков, взаимодействующих с участками ДНК
- индукторов (стимулируют экспрессию) или корепрессоров (подавляют экспрессию)

Индукторы или корепрессоры стимулируют присоединение регуляторных белков к регуляторным участкам ДНК

В качестве индукторов и корепрессоров выступают гормоны, ростовые факторы, продукты метаболических путей

Регуляторные участки ДНК:

- Энхансер – «усилитель» транскрипции
- Сайленсер – «тушитель» транскрипции

ПРИМЕР:

ХОЛЕСТЕРИН (как корепрессор) → БЕЛОК-РЕГУЛЯТОР → САЙЛЕНСЕР → ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГМГ-КоА-РЕДУКТАЗЫ (ключевой фермент синтеза холестерина) → СНИЖЕНИЕ СИНТЕЗА ХОЛЕСТЕРИНА

Примеры ингибиторов матричных биосинтезов

- Токсин белой поганки **аманитин** ингибирует РНК-полимеразу II (синтез мРНК)
- **Энтеротоксин возбудителя дифтерии** ингибирует трансляцию, модифицируя фактор элонгации EF2 и нарушая транслокацию рибосом
- **Интерфероны** (гликопротеины лимфоцитов и макрофагов, обладающие противовирусной активностью):
 - активируют РНК-азу, расщепляющую мРНК и рРНК
 - стимулируют синтез протеинкиназы, которая фосфорилирует и тем самым инактивирует фактор инициации трансляции IF2
- прекращается синтез белков в инфицированных клетках человека, клетка погибает, но останавливается размножение вирусов

Задание для самостоятельной работы

- 1. Ознакомиться с принципом метода полимеразной цепной реакции и его применением в медицине
- 2. Выяснить роль нерепарированных изменений ДНК (мутаций) в развитии биохимической индивидуальности человека (полиморфизме генов и белков), наследственных заболеваний, канцерогенезе
- 3. Найти информацию по теме «Лекарственные препараты – ингибиторы матричных биосинтезов», заполнить таблицу (*см. следующий слайд*)

Противоопухолевые и антибактериальные препараты ингибиторы матричных биосинтезов



Препараты	Механизм действия
Ингибиторы репликации и транскрипции	
Доксорубин, дауномицин	
Циклофосфан, мелфалан	
Фторхинолоны	
Рифамицины	
Ингибиторы трансляции	
Тетрациклин	
Эритромицин	
Левомецетин	

Заключение

Процессы репликации, транскрипции, трансляции (матричные биосинтезы) лежат в основе «производства» белков и ферментов, функционирование которых является основой жизни

Регуляция данных процессов лежит в основе адаптации

Нарушение данных процессов приводит к развитию заболеваний

Знания о нуклеиновых кислотах и механизмах матричных биосинтезов являются основой создания лекарственных препаратов, методов диагностики и терапии

Литература

1. Биологическая химия: учебник для студ. мед. вузов / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2004. - 704 с. (глава 3, глава 13 С. 478-497, глава 14)
2. Биохимия: учебник для студентов медицинских ВУЗов / Е. С. Северин - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 768 с. (раздел 4)
3. Биологическая химия с упражнениями и задачами: учебник для студентов ВУЗов / ред. С. Е. Северин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 624 с. (С. 113 – 171, для выполнения самостоятельной работы п.1 и 2 С. 153-165)
4. Биохимия с упражнениями и задачами: учебник для студ. мед. вузов / ред. Е. С. Северин. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 384 с. (раздел 3, С. 54-79; для выполнения самостоятельной работы п. 1-3 С. 70, 73-77)