

Лекция 2. ДНК - носитель генетической информации и основная составляющая генома.

Раздел 1. Структура ДНК.

Рис. 2. ДНК – нерегулярный природный полимер, основной носитель наследственной информации. Первичная структура ДНК представляет собой линейную последовательность мононуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, сахара (дезоксирибозы) и фосфатной группы. Для построения молекулы ДНК используются 4-ре нуклеотида: А, С, G, Т.

Рис.3 . Хронология открытий, подготовивших создание Уотсоном и Криком модели двойной спирали ДНК

1868. Обнаружен нуклеин. Современное название - хроматин (Фридрих Мишер)

1889. Нуклеин разделен на нуклеиновую кислоту и белок. Появился термин "нуклеиновая кислота" (Рихард Альтман)

1900. Все азотистые основания были описаны химиками.

1909. В нуклеиновых кислотах обнаружены фосфорная кислота и рибоза (Фибус Левин).

1930. Найдена дезоксирибоза (Фибус Левин).

1938. Рентгеноструктурный анализ показал, что расстояние между нуклеотидами в ДНК 3,4Å. При этом азотистые основания уложены стопками (Уильям Астбюри, Флорин Белл).

1947. С помощью прямого и обратного титрования установлено, что в ДНК есть водородные связи между группами N-H и C=O. (Гулланд).

1953. С помощью кислотного гидролиза ДНК с последующей хроматографией и количественным анализом установлены закономерности: $A/T=1$; $G/C=1$; $(G+C)/(A+T)=K$ - коэффициент специфичности, постоянен для каждого вида (Эрвин Чаргаф).

Рис.4. Четыре принципа строения молекул ДНК

1. Нерегулярность чередования. К регулярному сахарофосфатному остову нерегулярно присоединены азотистые основания. Азотистые основания в связывании нуклеотидов одной цепи участия не принимают.

2. Антипараллельность. Молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, ориентированных антипараллельно. 3'-конец одной расположен напротив 5'-конца другой.

3. Комплементарность (дополнительность). Каждому азотистому основанию одной цепи соответствует строго определенное азотистое основание антипараллельной цепи. Соответствие определяется химическим строением оснований. Пурины и пиримидины в парах образуют водородные связи. Пары А-Т соответствуют две водородные связи, пары Г-Ц - три.

4. Наличие регулярной вторичной структуры. Молекула ДНК имеет вторичную структуру в виде двойной спирали с общей осью. Разные азотистые основания ориентированы в большую и малую борозды, в которых структурные группы азотистых оснований доступны для модификации.

Рис.5. Вторичная структура ДНК.

Детальная схема строения двойной спирали ДНК.

Рис. 6. Вторичная структура ДНК.

Формы двойной спирали ДНК

Существуют несколько форм двойной спирали ДНК

В основной **В-форме** на виток 34\AA приходится 10 комплементарных пар. Плоскости азотистых оснований перпендикулярны оси спирали. Соседние комплементарные пары повернуты друг относительно друга на 36° . Диаметр спирали 20\AA , причем пуриновый нуклеотид занимает 12\AA , а пиримидиновый - 8\AA .

А-форма - 11 пар азотистых оснований на виток. Плоскости азотистых оснований отклонены от нормали к оси спирали на 20° . Отсюда следует наличие внутренней пустоты диаметром 5\AA . Высота витка 28\AA . Такие же параметры у гибрида из одной цепи ДНК и одной цепи РНК.

С-форма - шаг спирали 31\AA , 9.3 пар оснований на виток, угол наклона к перпендикуляру 6° .

Все три формы - **правозакрученные** спирали.

Есть еще несколько форм правых спиралей и всего одна **левая** спираль (**Z-форма**).

Высота витка в **Z-форме** - 44.5\AA , на виток приходится 12 пар нуклеотидов. Z-форма ДНК не имеет бороздок, но имеет изломы. В такую форму переходят отдельные участки ДНК

при взаимодействии с рядом белков; но не всякая последовательность, тем не менее, способна переходить в Z-форму.

Ни A-, ни Z- формы не могут существовать в водном растворе без дополнительных воздействий (белки или суперспирализация).

ДНК может находиться в различных формах даже в пределах одной молекулы. Предсказание вторичной структуры конкретной молекулы ДНК и/или ее участка один из фундаментальных вопросов современной кристаллографии и биоинформатики.

Рис.7. Вторичная структура ДНК.

Иллюстрация форм двойной спирали ДНК.

Рис.8. Вторичная структура ДНК.

Иллюстрация форм двойной спирали ДНК (продолжение).

ДНК может находиться в различных формах даже в пределах одной молекулы. Предсказание вторичной структуры конкретной молекулы ДНК и/или ее участка один из фундаментальных вопросов современной кристаллографии и биоинформатики.

Рис.9. Трехмерная структура ДНК. Комплекс ДНК – белок.

Рис.10. Модификация ДНК.

Метилирование ДНК – основная модификация. Метилирование ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в позиции N5 пиримидинового кольца.

У человека метилировано около 1 % геномной ДНК. В соматических клетках взрослого организма метилирование ДНК обычно происходит в CpG-динуклеотидах; метилирование ДНК вне CpG-динуклеотидов встречается в эмбриональных стволовых клетках.

У растений метилирование цитозина происходит как симметрично по обеим цепям (на CpG или CpNpG), так и асимметрично лишь на одной из двух цепей (на CpNpN).

У грибов встречается симметричное метилирование по CpG сайтам и асимметричное метилирование по CpA сайтам.

Раздел 2. Организация ДНК в клетках.

Прокариоты.

Рис. 11. Размеры геномов прокариот. Размеры геномов прокариот колеблются от 0.5 до 10 Мб.

Рис. 12, 13. Прокариотическая ДНК представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу. Иллюстрация структуры прокариотической ДНК

Эукариоты.

Рис. 14. Эукариотическая ДНК.

Диапазон размера эукариотических геномов.

Рис.15. Эукариотическая ДНК.

Нуклеосомная и хромосомная организация ДНК эукариот.

Рис. 16. Эукариотическая ДНК.

Схема этапов упаковки эукариотической ДНК от двойной спирали до метафазной хромосомы.

Раздел 3. Функция ДНК.

Рис.17.

Хранение и передача информации – **репликация**

Реализация информации - **транскрипция**

Рис. 18. Репликация ДНК.

Общая схема.

Во время репликации каждая из цепей родительской ДНК служит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепи. ДНК-зависимые ДНК-полимеразы осуществляют полимеризацию низкомолекулярных предшественников ДНК - дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP и dTTP). Положение каждого последующего нуклеотида в строящейся цепи ДНК **по правилам комплементарности** однозначно определяется положением соответствующего нуклеотида матрицы.

При полимеризации дезоксирибонуклеозидтрифосфатов происходит освобождение молекул пирофосфата, который затем расщепляется неорганической пирофосфатазой, что делает реакцию полимеризации практически необратимой. Полимеризация нуклеотидов **происходит только в одном направлении**: от 5'-конца к 3'-концу строящейся цепи, и

синтезированная молекула ДНК антипараллельна по отношению к ДНК-матрице. Репликация ДНК осуществляется **по полуконсервативному механизму**, т.е. одна из цепей дочерних молекул ДНК является частью родительской молекулы ДНК, а другая является вновь синтезированной.

Рис. 19. Репликация ДНК. Прокариоты.

Как и в случае биосинтеза других макромолекул клетки, процесс репликации условно разделяют на три основных этапа: инициацию, элонгацию и терминацию. Чтобы молекулы ДНК-полимераз могли начать синтез ДНК, им необходима затравка (праймер) - короткий олигодезоксирибонуклеотид или олигорибонуклеотид, комплементарный соответствующему участку ДНК-матрицы, у которого на конце имеется свободная 3'-ОН-группа.

У прокариот инициация репликации происходит в одном единственном ориджине (ori) репликации. Элонгация осуществляется сразу в двух направлениях (в одном – непрерывно, во втором – фрагментарно с последующим сшиванием фрагментов). Инициация репликации находится под контролем клеточной регуляции. Скорость репликации ДНК составляет около 45.000 нуклеотидов в минуту; таким образом, родительская вилка расплетается со скоростью 4500 об/мин.

Частота ошибок при ДНК-репликации не превышает 1 на 10^9 – 10^{10} нуклеотидов.

Рис. 20, 21. ДНК репликация, Эукариоты.

Схема репликации. У эукариот инициация репликации происходит во множестве участков молекулы одновременно.

Рис. 22. Транскрипция ДНК. Основные принципы.

В процессе транскрипции генов происходит биосинтез молекул РНК, комплементарных одной из цепей матричной ДНК, сопровождаемый полимеризацией четырех рибонуклеозидтрифосфатов (АТР, ГТР, СТР и УТР) с образованием 3'–5'-фосфодиэфирных связей и освобождением неорганического пирофосфата.

ДНК-зависимые РНК-полимеразы - основные ферменты осуществляющие транскрипцию. РНК-полимеразы могут состоять из одной или нескольких субъединиц. Для бактерий и

эукариот, с большим числом генов и сложными системами регуляции РНК-полимеразы состоят из нескольких субъединиц.

Факторы транскрипции - белки взаимодействующие с друг другом, регуляторными участками ДНК и РНК-полимеразой с образованием транскрипционного комплекса и регулирующие транскрипцию. Благодаря факторам транскрипции и регуляторным последовательностям генов становится возможным специфический синтез РНК.

Стадии транскрипции:

инициация - образование первой фосфодиэфирной связи между Р_i и первым нуклеотидом. К пуриINTRИФосфату присоединяется нуклеотид комплементарный второму нуклеотиду ДНК с отщеплением пирофосфата от нуклеозидтрифосфата с образованием фосфодиэфирной связи

элонгация (3'→5')- мРНК гомологичная нематричной (кодирующей, смысловой) ДНК, синтезируется на матричной ДНК; какая из двух цепей ДНК будет матрицей, определяется направлением промотора

терминация

Рис. 23. Транскрипция ДНК. Основные принципы. комплементарность - mRNA комплементарна матричной цепи ДНК и аналогична кодирующей цепи ДНК

антипараллельность

униполярность

беззатраповочность - РНК-полимераза не требует праймера

асимметричность

Рис. 24. Транскрипция ДНК. Прокариоты.

У прокариот регуляция транскрипции осуществляется на уровне включения и выключения .

Активность многих генов прокариот регулируется с помощью белковых факторов, взаимодействующих с регуляторными участками промоторов генов. При этом происходят как активация транскрипции генов, так и подавление считывания генетической информации РНК- полимеразами. В первом случае регуляторные белковые факторы называют активаторами, осуществляющими позитивную регуляцию транскрипции, а во втором - репрессорами. Регуляцию, связанную с подавлением транскрипции, называют негативной.

Рис. 25. Транскрипция ДНК. Прокариоты.

Регуляция на уровне элонгации и терминации

РНК-полимераза в процессе элонгации цепей РНК перемещается вдоль матричной ДНК неравномерно, с остановками (паузами). Время задержки РНК-полимеразы в определенных участках генов меняется под действием белковых факторов. Эффективность транскрипции фрагментов ДНК зависит от последовательностей нуклеотидов, окружающих транскрибируемые участки генов.

Регуляторная роль терминаторов транскрипции заключается в прекращении синтеза РНК на границе гена и освобождении полученной РНК из транскрипционного комплекса. Терминаторы встречаются не только на границах одиночных генов, но и в конце генов, входящих в состав оперонов. Эффективность терминации транскрипции на внутренних терминаторах может регулироваться, что сопровождается изменением скорости синтеза РНК на последовательностях нуклеотидов оперонов, расположенных за терминаторами.

Функционирование аттенюаторов - регулируемых терминаторов транскрипции бактерий, сопряжено с синтезом лидерного пептида рибосомами. Этот тип регуляции используется грамотрицательными бактериями для изменения уровня транскрипции оперонов, контролирующих биосинтез аминокислот, и его отличительной чертой является образование альтернативных вторичных структур РНК под влиянием рибосом, прекращающих трансляцию на кодонах аминокислот, которые клеткам необходимо синтезировать. Прокариоты и эукариоты способны реагировать на вне- и внутриклеточные процессы изменением скорости элонгации транскриптов.

Рис. 26. Транскрипция ДНК. Эукариоты.

У эукариот регуляция транскрипции осуществляется на уровне усиления или подавления транскрипции. Большинство генов эукариот постоянно транскрибируются на фоновом уровне.

Регуляторные элементы эукариот – промоторы и энхансеры.

Рис. 27. Транскрипция ДНК. Эукариоты.

Инициация транскрипции.

