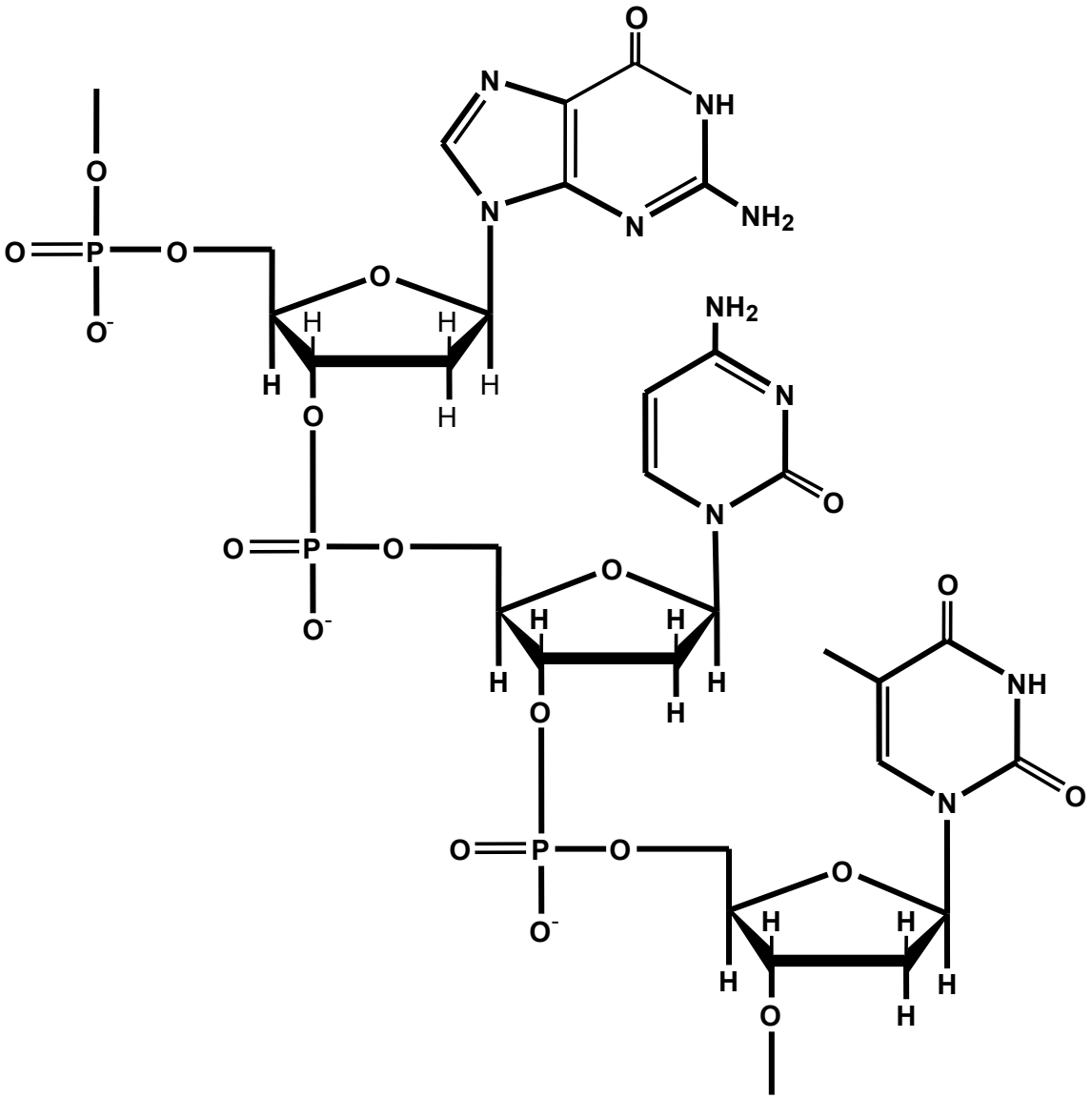
Ф.К.АЛИМОВА, Т.А.НЕВЗОРОВА

ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ



Казань
Казанский государственный университет
2009

Ф.К.АЛИМОВА, Т.А.НЕВЗОРОВА

ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Учебное пособие для вузов

Казань
Казанский государственный университет
2009

УДК 577.1
ББК 28.072
А 50

Печатается по решению учебно-методического совета биолого – почвенного факультета Казанского государственного университета

Рецензент: Ишмухаметова Диляра Галимовна – доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии КГУ

Авторы:

- Алимова Фарида Кашифовна – доктор биологических наук, профессор, зав. каф. биохимии КГУ;
- Невзорова Татьяна Александровна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии КГУ.

Редактор: Невзорова Татьяна Александровна

Компьютерное моделирование текста, схем и рисунков учебного пособия – Сунгатуллина Л.М.

Обмен нуклеиновых кислот: Учебное пособие для вузов / Ф.К. Алимова, Т.А. Невзорова; под ред. Т.А. Невзоровой. – Казань: КГУ, 2009. – 62 с.: ил.

Учебное пособие «Обмен нуклеиновых кислот» представляет собой курс лекций по биохимии, предназначенный для студентов биологического факультета и всех читателей, желающих ознакомиться и получить знания о строении и метаболизме нуклеиновых кислот в клетке. Одна из целей данного пособия – изложение трудных разделов предлагаемого материала в доступной для понимания и запоминания форме.

Данное пособие содержит большое количество схем, рисунков, определений и пояснительный текст к лекциям, читаемым преподавателями кафедры биохимии КГУ по курсу Биохимия.

В издании приведены задания в тестовой форме, которые можно использовать для текущего и заключительного контроля знаний студентов.

© Алимова Ф.К., 2009
© Невзорова Т.А.,2009
© Казанский Государственный Университет, 2009

От коллектива кафедры биохимии
с благодарностью нашему Учителю
Виктору Георгиевичу Винтеру

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфорная кислота, аденозиндифосфат

АМФ (AMP) – аденозинмонофосфат

цАМФ –циклический аденозин-3’,5’-монофосфат

АТФ (ATP) – аденозинтрифосфорная кислота

АФРТ – аденинфосфорибозилтрансфераза

ГДФ – гуанозиндифосфат

ГМФ - гуанозинмонофосфат

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ГФРТ – гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза

Да – дальтон

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ (dNTP) - дезоксинуклеозидтрифосфат

ИМФ – инозинмонофосфат

кДА – килодальтон

КМФ – ксантидиновая кислота

КоА – коэнзим А

$НАД^+$ - никотинамидадениндинуклеотид

$НАДФ^+$ - никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НТФ - нуклеозидтрифосфат

РНК – рибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная РНК

мяРНП – малые ядерные рибонуклеопротеины

рРНК – рибосомная РНК

тРНК – транспортная РНК

ТТФ -тимидинтрифосфат

УДФ – уридиндифосфат

УМФ – уридинмонофосфат

УТФ – уридинтрифосфат

$ФАД^+$ - флавинадениндинуклеотид

Фн (Pi) – фосфат неорганический

ФФн (PPi) – пирофосфат неорганический

ФРПФ - фосфорибозилпирофосфат

ЦДФ – цитидинфосфат

ЦМФ –цитидинмонофосфат

ЦТФ – цитидинтрифосфат

CO_2 - двуокись углерода

NH_3 - аммиак

ХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты – важнейшие органические соединения, хранящие всю информацию об отдельной клетке и организме, определяющие его рост и развитие, а также наследственные признаки, передаваемые следующему поколению.

В 1868 г. швейцарский врач Фридрих Мишер выделил из ядер лейкоцитов и спермы лосося новое фосфорсодержащее вещество, соединенное с белками, которое назвал **нуклеином** (от лат. nucleus – ядро). Современное название нуклеина – **хроматин**.

В 1889 г. Рихард Альтман разделил нуклеин на нуклеиновую кислоту и белок и ввел в биохимию термин «нуклеиновая кислота».

Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) представляют собой высокомолекулярные линейные полимеры, построенные из нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из трех компонентов: азотистого основания, пентозы и остатка фосфорной кислоты.

Азотистые основания

Азотистые основания – производные ароматических гетероциклических соединений – пурина и пиримидина. В состав нуклеиновых кислот входят два производных пурина – аденин и гуанин, и три производных пиримидина – цитозин, урацил и тимин (рис.1). Все пять азотистых оснований называются главными (мажорными).

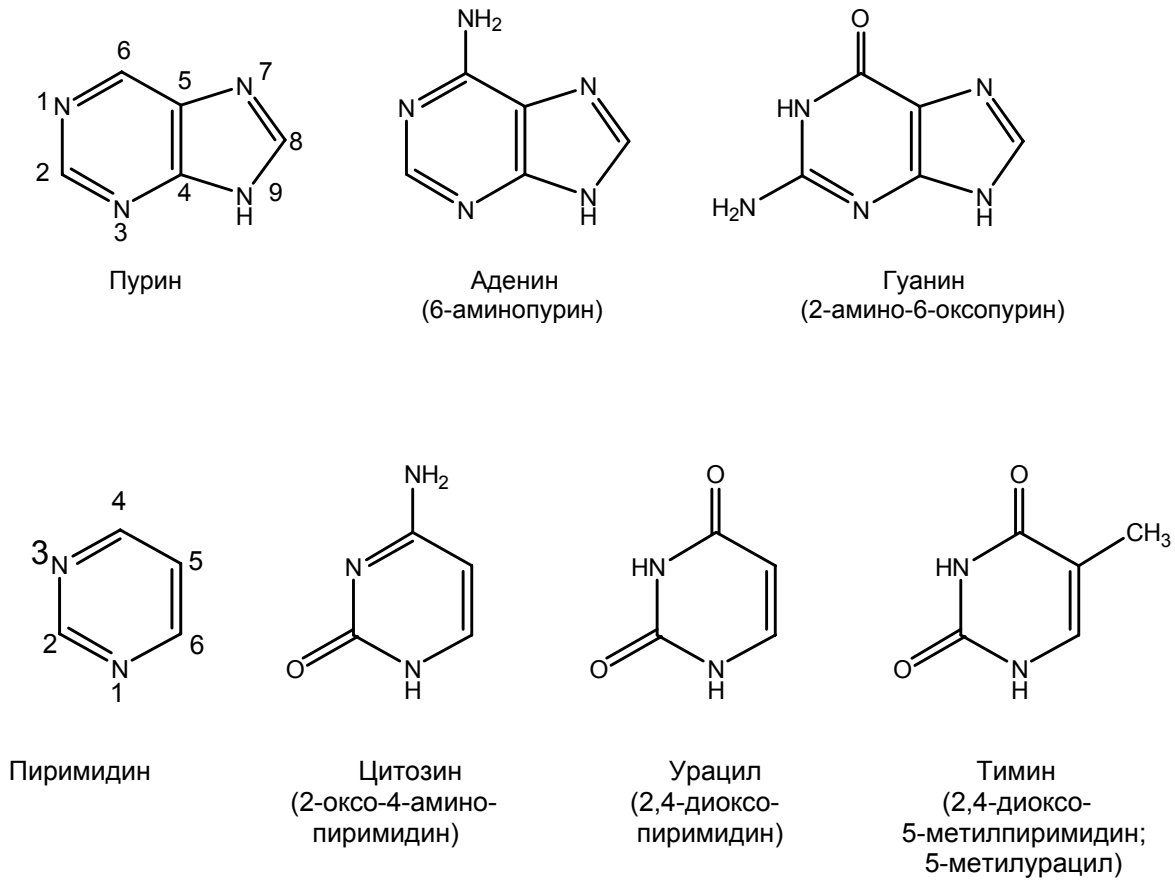


Рис. 1. Основные азотистые основания

В составе некоторых нуклеиновых кислот обнаружены (~0,1 – 1% всех оснований) разнообразные минорные (редко встречающиеся) азотистые основания (рис. 2).

Например, много (до 10%) минорных азотистых оснований содержится в составе транспортных РНК - дигидроурацил, ксантин, гипоксантин и др.

В молекулах ДНК в небольшом количестве содержится 5-метилцитозин и 6-метиладенин. Вероятно, метилированные основания защищают “свою” ДНК от расщепления ферментами – ДНКазами.

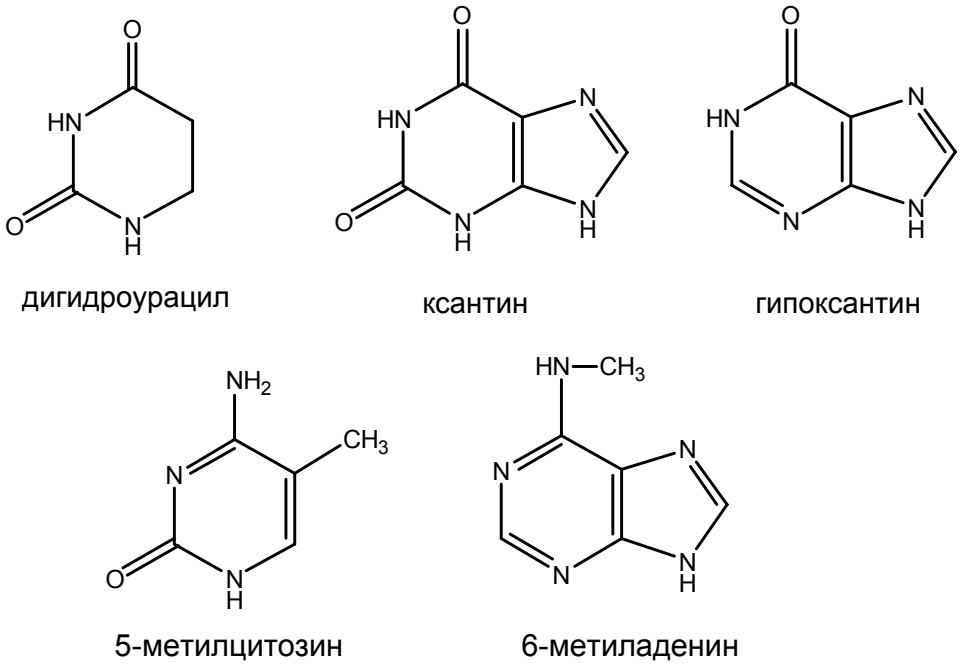


Рис. 2. Минорные азотистые основания

Таутомерия азотистых оснований

Азотистые основания содержат сопряженную систему кратных двойных связей и заместителей (группы O= и NH_2-), что обусловливает их способность к различным типам таутомерных превращений: лактам – лактимному для оксипроизводных и амин – иминному для аминопроизводных (рис.3). В составе нуклеиновых кислот пуриновые и пиримидиновые основания находятся в лактамной и аминной формах.

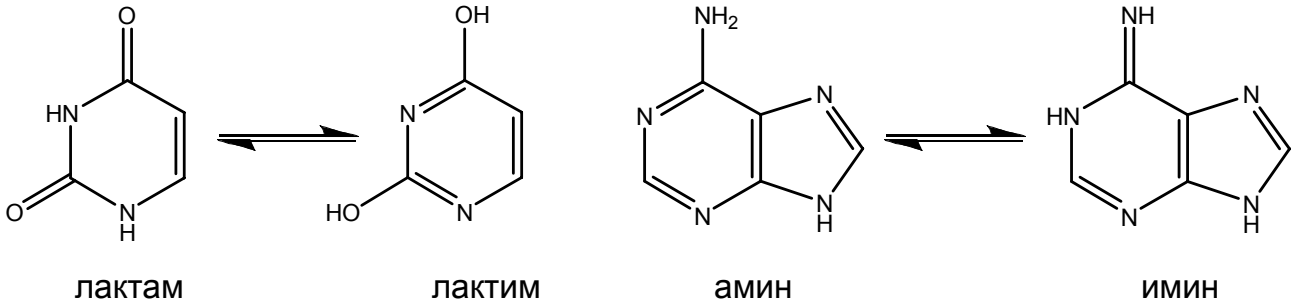


Рис. 3. Таутомерия азотистых оснований

Углеводные компоненты

Углеводная часть нуклеиновых кислот представлена двумя сходными моносахаридами правого ряда: дезоксирибозой (в ДНК) и рибозой (в РНК), находящимися в β-D-фуранозной форме (рис. 4). Углеродные атомы пентоз номеруются со знаком «штрих», чтобы отличать их от атомов азотистых оснований.

Доказано, что замена у дезоксирибозы при С-2’ ОН-группы на протон упрочняет связь между С-2’ и С-3’ атомами, что увеличивает прочность молекулы ДНК и способствует компактности её пространственной структуры.

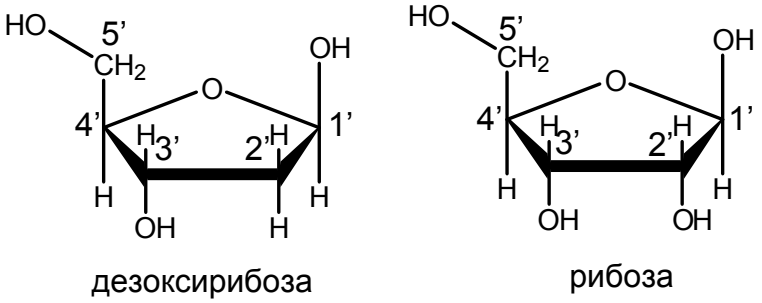


Рис.4. Углеводные компоненты нуклеотидов

Нуклеозиды и нуклеотиды

Взаимодействие азотистых оснований с пентозой приводит к образованию нуклеозида (рис. 5). Нуклеозиды, содержащие рибозу, называются рибонуклеозидами, а нуклеозиды, содержащие дезоксирибозу – дезоксирибонуклеозидами.

Пентоза углеродным атомом в первом положении связывается N-гликозидной связью с атомом азота в 9 положении пурина или атомом азота в 1 положении пиримидина. Так, аденин, соединяясь с рибозой, образует аденозин, гуанин дает гуанозин, из цитозина образуется цитидин, из урацила – уридин, из тимина – риботимидин. Приставка «дезокси» указывает на наличие дезоксирибозы в составе нуклеозида: дезоксиаденозин, дезоксигуанозин и т.д. (табл. 1).

Нуклеотидами называют фосфорные эфиры нуклеозидов. К одному атому пентозы может присоединяться от одного до трех остатков фосфорной кислоты.

Название мононуклеотида состоит из названия нуклеозида, указания места присоединения и числа остатков фосфорной кислоты (табл. 1).

Например, если к аденозину присоединить один остаток фосфорной кислоты в положении С5', то такой мононуклеотид будет называться аденозин-5'-монофосфорная кислота (адениловая кислота) или аденозин-5'-монофосфат (АМФ). Если к АМФ присоединить еще один остаток фосфорной кислоты, то образуется аденозин-5'-дифосфат (АДФ). И, наконец, добавление третьего остатка приведет к образованию аденозин-5'-трифосфата (АТФ) (рис. 6).

В молекулах нуклеозиддифосфатов и нуклеозидтрифосфатов остатки фосфорной кислоты соединены ангидридной связью (обозначается знаком “~” - тильда), обладающей большим запасом потенциальной энергии. Такие связи называют макроэргическими.

Если один остаток фосфорной кислоты соединен сложноэфирной связью с С5'-атомом рибозы, то нуклеотиды принято обозначать АМФ, ГМФ, ЦМФ, УМФ, или с С5'-атомом дезоксирибозы – дАМФ, дГМФ, дЦМФ, ТМФ.

Если один остаток фосфорной кислоты соединен эфирной связью с С3'-атомом пентозы, то нуклеотиды обозначают: А-3'-МФ, дА-3'-МФ, и т.д.

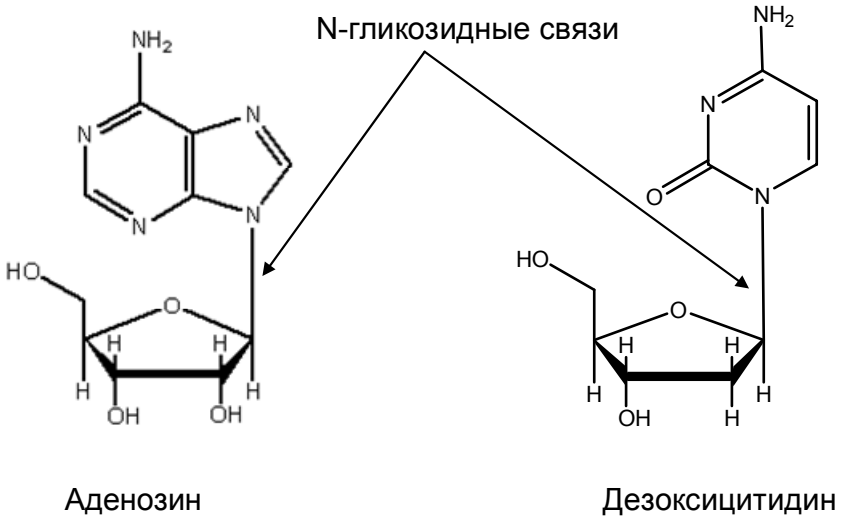


Рис. 5. Образование N-гликозидной связи между азотистым основанием и углеводным компонентом

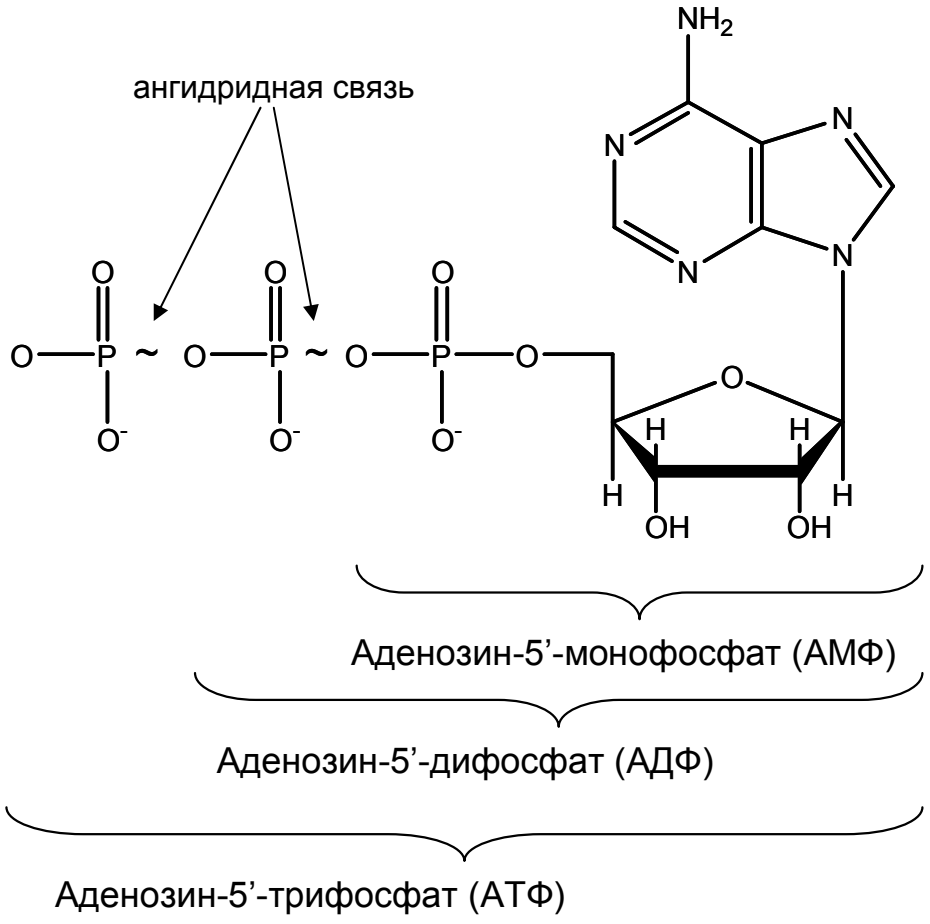


Рис. 6. Структура АМФ, АДФ и АТФ

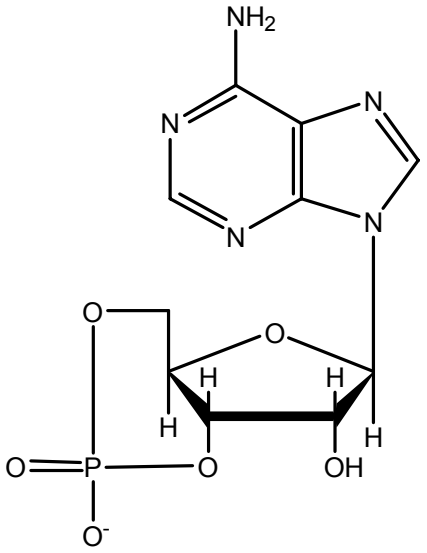
Таблица 1

Номенклатура азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов

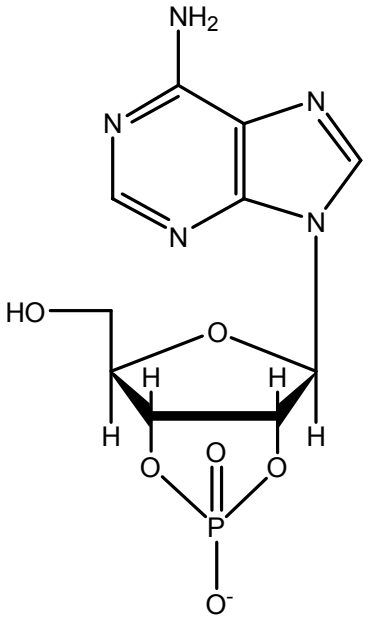
Азотистое основание	Нуклеозид (азотистое основание + пентоза)	Однобук-венный код	Мононуклеотид (нуклеозид+фосфат)	Обозначе-ния нуклеотидов
ДНК:				
Аденин	Дезоксиаденозин	дА	д-Аденозинмонофосфат	дАМФ
Гуанин	Дезоксигуанозин	дГ	д-Гуанозинмонофосфат	дГМФ
Цитозин	Дезоксицитидин	дЦ	д-Цитидинмонофосфат	дЦМФ
Тимин	Тимидин	Т	д-Тимидинмонофосфат	дТМФ
РНК:				
Аденин	Аденозин	А	Аденозинмонофосфат	АМФ
Гуанин	Гуанозин	Г	Гуанозинмонофосфат	ГМФ
Цитозин	Цитидин	Ц	Цитидинмонофосфат	ЦМФ
Урацил	Уридин	У	Уридинмонофосфат	УМФ

Циклические нуклеотиды

Циклические нуклеотиды образуются в клетке при участии ферментов – циклаз и осуществляют регуляцию внутриклеточного метаболизма. Так, циклические нуклеотиды 3',5'-аденозинмонофосфат (цАМФ) и 3',5'-гуанозинмонофосфат (цГМФ) являются внутриклеточными посредниками гормонов, нейромедиаторов. Другие циклические соединения – 2',3'-АМФ и 2',3'-ГМФ являются промежуточными продуктами распада нуклеиновых кислот (рис. 7)



Циклический 3’,5’-АМФ

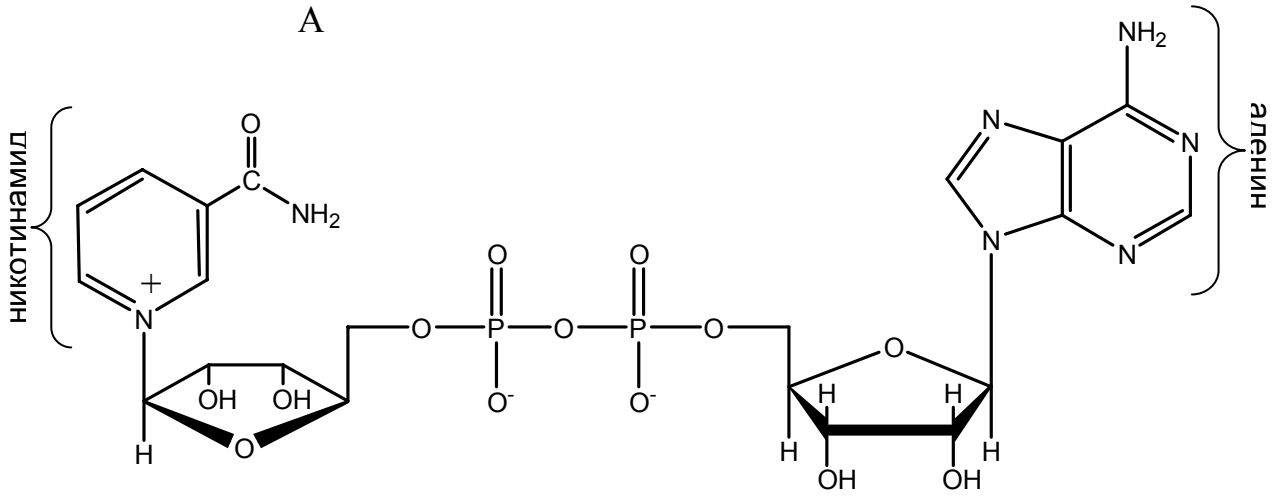


Циклический 2’,3’-АМФ

Рис. 7. Циклические нуклеотиды

Нуклеотиды в составе коферментов

Некоторые коферменты являются производными аденозинмонофосфата. Например, никотинамидадениндинуклеотид (НАД$^+$), никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ$^+$), флавинадениндинуклеотид (ФАД) (рис.8).



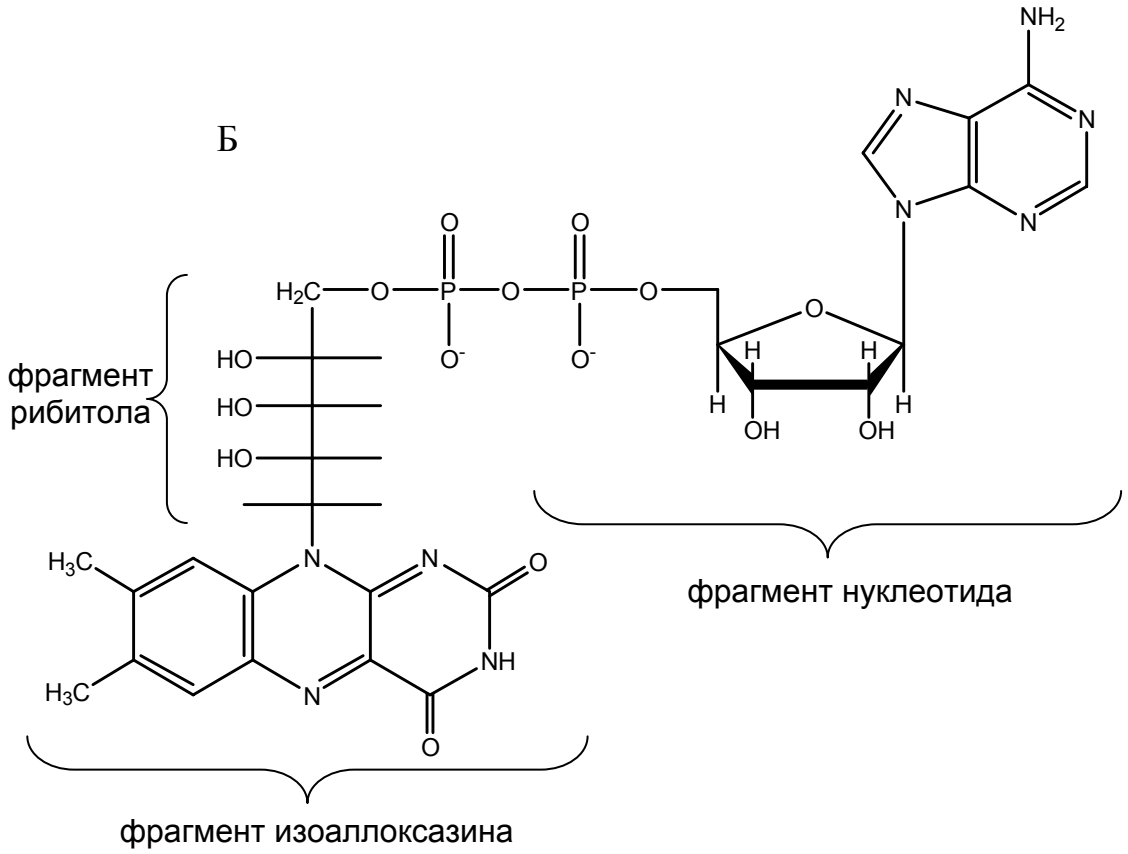


Рис. 8. Никотинамидадениндинуклеотид (А) и флавинадениндинуклеотид (Б)

Структура нуклеиновых кислот

Фосфатная группа одного нуклеотида взаимодействует с 3'-ОН-группой другого нуклеотида с образованием между ними фосфодиэфирной связи (рис. 9). Мононуклеотиды, объединяясь в количестве нескольких сотен или тысяч в единую молекулу, образуют длинные неразветвленные полинуклеотидные цепи. Молекулярная масса таких молекул может достигать десятков миллион дальтон. На *начальном конце* полинуклеотида остается свободная 5'-фосфатная группа, поэтому он называется **5'-конец**;
второй – *терминальный* **3'-конец** заканчивается свободной 3'-ОН-группой.

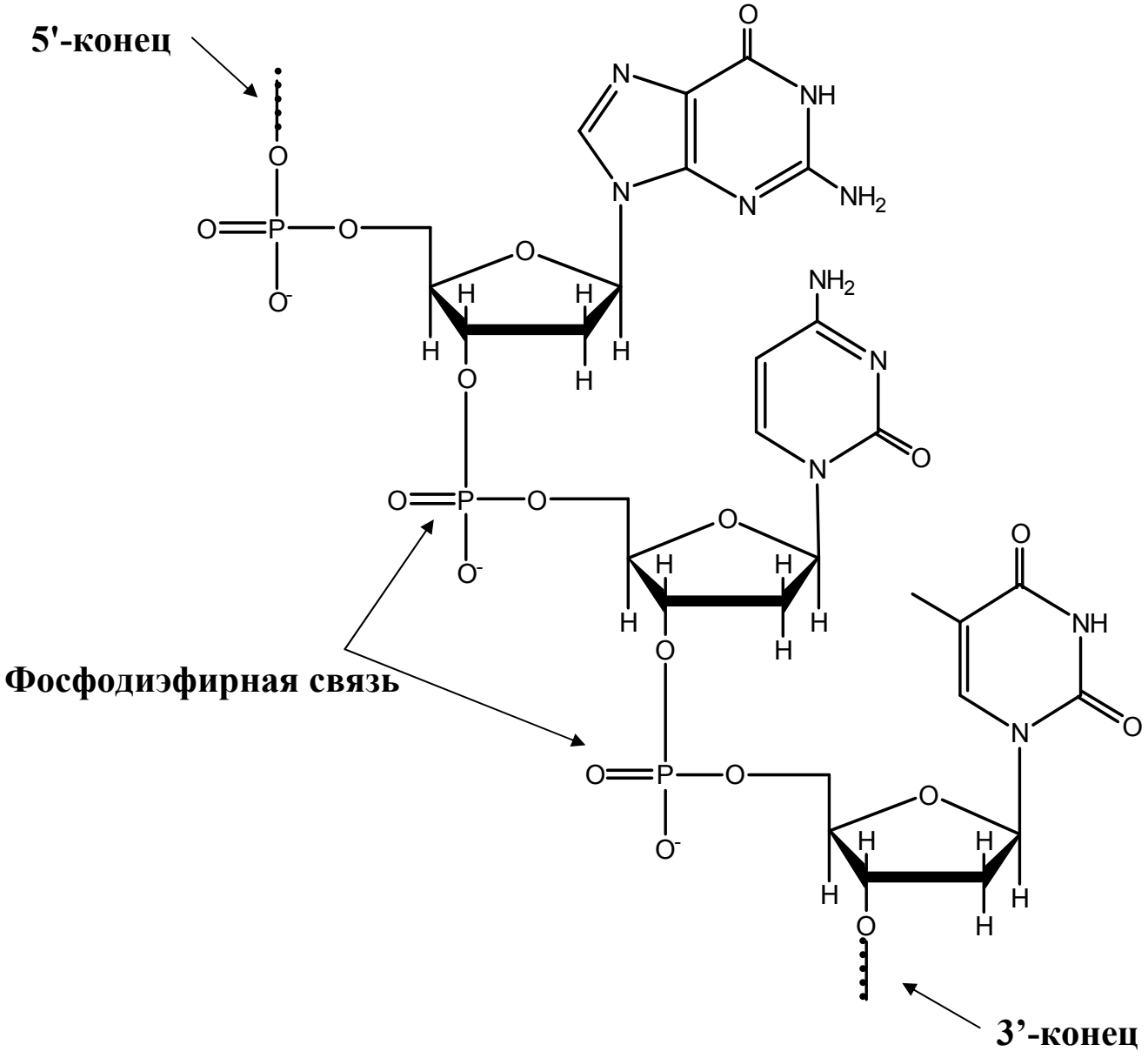


Рис.9. Фрагмент одной полинуклеотидной цепи молекулы ДНК

В соответствии с углеводным компонентом нуклеиновые кислоты делятся на дезоксирибонуклеиновые (ДНК) и рибонуклеиновые (РНК) (табл. 2).

Таблица 2

Особенности нуклеиновых кислот (адаптировано по Тагановичу, 2008)

Признак	ДНК	РНК
Локализация в клетке	У прокариот – в нуклеоиде и цитоплазме У эукариот – в ядре, митохондриях, хлоропластах	В цитоплазме В цитоплазма, небольшое количество в ядре, митохондриях, хлоропластах
Углевод	Дезоксирибоза	Рибоза
Главные основания	Аденин, гуанин, цитозин, тимин	Аденин, гуанин, цитозин, урацил
Молекулярная масса	$>10^9$ Да	$20000 \cdot 10^9$ Да
Функция	Хранение и передача генетической информации	Реализация генетической информации (синтез белка)
Форма вторичной структуры	Двойная спираль	Одноцепочечная молекула

Структура и функции ДНК

Первичная структура ДНК – последовательность дезоксирибонуклеотидов в полинуклеотидной цепи, что определяет закодированную в ней информацию.

В результате многочисленных исследований по определению первичной структуры ДНК установлено, что в молекулах ДНК бактериофагов почти все последовательности нуклеотидов уникальны, т.е. встречаются один раз. В ДНК бактерий большинство генов также уникальны, но некоторые последовательности, кодирующие транспортные и рибосомные РНК, повторяются несколько раз.

Фундаментальной особенностью геномов эукариот является наличие нуклеотидных последовательностей разной степени повторяемости:

- уникальные последовательности, т.е. последовательности нуклеотидов, представленные один раз, составляют 60% всей ДНК генома эукариот, несут информацию о структуре специфических белков;
- умеренно повторяющиеся последовательности, которые повторяются десятки и сотни раз (10-25% ДНК) - это структурные гены продуктов, необходимых клетке в больших количествах, например, гены рибосомных и транспортных РНК, гистоновых белков, иммуноглобулинов;
- часто повторяющиеся последовательности (10^5-10^6 раз), в основном, это сателлитная ДНК, находящаяся в центромерных областях хромосом, участвующая, вероятно, в распределении гомологичных хромосом в митозе и мейозе.

Анализ содержания азотистых оснований в нуклеиновых кислотах позволил американскому ученому Э. Чаргаффу сформулировать ряд правил (правила Чаргаффа):

1. В молекулах ДНК сумма молярных концентраций пуриновых нуклеотидов равна сумме молярных концентраций пиримидиновых нуклеотидов: А+Г=Т+Ц. Эта закономерность не выполняется для РНК в связи с одноцепочечным строением молекулы, в

которых отношение суммарных молярных концентраций пуриновых и пиримидиновых оснований изменяется в широком интервале.

2. В молекулах ДНК молярное содержание аденина равно молярному содержанию тимина (А=Т), а молярная доля гуанина равна молярной доле цитозина (Г=Ц). Для молекул РНК это правило не соблюдается.

3. Отношение суммы молярных концентраций гуанина и цитозина к сумме молярных концентраций аденина и тимина в молекулах ДНК (аденина и урацила в молекулах РНК) в нуклеиновых кислотах варьирует. Это отношение называется коэффициентом специфичности нуклеиновых кислот:

$$\frac{Г + Ц}{А + Т(У)} = К$$, где К - коэффициент специфичности.

Для ДНК в основном К<1, т.е. в природе преобладают ДНК АТ-типа; для РНК К>1, т.е. РНК ГЦ-типа.

Молекулы ДНК обладают выраженной видовой специфичностью; в случае РНК видовая специфичность выражена слабо.

Вторичная структура ДНК. В соответствии с моделью, предложенной Дж. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 году, она представлена правозакрученной спиралью, в которой две полинуклеотидные цепи расположены антипараллельно и удерживаются относительно друг друга за счет взаимодействия между комплементарными азотистыми основаниями. Комплементарность – способность азотистых оснований образовывать водородные связи между собой.

Связи, стабилизирующие двойную спираль ДНК:

1. Водородные связи между комплементарными парами азотистых оснований. Между аденином и тимином могут образовываться две, а между гуанином и цитозином – три водородных связи (рис. 10). Комплементарные пары азотистых оснований одинаковы по размерам и форме, обращены внутрь молекулы ДНК и лежат в одной плоскости (рис. 11).

2. Между основаниями в ДНК возникают гидрофобные взаимодействия, обеспечивающие стабилизацию структуры спирали.

3. Стэкинг-взаимодействие – взаимодействие π-облаков азотистых оснований вдоль оси молекулы ДНК.

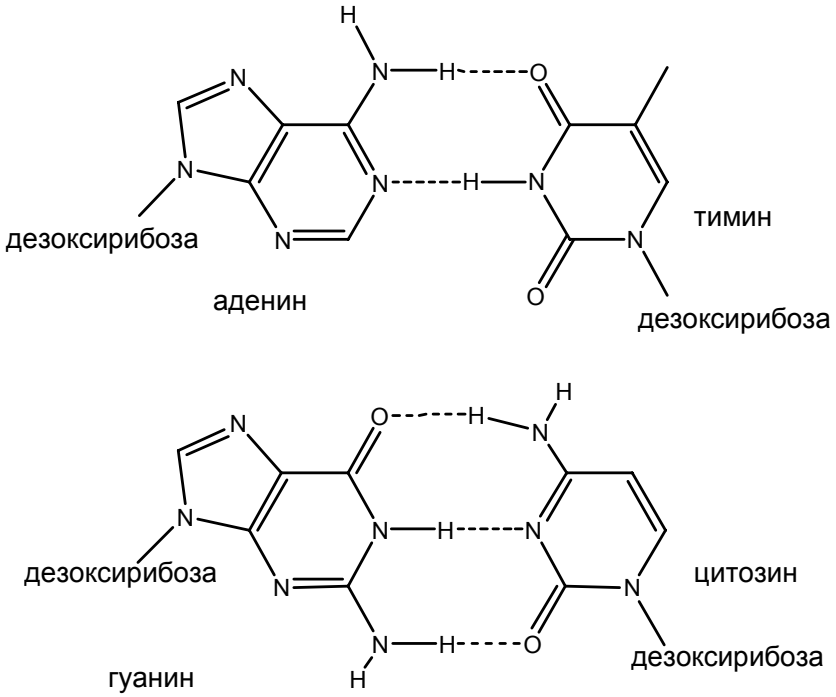


Рис. 10. Комплементарные взаимодействия азотистых оснований

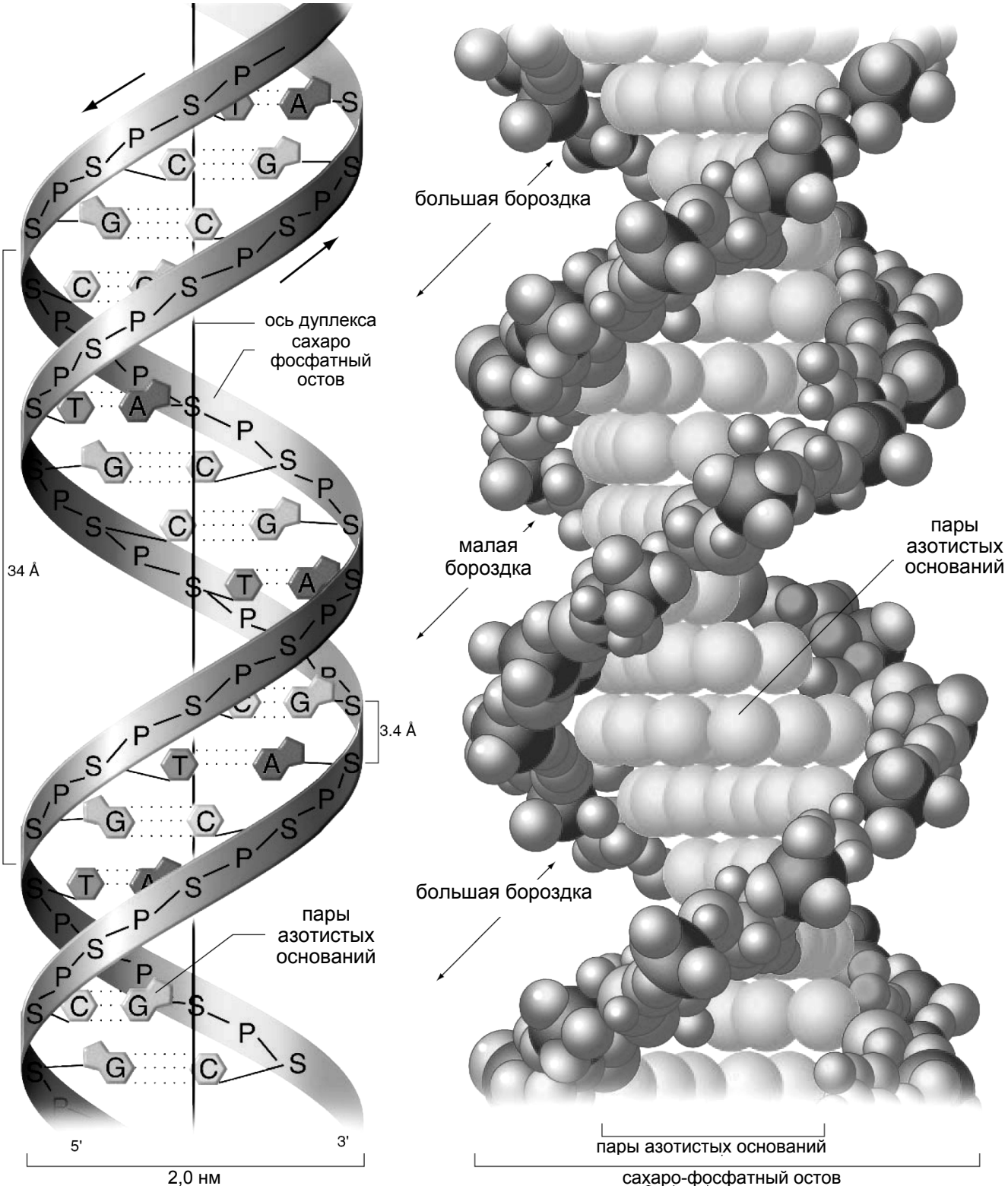


Рис. 11. Пространственная модель B-формы ДНК (цит. по Hartwell, et al., 2003)

На основе данных анализа рентгенограмм установлено, что двойная спираль ДНК может существовать в виде нескольких форм: A-, B-, C- и Z-. Указанные формы ДНК различаются диаметром и шагом спирали, числом пар оснований в витке, углом наклона плоскости оснований по отношению к оси молекулы (рис. 12). Характеристика форм ДНК представлена в табл. 3.

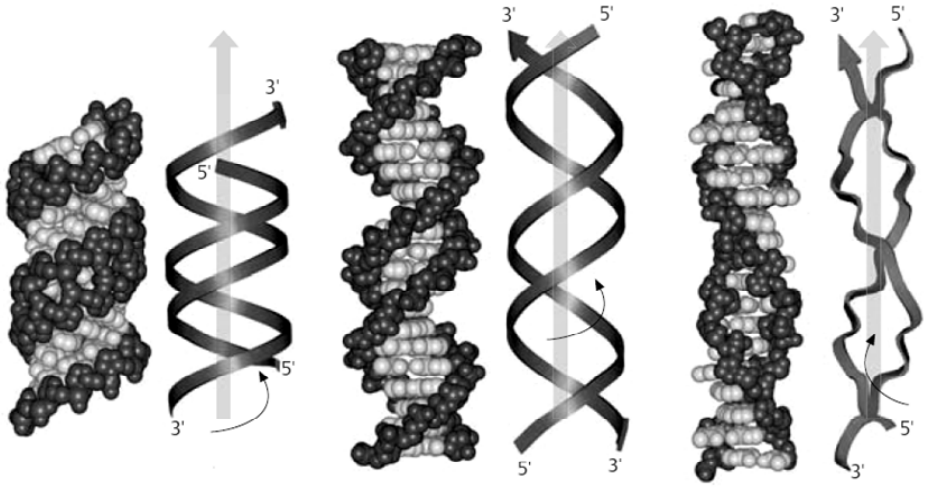


Рис. 12. Формы ДНК (цит. по Koolman, 2005)

Таблица 3

Характеристика форм ДНК

Тип спирали	B-	A-	C-	Z-
Число пар оснований на виток спирали	10	11	9,33	12
Шаг спирали, нм	3,38	3,2	3,09	4,46
Угол спирального вращения, град.	+36,0	+32,7	+38,7	-30
Расстояние между динуклеотидами вдоль оси спирали, нм	0,338	0,26	0,332	0,371
Наклон оснований, град.	-1,2	20	-8	-7
Диаметр спирали, нм	1,9	2,3	1,9	1,84
Бороздки	Большая и малая	Большая и малая	Большая и малая	Только одна
Условия образования	Влажность – 92%, низкая ионная сила	Влажность – 72%, присутствие Na+, K+, Cs+	Влажность – 66%, присутствие Li+	Высокие концентрации соли
Зависимость от нуклеотидной последовательности	Не зависят			Чередование д(ГЦ)n
Функция в клетке	Благоприятна для репликации	Предпочтительна для транскрипции	Для упаковки ДНК в структуры хроматина	Участвует в регуляции экспрессии генов

Описанные формы ДНК способны к взаимно обратимым переходам в зависимости от условий среды.

Третичная структура ДНК. У всех живых организмов двуспиральные молекулы ДНК плотно упакованы с образованием сложных трехмерных структур.

В митохондриях, пластидах и у прокариот молекулы ДНК имеют кольцевую замкнутую форму и образуют левые (отрицательные) суперспирали (рис. 13). Суперспирализация необходима для «упаковки» длинной молекулы ДНК в малом объеме клетки. Помимо этого, суперспирализация ДНК, облегчающая ее расплетение, обеспечивает репликацию и транскрипцию.

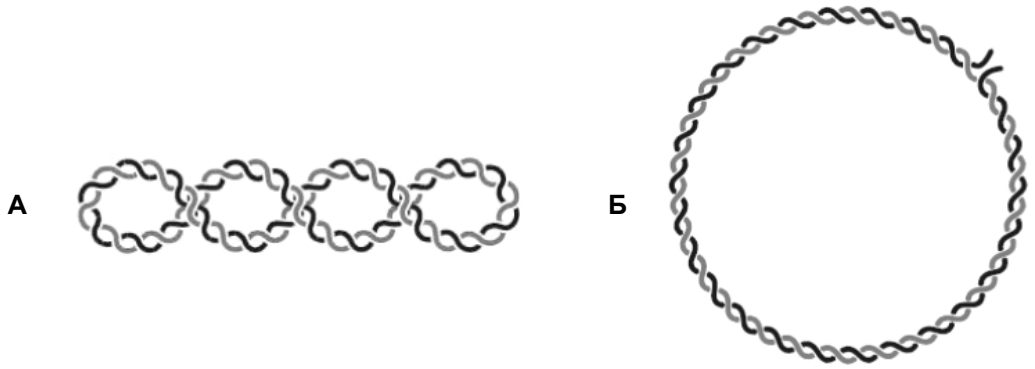


Рис.13. Кольцевая сверхспиральная ДНК (А), кольцевая релаксированная ДНК (Б) (цит. по Lodish, 2003)

Третичная структура ДНК эукариот формируется в результате ее взаимодействия с белками. Каждая молекула линейной ДНК упакована в отдельную хромосому, в составе которой разнообразные белки связываются с отдельными участками ДНК и обеспечивают суперспирализацию и компактизацию молекулы (рис. 14). Общая длина ДНК гаплоидного набора из 23 хромосом человека составляет ~ 3,5 $x10^9$ пар нуклеотидов. Хромосомы образуют компактные структуры только в фазу деления. В период покоя комплексы ДНК с белками распределены равномерно по объему ядра, образуя хроматин. Белки хроматина включают две группы: гистоны и негистоновые белки.

Гистоны – это небольшие белки с молекулярной массой от 11 000 до 22 000 Да и высоким содержанием лизина и аргинина. Различают пять видов гистонов: H1 – богаты лизином, H2A, H2B – умеренно богаты лизином, H3 и H4 – богаты аргинином.

Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 попарно образуют комплекс из 8 молекул – нуклеосомный октамерный кор. Этот комплекс за счет ионных связей взаимодействует с отрицательно заряженными фосфатными группами участка ДНК длиной около 146 пар нуклеотидов (примерно 1,75 витка левой спирали вокруг кора) и образует компактную структуру, называемую нуклеосомой. Между нуклеосомами находится участок ДНК длиной около 30 нуклеотидных пар – линкерный участок, к которому присоединится молекула гистона H1 (рис. 15). Нуклеосомная фибрилла сворачивается в виде соленоида в хроматиновую фибриллу диаметром 30 нм, которая укладывается в петли (рис.14). Длина петли составляет от 20000 до 100000 пар нуклеотидов. Такая упаковка ДНК в хроматине обеспечивает уменьшение линейных размеров ДНК до 1000 раз.

В процессе митоза интерфазный хроматин образует миникольца, которые располагаются друг под другом вдоль центральной оси и формируют конденсированные метафазные хромосомы.

Негистоновые белки представлены множеством ферментов и белков, участвующих в синтезе ДНК, РНК, регуляции этих процессов и компактизации ДНК.

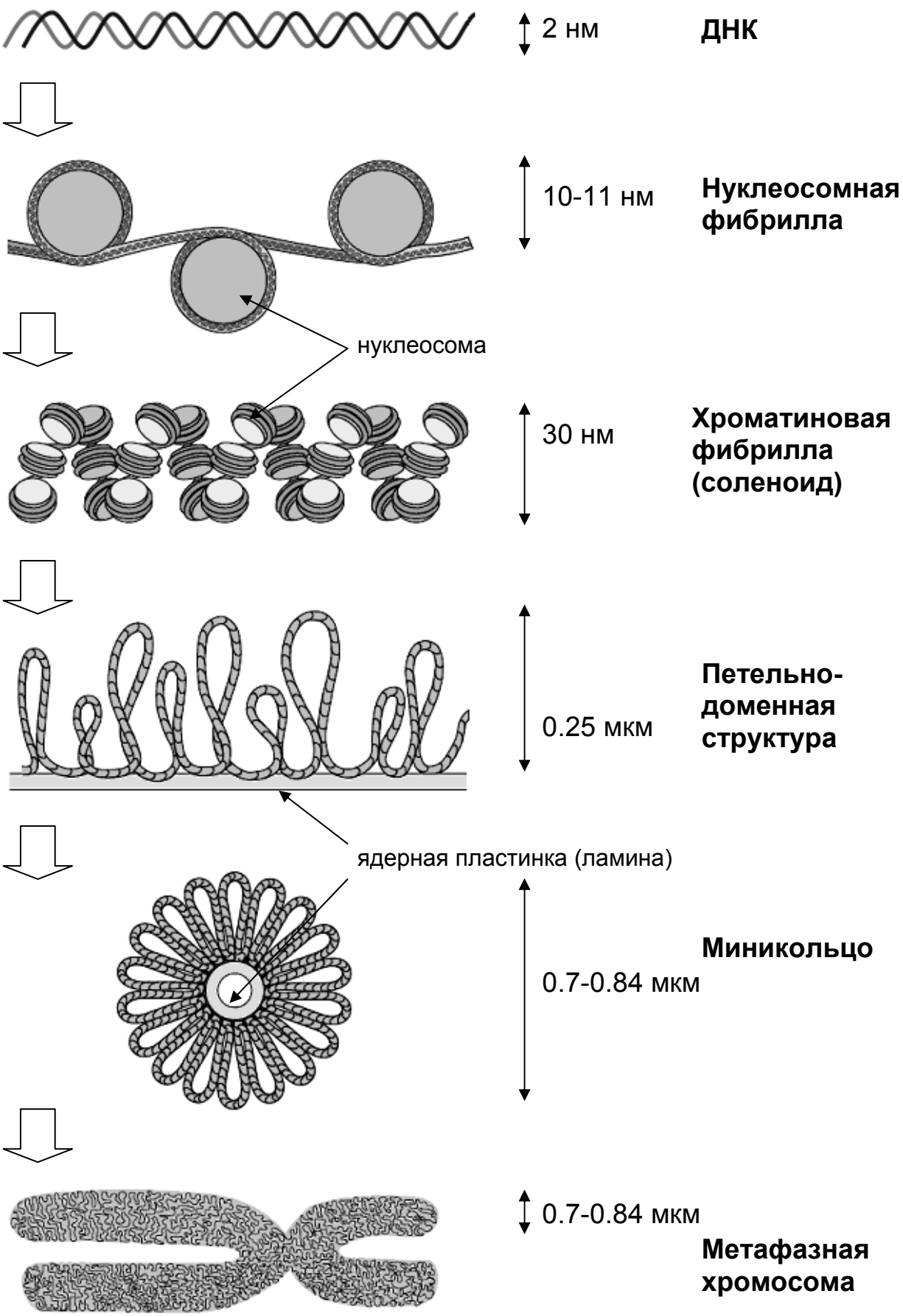


Рис. 14. Суперспирализация ДНК эукариот (цит. по Garrett, 1999)

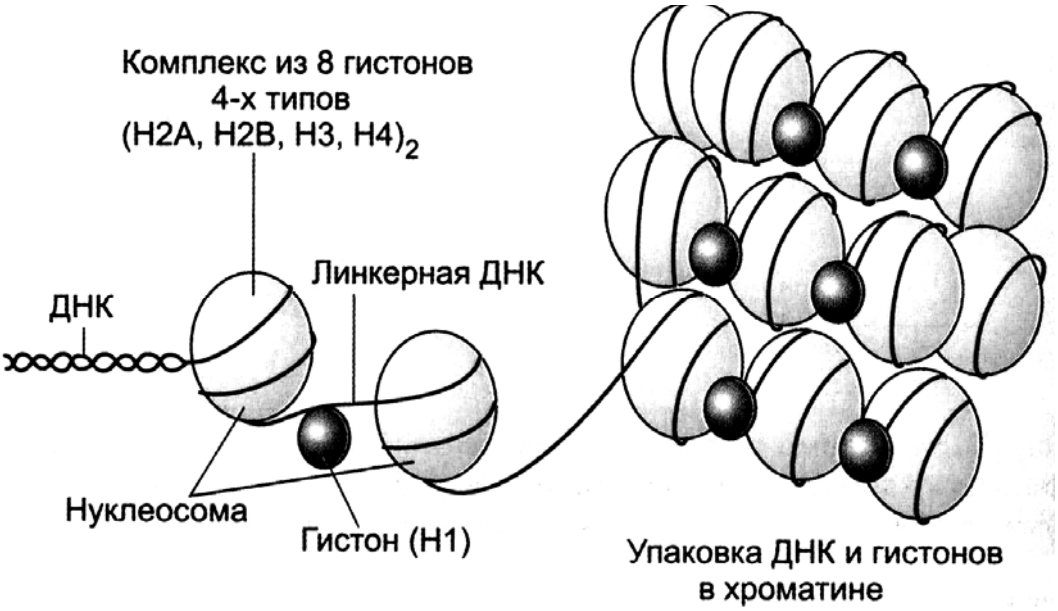


Рис. 15. Пространственная структура ДНК (цит. по Северину, 2008)

Физико-химические свойства ДНК

- Растворы нативной ДНК вязкие из-за большого отношения длины молекулы к ее диаметру.
- Благодаря азотистым основаниям ДНК поглощает свет в ультрафиолетовой области спектра с максимумом ~ 260 нм. Поглощение для нативной двуспиральной ДНК на 40-50% меньше, чем поглощение смеси свободных нуклеотидов того же состава. Это явление - гипохромнымный эффект, обусловлено стэкинг-взаимодействием. Любое отклонение от двухспирального состояния сказывается в изменении величины этого эффекта.
- Денатурация (плавление) ДНК – изменение пространственного расположения цепей ДНК без разрыва ковалентных связей, т. е. происходит расхождение цепей ДНК. Такая ДНК называется денатурированной. Переход от нативной формы к расплетенной беспорядочно скрученной денатурированной форме можно обнаружить по увеличению поглощения ультрафиолетового света (гиперхромный эффект) или по уменьшению вязкости раствора ДНК. Таким образом, за денатурацией ДНК можно наблюдать, оценивая ее гиперхромность, по величине которой можно судить о нативности ДНК.

Денатурирующие агенты: высокая температура (выше 80˚С), радиация, ультрафиолетовое излучение, изменение pH и ионной силы раствора, тяжелые металлы.

Среднюю точку температурного диапазона, при котором происходит разделение цепей ДНК, называют *точкой плавления* и обозначают $T_{пл}$. Для каждого вида ДНК характерна своя точка плавления. Чем выше содержание в ДНК Г-Ц пар, тем выше точка плавления. Это связано с тем, что пары Г-Ц более стабильны (содержат три водородных связи), следовательно, на их диссоциацию требуется больше энергии, чем на разрушение А-Т пар (две водородные связи).

Денатурация ДНК обратима. При определенных условиях две разделенные комплементарные цепи могут восстановить двойную спираль. Это явление называется ренатурацией (отжиг).

- Высокая реакционная способность. ДНК представляет собой сильную кислоту, таким образом, может образовывать прочные комплексы с положительно заряженными белками, ионами металлов.

Функции ДНК

1. Хранение наследственной информации и её передача из поколения в поколение при делении клеток.
2. Участвует в качестве матрицы в реализации генетической информации, регулирует во времени и пространстве биосинтез компонентов клетки.
3. Определяет деятельность клетки и организма в течение жизненного цикла.
4. Обеспечивает индивидуальность данного организма.

Эти функции ДНК обусловлены тем, что молекулы ДНК служат матрицей для репликации и транскрипции.

Структура и функции РНК

В цитоплазме клеток содержатся три основных вида РНК: транспортные (тРНК), матричные (мРНК) и рибосомные (рРНК).

РНК локализована в ядре клеток эукариот и составляет 4 - 10% от суммарной клеточной РНК. Основная масса ядерной РНК представлена высокомолекулярными предшественниками рРНК и тРНК. 2-10% от суммарной ядерной РНК приходится на особую фракцию гетерогенной ядерной РНК (г-яРНК), молекулы которой являются предшественниками мРНК.

Важным функциональным типом ядерной РНК являются малые ядерные РНК (м-яРНК), содержащие от 90 до 300 нуклеотидов с уникальной нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательностям сайтов сплайсинга в г-яРНК. Благодаря этому м-яРНК регулирует созревание г-яРНК в зрелые молекулы мРНК.

У некоторых вирусов РНК является основным генетическим материалом.

Молекула РНК, в отличие от ДНК, состоит, за редким исключением, из одной полинуклеотидной цепи. Полинуклеотидная цепь РНК, закручиваясь на себя, может образовывать биспиральные структуры, являющиеся вторичной структурой РНК.

Матричная РНК (мРНК). Содержание мРНК в клетках составляет 2-6% от общего количества РНК. Так как каждая молекула мРНК является матрицей в синтезе соответствующего белка их количество соответствует числу белков в организме. мРНК разнообразны по первичной структуре и являются точной копией отдельного гена. Размер молекулы зависит от размера кодируемого ею белка.

мРНК обладают сложной вторичной структурой, обеспечивающей выполнение ими матричной функции в ходе трансляции. Показано, что в целом в линейной молекуле мРНК формируется несколько двухспиральных шпилек, на концах которых располагаются «сайты» инициации и терминации трансляции.

Транспортная РНК (тРНК) составляет 10-20% от общего количества РНК клетки. тРНК участвуют в синтезе белка, являясь посредниками (адапторами) в трансляции мРНК: переводят последовательность нуклеотидов мРНК в последовательность аминокислотных остатков белковой молекулы. Каждой из 20 аминокислот соответствует своя тРНК, а для некоторых аминокислот существует несколько тРНК.

Это самые мелкие молекулы РНК, построеные из 70-93 нуклеотидов с молекулярной массой 24000-31000Да.

тРНК содержат различные минорные модифицированные основания, многие из которых представляют собой метилированные пуриновые или пиримидиновые основания. Обязательными минорными нуклеотидами для всех тРНК являются псевдоуридин и нуклеотиды, содержащие дигидроуридин. У большинства тРНК на 5'-конце находится остаток гуаниловой кислоты, а на 3'-конце всех тРНК обязательным является тринуклеотид-ЦЦА.

Вторичная структура тРНК формируется за счет образования максимального числа водородных связей между внутримолекулярными комплементарными парами азотистых оснований (рис.16). В результате образуются биспиральные ветви, заканчивающихся петлями из неспаренных нуклеотидов. Пространственное изображение вторичных структур всех тРНК имеет форму клеверного листа.

В «клеверном листе» различают четыре обязательные ветви, некоторые тРНК, кроме того, содержат короткую пятую (дополнительную) ветвь.

Адапторную функцию тРНК обеспечивают: акцепторная ветвь, к 3'-концу которой присоединяется эфирной связью аминокислотный остаток, и противостоящая акцепторной ветви антикодоновая ветвь, на вершине которой находится петля, содержащая антикодон. Антикодон представляет собой специфический триплет нуклеотидов, который комплементарен в антипараллельном направлении кодону мРНК, кодирующему соответствующую аминокислоту.

Т-Ветвь (тимидил псевдоуридиловая), содержащая псевдоуридин, обеспечивает взаимодействие тРНК с рибосомой. Д-ветвь (дигидроуридиловая), содержащая дигидроуридин, обеспечивает взаимодействие тРНК с соответствующей аминоацил-тРНК-синтетазой. Функции пятой дополнительной ветви пока мало исследованы, вероятнее всего она уравнивает длину разных молекул тРНК.

Третичная структура тРНК очень компактна и образуется путем сближения отдельных ветвей «клеверного листа» за счет дополнительных водородных связей и стэкинг-взаимодействий с образованием L-образной структуры, или «локтевого сгиба» (рис.17). При этом акцепторная ветвь и Т-ветвь располагаются в одной плоскости, а антикодоновая и Д-ветви располагаются в другой плоскости на втором конце молекулы. Третичные структуры всех тРНК настолько похожи, что смесь различных тРНК образует кристаллы. В то же время имеющиеся в пространственной структуре незначительные отличия обеспечивают специфическое узнавание тРНК соответствующими аминоацил-тРНК-синтетазами.

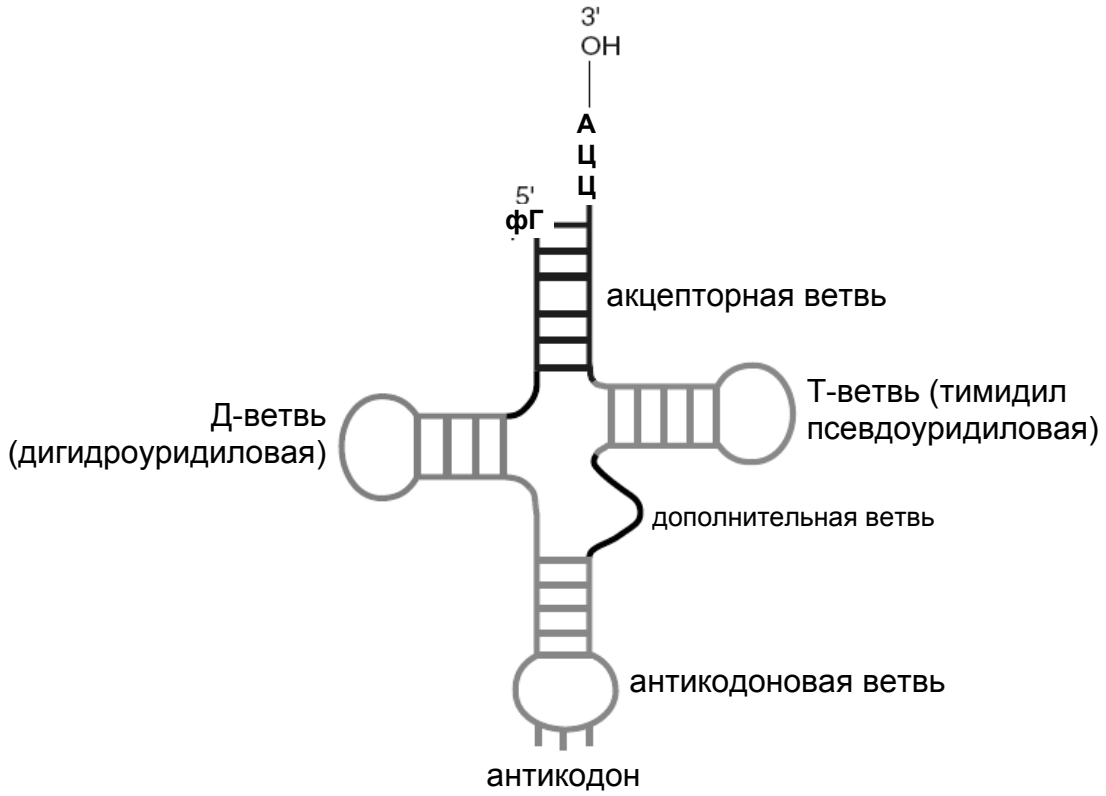


Рис. 16. Вторичная структура тРНК (цит. по Weaver, 2004)

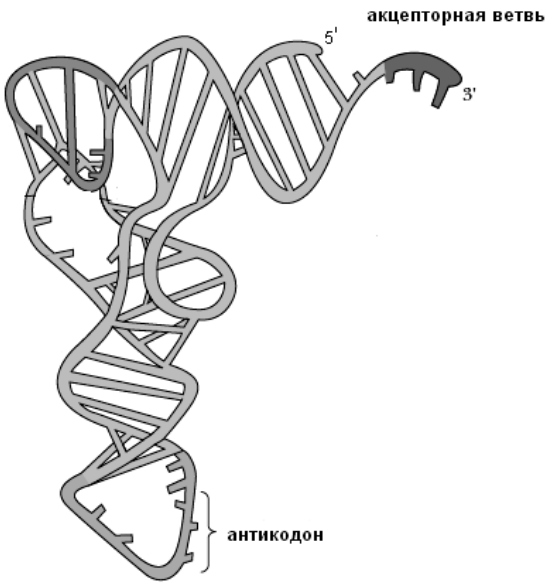


Рис. 17. Третичная структура тРНК (цит. по Garrett, 1999)

Рибосомные РНК (рРНК) – составляют около 80% всей РНК клетки и входят в состав рибосом. рРНК выполняет структурную и ферментативную функции, обеспечивают правильное взаимодействие рибосом с мРНК и тРНК.

Рибосомы состоят из двух субъединиц: большой и малой. По размерам и молекулярной массе рибосомы делят на 3 группы: 70S рибосомы прокариот, состоящие из малой 30S и большой 50S субъединиц; 80S рибосомы эукариот, состоящие из 40S малой и 60S большой субъединиц; и рибосомы митохондрий и хлоропластов, которые в общем относят к классу 70S, однако они различаются по коэффициентам седиментации у разных групп эукариот.

Малая субъединица 80S рибосом образована одной молекулой рРНК (18S около 1900 нуклеотидов) и 33 молекулами различных белков. Большая субъединица образована тремя молекулами рРНК (5S, 5,8S и 28S более 5000 нуклеотидов) и примерно 50 белками.

Прокариотические рибосомы и рибосомы митохондрий и пластид содержат меньше компонентов, но структурно и функционально очень сходны с эукариотическими:
малая субъединица состоит из 16S рРНК (более 1500 нуклеотидов) и 21 белка, а большая субъединица из двух молекул рРНК (5S, 23S около 3000 нуклеотидов) и 34 белков.

Вторичная структура рРНК образуется за счет коротких двуспиральных участков молекулы – шпилек, которые составляют около 2/3 рРНК (рис.18), 1/3 молекулы представлена однотяжевыми участками, богатыми пуриновыми нуклеотидами, с которыми преимущественно связываются белки. Очищенные рРНК способны спонтанно сворачиваться в компактные структуры, по размерам и форме похожие на рибосомные субъединицы.

Физико-химические свойства РНК

- Оптические свойства: РНК поглощает УФ с максимумом при 260 нм.
- Денатурация, РНК обладает гиперхромным эффектом.
- РНК подвергается щелочному гидролизу, т.к. присутствие ОН-группы в С2’-положении рибозы ослабляет фосфодиэфирную связь в полинуклеотиде.

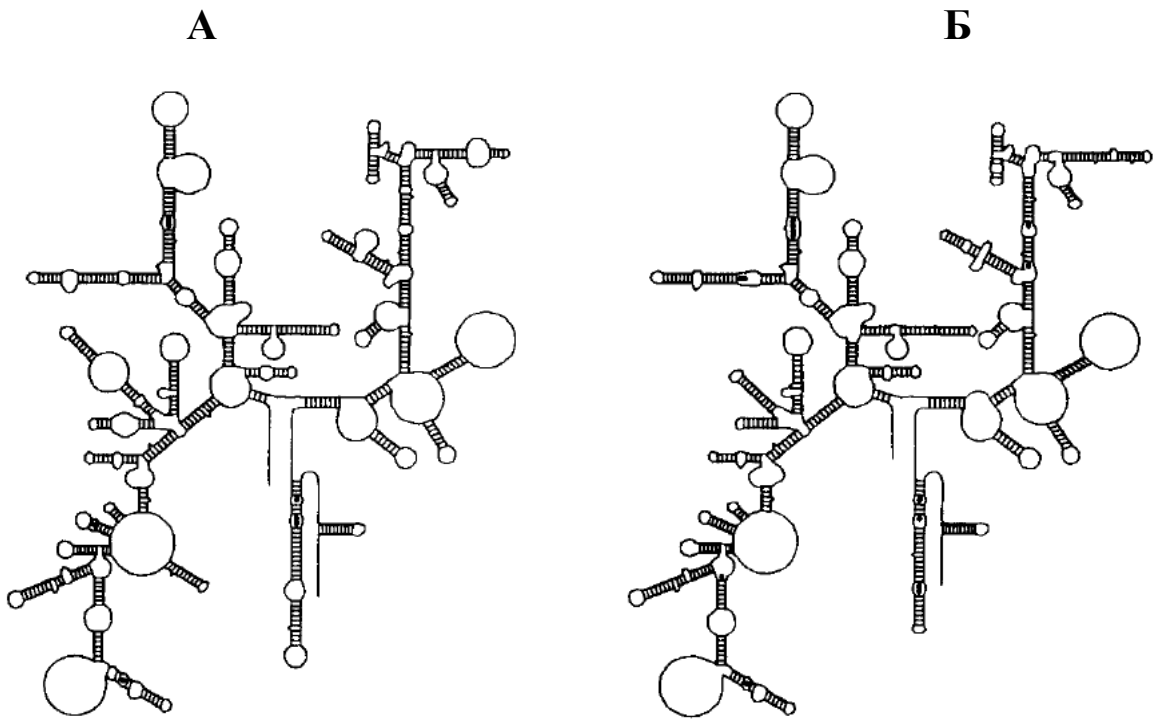


Рис. 18. Вторичная структура 16S рРНК из *E. Coli* (А), *H. volcanii* (Б) (цит. по Garrett, 1999)

Функции РНК

1. Хранение наследственной генетической информации у некоторых вирусов.
2. Передача генетичекой информации для обеспечения процессов жизнедеятельности клетки и организма.
3. Регуляторная: взаимодействие мРНК и тРНК регулирует начало синтеза белка и др.
4. Ферментативная. В 1980 г. были обнаружены и охарактеризованы молекулы РНК, обладающие ферментативной активностью, которые были названы рибозимы.

ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В клетках тканей нуклеиновые кислоты распадаются под влиянием ферментов (рис. 19). Ферменты, расщепляющие полинуклеотидные цепи, называют нуклеазами, или фосфодиэстеразами, так как они ускоряют реакции разрыва межнуклеотидных фосфодиэфирных связей в молекулах нуклеиновых кислот. Различают эндонуклеазы и экзонуклеазы.

Эндонуклеазы действуют на внутренние межнуклеотидные связи в молекулах ДНК и РНК. Таким образом, при их участии осуществляется деполимеризация нуклеиновых кислот, в основном до олигонуклеотидов.

Экзонуклеазы отщепляют нуклеотиды с 3′- или 5'-конца полинуклеотидной цепи и обеспечивают распад нуклеиновых кислот до свободных нуклеотидов.

По специфичности действия различают дезоксирибонуклеазы (ДНКазы, расщепляющие ДНК) и рибонуклеазы (РНКазы, гидролизующие РНК). В результате их действия образуются олигонуклеотиды и лишь небольшое количества мононуклеотидов.

Рибо- и дезоксирибонуклеозидфосфаты расщепляются до нуклеозидов и фосфорной кислоты под действием фосфатаз (нуклеотидаз).

Нуклеозиды могут расщепляться гидролитическим путем с участием фермента нуклеозидазы:

Аденозин + H_2O → Аденин + рибоза

Пентозы окисляются до CO_2 и H_2O; фосфорная кислота используется для фосфорилирования органических соединений или выводится из организма. Азотистые основания превращаются в конечные продукты обмена и выделяются с мочой.

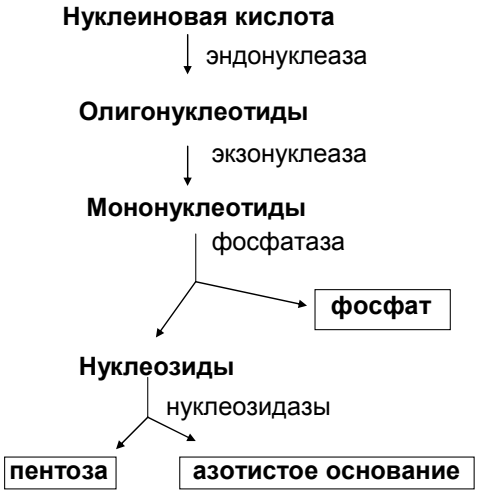


Рис. 19. Схема расщепления нуклеиновых кислот

Продукты гидролиза нуклеиновых кислот поступают в клетки организма, где используются для синтеза нуклеотидов, нуклеиновых кислот, или же для удовлетворения энергетических потребностей клетки и организма.

Катаболизм пуриновых нуклеотидов

У человека катаболизм пуриновых нуклеотидов заканчивается образованием мочевой кислоты. У других млекопитающих имеется фермент уратоксидаза, превращающая мочевую кислоту в более растворимый аллантоин (рис. 20). У некоторых животных аллантоин может распадаться далее до мочевины или аммиака.

Первоначально нуклеотиды гидролитически теряют фосфатный остаток в реакциях, катализируемых фосфатазами или нуклеотидазами (рис. 21).

Аденозин дезаминируется аденозиндезаминазой с образованием инозина. Пуриннуклеозидфосфорилаза расщепляет нуклеозиды до свободных оснований и рибозо-1-фосфата.

Гуанин под действием фермента гуаназы превращается в ксантин.

Затем ксантиноксидаза превращает азотистые основания в мочевую кислоту. Фермент в значительных количествах обнаруживается в печени и кишечнике и окисляет пурины молекулярным кислородом.

Мочевая кислота удаляется из организма человека главным образом с мочой и немного с фекалиями. Мочевая кислота плохо растворяется в воде (1:15000) и при нарушении обмена нуклеиновых кислот, особенно при избыточном поступлении в организм пуринов, мочевая кислота и ее соли откладываются в виде кристаллов в суставах пальцев, хрящах, в коже и мышцах, образуя узелки. Вокруг узелков развивается очень болезненный воспалительный очаг. Это заболевание известно под названием подагра.

Катаболизм пиримидиновых нуклеотидов

Основной путь катаболизма пиримидинов в организме человека и млекопитающих включает восстановление урацила или тимина с образованием полностью гидрированного гетероцикла соответственно дигидроурацила или дигидротимина. Расщепление цитозина происходит по тому же самому механизму, что и двух других нуклеотидов, после его дезаминирования на первой стадии под действием фермента цитозиндезаминазы и образования урацила.

Раскрытие кольца в дигидроураниле приводит к образованию β-уреидопропионовой кислоты, которая далее гидролизуется до CO_2, NH_3 и β-аланина. При аналогичном механизме превращения тимина из него получаются CO_2, NH_3 и β-аминоизомасляная кислота (рис. 22).

Продукты катаболизма пиримидинов либо выводятся из организма, либо повторно утилизируются в других метаболических процессах. Так, аммиак включается в орнитиновый цикл образования мочевины. β-аланин используется при биосинтезе витамина B_3 (пантотеновая кислота), который, в свою очередь, необходим для синтеза коэнзима А и ацилпереносящего белка — компонента, участвующего в синтезе жирных кислот.

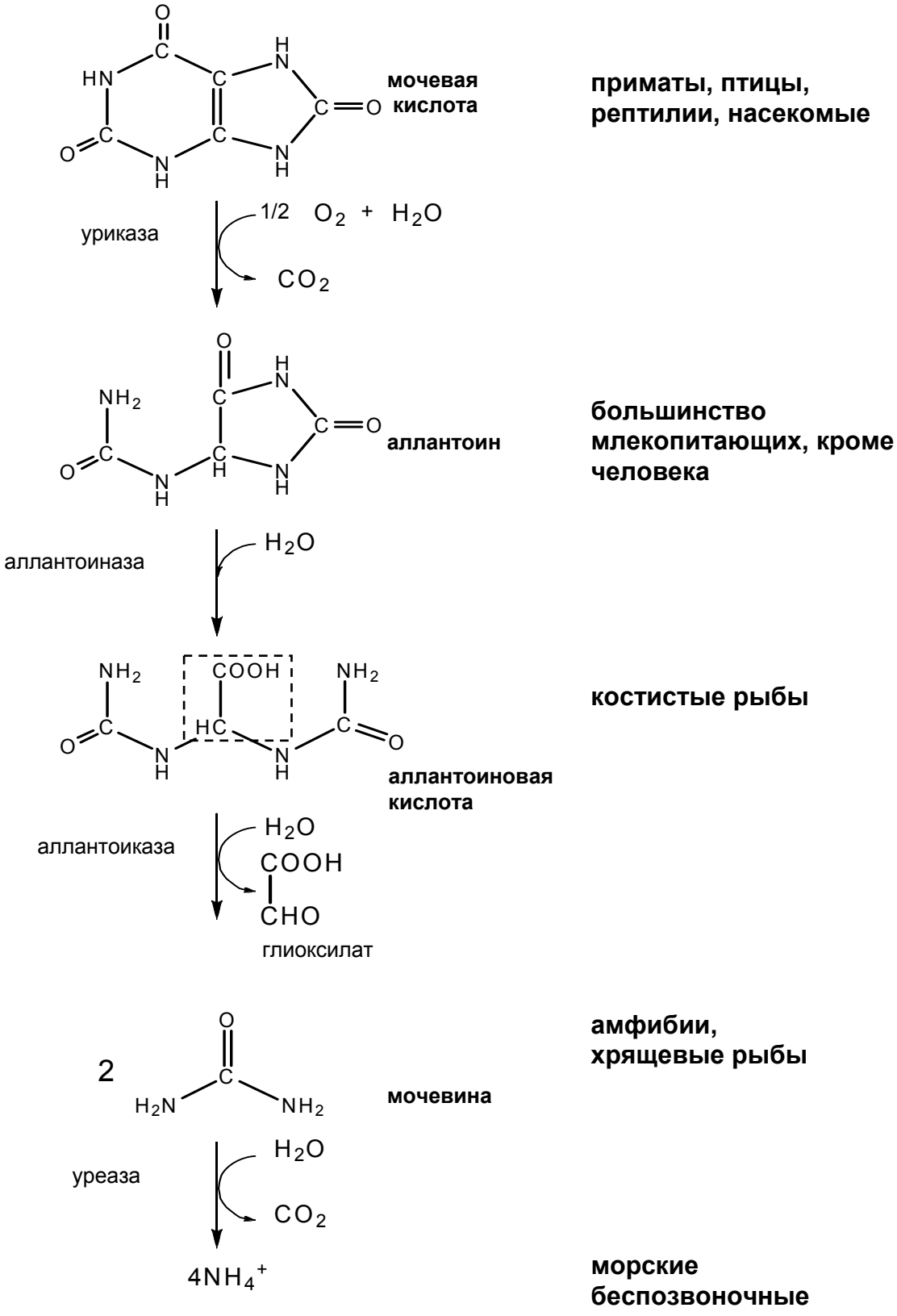


Рис. 20. Схема катаболизма мочевой кислоты

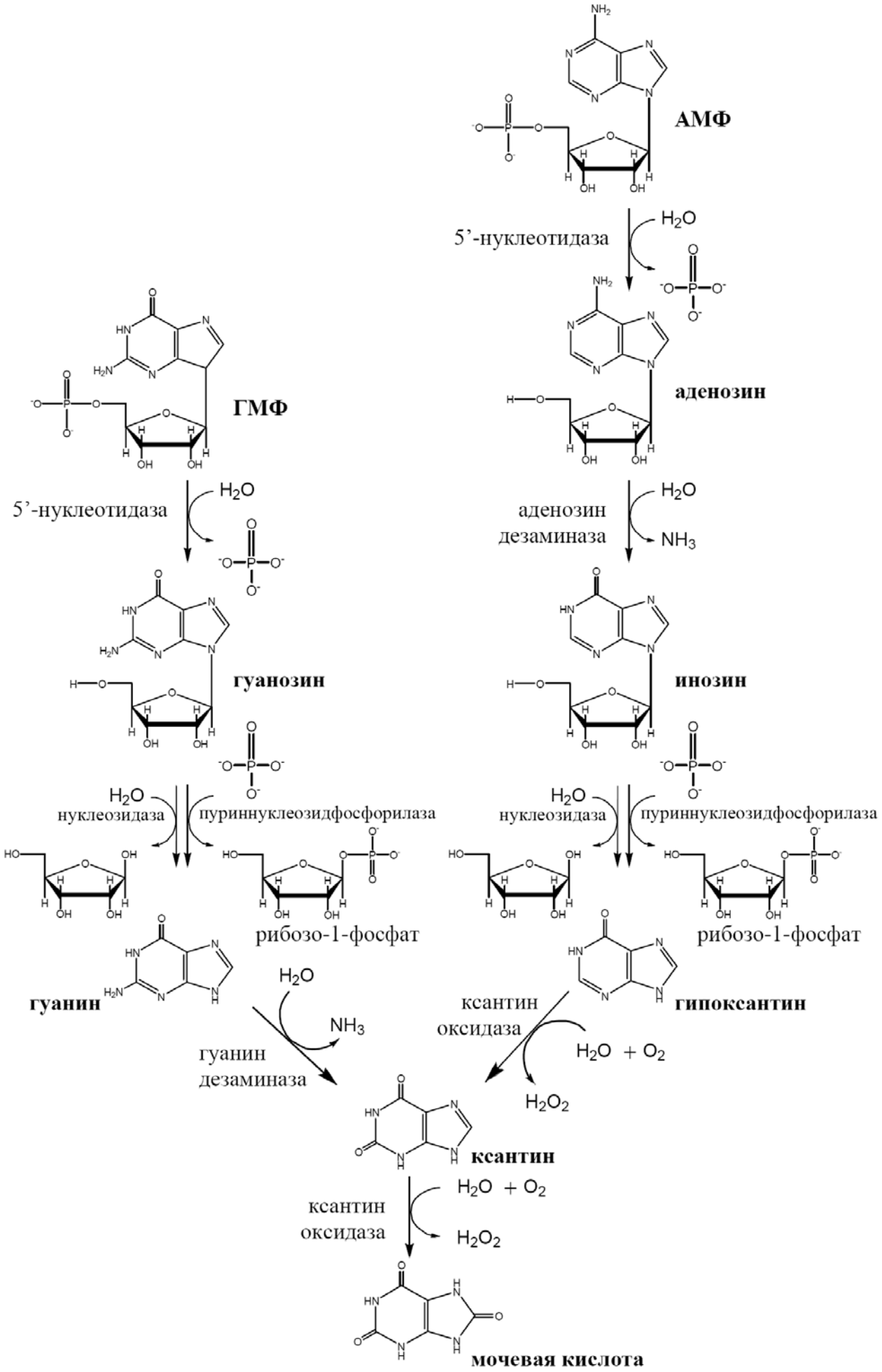


Рис. 21. Схема катаболизма пуриновых нуклеотидов

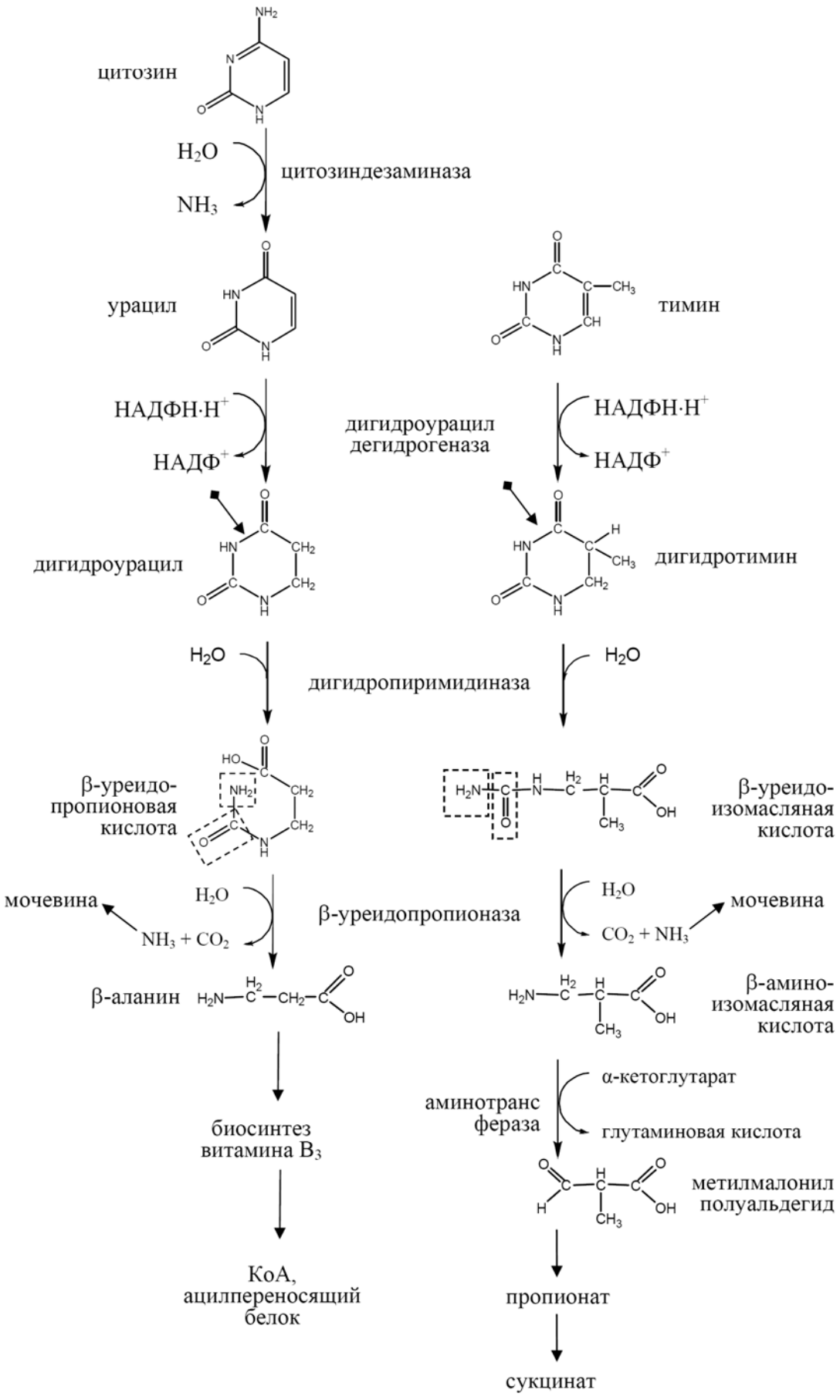


Рис. 22. Схема катаболизма пиримидиновых нуклеотидов

Анаболизм нуклеотидов

Субстратом для синтеза нуклеотидов в клетках и тканях могут служить продукты гидролиза ДНК и РНК, а также продукты обмена белков и углеводов.

Для синтеза обоих типов нуклеотидов фосфорибозильный компонент участвует в виде 5-фосфорибозил-1-пирофосфата (ФРПФ), который образуется при фосфорилировании рибозо-5-фосфата – промежуточного метаболита пентозофосфатного пути. Реакция катализируется ФРПФ-синтетазой (рис. 23). Однако пути синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов различны (табл. 4).

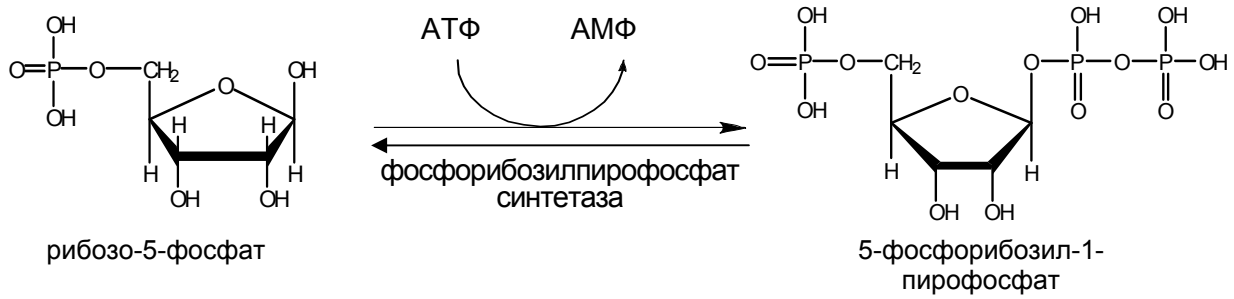


Рис. 23. Образование ФРПФ

Таблица 4

Сравнительная характеристика путей синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов (цит. по Тагановичу, 2008)

Особенности синтеза	Путь синтеза пуринов	Путь синтеза пиримидинов
Последовательность синтеза	1. Образование N-гликозидной связи 2. Сборка кольцевой структуры	1. Сборка кольцевой структуры 2. Образование N-гликозидной связи
Ключевая реакция	Образование фосфорибозиламина (фосфорибозиламидотрансфераза)	Образование карбамоилфосфата (аспартаттранскарбамоилаза)
Локализация в клетке	Цитозоль	Митохондрии и цитозоль
Ферментная организация	Отдельные ферменты и полифункциональные (3)	Отдельные ферменты и полифункциональные (2)
Регуляция	Торможение ИМФ, АМФ и ГМФ на нескольких уровнях	Торможение УТФ карбамоилфосфатсинтетазы II

Биосинтез пуриновых нуклеотидов

Происхождение каждого атома пуринового гетероцикла установлено экспериментами с использованием изотопов (рис. 24).

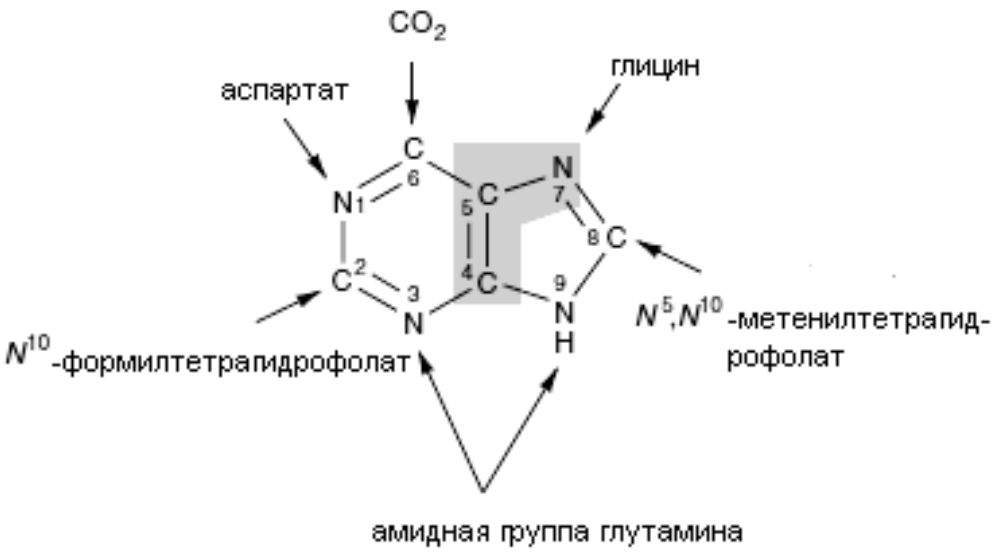


Рис. 24. Происхождение атомов углерода и азота в пуриновом основании (цит. по Murray, 2003)

Как видно из схемы (рис.24), два атома азота (N3 и N9) пуринового кольца происходят из амидной группы глутамина, третий атом азота (N1) — из аспартата и, наконец, четвертый (N7) — из глицина. Четвертый и пятый атомы углерода также происходят из глицина. Таким образом, молекула глицина дает три атома. Второй и восьмой атомы углерода происходят из формиата), а шестой атом углерода — из CO_2.

Формирование пуринового кольца сразу идет на рибозо-5-фосфате. В результате последовательных реакций наращивания пуринового цикла образуется инозин-5'-монофосфат (ИМФ) — ключевое соединение в синтезе пуриновых нуклеотидов.

Синтез первого пуринового нуклеотида — ИМФ включает 10 стадий (у высших эукариот) и протекает с затратой АТФ. Все реакции протекают в цитозоле клетки (рис. 25). АМФ и ГМФ образуются из ИМФ в каждом случае в ходе двух последовательных реакций (рис. 26).

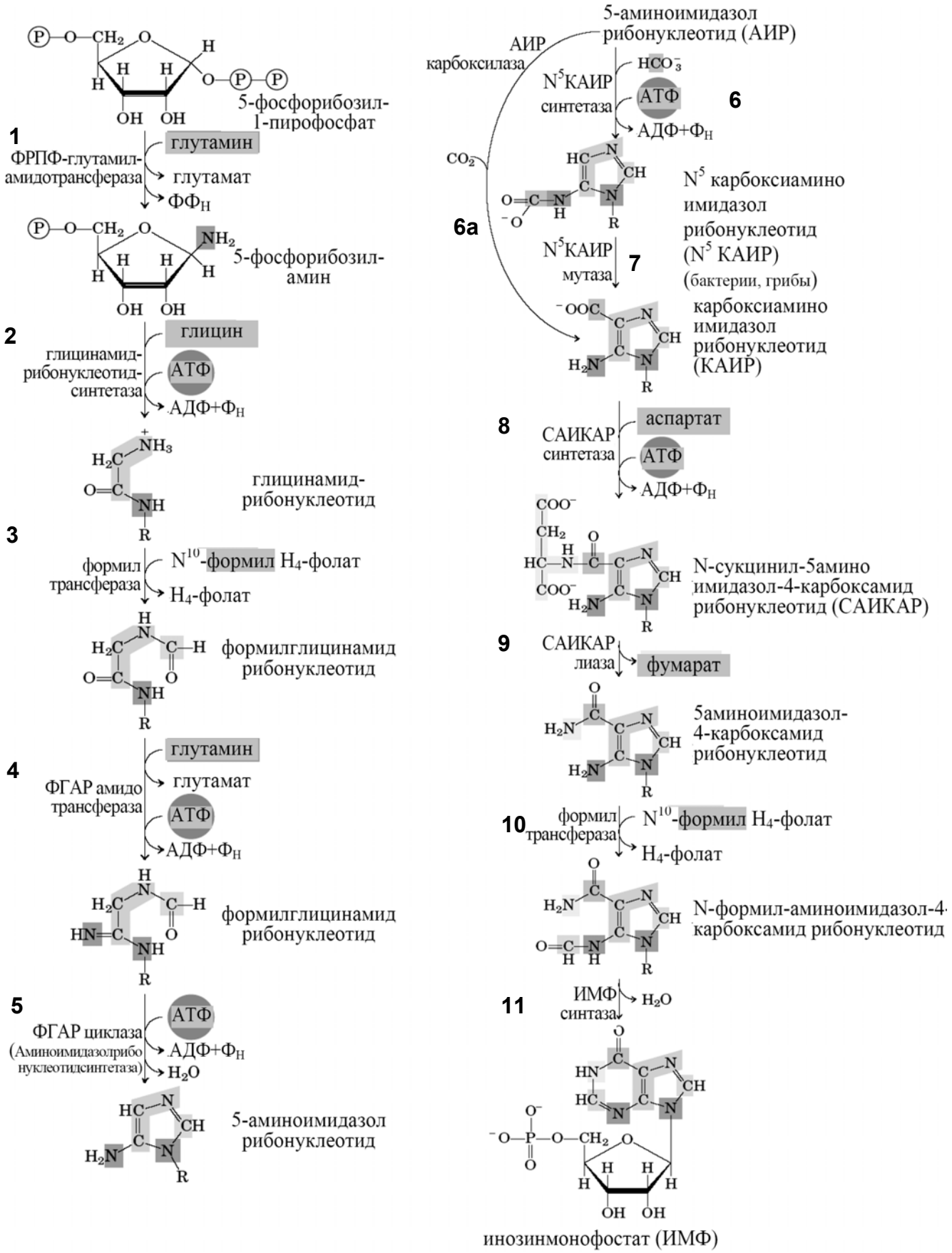


Рис. 25. Синтез инозинмонофосфата (ИМФ)

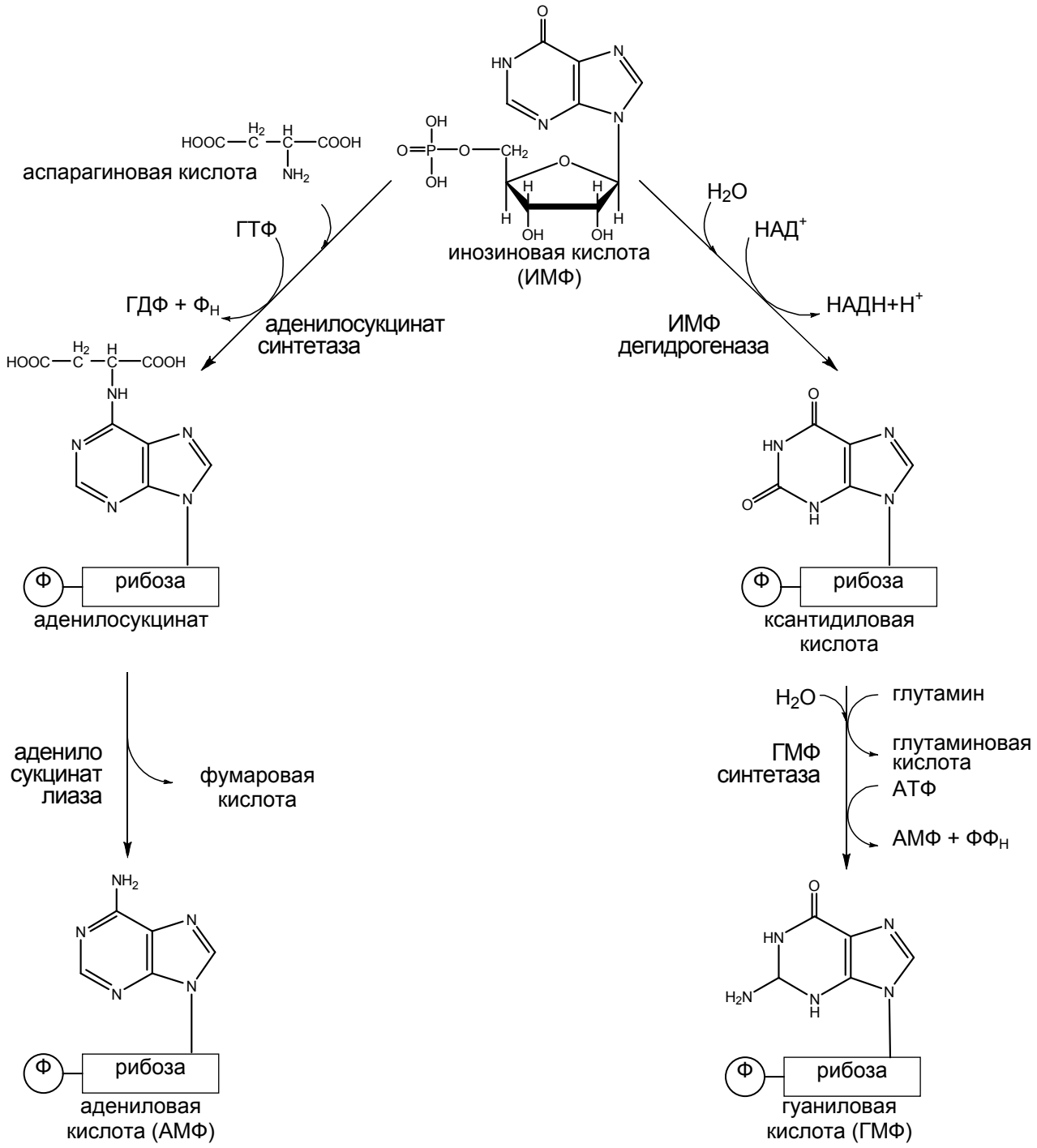
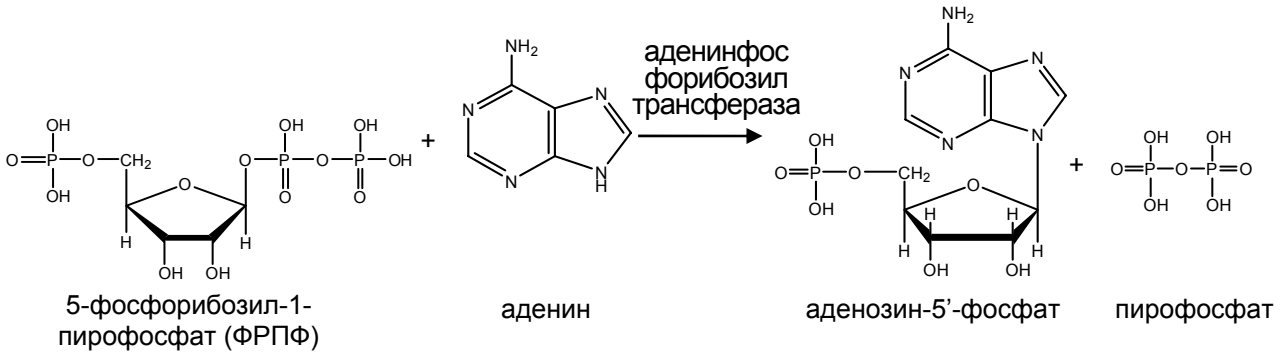


Рис. 26. Синтез аденозинмонофосфата (АМФ) и гуанозинмонофосфата (ГМФ) из инозинмонофосфата (ИМФ)

Альтернативный путь синтеза пуриновых нуклеотидов. Это реакции «сбережения», т.е. пути реутилизации пуриновых оснований, образующихся в процессе катаболизма нуклеотидов. Ферменты гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза (ГФРТ) и аденинфосфорибозилтрансфераза (АФРТ), утилизирующие свободные пурины, превращают их вновь в нуклеотиды при взаимодействии с ФРПФ (рис. 27).



гипоксантин-гуанин-фосфорибозил трансфераза

5-фосфорибозил-1-пирофосфат + Гуанин → ГМФ + $ФФ_н$

5-фосфорибозил-1-пирофосфат + Гипоксантин → ИМФ + $ФФ_н$

Рис. 27. Альтернативный путь синтеза пуриновых нуклеотидов

Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов

Синтез пиримидиновых нуклеотидов происходит также поэтапно (рис.28), вначале образуется карбомоилфосфат из NH_3, CO_2, АТФ. Затем с участием аспарагиновой кислоты образуется дигидрооротовая кислота, затем оротовая кислота.

Оротовая кислота далее взаимодействует с 5'-фосфорибозил-1-пирофосфатом, при этом синтезируется оротидин-5-фосфат, который затем декарбоксилируется с образованием уридинмонофосфата, который является общим предшественником всех пиримидиновых нуклеотидов.

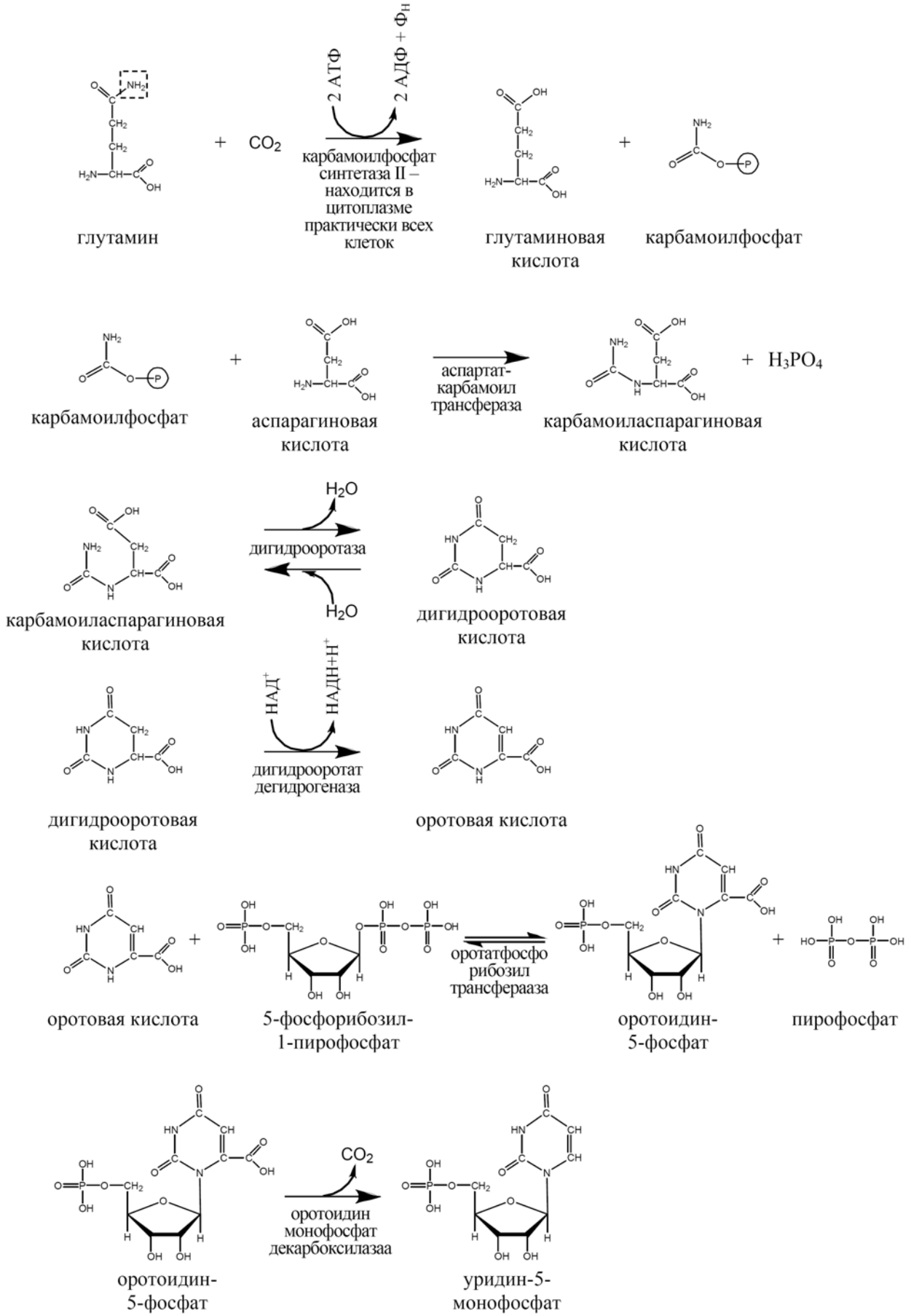


Рис. 28. Синтез уридинмонофосфата (УМФ)

Из уридиловой кислоты при аминировании углерода за счет глутамина образуется цитидинмонофосфат (рис.29), а при метилировании – тимидиловая кислота (рис.31).

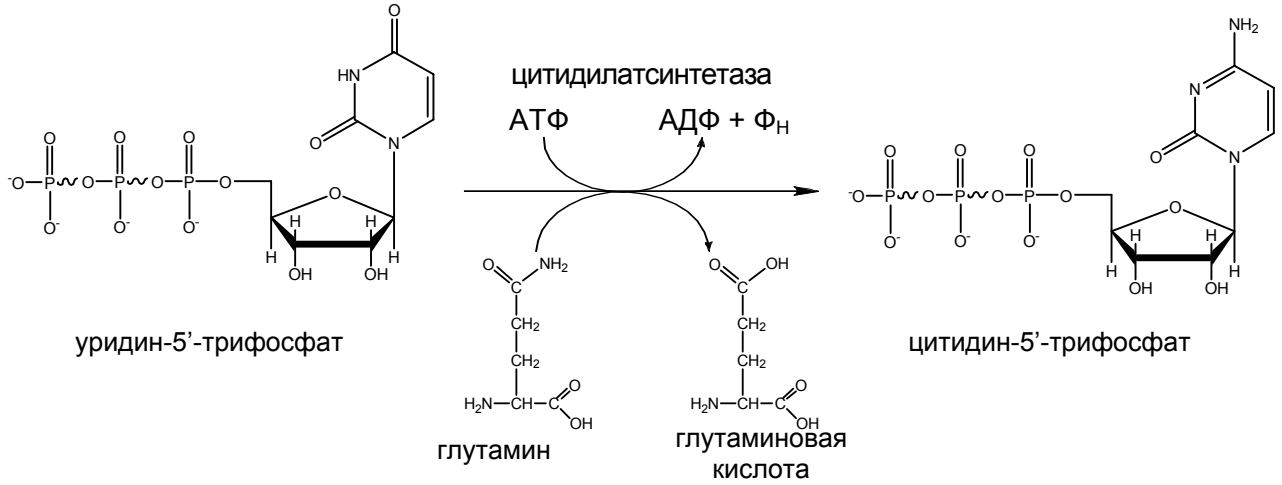
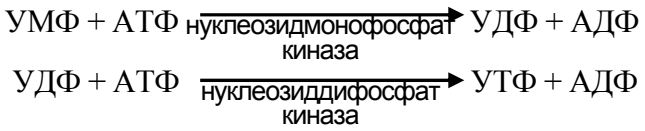


Рис. 29. Образование цитидинмонофосфата (ЦМФ) из уридинмонофосфата (УМФ)

Нуклеозидди- и трифосфаты синтезируются при участии АТФ и ферментов: нуклеозидмонофосфат- и нуклеозиддифосфаткиназ в результате трансферазных реакций по следующей схеме:

Пуриновые и пиримидиновые нуклеозид-5'-монофосфаты превращаются в макроэргические нуклеозид-5'-дифосфаты, которые далее переходят в богатые энергией нуклеозид-5'-трифосфаты. Процессы фосфорилирования нуклеотидов идут при их взаимодействии с универсальным источником энергии АТФ при участии специфических фосфотрансфераз (киназ), например:



Биосинтез дезоксирибонуклеотидов

Дезоксирибонуклеотиды образуются из соответствующих рибонуклеозидфосфатов путём непосредственного восстановления по второму углеродному атому рибозы рибонуклеотид редуктазой (рис. 30):

ЦДФ → дЦДФ → дЦТФ
ГДФ → дГДФ → дГТФ
АДФ → дАДФ → дАТФ
УДФ → дУМФ →→дТТФ

Источником восстановительных эквивалентов является термостабильный белок - тиоредоксин, который содержит две свободные SH-группы. Тиоредоксинредуктаза катализирует НАДФН-зависимое восстановление тиоредоксина.

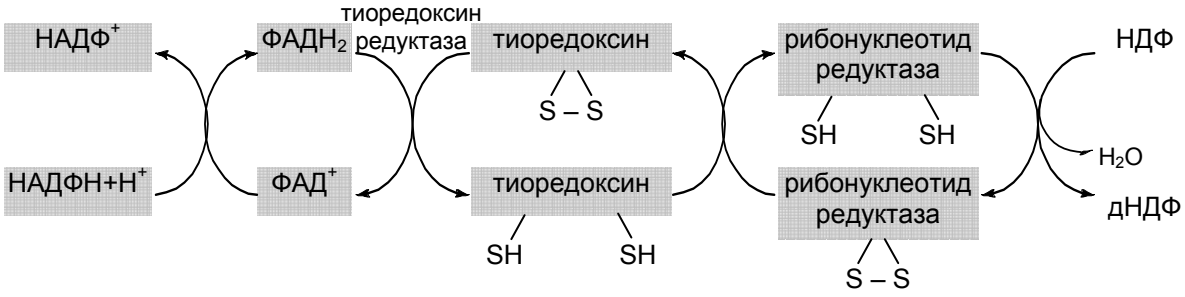
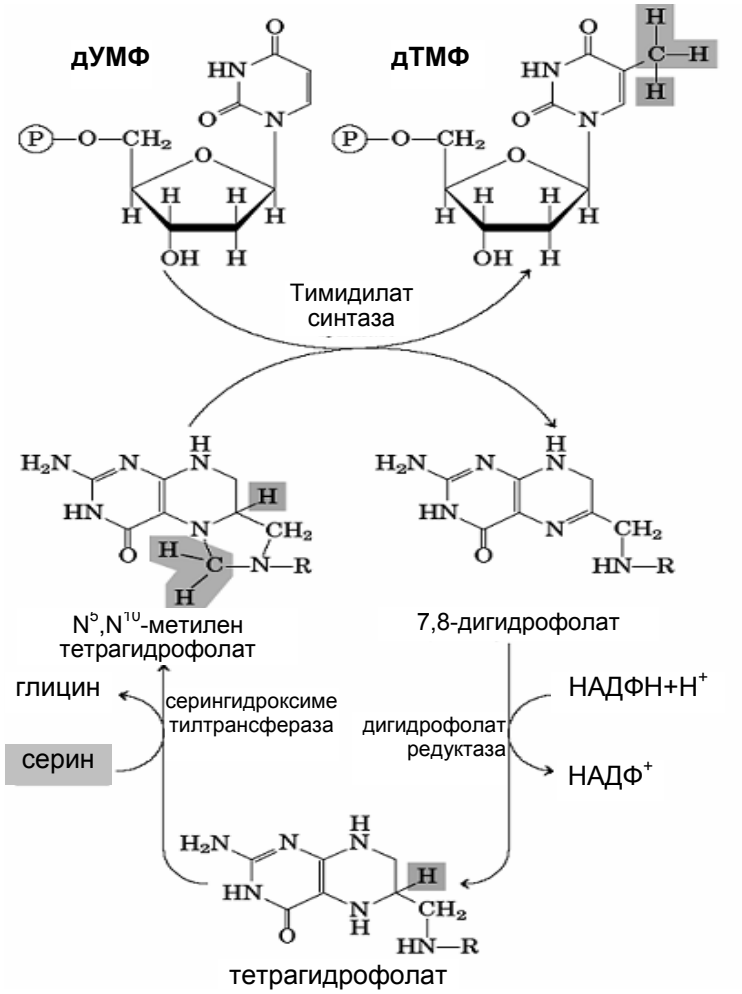


Рис. 30. Биосинтез дезоксирибонуклеотидов

1) дУДФ + H_2O → дУМФ + $Ф_н$

2)



3) дТМФ → дТДФ → дТТФ

АТФ АДФ — нуклеозидмонофосфат-трансферазы

АТФ АДФ — нуклеозиддифосфат-трансферазы

Рис. 31. Биосинтез дезокситимидинтрифосфата

Биосинтез всех дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов и рибонуклеозид-5'-трифосфатов регулируется в клетке таким образом, что они образуются зависимо друг от друга в строго определенные соотношениях.

Регуляция синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов

Регуляция синтеза пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов осуществляется аллостерически по механизму отрицательной обратной связи (рис. 32).

АМФ, ГМФ и ИМФ ингибируют ключевые реакции своего синтеза. ФРДФ-синтетаза и амидофосфорибозилтрансфераза ингибируются лишь при одновременном повышении концентрации АМФ и ГМФ. Активность аденилосукцинатсинтетазы и ИМФ-дегидрогеназы снижается лишь при увеличении количества конечного продукта, образующегося в каждой из ветвей метаболического пути. АМФ ингибирует превращение ИМФ в аденилосукцинат, а ГМФ — превращение ИМФ в ксантозин-5'-монофосфат (КМФ), обеспечивая таким образом сбалансированное содержание адениловых и гуаниловых нуклеотидов.

Регуляторными ферментами синтеза пиримидинов в животных тканях являются карбамоилфосфатфинтетаза II, аллостерическим ингибитором которой является УТФ, и аспартаткарбамоилтрансфераза, которая ингибируется ЦТФ.

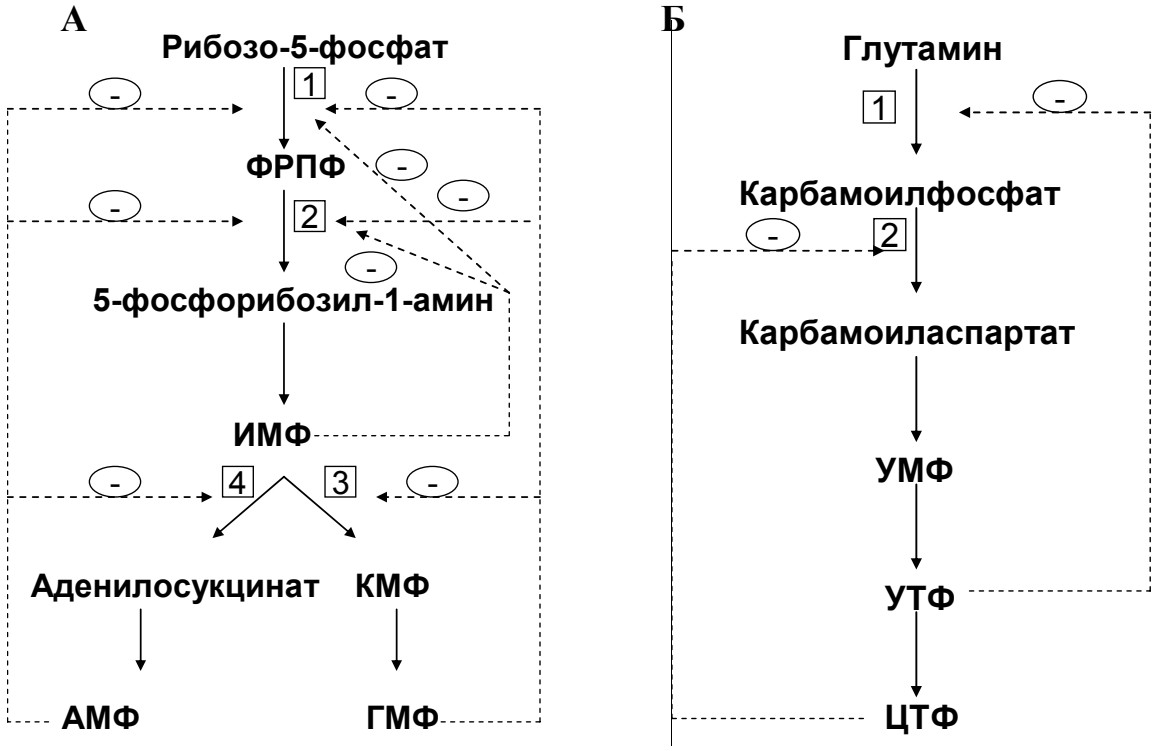


Рис. 32. Схема регуляции синтеза нуклеотидов:
А – пуриновых нуклеотидов (1 – ФРПФ-синтетаза,
2 – амидофосфорибозилтрансфераза, 3- ИМФ-дегидрогеназа,
4 – аденилосукцинатсинтетаза);
Б – пиримидиновых нуклеотидов (1 – карбамоилфосфатсинтетаза II,
2 – аспартаткарбамоилтрансфераза)

Нарушения обмена нуклеотидов

Основные заболевания, обусловленные нарушением обмена пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, представлены в табл. 5.

Таблица 5

Заболевания, связанные с нарушением обмена нуклеотидов
(цит. по Комову, 2004; Тагановичу, 2008)

Заболевание	Симптомы	Биохимические нарушения
Нарушение обмена пуриновых нуклеотидов		
Подагра	Гиперурикемия. Отложение уратов в области суставов, сухожилий, хрящей, сопровождающееся сильным болевым синдромом	1. Недостаточность ферментов утилизации пуринов 2. Активация синтеза пуринов 3. Уменьшение экскреции мочевой кислоты почками
Синдром Леша-Нихана	Гиперурикемия. Поражение нервной системы с явлениями деменции, агрессивности	1. Отсутствие фермента гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы. 2. Отсутствие утилизации гуанина и гипоксантина 3. Уменьшение ингибирования ФРПФ-амидотрансферазы ИМФ и ГМФ по механизму обратной связи
Иммунодефицит	Гиперурикемия	Отсутствие фермента пуриновой нуклеотидфосфорилазы
Почечно-каменная болезнь	2,8-дигидрокси-адениловый почечный литиаз	Отсутствие фермента аденозинфосфорибозилтрансферазы
Ксантинурия	Гипоурикемия и ксантиновый почечный литиаз	Отсутствие фермента ксантиноксидазы
Болезнь Гирке	Гипоурикемия и ксантиновый почечный литиаз	Отсутствие фермента глюкозо-6-фосфатазы
Нарушение обмена пиримидиновых нуклеотидов		
Оротацидурия	Гипероротацидурия. Резкое отставание умственного и физического развития. Мегалобластическая анемия	1. Ферментативная недостаточность оротатфосфорибозилтрансферазы и оротидинмонофосфатдекарбоксилазы 2. Уменьшение ингибирования карбамоилфосфатсинтетазы УТФ по механизму обратной связи 3. Недостаточность пиримидиновых нуклеотидов
Лекарственная оротовая ацидурия	Гипероротацидурия	Лечение аллопуринолом и 6-азауридином тормозит оротидинмонофосфатдекарбоксилазу

Биосинтез нуклеиновых кислот

Репликация

Полимеризация дочерней ДНК на матрице ДНК приводит к ее удвоению или репликации. Синтез ДНК протекает в ядре в S-фазу клеточного цикла и предшествует делению клетки.

Для реализации репликации необходимы: матрица – расплетенная цепь ДНК, субстраты, участвующие в полимеризации ДНК (нуклеозидтрифосфаты), ферменты, катализирующие этот процесс, ионы Mg2+, а также белковые факторы, обеспечивающие деспирализацию двухнитевой ДНК.

Механизмы репликации одинаковы для прокариот и эукариот.

Синтез ДНК происходит одновременно на обеих цепях ДНК. В основе – принцип комплементарности. Процесс является полуконсервативным, так как по завершении репликации каждая дочерняя молекула ДНК содержит одну родительскую и одну вновь синтезированную цепь.

Репликон – единица генома, в которой содержатся точка начала репликации (origin) – точка ori – последовательность ДНК, в которой инициируется процесс удвоения ДНК, и точка окончания репликации (terminus) – сегмент ДНК, в котором процесс удвоения ДНК останавливается. Репликативная вилка – область репликации ДНК, перемещающаяся от ori вдоль родительской ДНК, которая расплетается и служит матрицей для синтеза дочерней ДНК.

У прокариот ДНК имеет форму кольца и содержит один репликон. В ori-сайте (точка начала репликации) цепи расходятся и образуется две репликативных вилки, движущихся в противоположных направлениях. У эукариот имеется большое число репликонов и ori-сайтов, и репликация проходит одновременно на многих участках ДНК.

Процесс синтеза ДНК включает стадии: инициации, элонгации и терминации.

Этапы репликации у прокариот.

Синтез ДНК у прокариот осуществляют ДНК-полимеразы:
ДНК-полимераза I, которая участвует в репликации и репарации;
ДНК-полимераза II – вероятно, участвует в репарации;
ДНК-полимераза III – основной фермент репликации.

Инициация репликации. Репликация начинается с расплетения двойной спирали ДНК и образования репликативной вилки. Это осуществляется при помощи ферментов хеликаз, которые перемещаются вдоль цепей ДНК и раскручивают их. Процесс расплетения двойной спирали ДНК является энергозависимым и требует затраты АТФ. Далее SSB-белки (single strand binding) специфично связываются с одноцепочечной ДНК и препятствуют образованию двойных спиралей (ренатурации ДНК) и шпилечных структур.

Интенсивное раскручивание ДНК может приводить к образованию дополнительных супервитков, которые «снимают» топоизомераты (гираза).

Праймаза комплементарно из рибонуклеозидтрифосфатов синтезирует на матрице ДНК праймер, или РНК-затравку – короткий фрагмент РНК (10-12 нуклеотидов), 3’-ОН-конец которого используется для дальнейшего синтеза ДНК ключевым ферментом репликации ДНК у прокариот - ДНК-полимеразой III.

Элонгация репликации. Субстратами для синтеза дочерних цепей являются четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (дНТФ): дАТФ, дТТФ, дЦТФ, дГТФ. С 3’-ОН-конца праймера ДНК-полимераза III начинает синтезировать новую цепь ДНК присоединением каждого последующего дНТФ только к 3’-ОН-концу имеющейся цепи с выделением пирофосфата:

$$\mathbf{НТФ + (НМФ)_n \rightarrow (НМФ)_{n+1} + ФФ_H}$$

Синтез дочерних цепей ДНК идет в направлении 5’→3’ одновременно на обеих цепях матрицы ДНК.

Однако, так как цепи ДНК антипараллельны, а ДНК-полимеразы синтезируют ДНК

присоединением каждого последующего нуклеотида только к 3’-концу имеющейся цепи, в 1960-х гг. Рейжи Оказаки экспериментально доказал, что синтез одной цепи ДНК происходит фрагментарно, прерывисто. Эти фрагменты были названы фрагментами Оказаки.

Т.о. синтез одной цепи происходит непрерывно от 5’- к 3’-концу в направлении движения репликативной вилки и необходим только 1 акт инициации и один праймер. Эта цепь называется лидирующей (рис. 33).

Синтез второй цепи ДНК, которая называется Отстающей, также происходит от 5’- к 3’-концу, но в противоположном направлении репликативной вилки, инициируется многократно, т.о. синтезируется много праймеров и фрагментов Оказаки. У прокариот фрагменты Оказаки имеют длину около 1000 нуклеотидов, у эукариот – 150-300 нуклеотидов.

ДНК-полимераза III синтезирует цепь ДНК до следующей затравки (рис. 34). Далее ДНК-полимераза I удаляет праймер с 5’-конца и одновременно замещая рибонуклеотиды дезоксирибонуклеотидами, а ДНК-лигаза сшивает фрагменты Оказаки в непрерывную цепь.

При включении неправильного нуклеотида ДНК-полимеразы I и III удаляют ошибочный нуклеотид с 3’-конца, гидролизуя фосфодиэфирную связь.

В результате образуются дочерние цепи, комплементарные и антипараллельные цепям материнской ДНК.

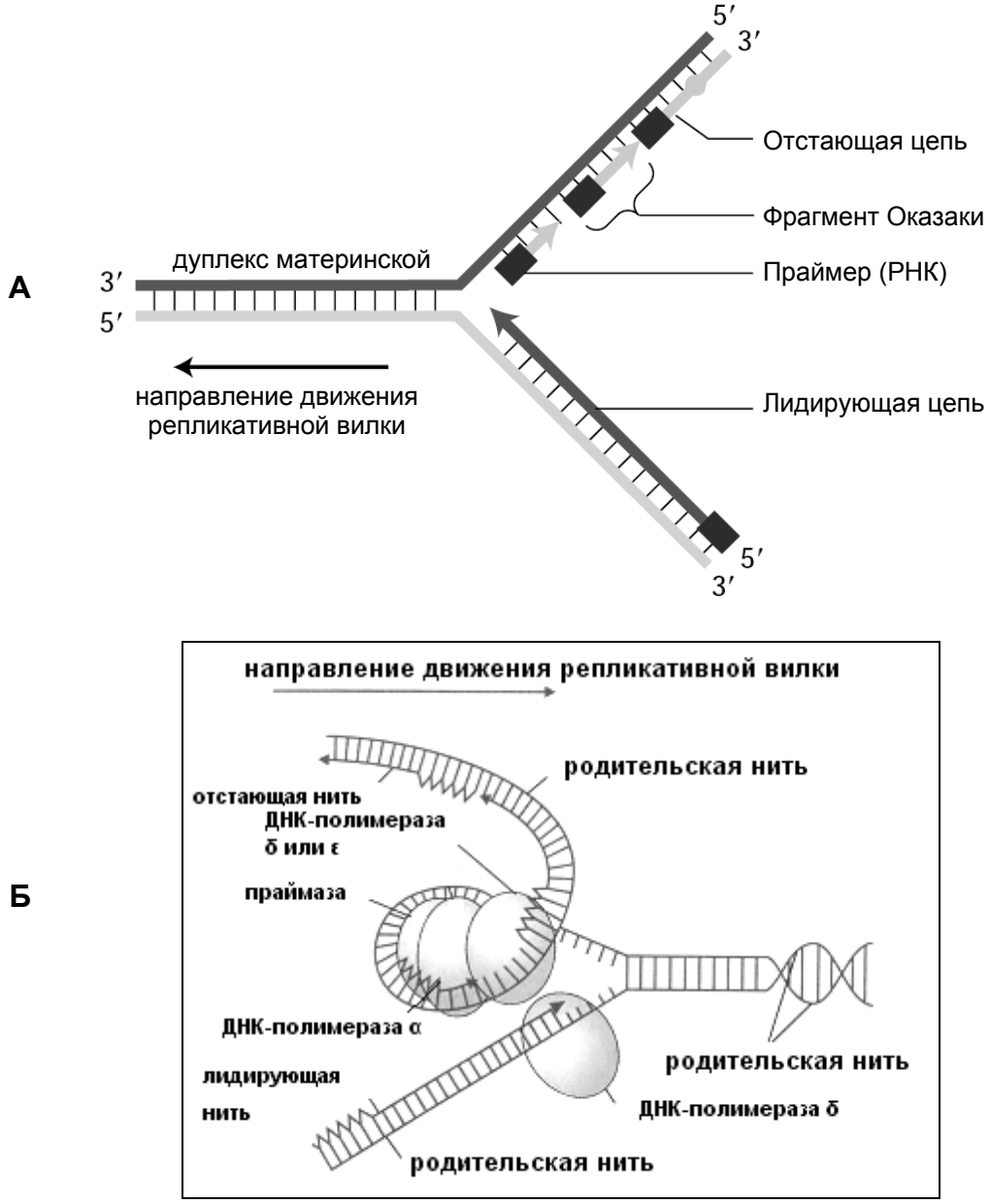


Рис. 33. Схематическое изображение синтеза ДНК в репликативной вилке (А - цит. по Lodish, 2003; Б - цит. по Северину, 2008)

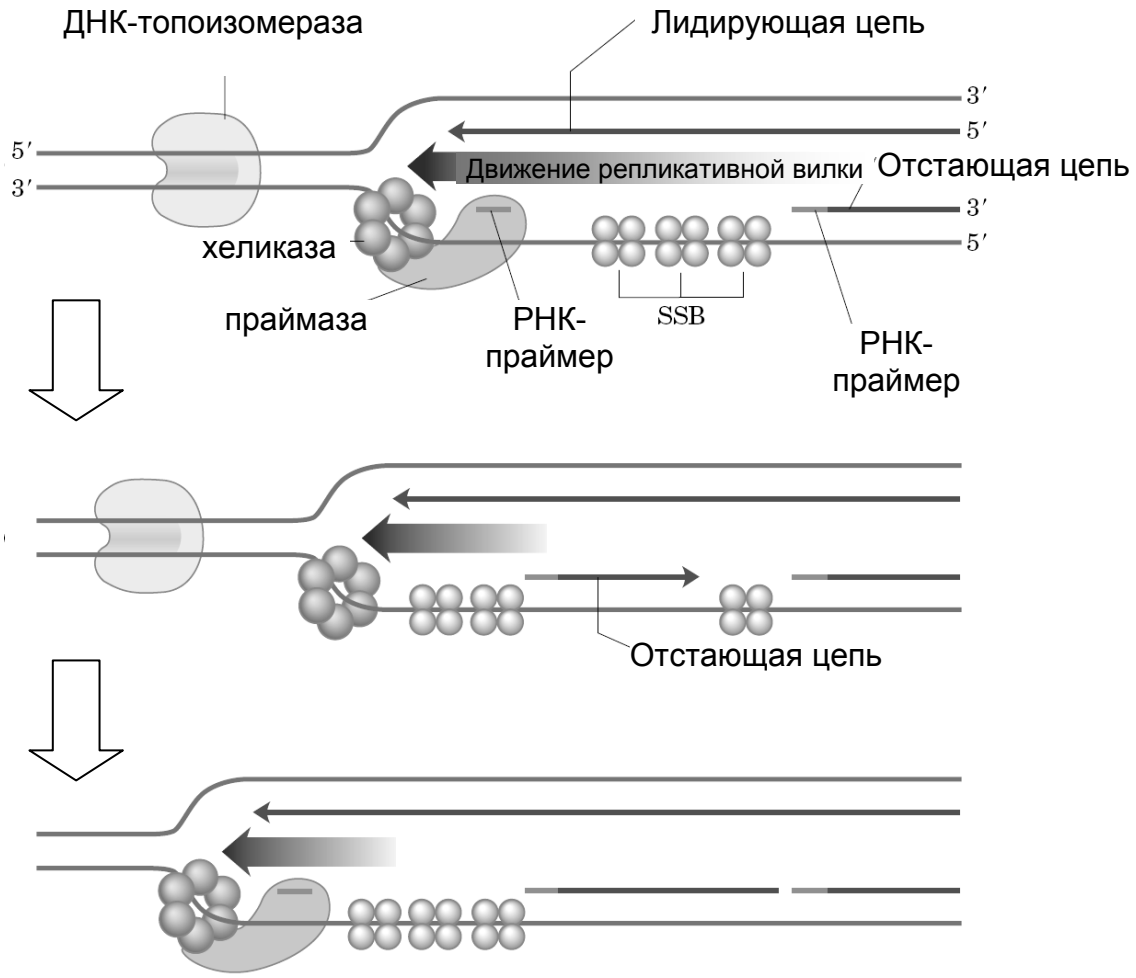


Рис. 34. Схематическое изображение этапов синтеза ДНК (цит. по Nelson, Cox, 2004)

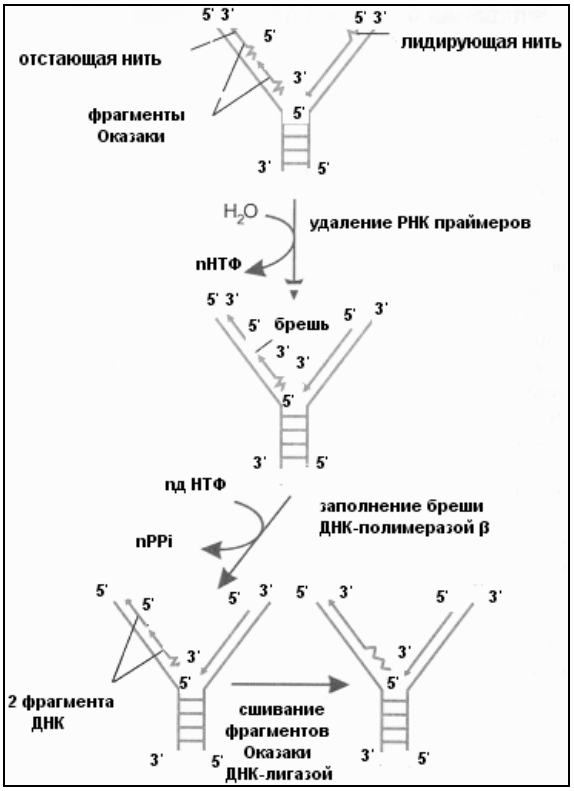


Рис. 35. Удаление праймеров из отстающей цепи в синтезе ДНК (цит. по Северину, 2008)

Терминация репликации. У прокариот при достижении ДНК-полимеразой определенной терминаторной последовательности синтез дочерней цепи ДНК прекращается.

Этапы репликации у эукариот.

Клетка эукариот содержит несколько ДНК-полимераз.

1 - Обладающие только полимеразной активностью:

ДНК-полимераза α – находится в ядре, основной фермент репликации;

ДНК-полимераза β - локализована в ядре, является репарирующей ДНК-полимеразой;

ДНК-полимераза γ - осуществляет репликацию ДНК в митохондриях и хлоропластах;

2 - Обладающие полимеразной и 3'→5'-экзонуклеазной активностями:

ДНК-полимераза σ - принимает участие в репликации отстающей цепи;

ДНК-полимераза ε - принимает участие в синтезе лидирующей цепи ДНК.

Так как ДНК в хромосоме эукариот линейна, то при репликации праймер у 3'-конца родительской цепи разрушается, но ДНК-полимераза не может достроить ДНК, т.к. нет 3'-ОН-конца, поэтому для предотвращения укорочения цепи на концах ДНК находятся участки нереплицируемой ДНК – теломеры (длина 10-15 тыс. пар оснований). На этом участке синтезируется праймер. Теломеры удлиняются с помощью фермента теломеразы. В норме теломераза присутствует только в половых и стволовых клетках.

Т.о. теломеры выполняют роль «буферной зоны», а также защищают концы ДНК от действия экзонуклеаз и позволяют концам хромосом прикрепляться к ядерной мембране.

Синтез ДНК начинается с образования праймера. Его образование катализирует праймаза – субъединица, входящая в состав ДНК-полимеразы α. Далее этот же фермент переключается на синтез ДНК и включает в синтезируемую цепь около 60 дезоксинуклеотидов, после чего заменяется другими ДНК-полимеразами. Продолжают синтез ДНК ДНК-полимеразы δ и ε, которые обладают экзонуклеазной активностью и в ходе синтеза могут отщеплять неправильно включенный нуклеотид. Это обеспечивает высокую точность синтеза ДНК.

В отстающей цепи ДНК каждый фрагмент Оказаки содержит около 200 нуклеотидов, включающих РНК-праймер и участок ДНК. Праймер удаляется эндонуклеазой и РНКазой, а ДНК-полимераза β заполняет образующуюся «брешь» по принципу комплементарности, используя дНТФ в качестве субстратов (рис. 35).

ДНК-лигаза объединяет фрагменты в полинуклеотидную цепь. Кофактором всех стадий репликации является ион Mg2+.

По хромосоме эукариот в каждый момент времени независимо могут двигаться множество репликативных вилок. Остановка вилки происходит только при столкновении с другой вилкой, движущейся в противоположном направлении, или по достижении конца хромосомы. Процесс завершения слияния репликативных вилок можно считать терминацией репликации у эукариот. В результате вся ДНК хромосомы оказывается реплицированной.

После деления каждая дочерняя клетка получает диплоидный набор хромосом, идентичный материнской клетке.

Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) была осуществлена в 1985 г на фирме Cetus. ПЦР – осуществляемая *in vitro* – специфическая амплификация нуклеиновой кислоты, инициируемая синтетическими праймерами. Цикл состоит из температурной денатурации ДНК, её отжига с праймером и элонгации. Смена этих этапов происходит в результате изменения температуры. В ПЦР используют термостабильную ДНК-полимеразу Taq (Thermus aquaticus).

Репарация ДНК

Репарация – процесс исправления ошибок, случайно возникающих при репликации ДНК и после ее завершения, является неотъемлемым свойством живых организмов.

Мутации – наследуемые необратимые изменения структуры генома. Причинами возникновения мутаций являются ошибки репликации, не исправленные ДНК-полимеразами, и мутагенные воздействия: химические и физические агенты (излучение; аналоги нуклеозидов и нуклеотидов; свободные радикалы; азотистая кислота и ее соли; вещества, алкилирующие азотистые основания; органические перекиси; промутагены – ксенобиотики: яды, лекарства, пестициды; и др.).

Под влиянием этих физических и химических факторов в структуре ДНК происходят следующие повреждения:

- дезаминирование оснований (из цитозина образуется урацил);
- удаление азотистого основания, чаще всего депуринизация — гидролитическое отщепление пуриновых оснований;
- образование ковалентных связей между соседними азотистыми основаниями в одной цепи ДНК – образование пиримидиновых димеров (рис.36);
- разрыв полинуклеотидных цепей;
- появление ковалентных сшивок между цепями ДНК или между ДНК и белками-гистонами;
- включение некомплементарного основания и встраивание таутомерных форм азотистых оснований, вызванное ошибками репликации.

Некоторые повреждения в ДНК могут создавать препятствия для репликации и транскрипции. Клетки обладают механизмами восстановления первичных повреждений ДНК, обращая повреждения.

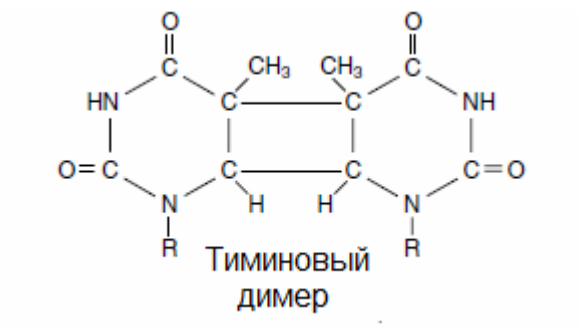


Рис. 36. Тиминовый димер (цит. по Schmidt, 2000)

Универсальная система репарации работает следующим образом (рис. 37-38) (некомплементарных оснований, репарация димеров, и др.).

1. Специфическая ДНК-эндонуклеаза обнаруживает повреждение в цепи ДНК и гидролизует фосфодиэфирную связь с 5'-конца от повреждения ДНК.
2. Экзонуклеаза удаляет участок цепи ДНК с повреждением (несколько нуклеотидных остатков по обе стороны от места повреждения).
3. К 3'-концу образовавшейся «бреши» присоединятся ДНК-полимераза и, используя дНТФ в качестве субстратов и доноров энергии, заполнят «брешь».
4. Одиночный разрыв между вновь синтезированной и основной цепями ДНК устраняет ДНК-лигаза, использующая АТФ в качестве источника энергии.

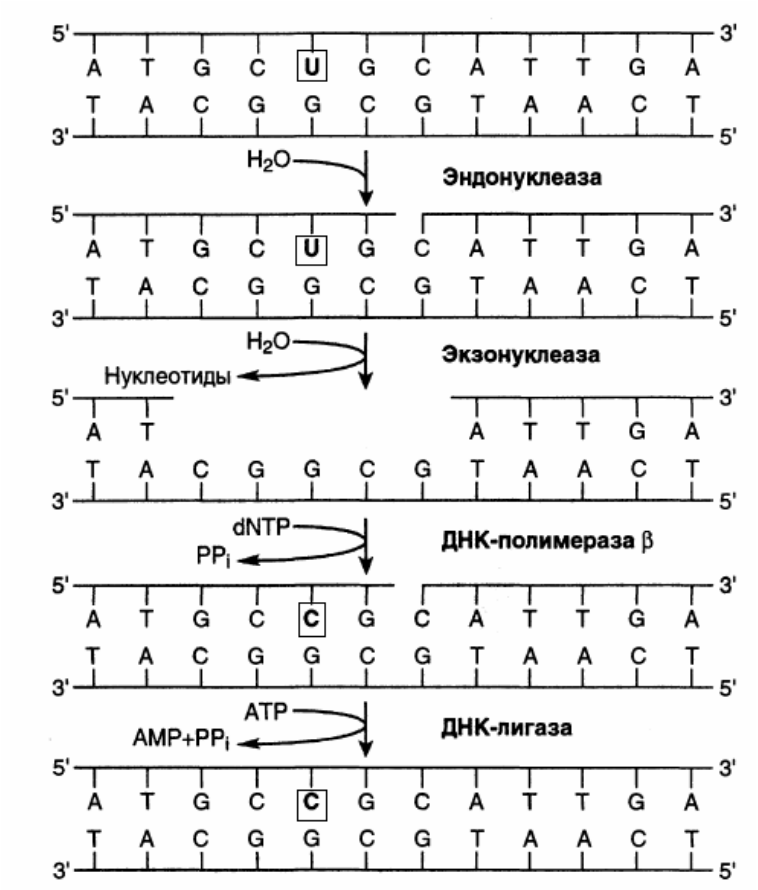


Рис. 37. Репарация ДНК (цит. по Северину, 2002)

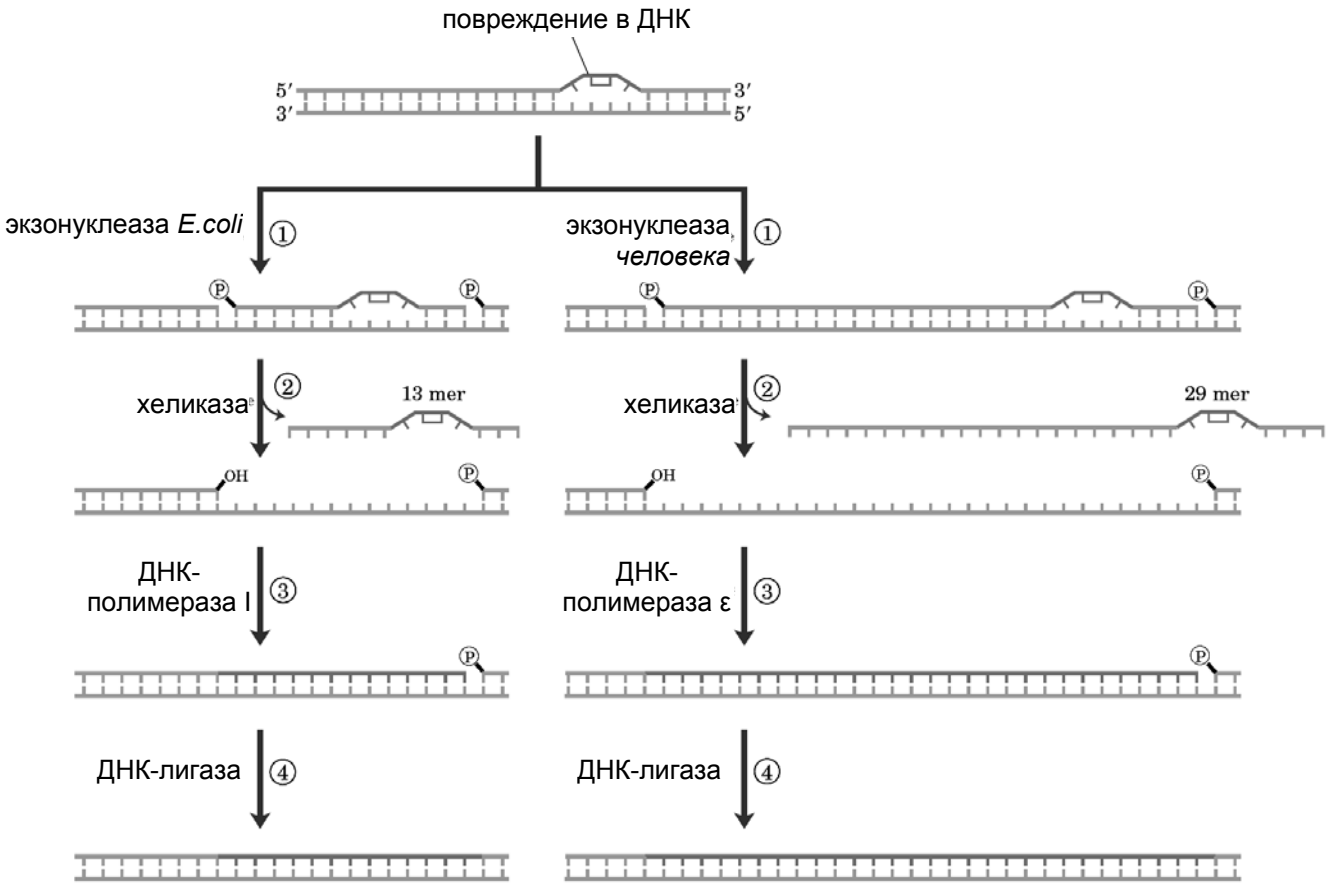


Рис. 38. Репарация тиминовых димеров в ДНК (цит. по Nelson, Cox, 2004)

В результате действия повышенных температур некоторые пуриновые нуклеотиды лишаются своих азотистых оснований и возможности участия в репликации. Процесс репарации депуринизированной (апуриновой) ДНК осуществляется при помощи особого фермента - апуриновой эндонуклеазы, которая находит участок апуриновой ДНК и вырезает его. Далее работает универсальный механизм репарации.

Репарация химически модифицированных азотистых оснований осуществляется двумя механизмами. 1) ДНК-гликозилазы – ферменты, специфичные к одному из модифицированных азотистых оснований, вырезают только азотистое основание из нуклеотида и образуется апуриновые или апиримидиновые участки. Дальнейший ход событий протекает по универсальному механизму. 2) Ферменты - инсертазы встраивают в поврежденный нуклеотид нормальное азотистое основание.

SOS-репарация осуществляется индуцибельными ферментами. Этот механизм включается для спасения клетки в условиях, когда нарушения ДНК реально угрожают ее жизнеспособности. Последовательность событий:

1. снижается скорость репликации ДНК, что делает процесс репарации более эффективным;
2. блокируется деление клетки;
3. индуцируется синтез ряда белков, участвующих в образовании олигонуклеотидов.

Действие SOS-репарации носит кратковременный характер, примерно через 40-60 минут она переключается на конститутивную репарацию.

Транскрипция

Биосинтез РНК на ДНК-матрице называют транскрипцией.

При синтезе РНК транскрибируются отдельные фрагменты одной цепи ДНК – транскриптоны (единицы транскрипции) – последовательность ДНК между промотором (последовательность ДНК перед геном, **обеспечивающая начало транскрипции,** с которой взаимодействует РНК-полимераза и инициируется транскрипция) и терминатором. У эукариот, в отличие от прокариот, в состав транскриптона входит, как правило, один ген.

Синтез РНК осуществляется при помощи ферментов – РНК-полимераз.

РНК-полимераза *у прокариот* катализирует синтез всех типов РНК клетки.

РНК-полимераза – сложно устроенный олигомерный фермент (холофермент), состоящий из кор-фермента и σ-фактора (рис. 39).

Кор-фермент (минимальный фермент) обладает РНК-полимеразной активностью и состоит из нескольких, прочно соединенных, полипептидных цепей ($\alpha_2\beta\beta'\omega$):

двух α-субъединиц (36,5 кДа) – обеспечивают соединение РНК-полимеразы с *промотором* (см. далее), структурный организатор полимеразы;

β-субъединица (150 кДа) – каталитический центр фермента (полимеразная активность);

β'-субъединица (155 кДа) – взаимодействие фермента с матрицей ДНК;

ω-субъединица (11 кДа) – функция неизвестна.

σ-Фактор (85 кДа) соединяется с кор-ферментом слабыми связями и может существовать вне минимального фермента. σ-Фактор обеспечивает распознавание и стабильное связывание РНК-полимеразы с промоторами.

Транскрипция инициируется только полным ферментом (холоферментом), далее σ-фактор освобождается и элонгация осуществляется кор-ферментом.

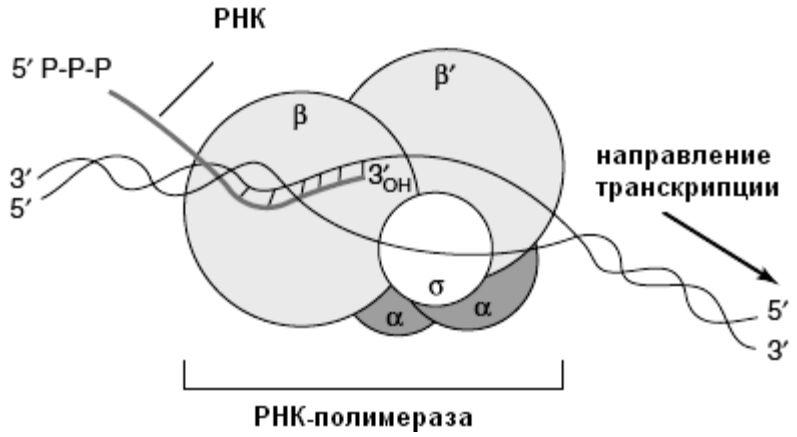


Рис. 39. Строение РНК-полимеразы (цит. по Murray, 2003)

У эукариот синтез РНК протекает в ядре, митохондриях и пластидах практически постоянно вне зависимости от фаз клеточного цикла. У эукариоты в клетке содержится 3 ядерных РНК-полимеразы и 1 в митохондриях и хлоропластах. Ядерные ферменты: РНК-полимераза I локализована в ядрышках, катализирует синтез рРНК; РНК-полимераза II локализована в нуклеоплазме, и отвечает за синтез г-яРНК; РНК-полимераза III локализована в нуклеоплазме, синтезирует м-яРНК и тРНК.

Транскрипция — эндэргонический процесс, в котором в качестве субстратов и источника энергии используются рибонуклеозидтрифосфаты (НТФ): АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ. Нуклеотиды присоединяются к 3’-концу растущей РНК с освобождением пирофосфата.

В ДНК различают две цепи – кодирующая (матричная) и некодирующая. Синтез РНК происходит комплементарно на матричной цепи, таким образом, последовательность нуклеотидов в РНК будет соответствовать последовательности нуклеотидов некодирующей цепи.

Все РНК-полимеразы осуществляют рост новых цепей РНК в направлении 5’→3’-конец. Первым нуклеотидом на 5’-конце в РНК является адениловая или гуаниловая кислота и сохраняется трифосфат.

Процесс транскрипции включает стадии инициации, элонгации и терминации.

Инициация транскрипции является наиважнейшим фактором, определяющим начало синтеза РНК, его скорость и регуляцию.

Транскрипция ***у прокариот*** начинается с присоединения σ-субъединицы к промотору. Промотор не несет информации и необходим для присоединения и ориентации РНК-полимеразы (рис. 40). На участке промотора в некодирующей цепи в центре «-10» нуклеотидов от стартовой точки находится последовательность ТАТААТ – блок Прибнова, который определяет связывание РНК-полимеразы и ориентации фермента на ДНК. «Блок -35» содержит последовательность ТТГАЦА – сайт для присоединения σ-фактора. Холофермент связывается с ДНК в области промотора (рис. 41), образуется закрытый двойной комплекс, происходит локальное расплетение цепей ДНК (12-17 п.н.) и образуется открытый транскрипционный комплекс. Далее включается два первых нуклеотида с образованием фосфодиэфирной связи между ними и отделяется σ-фактор.

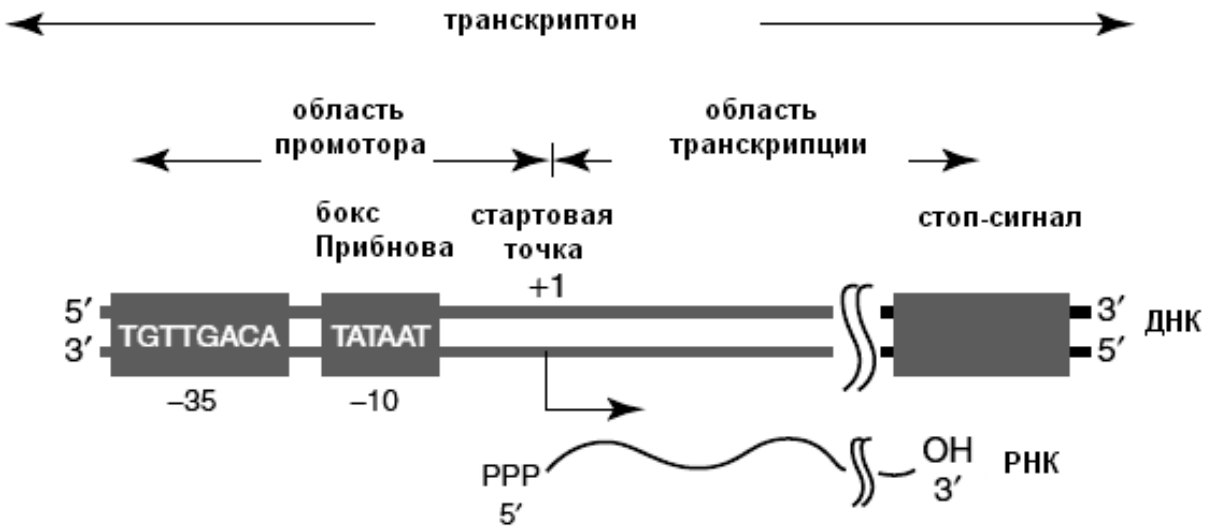


Рис. 40. Структура транскрибируемого участка ДНК прокариот (цит. по Murray, 2003)

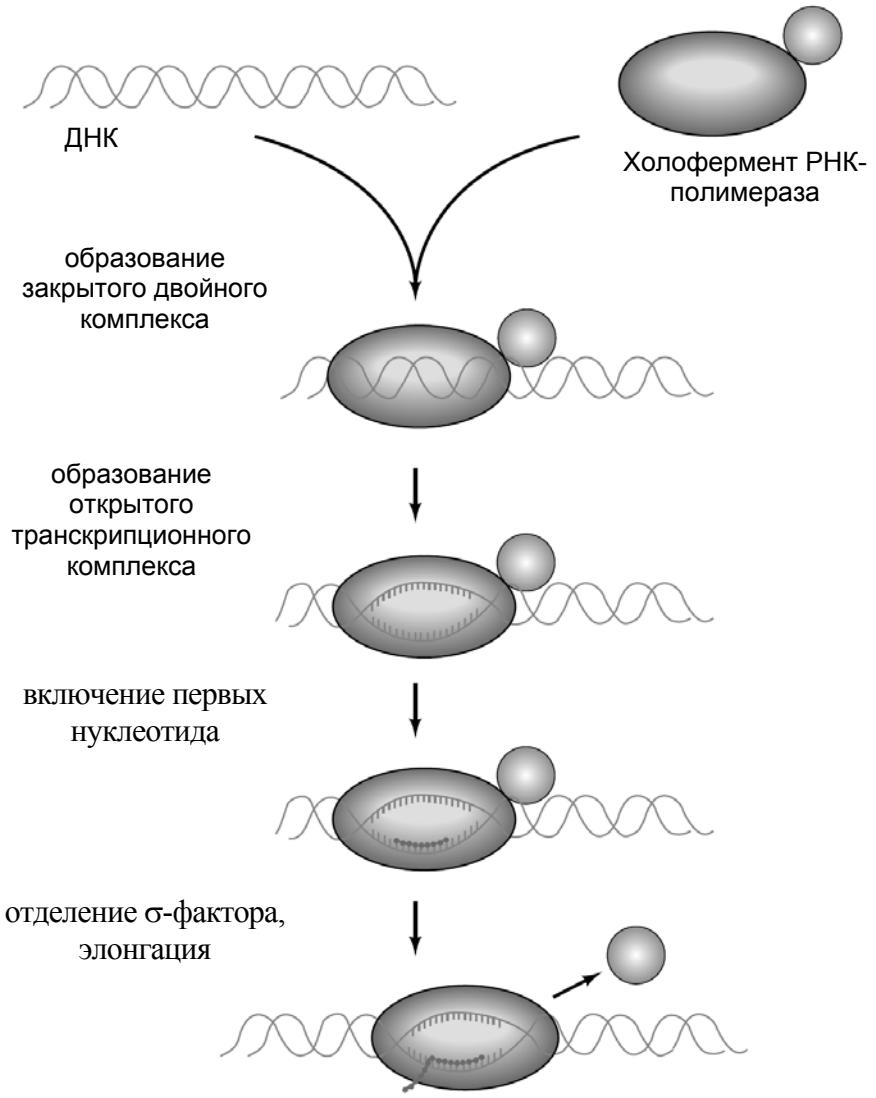


Рис. 41. Этапы инициации транскрипции прокариот (цит. по Weaver, 2004)

Инициация транскрипции ***у эукариот*** происходит по механизму, сходному для прокариот, однако последовательность нуклеотидов в регионе промотора несколько иная. В некодирующей цепи в центре «-25» находится последовательность ТАТА(А/Т)А(А/Т) – блок Хогнесса, и «Блок -75», который содержит последовательность ГГ(Ц/Т)ЦААТЦТ – «ЦААТ-блок». Последовательности ТАТА и ЦААТ в зоне промотора способствуют правильному расположению РНК-полимеразы на матрице ДНК, контролирую частоту инициации транскрипции.

У эукариот образование инициаторного комплекса требует наличия специальных инициаторных белков, которые называются общими факторами транскрипции. К ним относится ТАТА-связывающий белок, или ТСБ, а также 8—10 белков, ассоциированных с ТСБ. Они носят название ТСБ-ассоциированные факторы или ТАФ. ТСБ и ТАФ образуют комплекс транскрипционный фактор Д для РНК-полимеразы II. Этот комплекс связывается с РНК-полимеразой и способствует более эффективному образованию инициаторного комплекса.

Энхансеры, локализованные на значительном удалении от зоны промотора, участвуют в регуляции процесса транскрипции.

Элонгация транскрипции.

Прокариоты. Кор-фермент движется по цепи ДНК, расплетая двойную спираль, продолжает наращивать цепь РНК (рис. 42). Открытый комплекс включает 15-20 п.н., следовательно, по мере движения фермента нативность ДНК восстанавливается. В основе транскрипции – реакция полимеризации между 5’-трифосфатной группой нового нуклеотида и 3’-ОН-группой последнего нуклеотида цепи РНК. У прокариот частично синтезированная мРНК взаимодействует с рибосомами и вовлекается в процесс синтеза белка.

В клетках ***эукариот*** синтез РНК и белка разобщен. Сразу после начала транскрипции первый нуклеотид (гуаниловая кислота) РНК с 5’-конца метилируется – кэпирование. Новосинтезированные транскрипты подвергаются посттранскрипционным модификациям. (метилированию гуанина), которая называется кэпированием.

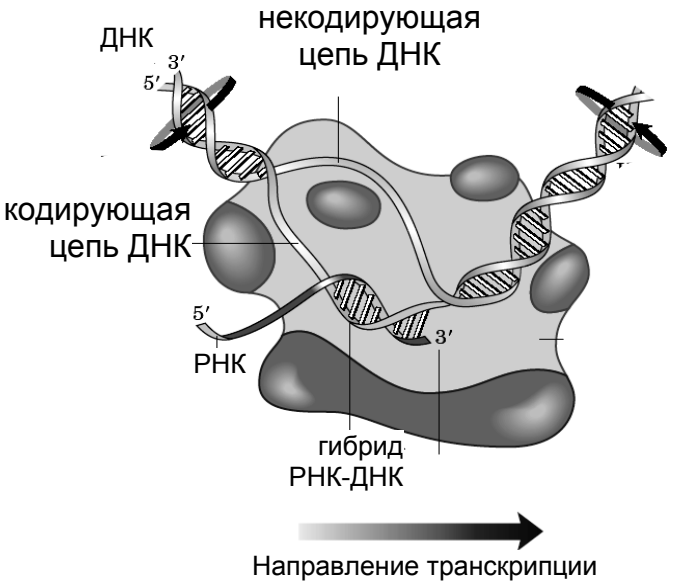


Рис. 42. Элонгация транскрипции (цит. по Nelson, Cox, 2004)

В ДНК различают две цепи – кодирующая (матричная) и некодирующая. Синтез РНК происходит комплементарно на матричной цепи, таким образом, последовательность нуклеотидов в РНК будет соответствовать последовательности нуклеотидов некодирующей цепи.

Терминация синтеза РНК. РНК-полимераза синтезирует РНК до достижения терминатора - происходит остановка включения нуклеотидов в цепь РНК, освобождение образовавшегося транскрипта и отделение РНК-полимеразы от ДНК-матрицы, происходит восстановление нативности ДНК.

У прокариот терминация обусловлена наличием на матрице ДНК последовательностей, которые допускают возможность образования шпильки на транскрипте РНК (рис. 43). При этом связь транскрипта с матрицей значительно ослабляется, что приводит к отделению РНК.

У прокариот возможен механизм терминации с помощью специального ρ-белка, обладающего хеликазной активностью (рис. 44). Этот белок присоединяется к транскриптону и движется вслед за РНК-полимеразой. По достижении фермента сайта терминации и образования шпильки на 3'-конце РНК скорость движения фермента замедляется, ρ-белок догоняет РНК-полимеразу и расплетает дуплекс ДНК-РНК, и новосинтезированная РНК отделяется от матрицы. У прокариот первичный транскрипт мРНК в основном не претерпевает изменений и транскрипция сопряжена с трансляцией.

Механизмы терминации транскрипции ***у эукариот*** до конца не изучены. Вероятно, с РНК-полимеразой II взаимодействует белковый стоп-сигнал, который замедляет транскрипцию. Далее фермент катализирует синтез на 3'-конце РНК последовательности ААУААА и следующие за ней 15 нуклеотидов, после чего завершает свою работу (рис. 45). В процессе отделения транскрипта от матрицы ДНК экзонуклеаза отщепляет терминальные 15 нуклеотидов, а фермент полиА-полимераза достраивает к последовательности ААУААА около 150-200 полиадениловых нуклеотидов (полиА-хвост).

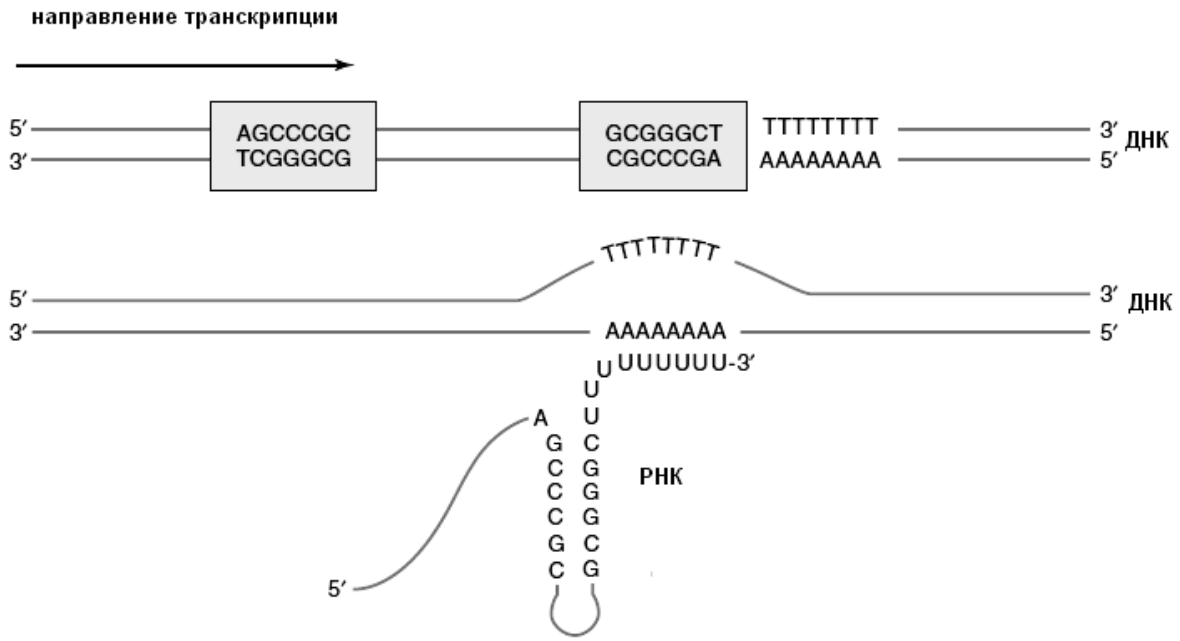


Рис. 43. Образование шпильки РНК в сайте терминации (цит. по Murray, 2003)

Синтез ДНК на РНК (обратная транскрипция) осуществляется ферментом – обратная транскриптаза, или ревертаза, которая была открыта в 1970 г. Для её работы необходим праймер – тРНК. Онкогенные вирусы содержат РНК и под влиянием обратных транскриптаз на матрице РНК, к которой присоединен комплементарный олигорибонуклеотид, синтезируется ДНК с образованием гибридов РНК-ДНК. Далее на цепи ДНК синтезируется вторая цепь ДНК. Синтезированная ДНК может встраиваться в ДНК клетки-хозяина и передаваться в поколениях клеток. При определенных условиях ДНК вируса может активироваться.

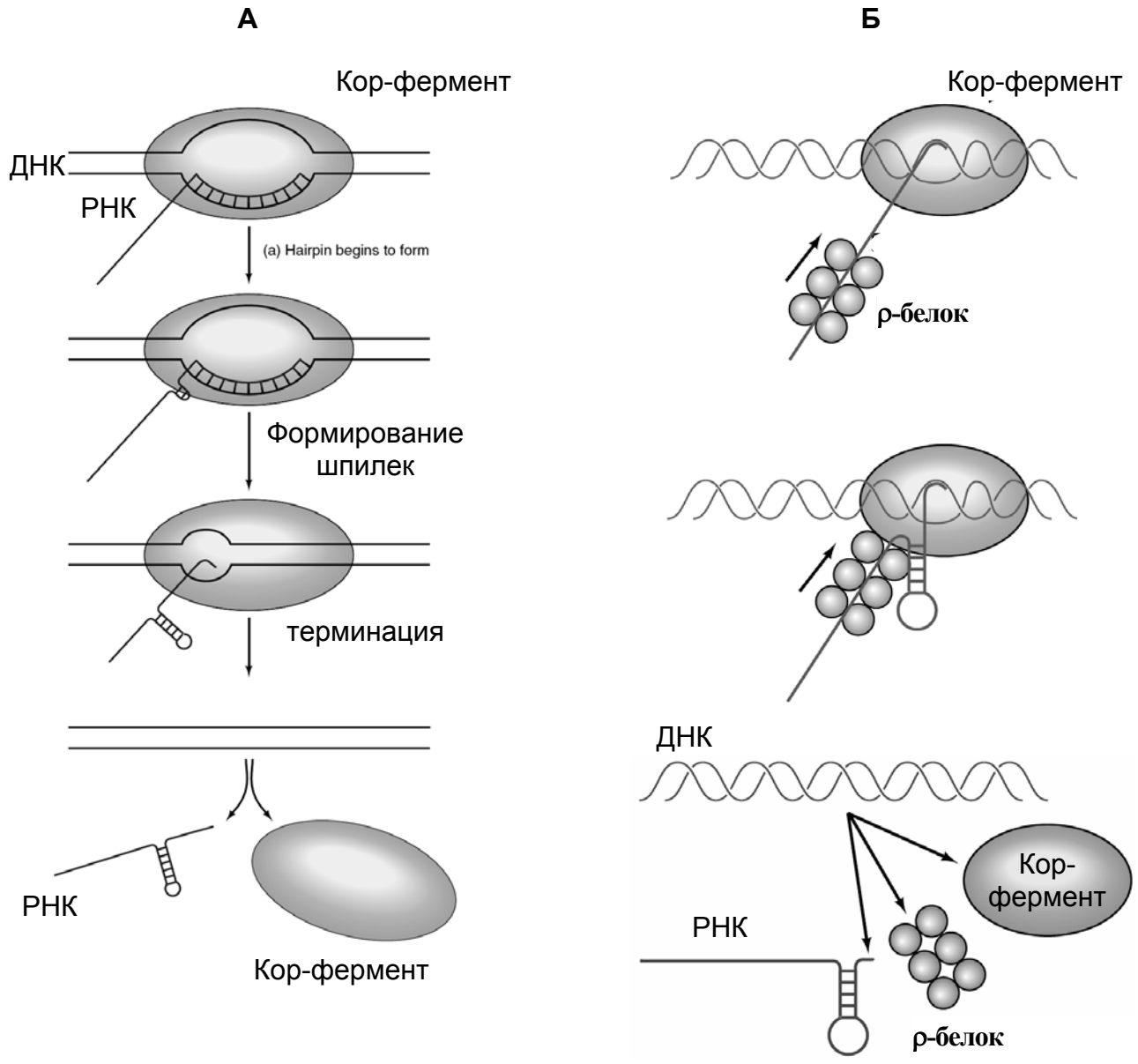


Рис. 44. Терминация транскрипции (цит. по Weaver, 2004)
А - ρ-независимая; Б - ρ-зависимая

Посттранскрипционный процессинг РНК

Как правило, все виды РНК синтезируются в виде РНК-предшественников (пре-РНК). Они имеют большую молекулярную массу. В дальнейшем в процессе «созревания» (процессинга) превращаются в зрелые молекулы РНК.

Процессинг – процесс формирования зрелых (функционально активных) молекул РНК из предшественников – первичных транскриптов. Процессинг – совокупность биохимических реакций, в результате которых уменьшается молекулярная масса РНК-предшественника, осуществляются различные химические модификации с образованием зрелых РНК..

Процессинг РНК у прокариот.

Процессинг *мРНК* протекает редко, в основном, молекулы являются первичными транскриптами, которые взаимодействуют с рибосомами. Большинство мРНК полицистронны.

рРНК. В результате транскрипции образуется предшественник – *первичный транскрипт 30S РНК* и при участии специфических РНКаз формируются 3'- и 5'-концы рРНК.

тРНК. Предшественник тРНК на 20% длиннее зрелой молекулы. РНКаза Р отщепляет нуклеотиды с 5'-конца, а РНКаза Д отщепляет нуклеотиды с 3'-конца до достижения 3'-концевой последовательности ЦЦА. Если последовательности ЦЦА в РНК нет, то она синтезируется внематрично с помощью фермента – тРНК-нуклеотидил-трансферазы.

Процессинг РНК у эукариот.

мРНК. Предшественником мРНК является г-яРНК.. Образование зрелых молекул мРНК начинается на стадии элонгации транскрипции (рис. 45). Происходит кэпирование 5'-конца растущей цепи РНК (образование 7-метил-ГТФ). Кэп защищает 5'-конец мРНК от действия нуклеаз и узнается рибосомами в ходе инициации трансляции.

После транскрипции г-яРНК к 3'-концу молекулы полиА-полимераза внематрично синтезирует полиА-«хвост» (полиадениловые нуклеотиды), состоящий примерно из 200 остатков АМФ и защищающий мРНК от расщепления РНКазами. Субстратом реакции является АТФ.

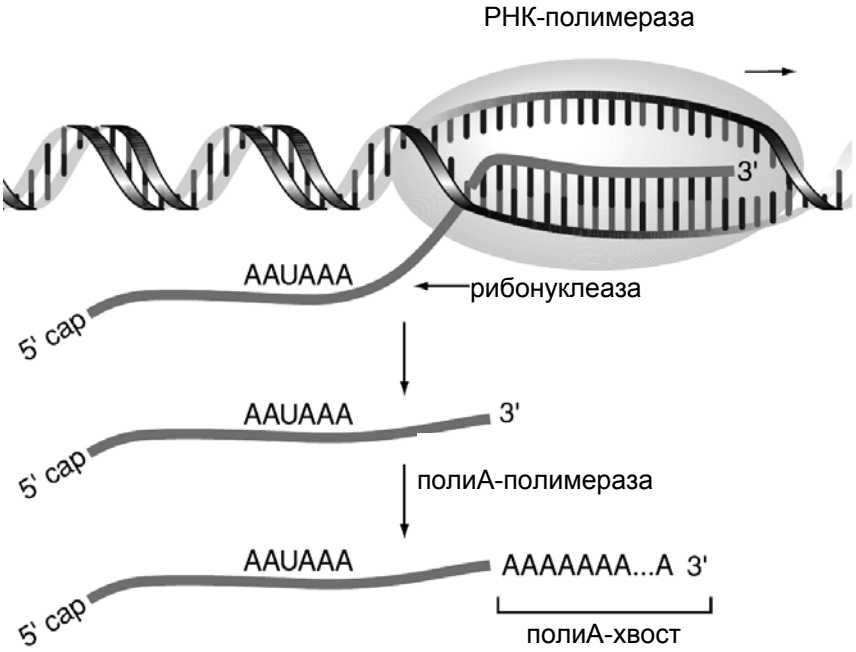


Рис. 45. Процессинг г-яРНК (цит. по Hartwell, et al., 2003)

Эукариотические гены имеют прерывистое строение. Гены эукариот состоят из чередующихся экзонов (последовательность нуклеотидов, представленных в мРНК) и интронов (последовательности нуклеотидов, которых нет в мРНК). В процессинге происходит вырезание интронных участков и сшивка последовательностей РНК, соответствующих экзонам в ДНК с образованием мРНК – **сплайсинг** (мор. сшивка концов канатов без узлов). Размеры интронов разнообразны и длиннее экзонов (100-10000 нуклеотидов и более). Интроны начинаются с ГУ (5’-конец) и заканчиваются АГ(3’-конец)-последовательностями. Число интронов может варьировать: от 1 до нескольких десятков.

В ядре интроны удаляются при участии малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП), которые образуют комплекс, или сплайсосому. Сплайсосомы гидролизуют 3',5'-фосфодиэфирные связи на границе интрон – экзон и связывают экзоны между собой. Ферментативной активностью обладают РНК в составе мяРНП. (рис. 46).

Таким образом, созревание мРНК включает следующие этапы: кэпирование 5'-конца; присоединение полиА-последовательности к 3'-концу и сплайсинг (рис. 47).

Если в первичном транскрипте закодирована информация о нескольких мРНК, то возможно несколько вариантов сплайсинга и образование различных зрелых мРНК. Такой сплайсинг называется альтернативным (рис. 48) и ведет к получению родственных, но различающихся по первичной структуре молекул мРНК. Так, в парафолликулярных клетках щитовидной железы в ходе транскрипции гена кальцитонина образуется мРНК, содержащая информацию о гормоне, ответственном за регуляцию обмена ионов кальция. В мозге тот же первичный транскрипт подвергается другому виду сплайсинга, в результате чего образуется мРНК, кодирующая белок, ответственный за вкусовое восприятие.

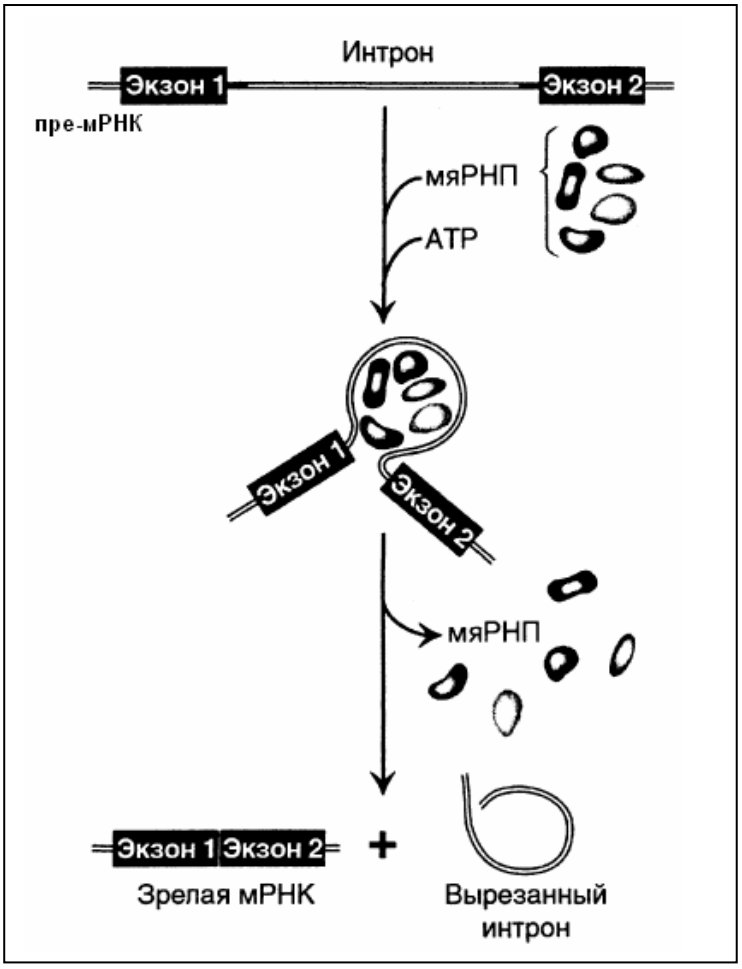


Рис. 46. Сплайсинг пре-мРНК (цит. по Северину, 2002)

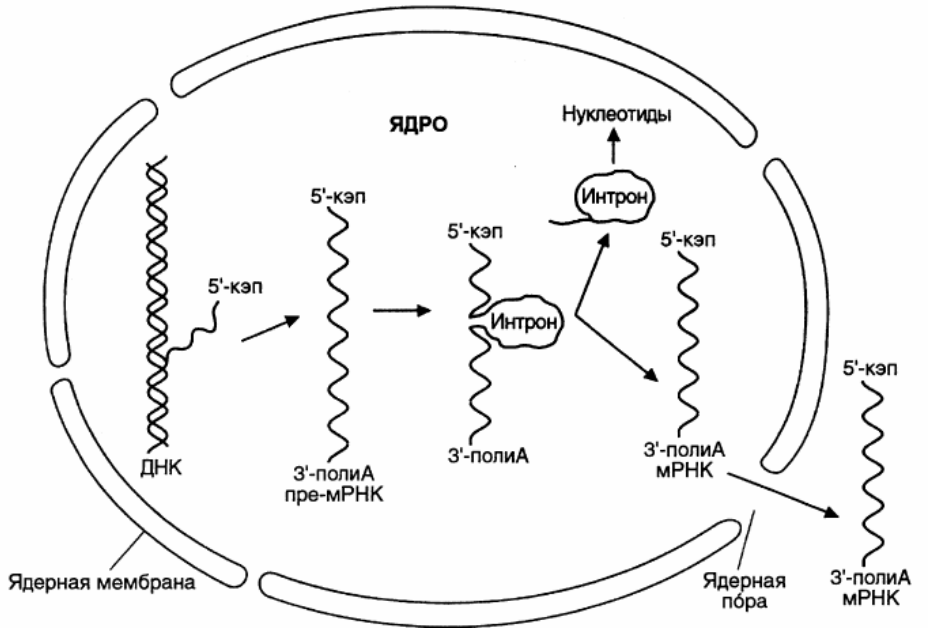


Рис. 47. Образование и выход из ядра зрелой мРНК (цит. по Северину, 2002)

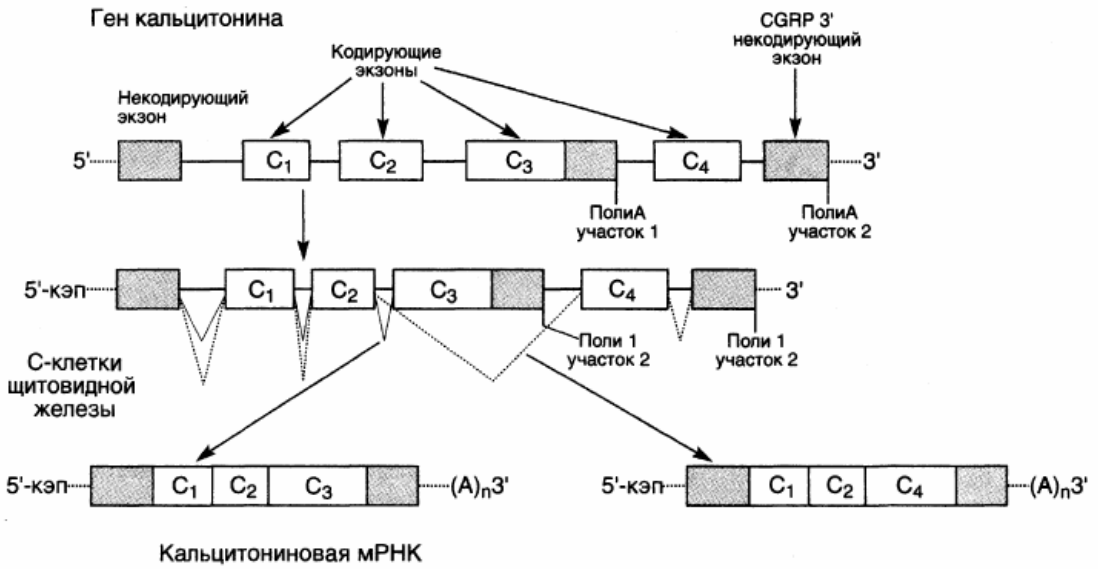


Рис. 48. Альтернативный сплайсинг (цит. по Северину, 2002)

После завершения процессинга зрелые мРНК перемещаются в цитоплазму при помощи специальных белков-информоферов.

Посттранскрипционные модификации тРНК

тРНК синтезируются в виде 4,5S РНК-предшественников (~100 нуклеотидов). В ядре при формировании пространственной конформации зрелых молекул (рис. 49) пре-тРНК укорачиваются с 5'- и 3'-концов и вырезается один интрон из центральной части полинуклеотидной цепи с помощью специфических РНКаз (реакция 1).

Модифицируются азотистые основания и к 3’-концу тРНК с помощью нуклеотидилтрансферазы последовательно присоединяется триплет ССА (реакция 2).

Зрелые молекулы тРНК выходят из ядра в цитоплазму (реакция 3).

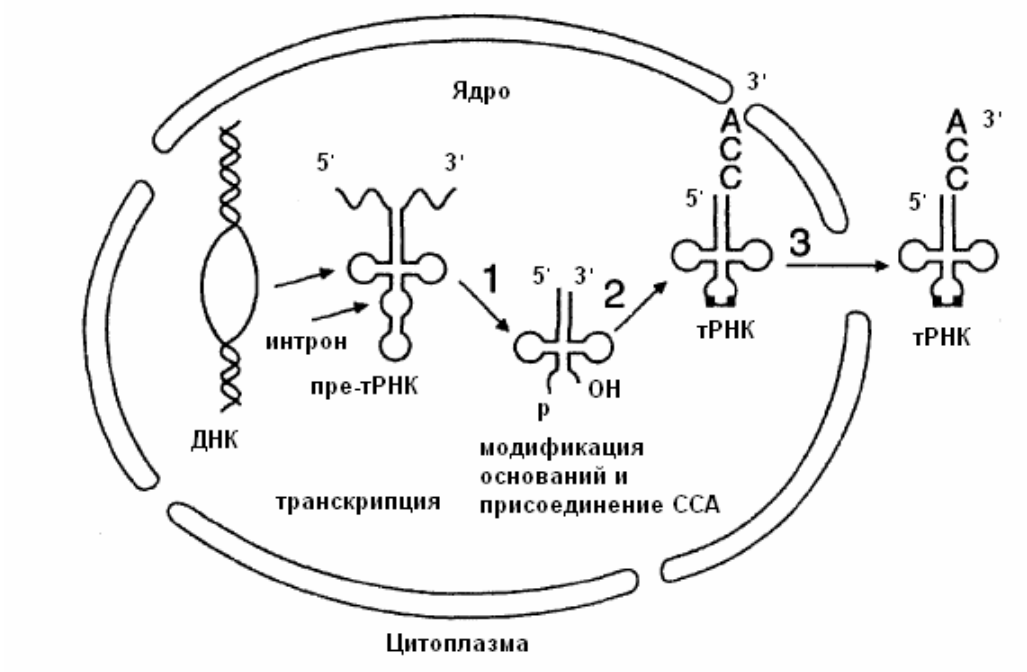


Рис. 49. Созревание пре-тРНК (цит. по Северину, 2002)

Посттранскрипционные модификации рРНК

Пре-рРНК освобождаются из комплекса с ДНК в виде крупного транскрипта с константой седиментации 45S, который является предшественником 18S, 28S и 5.8S рРНК.
1-2% нуклеотидов этой молекулы метилируется по 2'-гидроксильной группе рибозы, т.о. «отмечаются» участки, которые должны войти в состав зрелых рРНК. Самая короткая 5S рРНК кодируется отдельным геном, транскрибируется РНК-полимеразой III (ответственной за синтез тРНК) и затем поступает в 60 S рибонуклеопротеиновую частицу.

Субъединицы рибосомы и все зрелые мРНК и тРНК поступают в цитоплазму.

Исследования, проводимые на кафедре биохимии КГУ, связанные с обменом нуклеиновых кислот

В 1980х гг. была открыта новая функция антител – способность катализировать различные биохимические реакции, то есть выступать в роли биологических катализаторов. По аналогии с энзимами (англ. enzyme) такие антитела были названы абзимы (от англ. **a**nti**b**ody en**zyme**), или каталитические антитела. Согласно сложившимся представлениям, наличие в крови абзимов является чётким признаком протекания в организме аутоиммунных процессов. Но механизмы реализации патологических свойств абзимов и их клиническое значение пока остаются невыясненными.

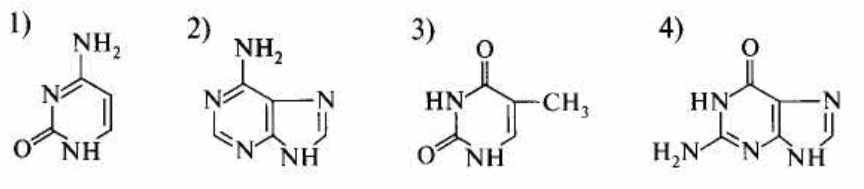
Под научным руководством проф. Винтера В.Г. была инициирована и разработана одна из основных плановых тем кафедры биохимии КГУ – изучение ферментативной активности и биологической роли антител к нуклеиновым кислотам, обладающих ДНК-гидролизующей активностью, при различных заболеваниях человека. Не исключено, что природные абзимы могут быть антителами с уникальным гидролитическим центром. Учитывая тот факт, что

антитела к ДНК проникают в клетку и ядро, ДНК-гидролизующие антитела могут участвовать в репликации, репарации и рекомбинации ДНК, вмешиваясь в ход событий этих процессов, что приводит к изменению пролиферации и апоптоза клеток. Активность абзимов к ДНК может модулироваться состоянием клетки.

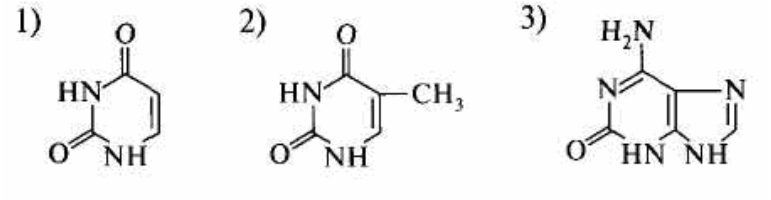
Следовательно, изучение взаимодействия антител с нуклеиновыми кислотами и ферментативной активности абзимов к ДНК позволит выяснить не только фундаментальные основы функционирования иммунной системы, но и внесет вклад в понимание биохимических основ жизнедеятельности клетки.

ТЕСТЫ ПО ТЕМЕ “ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ”

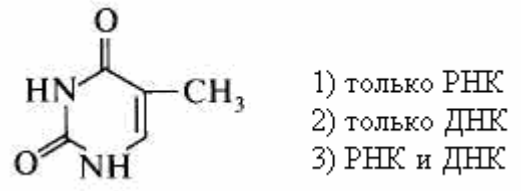
1. К пиримидиновым основаниям относится:



2. К пуриновым основаниям относится:

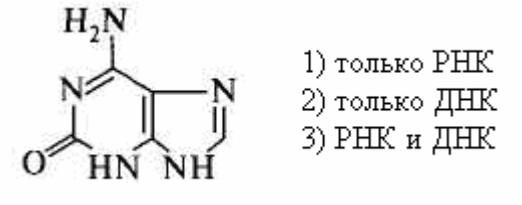


3. Входит в состав:



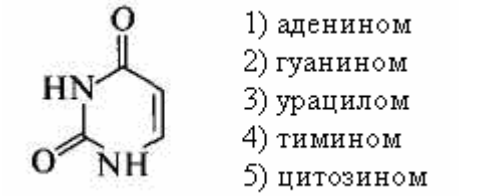
1) только РНК
2) только ДНК
3) РНК и ДНК

4. Входит в состав:



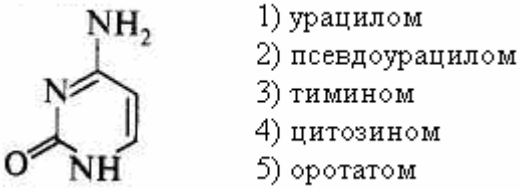
1) только РНК
2) только ДНК
3) РНК и ДНК

5. Является:



1) аденином
2) гуанином
3) урацилом
4) тимином
5) цитозином

6. Является:



1) урацилом
2) псевдоурацилом
3) тимином
4) цитозином
5) оротатом

7. В продуктах полного гидролиза нуклеиновых кислот отсутствуют:

1) азотистые основания
2) пентозы
3) гексозы
4) фосфорные кислоты

8. В нуклеотидах азотистое основание и пентоза соединены связью:

1) фосфоангидридными
2) 2',3'-фосфодиэфирными
3) 3',5'-фосфодиэфирными
4) 2',5'-фосфодиэфирными
5) N-гликозидными

9. Модель вторичной структуры ДНК предложена:

1) Р.Митчелом и В.П.Скулачевым
2) Дж.Уотсоном и Ф.Криком
3) Ф.Жакобом и Ж.Моно

10. Чем отличается нуклеотид от нуклеозида?

1) обладает третичной структурой
2) обладает вторичной структурой
3) содержит остатки фосфата
4) содержит пуриновые основания
5) содержит пиримидиновые основания

11. По правилу Чаргаффа какова молярная доля пуринов в ДНК?

1) превосходит молярную долю пиримидинов
2) равна молярной доле пиримидинов
3) меньше молярной доли пиримидинов
4) не зависит от молярной доли пиримидинов
5) все ответы неверны

12. По правилу Чаргаффа каково количество аденина в ДНК?

1) всегда превосходит количество гуанина
2) всегда превосходит количество тимина
3) равно количеству цитозина
4) равно количеству тимина
5) всегда меньше количества гуанина

13. Что понимают под первичной структурой ДНК и РНК?

1) количественный состав пуриновых оснований
2) количественный состав пиримидиновых оснований.
3) последовательность расположения мононуклеотидов в полинуклеотидной цепи
4) количественный состав пуриновых и пиримидиновых оснований
5) структуру 3',5'-фосфодиэфирных связей

14. Согласно правилу комплементарности Чаргаффа водородные связи в молекуле ДНК замыкаются между:

1) аденином и гуанином
2) аденином и тимином
3) урацилом и аденином
4) цитозином и тимином
5) цитозином и гуанином

15. Вторичная структура ДНК образована двумя комплементарными цепями, образующими правозакрученную спираль. Благодаря чему удерживаются комплементарные цепи?

1) ковалентным связям
2) ионным взаимодействиям
3) водородным связям
4) гидрофобным взаимодействиям
5) гидрофобным взаимодействиям и водородным связям

16. Какое из следующих веществ ответственно у человека за передачу генетической информации от родителей детям?

1) РНК
2) белок
3) АТФ
4) ДНК
5) ЦТФ

17. Какая из указанных последовательностей будет комплементарной, если последовательность оснований в сегменте ДНК такова: ...Ц-А-Г-Т-Т-А-Г-Ц?

1)...Г-Т-Ц-А-А-Т-Ц-Г...
2)...Г-Ц-Т-А-А-Ц-Т-Г...
3)...Ц-Г-А-Т-Т-Г-А-Ц...
4)...Т-А-Г-Ц-Ц-А-Г-Т...
5)...Ц-А-Г-Т-Т-А-Г-Ц...

18. Если последовательность нуклеотидов в мРНК записана в направлении от 5'-ОН конца как АГУЦ.., какова будет комплементарной в ДНК последовательность нуклеотидов?

1) ГЦ АТ...
2) ТЦАГ...
3) УЦТГ...
4) ГЦУГ...
5) ТГЦГ...

19. Если содержание цитозина в двуспиральной ДНК составляет 20% общего количества оснований, какова доля аденина?

1) 10%.
2) 20%.
3) 30%.
4) 40%.
5) 80%.

20. Какое из приведенных утверждений справедливо для двойной спирали ДНК?

1) плоскости оснований лежат параллельно оси спирали

2)полинуклеотидные цепи удерживаются направленными наружу комплементарными пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями

3) если ДНК не циклическая, то 3'-гидроксильные группы каждой цепи находятся на противоположных концах молекулы

4) двуспиральная структура стабилизирована только водородными связями между основаниями

5) хотя цепи расположены антипараллельно, они имеют идентичную последовательность оснований

21. Дезоксирибонуклеопротеины содержат, кроме ДНК, гистоны и негистоновые белки. На сколько классов подразделяют гистоны по аминокислотному составу?

1) 2
2) 3
3) 4
4) 5
5) 6

22. В формировании третичной структуры ДНК у эукариот участвуют белки:

1) протамины
2) глютелины
3) гистоны
4) альбумины
5) глобулины

23. Вторичная структура тРНК имеет форму:

1) линейную
2) «клеверного листа»
3) «локтевого сгиба»

24. Нуклеиновые кислоты расщепляются ферментами:

1) пептидазами
2) липазами
3) глюкозидазами
4) нуклеазами

25. Нуклеотиды расщепляются ферментами:

1) нуклеазами
2) нуклеотидазами
3) нуклеозидазами
4) нуклеозидфосфорилазами

26. Ксантиноксидаза катализирует реакции:

1) окисления мочевой кислоты
2) окисления гипоксантина
3) гидролиза аллантоина
4) окисления ксантина
5) окисления аллантоиновой кислоты

27. Конечными продуктами катаболизма пиримидиновых оснований являются:

1) мочевая кислота
2) β-аланин
3) глиоксиловая кислота
4) $NH_3 + CO_2$
5) дигидротимин

28. Укажите источник атома N-1 при биосинтезе пуриновых нуклеотидов.

1) амидный азот глутамина
2) азот аминогруппы глутамата
3) тетрагидрофолиевая кислота
4) азот аминогруппы глицина
5) азот аминогруппы аспартата

29. Укажите источник атомов С-2 и С-8 при биосинтезе пуриновых нуклеотидов.

1) амидный азот глутамина
2) CO_2
3) тетрагидрофолиевая кислота
4) глицин
5) аспартат

30. Что необходимо для биосинтеза ГМФ из ИМФ?

1) $НАД^+$, АТФ, NH_3
2) НАДН, АТФ, глутамин
3) НАДН, ГТФ, глутамин
4) $НАД^+$, АТФ, глутамин
5) $НАДФ^+$, ГТФ, NH_3

31. Реакцию образования какого соединения считают регуляторной для синтеза нуклеотидов АМФ и ГМФ?

1) 5-Фосфорибозил-1-пирофосфата
2) 5-Фосфорибозиламина
3) инозиновой кислоты
4) оротовой кислоты
5) ГМФ и АМФ

32. Какое соединение у здоровых людей становится конечным продуктом обмена пуриновых нуклеозидов аденозина и гуанозина?

1) гипоксантин
2) ксантин
3) креатинин
4) мочевина
5) мочевая кислота

33. Установить соответствие:

фермент	***катализируемая реакция***
1) адениндезаминаза	а) реакция окисления пуринов
2) гуаниндезаминаза	б) фосфоролитический распад N-гликозидной связи
3) нуклеозидфосфорилаза	в) дезаминирование гуанина
4) ксантиноксидаза	г) дезаминирование аденина

34. Расплетающими белками молекулы ДНК являются:

1) РНК-полимераза
2) ДНК-полимераза
3) ДНК-хеликаза
4) ДНК-лигаза
5) топоизомераза

35. Процесс транскрипции осуществляет фермент:

1) ДНК-полимераза III
2) рибонуклеаза II
3) РНК-полимераза
4) пептидил-трансфераза
5) ДНК-праймаза

ОТВЕТЫ

1.	**1, 3**
2.	**3**
3.	**2**
4.	**3**
5.	**3**
6.	**4**
7.	**3**
8.	**5**
9.	**2**
10.	**3**
11.	**2**
12.	**4**
13.	**3**
14.	**2, 5**
15.	**5**
16.	**4**
17.	**1**
18.	**2**
19.	**3**
20.	**3**
21.	**4**
22.	**3**
23.	**2**
24.	**4**
25.	**2**
26.	**2, 4**
27.	**2, 4**
28.	**5**
29.	**3**
30.	**4**
31.	**2**
32.	**5**
33.	**1г, 2в, 3б, 4а**
34.	**3**
35.	**3**

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологическая химия: учебник. В. К. Кухта, Т. С. Морозкина, Э. И. Олецкий, А. Д. Таганович; под ред. А. Д. Тагановича. – Минск: Асар, М.: Издательство БИНОМ, 2008. – 688с.: ил.
2. Биологическая химия: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. Под редакцией Н. И. Ковалевской. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256с.
3. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами. Под редакцией чл.-корр. РАН, проф. Е. С. Северина, проф. А. Я. Николаева. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 448 с.: ил.
4. Биохимия. Тестовые вопросы: Учебное пособие. Под ред. Д. М. Зубаирова, Е. А. Пазюк. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2008. – 960 с.: ил.
5. Комов В. П. Биохимия: учеб. для вузов. – М.: Дрофа, 2004. – 640 с.
6. Северин Е. С., Алейникова Т. Л., Осипов Е. В., Силаева С. А. Биологическая химия: Учебник. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 368с.
7. Хазипов Н. З., Аскарова А. Н. Биохимия животных. – Казань, 2003. – 312 с.
8. Хазипов Н. З., Аскарова А. Н., Тюрикова Р.П. Биохимия животных. - М.: Издательство "КолосС", 2009. – 400 с.
9. Biochemistry I. By Frank Schmidt. – IDG Books Worldwide, Inc., 2000.
10. Garrett R.H., Grisham C.M. Biochemistry, 2 ed., 1999. – 851 p.
11. Hartwell L., Hood L., et al. Genetics: From Genes to Genomes, Second Edition. - McGraw-Hill Science, 2003. - 944 p.
12. Koolman J., Roehm K. H. Color Atlas of Biochemistry, 2nd edition. – Stuttgart, New York: Thieme, 2005. – 468 p.
13. Lodish H. Molecular Cell Biology, 5 edition. – Freeman, 2003. - 967 p.
14. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of biochemistry, 4ed. - W.H. Freeman & Company, 2004. – 1120 p.
15. Murray R.K., Granner D.K., et al. Harper’s Illustrated Biochemistry: a LANGE medical book, 26th edition. – Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2003. – 694 p.
16. Weaver R.F. Molecular Biology, Second Edition. – McGraw-Hill, 2004. - 863 p.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
ХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ 5
- **Азотистые основания** 5
- **Таутомерия азотистых оснований** 6
- **Углеводные компоненты** 7
- **Нуклеозиды и нуклеотиды** 7
- **Циклические нуклеотиды** 9
- **Нуклеотиды в составе коферментов** 10
- **Структура нуклеиновых кислот** 11
- **Структура и функции ДНК** 12
- **Структура и функции РНК** 19

ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ 23
- **Катаболизм пуриновых нуклеотидов** 24
- **Катаболизм пиримидиновых нуклеотидов** 24
- **Анаболизм нуклеотидов** 28
- **Биосинтез пуриновых нуклеотидов** 29
- **Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов** 32
- **Регуляция синтеза нуклеотидов** 36
- **Нарушения обмена нуклеотидов** 37

БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ 38
РЕПЛИКАЦИЯ 38
РЕПАРАЦИЯ ДНК 42
ТРАНСКРИПЦИЯ 44
ПОСТТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ПРОЦЕССИНГ РНК 50
ТЕСТЫ ПО ТЕМЕ “ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ” 55
ОТВЕТЫ НА ТЕСТЫ 60
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 61
СОДЕРЖАНИЕ 62