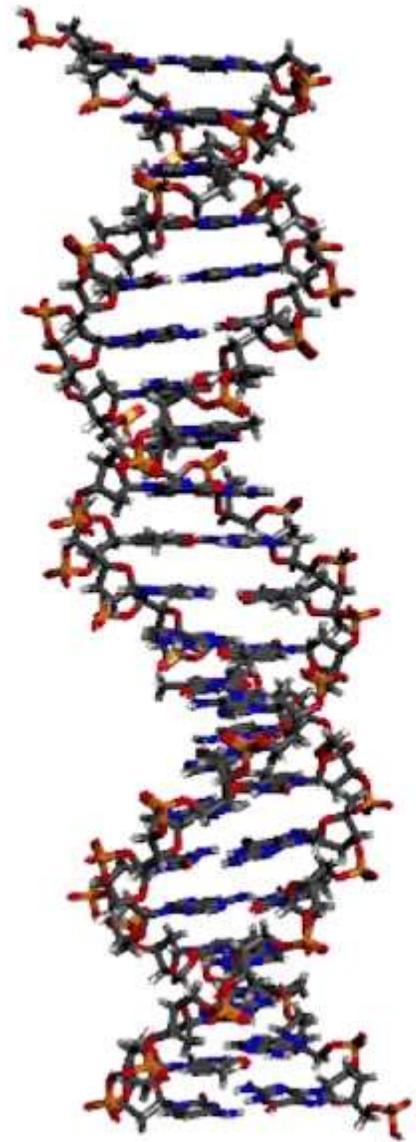


# **Нуклеиновые кислоты**

## **Репликация ДНК**

ДНК



DNA



RNA

РНК

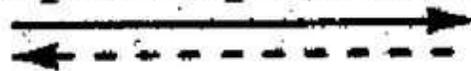
# Центральная догма биологии

Репликация



ДНК

Транскрипция



Обратная  
транскрипция

Репликация



РНК

Трансляция



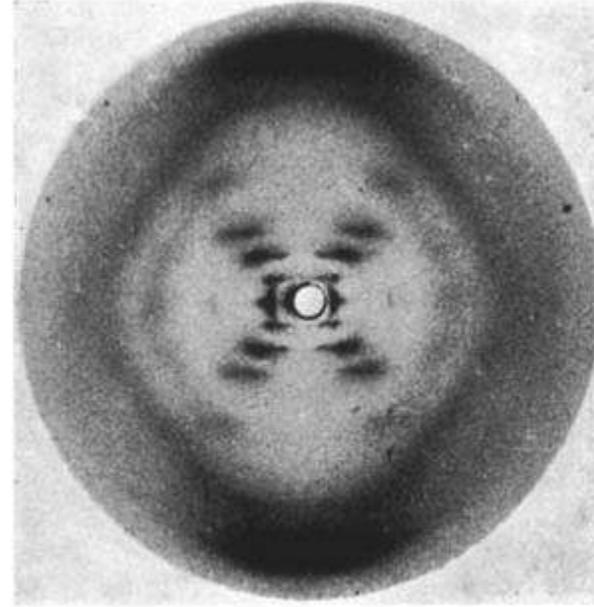
Белок

# Сходство и различие ДНК и РНК

Признаки	ДНК	РНК
<b>СХОДСТВА</b>	Полинуклеотиды, мономеры которых имеют общий план строения.	
<b>РАЗЛИЧИЯ:</b>		
<b>1) Сахар</b>	дезоксирибоза	рибоза
<b>2) Азотистые основания</b>	аденин - <u>тимин</u> , цитозин - гуанин	аденин – <u>урацил</u> , цитозин – гуанин
<b>3) Структура</b>	двойная спираль	одноцепочечная молекула
<b>4) Местонахождение в клетке</b>	ядро, митохондрии и хлоропласты	цитоплазма, рибосомы
<b>5) Биологические функции</b>	хранение наследственной информации и передача ее из поколения в поколение	участие в матричном биосинтезе белка на рибосоме, т.е. реализация наследственной информации

## Открытие ДНК

Rosalind Franklin  
1952



Толщина спирали позволяла предположить, что она состоит из двух или трех цепей ДНК

Совершенно не ясным оставался вопрос о происхождении однотипных блоков

**1962: Нобелевская премия по физиологии и медицине**



James D.  
Watson



Francis H.  
Crick



Maurice H. F.  
Wilkins



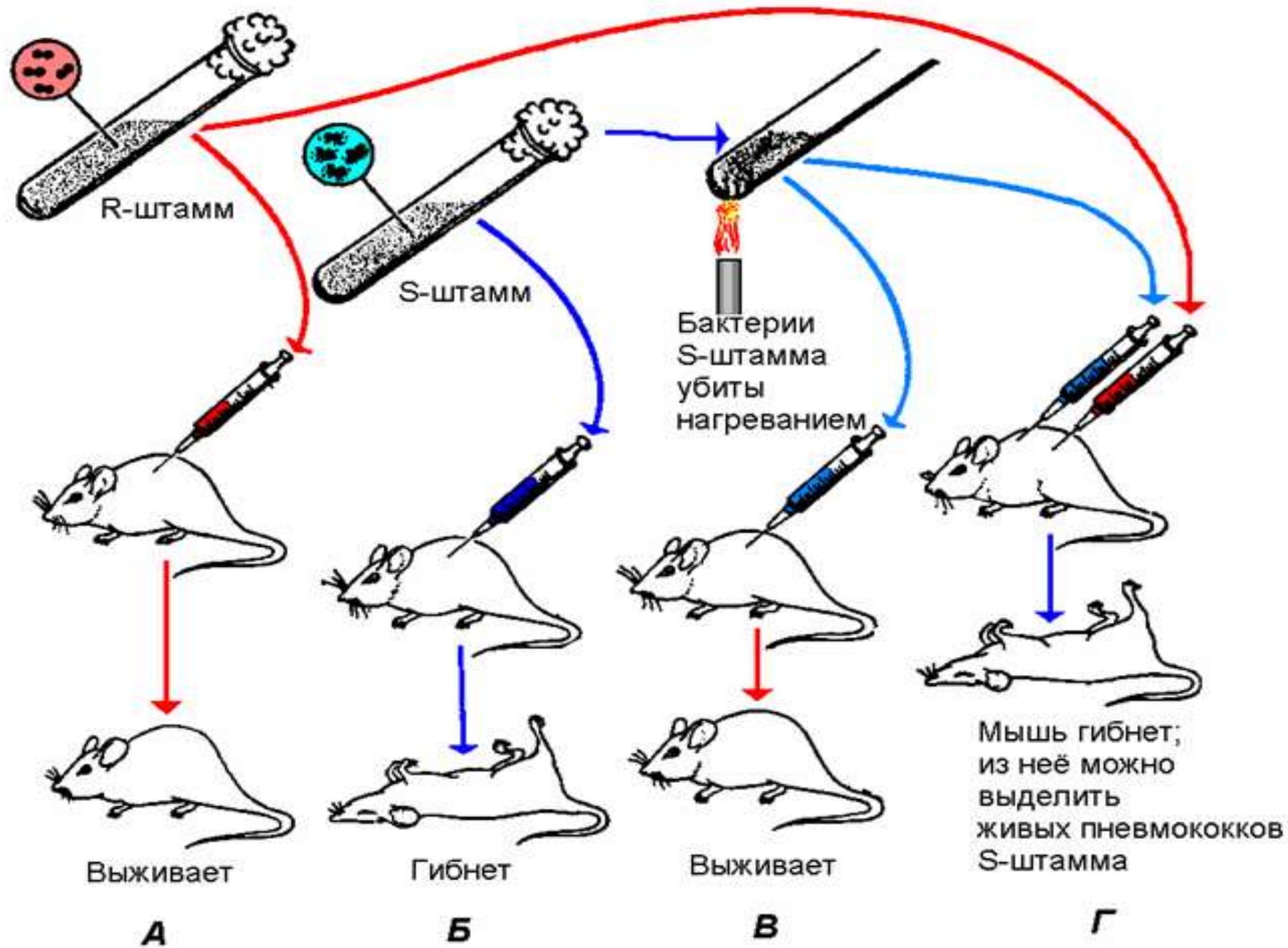
В **доказательстве** генетической роли ДНК ключевую роль сыграли две группы экспериментов:

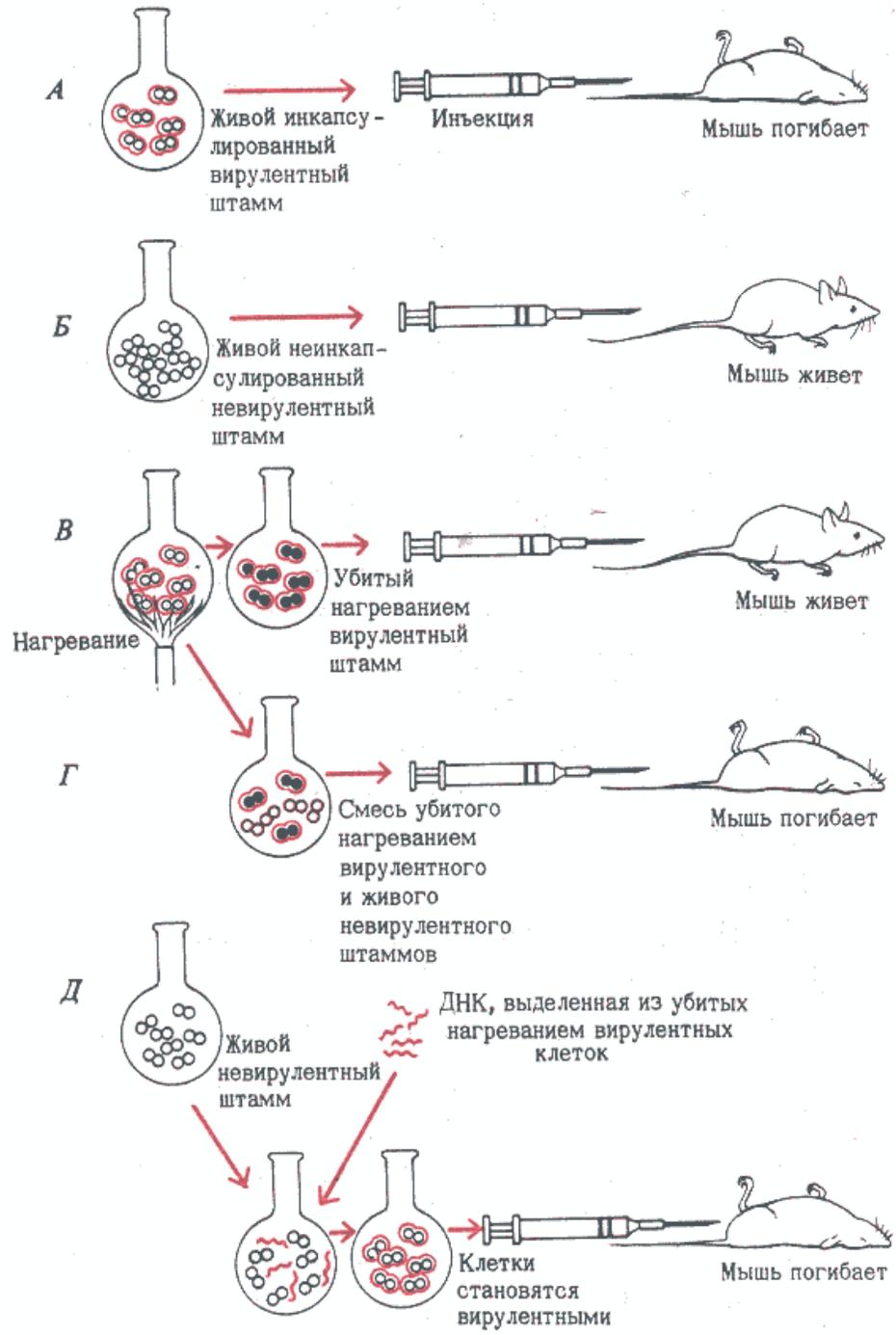
1. Демонстрация того, что при трансформация бактерий носителем информации является ДНК

**Griffith** (1928) трансформация бактерий

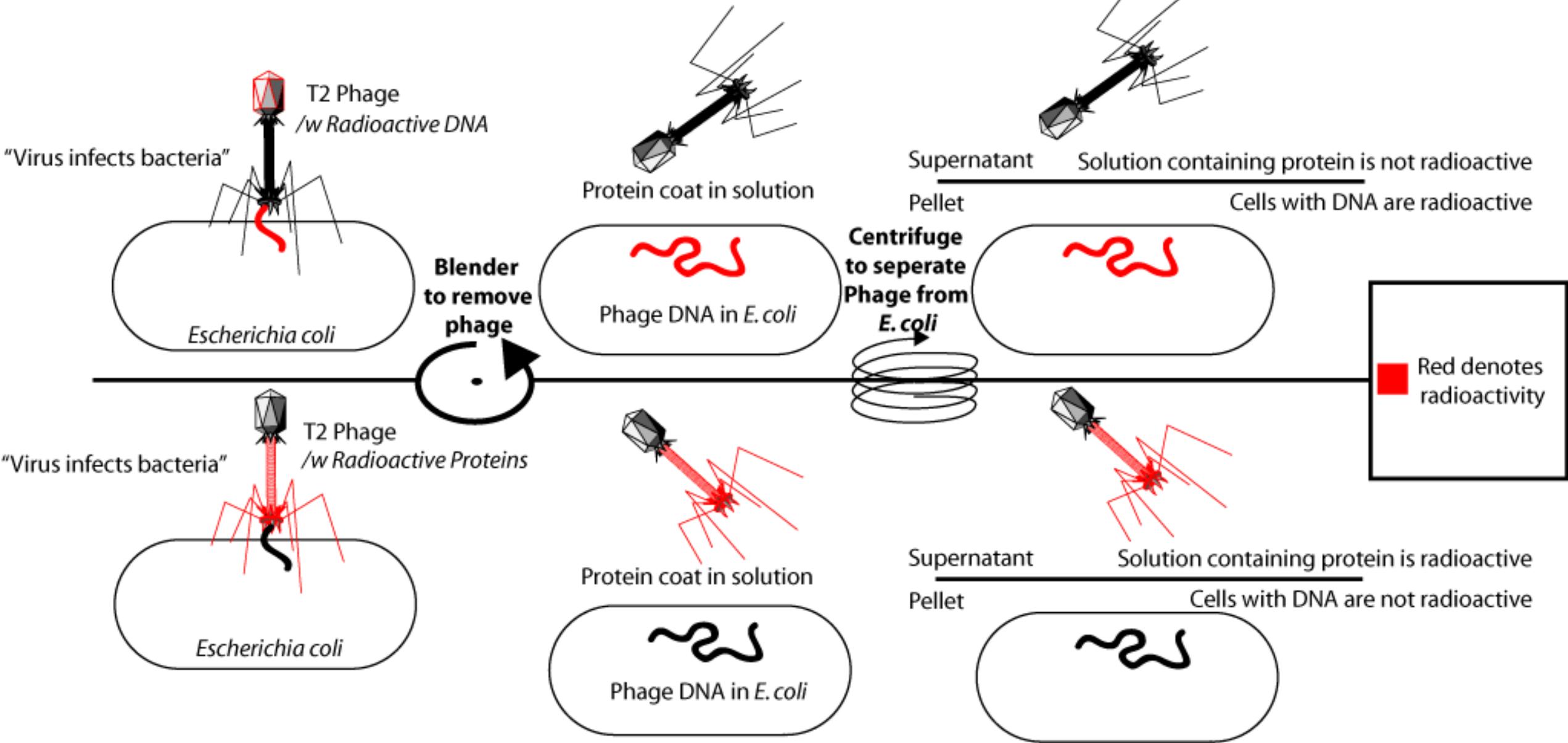
**Avery, MacLeod, McCarty** (1944) Демонстрация того, что трансформирующим агентом является ДНК

2. Демонстрация того, что при фаговой инфекции в клетку вводится ДНК (**Hershey and Chase**, 1952)





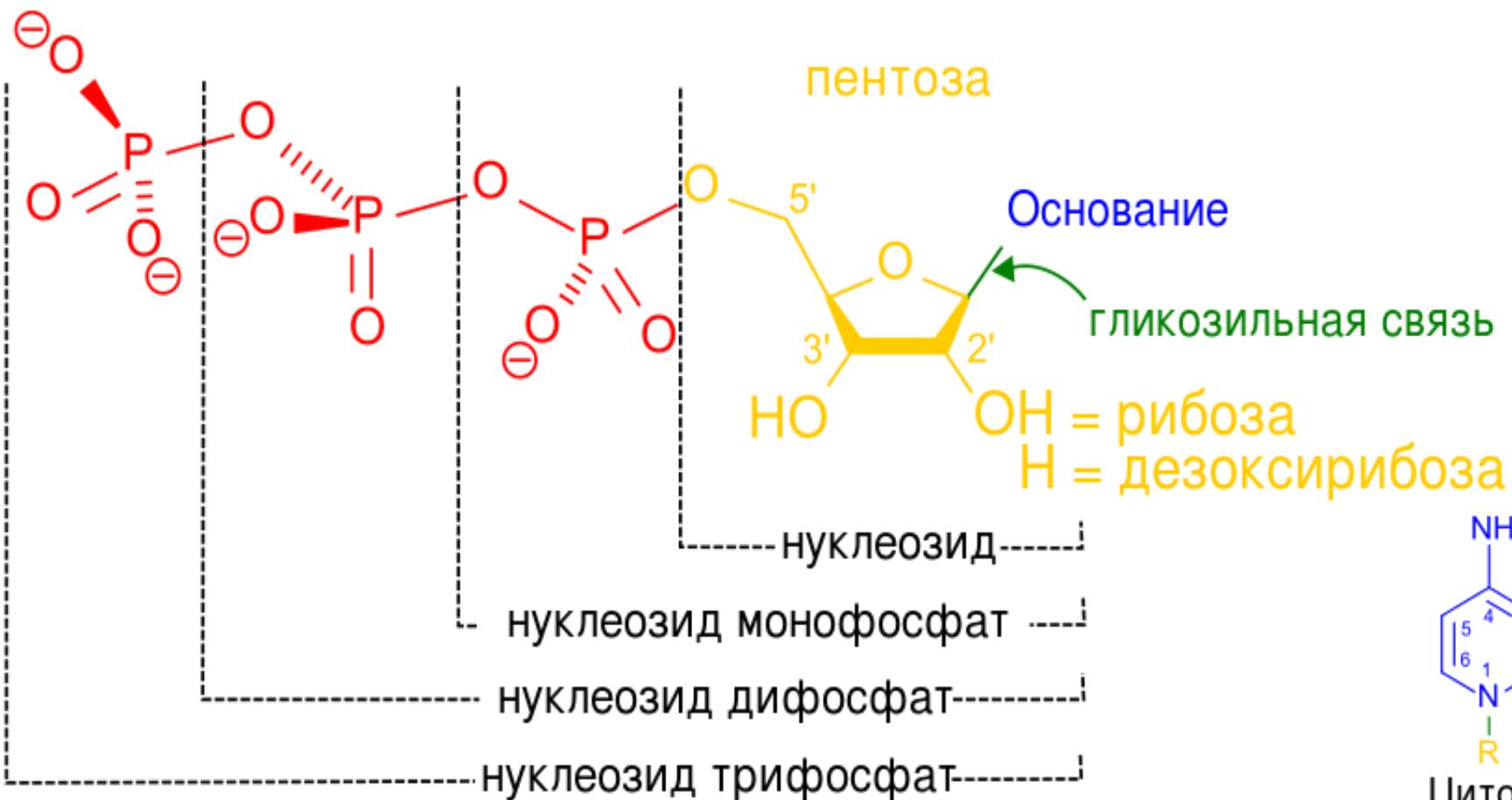
# Hershey and Chase, 1952



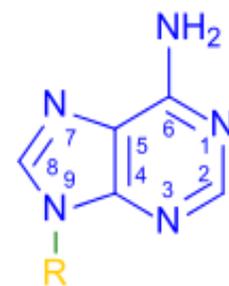
# Пространственная структура нуклеиновых кислот

- **Первичная структура** – последовательность нуклеотидов
- **Вторичная структура** – двойная спираль ДНК (А, В, С, Д – переходные конформации); «петлеобразная» структура т РНК
- **Третичная структура** - суперспирали, кольцевые структуры.

# Первичная структура ДНК



## Пурины

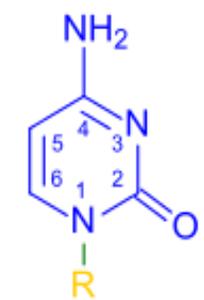


Аденин

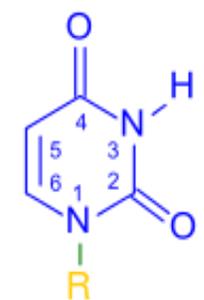


Гуанин

## Пиримидины



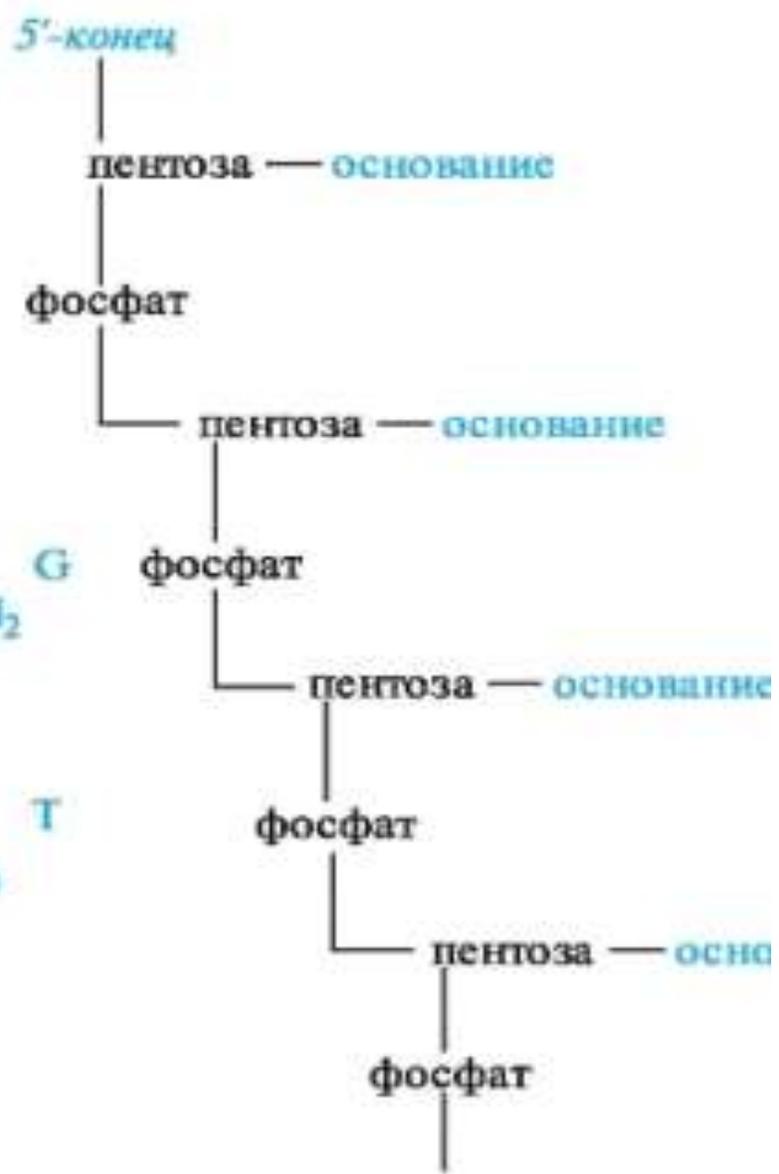
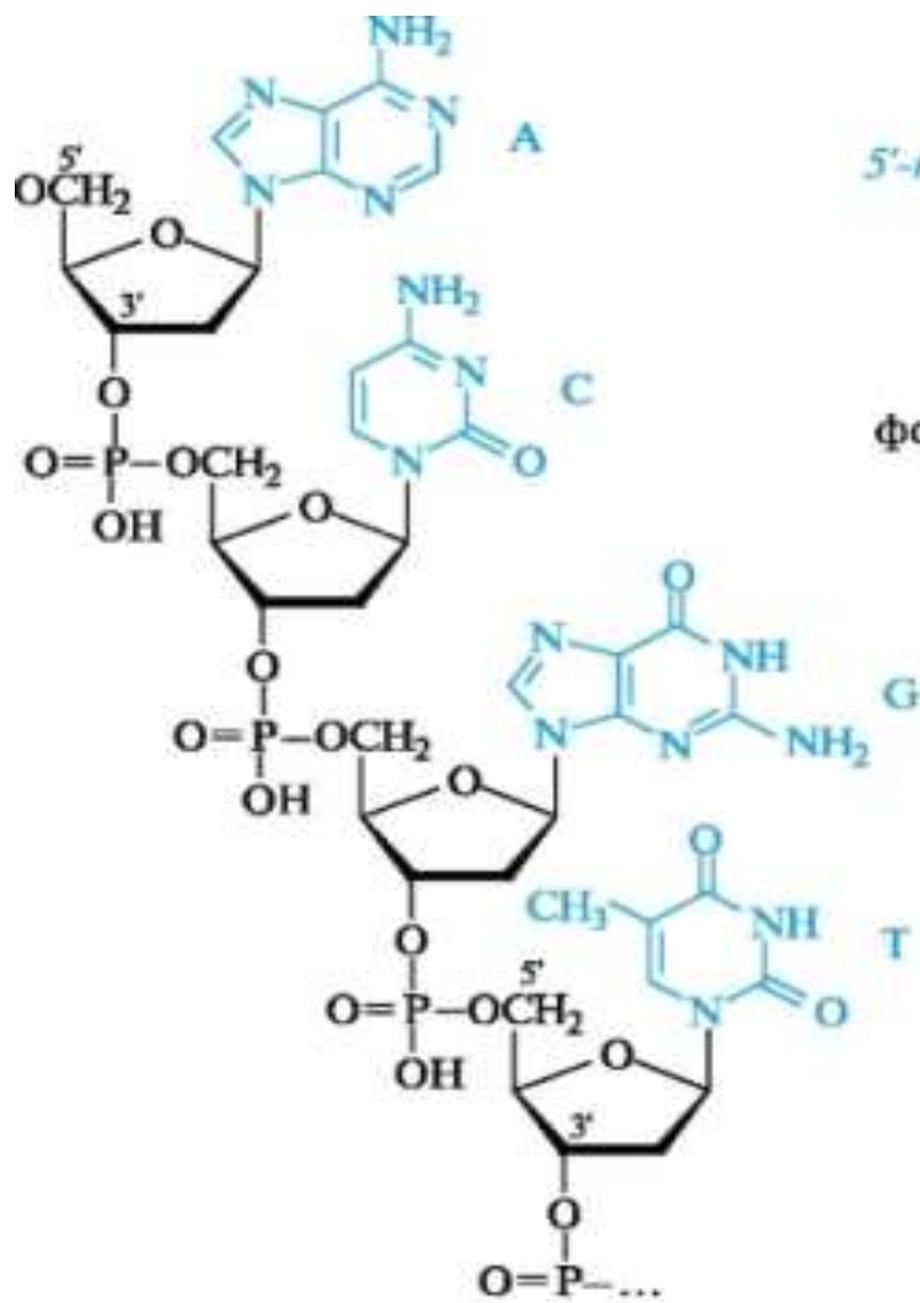
Цитозин

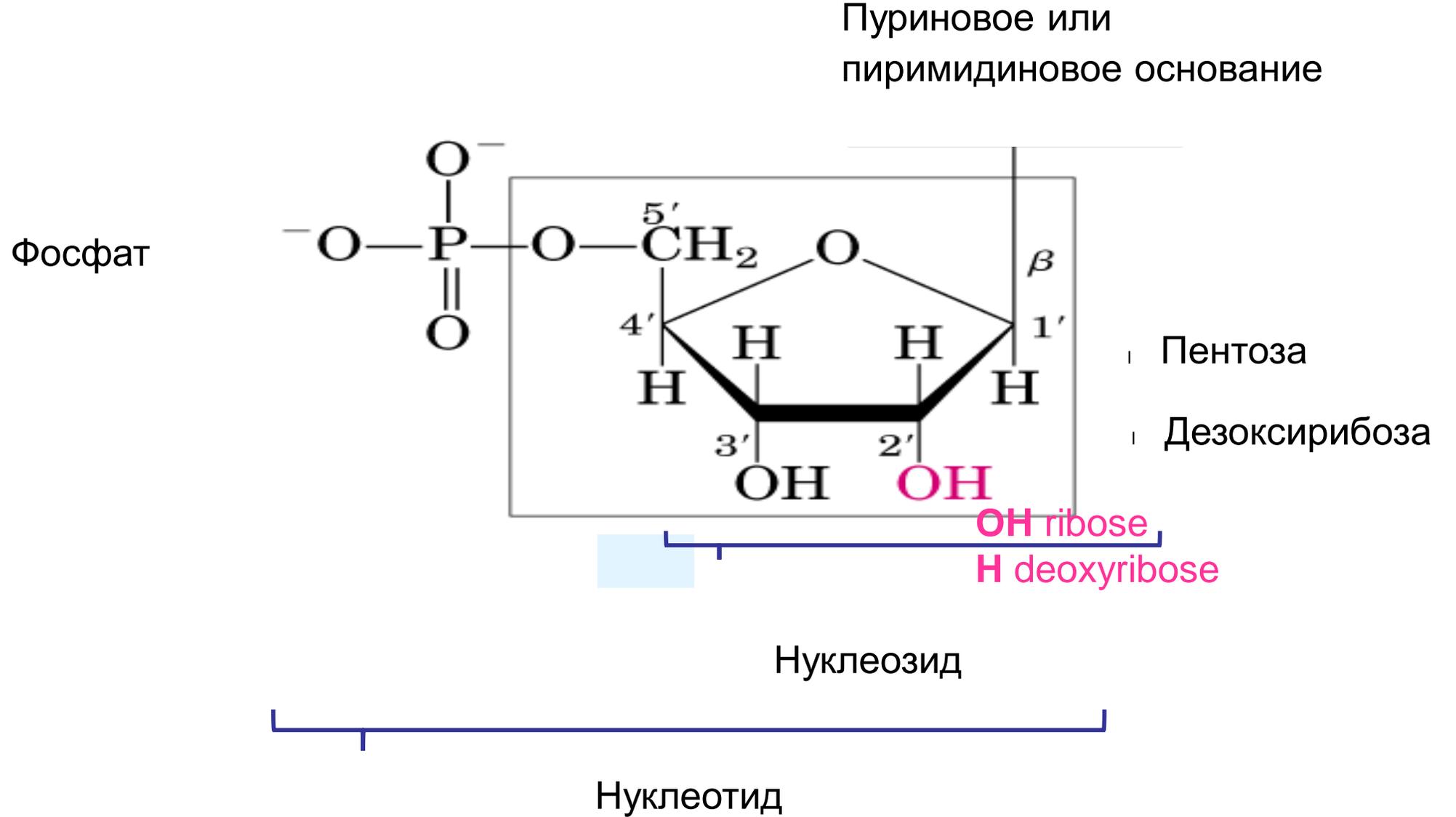


Урацил

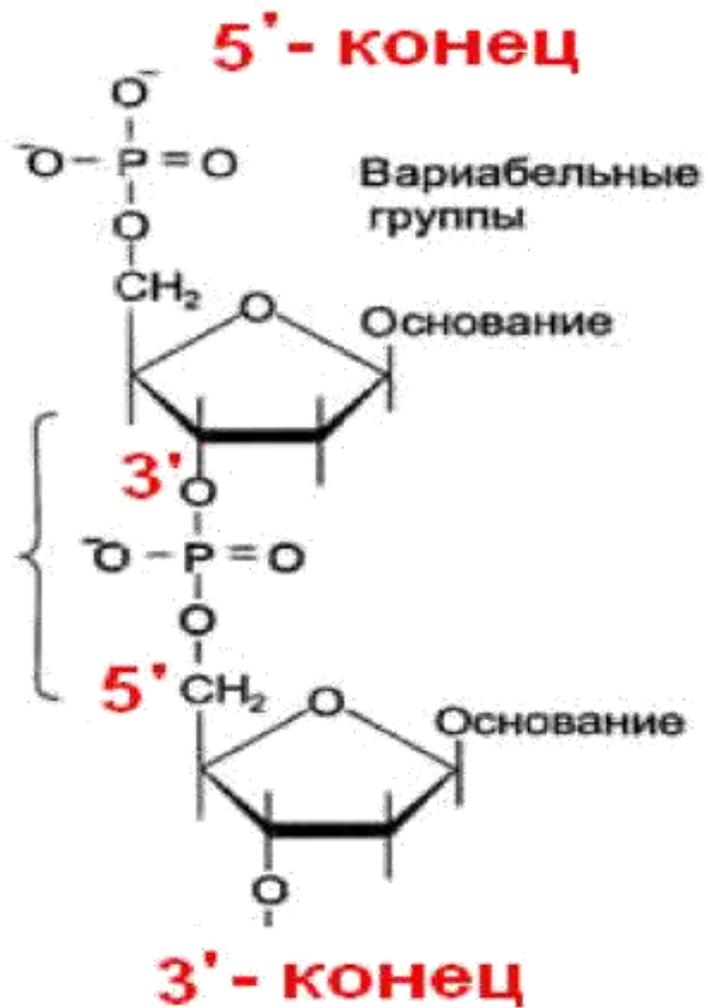


Тимин

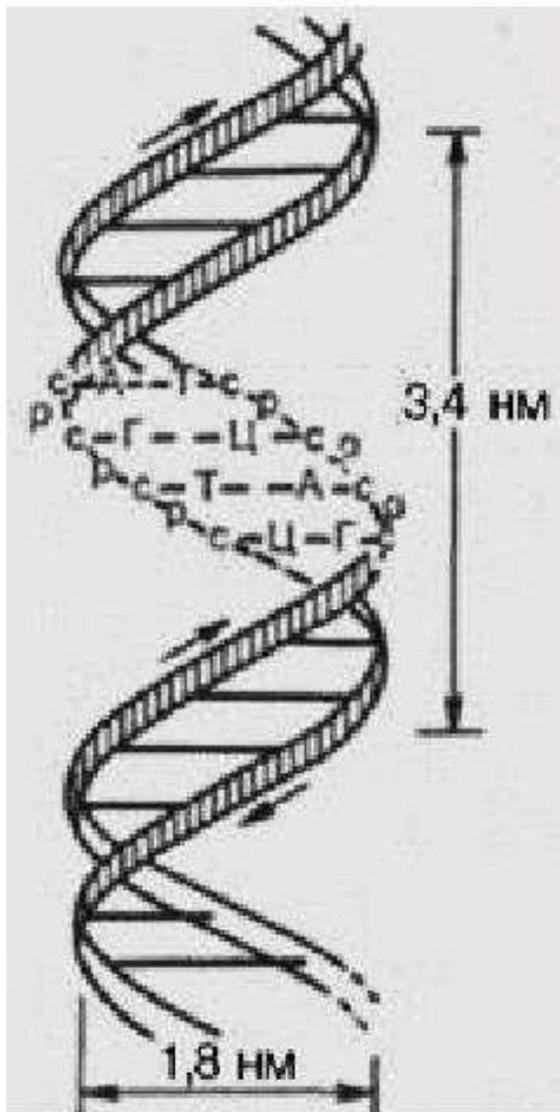




**5', 3' - фосфодиэфирная  
связь**



# Пространственная организация нуклеиновых кислот



## Вторичная структура ДНК

Наиболее изучена вторичная структура ДНК, установленная Д. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 г.

- ❑ Молекула ДНК состоит из двух антипараллельных правозакрученных полинуклеотидных цепей. На один виток спирали приходится 10 пар оснований, шаг спирали  $\square$  3,4 нм.
- ❑ Азотистые основания (гидрофобная часть) обращены внутрь спирали, а пентозофосфатные остатки (гидрофильная часть)  $\square$  наружу.

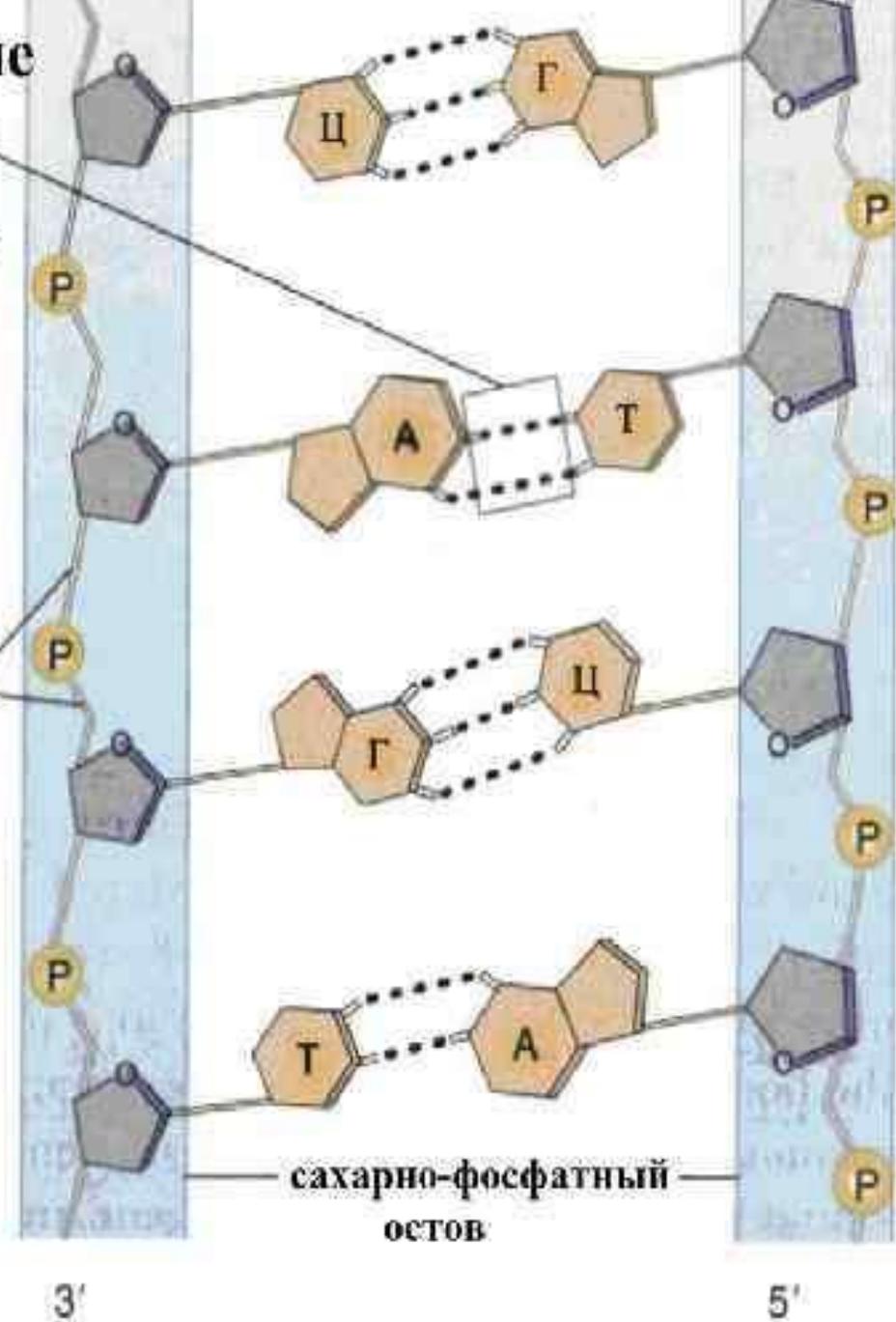
# Типы связей в молекуле ДНК

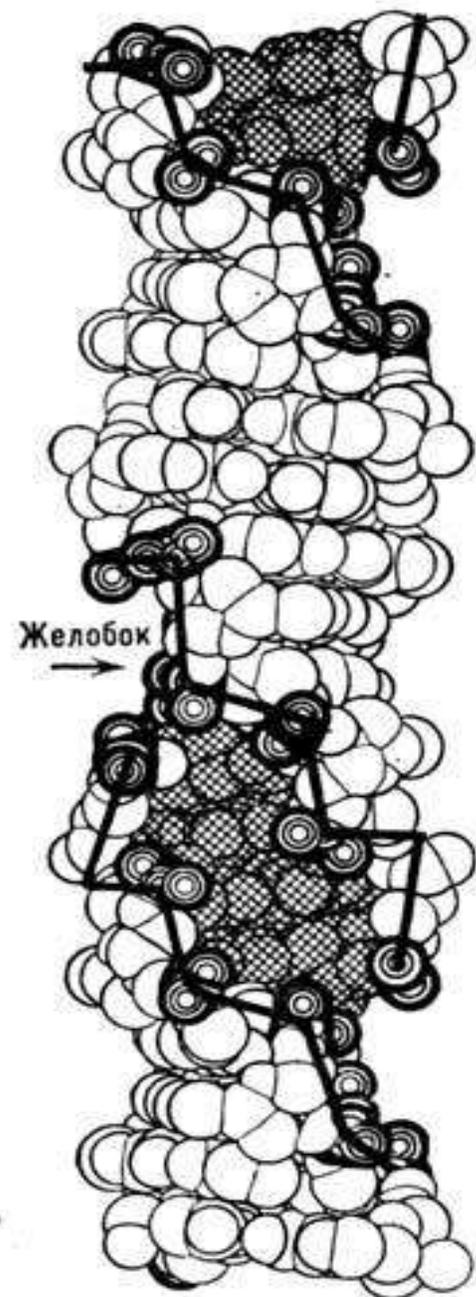
## Водородные

связи между  
азотистыми  
основаниями

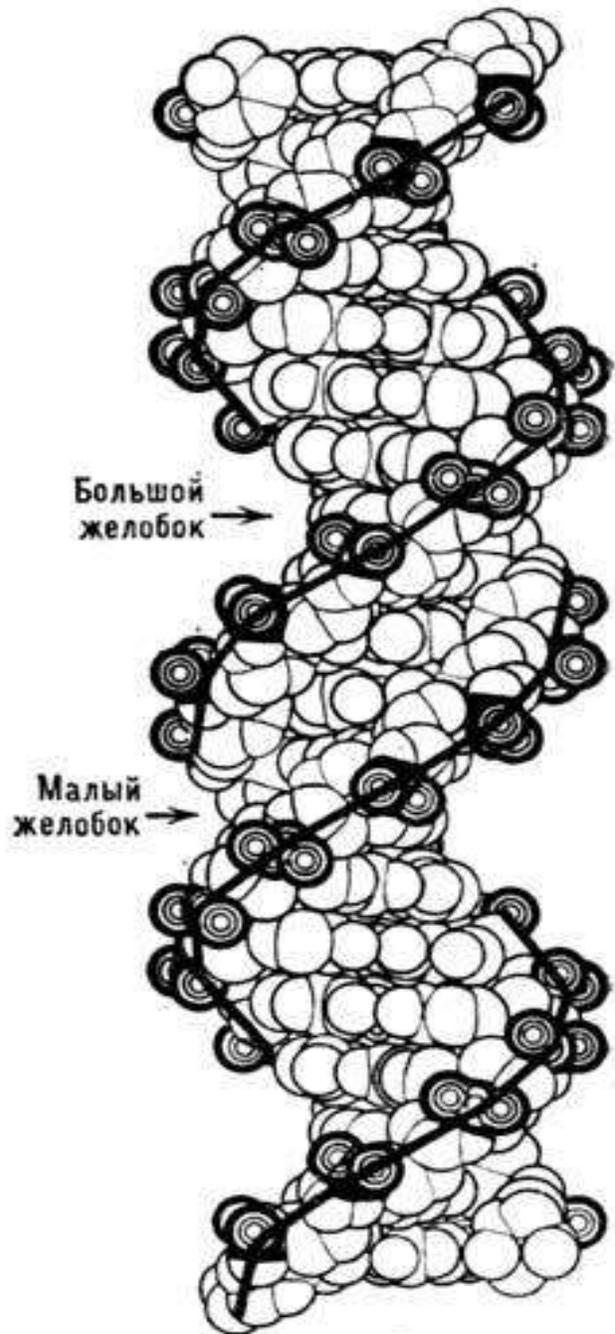
## Фосфоди- эфирные

связи между  
нуклеотидами

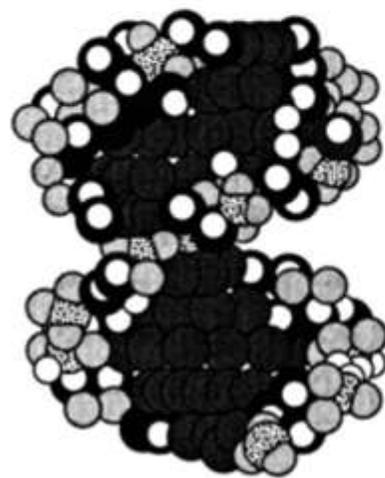
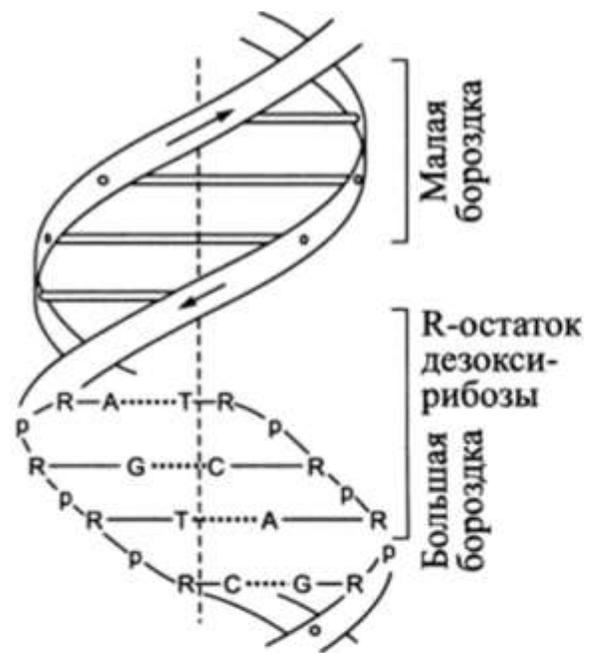




Z

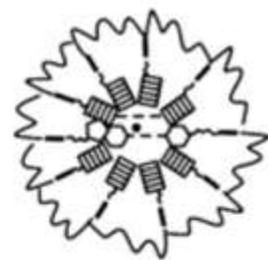


B

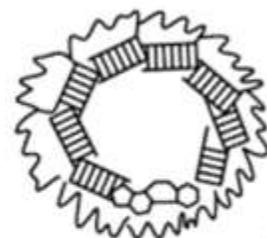


- АТОМЫ
- - C
  - (штрихованное) - P
  - (серое) - O
  - - H
- пары оснований

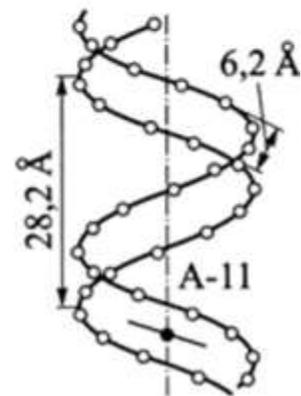
a



b

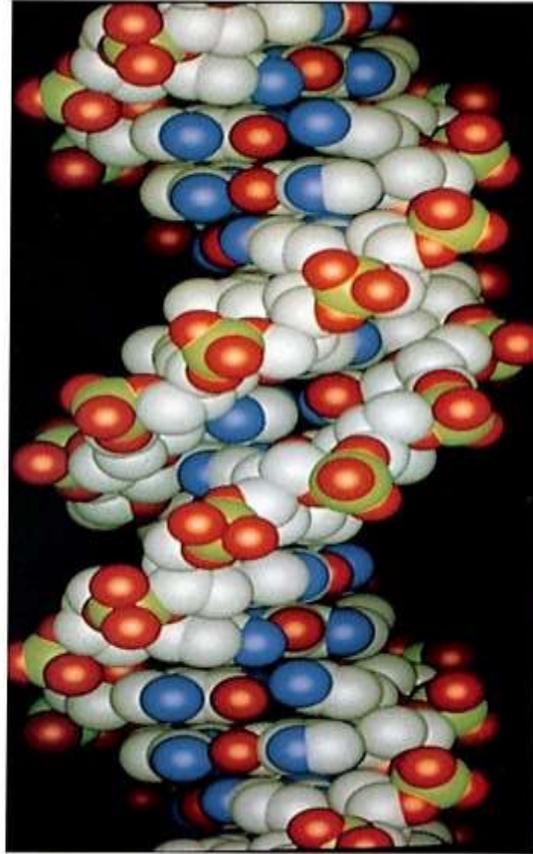
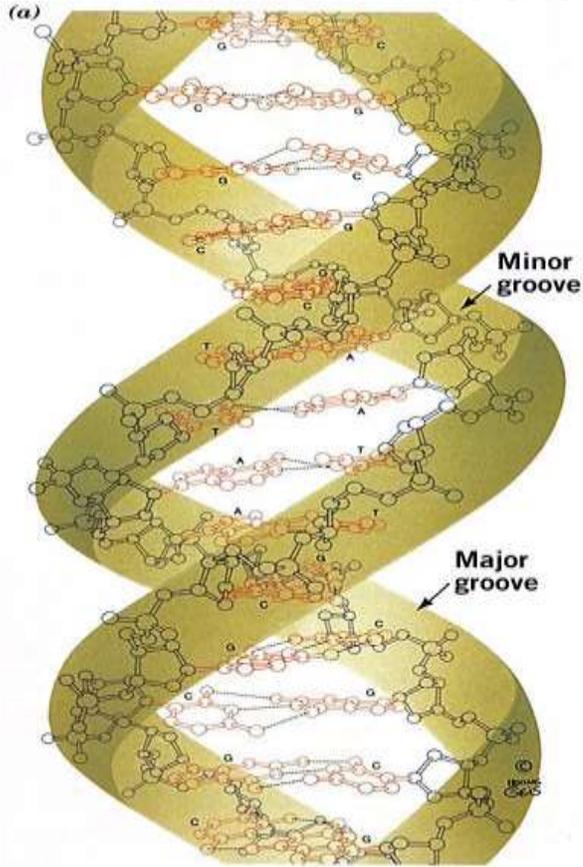


b

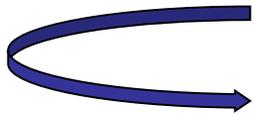
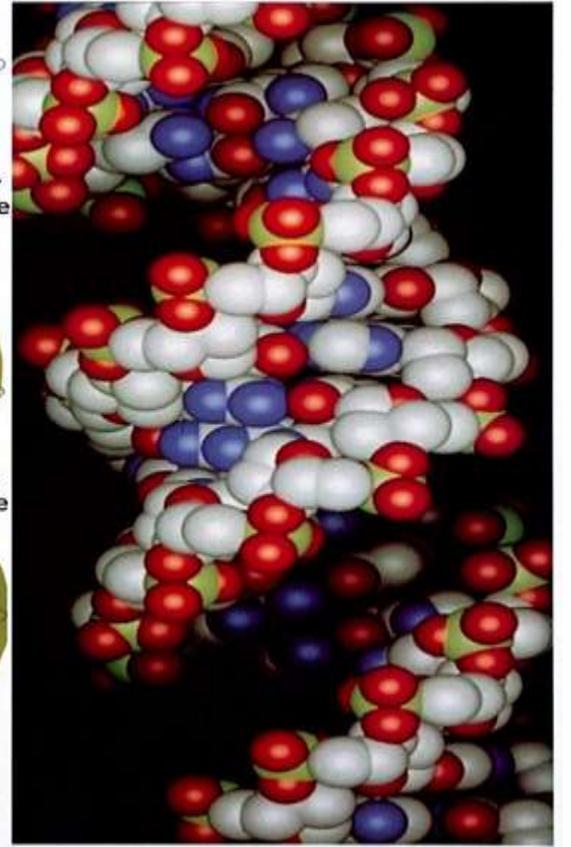
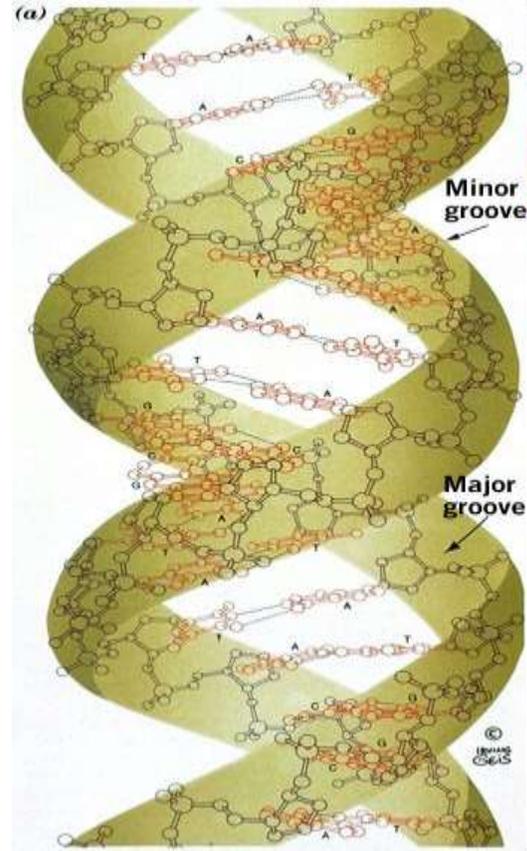


г

- | В форма шаг 33,2 Å
- | ~10 п.н. на виток



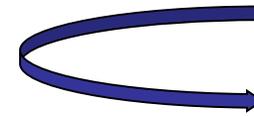
- | А форма шаг 24,6 Å
- | 10,7 п.н. на виток



правозакрученная спираль

- | отклонение плоскости оснований
- | от горизонтальной

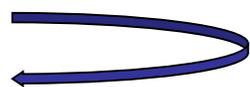
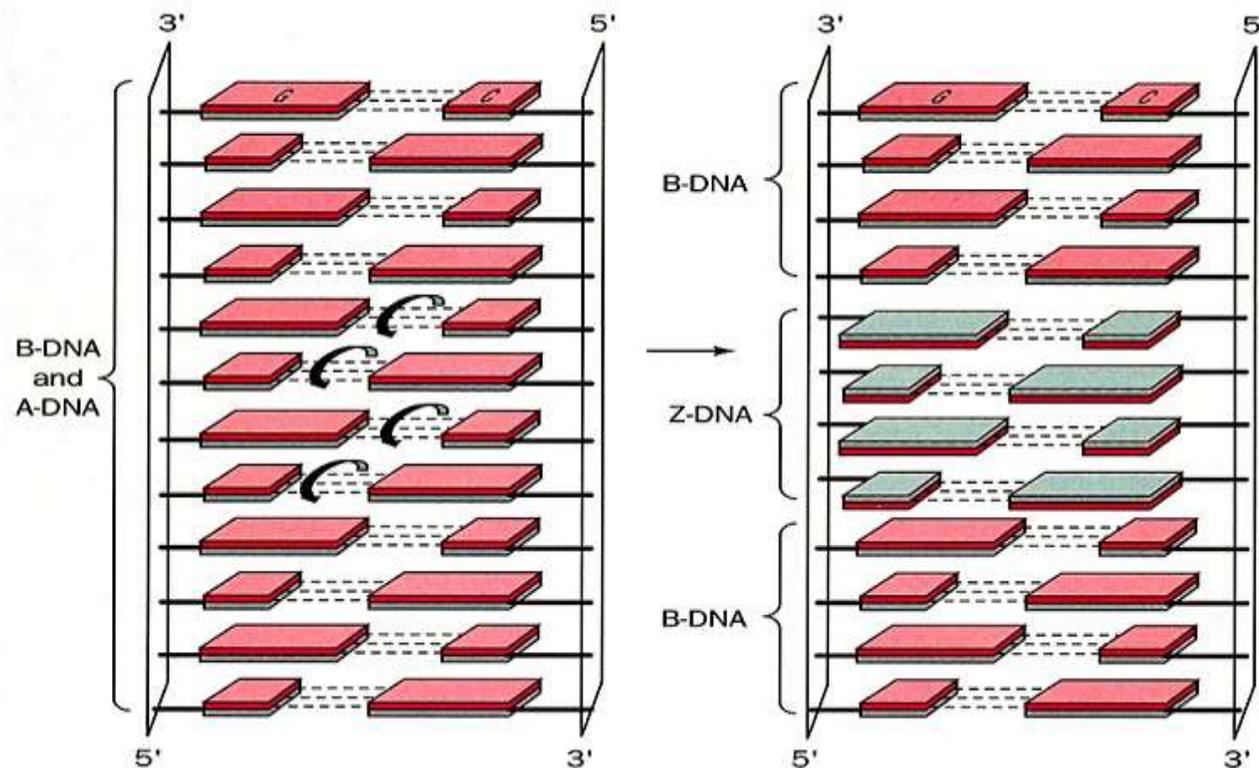
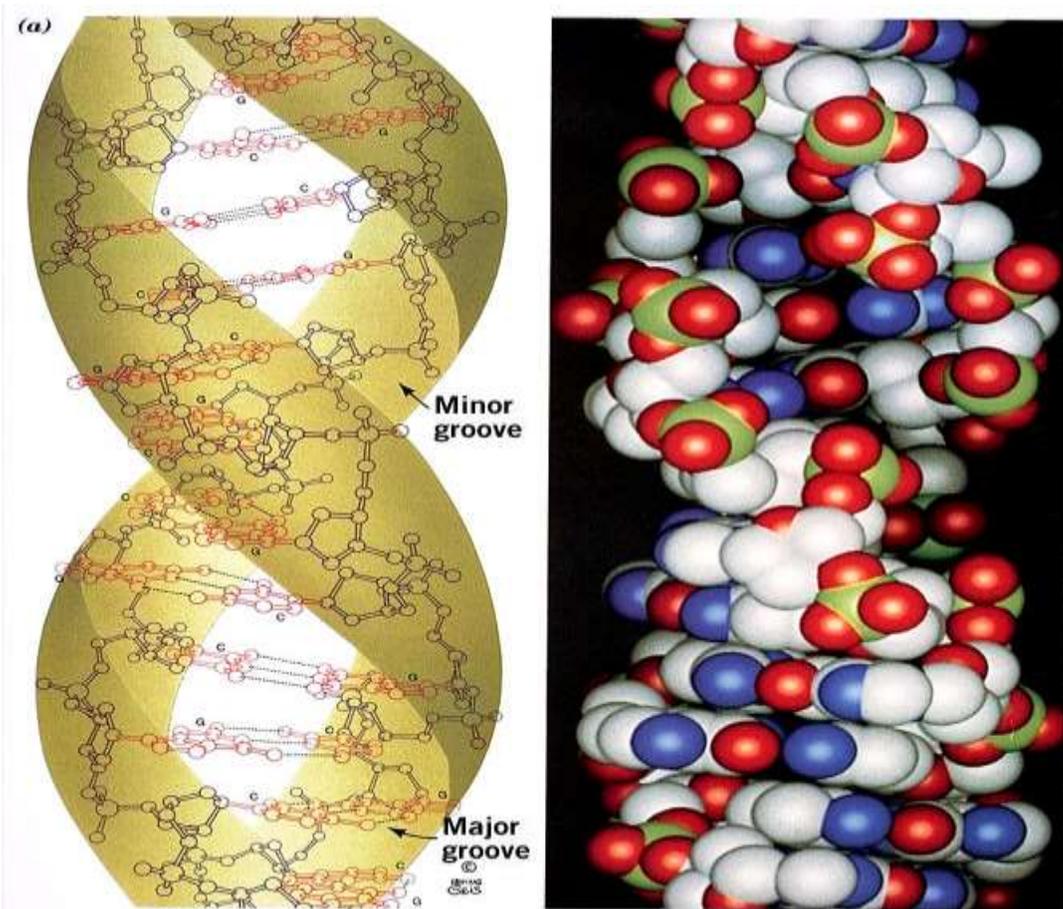
| -1.2°



| +19° !

правозакрученная спираль

**Z форма** шаг 45,6 Å ; ~12 п.н. на виток



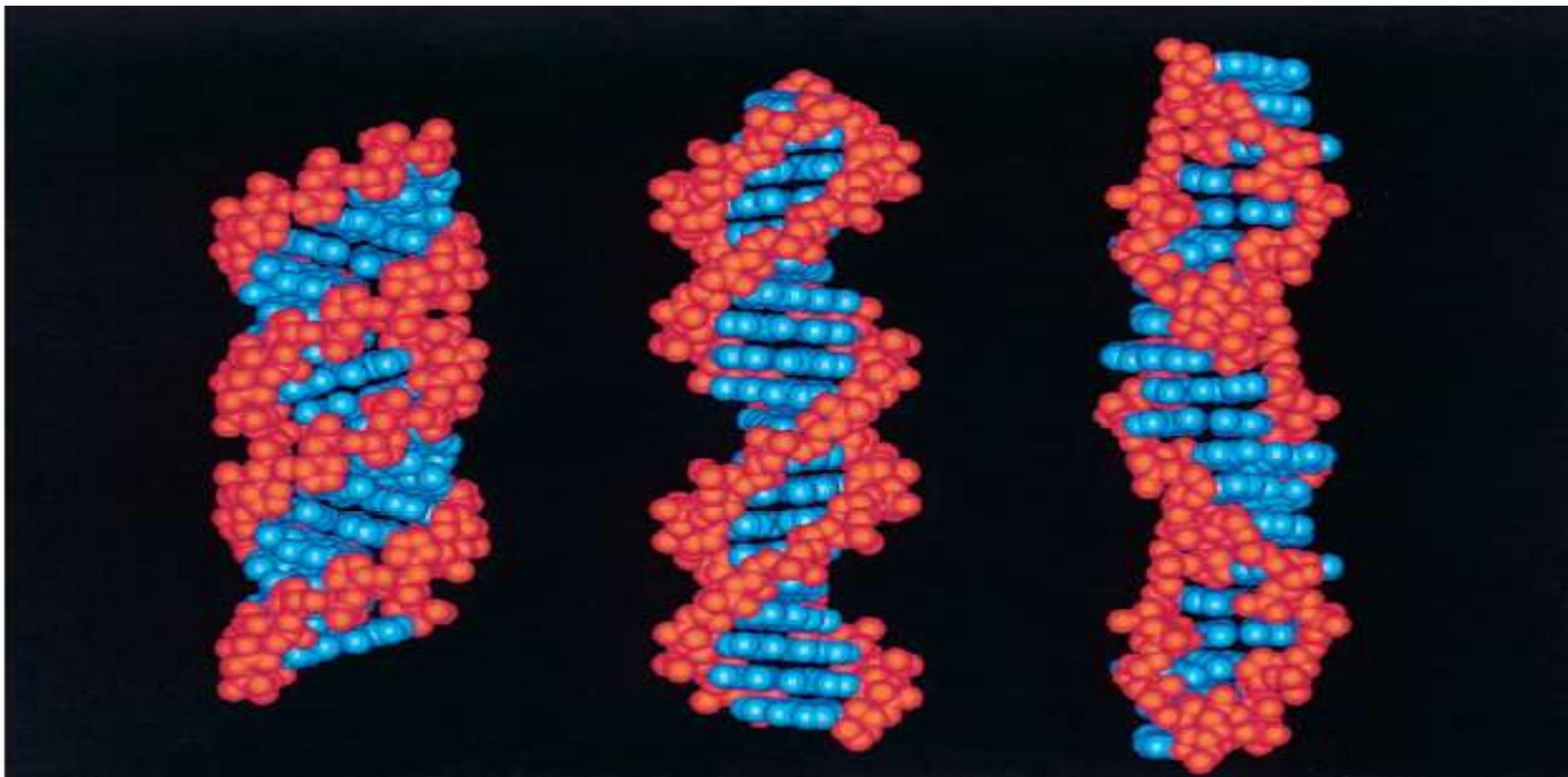
левозакрученная спираль

В Z ДНК основания перевернуты

А форма

В форма

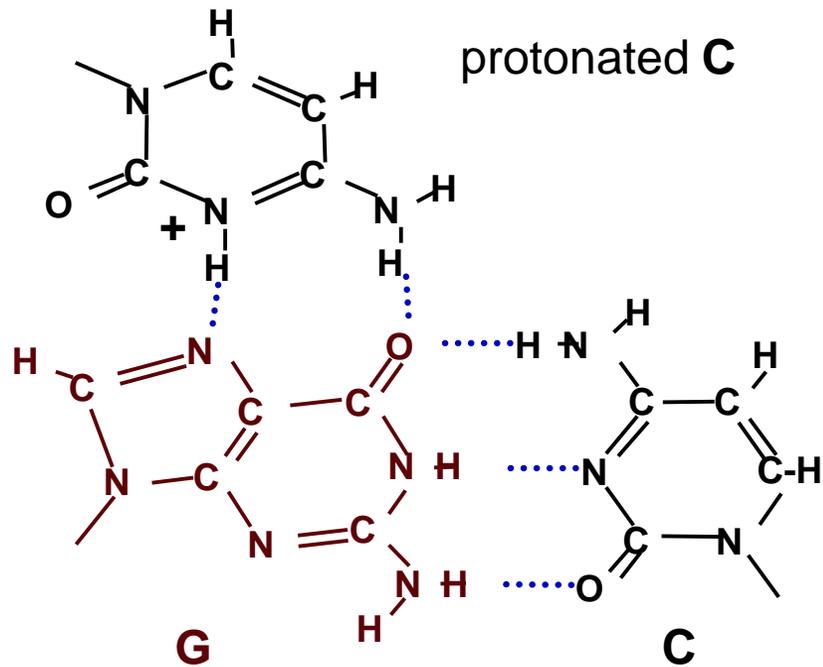
З форма



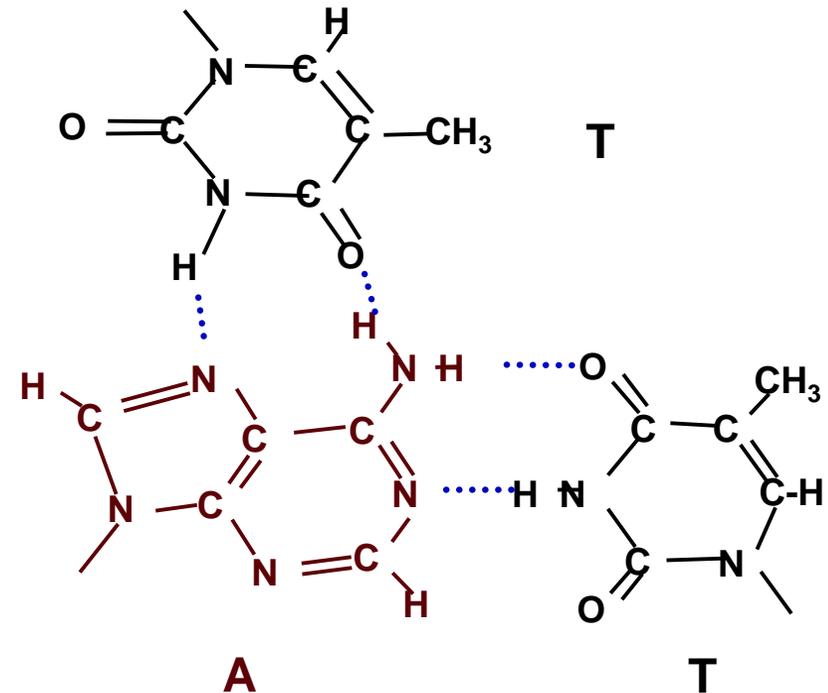
# Правила Чаргаффа

- 1) молярная доля пуринов равна молярной доле пиримидинов:  $A+G = T+C$
  - 2)  $A+C = G+T$
  - 3)  $A = T$  и  $G = C$
  - 4) коэффициент специфичности – отношение  $G+C/A+T$  является важным для характеристики вида.
- Для животных и большинства растений этот коэффициент ниже 1 (от 0,54 до 0,94), у микроорганизмов – от 0,45 до 2,57.

## Hoogsteen pairs stabilize triplex DNA structures



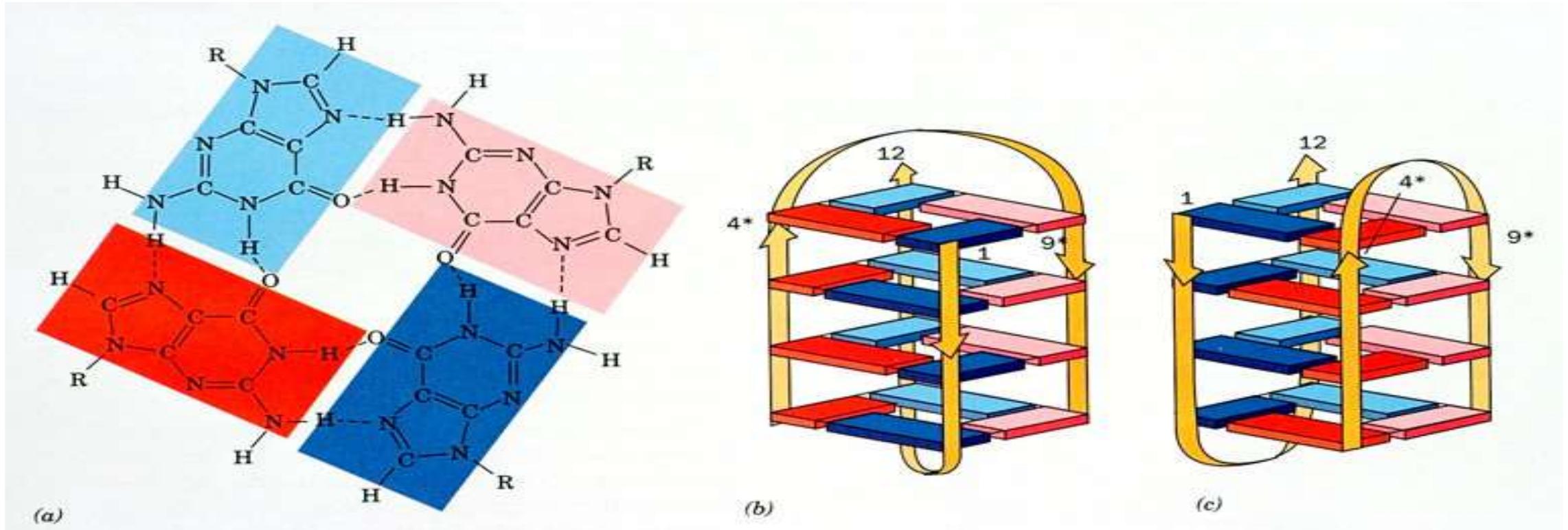
A protonated cytosine can form two H-bonds to the guanosine of a G-C pair.



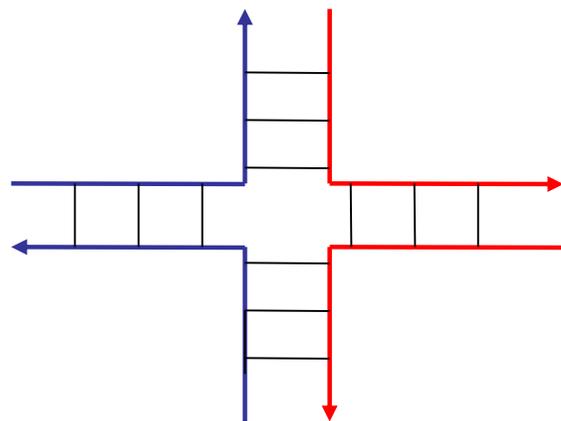
A thymidine can form two H-bonds to the adenosine of an A-T pair.

# Quadruplex DNA

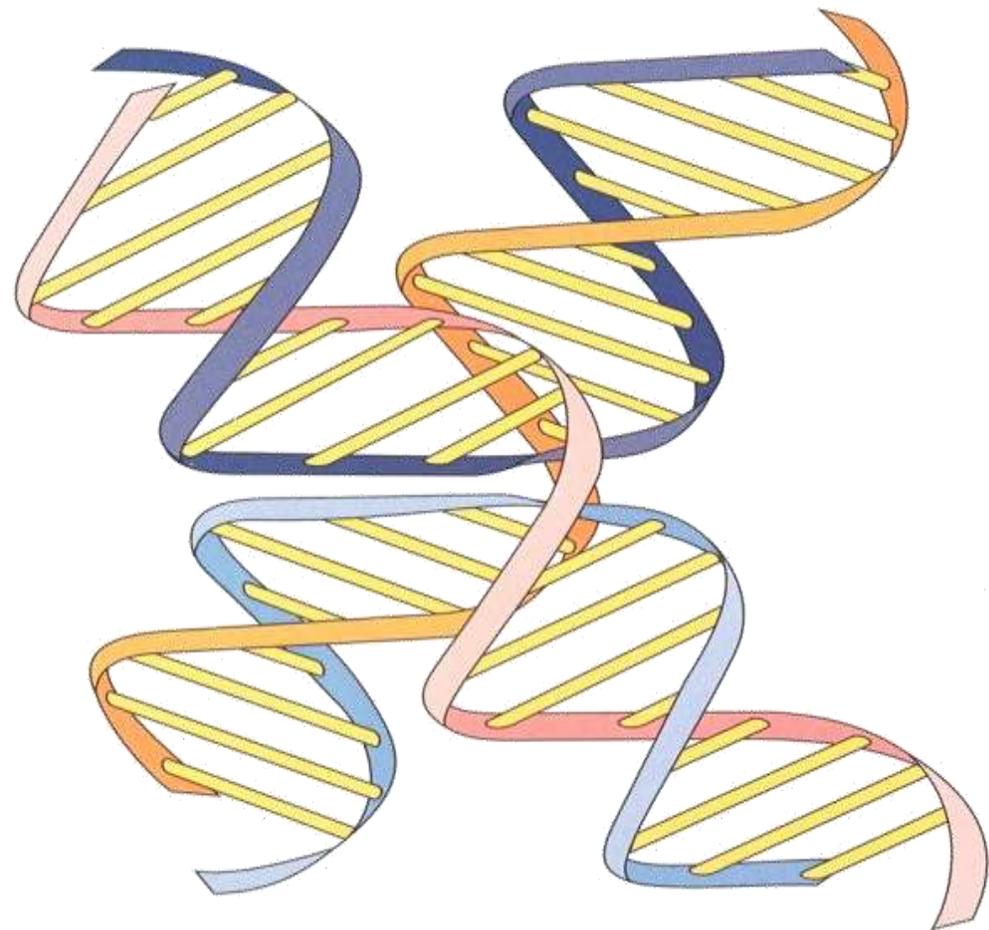
часто присутствует в теломерах, в том числе у человека



# Крестообразные структуры в ДНК



Holliday junction



# Свойства ДНК

- **Способность к самоудвоению (редупликации)  
Редупликация – синтез ДНК**
- **Способность к репарации – восстановлению повреждений ДНК**
- **Способность к денатурации и ренатурации.  
Денатурация – под действием высокой температуры и щелочей разрываются водородные связи между цепями ДНК и ДНК становится однонитевой. Ренатурация – обратный процесс. Это свойство используется в ДНК-диагностике.**

## Избыточность генома эукариот

Группы организмов	Средний размер генома, п.о.
Мелкие вирусы	$1,0 \times 10^4$
Микоплазмы	$1,6 \times 10^6$
Бактерии	$2,0 \times 10^6$
Грибы	$4,7 \times 10^7$
Насекомые	$2,3 \times 10^9$
Моллюски	$1,6 \times 10^9$
Костистые рыбы	$1,4 \times 10^9$
Амфибии бесхвостые	$2,7 \times 10^9$
хвостатые	$3,6 \times 10^{10}$
Рептилии	$1,5 \times 10^9$
Птицы	$1,2 \times 10^9$
Млекопитающие	$2,6 \times 10^9$
Человек	$3,0 \times 10^9$
Растения голосеменные	$1,6 \times 10^{10}$
Покрытосеменные	$2,7 \times 10^{10}$
Лилия <i>Lilium longiflorum</i>	$1,8 \times 10^{11}$

Прямой корреляции между количеством ДНК и эволюционной продвинутостью организма нет.

### «Парадокс С»

(1978 г. Т. Кавалье-Смит) : у эукариот транскрибируется лишь незначительная часть последовательностей нуклеотидов генома (~3% генома человека).

# Избыточность генома эукариот

## Причины избыточности:

1. Большой размер генов (за счет наличия интронов).
2. Присутствие повторенных последовательностей. Повторяются и гены, и некодирующие участки.
3. Наличие большого числа некодирующих последовательностей.

## Минусы "избыточной" ДНК:

- увеличение времени синтеза ДНК;
- сложнее организовывать удвоение ДНК;
- высокая энергоемкость - на 1 нуклеотид для включения в цепь ДНК нужно затратить ~60 молекул АТФ.

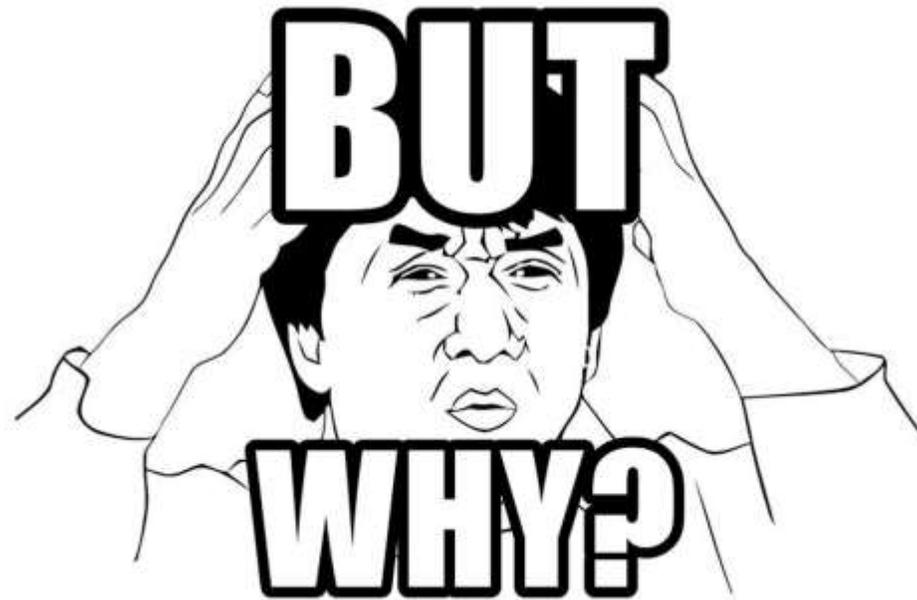
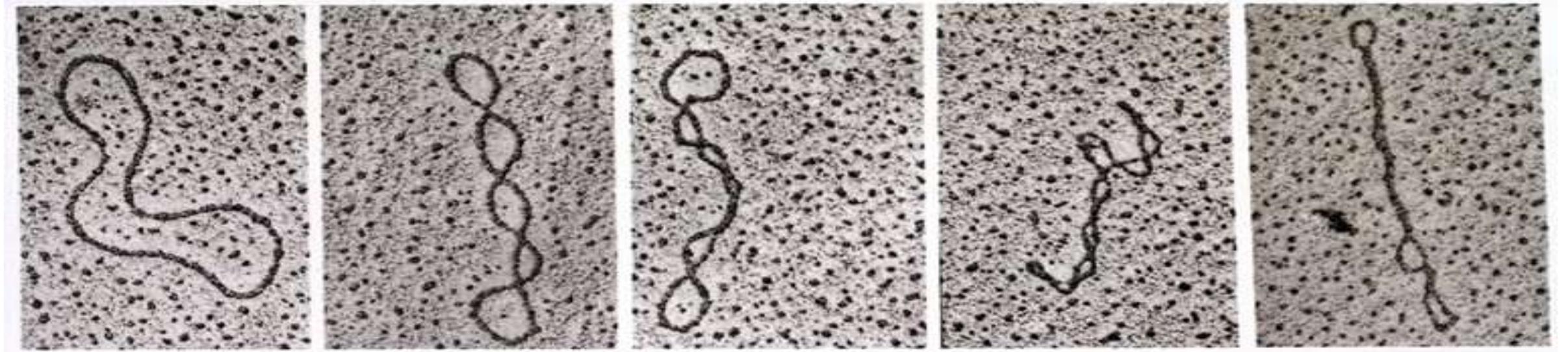
## Неопределенное следствие:

- благодаря зависимости размера ядра от количества ДНК происходит увеличение размеров клетки.

## Плюсы "избыточной" ДНК:

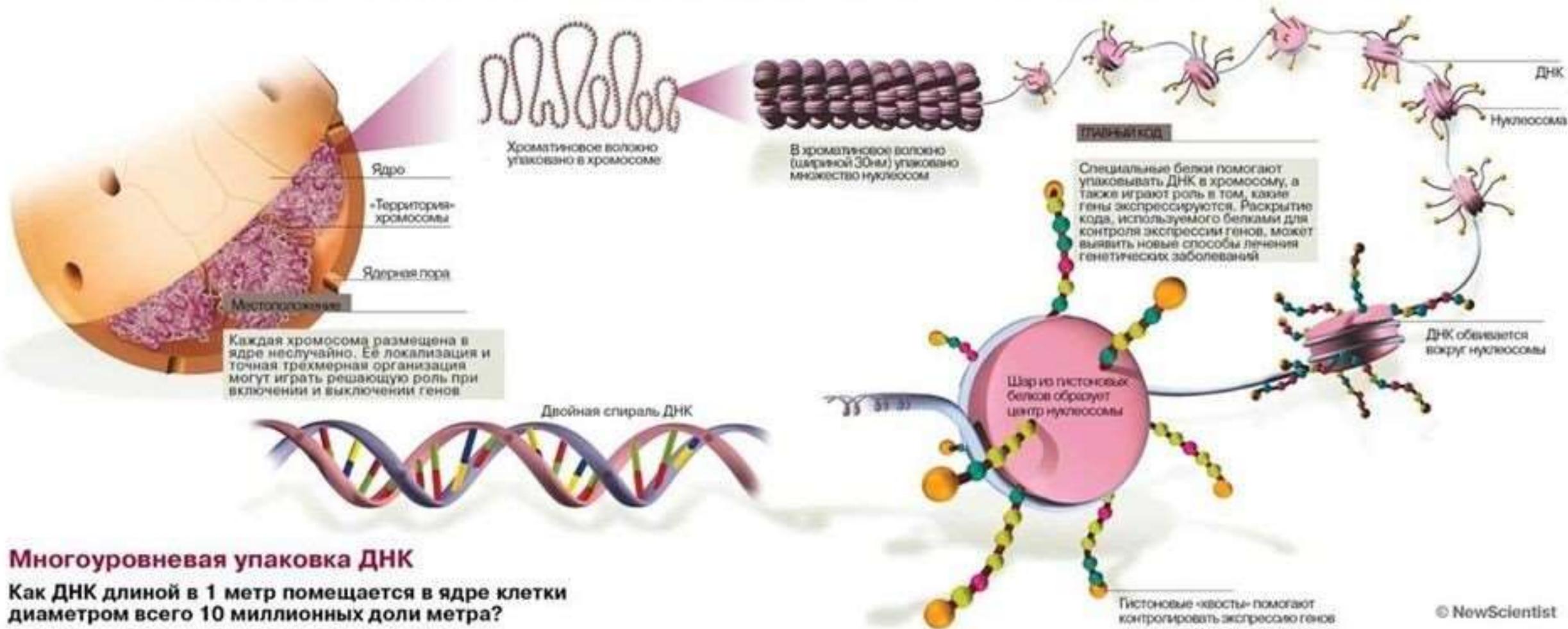
- возникает возможность создания сложного регуляторного аппарата, позволяющего поднять организм на более высокий эволюционный уровень.

# Суперспирализация ДНК

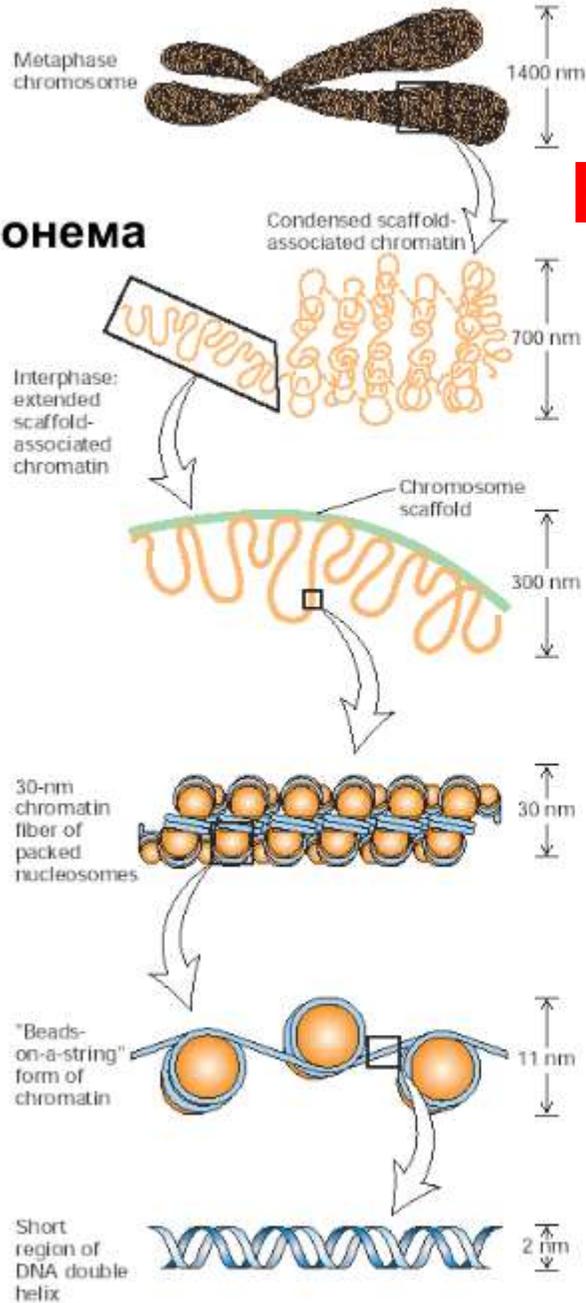


Длина ДНК одной клетки человека может составлять 2м, при размере самой клетки примерно в 30 мкм

# ДНК: ИДЕАЛЬНЫЙ ЖЕСТКИЙ ДИСК



**хромонема**

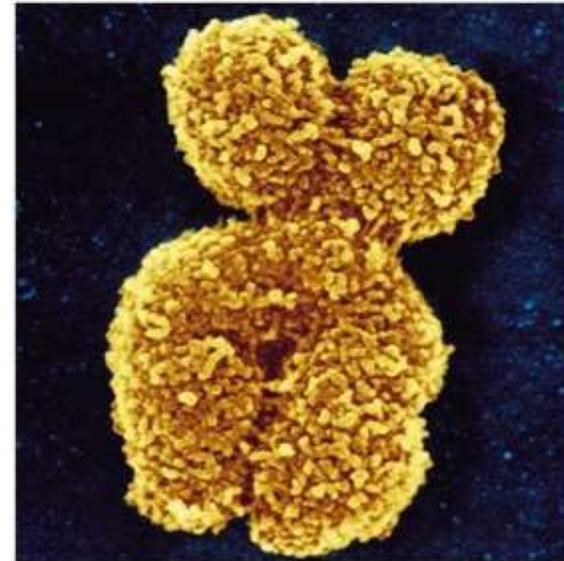


**Компактизация!!!**

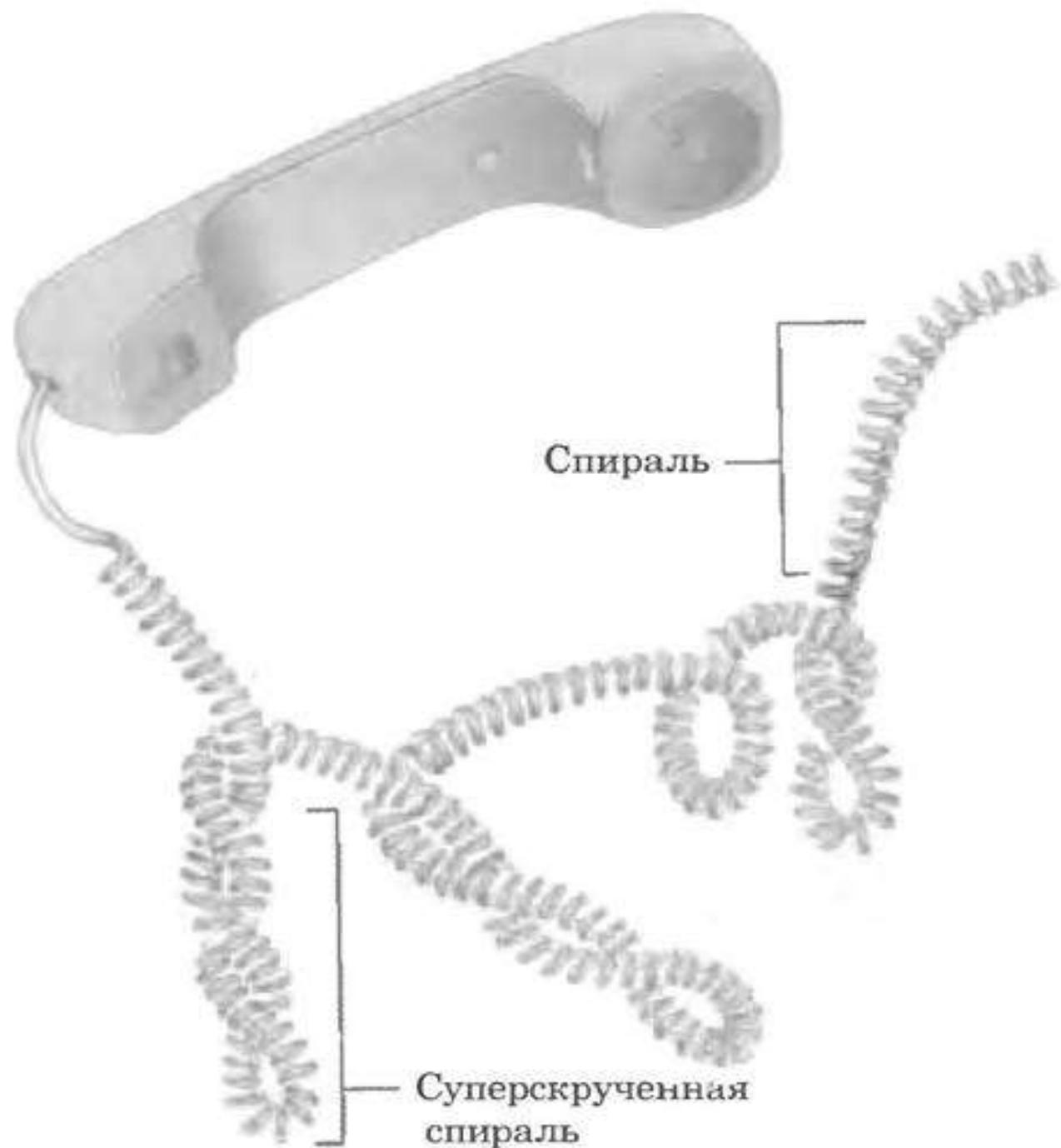


**хромомерный уровень**

**нуклеомер**



© Biophoto Associates/Science Source/Photo Researchers, Inc.



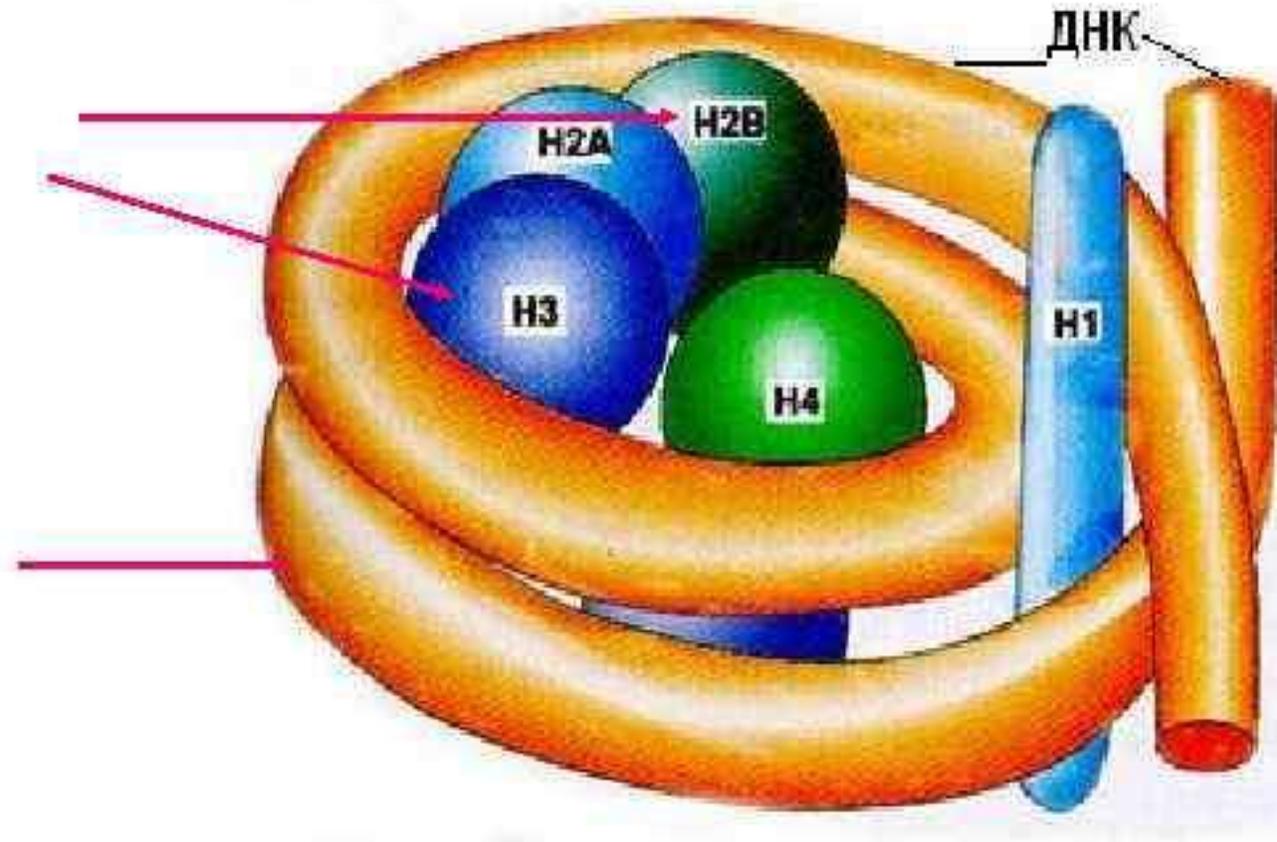
Спираль

Суперскрученная  
спираль

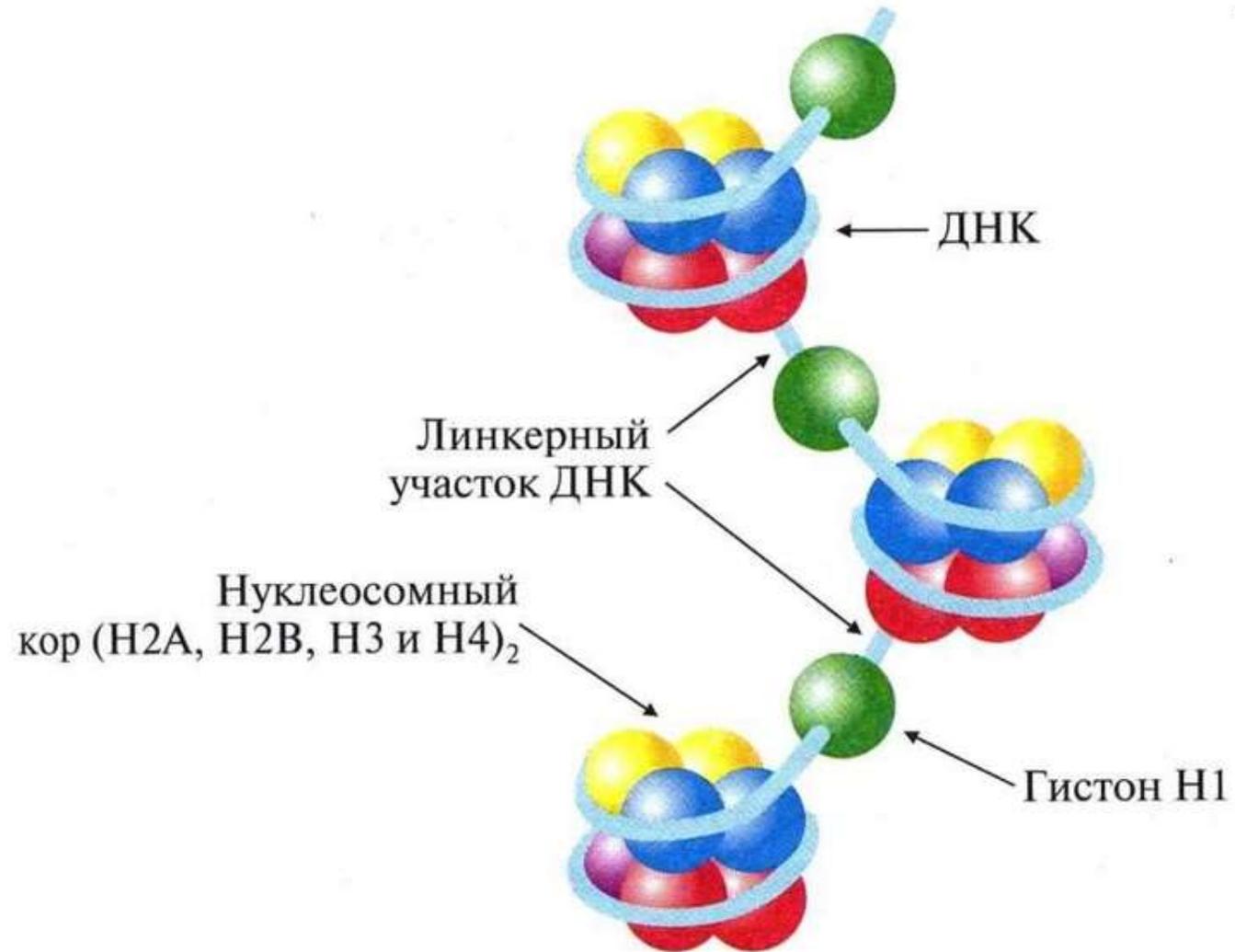
# Нуклеосома

Нуклеосомный кор  
(H2A, H2B, H3, H4)×2

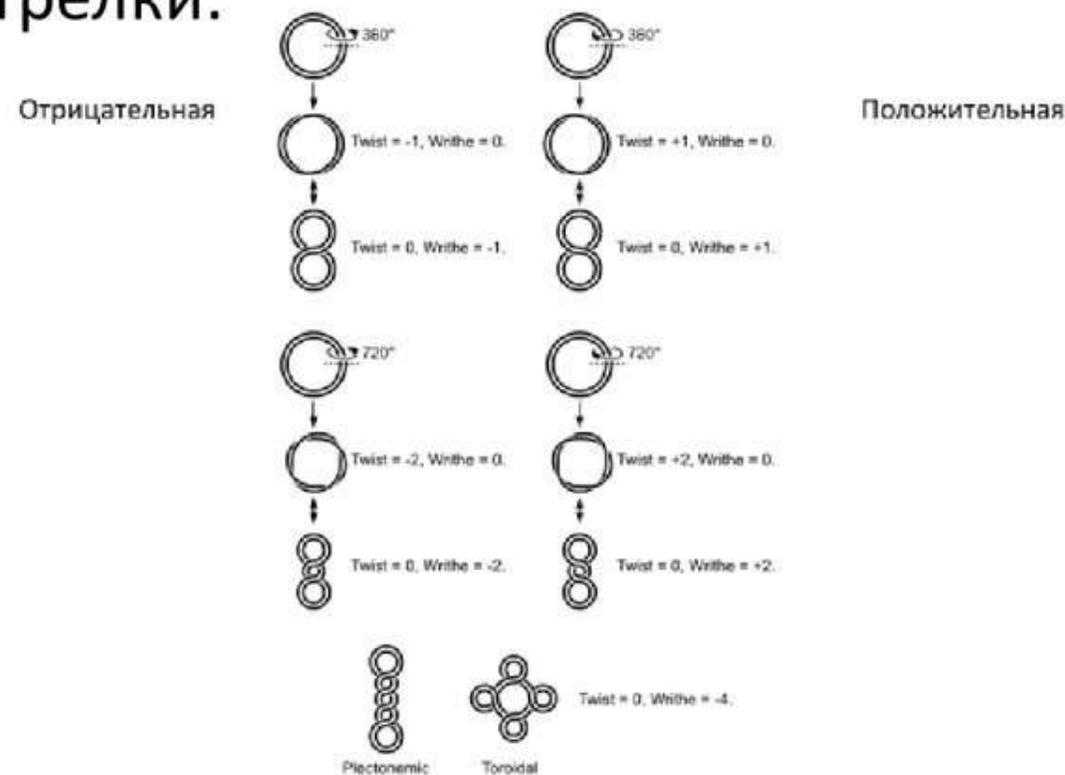
ДНК (146 п.н.)



# Строение нуклеосомы

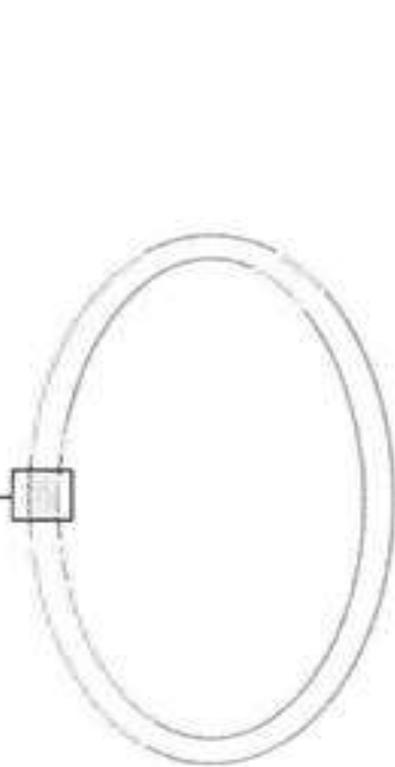
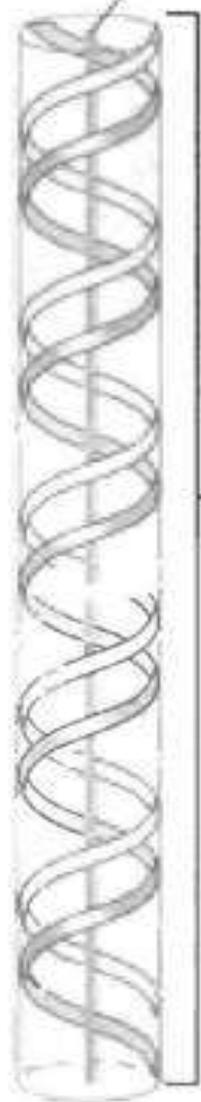


- Сверхспирализация ДНК может быть положительной и отрицательной. Положительная - ось двойной спирали закручена в том же направлении, что и цепи внутри двойной спирали (по часовой стрелке). Отрицательная - против часовой стрелки.



Двойная  
спираль ДНК

Ось



Суперскрученная  
ДНК



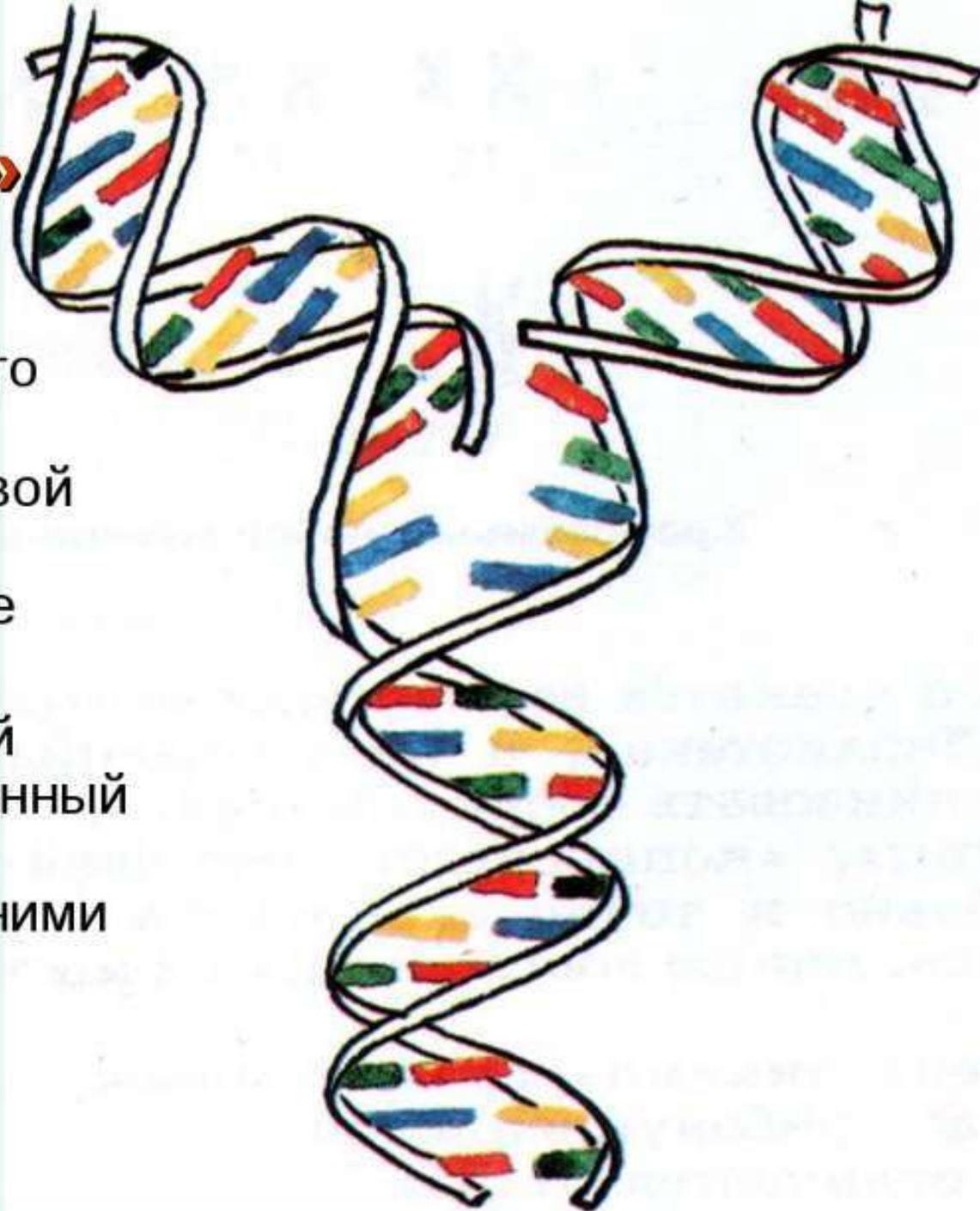
## Отличия организации генома и экспрессии генов у прокариот и эукариот

Прокариоты	Эукариоты
ДНК кольцевидной формы, не соединена с белками, расположена в цитоплазме	ДНК линейная, соединяется с гистоновыми и негистоновыми белками, находится в ядре клетки
В генах нет интронов	Есть интроны
Мало генов (у кишечной палочки около 4000)	Много генов (у человека до 30000)
Есть опероны	Нет оперонов Каждый ген окружен группой регуляторных генов

## Свойство «репликации»

**Репликация ДНК** – это процесс копирования дезоксирибонуклеиновой кислоты, который происходит в процессе деления клетки.

При этом генетический материал, зашифрованный в ДНК, удваивается и делится между дочерними клетками.



# **В конце 50х годов было сформулировано три модели репликации ДНК**

## **– Консервативная модель**

Обе родительские цепи остаются вместе после репликации

## **– Полуконсервативная модель**

После репликации ДНК состоит из одной родительской и одной новосинтезированной цепи

## **– Дисперсионная модель**

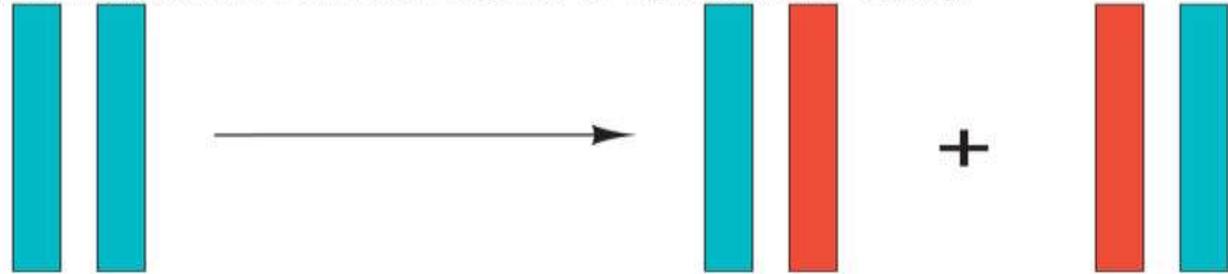
После репликации каждая из цепей ДНК содержит фрагменты родительской и новосинтезированной ДНК

# Альтернативные модели репликации ДНК

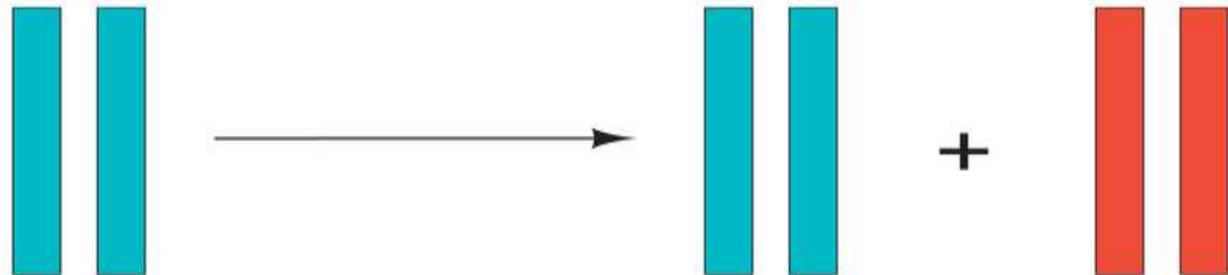
Fig. 20.1

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

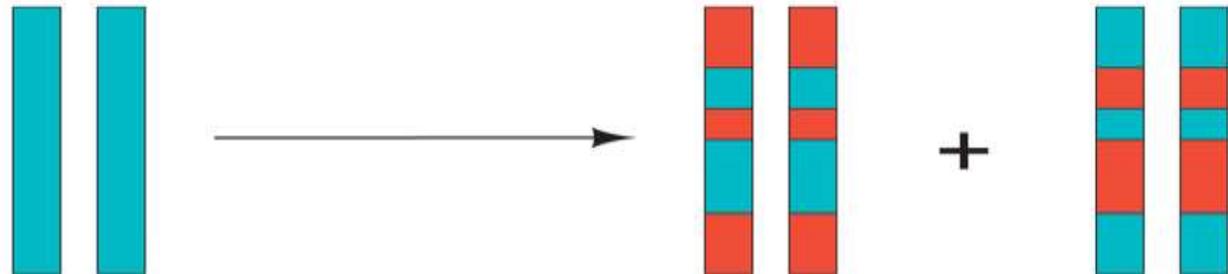
(a) Semiconservative



(b) Conservative

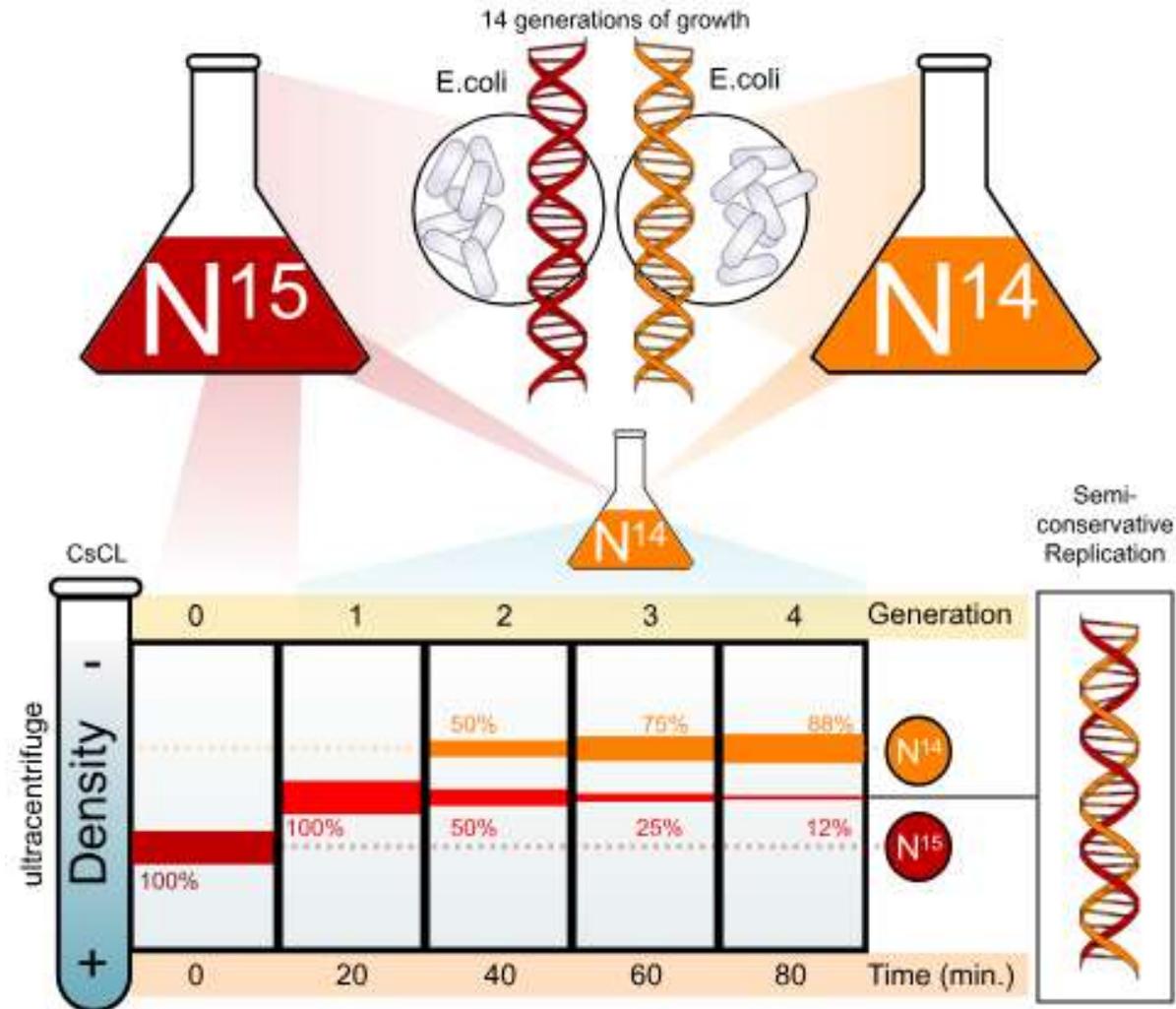


(c) Dispersive



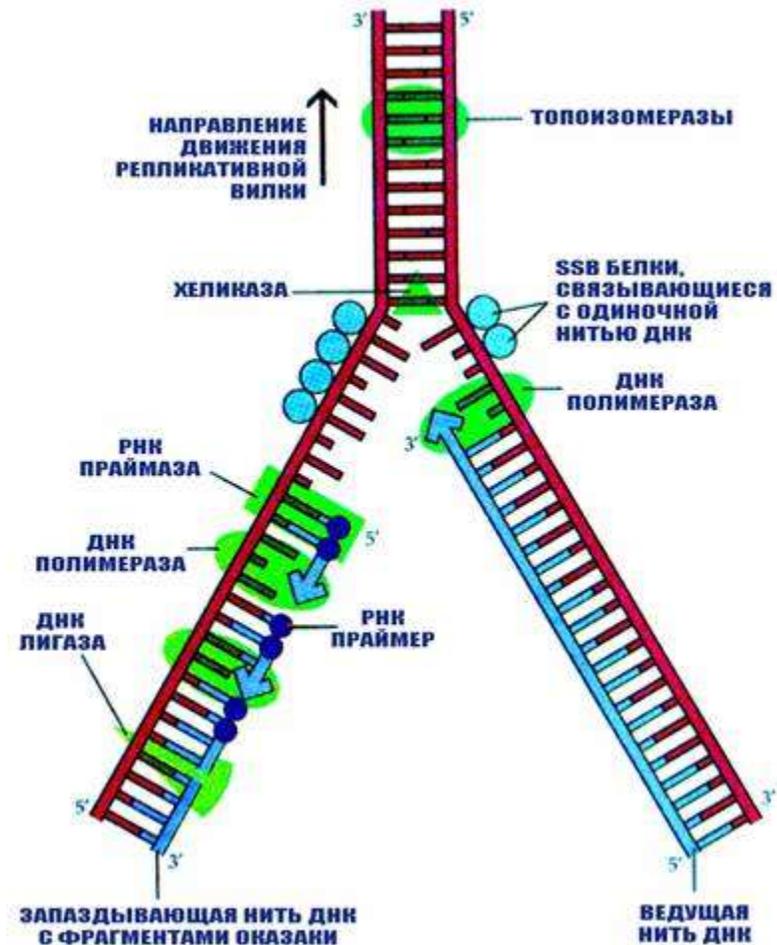
# Доказательство полуконсервативности

Эксперимент Мезельсона и Сталя (и Джером Виноград), 1958



# Принципы репликации

- Комплементарность
- Антипараллельность
- Униполярность
- Потребность в затравке
- Полунепрерывность (прерывистость)
- Полуконсервативность



# Ориджин репликации

В каждой точке 'origin' образуется «глазок» репликации.

Общие свойства ориджинов репликации:

1. Точки начала репликации – это уникальные сегменты ДНК, содержащие множественные короткие повторы;
2. Эти повторы узнаются мультимерными ориджин-связывающими белками, которые играют ключевую роль в сборке ферментативных комплексов в участках начала репликации;
3. Области ориджина содержат АТ-богатые участки (аденин-тимин богатые участки), облегчающие расплетание ДНК.

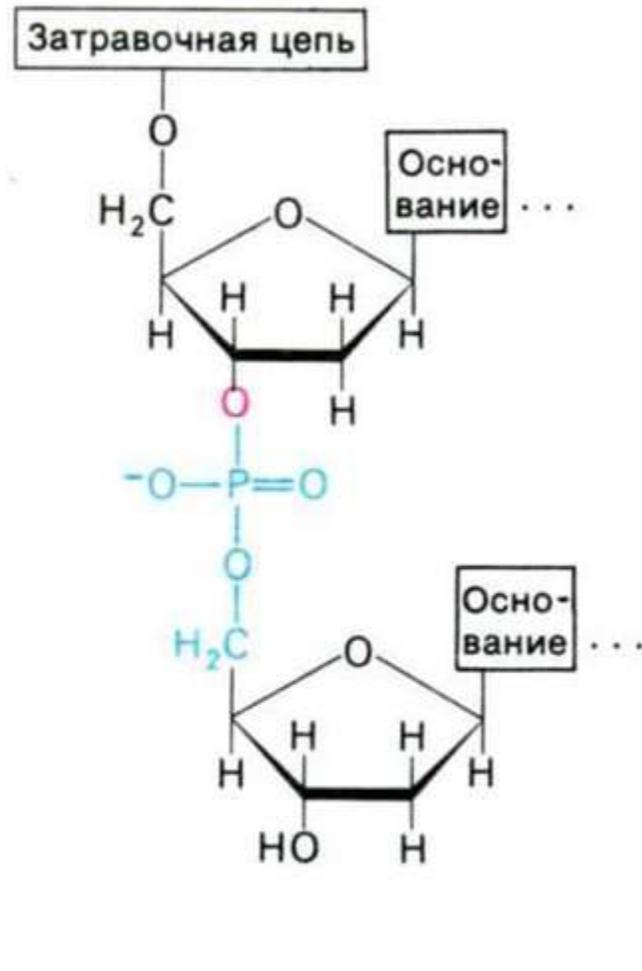
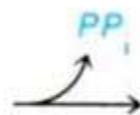
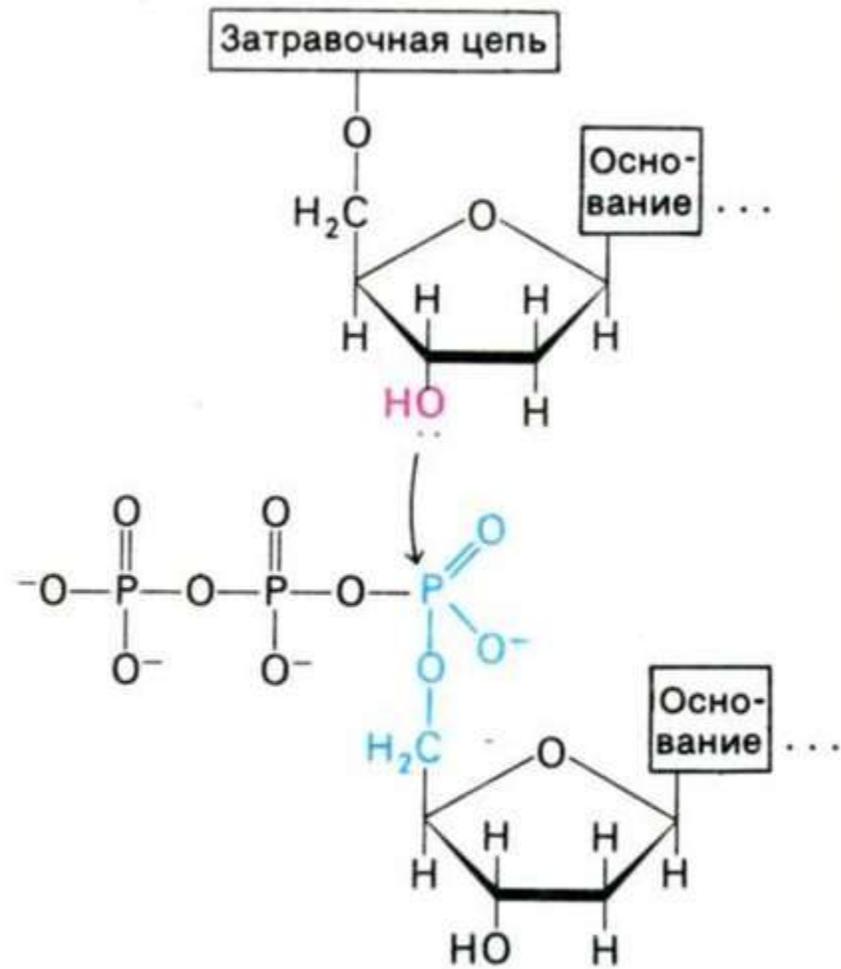


# Репликация ДНК

- **Этап инициации:**
- Сигналом начала репликации служат **белковые факторы роста** (модифицирующие регуляторные белки?)
- Формирование одноцепочечных матриц:  
**топоизомераза** «разрезает» сахарофосфатный остов, **хеликаза** «расплетает» двойную спираль, **топоизомераза** восстанавливает О-Р-О связь.
- Формируется **репликативная «вилка»**, стабилизируются одноцепочечные участки (**SSB – белки**)

# Репликация ДНК

- **Механизм реакции:**
- Субстратами служат дезоксинуклеозид трифосфаты
- 3-ОН группа дезоксирибозы (рибозы) производит **нуклеофильную атаку  $\alpha$  атома Р** в поступающем нуклеотиде. Оставшийся пирофосфат спонтанно гидролизуется.
- **Полимеразная реакция (образование одной О-Р-О связи) потребляет энергию гидролиза двух макроэргических связей.**



**ДНК-полимераза III** является репликазой, синтезирует обе цепи ДНК, обладает активностью  $5' \rightarrow 3'$  полимеразной и  $3' \rightarrow 5'$  экзонуклеазной

**ДНК-полимеразы I** действует на запаздывающей цепи для удаления РНК-праймеров ( $5' \rightarrow 3'$  экзонуклеазы) и дорепликации очищенных мест ДНК, выполняет репаративную функцию, обладает активностью  $5' \rightarrow 3'$  полимеразной и  $3' \rightarrow 5'$  экзонуклеазной

**ДНК-полимераза II** имеет отношение лишь к репарации, обладает активностью  $5' \rightarrow 3'$  полимеразной и  $3' \rightarrow 5'$  экзонуклеазной

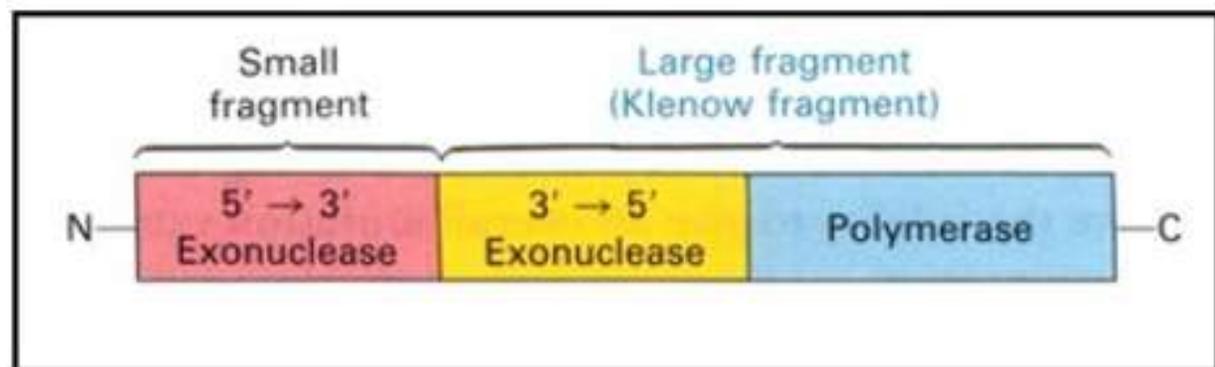
# *ДНК-полимераза 3 строение:*

Точно неизвестно как ДНК-полимераза осуществляет свою активность, но существует **модель ее работы**. Холофермент представляет собой комплекс (900кДа) из нескольких типов субъединиц:

- Каталитическая субъединица  $\alpha$  полимеризует нуклеотиды
- Субъединица  $\epsilon$  обладает 3'-5'-экзонуклеазной активностью и осуществляет коррекцию спаривания оснований
- Субъединица  $\theta$  необходима для сборки ферментного комплекса
- Вместе эти три субъединицы образуют кор-фермент (основной фермент)
- Субъединица  $\tau$  димеризует две каталитические субъединицы
- Субъединица  $\beta$  (скользящий зажим) обеспечивает процессивность фермента, стабилизируя его на матрице
- Субъединица  $\gamma$  обеспечивает установку скользящего зажима на матрице
- Также в комплекс входят и некоторые другие субъединицы

# ДНК-полимераза 1 строение:

- Одиночный полипептид с мультифункциональными активностями.
- После обработки ДНК-полимеразы трипсином происходит расщепление на два фрагмента:
  - Большой (С-концевой), фрагмент Кленова (Полимеразная и 3'-5'-эксонуклеазная активность).
  - Малый (N-концевой) (5'-3'-эксонуклеазная активность).



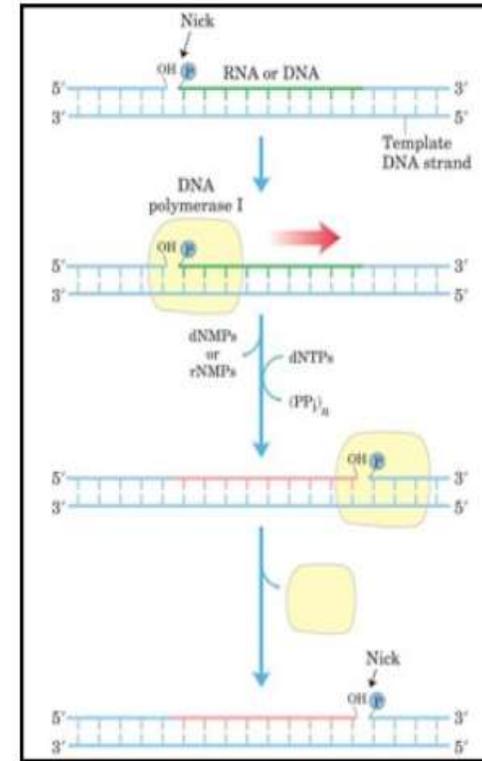
## *ДНК-полимераза 2:*

- Полимеризует нуклеотиды менее эффективно, чем ДНК-полимераза 1
- Не обладает 5'-3'-экзонуклеазной активностью (не способна осуществлять ник-трансляцию)
- Участвует в некоторых актах репарации повреждений ДНК

## 3'-5'-экзонуклеазная активность

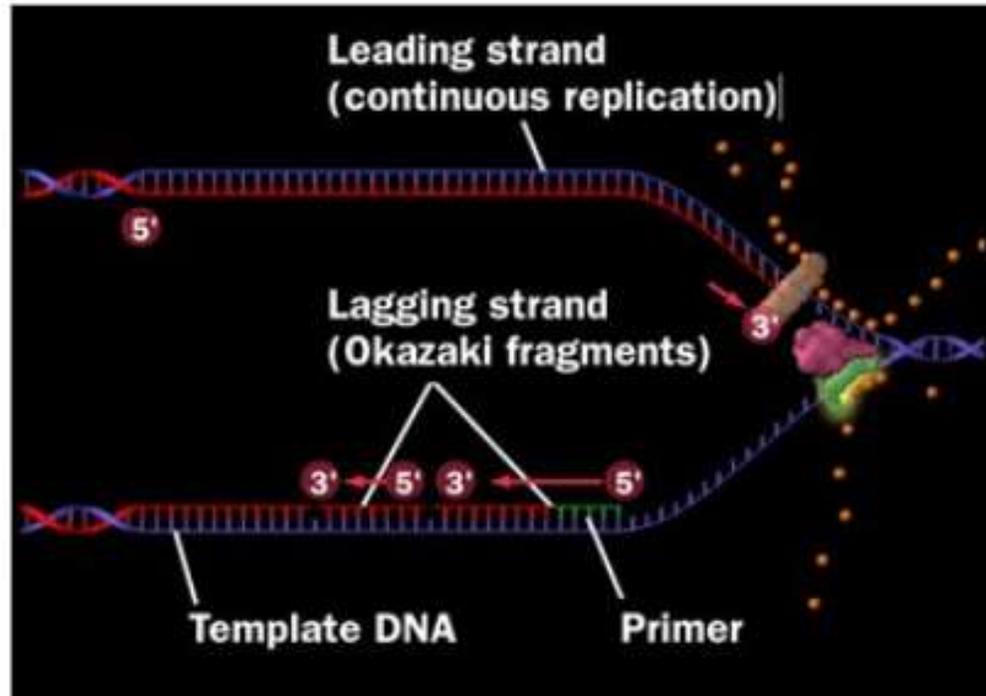
- Присуща ДНК-полимеразам 1, 2, 3 E.coli
- Происходит гидролиз фосфодиэфирной связи в одной цепи ДНК и удаляется один нуклеотид с 3' конца растущей цепи.
- Позволяет полимеразам осуществлять контроль за правильностью присоединения нуклеотидов к 3' концу (корректирующий механизм).

## 5'-3'-экзонуклеазная активность



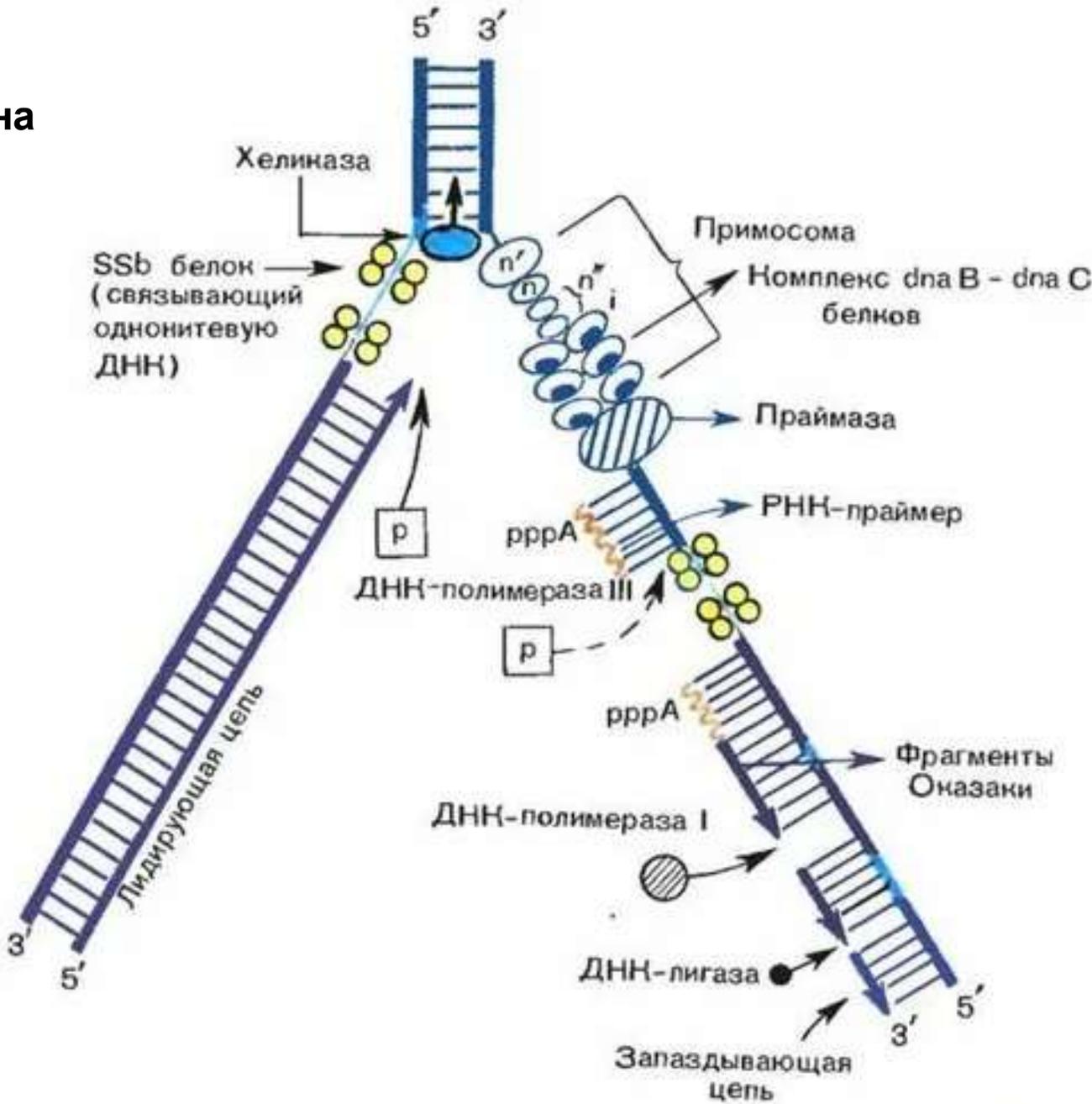
**Ник-трансляция** – это способность ДНК-полимеразы E.coli использовать концы (ники) в качестве стартовых точек полимеризации, при которой фрагмент цепи ДНК следующий за ником расщепляется и одновременно заменяется на вновь синтезированный участок.

# Значение ник-трансляции:



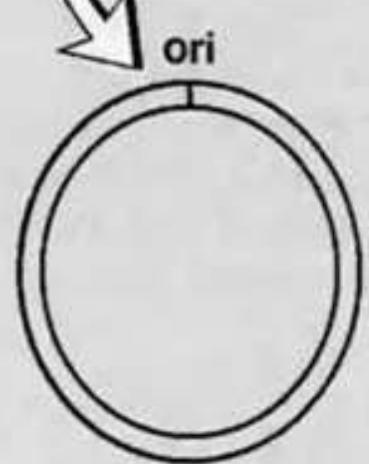
- Возможность быстрой репарации поврежденной нити ДНК без расплетания дуплекса.
- Возможность легко удалять праймеры, сращивая фрагменты Оказаки отстающей цепи.
- Возможность введения радиоактивной метки в молекулу ДНК в различных исследованиях.

# Репликация молекулы ДНК на примере E.coli



# Репликация кольцевых бактериальных хромосом

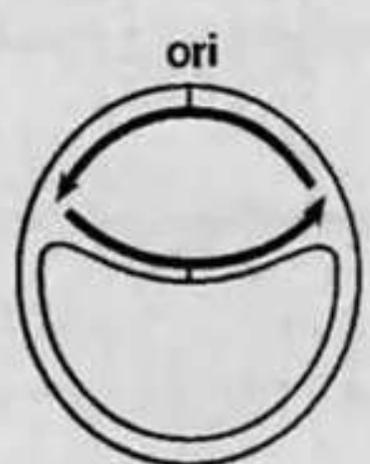
Для начала репликации требуется сайт *ori*. Его длина около 400 п.н.



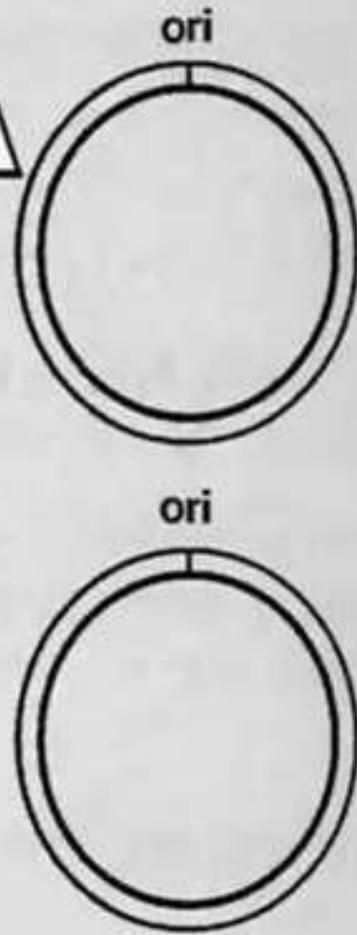
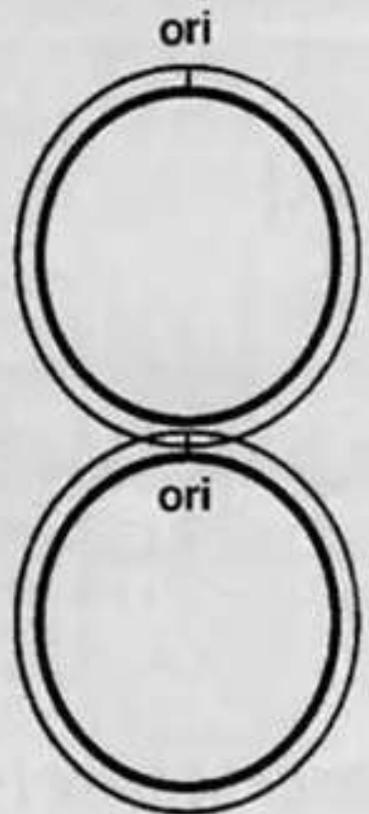
Формируется репликационный "пузырь"



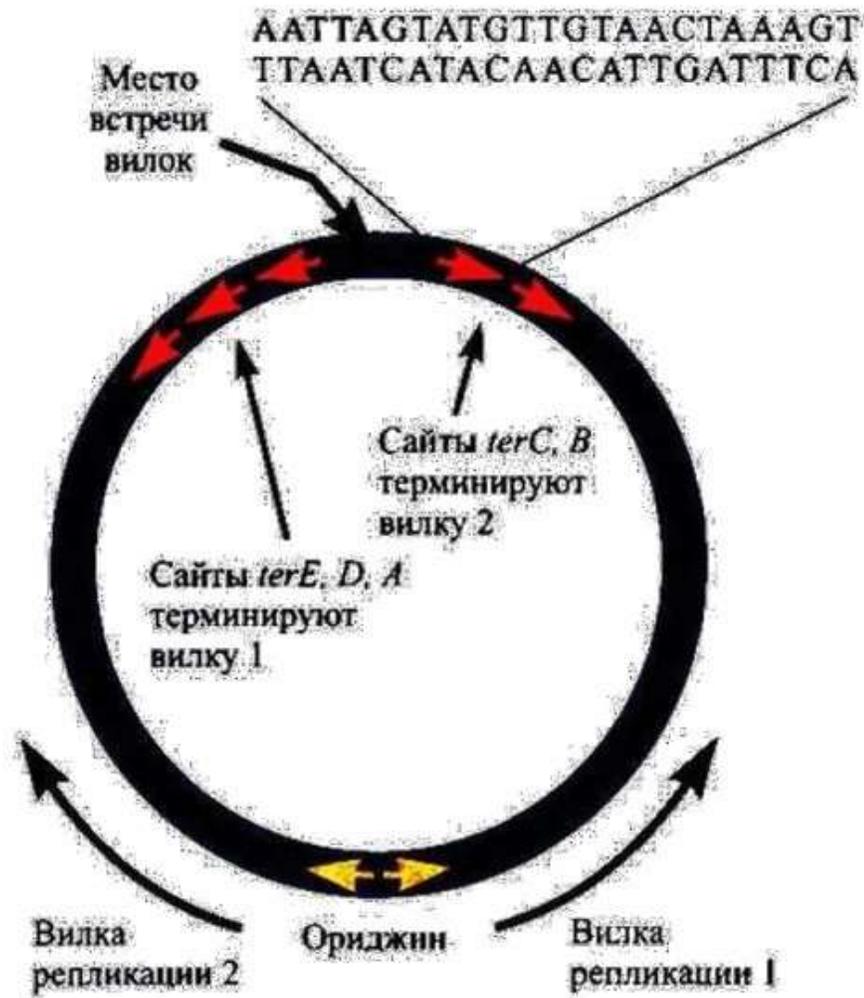
Репликация идет в двух направлениях до завершения копирования



Готовые копии ДНК расходятся



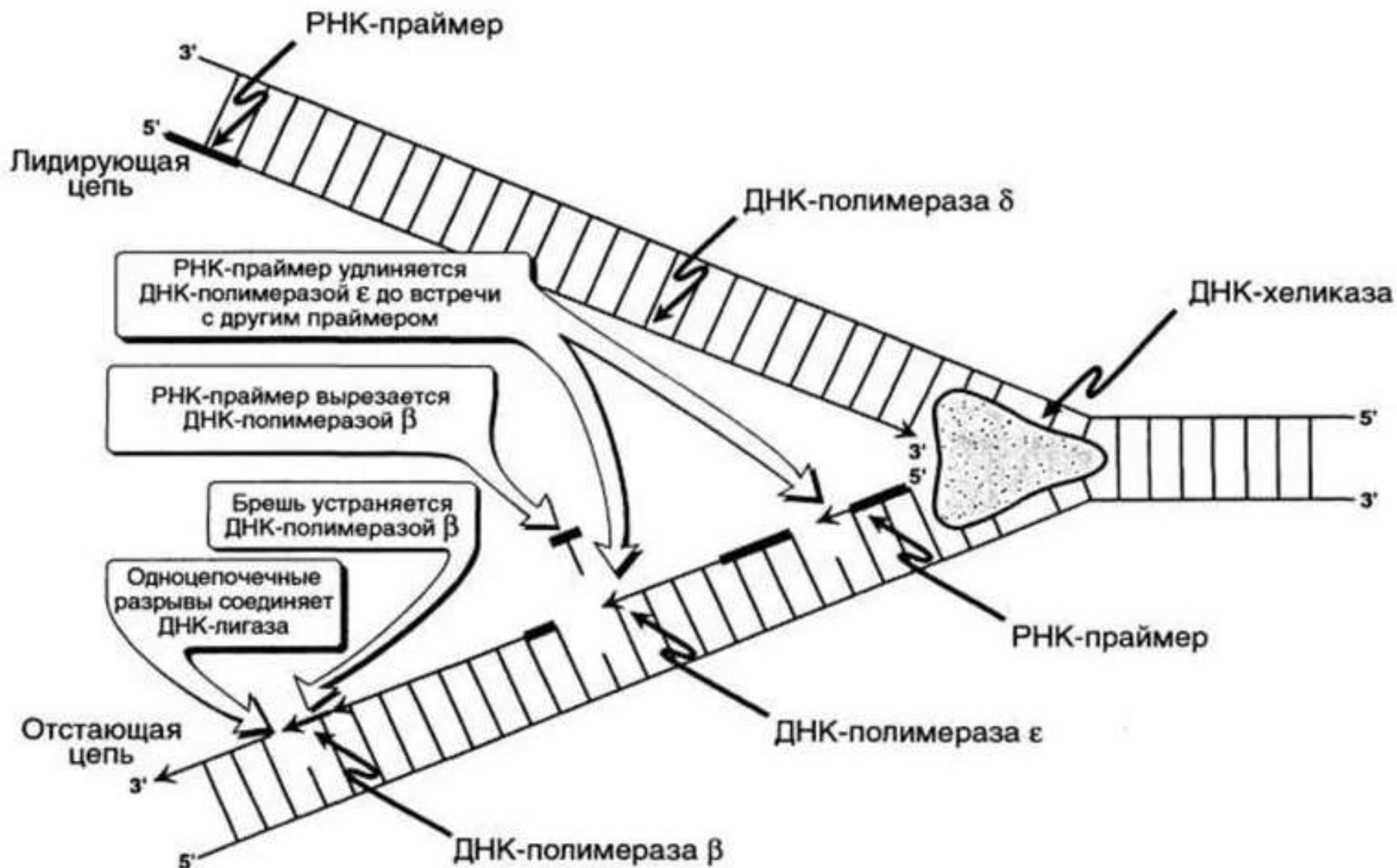
# Терминация репликации у прокариот



***E.coli***

- У прокариот есть участок *TerC*, на котором заканчивается репликация ДНК.
- На кольцевой хромосоме несколько *Ter*-участков (A-G). Полная остановка репликации проходит на центральном *TerC*-сайте.
- *Ter*-сайты содержат в составе консенсусные последовательности, с которыми связывается белок *tus*.
- Только прочный комплекс белка *tus* с последовательностью *С6* в составе *TerC* полностью останавливает репликативный комплекс.

# Репликация эукариот



# Терминация репликации у эукариот

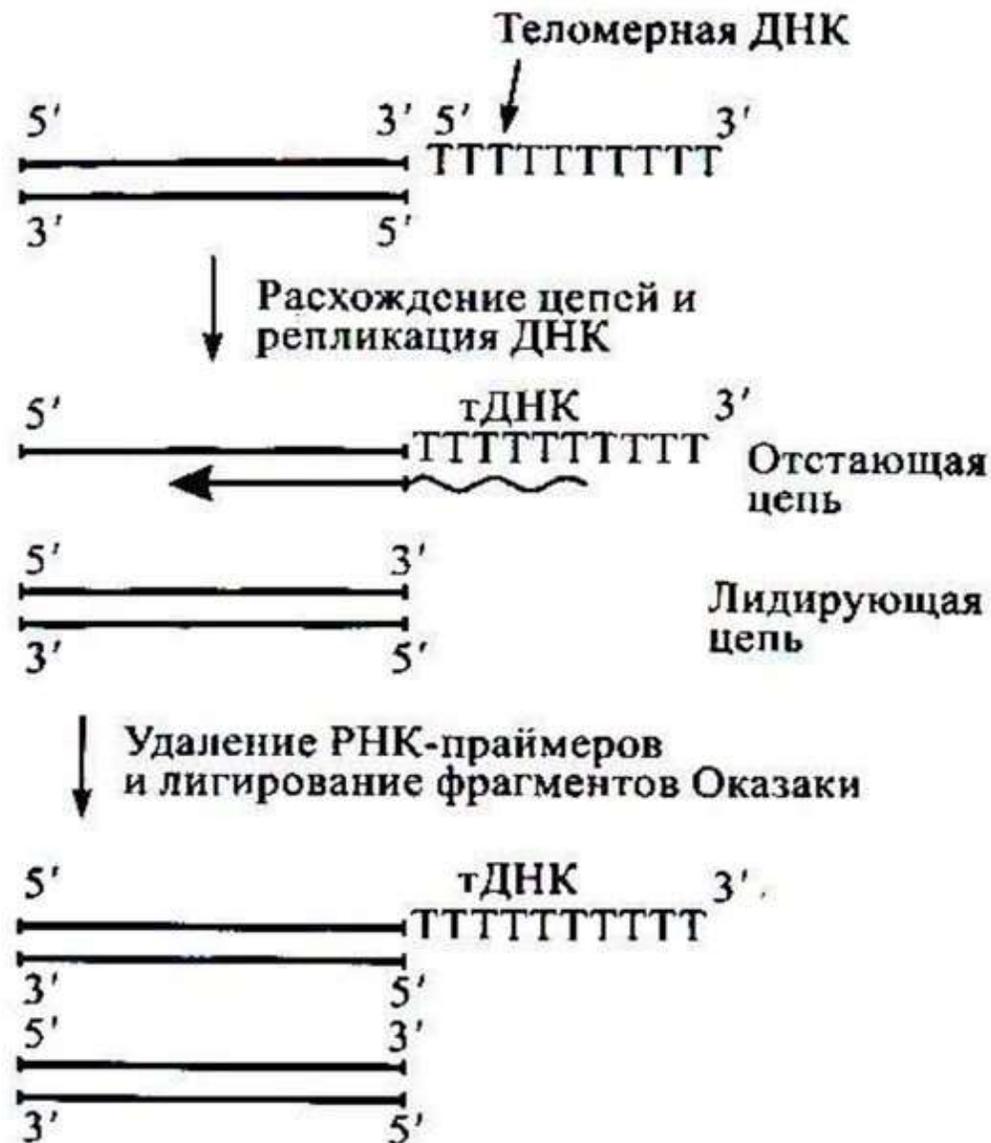
- **У эукариот** нет специфического сайта для терминации. Терминация происходит, когда сливаются репликационные пузырьки (вилки репликации встречаются).
- В терминации репликации принимает участие фермент РНКазы H (у человека) или экзонуклеаза (у дрожжей), которая удаляет РНК праймер, а ДНК-лигаза сшивает получившуюся брешь.
- В отличие от лидирующей цепи, которая реплицируется полностью, праймер, находящийся у 3'-конца отстающей цепи, разрушается и не реплицируется при помощи ДНК-полимераз.
- Для предотвращения укорачивания цепи на концах хромосомы находятся *теломеры* — участки нереплицируемой ДНК. На этом участке ДНК может синтезироваться праймер, и полнота репликации сохранится.

## *Репликация у про- и эукариот*

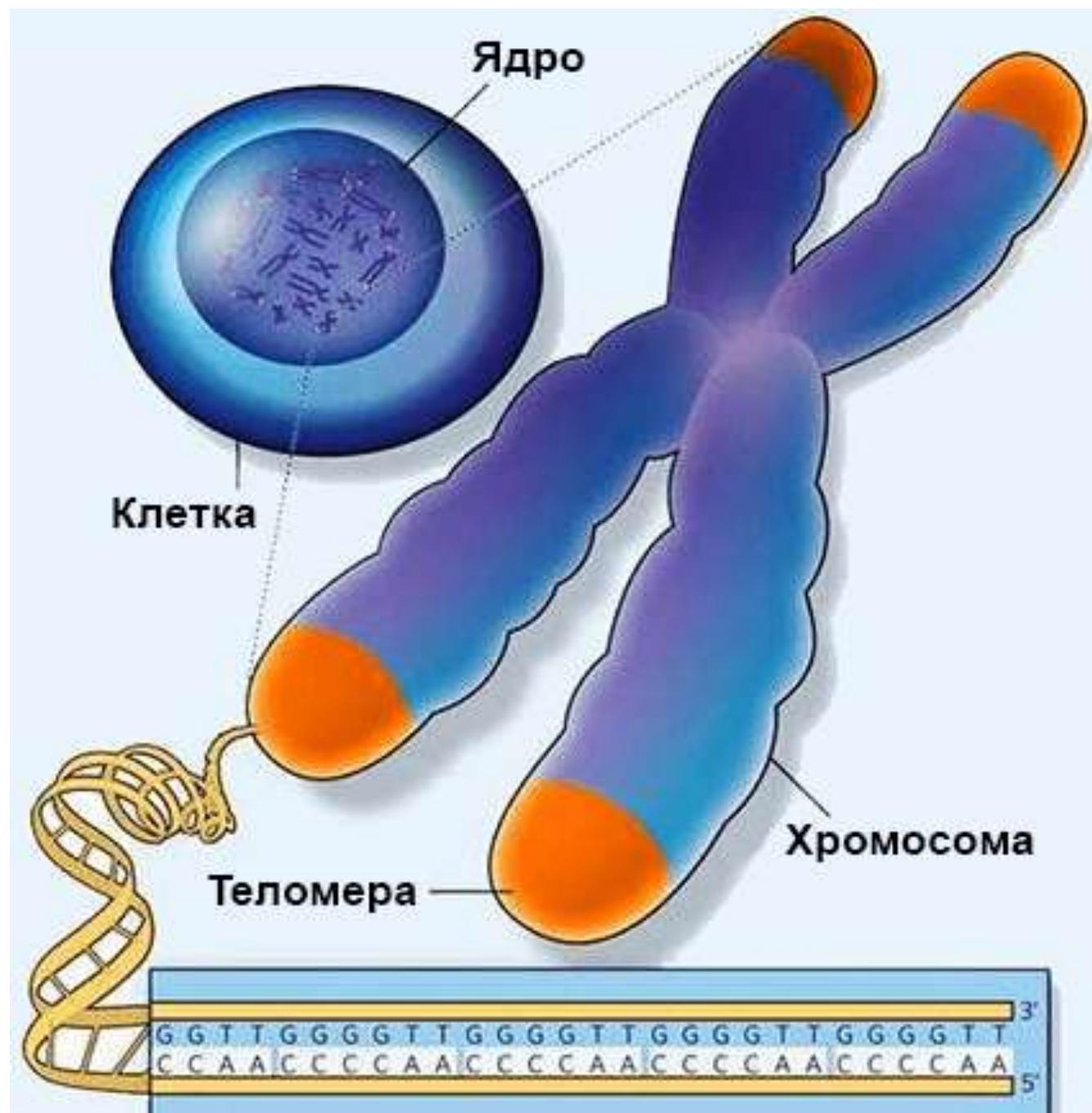
### **Разница в репликации ДНК у про- и эукариот**

<b>Прокариоты</b>	<b>Эукариоты</b>
<b>Пять полимераз (I, II, III, IV, V)</b>	<b>Пять полимераз (<math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math>, <math>\delta</math>, <math>\epsilon</math>)</b>
<b>Функции полимераз: I участвует в репликации, коррекции, репарации и удалении РНК-праймеров II – фермент репарации III – главный фермент репликации IV – V – участвуют в репарации</b>	<b>Функции полимераз: <math>\alpha</math> – синтез праймера <math>\beta</math> – синтез праймера, застраивание бреши <math>\gamma</math> – репликация митохондриальной ДНК <math>\delta</math> – основной фермент репликации <math>\epsilon</math> – фермент, реплицирующий отстающую цепь ДНК</b>
<b>Полимеразы являются также экзонуклеазами</b>	<b>Не все полимеразы обладают экзонуклеазной активностью</b>
<b>Один ориджин репликации</b>	<b>Несколько ориджинов репликации</b>
<b>Фрагменты Оказаки длиной 1000- 2000 нуклеотидов</b>	<b>Фрагменты Оказаки длиной 150- 200 нуклеотидов</b>
<b>ДНК не связана с белками</b>	<b>ДНК в комплексе с гистонами</b>

# Работа теломеразы(1)



- Перед началом цикла репликации ДНК теломераза добавляет несколько копий теломерных повторов на 3'-конец ДНК. После этого репликация идет в обычном порядке. На отстающей цепи синтезируются РНК-праймеры, при этом наиболее важно то, что **концевой праймер синтезируется на «досинтезированном» теломерном повторе**. После завершения репликации остается незаполненным только участок РНК-праймера, синтезированного на «досинтезированной» теломерной ДНК. В результате кодирующие части дочерних цепей ДНК получают той же длины, что и родительских.





*Благодарю за внимание!*