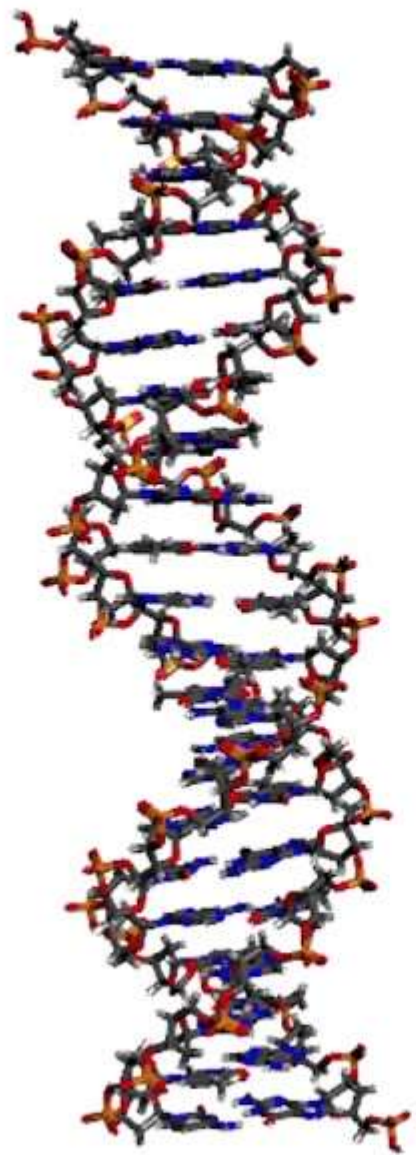


# **Нуклеиновые кислоты**

## **Репликация ДНК**

ДНК



DNA



RNA

РНК

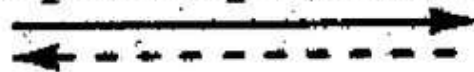
# Центральная догма биологии

Репликация



ДНК

Транскрипция



Обратная  
транскрипция

Репликация



РНК

Трансляция



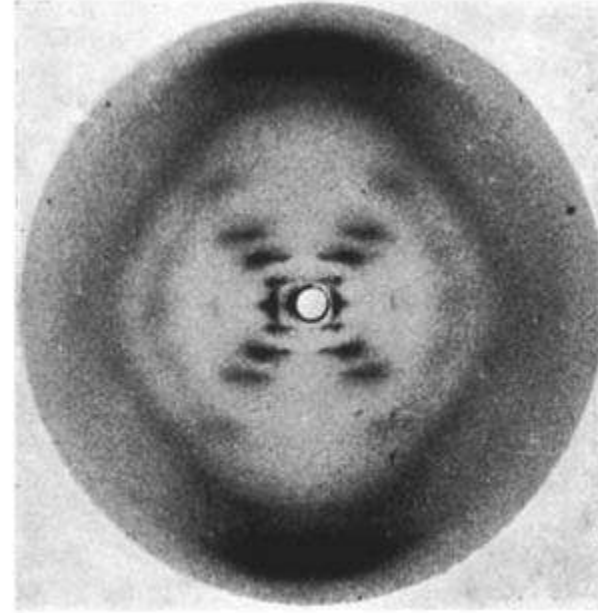
Белок

# 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



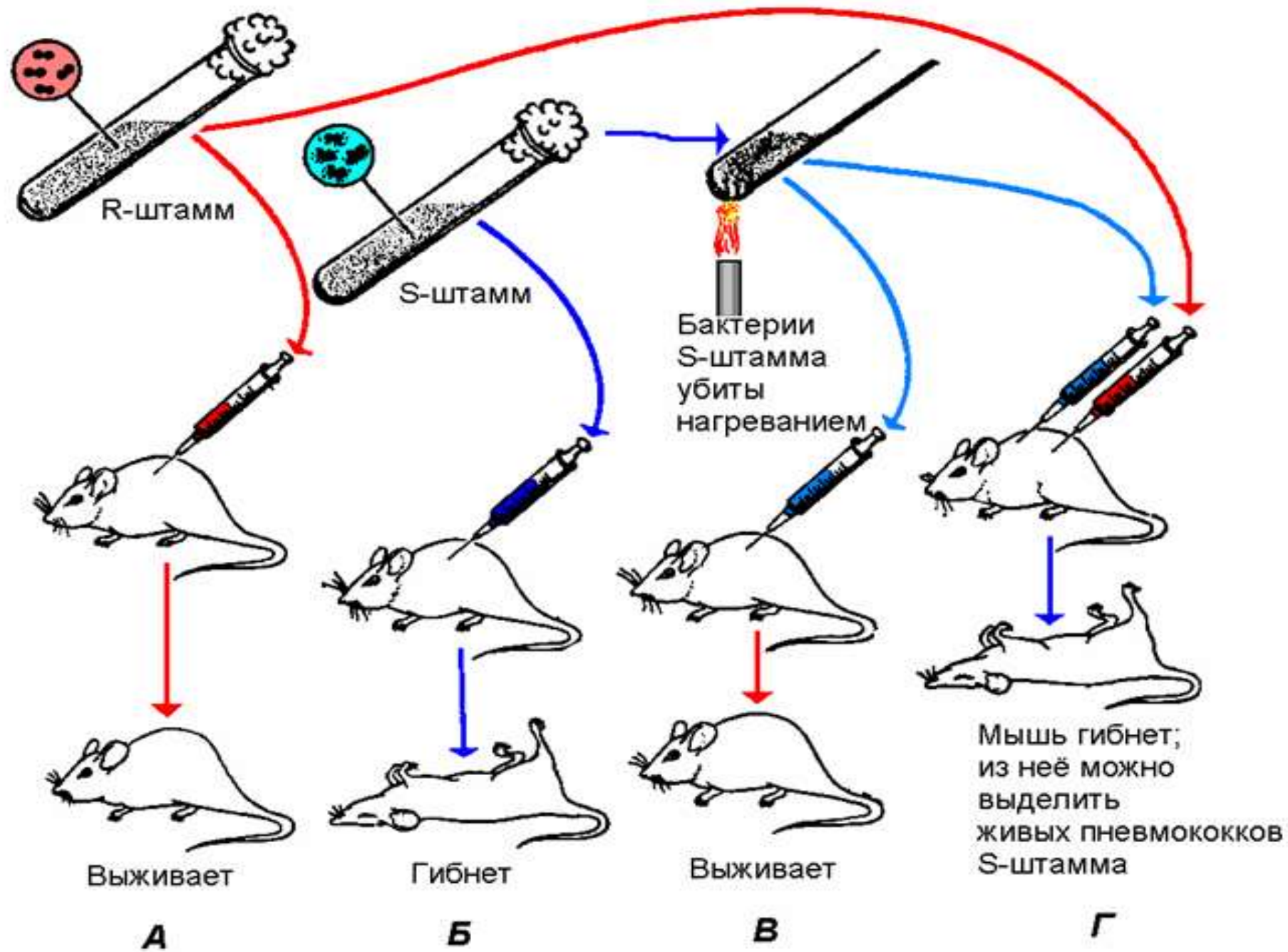
В **доказательстве** генетической роли ДНК ключевую роль сыграли две группы экспериментов:

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

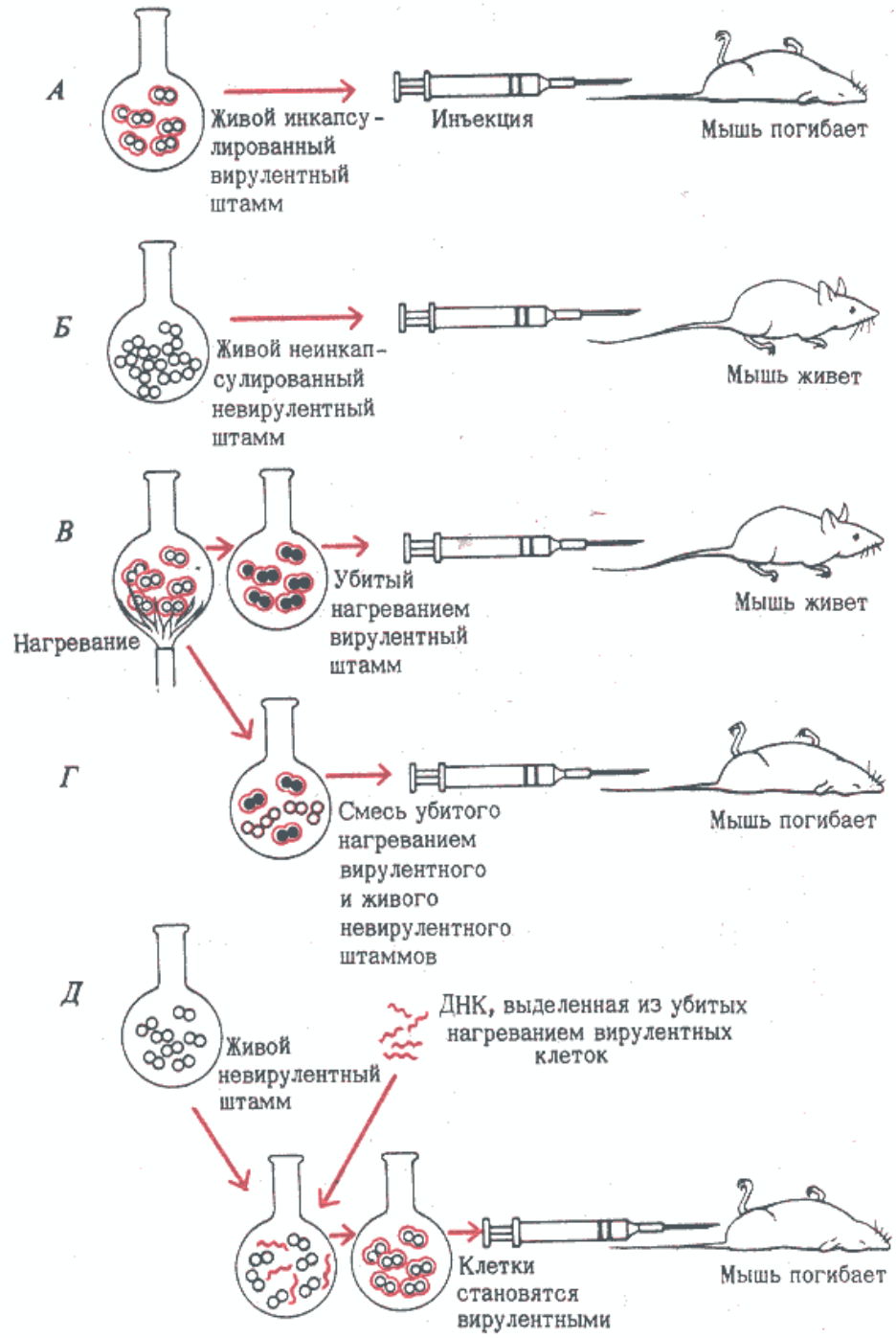
**Griffith** (1928) трансформация бактерий

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

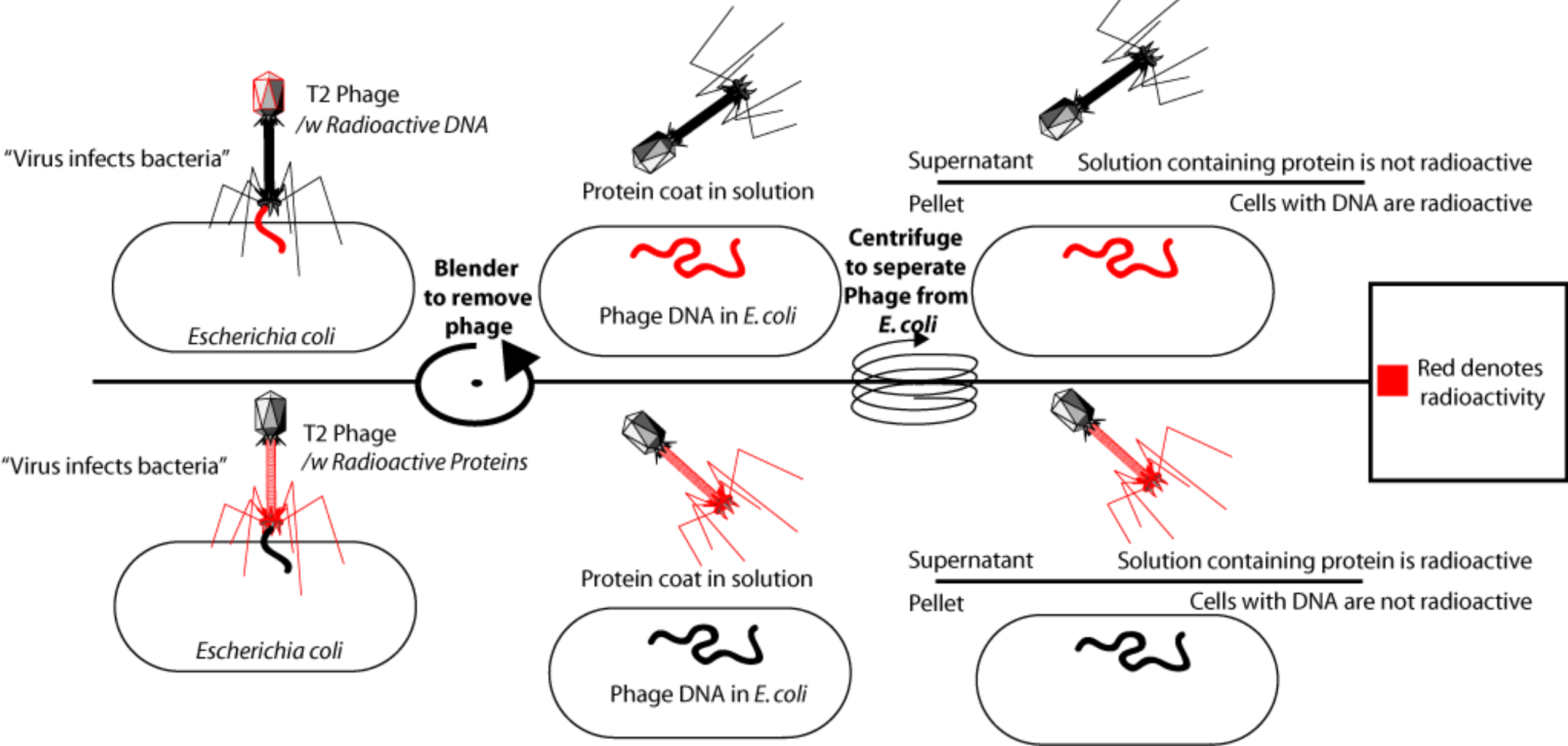
2. Демонстрация того, что при фаговой инфекции в клетку вводится ДНК (**Hershey and Chase**, 1952)







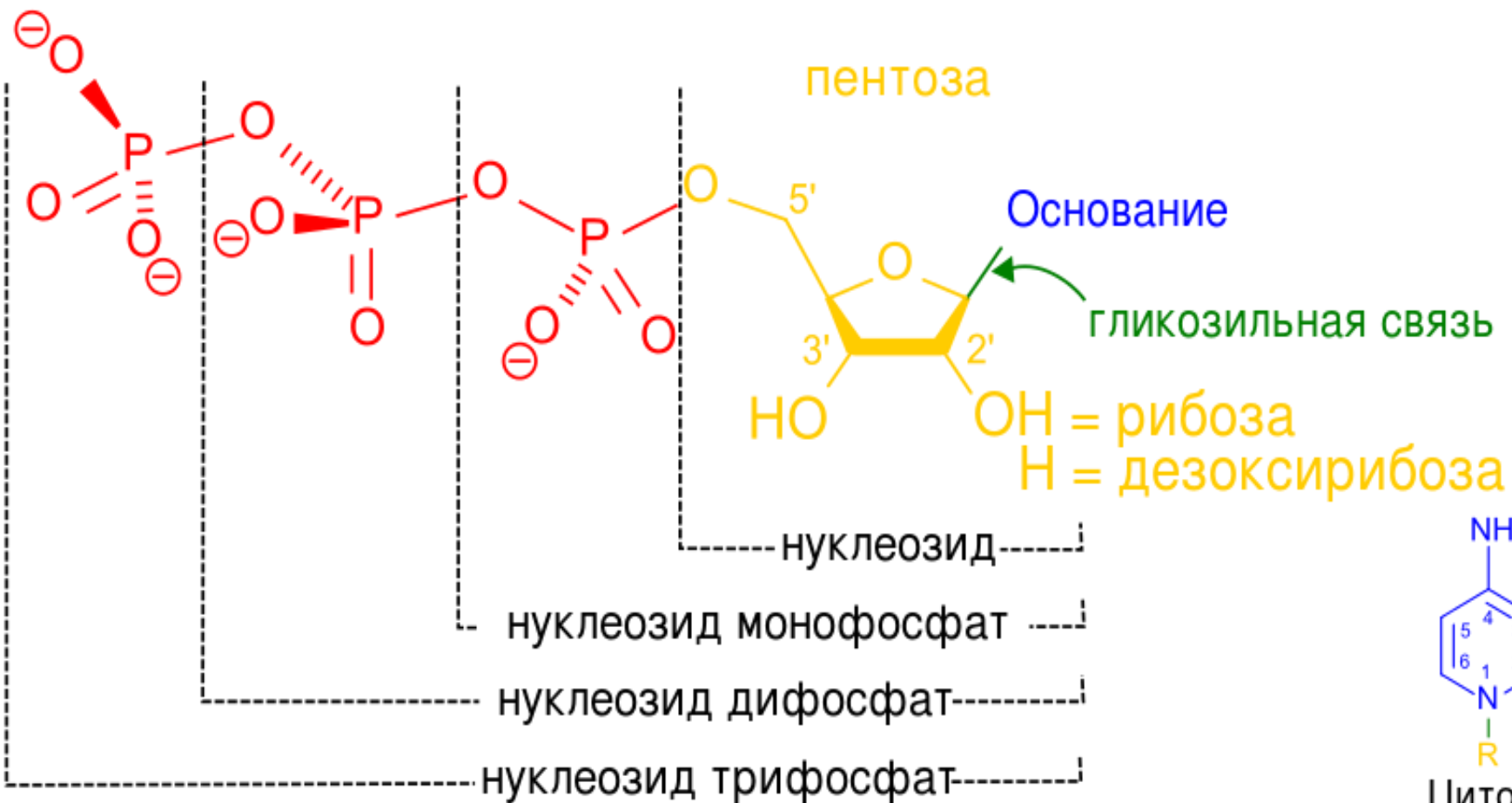
# Hershey and Chase, 1952



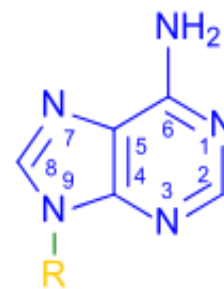
# Пространственная структура нуклеиновых кислот

- **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

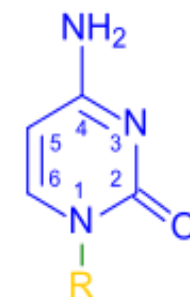


Аденин

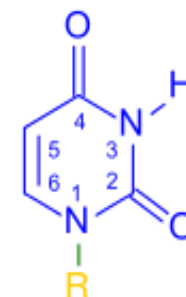


Гуанин

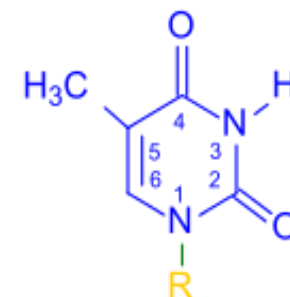
## Пиримидины



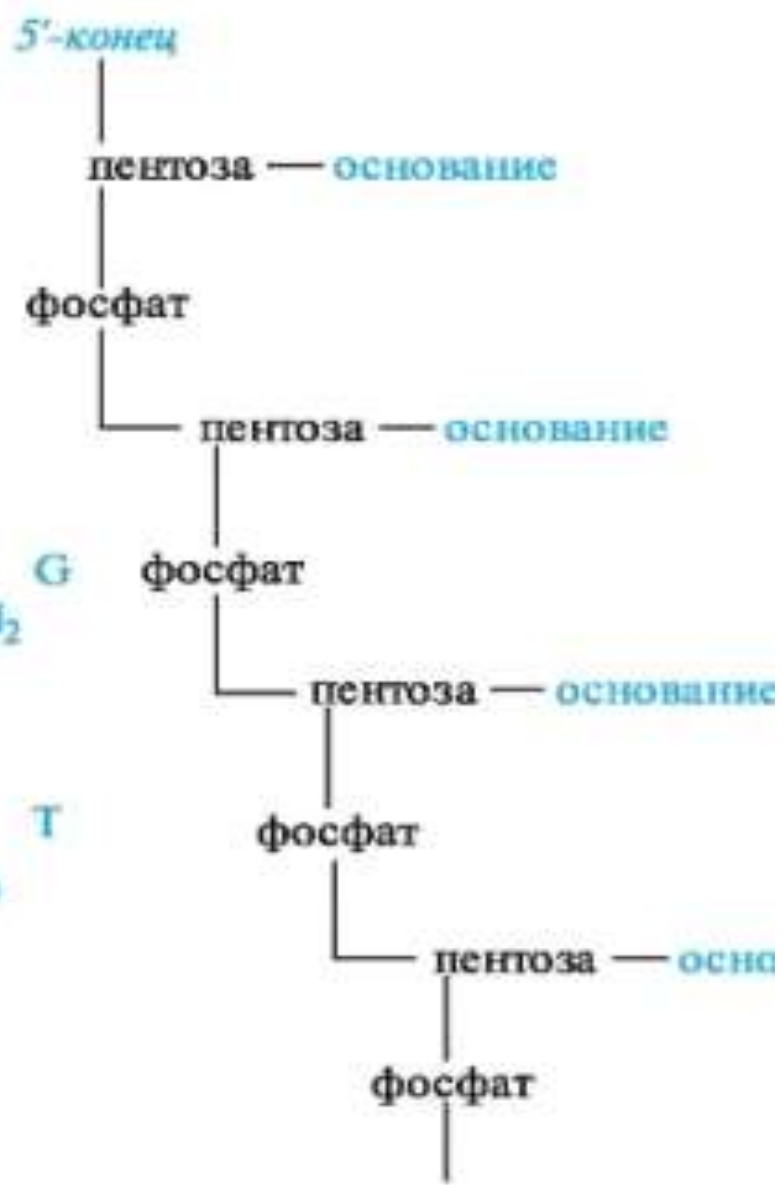
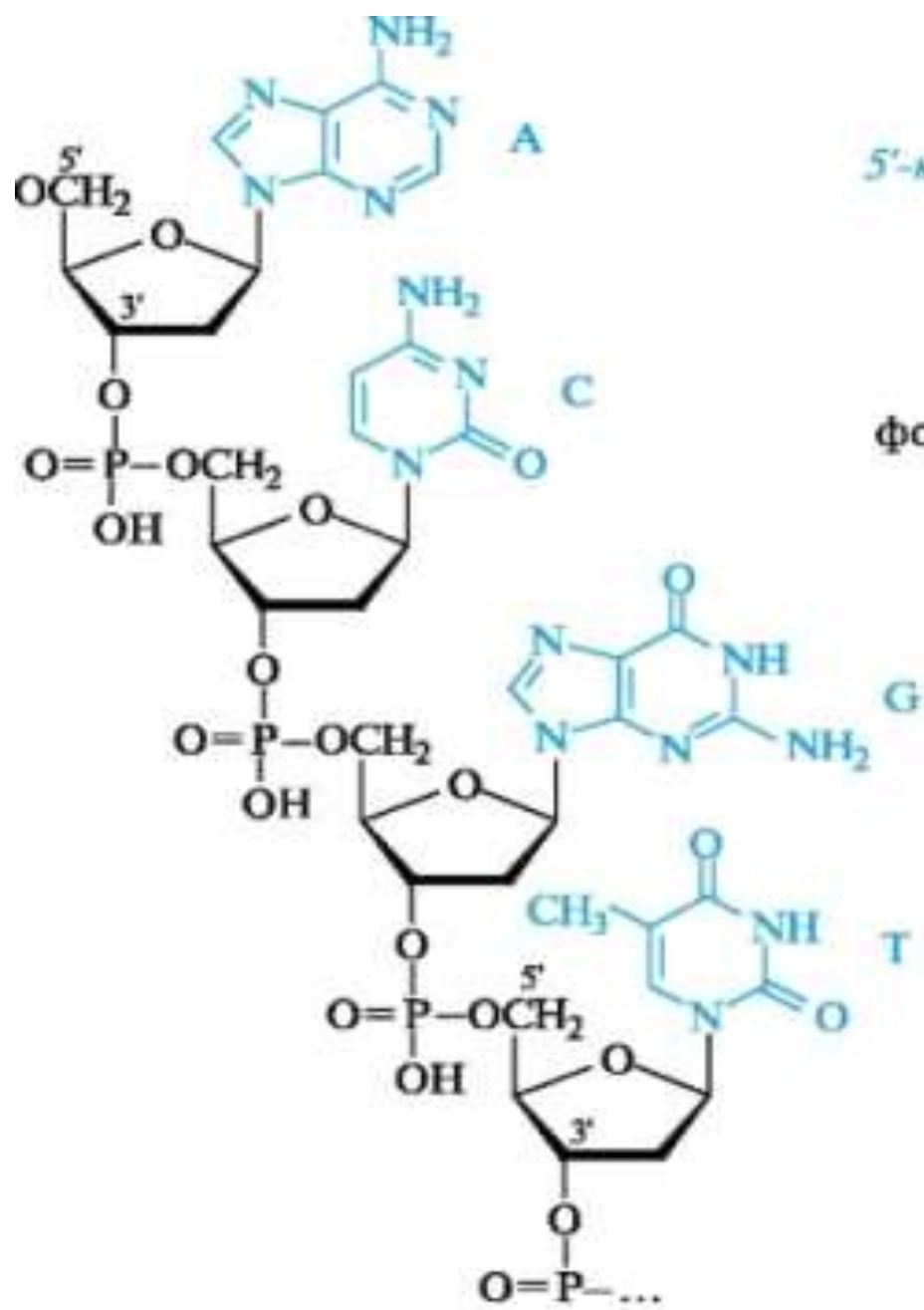
Цитозин

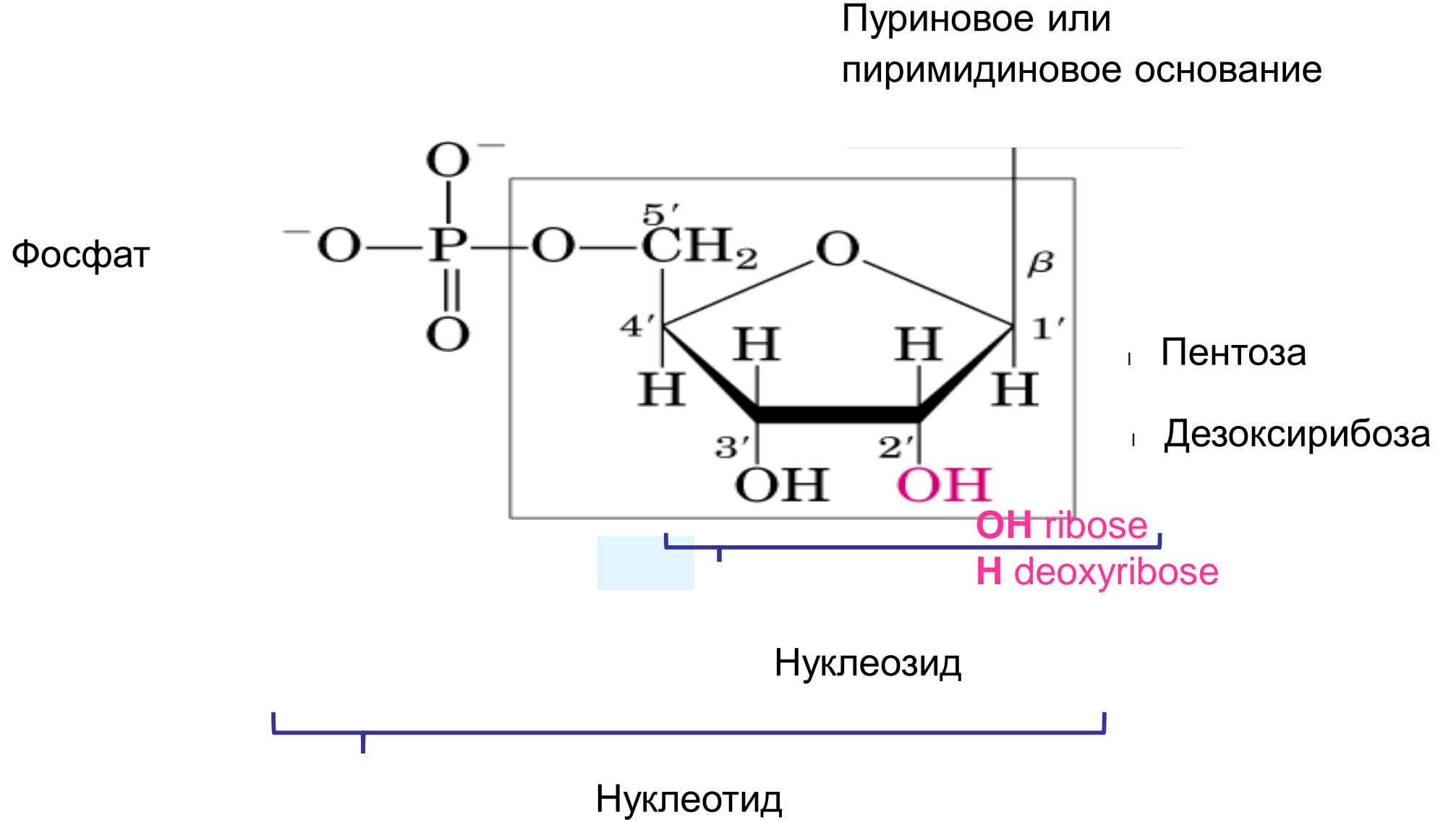


Урацил

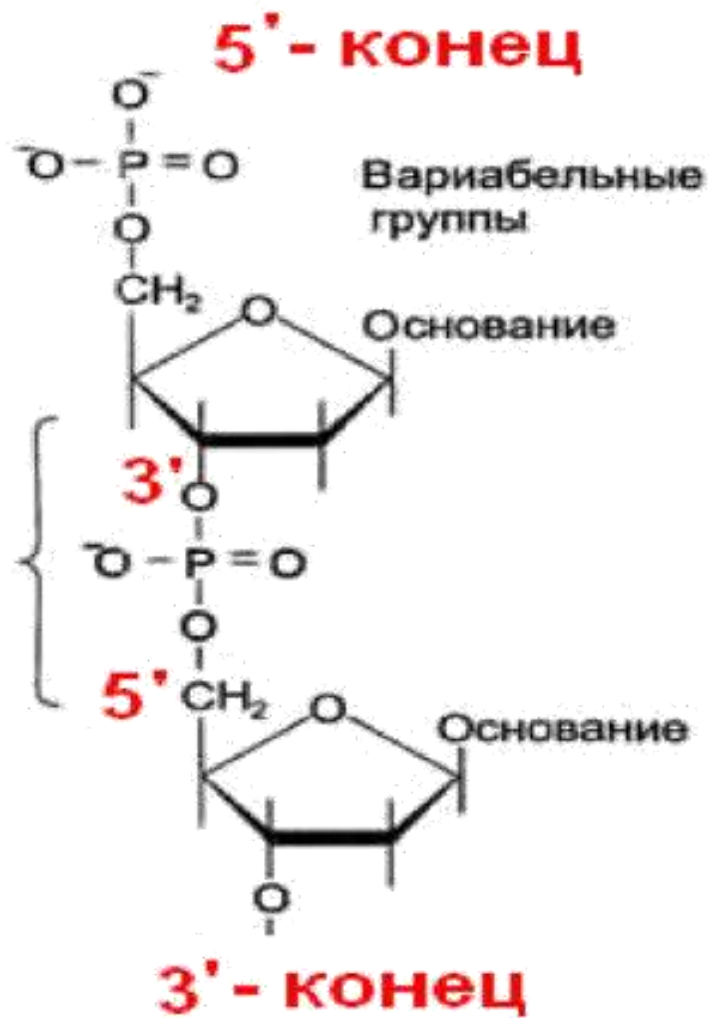


Тимин

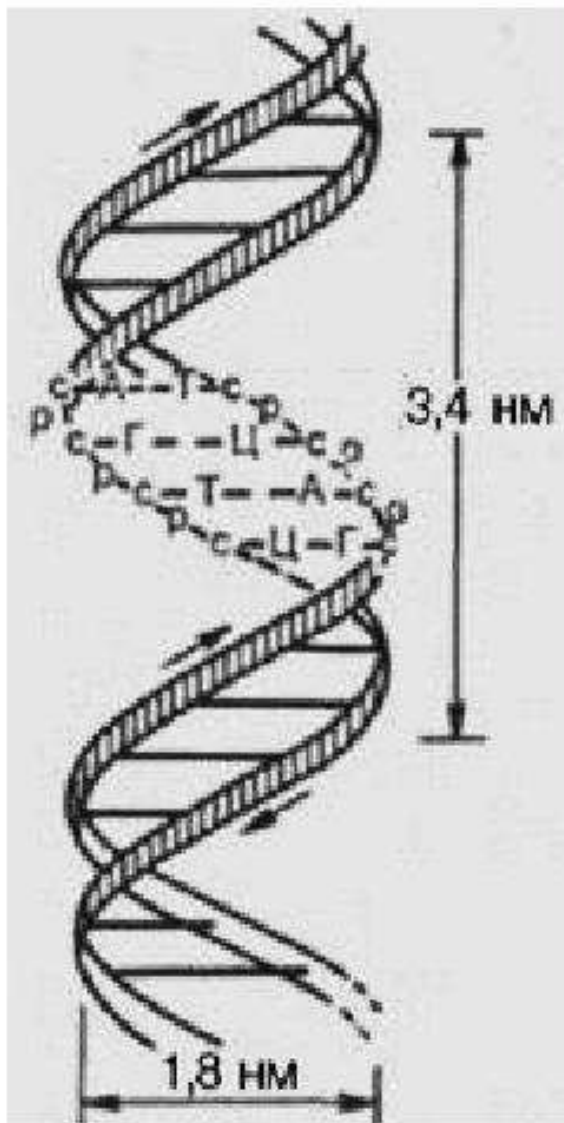




**5', 3' - фосфодиэфирная  
связь**



## 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  $\approx$  3,4 нм.
- ❑ Азотистые основания (гидрофобная часть) обращены внутрь спирали, а пентозофосфатные остатки (гидрофильная часть)  $\approx$  наружу.



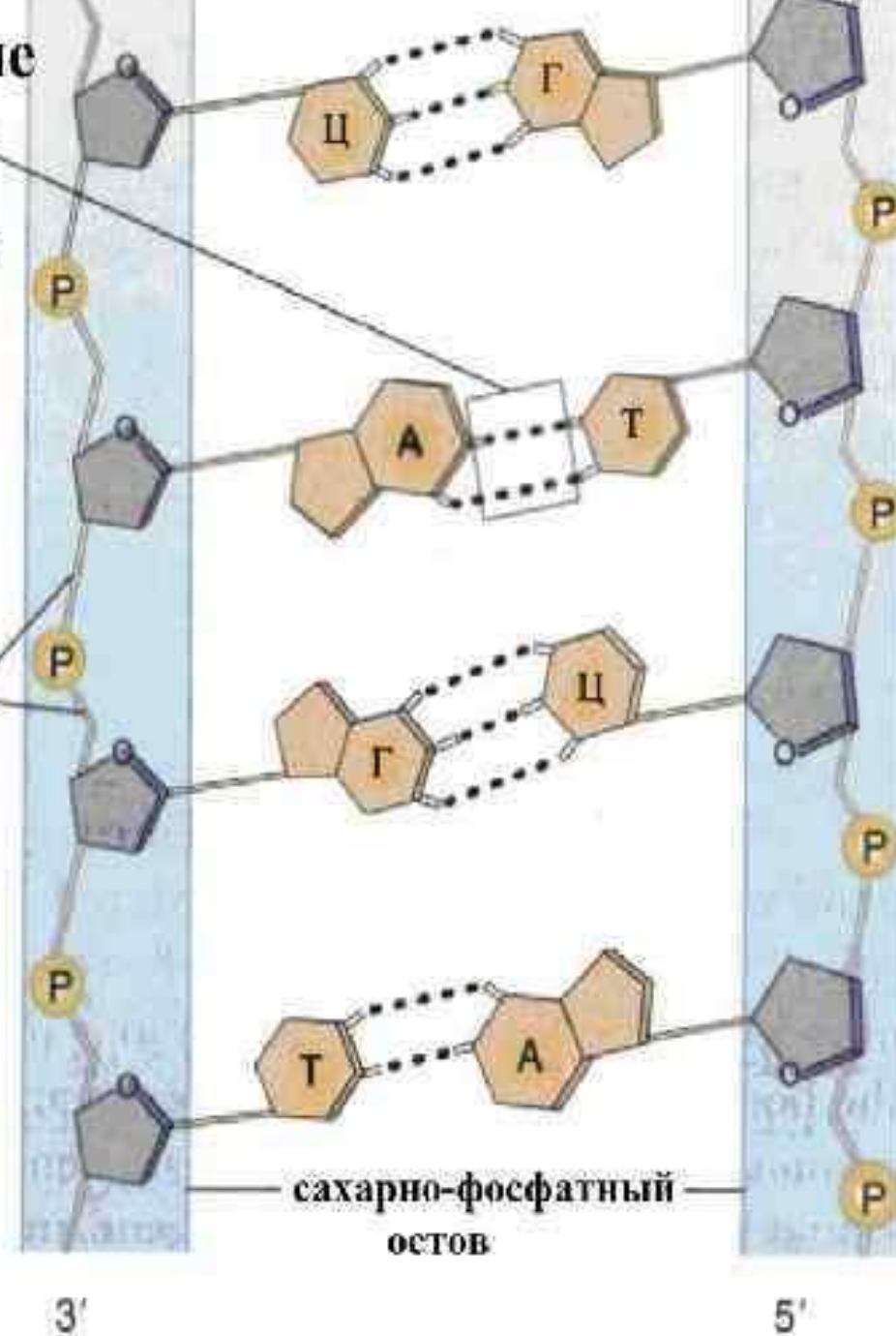
# Типы связей в молекуле ДНК

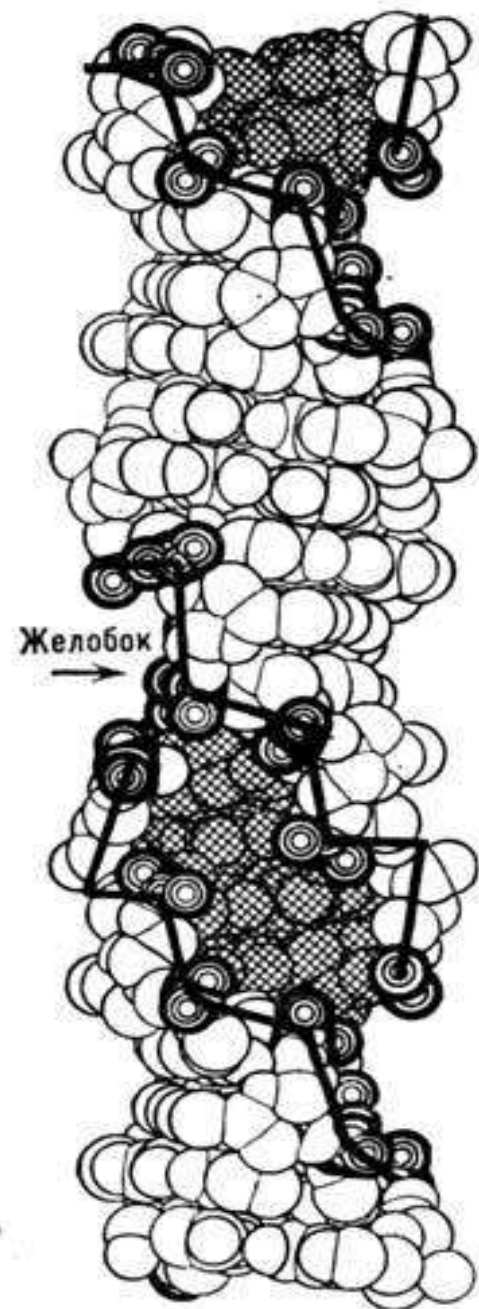
## Водородные

связи между  
азотистыми  
основаниями

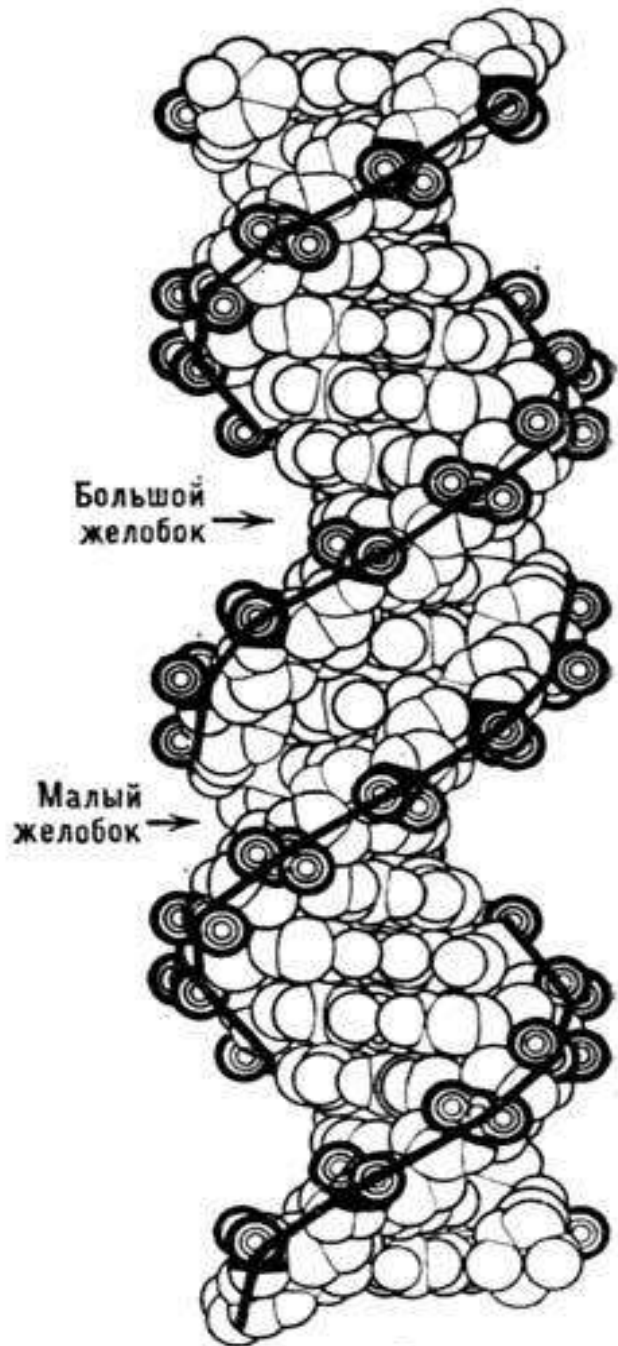
## Фосфоди- эфирные

связи между  
нуклеотидами

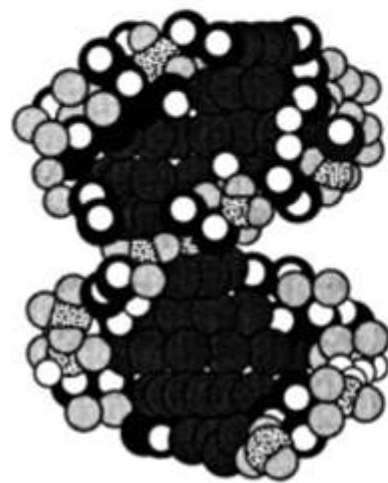
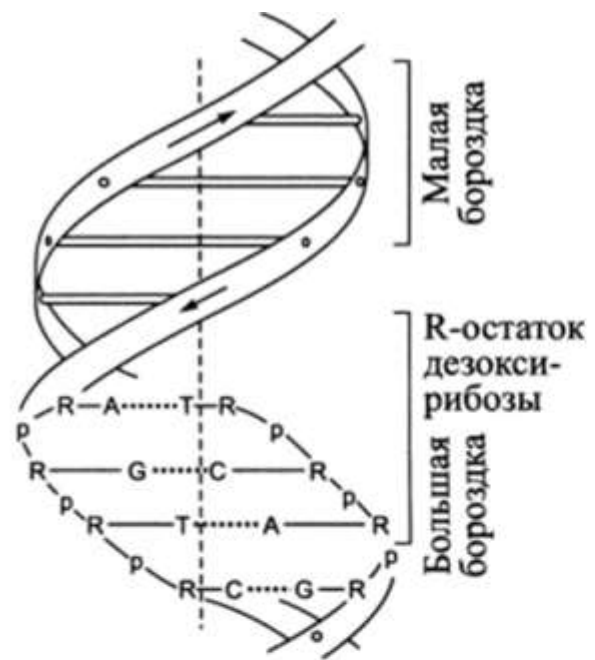




Z

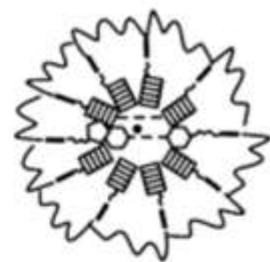


B

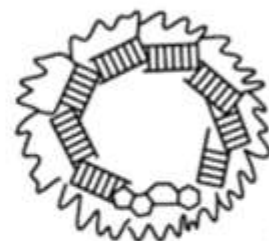


- АТОМЫ
- — C
  - — P
  - — O
  - — H
- пары оснований

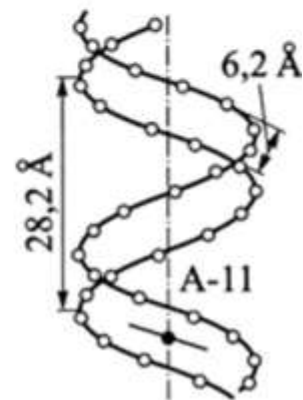
a



b

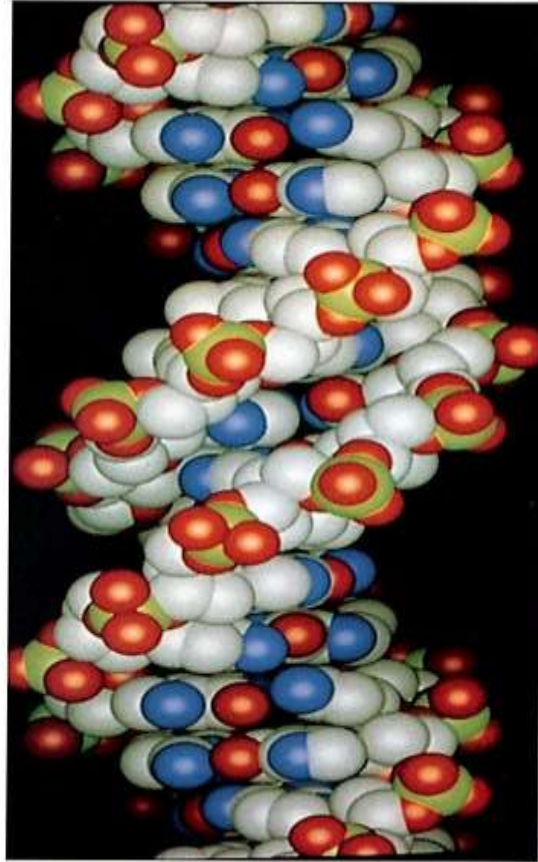
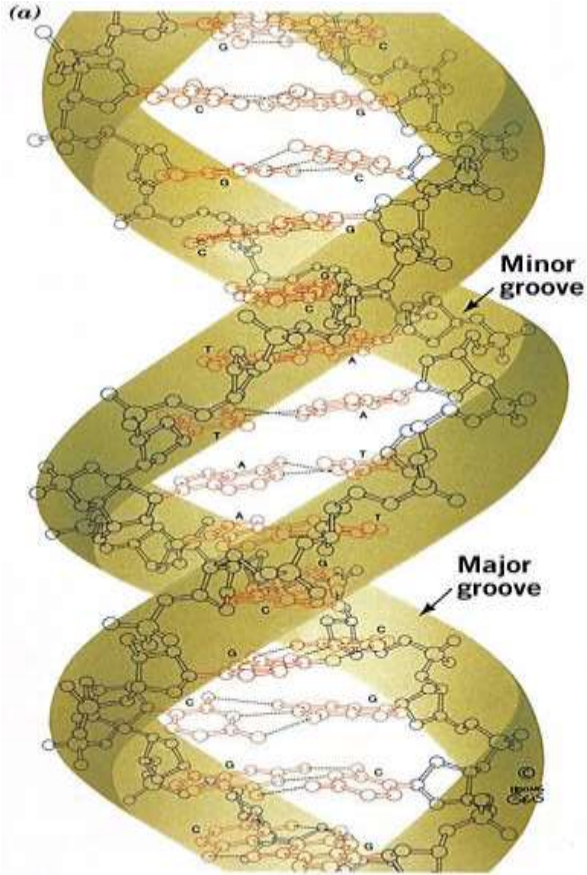


b

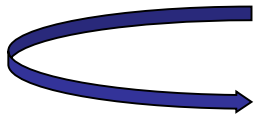
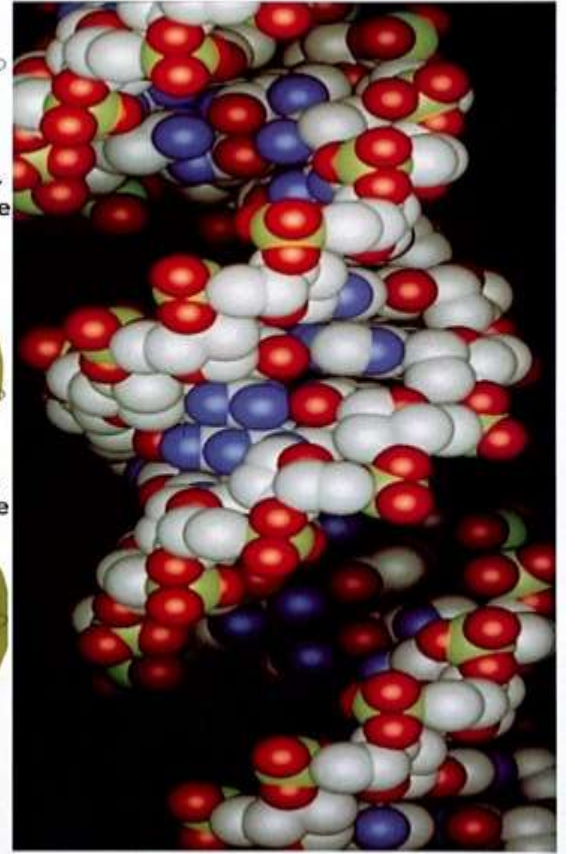
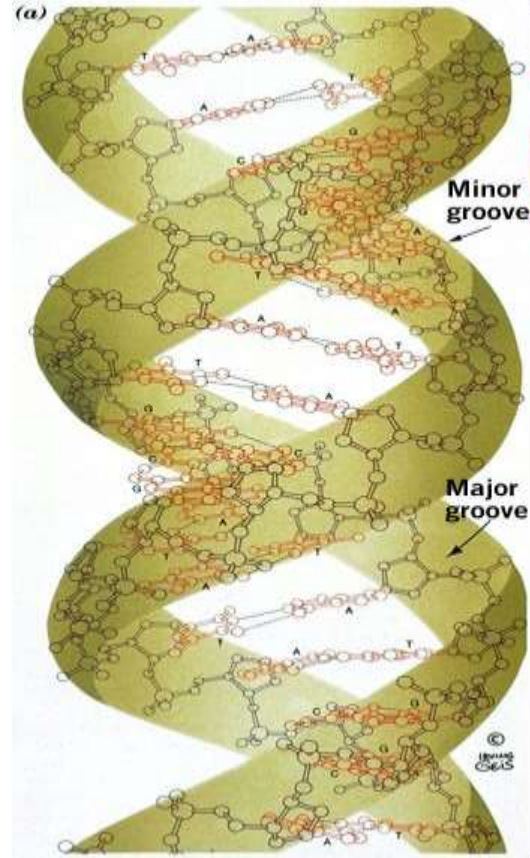


г

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



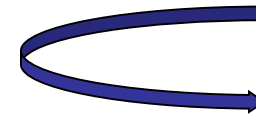
- | А форма шаг 24,6 Å
- | 10,7 п.н. на виток



правозакрученная спираль

- | отклонение плоскости оснований
- | от горизонтальной

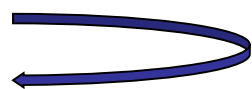
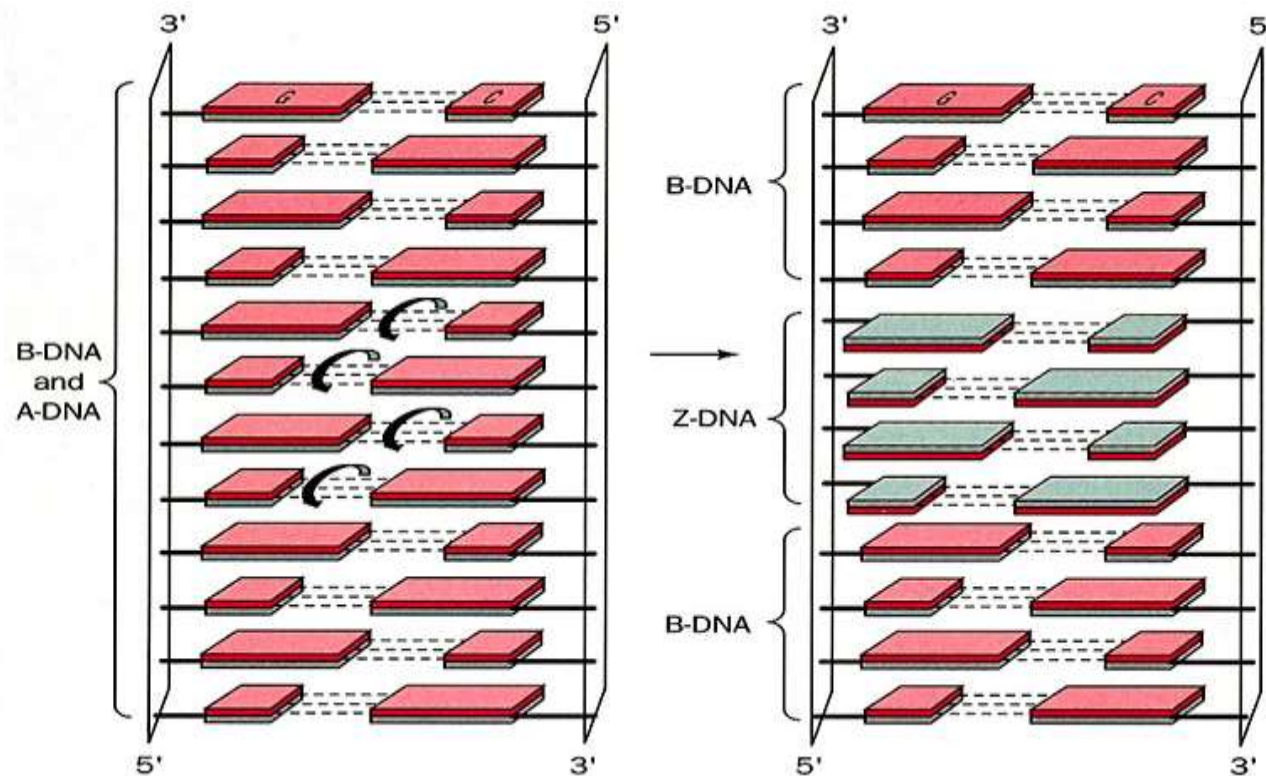
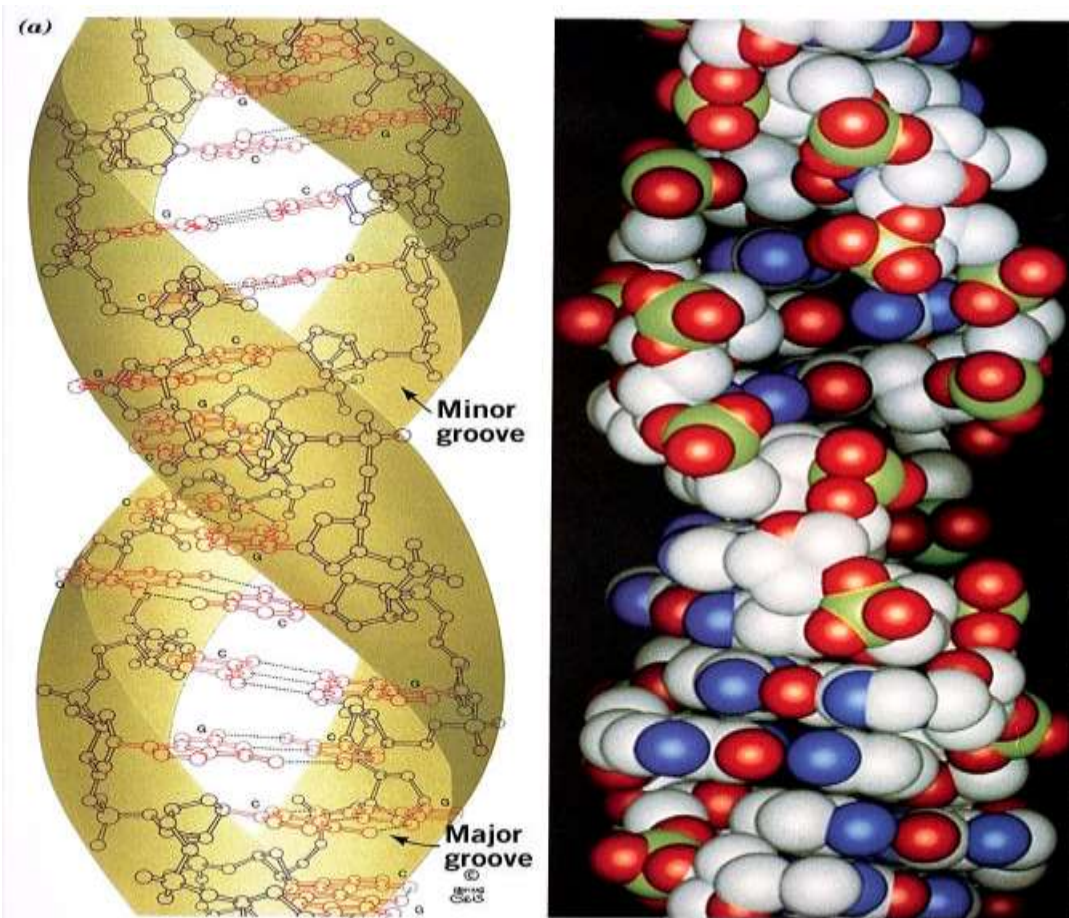
| -1.2°



| +19° !

правозакрученная спираль

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



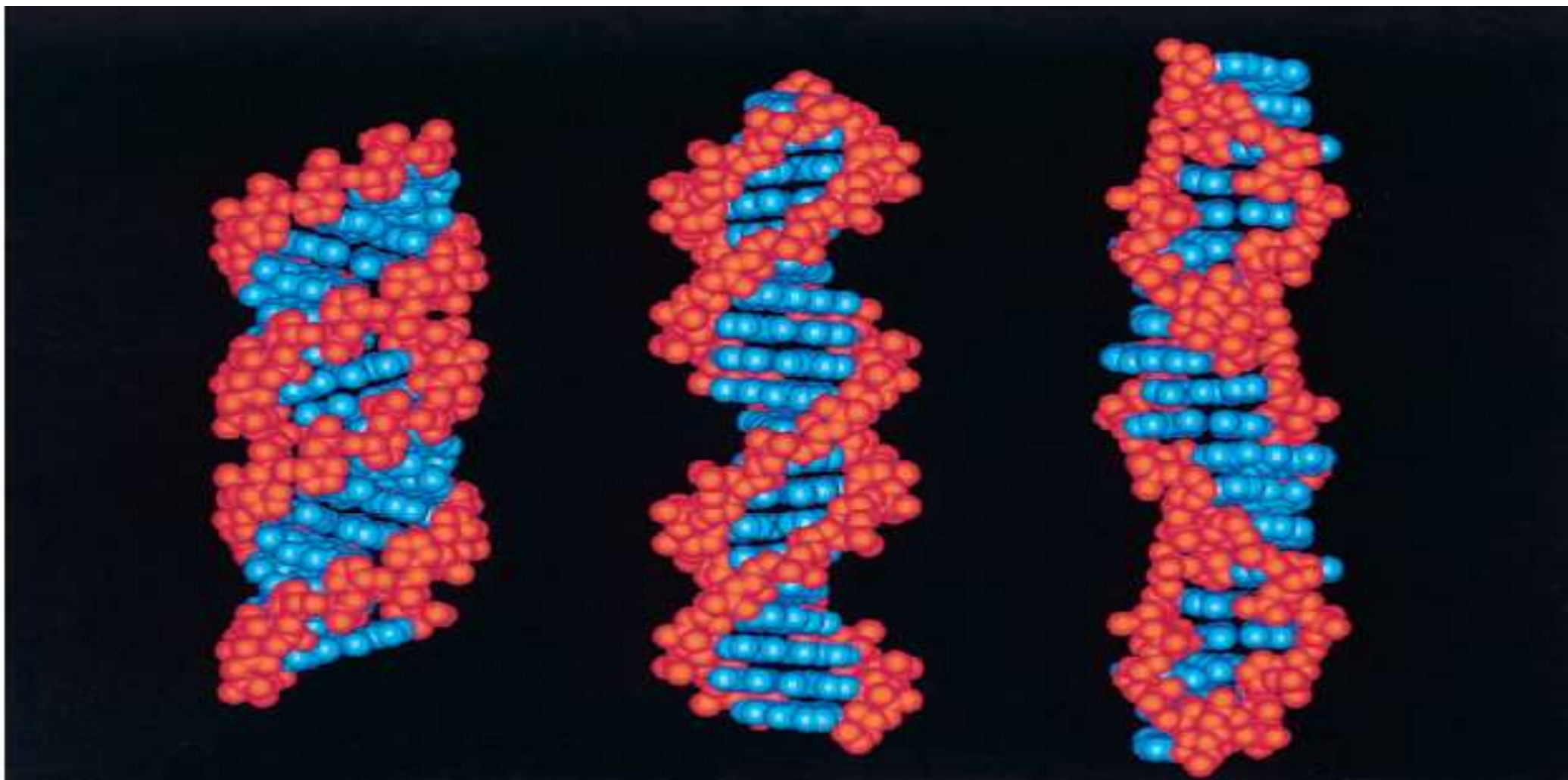
левозакрученная спираль

В Z ДНК основания перевернуты

А форма

В форма

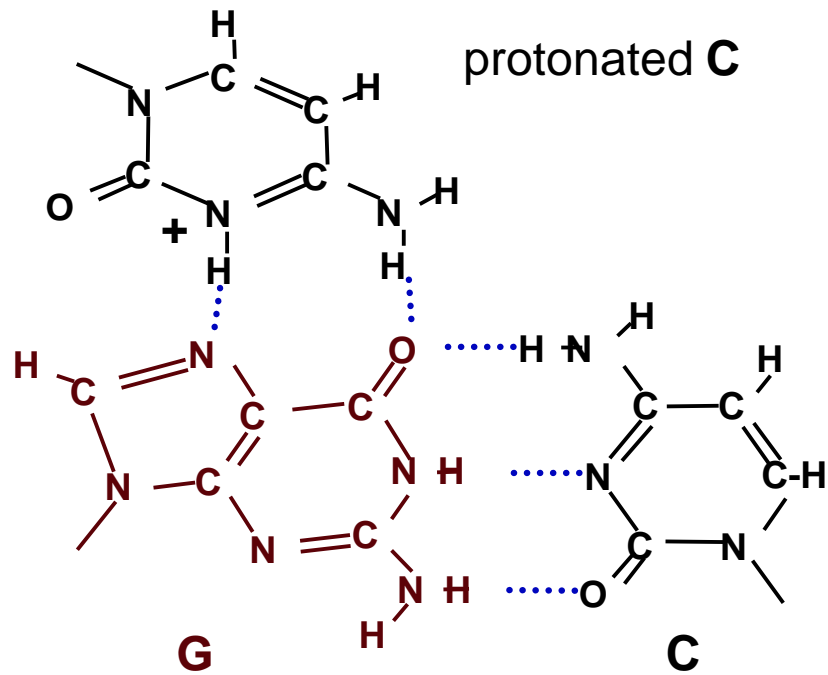
З форма



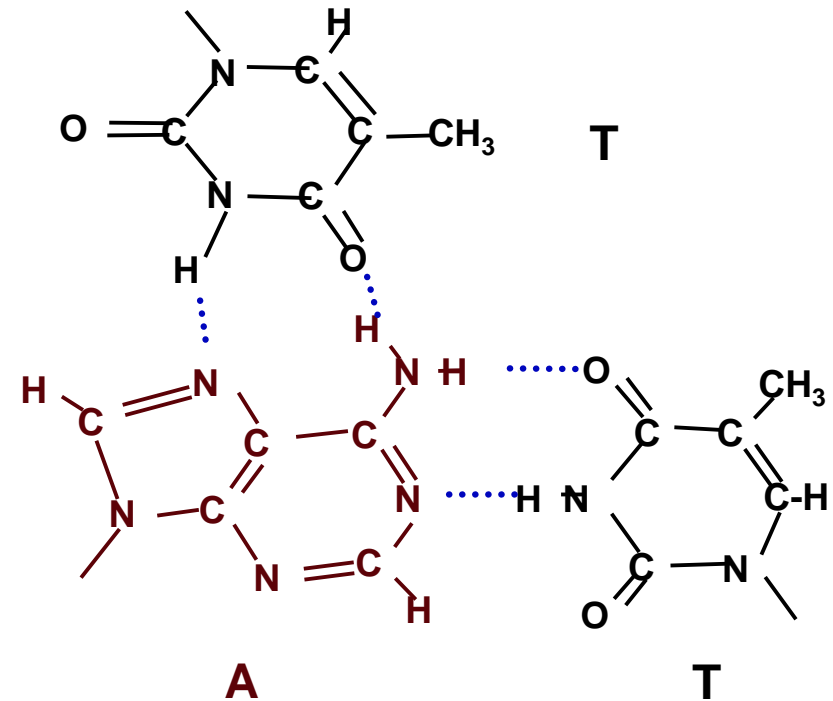
# Правила Чаргаффа

- 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



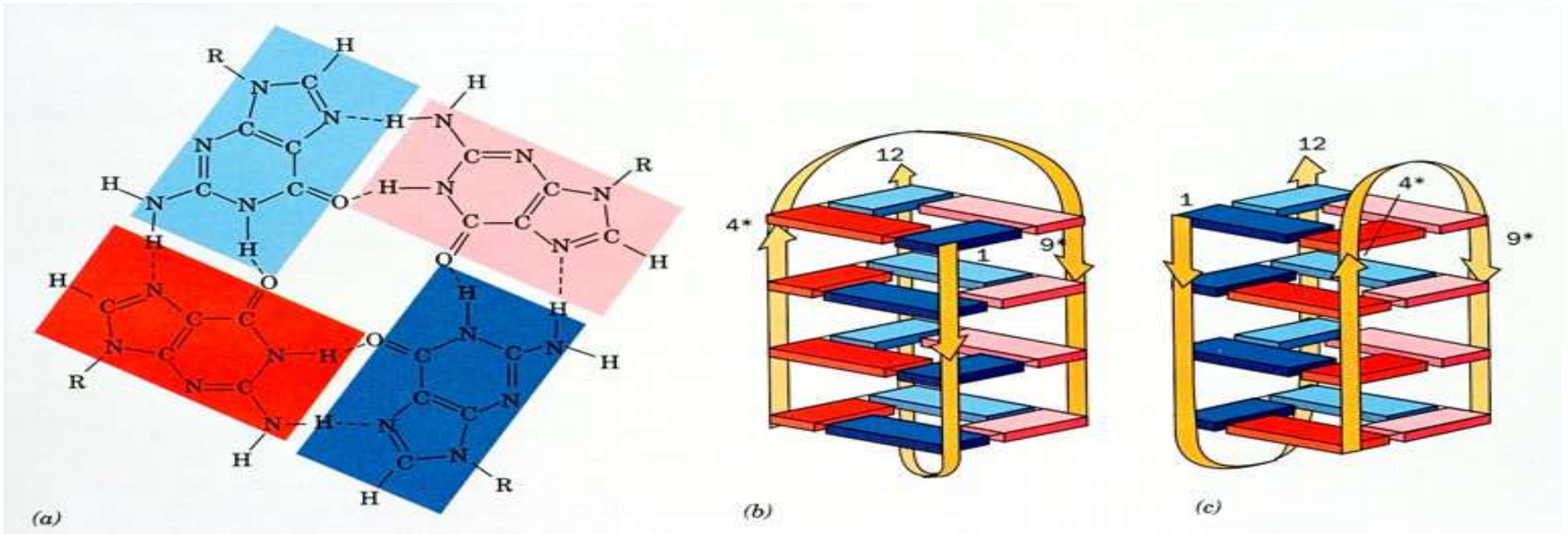
A protonated cytosine can form two H-bonds to the guanosine of a G-C pair.



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

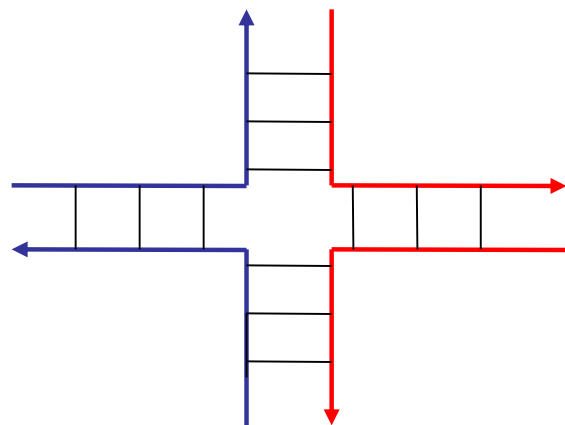
# Quadruplex DNA

часто присутствует в теломерах, в том числе у человека

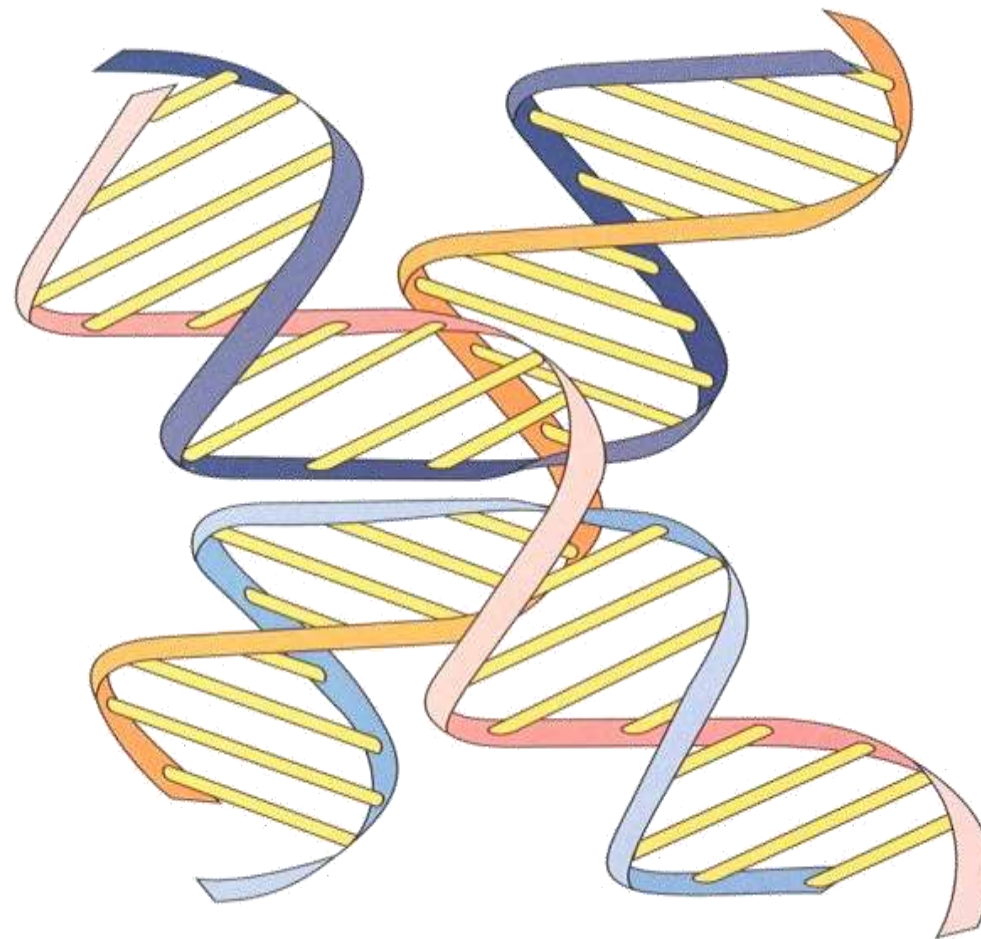




# Крестообразные структуры в ДНК



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.

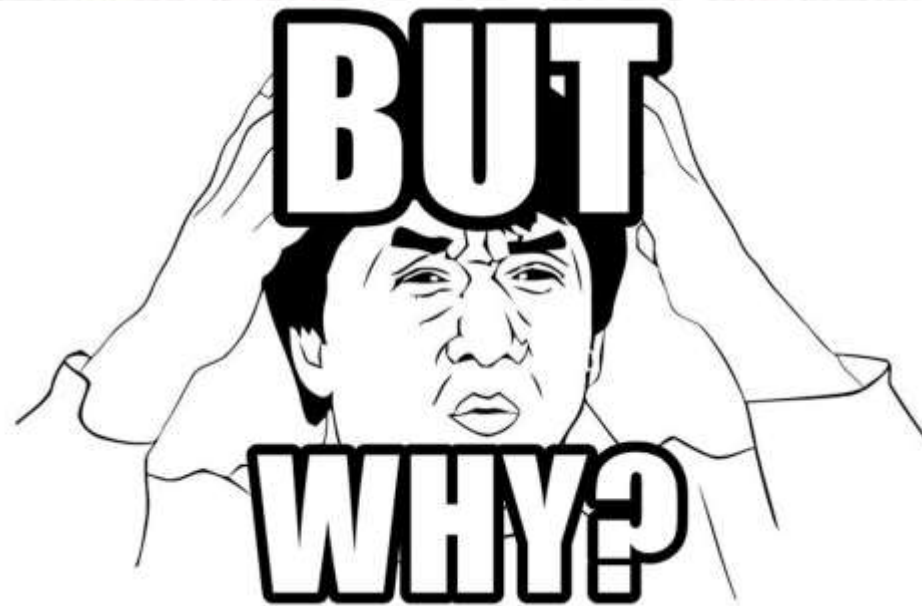
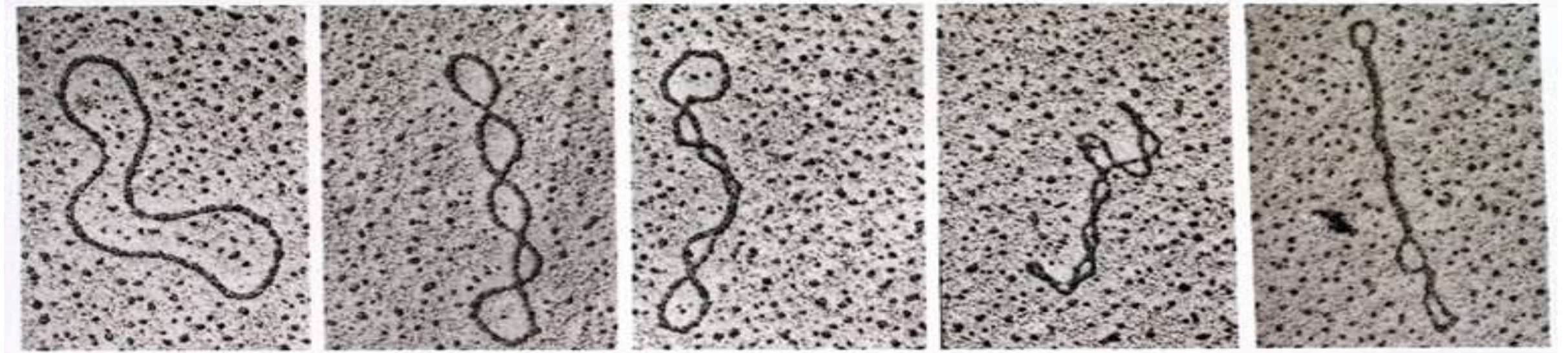
## Неопределенное следствие:

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

## Плюсы "избыточной" ДНК:

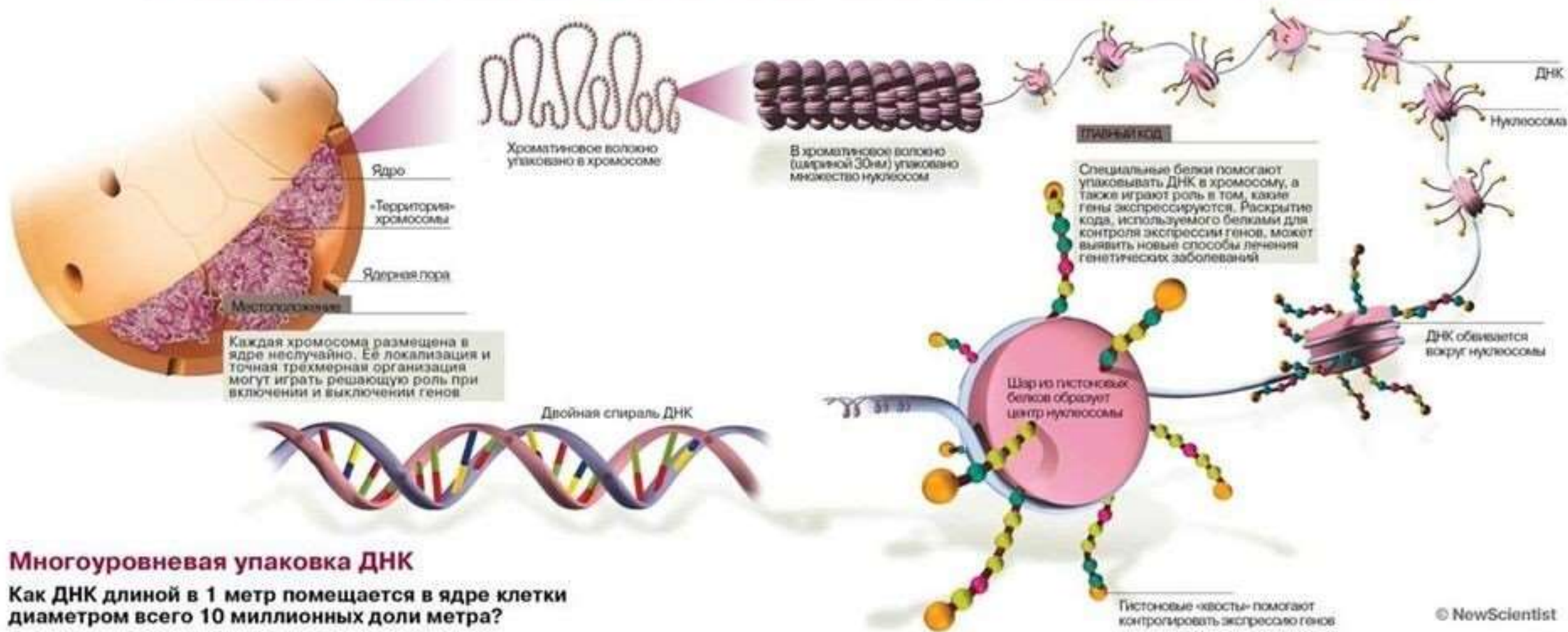
- возникает возможность создания сложного регуляторного аппарата, позволяющего поднять организм на более высокий эволюционный уровень.

# Суперспирализация ДНК

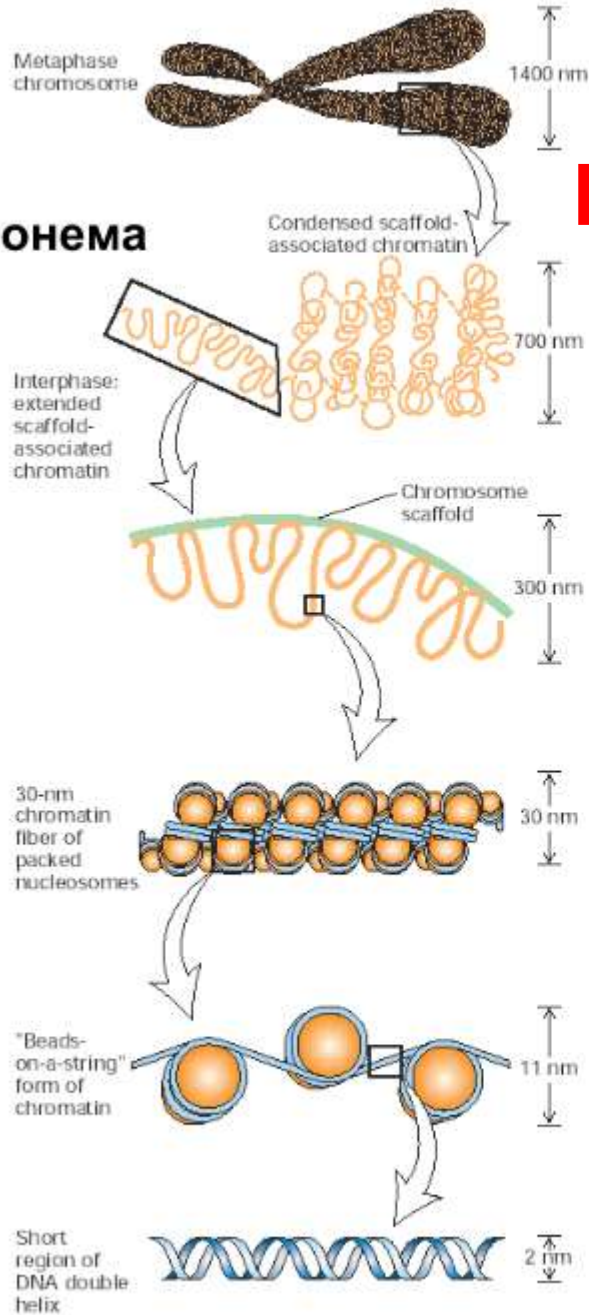


Длина ДНК одной клетки человека может составлять 2м, при размере самой клетки примерно в 30 мкм

# ДНК: ИДЕАЛЬНЫЙ ЖЕСТКИЙ ДИСК



**хромонема**

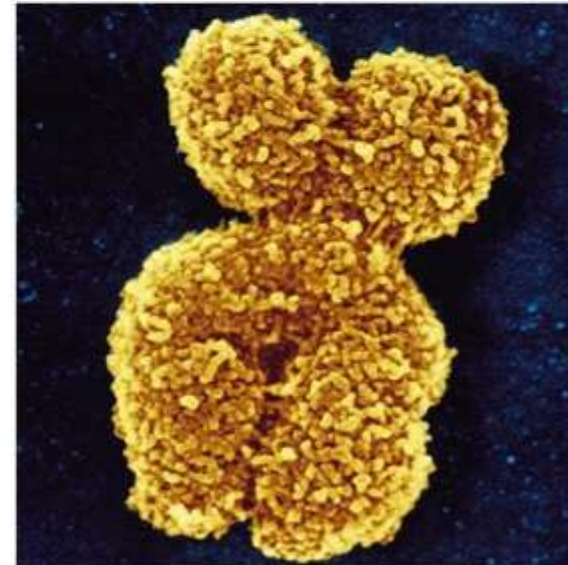


**Компактизация!!!**

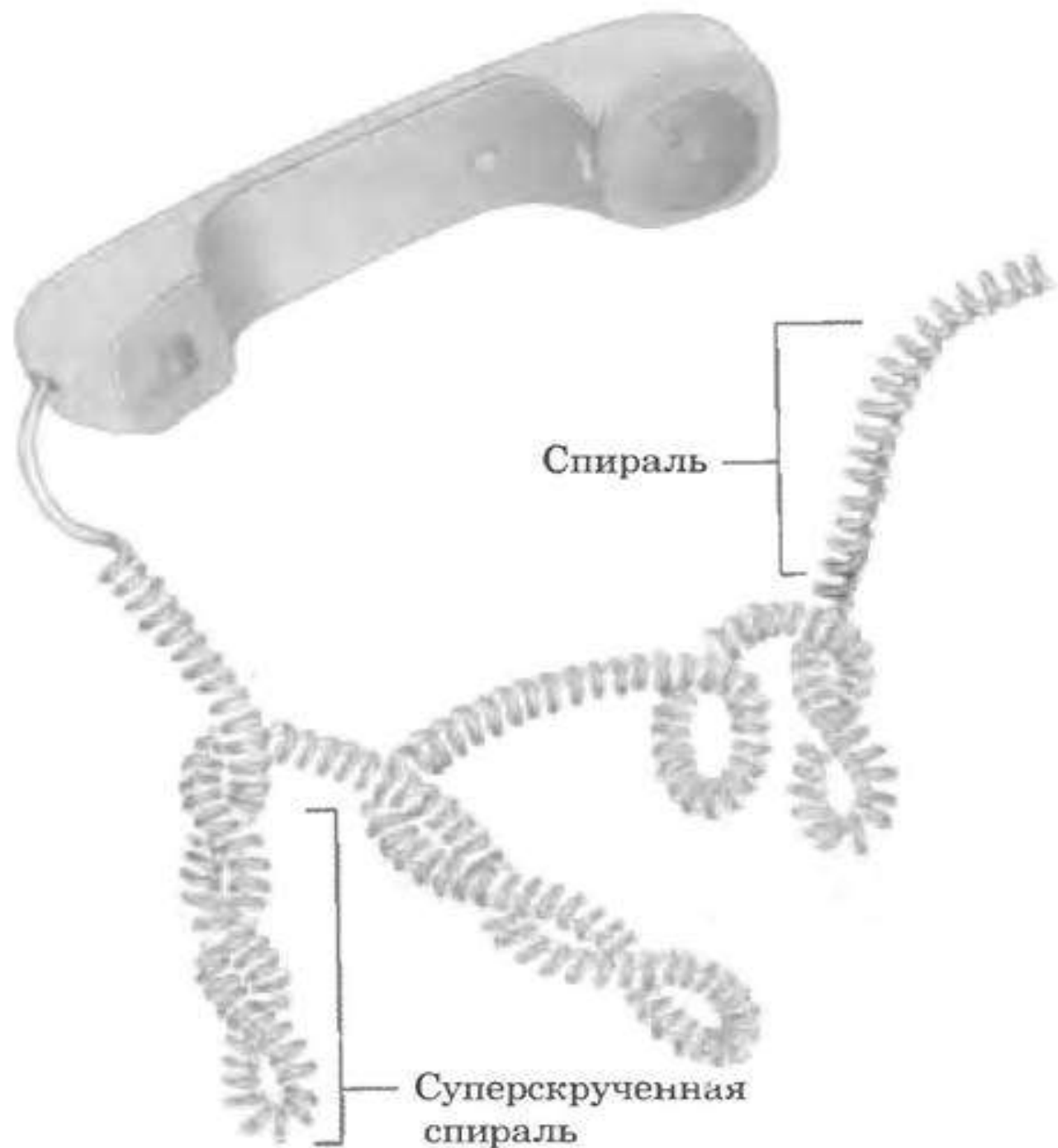


**хромомерный уровень**

**нуклеомер**



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



Спираль

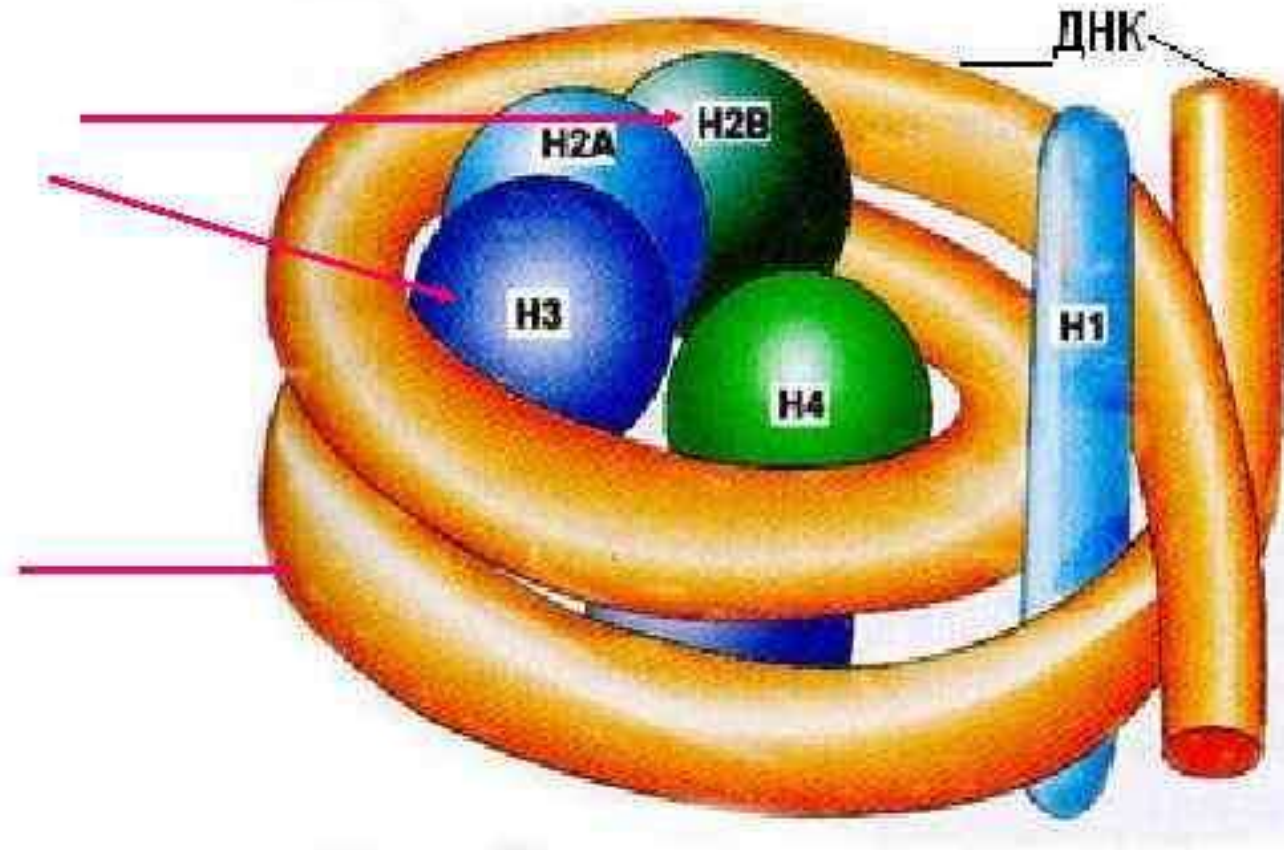
Суперскрученная  
спираль



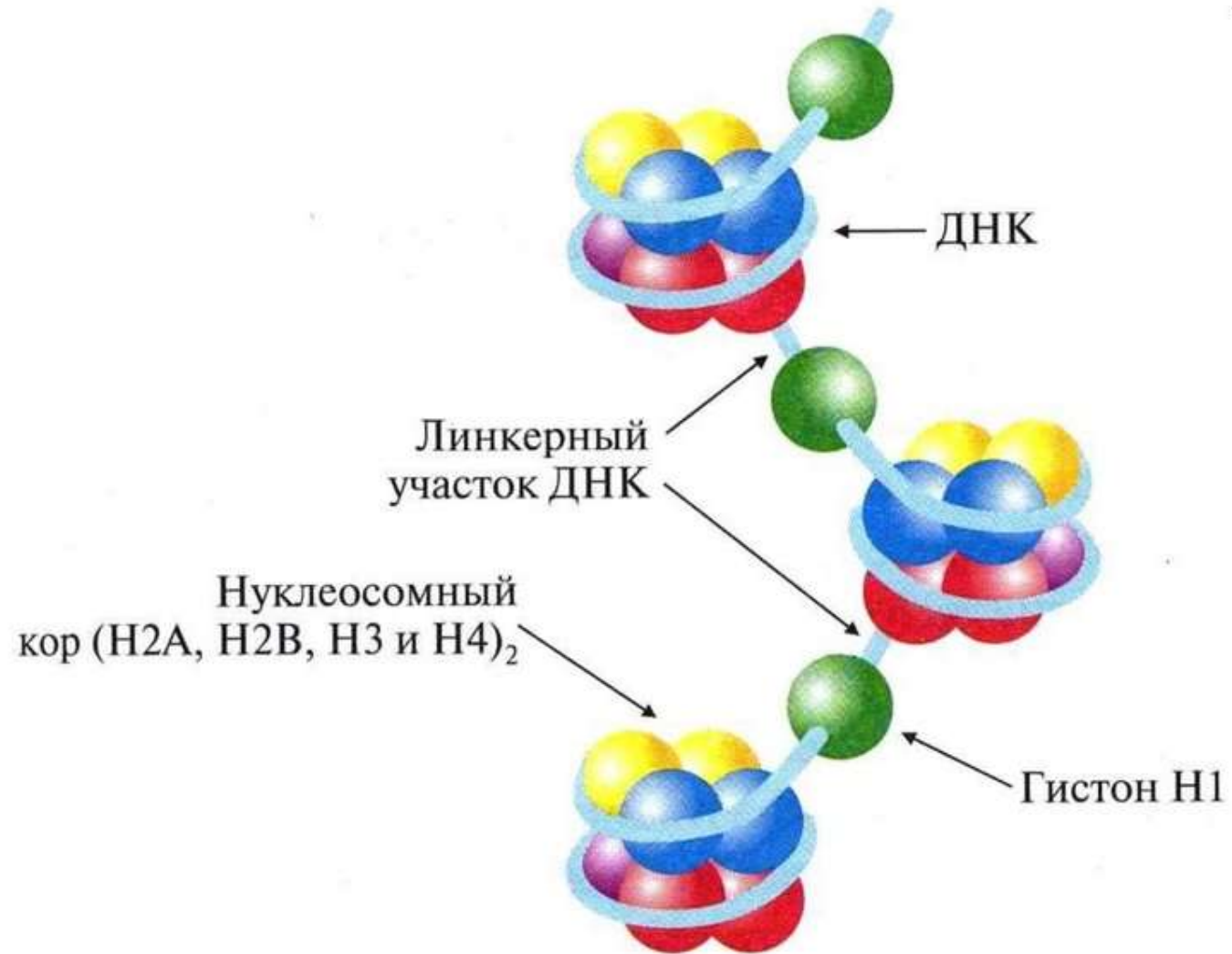
# Нуклеосома

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

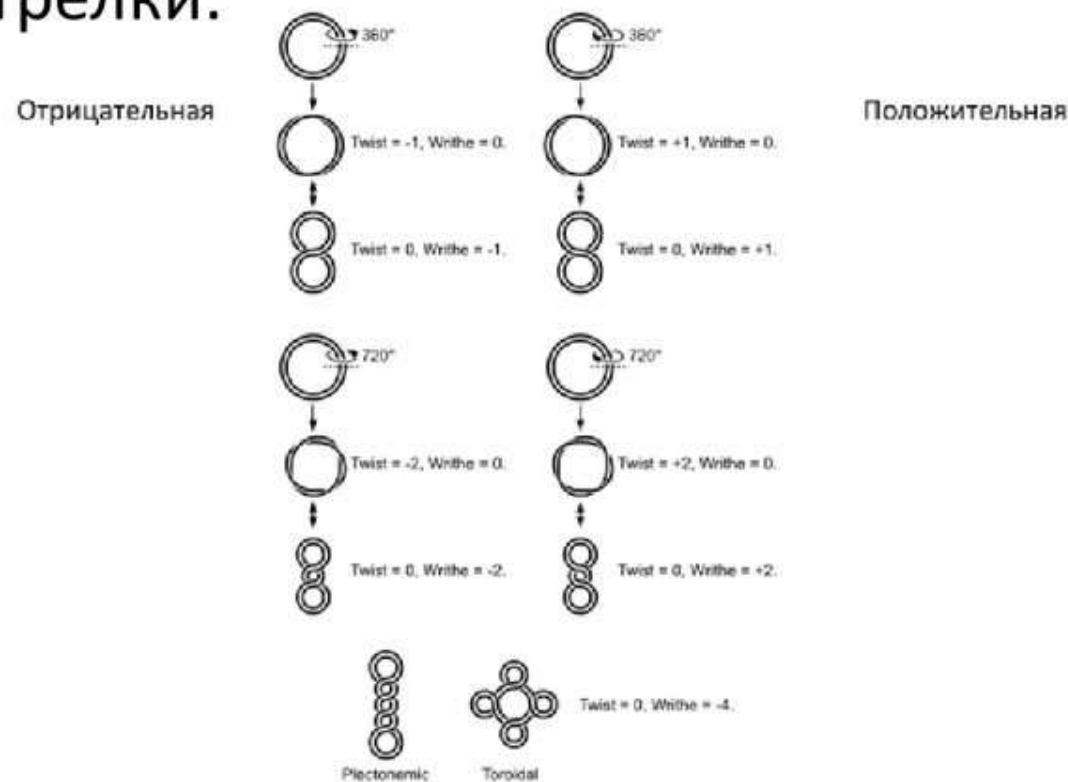
ДНК (146 п.н.)



# Строение нуклеосомы

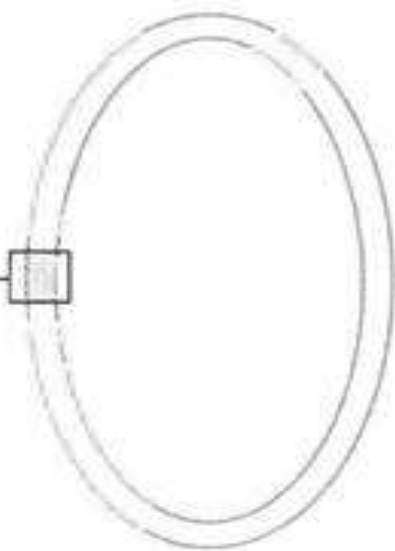


- Сверхспирализация ДНК может быть положительной и отрицательной. Положительная - ось двойной спирали закручена в том же направлении, что и цепи внутри двойной спирали (по часовой стрелке). Отрицательная - против часовой стрелки.



Двойная  
спираль ДНК

Ось



Суперскрученная  
ДНК



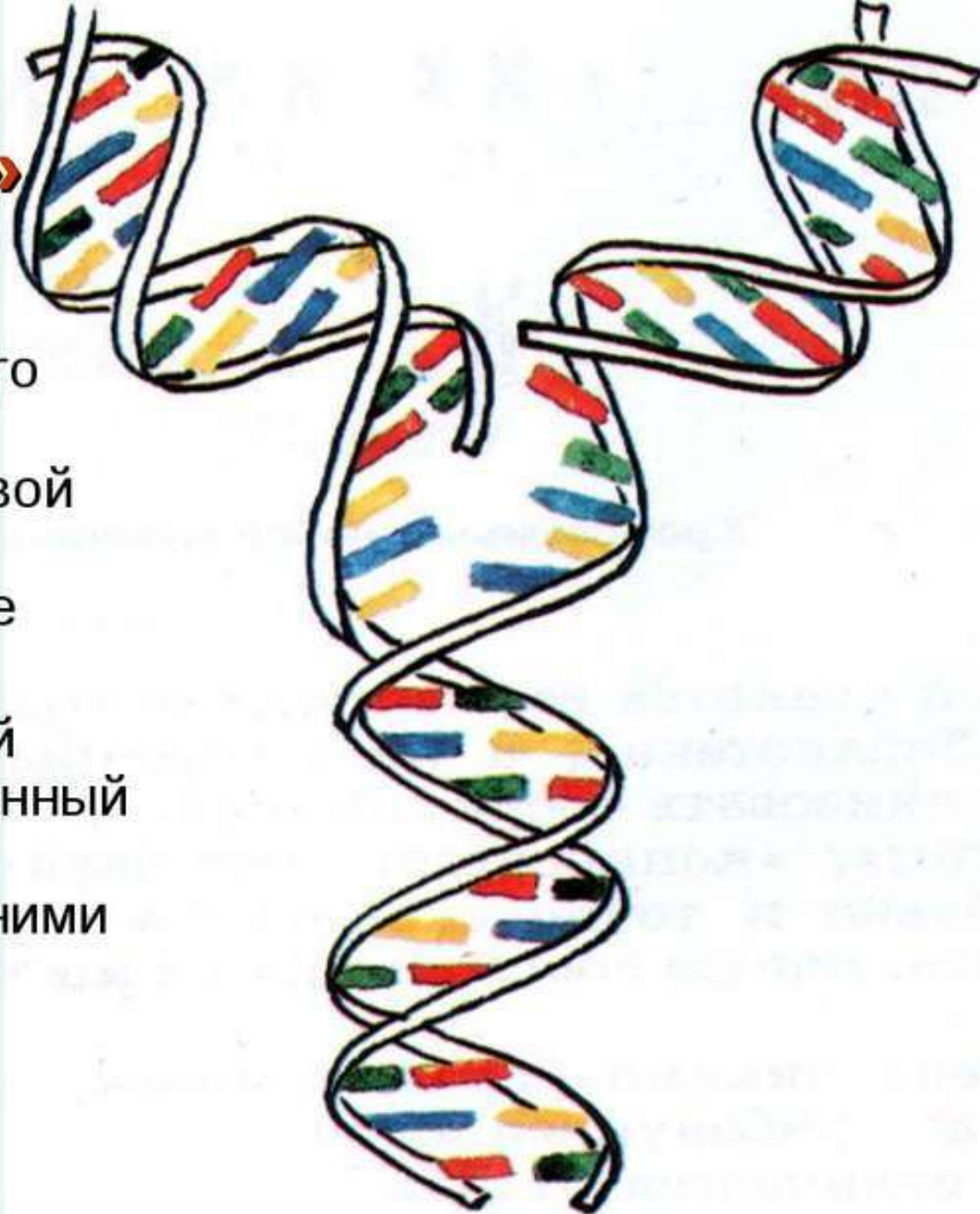
## Отличия организации генома и экспрессии генов у прокариот и эукариот

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

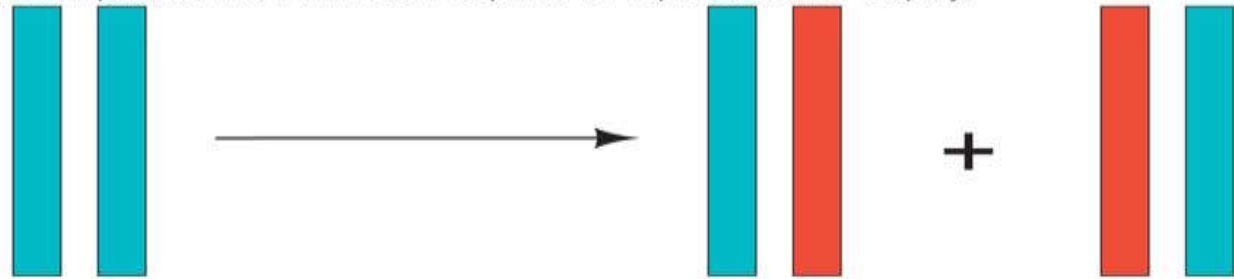
После репликации каждая из цепей ДНК содержит фрагменты родительской и новосинтезированной ДНК

# Альтернативные модели репликации ДНК

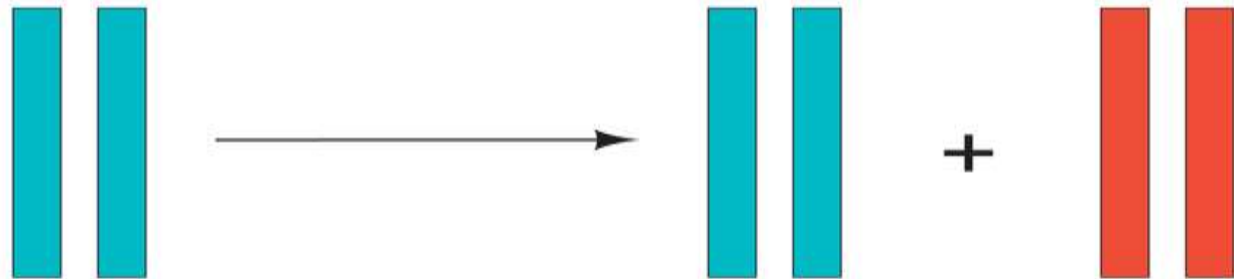
Fig. 20.1

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

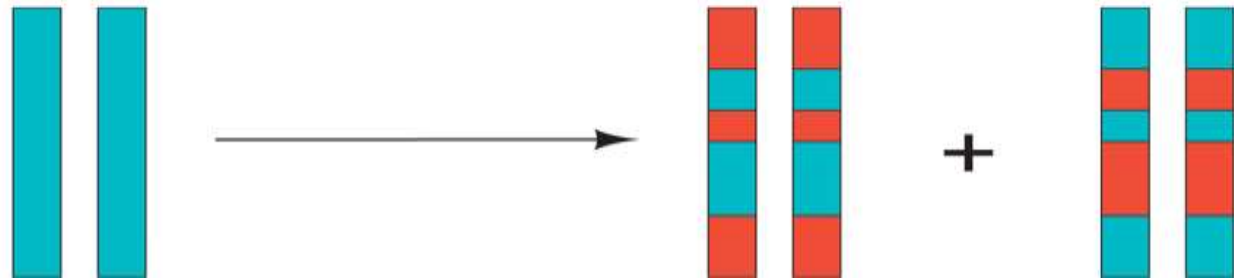
(a) Semiconservative



(b) Conservative



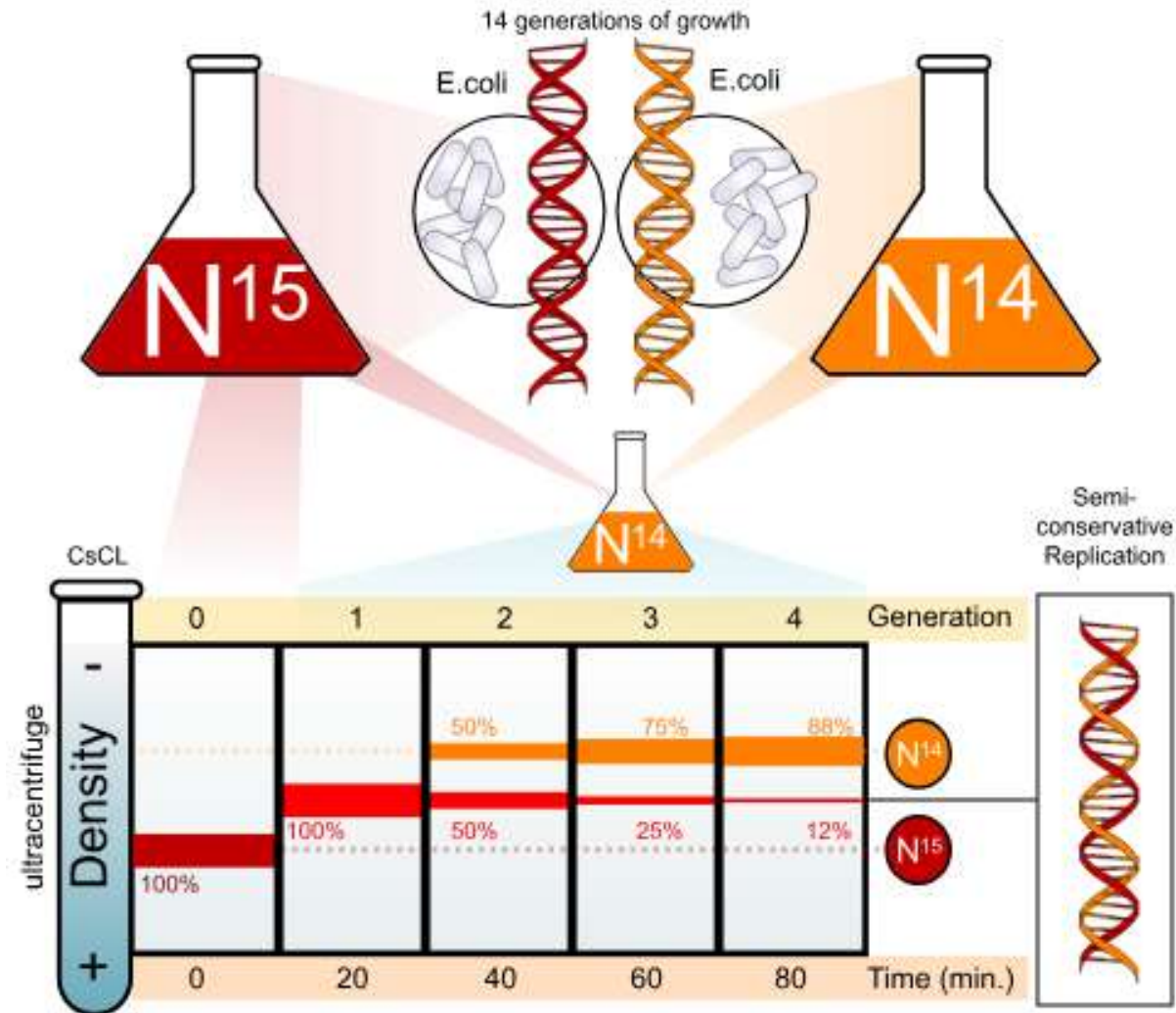
(c) Dispersive





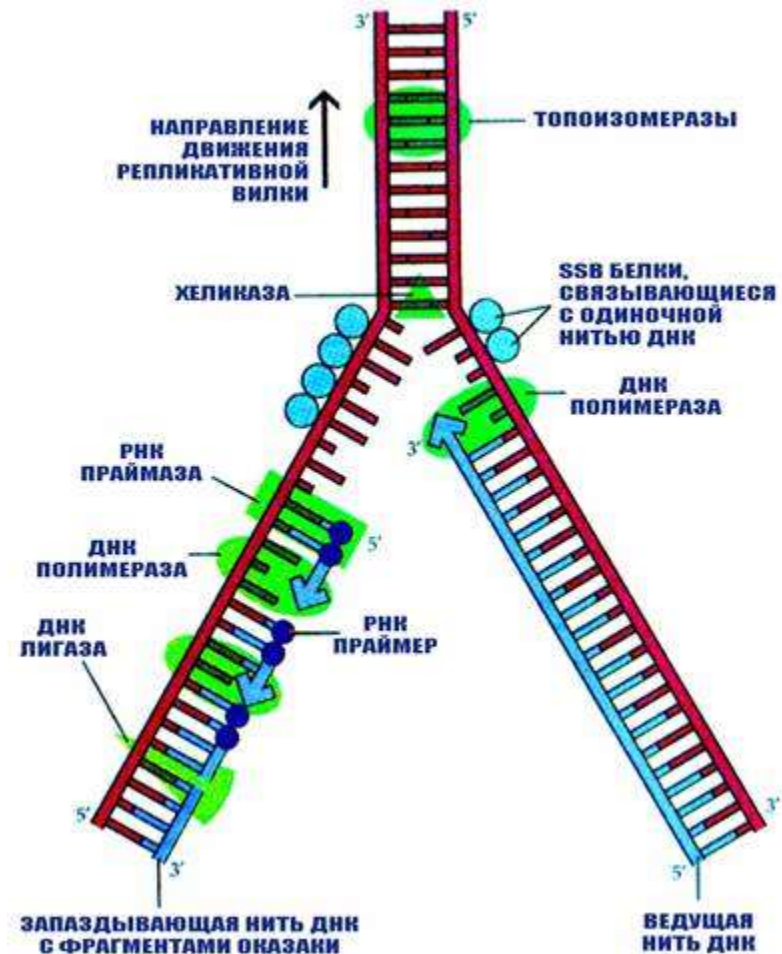
# Доказательство полуконсервативности

Эксперимент Мезельсона и Сталя (и Джером Виноград), 1958



# Принципы репликации

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

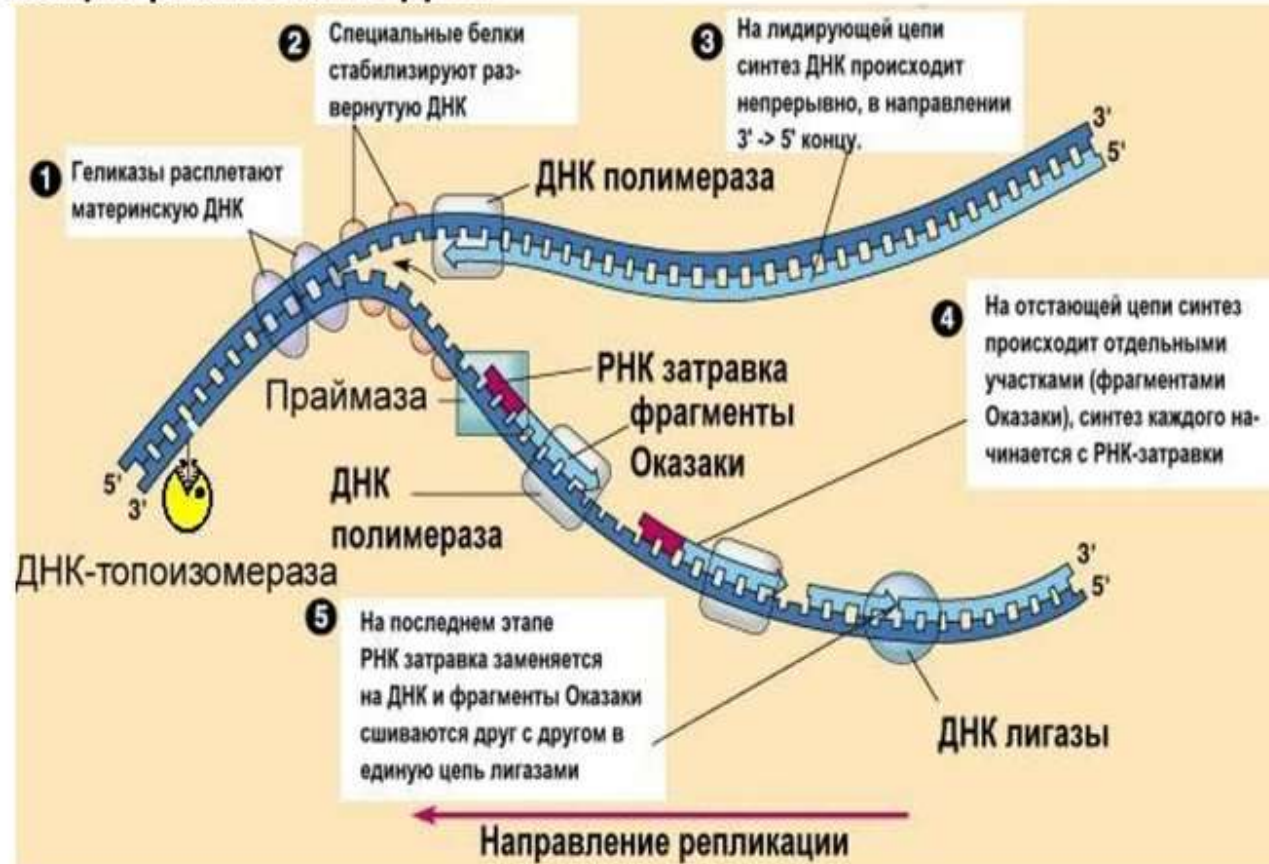


# Ориджин репликации

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.

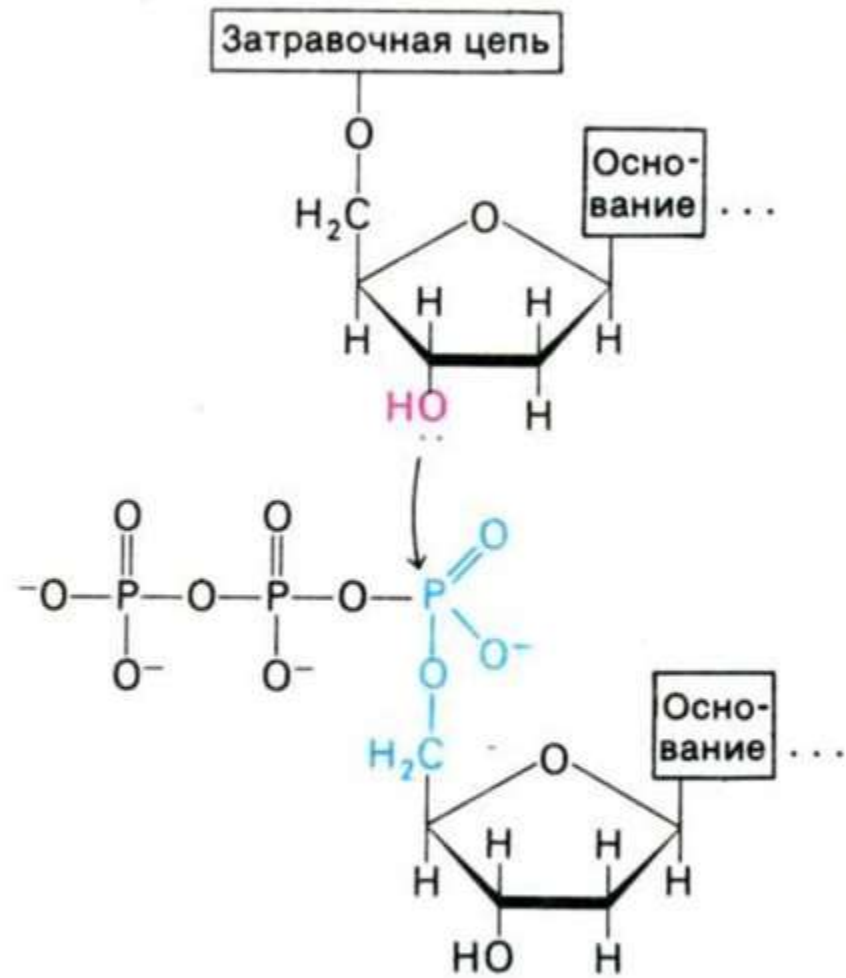


# Репликация ДНК

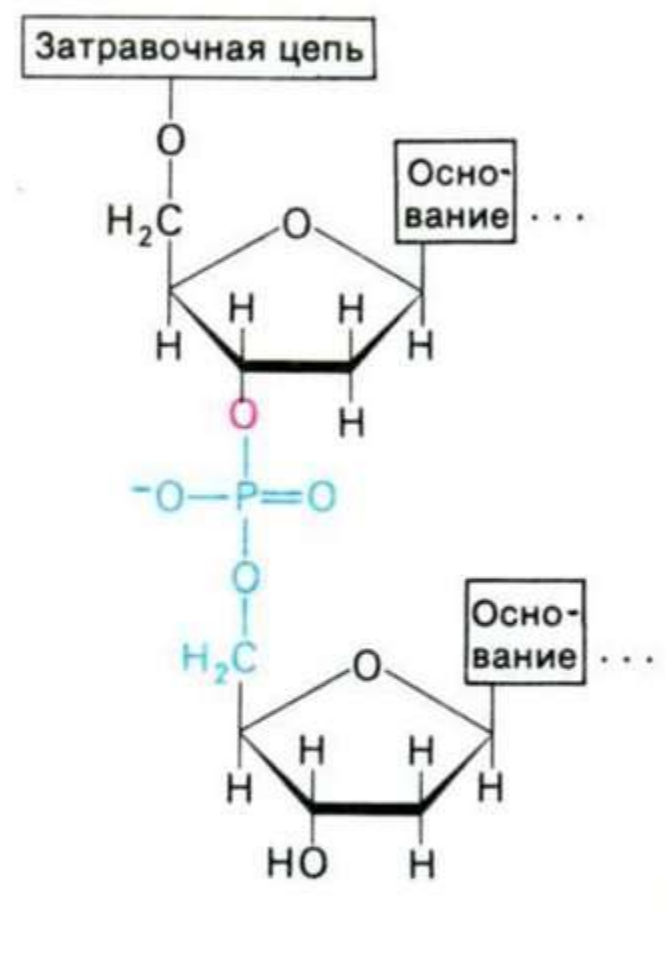
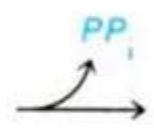
- **Этап инициации:**
- Сигналом начала репликации служат **белковые факторы роста** (модифицирующие регуляторные белки?)
- Формирование одноцепочечных матриц:  
**топоизомераза** «разрезает» сахарофосфатный остов, **хеликаза** «расплетает» двойную спираль, **топоизомераза** восстанавливает О-Р-О связь.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

# Репликация ДНК

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



М а т р и ч н а я ц е п ь



М а т р и ч н а я ц е п ь

**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:

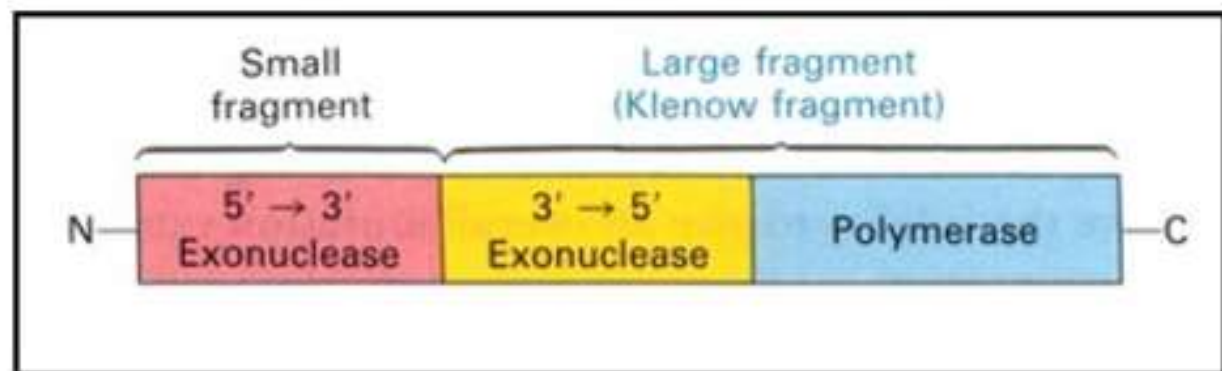
Точно неизвестно как ДНК-полимераза осуществляет свою активность, но существует **модель ее работы**. Холофермент представляет собой комплекс (900кДа) из нескольких типов субъединиц:

- 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'-экзонуклеазная активность).
  - Малый (N-концевой) (5'-3'-экзонуклеазная активность).



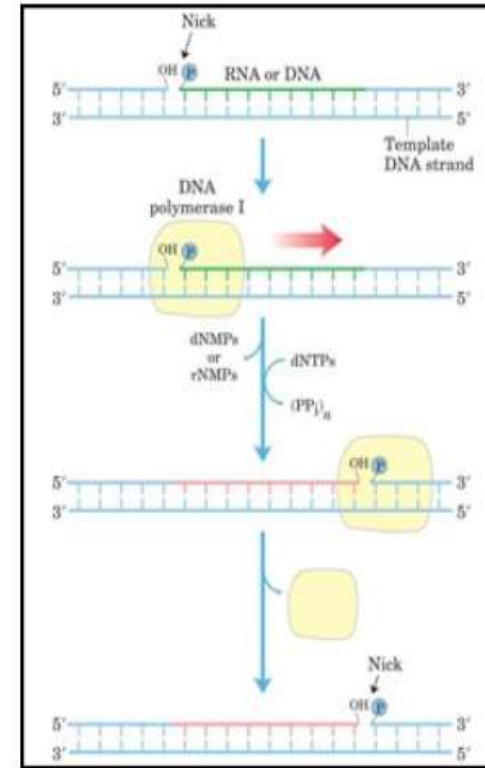
## *ДНК-полимераза 2:*

- 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

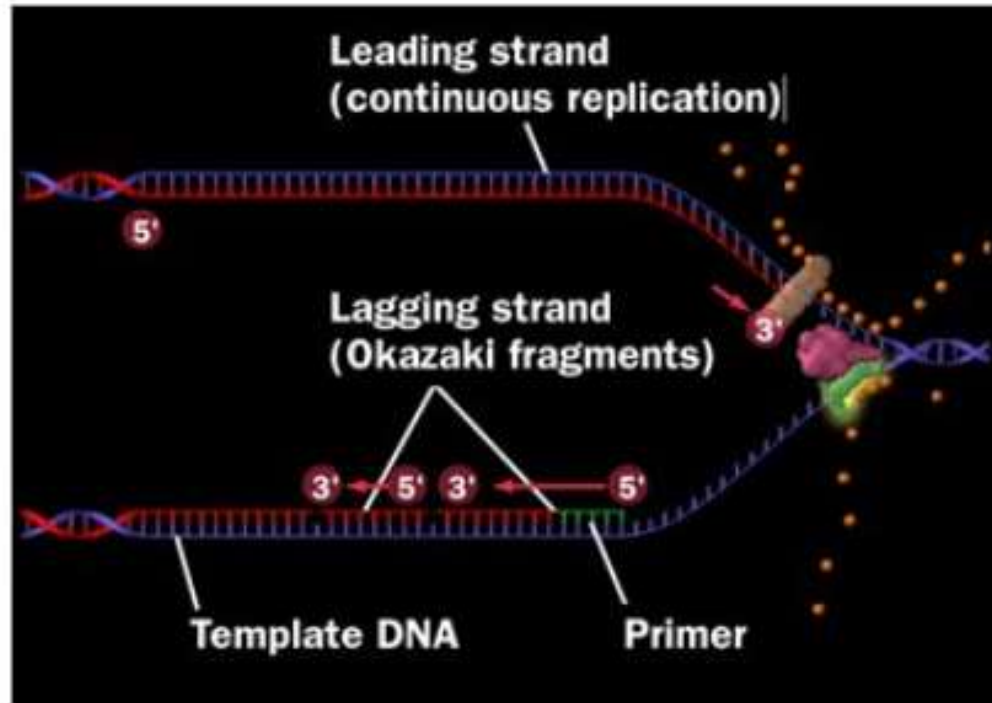
- Присуща ДНК-полимеразам 1, 2, 3 E.coli
- Происходит гидролиз фосфодиэфирной связи в одной цепи ДНК и удаляется один нуклеотид с 3' конца растущей цепи.
- Позволяет полимеразам осуществлять контроль за правильностью присоединения нуклеотидов к 3' концу (корректирующий механизм).

## 5'-3'-экзонуклеазная активность



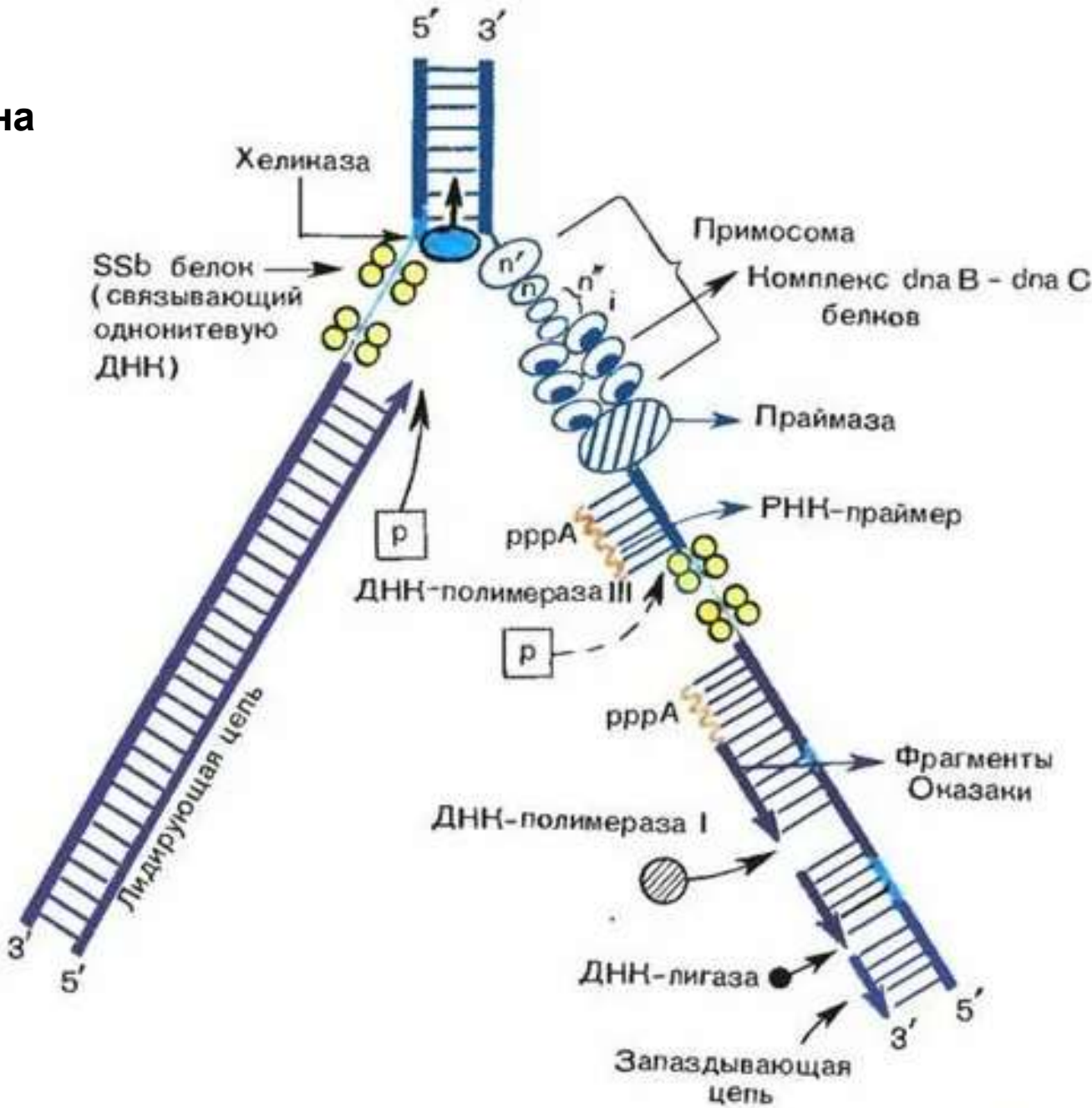
**Ник-трансляция** – это способность ДНК-полимеразы E.coli использовать концы (ники) в качестве стартовых точек полимеризации, при которой фрагмент цепи ДНК следующий за ником расщепляется и одновременно заменяется на вновь синтезированный участок.

# Значение ник-трансляции:

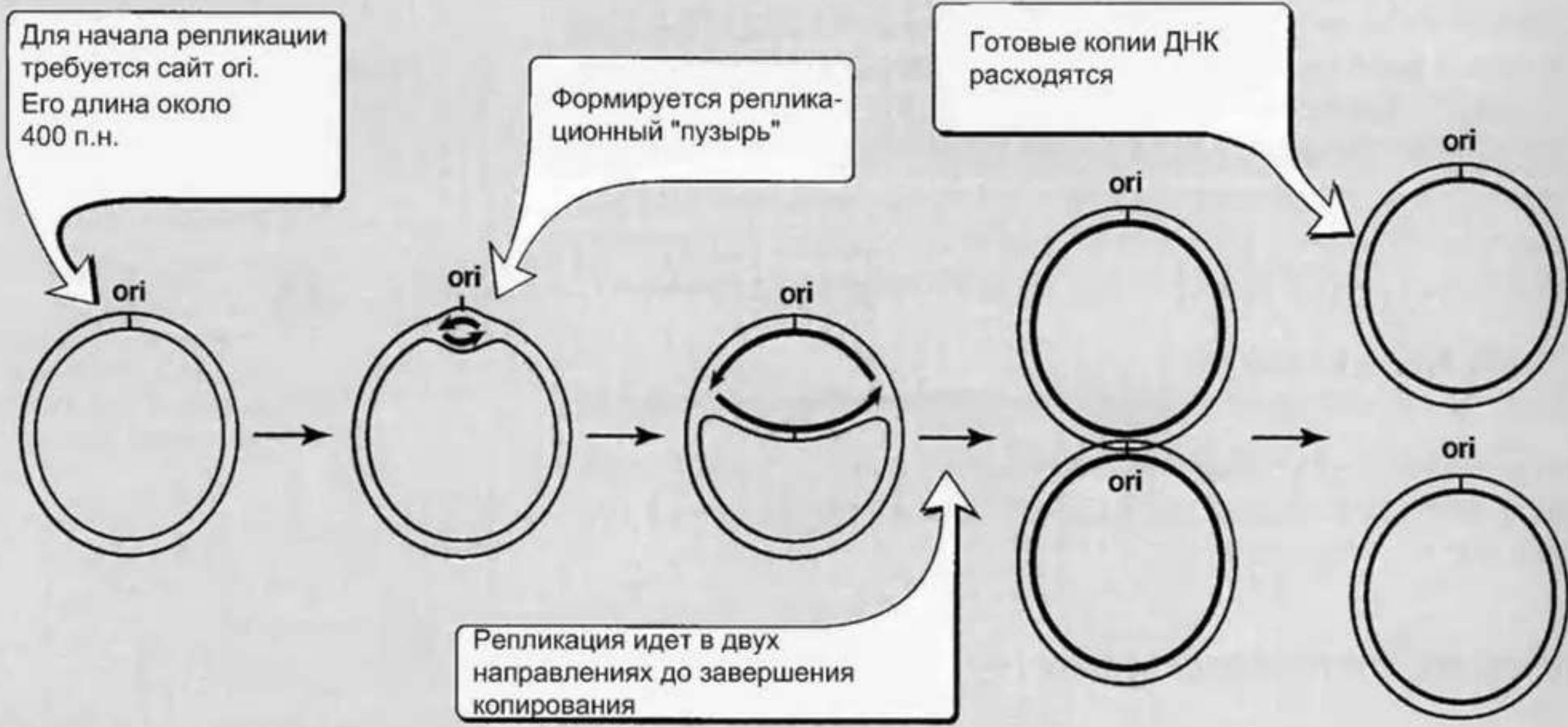


- Возможность быстрой репарации поврежденной нити ДНК без расплетания дуплекса.
- Возможность легко удалять праймеры, сращивая фрагменты Оказаки отстающей цепи.
- Возможность введения радиоактивной метки в молекулу ДНК в различных исследованиях.

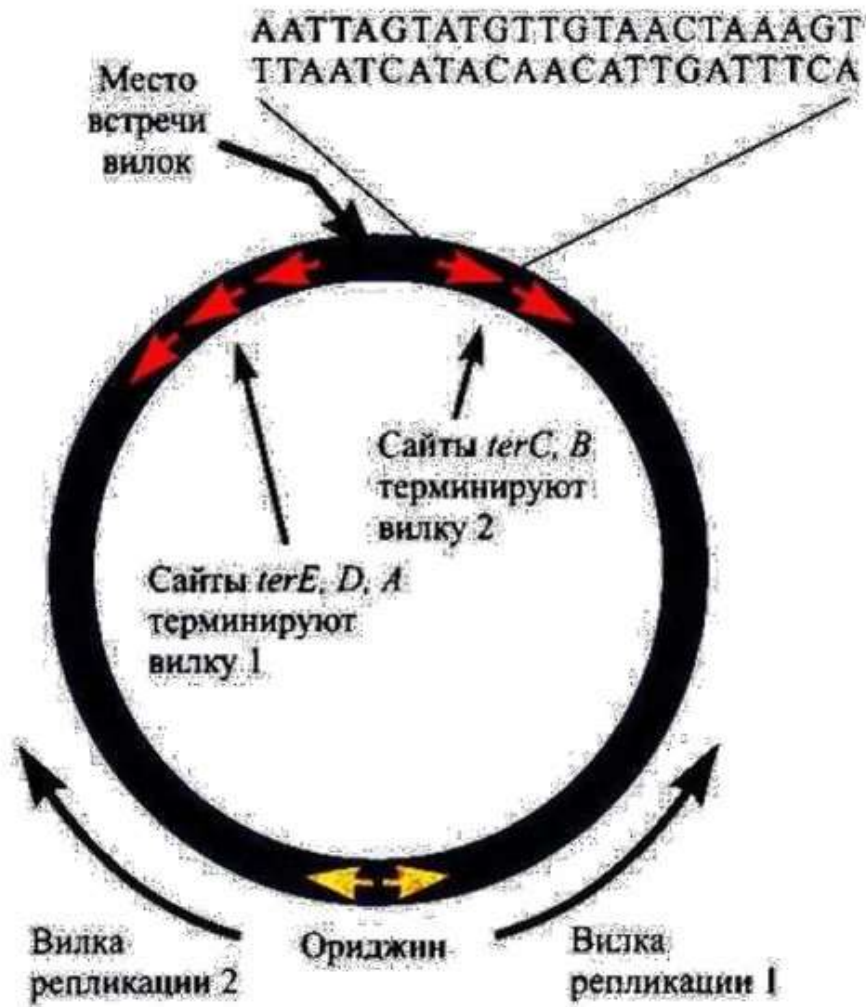
# Репликация молекулы ДНК на примере E.coli



# Репликация кольцевых бактериальных хромосом



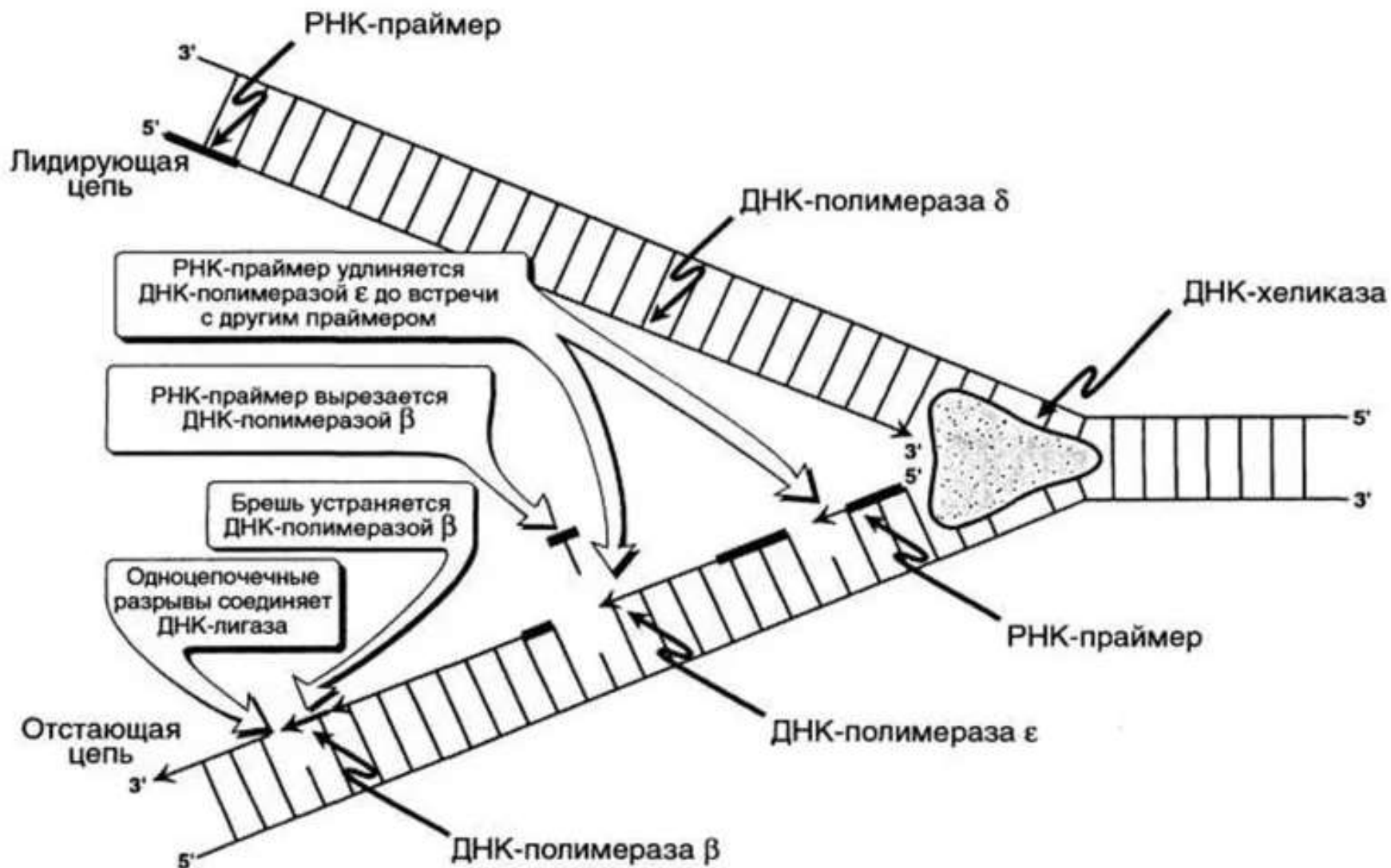
# Терминация репликации у прокариот



*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

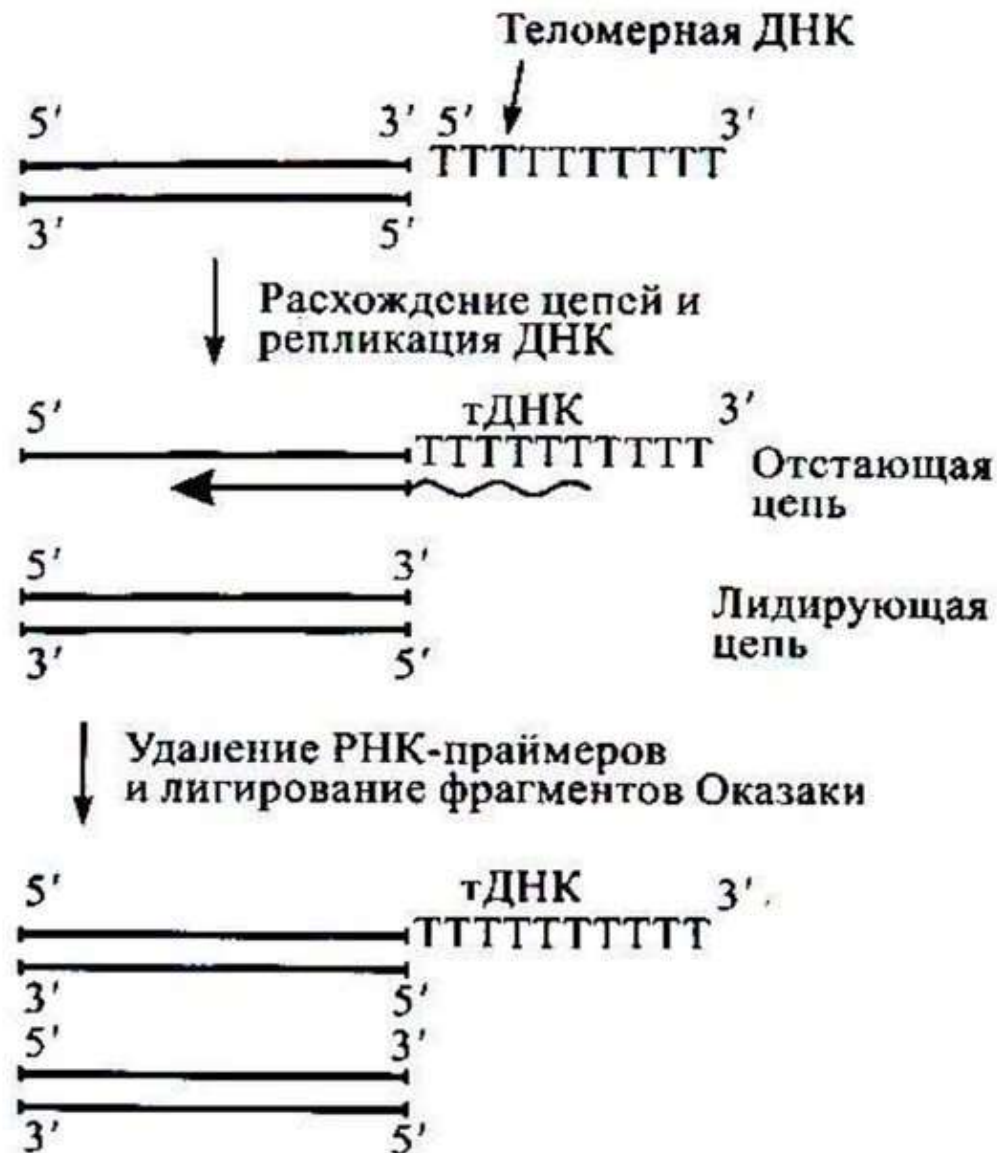
- **У эукариот** нет специфического сайта для терминации. Терминация происходит, когда сливаются репликационные пузырьки (вилки репликации встречаются).
- В терминации репликации принимает участие фермент РНКазы H (у человека) или экзонуклеаза (у дрожжей), которая удаляет РНК праймер, а ДНК-лигаза сшивает 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*

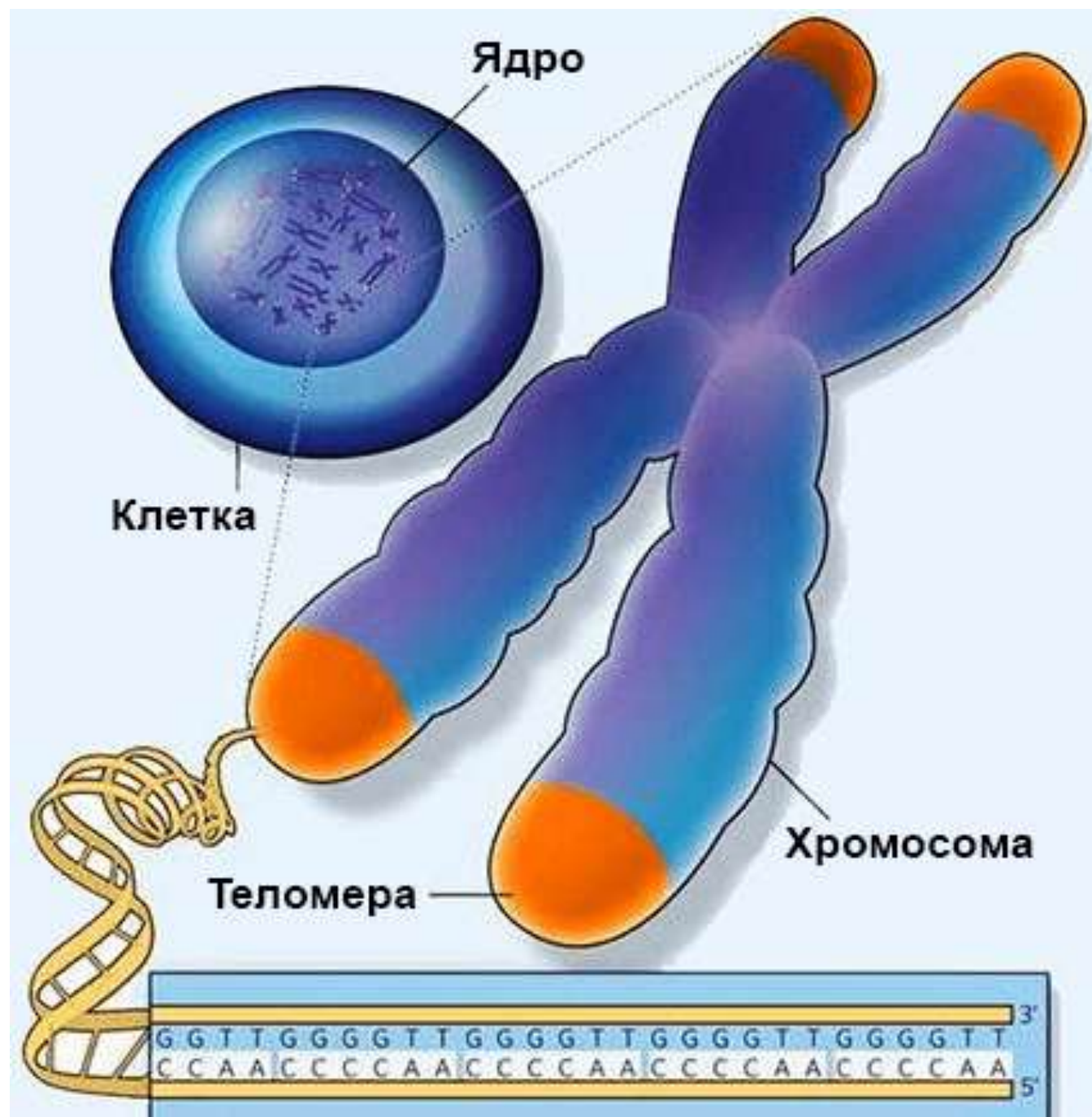
### **Разница в репликации ДНК у про- и эукариот**

<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.





Telomerase binds to 3' flanking end of telomere that is complementary to telomerase RNA



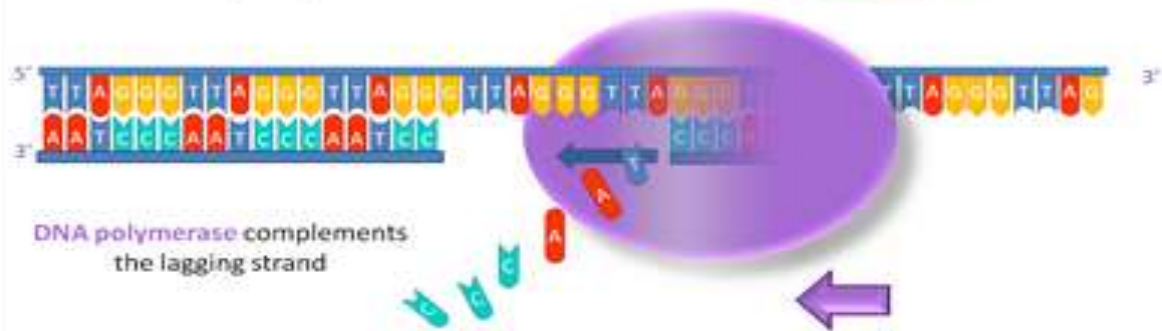
Bases are added using RNA as template



Telomerase relocates



Second step is repeated



DNA polymerase complements the lagging strand

*Благодарю за внимание!*