

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт медицины, экологии и физической культуры

В.Ф. Сыч, Н.А. Курносова, Е.П. Дрождина

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Часть 1. Биополимеры живых систем

Учебное пособие

Ульяновск
2008

УДК 577
ББК 28.070
С 95

*Печатается по решению Ученого совета
Института медицины, экологии и физической культуры
Ульяновского государственного университета*

Рецензент:

кандидат медицинских наук *Е.В. Слесарева*

Сыч, В. Ф.

С 95 **Основы молекулярной биологии** : учеб. пособие. Ч. 1. Биополимеры живых систем / В. Ф. Сыч, Н. А. Курносова, Е. П. Дрождина. – Ульяновск : УлГУ, 2008. – 64 с.

В пособии отражено небольшое количество фундаментальных тем, имеющих исключительно важное значение для познания живой природы. Одна из основных задач пособия – изложение материала в достаточно простой и лаконичной форме. Приведенные иллюстрации и схемы позволят освоить непростые молекулярно-биологические понятия, помогут студентам преодолеть различия между школьным и университетским курсами биологии.

Пособие предназначено для студентов 1 экологического факультета.

УДК 577
ББК 28.070

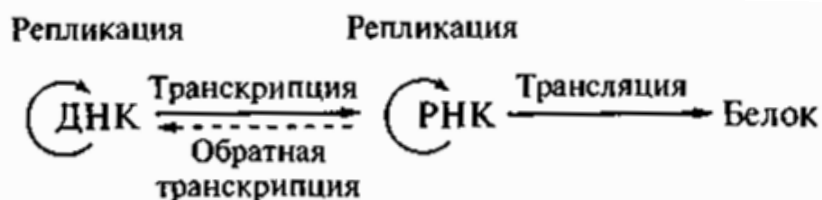
© Сыч В.Ф., Курносова Н.А., Дрождина Е.П., 2008
© Ульяновский государственный университет, 2008

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
1. Основные биополимеры клетки	5
1.1. Белки.....	5
<i>Состав и пространственная организация белковой молекулы</i>	<i>5</i>
<i>Функции белков</i>	<i>12</i>
1.2. Нуклеиновые кислоты	14
<i>Химический состав в строение ДНК.....</i>	<i>14</i>
<i>Полиморфизм двойной спирали ДНК.....</i>	<i>17</i>
<i>Функции ДНК.....</i>	<i>18</i>
<i>Структура РНК.....</i>	<i>18</i>
<i>Виды РНК</i>	<i>20</i>
<i>Функции РНК.....</i>	<i>24</i>
<i>Концепция «Мир РНК».....</i>	<i>25</i>
2. Основные матричные процессы	27
2.1. Репликация ДНК	27
<i>Основные принципы репликации ДНК.....</i>	<i>27</i>
<i>Особенности репликации.....</i>	<i>28</i>
<i>Ферменты, участвующие в репликации ДНК.....</i>	<i>30</i>
2.2. Транскрипция	36
<i>Принципы транскрипции</i>	<i>37</i>
<i>РНК-полимеразы.....</i>	<i>37</i>
<i>Этапы транскрипции.....</i>	<i>39</i>
<i>Процессинг РНК.....</i>	<i>42</i>
2.3. Трансляция.....	46
<i>Подготовительные стадии.....</i>	<i>47</i>
<i>Этапы трансляции.....</i>	<i>48</i>
<i>Формирование пространственной структуры белков</i>	<i>54</i>
2.4. Регуляция биосинтеза белка	56
<i>Регуляция генной активности у прокариот</i>	<i>57</i>
<i>Особенности регуляции синтеза белка у эукариот.....</i>	<i>59</i>
Контрольные вопросы	62
Библиографический список.....	63

Введение

Молекулярная биология как самостоятельная наука, изучающая явления жизни на уровне макромолекул, сформировалась в середине XX века, когда была установлена генетическая роль и структура ДНК. В результате выдающихся открытий Дж. Уотсона, Ф. Крика, Г. Кораны, А. Корнберга и других крупнейших молекулярных биологов в середине 60-х годов XX века утвердилась «центральная догма молекулярной биологии», формулирующая магистральный путь реализации генетической информации в клетке: ДНК → РНК → белок. Впоследствии «центральная догма молекулярной биологии» была детализирована и дополнена представлениями о существовании процесса обратной транскрипции (биосинтезе ДНК на матрице РНК) и репликации РНК:



К настоящему времени молекулярная биология накопила огромный запас уже устоявшихся фактов, которые изложены в классических учебниках и справочных пособиях. С другой стороны, молекулярная биология продолжает стремительно развиваться, возникают принципиально новые методические подходы в изучении молекулярных основ жизнедеятельности клетки. В связи с этим предлагаемое пособие содержит не только достаточно известные и устоявшиеся научные сведения, но и знакомит студентов с последними достижениями науки.

В пособии отражено относительно небольшое количество фундаментальных тем, имеющих исключительно важное значение для познания живой природы. Одна из основных задач пособия — изложение материала в достаточно простой и лаконичной форме. Приведенные иллюстрации и схемы позволят освоить непростые молекулярно-биологические понятия, помогут студентам преодолеть различия между школьным и университетским курсами биологии. Пособие предназначено для студентов 1-го курса медицинского и экологического факультетов, изучающих дисциплины «Основы молекулярной биологии» (элективный курс), «Биология с экологией», «Общая биология».

1. ОСНОВНЫЕ БИОПОЛИМЕРЫ КЛЕТКИ

1.1. Белки

Состав и пространственная организация белковой молекулы

Белки представляют собой биополимеры, состоящие из аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями. Известно более 170 аминокислот, но только 20 из них входят в состав белков. Их называют протеиногенными.

Протеиногенные аминокислоты являются α -аминокислотами (рис. 1) и имеют L-конфигурацию. Благодаря своему строению аминокислоты обладают амфотерными свойствами, т. е. одновременно проявляют свойства кислот и оснований. Аминогруппа сообщает молекуле аминокислоты свойства основания, карбоксильная группа – свойства кислоты. Недиссоциированная форма аминокислоты в нейтральном водном растворе превращается в диполярную форму (цвиттерион), которая способна взаимодействовать как с кислотами, так и с основаниями.

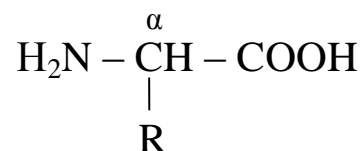
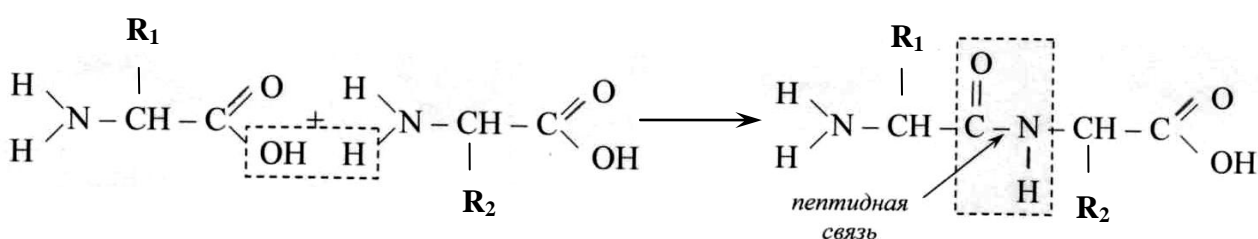


Рис. 1. Общая формула протеиногенных аминокислот

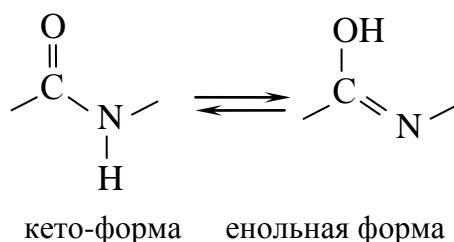
При взаимодействии аминокислот друг с другом образуются прочные ковалентные (*пептидные*) связи между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой аминокислоты:



Длина пептидной связи составляет 0,1325 нм, представляя собой среднюю величину между длинами одинарной C-N связи (0,146 нм) и двойной C=N связи (0,127 нм), т. е. пептидная связь частично имеет характер двойной связи. Это сказывается на *свойствах пептидной группировки*:

- пептидная группировка имеет жесткую планарную структуру, т. е. все атомы, входящие в нее, располагаются в одной плоскости;
- атомы кислорода и водорода в пептидной группировке находятся в *транс*-положении по отношению к пептидной C-N связи (рис. 2);

• пептидная группировка может существовать в двух резонансных формах (кето- и енольной):



Эти свойства пептидной группировки определяют структуру полипептидной цепи, которая состоит из регулярно повторяющихся участков, образующих остов молекулы, и переменных участков – боковых радикалов аминокислотных остатков.

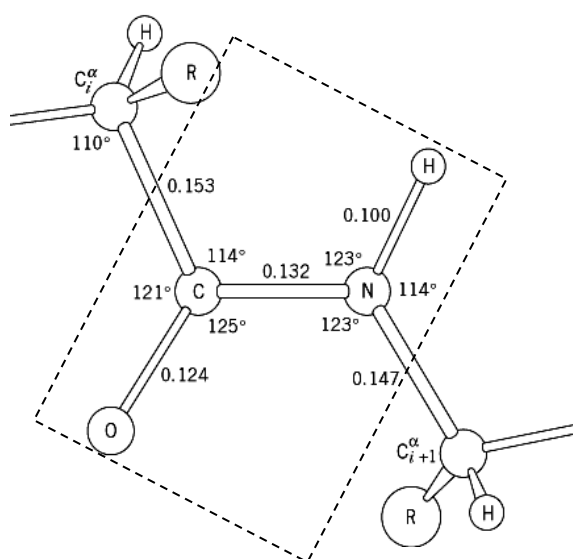


Рис. 2. Строение пептидной связи

Полипептидная цепь направлена, поскольку каждый из ее строительных блоков имеет разные концы: амино- и карбоксильную группы. Началом полипептидной цепи считают конец, несущий свободную аминогруппу (N-конец), а заканчивается полипептидная цепь свободной карбоксильной группой (C-конец).

В каждой белковой молекуле порядок чередования аминокислот и их количество строго определены, в норме постоянны и закодированы в

ДНК. Перестановка аминокислотных остатков или замена одного из них может привести к серьезным нарушениям процессов, протекающих в клетке. Например, замена в β -цепи гемоглобина человека остатка глутаминовой кислоты на остаток валина приводит к тяжелому, передающемуся по наследству заболеванию – серповидноклеточной анемии.

Различают несколько уровней структурной организации белков: первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры.

Под **первичной структурой** белка понимают порядок чередования аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка, соединенных пептидными связями:

... - Гли – Вал – Тир – Глн – Сер – Ала – Иле – Асн – Лиз – Ала – ...

Вторичная структура белка – это упорядоченное расположение отдельных участков основной цепи полипептида, без учета расположения боковых цепей (радикалов аминокислотных остатков). Все вторичные структуры стабилизированы водородными связями между кислородом карбонильной группы и водородом амидной группы: $C=O \dots H-N$. Существуют три основных типа вторичной структуры:

- *α-спираль* (рис. 3а). Остов полипептидной цепи закручивается в спираль, при этом радикалы аминокислот обращены кнаружи от спирали. Фиксируется *α-спираль* водородными связями, которые расположены параллельно оси спирали и многократно повторяются. В силу этого *α-спираль* имеет плотно упакованную структуру, не имеющую внутреннего канала и не проницаемую даже для молекул воды. *α-спираль* имеет определенные характеристики: радиус – 0,23 нм, расстояние между витками – 0,54 нм, среднее число аминокислотных остатков, приходящееся на один оборот, – 3,6. В природных белках существуют только правозакрученные *α-спирали*, что связано с наличием в них аминокислот L-ряда.

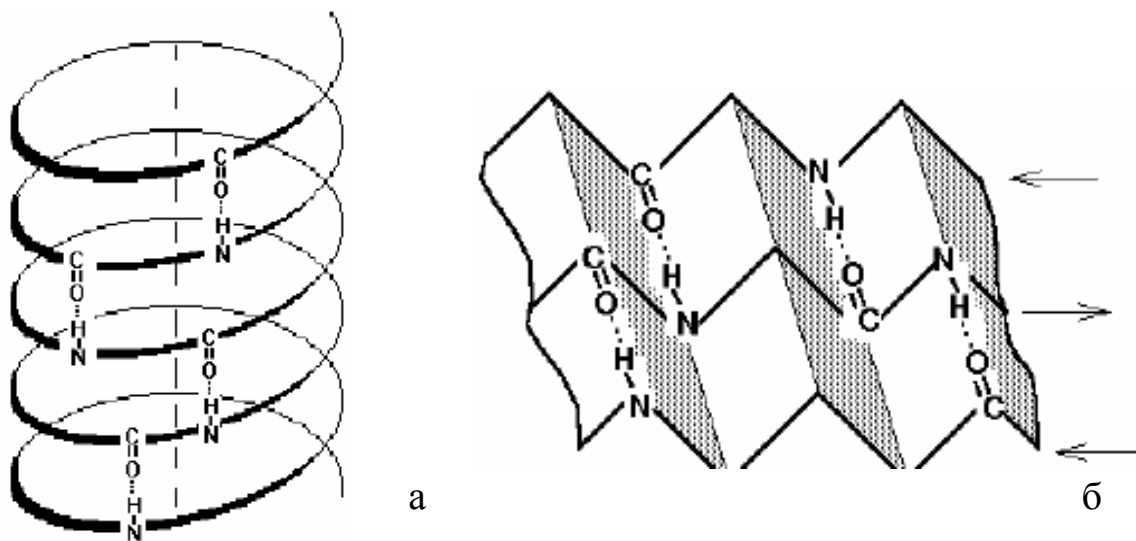


Рис. 3. *α-спираль* (а) и *β-складчатая антипараллельная структура* (б)

- *β-структура* или структура складчатого листа (рис. 3б). Остовы пептидных цепей скручены не в спираль, а имеют зигзагообразную конфигурацию. В отличие от *α-спирали*, в *β-структуре* водородные связи возникают не внутри цепи, а между параллельно или антипараллельно идущими и сближенными участками цепи. *β-структура* (как и *α-спираль*) является наиболее термодинамически выгодным состоянием для данного участка полипептидной цепи.

- *Нерегулярная структура* – тип вторичной структуры, в котором расположение различных участков полипептидной цепи относительно друг друга не имеет постоянного характера, поэтому нерегулярные структуры

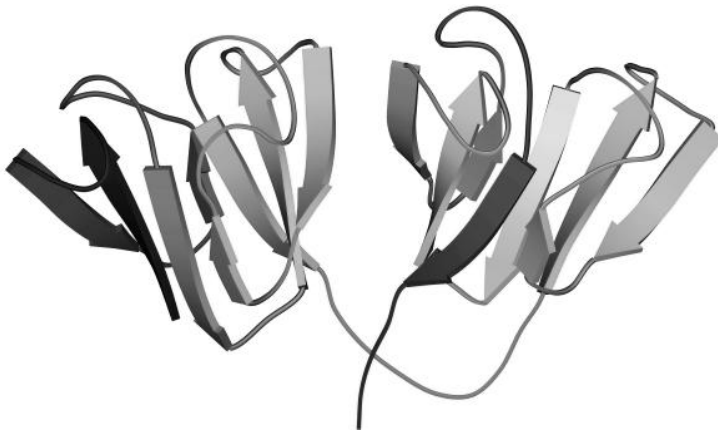


Рис. 4. Глобулярные домены в γ -кристаллине. β -структуры представлены стрелками, нерегулярные структуры – в виде нитей

могут иметь различную конформацию (рис. 4). Один из видов такого рода структур получил название β -изгиб. Этот элемент наблюдается при изменении направления полипептидной цепи на 180° и стабилизируется водородной связью между 1-м и 4-м по ходу цепи аминокислотными остатками.

Вторичная структура белка определяется первичной. Аминокислотные остатки в разной степени способны к образованию водородных связей, это и влияет на образование α -спирали или β -слоя. К спиралеобразующим аминокислотам относятся аланин, глутаминовая кислота, глутамин, лейцин, лизин, метионин и гистидин. Если фрагмент белка состоит главным образом из перечисленных выше аминокислотных остатков, то на данном участке сформируется α -спираль. Валин, изолейцин, треонин, тирозин и фенилаланин способствуют образованию β -слоев полипептидной цепи. Неупорядоченные структуры возникают на участках полипептидной цепи, где сконцентрированы такие аминокислотные остатки, как глицин, серин, аспарагиновая кислота, аспарагин, пролин.

Супервторичные структуры представляют собой энергетически предпочитаемые ансамбли вторичных структур – *белковые домены*.

Домены обычно состоят из отрезков полипептидной цепи, содержащих от 50 до 350 аминокислот, и являются теми модульными единицами, из которых строятся белки. Небольшие белки могут содержать только один домен, более крупные белки состоят из нескольких доменов, связанных сравнительно открытыми участками полипептидной цепи (рис. 4).

Каркас пространственной структуры подавляющего большинства доменов состоит из регулярных вторичных структур – α -спиралей и β -

листов, которые стабилизированы регулярными водородными связями в главной цепи. В зависимости от наличия и расположения α - и β -структур, выделяют белки группы α -, β - и «смешанные» белки – $\alpha\&\beta$ (рис. 5).

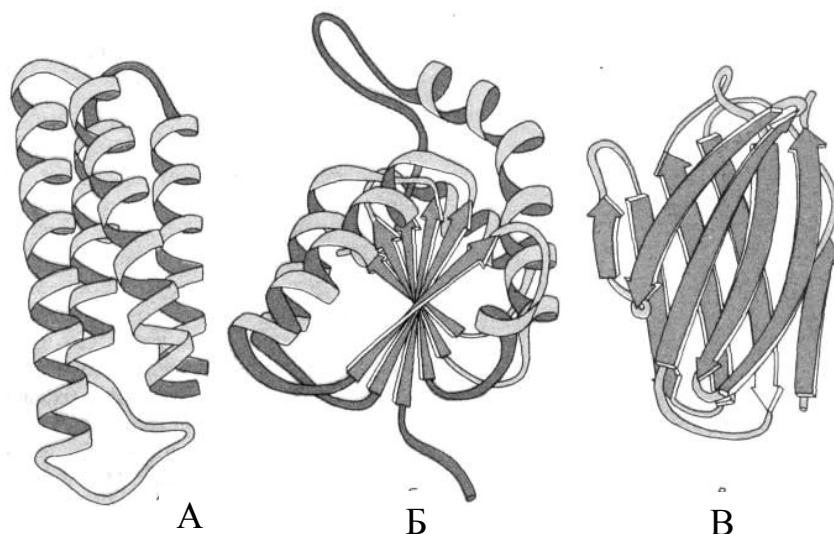


Рис. 5. Модели пространственной структуры некоторых белковых доменов:
А – белок цитохрома b_{562} , почти целиком состоящий из α -спиралей;
Б – НАД-связанный домен лактат-дегидрогеназы, состоящий из смеси α -спиралей и β -слоев; В – домен одной из цепей иммуноглобулина, состоящий из двух β -слоев

Третичная структура – трехмерная структура белка, характеризующаяся определенной укладкой в пространстве всех звеньев полипептидной цепи.

Выделяют два общих типа третичной структуры белков:

- *Фибриллярные белки* представляют собой нерастворимые в воде длинные нитевидные молекулы, полипептидные цепи которых не имеют глобулярной формы, а вытянуты вдоль одной оси. Третичная структура представлена либо тройной α -спиралью, либо β -складчатыми структурами. Большинство фибриллярных белков выполняют структурные или защитные функции. Типичными фибриллярными белками являются α -кератин волос и шерсти, фиброин шелка и коллаген сухожилий. К этому классу относятся также нитевидные белки, присутствующие в сократительных системах мышечных и немышечных клеток, например актин и миозин, а также протофиламенты, из которых построены микротрубочки.

- В *глобулярных белках* полипептидные цепи свернуты в плотную компактную структуру сферической (глобулярной) формы. Обычно третичную структуру белков рассматривают именно в отношении глобулярных белков, имеющих разнообразную пространственную организацию

конформацией, какую может принять полипептидная цепь, третичная структура не является абсолютно жесткой и неподвижной. Многие глобулярные белки в норме претерпевают конформационные изменения при выполнении ими биологических функций. Например, молекула гемоглобина изменяет свою конформацию при связывании кислорода и возвращается к исходной конформации после его освобождения. Кроме того, молекулы многих ферментов претерпевают конформационные изменения при связывании субстратов – это составная часть их каталитического действия.

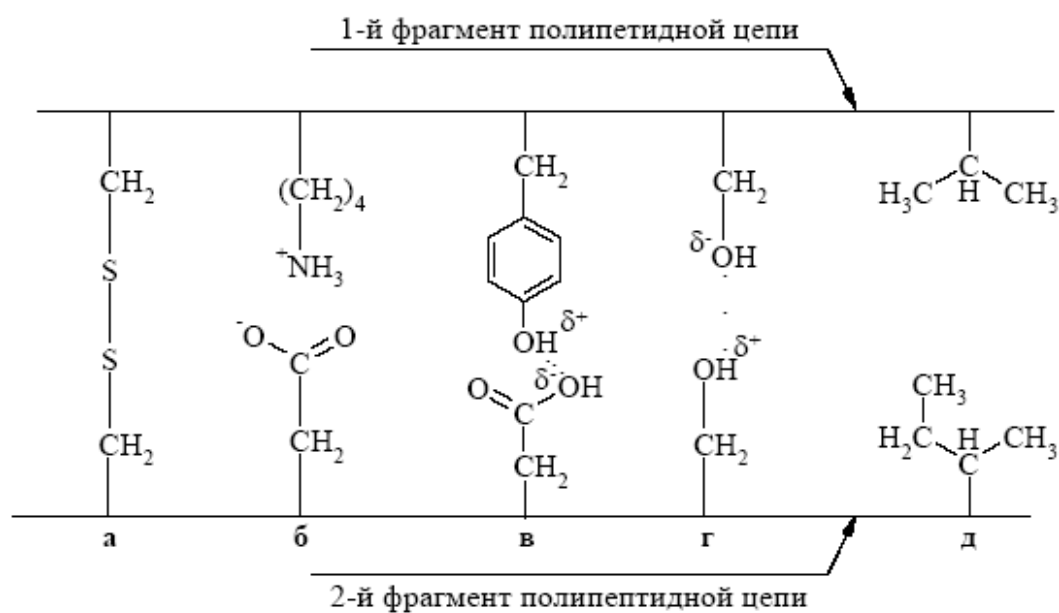


Рис. 6. Типы взаимодействий, поддерживающих третичную структуру белка:
а – дисульфидный мостик; б – ионная связь; в, г – водородные связи;
д – гидрофобные взаимодействия

Четвертичная структура характерна для белков, построенных из нескольких полипептидных цепей. Полипептидные цепи занимают строго фиксированное положение друг относительно друга, вследствие чего белок обладает специфической функцией. Белок, имеющий четвертичную структуру, называется *эпимолекулой* или *мультимером*, а составляющие его отдельные полипептидные цепи – *протомерами* или *субъединицами*.

Четвертичная структура поддерживается исключительно силами слабых взаимодействий (рис. 7), поэтому она представляет собой достаточно лабильное образование, значительно менее прочное, чем третичная или вторичная структуры. Участки субъединиц, на которых происходят взаимодействия, называются *контактными площадками*.

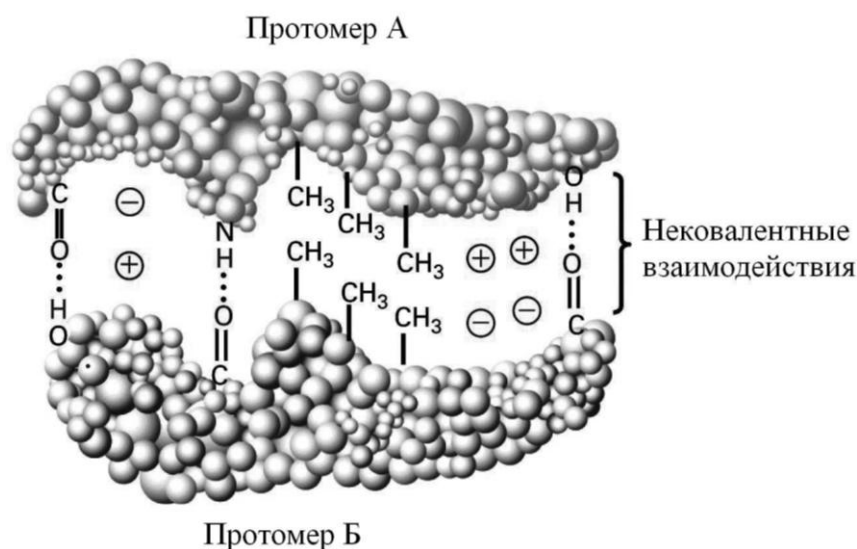


Рис. 7. Нековалентные (слабые) взаимодействия между протомерами белка при образовании четвертичной структуры

Белки, обладающие четвертичной структурой, как правило, содержат четное число субъединиц и представляют собой димеры, тетрамеры, гексамеры и т. д. Число димеров и тетрамеров резко преобладает среди всех изученных белков. Классическим примером белка, имеющего четвертичную структуру, является гемоглобин, молекула которого включает 4 субъединицы двух видов (α и β).

Утрата или изменение структурной организации белковой молекулы называется *денатурацией*. Она сопровождается изменением свойств белка и происходит под воздействием различных физических и химических факторов (например, температуры, радиации, гормонов и др.). Если утрачена четвертичная, третичная или вторичная структуры, то возможно их восстановление, или *ренатурация*. Если же нарушения коснулись и первичной структуры, то ренатурация невозможна, и такая денатурация необратима.

Функции белков

- *Каталитическая.* Все биохимические реакции, протекающие в клетке, катализируются белками особой группы – ферментами (энзимами). Каждая реакция обеспечивается собственным ферментом, вследствие чего ускоряется как минимум в 1 млн раз. Например, *липаза* расщепляет жиры, *амилаза* – крахмал. Ферменты локализуются в митохондриях, цитоплазме, лизосомах и на мембранах клеток и органелл.

- *Структурная.* Белки входят в состав биологических мембран, мембранных и немембранных органелл клетки, обладают способностью образовывать волокна. Например, главным компонентом хрящей и сухожилий является фибриллярный белок *коллаген*. Связки содержат *эластин* – белок, способный растягиваться в двух измерениях. Волосы, ногти и перья состоят из прочного нерастворимого белка *кератина*. Шелковые нити и паутина построены из белка *фиброина*.

- *Сократительная и двигательная.* Белки наделяют клетку или организм способностью сокращаться, изменять форму или передвигаться (*актин* и *миозин* мышечных клеток, *тубулин* микротрубочек).

- *Транспортная.* Существуют специальные белки-переносчики, которые, связываясь со специфическими веществами (гормонами, аминокислотами, липидами, моносахаридами, кислородом и др.), обеспечивают их транспорт между тканями и через мембраны клетки.

- *Регуляторная.* Некоторые белки участвуют в системе регуляции клеточной или физиологической активности. На клеточном уровне: белки-репрессоры и белки-активаторы транскрипции. На организменном уровне: некоторые гормоны – белки (например, инсулин, соматотропин, паратиреоидный гормон).

- *Запасающая и пищевая.* В семенах многих растений запасены белки, потребляемые зародышем на первых стадиях развития. Пищевыми белками являются *альбумин* (главный белок яиц птиц) и *казеин* (главный молочный белок).

- *Защитная.* Иммуноглобулины (антитела) позвоночных – специализированные белки. Они вырабатываются лимфоцитами и, взаимодействуя с антигенами, дезактивируют чужеродные соединения, вирусы, бактерии и т. д. *Фибриноген* и *тромбин* участвуют в свертывании крови, предохраняя организм от её потери.

- *Токсическая.* Многие токсины бактерий (*дифтерийный токсин*), растений (*рицин*) и животных (яд змей) являются веществами белковой природы.

- *Энергетическая.* В экстремальных условиях при истощении углеводных и липидных ресурсов белки могут распадаться с освобождением энергии.

1.2. Нуклеиновые кислоты

Различают два вида нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), которые обеспечивают хранение наследственной информации, и рибонуклеиновые кислоты (РНК), играющие основную роль в реализации генетической информации.

Химический состав и строение ДНК

Молекула ДНК представляет собой правильную спираль, образованную двумя полинуклеотидными цепями, закрученными друг относительно друга и вокруг общей оси. Диаметр спирали постоянен вдоль всей ее длины и равен 2,0 нм. Полный оборот спирали составляет 3,6 нм. На один виток спирали приходится 10,5 нуклеотидных остатков в одной цепи. Межнуклеотидное расстояние составляет 0,34 нм. Спираль правозакрученная, полинуклеотидные цепи в ней антипараллельны, т. е. разнонаправлены: 3'-концу одной цепи соответствует 5'-конец другой (рис. 8). На поверхности спирали можно выделить две бороздки: большую и малую, их также называют главным и минорным желобками (рис. 9.):

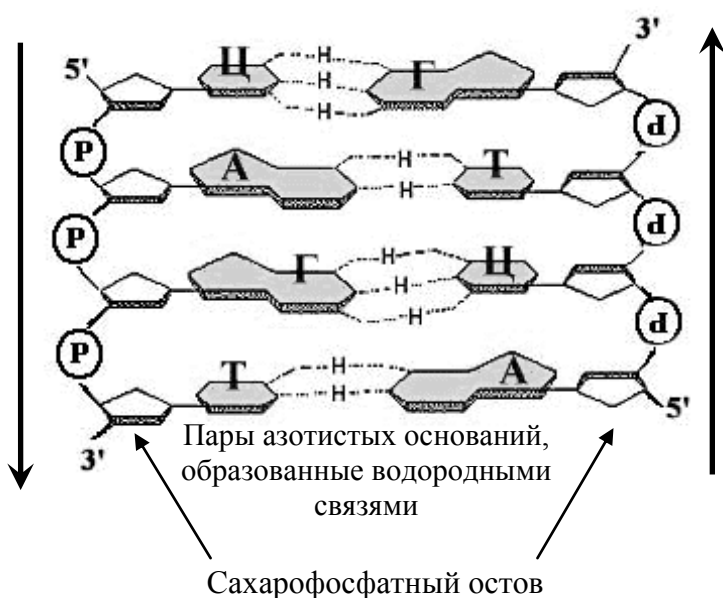


Рис. 8. Антипараллельные цепи ДНК

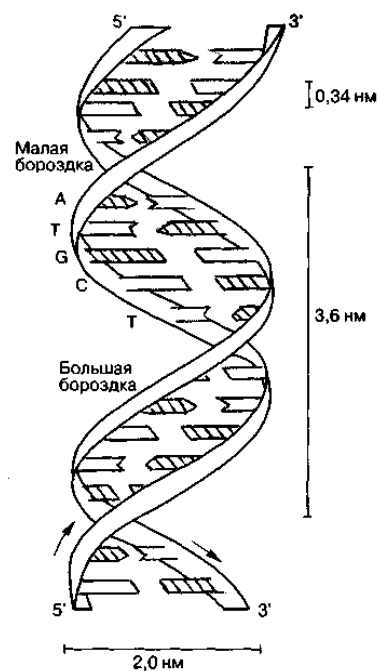


Рис. 9. Модель структуры ДНК по Дж. Уотсону и Ф. Крику

Гидрофильные сахарофосфатные остовы цепей расположены на внешней стороне двойной спирали. Гидрофобные азотистые основания направлены внутрь спирали, расположены параллельно друг другу и перпендикулярны главной оси спирали. Последовательность азотистых оснований нерегулярна, каждая молекула ДНК определенного типа характеризуется особой последовательностью.

Каждая полинуклеотидная цепь – линейная последовательность нуклеотидов. Нуклеотид ДНК имеет три компонента (рис. 10, 11):

- азотистое основание (рис. 12): либо пуриновое (аденин (А) или гуанин (Г)), либо пиримидиновое (цитозин (Ц) или тимин (Т));
- пятиуглеродный сахар – дезоксирибозу;
- фосфатный остаток.

Азотистое основание, связанное с пентозой, называется нуклеозид.



Рис. 10. Компоненты нуклеотида, входящего в ДНК

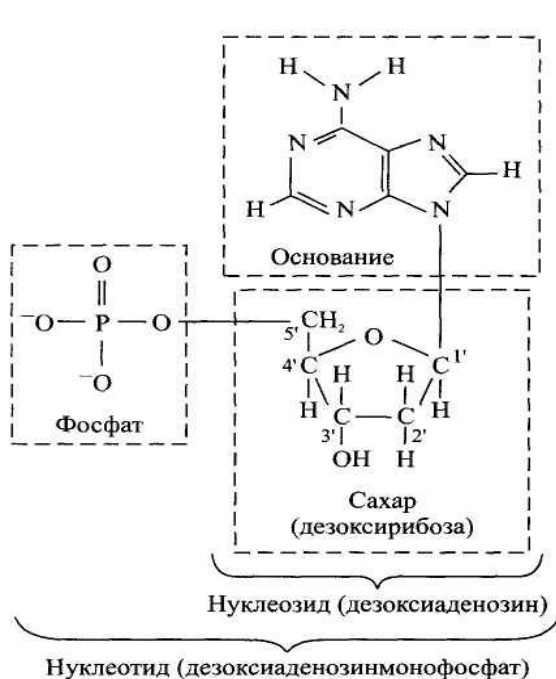


Рис. 11. Структурная формула нуклеотида, содержащего в качестве азотистого основания аденин



Рис. 12. Структурные формулы азотистых оснований, входящих в состав ДНК и РНК: пурины: аденин (А) и гуанин (Г) – содержат два гетероцикла; пиримидины: тимин (Т), цитозин (Ц) и урацил (У) – содержат один гетероцикл

Нуклеотиды соединены в цепи прочными ковалентными (фосфодиэфирными) связями. Причем эти связи осуществляются за счет 3'-ОН одного нуклеозидного остатка и 5'-ОН другого. Поэтому межнуклеотидные связи называют 3'-5'-фосфодиэфирными. Обе полинуклеотидные цепи соединены друг с другом водородными связями, образующимися между азотистыми основаниями внутри спирали. При этом аденин (А) соединяется только с тимином (Т), а гуанин (Г) – с цитозином (Ц). В результате у любого организма независимо от видовой принадлежности сумма пуриновых азотистых оснований равна сумме пиримидиновых оснований ($A+G=T+C$). Эта закономерность получила название «правило Чаргаффа». Пара аденин-тимин образуется путем формирования двух водородных связей (А – Т), пара гуанин-цитозин – трех (Г – Ц). Основания, образующие водородные связи, получили название комплементарных пар (рис. 13).

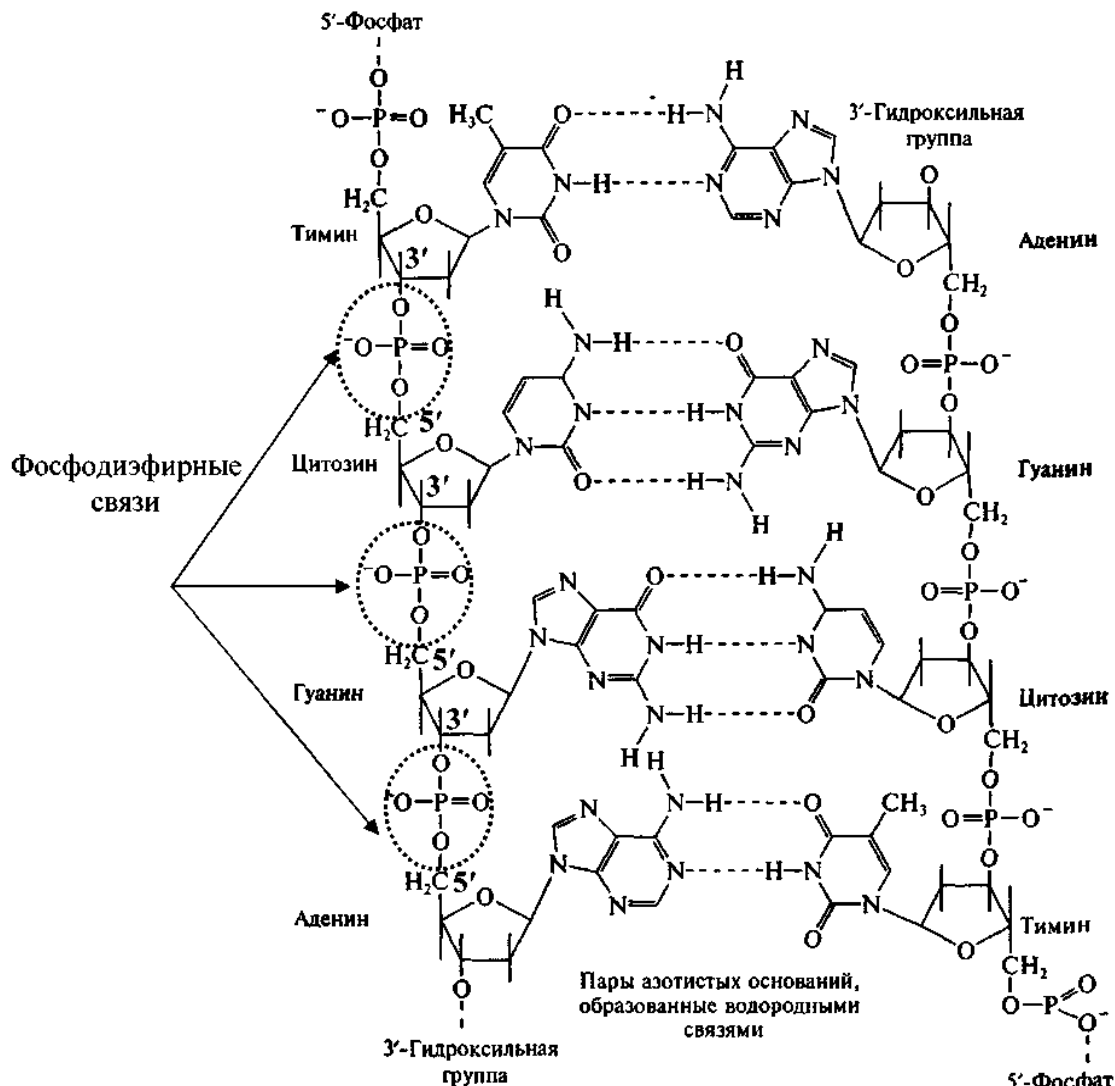


Рис. 13. Полинуклеотидные цепи ДНК, объединенные водородными связями

Комплементарность (от лат. *complementum* – дополнение) – пространственная взаимодополняемость (взаимное соответствие) поверхностей молекул или их частей, приводящая, как правило, к образованию вторичных связей между ними (водородных связей). Комплементарность азотистых оснований в полинуклеотидных цепях – ключевое свойство ДНК, на котором основаны все фундаментальные процессы жизнедеятельности клетки: репликация, транскрипция, трансляция, репарация.

Полиморфизм двойной спирали ДНК

Модель ДНК Уотсона и Крика описывает структуру одной из нескольких форм двойной спирали. Эта основная форма ДНК, в которой большая часть ее молекул существует в клетке, была названа *В-формой*.

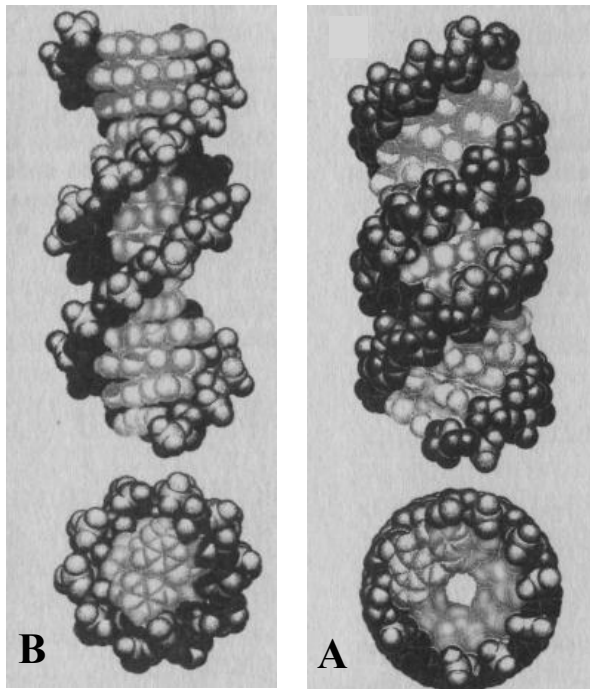


Рис. 14. В- и А-формы ДНК (вид сбоку и сверху): объемные модели

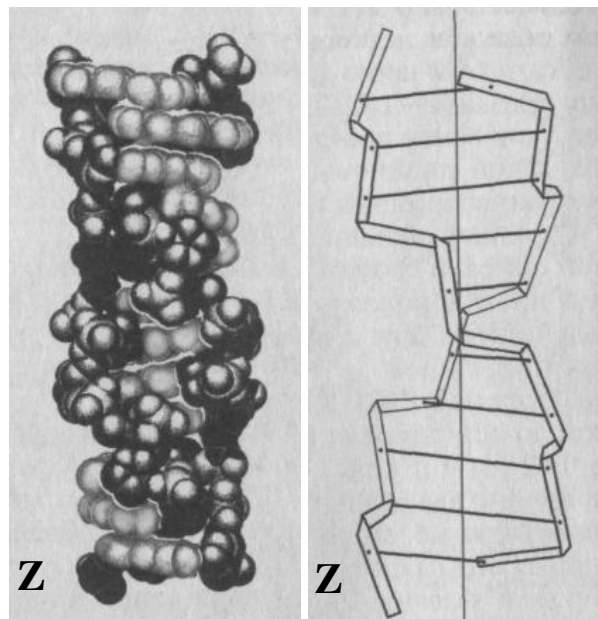


Рис. 15. Z-форма ДНК (вид сбоку): объемная модель и схематическое изображение. Показана зигзагообразная линия, соединяющая фосфатные группы в Z-ДНК. После остатков гуанина зигзагообразная линия идет вертикально, после остатков цитозина – горизонтально

При понижении влажности В-форма ДНК переходит в *А-форму* (рис. 14). Изменение конформации углеводного остатка приводит к уменьшению расстояния между нуклеотидными парами вдоль оси спирали

(примерно до 25 нм при 11 нуклеотидных остатках на виток спирали). Диаметр спирали увеличивается, изменяется ширина бороздок, пары оснований смещаются к периферии спирали. Вследствие этого внутри спирали возникает полость диаметром около 0,40 нм. А- и В-формы ДНК – это правозакрученные спирали.

При высокой концентрации солей или добавлении спирта спираль В-типа переходит в левозакрученную *Z-форму* (рис. 15). Левая спираль была обнаружена у полинуклеотида с чередующейся последовательностью нуклеотидов гуанин-цитозин. Повторяющаяся единица в *Z-форме* состоит из двух пар нуклеотидов (Г-Ц), в результате линия, соединяющая фосфатные группы, через каждые две пары имеет излом и принимает зигзагообразный вид (отсюда название *Z-формы*).

Функции ДНК

1. ДНК является носителем генетической информации. Функция обеспечивается фактом существования генетического кода.

2. Воспроизведение и передача генетической информации в поколениях клеток и организмов. Функция обеспечивается процессом репликации.

3. Реализация генетической информации в виде белков, а также любых других соединений, образующихся с помощью белков-ферментов. Функция обеспечивается процессами транскрипции и трансляции.

Структура РНК

Рибонуклеиновые кислоты (РНК) представляют собой линейные полинуклеотиды с общими для нуклеиновых кислот принципами организации:

- состоят из четырех видов нуклеотидов, каждый из которых включает азотистое основание (аденин, урацил, гуанин, цитозин), пентозу (рибозу) и фосфатный остаток;
- нуклеотиды связаны в цепь с помощью 3'–5'-фосфодиэфирных связей;
- полинуклеотидные цепи полярны, т. е. имеют различимые 5'- и 3'-концы.

Отличия РНК и ДНК

Признак \ Нуклеиновая кислота	РНК	ДНК
Сахар	Рибоза	Дезоксирибоза
Азотистые основания	А, У, Г, Ц	А, Т, Г, Ц
Количество цепей в молекуле	99,99% одноцепочечная, 0,01% двухцепочечная	99,99% двойная спираль, 0,01% одноцепочечная
Форма молекулы	Линейные молекулы	Большинство двухцепочечных – линейные, часть – кольцевые

Главное отличие РНК от ДНК состоит в том, что молекулы РНК являются не двух-, а одноцепочечными. Причиной этому служат следующие особенности первичной структуры РНК:

1. Пентоза в РНК – не дезоксирибоза, а рибоза, которая содержит дополнительную гидроксигруппу. Последняя делает двухцепочечную структуру менее устойчивой.

2. Среди четырех главных (мажорных) азотистых оснований вместо тимина содержится урацил, отличающийся от тимина лишь отсутствием метильной группы у 5-го атома углерода (рис. 12). Благодаря этому уменьшается сила гидрофобного взаимодействия в комплементарной паре А-У. Это снижает вероятность образования устойчивых двухцепочечных молекул.

3. В РНК высоко содержание так называемых минорных оснований. Среди них – дигидроуридин (в урациле нет одной двойной связи), псевдоуридин (урацил иначе, чем обычно, связан с рибозой), диметиладенин и диметилгуанин (в азотистых основаниях – по две дополнительных метильных группы) и многие другие. Почти все эти основания не могут участвовать в комплементарных взаимодействиях.

Перечисленные отличия строения РНК от ДНК имеют большое биологическое значение, так как свою функцию молекулы РНК способны выполнять только в одноцепочечном состоянии.

Общие черты вторичной структуры РНК

Молекулы большинства природных РНК построены из одной полинуклеотидной цепи. Вместе с тем в некоторых участках цепь РНК может образовывать петли, или «шпильки», с двухцепочечной структурой (рис. 16А). Эта структура стабилизирована взаимодействием оснований в парах А-У, Г-Ц. Однако могут образовываться и «неправильные» пары (например, Г-У), а в некоторых участках «шпильки» вообще не происходит никакого взаимодействия. В составе таких петель может содержаться до 50% всех нуклеотидов.

Третичная структура РНК

В физиологических условиях однотяжевые РНК характеризуются компактной и упорядоченной третичной структурой, которая возникает за счет взаимодействия элементов их вторичной структуры (рис. 16Б).

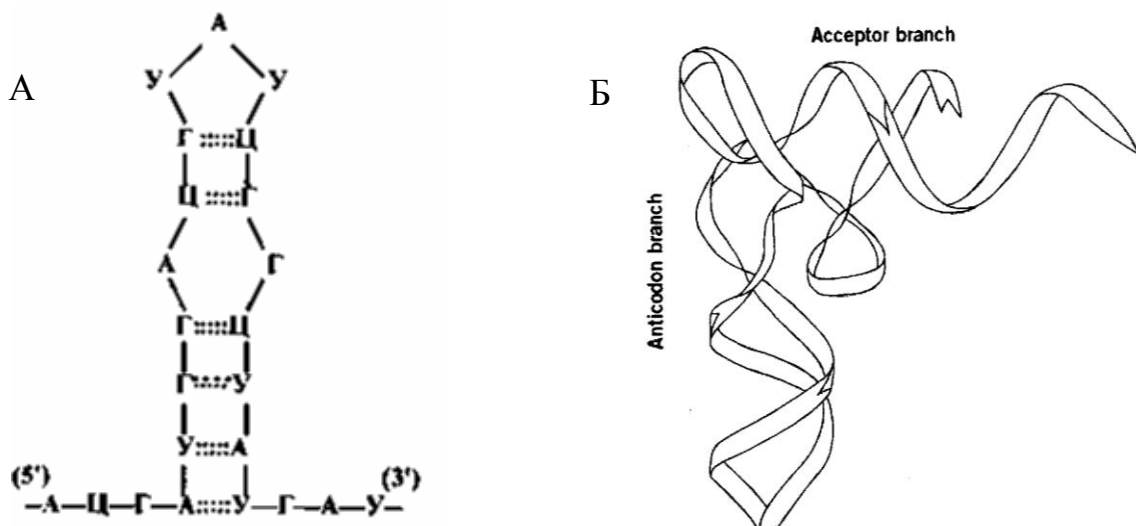


Рис. 16. Структура РНК:

А – участок вторичной структуры в цепи РНК; Б – схема третичной структуры тРНК

Виды РНК

Матричная, или информационная, РНК (мРНК) переносит генетическую информацию из клеточного ядра в цитоплазму. Составляет около 5% всей клеточной РНК. Зрелые мРНК имеют сходный план строения. Линейная цепь мРНК содержит несколько областей с различной функциональной ролью (рис. 17).

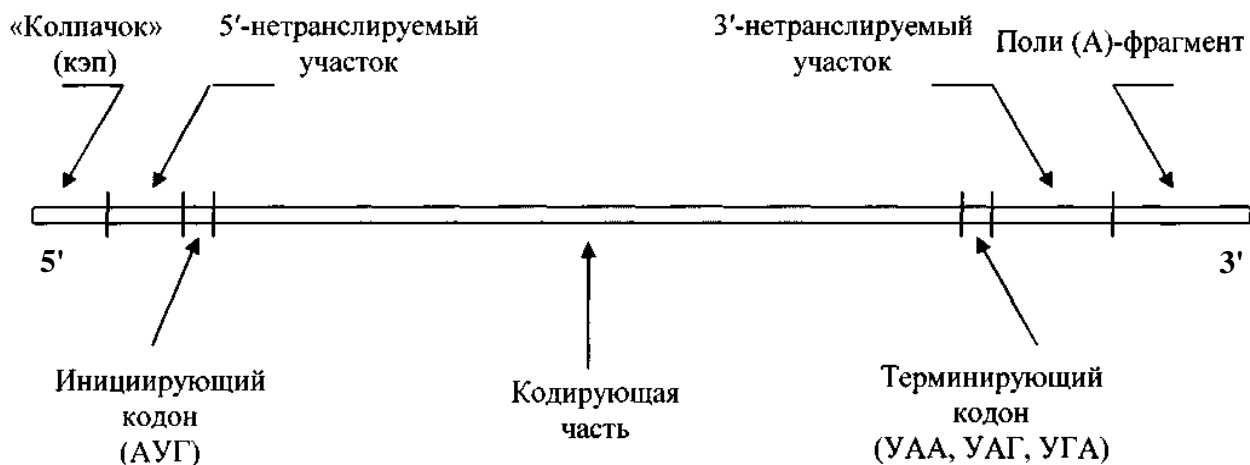


Рис. 17. Составные части зрелой мРНК

1. «Колпачок» (кэп) – нуклеотидная последовательность на 5'-конце мРНК, состоящая из одного-четырех модифицированных нуклеотидов. Такая структура защищает 5'-конец мРНК от действия экзонуклеаз.

2. 5'-нетранслируемый участок – последовательность из нескольких десятков нуклеотидов, которые комплементарны нуклеотидам рРНК, входящим в состав малой субъединицы рибосомы. За счет этого 5'-нетранслируемый участок выполняет функцию первичного связывания мРНК с рибосомой, но сам не транслируется.

3. Иницирующий кодон – кодон, с которого начинается трансляция мРНК. Во всех мРНК он один и тот же – АУГ (кодирует метионин).

4. Кодирующая часть содержит информацию о последовательности аминокислот в белке. В зрелой мРНК она лишена интронов – вставочных некодирующих последовательностей, т. е. имеется непрерывная последовательность смысловых кодонов, которая должна считываться в направлении 5'→3'.

5. Терминирующий кодон – один из трех «бессмысленных» кодонов: УАА, УАГ или УГА.

6. 3'-нетранслируемый участок содержит последовательности нуклеотидов, которые называют элементами нестабильности мРНК. Определенные белки клетки узнают эти последовательности, связываются с ними и стабилизируют мРНК.

7. Поли (А)-фрагмент содержит от 50 до 400 адениловых нуклеотидов. Эти фрагменты отсутствуют в молекулах гистоновых мРНК. Полагают, что поли (А)-фрагмент имеет отношение к регуляции продолжитель-

ности жизни мРНК. Согласно одной из гипотез, после того как очередная рибосома заканчивает трансляцию мРНК, от поли (А)-фрагмента отщепляются 10-15 нуклеотидов. Когда данный фрагмент исчерпывается, начинает разрушаться кодирующая часть мРНК (если отсутствует 3'-нетранслируемый участок).

Общее количество нуклеотидов в мРНК составляет обычно несколько тысяч. При этом на кодирующую часть приходится лишь 60-70% нуклеотидов.

Транспортные РНК (тРНК) – короткие молекулы (70-90 нуклеотидов), главной функцией которых является присоединение аминокислот и перенос их в белоксинтезирующий аппарат клетки. Количество различных тРНК в клетке – несколько десятков: от одного до шести видов для каждой из 20 аминокислот. Виды тРНК, способные связывать одну и ту же аминокислоту, называются изоакцепторными. Специфичность тРНК обозначается

верхним индексом, например тРНК^{Ала}.

Среди нуклеотидов тРНК высоко содержание минорных нуклеотидов (около 10%). Благодаря образованию участков вторичной структуры, цепь тРНК имеет характерную форму «клеверного листа» (рис. 18).

В этой структуре четыре двухцепочечных и пять одноцепочечных участков. Поскольку минорные нуклеотиды, как правило, не способны к комплементарным взаимодействиям, они содержатся в основном в одноцепочечных локусах.

Для одноцепочечных участков приняты следующие названия:



Рис. 18. Структура тРНК (на примере тРНК^{Phe})

- акцепторная ветвь – участок на 3'-конце тРНК из четырех нуклеотидов, место присоединения аминокислоты;
- антикодоновая петля – участок из 7 нуклеотидов в середине цепи; три из них выполняют функцию антикодона, который комплементарно взаимодействует с соответствующим кодоном мРНК;
- дигидроуридиловая, псевдоуридиловая и не всегда имеющаяся добавочная петли способствуют формированию специфичной для данной тРНК третичной структуры.

Особенность тРНК – наличие стабильной третичной структуры. Четыре двухцепочечных участка, попарно сближаясь, образуют примерно два витка двойной спирали, расположенные почти перпендикулярно друг другу – так, что молекула приобретает Г-образную форму (рис. 16Б).

Рибосомные РНК являются структурной основой для формирования субъединиц рибосом. Среди азотистых оснований в рРНК выше, чем обычно, содержание гуанина и цитозина. Встречаются также минорные азотистые основания, но не столь часто, как в тРНК – примерно 1%. Во вторичной структуре рРНК много двухцепочечных участков и петель (рис. 19).

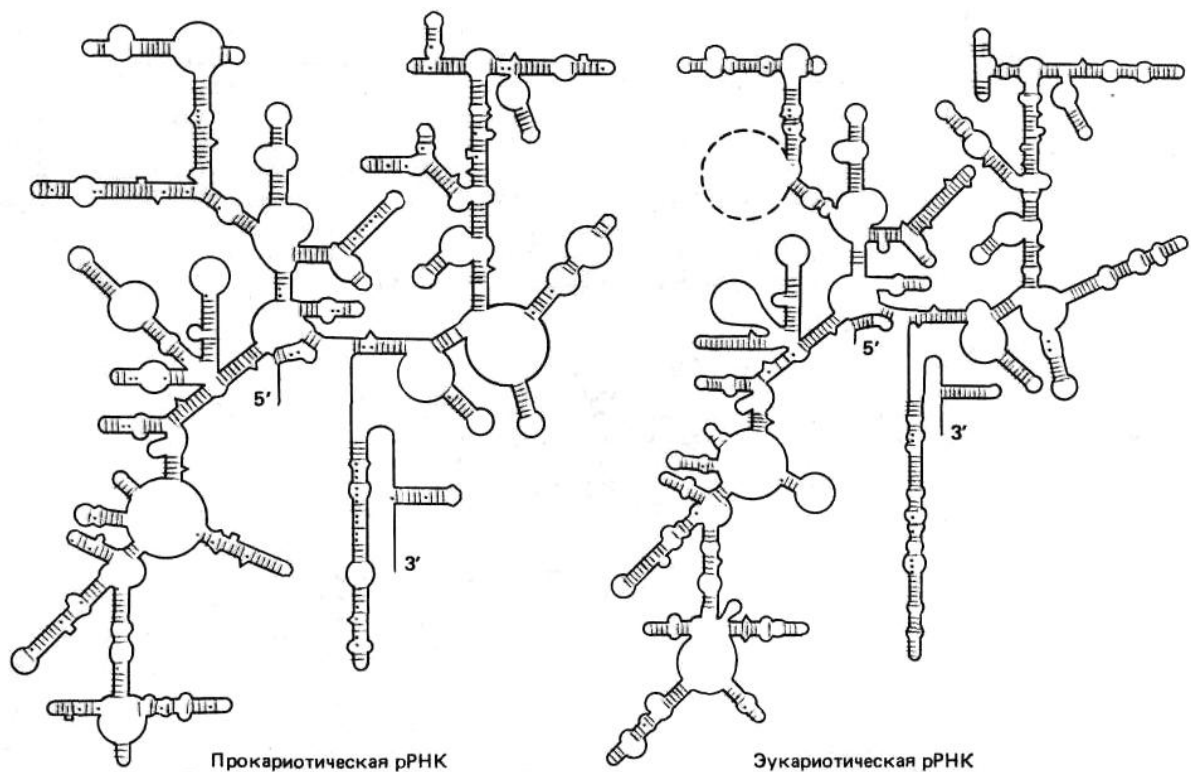


Рис. 19. Структура 16S-рРНК прокариотической и 18S-рРНК эукариотической клеток

Рибосомные РНК, а также образуемые ими субъединицы рибосом принято обозначать по их константе седиментации (S). Седиментация (от лат. *sedimentum* – осадок) – оседание частиц, взвешенных в жидкости, при центрифугировании. Под действием центробежных сил, намного превосходящих силу тяжести, даже сравнительно небольшие макромолекулы, такие как тРНК, разделяются и распределяются в строгом соответствии со своими размерами. Измерение коэффициента седиментации макромолекулярных комплексов обычно используют для определения их общей массы и количества входящих в их состав субъединиц.

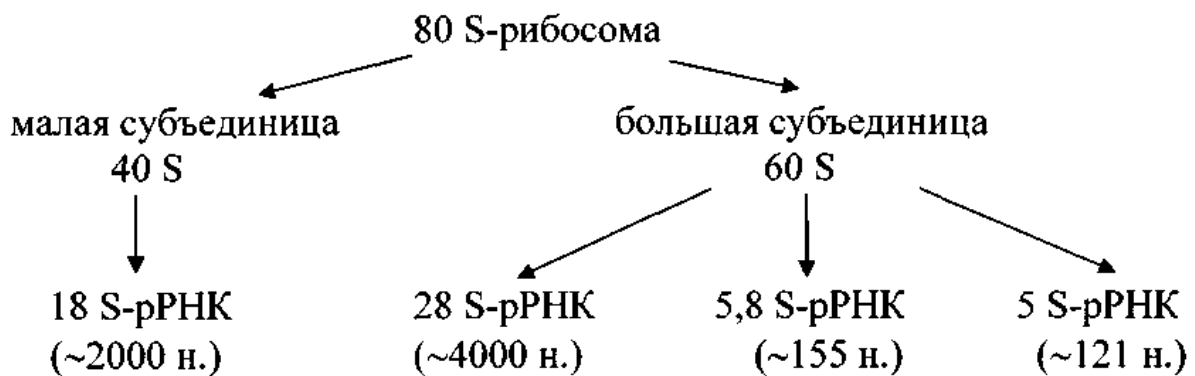


Рис. 20. Состав цитоплазматической рибосомы эукариот (в скобках указано количество нуклеотидов в цепи рРНК)

Размеры молекул рРНК в рибосомных субъединицах у разных организмов варьируют (рис. 20), но сложная ее структура остается относительно постоянной. Кроме рРНК в состав рибосомы входит значительное число белков, но многие из них, по-видимому, не являются необходимыми для функционирования рибосом. Можно предположить, что именно молекулы РНК, а не белковые молекулы катализируют многие реакции, протекающие на рибосомах. Рибосомные белки при этом лишь усиливают функции рРНК.

Функции РНК

РНК многофункциональна. К ее основным функциям относятся:

1. Передача наследственной информации о структуре белка от ДНК к белоксинтезирующему аппарату клеток (мРНК).

2. Формирование структуры рибосом (рРНК).
3. Специфическое связывание и перенос аминокислот к рибосомам (тРНК).

Вместе с тем РНК выполняет ряд других функций:

- участвует в репликации ДНК, выступая в роли затравок (праймеров), необходимых для инициации синтеза комплементарных цепей ДНК;
- является матричной молекулой в процессе обратной транскрипции (биосинтезе ДНК на матрице РНК) и при собственной репликации у РНК-содержащих вирусов и фагов; матричные свойства РНК реализуются также в процессе наращивания теломерных повторов в молекулах ДНК;
- осуществляет специфический катализ химических реакций в клетке.

В 1982-1983 гг. в лабораториях Т. Чека и С. Олтмана (США) было сделано сенсационное открытие, осуществившее революцию в биохимии и молекулярной биологии: показано, что РНК может быть специфическим катализатором биохимических реакций. В течение всей предшествующей истории биохимии на протяжении десятилетий утверждалось, что биохимический катализ – функция исключительно белков-ферментов. По аналогии с белками-ферментами – *энзимами* – каталитические РНК были названы *рибозимами*. В настоящее время рибосому принято рассматривать как рибозим. Все имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют о том, что синтез полипептидной цепи белка в рибосоме катализируется рибосомной РНК, а не рибосомными белками.

Концепция «Мир РНК»

Открытие многофункциональности РНК, ее каталитических функций привело к созданию концепции «Мир РНК» – концепции мира, который, вероятно, возник и существовал задолго до оформления ныне существующего «ДНК-белкового мира». По ряду причин именно РНК, а не ДНК могла представлять собой первичный генетический материал:

- *во-первых*, и в химическом синтезе, и в биохимических реакциях рибонуклеотиды предшествуют дезоксирибонуклеотидам; дезоксирибонуклеотиды – продукты модификации рибонуклеотидов;

- *во-вторых*, в самых древних, универсальных процессах жизненно-го метаболизма широко представлены именно рибонуклеотиды, а не дезоксирибонуклеотиды, включая основные энергетические носители (АТФ и т. п.);

- *в-третьих*, репликация РНК может происходить без какого бы то ни было участия ДНК, а механизм редупликации ДНК даже в современном живом мире требует обязательного участия РНК-затравки в инициации синтеза цепи ДНК;

- *в-четвертых*, обладая всеми теми же матричными и генетическими функциями, что и ДНК, РНК способна также к выполнению ряда функций, присущих белкам, включая катализ химических реакций.

Таким образом, имеются все основания рассматривать ДНК как более позднее эволюционное приобретение – модификацию РНК, специализированную для выполнения функции воспроизведения и хранения уникальных копий генов в составе клеточного генома без непосредственного участия в биосинтезе белков.

2. ОСНОВНЫЕ МАТРИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ

2.1. Репликация ДНК

Репликация ДНК обеспечивает воспроизведение наследственной информации при образовании новых клеток.

Основные принципы репликации ДНК

1. Субстратами, из которых синтезируются новые цепи ДНК, являются дезоксирибонуклеозид**три**фосфаты (дНТФ), а не дезоксирибонуклеозид**моно**-фосфаты (дНМФ).

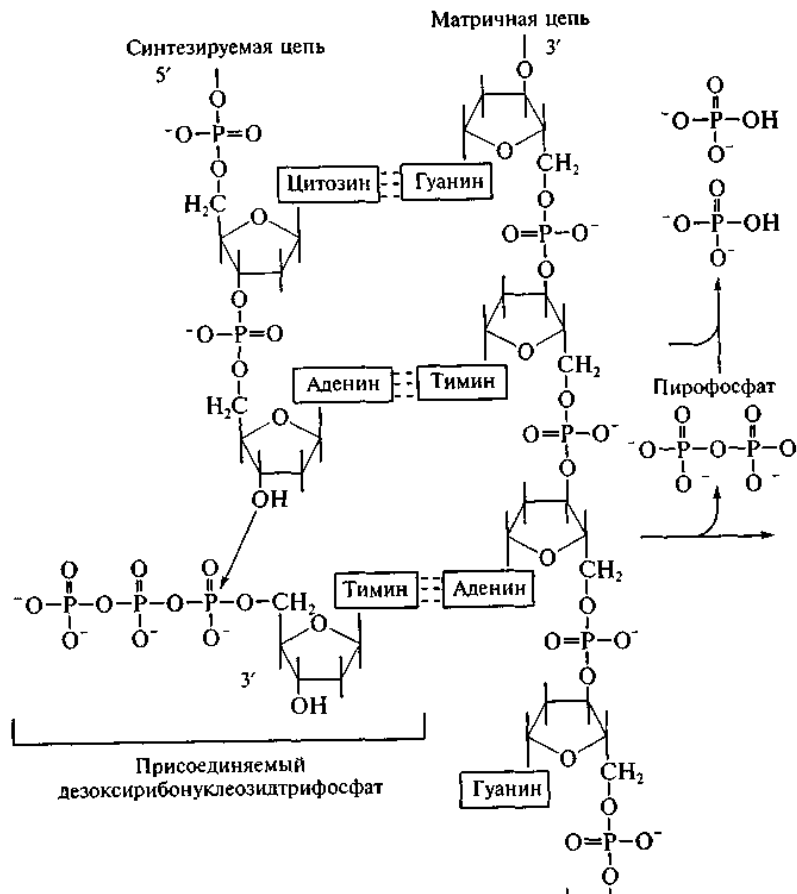


Рис. 21. Присоединение дезоксирибонуклеозидтрифосфата к синтезируемой цепи ДНК при репликации

В ходе включения в цепь ДНК от каждого нуклеотида отщепляется два фосфатных остатка в виде пирофосфата, который вскоре гидролизуется до фосфатов (рис. 21). Использование именно дНТФ, а не дНМФ объяс-

няется энергетическими причинами. Образование межнуклеотидной связи требует энергии, ее источником служит разрыв межфосфатной связи.

2. Репликация ДНК – матричный процесс: каждая дочерняя цепь ДНК строится, используя в качестве матрицы исходную (родительскую) ДНК. В основе такого построения – принцип комплементарности: из четырех возможных нуклеотидов в состав растущей цепи включается в данный момент тот, который комплементарен нуклеотиду родительской цепи.

3. Репликация – процесс симметричный: матрицами служат обе цепи родительской ДНК. Также его можно назвать *полуконсервативным*: по завершении репликации исходные молекулы ДНК оказываются наполовину обновленными. В каждой из дочерних молекул одна цепь – родительская, а вторая – вновь синтезированная.

4. Удлинение цепи ДНК всегда происходит в направлении *от 5'-конца к 3'-концу*, т. е. очередной нуклеотид присоединяется к 3'-концу растущей цепи. Синтезируемая цепь антипараллельна матричной цепи. Следовательно, последняя считывается в направлении $3' \rightarrow 5'$.

Особенности репликации

1. Для эукариотических клеток характерно наличие множества точек начала репликации. Одновременное удвоение ДНК во многих участках значительно сокращает продолжительность всего процесса.

Точка начала репликации имеет специфическую последовательность оснований, богатую парами А – Т, что, вероятно, облегчает разделение цепей. Отрезок ДНК, репликация которого протекает под контролем одной точки начала репликации, образует *репликон*. В каждом репликоне присутствуют точка инициации (*область начала репликации*, от англ. replication origin – *ori*) и точка окончания (*terminalis*).

2. Репликация распространяется в обе стороны от каждой точки начала репликации. При этом образуются две *репликативные вилки*, движущиеся в противоположных направлениях (ранняя стадия репликации, рис. 22). Между репликативными вилками появляется постепенно расширяющийся «глазок»: это уж реплицированные отделы ДНК. В итоге соседние зоны репликации («глазки») сливаются, и вся молекула ДНК оказывается удвоенной (поздняя стадия репликации, рис. 22).

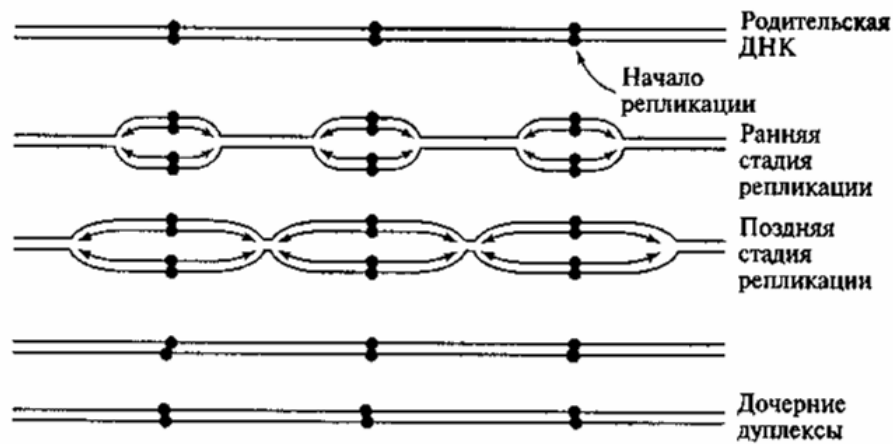


Рис. 22. Множественная двунаправленная репликация эукариотической ДНК

3. Движение репликативной вилки сопровождается одновременным считыванием двух матричных цепей. Поскольку синтез дочерних цепей ДНК осуществляется антипараллельно матричным и всегда в направлении $5' \rightarrow 3'$, то лишь одна дочерняя цепь ДНК будет синтезироваться непрерывно. Эта цепь называется *ведущей* или лидирующей. Направление ее синтеза совпадает с направлением расплетания двойной спирали (рис. 23). На второй матричной цепи ДНК синтезируется сравнительно короткими фрагментами, названными *фрагментами Оказаки* (1000-2000 нуклеотидов у прокариот и 100-200 нуклеотидов в реплицирующейся ДНК эукариот). Синтез каждого фрагмента Оказаки также идет в направлении $5' \rightarrow 3'$. В виде фрагментов Оказаки синтезируется та цепь, направление образования которой противоположно движению соответствующей репликативной вилки. Эта цепь называется *отстающей* или запаздывающей.

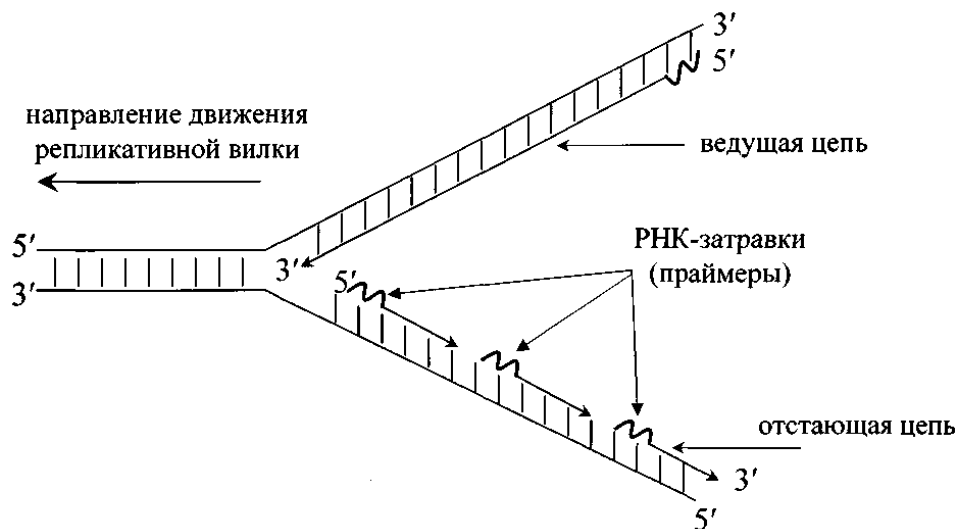


Рис. 23. Репликативная вилка

4. Образованию каждого нового фрагмента ДНК (как длинного фрагмента ведущей цепи, так и любого из фрагментов Оказаки отстающей цепи) предшествует синтез короткой последовательности РНК-затравки (праймаера) из 10-15 нуклеотидов. Основной фермент, синтезирующий ДНК (ДНК-полимераза), не может начинать процесс «с нуля», а лишь достраивает 3'-конец уже имеющейся нуклеотидной последовательности. В противоположность этому, фермент ДНК-праймаза такой способностью обладает. Через некоторое время РНК-затравки удаляются и образовавшиеся бреши застраиваются ДНК-полимеразой. В дальнейшем все многочисленные фрагменты ДНК, образованные на одной родительской цепи, сшиваются специальным ферментом ДНК-лигазой в одну непрерывную цепь.

Ферменты, участвующие в репликации ДНК

Процесс репликации осуществляется сложным ферментным комплексом, включающим 15-20 белков, которые условно разделяют на три группы.

1. Белки, подготавливающие родительскую ДНК к репликации

а) Узнающие (инициирующие) белки связываются со специфической последовательностью нуклеотидов в точке начала репликации и участвуют в присоединении к цепи ДНК всего комплекса ферментов репликации.

б) ДНК-хеликаза (от англ. helix – спираль) обеспечивает расплетание двойной спирали родительской ДНК в области репликативной вилки. Родительская ДНК разделяется на одноцепочечные участки, при этом затрачивается энергия гидролиза АТФ:

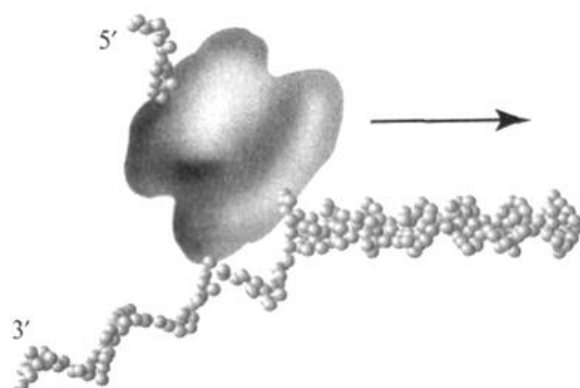


Рис. 24. Схема расплетания двойной спирали ДНК-хеликазой

2 молекулы АТФ на разделение 1 пары нуклеотидов. Хеликаза, имеющая кольцевую структуру, однонаправленно перемещается по одной из цепей ДНК, расплетая перед собой двойную спираль, в результате чего возникает репликационная вилка (рис. 24). Вероятно, одновременно проис-

ходит вытеснение данного участка ДНК из связи с гистонами и другими хромосомными белками. Хеликазы часто функционируют в составе комплекса, осуществляющего перемещение репликативной вилки и репликацию расплетенных цепей.

в) Белки, связывающиеся с одноцепочечной ДНК (SSB-белки – **Single Strand Binding Proteins**) обладают повышенным сродством к одноцепочечным участкам ДНК и стабилизируют их в таком состоянии. Роль SSB-белка в репликации, по-видимому, состоит в том, чтобы расправить ДНК и удалить возможные элементы вторичной структуры, которые могли бы образоваться в самокомплементарных участках ДНК. Связывание одноцепочечной ДНК с SSB-белком стимулирует ДНК-полимеразу и повышает точность ее работы.

г) Топоизомеразы. Каждая молекула ДНК зафиксирована в ядерном матриксе, поэтому она не может свободно вращаться при расплетании определенного участка. Это вызывает суперспирализацию (увеличивается количество оборотов на отрезке ДНК) и блокирует дальнейшее расплетание двойной спирали. Топоизомеразы решают названную топологическую проблему путем внесения одноцепочечных (топоизомераза I) или двухцепочечных (топоизомераза II) разрывов с последующим их восстановлением (рис. 25).

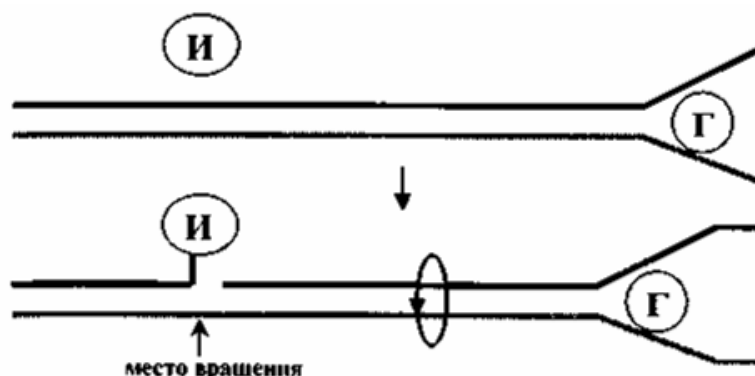


Рис. 25. Действие топоизомеразы I

2. Ферменты полимеризации

а) ДНК-праймаза синтезирует короткую РНК-затравку (праймер). ДНК-праймаза может быть отдельным ферментом (как у бактерий) или входить в качестве субъединицы в ДНК-полимеразу (как у α -ДНК-полимеразы эукариот). У некоторых прокариот (*E. coli*) праймаза образует

комплекс с хеликазой, называемый праймосомой. Праймосома в свою очередь является компонентом еще более сложного комплекса – реплисомы, осуществляющей процесс полной репликации.

б) ДНК-полимеразы осуществляют комплементарное копирование одноцепочечной родительской ДНК. Про- и эукариотические ДНК-полимеразы несколько различаются по физическим и ферментативным свойствам, однако механизм их действия в общих чертах одинаков.

ДНК полимеразы прокариот разделяют на три типа – I, II и III (названия даны в порядке их открытия).

ДНК-полимераза I состоит из одного полипептида (молекулярная масса 109 кДа) и характеризуется:

- полимеразной активностью, т. е. осуществляет присоединение очередных нуклеотидов к строящейся цепи ДНК;
- 3'-экзонуклеазной (корректирующей) активностью, которая осуществляется в тех случаях, когда произошла ошибка и в строящуюся цепь включен «неправильный» нуклеотид. Тогда фермент отщепляет с растущего 3'-конца последний нуклеотид, после чего полимеризация восстанавливается;
- 5'-экзонуклеазной активностью, т. е. осуществляет последовательное отщепление нуклеотидов с 5'-конца РНК-затравки предшествующего фрагмента (рис. 26). Функция ДНК-полимеразы I исчерпывается, когда растущий фрагмент доходит до дезоксирибонуклеотидов предыдущего фрагмента.

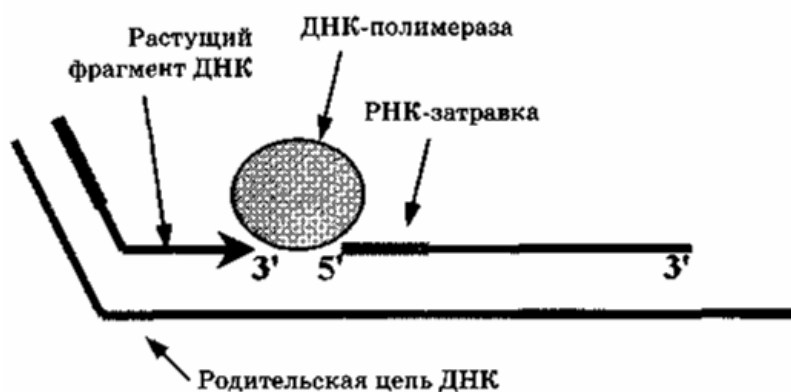


Рис. 26. ДНК-полимераза на «стыке» синтезируемых фрагментов

Фактически ДНК-полимераза I – это два фермента на одной полипептидной цепи: при мягком расщеплении этой ДНК-полимеразы трипсином можно получить большой и малый фрагменты с разными активностями

ми. Большой фрагмент ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) обладает полимеразной и 3'-экзонуклеазной (корректирующей) активностями, малый фрагмент несет 5'-экзонуклеазную активность (рис. 27). Подобные свойства ДНК-полимеразы I соответствуют ее функциям в клетке: эта полимераза удаляет различного рода дефекты в ДНК в ходе репарации и служит вспомогательной полимеразой при репликации ДНК, удаляя РНК-затравки. В целом ДНК-полимераза I имеет большее отношение к созреванию реплицирующейся ДНК, чем непосредственно к полимеразным процессам в репликативной вилке.

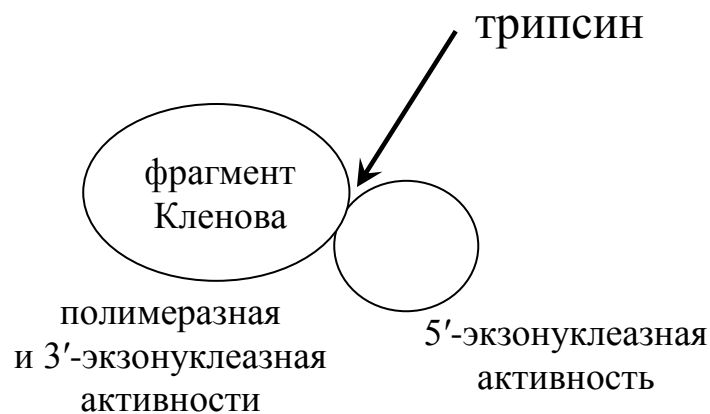


Рис. 27. Фрагменты полимеразы I

ДНК-полимераза II – одиночный полипептид с молекулярной массой около 120 кДа, обладающий полимеразной и 3'-экзонуклеазной активностями. Его содержание в клетке в несколько раз ниже, чем ДНК-полимеразы I. Эта полимераза лучше всего работает на двуцепочечной ДНК с одноцепочечными брешами в несколько десятков нуклеотидов длиной. Предполагают, что основной функцией ДНК-полимеразы II является достраивание поврежденных участков в молекуле ДНК, т. е. репарация ДНК.

ДНК-полимераза III играет главную роль в репликации ДНК у бактерий. В каждой клетке содержится только 10-20 копий фермента, примерно столько же, сколько репликативных вилок. ДНК-полимераза III состоит из нескольких субъединиц (α , β , γ , δ , δ' , ϵ , θ и т. д. – всего около 10) и обладает полимеразной и 3'-экзонуклеазной активностями. Репликацию проводит полная форма фермента – холофермент, содержащий все субъединицы. Полимеразную реакцию осуществляет каталитический кор (ядро) из α -, ϵ -

θ -субъединиц, остальные усиливают его действие. Отличительная черта ДНК-полимеразы III – исключительно высокая процессивность (скорость и точность синтеза новой цепи).

В клетках эукариотических организмов обнаружены шесть ДНК-полимераз: α , β , δ , ϵ , γ , ζ , из них первые четыре непосредственно участвуют в репликации хромосомной ДНК.

3. Ферменты, завершающие репликацию ДНК

а) ДНК-лигаза осуществляет «сшивание» соседних фрагментов ДНК, образуя межнуклеотидную (фосфодиэфирную связь). Реакция сопряжена с гидролизом молекулы АТФ.

б) Теломераза участвует в репликации теломерных (концевых) участков линейной ДНК.

ДНК-полимеразная система, описанная выше, оставляет недореплицированными 3'-концы материнских цепей ДНК, т. е. новые цепи оказываются укороченными с 5'-концов (рис. 28). Пропуск, образовавшийся после удаления крайнего праймера на 5'-конце дочерней цепи ДНК, заполнен быть не может, поскольку любая из полимераз не способна действовать «с нуля», а лишь удлиняет 3'-конец имеющегося полинуклеотида. В результате выступающие 3'-концевые участки материнской цепи ДНК остаются односторонними, недореплицированными. Подобные концы ДНК называют острыми, или оверхенгами. Каждый раунд репликации ДНК будет приводить к ее укорочению на 50-60 нуклеотидов.

На концах линейных хромосом эукариот находятся специализированные ДНК-белковые структуры – теломеры. У большинства организмов теломерная ДНК представлена многочисленными короткими повторами (у млекопитающих – ТТАГГГ), не несущими генетической информации. Поэтому, если происходит потеря некоторой части данных повторов, это не отражается на функционировании генома. В этом состоит, вероятно, основная функция теломер: они предохраняют от недорепликации более значимые области ДНК, т. е. выполняют роль своеобразного буфера.

Однако теломерные участки ДНК имеют и ряд специальных функций (участвуют в фиксации хромосом к ядерному матриксу, влияют на экспрессию генов и др.), поэтому их укорочение допустимо лишь до некоторого предела. Синтез теломерных участков, утраченных в результате «концевой недорепликации», осуществляет фермент теломераза. К 3'-

концу родительской цепи теломераза последовательно достраивает несколько десятков или сотен повторов ТТАГГГ. Таким образом, фермент удлиняет не дочернюю укороченную цепь, а родительскую – более длинную (рис. 28). Роль матрицы для наращивания ДНК повторами выполняет РНК, связанная с теломеразой. Следовательно, теломераза выступает как обратная транскриптаза – фермент, осуществляющий синтез ДНК на РНК-матрице.

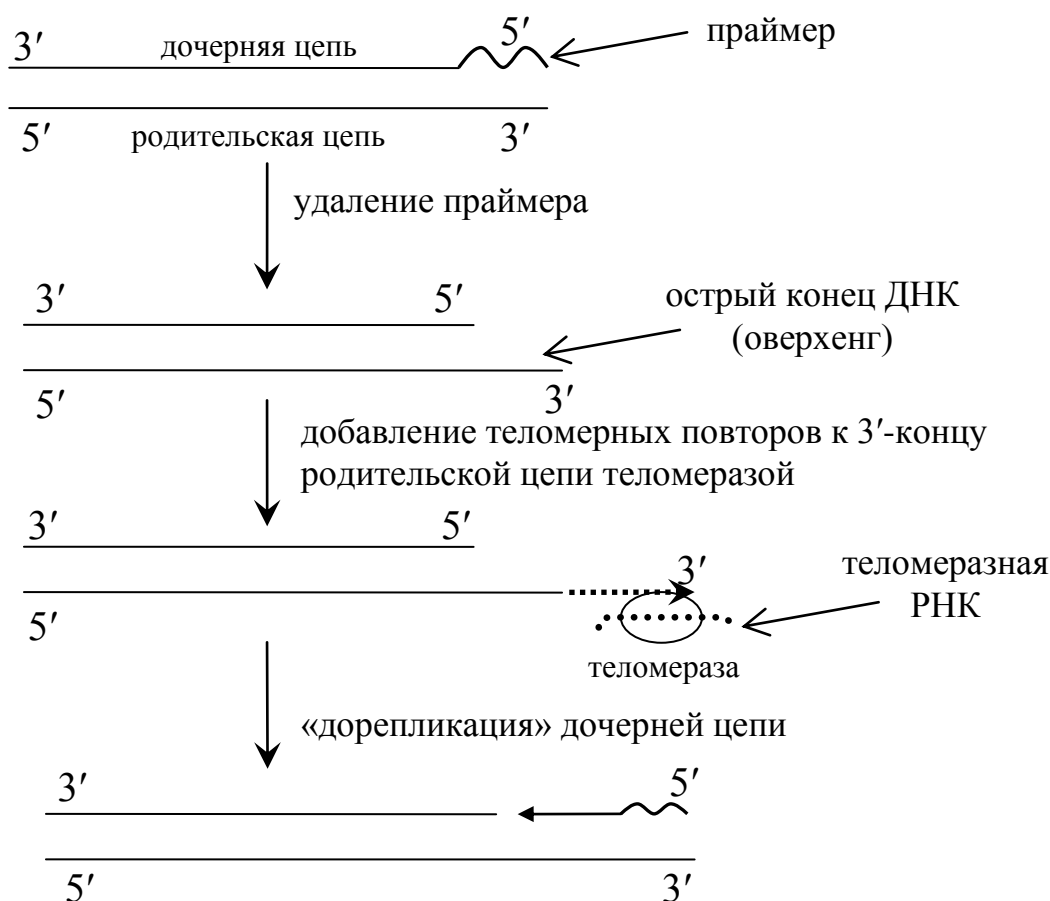


Рис. 28. Схема репликации теломерного участка ДНК с участием теломеразы

Значительно удлиненная родительская цепь становится способной выступать в качестве матричной для образования еще одного фрагмента Оказки дочерней цепи. При этом репликация идет в обычном порядке: праймаза синтезирует РНК-затравку, ДНК-полимераза последовательно присоединяет к затравке дезоксирибонуклеотиды – комплементарно теломерным повторам родительской цепи. Рост фрагмента происходит в обычном направлении $5' \rightarrow 3'$. «Сшивание» фрагмента с цепью осуществляет ДНК-лигаза, экзонуклеаза удаляет РНК-затравку на новой цепи. В итоге

конец двухцепочечной ДНК приобретает ту же конфигурацию, что и до действия теломеразы (дочерняя цепь немного короче старой), однако становится длиннее на серию теломерных повторов. Это основной способ восстановления длины теломер, обнаруженный практически у всех исследованных организмов.

Высокая теломеразная активность наблюдается в эмбриональных тканях, стволовых и половых клетках (табл. 2). При дифференциации зародышевых или стволовых клеток активность теломеразы падает и теломеры укорачиваются. С достижением критической величины теломерной ДНК запускаются процессы остановки клеточного цикла. Дифференцированные клетки делятся ограниченное число раз. Это явление получило название «лимита Хейфлика».

Таблица 2

Длина теломерной ДНК и активность теломеразы в клетках человека (Богданов А.А., 1998)

Тип клеток	Длина теломерной ДНК, тыс. п.н.	Теломеразная активность
Половые	15-20	Высокая
Соматические	10-12 при рождении, уменьшается с возрастом	Отсутствует
Раковые	4-6, 10-15	Присутствует в 80% случаев

2.2. Транскрипция

Транскрипцией называют биосинтез РНК на матрице ДНК. Это первая стадия реализации генетической информации, в процессе которой определенные участки нуклеотидной последовательности ДНК «переписываются» в комплементарные одноцепочечные молекулы РНК. В результате транскрипции образуются мРНК, кодирующие аминокислотные последовательности белков, тРНК, рРНК и другие виды РНК, выполняющие структурные, регуляторные и каталитические функции.

Принципы транскрипции

Транскрипция во многом сходна с репликацией. В основе механизма копирования при транскрипции лежит фундаментальный принцип комплементарности азотистых оснований полинуклеотидных цепей ДНК и РНК. Как и при синтезе ДНК, субстратами синтеза РНК являются рибонуклеозид**три**фосфаты. В ходе включения в строящуюся цепь они теряют пирофосфатные остатки, что обеспечивает процесс энергией. Еще одно сходство с синтезом ДНК состоит в направлении роста строящейся цепи: 5'→3', т. е. очередные нуклеотиды присоединяются к 3'-концу. Как и при всех матричных синтезах, строящаяся цепь антипараллельна матричной цепи ДНК.

Однако имеются и принципиальные отличия от синтеза ДНК. Транскрипция – ассиметричный процесс, в качестве матрицы используется лишь одна молекула ДНК, получившая название матричной или значащей. Синтез РНК не требует для своего начала никакой затравки. Процессу транскрипции подвергается одновременно не вся молекула ДНК, а только ее определенные участки – транскриптоны. Они ограничены двумя последовательностями, которые называются промотором (зона начала транскрипции) и терминатором (зона остановки транскрипции). Транскриптоны бактерий (опероны) обычно включают несколько структурных генов (цистронов). Поэтому синтезируемая на оперонах бактерий мРНК является полицистроновой и может быть использована для синтеза нескольких белков, в отличие от моноцистроновых мРНК эукариот, служащих матрицами для синтеза одного определенного белка.

РНК-полимеразы

Процесс транскрипции осуществляется с участием ферментов – РНК-полимераз, а также большой группы белков – регуляторов транскрипции.

У прокариот молекула РНК-полимеразы состоит из двух компонентов:

- *минимальной РНК-полимеразы, или «кор»-фермента* (от англ. *core* – сердцевина), содержащей все каталитические центры, участвующие в синтезе РНК;

- σ -субъединицы, необходимой для правильного присоединения фермента к промотору и отделяющейся от РНК-полимеразы после начала синтеза РНК.

Комплекс минимального (*core-*) фермента и σ -субъединицы называется *холоферментом*. *Core*-фермент имеет одинаковое сродство к любой последовательности нуклеотидов (рис. 29а). Только полный (*holo-*) фермент обладает высоким сродством к промотору, сродство к остальным случайным последовательностям ДНК у него снижено в 10 тыс. раз (рис. 29б).

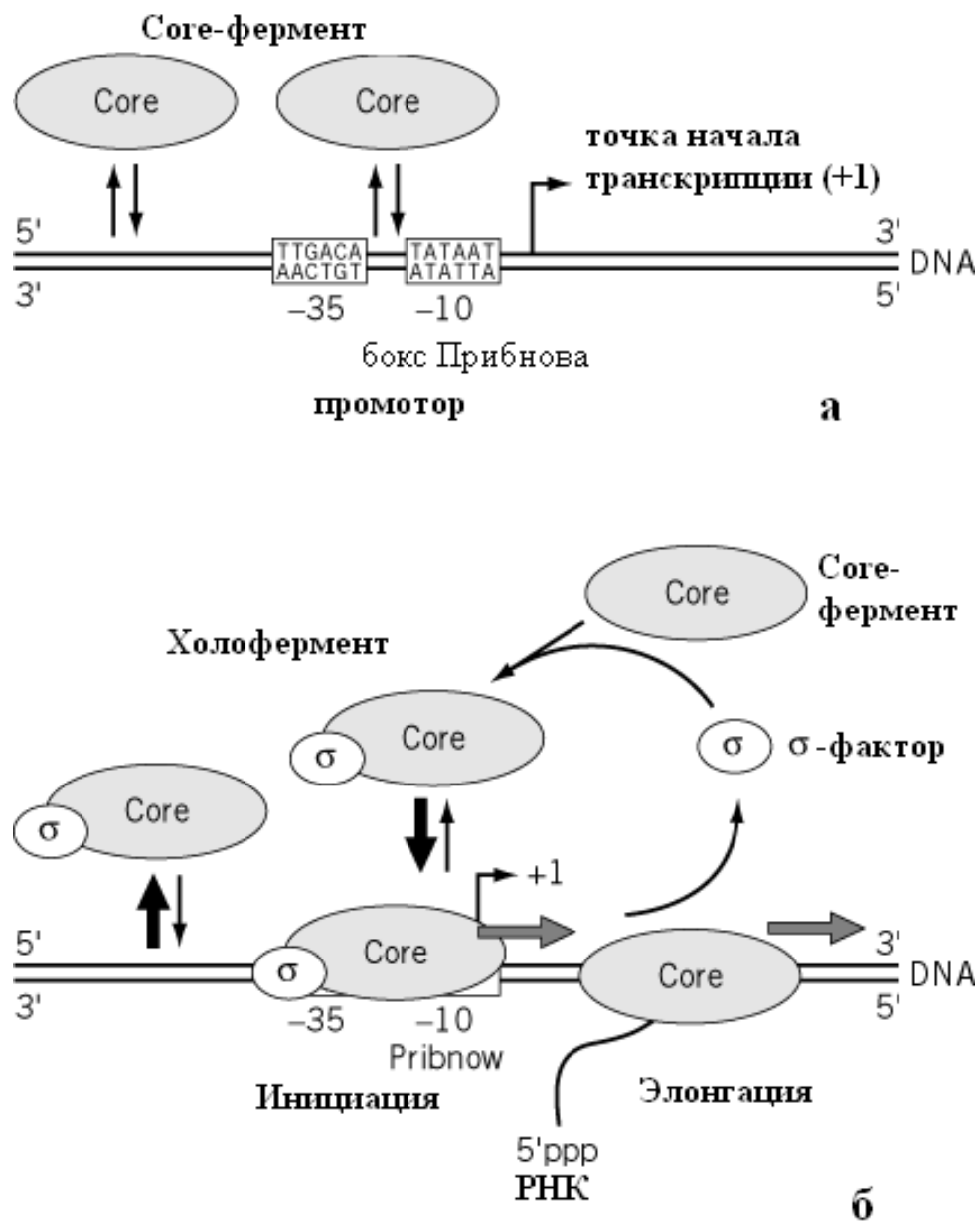


Рис. 29. Инициация транскрипции ДНК бактериальной РНК-полимеразой

Как только произошла инициация транскрипции, σ -фактор отделяется. Элонгация (продолжение синтеза РНК) и терминация (остановка транскрипции) осуществляются *core*-ферментом. Минимальная РНК-полимераза состоит из четырех субъединиц: двух идентичных α -субъединиц и неидентичных β - и β' -субъединиц.

В ядрах эукариот обнаружены три специализированные формы РНК-полимеразы:

- РНК-полимераза I синтезирует рибосомные РНК (28S и 18S);
- РНК-полимераза II – матричные РНК;
- РНК-полимераза III – транспортные и низкомолекулярные рибосомные РНК (5S).

Этапы транскрипции

1. Инициация – первый этап транскрипции, в ходе которого происходит связывание РНК-полимеразы с промотором и образование первой межнуклеотидной связи.

У бактерий холофермент РНК-полимераза непосредственно узнает определенные последовательности нуклеотидных пар в составе промотора: последовательность 5'-ТАТААТ-3' (расположена на расстоянии 10 нуклеотидов от точки начала транскрипции и называется боксом Прибнова) и последовательность 5'-ТТГАЦА-3' (удалена от точки начала транскрипции на 35 нуклеотидов). В некоторых оперонах, например в лактозном, необходимо предварительное взаимодействие с промотором дополнительного белка (*SAR* изменяет структуру промотора, резко повышая его сродство к РНК-полимеразе).

РНК-полимеразы эукариот не способны самостоятельно связываться с промоторами транскрибируемых генов. В присоединении к транскриптонам РНК-полимераз принимают участие общие факторы транскрипции (ТФ). Они отличаются от σ -факторов прокариот тем, что могут связываться с ДНК независимо от РНК-полимеразы. Полимеразы I, II и III требуют присутствия разных факторов транскрипции, обозначаемых ТФ I, ТФ II и ТФ III соответственно. Промоторы эукариот устроены более сложно, чем прокариотические, и состоят из нескольких элементов. Из них самым близ-

ким к точке начала транскрипции является ТАТА-домен, называемый также доменом Хогнесса. Затем следуют домены ЦААТ и ГЦ. Промоторы эукариот могут содержать различные комбинации этих элементов, но ни один из них не встречается во всех промоторах. Домен ЦААТ играет существенную роль в инициации транскрипции, ТАТА и ГЦ, по-видимому, выполняют вспомогательные функции.

Связавшись с промотором, РНК-полимераза вызывает локальную денатурацию ДНК, т. е. разделение цепей ДНК на протяжении примерно 15 нуклеотидных пар. Образуется транскрипционный «глазок». Первым в строящуюся цепь РНК включается пуриновый нуклеотид – АТФ или ГТФ, при этом все три его фосфатных остатка сохраняются. После образования первой фосфодиэфирной связи σ -фактор у бактерий теряет связь с ферментом, и оставшийся *core*-фермент начинает перемещаться по ДНК. РНК-полимераза эукариот после инициации транскрипции также теряет связь с транскрипционными факторами и перемещается по ДНК самостоятельно.

2. Элонгация – последовательное удлинение растущей цепи РНК. Перемещаясь вдоль двойной спирали ДНК, РНК-полимераза непрерывно раскручивает спираль впереди того участка, где происходит синтез РНК. На короткое время образуется так называемый открытый комплекс, внутри которого возникает РНК-ДНК-спираль длиной около 20 нуклеотидов (рис. 30). Затем фермент (с помощью специального сайта) вновь закручивает

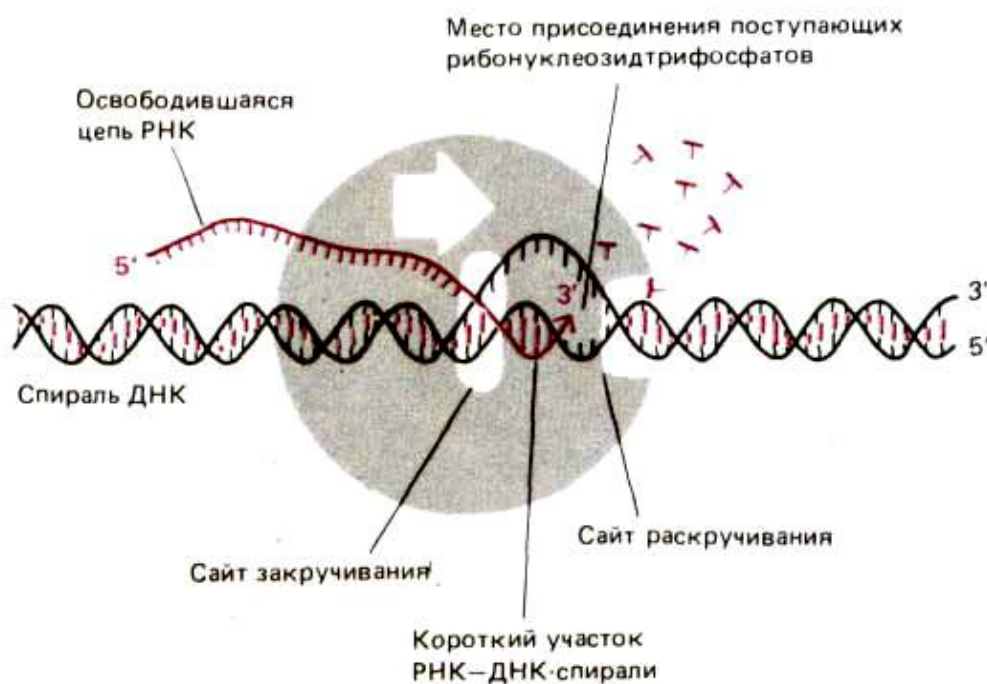


Рис. 30. Элонгация транскрипции

ДНК позади участка полимеризации. РНК-транскрипт выводится из комплекса через особый канал, свойственный РНК-полимеразе.

Скорость синтеза РНК у бактерий составляет около 30 нуклеотидов в секунду, однако она не постоянна и может несколько снижаться. Такие периоды называют паузами транскрипции.

Показано, что еще до образования гибрида РНК-ДНК РНК-полимераза переводит ДНК из В-формы в А-форму. В ней плоскости азотистых оснований не перпендикулярны оси спирали, а наклонены на 20° к перпендикуляру. Вероятно, это облегчает разъединение двух соседних азотистых оснований в цепи ДНК. Параметры РНК-ДНК-спирали также практически полностью идентичны характеристикам А-формы ДНК.

3. Терминация (окончание транскрипции) определяется особой нуклеотидной последовательностью ДНК, расположенной в зоне терминатора оперона. В бактериальных оперонах выделяют два типа терминаторов:

- ρ (*rho*)-независимые терминаторы (I типа);
- ρ -зависимые терминаторы (II типа).

ρ -независимые терминаторы состоят из последовательностей, представляющих собой инвертированный повтор – палиндром (рис. 31), и рас-

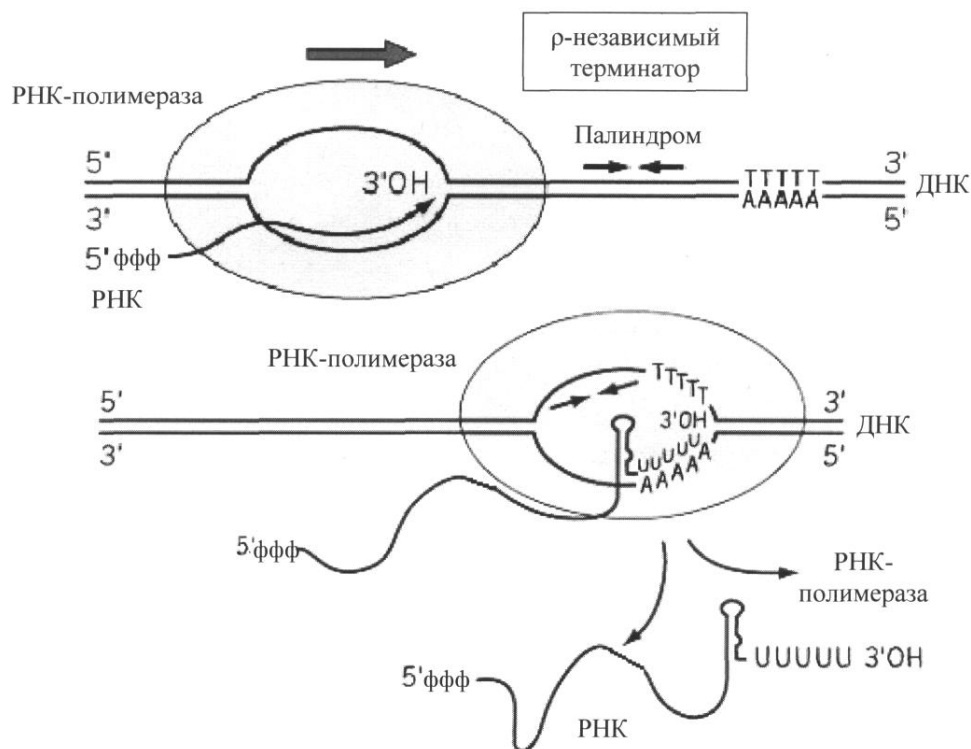


Рис. 31. ρ -независимая терминация транскрипции у бактерий

полагаются за 16-20 нуклеотидных пар от точки терминации. Палиндромы (последовательности, которые читаются одинаково слева направо и справа налево) ρ -независимых терминаторов содержат большое количество Г-Ц-повторов. За этим участком на матричной цепи расположена олиго(А)-последовательность (4-8 адениловых нуклеотидов подряд). Транскрипция в области палиндрома приводит к тому, что в получившемся РНК-транскрипте быстро образуется устойчивый элемент вторичной структуры – «шпилька» – спирализованная область, содержащая комплементарные Г-Ц-пары. «Шпилька» нарушает прочность связи ДНК-РНК в открытом комплексе. Кроме этого транскрипция олиго(А)-последовательности в матричной цепи ведет к образованию участка ДНК-РНК-гибрида, составленного из непрочных А-У пар, что также способствует разрушению контакта между ДНК и РНК.

ρ -зависимые терминаторы. Одним из факторов транскрипции прокариот является белок ρ . ρ -фактор – это имеющий четвертичную структуру белок, обладающий АТФ-азной активностью. Он способен связываться с 5'-концом синтезируемой РНК длиной около 50 нуклеотидов. ρ -фактор движется по РНК с такой же скоростью, с которой РНК-полимераза движется по ДНК. Вследствие того что в терминаторе много Г-Ц-пар (с тремя водородными связями), РНК-полимераза в области терминатора замедляет ход, ρ -фактор ее догоняет, изменяет конформацию фермента, и синтез РНК прекращается (рис. 32).

На терминаторах обоих типов происходят три ключевых события:

- останавливается синтез РНК;
- цепь РНК освобождается от ДНК;
- РНК-полимераза освобождается от ДНК.

Процессинг РНК

Первичные РНК (предшественники РНК, гетерогенные ядерные РНК), образующиеся в результате транскрипции, в большинстве случаев представляют собой функционально неактивные молекулы. Поэтому сразу после транскрипции они претерпевают ряд модификаций и превращаются в зрелые РНК. Созревание первичных транскриптов называется *процессингом*.

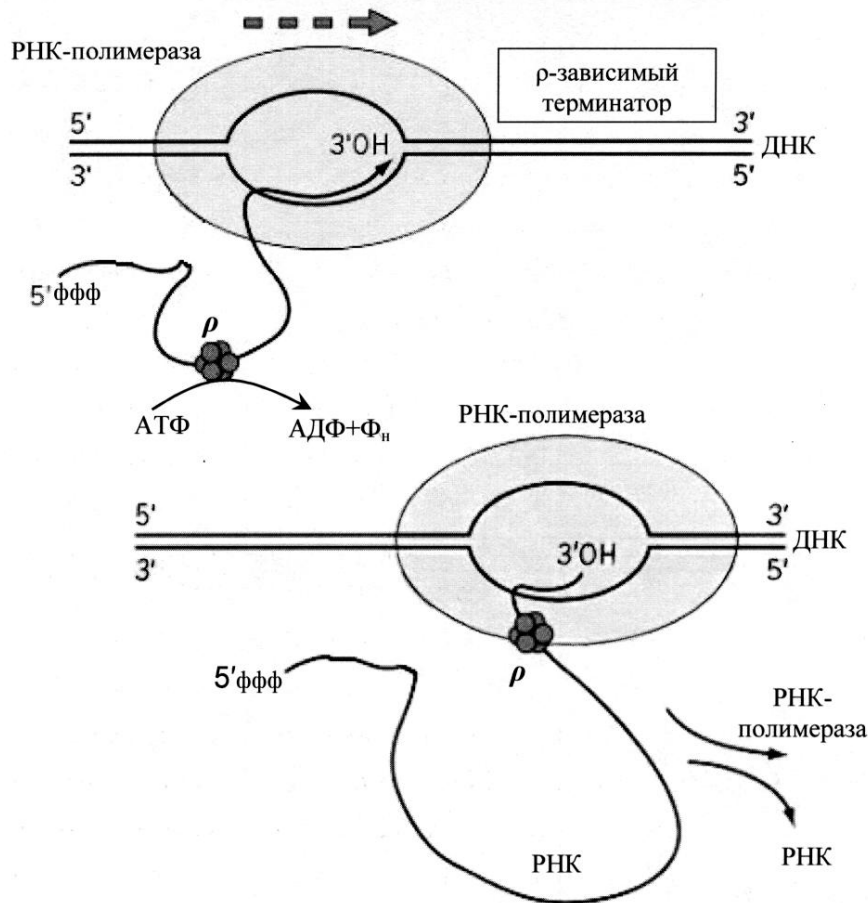


Рис. 32. ρ -зависимая терминация транскрипции у бактерий

Для бактериальных клеток процессинг предшественников мРНК не характерен и необходим только при образовании зрелых молекул рРНК и тРНК.

Процессинг РНК у эукариот представляет собой достаточно сложный и тонко организованный процесс, непосредственно влияющий на регуляцию экспрессии генетического материала. Наиболее детально изучен процессинг мРНК эукариот, который включает:

- сплайсинг – вырезание из пре-мРНК некодирующих областей (интронов) и сшивание кодирующих структур белка участков (экзонов);
- кэпирование – образование на 5'-конце мРНК особой структуры – кэпа – происходит вскоре после начала синтеза мРНК и осуществляется с участием ГТФ;
- полиаденилирование – образование на 3'-конце поли(А)-фрагмента, содержащего около 200 адениловых нуклеотидов (рис. 33).

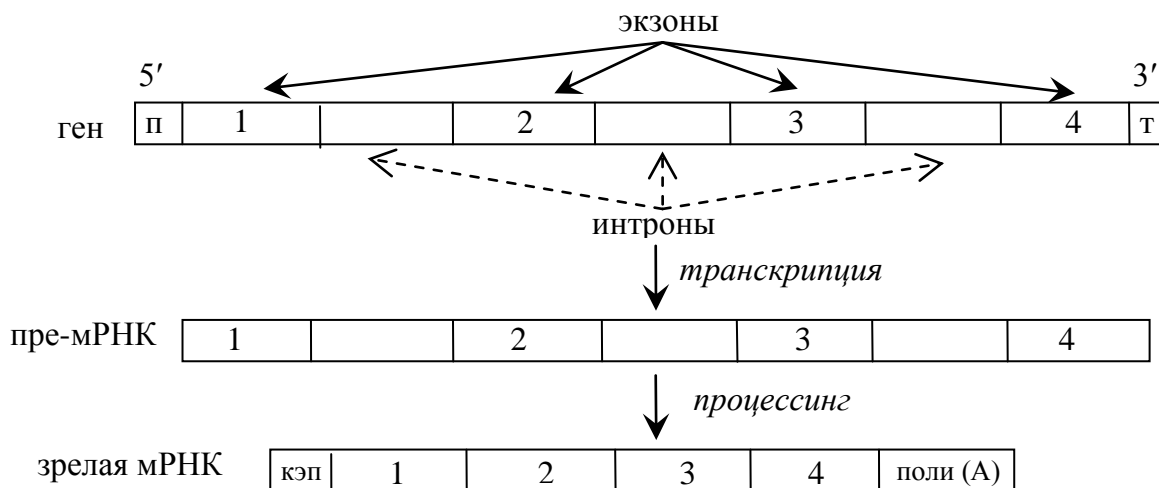


Рис. 33. Процессинг мРНК

Механизм сплайсинга

В сплайсинге пре-мРНК эукариот принимает участие ряд белков, а также РНК особого вида – малые ядерные РНК (мяРНК). Различные мяРНК по принципу комплементарности связываются с пограничными участками интронов РНК. Для этого взаимодействия существенны определенные последовательности нуклеотидов в начале и конце интронов: так, интроны всегда начинаются с Г-У, а заканчиваются дуплетом А-Г. Малые ядерные РНК образуют комплекс с ферментами, катализирующими сплайсинг – *сплайосому*.

Первый разрыв пре-РНК происходит в области 5'-конца интрона, который связывается с одним из нуклеотидов в средней части того же интрона (рис. 34). Это приводит к образованию кольцевой (или, точнее, лассоподобной) структуры. Первая мяРНК диссоциирует, а ферментный комплекс перемещается к другой мяРНК, маркирующей 3'-конец интрона. Здесь происходит второй разрыв пре-РНК. Связь экзона 2 с интроном заменяется связью с экзонам 1.

Альтернативный сплайсинг

В ряде случаев возможно изменение хода сплайсинга и осуществление его по альтернативному варианту. В этом случае с одного гена считывается более одного типа мРНК. Альтернативный сплайсинг позволяет организму синтезировать разные по структуре и свойствам белки на базе одного гена. Такие гены кодируют семейства родственных белков, участ-

вующих в мышечных сокращениях, формировании цитоскелета, нервных волокон, пептидных гормонов и др.

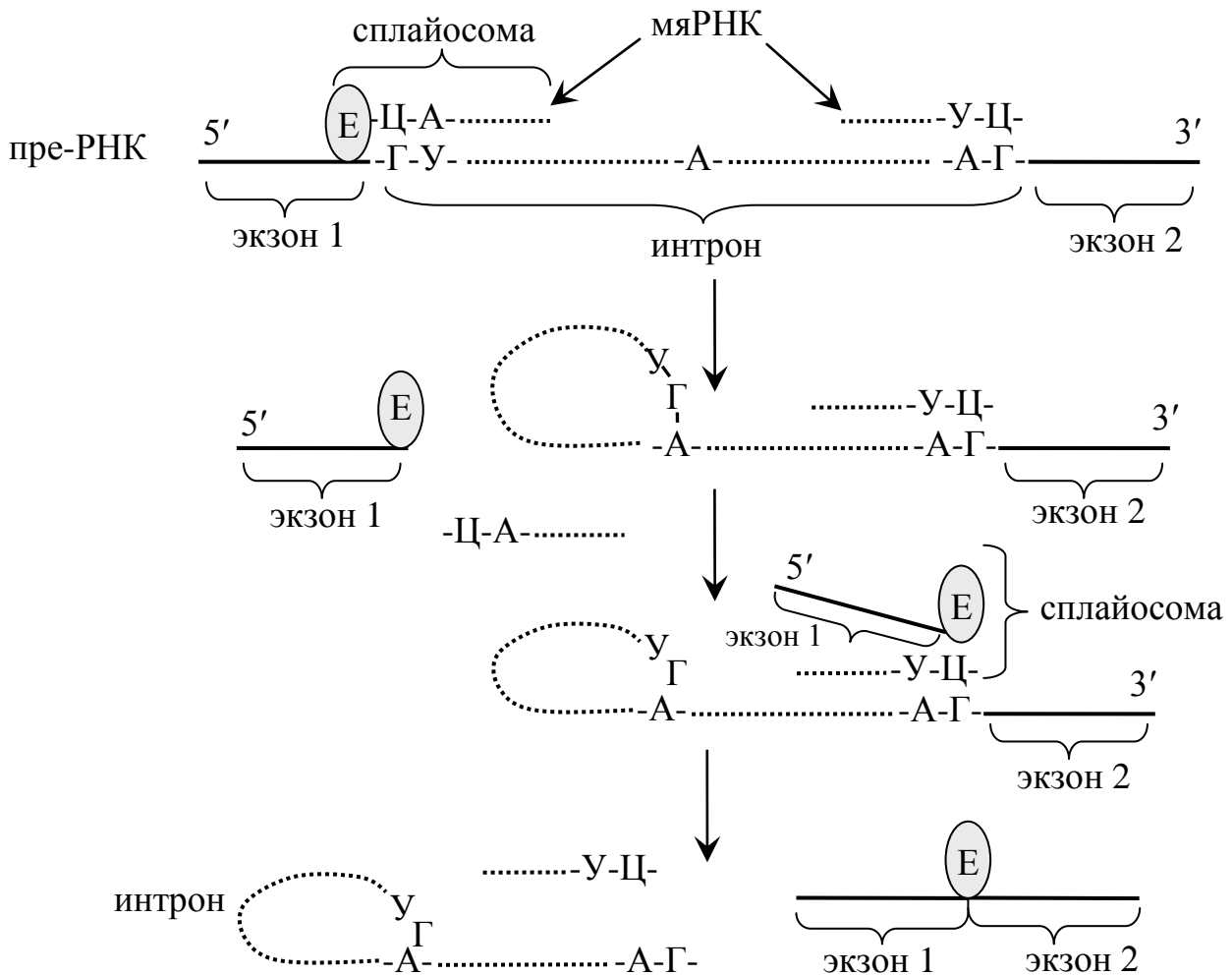


Рис. 34. Вероятный механизм спайсинга:
 E – ферментный комплекс (с нуклеазной и лигазной активностью)

Альтернативный сплайсинг мРНК включает три основных механизма:

1. Использование разных промоторов. При наличии в гене альтернативных промоторов разные типы РНК могут синтезироваться с разных сайтов инициации транскрипции. Альтернативный промотор – сложный промотор, состоящий по крайней мере из двух независимо функционирующих частей, расположенных перед разными экзонами одного гена. В этом случае образуются транскрипты, имеющие разные по длине 5'-концы и разное количество экзонов.

2. Изменение сайта полиаденилирования первичного транскрипта. В результате изменяются размеры и структура 3'-концевого участка пре-мРНК.

3. Соединение экзонов в различных комбинациях. При этом часть экзонов может не включаться в сплайсинг. Например, если ген содержит всего шесть экзонов (с 1-го по 6-й), в одном типе мРНК они могут располагаться в порядке 1,2,3,4,5,6, в других РНК порядок может быть иным, например 4,5,6,1,2,3, или 2,5,6, или 1,3,5.

Альтернативный сплайсинг обеспечивает тонкую регуляцию работы генов у эукариот, дифференцировку тканей, определяет развитие различных признаков, детерминированных одним геном. У человека около 1/3 всех генов может кодировать более одного белка, т. е. разные белки кодируются разными сочетаниями экзонов одного и того же гена. Наличие альтернативного сплайсинга может объяснить тот факт, что количество белков в организме человека в несколько раз больше, чем число белок-кодирующих генов.

2.3. Трансляция

Трансляция – процесс перевода генетической информации с последовательности нуклеотидов мРНК в последовательность аминокислот в молекуле полипептида. Трансляция осуществляется согласно правилам генетического кода, который имеет следующие особенности:

1. Код – триплетный, т. е. одну аминокислоту определяет три нуклеотида.

2. Код – однозначный (специфичный): каждый кодон обозначает только одну аминокислоту.

3. Код – непрерывный, т. е. отсутствуют сигналы, показывающие конец одного кодона и начало следующего.

4. Код – вырожденный, т. е. одной аминокислоте может соответствовать более одного кодона. Только две аминокислоты – метионин и триптофан – имеют по одному кодону. Лейцину и серину соответствует 6 кодонов, глицину и аланину – по 4 и т. д. Если аминокислота кодируется несколькими кодонами, то в большинстве случаев они различаются по третьей букве, т. е. по нуклеотиду на 3'-конце. Таким образом, специфичность каждого кодона определяется главным образом его первыми двумя нуклеотидами.

5. Код не перекрывается, т. е. один нуклеотид не может одновременно входить в два соседних триплета.

6. Генетический код содержит триплеты, обозначающие начало и окончание синтеза белка. АУГ – иницирующий кодон (кодирует метионин). УАА, УАГ, УГА – терминирующие кодоны, которые не кодируют ни одну из известных аминокислот и сигнализируют об окончании синтеза белка.

7. Генетический код универсален, т. е. одинаков у животных, растений, многих бактерий.

Подготовительные стадии

Подготовительные стадии трансляции включают:

- активацию аминокислот;
- присоединение аминокислот к тРНК.

Обе стадии осуществляются с помощью фермента – аминоацил-тРНК-синтетазы (АРС-азы, кодазы). Существует 20 видов таких ферментов – по числу аминокислот. В каждом случае фермент имеет два центра узнавания – для аминокислоты и тРНК (рис. 35).

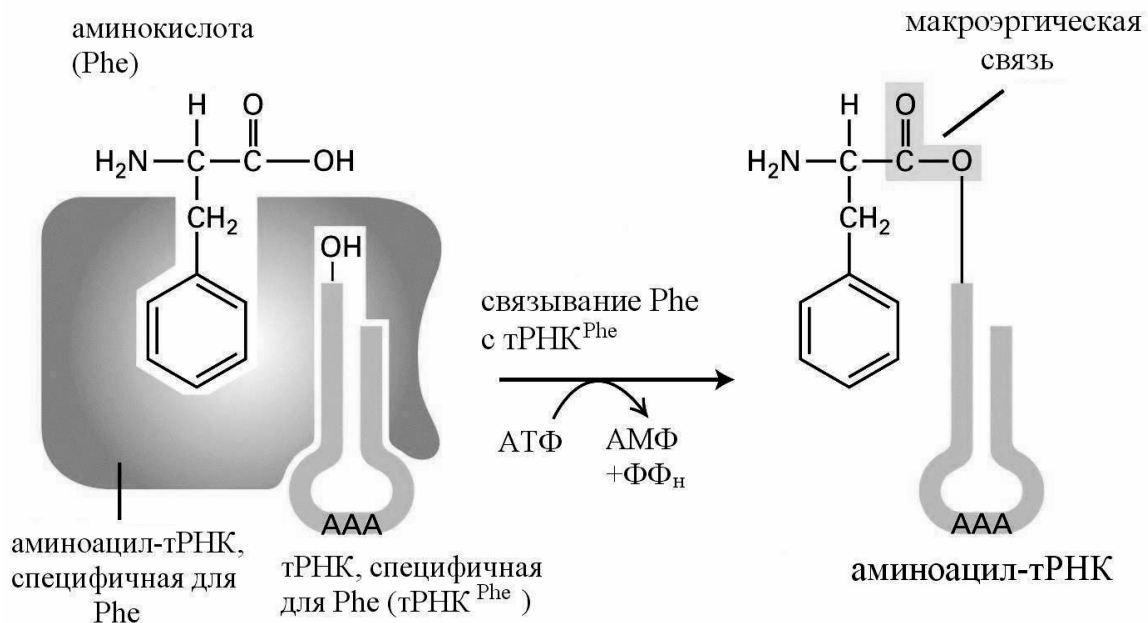


Рис. 35. Связывание аминокислоты (фенилаланина – Phe) с тРНК

В активном центре фермента аминокислота связывается с АТФ, лишь затем переносится на тРНК. Образование макроэргической связи между

аминокислотой и тРНК называется аминоацилированием, а образовавшийся комплекс – аминоацил-тРНК (aa-тРНК). Каждая тРНК может переносить к месту синтеза белка только одну из аминокислот. Для большей части аминокислот имеется несколько тРНК, которые называются изоакцепторными и обозначаются соответственно $\text{тРНК}_1^{\text{Phe}}$, $\text{тРНК}_2^{\text{Phe}}$ и т. д.

Этапы трансляции

Собственно процесс трансляции включает три фазы:

- инициацию;
- элонгацию;
- терминацию.

Инициация трансляции – начало синтеза полипептидной цепи, заключается в сборке белоксинтезирующей системы (активной рибосомы).

Функциональные центры рибосом

Каждая рибосома состоит из двух субчастиц: большой и малой. Форма субчастиц, их контактирующих поверхностей, достаточно сложная (рис. 36). На контактирующих поверхностях большой и малой субчастиц в небольших углублениях находятся центры связывания всех компонентов белоксинтезирующей системы (мРНК, пептидил-тРНК, очередная аминоацил-тРНК), а также центры, катализирующие образование пептидной связи и постепенное перемещение рибосомы относительно мРНК.



Рис. 36. Модель рибосомы *Escherichia coli* (Васильев В.Д., Институт белка РАН): слева – перекрывающаяся проекция: малая (30S) субчастица обращена к зрителю и закрывает собой часть большой (50S) субчастицы; справа – боковая проекция: к зрителю обращен боковой палочкообразный выступ большой (50S) субчастицы, а малая (30S) субчастица расположена сверху

Функциональные центры рибосом (рис. 37):

1. Центр связывания мРНК (М-центр). Образован участком 18S-рРНК, который комплементарен на протяжении 5-9 нуклеотидов 5'-нетранслируемому фрагменту мРНК. Расположен на малой субчастице рибосомы.

2. Пептидильный центр (П-центр). В начале процесса трансляции с пептидильным центром связывается иницирующая аа-тРНК. На последующих стадиях трансляции в пептидильном центре находится пептидил-тРНК, содержащая уже синтезированную часть пептидной цепи.

3. Аминоацильный центр (А-центр) – место связывания очередной аа-тРНК.

Аминоацильный и пептидильный центры расположены как на большой, так и на малой субчастицах рибосомы.

4. Каталитический (пептидилтрансферазный) центр (К-центр). Катализирует перенос пептидила из состава пептидил-тРНК на поступившую в амино-ацильный центр очередную аа-тРНК. Расположен на большой субчастице рибосомы.

Инициация трансляции у прокариот начинается со связывания мРНК в области 5'-нетранслируемого участка с малой субъединицей рибосомы. Иницирующий кодон (АУГ) оказывается на уровне пептидильного центра будущей рибосомы. Далее за счет комплементарного взаимодействия с этим кодоном происходит связывание иницирующей аа-тРНК. У прокариот иницирующей аа-тРНК является формилметиониновая аа-тРНК – fMet-тРНК_i^{fMet} (рис. 38). Блокирование аминогруппы метионина формильным остатком препятствует включению такой аминокислоты во внутренние участки цепи, но в то же время позволяет fMet-тРНК_i^{fMet} связываться с иницирующим кодоном мРНК

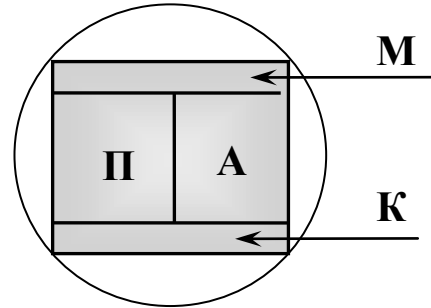


Рис. 37. Проекция функциональных центров рибосомы на плоскость между субчастицами

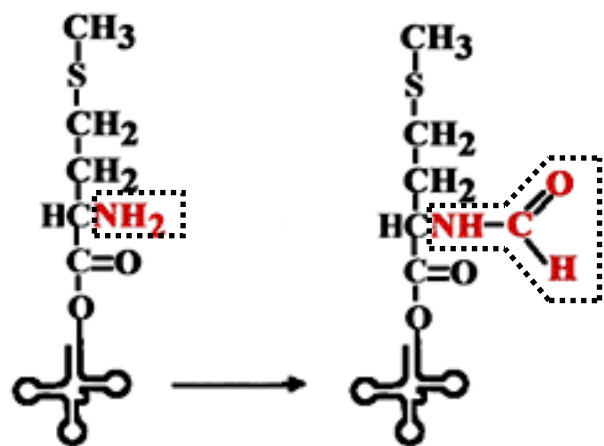


Рис. 38. Формилирование иницирующей аа-тРНК у прокариот

(АУГ). Иницирующая аа-тРНК, взаимодействуя с пептидным центром большой субъединицы, вызывает связывание последней.

У прокариот инициация осуществляется при участии трех специфических белков – факторов инициации (IF – Initiation Factors). IF-3, присоединяясь к малой субчастице рибосомы, препятствует преждевременному связыванию большой субчастицы и, с другой стороны, способствует связыванию мРНК. IF-2 участвует в связывании иницирующей аа-тРНК. Вероятно, этот фактор образует комплекс с аа-тРНК еще вне рибосомы, причем в состав комплекса входит ГТФ. В результате образуется так называемый *инициаторный комплекс*, состоящий из малой субчастицы рибосомы, мРНК, инициаторной аминоксил-тРНК и факторов инициации (рис. 39). Большая субчастица при ассоциации с малой субчастицей вызывает гидролиз ГТФ (до ГДФ и P_i) и одновременно вытесняет все факторы инициации, включая IF-3. В итоге инициации трансляции образуется полная 70S (у прокариот) рибосома с пептидным участком, занятым инициаторной формилметионил-тРНК, и со свободным аминоксилным участком.

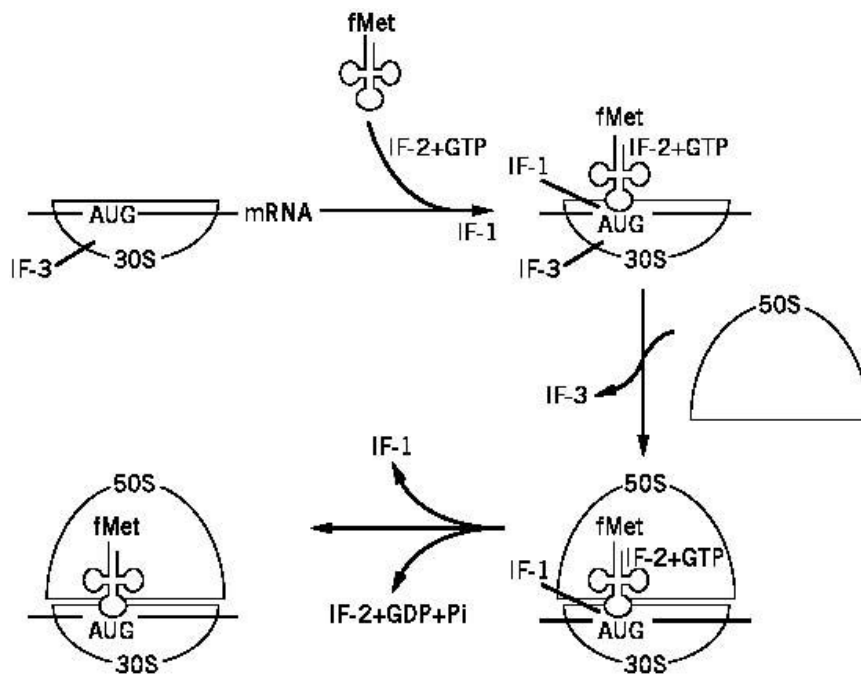


Рис. 39. Инициация трансляции у прокариот

Элонгация трансляции – основной и самый продолжительный этап белкового синтеза, в ходе которого происходит удлинение полипептидной цепи за счет последовательного присоединения аминокислот. Начинается с момента образования первой пептидной связи и заканчивается после включения в полипептидную цепь последней аминокислоты.

Элонгация у бактерий осуществляется при участии трех белковых факторов (EF-Tu, EF-Ts, EF-G) и имеет циклический характер.

Цикл элонгации включает 3 стадии:

1. Связывание аа-тРНК с аминокатильным центром рибосомы. На этой стадии со свободным А-центром рибосомы связывается очередная аа-тРНК – та, чей антикодон комплементарен кодону мРНК, находящемуся в А-центре. Поступив в А-центр, аа-тРНК закрепляется в нем в комплексе с белковым фактором EF-Tu (EF – Elongation Factor) и ГТФ. При участии фактора EF-Tu осуществляется гидролиз ГТФ до ГДФ и Φ_H , а выделяющаяся энергия расходуется на сближение двух аминокислотных остатков. Комплекс EF-Tu•ГДФ при этом покидает рибосому и регенерируется с участием фактора EF-Ts, так что фактор EF-Tu вновь оказывается связанным с молекулой ГТФ (рис. 40).

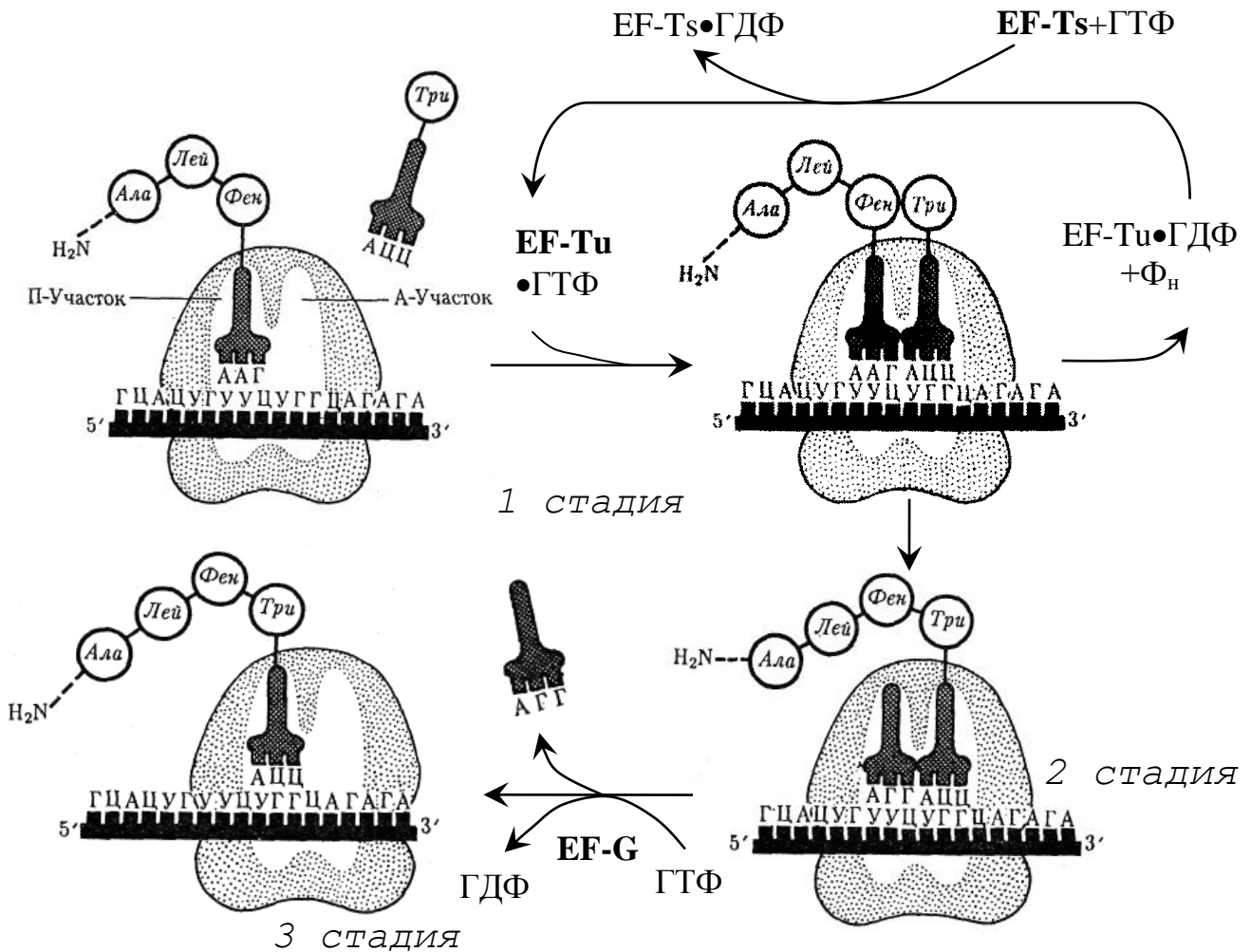


Рис. 40. Этап элонгации в синтезе белка у прокариот

2. Образование пептидной связи. В рибосоме после первой стадии цикла находятся пептидил-тРНК (в П-центре) и аа-тРНК (в А-центре). При этом их акцепторные петли и связанные с ними аминокислотные остатки располагаются в каталитическом (К-) центре. Последний и осуществляет *пептидилтрансферазную реакцию*: переносит пептидил (или иницирующую аминокислоту – формилметионин у прокариот) на аминокислоту поступившей аа-тРНК. Прежняя тРНК пептидила становится свободной (рис. 40).

В ходе пептидилтрансферазной реакции карбоксильная группа пептидила образует пептидную связь с аминогруппой очередной аминокислоты (рис. 41). Таким образом, рост пептидной цепи при трансляции происходит в направлении от N- к С-концу.

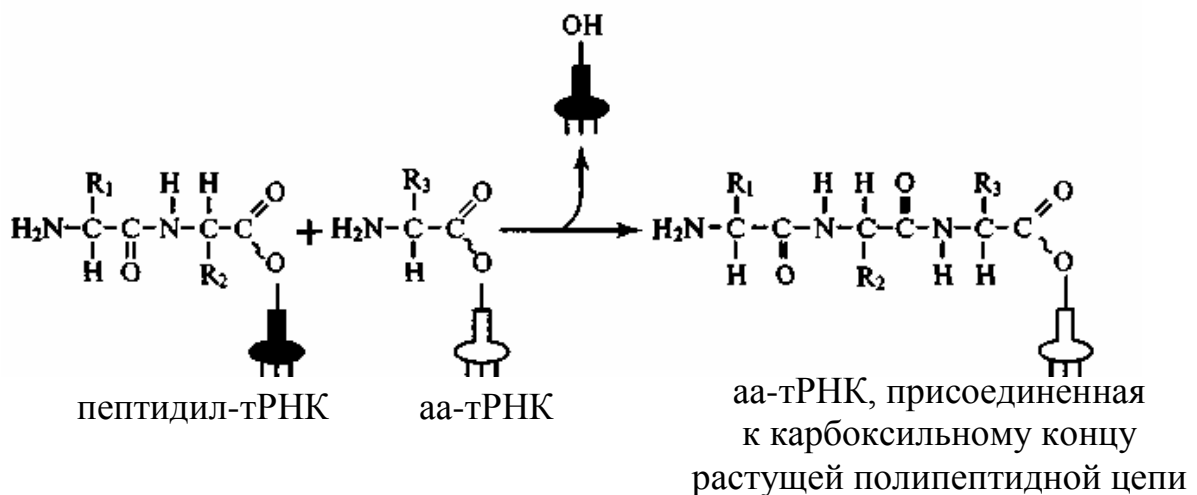


Рис. 41. Пептидилтрансферазная реакция

3. Транслокация – перемещение пептидил-тРНК из А-центра в П-центр в результате передвижения рибосомы по мРНК на один кодон. Свободная тРНК вытесняется из рибосомы, и одновременно освобождается А-центр, необходимый для связывания следующей аа-тРНК. Транслокация идет с участием белкового фактора EF-G (у бактерий) и сопровождается гидролизом одной молекулы ГТФ.

Таким образом, удлинение пептидной цепи на один аминокислотный остаток требует расхода двух молекул ГТФ (одна идет на связывание аа-тРНК, вторая – на транслокацию). Многократное повторение циклов элонгации приводит к включению в строящуюся пептидную цепь аминокислотных остатков в соответствии с последовательностью кодонов в мРНК.

Терминация трансляции. Сигналом об окончании трансляции служит появление в рибосоме одного из терминирующих кодонов мРНК: УАА,

УАГ или УГА. С терминирующим кодоном, находящимся в А-центре, взаимодействуют особые белки – факторы терминации, или *рилизинг-факторы* (от англ. release – освобождать). У бактерий в терминации трансляции участвуют три белковых фактора: RF-1, RF-2 и RF-3. Фактор RF-1 узнает кодоны УАА и УАГ, а фактор RF-2 – кодоны УАА и УГА. Фактор RF-3 выполняет вспомогательную роль, стимулируя работу RF-1 и RF-2. При поступлении в рибосому одного из терминирующих кодонов с ним немедленно связывается соответствующий RF-фактор и тем самым блокирует присоединение aa-тРНК. Присоединение факторов терминации стимулирует гидролизную активность пептидилтрансферазного (каталитического) центра, в результате чего связь полипептида с тРНК гидролизуется. Синтезированный белок отделяется от рибосомы, одновременно отделяются тРНК и мРНК, а рибосома диссоциирует на субчастицы (рис. 42).

В терминации трансляции принимает участие молекула ГТФ, которая, вероятно, служит аллостерическим регулятором активности белковых факторов терминации.

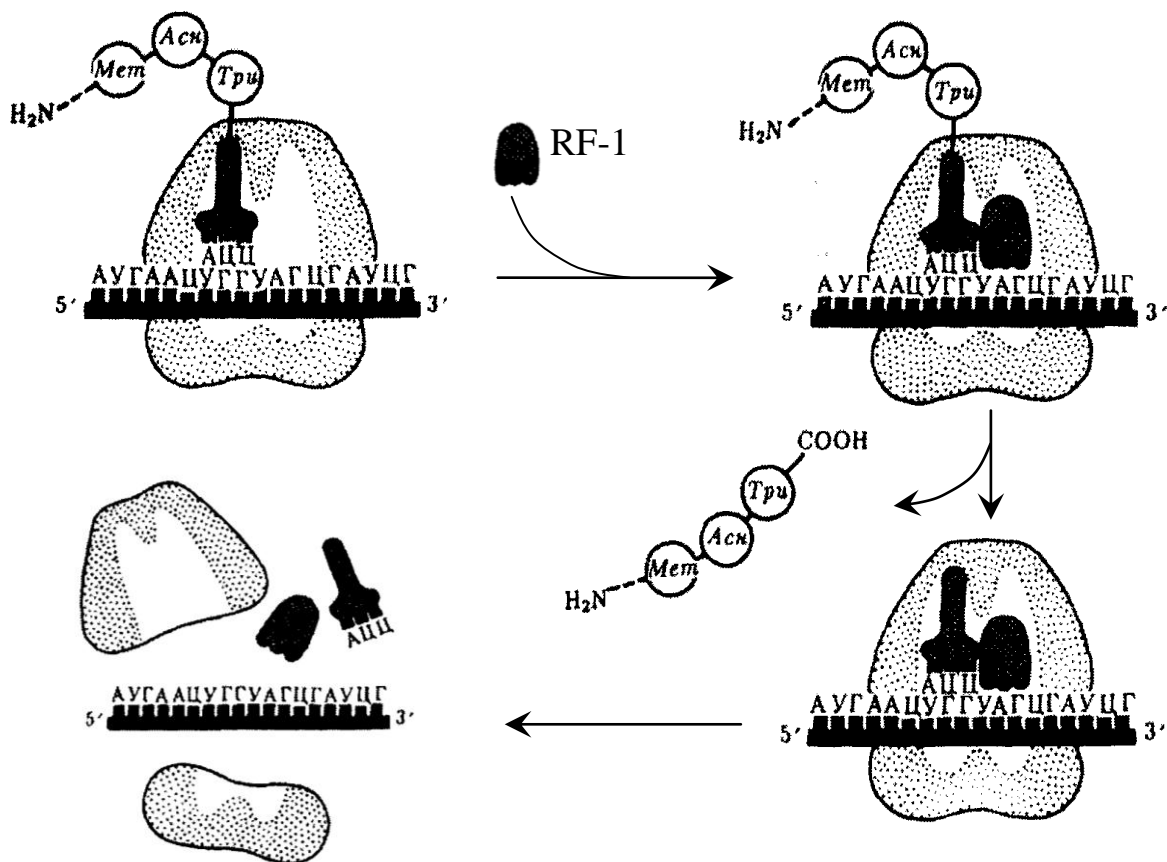


Рис. 42. Терминация синтеза пептидной цепи у бактерий

Формирование пространственной структуры белков

После окончания трансляции процесс образования белков обычно еще не завершен. Для того чтобы белок приобрел присущие ему функциональные свойства, полипептидная цепь должна определенным образом свернуться в пространстве, сформировав функционально активную («нативную») структуру. Процесс формирования пространственной структуры белка называется фолдингом.

Стадии фолдинга

Пространственная (третичная) структура белка характеризуется сочетанием элементов вторичной структуры (α -спиралей, β -слоев), а также гибких участков полипептидной цепи, называемых петлями. Процесс сворачивания полипептидной цепи имеет ступенчатый характер (рис. 43) и включает:

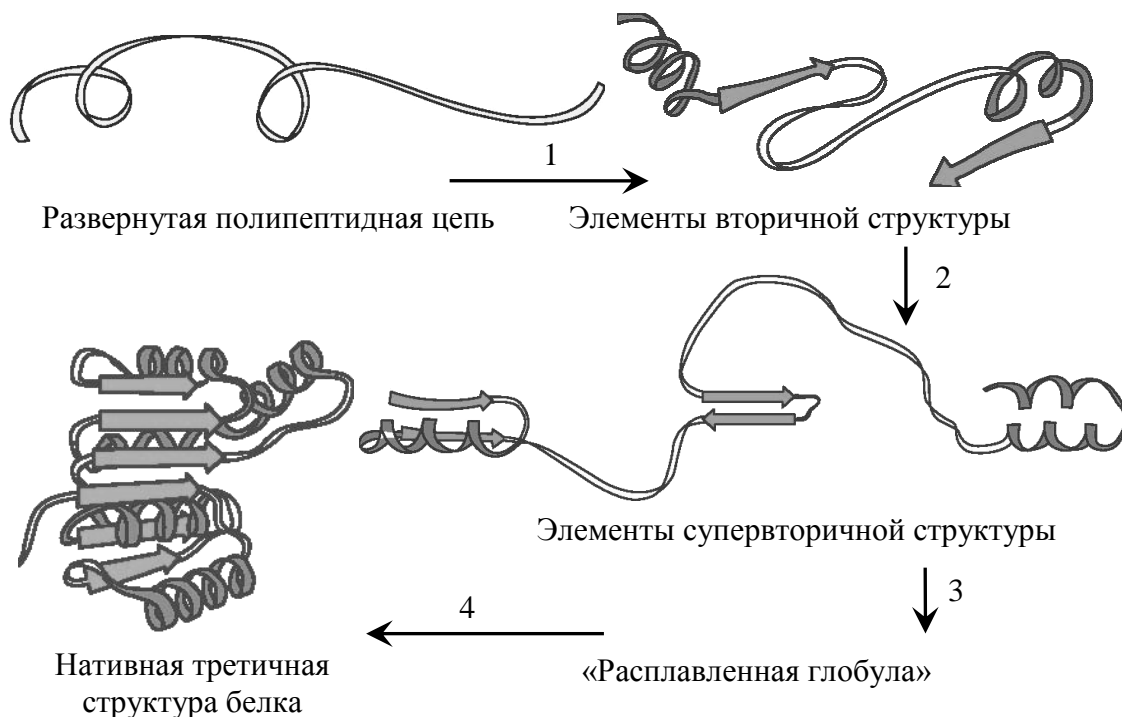


Рис. 43. Стадии фолдинга

- 1) формирование элементов вторичной структуры;
- 2) специфическую ассоциацию некоторых элементов вторичной структуры с образованием супервторичной структуры: это могут быть сочетания нескольких α -спиралей, β -слоев или смешанные комплексы данных элементов;

3) промежуточную стадию, связанную с формированием основных элементов третичной структуры и образованием гидрофобного ядра молекулы. Молекула приобретает пространственную структуру, близкую к структуре нативного белка. Однако она еще не обладает присущей данному белку функциональной активностью. Это состояние, получившее название «расплавленная глобула», отличается от нативного меньшей степенью упорядоченности структуры (рис. 44);

4) образование нативной третичной структуры белка.

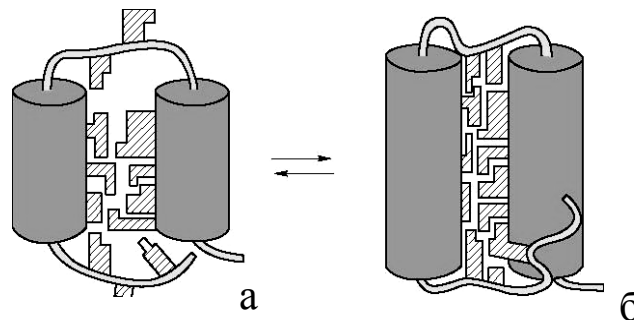


Рис. 44. Схема структуры «расплавленной глобулы» (а) и структуры нативного белка (б): элементы вторичной структуры представлены двумя спиральными участками (цилиндры); заштрихованные фигуры – неполярные группы аминокислотных остатков

Факторы фолдинга обеспечивают оптимальные условия для реализации быстрого и эффективного образования нативной пространственной структуры. Выделяют две группы факторов:

1. Фолдазы – ферменты фолдинга (белки с каталитической активностью). Как и все ферменты, фолдазы необходимы лишь в каталитических количествах, т. е. в концентрациях, на порядки меньших, чем у «обслуживаемых» ими белков.

2. Молекулярные шапероны. Требуются в количествах, близких к стехиометрическим, т. е. сравнимых по величине с концентрацией сворачиваемых белков. Как и фолдазы, не входят в состав конечных продуктов фолдинга.

Часто построенная на рибосоме полипептидная цепь не может принять окончательную биологически активную (нативную) конформацию, пока не подвергнется *процессингу*, или *ковалентной модификации*. При этом может происходить отщепление ферментами иницирующих аминокислотных остатков, введение в определенные аминокислотные остатки фосфатных, метильных, карбоксильных, олигосахаридных или простети-

ческих групп. Например, гормоны поджелудочной железы инсулин и глюкагон синтезируются в виде неактивных предшественников. Сначала из них удаляются сигнальные пептиды, в результате чего образуются прогормоны. Затем уже в секреторных гранулах прогормоны превращаются в активные гормоны.

Новообразованные белки направляются в ту часть клетки, где они выполняют свои функции: некоторые поступают в клеточный цитозоль, другие – к различным клеточным органеллам, третьи секретируются из клетки, наконец, некоторые встраиваются в ту или иную клеточную мембрану, где работают в качестве ферментов или переносчиков.

2.4. Регуляция биосинтеза белка

В каждой клетке синтезируются специфические белки, и с неодинаковой скоростью. Благодаря регуляции синтеза в конкретных условиях среды образуется лишь необходимое число молекул данного белка. Все соматические клетки многоклеточных организмов содержат в ДНК одинаковую генетическую информацию, однако отличаются друг от друга по составу белков. Так, клетки эритроцитов содержат большое количество гемоглобина, клетки кожи – коллагена, скелетных мышц – актина и миозина, клетки печени содержат ферменты синтеза мочевины, которые отсутствуют у всех других клеток. Таким образом, в клетках каждого типа экспрессируется только часть структурных генов.

Большая часть генома находится в неактивном, репрессированном, состоянии. Спектр функционирующих генов зависит от типа клетки, периода ее жизненного цикла, стадии индивидуального развития организма. У большинства организмов активно транскрибируются только 2-10% генов.

Гены, которые транскрибируются постоянно, не подчиняясь каким-либо регуляторным воздействиям, называются *конститутивными*. Обычно это гены, обеспечивающие синтез белков общего назначения (белки рибосом, гистоны, тубулины и др.), а также тРНК и рРНК. Включение и выключение других генов зависит от различных метаболитов, эти гены называются *регулируемыми*.

Регуляция генной активности у прокариот

Схема регуляции активности генов на уровне транскрипции была впервые разработана Ф. Жакобом и Ж. Моно (1961) на примере лактозного (*lac*)-оперона кишечной палочки (*E.coli*). Единица регуляции транскрипции была названа опероном. *Оперон* – это последовательность структурных генов, определяющих синтез группы белков, участвующих в одной метаболической цепи, имеющих общий промотор и оператор.

E.coli быстро растет на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу. Глюкоза – самый доступный и выгодный для *E.coli* источник углерода и энергии. Пока глюкоза имеется в достаточном количестве, клетка не нуждается в получении и переработке других сахаров.

После переноса клеток на среду, содержащую вместо глюкозы лактозу, рост сначала замедляется, а затем возобновляется с высокой скоростью. При этом бактерии синтезируют три необходимых для усвоения лактозы фермента:

- β-галактозидазу, которая расщепляет лактозу на глюкозу и галактозу;
- пермеазу, необходимую для проникновения лактозы через клеточную мембрану;
- тиогалактозидазу.

Эти ферменты кодируются тремя структурными генами (соответственно Z, Y и A) лактозного оперона. Кроме структурных генов в состав оперона входят промотор и оператор. В схеме оперонной регуляции присутствует также ген-регулятор, кодирующий белок-репрессор. Однако ген-регулятор не входит в состав оперона и может находиться на расстоянии от него.

При отсутствии в среде лактозы активный белок-репрессор связывается с оператором, блокируя транскрипцию структурных генов. Хотя РНК-полимераза может связаться с промотором, она не перемещается дальше «выключенного» оператора (рис. 45А). При добавлении в среду лактозы ее молекулы связываются со специфическим участком репрессора, инактивируя его. У инактивированного репрессора резко снижается сродство к зоне оператора, в результате чего он отсоединяется, и РНК-полимераза начинает транскрипцию структурных генов (рис. 45Б).

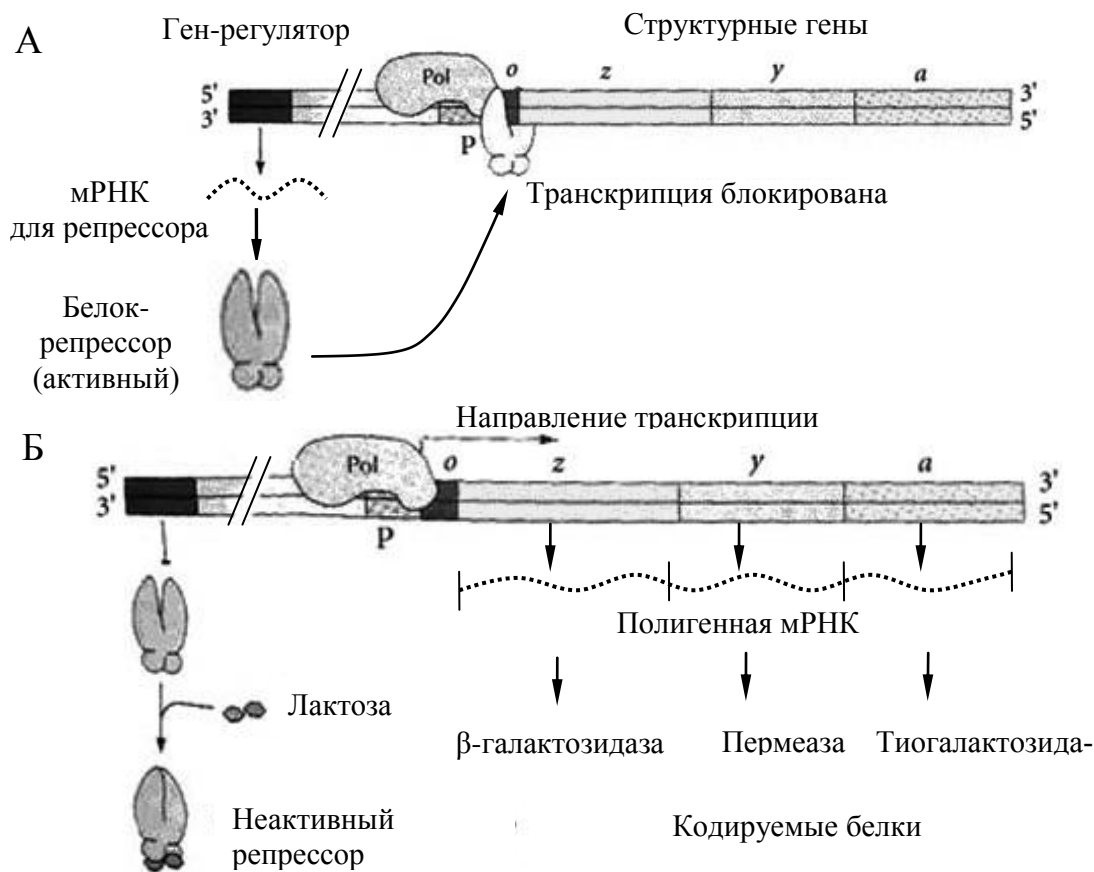


Рис. 45. Схема негативной регуляции *lac*-оперона *E. coli*:

А – лактозный оперон репрессирован присоединением белка-репрессора к зоне оператора (транскрипция не идет); Б – инактивация репрессора и осуществление транскрипции

Снижение концентрации субстрата – лактозы – вновь является сигналом к соединению белка-репрессора с оператором и прекращению транскрипции генов *lac*-оперона. Таким образом, синтез ферментов происходит только в том случае, если в них возникает необходимость. Данная схема регуляции называется «негативной», так как контролирующим транскрипцию фактором является негативный фактор, «выключатель» – белок-репрессор. Индукция (включение) происходит при потере сродства белка-репрессора к оператору.

Наряду с негативной системой регуляции, для *lac*-оперона существует и позитивная регуляция. Промотор лактозного оперона способен связывать не только РНК-полимеразу, но и особый белок-активатор катаболизма (CAP) в комплексе с циклическим АМФ (рис. 46А).

Присутствие CAP и цАМФ вызывает не репрессию, а напротив, активирование транскрипции. Без CAP РНК-полимераза не может связаться с промотором и начать транскрипцию. CAP, образовав комплекс с цАМФ,

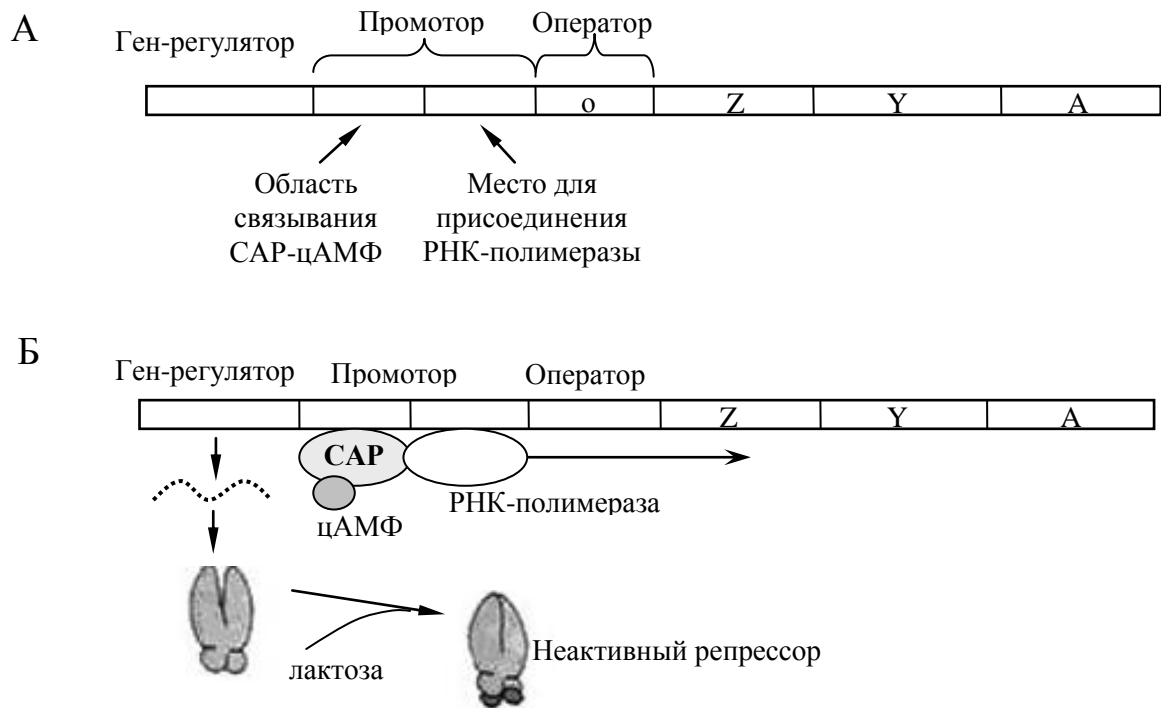


Рис. 46. Регуляторные участки *lac*-оперона

активизируется и только после этого присоединяется к своему сайту (CAP-участку) на промоторе, многократно (почти в 50 раз) усиливая транскрипцию генов *lac*-оперона. При этом транскрипция возможна только в присутствии лактозы, когда оператор не блокирован репрессором (рис. 46Б). В случае присутствия в среде глюкозы, концентрация цАМФ в клетке резко снижается, и не образуется комплекса цАМФ с CAP. В результате этого РНК-полимераза не может связаться с промотором и *lac*-гены не транскрибируются.

Особенности регуляции синтеза белка у эукариот

Механизмы регуляции биосинтеза белков у эукариот более разнообразны и осуществляются на разных уровнях. Так, стойкую репрессию генов вызывает компактная упаковка хроматина, включая взаимодействие с гистонами, образование нуклеосом и хроматиновых фибрилл. В гетерохроматине для транскрипции доступно менее 1% генов, в эухроматине, имеющем более рыхлую укладку, – значительно больше. В разных типах клеток в область эухроматина попадают неодинаковые гены, что обеспе-

чивает стабильную репрессию одних генов и дерепрессию других на протяжении всей жизни клетки.

Большинство генов эукариот подвергается адаптивной регуляции, осуществляющейся на уровне транскрипции. Вследствие огромной протяженности и сложности эукариотической ДНК специфические регуляторные участки ДНК и взаимодействующие с ними белки-регуляторы весьма многочисленны. Выявлено более 100 различных белков, способных взаимодействовать с регуляторными последовательностями ДНК и тем самым влиять на сборку транскрипционного комплекса и скорость транскрипции. Эти белки содержат ДНК-связывающие домены, отвечающие за узнавание специфических участков в молекуле ДНК, а также домены, активирующие транскрипцию. Последние связываются с транскрипционными факторами либо с РНК-полимеразой. Регуляторные белки могут иметь в своем составе антирепрессорные домены, которые взаимодействуют с гистонами нуклеосом, освобождая от них участки ДНК. Эти белки могут содержать в себе также домены, связывающие лиганды – индукторы транскрипции (стероидные гормоны, гормоны щитовидной железы, производные витаминов). После связывания лиганда конформация белка изменяется, и он образует участок, узнающий в регуляторной зоне ДНК специфическую последовательность и индуцирующий транскрипцию определенного гена.

Важную роль в регуляции активности генов играют участки ДНК, расположенные на значительном (1000 и более пар оснований) расстоянии от промотора.



Рис. 47. Схема регуляции транскрипции с помощью энхансерных участков

от промотора.

Энхансеры («усилители») – последовательности ДНК, служащие в качестве специфических участков связывания регуляторных белков, активизирующих процесс транскрипции.

Сайленсеры («глушители») – участки ДНК, которые, связываясь с белками, обеспечивают замедление транскрипции. Вероятно, влияние этих элементов на транскрипцию связано с изменением топологии

цепей ДНК, в частности с образованием петель (рис. 47), что приближает

регуляторные последовательности к промоторам, с которыми они взаимодействуют с помощью белковых факторов.

Регуляция на уровне транскрипции наиболее экономична, но она осуществляется недостаточно быстро. Поэтому важное значение имеет регуляция на других этапах реализации генетической информации.

На многих эукариотических генах, имеющих полиэкзонное строение, после транскрипции и процессинга образуется несколько вариантов зрелой мРНК, когда экзон одного варианта сплайсинга может оказаться интроном в другом. Это приводит к образованию разных мРНК и, соответственно, разных белков с одного первичного транскрипта. Так, в парафолликулярных клетках щитовидной железы в ходе транскрипции гена гормона кальцитонина образуется первичный транскрипт мРНК, который имеет в своем составе шесть экзонов. мРНК кальцитонина образуется путем сплайсинга первых четырех экзонов. Этот же первичный транскрипт в клетках головного мозга в ходе альтернативного сплайсинга образует другую мРНК, кодирующую белок, не обладающий гормональной активностью.

На состав белков клетки оказывает влияние также неодинаковая стабильность мРНК. Время жизни эукариотических мРНК составляет от нескольких часов до нескольких дней. Расположенный на 3'-конце фрагмент поли-(А) увеличивает продолжительность жизни молекул мРНК и, соответственно, количество белка.

Регуляция синтеза белка осуществляется и на уровне трансляции. Разные мРНК имеют неодинаковое сродство к рибосомным субчастицам, поэтому полирибосома может содержать различное количество рибосом. Так определяется соотношение белков в клетке. Наконец, может происходить подавление инициации трансляции всех мРНК клетки (например, при действии теплового шока, стрессах, недостатке железа, вирусной инфекции и т. п.). Стрессовый фактор индуцирует фосфорилирование второго фактора инициации (IF-2), тем самым инактивирует его и, следовательно, трансляцию.

Контрольные вопросы

1. Почему белковую молекулу называют полимером? Что является ее мономером?
2. Как образуется пептидная связь? Назовите ее основные характеристики.
3. Чем характеризуются первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры белка?
4. Опишите основные типы вторичной структуры белков.
5. Охарактеризуйте фибриллярные и глобулярные белки.
6. Что такое денатурация и ренатурация белка?
7. Какие функции белков вам известны?
8. Какие типы нуклеиновых кислот вы знаете? Назовите их функции.
9. Опишите строение ДНК. Какова общая конфигурация молекулы ДНК?
10. Что представляет собой мономер ДНК? Назовите компоненты нуклеотида.
11. Что такое комплементарность азотистых оснований?
12. Дайте сравнительную характеристику ДНК и РНК.
13. Какие виды РНК имеются в клетке?
14. Опишите общий план строения зрелой матричной РНК. Какова ее функция?
15. Каковы строение и функции транспортной и рибосомной РНК?
16. Что подразумевает концепция «Мир РНК»?
17. Что такое репликация? В какой период клеточного цикла происходит самоудвоение ДНК?
18. Перечислите основные принципы репликации.
19. Опишите основные этапы репликации ДНК.
20. Какие ферменты участвуют в репликации ДНК?
21. Как осуществляется репликация концевых участков линейной ДНК? Какова роль теломеразы?
22. Что такое транскрипция? Назовите основные принципы транскрипции.
23. Какие ферменты участвуют в транскрипции? Каково строение РНК-полимеразы? Какие типы РНК-полимераз вам известны?
24. Перечислите основные этапы транскрипции.
25. Что такое процессинг? Опишите процесс сплайсинга.
26. Назовите основные свойства генетического кода.
27. В чем заключаются подготовительные стадии трансляции?
28. Охарактеризуйте основные фазы трансляции.
29. Какие стадии включает цикл элонгации?
30. Как осуществляется терминация трансляции?
31. Что такое фолдинг? Каковы его основные стадии?
32. Каковы механизмы регуляции генной активности у про- и эукариот?

Библиографический список

Основная литература

1. Коничев А.С. Молекулярная биология: учебник для вузов по специальности «Биология» / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2003. – 400 с.
2. Молекулярная биология клетки: в 3 т. / Б. Альбертс и др. – М.: Мир, 1994.
3. Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот: учебник для биологических специальностей вузов / В.И. Агол и др.; под ред. А.С. Спирина. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
4. Мушкамбаров Н.Н. Молекулярная биология: учеб. пособие для мед. вузов / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: МИА, 2003. – 535 с.
5. Спирин А.С. Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка: учебник для студентов биологических вузов / А.С. Спирин. – М.: Высш. шк., 1986. – 303 с.
6. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков: учебник для биологических специальностей вузов / В.М. Степанов; под ред. А.С. Спирина. – М.: Высш. шк., 1996. – 335 с.

Дополнительная литература

1. Айала Ф. Современная генетика: в 3 т.: пер. с англ. / Ф. Айала, Дж. Кайгер. – М.: Мир, 1987-1988.
2. Дымшиц Г.М. Проблема репликации концов линейных молекул ДНК и теломераза / Г.М. Дымшиц // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 5. – С. 8-13.
3. Наградова Н.К. Внутриклеточная регуляция формирования нативной пространственной структуры белков / Н.К. Наградова // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 7. – С. 10-18.
4. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика: учеб. пособие / И.Ф. Жимулев. – Новосибирск: Изд-во Новосибирского ун-та, 2002. – 459 с.
5. Льюин Б. Гены: пер. с англ. / Б. Льюин. – М.: Мир, 1987. – 544 с.
6. Спирин А.С. Биосинтез белков, мир РНК и происхождение жизни / А.С. Спирин // Вестник Российской академии наук. – 2001. – Т. 71, № 4. – С. 320-328.
7. Чек Томас Р. РНК-фермент / Томас Р. Чек // В мире науки (Scientific American) (изд. на русс. языке). – 1987. – № 1.
8. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: учеб.-справ. пособие / С.Н. Щелкунов. – 2-е изд., испр. и доп. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Учебное издание

В.Ф. Сыч, Н.А. Курносова, Е.П. Дрождина

Основы молекулярной биологии

Часть 1. Биополимеры живых систем

Учебное пособие

Директор Издательского центра *Т.В. Филиппова*
Редактирование и подготовка оригинал-макета *Е.Г. Туженковой*

Подписано в печать 30.07.08.
Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 3,7. Уч.-изд. л. 3,3
Тираж 100 экз. Заказ 60/

Оригинал-макет подготовлен
в Издательском центре
Ульяновского государственного университета

Отпечатано в Издательском центре
Ульяновского государственного университета
432000, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42