

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
КЫРГЫЗСКО-РОССИЙСКИЙ СЛАВЯНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МЕДИЦИНСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра химии и биохимии

МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ

Учебное пособие

Допущено Министерством образования и науки
Кыргызской Республики в качестве учебного пособия
для студентов высших учебных заведений

*Посвящается 25-летию
медицинского факультета КРСУ*

Бишкек 2019

УДК 577
ББК28.072 я 73
М 33

Рецензенты:

Б.М. Худайбергенова, д-р биол. наук, профессор,
Международная высшая школа медицины,
Б.А. Какеев, д-р мед. наук, профессор, КРСУ,
Б.Р. Раимов, канд. мед. наук, доцент,
КГМА им. И.К. Ахунбаева

Составители:

Е.В. Шарова, канд. биол. наук, доцент,
Л.П. Горборукова, канд. с/х наук,
М.К. Айтматов, ст. преп.

Рекомендовано к изданию Ученым советом ГОУВПО КРСУ

М33 МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ: учебное пособие / сост.:
Е.В. Шарова, Л.П. Горборукова, М.К. Айтматов. – Бишкек: Изд-
во КРСУ, 2019. – 116 с.

ISBN 978-9967-19-618-6

Учебное пособие является руководством к практическим и теоретическим занятиям по биологии. Структура и форма изложения материала соответствует учебной программе по биологической химии.

Учебное пособие предназначено для студентов медицинских вузов, обучающихся по специальностям «Лечебное дело» и «Педиатрия».

М 1903010000-18

УДК 788
ББК 28.072 я 73

ISBN978-9967-19-618-6

© ГОУВПО КРСУ, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	6
ВВЕДЕНИЕ	8
Раздел 1. МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕОТИДОВ	9
Строение и функции нуклеотидов, нуклеозидов	9
Переваривание нуклеопротеидов	18
Биосинтез пуриновых нуклеотидов	20
Запасные пути синтеза пуриновых нуклеотидов	23
Регуляция синтеза пуринов	24
Лекарственная регуляция синтеза пуринов	25
Катаболизм пуриновых нуклеотидов	25
Синтез пиримидиновых нуклеотидов	29
Оротацидурия	32
Синтез дезоксирибонуклеотидов	33
Регуляция синтеза пиримидинов	35
Катаболизм пиримидиновых нуклеотидов	36
Иммунодефициты	38
Механизм действия противоопухолевых и антивирусных препаратов	39
Раздел 2. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ	42
Строение и функции ДНК	42
Структура и функции РНК	49
Сходства и различия РНК и ДНК	50
Виды РНК и выполняемые функции	51
Строение информационной РНК	52
Строение транспортной РНК	53
Строение рибосомной РНК	55
Раздел 3. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ	58
Основной постулат молекулярной биологии	58
РЕПЛИКАЦИЯ – БИОСИНТЕЗ ДНК	59
Репликация ДНК эукариот	60
Этапы репликации	61
Характеристика ферментов репликации	64
Репликация ДНК прокариот	65
Синтез ДНК на матрице РНК	68

Повреждения, мутации и репарация ДНК.....	68
Характеристика мутаций.....	72
Репарация ошибок и повреждений ДНК	77
ТРАНСКРИПЦИЯ – БИОСИНТЕЗ РНК	80
Посттранскрипционные модификации.....	82
Биогенез матричной РНК.....	82
Биогенез транспортной РНК.....	84
Биогенез рибосомальной РНК.....	85
Строение рибосом.....	86
Регуляция транскрипции	87
ТРАНСЛЯЦИЯ – БИОСИНТЕЗ БЕЛКА	88
Генетический код	88
Адапторная роль транспортных РНК.....	89
Основные компоненты белоксинтезирующей системы	90
Этапы трансляции.....	91
Особенности трансляции эукариот	96
Посттрансляционная модификация белков	96
Регуляция биосинтеза белков.....	98
Регуляция транскрипции у прокариот	98
Регуляция синтеза белка по механизму индукции.....	101
Регуляция синтеза белка по механизму репрессии.....	102
Регуляция транскрипции у эукариот.....	103
Регуляция действия генов и клеточная дифференцировка	104
Лекарственная регуляция транскрипции	105
Молекулярная гибридизация ДНК	106
Полимеразная цепная реакция – ПЦР.....	108
Список литературы	115

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А	– аденин
АМФ	– аденозинмонофосфат
АДФ	– аденозиндифосфат
АТФ	– аденозинтрифосфат
dATФ	– дезоксиаденозинтрифосфат
dАДФ	– дезоксиаденозиндифосфат
Г(G)	– гуанин
ГАМК	– гамма-аминомасляная кислота
ГДФ	– гуанозиндифосфат
ГМФ	– гуанозинмонофосфат
ГТФ	– гуанозинтрифосфат
dГДФ	– дезоксигуанозиндифосфат
dГТФ	– дезоксигуанозинтрифосфат
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНП	– дезоксирибонуклеопротеид
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ИМФ	– инозинмонофосфат
мРНК/ иРНК	– матричная/информационная рибонуклеиновая кислота
НАД	– никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НДФ	– нуклеозиддифосфат
НТФ	– нуклеозидтрифосфат
НК	– нуклеиновая кислота
ОМФ	– оротидилмонофосфат, оротидиловая кислота
ПФ	– пиридоксальфосфат
ПФП	– пентозофосфатный путь
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РНП	– рибонуклеопротеид
РНР	– рибонуклеотидредуктаза
рРНК	– рибосомная рибонуклеиновая кислота
Т	– тимин
ТГФК	– тетрагидрофолиевая кислота

ТДФ	– тимидиндифосфат
ТМФ	– тимидинмонофосфат
ТПФ	– тиаминпирофосфат
тРНК	– транспортная рибонуклеиновая кислота
ТТФ	– тимидинтрифосфат
У(У)	– урацил
УДФ	– уридиндифосфат
dУДФ	– дезоксиуридиндифосфат
УМФ	– уридинмонофосфат
УТФ	– уридинтрифосфат
ФАД	– флавинадениндинуклеотид
ФАФС	– фосфоаденозилфосфосульфат
ФМН	– флавинмоноклеотид
ФРДФ	– фосфорибозилдифосфат
Ц(С)	– цитозин
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
ЦДФ	– цитидиндифосфат
dЦДФ	– дезоксицитидиндифосфат
ЦМФ	– цитидинмонофосфат
ЦНС	– центральная нервная система
ЦТК	– цикл трикарбоновых кислот
ЦТФ	– цитидинтрифосфат
dЦТФ	– дезоксицитидинтрифосфат
dR	– дезоксирибоза
H ₂ -фолат	– дигидрофолат
H ₄ -фолат	– тетрагидрофолат
R	– рибоза
SAM	– S-аденозинметионин
SH	– сульфгидрильная группа

ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие «Матричные биосинтезы» охватывает материал, изучаемый по программе весеннего семестра. Пособие подготовлено на кафедре химии и биохимии медицинского факультета КРСУ и охватывает информационный материал одной модульной единицы. Приведены современные положения о структуре, свойствах, молекулярной организации генетической информации и методах её реализации. Материал курса построен с учетом интеграции биохимии со смежными дисциплинами медико-биологического профиля.

Учебное пособие предназначено студентам медицинских вузов по предмету «Биологическая химия» при самостоятельной подготовке к занятиям, коллоквиумам, тестам, экзаменам и может также использоваться клиническими ординаторами и преподавателями на занятиях в процессе учебного года. Темы составлены в соответствии с программой по биологической химии для медицинских институтов и апробированы на кафедре биохимии в течение многих лет.

Раздел 1. МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕОТИДОВ

Строение и функции нуклеотидов, нуклеозидов

Важнейшей группой азотистых веществ являются нуклеотиды. Нуклеотиды и их производные выполняют многообразные функции в организме:

1) **структурная:** формируют молекулы нуклеиновых кислот – дезоксирибонуклеиновой (ДНК) и рибонуклеиновой (РНК);

2) **энергетическая:** участвуют в биоэнергетических процессах: аккумуляции энергии в форме **АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ, ТТФ**, передаче энергии в креатинфосфокиназной реакции;

3) осуществляют процессы **активного транспорта через клеточные мембраны** (Na, K-АТФаза, H-АТФаза, Ca-АТФаза);

4) обеспечивают **мышечное сокращение и секреторную функцию клеток**;

5) **каталитическая:** входят в состав каталитических центров ферментов в форме **НАД, НАДФ, ФАД, ФМН**;

6) участвуют в **синтезе углеводов** (УТФ, ГТФ), **липидов** (АТФ, ЦТФ), **белков** (ГТФ и АТФ), служат переносчиками **сульфата** (ФАФС), **метильных групп** (SAM) и т. д.;

7) выполняют **регуляторные функции:** производные аденозина – **цАМФ** и гуанозина – **цГМФ**, являются вторичными посредниками гормонального сигнала и аллостерическими эффекторами; **УТФ** регулирует синтез пиримидиновых нуклеотидов, **АМФ** и **ГМФ** – синтез пуринов; **АТФ** активирует и ингибирует фосфофруктокиназу (гликолиз) и изоцитратдегидрогеназу (ЦТК).

Каждый **нуклеотид** состоит из трех компонентов:

1) **азотистого основания** – производные пурина или пиримидина;

2) **пентозы:** рибозы или дезоксирибозы;

3) остатка **фосфорной кислоты**.

К пуриновым азотистым основаниям относят **аденин, гуанин, ксантин, гипоксантин** (рисунок 1). Мочевая кислота является конечным продуктом пуринового обмена у человека.

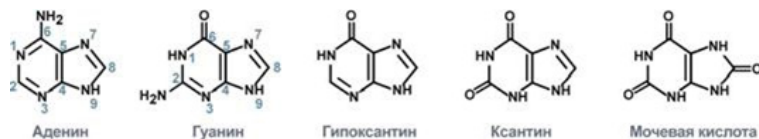


Рисунок 1 – Пуриновые азотистые основания

В ДНК и РНК человека, бактериях и бактериофагах содержатся модифицированные минорные (редко встречающиеся) азотистые основания: 6-метиладенин, 7-метилгуанин, дигидроурацил, 5-метилцитозин и др.

До 10 % минорных азотистых оснований содержится в составе транспортных РНК. В молекулах ДНК в небольшом количестве содержатся 5-метилцитозин и 6-метиладенин. Вероятно, метилированные основания защищают “свою” ДНК от расщепления ферментами – ДНКазами. В клетках растений содержатся минорные пуриновые основания, многие из них фармакологически активны. Кофейные зерна содержат кофеин (1,3,7-триметилксантин), чайный лист включает теofilлин (1,3-диметилксантин), в состав какао-бобов входит теобромин (3,7-диметилксантин).

К пиримидиновым азотистым основаниям относят **цитозин**, **урацил** (в РНК), **тимин** (в ДНК), оротовую кислоту (рисунок 2).

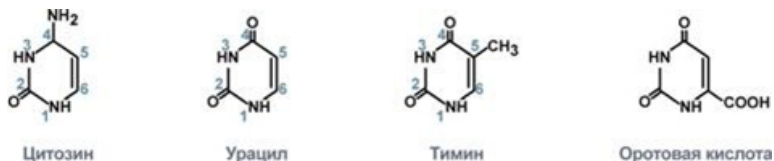


Рисунок 2 – Строение пиримидиновых азотистых оснований

Азотистые основания могут существовать в двух формах: лактамной и лактимной (кето- и енольной формах). Взаимопревращение таутомерных форм связано с переносом протона от гидроксильной группы к пиридиновому атому азота и наоборот. Обычно лактамная форма в равновесии преобладает (рисунок 3).

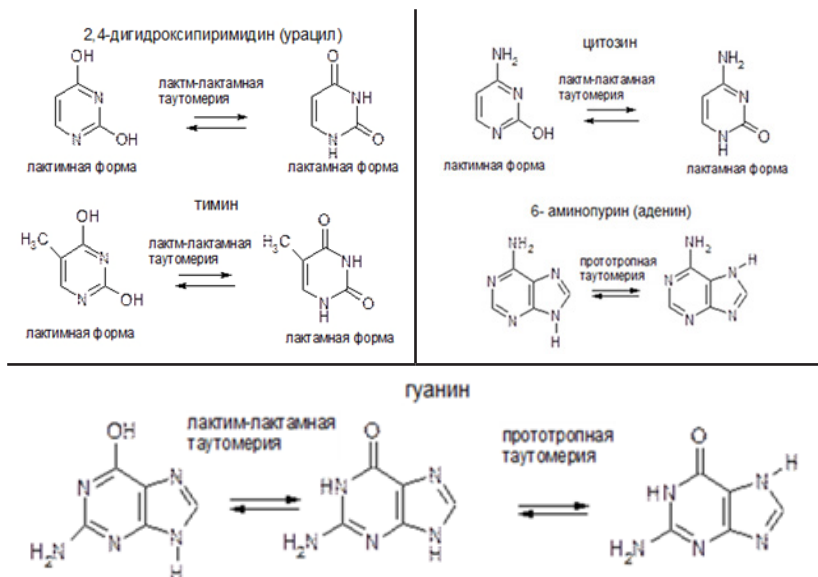


Рисунок 3 – Лактамная и лактимная формы азотистых оснований

В нуклеиновых кислотах все оксосодержащие азотистые основания присутствуют в **лактимной форме (кетоформе)**. Если они будут в **енольной форме (лактимной)**, то комплементарность не сохраняется, возникает точечная мутация. Тимин под действием внешних факторов может перейти в оксиформу и будет комплементарен гуанину, а не аденину.

Для цитозина, аденина, гуанина характерна **амино-иминная** таутомерия. В состав нуклеиновых кислот входят амино-формы азотистых оснований. Сдвиг равновесия в сторону гидрокси- или иминоформ нуклеиновых оснований может происходить под воздействием мутагенных факторов.

При нейтральном значении pH наименьшей растворимостью обладает гуанин. Следующим в этом ряду стоит ксантин. Мочевая кислота в форме уратов сравнительно неплохо растворяется при нейтральном pH, но очень плохо растворима в жидкостях с более низкими значениями pH, например, в моче. Гуанин в моче человека в норме отсутствует, а ксантин и мочевая кислота явля-

ются её обычными компонентами и часто входят в состав камней мочевого тракта.

Моносахарид (пентоза) представлен рибозой в РНК или d-рибозой в ДНК (рисунок 4).

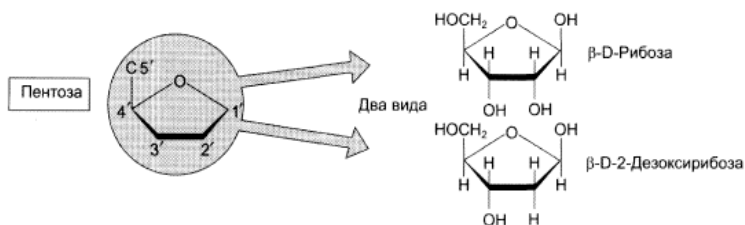


Рисунок 4 – Строение рибозы и дезоксирибозы

Замена у дезоксирибозы при C2' OH-группы на протон упрочняет связь между C2' и C3' атомами, что увеличивает прочность молекулы ДНК и способствует компактности её пространственной структуры.

Нуклеозид построен из двух компонентов – азотистого гетероциклического основания, к которому N-гликозидной связью присоединен углевод (пентоза). Если в качестве пентозы в нуклеозиде присутствует рибоза, то это **рибонуклеозид**. Так, аденин и рибоза образуют нуклеозид **аденозин** (таблица 1). Соответствующие производные других азотистых оснований называются **гуанозин, уридин, тимидин и цитидин**. Названия нуклеозидов строятся от тривиального названия азотистого основания с суффиксом *-идин* у пиримидиновых и *-озин* – у пуриновых нуклеозидов. У дезоксирибонуклеотидов добавляют приставку *дезокси-*.

Если углеводный остаток представлен 2-дезоксирибозой, образуется **дезоксинуклеозид**, например, 2'-дезоксаденозин. В названиях производных тимина приставка дезокси-, как правило, опускается (так как это основание содержится исключительно в дезоксирибонуклеотидах).

Таблица 1 – Номенклатура нуклеотидов РНК, ДНК

Азотистое основание	Нуклеозид РНК	Нуклеотид РНК	Нуклеозид ДНК	Нуклеотид ДНК	Однобуквенный код
Аденин	Аденозин А + R	Аденозинмонофосфат (АМФ)	d-аденозин А + dR	Дезоксиаденозинмонофосфат (dАМФ)	A
Гуанин	Гуанозин Г + R	Гуанозинмонофосфат (ГМФ)	d-гуанозин Г + dR	Дезоксигуанозинмонофосфат (dГМФ)	G
Цитозин	Цитидин Ц + R	Цитидинмонофосфат (ЦМФ)	d-цитидин Ц + dR	Дезоксцитидинмонофосфат (dЦМФ)	C
Урацил	Уридин У + R	Уридинмонофосфат (УМФ)			U
Тимин			d-тимидин Т + dR	Дезокситимидинмонофосфат (dТМФ)	T

Нуклеозиды, являясь N-гликозидами, устойчивы к гидролизу в слабощелочной среде, но расщепляются в кислой. Пуриновые нуклеозиды гидролизуются легко, пиримидиновые – труднее.

Нуклеотиды – фосфорилированные нуклеозиды. Нуклеотиды можно рассматривать, с одной стороны, как эфиры нуклеозидов (фосфаты), а с другой – как кислоты (в связи с наличием остатка фосфорной кислоты). За счет фосфатного остатка нуклеотиды проявляют свойства двухосновной кислоты и в физиологических условиях ($\text{pH} \approx 7$) находятся в ионизированном состоянии.

Тимидиловая кислота (ТМФ) состоит из тимина, 2'-деоксирибозы и фосфата, а в состав уридиловой кислоты (УМФ) входят урацил, рибоза и фосфат. Гипоксантиновый рибонуклеотид называют инозиновой кислотой (ИМФ), которая является предшественницей пуриновых рибонуклеотидов.

В нуклеотидах пуриновое или пиримидиновое основание соединяется с углеводом *N-гликозидной* связью; остаток фосфорной кислоты присоединяется к гидроксильной группе пентозы в 5'-положении при помощи *сложноэфирной связи*, 3'- группа остается свободной (рисунок 5).

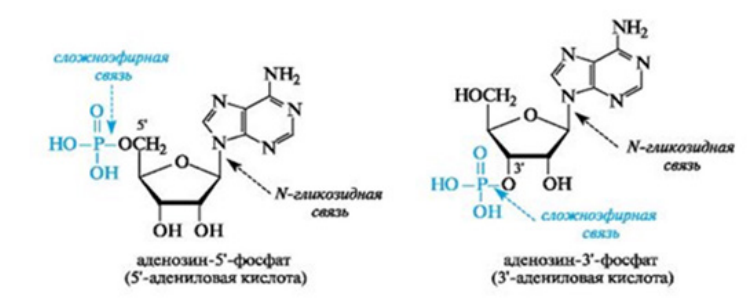


Рисунок 5 – N-гликозидная и сложноэфирная связь в нуклеотидах

В зависимости от числа имеющихся в молекуле остатков фосфорной кислоты различают нуклеозидмонофосфаты (НМФ), нуклеозиддифосфаты (НДФ), нуклеозидтрифосфаты (НТФ).

Большое значение в живых системах играют нуклеотиды, содержащие в своем составе ди- и трифосфатные группировки. Важнейшими среди этих производных являются аденозинтри-

фосфат (АТФ) и аденозиндифосфат (АДФ), которые способны к взаимопревращениям путем наращивания или отщепления фосфатных групп. В этих соединениях фосфатные группы в физиологических условиях почти полностью ионизированы.

В состав АТФ входят **аденин, рибоза, три остатка фосфорной кислоты**. Фосфаты последовательно связаны между собой 2-мя макроэргическими связями, при расщеплении которых образуется значительное количество энергии (обозначается знаком ~ тильда) (рисунок 6).

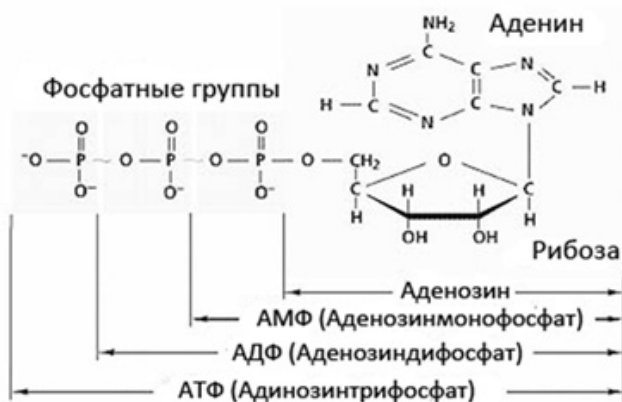


Рисунок 6 – Строение нуклеотида и нуклеозида

Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) содержится в каждой клетке в растворимой фракции цитоплазмы, митохондриях, хлоропластах и ядрах. Она является универсальным источником энергии в клетке. АТФ является основным связующим звеном между процессами, сопровождающимися выделением и накоплением энергии, и процессами, протекающими с затратами энергии. Кроме этого, АТФ наряду с другими рибонуклеозидтрифосфатами (ГТФ, ЦТФ, УТФ) является субстратом для синтеза РНК.

В живых организмах ди- и трифосфаты присутствуют в виде солей тех или иных ионов металлов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} и т. д.). Ион Mg^{2+} участвует в присоединении и правильной ориентации мо-

лекулы АТФ в активном центре фермента, нейтрализации отрицательного заряда субстрата, ослабляет фосфоэфирную связь и облегчает перенос фосфата на глюкозу (рисунок 7).

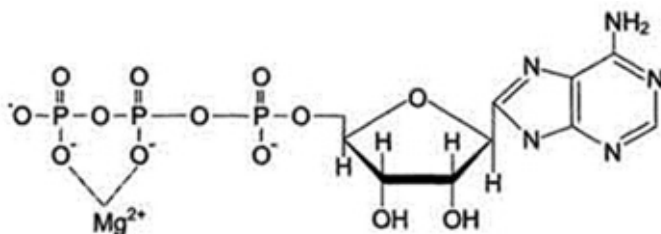


Рисунок 7 – Комплекс АТФ-Mg

В организме активно участвуют в регуляции метаболизма веществ **циклические нуклеотиды** – 3',5'-АМФ и 3',5'-ГМФ, которые образуются из АТФ и ГТФ соответственно в процессе реакций, катализируемых ферментами аденилатциклазой и гуанилатциклазой (рисунок 8). Циклические нуклеотиды являются посредниками в передаче гормонального сигнала (адреналина, норадреналина, глюкагона, кальцитонина, паратгормона, ацетилхолина, окситоцина, серотонина и простагландинов) внутрь клетки.

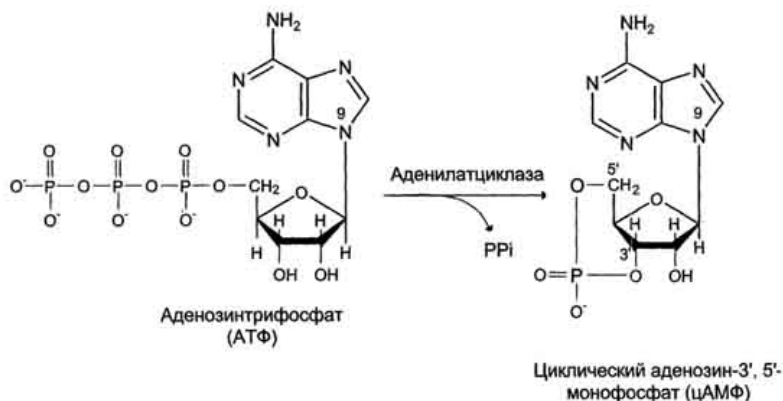


Рисунок 8 – Циклический АМФ – вторичный посредник гормонального сигнала (мессенджер)

Концентрация циклических нуклеотидов в клетке поддерживается путем регуляции соотношения активностей **циклаз** (**аденилатциклазы** и **гуанилатциклазы**) и гидролизующих циклические нуклеотиды фосфодиэстераз. Циклазы стимулируют образование цАМФ, цГМФ; фосфодиэстеразы расщепляют циклические нуклеотиды.

Наиболее важными представителями коферментов дегидрогеназ являются **НАД** (**никотинамидадениндинуклеотид**) и **НАДФ** (**никотинамидадениндинуклеотидфосфат**) – производные витамина РР (рисунок 9).

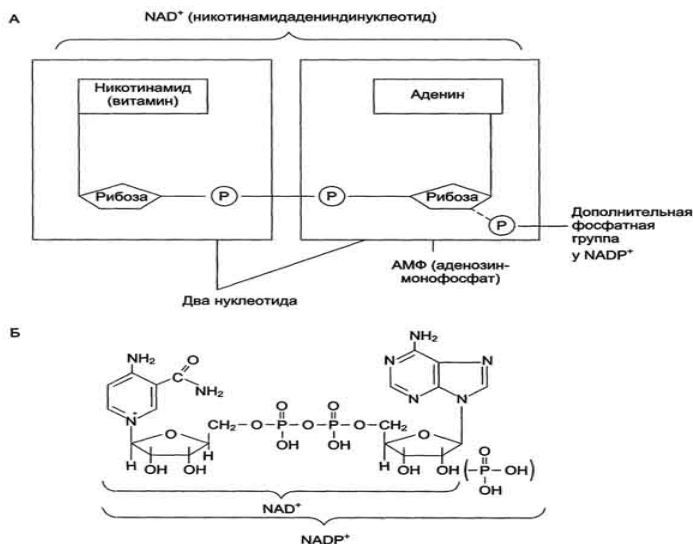


Рисунок 9 – Строение НАД и НАДФ

Они переносят *гидрид-ион* и действуют *всегда* в растворимой форме. НАД передает восстановительный эквивалент из катаболического пути в дыхательную цепь и тем самым участвует в энергетическом обмене. НАДФ, напротив, является самым важным *восстановителем* при биосинтезе.

ФМН (**флавиномононуклеотид**) и **ФАД** (**флавинадениндинуклеотид**) (рисунок 10) участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, акцептируя 2 e⁻ и 2 H⁺ в изоаллоксазиновом кольце.

ФАД образуется из рибофлавина (витамина В₂), многие оксидоредуктазы, называемые флавопротеинами, используют ФАД или ФМН как простетическую группу в реакциях переноса электронов.

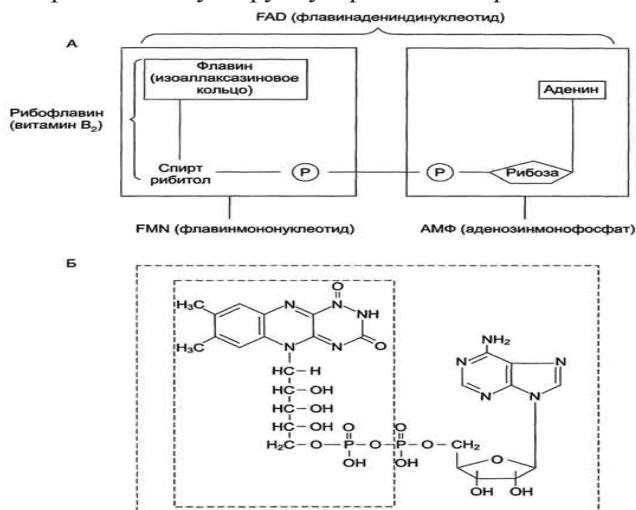


Рисунок 10 – Строение ФМН и ФАД

Переваривание нуклеопротеидов

Нуклеотиды поступают в организм с пищей, главным образом, в составе нуклеопротеидов. Нуклеиновыми кислотами богаты мясо, икра, дрожжи.

Под воздействием соляной кислоты и протеолитических ферментов желудка нуклеопротеиды распадаются на нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК) и белок (рисунок 11).

Белки перевариваются с участием *протеаз* до аминокислот, а нуклеиновые кислоты расщепляются под влиянием *нуклеаз* панкреатического сока. *Рибонуклеаза (РНКаза)* расщепляет РНК, *дезоксирибонуклеаза (ДНКаза)* – ДНК до олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды под действием *фосфодиэстераз* (группа ферментов, гидролизующих фосфодиэфирную связь) распадаются до смеси мононуклеотидов. Мононуклеотиды гидролизуются *нуклеотидазами (фосфатазами)* на фосфатный остаток и нуклеозиды, которые либо всасываются, либо под действием нуклеози-

даз слизистой кишечника деградируют до пуриновых/пиримидиновых оснований и рибозы/d-рибозы.

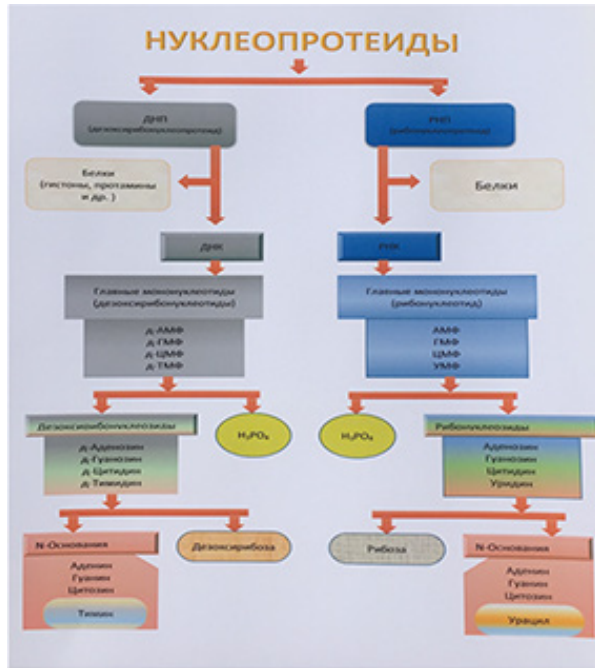


Рисунок 11 – Схема переваривания нуклеопротеидов

Продукты расщепления нуклеиновых кислот всасываются в тонкой кишке в виде мононуклеотидов, нуклеозидов, пентоз, пуриновых и пиримидиновых оснований, фосфорной кислоты (ее эфиров и солей).

Ни сами нуклеотиды, ни азотистые основания, поступающие с пищей, не включаются в синтез нуклеиновых кислот и нуклеотидов организма, то есть нуклеотиды пищи всегда распадаются до конечных продуктов.

В энтероцитах кишечника пуриновые основания могут подвергаться окислению до мочевой кислоты, которая всасывается и затем выделяется с мочой; при этом не происходит их включения во вновь образующиеся молекулы нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Пиримидиновые основания, не успевшие поступить

в энтероциты, катаболизируются под действием микрофлоры кишечника до NH_3 , CO_2 , β -аланина и β -аминоизобутирата и выделяются без их использования в организме.

Азотистые основания, образовавшиеся при переваривании нуклеотидов пищи, всасываются в 12-перстной кишке и по воротной вене поступают в печень, где распадаются до конечных продуктов. Азотистые основания, необходимые для синтеза мононуклеотидов, синтезируются в организме *de novo* из заменимых аминокислот, фолиевой кислоты и углекислого газа.

Биосинтез пуриновых нуклеотидов

Синтез пуриновых оснований происходит **во всех клетках организма**, главным образом, в печени. Исключение составляют эритроциты, полиморфноядерные лейкоциты, лимфоциты.

Существует 2 пути биосинтеза нуклеотидов в клетке:

1) путь повторного использования азотистых оснований и нуклеозидов (экзогенных, и образовавшихся в клетке в процессе репарации ДНК или при распаде «отработавших» РНК). Наиболее активно протекает в интенсивно размножающихся клетках (эмбриональных, регенерирующих, эпителиальных, опухолевых);

2) основной путь поступления нуклеотидов – синтез *de novo* (из низкомолекулярных предшественников).

Условно все реакции синтеза *de novo* можно разделить на четыре этапа. Синтез АМФ и ГМФ протекает одинаково до стадии образования инозиновой кислоты.

I этап. Синтез 5'-фосфорибозиламина.

Рибозо-5-фосфат является тем якорем, на основе которого синтезируется пуриновое кольцо. Первая реакция синтеза пуринов заключается в активации углерода в первом положении рибозо-5-фосфата, это достигается синтезом **5-фосфорибозил-1-дифосфата (ФРДФ)** в реакции фосфорилирования, катализируемой *ФРДФ-синтетазой* (рисунок 12). Необходимая для синтеза рибозо-5-фосфат формируется в ПФП превращения глюкозы или образуется в тканях при распаде нуклеиновых кислот и нуклеотидов. ФРДФ является общим донором фосфорибозы в синтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

Вторая реакция – перенос NH_2 -группы глутамина на активированный первый атом С1 рибозо-5-фосфата с образованием **5'-фосфорибозиламина** под действием фермента *ФРДФ-амид-трансферазы*. Внесенная NH_2 -группа фосфорибозиламина уже принадлежит будущему пуриновому кольцу и ее азот будет атомом номер 9.

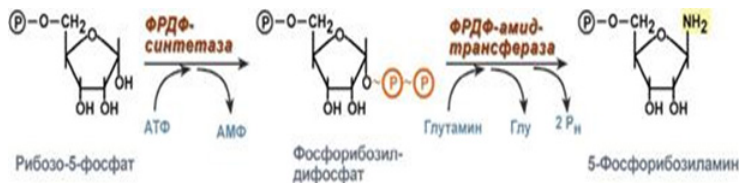


Рисунок12 – Реакции синтеза ФРДФ

Параллельно фосфорибозилдифосфат используется при синтезе пиримидиновых нуклеотидов. Он реагирует с оротовой кислотой и рибозо-5-фосфат связывается с ней, образуя оротидилмонофосфат.

II этап. Синтез инозинмонофосфата.

В этих реакциях источниками атомов пуринового кольца являются **глицин**, **аспартат**, еще одна молекула **глутамин**, **углекислый газ** и производные **тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФК)** (рисунок 13).

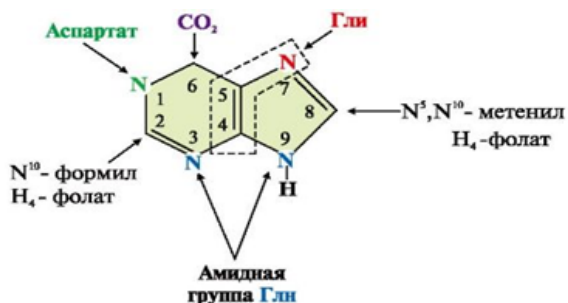


Рисунок 13 – Источники атомов пуринового цикла

Сначала формируется 5-членное кольцо, а затем 6-членное с образованием первого пуринового азотистого основания – **гипоксантина**. В целом на синтез пуринового кольца затрачивается энергия 6 молекул АТФ.

5-фосфорибозиламин вступает последовательно в девять реакций, в результате которых образуется первый пуриновый нуклеотид – **инозинмонофосфорная кислота (ИМФ)**. ИМФ является предшественником пуриновых нуклеотидов – ГМФ и АМФ.

III этап. Синтез аденозинмонофосфата и гуанозинмонофосфата.

Реакция осуществляется из молекул ИМФ.

Гуанозинмонофосфат (ГМФ) образуется в двух реакциях – сначала он окисляется *ИМФ-дегидрогеназой* до ксантозилмонофосфата, источником кислорода является вода, акцептором водорода – НАД. После этого работает *ГМФ-синтетаза*, она использует донором NH_2 -групп – глутамин, источником энергии для реакции служит АТФ (рисунок 14).

Аденозинмонофосфат (АМФ) также образуется в двух реакциях, но в качестве донора NH_2 -группы выступает аспарагиновая кислота. В первой, *аденилосукцинат-синтетазной* реакции на присоединение аспартата используется энергия распада ГТФ, во второй реакции аденилосукцинатлиаза производит отщепление аспарагиновой кислоты в виде фумарата.

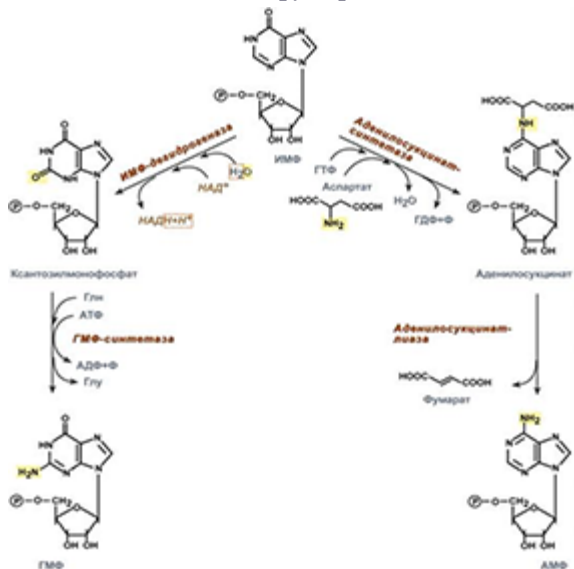


Рисунок 14 – Реакции синтеза АМФ и ГМФ

При образовании пуриновых нуклеотидов ГТФ расходуется на синтез АМФ, а АТФ – на синтез ГМФ. Перекрёстное использование пуриновых нуклеозидтрифосфатов на образование конечных продуктов синтеза помогает поддерживать в клетках баланс адениловых и гуаниловых нуклеотидов. Все реакции протекают в цитозоле большинства клеток организма.

IV Этап. Образование нуклеозидтрифосфатов АТФ и ГТФ.

Синтез ГТФ осуществляется в две стадии посредством переноса макроэргических фосфатных групп от АТФ (рисунок 15). Синтез АТФ происходит несколько иначе. АДФ из АМФ образуется также за счет макроэргических связей АТФ. Для синтеза же АТФ из АДФ в митохондриях есть фермент **АТФ-синтаза**, образующий АТФ в реакциях **окислительного фосфорилирования**.

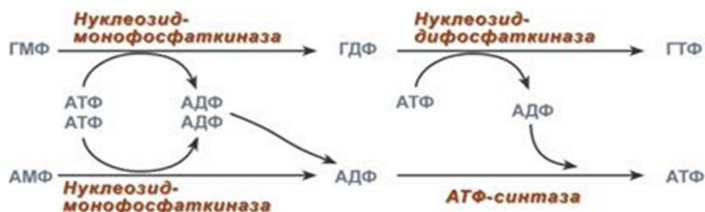


Рисунок 15 – Схема синтеза АТФ и ГТФ

Запасные пути синтеза пуриновых нуклеотидов

Огромные затраты энергии для синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* не способны полностью обеспечить субстратами синтез нуклеиновых кислот в период гастрюляции и раннего роста ребёнка. Потребность в большом количестве нуклеотидов привела к развитию «запасных» путей синтеза необходимых молекул.

Реутилизация пуриновых оснований – это процесс повторного их использования. Он происходит во всех тканях, но особенно актуален в быстрорастущих тканях (эмбриональная, регенерирующая, опухолевая), когда активно идет процесс синтеза нуклеиновых кислот и недопустима потеря их предшественников.

Пуриновые нуклеотиды синтезируются «запасными» путями из азотистых оснований и нуклеозидов, давая от 10 до 20 % общего количества нуклеотидов. При этом используются азотистые

основания и нуклеозиды, образующиеся в процессе катаболизма нуклеиновых кислот («путь спасения»). Эти реакции катализируют ферменты:

- а) **гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза**, которая использует в качестве субстратов гипоксантин и гуанин:



- б) **аденин-фосфорибозилтрансфераза**, отвечающая за образование АМФ из аденина и ФРДФ:



Сущность реутилизации заключается в присоединении к аденину, гуанину или гипоксантину рибозо-5-фосфата и образовании АМФ, ГМФ или ИМФ. Эту реакцию осуществляют соответствующие трансферазы. Наиболее характерным примером является реутилизация гипоксантина и гуанина под влиянием фермента **гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы**. В качестве источника рибозо-5-фосфата используется фосфорибозилдифосфат (ФРДФ).

Регуляция синтеза пуринов

В регуляции синтеза пуриновых нуклеотидов можно выделить несколько уровней.

Управление синтезом в целом происходит на этапе **фосфорибозиламидотрансферазы**. Основную роль в регуляции на этом уровне играет ингибирующее влияние мононуклеотидов и/или концентрация ФРПФ.

Каждый нуклеотид (АМФ, ГМФ) тормозит свое образование по **механизму обратной отрицательной связи**, то есть продукт реакции (или совокупности реакций) ингибирует начальные этапы процесса, действуя на ферменты своего синтеза. Для синтеза пуринов такими ингибиторами являются АМФ и ГМФ.

Второй уровень регуляции связан с контролем за поддержанием соответствующего равновесия между АТФ и ГТФ (**положительная перекрестная регуляция**). АТФ, являясь источни-

ком энергии для синтеза ГМФ, стимулирует образование ГМФ. В свою очередь ГТФ, как источник энергии для синтеза АМФ, стимулирует образование АМФ со стороны АТФ и ГТФ.

Концентрация ФРПФ зависит от скорости его синтеза, утилизации и разрушения. Синтез ФРПФ активирует наличие субстратов синтеза (рибоза-5-фосфата) и каталитической активности ФРПФ-синтетазы, активность которой связана с концентрацией фосфатов и мононуклеотидов, выступающих в роли аллостерических регуляторов.

Пиримидиновый нуклеотид тимидиндифосфат (ТДФ) блокирует фермент ФРДФ-синтетазу, что снижает синтез ФРДФ, который используется при синтезе пуринов и пиримидинов.

Скорость утилизации ФРПФ в значительной степени зависит от интенсивности цикла реутилизации пуриновых оснований и интенсивности синтеза пуринов *de novo*.

Лекарственная регуляция синтеза пуринов

Наличие путей повторного использования азотистых оснований и нуклеозидов позволяет использовать синтетические аналоги пуринов и пиримидинов для химиотерапии опухолей и лечения вирусных инфекций (например, 5-фторурацил, меркаптопурин, ацикловир, АЗТ (азидотимидин) и др.). Такие препараты включаются клеткой в состав нуклеотидов, встраиваются в молекулу ДНК и вызывают цитотоксический эффект.

При разработке новых противоопухолевых средств были предложены ингибиторы ферментов:

- *ФРДФ-амидтрансфераза* (азосерин, диазонорлейцин);
- *ИМФ-дегидрогеназа* (микофеноловая кислота, 6-меркаптопурин);
- *аденилосукуцинатлиаза* (6-меркаптопурин).

Катаболизм пуриновых нуклеотидов

Наиболее активно катаболизм пуринов идет в печени, тонком кишечнике (пищевые пурины) и почках.

Реакции распада пуринов можно условно разделить на пять стадий:

1. АМФ и ГМФ теряют фосфатный остаток под действием **фосфатаз** или **нуклеотидаз** с образованием нуклеозидов – аденозина, гуанозина.

2. Аденозин гидролитически дезаминируется **аденозиндеаминазой** с образованием инозиновой кислоты – ИМФ.

3. Фермент **нуклеозидфосфорилаза** отщепляет рибозу от инозина и гуанозина в форме рибозо-1-фосфата. Продуктом реакции являются свободные основания – гипоксантин и гуанин.

4. Гуанин под влиянием **гуаниндеаминазы (гуаназы)** дезаминируется в ксантин.

5. Гипоксантин и ксантин под действием **ксантиноксидазы** с участием молекулярного кислорода окисляются в **мочевую кислоту** (рисунок 16). Ксантиноксидаза является аэробной оксидоредуктазой, простетическая группа включает ионы Fe^{3+} , Mo и ФАД.



Рисунок 16 – Катаболизм пуриновых нуклеотидов

У человека мочевая кислота является конечным продуктом обмена пуринов и выводится из организма с мочой и 20 % – с желчью через кишечник, где она разрушается микрофлорой до CO_2 и воды. Ежесуточно выводится 0,4–0,6 г мочевой кислоты и уратов.

Мочевая кислота является слабой кислотой и в биологических жидкостях находится в недиссоциированной форме в комплексе с белками или в виде моноватриевой соли – **урата**. В норме содержание мочевой кислоты в сыворотке крови составляет 0,12–0,42 ммоль/л, или 3–7 мг/дл, а в суточной моче – 400–600 мг/дл.

Частым нарушением катаболизма пуринов является **гиперурикемия** – повышение в плазме крови концентрации мочевой кислоты. Растворимость солей мочевой кислоты (уратов) в плазме крови невелика и при превышении порога растворимости в плазме (около 0,7 ммоль/л) они кристаллизуются в периферических зонах с пониженной температурой. Мочевая кислота выводится из организма с мочой. Однако в почках происходит ее интенсивная реабсорбция и концентрация мочевой кислоты в крови поддерживается на постоянном уровне 0,12–0,42 ммоль/л. За сутки в организме образуется около 1 грамма мочевой кислоты. Мочевая кислота и ее соли – **ураты (натриевые соли мочевой кислоты)** плохо растворимы в воде и могут выпадать в осадок и откладываться в сосудах.

В зависимости от длительности и тяжести **гиперурикемия** проявляется:

1. Появлением **тофусов** (*греч.* tophus – пористый камень, туф), т. е. отложением уратных кристаллов в коже и подкожных слоях, мелких суставах ног и рук, сухожилиях, хрящах, костях и мышцах. Поскольку лейкоциты фагоцитируют кристаллы уратов, причиной воспаления является разрушение лизосомальных мембран лейкоцитов кристаллами мочевой кислоты. Освободившиеся лизосомальные ферменты выходят в цитозоль и разрушают клетки, а продукты клеточного катаболизма вызывают воспаление.

2. **Нефропатии** в результате кристаллизации мочевой кислоты с поражением почечных канальцев и **мочекаменная болезнь**.

Главным провоцирующим фактором кристаллизации является **увеличение кислотности мочи**. При понижении pH мочи ниже 5,75 ураты переходят в менее растворимую форму (кетоформу) и кристаллизуются в почечных канальцах.

За кислению мочи возникает по различным причинам. Это может быть избыточное питание мясopодуктами, содержащими большое количество нуклеиновых кислот, аминокислот и неорганических кислот, что делает такую пищу «кислой» и снижает pH мочи. Также кислотность мочи усиливается при ацидозах различного происхождения. Растительная диета приводит к подщелачиванию мочи, что увеличивает долю растворимых в воде солей мочево́й кислоты – уратов.

3. **Подагра** (*греч.* *podlos* – нога, *agra* – захват, дословно – «нога в капкане») – поражение мелких суставов. В 50–75 % случаев первым признаком заболевания является мучительная ночная боль в больших пальцах ног.

Подагрой страдает от 0,3 до 1,7 % населения земного шара. У мужчин сывороточный фонд уратов в два раза выше, чем у женщин, поэтому они болеют подагрой в 20 раз чаще, чем женщины.

Заболевание генетически детерминировано и вызвано:

- дефектами **ФРДФ-синтетазы**, связанными с гиперактивацией фермента, либо его устойчивостью к ингибированию конечными продуктами синтеза;
- частичной потерей активности *гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы*, которая обеспечивает повторное использование пуринов.

При полной потере активности/отсутствии фермента *гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы* (фермент реутилизации пуриновых оснований) развивается тяжелая форма гиперурикемии – **синдром Леша – Нихана**, при котором наблюдаются неврологические и психические отклонения. Впервые его описали в 1964 году в США студент-медик Майкл Леш и педиатр Уильям Нихан. В первые месяцы жизни детей неврологические расстройства еще не наблюдаются, но на пеленках обнаруживаются розовые и оранжевые пятна, вызванные повреждением

мочевыводящих путей кристаллами мочевой кислоты. К 4–6-му месяцу обнаруживаются отклонения в развитии, а именно – отставание физического развития (с трудом держит голову), повышенная возбудимость, рвота, периодическое повышение температуры. К концу первого года жизни симптомы нарастают, развивается нарушение координации движений, хореоатетоз, корковый паралич, спазм мышц ног. Наиболее характерный признак заболевания проявляется на 2–3-м году жизни – **аутоагрессия**, или самокалечение – неодолимое стремление детей кусать себе губы, язык, суставы пальцев на руках и ногах. Болезнь наследуется как рецессивный признак, сцепленный с X-хромосомой и встречается только у мальчиков.

Для диагностики нарушений используют ***определение концентрации мочевой кислоты*** в крови и моче.

Лечат подагру диетой, ограничивающей потребление мясных продуктов, пива, кофе, чая, шоколада, печени, и **аллопуринолом** – структурным аналогом гипоксантина. Ксантиноксидаза окисляет препарат в оксипуринол, который прочно связывается с активным центром фермента и останавливает катаболизм пуринов на стадии гипоксантина, который в 10 раз лучше растворим в жидкостях организма, чем мочевая кислота.

Примечание. Хореоатетоз – сочетание хореического гиперкинеза (быстрые, порывистые движения) с атетозом (медленные судорожные движения).

Синтез пиримидиновых нуклеотидов

К пиримидиновым азотистым основаниям относят **тимин, цитозин и урацил**. На основе азотистых оснований синтезируются **нуклеозиды**, представляющие собой комбинацию азотистого основания и рибозы (или дезоксирибозы). Присоединением одного, двух или трех остатков фосфорной кислоты к нуклеозиду достигается образование соответственно нуклеозид (моно-, ди-, три-)фосфатов – **нуклеотидов**.

Синтез пиримидиновых оснований происходит во всех клетках организма. В отличие от разветвленного синтеза пуринов,

синтез пиримидинов происходит **линейно**, пиримидиновые нуклеотиды образуются последовательно, друг за другом. Вначале образуется пиримидиновое кольцо, а затем к нему присоединяется рибозо-5-фосфат. Источниками атомов для пиримидинового кольца являются **аспарагиновая кислота, глутамин, CO_2** , затрачивается 2 молекулы АТФ (рисунок 17).

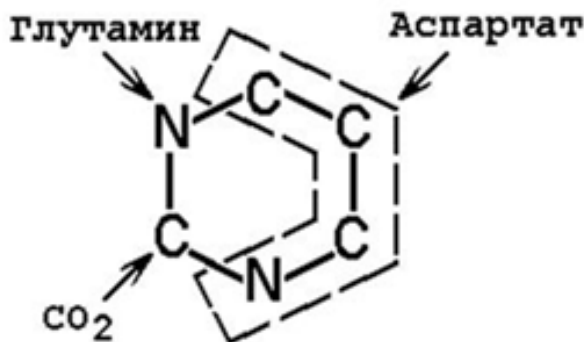


Рисунок 17 – Источники атомов пиримидинового кольца

Вначале образуется карбамоилфосфат из NH_3 , CO_2 , АТФ. Затем с участием аспарагиновой кислоты образуется дигидрооротовая кислота, а из неё – оротовая кислота. Оротовая кислота далее взаимодействует с 5'-фосфорибозил-1-пирофосфатом, при этом синтезируется оротидин-5-фосфат, который затем декарбоксилируется с образованием уридинмонофосфата УМФ), являющегося общим предшественником всех пиримидиновых нуклеотидов.

Синтез УМФ *de novo* включает шесть последовательных реакций.

Условно можно выделить три общих этапа синтеза УМФ:

1. Образование карбамоилфосфата. Образование карбамоилфосфата в отличие от синтеза мочевины происходит в цитозоле большинства клеток организма (см. Биосинтез мочевины). В этой реакции донором аминогруппы является глутамин, реакцию катализирует фермент **карбамоилфосфатсинтетаза II** (рисунок 18).

2. Образование пириимидинового кольца. Карбамоил-фосфат в реакции с аспарагиновой кислотой образует **карбамоиласпартат**, который дегидратируется с образованием пириимидинового цикла **дигидрооротовой кислоты**. Дигидрооротовая кислота под действием дегидрогеназы превращается в **оротат**.

3. Синтез оротидинмонофосфата и уридинмонофосфорной кислоты. В реакции с **фосфорибозилдифосфатом (ФРДФ)** к оротовой кислоте присоединяется **рибозо-5-фосфат** и образуется оротидилмонофосфат (ОМФ), при декарбоксилировании превращающийся в **уридинмонофосфат (УМФ)**.

Источником фосфорибозилдифосфата (ФРДФ) является первая из двух реакций синтеза пуриновых нуклеотидов.

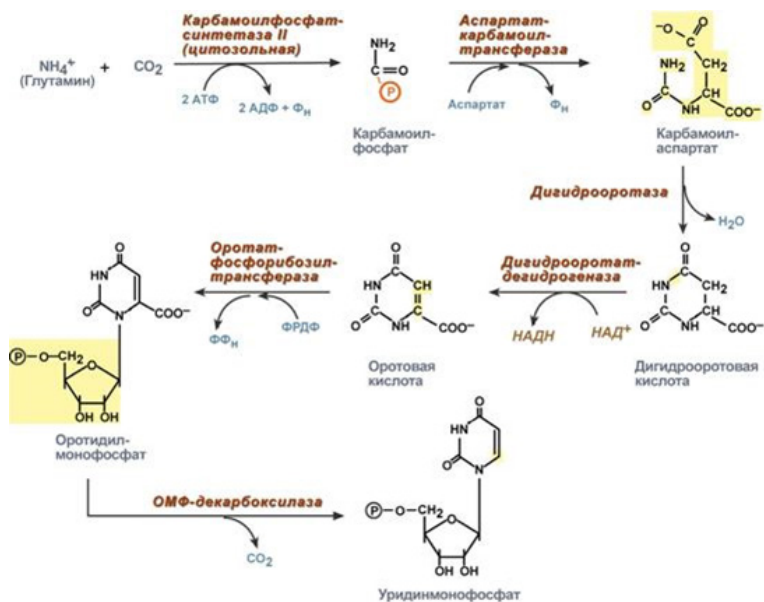


Рисунок 18 – Синтез УМФ

Синтез УТФ осуществляется из УМФ в две реакции посредством переноса макроэргических фосфатных групп от **АТФ** (рисунок 19).



Рисунок 19 – Синтез УТФ

Синтез цитидинтрифосфата (ЦТФ) происходит из УТФ с затратой энергии АТФ при участии глутамина, являющегося донором NH_2 -группы (рисунок 20). Реакцию катализирует фермент ЦТФ-синтетаза.

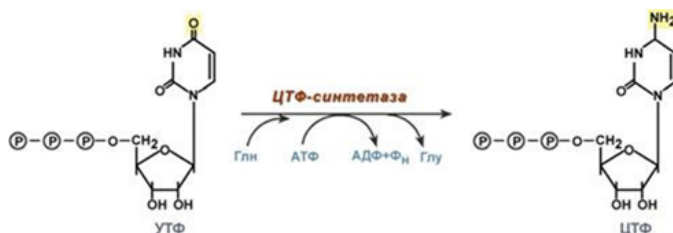


Рисунок 20 – Синтез ЦТФ

Оротацидурия

Оротацидурия (или оранжевая кристаллоурия) – нарушение метаболизма пиримидинов, проявляющееся повышенной экскрецией с мочой оротовой кислоты. Заболевание может быть наследственным и приобретенным.

Наследственная форма оротацидурии весьма редка (описано не более 20 случаев). В основе лежит одновременный дефект двух ферментов последних реакций – *оротатфосфорибозилтрансферазы* и *оротидилдекарбоксилазы*, трансформирующих оротовую кислоту в оротидиловую (ОМФ) и затем в уридилловую (УМФ), необходимую для синтеза пиримидиновых нуклеотидов (УТФ, ЦТФ, ТТФ) и нуклеиновых кислот. Нарушение синтеза нуклеиновых кислот ведет к извращению эритропоэза и развитию мегалобластной анемии, несмотря на нормальное содержание в организме витамина B_{12} и фолиевой кислоты. Снижение активности указанных ферментов приводит к избыточному накоплению и выделению с мочой **оротовой кислоты** и ее предшествен-

ников: дигидрооротовой и карбамоиласпарагиновой кислот. Заболевание проявляется на втором полугодии жизни гипохромной мегалобластической **анемией, лейкопенией, отставанием умственного и физического развития**. Высокие концентрации оротата в крови и тканях не токсичны для организма, а указанные симптомы возникают в результате неспособности организма из-за «**пиримидинового голода**» обеспечить нормальную скорость синтеза нуклеиновых кислот и увеличения числа клеток. Диагноз ставится при обнаружении в охлажденной моче оранжевых игольчатых кристаллов оротовой кислоты.

Болезнь осложняется тем, что при недостатке УТФ и ЦТФ активируются первые реакции синтеза оротовой кислоты. С мочой выделяется до 1,5 г оротата (в 1000 раз больше, чем в норме). При отсутствии лечения гибель наступает в первые годы жизни. Однако, поскольку первопричиной заболевания является «пиримидиновый голод», его можно достаточно успешно корректировать с помощью приема **уридина**, при этом серьезно не опасаясь передозировки. УТФ и ЦТФ ингибируют регуляторные ферменты синтеза пиримидиновых нуклеотидов *de novo* и снижают синтез и выведение оротата с мочой.

Синтез дезоксирибонуклеотидов

Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты необходимы клетке для **синтеза ДНК**. Их образование протекает в три реакции (рисунок 21). Главные события происходят во второй реакции.

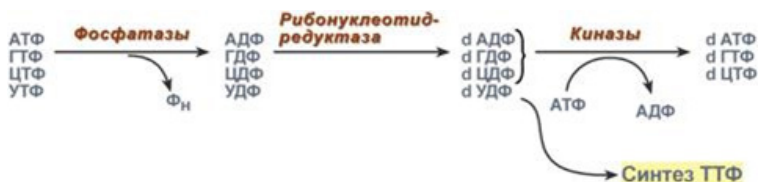


Рисунок 21 – Реакции синтеза дезоксирибонуклеотидов

1. Реакция дефосфорилирования. В самом начале процесса происходит потеря рибонуклеозидтрифосфатами одной фосфатной группы и образуются АДФ, ГДФ, ЦДФ, УДФ.

2. Реакция восстановления. Во второй реакции фермент *рибонуклеотидредуктаза* (РНРаза) восстанавливает АДФ, ГДФ, ЦДФ, УДФ по C_2 до дезоксирибонуклеозиддифосфатов dАДФ, dГДФ, dЦДФ, dУДФ. Донором водорода для восстановления рибозы является белок **тиоредоксин**, его SH-группы окисляются кислородом рибозы и образуется вода (рисунок 22). Последующее восстановление тиоредоксина в рабочее состояние обеспечивается *тиоредоксинредуктазой* с участием **НАДФН₂**.

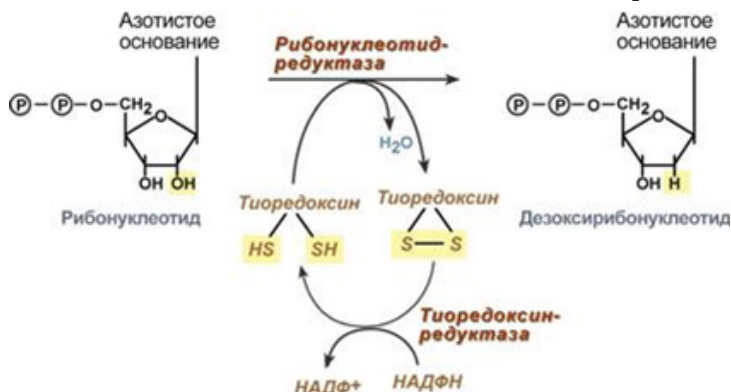


Рисунок 22 – Механизм реакции синтеза дезоксирибонуклеотидов

3. Реакция фосфорилирования. После образования dАДФ, dГДФ, dЦДФ фосфорилируются, а dУДФ используется для синтеза **тимидилового** нуклеотида.

Синтез тимидиловой кислоты дТМФ из дУМФ катализирует тимидилатсинтаза. Донором метильной группы является производное фолиевой кислоты – **N⁵, N¹⁰-метилен-ТГФК**. С помощью этого кофермента в молекулу дУМФ включается метиленовая группа и восстанавливается в метильную, используя два атома водорода от H₄-фолат (рисунок 23). Восстановление H₂-фолат в ТГФК осуществляется при участии двух ферментов: *дигидрофолатредуктазы*, которая с участием НАДФН восстанавливает H₂-фолат в H₄-фолат, и *серин-гидроксиметилтрансферазы*, осуществляющей перенос β-гидроксиметиленовой группы серина на H₄-фолат.

Дигидрофолатредуктаза является мишенью при антиопухолевой терапии.

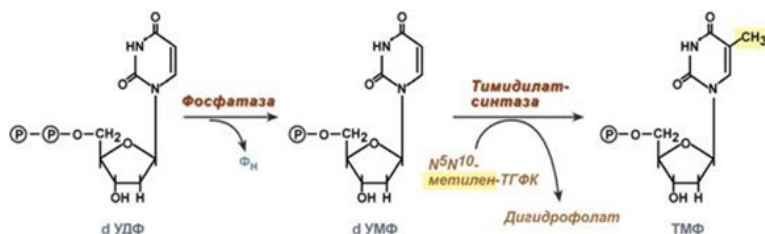


Рисунок 23 – Реакции синтеза ТМФ

Далее тимидилмонофосфат в фосфотрансферазных реакциях фосфорилируется с образованием тимидилтрифосфата (ТТФ) (рисунок 24).

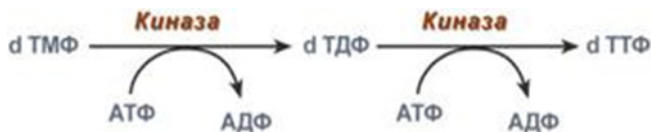


Рисунок 24 – Образование dТТФ

Количество ферментов РНРазы (рибонуклеотидредуктаза) и тимидилатсинтазы регулируется на генетическом уровне **по механизму индукции** и зависит от скорости синтеза ДНК. Высокая скорость реакций, катализируемых РНРазой и тимидилатсинтазой, наблюдаются только тогда, когда клетки активно синтезируют ДНК и готовятся к делению.

Регуляция синтеза пиримидинов

Регуляция синтеза пиримидинов (пиримидиновых нуклеотидов) происходит по **механизму обратной отрицательной связи**, то есть продукт реакции (совокупности реакций) ингибирует начальные этапы процесса. Для синтеза пиримидинов такими ингибиторами являются **УТФ** и **ЦТФ**. Одновременно синтез пиримидинов отрицательно регулируется также пуриновыми нуклеотидами **АМФ** и **ГМФ**. **Тимидилатдифосфат** (ТДФ), в свою очередь, блокирует синтез ФРДФ, который используется как при синтезе пиримидинов, так и при синтезе пуринов.

Регуляторными ферментами синтеза пиримидинов являются **карбамоилфосфатсинтетаза 2**, аллостерическим ингибитором которой служат УТФ и **аспараткарбамоилтрансфераза**, которая ингибируется ЦТФ.

Катаболизм пиримидиновых нуклеотидов

От пиримидиновых нуклеотидов отщепляются остатки фосфорной кислоты и рибозы в реакциях, аналогичных катаболизму пуриновых нуклеотидов. Образующиеся пиримидиновые основания способны разрушаться ферментными системами организма с образованием ряда продуктов (рисунок 25).

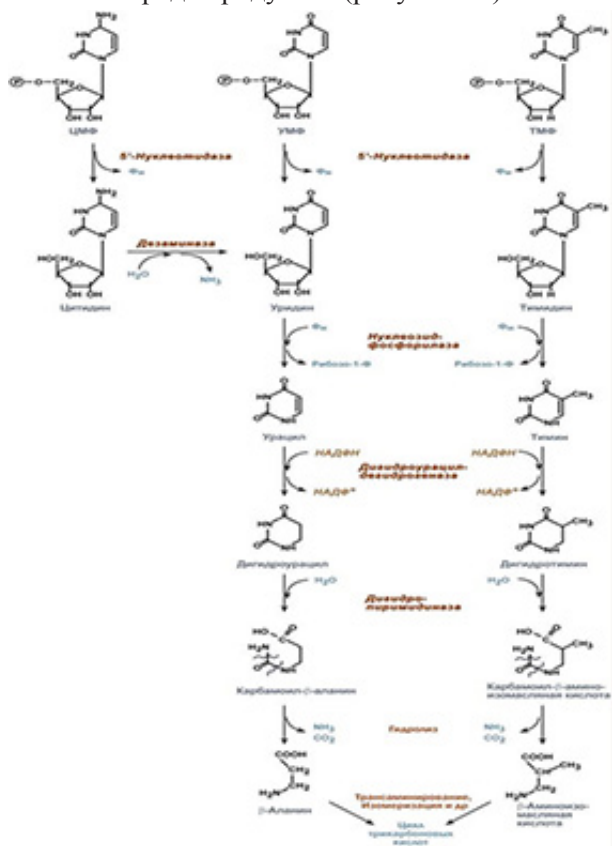


Рисунок 25 – Катаболизм пиримидиновых нуклеотидов

Распад пиримидиновых нуклеотидов происходит параллельно, с использованием одинаковых реакций и ферментов. Основной путь катаболизма пиримидинов в организме человека и млекопитающих включает восстановление урацила или тимина с образованием соответственно дигидроурацила или дигидротимина. Расщепление цитозина происходит по тому же самому механизму, что и двух других нуклеотидов, после его дезаминирования на первой стадии под действием фермента *дезаминазы* и образования урацила.

Раскрытие кольца в дигидроурациле приводит к образованию β -уреидопропионовой кислоты, которая далее гидролизует-ся до CO_2 , NH_3 и β -аланина.

Тимин распадется подобно урацилу, но вместо β -аланина образуется **β -аминоизобутират**, который частично экскретируется с мочой, а частично трансаминируется, превращаясь в метилмалонил полуальдегид, а затем в сукцинил-КоА, который включается в цикл Кребса.

Таким образом, конечными продуктами распада цитозина и урацила являются CO_2 , NH_3 (мочевина) и β -аланин. При аналогичном механизме катаболизма тимина из него получают CO_2 , NH_3 (мочевина) и β -аминоизомасляная кислота.

Можно отметить несколько специфических ферментов:

1. Фермент ***5'-нуклеотидаза*** отщепляет 5'-фосфатную группу от ЦМФ, УМФ и ТМФ.

2. ***Аденозин-дезаминаза*** проводит окислительное дезаминирование цитидина.

3. ***Нуклеозид-фосфорилаза*** удаляет рибозу от уридина и тимидина.

4. ***Дигидроурацил-дегидрогеназа*** катализирует восстановление урацила и тимина.

5. ***Дигидропиримидиназа*** осуществляет гидролитическое расщепление пиримидинового кольца.

6. Далее происходит гидролитическое отщепление **аммиака** и **углекислого газа**.

7. После окончательного разрушения пиримидинового кольца появившиеся β -аминокислоты направляются в реакции

трансаминирования, после чего соответствующие кетокислоты изомеризуются и далее вовлекаются в ЦТК.

Продукты катаболизма пиримидинов хорошо растворимы в воде, либо выводятся из организма, либо повторно утилизируются в других метаболических процессах.

Аммиак включается в орнитиновый цикл образования мочевины.

β-аланин имеет физиологическое значение, он содержится во многих тканях и плазме крови в свободном виде или включается в состав мышечных пептидов **карнозина** (гис-β-ала) и **ансерина** (метил гис-β-ала). Бактериальные клетки используют β-аланин для синтеза **пантотеновой кислоты**, которая входит в состав HS-KoA.

Поскольку тимин встречается только в ДНК, то **по уровню α-аминоизобутирата в моче судят об интенсивности распада ДНК**.

Нарушением обмена пиримидинов является **β-аминоизобутиратацидурия**, то есть накопление β-аминоизомасляной кислоты, конечного продукта распада тиминового кольца, при которой имеется дефект соответствующей трансаминазы. Заболевание протекает бессимптомно и встречается, в основном, у японцев и китайцев (около 25 %).

Иммунодефициты

Иммунодефициты – состояния, связанные с нарушением функций иммунной системы. Они **возникают при ингибировании работы РНРазы**, вызванном недостаточностью ферментов катаболизма аденозина и гуанозина. **Недостаточность аденозиндезаминазы и пуриннуклеозидфосфорилазы** снижает скорость превращения пуриновых нуклеозидов в азотистые основания и мочевую кислоту. В клетках накапливаются избыточные количества рибо- и дезоксирибонуклеотидов, вызывая в быстро делящихся клетках повышение концентрации дАТФ и дГТФ, которые тормозят восстановление всех остальных нуклеозиддифосфатов (НДФ) в дезоксипроизводные. Это останавливает синтез ДНК и деление клеток.

Низкая активность аденозиндезаминазы нарушает пролиферацию и созревание Т- и В-лимфоцитов и сопровождается возникновением тяжелых форм клеточного и гуморального иммунодефицита. Накопление дАТФ ингибирует РНРау и лишает клетки субстратов для синтеза ДНК. Дети с этой патологией, как правило, погибают от частых инфекций.

Наследственная **недостаточность пурииннуклеозидфосфоорилазы** останавливает созревание Т-лимфоцитов в связи с накоплением в клетках предшественниках дГТФ, блокирующего РНРау и синтез пиримидиновых дНТФ, но не столь сильно, как дАТФ. У пациентов оказывается сниженным клеточный иммунитет. Больные страдают частыми и хроническими инфекционными заболеваниями.

Механизм действия противоопухолевых и противовирусных препаратов

Аналоги азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов, широко используются в медицинской практике в качестве лекарственных препаратов. Они могут:

- 1) ингибировать определенные ферменты синтеза нуклеотидов и нуклеозидов;
- 2) включать в растущие цепи РНК или ДНК и останавливать рост цепей.

К числу мощных противоопухолевых препаратов принадлежит **5-фторурацил (5-FU)** – аналог урацила. Механизм действия 5-фторурацила определяется его превращением в 5-фтор-дезоксидуридинмонофосфат (5-FdУМФ) и 5-фторуридинтрифосфат (5-FУТФ). 5-FdУМФ – **конкурентный ингибитор** фермента **тимидилатсинтазы**, что ведет к блокированию синтеза ДНК.

Цитозинарабинозид (или цитарабин) представляет собой соединение, в котором остаток рибозы замещён на стероизомер – арабинозу. Оно используется в химиотерапии рака, в частности, при острой миелоцитарной лейкемии.

В организме препарат может превращаться в дНТФ, **ингибировать ДНК-полимеразу** и снижать скорость репликации.

Аналоги фолиевой кислоты. В обмене нуклеотидов производные H_4 -фолата как доноры одноуглеродных групп участвуют в формировании пуринового гетероциклического кольца и в ключевой реакции синтеза дТМФ из дУМФ, катализируемой тимидилатсинтазой.

В последнем случае N^5, N^{10} -метилен- H_4 -фолат **служит донором метильной группы** и в ходе реакции превращается в H_2 -фолат. Для активного синтеза тимидиловых нуклеотидов H_2 -фолат должен повторно использоваться, проходя стадию восстановления в H_4 -фолат (рисунок 26).

Метотрексат, аминоптерин, триметоприм – структурные аналоги фолиевой кислоты - ингибируют *дигидрофолатредуктазу*, что препятствует ресинтезу ТГФК и лишает реакцию кофермента. Препараты широко используют в химиотерапии опухолей.

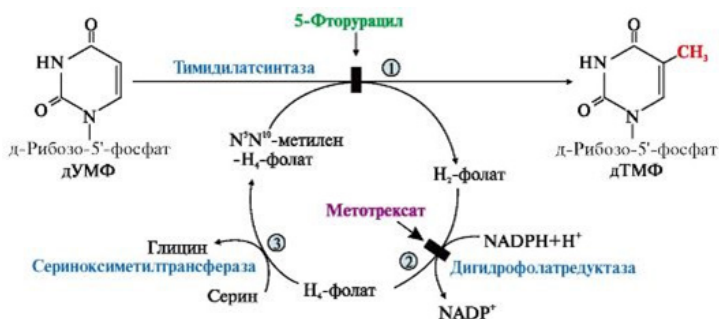


Рисунок 26 – Схема ингибирования реакций синтеза дТМФ лекарственными препаратами при онкологических заболеваниях

Азидотимидин (АЗТ, или зидовудин) представляет собой мощный противовирусный препарат, применяющийся в лечении инфекций, сопровождающих приобретённые формы иммунодефицита. Будучи структурным аналогом тимидина, препарат имеет в 3'-положении дезоксирибозы азидогруппу. При синтезе ДНК на матрице ретровирусной РНК встраивается вместо дТТФ, так как вирусная ДНК-полимераза («обратная транскриптаза») обладает большим сродством к нему, чем к естественному субстрату дТТФ. В результате образование новых молекул ДНК прекращается.

Препарат наиболее эффективно влияет на размножение вирусов и, в частности, ретровируса, вызывающего ВИЧ-инфекцию.

Цидовудин (аналог тимидина) и **зальцитабин** (аналог 2-d-цитидина) фосфорилируются в клетках организма с образованием d-НТФ, ингибируют обратную транскриптазу и блокируют репликацию вируса иммунодефицита человека.

5-йоддезоксинуридин используют в терапии кератитов и поражений роговицы глаза вирусом герпеса. Препарат нарушает синтез клеточной ДНК за счет трех механизмов: а) конкурирует с тимидином за определенные ферменты, участвующие в синтезе ДНК (тимидинкиназа, тимидилатсинтетаза, ДНК-полимераза), б) подавляет активность некоторых ферментов по механизму обратной связи и в) после фосфорилирования включается в ДНК на место тимидина, что приводит к нарушению функций молекулы при транскрипции и(или) репликации

Азатиоприн в организме превращается в 6-меркаптопурин, который оказывает мощное иммуносупрессорное действие. Препарат широко используют в трансплантологии для предотвращения развития иммунологических реакций, вызывающих отторжение трансплантата.

Ацикловир (ацикло-гуанозин) превращается в соответствующий НТФ, встраивается в синтезируемую молекулу ДНК и останавливает её синтез. Используется в лечении герпесвирусных инфекций.

Раздел 2. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

В хранении, передаче и преобразовании генетической информации центральное место занимают **нуклеиновые кислоты**.

У всех живых организмов ДНК является носителем генетической информации. В структуре молекулы ДНК в виде последовательности нуклеотидов записана вся программа, необходимая для жизнедеятельности клетки, ее реакции на различные внешние воздействия.

У прокариот (доядерных организмов) вся наследственная информация представлена в одной кольцевой молекуле ДНК, состоящей из нескольких миллионов пар нуклеотидов. Иногда часть информации содержится в нескольких небольших кольцевых ДНК – плаزمидах.

У эукариот (имеющих клеточное ядро) ДНК, в основном, сосредоточена в хромосомах. В каждой хромосоме содержится одна двойная нить ДНК, размер которой достигает сотен миллионов пар нуклеотидов. Относительно маленькие молекулы ДНК содержатся в митохондриях. Они необходимы для синтеза митохондриальных РНК и митохондриальных белков.

ДНК и РНК представляют собой линейные полимеры, построенные из нуклеотидов.

Первичная структура нуклеиновых кислот (НК) – это последовательность чередования **нуклеотидов** в полинуклеотидной цепи, связанных между собой **3',5'-фосфодиэфирной связью** (между дезоксирибозой одного и остатком фосфорной кислоты другого нуклеотида). Образующиеся полимеры имеют фосфатный остаток на 5'-конце и свободную ОН-группу пентозы на 3'-конце.

Строение и функции ДНК

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – высокомолекулярное соединение, которое содержится в каждой клетке живого организма. ДНК выполняет уникальные биологические функции:

1. Хранение наследственной информации и её передача из поколения в поколение при делении клеток.

2. Участвует в качестве матрицы в реализации генетической информации, регулирует во времени и пространстве биосинтез компонентов клетки.

3. Определяет деятельность клетки и организма в течение жизненного цикла.

4. Обеспечивает индивидуальность данного организма.

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

В клетках прокариот содержится одна хромосома, в состав которой входит двойная цепь ДНК. Эукариотические клетки содержат несколько молекул ДНК, которые связаны с белками и организованы внутри ядра. В ядре ДНК размещается благодаря образованию компактной структуры. В ДНК условно можно выделить первичную, вторичную и третичную структуры.

Первичная структура ДНК – порядок чередования дезоксирибонуклеотидов в полинуклеотидной цепи (рисунок 27). Линейная последовательность дезоксирибонуклеотидов в полимерной цепи ДНК обычно сокращённо записывают с помощью однобуквенного кода, например, d-A-G-C-T-T-A-C-A-, от 5' (начало цепи) – к 3'-концу. Полярность цепи играет важную роль при синтезе ДНК: удлинение цепи возможно только путём присоединения новых нуклеотидов к свободному 3'-концу.

В каждом мономере нуклеиновой кислоты присутствует остаток фосфорной кислоты. При pH 7 фосфатная группа полностью ионизирована, поэтому *in vivo* нуклеиновые кислоты существуют в виде полианионов (имеют множественный отрицательный заряд). Остатки пентоз тоже проявляют гидрофильные свойства. Азотистые основания почти нерастворимы в воде, но некоторые атомы пуринового и пиримидинового циклов способны образовывать водородные связи.

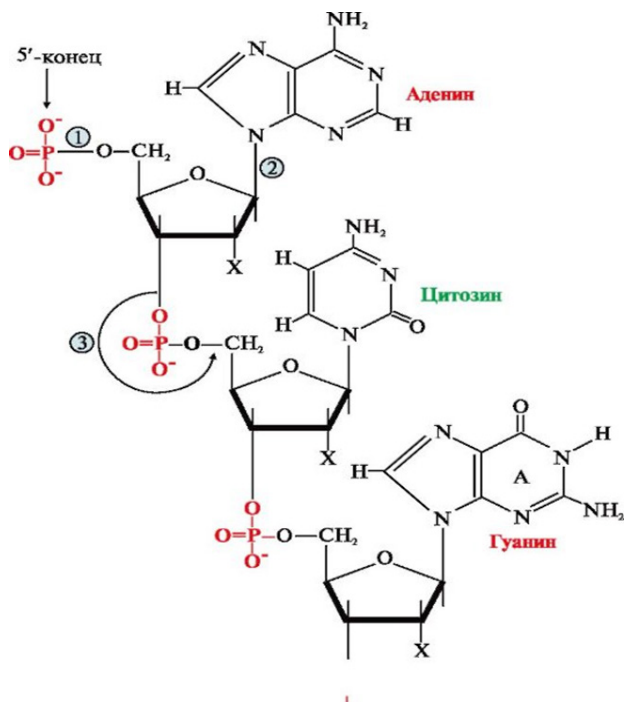


Рисунок 27 – Первичная структура нуклеиновых кислот.

Связи, стабилизирующие структуру:

- 1) 5'-фосфоэфирная; 2) N-гликозидная; 3) 3',5'-фосфодиэфирная

Вторичная структура ДНК. В соответствии с моделью, предложенной Джеймсом Уотсоном и Френсисом Криком в 1953 году вторичная структура ДНК представляет собой **двойную правозакрученную α -спираль** (рисунок 28), в которой азотистые основания обращены внутрь молекулы, а дезоксирибозо-фосфатные остатки – наружу и образуют остов спирали.

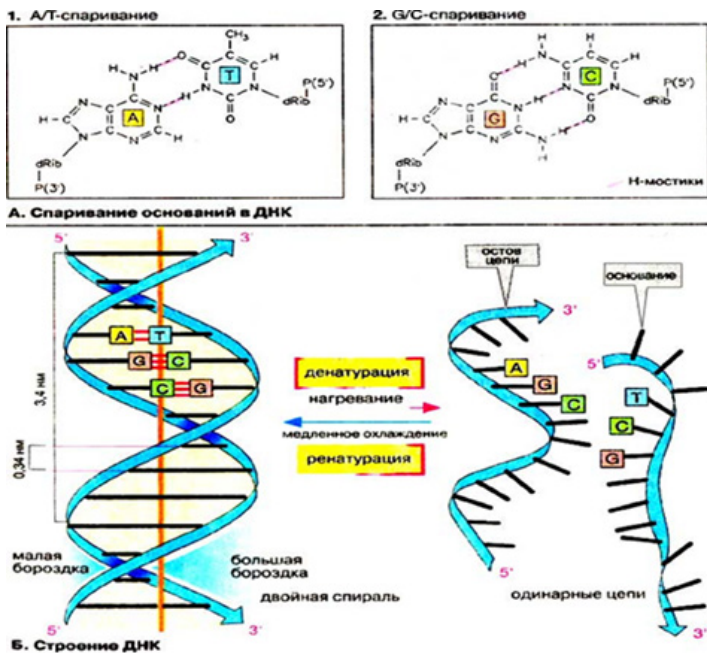


Рисунок 28 – Вторичная структура ДНК

Две полинуклеотидные цепи расположены **антипараллельно** и удерживаются относительно друг друга за счет взаимодействия между **комплементарными** азотистыми основаниями: Т одной цепи соответствует А, а Ц – Г в другой цепи (рисунок 29). Комплементарность – последовательность азотистых оснований в одной полинуклеотидной цепи определяет последовательность оснований в другой цепи. Полинуклеотидные цепи ДНК **разнонаправленны (антипараллельны)**: 5'-концу одной цепи соответствует 3'-конец комплементарной цепи, и наоборот. Подобная направленность цепей имеет важное биологическое значение при репликации и транскрипции молекулы ДНК.

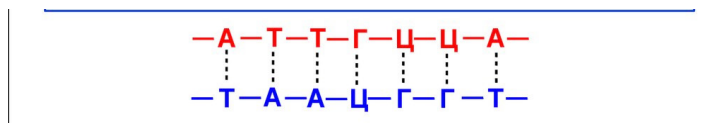


Рисунок 29 – Условное обозначение комплементарности цепей ДНК

На один виток спирали приходится 10 нуклеотидных пар, шаг спирали составляет 3,4 нм.

Содержание азотистых оснований в молекуле ДНК определяют **правила Чаргаффа** (Эрвин Чаргафф, 1953 г.):

1) количество пуриновых оснований равно количеству пиримидиновых ($A + G = C + T$);

2) количество аденина и цитозина равно количеству тимина и гуанина ($A + C = G + T$);

3) Всегда количество остатков аденина равно количеству остатков тимина, а количество гуанина равно цитозину ($A = T$; $C = G$);

4) ДНК, выделенные из клеток различных биологических видов, отличаются друг от друга величиной **коэффициента видоспецифичности**:

$(G + C) / (A + T)$. Соотношение $A + T / G + C$ – величина постоянная и **является видоспецифической характеристикой организма**. Например, у человека он равен 1,5, у быка – 1,3.

Комплементарные основания уложены в стопку в сердцевине спирали, такая структура исключает контакт азотистых остатков с водой. Пары оснований слегка смещены относительно друг друга. В образованной структуре различают две бороздки – большую, шириной 2,2 нм, и малую, шириной 1,2 нм. Азотистые основания в области большой и малой бороздок взаимодействуют со специфическими белками, участвующими в организации структуры хроматина.

Цепи удерживаются относительно друг друга **водородными связями** между комплементарными азотистыми основаниями: между А и Т формируется две водородные связи, между Г и Ц – три. Одновременно возникают гидрофобные взаимодействия между ароматическими кольцами азотистых оснований одной полинуклеотидной цепи.

Вторичная структура нуклеиновых кислот образуется за счёт слабых взаимодействий – водородных и гидрофобных. Поэтому, если водный раствор ДНК нагреть до 100 °С, то связи, удерживающие две цепи двойной спирали вместе, разрушаются. В результате разрыва водородных и гидрофобных связей цепи ДНК

расходятся с сохранением первичной структуры (без разрыва ковалентных связей). Этот процесс называют **денатурацией**. Денатурация ДНК обратима: если раствор, содержащий денатурированную ДНК, очень медленно охлаждать, то могут получиться двухспиральные структуры, идентичные исходным. Такой процесс получил название **ренатурация (ренативация)**.

Третичная структура ДНК. У всех живых организмов двухспиральные молекулы ДНК плотно упакованы с образованием сложных трехмерных структур. В митохондриях, пластидах и у прокариот молекулы ДНК имеют кольцевую замкнутую форму и образуют левые (отрицательные) суперспирали.

Третичная структура ДНК эукариот формируется в результате ее взаимодействия со специфическими белками. Каждая молекула ДНК упакована в отдельную хромосому, в составе которой разнообразные белки связываются с отдельными участками ДНК и обеспечивают суперспирализацию и компактизацию молекулы. Хромосомы образуют компактную структуру только в фазу деления. В период покоя комплексы ДНК с белками распределены равномерно по объему ядра, образуя **хроматин**. В электронном микроскопе изображение хроматина напоминает бусы, разделенные нитевидными перемиками.

Белки хроматина включают две группы: гистоны и негистоновые белки.

Гистоны – небольшие белки с молекулярной массой от 11 000 до 22 кД и высоким содержанием лизина и аргинина. Благодаря положительному заряду гистоны образуют **ионные связи** с отрицательно заряженными фосфатными группами, расположенными на внешней стороне двойной спирали ДНК.

Четыре типа гистонов в количестве восьми молекул (по две каждого вида – H2α, H2β, H3, H4) образуют комплекс – **нуклеосомный кор** (рисунок 30). Этот комплекс взаимодействует с молекулой ДНК длиной около 146 нуклеотидных пар, которая накручивается на поверхность гистонового октамера, совершая 1,75 витка вокруг кора и образует структуру, называемую **нуклеосомой**.

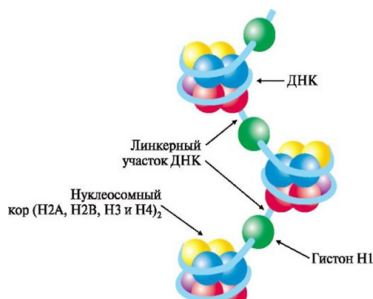
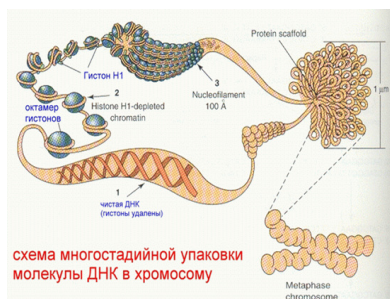


Рисунок 30 – Третичная структура ДНК

Между нуклеосомами находятся участки ДНК длиной около 30 нуклеотидных пар – **линкерные участки**, к которым присоединяются молекулы гистона H1. H1 – регуляторные белки, определяют активность данного участка ДНК и защищают эти участки от действия нуклеаз. **Негистоновые белки** представлены множеством ферментов репликации, транскрипции, репарации, регуляции этих процессов и компактизации ДНК. При участии структурных, регуляторных белков и ферментов, участвующих в синтезе ДНК и РНК, нить нуклеосом преобразуется в высококонденсированный комплекс белков и ДНК. Образованная структура в 10 000 раз короче исходной молекулы ДНК.

Аминокислотные остатки лизина, аргинина и концевые аминогруппы гистонов могут модифицироваться: ацетилироваться, фосфорилироваться, метилироваться или взаимодействовать с белком убиквитином (негистоновый белок). Модификации бывают обратимыми и необратимыми, они изменяют заряд и конформацию гистонов, а это влияет на взаимодействие гистонов между собой и с ДНК. Активность ферментов, ответственных за модификации, регулируется и зависит от стадии клеточного цикла. Модификации делают возможными конформационные перестройки хроматина и изменяют активность генов.

Основная часть хроматина неактивна. Она содержит плотноупакованную ДНК. Активный хроматин находится в области «перемычек», при разворачивании нуклеосом составляет в разных клетках от 2 до 11 %. В клетках головного мозга его больше всего – 10–11 %, в клетках печени – 3–4 %, почек – 2–3 %.

Структура и функции РНК

Синтез белка в клетке происходит не в ядре, где находится ДНК, а в цитоплазме. Молекулами, ответственными за считывание и перенос информации, а также за преобразование этой информации в последовательность аминокислот в структуре белковой молекулы, являются рибонуклеиновые кислоты (РНК).

Цепи РНК значительно короче цепей ДНК. Схема построения РНК аналогична ДНК. Мономерами РНК являются нуклеотиды, состоящие из азотистого основания, углевода (рибозы) и фосфорной кислоты, соединенные 3',5'-фосфодиэфирными связями. Полинуклеотидные цепи молекулы РНК полярны, то есть имеют различимые 5'- и 3'-концы. При этом, в отличие от ДНК, РНК является одноцепочечной молекулой. Различия химического строения заключаются в следующем: дезоксирибоза, присутствующая в ДНК, заменена на молекулу рибозы, а тимин представлен другим пиримидином – урацилом. Рибонуклеиновые кислоты (РНК) – одонитевые молекулы, поэтому в отличие от ДНК их вторичная и третичная структуры нерегулярны. В организме РНК находятся в виде комплексов с белками – рибонуклеопротеидов.

Первичная структура РНК – порядок чередования рибонуклеотидов в полинуклеотидной цепи. В РНК, как и в ДНК, нуклеотиды связаны между собой 3',5'-фосфодиэфирными связями. Концы полинуклеотидных цепей РНК неодинаковы. На одном конце находится фосфорилированная ОН-группа 5'-углеродного атома, на другом конце – ОН-группа 3'-углеродного атома рибозы, поэтому концы называют 5'- и 3'-концами цепи РНК. Гидроксильная группа у 2'-углеродного атома рибозы делает молекулу РНК нестабильной. Так, в слабощелочной среде молекулы РНК гидролизуются даже при нормальной температуре, тогда как структура цепи ДНК не изменяется. **Вторичная структура РНК** формируется за счет различных способов складывания (петли, узлы и др.) одной цепи, стабилизируемых водородными связями, возникающими между азотистыми основаниями. Участки цепи РНК в таких спиральных структурах антипараллельны, но не

всегда полностью комплементарны, в них встречаются неспаренные нуклеотидные остатки или даже одноцепочечные петли, не вписывающиеся в двойную спираль. Наличие спирализованных участков характерно для всех типов РНК. **Третичная структура РНК** возникает путём взаимодействия спирализованных элементов вторичной структуры между собой или с белком и характеризуется компактной и упорядоченной конформацией.

Сходства и различия РНК и ДНК

Сходства молекул РНК и ДНК:

1. Биополимеры, мономерами которых являются мононуклеотиды; в РНК, как и в ДНК, нуклеотиды связаны между собой 3',5'-фосфодиэфирными связями.
2. Содержат по два пиримидиновых и по два пуриновых основания.
3. Углеводы (рибоза и дезоксирибоза) находятся в β -Д-рибофуранозной форме;
4. Содержат остатки фосфорной кислоты.

Различия молекул РНК и ДНК:

1. Молекулярная масса молекулы ДНК больше, чем РНК.
2. ДНК – 2-цепочечная молекула, РНК – 1-цепочечная.
3. В ДНК содержится тимин, в РНК – урацил – неметилированная форма тимина (азотистое основание, комплементарное аденину).
4. В составе ДНК – углевод дезоксирибоза, в РНК – рибоза; РНК нестабильна, цепи ДНК устойчивы.

ДНК содержится преимущественно в ядре, но небольшое ее количество находится в митохондриях и пластидах. РНК синтезируется в ядре и работает в цитоплазме.

ДНК содержит генетическую информацию и определяет особенность белков. С помощью ДНК осуществляется передача наследственных особенностей клетки. РНК непосредственно участвует в биосинтезе белка.

Структура молекул ДНК и РНК является **видоспецифической характеристикой** организмов.

Содержание и соотношение ДНК и РНК зависят от функции клеток. В сперматозоидах содержание ДНК составляет до 60 % сухой массы; в большинстве клеток намного меньше – в соматических от 1 до 10 %, в мышечных – около 2 %. Содержание РНК в 5–10 раз больше, чем ДНК.

Виды РНК и выполняемые функции

Молекулы РНК в зависимости от выполняемых функций подразделяются на три основных вида: информационные, или матричные (иРНК, мРНК), транспортные (тРНК) и рибосомальные (рРНК).

1. Информационная, или матричная РНК (иРНК, или мРНК), является копией участка ДНК, переносит генетическую информацию с молекулы ДНК к месту синтеза белка – в рибосому. Синтезируется в ядре при участии фермента РНК-полимеразы. Она составляет 5 % от всех видов РНК клетки. Каждая молекула мРНК является матрицей в синтезе соответствующего белка, поэтому их количество соответствует числу белков в организме. Информационная РНК включает от 300 до 30 000 нуклеотидов, её размер зависит от кодируемого белка.

2. Транспортная РНК (тРНК) активирует аминокислоты, транспортирует аминокислоты к месту синтеза белка – в рибосому, является адаптором в трансляции мРНК: переводит последовательность нуклеотидов мРНК в последовательность аминокислотных остатков белковой молекулы. Имеет форму «креста» или «клеверного листа» и состоит из 75–95 нуклеотидов (самые мелкие молекулы РНК). Ее количество в клетке составляет 10–15 % РНК клетки.

3. Рибосомная РНК (рРНК) синтезируется в ядрышке и образует «скелет» рибосом; участвует в сборке белка на рибосоме, узнавании и активировании генов ДНК. Составляет 85 % РНК клетки.

Строение информационной РНК

Информационная РНК формирует первичную, вторичную и третичную структуры.

Первичная структура иРНК – последовательность чередования рибонуклеотидов в полинуклеотидной цепи (рисунок 31). В мРНК выделяют следующие активные участки:

1. **КЭП** (шапочка) представляет собой 7метил-ГТФ, присоединенный к информационному участку 5'-5'фосфодиэфирной связью. КЭП обеспечивает связывание мРНК с рибосомой с образование пептидного центра.

2. **Информационный участок** несет информацию о последовательности аминокислот в белке. У эукариот зрелые мРНК являются моностронными, то есть каждая из них несет информацию о структуре только одной полипептидной цепи.

3. **Полиадениловый хвост** образован 100–200 остатками адениловой кислоты (АМФ), которые обеспечивают стабильность и сохранность мРНК в процессе синтеза белка, предохраняют информационный участок от действия цитозольных нуклеаз.

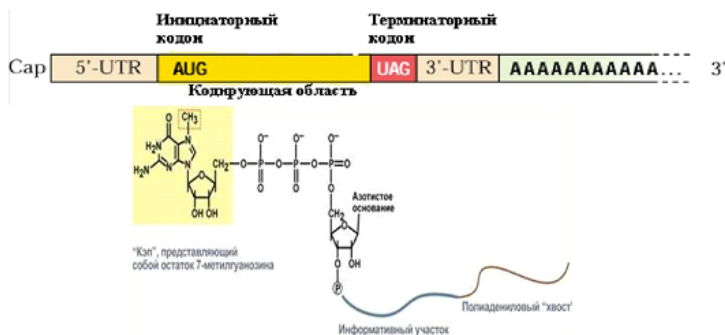


Рисунок 31 – Схема первичной структуры и-РНК

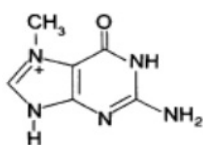
Первичная структура мРНК скопирована с участка ДНК, содержащего информацию о первичной структуре полипептидной цепи. Первичная структура остальных типов РНК (тРНК, рРНК) является окончательной копией генетической программы соответствующих генов ДНК.

Вторичная структура иРНК – изогнутые участки, образованные в результате взаимодействия комплементарных участков молекулы; удерживаются **водородными связями**.

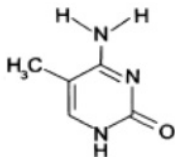
Третичная структура иРНК формируется за счет соединения с белком: на вторичную структуру наматывается белок – **информофер**, который обеспечивает транспорт мРНК из ядра в цитозоль и защиту от действия нуклеаз. Третичная структура стабилизируется **ионными взаимодействиями**.

Характерной особенностью РНК является наличие в их структуре **минорных нуклеотидов** (редко встречающихся). Минорные нуклеотиды содержат в своем составе **модифицированные азотистые основания** – минорные, не имеющие комплементарной пары (рисунок 32).

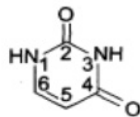
Минорные основания выполняют две функции: 1) они делают тРНК устойчивыми к действию нуклеаз цитоплазмы; 2) участвуют в формировании вторичной и третичной структур молекулы.



7-Метилгуанин



5-Метилцитозин



Псевдоурацил

Рисунок 32 – Минорные азотистые основания

Строение транспортной РНК

Молекулы тРНК представляют собой полинуклеотидные цепи, синтезируемые на определенных последовательностях ДНК. **Вторичная структура тРНК** образуется вследствие комплементарного соединения азотистых оснований, которые находятся в разных участках полинуклеотидной цепи тРНК. Комплементарные пары азотистых оснований соединены **водородными связями**. Участки тРНК, содержащие минорные нуклеотиды, не образуют водородные связи между нуклеотидами и формируют

петли или линейные звенья. Вторичная структура тРНК имеет вид «клеверного листа» (рисунок 33). Для каждой из 20 аминокислот имеются специфические тРНК (обычно более одной).

В тРНК выделяют следующие структурные участки:

1. **Акцепторный участок (конец)**, состоящий из четырех линейно расположенных нуклеотидов, три из которых имеют во всех типах тРНК одинаковую последовательность – **ЦЦА**. Гидроксил 3'-ОН аденозина свободен. К нему карбоксильной группой присоединяется аминокислота, отсюда и название этого участка тРНК-акцепторный. Связанную с 3'-гидроксильной группой аденозина аминокислоту тРНК доставляет к рибосомам, где происходит синтез белка.

2. **Антикодонавая петля**, обычно образуемая семью нуклеотидами. Она содержит специфический для каждой тРНК триплет нуклеотидов, называемый **антикодоном**. Антикодон тРНК комплементарен кодону мРНК. Кодон-антикодоновое взаимодействие определяет порядок расположения аминокислот в полипептидной цепи во время сборки ее в рибосомах.

3. **Псевдоуридиловая петля (Ψ-петля)** состоит из семи нуклеотидов и обязательно содержит остаток псевдоуридиловой кислоты. Псевдоуридиловая петля участвует в связывании тРНК с рибосомой.

4. **Дигидроуридиновая**, или **D-петля**, состоит обычно из 8–12 нуклеотидных остатков, среди которых обязательно имеется несколько остатков дигидроуридина. D-петля необходима для связывания с *аминоацил-тРНК-синтетазой*, которая участвует в узнавании аминокислотой своей тРНК (см. Биосинтез белка).

5. **Добавочная петля** варьирует по размерам и составу нуклеотидов у разных тРНК.

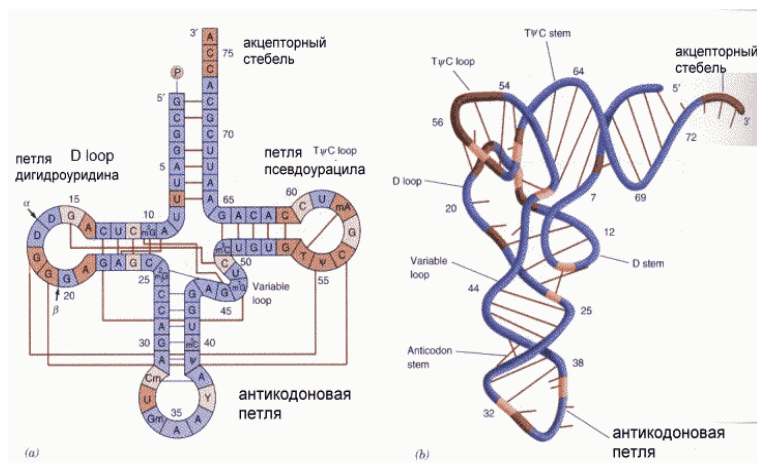


Рисунок 33 – Вторичная и третичная структуры тРНК

Третичная структура тРНК формируется за счет образования водородных связей между нуклеотидами из разных частей «листа клевера», связывания вторичной структуры с белками ионными взаимодействиями, его лепестки заворачиваются на тело молекулы и удерживаются в таком положении дополнительно ван-дер-ваальсовыми связями, напоминая собой форму буквы Г или L (локтевой сгиб). Наличие стабильной третичной структуры является еще одной особенностью т-РНК.

Строение рибосомной РНК

Рибосомная РНК (рРНК) составляет основную часть РНК цитоплазмы (80–90 %). Самая большая из всех видов РНК. В рРНК среди азотистых оснований выше, чем обычно, содержание гуанина и цитозина. Встречаются также минорные нуклеозиды, но не столь часто, как в тРНК, примерно 1 %. Это, в основном, нуклеозиды, метилированные по рибозе. **Вторичная структура** имеет вид двухспиральных шпилек, стабилизируемых *водородными связями* (рисунок 34).

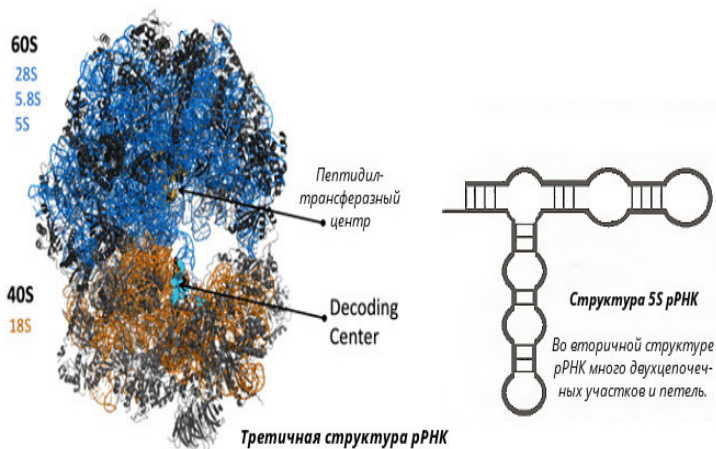


Рисунок 34 – Вторичная структура рРНК

Третичная структура рРНК формируется за счет связывания рРНК с рибосомальными белками и организацией субъединиц рибосом. Рибосомальные РНК являются основой для формирования субъединиц рибосом. Очищенные рРНК способны спонтанно скручиваться в компактные структуры, по размерам и форме похожие на рибосомальные субъединицы.

Рибосомы локализованы в цитоплазме, ядрышке, митохондриях, хлоропластах.

рРНК выполняет следующие функции:

- 1) структурный компонент рибосом – их целостность, необходима для биосинтеза белков;
- 2) обеспечивают правильность связывания рибосомы с мРНК;
- 3) обеспечивают правильность связывания рибосомы с тРНК.

Каждая рибосома состоит из большой и малой субъединиц. Субъединицы включают в себя большое количество белков и рибосомальные РНК, которые не подвергаются трансляции. Рибосомы, как и рРНК, различаются по коэффициенту седиментации (осаждения), измеряемому в единицах Сведберга (S). Данный коэффициент зависит от скорости осаждения субъединиц при центрифугировании в насыщенной водной среде.

Каждая **рибосома эукариот** имеет коэффициент седиментации, равный **80S**, и ее принято обозначать как 80S-частицу. **Бактериальная рибосома** имеет коэффициент седиментации **70S** и обозначается как 70S-частица, что указывает на меньшую скорость осаждения

Раздел 3. МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ

Термин «матричные биосинтезы» подразумевает способность клетки синтезировать полимерные молекулы, такие как **нуклеиновые кислоты** и белки, на основе шаблона – матрицы. Это обеспечивает точную передачу сложнейшей структуры от уже существующих молекул к новосинтезируемым.

Основной постулат молекулярной биологии

Последовательность нуклеотидов в ДНК определяет структуру всех белков клетки. В подавляющем большинстве случаев передача наследственной информации от материнской клетки к дочерней осуществляется при помощи ДНК (**репликация**). Репликация, или самоудвоение, – перенос генетической информации в пределах одного класса нуклеиновых кислот: ДНК → ДНК (рисунок 35). Возможна репликация отдельных участков ДНК, называемая амплификацией.

Для использования генетической информации самой клеткой необходимы РНК, образуемые на матрице ДНК (**транскрипция**). *Транскрипция, или переписывание*, – перенос информации между разными классами нуклеиновых кислот: с ДНК → на РНК. В ходе транскрипции образуются все типы РНК: иРНК, тРНК, рРНК. Участки ДНК, кодирующие определенные белки (гены), копируются (транскрибируются) в виде полинуклеотидной цепи матричной РНК (мРНК), которая затем служит матрицей для синтеза белка.

Далее РНК непосредственно участвует на всех этапах синтеза белковых молекул (**трансляция**), обеспечивающих структуру и деятельность клетки. *Трансляция, или перевод*, – перенос генетической информации в пределах разных классов макромолекул, то есть с иРНК → на белок.



Рисунок 35 – Центральная догма молекулярной биологии

Таким образом, генетическая информация, записанная в ДНК (в генотипе) обеспечивает образование фенотипических признаков клетки, то есть *генотип трансформируется в фенотип*. Это направление потока информации включает три типа матричных синтезов:

- 1) синтез ДНК – репликация;
- 2) синтез РНК – транскрипция;
- 3) синтез белка – трансляция.

На вышесказанном основана *центральная догма молекулярной биологии*, согласно которой перенос генетической информации осуществляется только от нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК). Получателем информации может быть другая нуклеиновая кислота (ДНК или РНК) и белок.

РЕПЛИКАЦИЯ – БИОСИНТЕЗ ДНК

Репликация (синтез) ДНК происходит не беспорядочно, а в строго определенный период жизни клетки – в S-фазу клеточного цикла, когда клетка готовится к делению. Инициацию репликации регулируют специфические сигнальные белковые молекулы – **факторы роста**. Факторы роста связываются рецепторами мембран клеток, которые передают сигнал, побуждающий клетку к началу репликации

Важное участие в регуляции смены фаз клеточного цикла занимают **циклины** – белки массой 35–90 кДа, уровень которых меняется в ходе клеточного цикла. Различают циклины А, В, D, Е. Циклины являются активаторами *циклин-зависимых киназ (ЦЗК)*, которые в активной форме могут фосфорилировать специфические белки, участвующие в подготовке и продвижении клетки по клеточному циклу. Активные комплексы циклин-ЦЗК фосфорилируют внутриклеточные белки, изменяя их активность. Этим обеспечивается продвижение по клеточному циклу. В каждом цикле концентрация циклинов постепенно возрастает от нуля, а затем резко падает опять до нуля.

Циклины Д, Е – регулируют переход клетки из G_1 -фазы в S-фазу.

Циклины А – активируют синтез ДНК на начальной стадии S-фазы.

Циклины В – регулируют переход клетки из G_2 -фазы в М-фазу.

Механизм репликации, как установили Мэтью Мезельсон и Франклин Сталь в 1957 году, **полуконсервативный**, то есть на каждой нити материнской ДНК синтезируется дочерняя копия. В образованных молекулах одна цепь является материнской, а комплементарная ей – дочерней, вновь синтезированной (рисунок 36). Если нуклеотидная последовательность одной из двух цепей оказывается повреждённой (изменённой), информацию можно восстановить, так как исходная (материнская) цепь сохранена.



Рисунок 36 – Схема полуконсервативного механизма репликации ДНК

Репликация ДНК эукариот

Как любой матричный биосинтез, репликация требует наличия нескольких компонентов, это:

- матрица – в ее роли выступает материнская нить ДНК;
- субстраты для синтеза – dATФ, dГТФ, dЦТФ, ТТФ, АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ;
- источник энергии – dATФ, dГТФ, dЦТФ, ТТФ, АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ;
- ферменты, катализирующие процесс;
- ионы Mg^{2+} ;
- белковые факторы.

Основные принципы репликации ДНК:

- комплементарность;
- антипараллельность;
- униполярность;
- потребность в затравке;
- прерывистость;
- полуконсервативность.

Репликация происходит на обеих цепях ДНК. Синтез ДНК начинается в определенных участках, получивших название точки репликации или **ориджины -ori** (от *англ.* origin – начало) (рисунок 37). Каждая нить ДНК становится матрицей и от них в обоих направлениях и одновременно из множества точек происходит репликация генома человека. Синтез начинается в области ориджина и идет в противоположных направлениях. В каждом ориджине образуются две репликативные вилки. Единица репликации у эукариотов называется **репликоном** – это участок ДНК между соседними ориджинами. В целом репликация всех ДНК у эукариот заканчивается за несколько часов.

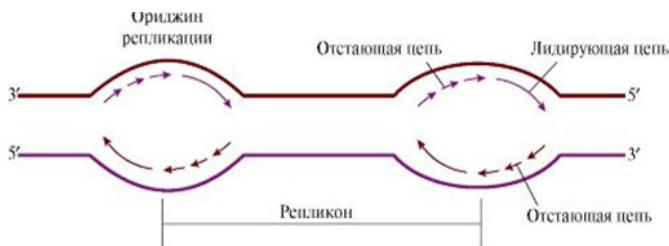


Рисунок 37 – Образование репликативных вилков, перемещающихся в противоположных направлениях от ориджина

Этапы репликации

Процесс репликации включает следующие основные этапы:

- Инициация – Формирование репликативной вилки.
- Элонгация – Синтез новых цепей ДНК.
- Терминация – Завершение формирования цепи ДНК.

I этап. Участок ДНК, служащий местом синтеза новых цепей ДНК называется **репликативной вилкой**. Инициация реплика-

ции ДНК эукариот начинается с образования комплекса ориджи-на репликации и белка-инициатора репликации. **Формирование репликативной вилки** идет при участии *ДНК-топоизомеразы*, которая является «обратимой нуклеазой». Фермент разрывает 3',5'-фосфодиэфирную связь в одной из цепей ДНК и присоединяется к 5'-концу в точке разрыва, вызывая сброс суперспиралей ДНК-хроматина.

В области разрыва цепи присоединяются две молекулы *ДНК-хеликаз* и обеспечивают локальное разделение двойной спирали ДНК с затратой энергии АТФ.

ДНК-топоизомераза восстанавливает расщепленную 3',5'-фосфодиэфирную связь и отделяется, а к одноцепочечным участкам ДНК присоединяются *SSB-белки* (англ. single strand binding – ДНК-связывающие белки), не закрывая азотистых оснований и предотвращают повторное комплементарное «слипание» матричных цепей (рисунок 38).

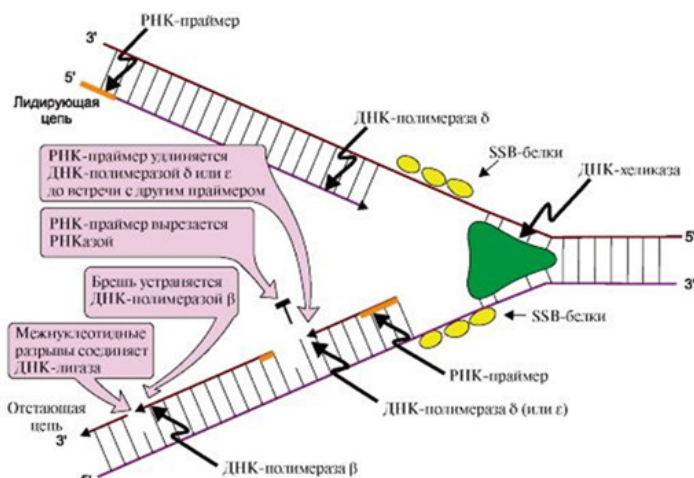


Рисунок 38 – Репликация ДНК эукариот

Всего в репликации ДНК участвует более 40 ферментов и белковых факторов, объединенных в единую *ДНК-репликационную систему – праймасому*, называемую также *реплисомой*.

II этап. Синтез новых цепей ДНК – элонгация

На этой стадии дочерние нити ДНК образуются на обеих нитях материнской ДНК. Процесс катализирует несколько **ДНК-полимераз**, которые синтезируют полинуклеотидные цепи из **дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ)**: дАТФ, дГТФ, дТТФ и дЦТФ антипараллельно матрице.

Новые цепи синтезируются по-разному. На матрице ДНК с направлением от 5'- к 3'-концу цепь растет **непрерывно** по ходу движения репликативной вилки и называется **лидирующей**. Вторая цепь синтезируется на матрице с направлением от 5'- к 3'-концу, против движения репликативной вилки, в виде коротких отрезков – **фрагментов Оказаки**. Рост этой цепи начинается только тогда, когда на матрице ДНК появляется одноцепочечный участок длиной около 200 нуклеотидов, поэтому ее называют **запаздывающей**, или **отстающей**.

Каждый фрагмент Оказаки включает:

- РНК-праймер (~10 нуклеотидов);
- участок ДНК, примерно равный длине цепи из 150 нуклеотидов (у прокариот – 1000 нуклеотидов).

Включение дезоксирибонуклеозидмонофосфатов в растущую цепь сопровождается гидролизом макроэргических связей соответствующих нуклеозидтрифосфатов, энергия которых расходуется на образование 3',5'-фосфодиэфирной связи между нуклеотидами.

В синтезе эукариотических ДНК принимают участие 5 ДНК-полимераз (α -альфа, β -бета, γ -гамма, δ -дельта, ϵ -эпсилон). ДНК-полимеразы α , β , δ , ϵ участвуют в синтезе ДНК в ядре клеток, ДНК-полимераза γ – в репликации митохондриальной ДНК.

ДНК-полимеразы δ , β и ϵ не способны инициировать синтез новых цепей ДНК, они могут лишь удлинять имеющуюся нуклеотидную цепь. Синтез лидирующей и отстающей нитей начинается с образования «затравки» или **праймера**-олигорибонуклеотида (РНК), включающего около 10–100 моновнуклеотидов. Его образование катализирует **праймаза (РНК-полимераза)** – субъединица **ДНК-полимеразы α (альфа)**. Далее этот фермент, используя в качестве субстратов дНТФ, переключается на образование ДНК

и включает во вновь синтезируемую нить 20–50 дезоксирибонуклеотидов, после чего заменяется другими ДНК-полимеразами. Синтез лидирующей цепи продолжает **ДНК-полимераза δ (дельта)** со скоростью до 100 пар в минуту, а отстающей – **ДНК-полимераза ϵ (эпсилон)** до встречи фрагмента Оказаки. Оба фермента, помимо полимеразной, обладают еще и экзонуклеазной активностью. В ходе синтеза они могут исправлять допущенную ошибку и отщеплять неправильно включенный нуклеотид, что обеспечивает высокую точность синтеза ДНК.

Праймеры удаляет **ДНК-полимераза β** . К ОН-группе на 3'-конце предыдущего фрагмента ДНК-полимераза β присоединяет дезоксирибонуклеотиды, заполняя образованную «брешь». Связывание 3'-ОН-группы одного фрагмента с 5'-фосфатом предыдущего фрагмента и образование фосфодиэфирной связи катализирует **ДНК-лигаза**. Фермент, используя энергию АТФ, из множества фрагментов Оказаки образует непрерывную цепь ДНК.

III этап. Завершение формирования отстающей цепи ДНК. Терминация синтеза ДНК наступает вследствие истощения матрицы. У эукариот при двунаправленной репликации синтез ДНК прекращается, когда встречаются репликационные вилки. Репликационные вилки сливаются, и на каждой матричной цепи образуется дочерняя цепь ДНК. В результате вся ДНК хромосомы оказывается реплицированной.

Кофактором всех стадий репликации является ион Mg^{2+} .

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

Характеристика ферментов репликации

В хронологическом порядке события репликации разворачиваются примерно следующим образом:

1. **ДНК-топоизомеразы**, находясь перед репликативной вилкой, разрезают молекулу ДНК для облегчения ее расплетания и раскручивания.

2. **ДНК-хеликазы**, следуя за топоизомеразами, раскручивают и расплетают молекулу ДНК.

3. ДНК-связывающие белки (ДСБ) связывают расплетенные нити ДНК и стабилизируют их, не допуская обратного «слипания» друг с другом.

4. ДНК-полимераза α присоединяется к нити ДНК сразу после расплетания и в направлении $5' \rightarrow 3'$ синтезирует праймер (РНК-затравку) – последовательность РНК на матрице ДНК длиной от 10 до 100 нуклеотидов. После этого фермент удаляется с нити ДНК.

5. ДНК-полимераза δ (греч. δ – дельта) осуществляет элонгацию ведущей цепи дочерней ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$ на матрице одной из нитей материнской ДНК (скорость 100 пар нуклеотидов в секунду).

6. ДНК-полимераза ϵ проводит синтез фрагмента (длина 150–200 нуклеотидов) отстающей цепи дочерней ДНК в продолжение праймера. Она работает до тех пор, пока не встретит праймер соседнего фрагмента Оказаки, синтезированного ранее. После этого данный фермент удаляется с цепи.

7. ДНК-полимераза β встает вместо ДНК-полимеразы ϵ , движется в том же направлении ($5' \rightarrow 3'$) и удаляет рибонуклеотиды праймера, одновременно встраивая дезоксирибонуклеотиды на их место. Фермент работает до полного удаления праймера, после чего сходит с цепи.

8. ДНК-лигаза производит сшивку нуклеотидов между собой с образованием $3',5'$ -фосфодиэфирной связи.

В активном центре всех ДНК- и РНК-полимераз находится ион Zn^{2+} (кофактор фермента). Для взаимодействия полимераз с субстратами необходимо также присутствие ионов Mg^{2+} , которые образуют с нуклеотидами комплексы и повышают их реакционную способность.

ДНК-полимераза γ реплицирует митохондриальную ДНК.

Ни одна из ДНК-полимераз эукариот, в отличие от прокариот, не обладает нуклеазной активностью.

Репликация ДНК прокариот

У прокариот ДНК имеет форму кольца и содержит один репликон, не связана с белками. Репликация бактериальных

и вирусных кольцевых геномов начинается с определенной точки и идет в противоположных направлениях, то есть у бактерий и вирусов существует одна точка начала репликации (*ori*) и две репликационные вилки. Реплицирующаяся хромосома напоминает по структуре греческую букву Θ (*тэта*). По завершении репликации Θ -типа образуются две кольцевые молекулы (рисунок 39).

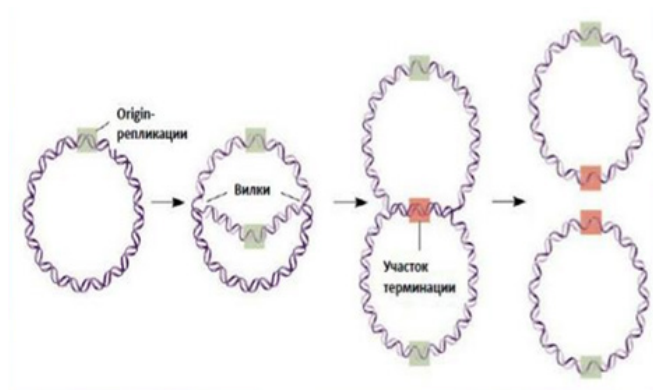


Рисунок 39 – Схема репликации у прокариот

Линейные хромосомы (у некоторых вирусов и эукариот) начинают реплицироваться в одной или нескольких точках, две вилки репликации движутся в противоположных направлениях. По завершении репликации образуются две линейные молекулы.

Синтез ДНК у прокариот протекает в три стадии – **инициация, репликация и терминация** – с участием репликативного мультиферментного комплекса – реписомы, включающего ферменты и белковые факторы (рисунок 40). Фермент топоизомеразы у прокариот называется **ДНК-гираза**.

У прокариот репликацию осуществляют ферменты **ДНК-полимеразы I, II, III**. Все они обладают двумя видами активности: полимеразной (образование 5',3'-фосфодиэфирных связей между дезоксирибонуклеотидами) и нуклеазной (гидролиз фосфодиэфирных связей).

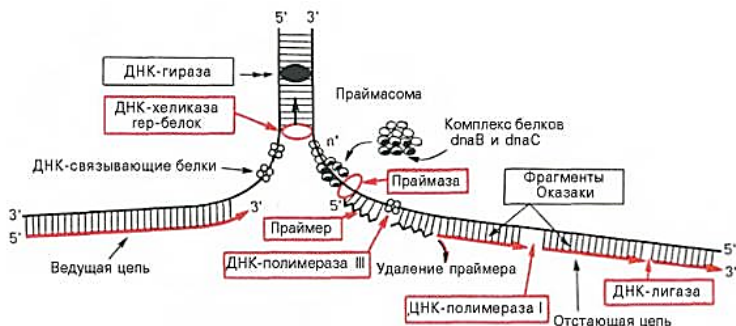


Рисунок 40 – Репликация ДНК прокариот

ДНК-полимераза I (фактор Корнберга) катализирует отщепление праймера (действует как РНКазы), удаление ошибочно присоединенных нуклеотидных остатков и заполнение образующихся пробелов комплементарным фрагментом ДНК. Наряду с ДНК-полимеразой I в гидролизе РНК-затравки в ходе репликации участвует **рибонуклеаза**.

ДНК-полимераза II достраивает поврежденные участки в молекуле ДНК, то есть осуществляет **репарацию** ДНК в направлении от 5'- к 3'-концу.

ДНК-полимераза III является основным ферментом репликации, катализирует синтез на ведущей (лидирующей) и отстающей цепях ДНК комплементарные участки новой ДНК. Фрагменты Оказаки у прокариот содержат 1000–2000 нуклеотидов.

ДНК-полимераза I в качестве матрицы использует одноцепочечные участки, а ДНК-полимераза III – двухцепочечные ДНК.

Терминация наступает при исчерпании ДНК-матрицы и прекращения трансферазных реакций. У кишечной палочки существует участок, который обеспечивает терминацию репликации ДНК. При двунаправленной репликации кольцевого генома (как у кишечной палочки) репликативные вилки встречаются в сайте терминации на расстоянии 180° от точки репликации, и в этом месте репликация завершается. Кольцевые ДНК в месте встречи соединяются **лигазой**, при этом они оказываются попарно сцепленными, и в дальнейшем происходит их разделение на отдель-

ные геномы с помощью *топоизомеразы II типа*. Последовательности нуклеотидов новой цепи ДНК строго комплементарны последовательностям родительской цепи, благодаря этому соблюдается передача наследственной информации из поколения в поколение. Точность репликации очень высока – возможна одна ошибка на 10^{10} трансферазных реакций.

Синтез ДНК на матрице РНК

Выдающимся достижением XX века является открытие в составе онковирусов (вирусы Раушера и саркомы Рауса) фермента *обратной транскриптазы*, или *ревертазы (РНК-зависимая ДНК-полимераза)*, катализирующего биосинтез молекулы ДНК на матрице РНК. Ревертаза нуждается в праймере, роль которого может играть тРНК.

На **I этапе** фермент ревертаза синтезирует на матрице вирусной РНК комплементарную цепь ДНК. Образуется так называемая гибридная молекула РНК × ДНК.

На **II этапе** происходит разрушение исходной вирусной РНК из комплекса гибридной молекулы под действием РНКазы.

На **III этапе** на матрице цепи ДНК комплементарно синтезируются новые цепи ДНК. Синтезированная ДНК может встраиваться в ДНК клетки-хозяина и передаваться следующим поколениям клеток. При определенных условиях ДНК вируса может активироваться.

Открытие ревертазы дополнило центральную догму биологии в плане возможности синтеза ДНК на матрице РНК. Ревертаза нашла применение в молекулярной биологии для синтеза генов и фрагментов генов и в генетической инженерии – для расшифровки первичной структуры РНК и белков.

Повреждения, мутации и репарация ДНК

В результате воздействия физических или химических факторов, либо ошибок в процессе репликации и рекомбинации ДНК могут возникать мутации. **Мутации – случайно возникшие стойкие изменения нуклеотидной последовательности**

ДНК (генотипа), затрагивающие целые хромосомы, их части или отдельные гены, приводящие к нарушению структуры и функциям соответствующего белка. Процесс возникновения мутаций называют мутагенезом.

В основе возникновения мутации лежит изменение структуры ДНК или хромосомы, поэтому мутации наследуются в последующих поколениях. Мутационная изменчивость универсальна; она имеет место у всех животных, высших и низших растений, бактерий и вирусов.

Условно мутации делят на:

Спонтанные:

- ошибки репликации;
- депуринизация;
- дезаминирование азотистых оснований.

Индукцируемые:

- образование димеров пиримидинов;
- алкилирование, окисление, восстановление оснований под действием химических мутагенов.

Спонтанные (естественные) мутации возникают в естественных условиях вследствие воздействия на генетический материал живых организмов мутагенных факторов окружающей среды, таких как ультрафиолет, радиация, химические мутагены (не зависит от человека).

Индукцированный (искусственный) мутагенез – возникновение наследственных изменений под влиянием специального воздействия мутагенных факторов внешней и внутренней среды (специально вызваны человеком) на клетку.

Спонтанные ошибки очень редки. При репликации они составляют один ошибочный нуклеотид на 10^6 – 10^9 нуклеотидов, при транскрипции – 10^5 – 10^6 и при трансляции – на 10^4 нуклеотидов.

Спонтанная мутация гена определяет генетическую изменчивость организма. Мутированный ген передается потомству путем полового размножения. У человека и животных суммарная частота мутации близка к 10^{-5} , то есть практически через 100 тыс. лет происходит замена только одной аминокислоты на другую в белке.

Мутагены – факторы, вызывающие мутацию:

1. Физические: излучение (УФ, СВЧ, рентген), радиация.

2. Химические факторы:

- сильные восстановители – гидриды металлов;
- алкилирующие соединения – иприт;
- альдегиды (формальдегид);
- нитрозосоединения;
- некоторые антибиотики;
- пестициды.

3. Биологические факторы: вирусы.

Молекула ДНК постоянно подвергается разнообразным изменениям, вызванным действием различных веществ внешней и внутренней среды, радиацией и ультрафиолетовым облучением. Под влиянием этих факторов в структуре ДНК происходит:

- **дезаминирование оснований**, при котором цитозин превращается в урацил, аденин – в гипоксантин, а гуанин – в ксантин. Чаще всего дезаминируется цитозин;
- **удаление азотистых оснований – депуринизация**, или **депиримидинизация**, результатом которой является появление в ДНК остатков дезоксирибозы, лишенных основания;
- образование ковалентных связей между рядом расположенными в цепи основаниями – **пиримидиновых димеров** под действием ультрафиолета (УФО);
- **разрыв полинуклеотидных цепей**;
- появление **ковалентных сшивок** между цепями ДНК или цепями ДНК и гистонами;
- включение некомплементарного основания и встраивание таутомерных форм азотистых оснований – возникновение **ошибок репликации**;
- образование **продуктов алкилирования ДНК** (6-метилгуанина, 7-метилгуанина, 3-метиладенина) под воздействием некоторых химических веществ.

Наиболее распространённым химическим изменением, вызванным ультрафиолетовым облучением, является образование **тиминовых димеров**, когда два соседних тиминовых основания ковалентно связываются друг с другом (рисунок 41).

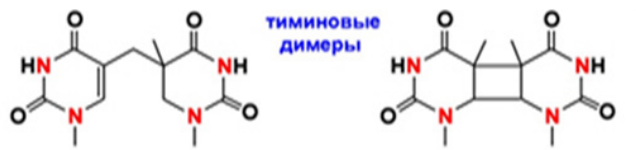


Рисунок 41 – Образование тиминовых димеров

При образовании димеров, пораженные нуклеотиды не могут образовать новые водородные связи и поэтому на данном участке не может происходить синтез дочерней цепи ДНК, в ней появляется разрыв.

Образование поперечных сшивок цепей ДНК приводит к нарушению нормального деления клеток.

Из множества **химических мутагенов** можно привести следующие примеры. *Азотистая кислота* (HNO_2) и *гидроксиламин* (NH_2OH) дезаминируют азотистые основания, в результате этой реакции аденин превращается в гипоксантин, гуанин – в ксантин, а цитозин – в урацил (рисунки 42, 43).



Рисунок 42 – Дезаминирование аденина

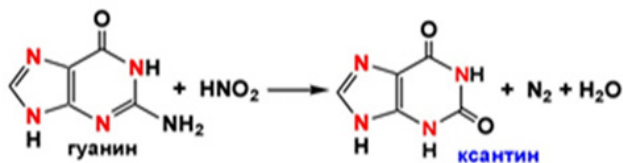


Рисунок 43 – Дезаминирование гуанина

Алкилирующие соединения имеют реакционные группы, которые могут образовывать ковалентные связи с азотистыми основаниями, входящими в ДНК. *Метилнитрозамины* распадаются с образованием реакционноспособного метилкатиона (CH_3^+),

который метилирует группы ОН и NH_2 в ДНК. Ароматический углеводород *бензапирен* сам по себе безвреден, но в результате метаболической трансформации образует производные, обладающие канцерогенным действием. За счёт гидроксилирования одного из колец он превращается в реакционноспособный эпоксид, который алкилирует аминогруппу гуанина и других азотистых оснований. Токсичен и свободный радикал бензапирена.

Характеристика мутаций

Изменения в геноме могут быть разнообразны и затрагивать различные по протяженности участки ДНК от хромосом и генов до отдельных нуклеотидов. Согласно современной классификации мутации делят на: геномные, хромосомные и генные.

Геномные мутации связаны с изменением числа хромосом в геноме клетки (*полиплоидия, анэуплоидия, гетероплоидия и гаплоидия*). Например, болезнь Дауна характеризуется появлением дополнительной 21-й хромосомы.

В **хромосомных мутациях** общее число хромосом не меняется. Наблюдают перестройки структуры хромосом, обычно видимые при микроскопическом исследовании – инверсию, дупликацию, дифференциацию, делецию, транслокацию. Например, мышечная дистрофия Дюшенна вызвана делецией в X-хромосоме.

Генные мутации обусловлены изменениями генов, затрагивают один кодон или небольшой отрезок гена и не обнаруживаются цитогенетически. Генные мутации встречаются наиболее часто.

Генные, или точечные, мутации бывают, в основном, трех видов:

1. **Замена** азотистых оснований в ДНК. Они составляют около 20 % спонтанно возникающих генных изменений.
2. Со сдвигом рамки считывания:
 - **вставки**, обеспечивающие внедрение в молекулу ДНК одного или нескольких дополнительных нуклеотидов;
 - **делеции** (или выпадения) одного или нескольких нуклеотидов, при которых происходит укорочение молекулы ДНК.

3. **Инверсия** нуклеотидных последовательностей в гене (поворот участка ДНК на 180°).

Наиболее распространенный вид мутации – **замещение какой-либо пары оснований на другую (1 нуклеотид заменяется другим)**. Мутации по типу замены оснований могут возникать в результате спонтанных изменений структуры основания цепи ДНК, в ходе репликации во вновь синтезируемой цепи и нарушении процесса репарации.

Одной из причин такого замещения может явиться сдвиг таутомерного равновесия. Например, тимин в лактамной форме комплементарен аденину. Если же тимин будет иметь лактимную форму, то ему комплементарен гуанин, это приводит к замене обычной пары **Т-А** на пару **Г-Т**. Аналогичная картина наблюдается, когда сдвиг в сторону лактимной формы происходит у гуанина. Тогда гуанин образует водородные связи с необычным для него основанием – тиминном.

Выше описано, что в результате воздействия азотистой кислоты и гидроксилamina цитозин превращается в урацил, а аденин – в гипоксантин. Это может привести к замене в ДНК комплементарной пары оснований, так как адениловый нуклеотид комплементарен тимину, а образовавшийся гипоксантин может образовывать комплементарную пару только с цитозином.

Если под действием мутации изменяется один нуклеотид, говорят о точечных мутациях. Точечные мутации часто вызываются химическими веществами или ошибками при репликации ДНК.

Существуют следующие варианты замены:

1) **транзиция** – замена одного пуринового основания на другое (А на Г) или одного пиримидинового основания на другое (Т на Ц);

2) **трансверсия** – замена пуринового основания на пиримидиновое (А или Г на Т или Ц) или пиримидинового основания на пуриновое (Т или Ц на А или Г).

Точечная мутация может быть нейтрализована другой точечной мутацией, в которой нуклеотид изменяется обратно к своему оригинальному состоянию (*действительная реверсия*) или

дополнительной мутацией где-нибудь в другом месте, которая приводит к восстановлению функциональности гена (*дополнительная реверсия*). Такие изменения классифицируются как *переходы* или *трансверсии*. Пример трансверсии – аденин, превращающийся в цитозин.

Точечные мутации, происходящие в пределах области гена, кодирующего белки, могут быть классифицированы на три вида в зависимости от того, для чего используются ошибочные кодоны:

- **безмолвные мутации**, кодирующие ту же аминокислоту. Если изменение одного нуклеотида не приводит к изменению смысла кодона, структура белка не изменяется. Например, аминокислота валин шифруется четырьмя триплетами: ЦАА, ЦАГ, ЦАТ, ЦАЦ. Замена третьего основания в любом из этих триплетов не изменит его смысла (вырожденность генетического кода);
- **миссенс-мутации**, кодирующие другую аминокислоту. В случае, когда вновь возникший триплет шифрует другую аминокислоту, изменяются структура полипептидной цепи и свойства соответствующего белка. В зависимости от характера и места случившейся замены специфические свойства белка изменяются в разной степени. Примером может служить изменение свойств гемоглобина человека при серповидно-клеточной анемии. В HbS в отличие от нормального HbA – в β -глобиновых цепях в шестом положении глутаминовая кислота заменена валином. Замена одного из оснований в триплете, шифрующем глутаминовую кислоту (ЦТТ или ЦТЦ) привело к появлению триплета, кодирующего другую аминокислоту – валин (ЦАТ или ЦАЦ). В данном случае замена одной аминокислоты в полипептиде существенно изменяет свойства глобина, входящего в состав гемоглобина, снижается его способность связываться с O_2 , у человека развиваются признаки серповидно-клеточной анемии;
- **нонсенс-мутации**, кодирующие код остановки (стоп-кодон) трансляции белка. В некоторых случаях замена одного основания на другое может привести к появлению

одного из нонсенс-триплетов (АГТ, АТЦ, АЦТ), не шифрующего никакой аминокислоты. Последствием такой замены будет прерывание синтеза полипептидной цепи.

Мутации со сдвигом рамки считывания составляют значительную долю спонтанных мутаций. Они происходят вследствие выпадения или вставки в нуклеотидную последовательность ДНК одной или нескольких пар комплементарных нуклеотидов. Более многочисленны и опасны для клеток мутации по типу вставки или делеции (утраты) нуклеотидов.

Инсерция (*лат.* *inserere* – вставка) – вставка одного или более нуклеотидов в ДНК размером до целого гена. Это приводит к сдвигу нуклеотидов по всей молекуле. Кодоны будут считываться неправильно и синтезируется белок, не способный выполнять свои биологические функции.

Делеции (*англ.* *deletion* – удаление) – утрата одного или более нуклеотидов в цепи ДНК. Она вызывает синтез белка, в молекуле которого отсутствует одна или несколько аминокислот. Это вызывает изменение сплайсинга мРНК или смещение рамки считывания (*англ.* *frameshift* – рамки считывания), в результате такой мутации синтезируется белок со случайной последовательностью аминокислот после места мутации. Эти мутации необратимы.

Инверсии (*лат.* *inversio* – переворачивание, перестановка) – поворот на 180° сегмента ДНК размером от двух нуклеотидов до фрагмента, включающего несколько генов. Обычно этому предшествует образование молекулой ДНК петли, в пределах которой репликация идет в направлении, обратном правильному. В пределах инвертированного участка нарушается считывание информации, в результате изменяется аминокислотная последовательность белка.

Генные мутации вызывают изменения генетического кода, нарушая порядок чередования нуклеотидов в ДНК и функцию транскриптонов. Если изменения происходят в структурных генах, то может образоваться дефектный белок, не способный полностью или частично выполнять свою функцию в зависимости от изменения его трехмерной структуры (конформации). Мутации в структурных генах РНК могут привести к образованию де-

фектных тРНК и рРНК, что приведет к нарушению их функций (узнавание и транспорт соответствующих аминокислот и сборки рибосом).

Мутации в промоторе нарушают связывание РНК-полимеразы, что приводит или к недостаточному образованию нормального белка, или к полному прекращению его синтеза. Мутации в акцепторном участке (оператор у прокариот) приводят к переходу от регулируемого синтеза индуцируемого белка к нерегулируемому, то есть конститутивному.

Нарушение природной структуры ДНК или мРНК приводит к образованию несвойственных для организма белков и, следовательно, к наследственным заболеваниям – галактоземии, гемолизу эритроцитов, фенилкетонурии, олигофрении, серповидноклеточной анемии, гемофилии, дальтонизму и другим.

При каждом цикле деления клетки нуклеотидная цепь ДНК укорачивается под действием *теломеразы* – фермента старения клетки. При укорачивании нуклеотидной цепи до определенного предела жизнь клетки прекращается: не происходит синтез структурных белков, ферментов, гормонов.

Мутации под воздействием различных химических соединений, называемых мутагенными веществами, имеют большое значение для управления наследственностью с целью ее улучшения. Результаты этих исследований нашли применение в селекции сельскохозяйственных культур, создании штаммов микроорганизмов, производящих антибиотики, витамины, кормовые дрожжи.

Генные мутации используют для идентификации генов, картирования хромосом и генов, в биохимической генетике для установления функций гена, последовательности этапов биосинтетического пути, а также в селекционной практике. Кроме того, с помощью генных мутаций изучают механизмы спонтанного и индуцированного мутагенеза, оценивают специфичность действия мутагенов, исследуют роль репликации, репарации и рекомбинации в мутационном процессе.

Репарация ошибок и повреждений ДНК

Точность репликации ДНК очень велика, но примерно один раз на 10^5 – 10^6 нуклеотидных остатков происходят ошибки спаривания. Процесс, позволяющий живым организмам исправлять ошибки репликации и восстанавливать повреждения, возникающие в ДНК, называют **репарацией**.

Выделяют: **эксцизионную репарацию, фотореактивацию, репарацию в результате рекомбинации**.

Система репарации некомплементарных пар должна происходить только на дочерней цепи и производить замену некомплементарных оснований только в ней.

Универсальный процесс репарации происходит в несколько этапов (рисунок 44):

1. **ДНК-эндонуклеаза** выявляет поврежденные (некомплементарные) основания ДНК (если это дезоксирибоза, лишенная основания, то фермент называют **АП-эндонуклеазой**) и гидролизует 3',5'-фосфодиэфирную связь.

2. **Эксонуклеаза (ДНК-N-гликозидаза)** удаляет поврежденный участок ДНК – некомплементарный нуклеотид или только основание. Ферменты гидролитически расщепляют N-гликозидную связь между поврежденным основанием и остатком дезоксирибозы. Участки на молекуле ДНК, лишенные азотистого основания, получили название **АП-сайтов** (от *англ.* apurinic – arylimidinic site). АП-сайты могут также возникать в результате самопроизвольного гидролитического отщепления пуриновых или пиримидиновых оснований.

3. **ДНК-инсертаза** может присоединять на участке АП-сайта к дезоксирибозе основание в соответствии с правилом комплементарности. В этом случае нет необходимости разрезать цепь ДНК, вырезать неправильный нуклеотид и репарировать разрыв. **ДНК-полимераза- β** присоединяется к 3'-концу образовавшейся «бреши» и достраивает недостающий участок цепи (ликвидирует «брешь»). Матрицей служит неповрежденная цепь ДНК.

4. **ДНК-лигаза** соединяет неповрежденный и вновь синтезированный участки цепи ДНК, используя энергию АТФ.

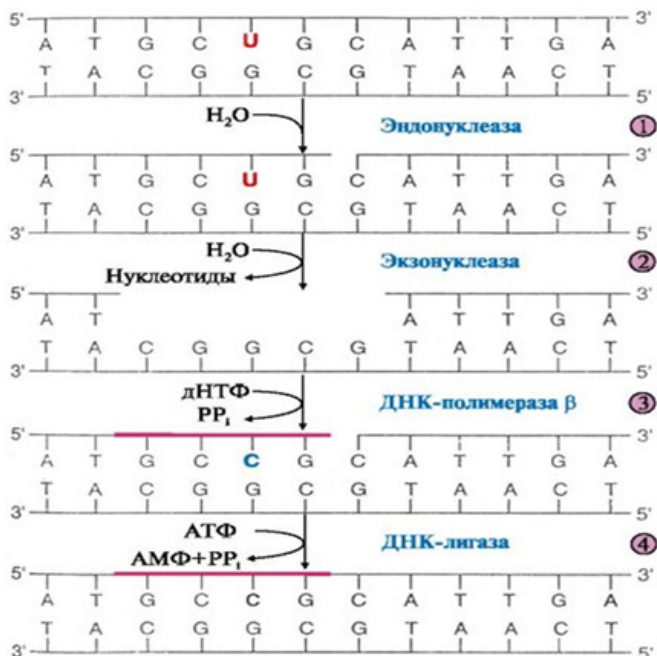


Рисунок 44 – Репарация эукариотической ДНК

Тиминовые димеры могут быть удалены **фотореактивацией**. Специфическая *фотолиаза* связывается с дефектным участком ДНК и после облучения расщепляет димер с образованием отдельных нуклеиновых оснований.

Третий механизм – это **репарация в результате рекомбинации**. В этом процессе участок, содержащий повреждение, пропускается во время репликации. Образующаяся брешь закрывается путём сдвига соответствующего сегмента из правильно реплицированной второй цепи. Новая брешь ликвидируется с участием полимераз и ДНК-лигаз. В завершение первоначальный дефект устраняется путём вырезания.

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

- 1) снижается скорость репликации ДНК, что делает процесс репарации более эффективным;
- 2) блокируется деление клетки;
- 3) индуцируется синтез ряда белков, участвующих в образовании олигонуклеотидов. Действие SOS-репарации носит кратковременный характер, примерно через 40–60 минут она переключается на конститутивную репарацию.

Репарация возможна благодаря существованию двух цепей в молекуле ДНК – двух копий генетической информации. Если одновременно повреждается комплементарная пара нуклеотидов, репарация в гаплоидных клетках невозможна, а в диплоидных может идти за счет присутствия идентичного гена в гомологичной хромосоме.

Репарация необходима для сохранения генетического материала на протяжении всей жизни организма (сохранение структуры генома). Все ферменты постоянно активны и процесс идет непрерывно. Снижение активности ферментов репарации приводит к накоплению повреждений (мутаций) в ДНК.

Однако не всегда репарация способна восстановить первоначальную структуру ДНК, и процесс репликации происходит с поврежденной цепи ДНК. В этом случае происходит наследование повреждений – **мутация**.

Нарушения процессов репарации могут приводить к драматическим последствиям. Так, у людей известно наследственное заболевание – пигментная ксеродерма, основными симптомами которой является повышенная чувствительность к солнечному свету, приводящая к развитию рака кожи. У этих больных обнаружены различные дефекты репарации.

Если повреждения в молекулах ДНК не успеют репарироваться до начала репликации, они, скорее всего, будут закреплены в ходе репликативного удвоения ДНК в виде **мутаций**.

ТРАНСКРИПЦИЯ – БИОСИНТЕЗ РНК

Транскрипцией называется синтез РНК на матрице ДНК. В результате образуются первичные транскрипты мРНК, тРНК, рРНК, комплементарные матричной цепи ДНК, имеющей направление от 3'-к 5'-концу.

Как в любом матричном биосинтезе в транскрипции выделяют пять необходимых элементов:

- 1) матрицу – одну из цепей ДНК;
- 2) растущую цепь – РНК;
- 3) субстрат для синтеза – рибонуклеотиды (УТФ, ГТФ, ЦТФ, АТФ);
- 4) источник энергии – УТФ, ГТФ, ЦТФ, АТФ;
- 5) ферменты РНК-полимеразы и белковые факторы транскрипции.

У прокариот и эукариот синтез РНК протекает в ядре, митохондриях практически постоянно вне зависимости от фаз клеточного цикла.

В ДНК различают 2 цепи – кодирующую (матричную) и не кодирующую. Синтез РНК происходит комплементарно на кодирующей цепи.

Единицей транскрипции является оперон (у прокариот) и транскриптон (у эукариот). **Транскриптон** с одного края ограничен **промотором** (начало), с другого – **сайтом терминации** (конец). Специфическая последовательность ДНК, в которой РНК-полимераза связывается с матрицей и инициирует синтез РНК, называется **промотором**. Последовательность, на которой завершается синтез РНК, – **сайтом терминации**.

У эукариот в состав транскриптона, как правило, входит только один ген.

Ферменты РНК-полимеразы катализируют синтез РНК в направлении от 5'-к 3'-концу. В ядре клеток эукариот обнаружены три ядерных фермента:

- 1) **РНК-полимераза I**, синтезирующая пре-рРНК;
- 2) **РНК-полимераза II**, ответственная за синтез пре-мРНК (гяРНК – гетерогенной ядерной РНК);

3) **РНК-полимераза III**, осуществляющая синтез пре-тРНК и мяРНК – малой ядерной РНК.

В основе процесса лежит принцип комплементарности оснований в полинуклеотидной цепи матричной ДНК и синтезируемой РНК, когда против А встает У, против Г – Ц, а против Т – А. Нуклеотиды присоединяются к 3'-концу растущей РНК с освобождением пирогосфата.

В процессе транскрипции различают стадии **инициации, элонгации, терминации и посттранскрипционных модификаций**.

Инициация. Активация промотора происходит с помощью белка – **ТАТА-фактора**, взаимодействующего со специфической последовательностью нуклеотидов промотора – ТАТА. ТАТА-фактор облегчает взаимодействие промотора с **РНК-полимеразой**. Связывание РНК-полимеразы с промотором увеличивает сродство фермента к **факторам инициации** (А, В), которые обеспечивают раскручивание примерно одного витка двойной спирали ДНК. После синтеза олигонуклеотида из 8–10 нуклеотидных остатков к молекуле фермента присоединяются факторы элонгации.

Элонгация. Факторы элонгации (Е, Н, F) повышают активность РНК-полимеразы и облегчают локальное расхождение нуклеотидных цепей. Синтез молекулы РНК идет от 5'– к 3'-концу на матричной цепи ДНК по принципу **комплементарности и антипараллельности**. По мере продвижения РНК-полимеразы по цепи ДНК в направлении от 3'– к 5'-концу впереди нее происходит расхождение, а позади – восстановление двойной спирали. РНК-полимераза продвигается со скоростью 40–50 нуклеотидов в секунду в направлении 5'→3'. Фермент использует АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ одновременно в качестве субстрата и в качестве источника энергии.

Терминация. Расхождение двойной спирали ДНК в области сайта терминации делает его доступным для **факторов терминации**. Когда РНК-полимераза достигает сайта терминации, транскрипция прекращается. Факторы терминации облегчают отделение первичного транскрипта от матрицы. Синтезированная молекула РНК, является **первичным транскриптом** – предшественником мРНК (или тРНК, или рРНК).

У прокариот первичный транскрипт мРНК в основном не претерпевает изменений и транскрипция сопряжена с трансляцией.

Посттранскрипционные модификации

Первичные транскрипты РНК являются «незрелыми» и в дальнейшем претерпевают ряд изменений, которые называются **процессингом (созревание РНК)**. У эукариот процессингу подвергаются все виды пре-РНК, у прокариот – только предшественники рРНК и тРНК.

Биогенез матричной РНК

При транскрипции участков ДНК, несущих информацию о белках, образуются гетерогенные ядерные РНК, по размеру намного превосходящие мРНК, незрелая пре-матричная РНК (пре-мРНК). Процесс созревания пре-мРНК включает:

1. Кэпирование (*англ.* cap – шапка) – происходит еще во время транскрипции. К 5'-трифосфату концевой нуклеотида пре-мРНК присоединяется 7-метил-гуанозинтрифосфат 5',5'-фосфодиэфирной связью. «Кэп» необходим для защиты молекулы РНК от 5'-экзонуклеаз, а также для связывания мРНК с рибосомой и для инициации трансляции.

2. Полиаденилирование: при помощи *полиаденилат-полимеразы* с использованием молекул АТФ происходит присоединение к 3'-концу РНК от 100 до 200 адениловых нуклеотидов, формирующих полиадениловый фрагмент – поли(А)-хвост. Поли(А)-хвост облегчает выход мРНК из ядра и замедляет её гидролиз в цитоплазме.

3. Сплайсинг. Первичный транскрипт или пре-мРНК содержит как экзоны – последовательности, кодирующие определенные участки молекулы белка, так и **интроны** – некодирующие последовательности. **Сплайсинг** (*англ.* splice – склеивать встык) – процесс, в котором происходит удаление интронов и соединение экзонов (рисунок 45).

Процесс вырезания интронов протекает при участии комплексов – **сплайсосом**. Во время сплайсинга комплексы из

гяРНК (первичные транскрипты РНК) и мяРНП образуют сплайсому. Сплайсинг присходит в ядре при участии *малых ядерных рибонуклеопротеидных частиц* – мяРНП (англ. small nuclear ribonucleic particles), в цитоплазму поступает уже зрелая мРНК.

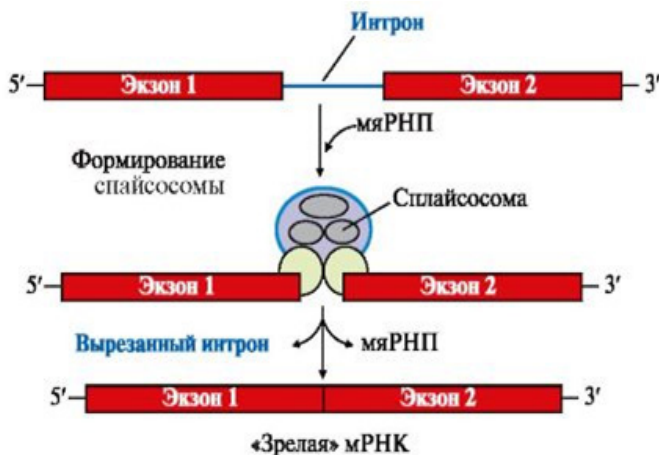


Рисунок 45 – Сплайсинг пре-мРНК

После завершения сплайсинга «зрелая» мРНК становится примерно в четыре раза короче первичного транскрипта (рисунок 46).

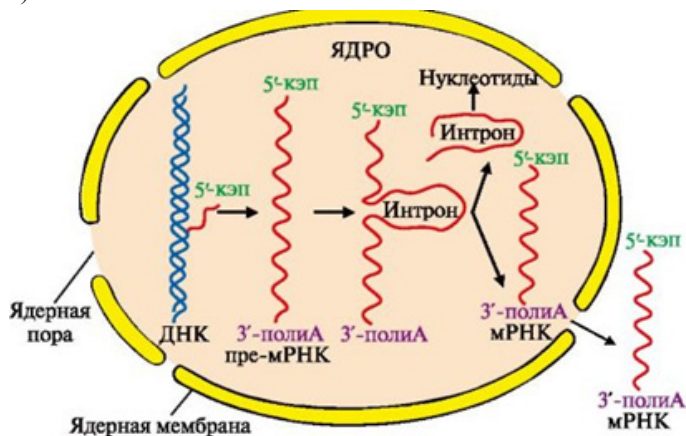


Рисунок 46 – Образование и выход из ядра зрелой мРНК

Одна и та же молекула мРНК в различных тканях может подвергаться разным схемам сплайсинга: наряду с интронами вырезаются некоторые экзоны, или некоторые интроны сохраняются в зрелой молекуле; иногда сохраняется интрон, содержащий стоп-кодон, и в результате образуется мРНК, кодирующая более короткий белок; в ходе транскрипции используются альтернативные промоторы – **альтернативный сплайсинг**, ведущий к получению родственных, но различающихся по первичной структуре мРНК. Так, в парафолликулярных клетках щитовидной железы в ходе транскрипции гена кальцитонина образуется мРНК, содержащая информацию о гормоне, ответственном за регуляцию обмена ионов кальция. В мозге тот же первичный транскрипт подвергается другому виду сплайсинга, в результате чего образуется мРНК, кодирующая белок, ответственный за вкусовое восприятие.

Биогенез транспортной РНК

Молекулы тРНК как у эукариот, так и у прокариот синтезируются в виде больших предшественников, часто содержащих последовательности более одной тРНК, которые затем подвергаются процессингу при участии специфических рибонуклеаз.

1. Модификация нуклеотидов в молекуле – образование псевдоуридина и дигидроуридина, которые формируют соответствующие петли в структуре тРНК.

2. Формирование антикодоновой петли происходит путем удаления интрона и сплайсинга в средней части пре-тРНК. Антикодон – триплет нуклеотидов, обеспечивает взаимодействие тРНК с кодоном мРНК.

3. Формирование на 3'-конце последовательности ЦЦА. Для этого у одних пре-тРНК с 3'-конца удаляются лишние нуклеотиды до открытия триплета ЦЦА, у других идет присоединение этой последовательности (рисунок 47).

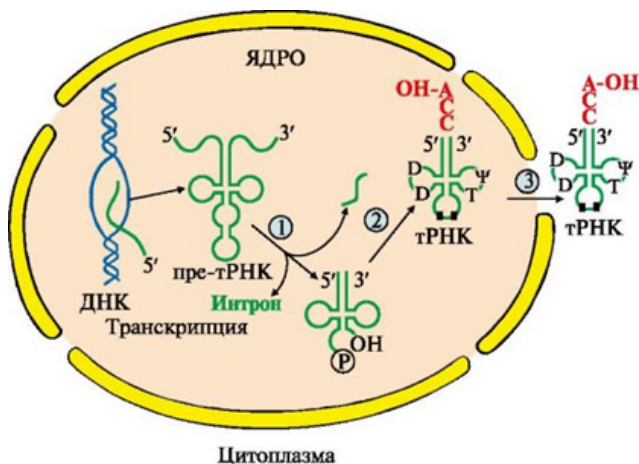


Рисунок 47 – Образование и выход из ядра зрелой тРНК

Биогенез рибосомальной РНК

Предшественники рРНК у эукариот являются более крупными молекулами (45S) по сравнению со зрелыми рРНК. Большая прерибосомная 45S-рРНК расщепляется специфичными **нуклеазами** с образованием 5,8S-рРНК, 18S-рРНК и 28S-рРНК (рисунок 48). При этом 5S-рРНК синтезируется отдельно. Таким образом, у эукариот существует четыре типа рРНК – 5S-, 5,8S-, 18S- и 28S-рРНК.



Рисунок 48 – Процессинг рРНК у эукариот

Часть нуклеотидов рРНК подвергаются модификации, которая состоит в метилировании оснований. Реакция осуществляется метилтрансферазами, донором метильных групп является S-аденозилметионин (SAM).

У **прокариот** синтез **23S, 16S и 5S рРНК** осуществляется из более длинного **30S предшественника**. Молекулы рибосомальной РНК прокариот иные по своим свойствам, что является основой изобретения и использования ряда антибиотиков в медицине.

Зрелые рРНК соединяются в ядре с белками рибосом и образуют малую и большую субъединицы рибосом.

Строение рибосом

Рибосомальные РНК являются основой для формирования субъединиц рибосом. В состав рибосом входят рРНК и белки, выполняющие структурную, регуляторную и каталитическую функции. Рибосомы доядерных и ядерных организмов различаются по молекулярной массе субъединиц, количеству рРНК, массе рРНК, количеству и разнообразию белков, способных связывать специфические лиганды.

Рибосома эукариот (80S) состоит из двух (большой и малой) субъединиц с молекулярной массой 60S и 40S (рисунок 49). Величина S характеризует скорость оседания (седиментации) субъединиц рибосом при ультрацентрифугировании. Она пропорциональна молекулярной массе частиц.

Большая субъединица формируется из трех молекул рРНК – 5S, 5,8S, 28S и 50 белков. Малая субъединица включает одну рРНК – 18S и 33 белка.

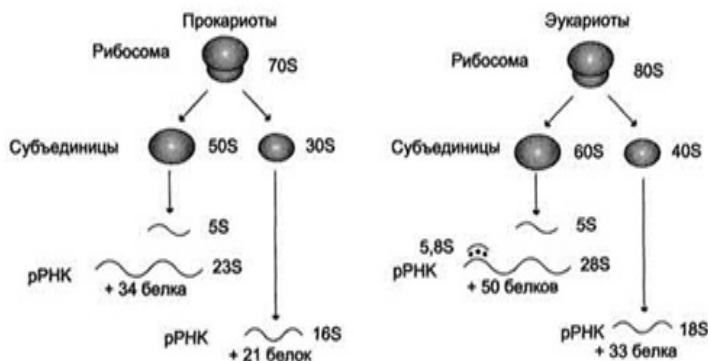


Рисунок 49 – Строение рибосом эукариот и прокариот

Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70S, отчего получили название 70S-частиц. Они построены из двух неодинаковых субчастиц – 30S и 50S. 30S-частица содержит одну молекулу 16S-рРНК и, в большинстве случаев, – по одной молекуле белка из более 20 видов. 50S-субъединица состоит из двух молекул рРНК 23S и 5S, в ее состав входят более 30 различных белков.

Эукариотические клетки имеют рибосомы как 80S-типа (шероховатые мембраны ЭПС, цитоплазма), так и 70S-типа (митохондрии, хлоропласты). Субъединицы рибосомы эукариот образуются в ядрышке. Объединение субъединиц в целую рибосому происходит в цитоплазме, как правило, во время биосинтеза белка. Рибосомы, не участвующие в синтезе белка, диссоциируют на субъединицы.

Регуляция транскрипции

Транскрипция не связана с фазами клеточного цикла; она может ускоряться и замедляться в зависимости от потребности клетки или организма в определенном белке. Такое избирательное функционирование возможно благодаря существованию механизмов регуляции генной экспрессии, которые действуют на разных уровнях. С помощью этих механизмов клетка в каждый момент времени синтезирует определенный набор веществ, а не весь возможный их спектр.

От качества и активности транскрипции зависит объем синтеза тех или иных белков, жизнедеятельность клетки, ее способность адаптироваться к окружающей обстановке.

У прокариот и эукариот регуляция транскрипции происходит, естественно, по-разному, хотя основные моменты похожи.

ТРАНСЛЯЦИЯ – БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Трансляция (*англ.* translation – перевод) – это биосинтез белка на матрице мРНК.

Синтез белка отличается от других матричных биосинтезов тем, что между матрицей (мРНК) и продуктом-белком нет комплементарного соответствия. Поскольку матрица построена из 4 нуклеотидов, а продукт – полипептидная цепь из 20 аминокислот, то существует определенный закон шифрования аминокислот в нуклеотидной последовательности матрицы, то есть биологический код.

Генетический код

Генетический (биологический) код – это способ кодирования информации о строении белков в виде нуклеотидной последовательности. Он предназначен для перевода четырехзначного языка нуклеотидов (А, Г, У, Ц) в двадцатизначный язык аминокислот (рисунок 50).

Нуклеотид					
1-й	2-й				3-й
	У	Ц	А	Г	
У	УУУ } Фенилаланин	УЦУ } Серин	УАУ } Тирозин	УГУ } Цистеин	У
	УУЦ } Лейцин	УЦЦ } Серин	УАЦ } Тирозин	УГЦ } Цистеин	Ц
	УУА } Лейцин	УЦА } Серин	УАА } стоп-кодона	УГА } стоп-кодон	А
	УУГ } Лейцин	УЦГ } Серин	УАГ } Тирозин	УГГ } Триптофан	Г
Ц	ЦУУ } Лейцин	ЦЦУ } Пролин	ЦАУ } Гистидин	ЦГУ } Аргинин	У
	ЦУЦ } Лейцин	ЦЦЦ } Пролин	ЦАЦ } Гистидин	ЦГЦ } Аргинин	Ц
	ЦУА } Лейцин	ЦЦА } Пролин	ЦАА } Глутамин	ЦГА } Аргинин	А
	ЦУГ } Лейцин	ЦЦГ } Пролин	ЦАГ } Глутамин	ЦГГ } Аргинин	Г
А	АУУ } Изолейцин	АЦУ } Треонин	ААУ } Аспарагин	АГУ } Серин	У
	АУЦ } Изолейцин	АЦЦ } Треонин	ААЦ } Аспарагин	АГЦ } Серин	Ц
	АУА } Метионин	АЦА } Треонин	ААА } Лизин	АГА } Аргинин	А
	АУГ } Метионин старт-кодон	АЦГ } Треонин	ААГ } Лизин	АГГ } Аргинин	Г
Г	ГУУ } Валин	ГЦУ } Аланин	ГАУ } Аспарагиновая кислота	ГГУ } Глицин	У
	ГУЦ } Валин	ГЦЦ } Аланин	ГАЦ } Аспарагиновая кислота	ГГЦ } Глицин	Ц
	ГУА } Валин	ГЦА } Аланин	ГАА } Глутаминовая кислота	ГГА } Глицин	А
	ГУГ } Валин	ГЦГ } Аланин	ГАГ } Глутаминовая кислота	ГГГ } Глицин	Г

Рисунок 50 – Биологический код

Генетический код обладает характерными особенностями:

- **триплетностью** – три нуклеотида (триплет) формируют кодон, кодирующий аминокислоту. Всего насчитывают 61 смысловой кодон. Терминирующие триплеты – УАА, УАГ, УГА не кодируют аминокислот, а являются сигналами к прекращению синтеза белка. Для каждой аминокислоты имеется по два обязательных нуклеотида и третий переменный, менее специфичный («**эффект качания**»);
- **специфичностью** (или **однозначностью**) – каждому кодону соответствует только одна аминокислота;
- **вырожденностью** – одной аминокислоте может соответствовать несколько кодонов (от 2 до 6). Например, аминокислота серин кодируется триплетами УЦУ, УЦЦ, УЦА, УЦГ, АГЦ;
- **универсальностью** – биологический код одинаков для всех видов организмов на Земле;
- **коллинеарностью** – последовательность кодонов соответствует последовательности аминокислот в кодируемом белке;
- **непрерывностью и неперекрываемостью** – триплеты не накладываются друг на друга, располагаясь рядом;
- **отсутствием знаков препинания** – между триплетами нет дополнительных нуклеотидов или каких-либо иных сигналов;
- **однонаправленностью** – при синтезе белка считывание кодонов идет последовательно, без пропусков или возвратов назад в направлении от 5' - к 3' -концу.

Биологический код не может проявить себя без дополнительных молекул, которые выполняют переходную функцию или функцию адаптора.

Адапторная роль транспортных РНК

Транспортные РНК являются единственным посредником между четырехбуквенной последовательностью нуклеиновых кислот и 20-буквенной последовательностью белков.

Каждая транспортная РНК имеет определенную триплетную последовательность в антикодонной петле (антикодон) и может присоединить только такую аминокислоту, которая соответствует этому антикодону. Именно от наличия того или иного антикодона в тРНК зависит, какая аминокислота включится в белковую молекулу, так как ни рибосома, ни мРНК не узнают аминокислоту. Таким образом, адапторная роль тРНК заключается: 1) в специфичном связывании с аминокислотами, 2) во включении аминокислот в белковую цепь в соответствии с матрицей мРНК.

Основные компоненты белоксинтезирующей системы

Основными компонентами синтеза белка являются: аминокислоты, тРНК, аминоацил-тРНК-синтетазы, мРНК, рибосомы, источники энергии, белки – факторы инициации, элонгации и терминации и кофакторы (таблица 2).

Таблица 2 – Основные компоненты белоксинтезирующей системы и их функции в процессе трансляции

№ п/п	Необходимые компоненты	Функции
1.	Аминокислоты	Субстраты для синтеза белков
2.	тРНК	Выполняют функцию адапторов – приспособителей аминокислот к кодонам мРНК. Акцепторным концом (ЦЦА) они взаимодействуют с аминокислотами, а антикодоном – с кодоном мРНК
3.	Аминоацил-тРНК-синтетазы	Каждый фермент катализирует реакцию специфического связывания одной из 20 аминокислот с соответствующей тРНК
4.	мРНК	Матрица содержит линейную последовательность кодонов, определяющих первичную структуру белков
5.	Рибосомы	Рибонуклеопротеиновые субклеточные структуры, являются местом синтеза белков
6.	АТФ, ГТФ	Источники энергии
7.	Белковые факторы инициации (IF), элонгации (EF), терминации (RF)	Специфические вне ribосомные белки, необходимые для процесса трансляции
8.	Ионы магния	Кофактор, стабилизирующий структуру рибосом, АТФ, ГТФ

Этапы трансляции

Биосинтез белка состоит из следующих этапов:

1. Активация аминокислот
2. Инициация
3. Элонгация
4. Терминация
5. Посттрансляционная модификация.

Активация аминокислот

Активация аминокислот протекает в цитозоле (рисунок 51). Присоединение аминокислоты к тРНК осуществляется ферментом **аминоацил-тРНК-синтетазой**, имеющей специфичность одновременно к двум соединениям: какой-либо аминокислоте и соответствующей ей тРНК. тРНК, связывающаяся с глутаматом, обозначается как тРНК^{Глу}, а с аланином – тРНК^{Ала}. Для реакции требуется две макроэргические связи АТФ.

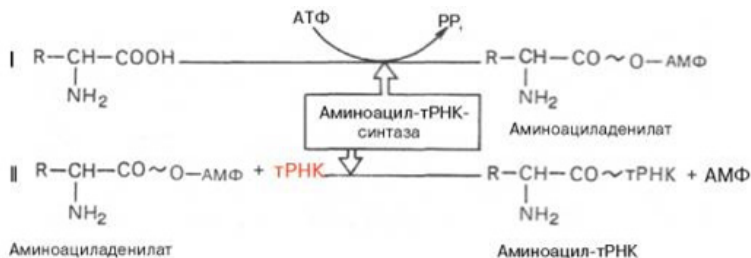


Рисунок 51 – Активация аминокислот

Аминокислота присоединяется к 3'-концу акцепторной петли тРНК через свою α-карбоксильную группу, и связь между аминокислотой и тРНК становится **макроэргической**, α-амино-группа остается свободной.

Инициация

Каждая зрелая мРНК несет информацию только об одной полипептидной цепи. Если клетке необходимы другие белки, то необходимо транскрибировать мРНК с иных участков ДНК.

Биосинтез белков или трансляция происходит на рибосомах.

Для инициации необходимы **мРНК, ГТФ, малая и большая субъединицы рибосомы, факторы инициации (ИФ-1, ИФ-2, ИФ-3), метионин и тРНК для метионина, аминоксил-тРНК (aa-тРНК).**

Синтез белка иницирует единственная аминокислота – метионин. В генетическом коде имеется только один кодон для метионина (АУГ), однако во всех живых организмах открыты две тРНК для метионина: одна используется для инициации синтеза белка (тРНК^{Фмет}), другая – для включения метионина в полипептидную цепь в стадии элонгации (тРНК^{мет}). В клетках эукариот иницирующим комплексом является метионил-тРНК, а в клетках прокариот – формилметионил-тРНК.

У прокариот синтез N-формилметионил-тРНК протекает в две стадии (рисунок 52).

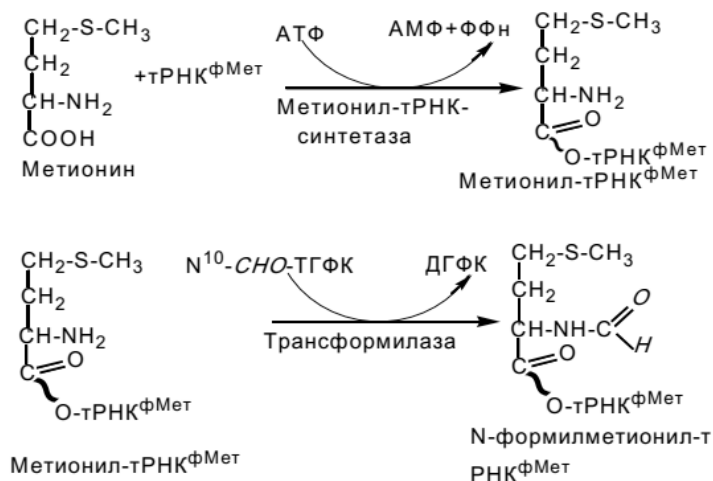


Рисунок 52 – Синтез N-формилметионил-тРНК

Первую стадию катализирует *метионил-тРНК-синтетаза*. Реакция нуждается в энергии АТФ.

Вторую стадию катализирует специфичная *трансформилаза*. N-формилметионил-тРНК является первой аминоксил-тРНК,

которая определяет включение N-концевого остатка аминокислоты и начало трансляции. Процесс формилирования имеет важный химический и биологический смысл, предотвращая участие NH_2 -группы аминокислоты в образовании пептидной связи и обеспечивая тем самым синтез белка в направлении от NH_2 к COOH . Молекула тРНК, аминоацилированная ***N-формилметионином***, является инициатором трансляции у прокариот.

Перед инициацией рибосомы диссоциированы на составляющие субчастицы – малую (30S у прокариот и 40S у эукариот) и большую (50S у прокариот и 60S у эукариот). Для инициации необходимо наличие в мРНК специального сигнала для связывания с рибосомой – *инициирующий кодон* – **АУГ** или **ГУГ** у бактерий в начале 5'-конца мРНК. Два кодирующих триплета АУГ и ГУГ выполняют двойную функцию: 1) кодируют аминокислоты метионин или валин, если являются внутренними кодонами; 2) служат стартовыми кодонами, на которых начинается процесс трансляции, если являются начальными триплетами мРНК.

Вначале формируются два тройных комплекса:

- первый комплекс – мРНК + малая субъединица + ИФ-3;
- второй комплекс – иницирующая аминоацил-тРНК + ИФ-2 + ГТФ.

Молекула мРНК связывается с малой субчастицей рибосомы, затем к ним присоединяется первая, иницирующая аминоацил-тРНК.

После формирования тройные комплексы объединяются с большой субъединицей рибосомы (рисунок 53). В этом процессе активно участвуют белковые факторы инициации, источником энергии служит ГТФ, а факторы инициации удаляются после объединения субъединиц рибосом. Формируется большая рибосома с двумя активными центрами – **Р** (пептидильным) **центром**, в котором находится формилМет-тРНК^{Мет}, и **А** (аминоацильным) **центром**, в область которого поступает первый смысловой кодон мРНК.

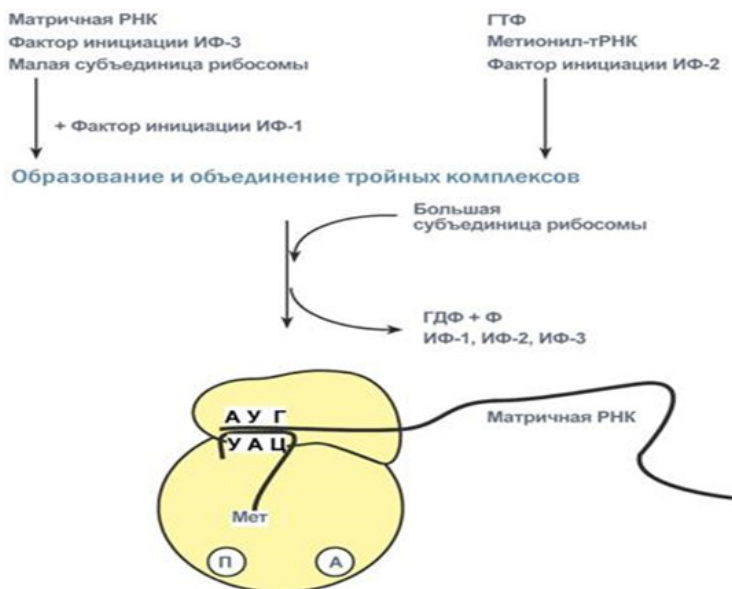


Рисунок 53 – Инициация синтеза белка

К иРНК присоединяется несколько рибосом (от 5 и более), образуя полирибосомы или полисомы. Каждая из рибосом транслирует полностью одну полипептидную цепь.

Элонгация

Для этой стадии необходимы все 20 аминокислот, тРНК для всех аминокислот, белковые факторы элонгации, ГТФ. Удлинение цепи происходит со скоростью примерно 20 аминокислот в секунду.

Синтез полипептида всегда начинается от N-конца и заканчивается С-концом. Этап элонгации включает три последовательные стадии:

- 1) связывание аминоксил-тРНК;
- 2) образование пептидной связи;
- 3) транслокацию – перемещение мРНК на один триплет.

1. На I стадии в соответствии с природой кодона мРНК в свободный А-участок рибосомы доставляется аминоксил-тРНК соответствующая первому кодону мРНК (следующему за ини-

цирующим кодоном) при участии фактора элонгации. Эта фаза процесса требует затраты энергии ГТФ и участия фактора элонгации.

2. Фермент **пептидилтрансфераза** осуществляет перенос метионина от формилМет-тРНК^{Мет}, входящей в Р-центр, на α -аминогруппу аминокислоты (валина), находящейся в А-центре в составе аа-тРНК^{аа}, с образованием **пептидной связи** между метионином и второй аминокислотой (Мет-Вал-тРНК^{Вал}). При этом уже активированная СООН-группа метионина связывается со свободной NH₂-группой второй аминокислоты. Источником энергии служит макроэргическая связь между аминокислотой и тРНК. Установлено, что пептидилтрансферазная активность большой субъединицы рибосомы принадлежит 28S рРНК. К настоящему времени обнаружена целая группа **РНК, обладающая свойствами ферментов**. Эти каталитически активные РНК получили название **рибозимов**.

3. Фермент **транслоказа** перемещает рибосому по мРНК на один кодон в направлении от 5'-к 3'-концу мРНК за счет энергии ГТФ и при участии фактора элонгации. В результате иницирующий кодон тРНК^{Мет} освобождается из комплекса, дипептидил-тРНК (формилМет-Вал-тРНК) из А-центра попадает в Р-центр, а в А-центре оказывается следующий третий кодон. Цикл элонгации (реакции 1, 2, 3) повторяется по числу смысловых кодонов мРНК. Таким образом, на стадии элонгации происходит последовательное наращивание полипептидной цепи по одной аминокислоте в строгом соответствии с последовательностью триплетов (кодонов) в молекуле мРНК.

Остаток метионина, участвующий в инициации и занимающий в полипептидной цепи N-концевое положение, отщепляется при участии пептидилгидролазы.

Терминация

Удлинение полипептидной цепи продолжается до тех пор, пока на пути рибосомы не встретится один из **терминирующих триплетов РНК – УАА, УАГ или УГА**. При вхождении этих кодонов внутрь рибосомы происходит активация белковых факторов терминации, которые последовательно катализируют:

1. Гидролитическое отщепление полипептида от конечной тРНК.
2. Отделение от П-центра последней тРНК.
3. Диссоциацию рибосомы.

Источником энергии для завершения трансляции является ГТФ.

Транскрипция и трансляция происходят во все фазы клеточного цикла, лишь во время митоза резко замедляется синтез многих белков, кроме тех, которые участвуют в процессе митоза.

Особенности трансляции эукариот

Процесс трансляции эукариотической мРНК в основном аналогичен таковому для прокариот. Однако имеется ряд отличий. Во-первых, аппараты транскрипции и трансляции у эукариот разобщены во времени и в пространстве: транскрипция осуществляется в ядре, а трансляция – в цитоплазме. Во-вторых, иницирующей аминоацил-тРНК у эукариот служит не Фмет-тРНК, а специальная иницирующая мет-тРНК. В-третьих, на 5'- и 3'-концах эукариотических мРНК имеются особые структуры – «кэпы» и «шлейфы», принимающие участие в трансляции. Известно, что отдельные факторы инициации трансляции узнают экзипированные области для связывания с мРНК и начала процесса трансляции.

Посттрансляционная модификация белков

Образующиеся в процессе трансляции полипептидные молекулы часто не являются зрелыми, биологически активными формами белка. Для того чтобы они приобрели функциональную активность, требуются различные изменения в их составе и структуре, которые принято называть посттрансляционной модификацией.

Фолдинг, или формирование пространственной структуры, в котором принимают участие **белки-шапероны** (*франц.* – *chaperon* – спутник, нянька), обеспечивающие образование функционально активной конформации полипептидной цепи. Они

предотвращают взаимодействие новосинтезированных белков друг с другом, изолируют гидрофобные участки белков от цитоплазмы и «убирают» их внутрь молекулы, правильно располагают белковые домены. В целом, шапероны способствуют переходу структуры белков от первичного уровня до третичного и четвертичного. При нарушении функции шаперонов и отсутствии фолдинга в клетке формируются белковые отложения – развивается **амилоидоз**.

Образование олигомерных структур, которое также осуществляется при участии шаперонов, например, гемоглобин, лактатдегидрогеназа, креатинкиназа.

Ковалентное **присоединение простетической группы** к молекуле белка:

- **гема** – при синтезе гемоглобина, миоглобина, цитохромов, каталазы;
- **витаминных кофакторов** – биотина, ФАД, ПФ и т. п.

Модификация аминокислот:

- **гликозилирование**, присоединение олигосахаридных остатков с образованием гликопротеинов;
- **гидроксилирование** остатков пролина, лизина при формировании молекул коллагена;
- **карбоксилирование** остатков глутамата и аспартата ряда белков. В частности, протромбин (белок свертывающей системы крови) содержит ряд γ -карбоксиглутаматных остатков на N-конце, в образовании которых активное участие принимает витамин К-содержащий фермент;
- **фосфорилирование** остатков серина, треонина и тирозина в молекуле гистоновых и негистоновых белков, а также в казеине молока для связывания ионов кальция или для активации/инактивации ферментов (гликоген-фосфоорилазы, гликоген-синтазы);
- **метилование** аргинина и лизина в гистонах, мышечные белки и цитохромы;
- **йодирование** тирозина в тиреоглобулине.

Образование дисульфидных связей между остатками цистеина, участвующими в формировании трехмерной структуры белка (пример – строение инсулина, рибонуклеазы)

Ограниченный (частичный) протеолиз предшественников пепсина, трипсина, инсулина путем отщепления N-концевого пептида.

Регуляция биосинтеза белков

Концентрация многих белков в клетке не постоянна и меняется в зависимости от изменяющихся условий окружающей среды.

В клетках млекопитающих существуют два вида регуляции биосинтеза белков:

- **кратковременная**, обеспечивающая адаптацию организма к изменениям окружающей среды;
- **длительная, стабильная**, определяющая дифференцировку клеток и разный белковый состав органов и тканей.

Регуляция генной активности сложна и многообразна и происходит на всех уровнях реализации генетической информации от ДНК к РНК и белку, то есть на уровне:

- репликации;
- транскрипции;
- трансляции;
- посттрансляционной модификации.

Наиболее распространенным механизмом регуляции синтеза белков является **регуляция на уровне транскрипции**. Гены высших эукариот обычно регулируются путем комбинированного воздействия нескольких белков – факторов транскрипции, в отличие от прокариот, у которых фермент РНК-полимераза узнает сайт инициации транскрипции непосредственно.

Регуляция транскрипции у прокариот

Исследования на клетках *E. coli* позволили установить, что у бактерий существуют ферменты трех типов:

1. Конститутивные, присутствующие в клетках в постоянных количествах независимо от метаболического состояния организма (например, ферменты гликолиза).

2. Индуцируемые, их концентрация в обычных условиях мала, но может возрастать в 1000 раз и более, если, например, в среде культивирования клеток добавить субстрат такого фермента.

3. Репрессируемые, то есть ферменты метаболических путей, синтез которых прекращается при добавлении в среду выращивания конечного продукта этих путей.

Регуляция биосинтеза белка у прокариот осуществляется на уровне изменения скорости синтеза мРНК. Основные механизмы регуляции – индукция и репрессия. В настоящее время принята **теория оперона**, сформулированная Франсуа Жакобом и Жаком Моно. В основе теории лежат следующие понятия и строение оперона (рисунок 54):

Транскриптон – отрезок молекулы ДНК, подвергающийся транскрипции.

У прокариот гены образуют блоки – опероны, которые являются матрицей для транскрипции.

Оперон – группа тесно связанных между собой генов, которые программируют образование **структурных белков** и **ферментов** в клетке, могут включаться и выключаться в зависимости от метаболических потребностей клетки (рисунок 55). В состав оперона входят ген-регулятор, ген-оператор, структурные гены.

Цистрон (структурный ген) – участок ДНК, несущий информацию о структуре полипептидной цепи определённого белка или нематричной РНК. В большинстве случаев цистроны объединяются в оперон по следующему принципу: закодированные в них белки принимают участие в одной биохимической цепи реакций.

Транспозоны (англ. transposable element, transposon), или **мобильные гены** – участки ДНК организмов, способных к передвижению (транспозиции) и размножения в пределах генома.

Ген-регулятор – ген, регулирующий работу оперона, но не входящий в его состав. Он синтезирует **белок-регулятор** (чаще называемый **белок-репрессор**), который может быть в активной или неактивной форме.

Промотор – начальный участок транскриптона к которому присоединяются белки, облегчающие начало транскрипции и фермент транскрипции – РНК-полимераза.

Оператор – участок ДНК, способный связываться с белком-регулятором активности РНК-полимеразы.

Терминатор – последовательность нуклеотидов в конце транскриптона, являющаяся сигналом об окончании транскрипции.

Индуктор – исходный субстрат метаболического пути, индуцирующий транскрипцию и трансляцию.

Корепрессор – составная часть репрессора, конечный продукт метаболического пути.

Конституитивные ферменты – ферменты, которые присутствуют в клетках всегда, независимо от ее активности и условий. Это белки, которые обеспечивают жизнеспособность клеток: ферменты биологического окисления, синтеза АТФ, мембран и нуклеиновых кислот.

Индукцибельные ферменты – ферменты, которые программируются опероном и синтезируются при необходимости; их концентрация может возрасти в десятки или тысячи раз при возникновении потребности клетки в этих белках.

Репрессируемые ферменты – скорость синтеза которых может ингибироваться при снижении потребности клетки в соответствующих белках.

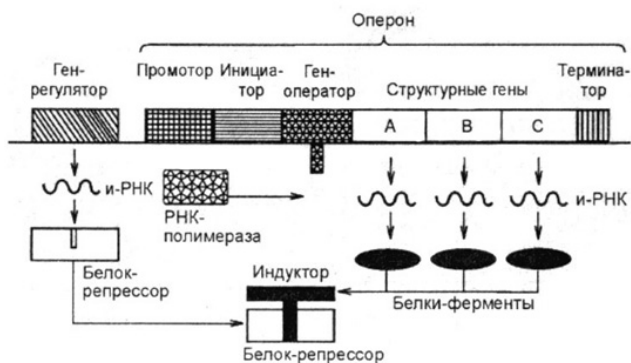


Рисунок 54 – Схема строения и работы оперона

Различают две формы регуляции – **индукция синтеза (положительная регуляция)** и **репрессия синтеза (отрицательная регуляция)**. Если скорость конститутивного синтеза белка высока, то белок регулируется по механизму репрессии синтеза, и, наоборот, – при низкой базальной скорости наблюдается индукция синтеза.

Регуляция синтеза белка по механизму индукции

Лактозный оперон отвечает за катаболизм лактозы (рисунок 55). Клетки кишечной палочки обычно используют в качестве источника углерода глюкозу. Но, если в среде культивирования глюкозу заменить на лактозу, клетки в течение нескольких минут перестраиваются и начинают утилизировать лактозу. Теория оперона объясняет это явление следующим образом.

1. В **отсутствие лактозы** активный белок-репрессор связывается с оператором и блокирует синтез мРНК, кодирующей ферменты катаболизма лактозы. В результате эти ферменты не образуются.

2. Если **нет глюкозы, но имеется лактоза**, последняя связывается с белком-репрессором и ингибирует его, не давая связаться с геном-оператором. Это позволяет РНК-полимеразе считывать информацию, отвечающую за синтез ферментов катаболизма лактозы, и синтезировать мРНК.

Таким образом, лактоза является **индуктором** транскрипции.

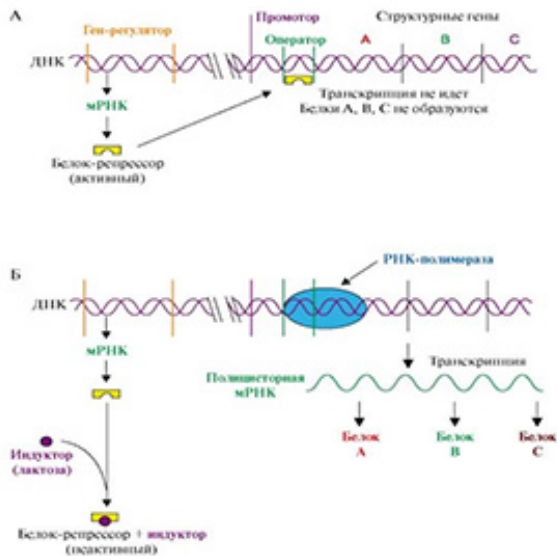


Рисунок 55 – Схема работы лактозного оперона

Регуляция синтеза белка по механизму репрессии

Триптофановый оперон в целом отвечает за синтез триптофана.

Функционирование триптофанового (гистидинового) оперона (рисунок 56) в некотором смысле противоположно лактозному. Регуляция осуществляется по **механизму репрессии**.

1. В отличие от лактозного оперона, **белок-репрессор** синтезируется в **неактивном** состоянии и не может заблокировать транскрипцию генов, кодирующих ферменты синтеза триптофана. Синтез этой аминокислоты будет в клетке продолжаться до тех пор, пока в питательной среде не появится триптофан.

2. **Триптофан** соединяется с белком-репрессором и **активирует** его. Далее такой активный комплекс присоединяется к гену-оператору и блокирует транскрипцию. Таким образом, при наличии триптофана в среде прекращается его внутриклеточный синтез, экономятся ресурсы и энергия бактериальной клетки.

В этом случае триптофан является **репрессором транскрипции**.

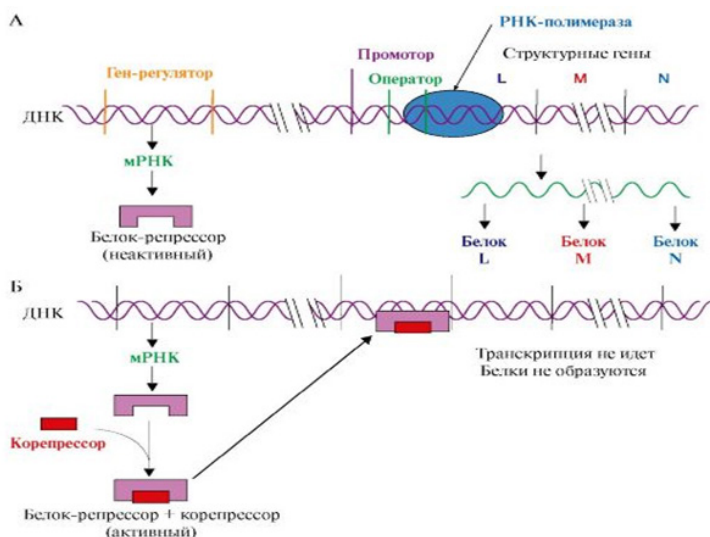


Рисунок 56 – Схема работы триптофанового оперона

Регуляция транскрипции у эукариот

Адаптивная регуляция активности генов у эукариотов обеспечивает изменения скорости транскрипции отдельных генов в ответ на меняющиеся условия внутренней и внешней среды.

Регуляция экспрессии генов у эукариот происходит на уровне:

- генома;
- транскрипции;
- трансляции.

Принцип регуляции (обратная связь) сохраняется, но механизмы ее более сложные. У эукариот единицей транскрипции является транскриптон, содержащий отдельный ген. У эукариот структурные гены, ответственные за разные звенья той или иной цепи биохимических реакций, разбросаны по геному, а не сосредоточены в одном опероне. Транскрипция и трансляция у эукариот разобщены (у прокариот – сопряжены).

Существенное усложнение эукариотических организмов повлекло за собой появление новых способов регуляции активности транскрипции. Порядок транскрибирования генов определяется регуляторной системой, которая носит название **системы регуляции транскрипции**. Контроль транскрипции осуществляется регуляторными элементами *промоторного участка ДНК*, с которыми могут связываться факторы транскрипции.

Регуляторные элементы, стимулирующие транскрипцию связанных с ними генов, называются энхансерами. Энхансеры (англ. to enhancer – усиливать) – это участки ДНК в 10–20 пар оснований, способные значительно **усиливать** экспрессию генов той же ДНК. В отличие от промоторов они значительно удалены от транскрипционного участка и могут располагаться от него в любом направлении (к 5'-концу или к 3'-концу). Сами энхансеры не кодируют какие-либо белки, но способны связываться с регуляторными белками (подавляющими транскрипцию).

Экспрессия генов начинается после присоединения белков – факторов транскрипции – к сайтам связывания в энхансере. Переключатель переходит в рабочее состояние и активирует РНК-полимеразу. В результате синтезируется РНК-копия соот-

ветствующего гена. РНК объединяется с рибосомами, которые продуцируют молекулы белка. Образовавшаяся молекула белка формируется в трех- или четырехмерную структуру и становится функционально активной.

Белки, подавляющие транскрипцию – сайленсеры (успокоители). **Сайленсеры** (англ. silencer – молчание) – участки ДНК, в принципе схожие с энхансерами, но они способны **замедлять** транскрипцию генов, связываясь с регуляторными белками (которые ее активируют).

Факторы транскрипции – это белки - продукты других, независимых генов, поэтому их называют *опосредованно* действующими факторами.

Амплификация – увеличение количества генов, точнее многократное копирование одного гена. Все полученные копии равнозначны и одинаково активно обеспечивают транскрипцию.

Перестройка генов. К подобным процессам относится **кроссинговер** – обмен участками гомологичных хромосом, и более сложный процесс – **сайт-специфичная рекомбинация**, которая изменяет положение и порядок нуклеотидных последовательностей в геноме.

Процессинг мРНК – некоторые пре-мРНК подвергаются разным вариантам сплайсинга (**альтернативный сплайсинг**) в результате чего образуются разные мРНК и, соответственно, белки с разной функцией.

Изменение **стабильности мРНК** – чем выше продолжительность жизни мРНК в цитозоле клетки, тем больше синтезируется соответствующего белка.

Регуляция действия генов и клеточная дифференцировка

В клетках животных кратковременная адаптивная индукция и репрессия синтеза белков возникает при изменении концентрации определенных веществ: субстратов, продуктов метаболических путей, гормонов. Однако существуют также длительные, часто сохраняющиеся на протяжении всей жизни индукция и репрессия, возникающие в ходе клеточной дифференцировки.

Разные дифференцированные клетки одного организма имеют одинаковый набор генов, но, как правило, отличаются по белковому составу. Различия клеток при дифференцировке возникают в результате *репрессии* одних генов и *dereпрессии* других. Молекулярные механизмы регуляции такого типа недостаточно изучены, но общий принцип действия специфических регуляторов сводится к созданию зон DNA, недоступных для транскрипции за счет конденсации хроматина.

Лекарственная регуляция транскрипции

Ингибирование

1. Гетероциклические соединения **доксорибуцин, дауномицин и актиномицин D** обладают способностью интеркалировать (встраиваться между нитей молекулы ДНК) между двумя соседними парами оснований Г-Ц. В результате возникает препятствие для движения РНК-полимеразы («заедание молнии») и остановка транскрипции.

2. **Рифампицин** связывается с β -субъединицей РНК-полимеразы прокариот и ингибирует ее. Благодаря такой избирательности действия рифампицин действует только на бактерии и является препаратом для лечения туберкулеза.

3. **α -Аманитин**, октапептид бледной поганки (*Amanita phalloides*) блокирует РНК-полимеразу II эукариот и предотвращает продукцию мРНК.

Активация

Активация транскрипции используется в клинике намного реже и заключается в применении **аналогов стероидных гормонов** для достижения анаболического эффекта в органе-мишени.

Ингибиторы матричных биосинтезов

Подавление матричных биосинтезов может быть достигнуто путем:

- структурной модификации матрицы и рибосом;
- инактивации ферментов;

- снижения синтеза исходных субстратов (НТФ и дНТФ).

Остановка любого из матричных биосинтезов опасна для клеток и может вызвать их гибель, поэтому многие ингибиторы матричных биосинтезов являются ядами для организма человека.

Трансляция является хорошей мишенью для лекарств.

Многие вещества обладают способностью связываться с элементами рибосом или другими факторами трансляции. Некоторые из этих веществ используются в качестве лекарственных средств, которые в состоянии действовать на разных уровнях трансляции, например:

1. Инактивация факторов инициации:

- *интерферон* активирует внутриклеточные протеинкиназы, которые, в свою очередь, фосфорилируют белковый фактор инициации ИФ-2 и подавляют его активность.

2. Нарушение кодон-антикодонного взаимодействия:

- *стрептомицин* присоединяется к малой субъединице и вызывает ошибку считывания первого основания кодона.

3. Блокада стадии элонгации:

- *тетрациклины* блокируют А-центр рибосомы и лишают ее способности связываться с аминоацил-тРНК;
- *левомицетин* связывается с 50S-частицей рибосомы и ингибирует пептидил-трансферазу;
- *эритромицин* связывается с 50S-частицей рибосомы и ингибирует транслоказу;
- *пурамицин* по структуре схож с тирозил-тРНК, входит в А-центр рибосомы и участвует в пептидил-трансферазной реакции, образуя связь с имеющимся пептидом. После этого комплекс «пурамицин – пептид» отделяется от рибосомы, что останавливает синтез белка.

Молекулярная гибридизация ДНК

На явлении денатурации и ренативации основан метод, называемый **молекулярной гибридизацией**. Процесс гибридизации может осуществляться между двумя любыми цепями нуклеиновых кислот (ДНК-ДНК, ДНК-РНК) при условии, что они содержат комплементарные последовательности нуклеотидов (рисунок 57).

При нагревании до 80–90 °С в резко кислой или щелочной среде водородные связи разрушаются, **нуклеиновые кислоты денатурируют** с расплетением двойной спирали, образуя одноцепочечные молекулы. При медленном охлаждении такие молекулы способны восстанавливать двойную спираль и либо приобретать исходную структуру, либо образовывать гибриды.

Если в одной пробирке провести плавление и отжиг смеси ДНК, например, **человека и мыши**, то некоторые участки цепей ДНК мыши будут воссоединяться с комплементарными участками цепей ДНК человека с образованием **гибридов**, такие двунитевые структуры выявляют с помощью метки. Для этой цели используются специальные ДНК- или РНК-зонды, меченные изотопом (^{32}P) или биотином, обнаруживающие комплементарные нити ДНК или РНК. Число таких участков зависит от степени родства видов. Чем ближе виды между собой, тем больше участков комплементарности нитей ДНК. Это явление называется **гибридизация ДНК-ДНК**.

Если в растворе присутствует РНК, то можно осуществить **гибридизацию ДНК-РНК**. Такая гибридизация помогает установить близость определенных последовательностей ДНК с какой-либо РНК. Гибридизацией ДНК-РНК было впервые установлено, что все виды РНК клетки имеют на молекуле ДНК комплементарные участки.

Гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК используется как **эффективное средство** в молекулярной генетике, судебной медицине, антропологии для установления генетического родства между видами.

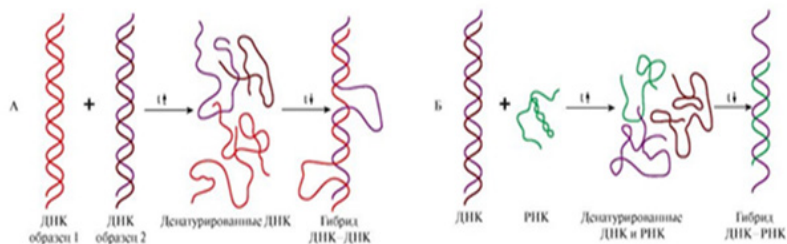


Рисунок 57 – Гибридизация нуклеиновых кислот:

А – гибридизация ДНК – ДНК; Б – гибридизация ДНК – РНК

Методом молекулярной гибридизации можно установить:

- сходство и различие первичной структуры разных образцов нуклеиновых кислот;
- различие ДНК, выделенных из организмов разных видов;
- идентичность ДНК всех органов и тканей одного организма.

Существует несколько вариантов метода:

- **точечная гибридизация.** Выделенную и денатурированную НК наносят на фильтры и затем добавляют меченый зонд; индикация результатов – автордиография при использовании ^{32}P или окраска – при авидин-биотине;
- **блот-гибридизация.** Метод выделения фрагментов НК, нарезанных рестрикционными эндонуклеазами из суммарной ДНК и перенесенных на нитроцеллюлозные фильтры и тестируемые мечеными зондами; используется как подтверждающий тест при ВИЧ-инфекции;
- **гибридизация *in situ*.** Позволяет определять НК в инфицированных клетках.

Полимеразная цепная реакция – ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR – polymerase chain reaction) – метод получения множества копий определенных фрагментов ДНК (генов) в биологическом образце.

Метод ПЦР был разработан в 1983 году Кэри Мюллисом (компания «Cetus», Калифорния, США), за что он был удостоен Нобелевской премии в 1993 году. Изначально метод использовался в основном для научных целей, но затем, разглядев его перспективность и эффективность, метод стали продвигать в практическую медицину.

Появление метода ПЦР было обусловлено достижениями молекулярной генетики, прежде всего расшифровкой нуклеотидной последовательности геномов ряда микроорганизмов. ПЦР стала возможной благодаря открытию уникального фермента ***taq-ДНК-полимеразы***, содержащегося у бактерий, обитающих в гейзерах. Особенность этой полимеразы заключается в ее исключительной термостойкости (выдерживает нагревание до тем-

пературы кипения без потери активности) и высокой рабочей температуре (оптимум работы +72 °C).

За короткое время ПЦР-анализ распространился по всему миру, быстро выйдя из лабораторий научных институтов в сферу практического клинического использования. Диагностика наследственных и инфекционных заболеваний, в том числе вызванных агентами, трудно поддающимися культивированию, генотипирование микроорганизмов, оценка их вирулентности, определение устойчивости микрофлоры к антибиотикам, генодиагностика и генетическая дактилоскопия, пренатальная диагностика, биологический контроль препаратов крови – вот далеко не полный перечень направлений медицины, где с успехом применяется ПЦР.

Принцип метода ПЦР

Именно репликация ДНК легла в основу ПЦР. В ПЦР перечисленные выше процессы осуществляются в пробирке в циклическом режиме. Переход от одной стадии реакции к другой достигается изменением температуры инкубационной смеси. При нагревании раствора до 93–95 °C происходит денатурация ДНК. Для перехода к следующему этапу – присоединению или «отжигу» праймеров – инкубационную смесь охлаждают до 50–65 °C. Далее смесь нагревают до 70–72 °C – оптимум работы taq-ДНК-полимеразы. На этой стадии происходит достраивание новой нити ДНК. Далее цикл повторяется снова. Другими словами, *метод ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК катализируемое ферментом ДНК-полимеразой.*

Сущность ПЦР как метода молекулярной биологии заключается в многократном избирательном копировании определённого гена (участка ДНК) при помощи специальных ферментов в условиях *in vitro*. Важной особенностью ПЦР является получение копий конкретного участка ДНК (гена), соответствующего заданным условиям. Синонимом процесса копирования ДНК является **амплификация**. Репликация ДНК *in vivo* также может считаться амплификацией. Однако в отличие от репликации, в процессе по-

лимеразной цепной реакции амплифицируются короткие участки ДНК (максимум 40 000 пар нуклеотидов).

Образование нуклеотидной цепи осуществляется ферментом ДНК-полимеразой. Однако для начала работы ферменту необходима стартовая площадка. В качестве площадок выступают **праймеры** (затравки) – синтетические олигонуклеотиды длиной 15–20 нуклеотидов. Праймеров должно быть два (прямой и обратный), они комплементарны участкам ДНК-матрицы и именно фрагмент ДНК, ограниченный праймерами, будет многократно копироваться ДНК-полимеразой. Работа полимеразы заключается в последовательном добавлении нуклеотидов, комплементарных последовательности ДНК-матрицы. Тем самым, в одном температурном цикле вновь синтезируются два новых фрагмента ДНК (так как молекула ДНК – двуцепочечная, то и матриц изначально две). Таким образом, за 25–35 циклов в пробирке накапливаются миллиарды копий участка ДНК, определенного праймерами. Структуру отдельного цикла можно представить следующим образом:

1) денатурация ДНК (плавление, расхождение цепей ДНК). Протекает при 95 °С – 1 или 2 минуты;

2) отжиг праймеров (затравки связываются с ДНК-матрицей, температура данной стадии определяется нуклеотидным составом праймера). Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50–65 °С. Время отжига 20–60 сек.

3) элонгация ДНК (время зависит от длины синтезируемого фрагмента). Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Процесс синтеза катализируется ферментом таq-полимеразой и проходит при температуре 70–72 °С. Время протекания синтеза 20 сек – 1 минута.

Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование специфического фрагмента

ДНК-ампликона (рисунок 58). В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей.

Таким образом, происходит накопление ампликонов в растворе по формуле 2^n , где n – число циклов амплификации. Поэтому, даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двухцепочечная молекула ДНК, за 30–40 циклов в растворе накапливается около 108 молекул ампликона. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле.

Процесс амплификации проводится в специальном программируемом термостате (амплификаторе), который по заданной программе автоматически осуществляет смену температур согласно числу циклов амплификации.

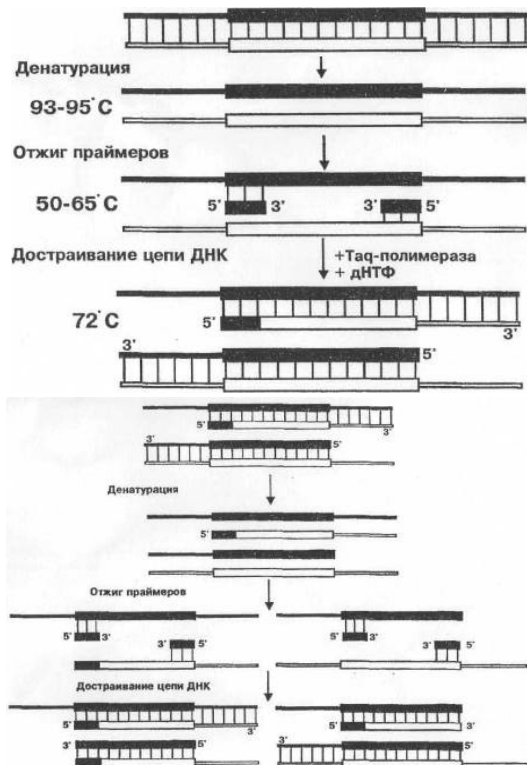


Рисунок 58 – Схема амплификации

Для определения специфических участков генома РНК-содержащих вирусов, сначала получают ДНК-копию с РНК-матрицы, используя реакцию обратной транскрипции (РТ), катализируемую ферментом ревертазой (обратной транскриптазой).

Детекция

Для визуализации результатов амплификации используют различные методы. Наиболее распространенный на сегодняшний день – электрофорез, основанный на разделении молекул ДНК по размеру. Для этого готовят пластину агарозного геля, представляющего собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5–2,5 % с добавлением специального красителя ДНК, например, бромистого этидия. Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенок в геле формируют специальные лунки, в которые в дальнейшем вносят продукты амплификации. Пластины геля помещают в аппарат для горизонтального гелевого электрофореза и подключают источник постоянного напряжения. Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от минуса к плюсу. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияют концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, состав ДНК. Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 минут до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне (254–310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).

В качестве «положительного контроля» используют стандарт ДНК искомого микроорганизма. Размер неспецифических ампликонов может быть как больше, так и меньше по сравнению с «положительным контролем». В худшем случае эти размеры могут совпадать и читаются в электрофорезе как положительные.

«Положительный контроль» позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции. В то же время препарат ДНК, подготовленный для ПЦР из биологического материала, может содержать примеси ингибиторов, заметно снижающих эффективность реакции, а в некоторых случаях, приводящих к отсутствию специфических ампликонов, даже при наличии искомого возбудителя. Необходимо контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью, для чего используют дополнительный, так называемый «внутренний контроль», который представляет собой любой стандарт ДНК, несхожий с ДНК искомого микроорганизма.

В современных лабораториях используется **метод ПЦР в режиме реального времени** (*англ.* – real-time PCR). Метод Real-Time PCR позволяет проводить детекцию продуктов амплификации в процессе реакции и вести мониторинг кинетики накопления ампликонов. Для детекции PCR-продукта используются флуоресцентные красители, обеспечивающие флуоресценцию, прямо пропорциональную количеству ПЦР-продукта. Кинетическая кривая в координатах «уровень репортерной флуоресценции – цикл амплификации» имеет S-образную форму.

В ней можно выделить три стадии:

1. Стадия инициации (когда ПЦР-продукты еще не детектируются флуоресцентной меткой).
2. Экспоненциальная стадия (в которой наблюдается экспоненциальная зависимость количества флуоресценции от цикла ПЦР).
3. Плато (стадия насыщения).

Регистрация флуоресцентного сигнала проводится в процессе амплификации на специальном приборе – амплификаторе для Real-Time PCR. По нарастанию интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью программного обеспечения, прилагаемого к амплификатору, вычисляется концентрация исходной матрицы ДНК.

Преимущества метода ПЦР в режиме реального времени

- возможность детекции накопления продуктов амплификации непосредственно во время проведения амплификации;
- принципиальным преимуществом является возможность осуществления детекции накопления ампликонов без открытия пробирки, что минимизирует риск получения ложноположительных результатов из-за контаминации проб и реагентов продуктами амплификации;
- существенное уменьшение количества манипуляций с исследуемым образцом сокращает затраты времени, упрощает анализ и позволяет снизить вероятность ошибок;
- подобный подход позволяет отказаться от стадии электрофореза, что ведет к резкому уменьшению вероятности контаминации исследуемых проб продуктами амплификации;
- понижение требований, предъявляемых к ПЦР лаборатории;
- увеличение объективности интерпретации результатов ПЦР-исследования, поскольку обработка ведется с помощью программного обеспечения прибора;
- значительно, практически в два раза, сокращается общее время исследования, позволяя получить результат уже через 1,5–2 часа после поступления клинического материала в лабораторию;
- данный метод впервые позволяет проводить количественную оценку содержания ДНК микроорганизма в клинической пробе;
- применение, наряду с праймерами, гибридационных зондов обеспечивает повышение специфичности анализа;
- возможность независимой одновременной регистрации флуоресцентного сигнала от нескольких гибридационных ДНК-зондов допускает выявление в одном исследовании нескольких различных участков одной или различных ДНК-мишеней.

Список литературы

1. *Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.* Биологическая химия: учебник. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2013. – 704 с.
2. Биоорганическая химия: учебник для студентов медицинских вузов / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зарубян. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 416 с.
3. Биохимия: учебник для вузов / под ред. Е.С. Северина. – 5-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 784 с.
4. Биохимия человека: учебное пособие / под ред. академика НАН КР, д-ра биол. наук, проф. А.А. Алдашева. – Бишкек, 2013. – 364 с.
5. Биохимия: учебник для вузов / В.П. Комов, В.Н. Шведова. – 3 изд., – М.: Дрофа, 2008. – 638 с.
6. *Кольман Я., Рем К.Г.* Наглядная биохимия. – М.: Бином, 2011. – 469 с.
7. *Костюк С.А., Кулага О.К., Хворик Д.Ф.* Новые аспекты клинического применения полимеразной цепной реакции // Медицинские новости. – 2006. – № 8.
8. *Херрингтон С., Макгли Дж.* Молекулярная клиническая диагностика. Методы. – М.: Медкнига, 1999. – 433 с.

Составители:
Елена Валерьевна Шарова,
Лидия Павловна Горборукова,
Манас Кожомкулович Айтматов

МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ

Учебное пособие

Редактор *Н.В. Шумкина*
Компьютерная верстка *А. Рахмановой*

Подписано в печать 18.06.2019
Печать офсетная. Формат 60 × 84 ¹/₁₆.
Объем 7,25 п. л. Тираж 100 экз. Заказ 77

Издательство КРСУ
720000, г. Бишкек, ул. Киевская, 44

Отпечатано в типографии КРСУ
720048, г. Бишкек, ул. Анкара, 2а