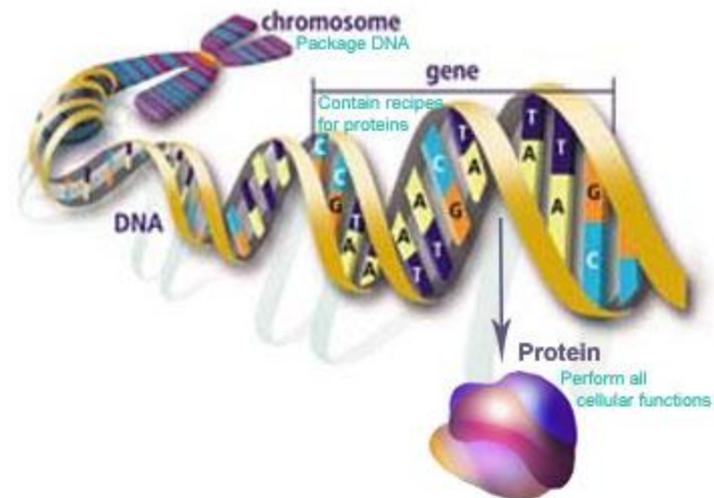
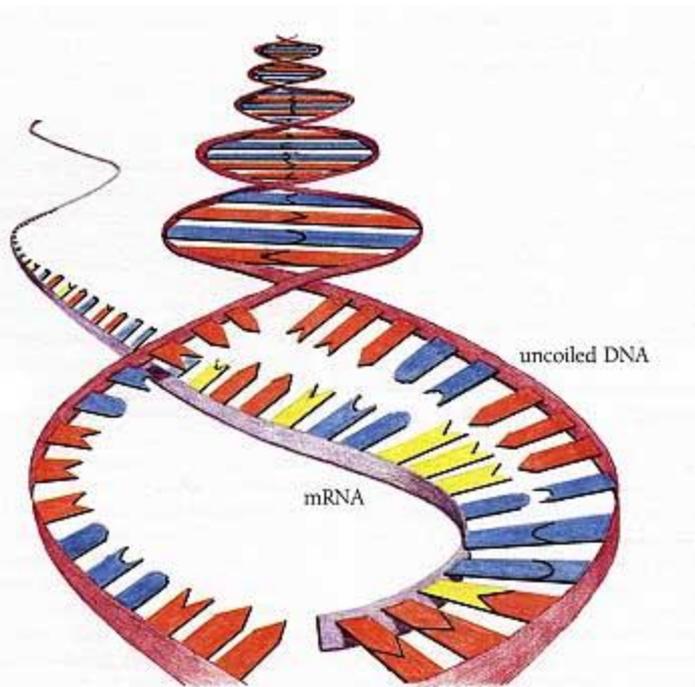


Генетическая информация и ее реализация в клетке



План лекции

- 1) Генетическая информация
- 2) Матричный принцип
- 3) Генетическая роль нуклеиновых кислот
- 4) Центральная догма молекулярной биологии
- 7) Репликация
- 8) Репарация
- 9) Недорепликация концов линейных молекул. Теломераза.
- 10) Применение технологий амплификации ДНК

Генетическая информация

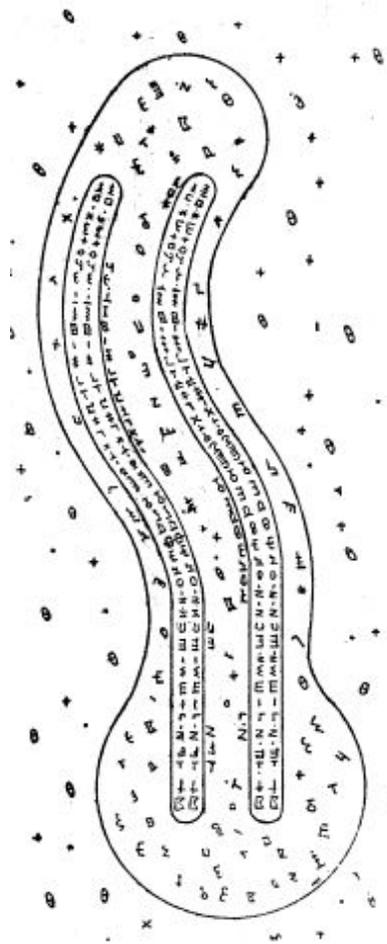
Информация о строении белков, закодированная с помощью последовательности нуклеотидов ДНК и РНК. Вся информация о структуре и деятельности клеток и организма в целом.



Впервые сформулировал идею
матричного синтеза



Николай Константинович Кольцов
(1872-1940)



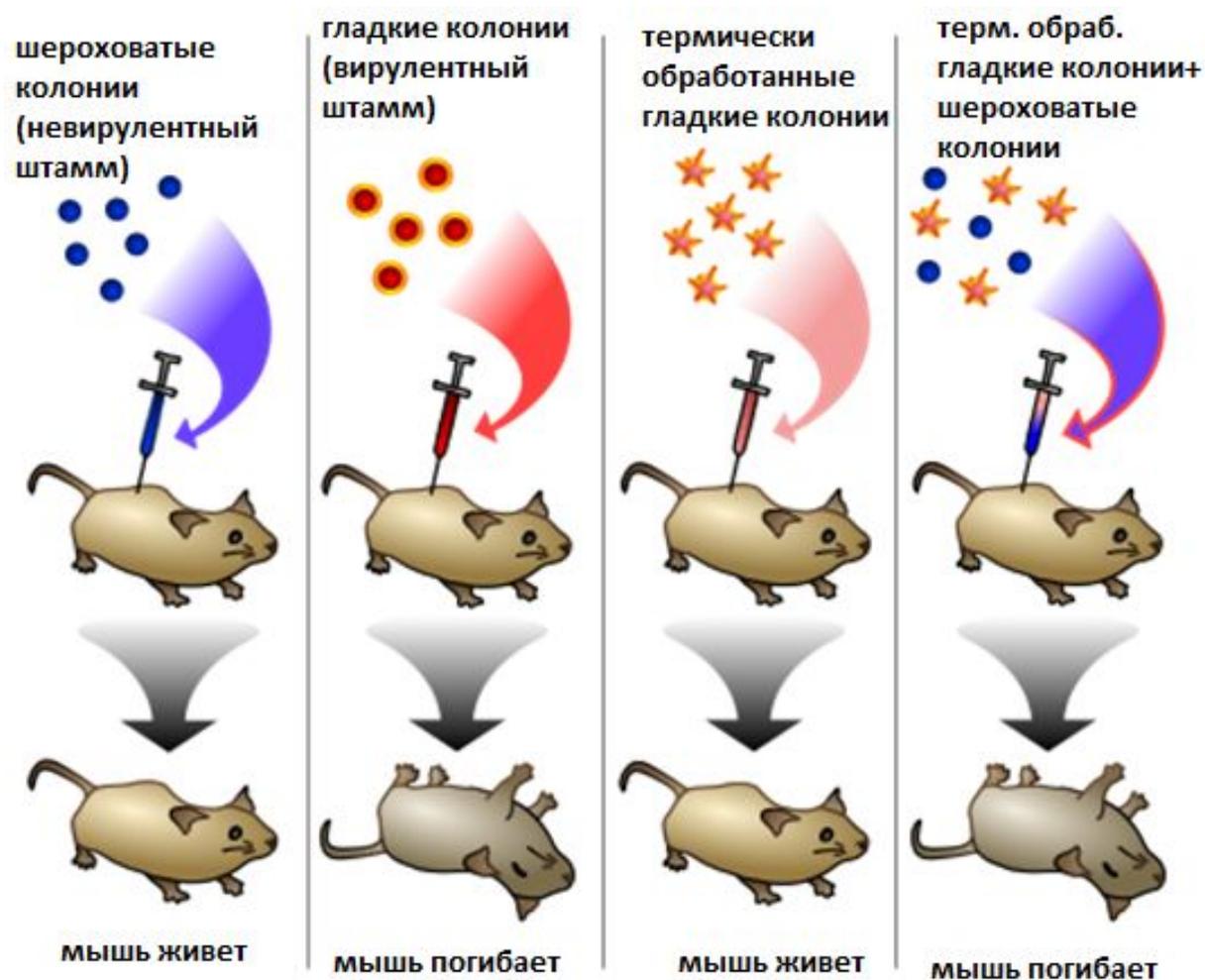
Белковая хромосома
в своей основе
представляет
молекулу или пучки
молекул с линейным
расположением в них
генов

Доказательства генетической роли ДНК

- В 1928 г Ф. Гриффит открыл принцип трансформации на пневмококках *Streptococcus pneumoniae*.

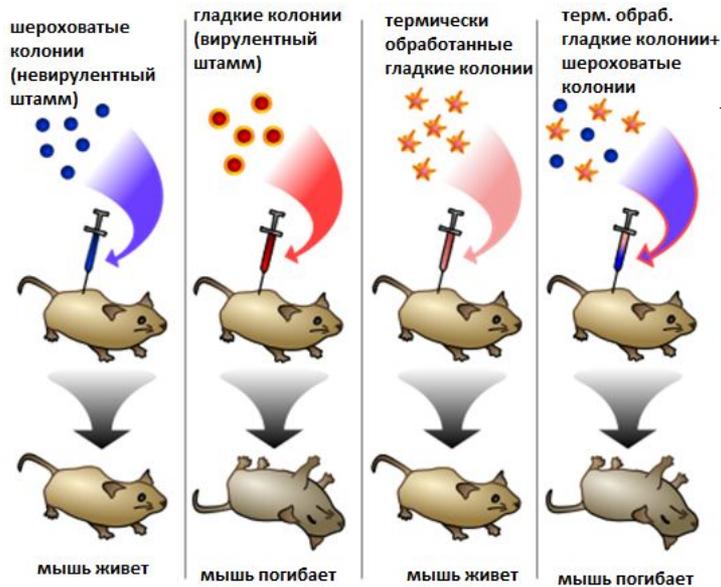


Фредерик Гриффит
(1879—1941)



Доказательства генетической роли ДНК

- 1943 г. О. Эвери, К. Маклеод и М.Маккарти



показали, что вещество, вызывающее трансформацию в эксперименте Гриффита, разрушается ДНКазой, но не разрушается РНКазой или протеазами.

STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES

INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III

BY OSWALD T. AVERY, M.D., COLIN M. MACLEOD, M.D., AND MACLYN McCARTY,* M.D.

(From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research)

PLATE 1

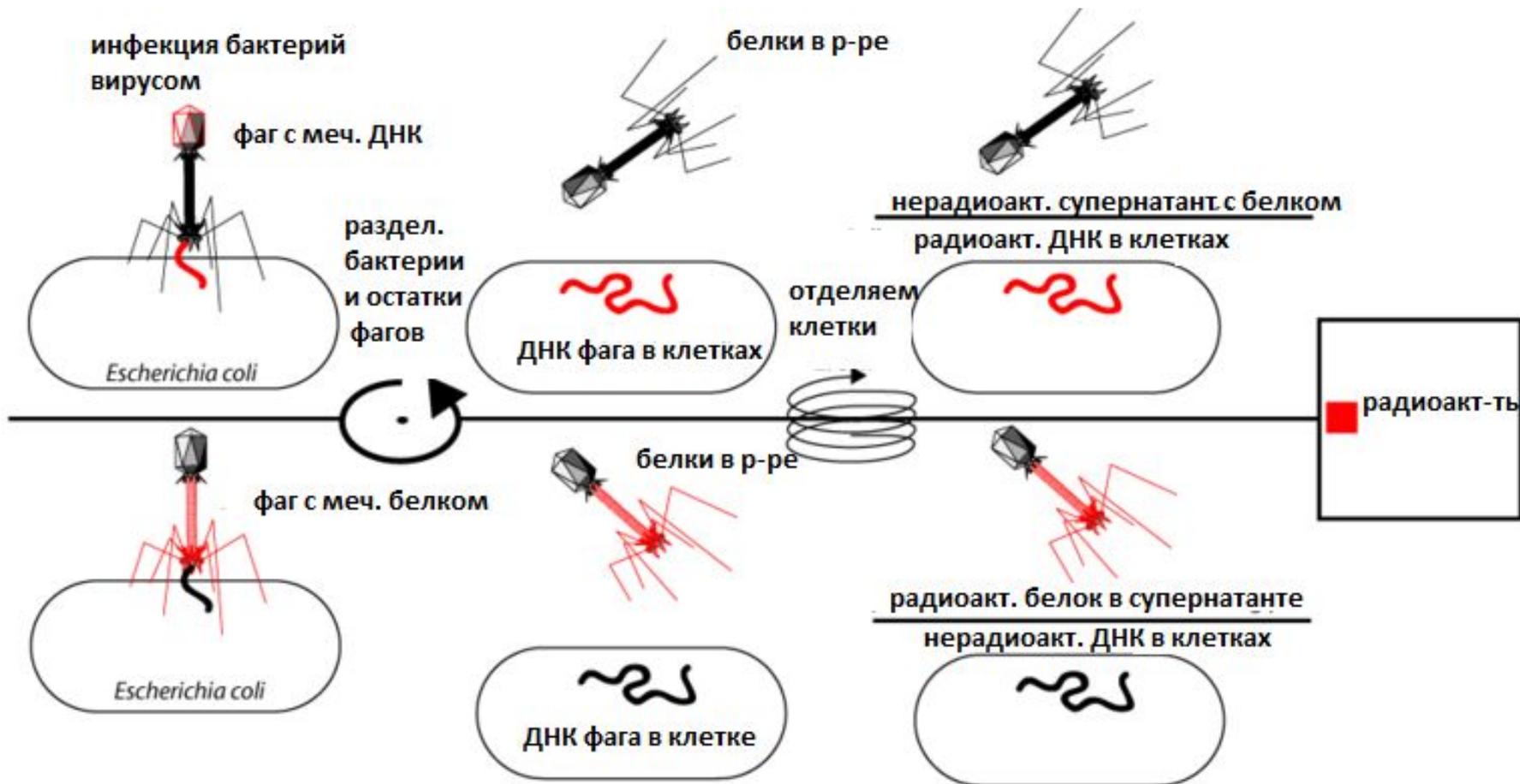
(Received for publication, November 1, 1943)

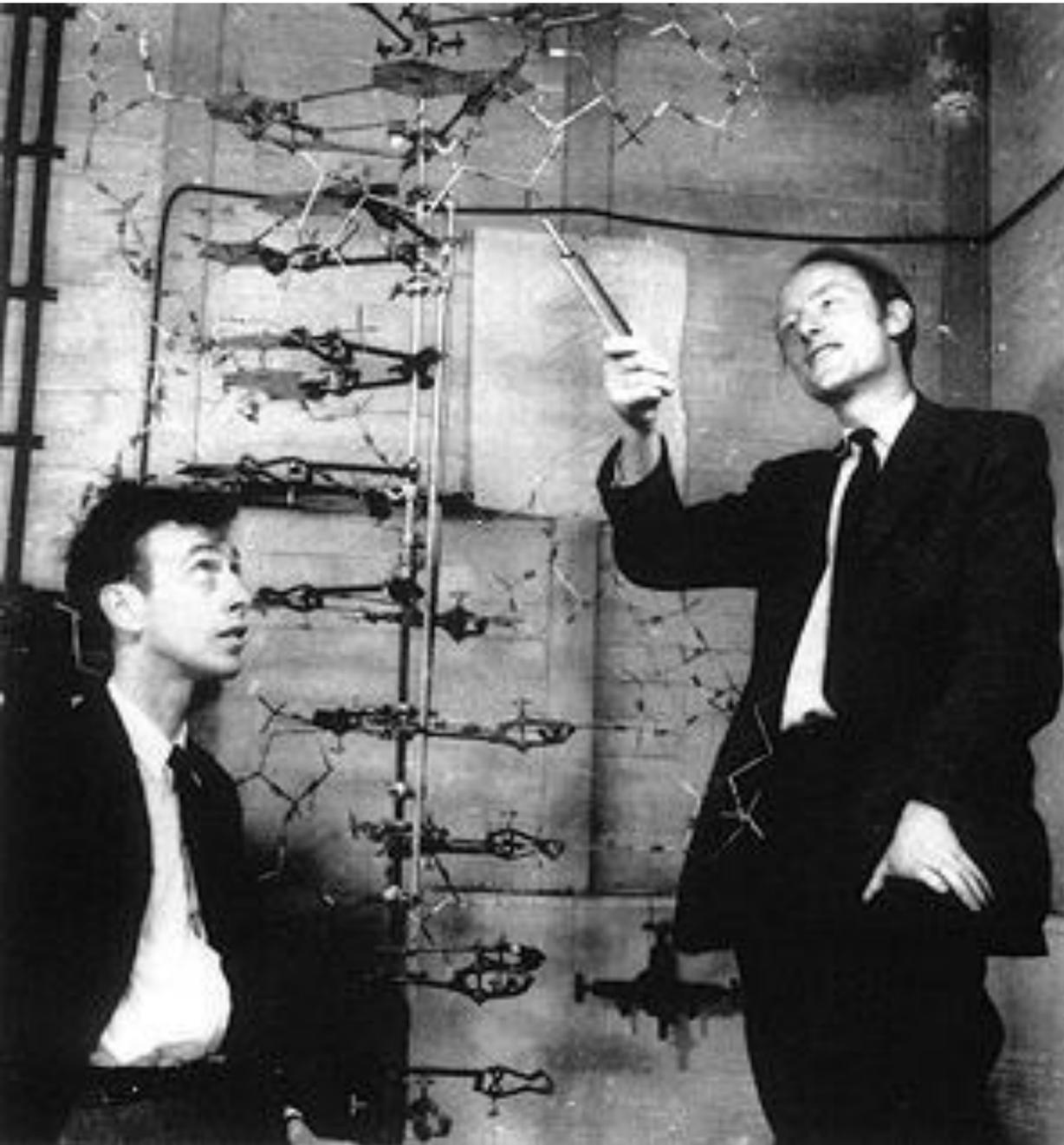
Biologists have long attempted by chemical means to induce in higher organisms predictable and specific changes which thereafter could be transmitted in series as hereditary characters. Among microorganisms the most striking example of inheritable and specific alterations in cell structure and function that can be experimentally induced and are reproducible under well defined and adequately controlled conditions is the transformation of specific types of *Pneumococcus*. This phenomenon was first described by Griffith (1)

Доказательства генетической роли ДНК



Эксперимент А. Херши и М. Чейз в 1952 г на бактериофаге Т2

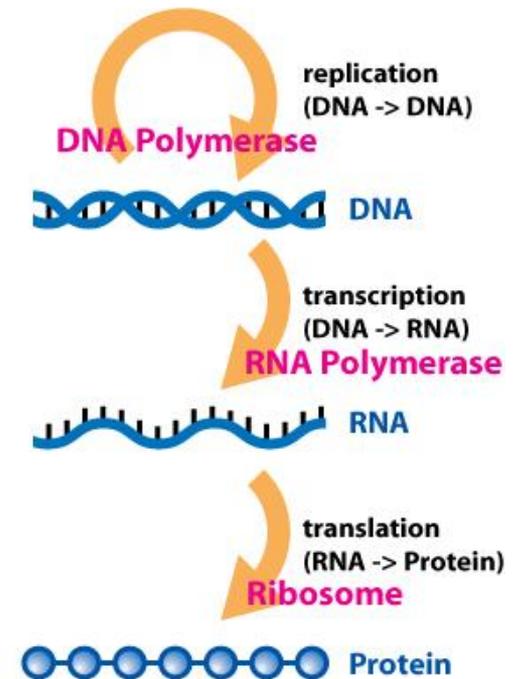




1953 г -
Джеймс Уотсон и
Фрэнсис Крик

Открытие двойной
спирали ДНК

Центральная догма молекулярной биологии

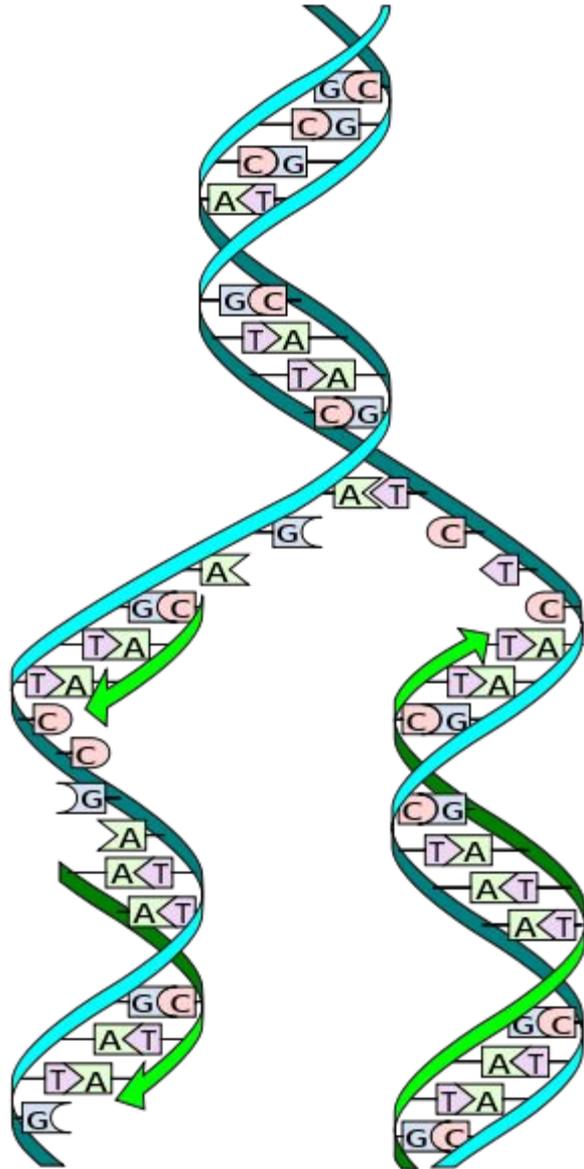


<http://en.wikipedia.org>

Правило сформулировано
Френсисом Криком в 1958 году

ДНК → ДНК

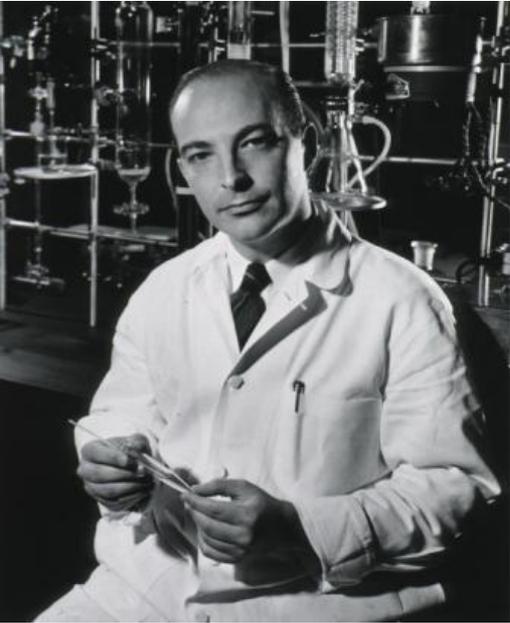
РЕПЛИКАЦИЯ ДНК



- Универсальный биологический процесс передачи генетической информации в поколениях клеток и организмов, благодаря созданию идентичных копий ДНК.

Генетический материал, зашифрованный в ДНК, удваивается и делится между дочерними клетками

Ферментативный синтез ДНК



- 1956 г. Артур Корнберг выделил фермент ДНК полимеразу



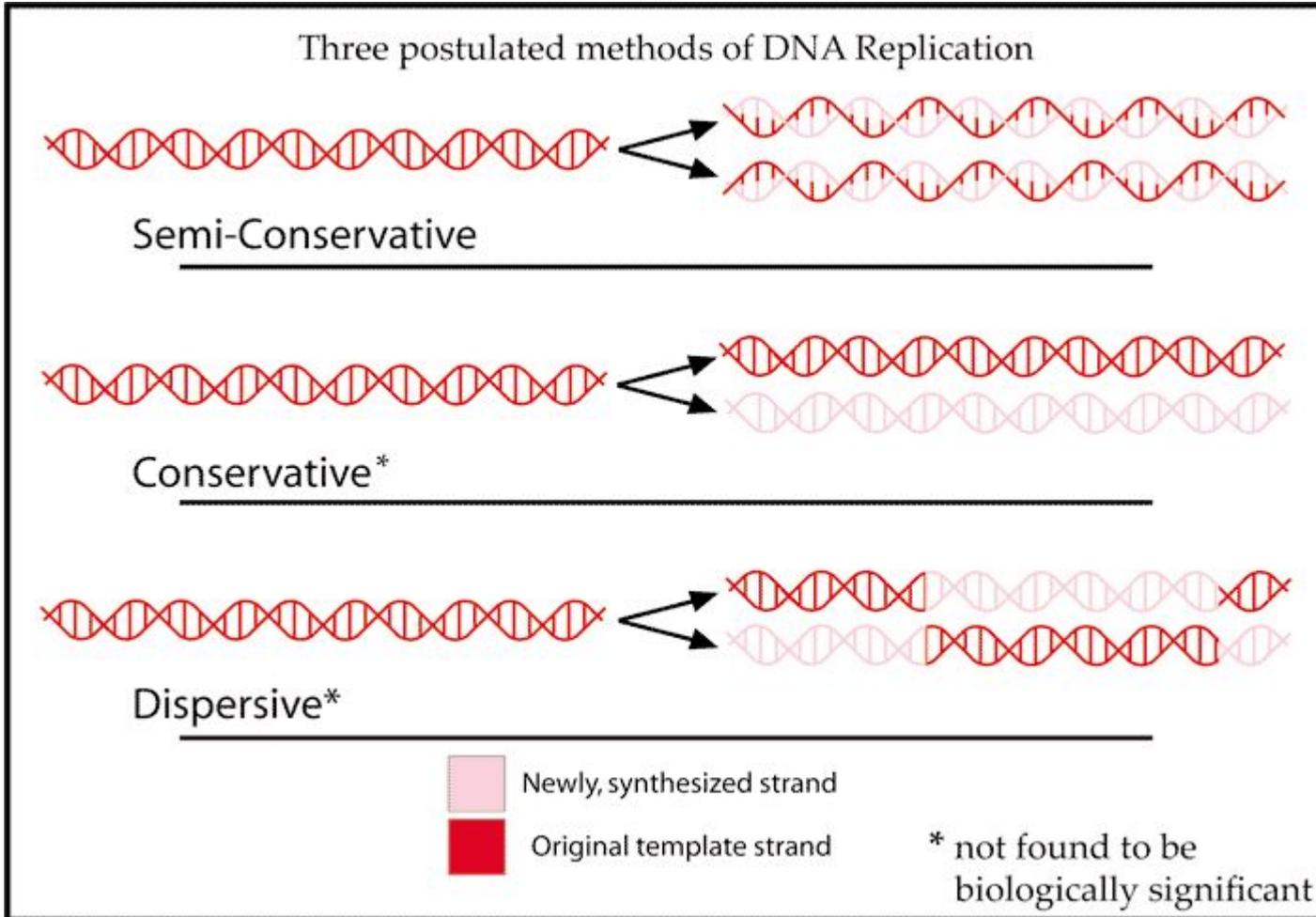
Нобелевская премия по физиологии и медицине 1993 года

Артур Корнберг
(1918-2007)

Lehman, I.R., Bessman, M.J., Simms, E.S., and Kornberg, A. (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 233, 163—170

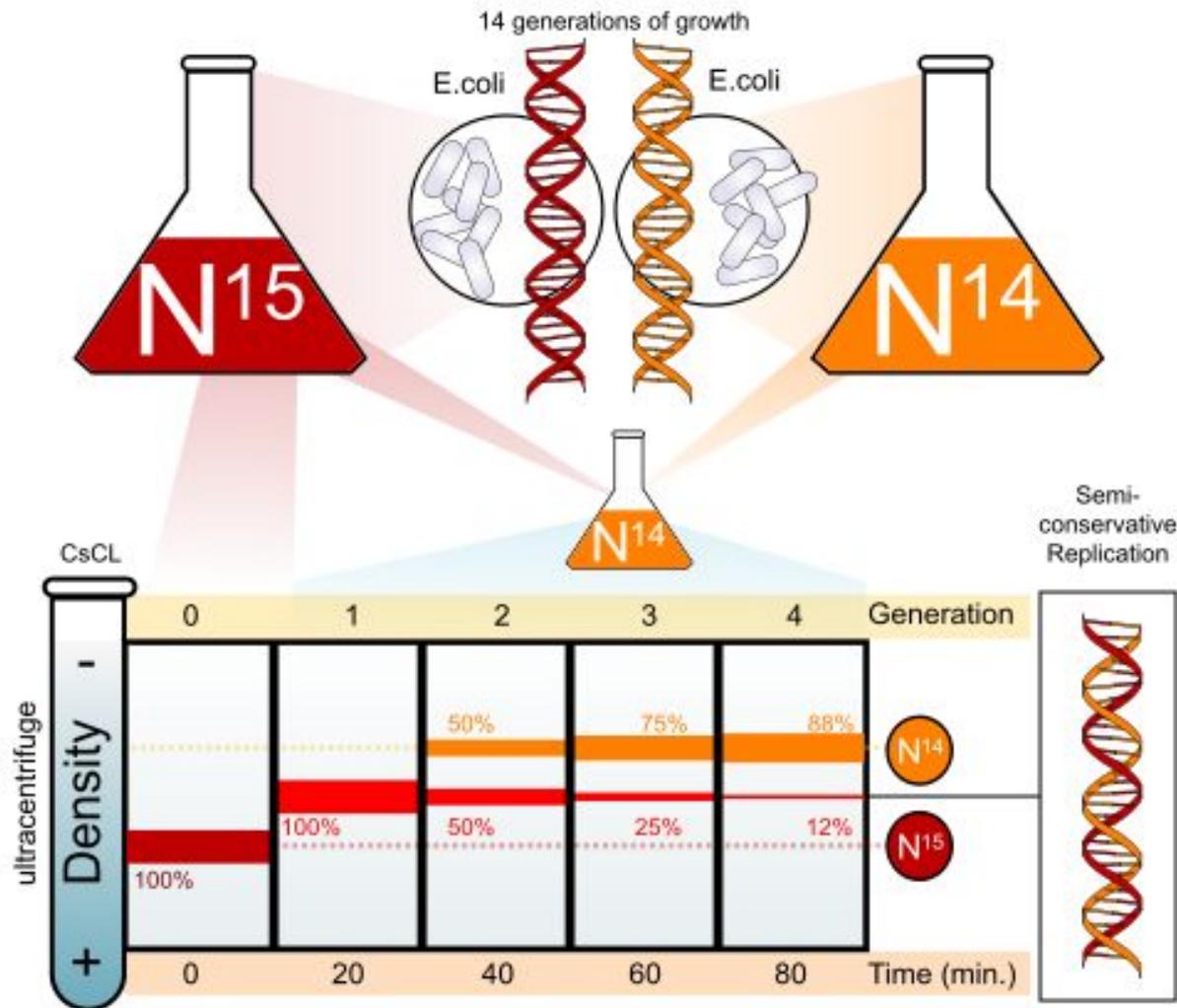
Bessman M.J., Lehman I.R., Simms E.S., Kornberg A. (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction. *J. Biol. Chem.* 233, 171—177

ПОЛУКОНСЕРВАТИВНОСТЬ

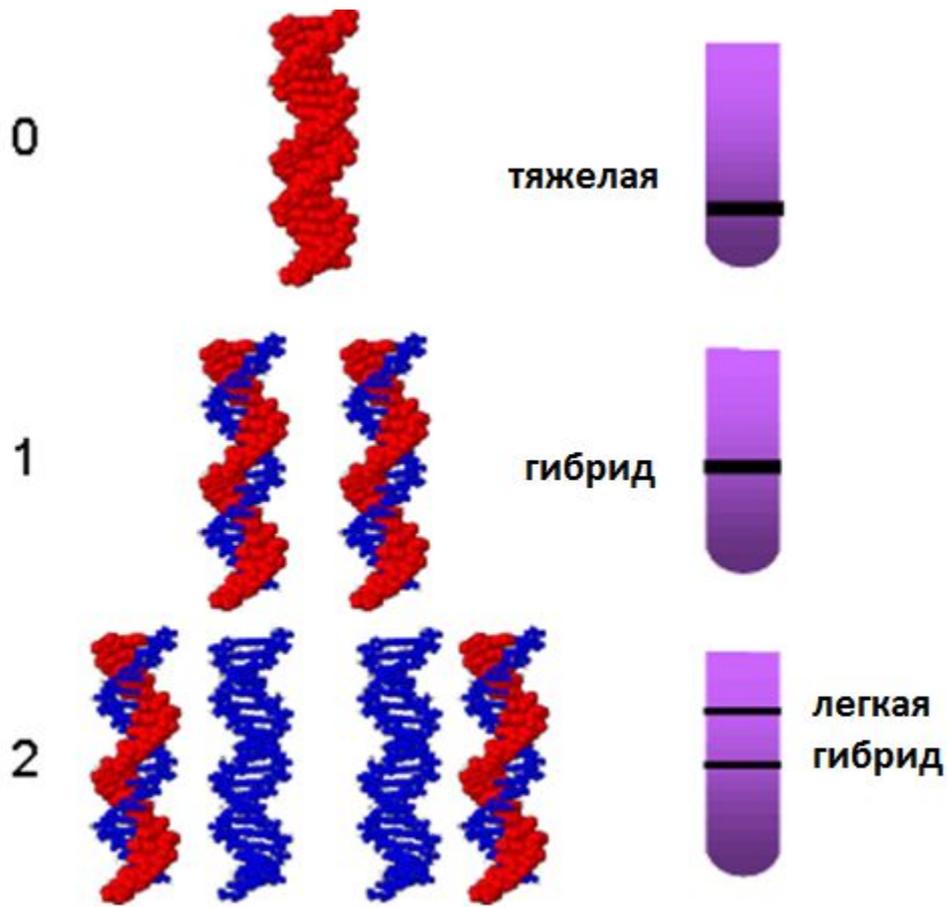


Опыт Мезельсона и Сталя, 1958 г.

ПОЛУКОНСЕРВАТИВНОСТЬ



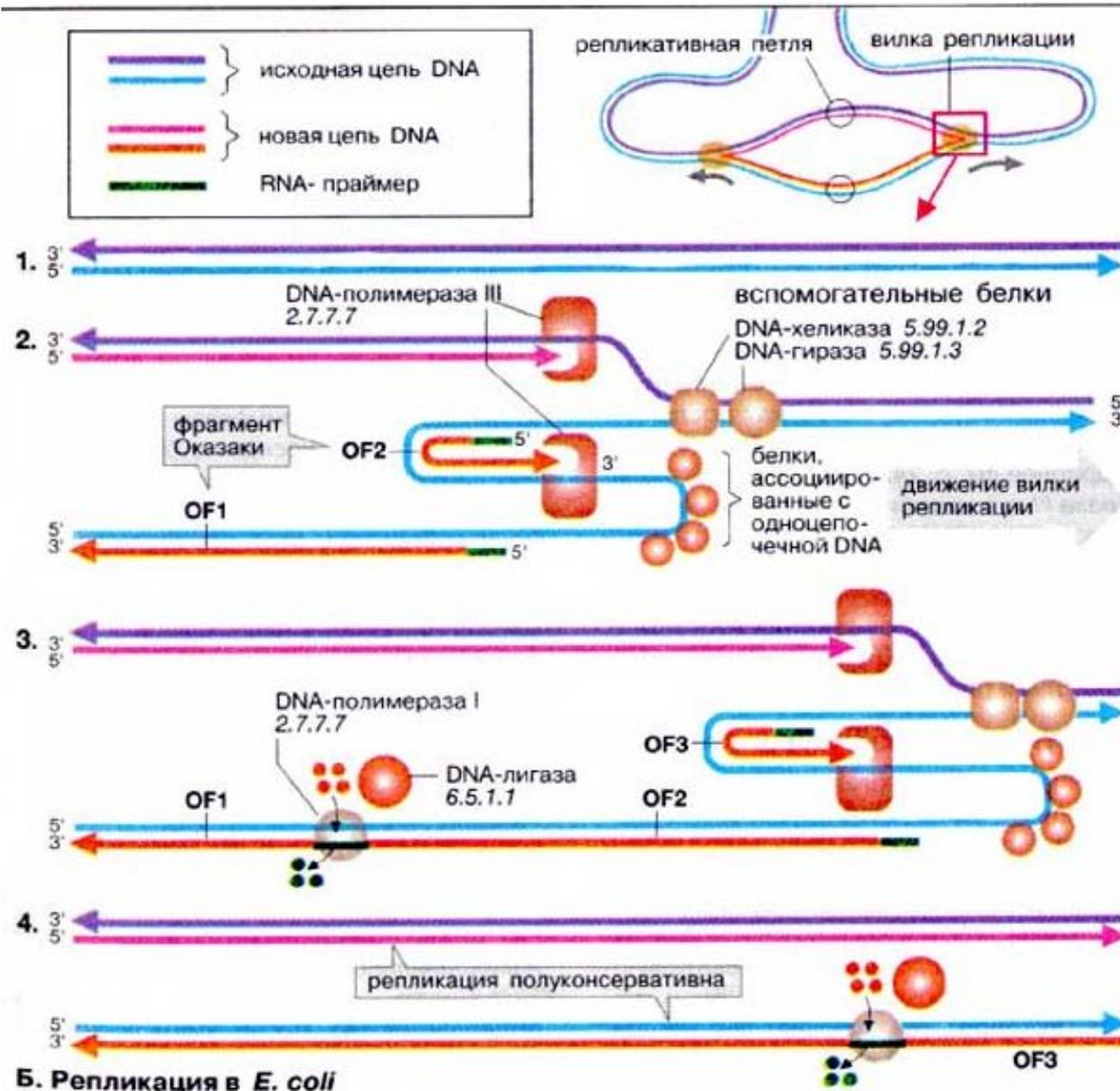
Опыт Мезельсона и Сталя, 1958 г.



- 1) выращивали бактерий на среде с ^{15}N
- 2) переносили на среду с ^{14}N
- 3) выделяли ДНК каждого поколения и центрифугировали в градиенте CsCl
- В первом поколении: гибридная ДНК, во втором – половина «легкой» и половина «гибридной» ДНК

Доказательство полуконсервативного механизма репликации!

Антипараллельность и униполярность

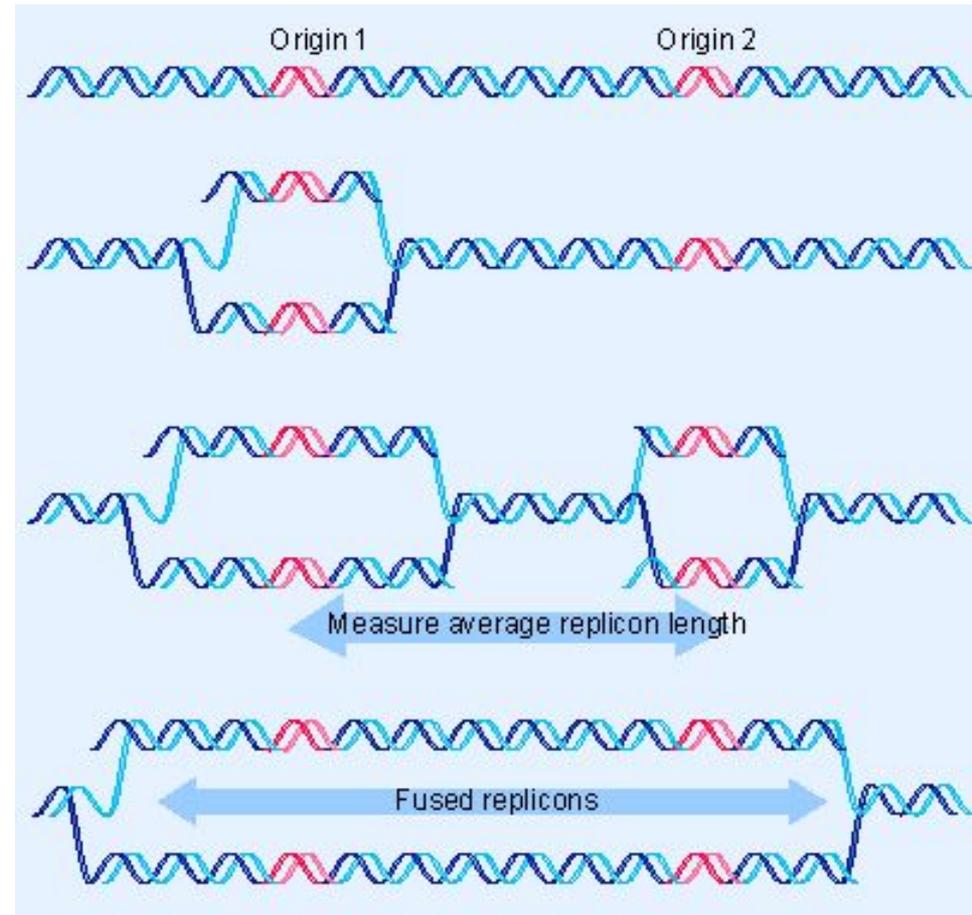


Из Кольман, Рем
«Наглядная биохимия»

Прерывистость

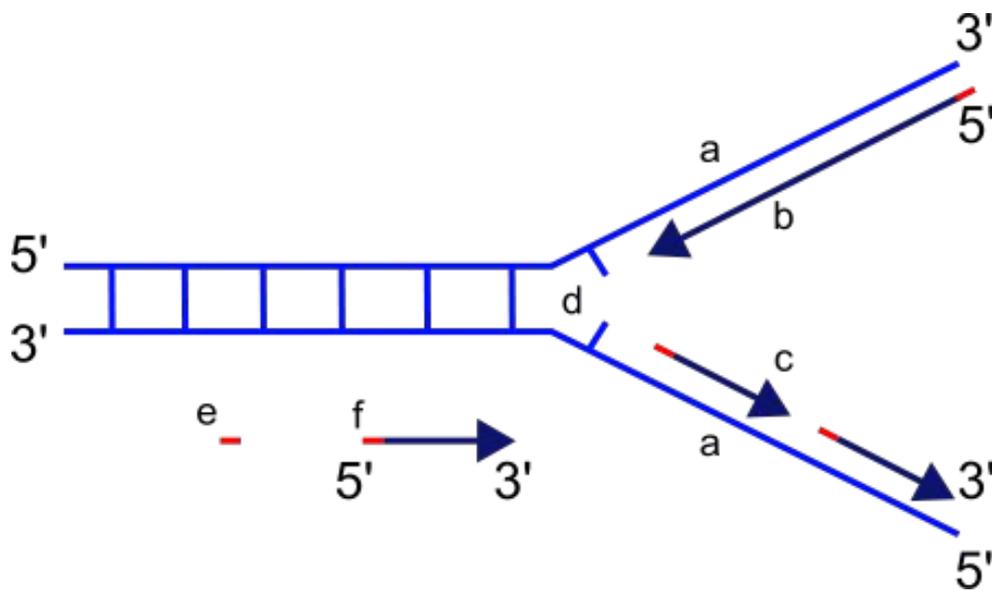
Репликон –
расстояние между
двумя сайтами
начала репликации
ori

У плазмид, прокариот,
ДНК митохондрий и
пластид вся кольцевая
молекула – один
репликон.



<http://genes.atSPACE.org>

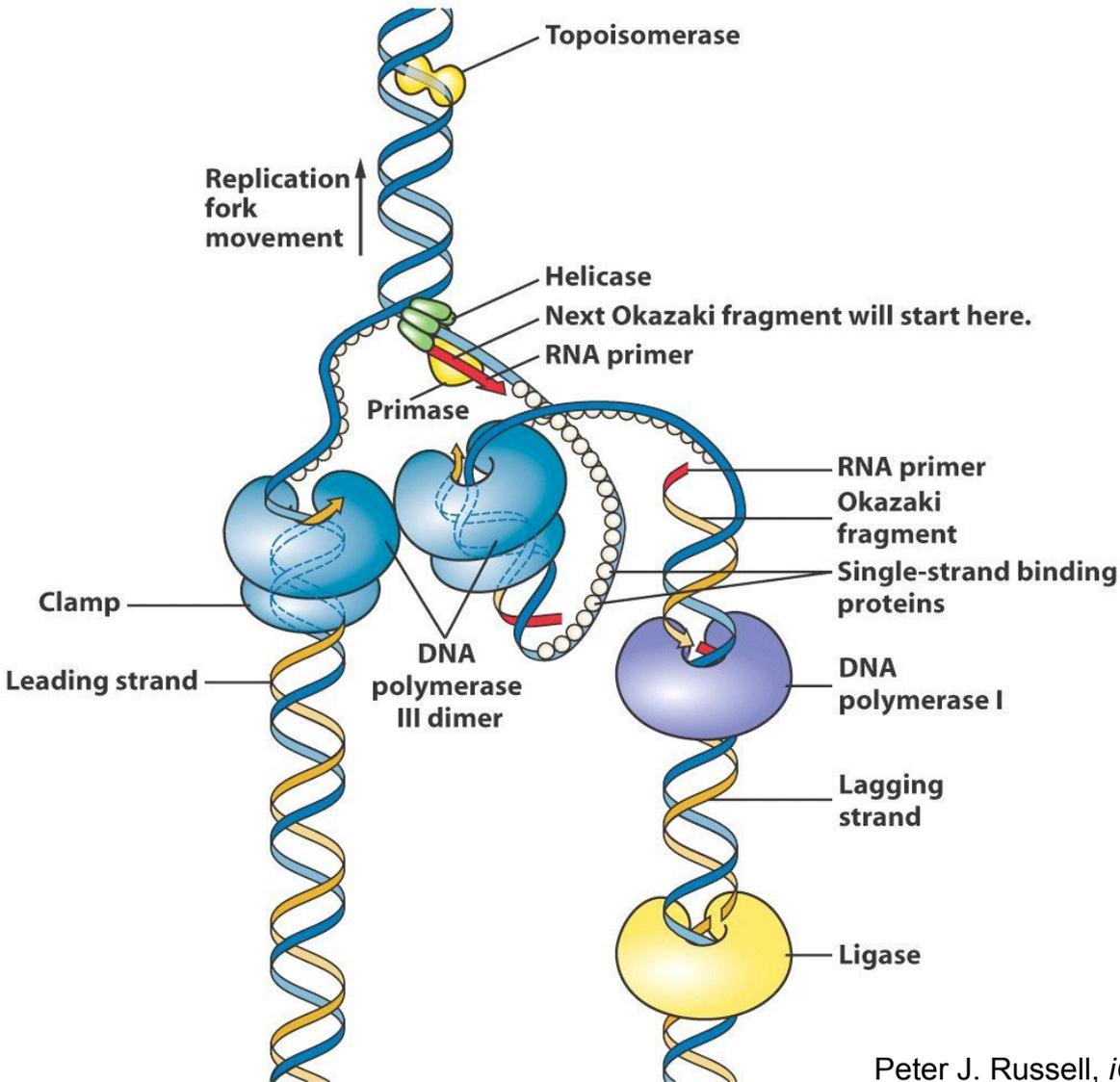
Потребность в затравке



- a: матричные цепи,
- b: лидирующая цепь,
- c: запаздывающая цепь,
- d: репликационная вилка,
- e: РНК праймер,
- f: фрагмент Оказаки

<http://en.wikipedia.org>

Модель тромбона



Белки репликации E. coli

- **ДНК-лигазы** - ферменты, сшивающие цепи ДНК. При репликации лигазы сшивают цепи фрагментов Оказаки
- **ДНК геликазы** - ферменты раскручивающие двуцепочечную спираль ДНК с затратой энергии гидролиза трифосфатов NTP.
- **SSB белки** – поддерживают нити ДНК в одноцепочечном состоянии
- **Праймаза** – синтезирует РНК праймер (затравку)
- **РНКазы** – удаляет РНК затравки
- **ДНК полимераза I** - заполняет пробелы между сегментами отстающей цепи
- **ДНК полимераза III** - ключевой фермент репликации хромосомной ДНК E.coli

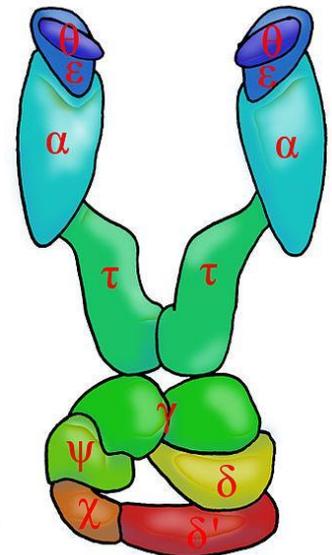
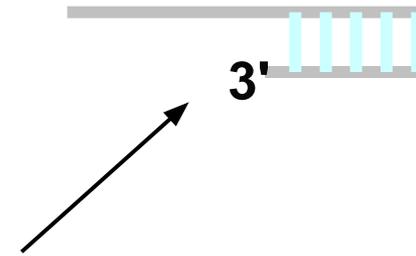
Принципы репликации

1. Комплементарность
2. Антипараллельность
3. Полуконсервативность
4. Униполярность
5. Прерывистость
6. Потребность в затравке

ДНК-полимераза III – основной фермент репликации

Свойства ДНК-полимеразы:

1. Присоединяет по одному нуклеотиду с 3' конца растущей цепочки.
2. Требуется для начала работы спаренного 3' конца.
3. Отщепляет один нуклеотид назад, если он не спарен – т.е. исправляет свои ошибки.



3'→5' экзонуклеазная активность (редактирующая)

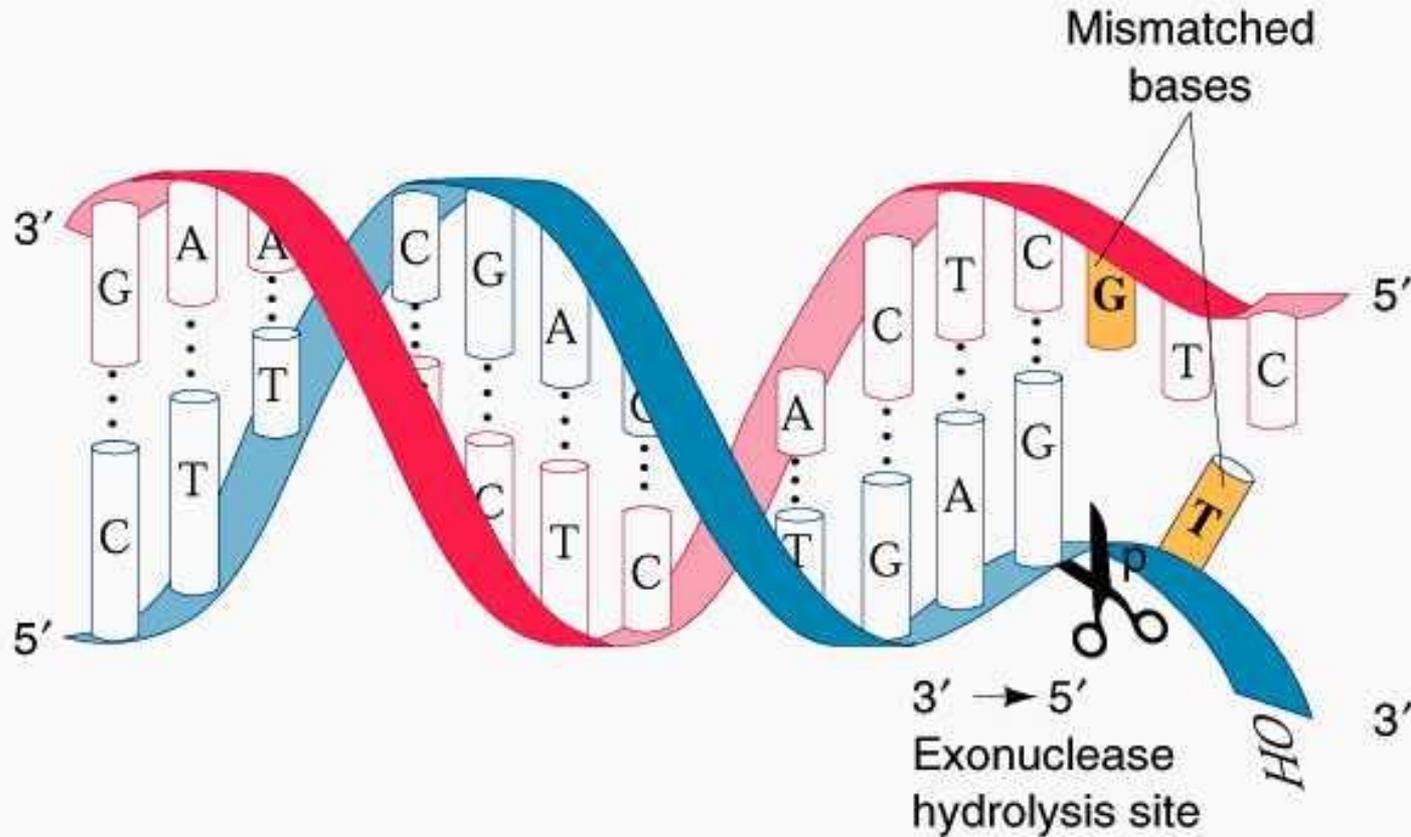


Figure 24-7. The 3'→5' exonuclease function of DNA polymerase I.
Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

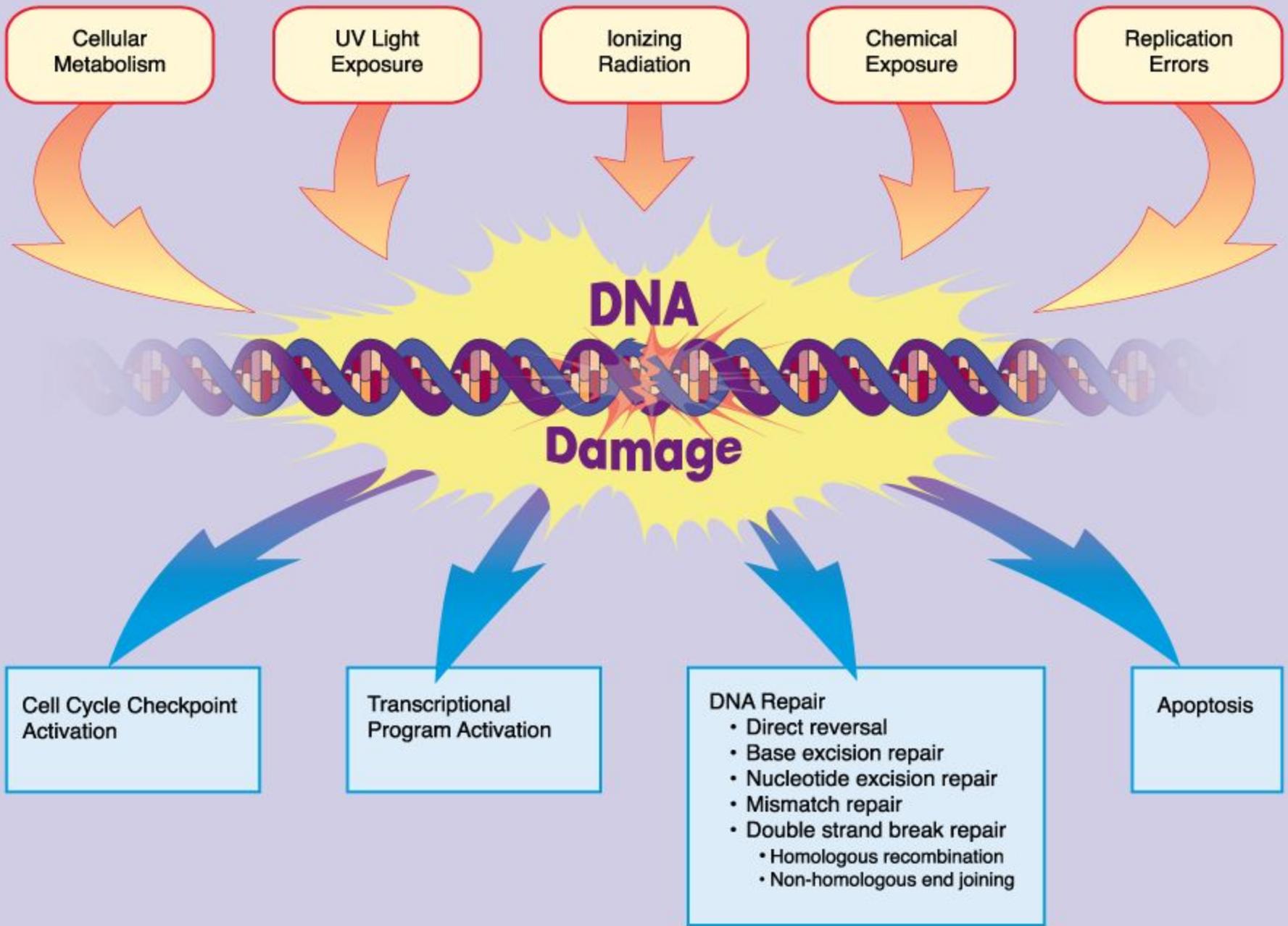
Скорость репликации ДНК

- Прокариоты – 1000 нуклеотидов /сек
- Эукариоты – 100 нуклеотидов /сек

Мутации и системы репарации

- Частота ошибок ДНК-полимеразы $\sim 10^{-9} - 10^{-10}$
- Ошибки встраивания нуклеотидов $\sim 10^{-4} - 10^{-5}$
- Редактирующая функция ДНК-полимеразы $\sim 10^{-7} - 10^{-8}$
- Пострепликативная система репарации несовпадений $\sim 10^{-9} - 10^{-10}$

- **Мутации** – это случайные изменения нуклеотидной последовательности ДНК клетки.
- Возникают как **ошибки** в нормальных клеточных процессах.



Мутагены

```
graph TD; A[Мутагены] --> B[Факторы внешней среды, повышающие спонтанную частоту мутаций:]; A --> C[Спонтанный уровень мутаций:];
```

Факторы внешней среды, повышающие спонтанную частоту мутаций:

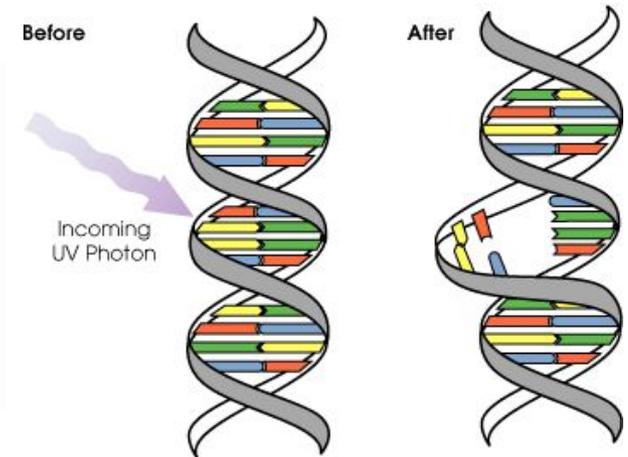
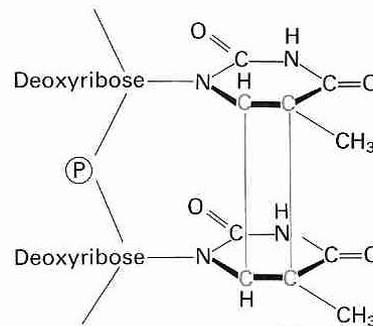
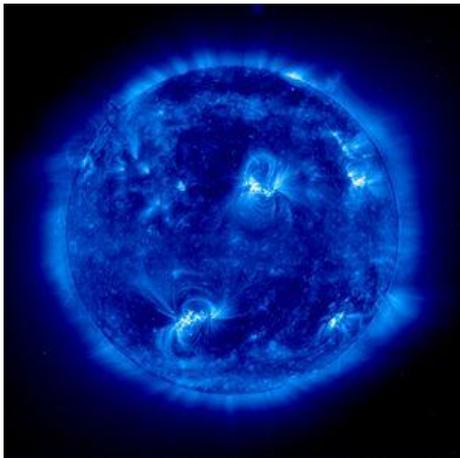
- Химические мутагены
- Эл. -магн. излучение (ультрафиолет, радиация)
- Вирусы

Спонтанный уровень мутаций:

- Ошибки репликации
- Инсерции мобильных элементов
- Ошибки деления клеток

Типы повреждений

- 1) Модификация азотистых оснований (алкилирование, дезаминирование)
- 2) Апуринизация и апириимидинизация (отщепление азотистых оснований)
- 3) Разрыв цепи ДНК (однонитевой или двунитевой)
- 4) Образование поперечных сшивок между основаниями одной цепи или разных цепей



Системы репарации

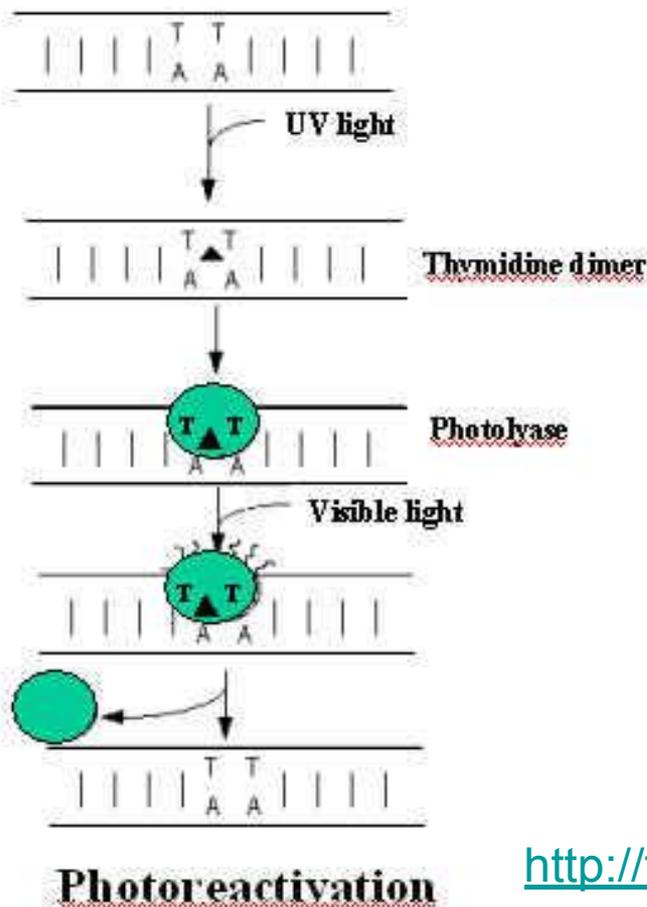
- Белки, исправляющие ошибки и повреждения ДНК.

Прокариоты: три ферментные системы — прямая, эксцизионная и пострепликативная.

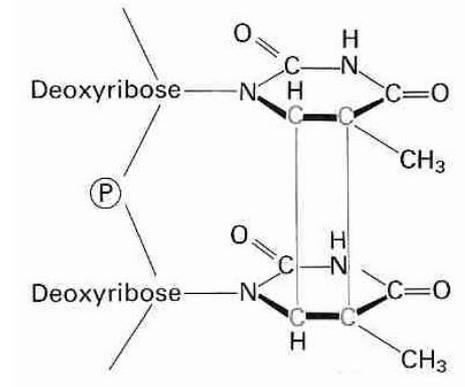
Эукариоты: еще Miss-match и Sos-репарация

Механизмы репарации ДНК

- 1) Прямая репарация



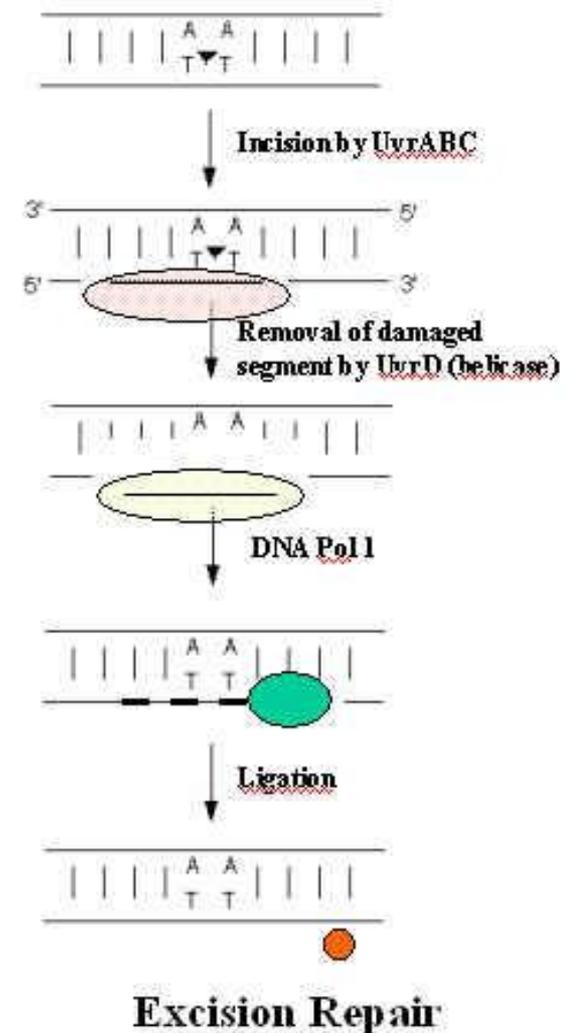
Фотопиаса



<http://trishul.sci.gu.edu.au>

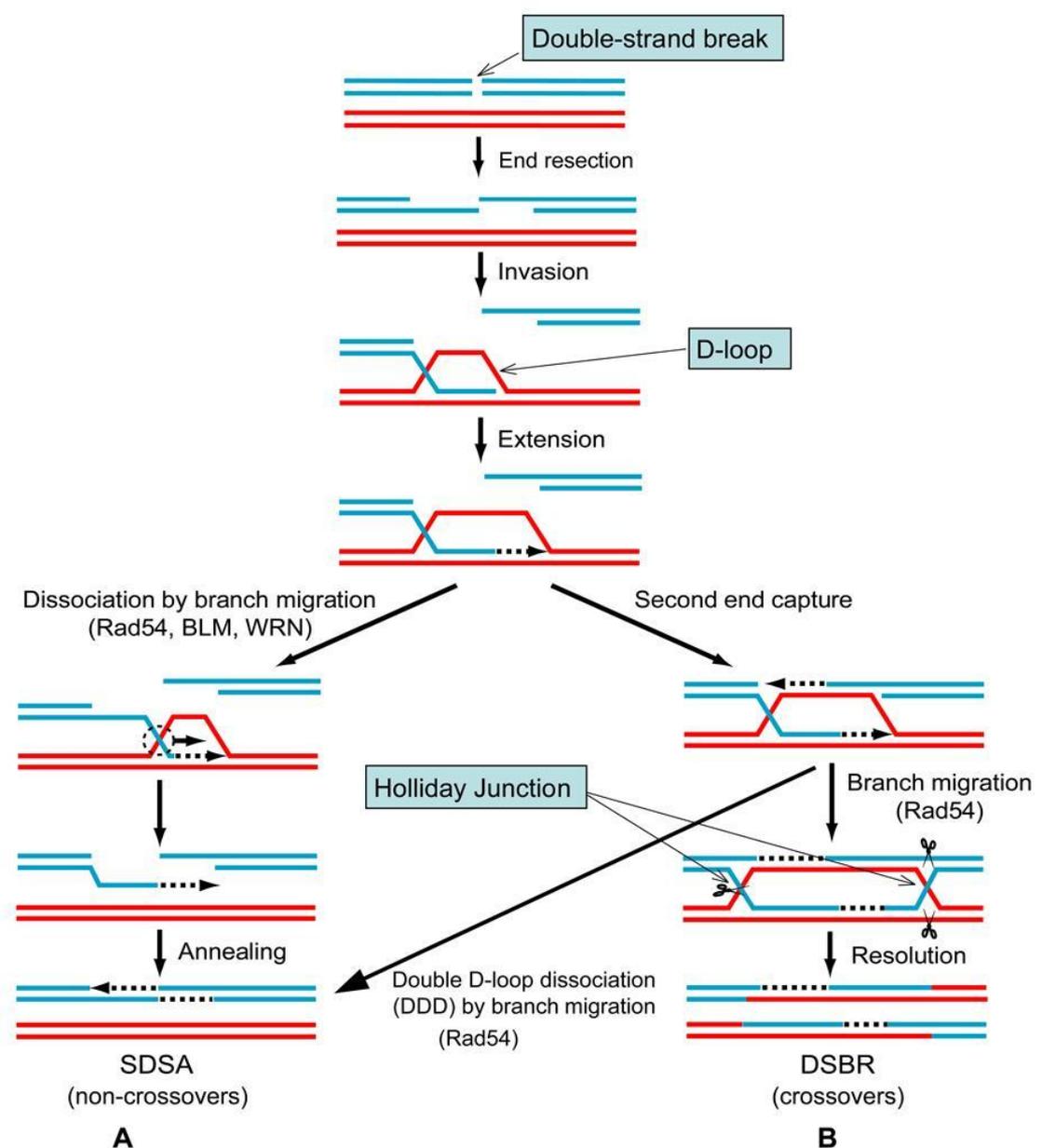
Механизмы репарации ДНК

- 2) Эксцизионная репарация
 - 2а) Вырезание основания - поврежденное основание удаляется гликозилазой и заменяется неповрежденным
 - 2б) Вырезание 2-20 нуклеотидов с последующим восстановлением цепи



Репарация двунитевых разрывов

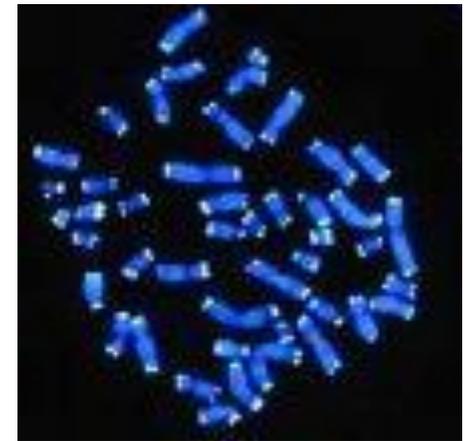
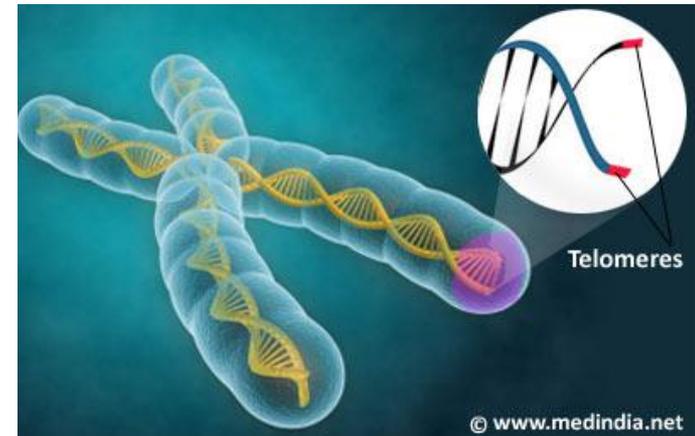
- 1) Соединение
концов
- 2) Гомологичная
репарация



Mazin et al., (2010)

Теломеры и теломераза

- Проблема недорепликации концов линейных ДНК – А.М. Оловников, 1971
- **Новые** цепи укорочены с 5' концов – где выедается РНК-затравка, а достроить ДНК-полимераза не может без спаренного конца.
- При каждом делении хромосома теряет 50 н.п. на концах – теломерах.



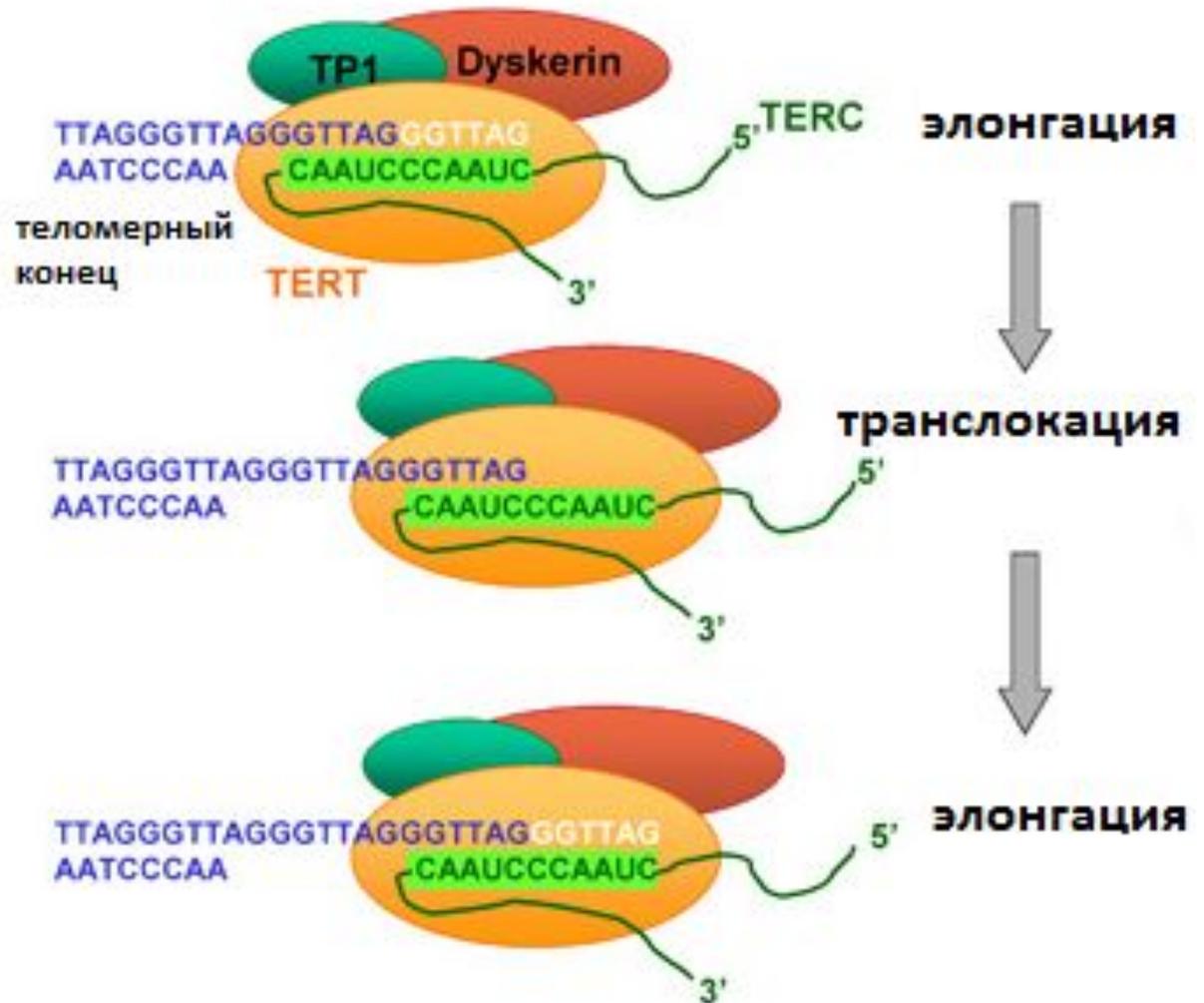
Теломераза

- фермент, надстраивающий концы хромосом.
- содержит РНК.
- удлинение происходит путем обратной транскрипции

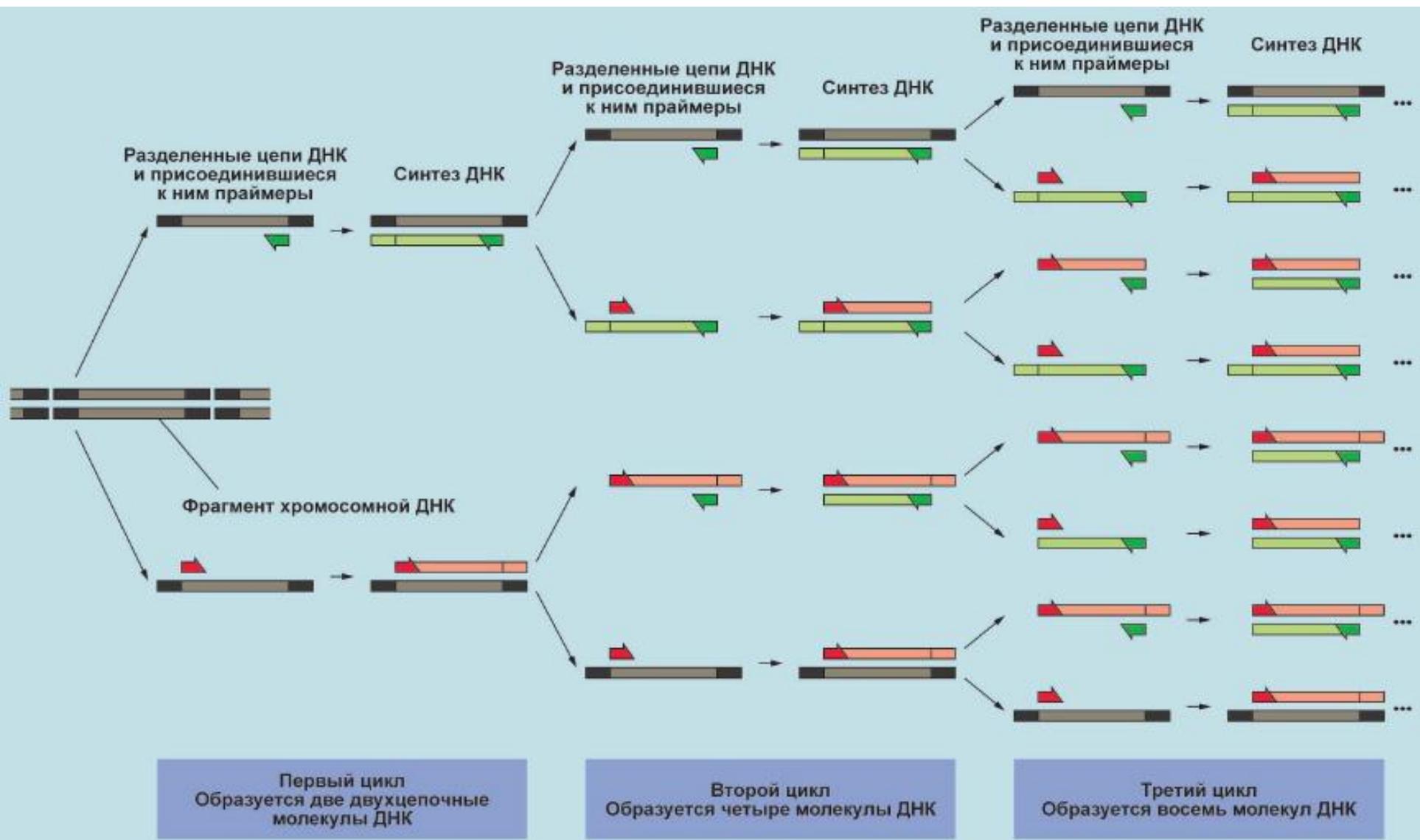


Элизабет Блэкберн (Elizabeth H. Blackburn) – получила Нобелевскую премию в 2009 году за открытие теломеразы

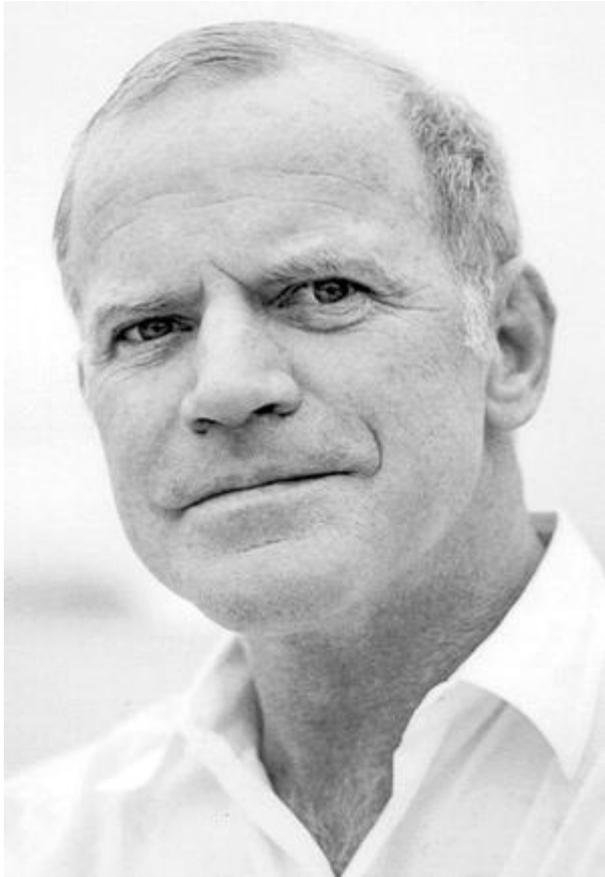
Теломераза



Амплификация ДНК in vitro. Полимеразная цепная реакция.



Изобретение ПЦР



Статья в журнале Science, 1985:

RESEARCH ARTICLE

Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia

Randall K. Saiki, Stephen Scharf, Fred Faloona, Kary B. Mullis
Glenn T. Horn, Henry A. Erlich, Norman Arnheim

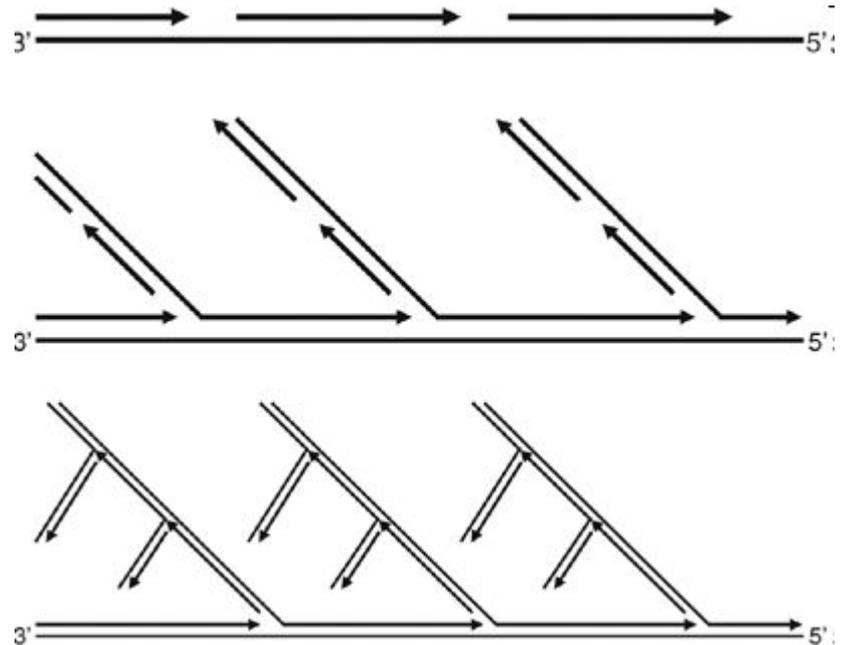
Кэрри Муллис (род. 1944 г) Нобелевская
премия по химии 1993 года



Применение ПЦР

- **Криминалистика**
- **Установление отцовства**
- **Медицинская диагностика.**
- **Персонализированная медицина**
Клонирование генов
- **Секвенирование**
- **Мутагенез**
- **Древняя ДНК**

Изотермальная амплификация



РНИ 29 кроме ДНК полимеразной активности, обладает геликазной активностью

Литература

