

Лекція 4.

Молекулярні основи спадковості

1. Історія дослідження носія спадковості.
2. Нуклеїнові кислоти: структура і функції.
3. Синтез ДНК та її реплікація.
4. Реалізація генетичної інформації. Генетичний код.
5. Синтез білка в клітині і його регуляція.
6. Сучасні уявлення про ген і його будову.

Ключові поняття: ген, генетичний код, дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК), комплементарність, нуклеотид, рибонуклеїнова кислота (РНК), сплайсинг, транскрипція, трансляція, трансдукція, трансформація.

1. Історія дослідження носія спадковості

Серед найвизначніших відкриттів і досягнень людства у ХХ ст. одне з перших місць займає відкриття природи дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК), що дало початок розгадки таємниць спадковості. Біологи давно знали, що спадковість пов'язана з ядром клітини і зокрема з хромосомами.

Оскільки було встановлено, що саме хромосоми є носіями спадкової інформації, то проблема зводилась до наступного: які молекули, білок чи нуклеїнові кислоти, відіграють ключову роль у спадковості?

Генетична роль ДНК була встановлена на мікроорганізмах в явищах трансформації і трансдукції. Остаточо доведено, що не стільки білки, скільки нуклеїнові кислоти відіграють провідну роль у процесах обміну речовин, передачі спадкової інформації.

У 1868 р. швейцарський лікар Ф. Мішер виявив у ядрах клітин речовину, яка мала кислотні властивості, і яку він назвав нуклеїном (відгрец. nucleus – ядро). У 1889 р. Р. Альтман запропонував назвати її нуклеїновою кислотою. Передумови досліджень молекулярної структури носія спадковості були закладені ще у перші

роки становлення генетики як науки.

Так, у період із 1929 по 1952 р. були такі відкриття:

-1929 р. – рос. хімік Ф. Левен встановив наявність двох типів нуклеїнових кислот (ДНК і РНК) та сформулював тетра nukлеотидну теорію будови ДНК;

-1944 р. – амер. біолог О. Ейвері, К. Мак-Леод та М. Мак-Карті переконливо довели, що генетичні функції в клітині притаманні саме ДНК, а не молекулі білка;

-1949–1950 рр. – Е. Чаргафф показав, що кількість А у будь-якій молекулі ДНК дорівнює кількості Т, а кількість Г дорівнює кількості Ц (правило Чаргаффа).

-1953 р. – Дж. Уотсон та Ф. Крік, опираючись на це правило, а також на дані рентгеноструктурного аналізу, отримані британським фізиком, біологом

Метью Уілкінсом та Розанін Франклін, сформували молекулярну модель (вторинну структуру) ДНК. Ці відкриття привернули увагу дослідників саме до ДНК, що сприяло розвитку молекулярної генетики.

2. Нуклеїнові кислоти: структура і функції

Нуклеїнові кислоти – високомолекулярні органічні речовини, які складаються з великої кількості зв'язаних між собою ланок(мононуклеотидів).

Первинна структура ДНК – це послідовність мононуклеотидних залишків у полі нуклеотидному ланцюгу. Розшифровка (секвенування) первинної структури молекули ДНК вперше була здійснена Фредеріком Сенджером (1977 р.), який за цю роботу одержав свою другу Нобелівську премію. Зараз первинну структуру ДНК визначають за допомогою приладу секвенатора, який автоматично розшифровує біля одного млн. нуклеотидів за добу.

Вторинна структура ДНК представляє собою подвійну спіраль, утворену двома антипаралельними полі нуклеотидними ланцюгами (рис.2). Цю структуру часто порівнюють з гвинтовими сходами, в яких “сходинки” утворені азотистими основами, оберненими назустріч одна іншій всередину, а “обіччя” – це залишки пентози і фосфату, що чергуються.

Азотисті основи направлені до середини спіралі і розміщені таким чином, що аденін одного ланцюга завжди знаходиться проти тиміну іншого і поєднується з ним подвійним водневим зв'язком. Гуанін у полі нуклеотидному ланцюзі з'єднується

потрійним водневим зв'язком ізцитозином (рис. 4).

Завдяки цій особливості два ланцюги ДНК взаємодіють між собою, послідовність нуклеотидів у першому ланцюгу визначає послідовність відповідних нуклеотидів у другому. Така строга просторова відповідність азотистих основ називається комплементарністю. Нуклеотидна послідовність одного ланцюга підходить (комплементарна) до нуклеотидної послідовності іншого.

Завдяки комплементарності всі "сходи" спіралі мають однакову ширину – її діаметр становить 2,0 нм або 20 Å (ангстрем). Спіраль стабілізується водневими зв'язками між комплементарними основами: двома між аденіном і тиміном і трьома між гуаніном і цитозином (рис. 5).

Між площинами ароматичних кілець існують також гідрофобні, так звані "стекинг"-взаємодії, завдяки яким пари основ утримуються як стовпчик монет. Спіраль правозакручена, плектономічна, тобто ланцюгине можна роз'єднати, не розкрутивши спіраль. Відомі розміри спіралі: відстань між парами азотистих основ складає 0,34 нм (3,4 Å), а на один оберт спіралі, висота якого 3,4 нм (34 Å), припадає 10 нуклеотидних пар. Зараз відомо декілька форм спіралі, які, ймовірно, відповідають різним функціональним станам ДНК.

Більш компактна форма А (з розташуванням основ під нахилом і 11 парами основ на виток) ймовірно утворюється при біосинтезі РНК, а більш розтягнена форма С типова для інертного хроматину. Форми А і С правоспіральні. Відома також лівоспіральна зигзагоподібна форма Z, яка може виконувати роль регуляторного сигналу.

Відкриття Уотсона і Кріка привело до створення нової природничої науки – молекулярної біології, яка розкриває молекулярні механізми біологічних функцій і робить можливим практичне втручання в ці процеси.

Термін "молекулярна біологія" ввів у 1940 р. У. Астбюрі, який вперше висунув припущення про тримірну структуру ДНК.

Третинна структура ДНК. Розрахунки показують, що подвійна спіраль ДНК з ядра однієї клітини людини займає відстань 1,8 м. Зрозуміло, що в ядрі діаметром 5 мк вона повинна бути укладена дуже компактно у третинну структуру. Така

структура у еукаріот утворюється за участю молекул білків.

У результаті формується нуклеопротеїд хроматин. Укладка досягається шляхом суперспіралізації і здійснюється в три етапи:

- перший, нуклеосомний підрівень нагадує буси, де кожна бусинка – це нуклеосома, яка формується накручуванням подвійної спіралі ззовні, як нитки на котушку, на октамери (поєднання восьми молекул) білків гістонів. Кожна нуклеосома має діаметр 10 – 11 нм і містить до 160 нуклеотидних пар.

85% ДНК знаходиться в складі нуклеосом. Між “бусинками” – нуклеосомами розташовуються ділянки з'єднуючої “нитки” – лінкерна ДНК, що містять 20 – 120 нуклеотидних пар. Посередині цієї ділянки розташована ще одна маленька “бусинка” – молекула гістону. Упаковочний коефіцієнт для нуклеосом становить 5–7.

- другий підрівень утворюється завдяки утворенню супервитків діаметром до 30–35 нм. Це своєрідний соленоїд, на один виток якого припадає 6–8 нуклеосом. Ця структура стабілізується за рахунок розташованого вздовж осі фібрили гістонового стрижня.

- третій підрівень, – це петлева структура. Соленоїдні структури випетлюються від білкового стрижня хромосоми. В результаті цього лінійні розміри ДНК зменшуються ще у 180 разів

Таким чином, сама ДНК має біспіральну організацію і досягає висококомпактного стану суперспіралі при взаємодії з білками і утворюючи разом з ними хроматин, в якому на білок припадає близько 60 %, ДНК – 35 %, РНК – 5 % за масою.

Кількість нуклеотидів у нуклеїнових кислотах може бути різною (від 80 до 30 тис. і більше). Залежно від цього вони мають неоднакову молекулярну масу: від 20 тис. – 2 млн. (РНК) до 10 млн. (ДНК).

На відміну від ДНК молекули рибонуклеїнової кислоти (РНК), як правило, однострижкові. Побудовані вони аналогічно ниткам ДНК, тільки в цукрофосфатний кістяк входить рибоза, а замість тиміну до їхнього складу входить інший піримідин – урацил (У). Однак геном окремих вірусів являє собою однострижкові ДНК або двострижкові РНК, які можуть мати лінійну форму або замкнені в кільце .

Відомо три типи рибонуклеїнових кислот (РНК):

1. Структурна або рибосомальна РНК (р-РНК) побудована з 6000 нукл. Молекулярна маса близько 2 млн. Входить до складу рибосом, становить майже 90% всіх РНК клітини.

2. Інформаційна або матрична РНК (і-РНК або м-РНК) складається з 1000 і більше нуклеотидів. Молекулярна маса – більше 300000. Міститься в рибосомах, становить близько 3 % всіх РНК клітини. Через і-РНК реалізується генетична інформація в клітині.

3. Транспортна РНК (т-РНК) – низькополімерна, побудована із 60–120 нуклеотидів, молекулярна маса 18 000–35000. Міститься в цитоплазмі, становить 7% всіх РНК клітини. Основна функція – переносить активовані амінокислоти до місць синтезу білка – рибосом.

Функції всіх РНК пов'язані з фазами синтезу білка. Одна з основних властивостей нуклеїнових кислот – їх висока специфічність, яка визначається певним співвідношенням пуринових і піримідинових основ для кожного виду

живих організмів. Згідно правила Чаргаффа "число аденінових залишків у будь-якій молекулі ДНК дорівнює числу тимінових ($A = T$), а гуанінових – числу цитозинових ($G = C$)". Встановлено видову специфічність ДНК, виражену коефіцієнтом нуклеотидної специфічності (k):

Цей показник для людини становить 1,52, пшениці – 1,19.

3. Синтез ДНК та її реплікація

Принцип комплементарності відіграє певну роль у процесі подвоєння молекули ДНК у хромосомах перед клітинним поділом. Цей процес отримав назву реплікація.

Реплікація – процес самовідтворення молекул нуклеїнових кислот, що забезпечує точне копіювання генетичної інформації та передавання її в поколіннях. В основі здатності молекули ДНК до самоподвоєння лежить принцип комплементарності.

Етапи синтезу дочірніх ланцюгів молекул ДНК (рис. 6):

1. Ініціація.

-активація дезоксирибонуклеотидів в результаті взаємодії з АТФ (фосфорилування);

-розпізнавання точки ініціації реплікації (спеціальна послідовність нуклеотидів) білками-ініціаторами;

-розкручування молекули ДНК шляхом розриву водневих зв'язків ферментами геліказами;

-поява з двох розведених ланцюгів реплікаційної вилки (Y-подібної структури)

2. Елонгація.

2.1. У материнській ДНК ланцюги є антипаралельними. ДНК-полімерази здатні рухатися в одному напрямку – від 3'- до 5'-кінця, будуючи дочірній ланцюг антипаралельно – від 5' до 3'-кінця.

На лідируючому ланцюгу нарощування здійснюється ДНК- полімеразою III, що функціонує безперервно, утворюючи ланцюг ДНК від РНК-праймера до реплікативної вилки.

2.2. На відстаючому ланцюгу:

а) синтезуються окремі фрагменти Оказакі; б) ДНК-полімераза I, видаляє РНК-праймери; в) ДНК-лігаза зшиває фрагменти Оказакі.

3. Термінація:

- молекули, що утворилися в результаті реплікації, розділяються;

- утворюються дві молекули ДНК, ідентичні материнській.

Послідовність нуклеотидів у новоствореному ланцюзі визначається їхньою послідовністю у ланцюзі первинної молекули ДНК, яка слугує матрицею.

Завдяки тому, що в дочірніх молекулах ДНК один ланцюг успадковується від материнської молекули, а другий – синтезується заново, вони є точною копією материнської ДНК. Це так званий напівконсервативний спосіб реплікації ДНК.

Так ДНК забезпечує передачу спадкової інформації. Окрім напівконсервативного способу реплікації ДНК (у „дочірні“ ДНК відходять по одному ланцюгу „материнської“ ДНК) зустрічаються ще консервативний і дисперсний способи.

Значення реплікації полягає у наступному:

- є основою всіх видів поділу клітин;
- забезпечує всі види розмноження одноклітинних та багатоклітинних;
- обумовлює фізіологічну регенерацію;
- забезпечує тривале існування окремих організмів та видів;
- у процесі реплікації можливі помилки (мутації) з розвитком патологічних змін.

4. Реалізація генетичної інформації. Генетичний код

Спираючись на будову ДНК Джеймс Уотсон і Френсіс Крік дійшли висновку, що оскільки вздовж молекули монотонно повторюється послідовність дезоксирибози і фосфатного залишку, мінливими виявляються тільки послідовності азотистих основ, то генетична інформація може бути закодована лише за допомогою послідовностей азотистих основ, які входять до складу нуклеотидів.

Отже, була виявлена специфічність взаємного розташування азотистих основ. Різні комбінації чергування азотистих основ приводять до утворення різних варіацій ДНК, які кодують безліч різноманітних білків в організмі, які визначають прояв тих чи інших характерних для них ознак.

Послідовність нуклеотидів у ДНК визначає амінокислотну послідовність білків.

Генетичний код – зашифрований у молекулах нуклеїнових кислот запис будови амінокислот білків у клітині. Це єдина система запису у нуклеїнових кислотах спадкової інформації у вигляді послідовності нуклеотидів. Генетичний код "трилітерний" або триплетний, тобто кожному із 20 амінокислот кодує трійка (кодон) нуклеотидів.

Кодон – послідовність трьох сусідніх нуклеотидів (триплет) ДНК, яка кодує певну амінокислоту. Генетичний код може містити ряд кодонів, які не визначають жодної амінокислоти (УАА, УАГ, УГГ). Такі кодони називають термінальними (нонсенс-кодони, „стоп-сигнали“). Їх функція полягає у тому, що вони подають сигнали про закінчення синтезу поліпептидного ланцюга молекули білка. Існують ще кодони- ініціатори, які є сигналами початку синтезу білкової молекули (АУГ і ГУГ).

Деяким амінокислотам, наприклад треоніну, відповідає лише один триплет (УГГ), іншим – два (фенілаланін – УУУ, УУЦ), третім – три, чотири і навіть п'ять (аргінін).

Властивості генетичного коду:

- триплетність – кожному амінокислоту можуть кодувати не менше трьох пар азотистих основ ($4 \times 4 \times 4 = 64$);
- виродженість – всі амінокислоти, окрім двох (метіоніну та триптофану) кодуються кількома кодонами;
- однозначність – один кодон може кодувати лише певну амінокислоту;
- універсальність – у різних організмів включення до синтезу білка певної амінокислоти визначається однаковими кодонами;
- неперекриваність – будь-яка азотиста основа може компонентом лише одного кодона:
- колінеарність – послідовність нуклеотидів у гені точно відповідає послідовності амінокислот у молекулі білка.

Ділянка ДНК, яка відповідає інформації про первинну структуру білку називається геном.

5. Синтез білка в клітині і його регуляція

Реалізація спадкової інформації клітини відбувається шляхом синтезу білків.

Білок – посередник між генами і ознаками організму. Білок як і нуклеїнові кислоти є складним біополімером, мономерами якого є амінокислоти.

Первина молекула білка являє собою ланцюжок, який складається з 100 – 300 різних амінокислот і більше, порядок чередування яких визначає специфічність даної молекули: кожна з 20 амінокислот може зустрічатися багаторазово, але місцезнаходження контролюється ДНК.

Вторинна структура білкової молекули залежить від первинної: амінокислоти в поліпептидному ланцюзі з'єднуються водневими зв'язками між NH– та CO– групами, у результаті чого вона звивається в так звану альфаспіраль.

Третинна структура білкових молекул утворюється в результаті зв'язування так званими дісульфідними містками (S-S) двох цистеїнових залишків амінокислот. Це визначає специфічне просторове розташування поліпептидних ланцюгів.

Четвертинна структура білкових молекул характеризується тим, що вони складаються із 2-4 різноманітних, стабільно з'єднаних поліпептидних ланцюгів. Вторинна, третинна та четвертинна структури білкових молекул залежать від числа та порядку чередування амінокислот у поліпептидному ланцюзі, тобто від первинної структури.

Процес синтезу білка в клітині називається біосинтезом. Він здійснюється під контролем молекули ДНК, яка в такий спосіб реалізує задовану в ній спадкову інформацію. Процес біосинтезу складний і включає ряд етапів – транскрипцію, сплайсинг та трансляцію.

1. Транскрипція. ДНК-залежна-РНК-полімераза „впізнає“ ініціюючий ДНК-кодон (промотор) і „копіює“ за принципом комплементарності А-У, Т-А, Ц-Г, Г-Ц фрагмент ДНК, утворюючи про-мРНК.

Далі проходить процесинг та сплайсинг – видалення некодуючих ділянок (інтронів) і „зшивання“ інформаційних ділянок (екзонів) у єдину функціональну одиницю (рис. 7). РНК-полімераза синтезує РНК в напрямку 5'→3'.

2. Трансляція – це переведення генетичної інформації.

Здійснюється на рибосомі за участю і-РНК, т-РНК та додаткових білкових факторів.

Трансляція проходить у чотири стадії.

Першою є стадія активації молекул амінокислот, що відбувається у цитозолі клітин. 20 амінокислот приєднуються ефірним зв'язком до відповідних "своїх" т-РНК. Цей процес каталізують високоспецифічні ферменти аміноацил тРНК-синтетази.

Стадія ініціації синтезу білка починається з утворення комплексу між малою (40S) субчастинкою рибосоми, молекулами матричної РНК та ініціаторною аміноацил-тРНК.

Ініціаторною аміноацил-тРНК при синтезі будь-якого білка у еукаріотів служить метіонін-тРНК. Ініціаторна аміноацил-т-РНК, що містить антикодон УАЦ, розпізнає ініціаторний кодон т-РНК – АУГ і завдяки комплементарній взаємодії АУГ – УАЦ, а також взаємодії певної ділянки т-РНК з рибосоною встановлюється у так званому пептидильному (П) центрі рибосоми, що утворюється після приєднання великої (60S) субчастинки рибосоми. Цим також задається рамка зчитування інформації, укладеної в м-РНК. Далі починається найтриваліший етап білкового синтезу – елонгація.

Стадія елонгації (або подовження пептиду) включає всі реакції від моменту утворення першої пептидного зв'язку до приєднання останньої амінокислоти. Під час наступної стадії термінації (закінчення синтезу поліпептидного ланцюга) стоп-кодони розпізнаються не комплементарними антикодонами аміноацил-тРНК (до термінальних кодонів таких немає), а специфічними білками – факторами термінації. За участю останніх відбувається гідролітичне відщеплення синтезованого поліпептиду від кінцевої т-РНК, звільнення його, а також кінцевої т-РНК і м-РНК від рибосоми, дисоціація (роз'єднання) рибосоми на субодиниці.

Після цього білки набувають певної просторової конфігурації, далі

– видалення ініціюючих амінокислот, уведення у амінокислоти залишків фосфатних, метильних і карбоксильних груп (процесинг).

Увесь цикл процесів, пов'язаних із синтезом однієї білкової молекули, займає

в середньому 1–3 с. Таким чином, процес синтезу білка полягає у переведенні інформації ДНК у послідовність амінокислот. Відтак, можна перелічити процеси, котрі лежать в основі центральної догми молекулярної біології: ДНК транскрипція і-РНК трансляція білок.

6. Сучасні уявлення про ген і його будову

Поняття про дискретну одиницю спадковості було гіпотетично висловлено Г. Менделем у 1865 р., а в 1909 р. В. Іогансен назвав її геном.

Перша спроба конкретизувати уявлення про ген належить Т. Моргану у його праці „Теорія гена“ (1926). Подальший розвиток проблеми гена пов'язаний із створенням хромосомної теорії спадковості. Т. Морган та його школа розробили теорію, згідно з якою гени являються собою одиницю мутації, рекомбінації та функції.

Проте подальші дослідження (Дубініна М.П., Серебровського О.С., Бензера С.) у середині 50-х років ХХ ст. дали підставу твердити, що ген не є неподільною одиницею мутації, функції та рекомбінації.

У 1929 р. радянський вчений М.П. Дубінін обґрунтував центрову теорію гена, згідно з якою ген являє собою дискретну (подільну) структуру, складається з відносно самостійних центрів здатних самостійно мутувати, рекомбінуватися і, взаємодіючи один з одним, у цілому зумовлювати розвиток певної ознаки.

Отже, ген – функціонально неподільна одиниця спадкового матеріалу. Групи генів, що пов'язані певною функцією утворюють оперон. Ген є елементарним носієм спадкової інформації.