

## Лекция 9.

### Тема: ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

#### План:

- 1. Распад нуклеиновых кислот до нуклеотидов при участии нуклеаз. Распад нуклеотидов, нуклеозидов, пуриновых и пиримидиновых оснований.**
- 2. Механизм биосинтеза ДНК.**
- 3. Биосинтез РНК- транскрипция.**

В клетках тканей нуклеиновые кислоты распадаются под влиянием ферментов. Ферменты, расщепляющие полинуклеотидные цепи, называют нуклеазами, или фосфодиэстеразами, так как они ускоряют реакции разрыва межнуклеотидных фосфодиэфирных связей в молекулах нуклеиновых кислот. Различают эндонуклеазы и экзонуклеазы.

Эндонуклеазы действуют на внутренние межнуклеотидные связи в молекулах ДНК и РНК. Таким образом, при их участии осуществляется деполимеризация нуклеиновых кислот, в основном до олигонуклеотидов.

Экзонуклеазы отщепляют нуклеотиды с 3'- или 5'-конца полинуклеотидной цепи и обеспечивают распад нуклеиновых кислот до свободных нуклеотидов.

По специфичности действия различают дезоксирибонуклеазы (ДНКазы, расщепляющие ДНК) и рибонуклеазы (РНКазы, гидролизующие РНК). В результате их действия образуются олигонуклеотиды и лишь небольшое количества мононуклеотидов.

Рибо- и дезоксирибонуклеозидфосфаты расщепляются до нуклеозидов и фосфорной кислоты под действием фосфатаз (нуклеотидаз).

Нуклеозиды могут расщепляться гидролитическим путем с участием фермента нуклеозидазы:



Пентозы окисляются до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ; фосфорная кислота используется для фосфорилирования органических соединений или выводится из организма. Азотистые основания превращаются в конечные продукты обмена и выделяются с мочой.

Продукты гидролиза нуклеиновых кислот поступают в клетки организма, где используются для синтеза нуклеотидов, нуклеиновых кислот, или же для удовлетворения энергетических потребностей клетки и организма.

### **Катаболизм пуриновых нуклеотидов**

У человека катаболизм пуриновых нуклеотидов заканчивается образованием мочевой кислоты. У других млекопитающих имеется фермент уратоксидаза, превращающая мочевую кислоту в более растворимый аллантаин. У некоторых животных аллантаин может распадаться далее до мочевины или аммиака.

Первоначально нуклеотиды гидролитически теряют фосфатный остаток в реакциях, катализируемых фосфатазами или нуклеотидазами. Аденозин дезаминируется аденозиндезаминазой с образованием инозина. Пурипнуклеозидфосфорилаза расщепляет нуклеозиды до свободных оснований и рибозо-1- фосфата.

Гуанин под действием фермента гуаназы превращается в ксантин.

Затем ксантиноксидаза превращает азотистые основания в мочевую кислоту. Фермент в значительных количествах обнаруживается в печени и кишечнике и окисляет пурины молекулярным кислородом.

Мочевая кислота удаляется из организма человека главным образом с мочой и немного с фекалиями. Мочевая кислота плохо растворяется в воде (1:15000) и при нарушении обмена нуклеиновых кислот, особенно при избыточном поступлении в организм пуринов, мочевая кислота и ее соли откладываются в виде кристаллов в суставах пальцев, хрящах, в коже и мышцах, образуя узелки. Вокруг узелков развивается очень болезненный воспалительный очаг. Это заболевание известно под названием подагра.

### **Катаболизм пиримидиновых нуклеотидов**

Основной путь катаболизма пиримидинов в организме человека и млекопитающих включает восстановление урацила или тимина с образованием полностью гидрированного гетероцикла 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 цитозиндезаминазы и образования урацила.

Раскрытие кольца в дигидроурациле приводит к образованию (3-уреидопропионовой кислоты, которая далее гидролизуется до CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> и в-

аланина. При аналогичном механизме превращения тимина из него получают  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  и  $\alpha$ -аминоизомасляная кислота. Продукты катаболизма пиримидинов либо выводятся из организма, либо повторно утилизируются в других метаболических процессах. Так, аммиак включается в орнитиновый цикл образования мочевины.  $\alpha$ -аланин используется при биосинтезе витамина В3 (пантотеновая кислота), который, в свою очередь, необходим для синтеза коэнзима А и ацилпереносящего белка — компонента, участвующего в синтезе жирных кислот.

### **Анаболизм нуклеотидов**

Субстратом для синтеза нуклеотидов в клетках и тканях могут служить продукты гидролиза ДНК и РНК, а также продукты обмена белков и углеводов. Для синтеза обоих типов нуклеотидов фосфорибозильный компонент участвует в виде 5-фосфорибозил-1-пирофосфата (ФРПФ), который образуется при фосфорилировании рибозо-5-фосфата - промежуточного метаболита пентозофосфатного пути. Реакция катализируется ФРПФ-синтетазой. Однако пути синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов различны.

### **Биосинтез нуклеиновых кислот**

#### Репликация

Полимеризация дочерней ДНК на матрице ДНК приводит к ее удвоению или репликации. Синтез ДНК протекает в ядре в S-фазу клеточного цикла и предшествует делению клетки.

Для реализации репликации необходимы: матрица - расплетенная цепь ДНК, субстраты, участвующие в полимеризации ДНК (нуклеозидтрифосфаты), ферменты, катализирующие этот процесс, ионы  $\text{Mg}^{2+}$ , а также белковые факторы, обеспечивающие деспирализацию двухнитевой ДНК.

Механизмы репликации одинаковы для прокариот и эукариот.

Синтез ДНК происходит одновременно на обеих цепях ДНК. В основе - принцип комплементарности. Процесс является полуконсервативным, так как по завершении репликации каждая дочерняя молекула ДНК содержит одну родительскую и одну вновь синтезированную цепь.

Репликон - единица генома, в которой содержатся точка начала репликации (origin) - точка *ori* - последовательность ДНК, в которой инициируется процесс удвоения ДНК, и точка окончания репликации (terminus) - сегмент ДНК, в котором процесс удвоения ДНК останавливается. Репликативная вилка -

область репликации ДНК, перемещающаяся от *ori* вдоль родительской ДНК, которая расплетается и служит матрицей для синтеза дочерней ДНК.

У прокариот ДНК имеет форму кольца и содержит один репликон. В *ori*-сайте (точка начала репликации) цепи расходятся и образуется две репликативных вилки, движущихся в противоположных направлениях. У эукариот имеется большое число репликонов и *ori*-сайтов, и репликация проходит одновременно на многих участках ДНК.

Процесс синтеза ДНК включает стадии: инициации, элонгации и терминации.

Этапы репликации у прокариот.

Синтез ДНК у прокариот осуществляют ДНК-полимеразы:

ДНК-полимераза I, которая участвует в репликации и репарации;

ДНК-полимераза II - вероятно, участвует в репарации;

ДНК-полимераза III - основной фермент репликации.

Инициация репликации.

Репликация начинается с расплетения двойной спирали ДНК и образования репликативной вилки. Это осуществляется при помощи ферментов хеликаз, которые перемещаются вдоль цепей ДНК и раскручивают их. Процесс расплетения двойной спирали ДНК является энергозависимым и требует затраты АТФ. Далее SSB-белки (single strand binding) специфично связываются с одноцепочечной ДНК и препятствуют образованию двойных спиралей (ренагурации ДНК) и шпилечных структур.

Интенсивное раскручивание ДНК может приводить к образованию дополнительных супервитков, которые «снимают» топоизомераты (гираза).

Праймаза комплементарно из рибонуклеозидтрифосфатов синтезирует на матрице ДНК праймер, или РНК-затравку - короткий фрагмент РНК (10-12 нуклеотидов), 3'-ОН-конец которого используется для дальнейшего синтеза ДНК ключевым ферментом репликации ДНК у прокариот - ДНК-полимеразой III. Элонгация репликации. Субстратами для синтеза дочерних цепей являются четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (дНТФ): дАТФ, дТТФ, дЦТФ, дГТФ. С 3'-ОН-конца праймера ДНК-полимераза III начинает синтезировать новую цепь ДНК присоединением каждого последующего дНТФ только к 3'-ОН-концу имеющейся цепи с выделением пирофосфата:

$$\text{НТФ} + (\text{НМФ})_n \rightarrow (\text{НМФ})_{n+1} + \text{ФФн}$$

Синтез дочерних цепей ДНК идет в направлении 5'—>3' одновременно на обеих цепях матрицы ДНК.

Однако, так как цепи ДНК антипараллельны, а ДНК-полимеразы синтезируют ДНК

присоединением каждого последующего нуклеотида только к 3'-концу имеющейся цепи, в 1960-х гг. Рейжи Оказаки экспериментально доказал, что синтез одной цепи ДНК происходит фрагментарно, прерывисто. Эти фрагменты были названы фрагментами Оказаки.

Т.о. синтез одной цепи происходит непрерывно от 5' - к 3'-концу в направлении движения репликативной вилки и необходим только 1 акт инициации и один праймер. Эта цепь называется лидирующей.

Синтез второй цепи ДНК, которая называется Отстающей, также происходит от 5' - к 3' - концу, но в противоположном направлении репликативной вилки, иницируется многократно, т.о. синтезируется много праймеров и фрагментов Оказаки. У прокариот фрагменты Оказаки имеют длину около 1000 нуклеотидов, у эукариот - 150-300 нуклеотидов.

ДНК-полимераза III синтезирует цепь ДНК до следующей затравки. Далее ДНК-полимераза I удаляет праймер с 5'-конца и одновременно замещая рибонуклеотиды дезоксирибонуклеотидами, а ДНК-лигаза сшивает фрагменты Оказаки в непрерывную цепь.

При включении неправильного нуклеотида ДНК-полимеразы I и III удаляют ошибочный нуклеотид с 3'-конца, гидролизуя фосфодиэфирную связь.

В результате образуются дочерние цепи, комплементарные и антипараллельные цепям материнской ДНК.

Терминация репликации.

У прокариот при достижении ДНК-полимеразой определенной терминаторной последовательности синтез дочерней цепи ДНК прекращается.

## **Транскрипция**

Биосинтез РНК на ДНК-матрице называют транскрипцией.

При синтезе РНК транскрибируются отдельные фрагменты одной цепи ДНК - транскриптоны (единицы транскрипции) - последовательность ДНК между промотором (последовательность ДНК перед геном, обеспечивающая начало транскрипции, с которой взаимодействует РНК-полимераза и иницируется

транскрипция) и терминатором. У эукариот, в отличие от прокариот, в состав транскриптона входит, как правило, один ген.

Синтез РНК осуществляется при помощи ферментов - РНК-полимераз.

РНК-полимераза у прокариот катализирует синтез всех типов РНК клетки.

РНК-полимераза - сложно устроенный олигомерный фермент (холофермент), состоящий из ко-фермента и  $\sigma$ -фактора.

Ко-фермент (минимальный фермент) обладает РНК-полимеразной активностью и состоит из нескольких, прочно соединенных, полипептидных цепей.

Транскрипция инициируется только полным ферментом (холоферментом), далее  $\sigma$ -фактор освобождается и элонгация осуществляется  $\sigma$ -ферментом.

У эукариот синтез РНК протекает в ядре, митохондриях и пластидах практически постоянно вне зависимости от фаз клеточного цикла. У эукариот в клетке содержится 3 ядерных РНК-полимеразы и 1- в митохондриях и хлоропластах. Ядерные ферменты: РНК-полимераза I локализована в ядрышках, катализирует синтез рРНК; РНК-полимераза II локализована в нуклеоплазме, и отвечает за синтез г-яРНК; РНК-полимераза III локализована в нуклеоплазме, синтезирует м-яРНК и тРНК.

Транскрипция — эндэргонический процесс, в котором в качестве субстратов и источника энергии используются рибонуклеозидтрифосфаты (НТФ): АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ. Нуклеотиды присоединяются к 3'-концу растущей РНК с освобождением пирофосфата. В ДНК различают две цепи - кодирующая (матричная) и не кодирующая. Синтез РНК происходит комплементарно на матричной цепи, таким образом, последовательность нуклеотидов в РНК будет соответствовать последовательности нуклеотидов не кодирующей цепи. Все РНК-полимеразы осуществляют рост новых цепей РНК в направлении 5' — >3'-конец. Первым нуклеотидом на 5'-конце в РНК является адениловая или гуаниловая кислота и сохраняется трифосфат.

Процесс транскрипции включает стадии инициации, элонгации и терминации. Инициация транскрипции является наиважнейшим фактором, определяющим начало синтеза РНК, его скорость и регуляцию.