

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

ОБМЕН НУКЛЕОПРОТЕИНОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

(Модуль 1, IV семестр)

учебно-методическое пособие
по биологической химии для студентов – иностранных граждан
специальности 7.12010001 «Лечебное дело»

Запорожье-2015

Учебно-методическое пособие по теме «Обмен нуклеопротеинов в норме и при патологии» дисциплины «Биологическая химия» для студентов-иностранцев II курса международного факультета утверждено на заседании Центрального методического Совета ЗГМУ

протокол №3 от 10.03.2016 г.

Составители:

- ©Александрова Е.В. - д.хим.н. профессор заведующая кафедры биологической химии ЗГМУ
- ©Крисанова Н. В. – к. б. н. доцент кафедры биологической химии ЗГМУ
- ©Рудько Н.П. – к. б. н. ст. преподаватель кафедры биологической химии ЗГМУ

Рецензенты:

- Заведующий кафедрой медицинской биологии, паразитологии и генетики ЗГМУ д.б.н. доцент Приходько А.Б.
- Профессор кафедры биоорганической химии Прийменко Б.А.

Обмен нуклеопротеинов в норме и при патологии. (Модуль 1, IV семестр) : учеб.-метод. пособие по биологич. химии для студентов – иностранных граждан специальности 7.12010001 «Лечебное дело» / сост. Е. В.Александрова, Н. В.Крисанова, Н. П.Рудько. – Запорожье : ЗГМУ, 2016. – 72 с.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.....	5
ЦЕЛИ ИЗУЧЕНИЯ ТЕМЫ «ОБМЕН НУКЛЕОПРОТЕИНОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ».....	6
ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ ТЕМЫ.....	6
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ ПО ИЗУЧАЕМОЙ ТЕМЕ.....	8
ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ. ВВЕДЕНИЕ.....	13
БИОСИНТЕЗ (СИНТЕЗ DE NOVO) ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ.....	14
БИОСИНТЕЗ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ.....	17
РАСПАД НУКЛЕОТИДОВ В ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА.....	21
РАСПАД ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ.....	23
ПРИЧИНЫ РАЗВИТИЯ И ДИАГНОСТИКА ГИПО- И ГИПЕРУРИКЕМИИ....	25
РЕПЛИКАЦИЯ - СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКЕ.....	28
МЕХАНИЗМЫ ТРАНСКРИПЦИИ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ.....	36
ЛЕКАРСТВЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ И ТРАНСКРИПЦИИ.....	53
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ПРОДУКТОВ ОБМЕНА НУКЛЕОТИДОВ.....	55
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТЕМЫ «ОБМЕН НУКЛЕОПРОТЕИНОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ».....	59
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	67
ЛИТЕРАТУРА.....	71
ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ ПО ИЗУЧАЕМОЙ ТЕМЕ:.....	72

ВВЕДЕНИЕ

Научные достижения последних лет по исследованиям биологических систем показали доминирующее значение нуклеиновых кислот как детерминантов наследственных свойств живых организмов, которые обуславливают синтез специфических белков живой системы. На основании этих исследований была дана современная трактовка проблемы наследственности, изменчивости, мутагенеза, а также патогенеза целого ряда наследственных и приобретенных соматических заболеваний. При изучении информационного материала по обмену нуклеиновых кислот студенту необходимо обратить особое внимание на матричные синтезы ДНК, РНК и их регуляцию, как основополагающие процессы передачи генетической информации в живой системе. Изучение нарушений в репликации и транскрипции на уровне клетки любой ткани человека помогает понять причины развития наследственных заболеваний, дает неограниченные возможности исследователю для научного обоснования причин возникновения наследственных патологий у людей и для разработки путей их лечения.

Изучение структуры и обмена нуклеотидов позволяет правильно оценить место указанных соединений в обмене веществ человека, установить тесные связи обмена нуклеотидов с обменом аминокислот, простых и сложных белков, с энергообеспечением клетки. Наследственные и приобретенные нарушения обмена нуклеотидов достаточно часто проявляются как в европейской, так и в других популяциях населения земного шара. Особенно это касается нарушений, приводящих к развитию гиперурикемии и, в дальнейшем, заболевания подагра.

Задача будущего врача усвоить данный информационный материал с целью: подготовить себя к будущей работе с пациентами, имеющими нарушения в обмене нуклеотидов и нуклеиновых кислот, изучив их диагностику с использованием биохимических показателей.

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

- Достижения последних лет показали ведущую роль нуклеиновых кислот как детерминант наследственных свойств живых организмов, кодирующих структуру специфических клеточных белков. На этом основании была дана современная трактовка проблем наследственности, изменчивости, мутагенеза, а также патогенеза целого ряда наследственных и приобретенных соматических заболеваний.
- Структурными компонентами информационных нуклеиновых кислот – ДНК, РНК – являются нуклеотиды пуринового и пиримидинового ряда. Биосинтез мононуклеотидов является жизненно важным процессом, поскольку он обеспечивает образование компонентов молекул нуклеиновых кислот, а также нуклеотидных коферментов. Свободные нуклеотиды, которые не используются для синтеза нуклеиновых кислот, подвергаются расщеплению с образованием конечных продуктов обмена. Определение количественного содержания таких продуктов (например, мочевой кислоты) имеет клинико-диагностическое значение при лечении ряда заболеваний (подагра и т.п.).
- Важнейшим достижением науки середины XX столетия было выяснение роли нуклеиновых кислот в хранении и передаче информации. Нуклеиновые кислоты обеспечивают процессы синтеза белка, а этим, в свою очередь, определяют характер обмена веществ, закономерности роста и развития, наследственности и изменчивости. Нарушения в процессах синтеза, репарации нуклеиновых кислот может приводить к патологическим изменениям в организме. Глубокое знание механизмов репликации, транскрипции дает понимание и возможность корректного использования лекарственных средств – ингибиторов и активаторов ферментов этих метаболических процессов.

ЦЕЛИ ИЗУЧЕНИЯ ТЕМЫ «ОБМЕН НУКЛЕОПРОТЕИНОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

- Выучить теоретический материал по структуре и биохимическим функциям нуклеопротеинов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот, а также биологических мембран. Уметь выделять и определять состав дезоксирибонуклеопротеинов из ткани селезенки.
- Изучить теоретический материал по обмену пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов и его нарушениям. Уметь проводить количественное определение мочевой кислоты в сыворотке крови и моче.
- Изучить теоретический материал относительно биосинтеза нуклеиновых кислот. Уметь трактовать биохимические особенности возникновения молекулярных патологий (мутации и механизм действия мутагенов). Ознакомиться с основными направлениями генной инженерии и биотехнологии.

ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ ТЕМЫ

- Нуклеопротеины: структура, биологические функции, классификация, локализация в клетке.
- Молекулярная организация ядерного хроматина эукариотов: нуклеосомная организация; гистоны и негистоновые белки.
- Нуклеиновые кислоты. Сравнительная характеристика ДНК и различных типов РНК: особенности строения, функции, локализация в клетке, уровни структурной организации.
- Нуклеотиды и нуклеозиды: строение, биологическая роль. Минорные азотистые основания.
- Производные мононуклеотидов (нуклеозидтрифосфаты, циклические мононуклеотиды, НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД, ФМН): структура и функции в клетке.
- Общие представления о биосинтезе пуриновых нуклеотидов: схема реакций синтеза ИМФ, образование АМФ и ГМФ; механизм регуляции.

- Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов: схема реакций, регуляция синтеза.
- Биосинтез дезоксирибонуклеотидов. Образование dТМФ; ингибиторы биосинтеза dТМФ как противоопухолевые средства.
- Катаболизм пуриновых нуклеотидов. Нарушения обмена пуриновых нуклеотидов. Подагра.
- Схема катаболизма пиримидиновых нуклеотидов. Конечные продукты распада пиримидиновых нуклеотидов.
- Молекулярные механизмы репликации ДНК. Типы репликации. Последовательность этапов и ферменты синтеза ДНК у прокариотов и эукариотов.
- Мутации и механизмы действия мутагенов. Понятие о молекулярных болезнях.
- Биологическая роль и механизмы репарации ДНК.
- Современные представления о механизме транскрипции. РНК-полимеразы прокариотов и эукариотов, сигналы транскрипции. Посттранскрипционный процессинг первичного транскрипта (созревание мРНК у эукариотов).
- Стимуляторы и ингибиторы биосинтеза нуклеиновых кислот.
- Общие понятия о генной инженерии, её биомедицинское значение.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ
СТУДЕНТОВ ПО ИЗУЧАЕМОЙ ТЕМЕ:

1. Укажите мономеры нуклеиновых кислот:

А. Нуклеозиды

В. Нуклеотиды

С. Азотистые основания

Д. Аминокислоты

Е. Мононуклеозид-5'-монофосфаты

2. Укажите гетероциклическое соединение, которое лежит в основе структуры аденина:

А. Пурин

В. Пиримидин

С. Имидазол

Д. Триптофан

Е. Циклопентанпергидрофенантрен

3. Укажите азотистое основание - производное пиримидина:

А. Аденин

В. Тимин

С. Гуанин

Д. Пиридоксин

Е. Имидазол

4. Укажите азотистое основание, которое входит в состав полинуклеотидной цепи РНК:

А. Аденин

В. Гуанин

С. Цитозин

Д. Урацил

Е. Тимин

5. Укажите структурный компонент, не характерный для ДНК:

А. dАМФ

В. dГМФ

С. dЦМФ

D. dТМФ

Е. dУМФ

6. Укажите фактор, наличие которого в среде определяет таутомерную форму (лактам-лактимную) оксипроизводных пурина и пиримидина:

A. Температура

В. рН

С. Накопление пуринов в клетке

D. Накопление урацила в клетке

Е. Накопление АТФ в клетке

7. Укажите компонент, характерный для ДНК:

A. АМФ

В. ГМФ

С. ЦМФ

D. dТМФ

Е. dУМФ

8. Укажите углевод, который входит в состав нуклеотидов, свойственных РНК:

A. β - D -рибофураноза

В. Рафиноза

С. β - D -фруктофураноза

D. β - D -2-дезоксирибофураноза

Е. β - D -галактопираноза

9. Укажите углевод, который входит в состав нуклеотидов ДНК:

A. α - D -глюкопираноза

В. β - D -фруктофураноза

С. β - D -рибофураноза

D. β - D -2-дезоксирибофураноза

Е. D -арабиноза

10. Укажите минорное азотистое основание пиримидинового ряда:

A. Цитозин

B. Урацил

C. 5-Метилцитозин

D. Тимин

E. Аденин

11. Укажите минорное азотистое основание пуринового ряда:

A. Аденин

B. Гуанин

C. Пурин

D. 1-Метилгуанин

E. Урацил

12. Укажите название нуклеотида:

A. 2'-Дезоксигуанозин

B. Адениловая кислота

C. Уридин

D. Аденозин

E. 2'-Дезоксицитидин

13. Укажите аббревиатуру рибонуклеозидтрифосфата:

A. ГТФ

B. АДФ

C. цГМФ

D. цАМФ

E. d-ГТФ

14. Укажите количество пар азотистых оснований, которое приходится на один виток двойной спирали ДНК (B-форма):

A. 5

B. 10

C. 15

D. 20

Е.100

15. Укажите соединение, комплементарное цитозину во вторичной структуре ДНК:

А. Аденин

В. Ксантин

С. Гуанин

Д. Гипоксантин

Е. Метилурацил

16. Укажите соединение, которое не может быть структурным компонентом м-РНК:

А. Аденин

В. Псевдоуридиловая кислота

С. Цитозин

Д. Тимин

Е. Гуанин

17. Укажите тип связи между фрагментами моноклеотидов в полинуклеотидной цепи:

А. Ионные

В. 3',5'- Фосфодиэфирные

С. Пирофосфатные

Д. Водородные

Е. Пептидные

18. Укажите уровень структурной организации молекулы ДНК, в котором полинуклеотидные цепи удерживаются (стабилизируются) водородными связями:

А. Первичный

В. Вторичный

С. Третичный

Д. Четвертичный

Е. Суперспираль

19. Выберите направленность полинуклеотидных цепей друг относительно друга во вторичной структуре ДНК (В-форма):

А. Параллельная

В. Перпендикулярная

С. Антипараллельная

Д. Складчатая

Е. Прерывистая

20. Полинуклеотидная цепь м-РНК эукариотической клетки содержит информацию о:

А. Первичной структуре всех полипептидных цепей белка

В. Первичной структуре одной полипептидной цепи

С. Четвертичной структуре белка

Д. Первичной структуре ДНК

Е. Первичной структуре т-РНК

Критерии оценивания исходного уровня

При получении результата меньше 75% верных ответов рассматривайте его, как неудовлетворительный, и вернитесь к изучению раздела «Структура нуклеотидов и нуклеиновых кислот» любого литературного источника в списке предложенной литературы (с. 71).

ИНФОРМАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ

ВВЕДЕНИЕ

Нуклеиновые кислоты в клетках тканей человека представлены в двух основных формах - ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) и РНК (рибонуклеиновая кислота). По локализации ДНК человека делятся на ядерные и митохондриальные, оба типа выполняют функцию хранителя генетической информации, которая обеспечивает синтез всех белков клетки. Процесс трансформации генетической информации в структуру белков связан с наиболее важными процессами в клетке: транскрипцией и трансляцией. Первый процесс обеспечивает синтез всех РНК клетки, без которых невозможно представить протекание трансляции, - биосинтеза белков.

По химической структуре все нуклеиновые кислоты являются высокомолекулярными полимерными структурами - полинуклеотидами. Их мономерные единицы (мононуклеозид монофосфаты), в свою очередь, состоят из трех основных компонентов:

1. Азотистого основания (пуринового или пиримидинового ряда);
2. Углеводного компонента (β - D -рибозы или β - D -дезоксирибозы);
3. Остатка фосфорной кислоты.

Мононуклеотиды и их производные могут иметь самостоятельное значение в обмене веществ, принимая участие в энергетическом (АТФ, АДФ, АМФ), липидном (ЦТФ) и углеводном метаболизме (УТФ). Роль вторичных посредников в гормональной регуляции выполняют циклические нуклеотиды: цАМФ, цГМФ. Производные ряда нуклеотидов могут выполнять роль коферментов и простетических групп ферментов, таких как НАД⁺, НАДФ⁺, ФАД, ФМН и их восстановленные форм.

Обмен нуклеиновых кислот состоит из двух основных метаболических направлений процессов - их синтеза и распада.

Процесс распада экзогенных нуклеиновых кислот (присутствуют в составе нуклеопротеинов продуктов питания) осуществляется нуклеазами

(ДНКаза, РНКаза) и нуклеотидазами, которые присутствуют в ЖКТ. Аналогичный распад нуклеиновых кислот происходит в цитоплазме клеток разнообразных тканей организма (названия ферментов те же). Процесс распада ДНК и РНК заканчивается в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) образованием нуклеозидов, которые проходят процесс всасывания (механизм активного транспорта). С током крови нуклеозиды транспортируются в ткани человека, где 95% от их количества разрушается до мочевой кислоты, β -аланина, β -гидроксимасляной кислоты, углекислого газа, мочевины и других соединений. Исключение составляет дезокситимидин, структура которого полностью используется тканями человека для формирования d-ТТФ, необходимого для синтеза ДНК.

Синтез нуклеиновых кислот постоянно нуждается в присутствии готовых исходных субстратов - мононуклеозидтрифосфатов, продукция которых практически невозможна в полной мере из продуктов распада экзогенных нуклеиновых кислот. Поэтому, мононуклеозидтрифосфаты должны синтезироваться из более простых веществ, таких как аминокислоты, рибозо-5-фосфат, углекислый газ, специальные производные тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФК). Такой метаболический путь носит название - *синтез de novo*.

БИОСИНТЕЗ (СИНТЕЗ DE NOVO) ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Решающее значение для разгадки механизма биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов имели работы по изучению обмена оротовой кислоты. Оротовую кислоту, открытую в 1905 г. в составе коровьего молока, длительное время считали побочным продуктом обмена нуклеотидов. Впервые заинтересованность этим соединением возникла лишь в 1944 г. после того, как было установлено, что оротовая кислота способна полностью удовлетворять потребность ряда микроорганизмов в нуклеотидах, содержащих урацил и цитозин.

Предшественником оротовой кислоты по пути синтеза является аспарагиновая кислота (по аниону название - аспартат). Из него путем конденсации с карбомилфосфатом образуется карбомиласпартат, который, в свою очередь, превращается дальше в дигидрооротовую кислоту (рис. 4). В дальнейшем дигидрооротовая кислота дегидрируется с образованием оротовой кислоты. Взаимодействие оротовой кислоты с 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом (ФРПФ) приводит к формированию мононуклеотида оротидин-5'-монофосфата, который является исходным субстратом для оротидин-5'-фосфат декарбоксилазы. Из этого соединения образуется уридин-5-монофосфат (рис.1).

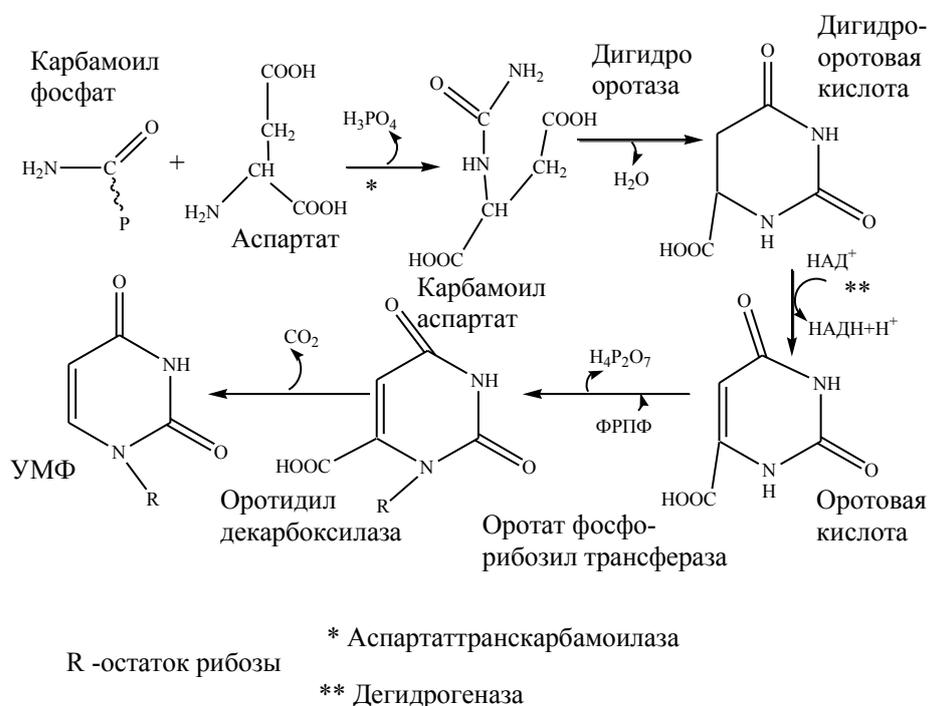
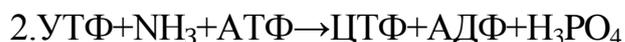
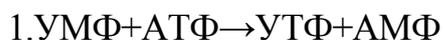
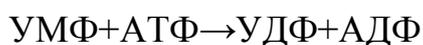


Рис. 1. Синтез уридин-5'-монофосфата

Из УМФ, в свою очередь, образуется уридинтрифосфат при действии специальной киназы (1); потом - цитидинтрифосфат, образование которого связано с аминированием предшественника, под действием цитидинтрифосфатсинтетазы (2), согласно реакциям 1 и 2:



Биосинтез тиминовых нуклеотидов в тканях имеет ряд характерных особенностей. Трудности расшифровки механизма биосинтеза d-ТМФ были связаны с тем, что в его образование вовлекаются вещества, которые не участвуют в биосинтезе других пиримидиновых мононуклеотидов, входящих в состав нуклеиновых кислот. В экспериментах на культуре клеток ткани было доказано, что недостаточность фолиевой кислоты лишает клетку возможности синтезировать фрагмент тимина из урацила. При этом избыток тимина компенсирует фолиевую недостаточность и возобновляет рост клеток. На основе подобных наблюдений был сделан вывод, что тимин образуется из урацила в составе дезоксимононуклеозидифосфата путем его трансметилирования. В реакции метилирования фрагмента урацила используется специальное производное тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФК) – метилен-ТГФК. Это вещество образуется из фолата при участии фермента, кофермент которого содержит метилкобаламин (производное витамина В₁₂). Первое превращение в синтезе d-ТМФ из УМФ – это фосфорилирование при действии нуклеотидкиназы :



Затем УДФ превращается в d-УДФ под действием специальной мультиферментной системы, содержащей рибонуклеозиддифосфатредуктазу и тиоредоксинредуктазу, содержащую НАДФН в качестве небелковой части. Образующийся d-УДФ дефосфорилируется при действии фосфатазы. Продукт этой реакции d-УМФ вступает в реакцию метилирования под действием дезокситимидилатсинтазы (рис. 2) с образованием d-ТМФ:

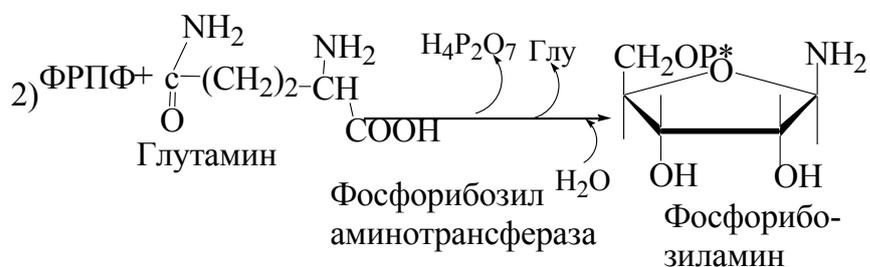
Рис. 2. Синтез дезокситимидин-5-монофосфата

Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов происходит в ядре клетки и в цитоплазме, где находятся соответствующие ферменты, которые катализируют отдельные реакции биосинтеза.

БИОСИНТЕЗ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

В биосинтезе пуриновых мононуклеотидов участвуют аминокислоты: аспарагиновая кислота, глицин, глутамин. Процесс биосинтеза состоит из двух этапов: 1) синтеза инозинмонофосфата (ИМФ) из исходного субстрата рибозы-5-фосфата; 2) превращения ИМФ в пуриновые нуклеотиды: АМФ или ГМФ.

Образование фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ, реакция 1) и взаимодействие глутамин с 5'-фосфорибозилпирофосфатом (реакция 2) являются ключевыми реакциями для всего синтеза пуриновых нуклеотидов, регулируются специальными факторами, которые будут рассмотрены позже. Продукт второй реакции - фосфорибозиламин вступает в реакцию с глицином, в результате чего образуется соединение – глицинамид-рибозил-5-фосфат (реакция 3):



В последующих реакциях биосинтеза ИМФ глицинамидрибозил-5-фосфат трансформируется в формилглицинамидрибозил, благодаря использованию метенил-ТГФК (рис.3, C₈). За счет присоединения к формилглицинамидрибозилу амидной группы из глутамина (рис.3, N₃), и последующей дегидратации образуется имидазольное кольцо пурина. Имидазольное производное карбоксилируется с помощью CO₂ (рис.3, C₆). Затем аспарагиновая кислота применяется в качестве донора аминогруппы (рис.3, N₁) и образуется продукт аминокимидазолсукцинил-карбоксиамидрибозил-5'-фосфат. Элиминация фумарата, включение еще одного углерода из формил-ТГФК (рис.3, C₂) - последние две реакции перед циклизацией с формированием ИМФ под действием фермента ИМФ-циклогидролазы. На рисунке 3 представлена структура ИМФ с указанием доноров каждого атома углерода и азота в структуре ИМФ.

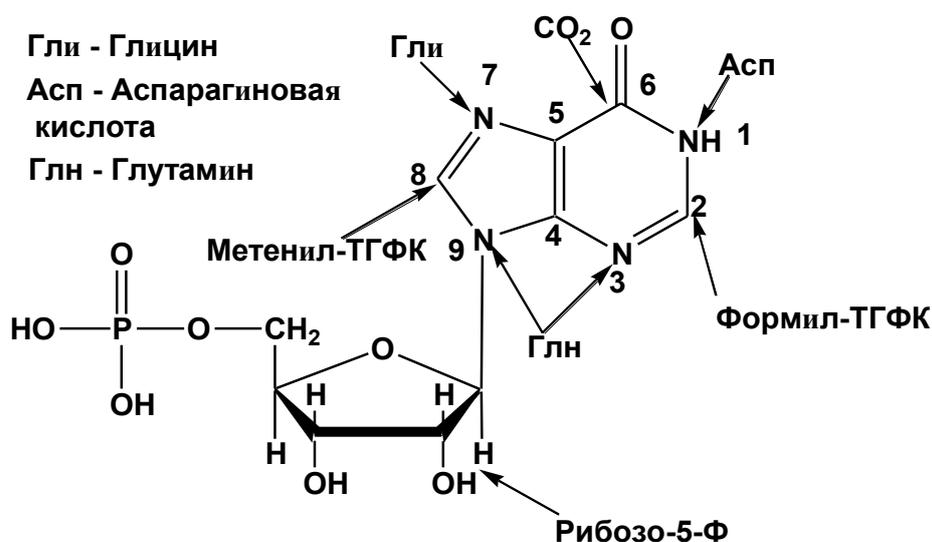


Рис. 3. Применение простых органических соединений в синтезе ИМФ.

ИМФ (инозинмонофосфат, инозиновая кислота) может быть рассмотрен как продукт дезаминирования адениловой кислоты. ИМФ превращается в адениловую кислоту путем конденсации с аспартатом (реакция 1, рис.4). Реакция сопровождается использованием энергии, донором которой является ГТФ. В ходе реакции образуется продукт - аденилосукцинат, который расщепляется с образованием фумаровой и адениловой кислот (реакция 3, рис. 4).

Рис. 4. Синтез АМФ и ГМФ из инозинмонофосфата

Инозиновая кислота является предшественником в образовании гуаниловой кислоты (ГМФ) благодаря последовательным превращениям: окисление инозиновой кислоты (реакция 2, рис.4) с последующим аминированием ксантозинмонофосфата (донор аминогруппы - глутамин, реакция 4, рис. 4).

Регуляция синтеза нуклеотидов в тканях организма человека

Синтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов имеет название синтеза *de novo*, потому что данные метаболические пути используют простейшие вещества для формирования конечных продуктов без применения продуктов распада нуклеотидов. Регуляция этого метаболического пути осуществляется благодаря аллостерическим активаторам и ингибиторам по принципу обратной связи (рис. 5):

Рис. 5. Аллостерическая регуляция синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. 1- ФРПФ-синтетаза; 2- фосфорибозил-аминотрансфераза

АМФ, АДФ, ГМФ, ГДФ, ТДФ являются аллостерическими ингибиторами фермента ФРПФ-синтетазы (рис. 5) в тот момент, когда они аккумулируются в цитоплазме клетки. Высокая концентрация ГМФ ингибирует активность фосфорибозил-аминотрансферазы (рис.5). Накопление ГТФ стимулирует АМФ синтез, аккумуляция АТФ приводит к активации синтеза ГМФ.

Накопление ФРПФ в цитоплазме клетки является стимулирующим фактором для карбамоилсинтетазы (изоформы II), участвующей в синтезе карбамоилфосфата, который может быть использован для синтеза УМФ; при аккумуляции УДФ в клетке активность карбамоилфосфат синтетазы снижается. Накопление ЦТФ является фактором, стимулирующим снижение продукции карбамоиласпартата, и, в то же время, снижается активность карбамоилфосфатаспартаттранс-феразы, которая продуцирует карбамоиласпартат в синтезе УМФ (рис.5).

Все выше описанные факторы являются аллостерическими по характеру влияния на активность ключевых ферментов синтеза нуклеотидов. Нарушение регуляции активности ферментов синтеза пуриновых нуклеотидов по принципу обратной связи приводит, большей частью, к их гиперпродукции и формированию в организме человека состояния - гиперурикемии, при котором возможно развитие клинических симптомов подагры.

РАСПАД НУКЛЕОТИДОВ В ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА

На рисунке 6 изображен метаболический путь деградации пуриновых нуклеозидов с образованием из аденозина последовательно инозина (1), потом гипоксантина (2). Ксантиноксидаза катализирует превращение двух субстратов - гипоксантина и ксантина (3,4) с формированием конечного продукта для организма человека - мочевой кислоты. Данный фермент является флавопротеином, который содержит кофакторы: ионы Mo^{2+} и Fe^{2+} . Синтетический аналог ксантина - *аллопуринол* является необратимым конкурентным ингибитором ксантиноксидазы. Аллопуринол является структурным аналогом ксантина, это способствует его присоединению к активному центру фермента, где структура аллопуринола трансформируется в оксипуринол, который полностью блокирует активность активного центра ксантиноксидазы. Таким образом, действие аллопуринола на фермент может быть классифицировано как суицидальное конкурентное ингибирование активности фермента. Кроме того, аллопуринол конкурирует с гипоксантином в реакции, которую катализирует гипоксантин-гуанинфосфорибозилпирофосфаттрансфераза (см. с.21), это способствует снижению концентрации ФРПФ - метаболита синтеза *de novo* пуриновых нуклеотидов.

Деградация гуанозина представлена тремя реакциями: из гуанозина образуется гуанин (5), который включается в гидролитическое дезаминирование с образованием ксантина (6), затем ксантин превращается в мочевую кислоту (4, рис.6).

Следует отметить, что мочевая кислота может быть в двух таутомерных формах: енольной и кето-формах, первая форма легко образует соли ураты с катионами натрия (рис. 7). Ураты являются солями со специальными свойствами: их растворимость в воде снижается при снижении температуры среды. Это свойство становится причиной накопления уратов в мягких тканях человека в условиях гиперурикемии (повышение уровня мочевой кислоты в плазме крови выше нормы) при переохлаждении организма.

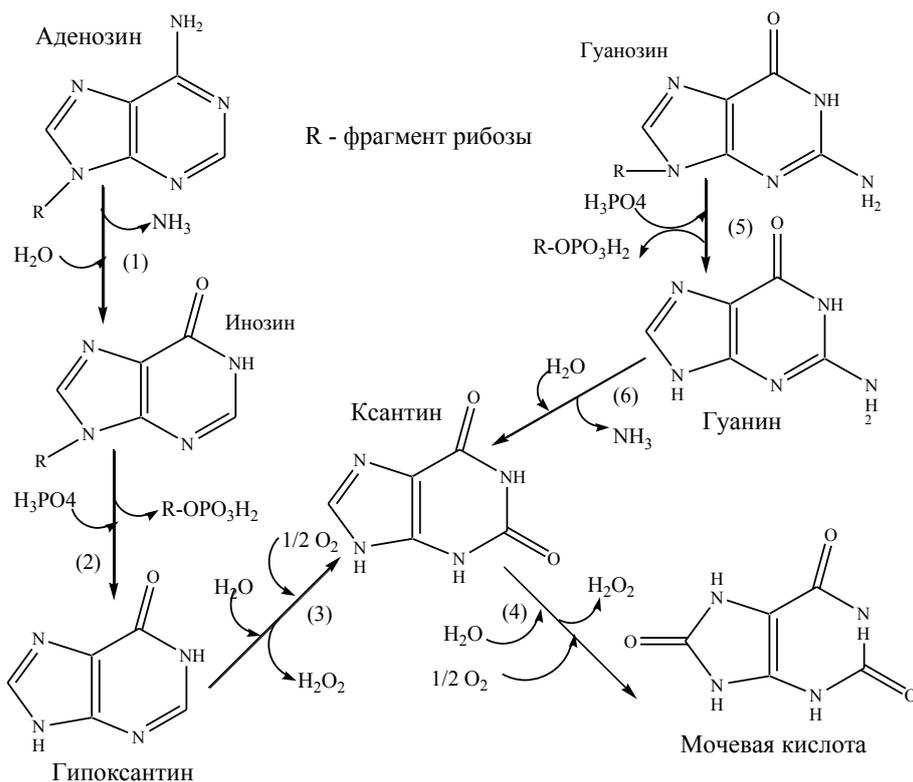


Рис. 6. Распад пуриновых нуклеозидов в организме человека

Рис. 7. Изомерные формы мочевой кислоты и образование уратов.

Гипоксантин, гуанин и аденин в свободной форме в некоторых типах клеток (нейронах головного мозга, гепатоцитах, полиморфноядерных лейкоцитах, лимфоцитах) превращаются в промежуточные метаболиты синтеза пуриновых нуклеотидов (рис. 8), таким образом, частично покрывая потребности в промежуточных метаболитах синтеза пуриновых нуклеотидов в выше указанных клетках человека

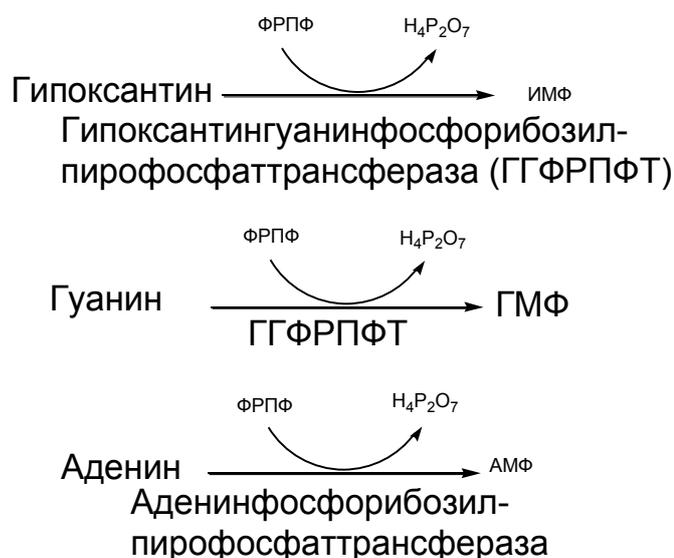


Рис. 8. Использование промежуточных метаболитов распада пуриновых нуклеотидов для их синтеза.

Следует обратить внимание на фермент первых двух реакций, в силу той причины, что его активность может меняться у некоторых больных с наследственной патологией, называемой синдромом Леша-Нихана.

РАСПАД ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ

Распад пиримидиновых нуклеозидов в тканях приведен на рисунке 9. Последовательное превращение цитидина в уридин (реакция окислительного дезаминирования), уридина и тимидина в азотистые основания урацил и тимин (реакция фосфоролиза) являются первыми реакциями этого метаболического пути. Урацил и тимин при действии ферментов:

специальной НАДФН-зависимой редуктазы, гидролазы превращаются соответственно в карбамоил-производные пропионовой и изомасляной кислот (рис.9). В тканях человека эти производные включаются в реакции дезаминирования и декарбоксилирования, в результате которых образуются соответствующие продукты: бета-аланин (конечный продукт для цитидина и уридина) и бета-аминоизобутират (конечный продукт для тимидина).

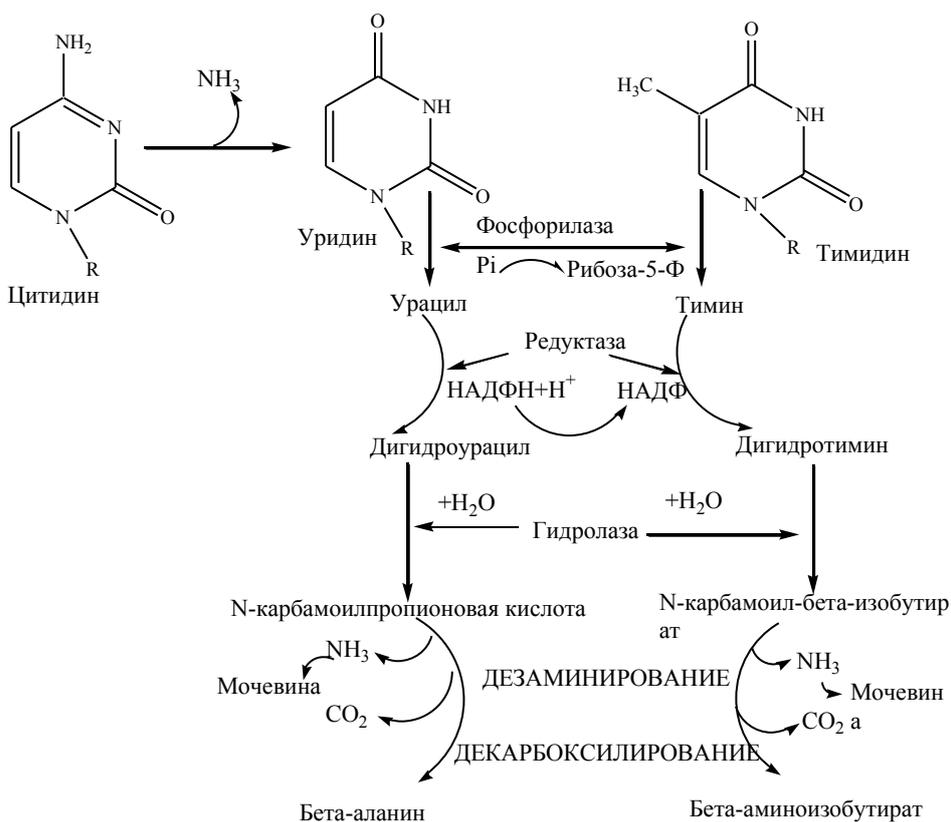


Рис. 9. Распад пиримидиновых нуклеозидов в организме человека

Однако они не являются конечными продуктами для организма человека и могут полностью разрушиться до углекислого газа, воды и мочевины. Возможно их использование для синтеза важных веществ: например, в скелетных мышцах из бета-аланина синтезируются ансерин и карнозин, которые необходимы мышце для регуляции амплитуды мышечного сокращения. Данная аминокислота используется в организме человека для образования коэнзима А. Бета-аминоизобутират в небольшом количестве обнаруживается в моче здорового человека, однако его концентрация может быть повышена при лейкемии, что используется для диагностики данного заболевания.

ПРИЧИНЫ РАЗВИТИЯ И ДИАГНОСТИКА ГИПО- И ГИПЕРУРИКЕМИИ

Мочевая кислота и ее соли ураты натрия фильтруются в мочу, их нормальное содержание в моче должно быть в пределах 400-600 мг/сутки. Некоторые фармацевтические препараты влияют на реабсорбцию уратов в почечных канальцах, например, высокие дозы аспирина конкурируют с уратами в процессе секреции и реабсорбции уратов.

Количество мочевой кислоты в плазме крови зависит от скорости синтеза пуриновых нуклеотидов и скорости их распада, которые, в свою очередь, лимитированы скоростью ключевых ферментативных реакций обоих метаболических путей. Нормальные концентрации мочевой кислоты в плазме крови должны быть в пределах не более 0,42 ммоль/л (для мужчин) и не более 0,3 ммоль/л (для женщин). Содержимое мочевой кислоты (уратов) в плазме крови выше этих значений обуславливает развитие *гиперурикемии* в организме пациентов.

При гиперурикемии уровень уратов является критическим для их растворимости в биологических жидкостях организма, что приводит к кристаллизации уратов в мягких тканях и суставах с образованием отложений - их называют тофусами. Формирование тофусов стимулирует развитие воспаления и эрозии суставов, развития подагрического артрита в острой форме, которая затем переходит в хроническую форму. Выше описанные симптомы сопровождают заболевание подагрой.

Только у 15% пациентов, имеющих гиперурикемию в анамнезе, наблюдается развитие клинических симптомов подагры. Какие факторы необходимо помнить врачу как факторы провокации развития подагры у пациентов с гиперурикемией? - Это, прежде всего, низкая температура окружающей среды, которая может вызывать переохлаждение организма человека и снижение растворимости уратов в плазме крови. Вторым фактором является резкое изменение диеты пациента с гиперурикемией: с высококалорийной (мясной) на вегетарианскую диету.

Больным подагрой следует уменьшить в рационе питания количество продуктов богатых пуринами (в основном продукты животного происхождения). В период обострения болезни назначается обильное питье. При устойчивой гиперурикемии в организме возникают условия для образования в почках мочевых камней – уратов. Образование почечных камней на фоне высоких уровней уратов в крови пациентов могут стать причиной смерти пациента по причине развития почечнокаменной болезни и почечной недостаточности.

Необходимо помнить, что увеличение концентрации мочевой кислоты в крови может возникать не только при подагре. Гиперурикемия наблюдается также при воспалительных заболеваниях почек, которые сопровождаются нарушением их мочеобразующей функции (при хроническом гломерулонефрите), а также при болезнях, ассоциированных со значительным распадом нуклеиновых кислот в тканях (например, при лейкомии и лучевых поражениях).

Гиперурикемия сопровождает ряд генетических заболеваний, некоторые из них представлены в таблице 1.

Другим наследственным нарушением обмена пуринов является ксантинурия. Эта патология встречается достаточно редко и проявляется тем, что у больных резко возрастает экскреция ксантина с мочой. Увеличение концентрации ксантина в моче у больных ксантинурией приводит к образованию почечных камней. Причина развития ксантинурии до настоящего времени досконально не выяснена. Считается, что возникновение данной болезни связано с изменением активности ксантиноксидазы. Диагностика ксантинурии основана на определении уровня мочевой кислоты и ксантина в сыворотки крови. Уровень мочевой кислоты при данной болезни снижается, что отвечает состоянию гипоурикемии. Лечение ксантинурии сводится к назначению обильного щелочного питья с целью повышения рН мочи и предотвращения формирования почечных камней.

Таблица 1 .Генетические заболевания, которые сопровождаются развитием гиперурикемии

Фермент, активность которого изменяется	Характер изменений	Последствия этих изменений
Фосфорибозил-пирофосфат синтетаза	Суперактивная	Гиперпродукция пуринов → гиперурикемия → подагра
	Не регулируется по принципу обратной связи	Гиперпродукция пуринов → гиперурикемия → подагра
	Увеличение сродства фермента к рибозо-5-фосфату	Гиперпродукция пуринов → гиперурикемия → подагра
Гипоксантингуанин-фосфорибозил-пирофосфат-трансфераза	Частичная недостаточность в организме	Гиперпродукция пуринов → гиперурикемия → подагра
	Повная недостаточность в организме (синдром Леша-Нихана)	Гиперпродукция пуринов → гиперурикемия → подагра Неврологические проблемы (садомазохизм), почечная недостаточность
Болезнь Гирке (гликогеноз первого типа)	Полная недостаточность в печени глюкозо-6-фосфатазы	Вторичная гиперурикемия благодаря гиперпродукции ФРПФ из глюкозо-6-фосфата вместо его превращения в глюкозу → подагра

РЕПЛИКАЦИЯ - СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКЕ

Введение

Одним из наиболее важных химических свойств моонуклеотидов является их способность к взаимодействию друг с другом с образованием полинуклеотидных цепей разнообразной длины. Синтез полинуклеотидов в клетке представляет собой сложный, многоступенчатый ферментативный процесс. Существуют определенные особенности в биосинтезе разных видов нуклеиновых кислот (ДНК; РНК) у эукариот и прокариот. Синтез каждого вида нуклеиновой кислоты происходит в определенное время жизненного цикла клетки, потому что функции каждого типа нуклеиновых кислот неодинаковы. Состав ферментов для синтеза нуклеиновой кислоты (НК) также зависит от типа организма и типа НК. Рассмотрим сначала процессы репликации и транскрипции для прокариот, потому что эти анаболические пути в прокариотической клетке проще для понимания при изучении.

Механизм репликации у прокариот

Репликация (синтез двух дочерних полинуклеотидных цепей ДНК из дезоксимононуклеозидтрифосфатов на матрице материнской ДНК) в прокариотической клетке возникает при специальных условиях, важнейшим из них является присутствие специальных факторов регуляции (специальные белки, так называемые, циклины), которые обеспечивают активацию полиферментной системы репликации, - *реплисома*. Активация реплисома наблюдается в S-фазе жизненного цикла прокариотической клетки. Наиболее изучена реплисома в *E.coli*, которая осуществляет полуконсервативную репликацию кольцевой материнской ДНК.

Репликацию называют:

- *полуконсервативной*, если каждая из двух синтезированных полинуклеотидных цепей будет применена при митозе для формирования разных молекул ДНК;

- *консервативной*, если в ходе митоза сохранится материнская двойная спираль ДНК, а дочерняя спираль будет представлять собой две заново синтезированных полинуклеотидных цепи.

Четыре типа мононуклеозидтрифосфатов являются наиболее важными субстратами синтеза: d-АТФ, d-ГТФ, d-ЦТФ, d-ТТФ, но в фазах инициации и элонгации репликации, используются также рибонуклеозидтрифосфаты в качестве субстратов фермента под названием *праймаза* (компонент реплисоми, рис. 10). Рассмотрим механизм репликации у *E.coli* согласно фазам.

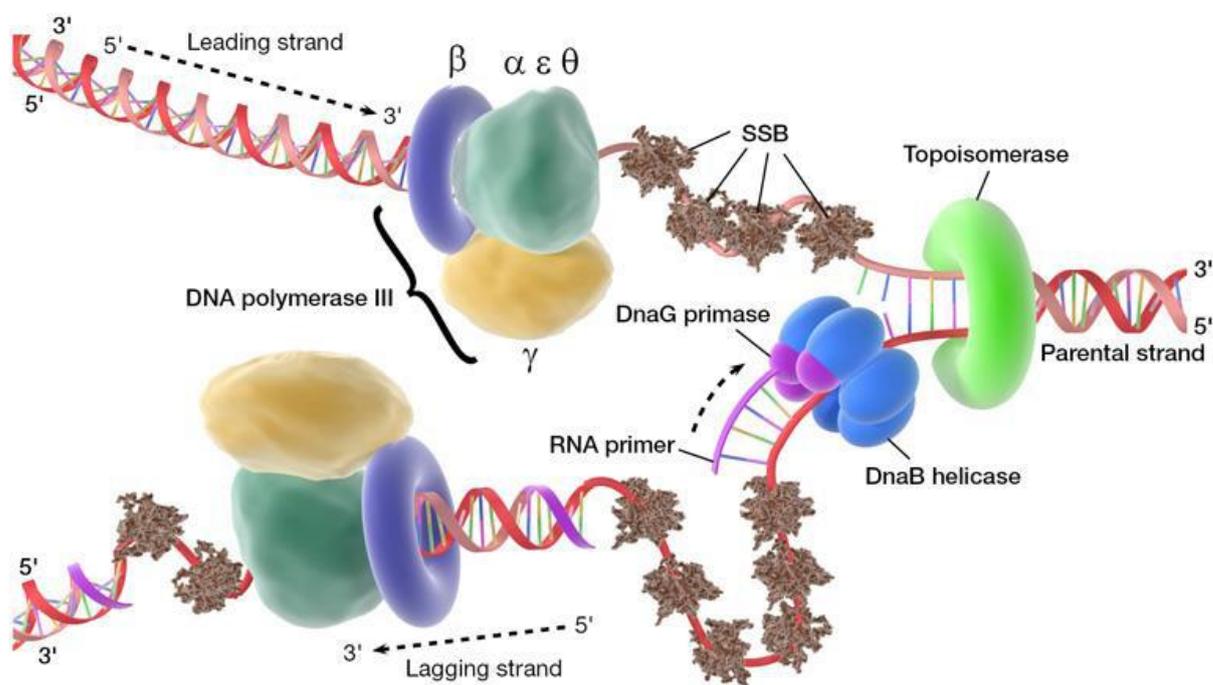


Рис. 10. Функция реплисоми в фазе элонгации в момент синтеза праймера для фрагмента Оказаки. (согласно Davidson V.L., Sittman D.B. , 1994).
 Обозначения: leading strand - ведущая цепь; lagging strand -ведомая цепь; SSB -специальные белки SSB, защищающие одинарную полинуклеотидную цепь; topoisomerase топоизомераза; DNA polymerase III - ДНК-полимераза III; DnaG primase - праймаза *E.coli*; DnaB helicase - хеликаза *E.coli*; parental strand - родительская цепь; RNA primer - праймер, фрагмент олигорибонуклеотида.

Фаза инициации репликации. Основные требования к этой фазе:

- наличие субстратов синтеза рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов;
- присутствие фермента *dna A* протеин, задача которого найти последовательность нуклеотидов материнской молекулы ДНК, где начинается репликация (имеет название origin C; рис.11,А);
- наличие фермента *dna B* протеин (хеликазы), функция которого обуславливает формирование двух репликативных "вилок" (энергозависимый процесс: расходы АТФ). Данное действие обеспечивает репликацию материнской ДНК одновременно в двух направлениях в течение всего процесса;
- присутствие *праймазного комплекса*, который синтезирует из рибонуклеозидтрифосфатов праймеры (короткие олигорибонуклеотиды) для лидирующей цепи и фрагментов Оказаки (рис.10);
- наличие специальных белков с протекторной функцией - так называемые *SSB* -протеины (рис.10), они защищают полинуклеотидные цепи материнской ДНК от деградации при действии ядерной нуклеазы (энергозависимый процесс, расходы АТФ);
- присутствие *топоизомеразы* - фермента, который является помощником хеликазы в сохранении постоянно расплетенных фрагментов цепей материнской ДНК в течение всего процесса репликации. Фермент постоянно осуществляет разрушение фосфодиэфирной связи в репликативных вилках с последующим сшиванием образовавшихся фрагментов (энергозависимый процесс, расходы АТФ).

Формирование первого праймера для лидирующей цепи дочерней ДНК является концом фазы инициации репликации. Все ферменты, за исключением фермента *dna A* протеина, будут необходимы в фазе элонгации репликации (рис. 12).

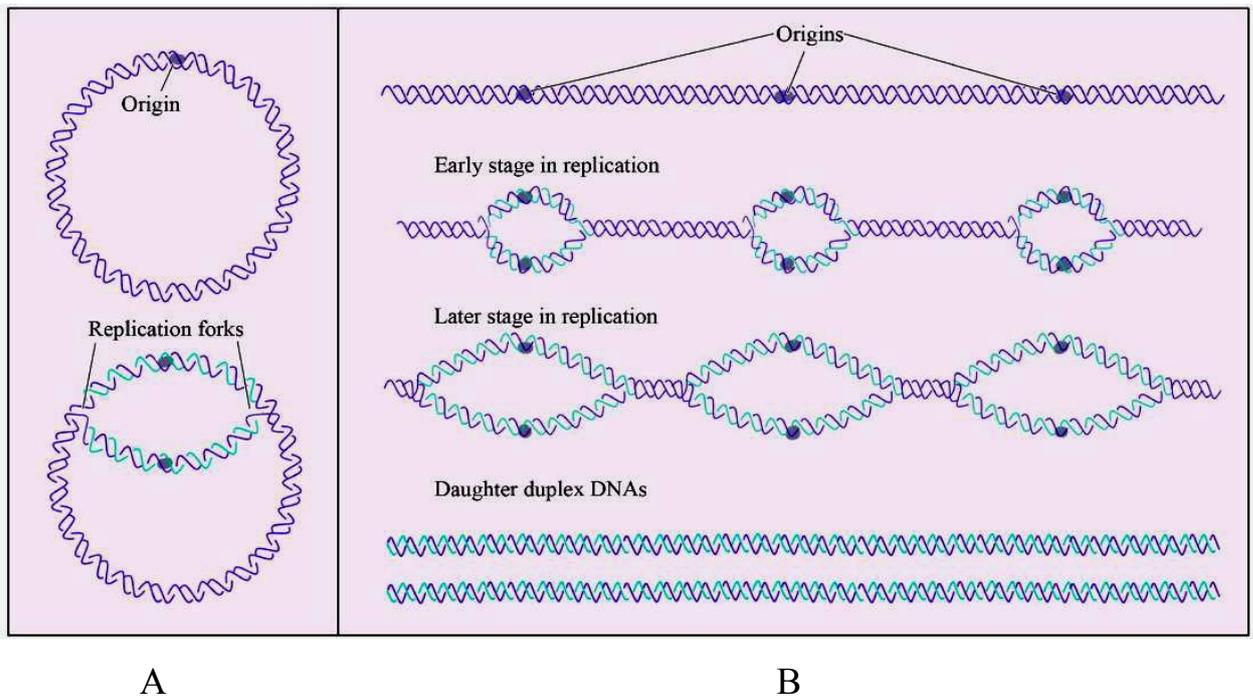


Рис. 11. Фаза инициации репликации у *E.coli* (A) и эукариот (B): A - показан origin C, где находится отправная точка инициации репликации, и «bubble» - дословно пузырь, а на самом деле, две репликативные «вилки», объясняющие бинаправленность репликации на матрице ДНК у *E.coli*; B - В фазе инициации репликации у эукариот в двойной спирали ДНК возникает множество репликаонов (bubbles), на которых начинается синтез дочерних цепей ДНК с возможностью одновременно реплицировать полностью родительские цепи ДНК.

Фаза элонгации репликации.

Основными требованиями к этой фазе являются:

- наличие субстратов синтеза - дезоксирибонуклеозидтрифосфатов;
- наличие всех ферментов фазы инициации, за исключением фермента dna A протеина;
- присутствие синтезированных праймеров для лидирующей цепи и фрагментов Оказаки;
- активное действие всех ДНК полимераз и других ферментов фазы в последовательности:

ДНК полимераза III - катализирует синтез лидирующей цепи дочерней ДНК и одновременно фрагментов Оказаки при наличии праймеров к ним.

ДНК полимераза I - имеет экзонуклеазную активность, потому что вырезает все праймеры из продуктов действия ДНК полимеразы III и вместо их синтезирует дополнительные фрагменты ДНК. При этом фермент выполняет функцию репарации, то есть устраняет ошибки синтеза.

ДНК полимераза II - действие этого фермента до конца не исследовано, но гипотетически он также выполняет функцию репарации.

ДНК лигаза - сшивает полинуклеотидные фрагменты - продукты действия ДНК полимераз I и II, таким образом, дает непрерывную вторую цепь дочерней ДНК.

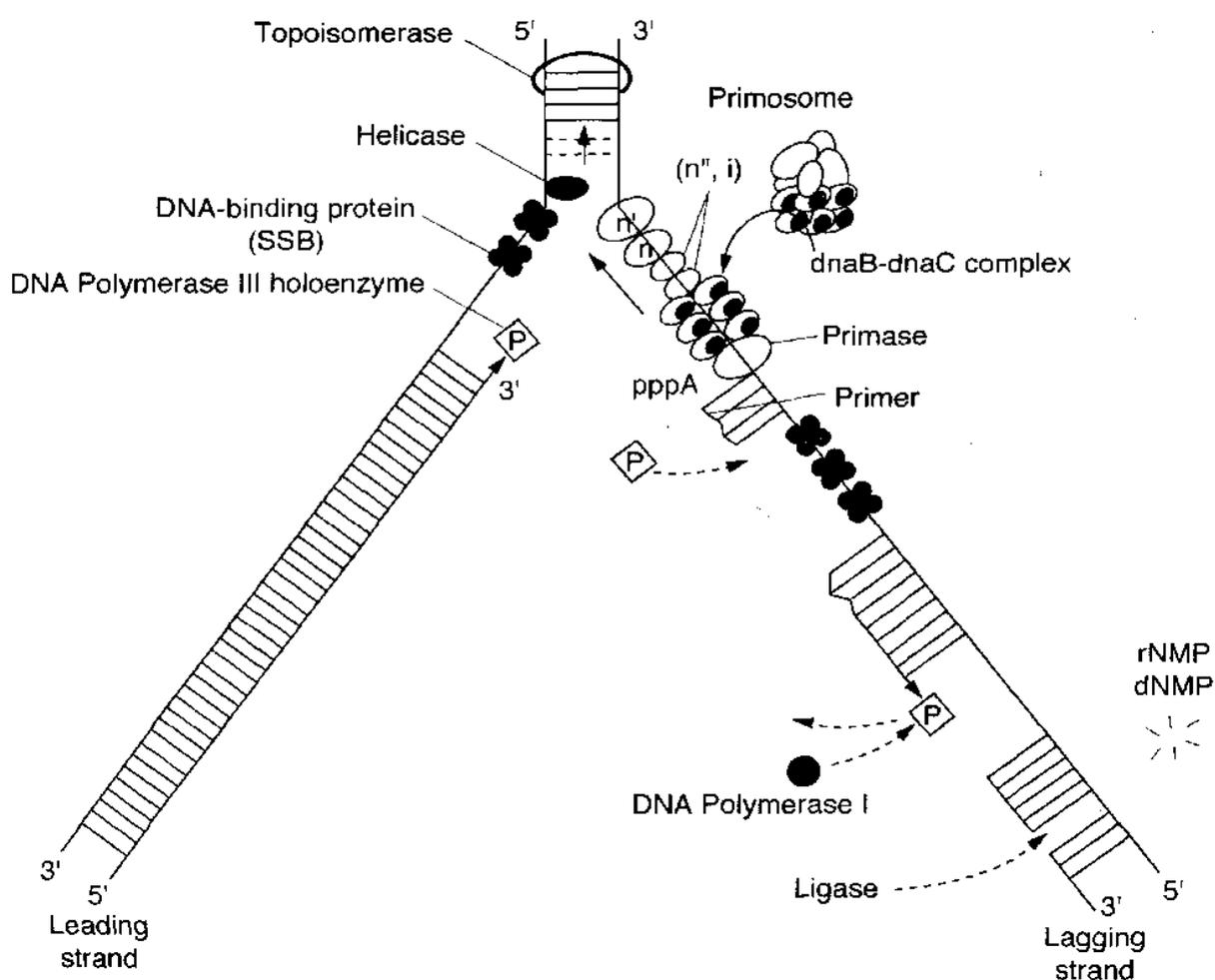


Рис. 12. Элонгация репликации у прокариот: обозначены одна репликативная вилка (по авторам Davidson V.L., Sittman D.B., 1994)

Каждый из выше названных ферментов является сложным протеином, который выполняет катализ, формируя фосфодиэфирную связь в полинуклеотидной цепи, но продукты действия каждого из этих ферментов не одинаковы. У *E.coli* реплисома представляет собой димерную структуру, синтезирующую одновременно в двух направлениях две дочерние цепи ДНК (рис.10,11,12,13).

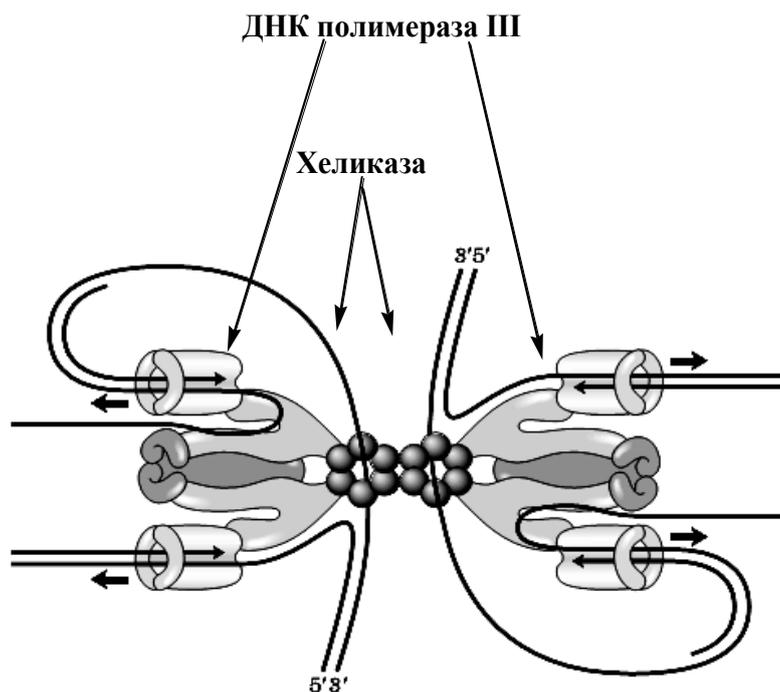


Рис. 13. Действие димерной структуры реплисомы *E.coli* в синтезе дочерних цепей ДНК

Фаза терминации репликации

У материнской молекулы ДНК *E.coli* существуют 10 терминальных последовательностей (*Ter sequences*), которые размещены таким образом, что они формируют трап репликативной вилки для реплисомы (рис. 14).

Эти последовательности в кольцевой ДНК *E.coli* находятся напротив *origin C*, реплисома находит их через 40 минут от начала фазы инициации. Специальный белок, его название на английском языке *Ter - binding protein (TUS)*, останавливает действие хеликазы (за счет энергии АТФ), затем происходит разъединение реплисомы, материнских и синтезированных дочерних цепей ДНК.

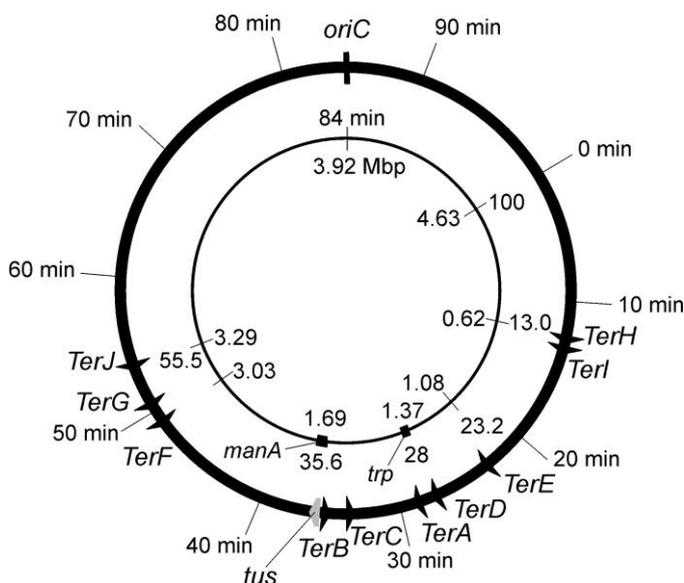


Рис. 14. Положения *Ter* сайтов и *TUS* сайта, где присоединяется белок TUS с целью остановить репликацию в хромосоме *E. Coli*

Особенности репликации у эукариот

Механизм репликации у эукариот является во многом подобным процессу репликации у прокариот. Репликация у эукариот:

- полуконсервативная;
- в двух направлениях одновременно;
- под действием полиферментной системы;
- с применением таких же субстратов синтеза;
- происходит в S -фазу жизненного цикла клетки, благодаря активации циклинами E, A.

Необходимо отметить более разнообразный состав ферментов в полиферментных системах синтеза ДНК эукариот, их локализацию не только в ядре клетки, а также и в митохондриях. Кроме того, начало репликации на матрице материнской ДНК происходит одновременно во многих сайтах инициации, которые называются репликационными. Около 100000 репликационных определяют в фазе инициации репликации в расчете на одну материнскую молекулу ДНК. В одной соматической клетке человека репликация всех материнских ДНК (они хранят информацию о первичной структуре всех белков этой клетки) продолжается около 8 часов. Ученые определяют

скорость репликации у эукариот приблизительно в 10 раз медленнее, чем у прокариот. На данный момент в литературе существует короткая информация о составе ферментов репликации и их функции у эукариот.

В составе ядерной полиферментной системы репликации изучены:

- ДНК полимеразы α - ученые допускают, что ее функция является подобной функции ДНК полимеразы I
- ДНК полимеразы β - выполняет функцию репарации
- ДНК полимеразы δ - аналогична по функции ДНК полимеразе III.

В митохондриях эукариот была открыта ДНК полимеразы g – исполняет репликацию митохондриальных ДНК.

Наличие линейной структуры ДНК у эукариот (вместо кольцевой для прокариот) нуждается в действии дополнительного фермента репликации - теломеразы, которая синтезирует полинуклеотидные фрагменты после отделения РНК-праймера от 5'-конца синтезированной ведомой цепи дочерней ДНК (рис. 15).

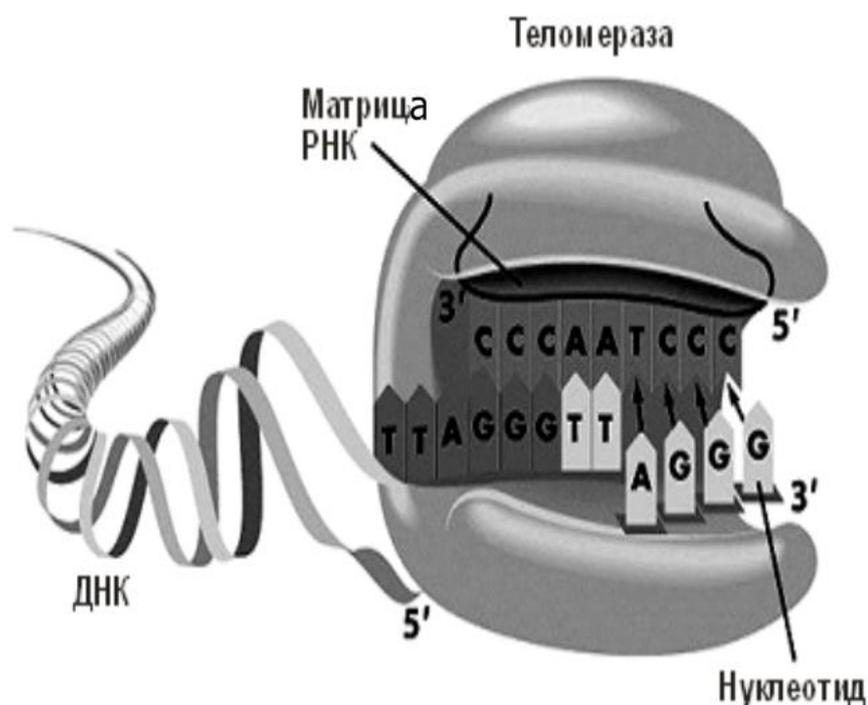


Рис. 15. Действие теломеразы, присоединенной к молекуле РНК, которая выполняет функцию матрицы при обратной транскрипции.

Эти фрагменты формируют концы хромосом человека, которые называются *теломерами*. Исследование английских ученых E. Blackburn, C. Greider, 1997 помогли классифицировать этот фермент как специализированную обратную транскриптазу.

Последние научные исследования подтверждают, что в клетках, которые имеют не лимитированную репликативную активность, например, клетки опухолей, уровень активности теломеразы очень высок. В 85% случаев при онкологических заболеваниях теломераза выполняет функцию главного маркера опухоли, что применяется в современной диагностике онкозаболеваний.

МЕХАНИЗМЫ ТРАНСКРИПЦИИ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

Введение

В 1959 году Weiss and Gladstone выделили из ядер печени крыс фермент, осуществляющий включение меченых мононуклеозидтрифосфатов (в структуру этих субстратов был включен изотоп C^{13}) в полинуклеотидную цепь м-РНК, наличие продукта реакции фиксировалось только в присутствии ДНК. Выделенный фермент получил название ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Последовательность мононуклеозидмонофосфатных остатков в синтезированной цепи была комплементарна фрагменту (матрице) ДНК. В течение последних 50 лет учеными разных стран мира была проведена интенсивная исследовательская работа с целью изучения процесса синтеза разных типов РНК в разнообразных организмах.

Процесс синтеза получил название ***транскрипция*** (независимо от типа клеток и типа РНК, для которых он рассматривается).

Особенности транскрипции у прокариот

Рассмотрим механизм транскрипции на примере синтеза рибонуклеиновой кислоты у *E. Coli*. Три типа РНК синтезируются в этой

клетке. Следует отметить, что механизм формирования молекулы каждого типа РНК у прокариот является зависимым от её типа:

- *Рибосомальные РНК* : 23S р-РНК; 16S р-РНК; 5S р-РНК образуются из одного предшественника 30S р-РНК. Рибосомальные РНК составляют около 80% всех РНК в прокариотической клетке.

- *Транспортные РНК* : каждая т-РНК содержит около 80 остатков нуклеотидов; все т-РНК образуются из одного очень большого по длине предшественника в течение пост-транскрипционного процессинга.

- *Матричные РНК* : большинство м-РНК прокариот являются полицистронными, то есть они содержат в собственной структуре информацию о последовательности не менее, чем двух полипептидных цепей. В механизме образования структуры м-РНК прокариот процессинг отсутствует. 5'- и 3'- концы м-РНК содержат последовательности, которые никогда не транслируются в последовательность полипептидных цепей. Цистронные последовательности перемежаются последовательностями, которые имеют название спейсеров (они также не кодируют полипептидные цепи). м-РНК составляют около 5% от всех РНК в прокариотической клетке.

Синтез всех типов РНК в *E. Coli* осуществляет один фермент – ДНК-зависимая РНК-полимераза, структура которой не одинакова в фазах инициации и элонгации транскрипции. Рассмотрим функцию этого фермента в фазах транскрипции поэтапно:

Фаза инициации транскрипции

РНК-полимераза в этой фазе представляет из себя *холофермент*, который содержит пять субъединиц. Одна из них имеет название *σ-фактор* и является важнейшей в фазе инициации, потому что этот фактор выполняет главную цель фазы - присоединиться к промоторной последовательности ДНК в сайте инициации транскрипции и провести расплетение двойной спирали ДНК (затраты АТФ). Действие *σ*-фактора в составе РНК-полимеразы стимулируется специальным протеином (на английском языке его название - *CAP - protein*) в присутствии *цАМФ*.

Поиск стартовой точки инициации транскрипции РНК-полимеразы выполняет благодаря специальным сигнальным последовательностям в полинуклеотидном фрагменте, который носит название *промотор* (рис. 16). Обычно в точке инициации (Start point) присутствует остаток гуанилового нуклеотида, его положение в промоторе детерминируется ТАТА-последовательностью (ТАТА-box; Pribnow box), которая расположена выше точки инициации на 10 пар азотистых оснований (другое название: -10 последовательность). Ещё одна сигнальная последовательность называется -35 последовательность, часто содержит последовательность азотистых оснований: ТТГАЦА (рис. 16).

A. Prokaryotic promoter

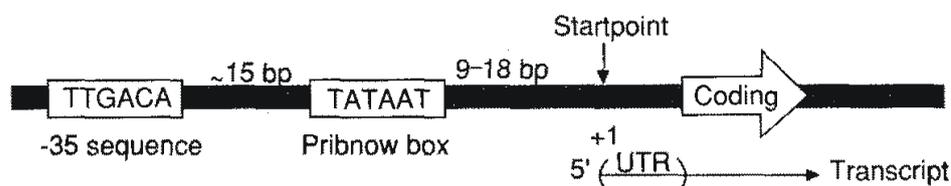


Рис. 16. Структура промоторной последовательности в ДНК прокариот (по авторам Davidson V.L., Sittman D.B., 1994)

Фаза элонгации транскрипции

. После синтеза олигорибонуклеотидного фрагмента (обычно, около 10 нуклеотидных остатков содержится в його последовательности) холофермент превращается в *кор-фермент* (core-enzyme): на матрице ДНК происходит отделение σ -фактора. Таким образом, в состав кор-фермента РНК-полимеразы, который продолжает синтез полинуклеотидной цепи новой РНК, входит только четыре субъединицы: две α_2 - и две β' -субъединицы.

Фаза терминации транскрипции

У прокариот найдено два механизма остановки транскрипции. Первый носит название *фактор-независимого механизма* (рис.17)

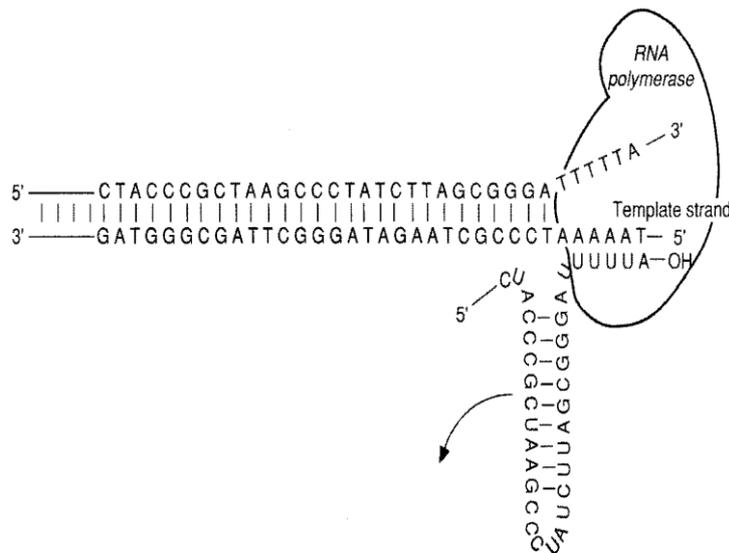


Рис. 17. Фактор-независимый механизм терминации: формирование «шпильки» под действием РНК-полимеразы (Davidson V.L., Sittman D.B., 1994)

Согласно этому механизму кор-фермент РНК-полимеразы находит на матрице ДНК терминальные последовательности, которые насыщены ГЦ-повторами, кодирующими обратное повторение азотистых оснований в синтезированной полинуклеотидной цепи. Синтезированные последовательности, комплиментарные обратным повторениям, формируют пространственную конформацию называемую «шпилькой». Эта «шпилька» способствует отделению синтезированной цепи РНК от матрицы ДНК. Отделение облегчается также синтезируемая после «шпильки» последовательность, которая богата урацилом и не так прочно присоединена водородными связями к матрице ДНК (рис.17).

Второй механизм имеет название *фактор-зависимый механизм*, потому что для некоторых прокариот существует специальный Rho –протеин с АТФ-азной активностью, который имеет сродство к терминальным последовательностям в матрице ДНК. В фазе терминации протеин присоединяется к ним и при помощи энергии АТФ способствует отделению синтезированной цепи РНК от матрицы ДНК.

Необходимо сделать ряд умозаключений относительно механизма транскрипции у прокариот:

- Для синтеза полинуклеотидной цепи ДНК-зависимая РНК-полимераза применяет только рибонуклеозидтрифосфаты: АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ. Синтез праймера в транскрипции отсутствует;
- Матрицей для синтеза РНК прокариот служит фрагмент только одной полинуклеотидной цепи ДНК – он может носить название *оперон*, если транскрипция стимулируется специальными веществами-индукторами. Оперон состоит из структурных генов, гена-оператора и промоторной последовательности;
- Направление синтеза то же, что и при репликации - от 5'-конца к 3'-концу синтезирующейся полинуклеотидной цепи;
- Продуктом транскрипции в процессе синтеза матричной РНК прокариот является сама матричная РНК. Для других типов РНК синтезируется сначала большой предшественник, который подлежит превращению в пост-транскрипционном процессинге под действием рибонуклеаз Р, D, III.
- Для синтеза всех типов РНК необходимым единственным ферментом - ДНК-зависимая РНК-полимераза, которая может быть в двух формах: холофермент и кор-фермент соответственно фазам транскрипции.

Особенности механизма транскрипции у эукариот

Процесс транскрипции у эукариот является подобным тому, который рассматривался для прокариот. Главная концепция биосинтеза белка со стадией транскрипции м-РНК у эукариот приведена на рисунке 18.

Следует отметить ряд характерных особенностей транскрипции эукариот:

- каждый структурный ген эукариот транскрибируется независимым образом и регулируется самостоятельно;
- существуют три типа РНК-полимераз для синтеза трех типов РНК в эукариотической клетке:
 - ДНК-зависимая РНК-полимераза I транскрибирует гены р-РНК;

- ДНК-зависимая РНК-полимераза II транскрибирует гены м-РНК;
- ДНК-зависимая РНК-полимераза III транскрибирует гены т-РНК и малых ядерных РНК;
- формирование матричной РНК у эукариот требует сначала действия РНК-полимеразы II с формированием первичного транскрипта - hnРНК (гетерогенной ядерной РНК). РНК-полимераза II содержит 12 субъединиц, одна из которых имеет функцию поиска базального промотора.

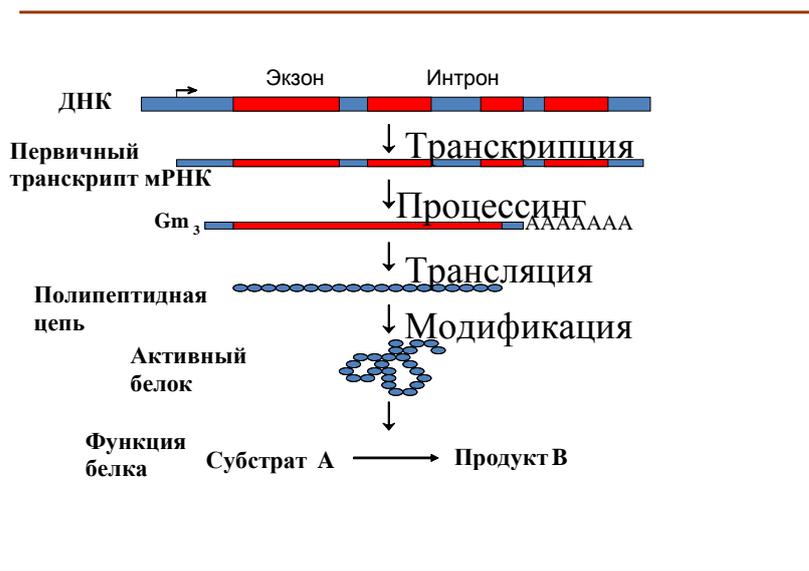


Рис. 18. Трансформация генетической информации ДНК в первичную структуру протеина с каталитической функцией с помощью м-РНК.

Информация о промоторах эукариотической ДНК:

Промотор - это предшествующая структурному гену сигнальная последовательность нуклеотидов, которую узнает фермент РНК-полимераза как стартовую площадку для транскрипции. У высших многоклеточных эукариот, в том числе и у человека, в пределах 100-200 п.н. перед стартом транскрипции была выявлена сложная мозаика промоторных элементов.

Регуляторные элементы промотора, управляющие транскрипцией гена, включают в себя три основных компонента:

- *базальный промотор* (core или basal promoter),

- *проксимальные элементы*, расположенные рядом с основным промотором (proximal elements),
- *энхансеры*, действие которых менее зависит от расстояния.

Базальные промоторы большинства эукариотических генов имеют сходные последовательности, рассмотрим их на рисунке 19.

Специфические факторы транскрипции

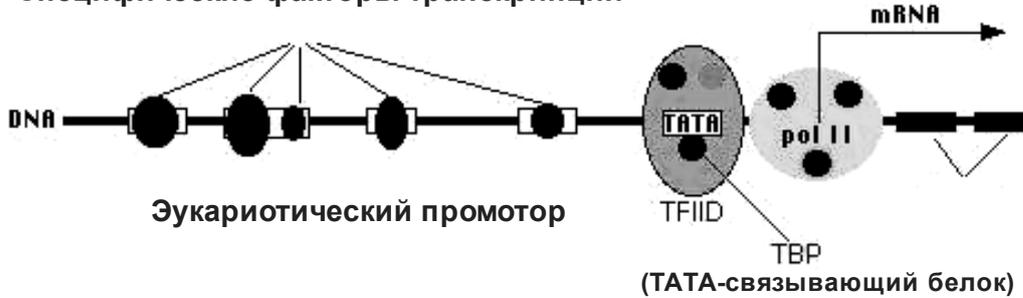


Рис. 19. Структура базального промотора эукариот.

Базальный промотор включает последовательность из 7 пар азотистых оснований ТАТАААА (она называется ТАТА-box), и возможно ее соединение с более чем 50 различными белками (факторами транскрипции), например:

- *фактор транскрипции II D (TFIID)*, который является комплексом ТАТА-связывающего белка с 14 белковыми факторами. Функция этого комплекса заключается в повышении скорости присоединения РНК полимеразы II к базальному промотору;
- *фактор транскрипции II В (TFIIB)*, который одновременно присоединяется к молекулам ДНК и РНК полимеразы II, с его помощью находится точка старта транскрипции.

Продукт действия РНК полимеразы II - первичный транскрипт (hnРНК) - подвергается интенсивному процессингу, состоящему из трех важных преобразований:

1. *Кэпирование* - к 5'-концу первичного транскрипта присоединяется 7-метил-гуанин. Это способствует экспорту м-РНК из ядра, предотвращает разрушение транскрипта в результате действия экзонуклеаз.

2. *Полиаденилирование* - последовательность из 200 нуклеотидов, содержащих аденин, добавляется к 3'-концу благодаря действию поли-А-

полимеразы. Это защищает м-РНК от разрушения нуклеазами в ядре и в цитоплазме клетки.

3. *Сплайсинг* - вырезаются последовательности интронов, не кодирующих полипептидную цепь, сшиваются смысловые последовательности экзонов. Эти действия выполняются полиферментной системой сплайсосомой. Сплайсосома состоит из пяти субъединиц (u1, u2, u4, u5, u6), каждая из которых содержит короткие ядерные *snРНК* (функционируют в качестве рибозимов). Сформировавшаяся м-РНК присоединяется в ядре к специальному протеину. Продуктом этого действия является рибонуклеопротеин м-РНП, который транспортирует м-РНК через ядерные поры и способствует присоединению м-РНК к малой субъединице рибосомы.

Регуляция транскрипции у прокариот

В 1961 ученые Жакоб Ф. и Мано Д. провели ряд экспериментов, применяя культуру *E.coli* для исследования регуляции транскрипции ЛАС-оперона. Этот оперон содержит структурные гены трех ферментов, катализирующих реакции метаболизма лактозы в этих микроорганизмах: Ген X - β -галактозидаза; Ген Y - β -галактозидпермеаза; Ген Z - β -галактозидтрансацилаза. Все эти три гена транскрибируются в одну полинуклеотидную цепь м-РНК, на матрице которой синтезируются три фермента одновременно.

С помощью проведенных экспериментов выше указанные ученые определили основные принципы регуляции экспрессии генов у прокариот. Прежде чем начать рассмотрение основных теоретических положений о механизмах регуляции экспрессии генов у прокариот рассмотрим терминологию данного вопроса:

1. *Цистрон (структурный ген)* - это фрагмент полинуклеотидной цепи ДНК, содержащий информацию о последовательности аминокислотных остатков в одной полипептидной цепи.

2. *Индуцибельный ген* - это ген, транскрипция которого требует присутствия специального вещества - индуктора. LAC-оперон является индуцибельным опероном, потому что он индуцируется в присутствии лактозы.

3. *Индуктор* - специальное вещество, которое стимулирует транскрипцию на опероне. Для LAC-оперона это аллолактоза.

4. *Конститутивный ген* - это ген, транскрипция которого не требует присутствия специального вещества-индуктора.

5. *Оперон* - это фрагмент полинуклеотидной цепи ДНК, содержащий последовательность-промотор, последовательность - ген-оператор и также один или несколько цистронов.

6. *Ген-оператор* - это фрагмент полинуклеотидной цепи ДНК, где возможно присоединение белка-репрессора в активной форме.

7. *Белок-репрессор* - это белок, который после взаимодействия с геном-оператором приостанавливает движение РНК-полимеразы на LAC-опероне. Трансформация белка-репрессора в неактивную форму возможна только в присутствии вещества-индуктора, это вещество играет роль аллостерического ингибитора действия активного белка-репрессора.

8. *Ген-регулятор* содержит информацию о первичной структуре белка-репрессора. Продуктом транскрипции на этом гене является м-РНК, которая используется клеткой для синтеза белка-репрессора.

Эксперименты с применением LAC-оперона *E.coli* подтвердили необходимость действия веществ-индукторов в качестве главных стимуляторов транскрипции индуцибельных генов ДНК этого микроорганизма (рис. 20). В присутствии индуктора в клетке белок-репрессор становится неактивным, движение РНК-полимеразы на матрице ДНК (оперона) не останавливается, и транскрипция успешно завершается формированием полинуклеотидной цепи м-РНК. После 1961 года были проведены дополнительные исследования на *E.coli*, которые подтвердили

необходимость действия дополнительных факторов регуляции действия РНК-полимеразы:

1. *CRP* (*Catabolite gene Reactive Protein*) - белок, который необходим для стимуляции σ -фактора РНК-полимеразы в момент присоединения к промоторным последовательностям.

2. *cAMP* - циклический нуклеотид, который в комплексе с *CRP* стимулирует РНК-полимеразу (рис. 20).

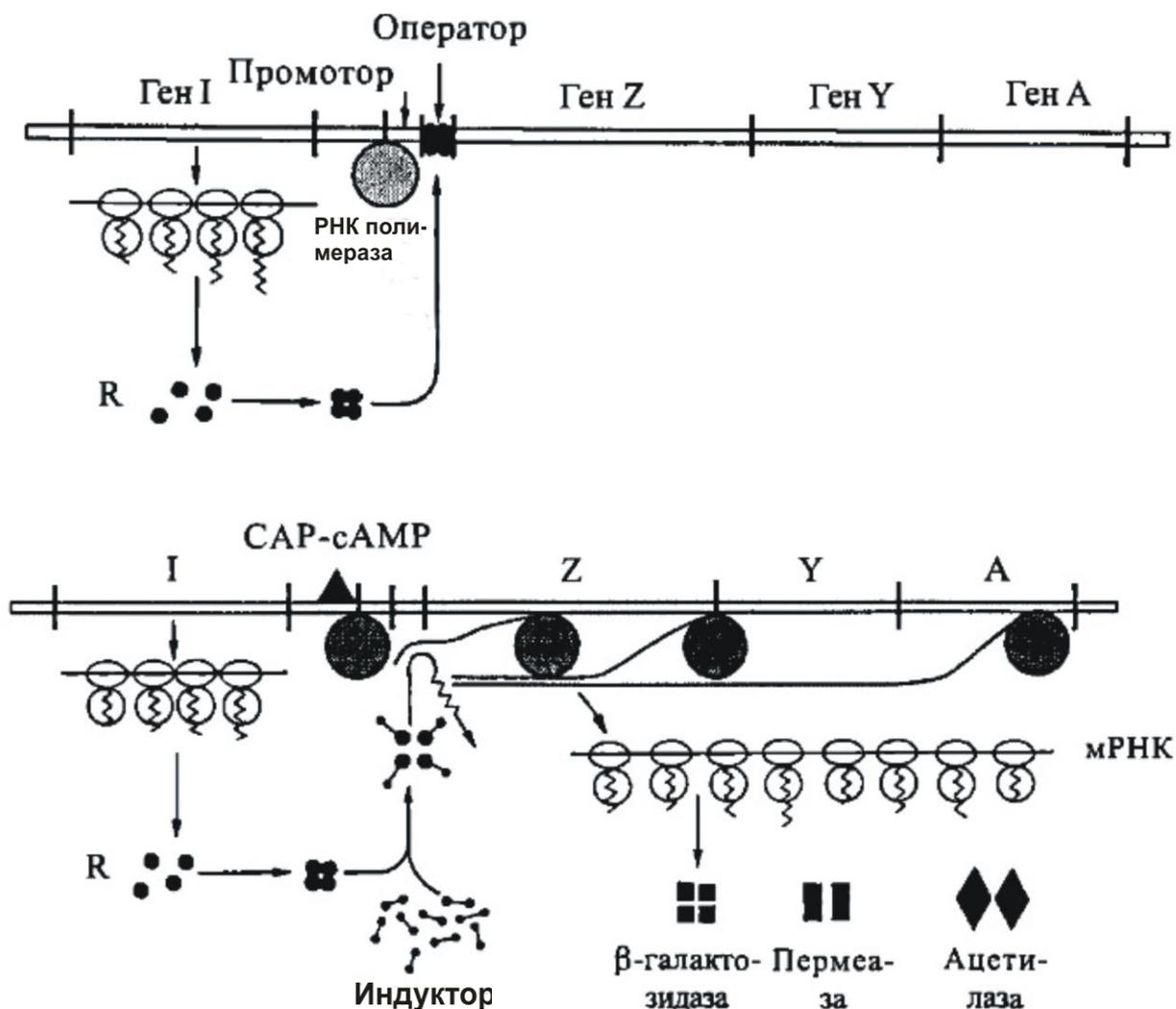


Рис. 20. Регуляция экспрессии LAC-оперона *E.coli*

Предложены две схемы регуляции скорости транскрипции: по механизму индукции (лактозный оперон) и по механизму репрессии (триптофановый оперон).

Лактозный оперон

Лактозный оперон в целом отвечает за катаболизм лактозы.

При изучении *E.coli* было замечено, что в клетке может быть две взаимоисключающие ситуации:

- активность одного из ферментов катаболизма лактозы низка, если в среде имеется глюкоза.
- активность этого фермента резко повышается в обратной ситуации, т.е. при отсутствии глюкозы и при наличии лактозы.

На основании наблюдений была предложена схема регуляции оперона по механизму индукции:

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 глюкозы нет, а лактоза есть, то 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.

Триптофановый оперон

Триптофановый оперон в целом отвечает за синтез триптофана.

Функционирование триптофанового оперона 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.

- Инактивация репрессора приводит к усилению транскрипции приблизительно в 70 раз. Это относительно небольшая разница (по сравнению с 1000-кратной индукцией *lac* оперона). Но такая кажущаяся неэффективность компенсируется дополнительными уровнями регуляции - во-первых, ретроингибированием, а во-вторых, феноменом, называемым аттенуацией.
- Аттенуация.

Вслед за промотором и оператором находится т.н. лидерный отдел; именно он оканчивается аттенюатором.

- За лидерным пептидом располагается шпильчатая структура, являющаяся терминатором, на котором в условиях избытка триптофана транскрипция оперона благополучно и заканчивается, не достигнув структурных генов
- Т.о., когда в клетке достаточно триптофана, то синтез лидерного пептида идет без задержки: образующая его рибосома не отстает от РНК-полимеразы. В этих условиях при достижении РНК-полимеразой аттенюатора с высокой долей вероятности срабатывает сигнал об окончании транскрипции: РНК-полимераза диссоциирует от ДНК и гены не считываются.
- В условиях недостатка триптофана концентрация нагруженных триптофаном аминоацил-тРНК не высока, и рибосома "притормаживает" на триптофановых кодонах, не давая возможности образоваться терминаторной шпильке. В результате транскрипция продолжается и с рамок структурных генов считывается РНК. Лидерная область, также называемая аттенюатором, занимает 162 н.п.

между стартом транскрипции и первым кодоном *trpE* гена. Атенуатор является барьером для транскрипции.

- Триптофан, быстро включаясь в лидерный пептид, блокирует через аттенуаторный механизм синтез ферментов, необходимых для его образования
- В присутствии триптофана ~90% РНК терминируется здесь (что вместе с репрессией дает приблизительно 600-кратное снижение транскрипции в присутствии триптофана).

Содержание выше обозначенных факторов в прокариотической клетке находится также в зависимости от количества таких веществ, как глюкоза или глицерол. Чем меньше концентрация глюкозы в клетке, тем меньше активность РНК-полимеразы на *LAC*-опероне.

Регуляция транскрипции у эукариот

Регуляция транскрипции у эукариот является более сложной в понимании механизма, но есть ряд положений (о влиянии различных факторов на действие ДНК-зависимых РНК-полимераз) аналогичных тем, которые были рассмотрены для прокариот.

Последние исследования генома человека подтвердили разнообразие и количество около 20000-25000 генов в эукариотической клетке (различие значений зависит от типа эукариотической клетки).

Следует отметить ряд особенностей генов эукариот:

- часть генов человека транскрибируется постоянно независимо от типа клетки, где происходит транскрипция (например: транскрипция генов, содержащих информацию о первичной структуре ферментов тканевого дыхания);
- часть генов транскрибируется только при вхождении клетки в S-фазу жизненного цикла, когда материнская клетка активно синтезирует структурные компоненты дочерней клетки;
- часть генов транскрибируется в специальных клетках при выполнении ими функций (например: лимфоциты продуцируют антитела в качестве

иммунного ответа организма человека на появление постороннего организма);

- часть генов транскрибируется только при воздействии специальных факторов на клетку (например: при действии гормонов, стимулирующих экспрессию генов).

Регуляция транскрипции генов эукариот возможна при применении разных механизмов влияния на этот процесс путем действия:

- 1) факторов, влияющих на активность РНК полимераз;
- 2) факторов, влияющих на скорость процессинга первичного транскрипта в ядре клетки;
- 3) факторов, которые могут изменить стабильность молекулы м-РНК, когда она двигается к эндоплазматическому ретикулуму;
- 4). веществ, влияющих на факторы инициации и элонгации трансляции.

Эукариотические гены, кодирующие последовательность полипептидных цепей, имеют:

- экзоны - кодирующие последовательности;
- интроны - последовательности, которые вырезаются, так как они не кодируют полипептидную цепь;
- стартовую точку транскрипции;
- промоторные последовательности.

Рассматривают два типа промоторных последовательностей:

- 1) *основной (базальный) промотор*, который находится в последовательности 40 пар азотистых оснований от точки старта транскрипции;

- 2) *промоторная последовательность "upstream"-промотор*, которая находится на значительном удалении от точки старта (на расстоянии 200 пар азотистых оснований выше точки старта).

Следует отметить, что базальные промоторы большинства кодирующих генов имеют одинаковые последовательности в отличие от второго типа промоторов - "upstream" промоторов. Их структура и факторы, которые к ним

присоединяются, уникальны для каждого типа гена в каждой эукариотической клетке. Экспериментальные данные доказывают возможность изменения конформации ДНК при действии факторов регуляции транскрипции с формированием петель во вторичной структуре ДНК. Это способствует уменьшению расстояния энхансера до места присоединения РНК-полимеразы (рис. 21).

- *энхансер* - последовательность пар азотистых оснований, которая имеет сродство к фактору регуляции, стимулирующему транскрипцию. Он может быть расположен выше, ниже или внутри гена, который контролируется.

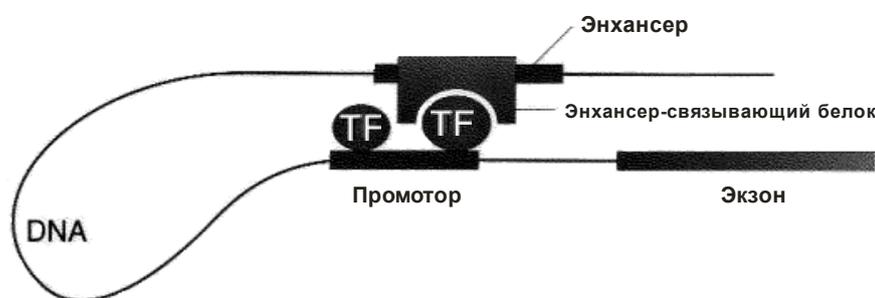


Рис. 21. Изменения конформации ДНК (формирование петли) под влиянием факторов транскрипции (TF) на промоторную последовательность с участием энхансера.

Как присоединение регуляторного белка к энхансеру, который расположен на расстоянии более тысячи пар азотистых оснований от базального промотора гена, усиливает его транскрипцию? Это возможно благодаря свойству регуляторного белка связываться с фактором транскрипции, который контактирует с базальным промотором. Все выше обозначенные контакты формируют петлеобразную структуру в молекуле ДНК (рис. 21).

Присутствие *инсалеитора* (изолятора) препятствует ошибочному присоединению энхансера через регуляторный белок к базальному промотору другого гена в той же области хромосомы (рис.22).

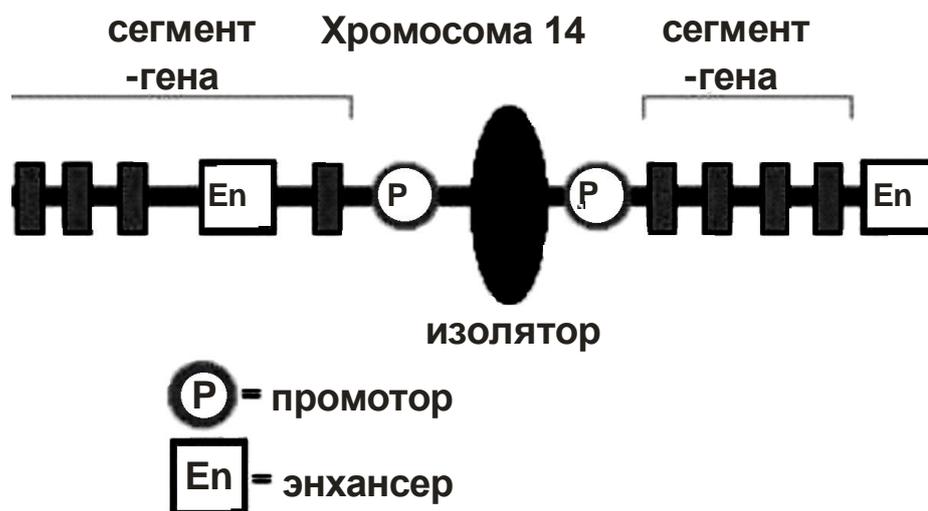


Рис. 22. Место инсалеитора (изолятора) в полинуклеотидной последовательности ДНК между двумя генами – геном α и геном δ .

Инсалеиторы (изоляторы) - это последовательности ДНК, состоящие из 42 пар азотистых оснований. Они могут быть расположены: между энхансером и промотором или между сайленсером и промотором и помогают ферментам транскрипции и факторам регуляции транскрипции находить промоторные и энхансерные последовательности различных генов.

Сайленсеры - это регуляторные последовательности в молекуле ДНК, присоединение к которым факторов регуляции транскрипции приводит к блокированию процесса транскрипции.

Стероидные гормоны являются примером факторов регуляции транскрипции генов, кодирующих полипептидные цепи ферментов обмена белков, липидов и углеводов. Рецепторами стероидных гормонов являются белки, имеющие в своей структуре:

- специальные сайты для присоединения к ним стероидного гормона;
- специальные сайты, формирующиеся только после присоединения стероидного гормона. Эти сайты имеют сродство к энхансерам или к сайленсерам в структуре молекул ДНК хромосом, регулирующих транскрипцию генов ферментов обмена веществ, контролируемых стероидными гормонами.

Глюкокортикоид-рецепторный комплекс играет роль фактора транскрипции, который имеет конформацию «цинкового пальца» («zinc-finger»). На рис. 23 четыре атома цинка, изображенные в виде сфер, соединяются с петлями полипептидных цепей через остатки цистеина. При появлении молекулы стероидного гормона в цитоплазме клетки его рецептор должен:

- присоединиться к гормону;
- сформировать гомодимер гормон-рецепторного комплекса;
- переместиться в нуклеоплазму;
- присоединиться в составе гомодимерного комплекса к последовательностям в молекуле ДНК, к которым он имеет сродство;
- активировать соответствующие факторы регуляции транскрипции.

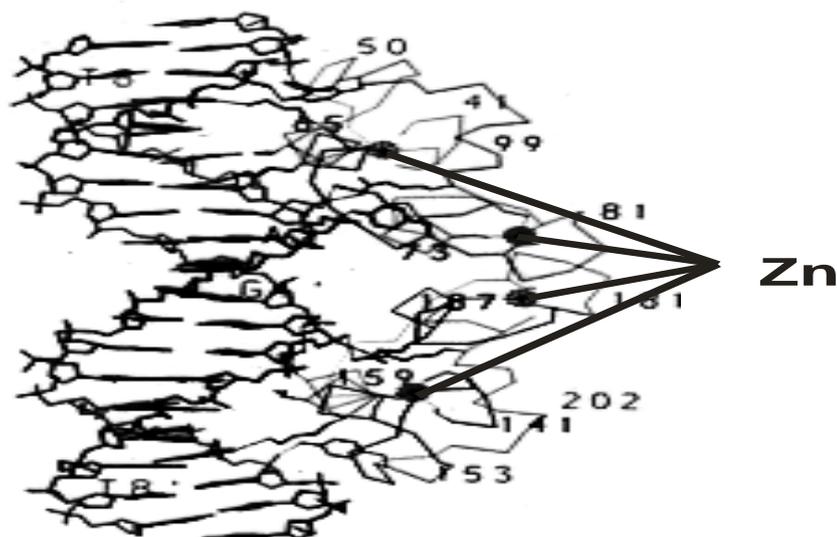


Рис. 23. Стереоскопическое изображение глюкокортикоид-рецепторного комплекса с молекулой ДНК

На рисунке 23 представлено стереоскопическое изображение гомодимерного гормон-рецепторного комплекса глюкокортикоида со специальными последовательностями в молекуле ДНК. Эти последовательности определены (n - любой другой нуклеотид):

5 'AGAACA_nn_nTGTTCT 3'

3 'TCTTGT_nn_nACAAGA 5'

Сродство рецептора как к гормону, так и к последовательностям ДНК может уменьшаться по причине изменения структуры сайтов связывания гормонов и регуляторных последовательностей ДНК в результате действия токсинов, мутаций гена, кодирующего данный рецептор и т.п.

Таким образом, после обзора механизмов регуляции транскрипции у эукариот можно сделать два вывода:

1. Большинство активаторов и репрессоров транскрипции эукариот являются специальными сложными белками четвертичной структуры, которые имеют сайты для связывания с ДНК и домены для соединения с различными органическими молекулами, выполняющими функцию регуляторных факторов транскрипции в клетке.

2. Контролирующие последовательности большинства генов (энхансеры и сайленсоры) эукариот имеют сродство к различным факторам транскрипции, соотношение концентраций которых постоянно меняется в каждом типе клетки и контролируется эндогенными и экзогенными факторами, которые влияют на организм в целом.

ЛЕКАРСТВЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ И ТРАНСКРИПЦИИ

Ингибирование транскрипции:

1. Гетероциклические соединения доксорубицин, 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 транскрипции:

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

В приложениях 1-5 (с. 67-70) и на рисунке 24 представлены данные о различных фармацевтических средствах, оказывающих влияние на процессы репликации, транскрипции, имеющих место в клетках патогенных для человека микроорганизмов или в клетках раковых опухолей.



Рис. 24. Группы фармацевтических препаратов, оказывающих влияние на матричные синтезы и формирование бактериальной клетки.

Для некоторых лекарственных средств рассматривается побочное негативное воздействие на организм человека, так как механизмы транскрипции и репликации прокариот имеют сходство с теми же процессами в соматических клетках организма человека. Поэтому лечащему врачу нужно внимательно рассматривать механизм действия любого фармацевтического препарата, который имеет влияние на базовые синтетические процессы клетки - репликацию, транскрипцию и трансляцию, прежде чем назначать этот препарат больному.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ПРОДУКТОВ ОБМЕНА НУКЛЕОТИДОВ

Спектрофотометрическое определение рибонуклеиновых кислот во фракции рибосом (по методу А. С. Спирина и соавт.)

Принцип метода: пуриновые и пиримидиновые азотистые основания интенсивно поглощают ультрафиолетовое излучение в области спектра 260-280 нм. Интенсивность поглощения прямо пропорциональна концентрации азотистых оснований, следовательно, и концентрации молекул, в состав которых они входят, - нуклеиновых кислот.

Ход работы: Смесь 0,1 мл фракции рибосом и 3 мл раствора 0,5 N HClO₄ нагревается на кипящей водяной бане в течение 20 минут (готовится параллельно 3-4 пробы). После этого пробы охлаждаются и центрифугируются. Полученная надосадочная жидкость используется для определения поглощения ультрафиолетового света на спектрофотометре. Измерение оптической плотности проводится в кювете толщиной слоя 10 мм при 270 и 290 нм против раствора 0,5 N HClO₄. Разница между оптической плотностью при 270 нм и 290 нм делится на коэффициент 0,19. Результатом этой математической операции является количество в мкг нуклеинового фосфата в 1 мл исследуемого раствора.

Для перерасчета количества нуклеинового фосфата на количество нуклеиновой кислоты используют коэффициент пересчета 10,3:

$$[\text{РНК}] = 10,3 \cdot [\text{нуклеиновый фосфат}]$$

Количественное определение мочевины в сыворотке крови (*по методу Folin O et al.*)

Принцип метода:

Мочевая кислота восстанавливает фосфорно-вольфрамовокислый реактив, в результате чего образуются более низкие окислы вольфрама синего цвета, интенсивность окраски которых пропорциональна количеству мочевины.

Ход работы:

Для исследования берут две центрифужные пробирки:

Содержимое пробирок, мл	Исследуемая проба	Холостая проба
Вода дистил.	4.0	4.5
Сыворотка крови	0.5	-
Кислота серная	0.25	0.25
Вольфрамат натрия	0.25	0.25

Перемешать, выдержать 10 минут при комнатной температуре.
Центрифугировать 10 минут при 3000 об/мин. Отобрать центрифугат:

Центрифугат	2.0	2.0
Раствор карбоната натрия	1.0	1.0
Фосфорновольфрамный реактив	0.6	0.6

Перемешать, выдержать 30 минут при комнатной температуре. При длине волны 650 (620-700 нм) в кюветах с толщиной слоя 10 мм измерить оптическую плотность исследуемой пробы (Е_{иссл.}) против холостой пробы.

Расчет результатов проводится по формуле:

$$C = \frac{E_{\text{иссл.}} * 300}{E_{\text{ст}} * 1000}, \text{ где}$$

C - концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови (ммоль/л);

E_{иссл.} - экстинкция опытной пробы против холостой;

E_{ст.} - экстинкция стандартной пробы против холостой;

300- концентрация мочевой кислоты в стандартном растворе (мкмоль/л).

1000 – коэффициент перерасчета в ммоль/л

Содержание мочевой кислоты в сыворотке крови:

у мужчин - 0,18 - 0,54 ммоль/л.;

у женщин - 0.15-0.45 ммоль/л.

2.Количественное определение мочевой кислоты в моче

(принцип метода см.выше)

Ход работы:

Перед началом исследования мочу развести в десять раз (1мл мочи/9мл воды)

.Отмерить в пробирку, мл	Опыт	Контроль
Дистиллированная вода	4	4.5
Разбавленная моча (1:10)	0.5	-
Кислота серная	0.25	0.25
Вольфрамат натрия	0.25	0.25

Перемешать, выдержать 10 минут при комнатной температуре, отфильтровать, отобрать необходимое количество фильтрата

Фильтрат	2	2
Карбонат натрия	1	1
Фосфорновольфрамовый реактив	0.6	0.6

Перемешать, выдержать 30 минут при комнатной температуре, измерить оптическую плотность опытной пробы ($E_{\text{опыт}}$) против контрольной при 650 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Расчет концентрации мочевой кислоты проводят по формуле:

$$E_{\text{оп.}} \cdot 300 \cdot 10 \cdot A$$

$$C = \frac{\text{-----}}{E_{\text{ст}} \cdot 1000}, \text{ где}$$

$$E_{\text{ст}} \cdot 1000$$

C – содержание мочевой кислоты в моче, моль/сут;

300- содержание мочевой кислоты в стандартном растворе (мкмоль/л);

1000 – коэффициент перерасчета в ммоль/л

10 – разведение мочи;

A – суточный диурез :1,5 л- мужчины, 1,2 л –женщины.

Нормальное содержание мочевой кислоты в моче составляет: 1.48-4.43 ммоль/сут

У вегетарианцев этот показатель <2,48 ммоль/сут. При употреблении пищи, содержащей большое количество пуринов, концентрация мочевой кислоты может возрастать до 5,9 ммоль/сут.

Клинико-диагностическое значение определения мочевой кислоты в сыворотке крови и в моче:

Содержание мочевой кислоты в крови зависит от пола, количества пуринов в пище, а также от интенсивности обмена нуклеопротеинов в организме. Увеличение концентрации мочевой кислоты в плазме крови выше 0.54 ммоль/л определяет гиперурикемию. Гиперурикемию диагностируют при подагре, которая сопровождается отложением солей мочевой кислоты (уратов натрия) в хрящах, слизистой сумке суставов. При этом содержание мочевой кислоты в крови может быть повышено, а с мочой выделяться ее меньше, чем в норме. Гиперурикемия наблюдается также у пациентов с нефритом, почечной недостаточностью и др.

Гиперурикемия и подагра развиваются у пациентов с генетическими нарушениями активности ферментов синтеза пуриновых нуклеотидов (фосфорибозилпирофосфат-аминотрансферазы, гипоксантингуанинфосфорибозил-трансферазы), у больных с синдромом Леша-Нихана.

Гипоурикемия наблюдается при генетическом дефекте ксантиноксидазы, что сопровождается накоплением ксантинов в крови пациентов и выведением их в большой концентрации с мочой (ксантинурия).

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТЕМЫ
«ОБМЕН НУКЛЕОПРОТЕИНОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ»

1. Укажите нуклеозид, который не подвергается разрушению в тканях человека после всасывания в ЖКТ и на 95% используется для синтеза нуклеотида - субстрата синтеза нуклеиновых кислот:

- A. Аденозин
- B. Цитидин
- C. Тимидин
- D. Гуанозин
- E. Уридин

2. Укажите основной путь для получения азотистых оснований в организме человека:

- A. Синтез de novo нуклеотидов
- B. Переваривание ДНК и РНК в ЖКТ
- C. Минеральные соли
- D. Получение продуктов распада эндогенных нуклеиновых кислот
- E. Процесс изомеризации аминокислот

3. Укажите метаболический путь – основной источник получения структуры рибозы в клетке:

- A. Гликолиз
- B. Цикл Кребса
- C. Пентозофосфатный путь
- D. Гликогенолиз
- E. Орнитиновый цикл

4. Укажите аминокислоту, которая в синтезе de novo является одновременно источником двух атомов углерода и одного атома азота в структуре пурина:

- A. Лизин
- B. Гистидин
- C. Аланин
- D. Цистеин

Е. Глицин

5. Укажите витамин, активные формы которого клетка использует в качестве источника атомов углерода в структуру пурина:

А. Пантотеновая кислота

В. Фолиевая кислота

С. Аскорбиновая кислота

Д. Токоферол

Е. Ретинол

6. Укажите показатель сыворотки крови, концентрация которого повышается при усиленном распаде пуринов в организме человека:

А. Креатин

В. Креатинин

С. Мочевина

Д. Мочевая кислота

Е. Аммиак

7. Укажите аминокислоту, амид которой является источником атомов азота в 3-м и 9-м положениях структуры пуринового азотистого основания:

А. Глутаминовая кислота

В. Аспарагиновая кислота

С. Глицин

Д. Цистеин

Е. Триптофан

8. Укажите фермент, который называют регуляторным ферментом для синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов одновременно:

А. Гексокиназа

В. Пирофосфокиназа

С. Фосфорибозилпирофосфатсинтетаза

Д. Аденилосукцинатлиаза

Е. ГМФ-синтаза

9. Укажите нуклеозидмонофосфат, который образуется из ИМФ, благодаря действию двух ферментов при участии ГТФ и аспарагиновой кислоты:

- A. АТФ
- B. ГТФ
- C. АДФ
- D. АМФ
- E. ЦМФ

10. Укажите аминокислоту, необходимую для синтеза как пуриновых так и пиримидиновых мононуклеозидмонофосфатов:

- A. Глу
- B. Лиз
- C. Про
- D. Асп
- E. Фен

11. Укажите название полиферментной системы синтеза ДНК у прокариотов:

- A. Реплисома
- B. Полисома
- C. Наносома
- D. Полиферментный комплекс
- E. Комплексома

12. Укажите название короткого олигорибонуклеотида, без которого невозможно действие ДНК-полимеразы III у прокариотов:

- A. Промотор
- B. ДНК-затравка
- C. Праймер
- D. Сигма-фактор
- E. Ori C

13. Укажите фермент, который катализирует отсоединение праймеров и вместо них синтезирует полинуклеотидные последовательности ДНК в процессе элонгации репликации прокариотов:

- A. ДНК-полимераза I
- B. ДНК-полимераза III
- C. Праймаза
- D. Хеликаза
- E. ДНК-лигаза

14. Укажите фермент репликации, присутствующий только у эукариот, механизм катализа которого напоминает действие обратной транскриптазы:

- A. ДНК-полимераза I
- B. ДНК-полимераза III
- C. Праймаза
- D. Теломераза
- E. ДНК-лигаза

15. Укажите фермент, который за счет энергии АТФ катализирует образование фосфодиэфирной связи между двумя синтезированными ранее фрагментами ДНК:

- A. ДНК-полимераза I
- B. ДНК-полимераза III
- C. Праймаза
- D. Хеликаза
- E. ДНК-лигаза

16. Укажите синоним для термина «транскрипция»:

- A. Трансляция
- B. Элонгация
- C. Биосинтез РНК
- D. Генная инженерия
- E. Процессинг

17. Укажите название фермента, катализирующего синтез РНК из свободных мононуклеозидтрифосфатов на матрице одинарной полинуклеотидной цепи ДНК:

- A. Рестриктаза

В. Транскриптаза

С. Топоизомераза

Д. ДНК-лигаза

Е. ДНК-зависимая РНК полимераза

18. Укажите процесс, который не характерен для биосинтеза м-РНК у эукариот:

А. Инициация транскрипции

В. Терминация транскрипции

С. Синтез праймера

Д. Элонгация транскрипции

Е. Сплайсинг

19. Укажите название последовательности нуклеотидов в молекуле первичного транскрипта, которая не кодирует полипептидную цепь:

А. Интрон

В. Экзон

С. Праймер

Д. Кодон

Е. Триплет

20. Укажите название последовательности пар азотистых оснований ДНК, которая является регуляторной и имеет сродство к факторам регуляции, способным повысить скорость транскрипции у эукариотов:

А. Экзон

В. Интрон

С. Сайленсер

Д. Инсалеитор

Е. Энхансер

21. Какие из перечисленных положений характерны для катаболизма пуриновых нуклеотидов?

А. При катаболизме цитозин превращается в гипоксантин

- В. При катаболизме аденилатных и гуанилатных нуклеотидов в организме человека пуриновое ядро не разрушается
- С. Промежуточным метаболитом распада пиримидинов является оротовая кислота
- Д. Основным конечным метаболитом является мочеви́на
- Е. Основными конечными метаболитами являются аммиак, вода, CO_2
22. Выберите реакцию, в результате которой синтезируется АМФ?
- А. ИМФ + NH_3
- В. ИМФ + НАДН + глутамат
- С. ИМФ + ГТФ + аспарат
- Д. гипоксантин + рибозо-1-фосфат
- Е. гипоксантин + 5 фосфорибозил-1-пирофосфат
23. Назовите условие, характерное для синтеза пиримидиновых нуклеотидов:
- А. Промежуточным метаболитом синтеза является ИМФ
- В. Синтез начинается с формирования пиримидинового ядра на 5-фосфорибозе
- С. В образовании основания участвует формил-ТГФК
- Д. В синтезе карбамоилфосфата используется глутамат
- Е. Карбамоилфосфат используется для синтеза оротата
24. Выберите особенности, характерные для процесса синтеза пуриновых нуклеотидов:
- А. В образовании пуринового ядра участвует аспарагин
- В. В образовании пуринового ядра участвует глутамат
- С. В образовании основания не используется формил-ТГФК
- Д. Синтез начинается с формирования пуринового ядра на 5-фосфорибозе
- Е. Для синтеза необходимо наличие 5-фосфодезоксирибозы и аммиака
25. Назовите факторы, обеспечивающие превращение рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды?
- А. Тиоредоксинредуктаза и НАДФН₂
- В. НАДН и ФАД-оксидоредуктаза
- С. Рибонуклеотидредуктаза и тиоредоксин

D. Тиоредоксин и ФМНН₂

E. НАДН и тиоредоксинредуктаза

26. Назовите фермент метаболического пути образования мочевой кислоты, ингибируемый аллопуринолом:

A. Уреаза

B. Аденозиндезаминаза

C. Уриказа

D. Ксантинооксидаза

E. Аллантаиназа

27. Назовите возможные причины возникновения подагры:

A. Ускоренный распад пиримидиновых нуклеотидов

B. Ускорение процессов реутилизации пуринов

C. Употребление аллопуринола

D. Гиперурикемия с ускоренным распадом пуринов

E. Сниженный синтез мочевой кислоты

28. Какой белок необходим для синтеза дезоксирибозы в составе нуклеотидов?

A. Родопсин

B. Тиоредоксин

C. Рибозилтрансфераза

D. Малатдегидрогеназа

E. Трансферрин

29. Укажите процесс, не относящийся к посттранскрипционным модификациям:

A. Сплайсинг

B. Синтез праймера

C. Метилирование

D. Кэпирование

E. Полиаденилирование

30. Укажите структуру в составе молекулы РНК, защищающую ее от деградации нуклеазами:

А. Праймер

В. Интрон

С. Экзон

Д. Оперон

Е. Кэп

Приложение 1

Фармацевтические средства с фармакологической активностью гормонов половых желёз

Классификация	Женские половые гормоны: Эстрогены и гестагены	Мужские половые гормоны	Анаболические стероиды
<p>Препараты и их синонимы</p>	<p><i>Стероидной структуры:</i></p> <p>1.Этенилэстрадиол (микрофолин)</p> <p>2.Эстрон (Фоликулин)</p> <p><i>Нестероидной структуры:</i></p> <p>3. Гексестрол (синестрол)</p> <p><i>Антиэстрогенные препараты:</i></p> <p>4. Кломифена цитрат</p> <p>5. Ацетомепрегенол</p>	<p>6.Пропионат тестостерона</p> <p>7.Тестенат</p>	<p>8.Синаболин</p>
<p>Механизм действия</p>	<p>При формировании комплекса с рецепторами гормонов стероидной природы, проникают в составе комплекса в ядро клетки, где стимулируют транскрипцию, и опосредованно влияют на синтез белков в клетке-мишени (1-3,5-8). Конкурентно связывают рецепторы эстрогенов в гипоталамусе и яичниках, что по принципу обратной связи усиливает секрецию гонадотропинов и вызывает дозревание фолликул (4)</p>		

Приложение 2

Фармацевтические препараты с антибластомным действием

1. Алкилирующие вещества					
Классификация	Хлорэтиламины	Этиленамины	Эфиры дисульфоновых кислот	Производные нитрозомочевины	Металлоорганические соединения и др..
Препараты и их синонимы	1. Люфенал 2. Мелфалан (алкеран)	3. Бензотетф	4. Бисульфан (Миелосан)	5. Ломустин	6. Карбоплатин
Механизм действия	Алкилируют нуклеофильные фрагменты структуры ДНК, образуя поперечные сшивки в ДНК и РНК, опосредованно влияя на синтез белков в клетке-мишени. Снижают способность раковых клеток к митозу, нарушают проницаемость мембран митохондрий. Разобщают окисление и фосфорилирование, приводя необратимо к гибели опухолевых клеток.				
2. Антиметаболиты					
Классификация	Аналоги фолиевой кислоты, пуринов, пиримидинов; комбинированные препараты				
Препараты и их синонимы	7. Эдатрексат		8. Флуороурацил		
Механизм действия	Антагонисты природных нуклеотидов, либо субстратов их синтеза, нарушают синтез ДНК и РНК в опухолевых клетках путем блокирования ключевых процессов – синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот				

Приложение 3

Антибиотики с антибластомным действием

Классификация	1. Противоопухолевые антибиотики		2. Ингибиторы топоизомеразы I, ароматазы. ферментные препараты	3. Антибиотики широкого спектра действия
	Актиномицины	Антрациклины		
Препараты и их синонимы	1. Митомоцины 2. Блеомоцины	3. Карминомицин 4. Даунорубицин	5. Топотекан 6. Трастузумаб	7. Рифампицин
Механизм действия	<p>Происходит их внедрение в спираль ДНК, что сопровождается ингибированием транскрипции (1-4). Происходит образование свободных радикалов, которые при взаимодействии с ДНК вызывают разрыв полинуклеотидных цепей, разрушают мембраны клеток-мишеней (4).</p> <p>Ингибируют топоизомеразу I (5,6). Ингибируют синтез РНК при взаимодействии с РНК-полимеразой (7).</p>			

Приложение 4

Фармацевтические средства – производные фторхинолов

Классификация	1 и 2 поколение	3 поколение
	1. Ципрофлоксацин (Цифран, ципринол)	3. Моксифлоксацин
Препараты и их синонимы	2. Офлоксацин (таривид)	4. Спарфлоксацин
Механизм действия	Ингибирование ДНК-гиразы (топоизомеразы) бактерий, что приводит к нарушению репликации	

Приложение 5

Сульфаниламидные препараты

Классификация	Те, что всасываются в тонком кишечнике		
Препараты и их синонимы	Короткого действия	Долгого действия	Очень долгого действия
	1. Стрептоцид 2. Этазол	3. Сульфадиметоксин	4. Сульфален , (Келфизин)
Механизм действия	Нарушают синтез пуринов и пиримидинов через конкурентное ингибирование ферментов, образующих производные фолиевой кислоты. Как следствие синтез нуклеиновых кислот тоже ингибируется.		
Препараты	Для местного действия: монокомпонентные и комбинированные		
	5. Сульфацетамид серебра 6. Сульфтиазол серебра		

Механизм действия	Ион Ag^+ связывается с ДНК микроорганизмов, что приводит к нарушениям репликации и транскрипции
-------------------	---

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1998.- 704с.
2. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами. Под редакцией Е.С. Северина, А.Я. Николаева.–М.:ГЭОТАР– Мед., 2001.– 448 с.
3. Биохимия человека. // Р.К. Марри, Д.К. Греннер, П.А. Мейес, В.В. Родуэлл. - В 2-х т.- М.: Мир.-1993.-687с.
4. Бышевский А.Ш. Биохимия для врача. – Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994.– 384 с.
5. A. Lehninger. Principles of Biochemistry, fourth edition, 2000.(CD disk). – 1118 p.
6. Davidson V.L., Sittman D.B. Biochemistry. USA:Harwal Publishing. -1994. – 584 p
7. Lieberman Michael; Marks Allan; Smith Colleen. Marks' Essential Medical Biochemistry, 2nd Edition. - Lippincott Williams & Wilkins. – 2007. – 540 p.
8. R. K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell . Harper`sIllustratedBiochemistry., LANGEmedicalbooks, 26-edition, India, 2006.-868 p.
9. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. – 3rd ed. - Kolkata:Books and Allied, India. – 2006. – 792 p
10. Smith Colleen, Marks Allan, Lieberman Michael.Marks’ Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach, 2nd Ed. - Lippincott Williams & Wilkins.- 2000.- 920 p
11. William J Marshall, Stephen K Bangert. Clinical Chemistry. Fifth edition. – China:”Mosby”. -2004. – 422 p.

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ИСХОДНОГО
УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ ПО ИЗУЧАЕМОЙ ТЕМЕ:

1	В	11	Д
2	А	12	В
3	В	13	А
4	Д	14	В
5	Е	15	С
6	В	16	Д
7	Д	17	В
8	А	18	В
9	Е	19	С
10	С	20	В

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ТЕМЫ «ОБМЕН НУКЛЕОПРОТЕИНОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ»

1	С	11	А	21	В
2	Д	12	С	22	С
3	С	13	А	23	Е
4	Е	14	Д	24	С
5	В	15	Е	25	С
6	Д	16	С	26	Д
7	А	17	Е	27	Д
8	С	18	С	28	В
9	Д	19	А	29	В
10	Д	20	Е	30	Е