

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Функции ДНК

1. ДНК является носителем генетической информации.

Функция обеспечивается фактом существования **генетического кода.**

2. Воспроизведение и передача генетической информации в поколениях клеток и организмов.

Функция обеспечивается процессом **репликации.**

3. Реализация генетической информации в виде белков, а также любых других соединений, образующихся с помощью белков-ферментов.

Функция обеспечивается процессами **транскрипции** и **трансляции.**

Репликация ДНК

- процесс, осуществляемый комплексом ферментов и белков, суть которого в образовании идентичных копий ДНК для передачи генетической информации в поколениях клеток и организмов.

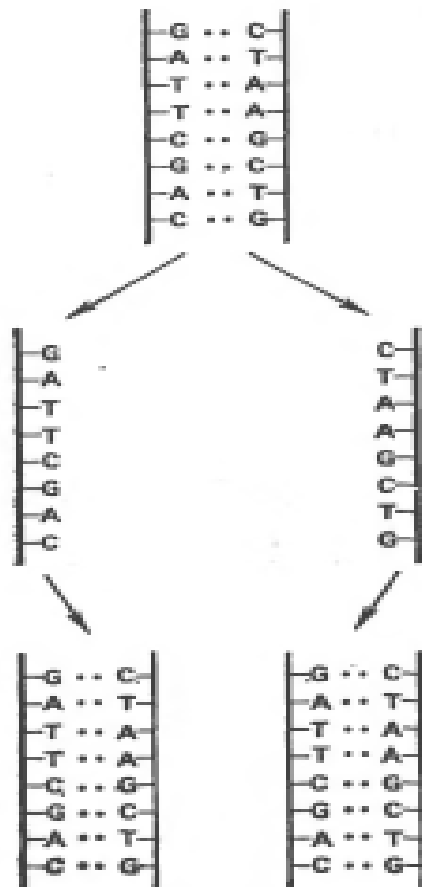


Рис. 26. Полуконсервативная репликация

В ходе репликации две комплементарные цепи ДНК разделяются и каждая из них служит матрицей для синтеза новой комплементарной цепи (тонкая линия). В результате образуются одинаковые дочерние молекулы, идентичные исходной молекуле ДНК.

Принципы репликации

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

Синтез каждой дочерней цепи ДНК идет **комплементарно** и **антипараллельно** матричной цепи и всегда в направлении **5' → 3'**.

Модели репликации ДНК

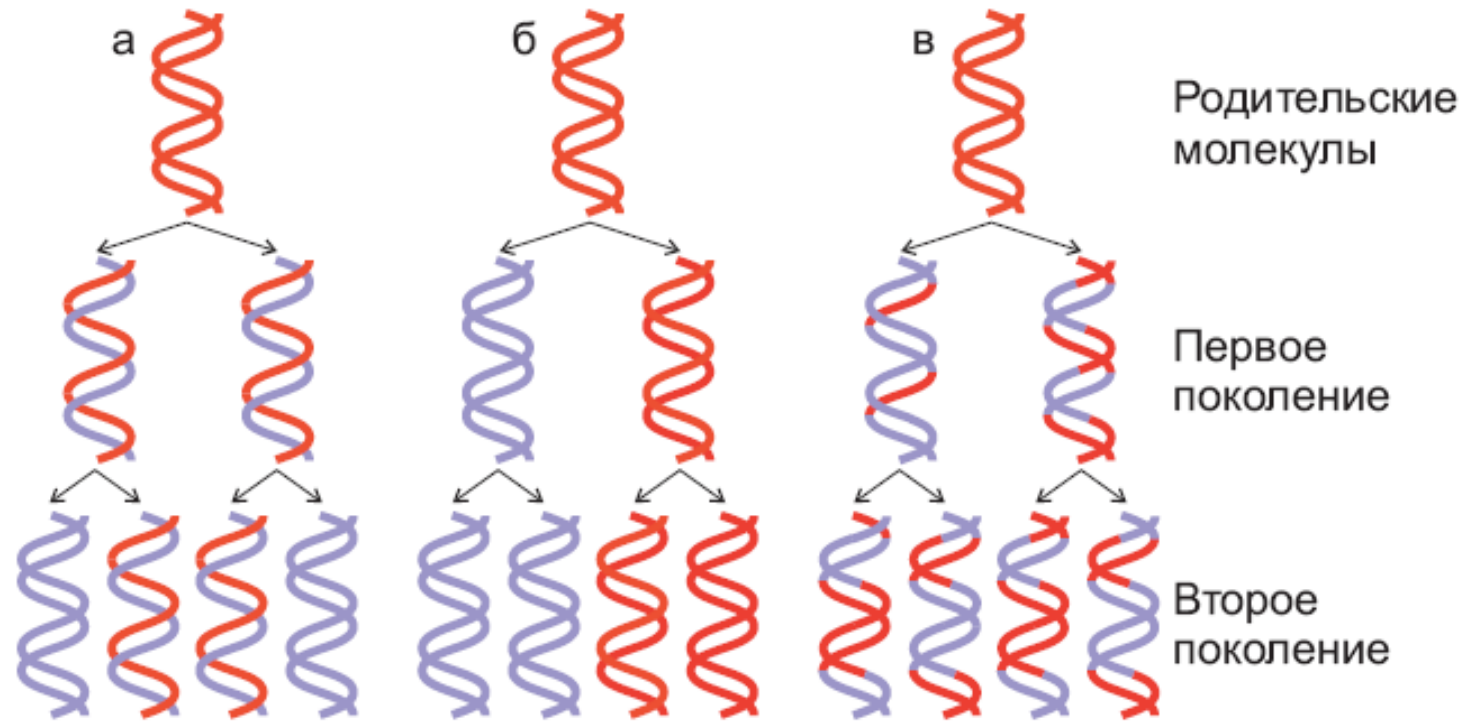


Рис. 6.6. Модели репликации ДНК:

а - полуконсервативная,

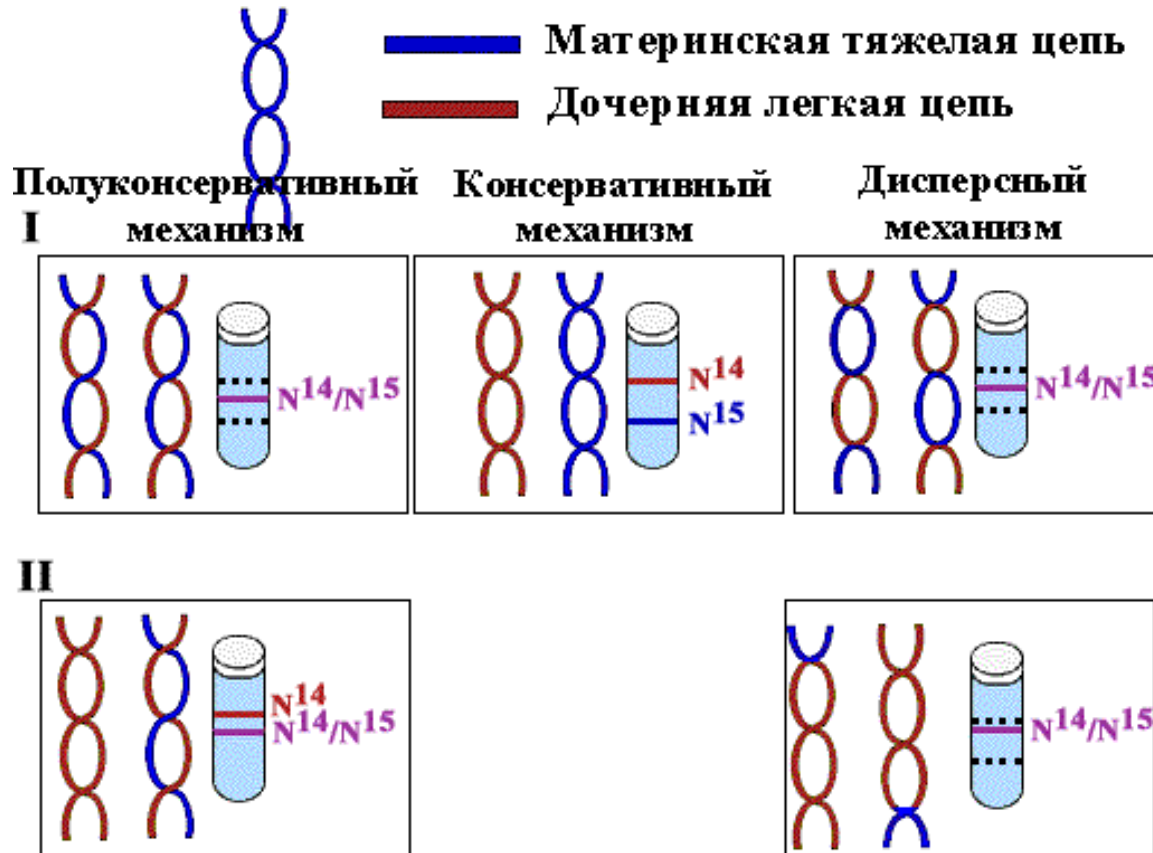
б - консервативная,

в - дисперсионная.

Родительские цепи изображены в виде красных лент, вновь синтезированные показаны синим цветом. (Из: Russell, 1998, p.345).

Доказательство полуконсервативного характера репликации

1958 г. - Мэтт Мезельсон и Фрэнк Сталь



Полуконсервативность означает, что каждая дочерняя ДНК состоит из одной матричной цепи и одной вновь синтезированной.

Р
Е
П
Л
И
К
А
Ц
И
Я

Репликация у прокариот

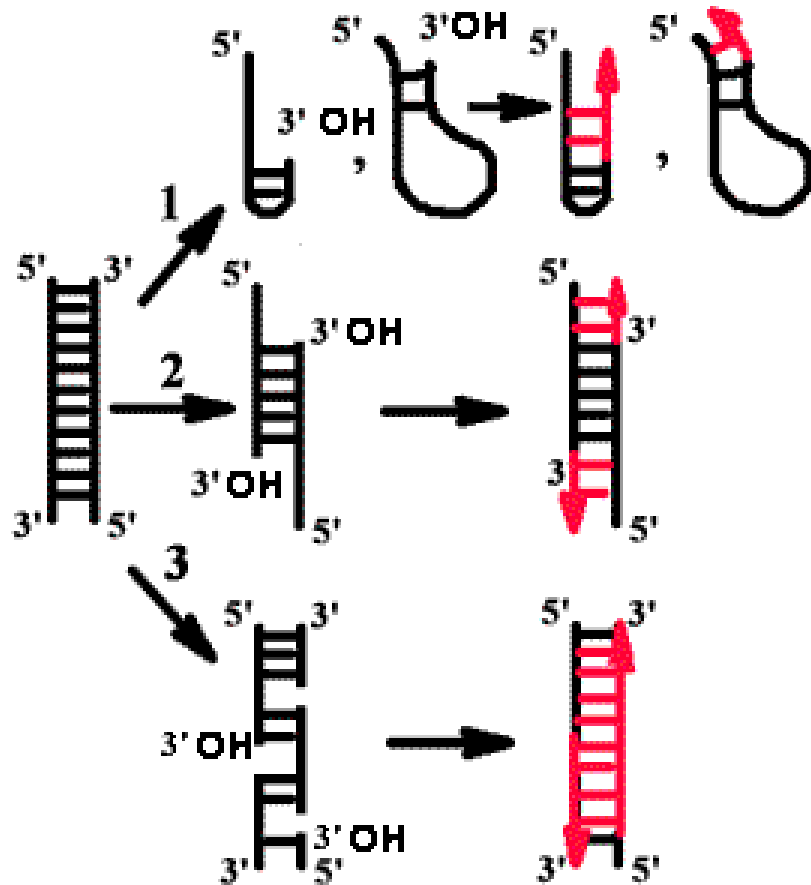
Ферментативная система синтеза ДНК *in vitro*

1956 г. - Артур Корнберг из 100 кг биомассы *E. coli* выделил 0.5 г ДНК-полимеразы.

Для синтеза ДНК *in vitro* необходимы следующие компоненты :

1. ДНК-матрица - образец, по которому строится новая цепь ДНК.
2. Активированные нуклеотиды (dATФ, dГТФ, dТТФ, dЦТФ) - то, из чего строятся дочерние цепи.
3. ДНК-полимераза - то, что строит новую цепь ДНК.
4. Ионы магния - то, без чего фермент не работает.

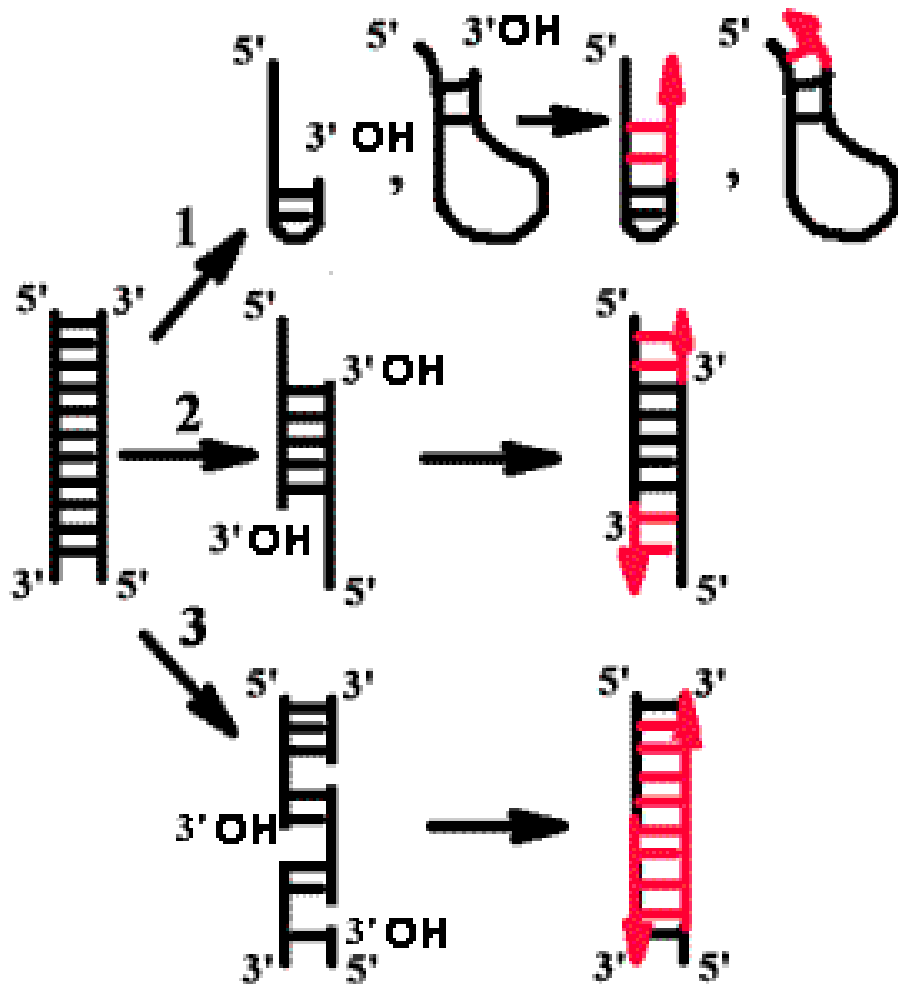
Нативная двухцепочечная ДНК не может быть использована в системе синтеза *in vitro*. Её можно активировать



(1) Денатурацией щелочью или нагреванием

(2) Обработкой экзонуклеазой III из *E. coli*

(3) Внесением ников (одноцепочечных разрывов) с помощью эндонуклеаз

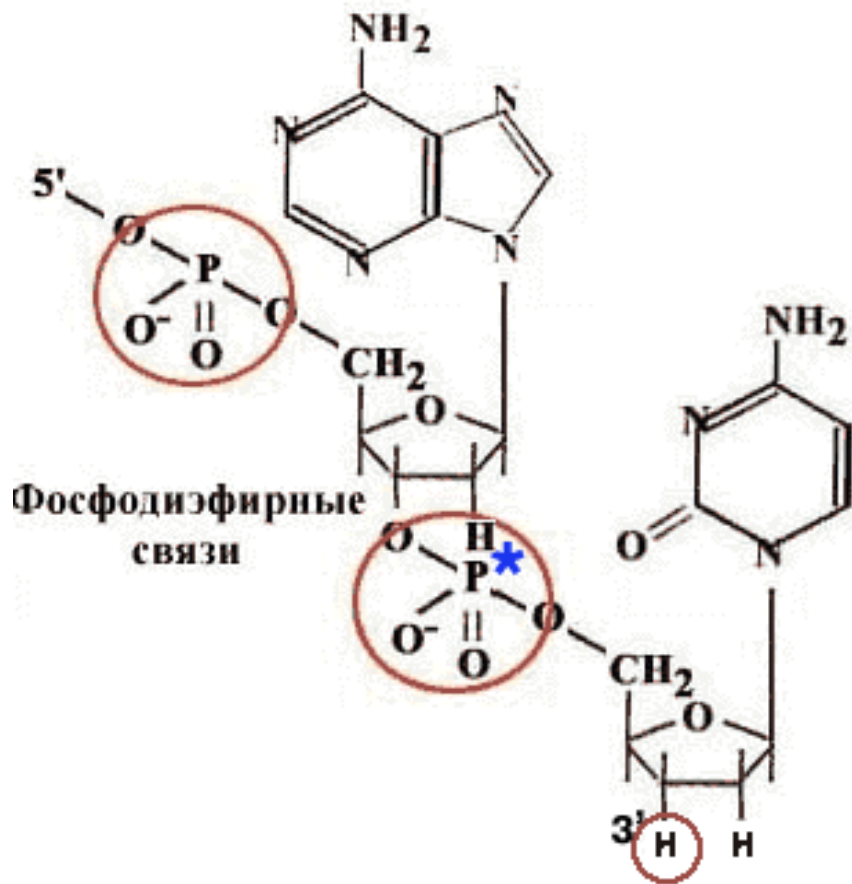


Значит, для инициации репликации нужен свободный 3' - гидроксильный конец.

Он является сигналом к началу репликации.

Затравкой для репликации является **3'-гидроксильный конец** двуцепочечной ДНК, причем он должен быть спарен с матрицей.

Эксперимент с дидезоксинуклеозидтрифосфатом



Включение дидезоксинуклеозидтрифосфата без 3'-гидроксильного конца останавливает рост цепи

Это также доказывает и **униполярность репликации** в направлении **5' → 3'**.


ДНК-полимераза Корнберга (ДНК-полимераза I)

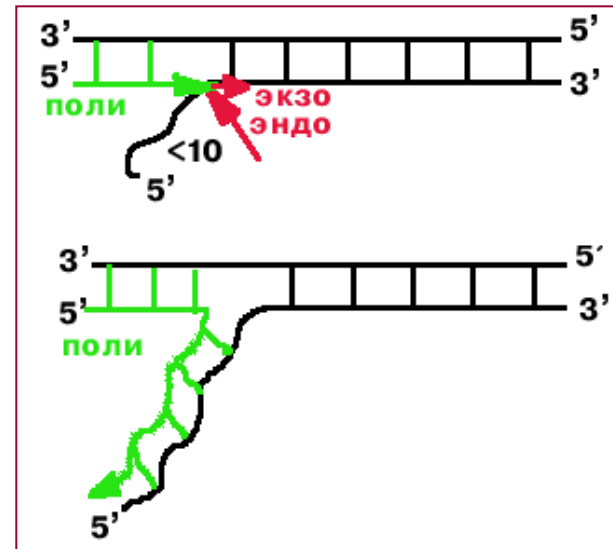
Обладает 4-мя разными каталитическими активностями:

1. Полимеризационная в направлении $5' \rightarrow 3'$.
 $\text{ДНК}_n + \text{dХТФ} \rightarrow \text{ДНК}_{n+1} + \text{Ф-Ф}$

2. Пирофосфоролиз:
 $\text{ДНК}_n + \text{Ф-Ф}^* \rightarrow \text{ДНК}_{n-1} + \text{dХТФ}^*$

3. Пирофосфатный обмен:
 $\text{ДНК}_n + \text{dХТФ} + \text{Ф-Ф}^* \rightarrow \text{ДНК}_{n+1} + \text{dХТФ}^* + \text{Ф-Ф}$

4. 
полимеразная $5' \rightarrow 3'$ гидролитическая активности
 $3' \rightarrow 5'$ гидролитическая активности



Корректорская функция фермента

Расщепление полимеразы трипсином

Таблица 2. Компоненты холофермента ДНК-полимеразы III *E. coli*

Субъединица	Ген	Масса, кД	Агрегаты субъединиц*
α	<i>dna E</i> (<i>pol C</i>)	140	
ϵ	<i>dna Q</i>	25	
θ	?	10	
τ	?	83	
γ	<i>dna Z</i>	52	
δ	<i>dna X</i>	32	
β	<i>dna N</i>	37	

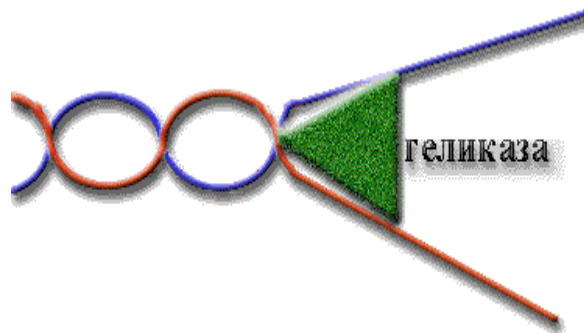
* Различным неполным агрегатам субъединиц ранее приписывали функцию ДНК-полимеразы III. Обнаружение этих неполных агрегатов есть следствие нестабильности холофермента в ходе выделения из клетки.

(Спирин, 1990)

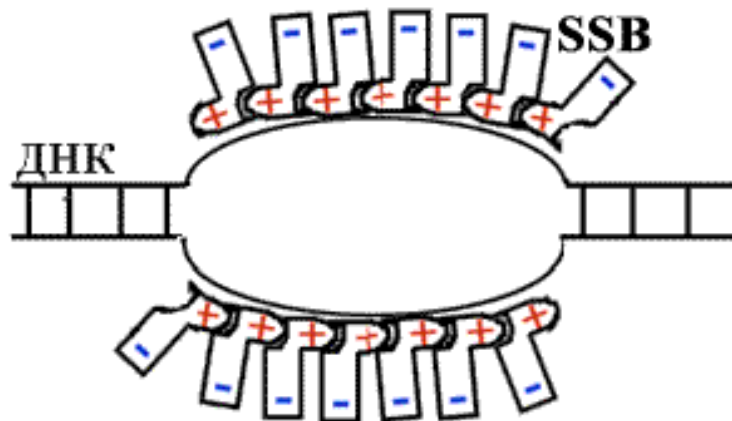
ДНК-полимеразы *E. coli*

Функция	ДНК-полимераза I	ДНК-полимераза II	ДНК-полимераза III
Полимеризация в 5' - 3' направлении	+	+	+
Гидролитическая активность 3' - 5'	+	+	+
Гидролитическая активность 5' - 3'	+	-	-
Число оборотов, принимая за единицу 667 нукл/мин.	1	0.05	15
Число молекул на клетку	250	100	20
	Участвует в репарации и является вспомогательной полимеразой при репликации, устраняя РНК-затравки.	Лучше всего работает на двухцепочечной ДНК с одноцепочечными брешами. Участвует в репарации.	Играет главную роль в репликации.

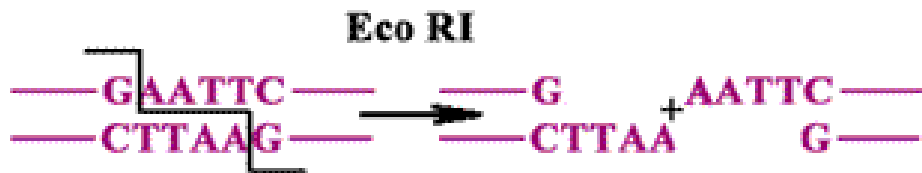
Геликазы



SSB – белки (single strand bind), или белки Альбертса



Топоизомеразы



Гиразы

Релаксазы

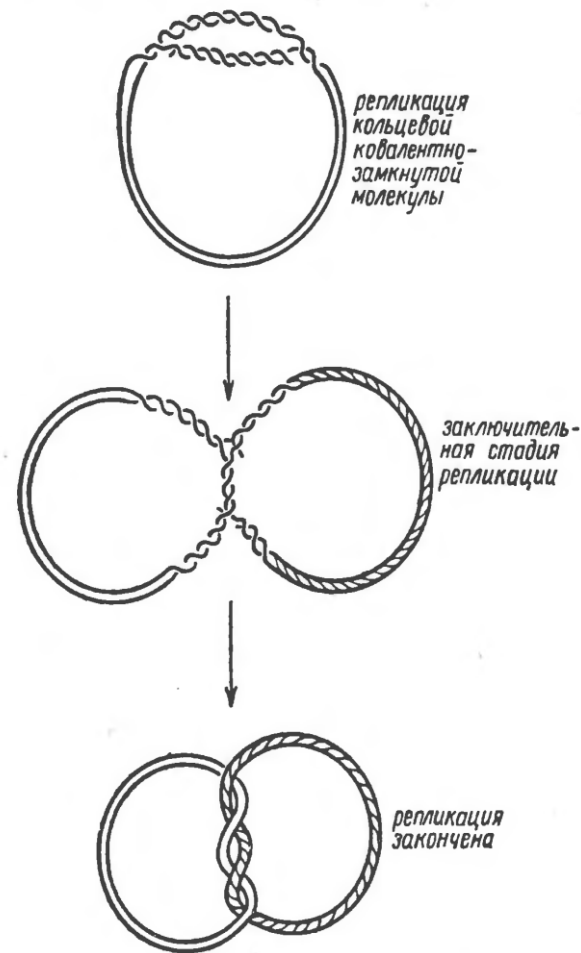


Рис. 35. Образование катенанов при репликации кольцевых ДНК

[Взаимозакрученность двух матричных цепей в кольцевых молекулах ДНК часто приводит к образованию в результате репликации зацепленных друг за друга дочерних молекул (катенанов). Расцепить катенаны способна топоизомераза второго типа (см. гл. 1)]

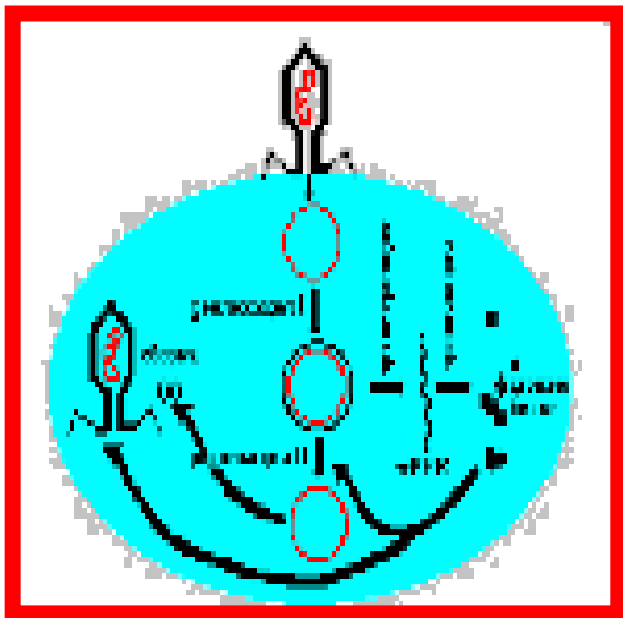
Катенаны

Праймаза

1974 г. – Рейджи Оказаки

Рифампицин - ингибитор бактериальной РНК-полимеразы (на стадии инициации).

Его добавление блокирует не только транскрипцию, но и репликацию. Значит в процессе репликации должна участвовать **РНК-полимераза**.



Праймосома



Схемы репликации ДНК *in vivo*

1960 г. Гипотетическая модель непрерывной антипараллельной репликации *in vivo* Корнберга

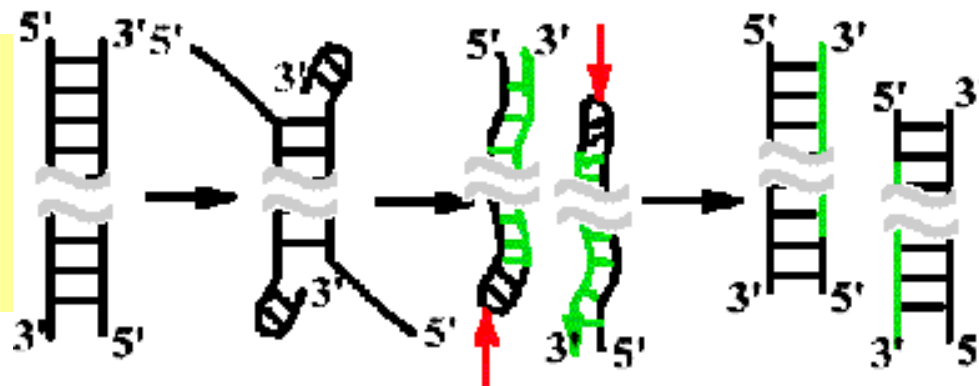


Схема непрерывной параллельной репликации Джона Кэрнса

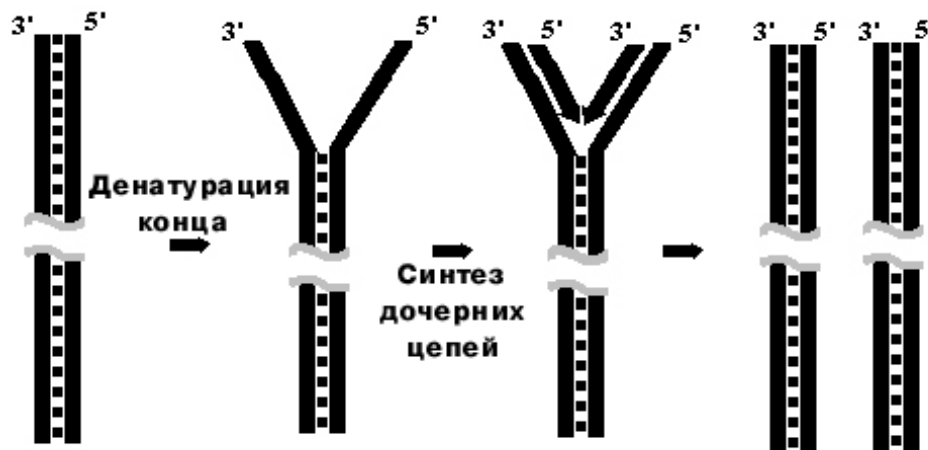
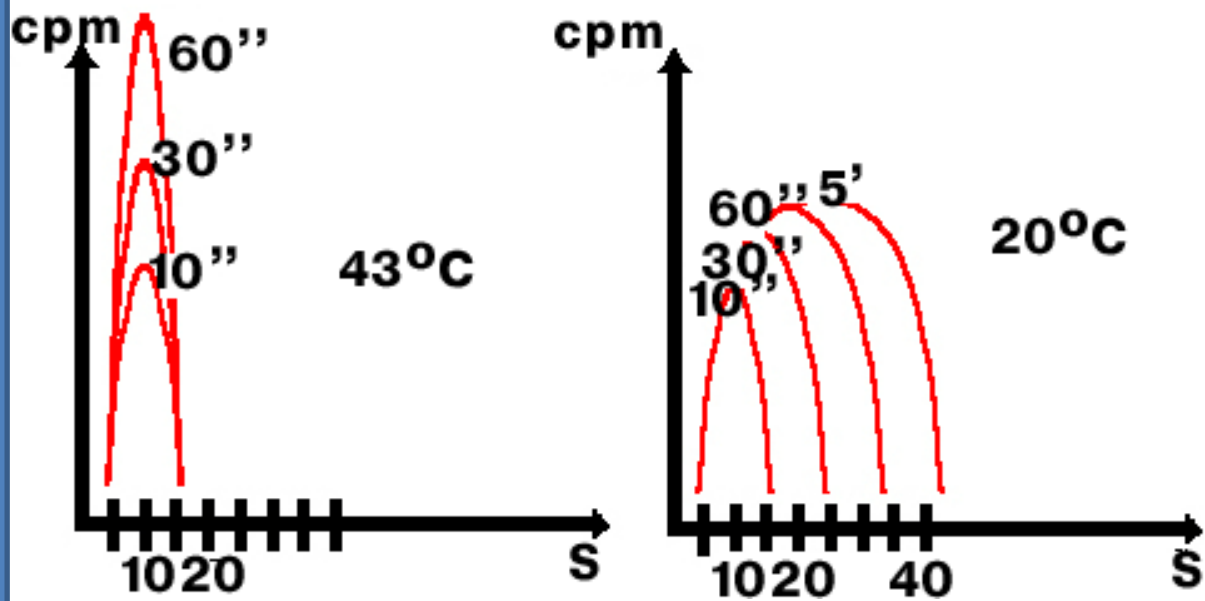


Схема прерывистой антипараллельной репликации Рейджи Оказаки (1968 г.)

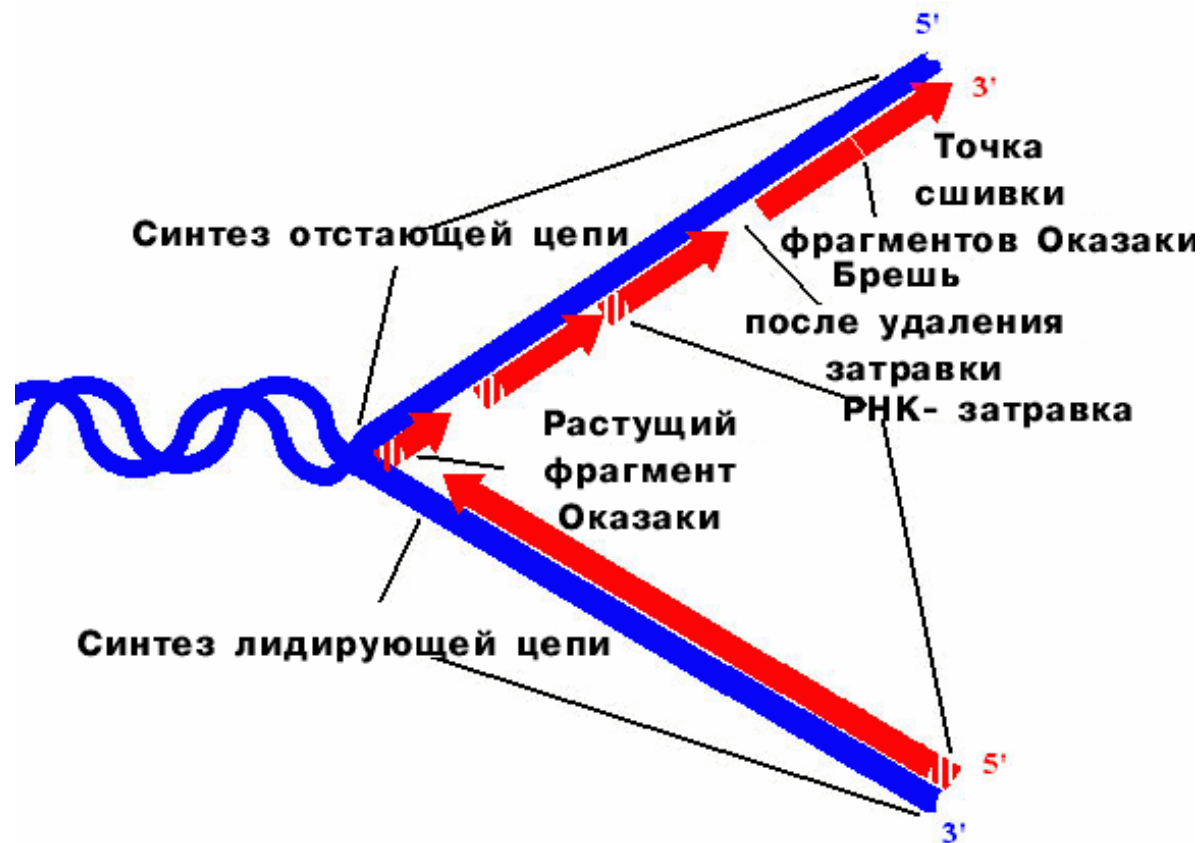


Оказаки специально для этого эксперимента разработал два новых метода исследования:

- 1. Метод импульсного мечения*
- 2. Центрифугирование в щелочном градиенте сахарозы*

Синтез ДНК идёт короткими фрагментами, которые сшиваются ферментом лигазой.

Репликация осуществляется неравномерно



У бактерий и высших организмов одна цепь образуется непрерывно (лидирующая), а другая – прерывисто (запаздывающая). Фрагменты Оказаки сшивает фермент ДНК-лигаза.

У фага Т7 обе цепи ДНК тоже реплицируются прерывисто

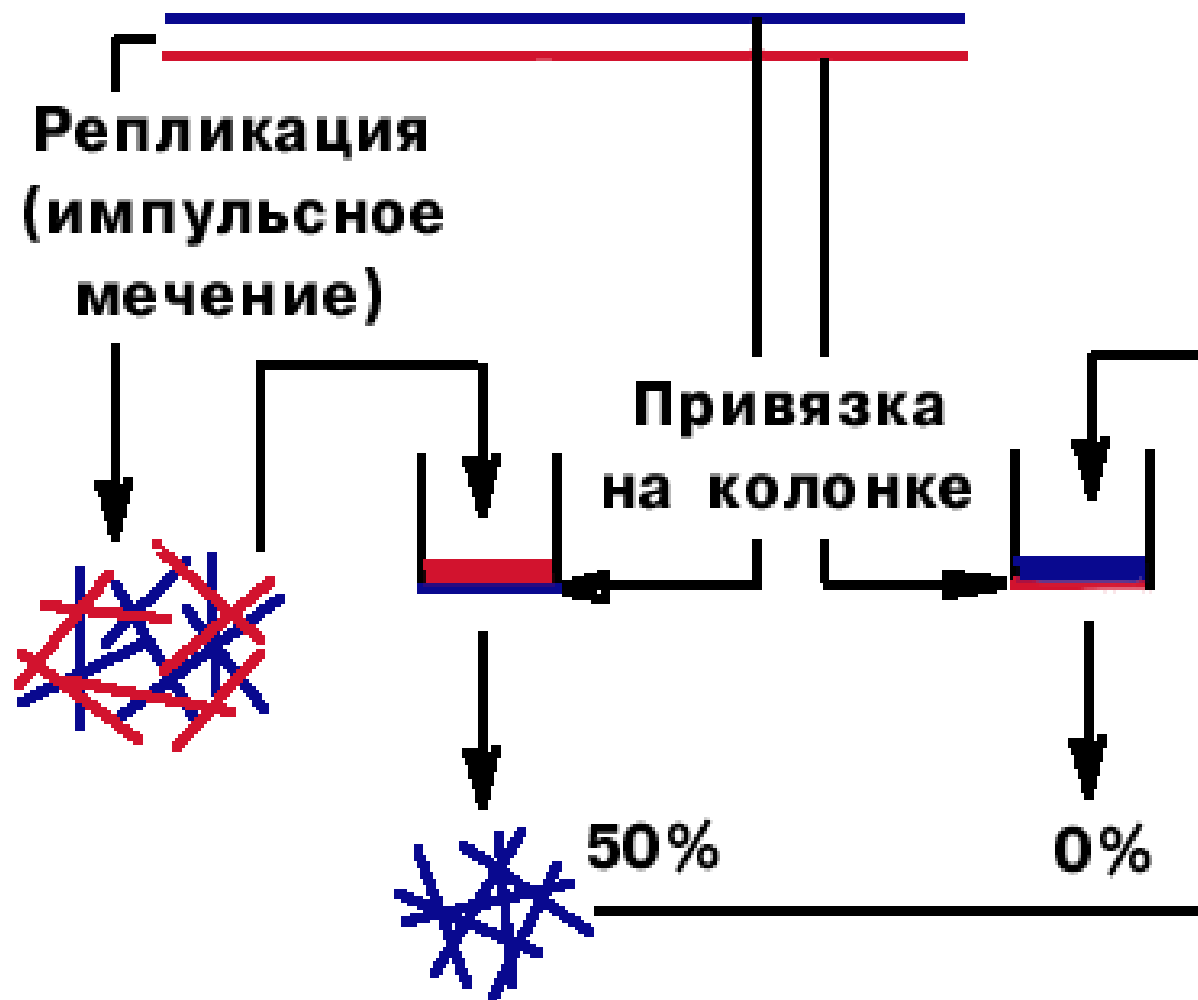
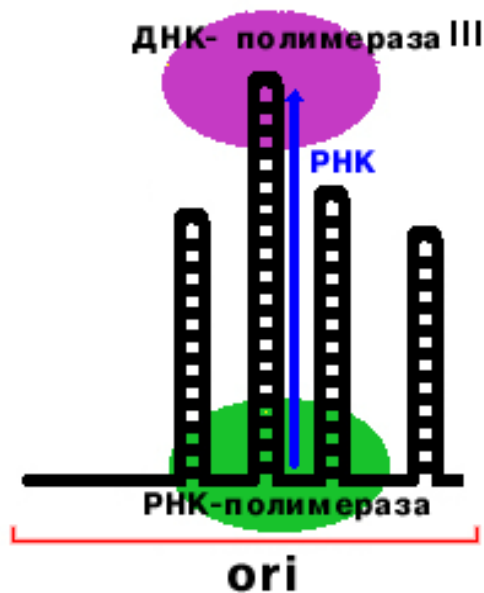


Схема репликации у *E. coli*

Молекулу ДНК, способную к автономной репликации, называют **репликоном** (Жакоб и др., 1963)

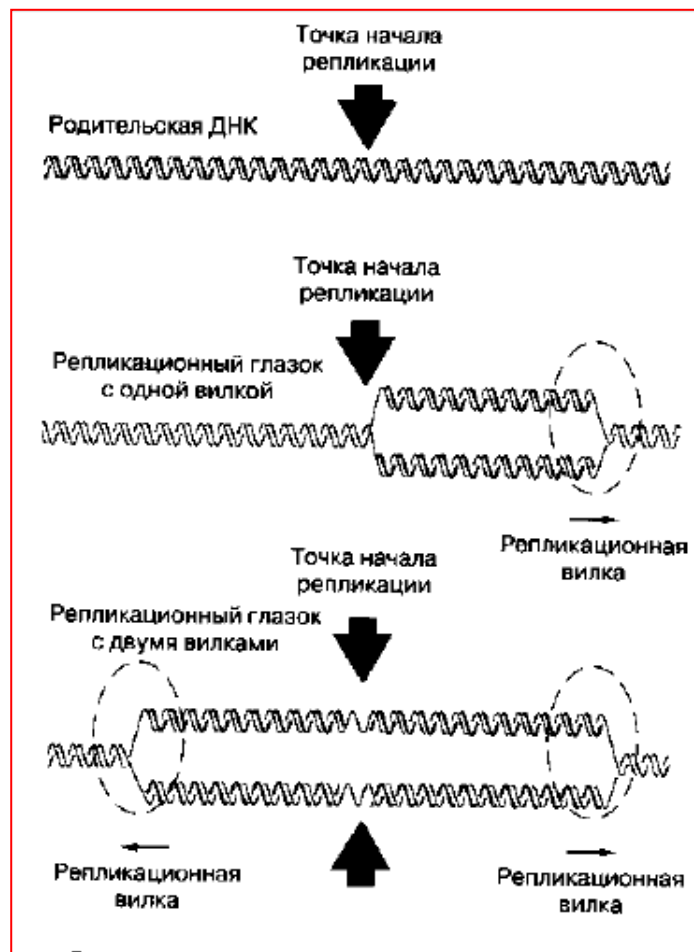
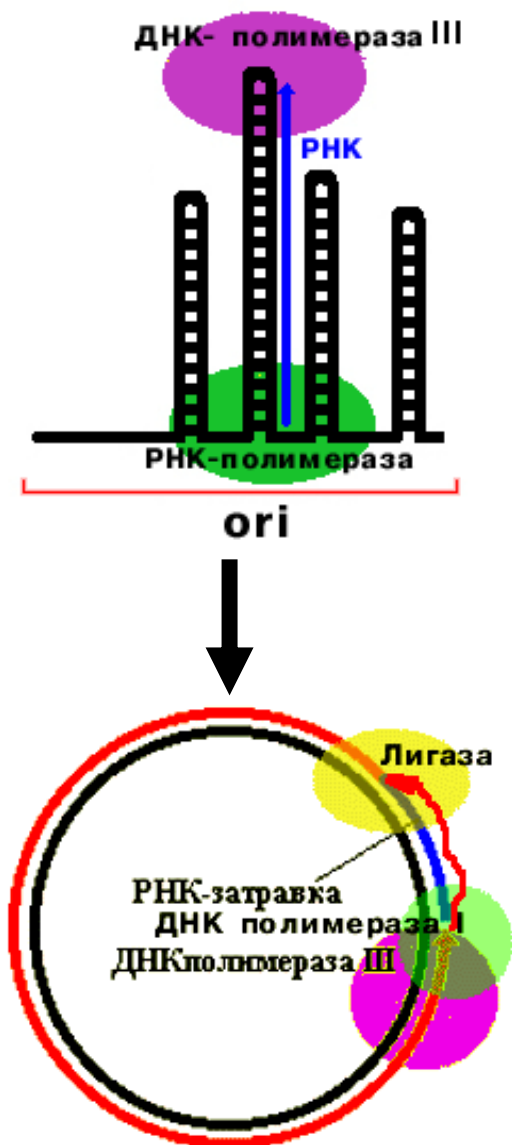
Участок репликона, в котором начинается репликация, называется **репликатором** или **областью начала репликации (replication origin)** (у *E. coli* – **oriC**).



OriC содержит сайты связывания белков **IHF** (integration host factor) и **FIS** (factor for inversion stimulation).

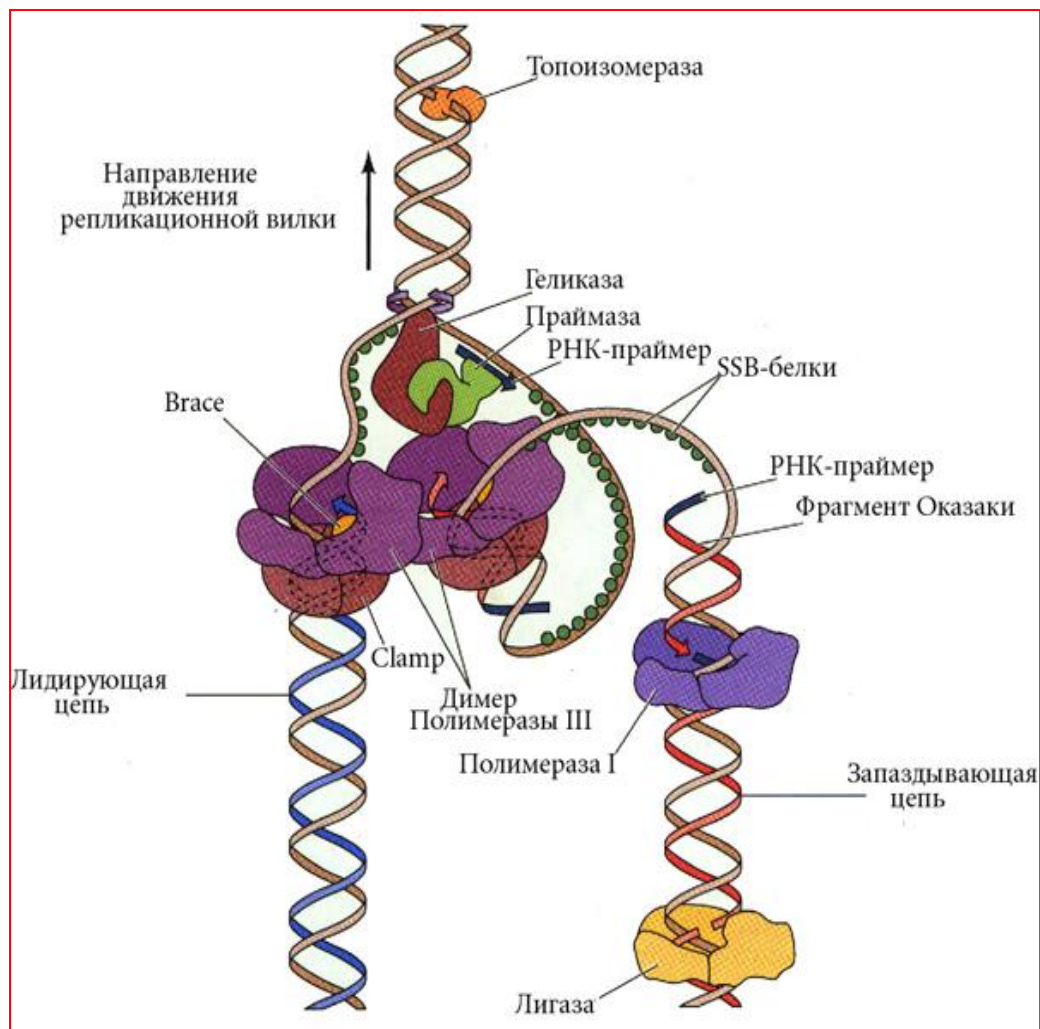
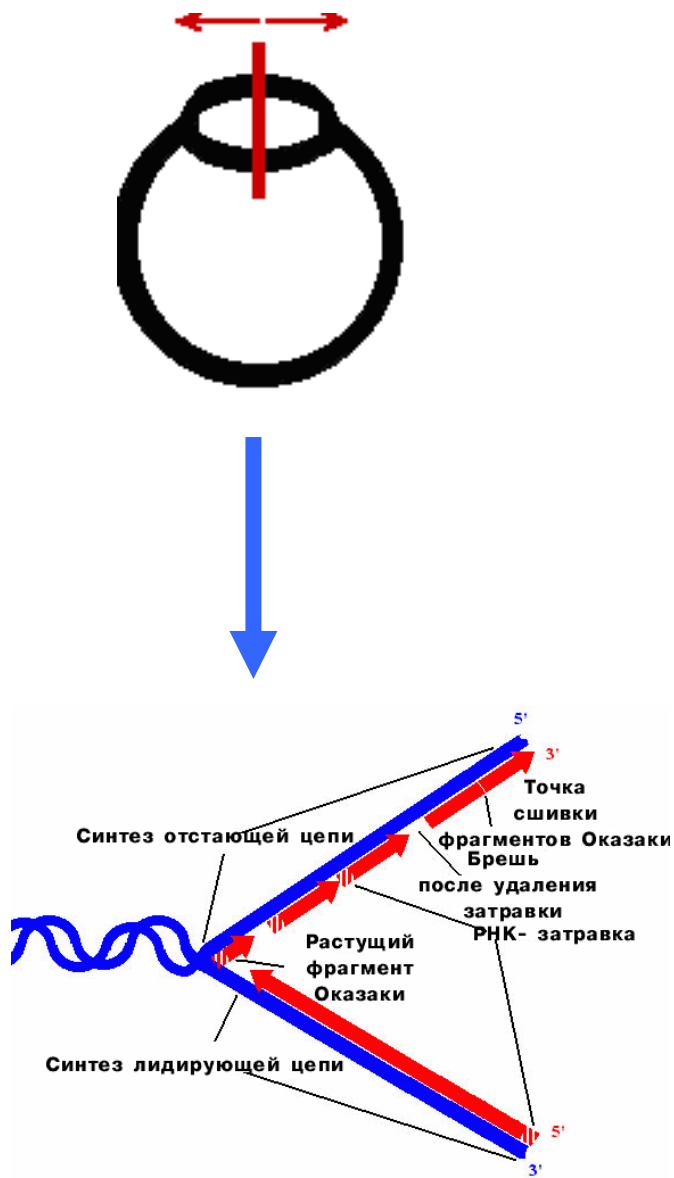
При инициации репликации с репликатором взаимодействует белок-инициатор (у *E. coli* – **DnaA**),.

Инициация репликации



Глазок и вилка репликации

Схема репликации у *E. coli*



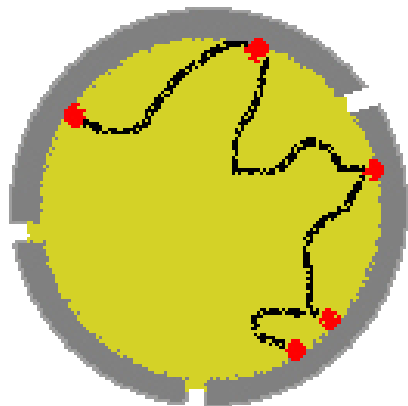
Модель "тромбона"

Схема репликации

Принципы репликации

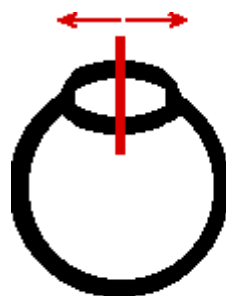
1. Комплементарность
2. Антипараллельность
3. Униполярность
4. Потребность в затравке
5. Прерывистость
6. Полуконсервативность

Особенности репликации ДНК эукариот



Каждая эукариотическая хромосома - полирепликон.

Формируется множество ori.



E. coli

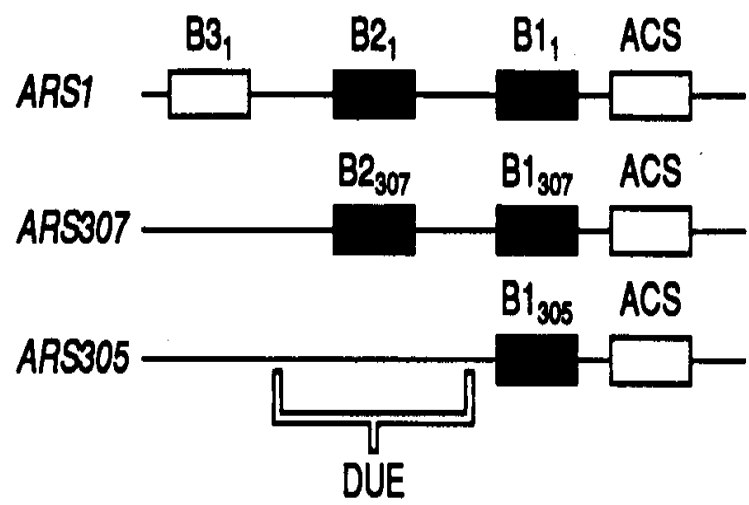


Эукариоты

Репликон - участок ДНК между двумя ori.

Организм	Количество репликонов	Средний размер репликона, тыс.п.н.	Скорость движения репликативной вилки п.н./мин.
E.coli	1	4200	50000
Дрожжи	500	40	3600
Дрозофила	3500	40	2600
Ксенопус (лягушка)	15000	200	500
Мышь	25000	150	2200
Бобы	35000	300	2200

Репликатор (origin) эукариот - ARS (autonomously replicating sequence)



В инициации репликации у эукариот участвует **ORC (origin-recognition complex)**.

Структура репликаторов дрожжей *S. cerevisiae*. (Патрушев, 2000).

ACS – каноническая последовательность ARS, DUE – ДНК-расплетающий элемент.

Размер фрагментов Оказаки у эукариот составляет 200-400 нукл).

Скорость работы ДНК-полимераз эукариот на порядок ниже, чем у прокариот.

Праймаза является субъединицей ДНК-полимеразы, а не отдельным ферментом

У эукариот синтез ведущей и отстающей цепей ДНК осуществляют разные ДНК-полимеразы (α и δ соответственно).

Организм	Количество репликонов	Средний размер репликона, тыс.п.н.	Скорость движения репликативной вилки п.н./мин.
E.coli	1	4200	50000
Дрожжи	500	40	3600
Дрозофила	3500	40	2600
Ксенопус (лягушка)	15000	200	500
Мышь	25000	150	2200
Бобы	35000	300	2200

У эукариот молекулы ДНК линейные

Фотография эукариотич хромосомы с указанием теломер.

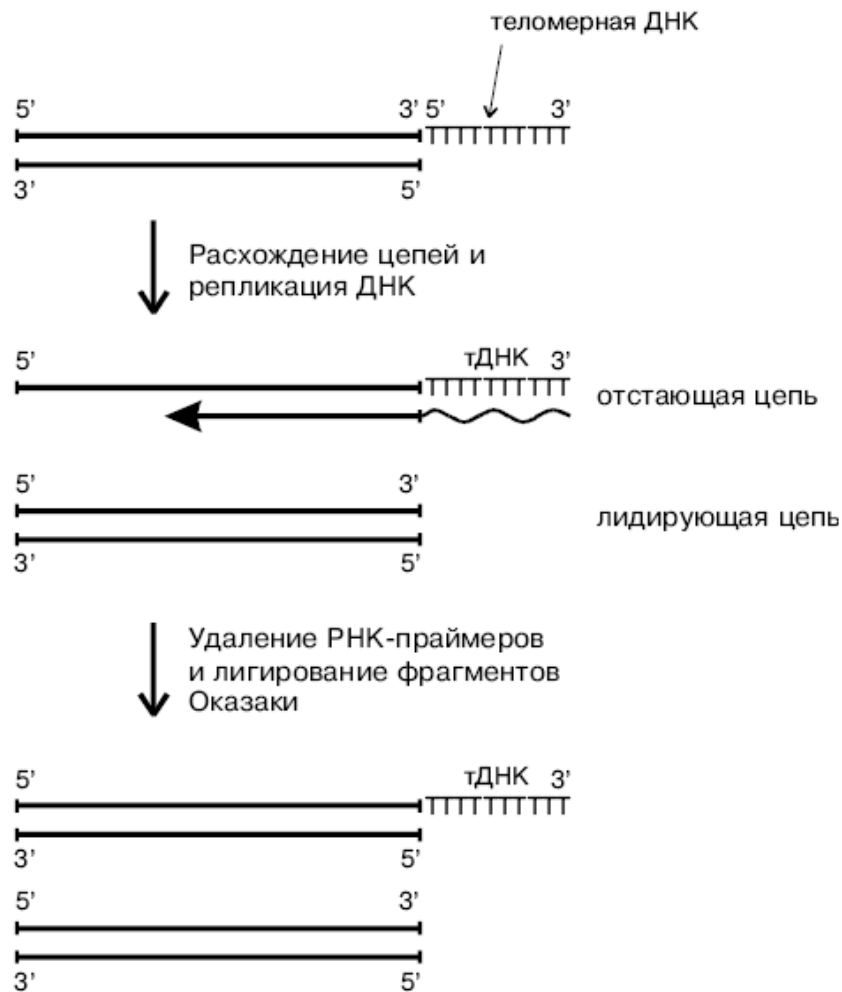


Схема репликации концевой участка отстающей цепи ДНК

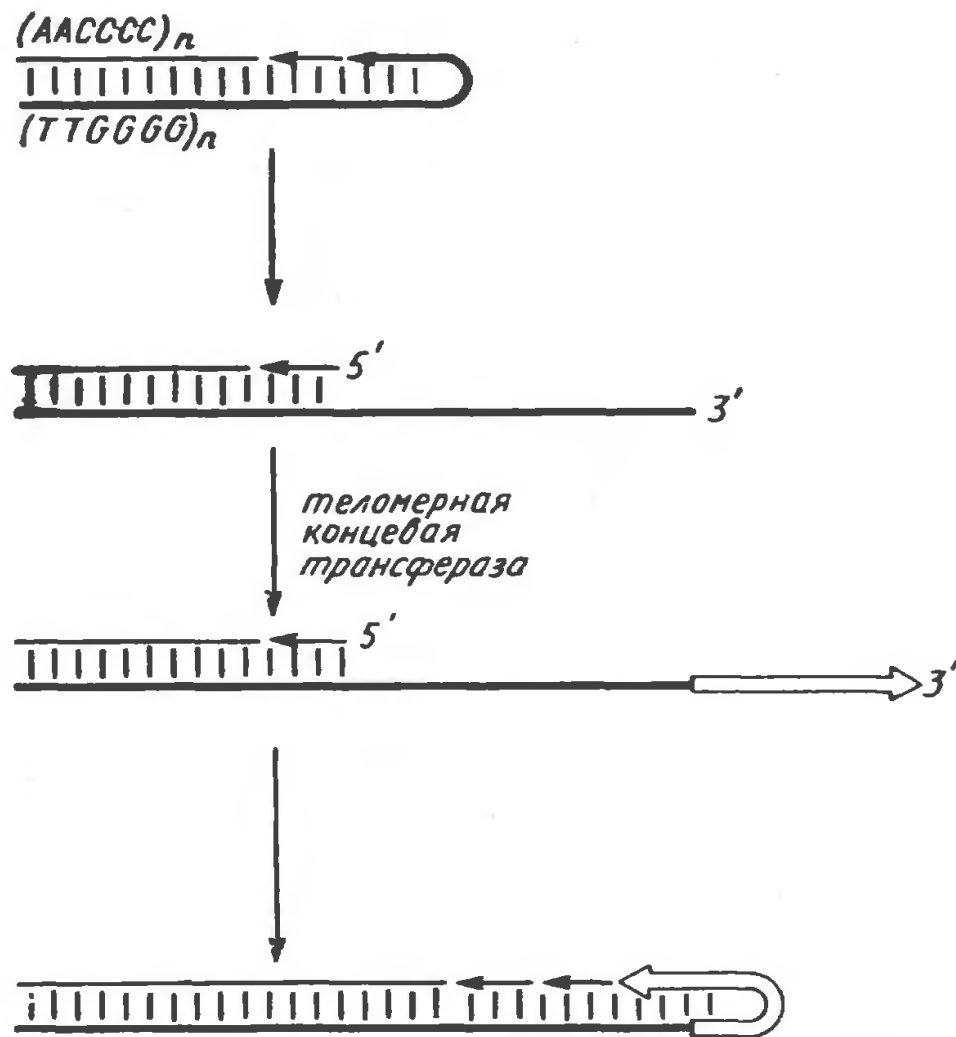


Рис. 42. Модель репликации теломер (на примере тетрахимены)

(Цепь, состоящая из повторенных последовательностей $5'TTGGGG3'$, замкнута сама на себя за счет образования неканонических G·G-пар. После того как она разворачивается, ее удлиняет терминальная трансфераза. Удлинившаяся матрица позволяет праймазе и полимеразе удлинить комплементарную цепь; оставшийся одноцепочечным 3'-конец вновь загибается сам на себя)

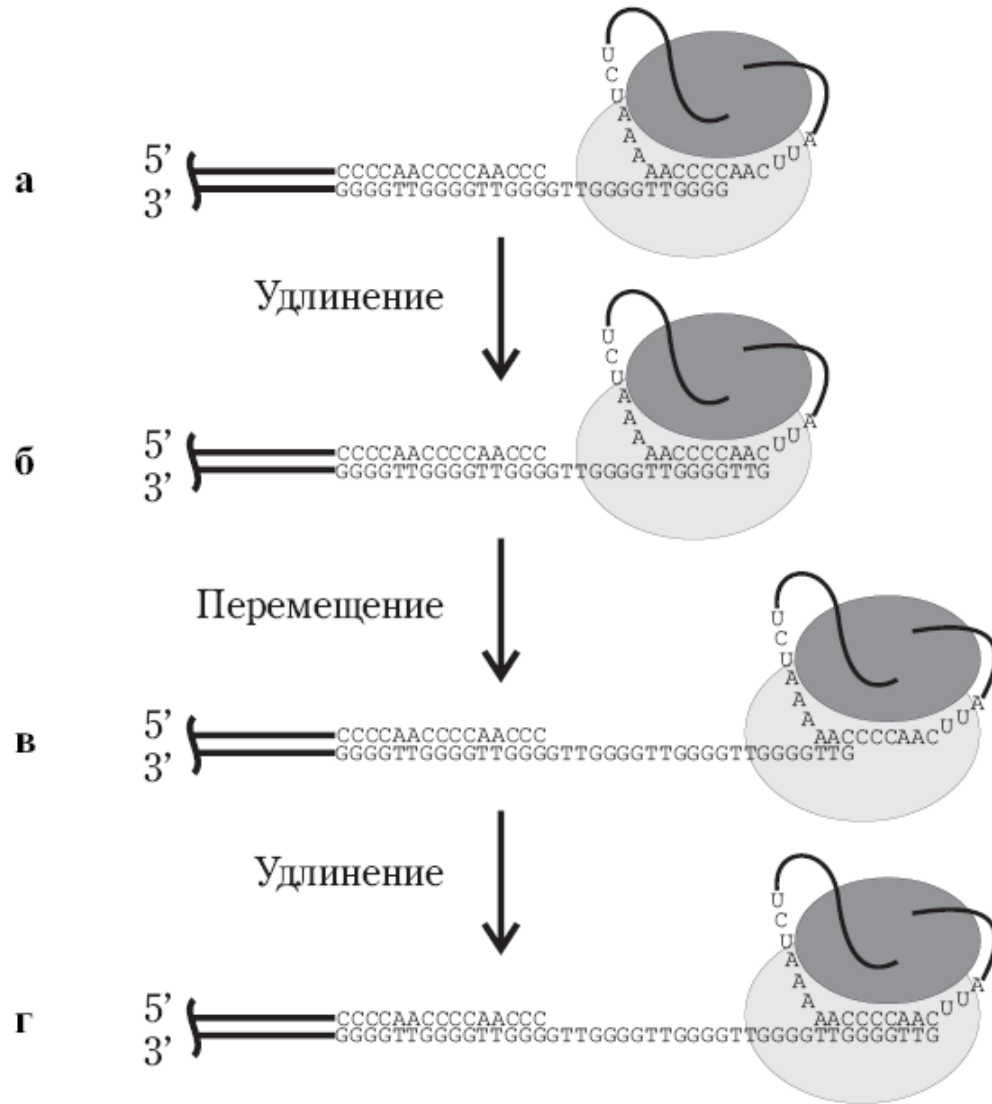
(Спирин, 1990)

Теломеры эукариот

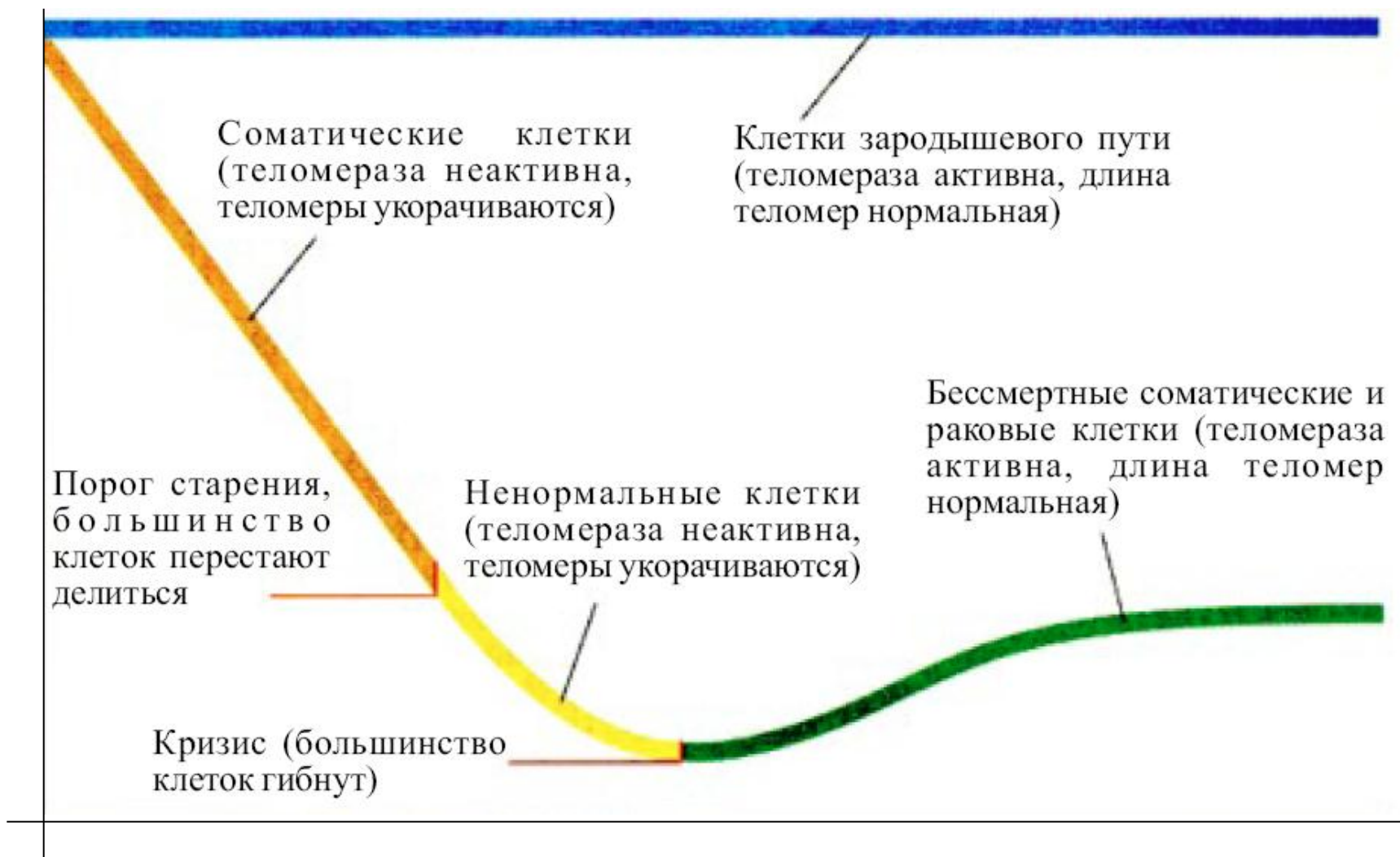
Табл. 9.4. Теломерные повторы в хромосомах некоторых видов (частично из: Blackburn, Greider, 1995, p. 12-13)

Вид	Последовательность нуклеотидов (5'-3')
Простейшие <i>Euplotes</i>	TTTTGGGG
Слизневые грибы <i>Phusarum</i>	TTTAGGG
Жгутиковые <i>Trypanosoma</i>	TTAGGG
Споровики <i>Plasmodium</i>	TT(T/C)AGGG
Грибы <i>Neurospora</i>	TTAGGG
<i>Candida maltosa</i>	ACGGATGCAGACTCGCTTGGTGT
Нематоды <i>Ascaris</i>	TTAGGC
Насекомые <i>Bombyx mori</i>	TTAGG
Водоросли <i>Chlamidomonas</i>	TTTTAGGG
Высшие растения <i>Arabidopsis</i>	TTTAGGG
Позвоночные животные <i>Homo sapiens</i>	TTAGGG

Удлинение теломерного повтора ферментом теломеразой



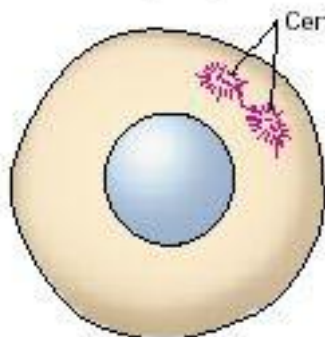
Изменение длины теломер у человека (Из: Greider, Blackburn, 1996)



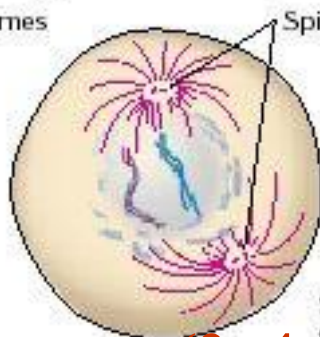
По оси абсцисс - число клеточных делений, по оси ординат - длина теломеры

Этапы клеточного цикла

Интерфаза (G_2)

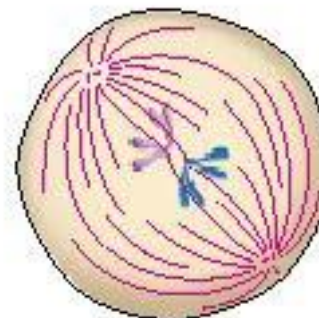
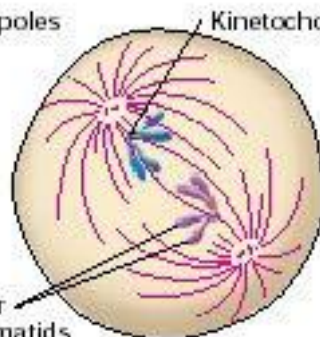


Профаза

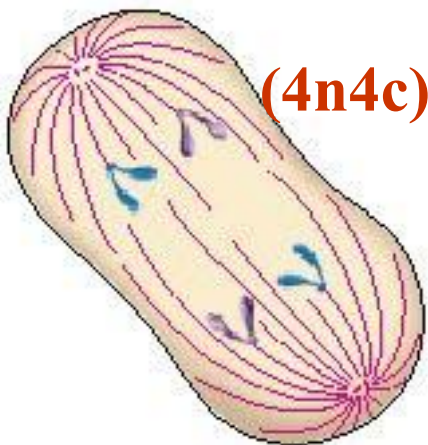


$(2n4c)$

Метафаза

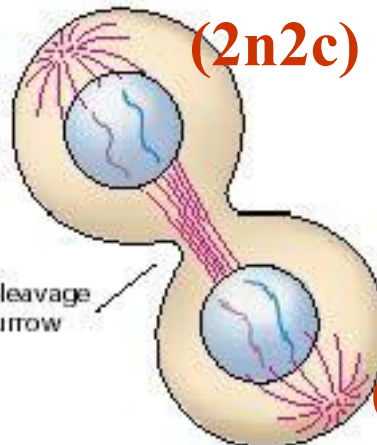


Анафаза



$(4n4c)$

Телофаза

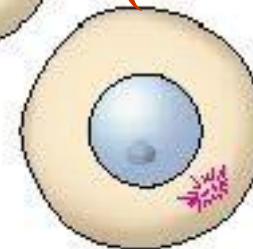


$(2n2c)$

Интерфаза (G_2)

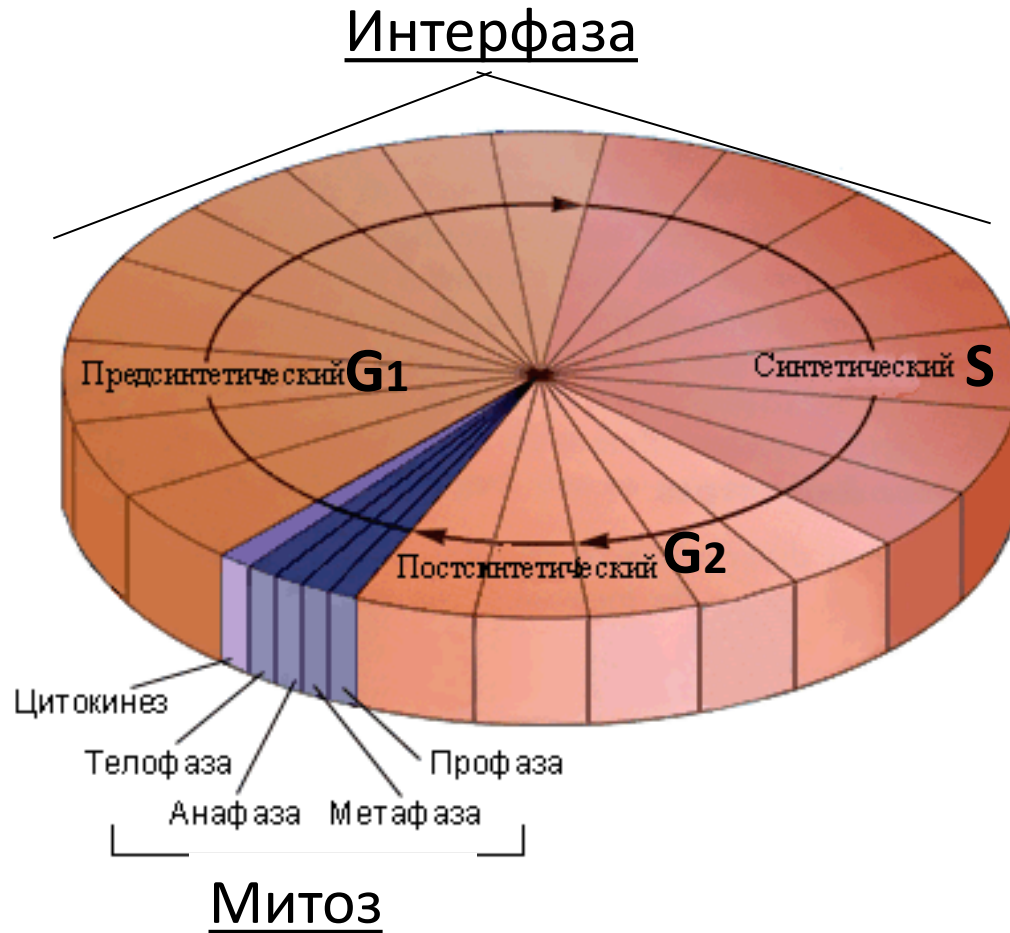


$(2n2c)$



$(2n2c)$

Этапы клеточного цикла



Регуляция клеточного цикла

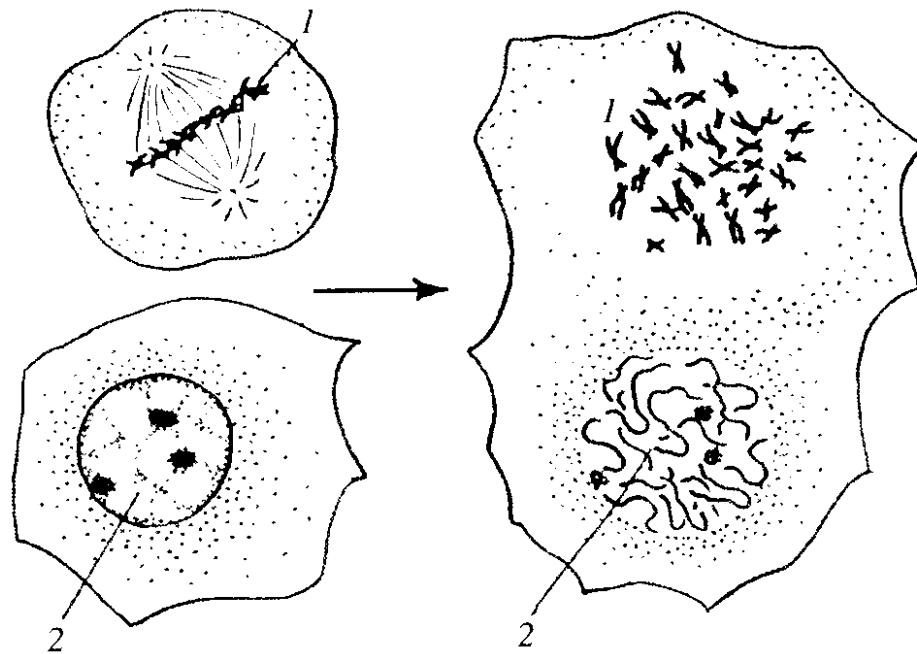


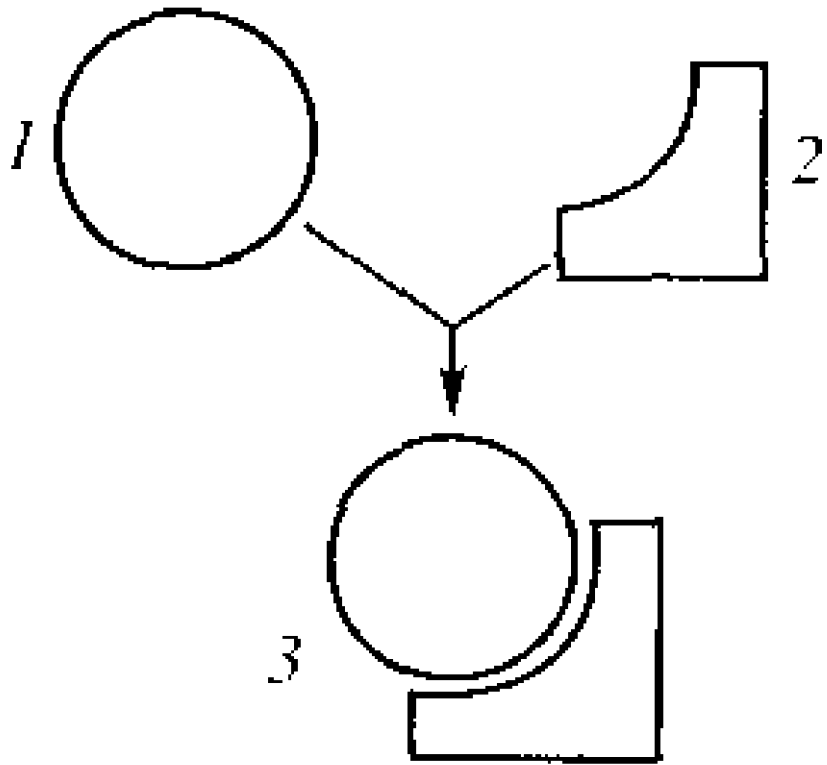
Рис. 114. Преждевременная конденсация хромосом и растворение ядерной оболочки в гетерокарионе

1 – митотические хромосомы донорской клетки; 2 – ядро клетки-реципиента

(Ченцов, 2005)

ПКХ (РСС) — преждевременно конденсированные хромосомы (preliminary condensed chromosomes)

ФСМ (MPF) — факторы, стимулирующие митоз (mitosis promoting factors)

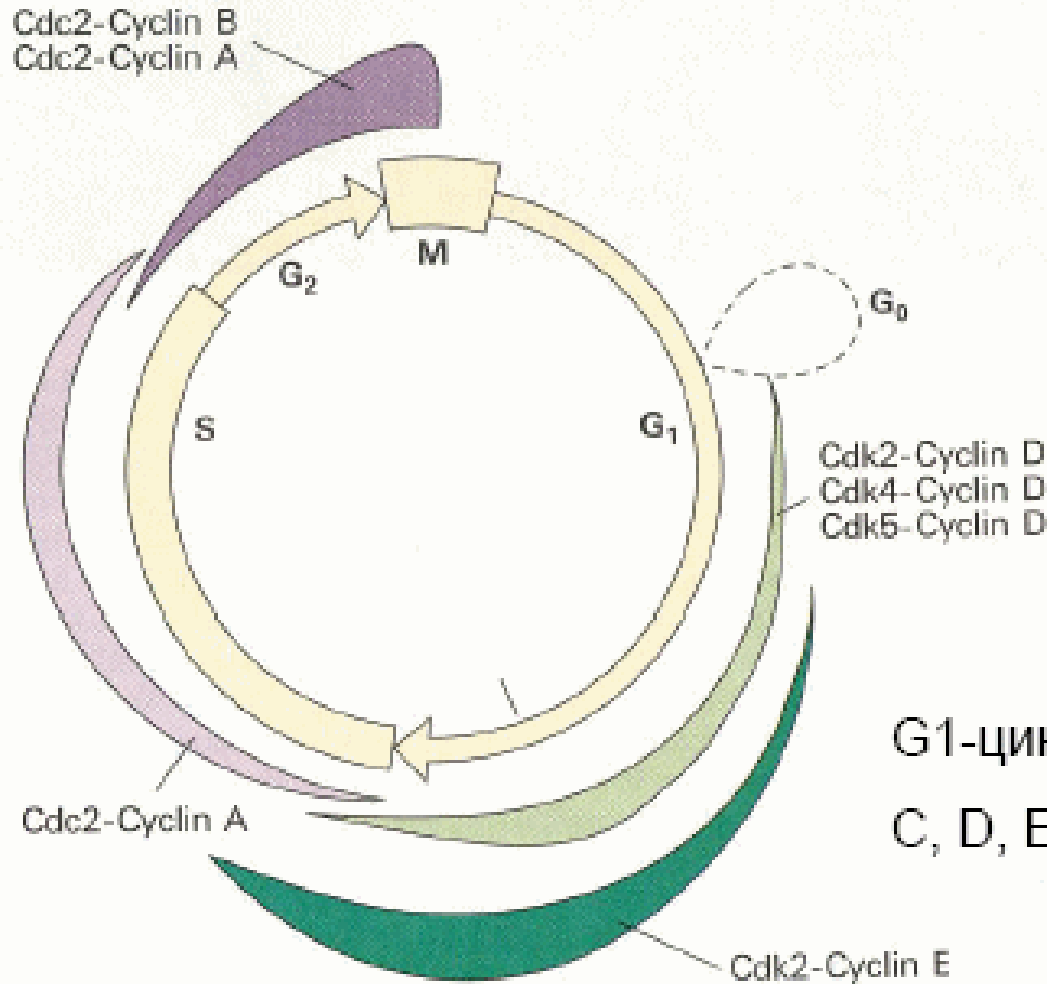


Клеточный цикл контролируется изменением активности Cdk, которая регулируется периодическим образованием и распадом их регуляторных субъединиц - циклинов.

Структура фактора, стимулирующего митоз (MPF)

- 1 – циклин (Cyclin)
- 2 – зависимая от циклина неактивная протеинкиназа (cyclin dependent kinase – Cdk)
- 3 – активный MPF

М-циклины: А, В

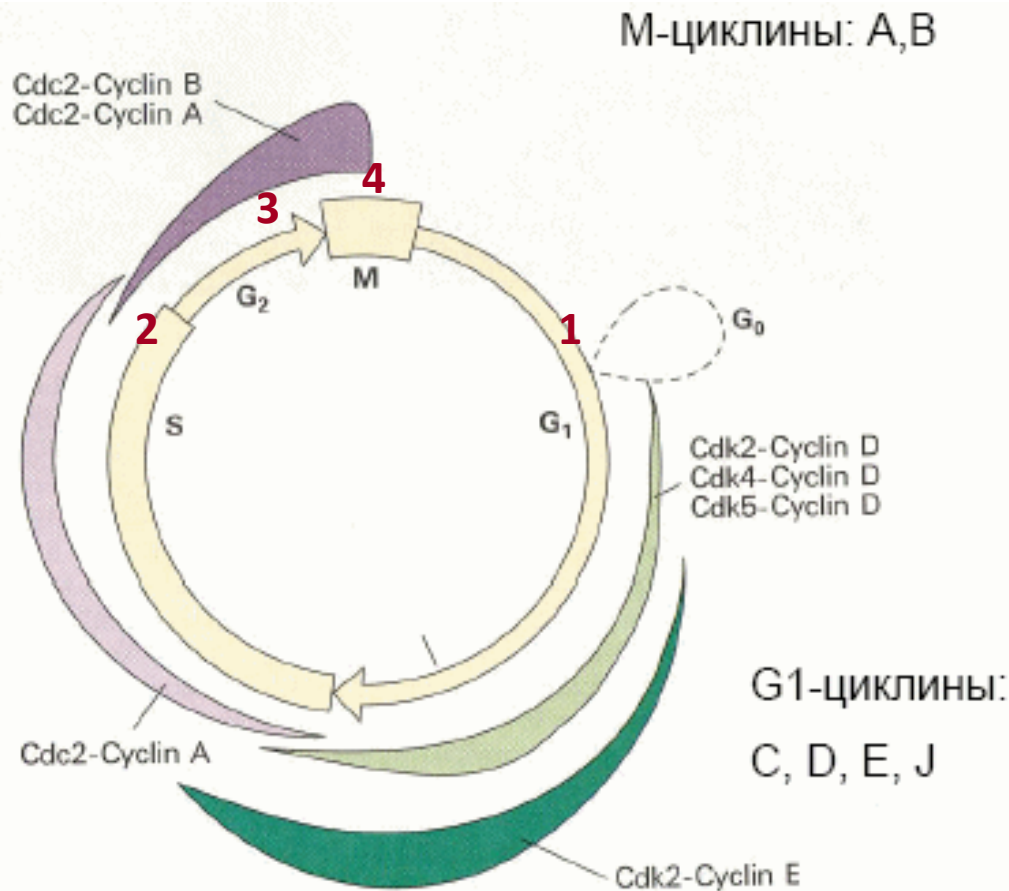


Cdk-циклиновые комплексы являются положительными регуляторами клеточного цикла.

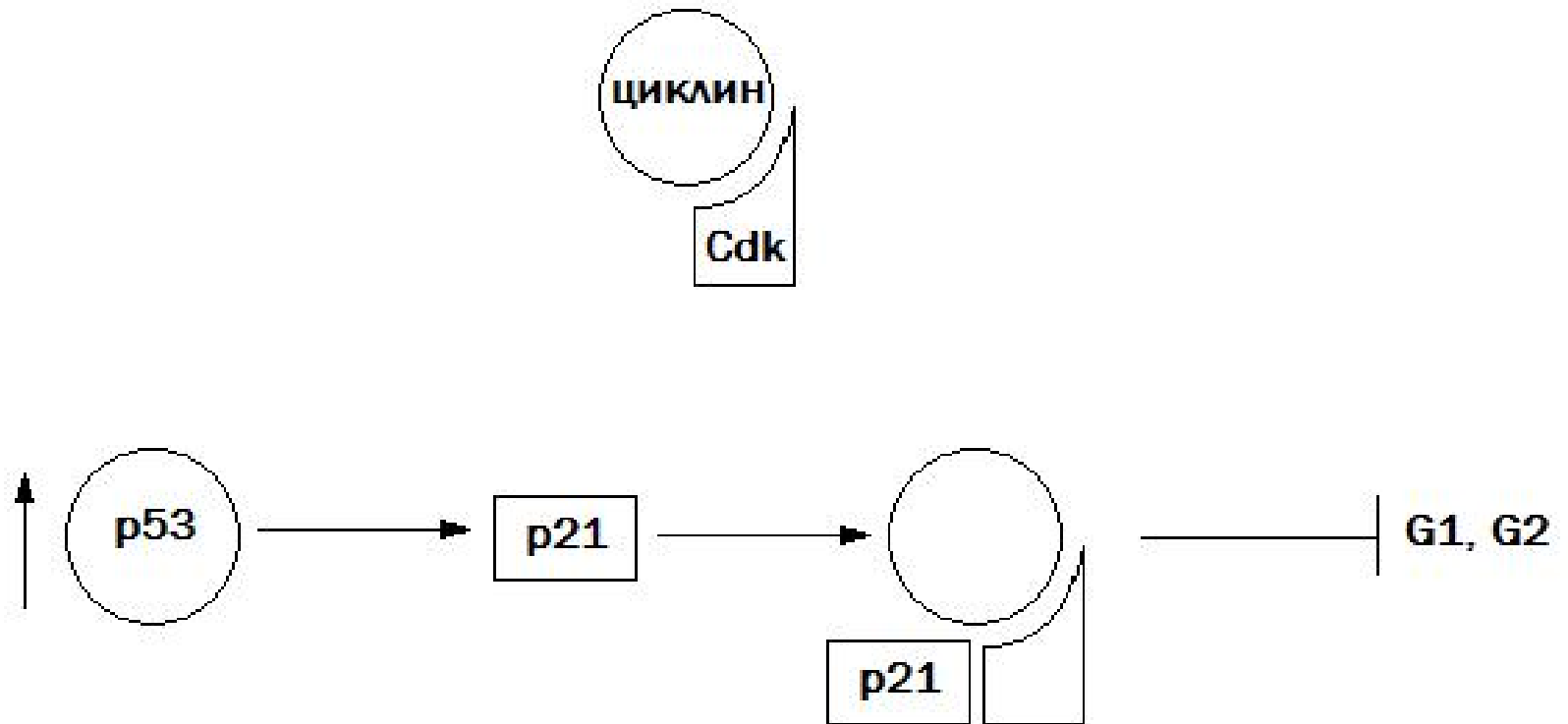
G1-циклины:
C, D, E, J

К отрицательным регуляторам клеточного цикла относятся супрессоры опухолей белки p53 и pRB, сходные по структуре белки p107 и p130, а также ингибиторы циклин-киназных комплексов p15, p16, p21.

Контрольные точки клеточного цикла



1. Точка выхода из G1-фазы, называемая Старт - у млекопитающих и точкой рестрикции у дрожжей.
2. Точка S – проверка точности репликации.
3. Точка G2/М-перехода – проверка завершения репликации.
4. Переход от метафазы к анафазе митоза.



Остановка клеточного цикла в результате нарушения синтеза ДНК или её повреждения

