

Курс молекулярной биологии

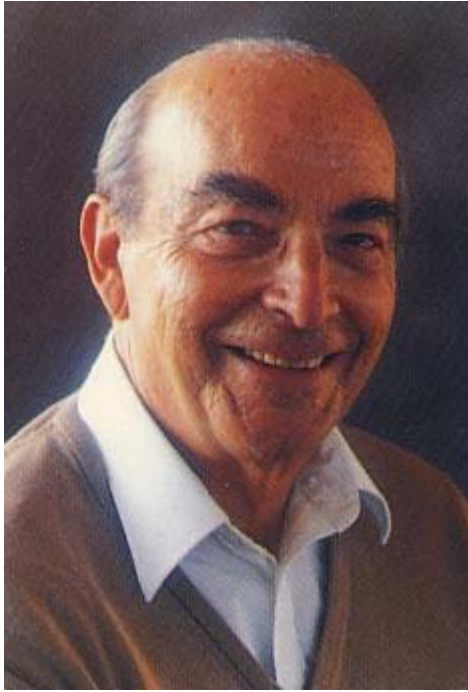
Репликация ДНК

**Захарова Ирина Борисовна,
к.б.н., доцент**

Репликация ДНК

Репликация ДНК — процесс синтеза дочерней молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты на матрице родительской молекулы ДНК.

«Каждая цепь двуцепочечной ДНК служит матрицей при синтезе комплементарной цепи и в результате образуются две пары цепей, в каждой из которых только одна является родительской» – Уотсон и Крик.



Артур Корнберг
Arthur Kornberg

- В 1956 г. Артур Корнберг выделил из клеток бактерии *E. coli* фермент *ДНК-полимеразу (ДНК-полимераза I)*
Этот фермент осуществлял синтез ДНК при наличии в реакционной смеси всех четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов: АТФ, ГТФ, ТТФ, ЦТФ и молекулы ДНК
- В 1959 г. получил нобелевскую премию по физиологии и медицине
«За открытие механизмов биологического синтеза рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислот».

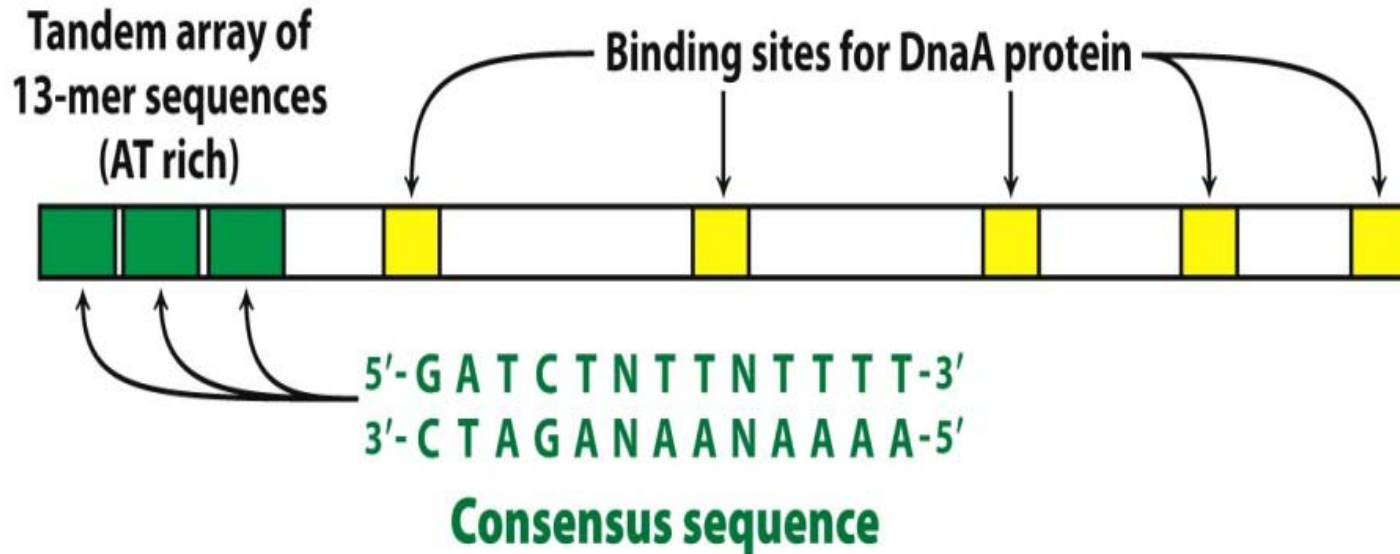
Принципы репликации

- *Комплементарность (Уотсон-Криковские пары)*
- *Антипараллельность (две цепи ДНК)*
- *Униполярность (5'→3')*
- *Потребность в затравке (РНК-праймер)*
- *Прерывистость (фрагменты Оказаки)*
- *Полуконсервативность (одна из цепей матричная, вторая - новая)*

Основные этапы репликации

1. Инициация
2. Элонгация
3. Терминация

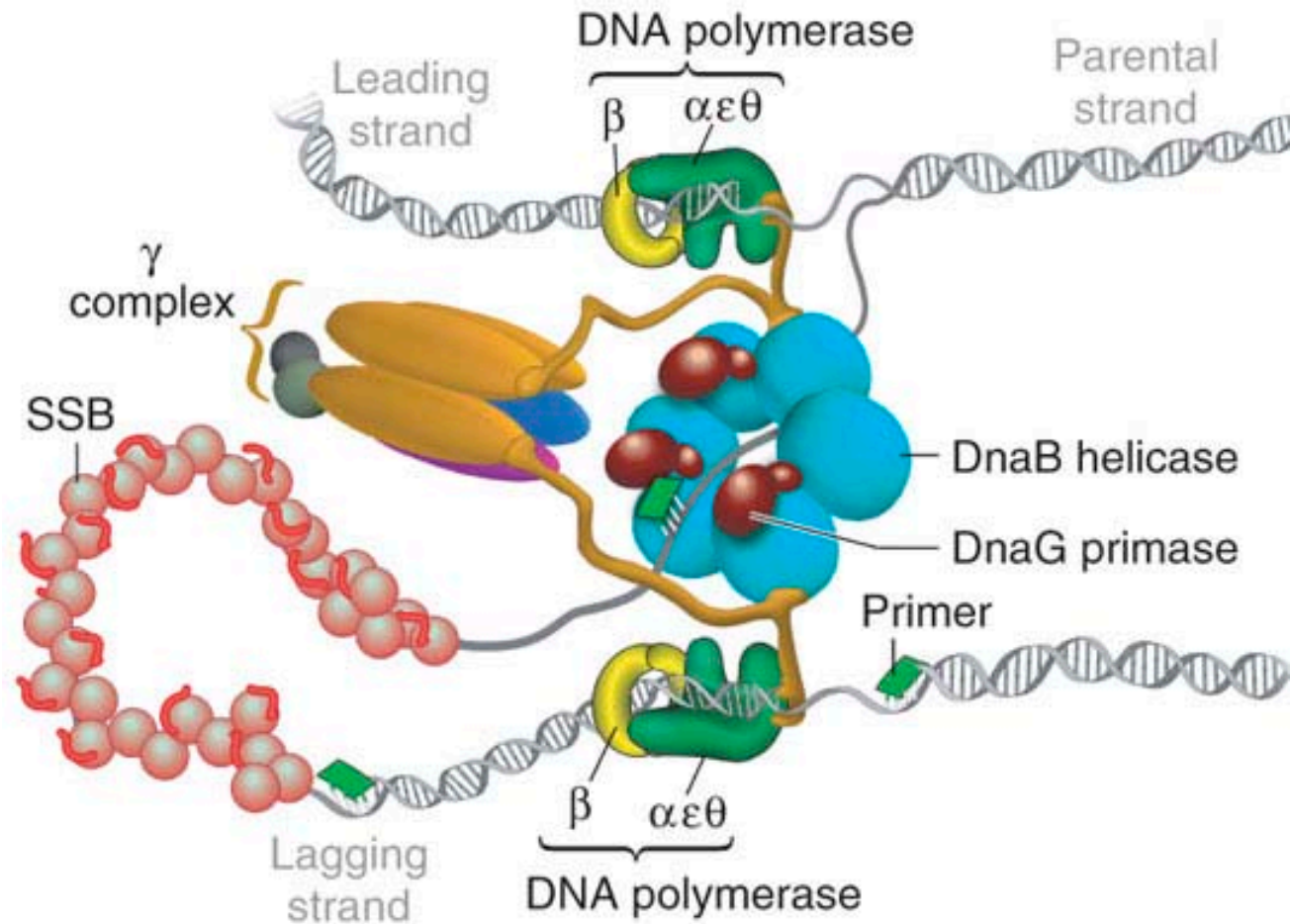
Инициация репликации



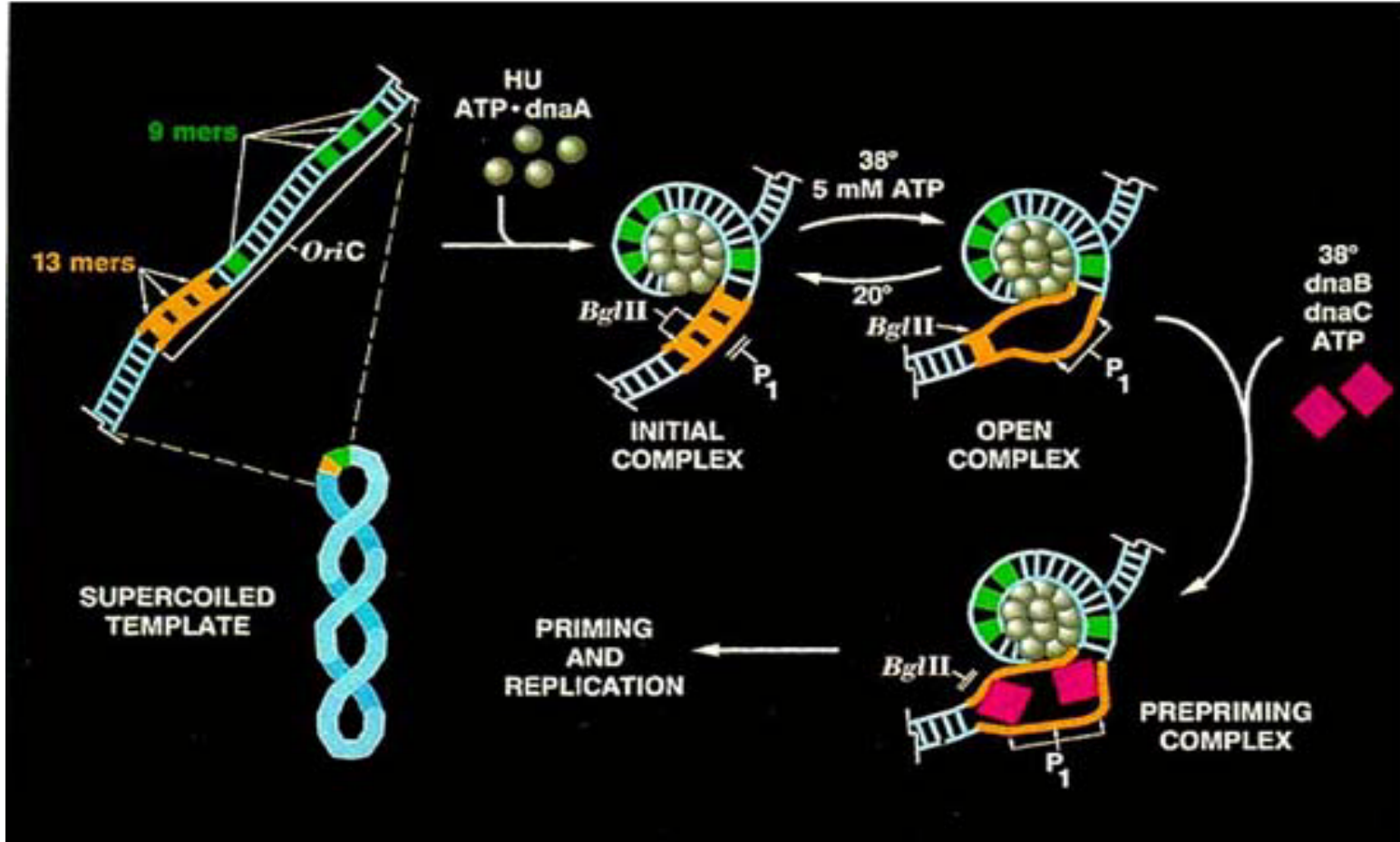
- Точка (область) начала репликации ДНК *E. coli* – **oriC** - 245 пар оснований
- Локус *ori* содержит последовательности, высококонсервативные для всех точек начала репликации у бактерий

Белки, необходимые для инициации репликации хромосомы *E. coli* в локусе *oriC*

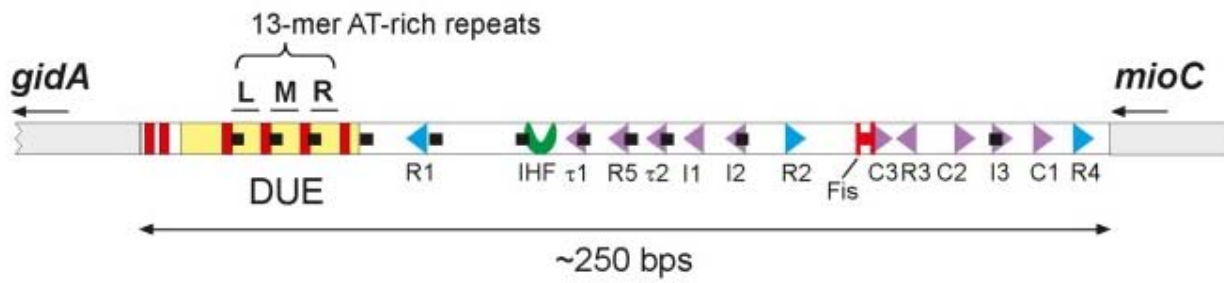
- DnaA
- DnaB (геликаза)
- DnaC
- SSB-белки
- DnaG (праймаза)
- ДНК-гираза (ДНК-топоизомераза II)



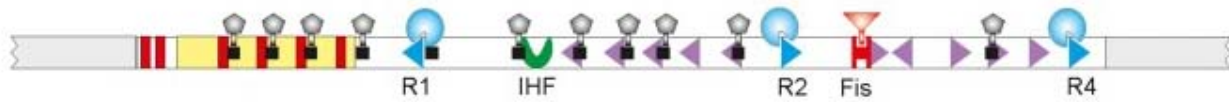
Белок DnaA



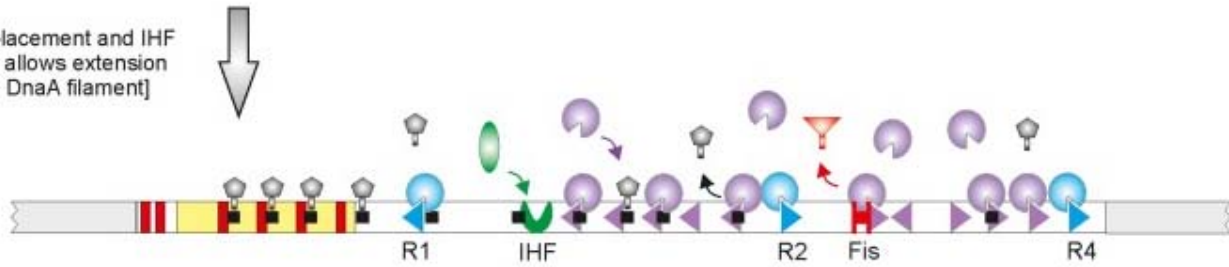
Узнает специфические последовательности *oriC*
Открывает дуплекс ДНК в локусе *ori*



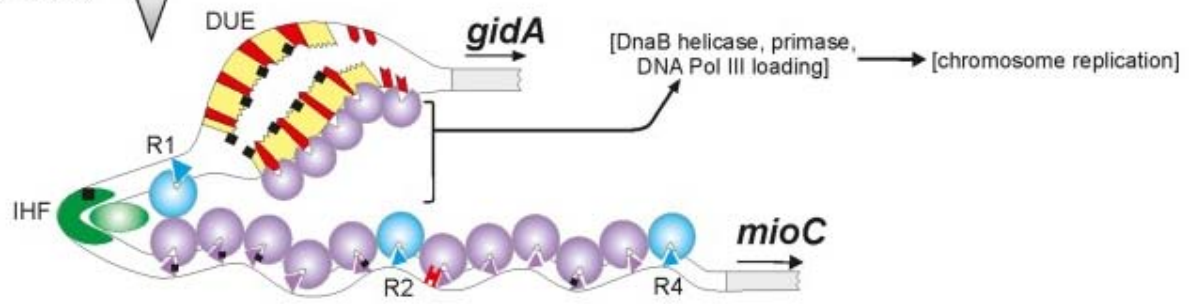
[SeqA and Fis prevent extension of the DnaA filament]



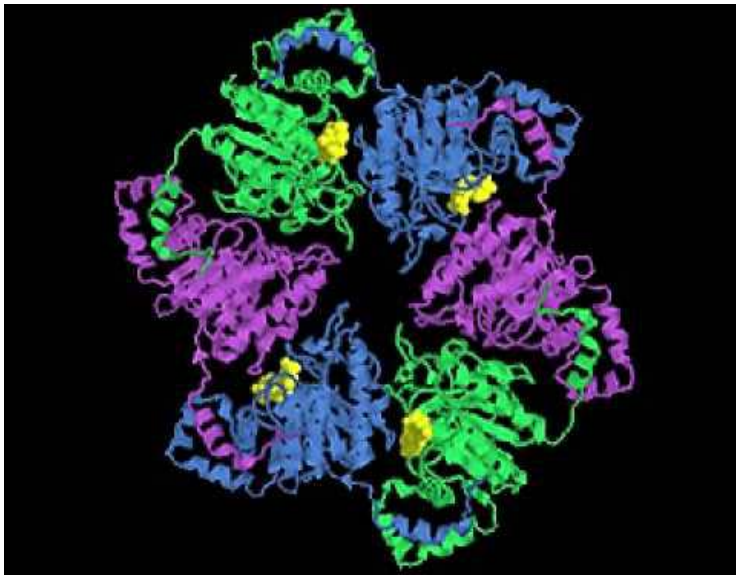
[Fis displacement and IHF binding allows extension of the DnaA filament]



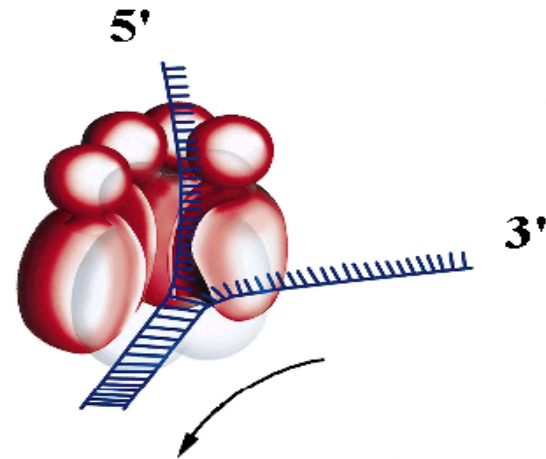
[final assembly of DnaA filament leads to DUE unwinding]



Инициация репликации

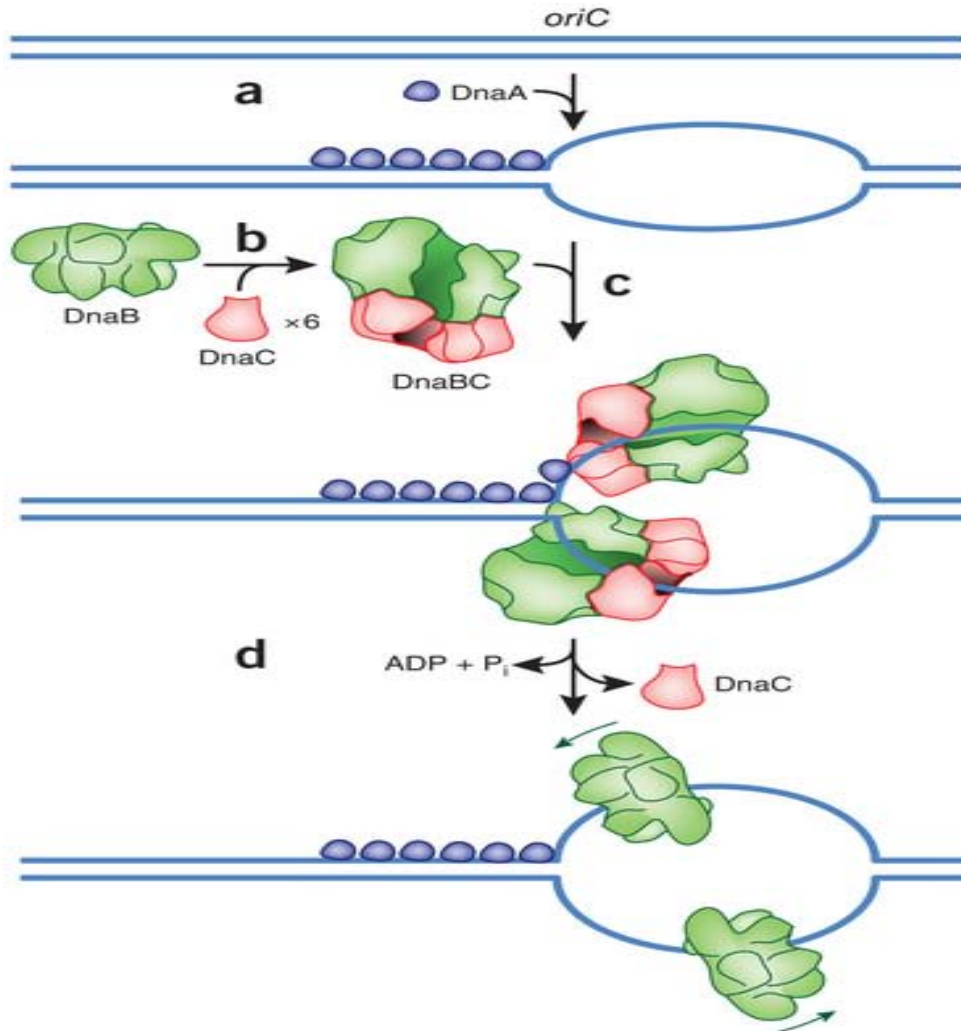


ДНК-геликазы, участвующие в репликации ДНК, являются гексамерными ферментами.



Белок **DnaB (геликаза)** - Разделяет цепи ДНК

Инициация репликации



Белок **DnaC**
Участвует в
связывании
DnaB в точке
начала
репликации

Белки SSB

SSB (single stranded binding) proteins – белки связывающиеся с одноцепочечной ДНК.

Функции:

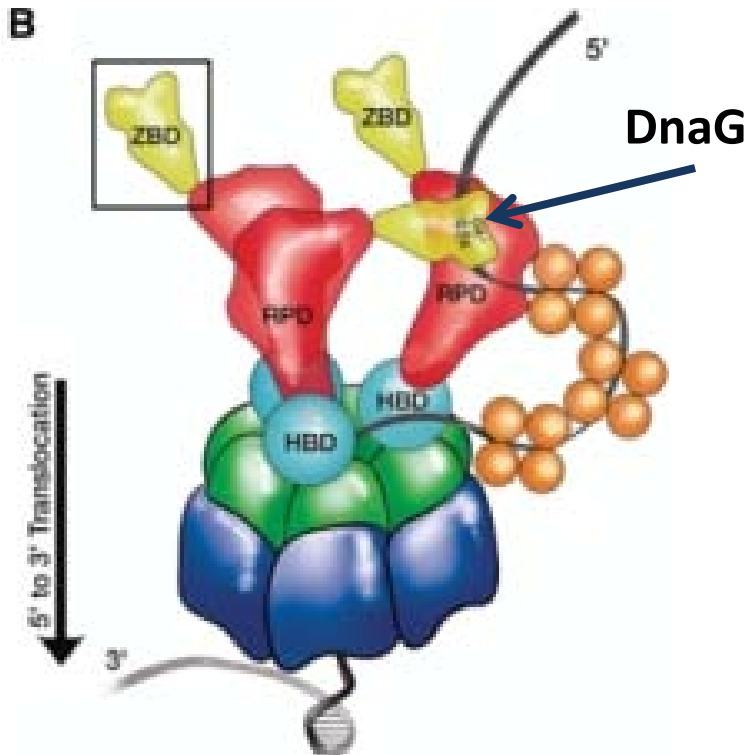
- Стабилизация онДНК
- Защита онДНК от деградации “однонитевыми” нуклеазами
- Стимуляция синтеза ДНК. В присутствии белков SSB скорость и точность синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразами, могут возрастать в десятки раз
- Некоторые белки класса SSB стимулируют гомологическую рекомбинацию



Белки SSB функционируют в стехиометрических, а не каталитических количествах по отношению к доступной онДНК и не обладают ферментативной активностью

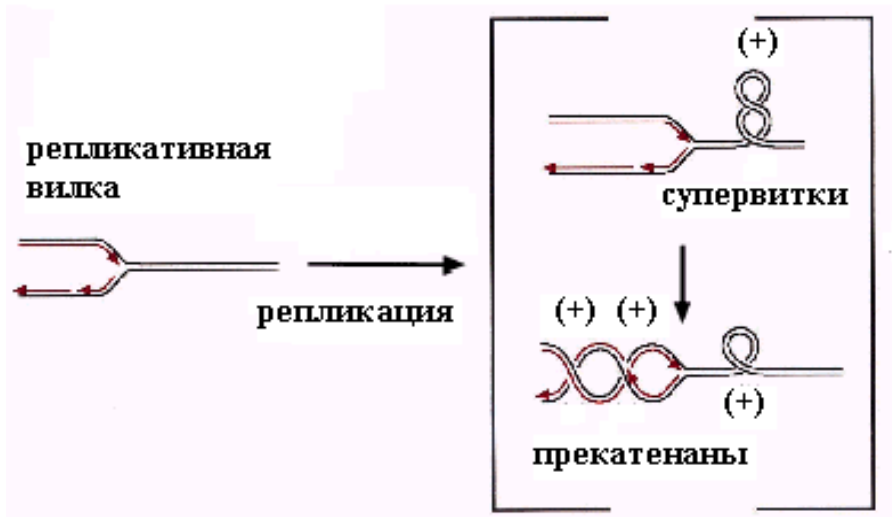
Инициация репликации DnaG - Праймаза

- Особая разновидность ДНК-зависимых РНК-полимераз
- Отличается от РНК-полимераз, участвующих в транскрипции
- Иницирует синтез затравок РНК



Н-концевой домен ДНК-геликазы **DnaB** присоединяется к **DnaG**, что обеспечивает попадание расплетенной геликазой нити ДНК сразу к активному центру **DnaG** и стимулирует праймазную активность

Инициация репликации



Образование «+»-супервитков перед репликативной вилкой и прекатенанов позади неё в процессе репликации

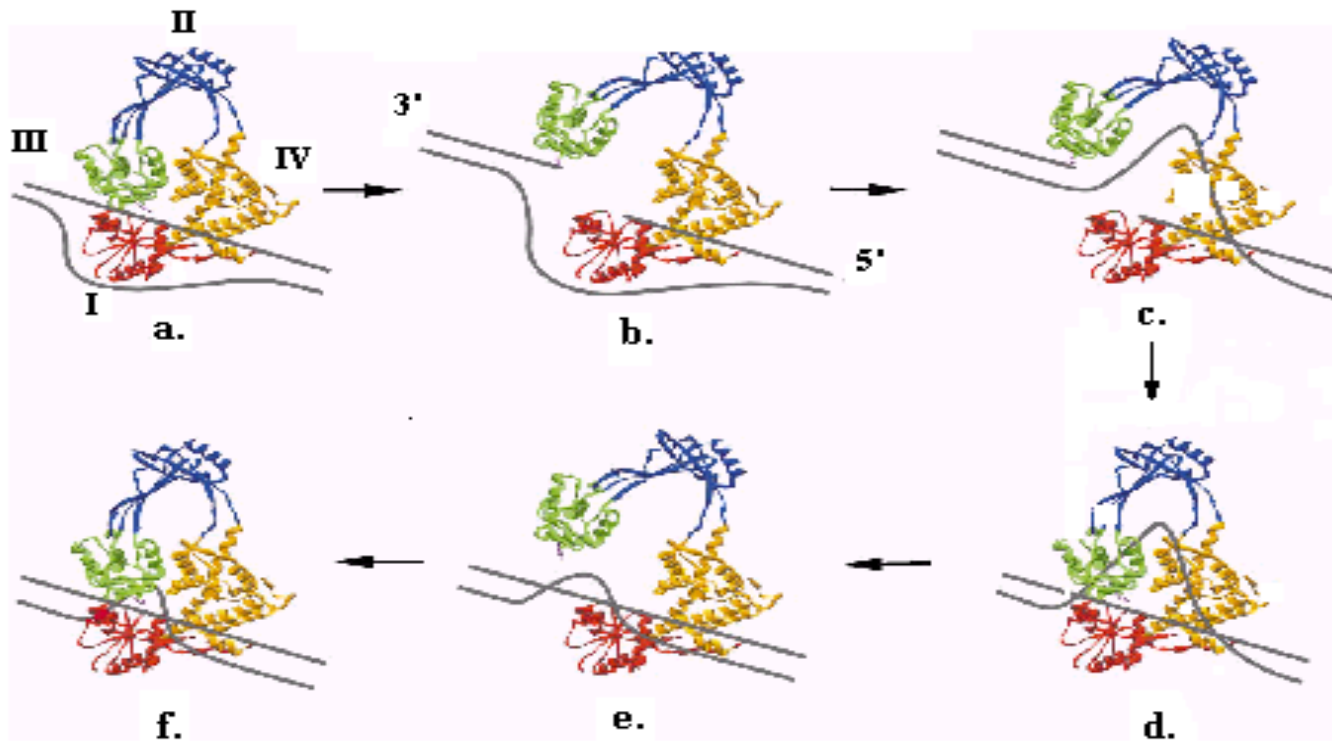
Ферменты, которые изменяют и регулируют топологическое состояние клеточной ДНК, получили название *ДНК-топоизомераз*.

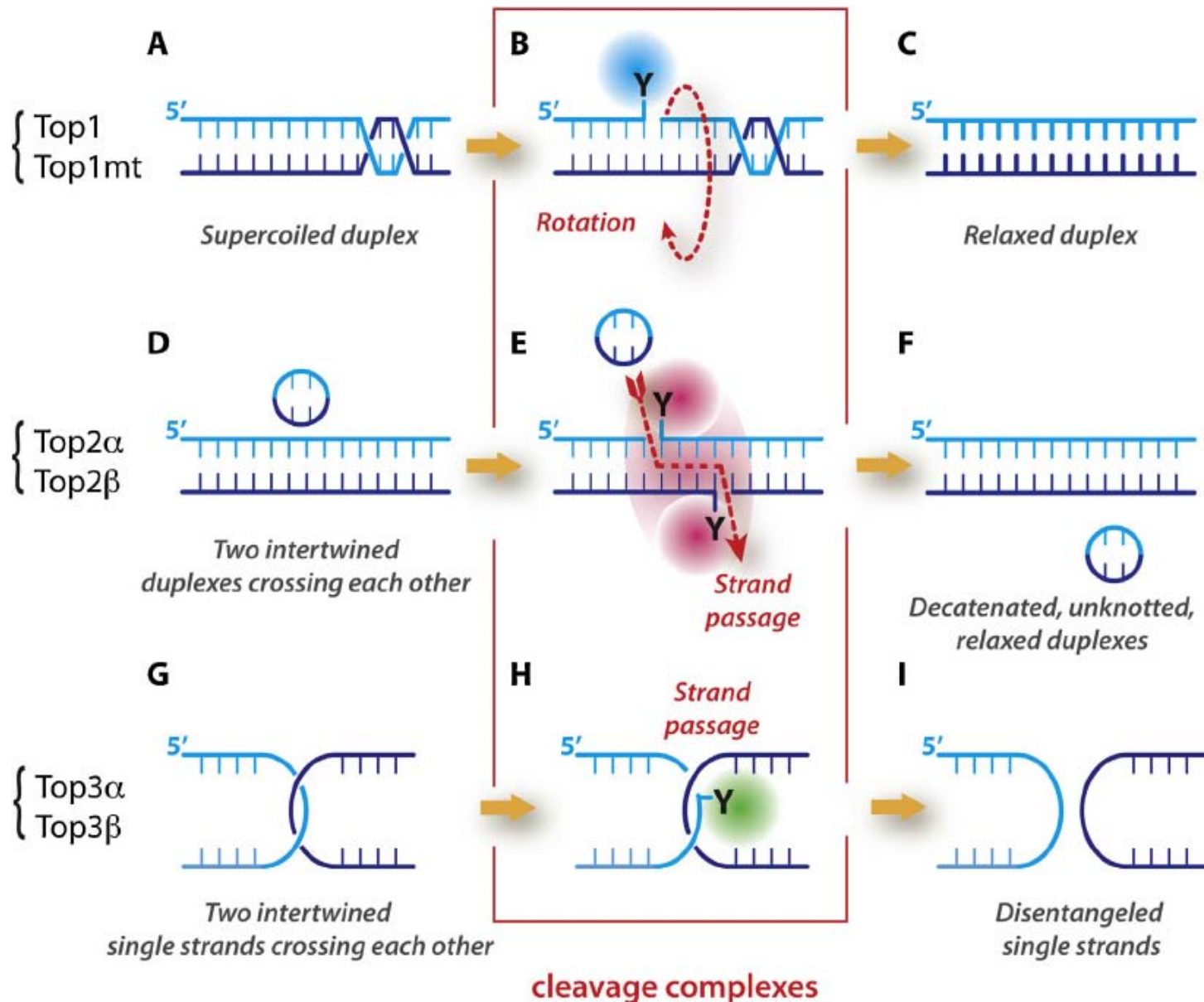
Топоизомеразы

ДНК-топоизомеразами называются ферменты, которые изменяют и регулируют топологическое состояние клеточной ДНК

- **Ферменты типа I временно расщепляют только одну цепь ДНК и не требуют присутствия кофакторов типа АТР.**
- **Ферменты типа II производят временный двухцепочечный разрыв, гидролизуя АТР**

Механизм действия топоизомераз

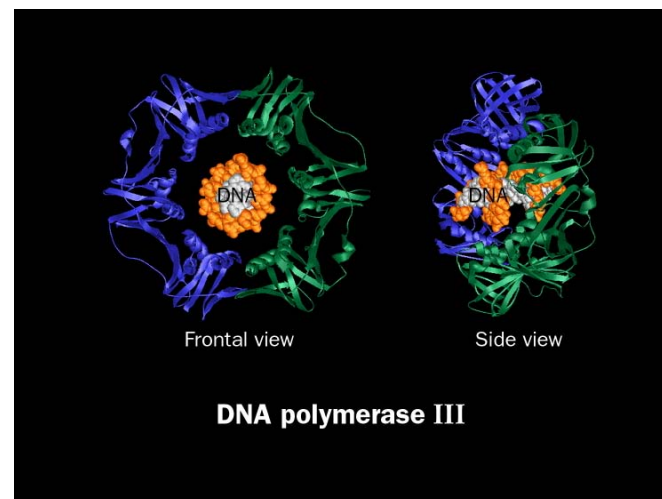
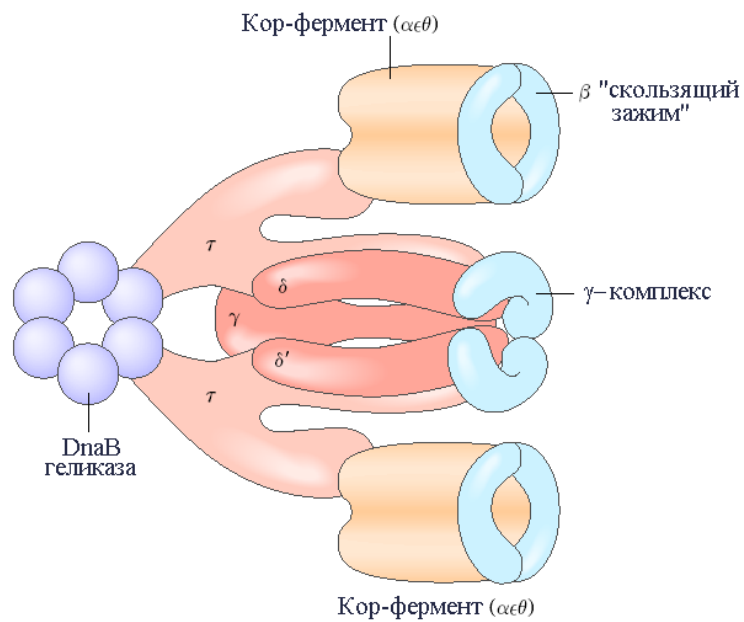




Прокариотические ДНК-полимеразы

Свойство	Полимераза I	Полимераза II	Полимераза III
Количество субъединиц	1	>4	>10
Структурный ген	polA	polB	polC
Полимеризация 5'-3'	+	+	+
Экзонуклеазная активность 3'-5'	+	+	+
Экзонуклеазная активность 5'-3'	+	-	-
Число молекул на клетку	250	100	20
Функция	Репарация, репликация	Репарация, мутагенез	Основная репликативная полимераза

ДНК-полимераза III



Основные эукариотические ДНК-полимеразы

ДНК-полимераза (семейство)	Функции
α (В)	ДНК-полимераза - праймаза, инициация и синтез отстающей нити
β (X)	Экцизионная репарация оснований
γ (А)	Митохондриальная ДНК-полимераза
δ (В)	Главная полимеразы ведущей и отстающей нитей; репарация, рекомбинация
ε (В)	Полимераза ведущей и отстающей нитей репарация, рекомбинация

Эукариоты содержат по меньшей мере пятнадцать видов ДНК-полимераз

Элонгация

Стадия элонгации в ходе репликации ДНК включает два различных, но взаимосвязанных процесса:

- **синтез лидирующей цепи**
- **синтез отстающей цепи**

синтез обеих цепей происходит с участием одного единственного (в одной репликативной вилке) асимметрического димера ДНК-полимеразы III

Открытие фрагментов Оказаки

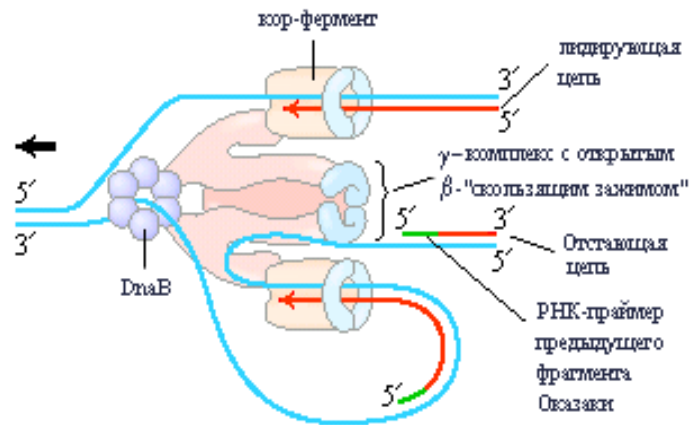
В 1968 г. Оказаки сообщил, что в процессе репликации у прокариот появляются **короткие фрагменты ДНК**, получившие название репликационных фрагментов или **фрагментов Оказаки**



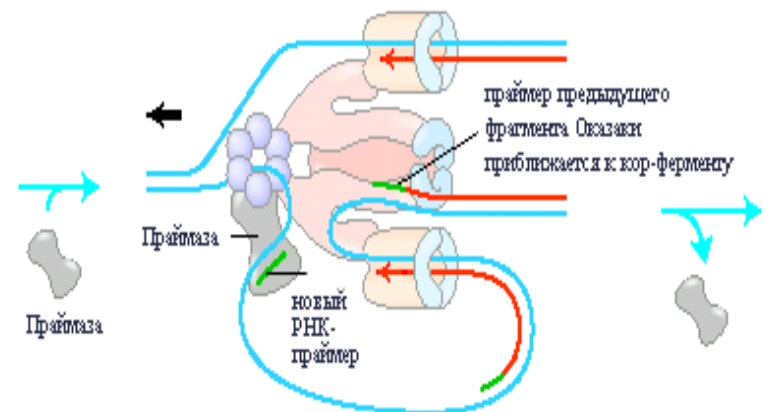
Благодаря этому открытию доказано, что:

- Лидирующая цепь реплицируется непрерывно в направлении $5' - 3'$, т. е. в направлении движения репликативной вилки
- Вторая цепь синтезируется прерывисто с образованием коротких фрагментов так же в направлении $5' - 3'$, т.е. против движения репликативной вилки.
- Затем фрагменты Оказаки с помощью лигазы сшиваются друг с другом, образуя вторую дочернюю цепь, называемую отстающей

Репликация ДНК у *E.coli*

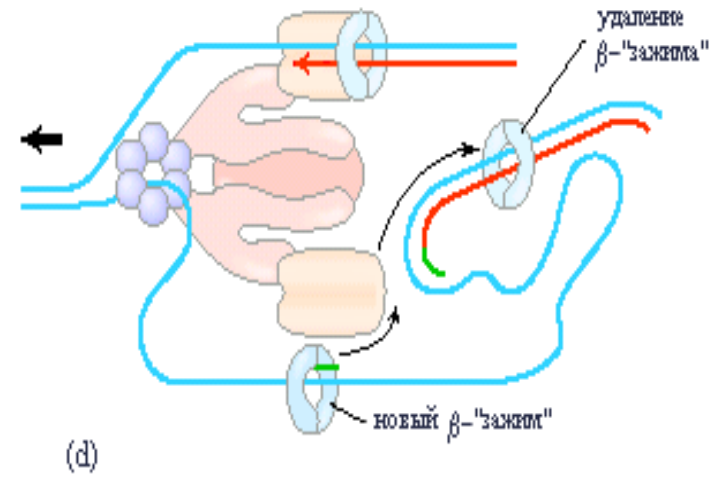
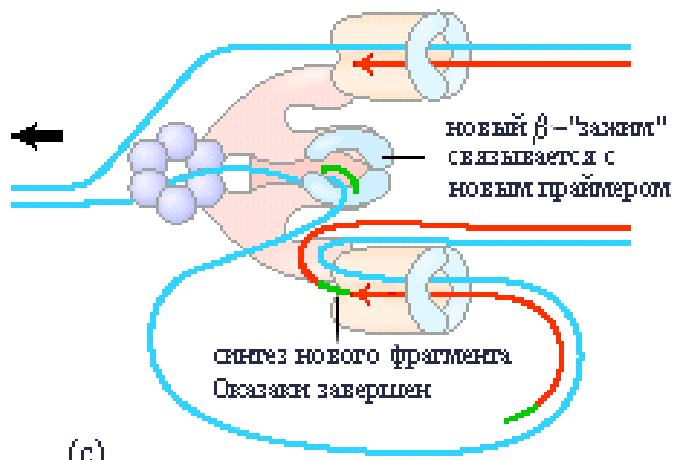


(а) По мере разделения цепей ДНК под действием DnaB-геликазы происходит непрерывный синтез лидирующей цепи



(б) Праймаза связывается с DnaB, синтезирует новый праймер и отделяется от комплекса

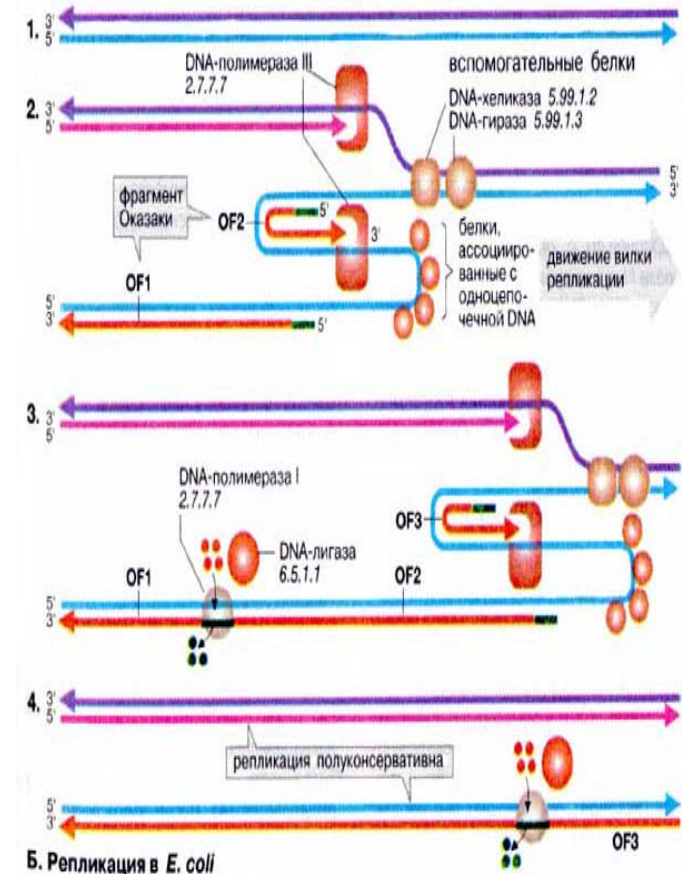
Репликация ДНК у *E.coli*

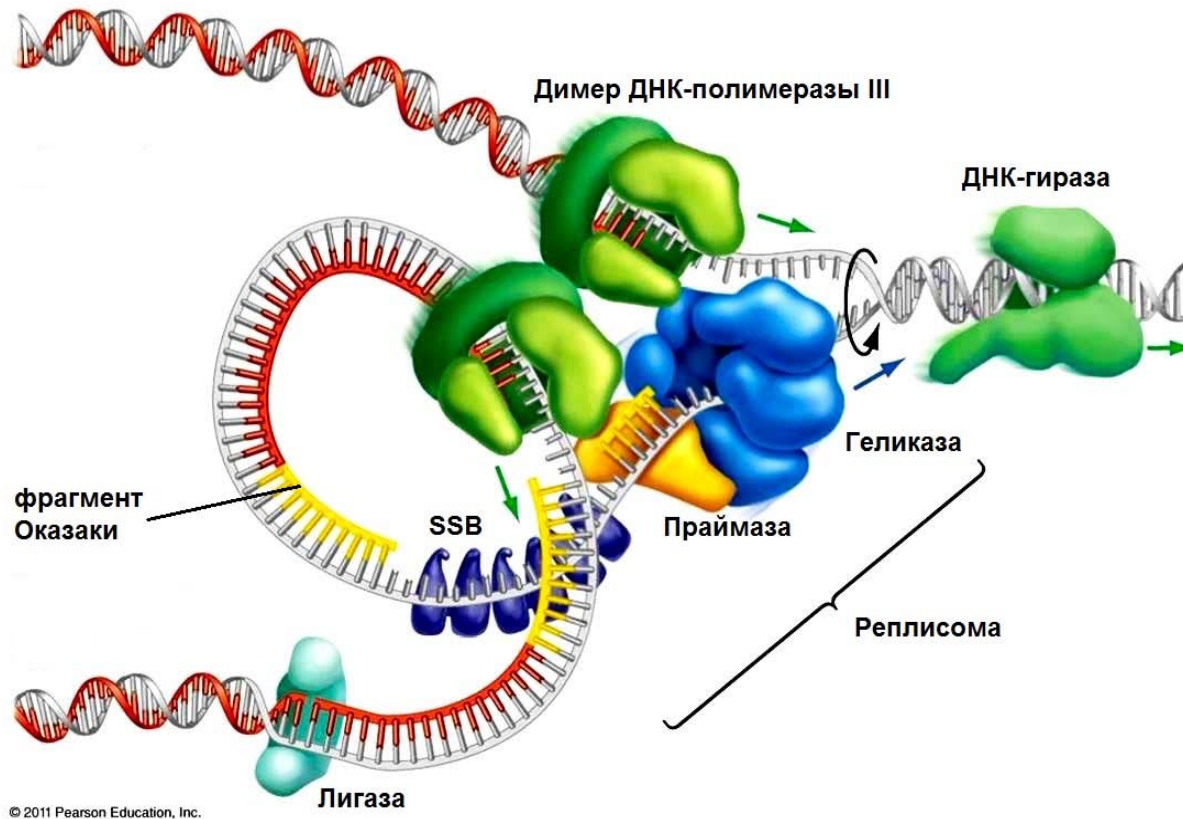


Синтез отстающей цепи ДНК

- Каждый фрагмент начинается с короткой РНК-затравки, синтезируемого **праймазой**
- **ДНК-полимераза III** достраивает этот праймер до фрагмента ДНК длиной 1000-2000 нуклеотидов
- Отдельные фрагменты Оказаки первоначально не связаны друг с другом и имеют **РНК на 5'-концах**
- **ДНК-полимераза I** начинает замещать РНК-праймер последовательностью ДНК
- В завершение остающиеся одноцепочечные разрывы сшиваются **ДНК-лигазой**

На матрице синтезируются короткие фрагменты новой цепи ДНК - **фрагменты Оказаки (OF)**

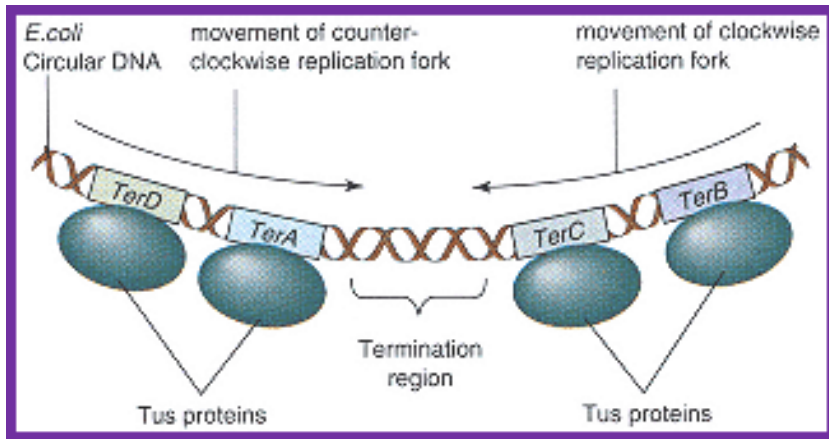




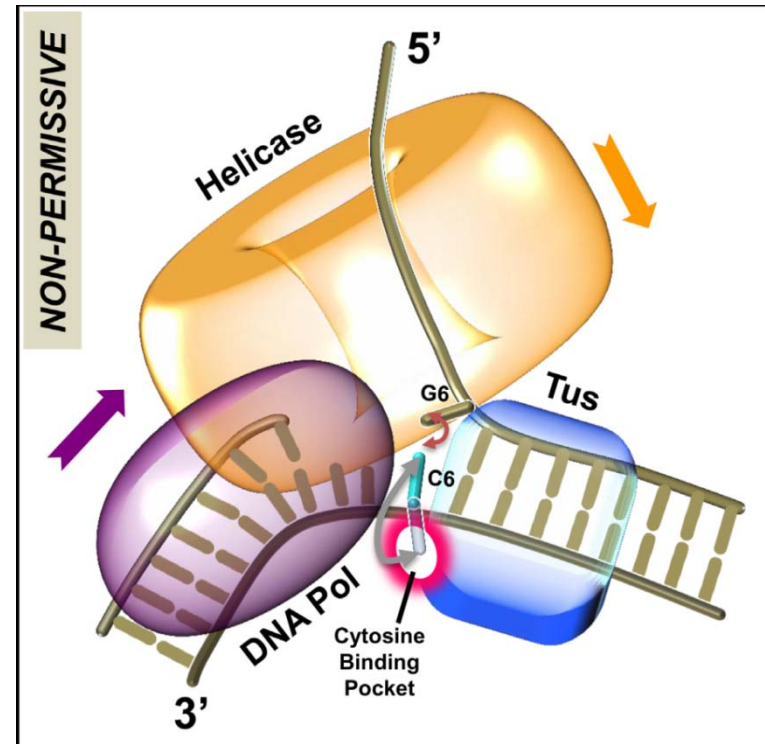
ДНК-лигаза катализирует формирование фосфодиэфирной связи 3'-гидроксильным концом одной цепи и 5'-фосфатным концом другой

Терминация репликации

Ter (от *terminus*) - области терминатора



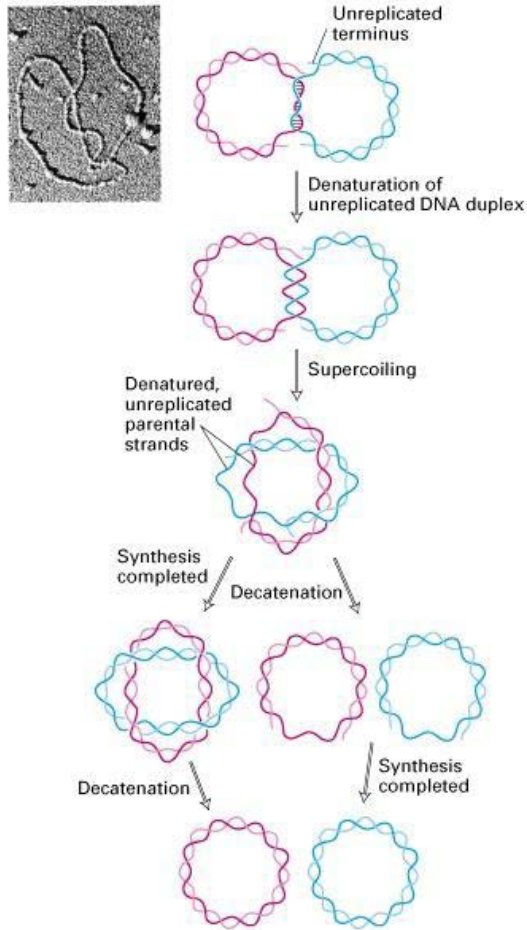
Ter - последовательность ДНК - сайт связывания белка терминации репликации **Tus** (*t*erminus *u*talization *s*ubstance)



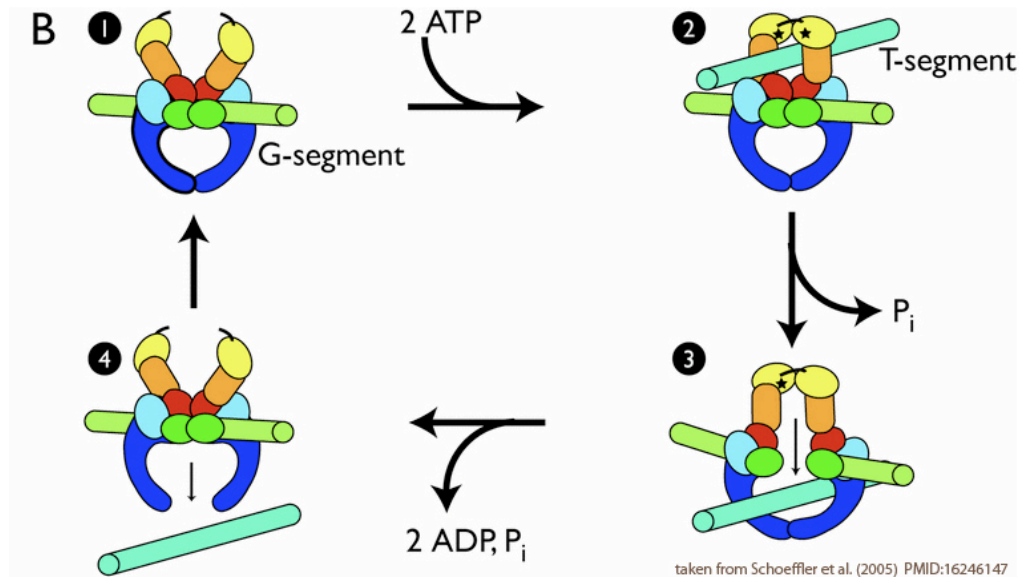
Комплекс Tus-Ter

останавливает репликативную вилку

Терминация репликации у прокариот



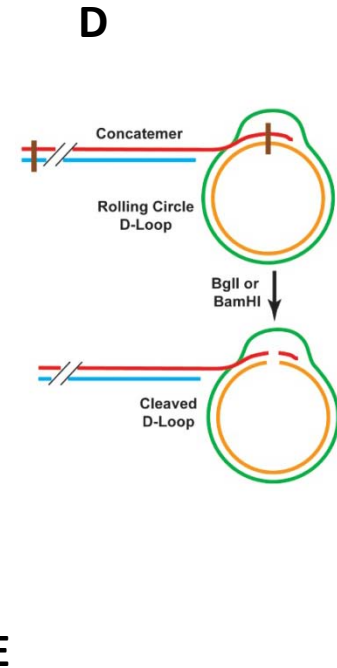
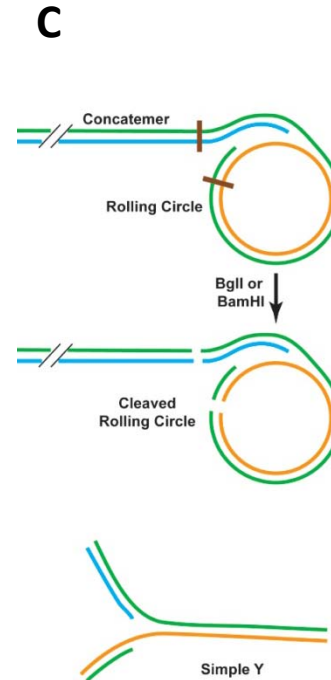
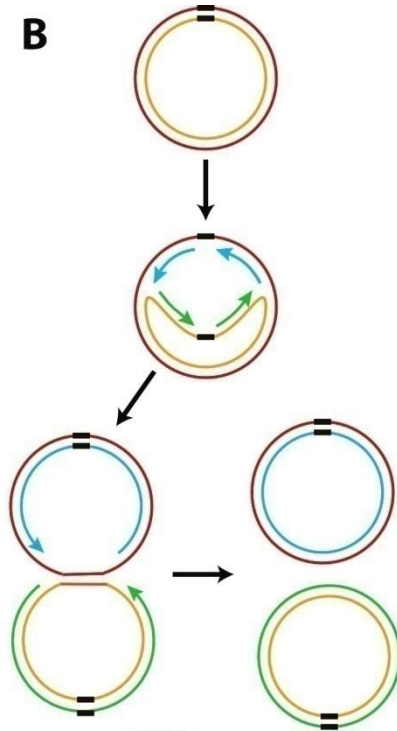
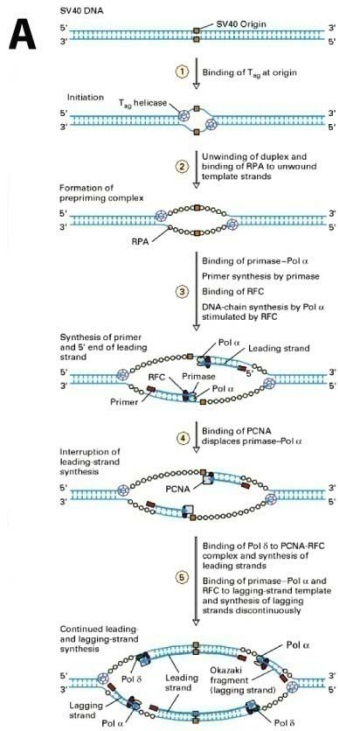
В расхождении двух дочерних кольцевых ДНК - конкатамеров участвует топоизомераза IV



Способы репликации различных геномов

- Репликация по типу глазка или θ -структуры (для кольцевых геномов).
- Репликация по типу множественных глазков при репликации хромосом эукариотических организмов.
- Репликация по типу катящегося кольца (для хромосомы *E.coli* во время конъюгации, а также для геномов бактериофагов и многих вирусов).
- Репликация по типу D-петли (репликация ДНК хлоропластов и митохондрий).
- Репликация теломерных концов у эукариот.

Типы репликации



E

A - по типу глазков, «пузырьков»

B - « θ -структура»

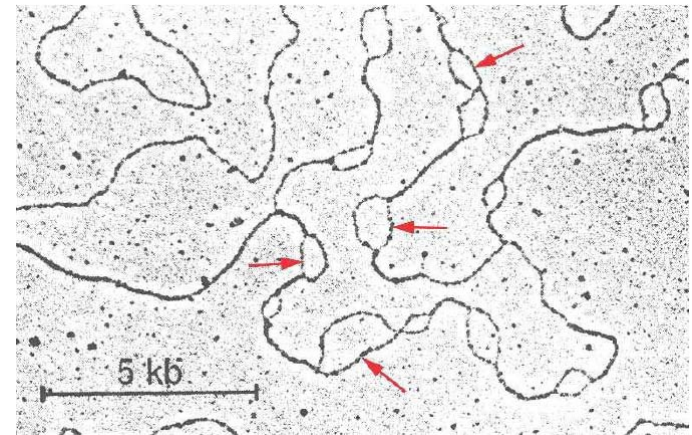
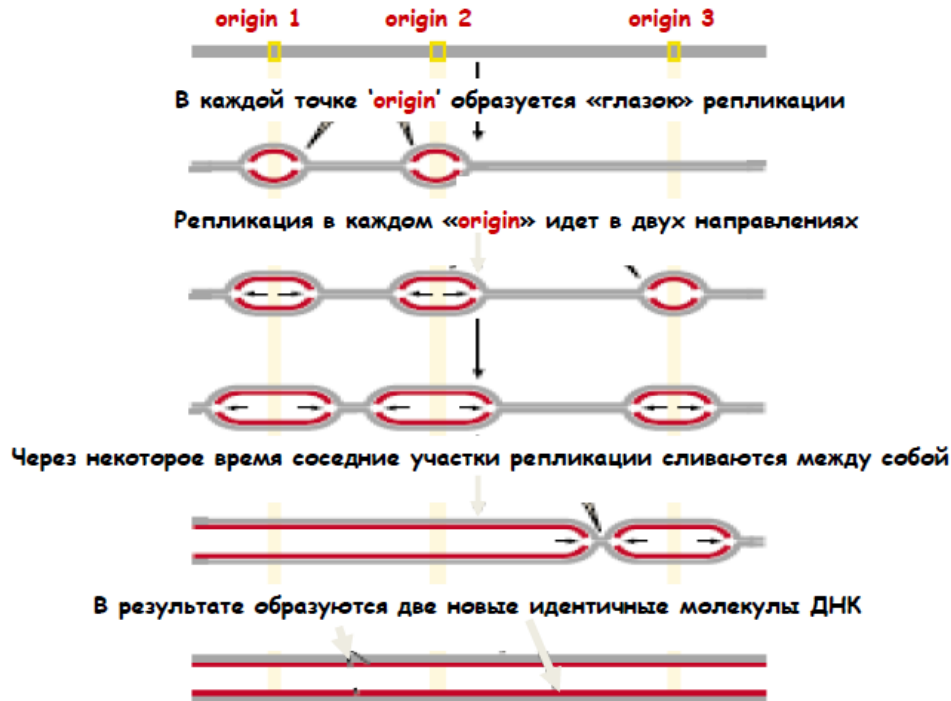
C - «катящееся кольцо»

D - по типу D-петли

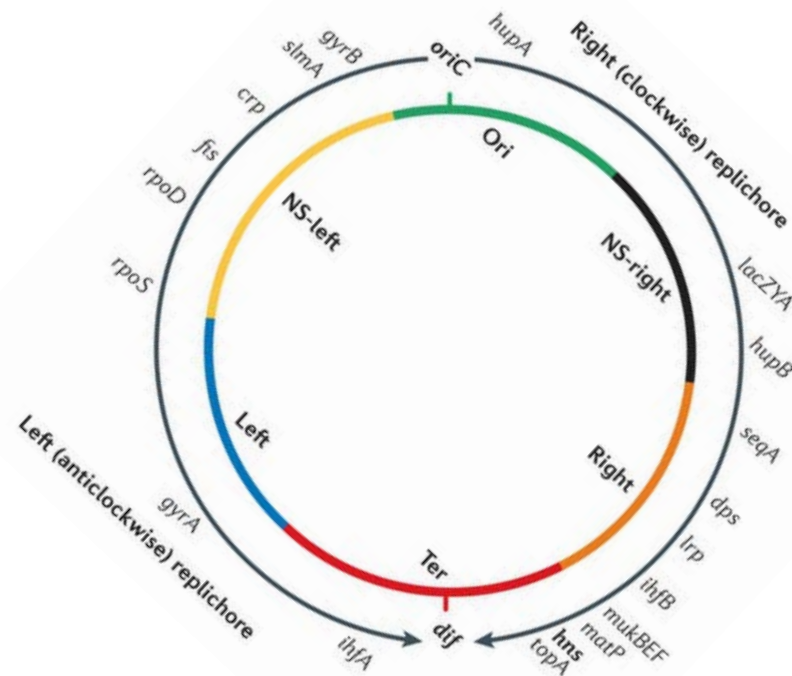
E - по типу Y-структуры

Хромосомы эукариотических организмов имеют множество репликонов

Репликон - автономная единица репликации, находящаяся под контролем одной точки инициации репликации

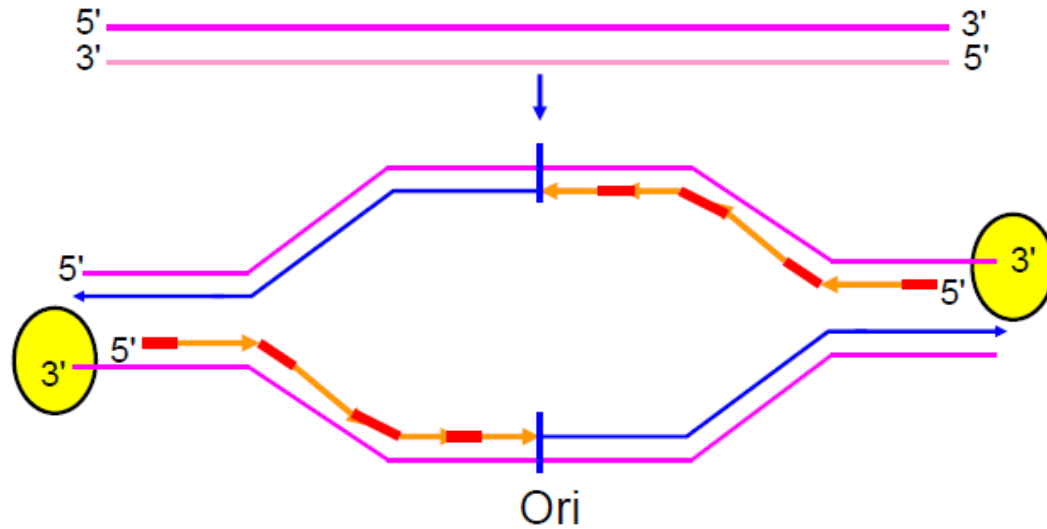


Реплиокор



В хромосомах *E. coli* начало и конец репликации делят геном на противоположно реплицированные половины, называемые **репликорами**

Проблема недорепликации линейных хромосом



**Каждый раунд репликации ДНК укорачивается
на 50-200 п.н. с 3' конца**



***Теломеры - это специальные структуры, находящиеся в
конце хромосомы эукариотических организмов***

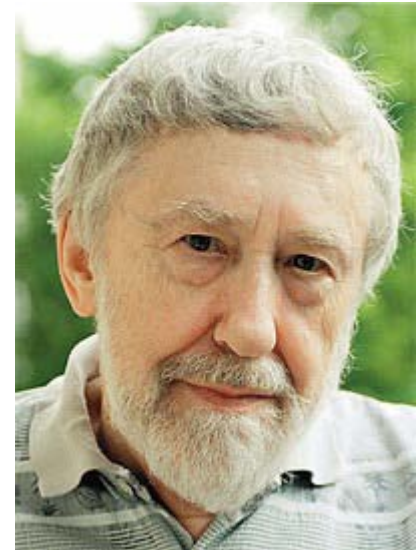
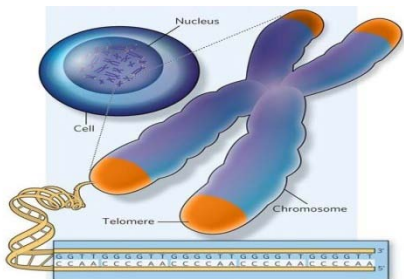


**Нобелевская премия по физиологии и медицине
— 2009 за открытие теломеразы и механизма
защиты хромосом:**

Элизабет Блэкберн (Elizabeth H. Blackburn)

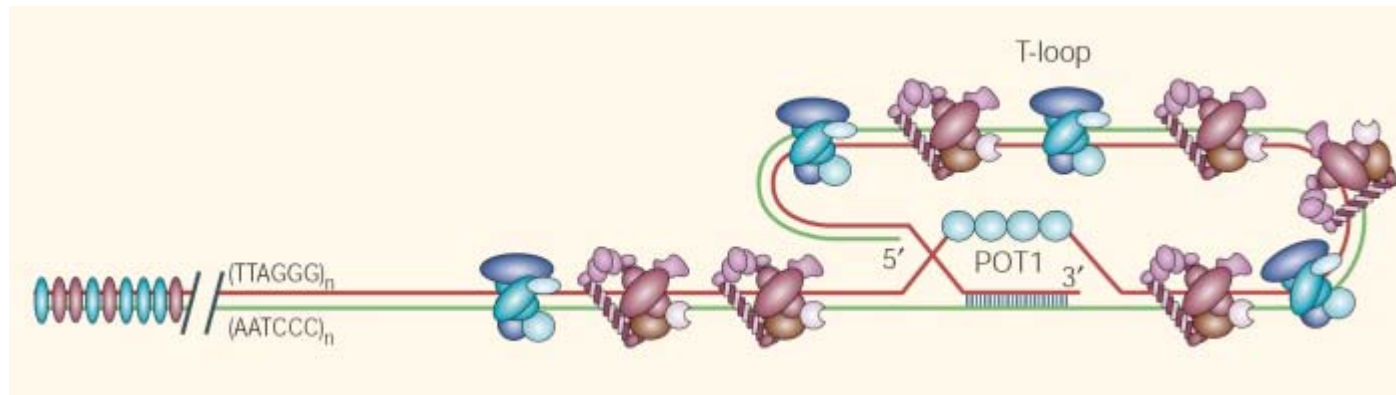
Кэрол Грейдер (Carol W. Greider)

Джек Шостак (Jack W. Szostak)



**А.М.Оловников в 1971 г.
предсказал механизм
защиты хромосом от
укорачивания при каждом
делении клетки**

Теломеры представляют собой повторяющиеся нуклеотидные последовательности, с которыми связаны специальные белки, защищающие концы хромосом от деградации и систем репарации двухцепочечных разрывов



Теломеры млекопитающих состоят из двухцепочечного участка из повторов TTAGGG и 3'-выступающего одноцепочечного участка G-цепи длиной 150–200 нуклеотидов.

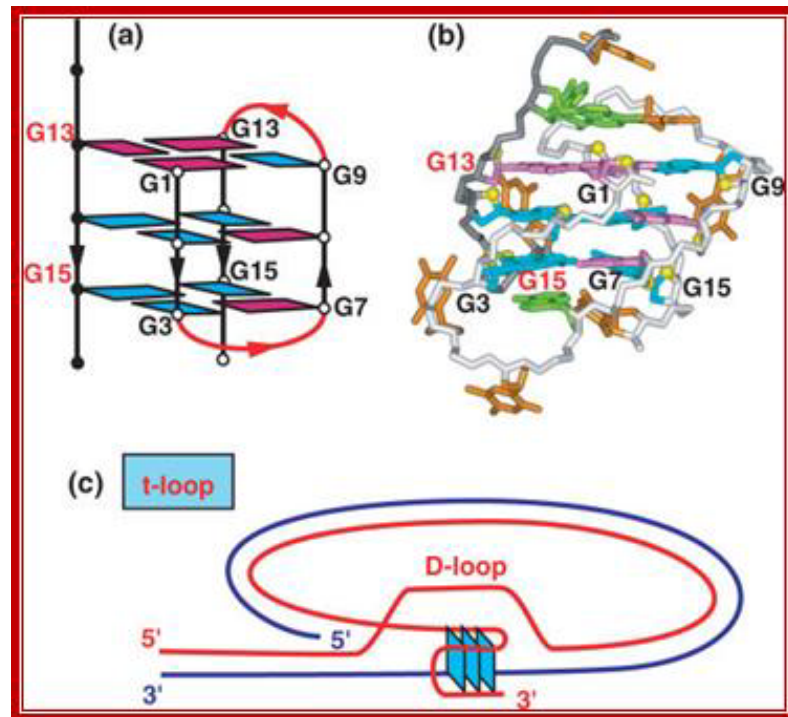
Кэп теломеры

Кэп – структура, состоящая из Т-петли, D-петли и G-квадруплекса

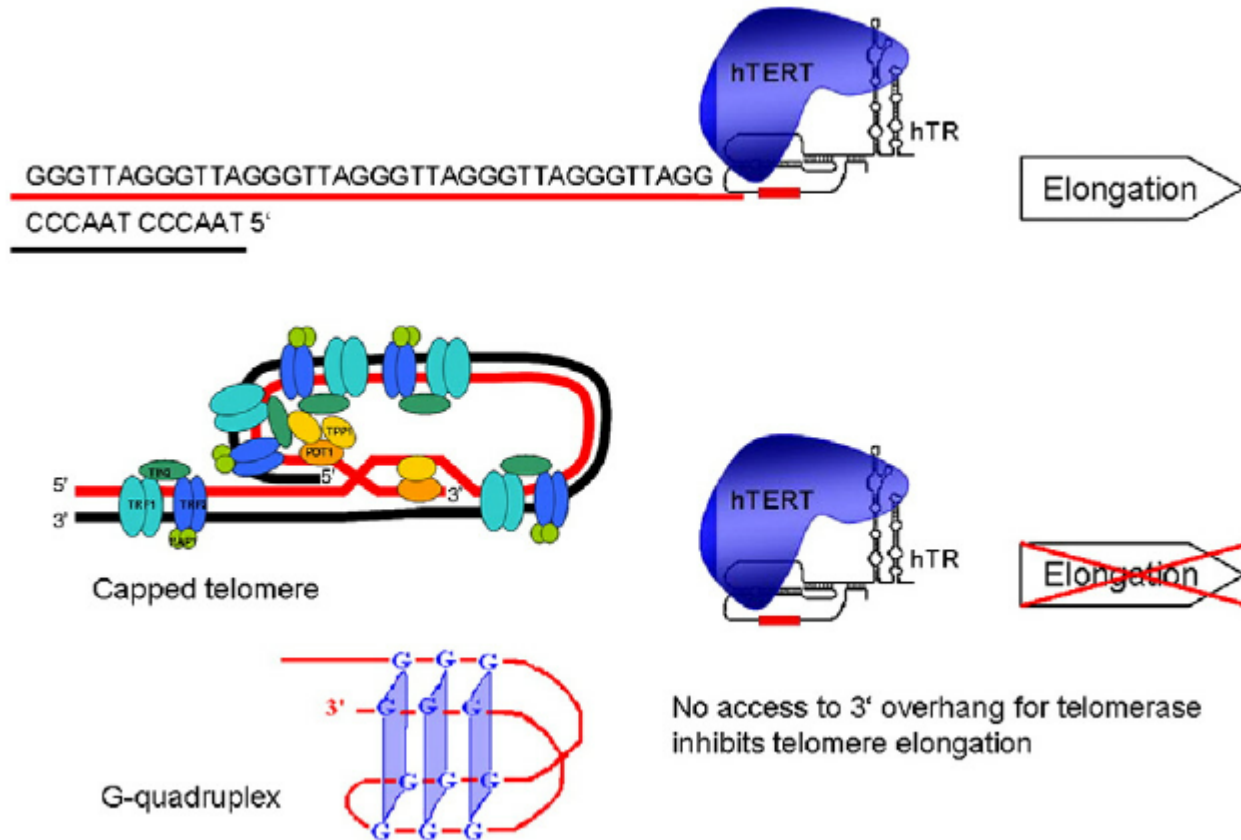
D-петля и G-квадруплекс образованы выступающей однонитевой ДНК

Кэп защищает:

- концы хромосом от деградации
- системы репарации двухцепочечных разрывов

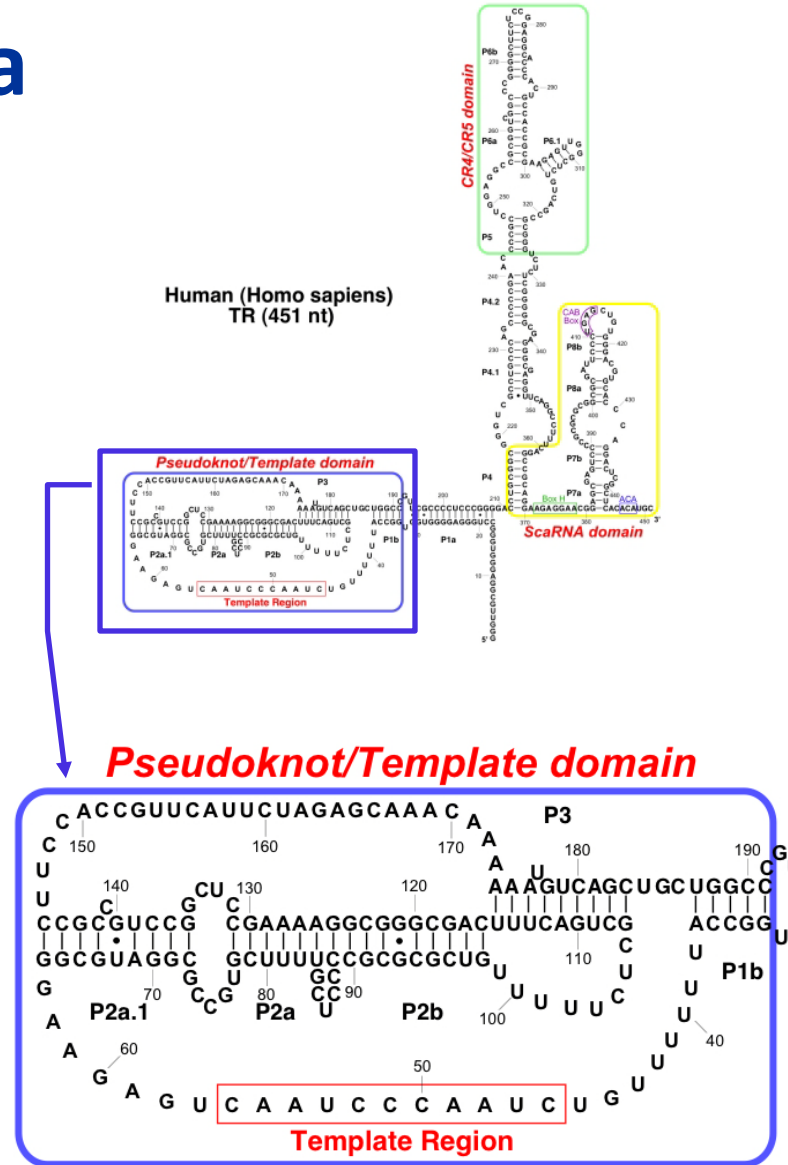


Кэп контролирует активность теломеразы – G-квадруплекс ингибирует теломеразную активность



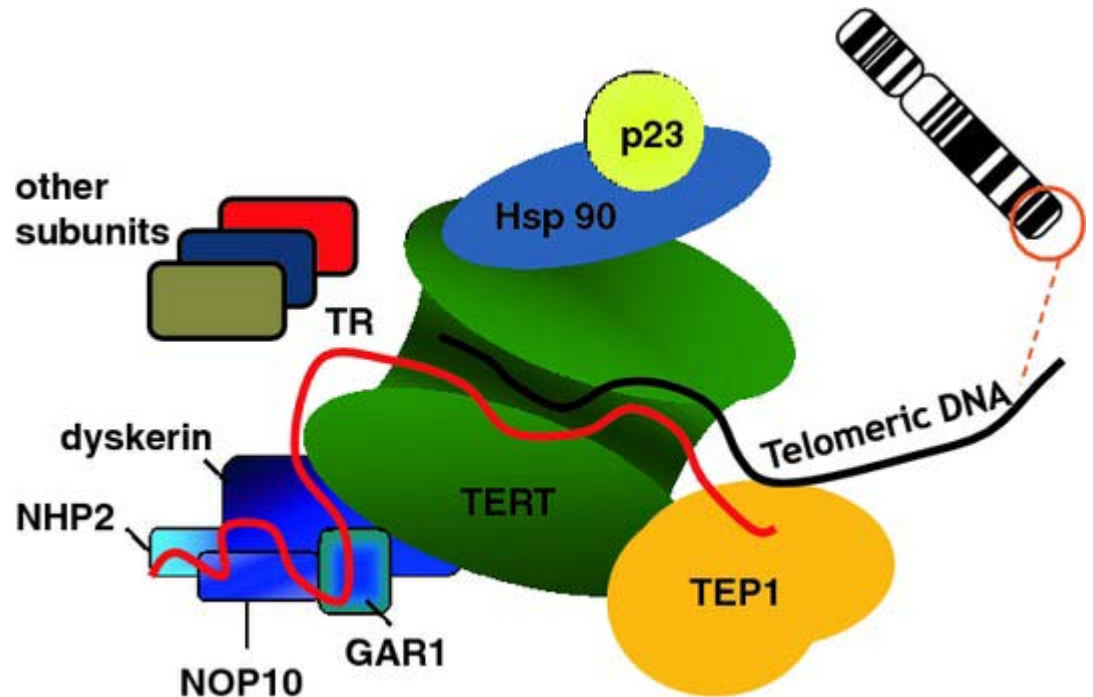
Теломераза

- Теломераза – это особая обратная транскриптаза, имеющая в своем составе специальную теломеразную РНК
- Особое свойство, отличающие теломеразу от других РНК-зависимых ДНК-полимераз - использование фиксированного участка теломеразной РНК в качестве матрицы для удлинения теломеры.



Компоненты теломеразы

- Обратная транскриптаза (TERT – telomerase reverse transcriptase),
- Теломеразная РНК (TR – telomerase RNA)
- TEP - связывающие белки, которые стабилизируют РНК и способствуют сборке активного фермента.



Репликация теломер

