



## **РЕПЛИКАЦИЯ И РЕПАРАЦИЯ ДНК**

*Репликация ДНК* – это молекулярный процесс точного копирования молекул ДНК (ее нуклеотидной последовательности). С помощью механизма репликации происходит точная передача генетической информации от клетки к клетке и, таким образом, все клетки многоклеточного организма являются носителями одной и той же наследственной информации. Процесс синтеза ДНК сопровождается множеством событий и является, как правило, точным. Из одной молекулы ДНК синтезируются две идентичные дочерние молекулы. Этот процесс становится возможным благодаря структурным особенностям молекулы ДНК:

- двухцепочечная структура;
- комплементарность и антипараллельность.

Основными характеристиками репликации являются:

- ✓ синтез ДНК является полуконсервативным, так как каждая цепь служит матрицей для синтеза дочерней цепи;
- ✓ репликация носит двунаправленный характер;
- ✓ синтез новой цепи осуществляется только в направлении  $5' \rightarrow 3'$ ;
- ✓ в репликации участвует значительное количество белковых факторов.

## Аппарат репликации

Аппарат репликации включает ДНК–матрицу с точкой инициации, нуклеозидтрифосфаты и белки, участвующие в деспирализации двухцепочечной молекулы ДНК, в инициации репликации, в полимеризации нуклеотидов и др.

### Точка начала репликации

Точка начала репликации представлена специфичной последовательностью нуклеотидов, которая называется автономной последовательностью репликации, *точкой ori*. Участок ДНК который содержит точку *ori* который способен к независимой репликации называется *репликон*. У прокариот каждая молекула ДНК представляет один репликон, у эукариот ДНК содержит больше точек начала (*ori*), и соответственно больше репликонов. В таб.7.1 приведены данные, касающиеся числа репликонов на геном, среднюю длину одного репликона и скорость репликации у разных организмов.

Таблица 7.1. Некоторые характеристики репликонов

Организм	Число репликонов	Средняя длина, кб	Скорость репликации п.н./мин
E.coli	1	4200	30000
S.pombe	500	40	3600
D.melanogaster	3500	40	2600
M.musculus	25000	150	2200
Homo sapiens	$10^5 - 10^6$	100-1000	3000

Точка инициации *ori* имеет следующую структуру:

**AUX-2 — A/T — ORE — DUE — AUX-1**

**ORE** – сайт ДНК, который соединяется с сайт-специфическими белками и белками репликации;

**DUE** – участок ДНК, который легко деспирализуется, чувствителен к нуклеазам и не чувствителен к мутациям;

*A/T* – последовательность, регулирующая активность геликаз;

*AUX-2* и *AUX-1* – последовательности, которые соединяются с высокоспецифичными факторами инициации репликации.

У прокариот точка инициации фиксирована на плазматической мембране, а у эукариот она фиксируется с помощью металлопротеидов к белковой оси хромосом (SAR).

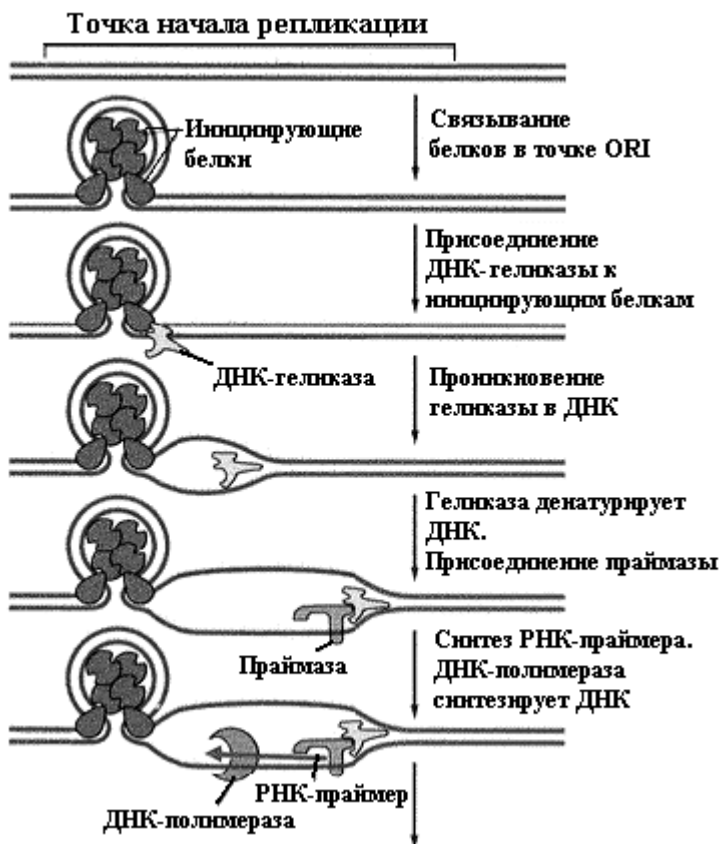


Рис. 7.1. Ферменты аппарата репликации

## Белки аппарата репликации

В репликации ДНК участвует большое количество белковых факторов и ферментов (рис.7.1).

**ДНК-геликазы** осуществляют деспирализацию и денатурацию участка ДНК с использованием энергии гидролиза АТФ и образование репликационной вилки. В связи с наличием двух репликационных вилок, существуют две геликазы, которые передвигаются в разных направлениях от точки инициации репликации.

**Праймаза** – фермент, который инициирует синтез ДНК за счет синтеза небольшого фрагмента, состоящего из 11-12 рибонуклеотидов, - **прайма** или **затравки** (РНК-праймер). Геликаза совместно с праймазой образует комплекс - **праймосома**.

**Топоизомераза I** разрывает только одну из двух цепей двойной спирали ДНК, расщепляя фосфодиэфирные связи, что предупреждает суперспирализацию молекулы ДНК.

**Топоизомераза II** ковалентно связывается с обеими цепями двойной спирали ДНК и вносит в нее на время двухцепочечный разрыв.

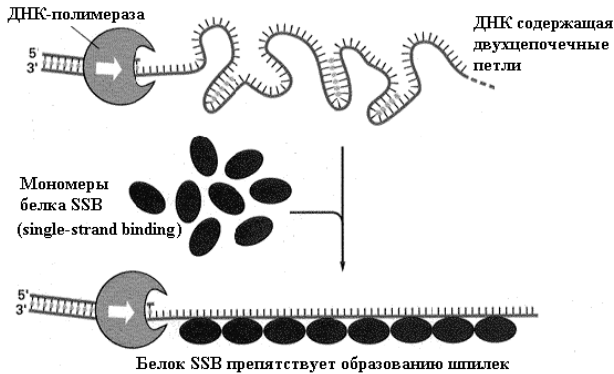


Рис. 7.2. Стабилизация одноцепочечной молекулы ДНК в процессе репликации

**Белки, связывающиеся с одноцепочечной ДНК (SSB – белки)**, это факторы, стабилизирующие одноцепочечную ДНК в области денатурации и препятствующие комплементарному спариванию двух цепей или различных участков одной и той же цепи, имеющих палиндромные последовательности (рис.7.2).

**ДНК-полимеразы** - ферменты, способные синтезировать новые цепи ДНК с матричной цепи. Было обнаружено три класса полимераз у прокариот (I, II, III) и полимеразы  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  у эукариот (табл.7.2).

**Таблица 7.2. Характеристика ДНК-полимераз у эукариот**

ДНК-полимераза	$\alpha$	$\Delta$	$\epsilon$	$\beta$	$\gamma$
Место нахождения	Ядро	Ядро	Ядро	Ядро	Митохондрии
Синтетическая функция	Синтез праймеров	Синтез ДНК	Репарация	Репарация	Репликация
Дополнительные функции	_____	Экзонуклеазная	Экзонуклеазная	_____	Экзонуклеазная

Полимеразная активность характеризуется следующими особенностями:

- синтез осуществляется только в направлении  $5' \rightarrow 3'$  с присоединением нуклеотидов к группе 3'-ОН пентозы (рис.7.3);
- чтение матрицы происходит только в направлении  $3' \rightarrow 5'$ ;
- для синтеза используются предшественники трифосфатов, которые теряют во время реакции две фосфатные группы;
- ДНК-полимераза не может начать синтез новой полинуклеотидной цепи, а способна только добавлять новые нуклеотиды к существующей цепи или к РНК-праймеру.

Наряду с синтетической активностью, ДНК-полимераза содержит субъединицы, которые обладают нуклеазной активностью для удаления РНК-затравок или нуклеотидов в процессе коррекции ошибок репликации ДНК.

**ДНК-лигаза** – это фермент, связывающий участки вновь синтезированной ДНК, посредством образования

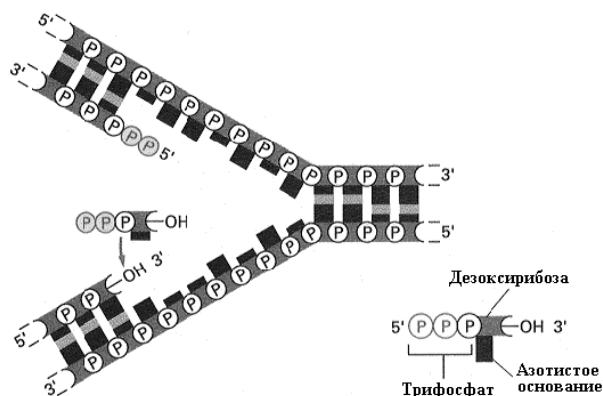


Рис. 7.3. Функционирование ДНК-полимераза

фосфодиэфирных связей  $3' \rightarrow 5'$ .

## Механизм репликации

Синтез начинается с момента деспирализации цепей ДНК и образования репликационной вилки. Каждая цепь представляет матрицу для вновь синтезируемой цепи. Деспирализация двух цепей ДНК необходима для того, чтобы каждое основание обеих цепей оказалось доступным для узнавания новыми основаниями и комплементарного спаривания. Синтез осуществляется в двух направлениях; от каждой точки инициации образуются две репликационные вилки в противоположном направлении.

Для инициации репликации необходим белковый комплекс, названный **реписомой**, который узнает точку инициации и запускает механизм репликации. Белок / бел-

ки, распознающие точку инициации (у дрожжей известно 5 белков), связываются с *ori* и инициируют деспирализацию ДНК в сайте DUE.

Реплисома движется вдоль ДНК и осуществляет синтез обеих цепей репликационной вилки. Репликация представляет собой непрерывный рост обеих цепей спирали ДНК. Необходимо подчеркнуть что:

- считывание информации с матрицы осуществляется только в направлении  $3' \rightarrow 5'$ ;
- синтез новой цепи осуществляется только в направлении  $5' \rightarrow 3'$ .

Репликационная вилка асимметрична (рис.7.4). Из двух синтезированных дочерних цепей ДНК:

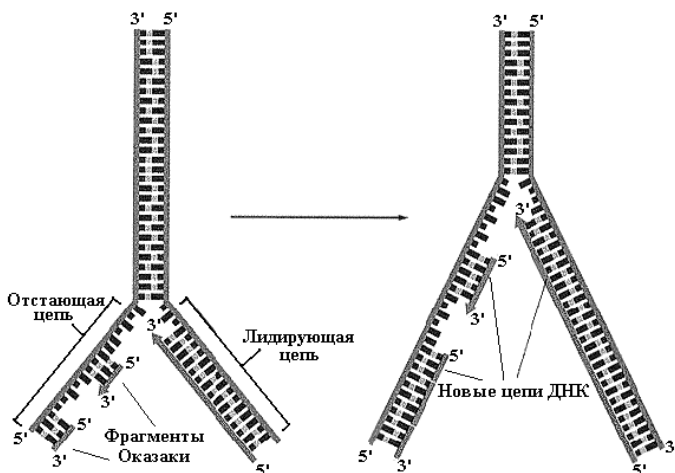


Рис. 7.4. Механизм репликации в репликационной вилке

- одна цепь синтезируется непрерывно в направлении  $5' \rightarrow 3'$  и называется *ведущей (лидирующей)* цепью. Она считывается в направлении  $3' \rightarrow 5'$  с матричной цепи  $3' \rightarrow 5'$ ;
- другая цепь синтезируется с матричной цепи  $5' \rightarrow 3'$ . Считывание происходит также в направлении  $3' \rightarrow 5'$ , а новую цепь называют *отстающей* цепью. Она синтезируется

прерывисто, с образованием **фрагментов Оказаки**. Длина фрагментов Оказаки у прокариот составляет - 1000-2000, а у эукариот – 100-200 нуклеотидов.

Согласно гипотезе Артура Корнберга отстающая цепь развернута на 180°. Таким образом, молекулы ДНК-полимераза совместно с другими белками реплисомы обеспечивают одновременный синтез обеих цепей (рис. 7.5).

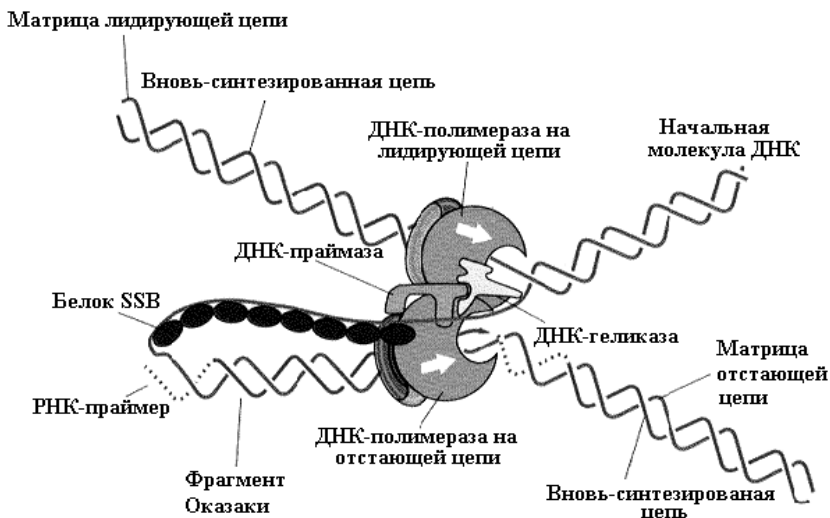


Рис. 7.5. Топография репликации согласно гипотезе А. Корнберга

При встрече двух репликационных вилок процесс репликации останавливается, фермент ДНК-лигаза связывает все фрагменты, предварительно удаляются праймеры и заполняются недостающие фрагменты.

## Этапы репликации

**1. Инициация** включает следующие процессы:

- ↪ присоединение реплисомы к точке инициации репликации и деспирализация участка двойной спирали ДНК геликазами;



- ↙ синтез РНК-праймеров ферментом праймазой, выполняющей функции РНК-полимеразы;
- ↙ присоединение дезоксирибонуклеотидов, комплементарных матрице, к 3'-концу праймера ДНК-полимеразой.

**2. Элонгация** характеризуется удлинением вновь синтезируемых цепей, которое осуществляется ДНК-полимеразой, входящей в состав реплисомы, во время ее продвижения по матрице:

- ↙ непрерывный рост лидирующей цепи;
- ↙ прерывистый синтез фрагментов Оказаки на отстающей цепи;
- ↙ контроль ошибок спаривания оснований во время репликации и их исправление при помощи 3'→5' экзонуклеазы из состава ДНК-полимеразы.

**3. Терминация** включает следующие процессы:

- ↙ удаление РНК-праймеров 5'→3' экзонуклеазой, представляющей собой субъединицу ДНК-полимеразы;
- ↙ заполнение недостающих участков ДНК-полимеразой;
- ↙ связывание фрагментов вновь синтезированной ДНК с помощью лигаз.

## Модели репликации у различных организмов

У прокариот и вирусов существуют специфические типы репликаций. Кольцевые молекулы прокариот (нуклеид, плазмиды) реплицируются с помощью механизма репликации типа  $\theta$ . Из точки *ori* направляются две репликационные вилки, что приводит к образованию структуры, похожей на греческую букву  $\theta$  (рис.7.6).

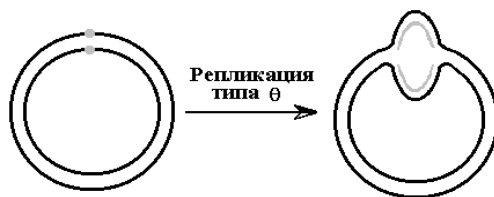


Рис. 7.6. Репликация типа  $\theta$  у прокариот

У некоторых вирусов, которые инфицируют прокариотические и эукариотические клетки существует другой тип репликации, получивший название "катящегося кольца" (репликация типа  $\sigma$ ).

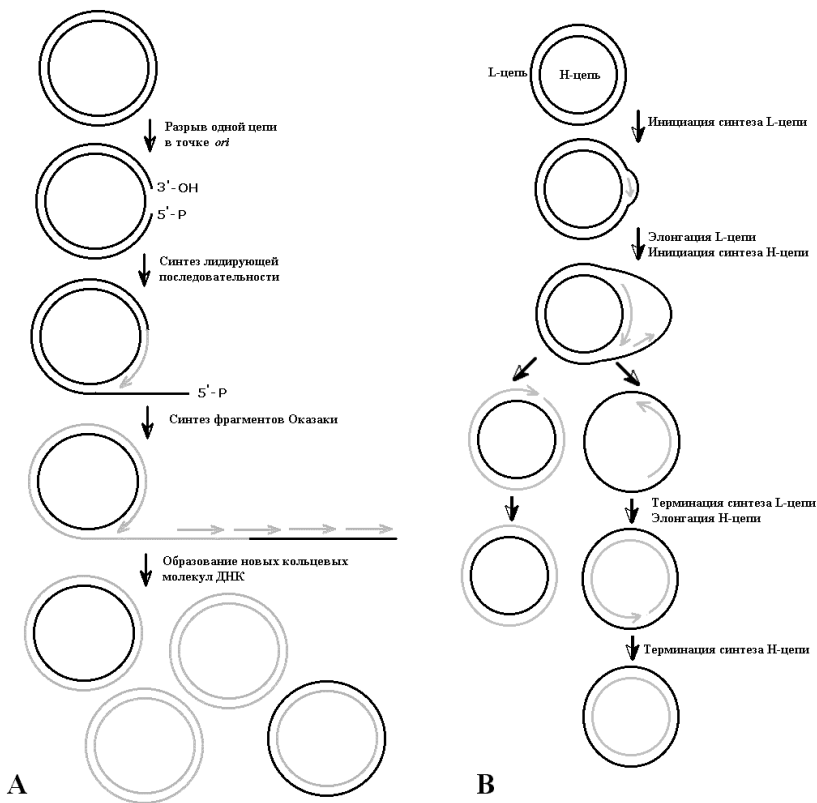


Рис. 7.7. А. Репликация типа  $\sigma$  у вирусов.  
В. Репликация типа D в митохондриях

Нуклеаза разрывает одну цепь и свободный 3'-ОН конец, образовавшийся при этом, наращивается с помощью ДНК-полимераз. Точка роста "скользит" по кольцу матричной

ной цепи. 5'-конец отделяется от кольцевой молекулы и служит матрицей для синтеза второй цепи ДНК. Одновременно могут образоваться много копий генома вируса, которые позже разделяются при разрезании специфическими эндонуклеазами (рис.7.7А).

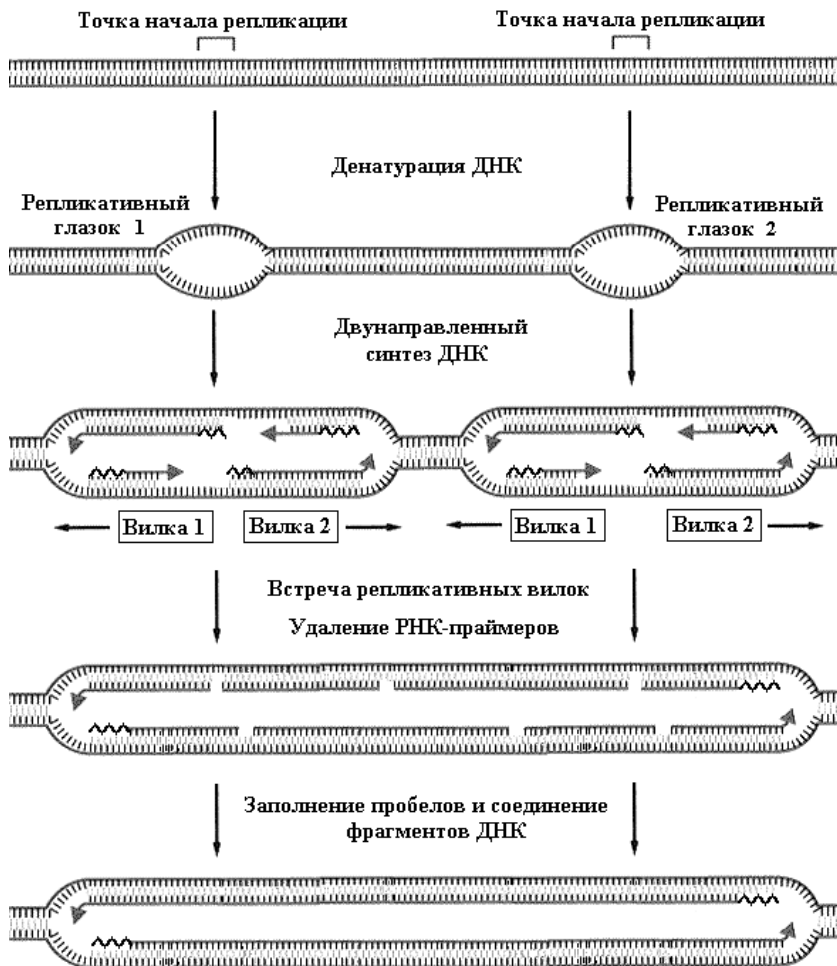


Рис. 7.8. Механизм и этапы репликации у эукариот

В митохондриальной ДНК, имеющей кольцевую структуру, каждая цепь содержит собственную точку инициации репликации. Синтез начинается с Н-цепи (тяжелая цепь). В момент, когда репликационная вилка достигает точки *ori* цепи L (легкой цепи), начинается репликация этой цепи в обратном направлении. Таким образом, репликация двух цепей носит асинхронный характер (репликация типа D) (рис.7.7,В).

У эукариот ДНК представлена длинными линейными молекулами с различным уровнем компактизации, скорость репликации составляет несколько тысяч пар нуклеотидов в минуту (у прокариот – 30000 пар нуклеотидов в минуту). Чтобы обеспечить синтез целой молекулы, нужен определенный период времени (в клетках человека  $7 \times 10^9$  п.н. реплицируются в течение 8-9 часов). Репликация начинается одновременно во многих точках *ori* (46 молекул ДНК клетки человека содержат от  $10^5$  до  $10^6$  репликационных) (рис.7.8). У эукариот репликация происходит только в периоде S клеточного цикла и носит асинхронный характер. Эухроматиновые участки реплицируются раньше – в начале S-периода, гетерохроматиновые участки – в конце S-периода.

Особенность репликации у эукариот состоит в том, что 5'-конец новой цепи короче в связи с отсутствием возможного синтеза последнего фрагмента Оказаки. Это могло бы привести в последующих поколениях молекул к укорочению хромосом и, как следствие, к потере генетической информации, содержащейся на их концах. Для предупреждения потерь концевых последовательностей ДНК на концах хромосом существует специальная структура (теломера), имеющая собственный механизм синтеза. Теломерные участки хромосом реплицируются с помощью специального механизма, с участием фермента *теломеразы*. Теломераза представляет собой белок, обладающий функцией обратной транскрипции и содержащий в качестве матрицы РНК (рис. 7.9). На первом этапе происходит присоединение теломера-

зы к концу лидирующей цепи в области теломера. В дальнейшем фермент удлиняет цепь, используя в качестве матрицы молекулу РНК. Процесс удлинения 3'-конца повторяется многократно. В последующем ДНК-полимераза синтезирует отстающую комплементарную цепь.

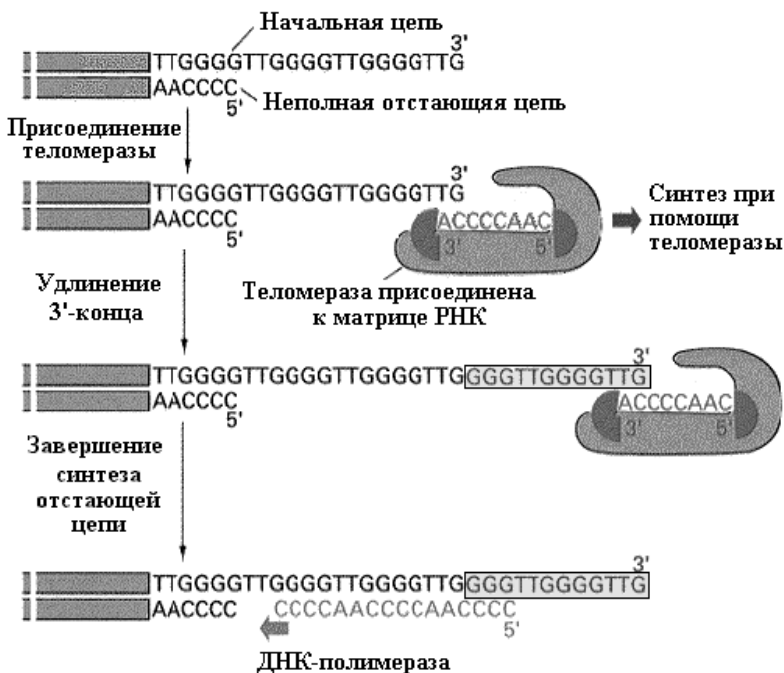


Рис. 7.9. Механизм репликации теломеров

## Репарация ДНК

Процесс коррекции повреждений в молекулах ДНК, который обеспечивает стабильность генома на протяжении многих поколений, носит название репарации. Механизм репарации характерен только для молекул ДНК, и обусловлен структурными особенностями этих молекул: наличие двух комплементарных и антипараллельных цепей.

В структуре молекул ДНК могут возникнуть два типа изменений.

- Модификация одного нуклеотида – нарушается только последовательность ДНК без повреждений ее структуры. Эти изменения не влияют на процессы репликации и транскрипции. Они могут возникнуть в результате ошибок репликации в случае спаривания некомплементарных оснований (например, С:::А) или при химических превращениях азотистых оснований (например, дезаминирование цитозина приводит к образованию урацила).
- Структурные модификации образуются в результате возникновения ковалентных связей между основаниями одной цепи или противоположных цепей. К примеру, ультрафиолетовые лучи провоцируют возникновение тиминовых димеров с образованием ковалентных связей между соседними тиминовыми основаниями одной цепи.

Структурные модификации могут привести к нарушению репликации и транскрипции. Системы репарации у разных организмов различны. Тем не менее, существуют общие для всех механизмы репарации:

- прямая репарация – встречается очень редко и состоит в возврате молекулы к исходному состоянию (путем аминирования  $U \rightarrow C$ );
- фотореактивация – широко распространена в природе и состоит в удалении пиримидиновых димеров при участии ферментов, зависимых от света;
- эксцизионная репарация – заключается в узнавании и вырезании поврежденного фрагмента одной цепи специальными ферментами. В дальнейшем восстановление удаленного участка происходит при участии ДНК-полимеразы с использованием в качестве матрицы неповрежденной цепи. Наконец, ДНК-лигаза связывает вновь синтезированный фрагмент с остальной цепью, восстанавливая ее целостность (рис.7.10);

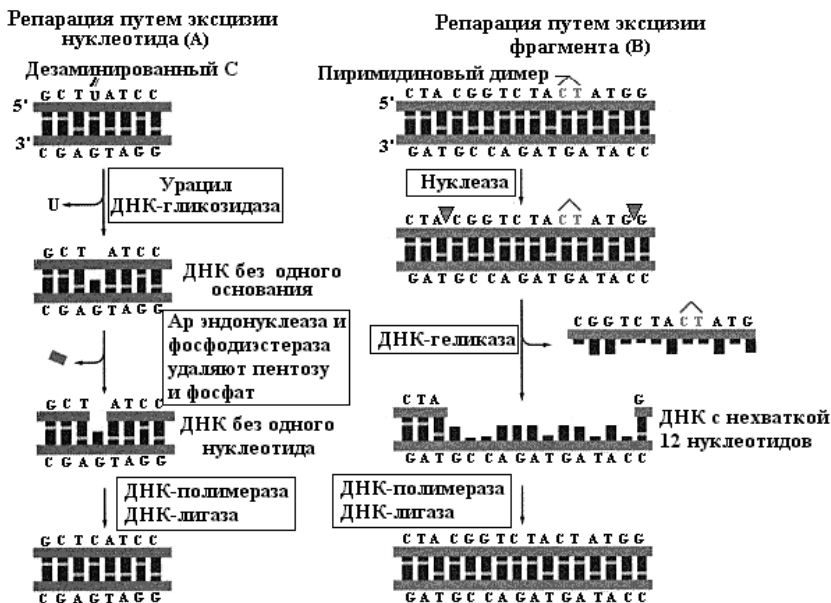


Рис. 7.10. Репарация путем эксцизии

- рекомбинационная репарация осуществляется ферментами, которые используют фрагмент одной молекулы для восстановления другой молекулы (рис.7.11). Может происходить как во время репликации, так и после нее;
- SOS-репарация индуцируется в результате влияния стрессовых факторов. Например, у *E.coli* под влиянием теплового шока или появления пиримидиновых димеров синтезируется избыточное количество белка RecA-протеазы. Другой белок LexA связан с последовательностью ДНК, названной SOS-блоком, который блокирует синтез ферментов репарации. RecA-протеаза в больших количествах гидролизует белок LexA, что приводит в результате к активации генов, кодирующих белки репарации (около 15 генов). SOS-ответ наступает быстро, в течение нескольких минут. На втором этапе синтезиру-

ется в большом количестве белок LexA, который блокирует синтез RecA-протеазы, и через 30-60 минут система SOS-репарации инактивируется. Механизм SOS-репарации включается при больших повреждениях, с целью исправления больших нарушений эксцизионным или рекомбинационным механизмами. Этот тип репарации не всегда точен и принцип комплементарности не всегда соблюдается. В результате после SOS-репарации молекулы могут содержать ошибки (мутации, которые передаются следующим поколениям молекул).

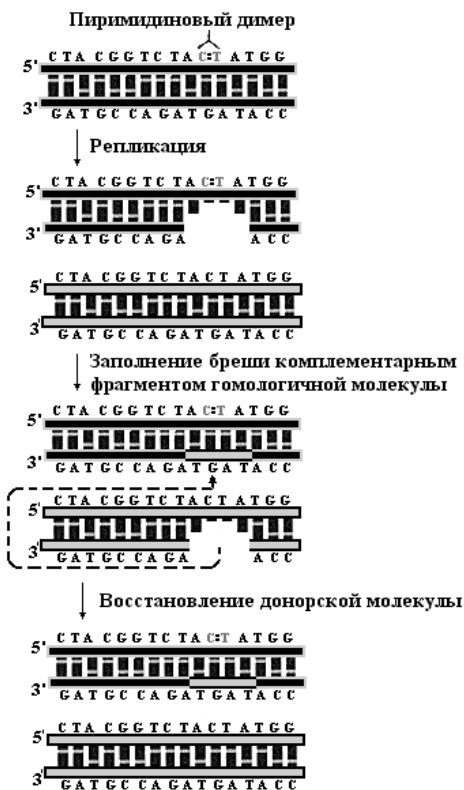


Рис. 7.11. Репликация путем рекомбинации



Было обнаружено несколько генов, участвующих в процессе репарации, к примеру, семейства RAD у дрожжей: RAD3 - эксцизионная репарация, RAD6 – пострепликационная репарация, RAD52 – рекомбинационная репарация.

У человека наиболее изученной является система, отвечающая за болезнь – пигментная ксеродерма (XP – *xeroderma pigmentosum*). XP – это генетическое заболевание с аутосомно-рецессивной передачей, которое характеризуется повышенной чувствительностью к солнечным лучам, особенно к ультрафиолетовым. Механизм этого заболевания объясняется нарушением эксцизионной репарации в клетках.

### **Метилирование ДНК.**

У прокариот существуют ферменты, которые обеспечивают метилирование (присоединение метиловой группы – CH<sub>3</sub>) цитозина и аденина с превращением их в метилцитозин и метиладенин. Метилированные последовательности устойчивы к воздействию специальных ферментов рестрикции (рестриктаз). У бактерий рестриктазы расщепляют чужеродные молекулы ДНК, в то время как собственная ДНК метилируется и не подвергается гидролизу.

У эукариот метилирование азотистых оснований осуществляется с целью инактивации неактивных в данной клетке генов (гетерохроматиновые участки ДНК содержат метилированные последовательности).

### **Контроль знаний:**

1. Дайте определение: репликация, репликон, реплисома, полимеразы, фрагмент Оказаки, репарация, метилирование.
2. Каковы основные принципы репликации ДНК?
3. В чем особенности репликации у прокариот и эукариот?
4. Каковы компоненты репликации?

5. В чем особенности синтеза лидирующей и отстающей цепи?
6. Какие типы репликации ДНК существуют?
7. В чем особенности репликации концевых участков хромосом?
8. Какие механизмы участвуют в стабилизации молекулы ДНК?
9. Какие ферменты участвуют в процессе репарации?
10. Каково биологическое значение метилирования ДНК?