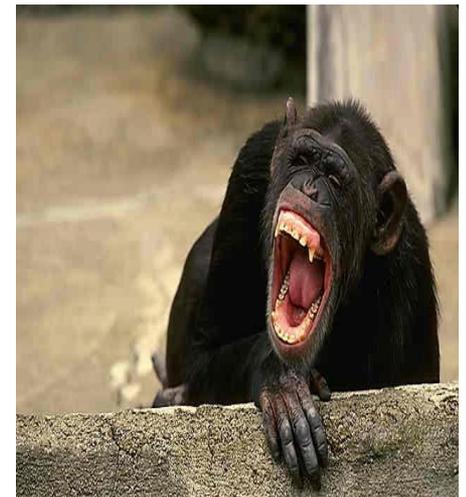


РЕПЛИКАЦИЯ. ДНК

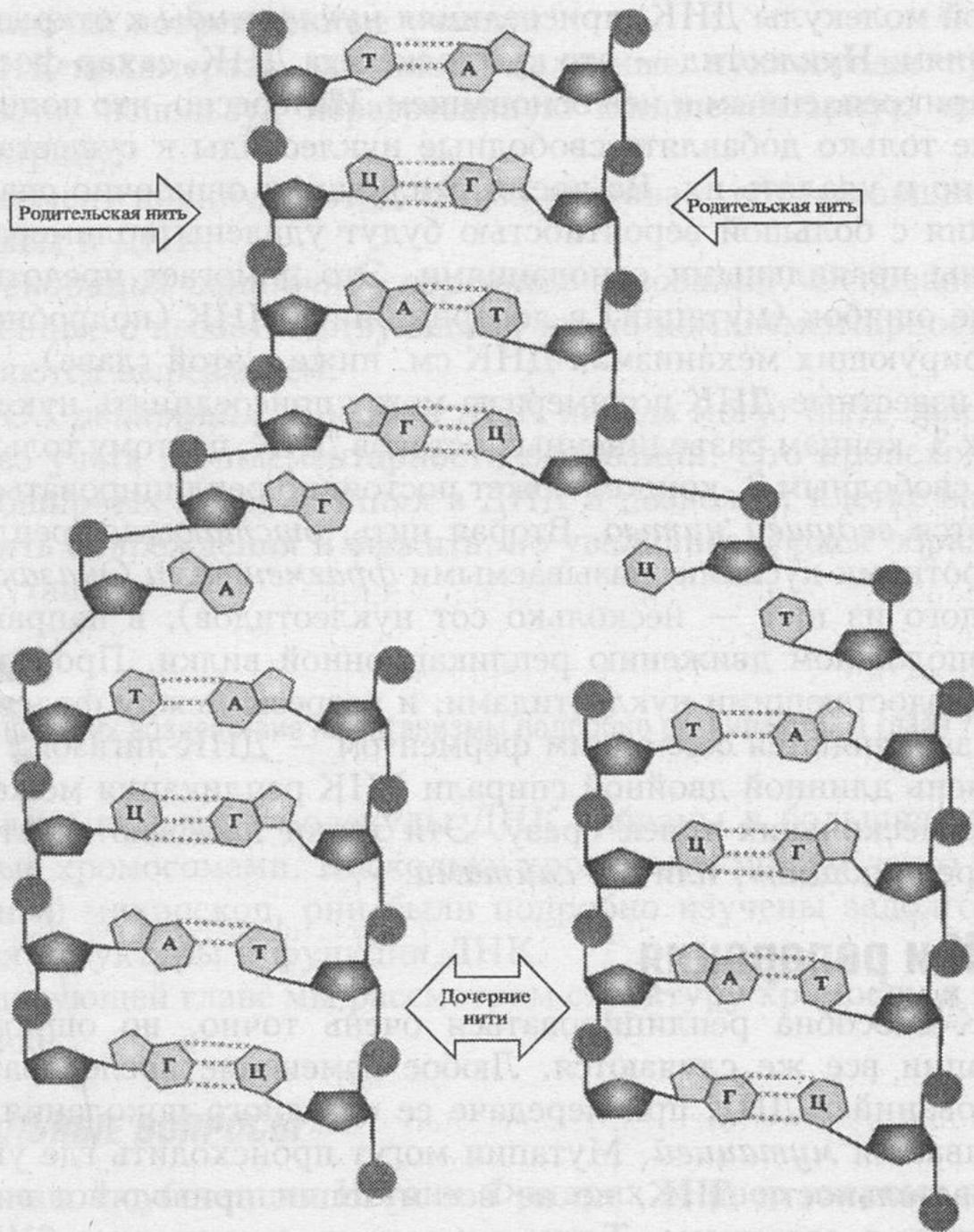
Резяпкин Виктор Ильич
доцент кафедры биохимии
v.rezyapkin@grsu.by



- **В основе репликации лежит принцип комплементарности**
- **В результате репликации образуются дочерние молекулы НК, нуклеотидные последовательности которых идентичны между собой и с материнской молекулой НК**

Типы репликации

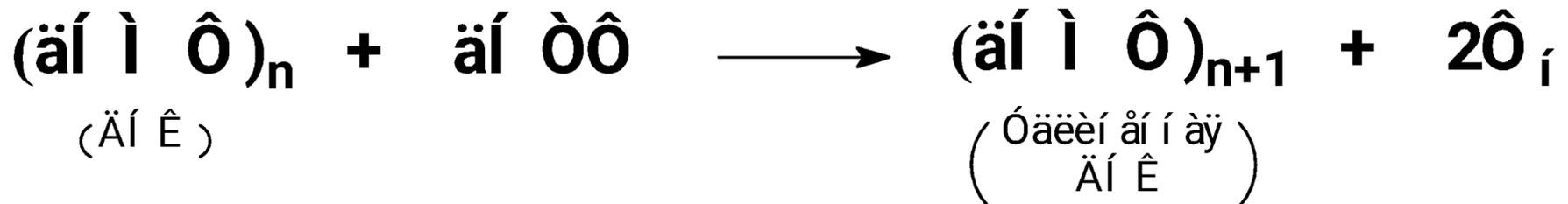
- **Полуконсервативный** – вновь синтезированная молекула НК состоит из одной материнской и одной дочерней полинуклеотидных цепей НК
- **Консервативный** – вновь синтезированная молекула НК состоит только из дочерних полинуклеотидных последовательностей
- **Дисперсный** – вновь синтезированная полинуклеотидная цепь НК состоит из фрагментов дочерних и материнских полинуклеотидных последовательностей
- Для прокариот и эукариот характерен полуконсервативный тип репликации
- У вирусов встречаются все три типа репликации



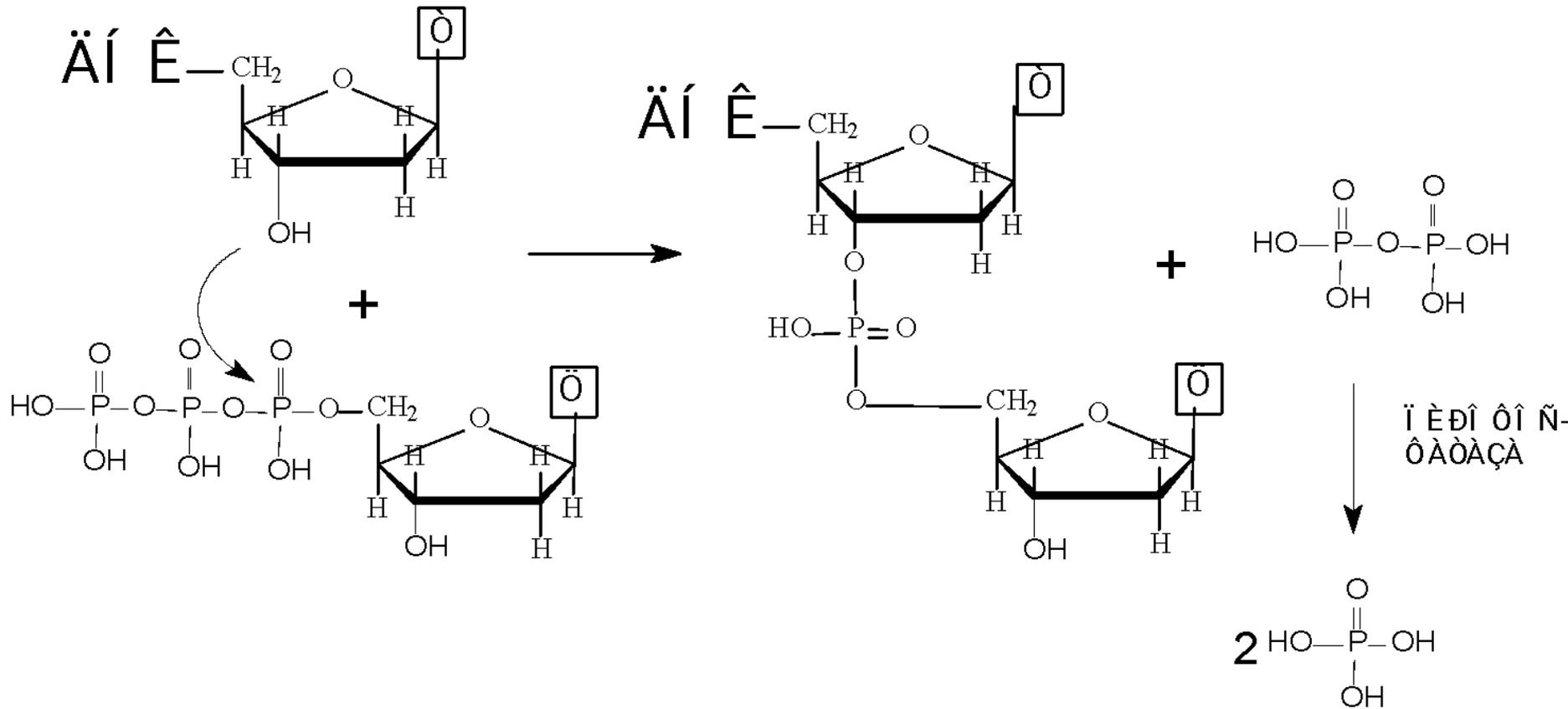
Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК

ДНК-полимеразы

- ДНК-полимеразы осуществляют синтез ДНК.
- Субстратом ДНК-полимераз являются дезоксинуклеотид-5'-трифосфаты: дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ.
- Уравнение этой реакции в общем виде выглядит так:

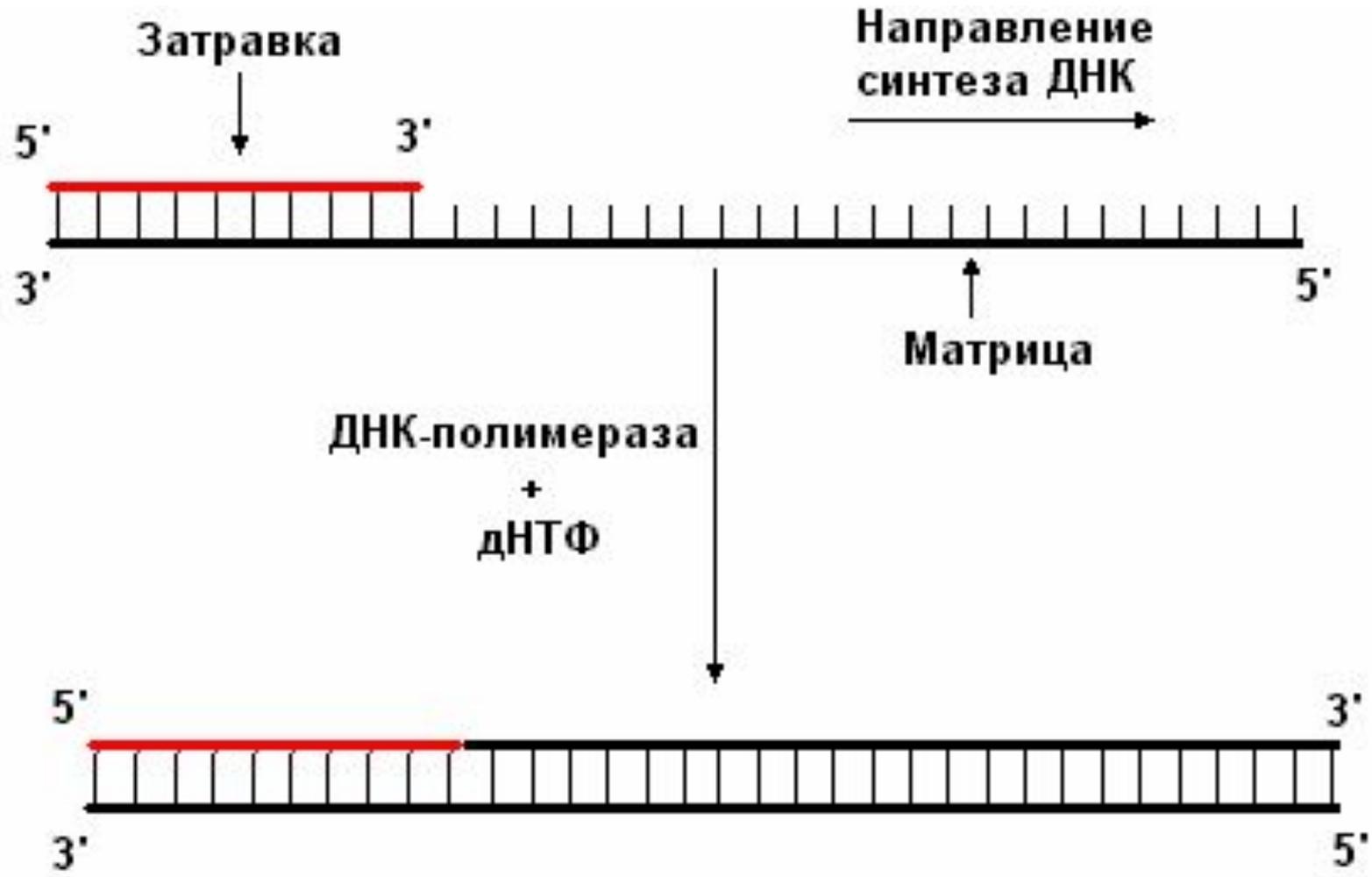


- ДНК-полимераза последовательно добавляет нуклеотиды к 3' – концу полинуклеотидной цепи

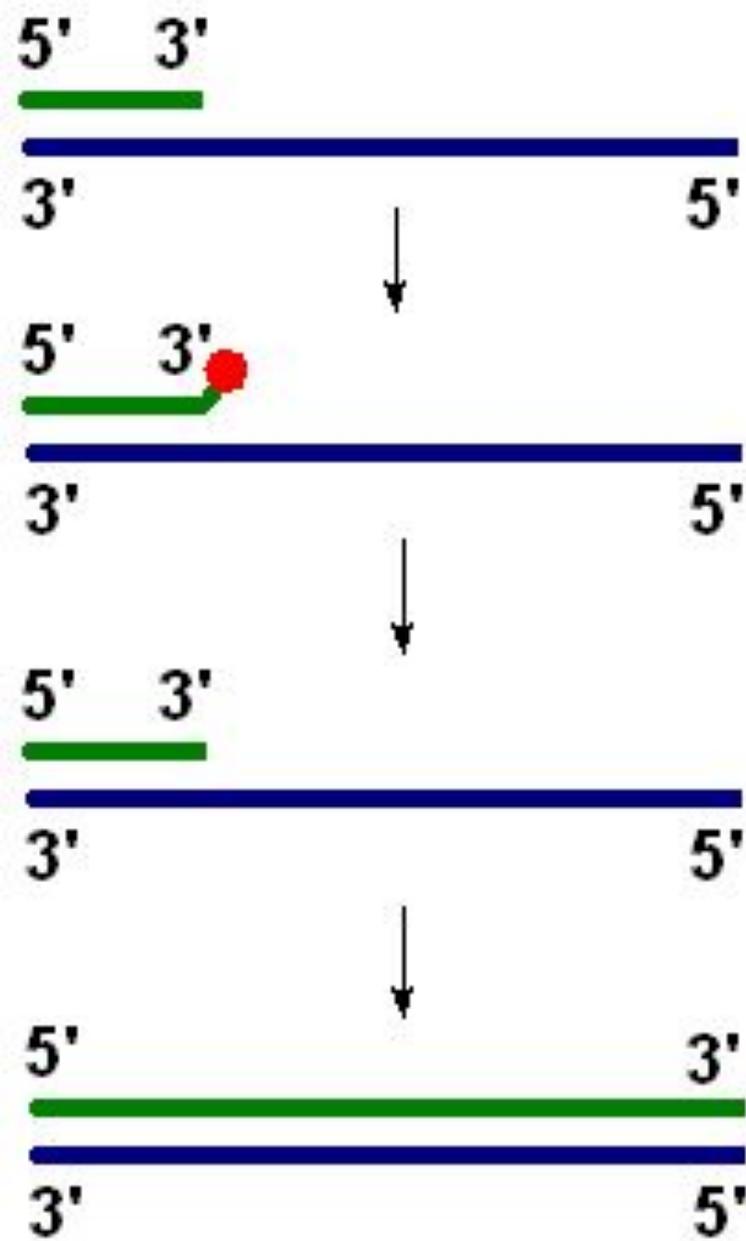


- Синтез новой цепи происходит в направлении от 5'-конца к 3'-концу.
- ДНК-полимераза может только наращивать цепь ДНК, начать же синтез ДНК с нуля она не может, (для начала ее работы требуется затравка)
- В качестве затравки может выступать ДНК или РНК
- ДНК-полимераза способна удлинять цепь только в присутствии цепи, играющей роль матрицы
- Нуклеотиды присоединяются к затравке в соответствии с принципом комплементарности, напротив аденина всегда будет встроен тимин, а напротив гуанина – цитозин.

- ДНК-полимераза наращивает цепь в направлении 5' → 3'. Для этого ей нужны матрица и затравка

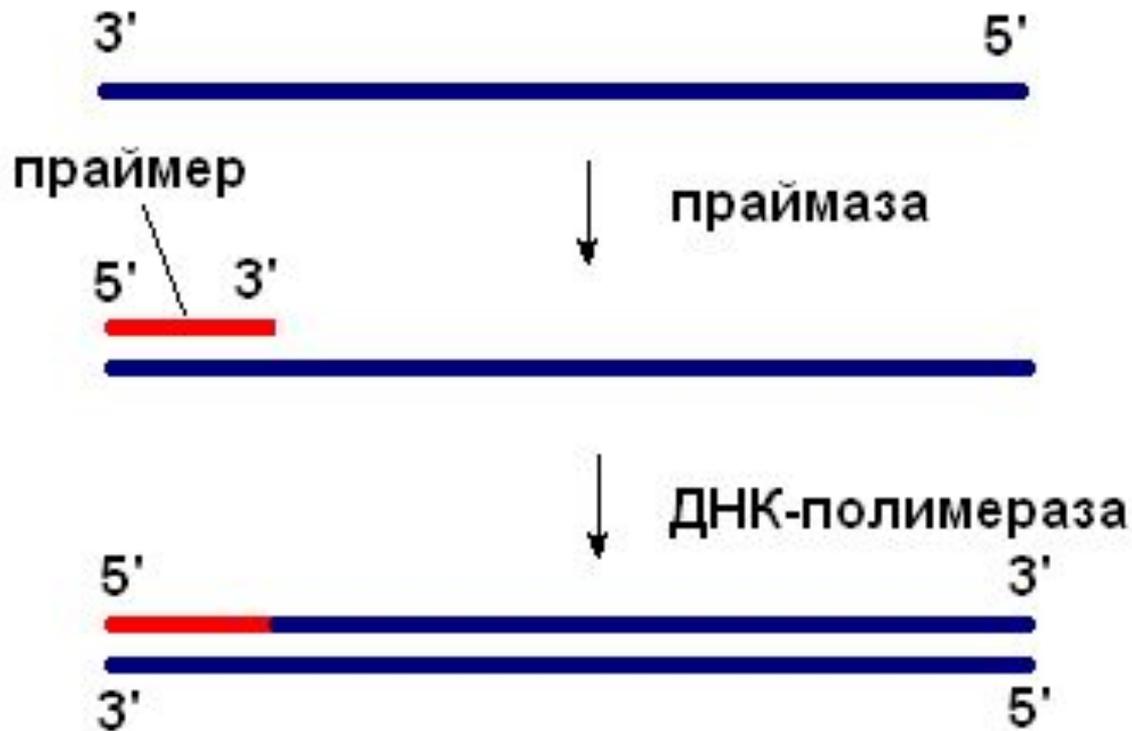


- **Задача ДНК-полимеразы – снять точную копию с матрицы**
- **ДНК-полимераза проверяет комплементарность каждого нуклеотида дважды:**
 1. **перед включением его в состав растущей цепи**
 2. **перед тем как включить следующий нуклеотид.**
 - **Очередная фосфодиэфирная связь образуется, если последний нуклеотид комплементарен матрице.**
 - **Если включен некомплементарный нуклеотид, то он удаляется за счет 3 → 5'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы**



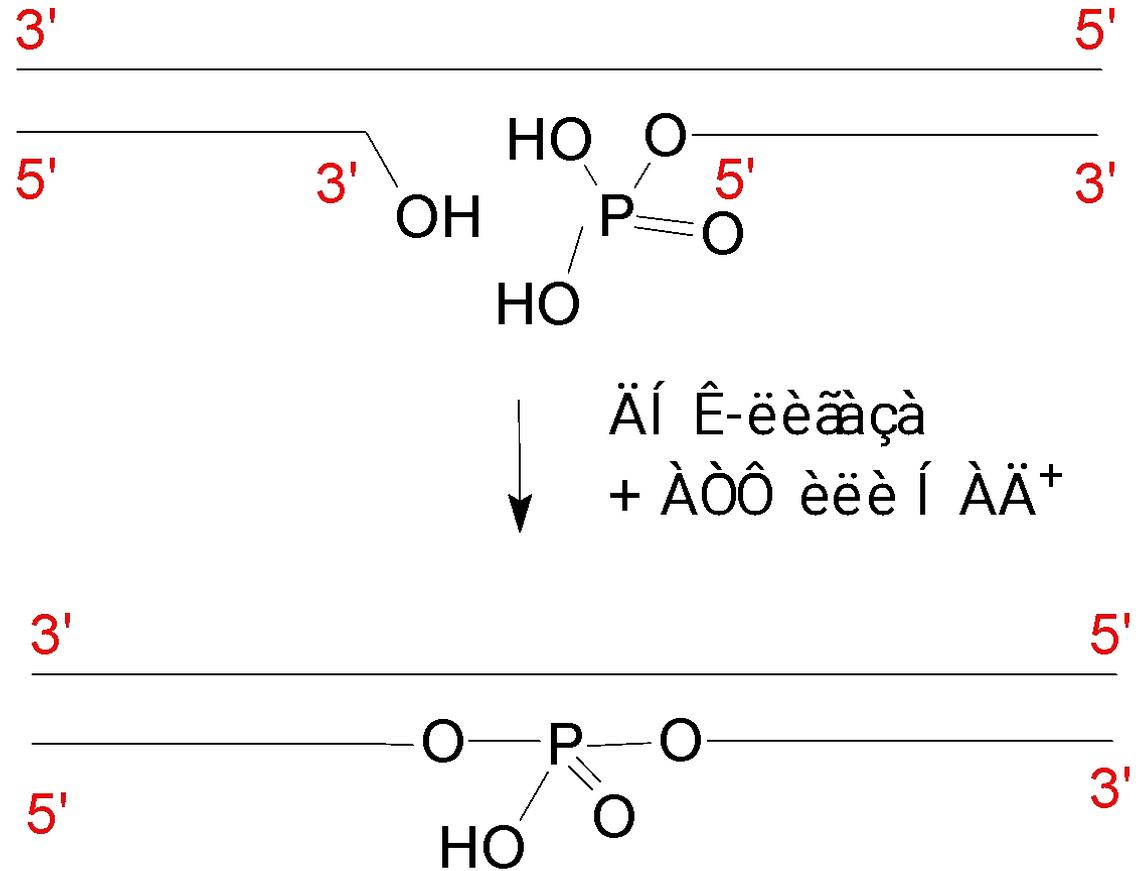
Праймаза

- Праймаза – синтезирует праймер (РНК-затравку)

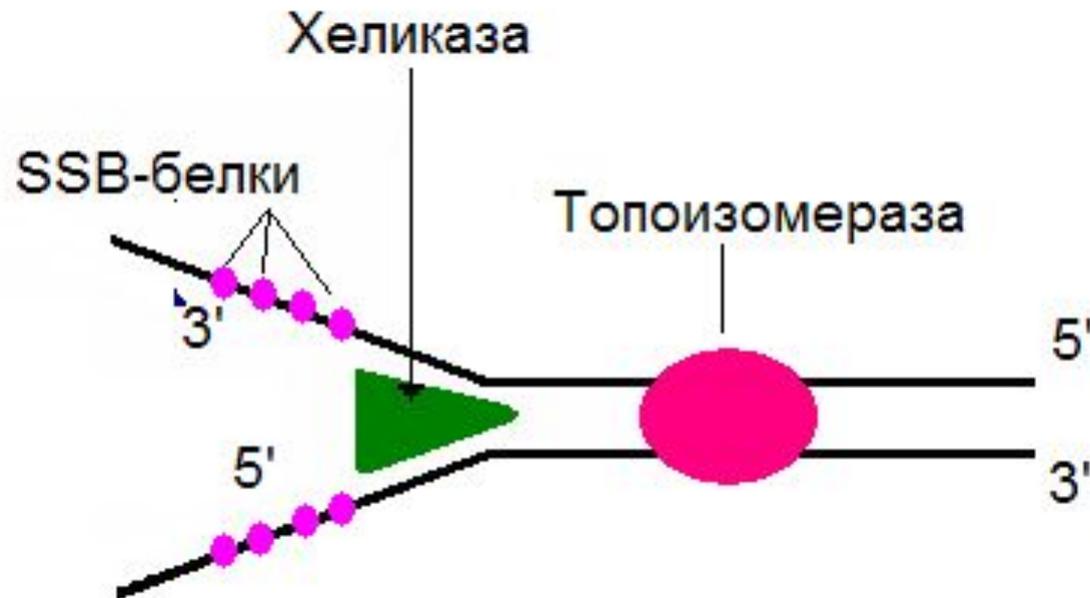


ДНК-лигаза

- ДНК-лигаза соединяет 5'-фосфатную и 3'-гидроксильную группы соседних нуклеотидов, в результате образуется фосфодиэфирная связь, ликвидирующая разрыв

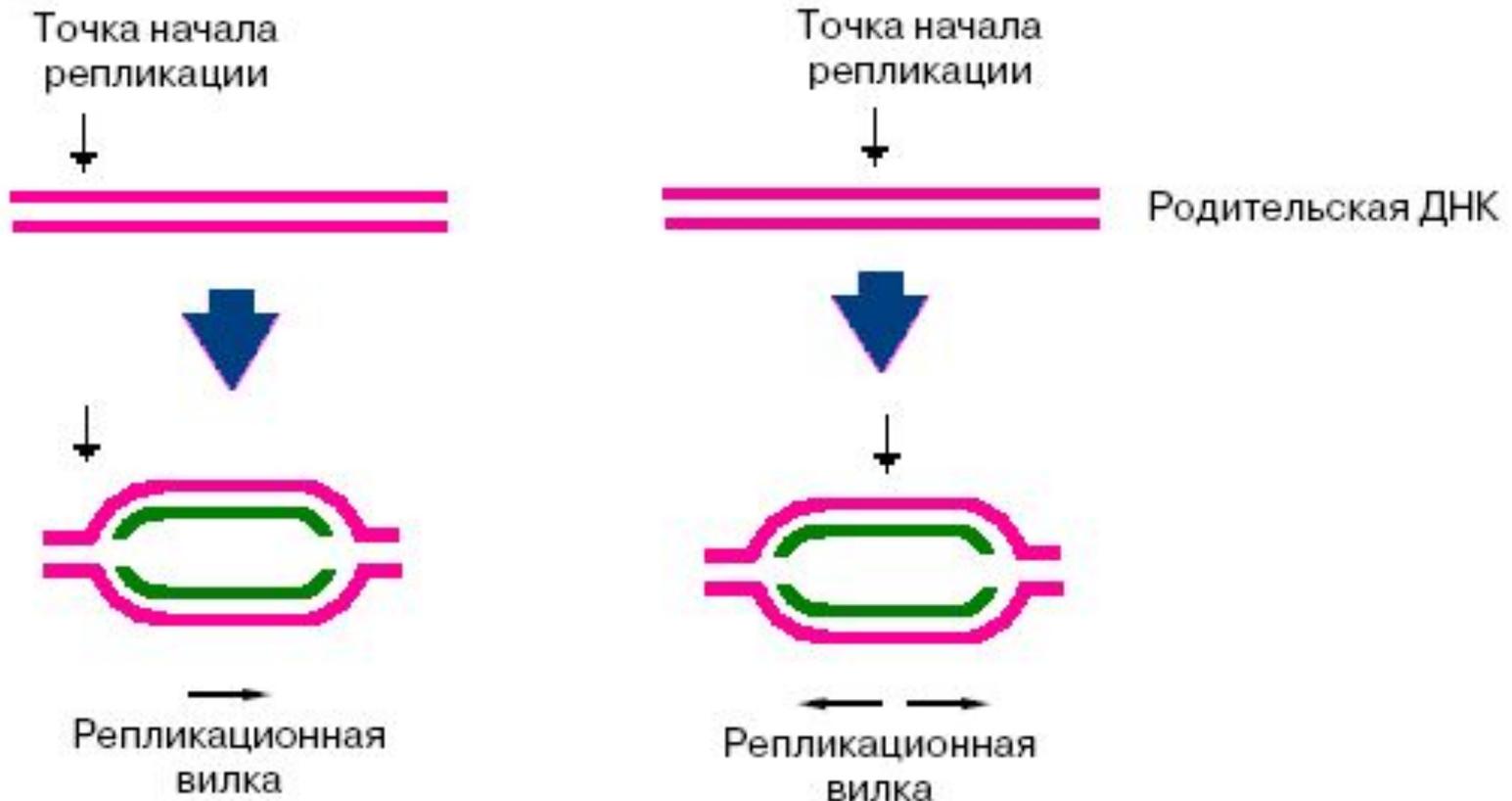


- **ДНК-хеликаза** осуществляет расплетение двойной спирали ДНК, используя энергию гидролиза АТФ
- **Белки, связывающиеся с одноцепочечной ДНК (SSB-белки)**, обладают большим сродством к одноцепочечной ДНК, препятствуют образованию двойной спирали.
- **Топоизомеразы** снимают напряжения, возникшее в результате расплетения двойной спирали в ДНК, за счет разрыва и последующего воссоединения цепи ДНК

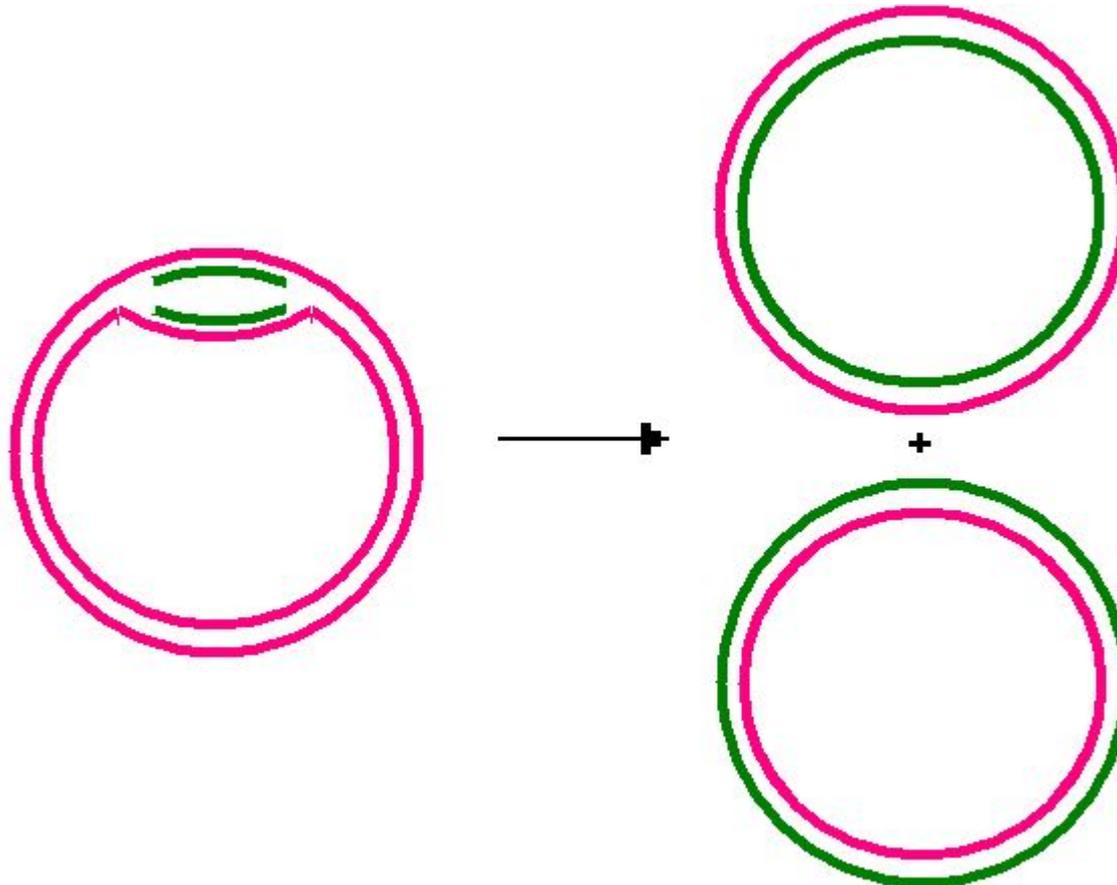


Механизм репликации

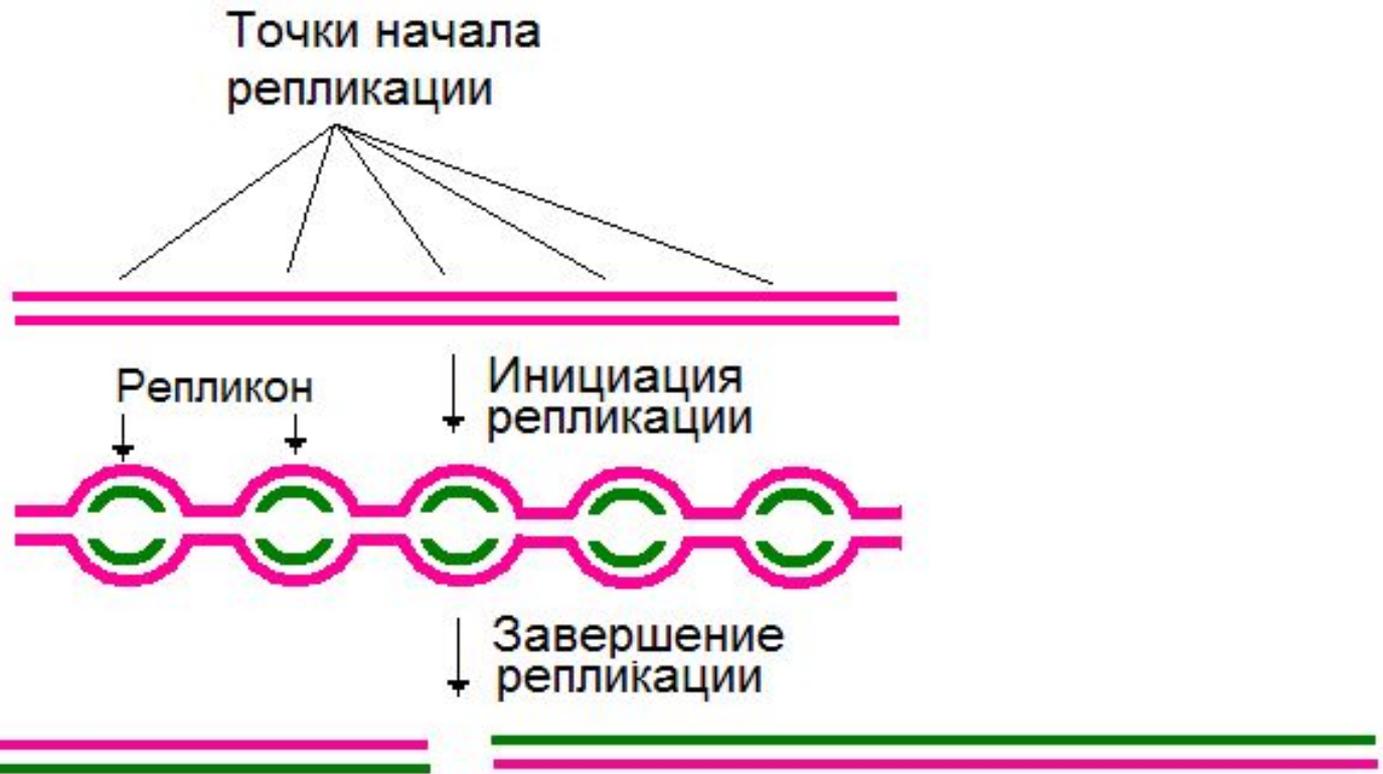
- Репликация ДНК начинается в определенном месте – в точке начала репликации
- Репликация от точки начала репликации может происходить в одном или двух направлениях



- Бактериальная хромосома имеет одну точку начала репликации, т.е. представляет собой единицу репликации, получившее название **репликон**
- Иначе говоря, бактериальная хромосома представлена одним репликоном



- ДНК эукариот представлена множеством репликонов



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

Механизм репликации у *E.coli*.

ДНК-полимеразы *E.coli*

ДНК-полимераза I.

- На одной полипептидной цепи содержится 2 активных центра:

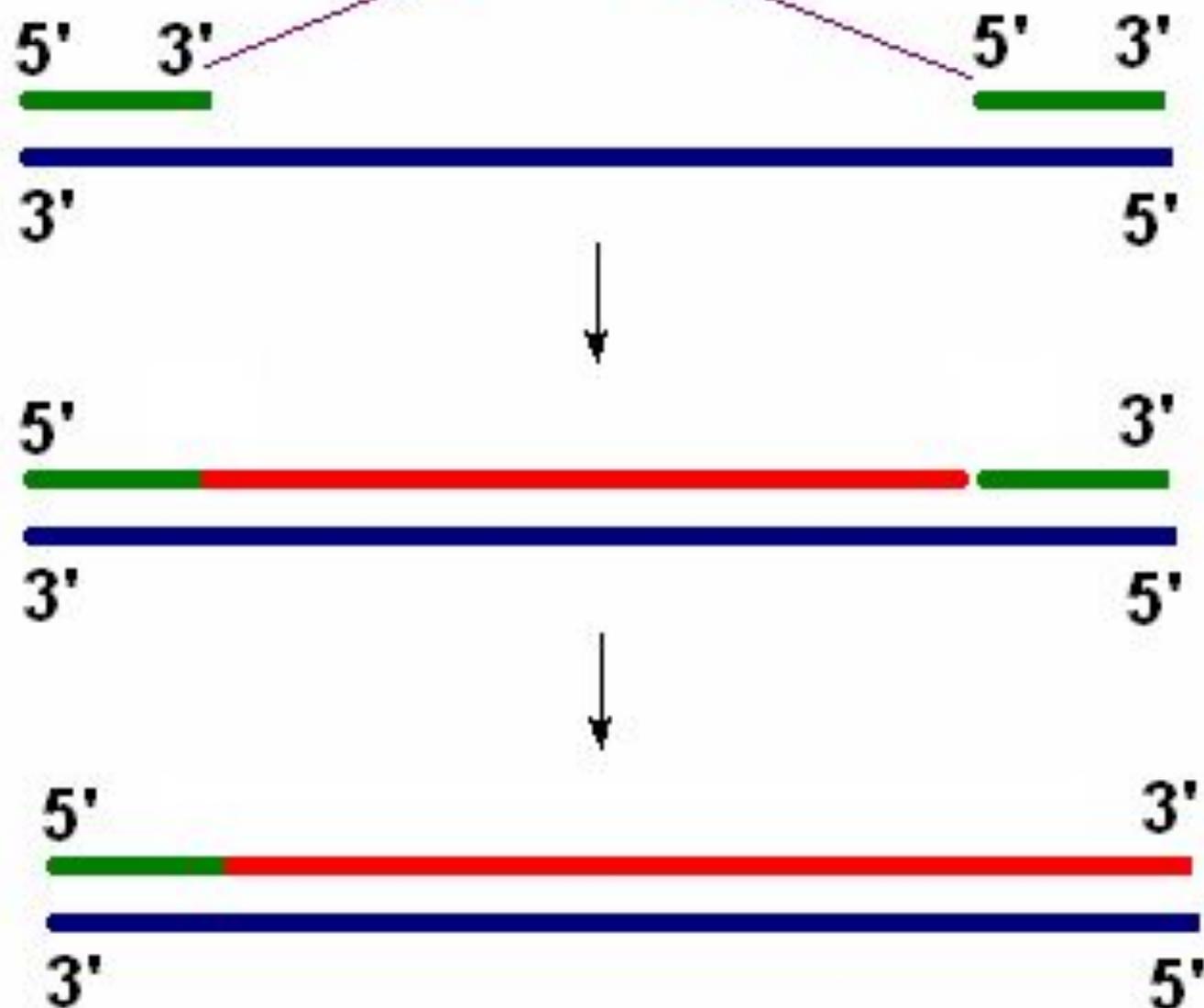
1-ый – ответственен за полимеразную и $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазную активности.

Последняя обеспечивает удаление ошибочно встроенных нуклеотидов.

2-ый – за $5' \rightarrow 3'$ - экзонуклеазную активности.

Эта активность необходима для удаления РНК-затравки в процессе репликации.

затравка

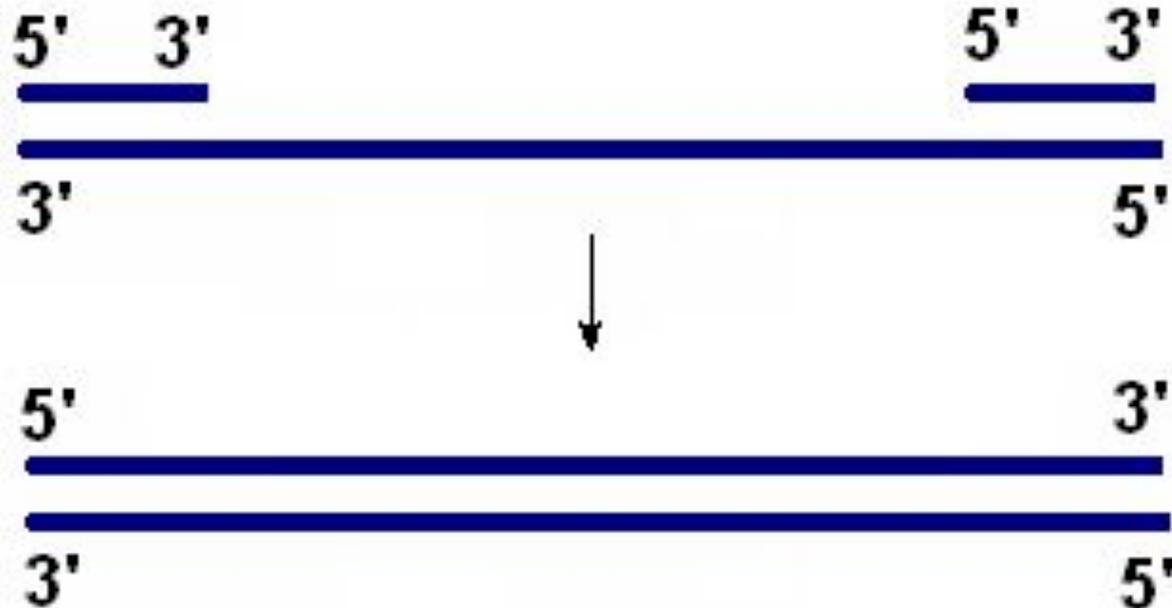




ДНК-полимераза I
(кольцеобразная
структура, состоящая
из нескольких
одинаковых молекул
белка, показанных
разными цветами)

ДНК-полимераза II.

- Обладает полимеразной и 3'→5'- экзонуклеазной активностями
- Лучше всего работает на двухцепочечных ДНК с брешами
- Основное назначение – репарация ДНК



ДНК-полимераза III.

- **Обладает полимеразной и 3'→5'- экзонуклеазной активностями**
- **Основное назначение – репликация ДНК**
- **Скорость синтеза – 500 нуклеотидов в секунду**

Хромосома *E. coli* имеет одну точку начала репликации (*oriC*), ее - размер 258 н. п.

OriC узнает белок Dna A и инициатирует репликацию.

АТФ-зависимая хеликаза начинает расплетать дуплекс ДНК.

Топоизомераза, располагаясь впереди по ходу движения репликативной вилки, снимают напряжение, возникающее в результате расплетения двойной спирали в ДНК.

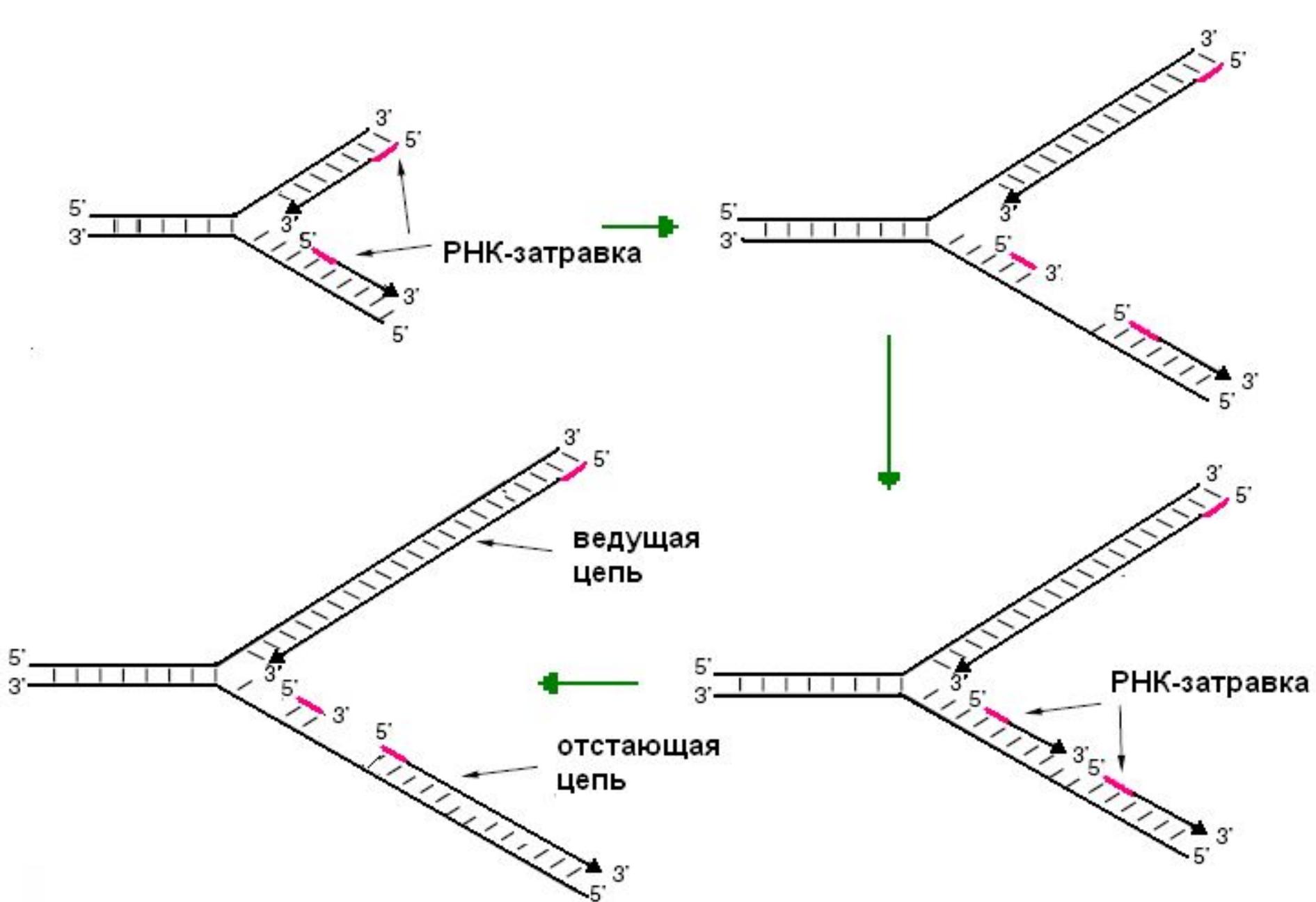
С одноцепочечными участками ДНК связывается SSB-белок.

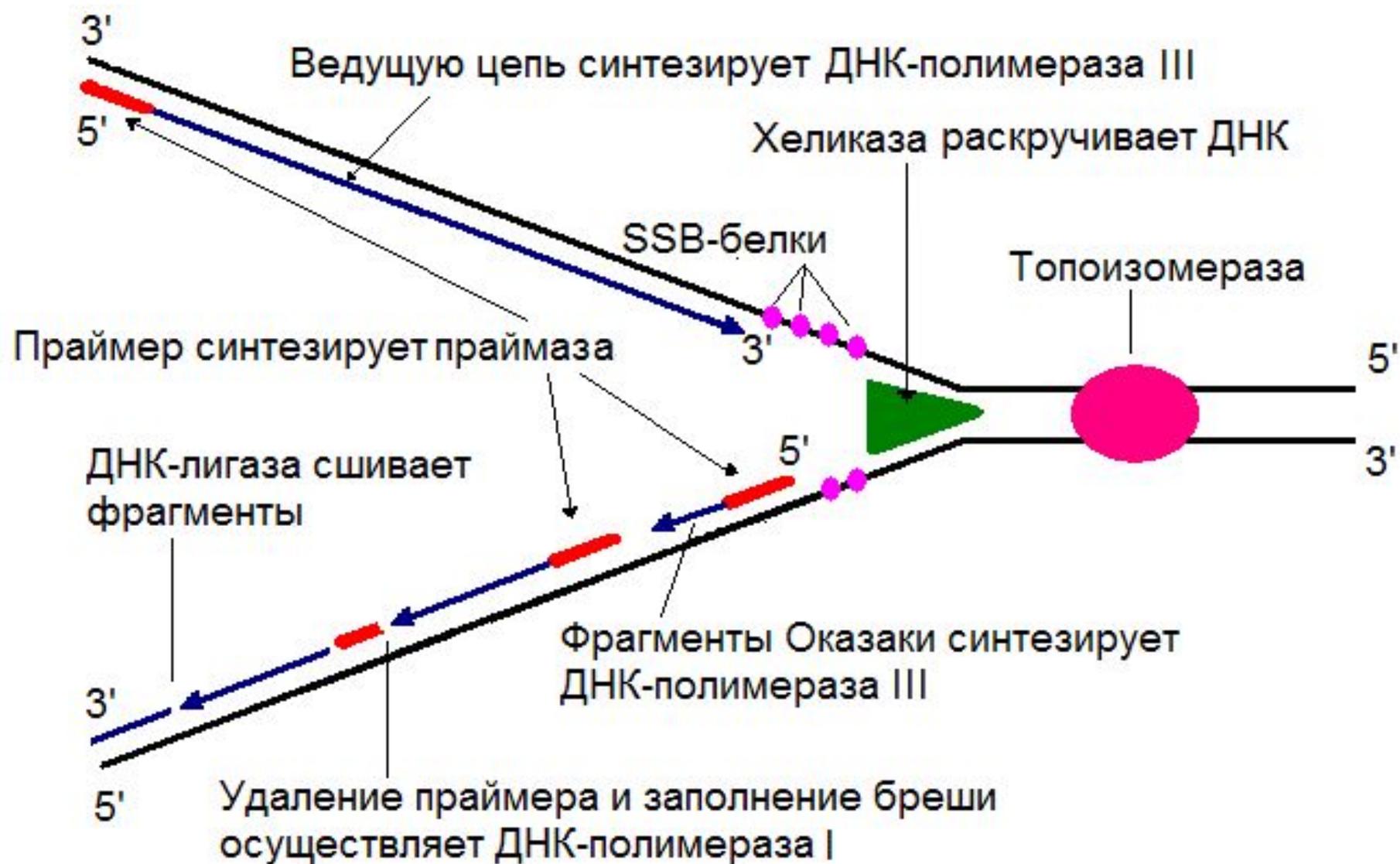
Праймаза осуществляет синтез затравки.

В работу включается ДНК-полимераза III.

Поскольку синтез ДНК осуществляется в направлении $5' \rightarrow 3'$, одна цепь синтезируется непрерывно (ведущая цепь), вторая фрагментами (отстающая цепь) по 1000 – 2000 нуклеотидов (фрагменты Оказаки).

- По окончании синтеза фрагмента Оказаки ДНК-полимераза I за счет 5' → 3'-экзонуклеазной активности удаляет затравку и заменяет ее на ДНК.
- После действия этого фермента между фрагментами Оказаки остается разрыв, который сшивает ДНК-лигаза.





- Терминация репликации происходит после удвоения кольцевой молекулы ДНК.

Репликация хромосом у эукариот

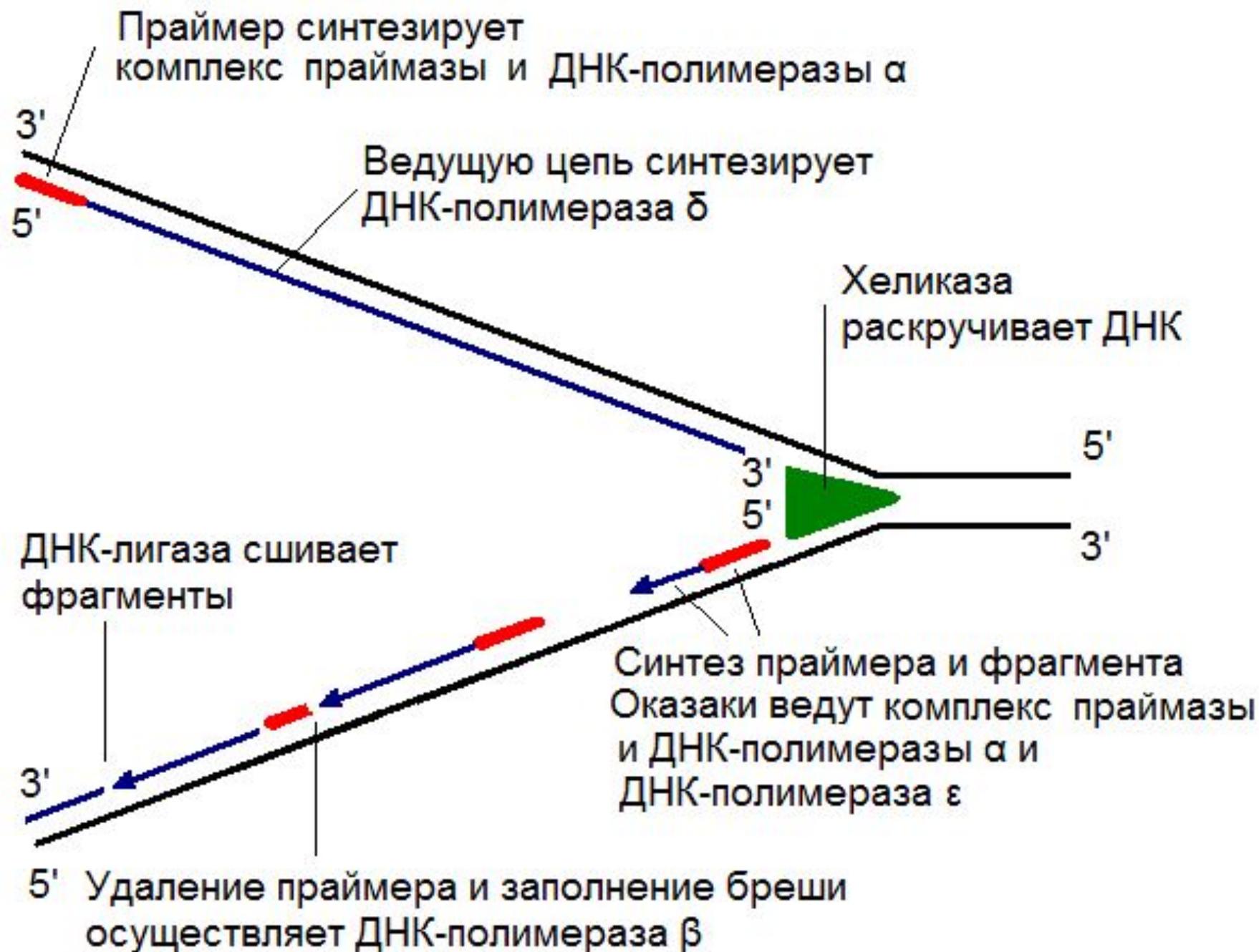
- У эукариот обнаружено несколько ДНК-полимераз:
- *ДНК-полимераза α* образует прочный комплекс с праймазой. Этот комплекс способен инициировать синтез ДНК de novo.

Вначале праймаза комплекса синтезирует РНК-затравки длиной около 10 нуклеотидов, затем ДНК-полимераза начинает синтез ДНК.

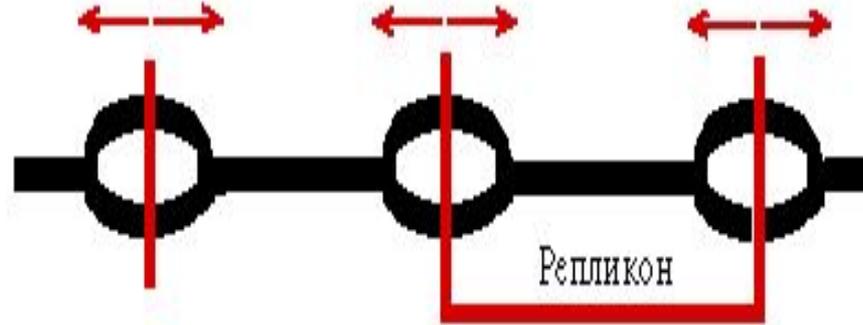
У ДНК-полимеразы α 3'→5'-экзонуклеазная активность как правило отсутствует.

- *ДНК-полимераза β* принимает участие в процессинге фрагментов Оказаки и репарации ядерной ДНК.

- ДНК-полимераза δ обладает полимеразной и 3' \rightarrow 5'-экзонуклеазной активностями.
- ДНК-полимераза ϵ обладает полимеразной и 3' \rightarrow 5'-экзонуклеазной активностями.
- ДНК-полимераза γ обеспечивает репликацию и репарацию митохондриальной ДНК, она кодируется ядерным геномом.
- ДНК-полимераза ζ (дзета) обладает полимеразной и 3' \rightarrow 5'-экзонуклеазной активностями, осуществляет синтез ДНК при SOS-репарации.
- Скорость синтеза ДНК у эукариот приблизительно на порядок ниже, чем у прокариот и составляет около 50 нуклеотидов в секунду.



- Размер фрагментов Оказаки у эукариот меньше, чем у прокариот и составляет около 100 нуклеотидов.
- Инициация репликации у эукариот происходит на многочисленных точках начала репликации.
- У млекопитающих точки начала репликации располагаются на расстоянии ~ 100 тыс. н. п. друг от друга.
- Синтез ДНК в репликаонах происходит в двух направлениях.

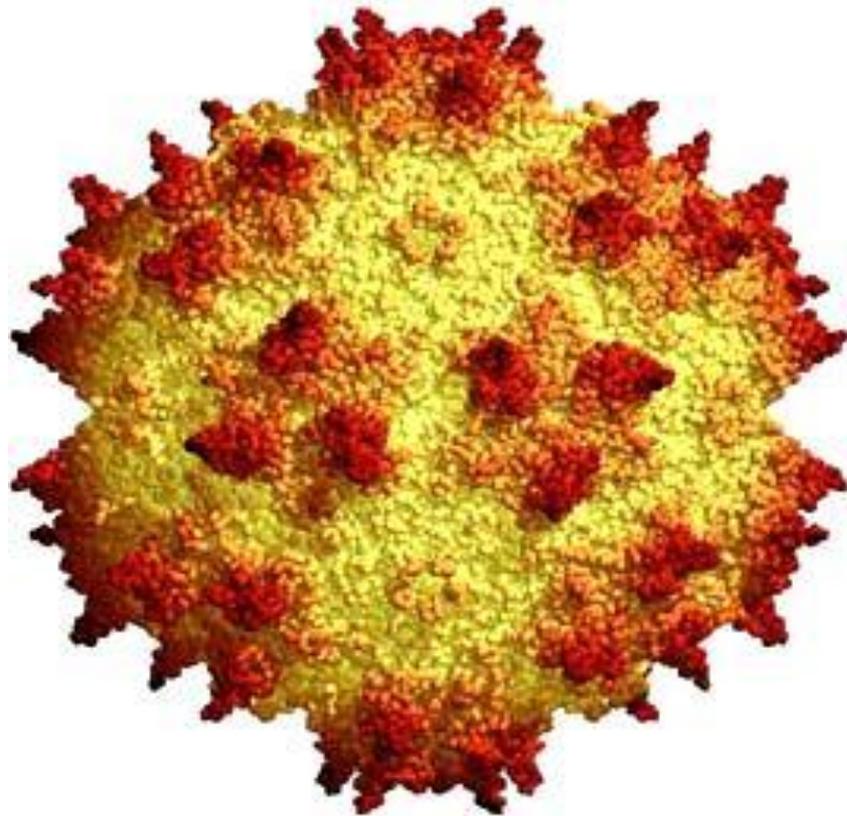


- Наличие многочисленных репликаонов у эукариот связано с большими размерами ДНК и более низкой активностью ДНК-полимераз.

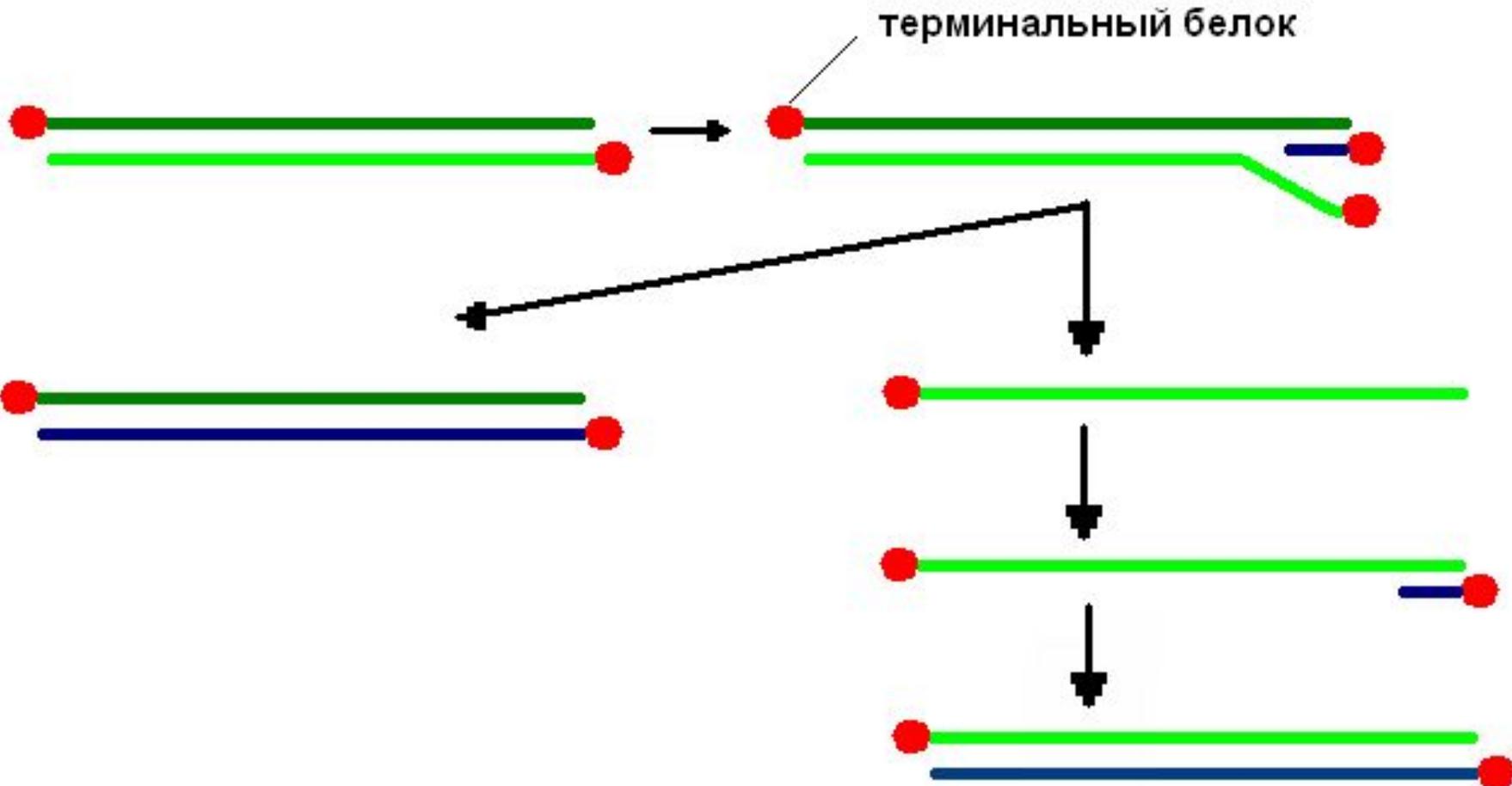
- Продвижение репликативной вилки прекращается при столкновении с другой вилкой или при достижении конца хромосомы.
- в результате репликации образуются две дочерни молекулы ДНК, являющиеся точными копиями материнской.
- Причем каждая дочерняя молекула ДНК состоит из одной материнской и одной дочерней цепей ДНК.
- Такой тип репликации называется полуконсервативным.
- Образовавшиеся молекулы ДНК в результате митоза распределяются между дочерними клетками.
- Репликация обеспечивает воспроизведение генотипов в ряду поколений.

Репликация вирусов

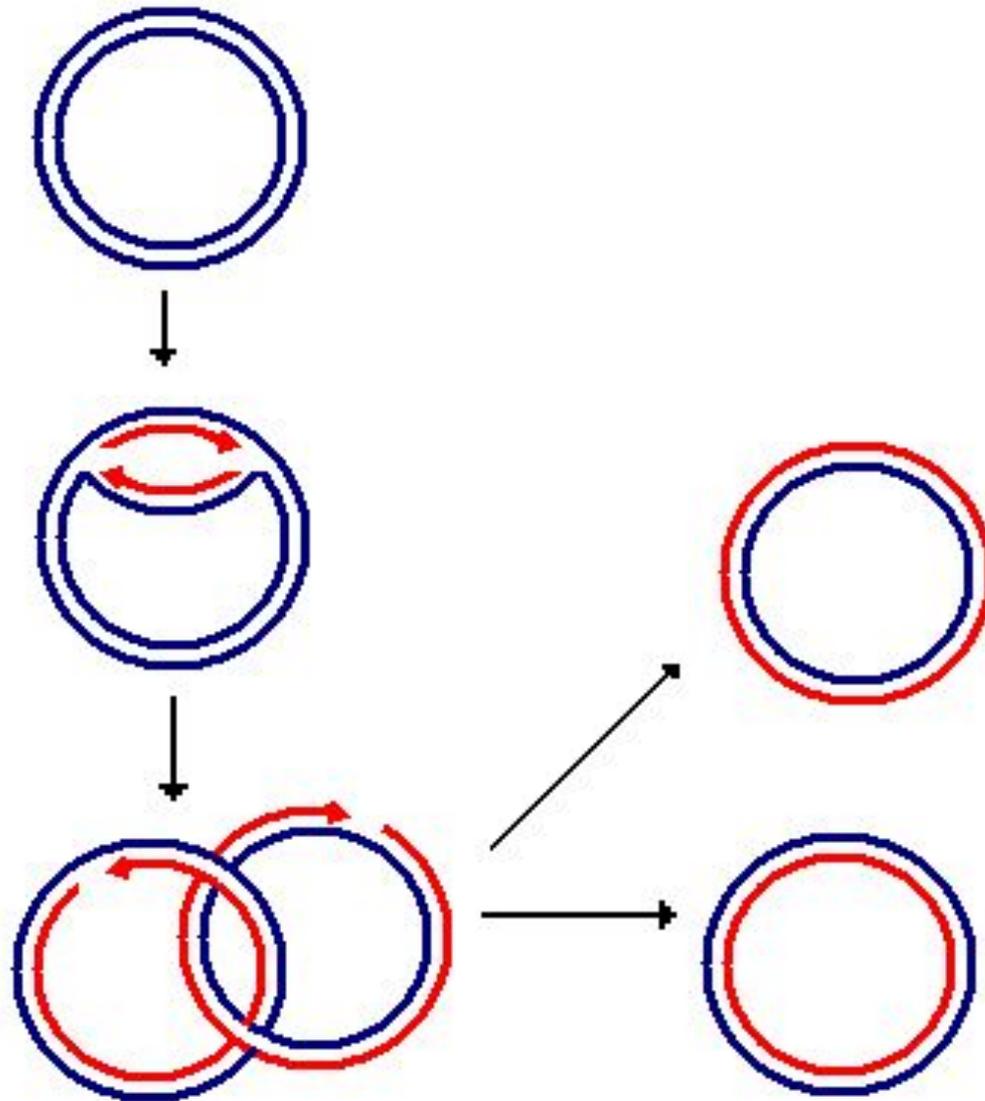
Репликация генома аденовирусов (терминальная инициация с использованием нуклеотид-белковой затравки)



Роль затравки выполняет комплекс терминального белка и одного нуклеотида



- **Схема репликации SV-40**



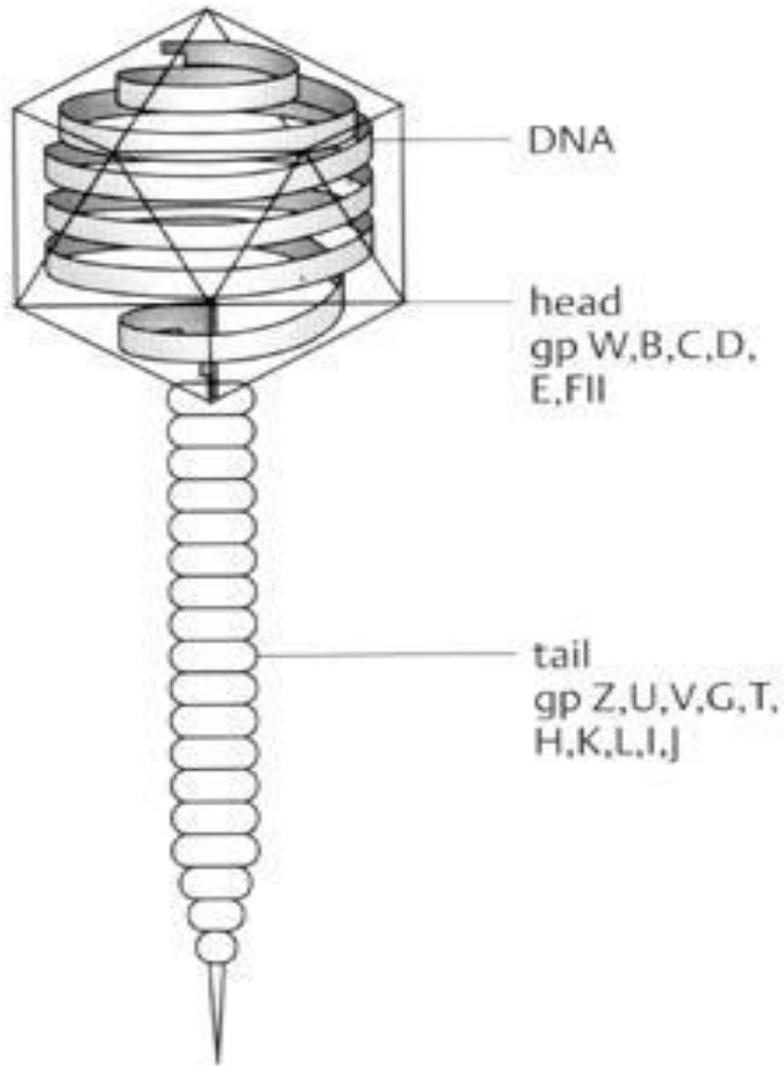
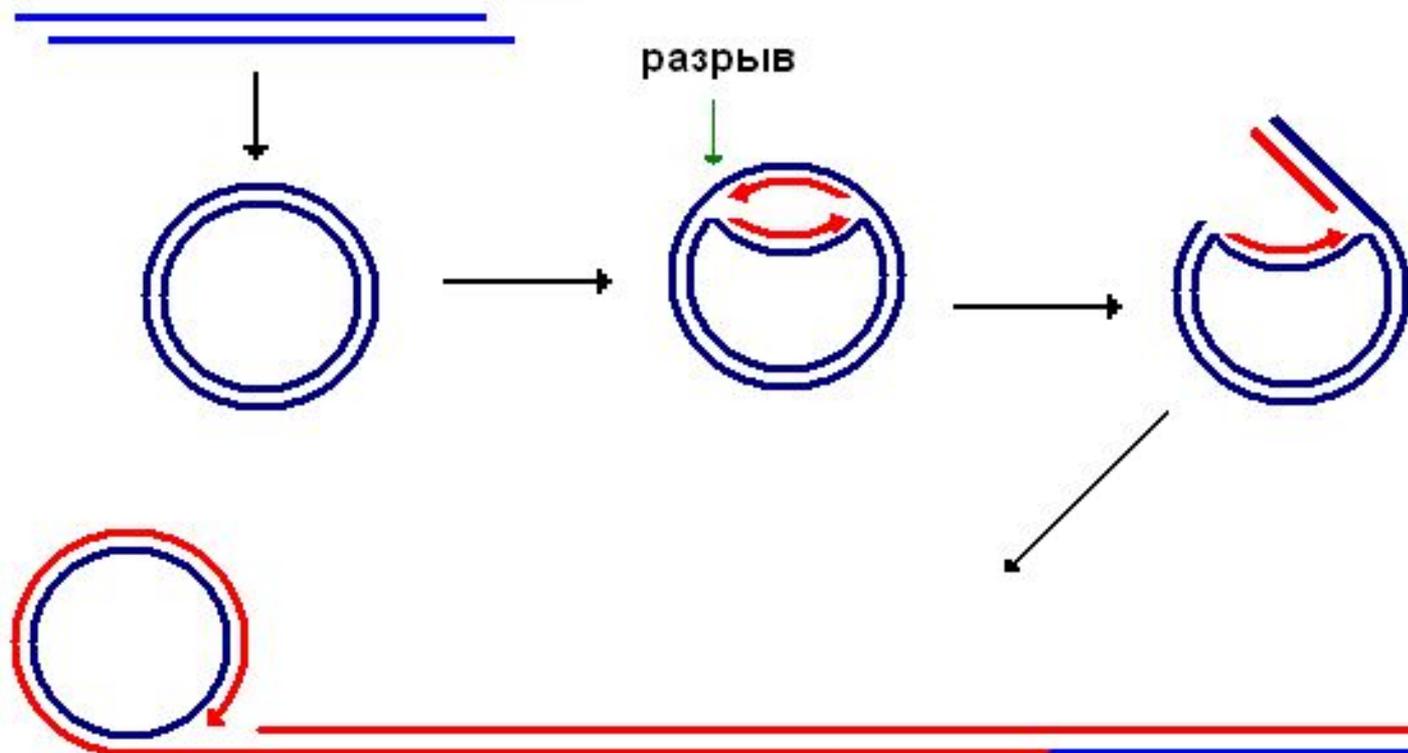


Схема репликации **λ-фага** (репликация по схеме вторично разматывающегося кольца)

- В клетке линейная ДНК λ-фага за счет липких концов образует кольцо и превращается в ковалентно-непрерывную форму



На поздних стадиях репликации молекула ДНК будет содержать множественные копии вирусного генома



фагоспецифическая эндонуклеаза вносит ступенчатые разрывы в строго определенных местах



Схема репликации генома по схеме катящегося кольца (φX174)

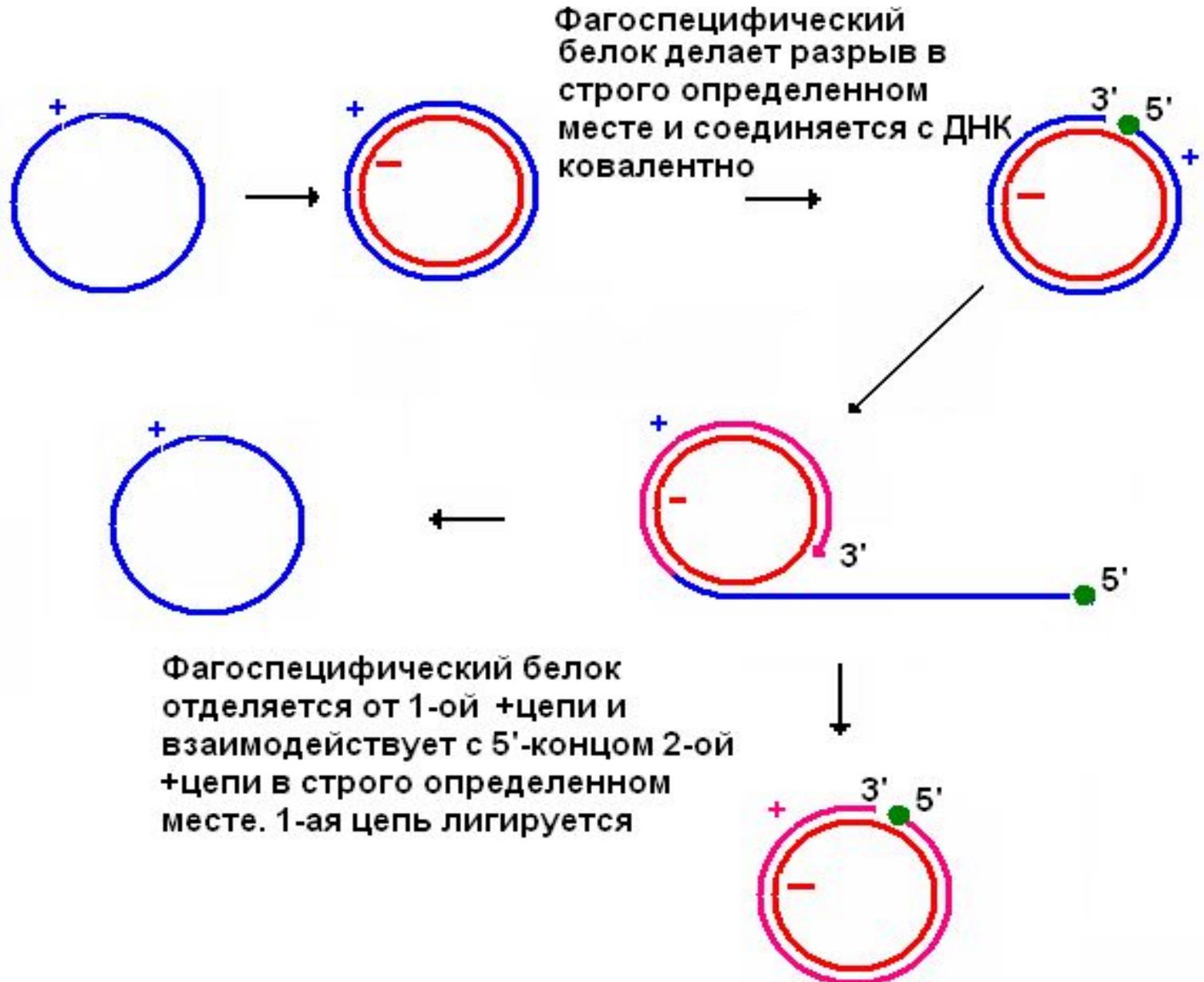


Схема репликации парвовирусов

(терминальная инициация при помощи самозатравочного механизма.

- Оба конца цепи ДНК способны образовывать шпильки

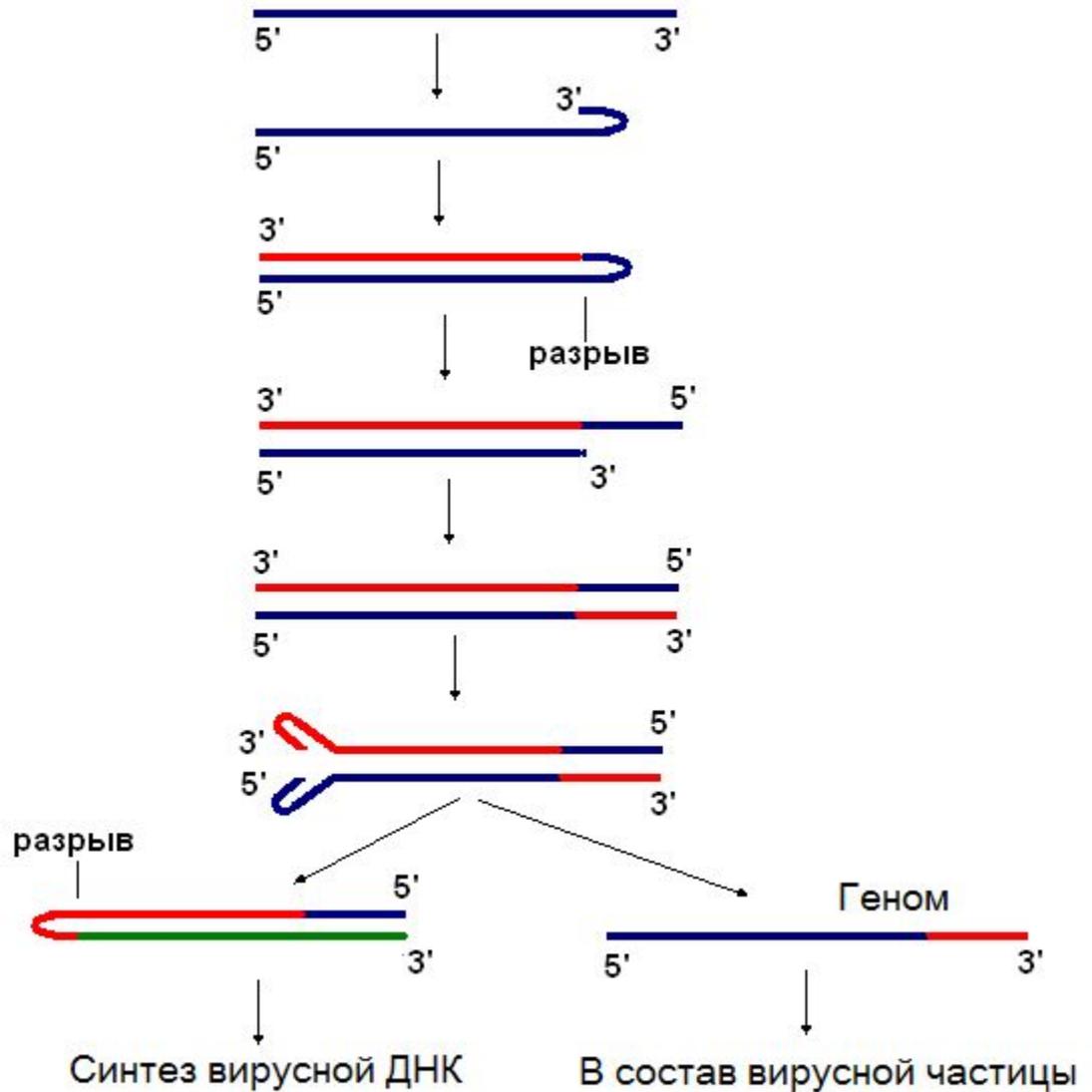
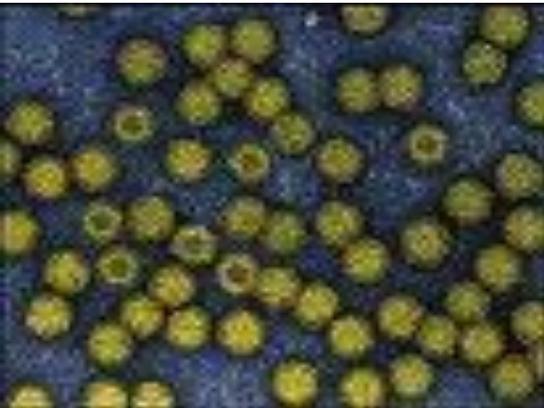
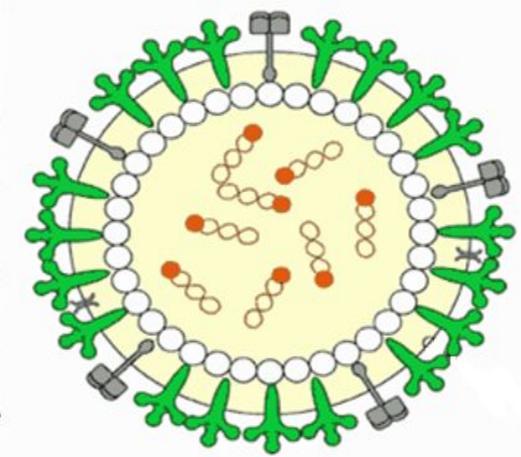


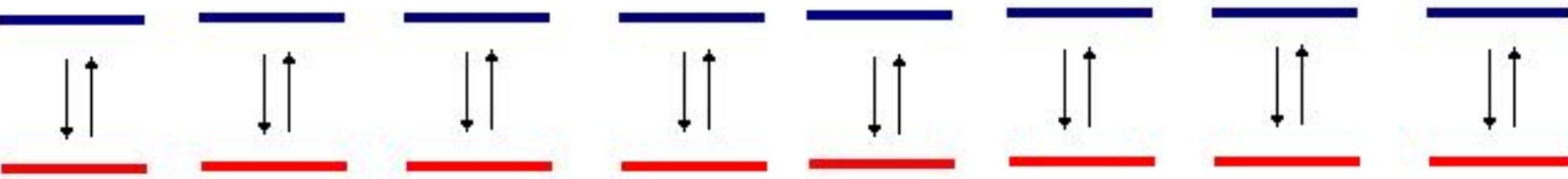
Схема репликации генома вируса гриппа



Геном вируса гриппа представлен 8 молекулами одноцепочечных – РНК от 900 до 2350 нуклеотидов



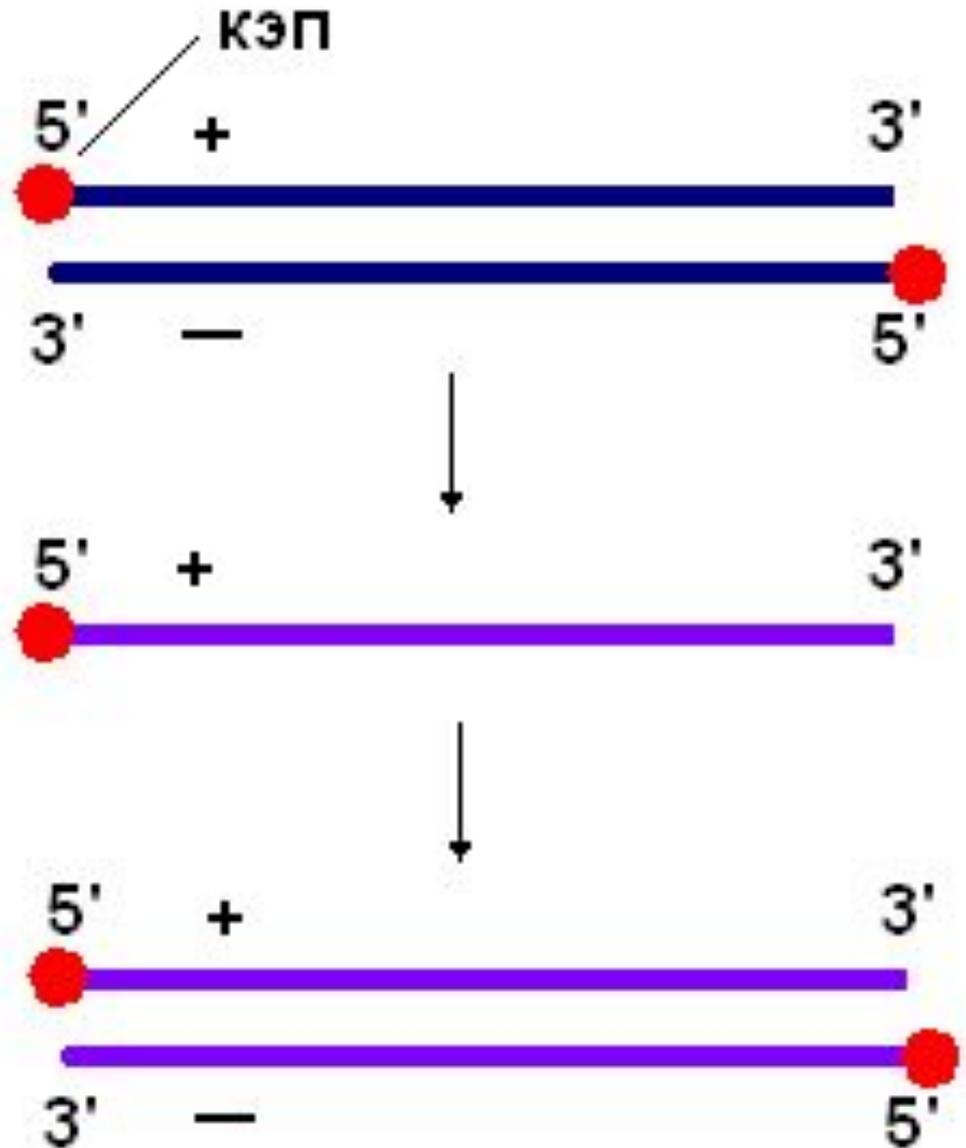
Геном



Антигеном

Схема репликации генома реовирусов

- Содержат 10 сегментов двухцепочечных РНК, РНК-полимеразу, способную использовать дуплекс для синтеза +РНК
- На первых этапах +РНК используется в качестве матрицы для синтеза белка, затем +РНК служит матрицей для синтеза двухцепочечных РНК



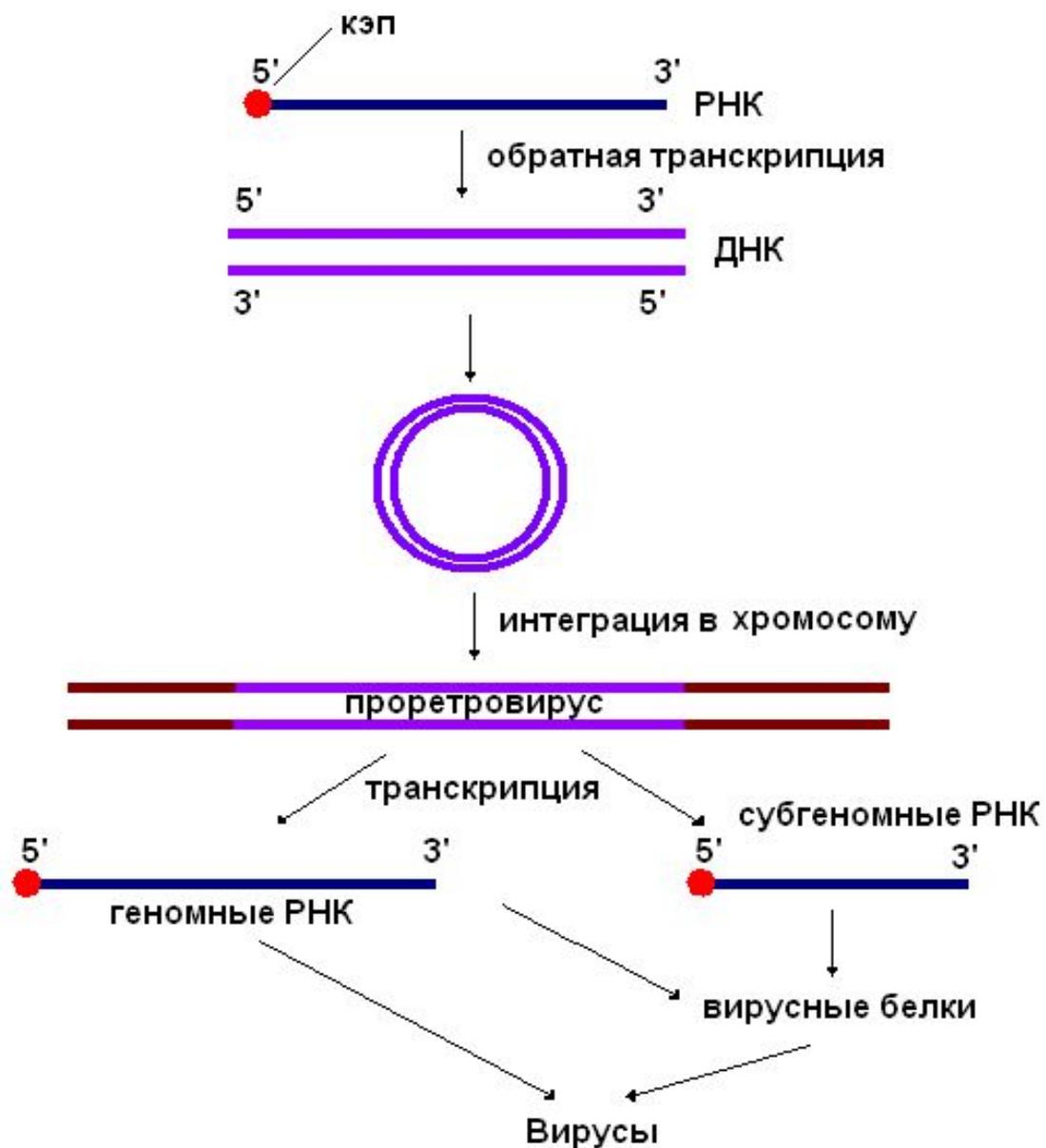
Ретровирусы

РНК-содержащие вирусы.

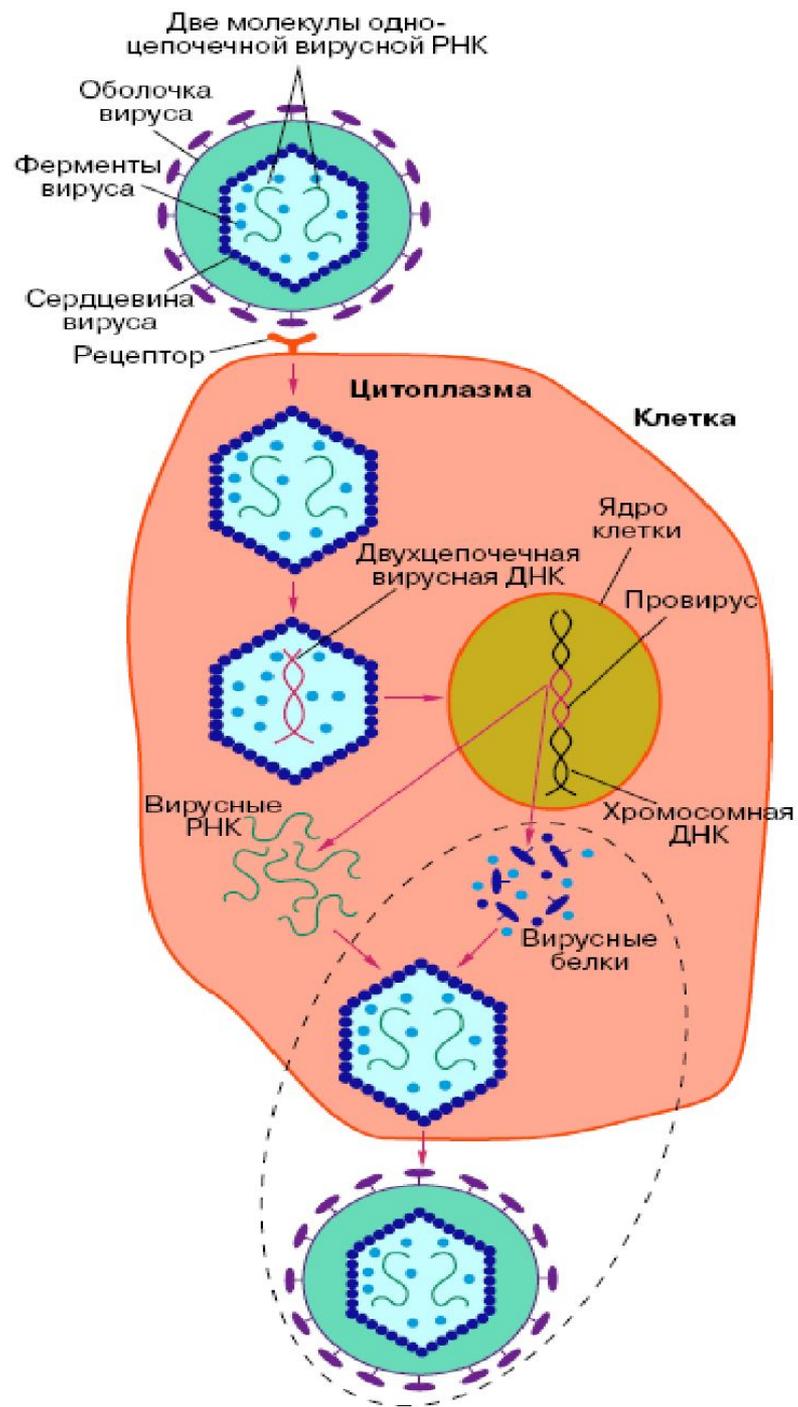
Содержат ревертазу



ВИЧ



Ретровирусы





Спасибо за внимание

