

Тема: Репликация

Цель: изучить главное свойство наследственного материала - способность к самоудвоению или репликацию

План лекции:

- 1.Репликация: определение, типы репликации геномов.**
- 2.Принципы репликации.**
- 3.Основные этапы репликации.**
- 4.Репликация теломерных отделов ДНК.**

Литература:

- 1) Б. Албертс, Д Брей, Дж. Льюис и др. Молекулярная биология клетки т. 2 «Мир» 1986**
- 2) Б. Льюин Гены. ., Мир «1987» стр. 396-430**
- 3) Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. Молекулярная биология. М., МИА, 2003, стр. 17-60**
- 4) И.Ф. Жимулев. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск, 2006, стр.110-123**
- 5) С.Г. Инге-Вечтомов. Генетика с основами селекции М., Высшая школа, 1989, стр. 122-131**
- 6) В.И.Иванов, Н.В. Барышникова, Дж. С.Билева и др. Генетика под ред. В.И.Иванова. М., 2006г, стр.147-163**

**Если истинно утверждение, что
сущность жизни состоит в накоплении
и передаче опыта от поколения к
поколению, то ключевой проблемой
биологии, по-видимому, можно
считать вопрос о том, как
увековечивает свой опыт живая
материя.**

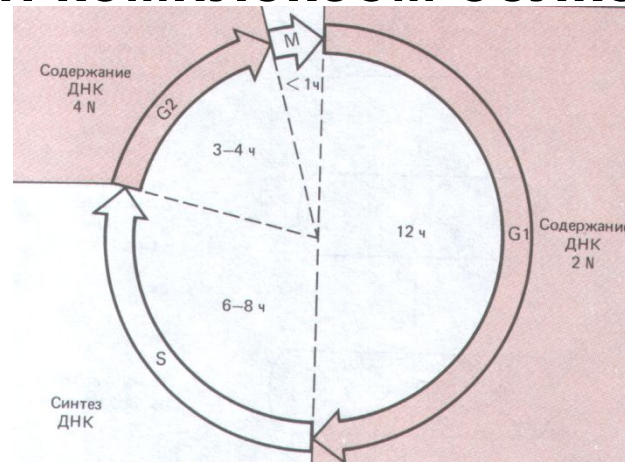
Макс Дельбрюк, 1949

Репликация ДНК – процесс самоудвоения, самовоспроизведения, самокопирования наследственной информации.

Суть репликации ДНК - образование идентичных копий для передачи наследственной информации из поколения в поколение.

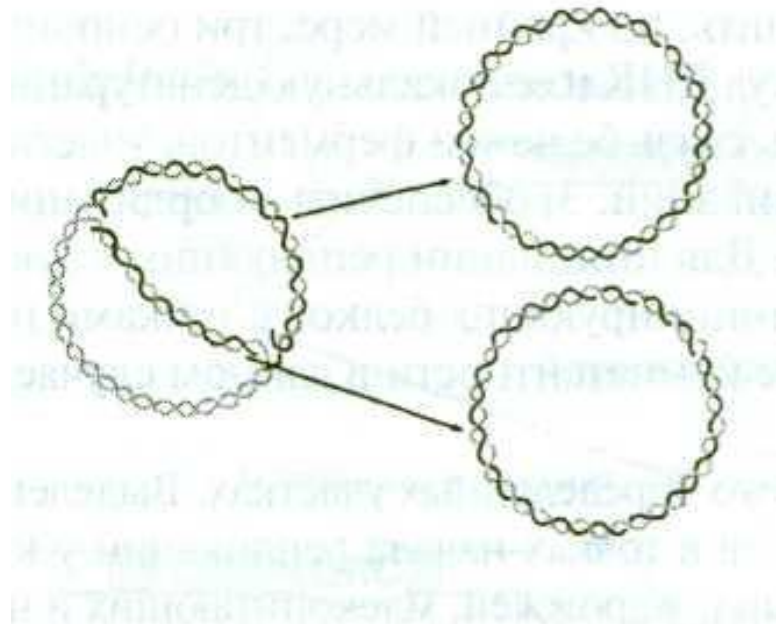
Репликация ДНК связана с репликацией хромосом и с делением клетки.

Репликация ДНК – сложный процесс, осуществляемый комплексом белков и ферментов.

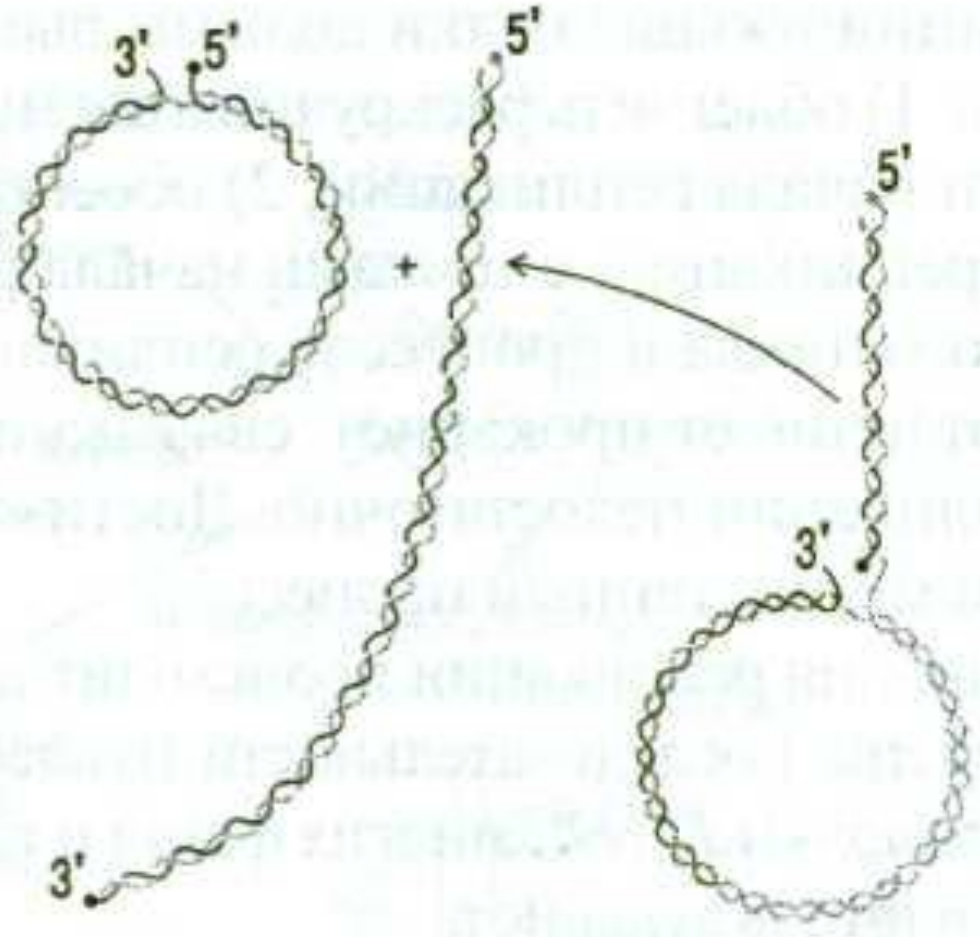


Типы репликации геномов.

1. Θ (тэта)-тип репликации кольцевой ДНК у бактерий. Начинается с определенной точки, идет в противоположных направлениях. Одна точка начала репликации (*ori*) и две репликационные вилки. В итоге ρ . Образуются две кольцевые молекулы.

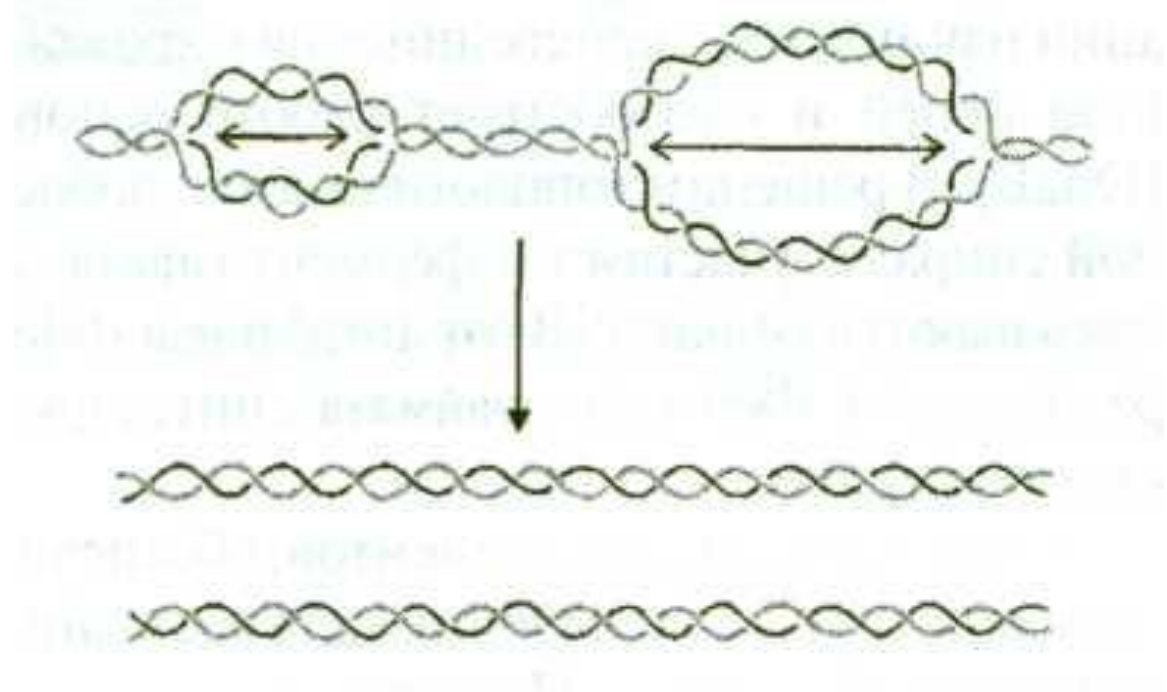


2. σ (сигма)-тип репликации кольцевой ДНК-вирусов, называется «катящимся кольцом». В одной цепи кольцевой хромосомы происходит разрыв и к свободному 3' концу разорванной цепи присоединяются нуклеотиды, эта цепь растет, кольцевая цепь служит матрицей. 5' конец разорванной цепи смещается и начинается синтез цепочки, комплементарной этому участку. Образуется структура, напоминающая греческую букву **σ** . Образуется одна кольцевая молекула и одна линейная.



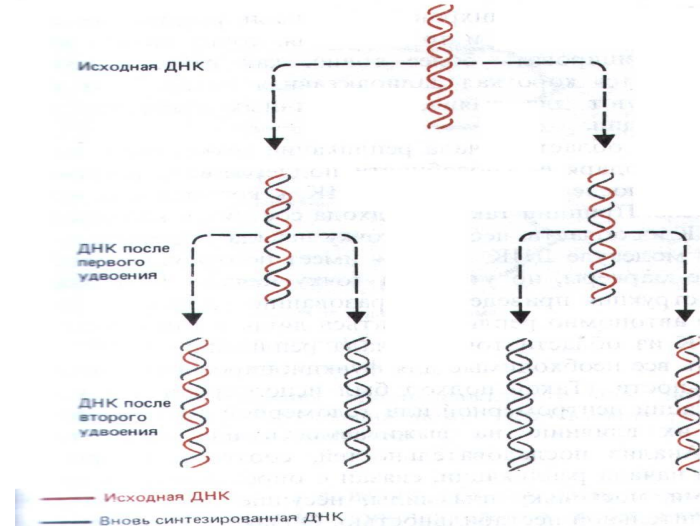
3. Полирепликонная репликация линейных молекул ДНК.

Репликация в линейных хромосомах начинается в одной или нескольких точках, две вилки движутся в противоположных направлениях. В итоге образуются две линейные молекулы.



Репликация ДНК идет на основе следующих принципов:

- **Полуконсервативность**



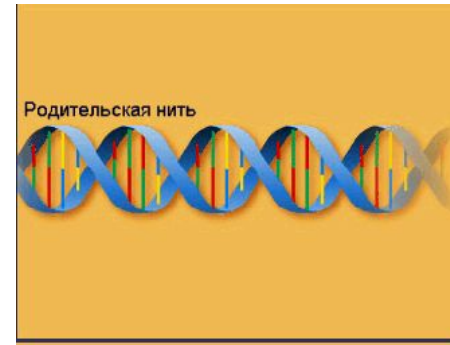
Синтез ДНК начинается с расхождения цепей, каждая из которых служит матрицей для синтеза дочерней цепи. В итоге репликации образуются две дочерние двухцепочечные молекулы, каждая из которых состоит из одной родительской (исходной) и одной (вновь синтезированной) дочерней цепи. Т.о., от одного поколения к другому передается одна из двух цепей, составляющих родительскую молекулу ДНК. Такой способ репликации называется полуконсервативным

Консервативный способ репликации – когда после удвоения одна молекула состоит из двух старых цепей, другая – из двух новых.

Дисперсный способ – когда каждая из двух новых цепей содержит как новые, так и старые участки.

•Комплементарность

Вновь синтезируемая (дочерняя) цепь ДНК строится по принципу комплементарности. В состав растущей цепи включается тот нуклеотид, который комплементарен нуклеотиду родительской цепи.



•Антипараллельность

В молекуле ДНК две комплементарные цепи антипараллельны, поэтому растущая цепь антипараллельна матричной цепи и считывается в направлении 3` □ 5`

Униполярность

Удвоение цепи ДНК идет в направлении от 5` конца к 3` концу, следовательно новый нуклеотид присоединяется к 3` концу растущей цепи.

Прерывистость – репликация может идти одновременно в нескольких местах молекулы ДНК.

Участок ДНК в пределах которого репликация начинается и заканчивается называется репликоном.

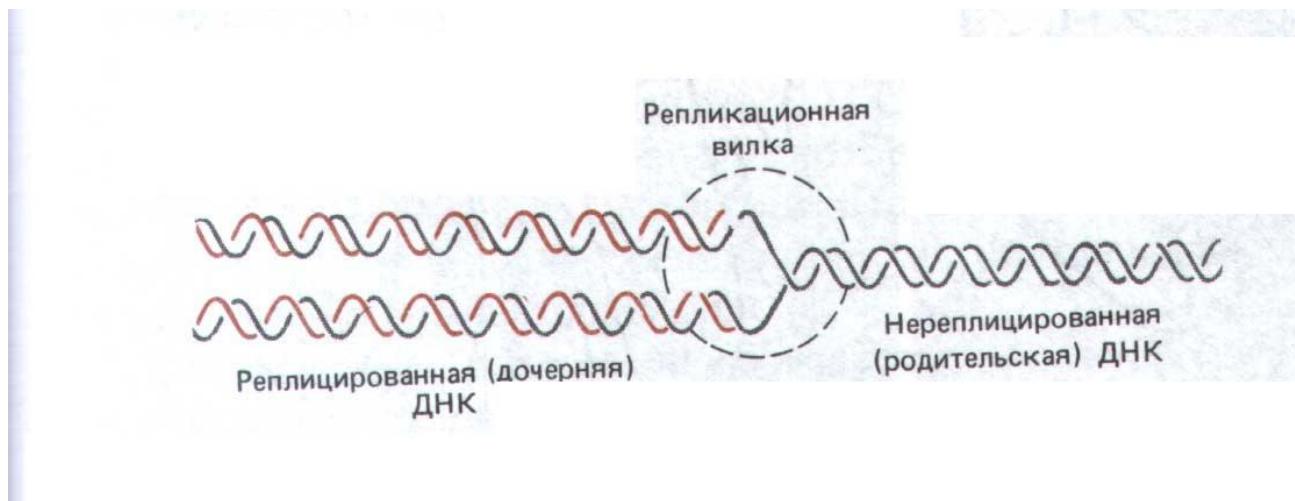
В репликоне различают точку начала (**origin**), где иницируется репликация и точку окончания (**terminus**), где репликация останавливается.

В эукариотической хромосоме - большое число репликонов.

В бактериальной хромосоме - один репликон.

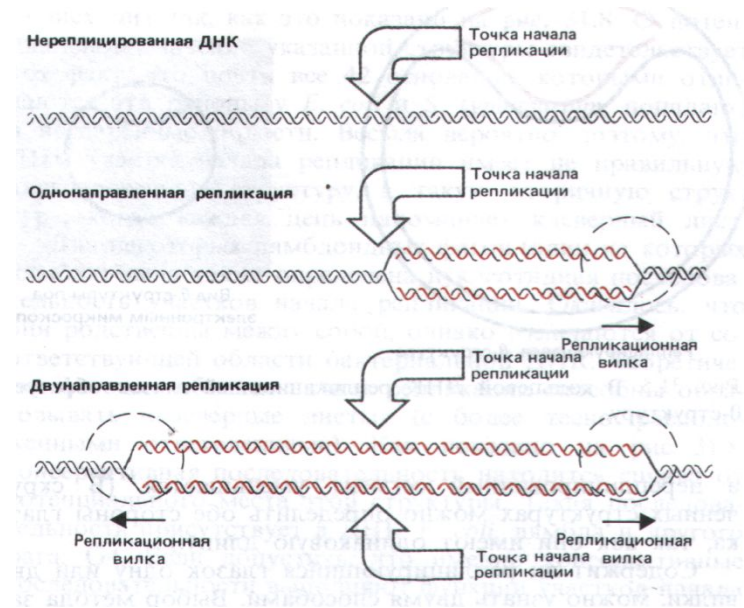
За один клеточный цикл все репликоны эукариотической хромосомы должны быть активированы, однако они не становятся активными одновременно. Это происходит на протяжении определенного периода. В то же время каждый из этих репликонов в течение клеточного цикла должен быть активирован только один раз.

Молекула ДНК, вступающая в репликацию:



Точка, в которой происходит репликация называется **репликационной вилкой** (иногда наз. точкой роста). Репликационная вилка движется последовательно вдоль ДНК от ее стартовой точки.

Репликация может идти либо в одном направлении, либо в двух направлениях.

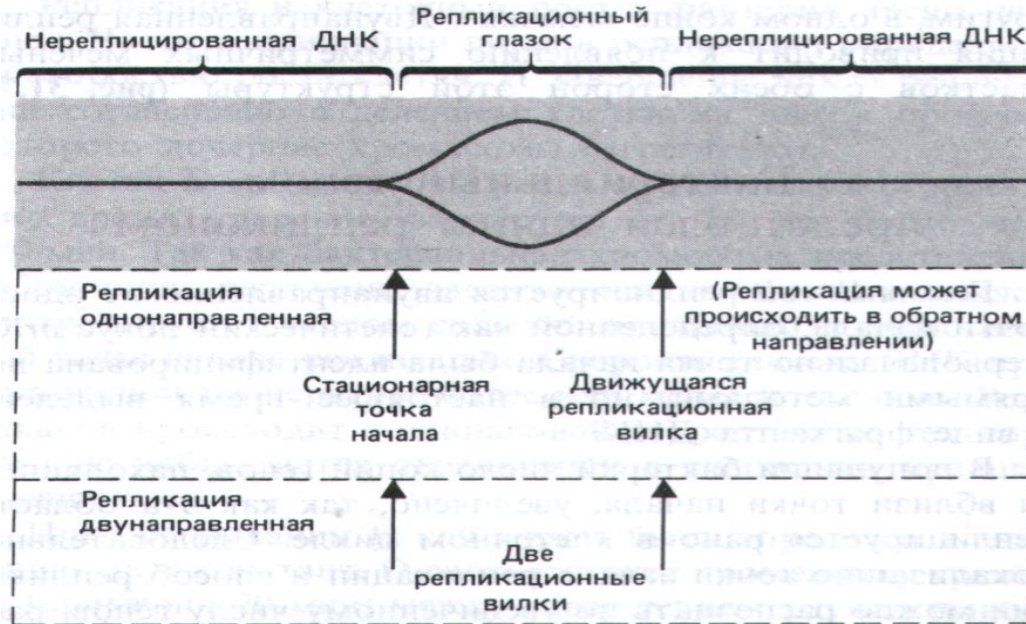


Это зависит от количества репликационных вилок, которые отходят от точки начала репликации .

При однонаправленной репликации вдоль ДНК движется одна репликационная вилка.

При двунаправленной репликации от точки начала в противоположных направлениях расходятся 2 репликационные вилки.

Область, которая уже реплицирована, имеет вид «глазка» внутри нереплицировавшейся ДНК. Этот глазок выглядит одинаково при однонаправленной и двунаправленной репликации.



При однонаправленной репликации глазок имеет фиксированную точку начала и движущуюся репликационную вилку.

При двунаправленной репликации он представлен двумя репликационными вилками. В любом случае продолжающаяся репликация расширяет глазок до тех пор, пока он не включит в себя весь репликон.

У прокариот один репликационный глазок, у эукариот количество репликационных глазков большое (сотни тысяч) и зависит от размеров молекулы ДНК.

Этапы репликации:

1.Инициация идет с участием белков и ферментов, которые должны обеспечить:

1)Раскручивание ДНК

2)Связь иницирующих белков с точками начала репликации

3)Координацию репликации и клеточного цикла

Инициация идет в строго определенных участках. Такие точки найдены для кишечной палочки, фагов, плазмид, дрожжей, млекопитающих и некоторых вирусов эукариот. У кишечной палочки сайт инициации репликации (*ori C*) – участок ДНК из 245 нуклеотидов. Инициация начинается с присоединения к хромосоме белка **Dna A**. При этом цепи ДНК разделяются и начинает работать **геликаза (Dna B)** – основной расплетающий белок. Также принимают участие фермент **гираза, белки SSB, топоизомеразы**. Фермент **праймаза** синтезирует РНК праймеры на лидирующей и отстающей цепях.

Точки начала репликации богаты парами А-Т.

Геликаза (от helix - спираль) расплетает двойную цепь родительской ДНК на одноцепочечные участки в районе репликационной вилки. Расплетение спирали приводит к суперспирализации, возникает структурное напряжение, которое мешает дальнейшему расплетению спирали (молекула ДНК зафиксирована на ядерном матриксе и поэтому она не может свободно вращаться при расплетении и возникает супернапряжение).

Топоизомераза снимает суперспирализацию. Топоизомеразы делятся на 2 класса в соответствии с природой механизмов, которые они используют.

Топоизомераза I временно надрезает одну из цепей ДНК

Топоизомераза II временно надрезает обе цепи ДНК.

SSB-белки (от англ. Single Strand Binding Proteins) стабилизируют одноцепочечные участки ДНК.

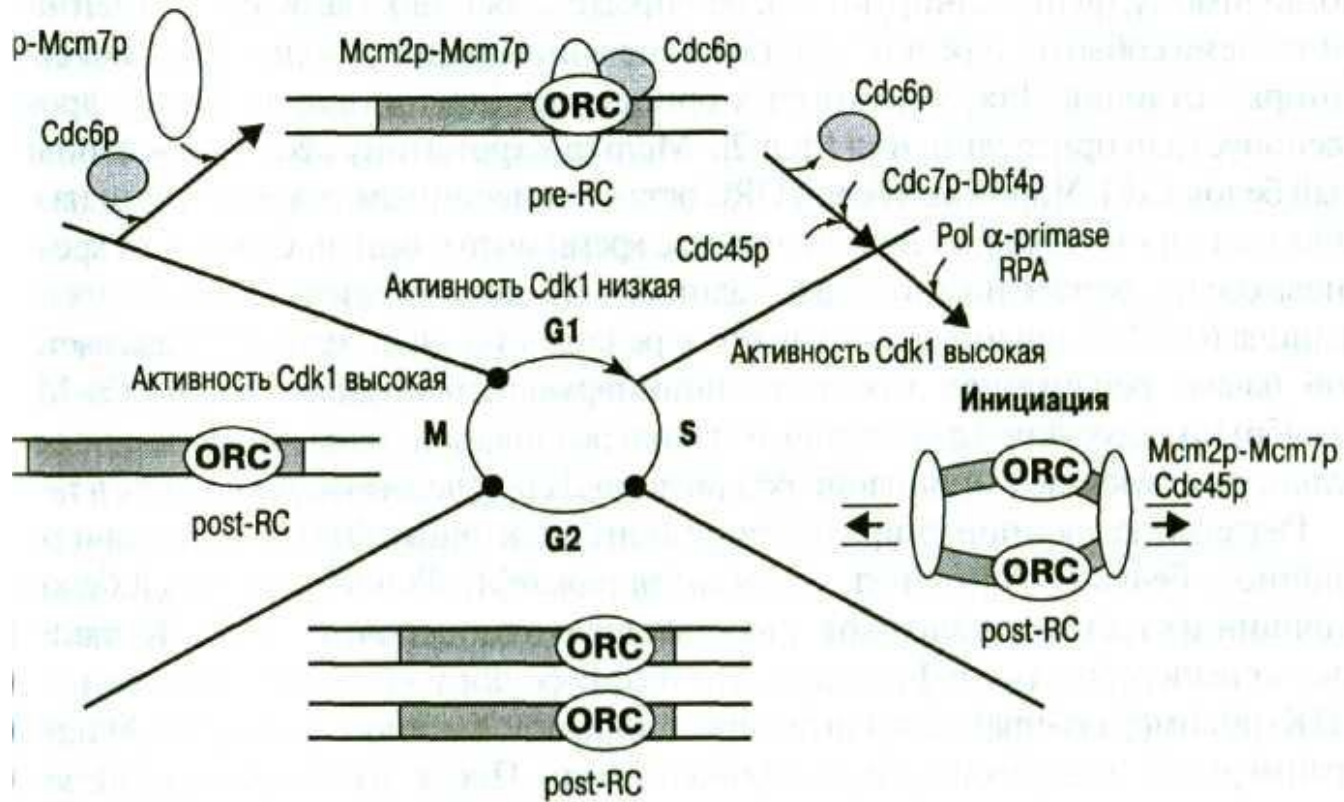
Инициация репликации у эукариот.

Белки инициации и происходящие процессы сходны с прокариотами.

Отличия:

- 1.Участие дополнительного белка Cdt1 для присоединения Mcm2p-Mcm7p к хроматину.**
 - 2.Белки ORC у позвоночных во время митоза отделяются от хроматина и соединяются с ним в стадии G1.**
 - 3.Разделение двойной спирали идет с помощью ДНК-геликазы и репликационного белка RPA. RPA выполняет ту же функцию, что и SSB белки у кишечной палочки.**
- Т.о., инициация репликации завершается формированием репликационной вилки и синтеза РНК праймера.**

Инициация репликации и клеточный цикл у дрожжей.



2. Элонгация.

Идет при помощи ферментов ДНК-полимераз. Все полимеразы обеспечивают синтез новых цепей ДНК, новая цепь растет в направлении от 5' конца к 3' концу. Присоединение нуклеотидов возможно только в присутствии одноцепочечной матрицы и короткого двухцепочечного участка со свободным 3' концом - **прайма**. Первый нуклеотид присоединяется к 3' концу праймера, затем ДНК-полимераза присоединяет нуклеотиды один за другим.

Так как ДНК-полимеразы могут строить цепь только в одном направлении от 5' к 3' концу, то на одной цепи синтез будет идти непрерывно. Эту цепь называют **лидирующей**. Направление движения лидирующей цепи совпадает с направлением движения репликационной вилки и для ее элонгации необходим только один акт инициации.

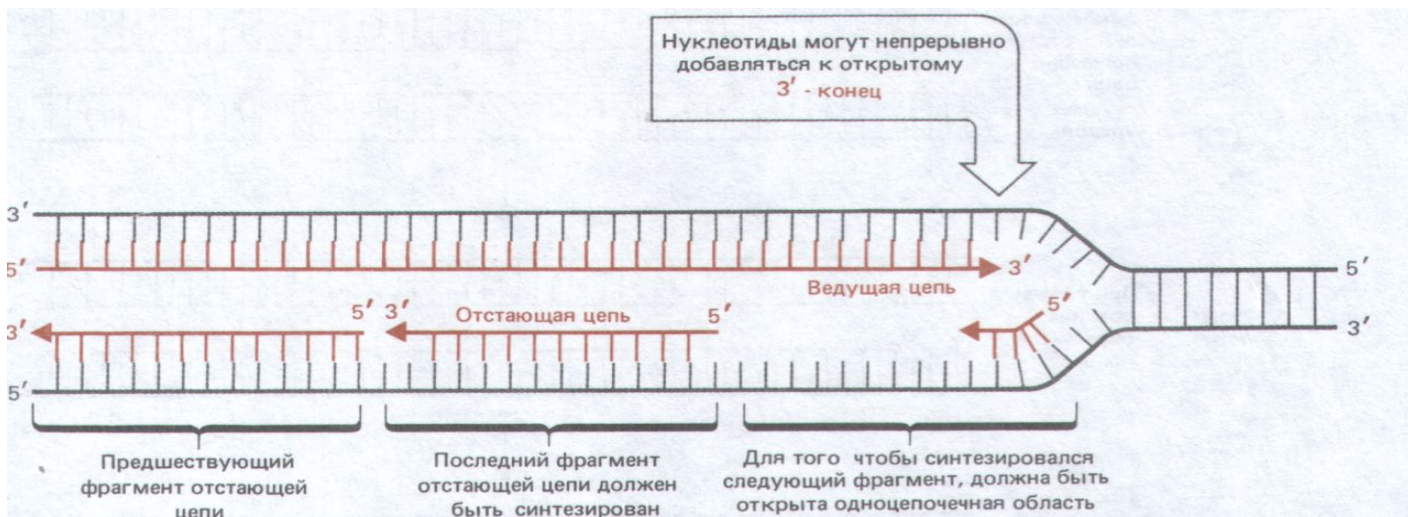
Синтез другой цепи идет короткими фрагментами – **фрагментами Оказаки**. Эта цепь называется **запаздывающей**.

Длина ФО у прокариот 1000-2000 п.н.

Длина ФО у эукариот 100-200 п.н.

Направление роста запаздывающей цепи противоположно направлению движения репликативной вилки, для ее элонгации необходимо много актов инициации.

Ферменты ДНК-лигазы сшивают ФО после удаления РНК праймеров.



ДНК-полимеразы. У прокариот известно 3 вида ДНК-полимераз:

- 1) ДНК-П I**
- 2) ДНК-П II**
- 3) ДНК-П III**

У кишечной палочки в репликации участвуют ДНК-полимераза I и ДНК-полимераза III. Главным является ДНК-П III с тремя субъединицами:

- 1) α (альфа) – имеет полимеразную активность**
- 2) ϵ (эпсилон) – имеет 3' \square 5' экзонуклеазную активность**
- 3) θ (тэта) – функция не ясна**

ДНК-полимераза I – участвует в синтезе отстающей цепи, состоит из одной полипептидной цепи и имеет 3 ферментативные активности:

- 1) 5' \square 3' экзонуклеазная активность: удаляет РНК праймер.**
- 2) Полимеразная активность: наращивает цепь ДНК предыдущего фрагмента.**
- 3) 3' \square 5' экзонуклеазная активность: контролирует правильность присоединения нуклеотидов и удаляет ошибочно вставленные нуклеотиды с растущего конца цепи.**

ДНК-П I открыта в 1960 году А. Корнбергом и поэтому её называют ферментом Корнберга.

ДНК-П II очень похожа на ДНК-П I и участвует в репарации ДНК

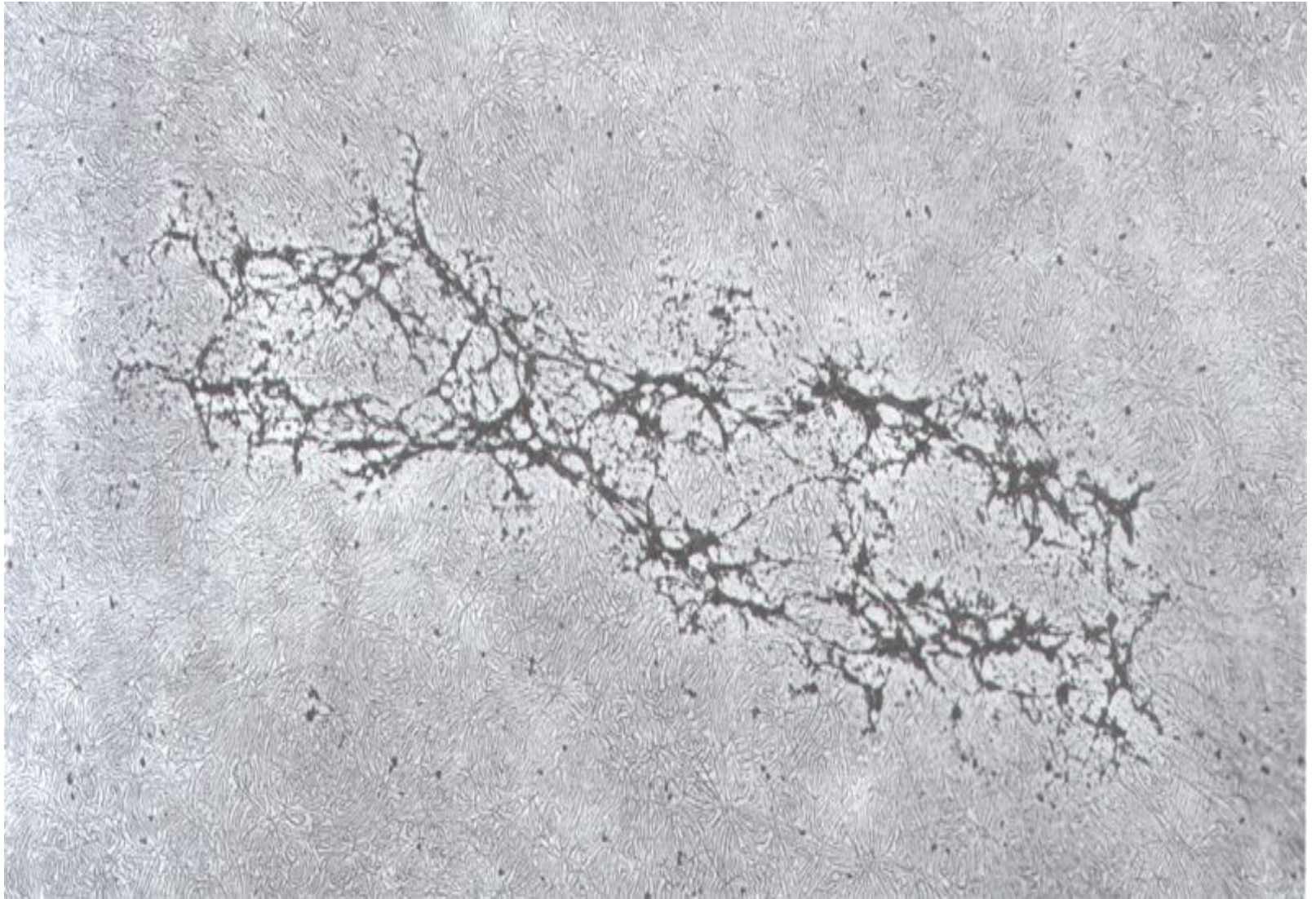
У эукариот известно 5 видов ДНК-полимераз:

- 1) α – в репликации ядерной ДНК. Это цитоплазматическая полимераза или большая.
- 2) β – в репарации ДНК. Это нуклеазная полимераза или малая.
- 3) δ (дельта) – в репликации ядерной ДНК, найдена в клетках млекопитающих..
- 4) ϵ – в репарации ДНК, сходна с δ .
- 5) γ – в репликации митохондриальной ДНК, митохондриальная полимераза.

3. Терминация репликации.

У кишечной палочки есть ter-сайты, где происходит терминация репликации.

У эукариот терминация репликации происходит при встрече двух репликационных вилок.



В 80-х годах 20 века было установлено, что на концах хромосом есть особые структуры – теломеры, которые не несут генетической информации, предотвращают объединение концов и защищают материал хромосомы от потерь при репликации.

Теломеры у многих организмов имеют сходное строение и состоят из многократно повторяющихся фрагментов, у человека это: TTAGGG.

Во время деления теломеры теряют от 5 до 20 фрагментов и с каждым делением становятся короче, что в конечном итоге привело бы к гибели клетки. Было обнаружено, что существует некий лимит на число делений. Американский ученый Хейфлик Л. в 1965 году установил, что у человека клетки новорожденных делятся 80-90 раз, а клетки 70-летних делятся только 20-30 раз. Ограничение на число клеточных делений называется барьером Хейфлика. Оловников связывает длину теломерной ДНК со сроком жизни клетки.

Проблема концевой недорепликации.

Репликация на отстающей цепи ДНК начинается с синтеза коротких РНК-праймеров или затравок, с 3' концов которых синтезируются короткие фрагменты Оказаки.

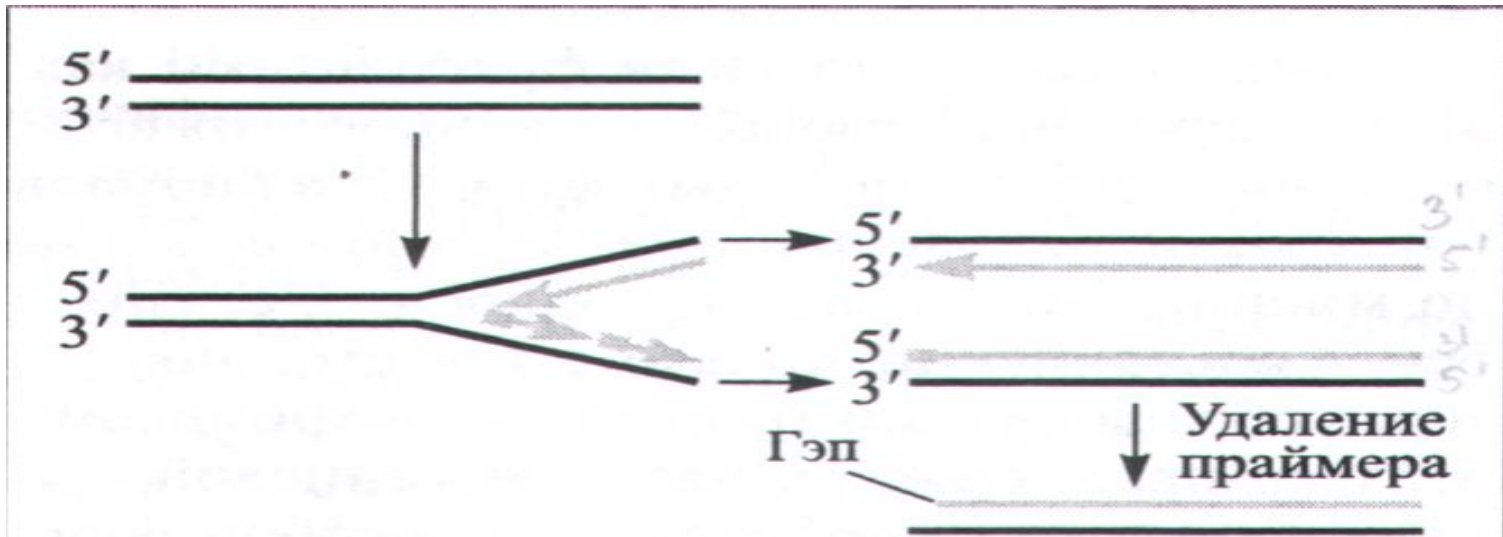


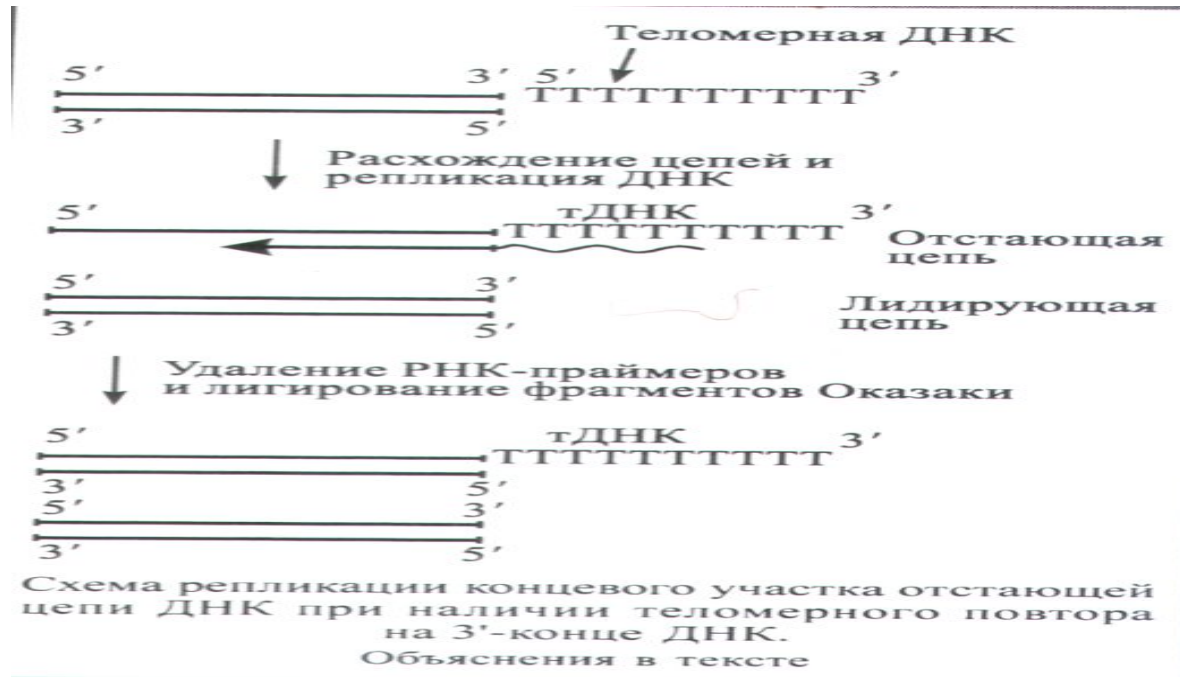
Схема недорепликации конечной части молекулы ДНК [Zakian, 1997].

Прямоугольниками на отстающей цепи изображены РНК-праймеры длиной 8–12 пн.
Короткие стрелки — фрагменты Оказаки

Затем РНК-затравки удаляются, а образовавшиеся пустоты (бреши, гэпы) заполняются фрагментами ДНК. Причем при синтезе фрагментов ДНК используются в качестве праймеров 3' концы фрагментов Оказаки. Так как для синтеза крайнего фрагмента нет праймера, то вновь синтезированная цепь на 8-12 нуклеотидов короче исходной. Таким образом, если в клетке нет механизмов, которые могли бы компенсировать потерю нуклеотидов, хромосома станет укорачиваться и в конечном итоге это приведет к гибели клетки.

Т.о., к началу 90-х годов XX века молекулярная структура теломеры была открыта, а проблема неполной репликации на конце линейной молекулы ДНК осталась нерешенной. В 1985г. Ученые Грейдер и Блакберн установили существование в природе фермента теломеразы, который обеспечивает удлинение конца хромосомы или теломерного концевоего повтора. Теломераза – это рибонуклеопротеид, содержит короткую молекулу РНК (150 нуклеотидов с двумя копиями теломерного повтора 5` – УААССС – 3`).

Перед репликацией ДНК теломераза добавляет несколько копий теломерных повторов на 3` конец ДНК.



Теломераза удлиняет не новую, укороченную цепь, а старую – более длинную. Далее репликация идет по стандартной модели. На отстающей цепи синтезируются РНК-затравки и важно, чтобы концевая затравка синтезировалась на теломерном повторе.

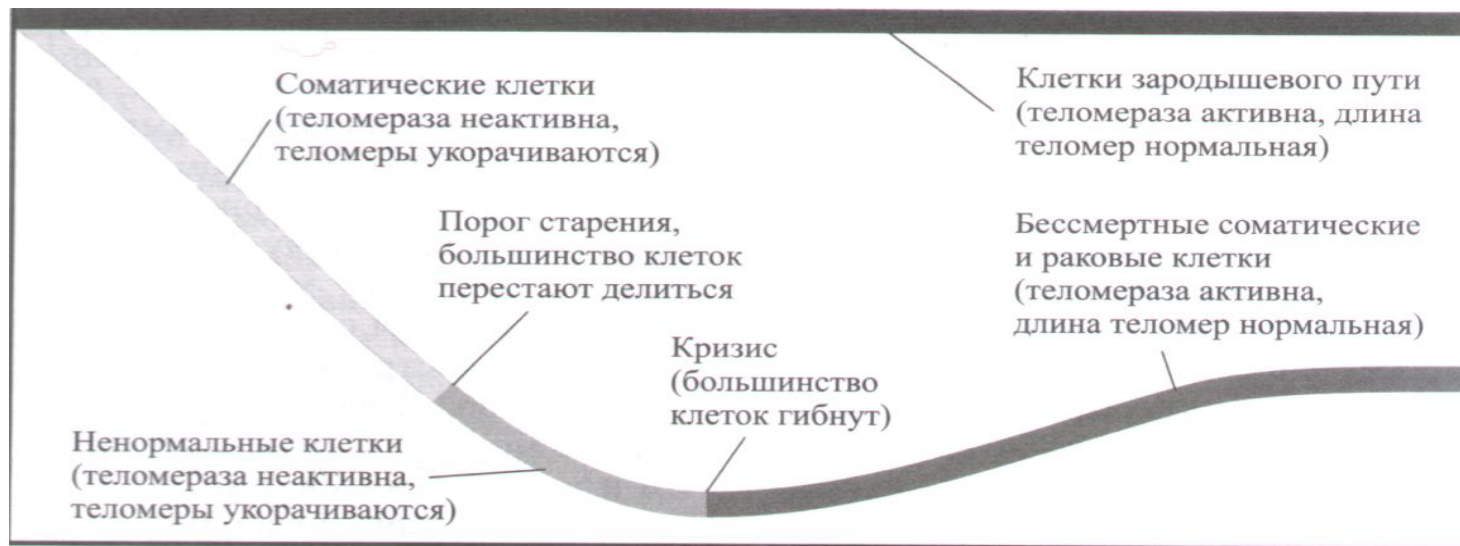
По окончании репликации остается незаполненным только участок РНК-затравки, синтезированный на теломерной последовательности. В итоге дочерние цепи ДНК имеют такую же длину, как и родительские.

Альтернативный механизм удлинения теломер (ALT – Alternative Lengthening of Telomeres) без участия теломеразы (встречается у дрозофилы, в линиях некоторых опухолевых клеток). Один из ALT – рекомбинация между теломерными участками разных хромосом: при этом две молекулы ДНК взаимодействуют своими теломерными концами и образуют гибридные теломеры, где цепь от одной ДНК намного длиннее, чем цепь от другой ДНК. Затем более длинная цепь служит матрицей, по которой ДНК-полимераза достраивает короткую цепь.

Однако теломераза должна постоянно удлинять теломерные повторы, чтобы недорепликация не затронула гены. Нарушения в механизме удлинения теломерного повтора приводят к злокачественным новообразованиям и старению.

В клетках зародышевого пути теломеразы обладают высокой активностью, поэтому теломеры имеют нормальную длину. В соматических клетках, выращиваемых *in vitro*, теломеразы неактивны, поэтому теломеры укорачиваются. В раковых клетках (соматических) теломеразы высокоактивны и теломеры не укорочены. По последним достижениям американских ученых (1998) в геном соматических клеток человека ввели ген теломеразы с регуляторными элементами ДНК, благодаря которому ген стал активным в клетках, где обычно неактивен.

При этом длина теломер стала удлиняться и увеличилась продолжительность жизни клеточных культур.



Изменение длины теломер у человека [Greider, Blackburn, 1996].

По горизонтали — число клеточных делений, по вертикали — длина теломеры

Таким образом, теломеры имеют свой состав и для поддержания своей длины используют фермент теломеразу

Структура теломер.

- 1) определенный нуклеотидный состав
- 2) специфические белки, которые отличаются от обычных гистонов и не образуют нуклеосомные глобулы.

Теломерные белки: белок Rap 1 (у дрожжей)

Его аналог- белок TR F1 (у млекопитающих).

Эти белки обеспечивают теломерам плотную упаковку, поэтому они относятся к фракции гетерохроматина и прикрепляют теломеры к компонентам ядерного матрикса (н-р, к ядерной ламине).

Функции теломер

1) механическая: фиксация хромосом к ядерному матриксу; сцепление друг с другом концов сестринских хроматид

2) стабилизационные: теломеры предохраняют генетически значимые отделы ДНК от недорепликации; стабилизация концов разорванных хромосом за счет теломеразы

3) влияние на экспрессию генов – эффект положения: активность генов, расположенных рядом с теломерами снижена (репрессирована). Такой эффект называют сайленсингом или транскрипционным молчанием.

4) Счетная- теломеры определяют количество делений клетки после исчезновения теломеразной активности. При достижении критически короткой длины, теломеры перестают выполнять все перечисленные функции, клеточный цикл нарушается и клетка погибает.

Выводы:

- 1. Репликация – матричный процесс. Во время репликации каждая из двух цепей ДНК служит матрицей для образования новой цепи.**
- 2. Основные этапы репликации:**
 - 1) инициация репликации (формирование репликативной вилки и синтез РНК праймера)**
 - 2) элонгация (синтез новых цепей ДНК)**
 - 3) терминация**
- 3. Процесс репликации катализируется ферментами:**

ДНК-топоизомеразы
ДНК – хеликазы
SSB – белков
репликативной вилки

— в формировании —

ДНК полимеразы : δ
 α
 ϵ } **синтез новых цепей ДНК**

ДНК - полимеразы β - удаление праймеров

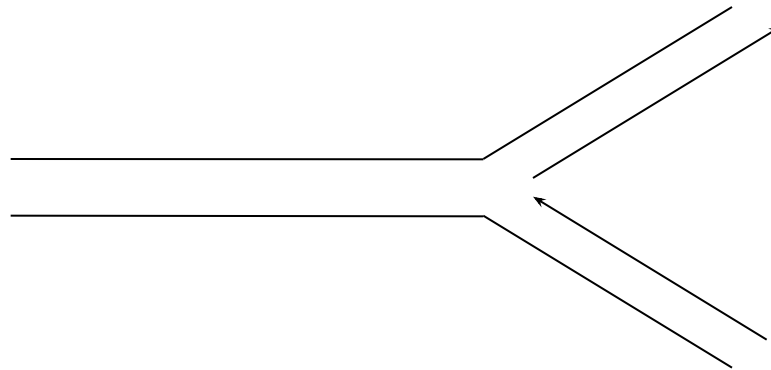
4. Молекула ДНК человека имеет очень большие размеры, репликация ее шла бы в течение примерно 800 часов. Поэтому инициация синтеза ДНК происходит в нескольких точках хромосомы, которые называются ориджинами репликации или точками инициации репликации. Ориджины репликации имеют определенную п.н. Единица репликации у эукариотов называется репликоном. На ориджинах иницируется двунаправленная репликация., образуются две репликационные вилки, перемещающиеся в противоположных направлениях до тех пор, пока не встретятся со следующим репликоном

5. По завершении репликации образуются две молекулы 2-х спиральной ДНК, каждая из которых содержит одну матричную и одну дочернюю вновь синтезированную нить (полуконсервативный механизм). В результате митоза они поступают в дочерние клетки. Т.о., репликация обеспечивает воспроизведение генотипа в новых поколениях.

6. Репликация происходит в S фазу клеточного цикла.

7. Проблема концевой недорепликации ДНК решается через фермент теломеразу.

Контрольные вопросы:



Укажите 3` и 5` концы матричных цепей ДНК и вновь синтезированных фрагментов, лидирующую и отстающую цепи