

Молекулярный механизм генетических процессов

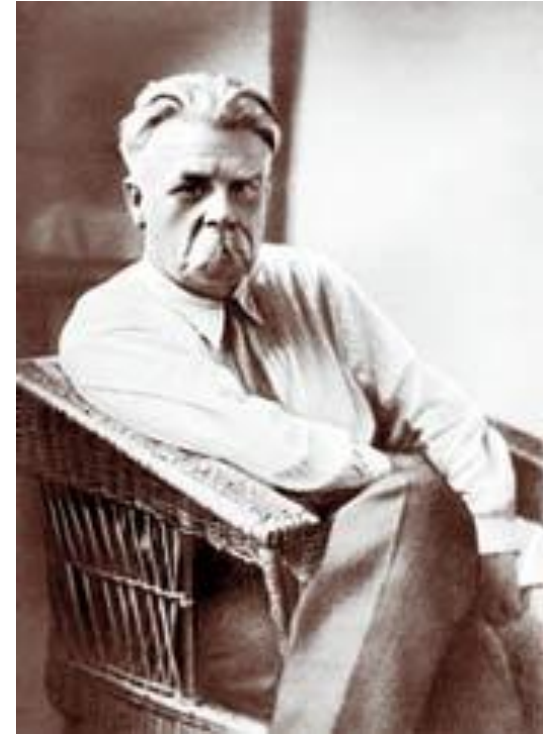
Репликация

- **1. Универсальный способ репликации геномов.**
- **2. Характеристика процесса репликации.**
- **3. Составляющие элементы процесса репликации.**
- **4. Молекулярный механизм процесса репликации.**
- **5. Особенности репликации различных геномов.**

Идея матричного принципа

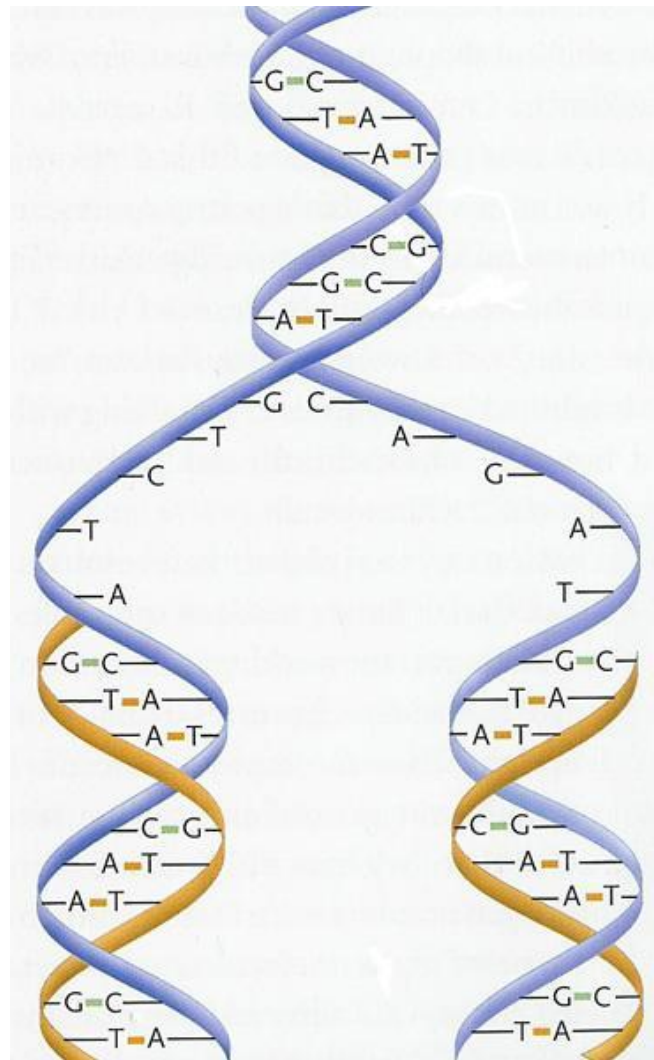
Кольцову принадлежит главная идея XX века в молекулярной биологии – идея матричного происхождения биологических молекул.

В 1927 г. Кольцов предположил, что наследственные «тексты» копируются с использованием матриц. Матричное воспроизведение «текста» - еще одно озарение Кольцова.



**Николай Константинович Кольцов
(1872-1940 г.)**

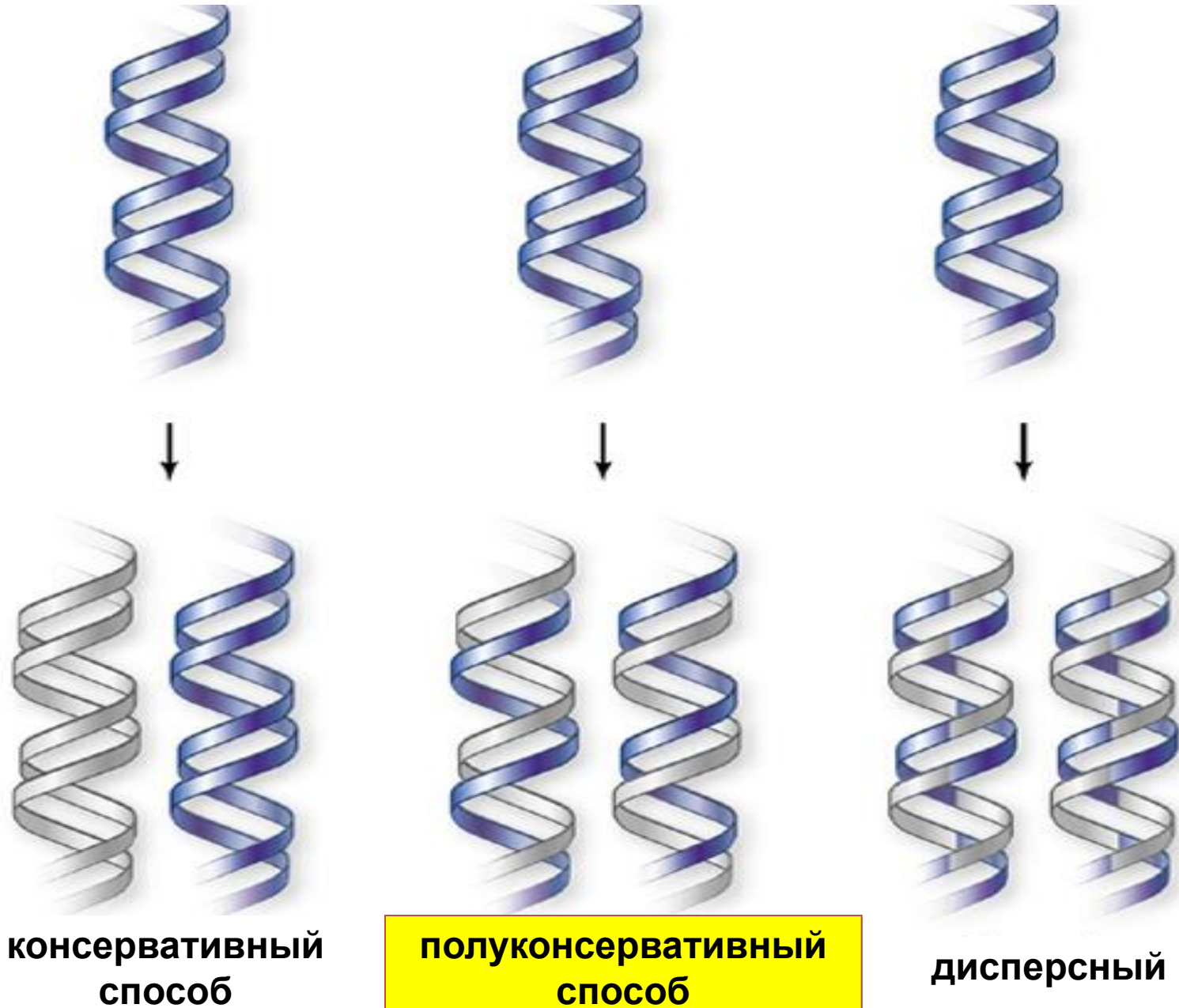
Матричный синтез



1. Универсальный способ репликации геномов- полуконсервативный

Доказательство полуконсервативного способа
репликации ДНК **Мэтью Мезельсоном и
Франклином Сталем в 1958 г.**

Предварительная гипотеза



Репликация ДНК осуществляется полуконсервативно

Предполагаемые схемы процесса репликации



Полуконсервативный синтез



Консервативный синтез



Дисперсный синтез



Вновь синтезированная нить ДНК

Старая материнская нить

- **Консервативная репликация.**

Молекула ДНК служит матрицей для образования совершенно новой молекулы ДНК. В результате одна из образующихся клеток получает исходную молекулу ДНК, а другая – вновь синтезированную.

- **Полуконсервативная репликация.**

Две цепи исходной молекулы ДНК расходятся вследствие разрыва слабых водородных связей между азотистыми основаниями. Каждая из них служит матрицей для образования новой цепи ДНК, а возникающие между азотистыми основаниями водородные связи соединяют старую и новую цепи, восстанавливая целостность молекулы. В результате каждая новая клетка получает гибридную молекулу ДНК, состоящую из одной старой и одной новой цепи.

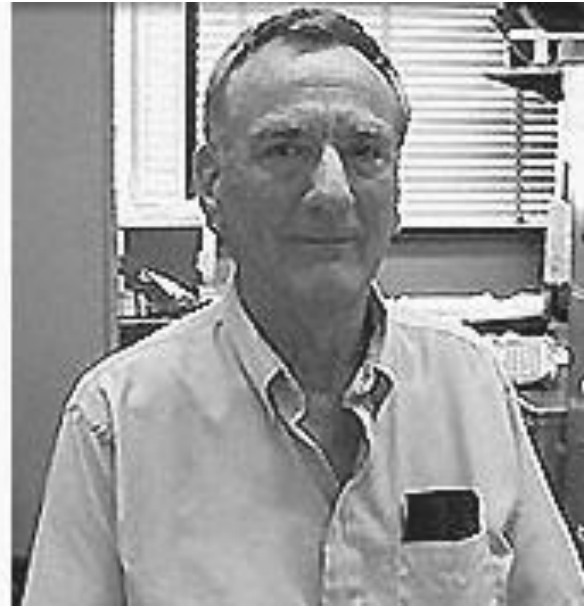
- **Дисперсная репликация.**

ДНК распадается на короткие фрагменты, используемые в качестве матриц для построения фрагментов двух новых молекул ДНК, которые затем каким-то образом соединяются между собой.

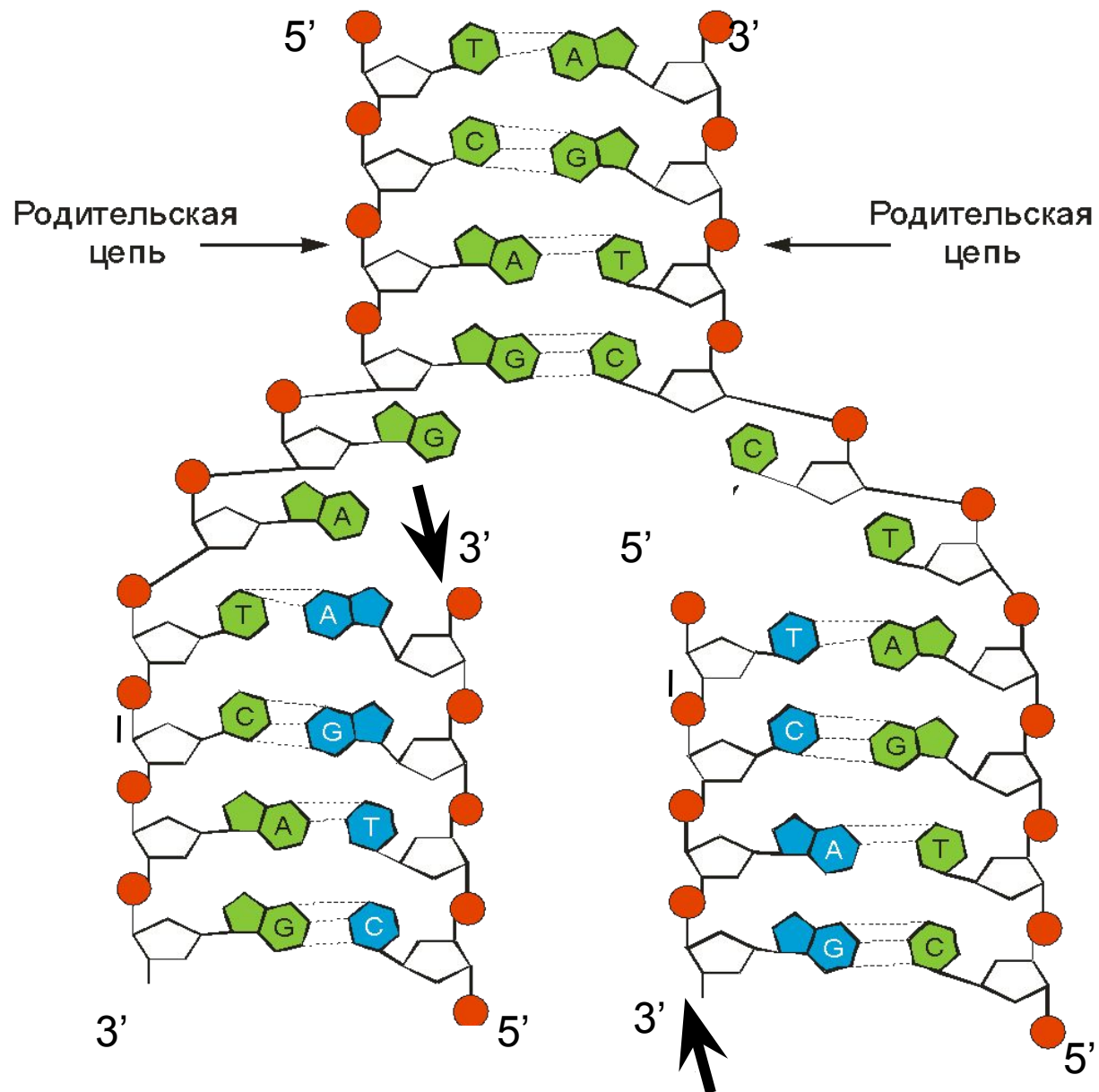
**Доказательство полуконсервативного характера
репликации было представлено
М. Мезельсоном и Ф.Сталем в 1958 г.**



Метью Мезелсон



Франклин Сталь

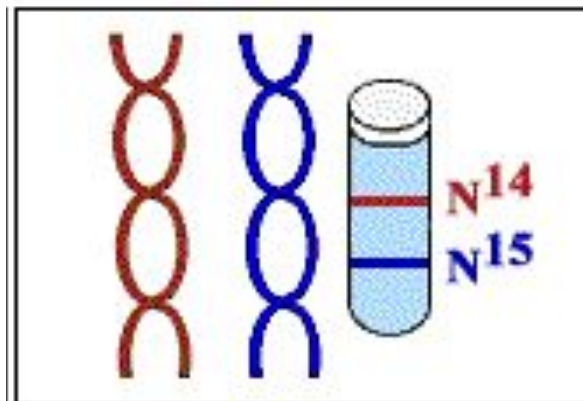


Вновь синтезированные дочерние цепи

Схема полуконсервативной репликации ДНК

**М. Мезелсон и Ф. Сталь разработали метод
равновесного центрифугирования в
градиенте плотности CsCl. При этом ДНК
разделяется не по молекулярным массам,
а по *удельной плотности*.**

Меченая радиоактивным азотом ^{15}N ДНК
(«тяжелым азотом») имеет плотность
1,724 г/см³, а ДНК клеток, выращенных на среде
с ^{14}N («легким азотом»), – 1,710 г/см³.



В 1957 г. Мезельсон и Сталь разработали метод, позволяющий отделить меченные ^{15}N молекулы ДНК, от менее плотной обычной ДНК, содержащей ^{14}N .

Для этой цели они применили центрифугирование ДНК в градиенте плотности, который устанавливается при центрифугировании с очень высокой скоростью в течение 50-60 ч водного раствора хлористого цезия 6 М концентрации.

В таком градиенте плотности хлористого цезия ДНК, когда она достигает седиментационного равновесия, образует полосу на уровне той плотности градиента, которая соответствует ее собственной.



Описание эксперимента

Бактерии *E. coli* выращивали на протяжении нескольких поколений (14 поколений) на среде, содержащей радиоактивный азот (^{15}N), для того, чтобы все вновь синтезированные молекулы ДНК включили ^{15}N и стали «тяжелыми».

Затем клетки синхронизировали и пересаживали их в среду с «легким» изотопом азота (^{14}N) для того, чтобы вновь синтезированные цепи ДНК стали "легкими". Начиная с первой генерации, из клеток, выращиваемых на среде с легким (^{14}N), выделяли ДНК и центрифугировали в градиенте плотности CsCl .

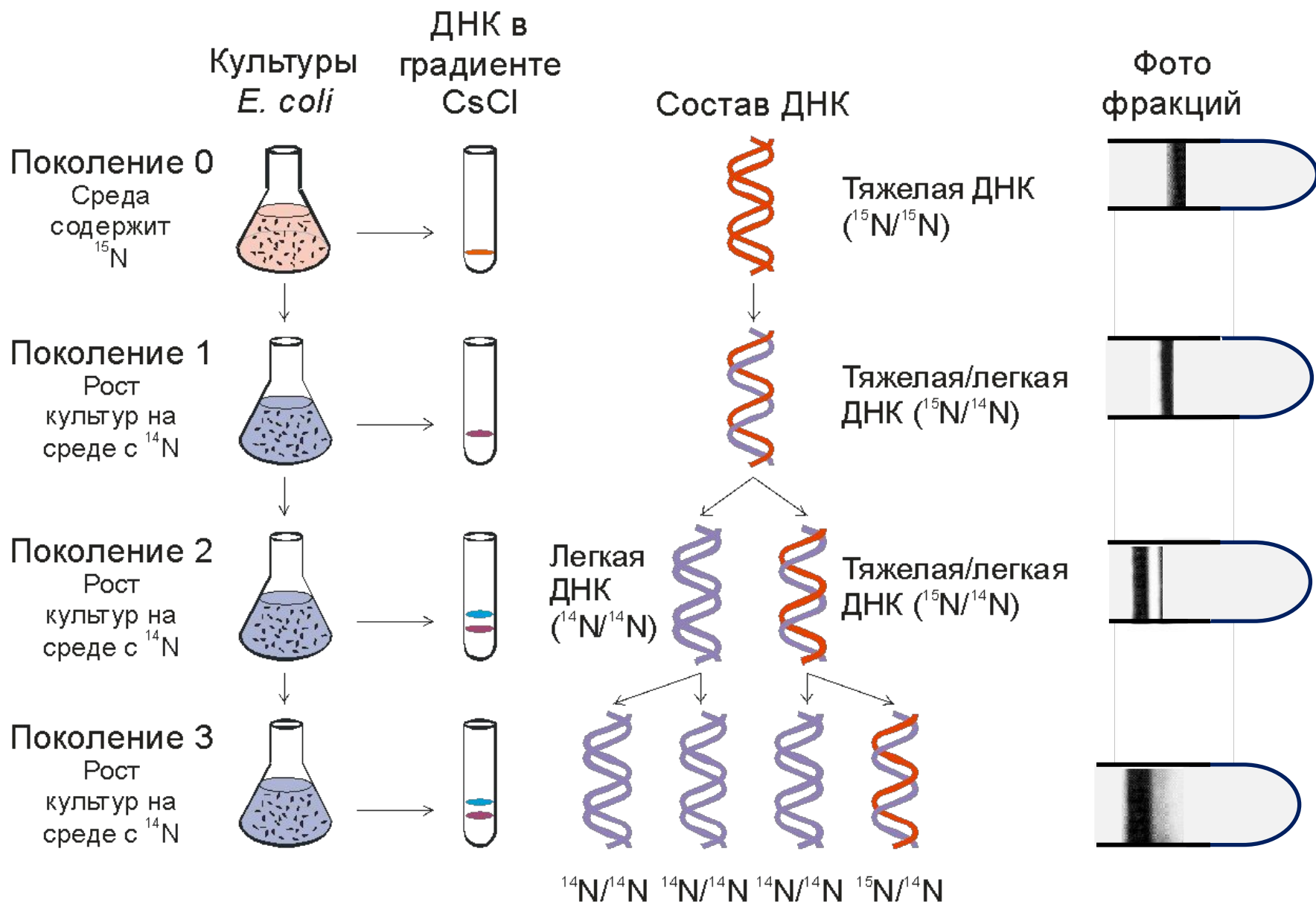


Схема опытов Мезелсона и Сталя, доказывающих полуконсервативность репликации ДНК

Визуализация репликации у бактерий *E. coli* (эксперимент Дж. Кернса, 1963 г.

Дж.Кэрнс показал, что репликация у бактерий *E. coli* происходит полуконсервативным способом одновременно в двух направлениях.

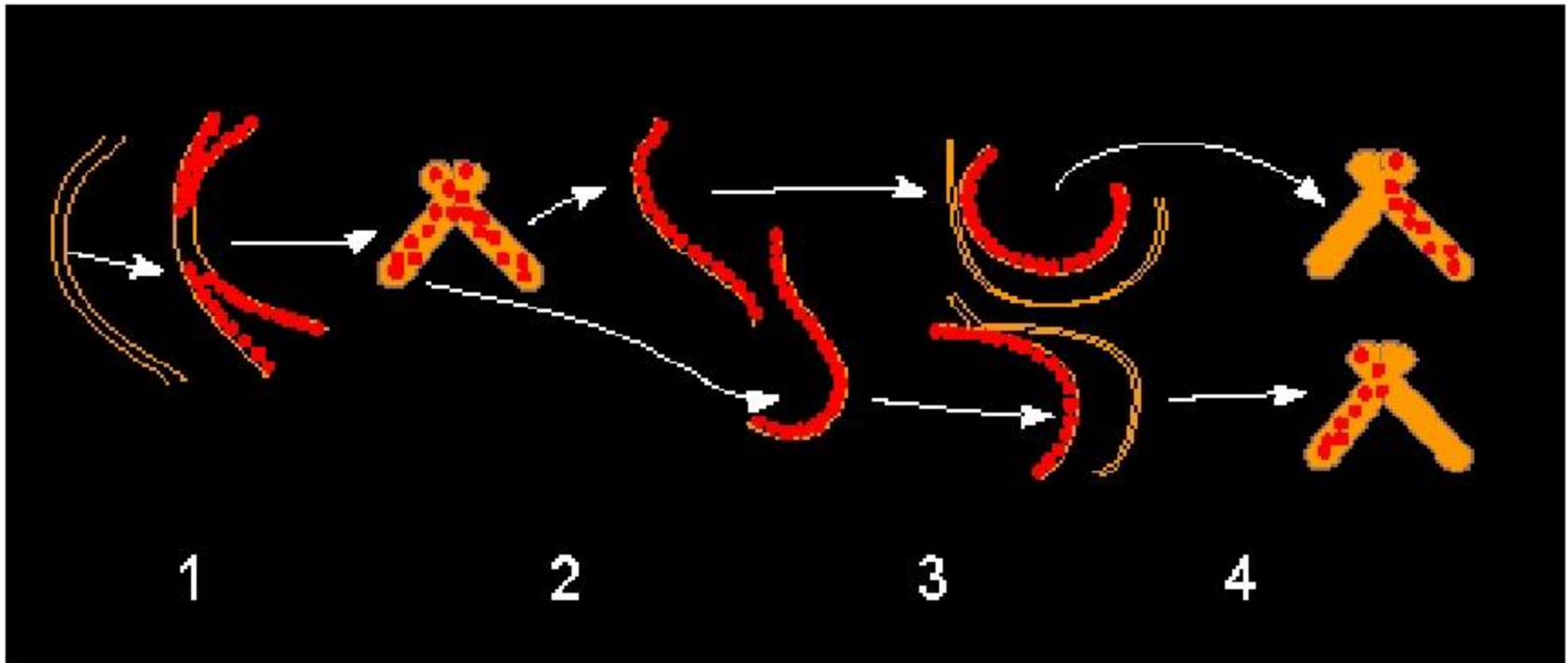


100 μm



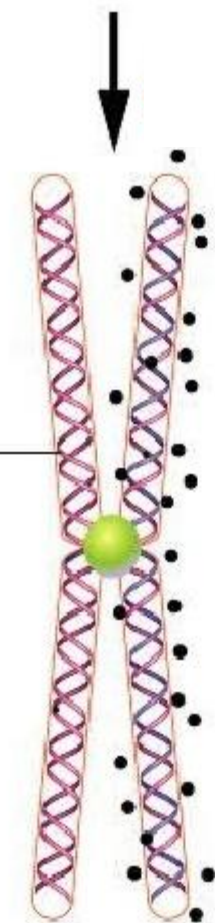
Полуконсервативный характер репликации был доказан Дж. Тейлором (в 1958 г.) на **МИТОТИЧЕСКИХ клетках корешков бобов *Vicia faba***. Семена проращивали на среде, содержащей меченый ^3H -тимидин (ТТФ, содержащий радиоактивный водород). Радиоактивная метка включалась в ДНК, и обнаруживалась в хромосомах делящихся клеток с помощью радиоавтографии. Когда корешки перенесли в среду без метки, во вновь синтезированные цепи ДНК включался только немеченый тимидин.

После одного деления клеток в нормальной среде метку обнаруживали в обеих хроматидах метафазных хромосом, однако ее количество было меньшим наполовну, так как метка оставалась только в «материнской» нити ДНК, а вновь синтезированная нить была уже без метки. А после второго деления - одна хроматида содержала метку, другая не содержала метки. Эти результаты согласуются с представлением о том, что хроматида состоит из одной молекулы ДНК, и ДНК реплицируется **ПОЛУКОНСЕРВАТИВНО**. Позднее Дж. Тэйлор показал, что таким же образом реплицируются молекулы ДНК при удвоении хроматид (в S-фазе клеточного цикла) перед **МЕЙОТИЧЕСКИМ** делением.



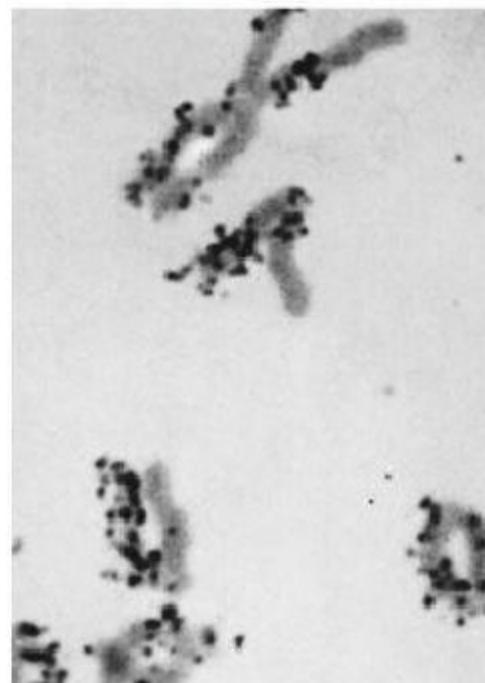
Проростки расения *Vicia faba* выращивали на среде, содержащей меченый ^3H -тимидин для того, чтобы этот изотоп включился во все молекулы ДНК (1), таким образом, все хроматиды оказались мечеными даже после их разделения в ходе митоза (2). Затем клетки переносили на среду с обычным нерадиоактивным тимидином и выдерживали некоторое время. На нерадиоактивной среде в S-фазе клеточного цикла в ДНК включался немеченый тимидин, однако хроматиды оставались мечеными, хотя интенсивность радиоактивного импульса была снижена, а после второго деления одна из хроматид оказывалась не меченой (3 и 4).

Немеченая
хроматида



Только одна
хроматида
меченая

Метафаза



Эти данные были подтверждены исследованиями хромосом других растений из родов *Bellevia*, *Crepis*, *Allium*, животных (хомячки) из сем. *Cricetinae* и человека, что говорит об универсальности этого механизма для высших форм.

Таким образом было доказано:

- Репликация происходит с помощью полуконсервативного синтеза:
 - двойная спираль раскручивается;
 - каждая родительская цепь служит в качестве матрицы для синтеза новой дочерней цепи;
 - в ходе синтеза дочерних цепей возникают новые комплементарные пары;
 - в результате репликации образуются две новые одинаковые дочерние молекулы.

Репликация (продолжение)

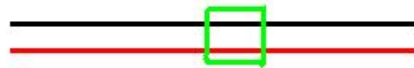
- **1. Полуконсервативный способ репликации геномов.**
- **2. Характеристика процесса репликации.**
- 3. Составляющие элементы процесса репликации.
- 4. Молекулярный механизм процесса репликации.
- 5. Особенности репликации различных геномов.

2. Характеристика процесса репликации

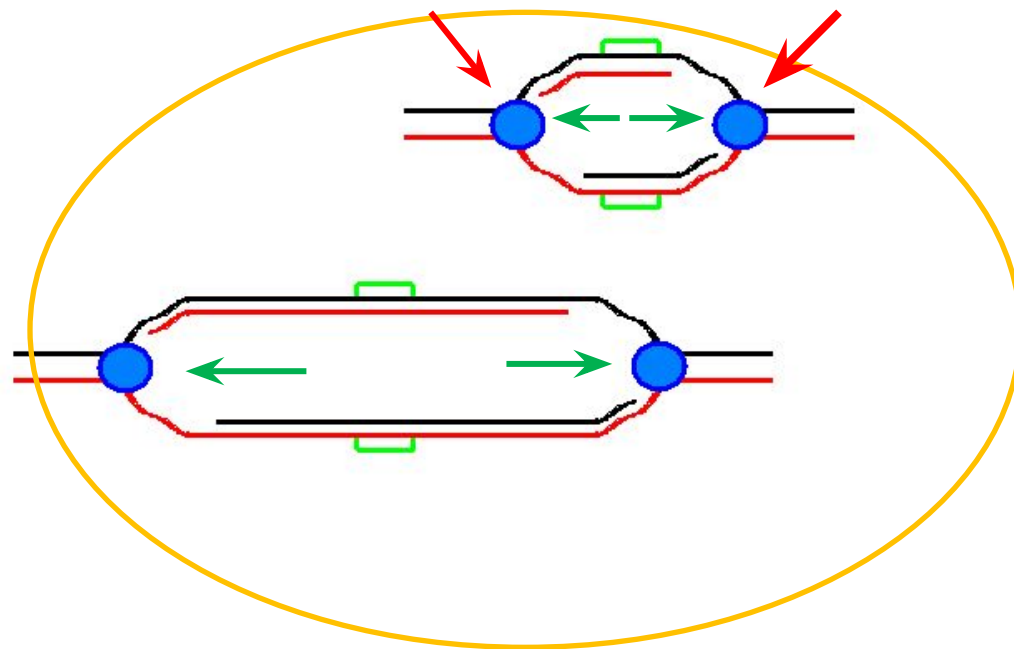
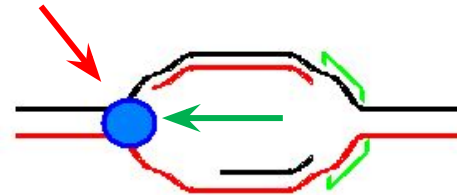
**Биологический смысл репликации ДНК:
копирование генетической информации для
переноса ее следующему поколению**

**1. Репликация у бактерий в большинстве случаев
двунаправленная**

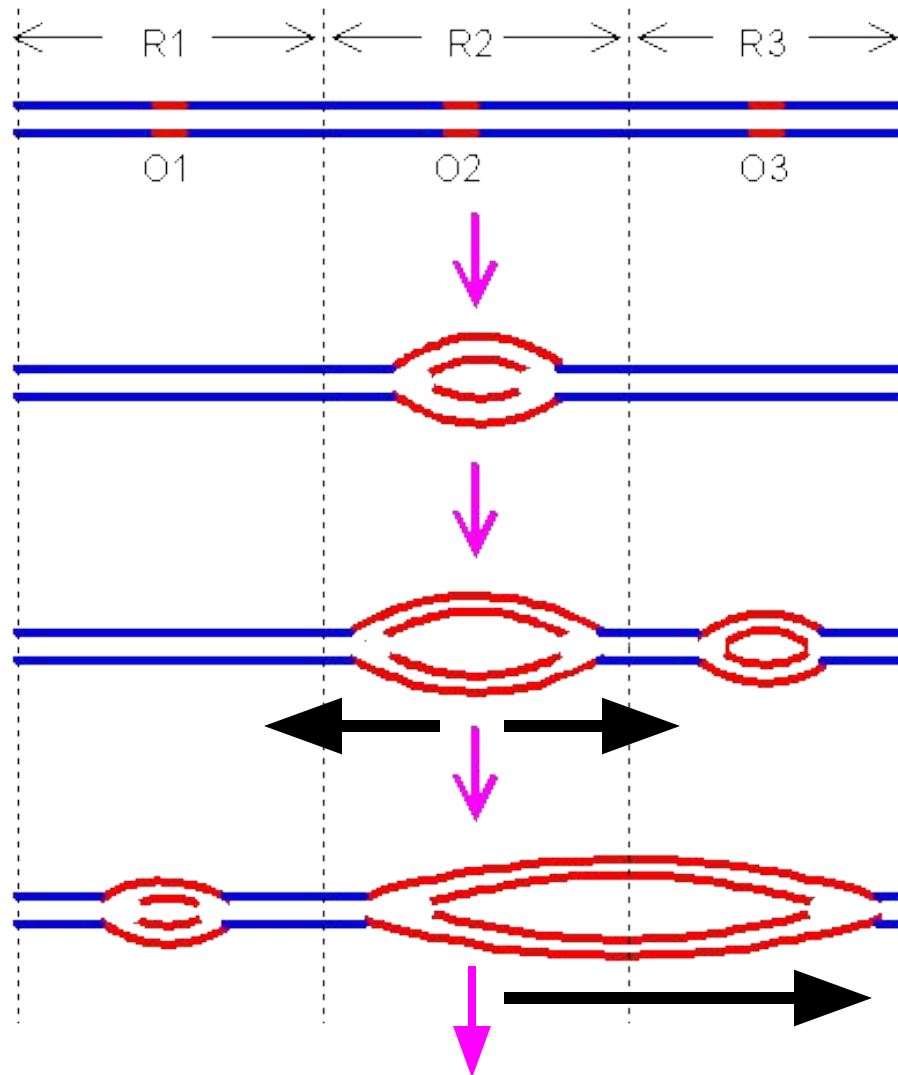
двунаправленная
репликация



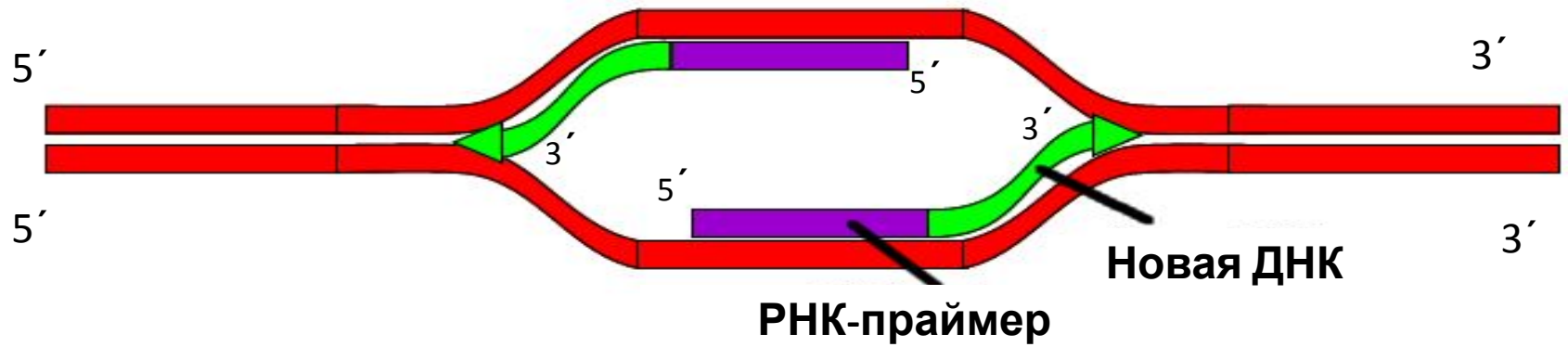
однонаправленная
репликация



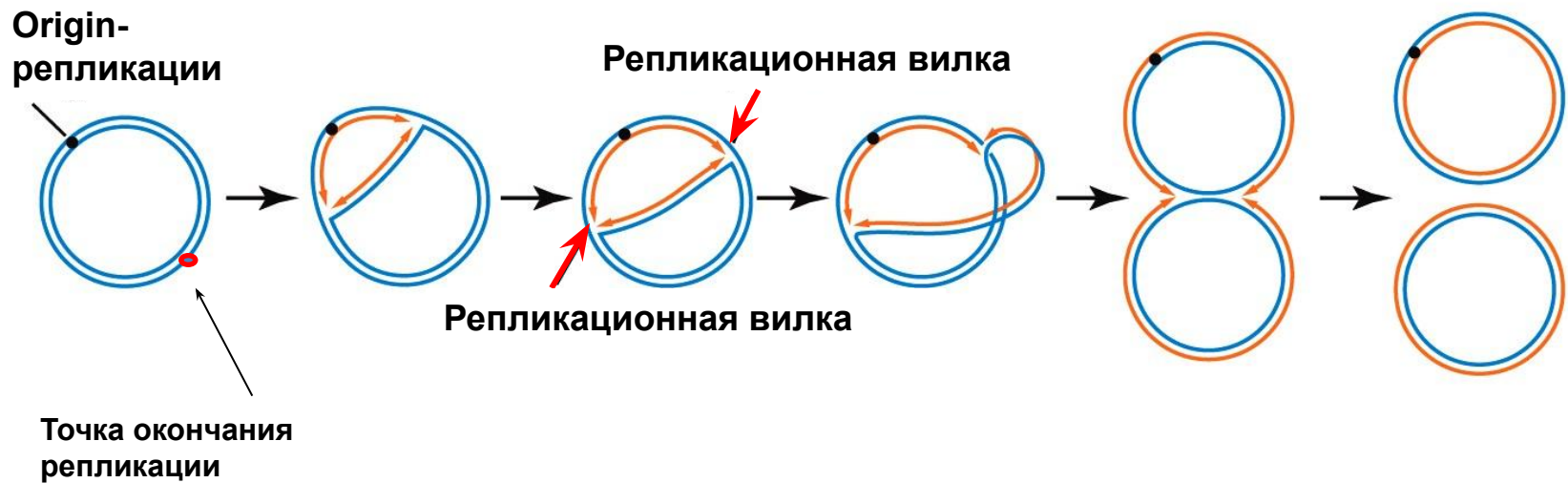
Двунаправленность продвижения репликационной вилки у эукариот



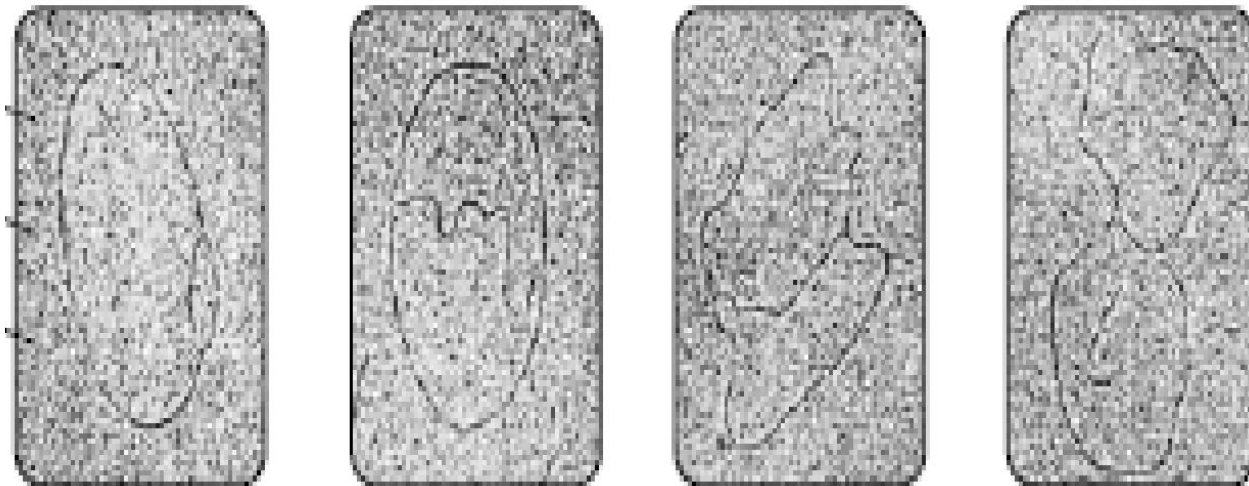
Двунаправленная репликация линейной хромосомы эукариот

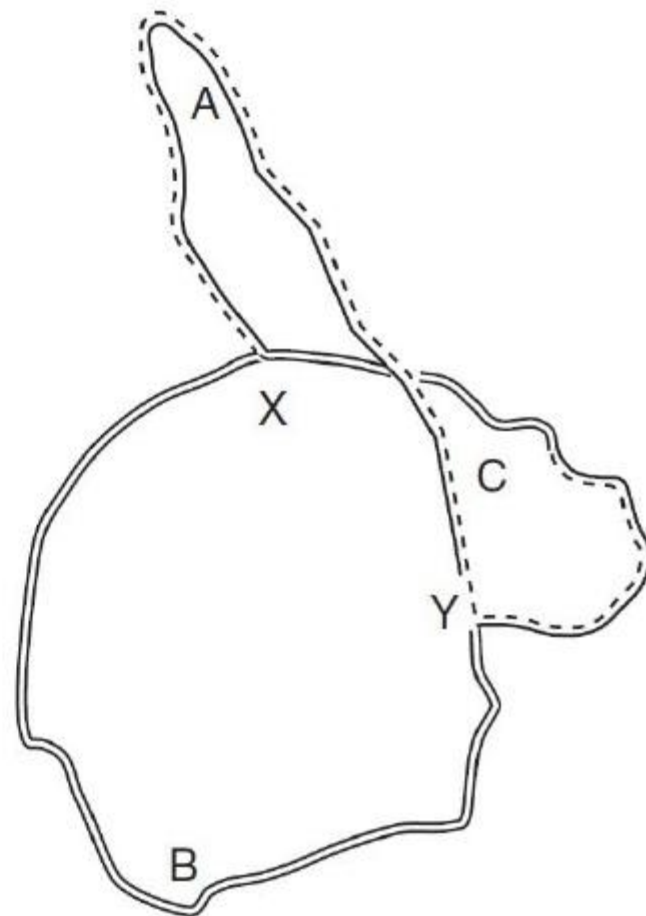
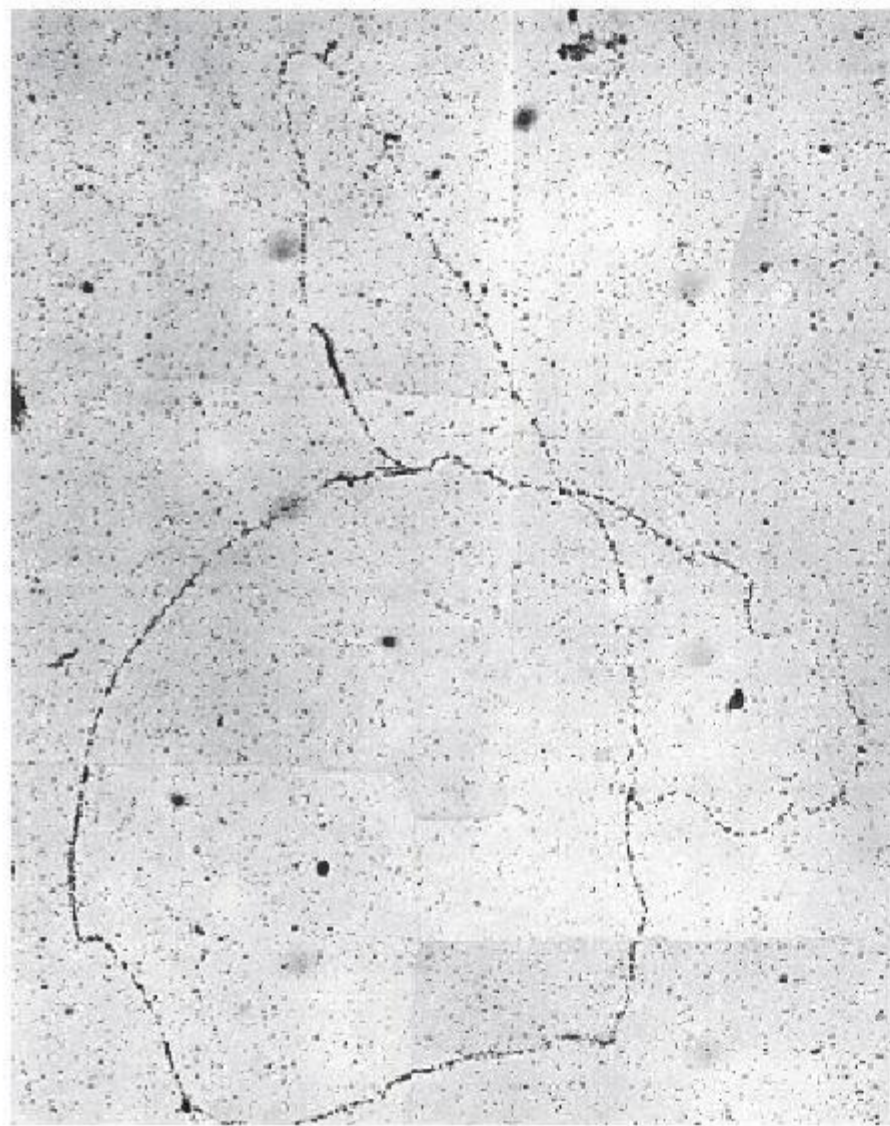


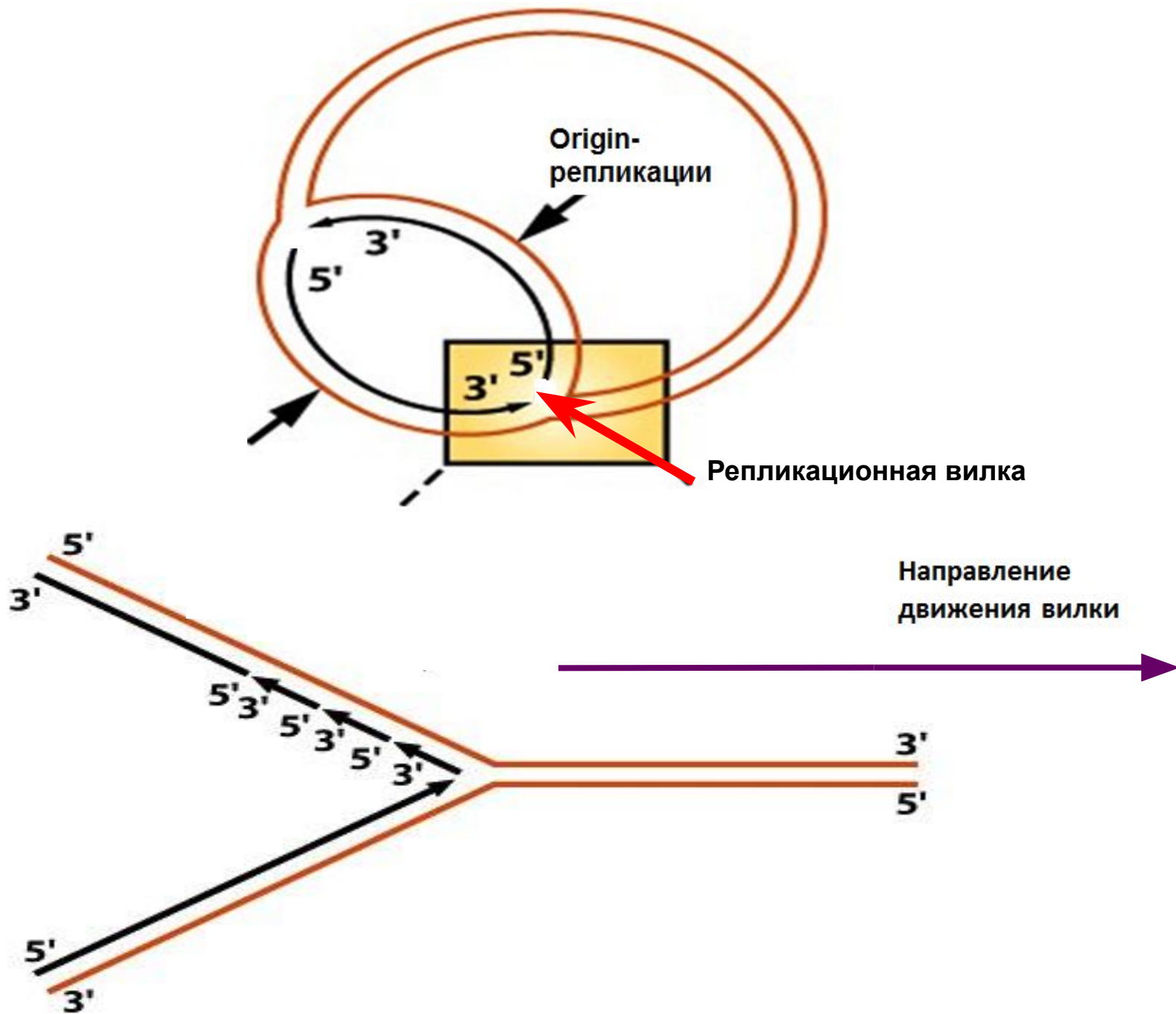
Двухнаправленная репликация кольцевой хромосомы бактерий



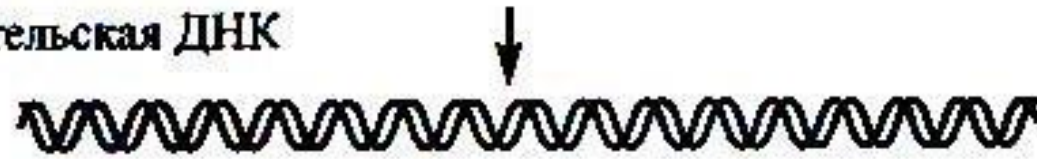
Эксперимент Дж. Кернса, демонстрирующий
двунаправленность репликации ДНК у
бактерий *E.coli* (1961 г.)



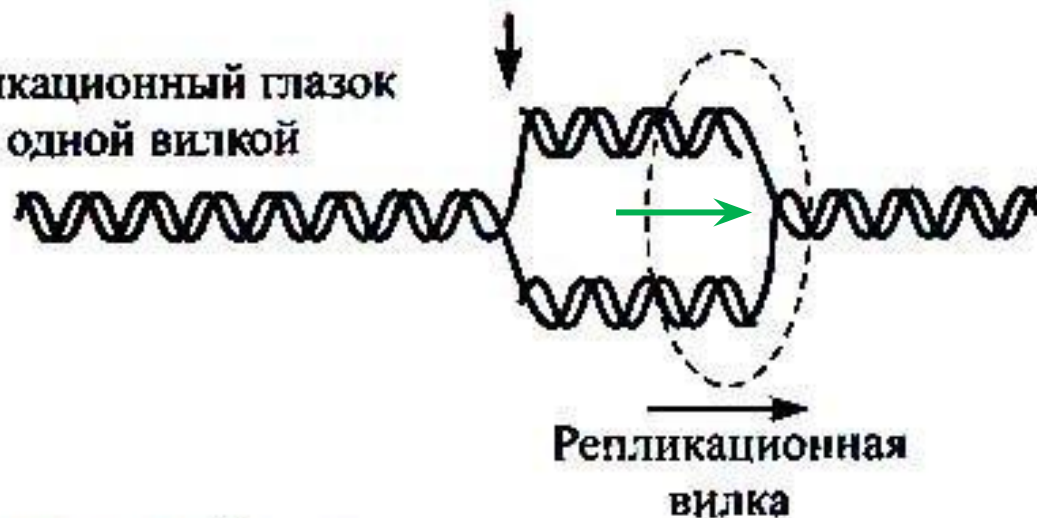




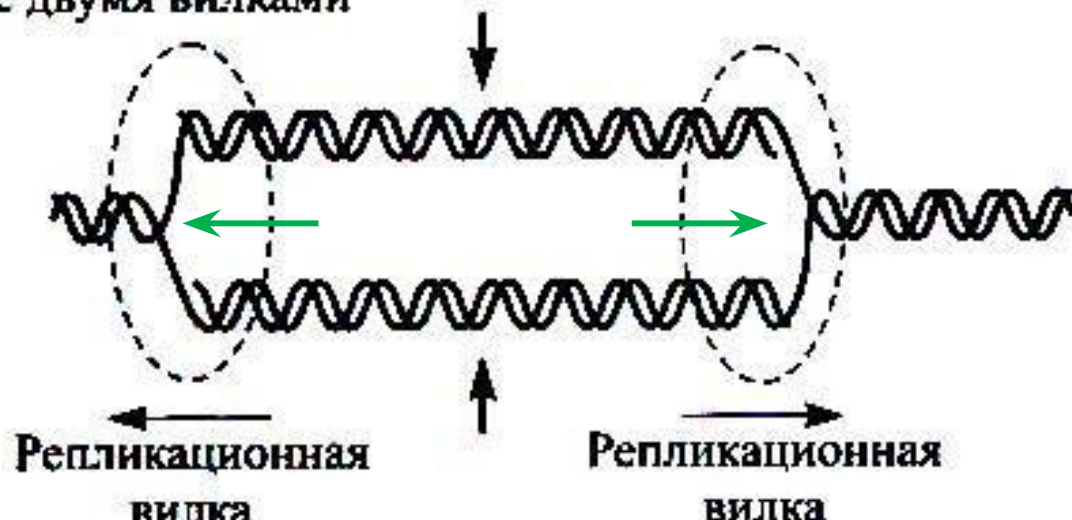
Родительская ДНК



Репликационный глазок
с одной вилкой

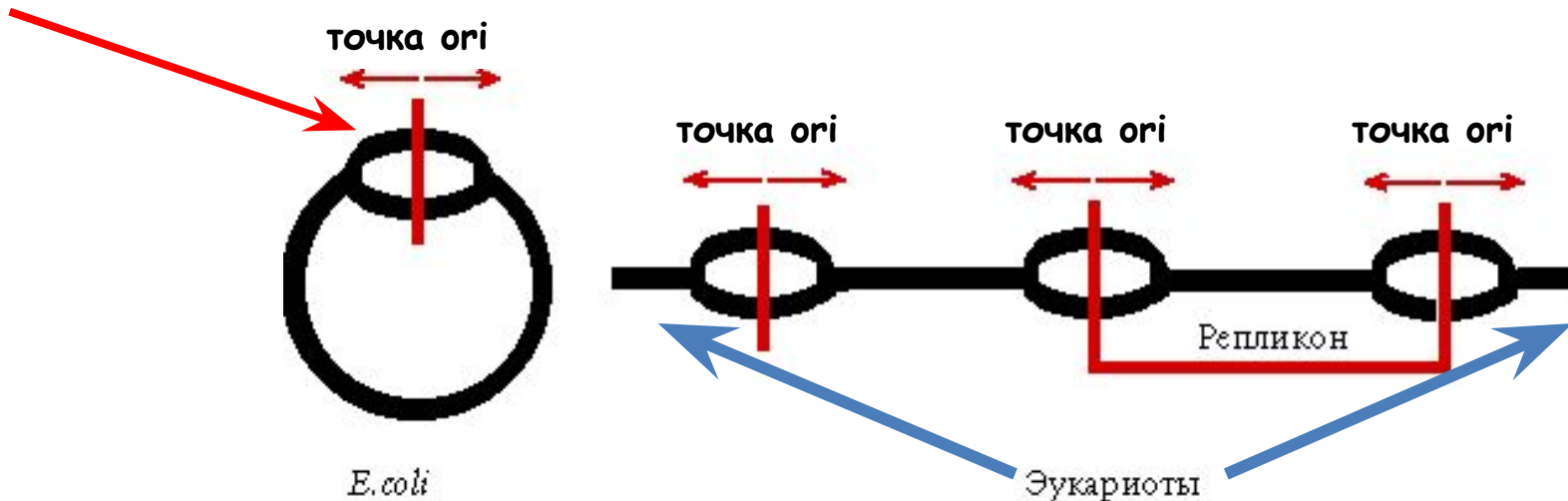


Репликационный глазок
с двумя вилками



2. Репликация начинается в точке «origin» (начало репликации)

У бактерий в кольцевом геноме имеется только одна точка «origin», тогда как у эукариотических хромосом их множество



Понятие о репликоне

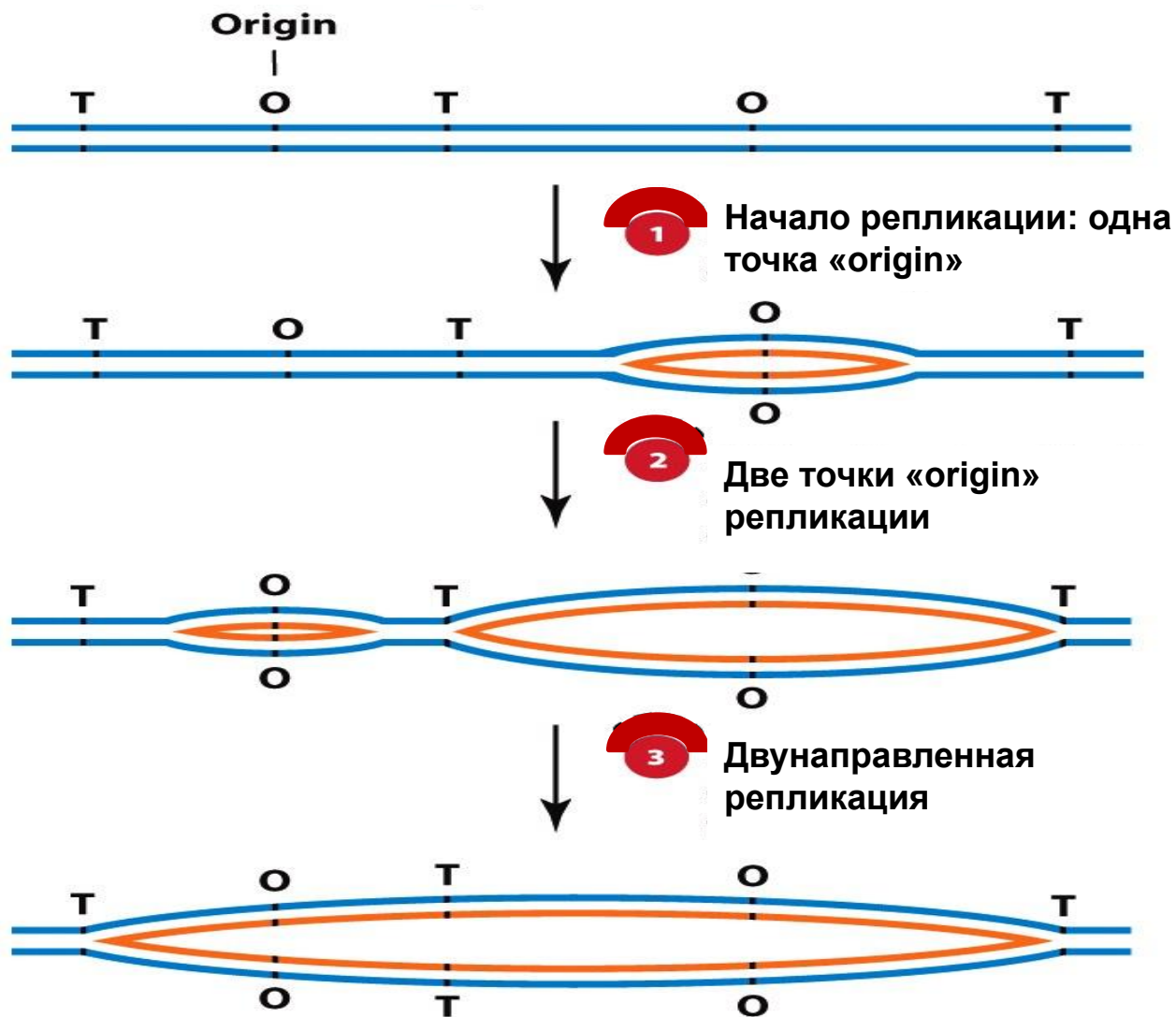
Репликон - участок ДНК между двумя «ориджинами» репликации.

Или: репликон — это участок ДНК от одной точки «начала» репликации до следующей.

Репликоны у эукариот

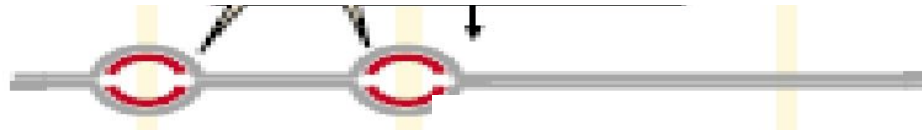
Репликация у эукариот начинается на хромосоме во многих точках «origin»-репликации.

Геномы эукариот (а также их отдельные хромосомы) состоят из **большого числа самостоятельных репликонов**, это значительно сокращает суммарное время репликации отдельной хромосомы.

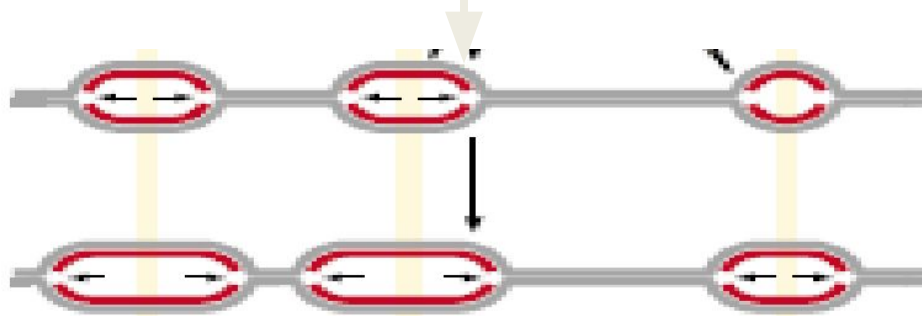


Репликоны у эукариот

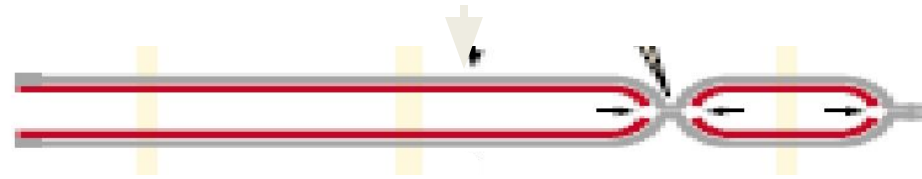
origin 1 origin 2 origin 3
В каждой точке 'origin' образуется «глазок» репликации



Репликация в каждом «origin» идет в двух направлениях

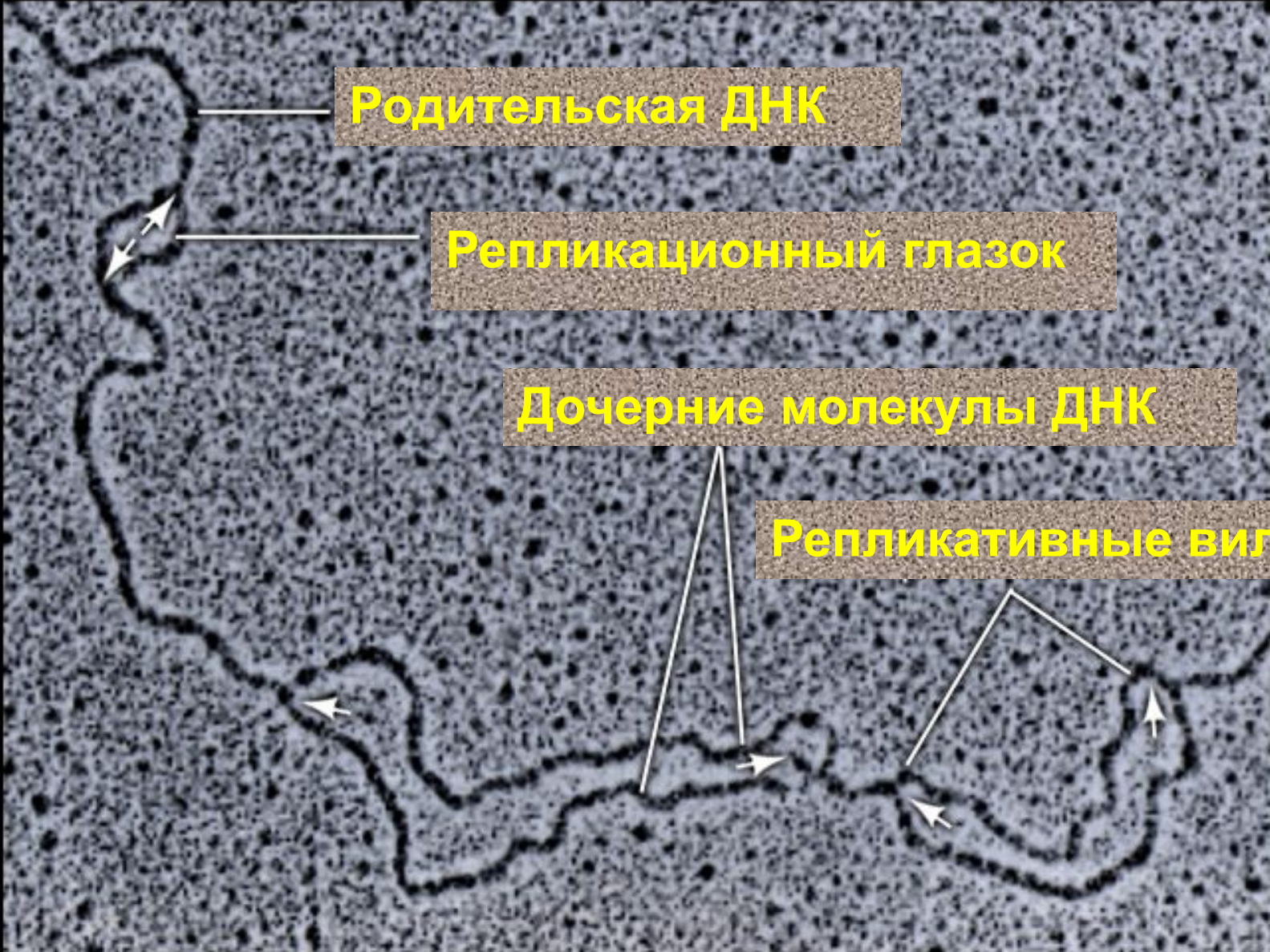


Через некоторое время соседние участки репликации сливаются между собой



В результате образуются две новые идентичные молекулы ДНК





This electron micrograph shows a DNA replication bubble. A single, continuous dark line represents the parental DNA molecule. From a central point, two new DNA molecules branch out, forming a Y-shape. The branching points are labeled as 'Репликационный глазок' (replication eye). The newly synthesized DNA molecules are labeled as 'Дочерние молекулы ДНК' (daughter DNA molecules). The points where the new molecules branch off from the parent are labeled as 'Репликативные вилки' (replication forks). The background is a grainy, light blue-grey texture.

Родительская ДНК

Репликационный глазок

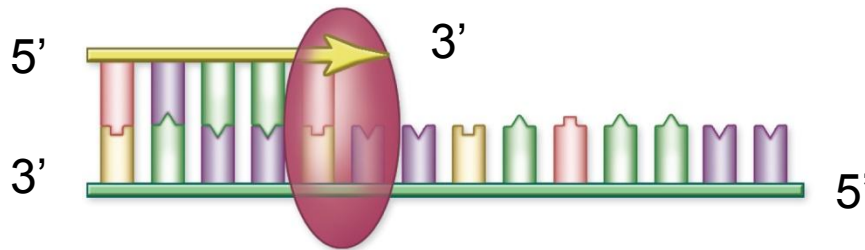
Дочерние молекулы ДНК

Репликативные вилки

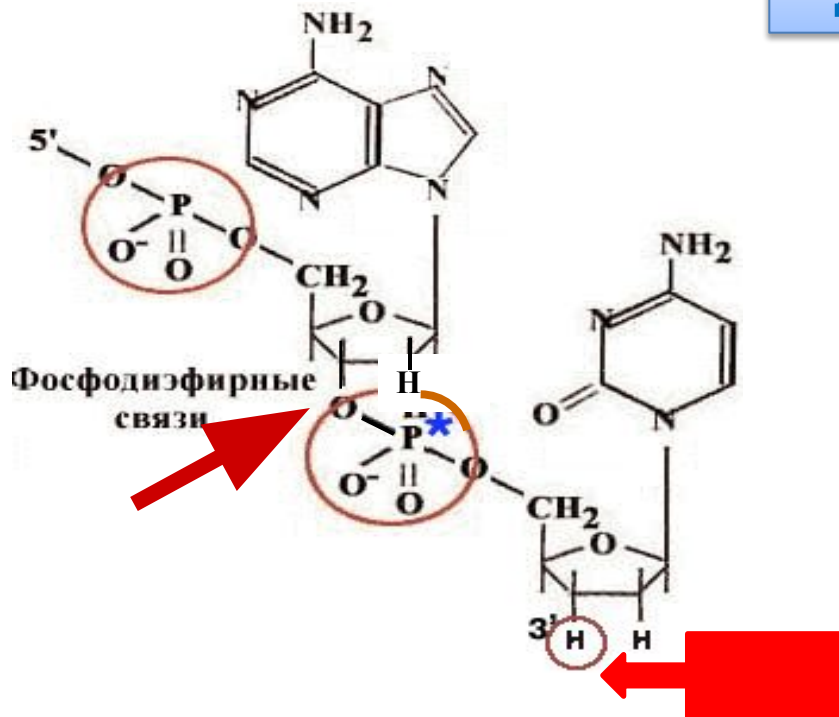
Число репликонов у различных организмов

Организм	Число репликонов	Средний размер репликона, тыс. п. н.
E.coli	1	4 200
Дрожжи	500	40
Дрозофила	3 500	40
Лягушка	15 000	200
Мышь	25 000	150
Бобы	35 000	300

3. Достраивается в ходе репликации 3'-конец цепи ДНК

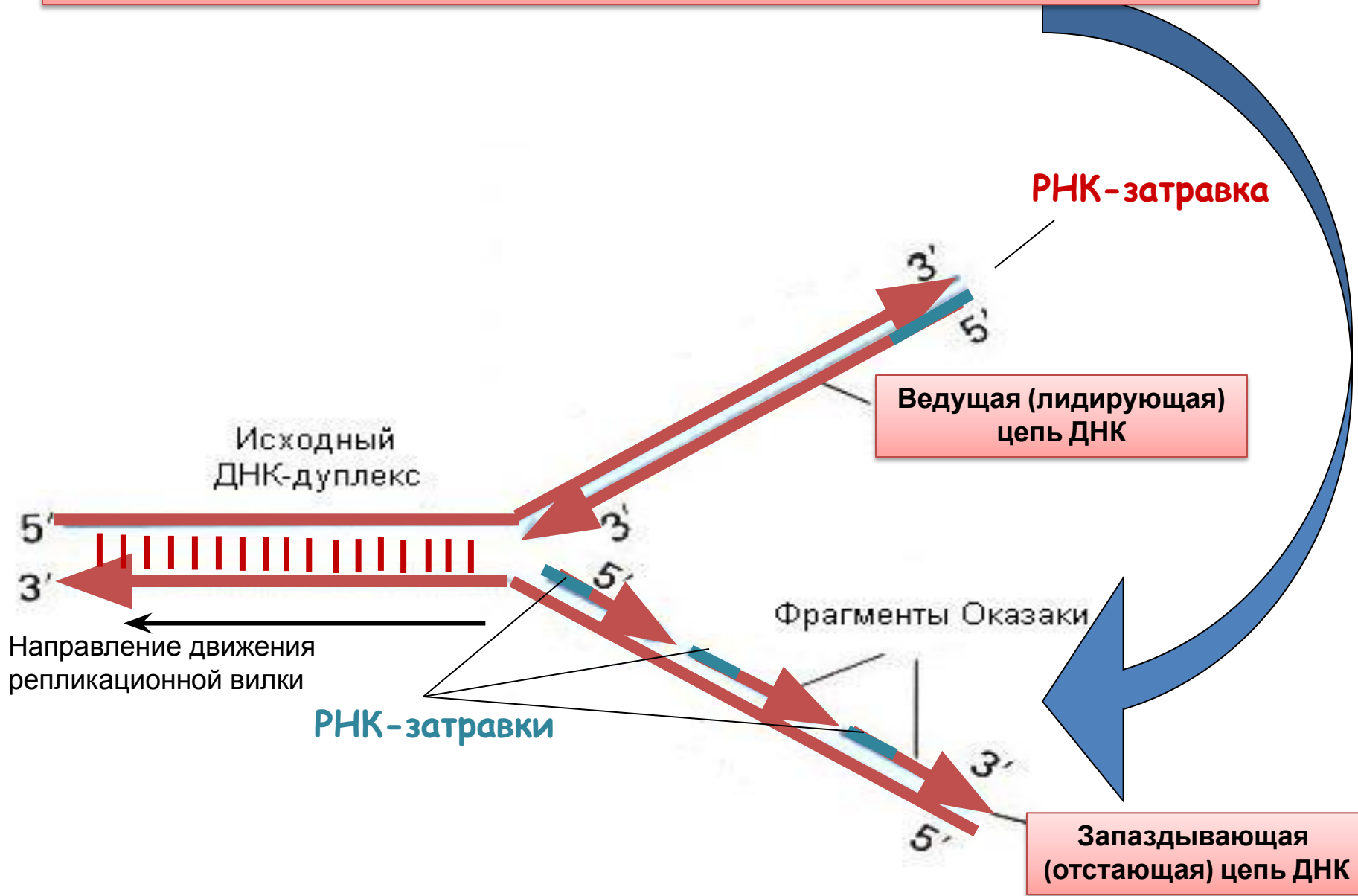


Эксперимент с дидезоксинуклеозидтрифосфатом



Если **дидезоксирибонуклеозидтрифосфат** (имеющий на 3'-конце вместо OH-группы только H-группу) включался в растущую цепь ДНК, то присоединение следующего нуклеотида блокировалось в связи с отсутствием реакционно способной 3'-гидроксильной группы.

4. На запаздывающей цепи синтеза ДНК прерывистый



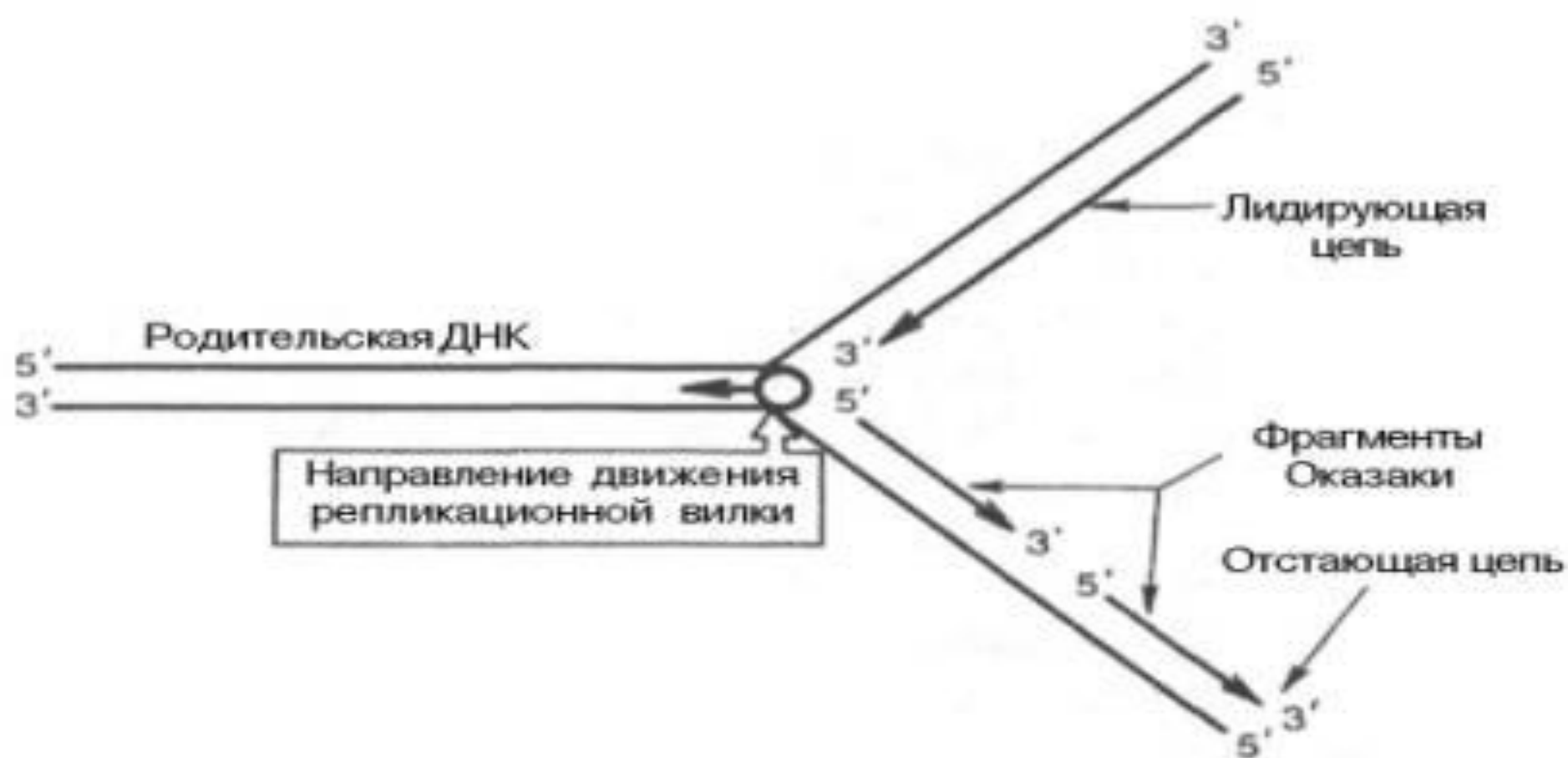


Схема прерывистой репликации на запаздывающей цепи была доказана Рейджи Оказаки в 1968 г. Он провел эксперимент на бактериях *E.coli*, зараженных бактериофагом T4.

Было использовано два подхода:

1. Метод импульсного мечения.
2. Метод с использованием мутантов *E.coli*, дефектных по ферменту ДНК-лигазе.

Справка: ДНК-лигаза сшивает одонитчатые фрагменты ДНК (фрагменты Оказаки) между собой.

Метод импульсного мечения

- Р. Оказаки заражал бактерии *E.coli* бактериофагом Т4 и одновременно вводил в культуру меченый ^3H -тимидин.

Если в бактериальную клетку попадает фаговая ДНК, то клетка целиком переключается на репликацию ДНК фага.

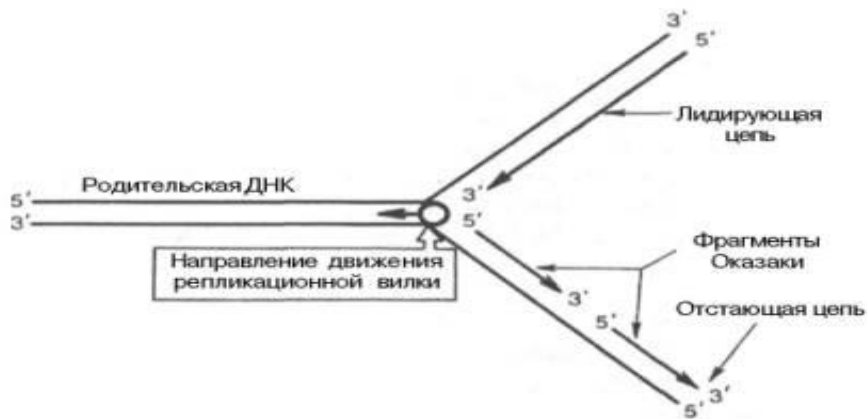
Когда бактериофаги начинали размножаться (реплицироваться), через очень малые промежутки времени (например, через 2 сек) в пробирку, где находились бактерии, Р. Оказаки добавлял 1000-кратный избыток «холодного» (немеченого) тимидина. Таким образом, в репликации фаговых геномов начинал встраиваться немеченый тимидин, а сама

^3H -тимидиновая радиоактивная метка включалась только в течение очень короткого промежутка времени.

Сахароза разводится в растворе щелочи. В щелочной среде происходит денатурация ДНК. В этом случае короткие фрагменты ДНК, если они есть, отделяются от длинных. После этого их можно выявить при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы, разделяющем молекулы по молекулярной массе.

С помощью этого метода ему удалось обнаружить маленькие меченые фрагменты однонитчатой ДНК, образовавшейся в ходе репликации бактериофагов, которые были названы фрагментами Оказаки.

Кроме того, Р. Оказаки доказал, что время «жизни» этих фрагментов очень короткое и затем они сшиваются в непрерывную «запаздывающую» цепь ДНК с помощью фермента ДНК-лигазы.



Метод с использованием мутантов *E.coli*, дефектных по ДНК- лигазе

- **ДНК-лигаза** имеется как у прокариот, так и у эукариот. У мутантов *E.coli*, дефектных по ДНК-лигазе, этот фермент не синтезируется.
- У бактериофагов Т4 также имеется своя термочувствительная лигаза, которая работает при 20° С, но не работает при 43° С.
- Клетки заражали фагом Т4, давали импульсную ³Н-**ТИМИДИ-НОВУЮ метку** и выращивали при двух температурах: 20° С и 43° С. Потом проводили центрифугирование в щелочном градиенте сахарозы. При высоких температурах фаговая ДНК-лигаза не синтезировалась и образующиеся фрагменты Оказаки оставались разрывами.

Таким образом, синтез запаздывающей цепи осуществляется с помощью отдельных фрагментов, которые называются фрагментами Оказаки

Фрагменты Оказаки у бактерий имеют длину 1 000 – 2 000 нуклеотидов.

У эукариотических организмов в 10 раз меньше – 100 – 200 нуклеотидов.

В свою очередь, каждый фрагмент Оказаки состоит из небольшого участка РНК (10-12 нуклеотидов), который называется **РНК-праймером** или **РНК-затравкой**, и участка ДНК. При дальнейшем «созревании» запаздывающей цепи **РНК-праймеры** удаляются и замещаются участком ДНК.

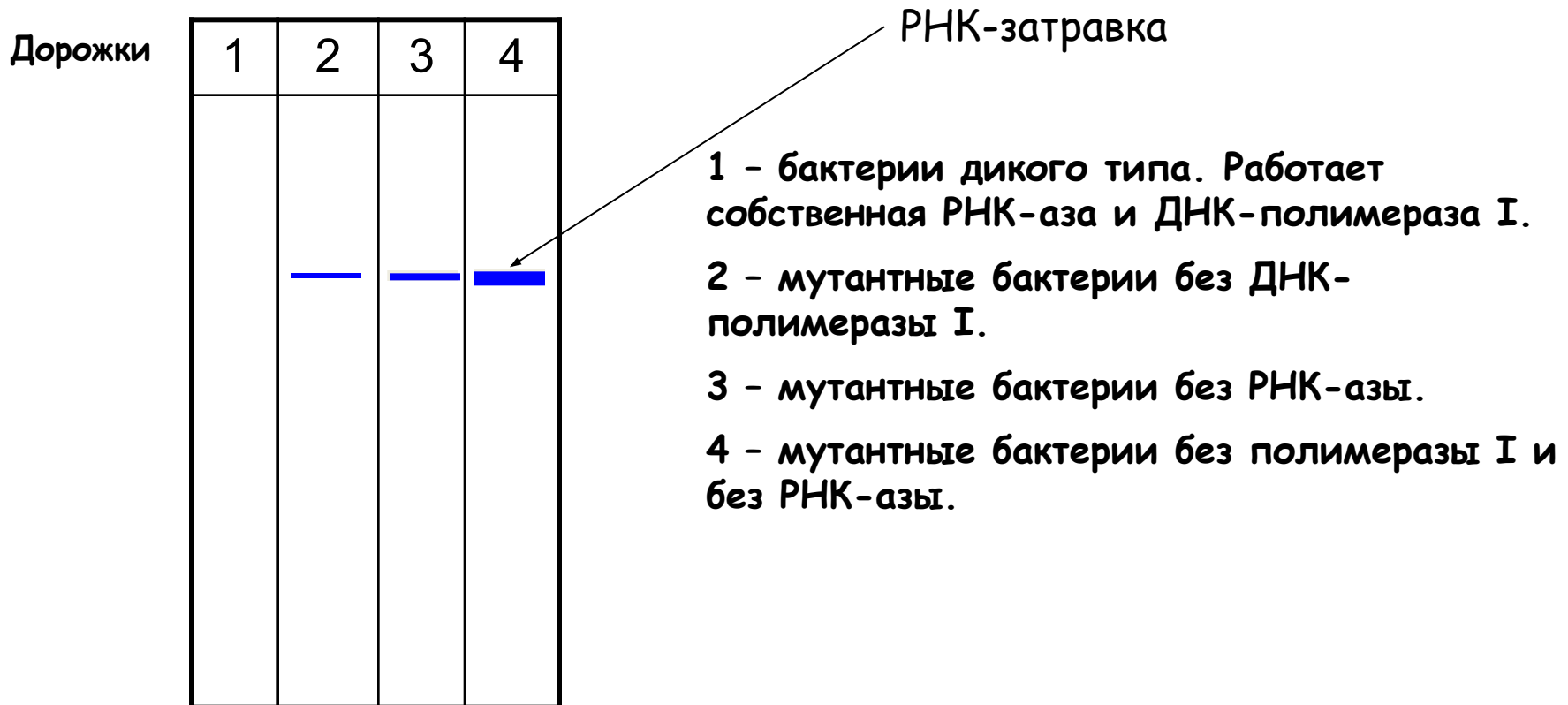
5. Потребность в РНК-затравке для запуска синтеза ДНК

Потребность в РНК-затравке для синтеза ДНК была доказана

Т. Оказаки в 1985 г.:

- 1. Было установлено, что репликация ДНК бактериофага М13 (РНК-содержащий фаг) после заражения им бактерий *Escherichia coli* ингибируется при добавлении в среду антибиотика рифампицина. Этот антибиотик блокирует активность фермента РНК-полимеразы, которая осуществляет синтез РНК.**
- 2. Фермент ДНК-аза не мог полностью разрушить фрагмент Оказаки – оставались участки РНК, величиной 10-12 нуклеотидов, которые не разрушались этим ферментом.**

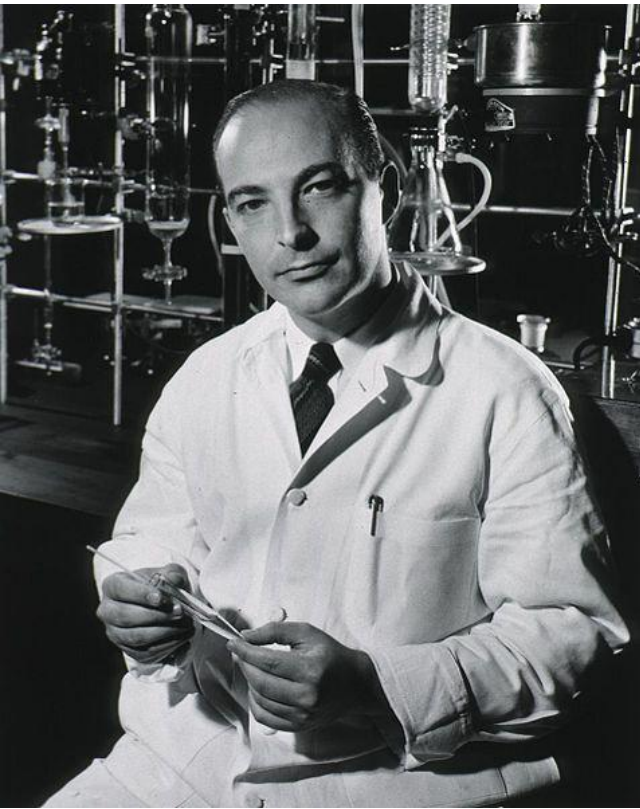
1. Т. Оказаки использовала мутанты *E. coli*, дефектные по рибонуклеазе H, а также нуклеазной активности ДНК-полимеразы I. Это увеличивало вероятность сохранения РНК-праймера.
2. Присоединила к 5'-концу фрагмента Оказаки модифицированный нуклеотид (ГМФ) для стабилизации с этого конца.
3. Праймер РНК был радиоактивно помечен.
4. ДНК фрагмента Оказаки была разрушена ДНК-азой.
5. Оставшаяся часть была подвергнута электрофорезу.



6. Скорость репликации у бактерий около 1000 - 2 000 нуклеотидов в секунду.

Скорость репликации у эукариот в 10 раз ниже – 100 – 200 нуклеотидов в секунду.

- Бактериальная хромосома реплицируется за 40 минут, тогда как эукариотическая - за 1-2 часа.**



1918-2007 гг.

В 1959 г. получил Нобелевскую премию в области физиологии и медицины за разработку подходов синтеза ДНК (совместно с Северо Очоа – он за синтез РНК).

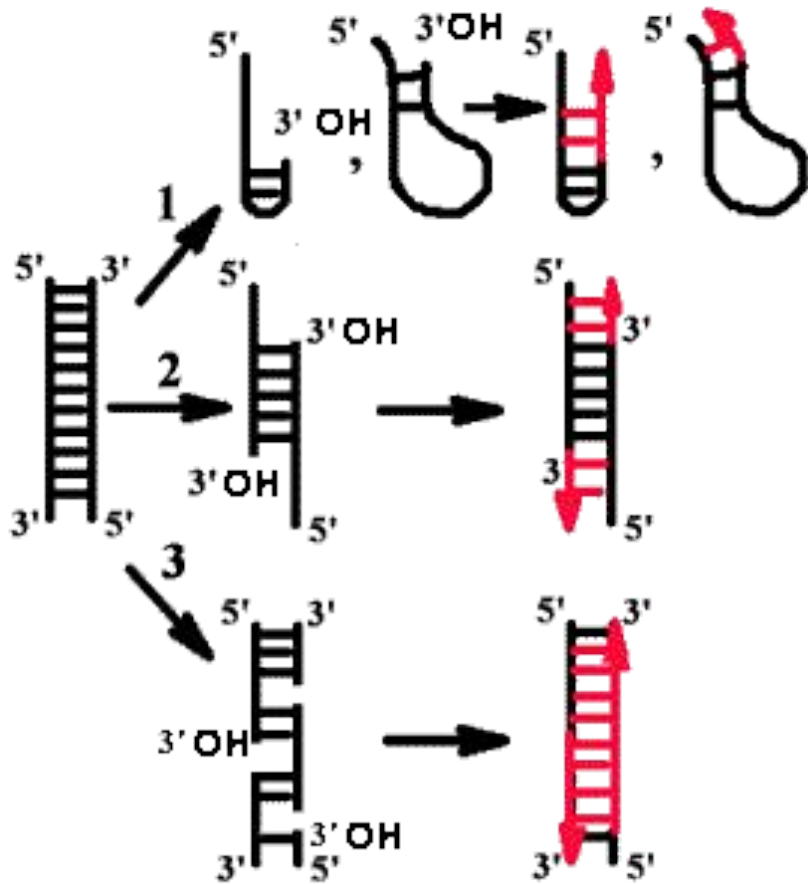
ОТКРЫТИЕ ПРОЦЕССА РЕПЛИКАЦИИ

В 1956 г. Артур Корнберг наработал 100 кг биомассы бактерий *E. coli* и выделил только 0,5 г фермента ДНК-полимеразы.

Основные компоненты для синтеза ДНК *in vitro*:

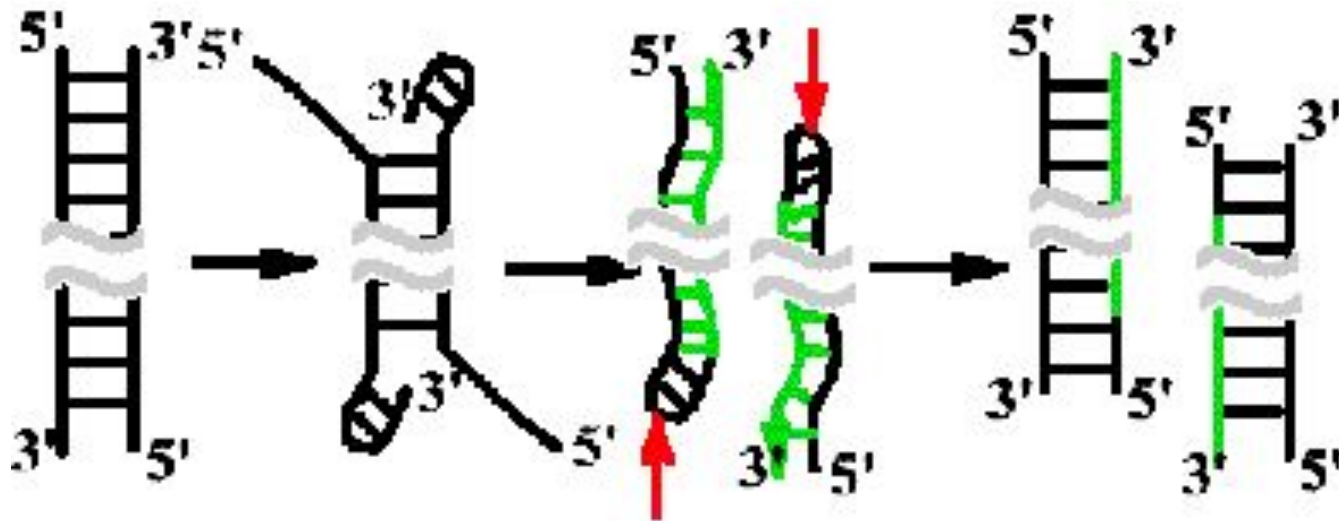
1. **ДНК-матрица** - образец, по которому строится новая цепь ДНК.
2. **Дезоксирибонуклеотиды (АТФ, ГТФ, ТТФ, ЦТФ)** - то, из чего строятся дочерние цепи.
3. **ДНК-полимераза** – фермент, осуществляющий синтез ДНК.
4. **Ионы магния** – необходимы для работы фермента.

Активация ДНК-матрицы



Нативная двуцепочечная ДНК, не имеющая повреждений, не может эффективно использоваться для репликации. Активировать ее можно либо **денатурацией щелочью или нагреванием** (1), либо **обработкой нуклеазой определенного типа, которая делает однонитчатые концы** (2), либо **внесением одноцепочечных разрывов с помощью эндонуклеаз** (3).

Во всех случаях матрицей для синтеза новых цепей служит одноцепочечная ДНК. Затравкой является 3'-ОН конец двуцепочечной ДНК, причем он должен быть спарен с матрицей.



Репликация (продолжение)

- 1. Полуконсервативный способ репликации геномов.
- 2. Характеристика процесса репликации.
- **3. Составляющие элементы процесса репликации.**
- 4. Молекулярный механизм процесса репликации.
- 5. Особенности репликации различных геномов.

Составляющие элементы процесса репликации

(на примере бактерий)

Для подготовки хромосомы к репликации работают:

Топоизомеразы –
топоизомераза I и топоизомераза II

Непосредственно в процессе репликации участвуют ферменты:

1. Хеликазы
2. Белки инициации репликации DnaA, DnaB, DnaC
3. SSB-белки
4. ДНК-праймаза (РНК-полимераза)
5. ДНК-полимеразы:
ДНК-полимераза I
ДНК-полимераза II
ДНК-полимераза III
6. ДНК-лигаза

Основные функции ферментов репликации

- **ДНК-топоизомеразы** - ферменты изменяющие степень сверхспирализации ДНК, путем внесения одноцепочечных или двухцепочечных разрывов в ДНК.
- **ДНК-хеликаза** – фермент разделяющий цепи двухцепочечной ДНК на одинарные цепи.
- **ДНК-праймаза** — это фермент РНК-полимераза, синтезирующий короткий фрагмент РНК, называемый праймером, комплементарный одноцепочечной матрице ДНК.
- **ДНК-полимеразы** - ферменты катализирующие синтез дочерних цепей на матрице ДНК по принципу комплементарности.
- **ДНК-лигаза** – фермент катализирующий сшивание одноцепочечных фрагментов ДНК.

Топоизомеразы

ДНК-топоизомеразы, находясь перед репликативной вилкой, разрезают молекулу ДНК для облегчения ее расплетания и раскручивания молекулы ДНК, после чего непрерывность ее восстанавливается.

Топоизомеразы – ферменты, катализирующие изменение топологии ДНК путем временного разрыва одной (**Топоизомеразы I**) или обеих (**Топоизомеразы II**) нитей ДНК, переносу через брешь другой нити, а затем зашивает брешь.

Одни **топоизомеразы** могут удалять только негативные супервитки, а другие и негативные и позитивные.

Ферменты, которые могут вносить негативные супервитки называют **ДНК-гиразами**

У *E. coli* идентифицированы топоизомеразы I и III (тип I) и топоизомераза IV и ДНК-гираза (тип II)

По механизму действия топоизомеразы делятся на два типа:

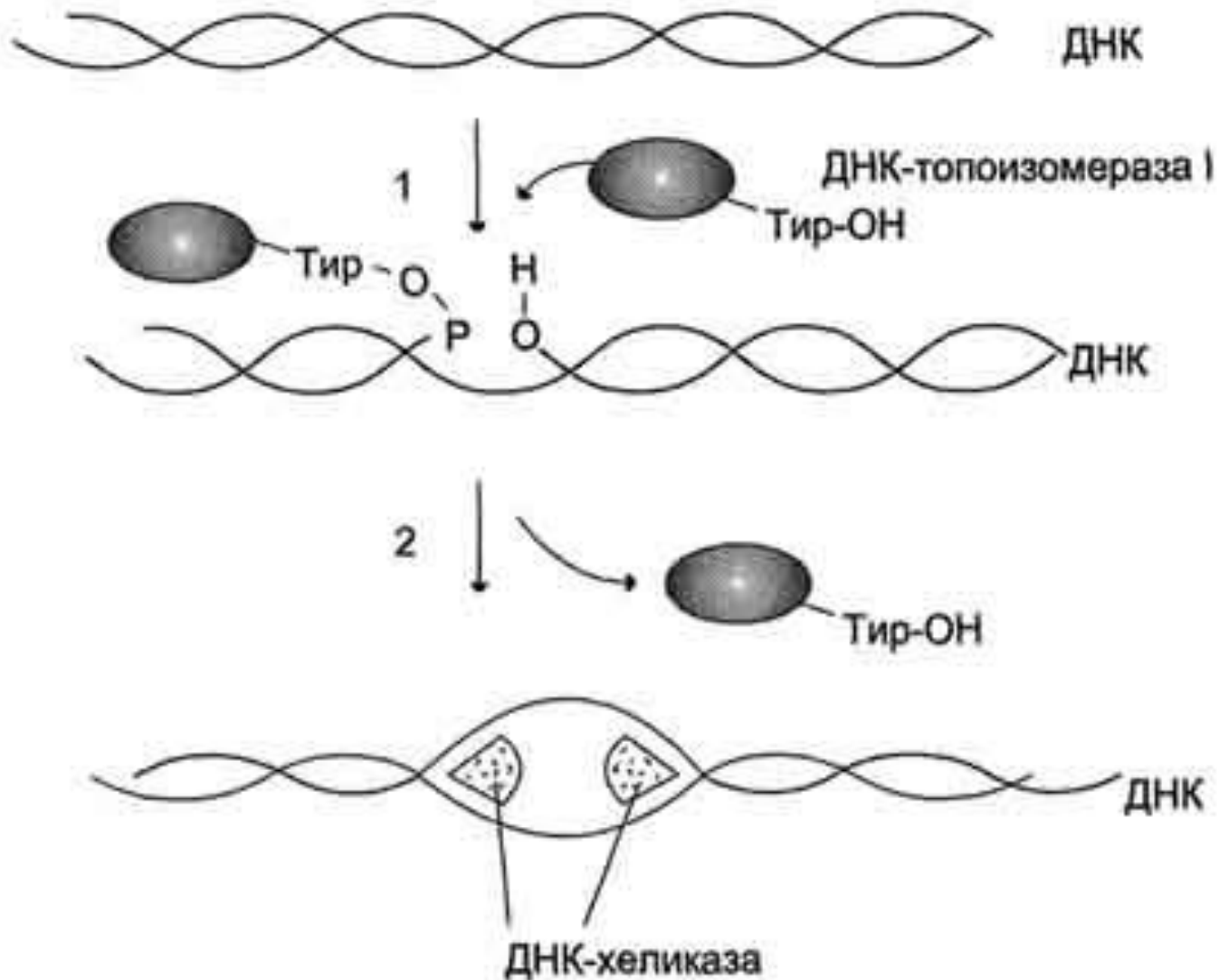
топоизомераза I и топоизомераза II

Топоизомераза I путём одноцепочечного разрыва создает шарнир, вокруг которого молекула ДНК, находящаяся перед вилкой, может свободно вращаться.

Это снимает механическое напряжение, возникающее при раскручивании двух цепей в репликативной вилке, что является необходимым условием для её непрерывного движения.

Топоизомераза I уменьшают число сверхвитков ДНК

Участие топоизомеразы I в образовании репликативной вилки

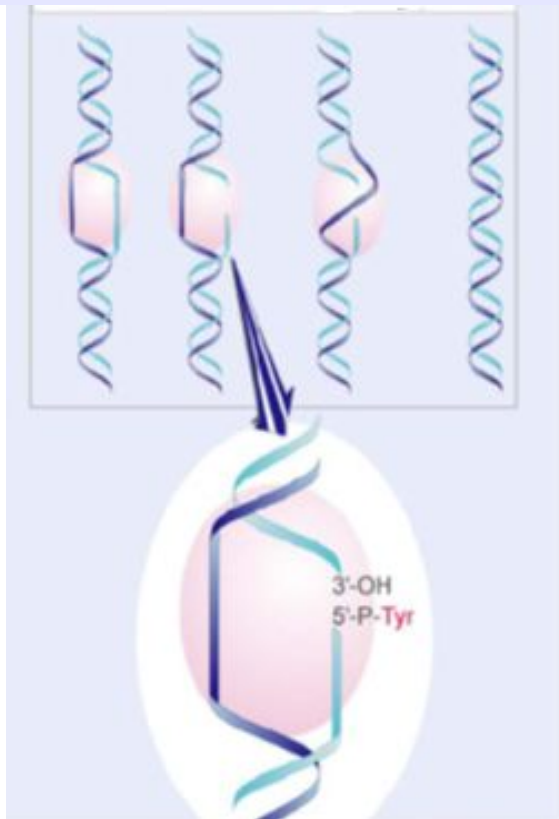


Механизм действия топоизомераз I и II

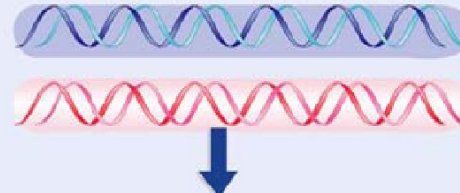
Топоизомераза I



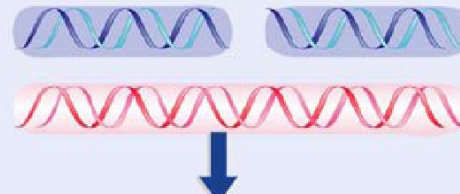
Фермент делает одноцепочечный надрез в молекуле ДНК



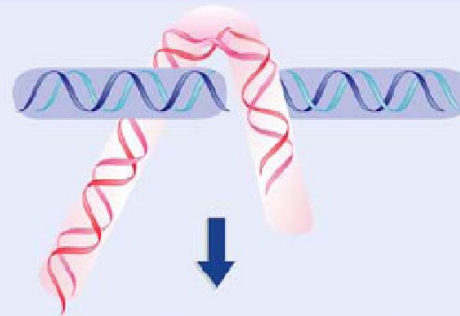
Топоизомераза II



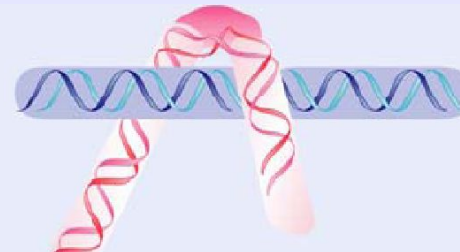
Фермент делает двухцепочечный надрез в ДНК



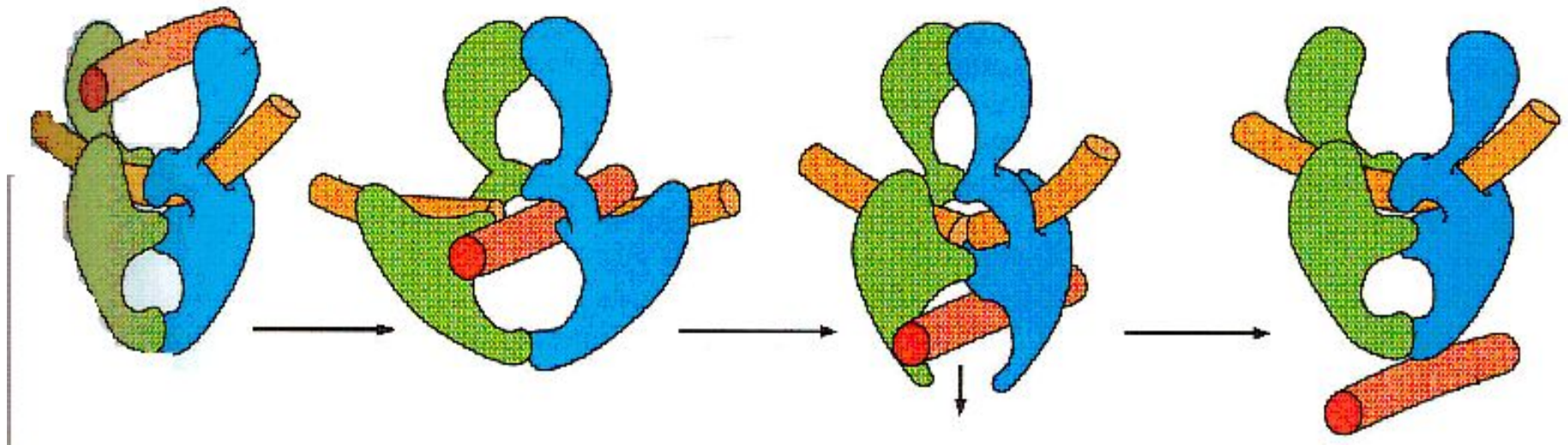
Цельная молекула ДНК пропускается через этот надрез



Двухцепочечная структура восстанавливается

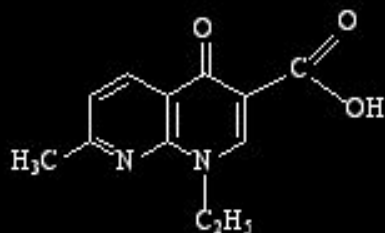
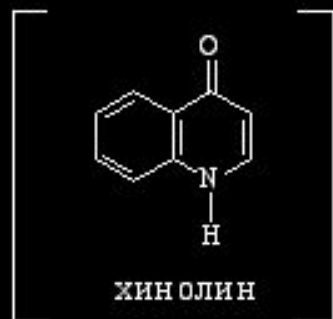


Топоизомераза I убирают суперспирализацию ДНК

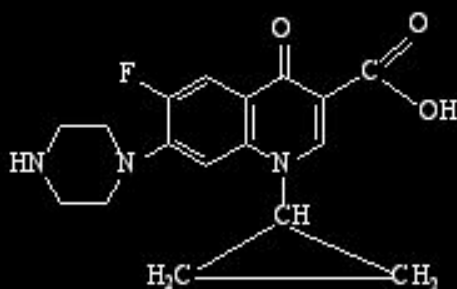


Топоизомераза II вносит временные разрывы в обе комплиментарные цепи ДНК, пропускает двухцепочечный сегмент той же самой или другой молекулы ДНК через разрыв, а затем соединяют разорванные концы. В результате за один акт снимаются два сверхвитка.

Антибиотики - ингибиторы топоизомеразы
(гиразы)



налидиксовая кислота (“неграм”)



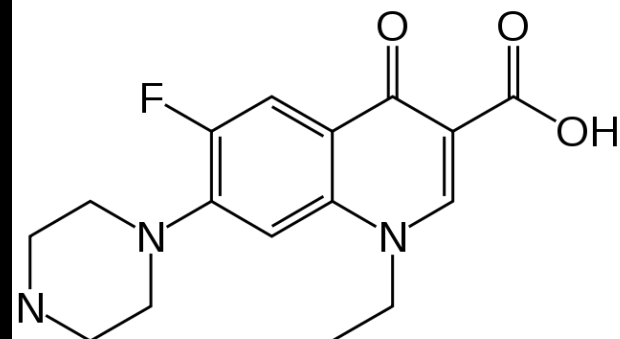
ципрофлоксацин (“ципробай”)

“Неграм” - грамотрицательный

Антибиотики –
ингибиторы
топоизомеразы:

**хинолоны/
фторхинолоны**

(Ципробай)



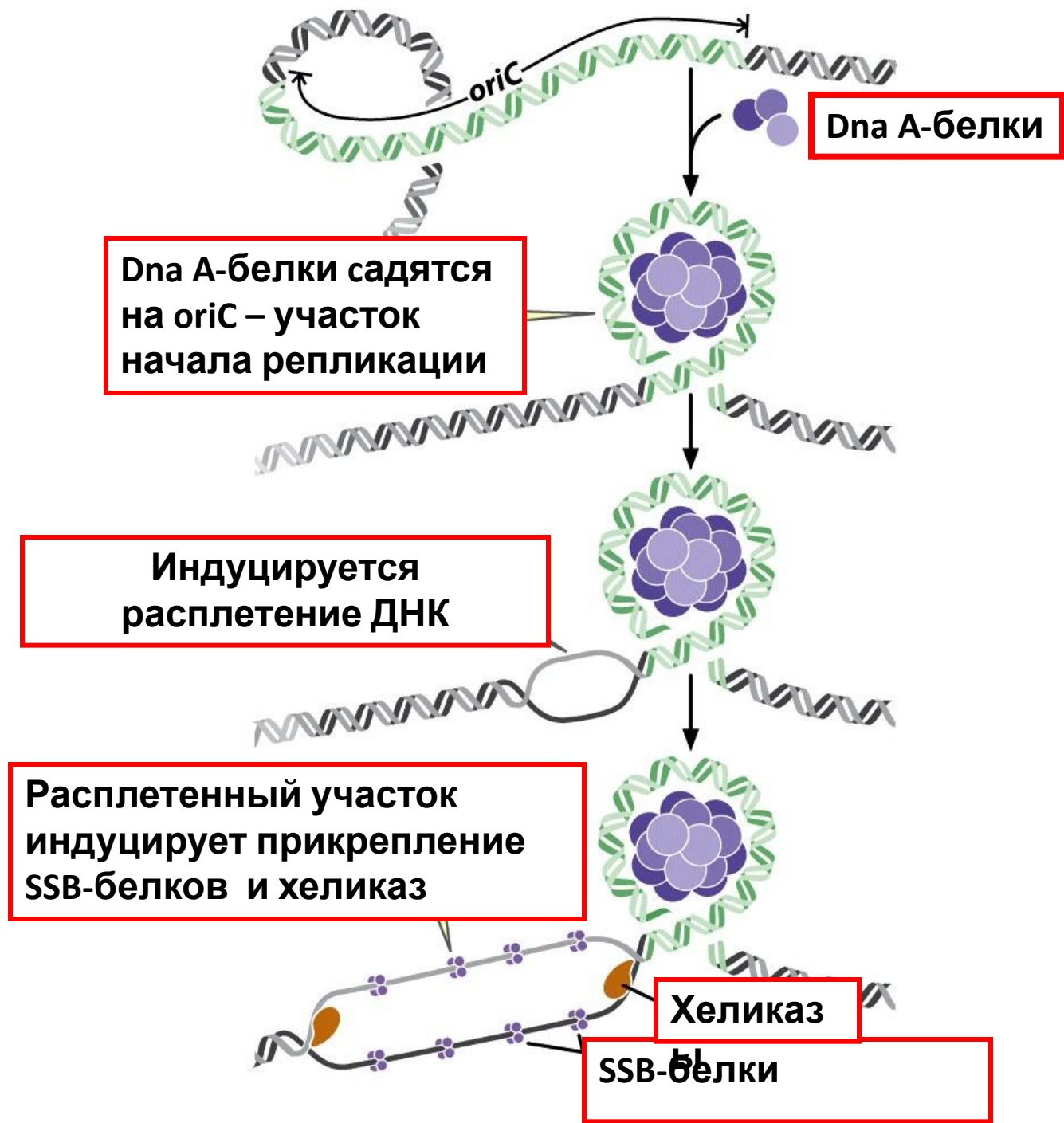
Норфлоксацин

Хеликазы – это ферменты, способные расплестать две комплементарные нити в ДНК с использованием энергии, полученной при гидролизе АТФ.

У бактерий имеется две хеликазы – хеликаза Rep и хеликаза DnaB. Считается, что хеликаза, движимая гидролизом АТФ, однонаправленно «едет» по одной из цепей ДНК, расплетая перед собой двойную спираль.

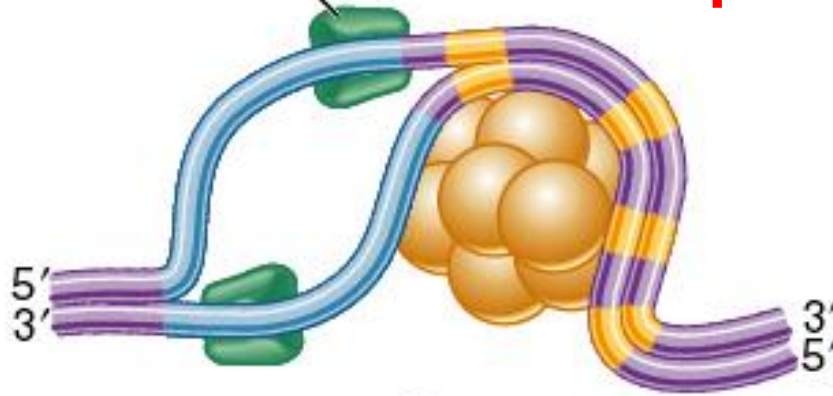
Хеликаза Rep продвигается по ДНК от 3'-конца к 5'-концу цепи ДНК, служащей матрицей для **ведущей цепи ДНК**.

Хеликаза DnaB продвигается по ДНК от 5'-конца к 3'-концу цепи, служащей для синтеза **запаздывающей цепи**.
Продвижение хеликаз идет в направлении вместе с репликативной вилкой.

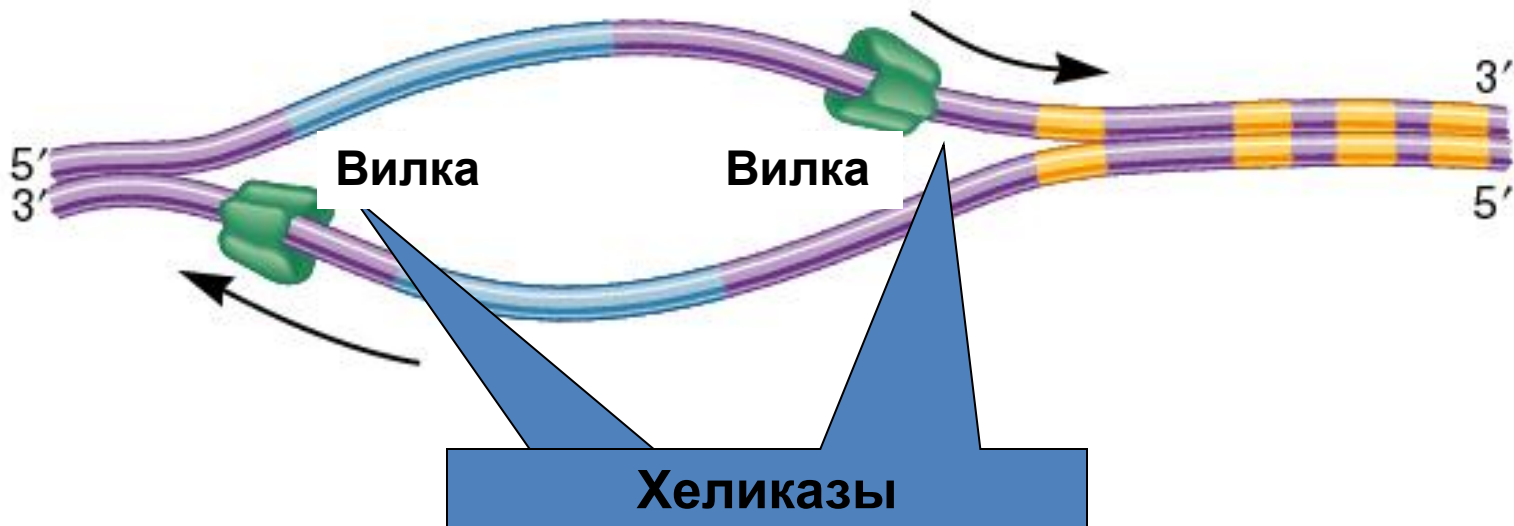


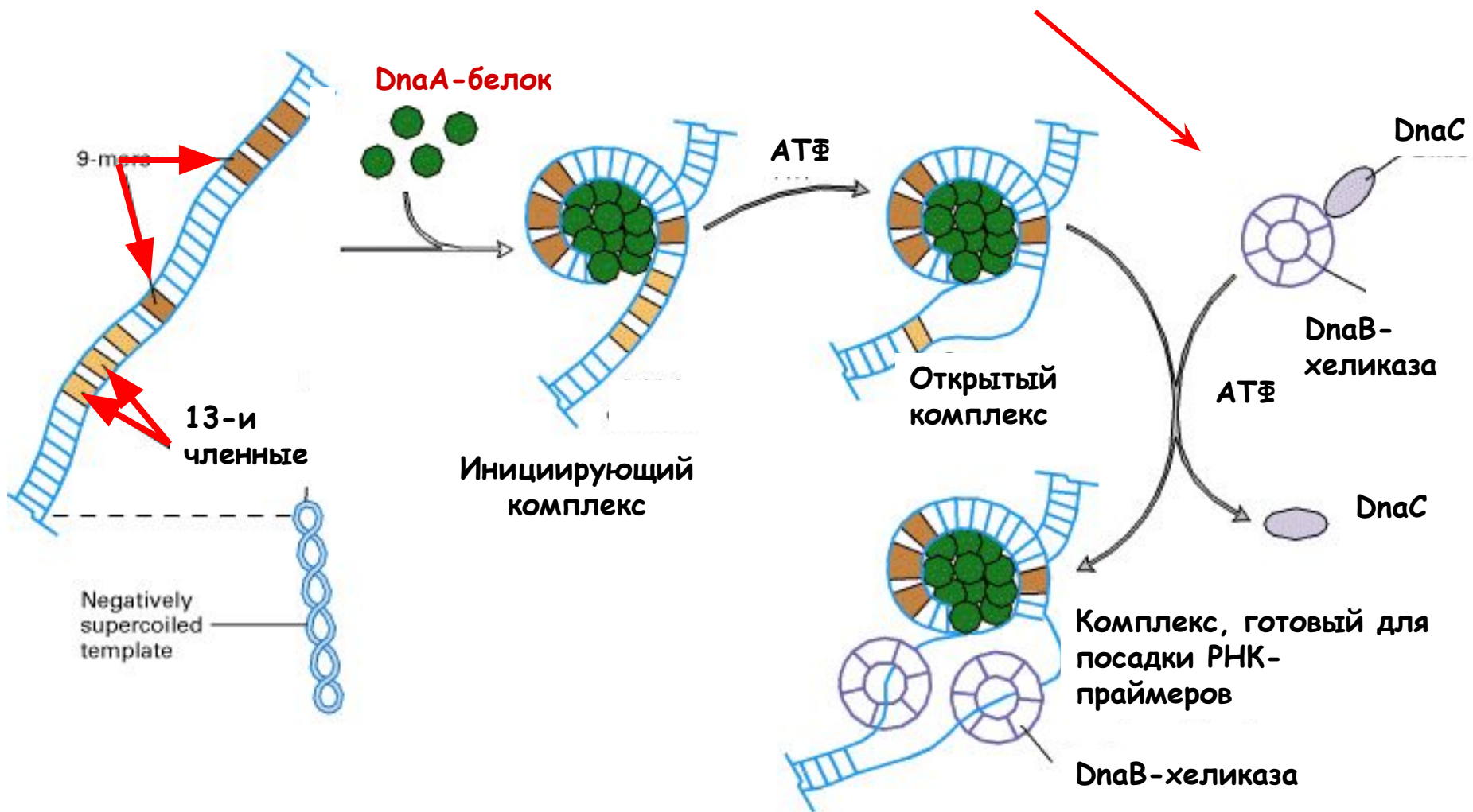
Хеликазы участвуют в инициации репликации

Хеликазы



Хеликазы разделяют ДНК в двух направлениях в районе двух вилок



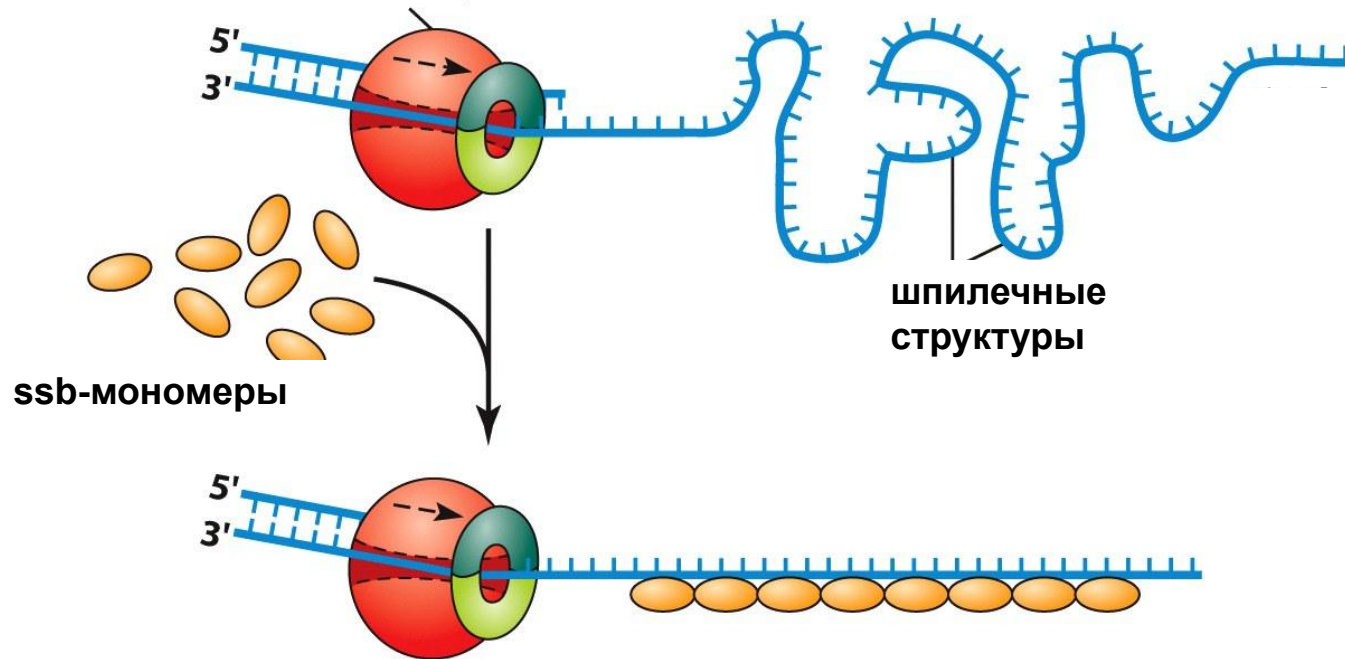


ДнаА-белок

ssb-белки

Роль ssb-белков заключается в том, что они связываются с однонитчатой ДНК, выпрямляют ее и блокируют образование шпилечных двухнитчатых структур

ДНК-полимераза

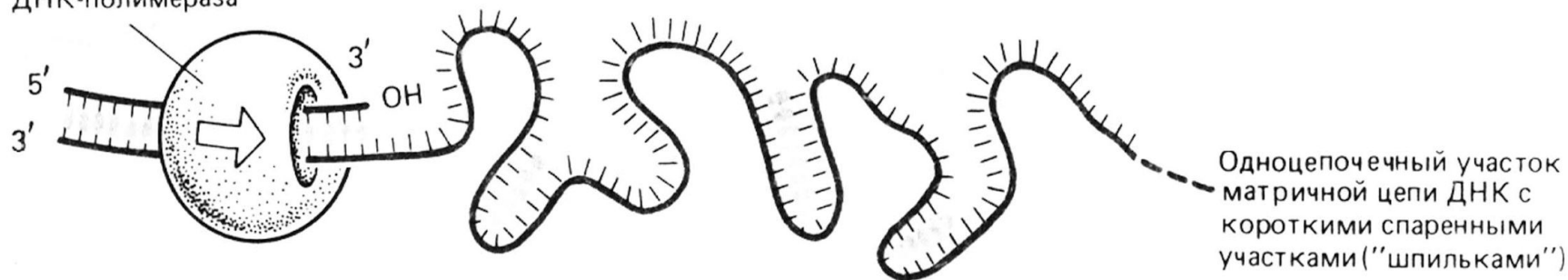


температуру плавления ДНК *in vitro* на 20-40°C. Эти белки связываются с ДНК электростатически.

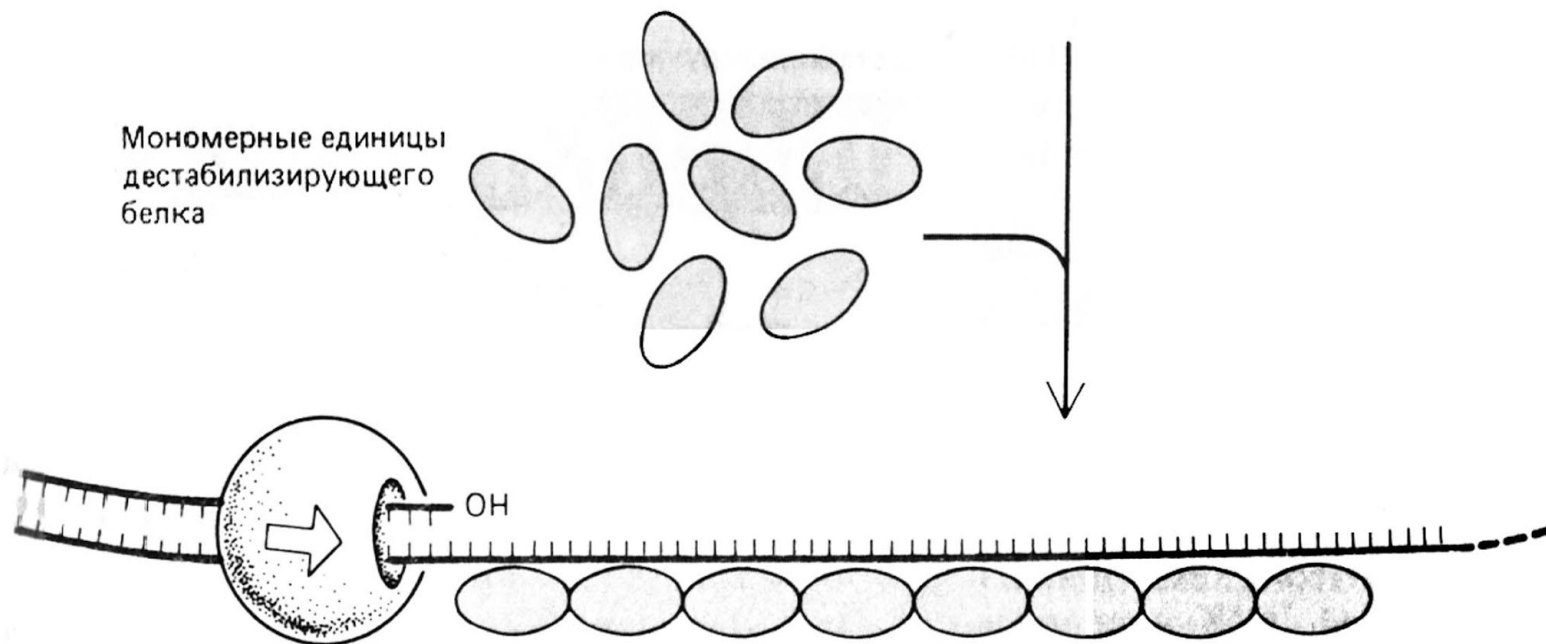
У SSB-белков повышенное сродство к одноцепочечной ДНК. SSB-белки, не закрывая азотистых оснований, связываются с одноцепочечной ДНК по всей длине разделившихся цепей и таким образом предотвращают их комплементарное скручивание и образование "шпилек". Белки не связываются с двуцепочечной ДНК, не имеющей расплавленных участков. При этом также проявляется сродство SSB-белков друг к другу. Они покрывают ДНК сплошным слоем (стехиометрическое количество белка).

Участие SSB в репликации абсолютно необходимо. Они удерживают матричные цепи ДНК в репликативной вилке в одноцепочечном состоянии, а также защищают одноцепочечную ДНК от действия нуклеаз.

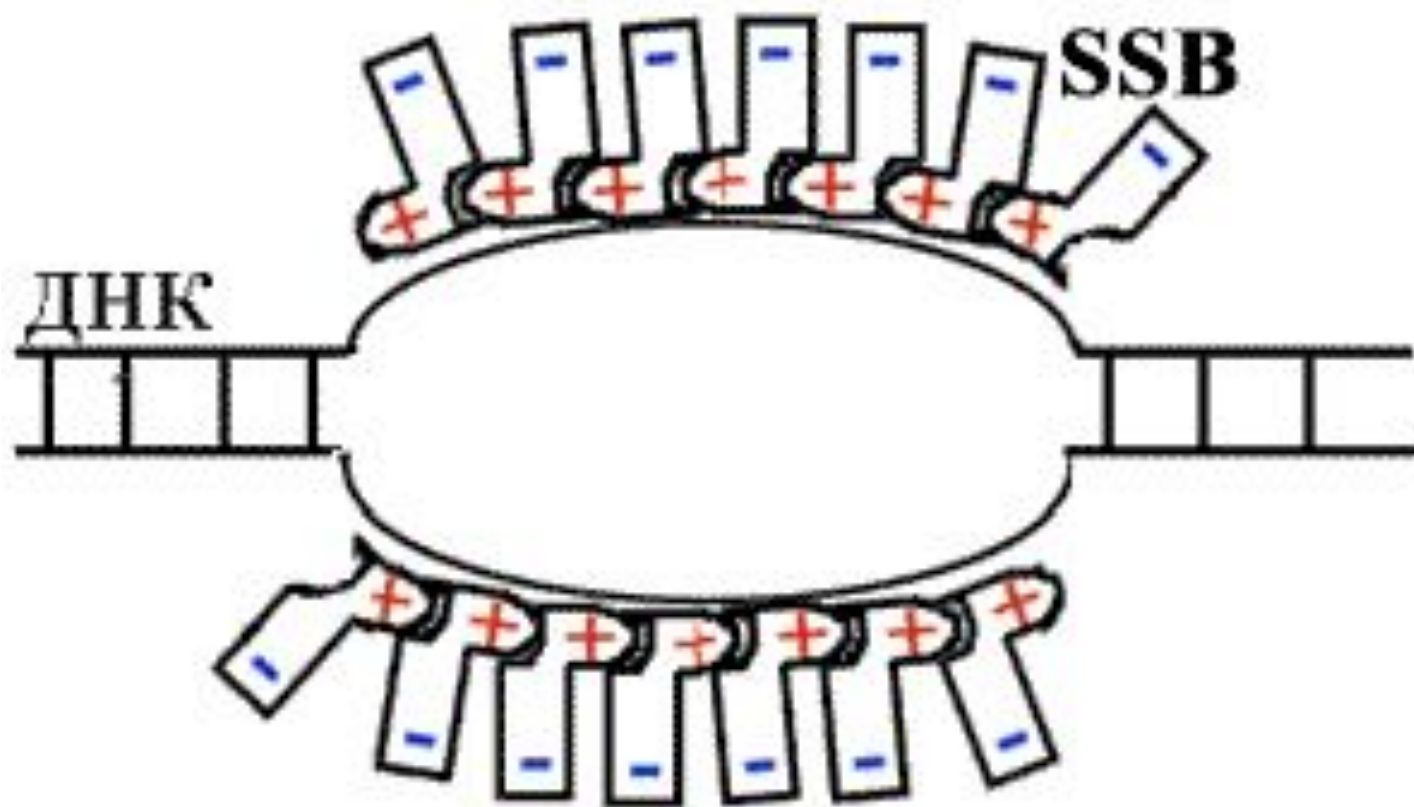
ДНК-полимераза



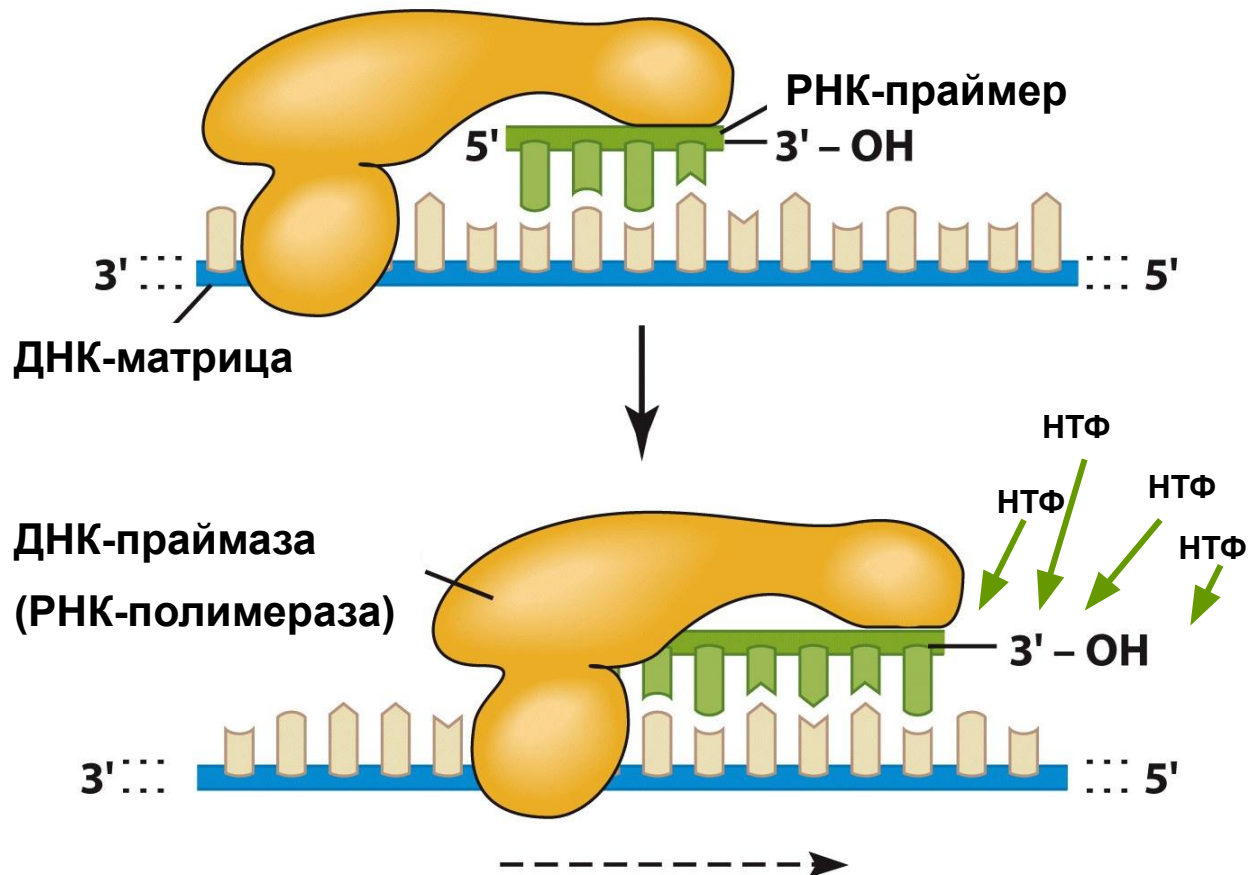
Мономерные единицы дестабилизирующего белка



Кооперативное связывание белковых молекул выпрямляет данный участок цепи ДНК



**Для инициации репликации необходима
ДНК-праймаза (РНК-полимераза)**

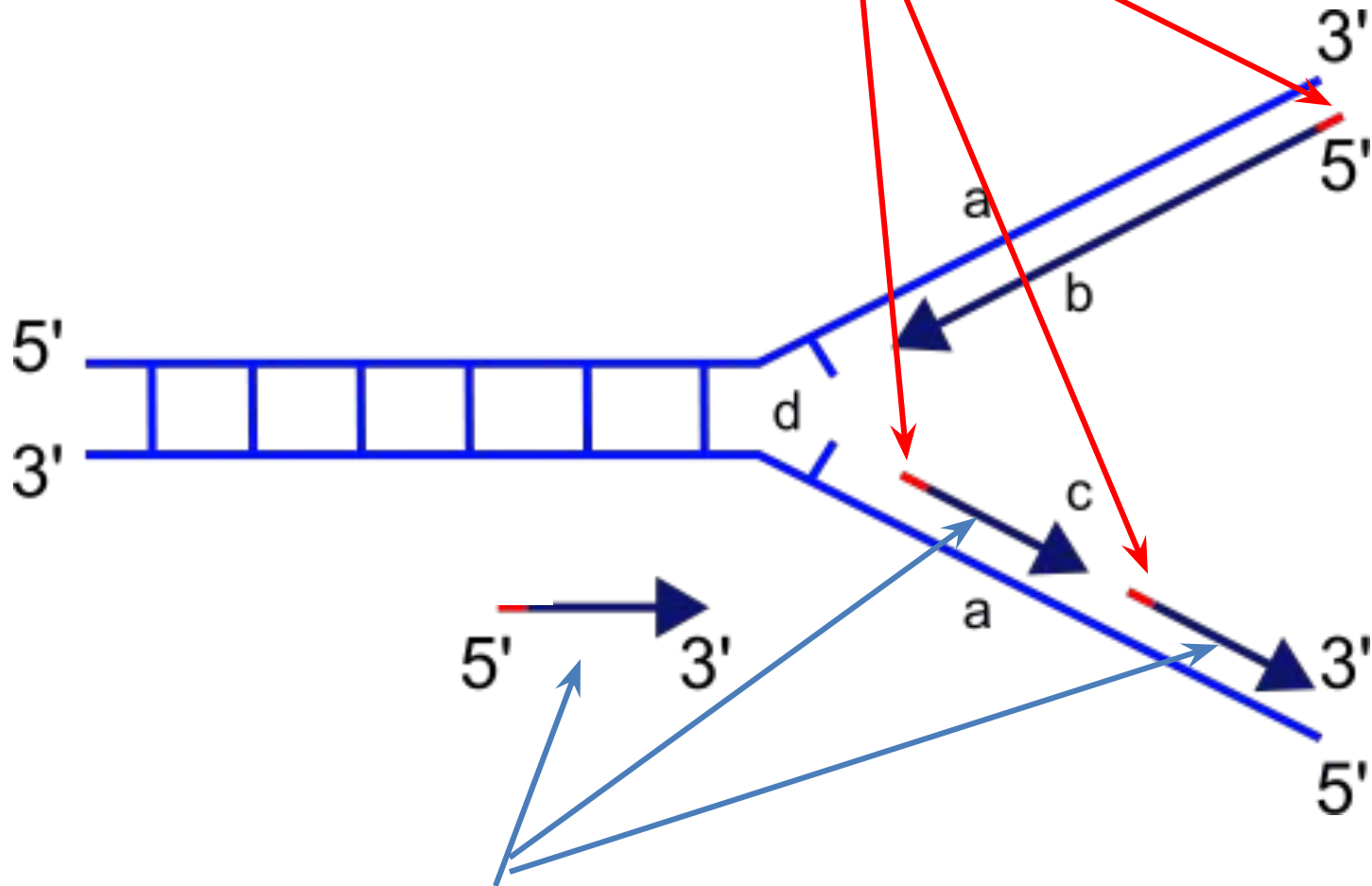


ДНК-праймаза (РНК-полимераза) –DnaG-белок

- **Праймаза** – фермент, синтезирующий РНК-праймеры для запуска синтеза ведущей цепи ДНК и запуска синтеза фрагментов Оказаки на запаздывающей цепи ДНК.
- **Праймаза** активируется ДНК-хеликазой и находится с ней в комплексе, который называется **праймасомой**. Без РНК-праймеров синтез ДНК начаться не может.

РНК- праймеры

Размер праймеров 10-12 нуклеотидов



Фрагмент Оказаки