

# ***РЕПЛИКАЦИЯ ДНК***

Каредина Валентина Семеновна  
д.м.н., профессор

# ***ПРИНЦИПЫ РЕПЛИКАЦИИ ДНК***

- 1. Комплементарность**
- 2. Антипараллельность**
- 3. Полуконсервативность**

## *Репликация ДНК – процесс образования идентичных копий ДНК, осуществляемый комплексом ферментов и структурных белков*

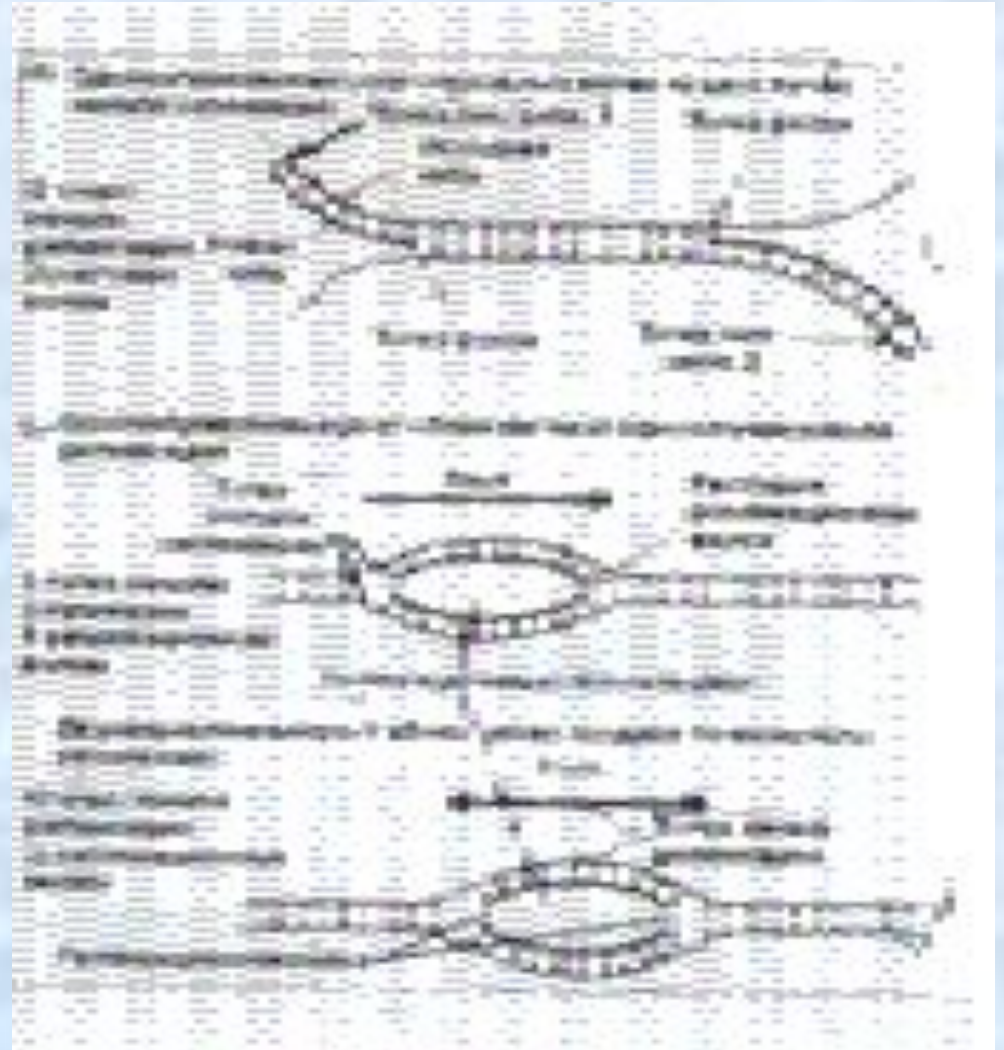
Репликация ДНК лежит в основе:

- воспроизведения генетической информации при размножении живых организмов
- передачи наследственных свойств из поколения в поколение
- развития многоклеточного организма из зиготы.

**Общие принципы репликации ДНК применимы, с небольшими модификациями, ко всем организмам**

## *Три механизма роста дочерней нити ДНК, согласующиеся с полуконсервативной репликацией*

- a) **однонаправленный  
рост обеих нитей от  
двух точек начала  
репликации (ori)**
- b) **однонаправленный  
рост двух цепей от  
одной ori с  
формированием  
одной репликативной  
вилки**
- c) **Двунаправленный  
рост двух цепей от  
одной ori с  
формированием двух  
репликативных вилок**



# Принципы репликации ДНК

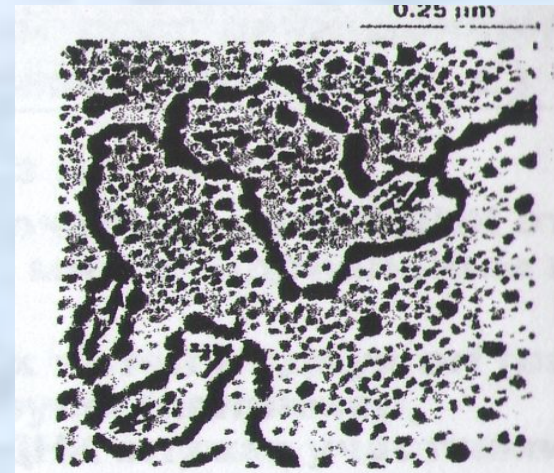
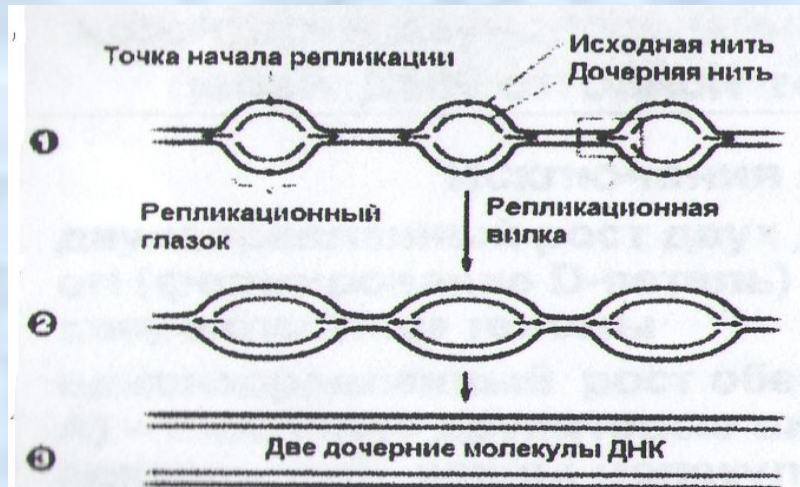
1. Комплементарность
2. Антипараллельность
3. Полуконсервативность
4. Двухнаправленный рост двух дочерних цепей ДНК от одной специфической точки начала репликации (вариант С)
  - правило распространяется на прокариот, эукариот, вирусы млекопитающих (например, SV 40)
  - имеются исключения из правил

## *Единица репликации - репликон*

*Репликон – молекула ДНК или ее участок, способные к автономной репликации*

- Репликон содержит регуляторные последовательности, которые обеспечивают регулируемое удвоение его ДНК; к ним относятся точки инициации (*ori*) и терминации репликации
- Последовательность событий в репликоне:  
Инициация репликации ➡ элонгация ➡ терминация репликации
- Репликон контролируется на стадии инициации репликации ( у эукариот – переход от фазы G1 к S-фазе)

# Каждая эукариотическая хромосома - полирепликон



**Множественная инициация обеспечивает большую скорость репликации у эукариот**

Средняя хромосома (единица сегрегации) –  $150 \times 10^5$  п.н.,  $V = 50$  п.н./сек. При одном репликоне на репликацию хромосомы потребовался бы месяц, а происходит она за 1 час

**Репликация ДНК в ядре культивируемых клеток китайского хомячка в S-фазе**  
Примерно 1 репликон со своим ориджаном на петлю хроматина

## *Пять принципов репликации ДНК*

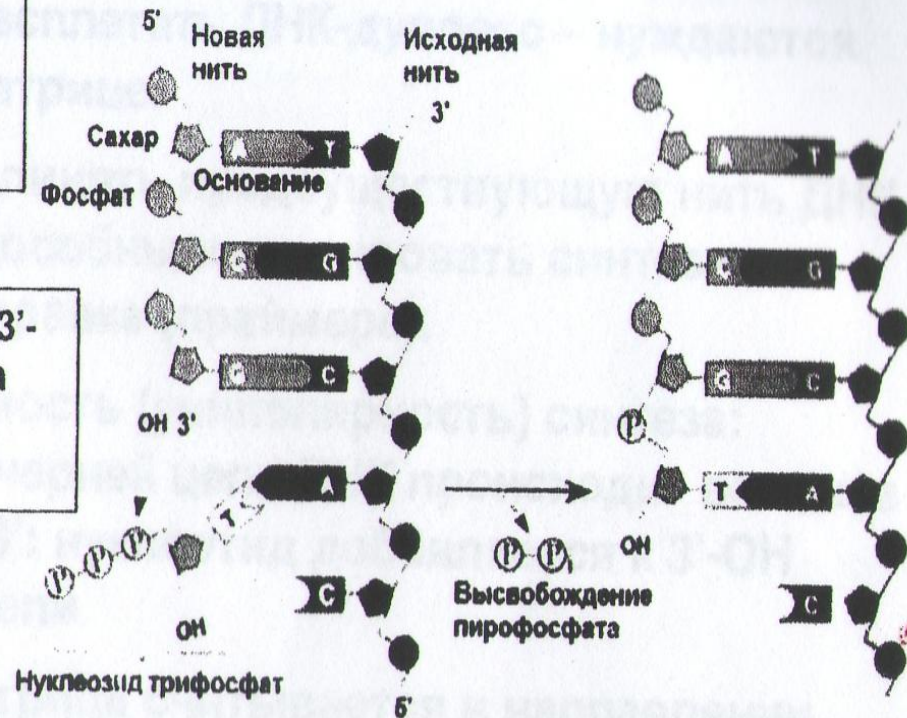
1. **Комплементарность**
2. **Антипараллельность**
3. **Плуконсервативность**
4. **Двунаправленность от одной специфической точки начала репликации (в большинстве случаев)**
5. **Согласованность репликации и клеточного давления**

***Репликацию ДНК осуществляют ферменты ДНК-полимеразы***

**Положение каждого последующего нуклеотида в дочерней цепи ДНК однозначно определяется положением соответствующего нуклеотида матрицы**

Синтез новой цепи ДНК осуществляется ДНК-полимеразой в направлении 5' → 3'

Нуклеофильная атака 3'-ОН группы затравки на альфа-фосфат очередного dNTP



PP<sub>i</sub> немедленно расщепляется неорганической пирофосфатазой до 2 молекул P<sub>i</sub>, что делает реакцию необратимой



## *Общие свойства ДНК-полимера*

- Не способны расплетать ДНК-дуплекс – нуждаются в однонитевой матрице.
- Могут только удлинять предсуществующую нить ДНК или РНК, но не способны инициировать синтез – потребность в затравке (праймере).
- Однонаправленность (униполярность) синтеза: синтез каждой дочерней цепи ДНК происходит всегда в направлении  $5' \rightarrow 3'$ : нуклеотид добавляется к 3'-ОН концу растущей цепи.
- Однонитевая матрица считывается в направлении  $3' \rightarrow 5'$ .

## ***Проблема репликации теломер – концов эукариотических хромосом***

- Репликация конца запаздывающей цепи не может пройти полностью: после удаления РНК-затравки ни одна ДНК-полимераза не сможет восстановить ее 5'-конец. В хромосоме остаются выступающие 3'-концы.
- В каждом цикле деления теломеры клетки утрачивается. Этот феномен носит название концевой недорепликации и является одним из важнейших факторов биологического старения.
- Теломеры имеют особое строение: они содержат простые некодирующие G-богатые повторяющиеся последовательности из 6-8 п.о. с выступающими 3'-концом, способные сворачиваться с образованием петли (T-loop).

# *Теломеры и теломераза*

- **Функция теломер:**
  - Защита от слияния концов линейных ДНК
  - Защита концов от деградации нуклеазами
    - Создание структурной основы для восстановления недореплицированных концов
- Восстановление концов линейных ДНК происходит благодаря функционированию специального фермента – теломеразы. Теломераза репрессирована в соматических клетках и активна в клетках зародышевой линии, в стволовых и в раковых клетках.
- Теломераза – РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза), помимо белковых субъединиц содержит специальную РНК, выполняющую роль матрицы для наращивания ДНУ комлементарными повторами.
- Длина теломеразной ДНК колеблется от 150 нуклеотидов у простейших до 1400 нуклеотидов у дрожжей; у человека 450 нуклертидов.

*1991 г. – экспериментально показано укорочение теломер*

*1997 г. – генно-инженерным путем получена активная теломераза, удлиняющая теломеры – «фермент бессмертия».*

*2009 г. – Нобелевская премия «за открытие того, как теломеры и фермент теломеразы защищают хромосомы» Элизабет Блэкберн, Кэрол Грейдер и Джек Шостак (США).*

## *Длина теломерной ДНК как счетчик времени*

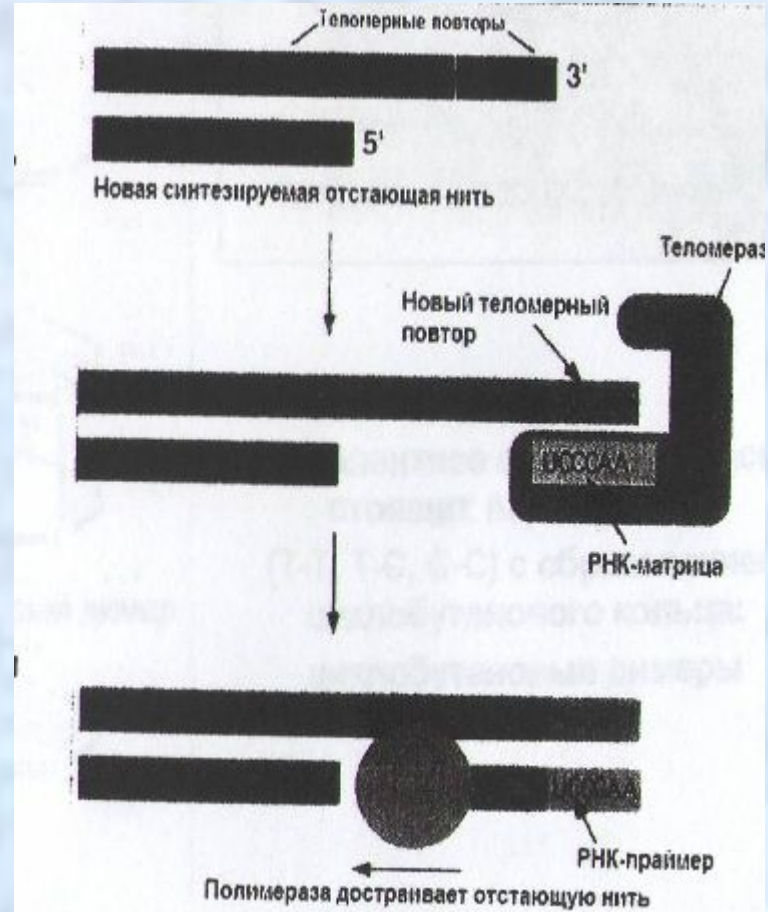
- 1966 г. – гипотеза А. Оловникова (2-ой мед): Постепенное укорочение ДНК хромосом с каждым раундом репликации может лежать в основе ограниченного потенциала удвоения нормальных соматических клеток («лимита Хайфлика»). Длина теломерной ДНК – счетчик времени, определяющий старение клетки.
- Укорочение ДНК в ходе каждого раунда репликации (концевая недорепликация) в пределах «лимита Хайфлика» сокращает длину простых повторяющихся последовательностей теломеры, но не приводит к утрате смысловых последовательностей – генов и регуляторов их экспрессии. Сокращение длины теломер в ходе пролиферации соматических клеток до критического значения приводит к аресту деления.
- Должен существовать фермент для наращивания теломер.
- 1971 г. – публикация Оловникова в ДАН и Дж. Уотсона в Nature (что ДНК бактериофага должна укорачиваться при каждом делении клетки за счет некопируемых концевых участков).

## Репликация теломер в гаметогенезе

Укороченная  
запаздывающая цепь

Удлинение ведущей  
цепи ДНК по матрице  
теломеразной РНК

На новом теломерном  
повторе синтезируется  
РНК-затравка для  
запаздывающей нити



# ***Повреждающиеся изменения в ДНК***

## ***Точковые мутации***

<b>Тип повреждения</b>	<b>Последствия</b>
<b>Нарушается правильное спаривание оснований</b>	<b>Влияние на будущие поколения</b>

## ***Структурные нарушения***

<b>Тип повреждения</b>	<b>Последствия</b>
<b>Введение одноцепочных разрывов</b>	<b>Нарушение матричных свойств ДНК</b>
<b>Удаление основания или размыкание пуринового кольца</b>	<b>«---»</b>
<b>Введение ковалентных связей между основаниями одной цепи</b>	<b>Остановка полимеразы, брешь</b>
<b>Введение ковалентных связей между основаниями на антипараллельных цепях</b>	<b>Невозможность разделения цепей, остановка полимеразы</b>

## *Система репарации ДНК обеспечивают исправление 999 повреждений из 1000*

**Заболевания, обусловленные дефектами системы репарации:**

- **Пигментация ксеродерма (пятна, короста, рак кожи) – нарушение репарации УФ – повреждений.**
- **Синдром Блума (глубокие поражения капилляров на лице – мутация ДНК-лигазы.**
- **Злокачественные перерождения – нарушение репарации неспаренных нуклеотидов.**

**Пигментная ксеродерма**



**Синдром Блума**



# *Репарация поврежденных одной цепи ДНК*

- Прямая реактивация повреждений
- Эксцизионная репарация (excision – отсекание, вырезание):
  - Вырезание основания (base excision repair) BER
  - Вырезание нуклеотидов (nucleotide excision repair) NER ( в случае повреждений, заметно нарушающих вторичную структуру).
- при увеличении количества повреждений в ДНК блокируется делений клеток и происходит индукция дополнительных репаративных ресурсов клетки.
- Индуцируемая репарация с исправлением ошибок:
  - Например, индукция SOS-системы при УФ-облучении
- Индуцируемая репарация с мутагенным эффектом.
  - Именно она определяет мутагенный эффект УФ-облучения и химического мутагена: мутагенез – активный процесс.

## **Общие принципы репарации:**

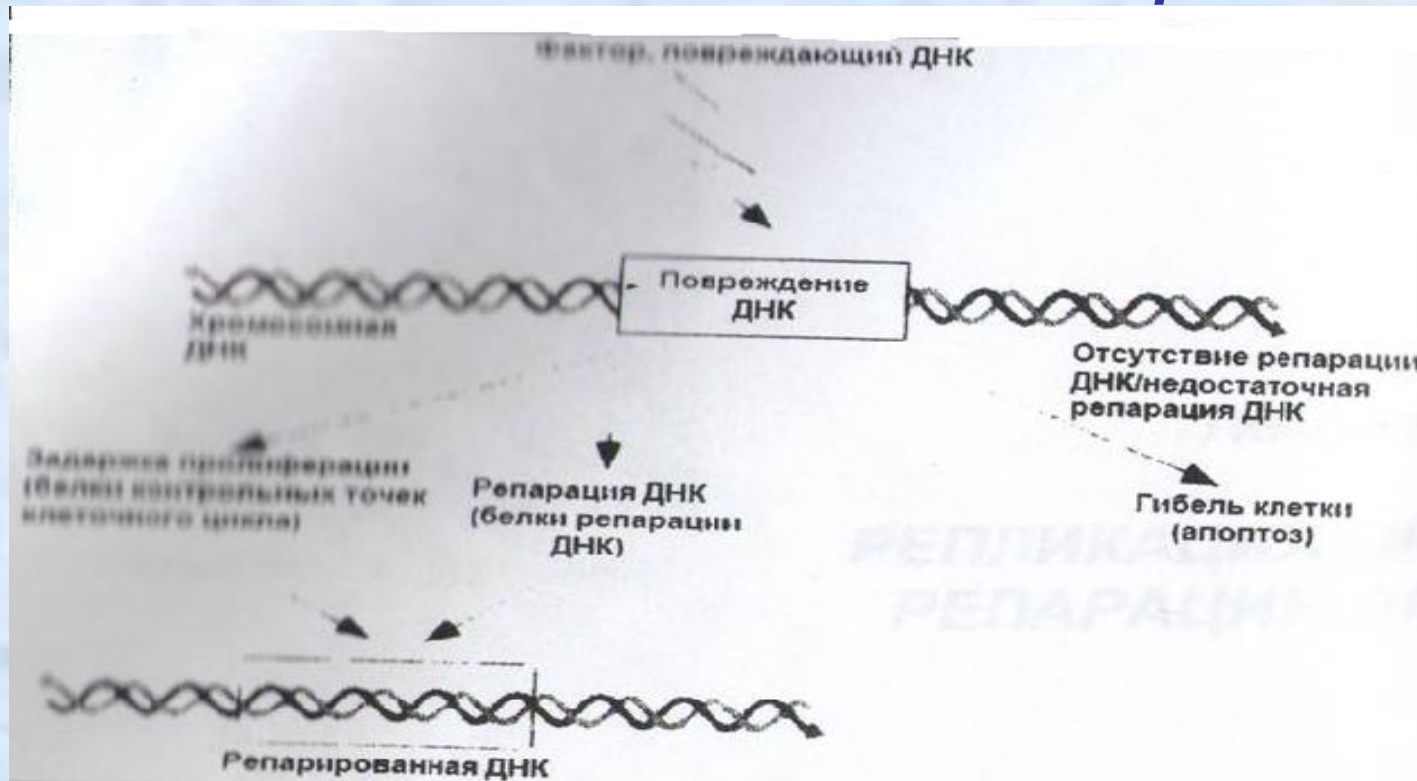
- чем серьезнее повреждение, тем большее количество ресурсов клетки привлекается на исправление ошибки;
- принцип «меньшего из зол»: репарация ценой жертв, например с мутагенным эффектом



## Повреждения двух цепей ДНК

- Одноцепочные разрывы могут стать двухцепочечным во время репликации хромосом;
- Двухцепочечные разрывы могут вызваться гамма-облучением;
- Действие некоторых противоопухолевых препаратов, таких как блеомицин, основано на внесении двухцепочечных разрывов, чтобы убивать быстро растущие клетки.

## Способы клеточного ответа на повреждение ДНК



***ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД***

***БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВ  
(ТРАНСЛЯЦИЯ)***

# Биосинтез белков

## □ Наиболее сложный из генетических процессов

У эукариот участвует > 300 макромолекул:

- >40 видов тРНК и рРНК;
- >70 различных рибосомных белков;
- >20 ферментов, активирующих аминокислоты;
- >12 белковых факторов инициации, элонгации и терминации;
- >100 ферментов процессинга белков;

У прокариот приблизительно столько же компонентов (до 35% сухого веса клетки *E.coli*).

## □ Наиболее энергоемкий процесс

Потребляет 90% энергии всех биосинтетических реакций

## □ Протекает с высокой скоростью

При 37°C из ста аминокислотных остатков синтезируется в *E.coli* за 5 сек.

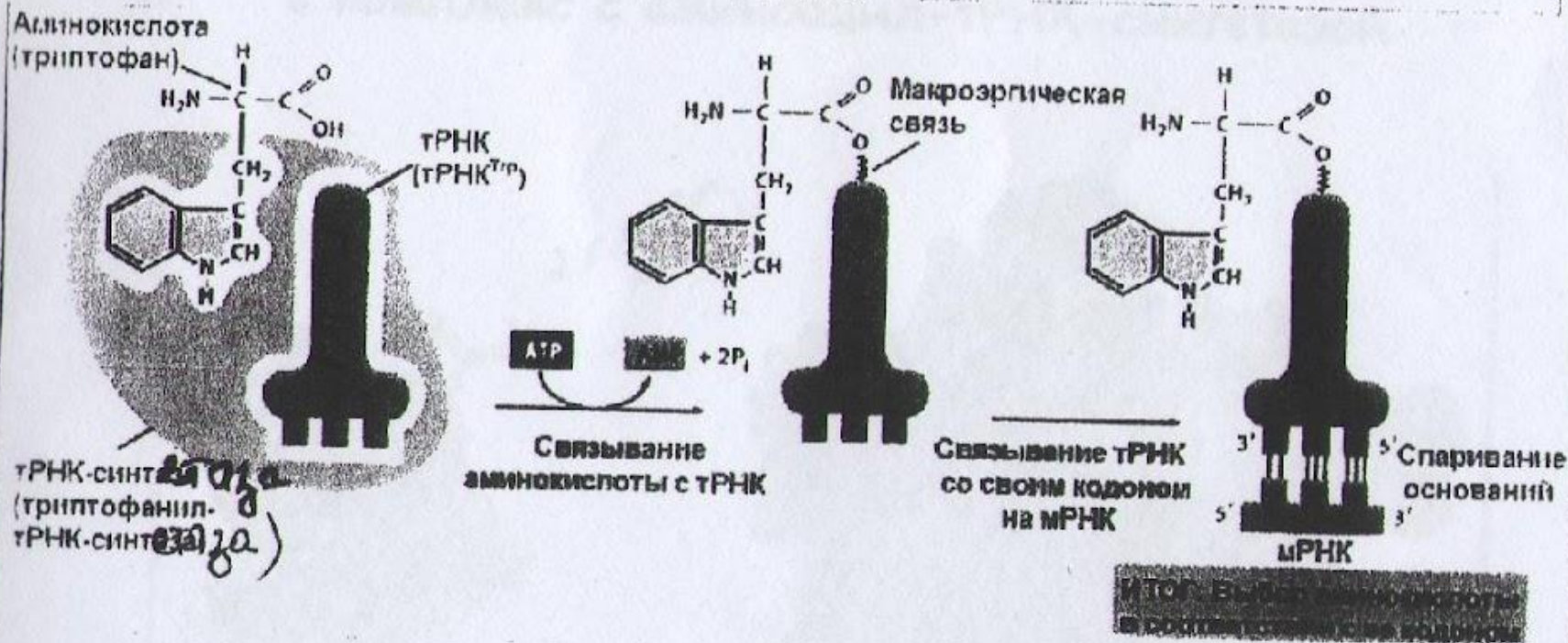
# Генетический код

Генетический код – это способ записи генетической информации о структуре белков (полипептидов) посредством последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах (ДНК или РНК)

Генетический код диктует состав и последовательность аминокислот в белке.

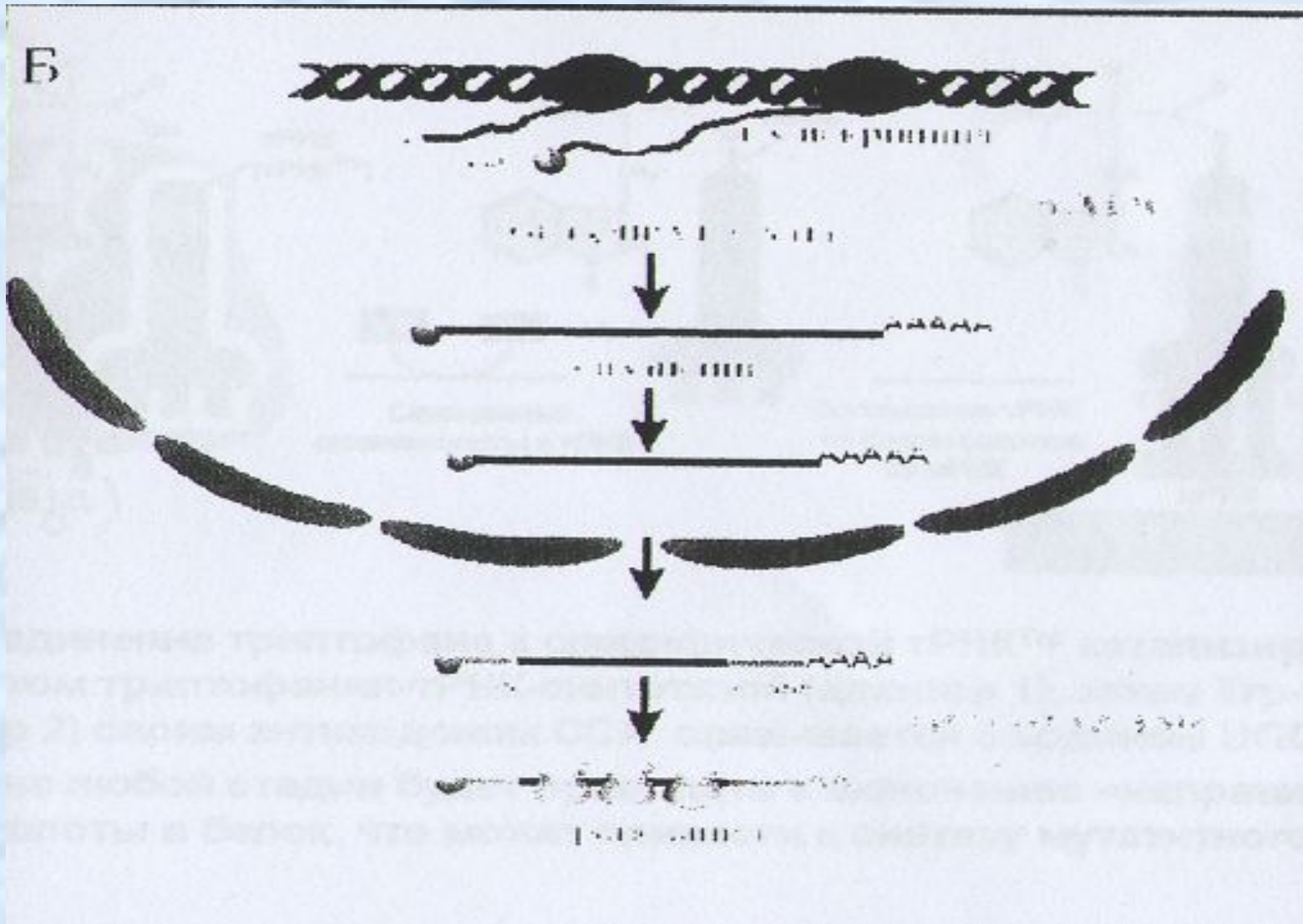
- состоит из 64 триплетных кодонов, включающих А, G, С и U:  $4^3 = 64$  Дуплетов для 20 АК недостаточно:  $4^2 = 16$
- все кодоны используются в белковом синтезе: 61 кодон кодирует 20 аминокислот; 3 кодона являются терминирующими (стоп-, или нонсенс-кодонами): UAA, UAG, UGA
- считывание начинается с определенной точки, но нет специальных инициаторных кодонов
- между последовательностью нуклеотидов и кодируемой последовательностью аминокислот существует линейное соответствие (колинearность)
- считывание идет в одном направлении в пределах одного гена
- вырожденный: для одной АК существует несколько кодонов-синонимов  
*Вырожденность генетического кода уменьшает вероятность того, что мутационная замена основания в триплете приведет к ошибке*
- неперекрывающийся (3 потенциальных рамки считывания)
- без запятых (без незначащих остатков)
- специфичный

# Генетический код транслируется при участии двух адапторов: тРНК и аминокацил-тРНК-синтетаз



Присоединение триптофана к специфической тРНК<sup>Trp</sup> катализируется ферментом триптофанил-тРНК-синтетазой (адаптор 1), затем Trp-тРНК<sup>Trp</sup> (адаптор 2) своим антикодоном ССА связывается с кодоном UGG мРНК. Ошибка на любой стадии будет приводить к включению «неправильной» аминокислоты в белок, что может привести к синтезу мутативного белка.

# Транскрипция и трансляция мРНК эукариот разобщены во времени и в пространстве



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ