

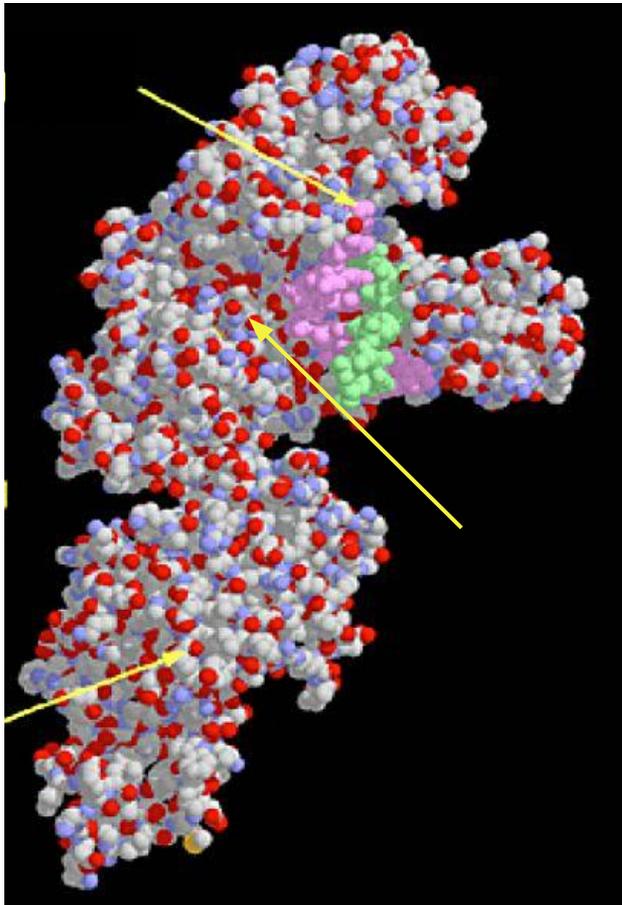
РЕПЛИКАЦИЯ. ПРОКАРИОТЫ

ДНК-полимеразы *E.coli*: pol I

А. Корнберг, 1956 г.

I. R. Lehman, Maurice J. Bessman, Ernest S. Simms, and Arthur Kornberg

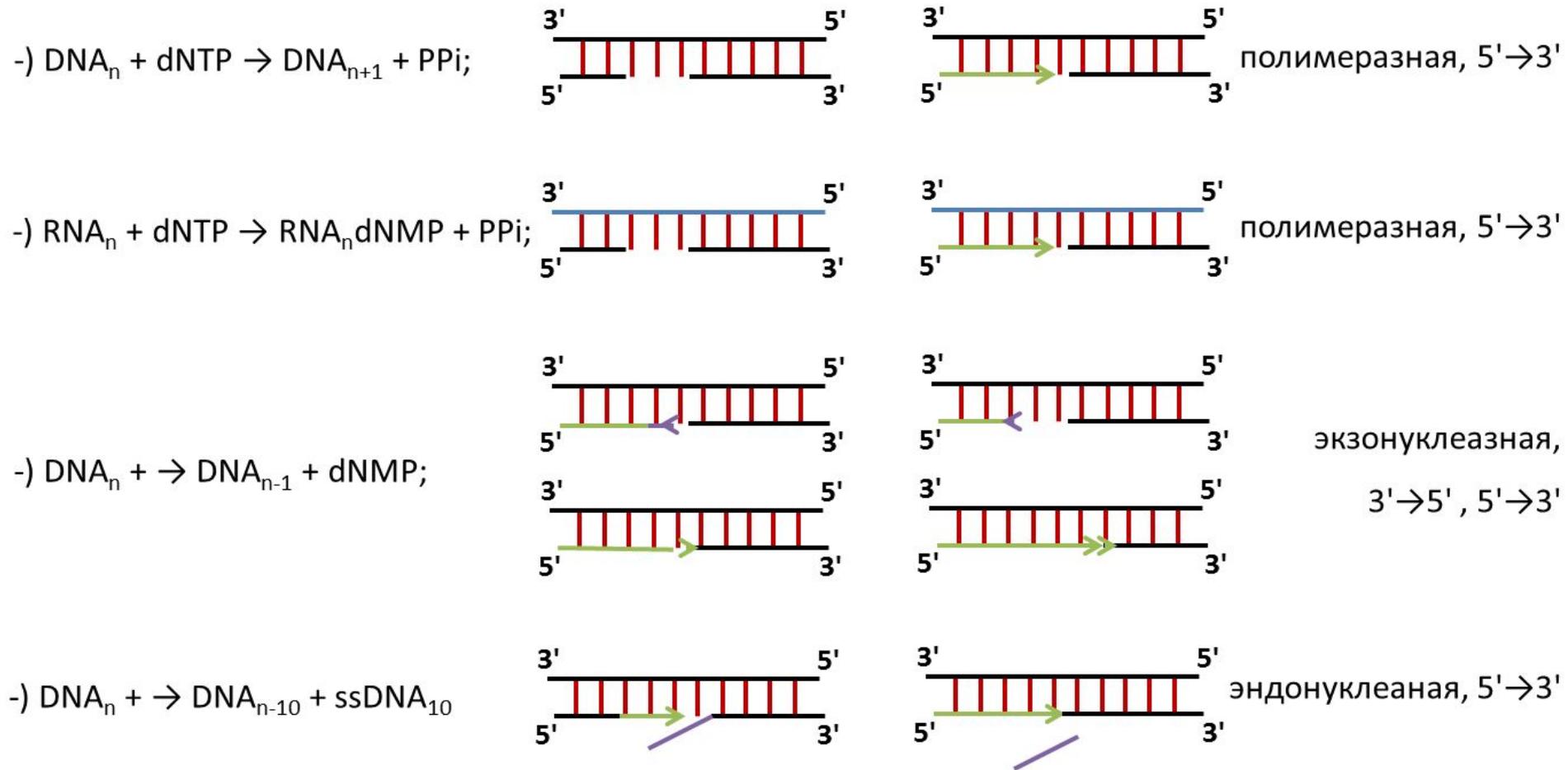
Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid: I. PREPARATION OF SUBSTRATES AND PARTIAL PURIFICATION OF AN ENZYME FROM ESCHERICHIA COLI // J. Biol. Chem. 1958 233: 163-170.



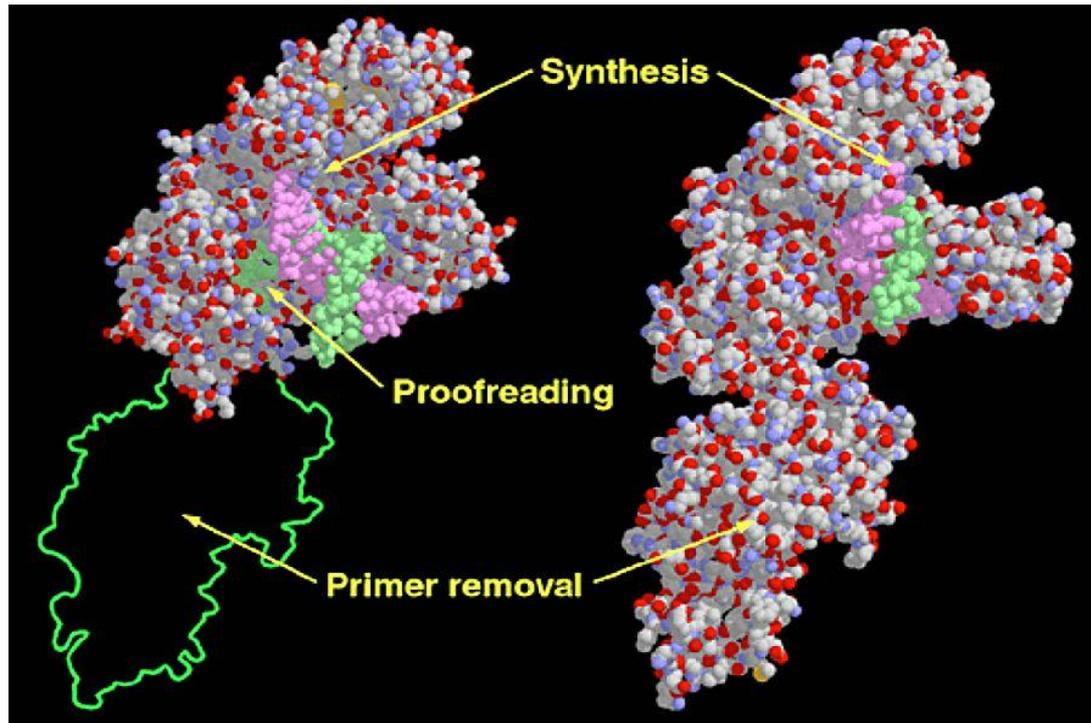
-) 928 аминокислот;
-) 103 кДа;
-) ген *polA*;
-) моносубъединичный процессивный фермент (25-50 нт);
-) семейство А;
-) 3 доменная структура (2 экзонуклеазный + 1 полимеразный);
-) точность синтеза 10^{-4} - 10^{-5} ;
-) скорость синтеза 10-20 нт/сек;
-) копияность ~ 400 мол/клетку.

ДНК-полимеразы *E.coli*: pol I

Каталитические активности pol I:



ДНК-полимеразы *E.coli*: pol I



1 – 323 (323 ак) - 5'-3'-экзонуклеаза

324 – 517 (194 ак) - 3'-5'-экзонуклеаза

521 – 928 (408 ак) – полимераза

324 – 928 (605 ак) – фрагмент Кленова

1970-1976 гг.

ДНК-полимеразы

1975 г., классификация

1990 г., новая номенклатура

2000 г., Burgers P.M., Koonin E.V., Bruford E., Blanco L., Burtis K.C., Christman M.F. Copeland W.C., Friedberg E.C., Hanaoka F., Hinkle D.C., Lawrence C.W., Nakanishi M., Ohmori H., Prakash L., Prakash S., Reynaud C.A., Sugino A., Todo T., Wang Z., Weill J.C., Woodgate R.
Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature
J Biol Chem. 2001. V. 276. P. 43487 43490

Функциональная специфичность, 5 классов: ДНК- и РНК-

Гомология и структурная специфичность, 6 семейств: **A, B, C, D, X, Y**

A семейство pol I: *E.Coli*, *Bacillus*, ДНК-полимераза *T.aquaticus*, T7 (РНК- и ДНК-), pol γ

B семейство pol α : репликативные ДНК-полимеразы эукариот, T4 и RB69

C: RT, теломераза, РНК-зависимые РНК-полимеразы, pol III

D: эвриархеоты

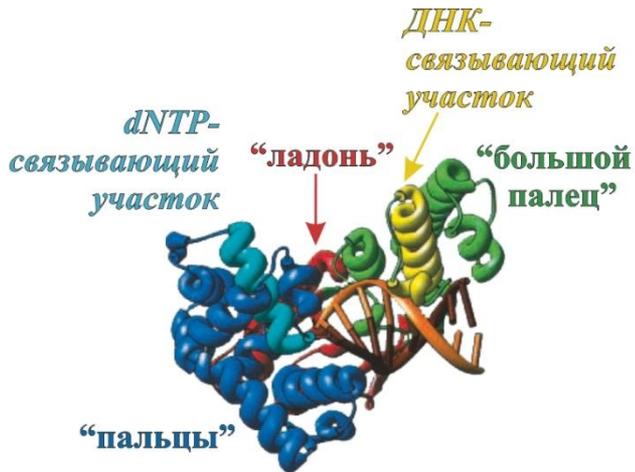
X: репаративные ДНК-полимеразы эукариот, TdT

Y: специализированные ДНК-полимеразы эукариот, вирусные и ретровирусные полимеразы, pol IV, pol V

3D-СТРУКТУРА ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

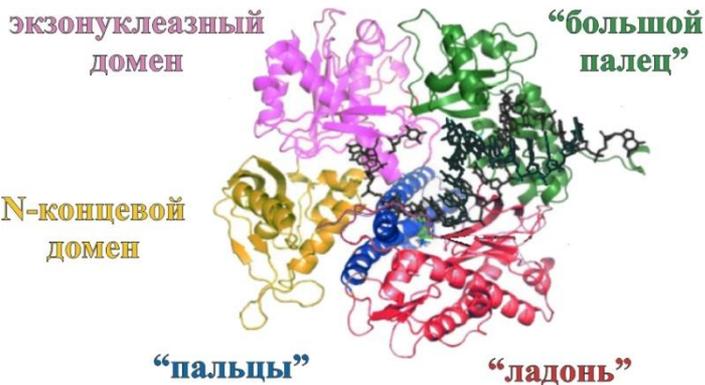
ДНК-полимераза Taq *T. Aquaticus*
(PDB-код 1TAQ)

A-семейство



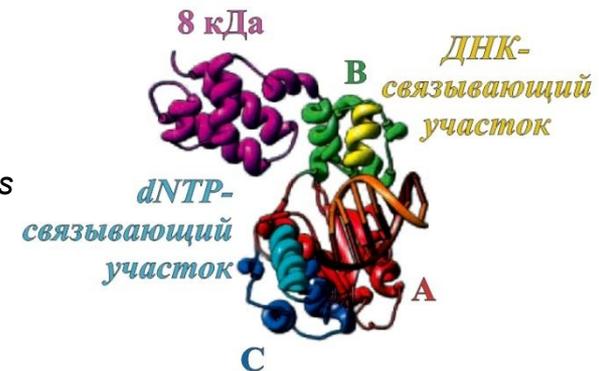
ДНК-полимераза HIV-1 RT, ВИЧ
(PDB-код 2HMI)

C-семейство



ДНК-полимераза Dpo4 *S. solfataricus*
(PDB-код 1JX4)

Y-семейство



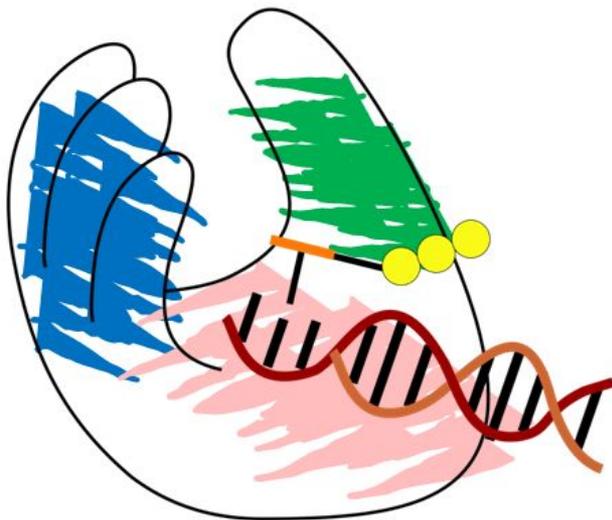
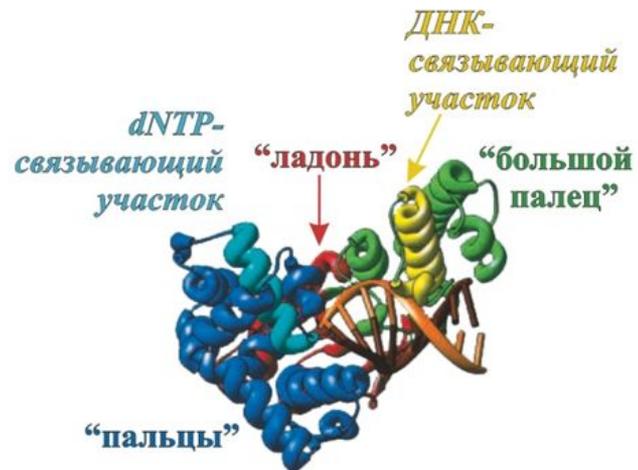
ДНК-полимераза β человека
(PDB-код 3QEP)

X-семейство

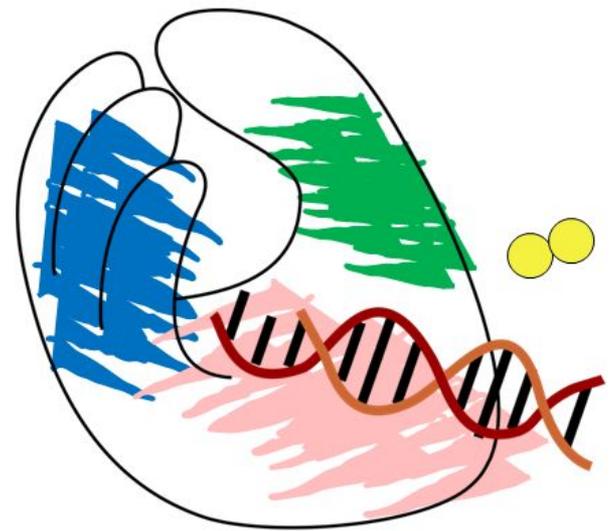
ДНК-полимераза фага RB69
(PDB-код 3QEP)

B-семейство

3D-СТРУКТУРА ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

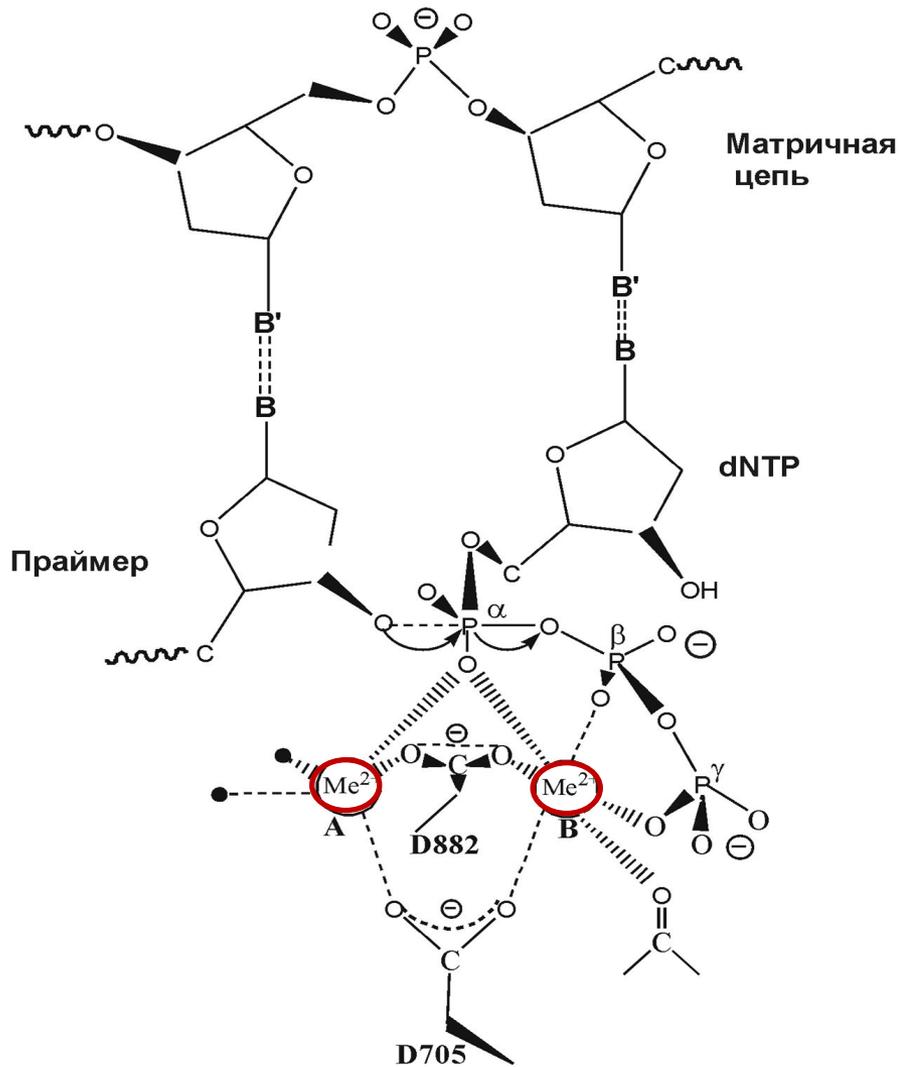


тройной открытый комплекс



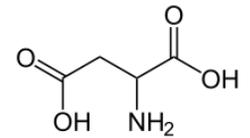
тройной закрытый комплекс

3D-СТРУКТУРА ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

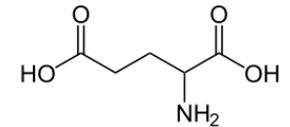


E. Coli
Klenow pol I

D, Asp, аспарагиновая кислота



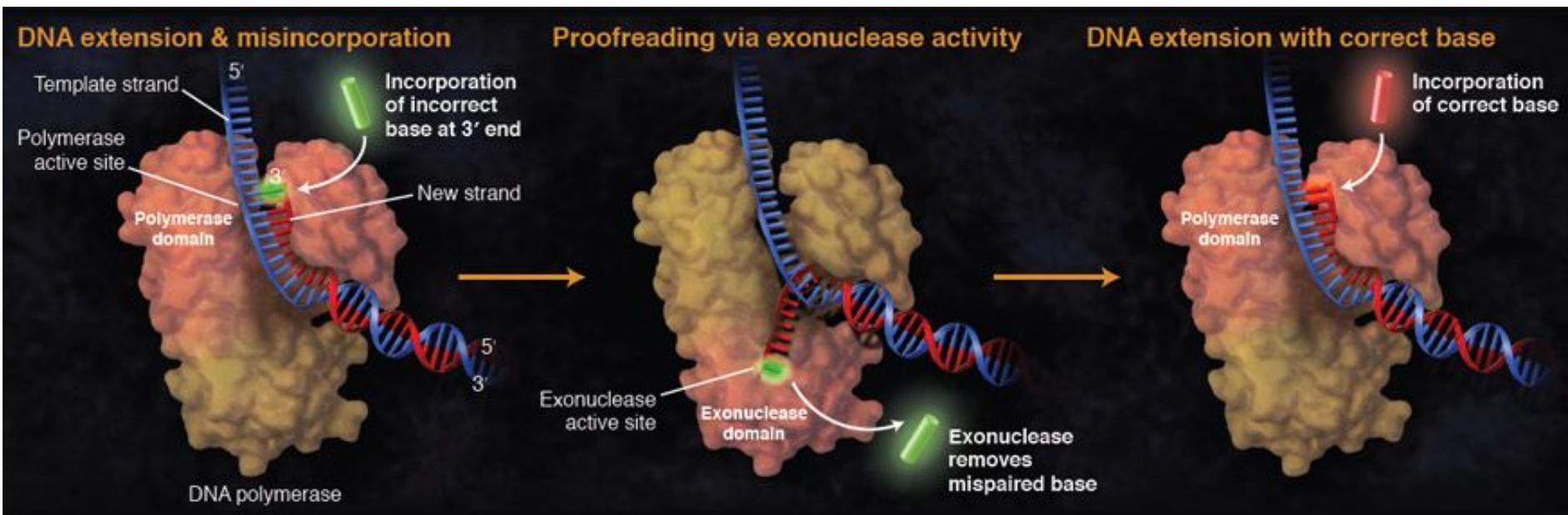
E, Glu, глутаминовая кислота



Steitz, T. A. (1998) Nature 391, 231-232 – D705, D882

Gangurde R et al. (2000) J Biol Chem 275, 19685-92 – D705, E710, D882 или D705, D882, E883

ДНК-полимеразы *E.coli*: pol I



pol I отвечает за застройку брешей:

после выщепления RNAase H РНК-праймеров или вследствие ник-трансляции

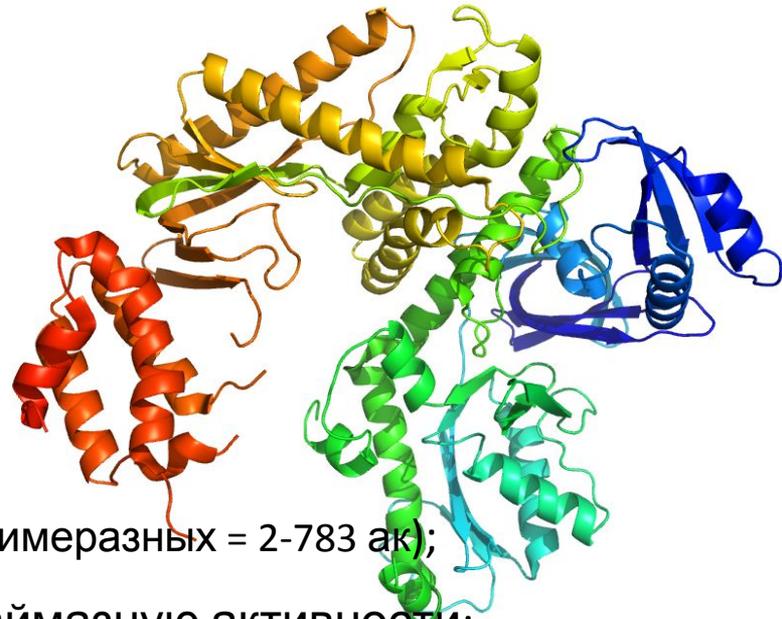
ДНК-полимеразы *E.coli*: pol II

Т. Корнберг (1948 г.), 1970 г.

Kornberg T, Gefter ML DNA synthesis in cell-free extracts of a DNA polymerase-defective mutant // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1970, 40(6): 1348–55;

Kornberg T, Gefter ML Purification and DNA synthesis in cell-free extracts: properties of DNA polymerase II // PNAS. 1971, 68(4): 761–4.

-) 783 аминокислоты;
-) 90 кДа;
-) ген *polB*, *dinA*;
-) моносубъединичный фермент;
-) семейство В;
-) 2 доменная структура (1 экзонуклеазный + 1 полимеразный = 2-783 ак);
-) имеет полимеразную, корректирующую и праймазную активности;
-) точность синтеза $2 \cdot 10^{-6}$, частота внесения делеций 10^{-6} ;
-) скорость синтеза 0,5-1 нт/сек;
-) копияность $\sim 30 - 50 \rightarrow 350-1000$ мол/клетку.



ДНК-полимеразы *E.coli*: pol III

Т. Корнберг (1948 г.), 1971 г.

Kornberg T, Gefter ML Purification and DNA synthesis in cell-free extracts: properties of DNA polymerase II // PNAS. 1971, 68(4): 761–4;

Gefter ML, Hirota Y, Kornberg T, Wechsler JA, Barnoux C. Analysis of DNA polymerases II and 3 in mutants of Escherichia coli thermosensitive for DNA synthesis // PNAS. 1971, 68(12):3150-3.

-) многосубъединичный фермент;
-) семейство C;
-) имеет полимеразную и корректирующую активности;
-) точность синтеза $\sim 10^{-8}$ (скорость накопления мутаций за 1 раунд репликации T4 , геном 168,903 bp , $\sim 1,7$ bp / 10^{-8} nt;
-) скорость синтеза 2-4 нт/сек;
-) копияность $\sim 5 - 10$ мол/клетку.

ДНК-полимеразы *E.coli*: pol III

Функционально представлена core- и holo-ферментами (реписома):

core + sliding clamp + clamp-loading complex = holo

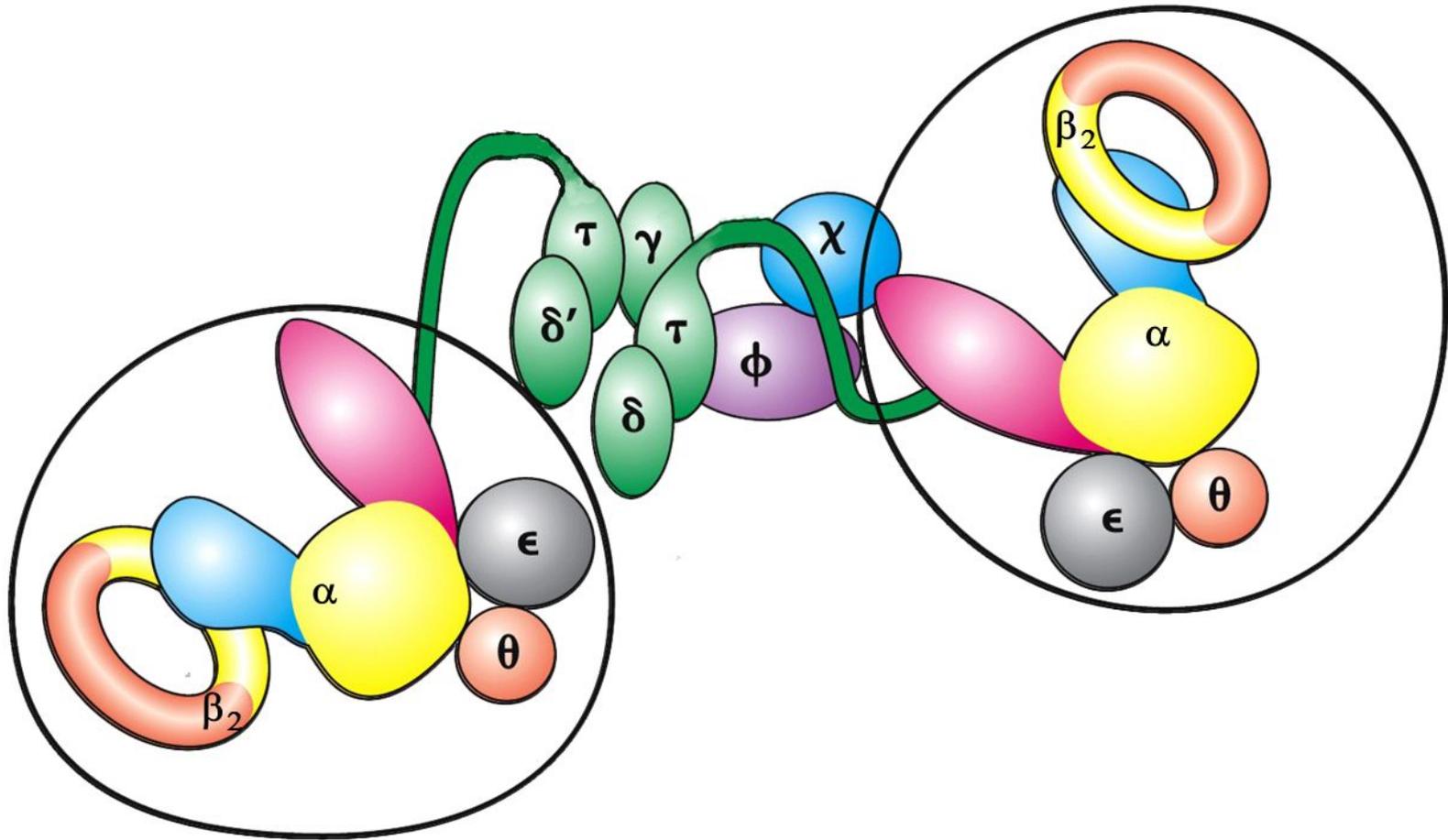


Figure 28.22

Biochemistry, Seventh Edition

© 2012 W. H. Freeman and Company

ДНК-полимеразы *E.coli*: pol III

компонент holo-фермента	субъединица	число субъединиц	масса, kDa	ген	функция
2 pol III core*	α	1*2	130	<i>dnaE</i>	ДНК-полимераза
	ϵ	1*2	28	<i>dnaQ</i>	3'→5'-экзонуклеаза
	θ	1*2	9	<i>holE</i>	в/д с ϵ
2 sliding clamp	β	2*2	41	<i>dnaN</i>	sliding clamp
1 γ -комплекс (clamp loader)	γ	1	48	<i>dnaX</i>	ATPase
	τ	2	71	<i>dnaX</i>	ATPase, в/д с pol III, pol IV
	δ	1	39	<i>holA</i>	в/д с clamp
	δ'	1	37	<i>holB</i>	в/д с δ
	χ	1	17	<i>holC</i>	в/д с SSB
	ψ	1	15	<i>holD</i>	в/д с χ и ψ
		17	796		

СХЕМА РЕПЛИКАЦИИ

Схема непрерывной антипараллельной репликации *in vivo* по Корнбергу

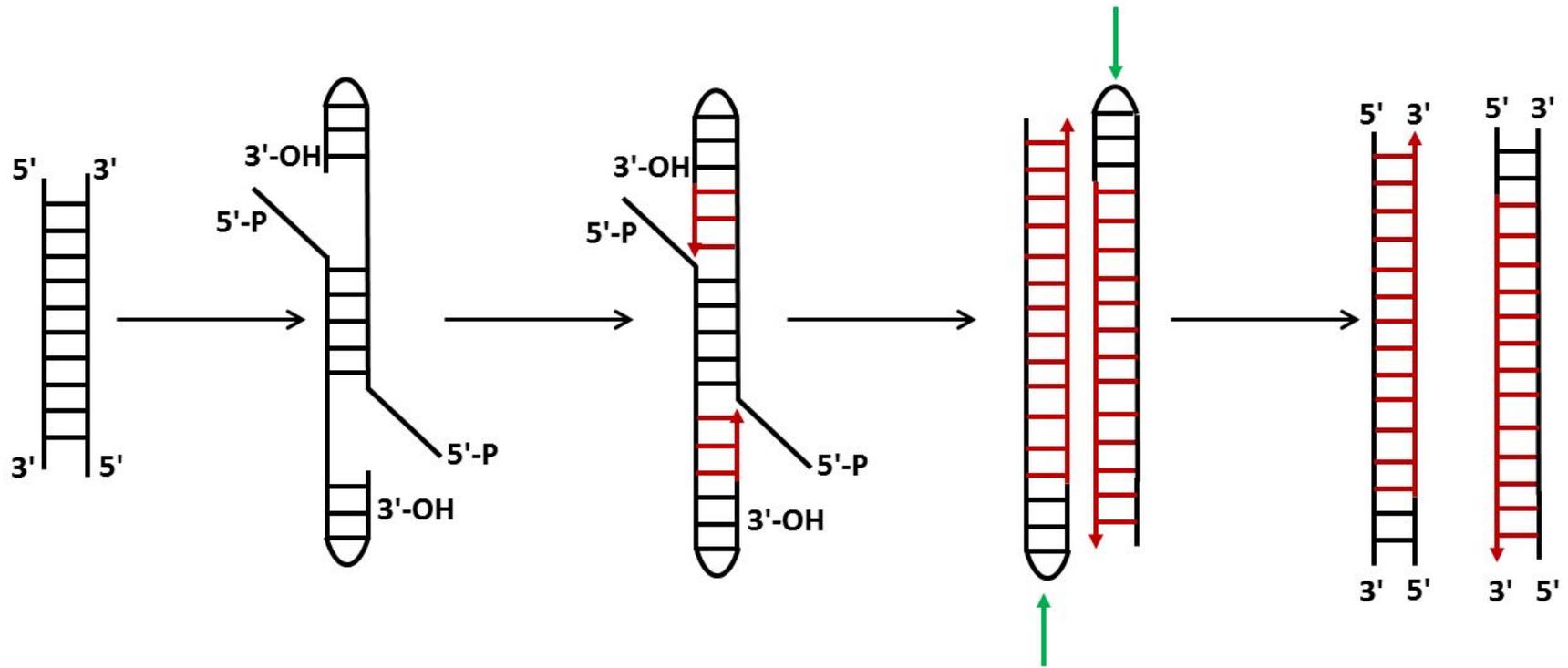


СХЕМА РЕПЛИКАЦИИ

Схема непрерывной параллельной репликации *in vivo* по Кэрнсу, 1963 г.



радиоавтогра
ф



интерпретаци
я



радиоавтогра
ф



интерпретаци
я

СХЕМА РЕПЛИКАЦИИ

Схема непрерывной параллельной репликации *in vivo* по Кэрнсу

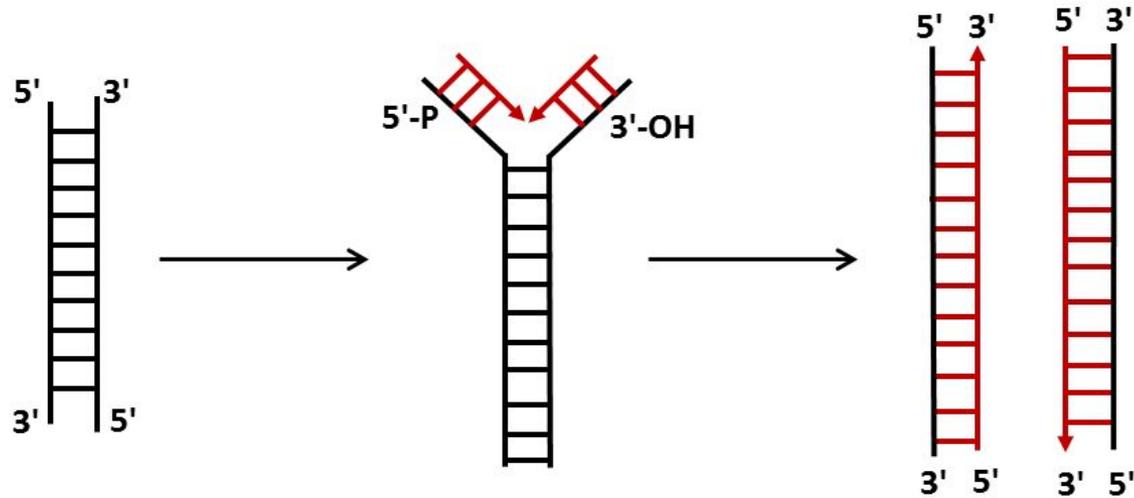


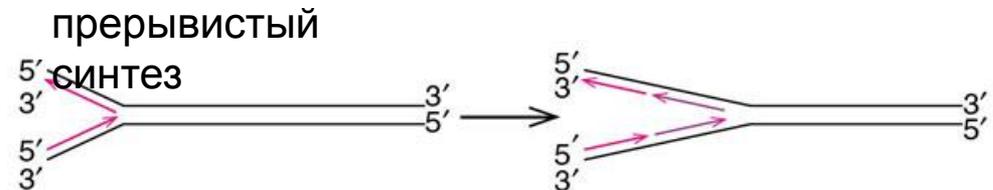
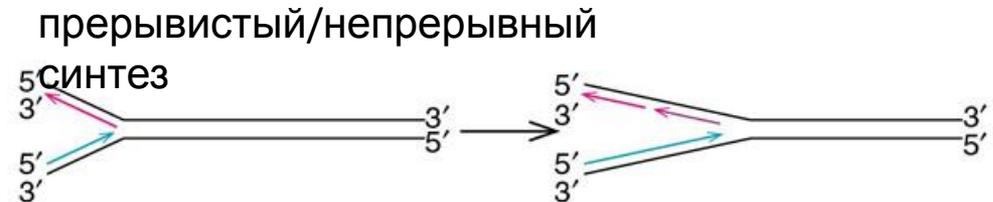
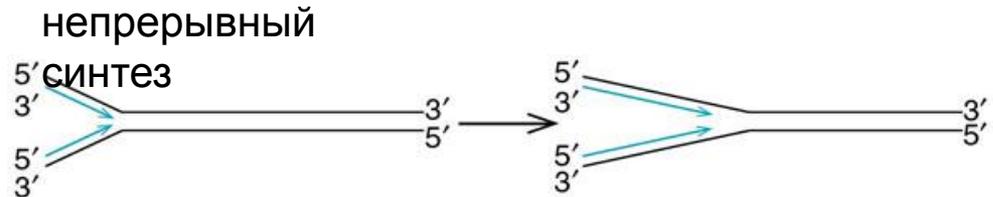
СХЕМА РЕПЛИКАЦИИ

Схема антипараллельной репликации *in vivo* по Оказаки

Рейджи Оказаки
1930-1975 гг.



Тцунэко Оказаки
1933г.



Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K, Sugimoto K, Sugino A. Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains // PNAS 1968, 59(2):598-605.

Sugimoto K, Okazaki T, Okazaki R. Mechanism of DNA chain growth, II. Accumulation of newly synthesized short chains in E. coli infected with ligase-defective T4 phages // PNAS 1968, 60(4):1356-62.

СХЕМА РЕПЛИКАЦИИ

Схема антипараллельной репликации *in vivo* по Оказки

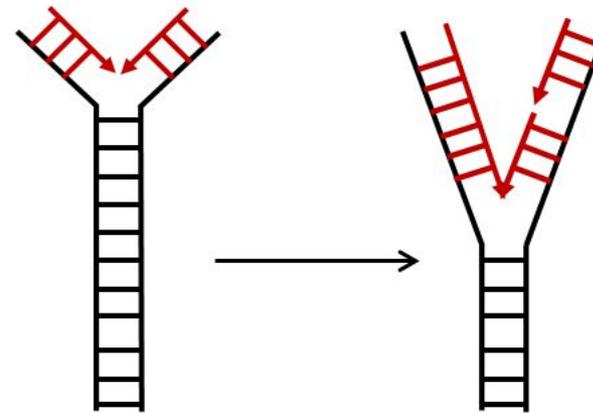
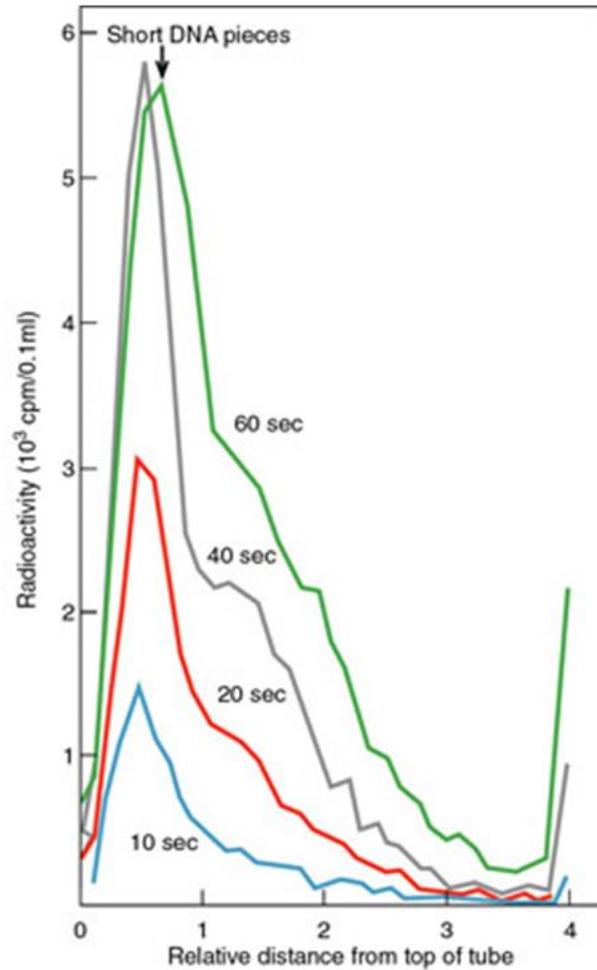


СХЕМА РЕПЛИКАЦИИ

Схема антипараллельной репликации *in vivo* по Оказаки

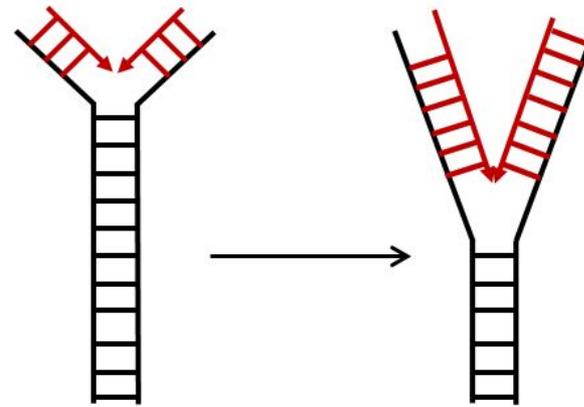
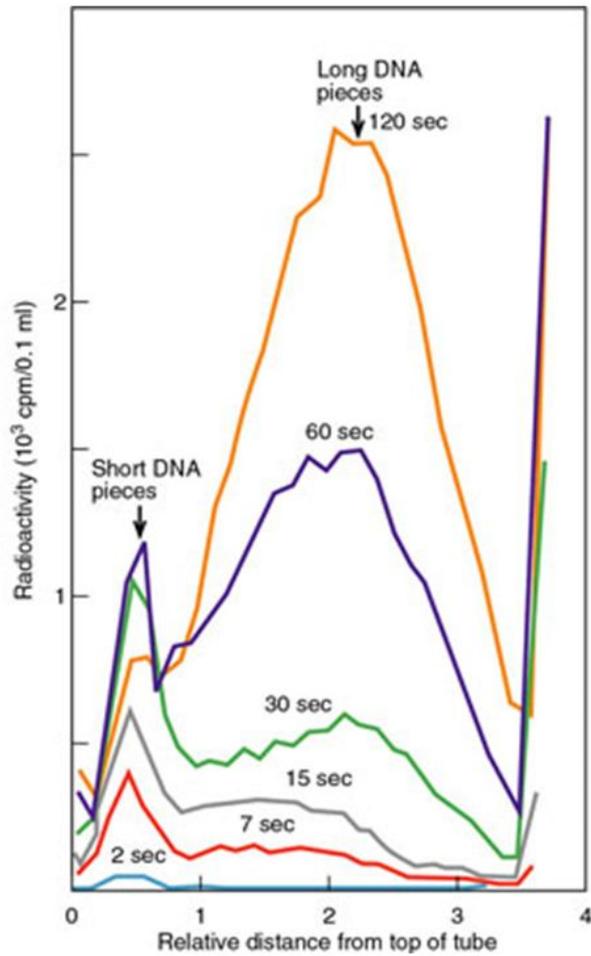


СХЕМА РЕПЛИКАЦИИ

Схема антипараллельной репликации *in vivo* по Оказаки

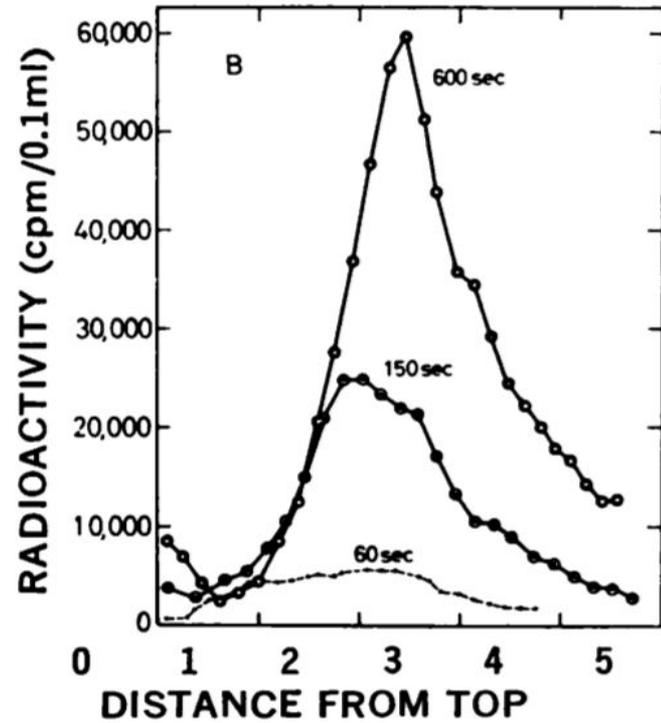
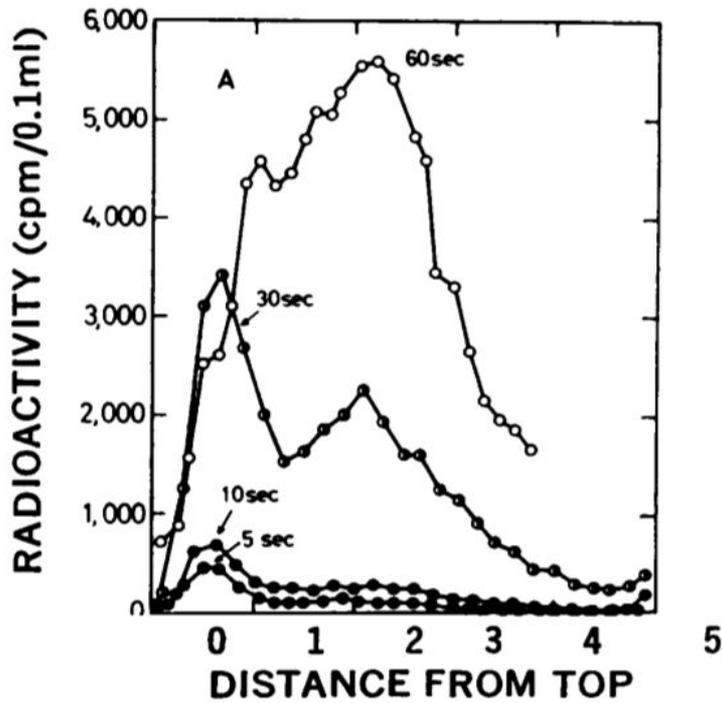


СХЕМА РЕПЛИКАЦИИ

Схема специфической модели *in vivo* по Корнбергу

"The operations are localized and arranged in multiple sites within a single area of the molecule."

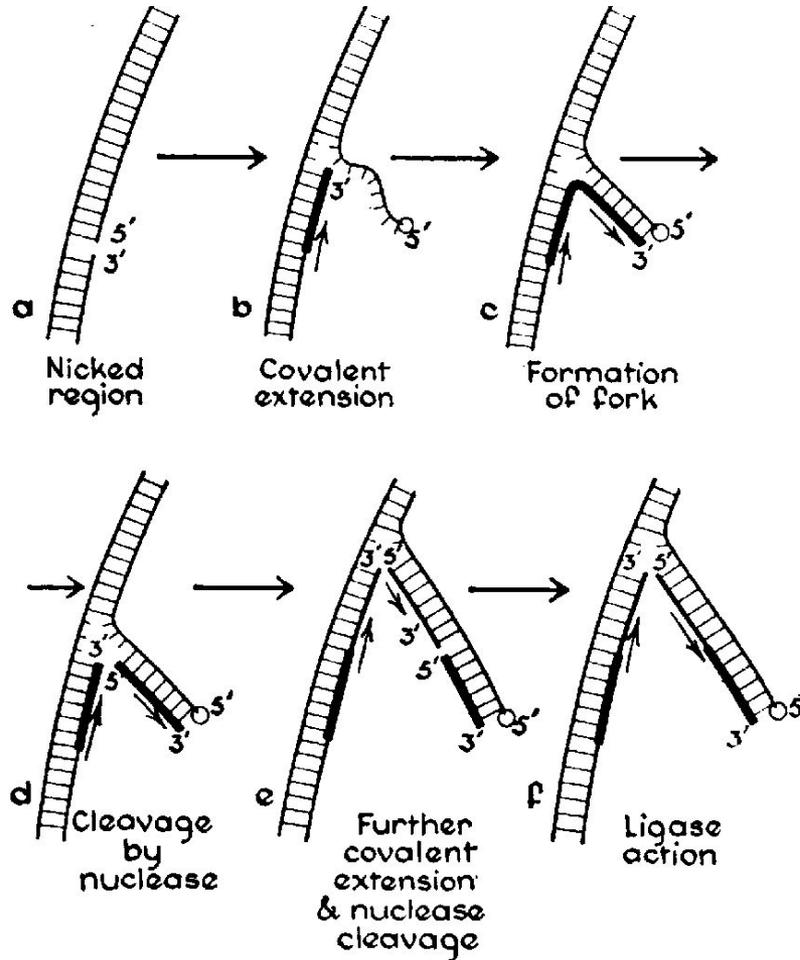


СХЕМА РЕПЛИКАЦИИ

Схема непрерывной антипараллельной синхронной репликации *in vivo* по Моргану

