

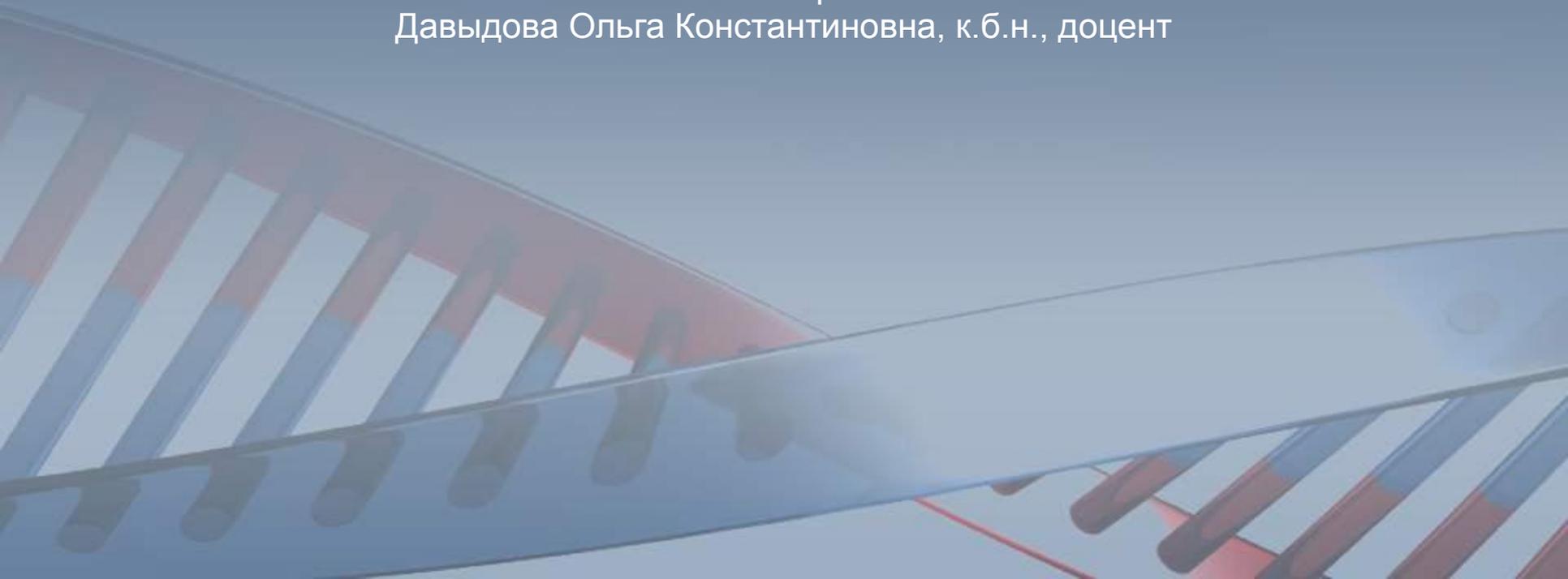
Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное бюджетное государственное образовательное учреждение  
высшего образования «Оренбургский государственный университет»  
Химико-биологический факультет  
Кафедра биохимии и микробиологии

# Репликация ДНК

## Лекция №3

Лектор:

Давыдова Ольга Константиновна, к.б.н., доцент



## План лекции:

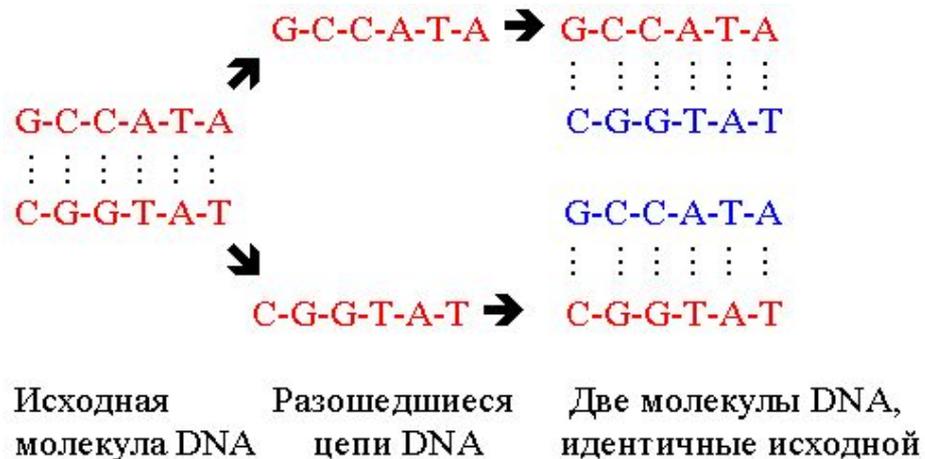
- Механизмы репликации ДНК
- Репликационная вилка
- Современная модель репликации
- Ферменты репликации
- Особенности репликации про- и эукариот



# Механизмы репликации ДНК



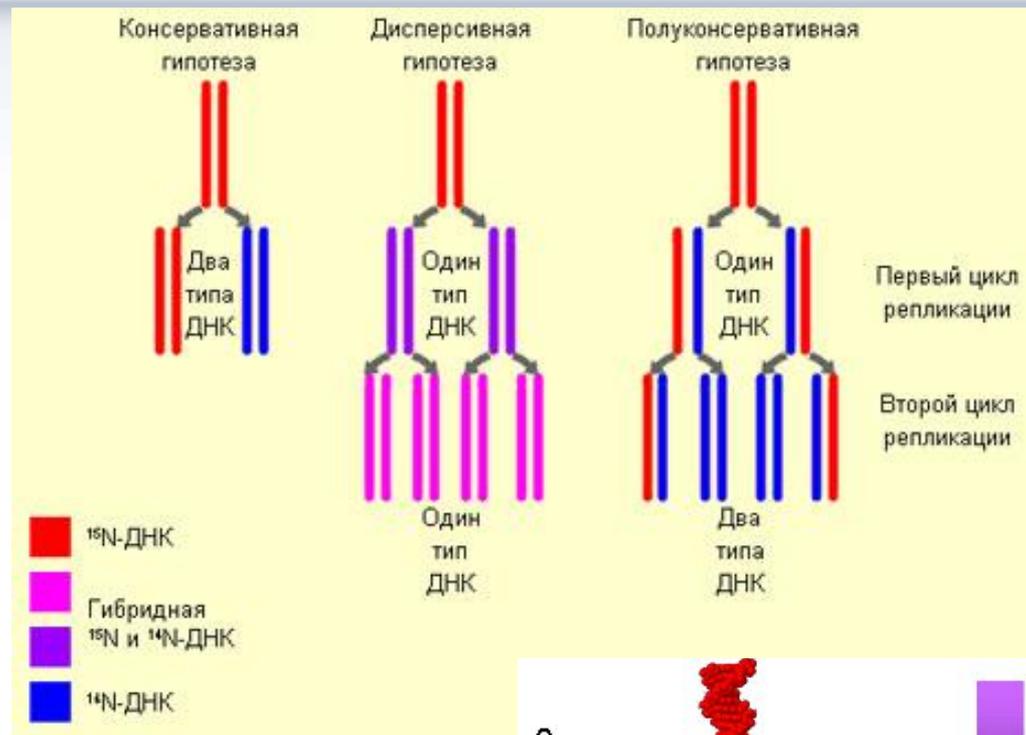
- Во время репликации каждая из цепей родительской ДНК служит **матрицей** для синтеза комплементарной дочерней цепи.
- Репликация ДНК осуществляется по **полуконсервативному** механизму, т.е. одна из цепей дочерних молекул ДНК является частью родительской молекулы ДНК, а другая является вновь синтезированной.



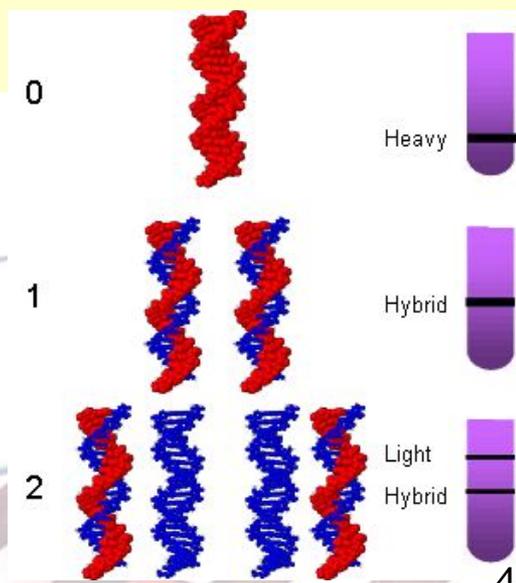
# Механизмы репликации ДНК

- Три альтернативные гипотезы.
- 1958 г. Подтверждена гипотеза полуконсервативной репликации (эксперимент Мезельсона-Сталя)

Схематически представленные тяжелая, меченная  $^{15}\text{N}$  родительская ДНК (обозначена красным), гибридная ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) ДНК первой генерации (обозначена красным/синим) и легкая ( $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) дочерняя ДНК (обозначена синим) разделяются в равновесном градиенте плотности  $\text{CsCl}$ , как показано справа. Сдвиг в плотности фрагментов в процессе переноса из «тяжелой» среды в «легкую» анализировали через 0, 1 и 2 генерации соответственно.



© <http://physicon.ru/news/articles/3105/>



# Репликационная вилка

- 1957 г. А.Корнберг обнаружил ДНК-полимеразу I – фермент, катализирующий процесс полимеризации ДНК из нуклеотидов. Этот фермент способен наращивать ДНК только на 3' – конце.
- Исследования с радиоактивными метками, проведённые в 1960-х гг. выявили особую ограниченную область репликации, перемещающуюся вдоль родительской спирали ДНК. Эта активная область из-за своей Y-образной формы была названа **репликационной вилкой**.

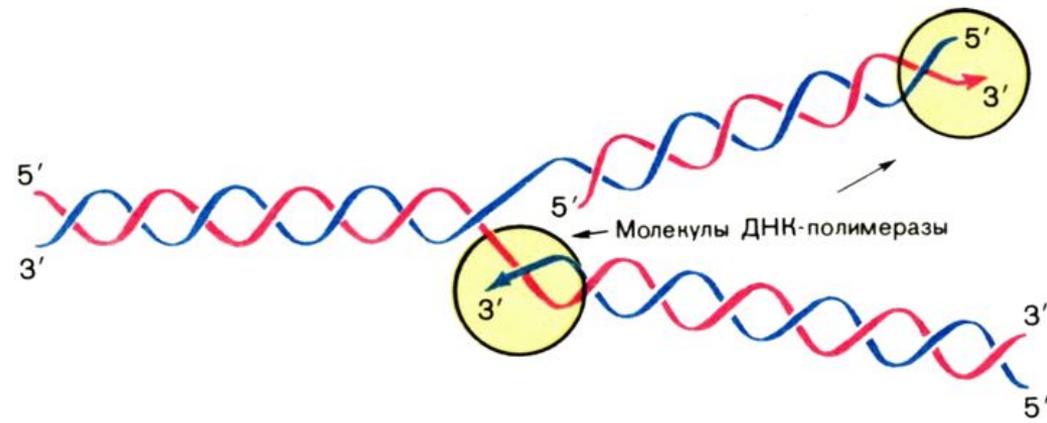
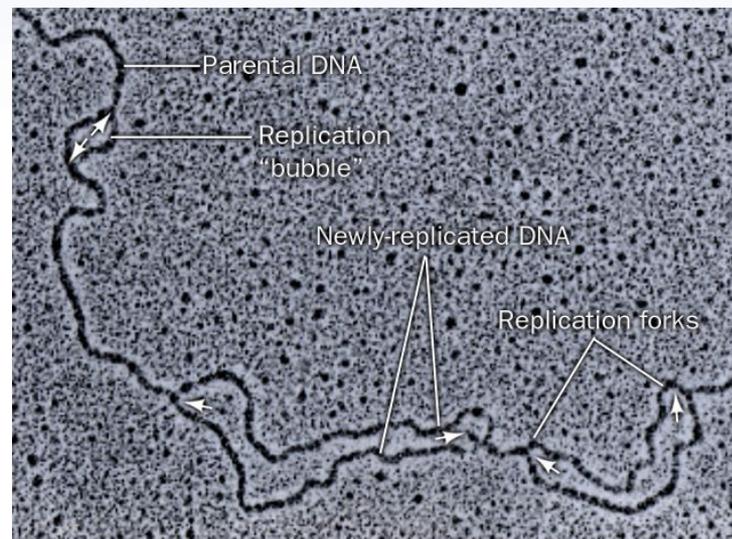


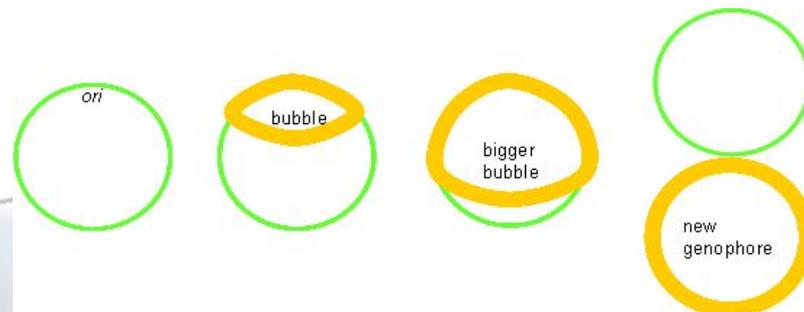
рис. из книги «Власть над геном», 1989

# Механизмы репликации ДНК у прокариот

- Реплицирующуюся ДНК бактерии можно наблюдать в электронном микроскопе, у нее вначале образуется "глазок", затем он расширяется, в конце концов вся кольцевая молекула ДНК оказывается реплицированной.
- Репликация всегда начинается в определенной области, OriC, и идет в основном симметрично по правому и левому полукружью хромосомы к конечной точке, TerC.
- Такой механизм носит название  $\theta$ -механизм.
- Завершение репликации служит началом для клеточного деления.
- Дуплицированные геномы сегрегируют по одному в каждую дочернюю клетку.



© <https://www.biochem.wisc.edu/>



©

<http://www.biologydiscussion.com/dna/biosynthesis-of-dna-replication-biology/514>

# Современная модель репликации

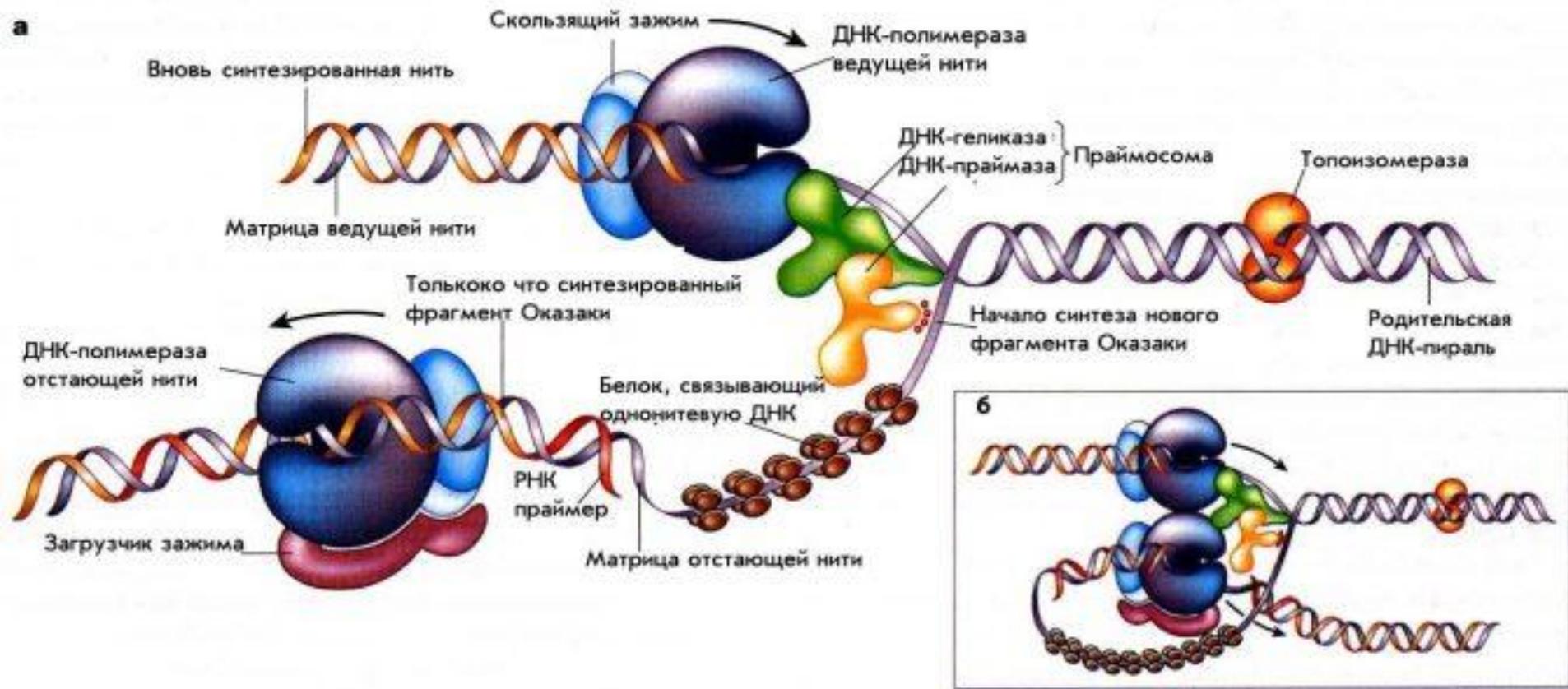


Схема репликации ДНК у *E. coli*. На панели а схематически показаны белки в Y-раскрученной вилке репликации ДНК, но в реальности вилка репликации свернута в трех измерениях и образует структуру, подобную той, что изображена на вставке б.

© <http://www.nature.com/encode/#/threads>

# Ферменты репликации

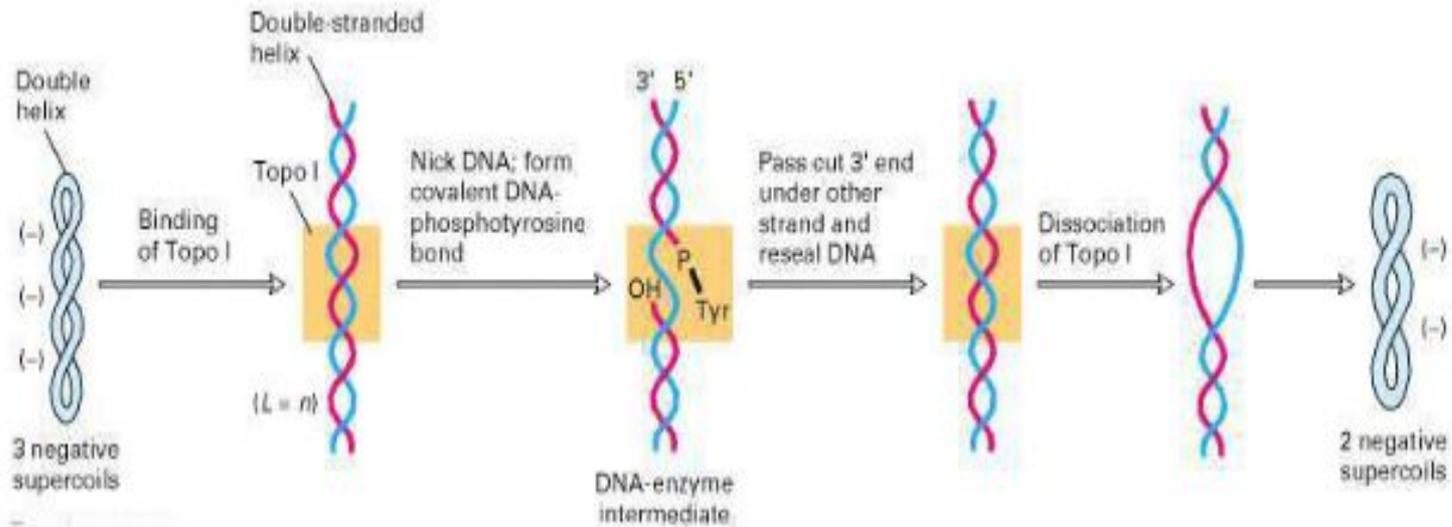
- Чтобы репликационная вилка могла продвигаться вперёд, вся хромосома впереди неё должна быстро вращаться. Это решается образованием в спирали своего рода «шарнира», особого класса белков, называемых **ДНК-топоизомеразами** (типа I и II), которые разрывают цепь и присоединяются к разорванному концу.
- Ферменты **ДНК-геликазы** присоединяются к одноцепочечной ДНК и двигаясь вдоль расплетают двойные участки. В области репликационной вилки работают две ДНК-геликазы, одна из которых перемещается по ведущей, а другая по отстающей цепи, т.е. движутся в противоположных направлениях.
- Белки, связывающиеся с одноцепочечной ДНК (**SSB-белки**) оставляют основания доступными для спаривания.
- **ДНК-полимеразы** способны только добавлять новые нуклеотиды к уже имеющему с 3'-ОН-концу полинуклеотидной цепи. Эту предобразованную цепь называют **затравкой** или **праймером**.
- Фермент синтезирующий из рибонуклеозидтрифосфатов праймеры называется **ДНК-праймазой**.
- Молекула праймазы непосредственно сцепленная с ДНК-геликазой – расплетающим двойную спираль ферментом, образует вместе с ней на отстающей цепи структуру, называемую **праймсомой**.
- Позади «репликационной машины» по ходу её движения остаётся на отстающей цепи ряд несшитых фрагментов Оказаки, всё ещё содержащих РНК-затравки, которые должны быть сшиты при помощи репарирующих ферментов, работающих позади репликационной вилки – **ДНК-лигаз**.

# ДНК-полимеразы

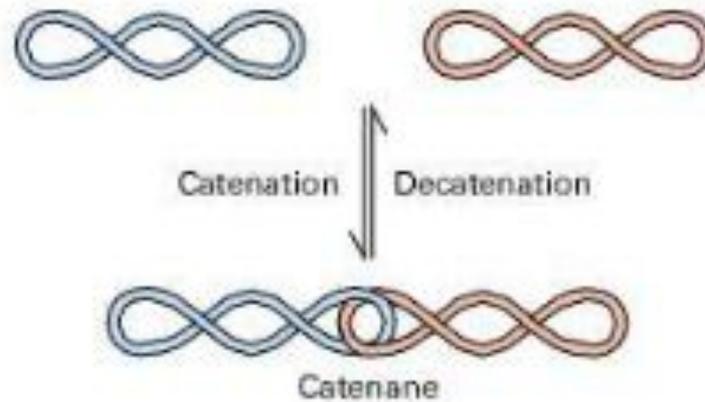
- **ДНК – полимераза I:** репаративный синтез ДНК в двух процессах: вырезает повреждённые участки одной цепи и застраивает брешь комплементарными нуклеотидами; удаляет затравочную РНК.
- **ДНК – полимераза II:** обуславливает начало синтеза каждого нового фрагмента (инициация), окончание синтеза фрагмента (терминация).
- **ДНК – полимераза III:** наращивание синтезируемой цепи в длину – элонгация.

Свойства бактериальных ДНК-полимераз	I	II	III
Инициация синтеза цепи	-	-	-
5'-3'-полимеризация	+	+	+
3'-5'-эксонуклеазная активность	+	+	+
5'-3'-эксонуклеазная активность	+	-	-
Количество молекул на клетку	400	?	15

# Действие топоизомераз I и II



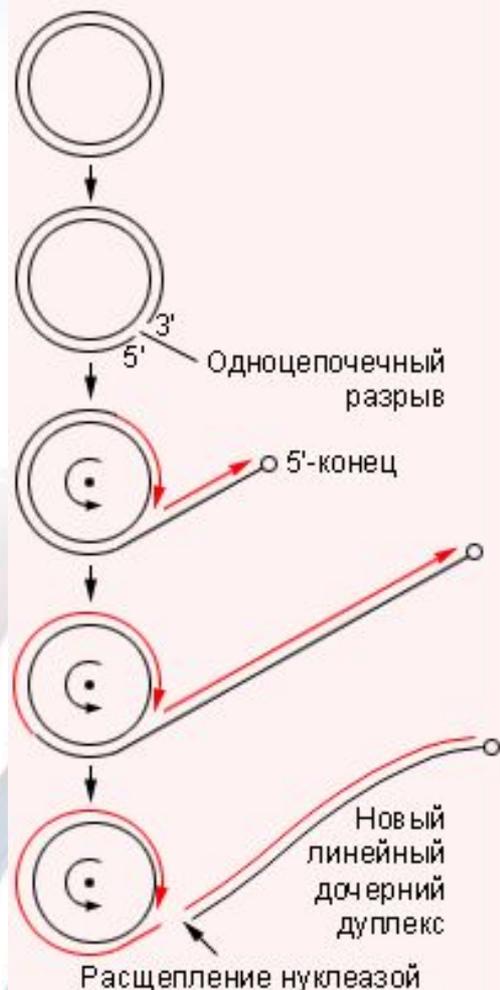
© <http://helicase.pbworks.com/w/page/17605720/Tyler-Huff>



© [http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Deoxy\\_Ribose\\_Nucleic\\_Acid4-Super\\_Coiling.htm](http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Deoxy_Ribose_Nucleic_Acid4-Super_Coiling.htm)

# Типы репликации ДНК

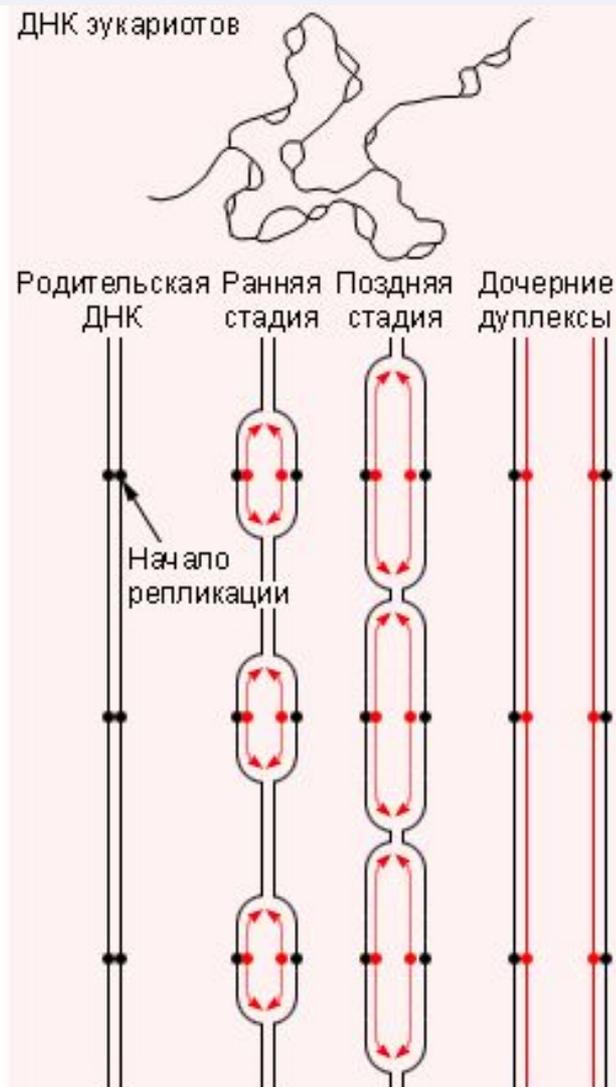
Кольцевая вирусная ДНК



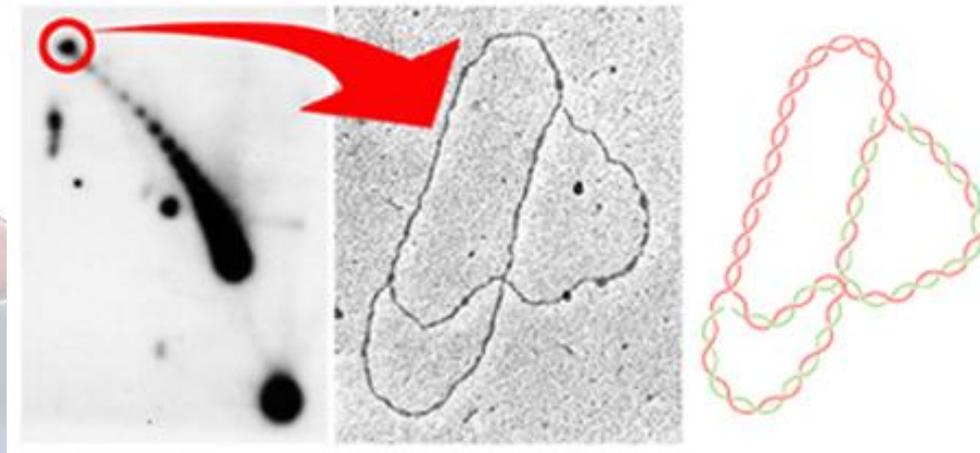
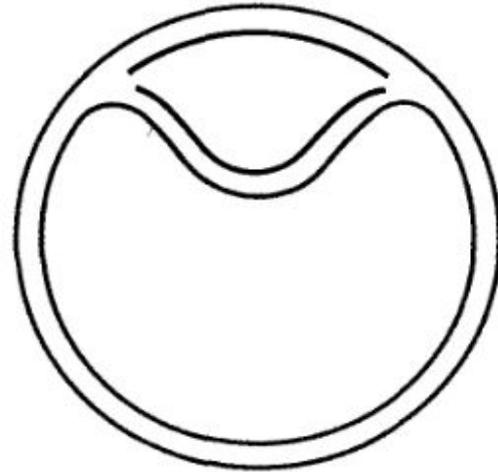
Кольцевая бактериальная ДНК



ДНК эукариотов

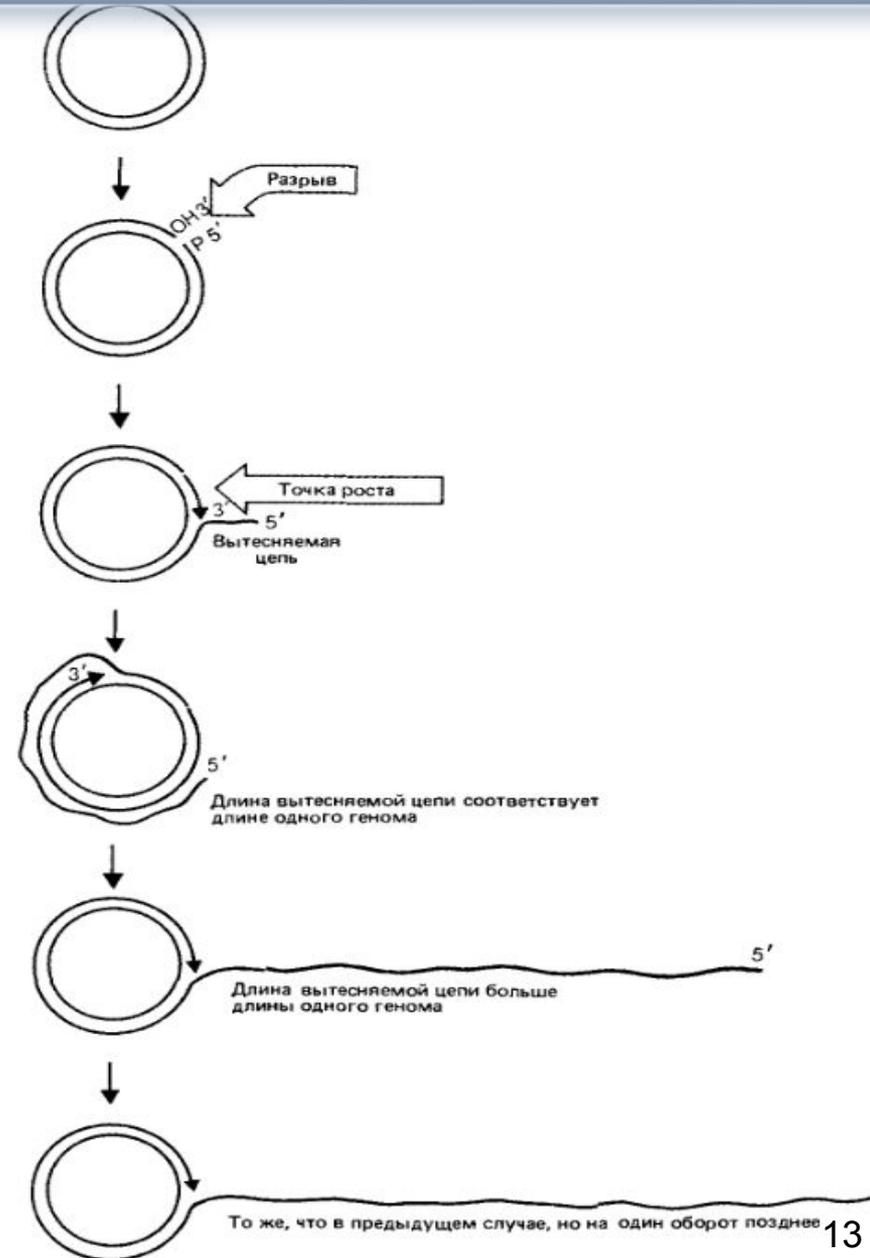


- В кольцевой хромосоме репликационный глазок образует Θ-структуру.



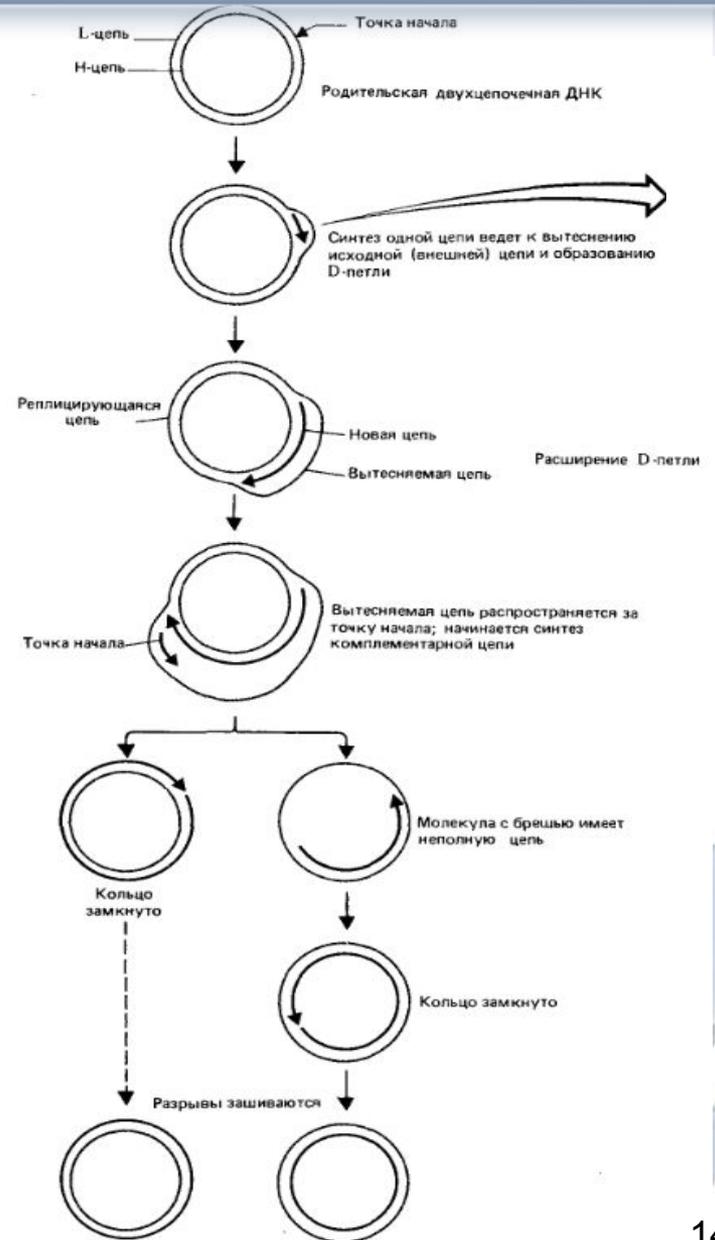
# Модель «катящегося кольца»

- Если в кольцевой ДНК разрывает одну цепь и свободный 3'-конец наращивается с помощью ДНК-полимеразы, то вновь синтезируемая цепь вытесняет исходную родительскую.



# D-петля

- В митохондриальной ДНК наблюдается тип репликации носящий название D-петель (displacement – вытеснение).



# Расхождение хромосом

- Специфические мембранные белки обеспечивают контакт ДНК с внутренней поверхностью цитоплазматической мембраны. Наиболее типичным является формирование подобного контакта в зоне мезосомы, положение которого соответствует точке старта репликации ДНК.
- Завершение репликации служит началом для клеточного деления.
- Дублированные геномы сегрегируют по одному в каждую дочернюю клетку.

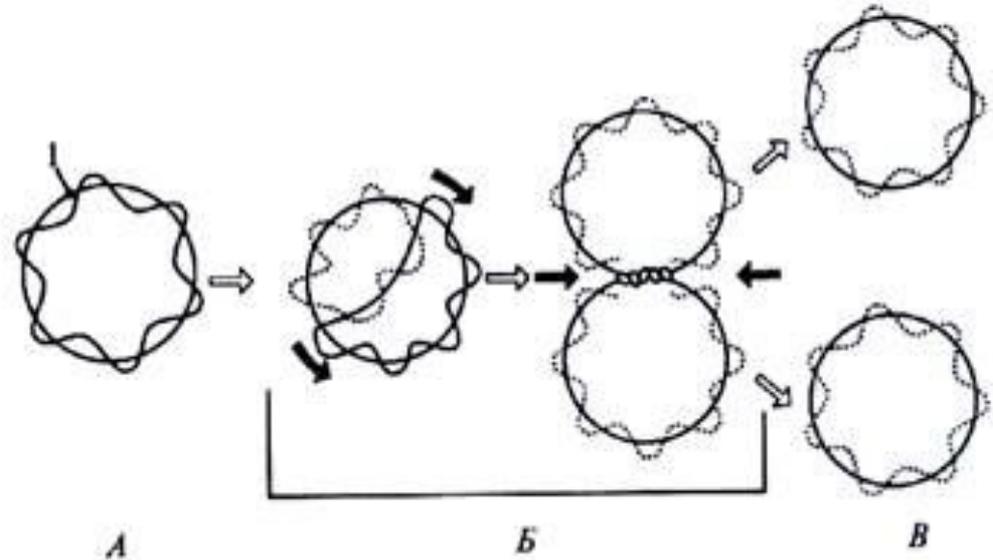


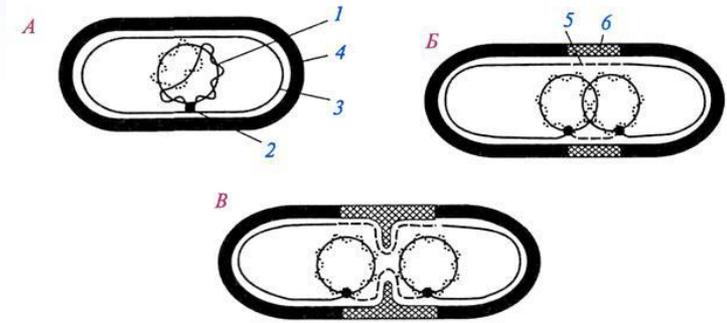
Рис. 17. Репликация кольцевой бактериальной хромосомы в двух направлениях:

*А* — родительская молекула ДНК; *Б* — промежуточные репликативные формы; *В* — дочерние молекулы ДНК после завершения процесса репликации и расхождения; *1* — точка начала репликации; черными стрелками показано направление репликации

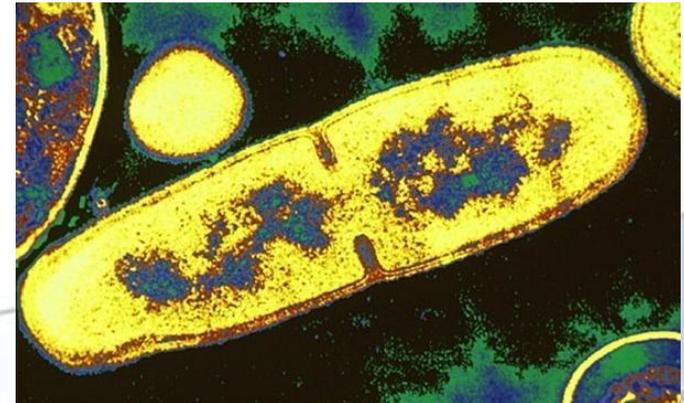
© <http://medbiol.ru/medbiol/microbiol/000e434c.htm>

# Расхождение хромосом

- *А* — бактериальная клетка содержит частично реплицированную хромосому, прикрепленную к мембране в точке (или точках) репликации;
- *Б* — репликация хромосомы завершена. В бактериальной клетке две дочерние хромосомы, каждая из которых прикреплена к ЦПМ. Показан синтез клеточной стенки и ЦПМ;
- *В* — продолжающийся синтез мембраны и клеточной стенки приводит к разделению дочерних хромосом. Показано начало деления клетки путем образования поперечной перегородки.
- 1 — ДНК; 2 — прикрепление хромосомы к ЦПМ; 3 — ЦПМ; 4 — клеточная стенка; 5 — синтезированный участок ЦПМ; 6 — новый материал клеточной стенки.



© <http://medbiol.ru/medbiol/microbiol/000e44e4.htm>

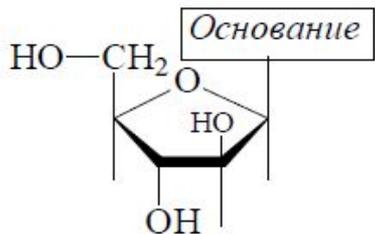


Деление клетки *B. licheniformis* (иллюстрация Lee D. Simon / Science Photo Library)

© <http://science.compuenta.ru/555361/>

# Ингибирование репликации

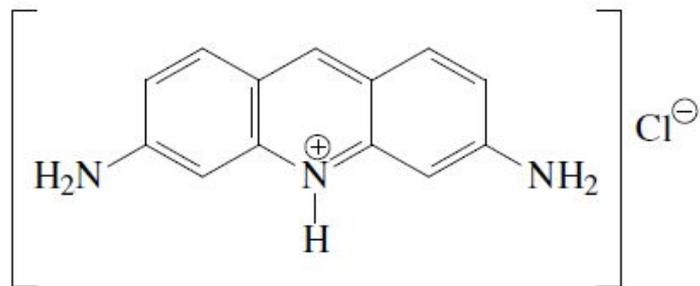
- Нуклеозидной природы



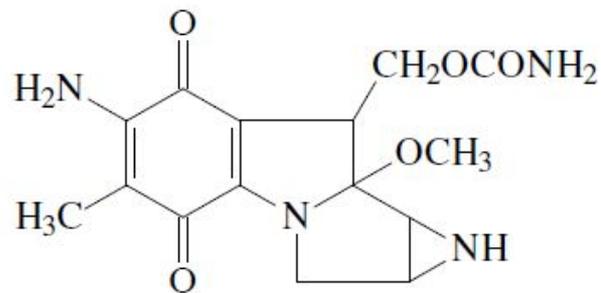
*Цитозинарабинозид (основание = Ц)*

*Аденинарабинозид (основание = А)*

- Ненуклеозидной природы



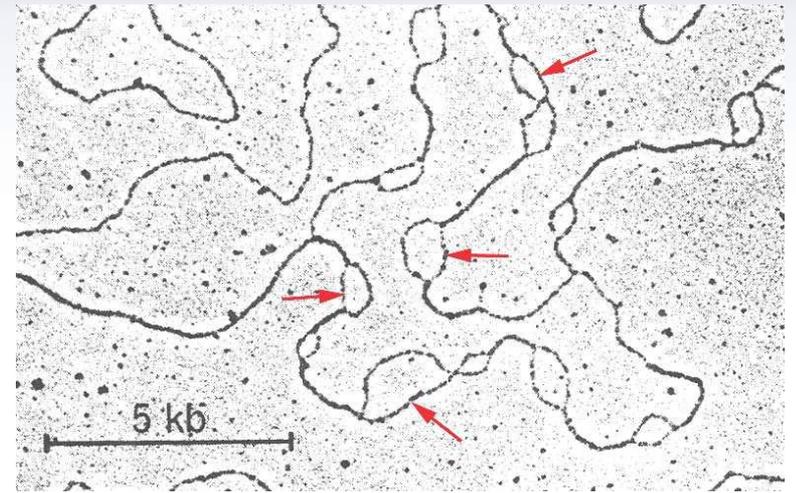
*Профлавин*



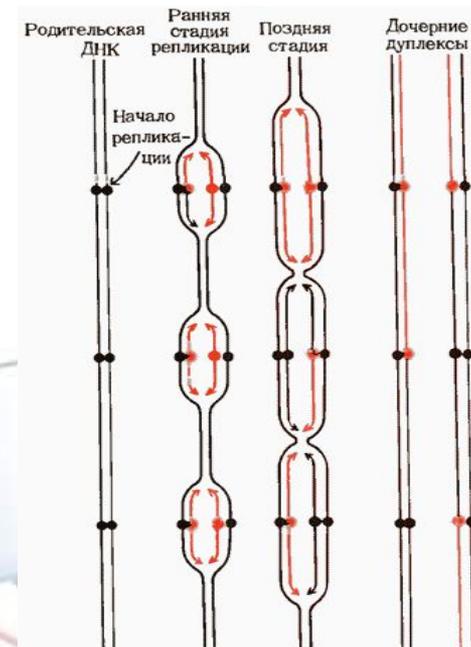
*Митомизин С*

# Отличия репликации эукариот

- В эукариотическом геноме имеется множество точек начала репликации (А-Т-богатых сайтов) и различные формы ДНК-полимераз.
- Эукариотическая ДНК также реплицируется в двух направлениях, но репликативные вилки движутся очень медленно (50 нуклеотидов в секунду), раз в 10 медленней, чем у *E. coli*. Если бы на каждую хромосому приходилась только одна пара репликативных вилок, то из-за больших размеров эукариотических ДНК их репликация продолжалась бы почти два месяца. Оказалось, что репликация эукариотической ДНК начинается одновременно во многих точках (число которых, вероятно, превышает тысячу).

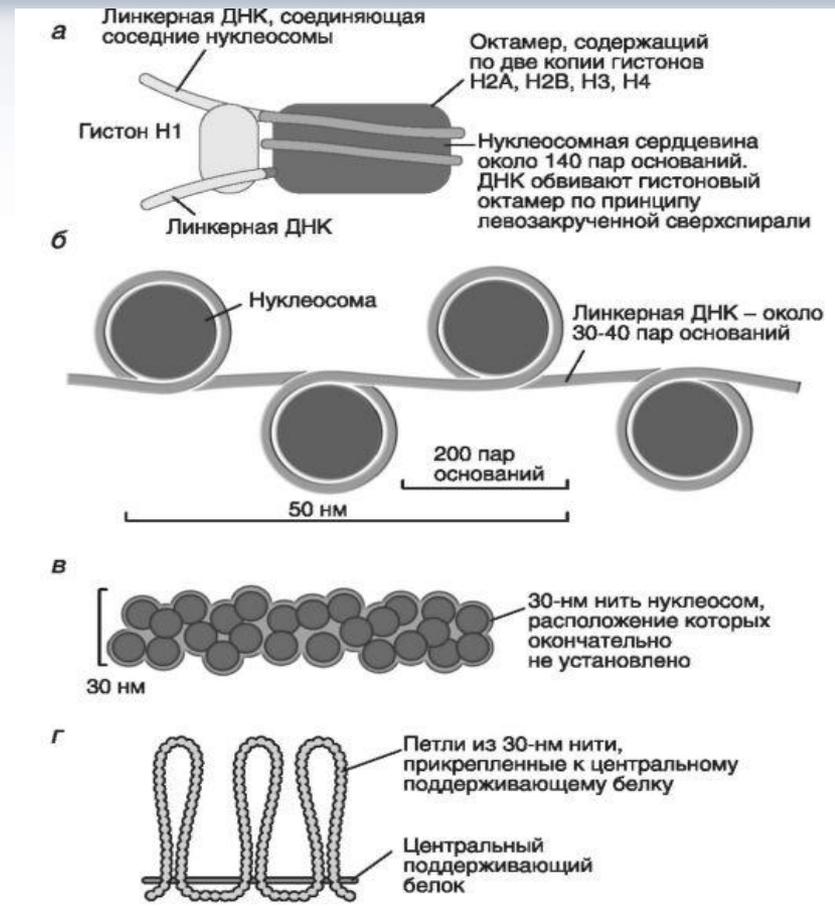


© [http://hogness.stanford.edu/PDFs/36\\_mechanism\\_of\\_dna\\_replication.pdf](http://hogness.stanford.edu/PDFs/36_mechanism_of_dna_replication.pdf)



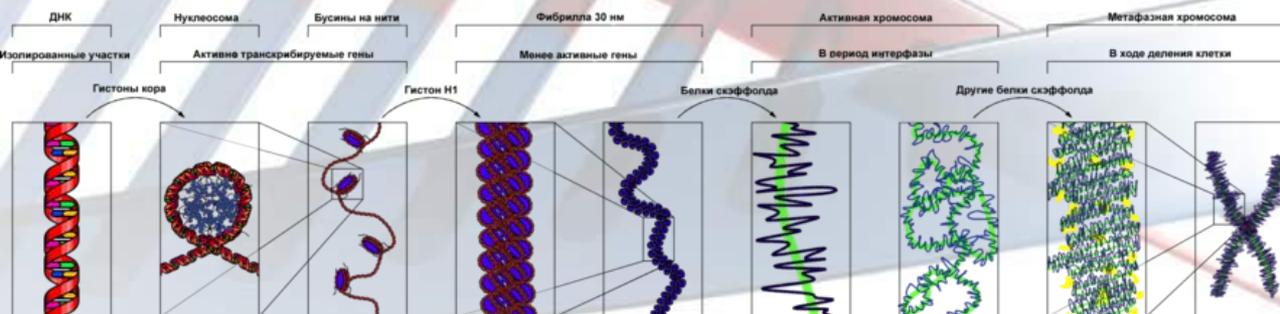
# Отличия репликации эукариот

- Участки эукариотической ДНК обвиты вокруг белковых частиц, образуя нуклеосомы, поэтому репликация этой ДНК, помимо раскручивания, должна сопровождаться еще механическими и геометрическими изменениями структуры ДНК.



© [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chromatin\\_Structures.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chromatin_Structures.png)

© <http://medinfo.net/Projects/nucleotyping>





# Теория маргинотомии А. Оловникова

- - отсчёта клеточных делений и старения, вследствие недорепликации последовательностей ДНК на концах хромосом (теломерных участков).
- Чтобы клетки не растеряли при делении часть генетического материала, теломерные повторы обладают способностью восстанавливать свою длину. В этом и заключается суть процесса «концевой репликации». Но учёные не сразу поняли, каким образом наращиваются концевые последовательности. Было предложено несколько различных моделей.
- Российский учёный А. М. Оловников предположил существование специального фермента (теломеразы), наращивающего теломерные повторы и тем самым поддерживающего длину теломер постоянной.

# Теломерная гипотеза старения

- Максимальное число делений зависит от типа клеток и для большинства человеческих клеток этот предел составляет 52 деления. Этот предел был назван **лимитом Хейфлика**.
- Чем короче теломеры, тем старше клетка, и наоборот: если активность теломеразы, достраивающей теломеры, высока и постоянно поддерживается одинаковая длина теломер, – клетка не стареет. По последнему «сценарию» развиваются раковые клетки.



© <http://www.vechnayamolodost.ru/pages/teoriistarenija/tevmt06.html>

# Лимит (предел) Хейфлика

- граница количества делений соматических клеток
- Эта граница была найдена в культурах всех полностью дифференцированных клеток. Максимальное число делений различно в зависимости от типа клеток и ещё сильнее различается в зависимости от организма. Для большинства человеческих клеток предел Хейфлика составляет 52 деления (у новорожденных 70- 80 раз, у 70-летнего человека – 20-30 раз).

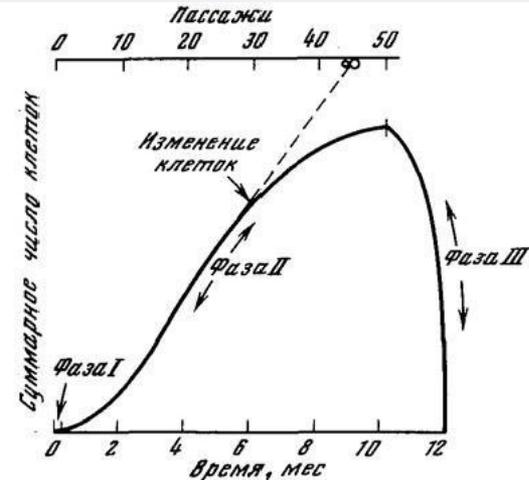


Рис. 54. Первоначальная версия поведения диплоидных фибробластов человека в культуре согласно работе [Hayflick, Moorhead, 1961]

На рисунке изображено увеличение числа клеток по мере их культивирования (фазы I и II), за которым следует резкое уменьшение числа клеток (фаза III). Данный рисунок, впервые опубликованный в 1961 г., постоянно воспроизводился в научных и научно-популярных изданиях [см.: например: Hayflick, 1966; 1968; 1977; 1982] и приведен в учебнике по биологии старения [Лэмб, 1980]

## Лимит Хейфлика для различных животных

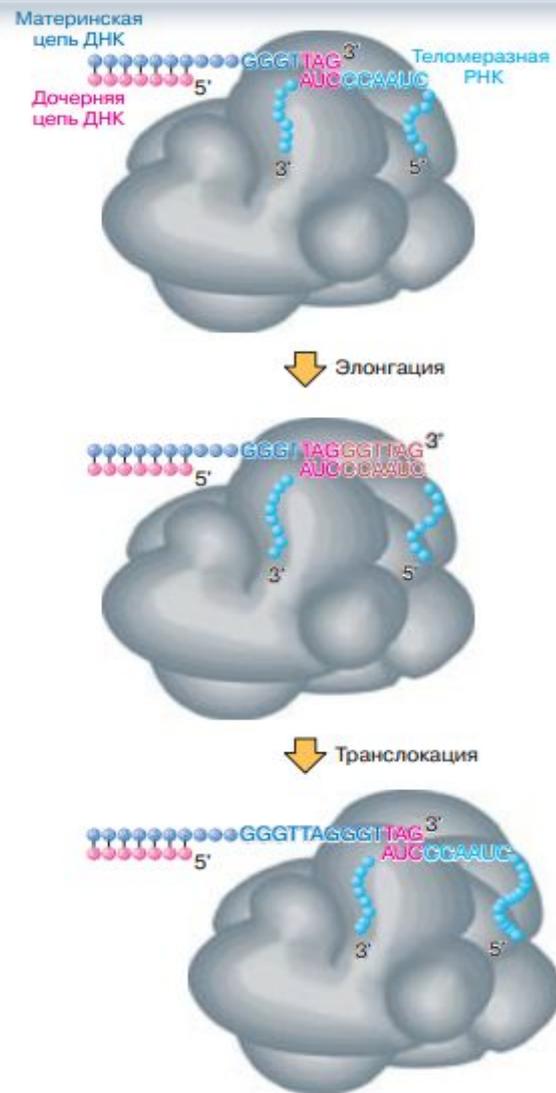
Источник клеток	Максимальная продолжительность жизни животного	Количество делений клеток в культуре ткани
Новорожденные мыши	3 года	15 – 20 раз
Новорожденные цыплята	12 лет	25 раз
Эмбрион человека	100 лет	50 раз
Галапагосская черепаха	175 лет	110 раз

# Строение и работа теломеразы



**Рис. 4.** Нарращивание концов ДНК хромосом эукариот теломерными повторами. Изображен один из концов хромосомы, другой удлиняется по такой же схеме

В результате деятельности теломеразы длина теломерных участков хромосом клетки увеличивается или сохраняется на постоянном уровне, компенсируя таким образом концевую недорепликацию и позволяя клетке делиться неограниченно долго.



**Рис. 5.** Схема удлинения 3'-конца ДНК с помощью РНК-содержащего фермента – теломеразы. Красным цветом выделены спаренные комплементарные нуклеотиды выступающего конца ДНК и матричного участка теломеразной РНК

# Строение и работа теломеразы

- В ходе исследования этого фермента (состоящего, из РНК-компонента и белкового компонента) выяснилось, что РНК-компонент экспрессируется на постоянном уровне практически во всех клетках, и для индуцирования теломеразной активности необходима экспрессия белкового компонента, названного поэтому каталитическим компонентом теломеразы.
- Искусственно индуцированная экспрессия гена каталитического компонента теломеразы (путём введения гена при помощи методов генной инженерии) делает клеточную культуру иммортальной (бессмертной), то есть способной делиться неограниченно долго, отменяя тем самым для культуры [предел Хейфлика](#).
- Теломераза экспрессируется в [стволовых](#), половых и некоторых других типах клеток организма, которым необходимо постоянно делиться для функционирования определённых тканей (например, клетки эпителия кишечника).
- Обычные соматические клетки организма лишены теломеразной активности.
- Клетки 85 % [раковых опухолей](#) обладают теломеразной активностью, поэтому считается, что активация теломеразы является одним из событий на пути клетки к злокачественному перерождению.

# Теломеры и теломераза



*Элизабет Блэкбёрн.*



*Кэрол Грейдер.*



*Джек Шостак.*

- В октябре 2009 года в Стокгольме объявлены имена лауреатов Нобелевской премии по физиологии и медицине. Это американские учёные Элизабет Блэкбёрн (Elizabeth H. Blackburn), Кэрол Грейдер (Carol W. Greider) и Джек Шостак (Jack W. Szostak), удостоившиеся самой престижной научной награды дословно «за открытие того, как теломеры и фермент теломераза защищают хромосомы».

# Заключение

- Репликация – это процесс удвоения ДНК. Принципиальный механизм репликации вытекает из строения молекулы ДНК и получил название полуконсервативного, поскольку в каждой из вновь образовавшихся молекул одна цепь является старой (родительской), а другая – вновь синтезированной (дочерней).
- Репликация – важнейшая функция генетического материала, которая необходима для поддержания генетической непрерывности клеток и должна быть очень точной.
- Не смотря на всестороннее изучение процесса репликации, детальные механизмы синтеза ДНК продолжают активно изучаться и по сей день.