

Министерство образования и науки Российской Федерации

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

И.М.Спивак

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Учебное пособие

Санкт-Петербург
Издательство Политехнического университета
2011

Ирина Михайловна Спивак

Репликация ДНК: учебное пособие

Текст предоставлен правообладателем

http://www.litres.ru/pages/biblio_book/?art=3373845

Репликация ДНК : Учеб. пособие / И.М. Спивак.: Изд-во Политехн. ун-та; СПб.; 2011

Аннотация

Учебное пособие соответствует государственному образовательному стандарту дисциплин «Экология» и «Физико-химические основы цитологии» подготовки бакалавров по направлению 140400 «Техническая физика».

В пособии описываются проблемы репликации ДНК. Излагаются современные представления о строении хромосом, координации в течение клеточного цикла процессов ДНК-метаболизма, а также описываются участвующие в этих процессах белки и рассматриваются механизмы, отвечающие за сохранение генетической стабильности организмов.

Предназначено для студентов дневной, очно-заочной и заочной форм обучения, изучающих дисциплины «Экология» и «Физико-химические основы цитологии» в рамках подготовки бакалавров по направлению 140400 «Техническая физика».

Содержание

Введение	4
Глава 1. Репликация – полимеразная реакция	5
1.1. Вилка репликации	7
Глава 2. Начало репликации	9
2.1. Понятие о репликоне и ориджине репликации	11
2.2. Ориджин репликации <i>E.coli</i> oriC	12
2.3. Ориджины других организмов	13
2.4. Скорость репликации	15
Глава 3. Инициация репликации	17
3.1 Инициация репликации у <i>E.coli</i>	18
3.2. Инициация репликации у эукариот	19
Глава 4. Механизм образования и необходимость РНК-праймера	25
4.1. Синтез праймера для полимеразной реакции	25
4.2. Понятие об РНК-ДНК дуплексе	27
4.3. Ключевые ферменты, участвующие в синтезе ДНК	31
4.3.1. ДНК-полимеразы	31
4.3.1.1. ДНК-полимеразы прокариот	32
4.3.1.2. ДНК-полимеразы эукариот	34
4.3.1.3. ДНК-полимераза α – праймаза	35
4.3.1.4. Реакция праймирования	36
Конец ознакомительного фрагмента.	39

Спивак Ирина Михайловна

Репликация ДНК

Введение

Генетическая программа всех живых организмов, за исключением РНК-содержащих вирусов, записана в нуклеотидной последовательности ДНК. Следовательно, для сохранения уникальных свойств организма необходимо точное воспроизведение этой последовательности в каждом последующем поколении. *E. coli*, например, должна дублировать практически без ошибок полный геном размером $4 \cdot 10^6$ нуклеотидных пар при образовании каждого последующего поколения; точно так же должны быть скопированы почти $4 \cdot 10^9$ пар оснований в 23 парах хромосом человека при каждом акте деления клеток. Основным свойством ДНК является то, что она служит матрицей и определяет порядок, в котором нуклеотиды выстраиваются в новые полинуклеотидные нити.

Собственно репликация ДНК в широком смысле – очень важный для делящейся клетки процесс. В него входит также подготовка хроматина к репликации и недопущение повторного митоза. Это обеспечивает однократную дубликацию ДНК в течение одного клеточного цикла, поддерживая таким образом стабильность генома.

Генетическая стабильность живых организмов в значительной степени определяется функционированием комплекса белков, осуществляющих репликацию ДНК. Очевидно, что репликация ДНК регулируется множеством белок-белковых и ДНК-белковых взаимодействий, механизм которых остается неизвестным. Кроме того, комплекс репликации ДНК работает взаимосогласованно с комплексами белков, осуществляющих репарацию повреждений ДНК. Одновременно процесс передачи информации от родительского организма к дочернему сопровождается рекомбинацией молекул ДНК для создания большего наследственного разнообразия. Процесс ДНК-рекомбинации подробно описан при мейотическом кроссингвере в процессе образования половых клеток, при V(D)J-рекомбинации – процессе формирования разнообразных генов иммуноглобулинов и иммуноглобулиновых рецепторов, при действии некоторых систем репарации ДНК. Учитывая все многообразие и согласованность процессов ДНК-метаболизма, можно предположить еще большее разнообразие и сложное взаимодействие белковых комплексов, осуществляющих стабильное воспроизведение наследственного материала в поколениях.

Важно осознавать, что в ДНК закодирована информация о механизме ее собственного удвоения: одни гены кодируют ферменты, синтезирующие нуклеотидные предшественники ДНК, другие – белки, осуществляющие сборку активированных нуклеотидов в полинуклеотидные цепочки. Есть гены, координирующие процесс репликации с другими клеточными событиями, а также гены, кодирующие белки, которые упаковывают ДНК в хроматин.

Понимание регуляции и динамики этих систем является ключевой задачей молекулярной биологии XXI века.

Глава 1. Репликация – полимеразная реакция

Обнародуя свою модель структуры ДНК в 1953 г., Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик писали: «Мы не могли не осознавать, что специфическое спаривание оснований, постулированное нами, подразумевает наличие какого-то механизма копирования теистического материала». Они первыми заметили: «Если известен точный порядок оснований в одной из цепей, то можно записать и порядок оснований в другой, поскольку спаривание оснований специфично. Таким образом, одна цепь является комплементом другой; именно это свойство наводит на мысль, что ДНК может удваивать саму себя».

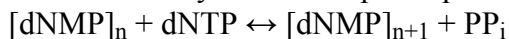
Уотсон и Крик предположили, что для удвоения ДНК должны произойти разрыв водородных связей, удерживающих вместе спиральный дуплекс, и расхождение нитей. Они также высказали мысль, что каждая нить дуплекса служит матрицей при синтезе комплементарной нити, и в результате образуются две пары нитей, в каждой из которых только одна является родительской. Таков механизм точного воспроизведения последовательности нуклеотидных пар в двойной спирали ДНК. Уотсон и Крик полагали, что репликация ДНК осуществляется спонтанно, без участия ферментов, но это оказалось неверно. Тем не менее, идея о том, что удвоение ДНК происходит путем последовательного соединения нуклеотидов в соответствии с правилом комплементарности, заданным каждой нитью спирали, решила концептуальную проблему точного воспроизведения генов.

Согласно общепринятой модели, репликация всех двунитевых ДНК полуконсервативна. Существуют ли в природе альтернативные способы репликации двунитевой ДНК (например, консервативный или дисперсный) – неизвестно. Таким образом, после каждого события репликации одна нить в обеих дочерних молекулах является родительской, консервативной, а другая – новосинтезированной, дочерней. Именно такой механизм копирования и называется полуконсервативным. Если геном представлен одонитевой ДНК (как у некоторых вирусов), то эта единственная нить служит матрицей для образования комплементарной нити, с которой она образует дуплекс, а затем на этом дуплексе синтезируются либо дочерние дуплексы, либо одонитевые копии одной из матричных нитей.

Уотсон и Крик уже во второй своей работе 1953 г. предположили возможный механизм копирования наследственного материала. Легко представить, что цепи молекулы ДНК расходятся и каждая из них становится матрицей, на которой синтезируется новая комплементарная цепь. В результате образуются две дочерние двуспиральные молекулы ДНК, не отличимые от родительской молекулы.

В 1957 г. А. Корнберг обнаружил у бактерии *E. coli* фермент, катализирующий процесс полимеризации ДНК из нуклеотидов – ДНК-полимеразу 1. В 1959 г. Артуру Корнбергу (А. Kornberg) была присуждена Нобелевская премия за открытие механизма биосинтеза ДНК. Он показал, что в основе удвоения молекул ДНК лежат обычные биохимические реакции.

В общем виде реакцию присоединения 5'-дезоксинуклеотидной группы к 3'-ОН-группе концевой нуклеотида праймерной цепи можно представить следующим образом:



где dNMP – любой из четырех обычных нуклеотидов. За один акт репликации нить, содержащая 3'-конец, удлиняется на один нуклеотидный остаток, при этом одновременно происходит удаление пирофосфата. Реакция присоединения нуклеотида обратима, но так как неорганический фосфат в клетках быстро разрушается, то реакция активно направлена в сторону синтеза. Репликация ДНК всегда идет от 5' – конца нити ДНК (то есть содержащего 5'-дезоксинуклеотидную группу) к 3'-концу (то содержащему свободную 3'-ОН-группу) и нуждается в наличии ранее синтезированного фрагмента нити ДНК в качестве затравки для реакции полимеризации. Такой ДНК-фрагмент, имеющий свободный 3'-конец, называ-

ется праймером. Ферменты, катализирующие праймер-зависимую, детерминируемую ДНК-матрицей реакцию присоединения дезоксинуклеотидов, называются ДНК-полимеразами. К настоящему времени выделены и охарактеризованы несколько различных классов ДНК-полимераз, детально описаны свойства этих ферментов и реакции, которые они катализируют. Об их строении и индивидуальных особенностях мы подробно поговорим в следующих главах.

1.1. Вилка репликации

Процесс репликации происходит в специальных структурах, названных вилками репликации. Схематическое устройство репликативной вилки *E.coli* представлено на рис. 1. То, что две нити молекулы ДНК расположены антипараллельно друг другу, создает ряд проблем для их одновременной разнонаправленной репликации.

По мере движения вилки одновременно должны синтезироваться две дочерние цепи. Вилка движется в направлении от 5' к 3' на одной цепи и от 3' к 5' – на другой. Однако нуклеиновые кислоты синтезируются только от 5'– к 3'-концу. Проблема решается таким образом, что на одной из родительских нитей новая нить синтезируется непрерывно в направлении 5'-3', что совпадает с движением вилки репликации. Это называется лидирующей или ведущей. Другая нить называется отстающей или запаздывающей, так как синтез на ней идет с некоторой задержкой по сравнению с лидирующей нитью. Это связано с тем, что ДНК на этой нити синтезируется также от 5' к 3', но в направлении, противоположном движению вилки, и короткими фрагментами. Благодаря этому разнонаправленный синтез ДНК может осуществляться в рамках одной структуры – репликативной вилки.

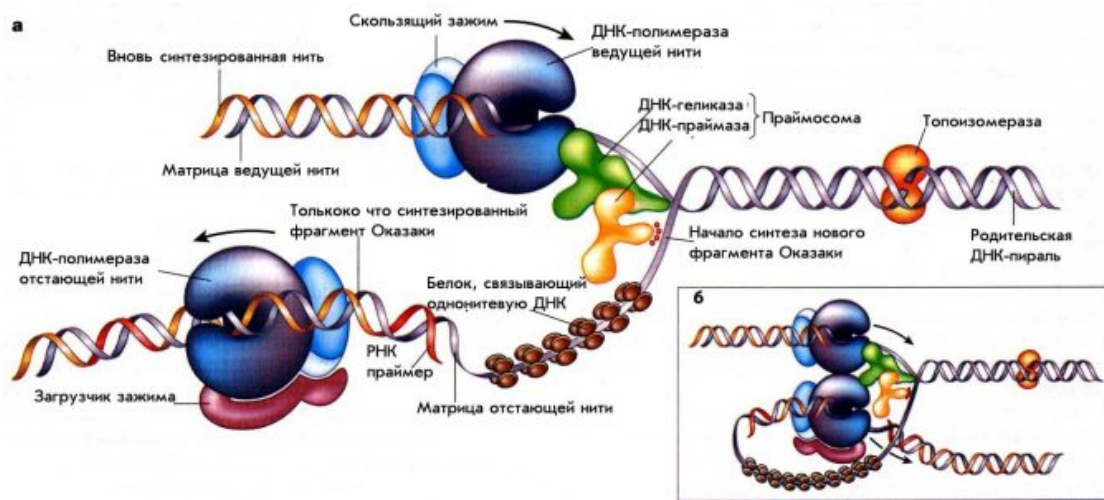


Рис. 1. Схема репликативной вилки.

Длина таких коротких фрагментов у прокариот составляет 1000–2000 пн. По имени открывшего их ученого они были названы «фрагментами Оказаки». По мере движения репликативной вилки концы соседних фрагментов Оказаки соединяются с образованием непрерывной отстающей нити. Для того, чтобы процесс на обеих нитях шел синхронно, полимеразные комплексы лидирующей и отстающей нити связаны между собой, образуя сложную трехмерную структуру (рис. 1, б)

Вилка репликации может двигаться как в одну сторону от точки начала репликации, так и в обе стороны. В зависимости от этого процесс называется однонаправленной или двунаправленной репликацией. Как это выглядит схематически, показано на рис. 2. У эукариот репликация обычно двунаправленная. Также и у *E.coli*.

Механизмы инициации репликации в точке начала репликации и при образовании фрагментов Оказаки в отстающей цепи в принципе аналогичны, хотя имеются некоторые тонкие различия. В обоих случаях происходит образование коротких РНК-затравок (праймеров), комплементарных матричной ДНК, в виде продолжения которых синтезируется новая

цепь ДНК. В дальнейшем короткие вставки РНК замещаются сегментами ДНК, отдельные фрагменты Оказаки затем объединяются с образованием непрерывной отстающей нити.

Все живые организмы на Земле обычно делят на прокариот и эукариот (от греч. карион – ядро). Главной особенностью прокариот является отсутствие у них в отличие от эукариот полноценного клеточного ядра, покрытого оболочкой. Генетический материал прокариот расположен в нуклеоиде – примитивном эквиваленте ядра эукариот. Клетки прокариот имеют очень небольшие размеры – около 1 мкм. Объем эукариотических клеток в 800-1000 раз больше объема клеток прокариот. К прокариотам относятся бактерии и археи (или археобактерии), предки которых возникли около 4 млрд лет назад. Эукариоты могут быть как одноклеточными, так и многоклеточными. Они появились на Земле примерно через 500 млн лет после прокариот.

По современным представлениям ДНК-метаболизм у прокариот имеет некоторые отличия от такового у эукариот. Описывая процессы репликации и рекомбинации, мы будем каждый раз подчеркивать эти отличия.

Глава 2. Начало репликации

Репликация ДНК начинается не в любой случайной точке молекулы, а в специфических местах, называемых точками начала репликации или олдрижинами. Процесс копирования продолжается через образование репликативных вилок в одном или обоих направлениях до тех пор, пока ДНК полностью не удвоится. В замкнутых кольцевых молекулах ДНК новосинтезированные цепи ковалентно соединяются в местах встречи увеличивающихся в размере репликативных вилок или в том месте, где единственная вилка возвращается к точке начала репликации. Дочерние молекулы, как правило, расходятся еще до начала нового раунда репликации.

Такие различающиеся по размеру геномы, как геном вируса SV40 (5,2 тпн), бактериофага λ (48,5 тпн) и *E. coli* ($4 \cdot 10^3$ тпн), воспроизводятся в результате одного иницирующего события, происходящего в определенной точке.

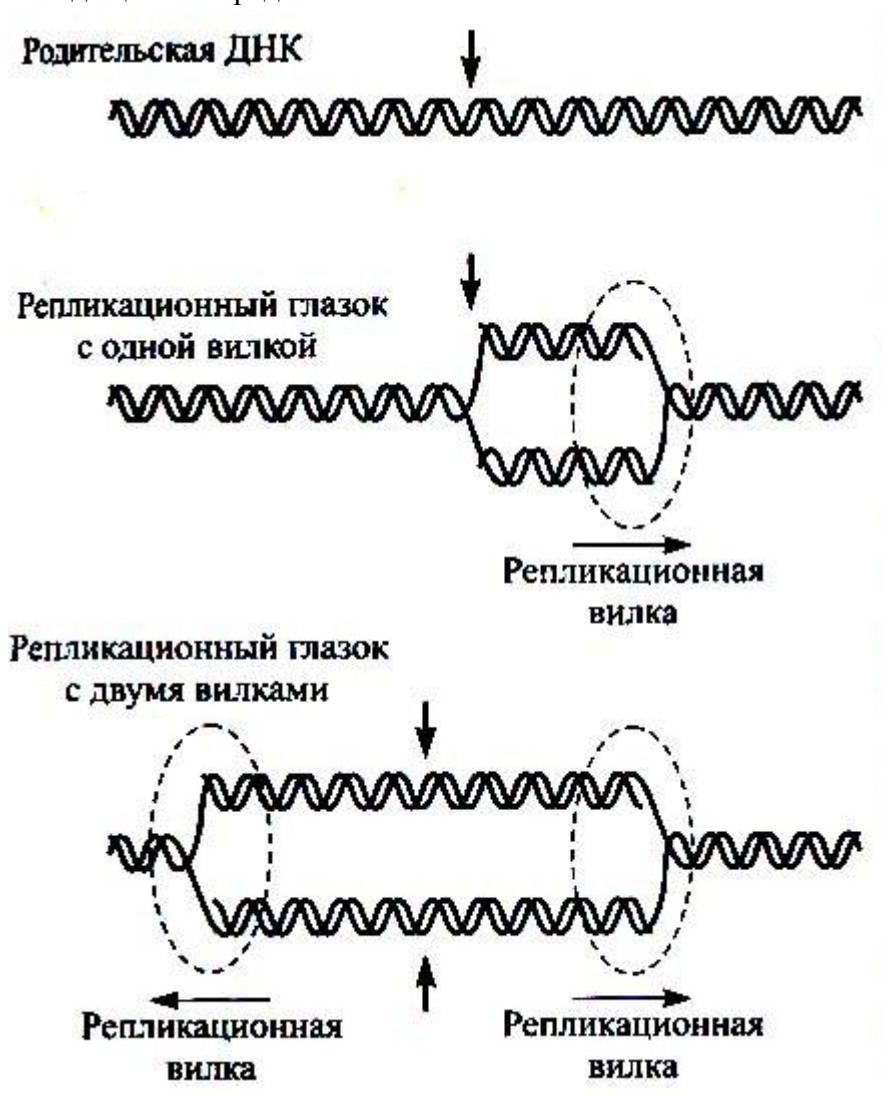


Рис. 2. Возможное движение репликативной вилки.

У про- и эукариот можно встретить различные вариации на эту тему. Так, каждая из цепей родительской спирали митохондриальной ДНК животных (15 тпн) имеет свою

точку начала репликации. Синтез комплементарной цепи некоторых небольших однонитчатых фаговых геномов начинается вблизи одной специфической последовательности, а репликация полученного дуплекса может инициироваться совсем в другой точке. Репликация линейных двунитчатых ДНК также инициируется в особых сайтах. Например, ДНК бактериофага Т7 (40 тпн) реплицируется в двух противоположных направлениях к разным концам молекулы, начиная от одной точки, а каждая из двух цепей ДНК аденовируса человека (30–38 тпн) реплицируется последовательно всегда от 3'-конца.

Для геномов эукариотических клеток характерно наличие множественных точек начала репликации, разбросанных по хромосоме на расстоянии около 20 тпн. После инициации репликация продолжается в двух направлениях от каждой точки до тех пор, пока репликативные вилки двух соседних точек начала репликации не сольются. Полноразмерные ДНК каждой дочерней хромосомы получают путем соединения более коротких, независимо инициированных новосинтезированных нитей.

2.1. Понятие о репликоне и ориджине репликации

Участок ДНК, на котором синтезируется отдельный фрагмент лидирующей нити, называется репликоном. У многих прокариот их геном содержит только одну точку инициации репликации, то есть у них в ДНК только один репликон. Эукариотические геномы полирепликонны.

Место начала репликона, в котором происходит инициация репликации, носит название ориджина репликации. Именно ориджин распознается специальными белковыми комплексами и на нем начинается формирование вилки репликации.

В некоторых случаях место начала репликации имеет такую нуклеотидную последовательность, что дуплекс принимает необычную конфигурацию, которую распознают белки, участвующие в инициации. Природа взаимодействия между точкой начала репликации и белками и механизм инициации в целом исследованы недостаточно, однако можно сказать, что, по-видимому, они в разных случаях различны.

2.2. Ориджин репликации *E.coli* *oriC*

Наиболее подробно изучены ориджины у *E. coli* и *Bacillus subtilis*. Область начала репликации хромосомы, *oriC* (origin of chromosome), включает в себя участки со специфическими последовательностями, так называемыми ДНК-боксами, и расположенными между ними короткими последовательностями. ДНК-боксы со специфическим «мотивом» нуклеотидов, преимущественно в 9пн, перемежаются фрагментами в 12-13пн с высоким содержанием АТ. Сами девятичленные последовательности могут располагаться как в прямом, так и в инвертированном положении по отношению друг к другу. Например, у *B. subtilis* имеется один фрагмент ТТАТССАСА и два других девятичленных бокса, ориентированных в противоположном направлении, с заменой одной из пар нуклеотидов. Всего у *B. subtilis* на *oriC* расположено 15 ДНК-боксов. Область *oriC* очень консервативна: ДНК-боксы сходного состава имеются в соответствующем месте хромосомы у других бактерий (только у *Mycoplasma genitalium*, несмотря на наличие общих для всех бактерий ферментов репликации, ДНК-боксов найдено не было). Сами ДНК-боксы не кодируют белок или РНК, хотя между ними располагаются отдельные гены. Продукты этих генов также большей частью вовлечены в «обслуживание» процесса репликации ДНК.

Порядок расположения ДНК-боксов, промежуточных областей и их количество позволяют думать, что эволюционная дивергенция *oriC* шла главным образом за счет дупликаций и трипликаций. Схема абстрактного «минимального ориджина» прокариот представлена на рис. 3.

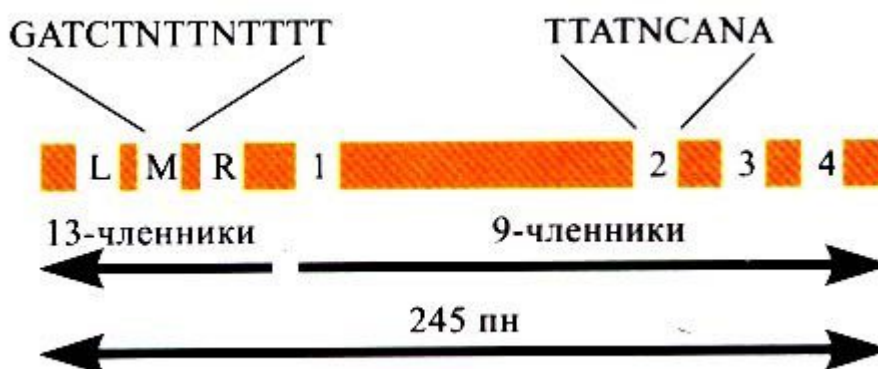


Рис. 3. Организация минимального ориджина прокариот
Схема минимального ориджина прокариот.

2.3. Ориджины других организмов

Коровая часть ориджина репликации у вируса SV40 состоит из элемента опознания (ORE – origin recognition element), необходимого для связывания особого белка Т-антигена (Т-ag), элемента для связывания белка, расплетающего ДНК (DUE – DNA unwinding element), и элемента, обогащенного АТ-нуклеотидами. Участок, с которого вилка репликации начинает двигаться в противоположных направлениях, называется началом двунаправленной репликации (OBR – origin bidirectional replication).

Вспомогательные элементы (Aux) связывают димеры Т-антигена (Aux-1) и фактор транскрипции Sp1 (Aux-2). Расстояние между этими элементами и их ориентация играют важную роль в процессе инициации репликации. Схема ориджина вируса SV40 представлена на рис. 4.

У эукариот гомологами ориджинов репликации являются автономно реплицирующиеся последовательности, или ARS (autonomously replicating sequences), открытые в 1980 г. Р. Дэйвисом и Дж. Карбоном.



Рис. 4. Схема ориджина вируса SV40.

У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* особые последовательности, способные обеспечивать репликацию фрагментов ДНК в дрожжевой клетке были выделены раньше, чем у других эукариот. Позднее такие последовательности были найдены и у многих других организмов. У *S.cerevisiae* ARS занимает 100—200 пн и содержит специфическую консенсусную последовательность (ACS – ARS consensus sequence), размером в 11 пн, необходимую для связывания с белком-инициатором, а также дополнительные элементы (В-элементы), усиливающие функцию ориджина. Например, ARS1 – первый подробно охарактеризованный ориджин – содержит три таких элемента – В1, В2, В3. Последовательности ACS и В1 занимают приблизительно 50 пн и представляют собой наименьшую функциональную область любого ориджина, которая требуется для связывания с белком-инициатором.

Элемент В2 обычно содержит генетически охарактеризованный участок DUE. Вспомогательный элемент В3 связывает фактор транскрипции Abf-1. Общая длина ARS-элемента составляет 100-200 пн. Строение ориджина *S.cerevisiae* представлено на рис. 5.

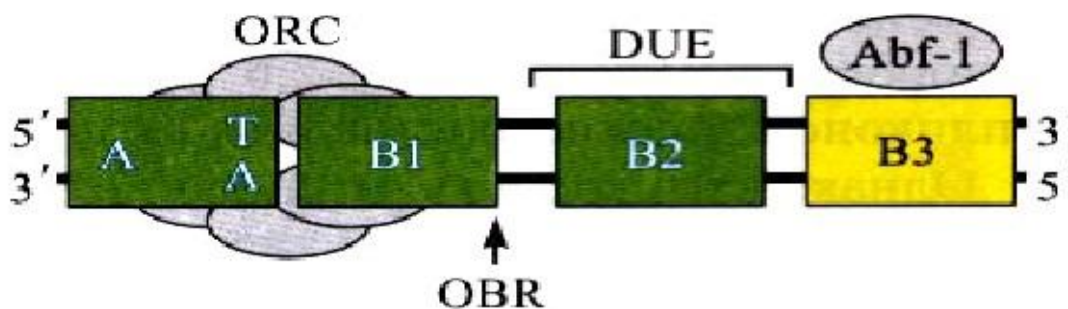


Рис. 5. Схема ориджина *Saccharomyces cerevisiae*

У другого вида дрожжей, *Shizosaccharomyces pombe*, ориджины состоят по крайней мере из одной ARS, которая значительно длиннее, чем у *S. cerevisiae*. В некоторых случаях несколько ARS-элементов формируют зону инициации репликации. (Рис. 6.)



Рис. 6. Схема ориджина *Shizosaccharomyces pombe*

У млекопитающих ориджины детально не охарактеризованы, некоторые из них располагаются в межгенных промежутках, имеют сайты связывания для транскрипционных факторов, часто содержат только районы инициации двунаправленной репликации – OBR.

2.4. Скорость репликации

Скорость репликации генома регулируется в основном частотой инициирующих событий. Так, у *E. coli* скорость копирования в каждой репликативной вилке постоянна и равна примерно 1500 пн в секунду: следовательно, полный геном длиной $4 \cdot 10^6$ пн реплицируется примерно за 40 мин. Если хромосома реплицируется быстрее, это значит, что увеличивается частота актов инициации в той же самой точке начала репликации при прежней скорости копирования. Клетки *E. coli* делятся каждые 20 мин; это означает, что репликация ДНК инициируется в хромосомах, еще не закончивших предыдущий раунд репликации. Скорость движения репликативной вилки в эукариотических клетках значительно меньше (10-100 пн в секунду), но завершение репликации хромосомы в разумное время обеспечивается одновременной инициацией во множестве точек. Итак, скорость репликации хромосом контролируется числом и расположением точек начала репликации. Например, в ранних эмбрионах дрозофилы репликация отдельной хромосомы осуществляется каждые 3 мин, благодаря почти одновременной инициации событий в точках, отстоящих друг от друга на 7000-8000 пн. В тоже время известно, что у дрозофилы в ходе раннего эмбрионального развития, как скорость репликации, так и размеры и число репликонов тканеспецифичны. В культуре же соматических клеток той же дрозофилы скорость удвоения хромосом значительно более медленная, так как репликация начинается в гораздо меньшем числе точек, находящихся друг от друга на расстоянии 40000 пн, при этом продолжительность S-фазы составляет 600 мин. Следовательно, при фиксированной скорости синтеза ДНК множественная инициация повышает скорость процесса репликации в целом и таким образом уменьшает время, необходимое для удвоения всего набора хромосом. Данные о числе репликонов и скорости репликации приведены в табл. 1.

Различия в продолжительности S-фазы найдены и у других организмов. Например, у тритона S-фаза длится 1 ч в ядрах бластулы и 200 ч в предмейотической S-фазе сперматозоидов. Вероятно, длительность S-фазы определяется не скоростью синтеза ДНК, а числом задействованных ориджинов репликации. В ДНК клеток нейрулы тритона они находятся на расстоянии около 40 мкм друг от друга, а в соматических клетках – около 100 мкм.

Таблица 1

Число и длина репликонов у разных организмов.

Организмы	Число репликонов	Средняя длина репликона	Скорость движения вилки репликации

		(тпн)	(тпн/мин)
Бактерии (<i>Escherichia coli</i>)	1	4 200	50
Дрожжи (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	500	40	3,6
Насекомые (<i>Drosophila melanogaster</i>)	3 500	40	2,6
Амфибии (<i>Xenopus laevis</i>)	15 000	200	0,5
Млекопитающие (<i>Mus musculus</i>)	25 000	150	2,2
Растения (<i>Vicia faba</i>)	35 000	300	Нет данных

В соответствии с современными представлениями репликоны у эукариот распределены в геноме не случайно, они расположены группами (replicon foci). В этих группах, или фокусах, собираются ферменты репликации, которые удлиняют вилки репликации одновременно 10-100 соседних репликонов длиной примерно по 100тпн каждый. Репликация в них завершается за 45–60 мин. Кроме этого существуют очень длинные репликоны (более 1000тпн) – столь большие, что репликация в них продолжается по несколько часов.

Активация ориджинов репликации происходит на протяжении всей S-фазы. Например, ARS1 *S.cerevisiae* активируется в ранней, а ARS501 – в поздней S-фазе. Большинство ориджинов активируется в середине S-фазы. Интересно отметить, что участки хромосом *S.cerevisiae*, реплицирующиеся в ранней или поздней S-фазе, располагаются мозаично, то есть перемешаны. У *S.cerevisiae* было обнаружено, что центральная область хромосомы IV реплицируется в ранней, а теломеры – в поздней S-фазе. Участок ДНК размером 67тпн, прилежащий к теломере на правом конце хромосомы V и содержащий ARS501, реплицируется в поздней S-фазе. По-видимому, поздняя репликация этого участка хромосомы является следствием его соседства с теломерой. Кроме того, известно, что в конце S-фазы реплицируются "молчащие" гены, например неэкспрессирующиеся в определенных типах клеток локусы HML и HMR, которые локализованы в субтеломерных областях. Активно экспрессирующиеся гены, например локус MAT, напротив, реплицируются в первой половине S-фазы.

Глава 3. Инициация репликации

Ориджины репликации являются местом, с которого начинает свое движение репликативная вилка. Но ДНК-полимеразы не могут начать процесс репликации без помощи других белков. Белки, участвующие в распознавании ориджина и способствующие привлечению к нему праймазы – РНК-полимеразы, синтезирующей праймер, «затравку» для синтеза ДНК – и ДНК-полимеразы, образуют комплекс инициации репликации.

3.1 Инициация репликации у *E.coli*

Инициация репликации в *oriC* в системе *in vitro* начинается с формирования комплекса, в состав которого входят шесть белков: DnaA, DnaB, DnaC, HU, Girase и SSB. Сначала с девятичной последовательностью связывается мономер DnaA, затем 20–40 мономеров этого белка формируют большой агрегат. ДНК ориджина опоясывает его, и цепи ДНК разъединяются в области трех тринадцатичленных последовательностей. На следующем этапе димер DnaB/DnaC присоединяется к комплексу *oriC*/DnaA, формируя агрегат размером около 480 кДа, соответствующий сфере с радиусом 6 нм. В результате формируется вилка репликации.

3.2. Инициация репликации у эукариот

Инициация репликации ДНК эукариот начинается с образования комплекса ориджина репликации и белка-инициатора репликации. Этот комплекс называется пострепликативным (post.-RC). Он служит платформой для сборки структур более высокого порядка, которые переводят хроматин в состояние, компетентное для репликации. Последовательные стадии образования комплексов инициации репликации показаны на рис. 7.

Белком-инициатором репликации ДНК в клетках эукариот является ORC (origin recognition complex), который впервые был описан у *S.cerevisiae*. Впоследствии ORC-подобные белки были обнаружены и изучены и у других представителей эукариот, а также у млекопитающих и человека. У всех эукариот ORC образован шестью субъединицами – Orc1-Orc6 (120-50 кДа). Для жизнедеятельности *S. cerevisiae* существенны все шесть субъединиц комплекса. Две разные группы субъединиц ORC участвуют в распознавании последовательностей ориджина при его связывании с ориджином репликации. Orc1, Orc2 и Orc4 взаимодействуют с ACS, остальные три субъединицы распознают B1– подобные элементы. Возможно, что связь с нуклеотидными последовательностями B1 осуществляет только Orc5. ORC специфически связывается с ДНК только в присутствии АТФ и обладает АТФ-азной активностью, которая регулируется координированным взаимодействием белка с АТФ и элементами ARS. АТФ связывается с субъединицей Orc1 и играет роль кофактора, необходимого для присоединения ORC к ориджину. Специфическая последовательность ориджина, связавшегося с ORC, ингибирует АТФазную активность Orc1, в то время как одонитевые участки ДНК, появляющиеся в S-фазе, ее снова активируют. При этом меняется конформация ORC – с вытянутой (extended) на изогнутую (bent). Возможно, связывание и гидролиз АТФ субъединицей Orc1 участвуют в контроле функций ORC в клеточном цикле.

У делящихся дрожжей *S.pombe* белок Orc4 содержит в N-концевом домене так называемые «АТ-крючки», с помощью которых ORC связывается с несколькими областями ARS1, богатыми АТ-последовательностями. У *S.cerevisiae* ORC присоединяется к ориджину в конце митоза, образуя пострепликативный комплекс (post-RC), и остается связанным с ним в последующих клеточных циклах. При этом post-RC существует в фазах S, G2 и M, а в фазе G1 входит в состав пререпликативного комплекса (pre-RC).

Пререпликативный комплекс формируется на основе post-RC, этот процесс начинается во всех ориджинах одновременно на границе фаз M и G1 и завершается в конце G1 в ориджинах, активирующихся первыми при переходе в S-фазу. В ориджинах, активирующихся позже в S-фазе, образование pre-RC завершается в соответствующий для каждого из них период S-фазы. В G1-фазе во время сборки pre-RC ORC способен взаимодействовать с циклинзависимыми киназами (Cdk, cyclin-dependent kinases). Это взаимодействие является одним из механизмов, позволяющих клетке формировать pre-RC после митоза. Первыми к post-RC на границе фаз M/G1 присоединяются белок Cdc6 (cell division cycle protein) и семейство шести белков Mst 2–7 (minichromosome maintenance proteins). Белки Mst 2–7 являются наиболее известными среди семейства «поддерживающих мини-хромосомы» белков, впервые идентифицированных у *S.cerevisiae* при исследовании мутантов, не способных к поддержанию стабильности мини-хромосом.

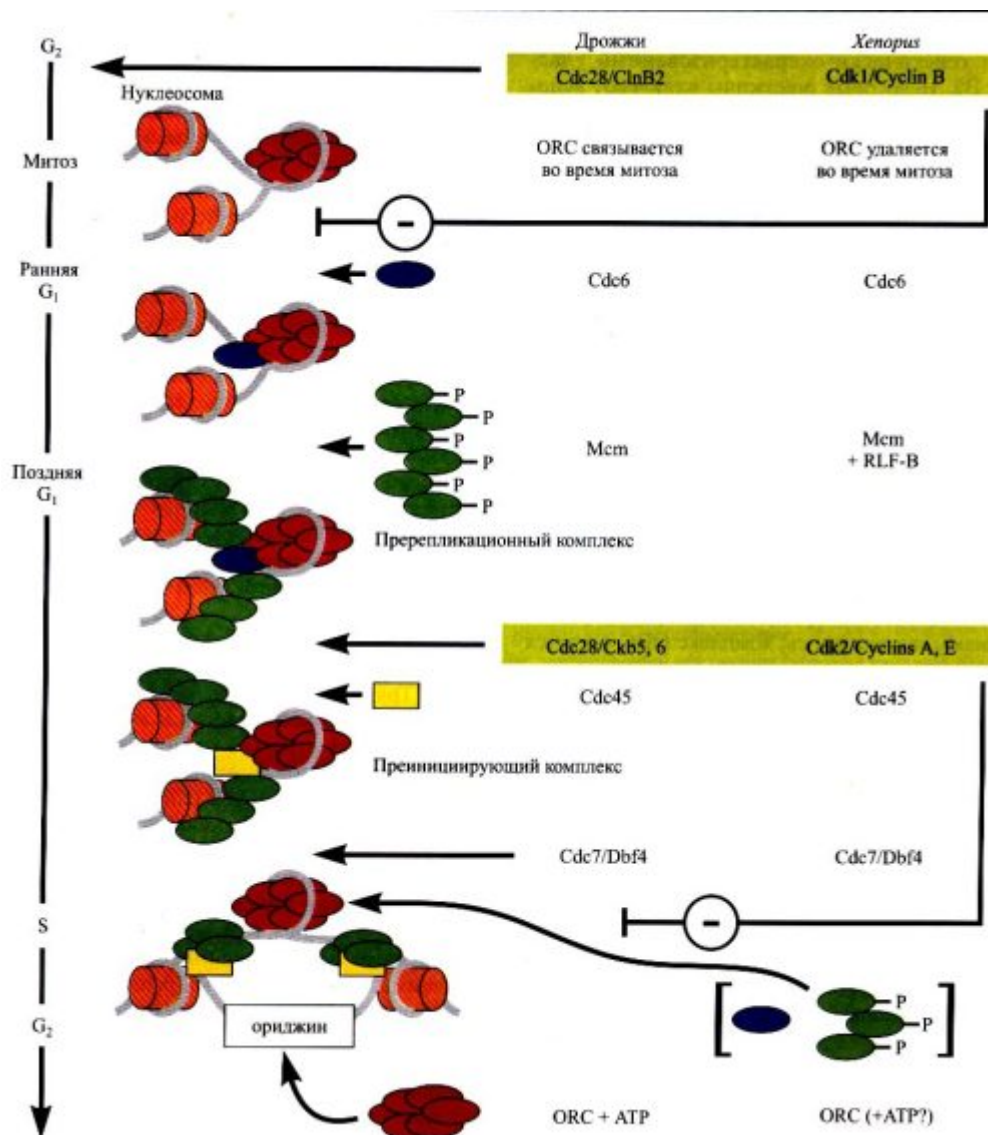


Рис. 7. Схема инициации репликации у эукариот

Белки Cdc6 и Mst 2–7 описаны у многих представителей эукариот, включая млекопитающих. Недавно было показано, что в клетках *S.pombe* и высших эукариот в ранней стадии формирования pre-RC участвует еще один белок – Cdt1 (cell division termination). Белки Mst 2–7 образуют гексамерный комплекс MCM – ключевой компонент pre-RC. MCM генерирует контрольный сигнал на нереплицированном хроматине для ингибирования преждевременного митоза в G1-фазе. Также он необходим для продвижения клетки по циклу в S-фазу. Присоединение MCM к ориджину репликации регулируется фосфорилированием-дефосфорилированием отдельных субъединиц этого комплекса. Например, частичное дефосфорилирование Mst4-субъединицы, гиперфосфорилированной в фазе M, способствует образованию pre-RC, а полное дефосфорилирование Mst3-субъединицы инактивирует комплекс и препятствует его связыванию с хроматином. В то же время, присоединение MCM к ориджину зависит от белков Cdc6 и Cdt1, которые совместно «насаживают» MCM на хроматин. В отсутствие Cdc6 клетки *S.cerevisiae* теряют способность инициировать репликацию ДНК и подвергаются «урезанному» митозу и нереплицированные хромосомы сегрегируют случайным образом к полюсам веретена.

Способность Cdc6 предотвращать «урезанный» митоз до завершения репликации ДНК обеспечивается его взаимодействием с Cdk. Активность Cdc6 в фазе G1 регулируется также его взаимодействием с АТР, так как мутации в консервативных последовательностях АТР-связывающего мотива Cdc6 приводили к потере способности хроматина присоединять МСМ в клетках *S.cerevisiae* и к подавлению репликации ДНК в клетках человека. У *S.cerevisiae* в присоединении МСМ к pre-RC принимает участие еще один белок – Mcm10, который ассоциирован с хроматином и взаимодействует с компонентами Mct2-7. Столь сложный контроль связывания МСМ с ориджином свидетельствует о том, что в клетке существует многоступенчатая система регуляторных механизмов, необходимая для недопущения повторного митоза при нереплицированном хроматине. Связывание МСМ с ориджинами репликации необходимо для обеспечения стабильности генома, именно оно переводит хроматин в состояние, за которым закрепилось название «разрешающего» репликацию (replication-licensing). У кеенопуса для связывания МСМ требуется наличие дополнительного фактора, носящего такое же название, RLF-B (replication licensing factor B). Белки МСМ обнаруживают аффинность к гистонам, а не к ДНК, в результате чего в конце G1-фазы весь пререпликативный комплекс прочно привязывается к хроматину непосредственно в участке ориджина репликации или рядом с ним.

В G1-фазе к частично сформированному pre-RC присоединяется киназа Cdc7 со своей регуляторной субъединицей Dbf4 (DNA binding factor 4), а в поздней G1-фазе или на границе фаз G1/S – белок Cdc45 и связывающий одностранный ДНК репликативный белок А (RPA, replication protein A). Взаимодействие между Cdc45 и Dbf4/Cdc7 в поздней G1-фазе требуется для последующего «включения» репликации в ориджинах после сборки pre-RC.

Киназа Dbf4/Cdc7 связывается с ori за некоторое время до того, как начинает выполнять свои функции. Присоединившись к pre-RC, киназа Dbf4/Cdc7 «ждет», когда активируются Cdk, и только после этого фосфорилирует свои субстраты. Роль «раннего» связывания этой киназы с ori пока остается неясной.

Связывание Cdc45 с хроматином зависит от белков Cdc6 и Mct2 и от активности киназы Dbf4/Cdc7 и циклинзависимых киназ S-фазы (Cdk-S-фазы – Cdc28/Ckb5,6 у дрожжей и Cdk2/Cyclins A,E у высших эукариот). Белок Cdc45 может быть фосфорилирован киназой Dbf4/Cdc7, но это происходит только после активации Cdk-S-фазы. Активность Cdk-S в свою очередь регулируется ингибитором Sic1, который в конце фазы G1 подвергается убиквитинзависимому протеолизу. Присоединение белка Cdc45 к pre-RC происходит в поздней G1-фазе клеточного цикла только на ориджинах тех репликонов, которые начинают синтез ДНК первыми при переходе к S-фазе. Cdk-S и Dbf4/Cdc7-зависимое связывание Cdc45 с остальными ориджинами осуществляется в определенное для каждого из них время на протяжении всей S-фазы. Вероятный механизм присоединения Cdc45 к pre-RC таков: Dbf4/Cdc7, связываясь со всеми ориджинами репликации в фазе G1, после воздействия Cdk-S фосфорилирует Mct2 в каждом ориджине в тот период фазы S, который определяется индивидуально для каждого ориджина. В результате фосфорилирования Mct2 конформация комплекса МСМ меняется таким образом, что он приобретает способность связывать Cdc45. В то же самое время к pre-RC присоединяется белок RPA. Подобно Cdc45 RPA связывается с ориджином Cdk-S зависимым образом при участии Mct2. Присоединение белков Cdc45 и RPA завершает сборку pre-RC. Сразу после завершения сборки pre-RC происходит частичная его диссоциация, сопровождающаяся началом формирования RC (replication complex). Белок Cdc6 первым диссоциирует из pre-RC при переходе из фазы G1 в S или даже ранее, подвергаясь фосфорилированию под действием Cdk, за которым следуют убиквитинирование и деградация. Этот путь инактивации Cdc6 показан как для низших эукариот, так и для некоторых представителей высших эукариот. В клетках человека уровень Cdc6 остается постоянным на протяжении всего клеточного цикла. Но при переходе в S-фазу Cdc6

транспортируется из ядра в цитоплазму. По всей видимости, и этот процесс регулируется Cdk. Удаление Cdc6 из ядра (путем гидролиза или транспортировки в цитоплазму) является одним из механизмов, предотвращающих множественные акты репликации в течение одного клеточного цикла.

Белок Cdt1 также инактивируется после завершения формирования *pre-RC*. При этом в клетках низших эукариот Cdt1 периодически экспрессируется, накапливаясь в ядрах в фазе G1, а в фазе G2 его уровень падает. У высших эукариот активность Cdt1 контролируется белком-ингибитором геминином, который отсутствует в клетках в фазе G1, накапливается на протяжении фаз S, G2 и частично – фазы M и исчезает в M-фазе на границе метафазы и анафазы.

В отличие от Cdc6 и Cdt1 белки Mct2-7, RPA и Cdc45, диссоциировав из *pre-RC*, остаются связанными с хроматином в S-фазе во время синтеза ДНК. Быстрое освобождение MCM из *pre-RC* в клетках дрожжей обеспечивается взаимодействием между Mcm10 и Mct7. Разъединению MCM и Mct10 способствует белок Cdc45.

Субъединицы Mct4,6,7 комплекса MCM обладают геликазной активностью, проявляющейся только при стимуляции под действием Cdk-S и киназы Dbf4/Cdc7. Белки Mct2-7 существенны не только для инициации, но и для элонгационной фазы репликации, для прогрессии репликативных вилок. MCM входит в состав RC и принимает участие в раскручивании двунитевой ДНК в репликативных вилках. В клетках человека связывание MCM с ориджином при формировании RC осуществляется с участием белка Mcm10, который накапливается и образует комплекс с хроматином в S-фазе, в отличие от Mcm10 *S.cerevisiae*. При переходе клеток из фазы G2 в M Mcm10 гиперфосфорилируется и диссоциирует из хроматина, а на границе фаз M/G1 он подвергается протеолизу по протеосомному механизму. Таким образом, фосфорилирование и протеолиз Mcm10 в клетках человека осуществляют отрицательную регуляцию активности MCM после завершения репликации ДНК. Кроме того, отрицательная регуляция активности MCM может быть результатом непосредственного фосфорилирования отдельных компонентов самого этого комплекса. Так, например, фосфорилирование Cdk специфических сайтов Mct4 в фазе M приводит к потере геликазной активности Mct4,6,7, а высокая концентрация комплекса Cdk-циклин E в ядрах эмбрионов *Xenopus* препятствует связыванию Mct3 с ДНК и таким образом предотвращает реассоциацию MCM с хроматином после завершения репликации. Комплекс MCM участвует не только в ранних этапах инициации репликации при переходе клеток в фазу G1, но и в завершении этого процесса в фазе S. Причем на завершающем этапе инициации репликации MCM выполняет две функции: раскручивает ДНК в ориджине и служит остовом, к которому присоединяются остальные компоненты при формировании RC. Поэтому множественные механизмы регуляции активности MCM вполне объяснимы. Если в фазе G1 эти механизмы направлены на осуществление продвижения клеток к фазе S без повторного митоза, то в фазах S и G2 они предотвращают повторную репликацию уже реплицированного хроматина.

RPA является белком, связывающим однонитевую ДНК и наличие его в RC при инициации репликации необходимо для стабилизирования расплетенного участка ДНК. RPA образован тремя субъединицами с молекулярными массами 70, 34 и 11 кДа, причем активностью, связывающей однонитевую ДНК, обладает субъединица 70 кДа, а субъединица 34 кДа является регуляторной. Последняя фосфорилируется Cdk, что, по-видимому, необходимо для активации репликации ДНК. Подробное описание этого комплекса будет дано далее.

Белок Cdc45 также участвует в формировании RC. Он необходим для присоединения ДНК-полимеразы α к ориджинам репликации. Показано, что белок Cdc45 человека связывается с белком Mct7 человека и субъединицей p70 ДНК-полимеразы α *in vitro*. Cdc45 присоединяет ДНК-полимеразу α к RC посредством связывания с Mct7. В клетках дрожжей *S.cerevisiae* Cdc45 присоединяет ДНК-полимеразу α к хроматину с участием Mct2.

Одним из компонентов комплекса, запускающего репликацию ДНК, является ДНК-полимераза α . Из всех многочисленных ДНК-полимераз эукариот именно она содержит праймазную активность, способную синтезировать короткую РНК «затравку» – праймер из рибонуклеозидтрифосфатов. РНК-праймер генерирует сигнал, который является одним из пусковых механизмов репликации. ДНК-полимераза α обнаружена у всех исследованных эукариот и хорошо изучена. Подробное описание этого фермента будет дано в следующем разделе. Показано, что один из путей регуляции инициации репликации связан с фосфорилированием двух больших субъединиц ДНК-полимеразы α под действием Cdk. При этом циклин E и Cdk стимулируют инициацию репликации при переходе клетки в S-фазу, а циклин A и Cdk ингибируют ее в фазе G2.

Очевидно, что активация упоминавшихся выше «ранне- и позднеактивных» ориджинов *S.cerevisiae* зависит от киназы Dbf4/Cdc7p. Вероятно, в каждом ориджине происходит локальная регуляция его активности дополнительными протеинкиназами, например Rad53. Киназа Rad53 блокирует запуск "позднеактивных" ориджин в ранней S-фазе. Когда это блокирование устраняется, киназа Dbf4/Cdc7p активирует МСМ, что приводит сразу к нескольким последствиям: стимуляции геликазной активности МСМ и связыванию белка RPA и ДНК-полимеразы α с ориджинами репликации. Присоединение ДНК-полимеразы α к РС, раскручивание ДНК в ориджине и синтез РНК-праймера завершают процесс инициации репликации ДНК эукариот. Следует отметить, что роль ДНК-полимеразы α ограничивается только запуском репликации ДНК. Эта ДНК-полимераза не способна к процессивному, то есть протяженному, синтезу ДНК и не обладает корректирующей активностью. Поэтому в дальнейшем в процессе репликации она добавляет к РНК-праймеру приблизительно 20 нуклеотидов и замещается ДНК-полимеразой δ или ϵ .

Post-RC, с образования которого начинается вся цепь событий процесса инициации репликации ДНК, в S-фазе клеточного цикла претерпевает изменения. Эти изменения касаются сродства ORC к ДНК. Так, например, белок Orc1 *Xenopus* образует прочный комплекс с хроматином в ранней интерфазе до тех пор, пока не завершится сборка pre-RC. Затем в S-фазе сродство Orc1 к ДНК уменьшается. У млекопитающих Orc1 диссоциирует из хроматина в S-фазе, превращается в моно- или диубиквитинированную форму, затем деубиквитируется и вновь связывается с ДНК при переходе из M- в G1-фазу. Белок Orc2, напротив,

остаётся связанным с хроматином на протяжении всего клеточного цикла и не является субстратом для убиквитинирования. В клетках человека в S-фазе из хроматина диссоциирует комплекс белков, содержащий Orc1 и Orc2, который реассоциирует в конце митоза. В клетках дрожжей *S.pombe* ORC подвергается посттрансляционным изменениям в клеточном цикле: в фазе S начинается фосфорилирование одной из его субъединиц, Orc2, которое достигает максимума в фазах G2 и M. Таким образом, в клетках эукариот один из механизмов, предотвращающих повторную репликацию уже реплицированного хроматина, связан с инактивацией post-RC либо путем диссоциации из него Orc1 (у высших эукариот), либо путем фосфорилирования Orc2 (у низших эукариот).

Таблица 2

Комплексы инициации транскрипции у эукариот

Вид комплекса	Белки	Функции
Пост-репликативный	ORC (Orc1-6)	Связывается с <i>ori</i> и образует платформу для сборки

(post-RC)		pre-RC
Пре-репликативный (pre-RC)	ORC Cdc6 Cdt1 MCM10 MCM (Mcm 2-7) Dbf4/Cdc7 Cdc45 RPA	Присоединяет Cdc6 Связывает MCM с ori Связывает MCM с ori Связывает MCM с ori; способствует диссоциации MCM из pre-RC; Генерирует контрольный сигнал, запрещающий повторный митоз; переводит хроматин в состояние, «разрешающее» репликацию, связывает Cdc45 с ori Участвует в связывании Cdc45 и RPA с ori; активирует геликазу MCM Высвобождает MCM из pre-RC Стабилизирует расплетенные однонитевые участки ДНК
Репликативный (RC)	Cdc45 MCM (Mcm 2-7) RPA pol α	Присоединяет pol α к RC Расплетает ДНК; участвует в присоединении pol α к RC Стабилизирует расплетенные однонитевые участки ДНК Синтезирует РНК-праймер; инициирует репликацию ДНК

Для облегчения понимания последовательности связывания различных белков в зоне инициации репликации см. таблицу 2.

В последние несколько лет значительные успехи достигнуты в понимании механизмов регуляции практически каждой стадии инициации репликации. Они осуществляются на уровне функционирования всех компонентов, образующих пост-, пре- и репликативный комплексы. Эти компоненты подвергаются воздействию не одного, а ряда различных факторов. Примером этому служит регуляция комплекса MCM, активность которого напрямую зависит от белков Cdc6, Mct10, Cdt1, циклин-зависимых киназ, киназы Dbf4/Cdc7, фосфатаз. До сих пор мало понятны закономерности процесса инициации репликации ДНК в эмбриогенезе и те факторы, которые влияют на эти процессы.

Глава 4. Механизм образования и необходимость РНК-праймера

4.1. Синтез праймера для полимеразной реакции

ДНК-полимеразы не могут начинать синтез ДНК непосредственно на матрице, а способны только добавлять новые дезоксирибонуклеотидные звенья к 3'-концу уже имеющейся полинуклеотидной цепи. Таковую заранее образованную цепь, к которой добавляются нуклеотиды, называют праймером (или затравкой), она состоит из РНК. Короткую РНК-затравку синтезирует из рибонуклеозидтрифосфатов фермент, называемый ДНК-прайماзой. Праймазная активность может принадлежать либо отдельному ферменту, либо одной из субъединиц ДНК-полимеразы. Праймаза связывается с геликазой и ДНК, формируя структуру, называемую праймосомой, и синтезирует РНК-праймер. РНК-праймеры удлиняются действием ДНК-полимеразы III у прокариот и ДНК-полимеразой α у эукариот. Схематически этот процесс на отстающей нити показан на рис. 8. У *E.coli* праймеры синтезирует специальный отдельный фермент – праймаза.

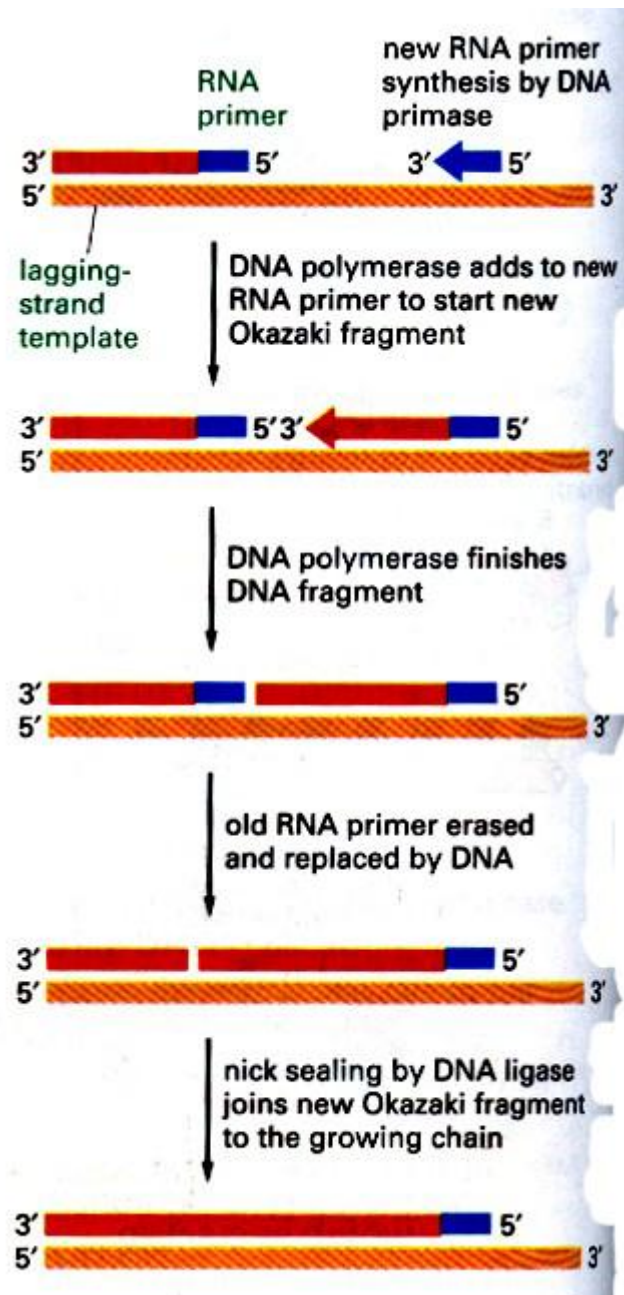


Рис. 8. РНК-праймеры на отстающей нити

4.2. Понятие об РНК-ДНК дуплексе

ДНК обычно присутствует в клетке в В-форме. Кроме этого, описаны еще две возможные формы состояния ДНК – А и Z. Эти формы представлены на рис. 9. Взаимодействие оснований в В-форме представлено на рис. 10.

У А-формы плоскости оснований составляют угол в 20 градусов с перпендикуляром к оси спирали (у В-формы – 0), расстояние между парами оснований уменьшается до 0.29 нм (у В-формы – 0.34 нм), число пар на виток увеличивается до 11–12 (у В-формы – 10).

Пары оснований в А-форме очень сильно отодвинуты от оси спирали к периферии молекулы – почти на половину радиуса; сдвиг достигает 4–5 Å, а в В-форме ДНК он близок к нулю.





А-ДНК

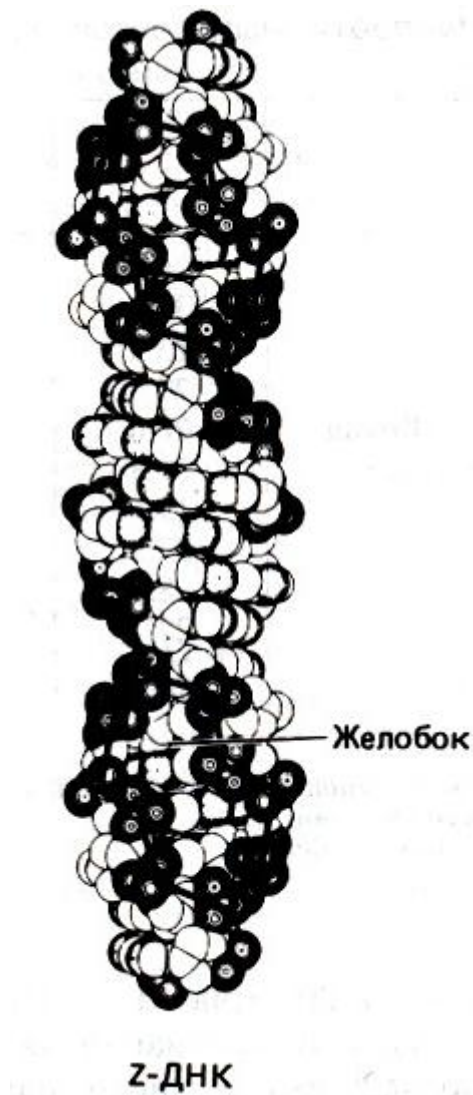


Рис. 9. Возможные формы ДНК

При образовании праймера (подробнее сам процесс его синтеза будет представлен при описании ДНК-полимеразы α эукариот) образуется ДНК-РНК дуплекс, который существует в А-форме. Таким

образом, в А-форме дуплекса обеспечивается оптимальный баланс между гидрофобными и комплементарными взаимодействиями оснований матрицы и праймера.

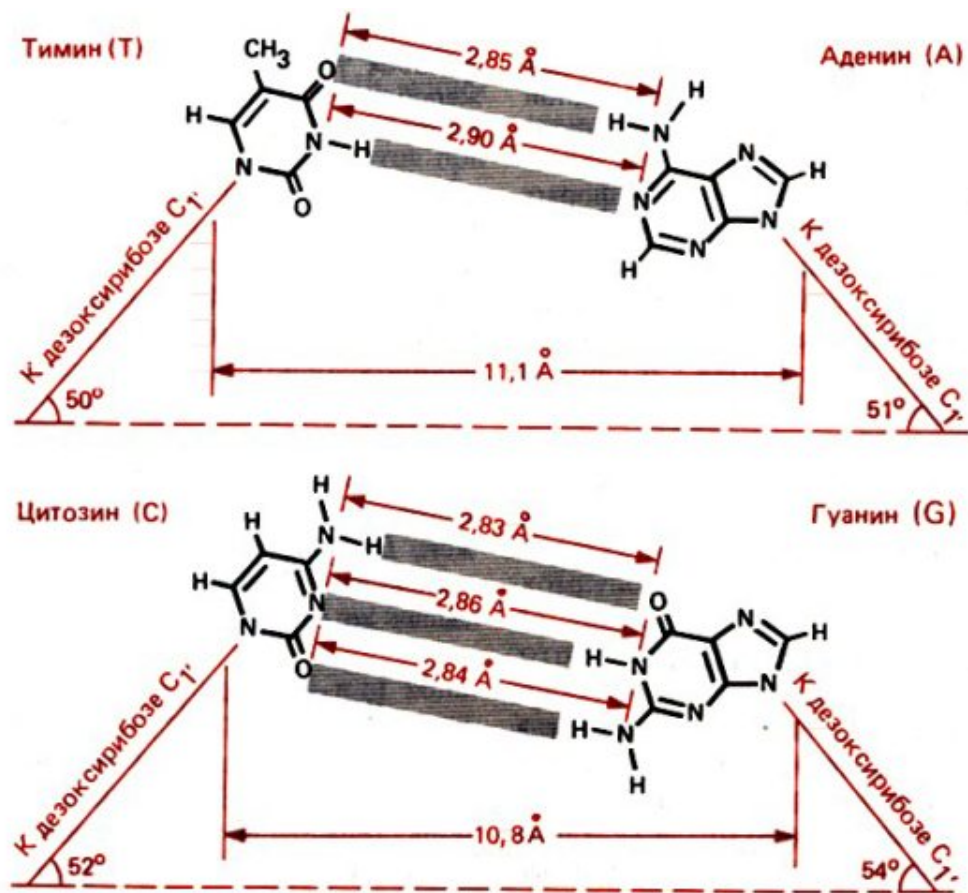


Рис. 10. Взаимное расположение нуклеотидов в ДНК в В-форме

4.3. Ключевые ферменты, участвующие в синтезе ДНК

Многие известные теперь детали процесса репликации ДНК удалось установить благодаря исследованию поведения и активности ферментов, обеспечивающих работу аппарата репликации. Наиболее полно изучен механизм репликации бактериальной ДНК, особенно ДНК *E. coli* и бактериофагов, которые в ней размножаются. Довольно хорошо известны и ферменты репликации дрожжей, *Drosophila*, млекопитающих.

4.3.1. ДНК-полимеразы

ДНК-полимеразы присутствуют во всех прокариотических и эукариотических клетках. Более того, многие вирусы бактерий и животных индуцируют образование вирус-специфических ДНК-полимераз или белков, способствующих эффективному участию ДНК-полимераз клеток-хозяев в репликации вирусной ДНК.

Многие прокариотические и эукариотические ДНК-полимеразы выделены в чистом виде, а их физические и ферментативные свойства детально охарактеризованы. И хотя эти свойства не совсем идентичны, механизм катализа для всех указанных ферментов в общих чертах одинаков.

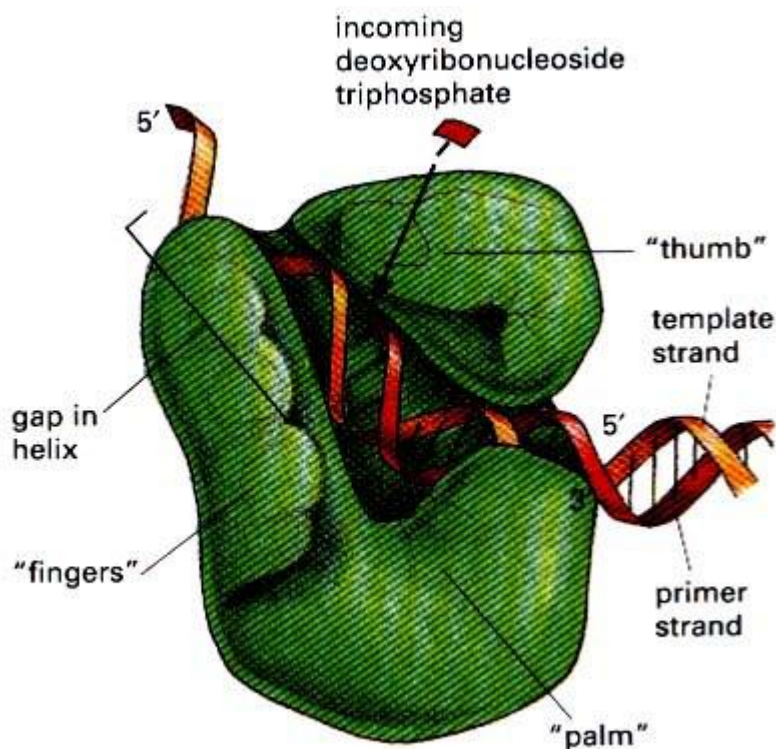


Рис. 11. Общий принцип строения ДНК-полимераз.

В первичной структуре ДНК-полимераз эукариот присутствуют консервативные мотивы, гомологичные соответствующим мотивам прокариотических ферментов. Это подтверждает, что все ДНК-синтезирующие ферменты имеют общий план строения. Общий принцип строения ДНК-полимераз показан на рис. 11. По форме ДНК-полимеразы можно уподобить полураскрытой кисти правой руки, в которой ладонь, большой палец и остальные пальцы представляют три основных пространственных домена и формируют полость,

удерживающую ДНК-матрицу и затравку в ходе синтеза. Консервативные мотивы А, В и С образуют активный центр в домене «ладони», «пальцы» удерживают одностороннюю матрицу, а «большой палец» прижимает праймер – матричный двуниевый участок.

Применительно к различным типам ДНК-полимераз эукариот эта модель может быть модифицирована. ДНК-полимеразы работают совместно с различными белковыми комплексами, удерживающими их в вилке репликации. Чаще всего их называют «зажим» и «загрузчик зажима» («sliding clamp», «clamp loader»).

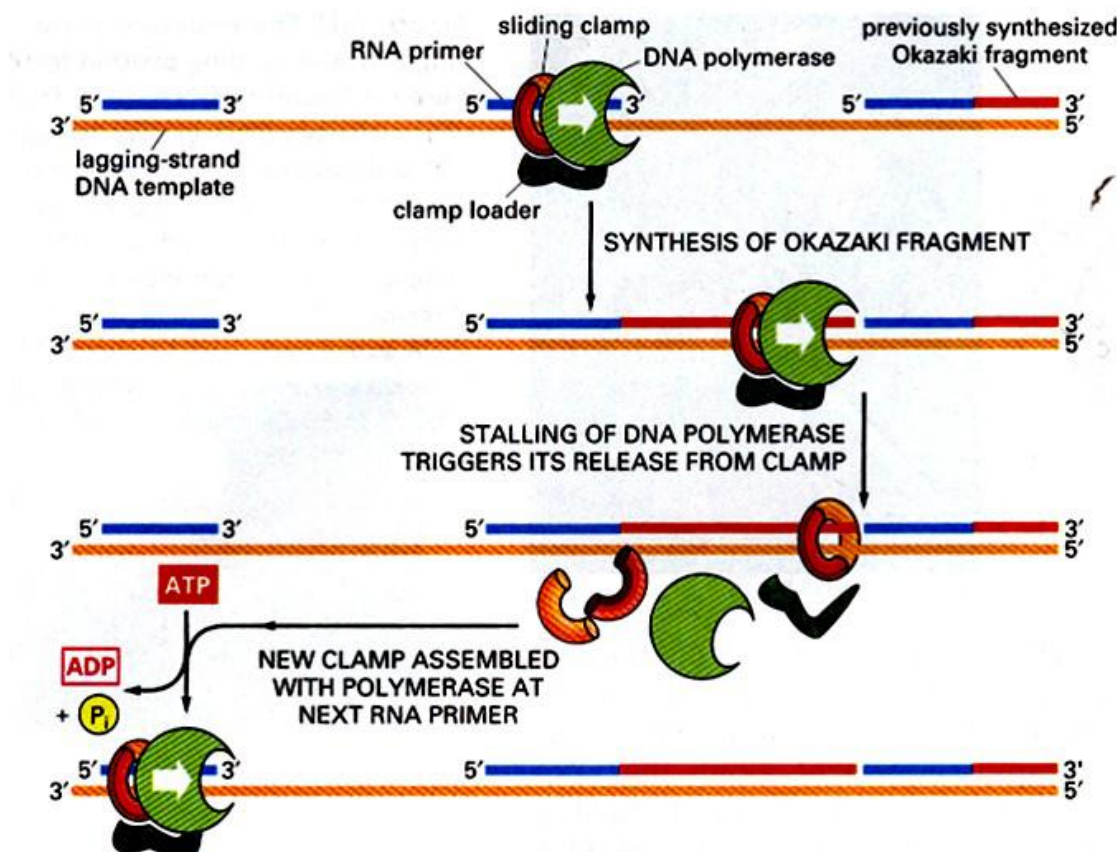


Рис. 12. Загрузка ДНК-полимеразы

После объединения ДНК-полимеразы с зажимом, «загрузчик зажима» отходит от места реакции, но держится поближе к отстающей нити, чтобы провести загрузку на новом месте объединения праймер-матрица, как только ДНК-полимераза диссоциирует при завершении синтеза предыдущего фрагмента Оказаки. Этот процесс схематически изображен на рис. 12. Подробно об этих комплексах у эукариот и их роли в репликации будет рассказано далее.

4.3.1.1. ДНК-полимеразы прокариот

Полимеразы прокариот обозначаются римскими цифрами (в отличие от полимераз эукариот, которые обозначаются греческими буквами). Наиболее полно изучена ДНК-полимераза I (Pol1) *E. coli*. Она представляет собой одиночный полипептид с мультифункциональными активностями. В качестве ДНК-полимеразы Pol1 катализирует перенос 5'-дезоксинуклеотидильных единиц дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов к 3'-ОН-группе в цепи ДНК или РНК, после чего происходит спаривание перенесенного основания с соответствующим основанием комплементарной цепи ДНК. Таким образом, для полимеризации ферменту

необходимы праймер в качестве акцептора дезоксинуклеотида и матрица, определяющая присоединение нужного нуклеотида. Помимо полимеризации нуклеотидов, PolI катализирует две другие реакции, биологическая роль которых очень важна. В одной из них происходит гидролиз фосфодиэфирных связей в одной цепи ДНК или на неспаренном конце дуплексной ДНК, причем за один акт удаляется один нуклеотид, начиная с 3'-конца цепи (3'-5'-экзонуклеаза). Вторая реакция также состоит в отщеплении нуклеотидов, но гидролиз начинается с 5'-конца двунитевой ДНК в направлении к 3'-концу (5'-3'-экзонуклеаза). Эти различные активности присущи разным сайтам полипептидной цепи PolI. Если *in vitro* обработать PolI трипсином, то полипептидная цепь расщепится на большой и малый фрагменты. Большой, С-концевой фрагмент («фрагмент Кленова») сохраняет ДНК-полимеразную и 3'-5'-экзонуклеазную активности; малый N-концевой фрагмент обладает только 5'-3'-экзонуклеазной активностью.

PolI и присущие ей экзонуклеазные активности играют очень большую роль в репликации и репарации хромосомной ДНК *E. coli*. 3'-5'-экзонуклеазная активность обеспечивает контроль за присоединением каждого нуклеотида и удаление ошибочных нуклеотидов вновь синтезированной цепи. Если эта активность подавлена в результате каких-то мутаций в гене, кодирующем PolI, то при репликации генома часто происходят мутации – замены оснований.

Способность ДНК-полимеразы удлинять 3'-конец нити, спаренной с матричной нитью, позволяет ей заполнять пробелы между сегментами отстающей нити. PolI удлиняет фрагменты Оказаки с 3'-концов и удаляет рибонуклеотиды праймера, с которых начинаются 5'-концы соседних фрагментов, что является необходимой предпосылкой для формирования непрерывной отстающей цепи. Поскольку PolI способна удлинять 3'-конец одной из цепей в месте разрыва в двунитевой ДНК и удалять нуклеотиды с 5'-конца того же разрыва (процесс, называемый ник-трансляцией), этот фермент играет ключевую роль в репарации поврежденной ДНК. Ник-трансляция широко используется *in vitro* для синтеза радиоактивно меченой ДНК.

У *E. coli* имеются и две другие ДНК-полимеразы, но они присутствуют в клетке в меньших количествах. PolIII присоединяет нуклеотиды значительно менее эффективно, чем PolI, и не обладает 5'-3'-экзонуклеазной активностью. Следовательно, PolIII может заполнять пробелы между фрагментами ДНК, спаренными с матричной цепью, но не способна отщеплять РНК-нуклеотиды от фрагментов Оказаки или осуществлять ник-трансляцию. Роль PolIII в репликации и сохранении хромосомной ДНК *E. coli* до настоящего момента неясна. Вероятно, она может участвовать в восстановлении синтеза ДНК после повреждения и остановки вилки репликации. Такой процесс принято называть ресинтезом.

PolIII-холофермент – это ключевой фермент, ответственный за репликацию хромосомной ДНК *E. coli*. В каждой клетке содержится только 10–20 копий PolIII – холофермента, но именно он является основным компонентом мультиферментного полимеразного комплекса, инициирующего формирование репликативных вилок в точках начала репликации, участвующего в элонгации лидирующей цепи в вилке и удлиняющего РНК-праймеры с образованием фрагментов Оказаки. Так как PolIII – холофермент не обладает 5'-3'-экзонуклеазной активностью, для репликации отстающей цепи необходимо участие PolI, чтобы произошло удлинение продукта, образовавшегося при участии PolIII, и удаление РНК-праймеров на 5'-конце фрагментов Оказаки.

Методом направленного мутационного анализа обнаружены изменения в полипептидной цепи основного (кор) фермента PolIII, и изучены аминокислотные замены, которые позволяют приписать определенные виды ферментативной активности конкретным субъединицам ферментного комплекса. Так, α -субъединица обладает полимеразной активностью, а ϵ -субъединица – 3' 5'-экзонуклеазной. Однако комплекс α - и ϵ -субъединиц обладает значи-

тельно более высокой полимеразной и экзонуклеазной активностями, чем каждая из соответствующих субъединиц в отдельности. Функция третьей, θ -субъединицы пока неясна.

Помимо субъединиц, составляющих PolIII – кор, PolIII-холофермент содержит еще семь субъединиц: $\tau, \gamma, \beta, \delta, \delta', \chi$ и ψ . Перечисленные полипептиды также существуют во множестве копий, так что в результате мол. масса полимеразного комплекса составляет примерно 10^3 кДа. Роль β -субъединицы заключается в том, чтобы свести к минимуму вероятность отделения фермента от матрицы до завершения процесса копирования, то есть работает как «зажим». Субъединица τ является фактором димеризации репликативных холоферментов. Точная же функция других субъединиц неизвестна. Вполне возможно, что PolIII-холофермент существует в двух формах, каждая из которых содержит определенный набор вспомогательных субъединиц, придающих ферменту определенные свойства. В одной форме фермент катализирует синтез непрерывной ведущей цепи, а в другой – прерывистой отстающей.

PolIII-холофермент катализирует же реакции синтеза, что и PolII, но работает примерно в 60 раз быстрее. Более того, PolIII-холофермент обладает повышенным сродством к матрице и обеспечивает более высокую эффективность копирования. PolIII-холофермент может связываться и с другими белками, увеличивая эффективность процесса копирования благодаря координации некоторых важных ферментативных этапов репликации. На этом более высоком уровне организации в комплексы могут включаться белки, расплетающие спираль ДНК в точках начала репликации и в репликативных вилках (геликазы), иницирующие образование праймерных РНК (праймазы), обеспечивающие последовательное наращивание цепей ДНК, терминирующие процесс репликации и разделяющие дочерние спирали ДНК.

ДНК-полимеразы, синтезируемые другими бактериями и многими бактериофагами, различаются по своим физической структуре и свойствам. Тем не менее, катализируемые ими реакции практически идентичны реакциям, изученным у *E. coli*. У всех ДНК-полимераз есть корректирующая 3'-5'-экзонуклеаза, однако 5'-3'-экзонуклеаза у большинства ферментов отсутствует. Например, ДНК-полимераза фага Т4 может осуществлять 3'-5'-экзонуклеазную реакцию и корректировать ошибки репликации, но не способна катализировать 5'-3'-экзонуклеазную реакцию и поэтому не может обеспечить ник-трансляцию. При репликации ДНК фага Т4 5'-3'-экзонуклеазную реакцию удаления РНК-праймеров перед объединением фрагментов Оказаки катализирует другой кодируемый фагом белок. В процессе прерывистого синтеза отстающих нитей и репарации повреждений ДНК фага Т4 этот фермент работает согласованно с фаговой ДНК-полимеразой. Некоторые вирусы животных (например, герпесвирус, вирус коровьей оспы и вирус гепатита) индуцируют синтез особых полимераз для репликации своих геномов.

Другие вирусы образуют белки, которые стимулируют системы репликации клеточной ДНК или участвуют в репликации вирусной ДНК. Например, паповавирусы синтезируют белки, необходимые для инициации репликации. Аденовирусы человека кодируют белки, «запускающие» инициацию синтеза обеих цепей линейной вирусной ДНК. Они продуцируют также особые ДНК-связывающие белки, облегчающие репликацию.

4.3.1.2. ДНК-полимеразы эукариот

В эукариотических клетках идентифицировано множество ДНК-полимераз, но их физические и функциональные свойства изучены менее детально, чем у соответствующих ферментов прокариот.

Таблица 3

ДНК-полимеразы эукариот

ДНК-полимераза	Дополнительная активность	Субъединицы (кДа)	Локализация, функция
α (альфа)	ДНК-праймаза Точность $10^2 - 10^4$	165-180 70 48-50, 55-60	Ядро, репликация (инициация в районе ori и фрагментов Оказаки)
β (бэта)	dRp-лиаза, 10^3	38-40	Ядро, репарация
γ (гамма)	$3' \rightarrow 5'$ экзонуклеаза, dRp-лиаза, 10^4	125-140 35-50	Митохондрии, репликация и репарация
δ (дельта)	$3' \rightarrow 5'$ экзонуклеаза, 10^5	125-130 48-55 (дрожжи: 125, 55, 54, 42, 22)	Ядро, репликация (элонгация лидирующей нити. PCNA-зависимая репарация)
ϵ (эпсилон)	$3' \rightarrow 5'$ экзонуклеаза, 10^5	261, 55 (дрожжи: 256, 870, 34, 31, 29)	Ядро, репликация (элонгация запаздывающей нити). PCNA-зависимая репарация

Точная пространственная структура, определенная с помощью рентгеноструктурного анализа, известна лишь для одной ДНК-полимеразы эукариот – полимеразы β -типа, которая заметно отличается по строению от других эукариотических ДНК-полимераз. Сводные данные об основных полимеразах эукариот приведены в таблице 3.

4.3.1.3. ДНК-полимераза α – праймаза

В клетках эукариот синтез ДНК происходит, в основном, в специфических плотных структурах ("репликативных фабриках"), присоединенных к диффузному ядерному матриксу. Предполагается, что в молекулярной организации ядерного матрикса играют некоторую роль фосфолипиды и что ДНК связана с ядерным скелетом гидрофобными взаимодействиями. "Репликативные фабрики" или 21S репликативные комплексы, включают в себя группу ферментов, состоящую не менее чем из 30 белков с молекулярной массой от 15 до 300 кДа, и содержат помимо ДНК-полимеразы α – праймазы еще и $3'$ - $5'$ -экзонуклеазу, ДНК-лигазу I, РНКазу H, ДНК-топоизомеразу I, ДНК-геликазу, PCNA и ряд других факторов. Также этот комплекс содержит RPA, специфически взаимодействующий с субъединицей p48 комплекса полимеразы-праймазы. Значительный запас ДНК-полимеразы α накапливается в яйцеклетках иглокожих, амфибий, костистых рыб и дрозофилы для обеспечения интенсивной репликации ядерной ДНК в ходе раннего развития.

Как правило, ДНК-полимеразы α не обладают корректорской $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активностью. Однако в каталитической субъединице 182 кДа ДНК-полимеразы α дрозофилы обнаружена $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеаза, проявляющая активность только при диссоциации субъединицы 73 кДа.

Мультибелковая форма ДНК-полимеразы α содержит также белок, который связывает динуклеотид диаденозинтетрафосфат (Ar_4A). Предполагается, что Ar_4A участвует в

репликации ДНК и клеточном делении. Имеются данные о способности ДНК-полимеразы α использовать Ар₄А в качестве праймера. Однако участие Ар₄А в качестве праймера *in vivo* маловероятно, скорее он используется как эффектор. Интересно, что триптофанил-тРНК-синтетаза, синтезирующая этот динуклеотид, находится в том же мультибелковом комплексе.

Обычно комплекс праймаза-полимераза α состоит из четырех субъединиц: большой субъединицы с молекулярной массой 180 кДа, или семейства полипептидов с размерами от 140 до 160 кДа; субъединицы с молекулярной массой около 68–70 кДа и двух малых субъединиц с молекулярными массами 54–58 и 46–50 кДа. Субъединица р180 отвечает за полимеразную функцию. С двумя малыми субъединицами связана праймазная активность. При этом субъединица 48 кДа является каталитической и непосредственно осуществляет праймирование ДНК, а субъединица 58 кДа участвует в связывании иницирующего пуринового нуклеотида и присоединении субъединицы р48 к ДНК-полимеразе α . Она также влияет на скорость полимеризации и стабильность продукта, синтезируемого субъединицей 48 кДа. р58 также облегчает проникновение р48 из цитоплазмы в ядро. Субъединица р180 непосредственно взаимодействует с р58.

С каталитической субъединицей связана субъединица 68–70 кДа, которая необходима для транспорта каталитического полипептида в клеточное ядро. Субъединица 68–70 кДа участвует также в регуляции уровня ДНК-полимеразы α в клетке, она стимулирует синтез каталитического полипептида. Хотя комплекс ДНК-полимераза α -праймаза состоит из четырех субъединиц, количественный состав этого комплекса может быть различным. Вероятно, полимеразы α и праймазы находятся в «коре» в соотношении 1: 3.

4.3.1.4. Реакция праймирования

Инициация репликации и прерывистый синтез ДНК на отстающей цепи происходит по РНК-праймерному механизму и является универсальным свойством репликации ДНК у про- и эукариот.

ДНК-праймаза отличается от других РНК-полимераз целым рядом присущих только ей свойств. Во-первых, матричной и субстратной специфичностью. Во-вторых, необычной процессивностью – синтезом мультимеров, кратных 10-нуклеотидным звеньям. В-третьих, низкой точностью и устойчивостью к некоторым ингибиторам РНК- и ДНК-полимераз. Здесь необходимо вернуться к проблеме синтеза РНК-праймеров. Синтез РНК-праймеров на природных матрицах начинается во множественных, но не случайных участках, его инициация происходит с АТР или ГТР даже при высоких концентрациях СТР и УТР. Показано, что, например, ДНК вируса SV40 содержат предпочтительные участки инициации – 3'-dCTTT или 3'-dCCC, расположенные внутри участков из 7-25 пиримидиновых нуклеотидов. Высокое соотношение АТР/ГТР повышает вероятность инициации в участках 3'-dCTTT, а низкое – в участках 3'-dCCC. Таким образом, концентрация НТР и нуклеотидная последовательность матрицы определяют участки инициации. Впрочем, участки инициации *in vivo* заметно отличаются от участков инициации, используемых во время репликации ДНК SV40. Во многих случаях обнаружена последовательность 5'-YYYYYYCTTTYYYY-3', где Y = С или Т, которая является стартовой площадкой для инициации синтеза ДНК-праймазой в составе комплекса с ДНК-полимеразой α . Минимальная длина пиримидинового кластера должна быть не менее 7 н. Замена одного из пиримидинов на 3'-конце кластера значительно понижает частоту инициации, а замены внутри и вне кластера приводят к смещению точки старта. Известно, что матрицу распознает сама ДНК-праймаза. Стартовый нуклеотид вновь синтезированного праймера всегда является пурином (чаще всего – аденином).

Этот комплекс имеет еще одну специфическую функцию – синтез теломерной отстающей цепи ДНК млекопитающих осуществляет ДНК-полимераза α -праймаза.

ДНК-праймаза – сравнительно медленный фермент. Средняя скорость включения NTP этим ферментом примерно на два порядка меньше, чем скорость включения dNTP ДНК-полимеразой α . ДНК-полимераза α способна удлинять праймеры длиной более 7-10 н. Продукты длиной 2–6 н. не являются субстратами ДНК-полимеразы α и называются абортными. До синтеза РНК-праймера ДНК-полимераза α и ДНК-праймаза действуют независимо, а после этого их активности координируются. Синтезированный РНК-праймер перемещается в полимеразный активный центр без диссоциации в раствор. Это внутримолекулярное перемещение праймера в дуплексе с матрицей является быстрым и сравнимо по скорости с синтезом праймера. После того как ДНК-полимераза α удлинит праймер, праймаза начинает синтез нового праймера, и цикл повторяется. ДНК-праймаза эукариот отличается от других РНК-полимераз своей способностью к включению дезоксирибонуклеотида в праймер, таким же свойством обладает и праймаза прокариот. Одним из возможных объяснений необходимости включения dNTP в 3'-конец праймера является необходимость перехода от А-формы к В-форме ДНК. Поэтому понимание механизма "переключения" комплекса ДНК-полимеразы α -праймазы от синтеза РНК к ДНК имеет очень большое значение. Способность праймазы узнавать одновременно и рибо-, и дезоксириботрифосфаты представляет серьезный научный интерес.

Выбор РНК-праймера определяется гидрофобным характером белково-нуклеиновых взаимодействий. В случае гибрида РНК-ДНК дуплекс находится в А-форме, в которой обеспечивается оптимальный баланс между гидрофобными и комплементарными взаимодействиями оснований матрицы и праймера.

После инициации рост праймера сопровождается извлечением оснований матрицы из гидрофобной полости белка для спаривания с основаниями растущей цепи РНК. В условиях такой конкуренции короткие ди- и тринуклеотиды легко диссоциируют, образуя абортные продукты. С ростом длины праймера прочность дуплекса увеличивается, ослабевает влияние гидрофобности активного центра, и пары оснований приближаются к оси спирали. При длине праймера 7 н создаются условия для включения дезоксинуклеотида и перехода в энергетически более выгодную В-форму. Здесь нужно учитывать и большее сродство к ферменту dNTP по сравнению с NTP. Предложенная концепция, по-видимому, носит универсальный характер, поскольку подобное происходит и при инициации транскрипции.

ДНК-полимераза α связывает сначала матрицу, затем праймер и субстрат. ДНК-полимераза α наиболее активна на двунитевой ДНК, содержащей брешу длиной не менее 20–30 н. Область связывания матрицы с ДНК-полимеразой α является достаточно протяженной. Она строго защищает от гидролиза 9 н праймерной цепи, 13 н двухцепочечного участка и 14 н одноцепочечной матрицы и слабо защищает несколько оснований вне этого района. Фермент связывается с 19–20 н матрицы посредством ионных и гидрофобных взаимодействий, эффективность связывания при этом коррелирует с гидрофобностью оснований матрицы.

Отличительной особенностью ДНК-полимеразы α является ее способность удлинять РНК-праймеры и прочная ассоциация с ДНК-прайماзой, которая синтезирует эти праймеры.

Средняя процессивность ДНК-полимеразы α составляет 20–50 н. Праймаза редко ошибается в момент синтеза динуклеотида, но затем легко использует неправильные NTP. Хотя скорость включения ошибочных нуклеотидов зависит от нуклеотидной последовательности матрицы и самого неправильного нуклеотида, в принципе, ДНК-праймаза является самым неточным нуклеотид-полимеризующим ферментом. В некоторых случаях один неправильный нуклеотид приходится менее чем на 100 правильных. Встраивание неправильного нуклеотида не препятствует включению следующего правильного нуклеотида. Праймаза может полимеризовать сходные нуклеотиды и генерировать праймеры с множественными ошибками, которые не ингибируют дальнейший синтез и после внутримолекулярного переноса в ДНК-полимеразный активный центр удлиняются ДНК-полимеразой в присутствии dNTP.

Существуют две модели механизма синтеза праймеров, некомплементарных матрице. Согласно первой модели, фермент просто включает некомплементарные матрице нуклеотиды. Вторая модель предполагает включение нуклеотида, комплементарного матрице, с последующим скольжением праймера относительно матрицы. Низкая точность ДНК-праймазы послужила основой гипотезы о том, почему именно РНК является затравкой при репликации ДНК. Поскольку первые нуклеотиды могут ошибочно включаться в новую растущую цепь, предполагается, что РНК-праймер отмечает "высокоошибочный" участок для последующего вырезания и более точной застройки. Эта точка зрения выглядит убедительной, но, вероятно, главная причина появления РНК-праймера связана все-таки с более эффективной инициацией синтеза ДНК при наличии А-формы РНК-ДНК дуплекса.

Конец ознакомительного фрагмента.

Текст предоставлен ООО «ЛитРес».

Прочитайте эту книгу целиком, [купив полную легальную версию](#) на ЛитРес.

Безопасно оплатить книгу можно банковской картой Visa, MasterCard, Maestro, со счета мобильного телефона, с платежного терминала, в салоне МТС или Связной, через PayPal, WebMoney, Яндекс.Деньги, QIWI Кошелек, бонусными картами или другим удобным Вам способом.