

ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России
Кафедра химии

Матричные биосинтезы. Репликация ДНК

Д.б.н. Сгибнев А.В.

Молекулярная биология – это комплексная наука, изучающая свойства и проявления жизни на молекулярном уровне

Термин молекулярная биология был введен Уильямом Астбери в 1938 году, а использован Френсисом Криком в 1953 году для объяснения, чем он занимается. Ему надоело в ответ на вопрос о его профессии объявлять себя смесью кристаллографа, биохимика, биофизика и генетика

Матричные биосинтезы – это синтезы с использованием матрицы, с помощью которой осуществляется образование информационных молекул ДНК (в роли матрицы выступают обе материнские цепи ДНК), РНК (в роли матрицы выступает одна из цепей ДНК) и белка.

Что такое «реализация генетической информации»?

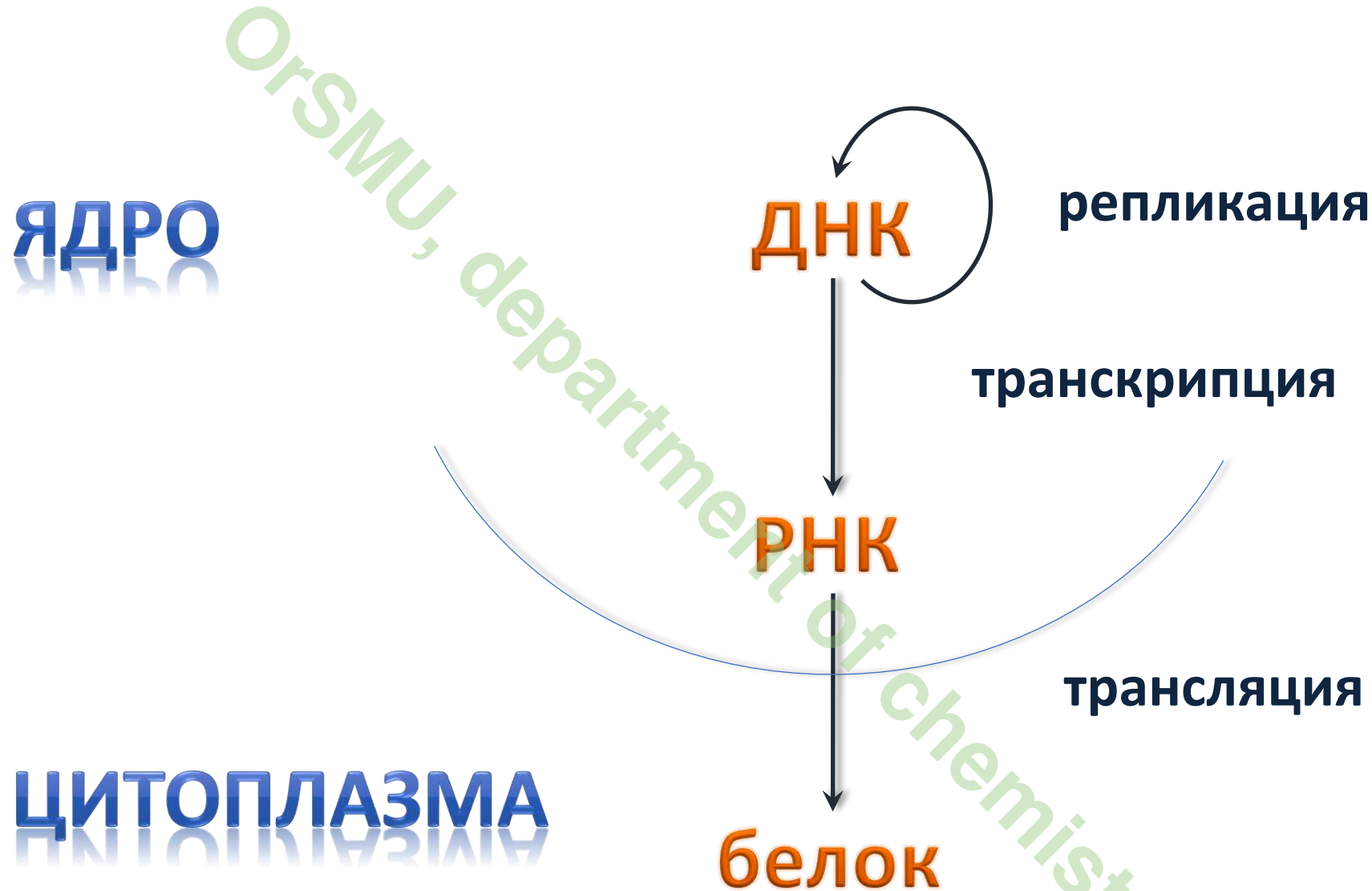
Это перенос смысла, записанного в последовательности нуклеотидов в ДНК, в последовательность аминокислот в белке.

Реализация наследственной информации осуществляется посредством транскрипции и трансляции

Схема переноса наследственной информации от ДНК на белок составляет суть **«ЦЕНТРАЛЬНОЙ ДОГМЫ молекулярной биологии»**

Информация передаётся от нуклеиновых кислот к белку, но не в обратном направлении!

Центральная догма молекулярной биологии



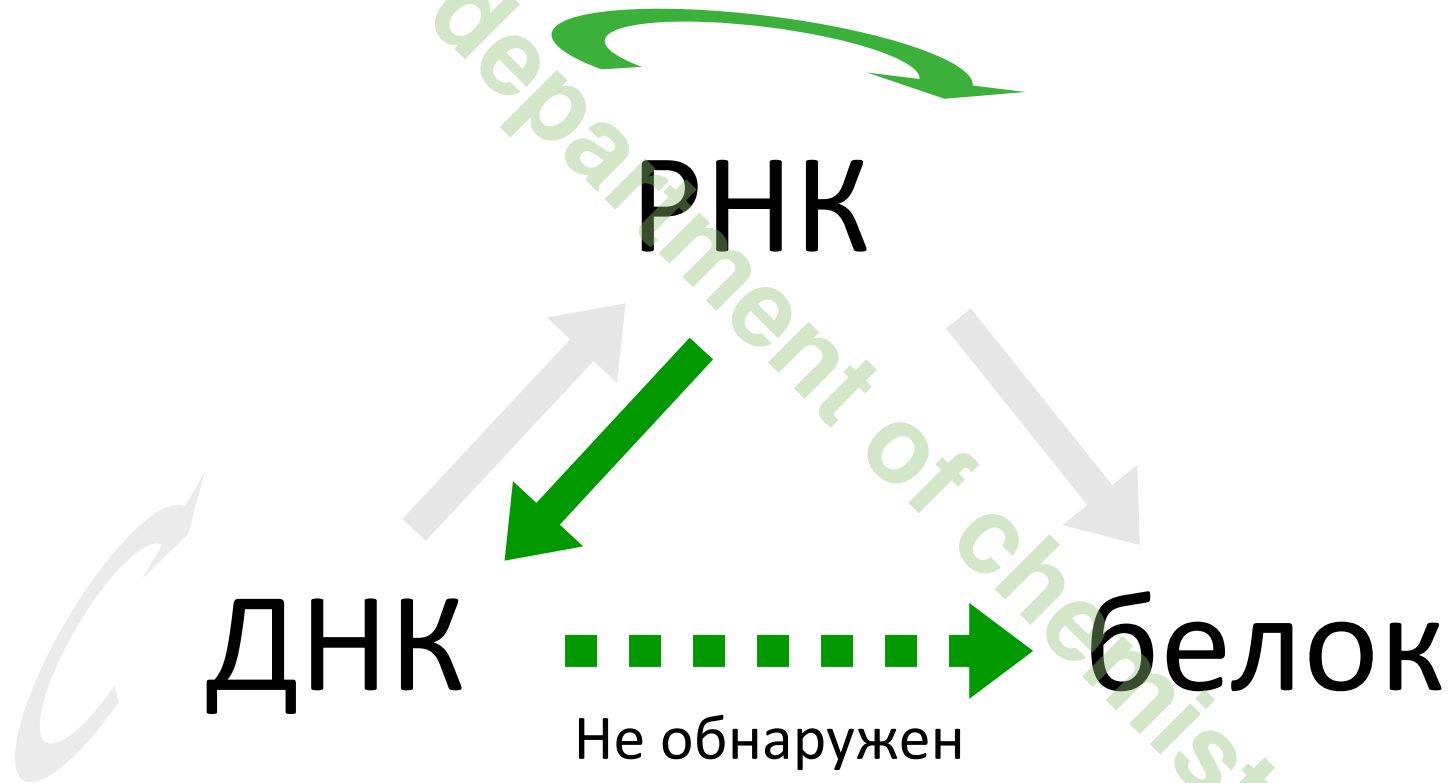
«Центральная догма» в ее общепринятой форме описывает матричные процессы: репликацию, транскрипцию и трансляцию

Центральная догма молекулярной биологии

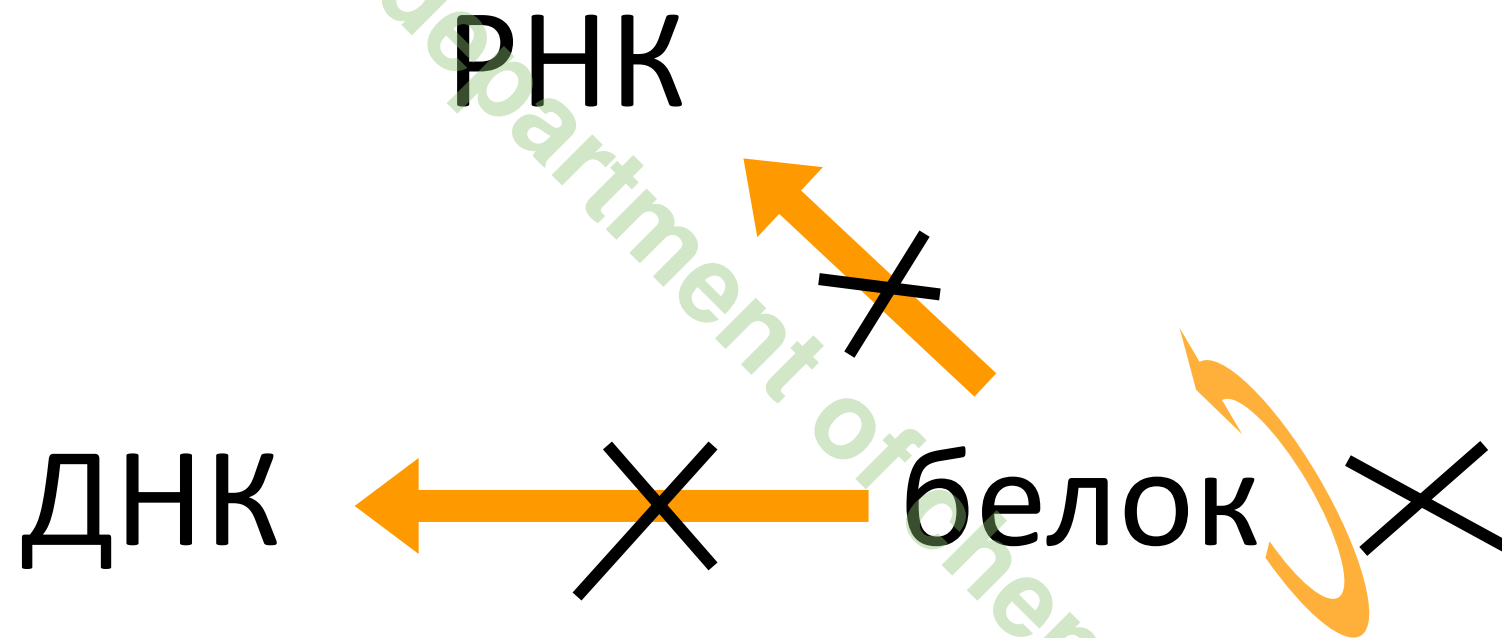


Другие организмы тоже получили от них этот фермент и используют в некоторых случаях

Матричные синтезы, разрешенные по центральной догме



«Запрещенные» матричные синтезы



Белки никогда не бывают матрицами



Современная интерпретация **ЦЕНТРАЛЬНОЙ**
ДОГМЫ молекулярной биологии

Открытия, интерпретируемые как исключения из ЦЕНТРАЛЬНОЙ ДОГМЫ молекулярной биологии

- Обратная транскрипция
- Действие рибозимов
- Редактирование РНК
- Сплайсинг
- Эпигенетические явления (Геномный импринтинг)
- РНК-интерференция
- Прионизация

УСПЕХИ ХИМИИ ДНК

Год	Открытие	Авторы
1869	Открыта нуклеиновая кислота. Показано, что нуклеиновая кислота находится в ядре и обладает кислотными свойствами.	Ф. Мишер
1879-1891	Выделены составные элементы нуклеиновой кислоты: пурины и пиримидины, фосфорная кислота, углеводный остаток. Было обнаружено четыре азотистых основания. <i>Нобелевская премия (1910 г.).</i>	А. Коссель
1924	Обнаружен краситель (фуксин), избирательно окрашивающий нуклеиновую кислоту.	Р. Фельген
1934	Получены химически чистые препараты ДНК тимуса теленка. Было показано, что ДНК — это полимер. Используя специфику поглощения ДНК УФ-светом, была показана связь ДНК с хромосомами.	Э. Хаммерштайн, Т. Касперсон
1938	Получена первая рентгенограмма ДНК. Показано, что азотистые основания расположены в определенном порядке — одно за другим.	У. Астбери
1948	Расшифрована структура нуклеотидов. <i>Нобелевская премия (1957 г.)</i>	А. Тодд

РАЗВИТИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ИЗУЧЕНИЯ ДНК

Год	Открытие	Авторы
1907	Изобретение оптических приборов и разработка методов спектроскопии. <i>Нобелевская премия (1907)</i>	А. Майкельсон
1912 1913	Разработка метода дифракции рентгеновских лучей. <i>Нобелевская премия.</i> Применение метода для выяснения структуры вещества. <i>Нобелевская премия.</i>	М. фон Лауэ У. Брегг, Г. Вульф
1922 1938	Разработан метод высокоскоростного центрифугирования (более 10 000 об/мин). <i>Нобелевская премия (1938 г.).</i> Этот метод впервые использован для разделения ядер и цитоплазмы.	Т. Сведберг Т. Беренс
1931- 1939	Создан электронный микроскоп. <i>Нобелевская премия (1986 г.).</i>	Э. Руска
1906- 1942	Изобретена хроматография. Изобретена разделительная хроматография. Метод введен в биохимические исследования. <i>Нобелевская премия (1952 г.).</i>	М.С. Цвет А. Мартин, Р. Синж
1933	Разработан метод электрофореза, который применен для разделения белков. <i>Нобелевская премия (1938 г.)</i>	А. Тизелиус
1943	Разработан метод радиоизотопного анализа биомолекул. <i>Нобелевская премия (1943 г.).</i>	Д. Хевеши

Идея матричного принципа

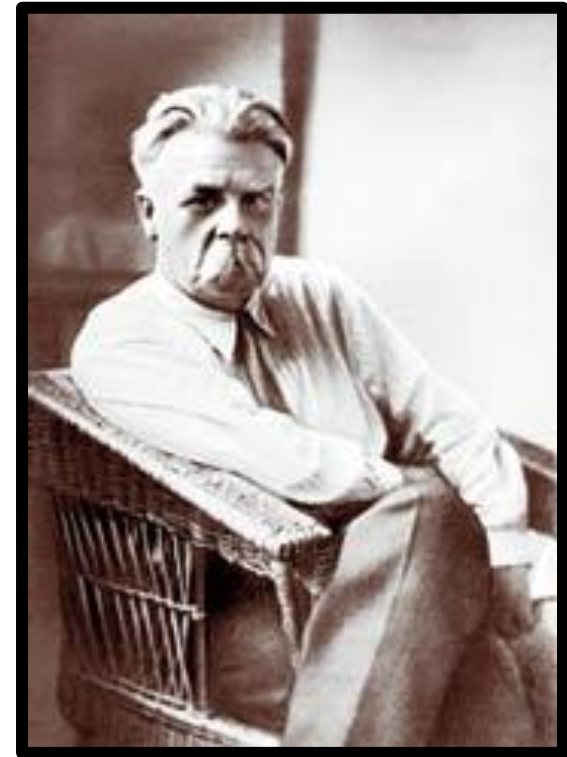
Кольцову принадлежит главная идея XX века в молекулярной биологии – идея матричного происхождения хромосом.

В 1927 г. Кольцов предположил, что наследственные «тексты» копируются с использованием матриц.

Матричное воспроизведение «текста» - еще одно озарение Кольцова.

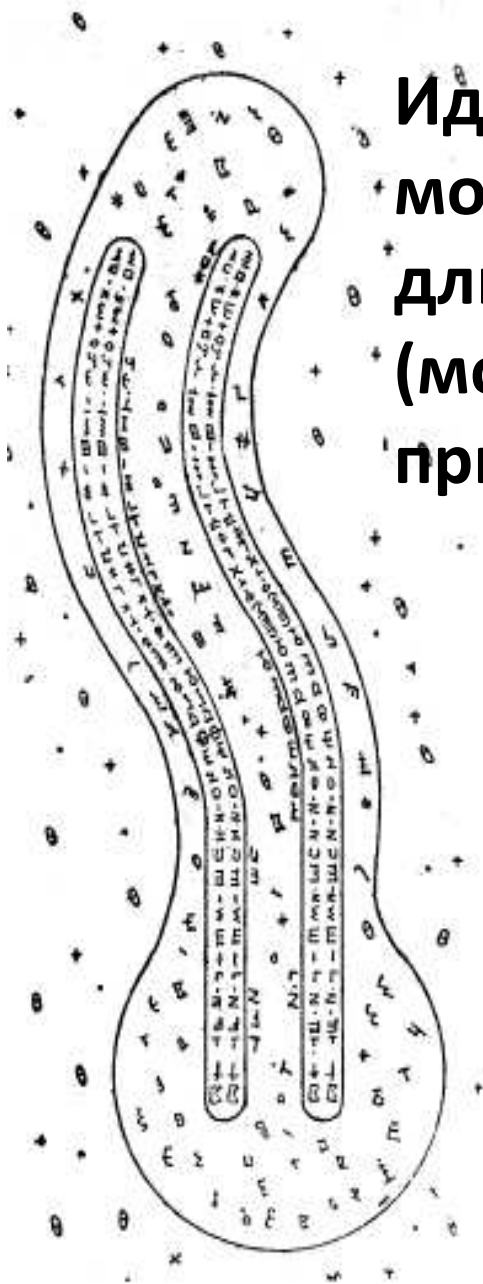
“...признаки, передаваемые по наследству, определяются линейным расположением мономеров в полимерных молекулах.”

(Кольцов думал, что это последовательность аминокислот в полипептидах). **По его мнению способность молекул каких-то белков к конвариантной редупликации лежит в основе наследственности.**



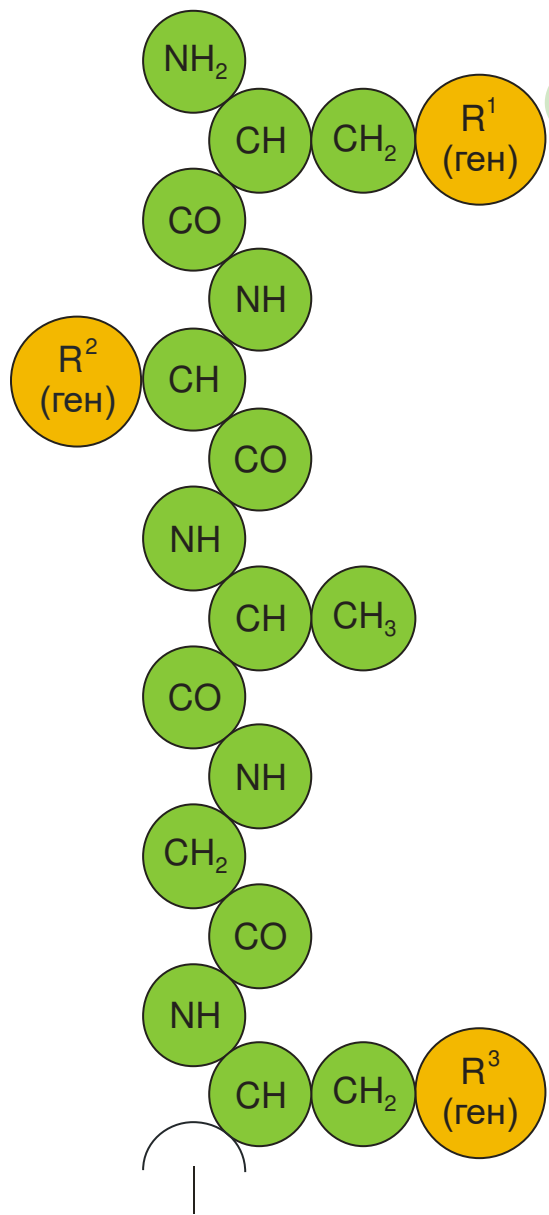
Николай Константинович
Кольцов
(1872-1940 г.)

В 1917 г. организовал и возглавил Институт экспериментальной биологии.



Идея Кольцова: наследственность передается молекулами, которых не так много, но эти молекулы – длинные полимерные нити, отдельные участки которых (мономеры) и определяют конкретные наследственные признаки.

Схема хромосомы перед делением клетки, по Н.К. Кольцову.
Видны четыре одинаковых (2+2) полимерных молекулы – генономы.



Генонома (от ген и греч. нема — нить), длинная белковая молекула-нить (или их пучок), которая, согласно модели, предложенной в 1928 советским биологом Н. К. Кольцовым, представляет основу хромосомы и является носителем генетической информации. Радикалы Г рассматривались как гены, а атомные изменения в белковой молекуле — как причины мутаций. Эта модель после открытия роли дезоксирибонуклеиновой кислоты устарела, но выдвинутое Кольцовым при её построении предположение о способности хромосомы к самокопированию было подтверждено дальнейшими исследованиями.

Модель белковой хромосомы, предложенная Н.К. Кольцовым (1927 г.)

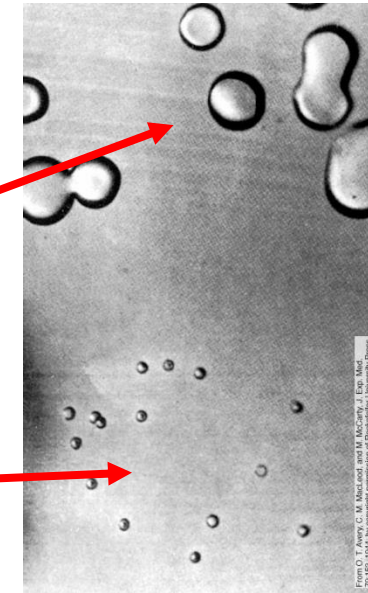
Доказательство генетической роли ДНК

OrSMU, department of chemistry

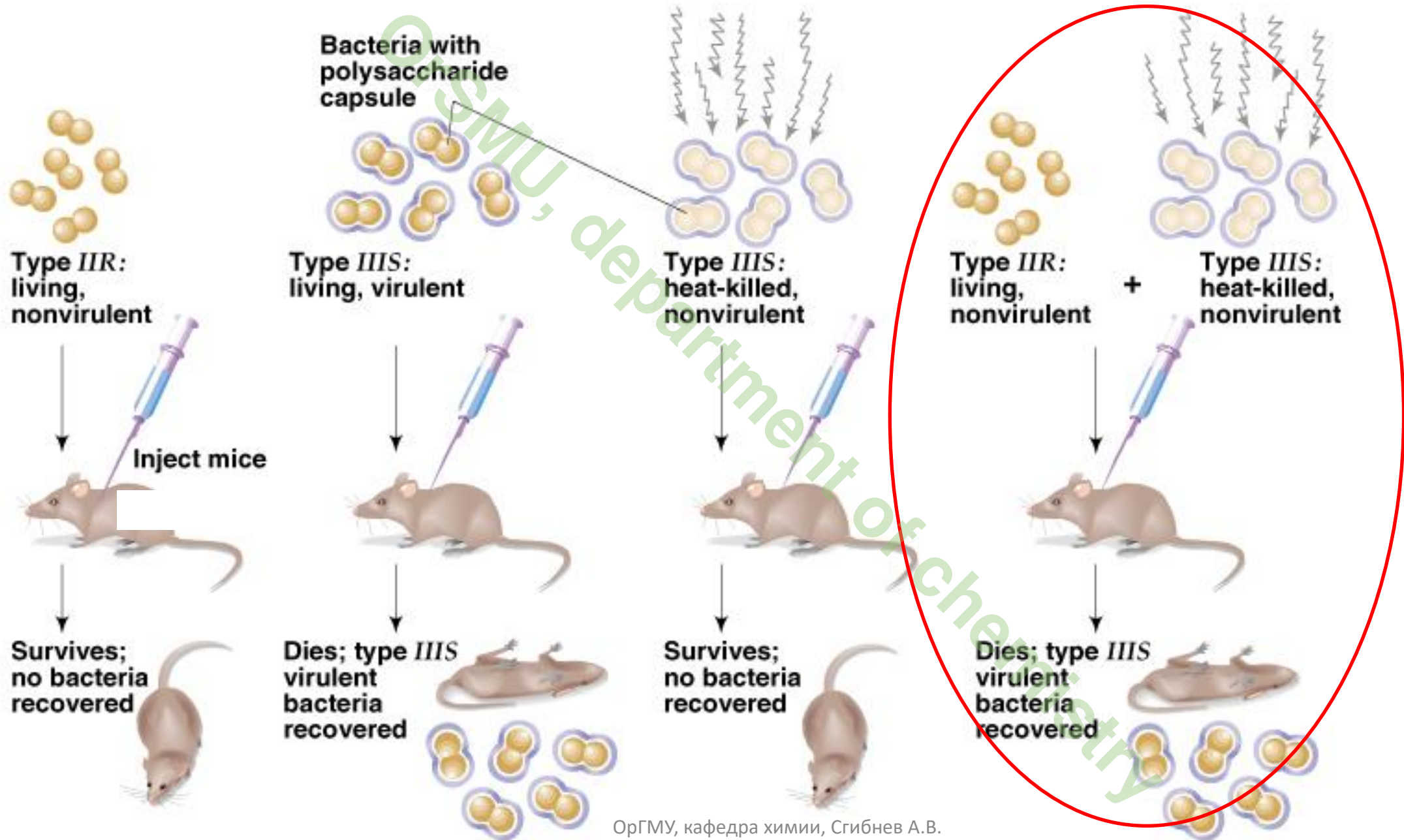
С чего все началось?

В 1928 г. Фредерик Гриффитс открыл явление трансформации у бактерий

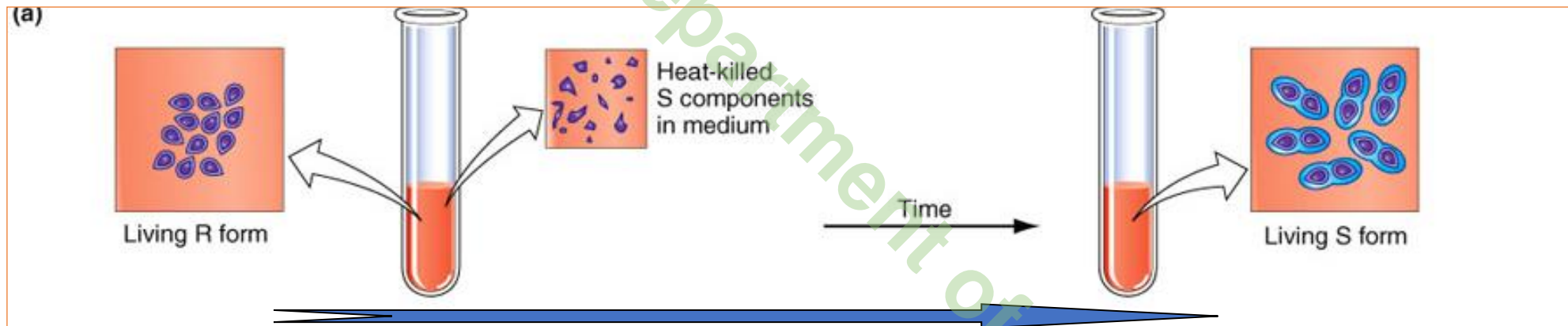
- Объект - *Streptococcus pneumoniae*, патогенные бактерии, вызывающие пневмонию.
- Использовал 2 штамма *Streptococcus*:
 - **S-штамм**, вирулентный (клетки окружены полисахаридной капсулой, являющейся фактором вирулентности);
 - **R-штамм**, неvirulentный (полисахаридная капсула отсутствует)
- Осуществляли инфицирование мышей указанными штаммами для того, чтобы понять различия между капсульным и бескапсульным вариантами.



Эксперимент Ф. Гриффитса



Ф. Гриффитс предположил, что убитые нагреванием вирулентные пневмококки S-типа, имеют некий фактор (он устойчив к температуре), который способен трансформировать неvirulentные клетки R-типа в вирулентные, при этом вирулентные клетки превращаются в слизистые, покрытые полисахаридной капсулой. **Ф. Гриффитс предположил, что трансформирующим фактором является белок.**



Ф. Гриффитс назвал превращение неvirulentных клеток пневмококков в вирулентные - **трансформацией.**

Через 16 лет

В 1944 г. **Освальд Эйвери, Колин МакЛеод и Маклин МакКарти** поставили перед собой цель - установить природу «трансформирующего» фактора, открытого в 1928 г. Ф. Гриффитсом.



О. Эйвери

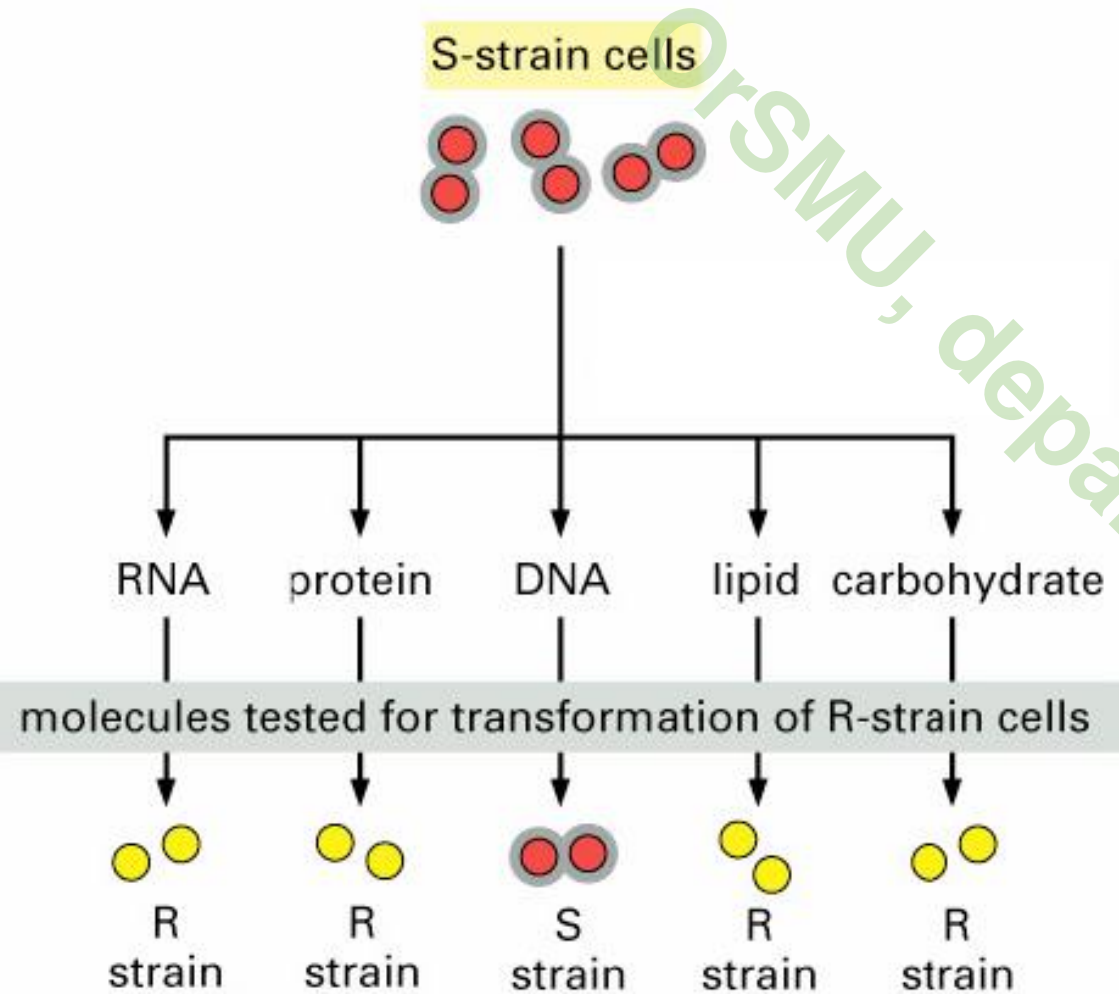


К. МакЛеод



М. МакКарти

Суть эксперимента Освальд Эйвери, Колин МакЛеод и Маклин МакКарти



Вместо убитых нагреванием целых клеток *Streptococcus pneumoniae* ученые **предварительно разрушили их и взяли экстракт этих клеток.**

Полученный экстракт поочередно подвергли действию гидролитических ферментов, которые специфически разрушают определенные классы макромолекул – **полисахариды, белки, липиды, РНК и ДНК.** И затем определяли, при деградации каких **макромолекул исчезает трансформирующая активность клеточного экстракта.**

Эйвери с сотр. поочередно обрабатывали клеточный экстракт **трипсином, химотрипсином, рибонуклеазой, липазой, гидролитическими ферментами для разрушения полисахаридов,** но эти обработки никак не влияли на трансформирующую активность экстракта.

Лишь обработка ДНК-азой приводила к исчезновению трансформирующего начала!

Таким образом было установлено, что действующим началом бактериальной трансформации является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)

- **Химический анализ показал, что соотношение углерода, водорода, азота и фосфора в трансформирующем веществе соответствуют соотношению этих же элементов в молекуле ДНК.**
- **По молекулярной массе молекулы трансформирующего вещества были больше, чем белков.**
- **Максимум поглощения при спектрофотометрическом анализе соответствовал 260 нм, что соответствовало нуклеиновой кислоте (у белков – 280 нм).**
- **ДНК, выделенная из клеточного экстракта, обладала трансформирующей активностью.**

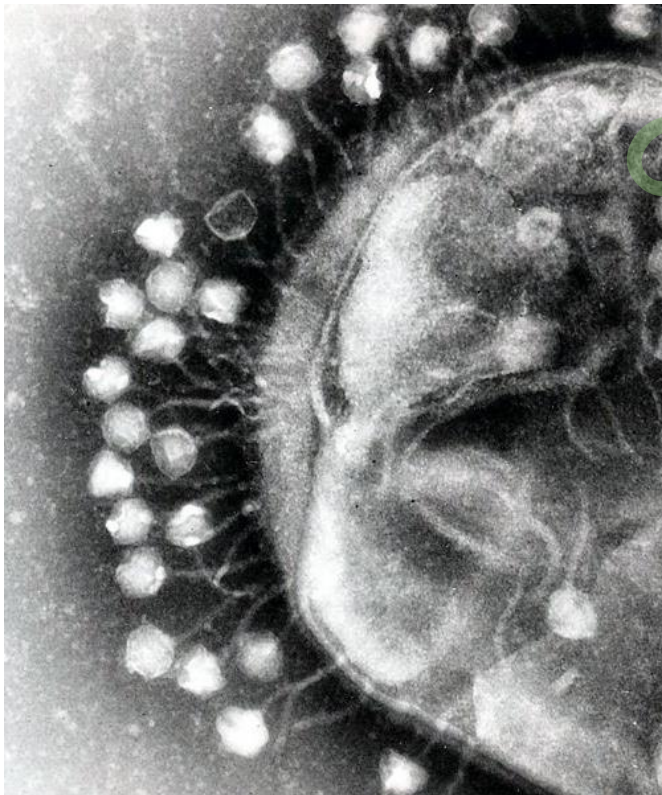
Эксперимент Альфреда Херши и Марты Чейз, 1952 г.



Объекты:
бактериофаг T2 и бактерия E.coli

Херши и Чейз для разработки своего эксперимента осуществляли радиоактивное мечение белка и ДНК бактериофага T2

**Марта Чейз (1927–2003) и
Альфред Херши (1908–1997)**

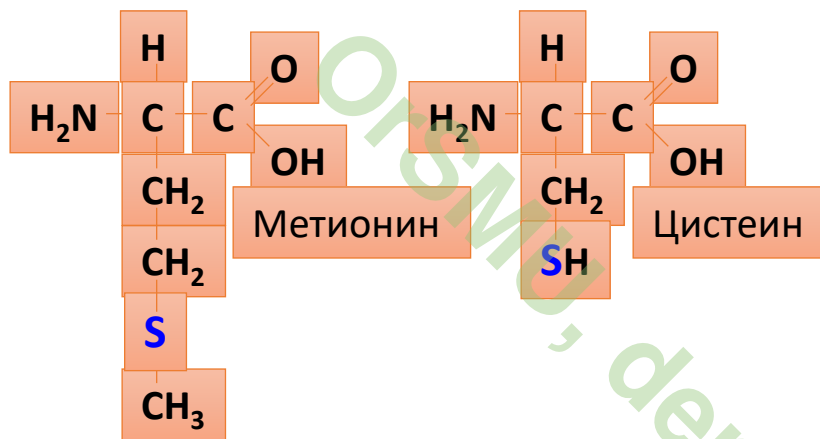


Предпосылки эксперимента:

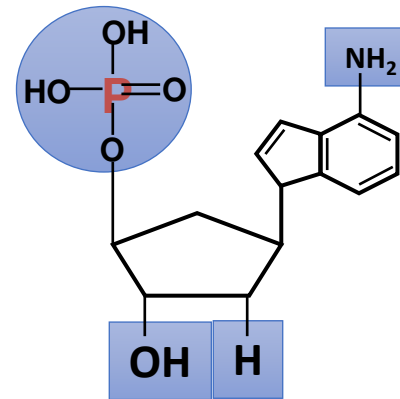
А. Херши и М. Чейз решили проверить, насколько верна картина нарисованная прежними исследователями в 1944 г.

На поверхности клетки в электронный микроскоп бактериофаги были видны. Но разглядеть их внутри клеток в те годы никому не удавалось. Тем более нельзя было увидеть процесс проникновения фага в клетку.

Стоило только подставить клетку с налипшими фагами под пучок электронов, как электроны убивали все живое, и то, что отражалось на экране микроскопа, было лишь постлетальной маской бактериофагов.

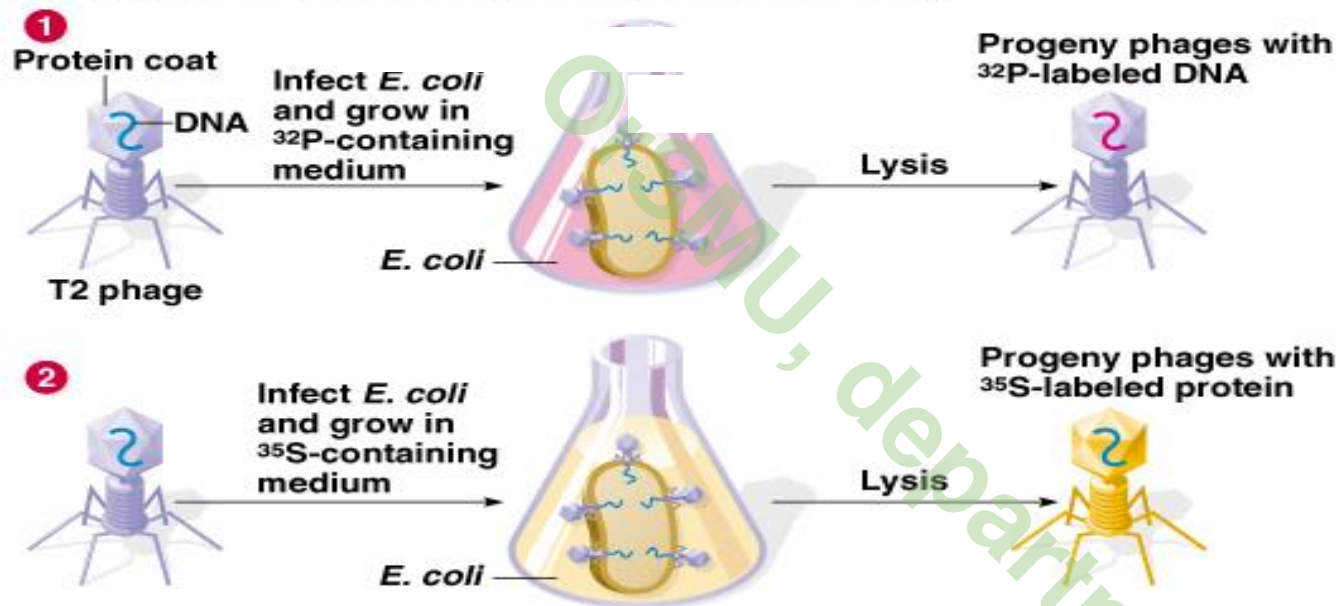


Некоторые аминокислоты содержат серу. Поэтому белки могут быть помечены радиоактивной ^{35}S .



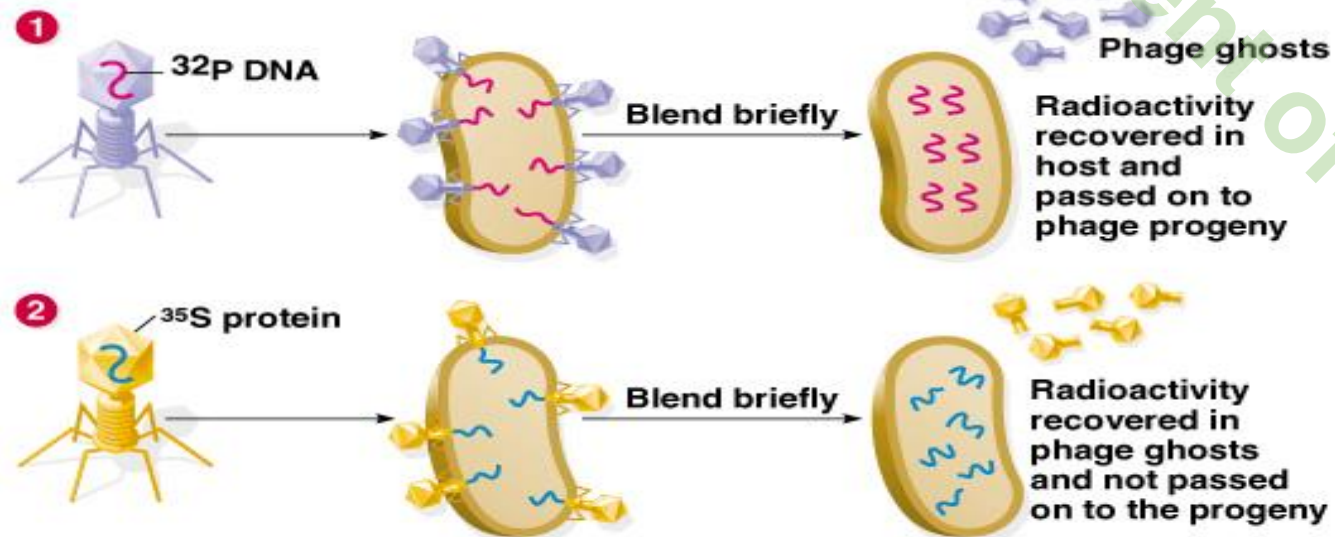
Нуклеотиды содержат фосфатную группу. Поэтому ДНК может быть помечена радиоактивным фосфором ^{32}P .

a) Preparation of radioactively labeled T2 bacteriophage



Радиоактивное мечение белковых оболочек бактериофага T2 и его ДНК, позволило проследить их судьбу при инфицировании бактериальных клеток.

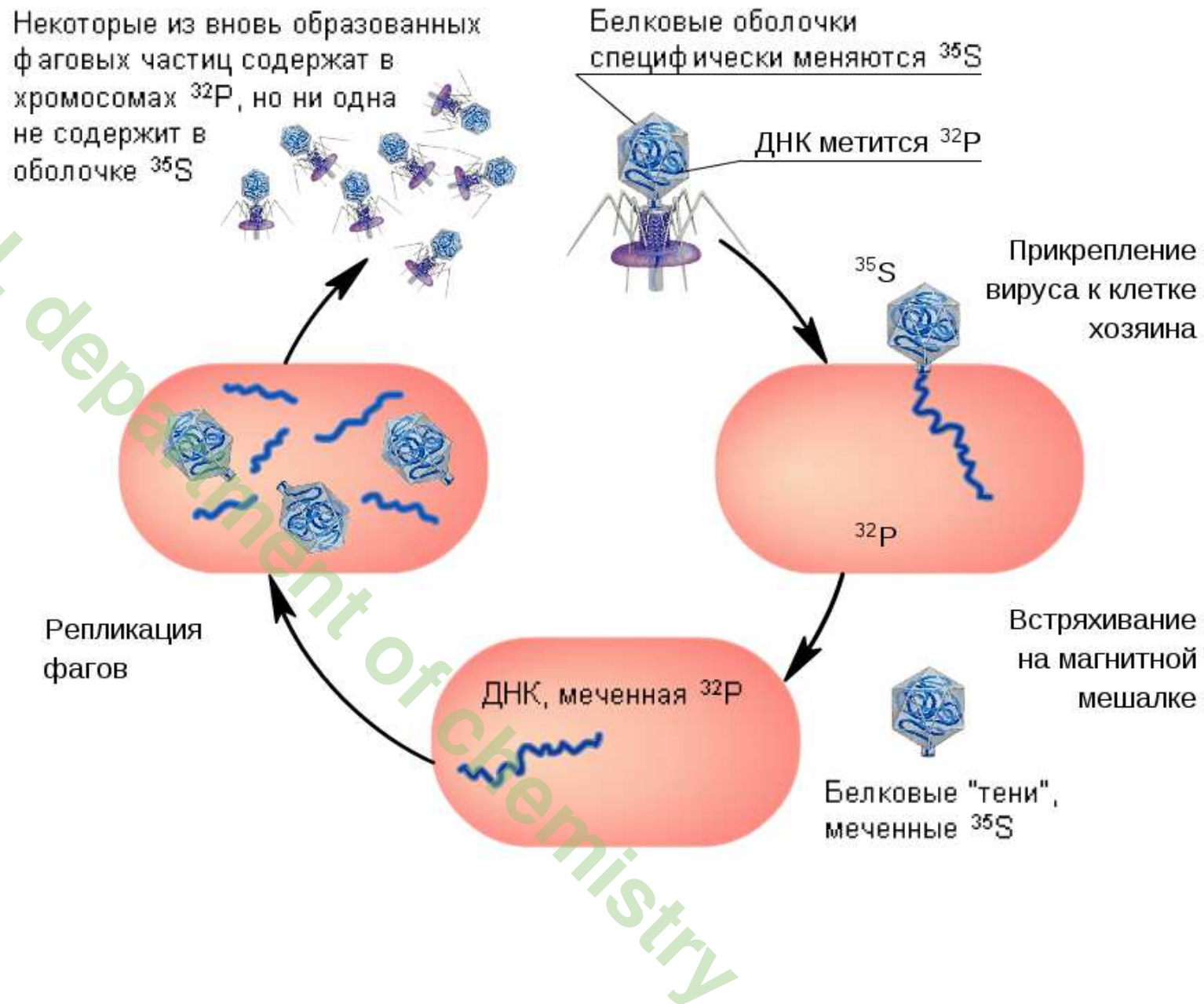
b) Experiment that showed DNA to be the genetic material of T2



Радиоактивно меченая ДНК из родительских фагов попадает в клетки бактерий и обеспечивает размножение фагового потомства.

После инфекции бактерии фагами, с помощью центрифугирования удалось выделить две фракции: пустые белковые оболочки фага и бактерии, инфицированных фаговой ДНК. Оказалось, что 80% метки ^{35}S осталась в пустых фаговых оболочках, а 70% метки ^{32}P - в инфицированных бактериях.

Результаты этого эксперимента прямо показали, что при инфицировании бактерий бактериофагами, их ДНК проникает внутрь клеток и затем участвует в размножении новых фагов частиц.



Таким образом, эксперимент А. Херши и М. Чейз показал, что **только ДНК бактериофага T2 при инфицировании бактерий попадает внутрь клеток**, и именно, она контролирует размножение фагов внутри клеток **(т.е. репликацию фаговых геномов, синтез фаговых оболочек, а также лизис бактериальных клеток и высвобождение фаговых частиц наружу)**.

Результаты эксперимента А. Херши и М. Чейз были сразу же приняты в качестве решающего доказательства генетической роли ДНК.

Основной фигурой матричных биосинтезов являются

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ.

Они представляют собой высокомолекулярные биополимеры, состоящие из нуклеотидов, соединенных между собой фосфодиэфирными связями.

Нуклеиновые кислоты

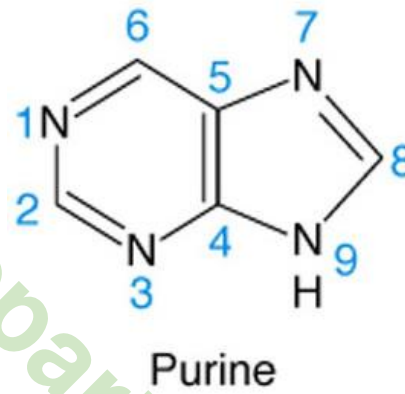
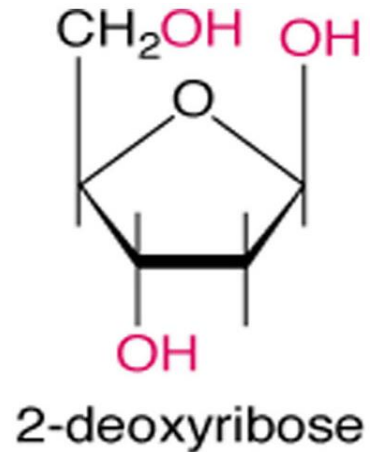
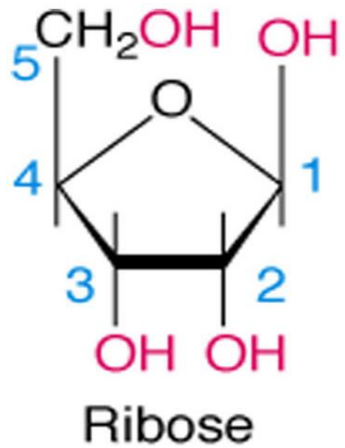
- Высокомолекулярные соединения, состоящие из нуклеотидов.
- Типы:
- **ДНК** (дезоксирибонуклеиновая кислота)
- **РНК** (рибонуклеиновая кислота): мРНК, рРНК, тРНК.

Функции нуклеиновых кислот - хранение и передача генетической информации

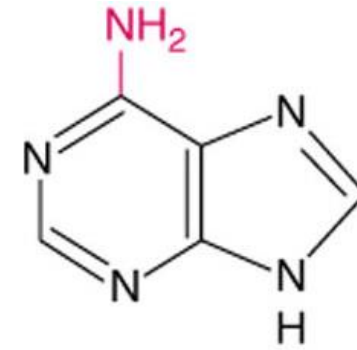
Нуклеотиды – мономеры нуклеиновых кислот

3 компонента:

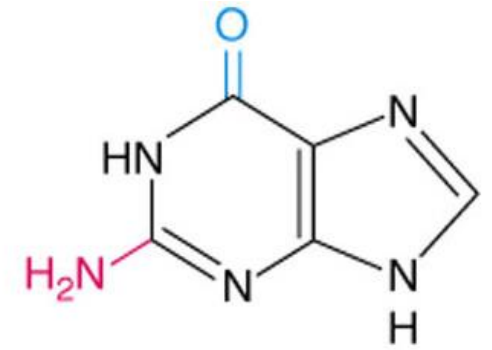
- Азотистое основание
- Пентоза
- Фосфорная кислота



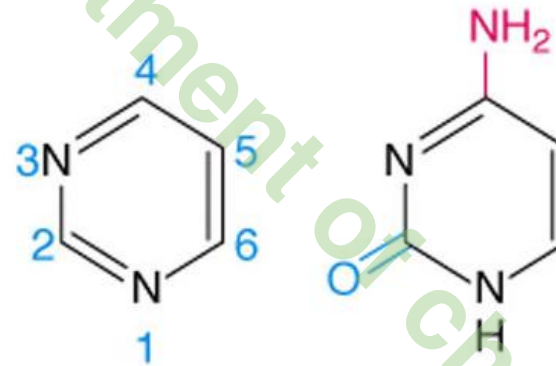
Purine



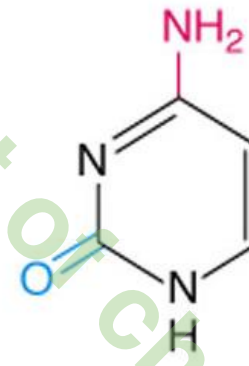
Adenine



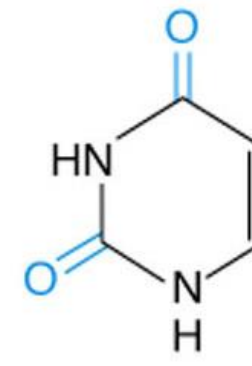
Guanine



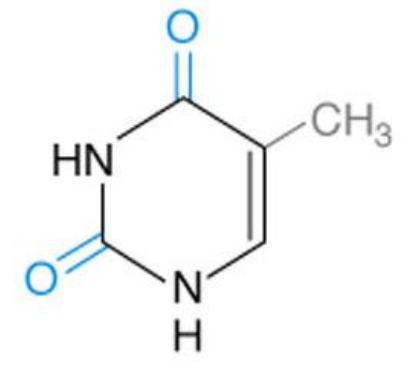
Pyrimidine



Cytosine



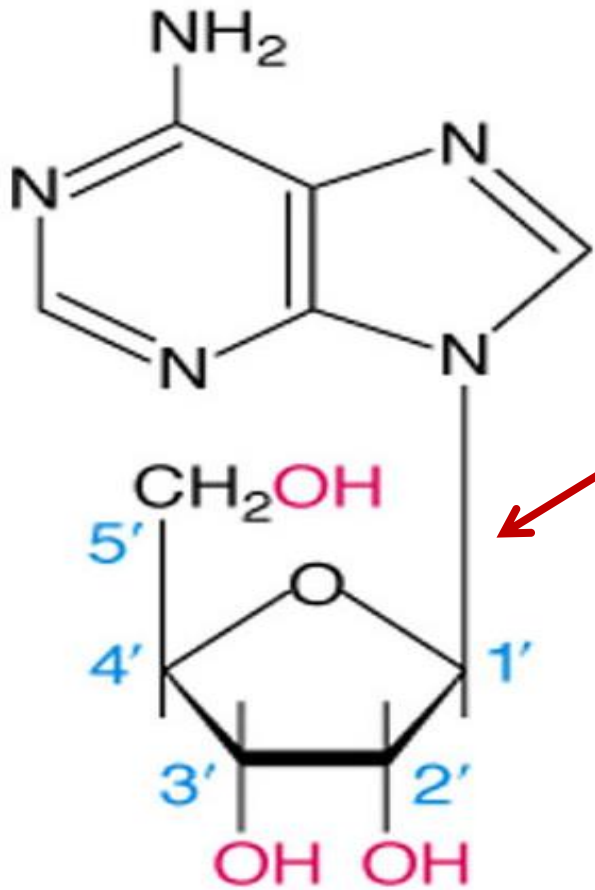
Uracil



Thymine

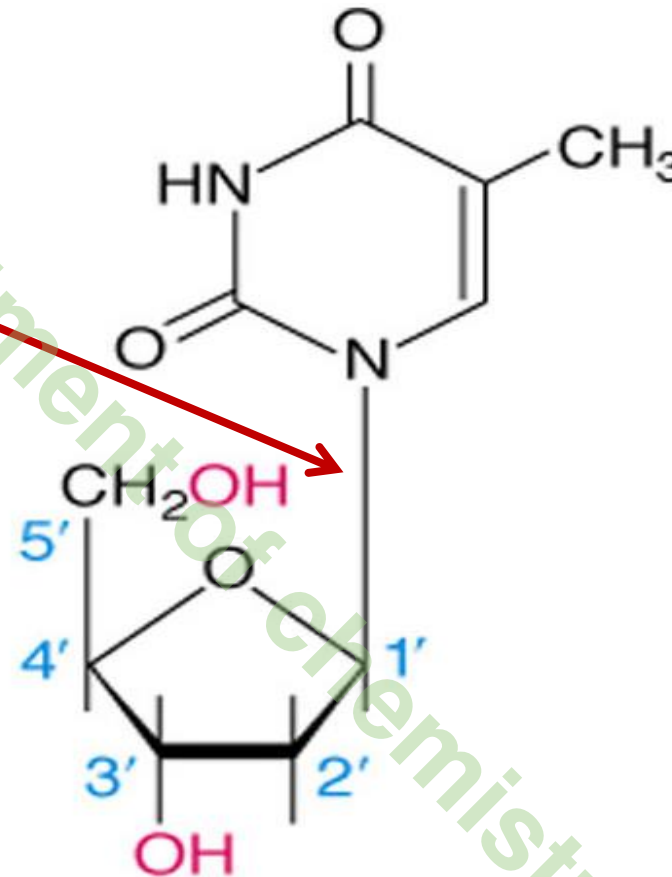
Нуклеозиды

- Азотистое основание + пентоза



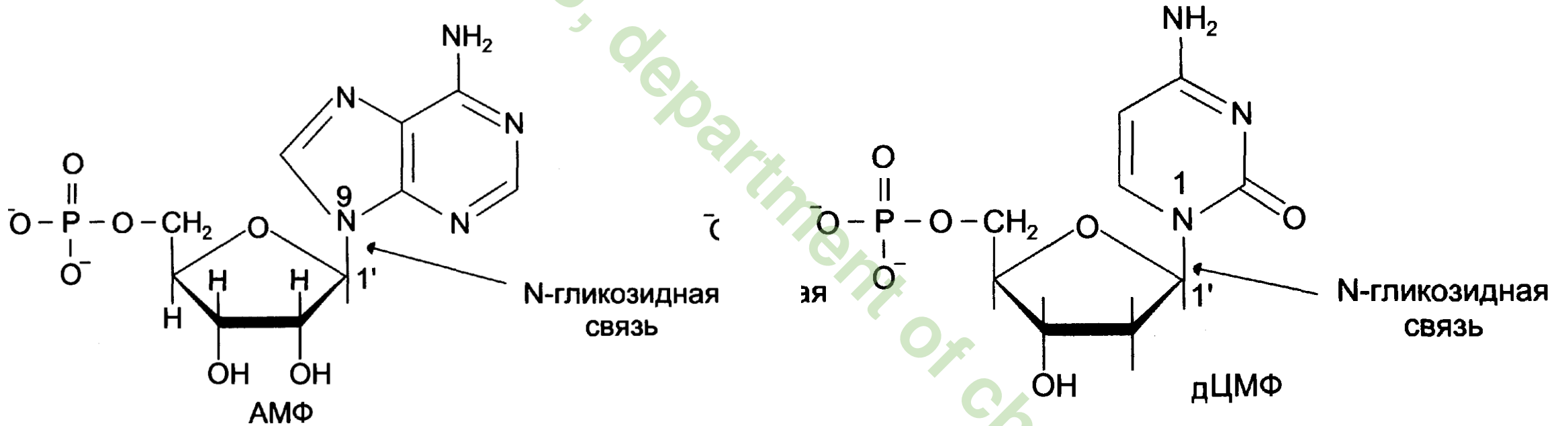
Adenosine

Н-гликозидная
связь



2' -Deoxythymidine

Нуклеотиды



Номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов

Азотистое основание	Нуклеозид	Нуклеотид
Аденин	Аден озин	Аденозин-моно-, ди- или трифосфат
Гуанин	Гуан озин	Гуанозин-моно-, ди- или трифосфат
Цитозин	Цит идин	Цитидин-моно-, ди- или трифосфат
Урацил	Ури дин	Уридин-моно-, ди- или трифосфат
Тимин	Тим идин	Тимидин-моно-, ди- или трифосфат

Функции нуклеотидов

- **Предшественники и мономеры нуклеиновых кислот**
- Макроэргические соединения
- Кофакторы
- Активаторы определенных веществ (УДФ-глюкоза, ЦДФ-холин)
- Вторичные посредники (циклические нуклеотиды – цАМФ, цГМФ)

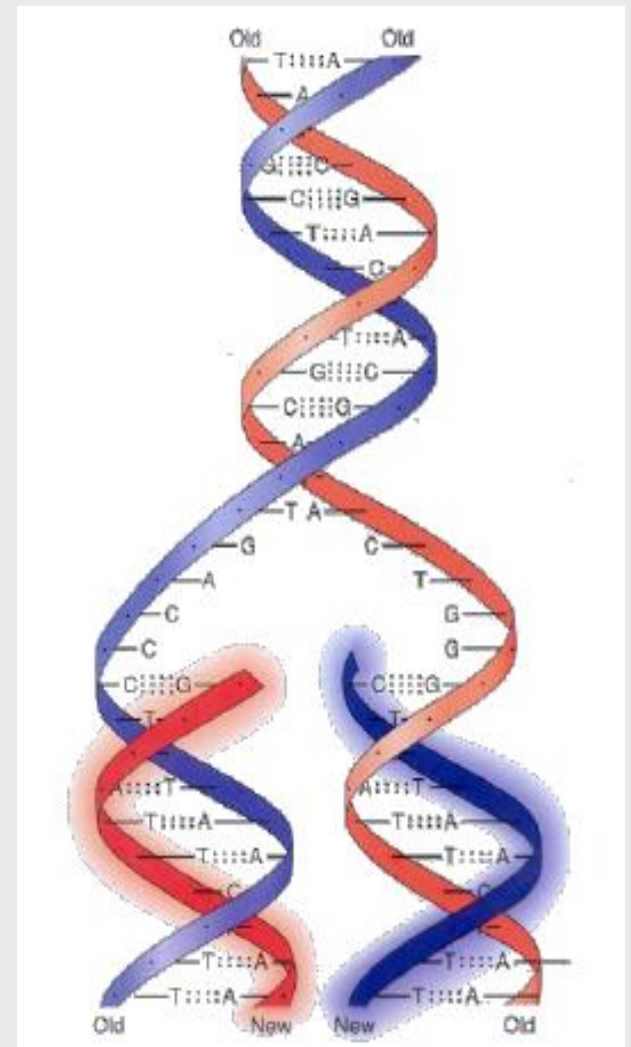
Репликация ДНК

Универсальный биологический процесс передачи генетической информации в поколениях клеток и организмов, благодаря созданию точных копий ДНК.

ДНК – единственная молекула клетки, способная к самоудвоению.

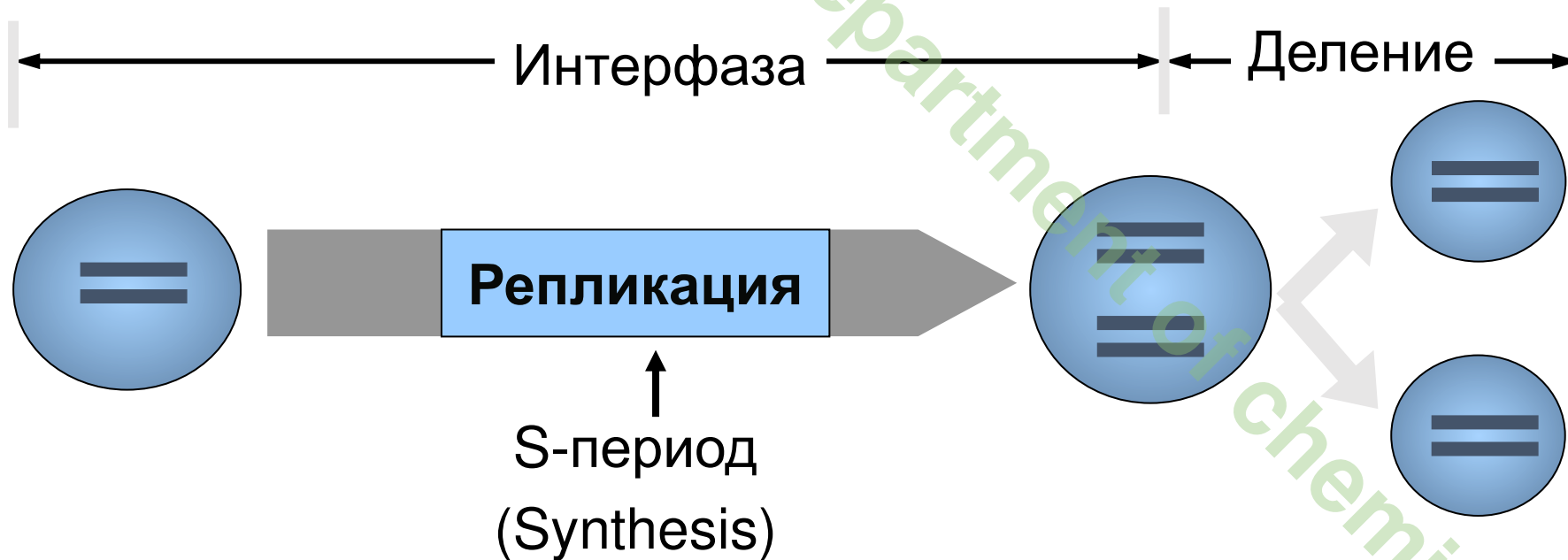
Репликация ДНК

В организме постоянно происходит деление клеток. Каждая соматическая клетка получает диплоидный набор хромосом. Делению клетки предшествует удвоение ДНК. Синтез ДНК происходит не беспорядочно, а в строго определенный период жизни клетки. Всего выделяют 4 фазы клеточного цикла: митоз (М), синтетическую (S), пресинтетическую (G1, от англ. gap – интервал), постсинтетическую (G2). Важное участие в регуляции смены фаз клеточного цикла занимают белки циклины. По функции циклины – это активаторные субъединицы ферментов циклин-зависимых киназ. Синтез (репликация, удвоение) ДНК происходит в S-фазу клеточного цикла, когда клетка готовится к делению. Мэтью Мезельсон и Франклин Сталь в 1957г установили, что репликация осуществляется **полуконсервативным способом**, т.е. на каждой нити материнской ДНК синтезируется дочерняя копия. Образовавшиеся молекулы ДНК будут иметь в своем составе одну дочернюю и одну материнскую цепь.



Место репликации в клеточном цикле

- Репликация ДНК всегда **предшествует** делению клетки.



Каждая дочерняя клетка получает точную копию всей ДНК

РЕПЛИКАЦИЯ

Фазы репликации:

- Инициация
- Элонгация
- Терминация

Репликация требует наличия нескольких компонентов:

- Матрица – в ее роли выступает материнская нить ДНК
- Субстраты для синтеза – дАТФ, дГТФ, дЦТФ, ТТФ,
- Источник энергии – дАТФ, дГТФ, дЦТФ, ТТФ
- Ферменты
- Факторы роста
- SSB-белки

Скорость репликации ДНК

- У прокариот – **1000** нуклеотидов /сек

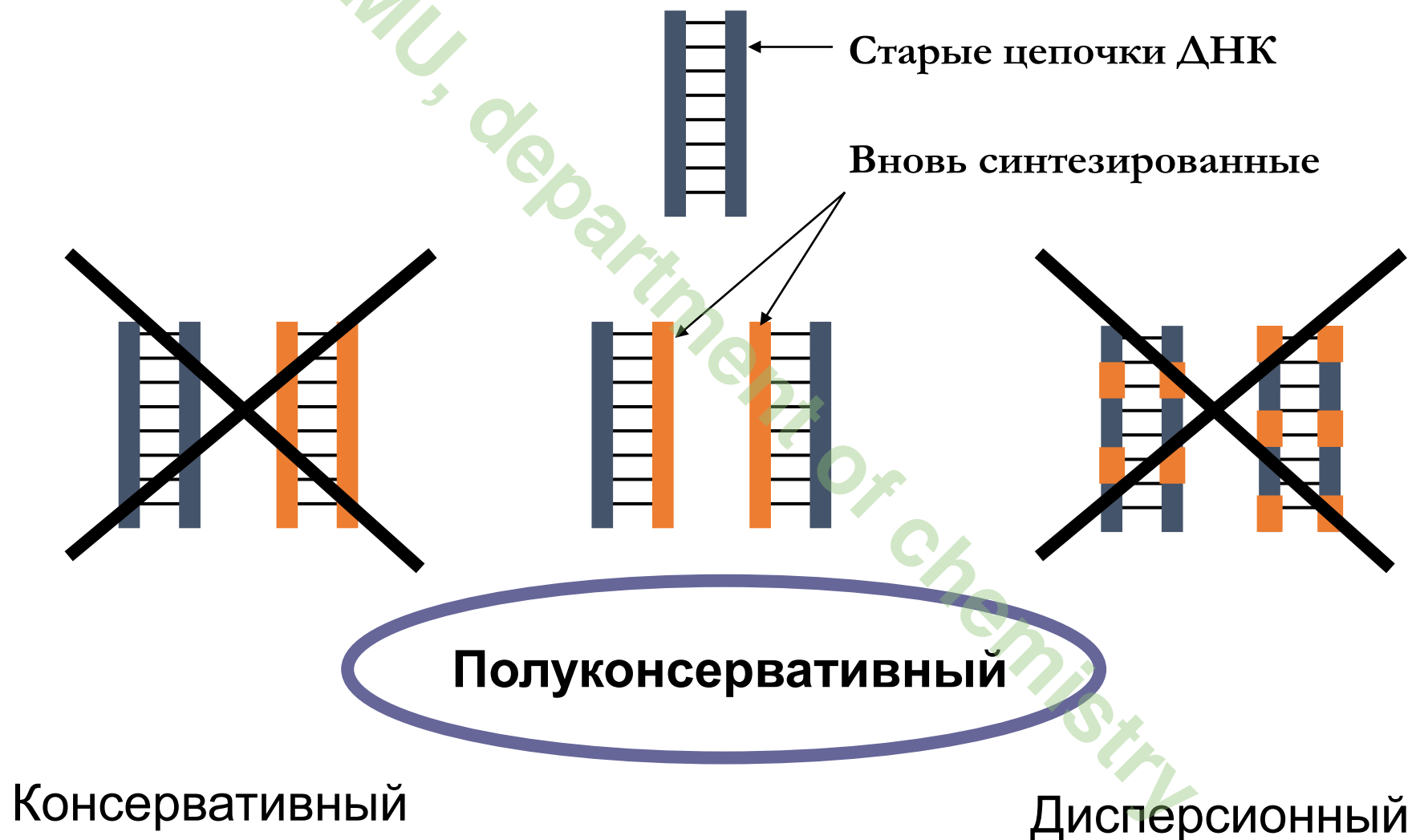
- У эукариот – **100** нуклеотидов /сек

(медленнее, потому что ДНК сложно упакована – нуклеосомы и другие уровни упаковки)

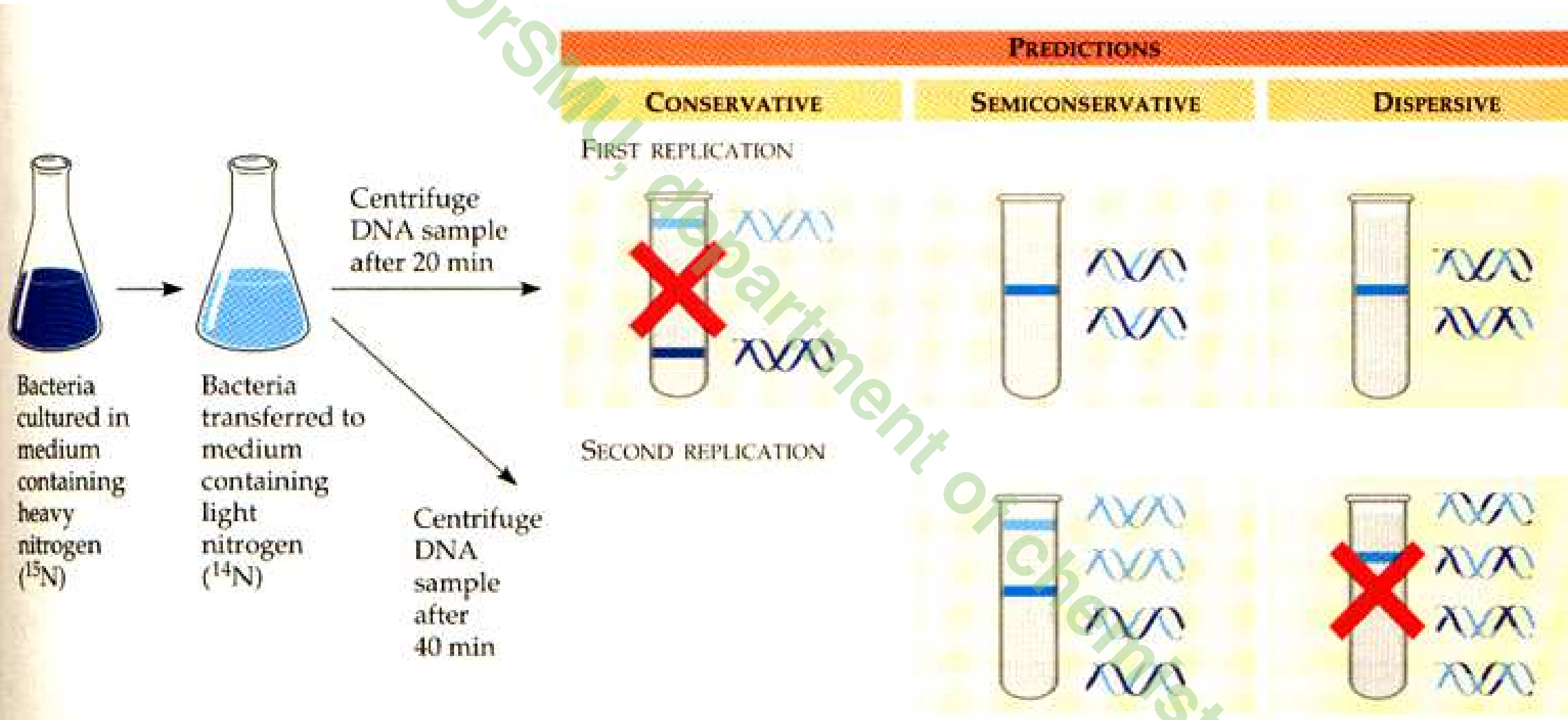
Принципы репликации

1. Полуконсервативность
2. Комплементарность
3. Антипараллельность
4. Униполярность
5. Прерывистость

Полуконсервативность – каждая исходная (материнская) цепь ДНК выступает в качестве матрицы для синтеза дочерней цепи



Полуконсервативность – эксперимент Мезельсона и Штала



Комплементарность

Вновь синтезируемая (дочерняя) цепь ДНК строится по принципу комплементарности. В состав растущей цепи включается тот нуклеотид , который комплементарен нуклеотиду родительской цепи (аденин с тимином, гуанин с цитозином).

Антипараллельность – синтез дочерней цепи ДНК происходит в противоположном от материнской цепи направлении

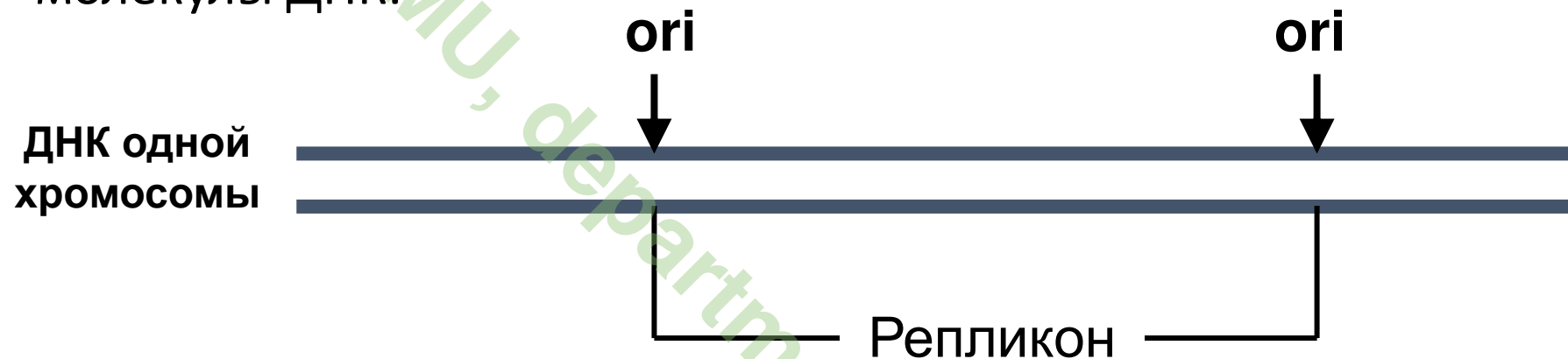
Униполярность:

Удвоение цепи ДНК идет в направлении от 5` конца к 3` концу, следовательно новый нуклеотид присоединяется к 3 ` концу растущей цепи.



Прерывистость репликации

Репликация может идти одновременно в нескольких местах молекулы ДНК.

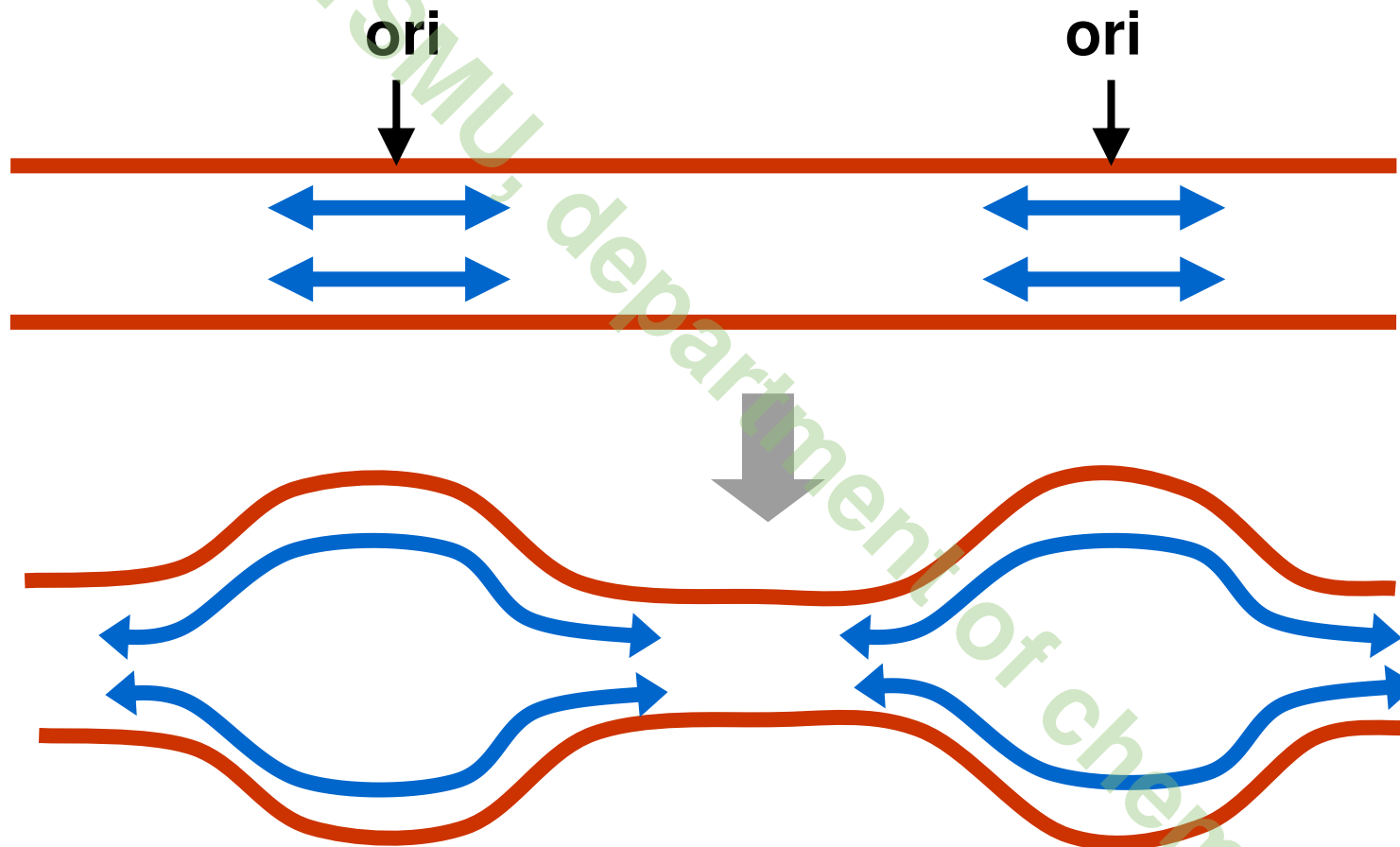


Репликон – расстояние между двумя сайтами начала репликации *ori* ~ 100 тыс. н.п.

У прокариот вся кольцевая молекула – **один репликон**

Прерывистость репликации

ДНК одной
хромосомы



Репликативные вилки

Основные ферменты репликации

ДНК ГЕЛИКАЗА – Фермент разделяющий цепи двухцепочечной ДНК на одинарные

ДНК ТОПОИЗОМЕРАЗА / ГИРАЗА – фермент, изменяющий степень сверхспиральности, возникающее при раскручивании двух цепей в репликативной вилке

ПРАЙМАЗА – фермент, обладающий РНК – полимеразной активностью; служит для образования РНК-праймеров, необходимых для инициации синтеза ДНК

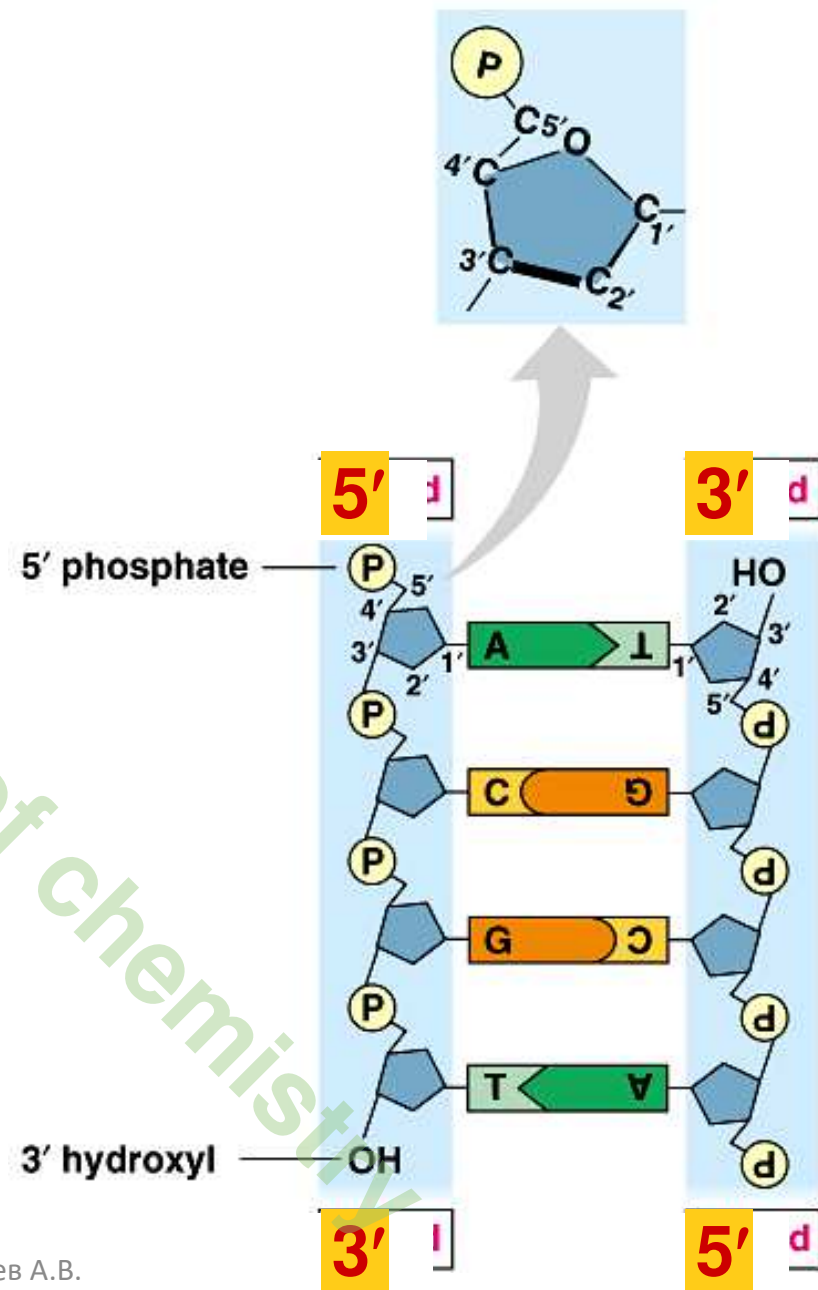
ДНК ПОЛИМЕРАЗА – синтезирует новую цепь ДНК по принципу комплементарности

ДНК ЛИГАЗА – фермент, образующий фосфодиэфирную связь между двумя полинуклеотидами

SSB (single-strand binding protein)-белки –связывающиеся с одноцепочечными нитями ДНК и предотвращают комплементарное спаривание

Антипараллельные цепи

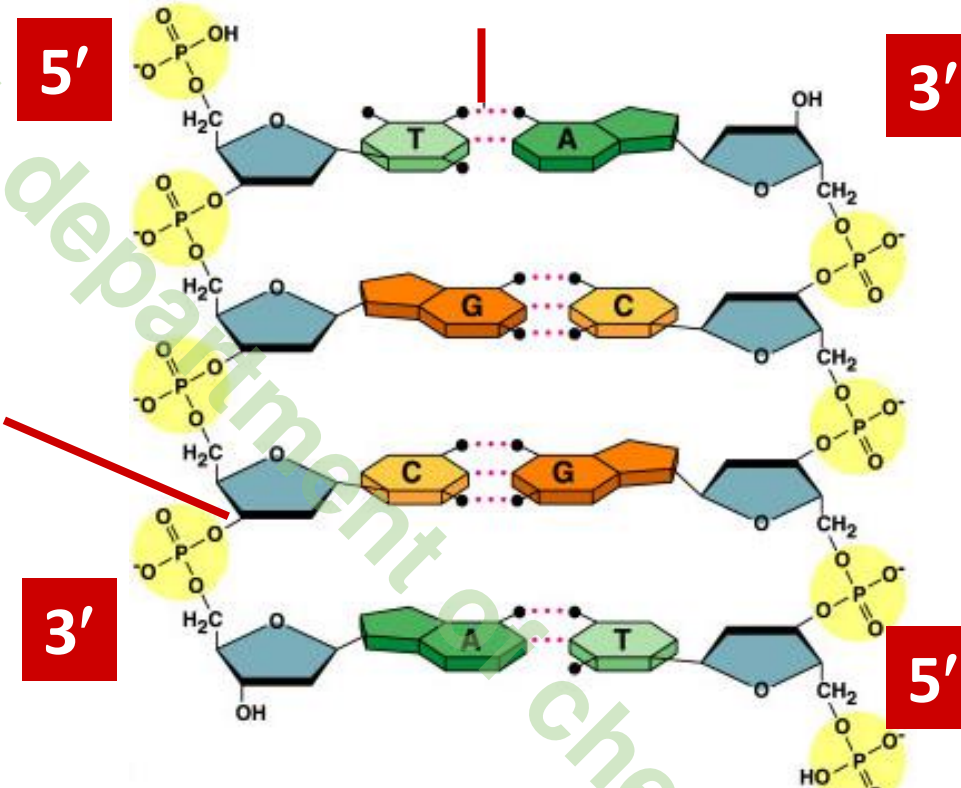
- Нуклеотиды в основной цепи ДНК связаны от фосфата к сахару между 3–5 атомами углерода.
- В молекуле ДНК одна из в противоположном направлении
- ЭТО ПРОБЛЕМА ДЛЯ РЕПЛИКАЦИИ



Типы химической связи в ДНК

Водородная связь

Ковалентная
фосфодиэфирная
связь



... сильные или слабые связи?

Как эти связи соответствуют механизму копирования ДНК?

ИНИЦИАЦИЯ

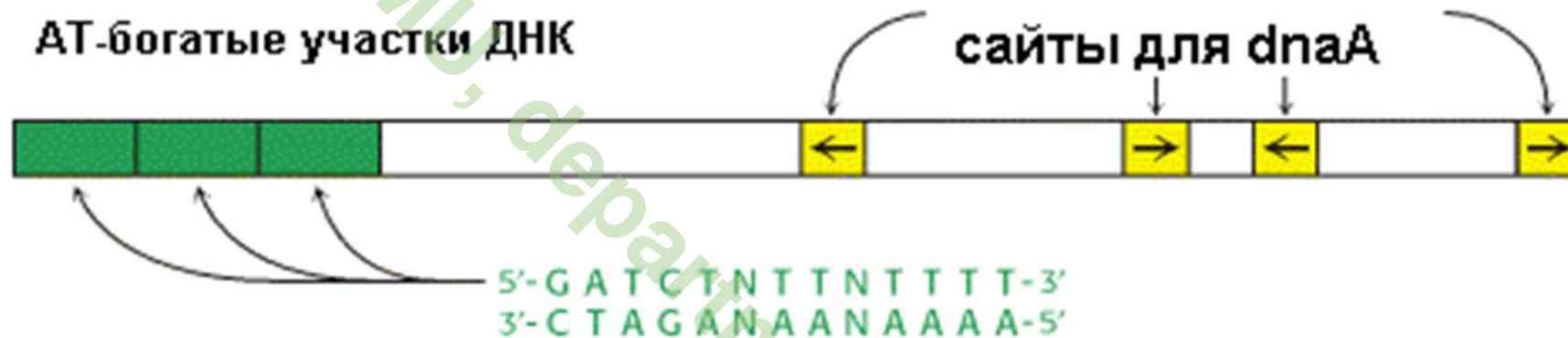
Запускается **факторами роста**.

1) В определенных участках, получивших название точка *ori* (англ. origin – начало, на молекуле ДНК около 100 таких точек), на ДНК действует фермент **ДНК-топоизомераза 1**. Она разрывает фосфодиэфирную связь в молекуле ДНК и крепится к 5'-концу в месте разрыва.

2) Фермент **ДНК-геликаза** разрывает водородные связи между цепочками ДНК. Процесс распространяется от этих участков в обе стороны по нитям ДНК с образованием **репликативных "пузырей"**. В каждом таком "пузыре" имеются две **репликативные "вилки"**, в которых происходит раскручивание и непосредственный синтез ДНК. При этом репликативные вилки удаляются друг от друга

3) Обратному соединению и закручиванию ДНК препятствуют **SSB-белки**, крепящиеся к каждой из цепей ДНК. Азотистых оснований они не перекрывают.

Инициация синтеза ДНК



- **Origin (Ori)** - точка начала репликации – это участок молекулы ДНК (300 п.н.), со специфической последовательностью нуклеотидов, который узнают специальные белки репликации:
- **dnaA** – у прокариот
- **RPA** - у эукариот

Репликация: 1-й этап - инициация

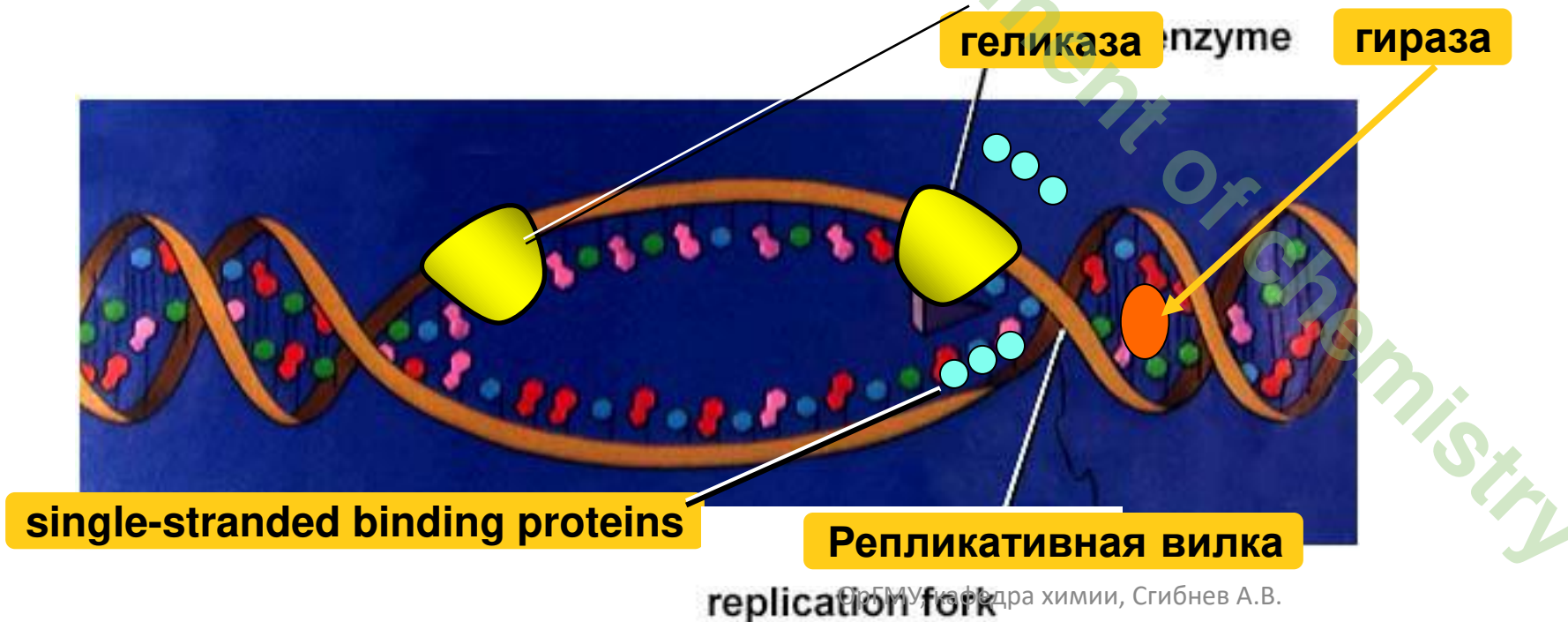
- Раскручивание ДНК

геликаза разделяет спираль двухцепочечной ДНК на одинарные цепи

- ДНК стабилизируется белками, связывающими одноцепочечные ДНК

ДНК-гираза/топоизомераза

- Фермент, предотвращающий запутывание перед репликационной вилкой



ЭЛОНГАЦИЯ

Включает в себя процесс образования новых цепей. Синтез идет в направлении 5'-3'. Осуществляется под действием ДНК-полимераз.

1) **ДНК-полимераза α** присоединяется к участку на раскрученной цепи ДНК в репликативной вилке и синтезирует небольшой фрагмент РНК (**праймер**) из 8 – 10 нуклеотидов и участок ДНК из 50 нуклеотидов

2) Затем **ДНК-полимераза δ** продолжает наращивать цепь ДНК

3) **ДНК-полимераза ϵ** достраивает праймеры РНК до их встречи друг с другом (работает только на отстающей цепи)

4) **ДНК-полимераза β** удаляет постепенно РНК праймеры и заполняет образовавшуюся брешь комплементарными дезоксирибонуклеотидами

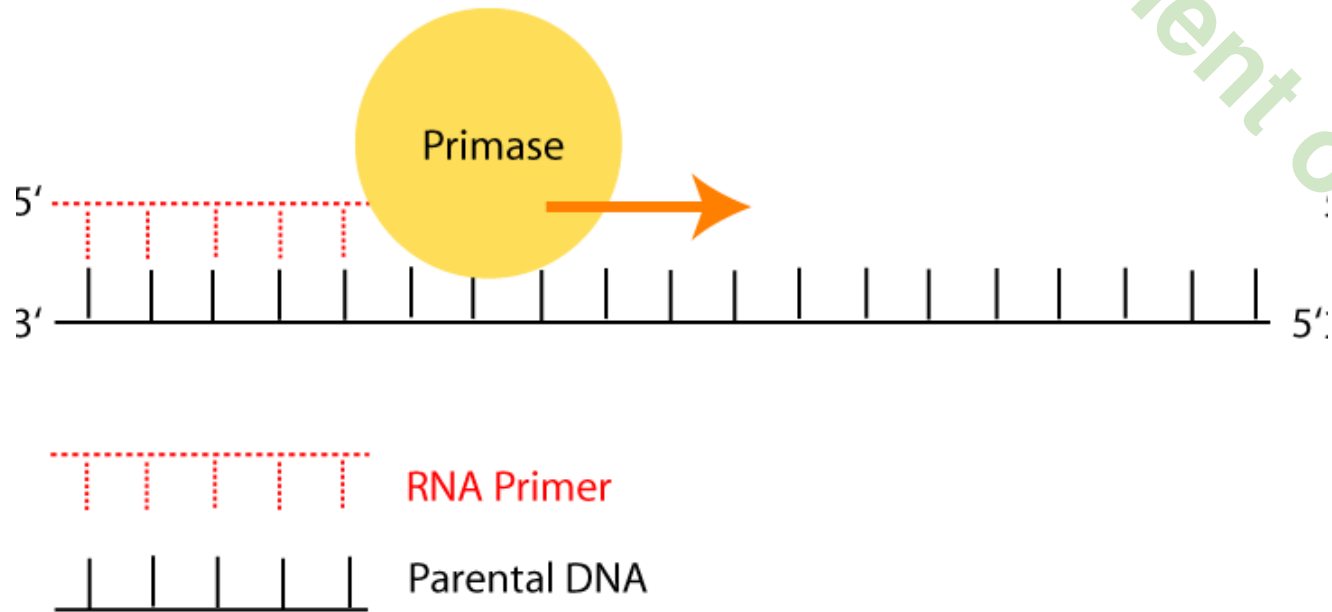
5) **ДНК-лигаза** «сшивает» фрагменты цепи с формированием фосфодиэфирных связей

Все репликация ДНК занимает примерно 9 часов

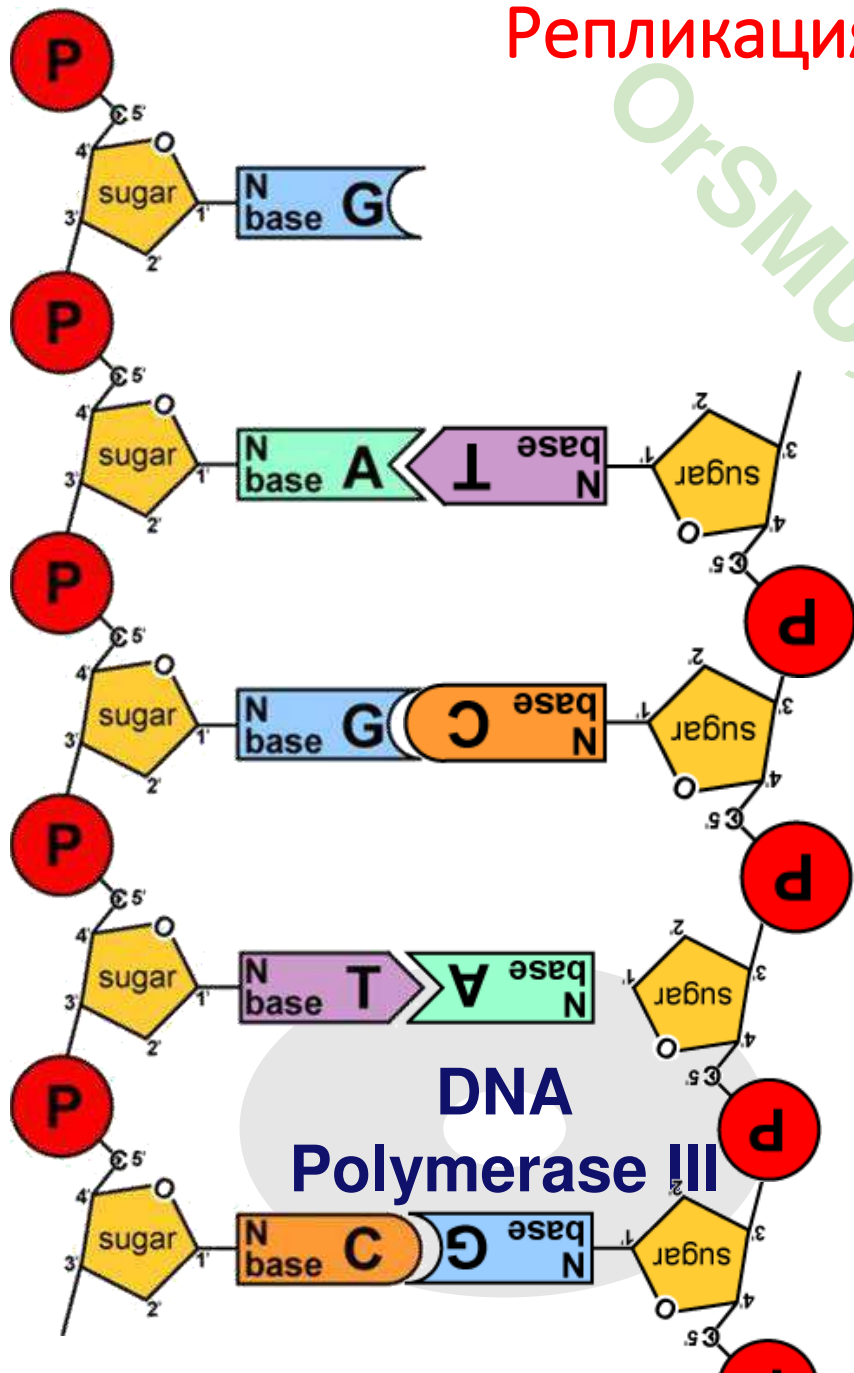
Репликация: 2-й этап - элонгация

- **РНК-праймаза/ДНК-полимераза α**
- Добавляет небольшой участок РНК (праймер РНК) к 3' концу матричной ДНК
- Зачем это нужно делать? ДНК-полимераза III/ДНК-полимераза δ (фермент, создающий новую цепь ДНК) может добавлять нуклеотиды только к существующим цепям ДНК.

DNA Synthesis Requires a RNA Primer

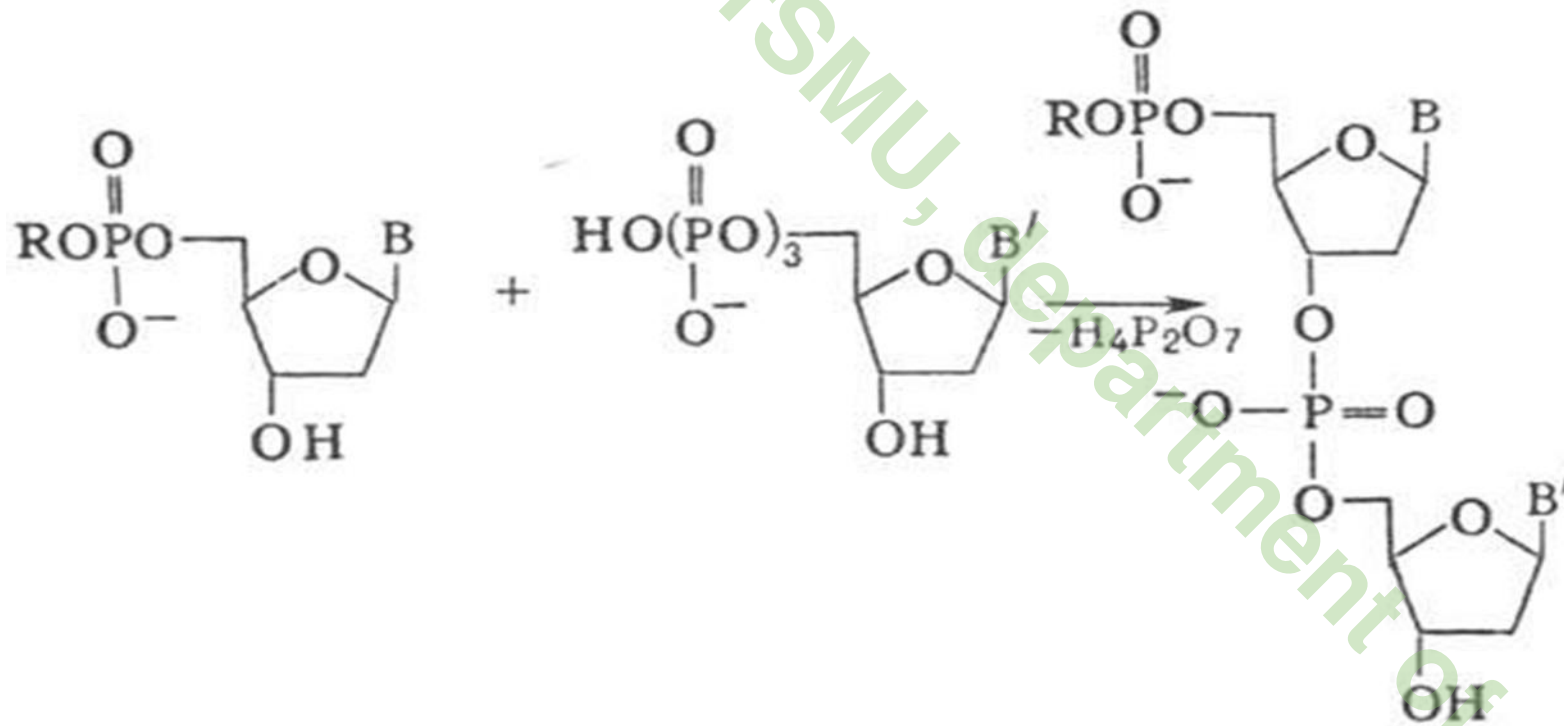


Репликация: 2-й этап - элонгация



- Построение дочерней цепи ДНК
- Добавляются новые **комплментарные основания** с помощью фермента ДНК-полимеразы III / ДНК-полимеразы δ

Реакция полимеризации нуклеотидов



- Суммарное уравнение реакции синтеза полинуклеотида:



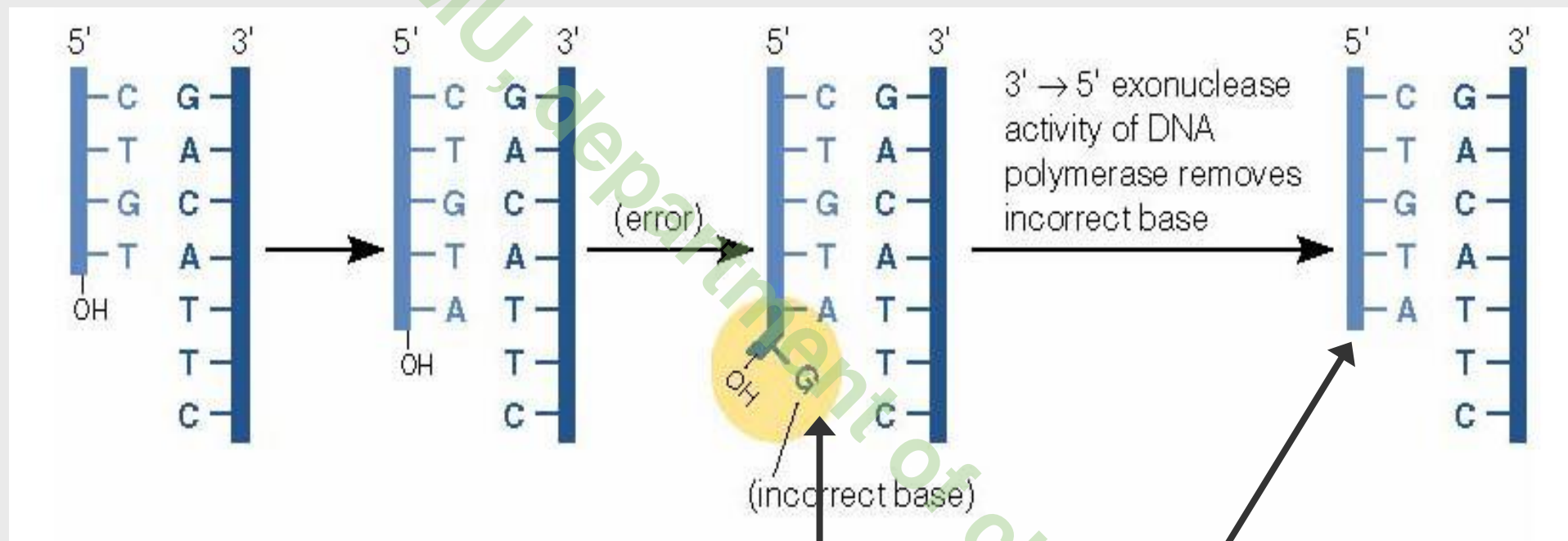
Необходимым условием биосинтеза ДНК и РНК является использование полимеразой нуклеозидтрифосфатов в качестве низкомолекулярного субстрата и образование молекулы пирофосфата с последующим его **гидролизом пирофосфатазой**. В случае сохранения пирофосфата в среде реакция бы шла в направлении пирофосфоролиза, т.е. отщепления от ДНК (РНК) нуклеотидных звеньев с образованием нуклеозидтрифосфатов. В этом случае синтез молекул нуклеиновых кислот был бы невозможен.

Свойства ДНК-полимеразы

1. Присоединяет по одному нуклеотиду с 3' конца растущей цепочки.
2. Требуется для начала работы спаренного 3' конца.
3. Отщепляет один нуклеотид назад, если он не спарен – т.е. исправляет свои ошибки.



ДНК-полимераза исправляет ошибки



Если новый нуклеотид не спарен – фермент не может двигаться дальше.

Тогда он убирает неверный нуклеотид и ставит другой.

Точность репликации

Частота ошибок при репликации составляет 10^{-6} - 10^{-7} .

Точность репликации обеспечивается 2-мя факторами:

- Соблюдение принципа комплементарности.
- Экзонуклеазной активностью ДНК-полимеразы.

Отличия репликации в клетках прокариот и эукариот

<u>характеристика</u>	<u>прокариоты</u>	<u>эукариоты</u>
Количество репликационных единиц	один	Тысячи и сотни
Скорость репликации	500 нукл/сек	50 нукл/сек
Длина фрагмента	1000 н.	200 н.
Оказаки		
Размер РНК-праймера	60 н.	10-15 н.
Типы ДНК-полимераз	ДНК-пол. I ДНК-пол. II ДНК-пол. III	ДНК-пол. α -отстающая цепь ДНК-пол. β - репарация ДНК-пол. γ - мтДНК ДНК-пол. δ - ведущая цепь ДНК-пол. ϵ - репарация

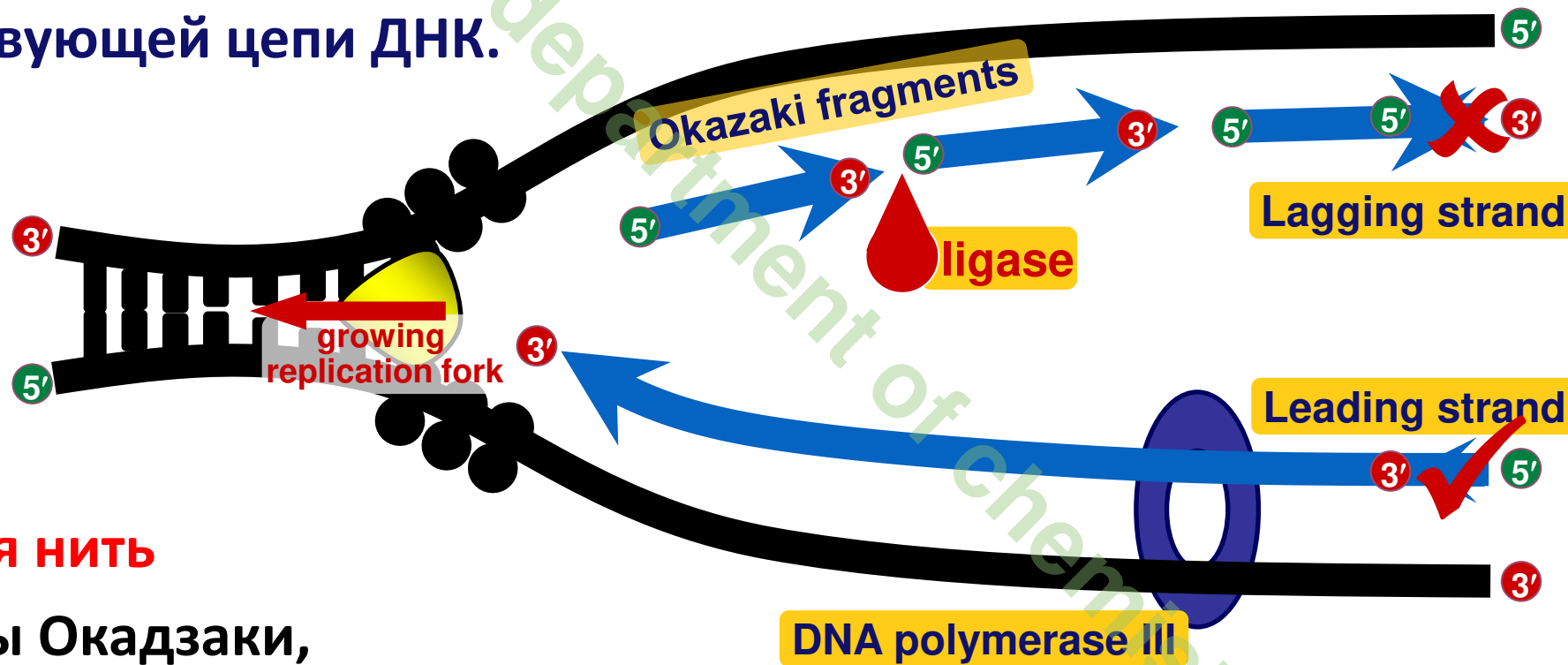
Репликация: 3-й этап терминация

- Замена праймера РНК на ДНК с помощью ДНК-полимеразы I/ДНК-полимеразы β

Ведущие и отстающие нити



Ограничение: ДНК-полимераза III/
ДНК-полимераза δ может
наращивать цепь только на 3' конце
существующей цепи ДНК.



Отстающая нить

Фрагменты Окадзаки,
соединенные ферментом
"точечной сварки" лигазой

Лидирующая нить

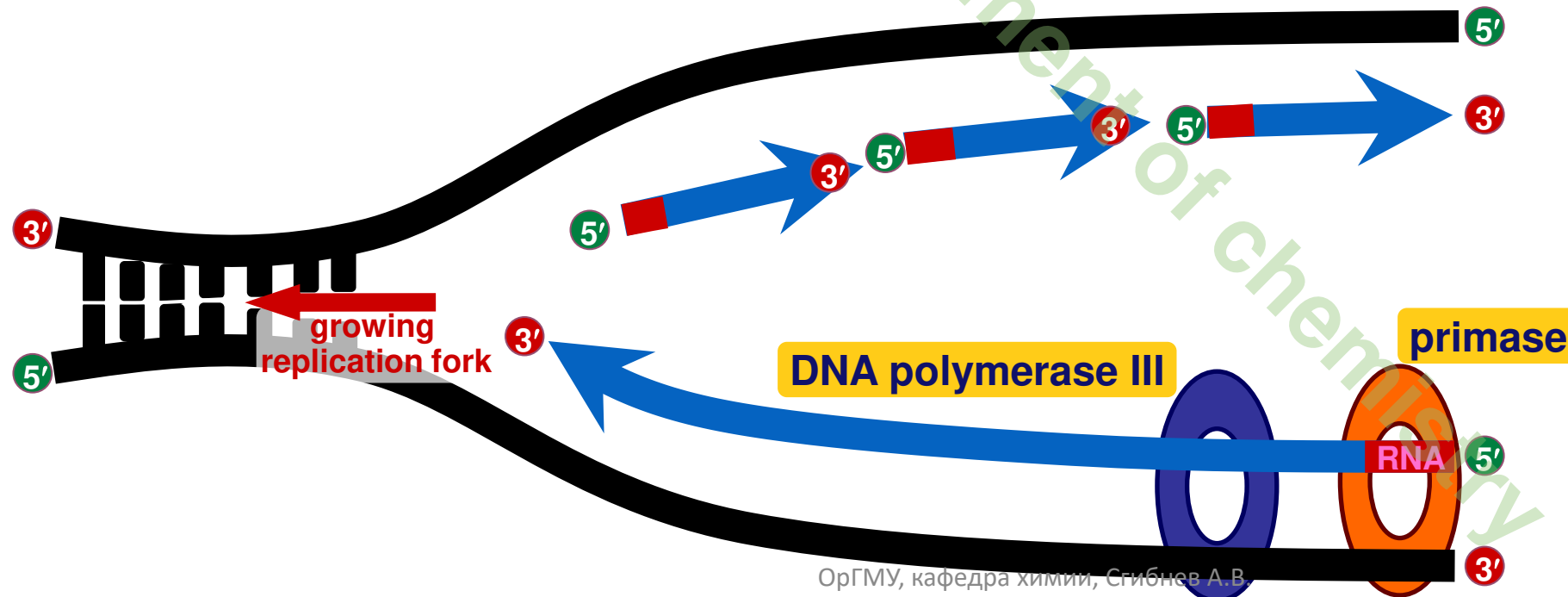
ОргМУ, кафедра химии, Сгибнев А.В. ♦ Продолжается синтез

Репликация ДНК на отстающей нити

Добавлен праймер РНК:

- создан праймазой
- служит стартовой последовательностью для ДНК-полимеразы III

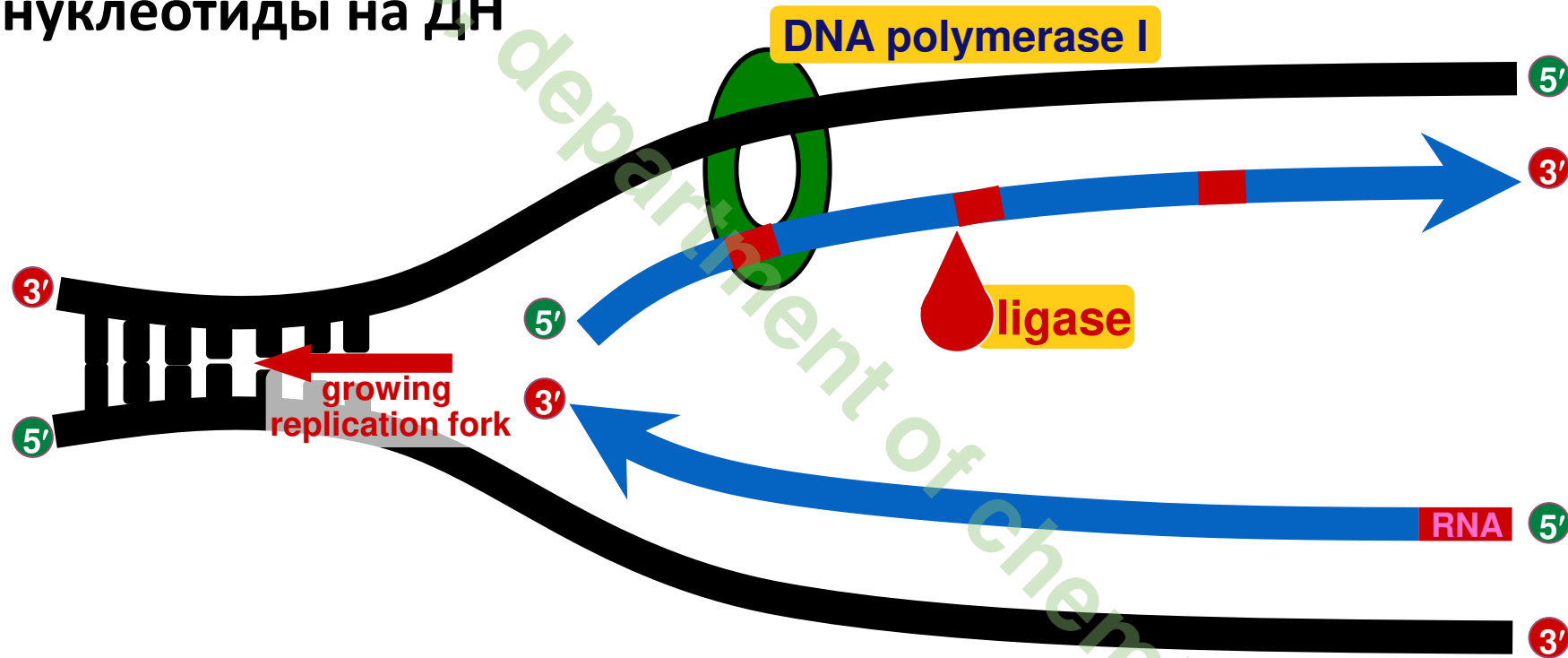
НО синтезируются короткие сегменты, называемые фрагментами Окадзаки



Замена праймеров РНК на ДНК

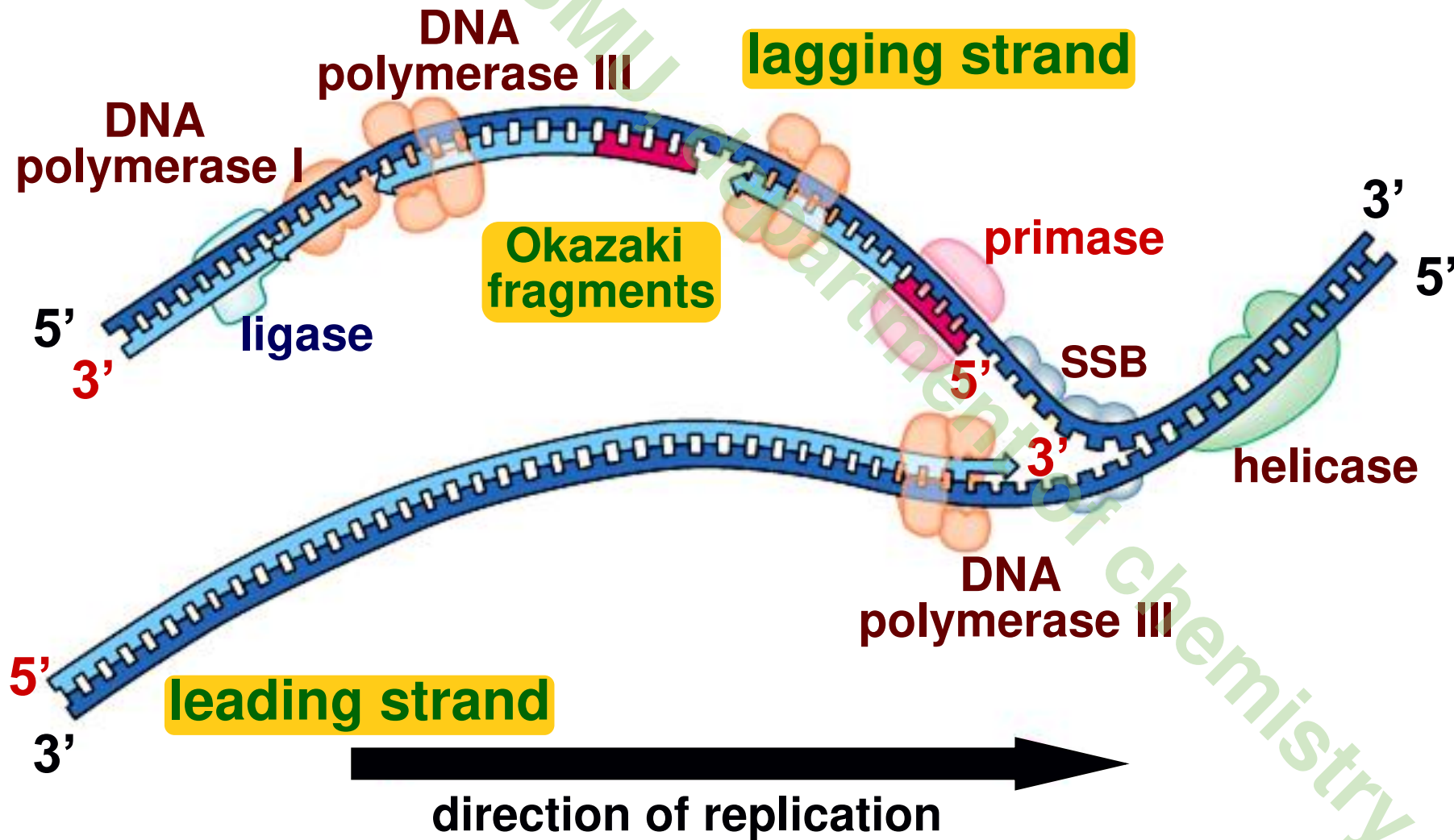
ДНК-полимераза I / ДНК-полимераза β

удаляет участки праймера РНК и
заменяет нуклеотиды на ДН



Нити склеены вместе с помощью
ДНК-лигазы

Вилка репликации



ОргМУ, кафедра химии, Сгибнев А.В.
SSB = single-stranded binding proteins

Выводы по репликации ДНК

- В результате репликации каждая дочерняя клетка получает **точную копию всей ДНК** содержащейся в материнской клетке.
- **ДНК всех клеток одного организма – одинаковая**, как по количеству молекул, т.е. хромосом, так и по их нуклеотидному составу.

Медицинское значение

Иногда в растущую цепь случайно вклинивается неправильное основание, однако у здоровых клеток присутствует **пострепликационные репаративные ферменты**, которые исправляют подобные ошибки.

Патология постреликационных механизмов репарации иногда обуславливает предрасположенность пациентов к некоторым онкологическим заболеваниям.

К ним относятся:

- Синдром множественной ломкости хромосом (синдром Блума);
- Наследственная предрасположенность к раку молочной железы, вызванную мутациями генов *BRCA1* и *BRCA2*;
- Аутомно-доминантная форма рака кишечника (наследственный неполипозный рак толстой кишки)

Проблема укорочения концов у линейных ДНК

- Сформулирована – А.М. Оловников, 1971
- При каждой репликации новые цепи должны **укорачиваться** с 5' концов
- Почему? – Там убирается РНК-праймер, а достроить брешь ДНК-полимераза не может – нет спаренного конца.
- При каждом делении хромосома теряет 50 н.п. на концах – **теломерах.**

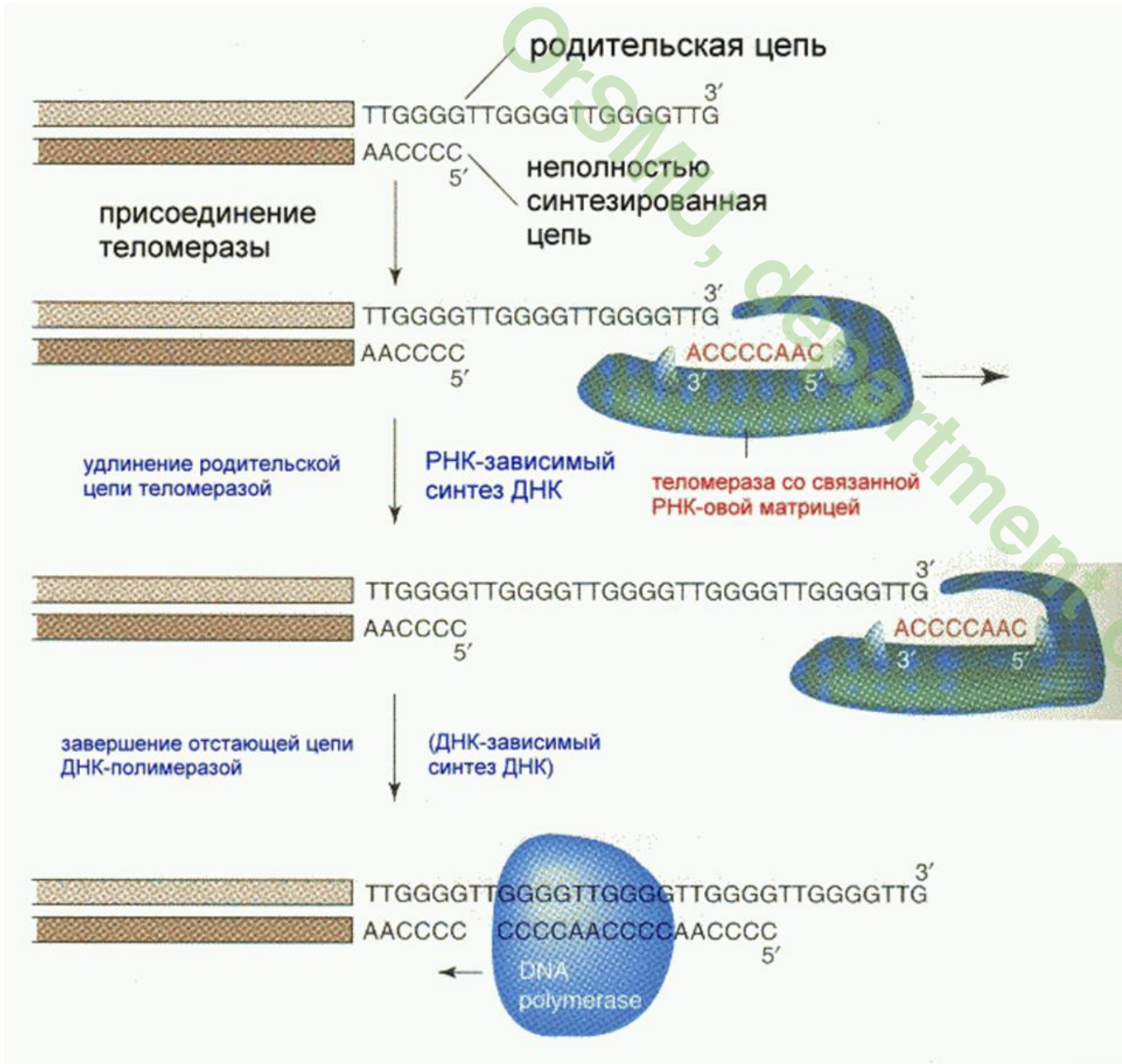
Гипотеза Оловникова

- Укорочение концов – это внутренние часы, отмеряющие время жизни многоклеточного организма – число отпущенных ему делений, начиная с зиготы.
- Как только теломеры «закончатся» – клетка больше не делится и погибает.

Но почему тогда клетки зародышевой линии делятся бесконечно?

- **Оловников:** должен существовать механизм удлинения концов хромосом.
- **Теломераза** – фермент, надстраивающий концы хромосом, содержит РНК длиной 150 нуклеотидов и осуществляет обратную транскрипцию
- **Теломераза и обратная транскриптаза** – родственные белки, гомологичные по структуре и топологии.

Синтез теломерных участков ДНК



Теломераза

- фермент, надстраивающий концы хромосом, содержит РНК.
- удлинение происходит путем **обратной транскрипции:**

РНК → ДНК

- На концах хромосом находятся длинные некодирующие повторы 5' – ГГТ ТАГ – 3' 10-15 тысяч н.п. у человека

- Теломераза **активна** в клетках
 - зародышевого пути
 - эмбриональных
 - стволовых
 - раковых – поэтому они бессмертны
- Теломераза **неактивна**
 - в соматических клетках – ген для нее там, конечно же, есть, но выключен

Значение для медицины

После каждого клеточного цикла *теломеры укорачиваются* на один повтор, а следовательно, количество делений клетки ограничено числом повторов в теломерной цепи. Согласно этому бесконечный рост и деление опухолевых клеток происходят из-за присутствия активных мутантных теломераз, которые препятствуют разрушению теломер.

OrSMU, department of chemistry

Спасибо за внимание!