



ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА КАФЕДРАСЫ

ДӘРІС 6.

РЕПЛИКАЦИЯНЫҢ КОРНБЕРГ ҰСЫНҒАН МОДЕЛІ. РЕПЛИКАЦИЯ
ПРОЦЕСІНІҢ БАҒЫТЫ ЖӘНЕ БАСТАЛУ НҮКТЕЛЕРІ.

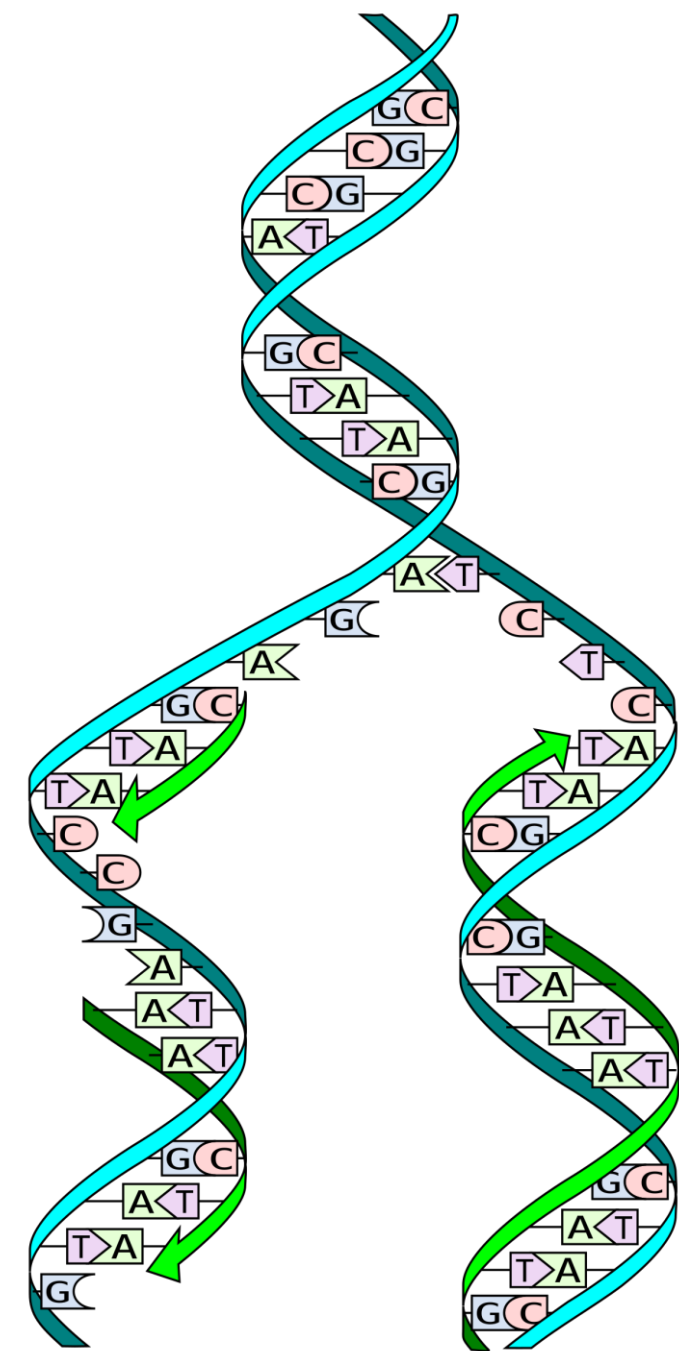
Лектор: PhD, қауымдастырылған
профессор Тайпақова С.М.

Дәріс жоспары:

- ДНҚ репликациясы
- ДНҚ репликациясының басталу нүктесі
- Процесске қатысатын негізгі ферменттер
- Эукариоттар мен прокариоттардағы ДНҚ репликациясының айырмашылығы
- Қорытынды

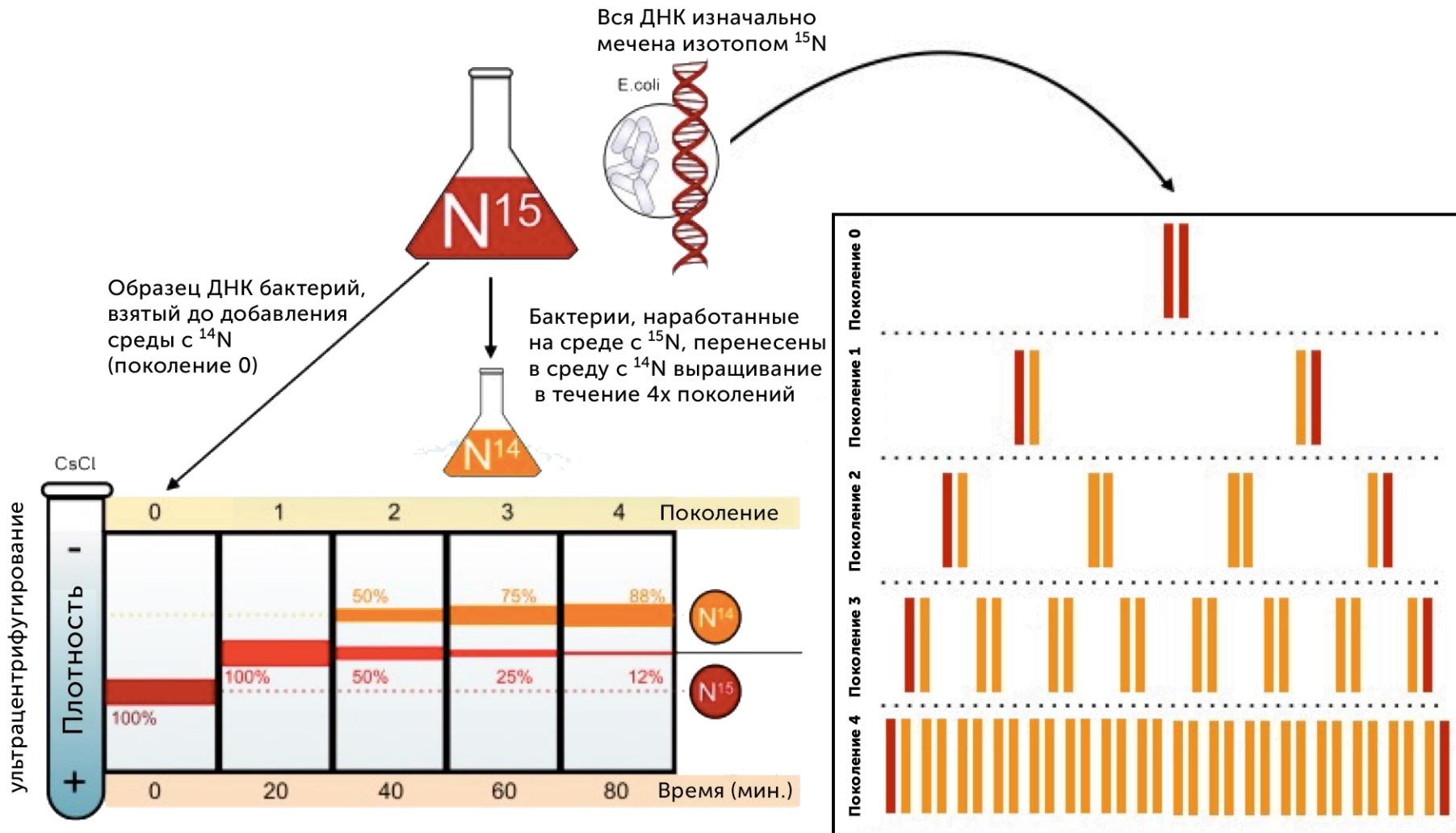
ДНК репликациясы

- **Реплика́ция** (латын тілінен replicatio – жаңару, қайталау) – ата-аналық ДНК молекуласы негізінде екі еншілес ДНК молекуласын құру процесі.
- ДНК репликациясын реписома деп аталатын 15-20 түрлі фермент-белоктардан тұратын күрделі кешен жүзеге асырады.
- Арнайы ферменттердің көмегімен аналық ДНК-ның қос спиралі екі жіпшеге бөлінеді, қалыптасқан әрбір жіптің негізінде екінші тізбек синтезделіп, екі бірдей еншілес ДНК молекуласын құрайды. Кейін олар жеке спиральдарға ширатылады.
- Аналық жасушаның бөлінуі кезінде әрбір еншілес жасуша бастапқы аналық жасушаның ДНК-сына ұқсас ДНК молекуласының бір көшірмесін алады. Бұл процесс генетикалық ақпараттың ұрпақтан ұрпаққа дәл берілуін қамтамасыз етеді.



Зерттеу тарихы

Әрбір ДНК молекуласы бастапқы аналық молекуланың бір тізбегінен және жаңадан синтезделген бір тізбектен тұрады. Мұндай репликация механизмі жартылай консервативті деп аталады. Қазіргі уақытта бұл механизм Мэттью Месельсон мен Франклин Стальдың (1958) тәжірибелерінің арқасында дәлелденген деп саналады.



Жалпы деректер

ДНҚ репликациясы жасушаның бөлінуіндегі негізгі процесс болып табылады. Жасуша бөлінген кезде ДНҚ толығымен және тек бір рет репликацияланады. Бұл ДНҚ репликациясын реттеудің белгілі механизмдерімен қамтамасыз етіледі.

Репликация үш кезеңде жүзеге асады:

- 1. Репликация инициациясы**
- 2. Элонгация**
- 3. Репликация терминациясы**

Репликацияның принциптері

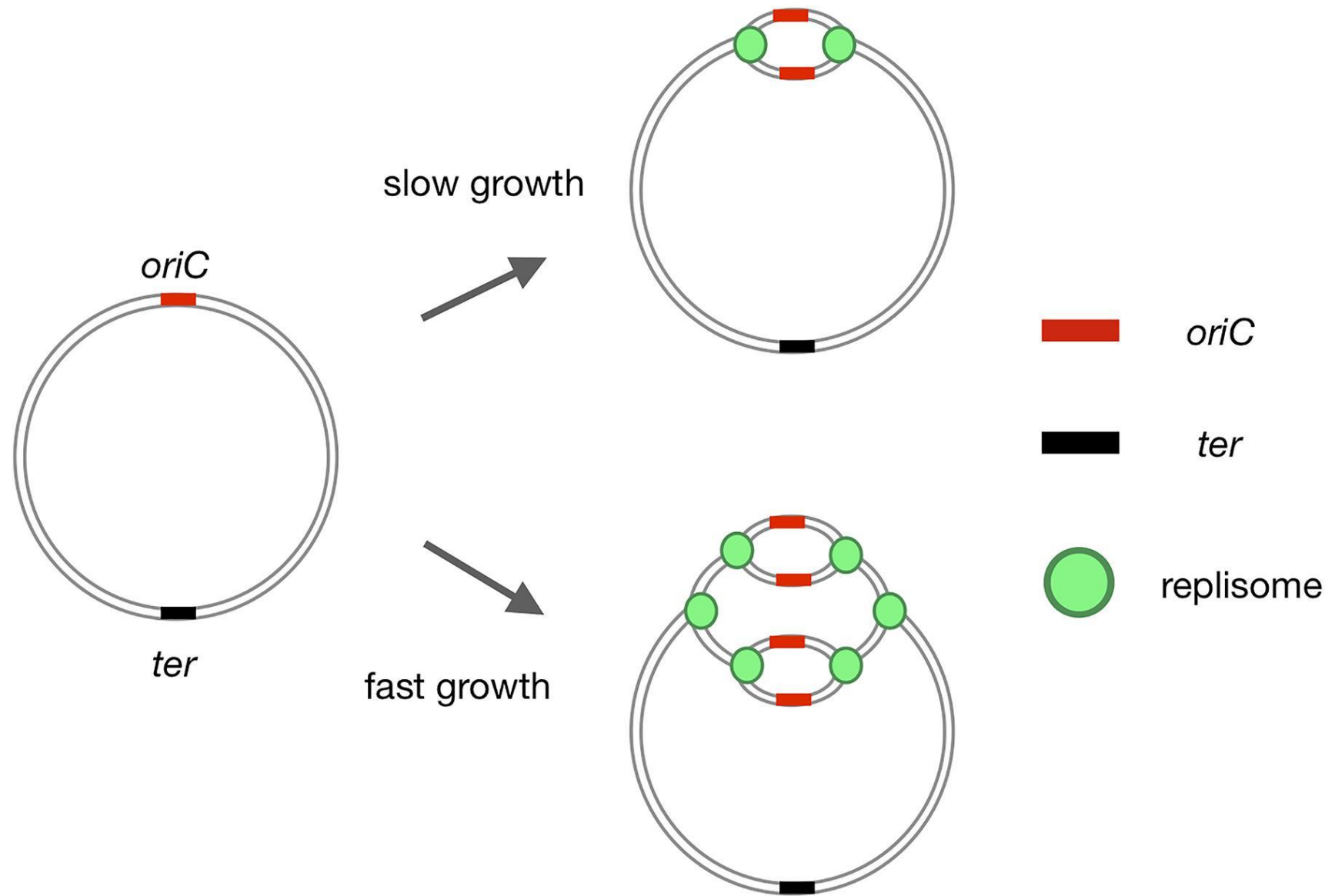
- 1. Комплементарлық.**
- 2. Антипараллельділік.**
- 3. Униполярлық.**
- 4. Ашытқыға (праймер) тәуелділік.**
- 5. Үзілісті.**
- 6. Жартылай консервативті.**

- Репликация негізінен инициация сатысында реттеледі. Репликация ДНҚ-ның кез келген нүктесінен емес, *репликацияның басталу нүктесі* деп аталатын қатаң анықталған бөлімнен басталады. *репликацияны бастау нүктесі ori* деп белгіленеді.
- *Репликацияның басталу нүктесінің* құрылымы (нуклеотидтік бірізділігі) әртүрлі түрлерде ерекшеленеді, бірақ барлық организмдерде ол **АТ-ға бай**, сондықтан балқуы төмен тізбек болып табылады..

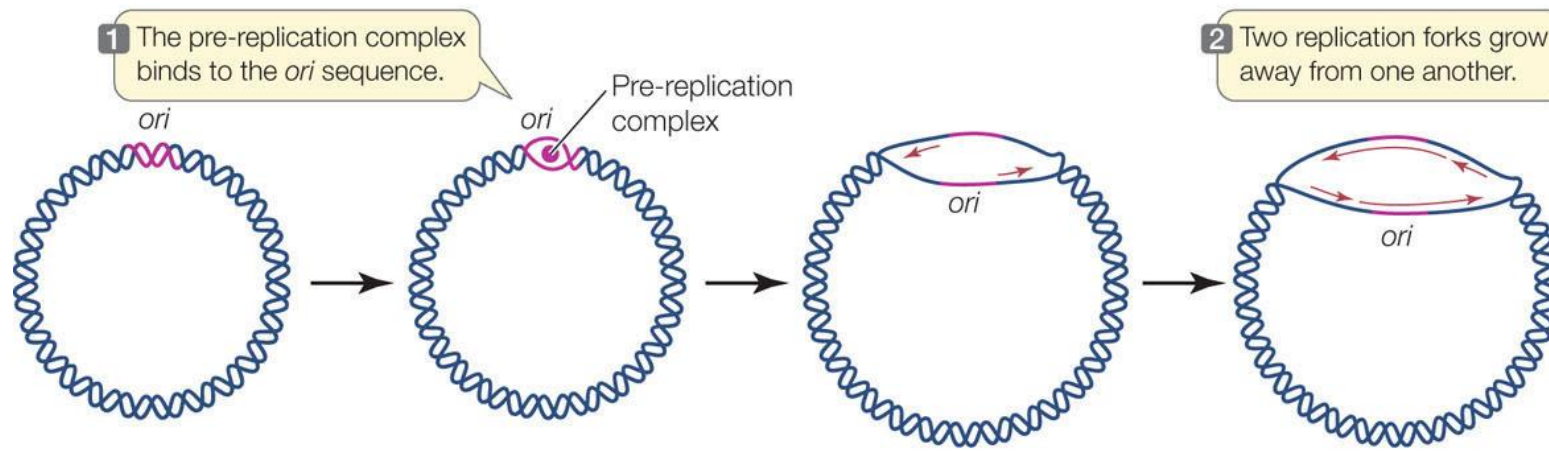


oriC – ішек таяқшасы ДНҚ-сының репликациясын бастау орны.

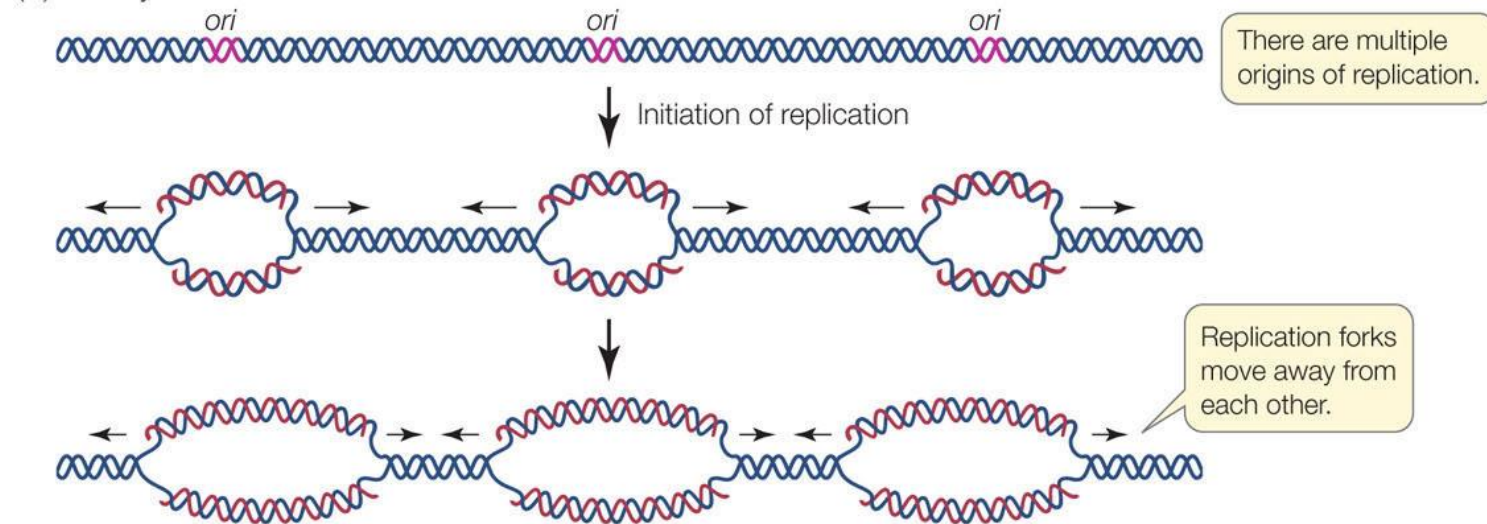
oriC 245 ж.н. және екі функционалды аймақты қамтиды: репликация инициациясының факторы DnaA спецификалық байланысу аймағы және ДНҚ спиралының бірінші реттік ағыту аймағы - DUE (DNA unwinding element)



(A) Prokaryotic



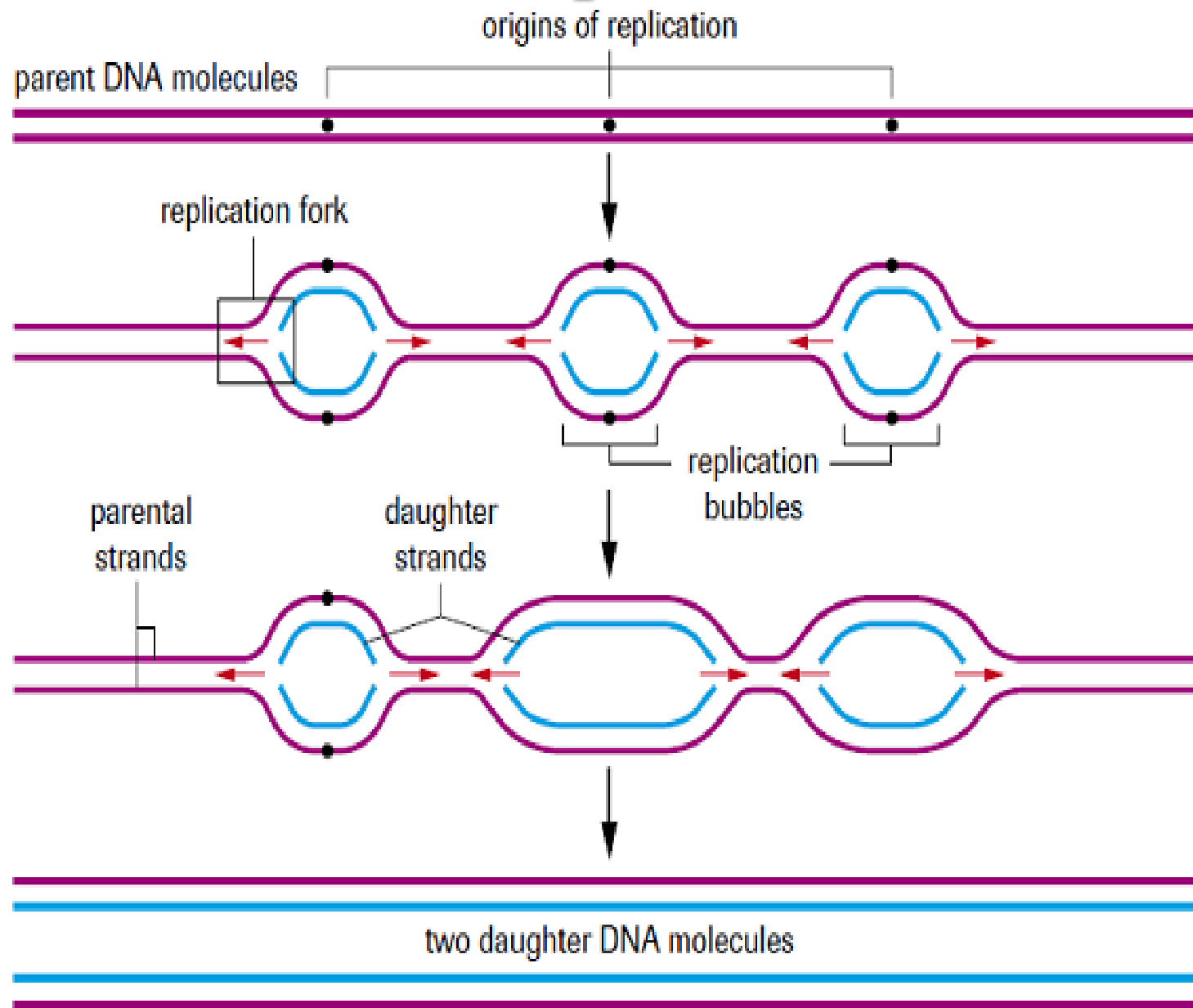
(B) Eukaryotic



- Бір репликацияның басталу нүктесінен тұратын репликацияның бір құрылымдық өлшем бірлігі — **репликон** деп аталады. Демек, репликон - бұл репликацияның басталу нүктесі бар және осы нүктеден ДНҚ синтезі басталғаннан кейін репликацияланатын ДНҚ бөлімі.
- **Прокариоттардың** хромосомалары мен плазмидаларында бір, сирек бірнеше ДНҚ репликациясының басталу нүктелері болады және, әдетте, **бір репликонды құрайды**. Демек бүкіл геномның репликациясы репликацияны бастаудың бір ғана актісінің нәтижесі болып табылады;

Эукариоттық геномдарда (сондай-ақ олардың жеке хромосомаларында) мұндай нүктелер көп және дербес хромосоманың жалпы репликация уақытын едәуір қысқартатын көптеген тәуелсіз репликондардан тұрады.

Репликация айыры



Репликация репликацияның басталу нүктесінде ДНҚ қос спиралінің шешілуінен басталады. Нәтижесінде **репликациялық айыры** деп аталатын Ү-тәрізді құрылым — нақты репликацияның жүретін орны түзіледі. Әрбір **origi сайтынан** репликацияның бір бағытты немесе екі бағытты болуына байланысты бір немесе екі репликация айырылымы түзіледі. Репликация айырылымы жылжу барысында репликацияланбаған ДНҚ-ның ұзын аймақтарымен қоршалған ДНҚсы репликацияланған хромосома аймағы — **репликация көзі немесе көпіршігі** пайда болады. Тізбектердің ажырау процесі **денатурация** немесе **балқу** деп аталады. ДНҚ бөлігін денатурациялау үшін қажетті энергия мөлшері **АТ** және **GC** байланыстарының қатынасына байланысты.

ДНҚ репликациясының энзимологиясы

Репликация айырында ДНҚ-ны үлкен ақуыз кешені (реписома) репликациялайды. Оның негізгі ферменті ДНҚ полимераза болып табылады.

Репликация айыры прокариоттарда минутына шамамен 100 000 жұп нуклеотид және эукариоттарда 500-5000 жылдамдықпен қозғалады.

ДНҚ полимераза – комплементарлық принципі бойынша ДНҚ матрицасында дезоксирибонуклеотидтердің полимерленуін катализдейтін фермент

ДНҚ лигазасы – қос тізбекті ДНҚ-ның үзілу орындарында іргелес дезоксинуклеотидтердің 5'-фосфорил және 3'-гидроксил топтары арасындағы фосфодиэфирлік байланыстардың түзілуін катализдейтін фермент.

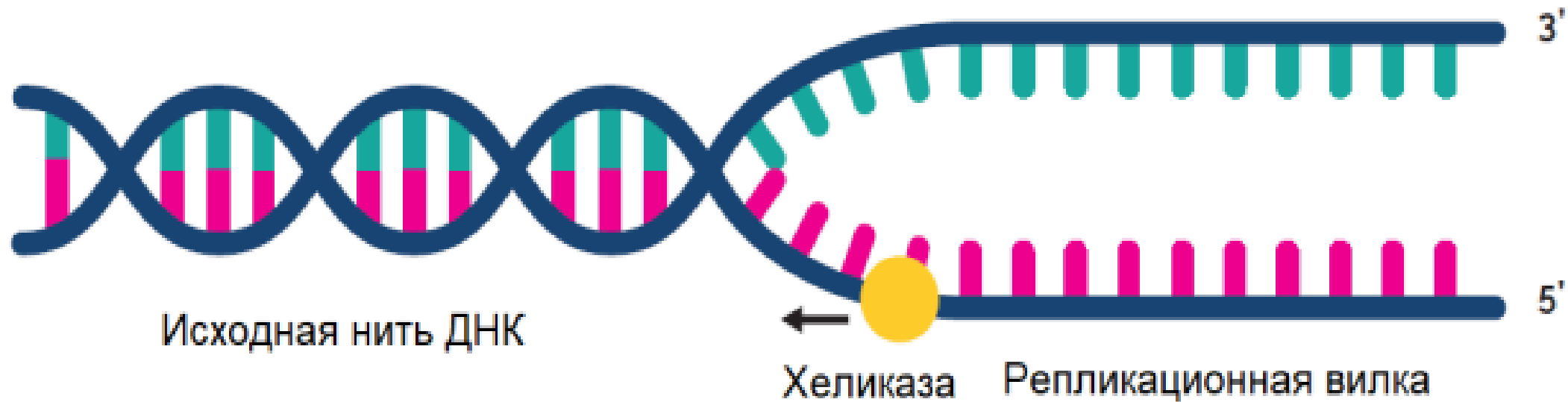
ДНҚ-хеликаза – қос тізбекті ДНҚ жіптерін бір тізбекке ажырататын фермент.

SSB протеиндері - бір тізбекті ДНҚ фрагменттерін байланыстырады және комплементарлы жұптасуды болдырмайды.

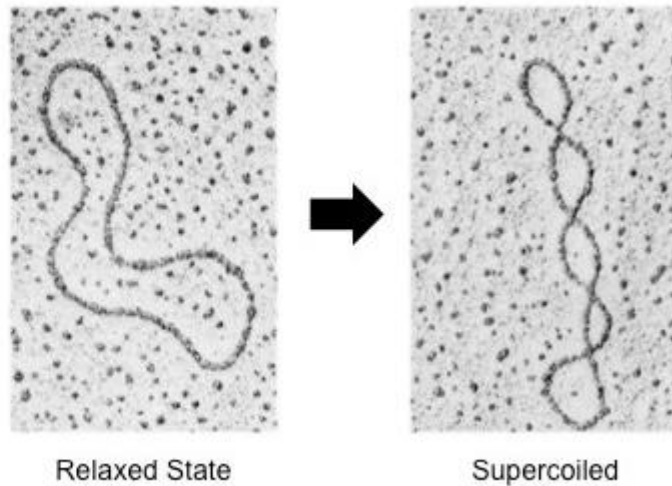
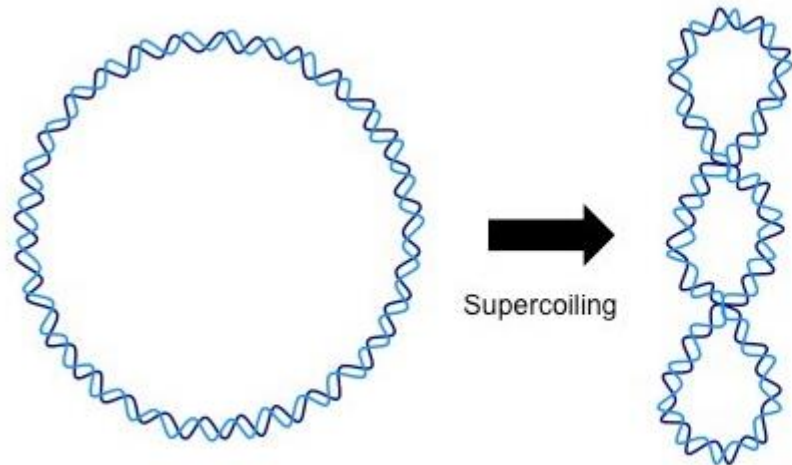
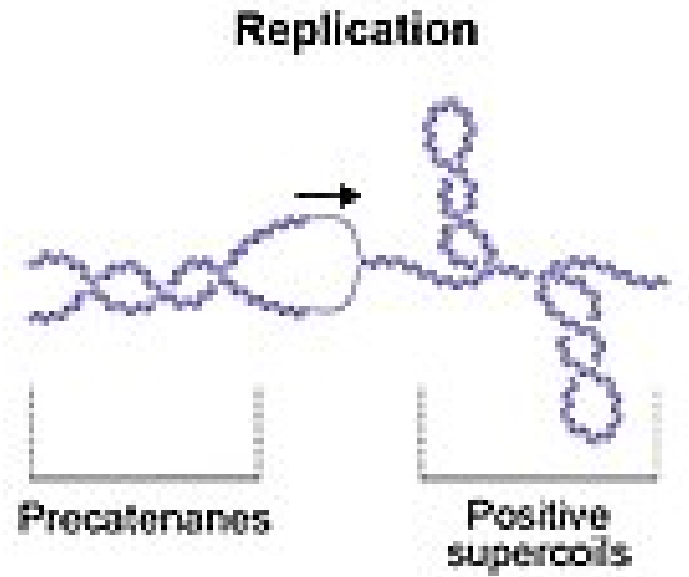
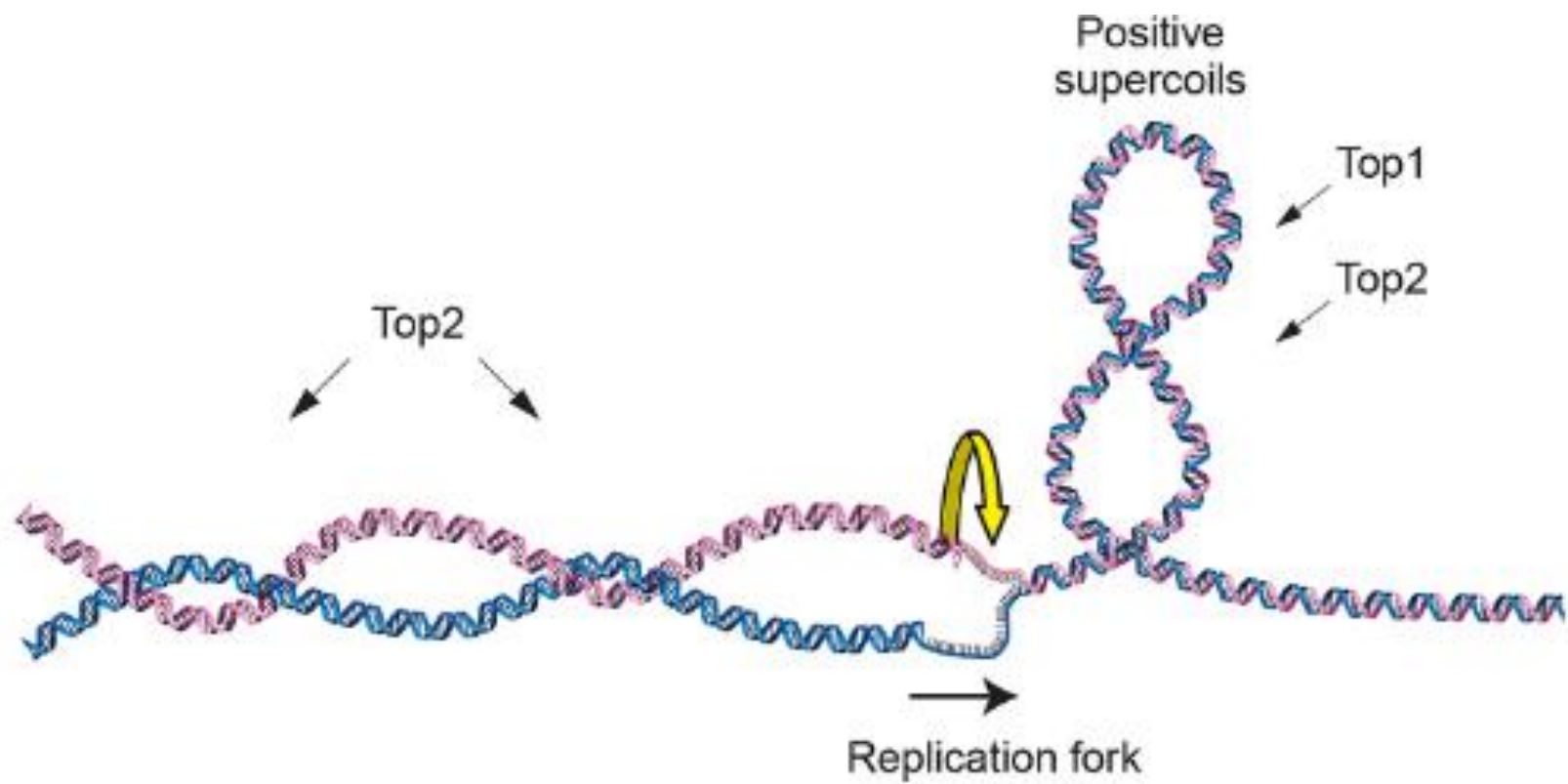
ДНҚ топоизомеразасы – ДНҚ-да бір тізбекті үзілістерді енгізу арқылы ДНҚ-ның супер ширатылуын шешетін фермент.

ДНҚ праймаза - бұл бір тізбекті ДНҚ матрицасына комплементарлы паймер деп аталатын РНҚ-ның қысқа бөлігін синтездейтін РНҚ-полимераза ферменті.

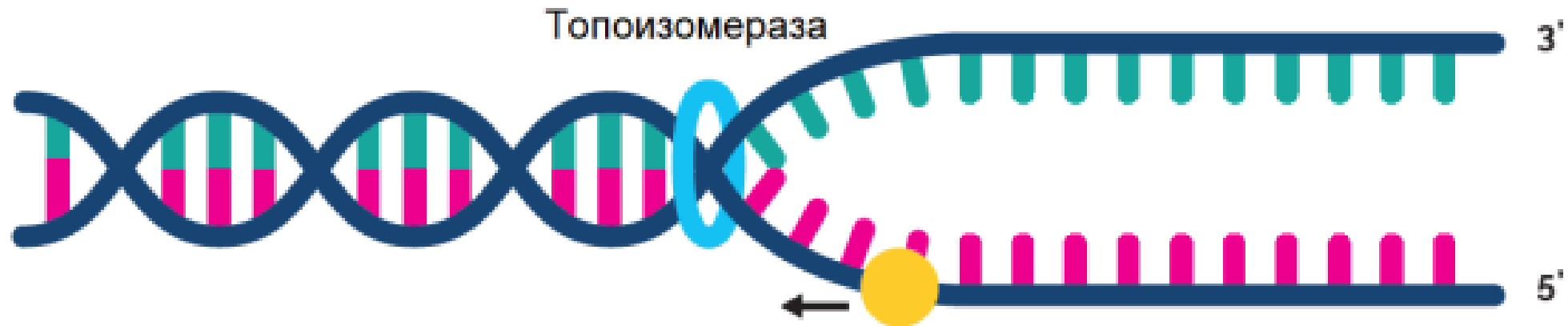
Репликацияның молекулалы механизмі



Хеликаза - репликацияның басталу нүктесіне байланысатын алғашқы фермент. Хеликаза ферментінің міндеті – ДНҚ молекуласының қос спиралін (азоттық негіздер арасындағы сутектік байланыстарды үзіп) сыдырма секілді шеше отырып репликациялық айырымды алға жылжыту болып табылады.



Топоизомераза ДНҚ репликациясында маңызды рөл атқарады. Бұл фермент ДНҚ қос спиралының аса қатты ширатылуын болдырмайды, яғни ДНҚ хеликаза әсерінен қос тізбектің тарқатылуы кезінде репликация айырымының алдындағы ДНҚ-дағы топологиялық қиындықтарды жеңілдетеді. Ол тізбектердің шамадан тыс орамдарын жою үшін тізбектерге уақытша үзілістерді енгізеді, содан кейін тұрақты зақымдануды болдырмау үшін оларды жөндейді.

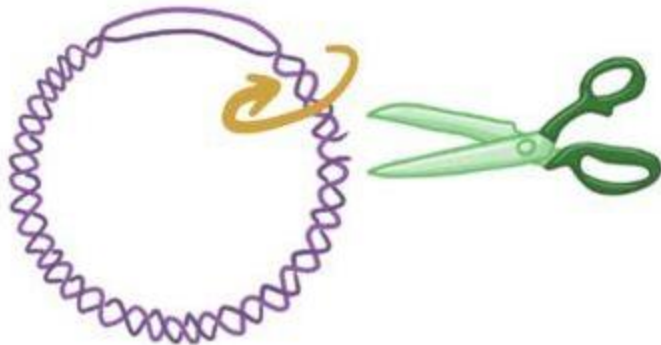


Топоизомераза I - репликация айырымы аумағындағы бір тізбекті уақытша үзіп, ДНҚ спиралінің өз осі бойымен айналуын қамтамасыз етеді. Тополигиялық қиындықтар шешілген соң тізбектер қайта тігіледі.

Топоизомераза II - екі тізбекті уақытша үзіп, күрделі түйіндердің шешілуіне мүмкіндік береді.

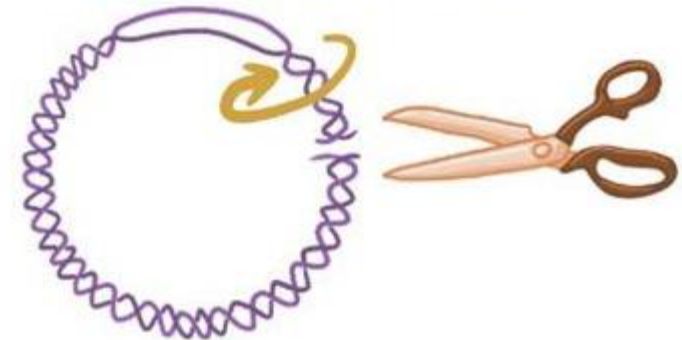
TOPOISOMERASE I

~ CUTS ONE STRAND



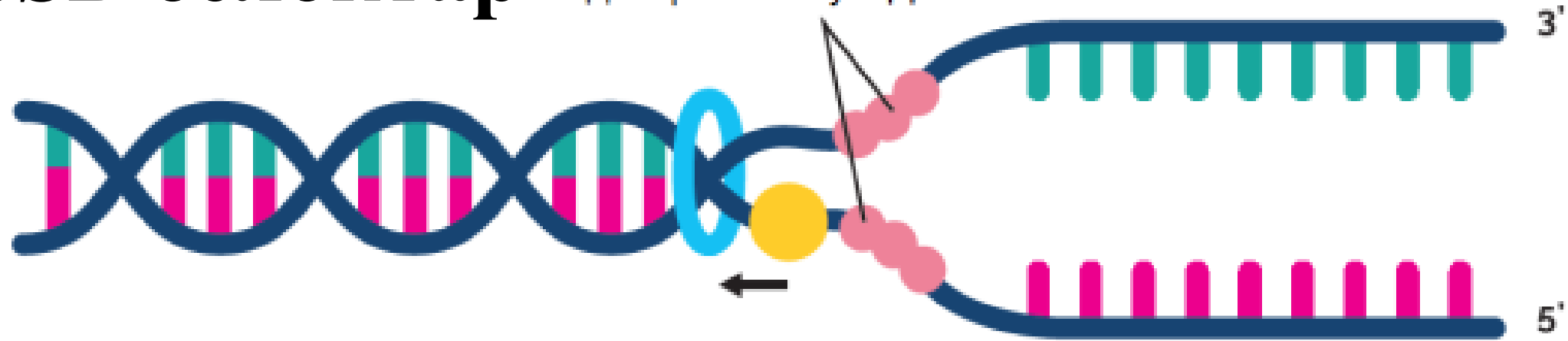
TOPOISOMERASE II

~ CUTS BOTH STRANDS



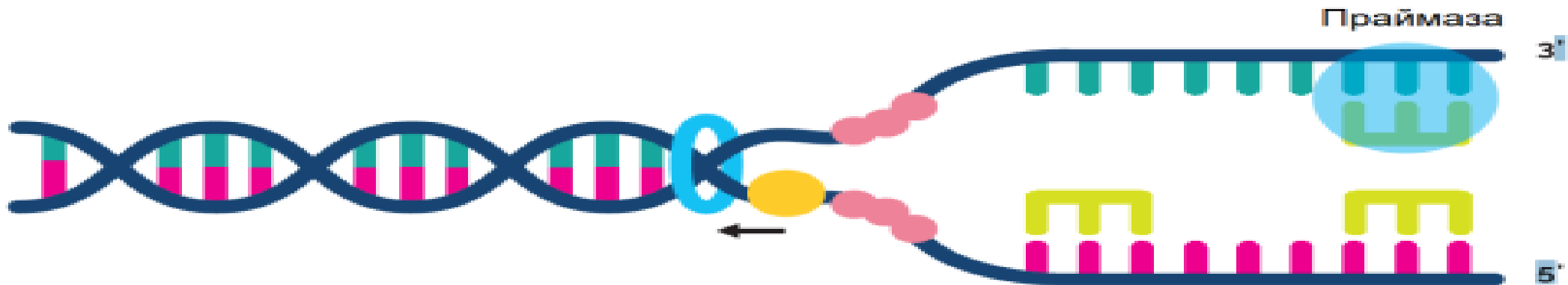
SSB белоктар

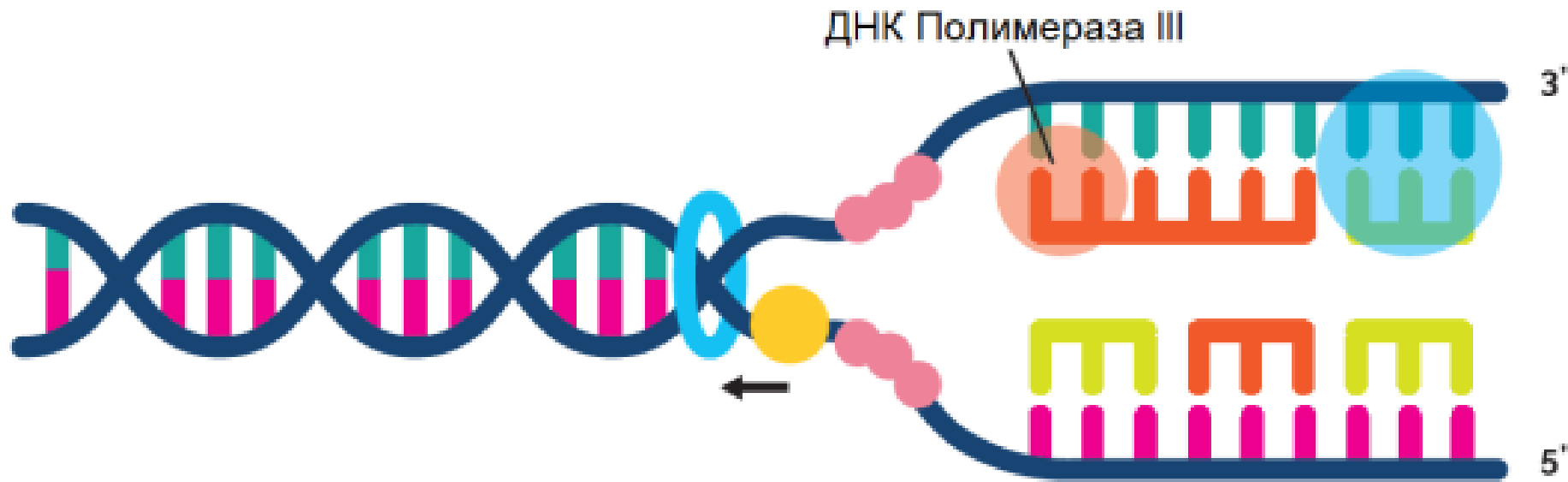
Белки, связывающие
одноцепочечную ДНК



- Бір тізбекті ДНҚ-ны байланыстыратын ақуыздар екі тізбекті бір-бірінен бөлуге көмектеседі. Олар ДНҚ-ның жеке жіптерін репликация айырылымы жанында орап, олардың қос спиральға қайта жиналуына ренатурациялануға жол бермейді. Олар ДНҚ-ны денатурацияламайды, тек бір тізбекті күйді бекітеді. Олардың бір тізбекті ДНҚ-ға туыстығы жоғары. Ақуыз қос тізбекті ДНҚ-мен байланыспайды.

ДНҚ праймаза – ДНҚ репликациясына қатысатын фермент және РНҚ полимеразаның бір түрі. Праймаза ssDNA (бір тізбекті ДНҚ) үлгісіне комплементарлы **праймер** деп аталатын қысқа РНҚ (немесе кейбір тірі ағзалардағы ДНҚ фрагментінің синтезін катализдейді. Бактерияларда праймаза ДНҚ хеликазасымен байланысып, **праймосома** деп аталатын кешен түзеді. Праймазаны хеликаза белсендіреді, онда ол **ұзындығы шамамен 11 ± 1 нуклеотидтер болатын қысқа РНҚ праймерін синтездейді**. Праймердің бос 3' соңына элонгация сатысында ДНҚ полимераза арқылы жаңа нуклеотидтер қосылады. Репликацияның элонгациясынан кейін РНҚ бөлігі 5'-3' экзонуклеаза арқылы жойылады және ДНҚ-мен толтырылады.





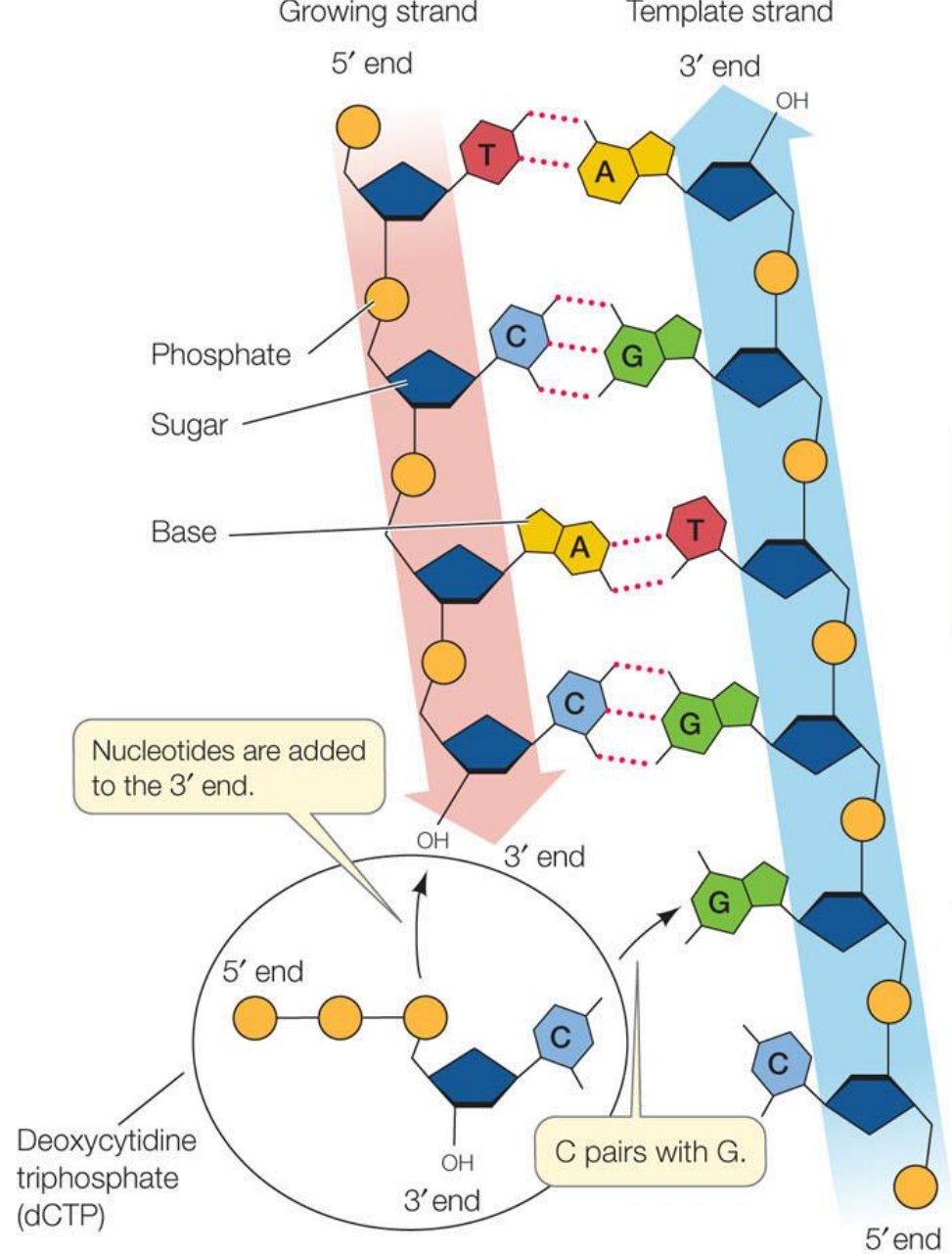
ДНҚ репликациясының негізгі молекулаларының бірі **ДНҚ полимераза ферменті** болып табылады. ДНҚ-полимеразалар ДНҚ синтезіне жауап береді: олар өсіп келе жатқан ДНҚ тізбегіне бірінен соң бірі нуклеотидтерді матрицаға комплементарлы қосады.

Оларға әрқашан бір тізбекті ДНҚ матрица қажет.

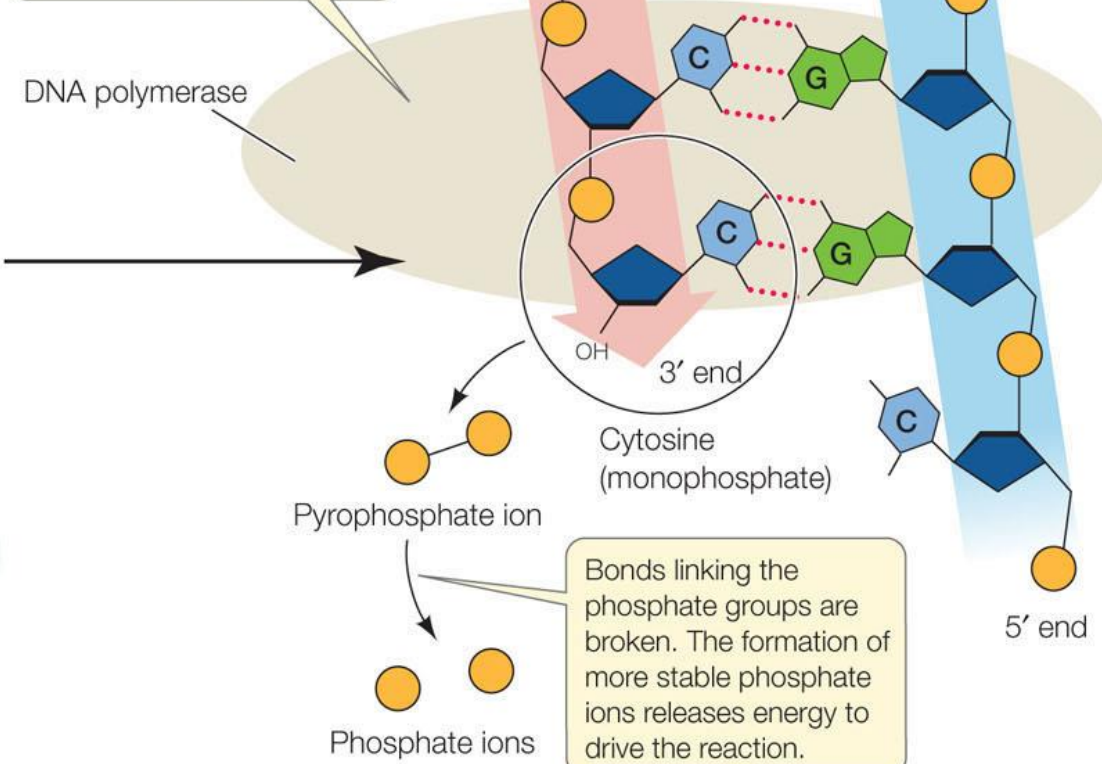
Олар нуклеотидтерді ДНҚ тізбегінің 3' ұшына ғана қоса алады, өйткені ДНҚ 5' -> 3' бағытында синтезделеді.

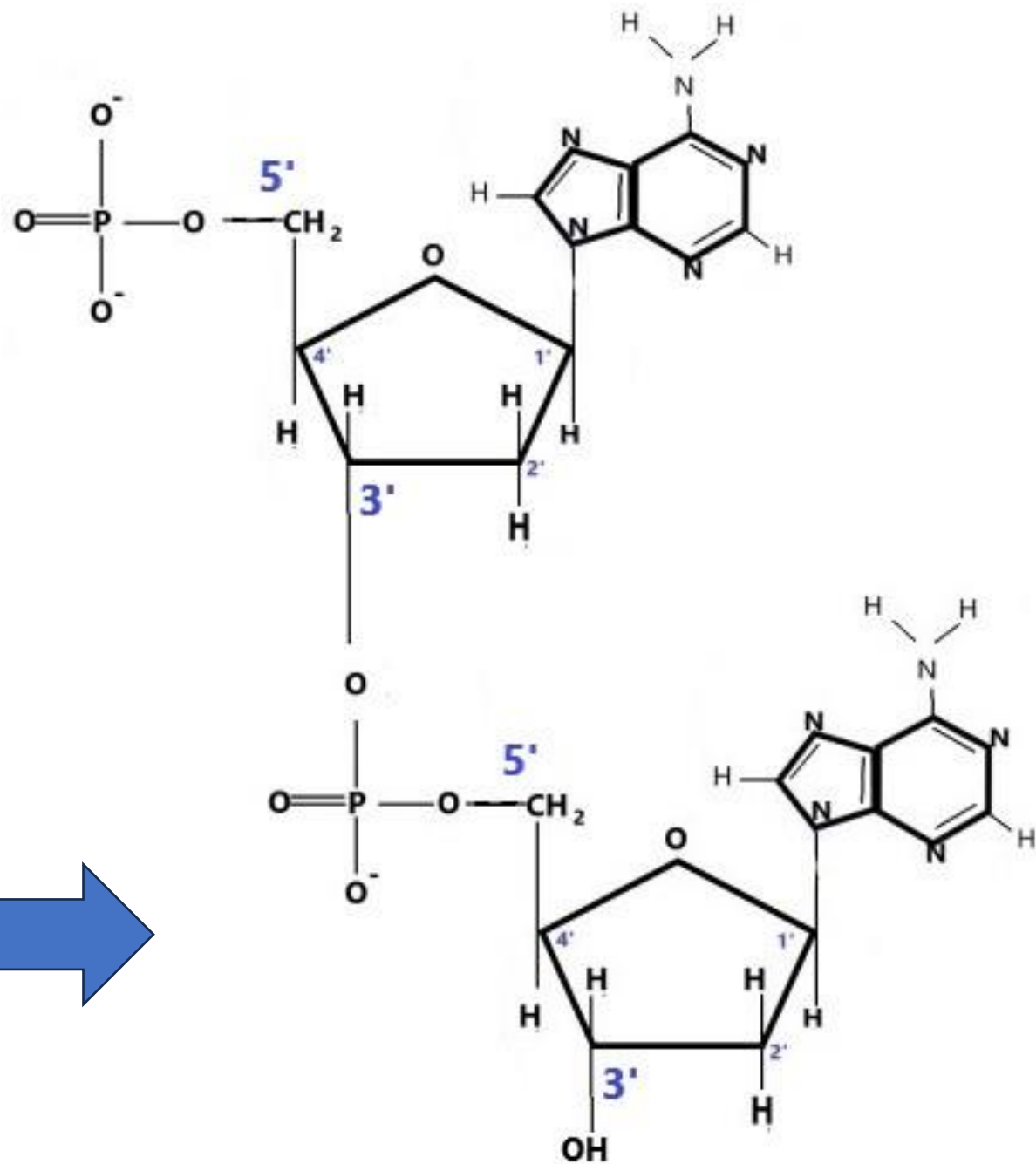
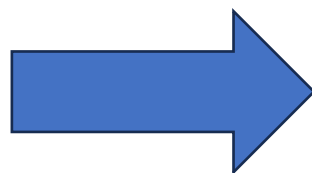
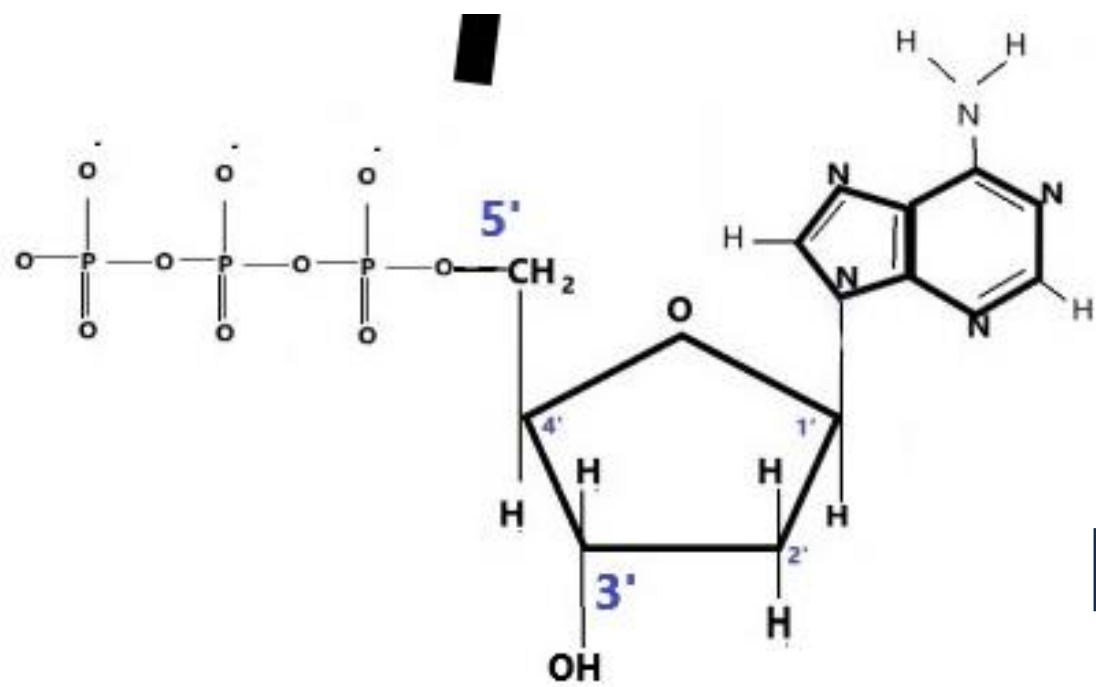
Олар ДНҚ-ның жаңа тізбегін синтездеуді нөлден бастай алмайды, сондықтан ДНҚ синтезінің бастапқы нүктесін қамтамасыз ету үшін оларға матрицалық тізбек және праймер немесе ашытқы деп аталатын қысқа фрагмент қажет.

Олардың коррекциялаушы белсенділігі бар, яғни жаңа тізбекке қате енгізілген «дұрыс емес» нуклеотидтерді алып тастап, өз жұмысын тексеріп отырады.



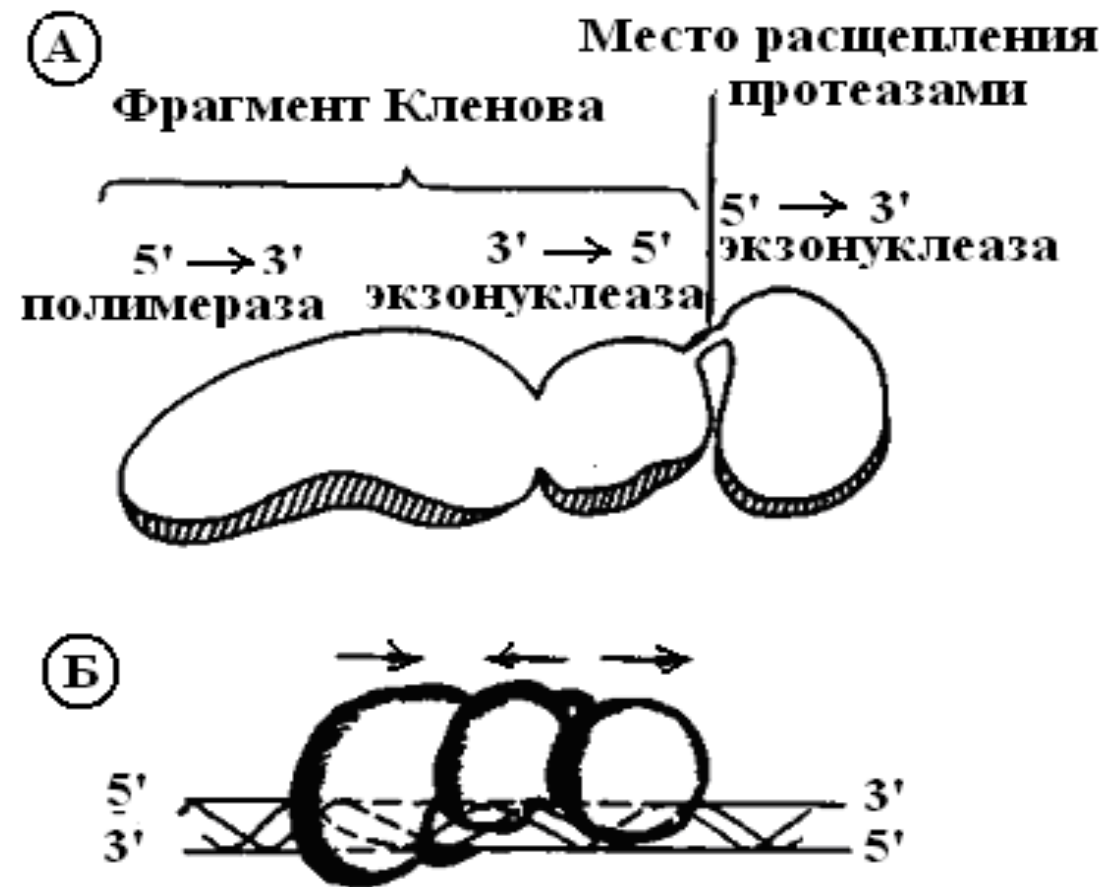
The enzyme DNA polymerase adds the next deoxyribonucleotide to the -OH group at the 3' end of the growing strand and releases pyrophosphate.



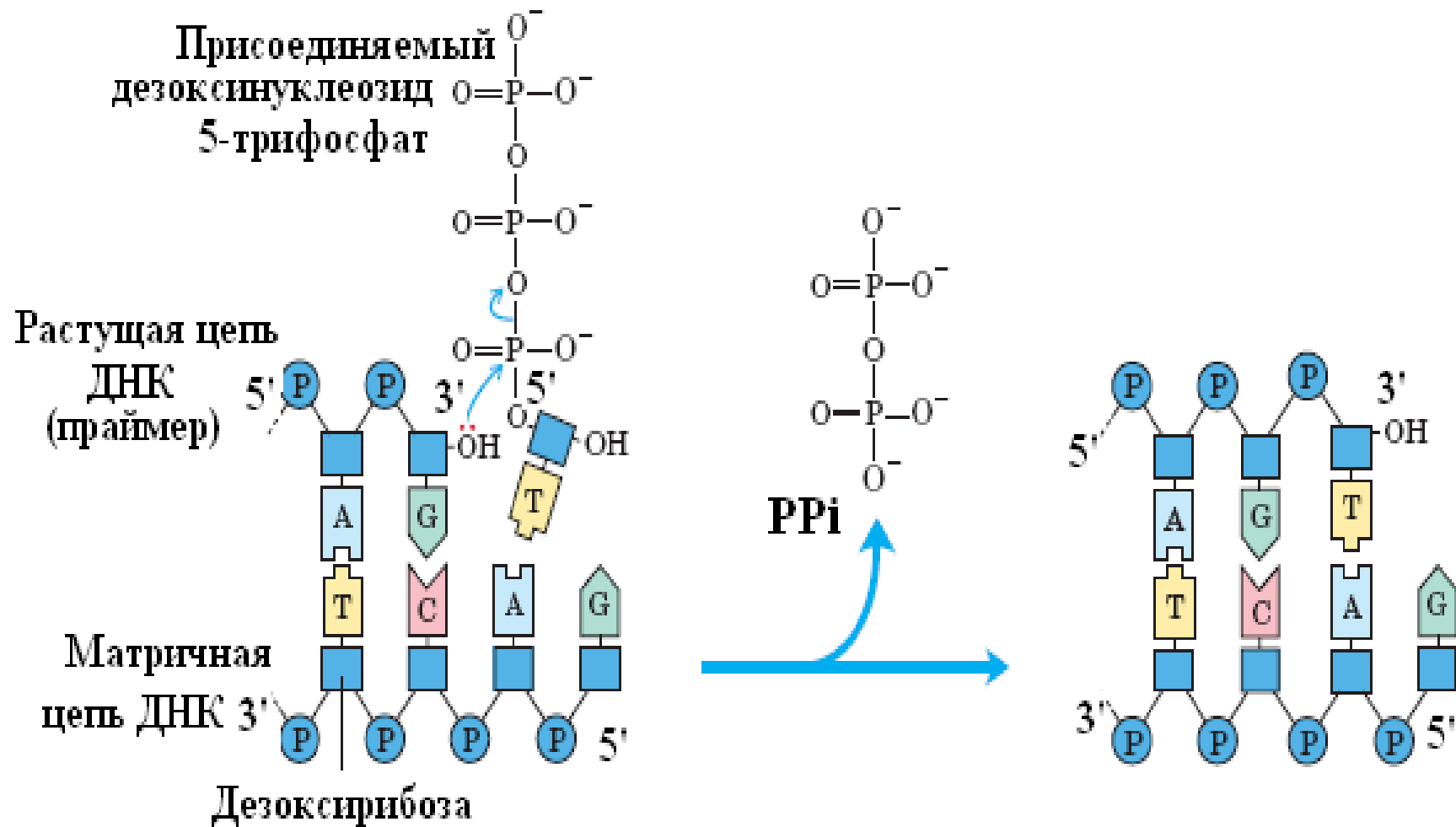


ДНК-полимераза I

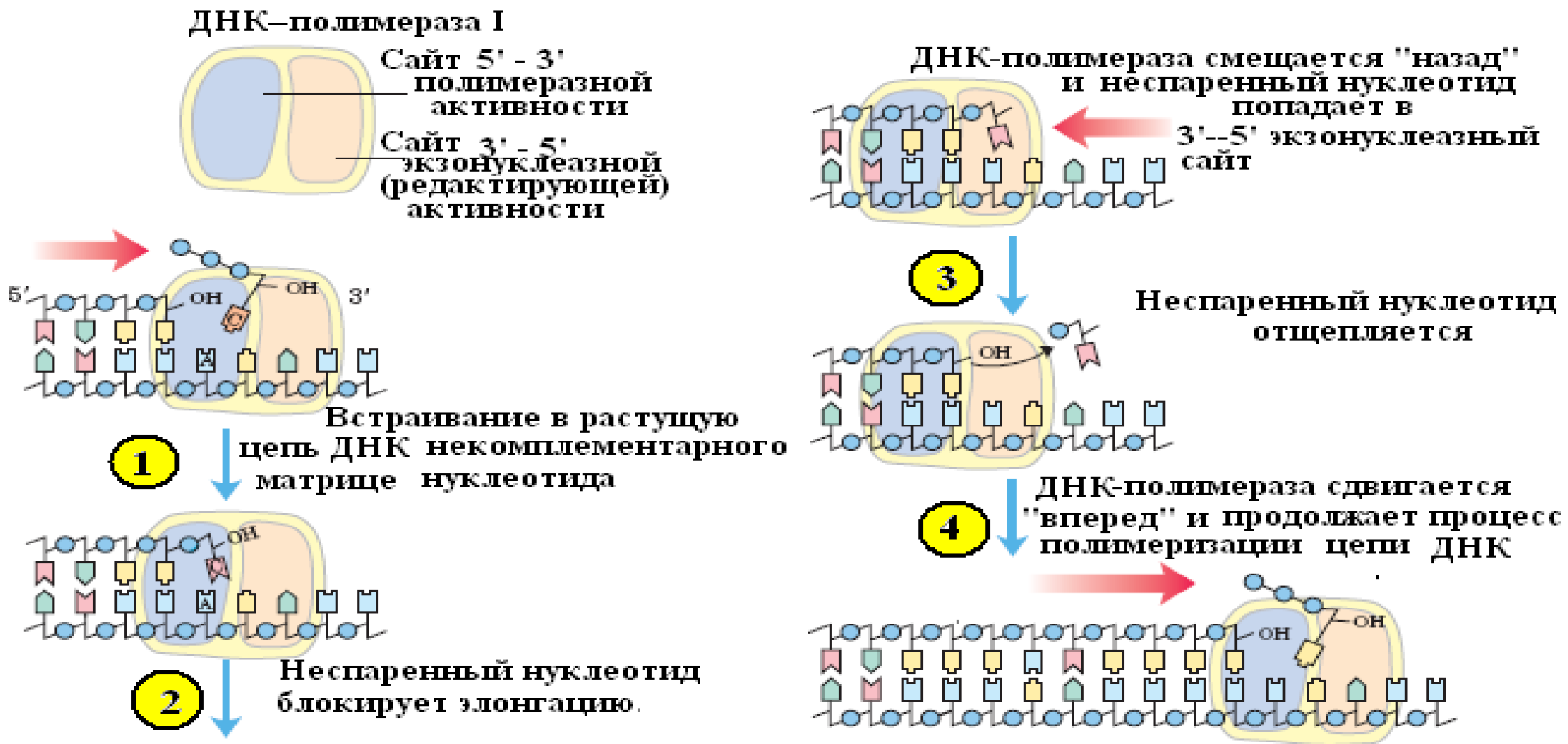
- Бірінші рет ДНК-полимераза 1958 ж *E. Coli*-дан Коренберг және қызметкерлермен бірге бөлініп алынды.
- Бұл фермент молекулалық салмағы 103 кДа болатын мономерлі полипептидті тізбектен және 3 доменді құрылымнан тұрады, әр домен өзіне тән ферментативті белсенділікке ие.



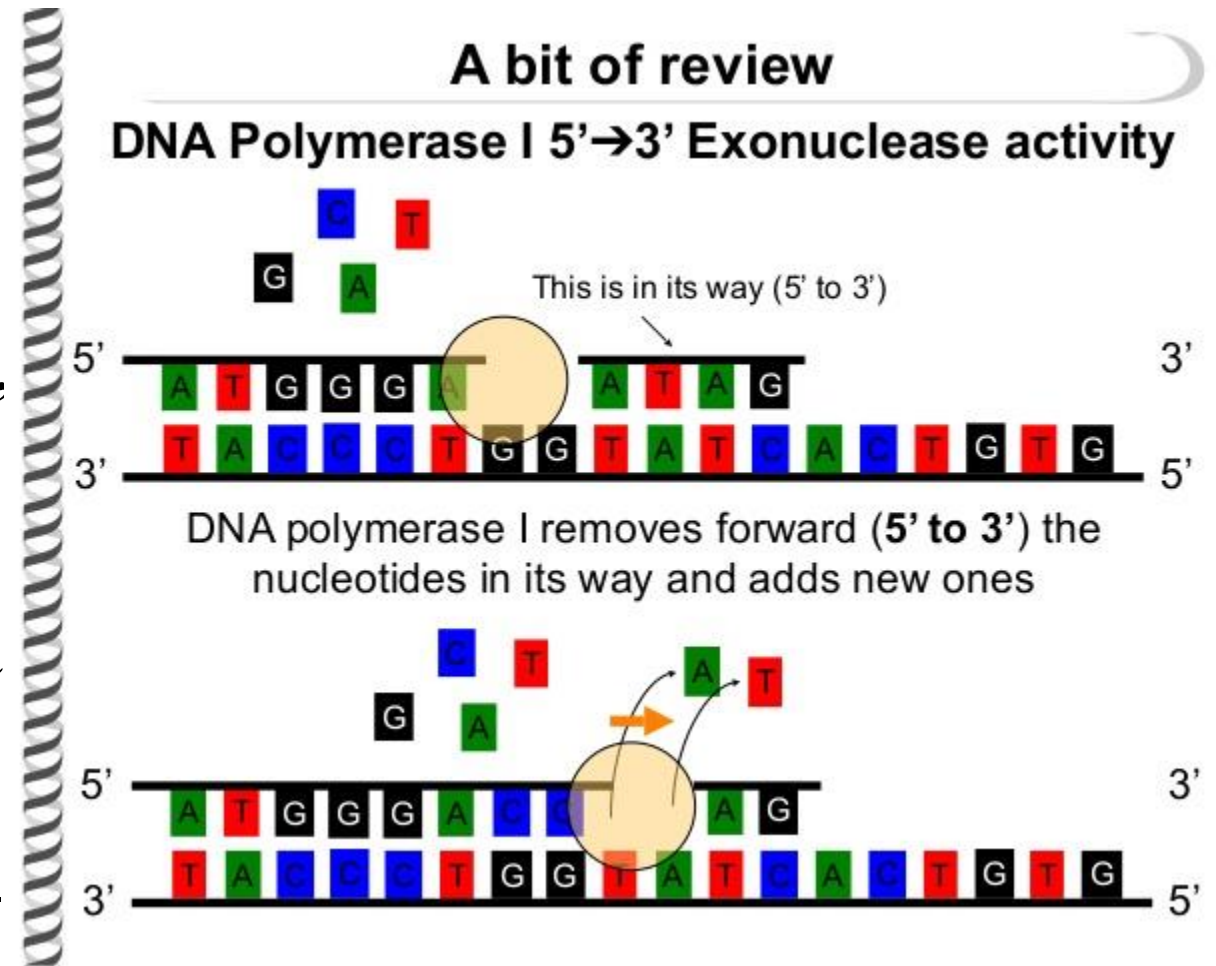
- **5'-3' полимеразалық белсенділік.** Реакция үшін бір тізбекті ДНК-матрица және осы бөлікке көмпланентарлы 3'-ОН соңы мен праймер фрагменті қажет.



- 3'-5' экзонуклеазалық белсенділік. 3'-ОН соңынан біртізбекті, екітізбекті ДНҚ-ны гидролиздейді. 3'-5' экзонуклеаза ДНҚ-синтезі кезіндегі қателіктерді жояды. 3'-5' экзонуклеаза ДНҚ-ның тек қана бірікпеген бөліктерінде диэфирлі байланыстарды ыдыратады.

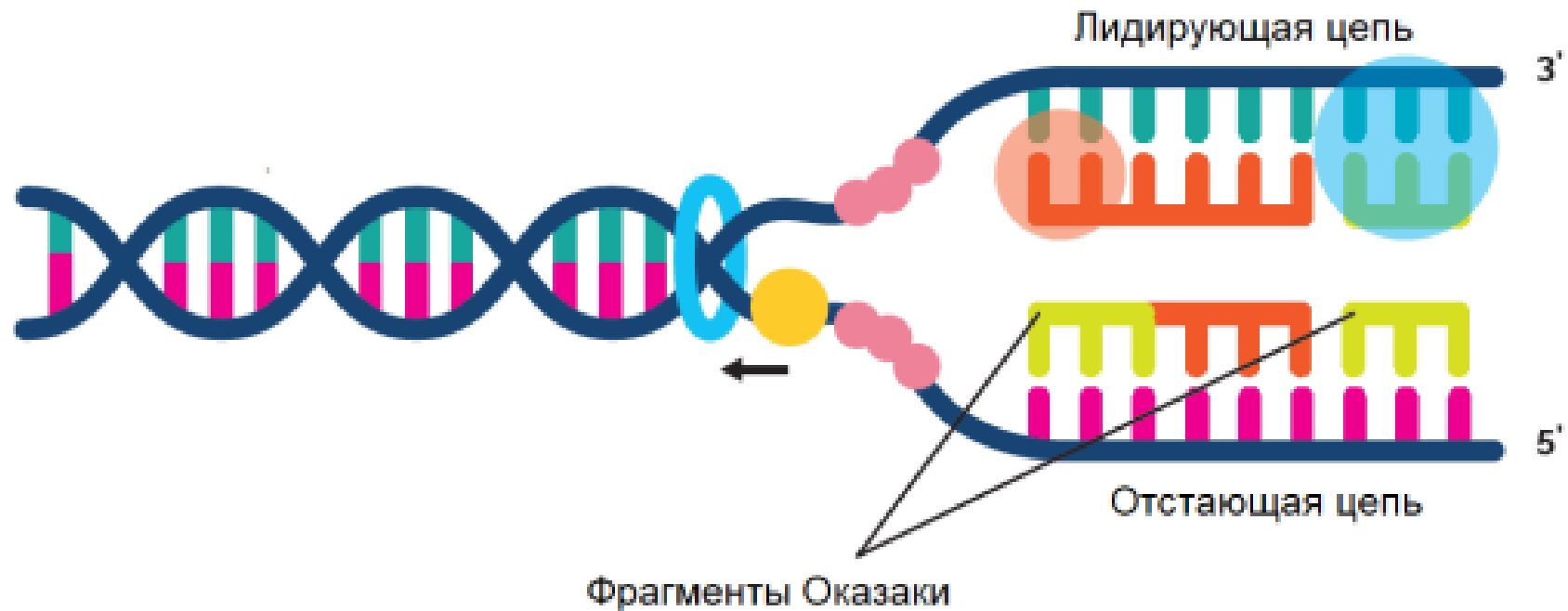


- **5'-3' экзонуклеазалық белсенділік.**
- Бос 5'-соңынан бастап екі тізбекті ДНҚ-ның бір тізбегін (цепь) деградиялайды. 5'-3' экзонуклеазаның 3'-5' экзонуклеазадан айырмашылығы 5'-3' экзонуклеаза ДНҚ-ның тек қана біріккен бөліктерінде диэфирлі байланыстарды ыдыратады, оған қоса 3'-5' экзонуклеаза бір мезетте бір нуклеотидті кесе (расщеплять), 5'-3' экзонуклеаза 5'-соңына ұзындығы 10-қалдықтан тұратын олигонуклеотидтерді кесе алады.



- 5' → 3' полимераза және 3' → 5' экзонуклеазалардан тұратын ДНК-полимеразаның бифункционалды бөлігі **Кленов фрагменті** деп аталды (оны сипаттаған авторлардың бірінің атымен).





Ата-аналық тізбектердің бірінде 5'- 3'-бағытында репликация айырымының бағытымен сәйкес келетін жаңа тізбек үздіксіз синтезделеді. Бұл тізбек ДНҚ полимераза ферментінің репликация айырылымының бағытымен қатар жүргендіктен үздіксіз синтезделеді. Және оның синтезі үшін бір ғана тізбек матрица бола алады. Үздіксіз синтезделетін тізбек **бастаушы** немесе **жетекші тізбек** деп аталады.

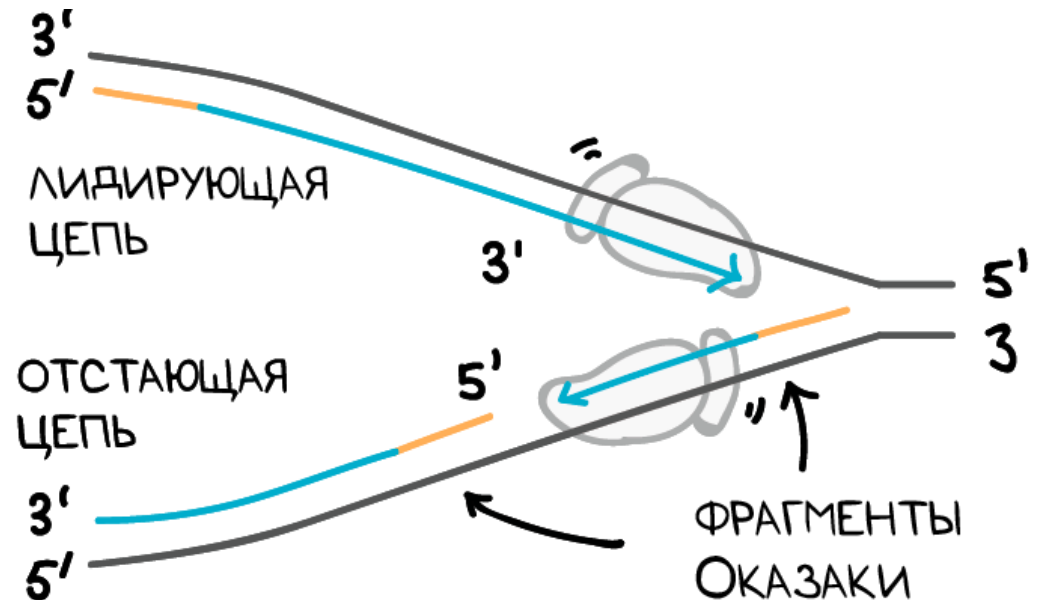
Репликациялық айырылымға қатысты қарама-қарсы бағыттталып 5'- 3'-бағытында қысқа фрагменттер есебінен үздікті синтезделіп отыратын түзбек **артта қалатын тізбек** деп аталады. Айырылым жылжыған сайын ДНҚ-полимераза одан алыстап кетеді де, белгілі бір уақытта ол үзіліп, ДНҚның үздікті синтезінің жаңа инициация нүктелері пайда болып, жаңа фрагментке қайта қосылып отырады.

Оказаки фрагменттері

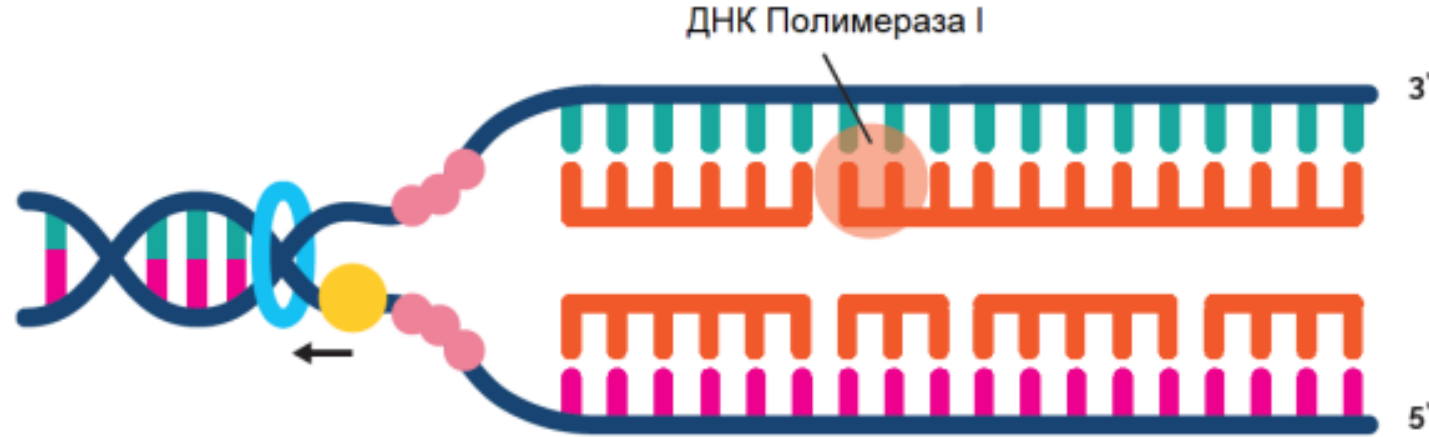
Оказаки фрагменттері (англ. *Okazaki fragments*) — Репликация барысында артта қалатын тізбектерде синтезделетін (5'-соңында РНҚ праймері бар) салыстырмалы қысқа ДНҚ фрагменттері.

E. coli-дегі Оказаки фрагменттерінің ұзындығы шамамен 1000-2000 нуклеотидті құрайды,
ал эукариоттарда әдетте 100-200 нуклеотидтерден тұрады.

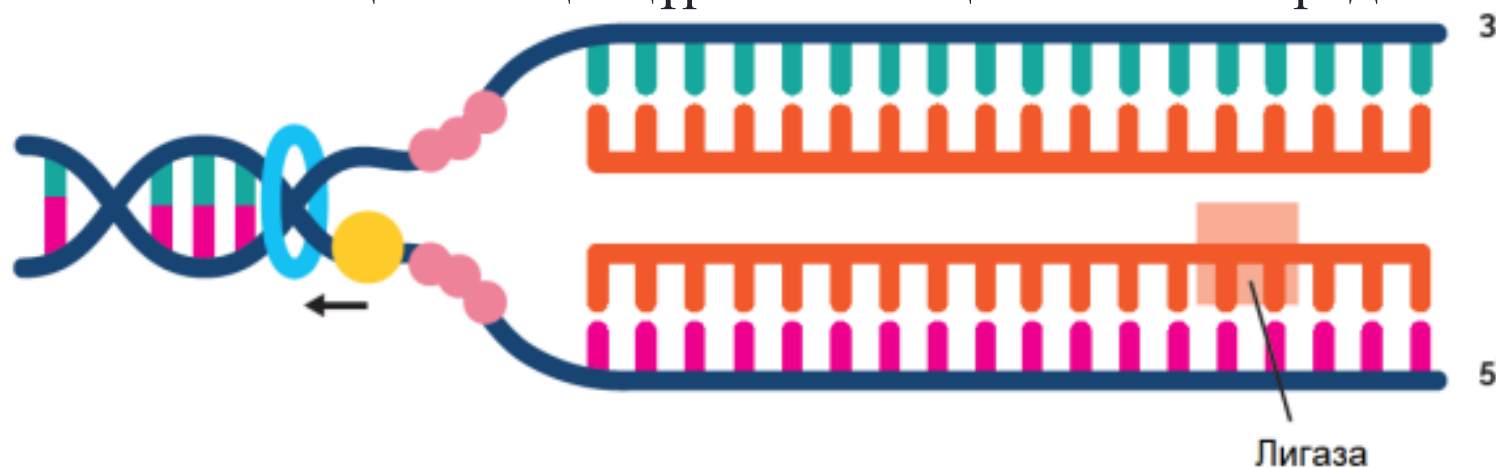
- Оказаки фрагменттерін 1968 жылы Рейджи Оказаки, Цунеко Оказаки және олардың бірлескен авторлары *E. coli*-де бактериофагтардың ДНҚ репликациясын зерттеу кезінде сипаттаған.
- Жетекші тізбекті бір праймер негізінде синтездеуге болады, ал артта қалған тізбектің қысқа Оказаки фрагменттерінің әрқайсысы үшін жаңа праймер қажет.



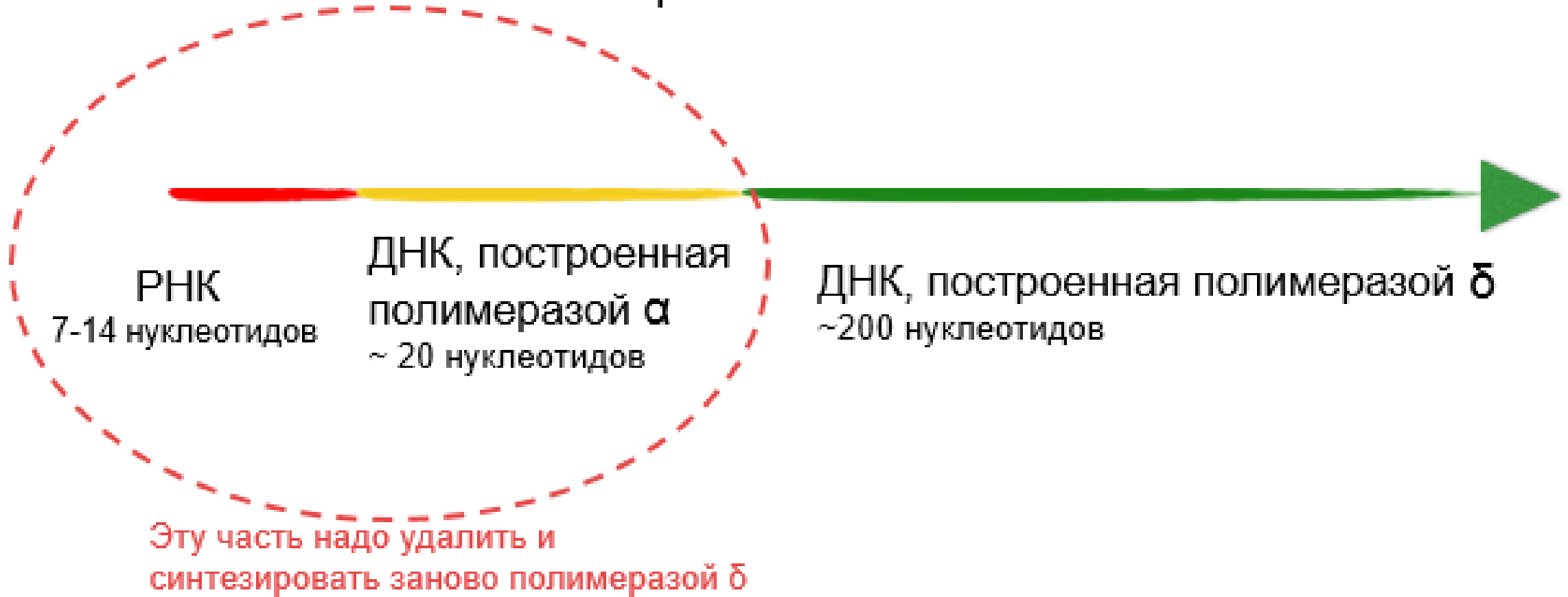
ДНҚ полимераза III Оказаки фрагментін синтездеп келесі праймердің 3'-соңына жеткен кезде ДНҚ-полимераза I ферменті 5'-экзонуклеазалық белсенділігімен 5'-3'-бағытында РНҚ нуклеотидтерін босатып РНҚ праймерлерін жояды және оларды ДНҚ-мен ауыстырады.



ДНҚ репликациясының соңғы кезеңі *ДНҚ-лигаза* ферментінің жұмысына байланысты. Ол Оказаки фрагменттерінің бірінің 3'-ұшының ОН тобын көршілес нуклеотидтің 5'-соңындағы фосфат тобымен байланыстырып, нәтижесінде фосфодиэфирлі байланыс түзәледі. Сөйтіп артта қалып қойған тізбектің алғашқы құрылымын қалпына келтіреді.



Фрагмент Оказаки



Differences in DNA Replication in Prokaryotes and Eukaryotes

Prokaryotes

Бес полимераза (I, II, III, IV, V)

Полимеразаның функциялары:

I - синтездеуге, жөндеу және РНК праймерлерін жоюға қатысады (дорепликация);

II – репарациялаушы фермент

III-негізгі полимерлеуші фермент

IV, V- ерекше жағдайларда қалпына келтіретін ферменттер

Полимеразалар экзонуклеазалар болып та табылады

Репликацияның бір басталу нүктесі

Оказаки фрагменттері 1000-2000 н.ж. ұзындықта

Eukaryotes

Бес полимераза ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$)

Полимеразаның функциялары:

α : полимерлеуші фермент

β : жөндеу ферменті

γ : митохондриялық ДНК синтезі

δ : негізгі полимерлеуші фермент, экзонуклеазалық қабілеті бар

ϵ : функциясы белгісіз

Барлық полимеразалар

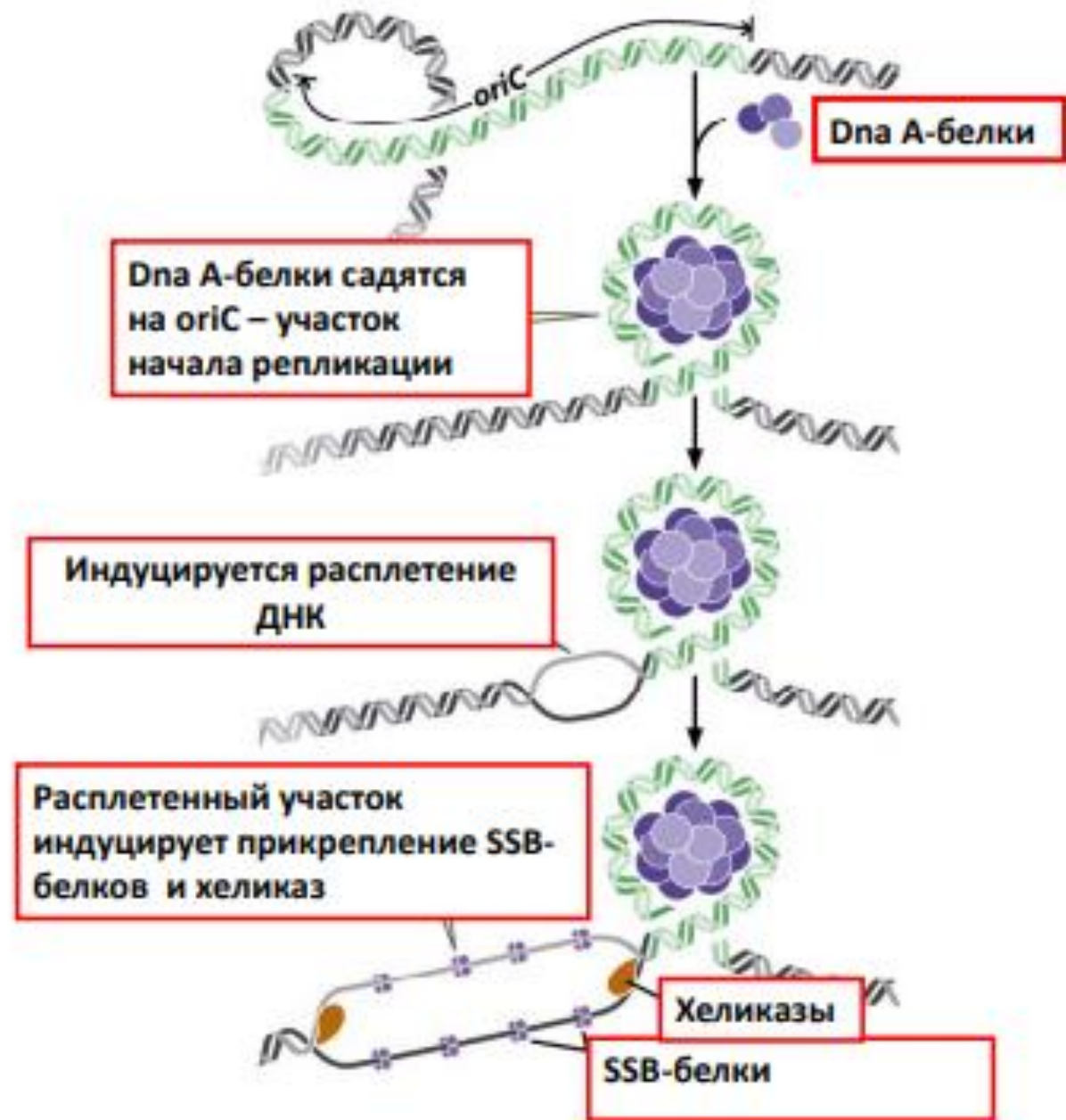
экзонуклеазалар емес

Репликацияның бірнеше бастаулары

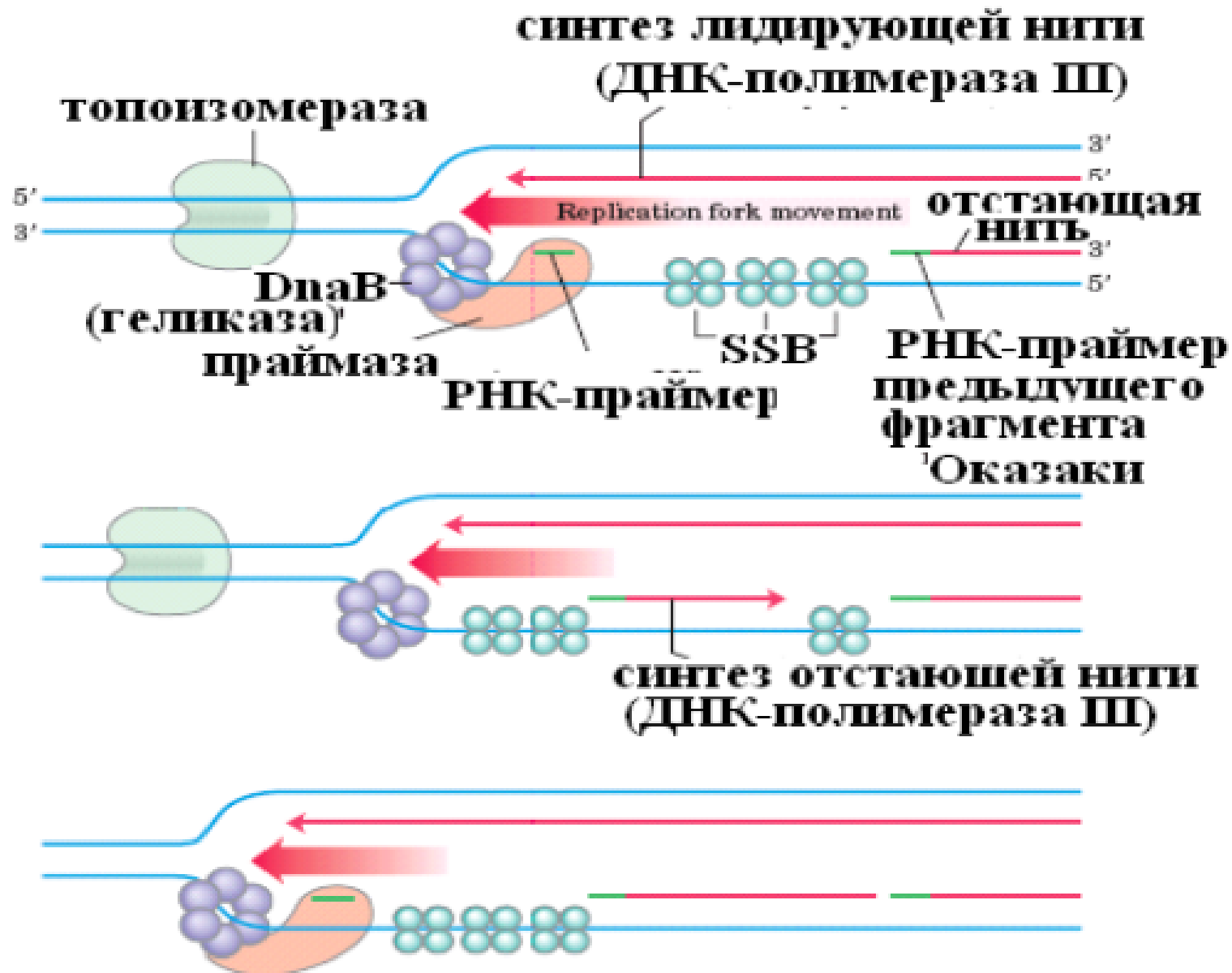
Оказаки фрагменттері 150-200 ж.н. ұзындықта

Репликация инициациясы

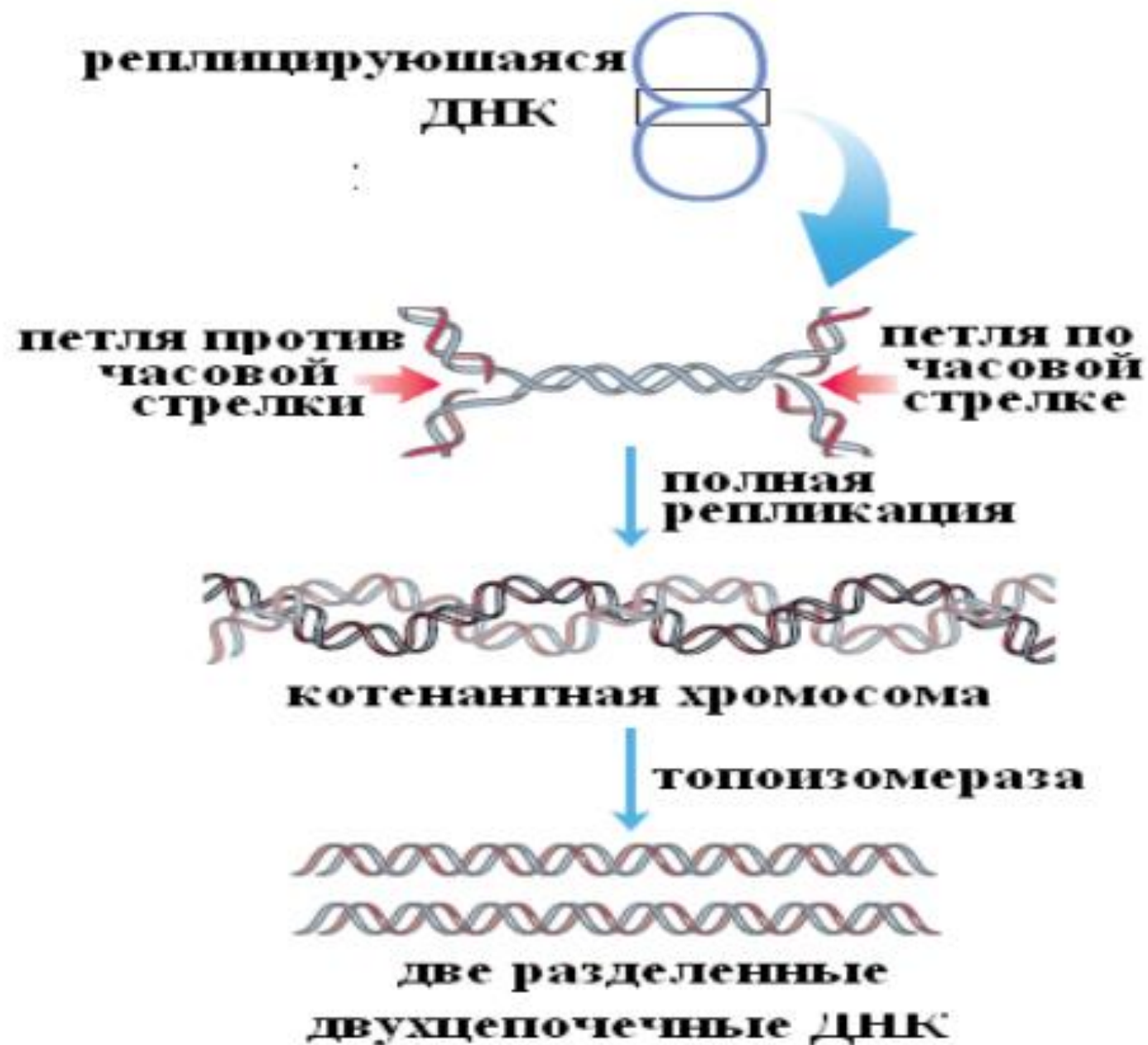
- DnaA инициатор ақуызы көптеген бактерияларда хромосомалардың репликациясын бастауда маңызды рөл атқарады. Ол кезекті түрде 3 негізгі функцияны орындайды:
- ДНҚ-дағы наномерлік қайталанулармен кезекті түрде байланысу арқылы *ori* репликацияның басталу аймағын таниды
- АТ-ға бай ДНҚ аймақтарының ажырауына ықпал етеді
- *ori* ажыратылған аймақтарына DnaB ДНҚ геликазасын тарту үшін жағдай жасайды



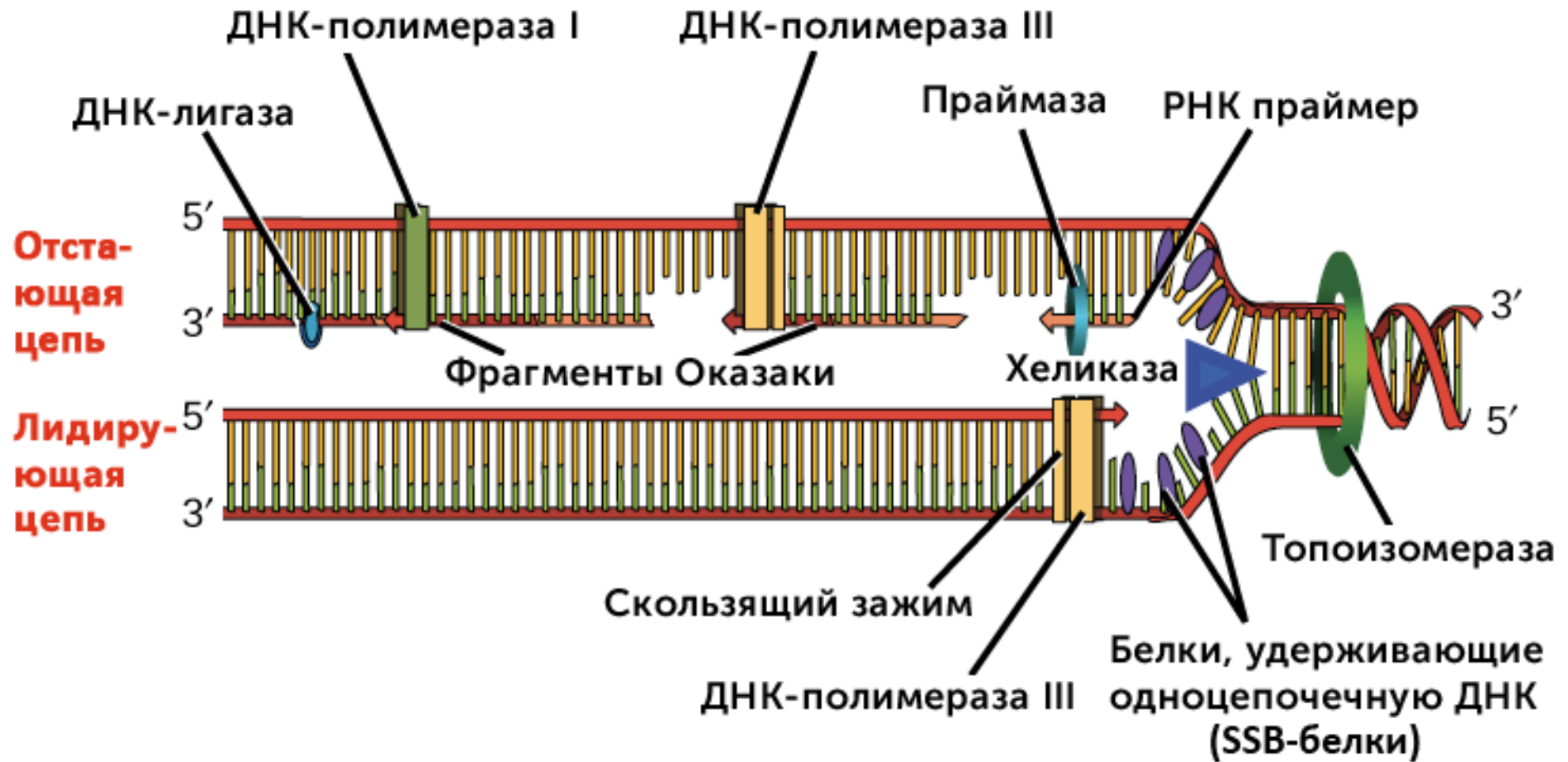
- Элонгация обеих нитей синтезирующейся ДНК



- **Терминация репликации**



Қорытынды: *E. Coli* бактериясындағы ДНК репликациясы



Эукариоттарда ДНҚ репликациясы

- ДНҚ репликациясының негізгі принциптері бактерияларда да, эукариоттарда да (әсіресе адамдарда) ұқсас, бірақ кейбір айырмашылықтар бар:
- Эукариоттарда әдетте бірнеше сызықтық хромосома болады, олардың әрқайсысында репликацияның бірнеше басталу нүктесі бар. Адамда репликацияның 100 000-ға дейін басталу нүктесі болуы мүмкін.
- *E. coli* ферменттерінің көпшілігінің эукариоттық ДНҚ репликация жүйесінде аналогтары бар, бірақ *E. coli*-де бір фермент жасайтын әрекет эукариоттардағы бірнеше ферменттер арқылы орындалуы мүмкін. Мысалы, адамдарда бес түрлі ДНҚ полимераза бар, олардың әрқайсысы репликацияда маңызды рөл атқарады.
- Эукариоттық хромосомалардың көпшілігі сызықты. Артта қалған жіптердің жасалу ерекшеліктеріне байланысты әрбір репликация кезінде сызықтық хромосомалардың соңындағы ДНҚ фрагменттерінің бір бөлігі жоғалады. Олар **теломерлер** деп аталады.

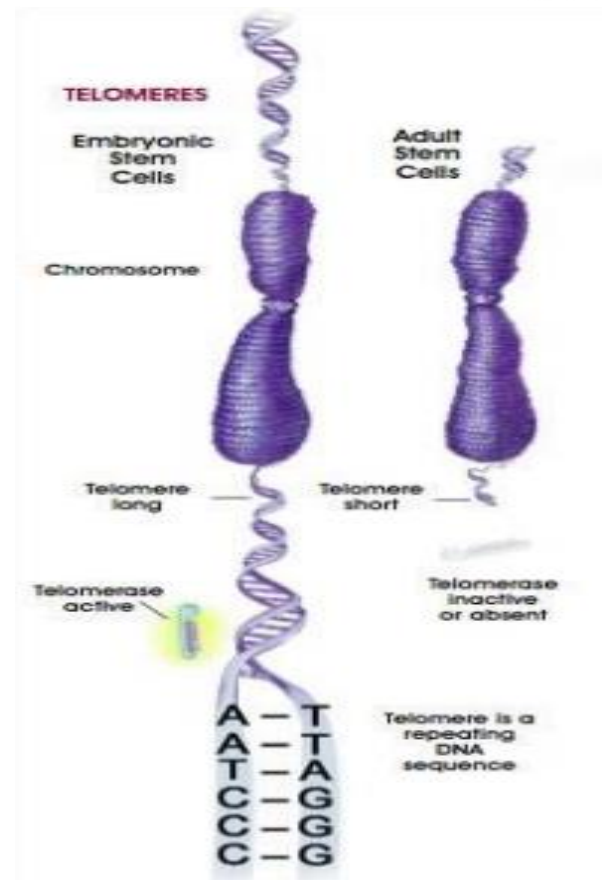
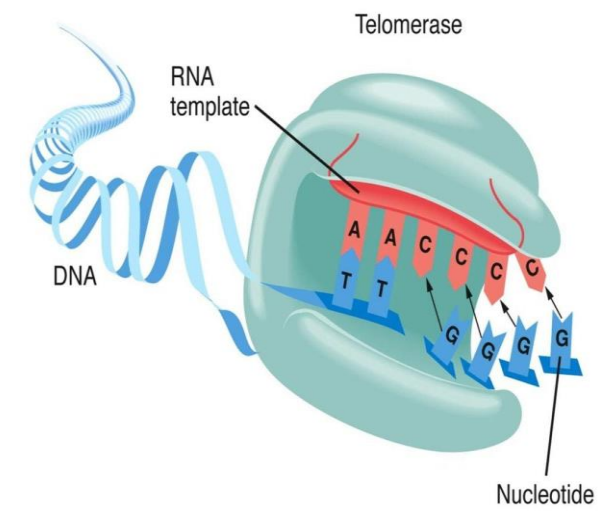
Размер фрагментов Оказаки у эукариот меньше, чем у прокариот. Скорость работы ДНК-полимераз эукариот на порядок ниже, чем у прокариот.

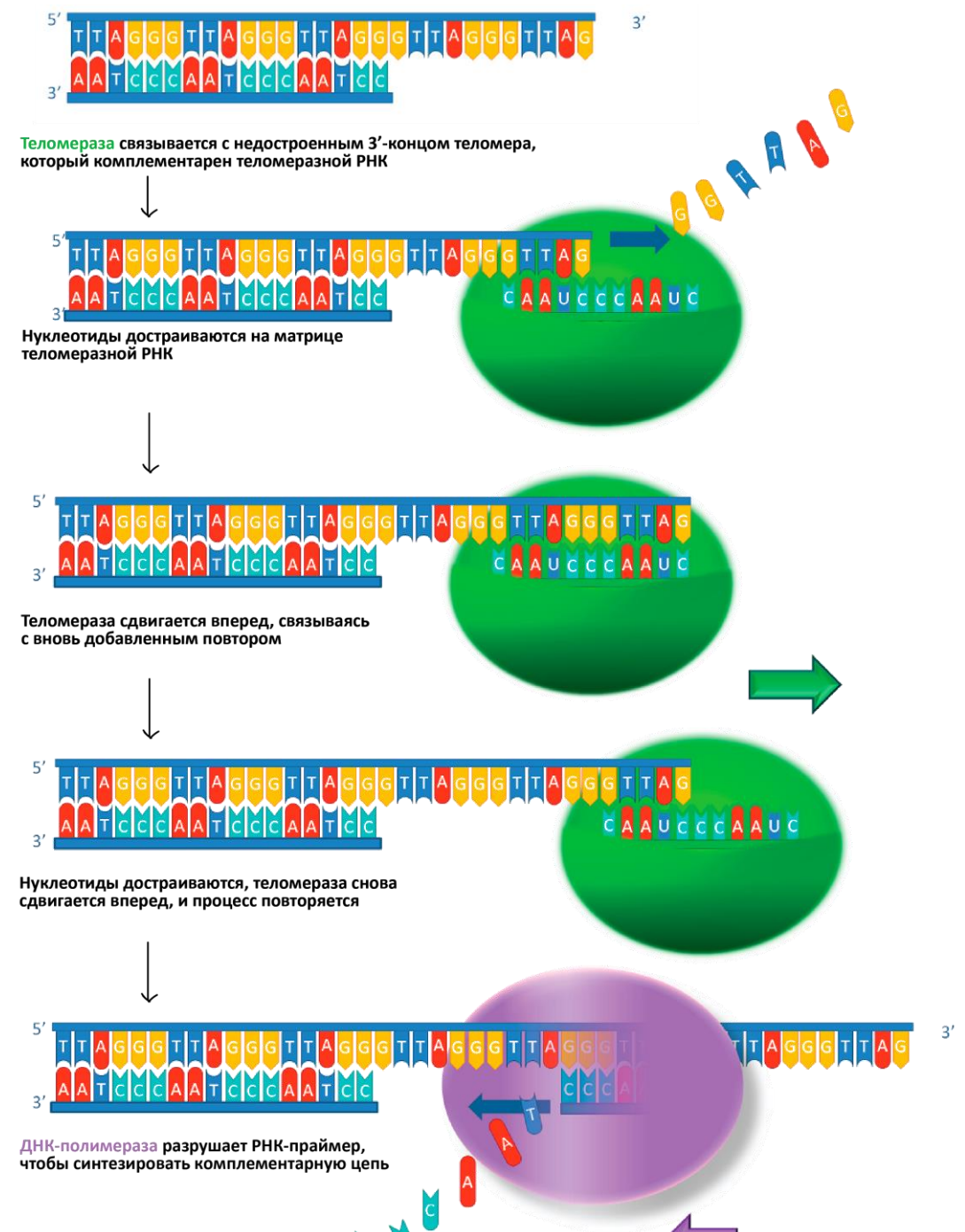
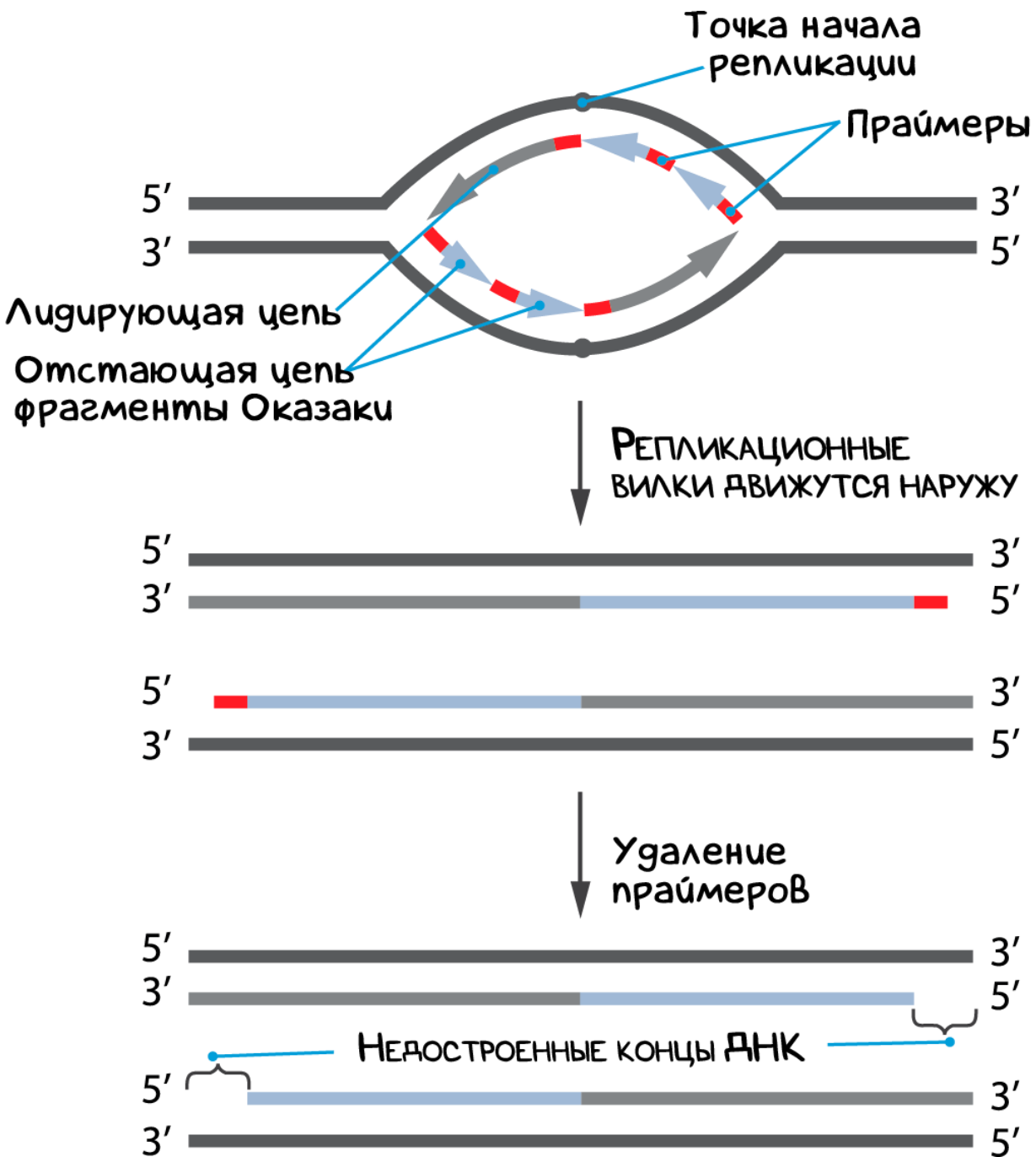
Организм	Количество репликонов	Средний размер репликона, тыс.п.н.	Скорость движения репликативной вилки п.н./мин.
E.coli	1	4200	50000
Дрожжи	500	40	3600
Дрозофила	3500	40	2600
Ксенопус (лягушка)	15000	200	500
Мышь	25000	150	2200
Бобы	35000	300	2200

- Эукариоттарда ДНҚ-полимеразалардың кем дегенде он бес түрі бар, олар грек алфавитінің әріптерімен белгіленеді.
- ДНҚ-полимераза δ — эукариоттардың негізгі полимеразасы (полимеразалық және редакциялау белсенділігі бар).
- ДНҚ-полимераза α алдымен ДНҚ праймерін синтездейтін праймаза қызметін атқарады, содан кейін қалыпты полимераза ретінде 20 нт дейінгі тізбекті синтездейді.
- ДНҚ полимераза β ДНҚ репарациясына қатысады.
- **Pol Y**, митохондриялық ДНҚ репликациясын жүзеге асырады.
- ДНҚ-полимераза ϵ , кейде 3'-5' моноспираліның синтезі кезінде ДНҚ-полимераза δ ауыстырады.
- ДНҚ-полимеразалар η , ι , κ , ζ және **Rev1** зақымдалған ДНҚ аймақтарын өткізіп жіберуге қатысады.
- ДНҚ-полимеразалар θ , λ , ϕ , σ және μ толық зерттелмеген

Эукариоттық хромосомалардың ДНК ұштарының репликациясы

- 3'-оверхенгтер, яғни аналық тізбектердің шығыңқы 3'-ұштары - теломерлер (басқа грек тілінен τέλος - соңы және μέρος - бөлігі) - хромосомалардың соңғы бөлімдері **теломераза** арқылы танылады, Теломераза құрамында ақуыз бөлігінен басқа РНҚ бар. ол ДНК соңдарын қайталанулардан құру үшін үлгі ретінде әрекет етеді.
- Теломераза РНҚ ұзындығы қарапайымдылардағы 150 нуклеотидтерден ашытқылардағы 1400 нуклеотидтерге және адамдардағы 450 нуклеотидтерге дейін ауытқиды.
- РНҚ-ның ДНК синтезі үшін шаблон ретінде пайдаланылуы теломеразаны кері транскриптазаның бір түрі ретінде жіктеуге мүмкіндік береді.
- Теломераза алдымен ұзын тізбекті ұзартады. Содан кейін ұзартылған қысқа тізбек синтезделеді.
- Адам және басқа омыртқалылар теломерінде ТTAGGG 3'-оверхенг болады.
- **Теломераза** — эукариоттық жасушаларда хромосомалардың ұштарында орналасқан теломера аймақтарындағы ДНК тізбегінің 3' ұшына қайталанатын ДНК тізбегін (омыртқалыларда ТTAGGG) қосып шпилкалы құрылым түзіп праймер синтезіне жол ашады..







Элизабет Блекборн



Кэрол Грейдер



Джек Шостак

Нобелевская премия по физиологии и медицине 2009 г.

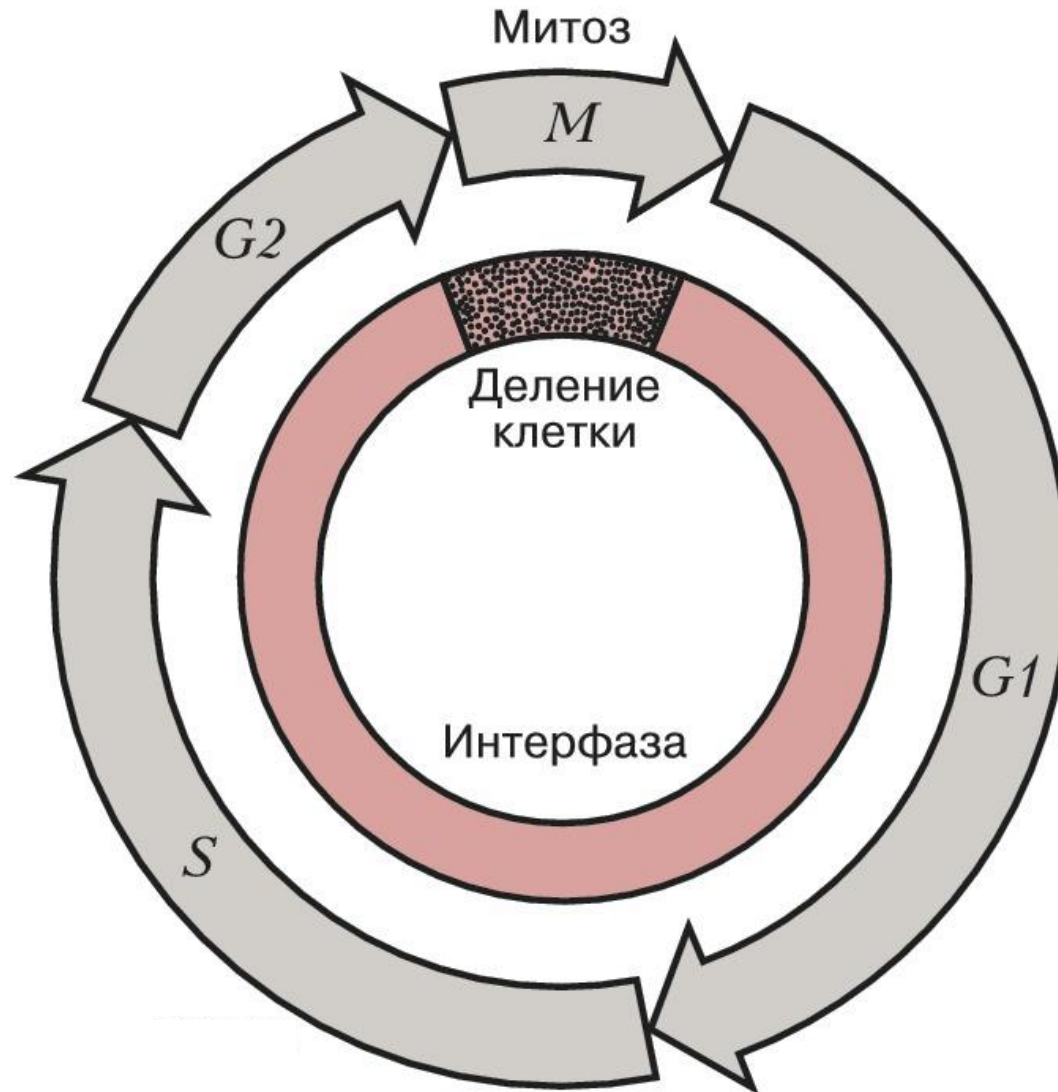
«за открытие того, как теломеры и фермент теломераза защищают хромосомы»

КЕРІ БАЙЛАНЫС

ДНҚ репликациясы қандай принциптерге негізделген?

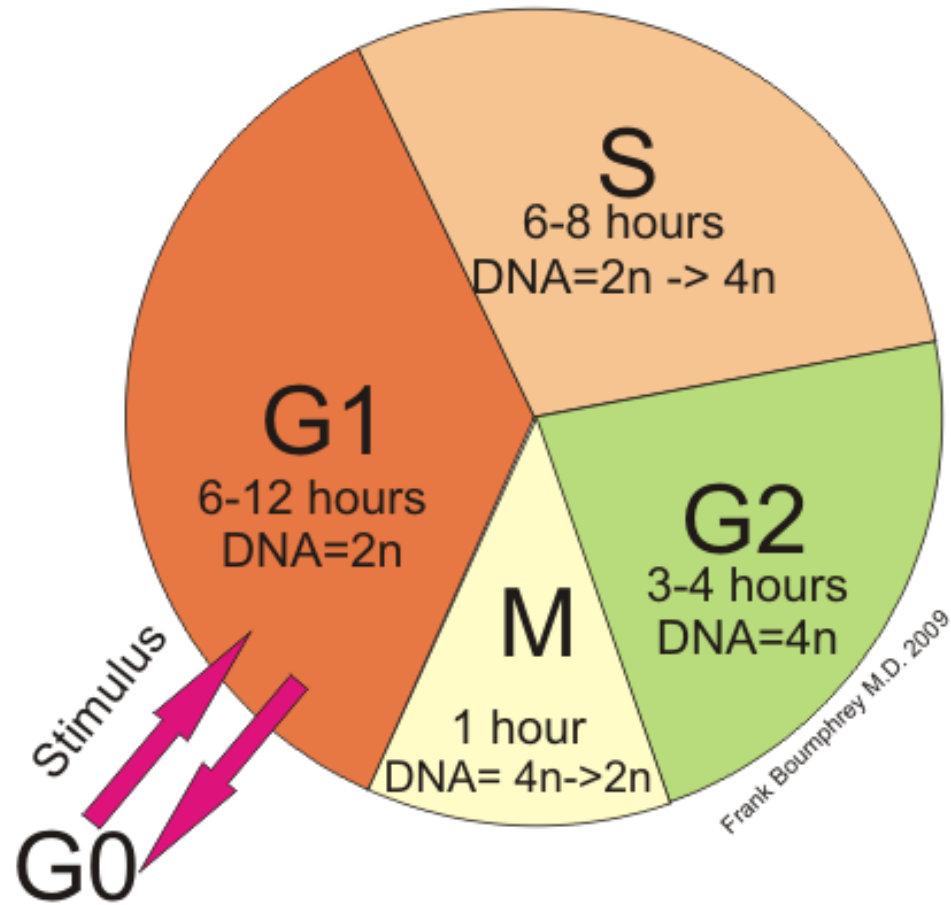
1. Жартылай консервативті
2. Комплементарлық
3. Антипаралельдік
4. Униполярлы 5`--3`
5. Үзілісті
6. Праймерге тәуелділік
7. Репликация басталу нүктесі: **ori**
8. Аяқталу нүктесі: **ter** сайты

ДНҚ РЕПЛИКАЦИЯСЫ ЖАСУШАЛЫҚ ЦИКЛДІҢ ҚАЙ ФАЗАСЫНДА ЖӘНЕ НЕШЕ УАҚЫТТА ЖҮЗЕГЕ АСАДЫ?



Eukaryotic Replication Cycle

(Times are for Cells Growing in Culture)



- G0: Resting Phase
- G1: Growth & Metabolism
- S: DNA Replication
- G2: Growth of Structural Elements
- M: Mitosis

Клеточный цикл у эукариот

