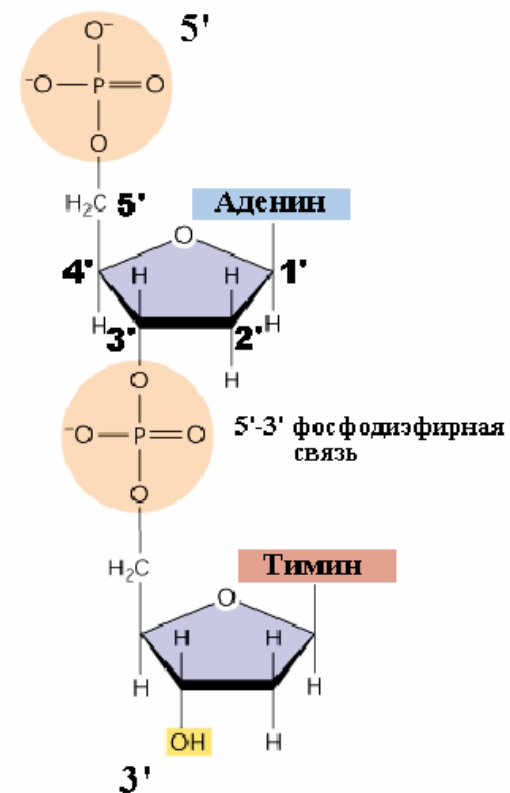
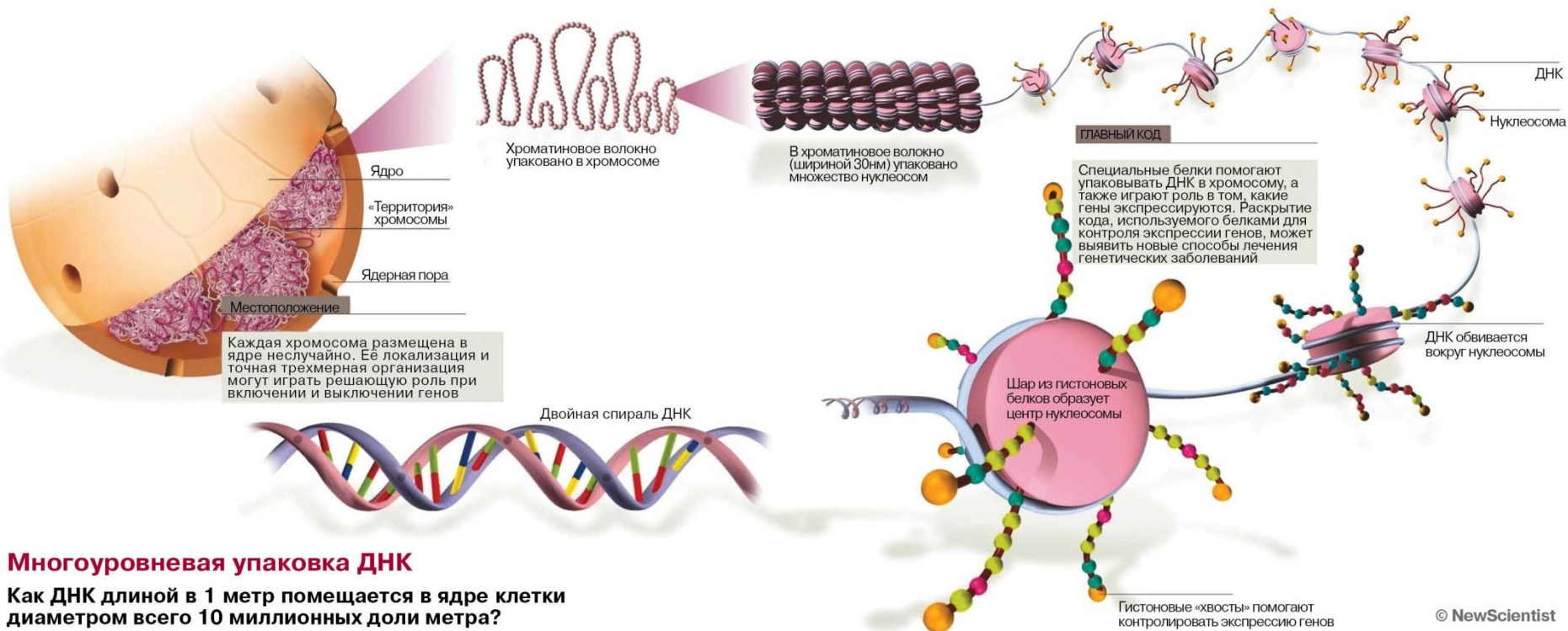


Лекция № 3



1. Репликация: модели, этапы, ферменты и белковые факторы;
2. Полимеразная цепная реакция

ДНК: ИДЕАЛЬНЫЙ ЖЕСТКИЙ ДИСК



Многоуровневая упаковка ДНК

Как ДНК длиной в 1 метр помещается в ядре клетки диаметром всего 10 миллионных доли метра?

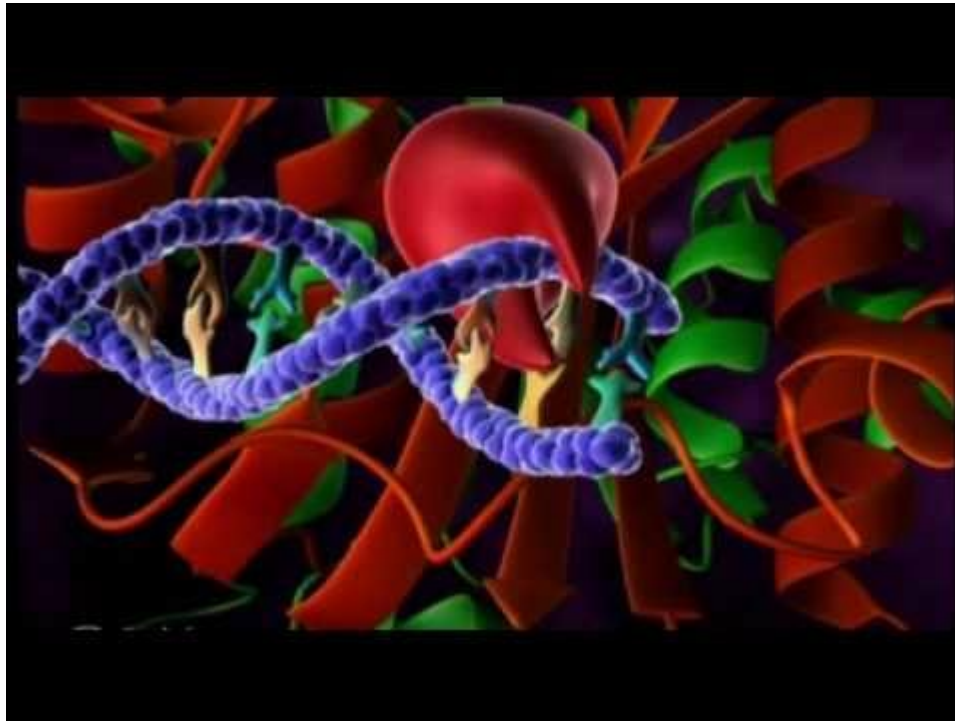
Репликация молекулы ДНК – это процесс образования идентичных копий ДНК, осуществляемый комплексом ферментов и структурных белков.

Репликация ДНК лежит в основе:

Воспроизведения генетической информации при размножении живых организмов;

Передачи наследственных свойств из поколения в поколение;

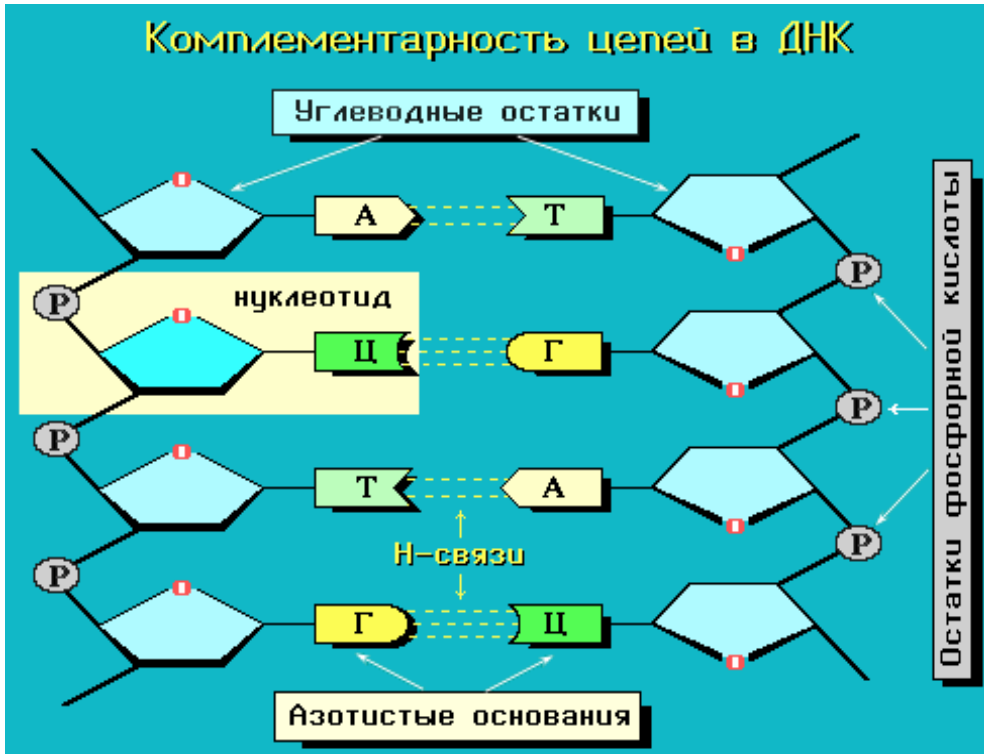
Развития многоклеточного организма из зиготы.



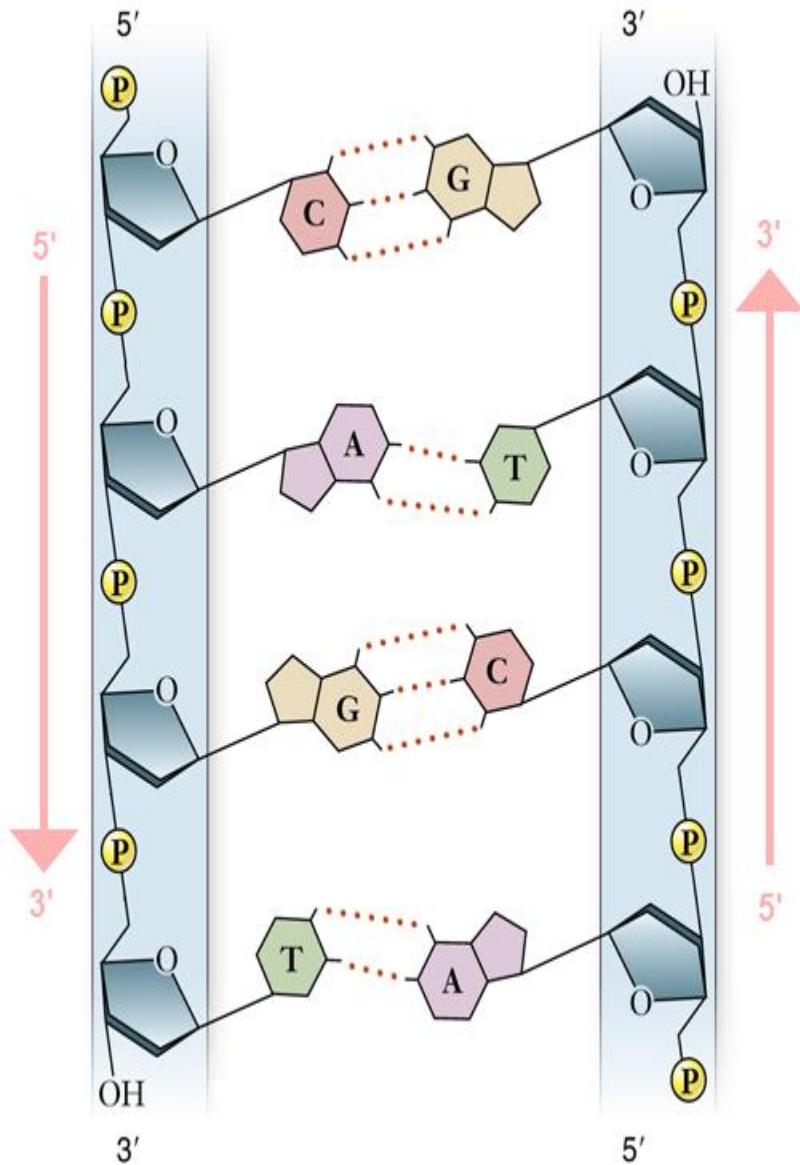
- ❖ Матричная функция ДНК при репликации;
- ❖ Репликация начинается в определенных точках;
- ❖ Репликация ДНК полуконсервативна;
- ❖ Комплементарное копирование оснований, перенос дезоксирибонуклеотидов и лигирование ДНК при репликации;
- ❖ Ключевые ферменты, участвующие в синтезе ДНК;
- ❖ Для репликации необходимо раскручивание спирали;
- ❖ Инициация образования новых цепей ДНК и их рост в репликативных вилках;
- ❖ Терминация репликации ДНК и расхождение дочерних спиралей.

Принципы репликации ДНК

1. Комплементарность - пространственная взаимодополняемость (взаимное соответствие) поверхностей взаимодействующих молекул или их частей, приводящая, как правило, к образованию вторичных водородных связей между ними. Комплементарность проявляется в структуре двуспиральных ДНК и РНК, где две полинуклеотидные цепи образуют в результате комплементарного взаимодействия пар пуриновых и пиримидиновых оснований (А-Т, Г-Ц) двуспиральную молекулу.



Принципы репликации ДНК



2. Антипараллельность -

противоположная направленность двух нитей двойной спирали ДНК; одна нить имеет направление от 5' к 3', другая - от 3' к 5'.

Каждая цепь ДНК имеет определенную ориентацию. Один конец несет гидроксильную группу (-ОН), присоединенную к 3'-углероду в сахаре дезоксирибозе, на другом конце цепи находится остаток фосфорной кислоты в 5'-положении сахара. Две комплементарные цепи в молекуле ДНК расположены в противоположных направлениях – антипараллельно: одна нить имеет направление от 5' к 3', другая – от 3' к 5'. При параллельной ориентации напротив 3'-конца одной цепи находился бы 3'-конец другой.

3. Полуконсервативность

Предполагаемые схемы процесса репликации





Полуконсервативный синтез

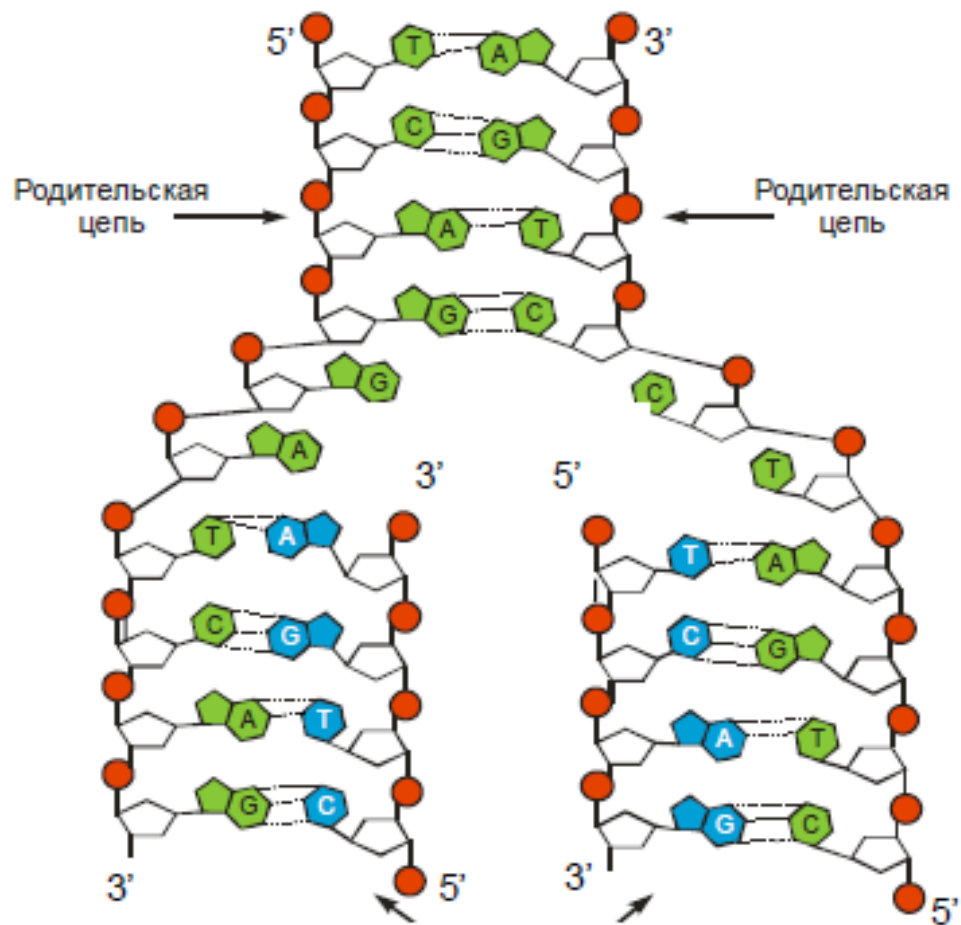


Консервативный синтез



Дисперсный синтез

 Вновь синтезированная нить ДНК
 Старая материнская нить



Вновь синтезированные дочерние цепи
 Схема полуконсервативной репликации ДНК

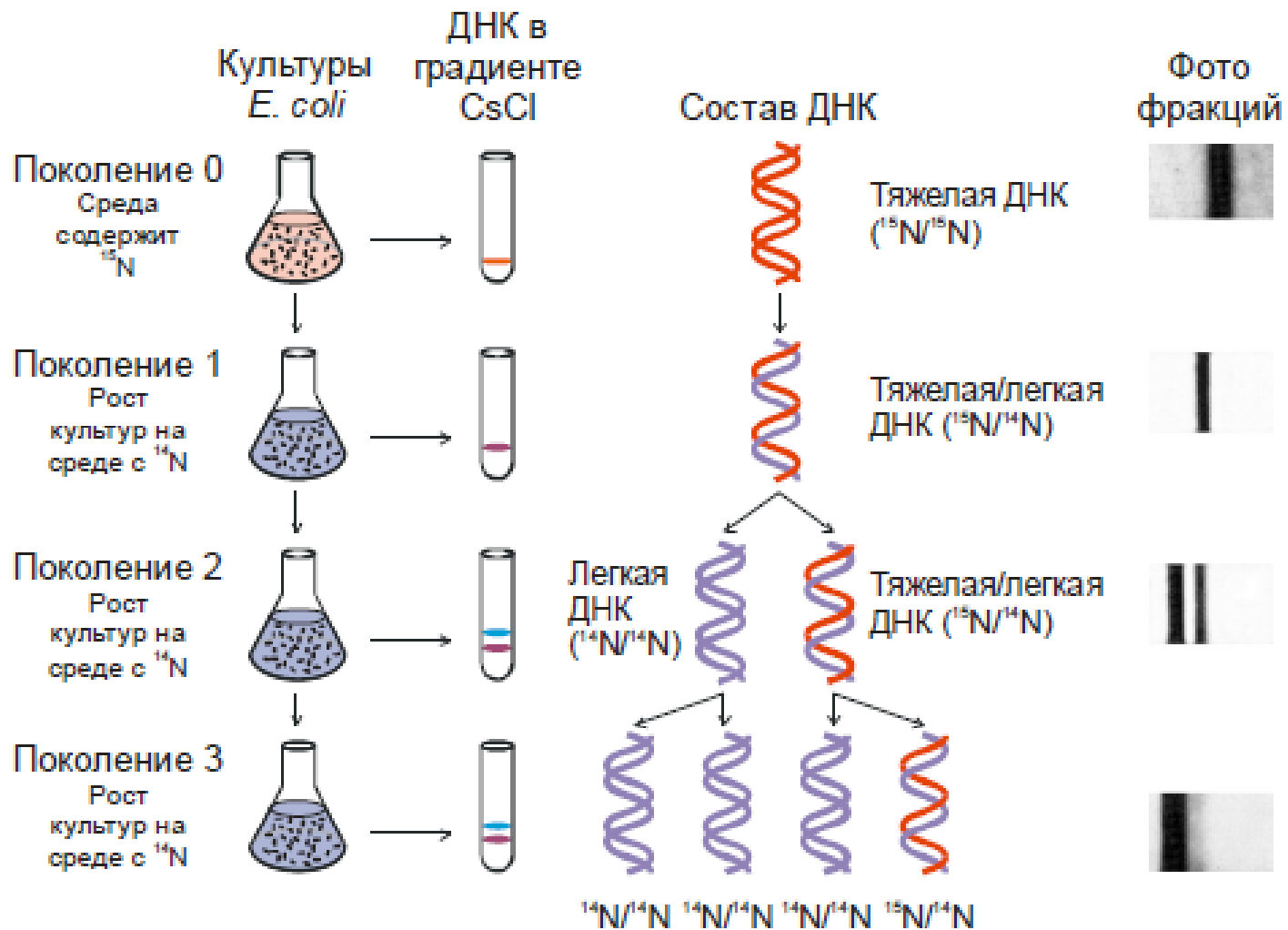
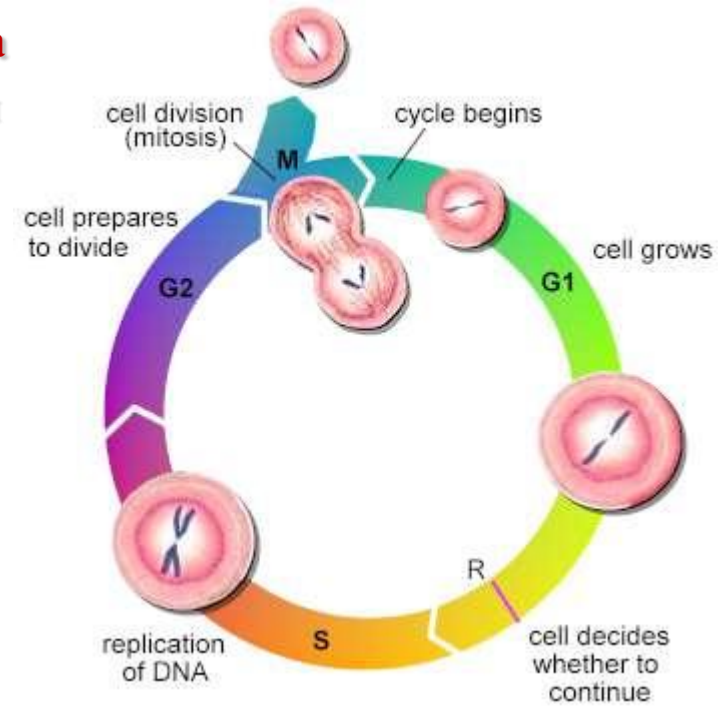
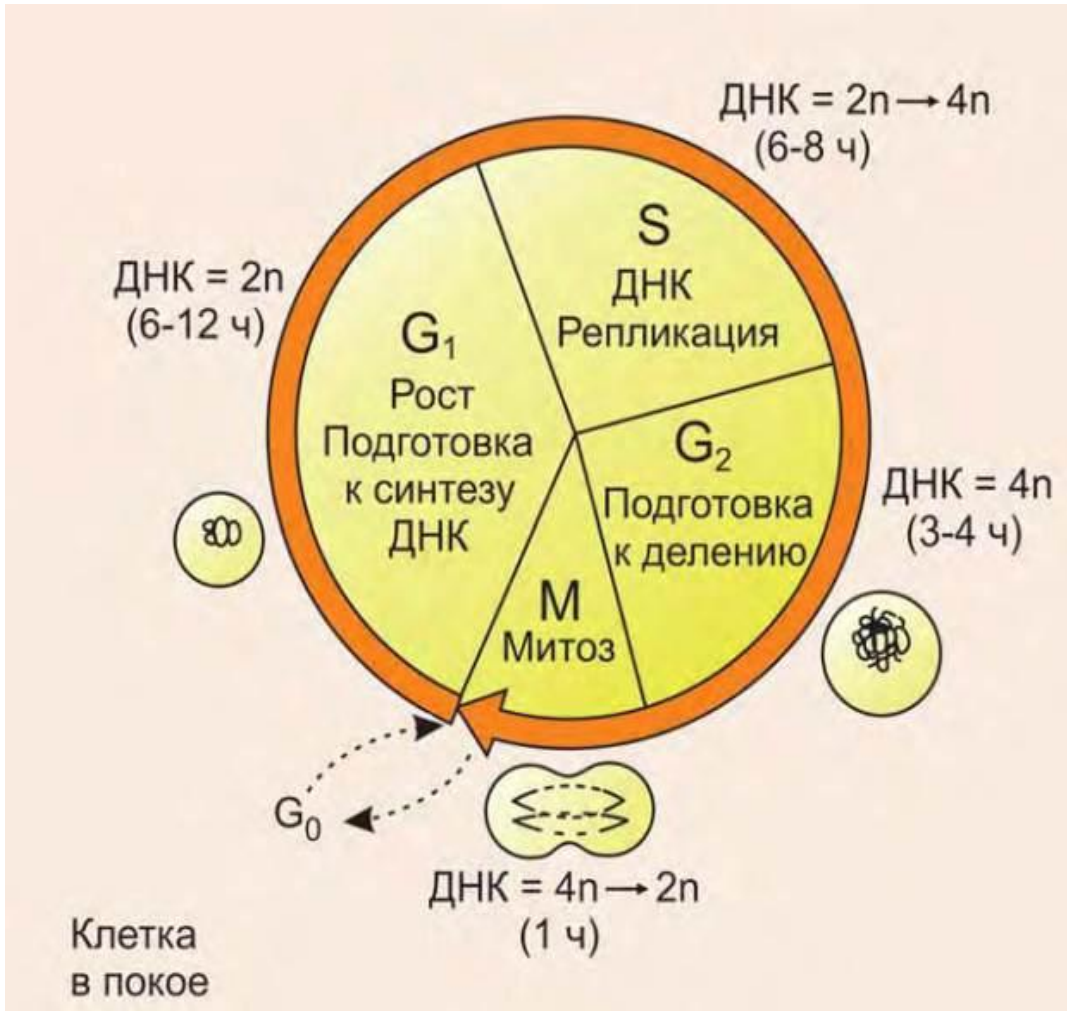
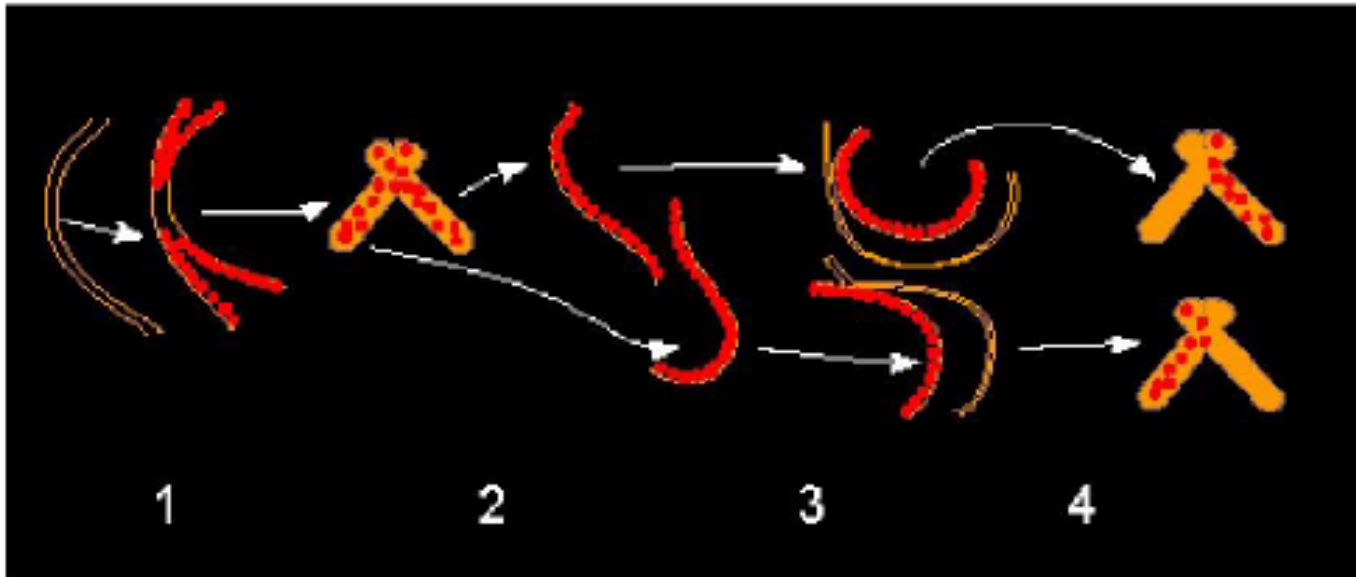


Схема опытов Мезелсона и Сталя, доказывающих полуконсервативность репликации ДНК

4. Согласованность репликации и клеточного цикла

Репликация молекулы ДНК происходит в S период интерфазы

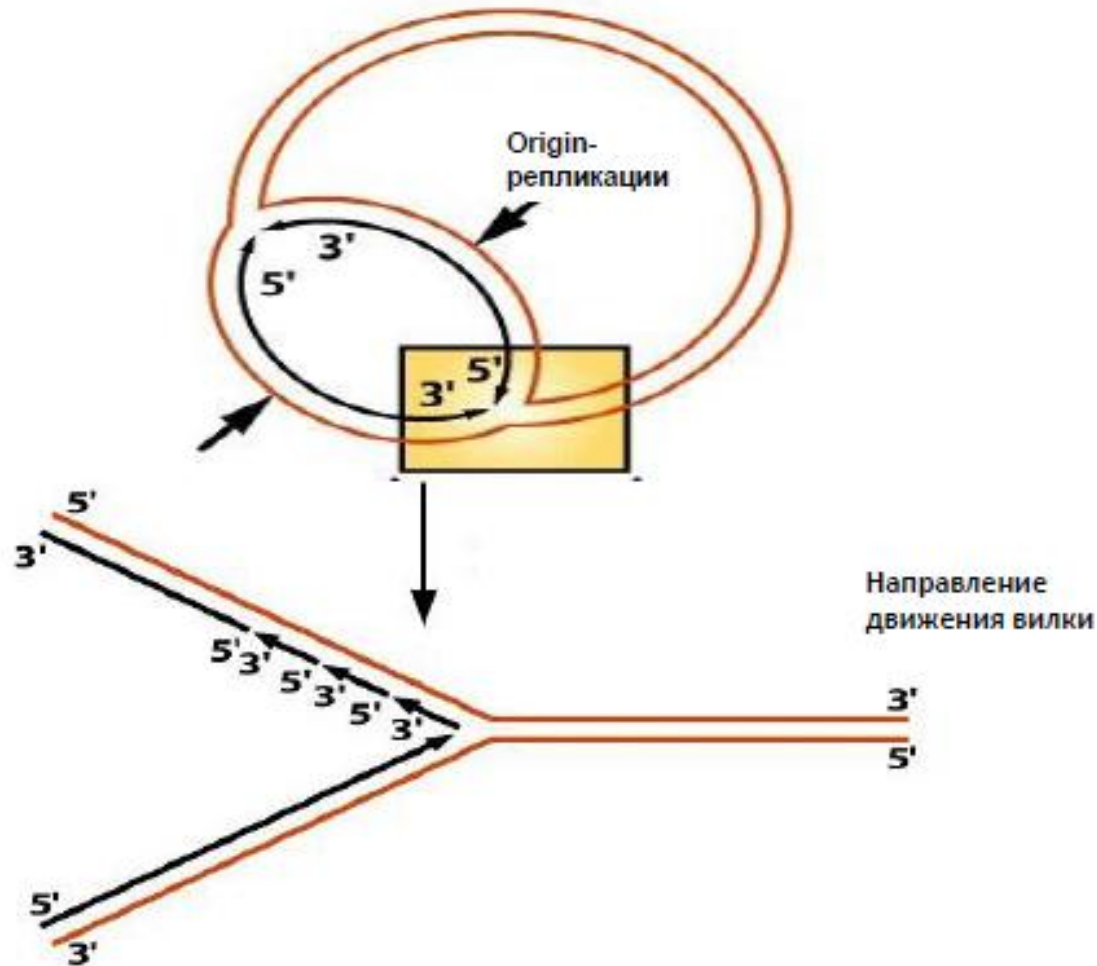




Проростки расения *Vicia faba* выращивали на среде, содержащей меченый ^3H -тимидин для того, чтобы этот изотоп включился во все молекулы ДНК (1), таким образом, все хроматиды оказались мечеными даже после их разделения в ходе митоза (2). Затем клетки переносили на среду с обычным нерадиоактивным тимидином и выдерживали некоторое время. На нерадиоактивной среде в S-фазе клеточного цикла в ДНК включался немеченый тимидин, однако хроматиды оставались мечеными, хотя интенсивность радиоактивного импульса была снижена, а после второго деления одна из хроматид оказывалась не меченой (3 и 4).

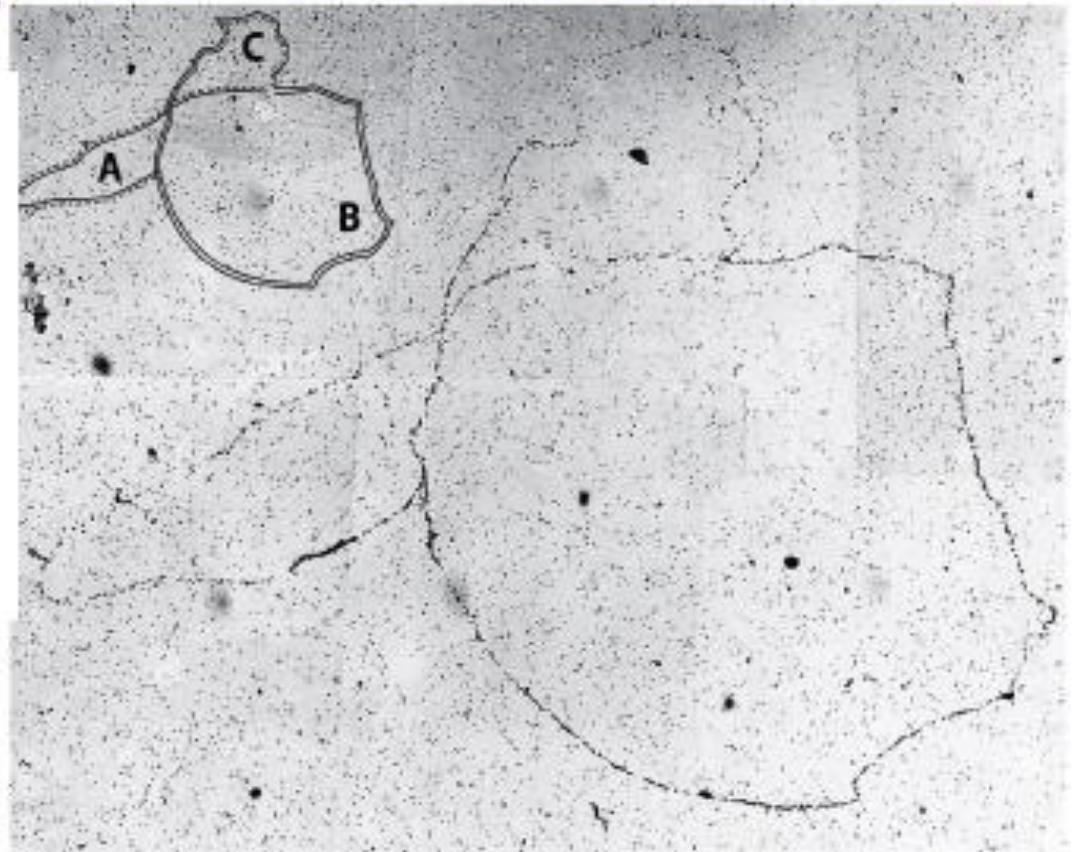
Дж. Тейлор показал, молекулы ДНК реплицируются полуконсервативно при удвоении хроматид (в S фазе клеточного цикла) перед митотическим делением.

5. Двунправленность – в каждой точке начала репликации формируются две репликационные вилки, которые движутся в противоположных направлениях. Продвижение вилки прекращается, когда она столкнется с репликационной вилкой соседнего репликона.



Визуализация репликации у бактерий *E. coli*
(эксперимент Дж. Кернса, 1963 г.)

Дж. Кернс показал, что репликация у бактерий *E. coli* происходит полуконсервативным способом одновременно в двух направлениях.



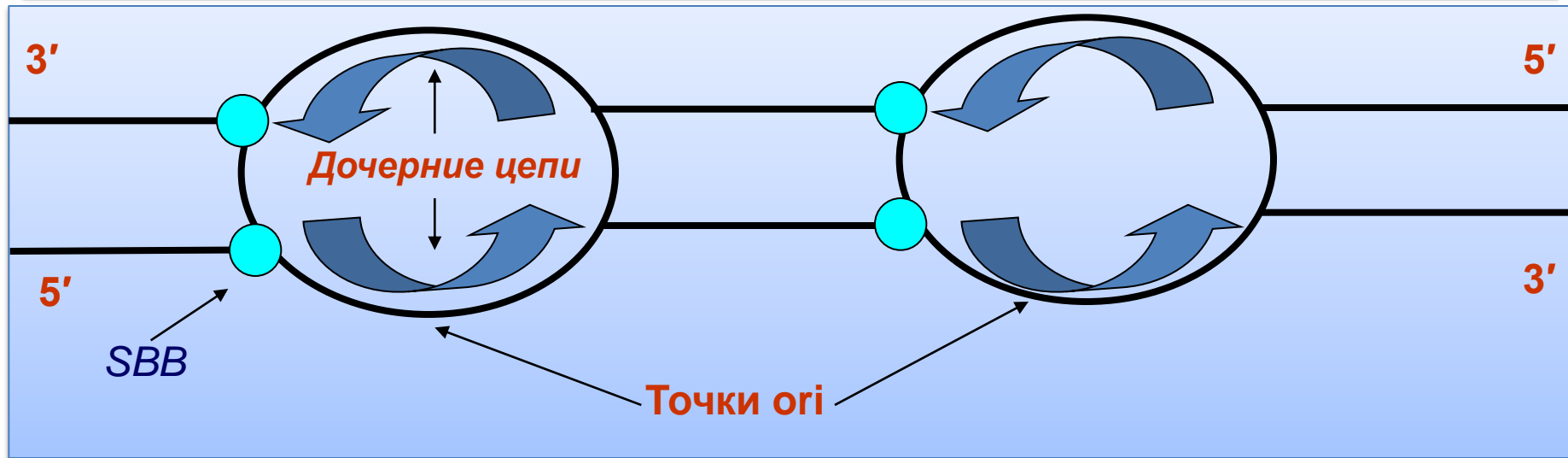
100 μm

Биологический смысл репликации ДНК: копирование генетической информации для переноса ее следующему поколению.

1. двойная спираль раскручивается;
2. каждая родительская цепь служит в качестве матрицы для синтеза новой дочерней цепи;
3. в ходе синтеза дочерних цепей возникают новые комплементарные пары;
4. в результате репликации образуются две новые одинаковые дочерние цепи.

Репликация начинается в точке «origin» (начало репликации)

У бактерий в кольцевом геноме имеется только одна точка «origin», тогда как у эукариотических хромосом их множество



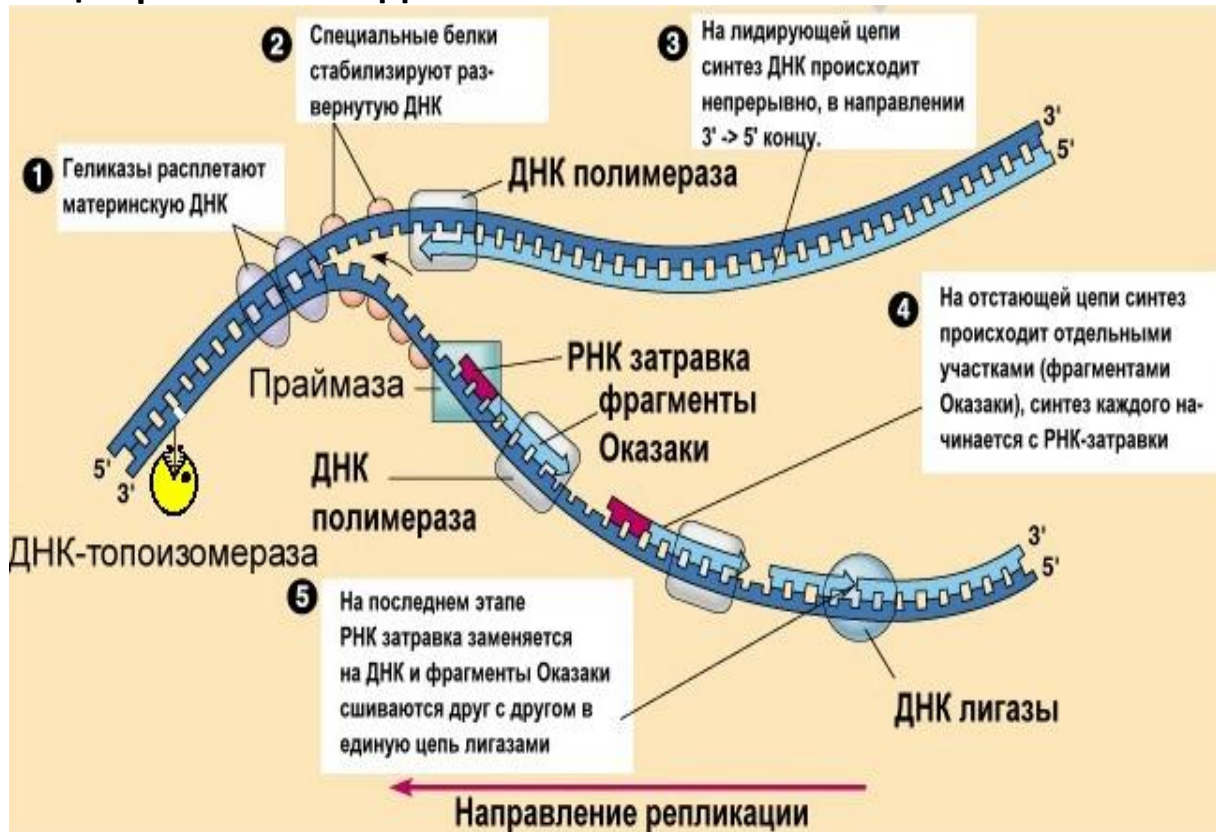
Репликон – участок ДНК от одной точки инициации репликации до следующей, т.е. расстояние между двумя «ориджинами» репликации. Каждая эукариотическая хромосома – полирепликон.

Ориджин репликации (точки ori)

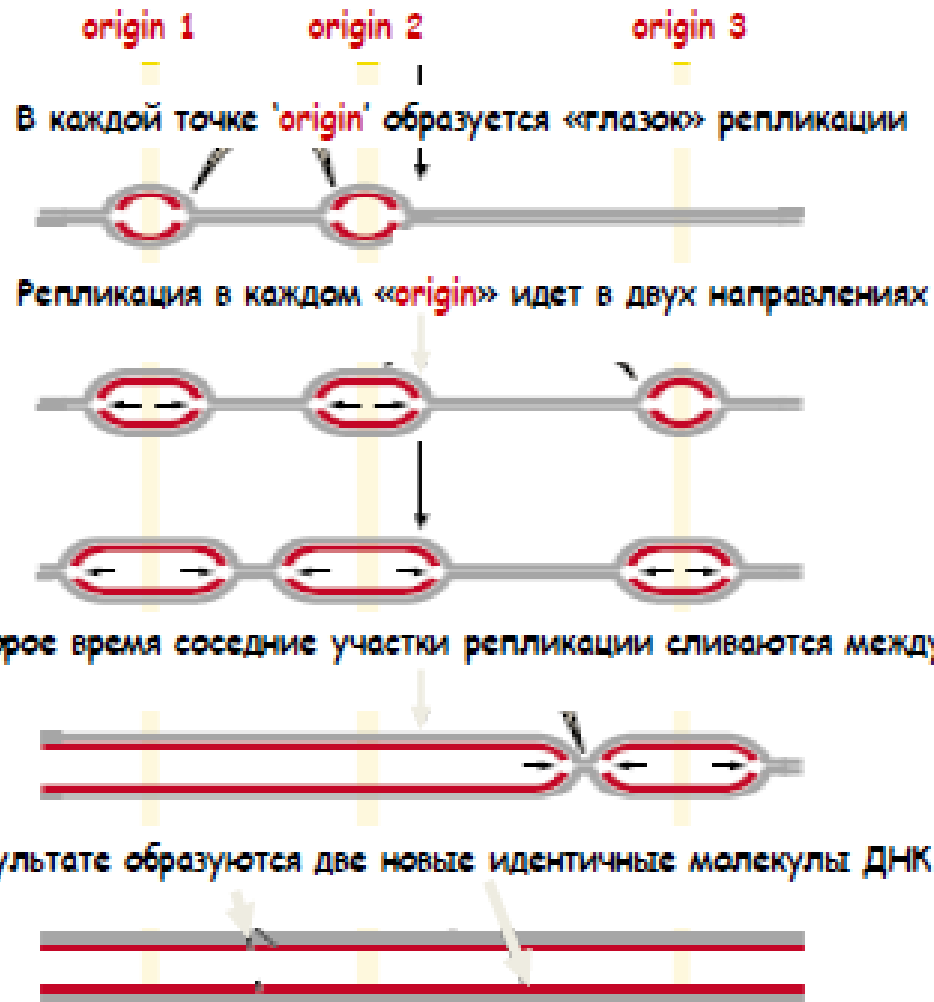
В каждой точке 'origin' образуется «глазок» репликации.

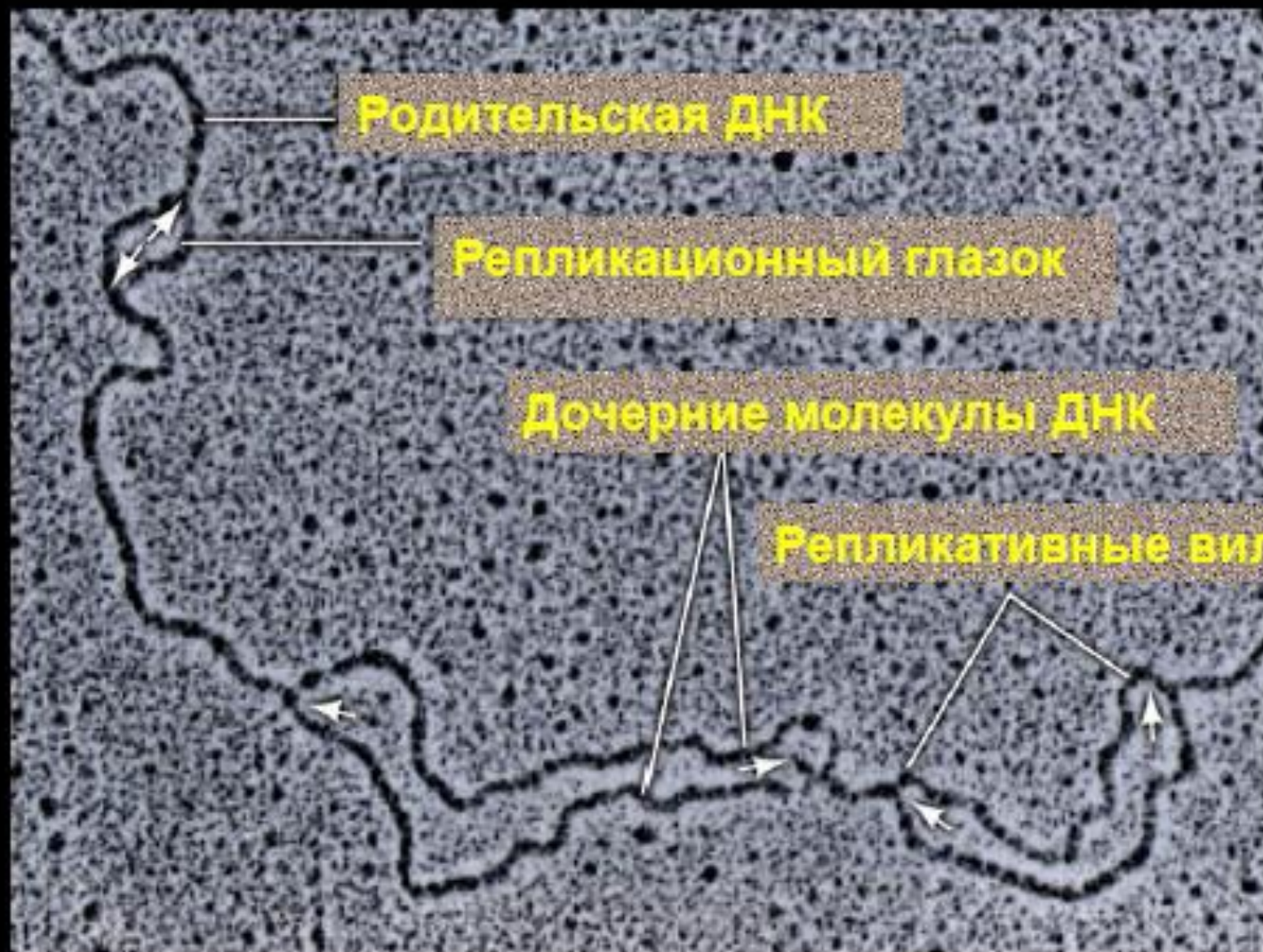
Общие свойства ориджинов репликации:

1. Точки начала репликации – это уникальные сегменты ДНК, содержащие множественные короткие повторы;
2. Эти повторы узнаются мультимерными ориджин-связывающими белками, которые играют ключевую роль в сборке ферментативных комплексов в участках начала репликации;
3. Области ориджина содержат АТ-богатые участки (аденин-тимин богатые участки), облегчающие расплетание ДНК.



Репликоны у эукариот





Родительская ДНК

Репликационный глазок

Дочерние молекулы ДНК

Репликативные вилки

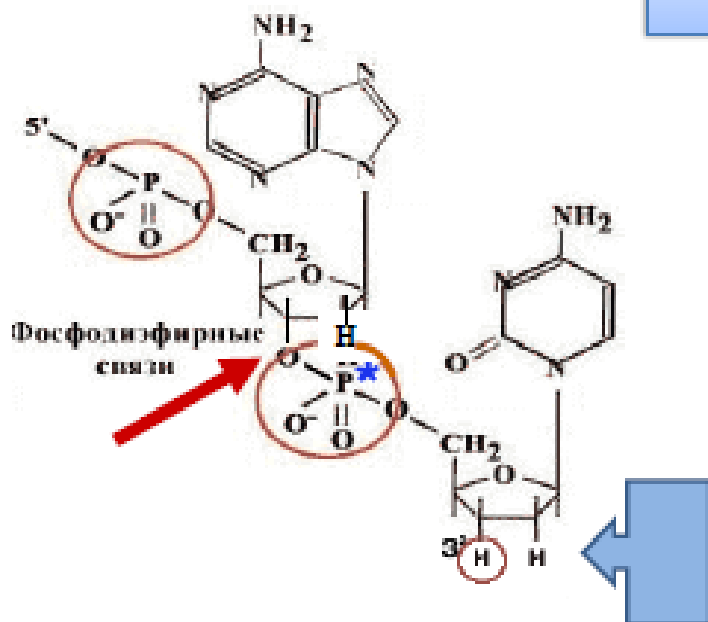
Число репликонов у различных организмов

Организм	Число репликонов	Средний размер репликона, тыс. п.н.
E.coli	1	4 200
Дрожжи	500	40
Дрезифила	3 500	40
Лягушка	15 000	200
Мышь	25 000	150
Бобы	35 000	300

3'-конец цепи ДНК достраивается в ходе репликации



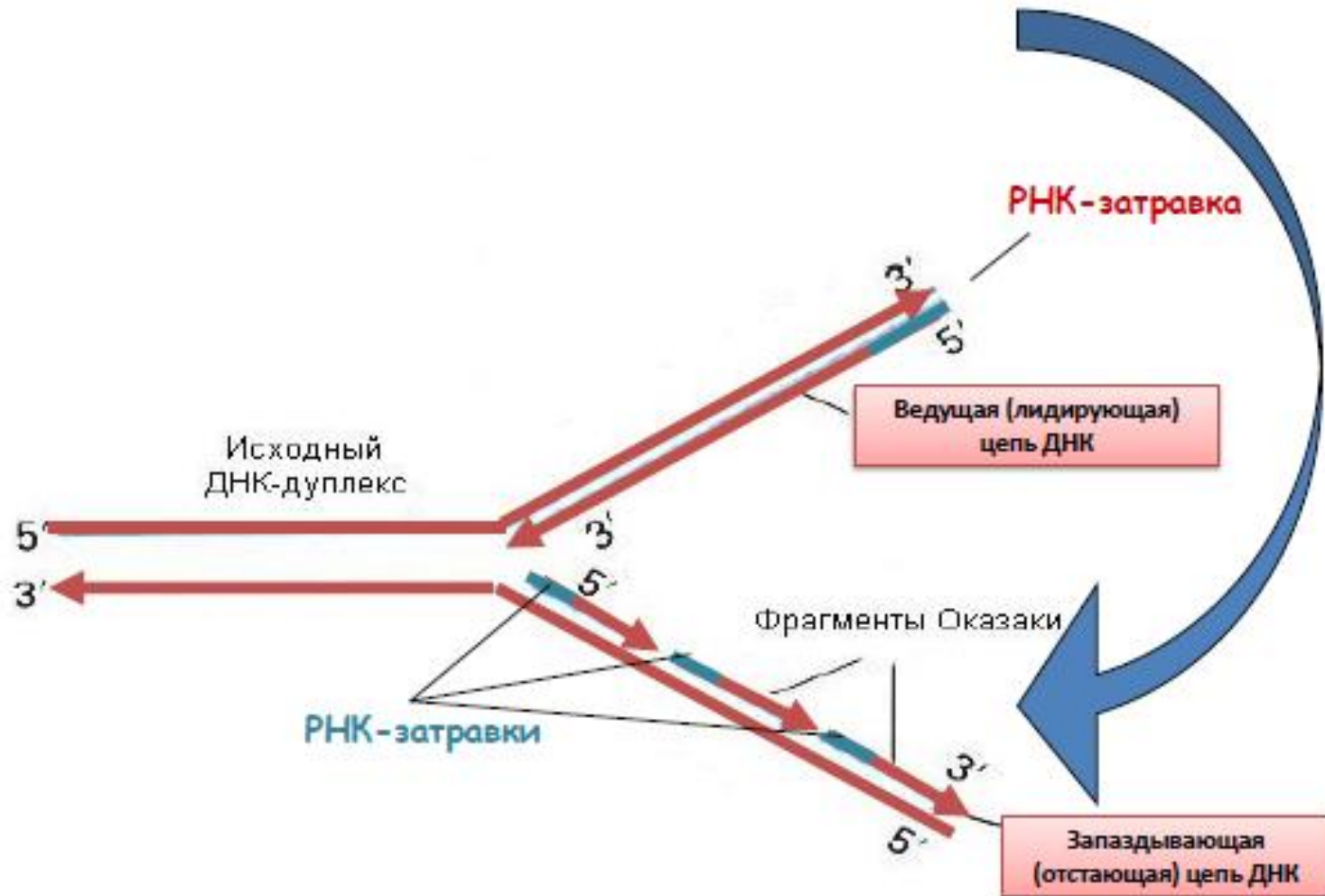
Эксперимент с дидезоксинуклеозидтрифосфатом



Если **дидезоксирибонуклеозидтрифосфат** (имеющий на 3'-конце вместо **ОН-группы** только **Н-группу**) включался в растущую цепь ДНК, то присоединение следующего нуклеотида блокировалось в связи с отсутствием реакционно способной 3'-гидроксильной группы.

Удлинение цепи ДНК (или ее отдельного фрагмента) всегда происходит в направлении от 5'-конца к 3'-концу, т.е. нуклеотиды присоединяются к 3' концу растущей цепи.

Синтез ДНК на запаздывающей цепи идет прерывисто



Лидирующая цепь – непрерывная, синтезируется на матрице цепи (3'→5')

Отстающая цепь – синтезируется фрагментами на матрице антипараллельной цепи (5'→3')

Схема прерывистой репликации на запаздывающей цепи была доказана Рейджи Оказаки в 1968 г.

Он провел эксперимент на бактериях *E.coli*, зараженных бактериофагом T4.

Было использовано два подхода:

1. Метод импульсного мечения.
2. Метод с использованием мутантов *E.coli*, дефектных по ферменту ДНК-лигазе.

Справка: ДНК-лигаза сшивает однонитчатые фрагменты ДНК (фрагменты Оказаки) между собой.

Метод импульсного мечения

- Р. Оказаки заражал бактерии *E.coli* бактериофагом T4 и одновременно вводил в культуру меченый ^3H -тимидин.

Если в бактериальную клетку попадает фаговая ДНК, то клетка целиком переключается на репликацию ДНК фага.

Когда бактериофаги начинали размножаться (реплицироваться) через очень малые промежутки времени (например, через 2 сек) Р. Оказаки добавлял 1000-кратный избыток «холодного» (немеченого) тимидина. Таким образом, в репликации фаговых геномов начинал встраиваться немеченый тимидин, а сама

^3H -тимидиновая метка включалась только в течение очень короткого времени.

- Затем Р. Оказаки осуществлял центрифугирование разрушенных клеток в щелочном градиенте сахарозы.

Сахароза разводится в растворе щелочи. В щелочной среде происходит денатурация ДНК. В этом случае короткие фрагменты ДНК, если они есть, отделяются от длинных. После этого их можно выявить при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы, разделяющем молекулы по молекулярной массе.

С помощью этого метода ему удалось обнаружить маленькие меченые фрагменты однонитчатой ДНК, образовавшейся в ходе репликации бактериофагов, которые были названы фрагментами Оказаки.

Кроме того, Р. Оказаки доказал, что время «жизни» этих фрагментов очень короткое и затем они сшиваются в непрерывную «запаздывающую» цепь ДНК с помощью фермента ДНК-лигазы.

Метод с использованием мутантов *E.coli*,
дефектных по ДНК-лигазе

- ДНК-лигаза имеется как у прокариот, так и у эукариот. У мутантов *E.coli*, дефектных по ДНК-лигазе, этот фермент не синтезируется.
- У бактериофагов Т4 также имеется своя термочувствительная лигаза, которая работает при 20° С, но не работает при 43° С.
- Клетки заражали фагом Т4, давали импульсную ³Н-тимидиновую метку и выращивали при двух температурах: 20° С и 43° С. Потом проводили центрифугирование в щелочном градиенте сахарозы. При высоких температурах фаговая ДНК-лигаза не синтезировалась и образующиеся фрагменты Оказакис сшиваться не могли.

Таким образом, синтез запаздывающей цепи осуществляется с помощью отдельных фрагментов, которые называются фрагментами Оказаки

Фрагменты Оказаки у бактерий имеют длину 1 000 – 2 000 нуклеотидов.
У эукариотических организмов в 10 раз меньше – 100 – 200 нуклеотидов.

В свою очередь, каждый фрагмент Оказаки состоит из небольшого участка РНК (10-12 нуклеотидов), который называется **РНК-праймером** или **РНК-затравкой**, и участка ДНК. При дальнейшем «созревании» запаздывающей цепи **РНК-праймеры** удаляются и замещаются участком ДНК.

5. Потребность в РНК-затравке для запуска синтеза ДНК

Потребность в РНК-затравке для синтеза ДНК была доказана Т. Оказаки в 1985 г.:

- 1. Было установлено, что репликация ДНК бактериофага М13 ингибируется при добавлении в среду антибиотика рифампицина. Этот антибиотик блокирует активность фермента РНК-полимеразу, которая осуществляет синтез РНК.**
- 2. Фермент ДНК-аза не мог полностью разрушить фрагмент Оказаки – оставались участки РНК, величиной 10-12 нуклеотидов.**

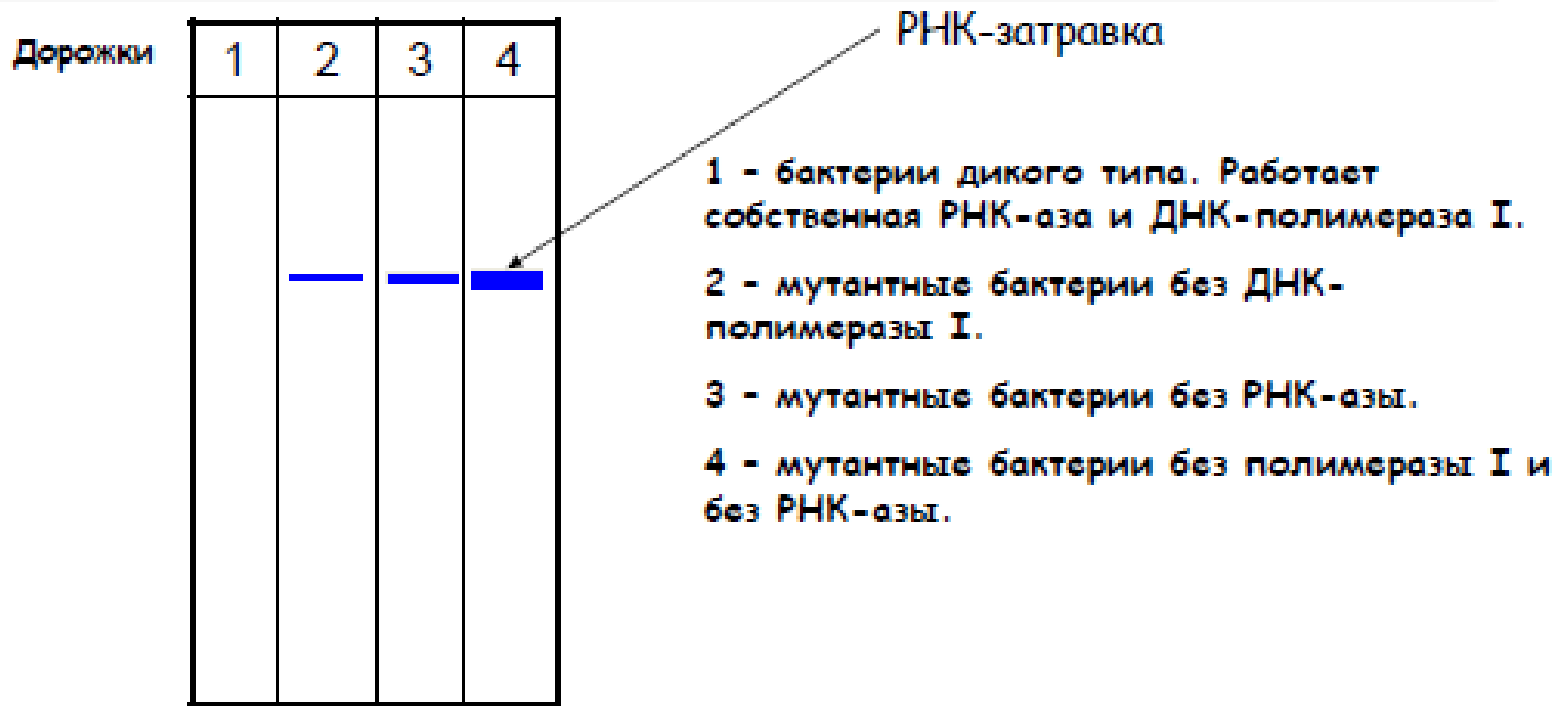
1. Т. Окаzuki использовала мутанты *E. coli*, дефектные по рибонуклеазе H, а также нуклеазной активности ДНК-полимеразы I. Это увеличивало вероятность сохранения РНК-праймера.

2. Присоединила к 5'-концу фрагмента Окаzuki модифицированный нуклеотид (ГМФ) для стабилизации с этого конца.

3. Праймер РНК был радиоактивно помечен.

4. ДНК фрагмента Окаzuki была разрушена ДНК-азой.

5. Оставшаяся часть была подвергнута электрофорезу.

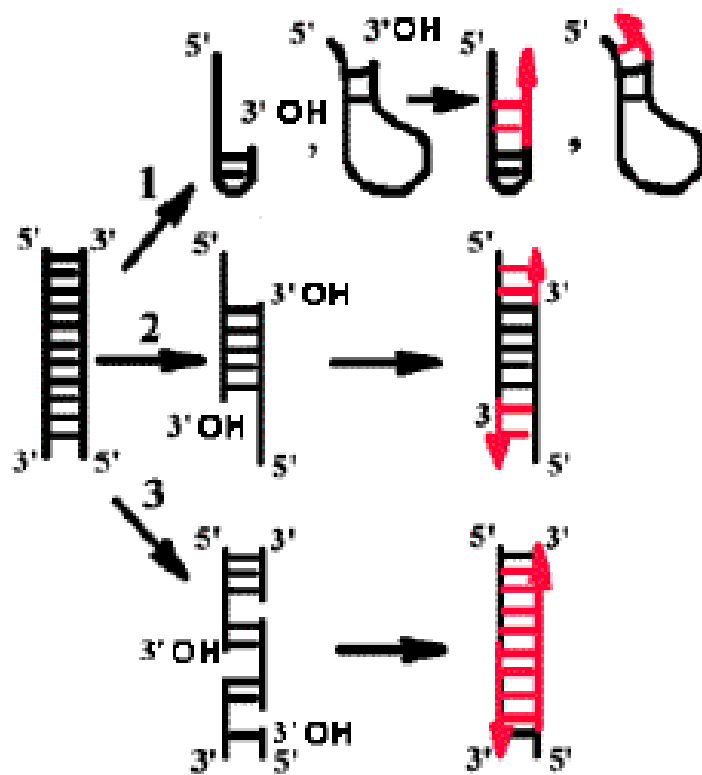


6. Скорость репликации у бактерий около 1000 - 2 000 нуклеотидов в секунду.

Скорость репликации у эукариот в 10 раз ниже – 100 – 200 нуклеотидов в секунду.

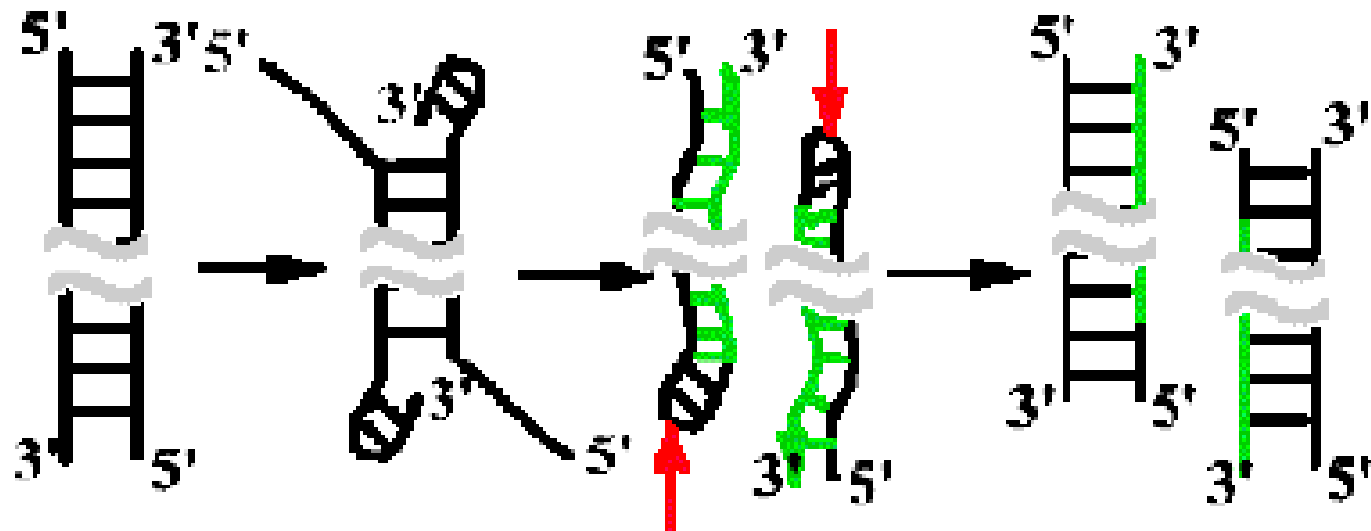
- Бактериальная хромосома реплицируется за 40 минут, тогда как эукариотическая - за 1-2 часа.**

Активация ДНК-матрицы



Нативная двуцепочечная ДНК, не имеющая повреждений, не может эффективно использоваться для репликации. Активировать ее можно либо *денатурацией щелочью или нагреванием (1)*, либо *обработкой нуклеазой определенного типа, которая делает однонитчатые концы (2)*, либо *внесением одноцепочечных разрывов с помощью эндонуклеаз (3)*.

Во всех случаях матрицей для синтеза новых цепей служит одноцепочечная ДНК. Затравкой является 3'-ОН конец двуцепочечной ДНК, причем он должен быть спарен с матрицей.



Составляющие элементы процесса репликации (на примере бактерий)

Для подготовки хромосомы к репликации работают:

Топоизомеразы –
топоизомераза I и топоизомераза II

Непосредственно в процессе репликации участвуют ферменты:

1. Хеликазы
2. Белки инициации репликации DnaA, DnaB, DnaC
3. SSB-белки
4. ДНК-праймаза (РНК-полимераза)
5. ДНК-полимеразы:
ДНК-полимераза I
ДНК-полимераза II
ДНК-полимераза III
6. ДНК-лигаза

Основные функции ферментов репликации

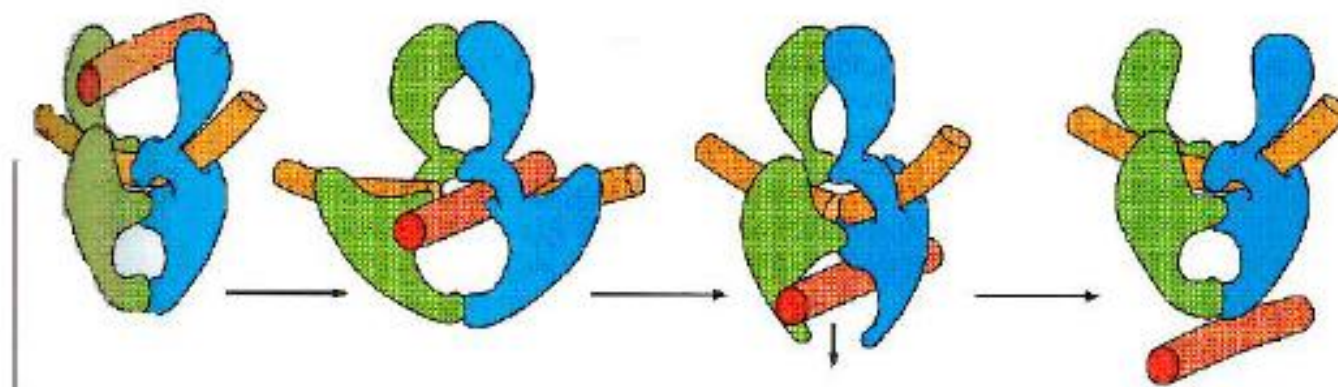
- **ДНК-топоизомеразы** - ферменты изменяющие степень сверхспирализации ДНК, путем внесения одноцепочечных или двухцепочечных разрывов в ДНК.
- **ДНК-хеликаза** – фермент разделяющий цепи двухцепочечной ДНК на одинарные цепи.
- **ДНК-праймаза** — это фермент РНК-полимераза, синтезирующий короткий фрагмент РНК, называемый праймером, комплементарный одноцепочечной матрице ДНК.
- **ДНК-полимеразы** - ферменты катализирующие синтез дочерних цепей на матрице ДНК по принципу комплементарности.
- **ДНК-лигаза** – фермент катализирующий сшивание одноцепочечных фрагментов ДНК.

Топоизомеразы

ДНК-топоизомеразы, находясь перед репликативной вилкой, разрезают молекулу ДНК для облегчения ее расплетания и раскручивания молекулы ДНК, после чего непрерывность ее восстанавливается.

ДНК-топоизомеразы действуют путем создания временного однонитевого или двунитевого разрыва в молекуле ДНК, проведения сквозь разрыв другого, целого сегмента цепи и воссоединения цепи в месте разрыва. В результате такого ферментативного акта целостность цепей сохраняется, но их топологическое состояние может измениться.

Топоизомеразы убирают суперспирализацию ДНК



По механизму действия топоизомеразы делятся на два типа:
топоизомераза I и топоизомераза II

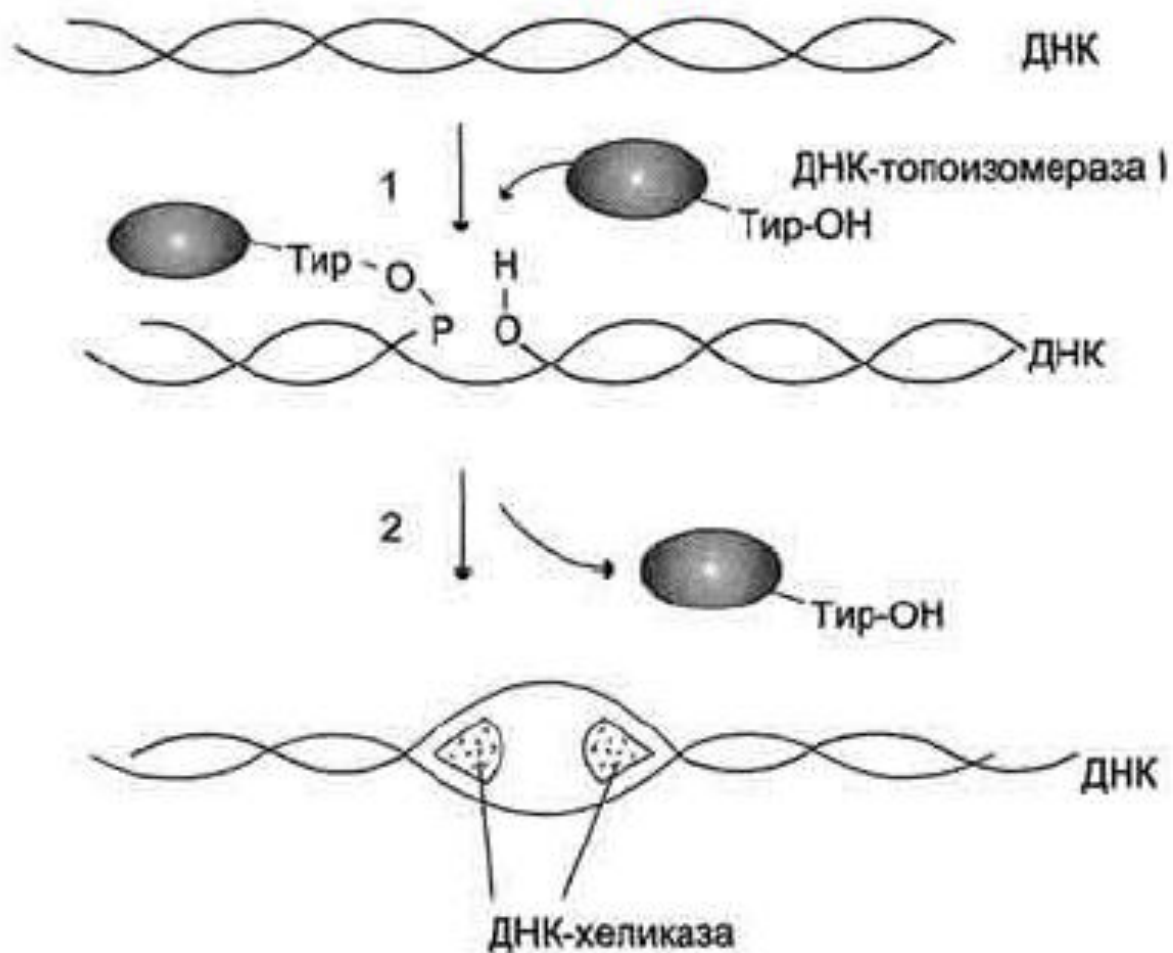
Топоизомераза I путём одноцепочечного разрыва создает шарнир, вокруг которого молекула ДНК, находящаяся перед вилкой, может свободно вращаться.

Это снимает механическое напряжение, возникающее при раскручивании двух цепей в репликативной вилке, что является необходимым условием для её непрерывного движения.

Топоизомераза I уменьшают число сверхвитков в ДНК на единицу за один акт.

Топоизомераза II вносит временные разрывы в обе комплиментарные цепи ДНК, пропускает двухцепочечный сегмент той же самой или другой молекулы ДНК через разрыв, а затем соединяют разорванные концы. В результате за один акт снимаются два сверхвитка.

Участие топоизомеразы I в образовании репликативной вилки

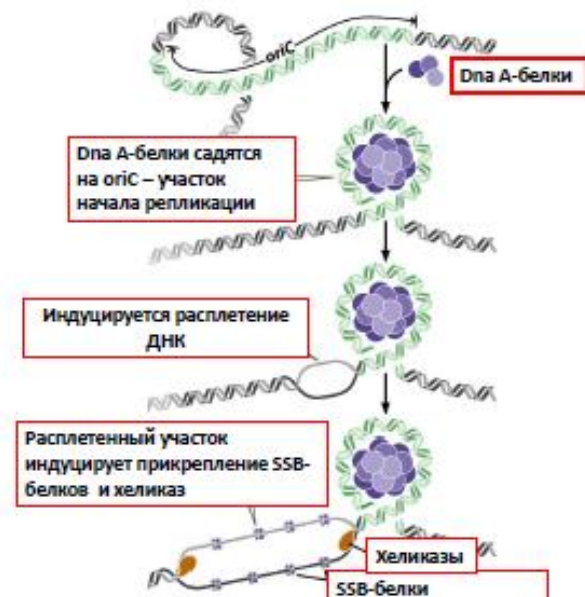


Хеликазы – это ферменты, способные расплетать две комплементарные нити в ДНК с использованием энергии, полученной при гидролизе АТФ.

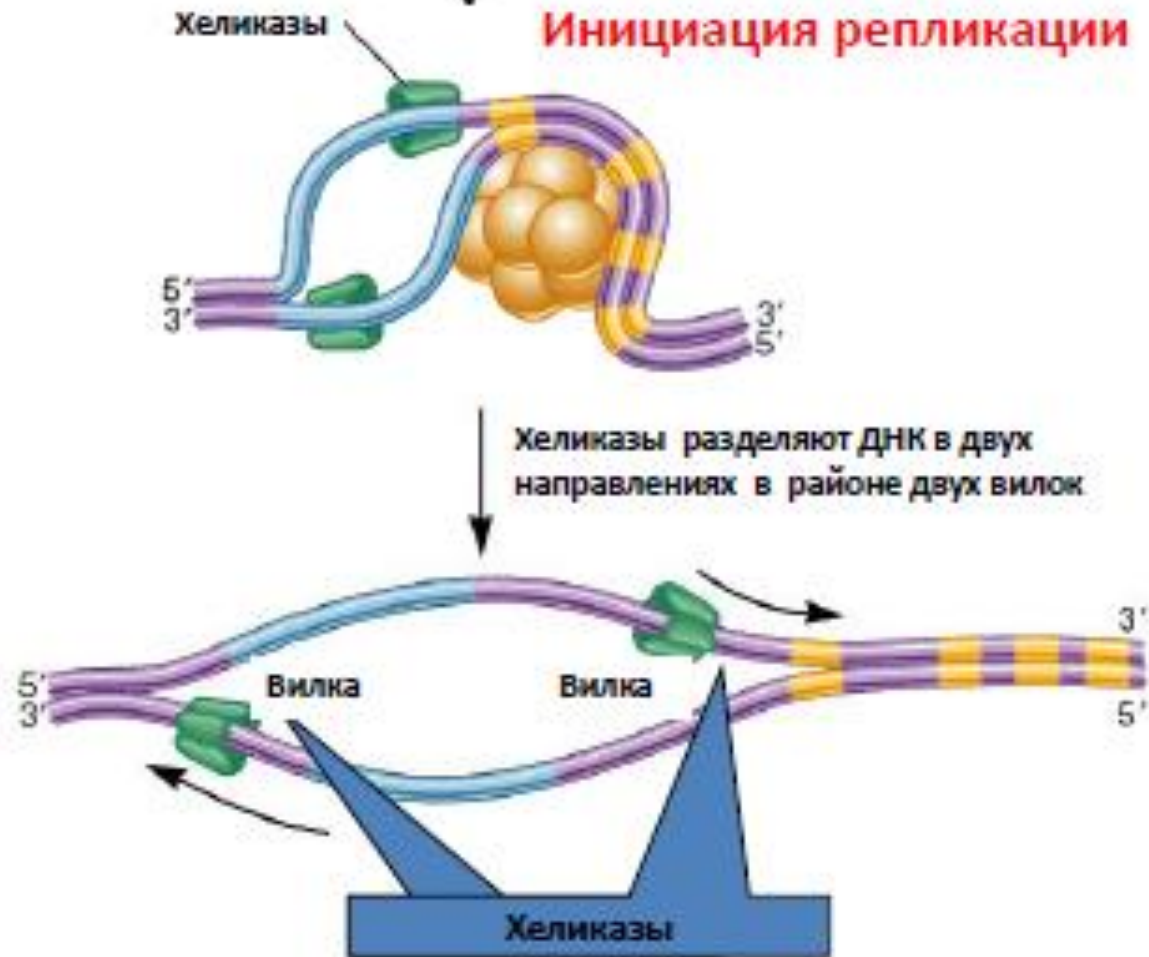
У бактерий имеется две хеликазы – хеликаза **Rep** и хеликаза **DnaВ**. Считается, что хеликаза, движимая гидролизом АТФ, однонаправленно «едет» по одной из цепей ДНК, расплетая перед собой двойную спираль.

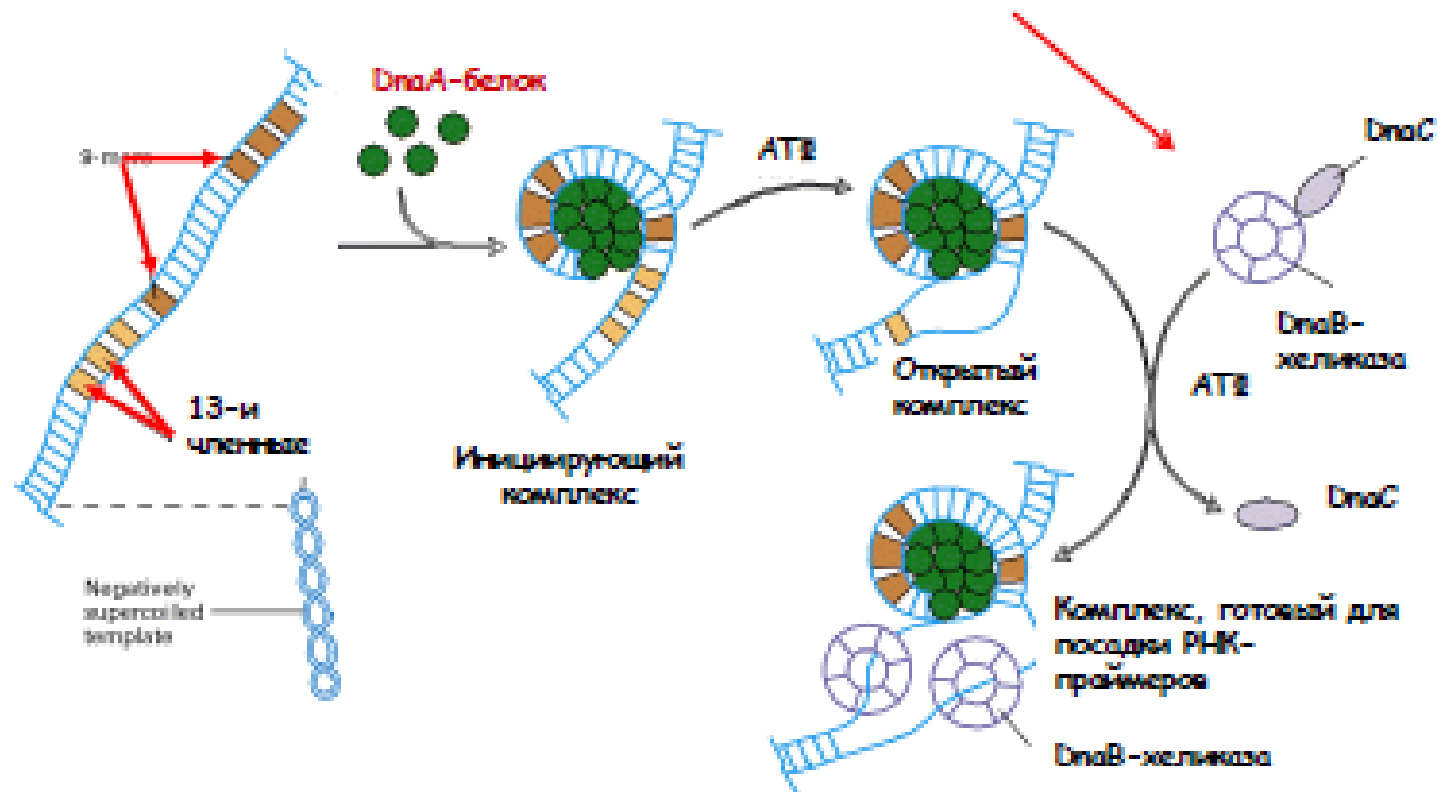
Хеликаза **Rep** продвигается от 3'-конца к 5'-концу цепи ДНК, служащей матрицей для **ведущей цепи ДНК**.

Хеликаза **DnaВ** продвигается по противоположной цепи, служащей для синтеза **запаздывающей цепи**. Продвижение хеликаз идет в направлении вместе с репликативной вилкой.



Инициация репликации

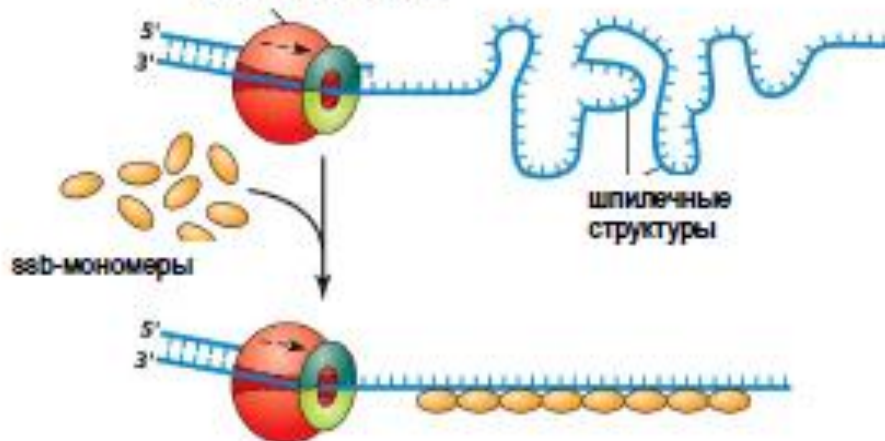




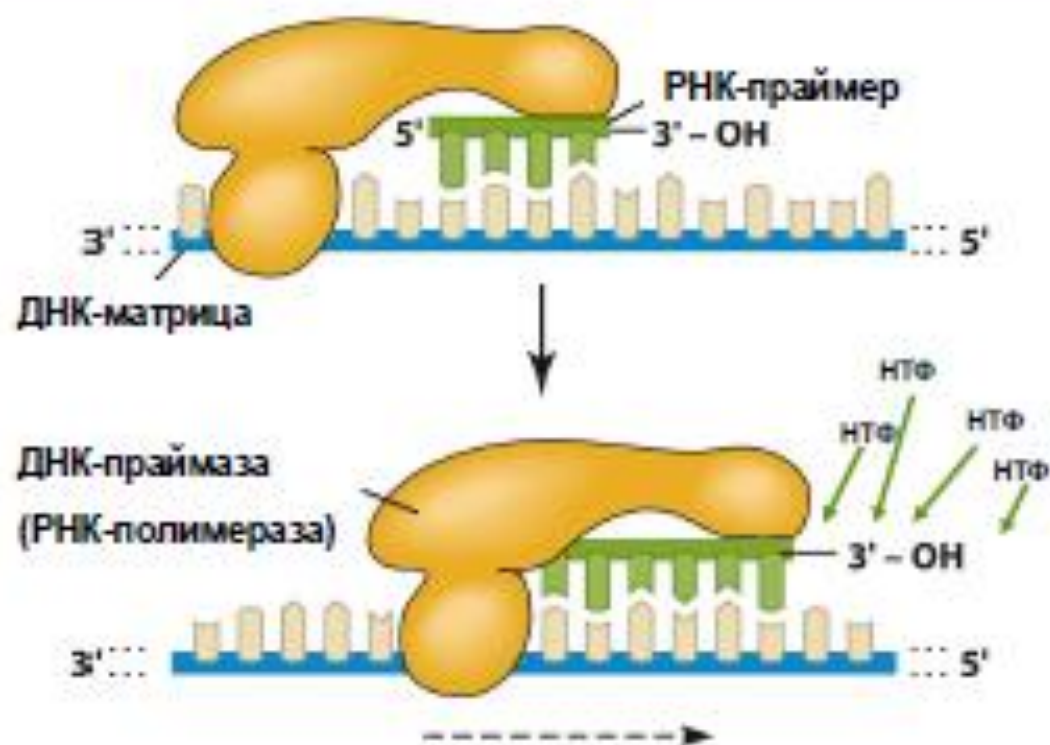
ssb-белки

Роль *ssb*-белков заключается в том, что они связываются с однонитчатой ДНК, выпрямляют ее и блокируют образование шпилечных двухнитчатых структур

ДНК-полимераза

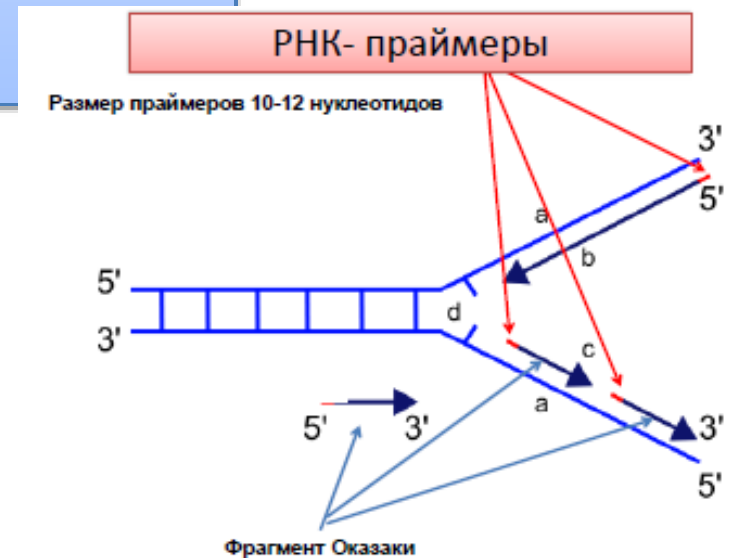


Для инициации репликации необходима
ДНК-праймаза (РНК-полимераза)



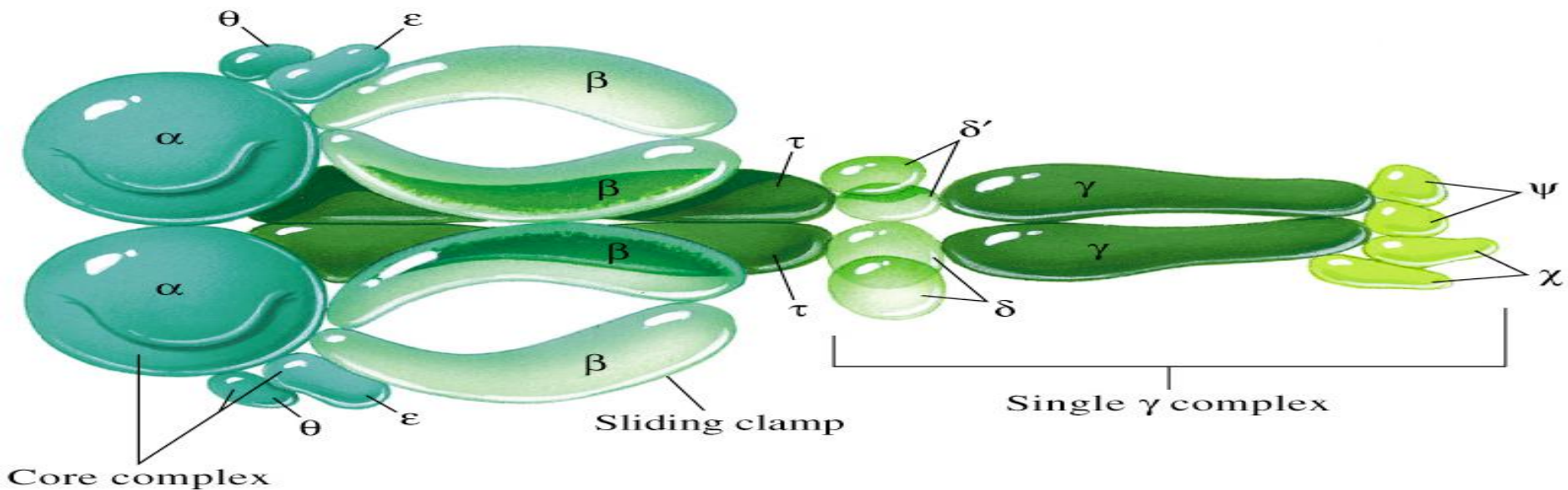
ДНК-праймаза (РНК-полимераза) –DnaG-белок

- **Праймаза** – фермент, синтезирующий РНК-праймеры для запуска синтеза ведущей цепи ДНК и запуска синтеза фрагментов Оказаки на запаздывающей цепи ДНК.
- **Праймаза** активируется ДНК-хеликазой и находится с ней в комплексе, который называется **праймасомой**. Без РНК-праймеров синтез ДНК начаться не может.



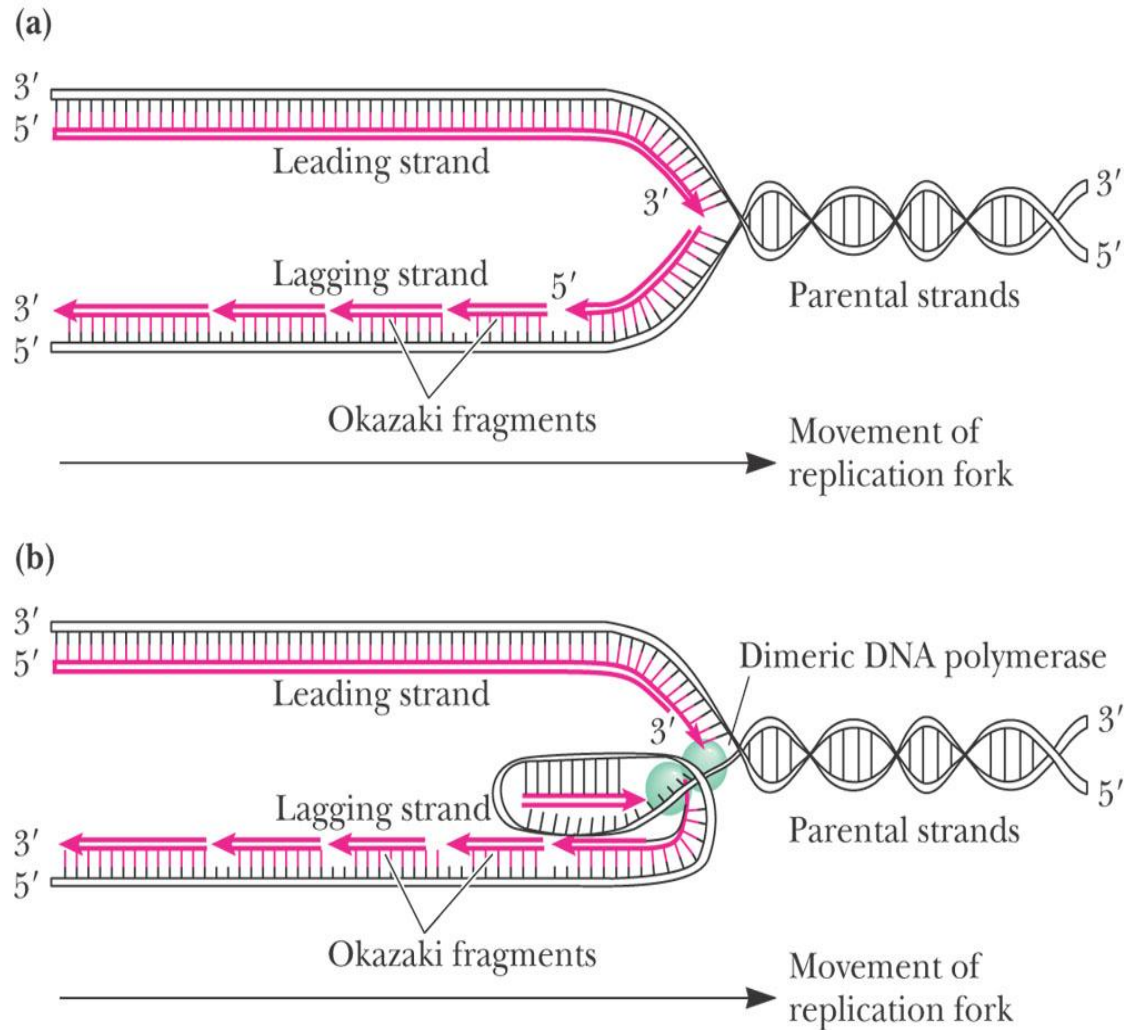
ДНК полимераза

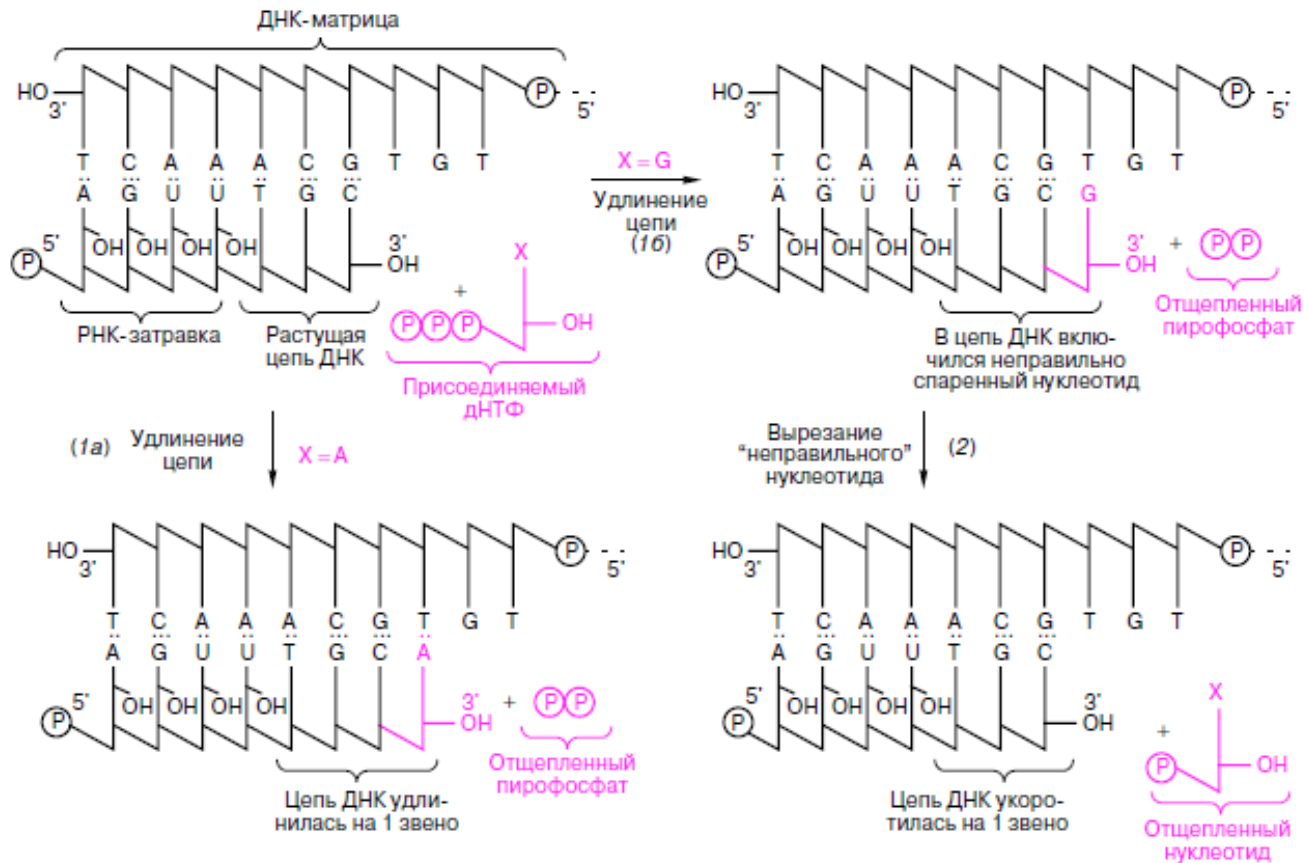
- ДНК полимераза III - основной репликационный фермент, который отвечает за элонгацию цепи
- ДНК полимераза синтезирует за принципом комплементарности
- Нуклеотиды присоединяются фосфорной группой к свободному гидроксилу 3'-конца цепи



ДНК полимераза синтезирует две цепи одновременно

- ДНК полимераза катализирует элонгацию только в 5'-3' направлении
- **Ведущая цепь** - синтезируется постоянно в направлении движения репликативной вилки
- **Отстающая цепь** - синтезируется в противоположном направлении фрагментарно

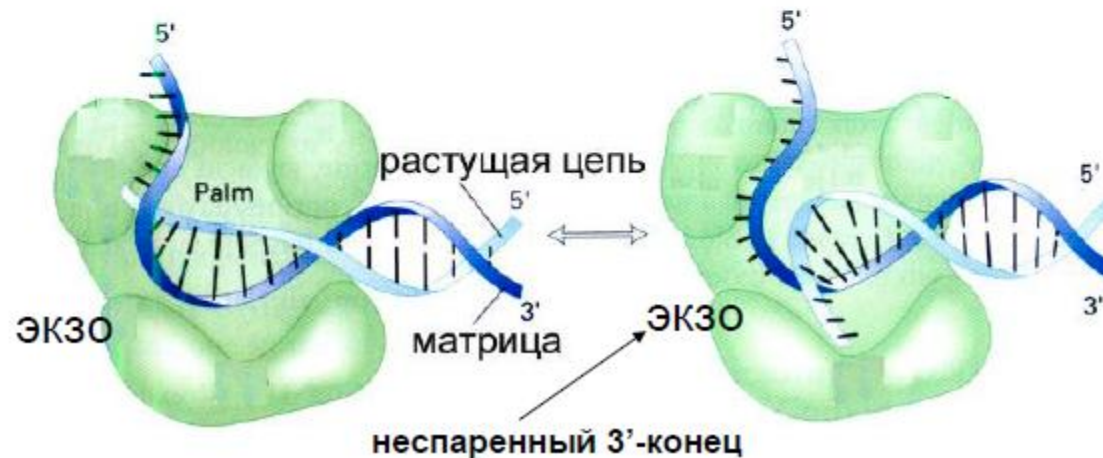




ДНК-полимеразы катализируют при наличии РНК-затравки синтез ДНК из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ), комплементарных нуклеотидам ДНК-матрицы, наращивая цепь по одному звену (стадия 1а). Они проверяют правильность подбора последней пары оснований и в случае присоединения неправильно спаренного нуклеотида (стадия 1б) вырезают его (стадия 2). РНК-затравка отличается от ДНК структурой сахарного остатка (содержит вместо 2'-деоксирибозы рибозу, что схематически отражено как наличие ОН-группы) и присутствием основания урацила (U) вместо тимина (T).

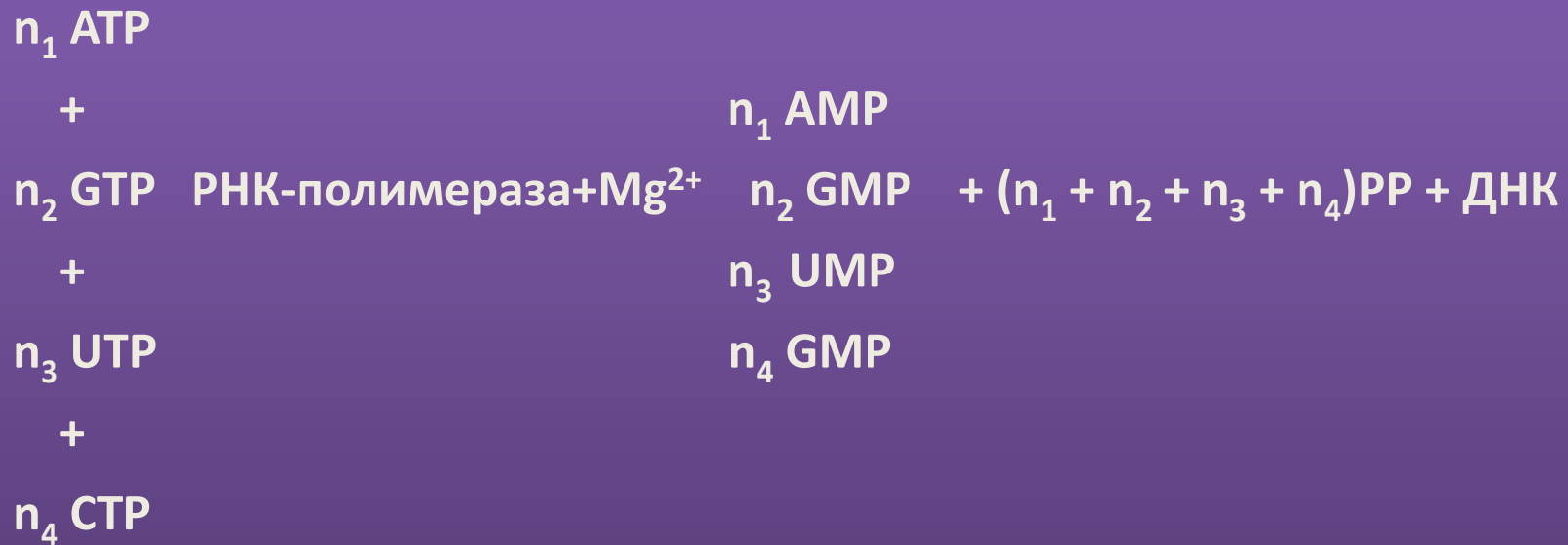
Только репликация в направлении $5' \rightarrow 3'$ позволяет эффективно исправлять ошибки

Активный центр ДНК-полимеразы отбирает только правильные пары, однако таутомерные превращения могут приводить к неверному спариванию в 1 случае из $10^5 - 10^6$ нуклеотидов. Таутомеры оснований в необычной таутомерной форме (например, цитозин может спариваться с аденином и включаться в цепь с ОН-группой в 3'-положении рибозы). Быстрый сдвиг в прежнюю таутомерную форму нарушает спаривание. Неспаренный 3'-конец препятствует удлинению цепи. $3' \rightarrow 5'$ экзонуклеаза, связанная с ДНК-полимеразой, удаляет неверно вставленный нуклеотид (процесс «пруффридинга»:



МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ФЕРМЕНТЫ РЕПЛИКАЦИИ ДНК

Первый шаг на пути к пониманию ферментативного механизма репликации ДНК был сделан А. Корнбергом. В 1956 г., он выделил из клеток бактерии *E. coli* фермент ДНК-полимеразу (впоследствии ДНК-полимераза I). Этот фермент осуществлял синтез ДНК при наличии в реакционной смеси всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов: АТФ, ГТФ, ТТФ, ЦТФ и молекул ДНК:



В такой реакции количество ДНК увеличивалось в 20 раз по сравнению с внесенным изначально. По нуклеотидному составу вновь синтезированная ДНК не отличалась от исходной. Однако оказалось, что ДНК-полимераза I не является истинной «репликазой». Что же происходит в реакции Корнберга?

Фрагмент ДНК, в котором имеются матричная и затравочная нити. Пунктир показывает направление роста цепи ДНК, синтезируемой ДНК-полимеразой I.



При выделении из клеток ДНК рвется, так что образуются фрагменты с одноцепочечными 5'-концами. Каждый фрагмент с одноцепочечным 5'-концом используется в качестве матрицы для полимеризации комплементарных нуклеотидов, которые связываются с ней водородными связями. Более короткая цепь фрагмента, имеющая свободный 3'-конец, служит в качестве **затравки, или праймера**, к которой ковалентно присоединяются полимеризуемые нуклеотиды. Таким образом, ДНК-полимераза I Корнберга достраивает двуцепочечные участки на концах фрагментов ДНК, после чего реакция останавливается.

Из бактериальных мутантов были выделены еще два фермента: ДНК-полимераза II и ДНК-полимераза III. Эти ферменты также достраивают двунитевые участки на фрагментах ДНК с однонитевыми 5'-концами. В дальнейшем было показано, что именно **ДНК-полимераза III участвует в синтезе полинуклеотидных цепей при репликации ДНК *E. coli*.**

Тем не менее, ни одна из трех ДНК-полимераз *E. coli* не может инициировать репликацию ДНК в отсутствие уже готового праймера (затравки). Начало синтеза ДНК — **инициацию репликации** — осуществляет иной фермент - РНК-полимераза. В качестве затравки при репликации бактериальной ДНК, ДНК-полимераза III использует полирибонуклеотид, синтезируемый на матрице ДНК.

Основные белки, осуществляющие репликацию ДНК у бактерий

Белок	Функция
Топоизомераза	Сбрасывание супервитков ДНК
Белок, раскручивающий двой-ную спираль (АТФ-зависи-мый)	Плавление ДНК
Белок, дестабилизирующий двойную спираль	Стабилизация однонитевых разрывов
РНК-полимераза (праймаза)	Инициация синтеза ДНК
ДНК-полимераза II	Синтез ДНК, корректорские функции
ДНК-полимераза III	Удаление РНК затравки, заполнение одно-нитевых участков, корректорские функции
ДНК-лигаза	Ковалентное соединение фрагментов Оказаки

Ферменты репликации

1. Фермент **геликаза** – обеспечивает расплетение двойной спирали путем разрыва водородных связей.
2. Ферменты **топоизомеразы** – снимают суперспирализацию перед репликативной вилкой.
3. Фермент **праймаза (РНК-полимераза)** – синтезирует РНК-затравку
4. Ферменты **ДНК-полимеразы**

ДНК-полимеразы прокариот:

- 1) **ДНК-полимераза III** – основной фермент, репликаза. осуществляет элонгацию в направлении 5'-3' от 3'-ОН-затравки (синтез лидирующей цепи и фрагментов Оказаки на запаздывающей цепи); 3'-5' – экзонуклеаза;
- 2) **ДНК-полимераза II** – фермент с неизвестной функцией. осуществляет элонгацию в направлении 5'-3' от 3'-ОН-затравки; 3'-5' – экзонуклеаза;
- 3) **ДНК-полимераза I** – вспомогательный фермент; осуществляет элонгацию в направлении 5'-3' от 3'-ОН-затравки при застраивании брешей; 3'-5' – экзонуклеаза (исправление возможных повреждений); 5'-3' – экзонуклеаза (удаление затравок);

ДНК-полимеразы эукариот:

ДНК-полимераза α – существует в виде комплекса с праймазой, осуществляет синтез праймеров на обеих цепях ДНК (инициация)

ДНК-полимераза δ – осуществляет синтез лидирующей цепи, 3'-5' – экзонуклеаза

ДНК-полимераза ϵ - осуществляет синтез отстающей цепи, 3' -5' - экзонуклеаза

ДНК-полимераза β – заполнение брешей при эксцизионной репарации

ДНК-полимераза γ осуществляет репликацию митохондрий

ДНК-полимераза ζ -синтез ДНК на поврежденной матрице при SOS-ответе.

Удаление РНК-затравки осуществляется специальной **нуклеазой**.

7. Фермент **лигаза** – осуществляет «сшивание» соседних фрагментов Оказаки.

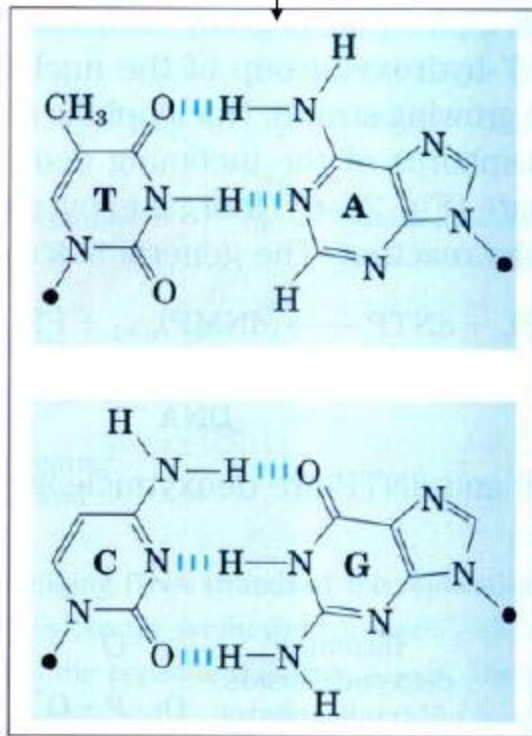
В репликации также принимают участие вспомогательные белки:

Белки, узнающие точку начала репликации

SSB-белки – стабилизируют ДНК в одноцепочечном состоянии

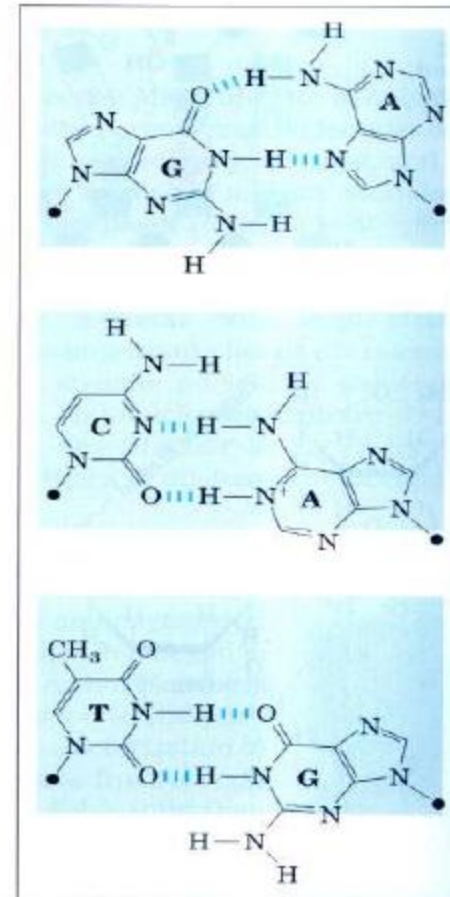
Правильное и неправильное спаривание оснований

правильное



(a)

неправильное



(b)

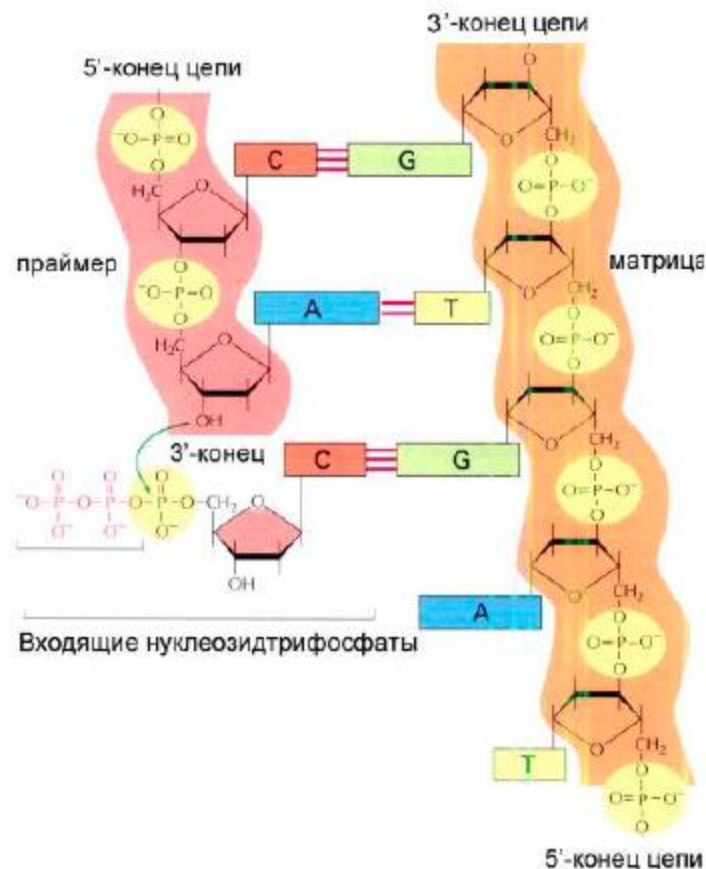
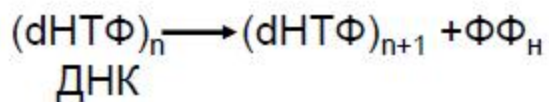
Химия биосинтеза ДНК

Биосинтез ДНК ведется в направлении 5'→3' ДНК-полимеразой I. К праймеру присоединяются нуклеозид-5'-трифосфаты

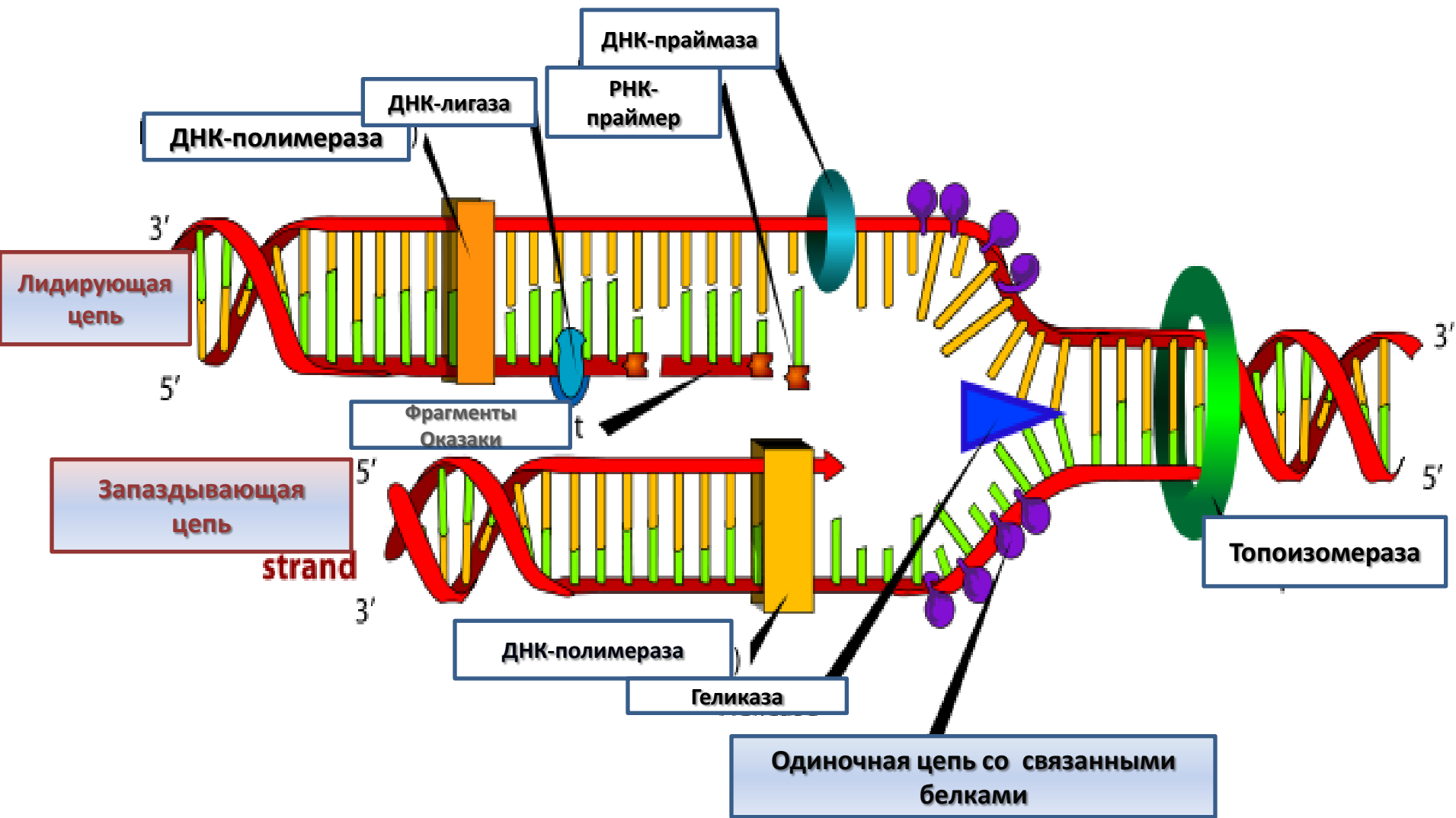
1. Суммарный процесс:



2. Одна стадия:



Репликация ДНК



Компоненты, необходимые для репликации

- Ферменты (главный - ДНК-зависимая ДНК-полимераза)
- Белковые факторы
- Материнская ДНК
- АТФ, ГТФ, ТТФ, ЦТФ
- Ионы Mg и Zn

Ферменты репликации

В репликации молекулы ДНК принимают участие ферменты:

- **ДНК-топоизомеразы** - ферменты изменяющие степень сверхспирализации ДНК
- **ДНК-хеликаза (геликаза)** - фермент разделяющий цепи двухцепочечной ДНК на одинарные цепи.
- **ДНК-праймаза** - это фермент РНК-полимераза, синтезирующий короткий фрагмент РНК, называемый праймером, комплементарный одноцепочечной матрице ДНК.
- **ДНК-полимеразы** - ферменты катализирующие синтез дочерних цепей на матрице ДНК по принципу комплементарности.
- **ДНК-лигаза** - фермент катализирующий сшивание одноцепочечных фрагментов ДНК.

Топоизомеразы

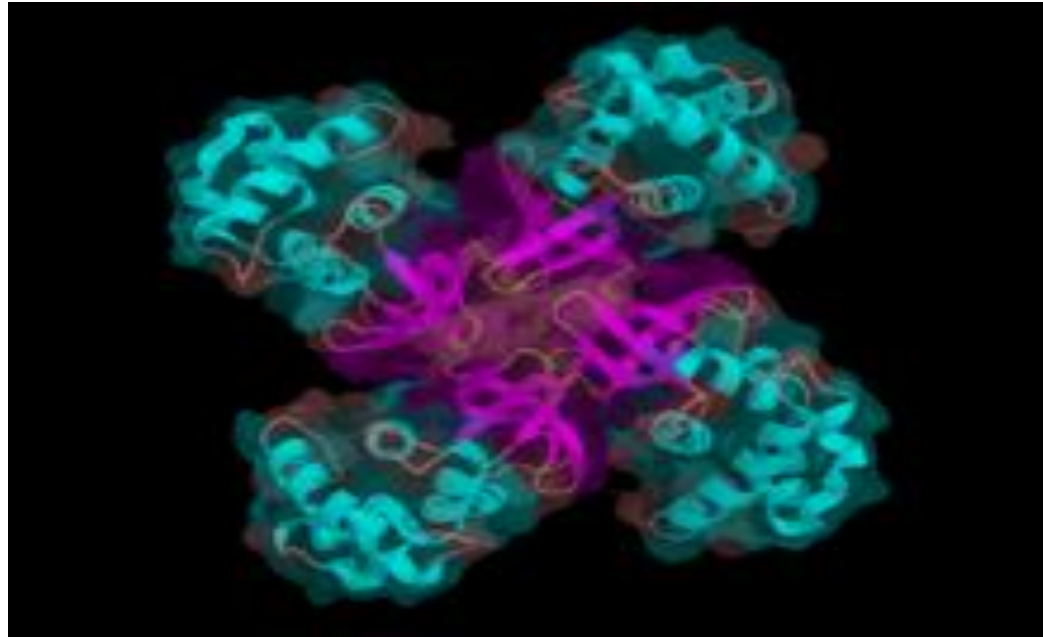
ДНК-топоизомеразы, находясь перед репликативной вилкой, разрезают молекулу ДНК для облегчения ее расплетания и раскручивания молекулы ДНК, после чего непрерывность ее восстанавливается. Топоизомеразы убирают суперспирализацию ДНК.



Схема строения
человеческий
топоизомеразы I в
комплексе с ДНК.

Хеликазы (геликазы)

Разделение закрученных в биспираль полинуклеотидных цепей ДНК осуществляется ферментом *геликазой* при участии дестабилизирующего белка.



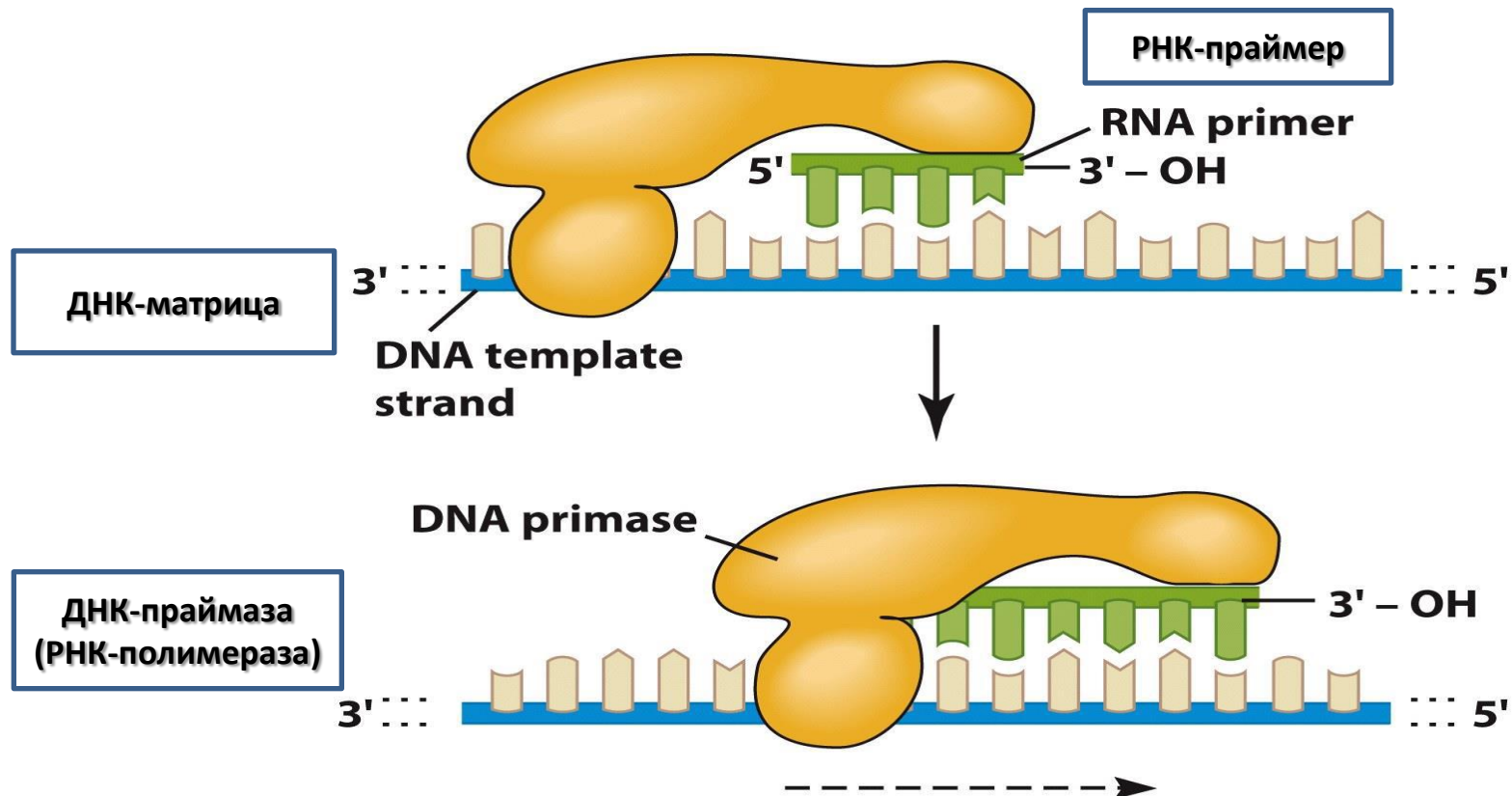
Структура геликазы RuvA

Хеликазы – это ферменты, способные расплести две комплементарные нити в ДНК с использованием энергии, полученной при гидролизе АТФ. Продвижение хеликаз идет в направлении вместе с репликативной вилкой.

Праймаза

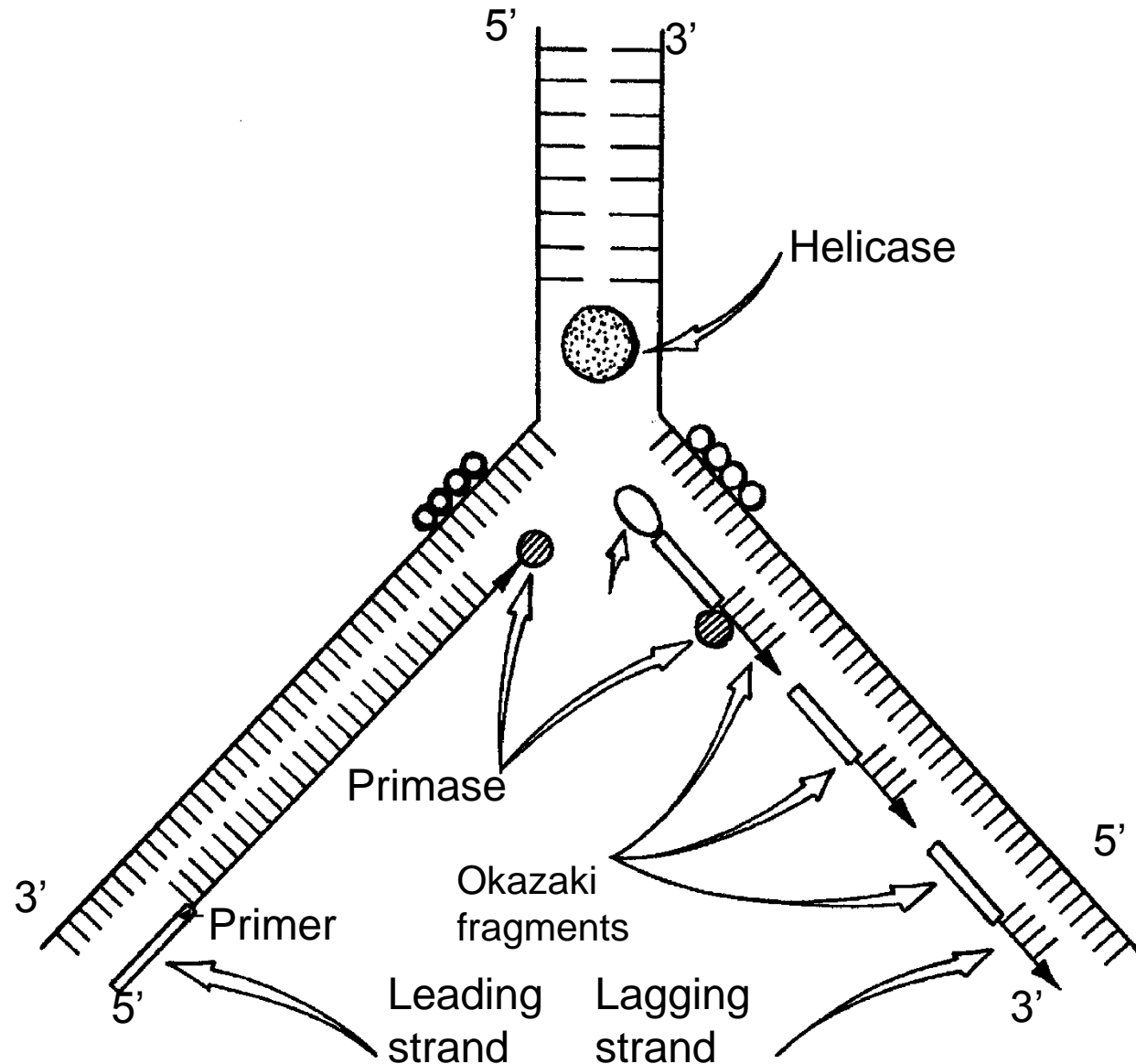
ДНК-праймаза (РНК-полимераза) необходима для инициации репликации.

Праймаза – фермент, синтезирующий РНК-праймеры для запуска синтеза ведущей цепи ДНК и запуска синтеза фрагментов Оказаки на запаздывающей цепи ДНК.

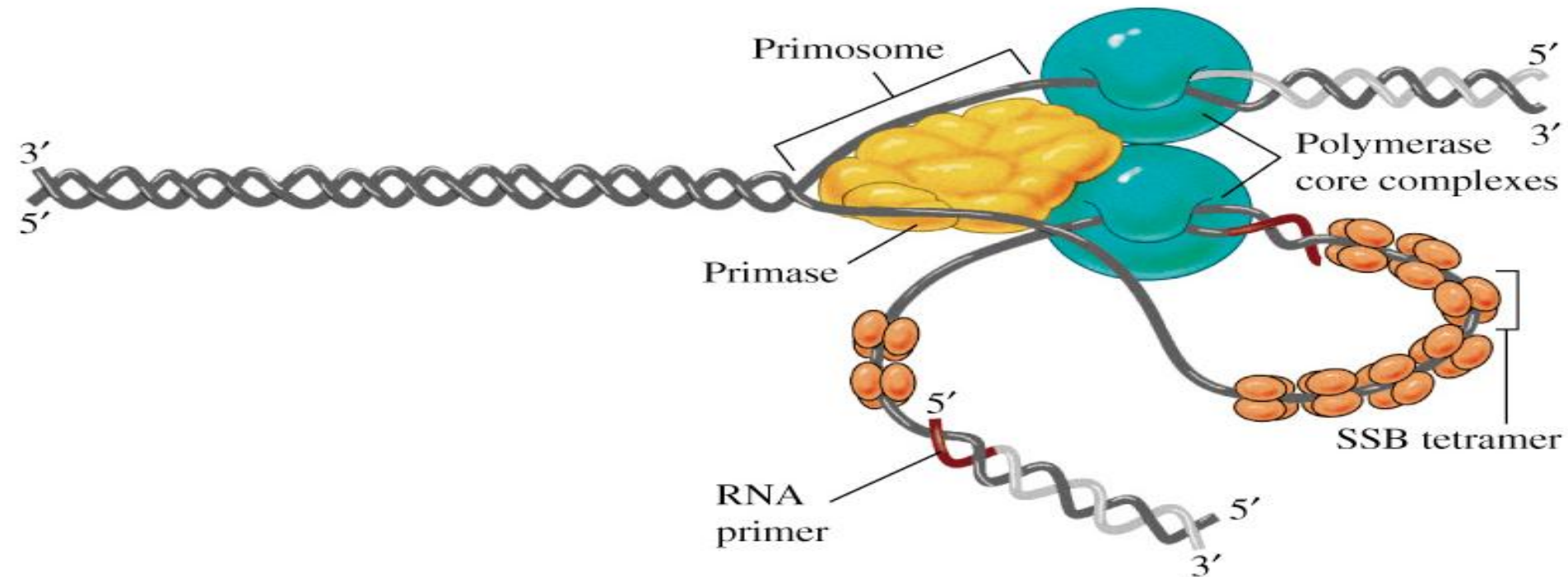


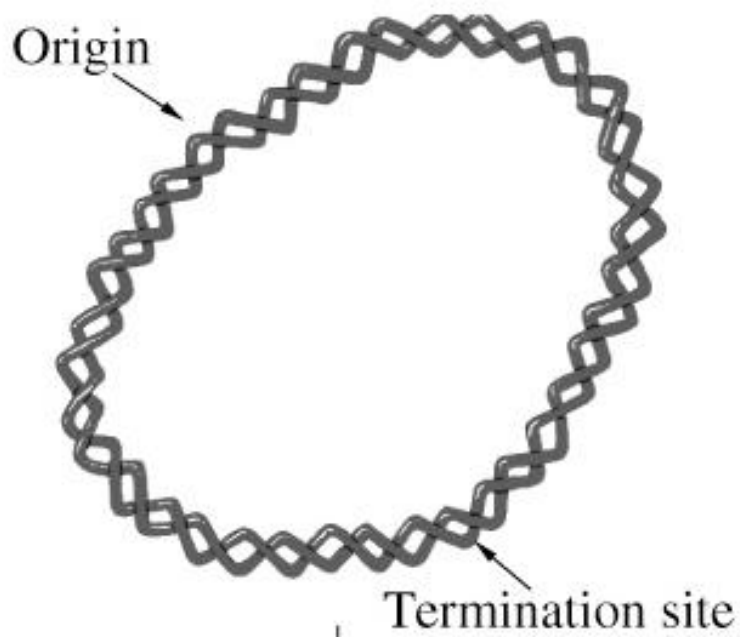
Репликация ДНК

- У эукариот репликация одновременно начинается в **многих местах**
- Точка начала репликации V-образной формы - **репликативная вилка**
- Фермент, который расплетает - **геликаза**



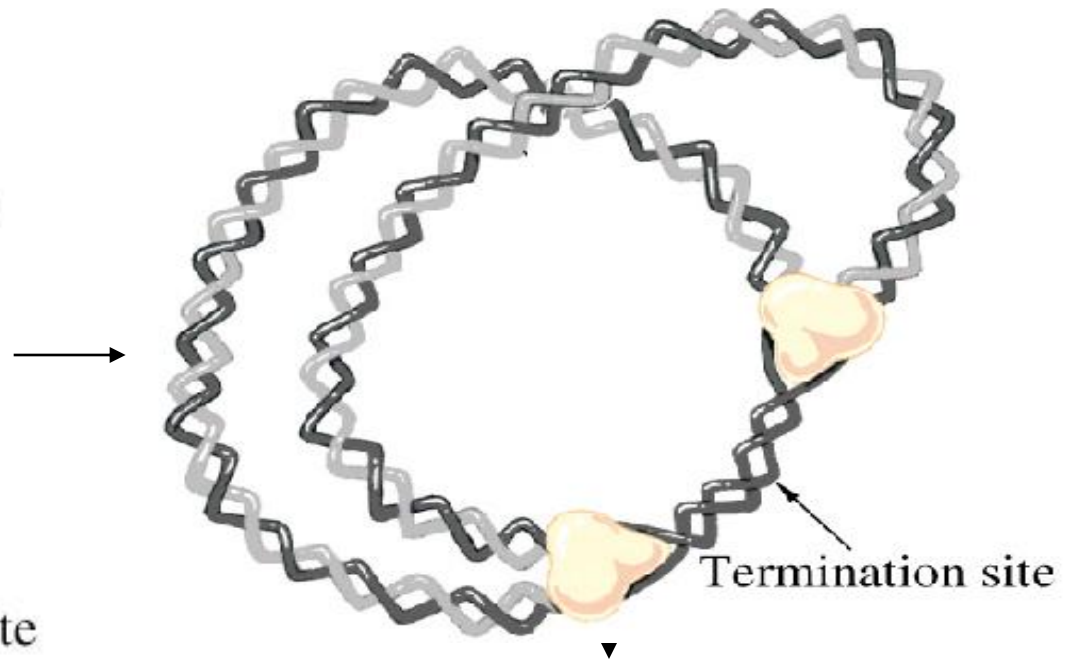
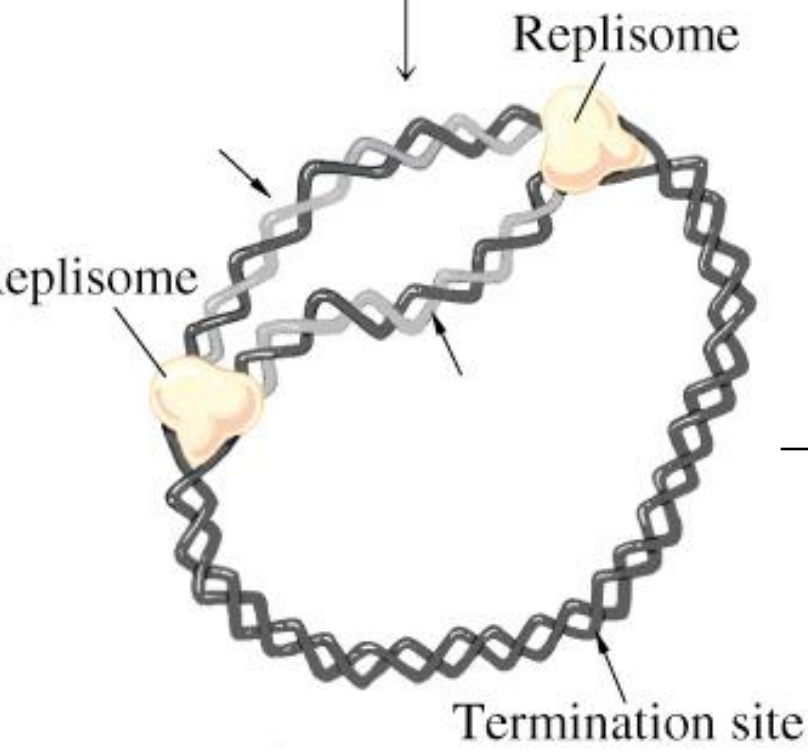
- **Реплисома** - фермент-белковый комплекс для репликации.
- **Реплисома** содержит: **праймосому**, **ДНК полимеразу III**, **белок**
- **Геликаза** является частью **праймосомы**





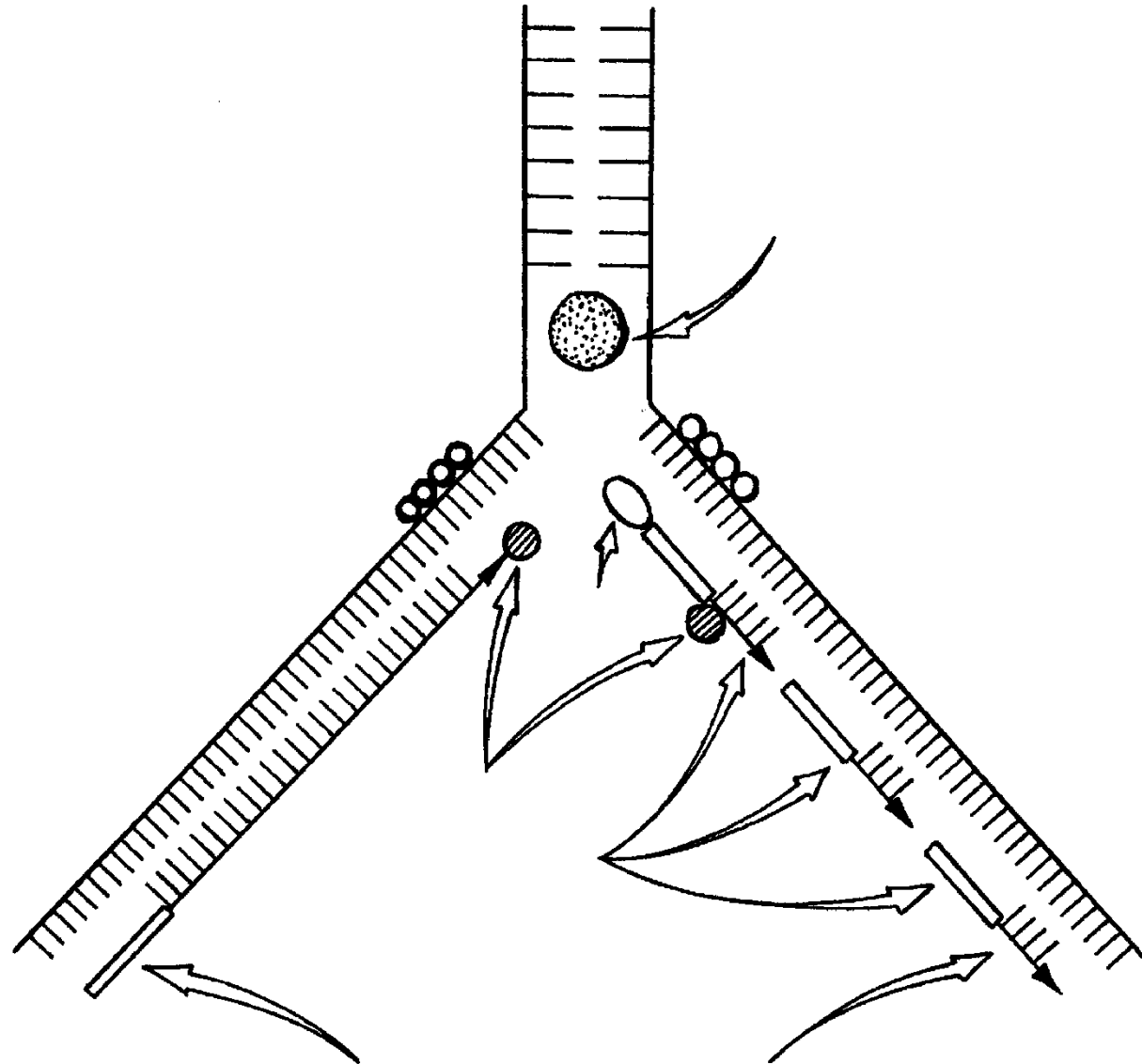
Репликация ДНК в
противоположных
направлениях у *E. coli*

Новые цепи ДНК
синтезируются в двух
репликационных вилках
где размещаются
реплисомы



Синтез отстающей цепи происходит дискретно

- Отстающая цепь синтезируется прерывисто короткими фрагментами (**фрагменты Оказаки**)
- Фрагменты отстающей цепи потом соединяются ферментом **лигазой**



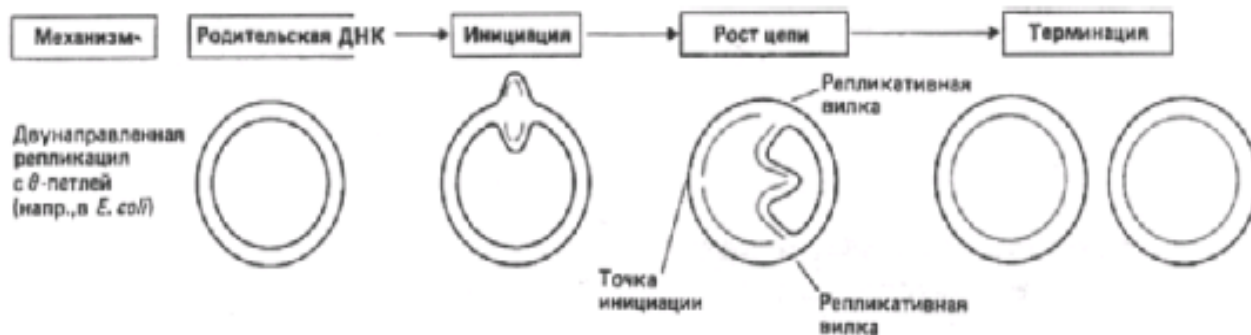
Способы репликации различных геномов

1. Репликация по типу глазка или θ -структуры (для кольцевых геномов).
2. Репликация по типу множественных глазков при репликации хромосом эукариотических организмов.
3. Репликация по типу катящегося рулона (для хромосомы *E.coli* во время конъюгации, а также для геномов бактериофагов и многих вирусов).
4. Репликация по типу D-петли (репликация ДНК хлоропластов и митохондрий).
5. Репликации теломерных концов у эукариотических организмов.

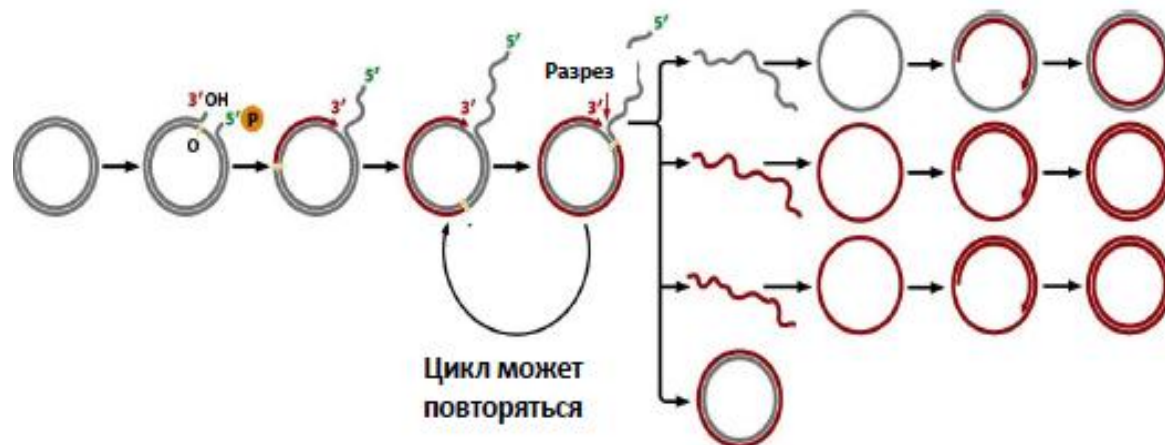
Кратко о строении геномов различных организмов и особенностях их репликации

Организмы	Организация наследственного материала	Характер репликации
Прокариоты	Кольцевые молекулы ДНК	1. Репликация по типу глазков или «θ-структуры»
		2. Репликация по типу «катящегося кольца»
Вирусы	Чередование линейной и кольцевой структуры (бактериофаги T2, T4, λ и др.)	Реплицируется только кольцевая структура по типу «катящегося кольца»
	Линейная ДНК – бактериофаг T7	Репликация по типу Y-структуры или «пузырьков»
Эукариоты	Линейные хромосомы	1. Наличие множества репликонов. 2. Нарастивание теломерных концов.
	Кольцевые молекулы ДНК в хлоропластах и митохондриях	Репликация по типу D-петли.

Прокариоты

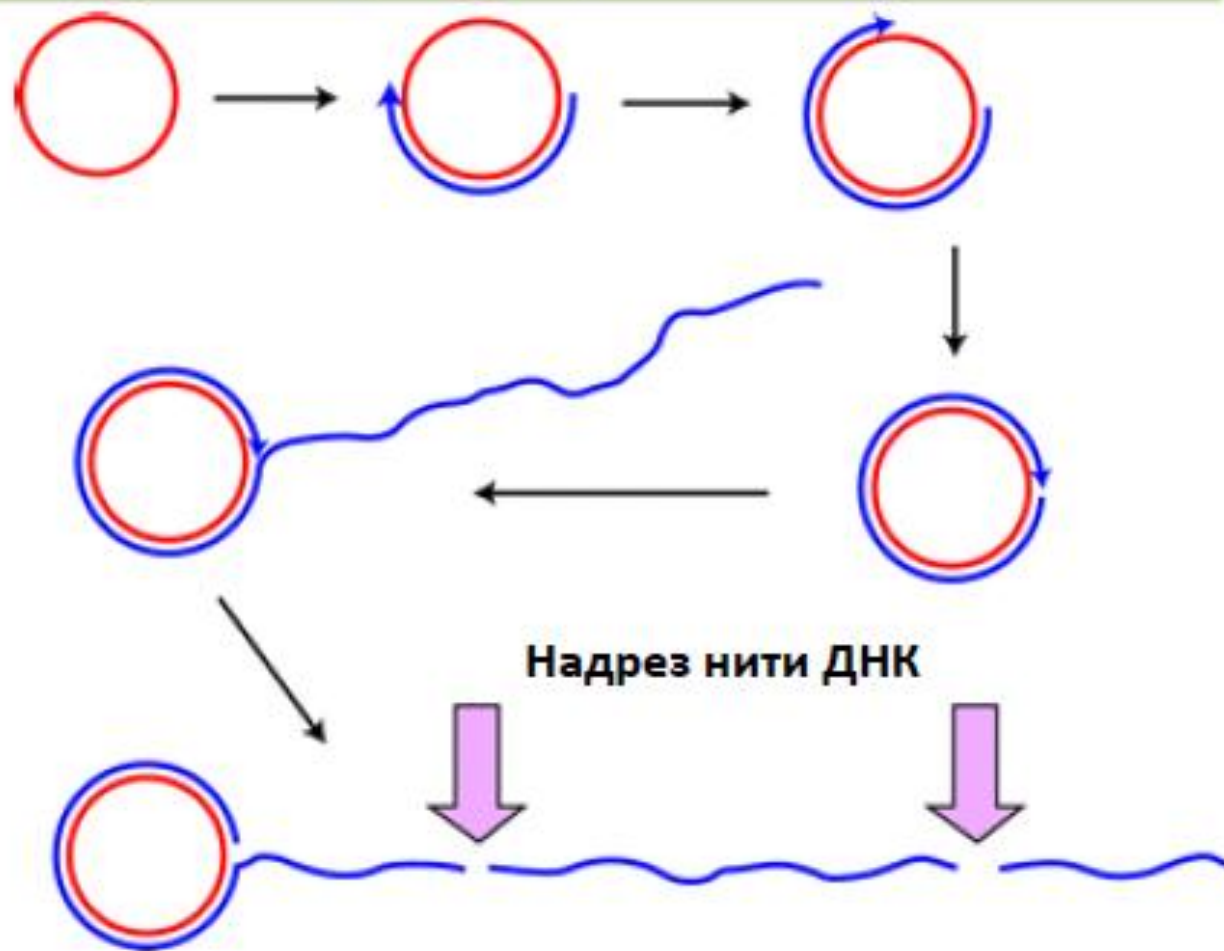


Репликация по типу глазка или θ -петли

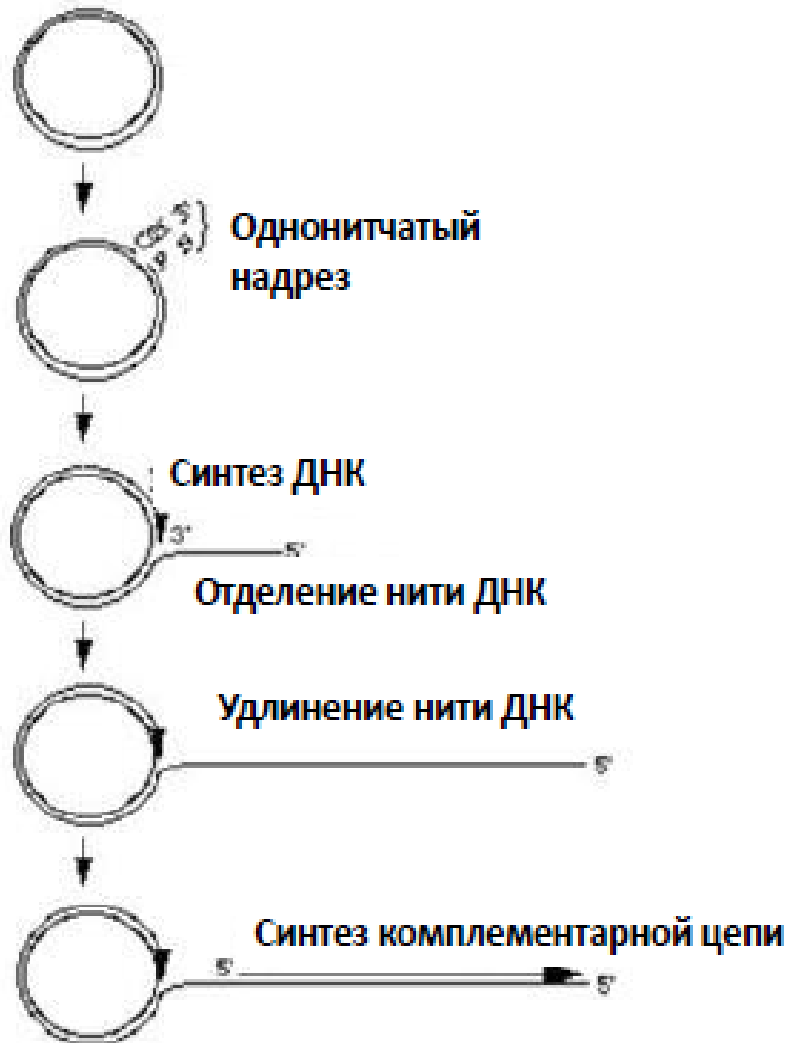


Репликация по типу катящегося кольца

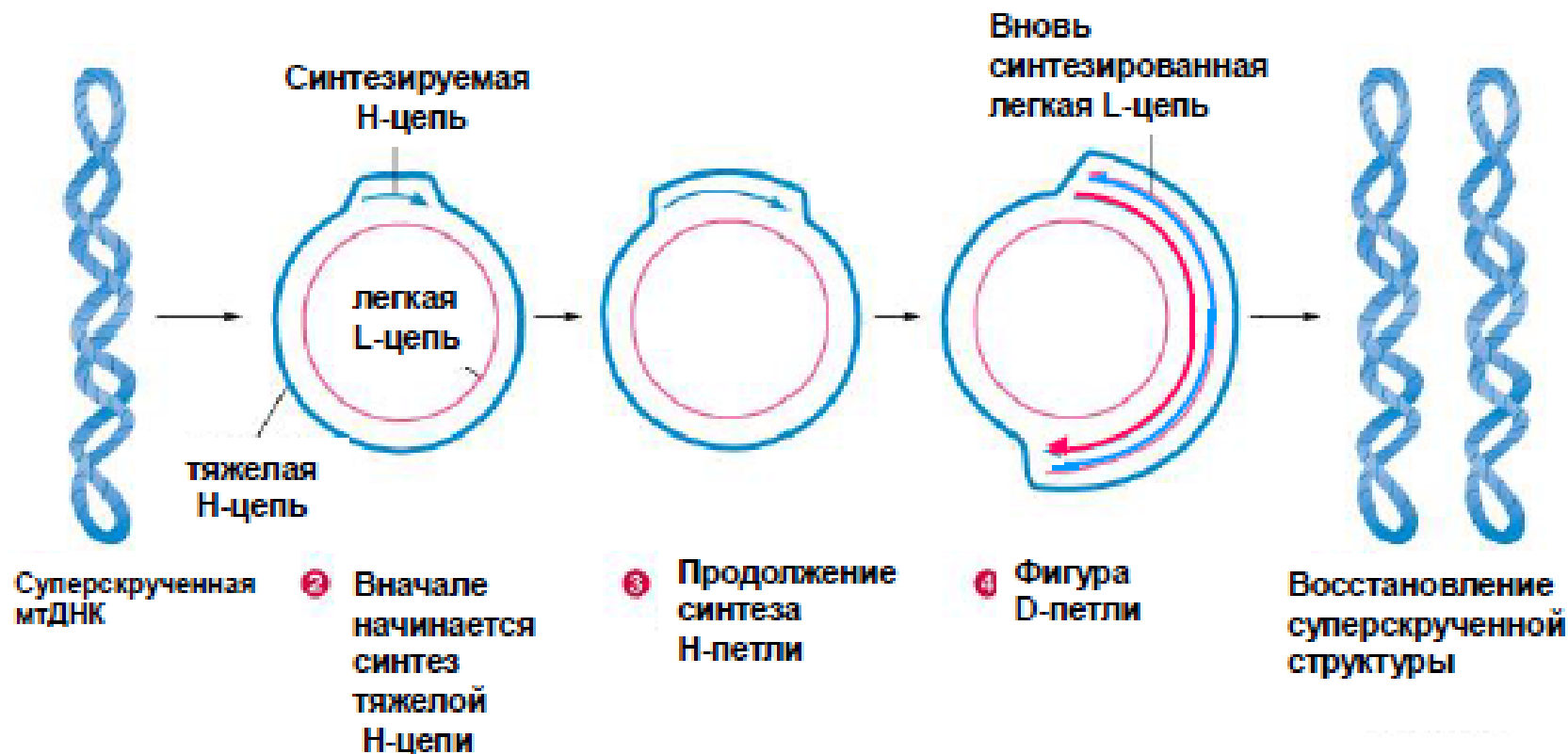
Репликация одноцепочечных геномов



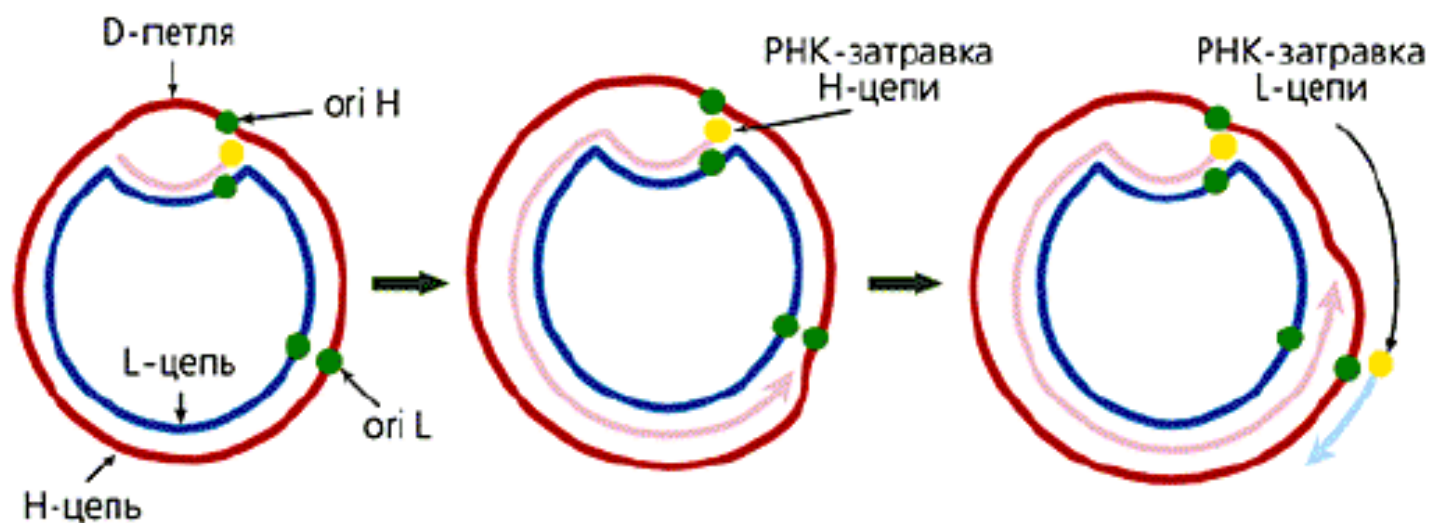
Репликация двухцепочечных геномов



Репликация хлоропластных и митохондриальных геномов по типу D-петли



Репликация геномов митохондрий и хлоропластов по типу D-петли



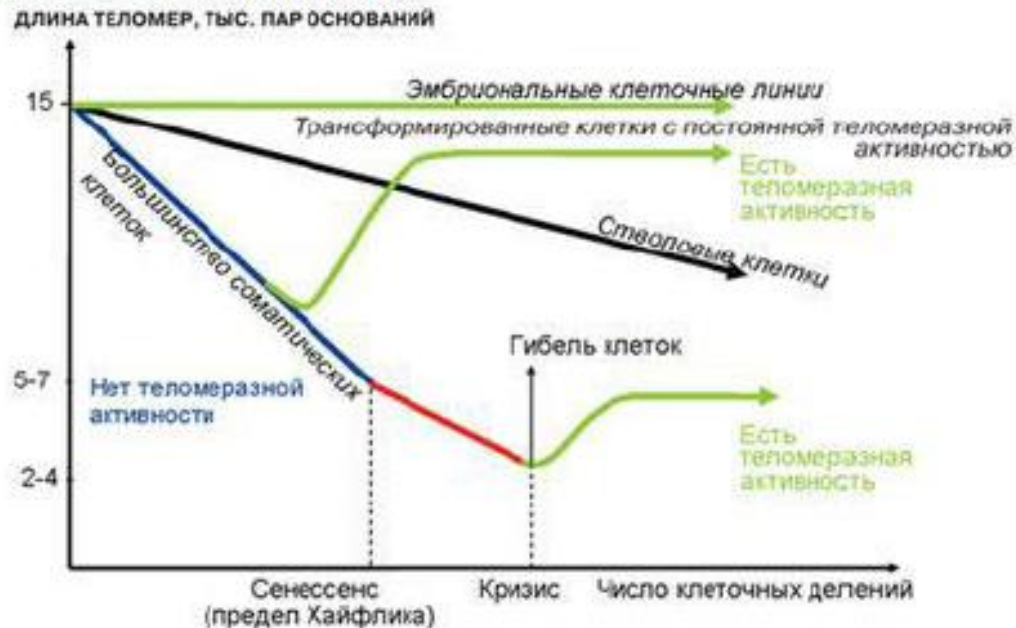
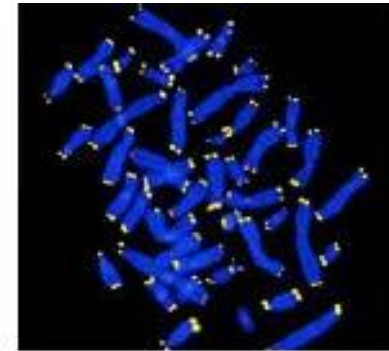
Доращивание теломерных концов

- Теломеры - это специальные структуры, находящиеся в конце хромосомы эукариотических организмов.
- Теломерные концы защищают хромосому от нуклеаз и поддерживают целостность структуры хромосомы.
- Теломерный конец укорачивается с каждым раундом репликации.
- Клетка человека может делиться не более 42 раз.





Нобелевская премия по физиологии и медицине 2009 года американских учёных Элизабет Блэкбёрн (Elizabeth H. Blackburn), Кэрол Грейдер (Carol W. Greider) и Джек Шостак (Jack W. Szostak) «за открытие того, как теломеры и фермент теломераза защищают ХРОМОСОМЫ»



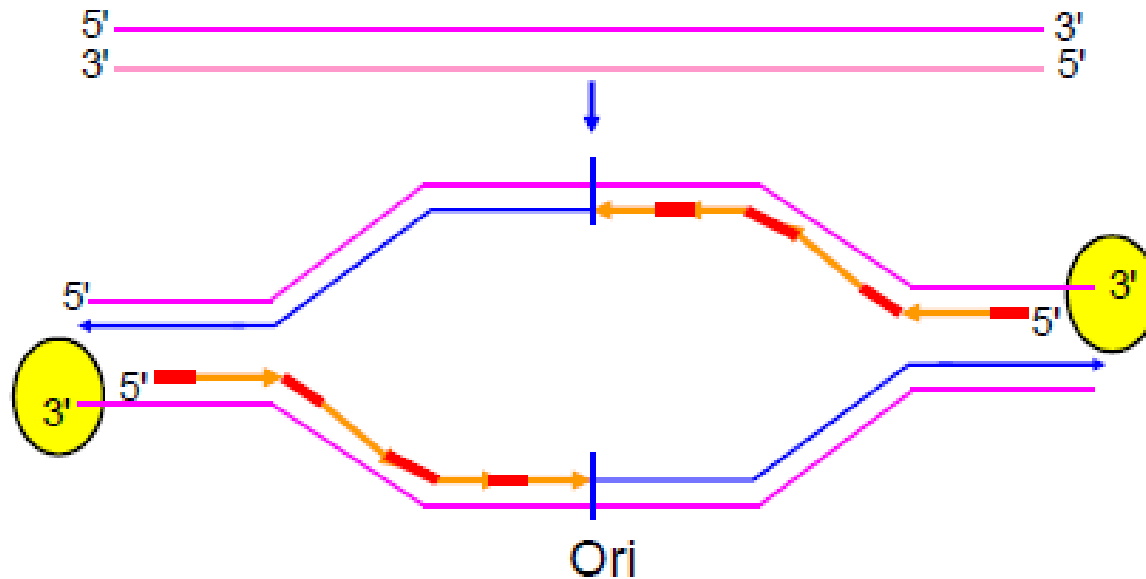
- Теломерные концы хромосомы состоят из повторяющихся последовательностей ДНК

TTAGGG – у позвоночных;

TTGGGG – у беспозвоночных

- Теломераза – фермент, удлиняющий теломерный конец на запаздывающей цепи ДНК, используя РНК-матрицу, которая находится в составе теломеразы.
 - Ведущая цепь синтезируется нормально до конца
- Теломераза активна в стволовых клетках, раковых клетках и половых клетках.
- Есть прямая связь между длиной теломерного конца и возрастом.

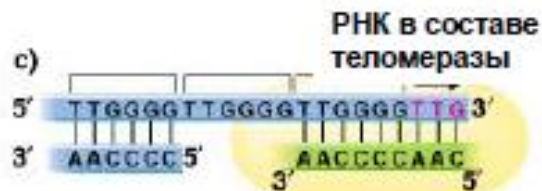
**Проблема недореплокации теломерных концов:
Теломеры укорачиваются в каждой S-фазе**



**Каждый раунд репликации ДНК укорачивается
на 50-200 п.н. с 3' конца**

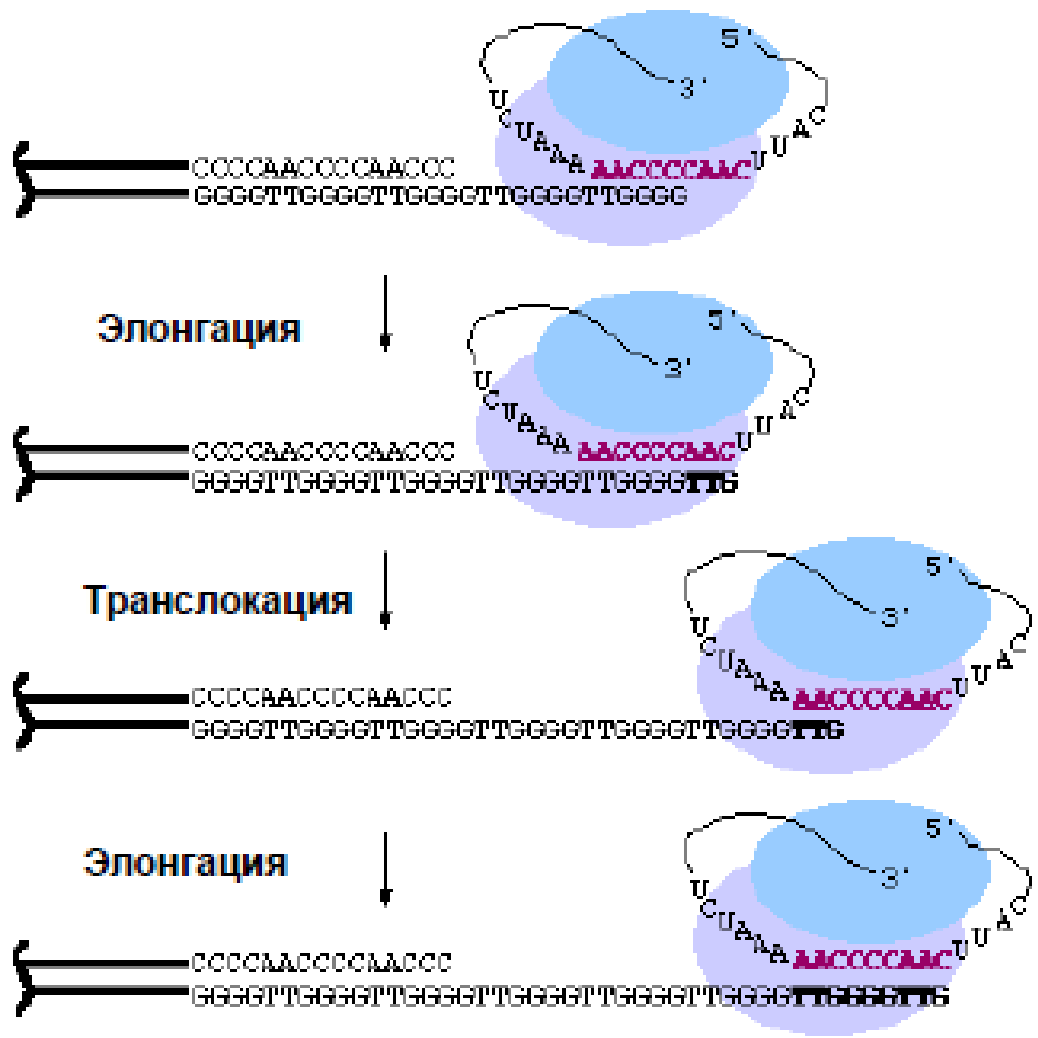
Дорращивание теломерного конца с помощью теломеразы

Повторы у позвоночных с 3' конца:
TTAGGG
Теломеразная рНК-матрица:
AAUCCC

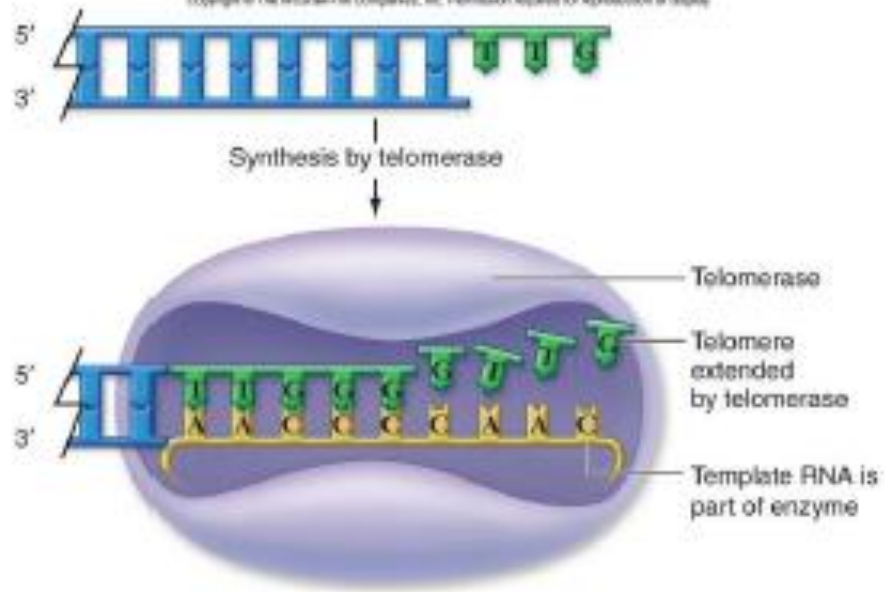




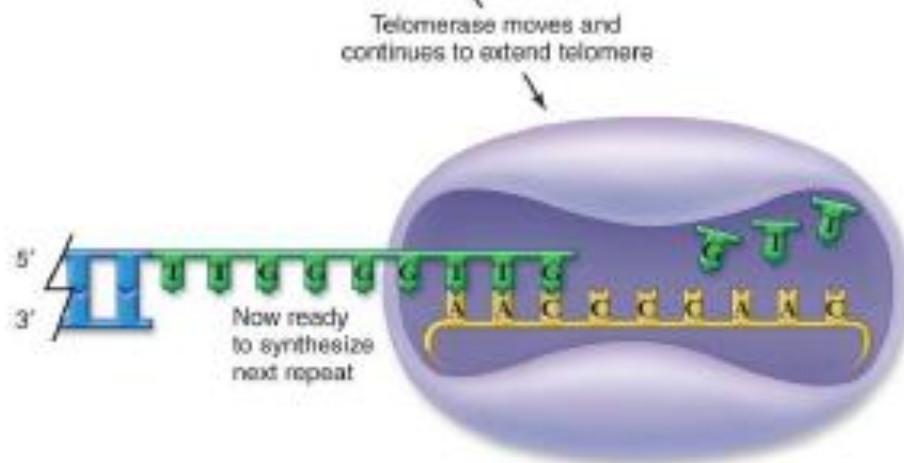
Теломераза



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display



Длина теломерных концов и старение организма



В 20 лет



После
операции
35 лет



Укорочение теломерных концов связано со старением и гибелью клеток.

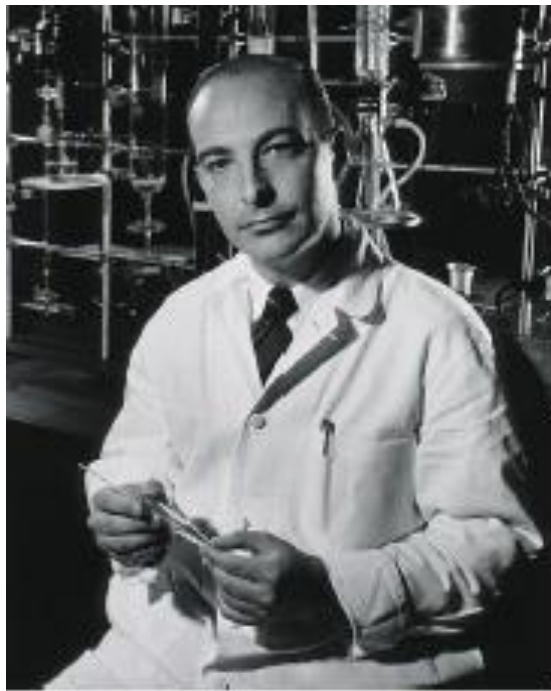
Одной из главных причин **синдрома Хатчинсона-Гилфорда –(прогерии) или синдрома преждевременного старения является укорочение теломерных концов.**

Прогерия Хатчинсона-Гилфорда



- Больные прогерией часто имеют характерный внешний вид: низкий рост, относительно большая голова и уменьшенная лицевая часть черепа.





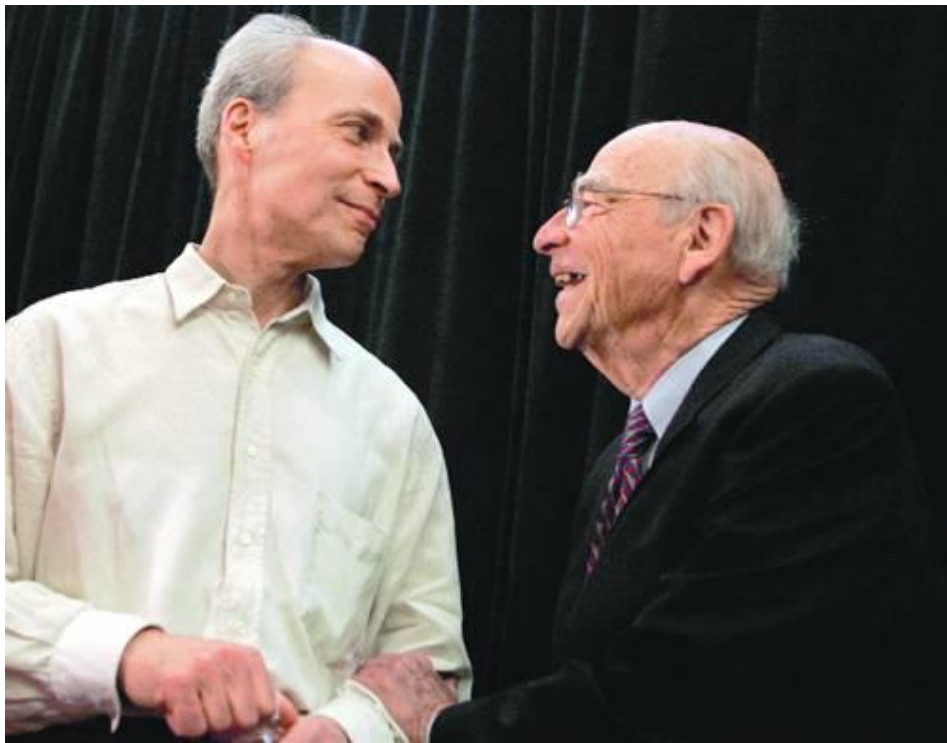
Это было мое убеждение ... вы должны знать актеров, чтобы понять сюжет. А актеры – ферменты. Они являются мини-химиками, машинами, с помощью которых протекают биологические явления... легендарный ли это вопрос спиртового брожения ... или как светится светлячок..

Первый лабораторный синтез ДНК

В 1956 г. Артур Корнберг наработал 100 кг биомассы бактерий *E. coli* и выделил только 0,5 г фермента ДНК-полимеразы.

Основные компоненты для синтеза ДНК *in vitro*:

1. **ДНК-матрица** - образец, по которому строится новая цепь ДНК.
2. **Дезоксирибонуклеотиды (АТФ, ГТФ, ТТФ, ЦТФ)** - то, из чего строятся дочерние цепи.
3. **ДНК-полимераза** – фермент, осуществляющий синтез ДНК.
4. **Ионы магния** – необходимы для работы фермента.



В 2011 году Роджер Дэвид Корнберг, сын Нобелевского лауреата по физиологии и медицине Артура Корнберга 1959, лауреат Нобелевской премии по химии 2006, профессор структурной биологии Стэнфордского университета, прочитал в КазНУ лекцию «Life as Chemistry». Он известен за исследование механизма копирования клетками генетической информации. Является наряду с другим нобелевским лауреатом Жоресом Алферовым сопредседателем консультационного научного совета фонда «Сколково» (РФ).

Полимеразная цепная реакция

Метод, который перевернул
современную молекулярную биологию

История

- Искусственный синтез ДНК с использованием праймеров был описан еще в 1971 г. Klerpe et al.
- В 1983 г. Kary Mullis предложил метод, обеспечивающий накопление (амплификацию) синтезируемого фрагмента ДНК, получивший название полимеразная цепная реакция (Нобелевская премия по химии 1993 г).
- Принцип реакции опубликован в 1985 г Science. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

Распространение метода ПЦР

Год	Число публикаций
1985	1
1986	3
1987	8
1988	139
1989	698
1990	2 668
1995	11 890
2000	16 430
2004	20 075

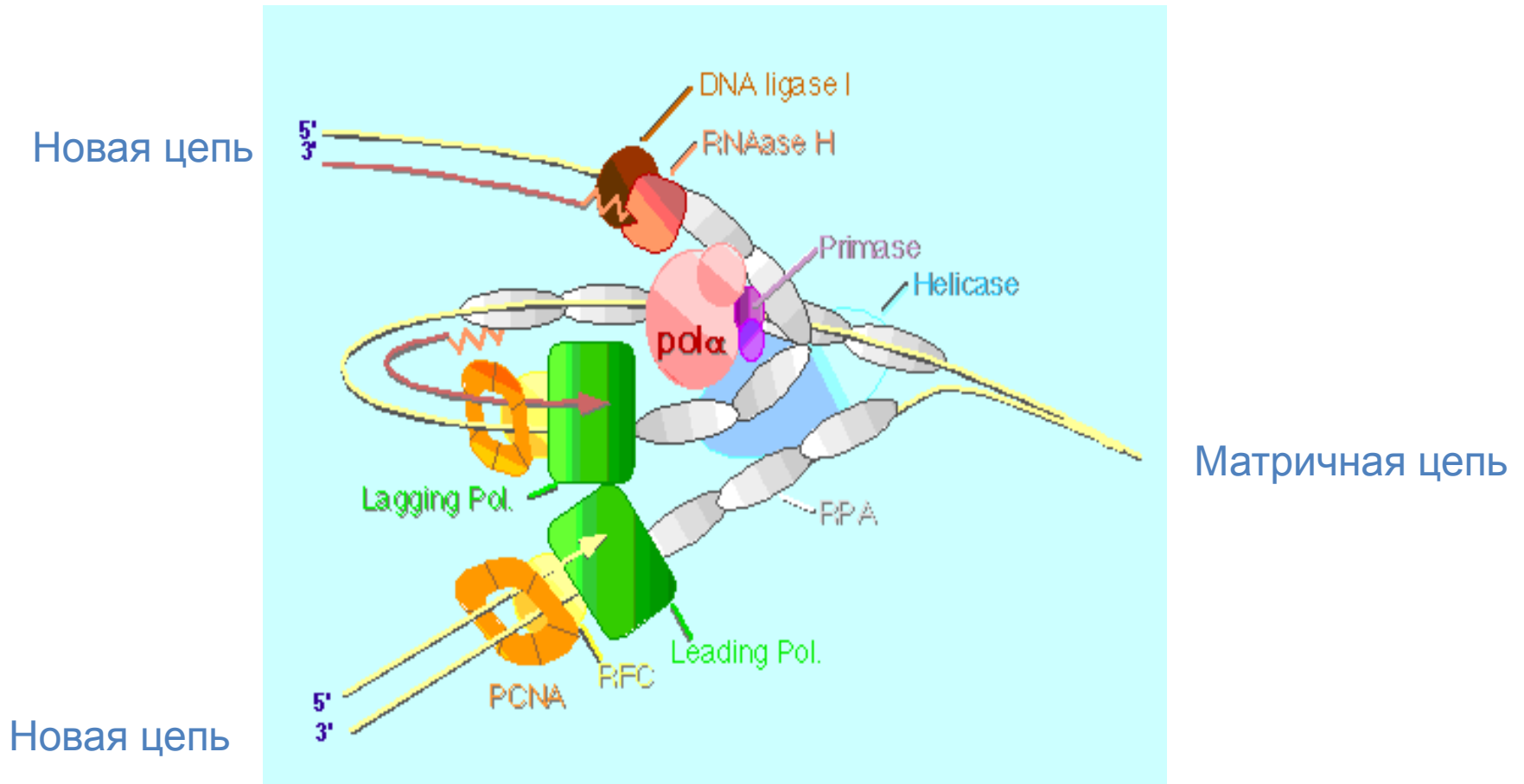
Основные достоинства ПЦР

- Высокая чувствительность
- Высокая специфичность
- Проста в исполнении
- Нет необходимости в выделении или сложной очистке матричной ДНК
- Возможность работы с практически любым биологическим материалом

Значение для современной науки и медицины

- Решение самых различных научных задач
- Генотипирование организмов
- Диагностика инфекционных заболеваний
- Диагностика генетических заболеваний и генетической предрасположенности
- Установление родства, идентификация личности
- Анализ древних останков, криминалистика
- Детекция ГМО

Репликация ДНК in vivo

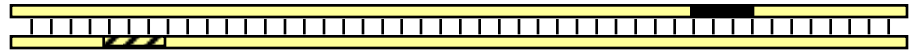


Стадии ПЦР

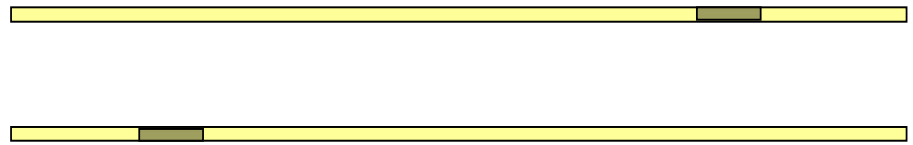
- Денатурация (94°C)
 - Обеспечивает разделение нитей ДНК
- Гибридизация (отжиг) праймеров на матрице (45-65°C)
 - Формирует структуры узнаваемые ДНК-полимеразой
- Синтез (удлинение) цепи (72°C)
 - Происходит синтез комплементарных цепей и удваивает число молекул ДНК мишени

Схема ПЦР

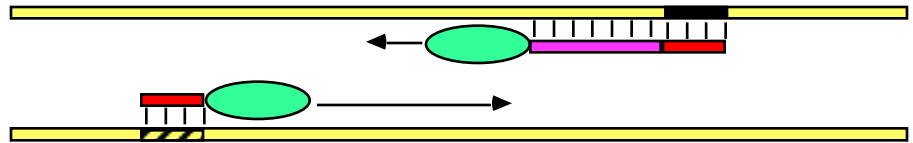
1 копия
(матрица)



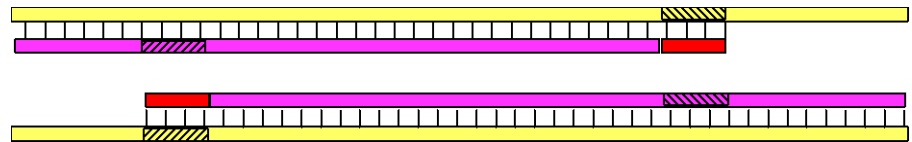
Денатурация

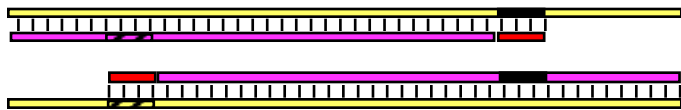


Отжиг праймеров
Синтез

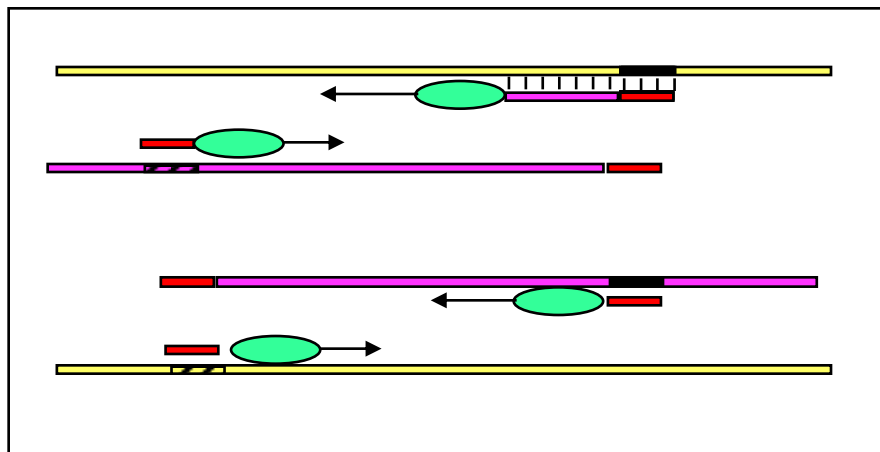


2 копии

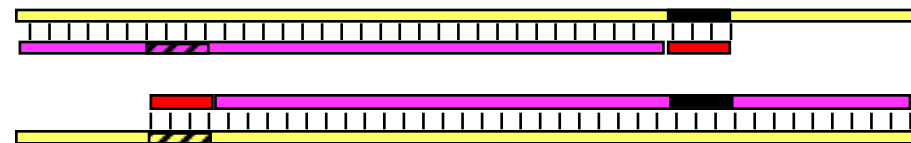




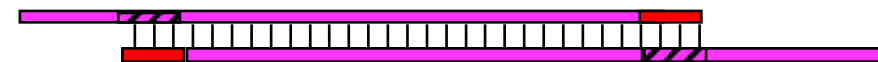
Продукты после 1-го цикла реакции



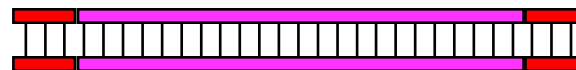
Денатурация
Отжиг
Синтез



Продукты после 2-го цикла
реакции



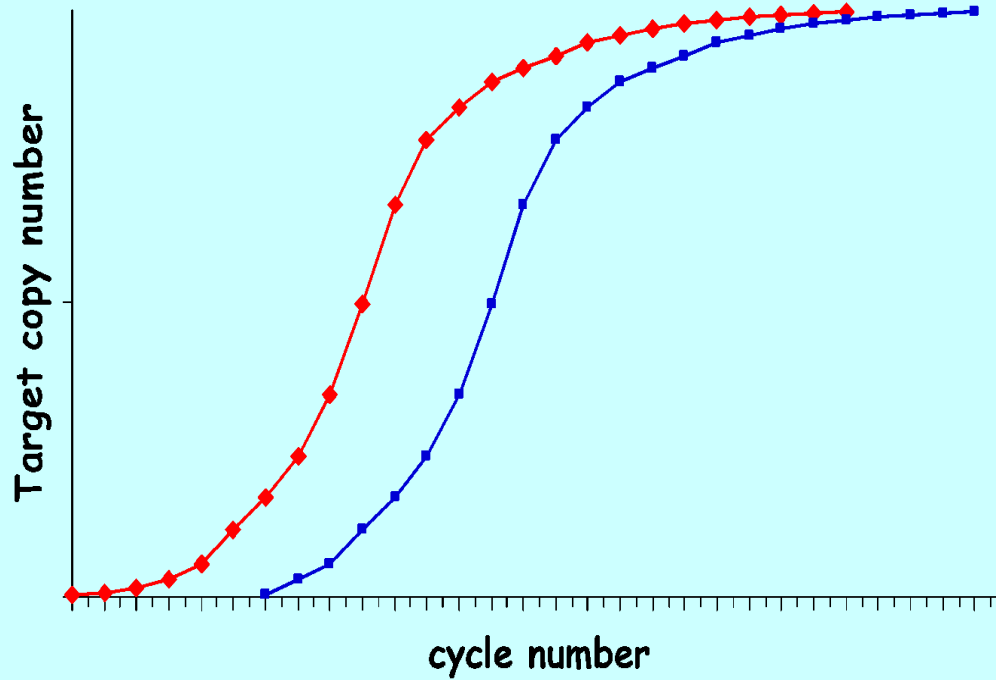
Продукт ПЦР



Основные принципы ПЦР

- Амплификация фрагмента происходит между двумя праймерами
- Амплификацию проводят в течение 30-40 циклов
- Каждый цикл состоит из смены температурных режимов
- В реакции используют термостабильные ДНК-полимеразы
- За 30 циклов происходит умножение амплифицируемого фрагмента ДНК в 1 000 000 000 раз
- Кинетика ПЦР характеризуется выходом на «плато»

PCR Amplification Curve



Основные причины выхода на «плато»

- истощение субстратов (дНТФ и праймеров)
- падение активности реактантов (дНТФ и фермента)
- накопление ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы
- конкуренция за реактанты неспецифическими продуктами или праймер-димерами
- концентрация специфического продукта и неполная денатурация при высокой концентрации продуктов амплификации.

Компоненты реакции

- Буфер (Tris-HCl, pH = 8,0-8,8; KCl)
- MgCl₂ (1-3 mM)
- Праймеры (0.4 мкМ каждого)
- dNTP (40-200 мкМ каждого)
- ДНК-полимераза (1 ед)
- Матрица (1 до 1000 нг)

Ферменты

<i>Некоторые характеристики ДНК-полимераз</i>				
Полимеразы	Время полужизни при 95С (min)	Экзонуклеазная активность 5'-3' (+/-)	Экзонуклеазная активность 3'-5' (+/-)	Достройка 3'-концов
Taq	40	+	-	A-он
Tth	20	+	-	A-он
Pfu	120	-	+	blunt ends
Vent	400	-	+	blunt ends
Deep Vent	1300	-	+	blunt ends
UITma	50	-	+	blunt ends
Pwo	120 при 100С	-	+	blunt ends

Праймеры

- Длина праймеров 18-30 нуклеотидов
- GC-состав 45-55%, близок к GC-составу матрицы
- Разница в температурах отжига не более 5°C

- Не должны флуктуировать на 3-конце



- Не дублируются на 3-конце



Оптимизация ПЦР

- Температурный профиль реакции
- Временной профиль реакции
- Состав реакционной смеси

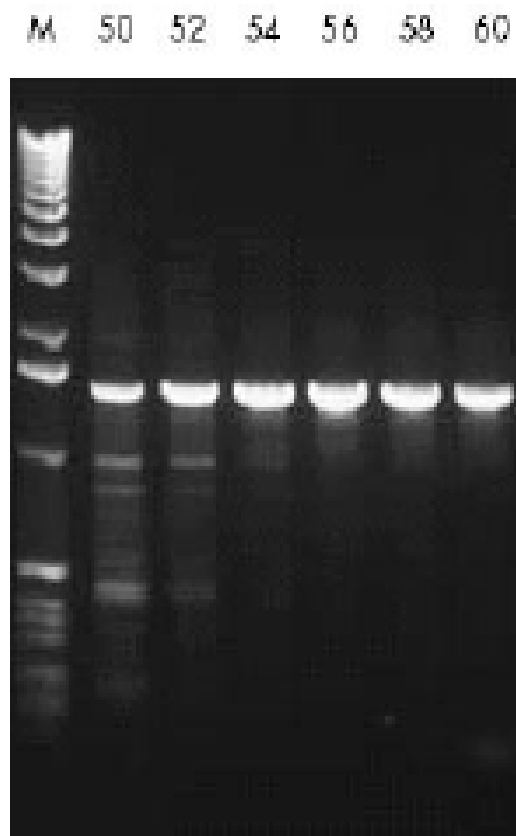
конц. ионов магния

конц. праймеров

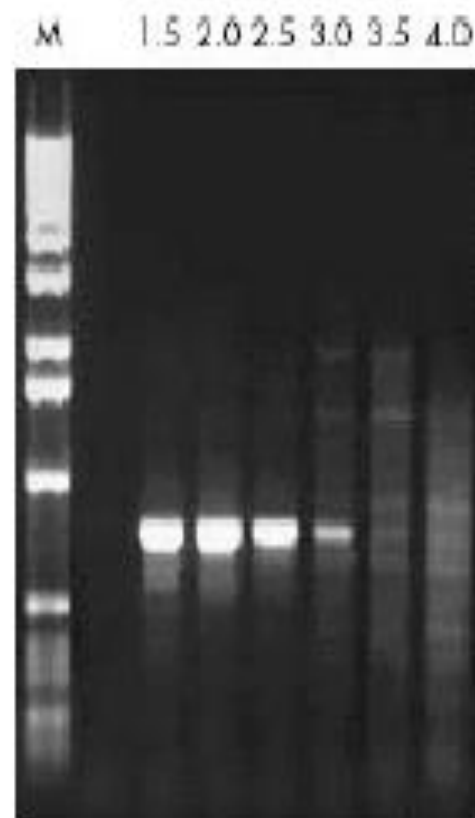
конц. полимеразы

добавки (глицерин, ДМСО, формамид, БСА и др.)

Подбор температуры отжига



Подбор концентрации ионов магния

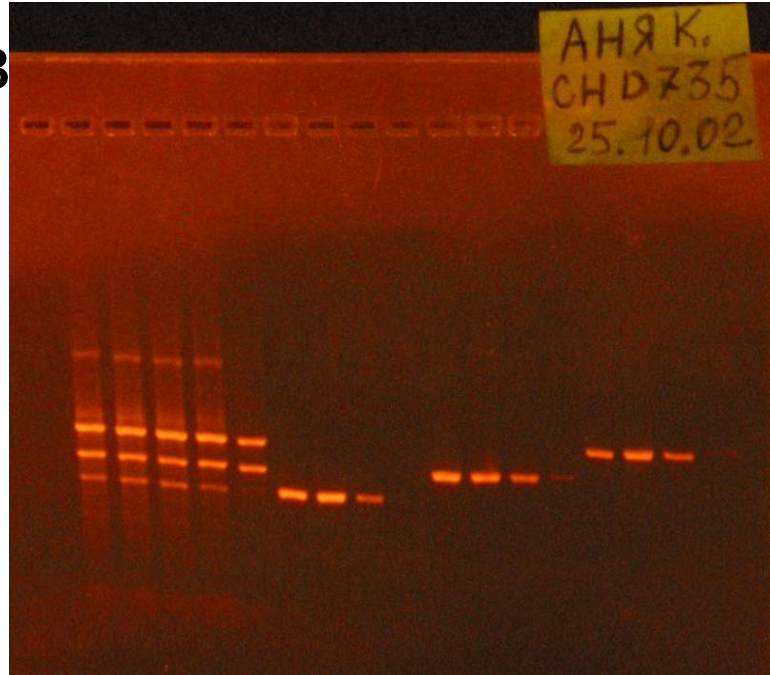


10 причин, по которым ПЦР может не идти

- Плохой дизайн праймеров
- Неверная концентрация праймеров
- Слишком много dNTP или деградированные dNTP
- Не перемешанный раствор $MgCl_2$
- Неверная концентрация $MgCl_2$
- Наличие ингибиторов
- Плохое качество минерального масла
- Слишком много фермента
- Ошибки в программе амплификатора
- Недостаток или избыток матрицы

Оценка результатов реакции

- Электрофорез



- Гибридизация с зондами

Разновидности ПЦР

- ПЦР с «горячим» стартом (hot-start PCR)
- Touchdown
- Мультиплексная
- Гнездовая (nested)
- In situ PCR
- Reverse transcriptase (RT-PCR)
- Real-time PCR (RT-PCR)

Другие методы амплификации

- Лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR)
- NASBA (nucleic acid sequence-based amplification)

Организация технологического процесса

- Контаминация
- Организация лаборатории (рабочих мест) по принципу изолированных рабочих зон
- Раздельное использование оборудования и принадлежностей при работе с чистыми растворами и растворами, содержащими ДНК или продукты ПЦР
- Обязательная постановка в каждом эксперименте отрицательного и положительного контролей
- Стоковые растворы разделять на аликвоты и периодически заменять

Real-time PCR

Интеркалирующие красители

- SYBR green

Гибридизационные зонды

- Taqman
- Molecular beacons
- FRET probes

