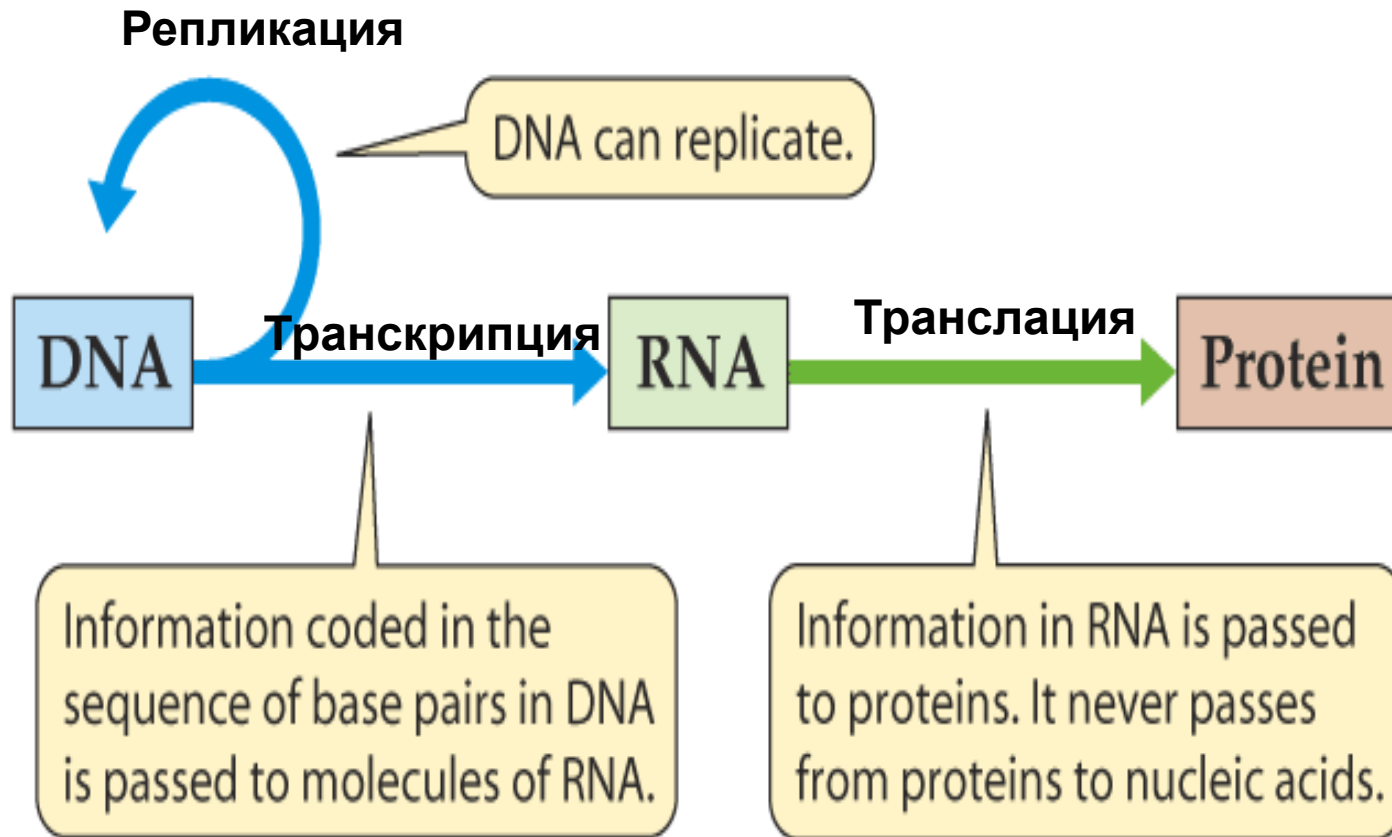


Биосинтез на ДНК - репликация

Доц. Милена Атанасова, д.б.
Ръководител сектор “Биология”
МУ-Плевен

ДНК, РНК, посока на информацията

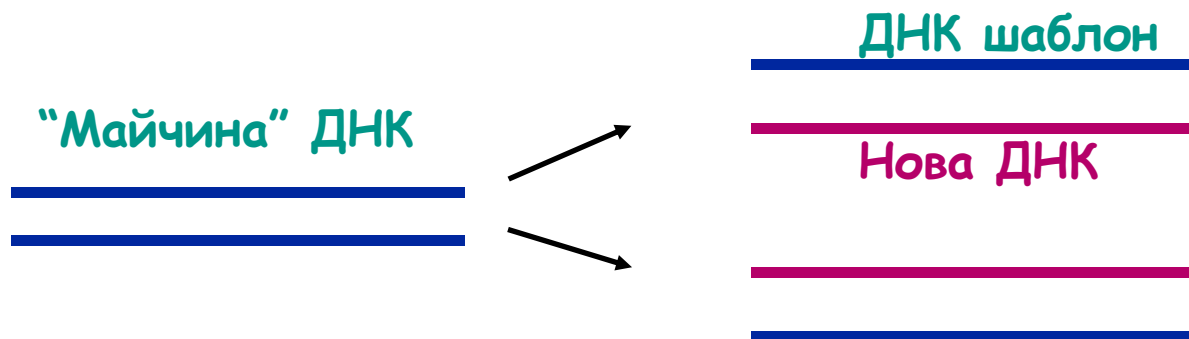


Репликация на ДНК: резюме

- Извършва се през **S фазата** на клетъчния цикъл
- **Полуконсервативен** процес, всяка ДНК верига служи като шаблон за синтез на комплементарна верига
- Процесът се осъществява на **репликони**, състоящи се от **едно начало** на репликация и две отдалечаващи се репликационни вилки (**двупосочна**)
- Всяка репликационна вилка съдържа комплекс ензими, един от които е **ДНК-полимераза**
 - Други ензими са праймаза, хеликаза, топоизомеразите

Репликацията е полуконсервативен процес

- Идеята е на **Watson & Crick**
- Двете вериги на “майчината” молекула се разделят и всяка служи за шаблон за нова комплементарна верига.
- Новата ДНК се състои от една **стара** (“майчина”) и една **нова** (“дъщерна”) верига



- Около 30 белтъка участват в репликацията на хромозомите на *E coli*.
- Този процес е сложен при еукариотните организми.

Protein	Function
DNA polymerases	Deoxynucleotide polymerization
Helicases	Processive unwinding of DNA
Topoisomerases	Relieve torsional strain that results from helicase-induced unwinding
DNA primase	Initiates synthesis of RNA primers
Single-strand binding proteins	Prevent premature reannealing of dsDNA
DNA ligase	Seals the single strand nick between the nascent chain and Okazaki fragments on lagging strand

Репликацията на двойната верига на ДНК е комплексен процес. Разделя се на 5 условни етапа :

1. Водородните връзки се разрушават и двете вериги на ДНК се разделят. Стабилната двойно-верижна спирала на ДНК трябва да се отвори за да се осъществи полукорсенвативна репликация.

2. Изграждане на праймер. Необходим е свободен 3' край за присъединяване на дезоксирибонуклеотиди. Осигурява се от къс сегмент РНК, изграден от РНК-полимераза, наречена праймаза – заедно с други субединици комплекс, формално наречен **праймосома**.

3. Асемблиране на комплементарните вериги. Димерната ДНК полимераза III се свързва за репликационната вилка. Когато водещата верига се присъедини към едната субединица на димера полимераза III, изоставащата верига се присъединява към втората субединица, като образува бримка. Придвижвайки се по матричната молекула, ДНК полимераза III катализира свързването на комплементарни нуклеотиди.

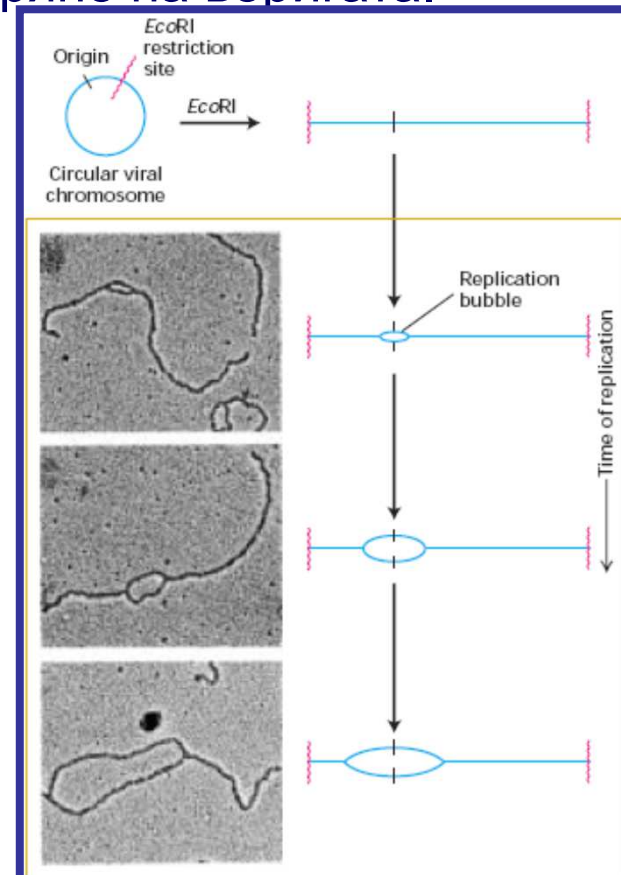
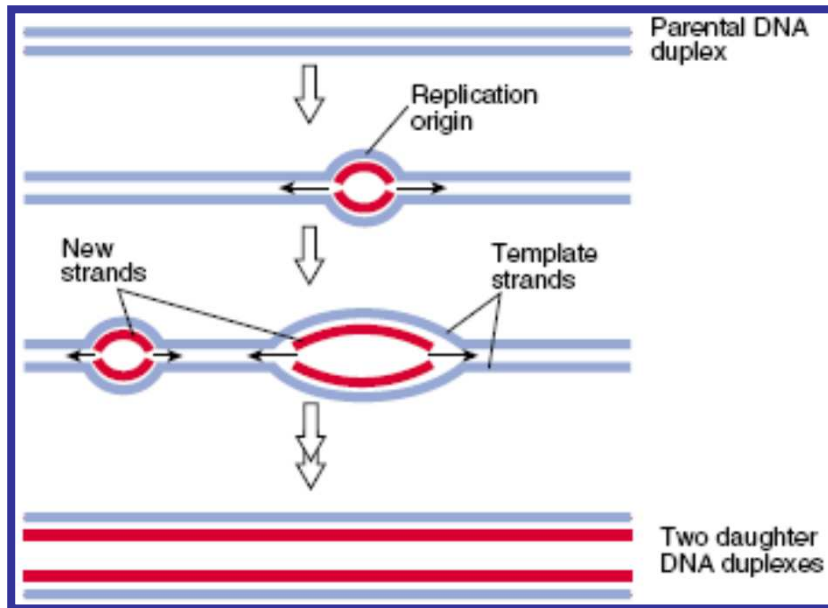
4. Премахване на праймера. Ензимът ДНК-полимераза I разгражда РНК праймера и запълва образуваната празнина, както празнините между фрагментите на Okazaki.

5. Свързване на фрагментите на Okazaki. След запълване на участъците м/у фрагментите на Okazaki, ензим ДНК-лигаза свързва фрагментите на изоставащата верига.

В еукариотните клетки **ДНК е пакетирана в нуклеозоми** в хромозомите. Всеки отделен участък на хромозомите се реплицира като отделна част, наречена **репликон**, дължината на който може да варира от 10,000 до 1 мил. нуклеотидни дв.; повечето са около 100,000 нд. Всеки репликон има свое начало и две посоки на растеж, и едновременно няколко репликация могат да се наблюдават върху една молекула ДНК по едно и също време. Репликацията при еукариотите се основава на подобни механизми и ензими както при прокариотите. Процесът подлежи на прецизен контрол, за да се осигури производството само на едно точно копие ДНК.

Инициация

За да е ефективна, ДНК репликацията трябва да е бърза и точна. Репликацията на ДНК започва от едно или повече места по дължината на ДНК молекулата в специфични последователности наречени **репликационно “начало”**. Към началото на репликацията се свързват инициаторни протеини, които дават началото на серия взаимодействия за отваряне на веригата.



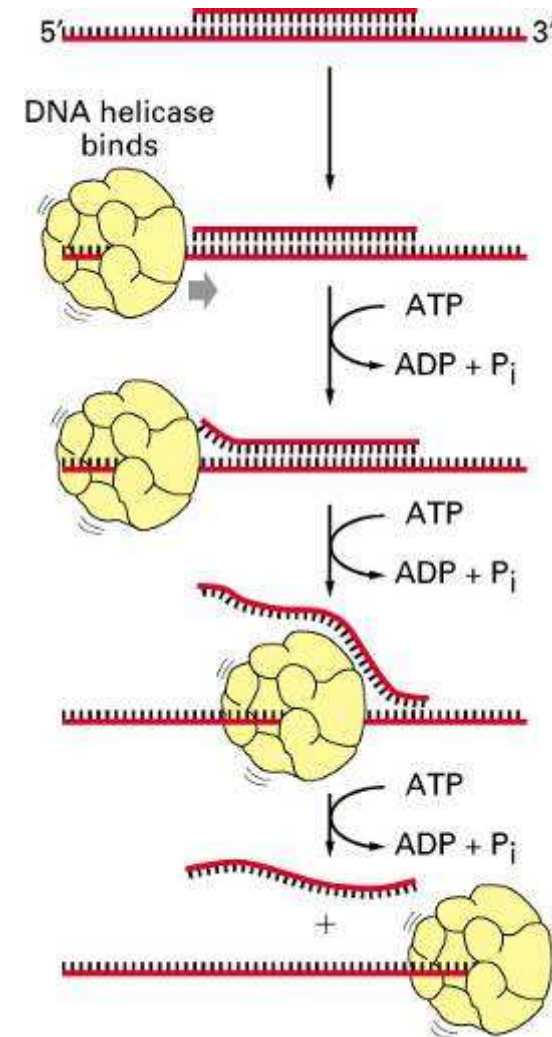
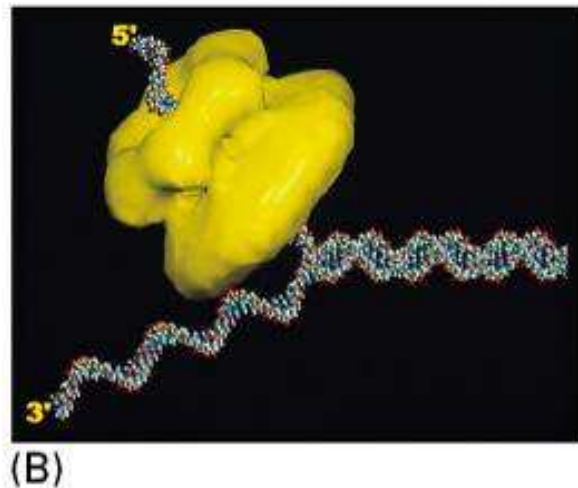
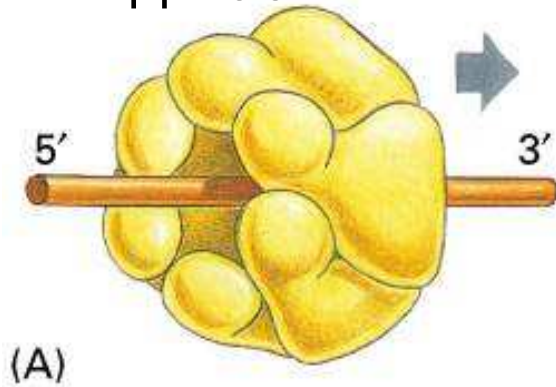
Репликационната вилка се състои от 4 компонента в следната последователност:

- (1) **ДНК-хеликаза** разрушава водородните връзки в двойната спирала на ДНК.
- (2) **Праймаза** инициира синтеза на малък РНК сегмент – **праймер**
- (3) **SSBs** белтъци, тапициращи разделените вериги на ДНК-молекулата, за да предотвратят преждевременното възстановяване на водородните връзки и възстановяването на ДНК.
- (4) **ДНК-полимераза** започва синтеза на същинската дъщерна верига

Развиване на дуплекса.

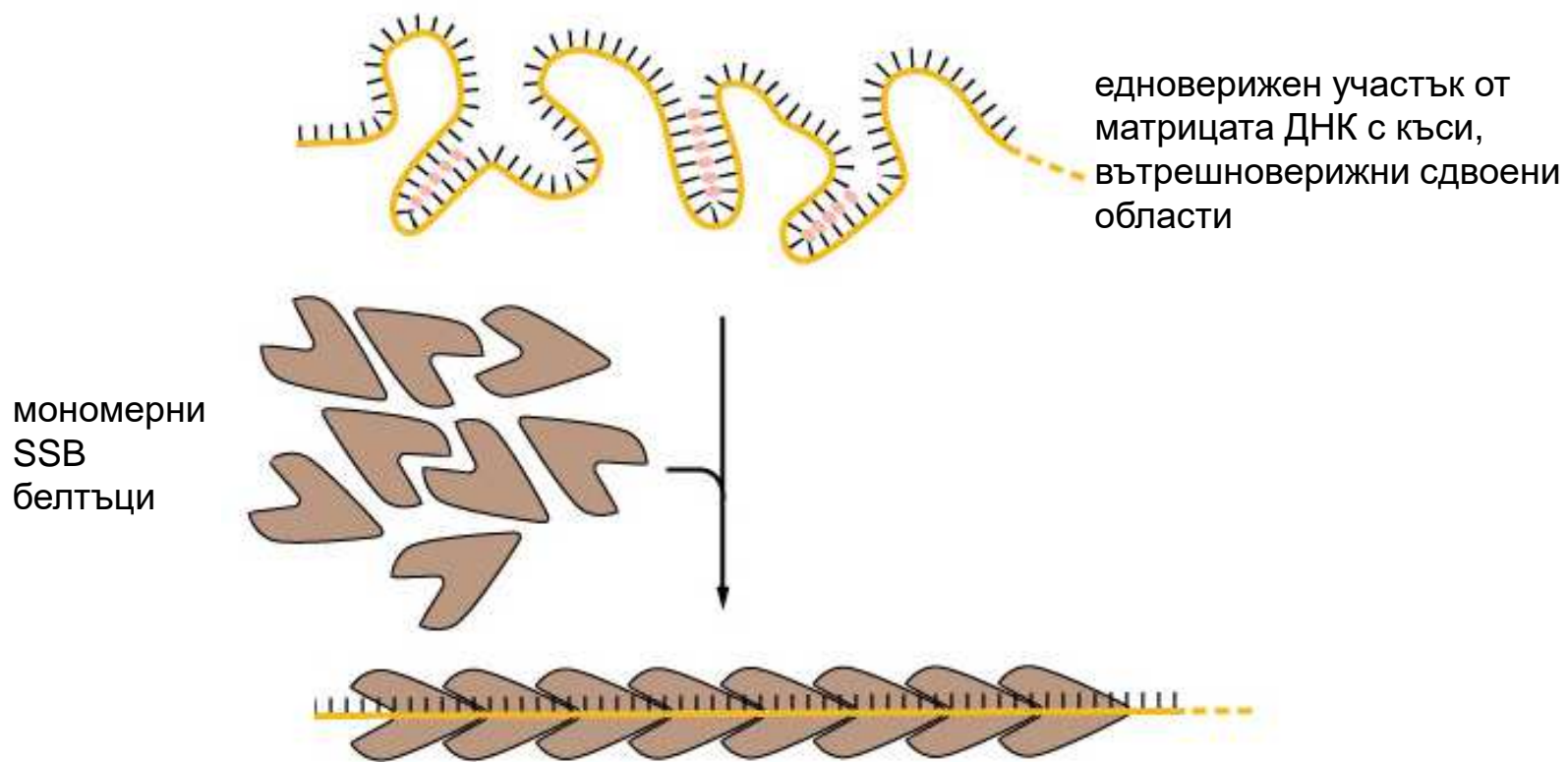
- След инициацията ензими, наречени хеликази се свързват и се придвижват по веригата, за да отворят двойната спирала – необходимо е за да се направят достъпни базите

Хеликаза – разрушава водородните и “стекинг”/интеркалационните взаимодействия за сметка на енергия от АТФ. Без ензима хеликаза това може да се постигне при нагряване до 90°C



Предотвратяване се сдвояването на едноверижните участъци на ДНК матрицата

SSB (single-stranded binding) белтъци



кооперативното свързване на SSB белтъците разпъва едноверижната ДНК

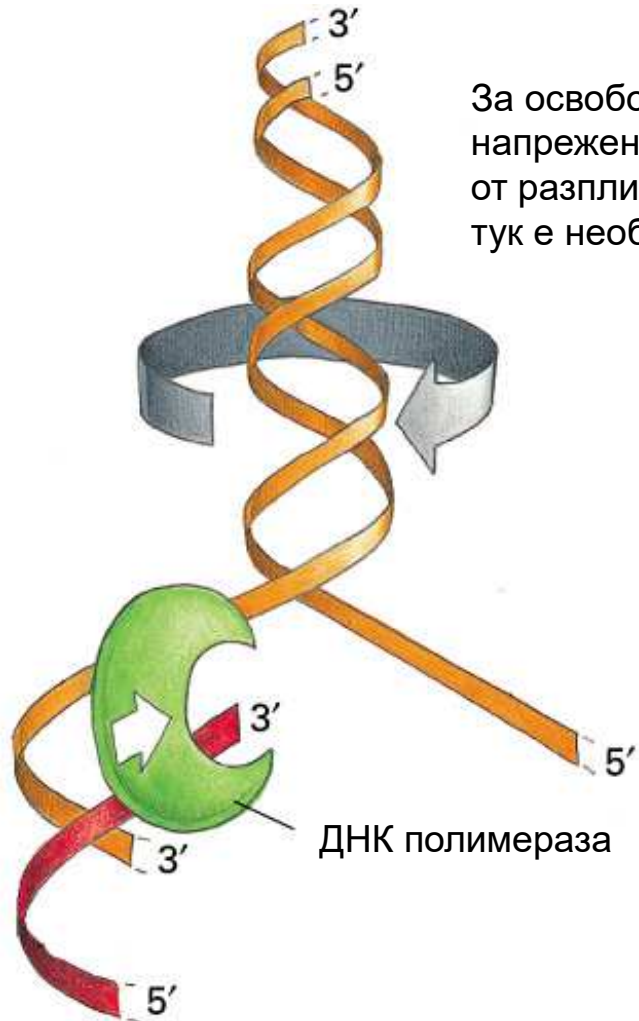
Намаляване на напрежението, породено от развиването на спиралата.

Ако скоростта на репликация е 1000 н/с, спиралата на “майчината” верига преди репликационната вилка трябва да се върти напред 100 пъти за s! За да се намали напрежението от усукването, допринасят ензими топоизомерази (гирази). Разкъсват едната верига от спиралата, развиват я около другата и после я свързват отново.



- Ензими освобождаващи напрежението в разплитащата се ДНК и предотвратяващи заплитания

ДНК топоизомераза I и II

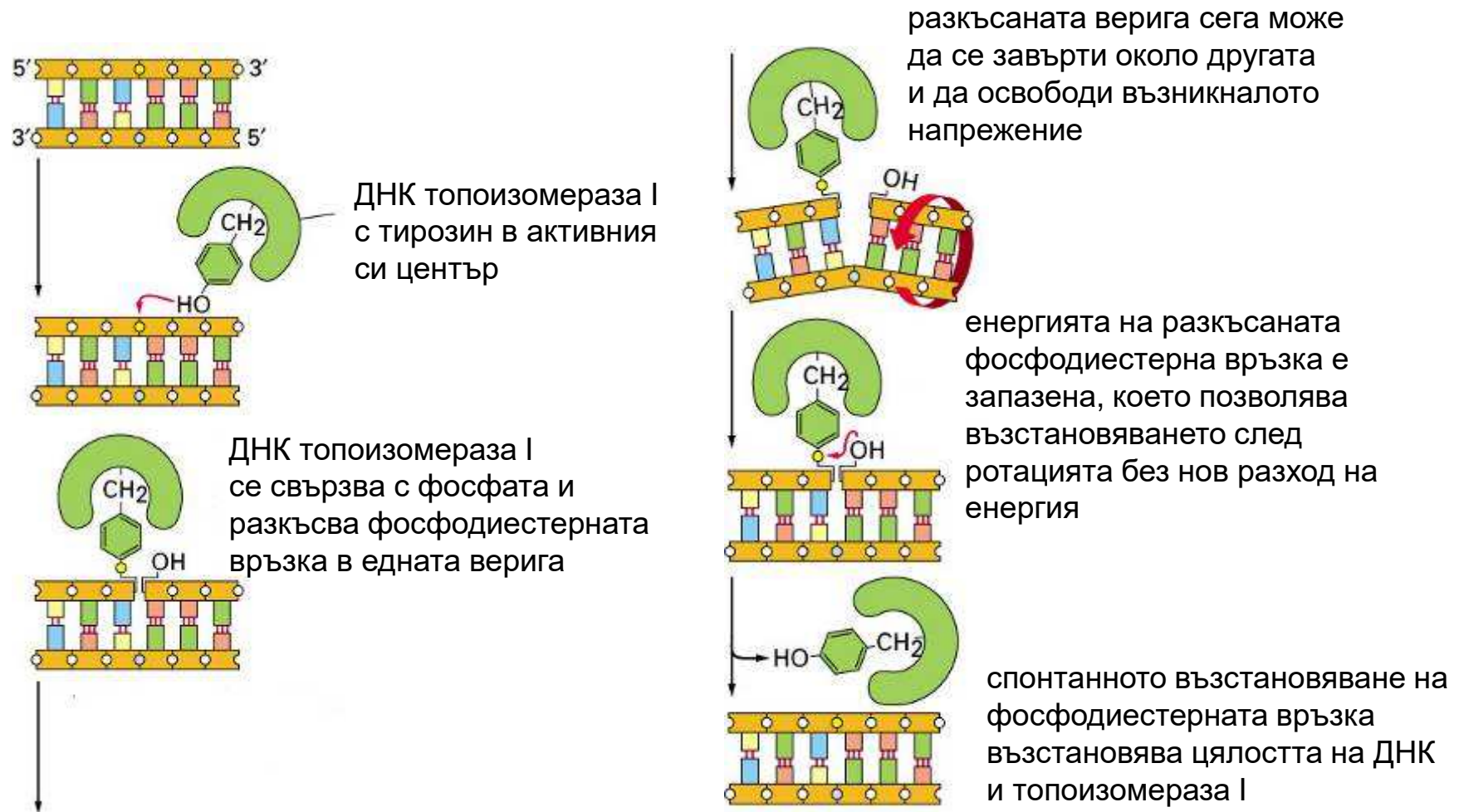


За освободаване на напрежението, породено от разплитането на спиралата тук е необходимо завъртане



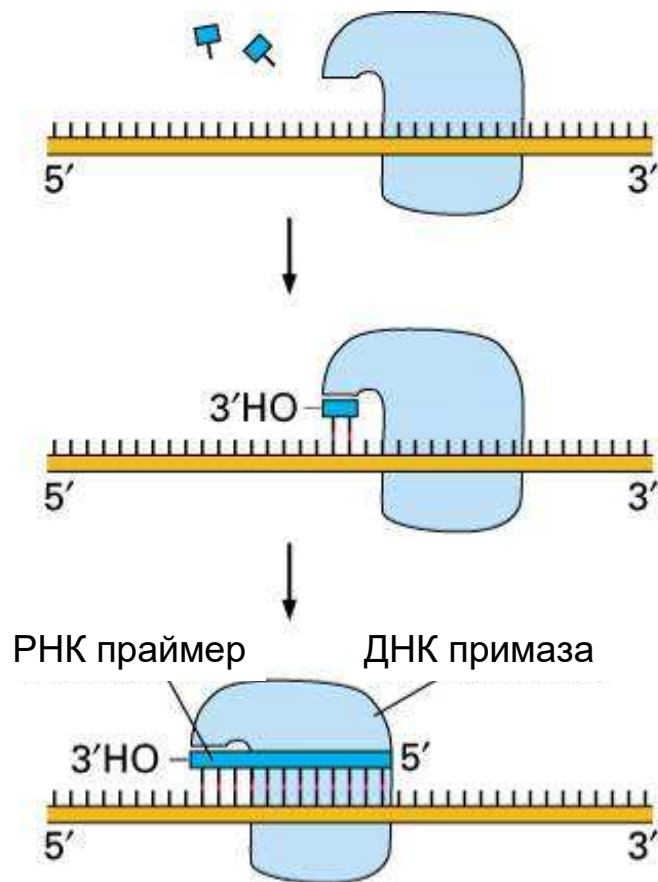
При отварянето на всеки 10 н. дв. ДНК трябва да се завърти на 180°

топоизомераза I – освобождава напрежението, възникващо при разплитането на ДНК, като разкъсва едната верига _



топоизомераза II – освобождава разплитания, като разкъсва и двете вериги на ДНК молекулата

ДНК праймаза синтезира РНК праймери необходими за синтеза на фрагментите на Оказаки

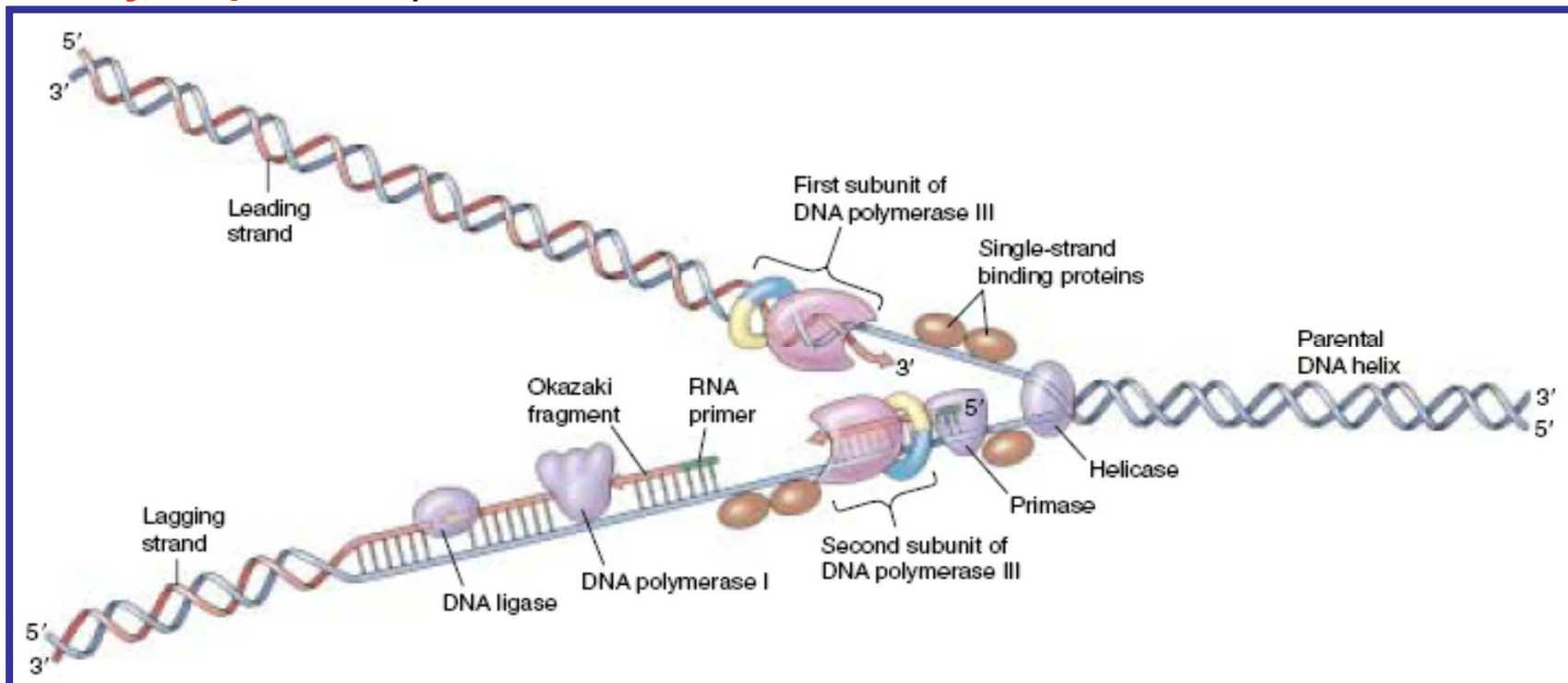


РНК праймерите имат дължина от около 10 н.дв. и се синтезират на разстояния от около 200 н.

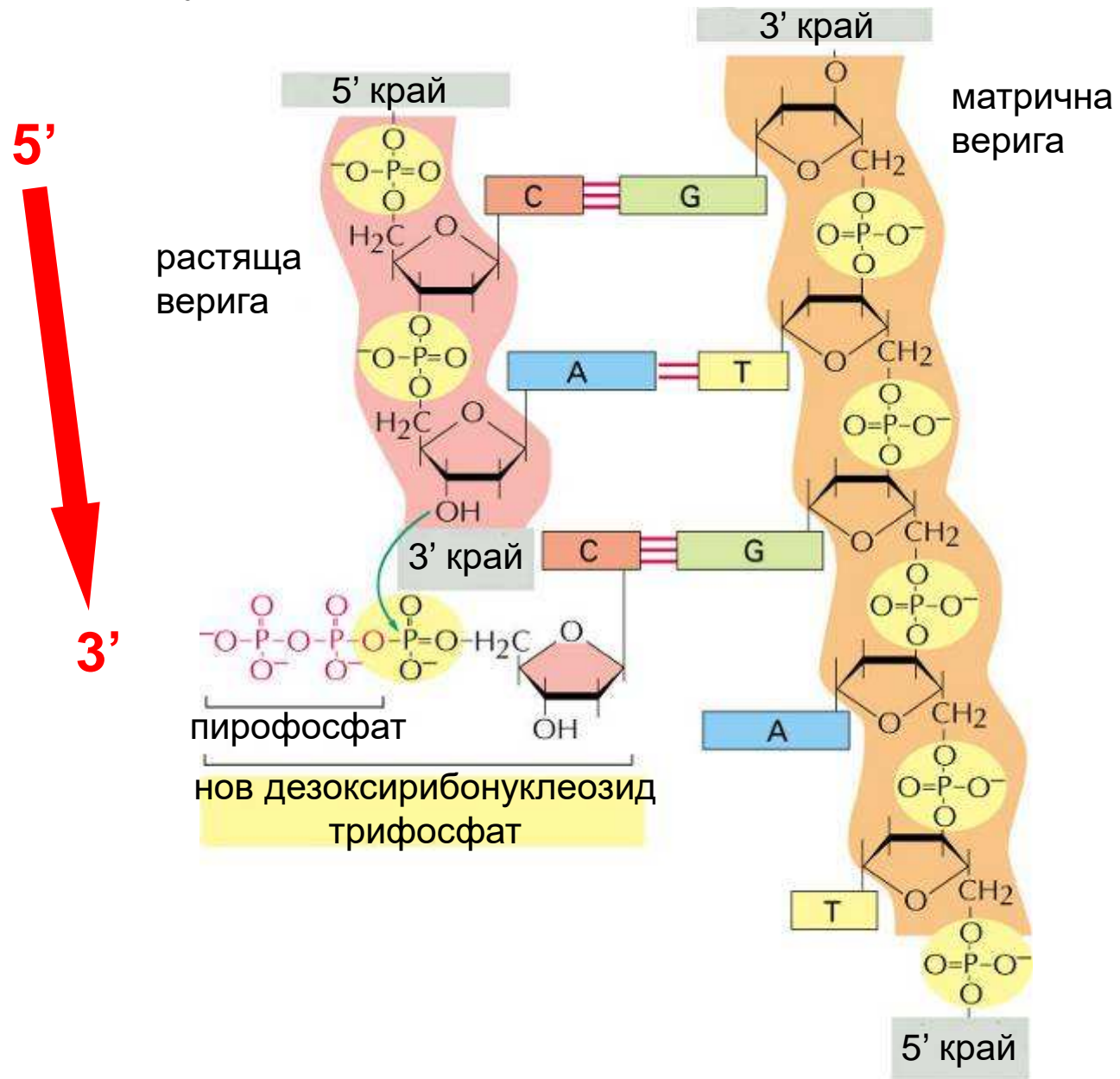


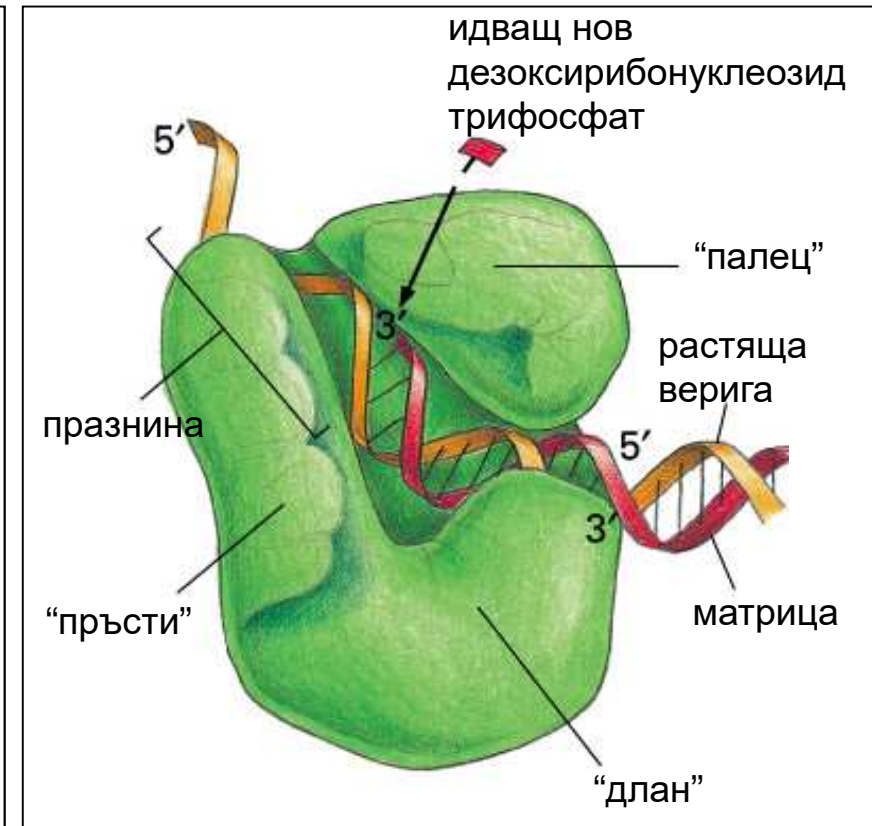
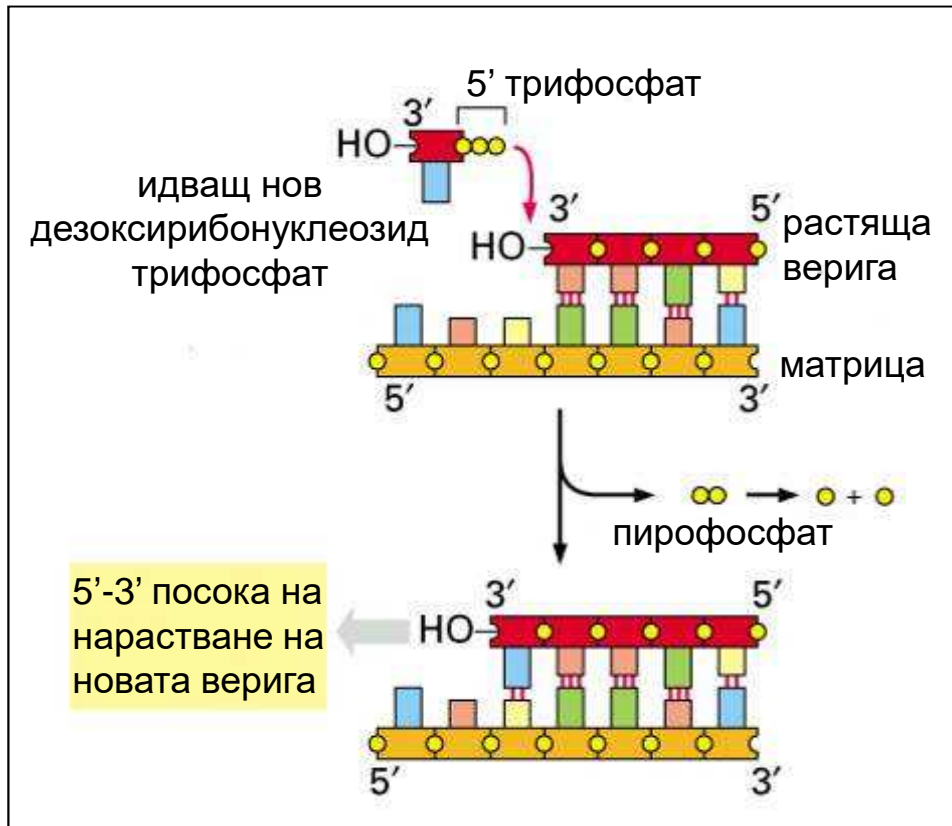
Елонгация/удължаване

- Добавянето на нови нуклеотиди към растящата верига се извършва от ензима ДНК полимераза (ДНК полимераза III при прокариоти и ДНК полимераза δ и α – при еукариоти)



- Синтез на нова молекула ДНК

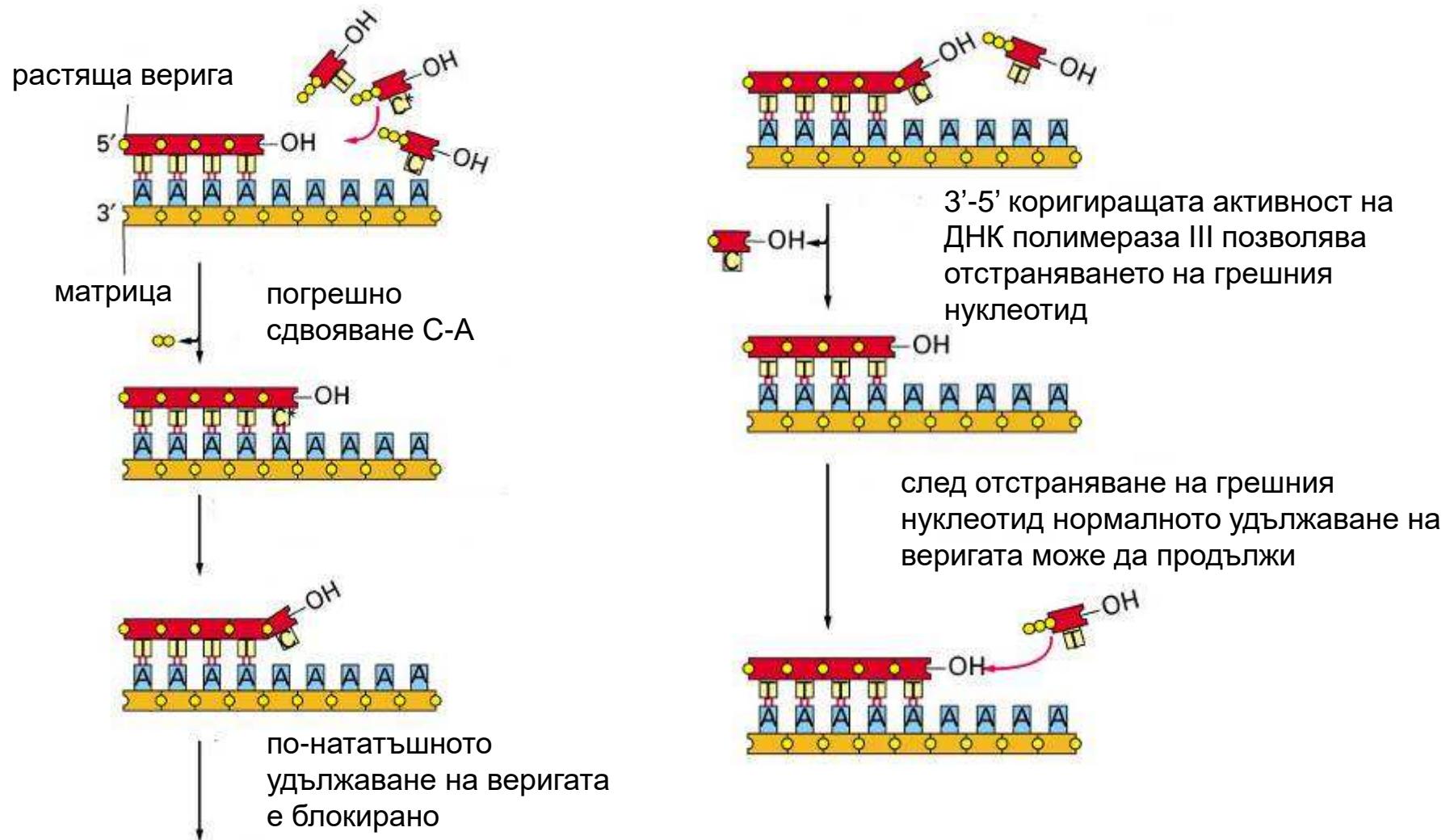




Характеристики на ДНК полимераза III:

- присъединява дезоксирибонуклеозид трифосфати към 3'ОН група
- изисква наличие на макар и къса верига нуклеинова киселина
- катализира нарастване на веригата в посока $5' \rightarrow 3'$
- има $3' \rightarrow 5'$ коригираща екзонуклеазна активност

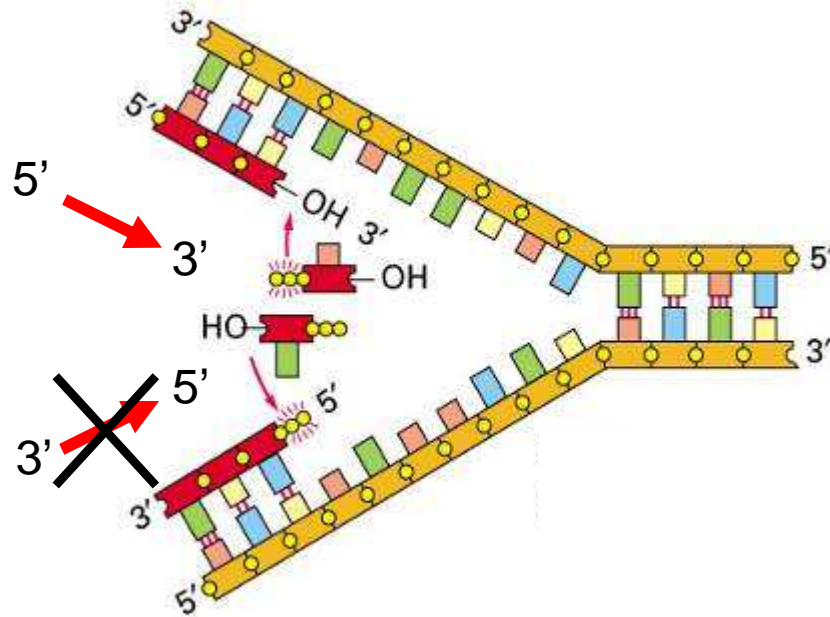
ДНК полимераза III има 3' → 5' коригираща екзонуклеазна активност



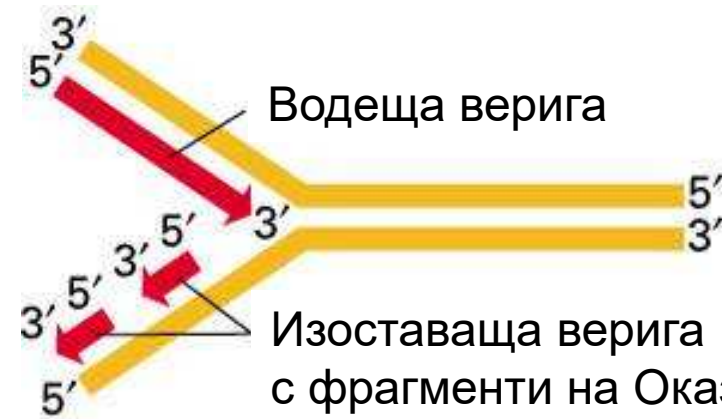
Точност – 1 грешка на 10^9 нуклеотиди

Само нарастване в посока 5' → 3' позволява корекция на възможните грешки

Особеностите на ДНК полимераза III и антипаралелността на ДНК определят разлики в нарастването на двете дъщерни вериги



Репликативна вилка



/100-200 н.дв. при еукариоти
1000-2000 н.дв.при прокариоти/

ДНК полимерази при про- и еукариоти

Е. coli/прокариоти	еукариоти	Функция
I	α	Запълване на липсващи фрагменти и изоставаща верига
II	ϵ	ДНК Проверка и поправка
	β	ДНК репарация/поправка
	γ	Митохондриална ДНК
III	δ	Водеща верига

ДНК полимераза I е първият открит и описан ензим с полимеразна активност. Той е сравнително малък по размери, но има ключова роля за разграждане на праймерите (екзонуклеазна активност), заместването им с ДНК нуклеотиди и запълване на сегментите между фрагментите на Okazaki в изоставащата верига. При еукариотните клетки съществуват ензими с подобно действие, но повече на брой.

ДНК пол II участва в проверката и репарацията на новосинетзираната ДНК.

ДНК полимерази при про- и еукариоти

ДНК пол III е по-голяма и комплексна структура. Представява димер, съставен от две почти еднакви мултикомпонетни единици. Всяка от двете единици катализира репликацията на една от двете ДНК вериги.

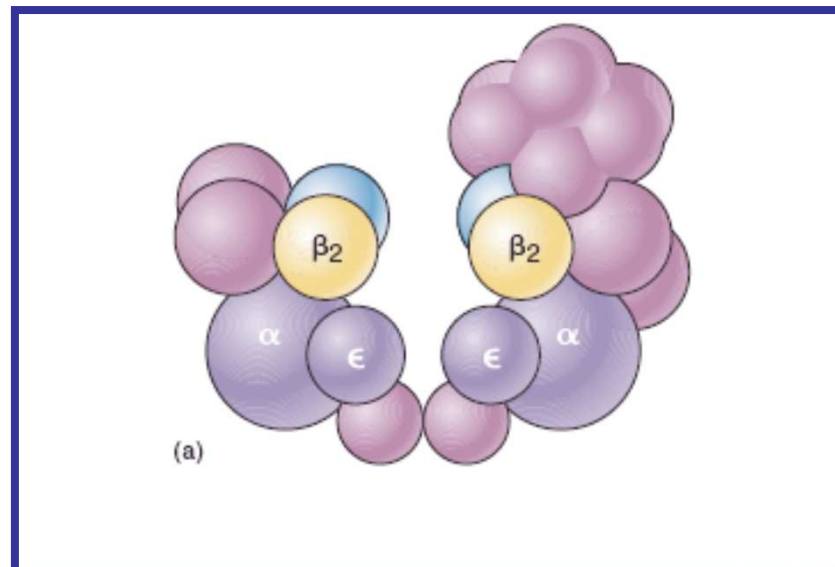
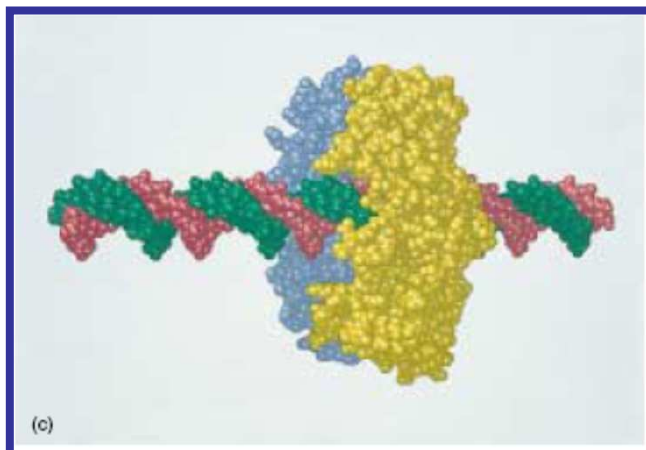
Роля някои от субединиците:

α катализира 5' to 3' добавянето на нуклеотидиди към нарастващата верига

ϵ по-малка субединица проверява в посока 3' to 5' за грешки

β_2 пръстеновиден димер – защипва ДНК пол III комплекса около двойноверижната молекула.

Скорост на ДНК пол III - 1000 n/s.



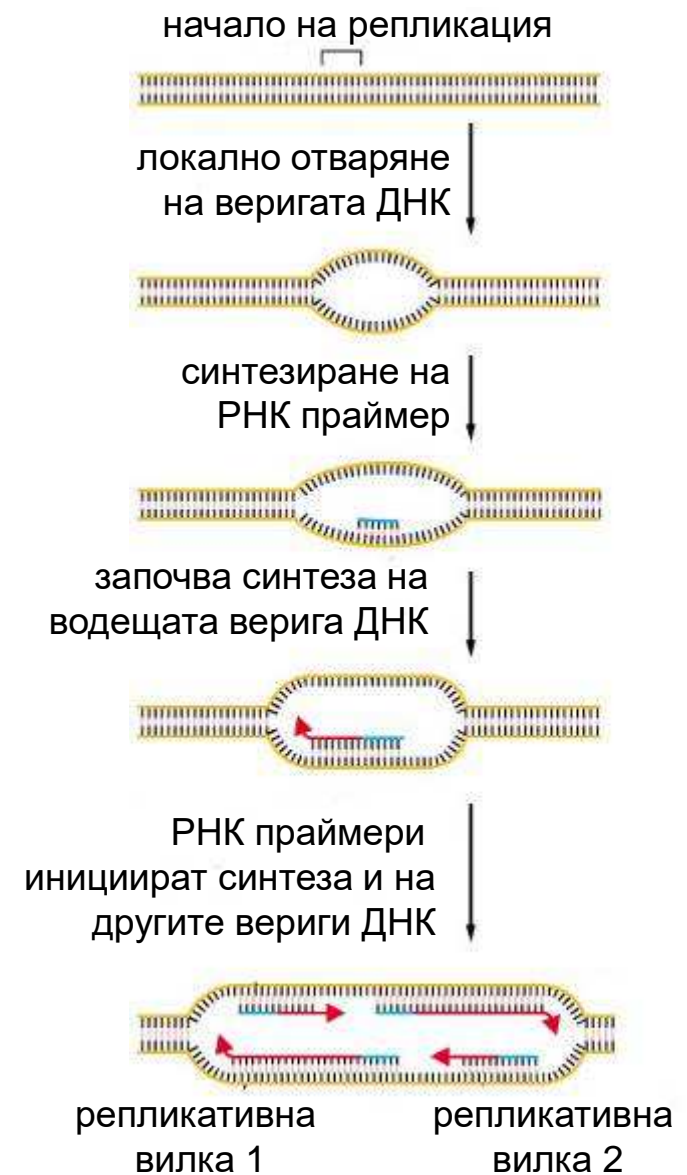
Обратна транскриптаза

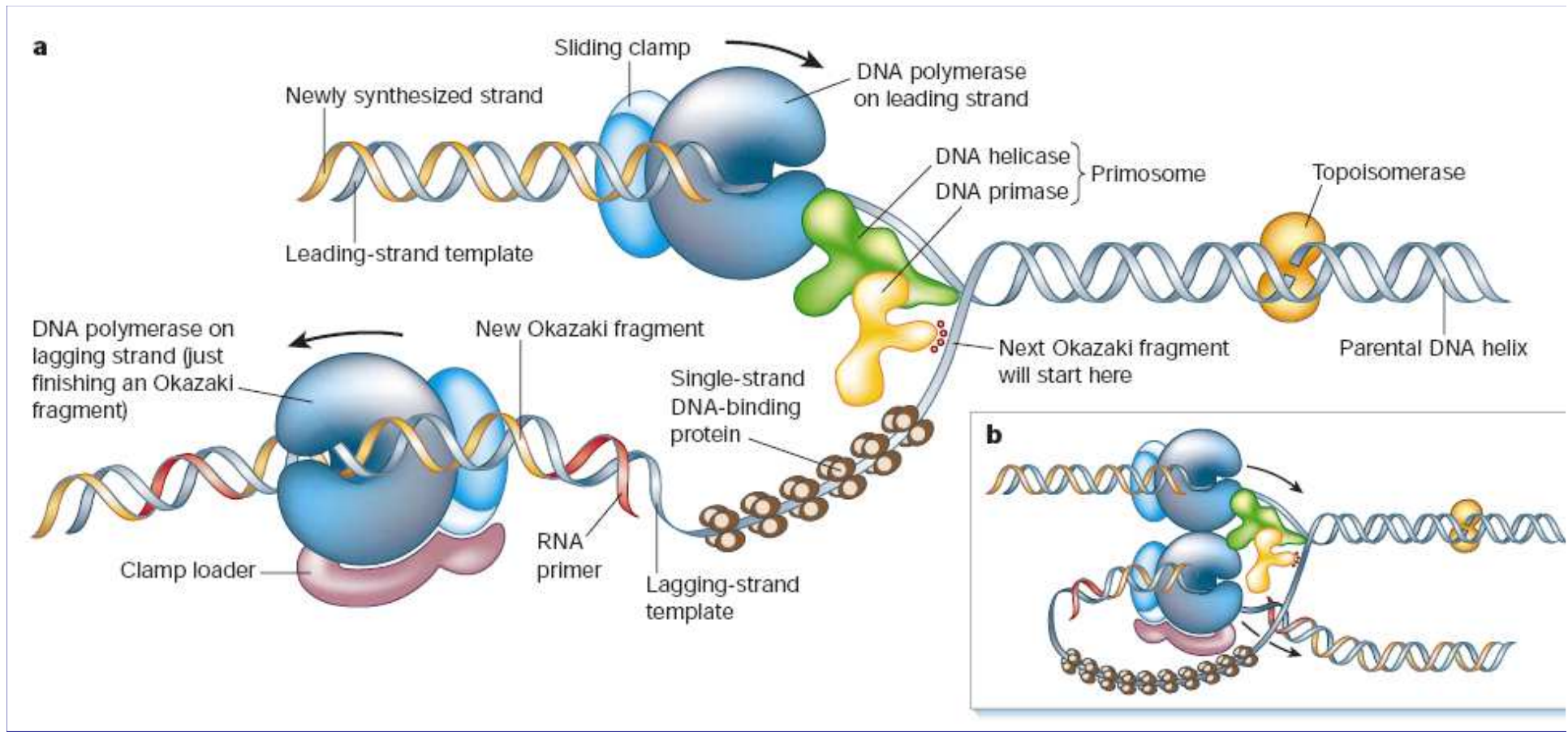
При някои вируси по животните (ретровируси) съществува специален клас ензими катализиращи синтеза на едноверижна, а след това и на двуверижна ДНК от едноверижна РНК, т.нар. **РНК-зависима ДНК полимераза**, или **“обратна транскриптаза”**. Този ензим първоначално синтезира ДНК-РНК хибрид, като използва РНК за шаблон. Специфична нуклеаза - **РНАза H**, разгражда РНК веригата, а ДНК служи за шаблон при изграждане на комплементарна ДНК верига. По този начин новоизградената ДНК има генома на вируса, но може да се “вмъкне” в генома на клетката гостоприемник и да промени цялост и дейност към синтез на и сглобяване на вирусни частици.

Скорост на репликацията

Прокариоти – една молекула ДНК (6×10^6 нд), едно начало, репликацията протича за около 30 min; **скорост** 3×10^5 нд/min.

Еукариоти – целият геном на бозайниците се реплицира за 9 h, като във всяка хромозома/молекула ДНК се наблюдават множество начала. (100 при човек). Наблюдават се “репликационни мехурчета или очи”.





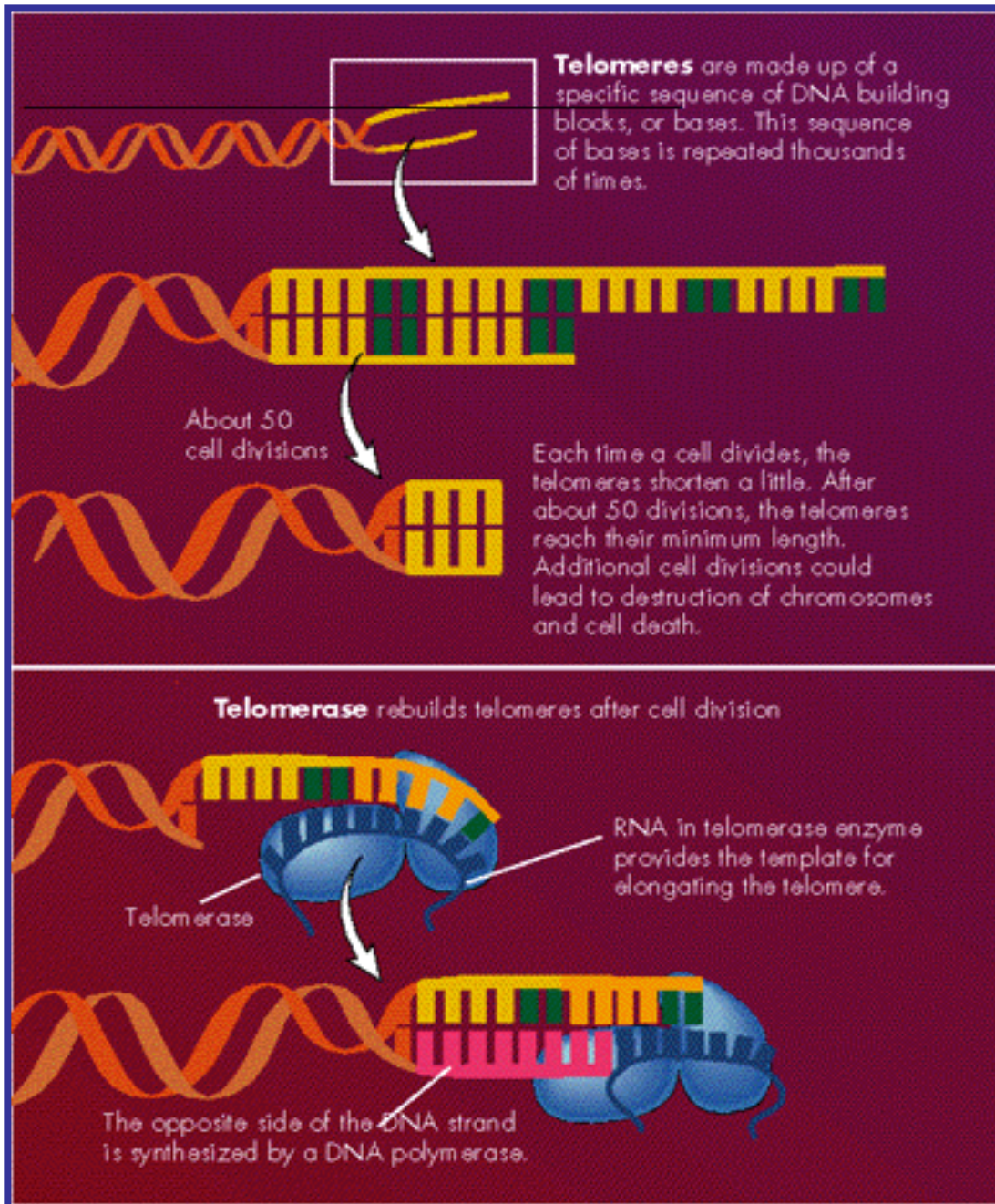
Репликативната вилка има форма на буква Y, но в действителност е пространствена структура (фиг. b). Активни са две молекули ДНК полимераза III едновременно. Едната се движи без прекъсване (във водещата верига), другата с прекъсване за изграждане на малки фрагменти (във изоставащата верига). И двата ензима са закотвени за шаблоните си посредством допълнителни протеини под формата на щипки/клатми.



Терминация

Теломерите са краищата на линейните хромозоми

- Прокариотните нуклеозоми са единични кръгови молекули и процесът репликация завършва с удвояването им.
- Еукариотните хромозоми са линейни. Водещата верига завършва процесът без да има недоизградени краища, но изоставащата ще има непълн 5' край след премахването на РНК праймера. При всяко делене, съответно репликация, теломерите се скъсяват по малко. След около 50 деления, теломерите достигат минималната си дължина и при всяко следващо делене хромозомата се уврежда/ скъсява и затова клетката умира.
- Теломерите биха могли да имат важно значение в биологията на туморните клетки и при клетъчното стареене.

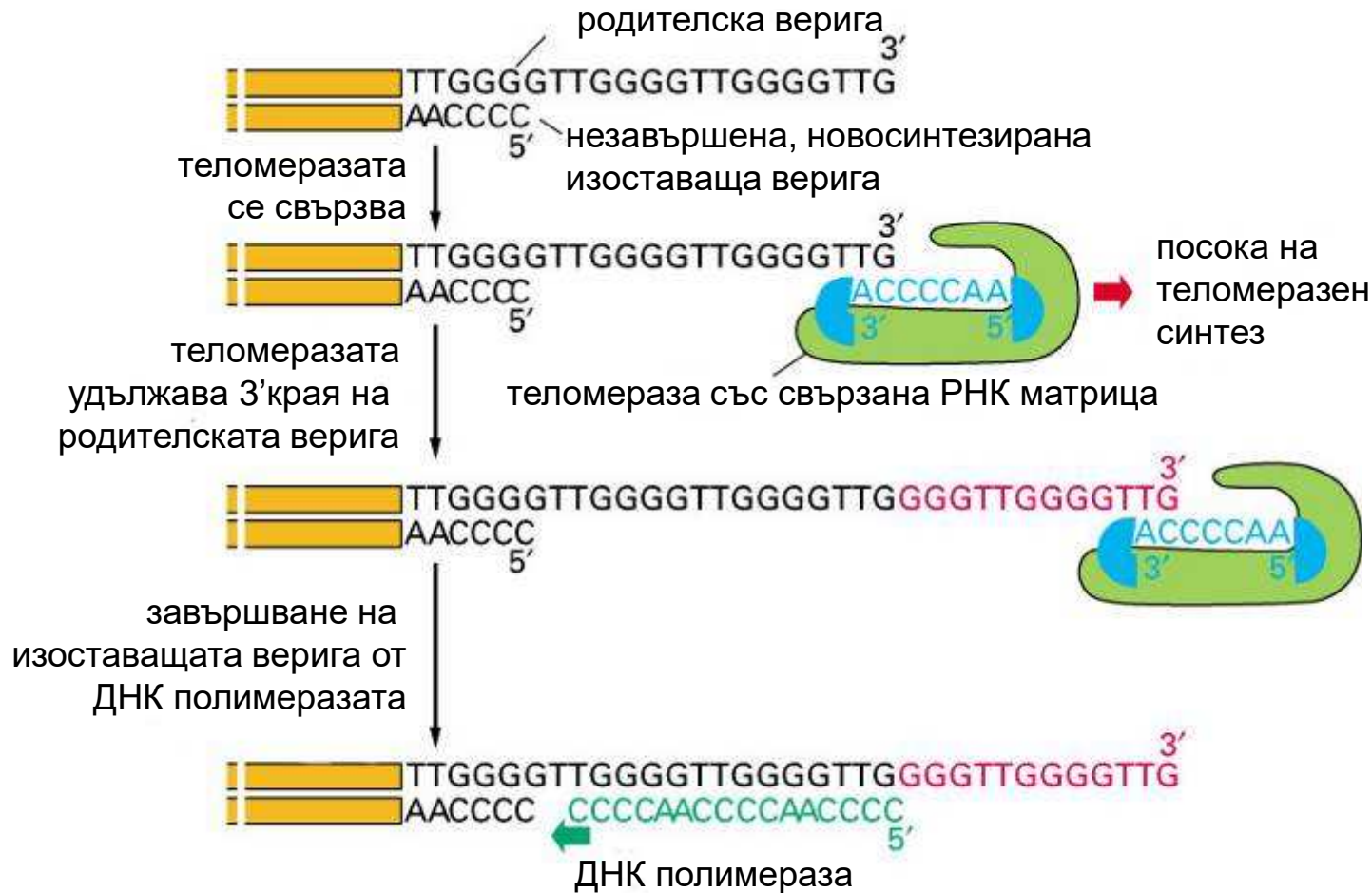


Теломерите са изградени от специфични последователности повторени хиляди пъти

При всяко делене, съответно репликация теломерите се скъсяват по малко. След около 50 деления, теломерите достигат минималната си дължина и при всяко следващо делене хромозомата се уврежда/скъсява и затова клетката умира.

Съществува ензим теломераза, изграждащ теломерите след всяко клетъчно делене. РНК е шаблон за действието на този ензим.

Теломеразата удължава теломерните участъци на майчината верига ДНК до пълното реплициране на новоизграждащата се верига



Теломери – тандемни повтори от къси G богати секвенции (при човек – 10 000 нуклеотида от повтарящи се GGGTTA секвенции)

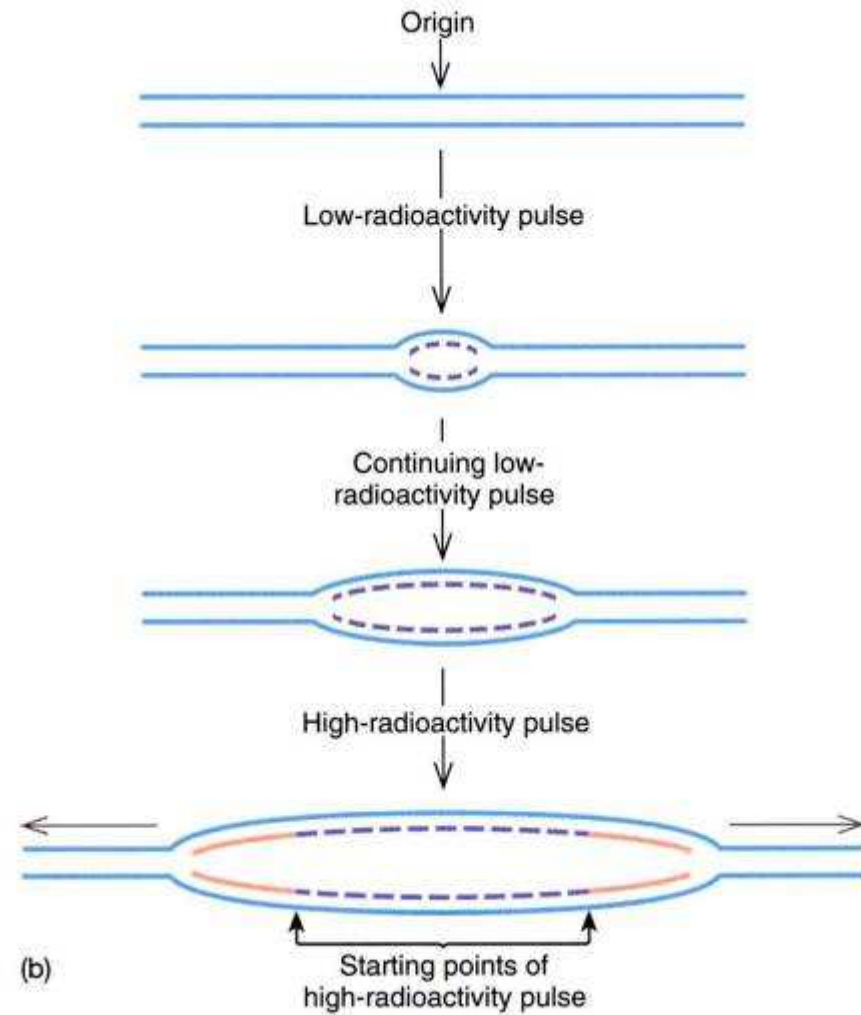
Типове репликация

- Тип “око” – линейни и кръгови ДНКи
- Тип “търкалящо се колело” (σ репликация) – малки пръстенни молекули (фаги и вируси)
- Тип θ (кръгови ДНКи)
- D-бримка – двете вериги с различни начала на репликация – пластидна и мх ДНК

Тип “око”



(a)



(b)

Figure 20.11 Experimental demonstration of bidirectional DNA replication.

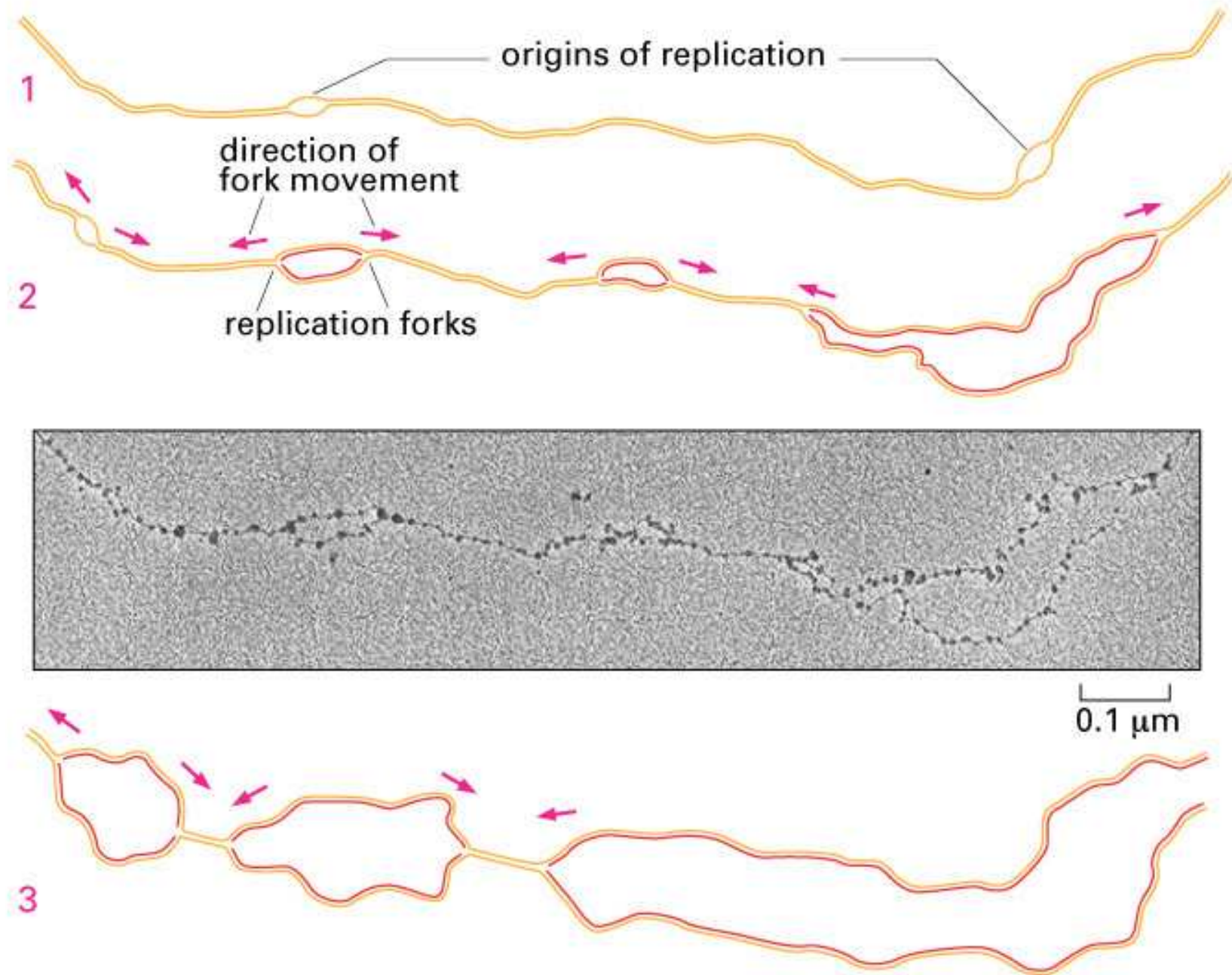


Figure 6-9 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

“Търкалящо се колело/кръг”

- Тип “търкалящо се колело” (σ репликация) – малки пръстенни двуверижни молекули (фаги и вируси)
- Ендонуклеаза разкъсва една от веригите
- ДНК-пол III веднага започва репликация към 3'-края и нарастването избутва 5'-края извън кръга
- От 3' към 5' – водеща, излизаният линеен 5' на разкъсаната майчина служи за матрица на изоставащата с фрагменти на Оказаки

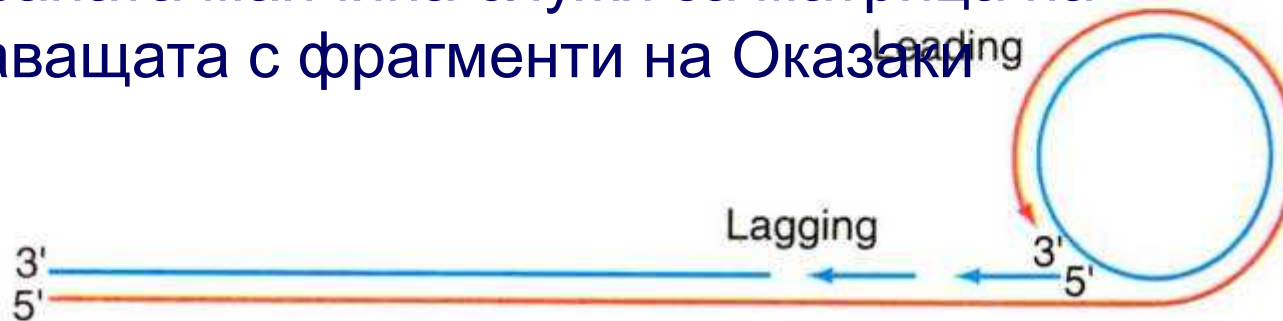
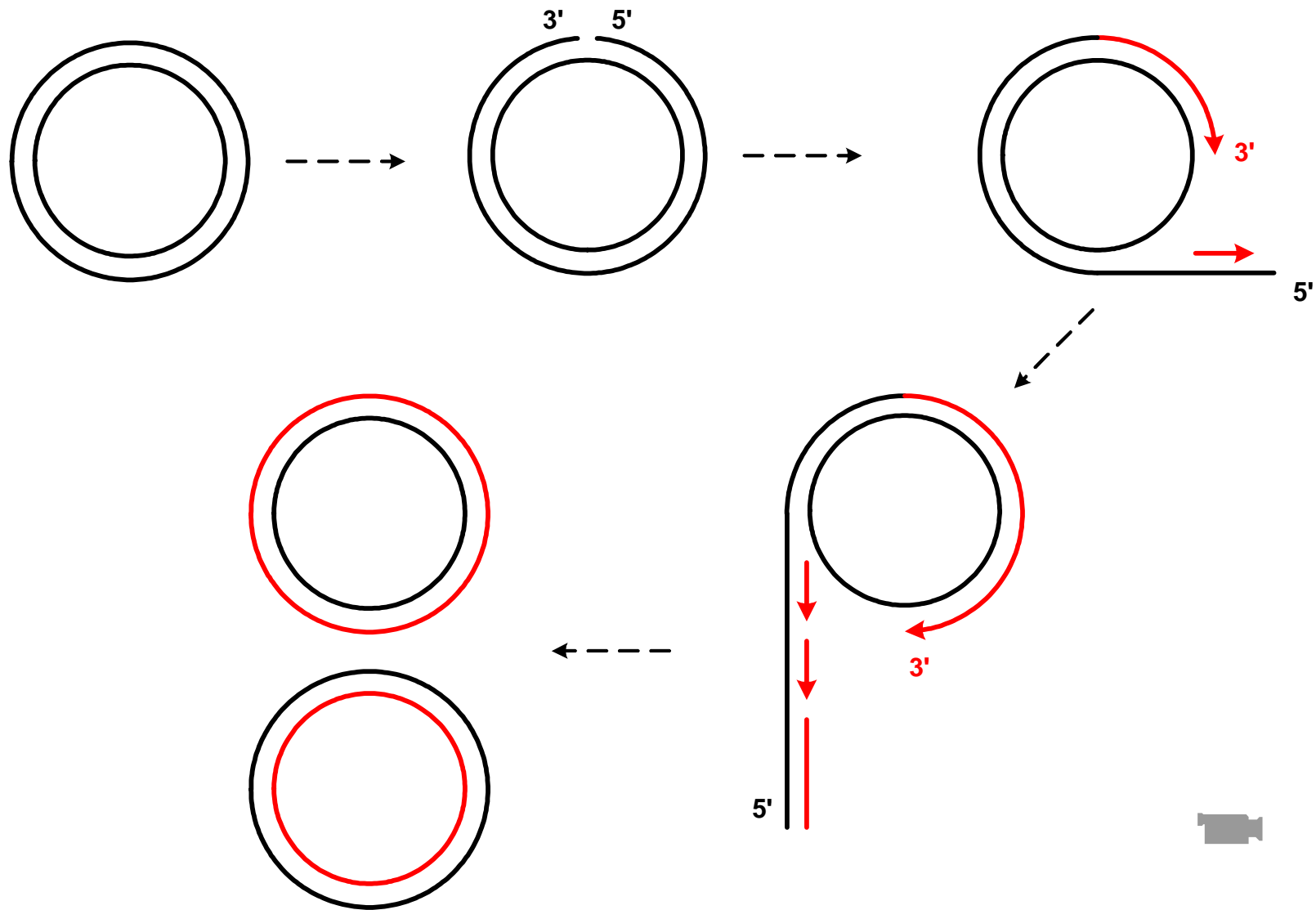
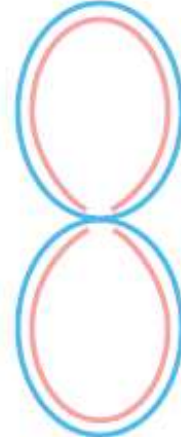
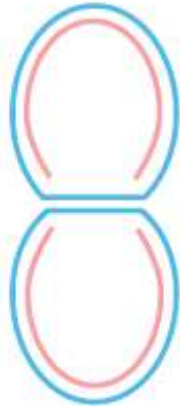
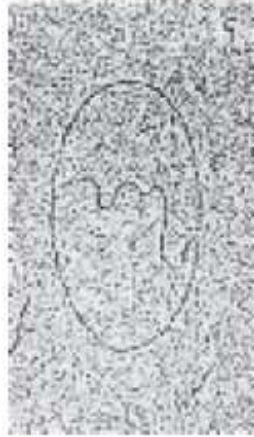


Figure 20.15 Rolling circle model for phage λ DNA replication.

“Търкалящо се колело/кръг”



Репликация тип θ (тита)



- Характерна главно при бактерии
- Репликацията започва от начало “ori” – само от едно място
- Двете вериги се разделят без да се скъсват
- Репликацията се извършва в две посоки, а вилката наподобява буквата θ .
- Ензим топоизомераза I намалява напрежението от суперспирализацията

Тип θ .

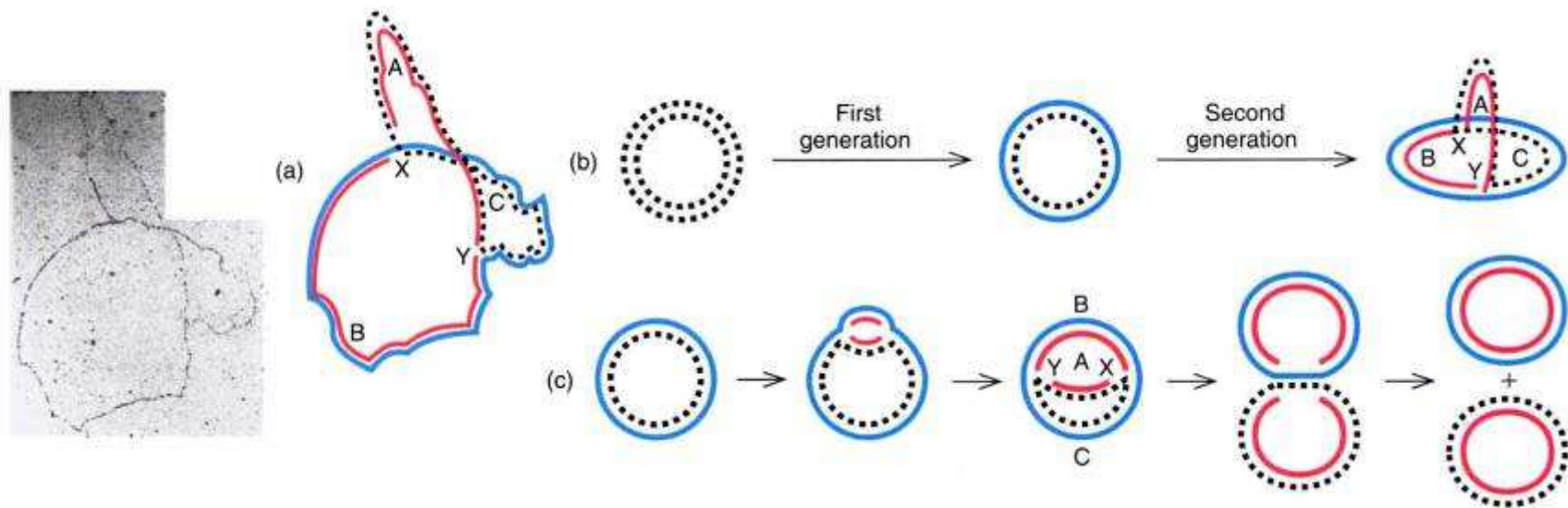
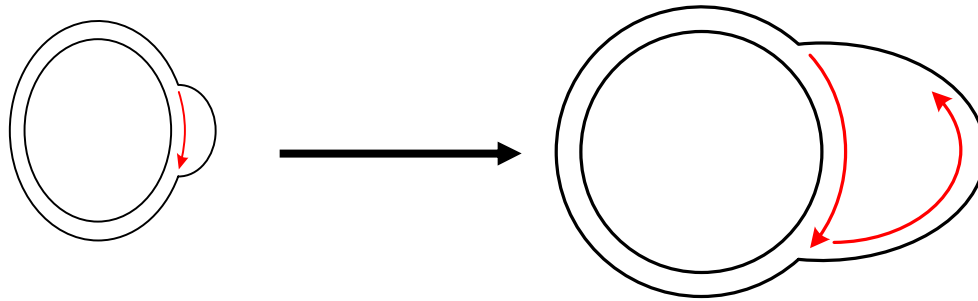


Figure 20.10 The theta mode of DNA replication in *Escherichia coli*.

Репликация тип D-бримка



- Мх и пластидна ДНК
- Механизъм, сходен с механизма на “търкалящия се кръг”