Белки и ферменты, участвующие в репликации

ДНК-полимеразы про- и эукариот

ДНК-полимеразы присутствуют во всех клетках про- и эукариот. Некоторые прокариотические и эукариотические ДНК-полимеразы выделены в чистом виде, и их ферментативные и физические свойства охарактеризованы. Физические свойства этих ферментов не совсем идентичны, но механизм катализа, который они осуществляют, в общих чертах одинаков: каждая из них способна удлинять цепь ДНК, наращивая ее посредством присоединения каждого последующего нуклеотида к 3’-концу цепи ДНК или РНК. Основные белки и ферменты, входящие в состав репликативного комплекса *E. coli*, а также их функции, указаны в таблице. У *E. coli* есть три ДНК-полимеразы– I, II и III (названия даны по мере их открытия).

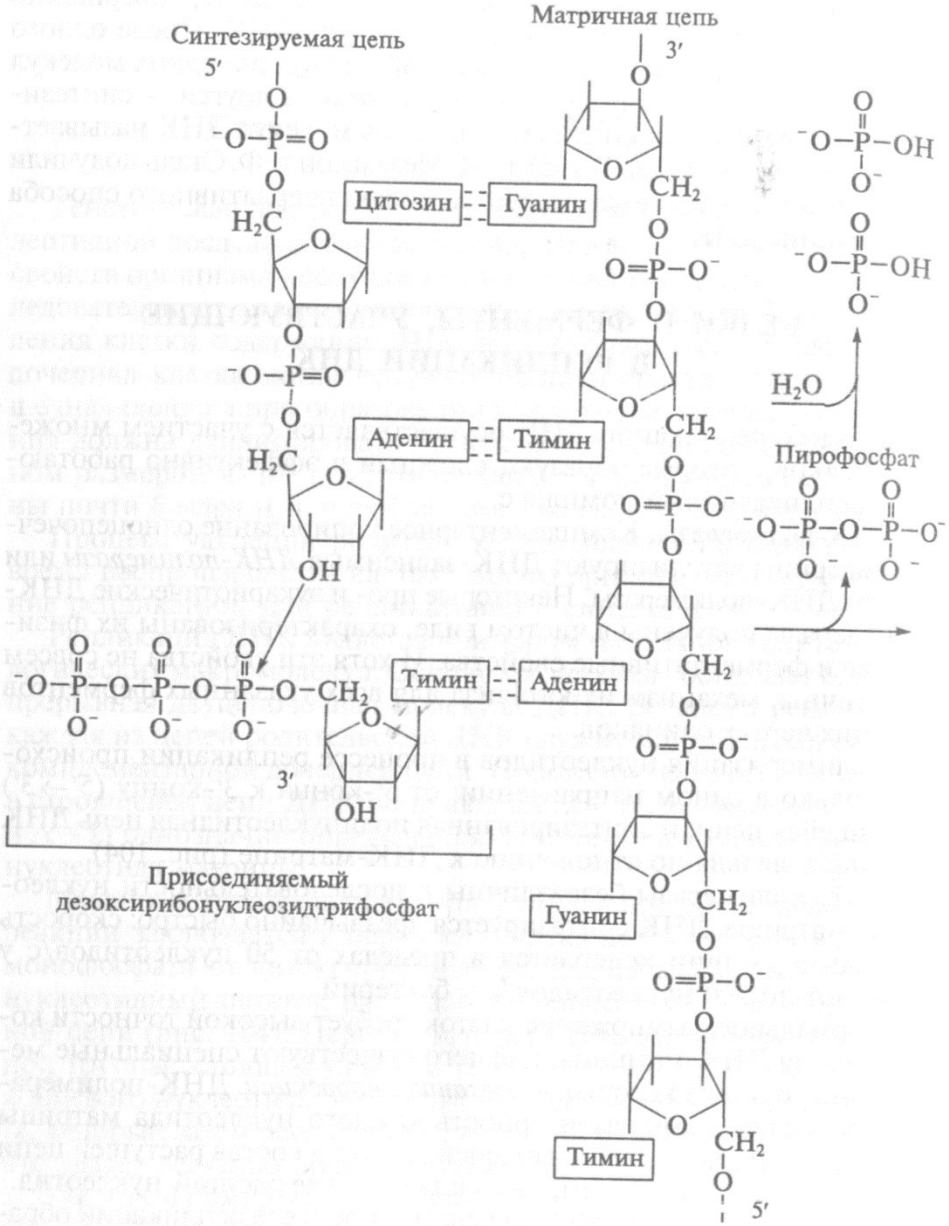
Белки, входящие в состав репликативного комплекса *E. coli*

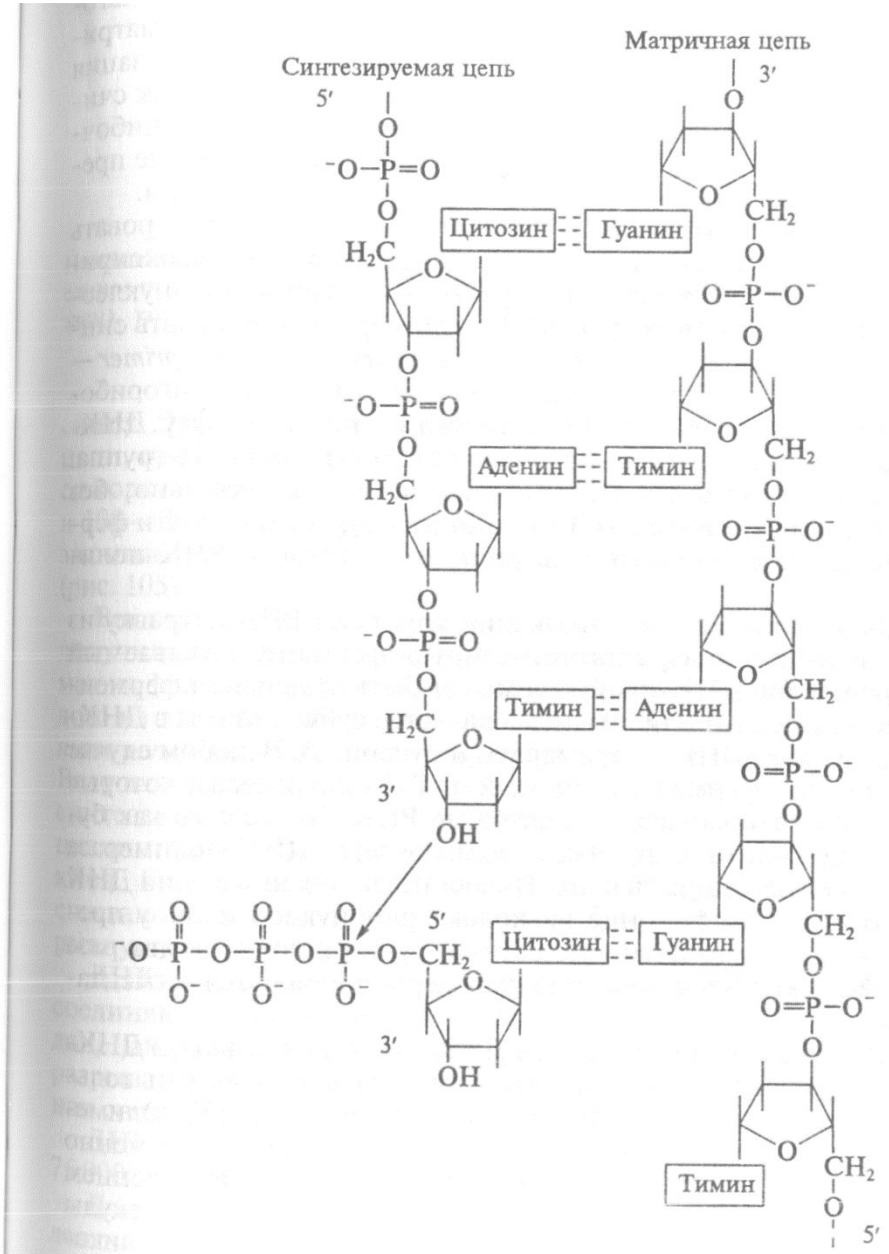
Белки	Энзиматическая активность	Биологическая функция
Dna A		Узнавание области начала репликации и привлечение к месту сборки остальных белковых компонентов реплисомы
Dna B	ДНК-хеликаза	Раскручивание двойной спирали ДНК в репликативной вилке
Dna C		Обеспечение взаимодействия хеликазы и праймазы с ДНК, находящейся в комплексе с SSB-белком
Dna G	Праймаза	Синтез РНК-затравок
SSB		Взаимодействие с одноцепочечной ДНК; активация ДНК-полимеразы и стабилизация расплетенного дуплекса
ДНК-полимераза I	ДНК-полимераза	Созревание реплицирующейся ДНК (застраивание брешей)
	3′—5′-экзонуклеаза	Коррекция ошибок
	5′—3′-экзонуклеаза	Удаление РНК-затравки (праймера)
ДНК-полимераза III:	ДНК-полимераза	Синтез лидирующей и отстающей цепей ДНК
(αθε) — кофермент		Активация ДНК-полимеразы и ДНК-зависимой АТРазы; осуществление функции «скользящего зажима», обеспечивающего процессивность репликации
β-белок		
γ-Комплекс (γ, δ, δ′, χ, ψ)	ДНК-зависимая АТРаза	Связывание затравки с матрицей; активация ДНК-полимеразы
τ-Белок		Сборка и димеризация холофермента ДНК-полимеразы
Лигаза	Лигаза	Лигирование фрагментов ДНК
Топоизомераза I	Топоизомераза	Релаксирование отрицательной суперспирализации
Топоизомераза II (ДНК-гираза)	Топоизомераза	Индуцирование образования отрицательных сверхвитков, разделение катенанов

ДНК-полимераза I *E. coli*

Выделена А. Корнбергом и сотр. в 1958 г. Изучена наиболее полно. Представляет собой одиночный полипептид с мультифункциональными активностями. Для осуществления реакции **полимеризации** ферменту необходим праймер, содержащий свободную 3’-ОН-группу и матрица, детерминирующая присоединение нужного нуклеотида.

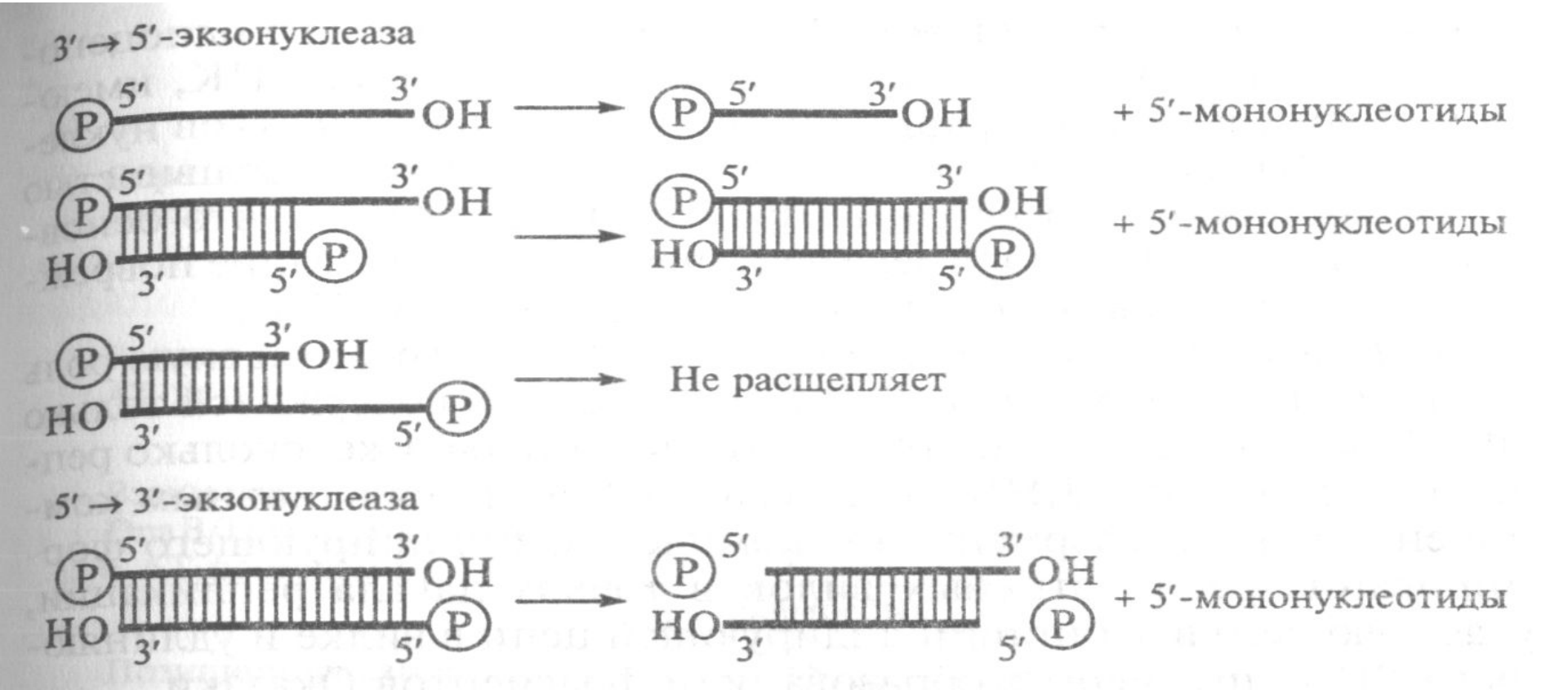
Схема удвоения молекулы ДНК при репликации





Экзонуклеазные реакции ДНК-полимеразы I. 3’ → 5’-экзонуклеазная активность

Кроме полимеризации ДНК-пол.I катализирует **две другие реакции**. В ходе одной из них происходит гидролиз фосфодиэфирных связей в одной из цепей ДНК, начиная с 3’-конца цепи (***3’→ 5’-экзонуклеазная*** активность), причем, за один акт удаляется один нуклеотид, начиная с 3’-конца цепи. Рисунок



5’→ 3’-экзонуклеазная активность ДНК-пол.I

Вторая реакция также заключается в отщеплении нуклеотидов, но гидролиз идет с 5’-конца цепи ДНК к 3’-концу (***5’→ 3’-экзонуклеазная активность***).
Различные активности ДНК-пол.I принадлежат разным участкам полипептидной цепи с молекулярной массой 109 000 дальтон.
Большой С-концевой участок (76 000 дальтон) проявляет 5’→3’-полимеразную и 3’→ 5’-экзонуклеазную активности.
Малый, N-концевой, фрагмент (36 000 дальтон) обладает только 5’→ 3’-экзонуклеазной активностью.
Большой фрагмент называется также **фрагментом Кленова**, он способен инициировать репликацию *in vitro*. 3’→ 5’-экзо-нуклеазная активность обеспечивает контроль за присоединением каждого последующего нуклеотида и удаление ошибочно вставленного нуклеотида с растущего конца цепи ДНК. С помощью 5’→ 3’-экзонуклеазной активности вырезаются праймеры.

Ник-трансляция

•ДНК-пол. I способна удлинять 3’-конец одной из цепей ДНК в месте разрывов и одновременно удалять нуклеотиды с 5’-конца того же разрыва. Этот процесс называется **ник-трансляцией**. Он играет ключевую роль в репарации повреждений ДНК.

- В клетке E. coli имеется несколько сотен молекул ДНК-пол.I. В целом ДНК-пол.I имеет большее отношение к созреванию реплицирующейся ДНК, чем непосредственно к полимеразным процессам в репликативной вилке.

•ДНК-полимераза I и присущие ей экзонуклеазные активности играют большую роль в репликации и репарации хромосомной ДНК E. coli. Экзонуклеазная активность 3' → 5' обеспечивает контроль за присоединением каждого нуклеотида и удаление ошибочных нуклеотидов с растущего конца цепи.

ДНК-полимераза II

Две другие ДНК-полимеразы присутствуют в клетках *E. coli* в меньших количествах.

- ***ДНК-пол. II*** (мол.масса 90 кДа) представлена одной полипептидной цепью, обладает полимеразной и 3’→ 5’-экзонуклеазной активностями. Она плохо соединяется с одноцепочечными ДНК, но лучше работает с биспиральной ДНК, имеющей одноцепочечные бреши длиной в несколько десятков нуклеотидов, обладает лишь 10 %-й ДНК-полимеразной активностью по сравнению с ДНК-полимеразой I. Предполагают, что основной функцией ДНК-полимеразы II является достраивание поврежденных участков в молекуле ДНК, т. е. репарация ДНК.

Она может заполнять пробелы между фрагментами ДНК за счет полимеразной активности, но не способна отщеплять РНК-нуклеотиды от фрагментов Оказаки (т.к. не обладает 5’→3’-экзонуклеазной активностью) или осуществлять ник-трансляцию.

ДНК-полимераза III-холофермент

Ключевой фермент, ответственный за репликацию ДНК E. coli. Кор-фермент ДНК-пол. III состоит из трех субъединиц. Самая большая α-субъединица обладает полимеразной активностью, а ε-субъединица 3’→ 5’-экзонуклеазной активностью. Комплекс α и ε-субъединиц характеризуется более высокими полимеразной и 3’→ 5’-экзонуклеазной активностями, чем каждая из соответствующих субъединиц в отдельности. Функция третьей θ-субъединицы кор-фермента пока не выяснена. Кроме указанных в состав ДНК-пол. III входят еще семь субъединиц: γ,β,δ,δ’,ψ… Таким образом, общая молекулярная масса ДНК-пол.III составляет 10^3 килодальтон. Роль β-субъединицы заключается в том, чтобы максимально снизить вероятность отделения фермента от матрицы до завершения процесса копирования. Точная функция других субъединиц неизвестна. ДНК-пол.III обладает повышенным сродством к матрице и характеризуется более высокой эффективностью копирования, чем ДНК-пол I.

ДНК-полимераза III-холофермент

ДНК-полимераза III (мол. масса 103 кДа) — играет главную роль в репликации ДНК у *E. coli*. В каждой клетке содержится только 10— 20 копий фермента, приблизительно столько же, сколько репликативных вилок. ДНК-полимераза III является основным компонентом ферментного комплекса, инициирующего формирование репликативных вилок в точках начала репликации.

- ДНК-полимераза III состоит из десяти типов субъединиц (α,β,γ,c,δ,δ’, θ,ε..). Репликацию проводит полная форма фермента — холофермент, содержащий все субъединицы. Холофермент не обладает 5'→3'-экзонуклеазной активностью, в связи с чем для репликации отстающей цепи необходимо участие ДНК-полимеразы I. Полимеразную реакцию осуществляет каталитический кор из α,ε и θ-субъединиц, в котором α-субъединица обладает полимеразной активностью, ε-субъединица — 3'→5'-экзонуклеазной активностью, функция θ-субъединицы пока неясна. Помимо субъединиц, составляющих полимеразный кор, ДНК-полимераза III-холофермент содержит еще семь субъединиц. Эти полипептиды существуют во множестве копий, являются регуляторными и усиливают действие каталитического ядра (кора) ДНК-полимеразы III.

- Отличительная черта холофермента ДНК-полимеразы III — исключительно высокая процессивность. Мерой процессивности является длина

ДНК-полимеразы эукариот

Механизмы репликации ДНК у эукариот менее изучены из-за их большей сложности. Основные результаты получены на модельной системе с ДНК вируса SV40, в которой процесс репликации исследовали в зараженных клетках человека, культивируемых in vitro. В этой системе вирусный белок, называемый Т-антигеном, выполняет многие функции, необходимые для репликации вирусной ДНК. Он является белком-инициатором, обладает ДНК-хеликазной активностью и необходим для правильного взаимодействия с ДНК ферментного комплекса, синтезирующего праймеры.
В то же время вирус SV40 использует для репликации своей небольшой хромосомы и многие белки клетки-хозяина, что позволяет исследовать функционирование репликативного комплекса клеток человека в такой относительно простой системе.

ДНК-полимеразы эукариот. В клетках эукариот имеются по меньшей мере шесть различных ДНК-зависимых ДНК-полимераз: α, β, δ,ε,γ,ζ. Четыре из них — α, β, δ,ε — непосредственно участвуют в репликации хромосомной ДНК (табл. 18).

Белки, входящие в состав репликативного комплекса эукариотических организмов

Белок	Молекулярная масса субъединиц, кДа	Энзиматическая активность	Биологическая функция
ДНК-полимераза:			
α (альфа)	160 — 185*	ДНК-полимераза	Синтез праймеров на обеих цепях ДНК
	67 — 70		Транспорт ДНК-полимеразы в клеточное ядро
	54 — 58		Связывание пуринового нуклеотида, присоединение праймазы к ДНК-полимеразе
	46 — 50*	Праймаза	
β (бета)	39 — 40*	ДНК-полимераза	Заполнение брешей при эксцизионной репарации ДНК, участие в рекомбинации, процессинг фрагментов Оказаки
γ (гамма)	125 — 140*	ДНК-полимераза 3′ → 5′-экзонуклеаза	Репликация и репарация митохондриальной ДНК
	35 — 40		
δ (дельта)	125 — 130*	ДНК-полимераза 3′ → 5′-экзонуклеаза	Синтез лидирующей цепи геномной ДНК в репликативной вилке
	48 — 55		Связь с фактором процессивности PCNA
ε (эпсилон)	230 — 261*	ДНК-полимераза 3′ → 5′-экзонуклеаза	Синтез отстающей цепи геномной ДНК в репликативной вилке
	55		
ξ (дзета)	173*	ДНК-полимераза 3′ → 5′-экзонуклеаза	Синтез ДНК на поврежденной матрице при SOS-ответе
	29		

ДНК-полимераза α — первая ДНК-полимераза, обнаруженная в клетках эукариот. Она представлена в клетке в виде прочного комплекса с ДНК-праймазой — ферментом, осуществляющим синтез РНК-затравок. Комплекс ДНК-полимераза α-праймаза является единственным у эукариот ферментативным ансамблем, способным инициировать синтез ДНК *de novo*. В ходе репликации в клеточных ядрах ДНК полимераза α-праймаза синтезирует затравку лидирующей нити в участке *ori* и затравки фрагментов Оказаки запаздывающей нити.

Как правило, ДНК-полимераза не обладает корректорской 3'→5'-экзонуклеазной активностью. По-видимому, в ходе эволюции экзонуклеазный центр в данном ферменте редуцировался.

- ***ДНК-полимераза β*** **является наименьшей по размеру и самой простой по строению ДНК-полимеразой в клетках эукариот. Основная функция ДНК-пол.β в клетке связана с эксцизионной репарацией ядерной ДНК (заполнение пробелов при репарации).**

ДНК-полимераза δ — гетеродимер, состоящий из каталитической субъединицы (125—130 кДа) и субъединицы 48 — 55 кДа, необходимой для преодоления ферментом структурных барьеров в природных однонитевых матрицах и для связи с **фактором процессивности PCNA** (от англ. Proliferating Cell Nuclear Antigen –ядерный антиген пролиферирующих клеток). Три молекулы PCNA образуют кольцевой тример с отверстием для двунитевой ДНК в центральной части, который представляет собой перемещающуюся по ДНК подвижную платформу или «скользящую скрепку» в форме тора (бублика), удерживающую ДНК-полимеразу δ в ходе полимеризации на матрице и обеспечивающую высокопроцессивный синтез ДНК. Хотя PCNA и прокариотический фактор процессивности субъединица β ДНК-полимеразы III *E. coli* имеют низкую гомологию на уровне первичной структуры, оба белка формируют близкие по пространственной геометрии структуры «скользящей скрепки».

ДНК-полимераза ε, выделена из клеток HeLa, содержит два полипептида — каталитический 261 кДа и полипептид 55 кДа. Каталитический полипептид обладает ДНК-полимеразной и 3'→5‘-экзонуклеазной активностями. Особенностью холофермента ДНК-полимеразы ε по сравнению с ДНК-полимеразой δ является его меньшая зависимость от вспомогательных факторов (PCNA, RFC - репликативный фактор С и RPA – репликативный ядерный белок А), а также низкая (почти на порядок) скорость синтеза ДНК.

Это различие, возможно, связано с разной функцией ДНК-полимераз в репликативной вилке. Один холофермент, ДНК-полимераза δ осуществляет быстрый и процессивный синтез лидирующей нити, используя для элонгации единственную затравку, синтезируемую ДНК-полимеразой α-праймазой в районе ori, и диссоциирует только по достижении конца репликона, тогда как несколько холоферментов ДНК-полимеразы ε могут одновременно синтезировать фрагмены Оказаки в «зоне Оказаки», удлиняя затравки, синтезируемые ДНК-полимеразой α-праймазой в начале каждого фрагмента.

ДНК-полимераза γ локализована в митохондриях, ее функция связана с репликацией и репарацией митохондриальной ДНК, она кодируется ядерным геномом. ДНК-полимераза γ способна направлять высокопроцессивную полимеризацию на однонитевых ДНК-матрицах в отсутствие вспомогательных факторов.

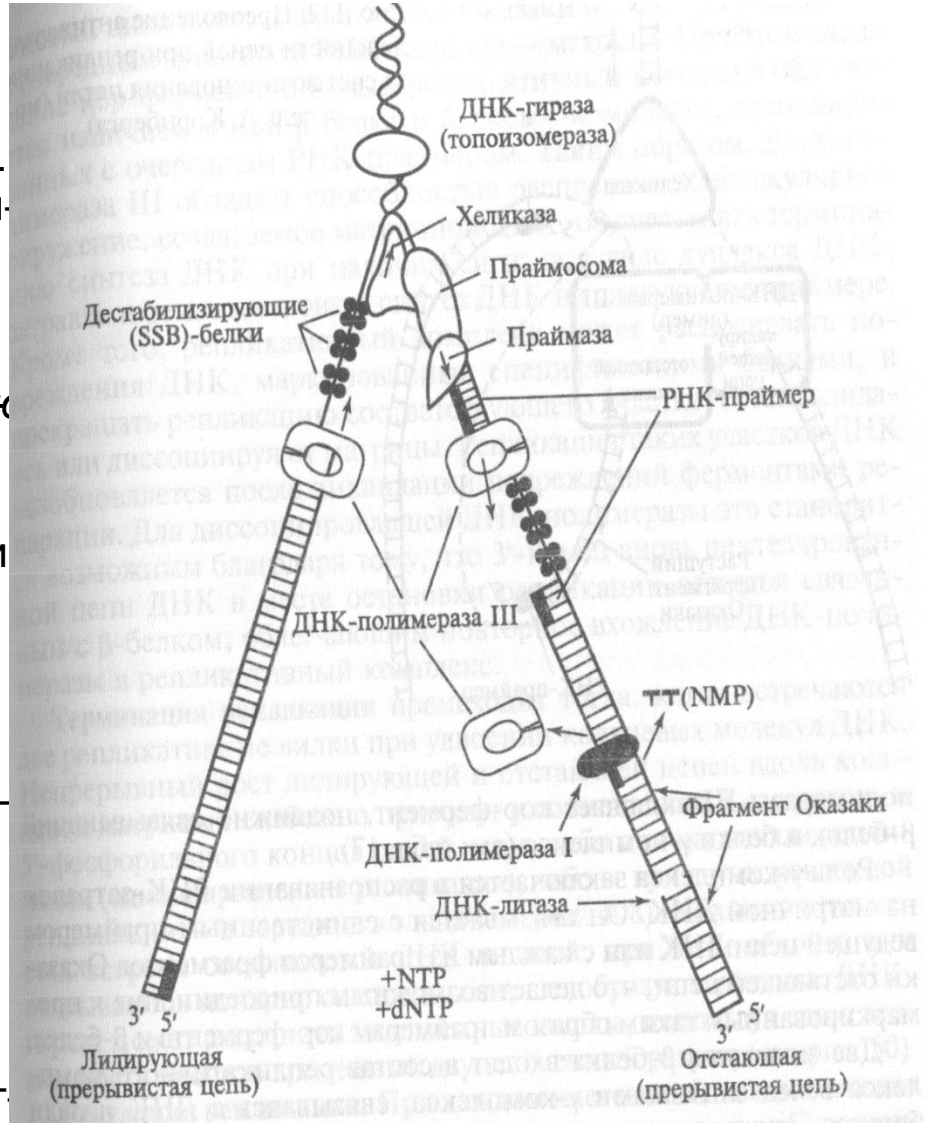
Охарактеризованы также другие ДНК-полимеразы эукариот: ή, θ, REV1 и др. Все эти ферменты участвуют в репарации ДНК.

В последние годы наряду с углубленным изучением строения и свойств отдельных ДНК-полимераз эукариот большое внимание уделяется взаимодействию этих ферментов со вспомогательными факторами и механизму функционирования их в составе многокомпонентных репликативных и репаративных комплексов. Список белков, взаимодействующих с ДНК-полимеразами, постоянно растет и включает не только известные факторы PCNA, RFC и RPA, но и ключевые факторы регуляции клеточного метаболизма, такие, как белки группы MCM (minichromosome maintenance factors), факторы узнавания участков ori репликации ORC (origin recognition complex) и др.

Таким образом, поскольку эукариотические ДНК-полимеразы α и β лишены 3′ → 5 ′ и 5 ′ → 3 ′ -экзонуклеазных активностей, становится понятным участие ДНК-полимераз δ и ε в процессе репликации ядерной ДНК в качестве корректирующих ферментов, а ДНК-полимеразе ε приписывают также функцию удаления РНК-праймеров на концах фрагментов Оказаки.

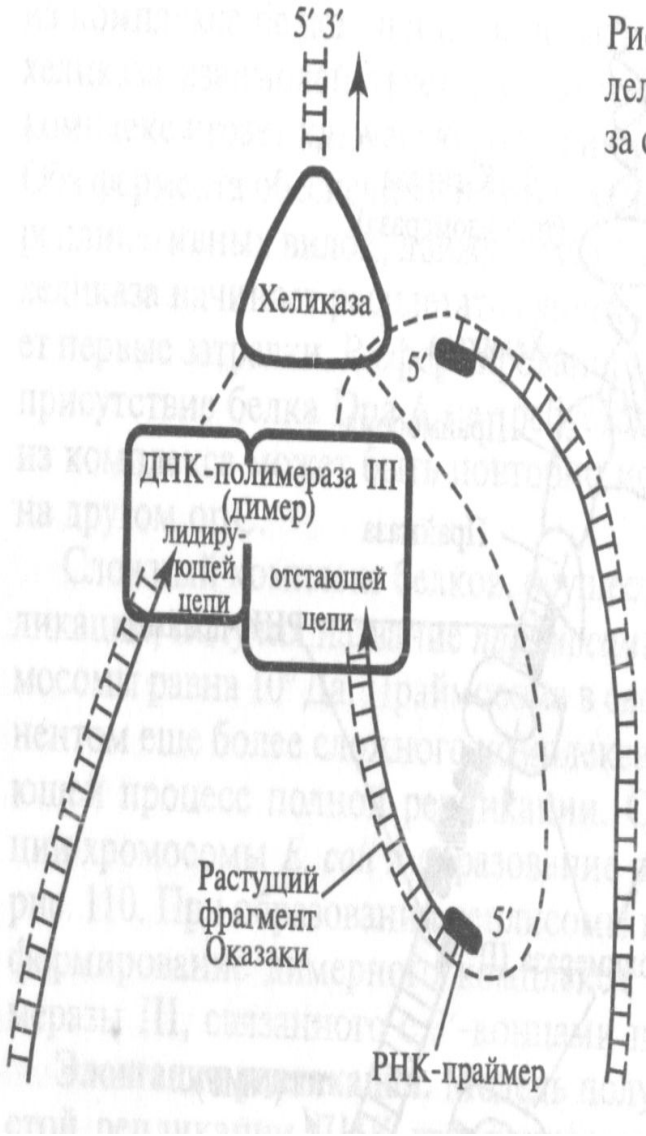
Модель работы димерной полимеразы(ДНК-пол.III); координация синтеза ДНК на комплементарных цепях

Элонгация репликации. Модель полуконсервативной прерывистой репликации ДНК в репликативной вилке представлена на рис. Дуплекс родительской молекулы ДНК расплетает АТР-зависимая хеликаза. Образующиеся одноцепочечные участки покрывает SSB-белок. ДНК-пол. III движется по одной из матричных цепей в направлении раскрывания вилки и синтезирует ведущую цепь ДНК. По другой, матричной цепи в том же направлении движется ***праймосома*** *(комплекс белков, осуществляющий инициацию репликации)*. Время от времени, входящая в состав праймосомы ***праймаза (белок Dna G),*** Синтезирует РНК-затравки для отстающей цепи Вторая молекула холофермента ДНК-пол. III удлиняет эти затравки до тех пор, пока не достигнет предыдущей затравки, т.е. она синтезирует фрагменты Оказаки длиной от 1000 до 2000 н. Удаление сегментов РНК с 5'-конца каждого фрагмента Оказаки осуществляет ДНК-пол.I, используя свою 5'→3'-кзонуклеазную активность. Заполнение брешей между фрагментами Оказаки катализируется той же ДНК-полимеразой I. Одноцепочечный разрыв зашивает ДНК-лигаза. Таким образом, из серии фрагментов Оказаки образуется новая цепь.



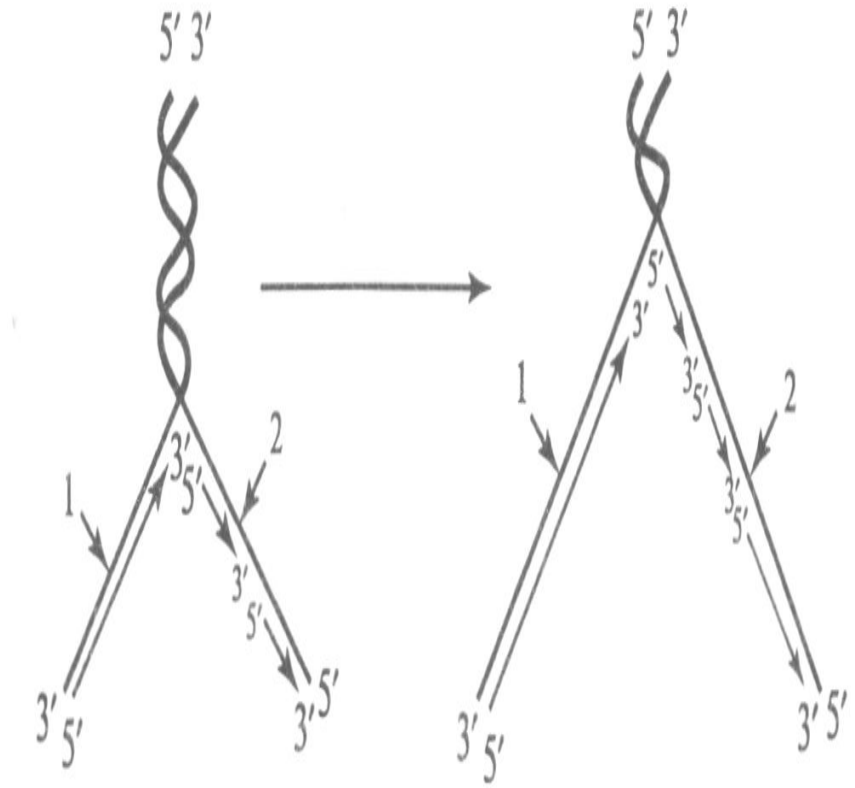
Преодоление антипараллельности цепей при репликации за счет возникновения петли

Холофермент ДНК-полимеразы III может образовывать димер при участии т-белка, в связи с чем ведущая и отстающая цепи реплицируются одновременно. Преодоление антипараллельности цепей при репликации в этом случае осуществляется за счет возникновения «петли» (модель А. Корнберга),где чередование фосфодиэфирных связей на ее восходящем отрезке изменяется на обратное и не препятствует ДНК-полимеразе III вести синтез фрагментов Оказаки на отстающей цепи родительской ДНК в том же направлении, что и на ведущей цепи. Необычность ситуации во время синтеза ДНК в репликативной вилке заключается в том, что один и тот же белковый комплекс осуществляет как непрерывный синтез ведущей цепи ДНК, так и прерывистый синтез фрагментов Оказаки отстающей цепи, претерпевая во втором случае периодическую диссоциацию от матрицы для инициации синтеза ДНК.



Роль вспомогательных белков в синтезе ДНК

ДНК-праймаза. ДНК-полимеразы не способны инициировать синтез новых цепей ДНК, они могут лишь добавлять дезоксирибонуклеотидные звенья к 3'-концу уже имеющейся полинуклеотидной цепи. Чтобы молекулы ДНК-полимераз могли начать синтез ДНК, им необходима затравка, или праймер (от англ. primer — затравка), короткий олигорибонуклеотид, комплементарный соответствующему участку ДНК-матрицы, у которого на конце имеется свободная 3'-ОН-гр. Неспособность молекул ДНК-пол. самостоятельно, без затравки начинать синтез ДНК принципиально отличает эти ферменты от других ферментов матричного синтеза — РНК-полимераз.



Синтез цепей ДНК в репликативной вилке.

Направление репликации 5′→3′. Одна цепь (лидирующая) синтезируется как единое целое, а другая (отстающая) – короткими фрагментами (фрагменты Оказаки), которые впоследствии соединяются с образованием непрерывной цепи

На стадии инициации репликации короткую РНК-затравку из рибонуклеозидтрифосфатов синтезирует фермент, называемый ***ДНК-праймазой***. ДНК-праймаза может быть отдельным ферментом (как у бактерий) или входить в качестве субъединицы в ДНК-полимеразу *(как у ДНК-полимеразы α эукариот*). В любом случае праймаза — это фермент, отличный от РНК-полимераз, которые синтезируют разнообразные клеточные РНК. После того как будет синтезирован РНК-праймер, подключается ДНК-полимераза и продолжает наращивать цепь. Новосинтезированные цепи ДНК всегда содержат на 5'-конце несколько рибонуклеотидов: у прокариот — от двух до пяти нуклеотидов, у эукариот их в два раза больше. В дальнейшем короткие праймеры замещаются сегментами ДНК.

ДНК-лигаза

ДНК-лигаза. ДНК-лигазы вирусов, бактерий, млекопитающих соединяют 5'-фосфатную и 3'-гидроксильную группы нуклеотидов, находящихся на противоположных концах одноцепочечного разрыва в дуплексе ДНК. В результате образуется фосфодиэфирная связь, ликвидирующая этот разрыв (рис.). **ДНК-лигаза E. coli — это одиночный полипептид (мол. масса 75000 Да). Для образования фосфодиэфирной связи между концами нуклеотидных цепей ДНК-лигазы используют энергию гидролиза ATP либо NAD**. Реакция протекает в три стадии:

- *Реакция аденилирования ДНК-лигазы*. Аденилильный остаток NAD или АТФ переносится на ε-аминогруппу лизиново-го остатка в активном центре лигазы с одновременным высвобождением пирофосфата (в случае АТФ) или никотинамидмононуклеотида (в случае NAD).

I. *Реакция трансаденилирования*. Остаток адениловой кислоты с аденилатлигазы перебрасывается на свободную фосфатную группу 5’-углеродного атома рибозы концевого нуклеотида.

II. *Реакция лигирования*. Между сближенными активированной аденилатом 5’-фосфатной группой и 3’-ОН-группой фрагмента цепи ДНК происходит образование фосфодиэфирной связи с выделением AMP.

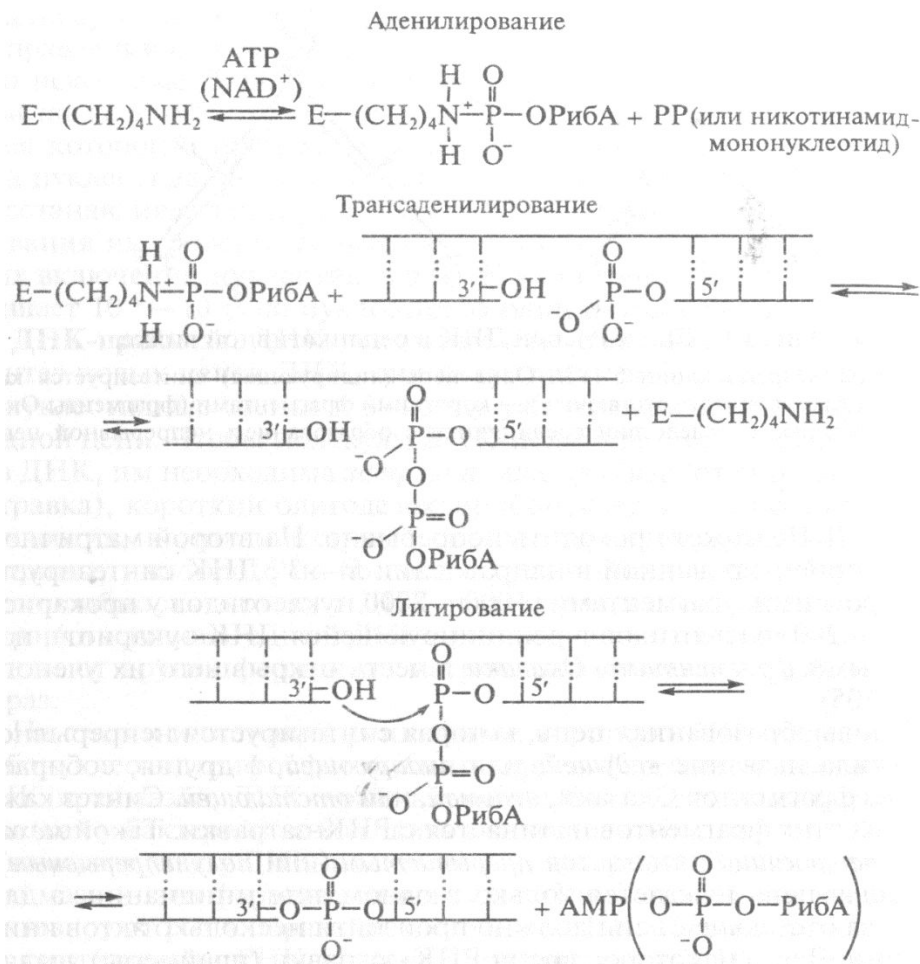


Рис. 106. Механизм действия ДНК-лигазы:
Риб — рибоза; А — аденин; PP — пирофосфат

Хеликаза

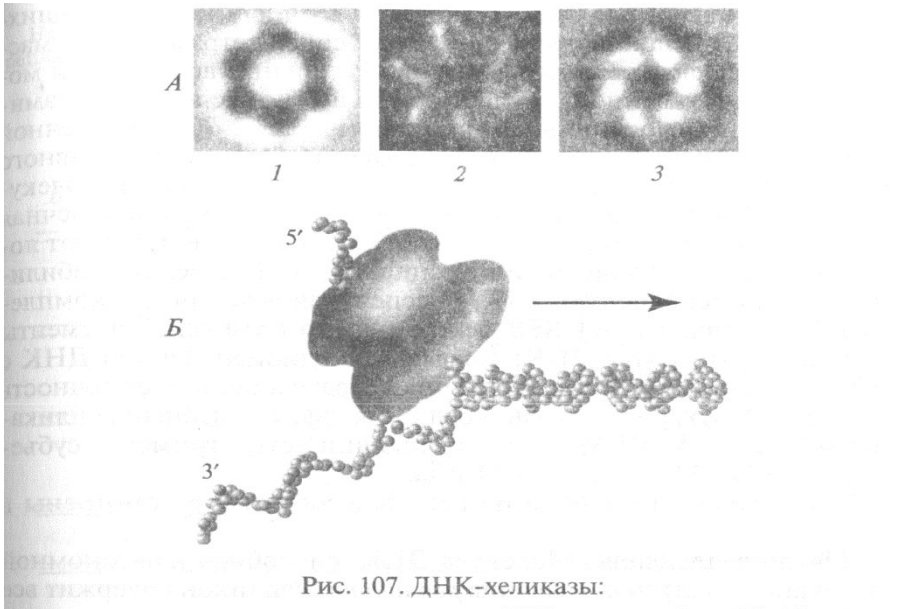


Рис. 107. ДНК-хеликазы:
А — четвертичная структура гексамерных ДНК-хеликаз: фага Т4 (*1*), вируса SV40 (*2*), Dna B *E. coli* (*3*); *Б* — схема расплетания двойной спирали ДНК-хеликазой

Раскручивание, или расплетание, спирали происходит в локальном участке ДНК. Эту реакцию осуществляет хеликаза — ДНК-зависимая АТРаза, использующая энергию гидролиза АТР для расплетания двойной спирали ДНК. Хеликазы имеют кольцевую (тороидальную) структуру, образованную шестью субъединицами. Такие гексамерные хеликазы кольцеобразной формы обнаружены у фагов, вирусов, бактерий, архей, эукариот (рис.). Хеликаза, движимая гидролизом АТР, однонаправ ленно перемещается по одной из цепей ДНК (вероятно, за счет ее конфор-мационных изменений), расплетая перед собой двойную спираль, в результате чего возникает вилка (Y) из двуцепочечного участка ДНК и двух одноцепочечных ветвей.

ДСБ-белки (SSB-белки)

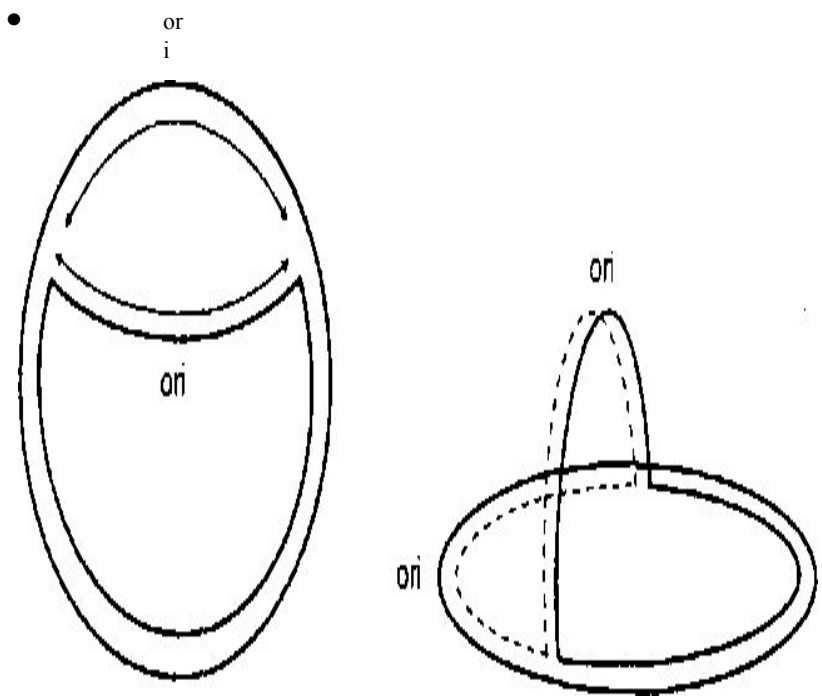
Белки, связывающиеся с одноцепочечной ДНК. ДСБ-белки связываются с сахарофосфатным остовом одиночных цепей ДНК, не закрывая оснований, что не мешает комплементарному присоединению нуклеотидов в ходе репликации. ДСБ-белок E. coli наиболее изучен, он представляет собой тетрамер, характеризуется высокой степенью асимметрии молекулы.

ДСБ-белки стабилизируют одноцепочечную ДНК, обеспечивая условия для комплементарного спаривания, удаляют Возможные элементы вторичной структуры ДНК(например, предотвращают образование шпилечных структур); связывание одноцепочечной ДНК с ДСБ-белками стимулирует ДНК-полимеразу и повышает точность ее работы.

У ***эукариот*** таковым белком является ядерный репликативный белок А (***RPA***), представляющий гетеротример с субъединицами 70, 32 —34 и 11 — 14 кДа.

Модель инициации репликации ДНК у *Escherichia coli*

Геном ***E. coli*** реплицируется двунаправленно от одной точки начала репликации, получившей название ***локус ori C***. Инициация репликации начинается с узнавания инициаторными белками специфических последовательностей в точках начала репликации ДНК.



В кольцевых молекулах ДНК репликационный глазок образует θ-структуру. Приведены две проекции реплицирующейся кольцевой ДНК. Символом *ori* обозначена точка начала репликации, стрелками показано направление репликации

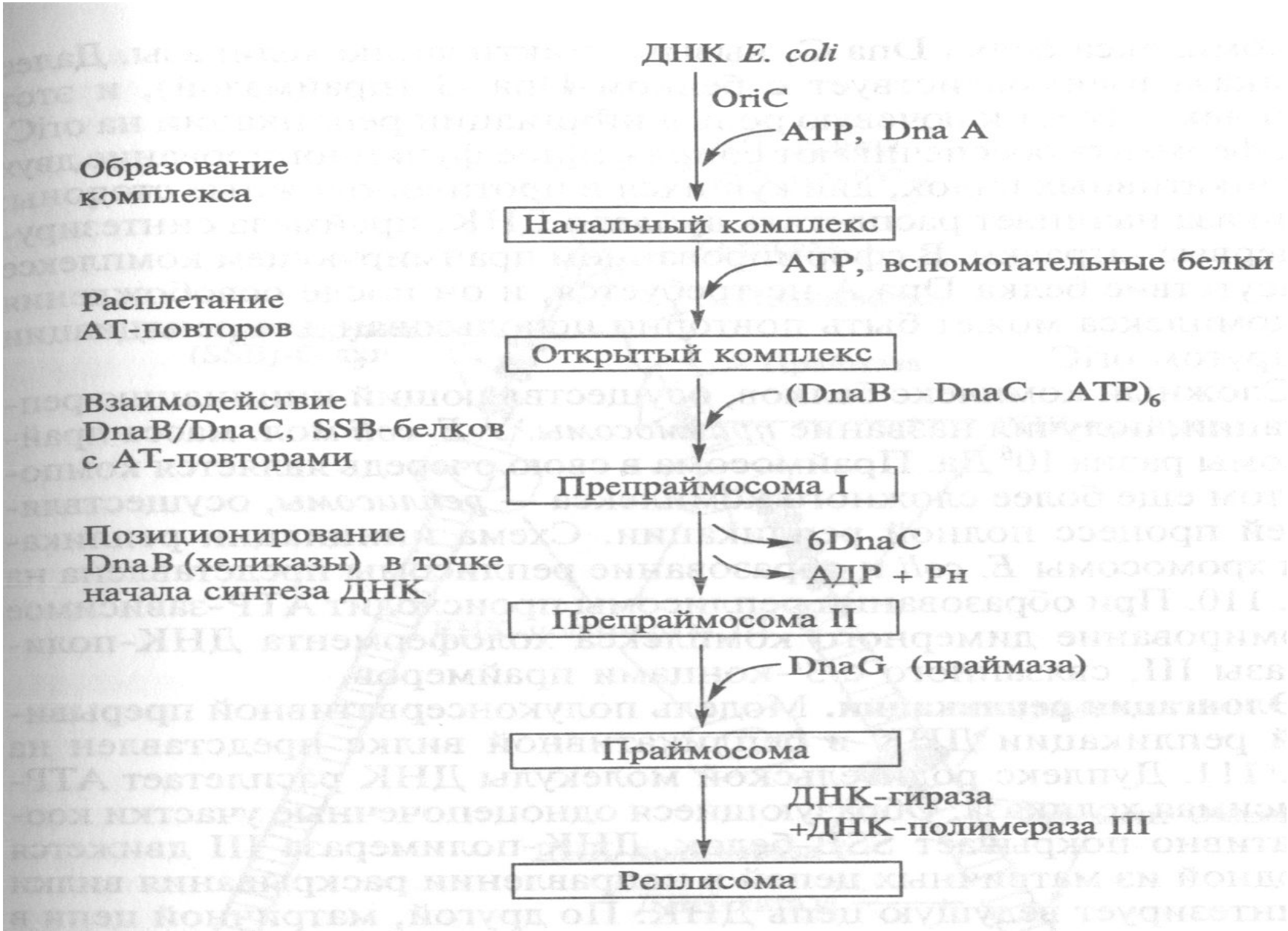
Регуляция инициации репликации у E. coli

Хромосома E. coli содержит единственную область начала репликации (*oriC*), размер которой составляет 258 н.п. В *oriC* имеется пять консенсусных девятинуклеотидных сайтов связывания инициаторного белка *Dna A*, названных *Dna A-боксами*. В левой части *oriC* наряду с *Dna A-боксами* находятся AT-богатые 13-нуклеотидные повторы. Белок Dna A распознает область начала репликации и образует комплекс с другими белками.

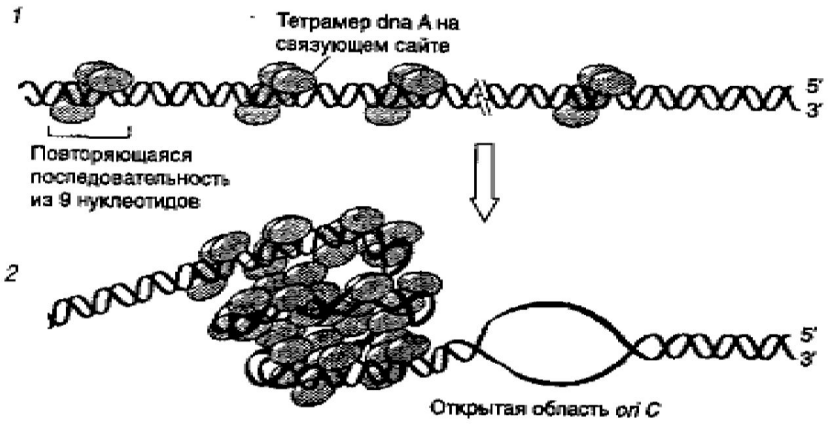
Сначала белок Dna A в комплексе с ATP взаимодействует с Dna A-боксами. С помощью электронной микроскопии исходный комплекс обнаруживается в виде компактной эллипсоидной структуры, содержащей -20 мономеров Dna A, которая закрывает oriC. В этом комплексе частично расплетаются AT-богатые повторы и формируется открытый комплекс. В этом процессе участвуют некоторые вспомогательные белки, которые помогают инициатору Dna A раскручивать и изгибать ДНК (ранее они обозначались n, n', n'', i, a. В последнее время их обозначают IME, FIS-факторы и т.д.).

Белок Dna B (хеликаза) в виде гексамеров в комплексе с шестью мономерами белка Dna C, каждый из которых связывает одну молекулу ATP, а именно (Dna B —Dna C—ATP)6, взаимодействует с одноцепочечными участками частично расплетенной ДНК. В этом комплексе хеликазная активность Dna B блокирована. Транслокация Dna B (хеликазы) от места ее первоначального вхождения в комплекс к месту старта репликативной вилки и высвобождение из комплекса белка Dna C, вызывает активацию хеликазы. Далее хеликаза взаимодействует с белком Dna G (праймазой), и этот комплекс играет ключевую роль в инициации репликации на oriC.
Оба фермента обеспечивают сопряженное функционирование двух репликативных вилок, движущихся в противоположные стороны; хеликаза начинает расплетать дуплекс ДНК, праймаза синтезирует первые затравки. В сформированном праймирующем комплексе присутствие белка Dna A не требуется, и он после освобождения из комплекса может быть повторно использован для репликации на другом oriC.

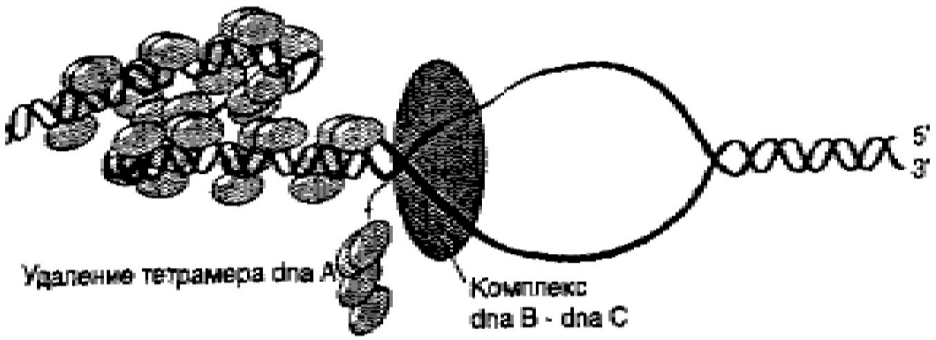
Схема инициации репликации хромосомы E. coli



Сложный комплекс белков, осуществляющий инициацию репликации, получил название **праймосомы**. Праймосома в свою очередь является компонентом еще более сложного комплекса — **реплисомы**, осуществляющей процесс полной репликации. Завершающим этапом сборки реплисомы является взаимодействие праймосомы с ДНК-полимеразой III.
Для продолжения синтеза ДНК необходимо участие еще двух белков, двигающихся впереди репликативной вилки и выполняющих функцию геликаз - **геликазы II и белка rep**.



Этапы инициации репликации ДНК E. coli.1 – белок dna A формирует тетрамеры, связывающиеся со специфическими сайтами из 9 пар нуклеотидов в пределах локуса ori C; 2 – тетрамеры dna A образуют комплекс, индуцирующий плавление ДНК.



ис. 4.10. Комплекс [dna B-dna C] формирует инициирующий «глазок»

Терминация репликации

Терминация репликации происходит тогда, когда встречаются две репликативные вилки при удвоении кольцевых молекул ДНК. Непрерывный рост лидирующей и отстающей цепей приводит к совмещению 3′- и 5′-концов одной цепи, либо в точке начала репликации (однонаправленная репликация), либо – при двунапраленной репликации – в середине кольца). Кольца в местах встреч соединяются лигазой, при этом они оказываются попарно сцепленными, т.е. образуется ***катенан***.

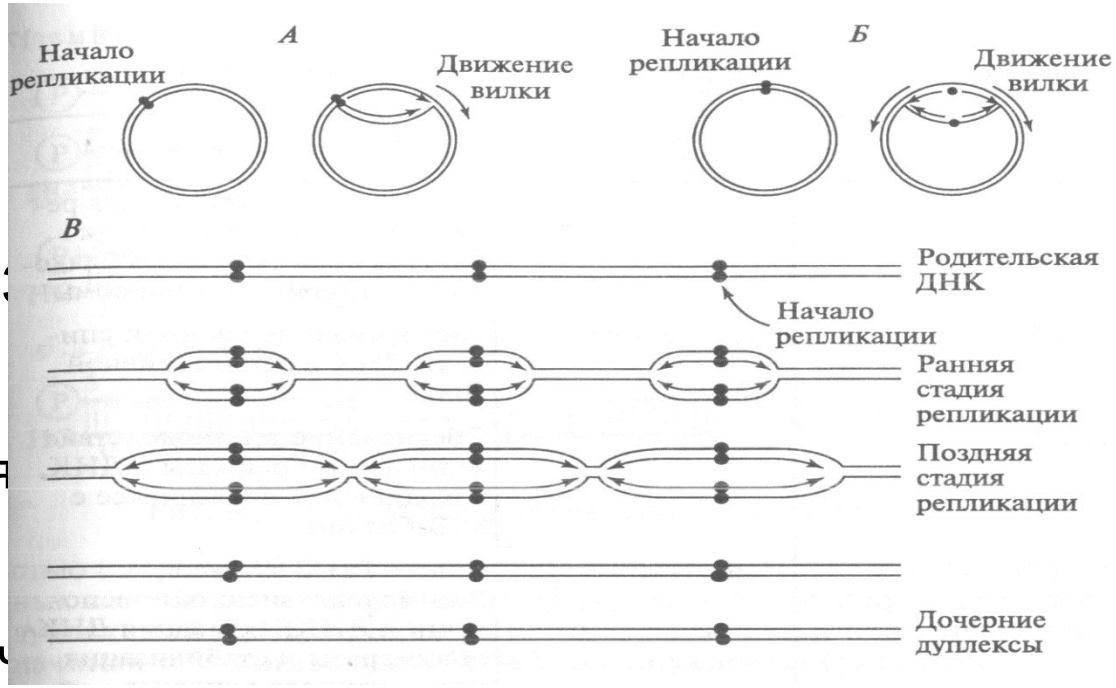
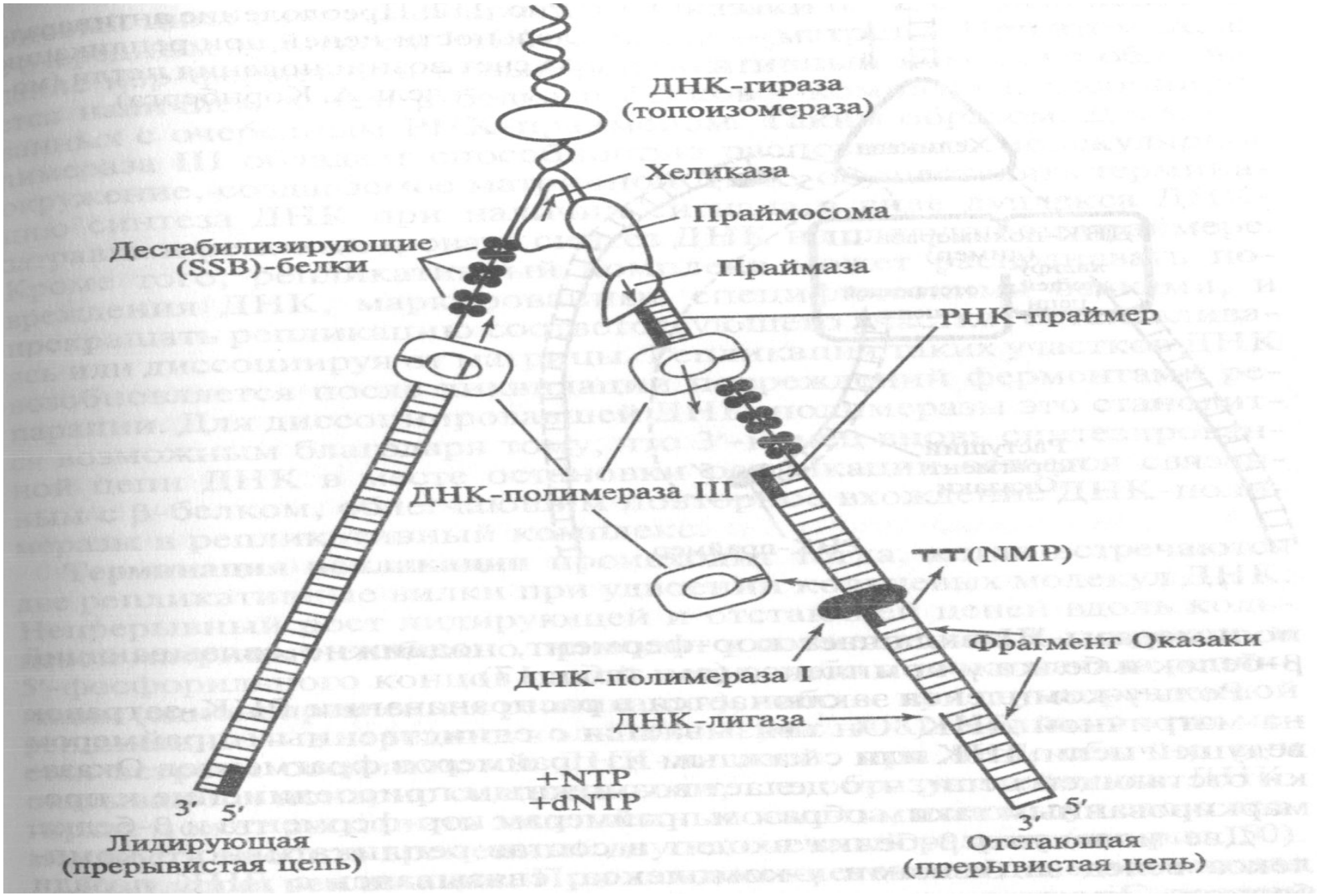


Рис. 108. Направление репликации:

А – однонаправленная репликация в кольцевой молекуле ДНК; *Б* – двунаправленная репликация в кольцевой молекуле ДНК; *В* – множественная двунаправленная репликация в эукаритической хромосоме (полирепликон)

Схема синтеза ДНК в репликативной вилке у прокариот



Бокуть, с.122

Таблица 4.1

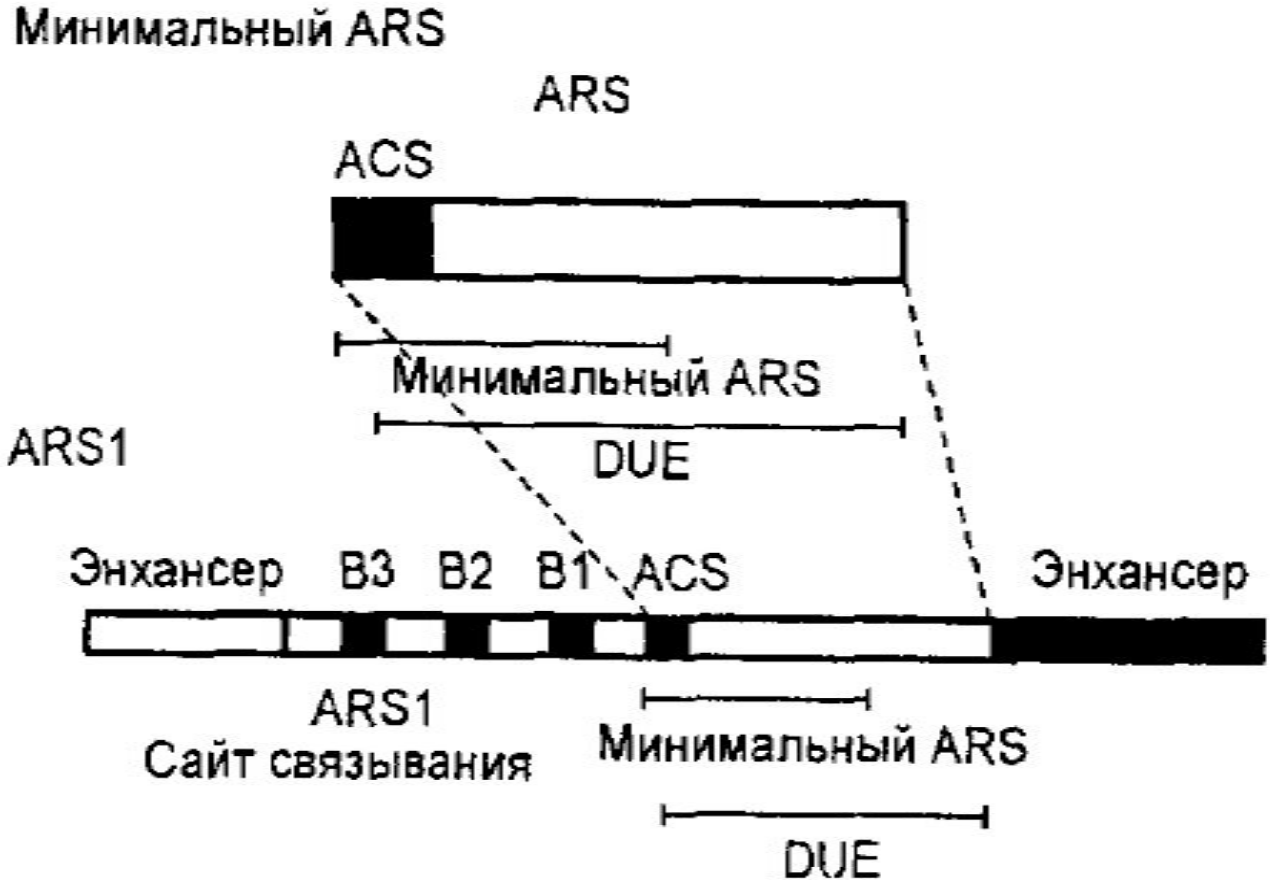
Компоненты реплисомы прокариотической клетки

№ п/п	Белок	Функция
1	SSB	Стабилизация одноцепочечной ДНК
2	Белок *i* (dna T)	
3	Белок *n*	
4	Белок *n'*	Компоненты праймосомы
5	Белок *n''*	
6	dna G	Праймаза, синтез РНК-праймера
7	ДНК-полимераза III	Основной полимеризующий фермент
8	ДНК-полимераза I	Заполнение брешей, удаление праймера
9	ДНК-лигаза	Сшивание фрагментов Оказаки
10	Гираза (gyr A, gyr B)	Введение отрицательных витков
11	rep	Геликаза, расплетение двойной спирали
12	Геликаза II	Геликаза
13	dna B	Геликаза
14	dna A	Инициация репликации
15	dna C	

Репликация ДНК у эукариот

Рассмотрим особенности репликации эукариот на примере дрожжей – ***Saccharomyces cerevisiae.*** Точки начала репликации ДНК дрожжей содержат два структурных компонента - последовательность из 11 пар оснований (ACS), называемую ***элементом узнавания инициатора,*** которая входит в состав функциональной ***автономно реплицирующейся последовательности*** (ARS), и области, представляющей собой легко расплетаемый участок ДНК - DUE (DNA unwinding element). Кроме того, для функционирования точки начала репликации необходимы еще три последовательности, называемые BI, B2 и B3. Структурный элемент B3 представляет собой сайт взаимодействия с белковым ARS фактором 1, который действует одновременно как транскрипционный фактор. Исходя из этих данных была предложена модель, в соответствии с которой организация точки начала репликации у эукариот сходна с организацией элементов промоторов. Кроме того, в точке начала репликации был обнаружен «глушитель» транскрипции, который необходим для инициации репликации и для репрессии транскрипции. В целом, у эукариот в точках начала репликации, вероятно, действуют транскрипционные факторы (позитивно и/или негативно), которые приводят к раскрыванию DUE-элемента и последующему введению компонентов ***репликативной машины.***

Структура точки начала репликации *Saccharomyces cerevisiae*



- Репликация ДНК эукариот протекает с образованием большого количества репликативных вилок. Возникает вопрос: «Какова величина среднего репликона и сколько их в геноме?»
- В группах активированных репликонов средний размер реплицирующихся единиц составляет, по одним данным, 20 тысяч пар нуклеотидов, по данным других авторов, размеры репликонов эукариот могут достигать 100-200 тысяч пар оснований - это расстояние измеряют от одной точки начала репликации до другой, соседней. Такая величина репликонов характерна для высших эукариот.
- Следовательно, в ***гаплоидном геноме*** млекопитающих должно быть 20 000-30 000 репликонов. У дрозофилы, или ***Saccharomyces cerevisiae,*** репликоны меньше - 40 000 пар оснований. Это соответствует количеству, равному 3500 репликонов на гаплоидный набор дрозофилы или 500 репликонов дрожжей.