**Лекція № 4. Природа генетичного матеріалу: Реплікація ДНК. Репарація ДНК**

Процес подвоєння ДНК – **реплікація** (replication) – забезпечує відтворення спадкової інформації та передачу її до дочірніх клітин при мітозі й мейозі. Комплементарне спарювання нуклеотидів у складі подвійної спіралі ДНК вказує на механізм копіювання генетичної інформації.

При реплікації синтез ДНК відбувається з використанням обох полінуклеотидних ланцюгів як матриць – за так званим *напівконсервативним механізмом*: дві дочірні молекули-копії містять один материнський ланцюг (що слугував матрицею) і один ланцюг, синтезований de novo. Включення нуклеотидів до ланцюга, що синтезується, детермінується матрицею за принципом комплементарності.

Такий механізм реплікації став зрозумілим відразу після того, як Уотсоном і Кріком була сформульована модель подвійної спіралі ДНК. Зростання ланцюга ДНК відбувається в напрямку від 5’ до 3’-кінця. Субстратами реакції є 3’-кінцева ОН-група дезоксирибози зростаючого ланцюга та дезоксирибонуклеозидтрифосфати (dNTP, див. розділ 3). Фермент, що каталізує цю реакцію – **ДНК-залежна ДНК-полімераза** (DNA dependent DNA Polymerase, DNAP). Синтез ДНК за подібними механізмами здійснюється також при репарації пошкоджень і деяких інших процесах.

Реплікація ДНК починається з невеликої ділянки – **ориджину** (origin), де здійснюється ініціація процесу, головним моментом якої є розходження ланцюгів ДНК. Далі з ходом реплікації такий *реплікативний міхур* (рис. 1.17) розростається у двох протилежних напрямках. На кожному боці міхура існує так звана ***реплікативна вилка***, в основі якої й відбувається синтез ДНК.

У кожній реплікативній вилці працюють дві молекули *ДНК-полімерази*, що здійснюють синтез двох полінуклеотидних ланцюгів. Оскільки два ланцюги є антипаралельними, а синтез здійснюється тільки в напрямку від 5’- до 3’-кінця, то синтез тільки одного з ланцюгів може відбуватися (і відбувається) безперервно, починаючись від *ориджину* (рис. 1.17). Цей ланцюг називають **лідируючим**, його 3’-кінець розташований поблизу від основи реплікативної вилки. Синтез іншого ланцюга розпочинається від реплікативної вилки: синтезуються окремі фрагменти – так звані **фрагменти Оказакі**, які пізніше з’єднуються між собою. Для синтезу кожного з фрагментів треба спочатку звільнити певний простір на матричному ланцюзі – пересунути реплікативну вилку вперед; відповідно, фрагментарний ланцюг називають ланцюгом, що запізнюється. Середня швидкість реплікації на одну реплікативну вилку становить ~750 нуклеотидів за секунду в бактерій, 60-90 нуклеотидів за секунду в еукаріотів. Синтез бактеріальної хромосоми відбувається за ~50 хв, повна реплікація ДНК еукаріотичної клітини – за кілька годин.

Ділянку ДНК, де здійснюється реплікація, яка розпочинається з однієї точки, називають **репліконом**. Бактеріальна хромосома часто містить тільки один ориджин (зокрема, в E. coli) – являє собою єдиний реплікон. У деяких бактерій може бути два реплікони на хромосому. Еукаріотична хромосома є полірепліконом – містить велику кількість точок ініціації. Загалом геном, наприклад ссавців, містить близько 40 тис. ориджинів. Розмір еукаріотичного реплікона варіює від 50 до 200 тис. пар основ, що збігається з розмірами петельних доменів хроматину. Отже, *хроматинова петля* – це один реплікон, а ориджин збігається з ділянкою, асоційованою з ядерним матриксом. Сусідні реплікони еукаріотичної хромосоми врешті-решт "зустрічаються", унаслідок чого утворюються дві копії ДНК хромосоми.

Більшість ДНК-полімераз мають дві ферментативні активності: власне полімеразну, за рахунок якої до 3’-кінця ланцюга, що синтезується, приєднуються нуклеотиди, і 3’-екзонуклеазну, яка використовується для редагування помилок – відщеплення помилкових нуклеотидів, щойно приєднаних до 3’-кінця. ДНК-полімераза є прецизійним молекулярним пристроєм: її полімеразний активний центр забезпечує впізнання комплементарного нуклеотиду в складі матриці нуклеозидтрифосфатом, приєднує цей черговий нуклеотид до зростаючого ланцюга і пересувається на один нуклеотид уперед уздовж матриці, знову повторюючи вказані операції з наступним нуклеотидом.

Дві ДНК-полімерази, що працюють у реплікативній вилці, об’єднані в складний мультибілковий комплекс – **реплісому**, компонентами якої є також інші важливі структурні та функціональні модулі: ДНК-геліказа – АТР-залежна молекулярна машина, що руйнує подвійну спіраль попереду від реплікативної вилки; праймаза, яка забезпечує синтез праймера – короткої ділянки РНК на початку кожного фрагмента Оказакі, після чого праймер подовжується ДНК-полімеразою (сама ДНК-полімераза не здатна ініціювати синтез нуклеїнової кислоти, а може тільки продовжувати синтез праймера); компоненти, що сприяють утриманню ДНК-полімераз у реплікативній вилці тощо.

У клітині прокаріот працюють ДНК-полімерази трьох типів (позначаються римськими цифрами). Основна реплікативна полімераза – ДНК-полімераза ІІІ. ДНК-полімераза ІІ – полімераза низької точності, яка використовується в певних репараційних процесах.ДНК-полімераза І (або полімераза Корнберга), на відміну від інших ДНК-полімераз, має також додаткову 5’-екзонуклеазну активність, саме ця полімераза й використовується при з’єднанні фрагментів Оказакі під час реплікації (видаляє праймер і заповнює прогалину), а також при репараційних процесах синтезу ДНК.

У еукаріот п’ять типів ДНК-полімераз високої точності прийнято позначати грецькими літерами. Основними ДНК-синтезуючими (під час реплікації та репарації) є ДНК-полімерази δ і ε. Вони ж заповнюють прогалину між фрагментами Оказакі, що утворюється після видалення праймера певною нуклеазою. Полімераза α використовується як праймаза при ініціації синтезу лідируючого ланцюга й кожного фрагмента Оказакі (синтезує РНК-праймер і трохи подовжує його як ДНК). Полімераза β використовується при ексцизійній репарації основ Полімераза γ  реплікативна ДНК-полімераза мітохондрій.

В еукаріотичних клітинах працює ще досить велика кількість ДНК-полімераз низької точності (ζ, η, ι, κ), функція яких полягає в забезпеченні синтезу ДНК у випадку пошкодження матриці.

Характерною особливістю еукаріотичної системи реплікації є те, що подвоюється не кільцева, як у прокаріотів, а лінійна молекула ДНК – така, що має два кінці. Унаслідок цієї простої обставини на 3’-кінцях матричних ланцюгів ДНК залишаються одноланцюгові хвости, що піддаються швидкій нуклеазній деградації, після кожної реплікації ДНК повинна вкоротитися.

**РЕПАРАЦІЯ ДНК**

Репарація ДНК – один із загальних біологічних процесів, спрямований на виправлення помилок синтезу ДНК при реплікації, а також численних пошкоджень, що виникають у ДНК унаслідок дії хімічних і фізичних факторів.

До таких пошкоджень відносять різноманітні хімічні модифікації азотистих основ, ковалентні зшивки сусідніх піримідинів (утворення піримідинових, найчастіше тимінових, димерів) під дією ультрафіолетового випромінювання, одно- і дволанцюгові розриви, що виникають під дією іонізуючої радіації та вільних радикалів тощо. Часто системи репарації працюють під час або відразу після реплікації. Більшість репараційних процесів передбачає видалення пошкодженої одноланцюгової ділянки з наступним синтезом ДНК за допомогою ДНК-полімераз. Але є й такі процеси, що пов’язані з безпосереднім "виправленням" пошкодженого елемента за рахунок прямої дії певних ферментів (пряма репарація).

Жодна репараційна система не має 100-відсоткової ефективності – частина пошкоджень залишається в ДНК, унаслідок чого відбуваються заміни нуклеотидів, утрати ділянок послідовності та інші порушення спадкової програми – **мутації.** Зрозуміло, що порушення репараційних систем приводять до підвищення частоти мутацій – прискорення мутаційного процесу.

**Пряма репарація**

Найочевиднішим випадком прямої репарації є зшивання одноланцюгового розриву ДНК лігазою.

Іншим спільним для більшості живих організмів (за винятком, наприклад, ссавців) шляхом прямої репарації є так звана фотореактивація – руйнування піримідинових димерів (рис. 1.20), індукованих ультрафіолетовим світлом, ферментом фотоліазою. Фотоліаза здатна поглинати світло, що зумовлює активацію ферменту. Тобто світло, викликаючи утворення піримидинових димерів, одночасно активує фотоліазу, яка каталізує розрив ковалентних зв’язків між сусідніми піримідинами (рис. 1.20) і, таким чином, відновлення структури ДНК.

**Ексцизійна репарація**

Більш радикальним і ефективним шляхом виправлення порушень нуклеотидів є ексцизійна репарація, коли пошкоджена одноланцюгова ділянка вирізається з ДНК, а інший ланцюг використовується далі як матриця для нового синтезу. Існує два варіанти такої репарації.

Ексицизійна репарація азотистих основ відбувається в усіх організмів, модифікована азотиста основа розпізнається ферментом, який відщеплює її від дезоксирибози. У ДНК залишається так званий АП-сайт – апуриновий / апіримідиновий. Ще два ферменти видаляють дезоксирибозу в АП-сайті, і в ДНК залишається прогалина довжиною в один нуклеотид. Ця прогалина заповнюється ДНК-полімеразою β (в еукаріотів), яка приєднує нуклеотид до 3’-ОН групи попереднього нуклеотиду ланцюга. Фосфодіефірний зв’язок приєднаного нуклеотиду з наступним нуклеотидом ланцюга відновлюється лігазою. У прокаріотів заповнення прогалини здійснюється ДНК-полімеразою І.

Ексцизійна репарація нуклеотидів – це шлях, пов’язаний із вирізанням одноланцюгової ділянки ДНК, яка містить пошкодження (модифіковану основу, тиміновий димер тощо).

**Репарація некомплементарних пар основ – місметчів**

Незважаючи на редагування помилок під час реплікації, певна кількість невірно спарених основ залишається в синтезованих ланцюгах ДНК. Зрозуміло, що при репарації таких місметчів (mismatch) із двох некомплементарних нуклеотидів замінити слід саме той, що входить до синтезованого, а не до матричного ланцюга. У бактеріальній клітині за репарацію місметчів відповідає система mutHLSU. Система mutHLSU є консервативною, гомологічні білки присутні також і в еукаріотів. Метилювання аденіну не використовується для дискримінації ланцюгів: білки еукаріотичної системи репарації місметчів пов’язані з реплісомою та ланцюгами ДНК, що синтезуються, тобто спрацьовують безпосередньо під час реплікації.

**Неточний синтез ДНК**

Іноді в клітині активуються процеси, які прийнято також називати репарацією, хоча насправді вони є засобом здійснити реплікативний синтез ДНК, "не звертаючи уваги" на пошкодження її структури.

Реплікативна машинерія зазвичай зупиняється, зустрічаючи пошкодження у складі матриці. Якщо таких пошкоджень надто багато, й істинні репараційні системи не встигають їх виправити, перемикання на неточний синтез ДНК дає клітині шанс на виживання.

Пошкодження при цьому залишаються, що спричинює виникнення мутацій. Усі процеси такого типу зазвичай об’єднують під назвою SOS-репарації, або (що точніше) –механізмів синтезу ДНК, толерантних до пошкоджень (damage tolerance mechanisms).

У прокаріотів перемикання на неакуратний синтез, який дозволяє долати перешкоди, відбувається завдяки заміні ДНК-полімерази ІІІ на полімеразу низької точності синтезу – ДНК-полімеразу V (полімераза активується у відповідь на несприятливі умови, скажімо, на ультрафіолетове опромінювання). Ця полімераза вставляє напроти тимінового димеру два довільні нуклеотиди (виникає мутація), після чого замінюється на ДНК-полімеразу ІІІ, яка продовжує точний синтез. Крім того, долати невеликі одноланцюгові прогалини при SOS-репарації допомагає ДНК-полімераза ІІ – інша полімераза низької точності. Аналогічним чином перемикання на полімерази низької точності відбувається й в еукаріотів у разі наявності в матриці пошкоджених основ, піримідинових димерів тощо.

Інший шлях здійснення реплікації, оминаючи пошкодження у складі матриці, отримав назву ***постреплікативної (рекомбінаційної) репарації***. За наявності пошкодження (наприклад, тимінового димеру) реплісома може його "обійти", залишивши прогалину в ланцюзі, що синтезується (рис. 1.24). У цьому випадку на її місце шляхом гомологічної рекомбінації (про неї йтиметься у відповідному підрозділі) вставляється ділянка сестринської молекули ДНК. Прогалина, що залишається при цьому в сестринській молекулі, легко заповнюється ДНК-полімеразою.

Як і при SOS-репарації, пошкодження залишається і може бути виправлено пізніше завдяки ексцизійній репарації.

**Репарація дволанцюгових розривів**

Точна репарація дволанцюгового розриву ДНК можлива лише під час або відразу після реплікації, коли розірвана ділянка може бути відновлена завдяки використання сестринської молекули як матриці за механізмом гомологічної рекомбінації.

В інших випадках цілісність розірваних молекул ДНК відновлюється в консервативному для всіх організмів процесі, який називається негомологічним з'єднанням кінців. З’єднуються при цьому будь-які кінці ДНК, що, за наявності великої кількості розривів, приводить до об’єднання ділянок різних хромосом – хромосомних перебудов (розділ 4).

Ключову роль у процесі NHEJ відіграють білки Ku, які розпізнають кінці ДНК, об’єднують їх у нековалентний комплекс і рекрутують до нього низку інших білків. У складі комплексу відбувається розплітання кінцевих ділянок ДНК і пошук мікрогомології – коротких комплементарних (чи майже комплементарних) одноланцюгових ділянок, котрі належать різним молекулам. У результаті утворюється короткий дуплекс, зайві одноланцюгові ділянки відщеплюються нуклеазами, лігаза зшиває одноланцюгові розриви. Таким чином, у процесі з’єднання відбувається втрата кількох пар основ.

ГОМОЛОГІЧНА РЕКОМБІНАЦІЯ ДНК

Суттєвим моментом існування ДНК у живих системах є не тільки процеси відновлення та збереження інформації, яка міститься в послідовності нуклеотидів, а й різноманітні дії, спрямовані на перетасування цієї інформації з метою створення нових комбінацій генів.

Найважливішою серед подібних операцій **є гомологічна рекомбінація** – обмін ділянками між досить довгими молекулами ДНК із гомологічними послідовностями пар основ. Такий процес відбувається в усіх організмів, котрі розмножуються статевим шляхом, між гомологічними хромосомами при мейозі (у процесі утворення статевих клітин).

Також гомологічна рекомбінація можлива в парах гомологічних дочірніх молекул ДНК при реплікації в соматичних клітинах (мітотична рекомбінація) і в прокаріотів, скажімо, після кон’югації двох бактеріальних клітин і проникнення ДНК із однієї в іншу (див. розділ 5).

Необхідною умовою для здійснення гомологічної рекомбінації є гомологія послідовностей між двома молекулами ДНК по всій довжині. Ініціюючою подією є *дволанцюговий розріз* в одній із гомологічних молекул (здійснюється спеціальними ферментами).

Під час рекомбінації відновлення цілісності ДНК є тільки завершенням початкового етапу. У результаті інвазії та репараційного синтезу дві молекули ДНК об’єднуються, утворюючи два перехрещення ланцюгів – **дві структури Холідея** (Robin Holliday). Кожна така структура може переміщуватись (так звана міграція гілки), результатом чого є подовження *гетеродуплекса* – подвійної спіралі між двома майжне комплементарними ланцюгами двох гомологічних молекул ДНК.

Незалежно від того, чи відбулася рекомбінація, усі продукти містять гетеродуплекси (середня частина всіх кінцевих молекул на

Оскільки гетеродуплекси складаються з *майже* комплемен-

тарних ланцюгів, вони містять місметчі. Відповідно, кінцевою опе-

рацією, яка завершує процес гомологічної рекомбінації, є репарація

цих місметчів описаною вище системою mutHLSU. На відміну від

того, як ця система спрацьовує після реплікації, після рекомбінації

ланцюг, де відбувається заміна нуклеотидів, обирається випадково,

наприклад, центральний фрагмент першої молекули на рис. 1.28

перетворюється або на В/В’, або на b/b’. Якщо на цій ділянці розта-

Генетика

**46**

шований ген, шляхом репарації обирається один із його алелів .

В чи b. Отже, ефектом рекомбінації може бути явище ***конверсії гена*** .

заміни одного алеля на інший.

**Кросинговер**

Іншим наслідком рекомбінації є обмін ділянками між двома гомо-

логічними хромосомами . ***кросинговер*** (рис. 1.29). Під час процесу ре-

комбінації кросинговер між двома хромосомами може відбутися (і час-

то відбувається) у кількох точках (рис. 1.29). Зрозуміло, що чим більшою

є відстань між двома хромосомними локусами, із тим вищою ймовір-

ністю відбудеться обмін ділянками десь між цими локусами, і тим

більшою буде кількість таких обмінів. Два локуси, що рознесені по

хромосомі на велику відстань, починають поводити себе як незалежні

(не зв’язані в одній хромосомі) спадкові елементи. У цьому, власне,

і полягає біологічне значення гомологічної рекомбінації (детальніше

ефекти кросинговеру описано в розділі 3.)

Серед інших процесів рекомбінації ДНК розрізняють сайт-

специфічну рекомбінацію (вирізання / вбудовування однієї молекули

ДНК з / в іншу за рахунок розпізнання специфічними білками корот-

ких елементів послідовності ДНК, див. розділ 5), незаконну рекомбі-

націю (об’єднання двох молекул ДНК, які не мають ані гомології, ані

специфічних елементів послідовності . основним механізмом є роз-

глянуте вище негомологічне з’єднання кінців) і переміщення в межах

геному мобільних елементів послідовності ДНК (розділ 6).