

ПРОБЛЕМА РЕПЛИКАЦИИ КОНЦОВ ЛИНЕЙНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК И ТЕЛОМЕРАЗА

Г. М. ДЫМШИЦ

Новосибирский государственный университет

DNA LINEAR END-REPLICATION PROBLEM AND TELOMERASE

G. M. DYMSHITS

Principles of replication and the problem of duplication of DNA linear molecule ends caused by the DNA-polymerases inability for primerless synthesis are considered. The mechanism of eukaryote chromosome DNA end elongation by telomerase is described. The role of cell telomerase activity in the determination of their proliferative potential is discussed.

Рассмотрены принципы репликации и проблема удвоения концов линейных молекул ДНК, связанная с неспособностью ДНК-полимераз вести беззатравоочный синтез. Изложен механизм работы фермента теломеразы, наращивающего концы ДНК хромосом эукариот. Обсуждается роль активности теломеразы клеток в детерминации их пролиферативного потенциала.

www.issep.rssi.ru

ВВЕДЕНИЕ

Преемственность генетического материала в поколениях клеток и организмов обеспечивается процессом *репликации* — удвоения молекул ДНК. В результате этого сложного процесса, осуществляемого комплексом нескольких ферментов и не обладающих каталитической активностью белков, необходимых для придания полинуклеотидным цепям нужной конформации, образуются две идентичные двойные спирали ДНК. Эти так называемые “дочерние” молекулы ничем не отличаются друг от друга и от исходной “материнской” молекулы ДНК. Репликация происходит в клетке перед делением, поэтому каждая дочерняя клетка получает точно такие же молекулы ДНК, какие имела материнская клетка [1].

“Проблема концевой репликации” заключается в том, что все известные ДНК-полимеразы, являющиеся ключевыми ферментами сложного репликативного белкового комплекса, неспособны полностью реплицировать концы линейных молекул ДНК. Для того чтобы клетки не теряли при делении часть генетического материала, 3'-концы ДНК хромосом эукариот нарастают перед каждым раундом репликации короткими повторяющимися последовательностями. Это осуществляется ферментами — *теломеразами*.

ПРИНЦИПЫ РЕПЛИКАЦИИ

Процесс репликации ДНК основан на следующих принципах.

Комплементарность. Каждая из двух цепей “материнской” молекулы ДНК служит матрицей для синтеза дополняющей ее, то есть комплементарной, “дочерней” цепи (рис. 1).

Полуконсервативность. В результате репликации образуются две двойные дочерние спирали, каждая из которых сохраняет (консервирует) в неизменном виде одну из цепей материнской ДНК. Вторые цепи дочерних молекул синтезируются из дезоксирибонуклеотидов заново по принципу комплементарности к нитям

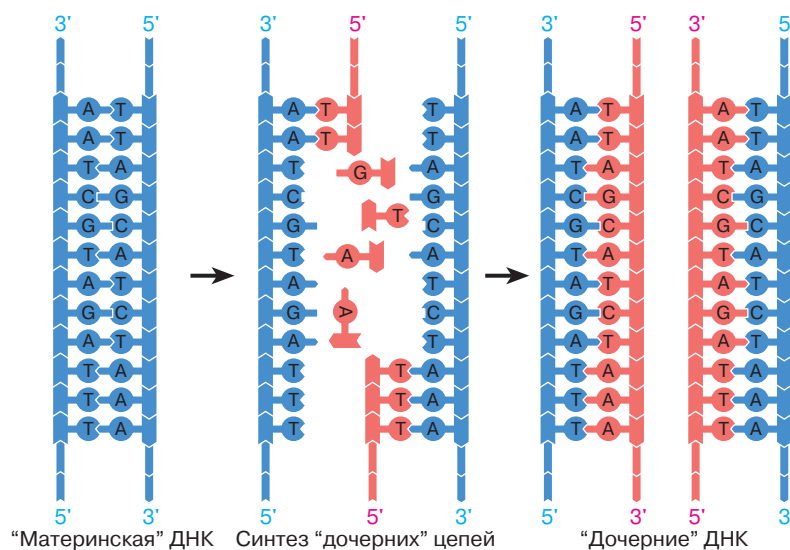


Рис. 1. Образование полуконсервативных дочерних молекул ДНК в результате репликации. Синтез дочерних цепей идет в направлении $5' \rightarrow 3'$ комплементарно и антипараллельно цепям материнской молекулы

материнской ДНК. Дочерние ДНК ничем не отличаются друг от друга и от материнской двойной спирали (см. рис. 1).

Антипараллельность и униполярность. 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 ориентированы в противоположных направлениях — антипараллельно (см. рис. 1) (при параллельной ориентации напротив 3'-конца одной цепи находился бы 3'-конец другой). Ферменты, синтезирующие новые нити ДНК, называемые ДНК-полимеразами, могут передвигаться вдоль матричных цепей лишь в одном направлении — от их 3'-концов к 5'-концам. При этом синтез комплементарных нитей всегда ведется в $5' \rightarrow 3'$ направлении, то есть униполярно. Поэтому в процессе репликации одновременный синтез новых цепей идет антипараллельно (см. рис. 1).

ДНК-полимеразы могут давать “задний ход”, то есть двигаться в направлении $3' \rightarrow 5'$. В том случае, когда последнее добавленное при синтезе нуклеотидное звено оказалось некомплементарным нуклеотиду матричной цепи, оно будет замещено комплементарным нуклеотидом. Отщепив “неправильный” нуклеотид, ДНК-полимераза продолжает синтез в $5' \rightarrow 3'$ направлении. Такая способность к исправлению ошибок получила название корректорской функции фермента.

Прерывистость. Для того чтобы новые нити ДНК были построены по принципу комплементарности, двойная спираль должна быть раскручена и между родительскими цепями должны отсутствовать водородные связи. Только в этом случае ДНК-полимеразы способны двигаться по материнским нитям и использовать их в качестве матрицы для безошибочного синтеза дочерних цепей. Но полное раскручивание спиралей, состоящих из многих миллионов пар нуклеотидов, сопряжено со столь значительным количеством вращений и такими энергетическими затратами, которые невозможны в условиях клетки. Поэтому репликация начинается одновременно в нескольких местах молекулы ДНК. Участок между двумя точками, в которых начинается синтез дочерних цепей, называется *репликоном* (рис. 2). В эукариотической клетке в каждой молекуле ДНК в зависимости от размеров имеются, как правило, тысячи репликонов. Репликоны в одной молекуле активируются по расписанию, заданному генетической программой.

В каждом репликоне можно видеть *репликативную вилку* — ту часть молекулы ДНК, которая под действием специальных ферментов уже распелась (рис. 2 и 3). Каждая нить в вилке служит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепи. В ходе репликации вилка перемещается вдоль материнской молекулы, при этом расплетаются новые участки ДНК. Так как ДНК-полимеразы могут двигаться лишь в одном направлении вдоль матричных нитей, а нити ориентированы антипараллельно, то в каждой вилке одновременно ве-

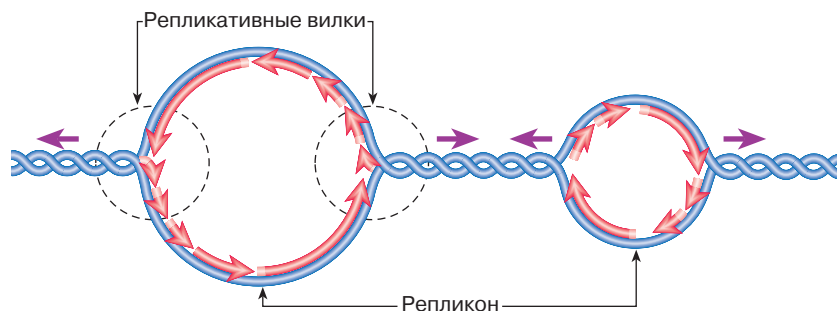


Рис. 2. Репликация ДНК эукариотической хромосомы. Показан один из многих репликонов. Репликативные вилки движутся в противоположных направлениях от точки начала репликации

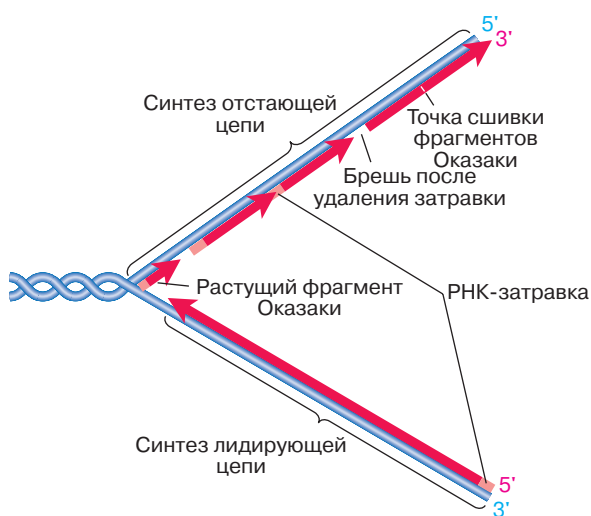


Рис. 3. Схема образования дочерних цепей ДНК в репликативной вилке. Лидирующая цепь синтезируется непрерывно, отстающая цепь сшивается из фрагментов Оказаки после удаления РНК-затравок и заделывания брешей

дуг синтез два по-разному организованных репликативных ферментативных комплекса. Одна дочерняя цепь (лидирующая) растет непрерывно, а другая (отстающая) — в виде фрагментов длиной в несколько сот нуклеотидов (см. рис. 3), названных в честь открывшего их японского ученого *фрагментами Оказаки*. После действия ферментов, изменяющих структуру фрагментов, они сшиваются ДНК-лигазой, образуя непрерывную цепь. Механизм синтеза дочерних цепей ДНК фрагментами называют прерывистым.

Потребность в затравке. ДНК-полимераза не способна начать синтез ни лидирующей цепи, ни фрагментов Оказаки отстающей цепи. Она может лишь наращивать уже имеющуюся полинуклеотидную нить, последовательно присоединяя дезоксирибонуклеотиды к ее 3'-ОН-концу. Откуда же берется начальный 5'-кон-

цевой участок растущей цепи? Его синтезирует особая форма РНК-полимеразы, называемая *ДНК-праймазой* (от англ. primer — затравка). Размер рибонуклеотидной затравки невелик (< 20 нуклеотидов) в сравнении с размером цепи ДНК, образуемой ДНК-полимеразой. Выполнив свою функцию РНК-затравка удаляется специальным ферментом, а образованная при этом бреши заделывается ДНК-полимеразой, использующей в качестве затравки 3'-ОН-конец соседнего фрагмента Оказаки (см. рис. 3).

Удаление крайних РНК-праймеров, комплементарных 3'-концам обеих цепей линейной “материнской” молекулы ДНК, приводит к тому, что дочерние цепи оказываются короче на 10–20 нуклеотидов (у разных видов размер РНК-затравок различен). В этом и заключается проблема недорепликации концов линейных молекул. В случае репликации кольцевых бактериальных ДНК этой проблемы не существует, так как первые по времени образования РНК-затравки удаляются ферментом, который одновременно заполняет образующуюся брешь путем наращивания 3'-ОН-конца растущей цепи ДНК, направленной в “хвост” удаляемому праймеру.

Проблема недорепликации 3'-концов линейных молекул ДНК решается эукариотическими клетками с помощью специального фермента — *теломеразы*.

КАК РАБОТАЕТ ТЕЛОМЕРАЗА

В статье А.А. Богданова [2] подробно рассказано о строении теломеразы и принципах функционирования этого фермента. В 1985 году он был обнаружен у равноресничной инфузории *Tetrahymena thermophila*, а впоследствии — в дрожжах, растениях и животных, в том числе в яйцниках человека и иммортализованных (бессмертных) линиях раковых клеток *HeLa*. Теломераза является ДНК-полимеразой, достраивающей 3'-концы линейных молекул ДНК хромосом короткими (6–8 нуклеотидов) повторяющимися последовательностями (у

позвоночных ТTAGGG). Согласно номенклатуре, этот фермент называют ДНК-нуклеотидилэкзотрансферазой или теломерной терминальной трансферазой. Помимо белковой части теломераза содержит РНК, выполняющую роль матрицы для наращивания ДНК повторами [3]. Длина теломеразной РНК колеблется от 150 нуклеотидов у простейших до 1400 нуклеотидов у дрожжей, у человека — 450 нуклеотидов. Сам факт наличия в молекуле РНК последовательности, по которой идет матричный синтез куска ДНК, позволяет отнести теломеразу к своеобразной обратной транскриптазе, то есть ферменту, способному вести синтез ДНК по матрице РНК.

В результате того что после каждой репликации дочерние цепи ДНК оказываются короче материнских на размер первого РНК-праймера (10–20 нуклеотидов), образуются выступающие одонитевые 3'-концы материнских цепей. Они-то и узнаются теломеразой, которая последовательно наращивает материнские цепи (у человека на сотни повторов), используя 3'-ОН-концы их в качестве затравок, а РНК, входящую в состав фермента, в качестве матрицы. Образующиеся длинные одноцепочечные концы, в свою очередь, служат матрицами для синтеза дочерних цепей по традиционному репликативному механизму (рис. 4).

Схема удлинения концов линейных молекул ДНК представлена на рис. 5. Сначала происходит комплементарное связывание выступающего конца ДНК с матричным участком теломеразной РНК, затем теломераза наращивает ДНК, используя в качестве затравки

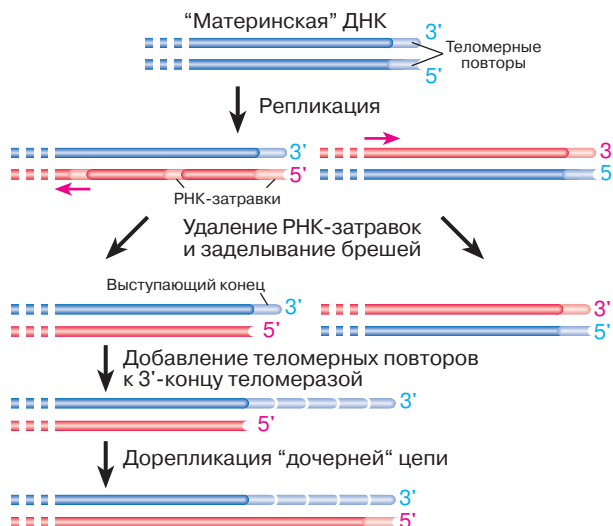


Рис. 4. Наращивание концов ДНК хромосом эукариот тельмерными повторами. Изображен один из концов хромосомы, другой удлиняется по такой же схеме

ее 3'-ОН-конец, а в качестве матрицы — РНК, входящую в состав фермента. Эта стадия называется элонгацией. После этого происходит транслокация — перемещение ДНК, удлиненной на один повтор, относительно фермента. Следом идет элонгация и очередная транслокация.

В результате образуются специализированные концевые структуры хромосом — *тельмеры* [2]. Они состоят

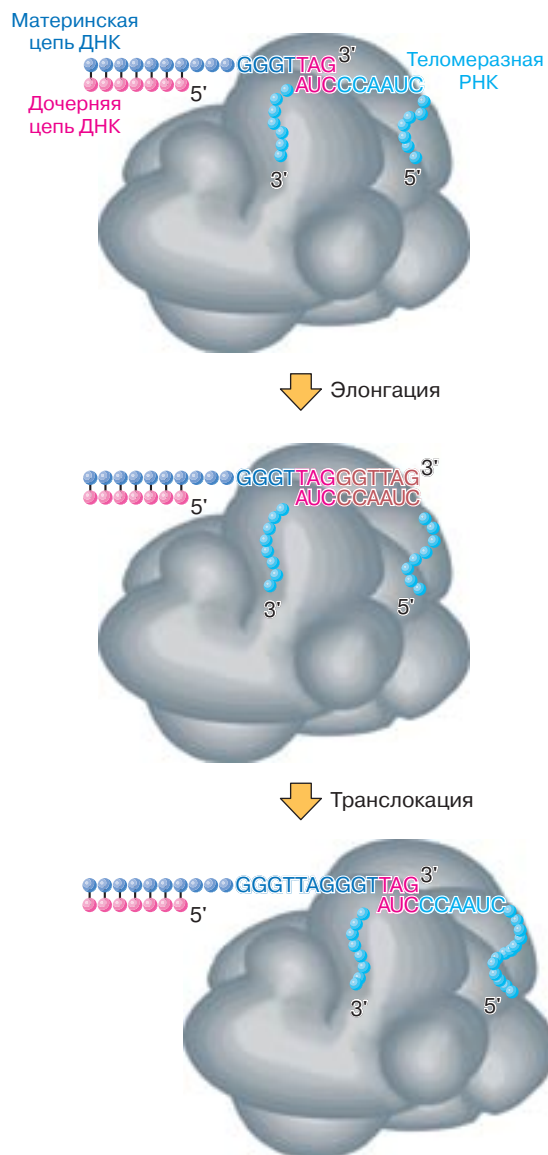


Рис. 5. Схема удлинения 3'-конца ДНК с помощью РНК-содержащего фермента — теломеразы. Красным цветом выделены спаренные комплементарные нуклеотиды выступающего конца ДНК и матричного участка теломеразной РНК

из многократно повторенных коротких последовательностей ДНК и теломерсвязывающих белков. Поскольку теломерные последовательности нуклеотидов не являются кодирующими, они выступают в роли буферной зоны как защита от проблемы концевой репликации. Укорочение ДНК в ходе каждого раунда репликации лишь сокращает нетранскрибируемый текст теломеры, но не приводит к утрате смысловых последовательностей — генов и регуляторов их экспрессии. Таким образом, репликация обеспечивает передачу генетического материала в поколениях клеток и организмов.

ТЕЛОМЕРАЗА И “КЛЕТОЧНОЕ БЕССМЕРТИЕ”

Еще в 1971 году отечественный ученый А.М. Оловников в своей теории маргинотомии (от лат. *marginalis* — краевой, *tome* — сечение) [4] предположил, что постепенное укорочение ДНК хромосом при репликации может лежать в основе ограниченного потенциала удвоения, наблюдаемого у нормальных соматических клеток, растущих в культуре *in vitro*, так называемого “лимита Хейфлика”. Американский ученый Леонард Хейфлик в начале 60-х годов показал, что если для культивирования взять клетки новорожденных детей, то они могут пройти 80–90 делений, в то время как соматические клетки от 70-летних делятся только 20–30 раз. Ограничение на число клеточных делений и называют лимитом Хейфлика.

Хромосомы соматических клеток человека несут на концах многократно повторенные гексамеры — TTAGGG, общая длина которых может достигать 10 тыс. пар нуклеотидов. В комплексе со специфическими белками такие tandemные повторы образуют теломеры, защищающие концы ДНК от действия экзонуклеаз, предотвращающие неправильную рекомбинацию и позволяющие концам хромосом прикрепляться к ядерной оболочке. Известно, что в ходе пассирования некоторых клонов нормальных клеток (например, фибробластов человека) происходит укорочение теломер в среднем на 50 пар нуклеотидов за каждый цикл деления. Подобное укорочение хромосом происходит *in vivo* в лейкоцитах периферической крови, клетках эпидермиса кожи, в эпителии толстого кишечника человека.

А.М. Оловников выдвинул гипотезу о существовании особого биологического механизма, решающего проблему концевой репликации, предположив, что он действует в клетках организмов, размножающихся вегетативным путем, а также в половых и раковых клетках, но не работает в большинстве наших соматических клеток. Нарастивание теломеразой концов линейных молекул и есть этот механизм.

Активность теломеразы у высших эукариот обнаружена лишь в трех типах клеток: генеративных, рако-

вых и линиях immortalized клеточных культур. В организме при дифференцировке клеток теломераза репрессируется. Экспрессию теломеразы считают фактором immortalization клеток.

В соматических клетках, культивируемых *in vitro*, теломераза не работает и теломеры постепенно укорачиваются. Длина теломер достоверно коррелирует с пролиферативным потенциалом (например, в фибробластах человека). Укорочение теломер может играть роль митотических часов, отсчитывающих число делений клетки. По достижении критической длины теломерной ДНК запускаются процессы остановки клеточного цикла [5].

Опубликованная в 1998 году в журнале “Science” статья американских исследователей благодаря средствам массовой информации привлекла внимание не только ученых (а в первую очередь не ученых) в связи с проблемами старения и “клеточного бессмертия”. В этой прекрасной работе коллектива, возглавляемого Джерри Шеером, удалось на 40% увеличить число делений нормальных соматических клеток человека в культуре. С помощью генно-инженерных методов в клетки был введен ген каталитической белковой субъединицы теломеразы и прилегающий к нему участок ДНК, регулирующий его работу. При активной работе гена увеличивался как размер теломерной ДНК, так и продолжительность жизни клеточных культур. Сверх обычных 50 делений клетки прошли дополнительно 20 делений.

Укорочение теломер можно рассматривать как молекулярный индикатор количества делений, но не старения клетки. Так, на культуре нормальных фибробластов человека, взятых от доноров в возрасте от 0 до 93 лет, выявили корреляцию между начальной длиной теломер и пролиферативной способностью клетки во всем диапазоне возрастов. А размер теломерной ДНК сперматозоидов не уменьшался в соответствии с возрастом мужчины, что говорит об экспрессии теломеразы в линии половых клеток. Прекращение работы теломеразы, отмечаемое в подавляющем большинстве дифференцированных соматических клеток животных, является свидетельством их зрелости, а стало быть, и неизбежно следующих затем процессов увядания и гибели.

Старение особи — это нормальная биологическая функция, способствующая прогрессивной эволюции вида, размножающегося половым путем. Давление естественного отбора ослабевает после достижения животным репродуктивного успеха, поскольку существование особи после этого имеет меньшее значение для вида. Смерть от старости удаляет из популяции выполнивших свою роль предков и дает простор потомкам — носителям новых полезных признаков. Как любая важная биологическая функция, старение обусловлено параллельным действием нескольких молекуляр-

ных механизмов [6]. Выключение теломеразы — лишь один из них.

Не стоит рассматривать гены, кодирующие белковые субъединицы теломеразы и входящую в ее состав РНК, как “гены бессмертия”. Поддержание длины теломерной ДНК на определенном уровне зависит не только от взаимодействия с ней теломеразы и теломерсвязывающих белков, но и некоторых, пока неизвестных факторов, регулирующих образование самих компонентов теломеробразующего комплекса.

Вряд ли бессмертие, достигнутое раковыми клетками, размножающимися в культуре десятилетиями без укорочения теломер, — это то, к чему нужно стремиться. Лекарства от смерти нет. Но тот факт, что введение в такие клетки препаратов, связывающих РНК-компонент теломеразы, приводит к укорочению теломер с последующей гибелью клеток, вселяет надежду на появление новых средств борьбы с раком.

Понимание механизма работы теломеразы, а главное, регуляции экспрессии ее в клетке приблизит нас к пониманию процессов и злокачественной трансформации и старения.

Автор благодарен студенту НГУ М.К. Иванову за творческий подход при подготовке иллюстративного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фаворова О.О. Сохранение ДНК в ряду поколений: репликация ДНК // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 4. С. 11–17.
2. Богданов А.А. Теломеры и теломераза // Там же. 1998. № 12. С. 12–18.
3. Докудовская С.С., Петров А.В., Донцова О.А., Богданов А.А. Теломераза — необычный РНК-содержащий фермент // Биохимия. 1997. Т. 62, № 11. С. 1411–1422.
4. Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Докл. АН СССР. 1971. Т. 201, № 6. С. 1496–1499.
5. Хейфлик Л. Смертность и бессмертие на клеточном уровне // Биохимия. 1997. Т. 62, № 11. С. 1380–1393.
6. Скулачев В.П. Старение организма — особая биологическая функция, а не результат поломки сложной живой системы // Там же. С. 1394–1399.

Рецензенты статьи Л.И. Корочкин, В.В. Власов

* * *

Григорий Моисеевич Дымшиц, доктор биологических наук, профессор кафедры молекулярной биологии Новосибирского государственного университета, зав. лабораторией структуры генома Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Область научных интересов — структурно-функциональная организация генома, химическая модификация нуклеиновых кислот. Автор более 130 научных публикаций. Соавтор и соредатор четырех школьных учебников по общей биологии.