

PERPETUATION OF DNA:
DNA REPLICATION

O. O. FAVOROVA

The DNA capability for self-reproduction (replication) provides a conservation of the genetic information from generation to generation. This article is devoted to the molecular mechanisms of reproduction of DNA double helices without mistakes. The complicated replication machinery involving variety of proteins is described.

Способность ДНК к самовоспроизведению (репликации) обеспечивает сохранение генетической информации в ряду поколений. Статья посвящена молекулярным механизмам, гарантирующим практически безошибочную репликацию двойной спирали ДНК. Описано строение сложной "репликационной машины", состоящей из множества белков.

СОХРАНЕНИЕ ДНК
В РЯДУ ПОКОЛЕНИЙ:
РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

О. О. ФАВОРОВА

Российский государственный медицинский университет,
Москва

ВВЕДЕНИЕ

Способность клеток поддерживать высокую упорядоченность своей организации зависит от генетической информации, которая сохраняется в форме дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). ДНК — это вещество, из которого состоят гены. Размножение живых организмов, передача наследственных свойств из поколения в поколение и развитие многоклеточного организма из оплодотворенной яйцеклетки возможны потому, что ДНК способна к самовоспроизведению. На языке молекулярной биологии — науки, изучающей молекулярные основы жизнедеятельности клетки, процесс самовоспроизведения ДНК называется *репликацией*. Иногда используют также название-синоним — редупликация. Представление о молекулах ДНК как о потенциально вечных репликаторах привело к парадоксальной идее, что живые организмы — лишь "машины для выживания", запрограммированные на сохранение эгоистичных молекул, известных под названием генов [1]. Статья посвящена молекулярным механизмам, обеспечивающим репликацию ДНК. Мы увидим, что для репликации ДНК требуется участие множества белков. Эти белки, как и все другие, закодированы в последовательности ДНК. Таким образом, возникает важнейшая для жизни "петля обратной связи": ДНК направляет синтез белков, которые синтезируют (реплицируют) ДНК.

МАТРИЧНЫЙ СИНТЕЗ ДНК

Как известно, генетическая информация записана в цепи ДНК в виде последовательности нуклеотидных остатков, содержащих одно из четырех гетероциклических оснований: аденин (А), гуанин (G), цитозин (С) и тимин (Т) (рис. 1). Предложенная Дж. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 году модель строения ДНК в форме регулярной двойной спирали (рис. 2) сразу же позволила понять принцип удвоения ДНК. Информационное содержание обеих цепей ДНК идентично, так как каждая из них содержит последовательность нуклеотидов, строго соответствующую последовательности другой цепи. Это соответствие достигается благодаря наличию водородных связей между направленными навстречу друг другу основаниями двух цепей — попарно G и C или A и T. Описывая это свойство двойной спирали,

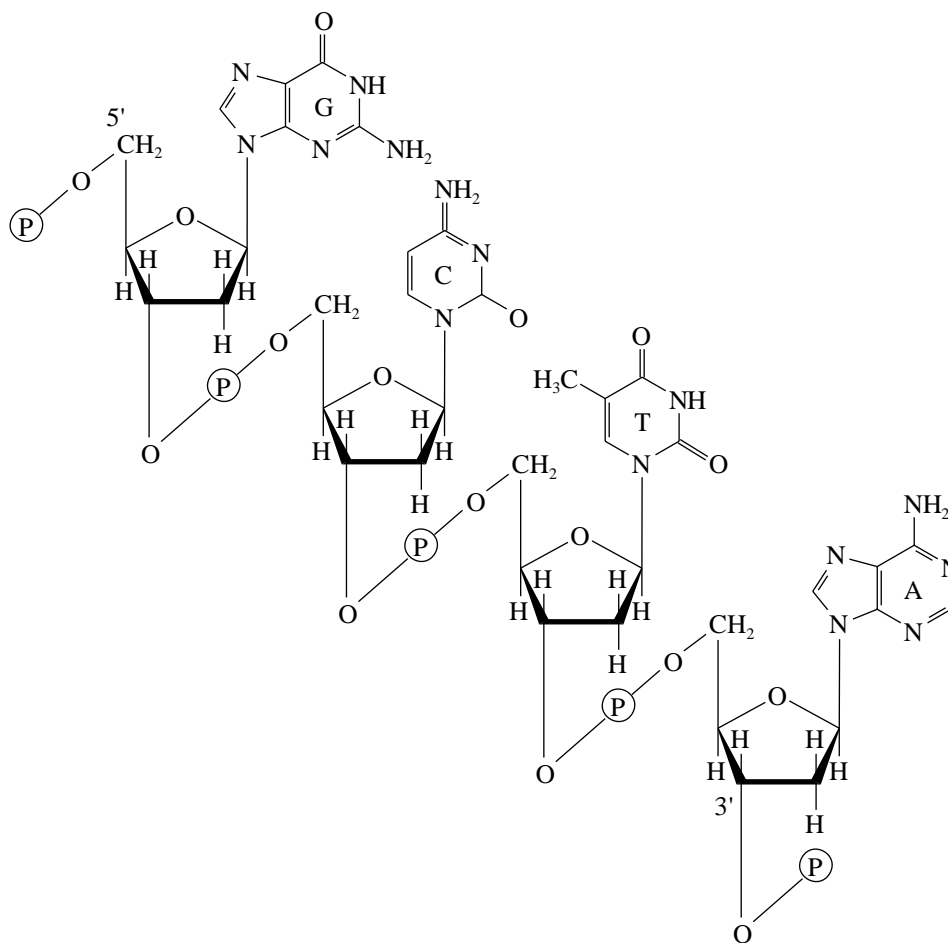


Рис. 1. Фрагмент полинуклеотидной цепи ДНК. Пуриновые основания аденин (А) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (Т) и цитозин (С) являются боковыми группами, прикрепленными на одинаковом расстоянии друг от друга к полимерному остову, состоящему из чередующихся остатков фосфата и сахара дезоксирибозы; этот остов полярен, поскольку имеет неравноценные 5'- и 3'-концы.

молекулярные биологи говорят, что цепи ДНК *комплементарны* за счет образования уотсон-криковских пар G–С и А–Т. Поскольку две цепи имеют противоположную направленность, их называют *антипараллельными*. Легко представить, что удвоение ДНК происходит вследствие того, что цепи расходятся, а потом каждая цепь служит матрицей, на которой собирается комплементарная ей новая цепь ДНК. В результате образуются две дочерние, двуспиральные, неотличимые по строению от родительской ДНК молекулы. Каждая из них состоит из одной цепи исходной родительской молекулы ДНК и одной вновь синтезированной цепи. Такой механизм репликации ДНК, при котором от одного поколения к другому передается одна из двух цепей, составляющих родительскую молекулу ДНК, получил название *полуконсервативного* и был экс-

периментально доказан в 1958 году М. Мезельсоном и Ф. Сталь.

ДНК-полимеразы

В 1957 году А. Корнберг обнаружил у кишечной палочки фермент, катализирующий процесс полимеризации ДНК из нуклеотидов; он был назван *ДНК-полимеразой*. Затем ДНК-полимеразы выявили и в других организмах. Было показано, что субстратами всех этих ферментов служат дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дНТФ), полимеризующиеся на одноцепочечной ДНК-матрице. ДНК-полимеразы последовательно наращивают одноцепочечную цепь ДНК, шаг за шагом присоединяя к ней следующие звенья в направлении от 5'- к 3'-концу, причем выбор очередного дНТФ диктуется матрицей (рис. 3). Присоединение каждого нового нуклеотидного

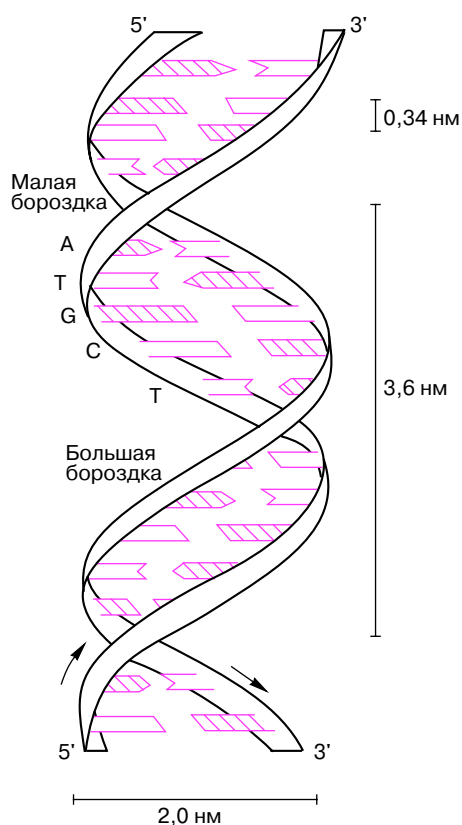


Рис. 2. Модель структуры ДНК по Уотсону и Крику. Две спиральные полинуклеотидные цепи закручены вправо вокруг общей оси. Основания изображены красным цветом; против каждого остатка пуринового основания (заштрихованы) одной цепи находится остаток пиримидинового основания другой цепи. На схеме показаны размеры спирали, наличие большой и малой бороздок и антипараллельность двух цепей ДНК. Исходно предполагалось, что на виток спирали приходится 10 пар оснований, или 3,4 нм. Последующие измерения показали, что виток соответствует 10,5 пар оснований, или 3,6 нм.

остатка к 3'-концу растущей цепи сопровождается гидролизом богатой энергией связи между первым и вторым фосфатными остатками в дНТФ и отщеплением пирофосфата, что делает реакцию в целом энергетически выгодной.

В клетках обычно присутствует несколько типов ДНК-полимераз, выполняющих различные функции и имеющих разное строение: они могут быть построены из различного количества белковых цепей (субъединиц), от одной до десятков. Однако все они работают на любых последовательностях нуклеотидов матрицы; задача этих ферментов – сделать точную копию каждой матрицы.

Точность синтеза ДНК и механизм коррекции

Генетический материал живых организмов имеет огромные размеры и реплицируется с высокой

точностью. В среднем в процессе воспроизведения генома млекопитающего, состоящего из ДНК длиной 3 млрд пар нуклеотидов, возникает не более трех ошибок [2]. При этом ДНК синтезируется чрезвычайно быстро (скорость ее полимеризации колеблется в пределах от 500 нуклеотидов/с у бактерий до 50 нуклеотидов/с у млекопитающих). Высокая точность репликации, наряду с ее высокой скоростью, обеспечивается наличием специальных механизмов, осуществляющих *коррекцию*, то есть устраняющих ошибки.

Суть механизма коррекции заключается в том, что ДНК-полимеразы дважды проверяют соответствие каждого нуклеотида матрице: один раз перед включением его в состав растущей цепи и второй раз перед тем, как включить следующий нуклеотид (см. рис. 3). Очередная фосфодиэфирная связь синтезируется лишь в том случае, если последний (3'-концевой) нуклеотид растущей цепи ДНК образовал правильную уотсон-криковскую пару с соответствующим нуклеотидом матрицы. Если же на предыдущей стадии реакции произошло ошибочное спаривание оснований, то дальнейшая полимеризация останавливается до тех пор, пока ошибка не будет исправлена. Для этого фермент перемещается в обратном направлении и вырезает последнее добавленное звено, после чего его место может занять правильный нуклеотид-предшественник. Иными словами, многие (но не все) ДНК-полимеразы обладают, помимо 5'-3'-синтетической активности, еще и 3'-гидролизующей активностью, которая обеспечивает удаление ошибочно спаренных с матрицей нуклеотидов.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РЕПЛИКАЦИИ

Основные правила, в соответствии с которыми происходит репликация, были выяснены в опытах с бактериями, однако они справедливы также и для высших организмов.

Инициация цепей ДНК

ДНК-полимеразы не могут начинать синтеза ДНК на матрице, а способны только добавлять новые дезоксирибонуклеотидные звенья к 3'-концу уже имеющейся полинуклеотидной цепи. Такую заранее образованную цепь, к которой добавляются нуклеотиды, называют *затравкой*. Короткую РНК-затравку (см. рис. 3) синтезирует из рибонуклеозидтрифосфатов фермент, не обладающий корректирующей активностью и называемый *ДНК-праймазой* (от англ. *primer* – затравка). Праймазная активность может принадлежать либо отдельному ферменту, либо одной из субъединиц ДНК-полимеразы. Затравка, синтезированная этим неточным ферментом, не умеющим исправлять ошибки, отличается от остальной новосинтезированной цепи ДНК, поскольку состоит из рибонуклеотидов, и далее может быть удалена. Образовавшиеся бреши за-

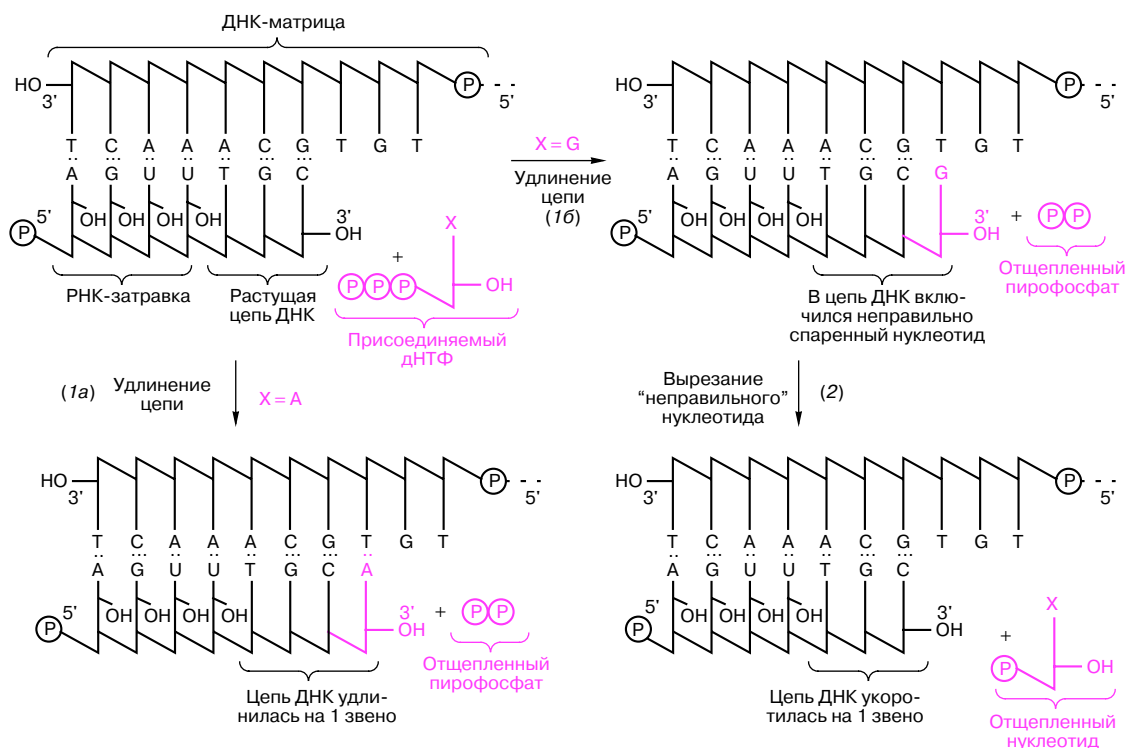


Рис. 3. ДНК-полимеразы катализируют при наличии РНК-затравки синтез ДНК из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ), комплементарных нуклеотидам ДНК-матрицы, наращивая цепь по одному звену (стадия 1а). Они проверяют правильность подбора последней пары оснований и в случае присоединения неправильно спаренного нуклеотида (стадия 1б) вырезают его (стадия 2). РНК-затравка отличается от ДНК структурой сахарного остатка (содержит вместо 2'-дезоксирибозы рибозу, что схематически отражено как наличие ОН-группы) и присутствием основания урацила (U) вместо тимина (T).

страиваются ДНК-полимеразой, а следовательно, с высокой точностью.

Расплетание двойной спирали ДНК

Поскольку синтез ДНК происходит на одноцепочечной матрице, ему должно предшествовать обязательное разделение (хотя бы на время) двух цепей ДНК. Исследования, проведенные в начале 60-х годов на реплицирующихся хромосомах, выявили особую, четко ограниченную область репликации, перемещающуюся вдоль родительской спирали ДНК и характеризующуюся местным расхождением двух ее цепей. Эта активная область из-за своей Y-образной формы была названа *репликационной вилкой*. Именно в ней ДНК-полимеразы синтезируют дочерние молекулы ДНК. С помощью электронной микроскопии реплицирующейся ДНК удалось установить, что область, которая уже реплицирована, имеет вид глазка внутри нереплицированной ДНК. Важно отметить, что *репликационный глазок* образуется только в тех местах молекулы, где находятся специфические нуклеотидные последовательности. Эти последовательности, получившие название *точек начала репликации*, состоят прибли-

зительно из 300 нуклеотидов. В зависимости от того, в одном или в двух направлениях происходит репликация (а это зависит от природы организма), глазок содержит одну или две репликационные вилки (рис. 4). Последовательное движение репликационной вилки приводит к расширению глазка.

Двойная спираль ДНК весьма стабильна; для того чтобы она раскрылась, необходимы особые белки. Специальные ферменты ДНК-*хеликазы* быстро движутся по одиночной цепи ДНК, используя для перемещения энергию гидролиза АТФ. Встречая на пути участок двойной спирали, они разрывают водородные связи между основаниями, разделяют цепи и продвигают репликационную вилку. Вслед за этим с одиночными цепями ДНК связываются специальные *дестабилизирующие спираль белки*, которые не позволяют одиночным цепям ДНК сомкнуться. При этом они не закрывают оснований ДНК, оставляя их доступными для спаривания.

Не следует забывать, что комплементарные цепи ДНК закручены друг вокруг друга в спираль. Следовательно, для того чтобы репликационная вилка могла продвигаться вперед, вся еще не удвоенная часть ДНК должна была бы очень быстро вращаться. Эта топологическая проблема решается

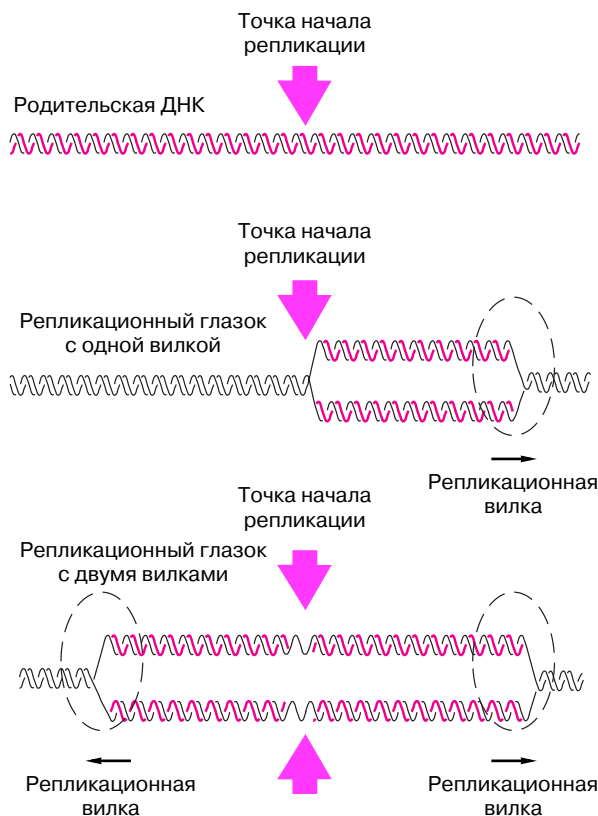


Рис. 4. Образование репликационного глазка с одной или двумя репликационными вилками. Стрелки показывают направление, в котором расплетается родительская ДНК. Красным обозначены новосинтезированные цепи дочерних молекул ДНК.

путем образования в спирали своего рода “шарниров”, позволяющих цепям ДНК раскрутиться. Принадлежащие к особому классу белки, называемые *ДНК-топоизомеразы*, вносят в цепь ДНК одно или двухцепочечные разрывы, позволяющие цепям ДНК разделиться, а затем заделывают эти разрывы. Топоизомеразы участвуют также в расщеплении зацепленных двухцепочечных колец, образующихся при репликации кольцевых двунитевых ДНК. С помощью этих важных ферментов двойная спираль ДНК в клетке может принимать “недокрученную” форму с меньшим числом витков; в такой ДНК легче происходит расхождение двух цепей ДНК в репликационной вилке.

Прерывистый синтез ДНК

Легко вообразить, что репликация происходит путем непрерывного роста нуклеотида за нуклеотидом обеих новых цепей по мере перемещения репликационной вилки; при этом, поскольку две цепи в спирали ДНК антипараллельны, одна из дочерних цепей должна была бы расти в направлении $5' \rightarrow 3'$, а

другая в направлении $3' \rightarrow 5'$. В действительности, однако, оказалось, что дочерние цепи растут только в направлении $5' \rightarrow 3'$, то есть всегда удлиняется $3'$ -конец затравки, а матрица считывается ДНК-полимеразой в направлении $3' \rightarrow 5'$. Это утверждение на первый взгляд кажется несовместимым с движением репликационной вилки в одном направлении, сопровождающемся одновременным считыванием двух антипараллельных нитей. Разгадка секрета заключается в том, что синтез ДНК происходит непрерывно только на одной из матричных цепей. На второй матричной цепи ДНК синтезируется сравнительно короткими фрагментами (длиной от 100 до 1000 нуклеотидов, в зависимости от вида), названными по имени обнаружившего их ученого *фрагментами Оказаки* (рис. 5). Вновь образованная

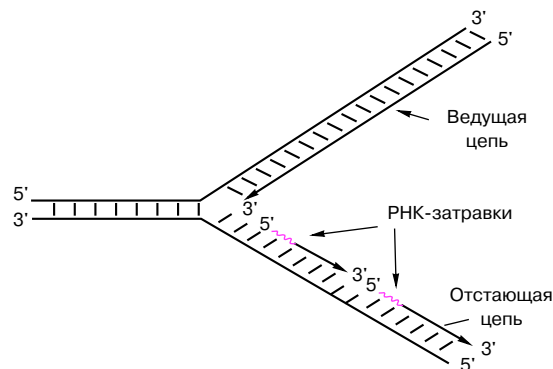


Рис. 5. Строение репликационной вилки. Направление синтеза ДНК совпадает с направлением расплетения двойной спирали лишь для одной из нососинтезированных цепей (ведущей). Вторая цепь (отстающая) синтезируется прерывисто, в виде коротких фрагментов Оказаки. В результате обе дочерние цепи растут в направлении от $5'$ к $3'$.

цепь, которая синтезируется непрерывно, называется *ведущей*, а другая, собираемая из фрагментов Оказаки, *отстающей*. Синтез каждого из этих фрагментов начинается с РНК-затравки. Через некоторое время РНК-затравки удаляются, бреши застраиваются ДНК-полимеразой и фрагменты сшиваются в одну непрерывную цепь ДНК специальным ферментом.

КООПЕРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ РЕПЛИКАЦИОННОЙ ВИЛКИ

До сих пор мы говорили об участии отдельных белков в репликации так, как будто бы они работают независимо друг от друга. Между тем в действительности большая часть этих белков объединена в крупный комплекс, который быстро движется вдоль ДНК и согласованно осуществляет процесс репликации с высокой точностью. Этот комплекс сравнивают с крошечной “швейной машиной”:

“детальями” его служат отдельные белки, а источником энергии — реакция гидролиза нуклеозидтрифосфатов [2].

На рис. 6, где изображена репликационная вилка, показано, как работают отдельные части такой “репликационной машины”. Спираль расплетается ДНК-хеликазой; этому процессу помогают ДНК-топоизомераза, раскручивающая цепи ДНК, и множество молекул дестабилизирующего белка, связывающихся с обеими одиночными цепями ДНК. В области вилки действуют две ДНК-полимеразы — на ведущей и отстающей цепи. На ведущей цепи ДНК-полимераза работает непрерывно, а на отстающей фермент время от времени прерывает и вновь возобновляет свою работу, используя короткие РНК-затравки, синтезируемые ДНК-праймазой. Молекула ДНК-праймазы непосредственно связана с ДНК-хеликазой, образуя структуру, называемую *праймосомой*. Праймосома движется в направлении раскрывания репликационной вилки и по ходу движения синтезирует РНК-затравку для фрагментов Оказаки. В этом же направлении движется ДНК-полимераза ведущей цепи и, хотя на первый взгляд это трудно представить, ДНК-полимераза отстающей цепи. Для этого, как полагают, последняя накладывает цепь ДНК, которая служит ей матрицей, саму на себя, что и обеспечивает разворот ДНК-полимеразы отстающей цепи на 180 градусов. Согласованное движение двух ДНК-полимераз обеспечивает координированную репликацию обеих нитей. Таким образом, в репликационной вилке одновременно работают около двадцати разных белков (из которых мы назвали только часть), осуществляя сложный, высокоупорядоченный и энергоёмкий процесс [3].

СОГЛАСОВАННОСТЬ ПРОЦЕССОВ РЕПЛИКАЦИИ ДНК И КЛЕТЧНОГО ДЕЛЕНИЯ

Независимо от того, содержит клетка только одну хромосому (как у прокариот) или много хромосом (как у эукариот), за период времени, соответствующий одному клеточному делению, весь геном, то есть вся ДНК клетки, должен быть реплицирован только один раз [4]. Сигналом к удвоению репликона служит связывание со специфической последовательностью точки начала репликации особого регуляторного белка, получившего название *инициаторного*; только после этого становится возможным формирование репликационной вилки (см. рис. 4).

Процесс репликации хромосомы бактерий начинается, как уже говорилось выше, в одной определенной области ДНК (в точке начала репликации) и продолжается до тех пор, пока не удвоится вся ДНК хромосомы. Поэтому можно сказать, что бактериальная хромосома представляет собой единицу репликации, получившую название *репликон*. Начало репликации неизбежно влечет за собой дальнейшее деление клетки, однако происходит оно только после завершения репликации. Удвоенные геномы разделяются по одному в каждую дочернюю клетку.

Эукариотическая клетка перед каждым делением должна синтезировать копии всех своих хромосом. Репликация ДНК эукариотической хромосомы осуществляется посредством разделения хромосомы на множество отдельных репликонов. Такие репликоны активируются не все одновременно, однако клеточному делению должна предшествовать обязательная однократная репликация каждого из них. Из сказанного ясно, что по хромосоме эукариот в каждый момент времени может двигаться независимо друг

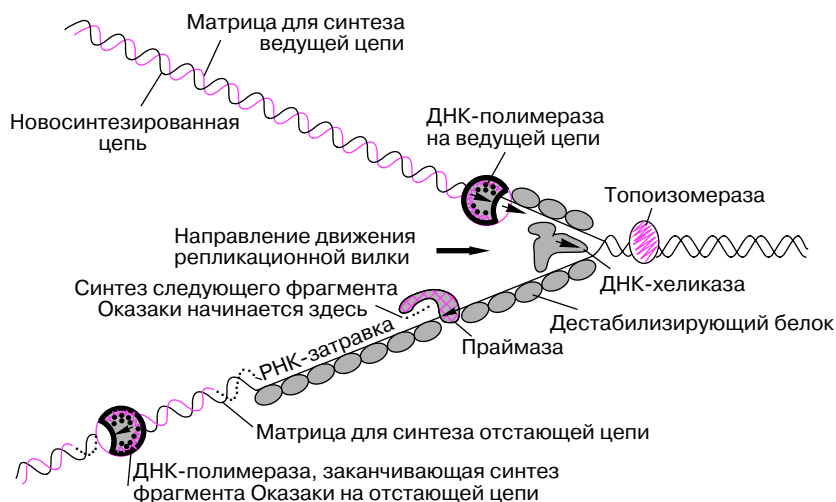


Рис. 6. Схематическое расположение в репликационной вилке основных белков, осуществляющих репликацию ДНК. В действительности ДНК-хеликаза и ДНК-праймаза на отстающей цепи образуют комплекс, получивший название праймосомы.

от друга множество репликационных вилок. Остановка продвижения вилки происходит только при столкновении с другой вилкой, движущейся в противоположном направлении, или по достижении конца хромосомы. В результате вся ДНК хромосомы в короткий срок оказывается реплицированной. После сборки на молекуле ДНК хромосомных белков каждая пара хромосом в процессе митоза упорядоченно разделяется по дочерним клеткам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс репликации ДНК согласован с клеточным делением и требует совместного действия многих белков. В нем участвуют:

1. ДНК-хеликазы и дестабилизирующие белки; они расплетают двойную спираль родительской ДНК и формируют репликационную вилку.
2. ДНК-полимеразы, которые катализируют синтез полинуклеотидной цепи ДНК в направлении 3'—5', копируя в репликационной вилке матрицу с высокой степенью точности. Поскольку две цепи двойной спирали ДНК антипараллельны, в направлении 5'—3' непрерывно синтезируется лишь одна из двух цепей, ведущая; другая цепь, отстающая, синтезируется в виде коротких фрагментов Оказаки. ДНК-полимераза способна к исправлению собственных ошибок, но не может самостоятельно начать синтез новой цепи.
3. ДНК-праймаза, которая катализирует короткие молекулы РНК-затравки. Впоследствии фрагменты РНК удаляются — их заменяет ДНК.

4. ДНК-топоизомеразы, помогающие решить проблемы кручения и спутывания спирали ДНК.

5. Инициаторные белки, связывающиеся в точке начала репликации и способствующие образованию нового репликационного глазка с одной или двумя вилками. В каждой из вилок вслед за инициаторными белками к расплетенной ДНК сначала присоединяется белковый комплекс, состоящий из ДНК-хеликазы и ДНК-праймазы (праймосома). Затем к праймосоме добавляются другие белки и возникает “репликационная машина”, которая и осуществляет синтез ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Докинз Р. Эгоистичный ген. М.: Мир, 1993. 316 с.
2. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 2. С. 287 — 301.
3. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот / Под ред. акад. А.С. Спирина. М.: Высшая школа, 1990. С. 44 — 73.
4. Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987. С. 396 — 431.

* * *

Ольга Олеговна Фаворова, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой молекулярной биологии и медицинской биотехнологии медико-биологического факультета Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова. Автор 105 научных работ.