

Биосинтеза на ДНК

Цели

Цели на преподавателя: 1) Да се разгледа на молекулно ниво как чрез репликация на ДНК се предава наследствената информация от поколение на поколение; 2) да се дадат примери за приложение на тези познания в клиничната практика.

След работа с този раздел студентите ще могат да постигнат следните учебни цели:

А. Знания

1. Да посочат принципите, на които се основава репликацията на ДНК;
2. Да изброят ензимните и неензимни белтъци, необходими за синтеза на ДНК;
3. Да изброят етапите, през които минава репликацията на ДНК;
4. Да дефинират какво представляват теломерите в еукариотни хромозоми;
5. Да изброят типовете поправящи механизми при репликацията;

Б. Разбирания

1. Да обяснят действието на ДНК полимеразите в прокариоти;
2. Да обяснят действието на ДНК полимеразите в еукариоти;
3. Да опишат действието на обратната транскриптаза;
4. Да опишат клетъчния цикъл в бозайници;
5. Да обяснят как се отстраняват грешки при репликацията на ДНК;
6. Да обяснят как действат поправящите механизми в случаи на некомплементарно сдвояване, изрязване на бази, изрязване на нуклеотиди, скъсвания на двойната верига и поправяне чрез рекомбинация;

В. Умения

1. Да приложат познанията си върху репликация на ДНК и обратна транскриптаза, за да представят схема за репликация на ДНК теломерите в еукариотни хромозоми;
2. Да сравнят репликацията на ДНК в прокариоти и еукариоти;
3. Да приложат познанията си за да обяснят механизма на действие на антимераболити и интеркалатори;
4. Да прилагат познанията върху дефекти в ДНК-поправящите механизми, за да разберат и обяснят причините за заболявания като неполипозен рак на дебелото черво, Xeroderma pigmentosum и др.
5. Да преценят предимствата на индиректния тест на Ames пред директния тест за канцерогенност;
6. Да прилагат знанията от този и предишни раздели за разбиране механизма и/или

възможностите за терапия на някои злокачествени заболявания и решават клинични случаи.

12.1 Резюме

Репликацията на ДНК представлява точно удвояване и предаване от поколение на поколение на наследствената информация.

Репликацията в прокариоти и еукариоти има редица общи характеристики:

- 1) Тя е матрично направляван процес, извършващ се по полуконсервативен механизъм;
- 2) Спазва се принципът за комплементарност между родителските матрични вериги и новосинтезиращите се вериги;
- 3) Процесът започва от определено начало (в прокариоти) или начала (в еукариоти);
- 4) Репликацията върви двупосочно спрямо началото/началата;
- 5) Субстрати за синтеза на ДНК са четирите дезоксинуклеозид-трифосфати дАТФ, дГТФ, дТТФ и дЦТФ.
- 6) Основните етапи са:
 - а) разпознаване началото/началата на репликация;
 - б) свързване на ензимния апарат и локално разплитане на двойноверижната ДНК;
 - в) образуване на репликативните вилки;
 - г) инициация и удължаване на веригите (водеща и изоставаща верига);
- д) двупосочно придвижване на репликативните вилки и свързване на новосинтезираните ДНК фрагменти чрез ДНК лигази.
- 7) Новите вериги се изграждат векторно в посока 5'-3';
- 8) Съществува асинхронност и асиметричност при изграждане на водещата верига (по непрекъснат начин) и на изоставащата верига (по прекъснат начин).
- 9) Сходно е образуването на праймерите в репликативните вилки, на фрагментите на Оказаци, отстраняването на праймерите, запълването на празнините и свързването на новосинтезираните сегменти от ДНК.
- 10) В синтеза на ДНК участват ДНК-зависими ДНК полимерази, хеликази, топоизомерази, ДНК праймази, SSB-белтъци, ДНК лигази и голям брой други белтъци.

Разгледани са различията в репликацията на ДНК между еукариоти и прокариоти, произтичащи от много по-големите размери на ДНК в еукариоти и многостепенното пакетиране на ДНК в хроматин. Синтезата на ДНК в еукариоти се извършва единствено само в S-фазата на клетъчния цикъл.

В част от животинските вируси (ретровируси, вкл HIV), съдържащи РНК вместо ДНК, има специален ензим обратна транскриптаза, която образува комплементарна ДНК

верига (кДНК) върху едноверижна РНК матрица. кДНК може да се включи в генома на клетката гостоприемник.

Репликацията на теломерите в еукариотни хромозоми се извършва под действие на специализирана обратна транскриптаза, наречена ДНК теломераза.

За осигуряване верността на репликацията се прилага двукратен контрол - по време на репликацията и след нея чрез специални поправящи механизми. Чрез последните се поправят некомплементарно сдвояване в ДНК, депуринизация на ДНК (чрез изрязване на бази), UV-предизвикани увреждания като тиминови димери (чрез изрязване на нуклеотиди) и скъсвания на двойната верига. Поправяне се извършва и чрез рекомбинация.

Дадени са примери за приложенията на познанията върху репликация на ДНК в медицината. Репликацията на ДНК в микроорганизми или туморни клетки повлиява от антиметаболити (аналози на субстрати или на коензими), от интеркалатори и други препарати, разрушаващи ДНК. Грешки в поправящите механизми могат да доведат до заболявания като напр. Xeroderma pigmentosum и рак на дебелото черво. Разгледан е и индиректният тест на Ames за доказване канцерогенност на различни химикали.

12.2 Обща характеристика

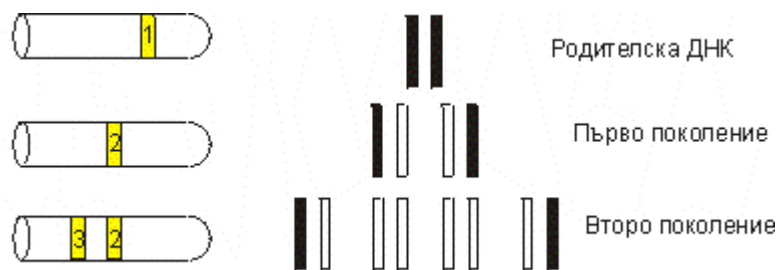
Репликацията на ДНК е точно безпогрешно удвояване и предаване от поколение на поколение на наследствената информация. Тя се основава на следните общи принципи във всички живи организми:

1) Тя е матрично направляван процес.

Репликацията на ДНК е първият биологически пример за направлявана синтеза на макромолекула. Молекулната матрица е повърхност, върху която молекулите на мономерите се подреждат в определен ред и се свързват, за да се създаде макромолекула с уникална структура и функция.

Наскоро след публикуване на двойно-спиралния модел за структурата на ДНК, Watson и Crick предположиха, като следствие от идеята за матричния принцип, че механизмът за репликацията на ДНК е полуконсервативен. Според тях веригите се разделят и всяка служи като матрица за образуване на нова верига.

Опитите на Meselson и Stahl потвърдиха, че репликацията се извършва именно по полуконсервативен механизъм (фиг. 12-1) и отхвърлиха другите предложени механизми (консервативен и случаен). След репликация и клетъчно делене всяка дъщерна клетка получава една родителска и една новосинтезирана верига,



Фиг. 12-1. Експерименти на Meselson и Stahl, потвърждаващи предложенията от Watson и Crick за полуконсервативен механизъм на репликация.

Бактерии *E. coli* се отглеждат първоначално в среда с тежък азот (^{15}N), поради което родителската ДНК съдържа само ^{15}N и има по-висока плътност при центрофугиране

(ивица 1). След прехвърляне на клетките в среда с нормален азот (^{14}N), първото поколение ДНК има междинна плътност - ивица 2 (^{15}N в едната и ^{14}N в другата верига). Във второто поколение две от веригите са с междинна плътност - ивица 2 (съдържат ^{15}N и ^{14}N), а другите две имат по-ниска плътност - ивица 3 (съдържат само ^{14}N).

2) Принцип на комплементарност между родителските матрични вериги и новосинтезиращите се.

Всяка верига в ДНК е комплементарна на другата. Строгите правила за сдвояване на базите (А с Т и Г с Ц - фиг. 3-12) осигуряват новосинтезиращата се верига, комплементарна на матрицата, да бъде с точно предсказуема последователност.

3) Репликацията започва от определен начален участък.

Обикновено има един начален участък в прокариоти и множество такива в еукариоти.

4) Синтезата на ДНК е двупосочна спрямо началото на репликация.

Синтезата на новите вериги върви в посока от 5' към 3'-края. Всяка нова верига е антипаралелна на родителската. И в двете нови вериги е необходим начален праймер или зародиш (къс фрагмент от РНК). Нов нуклеотид се добавя към 3'-края на зародиша.

Съществува асинхронност и асиметричност при изграждане на "водещата" и "изоставащата" верига. Водещата верига се синтезира непрекъснато в посока от 5' към 3'-края. Другата верига се означава като изоставаща, тъй като се синтезира пак от 5' към 3'-края, но прекъснато (на по-къси фрагменти) и с известно изоставане.

Репликативна вилка е мястото, където върху разплетените и разделени родителски вериги се образуват две нови вериги, комплементарни и антипаралелни на матриците.

Исходни субстрати за синтезата на ДНК са четирите дезоксинуклеозидтрифосфати дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ.

Образуването на фосфодиестерните връзки между нуклеотидите се осигурява от енергията, отделена при разкъсване на макроергичната връзка между \square и \square -фосфатните групи в субстратите.

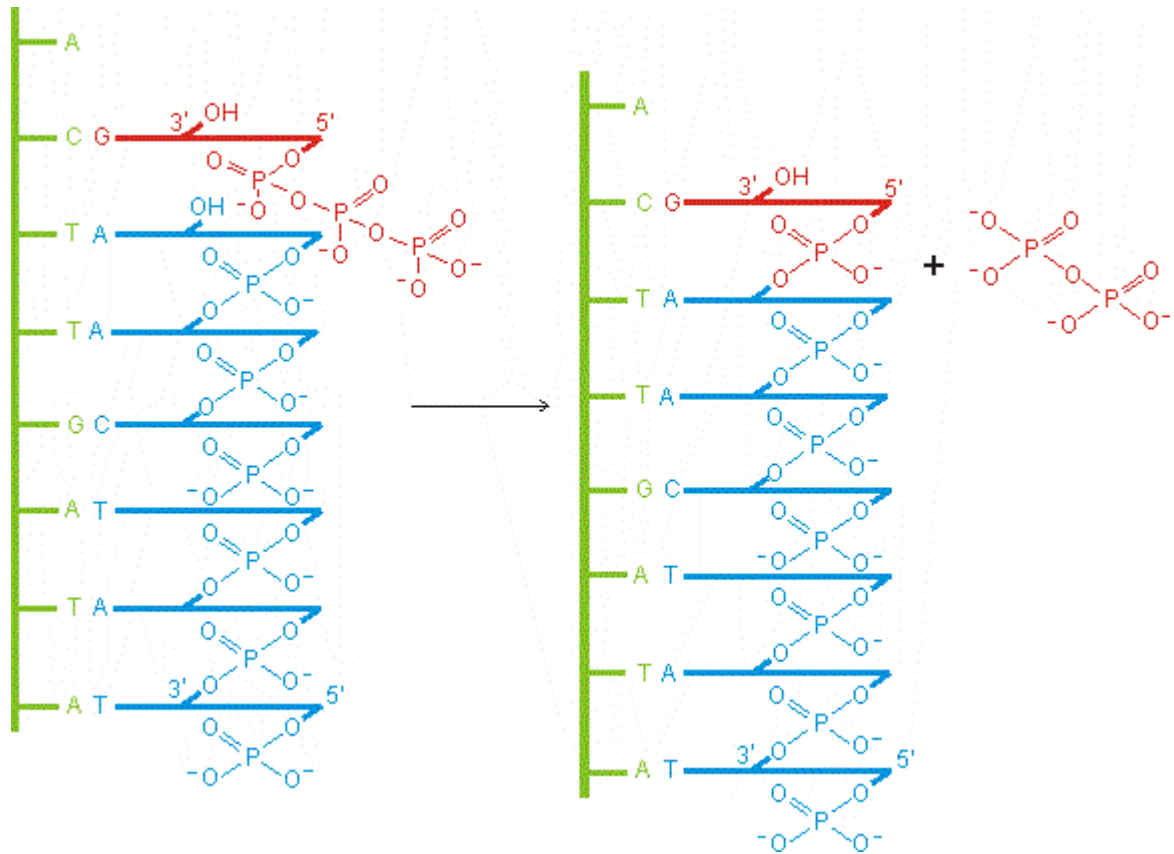
Тъй като матрицата определя подходящия комплементарен дезоксинуклеотид за нарастване на новосинтезиращата се верига, главните ензими, които катализират синтезата, са наречени ДНК-зависими ДНК полимерази. Необходими са и други ензимни и неензимни белтъци.

12.3 ДНК полимерази в прокариоти

По реда на тяхното откриване различните ДНК полимерази в прокариоти се означават с римски цифри (I, II, III) (табл. 12-1).

ДНК полимераза III е главният ензим за репликация на ДНК в прокариоти. Той катализира синтезата както на водещата, така и на изоставащата верига.

Характерна за тази полимераза (както и за всички останали ДНК полимерази в про- и еукариоти) е нейната "синтетична" или "полимеразна" или по-точно нуклеотидил-трансферазна активност. Ензимът катализира нуклеофилната атака на 3'-ОН група от последния нуклеотид в 3'-края на нарастващата верига върху 5'- \square -фосфатната група на идващия дезоксирибонуклеозид-трифосфат (фиг. 12-2). Така се образува 3'-5'-фосфодиестерна връзка и се удължава новосинтезиращата се верига.



Фиг. 12-2. Синтеза на 3'-5'-фосфодиестерни връзки под действието на ДНК-полимераза.

Освен тази обща за всички ДНК полимерази активност, ДНК полимеразата III има и коректорна функция, благодарение на 3'-->5'-екзонуклеазната си активност. Тази активност се проявява, когато трябва да се отстрани некомплементарен нуклеотид, включен погрешно в нарастващата верига. Тогава ензимът скъсва хидролитно фосфодиестерната връзка между този погрешно добавен в 3'-края нуклеотид и предходния във веригата. Отделя се нуклеозидмонофосфат.

ДНК полимеразата III е огромен (над 1 MDa) ензимен комплекс. Каталитичната сърцевина на ензима се състои от α , β и γ субединици. α -Субединицата има полимеразна активност, β -субединицата има 3'-->5'-екзонуклеазна активност, а ролята на γ -субединицата вероятно се свежда до осигуряване на връзка между другите две субединици или между тях и останалите в холоензима. Холоензимът съдържа общо десет различни субединици и е организиран като асиметричен димер с два каталитични центрове. Това позволява ензимът да катализира едновременно синтезата на водещата и изоставащата верига в репликативната вилка. Две от тези субединици (β) образуват две скоби (щипки), които обхващат ДНК. Тези β -скоби осигуряват здраво свързване на холоензима към ДНК и висока скорост на репликация (фиг. 12-3).

Фиг. 12-3. Структура на двете β -субединици в ДНК полимеразата III, образуващи кръг с



диаметър 3.5 nm, в средата на който се вмести ДНК [1].

ДНК полимераза II се състои от една полипептидна верига, която има три активни центрове и три каталитични активности: 5'-->3'-полимеразна, 3'-->5'-екзонуклеазна и 5'-->3'-екзонуклеазна. Чрез втората осъществява коректорна функция, а чрез третата хидролитно изрязва праймерите от новосинтезиращата се ДНК. Участва в корекцията и поправянето на ДНК, тъй като освен полимеразната активност има и 3'-->5'-екзонуклеазна активност.

ДНК полимераза I има три активности. Чрез 5'-->3'-екзонуклеазната си активност хидролитно изрязва праймерите от новосинтезиращата се ДНК от 5'-края на двойната спирала. Чрез полимеразната си активност участва в синтеза на изоставащата верига на ДНК - запълва празнините, които се получават след разграждане на РНК-праймерите. 3'-->5'-екзонуклеазната активност се проявява, ако в полинуклеотидната верига се включи погрешен нуклеотид. Тогава ензимът го отстранява - т.е. извършва корекция.

12.4 ДНК-полимеразен комплекс в еукариоти

По реда на откриването в клетките на човек са открити пет типа ДНК полимерази, означавани с гръцките букви $\alpha, \beta, \beta', \gamma, \delta$. Четири от тях са локализирани в ядрото ($\alpha, \beta, \beta', \gamma$), а една от тях - в митохондриите (δ). В табл. 12-1 е представена ролята на тези полимерази. Двете полимерази α и β действат съвместно в репликативната вилка, катализирайки образуването на 3'-5'-фосфодиестерни връзки, съответно във водещата и изоставащата верига. Полимерази α, β, β' и γ имат и хеликазна активност, а полимеразата δ има и праймазна активност. Полимерази $\alpha, \beta, \beta', \gamma, \delta$ имат също 3'-->5'-екзонуклеазна активност, което позволява коректорна и поправяща функции. Най-слабо-изразена е полимеразната активност на полимеразите α и β . Известно е, че полимеразата δ има 5'-->3'-екзонуклеазна активност, но вероятно и други белтъци осигуряват тази поправяща активност.

Табл. 12-1. Роля на ДНК полимеразите в *Escherihia coli* и бозайници за репликация на ДНК.

Роля за репликацията	Бозайници	<i>Escherihia coli</i>
Синтеза на водещата верига	□□□□	III
Синтеза на изоставащата верига и запълване на празнини	□□□□	I, III
Коректорна функция	□□□□□□□	I, II, III
Поправяща функция	□□□□□□□	I, II, III
Синтеза на митохондриална ДНК	□	-

Всички полимерази се характеризират със своята процесивност, скорост на удължаване на веригата и възможност за корекции.

Процесивността се измерва чрез броя присъединени нуклеотиди към веригата при всяко свързване преди полимеразата да се отдели от матрицата. Това означава, че ензимът остава прикрепен към родителската матрица, а не се дисоциира и присъединява след добавяне на всеки нуклеотид. Процесивността на ДНК полимераза III (холоензим) *in vivo* в *E. coli* е 50 000 нуклеотида за едно свързване. В бозайници полимераза □ и □ имат висока процесивност (1500 нуклеотиди). Полимераза □ има пониска процесивност и се отделя след добавяне на само около 200 нуклеотида, колкото е дължината на един фрагмент на Оказаки (вж по-долу).

Скоростта на удължаване на веригата се измерва в нуклеотиди за секунда. Полимеразният комплекс в бозайници удължава веригата с около 100 нуклеотида в секунда, а в *E. coli* действа с 10 пъти по-висока скорост.

Възможността за корекции се свежда до откриване на грешки по време на синтезата и поправянето им. Еукариотната репликация протича с висока точност - само 1 несъответстваща база се включва приблизително при присъединяване на 10^9 до 10^{12} включени нуклеотиди.

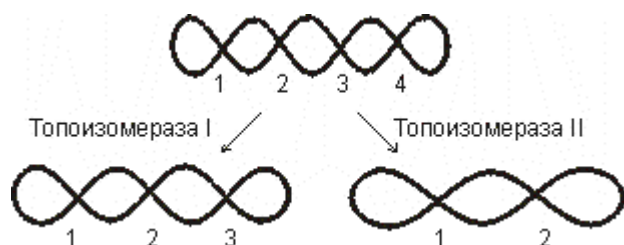
12.5. Други ензимни и неензимни белтъци, необходими за репликацията на ДНК

Хеликазите (от helix - спирала) са ензими, които постепенно разплитат ДНК спиралата и осигуряват единични матрици за репликацията. Това става за сметка на енергия, освободена от разграждане на АТФ.

Топоизомеразите (наричани гирази в *E. coli*) променят топологичното състояние на ДНК в пространството. Действат не само върху суперспирализирана ДНК, но и върху други субстрати като свързани (конкатенирани) дъщерни хромозоми или конкатемерни линейни форми, получени при многократно повторение на митохондриална ДНК. В частност при репликацията те премахват свръхнапрежението, породено от разплитането на веригите, като временно скъсват дезоксирибозо-фосфатния скелет и след това го възстановяват. Има два вида топоизомерази I и II.

Топоизомераза I скъсва само едната верига. Това позволява интактната верига да мине през процепа, след което той бива затворен. Суперспиралният ход се намалява с

единица - напр. от 4 извивки след скъсването и зашиването остават три извивки (фиг. 12-4). Топоизомерата II скъсва и двете вериги. Това позволява двойно-спирален сегмент да мине през процепа. Суперспиралния ход се намалява с две единици (фиг. 12-4). Топоизомеразите имат значение за суперспирализиране на новополучената ДНК в хромозомите.



Фиг. 12-4. Действие на топоизомерата I и II

ДНК праймазата катализира синтеза на РНК зародиши (праймери), върху които започва изграждане на ДНК верига. ДНК лигаза съединява фрагментите на Оказаки.

SSB-Белтъците, свързващи единичните разделени вериги на ДНК, предпазват от преждевременно образуване на двойна спирала.

Комплексът между хеликаза, праймаза и инициращи белтъци се означава като **праймозома**.

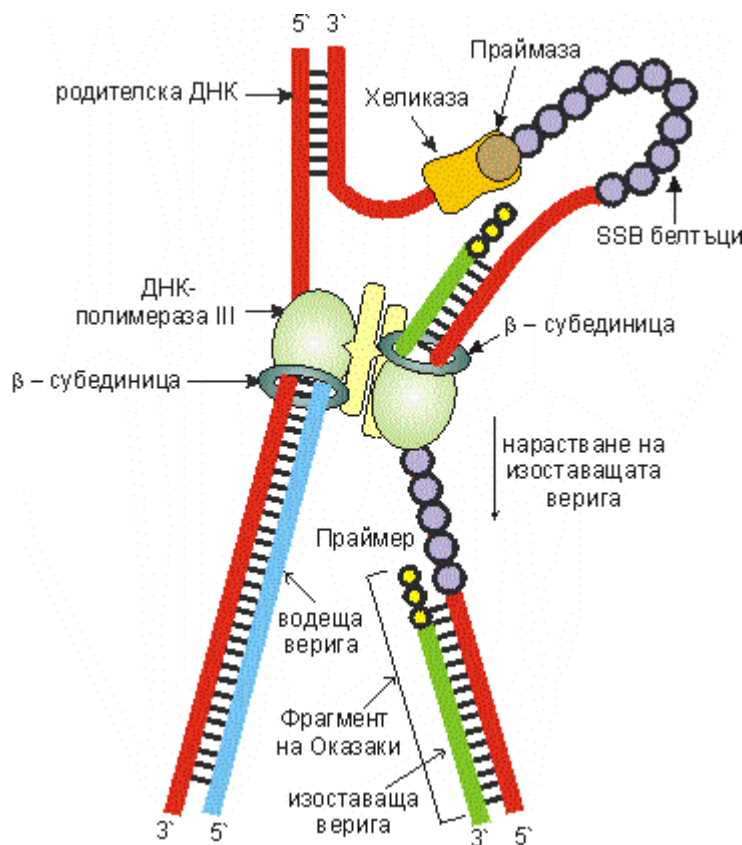
Реплизома се нарича комплексът от праймозома и холоензима ДНК полимераза. Много още други белтъчни фактори подпомагат процеса, но не са съставки на реплизомата.

12.6. Етапи в репликацията на ДНК

1) Разпознаване началото на репликация

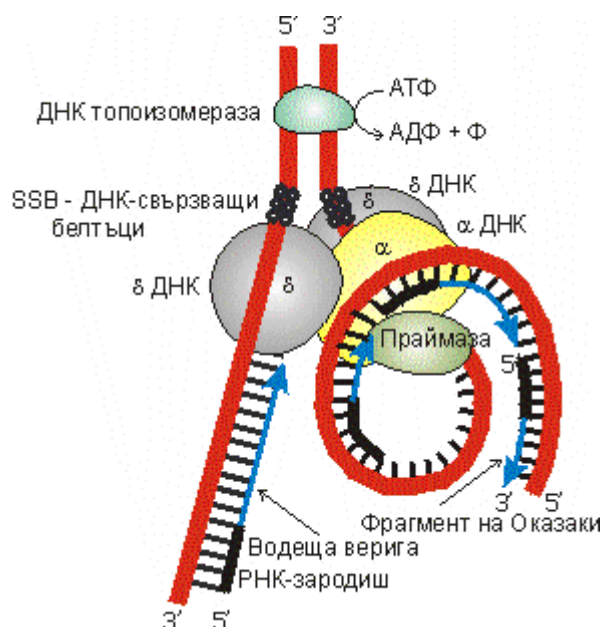
Все още в бозайници не са известни последователностите, от които започва репликацията. В прокариоти репликацията започва в определени ДНК участъци, означавани със съкращението Ori (от origin). В *E. coli* OriC е участък, съдържащ 245 bp. Сред тях има строго консервативни, характерни за бактериите повтори, които служат за залавяне на специфични белтъци. Специален DnaA белтък, необходим за инициране на репликацията разпознава и се свързва към четири такива еднакви повтори с по 9 bp, богати на АТ.

С помощта на фиг. 12-5а за прокариоти и на фиг. 12-5b за еукариоти са представени следващите етапи и възможните механизми за репликация на ДНК.



Фиг. 12-5а. Предполагам модел за синтеза на ДНК в репликативната вилка в прокариоти [2-4]. Водещата верига се синтезира в посока 5'-->3' непрекъснато от ДНК полимеразата III, която заедно с подобната на скоба β -субединица остава свързана към ДНК през цялото време на репликация. Разтварянето на двойната спирала се извършва от хеликаза, която се движи по матрицата за изоставащата верига в посока към нейния 3'-край. Друга молекула ДНК-полимераза III синтезира изоставащата верига прекъснато под форма на фрагменти на Оказаки. Двете молекули на ДНК полимеразата са свързани чрез β -белтък.

След разтваряне на веригите към сегмент от изоставащата верига се свързват SSB-белтъци и веригата се огъва - образува бримка. След завършване синтезата на всеки фрагмент на Оказаки полимеразата дисоциира от ДНК, но основната ѝ част остава свързана към β -белтък. Освободената полимеразата отново се свързва с помощта на друга β -субединица в близост с праймера за следващия фрагмент на Оказаки. В т.12.15 има връзки към анимация за репликация на ДНК.



Фиг. 12-5b. Предполагам модел за синтеза на ДНК в репликативната вилка в еукариоти. Водещата верига се синтезира в посока 5'-->3' непрекъснато от ДНК полимеразата. Изоставащата верига образува извивка около репликационния комплекс, който се състои от ДНК полимеразата β , имаща и хеликазна активност и от ДНК полимеразата α , имаща и праймазна активност. Не е представен белтъкът PCNA (proliferating cell nuclear antigen), който е аналогичен на двойната β -скоба на полимеразата III в прокариоти.

2) Свързване на ензимния апарат и локално разплитане (денатурация) на двойноверижната ДНК.

DnaA-белтък денатурира и разтваря ДНК в упоменатите повтори, което улеснява свързването на Dna B-белтък с участието и на Dna C-белтък. Dna B-белтък има хеликазна активност и разплита ДНК двупосочно, създавайки две репликативни вилки. Получават се два едноверижни участъци като матрици. Това става под действието на хеликази. След това SSB (белтъци, свързващи едноверижна ДНК) не позволяват сдвояването на веригите и улеснява свързването на други компоненти на ензимния апарат като праймаза, ДНК полимераза и др.

3) Образуване на репликативните вилки

Локалното разплитане на къс сегмент в родителската ДНК и разделяне на веригите поради свързването на SSB-белтъци към всяка от разделените вериги оформя репликативните вилки. Именно тук праймазата започва да образува РНК-праймери (зародиши). Това са къси сегменти от РНК (2-3 до 10 нуклеотиди []) със свободна 3'-ОН група. Едва тогава вече има условия за действие на ДНК-полимераза.

4) Инициация и удължаване на веригите (водеща и изоставаща)

3'-ОН група на РНК-зародиша атакува α -фосфатната група на първия присъединяван дезоксинуклеозид трифосфат, съпроводено с отделяне на пирофосфат. Последователността на нуклеотидите в матрицата определя последователността на нуклеотидите в новата верига съгласно правилата за комплементарност на Watson и Krick (А, Г, Т и Ц в матрицата определят включването на Т, Ц, А и Г в новата верига, съответно). Чрез водородни връзки новопостъпващият нуклеотид се прикрепва към комплементарния нуклеотид от матрицата, а 3'-ОН група на последния нуклеотид в новата верига атакува α -фосфатната група на новопостъпващия, съпроводено с отделяне на пирофосфат, както бе разгледано на фиг. 12-2.

Водещата верига се образува непрекъснато в посока 5'-3' под действие на ДНК полимераза α в еукариоти. За високата процесивност на ДНК полимераза α допринася още един фактор PCNA (proliferating cell nuclear antigen), който е аналогичен на двойната β -скоба на полимераза III в прокариоти, обхващаща ДНК. PCNA е съставен от три молекули, образуващи затворен пръстен около ДНК. Друг белтък RFC (replication factor C) също се свързва към полимераза α и вероятно улеснява свързването на PCNA с ДНК, както и връзката между полимераза α и полимераза β .

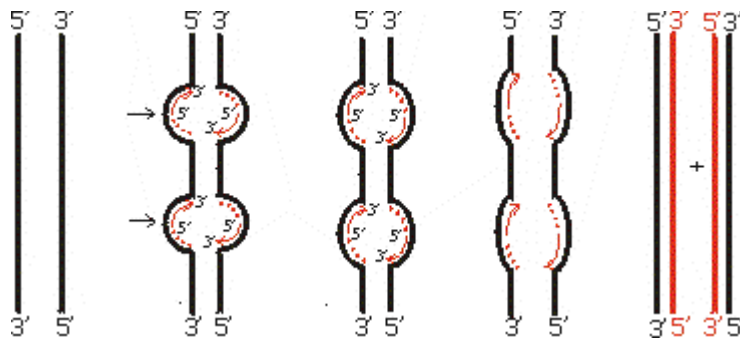
Огъване в матрицата за изоставащата верига позволява реплизомата, а именно ДНК полимераза β да катализира нарастване на изоставащата верига също в посока 5'-3', но прекъснато, на по-къси фрагменти (фиг. 12-5). Те се наричат фрагменти на Оказаки.

РНК зародишите във фрагментите на Оказаки се отстраняват и празнините се запълват с ДНК под действието на ДНК полимераза I в прокариоти. Накрая фрагментите се съединяват чрез ДНК лигази. В кръговата митохондрийна ДНК зародишите се запазват.

5) Двупосочно придвижване на репликативните вилки и свързване на новосинтезираните ДНК сегменти чрез ДНК лигази.

В *E. coli* репликацията започва от един Ori-участък, но в бозайници има множество такива участъци, което позволява целият геном да се реплицира за около 9 часа.

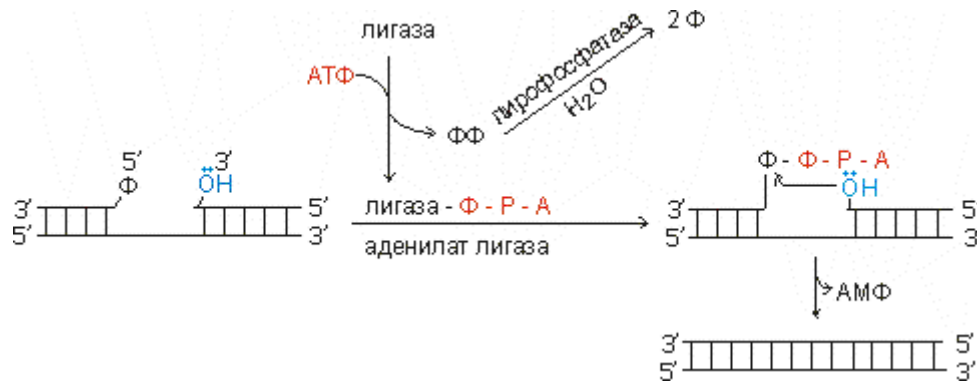
Репликацията върви двупосочно по протежение на ДНК и двете вериги се реплицират едновременно. Това води до разширяване на репликативните вилки (фиг. 12-6), които накрая се сливат.



Фиг. 12-6. Двупосочна репликация в еукариотна хромозома. Репликацията започва в множество стартови точки. Образуват се много репликативни вилки, които постепенно се уголемяват и накрая сливат.

В еукариоти лигазите изискват за своето действие АТФ (фиг. 12-7). От АТФ се прехвърля АМФ върху лигазата. После този АМФ се прехвърля върху 5'-фосфатната група на едната верига на ДНК, което я активира. Енергията на връзката между ДНК и АМФ осигурява енергетично лигазната реакция. Свободната 3'-хидроксилна група на другата верига атакува активирания фосфат. Образува се фосфодиестерна връзка и се отделя АМФ.

Лигазите в прокариоти действат съвместно с НАД, който съдържа пирофосфатна макроергична връзка и осигурява АМФ.



Фиг. 12-7. Действие на ДНК-лигази в еукариоти за свързване на ДНК сегменти.

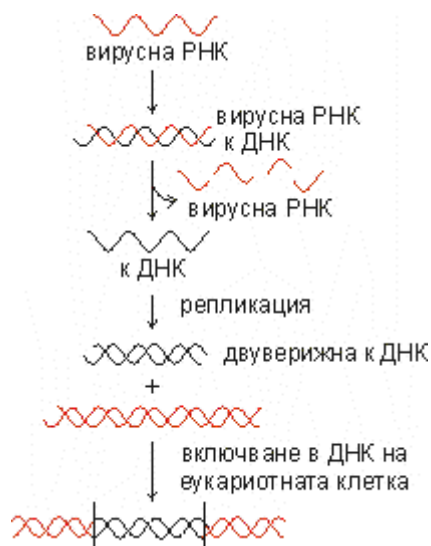
6) Реконституция на хроматиновата структура

Новообразуваната ДНК образува нуклеозоми, чиято структура и по-нататъшно пакетиране са разгледани в глава 3.

12.7 Обратна транскриптаза

В част от животинските вируси (ретровируси, напр. HIV) има специален клас ензими обратни транскриптази. Те образуват единична, а след това двойно-верижна ДНК върху едновержна РНК-матрица (фиг. 12-8). Първо върху РНК се образува комплементарна

ДНК верига - получава се РНК-ДНК хибрид. Ензим, наречен РНКаз Н разгражда РНК матрицата и оставащата ДНК на свой ред служи като матрица за нова комплементарна ДНК-верига. Образува се двойно-спирална ДНК, съдържаща информация, еднаква с тази в РНК генома на животинския вирус. Тази ДНК може да се включи в генома на клетката на гостоприемника.



Фиг. 12-8. Действие на обратна транскриптаза от ретровируси.
кДНК - комплементарна ДНК.

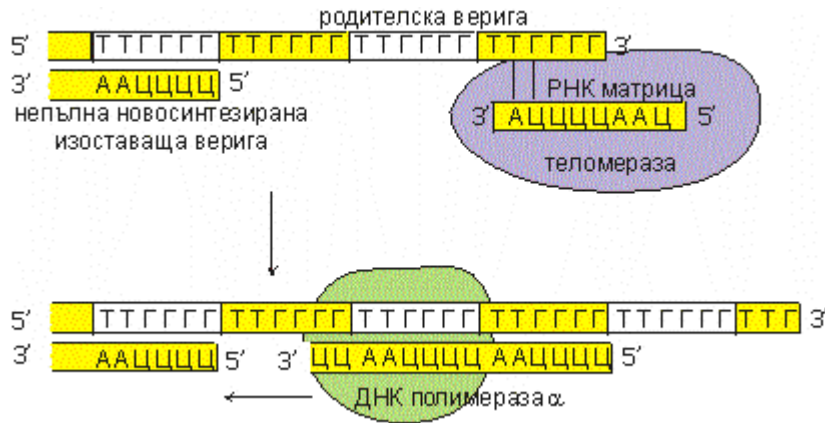
12.8 Репликация на теломерите в еукариотни хромозоми

Теломерите представляват особени секвенции в краищата на еукариотните хромозоми. В бозайници те съдържат около 1000 къси повтори на секвенцията ТТГГГГ, като 3'-краят завършва с къс едноверижен сегмент. Теломерите се реплицират от специализирана обратна транскриптаза, наречена ДНК теломераза (вж фиг. 12-9). Това се налага, тъй като след отделяне на реплизомата и разграждане на празнината от зародиша в края на изоставащата верига, новосинтезираната ДНК би се скъсила.

Броят на теломерните повтори варира в клетките на различни тъкани. Това се дължи на скъсяването на теломерите по време на репликация на някои соматични клетки - поради отсъствие на теломераза. Предполага се, че това може да е свързано със стареенето, макар че не се изключва и възможността скъсяването да е резултат, а не причина за стареенето [5]. Установена е зависимост между присъствие на теломераза в клетъчни култури и безсмъртието на клетките. Някои туморни клетки, които са безсмъртни в култура, имат високи нива на теломеразна активност [6].

В гаметните клетки има специален механизъм, за да не се допусне скъсяване на хромозомата. Теломеразата е рибонуклеопротеин - съдържа РНК-матрица, комплементарна на теломерните повтори ТТГГГГ. Свободният 3'-край на теломера е зародиш за синтеза на нова ДНК. Теломеразата удължава теломера, добавяйки комплементарни на РНК-матрицата нуклеотиди и премествайки РНК-матрицата, за да се добавят нови повтори към края на зародиша. След това удължената верига се използва от ДНК полимераза □ като матрица. В направление 5'-3'- този ензим попълва липсващата част на теломера в изоставащата верига, като прави комплементарно копие на всички нуклеотиди с изключение на най-крайните секвенции в 3'-края.

Фиг. 12-9.
Репликация на
теломери в

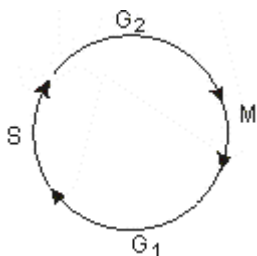


еукариотни хромозоми под действие на теломераза и ДНК полимераза □.

Първоначално теломеразата, чрез преместване на РНК матрицата катализира добавяне на повтори в родителската верига, представени в различен цвят. На фигурата горе се вижда синтезата на третия допълнителен повтор. След многократно отместване веригата се удължава. Долу се вижда как тази удължена верига се използва като матрица от ДНК полимераза □ за попълване на липсващата част в изоставащата верига. Прави се комплементарно копие на всички нуклеотиди с изключение на няколко крайни в 3'-края.

12.9 Клетъчен цикъл в бозайници

Човекът започва своето развитие като оплодена яйцеклетка (зигота). От нея произлизат всички клетки на тялото (около 10^{14}) чрез стотици клетъчни деления (митози). Клетъчният цикъл (фиг. 12-10) се състои от четири фази, означавани с буквите G₁, S, G₂, M. Първата фаза G₁ е с различна дължина. Клетката се подготвя за репликация - синтезира нуклеотидни прекурсори. Репликацията на ДНК се извършва само веднъж за клетъчен цикъл във фаза S. Нейната дължина варира. В бозайници трае около 8-9 часа. В третата фаза G₂ клетката се приготвя за делене, синтезирайки тубулин за делителното вретено. Клетъчно делене протича в M-фазата. G₁ и G₂ между S и M са растежни или подготвителни фази. Неделящите се клетки остават в G₁ фаза, наричана още G₀.



Фиг. 12-10. Клетъчен цикъл в еукариоти.

S - синтеза на ДНК; M - клетъчно делене (митоза); G₁ и G₂ - подготвителни фази.

Специални белтъци, наречени циклини управляват прехода от една фаза в друга. В определен момент активират циклин-зависими протеин кинази, които фосфорилират

субстрати, важни за преминаване в нова фаза на клетъчния цикъл. Напр. нивото на циклини D се увеличава в края на фаза G1 и позволява преминаване в S-фазата.

Под действие на някои онковируси увеличената синтеза на D циклини или синтезата им в неподходящ момент може да доведе до неконтролирана синтеза на ДНК и клетъчно делене. Някои онкогени също могат да премахнат нормално съществуващото ограничение за преминаване от G1 в S фазата. Напр. bcl-онкогенът, предизвикващ В-лимфома, е ген за циклин D1.

12.10 Разлики в репликацията на ДНК при прокариоти и еукариоти

Въпреки големите прилики, които бяха изтъквани досега, съществуват и различия между еукариоти и прокариоти.

В еукариоти размерите на ДНК са много по-големи (3×10^9 bp), а в *E. coli* ДНК съдържа 4×10^6 bp.

ДНК в еукариоти е пакетирана в хроматин (вж глава 3) и репликацията изисква допълнителен етап - реконституция на хроматиновата структура.

Синтезата на ДНК в еукариоти се извършва само в S-фазата на клетъчния цикъл, а при прокариоти няма такова ограничение.

В еукариоти репликативните вилки се придвижват с много по-ниска скорост, тъй като е необходимо разпакетиране на хроматина. Освен това ДНК полимеразите са по-слабо активни. При тези условия репликацията на ДНК би се извършвала за около месец. Но в еукариоти броят на ДНК полимеразите е много по-висок (около 20 000) от този в *E. coli* (няколко десетки) и броят на началата на репликация също е много по-висок. Това позволява репликацията на ДНК да приключи за около 9 часа.

12.11 Отстраняване на грешки при репликацията

За оцеляване на индивида и за запазване на даден вид, решаващо е запазването на информацията в молекулите на ДНК. В течение на еволюцията са се оформили механизми за поправяне уврежданията в ДНК, дължащи се на грешки при репликацията или причинени от химични, физични и други въздействия.

Верността на репликацията зависи от правилното комплементарно взаимодействие между базите в матрицата и базите в новосинтезиращата се верига. Пуриновите и пиримидинови бази съществуват в две тавтомерни форми (вж глава 3). Фактът, че предпочитаните по-стабилни тавтомери се отнасят към другите форми както 10^4 - 10^5 към 1, улеснява правилното включване на нуклеотиди, но не е достатъчно за осигуряване на висока степен на вярна синтеза. За целта се прилага двукратен контрол - веднъж по време на самата репликация, и втори път след като е синтезирана новата верига.

В *E. coli* корекциите по време на репликацията се осъществяват чрез 3'-5'-екзонуклеазната активност на ДНК полимераза I и на една от субединиците на ДНК полимераза III. В бозайници полимераза β има такава активност, а вероятно и други ензими поемат тази корегиреща функция. Ако нуклеотидът в края на нарастващата верига е некомплементарен на нуклеотида в матрицата, този нуклеотид се отстранява преди да продължи удължаването на веригата. По този начин се елиминират повечето от грешките. Изчислено е, че само една база от милион се включва погрешно. При експериментално отстраняване на 3'-5'-екзонуклеазната активност, грешките нарастват 10^3 пъти.

12.12 Поправящи механизми

Въпреки ефективността на корекционните механизми по време на репликацията, някои грешки остават незабелязани. След репликацията действат други поправящи механизми, с което се намалява честотата на грешките до 1 на 10^{10} бр.

12.12.1 Поправяне на некомплементарно сдвояване

Специални белтъци сканират новосинтезираната ДНК, ориентирайки се от метилиран аденин в ГАТЦ участъци в матричната верига. Новата верига не е метилирана. Това позволява да се открие коя верига съдържа погрешен нуклеотид или малка бримка (последователност от няколко несдвоени бази). Тогава ГАТЦ ендонуклеаза срязва дефектната верига в място, съответстващо на ГАТЦ-елемента. Екзонуклеаза разгражда тази верига от ГАТЦ до края на мутацията. Така дефектната верига се отстранява. Ако дефектът е между два ГАТЦ елемента, то този участък може да бъде разграден от кой да е край. След това празнината се запълва от нормалните клетъчни ензими.

В *E. coli* има три белтъка (Mut S, Mut L и Mut H), които са необходим за разпознаване на мутацията и срязване на дефектната верига. В бозайници за тези първи стъпки са необходими шест белтъка.

Грешки в този механизъм се свързват с неполипозен рак на дебелото черво при човек (вж т. 12.13.2).

12.12.2 Поправяне чрез изрязване на бази

Чрез този механизъм се отстранява депуринизацията на ДНК, която може да настъпи спонтанно поради топлинна лабилност на N-гликозидната връзка с пуриновите бази. Специфични ензими разпознават дефекта и включват подходяща база, без да прекъсват фосфодиестерния скелет.

Цитозин, аденин и гуанин могат спонтанно чрез дезаминиране да се превърнат в урацил, хипоксантин или ксантин, съответно. Специфични N-гликозилази разпознават получените нетипични за ДНК бази и отстраняват само базата. Това е ориентир за апуринова или апириимидинова ендонуклеаза да разкъса 5'-фосфатната връзка и да отстрани пентозния и фосфатния остатъци. Получава се скъсване (nick) в пентозо-фосфатния скелет в едната верига, т.е. получават се свободна 3'-ОН и 5'-ОН групи. След това празнината се запълва от поправяща полимераза и целостта на веригата се възстановява чрез лигаза

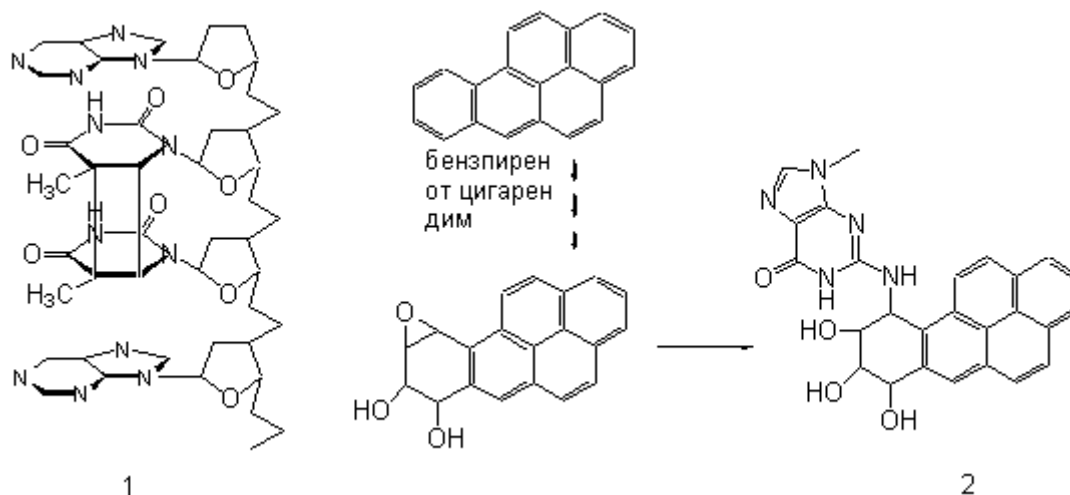
12.12.3 Поправяне чрез изрязване на нуклеотиди

Чрез този механизъм се изрязват фрагменти с дължина до 30 бр, получени при въздействия с УВ-светлина. Напр. при облъчване могат да се получат тиминови димери (фиг. 12-11-1). Увреждания се причиняват и от карциногени, получени при окисление на съдържащите се в цигарения дим бензпирен, бензантрацен и др. Получените карциногени образуват адукти с гуанин от ДНК - виж фиг. 12-11-2, а също и т. 12.13.3 и т. 2.13.4. Други увреждания се причиняват от йонизиращи лъчения и голям брой различни химикали, вкл. и някои лекарства. Тези въздействия водят до модификация на бази, прекъсване на веригите, напречно свързване на веригите и др.

Поправянето чрез изрязване на нуклеотиди е по-сложен механизъм от досега описаните и включва повече ензими. След разпознаване на дефекта и разплитане на ДНК в близост с дефекта, се скъсват две фосфодиестерни връзки под действие на специална екзонуклеаза (изрязваща нуклеаза) с три субединици в *E. coli* и 16

субединици в човек. В еукариотни клетки се изрязва не само дефектния участък, но по-голям фрагмент от около 27-29 нуклеотиди. След това полимерази \square/\square запълват празнината и краищата на новия фрагмент се свързват към ДНК чрез лигаза.

Пример за дефектен поправящ механизъм има при заболяването Xeroderma pigmentosum (ХР) - виж. т. 12.13.3.



Фиг. 12-11. Дефекти в ДНК, изискващи поправяне чрез изрязване на нуклеотиди.

1. Тиминов димер; 2 - Окисление на безвредния бензпирен от цигарен дим до опасен канцероген, който се свързва с гуанин от ДНК и нарушава нейните структура и функции.

12.12.4 Поправяне на скъсвания на двойната верига

Скъсвания на веригата се получават физиологично при пренареждане на имуноглобулиновите гени (вж глава 15).

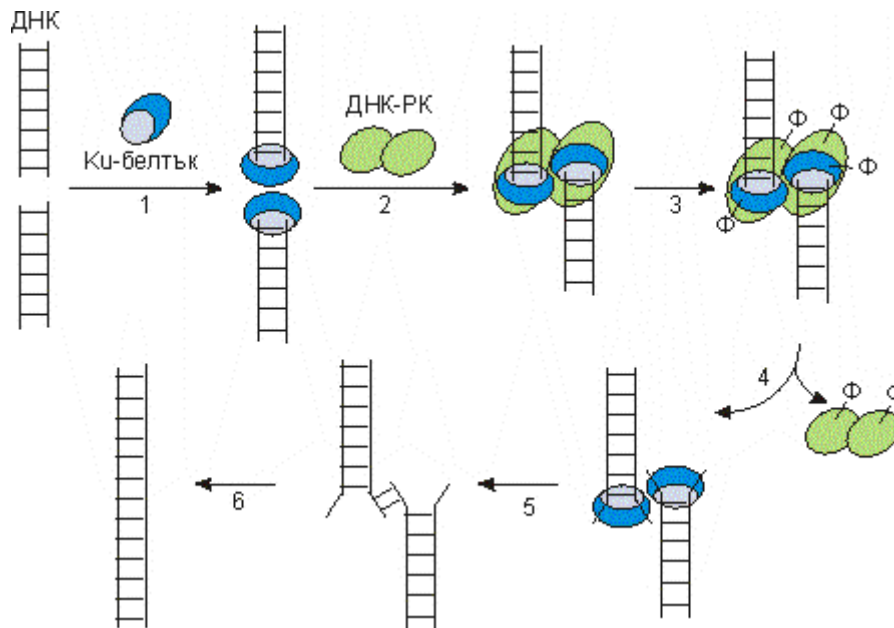
Скъсвания на двойната верига се получават при въздействия с йонизиращи лъчения, някои химиотерапевтици или при генериране на окислителни свободни радикали.

В поправяне на този дефект участват два белтъка (фиг. 12-12) [7]:

1) Ku-белтък (хетеродимер), който се свързва към свободните ДНК краища и има латентна АТФ-зависима хеликазна активност.

2) Особена ДНК зависима протеин киназа (ДНК-ПК), която има едно свързващо място за свободните краища на ДНК и друго за двойноверижните участъци в близост със свободните краища. Това позволява приближаване на разделените вериги.

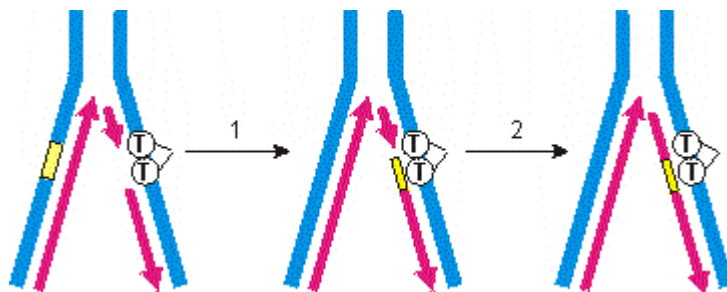
Комплексът от свободни краища на ДНК, Ku-белтък и ДНК-ПК активира киназната активност на последната. Всяка ДНК-ПК-молекула фосфорилира Ku-белтъка и ДНК-ПК-молекула в отсрещната верига. След това ДНК-ПК се отделя, а това води до активиране на хеликазната активност на Ku-белтъка и развиване на ДНК-краищата. Развитите доближени краища се свързват комплементарно, излишните нуклеотиди се изрязват чрез екзонуклеаза, а празнините се запълват. Накрая ДНК лигаза съединява веригите.



Фиг. 12-12. Поправяне на скъсване на двойната спирала (според [7]).

12.12.5 Поправяне на ДНК чрез рекомбинация

В случай, че ДНК полимеразата III от *E. coli* достигне непоправен дефект, напр; тимин димер, тя спира и възобновява репликацията след дефекта. Това води до получаване на празнина (фиг. 12-13). Тази празнина се запълва чрез заемане на хомоложен фрагмент от другата нормална верига посредством рекомбинация. Празнината в родителската верига се запълва от ДНК полимеразата и ДНК лигазата.



Фиг. 12-13. Поправяне на ДНК чрез рекомбинация

1 - Неувредената родителска верига рекомбинира с новосинтезиращата се верига, при което празнината в последната се запълва.

2 - Празнината в родителската верига се запълва от ДНК полимеразата и ДНК лигазата.

12.13 Примери за приложение на познатията върху репликация на ДНК в медицината

12.13.1 Лекарства, повлияващи репликацията на ДНК

12.13.1.1 Антиметаболити

Антиметаболитите могат да бъдат субстратни аналози на дезоксирибонуклеозиди. Голям брой такива аналози (вж глава 3) могат да бъдат включени в ДНК и това води до

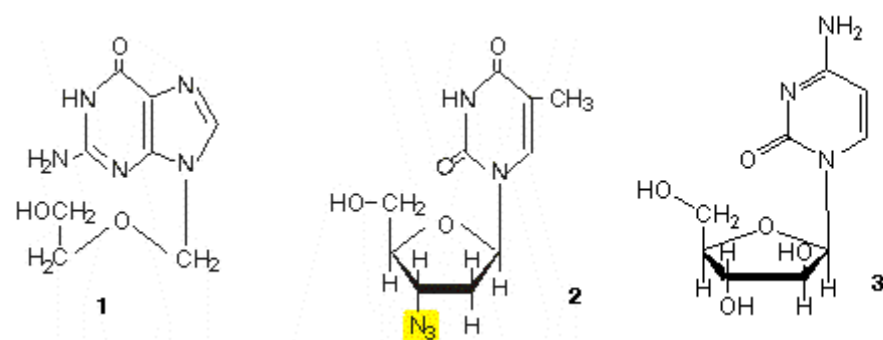
прекръпяване на репликацията. Модифицирани бази, напр. 5-F-урацил, 6-меркаптопурин (фиг. 3-25) и много други, в организма се превръщат в нуклеотиди.

5-F-дУМФ е ефикасен при неоплазми. Той потиска тимидилат синтазата, метилираща дУМФ до дТМФ (фиг. 9- 14 в т. 9.5.3), а с това и синтеза на ДНК.

В други структурни аналози е променена дезоксирибозата, напр. азидотимидин (AZT, зидовудин), ацикловир, цитозин арабинозид (цитарабин, ара-С) (фиг. 12-14) и др. При поемане от клетките те се фосфорилират и включват в ДНК. Липсата на 3'-ОН група в тези нуклеотиди спира синтеза на ДНК.

Азотимидин (AZT) е ефективен срещу ретровирусни инфекции (HIV). Той се фосфорилира от клетъчни кинази до AZT-трифосфат, който блокира репликацията на HIV вируса чрез блокиране на ДНК полимеразата от HIV. Вирусната ДНК полимераза е 100 пъти по-чувствителна към AZT-трифосфат, отколкото клетъчната.

Ацикловир (ациклогуанозин) се фосфорилира до нуклеозидмонофосфат от киназа в Herpesvirus (HSV). След това клетъчни кинази го фосфорилират до нуклеозидтрифосфат. А той е субстрат за ДНК полимеразата от HSV - включва се в нарастващата вирусна ДНК верига и спира ДНК репликацията.



Фиг. 12-14. Структурни аналози на нуклеозиди, инхибиращи синтеза на ДНК

1 - ациклогуанозин (ацикловир); 2 - 3'-азидо-3'-дезокси тимидин; 3 - цитарабин.

Цитозин арабинозид (цитарабин или араС) (фиг. 12-14-3) се фосфорилира до цитозин арабинозид 5'-трифосфат (араЦТФ) и така се конкурира с дЦТФ в ДНК полимеразната реакция. Включването на араЦТФ в ДНК инхибира репликацията. Затова цитарабин е ефикасен антилевкемичен препарат.

Антиметаболитите могат да бъдат аналози и на ензимни кофактори. Те намаляват или инхибират продукцията на субстратите (дНТФ) за репликацията. Без субстрати не се синтезира ДНК. Пример за такъв антиметаболит е метотрексат (глава 8 и глава 9). Като аналог на фолат, той инхибира дихидрофолат редуктазата и спира синтеза на дТМФ и ДНК.

12.13.1.2 Инхибитори на репликацията, взаимодействащи директно с ДНК

Интеркалаторите са вещества с планарна структура, което позволява вмъкването им между базите в ДНК. Прилагат се при левкемии и други тумори.

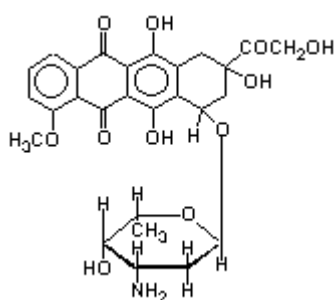
Примери за такива съединения са антрациклинови гликозиди като антибиотиките

даунорубин и доксорубин (фиг. 12-15), изолирани от щам на *Streptomyces*. Те блокират репликацията, увреждат и променят конформацията на ДНК, с което инхибират ДНК полимеразите. Някои интеркалатори са и мутагенни агенти.

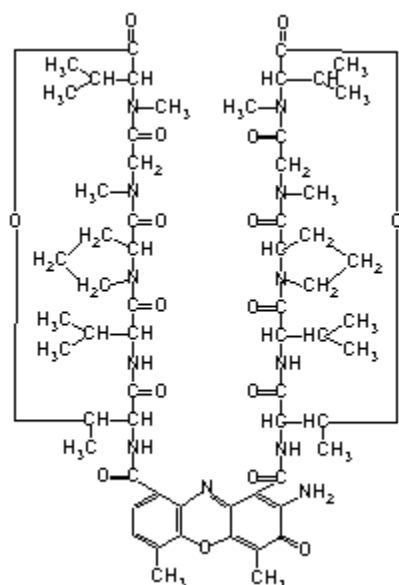
Антибиотикът актиномицин D (от *Streptomyces*) (фиг. 12-16) също действа като интеркалатор. Прилага се за лечение на различни тумори.

Платина-съдържащите съединения реагират с N^7 в пуриновия пръстен на гуанин и водят до образуване на напречни връзки между съседни гуанини в ДНК. Прилагат се за лечение на рак на тестиси и яйчници.

Блеомицините се свързват към ДНК и в присъствие на O_2 и Fe^{2+} разрушават ДНК. Прилагат се при рак на тестиси и др.



Фиг. 12-15. Формула на доксорубин (адриамицин), действащ като интеркалатор, който се вмъква между базите в ДНК и спира репликацията.



Фиг. 12-16. Формула на актиномицин D.

Пентапептидният фрагмент приляга в браздите на ДНК, а плоският феноксазонов пръстен действа като интеркалатор. В присъствие на този антибиотик ДНК не може да служи като матрица нито за репликация, нито за транскрипция

12.13.2 Неполипозен рак на дебелото черво вследствие на дефект за поправяне на некомплементарно сдвояване

При недостатъчност на механизма за поправяне на некомплементарно сдвояване има висока вероятност да се развие рак на дебелото черво. Клетките с дефектен поправящ механизъм са около 100 пъти по-податливи на мутации отколкото клетките на здрави хора [8].

Повечето тумори възникват при дефект в един от четирите гени, дадени в табл. 12-2. Кодираниите от тях белтъци са аналози на белтъците Mut S и Mut L, необходими за разпознаване на мутацията, водеща до некомплементарно сдвояване.

Табл. 12-2. Гени, чиито мутации водят до рак на дебелото черво.

Ген	Белтък
bMSH2	белтък, аналог на бактериалния Mut S
bMLH1	белтък, аналог на бактериалния Mut L
bPMS1	белтък, аналог на бактериалния Mut L
bPMS2	белтък, аналог на бактериалния Mut L

Нефункционирането на поправящия механизъм води до натрупване на мутации, които засягат системите, контролиращи клетъчното делене в клетките на дебелото черво. Това се смята за причина за около 90 % от случаите на рак в дебелото черво на човека.

12.13.3 Xeroderma pigmentosum вследствие дефект в механизма, поправящ ДНК чрез изрязване на нуклеотиди

Xeroderma pigmentosum (XP) е група от няколко близки автозомално рецесивни заболявания [9, 13, 14]. При тях има засилена чувствителност към УВ лъчи, водеща до фотодерматоза. Характерни са голям брой лунички и кожни язви, които водят до множествен рак на кожата и преждевременна смърт. Някои форми са придружени от неврологични увреждания.

При тези заболявания дефектен е поправящият ДНК механизъм, действащ чрез изрязване на нуклеотиди. Ако клетки от такива пациенти, отгледани в култура, се облъчат с УВ светлина, се получават тиминови димери (фиг. 12-11-1). Тези димери не могат да бъдат изрязвани поради дефекти в един от седем различни гени. Продуктите

на тези гени, означавани с буквите от XPA до XPG са съставни части на поправящия механизъм.

Около 80 % от пациентите спадат към една от споменатите 7 групи. Всяка група носи мутации в различен ген и се характеризира с различна чувствителност към УВ светлина, причинена от съответната недостатъчност на екзинуклеазата.

Останалите пациенти спадат към XPV, като буквата V идва от английската дума variant. В тази група УВ светлина предизвиква различни типове мутации в една или повече субединици на полимеразата или други помощни белтъчни фактори. В нормални клетки ДНК полимеразата заобикаля непоправен пиримидинов димер в матрицата и продължава синтеза, включвайки обикновено аденилов нуклеотид. В болните този механизъм на заобикаляне е променен и не действа

12.13.4 Тест на Ames за доказване на канцерогенност на химикали

Под канцерогенност се разбира способността на дадено вещество да предизвика рак.

Голям брой различни индустриално получени вещества (фиг. 12-11-2) или природни вещества като афлатоксини от плесени, сами по себе си безвредни, могат да се превърнат в карциногени след поемане от клетките и окисление, най-често хидроксилиране под действие на системи в ендоплазмения ретикулум, съдържащи цит. P450.

В миналото канцерогенността е била установявана чрез т.н. директен тест - въвеждане на високи дози от изследвания химикал в голям брой експериментални животни (обикновено гризачи) и проследяване на ефекта му. Директните тестове изискват много време и са много скъпи. Освен това в последно време се знае, че поправящите системи в транскрипционно неактивни участъци на ДНК са по-малко-ефикасни в гризачи, отколкото в хора. Много по-прост и евтин е индиректният тест, въведен от Ames [12]. Той се основава на предположението, че карциногенността и мутагенността отразяват едно и също явление, а именно структурните промени в ДНК. Тестът измерва скоростта на мутации, които претърпяват бактерии, когато са подложени на действието на предполагаемия карциноген. Въпреки някои изключения, изследването на голям брой химикали е показало, че има добра корелация между способността на даден химикал да предизвика мутации в бактерии и рак в животни.

12.14 Материали за самостоятелна работа

12.14.1. Интернет връзки: [The Human Genome Project](#)

12.14.2. Разгледайте дискусиите върху клиничен случай с Xeroderma pigmentosum, представени в литературните източници [13 и 14].

12.14.3. Разгледайте [on-line-каталога на Freeman](#).

12.15 Литература

1. Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F. Jr., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tasumi, M (1977). J. Biol. Chem. 112, 535, Protein Data Bank. A computer-based archival file for the macromolecular structures, file PDB:2pol.ent.

2. Kornberg, A. J. Mol. Biol. 1988, 263, 1.
3. Kim, S. et al. Cell 84, 1996, 643.
4. Lodish et al., Molecular Cell Biology, Fourth ed., The W. H. Freeman Publishers, 2000.
<http://www.whfreeman.com/lodish/>
5. Allsopp, R. C., H. Vasiri, C. Patterson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1992, 10114.
Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts.
6. Counter, C. M., H. W. Hirte, S. Bacchetti, and C. B. Harley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9, 1994, 2900. Telomerase activity in human ovarian carcinoma.
7. Chu, G. J. Biol. Chem. 272, 1997, 24097. Double strand break repair.
8. Modrich, P. Science 266, 1994, 1959. Mismatch repair, genetic stability and cancer.
9. Tanaka, K. and R. D. Wood. TIBS 9, 1994, 83. Xeroderma pigmentosum and nucleotide excision repair of DNA.
10. Wood, R. D. J. Biol. Chem. 272, 1997, 23465. Nucleotide excision repair in mammalian cells.
11. Sancar, A. J. Biol. Chem. 270, 1995, 15915. Excision repair in mammalian cells.
12. Ames, B., W. E. Dursto, E. Yamasaki and F. D. Lee. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1973, 2281. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.
13. Murray, R., D. Granner, P. Mayes, V. Rodwell (2000) Harper's Biochemistry, Prentice-Hall International, Inc., Twenty-Fifth Edition, London, Biochemical Case Histories. Case No. 1. Xeroderma pigmentosum, p. 850-852.
14. Montgomery, R., T. Conway, A. Spector. (1996) Biochemistry. A Case-Oriented Approach. The C. V. Mosby Company, St. Louis, Sixth Edition. Clinical Examples. Case No. 1. Xeroderma pigmentosum, p. 487-488.