ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА
КАФЕДРАСЫ

Пән атауы: Молекулалық биология

Дәріс 6

Репликацияның Корнберг ұсынған моделі. Репликация процесінің бағыты және басталу нүктелері

Лектор: к.б.н., Алтыбаева Н.А.

Дәрістің мақсаты: Корнберг тәжірибесі негізінде ДНҚ синтезінің ферменттік табиғатын түсіндіру, прокариоттар мен эукариоттардағы репликацияның басталу ерекшеліктерін және жаңа ДНҚ тізбектерінің синтез бағытын сипаттау.

Дәрістің жоспары:

1.Корнберг тәжірибесі. ДНҚ-полимераза I ферментінің ашылуы және ДНҚ синтезінің ферменттік табиғаты.

2.Репликацияның басталу нүктелері және репликондар. Бактериялар мен эукариоттардағы репликацияның басталу ерекшеліктері.

3.Репликациялық айыршалардың түзілуі және басталу нүктесінен екі бағытта қозғалуы.

4.ДНҚ синтезінің 5′-тен 3′-ке қарай жүруі. Жетекші тізбектің үздіксіз синтезі және артта қалушы тізбектегі Оказаки фрагменттерінің түзілуі мен бірігуі.

Оқыту нәтижелері

Дәрісті меңгеру нәтижесінде білім алушы:

1.Корнберг тәжірибесінің нәтижелері негізінде ДНҚ синтезінің ферменттік табиғатын негіздейді және ДНҚ-полимераза I ферментінің ашылу маңызын сипаттай алады.

2.Репликон ұғымын анықтайды және бактериялар мен эукариоттардағы репликацияның басталу нүктелерінің ұйымдасуын салыстыра алады.

3.Репликациялық айыршалардың түзілуін сипаттайды және олардың басталу нүктесінен қарама-қарсы бағыттарда қозғалуын сызбада көрсете алады.

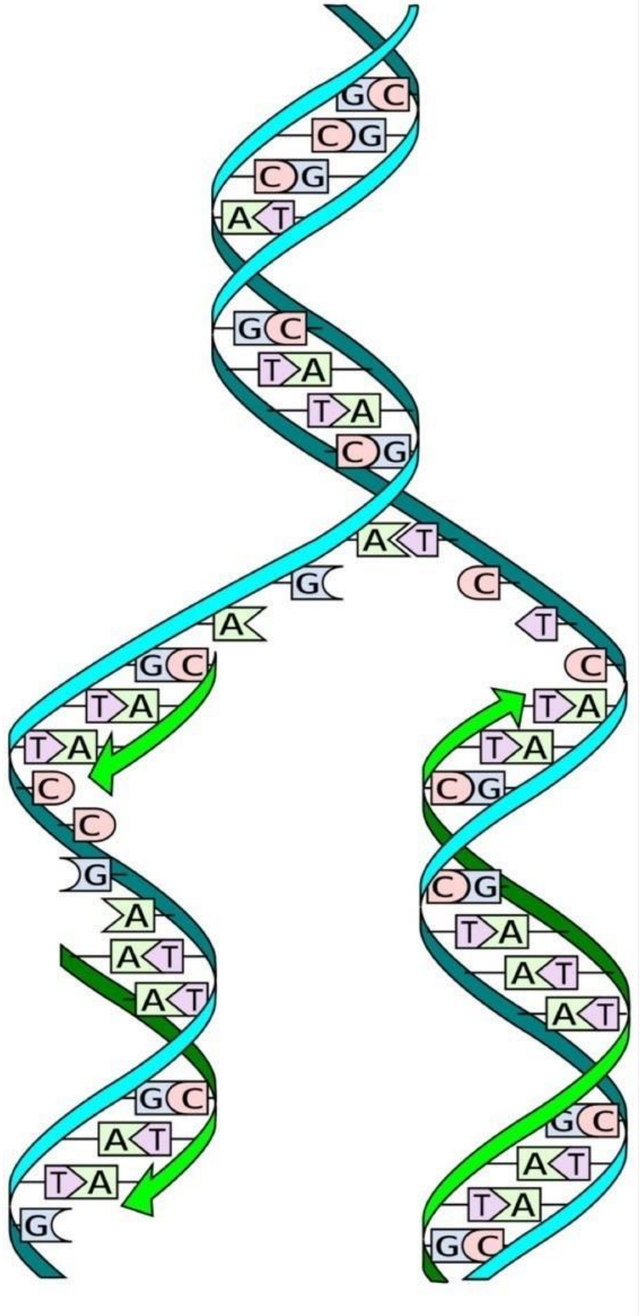
4.Матрицалық тізбектердің антипараллель орналасуы мен ДНҚ синтезінің 5′-тен 3′-ке қарай жүруіне сүйеніп, жетекші және артта қалушы тізбектердің синтез ерекшеліктерін негіздей алады.

5.Бактерияларда Оказаки фрагменттерінің түзілуі мен бірігуіне қатысатын праймаза, ДНҚ-полимераза III, ДНҚ-полимераза I және ДНҚ-лигазаның қызметтерін ажырата алады.

Репликация — бұл ДНҚ молекуласының дәл көшірмесін түзу процесі, яғни генетикалық ақпараттың жас жасушаларға дәл жеткізілуін қамтамасыз ететін негізгі биологиялық құбылыс. Бұл процесс жасуша бөлінер алдында жүреді және тұқым қуалау тұрақтылығын сақтауда маңызды рөл атқарады. Репликация нәтижесінде аналық ДНҚ-ның әрбір тізбегі жаңа комплементарлы тізбек түзу үшін қалып қызметін атқарады. Осылайша жаңа молекула бір ескі және бір жаңа тізбектен тұрады, бұл жартылай-консервативті механизм деп аталады.

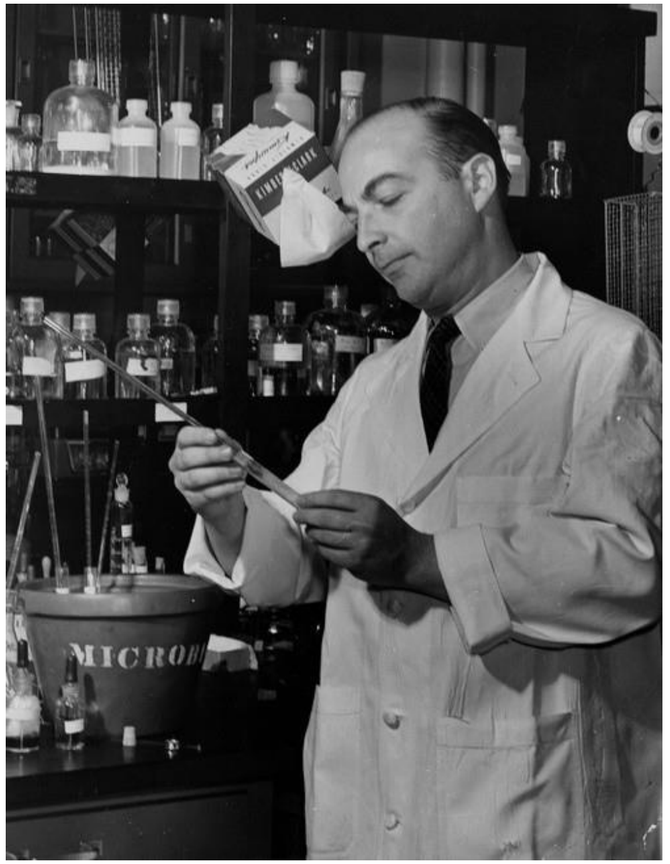
•ДНҚ репликациясын реплисома деп аталатын 15-20 түрлі фермент-белоктардан тұратын күрделі кешен жүзеге асырады.

ДНҚ-ның өзін-өзі екі еселеу қабілеті оның қос тізбекті құрылымына байланысты. Азоттық негіздердің комплементарлы жұптасуы (A–T және G–C) репликация кезінде жаңа тізбектердің дәл түзілуін қамтамасыз етеді. Бұл қасиет тірі ағзалардың дамуы, тұқым қуалаушылық және эволюциялық тұрақтылық үшін шешуші маңызға ие.



Зерттеу тарихы

Корнберг ұсынған репликация әдісі — ДНҚ репликациясының ферментативтік моделі, оны 1956–1959 жылдары американдық биохимик Артур Корнберг зерттеген.



Негізгі идеясы:

Корнберг ДНҚ-ның жасанды жағдайда қалай көшірілетінін анықтау үшін тәжірибе жүргізіп, ДНҚ-полимераза I ферментін ашты. Бұл фермент ДНҚ тізбегін жаңа комплементарлы тізбекке айналдырады.

- Бұл тәжірибе ДНҚ репликациясының молекулалық механизмін алғаш рет дәлелдеді.
- Корнберг пен әріптестері ашқан ДНҚ-полимераза I кейіннен ДНҚ жөндеу (репарация) процестерінде маңызды рөл атқаратыны анықталды.
- Бұл әдіс кейінгі молекулалық биология мен гендік инженерияның негізін қалады.

Артур Корнберг 1959 жылы Нобель сыйлығын (Северо Очоамен бірге) «ДНҚ мен РНҚ синтезі механизмін ашқаны үшін» алды.

ДНҚ репликациясы жасушаның бөлінуіндегі негізгі процесс болып табылады. Жасуша бөлінген кезде ДНҚ толығымен және тек бір рет репликацияланады. Бұл ДНҚ репликациясын реттеудің белгілі механизмдерімен қамтамасыз етіледі.

Репликация үш кезеңде жүзеге асады:

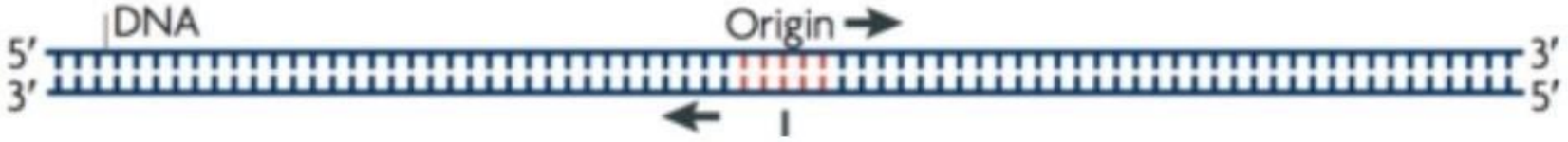
1. **Репликация инициациясы**
2. **Элонгация**
3. **Репликация терминациясы**

Репликацияның принциптері

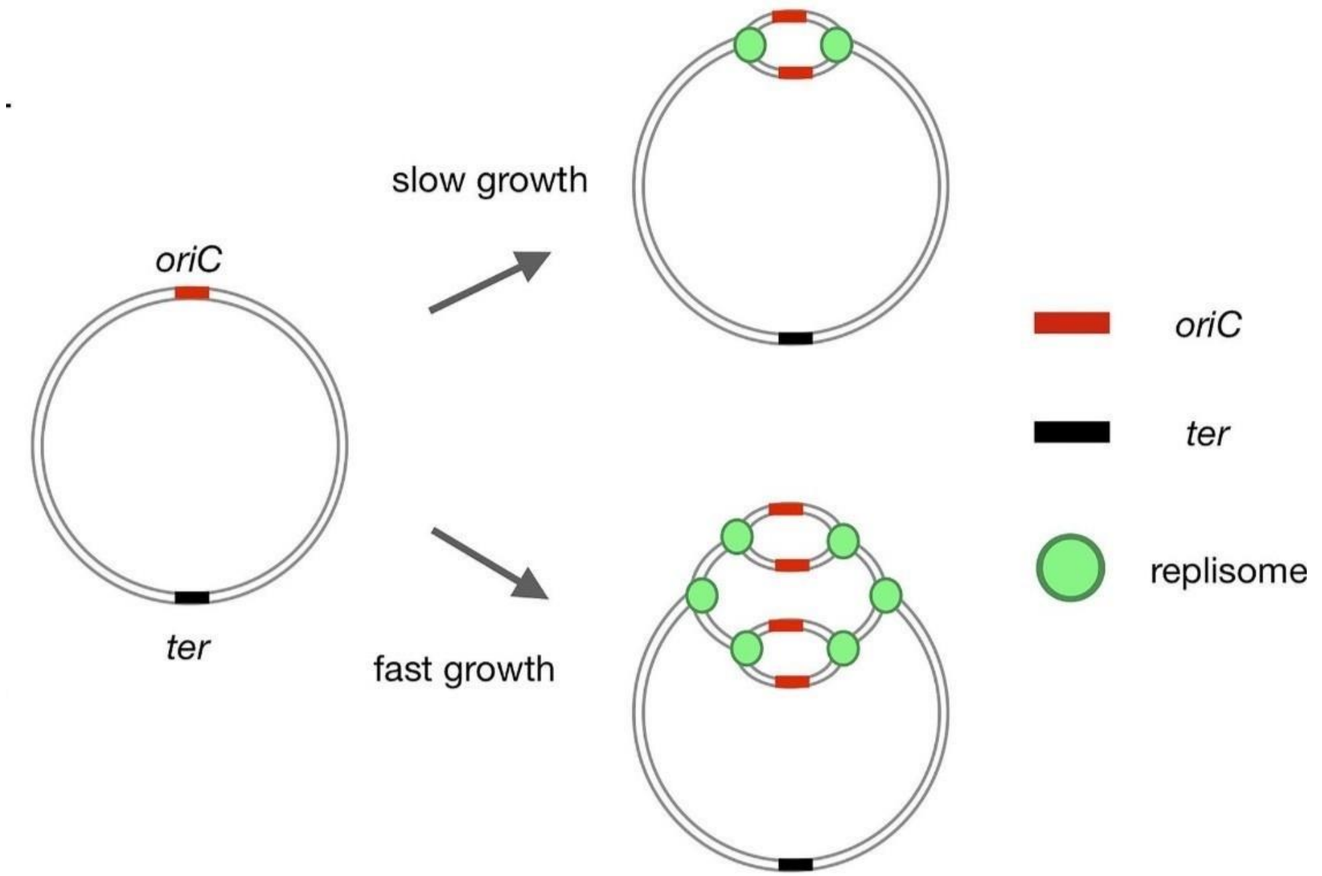
1. Комплементарлылық.
2. Антипараллельділік.
3. Униполярлылық.
4. Праймер тәуелділік.
5. Үзілісті.
6. Жартылай консервативті.

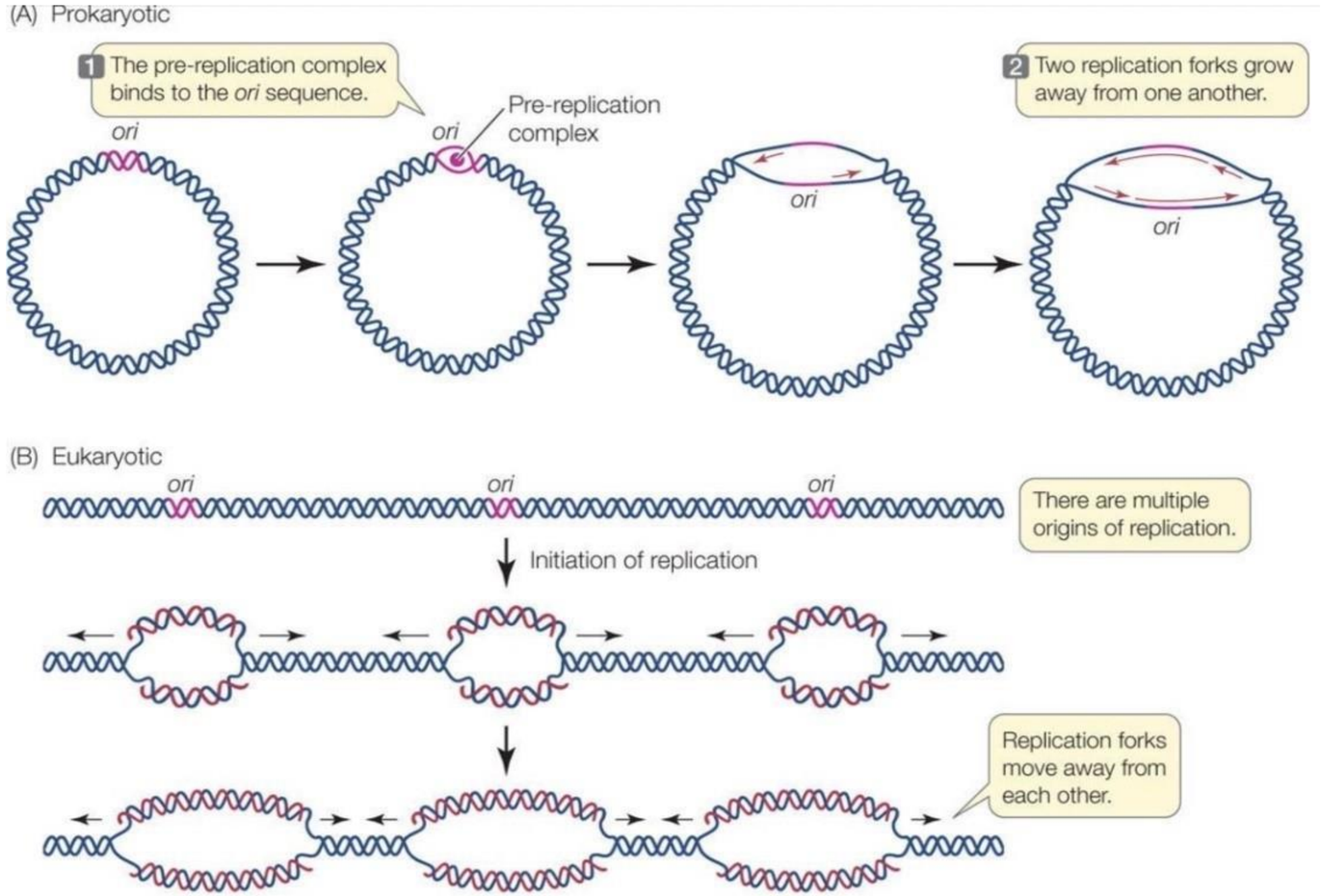
• Репликация негізінен инициация сатысында реттеледі. Репликация ДНҚ- ның кез келген нүктесінен емес, **репликацияның басталу нүктесі** деп аталатын қатаң анықталған бөлімнен басталады. репликацияны бастау нүктесі **ori** деп белгіленеді.

• **Репликацияның басталу нүктесінің** құрылымы (нуклеотидтік бірізділігі) әртүрлі түрлерде ерекшеленеді, бірақ барлық организмдерде ол **АТ**-ға бай, сондықтан балқуы төмен тізбек болып табылады.



oriC –ішек таяқшасы ДНҚ сының репликациясын бастау орны. oriC 245 ж.н. және екі функционалды аймақты қамтиды: репликация инициациясының факторы DnaA спецификалық байланысу аймағы және ДНҚ спиралының бірінші реттік ағыту аймағы - DUE





Эукариоттық геномдарда (сондай-ақ олардың жеке хромосомаларында) мұндай нүктелер көп және дербес хромосоманың жалпы репликация уақытын едәуір қысқартатын көптеген тәуелсіз репликондардан тұрады.

• Бір репликацияның басталу нүктесінен тұратын репликацияның бір құрылымдық өлшем бірлігі —

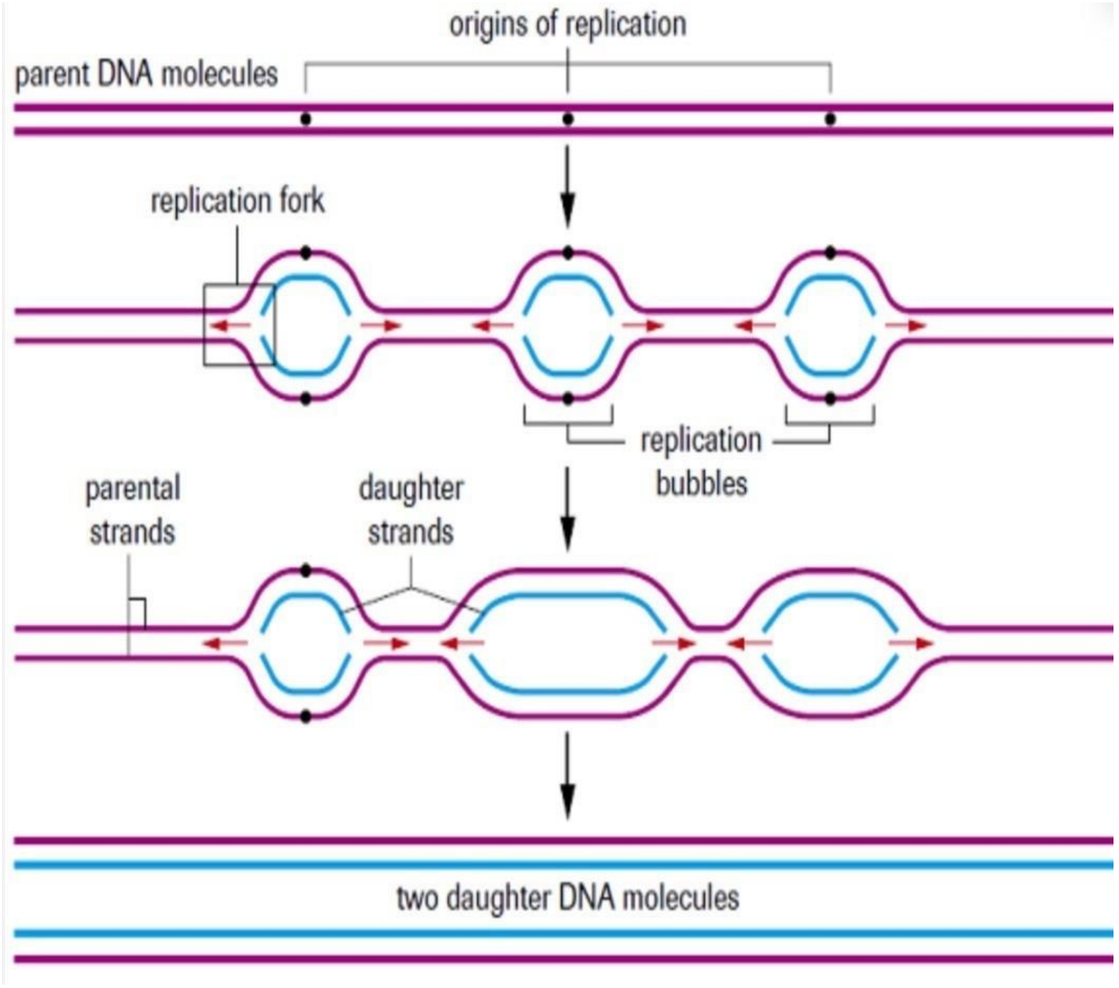
репликон деп аталады. Демек, **репликон** - бұл репликацияның басталу нүктесі бар және осы
нүктеден ДНҚ синтезі басталғаннан кейін репликацияланатын ДНҚ бөлімі.

• **Прокариоттардың** хромосомалары мен плазмидаларында бір, сирек бірнеше ДНҚ репликациясының басталу нүктелері болады және,

әдетте, бір репликонды құрайды. Демек бүкіл геномның репликациясы репликацияны бастаудың бір ғанаактісінің нәтижесі болып табылады;

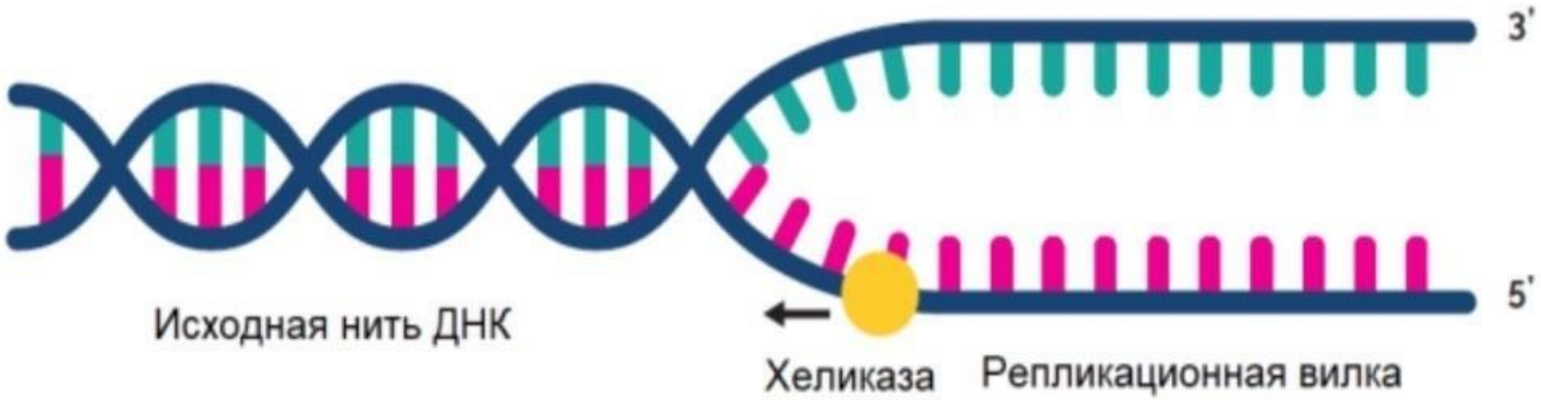
Репликация айырымы

Репликация репликацияның басталу нүктесінде ДНҚ қос спиралінің шешілуінен басталады. Нәтижесінде **репликациялық айырымы** деп аталатын Y-тәрізді құрылым — нақты репликацияның жүретін орны
түзіледі. Әрбір **ori сайтынан** репликацияның бір бағытты немесе екі бағытты болуына байланысты бір немесе екі репликация айырылымы түзіледі. Репликация айырылымы жылжу барысында репликацияланбаған ДНҚ-ның ұзын аймақтарымен қоршалған ДНҚсы репликацияланған хромосома аймағы – **репликация көзі немесе көпіршігі** пайда
болады. Тізбектердің ажырау процесі **денатурация** немесе **балқу** деп аталады. ДНҚ бөлігін денатурациялау үшін қажетті энергия мөлшері **AT** және **GC** байланыстарының қатынасына байланысты

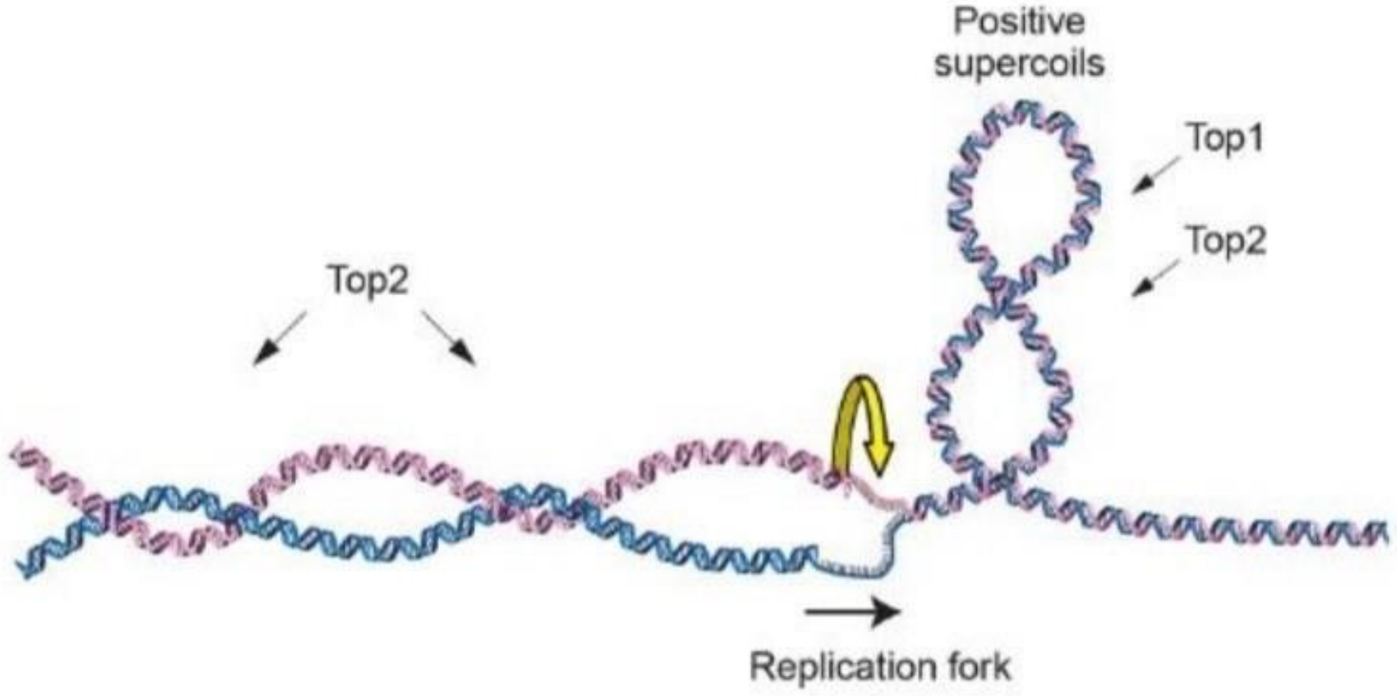


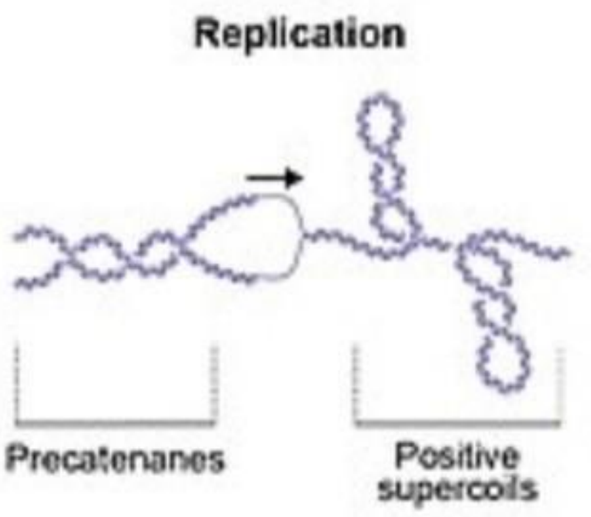
ДНҚ репликациясының энзимологиясы

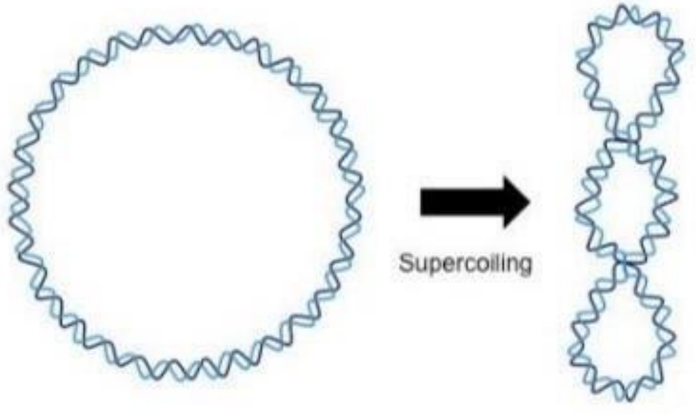
Фермент / Ақуыз	Қызметі (функциясы)
ДНҚ полимераза	Комплементарлылық принципі бойынша ДНҚ матрицасында дезоксирибонуклеотидтердің полимерленуін катализдейді.
ДНҚ лигазасы	Қос тізбекті ДНҚ-ның үзіліс орындарында іргелес дезоксинуклеотидтердің 5'-фосфорил және 3'-гидроксил топтары арасында фосфодиэфирлік байланыстарды түзіп, тізбекті біріктіреді.
ДНҚ-хеликаза	Қос тізбекті ДНҚ жіптерін ажыратып, бір тізбекті күйге көшіреді.
SSB протеиндері	Бір тізбекті ДНҚ фрагменттерін тұрақтандырады және олардың қайта комплементарлы жұптасуын болдырмайды.
ДНҚ топоизомеразасы	ДНҚ-да уақытша бір тізбекті үзілістер енгізу арқылы суперширатылуды шешеді (ДНҚ ширатылуын азайтады).
ДНҚ праймаза	Бір тізбекті ДНҚ матрицасына комплементарлы қысқа РНҚ тізбегін (праймер) синтездейтін РНҚ-полимераза ферменті.

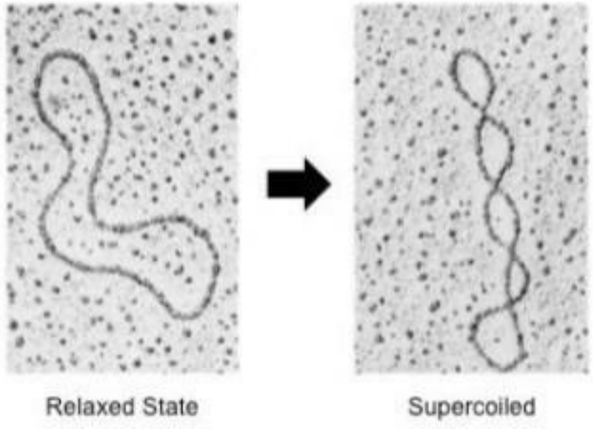


Хеликаза - репликацияның басталу нүктесіне байланысатын алғашқы фермент. Хеликаза ферментінің міндеті – ДНҚ молекуласының қос спиралін (азоттық негіздер арасындағы сутектік байланыстарды үзіп)сыдырма секілді шеше отырып репликациялық айырымды алға жылжыту болып табылады.

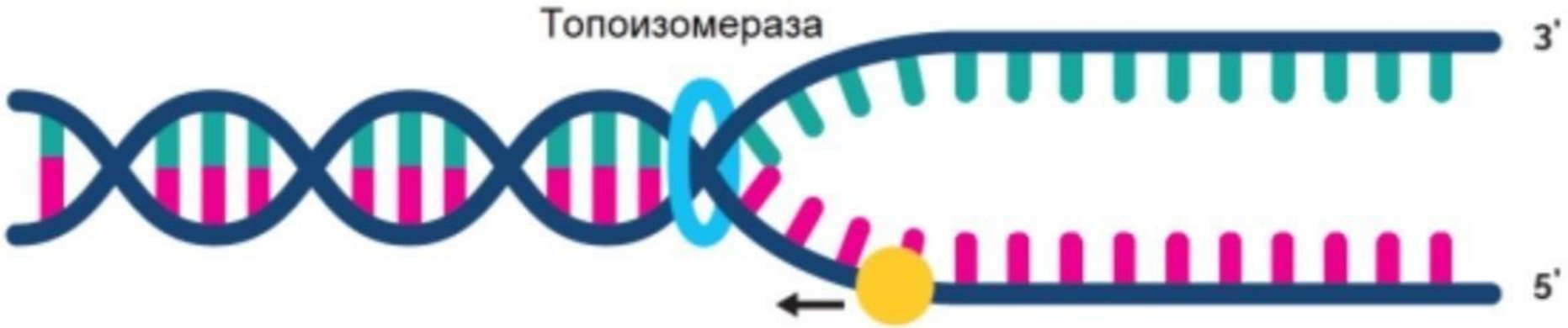

Positive
supercoils
Top1
Top2
Top2
Replication fork


Replication
Precatenanes
Positive
supercoils


Supercoiling

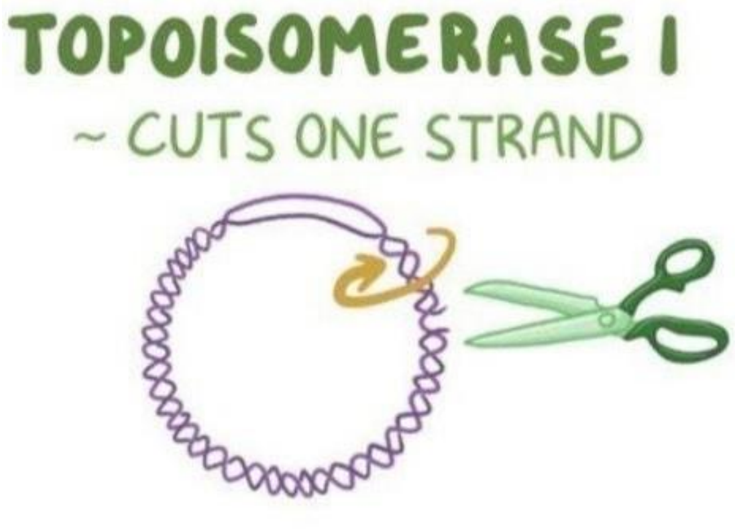

Relaxed State
Supercoiled

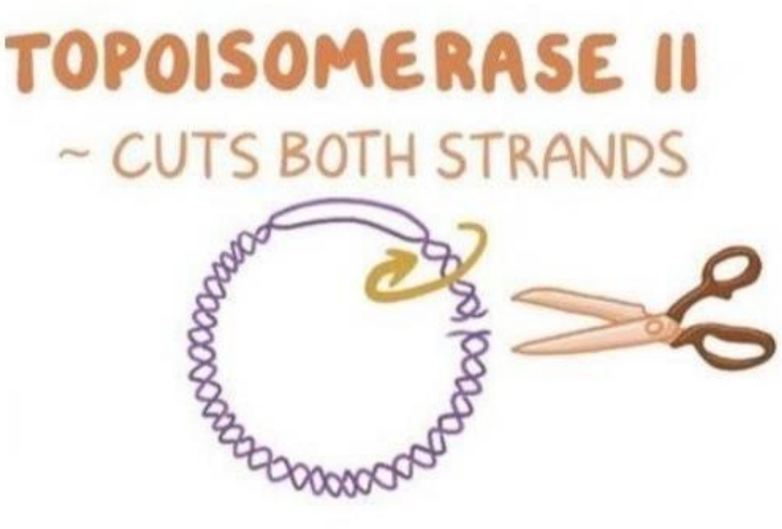
Топоизомераза ДНҚ репликациясында маңызды рөл атқарады. Бұл фермент ДНҚ қос спиралының аса қатты ширатылуын болдырмайды, яғни ДНҚ хеликаза әсерінен қос тізбектің тарқатылуы кезінде репликация айырымының алдындағы ДНҚ-дағы топологиялық қиындықтарды жеңілдетеді. Ол тізбектердің шамадан тыс орамдарын жою үшін тізбектерге уақытша үзілістерді енгізеді, содан кейін тұрақты зақымдануды болдырмау үшінолларды жөндейді



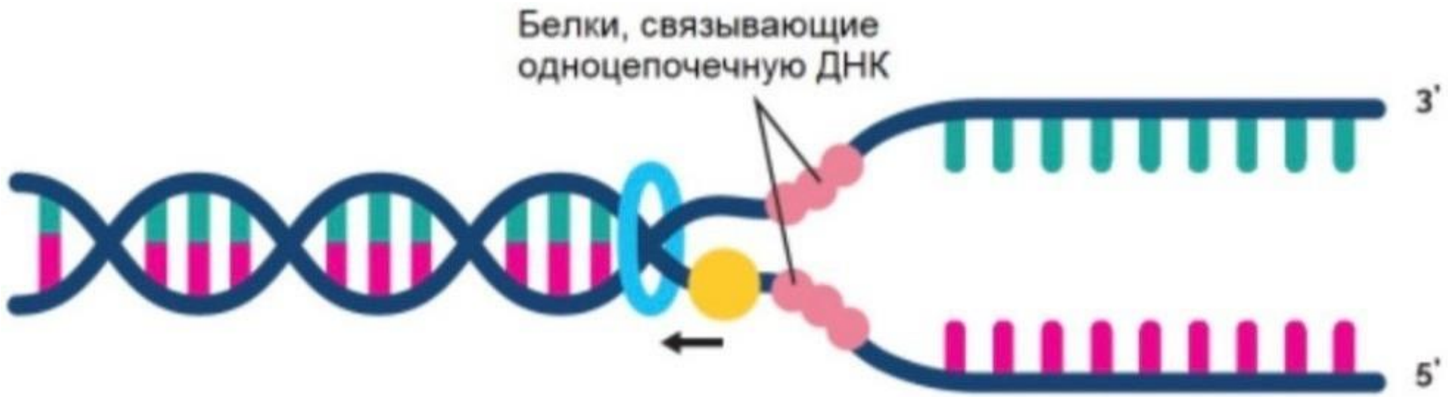
Топоизомераза I - репликация айырымы аумағындағы бір тізбекті уақытша үзіп, ДНҚ спиралінің өз осі бойымен айналуын қамтамасыз етеді. Тополигиялық қиындықтар шешілген соң тізбектер қайта тігіледі.

Топоизомераза II - екі тізбекті уақытша үзіп, күрделі түйіндердің шешілуіне мүмкіндік береді.



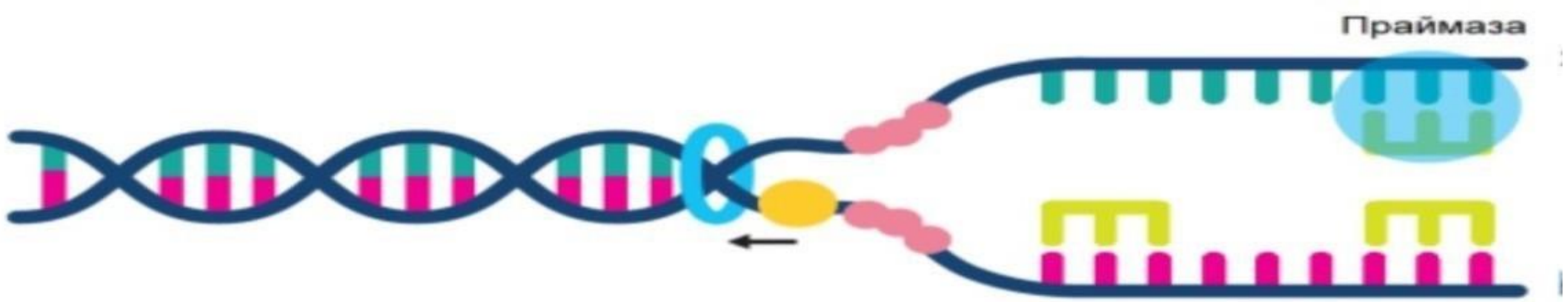


SSS белоктар



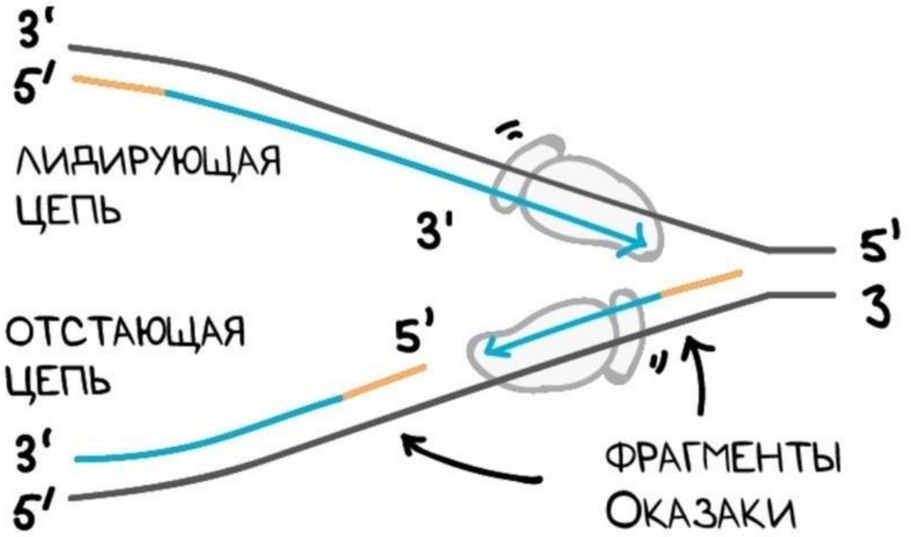
Бір тізбекті ДНҚ-ны байланыстыратын ақуыздар екі тізбекті бір-бірінен бөлуге көмектеседі. Олар ДНҚ-ның жеке жіптерін репликация айырылымы жанында орап, олардың қос спиральға қайта жиналуына ренатурациялануға жол бермейді. Олар ДНҚ-ны денатурацияламайды, тек бір тізбекті күйді бекітеді. Олардың бір тізбекті ДНҚ-ға туыстығы жоғары. Ақуыз қос тізбекті ДНҚ-мен байланыспайды.

ДНҚ праймаза – ДНҚ репликациясына қатысатын фермент және РНҚ полимеразаның бір түрі. Праймаза ssDNA (бір тізбекті ДНҚ) үлгісіне комплементарлы праймер деп аталатын қысқа РНҚ (немесе кейбір тірі ағзалардағы ДНҚ фрагментінің синтезін катализдейді. Бактерияларда праймаза ДНҚ хеликазасымен байланысып, праймосома деп аталатын кешен түзеді. Праймазаны хеликаза белсендіреді, онда ол ұзындығы шамамен 11 ±1 нуклеотидтер болатын қысқа РНҚ праймерін синтездейді. Праймердің бос 3’ соңына элонгация сатысында ДНҚ полимераза арқылы жаңа нуклеотидтер қосылады. Репликацияның элонгациясынан кейін РНҚ бөлігі 5'-3' экзонуклеаза арқылы жойылады және ДНҚ-мен толтырылады.



Оказаки фрагменттері

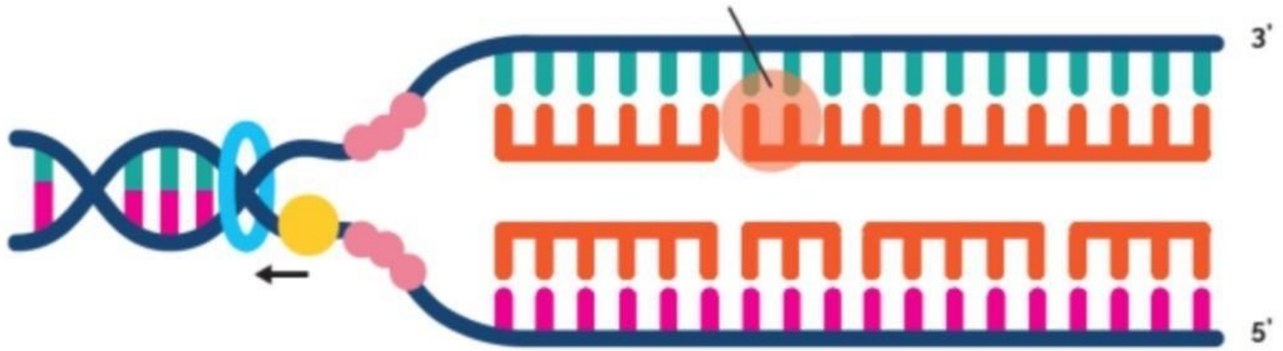
Оказаки фрагменттері (англ. Okazaki fragments) — Репликация барысында артта қалатын тізбектерде синтезделетін (5—соңында РНҚ праймері бар) салыстырмалы қысқа ДНҚ фрагменттері. E. coli-дегі Оказаки фрагменттерінің ұзындығы шамамен 1000-2000 нуклеотидті құрайды,ал эукариоттарда әдетте 100-200 нуклеотидтерден тұрады.



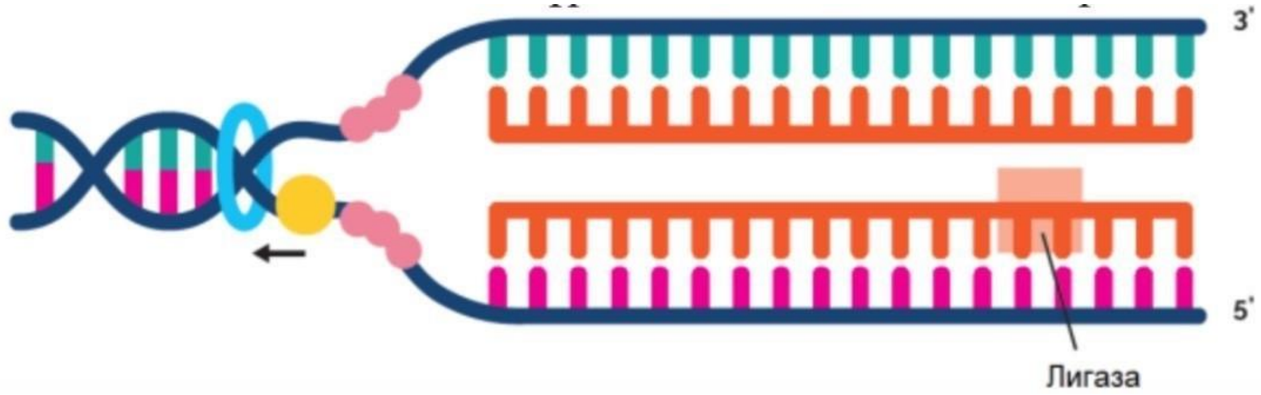
• Оказаки фрагменттерін 1968 жылы Рейджи Оказаки, Цунеко Оказаки және олардың бірлескен авторлары E. coli-де бактериофагтардың ДНҚ репликациясын зерттеу кезінде сипаттаған.

• Жетекші тізбекті бір праймер негізінде синтездеуге болады, ал артта қалған тізбектің қысқа Оказаки фрагменттерінің әрқайсысы үшін жаңа праймер қажет

ДНҚ полимераза III Оказаки фрагментін синтездеп келесі праймердің 3’-соңына жеткен кезде ДНҚ-полимераза I ферменті 5’- экзонуклеазалық белсенділігімен 5’- 3’-бағытында РНҚ нуклеотидтерін босатып РНҚ праймерлерін жояды және оларды ДНҚ-мен ауыстырады.



ДНҚ репликациясының соңғы кезеңі ДНҚ-лигаза ферментінің жұмысына байланысты. Ол Оказаки фрагменттерінің бірінің 3’-ұшының ОН тобын көршілес нуклеотидтің 5-соңындағы фосфат тобымен байланыстырып, нәтижесінде фосфодиэфирлі байланыс түзәледі. Сөйтіп артта қалып қойған тізбектің алғашқы құрылымын қалпына келтіреді.



Репликация инициациясы

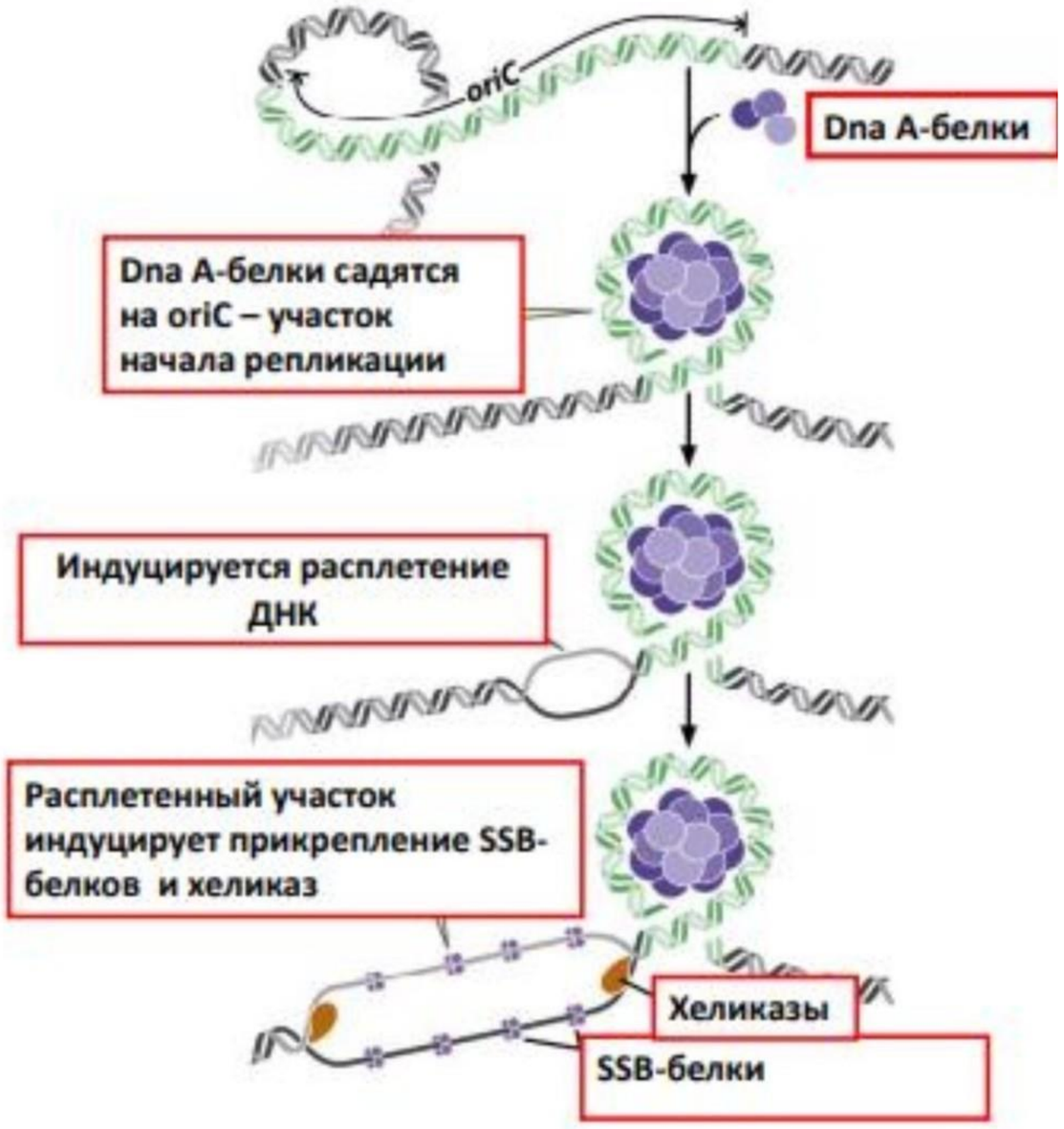
• DnaA инициатор ақуызы көптеген бактерияларда хромосомалардың репликациясын бастауда маңызды рөл атқарады. Ол кезекті түрде 3 негізгі функцияны орындайды:

• ДНҚ-дағы наномерлік қайталанулармен кезекті түрде байланысу арқылы ori репликацияның басталу аймағын таниды

• АТ-ға бай ДНҚ аймақтарының ажырауына ықпал етеді

• ori ажыратылған аймақтарына DnaB ДНҚ геликазасын тарту үшін жағдай жасайды

• Элонгация обеих нитей синтезирую



Эукариоттарда ДНҚ репликациясы

• ДНҚ репликациясының негізгі принциптері бактерияларда да, эукариоттарда да (әсіресе адамдарда) ұқсас, бірақ кейбір айырмашылықтар бар:

• Эукариоттарда әдетте бірнеше сызықтық хромосома болады, олардың әрқайсысында репликацияның бірнеше басталу нүктесі бар. Адамда репликацияның 100 000-ға дейін басталу нүктесі болуы мүмкін.

• E. coli ферменттерінің көпшілігінің эукариоттық ДНҚ репликация жүйесінде аналогтары бар, бірақ E. coli-де бір фермент жасайтын әрекет эукариоттардағы бірнеше ферменттер арқылы орындалуы мүмкін. Мысалы, адамдарда бес түрлі ДНҚ полимеразалары бар, олардың әрқайсысы
репликацияда маңызды рөл атқарады.

• Эукариоттық хромосомалардың көпшілігі сызықты. Артта қалған жіптердің жасалу ерекшеліктеріне байланысты әрбір репликация кезінде сызықтық хромосомалардың соңындағы ДНҚ фрагменттерінің бір бөлігі жоғалады. Олар теломерлер деп аталады

1. Негізгі қағида

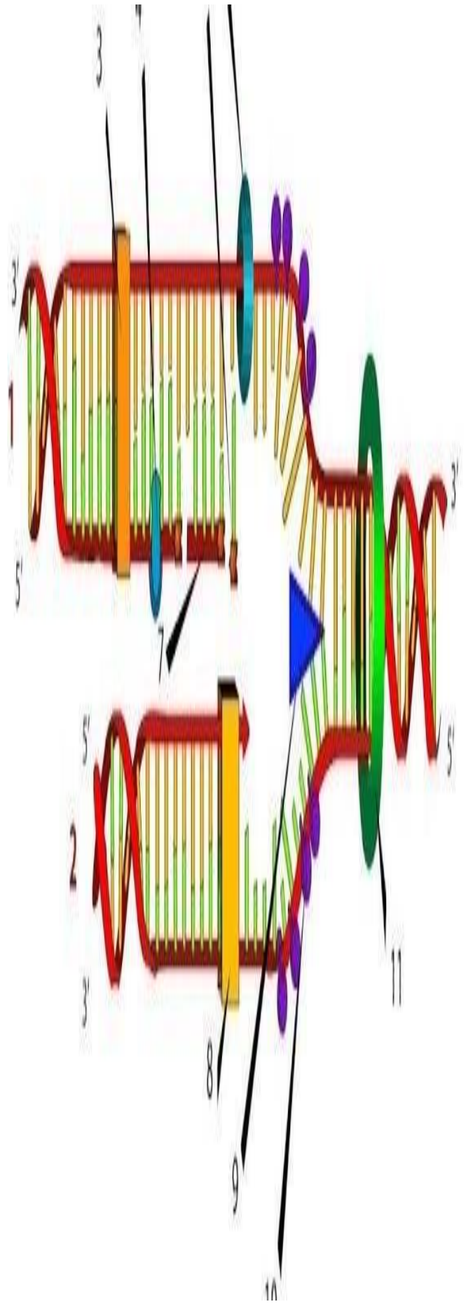
ДНҚ репликациясы кезінде жаңа тізбек әрқашан 5′ → 3′ бағытында синтезделеді.

Бұл — биохимиялық заңдылық, себебі ДНҚ-полимераза ферменті жаңа нуклеотидті тек өтіп жатқан тізбектің 3′–OH (гидроксил) ұшына қоса алады.

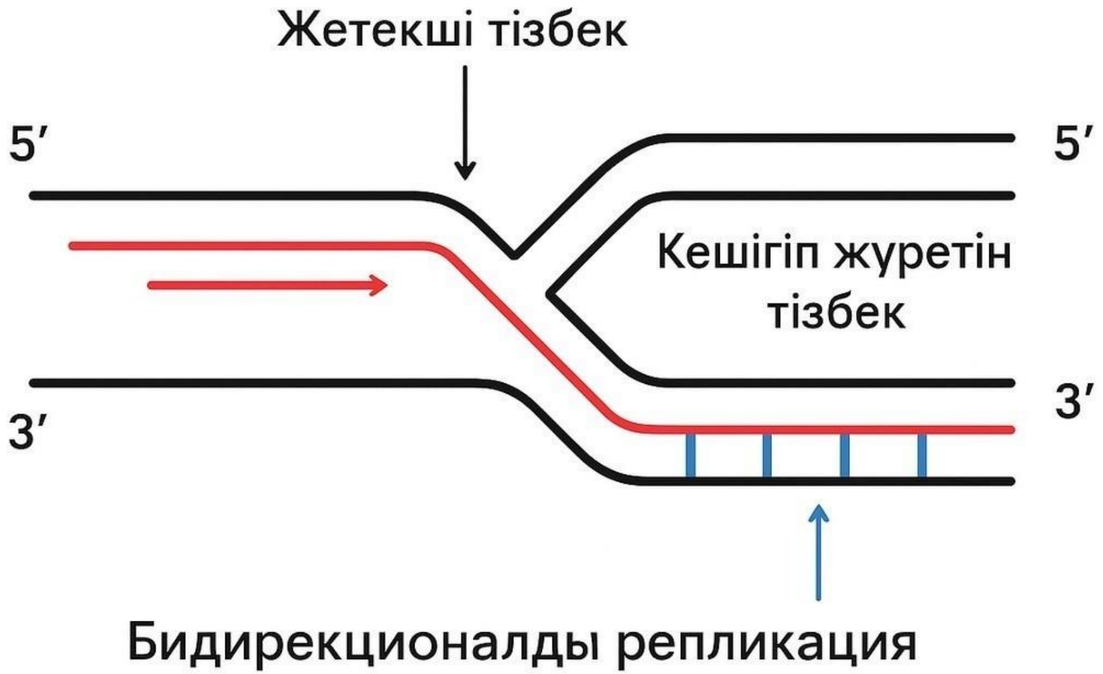
2. Матрицалық тізбектердің бағыты

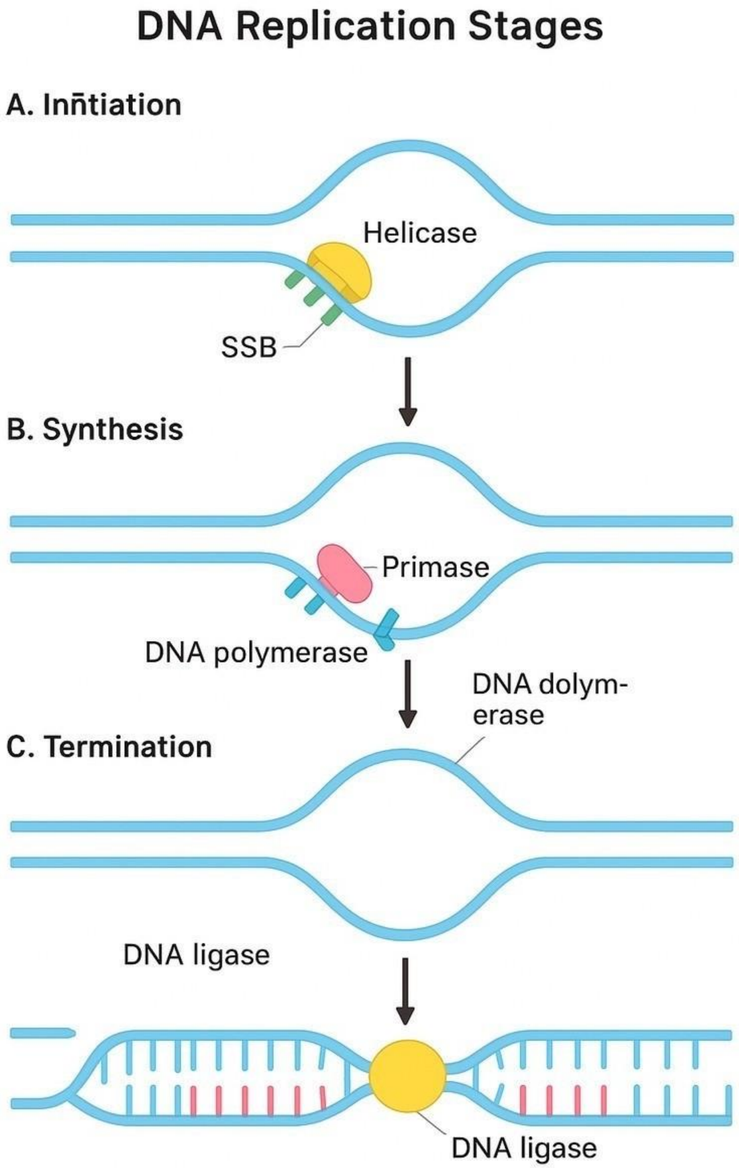
Екі ДНҚ тізбегі антипараллельді (қарама-қарсы бағытта орналасқан):

- Бір тізбек 5′ → 3′ бағытында,
- Екіншісі 3′ → 5′ бағытында жүреді.



ДНҚ репликациясының бағыты





3.Репликация айыршасындағы бағыттар

Репликация кезінде қос шиыршық репликация айыршасында (replication fork) ашылады.
Сол айыршадан екі жаңа тізбек пайда болады:

а) Жетекші тізбек (Leading strand)

- Бұл тізбек матрицасы 3′ → 5′ бағытында орналасқан.
- Сондықтан жаңа тізбек оған комплементарлы үздіксіз түрде 5′ → 3′ бағытында синтезделеді.
- ДНҚ-полимераза репликация айыршасы қозғалып жатқан бағытта үздіксіз жұмыс істейді.

Жетекші тізбек — айыршаның қозғалыс бағытымен бірге өседі.

ә) Кешігіп жүретін тізбек (Lagging strand)

- Бұл тізбектің матрицасы 5′ → 3′ бағытында орналасқан.
- Сондықтан жаңа тізбек айыршаның қарсы бағытына қарай, бөлік-бөлікпен синтезделеді.
- Әр бөлік — Оказаки фрагменті деп аталады.
- Кейін бұл фрагменттерді ДНҚ-лигаза ферменті біріктіріп, біртұтас үздіксіз тізбекке айналдырады.

Кешігіп жүретін тізбек — айыршаның қозғалысына қарсы бағытта, үздіксіз емес, «секіріп-секіріп» түзіледі.

4. Репликацияның жалпы бағыты

- Репликация басталу нүктесінен (origin of replication) екі бағытта бірдей жүреді.
- Бұл бидирекционалды репликация деп аталады.
- Әр бағытта бір жетекші және бір кешігіп жүретін тізбек түзіледі.

Қорытынды

Корнберг пен әріптестерінің тәжірибелері ДНҚ-полимераза I ферментінің ДНҚ матрицасына сәйкес жаңа тізбекті синтездей алатынын көрсетті. Репликация ДНҚ-ның белгілі бір аймағынан басталады. Бір басталу нүктесінен көшірілетін ДНҚ бөлігі репликон деп аталады. Бактериялардың көпшілігінде бір хромосомада бір басталу нүктесі болады, ал эукариоттардың әр хромосомасында бірнеше басталу нүктесі қызмет атқарады.

Репликация екі бағытта жүргенде, басталу нүктесінде түзілген екі айырша қарама-қарсы бағытта жылжиды. Әр айыршада ДНҚ-полимераза жаңа тізбектерді 5′-тен 3′-ке қарай синтездейді. Матрицалық тізбектер антипараллель орналасқандықтан, жетекші тізбек айыршаның қозғалыс бағытымен үздіксіз, ал артта қалушы тізбек Оказаки фрагменттері түрінде үзікті синтезделеді. Бактерияларда ДНҚ-полимераза I РНҚ-праймерлерді алып тастап, олардың орнын ДНҚ-мен толтырады, ал ДНҚ-лигаза іргелес фрагменттерді біріктіреді.

Өзін-өзі тексеруге арналған сұрақтар:

1.Корнберг тәжірибесінде қандай фермент ашылды және тәжірибе ДНҚ синтезінің қандай қасиетін көрсетті?
2.ДНҚ-полимераза жаңа тізбекті синтездеу үшін матрицаны, праймерді және дезоксирибонуклеозидтрифосфаттарды қалай пайдаланады?
3.Репликон дегеніміз не? Бактериялар мен эукариоттардың хромосомалары репликацияның басталу нүктелерінің саны бойынша қалай ерекшеленеді?
4.Репликацияның екі бағытта жүруі нені білдіреді? Репликациялық айыршалардың қозғалыс бағыты мен жаңа ДНҚ тізбегінің синтез бағыты қалай ажыратылады?
5.ДНҚ-полимераза екі жаңа тізбекті де 5′-тен 3′-ке қарай синтездесе, жетекші тізбек неліктен үздіксіз, ал артта қалушы тізбек үзікті синтезделеді?
6.Бактерияларда Оказаки фрагменттерінің түзілуі мен бірігуі кезінде праймаза, ДНҚ-полимераза III, ДНҚ-полимераза I және ДНҚ-лигаза қандай қызмет атқарады?

Пайдаланылған әдебиеттер тізімі:

1. Берсімбаев РІ Молекулалық биология – 2016, Қазақ университеті, Алматы
2. Льюин Б. Гены. – М.: Бином. Лаборатория знаний. 2012. – 896 с.
3. Т. А. Муминов, Е. У. Куандыко. Основы молекулярной биологии: курс лекций // Алматы: ССК, 2017. - 222 с.
4. Огурцов А.Н., Близнюк О.Н., Масалитина Н.Ю. Основы генной инженерии и биоинженерии. Учебное пособие. Часть 1.: Молекулярные основы генных технологий. Харьков: НТУ "ХПИ", 2018. 288 с.
5. Уилсон К., Уолкер Дж.: Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. Серия: Методы в биологии. Издательство: Лаборатория знаний, 2021 г.

Ғаламтор ресурстары:

1. http://elibrary.kaznu.kz/ru
2. http://molbiol.ru/