Тема 2. **Бактеріальна хромосома: структура ДНК та реплікація**

Сукупність послідовностей ДНК в клітинах даного організму називається геномом. На сьогодні повністю встановлена послідовність понад 700 бактеріальних і близько 100 еукаріотичних геномів. Головна відмінність між ними полягає в тому, що в прокаріотичних геномах кодуючі послідовності складають близько 95%, тоді як частка кодуючих послідовностей в геномах еукаріот не перевищує 3%.



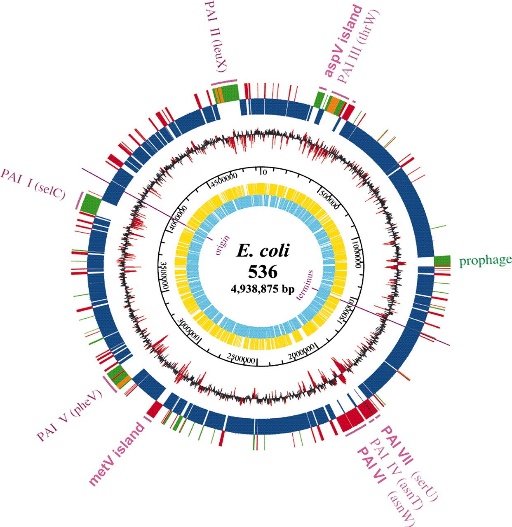
*Прокаріоти* - це організми, в клітинах яких відсутнє оформлене ядро. Його функції виконує бактеріальна хромосома (кільцева ДНК), розташована в зоні - **нуклеоїд** (тобто «подібний ядру»).

Тіло прокаріотів, як правило, складається з однієї клітини. Однак при неповному розходженні клітин, які діляться виникають нитчасті, колоніальні і полінуклеоїдні форми (бактероїди). В прокаріотичних клітинах відсутні постійні двумембранні і одномембранні органели: пластиди і мітохондрії, ендоплазматична сітка, апарат Гольджі і їх похідні. Їх функції виконують *мезосоми* - складки плазматичної мембрани. У цитоплазмі фотоавтотрофних прокаріот є різноманітні мембранні структури, на яких протікають реакції фотосинтезу. Іноді їх називають бактеріальними хроматофорами.

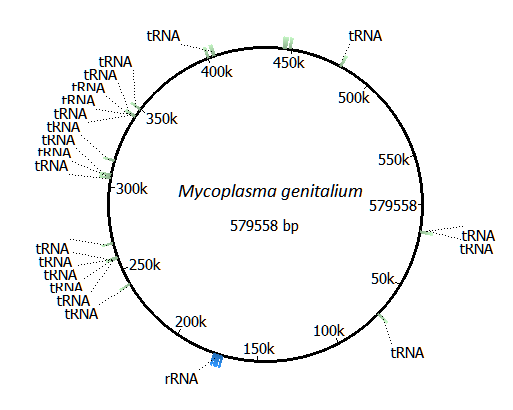
Специфічною речовиною клітинної стінки прокаріот є *муреїн*, однак у деяких прокаріотів муреїн відсутній. Ззовні клітинної стінки часто є слизова капсула. Простір між мембраною і клітинною стінкою служить резервуаром протонів при фотосинтезі і аеробному диханні.

Розміри прокаріотичних клітин змінюються від 0,1-0,15 мкм (мікоплазми) до 30 мкм і більше. Більшість бактерій має розміри 0,2-10 мкм. У рухливих бактерій є джгутики, основою яких служать білки флагеліни.

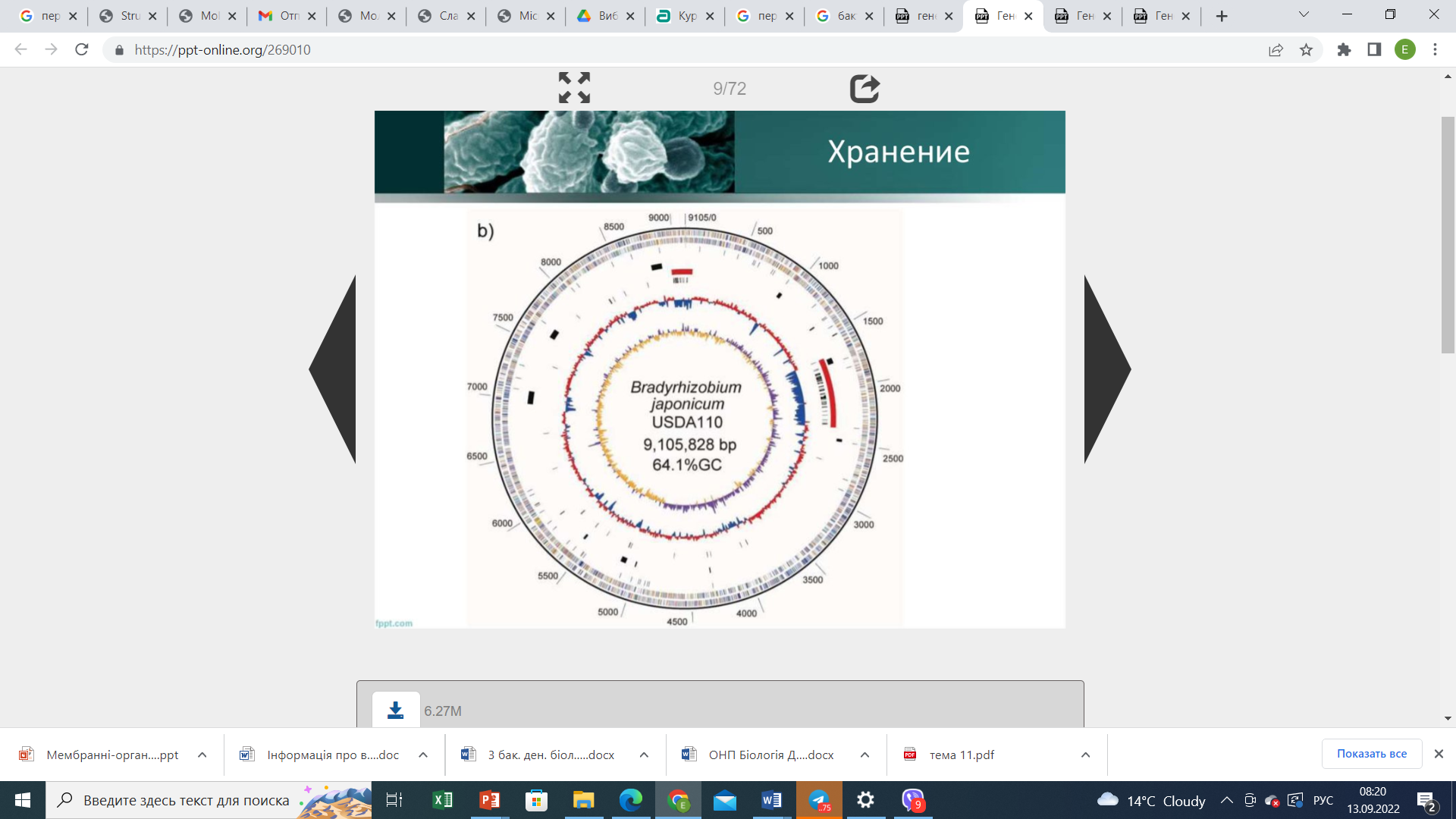
Прокаріотична клітина відрізняється порівняно простою організацією (відсутність ядра і розвиненою компартменталізацією, відсутністю мейозу, порівняно невеликою кількістю ДНК), що робить її зручним об'єктом досліджень. Саме вивчення прокаріотів відіграло провідну роль у з'ясуванні багатьох базових принципів функціонування генетичного апарату, особливо в перше десятиліття після початку інтенсивних досліджень молекулярних основ спадковості. При збереженні загальних принципів, організація і функціонування спадкового апарату таких порівняно простих систем має певні особливості.

Геном Escherichia coli •

Геном E. coli представлений однією циркулярною молекулою ДНК довжиною 4,6 мільйонів пар основ.

**

*Mycoplasma genitalium –* збудник урогенитального міксоплазмозу, внутрішньоклітинний паразит без клітиннох стінки. Як наслідок паразитарності має дуже малий геном – близько 580 т.п.н.



*Bradyrhizobium japonicum -* вид бульбочкових азотфіксаторів, симбіонт сої. Має один з найбільш великих геномів серед бактерій – близько 9-10 млн в залежності від штаму

Як правило, бактеріальний геном представлений однією циркулярної молекулою ДНК (бактеріальною хромосомою). Ця ДНК взаємодіє з білками, формуючи **нуклеоїд**, що займає певну зону бактеріальної клітини. Нуклеоїд по морфології нагадує суцвіття цвітної капусти і займає приблизно 30% об’єму цитоплазми.

Дослідження бактеріальних клітин за допомогою електронної мікроскопії в м’яких умовах без попередньої хімічної фіксації показало, що нуклеоїди представлені у вигляді дифузно забарвлених ділянок, вільних від рибосом. Витягнуті ділянки ДНК на зовнішній частині нуклеоїдів спрямовані в навколишню цитоплазму і утворюють так звані «петлі», які зазвичай інтерпретують як сегменти бактеріальної хромосоми, залучені до транскрипції. Вважають, що ці ділянки складаються з петель ДНК бактеріальної хромосоми, які залежно від фізіологічного стану клітини знаходяться в транскрипційно-активному стані або втягуються всередину нуклеоїдів при послабленні чи згасанні транскрипції.

Таким чином, нуклеоїд бактеріальних клітин не є статичним внутрішньоклітинним утворенням або компартментом, який можна чітко визначати морфологічно, навпаки, під час різних фаз росту бактеріальних клітин нуклеоїд безперервно змінює форму, що, мабуть, пов’язане з транскрипційною активністю певних бактеріальних генів.

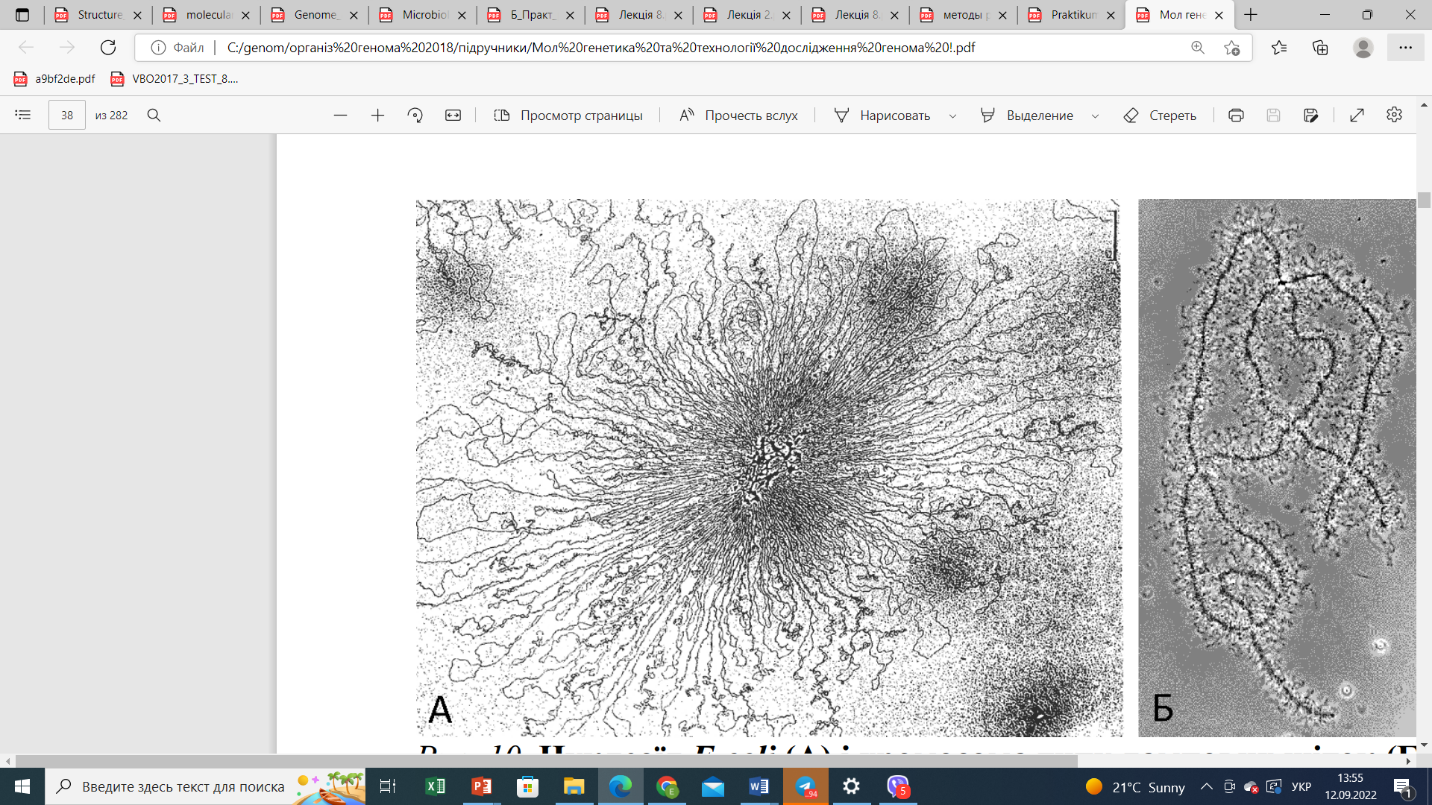
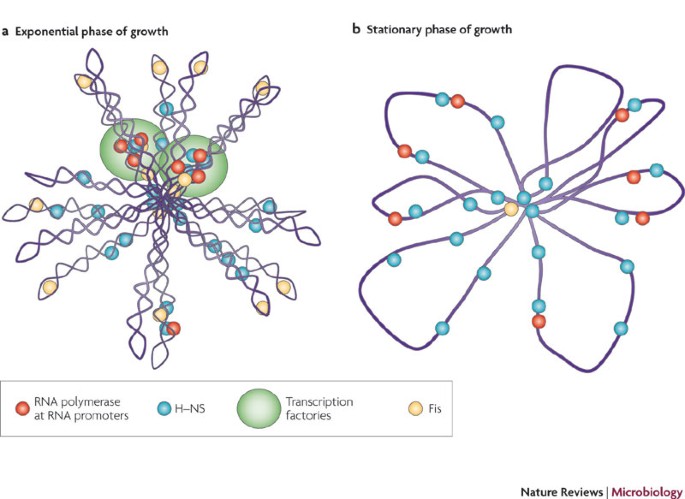
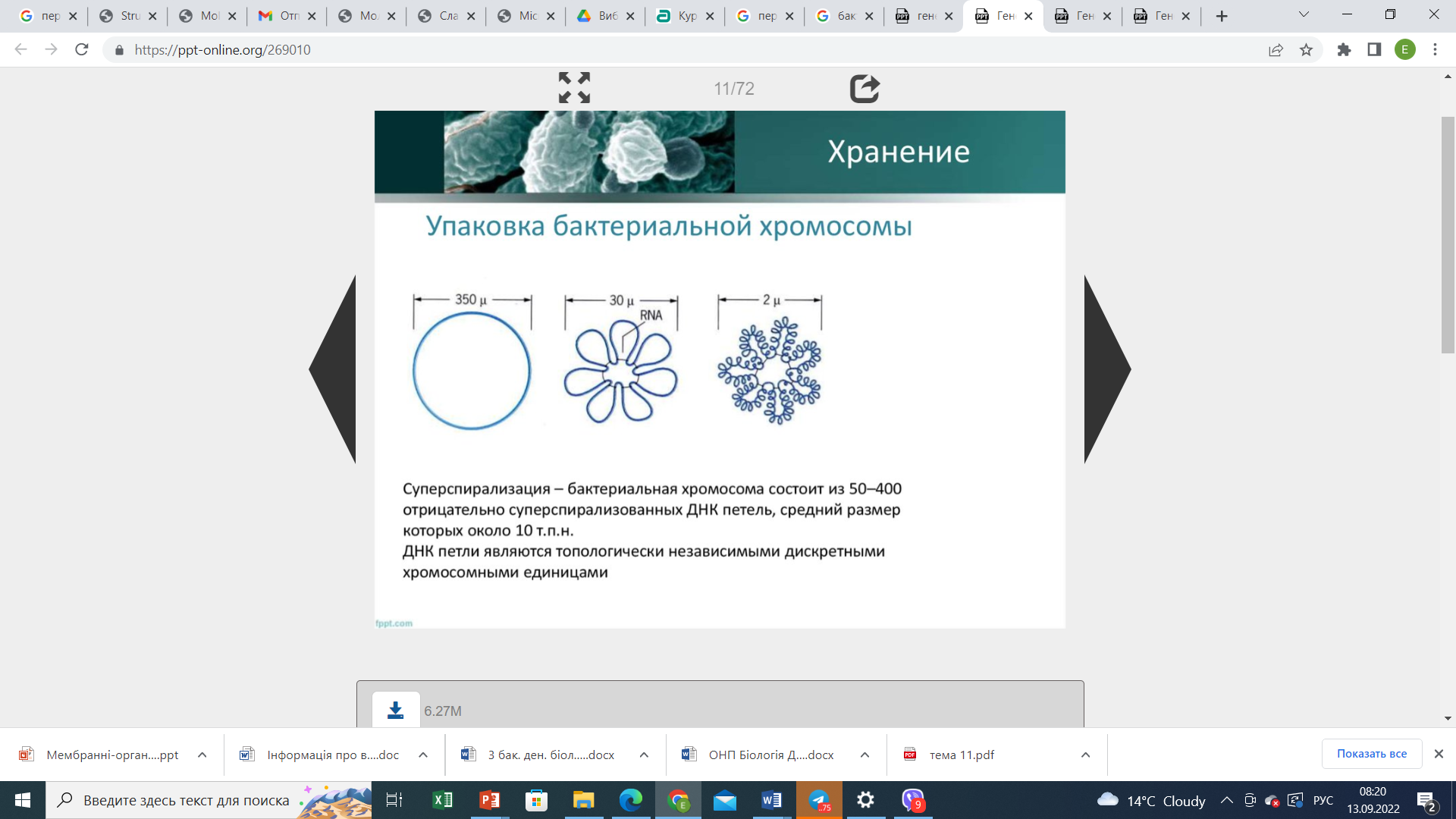


Рис. Нуклеоїд *E.coli*

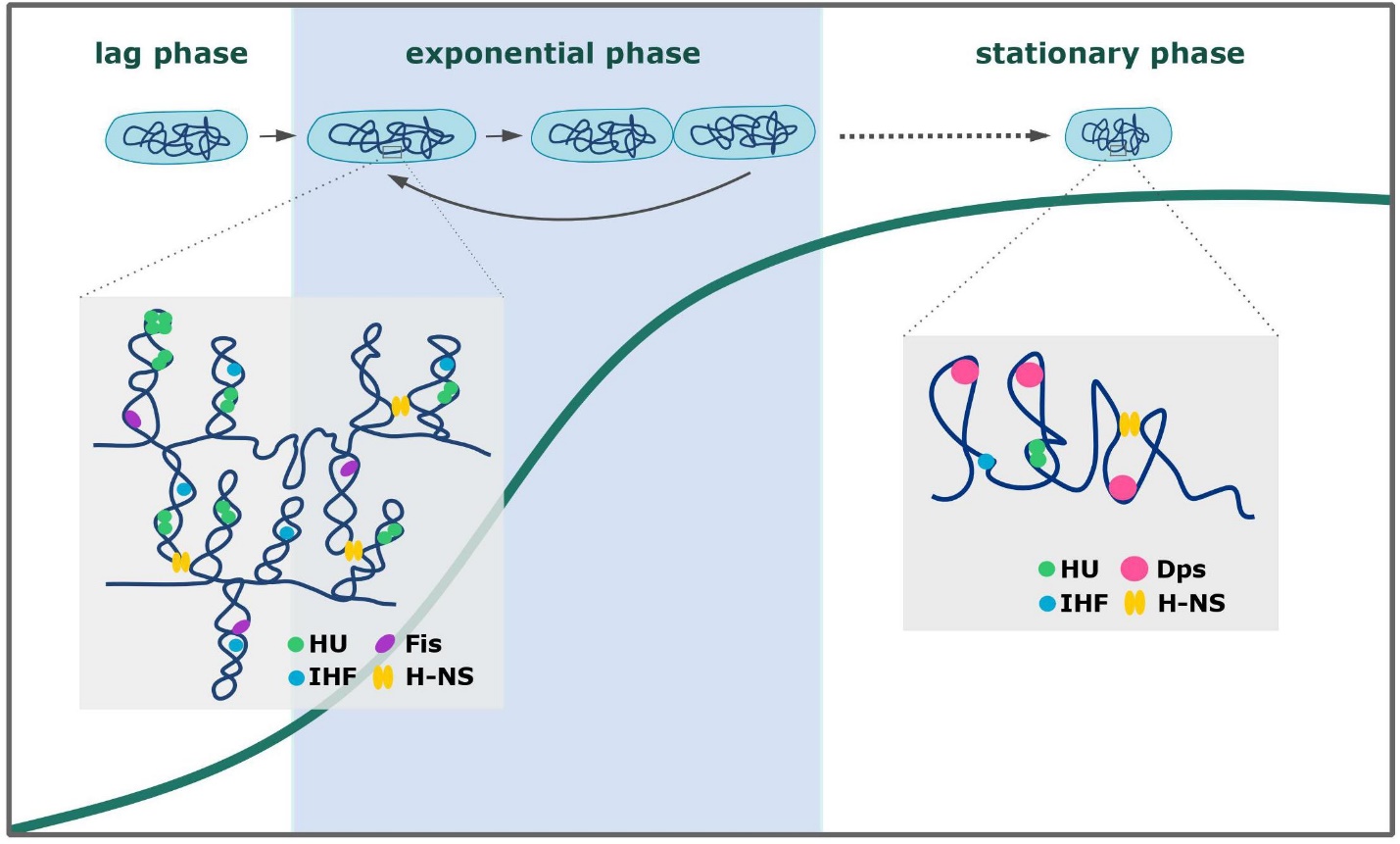
Отже, **бактеріальна хромосома являє собою кільцеву двуспіральную правозакручену молекулу ДНК, яка згорнута у вторинну спіраль (суперспіралізація), що змінюється впродовж життєвого циклу.**



Таким чином бактеріальна хромосома складається з 50-400 від’ємних суперспіралізованих петель ДНК, середній розмір яких близько 10 т.п.н. ДНК петлі є топологічно незалежними дискретними хромосомними одиницями.



Вторинна структура хромосоми (пакування) підтримується за допомогою асоційованих з нуклеоїдом (основних) білків (**PAN**) і РНК.



В лаг-фазі в клітині є одна бактеріальна хромосома, але в фазі експоненціального росту ДНК реплікується швидше, ніж відбувається поділ клітини; тоді число бактеріальних хромосом на клітину збільшується до 2 ... 4 ... 8. Такий стан генетичного апарату називається полігаплоїдністю.

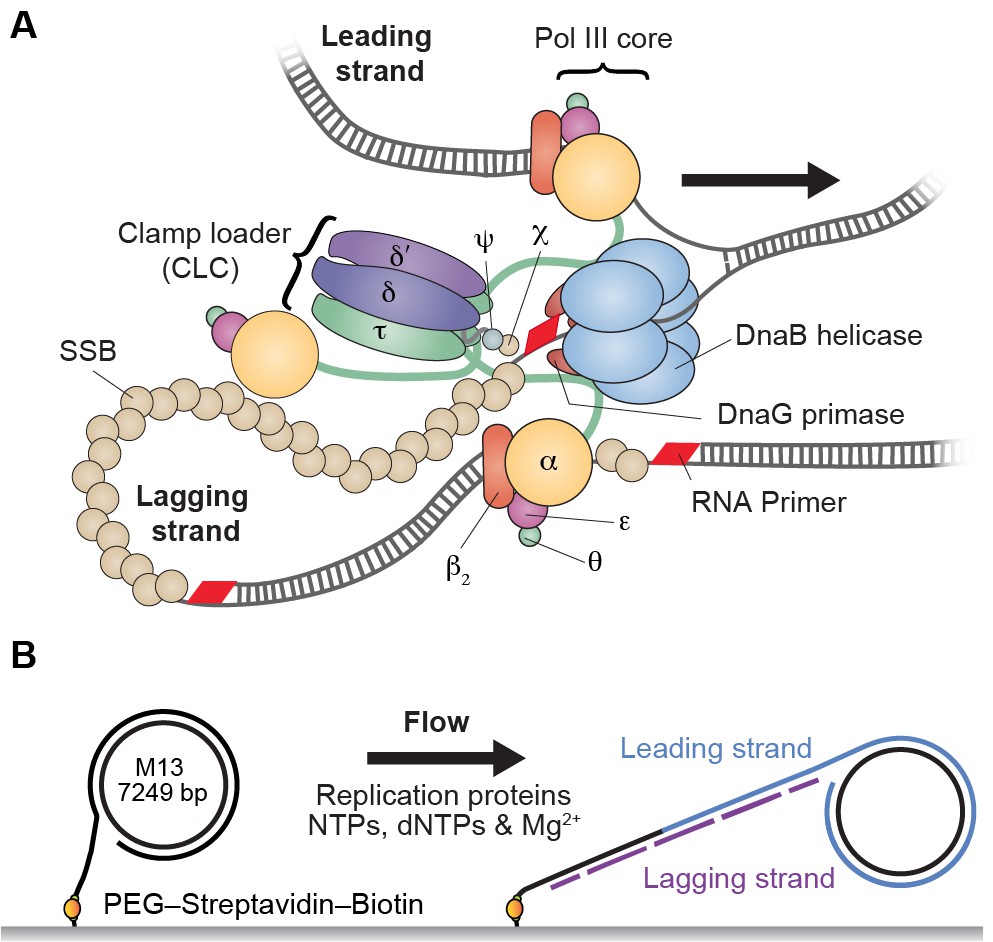
За допомогою специфічних антитіл встановлено, що ДНК нуклеоїда асоційована з молекулами РНК-полімерази, ДНК-топоізомерази I та багатьма ДНК-зв’язуючими білками, зокрема гістоноподобними білками HU, H-NS і IHF. Топоізомерази при цьому впливають на функціонування бактеріальних хромосом та їх внутрішньоклітинну компактизацію. Основний пакувальний білок - **HU** структурно дуже відрізняється від гістонів, але діє подібним чином, утворюючи тетрамер, навколо якого намотується приблизно 60 пар основ Однак детальні молекулярні механізми конденсації бактеріальної ДНК з утворенням лабільних «компактосом» поки невідомі.

Останнім часом зростає інтерес до бактеріального, так званого, **LP**-хроматину (від англ. Low Protein chromatin), для якого характерний відносно низький вміст білкового компонента. Аналогічний LP-хроматин виявлено у вірусів, у мітохондріях, пластидах і у джгутиконосців. Отже, цей тип структурної організації генетичного матеріалу претендує на універсальність і асоційований з певними формами регуляції експресії генів, властивими прокаріотам.

**Реплікація ДНК прокаріот.**

Реплікація ДНК здійснюється за напівконсервативним механізмом. Це означає, що один з ланцюгів дочірніх молекул ДНК є батьківським, а інший є наново синтезованим. Полімеризація нуклеотидів у процесі реплікації відбувається тільки в одному напрямку: від 5’- до 3’-кінця споруджуваного ланцюга, йдучи вздовж 57 ДНК-матриці у напрямку 3’→5’. У підсумку новий синтезований ланцюг ДНК є антипаралельним по відношенню до ДНК-матриці. Реплікацію ДНК здійснює складний ферментний (реплікативний) комплекс, що складається з 15-20 різних білків і називається реплісомою (англ. replisome). Головним ферментом при цьому виступає ДНК-залежні ДНК-полімерази. Вони здійснюють полімеризацію низькомолекулярних попередників ДНК – дезоксирибонуклеозид-трифосфатів (дНТФ, dNTP): дАТФ (dATP), дГТФ (dGTP), дЦТФ (dСTP) і дТТФ (dTTP). За правилами комплементарності положення кожного наступного нуклеотиду споруджуваного ланцюга ДНК однозначно визначається положенням відповідного нуклеотиду матриці. У відповідності з моделлю F.Jacob і співавторів (1963) репліконом називають цілу молекулу ДНК, або її частину, здатну до автономної реплікації. Реплікон містить всі необхідні гени і регуляторні послідовності, які забезпечують регульоване подвоєння його ДНК. Ділянка реплікону, з якої починається реплікація, отримала назву реплікатора або Ori-сайту (англ. replication origin). У більшості прокаріотичних хромосом репліконом є ціла хромосома, яка містить один реплікатор.

Під час реплікації ДНК її дочірні ланцюги розходяться в місці реплікації, утворюючи Y-подібну структуру, яка називається **реплікативною вилкою**. Саме в ділянках біля цього місця розгалуження локалізований функціонуючий реплікативний комплекс. Відповідно до цієї моделі, ДНК-хеліказа просуваючись вздовж ДНК попереду реплікативного комплексу,



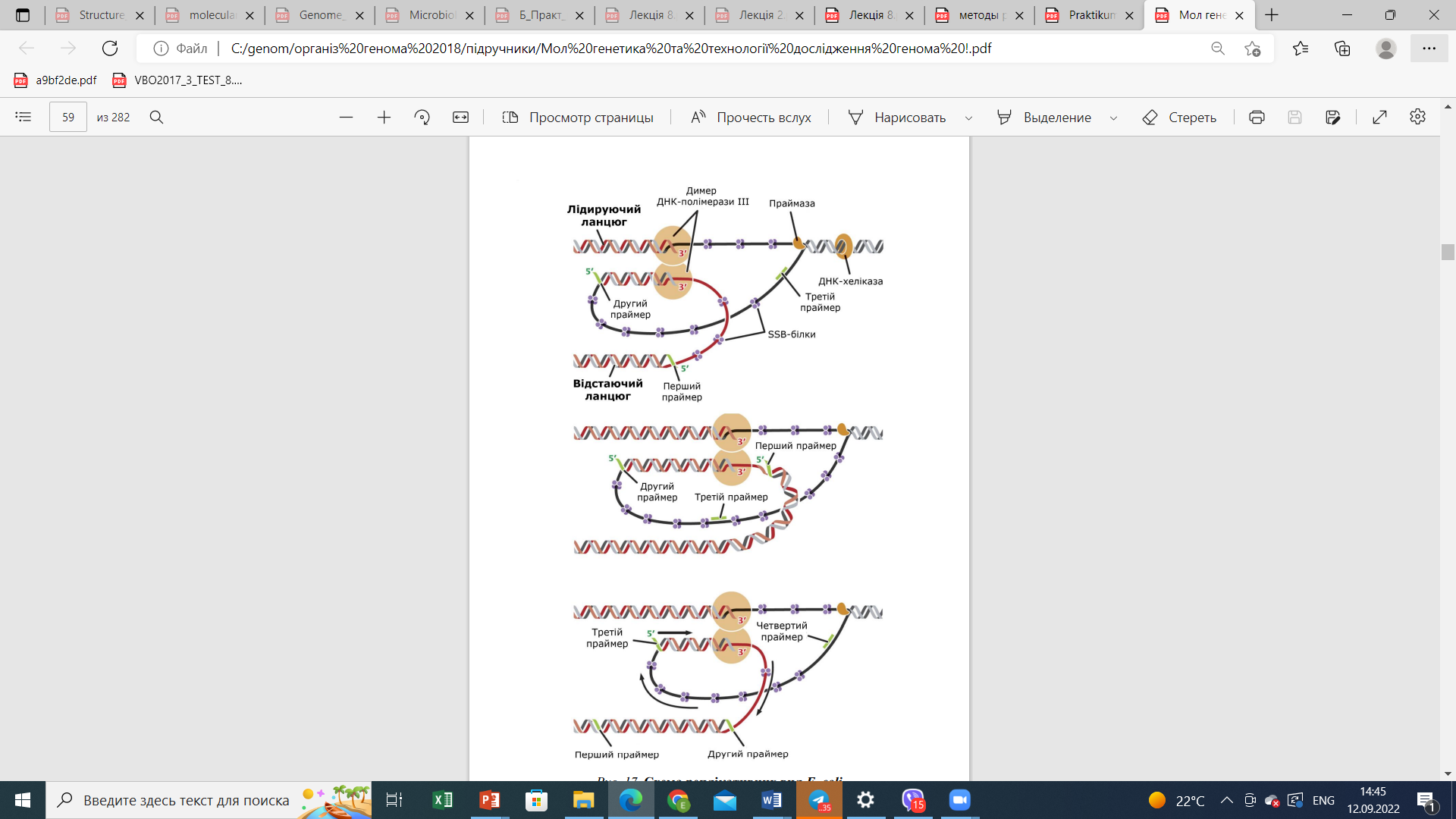


Рис. 2 Репликативна вилк E.coli

Враховуючи, що комплементарні ланцюги ДНК протилежно спрямовані (антипаралельні), ДНК-полімераза, яка здатна синтезувати ДНК тільки в одному напрямі – 5’→3’, не може реплікувати молекулу ДНК, просто просуваючись від одного кінця матричного дуплексу до іншого. Для вирішення цього протиріччя реплікативний комплекс використовує витончений механізм. На одному ланцюзі ДНК синтез нового комплементу відбувається безперервно, і ланцюг, що утворюється називається лідируючим. Тим часом, синтез іншого ланцюга здійснюється переривчасто у вигляді коротких фрагментів, які отримали назву фрагментів Оказакі на честь вченого, який вперше їх відкрив. У такому випадку новий ланцюг ДНК називається відстаючим.

Щоб молекули ДНК-полімерази могли почати синтез ДНК, їм потрібні затравки (праймери) – короткі олігодезоксирибонуклеотиди (ДНК-затравки) або олігорибонуклеотиди (РНК-затравки , приблизно 10 нуклеотидів), які комплементарні відповідним ділянкам ДНК-матриці і у яких на кінці є вільні 3’-ОН-групи. За синтез праймерів лідируючого і відстаючого ланцюгів відповідає фермент Dna G або праймаза.

У клітині E.coli працюють ДНК-полімерази 5 типів. Вони мають дві ферментативні активності: полімеразну, за рахунок якої до 3'-кінця ланцюга, що синтезується, приєднуються нуклеотиди, та 3'-екзонуклеазну, що використовується для редагування помилок – відщеплення помилкових нуклеотидів, приєднаних до 3'-кінця. • ДНК-полімераза І (або полімераза Корнберга (Arthur Kornberg)) – мономерний білок з мультидоменною структурою. На відміну від інших ДНК-полімераз має також додаткову 5'-екзонуклеазну активність. ДНК-полімераза І використовується як допоміжна полімераза при реплікації та інших процесах синтезу ДНК. • ДНК-полімераза ІІ залучена до певних репараційних процесів. • ДНК-полімераза ІІІ – основна реплікативна полімераза, дві копії якої працюють у реплікативній вилці. Складається з трьох субодиниць: субодиниця α відповідає за полімеразну активність, ε – за 3'-екзонуклеазну, θ виконує структурну роль

Отже, **основним ферментом, що здійснює полімеризацію нуклеотидів лідируючого і відстаючого ланцюгів є ДНК-залежна ДНК-полімераза III.** У прокаріот цей фермент представлений у вигляді димеру, що з’єднаний τ-білком. У такому димері один ДНК-полімеразний комплекс здійснює безперервний синтез лідируючого ланцюга ДНК, а інший – фрагментів Оказакі відстаючого.

До складу холоферменту (цілісний біологічно активний фермент) ДНК-полімерази ІІІ входять мінімальний фермент (субодиниці α, θ і ε), β-білок і білки γ-комплексу. Роль γ-комплексу полягає в розпізнаванні РНК-затравок на матричній ДНК. γ-комплекс зв’язується з єдиним праймером лідируючого ланцюга ДНК або з кожним з праймерів фрагментів Оказакі – відстаючого. Потім β-білки приєднуються до ДНК позаду білків γ-комплексу, залишаючи 3’-кінець праймера доступним для ДНК-полімерази. Димер β-білка утворює кільце навколо молекули ДНК і стимулює АТРазну активність білків γ-комплексу.

β-Білки і білки γ-комплексу, будучи пов’язаними з дуплексом праймер-матриця, забезпечують приєднання до цього комплексу мінімального ферменту ДНК-полімерази. Потім ДНК-полімераза при наявності доступних чотирьох дНТФ, використовуючи праймер, з високою ефективністю синтезує ланцюг ДНК, комплементарний ДНК- матриці. Ті ж самі білки беруть участь і в синтезі відстаючого ланцюга ДНК. У цьому випадку переривчастий синтез ДНК багаторазово ініціюється на великій кількості праймерів і **новий ланцюг синтезується у вигляді фрагментів Оказакі довжиною ~ 1000 нуклеотидів.**

ДНК-полімераза під час ініціації реплікації приєднує перший дНТФ до 3’-кінцевого нуклеотиду РНК-затравки. У процесі елонгації беруть участь β-білок і білки γ-комплексу, які просуваються вздовж молекули ДНК разом з каталітичною субодиницею ДНК-полімерази.

Таким чином, один і той же білковий комплекс здійснює як безперервну полімеризацію лідируючого ланцюга ДНК, так і переривчастий синтез фрагментів Оказакі відстаючого ланцюга. У другому випадку білковий комплекс періодично відокремлюється від матриці для ініціації синтезу наступного фрагменту Оказакі з кожного нового праймера. У результаті одна і та ж молекула ДНК-полімерази III у складі реплікативного комплексу здатна проводити синтез усіх фрагментів Оказакі відстаючого ланцюга, послідовно здійснюючи ініціацію, елонгацію, термінацію і реініціацію синтезу кожного з них.

Після чергової термінації синтезу фрагмента Оказакі, його 3’- кінець виявляється впритул наближеним до 5’-кінця праймера наступного фрагмента Оказакі. Для з’єднання двох фрагментів за допомогою ДНК-лігази необхіднє попереднє видалення РНКпраймера і добудова ланцюга ДНК в проломах, які утворюються. РНКзатравка видаляється за допомогою РНКази H, яка специфічно розщеплює РНК в ДНК-РНК-гібридах, і (або) за участю 5’→3’- екзонуклеази ДНК-полімерази I. У другому випадку одночасно з видаленням праймера відбувається забудова пролому тією ж ДНК-полімеразою І. У результаті два сусідніх фрагменти Оказакі впритул наближаються один до одного і виявляються відокремленими лише одноланцюговим розривом, який зшивається ДНК-лігазою.

Варто відмітити, що при синтезі лідируючого ланцюга реплікативний комплекс функціонує досить ефективно з високою процесивністю (середня кількість нуклеотидів, які приєднуються ферментом ДНК-полімеразою за один цикл зв’язування / дисоціації з матрицею). Встановлено, що холофермент ДНК-полімерази III синтезує лідируючий ланцюг ДНК довжиною в 50000 нуклеотидів зі швидкістю > **500 нуклеотидів за секунду** в одному циклі, жодного разу не дисоціюючи від ДНК-матриці. Точність реплікації ДНК холоферментом ДНК-полімерази III дуже висока. Частота помилкових включень нуклеотидів не перевищує 10-9 -10-10 за один раунд реплікації.