



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

Лекція № 2

Тема: ДНП. Реплікація хромосом

План:

1. ДНП-комплекс
2. Реплікація хромосом

1. ДНП-комплекс

Спадкова інформація організмів забезпечується специфічними послідовностями нуклеотидів в їх нуклеїнових кислотах. Найчастіше носієм інформації є ДНК, і лише у деяких вірусів цю роль виконує РНК. Молекулярна структура хромосоми – це головним чином структура – ДНП-комплекс, який складається з ДНК і білками хромосом.

При дослідженні хромосомної ДНК використовують метод реасоціації (відновлення) денатурованої ДНК. При нагріванні розриваються водневі зв'язки між азотистими основами комплементарних ланцюгів, які складають подвійну спіраль нативної ДНК. В процесі денатурації (плавління) ДНК приймає вид одониткових молекул. При поступовому охолодженні розчину плавленої ДНК між комплементарними послідовностями в одинарних нитках можуть знову встановитися водневі зв'язки, і з цих місць далі процес відновлення може продовжитися за принципом застібки «блискавка». Кількісний рівень реасоціації збільшується, по-перше, із зростанням вихідної концентрації денатуруючої ДНК і, по-друге, зі збільшенням часу. Тому частку ДНК, яка відновила дволанцюгову структуру зазвичай оцінюють залежно від співвідношення цих двох величин.

Дослідження ДНК еукаріот показало, що вона неоднорідна за швидкістю реасоціації. Повільне відновлення є характерним для унікальної послідовності в ДНК, оскільки концентрація кожної такої послідовності вельми мала. Більш швидким відновленням характеризуються послідовності, які в ядерній ДНК повторюються декілька раз – їх відносна концентрація набагато вища. Швидкість реасоціації деяких фракцій ядерної ДНК вказує, на те що вони містять послідовності, які повторюються сотні тисяч або навіть мільйони разів. Практично миттєво реасоціюють особливого роду послідовності – розташовані в безпосередньому сусідстві (*паліндроми*) або неподалік один від одного інвертовані (звернені) повтори. Найбільший ступінь повторюваності властивий послідовностям різних видів так званої сателітної ДНК. Ці фракції ДНК отримали таку назву тому, що вони при центрифугуванні фрагментованої ДНК в градієнті щільності, утворюють окремі, додаткові (сателітні) піки. Плавлена щільність молекул сателітних ДНК відрізняється від щільності основної маси ДНК.

Локалізацію в хромосомах високоповторюваних послідовностей ДНК досліджували шляхом проведення реасоціації («гібридизації») денатурованих молекул ДНК на препаратах. При цьому локалізована ДНК повинна містити радіоактивні атоми. Іноді замість локалізованої ДНК



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

використовують синтезовану на ній, як на матриці, радіоактивну РНК. Таку мічену денатуровану ДНК або РНК додають до препарату, на якому попередньо високотемпературним впливом денатурують ДНК хромосом. Потім в умовах, що сприяють відновленню, мічені молекули «гібридизуються» з ДНК хромосом на препараті. Місця «гібридизації» проявляються в фотоемульсії, якою покривається препарат. Найшвидше реасоціюють послідовності з найбільшим ступенем повторюваності. Результати показують, що зазвичай такі послідовності виявляються в ділянках розташування структурного (конститутивного) гетерохроматину – у прицентромірних, теломірних ділянках або в місцях розташування інтеркалярного гетерохроматину. Таким чином, в основі структурно-морфологічної неоднорідності по довжині хромосоми лежить розподіл специфічних послідовностей ДНК.

Високоповторювана сателітна ДНК, у різних видів становить від часток відсотка до 25-28% від усієї ядерної ДНК. Дані К.Г. Газарян і В.З. Тарантула показують, що унікальні послідовності у вивчених видів тварин становлять 40-90% від усієї ядерної ДНК (лише у двох видів найпростіших їх частка 37 і 12%), а у вивчених видів вищих рослин – 12-60%. Значну частину ядерної ДНК складають і різні сімейства помірно повторюваних послідовностей.

ДНК еукаріот завжди представлена в комплексі з основними і кислими білками. Утворення комплексу з білками забезпечує багатоступеневу укладку, компактизацію нитки ДНК в хромосомі. Перші рівні компактизації забезпечуються комплексом ДНК з основними білками – гістонами, які характеризуються підвищеним вмістом основних амінокислот – лізину і аргініну. Гістон H1 характеризується і найбільшим переважанням основних амінокислот над кислими (аспарагінової та глутамінової кислот), з усіх гістонів він найбільш збагачений лізином. Гістони H2A і H2B мають у своєму складі лише невелике переважання лізину над аргініном, а гістони H3 і H4, навпаки, містять аргініну більше, ніж лізину.

Первинна структура однойменних гістонів різних видів має неоднакову консервативність їх молекул в еволюції. Найбільш стабільні гістони H3 і H4. Первинна структура гістону H4 гороху та із тимуса теляти розрізняється всього за двома, а первинна структура гістона H3 цих двох видів – за 4 амінокислотними залишками. Гістони H2A і H2B менш консервативні. Найбільш мінливий гістон H1, за його структурою спостерігається навіть внутрішньовидовий поліморфізм. Гени, які контролюють структуру гістонів, відносяться до класу помірно повторюваних: вони повторюються в геномі десятки разів. Копії гена H1 не зовсім однорідні за структурою, оскільки навіть з клітин однієї тканини можна виділити кілька фракцій цього білка (наприклад, із клітин тимусу кролика – 8 видів гістону H1). Така ж неоднорідність властива і генам трьох інших гістонів, оскільки описані 3 поліпептидних варіанти гістону H3, 4 варіанти гістону H2A і 2 варіанти гістону H2B.

ДНП-комплекс обумовлює найважливішу характеристику нативного хроматину – його нуклеосомну структуру. Нуклеосоми у складі хроматину виявляються як «намистинки» товщиною 10-20 нм, з'єднані нитками товщиною 1,5-2 нм, ця нитка – не що інше, як «лінкерна» (зв'язуюча) ДНК.



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

З урахуванням варіювання розмірів цих зв'язуючих ділянок з однією нуклеосою може бути пов'язана ділянка ДНК, яка включає 160-240 п. н. Дослідження структури виявляють схожість ізольованих октамер гістонів з нуклеосомами. Структуру нуклеосом визначає взаємодія між молекулами гістонів в октамері. Найбільш істотну роль у взаємодіях всіх чотирьох типів гістонів в октамері виконують гідрофобні центральні частини цих білків. Саме цим і обумовлена їх висока еволюційна стабільність.

Проведені дослідження хімічного «зшивання» ДНК з гістонами показали, що структура октамеру гістонів організована таким чином, що один і той же гістон асоціюється з різними віддаленими один від одного ділянками 146-нуклеотидної послідовності ДНК, що входить до складу нуклеосоми. Можливо, що компонентами системи, що забезпечує формування нуклеосомної структури, можуть бути й інші ядерні білки. Наприклад, в ядрах клітин багатьох організмів виявлений білок, подібний з білком, виділеним з ядер ооцитів *Xenopus* – нуклеоплазміном. *Нуклеоплазмін* – кислий ядерний білок, який не зв'язується ні з ДНК, ні з цілими нуклеосомами, але кожна молекула цього білка (пентамер) здатна зв'язуватися з октамером гістонів.

Отже, ДНП-комплекс з гістонами H2A, H2B, H3, і H4 формує характерну структурну основу хроматину – нуклеосомну нитку. Довжина нитки ДНК на цьому рівні її укладки укорочується приблизно в сім разів.

Гістон H1, що входить до складу нуклеосоми своєю центральною глобулярною частиною взаємодіє з обома кінцями ДНК. Проте дуже істотний додатковий ефект зв'язування гістону H1 з нуклеосомною ниткою полягає в тому що в присутності цього гістону вона додатково компактизується, згортаючись в спіраль (соленоїд). Не з'ясоване, які особливості гістону H1 забезпечують таку компактизацію, але відомо, що для її здійснення необхідна досить висока концентрація катіонів, особливо двовалентних.

Подальші рівні компактизації хроматину досягаються за рахунок негістонових білків. Ця група білків хроматину виключно гетерогенна, до її складу входить біля 500 компонентів. У процесах реплікації та репарації ДНК більшість негістонових білків хроматину виконують чітко встановлені функції: транскрипції (РНК-полімераза) – гелікази, топоізомерази, ДНК-полімерази, ДНК-лігази, ендонуклеази, екзонуклеази; модифікації ДНК або гістонів – метилази, ацетилтрансферази, фосфокінази, деацетилази, фосфорилази, протеази. Також важливу структурну роль виконують інші негістонові білки – утворюють так званий ядерний матрикс (ядерну мембрану, губкові комплекси і внутріядерну мережу). Можливо, ці ж білки формують білковий каркас хромосом.

2. Реплікація хромосом

Процес реплікації ДНК досліджувався найбільш ретельно, оскільки з усіх молекулярних компонентів хромосом, саме ДНК здійснює функцію кодування спадкової інформації клітини та її відтворення при клітинному поділі. Ще у 1953 році Дж. Уотсон і Ф. Крик зробили припущення про те, що така молекула могла б відтворюватися за напівконсервативним механізмом. В результаті розплітання двох ниток вихідної молекули та



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

добудови до кожної з них другої комплементарної нитки повинні вийти дві молекули, в кожній з яких одна нитка «материнська», а інша – «дочірня». У класичних дослідженнях М. Мезельсоном і Ф. Сталя, було чітко доведено, що реплікація ДНК здійснюється за передбаченим напівконсервативним механізмом.

Дослідженнями процесів реплікації ДНК було встановлено, що у ДНК існує специфічна стартова точка – «реплікаційна вилка» (*Origin*), з якої процес починається. Комплекс різних білків забезпечує розплітання комплементарних ниток та стабілізацію протягом деякого часу одноланцюгових ділянок. Фермент ДНК-полімераза в напрямі 5'→3' синтезує нову комплементарну нитку по одиночній матриці. Проте лише одна з нових молекул синтезується від стартової точки як безперервна нитка (її називають ще «лідуючою»). У другій нитці («відстаюча») ДНК-полімераза стартує багаторазово, виробляючи в тому ж напрямку (5'→3') порівняно невеликі (1-2 тис. нуклеотидів) фрагменти Оказакі. Істотно, що ДНК-полімераза насправді не може ініціювати процес реплікації, і він починається з того, що РНК-полімераза синтезує короткий (близько 10 нуклеотидів) комплементарний матриці полінуклеотид – «затравку» (*primer*), і лише до 3'-кінця цього праймеру ДНК-полімераза приєднує перший нуклеотид.

Таким чином починається синтез кожного фрагмента Оказакі. Потім в пустотах, що утворилися внаслідок видалення ендонуклеазою ділянок РНК-праймеру відбувається синтез комплементарної ділянки ДНК по одноланцюговій матриці. І нарешті, особливий фермент – ДНК-лігаза з'єднує в єдину полінуклеотидну нитку фрагменти Оказакі. Всі ці білки утворюють гігантський мультифункціональний комплекс (*реплісому*), який здійснює всі вказані етапи процесу у так званій «вилці реплікації».

У еукаріотичних клітинах виявлені білки, аналогічні всім білкам, які беруть участь у процесі реплікації ДНК прокаріот, хоча взаємодія і генетичний контроль компонентів які складають реплікативний комплекс у еукаріот вивчено вельми фрагментарно. Напевно, процес реплікації ДНК у еукаріотичних організмів у основних рисах відбувається так само, як і у прокаріотів. У процесі реплікації з ДНК еукаріот видаляються короткі одниткові фрагменти ДНК (1,5 тис. нуклеотидів), аналогічні фрагментам Оказакі.

При дослідженні процесу реплікації ДНК еукаріот в ній виявлені так звані реплікаційні «вічка» – структури, аналогічні реплікації кільцевій ДНК прокаріот. Кожне таке «вічко» є результатом руху в обидві сторони від стартової точки двох «вилок реплікації».

Згідно досліджень Л. Ф. Андрєєва, в хромосомах існує своєрідна ієрархічна система одиниць реплікації. З початком фази **S** в точках, віддалених один від одного в нитці ДНК в середньому не менше ніж на 150-200 мкм реплікація стартує більш-менш одночасно. Протягом порівняно невеликого тимчасового інтервалу по сусідству з цими точками активуються нові групи невеликих репліконів. Завершення реплікації в такій групі репліконів призводить до утворення більш протяжних мічених фрагментів (15-20 мкм). З часом більш довгі мічені фрагменти не утворюються, що свідчить про те, що закінчив реплікацію район в 15-20 мкм, який обмежений точками термінації і являє собою одиницю реплікації



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

більш високого рівня. При продовженні фази **S** поруч з цими, що закінчили реплікацію ділянками, починають функціонувати кілька асинхронно нових невеликих репліконів – складова сусідньої реплікації.

Так послідовно йде поки не завершиться реплікація всього інтервалу в 150-200 мкм між вихідними точками, з яких вона почалася, процес активації все нових репліконів по сусідству з вже «працюючими» або «закінчившими» роботу. У даній ієрархічній системі ці інтервали являють собою найбільші одиниці реплікації.

Таким чином, в геномі розміром 10^6 мкм міститься така ж або в 2-3 рази більша кількість потенційних точок ініціації реплікації. Ймовірно, дозволяє здійснювати реплікацію всього генома в ранньому ембріогенезі в дуже короткі проміжки часу тільки одночасне функціонування переважної більшості або майже всіх цих репліконів.

В подальшому в процесі онтогенезу збільшення тривалості синтетичної фази **S** викликається все більш неодноразовим включенням в «роботу» різних репліконів. При цьому іноді виявляється, що реплікація певних частин геному приурочена до певних моментів синтетичної фази. Послідовність активації тих чи інших груп репліконів протягом фази **S** залежить від характерної для даного типу клітин молекулярної організації різних ділянок хромосом і властивого цим ділянкам способу (і ступеню) компактизації. Ієрархічні рівні в виявленні одиниць реплікації розглядаються як відображення дискретності нуклеопротеїдної нитки щодо тривимірної структури її укладання. На динаміку процесу реплікації в кожний конкретний момент синтетичної фази істотно впливає динаміка молекулярно-структурних взаємодій між ДНК, гістоновими і негістоновими білками, оскільки лише деякі ділянки хромосом доступні для комплексу цих білків, що складають *реплісому*. Також на динаміку реплікації впливає і приурочений до інтерфази процес модифікації гістонів. Поява модифікованих молекул гістонів в певних ділянках хромосом викликає локальні зміни у структурі комплексу ДНП з білками, або полегшує локальні заміни деяких гістонів негістоновими білками (наприклад, заміна гістона H1 білками HMG)