

Спивак Ирина Михайловна

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Учебное пособие

Редактор *Е.А. Пряникова*

Технический редактор *А.И. Колодяжная*

Оригинал-макет подготовлен автором

Директор Издательства Политехнического университета *А.В. Иванов*

Свод. темплан 2009 г.

Лицензия ЛР № 020593 от 07.08.97

Налоговая льгота – Общероссийский классификатор продукции
ОК 005-93, т.2; 95 3005 – учебная литература

Подписано в печать	2011. Формат 60X84/16.
Усл. печ. л. 10,75. Уч.-изд. л. 11,5. Тираж 100. Заказ	..

Санкт-Петербургский государственный политехнический университет.
Издательство Политехнического университета,
член Издательско-полиграфической ассоциации университетов России.
Адрес университета и издательства:
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29.

УДК 577.346:591.169 (075.8)
ББК 28.05:28.070я73
С 72

Р е ц е н з е н т ы:

Доктор биологических наук, профессор, декан биолого-почвенного
факультета СПбГУ **А. Д. Харазова**

Доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией
радиационной цитологии Института цитологии РАН **В. М. Михельсон**

Спивак И.М. **Репликация ДНК** : учеб. пособие / И.М.Спивак. -
СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. - 186 с.

Соответствует содержанию специальной дисциплины «Репликация, рекомбинация и репарация ДНК» государственного образовательного стандарта по направлению подготовки бакалавров 140400 «Техническая физика».

Рассматриваются проблемы репликации ДНК. Излагаются современные представления о строении хромосом, координации в течение клеточного цикла процессов ДНК-метаболизма, а также описываются участвующие в этих процессах белки и рассматриваются механизмы, отвечающие за сохранение генетической стабильности организмов.

Предназначено для студентов дневной, очно-заочной, заочной форм обучения факультета медицинской физики и биоинженерии СПбГПУ

Табл. 6. Ил. 34. Библиогр.: 14 назв.

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Санкт-Петербургского государственного политехнического
университета.

ISBN 978-5-7422-2966-7

© Спивак И.М., 2011

© Санкт-Петербургский государственный
политехнический университет, 2011

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	6
Глава 1. Репликация - полимеразная реакция	7
1.2. Вилка репликации	9
Глава 2. Начало репликации	11
2.1. Понятие о репликоне и ориджине репликации	13
2.2. Ориджин репликации <i>E.coli</i> <i>oriC</i>	13
2.3. Ориджины других организмов	15
2.4. Скорость репликации	19
3.1. Инициация репликации у <i>E.coli</i>	20
3.2. Инициация репликации у эукариот	20
Глава 4. Механизм образования и необходимость РНК-праймера	30
4.1. Синтез праймера для полимеразной реакции	30
4.2. Понятие об РНК-ДНК дуплексе	31
4.3. Ключевые ферменты, участвующие в синтезе ДНК	33
4.3.1. ДНК-полимеразы	33
4.3.1.1. ДНК-полимеразы прокариот	35
4.3.1.2. ДНК-полимеразы эукариот	39
4.3.1.3. ДНК-полимераза α – праймаза	40
4.3.1.4. Реакция праймирования	42
4.3.1.5. ДНК-полимеразы δ и ϵ	46
4.3.1.6. ДНК-полимераза γ	50
4.3.1.7. ДНК-полимераза β	50
4.3.2. Ферменты репликативного комплекса	51
4.3.2.1. Факторы репликации	51
4.3.2.1.1. RPA (replication protein A) и SSB	52
4.3.2.1.2. RFC (replication factor C)	56
4.3.2.1.3. PCNA (proliferating cell nuclear antigen)	57
4.3.2.2. Эндонуклеазы. FEN-1	59
4.3.2.3. ДНК-лигазы	59
4.3.2.4. Геликазы	61
4.3.2.5. ДНК-топпизомеразы	63

Глава 5. Терминация репликации	
67	
5.1. Завершение репликации у E.coli	67
5.2. Завершение репликации у эукариот. Теломеры	68
5.2.1. Понятие о теломерах	68
5.2.2. Строение теломер	69
5.3. Теория недорепликации теломер	73
5.3.1. Репликация теломер и поддержание их длины в клетках полового пути	75
5.4. Белки теломерного комплекса у человека	78
5.4.1. Теломеры дрожжей	86
5.5. Теломеры и репарация	89
5.6. Функции белков, связанных с теломерами	92
5.7. Теломеры и старение	93
5.8. Теломеры и рак	95
Глава 6. Клеточный цикл у эукариот	96
6.1. Понятие о клеточном цикле	96
6.2. Стадии клеточного цикла	96
6.3. Регуляция клеточного цикла у эукариот	98
6.3.1. Белки-ингибиторы комплексов циклин-зависимых киназ с циклинами	103
6.3.2. Регуляция активности CDKs фосфорилированием	104
6.3.3. Дегрэдация циклинов в клеточном цикле	105
6.4. Точка рестрикции клеточного цикла - узел митогенных и ингибирующих сигналов	106
6.4.1. Точка рестрикции и G1-чекпойнт	113
6.4.2. Остановка деления или пролиферация?	114
6.5. Координация ядерных и цитоплазматических процессов во время клеточного цикла	116
Глава 7. Пострепликативные модификации ДНК	116
7.1. Метилирование ДНК	116
7.1.1. Цитозин(C5)-ДНК-метилтрансферазы эукариот	118
7.1.1.1. Семейство Dnmt1	119
7.1.1.2. Семейство Dnmt2	122

7.1.1.3.Семейство Dnmt3	123
7.2.Регуляция экспрессии и модуляция активности метилтрансфераз	125
Глава 8.Протеасомная деградация белков и ее роль в регуляции процессов ДНК-метаболизма	130
8.1.Структура 26S протеасомы	130
8.1.1.Структура 20S протеасомы	132
8.1.2.Образование 26S протеасомы	134
8.2.Система убиквитинирования	135
8.2.1.Субстраты 26S протеасомы	138
8.3. Роль протеасомы в регуляции клеточного цикла	141
8.4.Роль протеасомы в представлении антигенов комплекса МНС (Major complex of histocompatibility)	142
8.5.Механизмы регуляции активности протеасомы	144
8.6.Основные субстраты протеасомы	146
Глава 9. Рекомбинация ДНК: связь с репликацией и репарацией	150
9.1.Роль двунитевых разрывов ДНК в процессе рекомбинации	151
9.2.DSBs и процесс репликации	152
9.3.Репликация, индуцированная разрывами. BIR (break induced replication)	153
9.5.Генная конверсия	154
9.6. Захват репарационно-репликационной вилки	156
9.6.Генетическая характеристика вовлеченных в гомологическую рекомбинацию белков-гомологов RecA	158
9.7.Биохимические свойства белков гомологической рекомбинации	160
9.8.Наблюдение рекомбинации in vivo	160
Заключение	161
Список литературы	162

Введение

Генетическая программа всех живых организмов, за исключением РНК-содержащих вирусов, записана в нуклеотидной последовательности ДНК. Следовательно, для сохранения уникальных свойств организма необходимо точное воспроизведение этой последовательности в каждом последующем поколении. *E. coli*, например, должна дублировать практически без ошибок полный геном размером $4 \cdot 10^6$ нуклеотидных пар при образовании каждого последующего поколения; точно так же должны быть скопированы почти $4 \cdot 10^9$ пар оснований в 23 парах хромосом человека при каждом акте деления клеток. Основным свойством ДНК является то, что она служит матрицей и определяет порядок, в котором нуклеотиды выстраиваются в новые полинуклеотидные нити.

Собственно репликация ДНК в широком смысле — очень важный для делящейся клетки процесс. В него входит также подготовка хроматина к репликации и недопущение повторного митоза. Это обеспечивает однократную дубликацию ДНК в течение одного клеточного цикла, поддерживая таким образом стабильность генома.

Генетическая стабильность живых организмов в значительной степени определяется функционированием комплекса белков, осуществляющих репликацию ДНК. Очевидно, что репликация ДНК регулируется множеством белок-белковых и ДНК-белковых взаимодействий, механизм которых остается неизвестным. Кроме того, комплекс репликации ДНК работает взаимосогласованно с комплексами белков, осуществляющих репарацию повреждений ДНК. Одновременно процесс передачи информации от родительского организма к дочернему сопровождается рекомбинацией молекул ДНК для создания большего наследственного разнообразия. Процесс ДНК-рекомбинации подробно описан при мейотическом кроссингвере в процессе образования половых клеток, при V(D)J-рекомбинации — процессе формирования разнообразных генов иммуноглобулинов и иммуноглобулиновых рецепторов, при действии некоторых систем репарации ДНК. Учитывая

6

все многообразие и согласованность процессов ДНК-метаболизма, можно предположить еще большее разнообразие и сложное взаимодействие белковых комплексов, осуществляющих стабильное воспроизведение наследственного материала в поколениях.

Важно осознавать, что в ДНК закодирована информация о механизме ее собственного удвоения: одни гены кодируют ферменты, синтезирующие нуклеотидные предшественники ДНК, другие - белки, осуществляющие сборку активированных нуклеотидов в полинуклеотидные цепочки. Есть гены, координирующие процесс репликации с другими клеточными событиями, а также гены, кодирующие белки, которые упаковывают ДНК в хроматин.

Понимание регуляции и динамики этих систем является ключевой задачей молекулярной биологии XXI века.

Глава 1. Репликация - полимеразная реакция

Обнародовав свою модель структуры ДНК в 1953 г., Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик писали: «Мы не могли не осознавать, что специфическое спаривание оснований, постулированное нами, подразумевает наличие какого-то механизма копирования теистического материала». Они первыми заметили: «Если известен точный порядок оснований в одной из цепей, то можно записать и порядок оснований в другой, поскольку спаривание оснований специфично. Таким образом, одна цепь является комплементом другой; именно это свойство наводит на мысль, что ДНК может удваивать саму себя».

Уотсон и Крик предположили, что для удвоения ДНК должны произойти разрыв водородных связей, удерживающих вместе спиральный дуплекс, и расхождение нитей. Они также высказали мысль, что каждая нить дуплекса служит матрицей при синтезе комплементарной нити, и в результате образуются две пары нитей, в каждой из которых только одна является родительской. Таков механизм точного воспроизведения последовательности нуклеотидных пар в двойной спирали ДНК. Уотсон и Крик полагали, что репликация ДНК

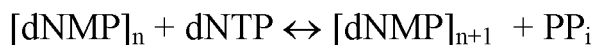
осуществляется спонтанно, без участия ферментов, но это оказалось неверно. Тем не менее, идея о том, что удвоение ДНК происходит путем последовательного соединения нуклеотидов в соответствии с правилом комплементарности, заданным каждой нитью спирали, разрешила концептуальную проблему точного воспроизведения генов.

Согласно общепринятой модели, репликация всех двунитевых ДНК полуконсервативна. Существуют ли в природе альтернативные способы репликации двунитевой ДНК (например, консервативный или дисперсный) - неизвестно. Таким образом, после каждого события репликации одна нить в обеих дочерних молекулах является родительской, консервативной, а другая – новосинтезированной, дочерней. Именно такой механизм копирования и называется полуконсервативным. Если геном представлен одонитевой ДНК (как у некоторых вирусов), то эта единственная нить служит матрицей для образования комплементарной нити, с которой она образует дуплекс, а затем на этом дуплексе синтезируются либо дочерние дуплексы, либо одонитевые копии одной из матричных нитей.

Уотсон и Крик уже во второй своей работе 1953 г. предположили возможный механизм копирования наследственного материала. Легко представить, что цепи молекулы ДНК расходятся и каждая из них становится матрицей, на которой синтезируется новая комплементарная цепь. В результате образуются две дочерние двуспиральные молекулы ДНК, не отличимые от родительской молекулы.

В 1957 г. А. Корнберг обнаружил у бактерии *E.coli* фермент, катализирующий процесс полимеризации ДНК из нуклеотидов — ДНК-полимеразу 1. В 1959 г. Артуру Корнбергу (A. Kornberg) была присуждена Нобелевская премия за открытие механизма биосинтеза ДНК. Он показал, что в основе удвоения молекул ДНК лежат обычные биохимические реакции.

В общем виде реакцию присоединения 5'-дезоксинуклеотидной группы к 3'-ОН-группе концевой нуклеотида праймерной цепи можно представить следующим образом:



где dNMP- любой из четырех обычных нуклеотидов. За один акт репликации нить, содержащая 3'-конец, удлиняется на один нуклеотидный остаток, при этом одновременно происходит удаление пирофосфата. Реакция присоединения нуклеотида обратима, но так как неорганический фосфат в клетках быстро разрушается, то реакция активно направлена в сторону синтеза. Репликация ДНК всегда идет от 5'- конца нити ДНК (то есть содержащего 5'-дезоксинуклеотидную группу) к 3'-концу (то содержащему свободную 3-ОН-группу) и нуждается в наличии ранее синтезированного фрагмента нити ДНК в качестве затравки для реакции полимеризации. Такой ДНК-фрагмент, имеющий свободный 3'-конец, называется праймером. Ферменты, катализирующие праймер-зависимую, детерминируемую ДНК-матрицей реакцию присоединения дезоксинуклеотидов, называются ДНК-полимеразами. К настоящему времени выделены и охарактеризованы несколько различных классов ДНК-полимераз, детально описаны свойства этих ферментов и реакции, которые они катализируют. Об их строении и индивидуальных особенностях мы подробно поговорим в следующих главах.

1.2. Вилка репликации

Процесс репликации происходит в специальных структурах, названных вилками репликации. Схематическое устройство репликативной вилки *E.coli* представлено на рис. 1. То, что две нити молекулы ДНК расположены антипараллельно друг другу, создает ряд проблем для их одновременной разнонаправленной репликации.

По мере движения вилки одновременно должны синтезироваться две дочерние цепи. Вилка движется в направлении от 5' к 3' на одной цепи и от 3' к 5' — на другой. Однако нуклеиновые кислоты синтезируются только от 5'- к 3'-концу. Проблема решается таким образом, что на одной из родительских нитей новая нить синтезируется непрерывно в направлении 5'-3', что совпадает с движением вилки репликации. Это называется лидирующей или ведущей. Другая нить

называется отстающей или запаздывающей, так как синтез на ней идет с некой задержкой по сравнению с лидирующей нитью. Это связано с тем, что ДНК на этой нити синтезируется также от 5' к 3', но в направлении, противоположном движению вилки, и короткими фрагментами. Благодаря этому разнонаправленный синтез ДНК может осуществляться в рамках одной структуры – репликативной вилки.

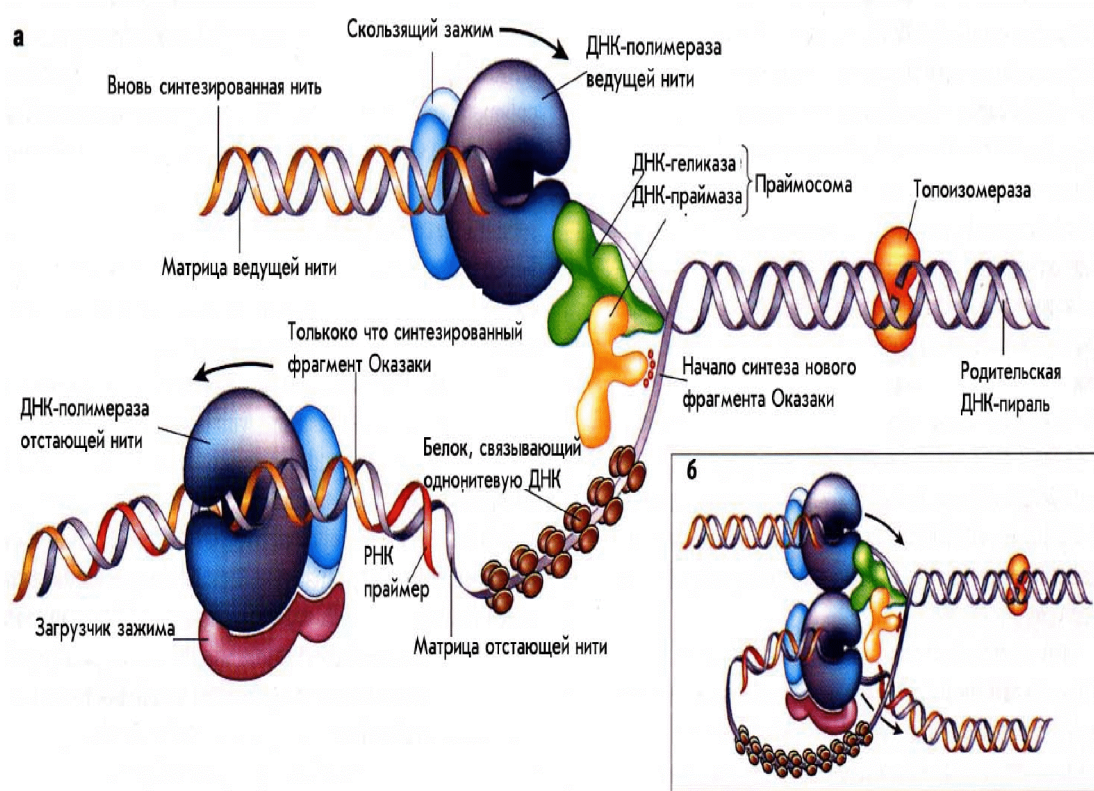


Рис.1. Схема репликативной вилки.

Длина таких коротких фрагментов у прокариот составляет 1000-2000 пн. По имени открывшего их ученого они были названы «фрагментами Оказаки». По мере движения репликативной вилки концы соседних фрагментов Оказаки соединяются с образованием непрерывной отстающей нити. Для того, чтобы процесс на обеих нитях шел синхронно, полимеразные комплексы лидирующей и отстающей нити

связаны между собой, образуя сложную трехмерную структуру (рис. 1, б)

Вилка репликации может двигаться как в одну сторону от точки начала репликации, так и в обе стороны. В зависимости от этого процесс называется однонаправленной или двунаправленной репликацией. Как это выглядит схематически, показано на рис.2. У эукариот репликация обычно двунаправленная. Также и у *E.coli*.

Механизмы инициации репликации в точке начала репликации и при образовании фрагментов Оказаки в отстающей цепи в принципе аналогичны, хотя имеются некоторые тонкие различия. В обоих случаях происходит образование коротких РНК-затравок (праймеров), комплементарных матричной ДНК, в виде продолжения которых синтезируется новая цепь ДНК. В дальнейшем короткие вставки РНК замещаются сегментами ДНК, отдельные фрагменты Оказаки затем объединяются с образованием непрерывной отстающей нити.

Все живые организмы на Земле обычно делят на прокариот и эукариот (от греч. карион — ядро). Главной особенностью прокариот является отсутствие у них в отличие от эукариот полноценного клеточного ядра, покрытого оболочкой. Генетический материал прокариот расположен в нуклеоиде — примитивном эквиваленте ядра эукариот. Клетки прокариот имеют очень небольшие размеры — около 1 мкм. Объем эукариотических клеток в 800-1000 раз больше объема клеток прокариот. К прокариотам относятся бактерии и археи (или археобактерии), предки которых возникли около 4 млрд лет назад. Эукариоты могут быть как одноклеточными, так и многоклеточными. Они появились на Земле примерно через 500 млн лет после прокариот.

По современным представлениям ДНК-метаболизм у прокариот имеет некоторые отличия от такового у эукариот. Описывая процессы репликации и рекомбинации, мы будем каждый раз подчеркивать эти отличия.

Глава 2. Начало репликации

Репликация ДНК начинается не в любой случайной точке молекулы, а в специфических местах, называемых точками начала репликации или олдрижинами. Процесс копирования продолжается через образование репликативных вилок в одном или обоих направлениях до тех пор, пока ДНК полностью не удвоится. В замкнутых кольцевых молекулах ДНК новосинтезированные цепи ковалентно соединяются в местах встречи увеличивающихся в размере репликативных вилок или в том месте, где единственная вилка возвращается к точке начала репликации. Дочерние молекулы, как правило, расходятся еще до начала нового раунда репликации. Такие различающиеся по размеру геномы, как геном вируса SV40 (5,2 тпн), бактериофага λ (48,5 тпн) и *E.coli* (4-10³ тпн), воспроизводятся в результате одного иницирующего события, происходящего в определенной точке.

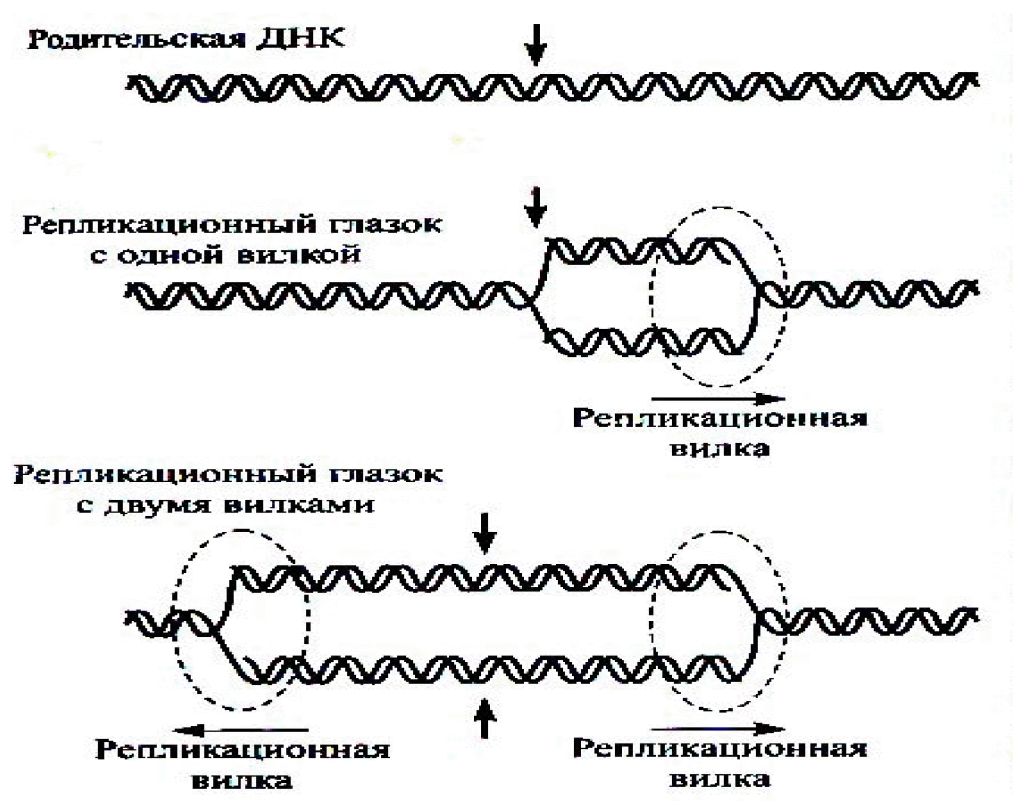


Рис.2.Возможное движение реплткативной вилки.

У про- и эукариот можно встретить различные вариации на эту тему. Так, каждая из цепей родительской спирали митохондриальной ДНК животных (15 тпн) имеет свою точку начала репликации. Синтез комплементарной цепи некоторых небольших однонитевых фаговых геномов начинается вблизи одной специфической последовательности, а репликация полученного дуплекса может инициироваться совсем в другой точке. Репликация линейных двунитевых ДНК также инициируется в особых сайтах. Например, ДНК бактериофага Т7 (40 тпн) реплицируется в двух противоположных направлениях к разным концам молекулы, начиная от одной точки, а каждая из двух цепей ДНК аденовируса человека (30-38 тпн) реплицируется последовательно всегда от 3'-конца.

Для геномов эукариотических клеток характерно наличие множественных точек начала репликации, разбросанных по хромосоме на расстоянии около 20 тпн. После инициации репликация продолжается в двух направлениях от каждой точки до тех пор, пока репликативные вилки двух соседних точек начала репликации не сольются. Полноразмерные ДНК каждой дочерней хромосомы получают путем соединения более коротких, независимо инициированных новосинтезированных нитей.

2.1. Понятие о репликоне и ориджине репликации

Участок ДНК, на котором синтезируется отдельный фрагмент лидирующей нити, называется репликоном. У многих прокариот их геном содержит только одну точку инициации репликации, то есть у них в ДНК только один репликон. Эукариотические геномы полирепликонны.

Место начала репликона, в котором происходит инициация репликации, носит название ориджина репликации. Именно ориджин распознается специальными белковыми комплексами и на нем начинается формирование вилки репликации.

В некоторых случаях место начала репликации имеет такую нуклеотидную последовательность, что дуплекс принимает необычную конфигурацию, которую распознают белки, участвующие в инициации. Природа взаимодействия между точкой начала репликации и белками и механизм инициации в целом исследованы недостаточно, однако можно сказать, что, по-видимому, они в разных случаях различны.

2.2. Орижин репликации *E.coli* *oriC*

Наиболее подробно изучены ориджины у *E. coli* и *Bacillus subtilis*. Область начала репликации хромосомы, *oriC* (origin of chromosome), включает в себя участки со специфическими последовательностями, так называемыми ДНК-боксами, и расположенными между ними короткими последовательностями. ДНК-боксы со специфическим «мотивом» нуклеотидов, преимущественно в 9пн, перемежаются фрагментами в 12-13пн с высоким содержанием АТ. Сами девятичленные последовательности могут располагаться как в прямом, так и в инвертированном положении по отношению друг к другу. Например, у *B.subtilis* имеется один фрагмент ТТАТССАСА и два других девятичленных бокса, ориентированных в противоположном направлении, с заменой одной из пар нуклеотидов. Всего у *B.subtilis* на *oriC* расположено 15 ДНК-боксов. Область *oriC* очень консервативна: ДНК-боксы сходного состава имеются в соответствующем месте хромосомы у других бактерий (только у *Mycoplasma genitalium*, несмотря на наличие общих для всех бактерий ферментов репликации, ДНК-боксов найдено не было). Сами ДНК-боксы не кодируют белок или РНК, хотя между ними располагаются отдельные гены. Продукты этих генов также большей частью вовлечены в «обслуживание» процесса репликации ДНК.

Порядок расположения ДНК-боксов, промежуточных областей и их количество позволяют думать, что эволюционная дивергенция *oriC* шла главным образом за счет дупликаций и

трипликаций. Схема абстрактного «минимального ориджина» прокариот представлена на рис. 3 .

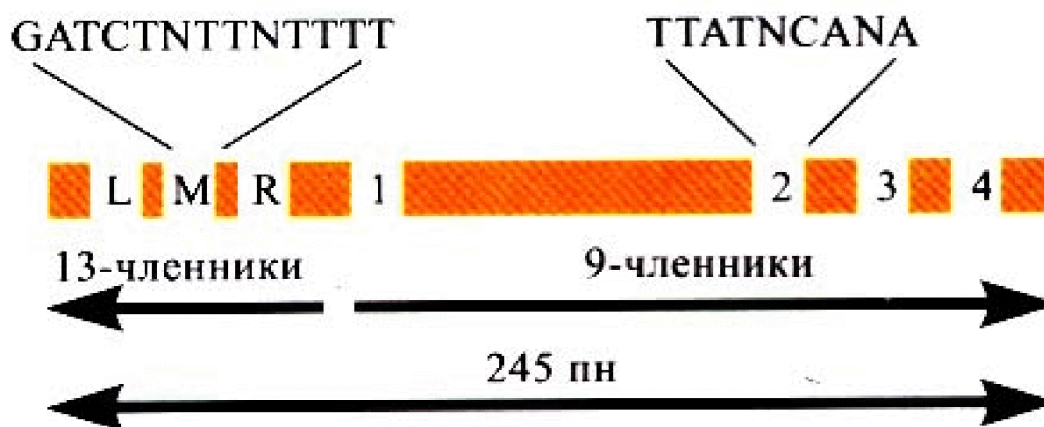


Рис.3. Организация минимального ориджина прокариот

Рис.3. Схема минимального ориджина прокариот.

2.3. Ориджины других организмов.

Коровая часть ориджина репликации у вируса SV40 состоит из элемента опознания (ORE — origin recognition element), необходимого для связывания особого белка Т-антигена (T-ag), элемента для связывания белка, расплетающего ДНК (DUE – DNA unwinding element), и элемента, обогащенного АТ-нуклеотидами. Участок, с которого вилка репликации начинает двигаться в противоположных направлениях, называется началом двунаправленной репликации (OBR – origin bidirectional replication).

Вспомогательные элементы (Aux) связывают димеры Т-антигена (Aux-1) и фактор транскрипции Sp1 (Aux-2). Расстояние между этими элементами и их ориентация играют важную роль в процессе инициации репликации. Схема ориджина вируса SV40 представлена на рис.4.

У эукариот гомологами ориджинов репликации являются автономно реплицирующиеся последовательности, или ARS (autonomously replicating sequences), открытые в 1980 г. Р. Дэйвисом и Дж. Карбоном.



Рис.4. Схема ориджина вируса SV40.

У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* особые последовательности, способные обеспечивать репликацию фрагментов ДНК в дрожжевой клетке были выделены раньше, чем у других эукариот. Позднее такие последовательности были найдены и у многих других организмов. У *S.cerevisiae* ARS занимает 100—200 пн и содержит специфическую консенсусную последовательность (ACS – ARS consensus sequence), размером в 11 пн, необходимую для связывания с белком-инициатором, а также дополнительные элементы (В-элементы), усиливающие функцию ориджина. Например, ARS1 – первый подробно охарактеризованный ориджин — содержит три таких элемента – В1, В2, В3. Последовательности ACS и В1 занимают приблизительно 50 пн и представляют собой наименьшую функциональную область любого ориджина, которая требуется для связывания с белком-инициатором.

Элемент В2 обычно содержит генетически охарактеризованный участок DUE. Вспомогательный элемент В3 связывает фактор

транскрипции Abf-1. Общая длина ARS-элемента составляет 100-200 пн. Структура ориджина *S. cerevisiae* представлена на рис.5.

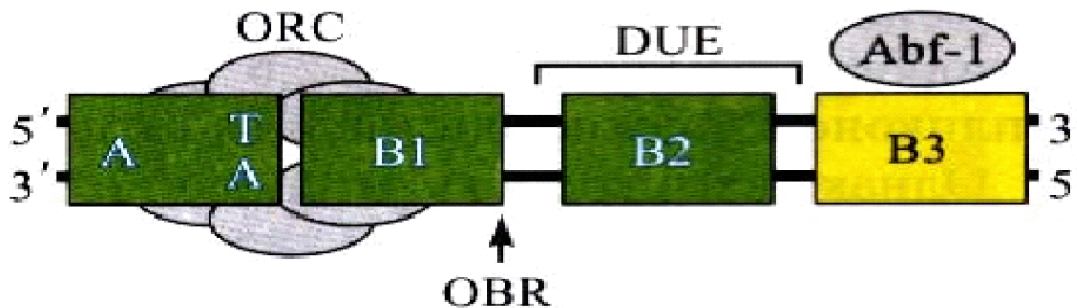


Рис.5. Схема ориджина *Saccharomyces cerevisiae*

У другого вида дрожжей, *Shizosaccharomyces pombe*, ориджины состоят по крайней мере из одной ARS, которая значительно длиннее, чем у *S. cerevisiae*. В некоторых случаях несколько ARS-элементов формируют зону инициации репликации. (Рис.6.)



Рис. 6. Схема ориджина *Shizosaccharomyces pombe*

У млекопитающих ориджины детально не охарактеризованы, некоторые из них располагаются в межгенных промежутках, имеют сайты связывания для транскрипционных факторов, часто содержат только районы инициации двунаправленной репликации – OBR.

2.4. Скорость репликации

Скорость репликации генома регулируется в основном частотой инициирующих событий. Так, у *E.coli* скорость копирования в каждой репликативной вилке постоянна и равна примерно 1500 пн в секунду: следовательно, полный геном длиной $4 \cdot 10^6$ пн реплицируется примерно за 40 мин. Если хромосома реплицируется быстрее, это значит, что увеличивается частота актов инициации в той же самой точке начала репликации при прежней скорости копирования. Клетки *E.coli* делятся каждые 20 мин; это означает, что репликация ДНК инициируется в хромосомах, еще не закончивших предыдущий раунд репликации. Скорость движения репликативной вилки в эукариотических клетках значительно меньше (10-100 пн в секунду), но завершение репликации хромосомы в разумное время обеспечивается одновременной инициацией во множестве точек. Итак, скорость репликации хромосом контролируется числом и расположением точек начала репликации. Например, в ранних эмбрионах дрозофилы репликация отдельной хромосомы осуществляется каждые 3 мин, благодаря почти одновременной инициации событий в точках, отстоящих друг от друга на 7000-8000 пн. В тоже время известно, что у дрозофилы в ходе раннего эмбрионального развития, как скорость репликации, так и размеры и число репликонов тканеспецифичны. В культуре же соматических клеток той же дрозофилы скорость удвоения хромосом значительно более медленная, так как репликация начинается в гораздо меньшем числе точек, находящихся друг от друга на расстоянии 40000 пн, при этом продолжительность S-фазы составляет 600 мин. Следовательно, при фиксированной скорости синтеза ДНК множественная инициация повышает скорость процесса репликации в целом и таким образом уменьшает время, необходимое для удвоения всего набора хромосом. Данные о числе репликонов и скорости репликации приведены в табл. 1.

Различия в продолжительности S-фазы найдены и у других организмов. Например, у тритона S-фаза длится 1 ч в ядрах бластулы и

200 ч в предмейотической S-фазе сперматоцитов. Вероятно, длительность S-фазы определяется не скоростью синтеза ДНК, а числом задействованных ориджинов репликации. В ДНК клеток нейрулы тритона они находятся на расстоянии около 40 мкм друг от друга, а в соматических клетках — около 100 мкм.

Таблица 1.

Число и длина репликонов у разных организмов.

Организмы	Число репликонов	Средняя длина репликона (тпн)	Скорость движения вилки репликации (тпн/мин)
Бактерии (<i>Escherihia coli</i>)	1	4 200	50
Дрожжи (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	500	40	3,6
Насекомые (<i>Drosophila melanogaster</i>)	3 500	40	2,6
Амфибии (<i>Xenopus laevis</i>)	15 000	200	0,5
Млекопитающие (<i>Mus musculus</i>)	25 000	150	2,2
Растения (<i>Vica faba</i>)	35 000	300	Нет данных

В соответствии с современными представлениями репликоны у эукариот распределены в геноме не случайно, они расположены группами (replicon foci). В этих группах, или фокусах, собираются ферменты репликации, которые удлиняют вилки репликации

одновременно 10-100 соседних репликонов длиной примерно по 100тпн каждый. Репликация в них завершается за 45—60 мин. Кроме этого существуют очень длинные репликоны (более 1000тпн) - столь большие, что репликация в них продолжается по нескольку часов.

Активация ориджинов репликации происходит на протяжении всей S-фазы. Например, ARS1 *S.cerevisiae* активируется в ранней, а ARS501 - в поздней S-фазе. Большинство ориджинов активируется в середине S-фазы. Интересно отметить, что участки хромосом *S.cerevisiae*, реплицирующиеся в ранней или поздней S-фазе, располагаются мозаично, то есть перемешаны. У *S.cerevisiae* было обнаружено, что центральная область хромосомы IV реплицируется в ранней, а теломеры - в поздней S-фазе. Участок ДНК размером 67тпн, прилежащий к теломере на правом конце хромосомы V и содержащий ARS501, реплицируется в поздней S-фазе. По-видимому, поздняя репликация этого участка хромосомы является следствием его соседства с теломерой. Кроме того, известно, что в конце S-фазы реплицируются "молчащие" гены, например неэкспрессирующиеся в определенных типах клеток локусы HML и HMR, которые локализованы в субтеломерных областях. Активно экспрессирующиеся гены, например локус MAT, напротив, реплицируются в первой половине S-фазы.

Глава 3. Инициация репликации

Ориджины репликации являются местом, с которого начинает свое движение репликативная вилка. Но ДНК-полимеразы не могут начать процесс репликации без помощи других белков. Белки, участвующие в распознавании ориджина и способствующие привлечению к нему праймазы – РНК-полимеразы, синтезирующей праймер, «затравку» для синтеза ДНК - и ДНК-полимеразы, образуют комплекс инициации репликации.

3.1 Инициация репликации у *E.coli*

Инициация репликации в *oriC* в системе *in vitro* начинается с формирования комплекса, в состав которого входят шесть белков: DnaA, DnaB, DnaC, HU, Girase и SSB. Сначала с девятичленной последовательностью связывается мономер DnaA, затем 20-40 мономеров этого белка формируют большой агрегат. ДНК ориджина опоясывает его, и цепи ДНК разъединяются в области трех тринадцатичленных последовательностей. На следующем этапе димер DnaB/DnaC присоединяется к комплексу *oriC*/DnaA, формируя агрегат размером около 480 кДа, соответствующий сфере с радиусом 6 нм. В результате формируется вилка репликации.

3.2. Инициация репликации у эукариот

Инициация репликации ДНК эукариот начинается с образования комплекса ориджина репликации и белка-инициатора репликации. Этот комплекс называется пострепликативным (post.-RC). Он служит платформой для сборки структур более высокого порядка, которые переводят хроматин в состояние, компетентное для репликации. Последовательные стадии образования комплексов инициации репликации показаны на рис.7.

Белком-инициатором репликации ДНК в клетках эукариот является ORC (origin recognition complex), который впервые был описан у *S.cerevisiae*. Впоследствии ORC-подобные белки были обнаружены и изучены и у других представителей эукариот, а также у млекопитающих и человека. У всех эукариот ORC образован шестью субъединицами – Orc1-Orc6 (120-50 кДа). Для жизнедеятельности *S. cerevisiae* существенны все шесть субъединиц комплекса. Две разные группы субъединиц ORC участвуют в распознавании последовательностей ориджина при его связывании с ориджином репликации. Orc1, Orc2 и Orc4 взаимодействуют с ACS, остальные три субъединицы распознают B1- подобные элементы. Возможно, что связь с нуклеотидными

последовательностями В1 осуществляет только Огс5. ORC специфически связывается с ДНК только в присутствии АТР и обладает АТР-азной активностью, которая регулируется координированным взаимодействием белка с АТР и элементами ARS. АТР связывается с субъединицей Огс1 и играет роль кофактора, необходимого для присоединения ORC к ориджину. Специфическая последовательность ориджина, связавшегося с ORC, ингибирует АТРазную активность Огс1, в то время как однонитевые участки ДНК, появляющиеся в S-фазе, ее снова активируют. При этом меняется конформация ORC - с вытянутой (extended) на изогнутую (bent). Возможно, связывание и гидролиз АТР субъединицей Огс1 участвуют в контроле функций ORC в клеточном цикле.

У делящихся дрожжей *S.pombe* белок Огс4 содержит в N-концевом домене так называемые «АТ-крючки», с помощью которых ORC связывается с несколькими областями ARS1, богатыми АТ-последовательностями. У *S.cerevisiae* ORS присоединяется к ориджину в конце митоза, образуя пострепликативный комплекс (post-RC), и остается связанным с ним в последующих клеточных циклах. При этом post-RC существует в фазах S, G2 и M, а в фазе G1 входит в состав пререпликативного комплекса (pre-RC).

Пререпликативный комплекс формируется на основе post-RC, этот процесс начинается во всех ориджинах одновременно на границе фаз M и G1 и завершается в конце G1 в ориджинах, активирующихся первыми при переходе в S-фазу. В ориджинах, активирующихся позже в S-фазе, образование pre-RC завершается в соответствующий для каждого из них период S-фазы. В G1-фазе во время сборки pre-RC ORC способен взаимодействовать с циклинзависимыми киназами (Cdk, cyclin-dependent kinases). Это взаимодействие является одним из механизмов, позволяющих клетке формировать pre-RC после митоза. Первыми к post-RC на границе фаз M/G1 присоединяются белок Cdc6 (cell division cycle protein) и семейство шести белков Mcm 2-7 (minichromosome maintenance proteins). Белки Mcm 2-7 являются наиболее известными среди семейства «поддерживающих мини-хромосомы» белков, впервые

идентифицированных у *S.cerevisiae* при исследовании мутантов, не способных к поддержанию стабильности мини-хромосом.

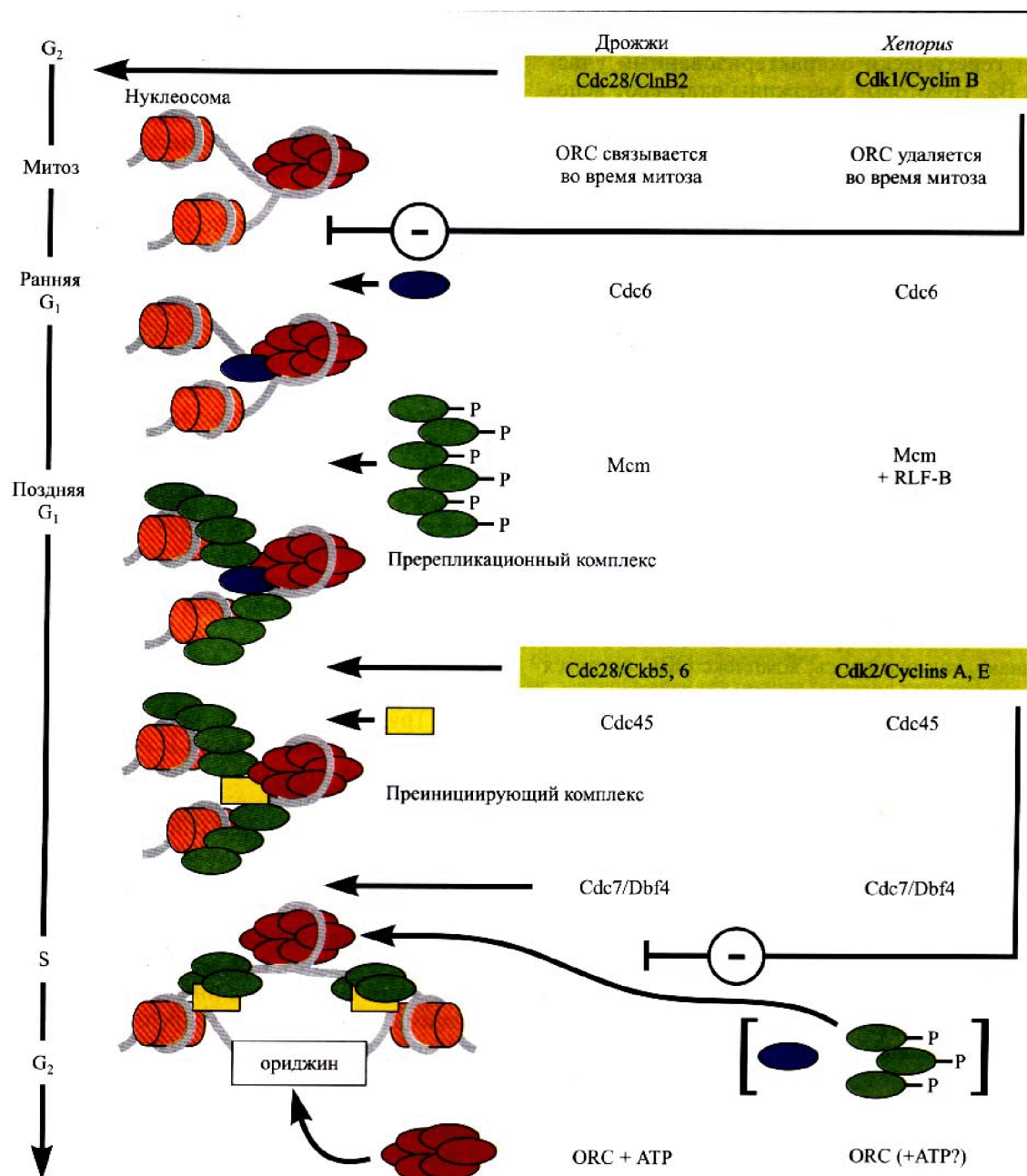


Рис. 7. Схема инициации репликации у эукариот

Белки Cdc6 и Mcm 2-7 описанны у многих представителей эукариот, включая млекопитающих. Недавно было показано, что в

клетках *S.pombe* и высших эукариот в ранней стадии формирования pre-RC участвует еще один белок – Cdt1 (cell division termination). Белки Mcm 2—7 образуют гексамерный комплекс MCM - ключевой компонент pre-RC. MCM генерирует контрольный сигнал на нереплицированном хроматине для ингибирования преждевременного митоза в G1-фазе. Также он необходим для продвижения клетки по циклу в S-фазу. Присоединение MCM к ориджину репликации регулируется фосфорилированием-дефосфорилированием отдельных субъединиц этого комплекса. Например, частичное дефосфорилирование Mcm4-субъединицы, гиперфосфорилированной в фазе M, способствует образованию pre-RC, а полное дефосфорилирование Mcm3-субъединицы инактивирует комплекс и препятствует его связыванию с хроматином. В то же время, присоединение MCM к ориджину зависит от белков Cdc6 и Cdt1, которые совместно «насаживают» MCM на хроматин. В отсутствие Cdc6 клетки *S.cerevisiae* теряют способность инициировать репликацию ДНК и подвергаются «урезанному» митозу и нереплицированные хромосомы сегрегируют случайным образом к полюсам веретена.

Способность Cdc6 предотвращать «урезанный» митоз до завершения репликации ДНК обеспечивается его взаимодействием с Cdk's. Активность Cdc6 в фазе G1 регулируется также его взаимодействием с АТФ, так как мутации в консервативных последовательностях АТФ-связывающего мотива Cdc6 приводили к потере способности хроматина присоединять MCM в клетках *S.cerevisiae* и к подавлению репликации ДНК в клетках человека. У *S.cerevisiae* в присоединении MCM к pre-RC принимает участие еще один белок - Mcm10, который ассоциирован с хроматином и взаимодействует с компонентами Mcm2-7. Столь сложный контроль связывания MCM с ориджином свидетельствует о том, что в клетке существует многоступенчатая система регуляторных механизмов, необходимая для недопущения повторного митоза при нереплицированном хроматине. Связывание MCM с ориджинами репликации необходимо для обеспечения стабильности генома, именно оно переводит хроматин в состояние, за которым закрепилось название «разрешающего» репликацию (replication-licensing). У кеенопуса для связывания MCM

24

требуется наличие дополнительного фактора, носящего такое же название, RLF-B (replication licensing factor B). Белки MCM обнаруживают аффинность к гистонам, а не к ДНК, в результате чего в конце G1-фазы весь пререпликативный комплекс прочно привязывается к хроматину непосредственно в участке ориджина репликации или рядом с ним.

В G1-фазе к частично сформированному pre-RC присоединяется киназа Cdc7 со своей регуляторной субъединицей Dbf4 (DNA binding factor 4), а в поздней G1-фазе или на границе фаз G1/S - белок Cdc45 и связывающий однонитевую ДНК репликативный белок A (RPA, replication protein A). Взаимодействие между Cdc45 и Dbf4/Cdc7 в поздней G1-фазе требуется для последующего «включения» репликации в ориджинах после сборки pre-RC.

Киназа Dbf4/Cdc7 связывается с ori за некоторое время до того, как начинает выполнять свои функции. Присоединившись к pre-RC, киназа Dbf4/Cdc7 «ждет», когда активируются Cdk, и только после этого фосфорилирует свои субстраты. Роль «раннего» связывания этой киназы с ori пока остается неясной.

Связывание Cdc45 с хроматином зависит от белков Cdc6 и Mcm2 и от активности киназы Dbf4/Cdc7 и циклинзависимых киназ S-фазы (Cdk-S-фазы - Cdc28/Ckb5,6 у дрожжей и Cdk2/Cyclins A,E у высших эукариот). Белок Cdc45 может быть фосфорилирован киназой Dbf4/Cdc7, но это происходит только после активации Cdk-S-фазы. Активность Cdk-S в свою очередь регулируется ингибитором Sic1, который в конце фазы G1 подвергается убиквитинзависимому протеолизу. Присоединение белка Cdc45 к pre-RC происходит в поздней G1-фазе клеточного цикла только на ориджинах тех репликонов, которые начинают синтез ДНК первыми при переходе к S-фазе. Cdk-S и Dbf4/Cdc7-зависимое связывание Cdc45 с остальными ориджинами осуществляется в определенное для каждого из них время на протяжении всей S-фазы. Вероятный механизм присоединения Cdc45 к pre-RC таков: Dbf4/Cdc7, связавшаяся со всеми ориджинами репликации в фазе G1, после воздействия Cdk-S фосфорилирует Mcm2 в каждом ориджине в тот период фазы S, который определяется индивидуально для каждого ориджина. В результате

фосфорилирования Mcm2 конформация комплекса МСМ меняется таким образом, что он приобретает способность связывать Cdc45. В то же самое время к pre-RC присоединяется белок RPA. Подобно Cdc45 RPA связывается с ориджином Cdk-S зависимым образом при участии Mcm2. Присоединение белков Cdc45 и RPA завершает сборку pre-RC. Сразу после завершения сборки pre-RC происходит частичная его диссоциация, сопровождающаяся началом формирования RC (replication complex). Белок Cdc6 первым диссоциирует из pre-RC при переходе из фазы G1 в S или даже ранее, подвергаясь фосфорилированию под действием Cdkс, за которым следуют убиквитинирование и деградация. Этот путь инактивации Cdc6 показан как для низших эукариот, так и для некоторых представителей высших эукариот. В клетках человека уровень Cdc6 остается постоянным на протяжении всего клеточного цикла. Но при переходе в S-фазу Cdc6 транспортируется из ядра в цитоплазму. По всей видимости, и этот процесс регулируется Cdkс. Удаление Cdc6p из ядра (путем гидролиза или транспортировки в цитоплазму) является одним из механизмов, предотвращающих множественные акты репликации в течение одного клеточного цикла.

Белок Cdt1 также инактивируется после завершения формирования pre-RC. При этом в клетках низших эукариот Cdt1 периодически экспрессируется, накапливаясь в ядрах в фазе G1, а в фазе G2 его уровень падает. У высших эукариот активность Cdt1 контролируется белком-ингибитором геминином, который отсутствует в клетках в фазе G1, накапливается на протяжении фаз S, G2 и частично - фазы M и исчезает в M-фазе на границе метафазы и анафазы.

В отличие от Cdc6 и Cdt1 белки Mcm2-7, RPA и Cdc45, диссоциировав из pre-RC, остаются связанными с хроматином в S-фазе во время синтеза ДНК. Быстрое освобождение МСМ из pre-RC в клетках дрожжей обеспечивается взаимодействием между Mcm10 и Mcm7. Разъединению МСМ и Mcm10 способствует белок Cdc45.

Субъединицы Mcm4,6,7 комплекса МСМ обладают геликазной активностью, проявляющейся только при стимуляции под действием Cdk-S и киназы Dbf4/Cdc7. Белки Mcm2-7 существенны не только для инициации, но и для элонгационной фазы репликации, для прогрессии

репликативных вилок. МСМ входит в состав РС и принимает участие в раскручивании двунитевой ДНК в репликативных вилках. В клетках человека связывание МСМ с ориджином при формировании РС осуществляется с участием белка Mcm10, который накапливается и образует комплекс с хроматином в S-фазе, в отличие от Mcm10 *S.cerevisiae*. При переходе клеток из фазы G2 в М Mcm10 гиперфосфорилируется и диссоциирует из хроматина, а на границе фаз М/G1 он подвергается протеолизу по протеосомному механизму. Таким образом, фосфорилирование и протеолиз Mcm10 в клетках человека осуществляют отрицательную регуляцию активности МСМ после завершения репликации ДНК. Кроме того, отрицательная регуляция активности МСМ может быть результатом непосредственного фосфорилирования отдельных компонентов самого этого комплекса. Так, например, фосфорилирование Cdk специфических сайтов Mcm4 в фазе М приводит к потере геликазной активности Mcm4,6,7, а высокая концентрация комплекса Cdk-циклинов Е в ядрах эмбрионов *Xenopus* препятствует связыванию Mcm3 с ДНК и таким образом предотвращает реассоциацию МСМ с хроматином после завершения репликации. Комплекс МСМ участвует не только в ранних этапах инициации репликации при переходе клеток в фазу G1, но и в завершении этого процесса в фазе S. Причем на завершающем этапе инициации репликации МСМ выполняет две функции: раскручивает ДНК в ориджине и служит остовом, к которому присоединяются остальные компоненты при формировании РС. Поэтому множественные механизмы регуляции активности МСМ вполне объяснимы. Если в фазе G1 эти механизмы направлены на осуществление продвижения клеток к фазе S без повторного митоза, то в фазах S и G2 они предотвращают повторную репликацию уже реплицированного хроматина.

RPA является белком, связывающим однонитевую ДНК и наличие его в РС при инициации репликации необходимо для стабилизации расплетенного участка ДНК. RPA образован тремя субъединицами с молекулярными массами 70, 34 и 11 кДа, причем активностью, связывающей однонитевую ДНК, обладает субъединица 70 кДа, а субъединица 34 кДа является регуляторной. Последняя фосфорилируется

Cdk, что, по-видимому, необходимо для активации репликации ДНК. Подробное описание этого комплекса будет дано далее.

Белок Cdc45 также участвует в формировании RC. Он необходим для присоединения ДНК-полимеразы α к ориджинам репликации. Показано, что белок Cdc45 человека связывается с белком Msm7 человека и субъединицей p70 ДНК-полимеразы α *in vitro*. Cdc45 присоединяет ДНК-полимеразу α к RC посредством связывания с Msm7. В клетках дрожжей *S.cerevisiae* Cdc45 присоединяет ДНК-полимеразу α к хроматину с участием Msm2.

Одним из компонентов комплекса, запускающего репликацию ДНК, является ДНК-полимераза α . Из всех многочисленных ДНК-полимераз эукариот именно она содержит праймазную активность, способную синтезировать короткую РНК «затравку» - праймер из рибонуклеозидтрифосфатов. РНК-праймер генерирует сигнал, который является одним из пусковых механизмов репликации. ДНК-полимераза α обнаружена у всех исследованных эукариот и хорошо изучена. Подробное описание этого фермента будет дано в следующем разделе. Показано, что один из путей регуляции инициации репликации связан с фосфорилированием двух больших субъединиц ДНК-полимеразы α под действием Cdk. При этом циклин E и Cdk стимулируют инициацию репликации при переходе клетки в S-фазу, а циклин A и Cdk ингибируют ее в фазе G2.

Очевидно, что активация упоминавшихся выше «ранне- и позднеактивных» ориджинов *S.cerevisiae* зависит от киназы Dbf4/Cdc7p. Вероятно, в каждом ориджине происходит локальная регуляция его активности дополнительными протеинкиназами, например Rad53. Киназа Rad53 блокирует запуск "позднеактивных" ориджинов в ранней S-фазе. Когда это блокирование устраняется, киназа Dbf4/Cdc7p активирует MCM, что приводит сразу к нескольким последствиям: стимуляции геликазной активности MCM и связыванию белка RPA и ДНК-полимеразы α с ориджинами репликации. Присоединение ДНК-полимеразы α к RC, раскручивание ДНК в ориджине и синтез РНК-праймера завершают процесс инициации репликации ДНК эукариот. Следует отметить, что роль ДНК-полимеразы α ограничивается только запуском репликации ДНК. Эта

28

ДНК-полимераза не способна к процессивному, то есть протяженному, синтезу ДНК и не обладает корректирующей активностью. Поэтому в дальнейшем в процессе репликации она добавляет к РНК-праймеру приблизительно 20 нуклеотидов и замещается ДНК-полимеразами δ или ϵ .

Post-RC, с образования которого начинается вся цепь событий процесса инициации репликации ДНК, в S-фазе клеточного цикла претерпевает изменения. Эти изменения касаются сродства ORC к ДНК. Так, например, белок Orc1 *Xenopus* образует прочный комплекс с хроматином в ранней интерфазе до тех пор, пока не завершится сборка pre-RC. Затем в S-фазе сродство Orc1 к ДНК уменьшается. У млекопитающих Orc1 диссоциирует из хроматина в S-фазе, превращается в моно- или диубиквитинированную форму, затем деубиквитинируется и вновь связывается с ДНК при переходе из M- в G-1-фазу. Белок Orc2, напротив, остается связанным с хроматином на протяжении всего клеточного цикла и не является субстратом для убиквитинирования. В клетках человека в S-фазе из хроматина диссоциирует комплекс белков, содержащий Orc1 и Orc2, который реассоциирует в конце митоза. В клетках дрожжей *S.pombe* ORC подвергается посттрансляционным изменениям в клеточном цикле: в фазе S начинается фосфорилирование одной из его субъединиц, Orc2, которое достигает максимума в фазах G2 и M. Таким образом, в клетках эукариот один из механизмов, предотвращающих повторную репликацию уже реплицированного хроматина, связан с инактивацией post-RC либо путем диссоциации из него Orc1 (у высших эукариот), либо путем фосфорилирования Orc2 (у низших эукариот).

Таблица 2.

Комплексы инициации транскрипции у эукариот

Вид комплекса	Белки	Функции
Пострепликати вный (post-RC)	ORC (Orc1-6)	Связывается с <i>ori</i> и образует платформу для сборки pre-RC

Пререпликативный (pre-RC)	ORC	Присоединяет Cdc6
	Cdc6	Связывает MCM с ori
	Cdt1	Связывает MCM с ori
	Mcm10	Связывает MCM с ori; способствует диссоциации MCM из pre-RC;
	MCM (Mcm 2-7)	Генерирует контрольный сигнал, запрещающий повторный митоз; переводит хроматин в состояние, «разрешающее» репликацию, связывает Cdc45 с ori
	Dbf4/Cdc7	Участвует в связывании Cdc45 и RPA с ori; активирует геликазу MCM
	Cdc45	Высвобождает MCM из pre-RC
	RPA	Стабилизирует расплетенные однонитевые участки ДНК
Репликативный (RC)	Cdc45	Присоединяет pol α к RC
	MCM (Mcm 2-7)	Расплетает ДНК; участвует в присоединении pol α к RC
	RPA	Стабилизирует расплетенные однонитевые участки ДНК
	pol α	Синтезирует РНК-праймер; инициирует репликацию ДНК

Для облегчения понимания последовательности связывания различных белков в зоне инициации репликации см. таблицу 2.

В последние несколько лет значительные успехи достигнуты в понимании механизмов регуляции практически каждой стадии инициации репликации. Они осуществляются на уровне функционирования всех компонентов, образующих пост-, пре- и репликативный комплексы. Эти компоненты подвергаются воздействию не одного, а ряда различных

факторов. Примером этому служит регуляция комплекса МСМ, активность которого напрямую зависит от белков Cdc6, Mcm10, Cdt1, циклин-зависимых киназ, киназы Dbf4/Cdc7, фосфатаз. До сих пор мало понятны закономерности процесса инициации репликации ДНК в эмбриогенезе и те факторы, которые влияют на эти процессы.

Глава 4. Механизм образования и необходимость РНК-праймера

4.1. Синтез праймера для полимеразной реакции

ДНК-полимеразы не могут начинать синтез ДНК непосредственно на матрице, а способны только добавлять новые дезоксирибонуклеотидные звенья к 3'-концу уже имеющейся полинуклеотидной цепи. Такую заранее образованную цепь, к которой добавляются нуклеотиды, называют праймером (или затравкой), она состоит из РНК. Короткую РНК-затравку синтезирует из рибонуклеозидтрифосфатов фермент, называемый ДНК-прайماзой. Праймазная активность может принадлежать либо отдельному ферменту, либо одной из субъединиц ДНК-полимеразы. Праймаза связывается с геликазой и ДНК, формируя структуру, называемую праймосомой, и синтезирует РНК-праймер. РНК-праймеры удлиняются действием ДНК-полимеразы β у прокариот и ДНК-полимеразой α у эукариот. Схематически этот процесс на отстающей нити показан на рис.8. У *E.coli* праймеры синтезирует специальный отдельный фермент – праймаза.

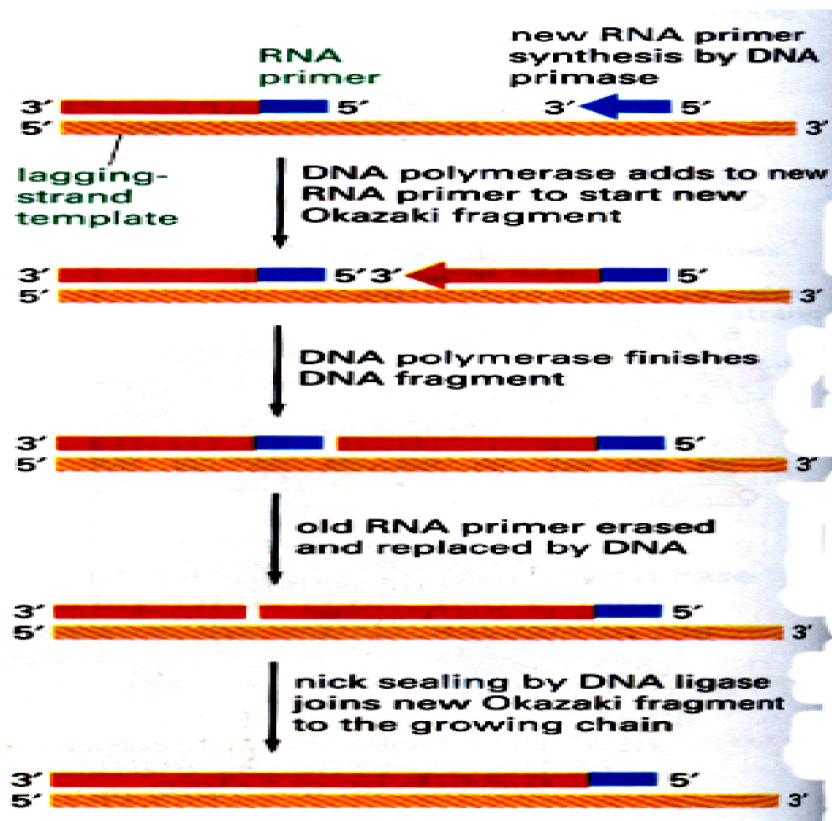


Рис.8. РНК-праймеры на отстающей нити

4.2.Понятие об РНК-ДНК дуплексе

ДНК обычно присутствует в клетке в В-форме. Кроме этого, описаны еще две возможные формы состояния ДНК – А и Z. Эти формы представлены на рис.9. Взаимодействие оснований в В-форме представлено на рис.10.

У А-формы плоскости оснований составляют угол в 20 градусов с перпендикуляром к оси спирали (у В-формы - 0), расстояние между парами оснований уменьшается до 0.29 нм (у В-формы - 0.34 нм), число пар на виток увеличивается до 11-12 (у В-формы - 10).

Пары оснований в А-форме очень сильно отодвинуты от оси спирали к периферии молекулы - почти на половину радиуса; сдвиг достигает 4—5 Å, а в В-форме ДНК он близок к нулю.

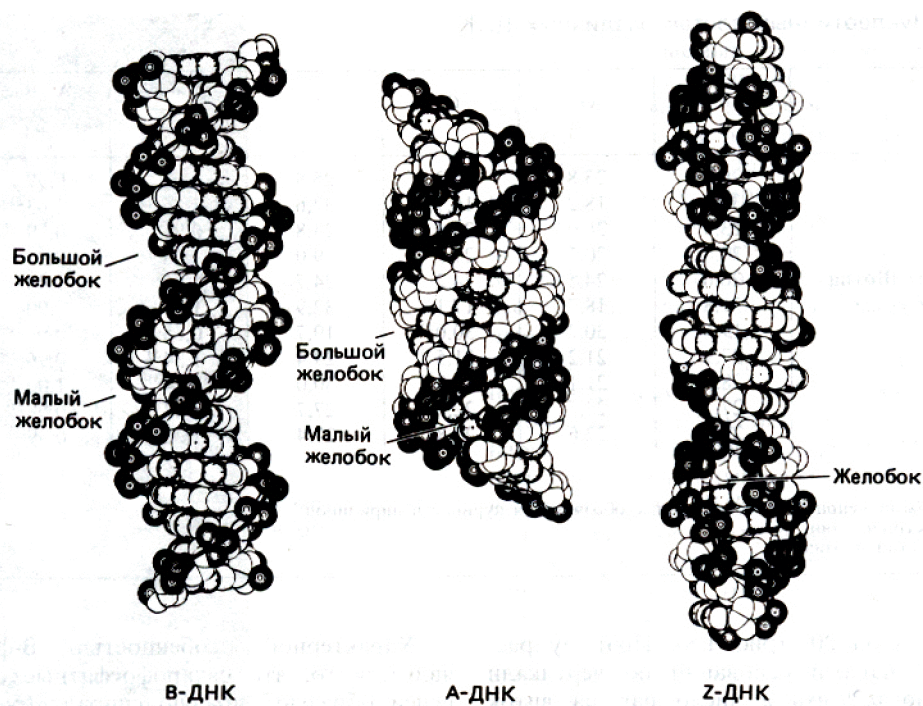


Рис. 9. Возможные формы ДНК

При образовании праймера (подробнее сам процесс его синтеза будет представлен при описании ДНК-полимеразы α эукариот) образуется ДНК-РНК дуплекс, который существует в А-форме. Таким образом, в А-форме дуплекса обеспечивается оптимальный баланс между гидрофобными и комплементарными взаимодействиями оснований матрицы и праймера.

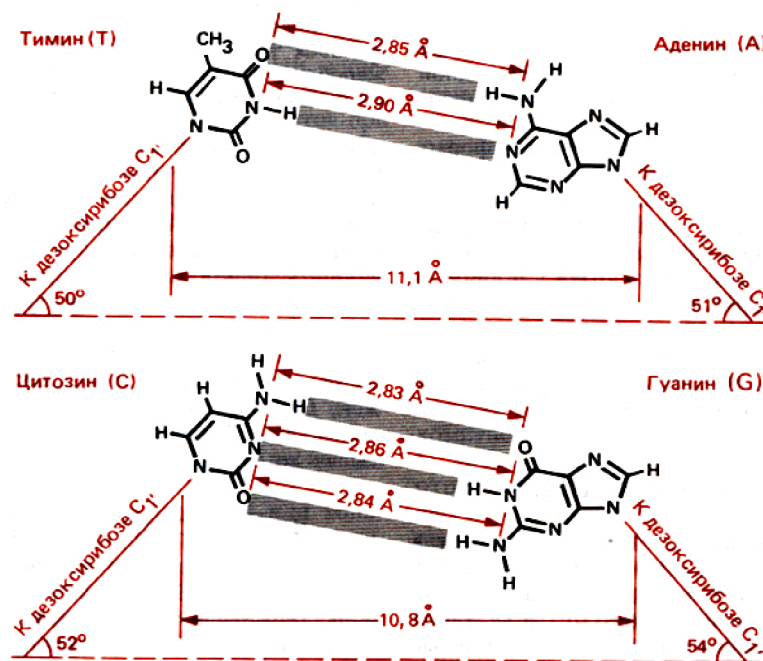


Рис.10. Взаимное расположение нуклеотидов в ДНК в В-форме

4.3. Ключевые ферменты, участвующие в синтезе ДНК

Многие известные теперь детали процесса репликации ДНК удалось установить благодаря исследованию поведения и активности ферментов, обеспечивающих работу аппарата репликации. Наиболее полно изучен механизм репликации бактериальной ДНК, особенно ДНК *E.coli* и бактериофагов, которые в ней размножаются. Довольно хорошо известны и ферменты репликации дрожжей, *Drosophila*, млекопитающих.

4.3.1. ДНК-полимеразы.

ДНК-полимеразы присутствуют во всех прокариотических и эукариотических клетках. Более того, многие вирусы бактерий и животных индуцируют образование вирус-специфических ДНК-

полимераз или белков, способствующих эффективному участию ДНК-полимераз клеток-хозяев в репликации вирусной ДНК.

Многие прокариотические и эукариотические ДНК-полимеразы выделены в чистом виде, а их физические и ферментативные свойства детально охарактеризованы. И хотя эти свойства не совсем идентичны, механизм катализа для всех указанных ферментов в общих чертах одинаков.

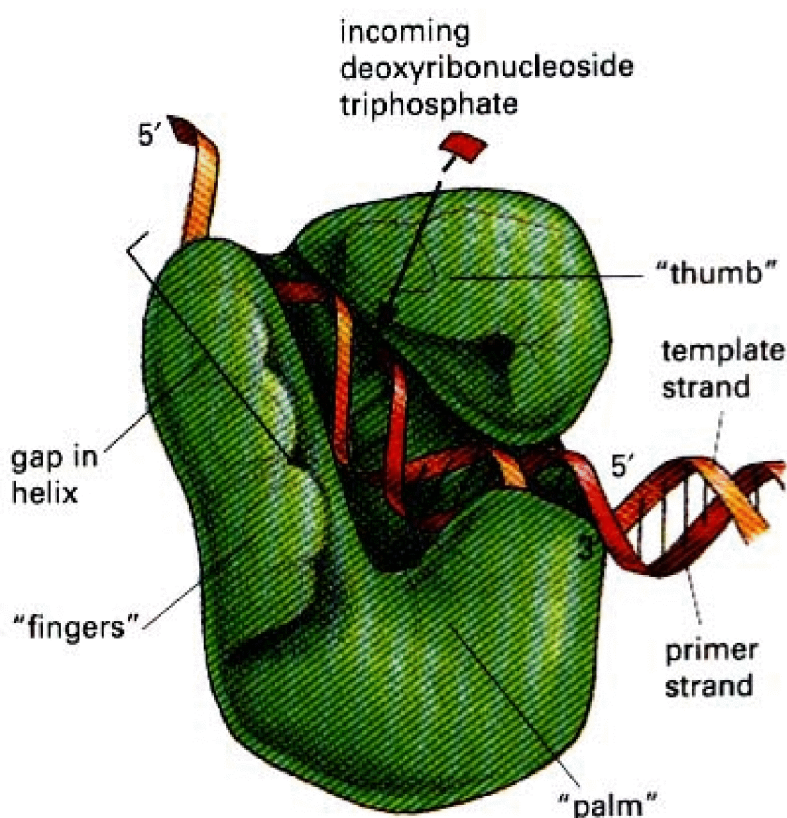


Рис.11. Общий принцип строения ДНК-полимераз.

В первичной структуре ДНК-полимераз эукариот присутствуют консервативные мотивы, гомологичные соответствующим мотивам прокариотических ферментов. Это подтверждает, что все ДНК-синтезирующие ферменты имеют общий план строения. Общий принцип строения ДНК-полимераз показан на рис.11. По форме ДНК-полимеразы

можно уподобить полураскрытой кисти правой руки, в которой ладонь, большой палец и остальные пальцы представляют три основных пространственных домена и формируют полость, удерживающую ДНК-матрицу и затравку в ходе синтеза. Консервативные мотивы А, В и С образуют активный центр в домене «ладони», «пальцы» удерживают одностратную матрицу, а «большой палец» прижимает праймер - матричный двунитевой участок.

Применительно к различным типам ДНК-полимераз эукариот эта модель может быть модифицирована. ДНК-полимеразы работают совместно с различными белковыми комплексами, удерживающими их в вилке репликации. Чаще всего их называют «зажим» и «загрузчик зажима» («sliding clamp», «clamp loader»).

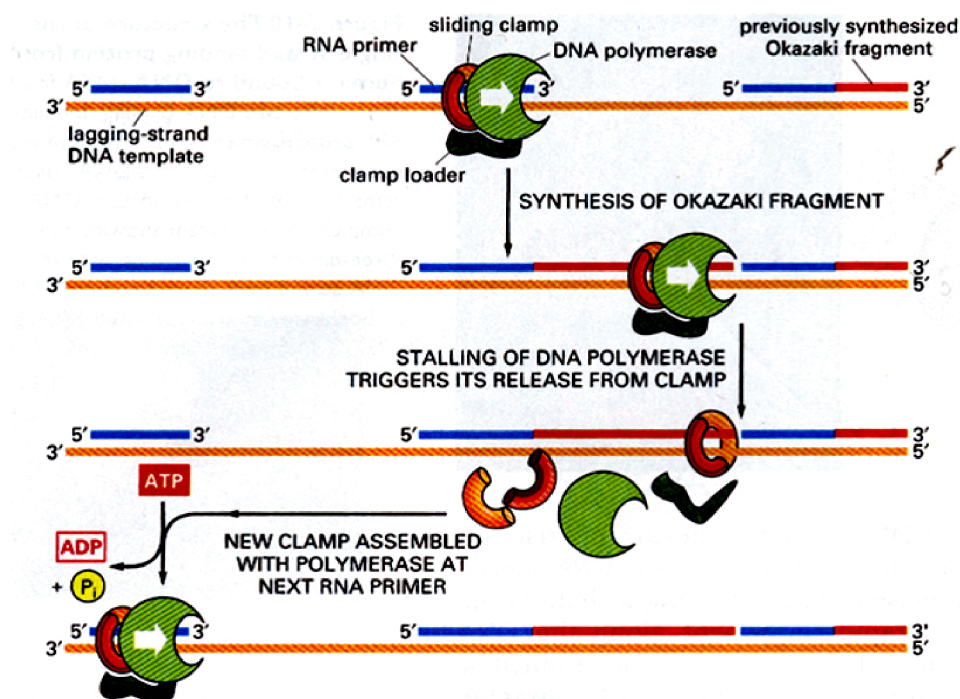


Рис. 12. Загрузка ДНК-полимеразы

После объединения ДНК-полимеразы с зажимом, «загрузчик зажима» отходит от места реакции, но держится поближе к отстающей

нити, чтобы провести загрузку на новом месте объединения праймер-матрица, как только ДНК-полимераза диссоциирует при завершении синтеза предыдущего фрагмента Оказаки. Этот процесс схематически изображен на рис. 12. Подробно об этих комплексах у эукариот и их роли в репликации будет рассказано далее.

4.3.1.1. ДНК-полимеразы прокариот.

Полимеразы прокариот обозначаются римскими цифрами (в отличие от полимераз эукариот, которые обозначаются греческими буквами). Наиболее полно изучена ДНК-полимераза I (PolI) *E.coli*. Она представляет собой одиночный полипептид с мультифункциональными активностями. В качестве ДНК-полимеразы PolI катализирует перенос 5'-дезоксинуклеотидильных единиц дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов к 3'-ОН-группе в цепи ДНК или РНК, после чего происходит спаривание перенесенного основания с соответствующим основанием комплементарной цепи ДНК. Таким образом, для полимеризации ферменту необходимы праймер в качестве акцептора дезоксинуклеотида и матрица, определяющая присоединение нужного нуклеотида. Помимо полимеризации нуклеотидов, PolI катализирует две другие реакции, биологическая роль которых очень важна. В одной из них происходит гидролиз фосфодиэфирных связей в одной цепи ДНК или на неспаренном конце дуплексной ДНК, причем за один акт удаляется один нуклеотид, начиная с 3'-конца цепи (3'-5'-экзонуклеаза). Вторая реакция также состоит в отщеплении нуклеотидов, но гидролиз начинается с 5'-конца двунитевой ДНК в направлении к 3'-концу (5'-3'-экзонуклеаза). Эти различные активности присущи разным сайтам полипептидной цепи PolI. Если *in vitro* обработать PolI трипсином, то полипептидная цепь расщепится на большой и малый фрагменты. Большой, С-концевой фрагмент («фрагмент Кленова») сохраняет ДНК-полимеразную и 3'-5'-экзонуклеазную активности; малый N-концевой фрагмент обладает только 5'-3'-экзонуклеазной активностью.

PolI и присущие ей экзонуклеазные активности играют очень большую роль в репликации и репарации хромосомной ДНК *E.coli*. 3'-5'-экзонуклеазная активность обеспечивает контроль за присоединением каждого нуклеотида и удаление ошибочных нуклеотидов вновь синтезированной цепи. Если эта активность подавлена в результате каких-то мутаций в гене, кодирующем PolI, то при репликации генома часто происходят мутации - замены оснований.

Способность ДНК-полимеразы удлинять 3'-конец нити, спаренной с матричной нитью, позволяет ей заполнять пробелы между сегментами отстающей нити. PolI удлиняет фрагменты Оказаки с 3'-концов и удаляет рибонуклеотиды праймера, с которых начинаются 5'-концы соседних фрагментов, что является необходимой предпосылкой для формирования непрерывной отстающей цепи. Поскольку PolI способна удлинять 3'-конец одной из цепей в месте разрыва в двунитевой ДНК и удалять нуклеотиды с 5'-конца того же разрыва (процесс, называемый ник-трансляцией), этот фермент играет ключевую роль в репарации поврежденной ДНК. Ник-трансляция широко используется *in vitro* для синтеза радиоактивно меченой ДНК.

У *E.coli* имеются и две другие ДНК-полимеразы, но они присутствуют в клетке в меньших количествах. PolII присоединяет нуклеотиды значительно менее эффективно, чем PolI, и не обладает 5'-3'-экзонуклеазной активностью. Следовательно, PolII может заполнять пробелы между фрагментами ДНК, спаренными с матричной цепью, но не способна отщеплять РНК-нуклеотиды от фрагментов Оказаки или осуществлять ник-трансляцию. Роль PolII в репликации и сохранении хромосомной ДНК *E.coli* до настоящего момента неясна. Вероятно, она может участвовать в восстановлении синтеза ДНК после повреждения и остановки вилки репликации. Такой процесс принято называть ресинтезом.

PolIII-холофермент - это ключевой фермент, ответственный за репликацию хромосомной ДНК *E.coli*. В каждой клетке содержится только 10-20 копий PolIII -холофермента, но именно он является основным компонентом мультиферментного полимеразного комплекса, инициирующего формирование репликативных вилок в точках начала

репликации, участвующего в элонгации лидирующей цепи в вилке и удлиняющего РНК-праймеры с образованием фрагментов Оказаки. Так как PolIII -холофермент не обладает 5'-3'-экзонуклеазной активностью, для репликации отстающей цепи необходимо участие PolI, чтобы произошло удлинение продукта, образовавшегося при участии PolIII, и удаление РНК-праймеров на 5'-конце фрагментов Оказаки.

Методом направленного мутационного анализа обнаружены изменения в полипептидной цепи основного (кор) фермента PolIII, и изучены аминокислотные замены, которые позволяют приписать определенные виды ферментативной активности конкретным субъединицам ферментного комплекса. Так, α -субъединица обладает полимеразной активностью, а ε -субъединица - 3' 5'-экзонуклеазной. Однако комплекс α - и ε -субъединиц обладает значительно более высокой полимеразной и экзонуклеазной активностями, чем каждая из соответствующих субъединиц в отдельности. Функция третьей, θ -субъединицы пока неясна.

Помимо субъединиц, составляющих PolIII -кор, PolIII-холофермент содержит еще семь субъединиц: $\tau, \gamma, \beta, \delta, \delta', \chi$ и ψ . Перечисленные полипептиды также существуют во множестве копий, так что в результате мол. масса полимеразного комплекса составляет примерно 10^3 кДа. Роль β -субъединицы заключается в том, чтобы свести к минимуму вероятность отделения фермента от матрицы до завершения процесса копирования, то есть работает как «зажим». Субъединица τ является фактором димеризации репликативных холоферментов. Точная же функция других субъединиц неизвестна. Вполне возможно, что PolIII-холофермент существует в двух формах, каждая из которых содержит определенный набор вспомогательных субъединиц, придающих ферменту определенные свойства. В одной форме фермент катализирует синтез непрерывной ведущей цепи, а в другой - прерывистой отстающей.

PolIII-холофермент катализирует те же реакции синтеза, что и PolI, но работает примерно в 60 раз быстрее. Более того, PolIII-холофермент обладает повышенным сродством к матрице и обеспечивает более высокую эффективность копирования. PolIII-холофермент может связываться и с другими белками, увеличивая эффективность процесса

копирования благодаря координации некоторых важных ферментативных этапов репликации. На этом более высоком уровне организации в комплексы могут включаться белки, расплетающие спираль ДНК в точках начала репликации и в репликативных вилках (геликазы), инициирующие образование праймерных РНК (праймазы), обеспечивающие последовательное наращивание цепей ДНК, терминирующие процесс репликации и разделяющие дочерние спирали ДНК.

ДНК-полимеразы, синтезируемые другими бактериями и многими бактериофагами, различаются по своей физической структуре и свойствам. Тем не менее, катализируемые ими реакции практически идентичны реакциям, изученным у *E.coli*. У всех ДНК-полимераз есть корректирующая 3'-5'-экзонуклеаза, однако 5'-3'-экзонуклеаза у большинства ферментов отсутствует. Например, ДНК-полимераза фага Т4 может осуществлять 3'-5'-экзонуклеазную реакцию и корректировать ошибки репликации, но не способна катализировать 5'-3'-экзонуклеазную реакцию и поэтому не может обеспечить нуклеотидную коррекцию. При репликации ДНК фага Т4 5'-3'-экзонуклеазную реакцию удаления РНК-праймеров перед объединением фрагментов Оказаки катализирует другой кодируемый фагом белок. В процессе прерывистого синтеза отстающих нитей и репарации повреждений ДНК фага Т4 этот фермент работает согласованно с фаговой ДНК-полимеразой. Некоторые вирусы животных (например, герпесвирус, вирус коровьей оспы и вирус гепатита) индуцируют синтез особых полимераз для репликации своих геномов.

Другие вирусы образуют белки, которые стимулируют системы репликации клеточной ДНК или участвуют в репликации вирусной ДНК. Например, паповавирусы синтезируют белки, необходимые для инициации репликации. Аденовирусы человека кодируют белки, «запускающие» инициацию синтеза обеих цепей линейной вирусной ДНК. Они продуцируют также особые ДНК-связывающие белки, облегчающие репликацию.

4.3.1. 2. ДНК-полимеразы эукариот.

В эукариотических клетках идентифицировано множество ДНК-полимераз, но их физические и функциональные свойства изучены менее детально, чем у соответствующих ферментов прокариот.

Таблица 3.

ДНК-полимеразы эукариот

ДНК-полимераза	Дополнительная активность	Субъединицы (кДа)	Локализация, функция
α (альфа)	ДНК-праймаза Точность $10^2 - 10^4$	165-180 70 48-50, 55-60	Ядро, репликация (инициация в районе ori и фрагментов Оказаки)
β (бэта)	dRp-лиаза, 10^3	38-40	Ядро, репарация
γ (гамма)	$3' \rightarrow 5'$ экзонуклеаза, dRp-лиаза, 10^4	125-140 35-50	Митохондрии, репликация и репарация
δ (дельта)	$3' \rightarrow 5'$ экзонуклеаза, 10^5	125-130 48-55 (дрожжи: 125, 55, 54, 42, 22)	Ядро, репликация (элонгация лидирующей нити. PCNA-зависимая репарация)
ϵ (эпсилон)	$3' \rightarrow 5'$ экзонуклеаза, 10^5	261, 55 (дрожжи: 256, 870, 34, 31, 29)	Ядро, репликация (элонгация запаздывающей нити). PCNA-зависимая репарация

Точная пространственная структура, определенная с помощью рентгеноструктурного анализа, известна лишь для одной ДНК-полимеразы эукариот - полимеразы β -типа, которая заметно отличается

по строению от других эукариотических ДНК-полимераз. Сводные данные об основных полимеразах эукариот приведены в таблице 3.

4.3.1.3. ДНК-полимераза α – праймаза

В клетках эукариот синтез ДНК происходит, в основном, в специфических плотных структурах ("репликативных фабриках"), присоединенных к диффузному ядерному матриксу. Предполагается, что в молекулярной организации ядерного матрикса играют некоторую роль фосфолипиды и что ДНК связана с ядерным скелетом гидрофобными взаимодействиями. "Репликативные фабрики" или 21S репликативные комплексы, включают в себя группу ферментов, состоящую не менее чем из 30 белков с молекулярной массой от 15 до 300 кДа, и содержат помимо ДНК-полимеразы α -праймазы еще и 3'-5'-экзонуклеазу, ДНК-лигазу I, РНКазу H, ДНК-топоизомеразу I, ДНК-геликазу, PCNA и ряд других факторов. Также этот комплекс содержит RPA, специфически взаимодействующий с субъединицей p48 комплекса полимеразы-праймазы. Значительный запас ДНК-полимеразы α накапливается в яйцеклетках иглокожих, амфибий, костистых рыб и дрозофилы для обеспечения интенсивной репликации ядерной ДНК в ходе раннего развития.

Как правило, ДНК-полимеразы α не обладают корректорской 3'—5'-экзонуклеазной активностью. Однако в каталитической субъединице 182 кДа ДНК-полимеразы α дрозофилы обнаружена 3'—5'-экзонуклеаза, проявляющая активность только при диссоциации субъединицы 73 кДа.

Мультибелковая форма ДНК-полимеразы α содержит также белок, который связывает динуклеотид диаденозинтетрафосфат (Ar_4A). Предполагается, что Ar_4A участвует в репликации ДНК и клеточном делении. Имеются данные о способности ДНК-полимеразы α использовать Ar_4A в качестве праймера. Однако участие Ar_4A в качестве праймера *in vivo* маловероятно, скорее он используется как эффектор.

Интересно, что триптофанил-тРНК-синтетаза, синтезирующая этот динуклеотид, находится в том же мультибелковом комплексе.

Обычно комплекс праймаза-полимераза α состоит из четырех субъединиц: большой субъединицы с молекулярной массой 180 кДа, или семейства полипептидов с размерами от 140 до 160 кДа; субъединицы с молекулярной массой около 68-70 кДа и двух малых субъединиц с молекулярными массами 54-58 и 46-50 кДа. Субъединица p180 отвечает за полимеразную функцию. С двумя малыми субъединицами связана праймазная активность. При этом субъединица 48 кДа является каталитической и непосредственно осуществляет праймирование ДНК, а субъединица 58 кДа участвует в связывании иницирующего пуринового нуклеотида и присоединении субъединицы p48 к ДНК-полимеразе α . Она также влияет на скорость полимеризации и стабильность продукта, синтезируемого субъединицей 48 кДа. p58 также облегчает проникновение p48 из цитоплазмы в ядро. Субъединица p180 непосредственно взаимодействует с p58.

С каталитической субъединицей связана субъединица 68-70 кДа, которая необходима для транспорта каталитического полипептида в клеточное ядро. Субъединица 68-70 кДа участвует также в регуляции уровня ДНК-полимеразы α в клетке, она стимулирует синтез каталитического полипептида. Хотя комплекс ДНК-полимераза α -праймаза состоит из четырех субъединиц, количественный состав этого комплекса может быть различным. Вероятно, полимеразы α и праймазы находятся в «коре» в соотношении 1 : 3.

4.3.1. 4. Реакция праймирования

Инициация репликации и прерывистый синтез ДНК на отстающей цепи происходит по РНК-праймерному механизму и является универсальным свойством репликации ДНК у про- и эукариот.

ДНК-праймаза отличается от других РНК-полимераз целым рядом присущих только ей свойств. Во-первых, матричной и субстратной специфичностью. Во-вторых, необычной процессивностью - синтезом

мультимеров, кратных 10-нуклеотидным звеньям. В-третьих, низкой точностью и устойчивостью к некоторым ингибиторам РНК- и ДНК-полимераз. Здесь необходимо вернуться к проблеме синтеза РНК-праймеров. Синтез РНК-праймеров на природных матрицах начинается во множественных, но не случайных участках, его инициация происходит с АТР или ГТР даже при высоких концентрациях СТР и УТР. Показано, что, например, ДНК вируса SV40 содержат предпочтительные участки инициации - 3'-dCTTT или 3'-dCCC, расположенные внутри участков из 7-25 пиримидиновых нуклеотидов. Высокое соотношение АТР/ГТР повышает вероятность инициации в участках 3'-dCTTT, а низкое - в участках 3'-dCCC. Таким образом, концентрация НТР и нуклеотидная последовательность матрицы определяют участки инициации. Впрочем, участки инициации *in vivo* заметно отличаются от участков инициации, используемых во время репликации ДНК SV40. Во многих случаях обнаружена последовательность 5'-YYYYYYCTTTYYYY-3', где Y = С или Т, которая является стартовой площадкой для инициации синтеза ДНК-праймазой в составе комплекса с ДНК-полимеразой α . Минимальная длина пиримидинового кластера должна быть не менее 7 н. Замена одного из пиримидинов на 3'-конце кластера значительно понижает частоту инициации, а замены внутри и вне кластера приводят к смещению точки старта. Известно, что матрицу распознает сама ДНК-праймаза. Стартовый нуклеотид вновь синтезированного праймера всегда является пурином (чаще всего – аденином).

Этот комплекс имеет еще одну специфическую функцию - синтез теломерной отстающей цепи ДНК млекопитающих осуществляет ДНК-полимераза α -праймаза.

ДНК-праймаза - сравнительно медленный фермент. Средняя скорость включения НТР этим ферментом примерно на два порядка меньше, чем скорость включения dНТР ДНК-полимеразой α . ДНК-полимераза α способна удлинять праймеры длиной более 7-10 н. Продукты длиной 2-6 н. не являются субстратами ДНК-полимеразы α и называются абортивными. До синтеза РНК-праймера ДНК-полимераза α и ДНК-праймаза действуют независимо, а после этого их активности

координируются. Синтезированный РНК-праймер перемещается в полимеразный активный центр без диссоциации в раствор. Это внутримолекулярное перемещение праймера в дуплексе с матрицей является быстрым и сравнимо по скорости с синтезом праймера. После того как ДНК-полимераза α удлинит праймер, праймаза начинает синтез нового праймера, и цикл повторяется. ДНК-праймаза эукариот отличается от других РНК-полимераз своей способностью к включению дезоксирибонуклеотида в праймер, таким же свойством обладает и праймаза прокариот. Одним из возможных объяснений необходимости включения dNTP в 3'-конец праймера является необходимость перехода от А-формы к В-форме ДНК. Поэтому понимание механизма "переключения" комплекса ДНК-полимеразы α -праймазы от синтеза РНК к ДНК имеет очень большое значение. Способность праймазы узнавать одновременно и рибо-, и дезоксириботрифосфаты представляет серьезный научный интерес.

Выбор РНК-праймера определяется гидрофобным характером белково-нуклеиновых взаимодействий. В случае гибрида РНК-ДНК дуплекс находится в А-форме, в которой обеспечивается оптимальный баланс между гидрофобными и комплементарными взаимодействиями оснований матрицы и праймера.

После инициации рост праймера сопровождается извлечением оснований матрицы из гидрофобной полости белка для спаривания с основаниями растущей цепи РНК. В условиях такой конкуренции короткие ди- и тринуклеотиды легко диссоциируют, образуя abortивные продукты. С ростом длины праймера прочность дуплекса увеличивается, ослабевает влияние гидрофобности активного центра, и пары оснований приближаются к оси спирали. При длине праймера 7 н создаются условия для включения дезоксинуклеотида и перехода в энергетически более выгодную В-форму. Здесь нужно учитывать и большее сродство к ферменту dNTP по сравнению с NTP. Предложенная концепция, по-видимому, носит универсальный характер, поскольку подобное происходит и при инициации транскрипции.

ДНК-полимераза α связывает сначала матрицу, затем праймер и субстрат. ДНК-полимераза α наиболее активна на двунитевой ДНК,

содержащей бреши длиной не менее 20-30 н. Область связывания матрицы с ДНК-полимеразой α является достаточно протяженной. Она строго защищает от гидролиза 9 н праймерной цепи, 13 н двухцепочечного участка и 14 н одноцепочечной матрицы и слабо защищает несколько оснований вне этого района. Фермент связывается с 19-20 н матрицы посредством ионных и гидрофобных взаимодействий, эффективность связывания при этом коррелирует с гидрофобностью оснований матрицы.

Отличительной особенностью ДНК-полимеразы α является ее способность удлинять РНК-праймеры и прочная ассоциация с ДНК-праймазой, которая синтезирует эти праймеры.

Средняя процессивность ДНК-полимеразы α составляет 20-50 н. Праймаза редко ошибается в момент синтеза динуклеотида, но затем легко использует неправильные NTP. Хотя скорость включения ошибочных нуклеотидов зависит от нуклеотидной последовательности матрицы и самого неправильного нуклеотида, в принципе, ДНК-праймаза является самым неточным нуклеотид-полимеризующим ферментом. В некоторых случаях один неправильный нуклеотид приходится менее чем на 100 правильных. Встраивание неправильного нуклеотида не препятствует включению следующего правильного нуклеотида. Праймаза может полимеризовать сходные нуклеотиды и генерировать праймеры с множественными ошибками, которые не ингибируют дальнейший синтез и после внутримолекулярного переноса в ДНК-полимеразный активный центр удлиняются ДНК-полимеразой в присутствии dNTP.

Существуют две модели механизма синтеза праймеров, некомплементарных матрице. Согласно первой модели, фермент просто включает некомплементарные матрице нуклеотиды. Вторая модель предполагает включение нуклеотида, комплементарного матрице, с последующим скольжением праймера относительно матрицы. Низкая точность ДНК-праймазы послужила основой гипотезы о том, почему именно РНК является затравкой при репликации ДНК. Поскольку первые нуклеотиды могут ошибочно включаться в новую растущую цепь, предполагается, что РНК-праймер отмечает "высокоошибочный"

участок для последующего вырезания и более точной застройки. Эта точка зрения выглядит убедительной, но, вероятно, главная причина появления РНК-праймера связана все-таки с более эффективной инициацией синтеза ДНК при наличии А-формы РНК-ДНК дуплекса.

В отличие от праймазы ДНК-полимераза α является достаточно точным ферментом. Она делает в среднем от 1/30 000 до 1/50 000 ошибок. Важную роль в обеспечении специфичности синтеза играют белковые факторы репликации. В присутствии РРА точность ДНК-полимеразы α повышается. Известно, что различие свободных энергий образования правильных и неправильных пар оснований в активном центре полимеразы, по-видимому, в 10 раз больше, чем в водной среде.

Выделенные из клеток высокомолекулярные формы ДНК-полимеразы α могут обладать другими активностями помимо ДНК-полимеразной и праймазной. Эти комплексы представляют собой фрагменты репликативной машины клеток. В комплексе, осуществляющем репликацию лидирующей нити, ДНК-полимераза α связана с ДНК-полимеразой δ , а в комплексе, синтезирующем запаздывающую цепь, - с ДНК-полимеразой ϵ . У эукариот оба комплекса связаны, вероятно, друг с другом в репликативной вилке подобно тому, как связаны холоферменты синтеза лидирующей и запаздывающей нити у прокариот. Об этом свидетельствует выделение из клеток человека комплексов, названных синтесомами и содержащих ДНК-полимеразы α , δ и ϵ , а также ряд других репликативных белков, среди которых ДНК-праймаза, репликативный фактор RFC, PCNA, поли(ADP-рибозо)-полимераза и ДНК-лигаза I. Из этого высокомолекулярного комплекса недавно выделены и охарактеризованы ДНК-геликаза А с молекулярной массой 90 кДа и 5' $\rightarrow$ 3'-экзонуклеаза с мол. массой 47 кДа. С ДНК-полимеразой α может быть также связан белок P1 из клеток мыши, являющийся гомологом белка Msm3 дрожжей. Комплекс ДНК-полимеразы α -праймазы в ходе мейоза диссоциирует.

Большой Т-антиген SV40 (и других паповавирусов) взаимодействует с субъединицами p180 и p70 в комплексе ДНК-полимеразы α -праймазы и рекрутирует этот комплекс в *ori* вируса. При

репликации вируса папилломы ДНК-полимераза α связана с вирусной геликазой E1.

Негативная регуляция комплекса в клеточном цикле зависит не только от фосфорилирования p180, но также от фосфорилирования субъединицы p68 циклина-зависимыми киназами. В клетках дрожжей комплекс ДНК-полимераза α -праймаза связан с хроматином в фазах G1 и S клеточного цикла, но не G2/M. Связывание с хроматином зависит от дефосфорилирования субъединицы 86 кДа (гомолог p70) в конце митоза.

4.3.1. 5. ДНК-полимеразы δ и ϵ

ДНК-полимераза δ представляет собой гетеродимер, состоящий из каталитической субъединицы с мол массой 125-130 кДа и субъединицы 48-55 кДа, необходимой для связывания с фактором процессивности PCNA (proliferating cell nuclear antigene). Малая субъединица нужна для преодоления ферментом структурных барьеров в природных одонитевых матрицах. В действительности нативный фермент может представлять собой тетрамер, содержащий по две субъединицы с мол массами 125 и 55 кДа, а субъединица 55 кДа является фактором димеризации репликативных холоферментов, подобно субъединице τ в ДНК-полимеразе III *E.coli*. В отсутствие PCNA ДНК-полимераза δ имеет низкую процессивность на длинных одонитевых матрицах, а в присутствии PCNA процессивность возрастает в 10-100 раз. С помощью делеционных мутантов установлено, что в ДНК-полимеразе δ мыши за связывание PCNA ответствен участок 129-149 аминокислотных остатков N-концевой области каталитического полипептида, С-концевой домен менее консервативен и содержит два участка связывания ДНК.

Холофермент ДНК-полимеразы δ включает в себя фактор процессивности PCNA и факторы RFC (replication factor C) и RPA, он собирается на праймер-матричном комплексе в следующем порядке: сначала RFC связывается с 3'-ОН-концом праймера на одонитевой ДНК-матрице, "покрытой" белком RPA. Затем RFC в присутствии АТР формирует на ДНК-дуплексе, прилежащем к 3'-концу праймера,

кольцевую структуру из трех молекул PCNA с мол массой 36 кДа каждая, а PCNA обеспечивает присоединение ДНК-полимеразы δ к 3'-концу праймера, завершая таким образом формирование высокопроцессивного холофермента.

В самом PCNA идентифицированы участки, отвечающие за связывание с субъединицами RFC и ДНК-полимеразами. В присоединении к ДНК у полимеразы δ участвуют аминокислотные остатки 121-135, образующие петлю между доменами PCNA.

3'→5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы δ также регулируется факторами, входящими в состав холофермента. В отсутствие вспомогательных факторов 3'→5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы δ низка, но в присутствии белка RPA, как и ДНК-полимеразы α , она возрастает в 8-10 раз. Активирующий эффект RPA на 3'→5'-экзонуклеазную активность обусловлен, очевидно, дестабилизацией комплекса затравки с матрицей в присутствии этого белкового комплекса.

Синтез ДНК-полимеразы δ в клеточном цикле регулируется на уровне транскрипции. Количество мРНК фермента и белка достигает максимума на границе G1/S-фаз. Динамика синтеза ДНК-полимеразы δ в цикле соответствует динамике ДНК-полимеразы α . Интересно, что синтез PCNA в ходе клеточного цикла коррелирует с синтезом ДНК-полимеразы δ , однако содержание PCNA стабильно увеличивается и остается высоким до границы фаз G2/M. ДНК-полимераза δ представляет собой фосфобелок, наибольшая степень фосфорилирования которого относится к фазе S. Фосфорилирование каталитической субъединицы 125 кДа ДНК-полимеразы δ осуществляется, очевидно, специфичной для фазы G1 циклин-зависимой протеинкиназой cdk2. Интересно, что фосфорилирование каталитической субъединицы не сказывается на ее ферментативной активности.

ДНК-полимераза ϵ человека содержит два полипептида - каталитический 261 кДа и 55 кДа. ДНК-полимераза ϵ дрожжей состоит из пяти субъединиц: каталитической 256 кДа и субъединиц 80, 34, 31 и 29 кДа. Субъединица 80 кДа ДНК-полимеразы ϵ дрожжей является гомологом субъединицы 55 кДа фермента из клеток млекопитающих.

Ферментативные активности - ДНК-полимеразная и 3'→5'-экзонуклеазная - связаны с высокомолекулярным полипептидом, N-концевой домен которого обеспечивает обе активности, а C-концевой домен необходим для контроля вступления клетки в S-фазу цикла.

Особенностью холофермента ДНК-полимеразы ϵ является его меньшая зависимость от вспомогательных факторов PCNA, RFC и RPA по сравнению с холоферментом ДНК-полимеразы δ . ДНК-полимераза ϵ способна процессивно удлинять затравку на одностранных матрицах в отсутствие PCNA. В присутствии полного набора репликативных факторов увеличивается процессивность синтеза и эффективность связывания ДНК-полимеразы ϵ с праймерами. Существует представление, что на ДНК-матрицах, покрытых белком RPA, факторы PCNA, RFC и АТР образуют «комплекс узнавания 3'-ОН-конца праймера». Участок связывания ДНК-полимеразы ϵ в молекуле PCNA не совпадает с участком связывания ДНК-полимеразы δ . Об этом свидетельствует тот факт, что разные мутантные формы белка PCNA, синтезируемые штаммами *pcna-79* и *pcna-90*, не способны взаимодействовать с ДНК-полимеразами δ и ϵ соответственно. В результате у мутанта *pcna-79* нарушен синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой δ , а у мутанта *pcna-90* - ДНК-полимеразой ϵ .

Другое различие между холоферментами ДНК-полимераз δ и ϵ заключается в разной скорости синтеза ДНК. В оптимальных условиях скорость синтеза ДНК холоферментом ДНК-полимеразы ϵ примерно на порядок ниже скорости синтеза холоферментом ДНК-полимеразы δ . Это различие связано с разной функцией ДНК-полимераз в репликативной вилке. Один холофермент ДНК-полимеразы δ осуществляет быстрый и процессивный синтез лидирующей нити, используя для элонгации единственный праймеру, синтезируемый в районе *ori*, и диссоциирует только по достижении конца репликона, а несколько холоферментов ДНК-полимеразы ϵ могут одновременно синтезировать фрагменты Оказаки в «зоне Оказаки», удлиняя праймеры, синтезируемые ДНК-полимеразой α -праймазой в начале каждого фрагмента. При этом должен происходить быстрый оборот ДНК-полимеразы ϵ , сопровождающийся диссоциацией после завершения синтеза фрагмента и ассоциацией с

50

праймером очередного фрагмента. При синтезе фрагментов запаздывающей цепи, когда концентрация праймеров высока и могут синтезироваться одновременно несколько фрагментов, скорость полимеризации менее важна, чем способность к быстрому переключению с одного фрагмента Оказаки к другому.

Содержание мРНК ДНК-полимеразы ϵ в клеточном цикле изменяется, достигая своего максимума непосредственно перед клеточным делением. Уровень этой мРНК в пролиферирующих клетках в 5-16 раз выше, чем в покоящихся.

ДНК-полимеразы, δ и ϵ , обладают 3'→5'-экзонуклеазной активностью, выполняющей корректорскую функцию в ходе синтеза ДНК, но частоты ошибок при синтезе лидирующей и запаздывающей нитей отличаются. Это связано с тем, что часть ДНК отстающей нити синтезируется ДНК-полимеразой α , которая способна синтезировать ДНК с большим количеством ошибок.

4.3.1. 5. ДНК-полимераза γ

Эта полимераза локализована в митохондриях, ее функция связана с репликацией и репарацией мтДНК. ДНК-полимеразы γ представляют собой гетеродимеры, состоящие из большой каталитической субъединицы 125-140 кДа, обладающей ДНК-полимеразной и 3'→5'-экзо-нуклеазной активностью, и вспомогательной субъединицы 35-50 кДа, функция которой неизвестна. Как и другие ферменты репликации мтДНК, ДНК-полимераза γ кодируется ядерным геномом. Первичная структура ДНК-полимеразы γ сходна со структурой ДНК-полимеразы I *E.coli*, особенно в области каталитических центров, в N-концевом 3'→5'-экзонуклеазном домене и C-концевом полимеразном домене.

4.3.1. 5. ДНК-полимераза β

ДНК-полимераза β является наименьшей по размеру и самой простой по строению ДНК-полимеразой в клетках эукариот. В силу этого она наиболее изучена. Выделенный из клеток позвоночных фермент представляет собой один каталитически активный полипептид из 334 или 335 аминокислотных остатков с молекулярной массой 39-40 кДа. По своему строению ДНК-полимераза β ближе к семейству нуклеотидилтрансфераз, чем к α -семейству ДНК-полимераз.

ДНК-полимераза β обладает двумя ферментативными активностями - ДНК-полимеразной ($5' \rightarrow 3'$ -дезоксинуклеотидилтрансферазной) и дезоксирибофосфатлиазной (dRp- или AP-лиазной), удаляющей по механизму β -элиминации 5'-концевые апуриновые/апиримидиновые остатки (AP-сайты), ограничивающие бреши в ДНК.

Мягкий протеолиз ДНК-полимеразы β приводит к образованию N-концевого домена 8 кДа и C-концевого домена 31 кДа. Дальнейший протеолиз домена 31 кДа расщепляет его на домены с мол массами 6, 10 и 12 кДа, расположенные последовательно от N- к C-концу. В домене 8 кДа находятся участки связывания фермента с однонитевой и двунитевой ДНК, дезоксирибофосфатлиазный каталитический центр и участок связывания 5'-фосфата, ограничивающего однонитевую брешь. Для дезоксирибофосфатлиазного центра характерна Lys-богатая область, аминокислотные остатки которой His-34, Lys-35, Lys-68 и Lys-72 непосредственно участвуют в высвобождении dRp. Lys-35 участвует в узнавании 5'-фосфата, а Lys-72 выступает нуклеофилом при β -элиминации в ходе dRp-лиазной реакции. Замена Lys-72 на Arg не влияет на ДНК-связывающую и полимеразную активности фермента, но нарушает способность к репарации AP-сайтов. ДНК-полимеразная активность фермента локализована в двух C-концевых доменах. Каталитический нуклеотидилтрансферазный центр расположен в домене 10 кДа и включает Asp-190 и Asp-192. В связывании атомов двухвалентных металлов участвуют Asp-256 и Arg-254, а в связывании dNTP - аминокислотные остатки 4-40 домена 8 кДа и аминокислотные остатки 263-283 домена 12 кДа. Замена одного аминокислотного остатка в этом районе (Tyr-265) приводит к появлению мутаторной формы

фермента. В ходе каталитической реакции фермент способен менять конформацию и изгибать матричную ДНК под углом 90° в месте бреши.

Уровень активности ДНК-полимеразы β не меняется на протяжении клеточного цикла. Однако в присутствии агентов, повреждающих геномную ДНК, может наблюдаться индукция этого фермента, что согласуется с репаративной функцией ДНК-полимеразы β .

4.3.2. Ферменты репликативного комплекса

Скорость синтеза ДНК резко возрастает при объединении белков в прочный комплекс. Кроме ДНК-полимераз в этих репликативных машинах присутствуют различные белки, необходимые для репликации.

4.3.2.1. Факторы репликации

Геномная ДНК синтезируется ДНК-полимеразами при участии белковых факторов, обеспечивающих взаимодействие ДНК-полимераз с ДНК и процессивность синтеза ДНК. На отстающей цепи продукты синтеза ДНК дискретны, а оставшиеся РНК-затравки удаляются до завершения реакции. В этот каскад превращений кроме $\text{Pol}\delta$ и ϵ вовлечены также РНКазы H, ДНК-лигаза I и флэп-эндонуклеаза-1 (FEN-1). Недавние исследования показали, что FEN-1 физически взаимодействует с PCNA, который стимулирует ее нуклеазную активность в сотни раз. Предполагается, что созревание фрагментов Оказаки осуществляется при согласованном действии $\text{Pol}\delta$, PCNA, FEN-1 и RPA. ДНК-лигаза I - один из компонентов, необходимых для соединения фрагментов Оказаки. Показано, что этот фермент также взаимодействует с PCNA и влияет на PCNA-зависимый синтез ДНК $\text{Pol}\delta$ и $\text{Pol}\epsilon$. Согласно одной из гипотез, PCNA может быть задействован в репликативной вилке как связующее звено между ДНК-полимеразами и другими факторами для координации процессов элонгации и процессинга отстающей цепи. Согласно другой

гипотезе, важнейшим фактором, координирующим действие всех других белков при переключении синтеза ДНК от одной ДНК-полимеразы к другой, равно как и завершение синтеза, является репликативный белок А.

4.3.2.1.1. RPA (replication protein A) и SSB

Когда цепи ДНК разъединены, молекула ДНК становится достаточно уязвимой и нестабильной. Все возможные нарушения в структуре одиночных цепей исключаются благодаря действию белков SSB (Single strand DNA-binding proteins или helix-destabilizing proteins). Они связываются с одиночными цепями, стабилизируют их, при этом не закрывая оснований и оставляя их доступными для ДНК-полимеразы. SSB белок сам не способен разделять нити ДНК, но помогает геликазе выравнивать их, подготавливая основу для синтеза. Двухдоменный белок покрывает восемь нуклеотидных пар, при этом не закрывая их. Так как один белок пристраивается сразу же за другим, то они способны быстро покрывать одностандартную ДНК, по мере ее появления и препятствовать образованию РНК-подобных шпильчатых структур. Обычно работает в тетрамерной форме, сразу покрывая 32 нуклеотида. Как происходит присоединение SSB к ДНК показано на рис.13.

Одним из ключевых факторов эукариотической репликации является гомолог SSB репликативный белок А. Этот белок состоит из полипептидов с молекулярной массой 70 (p70), 32 (p32) и 14 (p14) кДа, т.е. является гетеротримером. RPA известен как фактор, связывающий одностандартную ДНК. Сродство RPA к двунитевой ДНК на три порядка ниже. На определенных этапах репликации, рекомбинации или репарации ДНК комплементарные цепи разделяются, и последующие превращения происходят уже с одностандартной ДНК. RPA стабилизирует одностандартную ДНК, нарушая ее вторичную структуру.

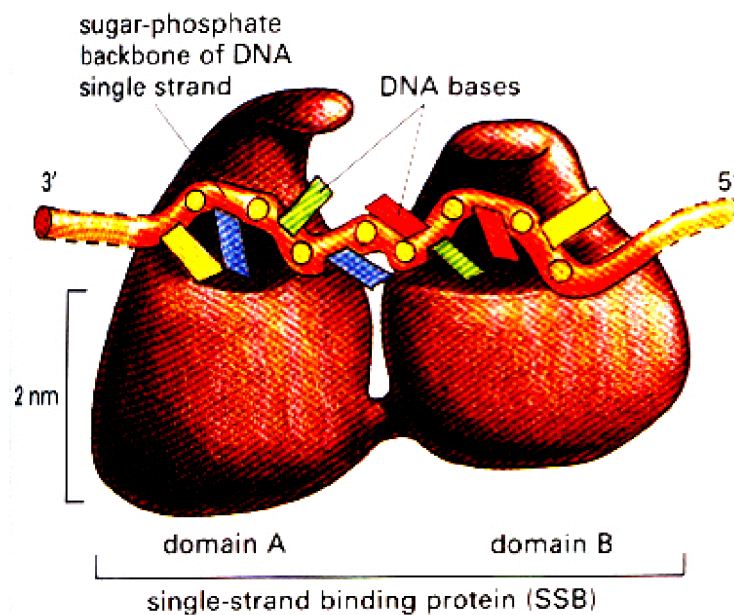


Рис.13. Строение белка SSB E.coli

Основные ДНК-связывающие домены RPA (А, В и С) входят в состав р70 субъединицы. При связывании одонитевой ДНК RPA претерпевает значительные конформационные перестройки, модулируемые длиной выступающего участка матричной цепи. Недавно была выяснена роль р32 субъединицы RPA в связывании RPA с ДНК. В случае ДНК-дуплексов с выступающим участком матрицы размером 30 и 18 н наблюдали преимущественное ковалентное присоединение р32-субъединицы к 3'-концу праймера, в то время как укорочение матричной цепи до 13-12 н. и далее обеспечивало в основном ковалентное присоединение субъединицы р70. р32 субъединица RPA размещается вблизи 3'-конца праймера при протяженном матричном участке и удаляется из области контакта с 3'-концом праймера при укорочении матрицы. С помощью электронной микроскопии показано, что RPA в комплексе с одонитевой ДНК принимает в зависимости от длины участка ДНК элонгированную, сжатую или глобулярную конформации. Это показано на рис.14.

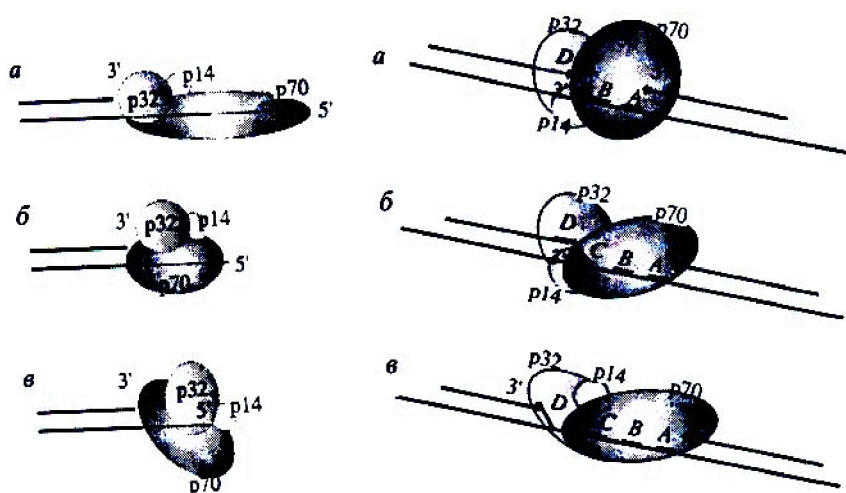


Рис.14.Конформационные изменения RPA

Предполагалось, что в этих конформациях изменяется расположение субъединиц RPA относительно 3'-конца растущей цепи. В вытянутой конформации RPA субъединица p32 расположена вблизи 3'-конца растущей цепи ДНК, в то время как изменение конформации RPA к сжатой и далее к глобулярной форме удаляет p32 от ее 3'-конца. Изменение конформации RPA зависит исключительно от длины выступающего участка матрицы.

В районах односторонних брешей односторонняя ДНК связывается с А и В ДНК-связывающими доменами субъединицы p70, при этом 5'-конец ДНК взаимодействует с доменом А, в то время как домен В расположен ближе к 3'-концу, что говорит о преимущественном взаимодействии p70 с 3'-концом брешки (рис.14).

Предложена модель, позволяющая рассмотреть возможное расположение RPA в брешках. В случае небольшой брешки размером 9-10 н RPA связывается с ее односторонним участком, используя свои основные ДНК-связывающие домены А и В субъединицы p70. При этом RPA находится в глобулярной конформации, в которой субъединица p32 практически не контактирует с 3'-концом праймера. В протяженной брешки RPA принимает вытянутую конформацию, в которой контакты p32 с 3'-концом праймера облегчены, но в то же время всегда

доминирует взаимодействие субъединицы р70 с одонитевой платформой брешы, в особенности на ее 5'-конце.

Связь р14 субъединицы с ДНК в составе полной молекулы. RPA не была обнаружена. Возможно, что эта субъединица закрыта от контактов с ДНК двумя другими субъединицами RPA. По-видимому, субъединица р14 выполняет структурно (как шарнир между субъединицами р70 и р32) организует гетеротример RPA, однако ее точная роль в структуре RPA остается неясной.

Таким образом, взаимодействие RPA с ДНК может быть рассмотрено как многостадийный процесс, в ходе которого RPA взаимодействует с участком 8-10 н, и это связывание осуществляется с помощью ДНК-связывающих доменов А и В субъединицы р70. Такое взаимодействие RPA осуществляет, по-видимому, находясь в глобулярной форме. При наличии более протяженного участка одонитевой структуры ДНК RPA изменяет свою конформацию, что делает возможным взаимодействие с ДНК другого домена субъединицы р70 - домена С, а затем и ДНК-связывающего домена D субъединицы р32. Такой тип связывания RPA может быть осуществлен в его «вытянутой» конформации в том случае, когда участок одонитевой ДНК достигает размера около 30 н. RPA в таком комплексе проявляет свое максимальное сродство к одонитевой ДНК. Возможно, что такое расположение ДНК-связывающих доменов обеспечивает возможность более легкого «вытеснения» RPA при заполнении одонитевых брешей в ходе синтеза ДНК ДНК-полимеразами.

Белок RPA (в нефосфорилированной форме) стимулирует полимеразную активность и увеличивает процессивность ДНК-полимеразы α . Фосфорилирование RPA, а также мутации в N-концевой области субъединицы р32 предотвращают взаимодействие белков и активацию ДНК-полимеразы α .

В ходе клеточного цикла уровень фосфорилирования RPA меняется и носит регуляторный характер. Участки фосфорилирования RPA находятся в N-концевом фрагменте субъединицы 32 кДа. При повреждающих воздействиях на клетку, типа УФ-облучения, происходит

гиперфосфорилирование RPA, коррелирующее с подавлением репликации ДНК.

4.3.2.1.2. RFC (replication factor C)

В процессе репликации крайне важно взаимодействие с ДНК и другого фактора репликации - репликативного фактора C. RFC представляет собой гетеропентамер, состоящий из субъединиц 140-145, 40, 38, 37 и 36 кДа, он обладает АТФазной активностью, стимулируемой ДНК и PCNA. Все пять субъединиц этого фактора содержат в С-концевой области консервативные PCNA-связывающие участки. Этот фактор способствует посадке на ДНК PCNA, и таким образом образуется тройной комплекс RFC•PCNA•Pol δ - холоэнзим, обеспечивающий процессивный синтез ДНК.

RFC взаимодействует преимущественно с 5'-концом праймера, но не с его 3'-концом. ДНК-связывающий участок RFC локализован на субъединице p140, поскольку именно эта субъединица обнаруживается в качестве продукта ковалентного присоединения к 5'-концу праймера. Существует модель переключения синтеза ДНК от Pol α к синтезу, катализируемому PCNA-зависимыми ДНК-полимеразами. Согласно этой модели, Pol α начинает синтез праймера на однонитевой ДНК, покрытой молекулами RPA. RFC связывается с 5'-концом только что синтезированного праймера и блокирует синтез ДНК, выполняемый Pol α , в тот момент, когда она синтезировала РНК-ДНК-праймер длиной 30 н. На этой стадии репликативный белок C, возможно, способствует посадке PCNA на ДНК. Это приводит к вытеснению Pol α с 3'-конца растущей цепи и синтез продолжается с помощью Pol δ или ϵ . Схема этого процесса показана на рис. 15.

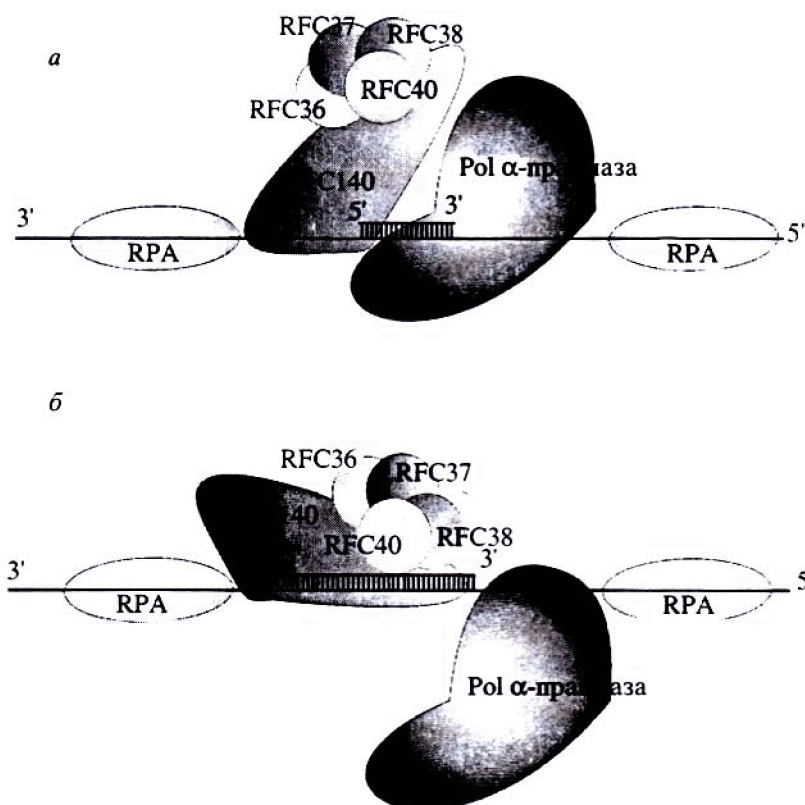


Рис.15. Роль RFC в репликации ДНК

4.3.2.1.3. PCNA (proliferating cell nuclear antigen)

Три молекулы PCNA (36 кД каждая) образуют кольцевой тример с отверстием для двунитевой ДНК в центральной части, который представляет собой перемещающуюся по ДНК подвижную платформу или «скользящий зажим» («sliding clamp») в форме тора (бублика), удерживающую ДНК-полимеразу δ в ходе полимеризации на матрице и обеспечивающую высокопроцессивный синтез ДНК. Структура этого тора показана на рис.16. Хотя PCNA и прокариотический фактор процессивности - субъединица β ДНК-полимеразы III *E.coli* - имеют низкую гомологию на уровне первичной структуры, оба белка формируют близкие по пространственной геометрии структуры "скользящей скрепки".

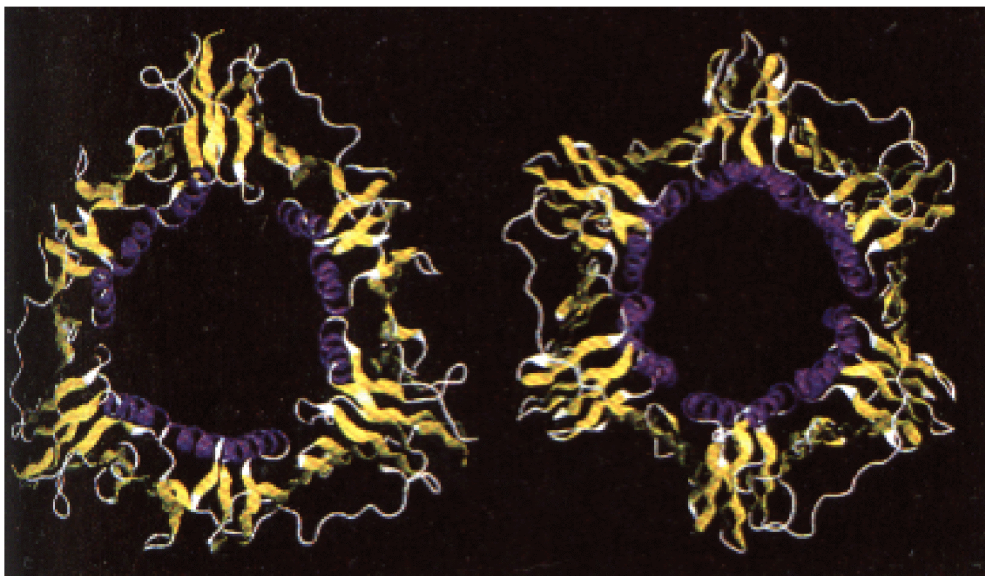


Рис. 16. Строение PCNA

Рис.16. Строение «скользящего зажима у про- и эукариот (PCNA)

PCNA стабилизирует комплекс ДНК-полимеразы δ с праймер-матрицей, предотвращает преждевременную диссоциацию фермента и тем самым обеспечивает высокую процессивность синтеза. Однако при этом PCNA способствует фиксации в новообразованной ДНК ошибочно включенных природных и модифицированных нуклеотидов. Фосфорилирование PCNA-связывающего домена RFC, вероятно, является способом регуляции PCNA-зависимого синтеза ДНК, осуществляемого ДНК-полимеразой δ или ϵ . Фосфорилирование PCNA-связывающего домена RFC Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой протеинкиназой II (CaMKII) ингибирует связывание PCNA с RFC и, как следствие, подавляет PCNA-зависимый синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразами δ и ϵ . С другой стороны, RFC в комплексе с PCNA и ДНК недоступен для фосфорилирования CaMKII. По другим данным, фосфорилирование PCNA-связывающего домена в большой субъединице (145 кДа) RFC, блокирующее связывание PCNA, может осуществляться при участии циклин-зависимых киназ, регулирующих клеточный цикл.

Многие белки, участвующие в ДНК-метаболизме, имеют сайты связывания с PCNA. Среди них лигаза I, метилтрансфераза для поддерживающего метилирования вновь синтезированной ДНК, некоторые гликозилазы, ингибитор циклин-зависимых киназ p21, флэп-эдонуклеаза I (FEN1). Т. е. PCNA служит для сборки комплекса репликации и может привлекать к нему специфические белки в зависимости от конкретных условий.

4.3.2.2. Эндонуклеазы. FEN-1

В ходе процессинга фрагментов Оказаки, равно как и в процессе репарации ДНК, в качестве промежуточных продуктов реакции возникают структуры ДНК, имеющие свисающий 5'-конец (флэп). Главная причина появления таких структур - активность Pol δ , обеспечивающая синтез с вытеснением цепи («strand-displacement»). Основным ферментом, выщепляющим флэп-структуры, является флэп-эдонуклеаза-1 (FEN-1). Предполагается, что при выщеплении таких структур FEN-1 взаимодействует с различными белками, в том числе с RPA и PCNA. Количественная оценка связывания RPA и FEN-1 с ДНК отчетливо показала конкуренцию RPA с FEN-1 за флэп-структуры протяженного размера, так как относительно длинный флэп позволяет RPA находиться в вытянутой конформации и обеспечить эффективное связывание с ДНК за счет всех его ДНК-связывающих доменов. Это может указывать на возможность ингибирования активности FEN-1 RPA. В тоже время связь с короткими флэпами у глобулярной конформации RPA не столь велика, что позволяет преимущественно связываться с ними FEN-1.

4.3.2.3. ДНК-лигазы.

ДНК-лигазы соединяют нити ДНК при репликации, репарации и рекомбинации. Все известные лигазы способны образовывать

фосфодиэфирные мостики между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксинуклеотидов в местах разрывов ДНК. Лучше всего описана ДНК-лигаза, индуцируемая в *E.coli* после заражения клетки фагом Т4 (Т4-лигаза). Она обладает уникальной способностью соединять двунитевые фрагменты ДНК по концам разрыва. Физиологическая роль этой реакции неизвестна, но практическое ее значение в манипуляциях с рекомбинантной ДНК неоценимо.

ДНК-лигазы некоторых бактерий, бактериофагов и млекопитающих выделены и их структура и механизм каталитической активности установлены. ДНК-лигазы *E.coli*, фагов Т4 и Т7 являются одиночными полипептидами, а тонкая структура ДНК-лигаз млекопитающих неизвестна. Для образования фосфодиэфирных связей между соответствующими концами нуклеотидных цепей лигазы используют энергию гидролиза либо АТФ, либо его производного - никотинамид-аденилиндинуклеотида. Реакция протекает в несколько этапов, как это показано на рис.17. Аденилильная единица переносится на Е-аминогруппу лизинового остатка лигазы с одновременным высвобождением никотинамид мононуклеотида или неорганического фосфата соответственно; затем аденилильная группа переносится от лигазы на 5'-фосфорильную группу концевого остатка цепи ДНК с образованием пирогосфосфатного производного, аденилил-ДНК и замещается 3'-гидроксильной группой прилегающего конца ДНК. В результате этих реакций происходит образование фосфодиэфирных связей в цепи ДНК за счет энергии гидролиза пирогосфосфатной связи NAD⁺ или АТФ. Для образования фосфодиэфирной связи во всех случаях, кроме лигазы фага Т4, должно произойти соединение нуклеотида, содержащего акцепторную 3'-гидроксильную группу, с соседним нуклеотидом, несущим активированную 5'-фосфатную группу. ДНК-лигазы *E.coli* и фага Т4 могут соединять концы двух разных дуплексных фрагментов или разорванные концы цепей линейной или кольцевой ДНК. Таким образом, с помощью ДНК-лигаз могут образовываться и линейные, и кольцевые двунитевые молекулы ДНК.

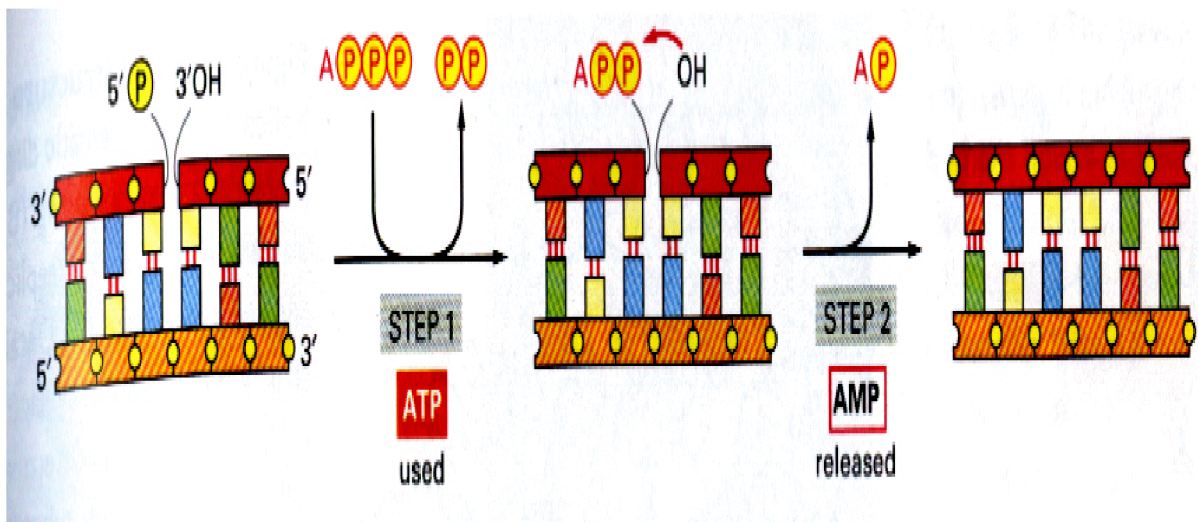


Рис. 17. Схема работы ДНК-лигазы

У эукариот описано несколько лигаз. Лигаза I необходима для сшивания фрагментов Оказаки и некоторых репарационных реакций, ее уровень коррелирует с пролиферативной активностью, она колокализуется в «фокусах репликации» и соочищается вместе с высокомолекулярным репликативным комплексом. Лигаза II появляется как продукт деградации лигазы III, а лигаза III имеет несколько изоформ, вовлеченных в процессы репарации и рекомбинации. Недавно описана лигаза IV, которая необходима для V(D)J рекомбинации и негомологичного соединения концов ДНК при репарации двунитевых разрывов.

4.3.2.4. Геликазы

Для осуществления комплементарного копирования цепей двунитевая ДНК должна постепенно раскручиваться. Раскручивание, или расплетание, спирали происходит только в локальном участке репликативной вилки. Раскручивание не является спонтанным процессом, в нем участвуют особые ферменты — ДНК-геликазы (у *E. coli* это продукт гена *dnaB*). Геликазы связываются с белками,

инициирующими процесс репликации, а затем переходят на молекулу ДНК. Этот фермент движется по одиночной нити ДНК и, встречая участок двойной спирали, разрывает водородные связи между основаниями, разделяет нити и продвигает репликационную вилку, используя для разделения нитей энергию, высвобождающуюся при гидролизе АТФ до АДФ.

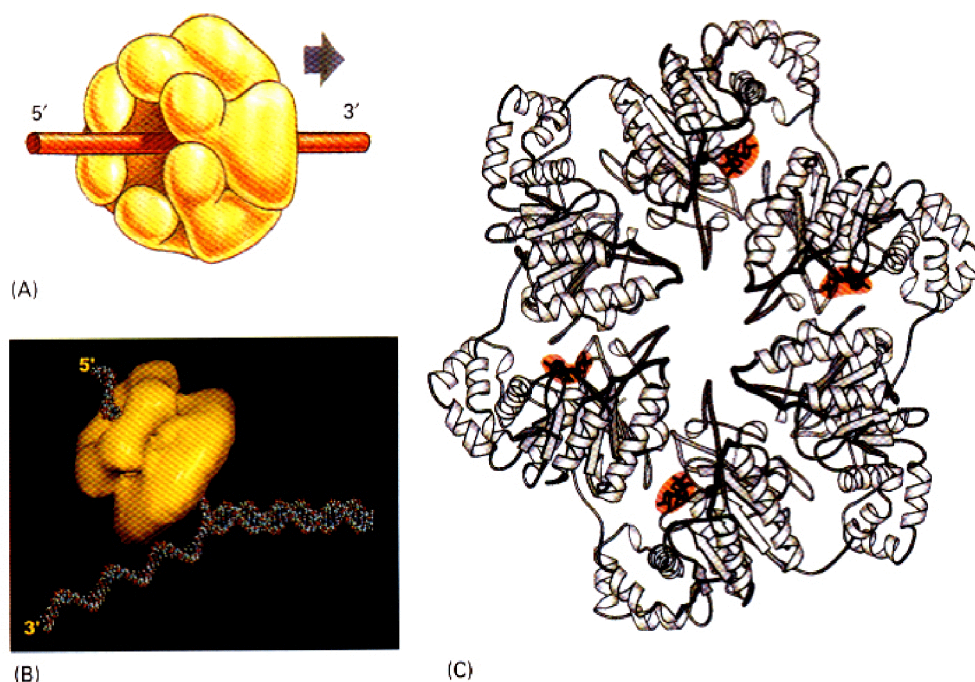


Рис.18. Строение гексамера геликазы.

Геликазы часто функционируют в составе комплекса, осуществляющего перемещение репликативной вилки и репликацию раскрученных цепей. Хотя для раскручивания достаточно одного геликазного белка, но для того, чтобы максимально ускорить процесс, несколько геликаз могут действовать совместно. ДНК-геликазы используют энергию АТФ для движения вдоль нити со скоростью более 1000 нуклеотидных пар в секунду. Молекулы геликазы образуют гексамер, надевающийся на однонитевую ДНК, как кольцо, причем АТФ присоединяются к активному центру каждого мономера последовательно, а не одновременно. Как это происходит, показано на

рис. 18. (А. Сборка комплекса на однонитевой ДНК, В – положение геликазы в вилке репликации, С- Структура гексамера).

Разворачивание матрицы в вилке репликации осуществляют две различные ДНК-геликазы, работающие на разных нитях и, соответственно, в разных направлениях. Главная роль принадлежит геликазе отстающей нити.

4.3.2.5. ДНК-топоизомеразы

Процесс раскручивания двойной спирали в репликативной вилке порождает механические и топологические проблемы. В принципе раскручивание линейной двунитевой ДНК может происходить благодаря вращению родительской спирали вокруг собственной оси. Но такое вращение очень длинных цепей ДНК вокруг длинных же осей во внутриклеточном пространстве механически затруднено. При репликации замкнутых кольцевых ДНК раскручивание цепей в вилке создает дополнительные проблемы. По мере раскручивания цепей степень отрицательной сверхспирализации сегментов, находящихся перед вилкой репликации, постепенно уменьшается и в них возникает положительная сверхспирализация. Дальнейшее перемещение вилки вдоль кольца затрудняется и в конце концов блокируется. Это блокирование снимается путем внесения однонитевого или двунитевого разрыва. Тем самым образуется «шарнир», который дает возможность нереплицированному дуплексу, находящемуся перед вилкой, вращаться вместе с ней. Такие разрывы вносятся в ДНК с помощью ферментов, имеющих общее название ДНК-топоизомеразы. Эти ферменты изменяют степень сверхспиральности и тип сверхспирали. У различных организмов идентифицированы топоизомеразы двух основных типов. Одни ферменты, называемые топоизомеразами типа I надрезают одну из двух нитей, в результате чего фланкирующие дуплексные области могут повернуться вокруг интактной цепи, и затем воссоединяют концы разрезанной цепи, как показано на рис. 19. Эта реакция не требует энергии АТФ, поскольку энергия фосфодиэфирной связи сохраняется

благодаря тому, что тирозиновый остаток в молекуле фермента выступает то в роли акцептора, то в роли донора фосфорильного конца разрезанной нити.

Отмечены два интересных, но, возможно, не связанных друг с другом различия между топоизомеразами I типа у про- и эукариот: во-первых, топоизомеразы I прокариот взаимодействуют с 5'-фосфорильным концом разорванной цепи, а эукариот- с 3'-фосфорильным концом, а во-вторых, топоизомеразы I прокариот устраняют только отрицательные сверхвитки, а эукариотические - как отрицательные, так и положительные.

Топоизомеразы II типа устраняют как отрицательные, так и положительные сверхвитки. В отличие от топоизомераз I типа, топоизомеразы II вносят временные разрывы в обе комплементарные нити, пропускают двунитевой сегмент той же самой или другой молекулы ДНК через разрыв, а затем соединяют разорванные концы, как это показано на рис.20. Топоизомеразы II типа тоже используют тирозиновые остатки (присутствующие по одному в каждой из субъединиц ферментов) для связывания 5'-конца каждой разорванной нити в то время, когда другой дуплекс проходит через место разрыва. В результате внесения двунитевого разрыва и прохождения через него другого дуплекса за одну реакцию снимаются два отрицательных или положительных сверхвитка. В некоторых случаях дуплексом, проходящим через место разрыва, оказывается другая замкнутая молекула ДНК; это приводит к разделению сцепленных кольцевых ДНК или, напротив, к образованию таких сцепленных комплексов (катенанов). Этот механизм может использоваться и для распутывания или запутывания клубков, а также для раскручивания или конденсации крупных дуплексных ДНК.

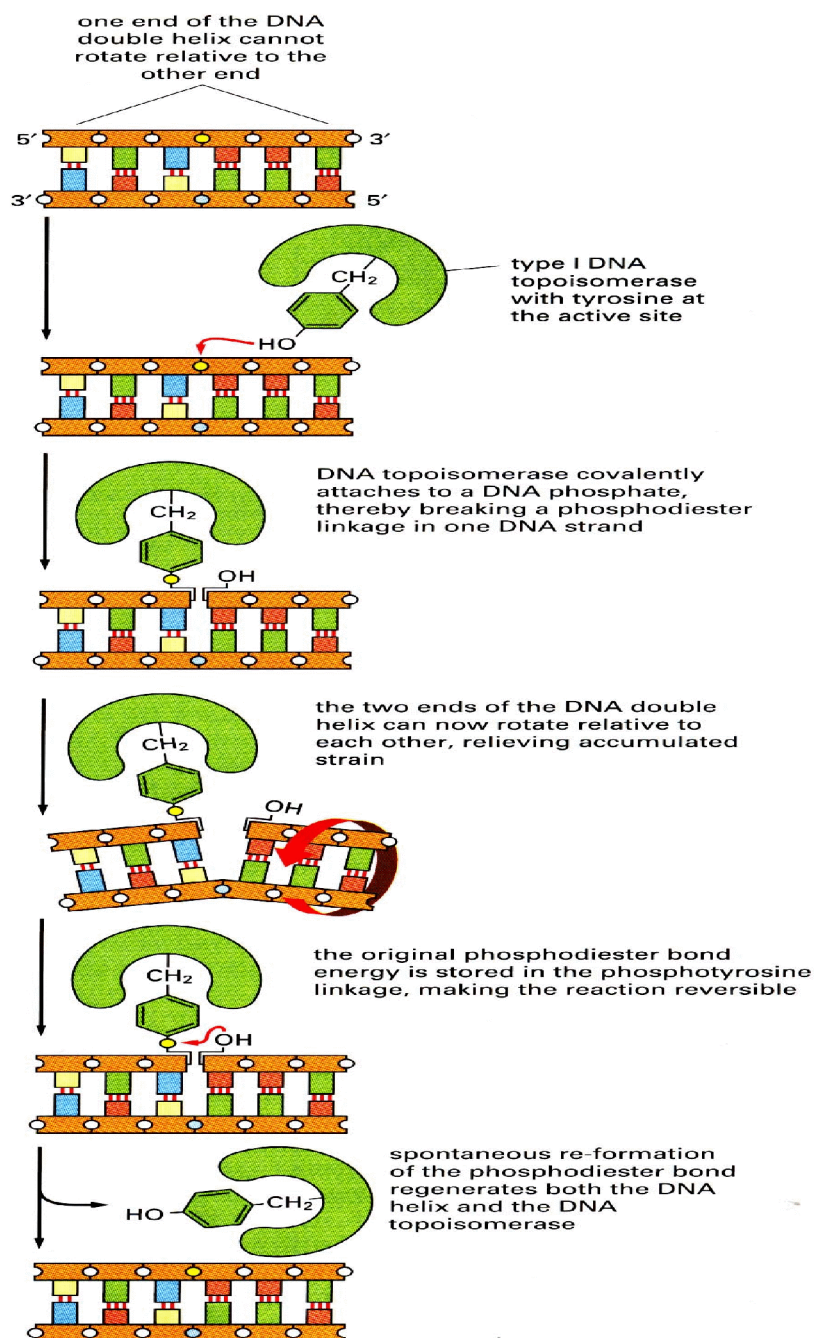


Рис.19. Принцип действия топоизомеразы I

Топоизомеразы типов I и II снимают сверхвитки, образующиеся при репликации кольцевой ДНК. Однако существует особая топоизомераза II, называемая гиразой, и обнаруженная пока только у бактерий. Эта топоизомераза способна индуцировать образование отрицательных сверхвитков в релансированных кольцевых ДНК. Для

этого гиразы делает двунитевые надрезы и затем особым способом воссоединяет концы, снимая таким образом положительные сверхвитки и внося отрицательные в релаксированную ДНК.

У бактерий топоизомераза I и гиразы являются ключевыми ферментами, определяющими степень суперскрученности ДНК при ее ответе на стрессовые внешние воздействия, такие как повышение температуры, изменении pH и окислительный стресс. Сбалансированное действие топоизомеразы I и гиразы у бактерий регулирует степень сверхспиральности ДНК и влияет на скорость движения репликативной вилки.

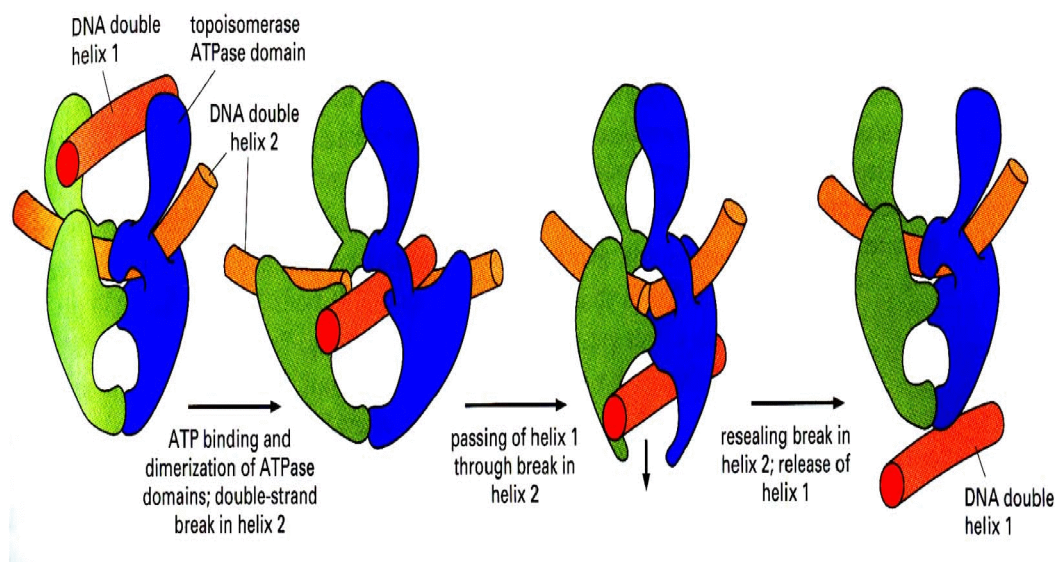


Рис.20. Принцип работы топоизомеразы II

У эукариот TopoII является одним из компонентов клеточного ответа на различные типы повреждений ДНК. Она способна образовывать комплексы с важнейшими регуляторами клеточного цикла, включая P53, BRCT-содержащий белок TopBP1 и Cdk1-киназу. Ассоциация топоизомеразы II с Cdk1 указывает на начальную раннюю стадию конденсации хроматина в митозе. Регуляция этого взаимодействия,

вероятно, является одним из механизмов, влияющих на вступление клеток в митоз. Конденсация хромосом и их сегрегация при переходе в анафазу находятся под контролем белкового комплекса, состоящего из топоизомеразы II и конденсина.

В кроссоверном разрешении холидеевских структур могут принимать участие различные эндонуклеазы, в том числе XPF. При некроссоверном разрешении, при котором также нужны топологические изменения ДНК, их могут проводить RecQ-подобные геликазы вместе с топоизомеразой III. Она так же, как и топоизомераза II, способна генерировать и воссоединять двунитевые разрывы ДНК. RecQ-подобные геликазы вместе с топоизомеразой III играют важную роль не только в гомологической рекомбинации, но и в других клеточных процессах, таких как репликация и контроль клеточного цикла.

Глава 5. Терминация репликации.

5.1. Завершение репликации у *E.coli*.

Последовательности, которые обеспечивают трминацию репликации кольцевой молекулы ДНК у *E.coli*, называются ter-сайтами. Они содержат короткую (около 23 пн) последовательность. В участке терминации находится несколько таких ter-сайтов. Они располагаются примерно на 8 тпн дальше точки, в которой встречаются вилки репликации.

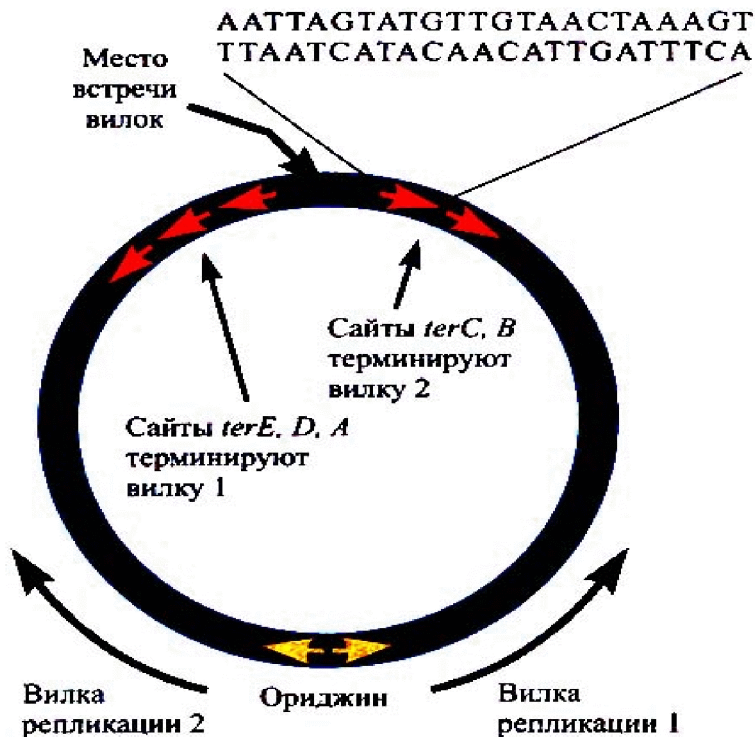


Рис.21. Терминация репликации у *E. coli*

Для терминации также необходим продукт гена *tus*, который опознает эту последовательность, связывается с ней и предотвращает дальнейшее продвижение вилки репликации. Схема терминации у *E. coli* представлена на рис. 21.

5.2. Завершение репликации у эукариот. Теломеры

5.2.1. Понятие о теломерах

К началу 1980-х гг. были накоплены факты, свидетельствующие о наличии на концах хромосом особых структур. Метафазные пластинки клеток разных видов демонстрировали видоспецифичные стабильные наборы хромосом. Хромосомы не склеиваются друг с другом концами,

что свидетельствует о существовании особой структуры, запрещающей объединение концов.

Еще в 1927 г. Генри Мёллер открыл возможность получения мутаций в результате облучения клеток дрозофилы рентгеновскими лучами. При этом мутации могут быть точковыми или сопровождаться перестройками хромосом (инверсиями, транслокациями, делециями и дупликациями). Перестройки образуются в результате появления разрывов в различных участках хромосом и последующего воссоединения фрагментов в новом порядке. Исследуя закономерности образования хромосомных перестроек, Мёллер в 1932 г. пришел к двум важным выводам о поведении наиболее дистальных частей нормальных хромосом: искусственно образовавшиеся концы фрагментов хромосом объединяются только с такими же искусственно образовавшимися фрагментами и никогда - с концевыми фрагментами, существующими в нормальных хромосомах. В свою очередь, концевые участки нормальных хромосом в результате облучения никогда не перемещаются во внутренние районы хромосом. Для объяснения результатов этих наблюдений Мёллер предположил, что участки хромосом (или «гены», как он их называл), расположенные во внутренних районах хромосом, обладают свойством биполярности, т. е. они могут соединяться с другими фрагментами каждым из двух своих свободных концов. Тот «ген» (или фрагмент хромосомы), который в нормальной хромосоме расположен на самом ее конце, по мнению Мёллера, униполярен, т. е. способен к объединению только с той стороны, которая обращена к внутренней части хромосомы. Мёллер предположил, что этот концевой униполярный «ген» необходим для особой функции «запечатывания конца хромосомы». Такой «ген» был назван специальным термином — «теломера» (от греч. «телос» — конец, «мерос» — часть).

Барбара МакКлинток в 1941 г. на основании полученных ею результатов по индукции хромосомных перестроек у кукурузы пришла к тем же выводам, что и Мёллер и постулировала, что пассивность теломер в объединении с другими участками хромосом играет исключительно важную роль, предотвращая склеивание хромосом конец

в конец, а это, в свою очередь, способствует сохранению индивидуальности отдельных хромосом и всего кариотипа в целом.

5.2.2.Строение теломер

Молекулярно-генетическое изучение теломер осложнялось тем, что число их в каждой клетке невелико: по две в каждой хромосоме (другими словами, 46 теломер на 3×10^9 пн генома человека).

В 1978. Элизабет Блэкберн (лауреат Нобелевской премии 2009 г.) и Джон Голл выделили из макронуклеуса инфузории тетрахимены («мешка с генами») фрагмент ДНК длиной 22 тпн, содержащий два сцепленных друг с другом гена рибосомной РНК. Секвенировав этот фрагмент, они определили, что на обоих его концах находится относительно простая последовательность 5'-CCCCAA-3' / 3'-GGGGTT-5', повторенная несколько раз подряд. При этом последовательность ориентирована так, что TTGGGG-повторы находятся на 3'-конце одной цепи ДНК, в то время как CCCCCA-повторы формируют 5'-конец другой цепи. Для удобства первую из цепей называют G-цепью, вторую - C-цепью. На рис.22 приведено схематичное устройство хромосомы другой инфузории - окситрихи с теломерами (G4T4).

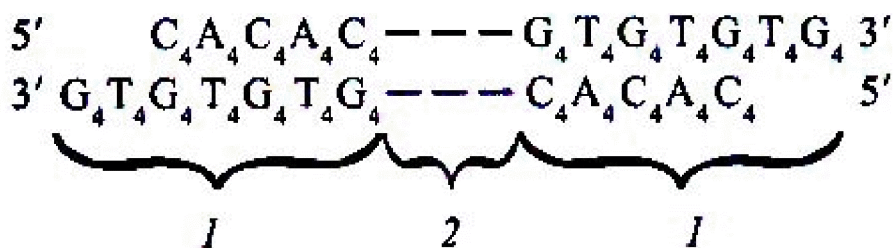


Рис.22. Схема хромосомы инфузории Окситрихи 1- теломеры, 2- собственно сама хромосома

В последние годы с помощью различных биохимических методик теломеры были выделены из ДНК многих организмов. Оказалось, что у большинства видов животных и растений теломерные районы имеют в целом очень похожее строение. Как правило, в состав теломерного района входят два типа фрагментов: собственно конечная часть хромосомы (или теломерный концевой повтор — telomere repeat, TR) и последовательность, связанная с теломерой (telomere associated sequence, TAS), которая располагается проксимальнее.

К настоящему времени известно, что теломерные фрагменты у большинства живых существ очень схожи, они обогащены нуклеотидами G и C, которые располагаются в определенной, похожей у всех организмов последовательности. Несколько отличается структура TR у некоторых видов грибов и особенно сильно — у дрозофилы. У *Saccharomyces cerevisiae* сравнительно короткие теломеры построены из нуклеотидов C и T в последовательности, которая имеет непостоянную структуру. Данные о строении теломер приведены в таблице 4.

Кроме инфузории тетрахимены, теломерные повторы изучены у многих других представителей простейших, в том числе у инфузорий стилонихии и окситрихи, у которых повторяющейся единицей является октамер 5'-CCCCAAAA-3'/3'-GGGGTTTT-5'. Этот октануклеотид расположен на концах хромосом особым образом, так что часть G-цепи ДНК остается однонитевой из-за отсутствия второй цепи. Выступающие концы нитей ДНК обнаружены в теломерах всех организмов. Этот октануклеотид, выступающий за обычную двойную уотсон-криковскую спираль, называют одно однонитевым свободным G-концом. Длина простого повторенного дуплекса, расположенного проксимальнее, может варьировать от менее чем 50 пн (у *Euplotes*) до более чем 100 тпн (у мыши). Интересно, что теломерные однонитевые свободные G-концы фактически одинаковы у многих представителей совершенно различных филогенетических таксонов, за исключением дрожжей. Анализ показал, что четыре молекулы гуанина на выступающем конце, не имеющие возможности контактировать с молекулами цитозина, как это бывает в обычной молекуле ДНК, все же спариваются. Они располагаются в одной плоскости и образуют водородные связи между собой.

Таблица 4.

Строение теломер у разных видов животных

Таксон	Вид	Последовательность нуклеотидов 5'→3'
Простейшие	Euplotes	TTTTGGGG
Слизневые грибы	Phusarum	TTAGGG
Жгутиковые	Trypanosoma	TTAGGG
Споровики	Plasmodium	TT(T/C)AGGG
Грибы	Neurospora	TTAGGG
	Candida maltosa	ACGGATGGAGACTCGCTTGGTGT
Нематоды	Ascaris	TTAGGC
Насекомые	Bombus mori	TTAGG
Водоросли	Chlamidomonas	TTTTAGGG
Высшие растения	Arabidopsis	TTTTAGGG
Позвоночные животные	Homo sapiens	TTAGGG

Особенность формирования этой структуры заключается в том, что соединение нуклеотидов происходит не по принципу комплементарности оснований, а между молекулами одного и того же основания - гуанина.

Как уже отмечалось, рядом с теломерным повтором располагаются участки ДНК большой протяженности, называемые субтеломерными повторами — TAS.

У дрожжей описано два субтеломерных повтора, X и Y'. X имеет размеры 0,3-3,75 тпн и менее консервативен, чем Y' (5,2-6,7 тпн). Они чередуются, или повтор может состоять только из X-элементов.

Последние имеют открытые рамки считывания. На основании обнаруженной слабой гомологии в первичных последовательностях этих повторов с мобильными элементами предположили, что Y'-элементы возникли из одиночной инсерции в предковый геном дрожжей. Субтеломерные повторы обнаружены у многих видов. Общая длина их может быть очень большой — у хирономуса, например, до 300 тпн в каждой теломере.

По иронии судьбы термин «теломера» возник в результате исследований на дрозофиле. В то же время до сих пор нет никаких доказательств того, что в геноме дрозофилы есть короткие теломерные G-богатые последовательности, характерные для большинства других видов.

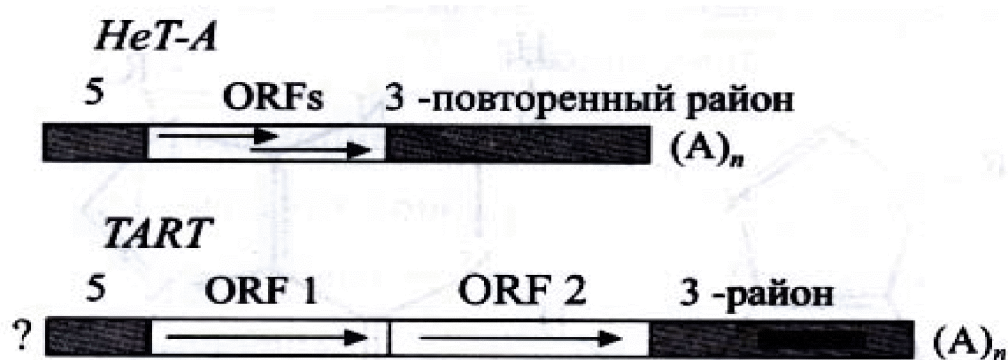


Рис. 23. Строение теломер у дрозофилы

Рис.23. Теломеры дрозофилы.

У дрозофилы на концах хромосом расположены теломероспецифичные ретротранспозоны - HeT-A и TART. В общих чертах они имеют похожее строение. У обоих на 5'- конце присутствуют небольшие повторенные последовательности, а на 3'-конце — более протяженный повтор, завершающийся длинным фрагментом, содержащим только нуклеотиды с аденином (A)_n. Различаются они тем, что HeT-A имеет две частично наложенные одна на другую рамки считывания (ORFs),

кодирующие белки, в то время как TART тоже две, ORF1 и ORF2, но расположенные тандемно. Оба ретротранспозона присутствуют во многих копиях, главным образом в прицентромерных районах. Они могут перемещаться по геному и в случае утраты теломерного района встраиваются на самый конец хромосомы, восстанавливая теломерную структуру (рис. 23).

5.3. Теория недорепликации теломер

После открытия структуры ДНК и механизмов ее репликации молодой российский ученый А. М. Оловников заинтересовался тем, как завершается процесс репликации на конце линейной молекулы ДНК. Дело в том, что каждая хромосома содержит единственную непрерывную молекулу ДНК, и концы этой молекулы совпадают с концами хромосомы. В соответствии со стандартной моделью репликации ДНК процесс удвоения отстающей нити ДНК начинается с синтеза коротких РНК-праймеров, или затравок, с начиная с 3'-концов которых синтезируются отрезки ДНК — фрагменты Оказаки. Затем РНК-праймер удаляется, образовавшиеся бреши (гэпы) заполняются фрагментами ДНК. Эти замещающие РНК-праймеры фрагменты ДНК синтезируются, используя в качестве праймеров 3'-концы предыдущих фрагментов Оказаки. Поскольку для замещения крайнего РНК-праймера нет соответствующего предыдущего фрагмента (а, следовательно, и праймера), вновь образованная цепь оказывается на 8-12 нуклеотидов (длина РНК-праймера) короче исходной. В результате после каждого цикла репликации молекула ДНК должна становиться все короче: одна из четырех нитей укоротилась на 8-12 пн, т. е. на одном из концов хромосомы средняя длина нитей ДНК (двух материнских и двух вновь синтезированных) уменьшилась на 2-3 пн.

Исходя из этих особенностей самого процесса репликации ДНК, А. М. Оловников пришел к выводу, что если в клетке нет особых механизмов, компенсирующих потери нуклеотидов с каждого конца нити ДНК, то хромосома начнет укорачиваться, при этом сначала

исчезнут теломерные районы, затем ближайшие к теломерам гены, потом более удаленные гены и т. д. Очевидно, что это в конце концов приведет к гибели клетки.

Действительно, у клеток, например, человека, растущих в культуре (*in vitro*), есть лимит на число делений. Американским ученым Л. Хейфликом в 1965 г. было показано, что, если для культивирования взять клетки у новорожденных, они могут пройти 80-90 делений, клетки же, взятые у 70-летних, делятся только 20-30 раз. Ограничение числа клеточных делений называют лимитом Хейфлика. Обычно клетки не преодолевают лимит из 20-90 делений, а в среднем, по мнению Хейфлика, он составляет 50 ± 10 . В своей статье в 1971 г. Оловников объяснил феномен лимита Хейфлика укорочением хромосом в процессе репликации и предложил следующую формулу для расчета продолжительности жизни любого клона клеток *in vitro*:

$$T = k(lt/lm - n),$$

где T — срок предстоящей жизни клеток; k — коэффициент корреляции между сроком жизни клона клеток и числом репликаций ДНК; lt — длина теломерного участка; lm — длина фрагмента ДНК, утрачиваемого в ходе каждого цикла репликации; n — число уже прошедших репликаций. Размер утрачиваемого фрагмента коррелирует с размером РНК-прайма, иницирующего синтез фрагментов Оказаки при репликации ДНК.

Таким образом, Оловников впервые напрямую связал срок жизни клеточных клонов с длиной теломерной ДНК и предположил, что «в качестве временной защиты концевых репликонов, локализующихся вблизи торцов хромосомы, клетка должна использовать теломеры, которые находятся на торцах теломер». Также он определил «телоген», функция которого оставалась тогда неясной, как «неинформационный ген, имеющий „буферную" функцию и монотонную нуклеотидную последовательность», который «укорачивается в митозах и тем самым защищает информационные гены от усечения при репликации».

Так что хотя часть нуклеотидов на 3'-конце отстающей цепи все же не будет реплицироваться, эта неполная репликация произойдет в зоне теломерного повтора, что не причинит никакого вреда генам,

расположенным рядом. Однако через несколько циклов репликации теломерный повтор «растет» и недорепликация начнет затрагивать гены.

5.3.1. Репликация теломер и поддержание их длины в клетках полового пути

Несмотря на то, что молекулярная структура теломеры была к началу 90-х гг. в основном охарактеризована, сохранилась проблема неполной репликации на конце линейной молекулы ДНК.

Было показано, что укорочение теломер у человека непостоянно и имеет свою возрастную динамику. В первичной культуре фибробластов, растущих *in vitro*, каждое удвоение количества клеток сопровождается уменьшением теломер на 48 ± 21 пар нуклеотидов, а *in vivo* теломеры фибробластов человека в среднем укорачиваются примерно на 75 пн за один акт митоза. Теломеры периферических клеток крови детей до 4 лет теряют более 1000 пн в год, в возрасте от 4 до 20 лет укорачиваются все медленнее, а в зрелом и пожилом возрасте их длина падает с практически постоянной скоростью около 30—60 пн ежегодно. Критическая длина теломер фибробластов человека, при которой наступает репликативное старение (торможение и полное прекращение пролиферации), не более 5 -7 тпн.

Длины теломер у разных видов, разных особей в популяции любого вида, в разных клетках одного и того же организма и даже на разных хромосомах одной и той же клетки или на разных плечах одной и той же хромосомы могут различаться в несколько раз. Обычно длина теломеры составляет от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч пар оснований. Одна из нитей теломерной ДНК всегда длиннее комплементарной нити и формирует участок 3'-концевой одонитевой ДНК, длина которого может превышать двести нуклеотидов.

В 1985 г. Грейдер и Блэкберн выяснили, что природа выработала механизм удлинения (элонгации) самого конца хромосомы, т. е. теломерного концевой повтора. Это связано с активностью особого

фермента - теломеразы. Теломераза является рибонуклеопротеидом, она содержит короткую молекулу РНК (примерно 150 нуклеотидов), в составе которой присутствуют 2 копии теломерного повтора 5'-СААССС-3'.

Перед началом репликации ДНК теломераза добавляет несколько копий теломерных повторов к 3'-концу ДНК. После этого репликация идет в обычном порядке. На отстающей нити синтезируются РНК-праймеры, при этом самое важное то, что концевой праймер синтезируется на досинтезированном теломеразой теломерном повторе. После завершения репликации остается незаполненным только участок РНК-праймера, синтезированного именно на этом участке теломерной последовательности. В результате дочерные нити ДНК получаются той же длины, что и родительские.

Механизм работы теломеразы на примере инфузории тетрахимены может быть описан следующим образом, как это показано на рис. 24. Теломераза обладает своей молекулой РНК, имеющей матричный участок, с помощью которого фермент распознает теломерный повтор. Последовательность 5'-СААССССАА-3' в составе молекулы теломеразы спаривается с последовательностью теломерного повтора 5'-ТТГГГГ-3'. Нуклеотиды ААС в РНК теломеразы остаются неспаренными, и на них достраиваются ТТГ. Фермент перемещается на самый конец теломерной последовательности, т. е. на всю длину ТТГГГГТТГ, и нуклеотиды ААС из молекулы теломеразной РНК спариваются с ТТГ теломерной ДНК, после чего достраивается вся последовательность повтора. Интересно, что теломераза, по-видимому, избирательно удлиняет наиболее короткие теломеры.

связаны с формированием злокачественных новообразований, но также играют важную роль в процессе клеточного старения. Искусственное удлинение теломер путем экспрессии теломеразы позволяет предотвратить клеточное старение и получить иммортализованную клеточную линию. Так же преодолевают старение спонтанно иммортализирующиеся опухолевые клетки: они либо начинают экспрессировать теломеразу, либо поддерживают на стабильном уровне длину теломер альтернативными способами. В ряде случаев прекратить рост культуры раковых клеток можно ингибируя теломеразу.

5.4. Белки теломерного комплекса у человека

Для того, чтобы выполнять все многочисленные функции по поддержанию геномной стабильности, теломерная ДНК должна функционировать в комплексе с определенными специфическими белками. Лучше всего они к настоящему времени изучены у человека.

Два главных белка, способных специфически связываться с теломерным повтором ДНК получили названия TRF1 и TRF2 (Telomeric repeat binding protein 1 и 2) У человека эти белки способствуют образованию гигантской теломерной петли (t-loop), размеры которой у человека сопоставимы с размерами теломер.

Первое сообщение о белке TRF1 было опубликовано в 1992 г. В 1997 была определена его аминокислотная последовательность и показано, что есть два несколько различающихся по размеру белка, являющихся продуктами альтернативного сплайсинга. Меньший получил название Pin1. Доменная структура TRF1-2 и устройство t-петли схематически представлена на рис. 25. На С-конце этой молекулы имеется ДНК-связывающий домен типа Myb. Для того, чтобы белок взаимодействовал с нуклеиновой кислотой, необходима его олигомеризация, для которой служит TRF-домен. По данным электронной микроскопии, тетрамер TRF1 с высокой специфичностью связывает до 12 теломерных повторов ДНК позвоночных, но не теломер растений или нематоды. В насыщающей концентрации этот белок покрывает теломеры как

сплошная оболочка 10-нм толщины. Каждая молекула TRF1 изгибает ДНК под углом около 120° . В последовательности ДНК белок связывает два сайта 5'-YTAGGGTTR-3', которые могут быть расположены на разном расстоянии и под разным углом, в связи с чем предполагается, что ДНК-связывающие участки TRF1 связаны с остальной частью белковой молекулы регионами, обладающими повышенной эластичностью. При этом TRF1 не связывается с одонитевой ДНК, расположенной на конце теломер человека.

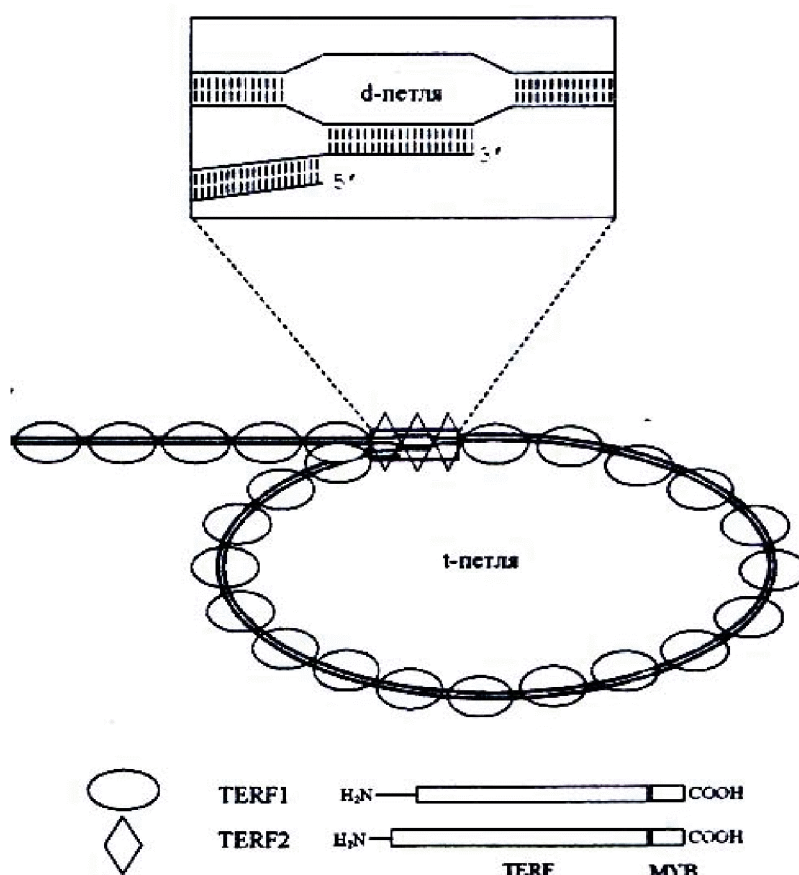


Рис. 25. Схема строения t-петли и белков TRF1,2 у человека

Белок TRF2 был найден в конце 90-х годов. По структуре он сходен с TRF1, но TRF домен последнего не взаимодействует с

гомологичным доменом второго представителя данного семейства, так что оба белка в клетке могут существовать в виде гомо-, но не гетеродимеров. У TRF2, как и у TRF1, в результате альтернативного сплайсинга образуются два варианта. На теломерах белок TRF2 связывается в существенно меньшем количестве, чем TRF1. С помощью электронной микроскопии была уточнена область теломеры, в которой концентрируется этот белок. Оказалось, что TRF2 расположен в узле, образующемся в точке касания однонитевого G-конца теломер со «стволом». Тогда же впервые было обнаружено, что подавление TRF2 может приводить к активации ATM/p53-зависимого пути ответа клетки на повреждение ДНК и затем к апоптозу, поскольку незащищенные t-петлей (развернутые) концы хромосом подобны двунитевым разрывам ДНК и так воспринимаются клеткой.

Теломерные петли были обнаружены на хромосомах клеток HeLa, периферических лейкоцитов человека, первичных клеток печени мыши, а также на теломерах трипаносом и на микроядерных, но не макроядерных хромосомах инфузории *Oxtricha*. Размеры t-петель в клетках человека составляют от 5 до 40 тпн. У трипаносом t-петли сравнительно небольших размеров, около 1 тпн, хотя теломеры у этих простейших и у человека сравнимы по длине. По-видимому, это минимальные размеры t-петель, обнаруженных на сегодняшний день.

Для связывания TRF2 на конце хромосомы необходим однонитевой участок теломерной ДНК длиной не менее одного повтора из шести нуклеотидов TTAGGG. Наличие более одного повтора в однонитевом участке улучшает связывание. Добавленный в избытке этот белок связывается на теломерах в количестве не менее трех, а в среднем около десяти димеров.

Предполагают, что в этом участке 3'-концевая однонитевая ДНК гибридизована с антипараллельной нитью частично расплетенной двойной спирали «ствола», так что образуется так называемая d-петля (displacement loop), или соединение подобное структуре Холлидея. Строение t-петли подробно показано на рис. 26.

Открытие и изучение теломерных белков дало дополнительную информацию о роли теломер в регуляции клеточного старения.

В функциональных исследованиях белков TRF выяснилось, что резкое увеличение концентрации TRF1 при его экспрессии под вирусным промотором в культуре клеток приводит к преждевременному вступлению в митоз и последующей гибели клеток. В аналогичных условиях ингибирование TRF1 в клетках, экспрессирующих теломеразу, сопровождается медленным увеличением длины теломер. Очевидно, TRF1, способствуя образованию t-петли, тем самым препятствует удлинению теломер за счет теломеразной активности.

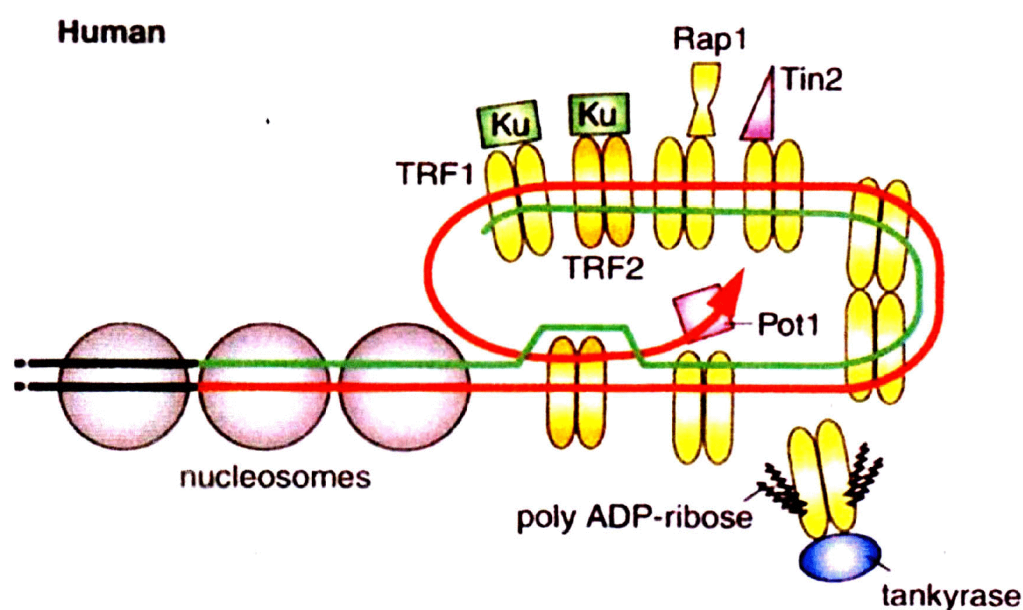


Рис.26. Строение t-петли у человека

Совсем иначе проявляются последствия экспериментального воздействия на белок TRF2. Его подавление с помощью доминантно негативных делеционных мутантов приводит к морфологическим изменениям в строении модельных клеток, напоминающим старение и к индукции в них характерных для клеточного старения молекулярных маркеров, а также к немедленному и необратимому прекращению пролиферации. Концы хромосом в этих клетках часто сливаются

концами и образуют кольцевые структуры, хотя и не теряют теломерные повторы. Одновременно на концах уцелевших теломер исчезают однонитевые участки, хотя активность теломеразы не изменяется. Таким образом, не теломеры сами по себе защищают хромосомы от нуклеаз, слияния и последующих разрывов при митозе. Это функция белка TRF2.

Увеличение концентрации TRF2 в первичной культуре фибробластов сопровождается некоторым возрастанием скорости укорочения теломер в ходе старения клеточной популяции. В то же время этот эффект не приводит к преждевременному старению: напротив, в ходе эксперимента клетки продолжают пролиферировать, когда контрольная культура уже прекращает расти. Пороговая для репликативного торможения пролиферации длина теломер у контрольных клеток составляет 6—7 тпн. У экспериментальной культуры, экспрессирующей большое количество TRF2, эта точка на 2—2,7 тпн ниже, что позволяет им пройти еще около 15 делений, прежде чем наступает старение. Более того, в клетках с критически короткими теломерами, сенильных или мутантных по p53 и Rb, повышенная экспрессия TRF2 предотвращает слияния и разрывы хромосом. Полученные данные можно интерпретировать следующим образом: не длина теломер важна для индукции клеточного старения, а их состояние, связанное с защитной функцией белка TRF2. Например, сенильные теломеры могут быть недостаточно длинными для защиты конца хромосомы в узловой точке t-петли, но когда концентрация TRF2 повышена, то вероятность образования нормальной t-петли возрастает.

Известно, что онкобелки некоторых вирусов позволяют соматическим клеткам преодолеть пролиферативные барьеры и делиться бесконечно долго. В экспериментах на первичной культуре фибробластов было показано, что ингибирование TRF2 не только приводит к фенотипическим изменениям, характерным для старения, как это ранее наблюдалось на клетках фибросаркомы, но также сопровождается характерными для старения генетическими изменениями. В частности, экспрессия доминантно негативного аллеля TRF2 сопровождается частым слиянием хромосом, формированием во

многих клетках более двух центросом и тетраплоидного кариотипа. После ингибирования TRF2 в клетках активирован p53, гипофосфорилирован Rb, увеличена концентрация p16 и понижен уровень циклина A, что характерно для клеточного старения. Одновременная инактивация p53 и Rb при помощи Т-антигена вируса SV40 и другими способами предотвращает старение экспериментальных клеток, вызванное ингибированием TRF2.

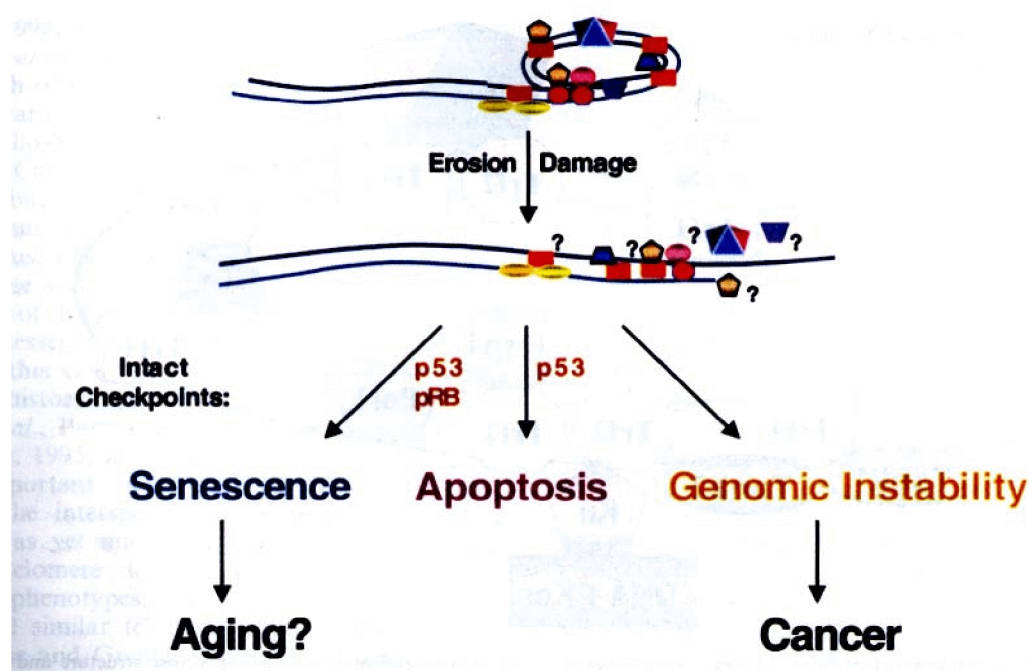


Рис. 27. Роль t-петли в индукции клеточного старения и апоптоза

Эти эксперименты вновь указывают, что белки p53 и Rb, индуцирующие старение, могут быть активированы теломерами, когда те развернуты и не защищены белком TRF2. Схема взаимодействия этих белков представлена на рис. 27.

Интересно, что p53 имеет повышенное сродство к одонитевому участку теломер, к узловому региону t-петли и даже несколько повышает вероятность образования t-петли в присутствии TRF2.

Уточнение состава теломерного нуклеопротеидного комплекса и выяснение роли теломерных белков в индукции клеточного старения позволяет перейти к исследованию естественных регуляторов состояния теломер. Кроме уже известной теломеразы, за последние годы было найдено еще несколько белков, которые могли бы играть подобную роль.

Хотя влияние TRF2 на теломеры в условиях эксперимента проявляется наиболее отчетливо, его модуляторы практически неизвестны. Лишь белок hRap1 (repressor-activator protein) был недавно идентифицирован как партнер TRF2, преимущественно связываемый на теломерах, хотя он может также взаимодействовать с некоторыми другими участками хромосом. Зато активность белка TRF1, относительно мягко изменяющего длину теломер, может регулироваться *in vivo* несколькими различными способами.

Например, TRF1 может быть поли-ADP-рибозилирован, что сопровождается его диссоциацией от ДНК. Эту посттрансляционную модификацию катализирует танкираза (теломерная анкириновая полимераз поли-ADP-рибозы), белок, проникающий в ядро и в неактивном состоянии связанный с TRF1. После активации танкираза подвергает поли-ADP-рибозилированию себя и TRF1, что приводит к распаду теломерного нуклеопротеидного комплекса и высвобождению теломер. В результате теломеры становятся доступными для теломеразы и других ферментов. Из-за этого танкразу считают позитивным регулятором теломеразы.

У человека и позвоночных животных имеется два изозима танкиразы, несколько различающихся по молекулярной массе (142 и 127 кДа в немодифицированном состоянии), называемые TNKL или танкираза 1 и TNKS или танкираза 2. Кроме энзиматического домена, гомологичного соответствующему домену PARP, у танкиразы имеется большой анкириновый домен, состоящий из 24 повторов, а также SAM-домен, участвующие в различных белок-белковых взаимодействиях. У

танкиразы 1 в отличие от танкиразы 2 имеется также дополнительный N-концевой домен, функция которого до сих пор не ясна. Ни одна из танкираз не имеет собственного сигнала ядерной локализации, поэтому большая часть фермента находится в цитоплазме. Здесь танкираза подвергается фосфорилированию и активации MAP-киназой, хотя пока остается неясным, переносится ли активированный фермент в ядро, или ядерный пул танкиразы активируется MAP-киназой, которая, как известно, сама может быть транслоцирована из цитоплазмы в ядро. MAP-киназа через сигнальный путь Ras-MAPK регулируется инсулином и факторами роста; поэтому следует предположить, что с помощью танкиразы организм держит теломеры всех клеток под контролем гормонов.

Активность TRF1 может быть увеличена за счет возрастания его концентрации, которая наблюдается на поздних стадиях клеточного цикла перед митозом. По-видимому, TRF1 необходим для упаковки митотических хромосом, так как экспериментальное увеличение его концентрации, как уже отмечалось выше, провоцирует преждевременный вход в митоз. Для предотвращения вступления в митоз, например, когда ДНК нуждается в репарации, TRF1 может быть фосфорилирован протеинкиназой ATM; той же самой протеинкиназой, которая активирует p53 и индуцирует апоптоз и клеточное старение по p53-зависимому механизму. Если в клетках больных АТ (у которых отсутствует активная ATM) ингибировать TRF1, то они смогут поддерживать нормальную длину теломер, которые обычно укорачиваются существенно быстрее, чем в клетках здоровых людей.

Недавно был найден еще один теломерный белок, взаимодействующий с TRF1, который получил название TIN2 или TIN2 (TRF1 interacting nuclear factor 2). Его молекулярная масса около 40 кДа и по структуре он напоминает белки TRF, так как на его С-конце также расположен ДНК-связывающий домен типа Myb. Как и TRF1, этот фактор способствует укорочению теломер и негативно регулирует активность теломеразы. Например, если в контрольной культуре иммортализованных фибробластов средняя длина теломер в ходе эксперимента через 43 удвоения популяции уменьшалась от 6,4 тнп до 88

5,7 тпн, то при высоком уровне экспрессии TINF2 длина теломер падала до 5 тпн. В том же эксперименте ингибирование TINF2 путем экспрессии его доминантно негативного мутанта, напротив, привело к удлинению теломер до 9 тпн. Считается, что TINF2 опосредует действие TRF1.

Механизм действия TRF1 на теломерах вряд ли заключается только в закручивании ДНК в суперспираль и облегчении последующего образования t-петли, как было указано ранее. Благодаря взаимодействию с множеством регуляторных белков, TRF1 может концентрировать их в области теломер. В частности, TRF1 связывает мощный ингибитор теломеразы, белок PinX1, который действует непосредственно на фермент, в отличие от остальных ранее упоминавшихся модуляторов, влияющих на доступность субстрата теломеразы, т. е. теломер. Совсем недавно был обнаружен еще один теломерный белок, связывающийся на ее одонитевом участке, Pot1. Вероятно, функция этого 71 кДа полипептида состоит в защите особенно уязвимой со стороны нуклеаз, облучения и химических агентов одонитевой ДНК, чем и объясняется его название (protection of telomeres, POT). Pot1 взаимодействует с TRF1. Предполагают, что, влияя на связывание Pot1, белок TRF1, концентрация которого пропорциональна длине теломер, передает на одонитевые концы информацию об общей протяженности теломерной ДНК.

Возможно, упомянутыми здесь белками список различных компонентов теломерного нуклеопротеидного комплекса, называемого также телосомой, не исчерпывается. В следующем разделе будут приведены дополнительные данные, указывающие на наличие еще не исследованных теломерных белков и белков, ассоциированных с теломерами структурно и/или функционально.

5.4.1. Теломеры дрожжей

Параллельно с работами на клетках человека развивались исследования и на модельных организмах. Примечательно то, что лишь у

некоторой части теломерных белков других эукариот в геноме человека имеются гомологи, функции которых известны на сегодняшний день.

Вслед за открытием белков семейства TRF у человека гомологичный им белок Taz1 был найден у делящихся дрожжей *Scizosaccharomyces pombe*. Кроме того, по структуре подобные TRF теломерные белки с ДНК-связывающим доменом типа Myb найдены у табака и некоторых других растений. Характерный для этого семейства домен типа Myb, связывающий теломеры, предложено именовать телобоксом. Дрожжи *S.cerevisiae* отличаются от *Scizosaccharomyces pombe* отсутствием теломерного белка семейства TRF. Теломерный белок *S.cerevisiae* Tbf1, в структуре которого обнаружен телобокс, за пределами ДНК-связывающего региона не имеет гомологии с белками TRF человека и не может быть отнесен к этому семейству. Столь же уникальна структура белка TIN2 (TIN2) человека. У него есть телобокс, но ни у дрожжей, ни у каких-либо еще модельных организмов, за исключением мышей, его гомологи не найдены.

Белок человека hRap1 (Repressor-activator protein), связывающийся на теломерах через TRF2, и его дрожжевой гомолог scRap1 также имеют ДНК-связывающий домен типа Myb, но не один на субъединицу, а два, и их сходство с телобоксом считают недостаточным для объединения белков Rap в один класс с другими теломерными белками. Белок scRap у пекарских дрожжей связывается непосредственно на ДНК, а не так, как его гомологи у *S.pombe* — через spTaz1, или у человека — через белок TRF2. Дрожжевой Rap1 изучают уже много лет. Известно, например, что этот белок, связываясь на теломерах, привлекает сюда белки семейства Sir (silent information regulator), контролирующие активность генома и образование гетерохроматина, а также белки семейства Rif (Rap interacting factor), контролирующие длину теломер.

Белки Sir, многочисленные и у дрожжей, у млекопитающих значительно эволюционировали. Один из дрожжевых представителей этого семейства, Sir2 (Sirt2), имеет не менее семи гомологов в геноме человека. Связываясь на теломерах дрожжей, Sir2 инициирует образование гетерохроматина и подавление активности прилегающих к

теломерам генов, взаимодействуя с Sir3 и Sir4, гомологи которых у человека пока не найдены. У млекопитающих до сих пор не найдены гомологи дрожжевых белков Rif. Хотя в геноме человека предположительно имеются гены, кодирующие белки, функционально подобные Rif, их активность пока не охарактеризована.

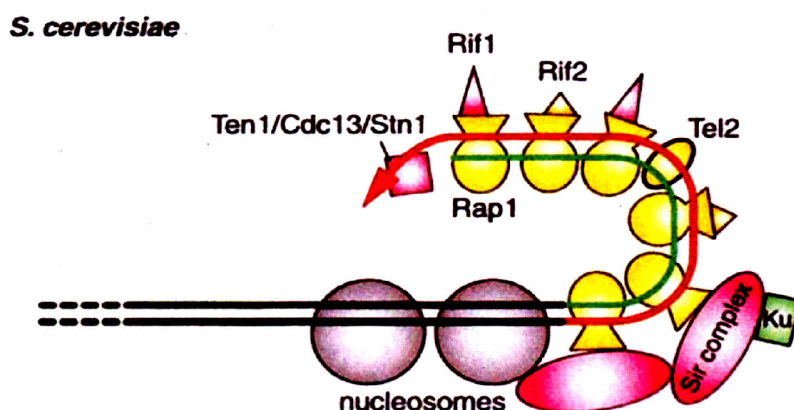


Рис.28. Белки теломерного комплекса у дрожжей.

Белки Sir проявляют энзиматическую активность, деацетилируя гистоны, т.е. являются гистоновыми деацетилазами. В регуляции активности генома также участвуют гистоновые ацетилазы, в том числе и в районе теломер. Другие ферменты, участвующие в посттрансляционной модификации гистонов, например, дрожжевые метилтрансферазы, такие как Set1 и Dot1, также представлены в районе теломер и имеют гомологи у человека. Set1/COMPASS - мультибелковый комплекс, состоящий, как минимум, из семи компонентов разного типа. Показано, что один из этих компонентов (YAR003) участвует в регуляции Rb, однако полностью функции этих белков еще не охарактеризованы. Dot1 - метилтрансфераза, которая не

имеет домена Set, и регулирует, в частности, связывание белка Sir3 на теломерах дрожжей.

Танкираза, один из регуляторов TRF1, у дрожжей не обнаружена, но гомологи генов танкиразы человека присутствуют в геномах дрозофилы, нематоды и других животных. По-видимому, эволюция танкираз происходила в пределах царства животных; при этом в геномах беспозвоночных найдено лишь по одному гомологу танкиразы. в то время как у позвоночных имеется по два таких гена.

У *S.pombe* имеется ортолог белка Pot1 человека. В то же время у *S.cerevisiae* белок, связывающий одностандную часть теломерной ДНК, Cdc13, как и многие другие теломерные белки пекарских дрожжей, не гомологичен функционально сходному белку человека и *S.pombe*, хотя в его вторичной пространственной структуре и наблюдается некоторое подобие белка Pot1. На рис.28 приведено строение теломерного комплекса у дрожжей.

Из представленного материала достаточно очевидно, что не всегда правомерно проводить параллели между строением теломерного нуклео-протеидного комплекса у человека и у модельных организмов, особенно *S.cerevisiae*. Эволюция почкующихся дрожжей явно пошла в ином направлении, чем у одноклеточных, от которых произошли *Metazoa*.

5.5.Теломеры и репарация.

Теломеры являются единственными «легально разрешенными» двунитевыми разрывами ДНК в клетке.

Двунитевые разрывы ДНК (DSBs, double-strand breaks) возникают под действием ионизирующей радиации и некоторых других повреждающих агентов. Известны два основных пути репарации DSBs: гомологическая рекомбинация и достраивание недостающих нитей, и нехомологичное соединение концов ДНК (NHEJ, Non-homologous end joining). Считают, что первый путь преобладает в S и G2 фазах клеточного цикла и в активно делящихся клетках, например дрожжей, а второй — в G0/G1 фазах и в редко делящихся клетках, в частности

клетках млекопитающих. С другой стороны, показано, что разрывы геномной ДНК могут активно стимулировать гомологичную рекомбинацию в клетках млекопитающих.

Независимо от механизмов репарации, и DSBs, и незащищенные теломеры активируют протеинкиназу ATM (ataxia-telangiectasia mutated), что приводит, как уже отмечалось ранее, к активации p53 и далее - к остановке пролиферации и индукции механизмов клеточного старения или апоптоза. При образовании t-петли, однонитевой участок теломер, спаривающийся со «стволом», имитирует гомологичную рекомбинацию и при определенных условиях может стимулировать достраивание новой цепи ДНК. По этому принципу происходит удлинение теломер, независимое от теломеразы.

В составе теломерного нуклеопротеидного комплекса как у дрожжей, так и в клетках человека постоянно присутствует белок Ku, один из компонентов NHEJ. Гетеродимер Ku человека состоит из субъединиц молекулярной массой 69 и 83 кДа, называемых Ku70 и Ku80 (или Ku86). У дрожжей гомологичные белки называются HDF1 (или yKu70) и HDF2 (соответственно, yKu80). Этот гетеродимер связывает как одно-, так и двунитевые разрывы ДНК не только в области теломер, но и в любой другой части хромосомы, и предположительно препятствует дальнейшей деградации порезанного участка ДНК.

Участие Ku в функционировании теломер изучается не столь давно, но его присутствие в области телосомы неоднократно отмечалось в разных лабораториях. Противоречие между ролью Ku в репарации DSBs и участием этого белка в защите теломер, в том числе, от слияний, достаточно очевидно, поскольку это два прямо противоположных процесса. Вероятно, Ku выполняет во всех случаях лишь защитные функции, а дальнейшие процессы происходят при участии специфических для них белков, т.е. либо TRF, либо систем репарации и рекомбинации. В частности, на теломерах Ku ингибирует деградацию и рекомбинацию теломерных повторов. При недостатке этого белка теломеры укорачиваются; в участках генома, прилегающих к концам хромосом, активность которых в норме подавлена, иницируются

перестановки последовательностей. К сожалению, единого мнения по вопросу о роли белка Ku в телосоме пока нет.

После связывания белка Ku на DSB и активации DNA-PK в репарации участвует еще множество белков. Среди них комплекс Rad50/Mre11/NBS1. Кроме NHEJ эти белки участвуют также в гомологичной рекомбинации и в поддержании целостности теломер.

Белок Rad50 (Radiation mutant 50) первоначально изучали на дрожжах, однако в 90-е гг. был найден его гомолог и у человека. Rad50 - вытянутая палочкообразная молекула, напоминающая по форме миозин. Молекулярная масса ортологов у дрожжей и человека — 153 кДа. Полипептид имеет два ДНК-связывающих домена, расположенных на N- и C-концах молекулы и проявляющих ферментативную АТРазную активность. Это наиболее консервативные по аминокислотной последовательности участки молекулы, идентичные у дрожжей и человека на 50% и более. Энзиматические домены соединены протяженным суперспирализованным участком, изогнутым под острым углом в районе Zn-связывающего мотива, расположенного в центре молекулы, так что ДНК-связывающие домены колокализуются. Zn-связывающий домен служит для димеризации белков Rad50, так что димер из двух палочковидных молекул может одновременно удерживать молекулы ДНК, расположенные на расстоянии до 1200Å. Mre11 (meiotic recombination 11) — нуклеаза, которая также изучалась на дрожжах, и гомологи которой присутствуют во всех царствах, включая животных и человека. При репарации Mre11 подвергает деградации шпильки и прочие неправильные структуры в молекуле ДНК, в частности, образующиеся в районе поврежденных вилок репликации. При гомологичной рекомбинации нуклеазная активность необходима для спаривания двух молекул ДНК, в котором участвуют 3'-концевые одностранные участки протяженностью в несколько сотен пар нуклеотидов. Комплекс Rad50/Mre11, в котором Mre11 связывается в районе АТРазного домена Rad50, проявляет эндонуклеазную, а также экзонуклеазную активность в направлении от 3'- к 5'-концу ДНК, но не в обратном направлении. Очевидно, Mre11 - не единственная нуклеаза, участвующая в катализе рекомбинации. Некоторые мутации Mre11,

приводящие к блокированию взаимодействия с Rad50, сопровождаются укорочением теломер, не нарушая при этом процессы репарации; другие, напротив, снижают энзиматическую активность белка, но не влияют на его участие в защите теломер. Следовательно, функции этого белка в репарации и в поддержании структуры теломер различны.

Третий компонент комплекса MRN у дрожжей и человека не гомологичен. У *S.cerevisiae* это белок Xrs2 (X-ray sensitivity), а у человека - нибрин или Nbs1) (Nijmegen breakage syndrome 1), белок, мутация которого на клеточном уровне приводит к изменениям, сходным с вызванными мутацией АТМ, хотя клиническая картина соответствующего наследственного заболевания в двух указанных случаях различается. NBS1 имеет три сайта фосфорилирования и таким образом модулирует энзиматическую активность Rad50 и Mre11. В то же время он придает комплексу способность в присутствии АТР раскручивать двунитевую ДНК.

5.6. Функции белков, связанных с теломерами

Нередко трудно понять, действительно ли тот или иной белок важен для теломер и играет какую-то роль в их защите, репликации, репарации или передаче сигнала об их состоянии к каким-то еще субклеточным структурам. Некоторые белки, выявленные в составе телосомы, не проявляют специфичности именно к теломерам и их активность в отношении ДНК не связана с теломерной нуклеотидной последовательностью. Так, например, обстоит дело с белками репарации, которые выявляют, разумеется, не только на теломерах; из них Ku и комплекс Rad50/Mre11/NBS1 считают постоянно присутствующими в составе телосомы, в то время как к другим участкам ДНК они транслицируются по мере необходимости. Среди белков такого рода можно также упомянуть UP1, который, вероятно, участвует в поддержании структуры теломер и некоторых других G-богатых участков ДНК.

Тем не менее, белки, связанные с теломерами, можно разделить по функциональному признаку на следующие группы: 1) белки, поддерживающие пространственную структуру теломер. К ним, в частности, относится семейство TRF и другие белки с телобоксом; 2) белки, которые обеспечивают и регулируют образование теломерного гетерохроматина, а также модулируют активность генов, прилегающих к теломерам, путем их включения в гетерохроматин. К этой группе можно отнести белки Rap, Sir, а также Rif, гистоновые ацетилазы, метилтрансферазы и др.; 3) белки, отвечающие за подготовку теломер к репликации и взаимодействию с теломеразой. Это танкираза, а также белки, непосредственно регулирующие теломеразу, такие как PinX1 и некоторые другие, например, комплекс Stn1/Cdc13/Ten1 у дрожжей; 4) белки, осуществляющие репарацию повреждений теломер, а также, возможно, негативно регулирующие их длину, т.е. нуклеазы. В качестве примера можно привести Rad50/Mre11/NBS1 и Ku; 5) сигнальные белки, передающие информацию о защите или повреждениях теломер в другие субклеточные компартменты, а также инициирующие клеточное старение и апоптоз. Это протеинкиназа ATM, p53, p16INK4, pRb и другие белки сигнальных путей, регулирующих пролиферацию и гибель клеток.

Разумеется, распределение собственно теломерных и ассоциированных с теломерами белков по указанным группам не исключает их участия в нескольких различных механизмах, изучение которых еще продолжается.

5.7. Теломеры и старение

Неоднократно упоминавшееся выше репликативное или клеточное старение не обязательно может быть связано со старением многоклеточного организма, а его молекулярный механизм - с укорочением теломер. У человека известны по меньшей мере два вида патологически быстрого старения, молекулярный механизм которого в

настоящее время изучен. Синдром Вернера или прогерия взрослых вызывается мутацией в гене геликазы WRN, что приводит к затруднениям в процессе репликации ДНК и клеточной пролиферации. Больные умирают от старости в возрасте 35—50 лет. Синдром Хатчинсона-Гилфорда или прогерия детей, связан с мутацией в гене ламина А, что затрудняет пролиферацию вследствие дисфункции ядерной оболочки. В результате старение наступает уже в детском возрасте, и больные не доживают до 20 лет. И в том, и в другом случае генетические аномалии приводят к патологически заторможенному обновлению тканей, которое не является следствием укорочения теломер, хотя при синдроме Хатчинсона-Гилфорда теломеры резко укорочены уже у новорожденных. Тем не менее, нормальное старение у человека, по-видимому, все-таки связано с исчерпанием лимита Хейфлика. Длина теломер у пожилых людей приближается к пределу в 1-2 тпн, необходимых для образования t-петли минимальных размеров. Если это так, то именно теломерный механизм старения следует считать причиной естественной смены поколений у человека.

В ходе индивидуального развития большая часть клеток человека и животных утрачивает способность экспрессировать теломеразу и, следовательно, их теломеры могут только укорачиваться. Дойдя до известного предела, после которого защита концов линейных хромосом становится невозможной, теломеры через ATM/p53- и p16/pRb-зависимые сигнальные пути инициируют блок пролиферации и отмирание клетки.

Несмотря на кажущуюся простоту этого механизма, его изучение далеко от завершения, и в ходе исследований возникают все новые вопросы. Например, в организме существуют стволовые клетки, обеспечивающие способность тканей к регенерации и так же, как и половые клетки, экспрессирующие теломеразу. Некоторые соматические клетки, способные к клональной экспансии в определенных условиях, такие как лимфоциты, тоже экспрессируют теломеразу. Тем не менее длина теломер в лимфоцитах, как и в остальных соматических клетках, уменьшается. Очевидно, продолжительность жизни и старение регулируются не только теломеразой.

Поиск генов, связанных с регуляцией старения, позволяет выявить ряд белковых продуктов, таких, например, как Clk2. Соответствующий ген был обнаружен у *C.elegans*; его мутация вызывает увеличение продолжительности жизни нематоды. Гомологичный ген известен у дрожжей под названием Tel2. Оба эти гена кодируют белки, регулирующие длину теломер, хотя молекулярные механизмы их действия остаются пока неясными.

Среди других генов, влияющих на скорость старения модельных животных ген *daf-2 C.elegans*, мутация которого может сопровождаться увеличением средней продолжительности жизни в несколько раз, а мутация гена *Inr* - гомолога *daf-2* у дрозофилы – увеличивает продолжительность жизни мухи на 85%. Оба гена кодируют рецепторы инсулиноподобных лигандов. Явление увеличения продолжительности жизни при ограничении калорийности питания известно давно, но идентификация рецепторов инсулина и/или инсулиноподобных факторов роста как части стоящего за этим феноменом механизма на молекулярном уровне только начато. Предполагают, что существует нейроэндокринная система регуляции жизненного цикла животных, и она увеличивает продолжительность жизни особи при недостатке питания.

Возможность участия теломер в этой системе пока изучена недостаточно. По меньшей мере, некоторые из ее компонентов появились еще у одноклеточных. Например, продолжительность жизни материнских клеток почкующихся дрожжей зависит от присутствия питательных веществ. В регуляции жизненного цикла калорийностью питания каким-то образом участвует ассоциированный с теломерами ген *Sir2*. Следует также заметить, что у животных рецепторы инсулина и факторов роста могут контролировать теломеры через танкиразу. С другой стороны, короткие теломеры могут передавать информацию о своем состоянии на сигнальный путь, начинающийся от рецепторов факторов роста и ведущий к танкиразе. Показано, что p53 регулирует передачу сигнала от указанных рецепторов через адапторный белок p66Shc. Мутации в генах p53 и p66Shc могут приводить к изменению продолжительности жизни мышей.

5.8.Теломеры и рак

Рак - еще одна проблема прикладного характера, решение которой также связано с функционированием теломер. Клеточное старение считают одним из барьеров на пути развития раковых опухолей. В результате злокачественной трансформации соматические клетки приобретают ряд свойств, в норме им не присущих, в том числе способность к неограниченной и нерегулируемой пролиферации. У них начинается экспрессия теломеразы, или длина теломер поддерживается на стабильном уровне каким-либо альтернативным механизмом. Значительная часть описанных к настоящему времени онкобелков и опухолевых супрессоров либо участвует в регуляции теломер, либо передает сигналы об их состоянии. Среди таких белков p53, Rb, ATM, NBS1, а также Ras и другие онкобелки сигнального пути Ras-MAPK, который контролирует тирозиназу и опосредует митогенную активность Src и других тирозинкиназных рецепторов.

Глава 6. Клеточный цикл у эукариот

6.1. Понятие о клеточном цикле

Молекулярные процессы, происходящие во время репликации ДНК, в основном похожи у эукариот и прокариот. Тем не менее, существуют и различия. Во-первых, репликация ДНК у эукариот происходит на определенной стадии клеточного цикла. Во-вторых, если бактериальная хромосома представляет собой единицу репликации - репликон, то репликация ДНК эукариотической хромосомы осуществляется посредством деления ее на множество отдельных репликонов. По эукариотической хромосоме в каждый момент времени

может двигаться независимо друг от друга множество репликативных вилок. Остановка продвижения вилки происходит только при столкновении с другой вилкой, движущейся во встречном направлении, или по достижении конца хромосомы. В результате вся ДНК хромосомы в короткий срок оказывается реплицированной.

Клеточные циклы эукариот качественно не различаются у разных видов и в клетках разных тканей одного вида. Замечены различия, главным образом, в длительности цикла. Среди высших эукариот некоторые клетки делятся каждые 10 мин, другие каждые 3 ч, третьи - 200 ч.

6.2.Стадии клеточного цикла

Клеточный цикл большинства соматических клеток высших эукариот подразделяют на 4 стадии: G1 (gap1, предсинтетический период, или период подготовки к синтезу ДНК), S (synthesis, период синтеза ДНК), G2 (gap 2, постсинтетический период подготовки к клеточному делению) и M (mitosis, собственно процесс клеточного деления). Иногда выделяют G0 - стадию между M и G1 или стадию покоя. В культуре клеток человека весь цикл занимает примерно 24 ч, при этом на стадии G1, S, G2 и M приходится 10, 9, 4 и 1 ч соответственно. Фазы G1, S и G2 вместе составляют интерфазу

Наиболее подробные сведения получены при изучении клеточных циклов дрожжей. Данные генетических и молекулярных исследований показали, что клеточные циклы включают ряд этапов, на которых осуществляется контроль продвижения клетки от одной фазы к другой - точки проверки или чекпойнты (checkpoints). Первая стадия проверки у дрожжей называется START, у млекопитающих — G1-checkpoint. Если клетка не выросла до необходимых размеров и окружающая среда недостаточно богата, клетка будет оставаться в G1, т. е. не будет получено сигнала для начала синтеза ДНК (S-фазы).

В S-фазе разные участки генома реплицируются в разное время. В культуре клеток человека сначала синтезируется ДНК, которая выявляется в обогащенных генами R-бэндах метафазных хромосом. В конце S-фазы синтезируется ДНК G-бэндов. Полагают, что между этими

отрезками S-фазы также существует стадия проверки (проверка целостности ДНК, checkpoint DNA integrity).

Стадия проверки G2 находится на границе G2 и M. Если не завершилась репликация всей ДНК, если клетка не выросла до нормальных для этой фазы размеров и окружающая среда недостаточно хороша, клетка не способна перейти к стадии M.

Третья проверка происходит в течение фазы M: чтобы началось разделение хроматид, хромосомы должны быть надежно прикреплены к нитям митотического веретена. Схематически клеточный цикл показан на рис.29.

Нарушения регуляции клеточного цикла и чекпойнт-контроля часто приводят к геномной нестабильности и предрасположенности к возникновению опухолей. Понимание молекулярных механизмов, которые регулируют эти процессы важно как для прикладной медицины, так и для фундаментальных научных исследований. Клеточный цикл проходит одинаково во всех эукариотических клетках, поэтому изучение его у различных модельных организмов создает общее понимание того, как различные события клеточного цикла контролируются и координируются у человека.

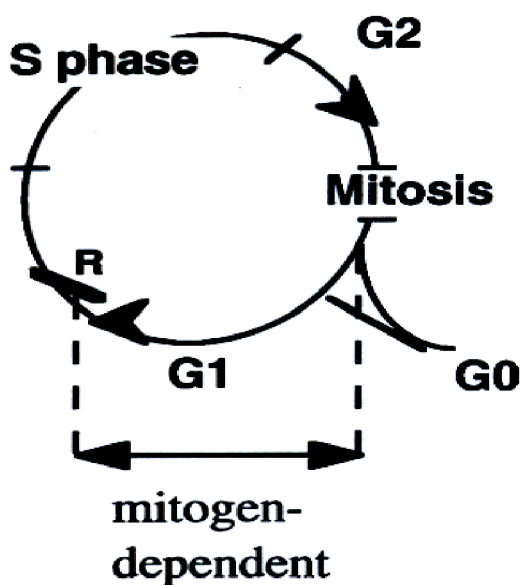


Рис.29. Схема клеточного цикла эукариот.

Успешное деление зависит от того, насколько высоко скоординированно прошли удвоение и сегрегация клеточных компонентов. Осуществления событий клеточного цикла координируется и контролируется сложно регулируемые протеинкиназами, известными как циклин-зависимые киназы (cycline-dependent kinases, Cdk).

6.3.Регуляция клеточного цикла у эукариот

Различные клеточные процессы, необходимые для успешной репликации и деления клеток, управляются последовательной активацией и дезактивацией семейства циклин-зависимых киназ (Cdk). Активация Cdk преимущественно управляется периодической экспрессией циклинов и нуждается в активирующем фосфорилировании киназы. Инактивация контролируется во-первых, ингибирующим фосфорилированием киназ, во-вторых убиквитин-опосредованной деградацией циклинов и в-третьих - взаимодействием всего комплекса с малыми белками-ингибиторами.

Основные принципы, положенные в основу регуляции прохождения клетки по циклу таковы:

- 1) Активация Cdk управляется последовательно экспрессией и объединением с циклинами;
- 2) Активность каждой пары Cdk-циклин необходима для активации последующей;
- 3) Разрушение циклинов приводит к однонаправленному клеточному циклу;
- 4) Ингибирование комплексов Cdk-циклин путем фосфорилирования или путем связывания с белками-ингибиторами задерживает активацию Cdk и замедляет движение клетки по циклу в неблагоприятных условиях.

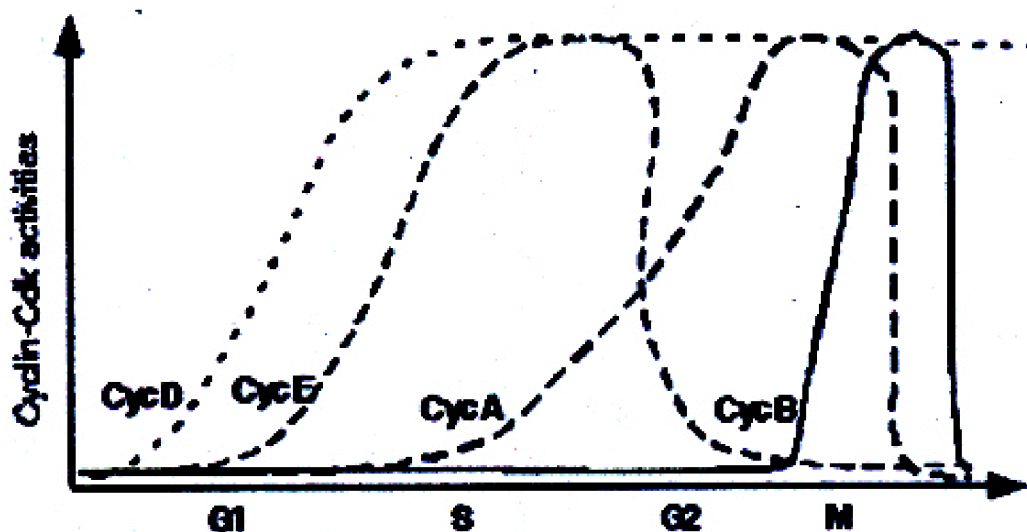


Рис.30.Экспрессия циклинов в течение клеточного цикла.

Как это следует из названия, Cdks являются протеин-киназами, которые для своей активации должны связаться с соответствующими циклинами. Процесс синтеза и деградации циклинов высоко координирован, в то время как основной уровень контроля активности Cdks заключается в периодичности присутствия или отсутствия циклиновой субъединицы. Сравнение динамики экспрессии различных циклинов в течение клеточного цикла показано на рис. 30.

Если покоящиеся клетки стимулировать к вхождению в клеточный цикл ростовыми факторами, то первым будет экспрессирован циклин D, который может объединяться с Cdk4 или Cdk6. Этот комплекс входит в ядро, где фосфорилирует белок ретинобластомы Rb и два других белка р107 и р130. Фосфорилирование Rb приводит к высвобождению семейства транскрипционных факторов E2F, активирующих транскрипцию генов, вовлеченных в процесс репликации ДНК, и таким образом способствует экспрессии белков, необходимых

для G1 и S-фаз клеточного цикла. Схема работы белка Rb показана на рис.31.

Тот же митогенный сигнал, который вызвал экспрессию циклина D, также вызывает и экспрессию второго циклина – E и двух ингибиторов Cdk – p21^{cip1} и p27^{kip1}. Экспрессия белков-ингибиторов в тот момент, когда клетка входит в новый цикл роста и деления, кажется контрпродуктивной. Тем не менее, p21 и p27 связываются с комплексом циклин D-Cdk4, не ингибируя его киназную активность, и на самом деле оказываются необходимыми для создания этого комплекса и его транспорта в ядро. Напротив, p21 и p27 являются эффективными ингибиторами активности комплекса циклин E-Cdk2. Таким образом, присутствие этих белков в ранней G1-фазе способствует образованию комплексов циклин D- Cdk4 и, в то же время, задерживает активацию циклин E-Cdk2 комплексов.

Циклин E-Cdk2 взаимодействует с циклин D-Cdk4/6 в фосфорилировании и инактивации Rb и покет-белков. Двойное фосфорилирование Rb необходимо для полной активации транскрипционной программы S-фазы. После этого с какого-то момента, называемого точкой рестрикции (restriction point) движение клетки по циклу происходит независимо от внеклеточных сигналов. Внутренние или внешние события могут замедлить или предотвратить продвижение клетки по циклу, но если никакого останавливающего это движение сигнала получено не будет, то инициированный клеточный цикл, включая рост, репликацию, сегрегацию и деление клетки, будет продолжаться сам по себе без дальнейших внеклеточных посылов.

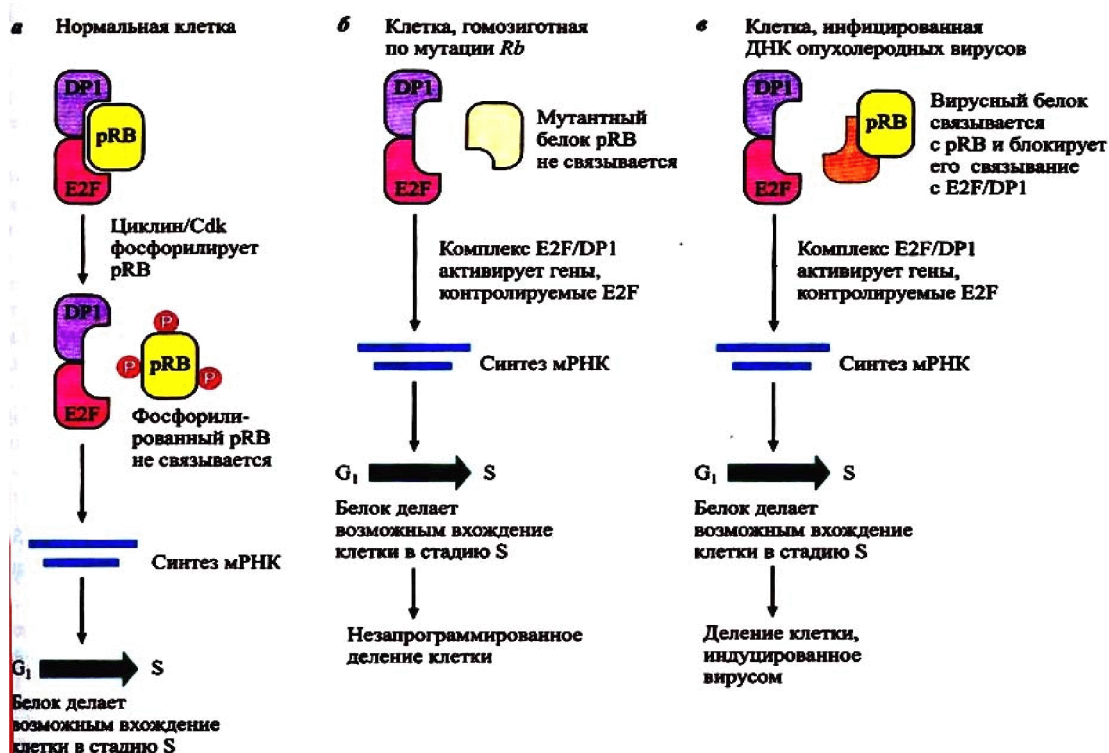


Рис.31.Роль белка Rb в регуляции клеточного цикла.

Активация циклин E-Cdk2 ведет к инициации репликации ДНК, причем описано большое число белков, необходимых для осуществления задачи удвоения и сегрегации клеточного содержимого. Циклин E-Cdk2 также фосфорилирует белок-ингибитор p27. Это делает p27 мишенью для распознавания убиквитин-лигазой, а убиквитинированная форма белка затем идет путем протеосомной деградации. Таким образом, циклин E-Cdk2 включает деструкцию своего отрицательного регулятора. Циклин E-Cdk2 также сам фосфорилирует свою циклиновую субъединицу (циклин E), что тоже делает его мишенью для деградации. Это свойство подготавливает к деградации как ингибитор, так и сам циклин, делает киназный комплекс одновременно самоактивирующим и самоограничивающим.

Циклин А экспрессируется сразу же после циклина Е на границе G1 и S фаз. Активность обоих комплексов - циклин E-Cdk2 и

циклин A-Cdk2 необходима для инициации и правильного протекания ДНК-репликации, а также для гарантии того, что репликация ДНК иницируется и проходит в течение каждого клеточного цикла только один раз. К тому же циклин A-Cdk2 способствует эффективному протеканию S-фазы, повышая транскрипцию гистоновых и других генов, необходимых для согласованной репликации.

После роста и удвоения клетка оказывается перед необходимостью делиться на две жизнеспособные дочерние клетки. Все завершается митозом, который начинается профазой с конденсацией хромосом и формированием веретена деления. В прометафазе микротрубочки веретена прикрепляются к кинетохорам двух сестринских хроматид, а оболочка ядра растворяется. Если все произошло правильно, то в анафазе веретено деления растаскивает сестринские хроматиды в разные стороны. Вслед за разделением удвоенного генома в телофазе деконденсируются хроматиды и начинают образовываться новые ядерные оболочки. Наконец, при цитокинезе образование двух дочерних клеток завершается разделением цитоплазмы. Эти драматические морфологические изменения происходят под контролем Cdk1 (Cdc2), ассоциированной с циклинами А и В. Экспрессия циклина В запаздывает по отношению к экспрессии циклина А, возрастая в поздней S-фазе и сохраняя высокий уровень в фазах G2 и М. Так как комплекс циклин В-Cdk1 преимущественно пребывает в неактивной фосфорилированной форме, то постепенное возрастание количества циклина В не сопровождается таким же постепенным возрастанием киназной активности этого комплекса. Дефосфорилирование и активация циклин В-Cdk1 строго коррелирует с морфологическими изменениями, сопровождающими митоз. Ядерные ламины, белки ядрышек, centrosомные белки и Eg5 (белок, связанный с движением кинезинов) являются субстратами циклин В-Cdk1 комплекса. Многокопийные органеллы, такие как митохондрии, распределены по цитоплазме равномерно, так, что дочерние клетки наследуют их вероятно, случайным образом. С другой стороны, органеллы, существующие в единственном числе, такие как аппарат Гольджи, должны быть разделены активно. Cdk1 при ассоциации с другой

106

субъединицей циклина В – В2 и, локализуясь преимущественно в зоне эндоплазматического ретикулума, может играть ведущую роль при диспергировании аппарата Гольджи и гарантировать его разделение при цитокинезе таким образом, чтобы в обеих дочерних клетках оказались компоненты, достаточные для построения заново этого секреторного комплекса. Разные стадии митоза характеризуются очень быстрым и скоординированным исчезновением циклинов А и В. Разрушение митотических циклинов необходимо для того, чтобы гарантировать переход клеток в интерфазу до инициации следующего раунда ДНК-репликации. Это разрушение опосредуется специальным белковым комплексом APC (anaphase promoting complex).

6.3.1. Белки-ингибиторы комплексов циклин-зависимых киназ с циклинами

Важнейшим механизмом негативной регуляции комплексов циклин – Cdk является взаимодействие с малыми белками-ингибиторами. Все они представлены на рис.31. У млекопитающих описано два различных семейства ингибиторов Cdk (Cdk-inhibitors – CKIs). Семейство Ink4 (inhibitor kinase 4), включающее белки p15, p16, p18 и p19, названные так по способности ингибировать Cdk4, связываются с мономерами Cdk4 и Cdk6.

Ингибиторы связываются с Cdk4 и Cdk6 в той же области, что и циклин D. Таким образом, высокая экспрессия Ink4 блокирует образование активных комплексов циклин D–Cdk4. Так как Ink4 препятствуют образованию комплексов циклин D–Cdk4, то они увеличивают пул p27, способного связываться с комплексами циклин E–Cdk2 и ингибировать их. Следовательно, повышение экспрессии Ink4 напрямую ингибирует активность комплексов циклин D – Cdk4 и опосредованно - активность комплексов циклин E –Cdk2. Вторая группа белков CKIs, Cip/Kip (cycline inhibitor/kinase inhibitor) семейство, включающее белки p21^{cip}, p27^{kip} и p57^{kip}, ингибируют комплексы, содержащие Cdk2. Это семейство ингибиторов связывается с

формирующимися комплексами, блокируя таким образом их доступ к субстрату. P21, главный из этих ингибиторов, является белком, экспрессия которого активируется белком p53 в ответ на повреждение ДНК.

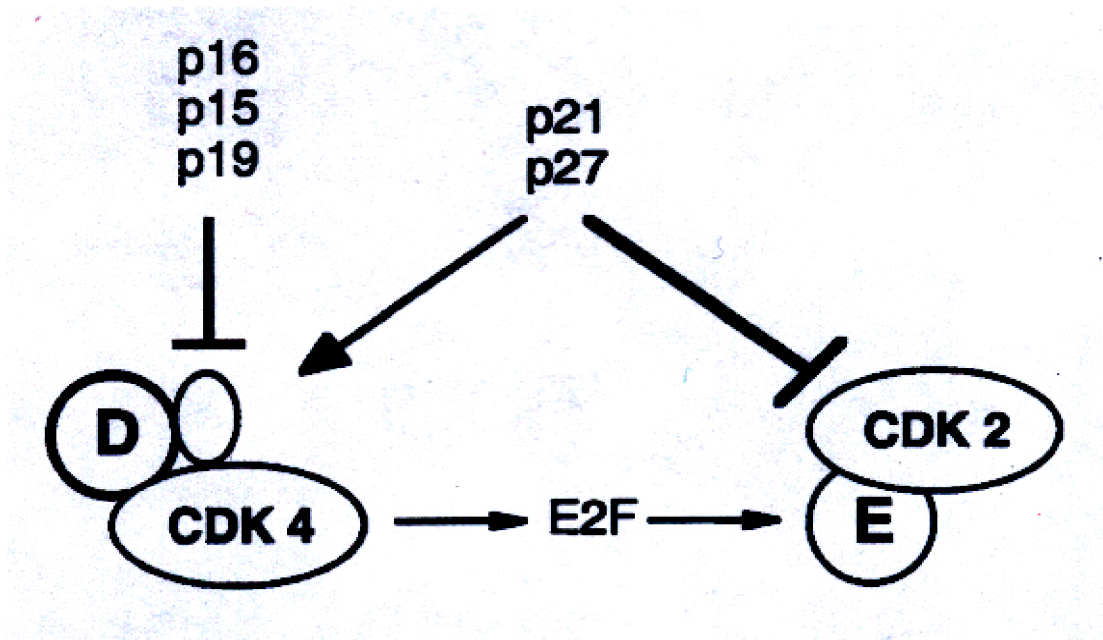


Рис.31. Ингибиторы комплексов циклин-CDKs

6.3.2. Регуляция активности CDKs фосфорилированием

Ассоциация киназы с циклином приводит к частичной активации киназного комплекса. Для полной активации требуется фосфорилирование по треонину-168 в районе Т-петли в С-конце киназы. Киназы, способные наносить такое активирующее фосфорилирование, называются Cdk-activating kinases (Cak). Активность самих Cak постоянна в течение клеточного цикла и, вероятно, даже небольшие ее модуляции могут оказывать влияние на движение по циклу.

Фосфорилирование некоторых аминокислот на N-конце Cdk также подавляет их киназную активность. Подавление активности комплекса Cdk1-циклин В в фазе G2 является наиболее полно охарактеризованным примером ингибирующего фосфорилирования

Cdks. Впрочем, активность циклин А–Cdk2, циклин Е–Cdk2 и циклин D–Cdk4 комплексов тоже регулируется таким способом. Ингибиторное фосфорилирование осуществляется рядом с АТР-связывающим сайтом киназной субъединицы. У человеческой Cdk1 мишенями ингибирующего фосфорилирования являются треонин-14 и тирозин-15. Фосфорилирование по тирозину-15 в основном осуществляется ядерной киназой Wee1, а фосфорилирование по треонину-14 проводит протеинкиназа Myt1, локализованная в цитоплазме и связанная с мембранами цитоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. Различная локализация этих киназ предполагает механизм, по которому Cdk1 может негативно регулироваться как в ядре, так и в цитоплазме. Ингибирующее фосфорилирование Cdks снимается фосфатазами двойной специфичности семейства Cdc25. В клетках млекопитающих экспрессируются три формы Cdc25. Cdc25А действует в начале клеточного цикла, способствуя дефосфорилированию и активации комплекса циклин Е–Cdk2. Две другие фосфатазы Cdc25В и Cdc25С принимают участие в дефосфорилировании комплекса циклин В–Cdk1 и переходе G2-М. Любопытно, что сами Cdc25 являются субстратами для Cdks: Cdc25А фосфорилируется и активируется комплексом циклин Е–Cdk2, а Cdc25С – циклин В–Cdk1. Это предполагает, что быстрая и полная активация Cdks стимулируется по принципу положительной обратной связи.

6.3.4. Деградация циклинов в клеточном цикле

Каждая фаза клеточного цикла характеризуется тем, какой именно комплекс циклин–Cdk присутствует и активен. Поэтому важно, какие комплексы циклин–Cdks вовремя инактивированы или разрушены. Убиквитин-опосредованная деградация является основным путем устранения из клеток белков клеточного цикла, уже выполнивших свои функции и гарантии того, что события клеточного цикла будут происходить в надлежащей последовательности. Присоединение убиквитиновых остатков к белкам-субстратам является сигналом для их

деградации с помощью 26S протеосом, мультибелкового комплекса, специализирующегося на анфолдинге и протеолизе убиквитин-меченых белков. Этот процесс продвижения белка к 26S протеосоме контролируется активностью двух структурно и функционально близких комплексов – Skp-Cullin F box complex (SCF) и Anaphase promoting complex (APC). Специфичность и временная правильность деградации достигается комбинацией различных механизмов. В случае SCF особые распознающие белки, известные как F-box белки, привлекают белки-мишени к SCF-комплексу. Большая часть белков-мишеней, то есть p27 и циклин E распознаются только в том случае, если они фосфорилированы Cdk. Таким образом, их деградация находится под прямым контролем Cdk-активности. В случае APC-комплекса были идентифицированы два специальных фактора – Cdc20 и Cdh1. Как следует из названия, активность APC необходима в начале анафазы. Она завершается деградацией белков, предотвращающих расхождение сестринских хроматид. Регуляция начала анафазы строго контролируется чекпойнтом веретена, гарантирующим, что сегрегация не может осуществиться до того, как все хромосомы правильно прикрепятся к митотическому веретену. Увеличение экспрессии Cdc20 в митозе инициирует деградацию субстратов APC-Cdc20. Фосфорилирование Cdc20 и компонентов кора APC комплексом циклин B-Cdk1 в дальнейшем стимулирует их убиквитин-лигазную активность. Циклин B и Cdc20 оба являются субстратами APC. Таким образом, они сами стимулируют ту активность, которая является причиной их будущей деструкции. Активность APC-Cdh1 в ранней G1 гарантирует разрушение всех митотических белков до начала инициации репликации ДНК в следующем цикле.

6.4.Точка рестрикции клеточного цикла - узел митогенных и ингибирующих сигналов

Во время клеточного деления удваиваются и разделяются по двум дочерним клеткам все молекулы и органеллы материнской клетки.

Удвоение ДНК происходит только в фазе S. У всех эукариот имеются сходные белковые комплексы, участвующие в инициации репликации и сходные белки, разрешающие репликацию. После образования, компоненты этого комплекса активируются циклин-зависимыми киназами. Начавшись, репликация ДНК должна быть завершена. Таким образом, внеклеточные сигналы типа ростовых факторов не могут и не должны влиять на прохождение S-фазы. Так как S-фаза независима от ростовых сигналов, то к ее остановке могут приводить только массивные повреждения ДНК или отсутствие пула нуклеотидов, но такой арест часто оканчивается гибелью клетки.

После успешного завершения синтеза ДНК клетки переходят в G2-фазу и готовятся к митозу. Активированные в G2-фазе протеинкиназы предотвращают повторную репликацию. Покоящиеся клетки млекопитающих являются диплоидными, так что после удвоения ДНК они должны разделиться. То есть в G2-фазе контроль ростовых факторов также не нужен. Не нужны и свободные нуклеотиды, и остановить вступление клетки в митоз могут внутриклеточные сигналы, генерируемые в ответ на повреждение ДНК.

В процессе митоза циклин B-cdk1 фосфорилирует ламинин, белок ядерной мембраны, что приводит к растворению ядерной оболочки. В метафазе митоза конденсация хромосом совпадает с формированием митотического веретена. Эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи распадаются на маленькие пузырьки. Во время митоза хромосомы конденсированы, белки гиперфосфорилированы, а транскрипция и биосинтез резко ограничены или отсутствуют. Прохождение митоза определяется мониторингом функционирования микротрубочек, способствующих правильному расхождению хромосом. Внешний контроль ростовых факторов в такой момент представляется просто вредным, так что и митоз также является фазой цикла, независимой от них. В анафазе митоза две группы хромосом расходятся в разные стороны. Во время телофазы и цитотокinesis в клетке как бы в обратном порядке идет процесс восстановления внутриклеточных мембран. Вокруг ядер формируются оболочки, эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи заново

выстраиваются в цитоплазме. Микротрубочки разбираются. Транскрипция и биосинтез нормализуются, восстанавливаются внутриклеточные мембранные пути. После выхода из митоза клетки готовы к следующему клеточному циклу, допуская установление нового компетентного к репликации состояния в G1-фазе. Таким образом, из простых логических умозаключений следует, что только G1-фаза клеточного цикла может зависеть от ростовых факторов.

Основные регуляторные события, приводящие к пролиферации, происходят в G1-фазе цикла. *In vivo*, так же, как и в клеточных культурах, большинство покоящихся клеток имеют количество ДНК, соответствующее таковому в G1. Рост нормальных клеток в культуре регулируется комплексом взаимодействий между факторами роста, плотностью клеток и степенью их прикрепления к субстрату. Факторы роста необходимы для инициации и поддержания движения по фазе G1, приводящего к фазе S. Удаление ростовых факторов до определенного момента фазы G1 предотвращает наступление фазы S в нормальных клетках. Точка G1-фазы, после которой клетка не нуждается более в ростовых факторах для завершения клеточного цикла, была названа точкой рестрикции. Ее время было определено примерно за 2-3 ч до начала синтеза ДНК. Единожды в точке рестрикции или точке, после которой нет пути назад, клетки настраиваются на синтез ДНК и в дальнейшем не нуждаются во внеклеточных ростовых факторах в течение всего клеточного цикла. Было высказано предположение, что прохождение точки рестрикции, определяется накоплением особого лабильного (короткоживущего) белка, который получил условное название «R-белок».

Определение точки рестрикции могло бы быть маркером для различения нормальных и опухолевых клеток. Но какова ее биохимическая природа? Была высказана гипотеза, что R-белок является функциональным короткоживущим регуляторным белком, синтез которого чувствителен к ростовым факторам и который должен накопиться в достаточном количестве до того, как клетка пройдет точку рестрикции и двинется вперед, к синтезу ДНК. К моменту постановки этого вопроса еще не были известны онкогены и пути передачи

112

клеточных сигналов. Многие из открываемых впоследствии белков анализировали с точки зрения критериев R-белка.

Поиск экспрессирующегося только в поздней G1-фазе и отсутствующего в покоящихся клетках белка позволил предложить несколько различных вариантов. Выявление потенциального R-белка было сделано методом дифференциального дисплея. К сожалению, в том случае, если накопление белка происходит путем его стабилизации, а не повышения экспрессии, данный метод не работает.

R-белок является короткоживущим белком, который индуцируется, или стабилизируется в ответ на действие ростовых факторов, причем накопление R-белка ведет к независимости от них. Открытие циклинов G1-фазы D и E было крайне важным. Циклин D1, короткоживущий ядерный белок, накапливается под действием ростовых факторов. Он обычно сверхэкспрессирован в опухолевых клетках. То же с циклином E, свойства которого отвечают всем требованиям к R-белку, включая повышение в поздней G1, задержку появления после ингибирования синтеза белка в нетрансформированных клетках и быстрое восстановление в трансформированных клетках.

Движение по циклу осуществляется под действием Cdk's. Их активаторы циклины нестабильны и их экспрессия циклична в течение клеточного цикла. Таким образом, именно наличие циклинов контролирует активность Cdk's и играет ключевую роль в регуляции клеточного цикла. За время прохождения клетки по циклу последовательно продуцируются четыре основных циклина – D, E, A, B. Циклин B ассоциирован с p34/cdk1 и является триггером митоза. Движение по S-фазе требует наличия циклина A и его ассоциации с p33/Cdk2. Циклины D и E приводят клетку к S-фазе. Три типа циклина D: D1, D2, D3 очень похожи, но существенно отличаются от циклина E. Во время клеточного цикла D-циклины начинают накапливаться в середине G1, в то время как циклин E появляется позже, почти прямо перед переходом из G1 в S. Зависимое от митогенного сигнала продвижение по G1 связано с индукцией циклинов D-семейства. Факторы роста регулируют циклин D, как это показано на рис/32 четырьмя способами одновременно:

- 1) индукция транскрипции;
- 2) стабилизация белка циклина D;
- 3) перемещение в ядро;
- 4) объединение с их каталитическими партнерами Cdk-4 Cdk-6.

Промоторы D-циклинов отвечают на большое число митогенно-активирующихся сигналов, таких как Ras и β -катенин-Tcf/lef.. Индукция транскрипции циклина D1 зависит от Ras/Raf-1/Mek/ERK сигнального пути. К тому же циклин D1 быстро деградирует и имеет короткое время существования. Важно подчеркнуть, что не только уровень циклинов D и E, но и других белков, которые регулируют или осуществляют точку рестрикции, может повышаться путем стабилизации (как p53, обычно без специального фосфорилирования идущий путем протеосомной деградации). Подобным же образом протеосомной деградации подвергаются ингибиторы Cdkс p27 и p21, сам циклин E и транскрипционный фактор E2F-1. Циклин D1 подвергается убиквитинированию и протеосомной деградации после фосфорилирования по треонину-286. Это фосфорилирование может быть ингибировано через сигнальный путь, в котором частично задействованы Ras, P13-киназа и протеинкиназа B (Akt). Такой оборот циклина D1 является митоген-зависимым, а перенос в ядро и ассоциация с Cdk4 – митоген-независимым.

После объединения циклина D с Cdk в ядре, этот комплекс фосфорилирует белок Rb, нарушая его связывание с факторами транскрипции E2F, активирующими E2F-зависимую транскрипцию. Транскрипционный фактор E2F активирует транскрипцию генов, продукты которых вовлечены в ядерный метаболизм и синтез ДНК. Для понимания природы точки рестрикции нужно помнить, что E2F трансаktivирует циклины E и A. Циклин E в комплексе с Cdk2 сотрудничает с циклин D–Cdk4/Cdk6 комплексами для полного фосфорилирования белка Rb. Циклин E-Cdk2 обладает более широкой активностью, чем циклин D-Cdk4/Cdk6. К примеру, циклин E-Cdk2 фосфорилирует ингибитор p27, что ведет к его деградации. Напротив, в низкой концентрации ингибиторы Cdkс p21 и p27 коактивируют циклин

D-Cdks. Другой класс ингибиторов p15, p16, p18 и p19 специально ингибируют циклин D-Cdks.

Факторы роста активируют собственные рецепторы и другие тирозинкиназы, а через них Ras и митоген-активирующиеся сигнальные пути, кульминацией этого процесса является индукция транскрипции многочисленных генов, включая протоонкогены. Сходным образом, многие гены, кодирующие факторы роста, рецепторы, рецептор-ассоциированные белки и киназы сами являются протоонкогенами.

Одним из важнейших загадок в понимании регуляции клеточного цикла является связь митогенной стимуляции с машиной клеточного цикла. Экспрессия циклина D, его продвижение в ядро, стабилизация и ассоциация с Cdk4 или 6 в активный киназный комплекс регулируется ростовыми факторами. Следовательно, циклин D является сенсором ростовых факторов. Способность циклин D-зависимых киназ начинать фосфорилирование Rb в средней и поздней G1 показывает, что инактивация Rb также является митоген-зависимым шагом. Rb является фактором, супрессирующим клеточный рост, и участвует в контроле G1/S перехода, связывая семейство транскрипционных факторов E2F.

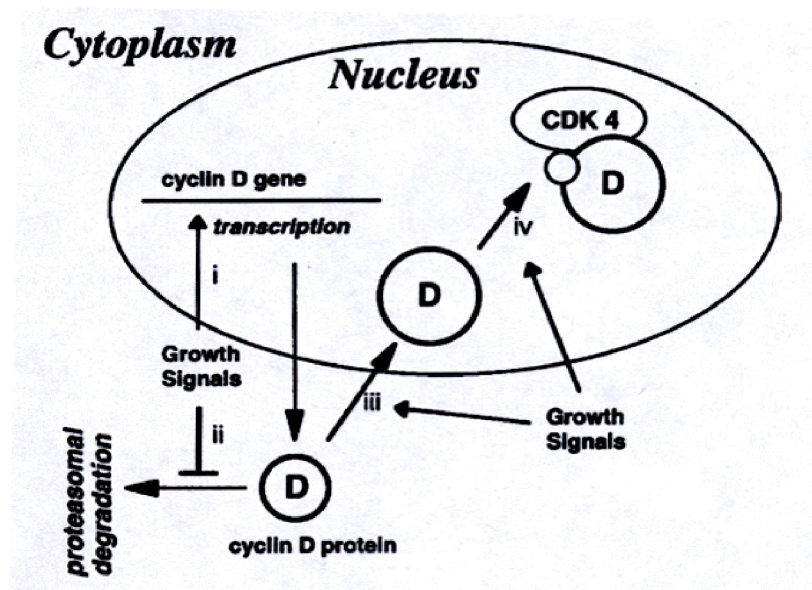


Рис.32.Регуляция экспрессии циклина D

Отсутствия функционально активного белка Rb достаточно для вхождения в фазу S в условиях, ограничивающих клеточный рост. Накопление E2F приводит к преодолению G1-ареста, вызванного подавлением активности циклин D и E-Cdks киназной активности. Зависимость от ростовых факторов заканчивается при полном фосфорилировании Rb, приводящем к прохождению через точку рестрикции в средней G1 и дальнейшему движению по клеточному циклу. Достаточно ли способности циклинов D фосфорилировать Rb для того, чтобы считаться R-белками? Не полностью. Их способность быть сенсором факторов роста зависит не только от их быстрой индукции в ответ на митогенные сигналы, но также от их белковой нестабильности, гарантирующей их быструю деградацию в клетках, лишенных ростовых факторов. То, что циклины D являются короткоживущими белками, гарантирует быстрое сокращение их пула при отсутствии митогенов. Индукции одного циклина D недостаточно для перехода покоящейся клетки через G1 в S.

Комплекс циклин E/Cdk2 возникает позже по отношению к комплексу циклина D/Cdk4 и завершает фосфорилирование Rb. Этот сдвиг между комплексами циклин E/Cdk2 и циклин D/Cdk4 объясняет потерю зависимости от факторов роста. Точнее, точка рестрикции расположена между пиками активности циклина E и циклина D. Переход из G1 в S сопровождается множественными петлями обратной связи, приводящими к ситуациям, при которых нижележащие события связаны с регуляцией самих себя на более высоком уровне. Например, и Rb/p130 и p27 оба являются негативными регуляторами циклина E. Экспрессия с-туса зависит от p21, CDKs и E2F, при том, что с-тус сам является регулятором p21 и CDKs.

Таким же образом циклин E расположен ниже по отношению к Rb и E2F-1, так как он трансактивируется E2F-1. В тоже время завершение фосфорилирования Rb циклином E и приводит к высвобождению E2F. Позитивная регуляция представляется

116

необратимой. Тот же циклин E, единожды экспрессировавшись становится в дальнейшем независимым от митоген-зависимого циклина D. Таким образом, циклин E является более удачным кандидатом на роль R-белка, чем циклин D. Зависимость от ростовых факторов заканчивается в момент полного фосфорилирования Rb, после чего клеткам остается только пройти через точку рестрикции и двигаться по циклу дальше. Таким образом и циклин D и циклин E, а также и циклин A связанные CDKs фосфорилируют Rb. R-белок разделяется, как минимум, надвое.

Кроме того, E2F-1 частично тоже обладает свойствами R-белка. Именно он необходим для начала фазы S. История поиска R-белка показывает, как, расширяясь, наши знания приводят к выводу о существовании не точки, а узла (knot) рестрикции. Современные

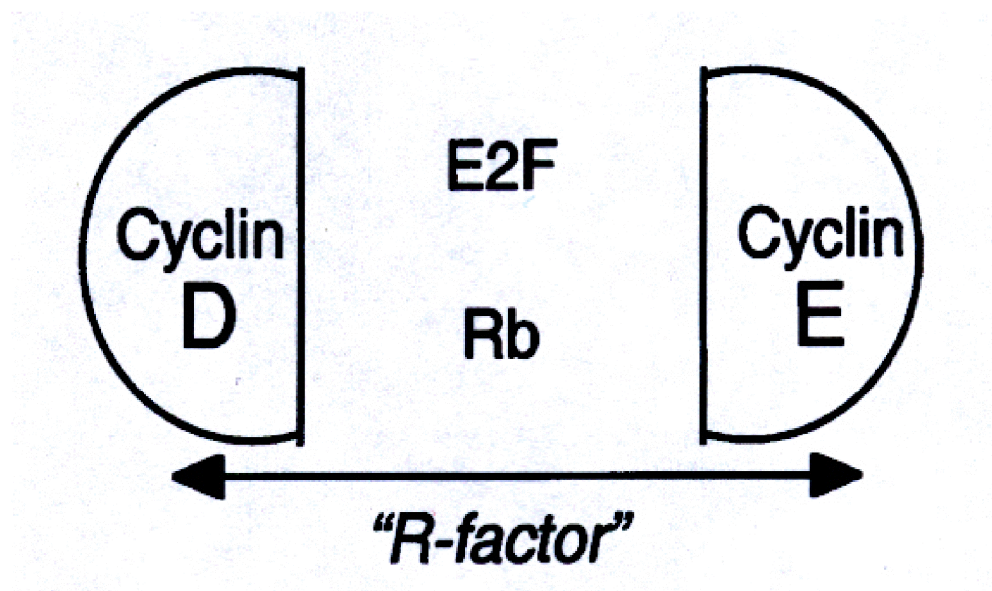


Рис.33. Представление о природе точки рестрикции.

6.4.1.Точка рестрикции и G1-чекпойнт

Вероятно, точка рестрикции расположена между пиками накопления циклинов D и E и активацией циклин E/Cdk2. Какова же

топологическая связь между зависимой от факторов роста точкой рестрикции и вызванным повреждением ДНК G1-чекпойнтом?

ДНК-повреждения действуют на CDKs двумя путями. Первый – быстрое и проходящее удаление циклина D. Путь, индуцированный повреждениями ДНК, влияет на циклин D и комплекс циклин E/Cdk2. После ДНК-повреждения циклин D быстро деградирует в 26S протеасомах. Деградация циклина D приводит к высвобождению белка p21 из комплекса с Cdk4 и ингибирования им Cdk2. Т.е. в ответ на повреждение ДНК p21 может перераспределяться в ядре без увеличения своего количества. Это p53-независимый процесс (как, собственно, p53-независим и сам контроль точки рестрикции). Отсутствие выраженного G1-ареста в клетках с функционально неактивным p53 связано с тем, что «резервуар» p21, связанного с циклин D/Cdk4 комплексом, после повреждения ДНК быстро истощается.

Второй путь – p53-зависимая индукция p21, также приводящая к подавлению активности циклин E/Cdk2 комплекса. Одновременно происходит накопление самого p53. Это приводит к индукции p21 и выраженной остановке роста. Белок Rb также является важным компонентом этого чекпойнта. Этот чекпойнт-ответ использует обычную машину клеточного цикла для того, чтобы индуцировать накопление Rb в гиперфосфорилированной форме, супрессирующей рост и пролиферацию клетки.

Ингибитор протеинкиназ стауроспорин останавливает движение по клеточному циклу в нормальных нетрансформированных клетках в G1 фазе между пиками активности циклинов D и E. Напротив, ингибитор гистоновых деацетилаз FR901228 приводит к нефизиологическому G1-аресту путем подавления циклина D и активации циклина E в опухолевых клетках, лишенных нормального контроля клеточного цикла. Очевидно, что результаты воздействия на системы контроля клеточного цикла в нормальных и трансформированных клетках существенно различаются.

6.4.2. Остановка деления или пролиферация?

Отдельный активирующий сигнал, поступающий после точки рестрикции, вызывает вход в S-фазу. Но в некоторых случаях может вызвать и апоптоз. Апоптоз подавляется EGF-зависимыми событиями, происходящими до точки рестрикции. С другой стороны, выбор между пролиферацией и остановкой роста в ответ на действие ростовых факторов и ингибиторов определяется состоянием «узла рестрикции» (restriction knot). Это всегда нужно учитывать при постановку эксперимента.

Хорошо известно, что экзогенные стимулы, такие как EGF, TGF β , CSF-1, интерлейкины и фтороловые эфиры, а также внутриклеточные сигнальные молекулы, такие как Ras, PKC, Raf-1, ERK могут вызывать как продвижение по циклу, так и его арест. Понимание этого столь просто, что часто оказывается вне зоны наблюдения: стимуляция роста происходит тогда, когда агент действует на покоящуюся клетку, в то время как остановка цикла – при его действии на клетку пролиферирующую.

Это очевидно, так как мы знаем, что митогенный сигнал одновременно активирует экспрессию циклина D и ингибиторов p21 и p27. Не уровень сигнала, а статус клетки определяют ответ. В покоящихся клетках можно обнаружить низкий базовый уровень циклинов DI и E, но высокий уровень ингибитора CDK p27. В пролиферирующих клетках наоборот, обнаруживается высокий уровень циклинов DI и E, но низкий – p27. В покоящихся клетках низкий уровень активности Raf-1 индуцирует циклин DI и пролиферацию, а в делящихся фибробластах высокий уровень Raf-1 приводит к остановке деления через активацию p21.

Факторы транскрипции E2F-1 и H-Ras могут влиять на промотор p21, причем индукция p21 активированным Ras частично опосредуется E2F-1.

Один и тот же стимул может вызывать различные последствия в зависимости от Rb-статуса. Индуцированная цитокинами экспрессия p21, которая в нетрансформированных клетках блокирует переходы G1/S или G2/M, не может предотвратить переход G1/S в клетках с

отсутствующей или подавленной активностью белка Rb, что приводит к эндоредупликации ДНК и нарушению хромосомной стабильности.

Для клеточного ответа также важен и уровень белка p21. Например, в клетках с низким базовым уровнем p21, повреждения ДНК вызывают только G2-арест, но не G1-чекпойнт. Более высокий уровень p21 останавливает клетки и в G1.

6.5.Координация ядерных и цитоплазматических процессов во время клеточного цикла

Важным вопросом регуляции клеточного цикла является то, каким образом Cdkс координируют ядерные и цитоплазматические функции клетки. В частности, эти белки гораздо менее статичны, чем было принято думать раньше, основываясь на результатах их иммунофлуоресцентного окрашивания. К примеру, Cdkс комплексы циклинов E и A на препаратах фиксированных клеток имеют преимущественно ядерную локализацию. В тоже время анализ живых клеток показал, что эти комплексы постоянно перемещаются между цитоплазмой и ядром. Такое челночное перемещение позволяет им фосфорилировать одновременно ядерные и цитоплазматические субстраты и, вероятно, позволяет им самим быть доступными для белков-регуляторов, расположенных в различных клеточных компартментах. Такое постоянное перемещение представляется одним из важнейших свойств Cdkс.

Глава 7. Пострепликативные модификации ДНК

7.1.Метилирование ДНК

Кроме того, что ДНК связана с различными белками, она также подвергается и энзиматическим модификациям, в первую очередь – метилированию. Нити образовавшихся при репликации молекул ДНК в течение какого-то периода времени различаются между собой: материнская нить метилирована, а дочерняя – нет. Процесс репликации ДНК сопровождается обязательным последующим метилированием дочерней ДНК. Несмотря на изучение энзиматического метилирования эукариот более 50 лет, мы еще далеки от всестороннего понимания функциональной роли этой модификации генома. При ее изучении был обнаружен CpG-тип метилирования ДНК животных и растений и CpNpG-тип (N - любой нуклеозид) метилирования ДНК высших растений.

Современный этап исследований энзиматического метилирования ДНК эукариот связан с революционными достижениями современной биологии в области молекулярной генетики, секвенирования метилированных ДНК, а также с выделением и исследованием самих ДНК-метилтрансфераз (ДНК-метилаз). В настоящее время установлено участие энзиматического метилирования ДНК эукариотических организмов в регуляции транскрипции генов, клеточной дифференцировке и эмбриональном развитии, эпигенетическом контроле геномного импринтинга и инактивации мобильных генетических элементов. Оно обнаружено как у млекопитающих, так и у высших растений. Нарушение нормальной картины метилирования ДНК сопровождается канцерогенезом и генетическими заболеваниями человека. Существенные успехи в исследовании функций метилирования ДНК достигнуты после открытия белков, связывающихся с метилированными CpG -последовательностями ДНК и мобилизующих в эти участки гистоновые деацетилазы, которые формируют транскрипционно неактивную структуру хроматина. В этом смысле «метилирование встречает ацетилирование», т. е. метилирование ДНК и деацетилирование гистонов могут быть прочно сопряжены с формированием нетранскрибируемой структуры хроматина.

В структурно-функциональном исследовании энзиматического метилирования эукариотических ДНК существует значительный пробел,

обусловленный изучением только CpG-типа этой модификации. В настоящее время выясняется связь других сайт-специфических типов метилирования эукариотических ДНК с разными генетическими функциями. Анализ же картины метилирования целого эукариотического генома, на фоне которого развиваются нормальные и нарушенные процессы жизнедеятельности клетки, позволит понять функциональное значение этих типов метилирования ДНК и определить роль индивидуальных ДНК-метилаз в специфических генетических процессах.

7.1.1. Цитозин(C5)-ДНК-метилтрансферазы эукариот

Цитозин(C5)-ДНК-метилтрансферазы катализируют перенос метальной группы с 3-аденозилметионина на остатки цитозина в специфических последовательностях двунитевой ДНК с образованием 5-метилцитозина и 5-аденозилгомоцистеина. Эта реакция необратима. Сравнительный анализ первичных структур прокариотических и эукариотических ДНК-метилаз позволяет отнести их к одному классу ферментов, имеющих одинаковую структуру каталитического домена. Все эти ферменты являются мономерными белками и отличаются присутствием в их структуре ряда консервативных гомологичных областей (мотивов), детерминирующих специфические ферментативные функции. В структуре большинства цитозин(C5)-ДНК-метилтрансфераз присутствует до 10 консервативных участков, расположенных в строго определенной последовательности. В результате сравнения первичных структур цитозин(C5)-ДНК-метилтрансфераз обнаружена связь каталитической функции этих ферментов с их консервативными мотивами, в то время как функция сайт-специфического узнавания связана с варибельным участком TRD (target-recognizing domain). Анализ аминокислотных последовательностей цитозин(C5)-ДНК-метилтрансфераз выявляет среди 10 консервативных блоков аминокислот четыре мотива с умеренной гомологией (II, III, V и VII), которые могут отсутствовать у некоторых ферментов, и шесть мотивов с высокой степенью гомологии (I, IV, VI, VIII, IX и X). Между VIII и IX мотивами расположена варибельная область TRD, существенно

122

различающаяся у сайт-специфических метилтрансфераз по ее аминокислотной последовательности и длине. Таким образом, консервативные мотивы ответственны за осуществление общей для всех метилтрансфераз функции каталитического переноса метильной группы с молекулы 5-аденозилметионина на ДНК, в то время как переменная область TRD определяет узнавание специфической последовательности ДНК и метилирование в ней гетероциклического основания. Схема структуры Dnmt1 приведена на рис.34.

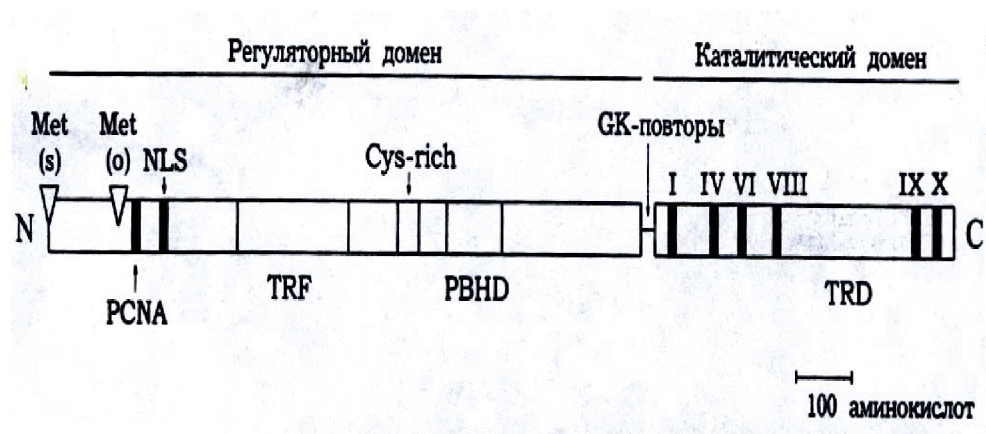


Рис.34. Структура Dnmt1-семейства ДНК-метилтрансфераз.

На рис. 34 видно, что N- и C-концевые домены белка разделены G-К-повторами. Римскими цифрами обозначены основные консервативные мотивы C-концевого каталитического домена. В N-концевом регуляторном домене отмечены функциональные последовательности, определяющие связывание ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), сигнал ядерной локализации (NLS), нацеливание белка в точки репликации ДНК (TRF), связывание с ионами Zn^{2+} (Cys-rich), гомологию с полибромо-1-белком (PBHD). Met(s) и Met(o) показывают N-концевые положения соответственно соматической и ооцит-специфической форм белка.

Эукариотические ДНК-металазы осуществляют метилирование цитозина в полуметилированной реплицирующейся ДНК в симметричных последовательностях CpG и CpNpG. Это соответствует полуконсервативному (как и синтез ДНК) типу наследования картины метилирования родительской ДНК, называемое поддерживающим метилированием, а также метилирование полностью неметилированных последовательностей ДНК, называемое метилированием *de novo*.

7.1.1.1. Семейство Dnmt1

Структурно-функциональное исследование генов эукариотических ДНК-метилаз началось значительно позднее аналогичных исследований у прокариот. Впервые кДНК гена DNMT1 (DNA-methyl-transferase 1), кодирующего полноразмерный ген мышинной ДНК-метилазы, была клонирована в 1988 г. Это белок, состоящий из 1620 аминокислотных остатков с молекулярной массой 190 кДа, проявляющий оптимальную метилтрансферазную активность на полуметилированной ДНК. Размер этого фермента по сравнению с прокариотическими ферментами значительно увеличен, что обусловлено наличием на N-концевой части Dnmt1 регуляторного домена, составляющего две трети всей молекулы. В клетке ДНК-метилаза Dnmt1 выполняет функцию поддерживающего метилирования ДНК, специфичность которой контролирует N-концевой домен. N-концевой домен ДНК-метилазы Dnmt1 позволяет ферменту различать в ДНК неметилированные и полуметилированные CpG-последовательности и предпочтительно метилировать *in vitro* и *in vivo* эти полуметилированные сайты. Лишенный своего N-концевого домена, фермент теряет это свойство и превращается в обычную прокариотическую ДНК-метилазу. Однако недавно это положение пересмотрено и показано, что существенная часть N-концевого домена без первых 300 аминокислот требуется также и для энзиматической активности метилазы Dnmt1. Предполагается, что N-концевой домен нужен для правильного формирования третичной структуры метилазы

124

Dnmt1. кДНК гена Dnmt1 человека клонирована и охарактеризована. Структура этой метилазы, включая N-концевой домен, близка к структуре соответствующей метилазы мыши.

По-видимому, ген DNMT1 возник путем слияния гена прокариотической ДНК-метилазы с одним или двумя генами, кодирующими ДНК-связывающиеся белки.

ДНК-метилаза Dnmt1 ассоциирована с областью репликации ДНК в течение S-фазы и распределена диффузно в нуклеоплазме в клетках, находящихся вне S-фазы. Метилаза Dnmt1 человека и животных является компонентом репликативного комплекса. На это указывает, в частности, способность фермента связываться с ядерным антигеном пролиферирующих клеток человека. N-концевой регуляторный и C-концевой каталитический домены молекулы Dnmt1 связаны GK-аминокислотными повторами. Следует отметить, что ДНК-метилаза Dnmt1 содержит в своем N-концевом домене аминокислотные последовательности, гомологичные транскрипционному репрессору HRX, посредством которого фермент ассоциирован *in vivo* с гистоновыми деацетилазами. Список некоторых белков, способных ассоциировать с эукариотическими ДНК-метилазами, представлен в табл. 3.

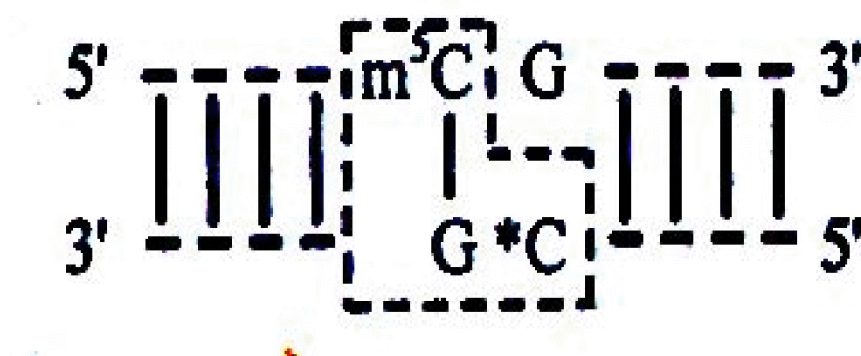


Рис.35. Субстратная специфичность ДНК-метилтрансфераз семейства Dnmt1.

Хотя Dnmt1 предпочтительно работает на полуметилированных сайтах, этот фермент способен также метилировать необычные субстраты с различными структурными аномалиями. Мышиная ДНК-метилаза способна метилировать также и одонитевую ДНК, если она содержит в своей цепи m^5C . Предполагается, что фермент распознает присутствующий в одонитевой цепи ДНК m^5C в качестве сигнала для метилирования немодифицированных остатков цитозина в последовательностях CpG и работает на петлевых участках одонитевой цепи. Аналогичной способностью модифицировать одонитевые ДНК обладает ДНК-метилаза *E.coli* dam, участвующая в процессах репликации и репарации ДНК. Сайт m^5C может также служить сигналом для Dnmt1 на полуметилированной и полностью неметилированной последовательностях CpG в двонитевых субстратах, причем скорость метилирования *de novo* таких полуметилированных субстратов в несколько раз выше скорости метилирования немодифицированных субстратов.

Dnmt1 человека может избирательно узнавать и метилировать полуметилированные асимметричные двонитевые ДНК, несущие «целевую мишень» CpG на одной цепи и спаренный с ней метилированный цитидиновый остаток в комплементарной цепи. Интересно, что соседство этого метилированного цитидина в своей цепи с гуанозином не обязательно: соседом может быть любой нуклеозид или его производное. На рис. 35 показано, как полуметилированная дуплексная последовательность детерминирует метилирование цитозина (*C) в CpG-последовательности нижней цепи. Видно, что C не обязательно должен быть спарен с G верхней цепи. Асимметричный сайт узнавания заключен в рамку.

Оптимальные для метилирования *de novo* субстраты содержат между немодифицированными динуклеотидами CpG другие последовательности длиной 13-17 нуклеотидов. Важно также отметить метилирование *de novo* мышинной ДНК-метилазой остатков цитозина в последовательностях, отличающихся от CpG, и более выраженное

проявление этой способности на односторонней ДНК. Вероятно, наблюдаемый в клетках различных эукариот несимметричный тип метилирования в ДНК остатков цитозина может осуществляться ДНК-метилазами при участии специальных регуляторных факторов, модулирующих специфичность узнавания метилируемой последовательности.

Инактивация гена мышинной метилазы Dnmt1 приводит к значительному (до 70%) снижению общего уровня метилирования генома и к гибели развивающихся эмбрионов. Данные о сохранении 30%-ного уровня метилирования ДНК и способности эмбриональных стволовых клеток, лишенных метилазы Dnmt1, метилировать ретровирусную ДНК *de novo* указывали на выполнение этих функций другими ДНК-метилазами. Поиск таких ДНК-метиляз у животных выявил новые ферменты семейств Dnmt2 и Dnmt3.

7.1.1.2.Семейство Dnmt2

ДНК-метилаза Dnmt2 состоит из 415 аминокислотных остатков и лишена N-концевого домена. Активность этого фермента была обнаружена в клетках человека и дрозофилы. В эмбриональных стволовых клетках мыши инактивация гена Dnmt2 путем гомологичного нокаута не выявила заметного изменения в поддерживающем метилировании и метилировании ДНК *de novo*, что оставляет функцию этого фермента неясной. У растений и грибов также выявлены гены «коротких» ДНК-метиляз.

7.1.1.3.Семейство Dnmt3.

Функцию метилирования ДНК *de novo* выполняют ДНК-метилазы Dnmt3a и Dnmt3b. Dnmt3a и Dnmt3b человека состоят из 908 и 859 аминокислотных остатков соответственно, причем ген DNMT3B путем альтернативного сплайсинга может кодировать и ряд более

коротких полипептидов. кДНК генов DNMT3A и DNMT3B мыши проявляет высокую гомологию с соответствующими кДНК человека. На функцию метилирования ДНК *de novo* этих белков указывает равная эффективность модификации ими последовательностей CpG в полуметилированных и неметилированных нативных и синтетических субстратах, а также значительное уменьшение их активности в зрелых соматических тканях. Высокая экспрессия генов DNMT3A и DNMT3B отмечена в недифференцированных эмбриональных стволовых клетках. В этих клетках метилазы Dnmt3a и Dnmt3b играют важную роль не только в установлении, но и в поддержании общей картины метилирования ДНК. В то же время в этих дифференцирующихся клетках и в соматических тканях взрослого организма экспрессия этих генов крайне мала. Инактивация генов DNMT3A и DNMT3B путем гомологичного нокаута в эмбриональных стволовых клетках приводила к потере способности этих клеток метилировать ретровирусную ДНК *de novo*. Эти гены существенны также для нормального постэмбрионального развития мышей: дефектные по этим генам животные погибали спустя четыре недели после рождения.

Хотя ферменты Dnmt3a и Dnmt3b выполняют сходные или перекрывающиеся функции, они проявляют и специфические различия. Так, метилаза Dnmt3b отвечает за метилирование центромерных линкерных сателлитных повторов, а мутации гена DNMT3B у человека приводят к развитию ICF-синдрома (immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies). ICF-синдром — редкое аутосомное рецессивное заболевание, характеризующееся различными иммунологическими дефектами и аномальным строением лица. Он связан с нестабильностью центромерного гетерохроматина. При ICF-синдроме отмечается гипометилирование сателлитных ДНК II и III - главных компонентов конститутивного гетерохроматина.

Важно отметить присутствие в клетках млекопитающих особого белка семейства Dnmt3, обозначенного как Dnmt3L. Этот белок не проявляет метилтрансферазной активности, так как у него отсутствуют или укорочены несколько ключевых аминокислотных мотивов каталитического домена. В то же время в клетке Dnmt3L стимулирует

активность ДНК-метилаз Dnmt3a и Dnmt3b и взаимодействует с ними напрямую. Установлена совместная локализация всех белков семейства Dnmt3 в ядре и необходимость наличия Dnmt3L для регуляции метилирования ДНК *de novo* и установления геномного импринтинга. Следует отметить, что в ассоциации с гистоновой деацетилазой Dnmt3L выполняет также функцию транскрипционного репрессора.

При анализе ДНК эмбриональных стволовых клеток мыши был выявлен высокий уровень метилирования в ней последовательностей CpA и в меньшей степени - CpT (15—20 % общего метилирования цитозина). Это «не-CpG»-метилирование отмечено как в симметричных Cp(N)_npG-последовательностях, так и в несимметричных сайтах. В эмбриональных стволовых клетках с инактивированным геном ДНК-метилазы Dnmt1 доля «не-CpG»-метилирования увеличивалась до 45% общего метилирования ДНК, что указывало на связь этой ДНК-метилазной активности с генами DNMT3A и DNMT3B. Действительно, ДНК трансгенных клеток дрозофилы с экспрессируемым в них геном DNMT3A наряду с последовательностью CpG содержала метилированный цитозин и в последовательности CpA. Метилазы Dnmt3 имеют значительно укороченный N-концевой домен по сравнению с метилазой Dnmt1, но в этом домене имеются области связывания с различными репрессорами (см. табл. 3). Благодаря этому свойству все метилазы семейства Dnmt3 способны выполнять функцию транскрипционных репрессоров, независимую от их каталитической ДНК-метилтрансферазной функции.

7.2.Регуляция экспрессии и модуляция активности метилтрансфераз

В связи с участием метилирования ДНК в переключении различных генетических программ клетки, должны существовать и механизмы регуляции экспрессии и модуляции активности самих ДНК-метилаз. Исследование этих механизмов находится пока на начальной стадии. Отмечена скоординированная транскрипция генов ДНК-метилаз

DNMT1, DNMT3A и DNMT3B в нормальных тканях человека, однако она нарушена в опухолях. При этом на фоне умеренного повышения экспрессии генов DNMT1 и DNMT3A наблюдается значительное повышение экспрессии гена DNMT3B. Сложная структура генов эукариотических ДНК-метилаз и кодируемых ими белков предполагает наличие у них разнообразных регуляторных элементов. На генном уровне одним из способов регуляции экспрессии этих генов является альтернативный сплайсинг и транскрипция с разных промоторов. Так, ген DNMT1 мыши (>56 тпн) состоит из 39 экзонов размером от 32 до 352 пн. Большая изоформа ДНК-метилазы Dnmt1 транслируется с третьего ATG-кодона первого экзона, она присутствует в эмбриональных стволовых клетках и соматических тканях, а короткая изоформа транслируется с четвертого ATG-кодона четвертого экзона и обнаружена в ооцитах и преимплантационных эмбрионах.

Два секс-специфических экзона гена DNMT1 контролируют его экспрессию в ооцитах млекопитающих. Вероятно, различные изоформы ДНК-метилаз могут обладать разной субстратной специфичностью. Транскрипция человеческого гена DNMT1 может происходить с одного главного и трех минорных участков инициации и регулироваться независимыми промоторами и энхансерами, что соответствует существованию различных изоформ этого фермента в зародышевых и соматических клетках. Область главного промотора гена DNMT1 P1 отличается высоким содержанием последовательностей CpG, характерным для «хаус-киппинг» генов, а область минорных промоторов P2—P4 - дефицитом этих последовательностей. Показана тканеспецифичность и различных изоформ ДНК-метилазы Dnmt3b человека.

Метилирование самого ДНК-метилазного гена может регулировать его экспрессию. В эмбриональных стволовых клетках мышей с высокой экспрессией гена DNMT1 все динуклеотиды CpG в его промоторной области не метилированы, в то время как в дифференцированных клетках и тканях они метилированы. Между промоторами P1 и P2—P4 расположены три энхансера, активируемых протоонкогенным сигналом Ras-c-jun и репрессируемые супрессором

130

опухолей Rb. Таким образом, регуляция транскрипции гена DNMT1 играет существенную роль в реализации нормальных и онкогенных программ клетки. В структуре гена DNMT1 мыши содержится регуляторный элемент AP-1, активируемый Ras-jun-протоонкогенным сигнальным путем. В AP-1-регуляторной области расположены 29 динуклеотидов CpG, выполняющих функцию сенсора состояния метилирования генома. Выдвинута гипотеза о регуляции экспрессии гена DNMT1 по принципу обратной связи. Согласно этой гипотезе конечный продукт реакции метилирования, т. е. метилированная ДНК, регулирует экспрессию гена DNMT1 в *цис*-положении. Эта гипотеза объясняет парадоксальное явление сосуществования в раковых клетках общего неометилирования ДНК и высокого уровня ДНК-метиلاзной активности.

В ядре растительной клетки существует система контроля метилирования ДНК фитогормонами. Добавление к ядерным экстрактам проростков пшеницы гиббереллина, 6-бензиламино-пурина и фузикокина повышает на 30-65% уровень метилирования ДНК пшеницы. В то же время эти фитогормоны не оказывают стимулирующего воздействия на активность частично очищенных ДНК-метилазных препаратов, что указывает на их опосредованное действие через ядерные белки. Как отмечено выше, в N-концевом домене большинства эукариотических ДНК-метилаз присутствуют разнообразные функционально значимые последовательности, определяющие их ассоциацию с ядерными белками. Это позволяет предположить, что происходит регуляция активности ДНК-метилаз на уровне белок-белковых взаимодействий. Так, супрессор опухолей Rb способен модулировать активность метилазы Dnmt1 человека.

Модификация метилазы Dnmt3a убиквитиноподобным пептидом SUMO-1 модулирует ее взаимодействие с деацетилазами гистонов и функцию транскрипционного репрессора. Метилаза Dnmt3b также модифицируется пептидом SUMO-1. В настоящее время изучается роль метилирования ДНК в иерархии процессов установки эпигенетического статуса хроматина. Так, метилирование ДНК растений в последовательностях CpNpG контролируется первичным

метилованием гистона H3. Этот процесс осуществляется через взаимодействие хромометилазы SMT3 с гомологом гетерохроматинового белка HP1, который, в свою очередь, взаимодействует с метилированным лизином 9 гистона H3 (H3K9), модифицированным специфической лизиновой гистон-H3-метилтрансферазой. У *N.crassa* экспрессия активности ДНК-метиلاзы dim-2 контролируется также гистоновой H3K9-метил-трансферазой. В свою очередь, метилирование Lys9 в гистоне H3 может зависеть от первичного метилирования в ДНК последовательностей CpG. В последнее время установлено, что у большинства эукариотических организмов геномное метилирование осуществляют множественные ДНК-метилазы, специфически участвующие в различных генетических процессах, причем иногда даже без проявления своей каталитической метилтрансферазной функции. В клетках низших эукариот, обладающих только одной ДНК-метилагой, этот фермент способен выполнять множественные функции и модифицировать цитозин в различных специфических последовательностях ДНК за счет действия модулирующих факторов.

Особый тип контроля метилирования ДНК осуществляется на уровне ДНК-белковых взаимодействий. Так, фактор транскрипции Sp1 часто ассоциируется с неметилованными CpG-островками в промоторах хаус-киппинг-генов, запрещая *de novo* метилирование таких CpG-островков и поддерживая конститутивную экспрессию этих генов. Делеция промоторной области гена *APRT* с GC-боксами или мутации в них Sp1-узнаваемых последовательностей с CpG-сайтами приводили к метилированию *de novo* CpG-островков этого гена. Белки, так или иначе связанные с функционированием ДНК-метилагов приведены в табл. 5.

В то же время белки, связывающиеся с метилированной ДНК, могут поддерживать ее метилированное состояние. Поэтому следует отметить существование особого класса ДНК(m⁵CpG)-связывающихся белков. Вероятно, такие белки могут опосредовать жесткую обратную связь между CpG- и CpNpG-типами метилирования специфических генетических областей. Также эти белки могут определять

5.

Белки, ассоциированные с метилтрансферазами

ДНК-метилаза	Ассоциированный белок	Функция
Dnmt1	Dnmt3a Dnmt3b HDAC1 HDAC2 SUV39H1 Rb PML-RAR DMP1 h\$NF2H PCNA MBD2 MBD3 MeCP2 HP1β RNApolII	de novo ДНК-метилтрансфераза de novo ДНК-метилтрансфераза деанетилаза гистонов деанетилаза гистонов метилтрансфераза гистона H3Lys9 супрессор опухолей онкогенный фактор транскрипции корепрессор транскрипции хроматин-ремоделирующий белок фактор репликации ДНК связывание с CpG-метилованной ДНК связывание с CpG-метилованной ДНК связывание с CpG-метилованной ДНК белок гетерохроматина РНК-полимераза II
Dnmt3a	Dnmt1 DnmtL HDAC1 HDAC2 SUV39H1 PML-RAR RP58 HP1β SUMO-1	поддерживающая ДНК-метилаза репрессор транскрипции деацетилаза гистонов деацетилаза гистонов метилтрансфераза гистона H3Lys9 онкогенный фактор транскрипции корепрессор транскрипции белок гетерохроматина убиквитиноподобный пептид
Dnmt3b	Dnmt1 DnmtL HDAC1 SUMO-1	поддерживающая ДНК-метилаза репрессор транскрипции деацетилаза гистонов убиквитиноподобный пептид
DnmtL	Dnmt3a Dnmt3b	de novo ДНК-метилтрансфераза de novo ДНК-метилтрансфераза

	HDAC1	деацетилаза гистонов
--	-------	----------------------

безальтернативный CpG-типа гиперметилирования при некоторых формах рака.

Для диагностики, прогнозирования и терапии заболеваний, связанных с аномальным метилированием ДНК, также важен вопрос о статусе различных сайт-специфических типов метилирования в картине метилирования генома в норме и при патологии. Надо отметить, что в клетке ДНК-метилазы действуют не на уровне простых ДНК-белковых комплексов, а на уровне ДНК в структуре сложно устроенного хроматина. Именно на уровне хроматина окончательно реализуются взаимосвязи между модификацией генома и многочисленными эпигенетическими модификациями белков хроматина. В настоящее время детально изучается причинно-следственная взаимосвязь метилирования ДНК и модификаций ядерных белков в процессах организации хроматина.

Дальнейшие исследования структурно-функциональной картины метилирования эукариотического генома и путей его регуляции имеют большое значение для понимания молекулярных основ эпигенетических процессов.

Глава 8. Протеасомная деградация белков и ее роль в регуляции процессов ДНК-метаболизма

Процесс деградации белков как механизм регуляции содержания индивидуальных белков в протеоме уже давно не вызывает сомнения. Однако только сравнительно недавно появилась возможность экспериментально доказать определяющую роль убиквитин-протеасомного пути деградации в таких критических процессах, как клеточный цикл, онкогенез, транскрипция, дифференцировка, рост и атрофия тканей, продвижение субстратов по метаболическим путям, селективное удаление аномальных белков, процессинг антигенов. На сегодняшний день известно, что эукариотическая клетка имеет две

основные системы деградации белков. Первая - это лизосомы, содержащие набор кислых протеаз и других гидролаз. Однако, к настоящему времени стало ясно, что лизосомы участвуют только в разрушении белков, ассоциированных с мембранами, и чужеродных белков, захваченных во время эндоцитоза. Вторая система - это гидролиз белка по АТР- и убиквитин-зависимому протеолитическому пути, основным действующим элементом которого является мультисубъединичный белковый комплекс, называемый 26S протеасомой. Протеасома обнаружена как у самых примитивных эукариот, так и у высших организмов, и присутствует как в ядре, так и в цитоплазме, некоторые 26S протеасомы ассоциированы с эндоплазматическим ретикулумом и цитоскелетом.

Протеолитическое ядро (20S протеасома) найдено также у архей и некоторых эубактерий. Все это свидетельствует об абсолютной необходимости данного комплекса для нормальной жизнедеятельности клетки.

8.1. Структура 26S протеасомы

26S протеасома - это мультисубъединичный комплекс, состоящий из каталитически активного ядра и двух регуляторных субкомплексов, обладающий молекулярной массой около 2500 кДа, с коэффициентом седиментации 26S; этот комплекс способен гидролизовать белки, конъюгированные с убиквитином в присутствии АТР. Термин "протеасома" предложен ведущими исследователями в этой области К. Танака и А. Голдбергом и отражает, по их мнению, как протеолитическую (протеаза) функцию, присущую этому комплексу, так и его природу как дискретной частицы - сомы. Впервые 26S протеасома была выделена из различных объектов в конце 80-х гг.

На основании данных кристаллографии протеолитического ядра (20S протеасомы архей и дрожжей) и исследования структуры 26S протеасомы методами электронной микроскопии была предложена модель строения 26S протеасомы, представленная на рис.36.

26S протеасома представляет собой гантелеобразную симметричную структуру и состоит из центрального цилиндрического 20S ядра, или 20S протеасомы, осуществляющей собственно протеолиз, а также двух боковых регуляторных комплексов PA700 (Protein activator). Первоначально 20S протеасома получила несколько названий: мультикаталитический протеазный комплекс, 20S протеаза, просома, макропайн и другие. Однако наиболее употребительным в настоящее время является обозначение «20S протеасома». В последнее время распространение получили также следующие обозначения: CP (Core Particle) для 20S протеасомы, RP (Regulatory Particle) для PA700 и, соответственно, RP-CP для всей 26S протеасомы целиком.

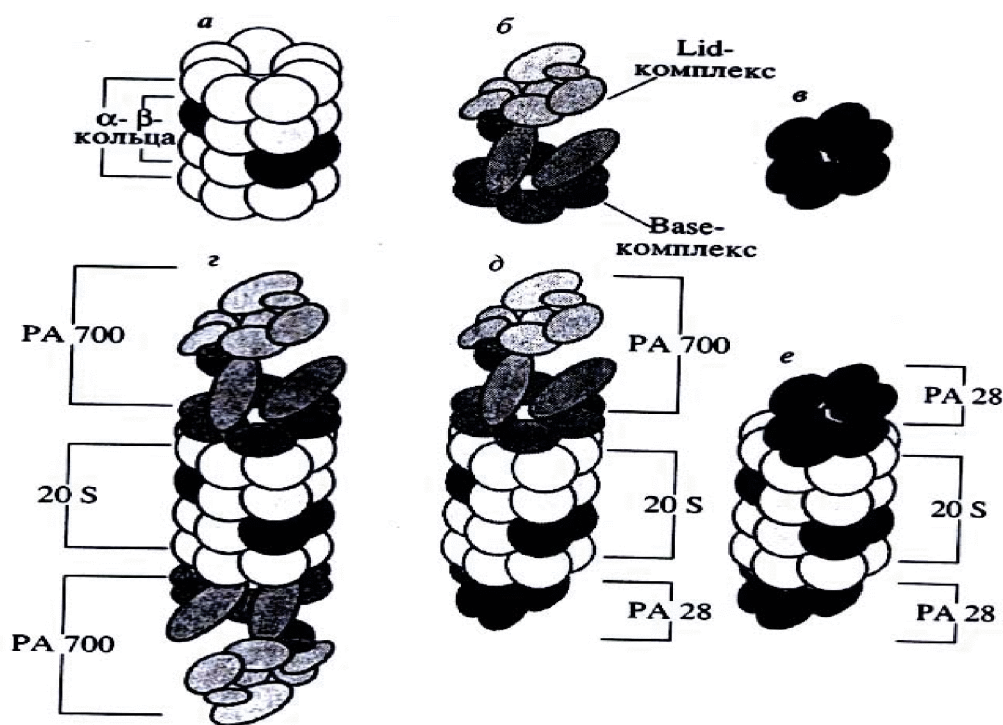


Рис.36.Схема строения 26S протеасомы (объяснения в тексте).

Необходимо отметить, что ряд исследователей употребляет термин «протеасома» только по отношению к 20S протеолитическому ядру, неспособному самостоятельно осуществлять АТР- и убиквитин-
136

зависимый протеолиз. При таком подходе 26S протеасома характеризуется как комплекс протеасомы с двумя регуляторными субкомплексами PA700 (PA700-20S-PA700 - рис. 36б,г). В некоторых случаях, которые будут описаны далее, 20S протеасома может объединяться с другим регуляторным субкомплексом - PA28, (PA28-20S-PA28 – рис. 36е). Также возможно существование гибридной формы протеасомы – PA700-20S-PA28 (рис.36д).

8.1.1. Структура 20S протеасомы

По данным рентгеноструктурного анализа 20S протеасома представляет собой полый цилиндр длиной 15-17 нм и диаметром 11-12 нм, состоящий из четырех лежащих друг на друге колец, каждое из которых образовано семью белковыми субъединицами с молекулярной массой от 20 до 35 кДа (рис. 36а). Полная масса 20S частицы составляет 750 кДа.

Наружные кольца сформированы семью субъединицами α -типа, а центральные – субъединицами β -типа. Внутри цилиндра имеется канал с тремя камерами-расширениями: одной большой, центральной, и двумя малыми, по краям. В центральной камере и осуществляется протеолиз поступающих в протеасому белков. Наиболее просто устроенные организмы, в частности археи, имеют только по две различных субъединицы α - и β -типа, а у дрожжей известно 7 различных субъединиц α -типа и 7 - β -типа. У млекопитающих это число еще выше, так как существуют изоформы некоторых субъединиц. В зависимости от типа ткани и стадии дифференцировки органа соотношение изоформ варьирует, и эти модификации имеют важнейшее физиологическое значение. Показано, что в культуре клеток γ -интерферон стимулирует экспрессию трех дополнительных протеолитически активных β -субъединиц (называемых индуцибельными, или иммунными), каждая из которых замещает определенную конституционно-экспрессируемую β -субъединицу. Субъединицы α - и β -типов обладают сходной третичной структурой, но различаются по аминокислотной последовательности.

Формирование четвертичной структуры (семичленного кольца) из α -субъединиц происходит без участия других компонентов, тогда как β -частицы сами не могут образовать кольцо. После формирования α -кольца с ним вступают во взаимодействие три β -субъединицы, одна из которых несет лидерный пептид, функционирующий как шаперон и отщепляющийся в процессе сборки протеасомы. Именно эти три белка определяют последующую посадку остальных β -частиц; в результате образуется 13S комплекс (~300 кДа) из одного α - и одного β -кольца. Затем происходит димеризация 13S комплекса в 16S предшественник. На этой стадии сборки протеасомы осуществляется процессинг β -субъединиц, при котором путем автокатализа отщепляются лидерные пептиды. Это способствует формированию активных протеазных каталитических центров. На заключительном этапе образуется зрелая 20S протеасома.

Кроме инициации сборки 20S частиц α -субъединицы выполняют еще несколько функций. Они являются местами связывания регуляторных комплексов, а их N-концевые гидрофобные участки образуют физический барьер, ограничивающий доступ цитоплазматических белков во внутреннюю протеолитическую камеру.

β -субъединицы формируют два центральных кольца, и именно на них локализованы каталитические центры, осуществляющие протеолиз.

8.1.2.Образование 26S протеасомы

Протеасома 26S образуется при связывании с 20S протеасомой в АТР-зависимой реакции активатора PA700. В результате этого взаимодействия 26S протеасома приобретает способность к протеолизу убиквитинированных белков, причем скорость гидролиза возрастает, т.е. наблюдается аллостерическая регуляция активности протеолитического ядра активатором PA700.

Активатор PA700 имеет молекулярную массу более 800 кДа и состоит, по крайней мере, из 17 различных полипептидов с

молекулярной массой от 25 до 110 кДа. По-видимому, он функционирует как «рот» для 20S протеолитического ядра, его субъединицы формируют два структурно и функционально различных комплекса, называемые lid- и base-комплексами (рис. 36б). Lid-комплекс состоит из 8 субъединиц, не обладающих АТРазной активностью (Rpn 3,5,6,7, 8, 9, 11, 12 - regulatory particle non-ATPase). Эти субъединицы отвечают за распознавание и подготовку убиквитинированных субстратов к деградации и взаимодействие с некоторыми непротеасомными белками.

Base-комплекс, прилегающий к 20S, включает три регуляторных субъединицы (Rpn 1, 2, 10) и шесть АТРАЗ (Rpt 1-6 - regulatory particle triple-A protein), которые играют важнейшую роль в работе 26S протеасомы. АТРАЗы PA700 относятся к АТРАЗам семейства AAA (ATPase associated with different cellular activities). Они участвуют как в АТР-зависимом процессе объединения PA700 и 20S протеасомы во время сборки 26S протеасомы, так и в гидролизе АТР при деградации убиквитинированных белков на этапах прикрепления субстрата, удаления или разрушения полиубиквитиновых цепей, раскручивания субстрата и его проникновения в 20S частицу, высвобождения олигопептидных продуктов.

Номенклатура субъединиц PA700 «Rnp» и «Rpt» относится к *S.serevisiae*, в случае высших эукариот названия основаны на «S»: например, Rpn2 соответствует S1, Rpn10 - S5a и т.д.

Показано, что присоединение PA700 приводит к открытию канала в α -кольце, при этом преодоление барьера из N-концевых участков α -субъединиц происходит под действием субъединицы Rpt2, одной из шести АТРАЗ base-комплекса.

В процессе образования 26S протеасомы необходимым этапом является фосфорилирование некоторых субъединиц как 20S протеасомы, так и PA700. По некоторым данным фосфорилирование/дефосфорилирование субъединицы Rpt6, непосредственно примыкающей к С3-субъединице α -кольца 20S протеасомы, регулирует сборку и диссоциацию 26S протеасомы. Показано, что *in vivo* фосфорилируются две α -субъединицы (С8 и С9)

20S протеасомы и, по крайней мере, четыре субъединицы PA700, причем под действием γ -интерферона снижается как уровень их фосфорилирования, так и количество зрелых 26S протеасом в целом. Эти результаты свидетельствуют, что ассоциация 20S протеасомы с PA700 является регулируемым процессом, и что фосфорилирование различных субъединиц протеасомы может быть одним из способов такой регуляции.

Генетика протеасомных генов достаточно хорошо исследована на дрожжах. Показано, что делеции в 13 из 14 генов, кодирующих α - и β -субъединицы 20S протеасомы, и в генах, кодирующих большинство компонентов PA700 (например, всех АТРаз), летальны. Этот факт еще раз подтверждает важность и необходимость протеасомы для жизни эукариотической клетки. Недавно у дрожжей *S.cerevisiae* была обнаружена общая система централизованной регуляции транскрипции. В промоторных областях 27 из 33 протеасомных генов был описан неизвестный ранее класс регуляторных UAS-последовательностей, названных PACE-последовательностями (Proteasome-associated control element). Короткоживущий белок Rpn4, присоединяясь к PACE, функционирует как общий транскрипционный активатор генов, кодирующих субъединицы протеасомы и ряд белков, связанных с убиквитин-протеасомным протеолитическим путем.

8.2. Система убиквитинирования

Основным субстратом 26S протеасомы являются белковые молекулы, несущие цепи полиубиквитина. Убиквитин - это небольшой полипептид, состоящий из 76 аминокислотных остатков. В его составе имеется семь остатков лизина, однако полимеризация этого белка с образованием полиубиквитиновой цепи происходит в случае протеасомной деградации через остаток Lys-48.

В эукариотических клетках существует специальная система ферментов: E1 или Uba – убиквити-активирующий (Ubiquitin-activated enzyme), E2 или Ubc – убиквитин-связывающий (Ubiquitin-conjugating enzyme) и E3 или Ubr – убиквитин-лигаза (Ubiquitin-recognition factor

или Ubiquitin-protein-ligase). Эта ферментная система узнает белки, несущие специальные деградационные сигналы, и осуществляет их конъюгацию с убиквитином через ϵ -NH₂-группу остатка лизина белкового субстрата. Высокая специфичность и селективность системы достигается за счет ее иерархичности. Так, в клетке существует только один фермент E1, активирующий молекулу убиквитина, образуя тиоэфирную связь с карбоксильной группой остатка Gly-76, и передающий ее на один из членов семейства убиквитин-конъюгирующих ферментов - E2. Геном дрожжей *S.cerevisiae* кодирует 13 E2-подобных белков, у млекопитающих их количество гораздо больше. Показано, что каждый E2-белок участвует в определенном клеточном процессе. Например, Ubc2/RAD6 вовлечен в репарацию ДНК, а Ubc3/CDC34 необходим в регуляции перехода от G1- к S-фазе клеточного цикла. Фермент из E2-семейства взаимодействует с одним или несколькими представителями семейства E3, функция которых заключается в ковалентном присоединении полиубиквитина к молекуле белка через изопептидную связь между остатком Lys субстрата и Gly-76 убиквитина. Минимальным сигналом для эффективного присоединения к протеасоме является цепочка из четырех убиквитиновых звеньев.

Сейчас известно около ста различных убиквитин-протеин-лигаз, которые и определяют, в конечном счете, высокую специфичность системы. Убиквитинирование субстрата, несущего определенный деградационный сигнал (часто таким сигналом является специфическое фосфорилирование), осуществляется различными группами ферментов E3, причем они могут соединяться с субстратом напрямую или через вспомогательный белок. Хотя о молекулярных механизмах катализа убиквитин-лигаз известно совсем мало, недавние исследования показали, что на основании структуры их каталитических доменов все известные пока E3-ферменты можно разделить на три класса.



Рис. 37. Убиквитин-зависимый протеасомный путь деградации белков

Первый класс – это E3, содержащие консервативную область в 350 аминокислотных остатков, которая получила название НЕСТ-домена (Homology to E6-AP carboxyl terminus) из-за своей гомологии с С-концом наиболее хорошо изученной убиквитин-лигазы E6-AP; второй класс – E3, содержащие мотив из восьми цистеиновых и гистидиновых остатков, которые удерживают два иона цинка, называемый RING-finger-доменом; третий класс - E3, содержащие U-box-домены, это новый класс убиквитин-протеин-лигаз с третичной структурой близкой к RING-finger-белкам, но без металл-хелатирующих аминокислотных остатков.

Цепи полиубиквитина служат для 26S протеасомы сигналом, что конъюгированные с ними белки должны быть деградированы. Предполагалось, что полиубиквитин узнаётся субъединицей Rpn10

комплекса PA700 и заякоривается на ней, удерживая белок на протеасоме. Однако, хотя Rpn10 и связывает некоторые полиубиквитинированные белки *in vitro*, но делеции гена RPN10 не являются летальными. Поэтому вопрос о том, какие из субъединиц PA700 отвечают за узнавание полиубиквитина, оставался открытым. По последним данным полиубиквитиновая цепь контактирует с Rpt5(S6') - одной из АТРаз PA700, причем этот процесс, так же как и последующее разворачивание субстрата, АТР-зависим. В процессе деградации белка полиубиквитиновые цепи высвобождаются и расщепляются до мономеров изопептидазами. Схема взаимодействия протеасомы и системы убиквитинирования белков представлена на рис. 37, она была предложена для наиболее изученного класса убиквитин-протеин-лигаз. содержащих НЕСТ-домены.

8.2.1. Субстраты 26S протеасомы

Роль 26S протеасомы заключается в избирательной АТР-зависимой утилизации белков, несущих специальные деградационные сигналы. Такими сигналами, отвечающими за присоединение убиквитина и последующую деградацию, могут быть как мотивы первичной структуры, так и вторичные посттрансляционные модификации. Первичными деградационными сигналами служат определенные N-концевые аминокислотные остатки (правило N-конца), а также некоторые небольшие аминокислотные последовательности внутри белковой молекулы - PEST-последовательности (такие специализированные последовательности имеет, например, дрожжевой циклин CLN3 фазы G1) и "desription box"-последовательности (они обнаружены у митотических циклинов). Посттрансляционной модификацией, определяющей деградацию ряда субстратов, является фосфорилирование. Этот процесс подробно описан для белка-ингибитора апоптозного фактора NF-κB - 1κBα. Ассоциация с некоторыми вспомогательными белками, такими как вирусные онкобелки (онкобелок E6 вируса папилломы человека) и молекулярные

шапероны, также служит сигналом для их убиквитинирования. Деградиационные сигналы обычно имеются у короткоживущих, частично разрушенных белков, или у белков с нарушенной третичной структурой. Как было сказано ранее, большинство белков, подвергающихся осуществляемому в клетке 26S протеасомой запрограммированному протеолизу, деградирует по АТР- и убиквитин-зависимому механизму. Однако есть ряд примеров, когда система убиквитинирования не задействована, а узнавание протеасомой осуществляется за счет каких-либо других механизмов. Так, деградация орнитиндекарбоксилазы (ODC), ключевого фермента биосинтеза полиаминов, происходит после нековалентного взаимодействия с белком антизимом, вызывающим диссоциацию каталитически активного димера и, вероятно, играющего роль убиквитинподобного шаперона.

Ранее считалось, что функции протеасомы заключаются только в избирательной деградации аномальных или неправильно сложенных белков, некоторых присутствующих в норме в клетке короткоживущих белков, а также в генерации антигенных полипептидов, представляемых на поверхность клетки молекулами класса 1 МНС (Major Histocompatibility Complex). В настоящее время доказано участие протеасомы в осуществлении целого ряда жизненно важных процессов в клетке. Установлено, что протеасома участвует и в медленной деградации части белков в клетках млекопитающих, например, при усилении деградиационных процессов в мышцах при различных патологических состояниях, а также в превращении ряда мембранных белков. Необходимо отметить, что существенный прогресс в понимании роли убиквитин-протеасомной деградации в различных клеточных процессах стал возможен благодаря применению ингибиторов протеасомы, которые легко проникают в клетку и селективно подавляют данный путь деградации белков.

В таблице 6 приведены белки, протеолиз которых осуществляется 26S протеасомой. Эти белки относятся, в основном, к так называемым короткоживущим белкам, время полужизни которых исчисляется минутами (например, Rpn4, ODC) или составляет менее трех часов (ENaC). Короткоживущими являются практически все факторы

144

регуляции транскрипции, онкобелки и супрессоры опухолей, белки, участвующие в регуляции клеточного цикла. В ряде случаев происходит только частичное расщепление белковой молекулы (например, p105) или протеолиз отдельной субъединицы в мультисубъединичных комплексах (например, 1кВ α , Sic 1).

Рассмотрим некоторые основные метаболические события в клетке, в которых участие протеасомы общепризнано.

1. *Онкобелки и белки-супрессоры опухолей.* Деграция ряда онкобелков и супрессорных белков опухолей (с-jun, с-fos, с-Mos, p53) в клетках млекопитающих происходит по убиквитин-зависимому протеасомному пути. Уровень онкосупрессорного белка p53 очень низок при ряде злокачественных заболеваний, вызванных онкогенным штаммом папилломавируса человека HPV (Human Papilloma Virus), хотя в клетках синтезируется нормальное количество и мРНК p53 и самого белка. Снижение количества p53 является следствием его ассоциации с присутствующим в клетке в норме белком E6-AP (E6-associated protein) и HPV-кодируемым онкобелком E6. Такое взаимодействие является сигналом для убиквитинирования и ускоренной деградации p53 протеасомой, что приводит к нарушению соотношения между процессами роста и апоптоза в зараженных клетках и к их злокачественному перерождению.

Концентрация онкобелка с-jun поддерживается в нормальных клетках на низком уровне также путем убиквитин-зависимой протеасомной деградации. При возникновении в системе деградации «сбоя» происходит накопление белка с-jun, что, в свою очередь, влечет за собой активацию его онкогенного потенциала и трансформацию клеток.

2. *Факторы транскрипции.* Наиболее подробно описано участие протеасомы в регуляции двуступенчатой активации ядерного фактора транскрипции NF-кВ (Nuclear factor кВ). Этот фактор регулирует экспрессию разных генов, в частности, участвующих в иммунном ответе и воспалительной реакции, и представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединиц p50 и p65. После убиквитин-зависимого протеолитического процессинга 105кДа белка-предшественника

образуется субъединица p50, которая в цитозоле связывается с субъединицей p65 и белком-ингибитором 1 кВ α в неактивный комплекс. Наличие этого комплекса не дает осуществляться NF-кВ-зависимой транскрипции. Для активации NF-кВ необходима 26S-протеасомная деградация ингибитора 1кВ α после его фосфорилирования по двум сайтам и убиквитинирования убиквитин-протеин-лигазой E3. Есть данные, что активность таких факторов транскрипции, как Gcn4p, H1F1, ICER и YAN, также регулируется убиквитин-зависимым протеолизом.

8.3. Роль протеасомы в регуляции клеточного цикла

Установлено, что убиквитин-зависимый протеолиз играет важнейшую роль в регуляции перехода от G1- к S-фазе, а также в процессе сегрегации хромосом при переходе от метафазы к анафазе и в последующем выходе из митоза. Переход от G1- к S-фазе детально изучен у дрожжей, он осуществляется по CDC34-зависимому механизму путем деградации G1-циклинов (циклинны дрожжей называются CLN2 и CLN3) и ингибитора циклин-зависимых киназ Sic1. CDC34 (Cell division cycle) является убиквитин-конъюгирующим ферментом E2. Регуляция стабильности субстратов CDC34-опосредованного убиквитинирования достигается за счет их фосфорилирования. Ингибитор циклин-зависимых киназ Sic1 стабилен во время ранней G1-фазы и препятствует преждевременной активации циклин-зависимых киназ S-фазы, но в поздней фазе G1 он быстро деградирует, и циклин-зависимые киназы S-фазы иницируют репликацию ДНК. Сходная ситуация наблюдается и у позвоночных, в клетках которых экспрессируются структурные и функциональные гомологи компонентов CDC34 пути.

APC (Anaphase promoting Complex), или циклосома, представляет собой белковый комплекс, содержащий убиквитин-протеин-лигазу E3, и осуществляющий при переходе от метафазы к анафазе убиквитин-зависимую протеасомную деградацию ингибиторов анафазы, а при выходе из митоза - митотических циклинов. Циклины A и

В имеют состоящий из 9 аминокислот консервативный фрагмент, названный «destruction box». После изменений именно в этом фрагменте они становятся объектами для убиквитинирования. У мутантов, утративших «destruction box», циклины не убиквитинируются и не деградируют, поэтому у них клеточный цикл останавливается в поздней анафазе.

8.4. Роль протеасомы в представлении антигенов комплекса МНС (Major complex of histocompatibility)

Синтезирующиеся в клетке аномальные и чужеродные белки также подвергаются деградации 26S протеасомой по АТФ- и убиквитин-зависимому пути. В результате гидролиза этих белков образуется набор полипептидов длиной от 5 до 24 аминокислот, часть из которых может являться антигенными эпитопами. Полипептиды длиной от 8 до 11 аминокислот соединяются в цитозоле с ТАР (Transporter associated with antigen presentation) и переносятся в эндоплазматический ретикулум, где они связываются в комплексы с молекулами класса I МНС и выносятся на поверхность клетки. Презентация этих антигенов дает возможность иммунной системе при помощи цитотоксических Т-лимфоцитов обнаруживать и разрушать клетки, экспрессирующие вирусные или другие необычные полипептиды. Центральная роль протеасомы в этом процессе была доказана опытами с использованием ее ингибиторов.

Связь протеасомы с иммунным ответом подтверждается и тем, что гены двух из трех γ -интерферон-индуцибельных β -субъединиц протеасомы - LMP2 и 7 (Low molecular mass polypeptides) расположены в локусе генов комплекса МНС. В присутствии γ -интерферона три конституционные β -субъединицы, X, Y и Z замещаются на свои иммунные изоформы LMP2, LMP7 и MECL-1 (Multicatalytic endopeptidase complex-like-1) соответственно с образованием так называемой иммунопротеасомы. Хотя скорость протеолиза белков при подобной замене не возрастает, но существенно изменяется спектр образуемых при протеолизе полипептидов: в несколько раз возрастает

количество потенциальных антигенных полипептидов с «правильным» С-концом, необходимым для связывания с ТАР. В лимфоидных органах (селезенка, тимус и лимфатические узлы) эти субъединицы экспрессируются постоянно. Сравнение содержания конститутивно-экспрессируемой субъединицы Х и замещающей ее индуцибельной субъединицы LPM7 выявило различное их содержание в таких органах, как печень, селезенка, язык и гипофиз. Было показано, что специфичность разрезания пептидных субстратов сильно различается у протеасом, выделенных из мозга и гипофиза, где обнаруживается только обычная протеасома, и из селезенки, где присутствует преимущественно иммунопротеасома.

В эукариотических клетках обнаружен еще один активатор 20S протеасомы - PA28 (REG или 11S регулятор), который может ассоциировать *in vitro* с 20S протеасомой в отсутствие АТФ, образуя комплекс PA28-20S-PA28 (рис.36). Две субъединицы этого комплекса - PA28 α и PA28 β - индуцируются в ответ на действие основного иммуномодуляторного цитокина γ -интерферона, что указывает на важную роль этого активатора и его участие в иммунном ответе. Комплекс PA28 имеет молекулярную массу около 180 кДа. Он, как и PA700, присоединяется к дистальным α -кольцам 20S протеасомы. Рентгеноструктурный анализ показал, что при образовании комплекса между 20S протеасомой и PA28, происходит, как и при взаимодействии 20S протеасомы с PA700, открытие канала в α -кольце, однако это не приводит к утилизации таким комплексом белковых субстратов. PA28 активирует только гидролиз коротких полипептидов.

Физиологическое значение активации гидролиза пептидов активатором PA28 не совсем ясно, так как содержание свободных пептидов в клетках очень мало. Вероятно, роль PA28 может заключаться в регуляции продукции антигенных пептидов для представления молекулами класса I МНС. Во-первых, как уже говорилось, содержание субъединиц PA28 повышается под действием γ -интерферона. Во-вторых, PA28 изменяет специфичность разрезания полипептидов. В-третьих, повышенная экспрессия PA28 α после трансфекции приводит к более эффективной презентации антигенов. Существует два объяснения того,

148

как PA28 осуществляет более эффективную презентацию антигенов. Комплекс PA28-20S-PA28 может гидролизовать более длинные полипептиды, первоначально образуемые 26S протеасомой после деградации убиквитинированных белков. Также оба активатора - PA700 и PA28 - могут присоединяться к 20S протеасоме одновременно с образованием гибридной молекулы - комплекса PA700-20S-PA28. Возможно, гибридная протеасома способна осуществлять более эффективный гидролиз ряда субстратов с образованием антигенных полипептидов - убиквитинированный белковый субстрат узнается PA700 и транспортируется в полость 20S ядра, протеолитическая способность которой модифицирована активатором PA28. Было показано, что под действием γ -интерферона происходит накопление в цитоплазме формы PA700-20S-PA28. Предполагается также, что *in vivo* действие PA28 может заключаться в стимуляции высвобождения продуктов деградации.

8.5. Механизмы регуляции активности протеасомы

Механизмы, регулирующие экспрессию протеасомных субъединиц, содержание в клетке и внутриклеточное распределение различных типов протеасом, только еще начинают изучаться. В настоящее время можно предположить, что регуляция активности протеасомы осуществляется на следующих этапах:

1. При экспрессии изоформ β -субъединиц, а также при индукции иммунных изоформ β -субъединиц под действием γ -интерферона (в ответ на вирусную инфекцию). Эта экспрессия является тканеспецифической и зависящей от стадии дифференцировки. При этом происходит регуляция набора образуемых при протеолизе полипептидов без изменения скорости самого протеолиза. Например, у млекопитающих в норме в таких органах, как печень, селезенка и мышцы спектр β -субъединиц существенно отличается, а у дрозофилы на различных стадиях развития в различных тканях экспрессируются разные изоформы одной и той же субъединицы. Есть данные, что в незрелых

дендритных клетках присутствуют как конституционная, так и иммунопротеасома. а в зрелых – только иммунопротеасома.

2. Скорость протеолиза в определенной области клетки может регулироваться путем изменения внутриклеточного распределения 20S и 26S протеасом. Расположенный на α -субъединицах сигнал ядерной локализации NLS (Nuclear localization signal) позволяет протеасоме перемещаться сквозь ядерные поры из цитоплазмы в ядерный матрикс. Например, при созревании ооцитов аксолотля происходит перемещение 26S протеасомы в ядро; такое же запрограммированное изменение в распределении форм протеасомы происходит и в клеточном цикле. Локализация 26S протеасомы в определенных клеточных компартментах, видимо, связана с необходимостью ускоренного протеолиза в этих областях, как это, например, происходит при ассоциации 26S протеасомы с центросомой.

3. Превращение 20S комплекса в 26S может регулироваться различными внутриклеточными факторами. Таким фактором может быть увеличение внутриклеточного содержания кальция. Также превращение 26S протеасомы в 20S и PA700 и обратно имеет место на различных пролиферативных стадиях у дрожжей.

4. Фосфорилирование/дефосфорилирование различных субъединиц как 20S, так и 26S протеасомы может являться одним из механизмов изменения соотношения этих двух форм, а также гибридной (PA28-20S-PA700) протеасомы и иммунопротеасомы.

5. Ряд вирусных белков (HIV-1 Tat-белок, онкобелок 16 E7 папилломавируса человека, белок E1A аденовируса) могут взаимодействовать с протеасомными АТРазами, увеличивая скорость протеолиза внутриклеточных белков и приводя к более эффективной вирусной репликации. Другой путь регуляции активности протеасомы при вирусной инфекции (белок X вируса гепатита В) заключается во взаимодействии вирусных белков с субъединицами 20S протеасомы или регулятора PA28, супрессии в представлении вирусных антигенов и, тем самым, "ухода" вируса из-под контроля иммунной системы;

6. Процесс авторегуляции активности протеасомы может осуществляться на уровне транскрипции. У дрожжей *S.cerviseae* белок

150

Rpn4 является активатором транскрипции генов, кодирующих субъединицы протеасомы и некоторые другие компоненты системы убиквитинирования. Сам Rpn4 представляет собой короткоживущий белок с расположенным в N-концевой области деградиционным сигналом, благодаря которому Rpn4 напрямую взаимодействует с субъединицей Rpn2 активатора PA700 и не нуждается в предварительном убиквитинировании для 26S-протеасомной деградации.

7. Изменение сродства протеасомы к различным субстратам может происходить и за счет субъединиц активатора PA700. Субъединица Rpn10 экспрессируется в тканях мыши в виде 5 различных изоформ (Rpn10a-e), образующихся за счет альтернативного сплайсинга мРНК. При этом Rpn10a экспрессируется постоянно, а Rpn10e выявляется только в эмбриональных тканях, особенно в развивающемся мозге. Из этого можно сделать вывод, что 26S протеасома существует, по крайней мере, в двух функционально различных формах, одна из которых может играть специфическую роль в раннем эмбриональном развитии. Эти же две изоформы оказывают различное действие на деградацию циклина В в экстрактах яйцеклеток *Xenopus*.

8.6. Основные субстраты протеасомы

Использование ингибиторов активности протеасомы позволило показать, что в клетках млекопитающих до 90% всего клеточного белка (все короткоживущие и 70%-90% долгоживущих белков) подвергается первичной деградации по убиквитин-зависимому протеасомному пути. Осуществляя деградацию короткоживущих и ключевых регуляторных белков, данный протеолитический путь играет важнейшую роль в регуляции основных клеточных процессов, таких как клеточный цикл и деление, дифференцировка, эмбриогенез, апоптоз, сигнальная трансдукция, репарация ДНК, трансмембранный и везикулярный транспорт, реакция на стрессовые воздействия, в том числе иммунный и воспалительный ответ.

Нарушения в этой системе могут быть причиной развития многих заболеваний человека как врожденных, так и приобретенных. Среди них известны различные формы мышечных дистрофий, мужская

стерильность, некоторые формы злокачественного перерождения, нейродегенеративные заболевания (некоторые формы болезни Альцгеймера), нарушения иммунного и воспалительного ответа при вирусной и бактериальной инфекции. Предполагается, что изменения в функционировании протеасомного пути деградации связаны с накоплением окисленных белков при старении. В табл.6. приведены примеры белков, протеолиз которых осуществляется 26S протеасомой.

Таблица 6.

Белки, протеолиз которых осуществляется 26S протеасомой

Субстрат	Физиологическая роль в клетке
Факторы транскрипции	
NF-κB – p105 (предшественник p50), IκBα (ингибитор NF-κB) YY1	Двуступенчатая активация NF-κB, иммунный и воспалительный ответ Дифференцировка мышц, репрессор транскрипции α-актиновых генов
ATF2 (Activating transcription factor 2)	Ответ на стрессовые воздействия, мишенью которых являются гены циклина A. ДНК полимеразы β, E- селектина и другие, отвечающие за клеточный рост и дифференцировку
HIF1 (Hypoxia inducible factor 1)	Регуляция энергетического обмена клетки и ангиогенеза в ответ на дефицит кислорода
ICER (Inducible c-AMP early repressor)	Регуляция cAMP-зависимой антипролиферативной активности в нейроэндокринной системе
MyoD	Тканеспецифичный активатор транскрипции при дифференцировке

RXRα (Retinoid X receptor α) MATα2 Gcn4 Rpn4 IRF1 (Interferon regulatory factor 1) E2F	скелетных мышц, ингибитор клеточного цикла в G1-фазе¹ Ядерный рецептор, связанный с гепатоканцерогенезом Репрессор транскрипции "mating-type" генов у дрожжей, контроль слияния гаплоидных клеток Активатор транскрипции, синтез аминокислот и пуринов Регуляция транскрипции генов протеасомы, активатор Регуляция транскрипции генов интерферона и интерферон-индуцируемых генов, клеточный рост и апоптоз Семейство факторов транскрипции, регуляция клеточного цикла
Регуляторы клеточного цикла Дрожжи: CLN1, CLN2, CLN3 Sic1 Far1p Clb5 Dbf4 Высшие эукариоты: Cyclin D1 p27^{kip} p21^{cip}	Циклины G1-фазы клеточного цикла Ингибитор CDK S-фазы (CDC28-Clb5,6), задержка в G1-фазе Ингибитор CDK, остановка в G1-фазе под действием феромонов Циклин S-фазы. Поддержание клеточного гомеостаза Компонент пререпликативного комплекса Циклин G1-фазы, переход к S-фазе Ингибитор CDK S-фазы, остановка в G1-фазе

Cyclin A, cyclin B CUT2, PDS1 Germinin Cdc6 Cyclin E CENP-E, NIMA, PIMPLES	Ингибитор CDK S-фазы, остановка в G1-фазе Митотические циклины, выход из митоза Ингибиторы анафазы Ингибитор репликации ДНК Компонент пререпликативного комплекса Поздняя G1-фаза и ранняя S-фаза, поддержание кариотипа и нормального клеточного гомеостаза Контроль митоза и морфогенез веретена у млекопитающих, <i>Drosophila</i>, <i>Aspergillus</i>
Онкобелки и белки-супрессоры опухолей c-jun c-fos C-mos E2A (E12 и E47) (helix-loop-helix motif) p53 c-myc	Продукт протоонкогена, активатор транскрипции, клеточный рост и дифференцировка Клеточный рост, дифференцировка и трансформация, продукт протоонкогена Продукт протоонкогена, ключевой регулятор клеточного цикла Контроль клеточного роста и дифференцировки, трансформация. Соотношение процессов роста и апоптоза, супрессия опухолей Фактор транскрипции, контролирующий клеточный цикл и пролиферацию, продукт протоонкогена.
Ферменты РНК полимеразы II (большая субъединица)	Репарация ДНК

ДНК-топоизомераза II	Ядерный фермент, модифицирующий топологию ДНК
ДНК- топоизомераза I	Релаксация суперскрученной ДНК, эмбриональное развитие
Орнитиндекарбоксилаза	Ключевой фермент биосинтеза полиамнов
Фруктозо-1,6-дифосфатаза	Обмен гликогена, ключевой фермент глюконеогенеза
Мембранные белки	
CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)	Мембранный белок, транспорт ионов хлора через мембрану в секретирующих и реабсорбирующих ионы хлора эпителиальных клетках
ENaC (Epithelia Na ⁺ channel), субъединицы α , γ	Апикальная мембрана Na ⁺ транспортирующего эпителия, солевой и водный гомеостаз

Глава 9. Рекомбинация ДНК: связь с репликацией и репарацией

Процесс генетической рекомбинации был подробно разобран нами в учебном пособии «Повреждение и репарация ДНК». В данном случае необходимо остановиться на тесной связи рекомбинации и репликации.

9.1. Роль двунитевых разрывов ДНК в процессе рекомбинации

Двунитевые разрывы хромосом (double-strand breaks, DSBs) образуются после воздействия ионизирующего излучения или химических мутагенов, получивших название радиомиметиков. Также DSBs могут быть результатом действия ферментов, особенно во время процесса репликации ДНК. Например, к появлению DSBs может привести нарушение работы топоизомеразы II. Главную роль в репарации подобных

DSBs играет гомологическая рекомбинация, которая осуществляется чаще всего по принципу геномной конверсии. Также в некоторых случаях гомологическая репликация может инициировать процесс праймер-независимой репликации. Недавние открытия утверждают, что геномная конверсия и индуцированная разрывами репликация являются связанными процессами, причем оба начинаются с образования репликативной вилки, на обеих нитях которой, лидирующей и запаздывающей, идет синтез ДНК. Также произошел большой прогресс в описании и определении биохимической роли белков рекомбинации, являющихся высоко консервативными у всех эукариот от дрожжей до человека.

Репарация DSBs крайне важна для клеточного гомеостаз и в нее вовлечены большие ресурсы. Оставшись неотрепарированными, такие повреждения ведут к потере хромосом и/или индукции клеточной гибели. Будучи неточно репарированными они приводят к мутациям и хромосомным перестройкам. Мы остановимся на репарации ДНК путем одного из процессов гомологической рекомбинации, известного как геномная конверсия, при котором разорванная хромосома «залатывается» с помощью копирования информации с гомологичной хромосомы или сестринской хроматиды. Геномная конверсия наиболее консервативный способ репарации, при котором повреждение репарруется с минимальным количеством ошибок, по сравнению с другими репарационными системами, использующими рекомбинацию, например NHEJ и рекомбинация с кроссинговером (то есть с обменом нитями ДНК), обязательно сопровождающимися обширными делециями или маленькими инсерциями в районе разрыва.

Впрочем, и геномная конверсия иногда сопровождается кроссинговером взаимодействующих последовательностей, что может приводить к потере гетерозиготности в митотических клетках. Очень похожие процессы наблюдаются и в мейозе, причем они также инициируются DSBs. Обычно они описываются под названием мейотического кроссинговера.

В клетках млекопитающих, в противоположность дрожжевым, нерекombинационные пути репарации гораздо более действенны, чем путь,

использующий гомологическую рекомбинацию. Но недавно было показано, что гомологическая рекомбинация крайне востребована в тех случаях, когда DSBs появляются в результате различных биохимических процессов.

9.2.DSBs и процесс репликации

В лаборатории DSBs обычно классически получают путем действия на клетку ионизирующего излучения. В последнее время также часто используют индукцию DSBs эндонуклеазами во время таких процессов как мейоз или V(D)J рекомбинация иммуноглобулиновых генов у высших эукариот или переключение спаривания у дрожжей. DSBs могут возникать и при перемещении мобильных элементов. Все это крайне важно для специализированных клеток, таких, например, как клетки лимфоцитарного ряда.

Одновременно стало понятно, что сам процесс репликации может быть источником эндогенных DSBs, приводящих к рекомбинации. Об этом свидетельствует возникновение при ~ 10 сестринских хроматидных обменов на клетку. Из-за этого любые позвоночные животные без Rad51 нежизнеспособны. Гомологическая рекомбинация играет еще одну важную роль в репликации – она способствует ресинтезу, то есть восстановлению движения остановившейся репликативной вилки. Вилка репликации может быть остановлена спонтанным разрывом или при проходе уже существующего конца нити. Репарация в таком случае может идти путем генной конверсии или репликации, индуцированной разрывом (break-induced replication, BIR). Сейчас стало понятно, что эти два процесса имеют гораздо больше общего и гораздо теснее связаны, чем предполагалось ранее. Оба эти процесса начинаются с образования активных 3'-концов ДНК, которые внедряются в интактный дуплекс и спариваются с донорной матрицей. Это основной шаг для инициации синтеза ДНК при репарации DSBs.

9.3. Репликация, индуцированная разрывами. BIR (break induced replication)

Это процесс репликации, независимый от наличия ориджина репликации и праймера, но зависимый от рекомбинации. Впервые он был изучен на примере репликации фага Т4. К настоящему времени стало понятен механизм этого процесса: свободный 3'-конец ДНК проникает в ДНК-матрицу и образует репликативную вилку. Инициация репликации подтверждается наблюдением о наличии внепланового синтеза ДНК как при репарации DSBs, так и при восстановлении вилки репликации. Подобная же модель применима для объяснения репарации DSBs у дрожжей, когда более проксимальная от центромеры часть плеча хромосомы реплицируется путем BIR.

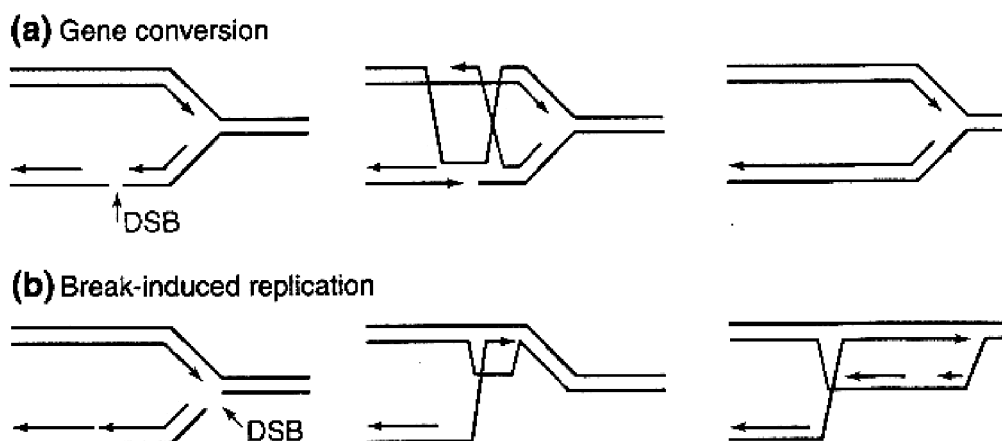


Рис.38.Генная конверсия и репликация, индуцированная разрывами ДНК

В гаплоидном геноме этот процесс может приводить к нерцепрокным транслокациям в том случае, если спаривание произойдет в неаллельном участке (а аллельно оно произойти не может из-за отсутствия аллельного партнера). По этому же механизму может идти встраивание линейной ДНК в неповрежденное плечо хромосомы дрожжей.

В опухолевых клетках млекопитающих этот процесс приводит к удлинению теломер в отсутствие теломеразы.

На рис. 38 показано сходство репликации, индуцированной разрывами в сравнении с генной конверсией. В обоих случаях необходим активный односторонний конец ДНК.

9.4.Генная конверсия

К настоящему времени предложено несколько различных моделей репарации DSBs. Долгое время наиболее популярной была модель, предложенная Шостваком. Она предполагает внедрение в матрицу двух 3'-концов (по одному от каждой стороны разрыва) и образование двух структур Холлидея, разрешение которых может идти как по кроссоверному, так и по некрассоверному типу. По этой модели вновь синтезированная ДНК присутствует и в донорной и в реципиентной ДНК, то есть является «полуконсервативной». Этот механизм, впрочем, не нашел своего экспериментального подтверждения. Во-первых, оказалось, что кроссоверные обмены при репарации DSBs крайне редки, что свидетельствует о том, что Холлидеевские структуры в этом случае разрешаются преимущественно без обмена нитей, или просто крайне редки, или даже вовсе не формируются. Во-вторых, появляющаяся в результате неполного спаривания донорной и реципиентной ДНК гетеродуплексная ДНК (то есть отличающаяся по последовательности в образующих ее нитях), редко обнаруживается у донора, но часто – у реципиента. Этого не могло бы быть при обычной (по модели Шоствака) расчистке разрыва с последующим спариванием нитей ДНК и синтезом, которая предполагает выравнивание последовательностей и отсутствие гетеродуплексности у реципиента. В-третьих, если зона рекомбинации содержит ДНК-повторы, то более 50% участков генной конверсии содержат их измененное (увеличенное или уменьшенное) количество копий, причем все эти изменения затрагивают реципиентную ДНК. Исходя из этих противоречий, было предложено несколько новых моделей репаративной рекомбинации, получивших общее название зависимого от

синтеза ДНК отжига нитей (synthesis-dependent strand annealing, SDSA). На рис. 39 для сравнения приведены модели Шостака и модели зависимо от синтеза ДНК отжига нитей.

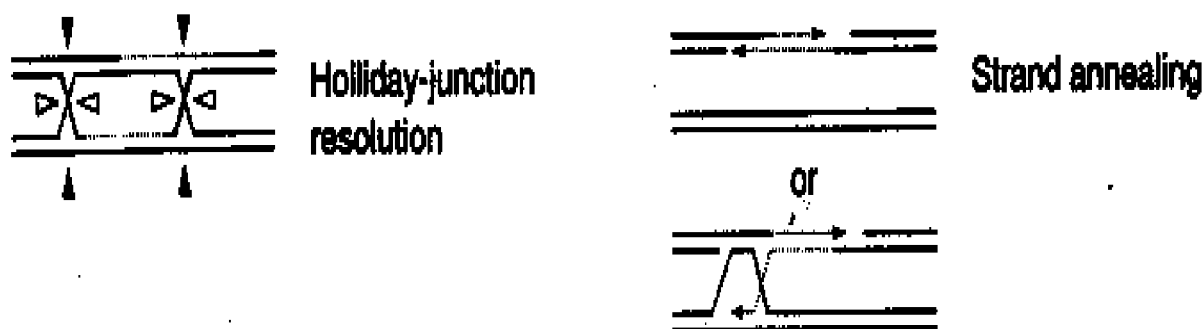


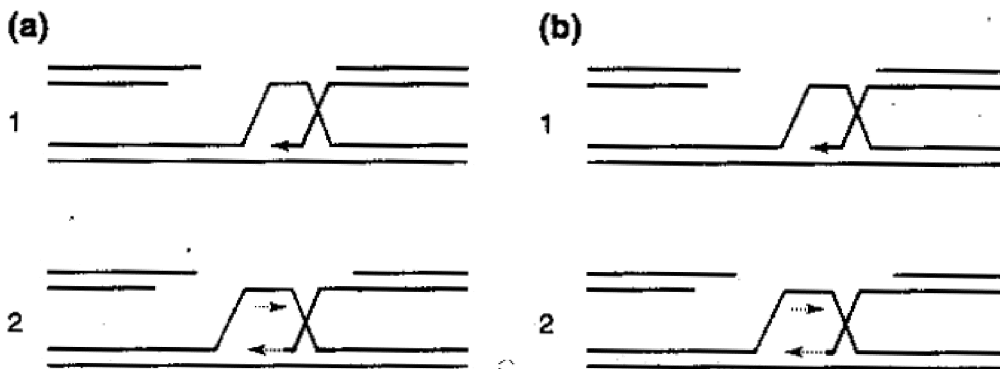
Рис. 39. Модель Шостака (слева) и модель зависимо от синтеза ДНК отжига нитей (справа).

Впрочем, нужно понимать, что SDSA может осуществляться и по модели Шостака – две полуконсервативные отреплицированные нити могут открутиться от их доноров и взаимно отжечься. В этом случае вся новосинтезированная ДНК оказывается у реципиента, а Холлидеевские структуры разрушаются за ненадобностью. Это хорошо согласуется с тем, что измененное число повторов встречается только в реципиентной ДНК.

Одновременно было высказано предположение, что новосинтезированная нить продолжает наращиваться за счет передвижения небольшого «пузырька» репликации, вроде того, что наблюдается при исследовании репликации «in vitro». Обычно вновь синтезированная нить спаривается со вторым концом DSB, но было показано, что этот второй конец сам может формировать «пузырек» репликации, и таким образом приводить к появлению Холлидеевской структуры, разрешающейся путем кроссинговера. Количество кроссоверных событий зависит от того, как часто формируются эти альтернативные структуры.

9.5. Захват репарационно-репликационной вилки

BIR и генная конверсия – тесно связанные процессы. При генной конверсии, как и в случае BIR, все начинается с внедрения в донорную ДНК одного конца DSB. Это внедрение формирует репликативную вилку, и на обеих нитях – отстающей и ведущей – начинается синтез ДНК. Генная конверсия произойдет, если вилка захватит второй конец DSB, который может отщепиться или с перемещающейся матрицей движущейся репликативной вилки, или с вновь синтезированной нитью, если она открутится от вилки репликации. В последнем случае не произойдет никакого кроссинговера, в первом – разрешение может пройти как по кроссоверному, так и по некроссоверному типу. Если в процессе митоза второй конец разрыва утрачен или деградирован (как на концах хромосом в клетках, утративших теломеразу) – то инициируется BIR. Из этого следует, что если митоз пройдет до того, как разрыв отрепарировается, то бесцентромерный участок будет утерян. Оставшаяся укороченная хромосома может быть впоследствии восстановлена также только путем BIR.



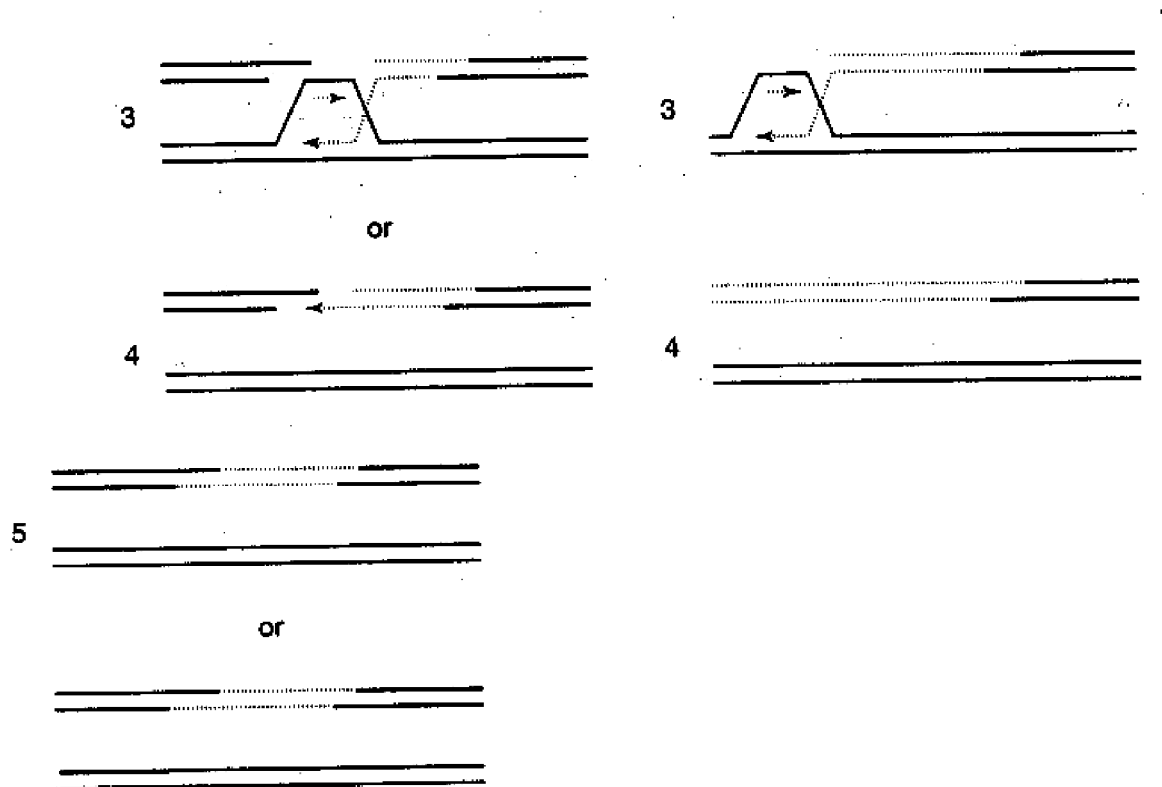


Рис.40. Захват репарационно-репликационной вилки. Генная конверсия (а) и BIR(б).

Недавно было показано, что вилка репликации при репарации ДНК включает в себя ДНК-полимеразы как ведущей, так и отстающей нитей и множество сопутствующих факторов. Хотя вилка репликации при рекомбинации может не содержать некоторых факторов, например, ДНК-геликаз, связанных с ориджинами репликации. Это может объяснить то, почему репаративная репликация часто приводит к перемещению вновь синтезированной нити и почему генная конверсия у дрожжей не приводит к синтезу протяженных участков ДНК (более 10 кб), хотя такая длина не является проблемой для нормальной вилки репликации.

Многие наблюдения подтверждают, что обе вновь синтезированные нити ДНК откручиваются от матриц и отжигаются друг с другом в реципиентном локусе. Это требует участия геликаз в перемещении нити, причем эти геликазы должны быть подобны RuvAB *E.coli*, связывающейся с холлидеевской структурой и способствующей ее разрешению. Белки

RuvAB играют важнейшую роль в ориджин-независимом, рекомбинационно-зависимом синтезе ДНК.

Конечно, механизм репарации DSBs, основанный на захвате репарационно-репликационной вилки, может осуществляться одним или несколькими различными описанными ниже путями. Выбор пути зависит от степени совершенства гомологии донора и реципиента. Также крайне важно, будет вовлечен в процесс один или оба конца двунитевого разрыва. Этапы возможных механизмов репарации DSBs, основанных на захвате репарационно-репликационной вилки представлены на рис.40.

9.6. Генетическая характеристика вовлеченных в гомологическую рекомбинацию белков-гомологов RecA

Наши знания о белках, вовлеченных в процесс гомологической рекомбинации, базируются в первую очередь на изучении бактерий и бактериофагов, главным белком рекомбинации которых является RecA.

У эукариот есть несколько эволюционно консервативных гомологов RecA, способных катализировать обмен нитями ДНК. Один из гомологов – Rad51, экспрессируется во всех клетках, другой Dmc1 – только в мейотических. Оба эти белка способны к переносу нити и переключению спаривания, их свойства подобны, но не идентичны свойствам белка RecA. Эукариоты без Dmc1 имеют тяжелые дефекты мейотической рекомбинации. В соматических клетках позвоночных Rad51 необходим не только для митотической рекомбинации, но и для нормального клеточного роста. Многочисленные исследования показывают, что большинство хромосомных aberrаций являются результатом DSBs, появившихся при репликации ДНК. Вопреки собственной универсальности, Rad51 не является необходимым для всех форм DSBs-индуцированной рекомбинации у дрожжей. Он необходим, как и Rad52, для процессов генной конверсии, происходящей с вовлечением двух гомологичных хромосом. Для других DSBs-индуцированных процессов он не столь необходим, например BIR может спокойно протекать в его отсутствии, но не в отсутствии Rad52. Как

внедрение нити и старт ДНК-репликации протекают в отсутствие Rad51, остается загадкой. Мутантный фенотип Rad51 сходен с мутантными фенотипами Rad54, Rad57 и Rad55.

Таким образом, самым важным для рекомбинации у дрожжей *S.cerevisiae* является белок Rad52, эволюционно крайне консервативный у эукариот. При его отсутствии у *S.cerevisiae* не идет никаких рекомбинационных процессов. Но, может быть, существуют какие-то его пока неизвестные гомологи. Например, у *S.pombe* есть два его гомолога, и только нокаут по обоим является летальным – клетки остаются заблокированными в S-фазе. Гомолог Rad52 - Rad59 у дрожжей может вести несколько типов Rad51-независимой рекомбинации. Белки Rad57 и Rad55 у дрожжей имеют большую гомологию с Rad51. Их мутации выявляют рекомбинационные дефекты при низкой температуре, но этот дефект может быть скорректирован оверэкспрессией Rad51. Вероятно, эти белки могут служить факторами поддержки для Rad51 при загрузке на ДНК, как RecFOR у прокариот. В тоже время, у *C.elegans* вообще нет гомолога Rad52.

У высших позвоночных напротив, Rad52 не столь важен, как Rad51. В клетках позвоночных есть также большое количество белков с некоторой гомологией с Rad51 – Rad51B, Rad51C, XRCC2, XRCC3. Эти белки играют свою роль в репарации, вероятно, подобную таковой Rad57 и Rad55 у дрожжей. Rad54 является членом обширного Swi/Snf2 семейства хроматин-ремоделирующих белков. Он имеет некоторую геликазную активность, но его точная роль в рекомбинации недостаточно ясна. Как и у дрожжей, у позвоночных его отсутствие приводит к повышенной радиочувствительности, вероятно в результате нарушения сродства к матрице. У дрожжей есть его гомолог Tid1 (Rdh54), влияющий на рекомбинацию между гомологичными хромосомами и не влияющий на таковую сестринских хроматид, что вызывает некоторые ассоциации с ролью Dmc1 в мейозе. Для рекомбинации двойной мутант по этим гомологам столь же тяжел, как мутант по Rad52.

9.7. Биохимические свойства белков гомологической рекомбинации

Наиболее важный белок Rad52 образует мультимерные (гексамерные) кольца, которые одновременно связывают концы и ведут отжиг. У человеческого Rad52 те же свойства. Rad52 связывается с Rad51, способствуя обмену нитей. Rad52 также связывается с RPA, необходимого для репликации ДНК. Интересно, что есть специальные мутации большой субъединицы этого комплекса, которые подавляет и генную конверсию и отжиг нитей, но не влияют на репликацию.

Rad51 и Rad52 белки взаимодействуют с множеством других белков Rad54, гетеродимером Rad55\Rad57. Ни один из этих белков не участвует в негомологическом воссоединении концов.

Любые стандартные опыты по изучению RecA/Rad51 опосредованного обмена нитей ДНК связаны с введением двунитевого фрагмента ДНК к одностранный ДНК кольцу, покрытому белком Rad51. В различных комбинациях с другими белками Rad51 проводит обмен нитей *in vitro*. Разумеется, у двунитевой и одностранный ДНК есть некоторая достаточная гомология. Схема подобного опыта представлена на рис. 41.

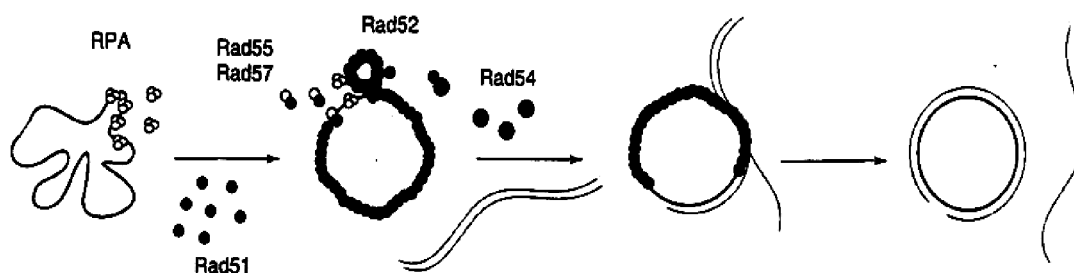


Рис.41. Схема реконструкции процесса рекомбинации *in vitro*

In vitro, и человеческий и дрожжевой Rad51 образуют на одностранный ДНК филамент, который может взаимодействовать с

гомологической двунитевой ДНК. Этот филамент растягивает двунитевую ДНК на 50% - то есть как бы удлиняет ее, причем может быть организовано два различных вытянутых состояния в зависимости от связывания с дезоксирибозой. Смена этих двух вытянутых состояний может, вероятно, быть двигателем обмена нитей, связанного с перемещениями Rad51 внутри филамента.

9.8. Наблюдение рекомбинации *in vivo*

Образование фокусов Rad51 во время мейоза. Это, вероятно, места рекомбинации. Делеции Rad52, Rad55, Rad57 предотвращают их образование как при нормальном мейозе, так и после γ -облучения.

Анализ температур-чувствительных мутантов ДНК-полимераз и факторов PCNA и RFC показывает, что они тоже необходимы для рекомбинации. Также оказалось, что для репарации DSBs совершенно необходима ДНК-полимераза- α -праймаза, то есть нормальный синтез ДНК на обеих нитях.

Изучение рекомбинации безусловно будет продолжаться и принесет свои плоды (например, как останавливать опухолевые клетки, делящиеся без активации теломеразы).

Заключение

В течение всего курса изучения репликации ДНК главной задачей представлялось создание общей картины взаимодействия большого числа генов и кодируемых ими белков в процессах поддержания стабильности передающейся по наследству информации и предотвращения нарушения процесса ее копирования. Новая парадигма – представление о динамических изменениях молекулы ДНК в процессе ее функционирования позволяет глубже понять происхождение и эволюцию живых организмов, их способность приспосабливаться к изменениям окружающей среды.

Детальное знание процессов репликации и рекомбинации ДНК, а также кинетики и молекулярных основ клеточного цикла могут быть продуктивно применены как в различных областях теоретической биологии, так и в прикладных исследованиях, например, при выработке стратегии сочетанной терапии опухолей. Одновременно нужно понимать, что даже в такой активно изучаемой последние 55 лет области, как ДНК-метаболизм до сих пор достаточно белых пятен. Может быть, именно вам посчастливится сделать новое большое открытие.

Список литературы

- Жимулев В.Ф.* Общая и молекулярная генетика. Сибирское университетское издательство. Новосибирск. 2003. 527 с.
- Коничев А.С.* Молекулярная биология: Учеб. Для студ. Пед. Вузов / М.: Издательский центр «Академия», 2005. 400 с.
- Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот. Учеб. Для биол. Спец. Вузов/ В.И.Агол, А.А.Богданов, В.А.Гволздев, А.И.Грагеров, А.М.Колчинский, А.Д.Мирзабеков, В.Г.Никифоров.; под ред. А.С.Спирина. М., Вычш. шк., 1990. 352 с.
- Патрушев Л.И.* Искусственные генетические системы. В 3-х т. Т. 1. Генная и белковая инженерия. М.: Наука. 2004. 526 с.
- Сингер М., Берг П.* Гены и геномы. В 2-х т. Т. 1. Пер. с англ. М.:«Мир». 1998. 373 с.
- Абрамова Е. Б., Шарова Н. П., Карнов В. Л.* Протеасома: разрушать, чтобы жить. Мол. биол., 2002. 36:761-776.

Бурьянов Я. И., Шевчук Т.В. ДНК-метилтрансферазы и структурно-функциональная специфичность модификации эукариотических ДНК. Биохимия. 2004. 69: 1474 – 1482

Завильгельский Г.Б. “Translesion synthesis”, или молекулярный «стипель-чез». Мол.биол., 2000. 34:201-209.

Крутяков В.М. Ферментативные механизмы антимутагенеза: роль автономных 3'→5- экзонуклеаз. Бреслеровские чтения. 2002. 85-94.

Куимов А.Н. Белковые компоненты теломерного нуклеопротеидного комплекса. Биохимия. 2004. 69:117-129.

Лаврик О. И. , Хлиманков Д. Ю., Ходырева С. Н. Репликативный комплекс эукариот и его исследование с помощью аффинной модификации. Биохимия. 2003 Мол. биол., 2003. 37:563-572.

Ланцов В.А. Рекомбинация, репарация и репликация: взаимосвязь и взаимозависимость. Бреслеровские чтения. 2002. 27-42.

Михайлов В. С. ДНК-полимеразы эукариот. Молекулярная биология. 1999. Мол. биол., 1999. 33:567-580.

Шарова Н.П. , Абрамова К.Б. Инициация репликации ДНК эукариот – интригующий каскад межбелковых взаимодействий. Молекулярная биология. 2002. 67:1217-1223.

Министерство образования и науки Российской Федерации

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

И.М.Спивак

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Учебное пособие

Санкт-Петербург
Издательство Политехнического университета
2011

Министерство образования и науки Российской Федерации

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

И.М.Стивак

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Учебное пособие

Санкт-Петербург
Издательство Политехнического университета
2011