J. REPLIKACJA DNA

1. OGÓLNE ZASADY

Model struktury dwułańcuchowej helisy DNA zaproponowany przez Watsona i Cricka wprost implikuje sposób replikacji DNA (**rys. 26**).

Matrycowa dwułańcuchowa helisa dysocjuje do pojedynczych łańcuchów DNA. Trójfosforany deoksynukleotydów komplementarne do matrycowych sekwencji są wprowadzane przez **DNA replikazy** (DNA polimerazy) i łączone ze sobą wiązaniami fosfodwuestrowymi.

Tworzą one nowe łańcuchy komplementarne do pierwotnych sekwencji. Taki sposób replikacji jest nazywany **semikonserwatywną replikacją**. Jej istnienie zostało eksperymentalnie udowodnione przez Meselsona i Stahla.

a. Enzymy replikujące DNA

Pierwszy enzym, polimeryzujący trójfosforany rybonukleotydów na łańcuchy podobne do RNA został izolowany z *Azotobacter agilis* w 1955 roku przez Ochoa i Grunberg-Manago. Ten enzym nie używał matrycy, nie był więc replikazą RNA. W roku 1956 Kornberg stwierdził w ekstraktach *E. coli* enzym polimeryzujący trójfosforany deoksynukleotydów tylko w obecności matrycy DNA (**DNA polimeraza I** lub enzym Kornberga). Obecnie wiemy, że ta DNA polimeraza I pełni rolę **reperazy DNA**, podczas gdy rzeczywistą replikazą DNA *E. coli* jest **DNA polimera**- za III, która jest wielocząsteczkowym kompleksem enzymatycznym (tab. IX).

Liczba kompleksów DNA polimerazy III w komórkach *E. coli* jest mała (od 20 do 30). Kompleks może dobudowywać komplementarne deoksynukleotydy do nici DNA (nowosyntetyzowanej), ale może także usuwać nukleotydy z końca 3' nowego łańcucha. Ta reakcja posiada znaczenie w usuwaniu nieprawidłowo wbudowanych nukleotydów. Jest nazywana **aktywnością korygującą replikazy** (*proofreading*).

Jak obecnie wiemy, żadna z dotychczas opisanych polimeraz DNA nie może samodzielnie inicjować syntezy DNA ani na jednołańcuchowych, ani na dwułańcuchowych matrycach DNA.

W komórkach ssaków znaleziono wiele polimeraz DNA. Główną rolę replikaz odgrywają trzy kompleksy nazywane **DNA polimerazą** α, **DNA polimerazą** β i **DNA polimerazą** ξ. **DNA polimeraza** β jest reperazą DNA, a **polimeraza DNA** γ jest specyficzną replikazą DNA mitochondrialnego.

Własności DNA polimeraz komórek ssaków zostały przedstawione w **tabeli X**.

Prekursorami replikacji DNA są trójfosforany deoksyrybonukleotydów. Energia uwalniana w dysocjacji pirofosforanu jest wystarczająca do stworzenia wiązania fosfodwuestrowego.

Opisano białka ochraniające i stabilizujące jednołańcuchowe odcinki DNA. Są one specyficzne dla organizmów.



Rys. 26. Replikacja DNA. Oba łańcuchy dsDNA (komplementarne i antyrównoległe) dysocjują i replikaza wbudowuje kolejne deoksyrybonukleotydy komplementarne do sekwencji jednołańcuchowych matryc. Niebieskie – matrycowe DNA, różowe – nowe łańcuchy DNA.

	DNA polimeraza I	DNA polimeraza III
Masa cząsteczkowa	109 000 Da	900 000 Da
Struktura	Monomer	Kompleks wielu podjednostek
Molekuł/komórkę	400	10 to 20
Elongacja 5'-3'	Aktywna	Aktywna
Egzonukleaza 3'-5'	Aktywna	Aktywna
Egzonukleaza 5'-3'	Aktywna	Nieaktywna
Mutanty zerowe – fenotyp	Mała żywotność Defekt naprawy DNA	Brak replikacji cecha letalna
Częstość pomyłek	5 × 10 ⁻⁷	5×10^{-6}

Tabela IX. Porównanie własności DNA polimerazy I (reperazy) i DNA polimerazy III (replikazy) E. coli

Tabela X.Własności ogólne i enzymatyczne DNA polimeraz eukariontów. Nie uwzględniono DNA
polimeraz TLP

DNA polimerazy	α/Ι	δ/Ш	ε/Π	β	γ
Lokalizacja	Jądro	Jądro	Jądro	Jądro	Mitochondria
Funkcja	Synteza starte- rów i łańcucha opóźnionego	Synteza łańcu- cha wiodącego	Naprawa uszko- dzeń DNA	Naprawa uszko- dzeń DNA	Replikacja DNA mitochondrium
Aktywność	80%			10-15%	2-15%
Masa czą- steczkowa	300 kDa	170-230 kDa	250 kDa	40 kDa	180-300 kDa
Podjednostki	4	4	4	Monomer	Trimer $\alpha + 2\beta$
3'-5' ekzonu- kleaza	Brak aktywności	Aktywna	Aktywna	Brak aktywności	Aktywna
Dwudeoksy- tymidyna	Brak efektu	Brak efektu	Słabe hamowanie	Hamowanie	Hamowanie
Afidikolina	Zahamowanie	Zahamowanie	Zahamowanie	Brak efektu	Brak efektu

Inicjacja polimeryzacji deoksynukleotydów wymaga obecności deoksyoligonukleotydów lub mieszanych rybo-deoksyoligonukleotydów komplementarnych do nici matrycowej DNA (startery). Startery są produkowane przez enzym prymazę.

Istnieje też grupa enzymów, które replikują DNA z istniejącymi uszkodzeniami przedmutacyjnymi. Takie enzymy (*translesion polymerases* – **TLP**) zostaną opisane w dalszych rozdziałach.

b. Mechanizm replikacji DNA adenowirusów

Mechanizm replikacji dwułańcuchowego DNA jest różny u wirusów, bakteriofagów i plazmidów, ale dość wzajemnie podobny u eubakterii, jednokomórkowych i wielokomórkowych wyższych eukariontów. Jako przykład można przytoczyć osobliwą replikację DNA adenowirusów (**rys. 27**). Genom adenowirusa stanowi linearny dsDNA, zakończony powtórzeniami 100 nukleotydowymi ITR (*inverted terminal repeats*) zawierającymi 18 nukleotydów rdzenia ORI. Łańcuch 5' ma stale przyłączone białko terminalne (TP). Po denaturacji 3' koniec ORI przyłącza białko preterminalne (Ptp.p) z przyłączoną kowalencyjnie cytozyną (do S580), DNA polimerazę wirusa i białko Dbp.p wirusa. Cytozyna tworzy parę zasad z guaniną 4 łańcucha 5' ITR. Dodatkowo ORI wiąże białka komórki: dimer NF1.p, topoizomerazę i Pou2f1.p/Oct1.p.

DNA polimeraza przyłącza dwa następne nukleotydy i cały kompleks cofa się do guaniny 1 ITR. Polimeraza kończy replikację łańcucha 3'-5', a przyłączone białko preterminalne Ptp.p po proteolitycznym przecięciu tworzy białko terminalne TP.p stale wiążące 5' końce DNA.

Podobnie przebiega replikacja łańcucha 5'-3'.

c. Mechanizm replikacji DNA mitochondrialnego

Osobliwa jest również replikacja **mitochondrialnego DNA**. Jest to dwułańcuchowy, cyrkularny DNA, którego komplementarne łańcuchy są nazywane H i L (ciężki i lekki). Oba łańcuchy posiadają specyficzne sekwencje, w których rozpoczyna się replikacja (**se**- **kwencje ORI**_H i **ORI**_L) położone w znacznej wzajemnej odległości.

Synteza startera nici H rozpoczyna się w dużym regionie niekodującym (NCR) przez syntezę RNA inicjowaną na sekwencji promotora nici lekkiej (LSP) przez mitochondrialną RNA polimerazę. Ten RNA odgrywa rolę startera dla nici H DNA (w ORI_{H}) – rys. 28A.

Nowo powstający łańcuch H oddziela stary łańcuch H i eksponuje znajdujący się na nim ORI_L. Umożliwia inicjację syntezy startera nici L.

Synteza łańcuchów mtDNA jest jednokierunkowa, niekiedy synteza nici H DNA kończy się w TAS sekwencji regionu **NCR** (*termination associated sequence*). Syntetyzowany jest około 650 nukleotydowy odcinek łańcucha H (7S DNA), dość trwale związany z łańcuchem matrycowym L. Oddzielony odcinek macierzystego łańcucha H tworzy **pętlę D**. Rola 7S DNA nie jest jasna.

Widełki replikacyjne mitochondrialnego DNA zawierają helikazę mitochondrialną TwinL.p/Twinkle.p typu 5'-3', a także mitochondrialną DNA polimerazę γ (PolG.p), mitochondrialną polimerazę RNA PolRmt.p i białka mtSSB (**rys. 28E**).



Rys. 27. Replikacja DNA adenowirusów. (A) – dsDNA wirusa na końcach 3' zawiera białko terminalne (TP.p) w powtórzeniach końcowych (ITR). (B) – do 3' końca ITR przyłącza się kompleks: (Ptp.p) – białko preterminalne wiążące cytozynę, (Pol) – DNA polimeraza i białka komórki: (1) – dimer Nf1.p, (2) – topoizomeraza, (3) – Pou2f1.p/Oct1.p. (C) – Kompleks syntetyzuje łańcuch potomny 3'-5'. (D) – Ptp.p ulega proteolizie do białka TP.p. Kompleks replikacyjny przyłącza się do końca 3' ITR łańcucha komplementarnego.



1 - 41

Rys. 28. Replikacja DNA mitochondrialnego. Model odseparowania łańcuchów (strand displacement).

- (A) Cyrkularny DNA mitochondrialny zawiera sekwencje kodujące i (NCR) region niekodujący, który zawiera: (LSP) – promotor lekkiego łańcucha, (OH) – ORI ciężkiego łańcucha, (TAS) – sekwencję terminacyjną. Łańcuch lekki posiada odległy (OL) – ORI łańcucha lekkiego.
- (B) Replikacja inicjowana w ORI_H ulega często terminacji w sekwencji TAS (syntetyzowany jest krótki 7S DNA – 650 nukleotydów). Rola 7S DNA nie jest znana. Odseparowany łańcuch lekki tworzy pętlę D.
- (C) Replikacja łańcucha ciężkiego replikacja przechodzi poza TAS i syntetyzuje łańcuch H.
- (D) Inicjacja replikacji łańcucha lekkiego po przejściu sekwencji TAS tworzy się długi potomny łańcuch H. Odseparowany ORIL zapoczątkowuje syntezę łańcucha L.
- (E) Widełki replikacyjne w replikacji mtDNA: (twinkle.p) heksamer helikazy mtDNA, (mtSSB)
 białka wiążące jednołańcuchowy DNA, (PolRmt) RNA polimeraza mitochondrialna, (1) RNA starter, (PolG) trimer polimerazy DNA γ.

d. Mechanizm replikacji DNA bakterii i eukariontów

Mechanizmy replikacji **DNA bakterii** (*Eubacteriaceae*), **niższych eukariontów** (*S. cerevisiae*), a także u **wyższych eukariontów** są najogólniej podobne.

Inicjacja replikacji ma miejsce w **regionach inicjacji**. U bakterii są to specyficzne sekwencje **ORI**, u drożdży raczej mało specyficzne sekwencje **ARS**.

Bakteryjne sekwencje ORI zawierają region bogaty w pary AT (który łatwo ulega denaturacji) i region wiążący białka.

U wyższych eukariontów replikacja DNA jest inicjowana w obrębie długich, heterogennych sekwencji (regiony inicjacji – **RI**). Liczba i sekwencja tych RI jest zmienna nawet u jednego gatunku. Liczba RI jest szczególnie wysoka w silnie proliferujących komórkach embrionalnych, a o wiele niższa w komórkach zróżnicowanych.

Najogólniej sekwencje regionów inicjacji są silnie wzbogacone w pary zasad AT i zawierają krótkie sekwencje wiążące białka macierzy jądrowej, tak zwane boksy MAR). Wewnątrz sekwencji ORI i RI następuje denaturacja dsDNA do pojedynczych łańcuchów z wytworzeniem "oczka replikacji". Oba końce oczka replikacyjnego tworzą "widełki replikacyjne", gdzie ulokowane są duże kompleksy białek zawierające DNA polimerazę (replisomy – rys. 29).

Sekwencja DNA inicjująca replikację z jednego oczka replikacyjnego nazywana jest **replikonem**. Gdy replikacja całego DNA jest zakończona, replikony łączą się ze sobą, tworząc ciągłą dwułańcuchową helisę potomnego DNA (zawiera ona zgodnie ze schematem semikonserwatywnej replikacji jeden "stary" łańcuch (matrycowy) i jeden nowosyntetyzowany łańcuch (potomny).

U *E. coli* cały genomowy DNA (około 4.10⁶ par zasad) stanowi jeden replikon. Szybkość replikacji jest bardzo duża (50 kpz/min).

U drożdży *S. cerevisiae* średnia długość replikonu wynosi 40 000 par zasad, a szybkość replikacji DNA tylko 3600 par zasad na minutę. Rośliny i płazy mają często dłuższe replikony, ale niewielką szybkość replikacji (tylko ok. 500 par zasad na minutę).

Długość replikonów ssaków wynosi około 150 kpz, a szybkość ich replikacji to do 2200 par zasad na minutę.

Średnia długość replikonu i ilość replikonów w genomie zależy nie tylko od gatunku, ale także od stanu zróżnicowania komórki (głównie od wielkości genomu i szybkości reakcji replikacji – **tabela XI**).

Zwiększenie liczby replikonów nie tylko zmniejsza czas potrzebny na replikację genomu komórki, ale także pozwala na replikację DNA zawierającego pewną liczbę uszkodzeń struktury i sekwencji stanowiących przeszkodę dla ruchu przesuwających się widełek replikacyjnych.

Genom zwykle zawiera znacznie więcej regionów inicjacji (RI) replikacji niż aktywnych "ognisk" replikacji w fazie S cyklu. Znaczenie tych "uśpionych" regionów replikacji będzie omawiane w dalszych rozdziałach.

Każda inicjacja replikacji wymaga też obecności białek inicjujących lub dużych multimerowych kompleksów inicjujących. Dla bakteriofagów, wirusów i plazmidów są to wysoce specyficzne białka, białka eukariontów są raczej wzajemnie podobne.

Najważniejszym podobieństwem między replikacją DNA bakterii (*E. coli*) i eukariontów jest mechanizm reakcji i funkcja replisomu. W obu przypadkach replikacja obu łańcuchów DNA (zarówno 5'-3', jak i 3'-5') odbywa się jednocześnie. Replisom musi zawierać przynajmniej dwie cząsteczki DNA polimerazy. Łańcuch DNA 3'-5' jest replikowany w sposób ciągły (jest "łańcuchem wiodącym" replikacji).

Replikacja łańcucha 5'-3' musi odbywać się w przeciwnym kierunku do ruchu replisomu (potomny DNA zawsze jest syntetyzowany w kierunku 5'-3'). Replikacja ta może być rozpoczęta dopiero po replikacji łańcucha wiodącego i oddzieleniu pewnego odcinka łańcucha 5'-3'. Dlatego też łańcuch 5'-3' jest "lańcuchem opóźnionym". Łańcuch opóźniony jest replikowany w sposób nieciągły, odcinkami liczącymi 200 nukleotydów nazywanych fragmentami Okazaki.

Każdy fragment Okazaki musi być inicjowany przez kilkunastonukleotydowy starter syntetyzowany przez specyficzny enzym **prymazę**, gdyż polimeraza DNA nie może inicjować replikacji ani na jednołańcuchowym, ani na dwułańcuchowym DNA.

Po zakończeniu syntezy startery są usuwane przez RNazę H, powstające ubytki wypełniane przez DNA polimerazę β (reperazę), a przerwa jednołańcuchowa jest zamykana przez DNA ligazę. Schemat syntezy obu łańcuchów DNA przedstawiono na **rys. 30**.

Przemieszczający się replisom zmienia stan nadspiralności DNA. W matrycowym DNA przed widełkami replikacyjnymi rośnie nadspiralność dodatnia (rośnie gęstość skrętów spirali), w helisach potomnych zwiększa się nadspiralność ujemna (maleje gęstość skrętów spirali). Te zmiany nadspiralności helisy DNA (stres torsyjny) są dość łatwo usuwane przez aktywność topoizomeraz typu 1.

Szybka rotacja helisy (do 50 obrotów na minutę) odbywa się na krótkich odcinkach spirali i nie powoduje zużycia wielkiej ilości energii.



Rys. 29. Synteza DNA w replikonach eukariontów jest inicjowana w sekwencjach RI-1 i RI-2. Tworzące się "oczka replikacyjne – (1) rozszerzają się zwykle dwukierunkowo dzięki aktywności DNA polimeraz, (2) – replisomy, (3) – fragmenty Okazaki. (A) – dsDNA przed inicjacją replikacji. (B) – replikacja w dwóch "oczkach". Linie pogrubione – nowosyntetyzowany DNA.

Tabela XI. Porównanie liczby replikonów, ich długości i szybkości reakcji replikacji u bakterii (*Escherichia coli*), drożdży (*S. cerevisiae*), owadów (*D. melanogaster*), płazów (*Xenopus laevis*), ssaków (*Mus musculus*) i roślin (*Vicia faba*)

Organizm	Liczba replikonów	Długość replikonu kpz	Szybkość replikacji pz/min
Bakterie (E. coli)	1	4200	50 000
Drożdże (S. cerevisiae)	500	40	3600
Owady (D. melanogaster)	3500	40	2600
Płazy (X. laevis)	15 000	200	500
Ssaki (M. musculus)	25 000	150	2200
Rośliny (V. faba)	35 000	300	



Rys. 30. Replikacja dwułańcuchowego DNA u bakterii i eukariontów.

(a) – dwułańcuchowy DNA, (b) – replikacja łańcucha wiodącego i oddzielenie łańcucha opóźnionego (5'-3'), (c) – synteza startera na łańcuchu opóźnionym – (1a). (d) – DNA polimeraza kontynuuje replikację łańcucha wiodącego. Inna DNA polimeraza wydłuża starter. Na oddzielonym odcinku DNA łańcucha opóźnionego DNA prymaza tworzy nowy starter – (1b). (e) – DNA polimeraza wydłuża starter 1b. Tworzy się fragment Okazaki – (2). (f) – starter 1a ulega wycięciu, a fragmenty Okazaki ligacji.

2. TERMINACJA REPLIKACJI

Poważna różnica w mechanizmie replikacji DNA *E. coli* i eukariontów dotyczy terminacji replikacji.

Chromosom *E. coli* jest cyrkularnym dwułańcuchowym DNA. Po replikacji dwie cyrkularne cząsteczki potomne DNA są katenatem (strukturą podobną do złączonych ogniw łańcucha). Rozdzielenie takich cząsteczek zależy od aktywności enzymów typu topoizomerazy (**resolwaz**).

Chromosomy eukariontów zawierają dwułańcuchowe linearne cząsteczki DNA. Zakończenie replikacji końców tego linearnego DNA jest trudne, zwłaszcza dla łańcucha opóźnionego. Zwykle oligonukleotydowy starter ostatniego fragmentu Okazaki nie może zostać utworzony z powodu niewystarczającej długości matrycy.

Zatem po każdej rundzie replikacji linearny DNA chromosomu ulega skróceniu o średnio 100 par zasad.

To skrócenie może być niebezpieczne zarówno dla integralności, jak i dla stabilności chromosomów. Dlatego też każdy wolny koniec chromosomu posiada specyficzne struktury stabilizujące – **telomery**.

DNA telomerowy zawiera wielką liczbę kopii krótkich powtórzeń. U drożdży są to powtórzenia $C_{1.2}A$, u *Dictyostelium discoideum* – powtórzenia $AG_{1.8}$, u muszki owocowej *D. melanogaster* – powtórzenia retrotransposonów TART (*telomere associated retrotransposons*).

Dla wszystkich wyższych eukariontów (a także dla *Trypanosoma*) sekwencja powtórzeń DNA telomerów jest zawsze **5'-TTAGGG-3'**.

Łańcuch 3'-OH DNA telomerowego posiada długi odcinek jednołańcuchowy, którego koniec ulega zapętleniu (pętla T lub pętla terminalna) i ulega insercji do odcinka dwułańcuchowego powtórzeń telomerowych (tworząc **pętlę D**).

Ta skomplikowana struktura jest stabilizowana przez liczne białka, tworząc telomerowy kompleks **ochronny białek** (shelterin). Do białek tego kompleksu ochronnego zalicza się:

- Terf1.p/Trf1.p i Terf2.p/Trf2.p (*Tandem repeats factors* 1/2). Izoforma Pinx1.p białka Terf1.p/Trf1.p obniża aktywność telomerazy i dlatego myszy Pinx1^{-/-} są podatne na nowotwory. Dodatkowo Terf1.p/Trf1.p wiąże tankyrazy.
- Tankyrazy Tnks1.p/Parp5a.p i Tnks2.p/Parpb.p ADP-rybozylotransferazy. Tnks1.p jest fosforylowany przez Plk1.p kinazę, co hamuje wymianę chromatyd siostrzanych.
- Tinf2.p/Tin2.p (Terf1.p interacting protein).
- Pot1.p (protection of telomeres) wiąże jednołańcuchowe powtórzenia nici 3'-OH (przy udziale białek).

- Tpp1.p). Pot1.p wiąże białko helikazy zespołu Wernera (Wrn.p). Wyciszenie syntezy Pot1.p powoduje aberracje chromosomów i wydłużenie powtórzeń jednołańcuchowych. Nadekspresja Pot1.p występuje w raku żołądka.
- Acd.p/Ptop.p (adrenocortical dysplasia homolog).
 Białko Acd.p wiąże telomerazę.
- Terf2ip.p/Rap1.p jest aktywatorem transkrypcji RNA polimerazy II w szybko rosnących komórkach. W telomerach hamuje naprawę przez homologiczną rekombinację.

Kompleks ochronny (shelteryna) jest obecny w telomerach w ich stanie stabilnym. W stanie stabilnym histony chromatyny są metylowane (w H3 K9me3, H4 K20me3), a nukleosomy przyłączają białka CBX/ HP1 (**rys. 31 A**).

Każdy podział komórki somatycznej skraca DNA telomerowe o około 100 nukleotydów, krytyczna długość konieczna do tworzenia stabilnej struktury telosomu wynosi około 1500 zasad.

Brak kompleksu ochronnego i pętli T eksponuje koniec dsDNA chromosomu i imituje pęknięcie dwułańcuchowe. Kompleksy Terf1.p – Terf2.p – Tinf2.p/ Tin2.p – Terf2ip.p pozostają związane z dsDNA, ale wiążą kompleksy MRN (Mre11.p – Rad50.p – Nbs1.p) i kinazę Atm.p. Histony H2AX ulegają fosforylacji (γH2AX), co dysocjuje białka CBX/HP1 z chromatyny.

Jednoniciowy łańcuch 3'-OH wiąże kompleksy Pot1.p – Acd.p/Tpp1.p, które bezpośrednio przyłączają kompleks telomerazy (**rys. 31 B**).

Skrócenie 3'-terminalnego jednołańcuchowego DNA poniżej 1500 nukleotydów powoduje nieodwracalne uszkodzenie telomerów. Jednołańcuchowy odcinek 3'-OH wiąże mało kompleksów Pot1.p – Acd.p/ Tpp1.p i nie wiąże telomerazy.

Chromatyna spoczynkowa ulega acetylacji i ubikwitynacji i traci kompleksy Terf1.p – Terf2.p i Tinf2.p – Terf2ip.p na rzecz białekTerf1.p/Trf1.p. Tego typu telomery są także charakterystyczne dla komórek wchodzących lub pozostających w stanie senescencji replikacyjnej.

Jednak telomery komórek macierzystych (ASC) i nowotworowych (CSC) zachowują stałą długość mimo bardzo licznych podziałów (chociaż telomery komórek nowotworowych są z reguły skrócone). Te komórki posiadają enzym typu rewertazy, który wydłuża jednołańcuchowe powtórzenia wystającego końca 3'-OH.

Tym enzymem jest **telomeraza** składająca się z produktu genu TERT (podjednostka katalityczna), z podjednostek regulatorowych: **dyskeryny** (produktu genu DKC1), białek Garl.p, Nop10.p, Nhp2.p, Wrap53.p/Tcabl.p, z cząsteczki RNA (produkt genu TERC) i białek dodatkowych, jak: Ruvbl2.p/reptyny, Ruvbl1.p/Pontyny, Zscan4.p, kompleksu CST (zawierającego białka Ten1.p – Obfc1.p/Stn1.p – Ctc1.p), Hmbox1.p/Hot1.p.

- Dyskeryna (Dkc1.p) stabilizuje telomery, jest obecna w kompleksach snoRNP, odgrywa pewną rolę w naprawie uszkodzeń DNA. Mutacje germinalne genu DKC1 powodują powstanie zespołu wrodzonej dyskeratozy.
- Gar1.p i Nop10.p są rybonukleoproteidami.
- Nhp2.p białko kompleksów snoRN.

- Wrap53.p/Tcab1.p w składzie kompleksu telomerazy.
- Ruvbl1.p/pontyna i Ruvbl2.p/reptyna są DNA helikazami i ATPazami.
- Zscan4.p jest białkiem ważnym dla aktywności telomerazy w komórkach embrionalnych stem (ESC), hamuje senescencję i stabilizuje proliferację tych komórek.
- Białka kompleksu CST (Ctc1.p, Obfc1.p/Stn1.p i Ten1.p) odgrywają ważną rolę w stabilizacji i protekcji struktury telomerów (niezależnie od funkcji



Rys. 31. Telomery i telomerowe kompleksy białek u wyższych eukariontów.

- (A) W stanie ustabilizowanym z pełną protekcją powtórzeń DNA telomerów. Długi "wystający" odcinek jednołańcuchowy 3'-OH tworzy "pętlę T" chroniącą końce DNA. Pętlę T stabilizują białka: Terf1.p, Terf2.p, Terf2ip.p, Tin2.p, Acd.p/Tpp1.p i Pot1.p. Metylowane histony H3 K9me3 i H4 K20me3 przyłączają białka CBX/HP1.
- (B) W stanie przejściowo niestabilnym skrócenie odcinka jednołańcuchowego 3'-OH uniemożliwia tworzenie "pętli T", ale odcinek 3'-OH przyłącza wiele kompleksów Pot1.p – Acd.p/Tpp1.p. Acd.p przyłącza telomerazę (tylko w fazie S). Do dsDNA powtórzeń przyłącza się kompleks MRN i kinaza Atm.p, tworzą się ogniska γH2AX.
- (C) W stanie niestabilnym mała liczba kompleksów Pot1.p Acd.p nie wystarcza do wiązania telomerazy. Odcinek powtórzeń dsDNA ulega acetylacji i ubikwitynacji i przyłącza białko 53bp1.p.

kompleksu ochronnego), regulują także aktywność telomerazy.

RNA telomerazy kodowany przez gen TERC, zawiera bardzo liczne powtórzenia komplementarne do powtórzeń telomerowych nici 3'-OH DNA. Składanie całego kompleksu telomerazy ma miejsce w "ciałkach Cajala".

Duży kompleks telomerazy jest magazynowany w "ciałkach Cajala" i jedynie w fazie S cyklu życiowego komórki jest uwalniany i przyłącza się do regionu telomerów.

Stymulacja syntezy telomerazy przez białko Myc.p lub Bmil.p jest typowa w nowotworach, ale nadmiar produktu genu TERT przy efektywnym zahamowaniu syntezy RNA telomerazy raczej obniża podatność na nowotwory.

Gen TERT (lokus 5p15.33) ulega amplifikacji w nowotworach piersi, wątroby, rakach szyjki macicy i w czerniakach złośliwych. Mechanizm działania telomerazy przedstawiono na **rys. 32.**

Do zespołów związanych ze skróceniem telomerów można zaliczyć:

 Zespół Høyeraala-Hreidarssona (aplazja móżdżku, brak odporności, niski wzrost, niedokrwistość). Dyskeratosis congenita (DC) – leukoplakia, pigmentacja skóry, defekty paznokci, marskość wątroby, zwłóknienie płuc, niedokrwistość.

3. REPLIKACJA DNA E. COLI

Synteza DNA replikonu *E. coli* inicjowana jest w sekwencji OriC przez przyłączenie wielu cząsteczek **białka DnaA.p.** Tworzy się spiralne włókno DNA – DnaA.p, w którym bogate w AT sekwencje OriC ulegają denaturacji. Powstające "oczko" jednołańcuchowych DNA przyłącza początkowo tetramery białek SSB, a następnie w obu końcach "oczka" kompleksy białek **DnaB.p** (głównej helikazy DNA replisomu).

Kompleksy zawierają po sześć cząsteczek białek DnaB.p otaczających łańcuch 3'-5' DNA.

Przyłączenie kompleksu helikazy jest możliwe w obecności **białek DnaC.p** (kompleks wiążący helikazę). Białka DnaC.p są podobne do białek DnaA.p i tworzą podobny spiralny kompleks z DNA. Następnie białko DnaC.p jest wypierane z kompleksu przez białko **DnaG.p** (**DNA prymazę**). DnaG.p zwiększa aktywność helikazy DnaB.p i "oczko" ulega znacznemu rozszerzeniu.



Rys. 32. Mechanizm wydłużania sekwencji powtarzających się wystającego, jednołańcuchowego końca 3' DNA przez telomerazę. (hTert.p) – podjednostka katalityczna telomerazy, (Dkc1.p) – białko dyskeryna, (Ndp10.p, Nhp2.p i Rar1.p) – inne białka kompleksu telomerazy. (Trf1.p, Trf2.p) – białka wiążące powtórzenia tandemowe, (Pot1.p) – białko chroniące jednołańcuchowe powtórzenia, (Wrn.p) – helikaza ulegająca mutacjom w zespole Wernera. (Rap1.p) – białko wiążące Trf2.p. Białko prymaza DnaG.p nie jest stałym składnikiem replisomu i u pewnych bakterii starter każdego fragmentu Okazaki jest syntetyzowany przez inną cząsteczkę prymazy – DnaG.p.

Następnym białkiem przyłączanym do replisomu jest pierścieniowy, ruchomy **dimer** β**2** ściśle związany z DNA polimerazą III. Przyłączenie dimeru β2 zależy od specyficznego **kompleksu wiążącego DNA polimerazę**. Kompleks ten zawiera:

- trzy podjednostki τ wiążące katalityczną podjednostkę DNA polimerazy,
- dwie podjednostki: δ i δ ',
- dwie podjednostki: χ i ψ .

Obecność trzech podjednostek wskazuje, że replisom zawiera trzy kompleksy DNA polimerazy III, co zostało potwierdzone doświadczalnie.

DNA polimeraza III zawiera podjednostkę α (katalityczną), podjednostkę ε (korygującą egzonukleazę) i podjednostkę θ . Tworzenie replisomu *E. coli* przedstawiono na **rys. 33**.

DNA polimeraza III wraz z dimerem białka β2 są odłączane od matrycy DNA po napotkaniu startera poprzedniego fragmentu Okazaki. Mechanizm rozpoznawania końca fragmentu Okazaki, jak i sygnał, który powoduje przyłączenie się DNA polimerazy III do nowego startera, nie jest znany.

Dimer białek β2 odgrywa rolę faktora procesywności polimerazy i stabilizuje jej wiązanie z DNA. Ważną rolę w przemieszczaniu DNA polimerazy III odgrywa także kompleks wiążący i stabilizujący dimer β2 i samą polimerazę DNA.

Szybkość replikacji DNA *E. coli* jest bardzo duża i wynosi około 1000 zasad na sekundę. Czas replikacji całego chromosomu bakteryjnego nie przekracza 40 minut.



Rys. 33. Inicjacja replikacji i tworzenie replisomu u E. coli.

- (A) Sekwencja OriC chromosomu bakterii, przyłączenie białek DnaA.p.
- (B) Tworzenie "oczka" replikacyjnego lokalna denaturacja sekwencji bogatych w AT. W widełkach replikacyjnych białko DnaC.p pomaga w przyłączeniu helikazy DNA heksameru DnaB.p. Białka SSB chronią jednoniciowe odcinki DNA.
- (C) Tworzenie replisomu. Helikaza przyłącza prymazę DnaG.p (3), a ta syntetyzuje starter RNA (1). Kompleks białek τ wiążący DNA polimerazę (4), dimer białek $\beta 2$ (2).
- (D) Polimeraza DNA (5) przyłącza się do dimeru β2 i replikuje rozwijającą się spiralę DNA. Łańcuch opóźniony 3'-5' tworzy pętlę.

Każde zahamowanie reakcji, a zwłaszcza przerwa dwułańcuchowa DNA powoduje zwykle rozpad replisomu i śmierć komórki bakteryjnej. Jednak taki rozpad replisomu zdarza się rzadko (średnio raz na 5 cykli podziałowych).

Każdy replisom syntetyzuje połowę DNA chromosomu bakteryjnego od OriC do sekwencji terminalnej replikacji. Szybkość progresji obu replisomów jest koordynowana przez hamowanie replikacji w **sekwencjach ter**. Głównym faktorem powodującym synchronizację obu replikonów jest białko Tus.p, ale mechanizm jego działania nie jest w pełni zrozumiały (tym bardziej że brak Tus.p nie powoduje widocznej zmiany fenotypu bakterii.

Innym zjawiskiem, które towarzyszy terminacji replikacji w cyrkularnym chromosomie, jest narastanie stresu torsyjnego dwułańcuchowego DNA w miarę zbliżania się replisomów i helikaz DnaB.p do sekwencji **ter**. Stres torsyjny jest zmniejszany i regulowany przez enzym typu topoizomerazy – bakteryjną **gyrazę**.

Stres torsyjny może odgrywać rolę w regulacji funkcji sekwencji ter i aktywności białek Tus.p wiążących te sekwencje.

Rozdzielenie potomnych cyrkularnych DNA bakteryjnych zależy od działania wielu enzymów:

- rekombinazy RecQ.p,
- topoizomerazy III,
- DNA translokazy RecG.p,
- nukleazy i helikazy (RecBCD.p),
- DNA ligazy
- być może także od samej DNA polimerazy III i DNA polimerazy I (reperazy).

4. REPLIKACJA U EUKARIONTÓW

Mechanizm replikacji DNA w komórkach wyższych eukariontów jest ogólnie podobny do opisanego u *E. coli*, jest jednak bardziej złożony i podlega licznym dodatkowym regulacjom.

Podobnie jak u bakterii żadne DNA polimerazy eukariontów nie mogą inicjować syntezy DNA na jedno- i dwułańcuchowych matrycach. Inicjacja może też mieć miejsce na 3'-OH grupie w obrębie istniejących przerw jednołańcuchowych (nicków) i taka inicjacja jest używana w laboratoriach do znakowania sond molekularnych.

Ważną rolę w inicjacji replikacji odgrywają kompleksy białek inicjatorowych – sześć białek kompleksu **ORC** (*ORI recognizing complex*) i białka kompleksu helikazy (**MCM**). Białka te pełnią dodatkowo rolę "**faktorów licencyjnych"** replikacji. Bezpośrednio po replikacji DNA są one poliubikwitynowane i niszczone w proteasomie, ale pojawiają się w ORI na długo przed nową rundą syntezy DNA (białka kompleksu ORC w anafazie i telofazie, a MCM w bardzo wczesnej fazie G1). Białka te tworzą **kompleks pre-RC** (prereplikacyjny) konieczny do inicjacji.

U drożdży białka ORC w większości pozostają w ORI po fazie S, nie mogą więc pełnić roli białek licencyjnych, ale raczej stanowią pamięć stanu aktywnego sekwencji ORI (u drożdży ARS). U *S. cerevisiae* tylko niewiele istniejących sekwencji ARS jest aktywnych w inicjacji syntezy DNA.

W skład kompleksów pre-RC wchodzi też **białko** Cdc6.p (ATPaza konieczna do przyłączenia kompleksu MCM – *minichromosome maintenance complex*), białko Cdt1.p (stabilizujące Cdc6.p w ORI) i białko Gmnn.p (geminina, inhibitor Cdt1.p).

Następnym etapem syntezy DNA u wyższych eukariontów jest tworzenie **kompleksu pre-IC** (preinicjacyjnego). Tworzenie pre-IC zależy od aktywacji kinazy Cdk2.p i cykliny E. Kompleks zawiera też szereg innych białek, jak Mcm9.p, Mcm10.p, kinazę Cdc7.p – Dbf4.p, RecQL4.p, Cdc45.p, TopBP1.p (*topoisomerase II*β *binding protein*) homolog białka Dbp11.p *S. cerevisiae* i Rad4.p *S. pombe*.

Przekształcenie pre-IC w IC (kompleks inicjujący) zależy od fosforylacji wielu białek pre-IC przez kinazy Cdk2.p z cykliną E i kinazy Cdc7.p z białkiem typu cyklin Dbf4.p (tworzą kompleks DDK – *Dbf4.p dependent kinase*).

Fosforylacja powoduje dysocjację bardzo wielu białek pre-IC, jak białek ORC (zwłaszcza Orcl.p), Cdc6.p, Cdt1.p.

Najważniejszą zmianą w przejściu pre-IC w IC jest przyłączenie kompleksów DNA polimeraz α , ξ i DNA prymazy. W tym procesie ważną rolę odgrywają białka TopBP1.p, Mcm10.p, Cdc45.p.

Tworzenie kompleksu inicjującego replikację zależy od przyłączenia helikaz **kompleksu GINS** (Go-ichinii-san) zawierającego białka Gins1-4.p (Psf1.p, Psf2.p i Psf3.p, Sld5.p). W wiązaniu kompleksu odgrywają też rolę Cdc45.p, Sld3.p, Pena.p i białka RPA (*replication protein A*).

Inną helikazą, która "rozwija" DNA, ale też łączy łańcuchy komplementarne na strukturę dsDNA, jest helikaza RecQ4.p. Odgrywa ona rolę w rekombinacji i naprawie DNA.

Kompleks elongacyjny DNA polimerazy eukariontów jest podobny do kompleksu *E. coli* przedstawionego na **rys. 33**. Łańcuch ciągły jest replikowany przez DNA polimerazę ξ , opóźniony przez DNA polimerazę δ .