

А. М. ОЛОВНИКОВ

**ПРИНЦИП МАРГИНОТОМИИ В МАТРИЧНОМ СИНТЕЗЕ
ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 14 VI 1971)

Репликация полинуклеотидов на краю матрицы имеет некоторые особенности. В отличие от гипотезы (1), мы полагаем, что абсолютно полное копирование полинуклеотидной цепи при удвоении ДНК в нормальной, способной к ограниченному числу делений соматической клетке эукариота принципиально невозможно. Дело в том, что классическая мо-

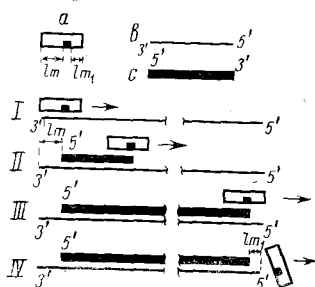


Рис. 1

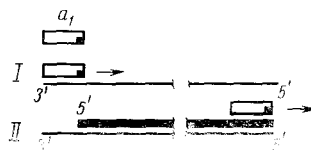


Рис. 2

Рис. 1. Схема маргинотомической редупликации (маргинотомии) ДНК. *a* — молекула моновлочной ДНК-полимеразы, зачернен каталитический активный центр; рост реплики начинается без затравки и не точно над 3'-концом матрицы, а в точке локализации каталитического активного центра фермента; l_m — длина маргинотомии, т. е. расстояние от «левого» конца молекулы фермента до его активного центра; l_{m_1} — расстояние от активного центра до «правого» конца фермента; *b* — матричная цепь ДНК; *c* — реплика, т. е. синтезируемая цепь ДНК. Стадии репликации: *I* — «посадка» фермента на край матричной ДНК; *II* — дочерняя цепь со стороны своего 5'-конца оказывается поза маргинотомии на l_m короче матрицы; *III* — фермент на l_m , недоставляет дочернюю цепь у ее 3'-конца; *IV* — фермент снимается с матрицы

Рис. 2. Схема проксимальной маргинотомии ДНК. *a₁* — молекула моновлочной ДНК-полимеразы с «правокраевым» расположением активного каталитического центра

дель не учитывает особого процесса, который должен происходить на концах каждой из цепей ДНК.

Суть этого процесса состоит в укорочении реплик по сравнению с матрицей из-за недостройки их по краям. Поскольку ДНК-полимераза (ДНК-нуклеотидилтрансфераза) имеет трехмерную структуру, в ней неизбежно должна существовать инертная в каталитическом отношении «мертвая зона» между активным центром, катализирующим включение в растущую реплику остатка очередного дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфата, и внешним краем молекулы фермента. Поэтому после присоединения полимераза к матрице, если внешний край фермента совпадает с торцом матрицы, реплика должна оказаться короче матрицы (рис. 1—3).

Примем, что молекула ДНК-полимеразы из соматических клеток эукариота, имеющих ограниченный потенциал удвоения, функционирует, независимо от числа своих субъединиц, как единый блок, и назовем ее «моновлочная ДНК-полимераза» (варианты ее представлены на рис. 1—3)

в отличие от двублочной, о которой речь пойдет дальше. Для моноблочной ДНК-полимеразы характерна следующая принципиальная особенность: при зависании за торцом полинуклеотидной цепи блок, имеющий один каталитический центр, утрачивает способность к самостоятельному перемещению по матрице (правило «двигательного паралича блока»), хотя принципиально сохраняет каталитическую активность, которая может проявиться только в случае принудительного перемещения «парализованного» блока вдоль матрицы.

Физической причиной паралича моноблочной полимеразы является, вероятно, то, что два трансферных, опорно-двигательных элемента, осуществляющих связывание блока с матрицей и перемещение вдоль по ней, локализованы как раз на противоположных концах блока. При зависании любого из двух трансферных элементов за торцом матрицы блок, утратив одну из точек опоры, остановится. Тот же результат может быть вызван аллостерическим отключением трансферного аппарата всего блока, утратившего на своей периферии контакт с подлежащей матрицей.

В силу правила паралича блока любая реплика, если синтезирует моноблочная ДНК-полимераза, действительно окажется неполной по сравнению с матрицей, ибо каталитический центр блока не способен оказаться над 3'- или 5'-концевыми нуклеотидными звеньями матрицы, и следовательно, не скопирует их. Этот тип синтеза с усечением реплики из-за каталитической неактивности краев молекулы фермента назван «маргинотомической редупликацией», или кратко «маргинотомией» (от *marginalis* — краевой, *to me* — сечение).

Обозначим расстояние в молекуле моноблочной ДНК-полимеразы от ее края до каталитического центра (рис. 1) через l_m . Активный центр блока, двигаясь от 3'-конца матрицы (рис. 1, стадия I), начнет копирование только в точке, отстоящей на l_m от начала матрицы, и устремится к ее 5'-концу. Синтезирующаяся реплика будет со своего 5'-конца короче матрицы на длину l_m (рис. 1, стадия II). Продолжая свое движение, блок не сможет реплицировать и конечные нуклеотиды матрицы, ибо у ее 5'-конца (рис. 1, стадия III) фермент также не сможет выдвинуться за торец нити ДНК, иначе наступает паралич блока. Поэтому блок не достраивает реплику, теперь уже на длину l_{m1} , после чего контакт с матрицей утрачивается (рис. 1, стадия IV). Расстояние l_m может быть равно, больше или меньше l_{m1} , что определяется структурой фермента.

Длина маргинотомии, т. е. величина, на которую укорачивается дочерняя цепь за один акт репликации (обозначим эту длину также через l_m или, соответственно, l_{m1}), не может быть меньше протяженности, занимаемой в ДНК остатком одного дезоксирибонуклеозидтрифосфата, но может превышать эту величину.

Назовем укорочение 5'-конца реплики, ближайшего к месту начала синтеза, проксимальной или 5'-маргинотомией, а противоположный вариант — дистальной или 3'-маргинотомией. В зависимости от места локализации каталитического центра в полимержном блоке будет происходить либо только проксимальная (рис. 2), либо только дистальная (рис. 3), либо проксимально-дистальная (рис. 4) маргинотомия реплики.

Должен существовать и третий тип — медиальная маргинотомия. Поскольку в репликоне может происходить разрыв и в нем временно появляются два новых медиально расположенных конца, копирование такой разорванной матрицы должно сопровождаться маргинотомическим укорочением реплики также и над этими медиальными 3'- и 5'-концами. В этом смысле длина медиальной маргинотомии в области разрыва матрицы равна сумме длин проксимальной и дистальной маргинотомии. Однако вслед за разрывом обычно происходит воссоединение матрицы с восстановлением непрерывности репликона. Поэтому последствия медиальной маргинотомии будут ликвидированы репарационной системой и не могут сказаться на конечном продукте синтеза.

Все сказанное о маргинотомии относится к любому самостоятельно перемещающемуся полимеразному блоку: к моноблочной ДНК-полимеразе, ДНК-репаразе и аналогичным ферментам, участвующим в синтезе РНК по РНК и по ДНК, а также ДНК по РНК.

Если принять, что в ДНК хромосом эукариот отсутствуют кольцевые репликоны, а из имеющихся линейных складывается непрерывность двойных спиралей ДНК внутри хромосомы, и принять, что синтез ДНК идет по матрице без иницилирующей затравки и при участии моноблочной ДНК-полимеразы, то в митозах маргинотомия должна приводить к укорочению ДНК с торцов двойных спиралей и, следовательно, с торцов хромосом.

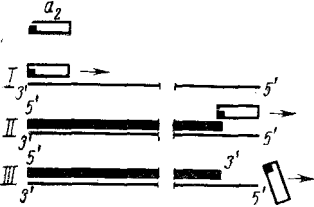


Рис. 3

Рис. 3. Схема дистальной маргинотомии ДНК. a_2 — молекула моноблочной ДНК-полимеразы с «левокраевым» расположением активного каталитического центра

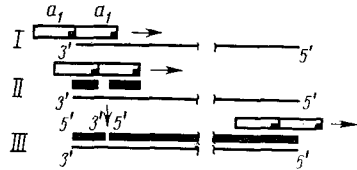


Рис. 4

Рис. 4. Схема редупликации ДНК тандем-ДНК-полимеразами без маргинотомии. Вертикальная стрелка указывает место действия полинуклеотидлигазы

Понятно, что в случае пробелов в ДНК между всеми репликонами маргинотомия за несколько митозов инактивировала бы большинство репликонов; это еще раз косвенно свидетельствует о непрерывности репликонов в хромосоме.

В качестве временной защиты концевых репликонов, локализирующихся вблизи торцов хромосомы, клетка должна использовать теломеры (²), которые находятся на торцах теломер. Мы полагаем, что телоген, функция которого оставалась неясной, — это неинформационный ген, имеющий «буферную» функцию и монотонную нуклеотидную последовательность. Из-за маргинотомии он укорачивается в митозах и тем самым защищает информационные гены от усечения при репликации. Вслед за исчерпанием телогенов наступает необратимое укорочение и, следовательно, инактивация соседних оперонов. Примем, что эти граничащие с телогенами опероны во всех или некоторых хромосомах клетки являются информационными и жизненно важными для сохранения теломерой функции униполярной структуры, при их инактивации нормальная клетка перестает существовать.

Срок предстоящей жизни любого клона клеток определяется поэтому, при прочих равных условиях, уравнением

$$\tau = K \left(\frac{l_T}{l_m} - n \right), \quad (1)$$

где τ — срок предстоящей жизни, K — коэффициент корреляции между длительностью жизни клона и числом митозов; l_T — длина телогена; l_m — длина маргинотомии, т. е. расстояние от края моноблочной полимеразы до ее каталитического центра; n — число прошедших митозов.

Произведение длины маргинотомии на число прошедших митозов, т. е. выражение $l_m n$, есть показатель «биологического возраста» клона. Соответственно, первопричиной старения многоклеточных организмов может служить маргинотомическая гибель составляющих их клонов клеток, израсходовавших своих телогены.

Именно механизмом маргинотомии может быть объяснен тот факт, что потенциал удвоения нормальных соматических клеток животных и человека в монослойной культуре *in vitro* (³, ⁴) строго лимитирован. Он различен для разных видов, что должно быть объяснено разной длиной их телогеенов.

Таким образом, торец — это ахиллесова пята двойной спирали, ибо именно там маргинотомия вызывает краевые делеции телогеенов.

Поскольку уменьшение срока жизни генераций ускоряет эволюцию (⁵), длина телогеенов должна быть одним из важных объектов естественного отбора.

Помимо телогеенов, могут существовать и другие средства не временного, а постоянного предотвращения маргинотомии. К их числу относится кольцевая хромосома. Поскольку концы у кольца нет, при репликации, независимо от типа полимеразы, конечная копия будет равна длине матрицы, ибо возможна лишь медиальная маргинотомия. Это используется в генофорах микробов, многих вирусов, плазмид, эписом, митохондрий и других объектов (⁶⁻¹²).

Тот же эффект возможен при репликации одной некольцевой матрицы двумя изозимами типа a_1 и a_2 (рис. 2 и 3). Другим вариантом антимаргинотомии является репликация ДНК в хромосомах эукариот, осуществляемая не моноблочной, а двублочной полимеразой, которую назовем «тандем-ДНК-полимеразой». Тандем может быть, например, типа $a_2 - a_1$ или $a_1 - a_1$ (как на рис. 4), $a_2 - a_2$, $a - a$. Каждый из двух блоков этого фермента копирует матрицу независимо (рис. 4), и потому при зацеплении за ее торцом и параличе одного из блоков (паралич движения, но не каталитической активности) миграция по матрице всего комплекса продолжается за счет тянущего или толкающего усилия второго блока, который спарен с первым в тандем и находится на той же матрице. Реплика оказывается не маргинотомированной, ибо второй блок участвует в достройке реплики, которая оказалась бы укороченной при работе одного блока. Для случая, изображенного на рис. 4, на заключительном этапе работает полинуклеотидлигаза. Тандем-полимераза или изозимы должны присутствовать в клетках, способных к бесконечному удвоению генома, например в опухолевых, половых и в ряде других клеток.

У большинства эукариот должны иметься, хотя и работать разновременно, гены этих типов ДНК-полимераз. Факторы, регулирующие активность этих генов, окажутся факторами, контролирующими продолжительность жизни клонов клеток и организмов.

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
14 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **171**, 964 (1953). ² H. J. Muller, *J. Genet.*, **40**, 1 (1940). ³ L. Hayflick, *Exp. Cell. Res.*, **37**, 614 (1965). ⁴ H. Green, G. J. Todaro, *Ann. Rev. Microbiol.*, **21**, 573 (1967). ⁵ A. Weismann, *Über die Dauer des Lebens*, Jena, 1882. ⁶ J. Cairns, *J. Mol. Biol.*, **6**, 208 (1963). ⁷ H. R. Bode, H. J. Morowitz, *J. Mol. Biol.*, **23**, 491 (1967). ⁸ K. G. Lark, *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 569 (1969). ⁹ H. Fraenkel-Conrat, *The Chemistry and Biology of Viruses*, London, 1969. ¹⁰ N. R. Cozzarelli, R. B. Kelly, A. Kornberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **60**, 992 (1968). ¹¹ J. Schaife, *Ann. Rev. Microbiol.*, **21**, 601 (1967). ¹² M. M. K. Nass, *Science*, **165**, 25 (1969).