

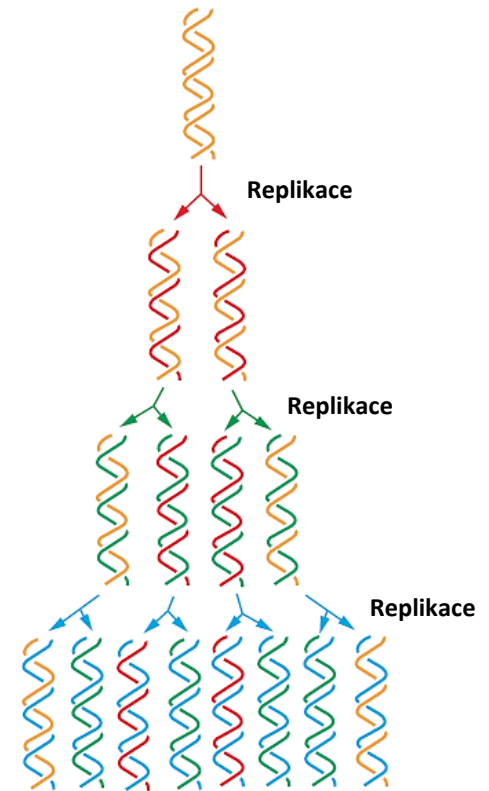
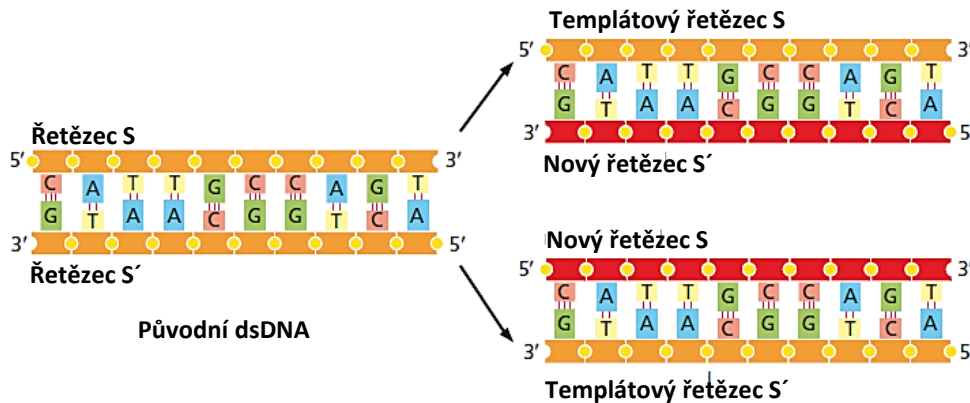
# **Molekulární biologie pro informatiky - 3**

## **Replikace genomu, reparace a rekombinace DNA**

# Replikace DNA

Schopnost buňky přežít a množit se závisí na přesném zdvojení genetického materiálu. K replikaci DNA musí dojít před rozdělením buňky, aby mohly vzniknout dvě dceřiné, geneticky identické buňky. Při každém dělení musí buňka zkopírovat svůj genom s mimořádnou přesností a dostatečnou rychlostí.

Replikace DNA je umožněna párováním bází. Komplementarita řetězců v dsDNA umožňuje, aby po separaci řetězců sloužil každý z nich jako templát pro syntézu nového vlákna.



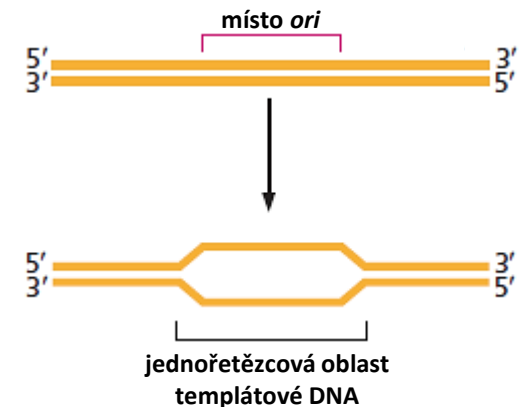
# Replikace DNA

Probíhá ve třech fázích

- 1. iniciace** - zahájení replikace (*ori*), vazba replikačních proteinů, tvorba replikační vidlice
- 2. elongace** - syntéza řetězce DNA
- 3. terminace** - zakončení replikace daného replikonu

## Počátek replikace (místo *ori*)

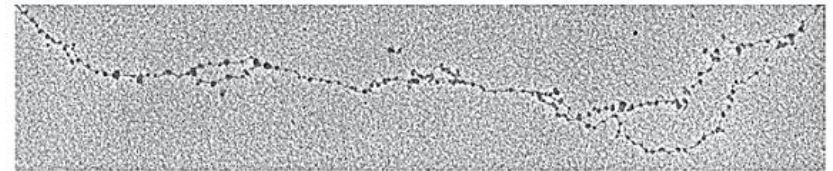
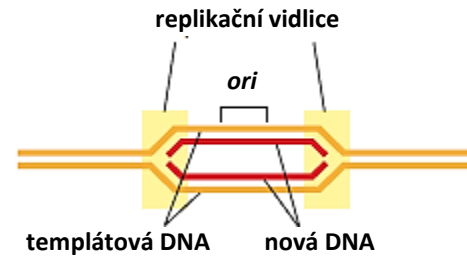
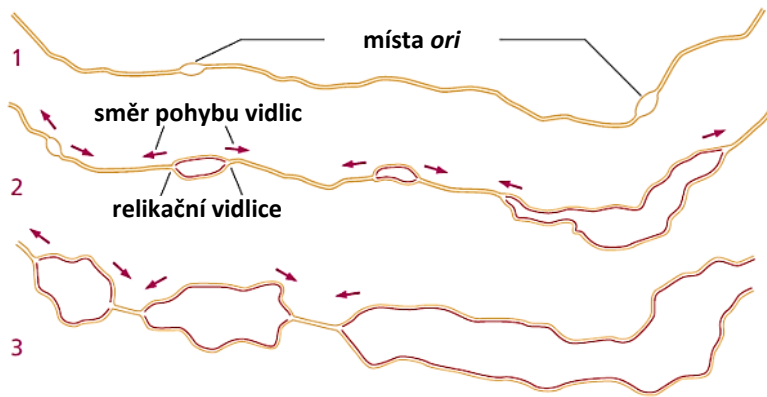
- specifická sekvence DNA, na které se zahajuje její replikace
- sekvence bohatá na AT páry rozpoznávána iniciačními proteiny
- vazba iniciačních proteinů narušuje vodíkové vazby mezi řetězci dsDNA
- do otevřené struktury dsDNA se váží proteiny zodpovědné za vlastní replikaci DNA
- přítomno na každém replikonu
- u bakterií 1x na chromozomu
- u člověka ~ 10.000x na jaderné DNA, v průměru 220x na chromozom



# Replikace DNA

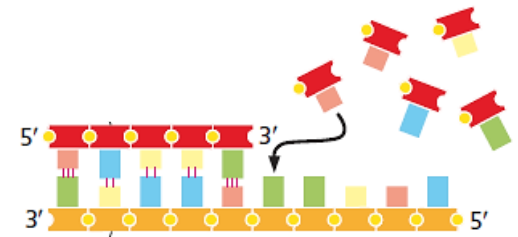
## Replikační vidlice

- struktura ve tvaru „Y“, kterou má DNA během své replikace
- při dvousměrné replikaci se vytvoří dvě vidlice, které se pohybují v opačných směrech od místa *ori*
- rychlost pohybu - bakterie ~ 1000 nukleotidů / s  
- člověk ~ 100 nukleotidů / s



## DNA polymeráza

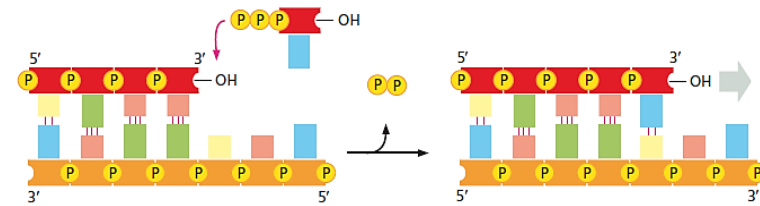
- tvorba nové DNA za využití jednoho z původních řetězců jako templátu
- katalyzuje připojení nukleotidů k 3' konci rostoucího řetězce DNA
- tvorba fosfodiesterové vazby mezi dNTP a DNA



# Replikace bakteriální chromozomové DNA

## DNA-polymerázy

- DNA-dependentní-DNA-polymerázy, 5' → 3' polymerace
- vyžadují přítomnost primeru (DNA či RNA)



## 1. DNA-polymeráza I (Kornbergův enzym)

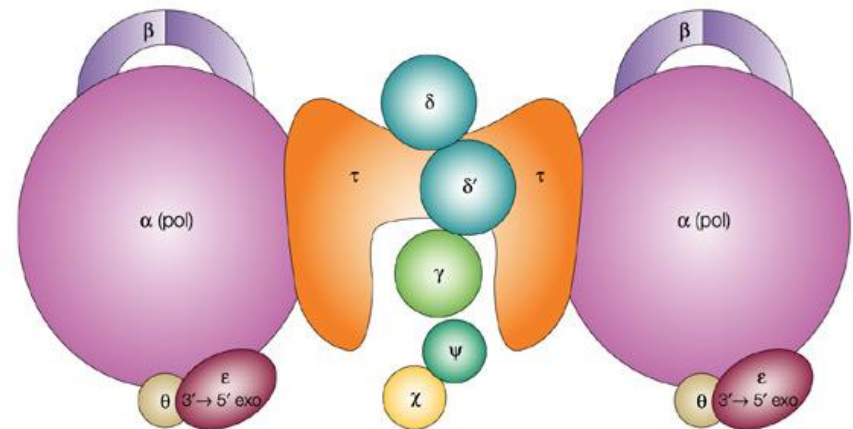
- DNA-primer, 10 nukleotidů/s, 5'-3' a 3'-5' exonukleázová aktivita
- odstranění RNA-primerů, syntéza DNA mezi Okazakiho fragmenty, opravy DNA

## 2. DNA-polymeráza II

- polymerázová a 3'-5' exonukleázová aktivita, záložní polymeráza, opravy DNA

## 3. DNA-polymeráza III

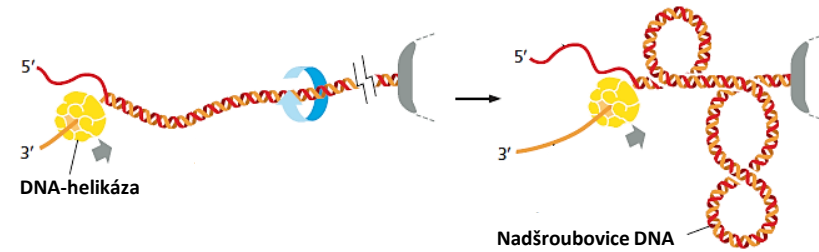
- RNA-primer, oligomerní protein
- katalytické jádro ( $\alpha$ ,  $\theta$ ,  $\epsilon$ ) - 8 nukleotidů/s, 3'-5' exonukleázová aktivita
- spojeny v dimer ( $\tau$ ) - 20 nukleotidů/s, procesivní pro 11 nukleotidů
- $\beta$ -svorka - stabilizuje úseky dsDNA čímž mnohonásobně zvyšuje procesivitu dimeru
- $\gamma$ -komplex ( $\gamma_2\delta\delta'\psi\chi$ ) - nakládá  $\beta$ -svorku na DNA v místech RNA-primerů
- 500 nukleotidů/s, procesivita pro celou molekulu DNA
- replikace DNA, opravy DNA



# Replikace bakteriální chromozomové DNA

## DNA-helikázy

- odvíjení komplementárních řetězců v dsDNA
- při replikaci se uplatňují DnaB-protein a  $\gamma$ -protein



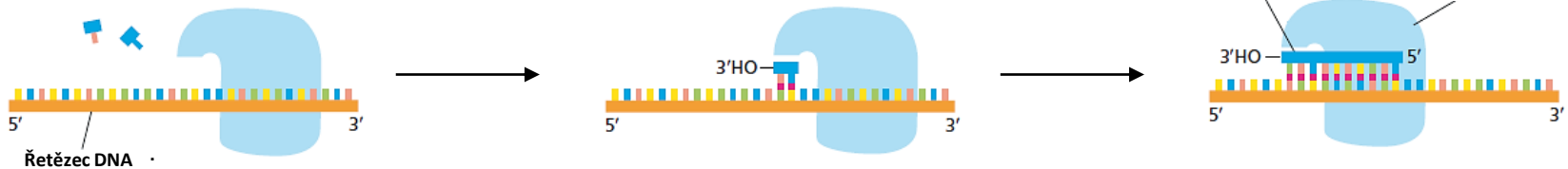
## DNA-gyráza

- topoisomeráza II
- před replikační vidlicí mění kladné nadšroubovicové závity na záporné



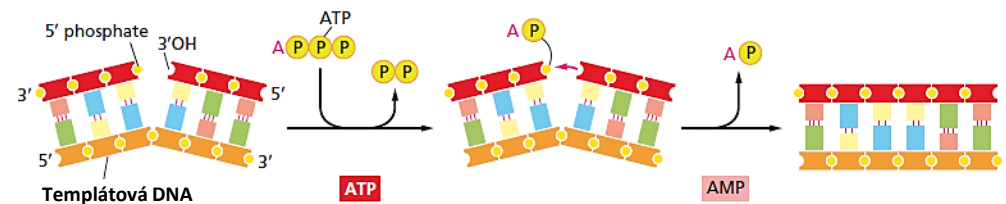
## DNA-primáza

- DNA-dependentní-RNA-polymeráza, syntéza RNA-primerů



## DNA-ligáza

- ligace polynukleotidových řetězců
- spojení Okazakiho fragmentů



# Semikontinuální syntéza dsDNA při replikaci

## Vedoucí DNA řetězec

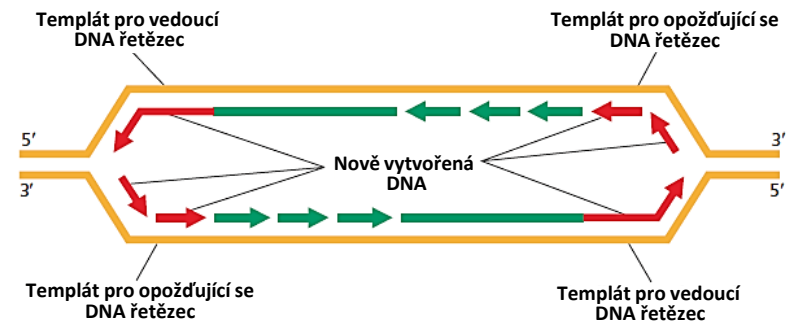
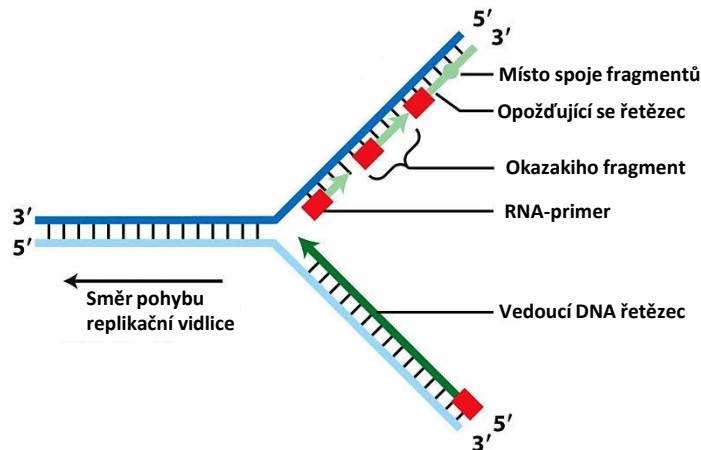
- syntetizován kontinuálně na matricovém řetězci orientovaném 3'→5'
- jeden RNA-primer v místě *ori*

## Opožďující se DNA řetězec

- syntetizován diskontinuálně přes Okazakiho fragmenty na matricovém řetězci orientovaném 3'→5'
- RNA-primer pro každý Okazakiho fragment
- RNA-primery odbourány od 5'-konce
- prodloužení Okazakiho fragmentů syntézou na 3'-konci a jejich spojení do souvislého řetězce DNA

Oba nové řetězce DNA syntetizuje jedna molekula DNA-polymerázy III

Obousměrná replikační vidlice



# Iniciace replikace

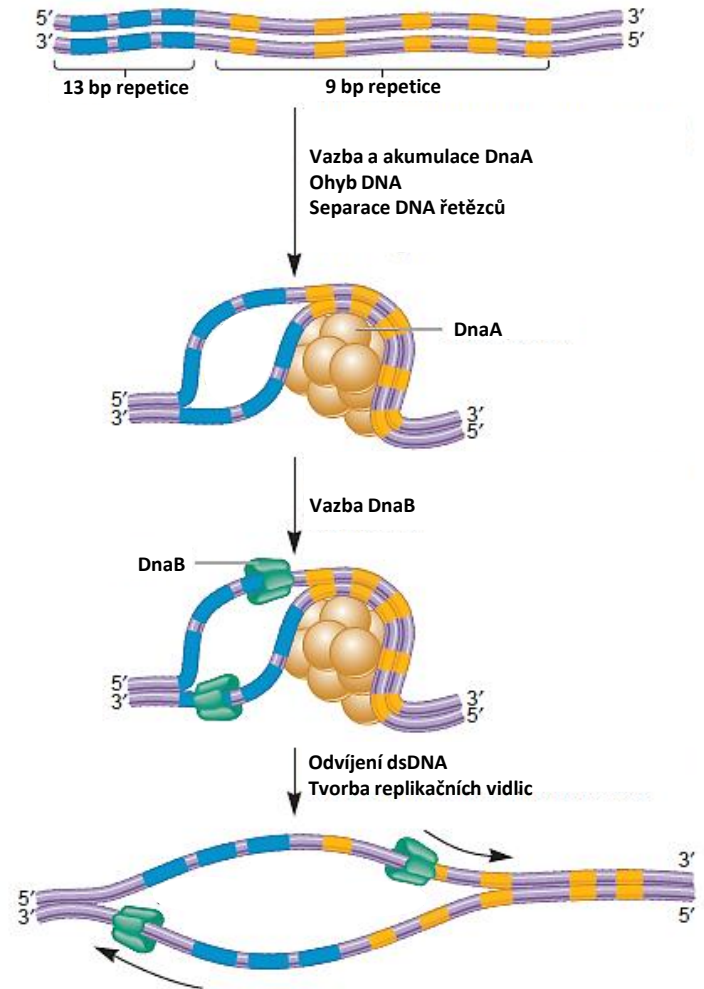
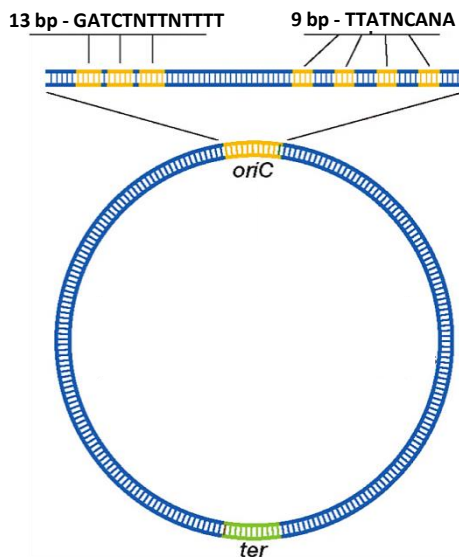
## Počátek replikace *oriC*

- 245bp
- 13 bp tandemová repetice: bohatá na AT páry
- 9 bp repetice: vazba DnaA

**DnaA** - rozeznává *oriC* a převádějí jej do otevřené formy

**DnaB** - helikáza, vazba z obou stran na otevřený úsek DNA  
- odvíjení dsDNA za vzniku replikačních vidlic

**SSB-proteiny** - vazba na jednořetězcové úseky



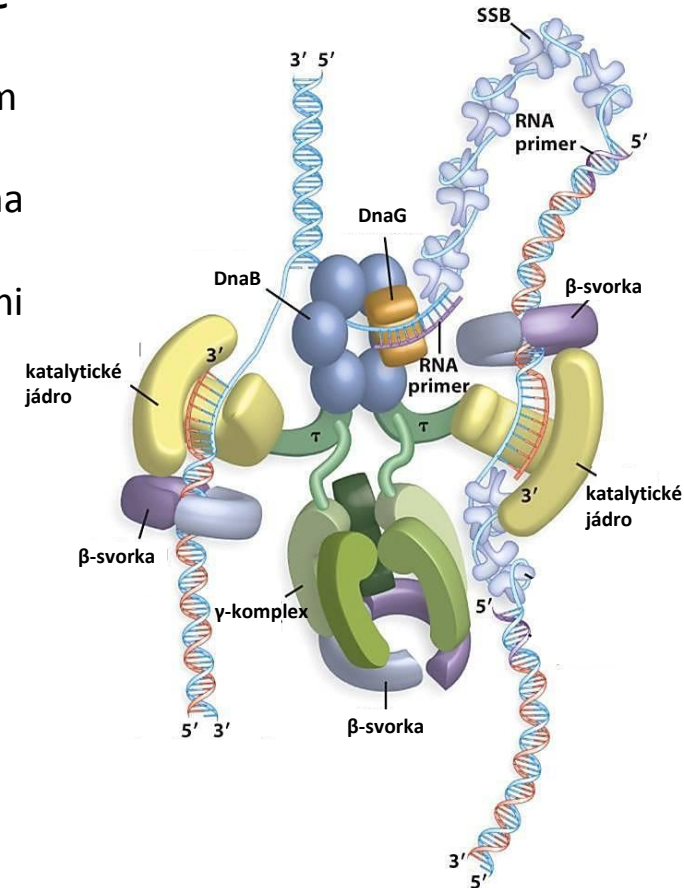
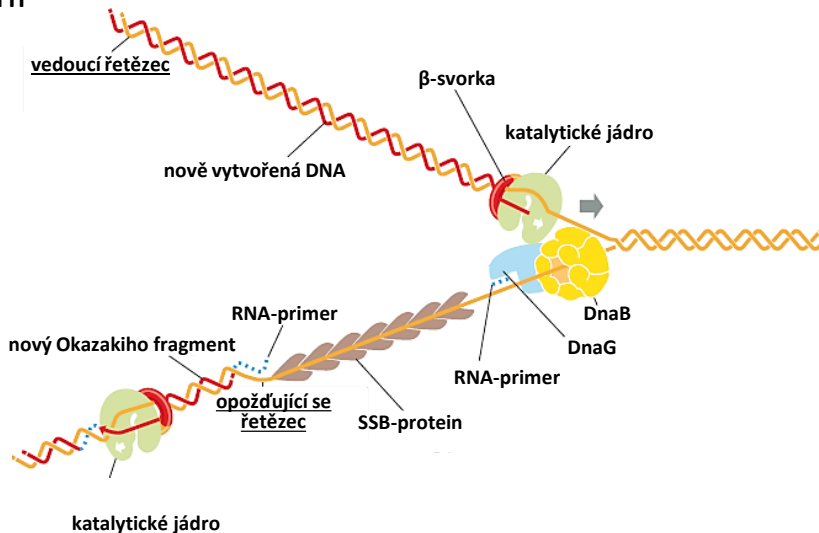


# Elongace replikace

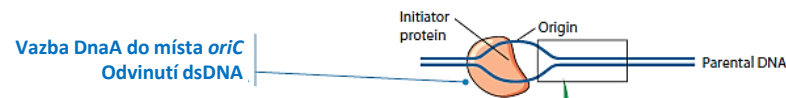
- syntéza obou dceřiných DNA řetězců vyžaduje RNA-primer
- u vedoucího DNA řetězce jeden RNA-primer na počátku replikace
- u opoždujícího se DNA řetězce je RNA-primer na začátku každého Okazakiho fragmentu
- primozom = komplex DnaB s navázaným proteinem DnaG, DNA-primázou tvořící RNA-primery

## Koordinace syntézy obou DNA řetězců ve směru replikační vidlice

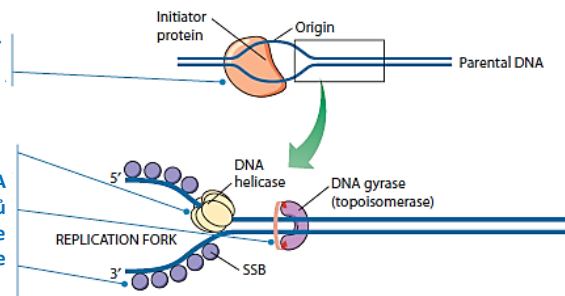
- umožněna ohybem DNA a strukturou DNA-polymerázy III
- katalytická jádra DNA-polymerázy III umístěna každé na jednom matricovém DNA řetězci
- $\gamma$ -komplex umístěn asymetricky, opakovaně nakládá  $\beta$ -svorky na opoždující se řetězec
- pohyb katalytického jádra DNA-polymerázy III mezi jednotlivými  $\beta$ -svorkami



# Elongace replikace



Vazba DnaB, která pokračuje v odvíjení dsDNA  
DNA-gyráza uvolňuje napětí tvorbou záporných nadšroubovcových závitů  
SSB-proteiny udržují řetězce DNA oddělené a přístupné replikace  
Vytvoření replikační vidlice



## Tvorba souvislého řetězce z Okazakiho fragmentů

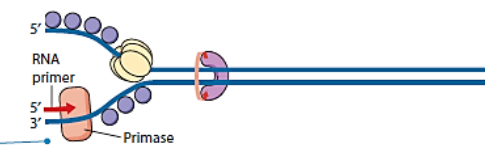
### DNA-polymeráza I

- postupuje za DNA-polymerázou III
- odbourává z 5'-konců RNA-primery
- na 3'-konec předchozího Okazakiho fragmentu napojuje dNTP

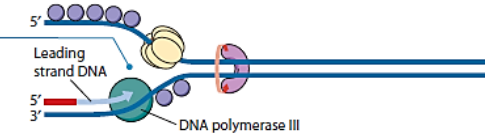
### DNA-ligáza

- spojuje doplněné fragmenty

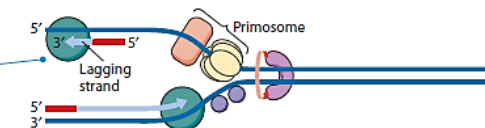
Vazba DnaG a syntéza RNA-primeru na vedoucím řetězci



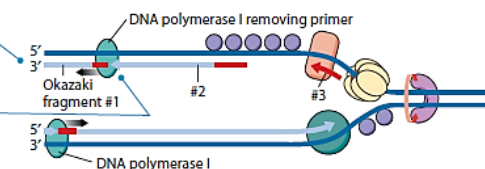
DNA-polymeráza III syntetizuje vedoucí řetězec



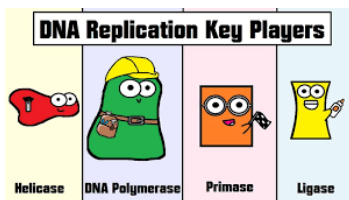
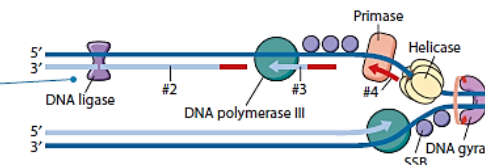
Tvorba RNA-primeru na opoždějícím se řetězci  
DNA-polymeráza III syntetizuje opoždějící se řetězec



Tvorba dalších RNA-primerů na opoždějícím se řetězci  
DNA-polymeráza III syntetizuje Okazakiho fragmenty  
DNA-polymeráza I odstraňuje RNA-primery a zaplňuje jejich místo DNA

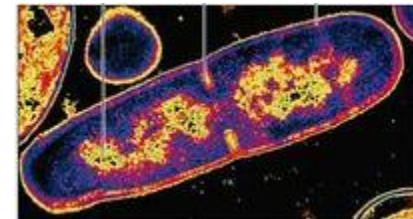
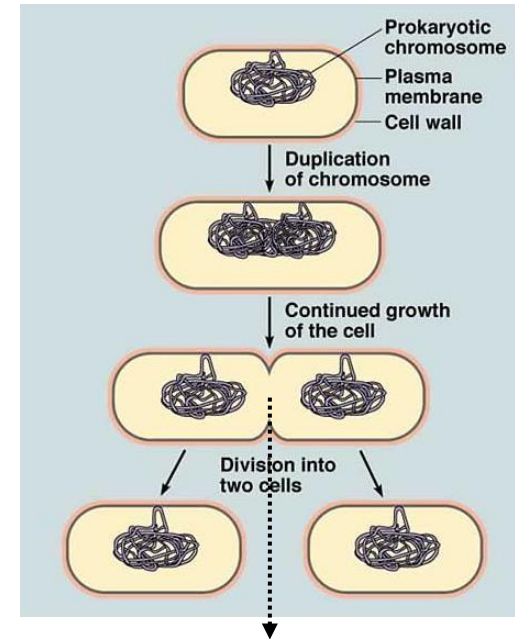
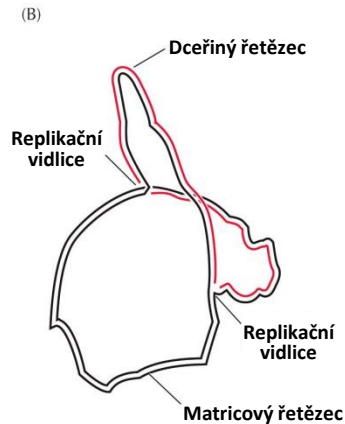
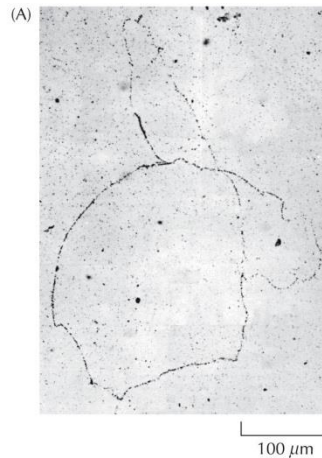
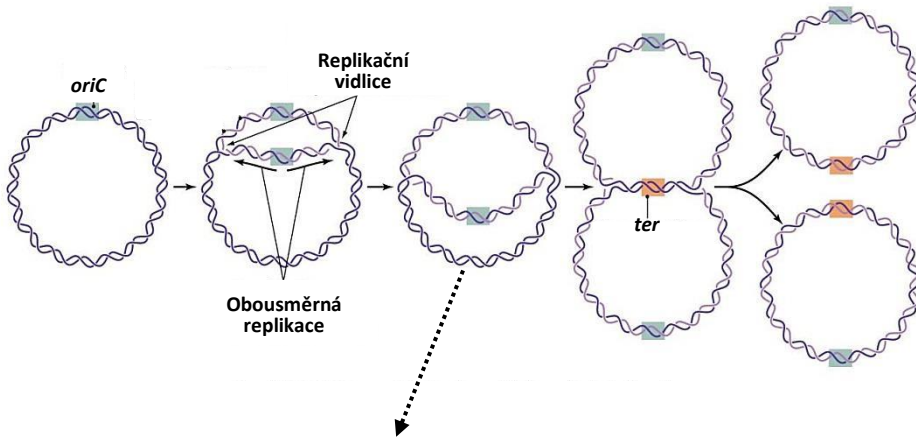


DNA-ligáza spojuje přilehlé Okazakiho fragmenty do souvislého řetězce



# Terminace replikace

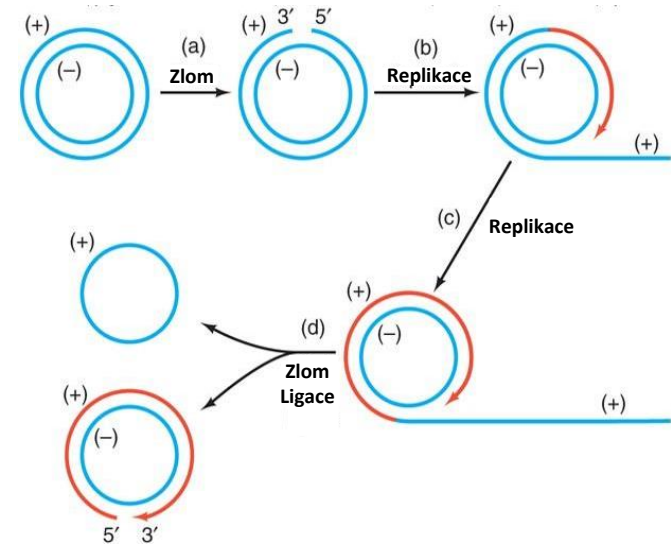
- replikace bakteriálního chromozomu končí na specifických sekvencích = terminátor replikace, *ter*
- vazba specifických proteinů, které inhibují DnaB a zastavují tvorbu replikační vidlice
- funkce topoizomerázy typu II při oddělení vzniklých chromozomů



# Replikace plazmidové DNA

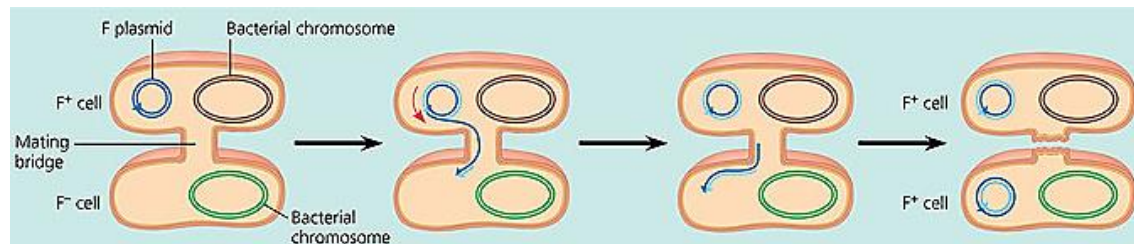
## Replikace plazmidů otáčivou kružnicí

- rozlišení pozitivního (+) a negativního (-) řetězce
- začíná v místě *ori*, kde Rep-protein štěpí (+) řetězec
- vzniklý 3'-konec je prodlužován, (+) řetězec je vytlačován
- po dokončení kružnice štěpí Rep-protein (+) řetězec mezi původní a novou DNA
- volné konce řetězců spojeny DNA-ligázou
- vzniká (i) kružnicová dsDNA (původní (-) a nový (+) řetězec)  
(ii) kružnicová ssDNA (původní (+) řetězec), který se dosyntetizuje přes Okazakiho fragmenty



## Replikace konjugativních plazmidů během konjugace

- interakce pilusu donorové buňky s recipientní aktivuje endonukleázu, která štěpí místo *ori*
- replikaci otáčivou kružnicí, vytlačovaný (+) řetězec přestupuje do recipientní buňky
- (-) řetězec zůstává v donorové buňce a syntéza na něm probíhá kontinuálně
- původní (+) řetězec se v recipientní buňce dosyntetizuje přes Okazakiho fragmenty



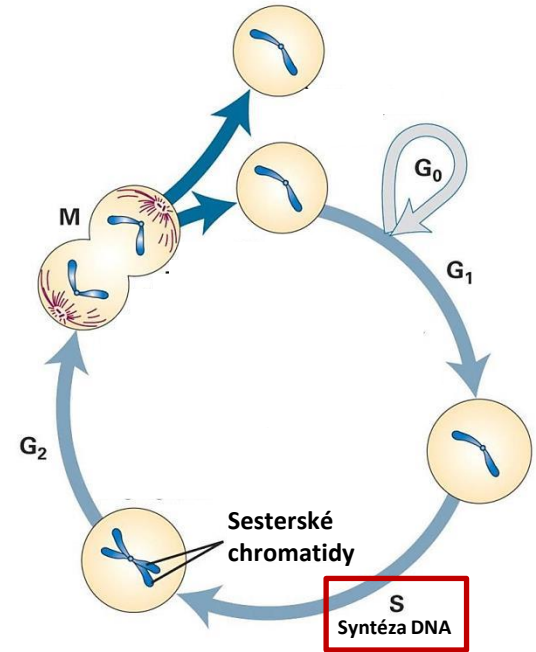
# Replikace chromozomové DNA u eukaryot

Podobné rysy jako u replikace bakteriálního chromozomu:

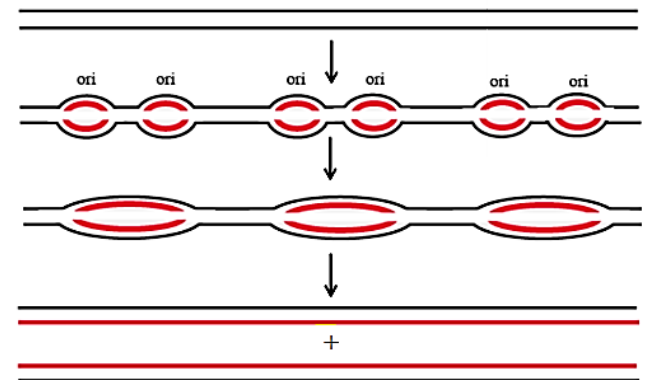
- semikonzervativní a semikontinuální způsob replikace
- organizace replikační vidlice
- analogní sestava replikačních proteinů
- fáze iniciace, elongace a terminace

Odlišnosti od replikace prokaryot:

- replikace DNA omezena do S-fáze buněčného cyklu
- přítomnost nukleozomů
- mnohonásobná místa počátku replikace
- problém s doreplikováním konců lineární molekuly DNA



| Druh                   | Velikost genomu (bp)  | Rychlost syntézy DNA (kbp/min) | Počet počátků replikace |
|------------------------|-----------------------|--------------------------------|-------------------------|
| <i>E. coli</i>         | 4,6 x 10 <sup>6</sup> | 30                             | 1                       |
| <i>S. cerevisiae</i>   | 1,4 x 10 <sup>7</sup> | 3                              | 330                     |
| <i>D. melanogaster</i> | 1,8 x 10 <sup>8</sup> | 2,6                            | 3.500                   |
| <i>Mus musculus</i>    | 2,5 x 10 <sup>9</sup> | 2,2                            | 25.000                  |
| <i>Homo sapiens</i>    | 3,2 x 10 <sup>9</sup> | 3                              | >10.000 ?               |



# Replikace chromozomové DNA u eukaryot

## DNA-polymerázy

|                                      |                               |                            |
|--------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| u eukaryot nalezeno nejméně 13 druhů | $\alpha, \delta, \varepsilon$ | nezbytné pro replikaci DNA |
|                                      | $\beta$                       | opravy DNA                 |
|                                      | $\gamma$                      | replikace mitDNA           |
|                                      | $\tau, \kappa, \eta, \dots$   | funkce neznámá             |

## DNA-polymeráza $\alpha$

- tetramer, dvě podjednotky fungují jako RNA-primáza
- tvorba RNA-primerů a části Okazakiho fragmentů
- mírná procesivita, 5'-3' exonukleázová aktivita

## DNA-polymeráza $\beta$

- monomer, syntéza krátkých řetězců při reparaci DNA
- nízká procesivita, 5'-3' exonukleázová aktivita

## DNA-polymeráza $\gamma$

- dimer, syntéza mitochondriální DNA
- vysoká procesivita, 5'-3' a 3'-5' exonukleázová aktivita

## DNA-polymeráza $\delta$

- interakce s proteiny RCF a PCNA
- dokončení syntézy Okazakiho fragmentů
- vysoká procesivita v asociaci s PCNA-proteinem, 5'-3' a 3'-5' exonukleázová aktivita

## DNA-polymeráza $\varepsilon$

- úzce souvisí s  $\delta$ , hlavní polymeráza pro syntézu vedoucího řetězce



# Iniciace replikace

Replikační počátky po 1 - 300 kbp

- u nižších eukaryot (kvasinky) specifické sekvence (ARS) dlouhé 100 - 200 bp
- savčí chromozomy bez specifických sekvencí, zóny bohaté na AT páry dlouhé 500 - 50.000 bp

## Pre-iniciační komplex

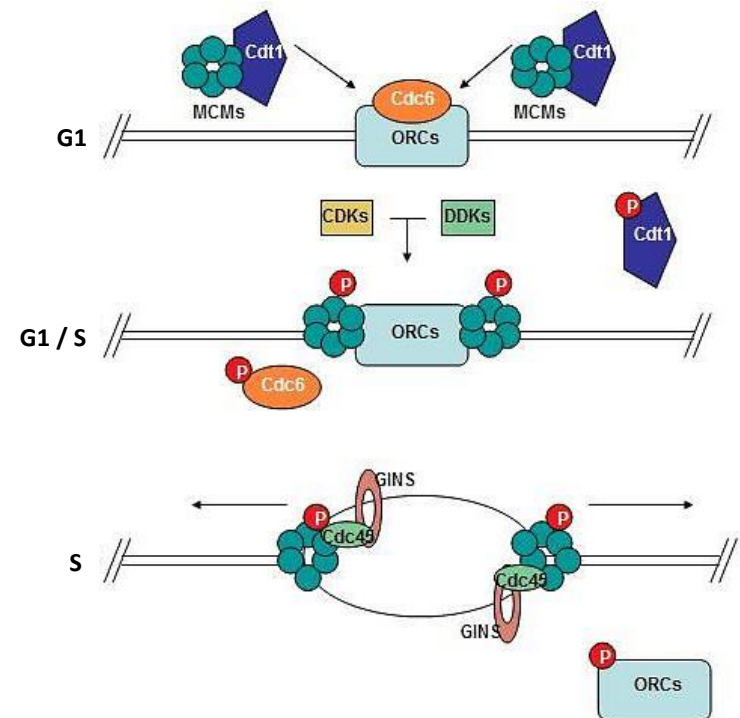
- sestaven v G1 fázi buněčného cyklu
- replikační počátek rozeznán proteinem ORC
- vazba CDC6 a CDT1
- společně umožňují vazbu komplexu MCM2-7

Při vstupu do S-fáze jsou složky pre-iniciačního komplexu fosforylovány, což vede k uvolnění již nepotřebných složek a k aktivaci MCM2-7.

## Iniciační komplex

- Mcm2-7 spolu s dalšími proteiny (CDC45, GINS) plní funkci DNA-helikázy a odvíjí DNA
- zároveň do replikační vidlice váží DNA-polymerázy

Výsledkem iniciace je založení replikační vidlice v počátcích replikace a vazba proteinů, které se budou účastnit elongační fáze replikace.



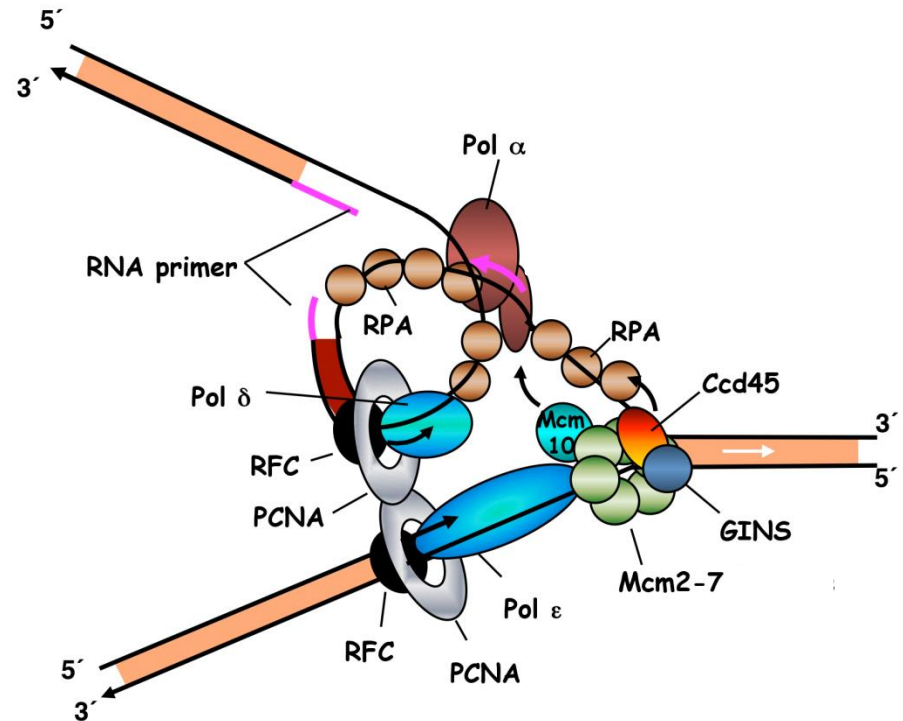
# Elongace replikace

## Vedoucí řetězec

- jediný primer vytvořený DNA-polymerázou  $\alpha$ , jejíž součástí je primáza
- RFC-protein nakládá PCNA na konec RNA-primeru
- PCNA-protein vytěsňuje DNA-polymerázu  $\alpha$
- zvyšuje procesivitu DNA-polymerázy  $\epsilon$ , která se na něj váže a syntetizuje DNA

## Opožďující se řetězec

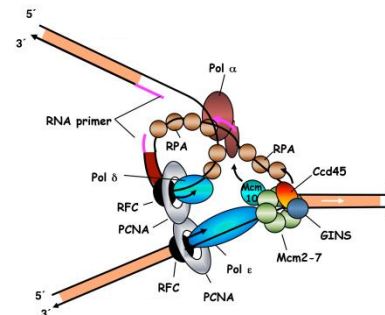
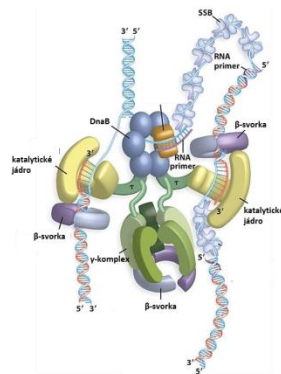
- jednořetězcové úseky pokryty proteinem RPA
- syntéza zahájena DNA-polymerázou  $\alpha$
- ta vytvoří RNA-primer (10 nt) a část DNA Okazakiho fragmentu (10-20 nt)
- vytlačena proteinem PCNA
- RNA-primery odstraňuje z 5'-konce RNázaH
- Okazakiho fragmenty dokončeny DNA-polymerázou  $\delta$  a spojeny DNA-ligázou





# Složky bakteriálního a eukaryotického replizomu

| Funkce                          | Bakterie          | Eukaryota                   |
|---------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Rozpoznání <i>ori</i>           | DnaA              | ORC                         |
| Vazba helikázy k DNA            | DnaC              | CDT1, CDC6                  |
| Helikáza                        | DnaB              | MCM komplex                 |
| Relaxace DNA                    | DNA-gyráza        | Topoizomeráza II            |
| Ochrana ss řetězců              | SSB               | RPA                         |
| Primáza                         | DnaG              | Pol $\alpha$                |
| Syntéza vedoucího řetězce       | Pol3              | Pol $\epsilon$              |
| Syntéza opožďujícího se řetězce | Pol3              | Pol $\alpha$ , Pol $\delta$ |
| Posuvná svorka                  | $\beta$ -svorka   | PCNA                        |
| Nakládání svorky                | $\gamma$ -komplex | RCF                         |
| Odstranění RNA-primeru          | Pol1              | RnázaH                      |
| Dokončení Okazakiho fragmentů   | Pol1              | Pol $\delta$                |
| Spojení Okazakiho fragmentů     | DNA-ligáza        | DNA-ligáza                  |



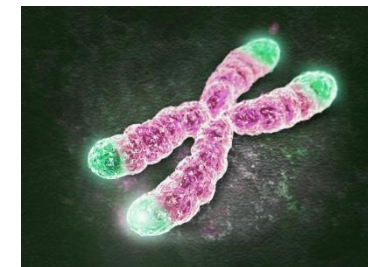
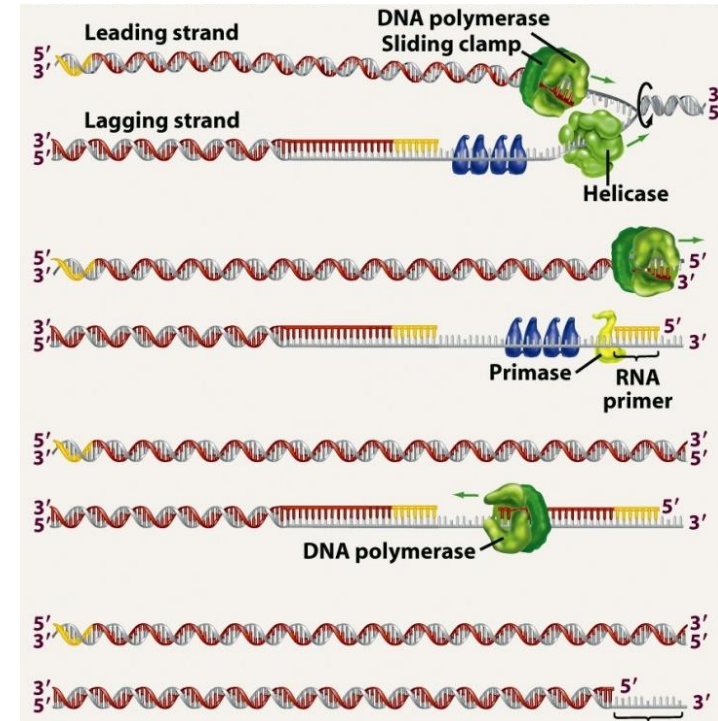
# Terminace replikace

## Problém zakončení replikace lineárních dsDNA

- po odstranění RNA-primeru na 3'-konci matricového řetězce pro opožďující se řetězec vzniká prázdné místo, které nemůže DNA-polymeráza zaplnit, protože nemá na co napojovat dNTP
- bez strategie, jak tento úsek doreplikovat by docházelo ke zkracování chromozomů a ztrátě GI

## Telomery

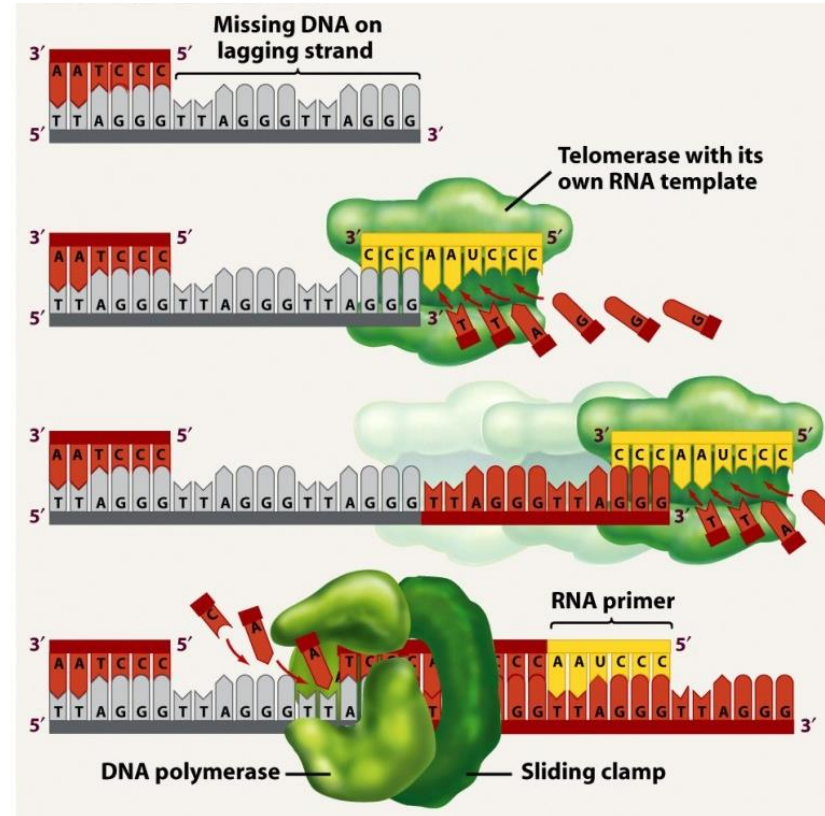
- konce eukaryotických chromozomů, které je chrání před degradací
- druhově specifické telomerické sekvence
- vazba telomerázy, která udržuje jejich délku
- u buněk bez telomerázy dochází ke zkracování telomer (~50-150 bp / dělení)
- senescence či smrt buněk po zkrácení telomer pod kritickou hranici
- telomery jsou rozeznány jako skutečné konce chromozomů a buňka je dokáže odlišit od dvouřetězcových zlomů uprostřed chromozomů



# Terminace replikace

## Telomeráza

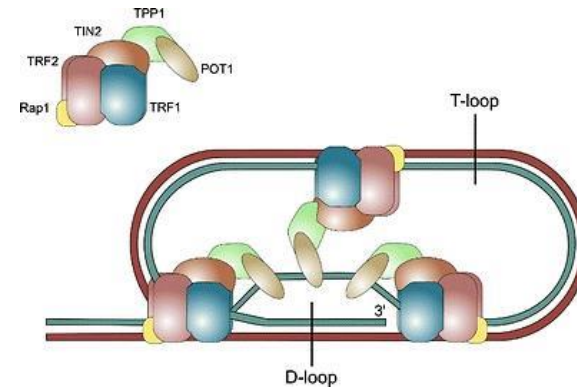
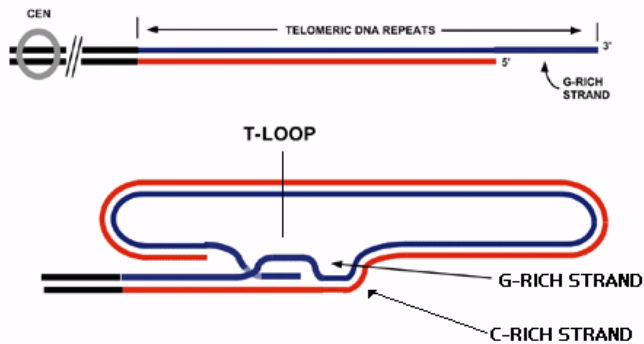
- umožňuje dokončit syntézu dceřiných řetězců na 3'-koncích matricové DNA
- ribonukleoproteinový komplex složený z
  - (i) RNA - působí jako templát
    - sekvence komplementární k telomerickým sekvencím
  - (ii) RNA-dependentní-DNA-polymerázy
- ke konci replikace se přes RNA složku váže k přečnívajícímu 3'-konci DNA
- tento konec využívá jako primer a podle RNA matrice ho prodlužuje o telomerické sekvence
- syntéza tandemových repetit je zajištěna translokací telomerázy podél vznikajícího řetězce
- na prodlouženém 3'-konci vytvoří replikační enzymy další Okazakiho fragment a původní délka chromozomu je zachována
- přítomna v zárodečných buňkách, nepřítomna v somatických buňkách
- reaktivace v nádorových buňkách



# Terminace replikace

## Ochrana přechřívajících 3'-koců chromozomů

- telomerické sekvence se ohýbají a vytvářejí strukturu telomerické smyčky (T-smyčka)
- ssDNA na konci řetězce se zanořuje do dsDNA úseku a tvoří trojvláknovou strukturu (D-smyčka)
- celou strukturu stabilizuje komplex proteinů = shelterin
  - u lidí TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1, RAP1
  - vazba na ss či ds úseky DNA, ochrana před endonukleázami
  - potlačení opravných mechanismů DNA, regulace telomerázy



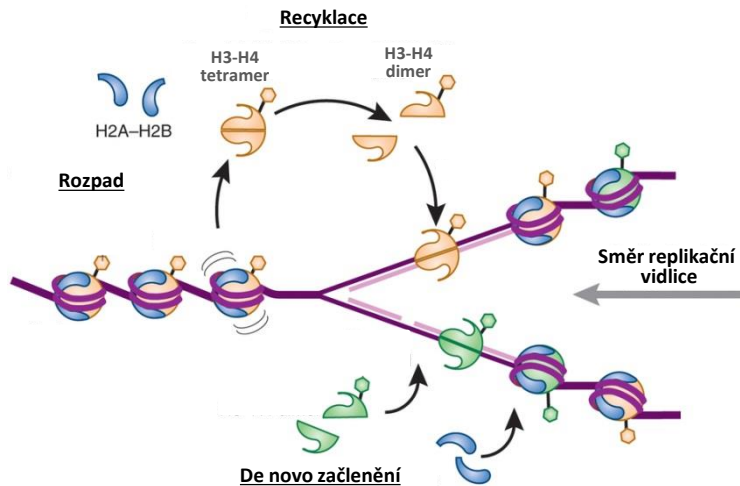
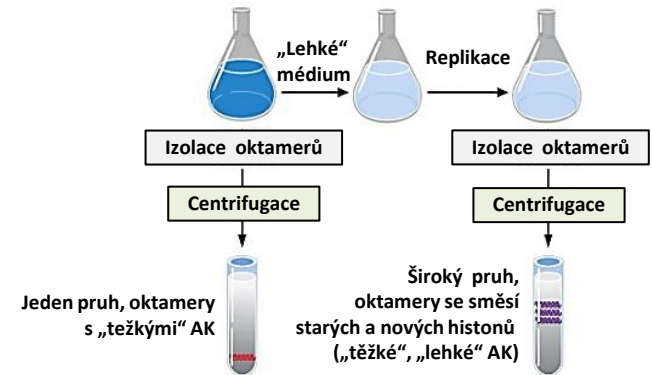
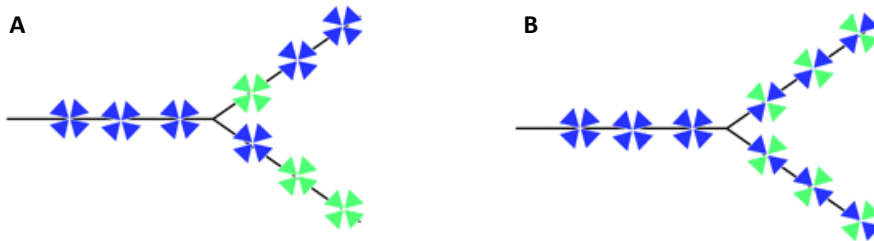
## Replikativní senescence

- způsobena zkrácením telomer a rozpadem T-smyčky
- buňky zastaví růst, vstoupí do senescence nebo spustí apoptózu
- brání tak nestabilitám v genomu a vývoji nádorů
- telomery by byly rozeznány jako poškození DNA
- odhalené konce by mohly vést k fúzi chromatid či chromozomů

# Nukleozomy během replikace

Během G1 a S fáze buněčného cyklu jsou syntetizovány histony nutné pro zdvojení nukleozomů během replikace DNA.

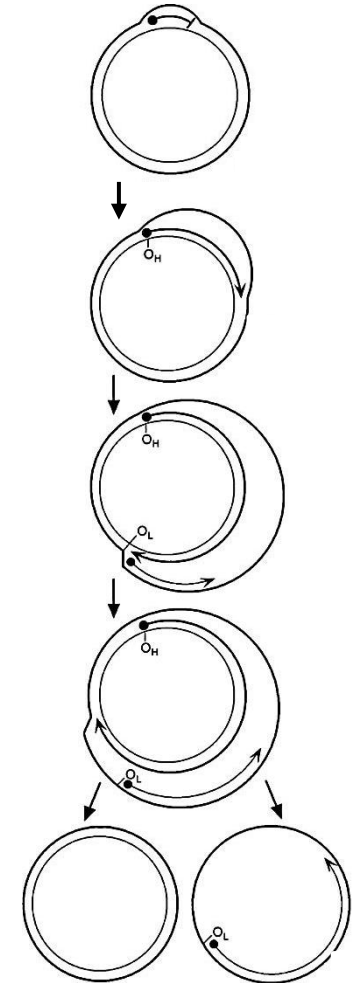
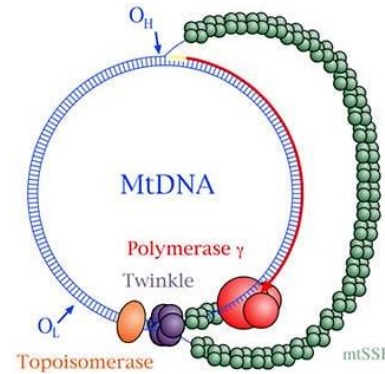
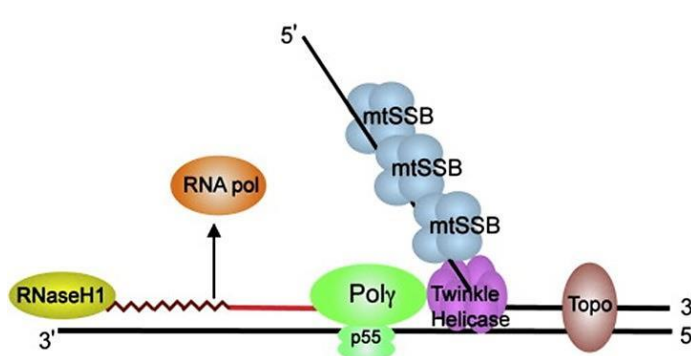
Teoretické způsoby využití původních a nových histonů v dceřiných nukleozomech



- nukleozomy se během replikace rozpadají
- rychlé opětovné sestavní nukleozomů po replikaci
- na umístění histonů do nových nukleozomů se podílí faktor CAF-1 za pomoci ASF1
- nové oktamery jsou náhodnou směsí původních a nových histonů

# Replikace mitochondriální DNA u eukaryot

## Replikační vidlice mitochondriální DNA



- kružnicová dsDNA z těžkého (H) a lehkého (L) řetězce
- každý řetězec obsahuje své místo *ori*
- D-smyčka: oblast vytěsnění H-řetězce  
vazba primeru párujícího se s L-řetězcem
- od primeru začíná syntéza nového H-řetězce za současného vytěšňování řetězce původního
- po uvolnění místa *oriL* začíná syntéza nového L-řetězce



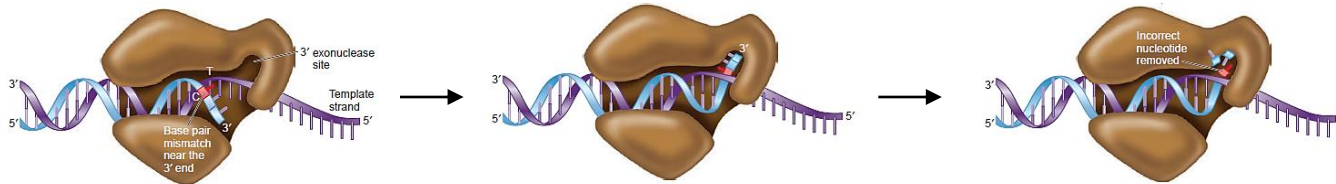
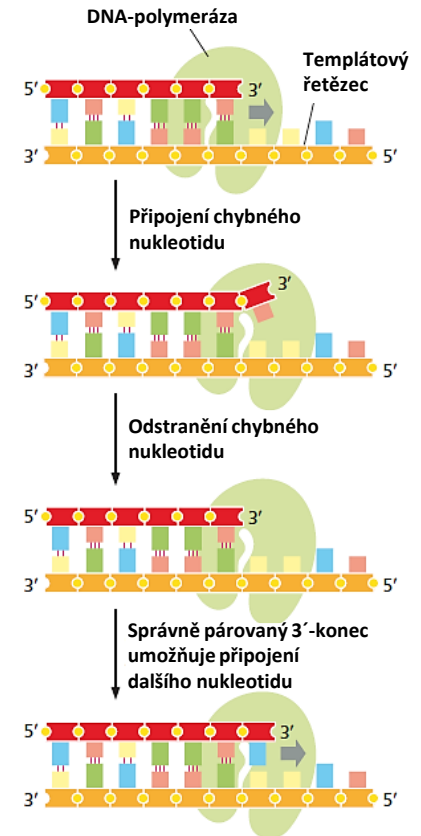
# Přesnost replikace DNA

Chybovost DNA-polymerázy je jedna chyba na každých  $10^7$  bází.  
Přesnost replikace DNA zajištěna komplementárním párováním bází a vlastnostmi DNA-polymerázy:

- (i) přednostní připojení nukleotidů se správným párováním
- (ii) odstranění chybně připojeného nt procesem zvaným proofreading

## Proofreading

- kontrolní čtení, které probíhá během syntézy DNA
- kontrola správného párování začleněných nukleotidů
- špatně začleněný nukleotid odstraněn 3'-5' exonukleázovou aktivitou DNA-polymerázy
- polymerační a korekční aktivita DNA-polymerázy zajištěna různými katalytickými doménami enzymu
- podmíněn syntézou DNA řetězce ve směru 5'-3'

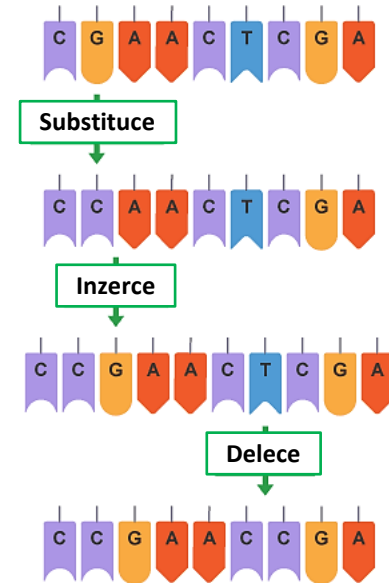


# Molekulární podstata mutagenese

- zachování genomu buněk vyžaduje - přesnost replikace DNA  
- schopnost opravit poškozenou DNA
- genom buněk je poškozován jak reaktivními molekulami pocházejícími z buňky, tak vnějšími vlivy
- i přes opravné mechanismy dochází ke vzniku mutací
- mutace jsou dědičné změny genotypu, jejichž molekulární podstatou jsou nukleotidové substituce, delece a inserce

## Substituce

- výměna nukleotidu
- tranzice: výměna purinové báze za purinovou či pyrimidinové za pyrimidinovou
- transverze: výměna purinové báze za pyrimidinovou či naopak
- synonymní substituce: vznik kodónu se stejným smyslem  
AAG (Lys) ---> AAA (Lys)
- nesmyslná mutace: vznik terminačního kodonu  
AAG (Lys) ---> TAG (STOP)
- neutrální substituce: změnou aminokyseliny se nemění konformace peptidového řetězce  
AAG (Lys) ---> AGG (Arg)
- mutace měnící smysl kodonu  
AAG (Trp) ---> ACG (Thr)

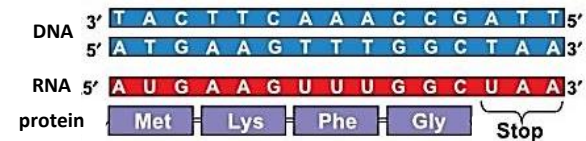




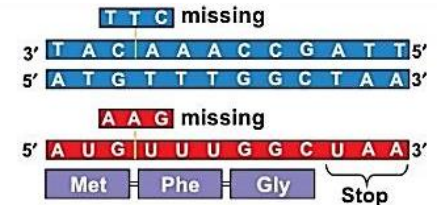
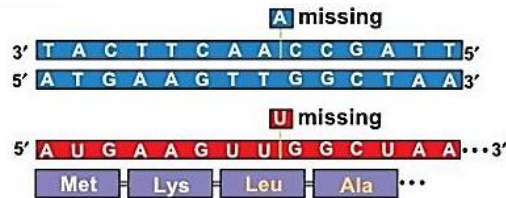
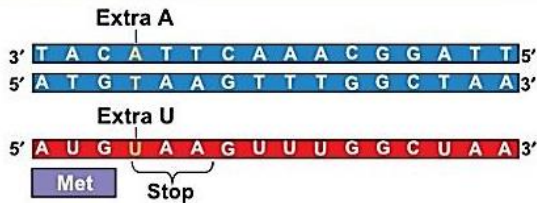
# Molekulární podstata mutagenese

## Delece, inserce

- ztráta / vložení jednoho nebo více nukleotidů
- posunové mutace: změna čtecího rámce



jednonukleotidová inserce      jednonukleotidová delece      trinukleotidová delece



Standardní alela: převládá v populaci, funkční

Mutantní alela: alela vzniklá mutací, její četnost v populaci nepřesahuje 1 %, nemusí být funkční

Spontánní mutace: vznikají bez účinku mutagenu

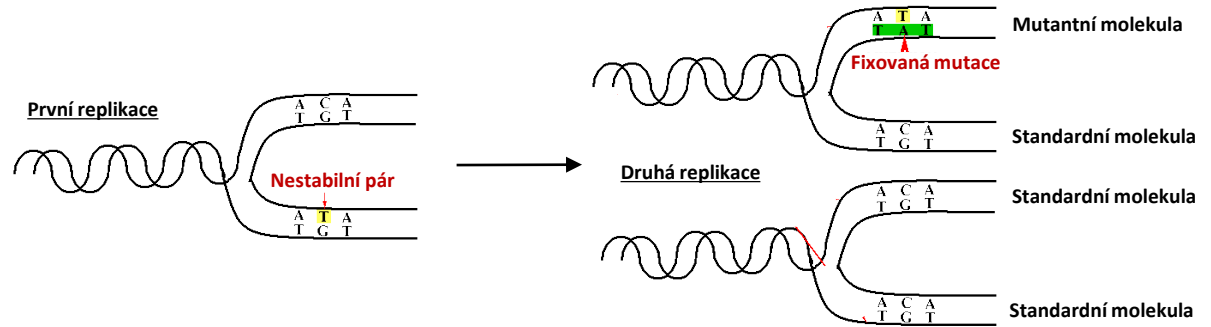
Indukované mutace: vyvolané mutagenem

## Mutagen

- fyzikální nebo chemické agens vyvolávající mutace
- působí genotoxicky, poškozují genotyp
- promutagen není přímo mutagenní, metabolickou aktivací přeměněn na mutagen

# Spontánní mutace

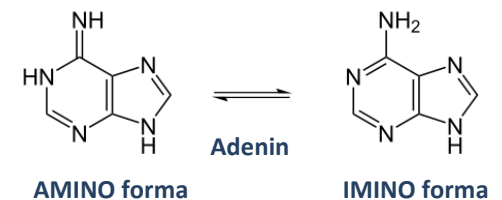
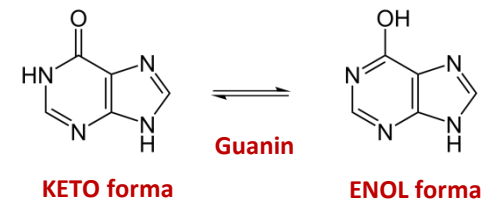
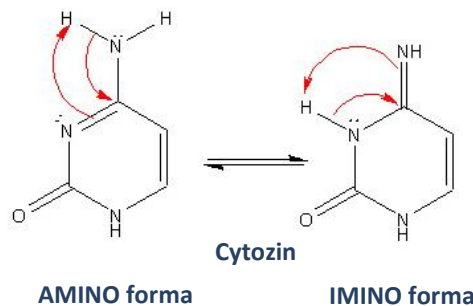
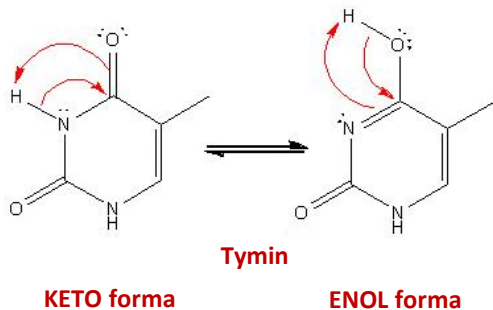
Pokud není chybné párování bází opraveno, dochází při dalších replikacích k fixaci mutace.



Chybné páry bází mohou vzniknout během replikace díky chemickým vlastnostem bází a těmto dějům:

## 1. Tautomerní změny bází

- stabilní tautomery podléhají Watson-Crickovu párování
- přechodné tautomery mohou tvořit páry AC, GT
- frekvence výskytu  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  / na nukleotid a replikační cyklus



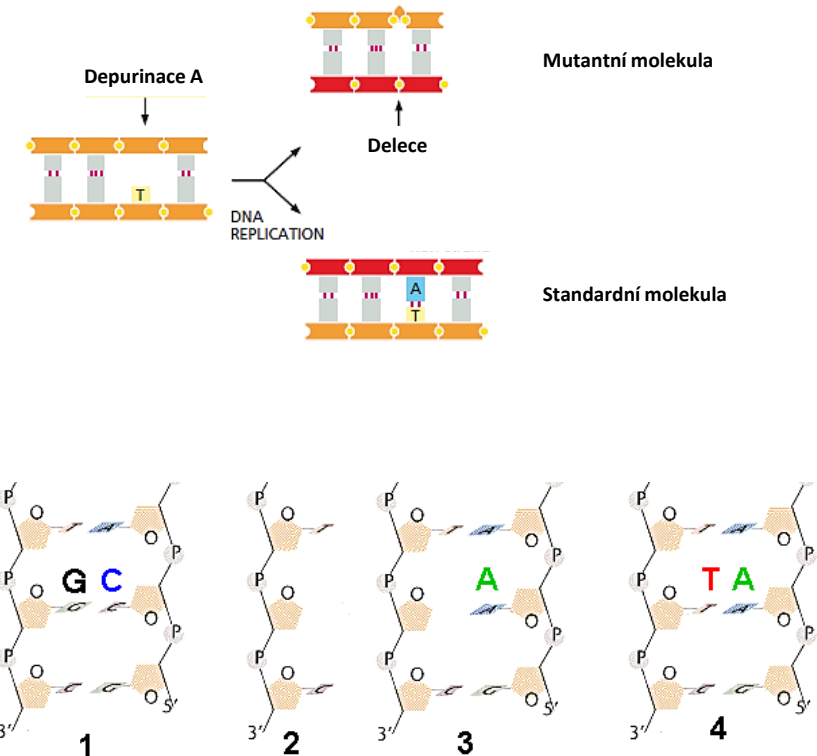
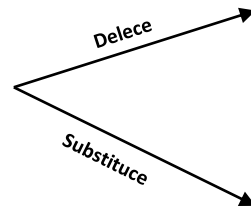
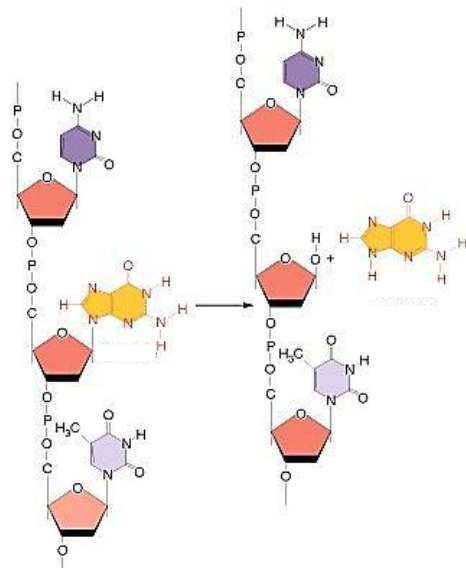
# Spontánní mutace

## 2. Kolísavost párování bází

- uplatňuje se při čtení genetického kódu, ale může se vytvořit i při replikaci
- vznik párů CT, GA, TG

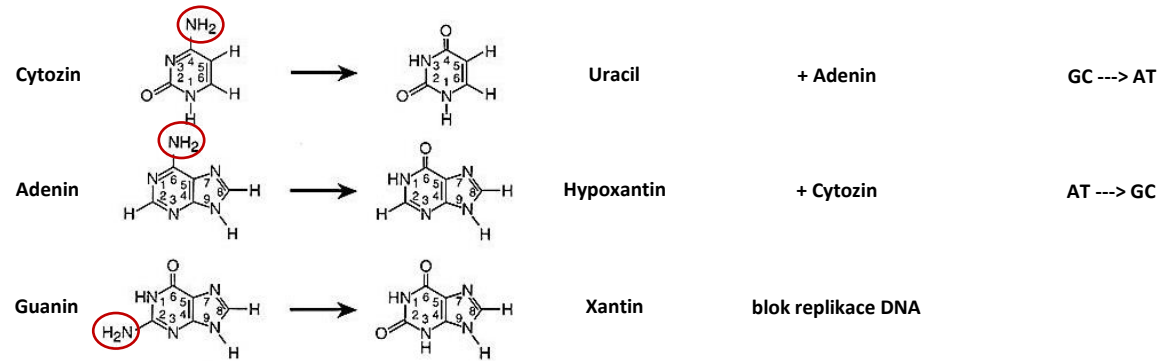
## 3. Depurinace a depyrimidinace

- přerušení glykosidické vazby mezi bází a cukrem, následná ztráta báze, vznik AP místa
- po replikaci může vzniknout substituce (přednostně A) či delece
- několik tisíc událostí / den v genomu savců
- depurinace častější



# Spontánní mutace

## 4. Deaminace

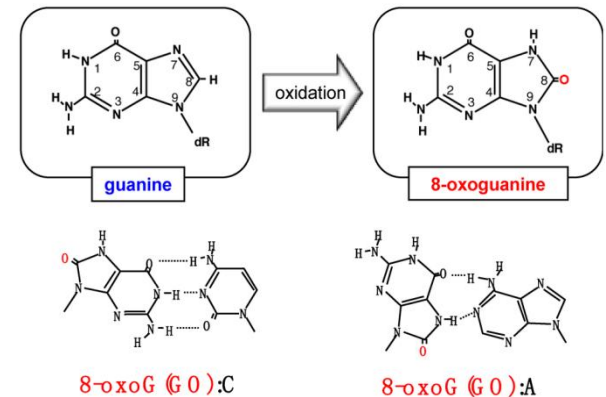
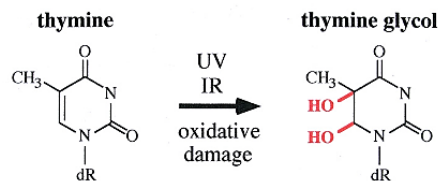


## 5. Inkorporace uracilu do DNA

- místo tyminu
- během replikace účinně odstraňován uracil-DNA-glykosylázou
- volné dUTP odbourávají dUTPázou
- dUMP vzniká z dCMP, a využívá se pro biosyntézu dTMP, při inhibici této biosyntézy roste pravděpodobnost, že se uracil zařadí do DNA

## 6. Oxidativní poškození DNA

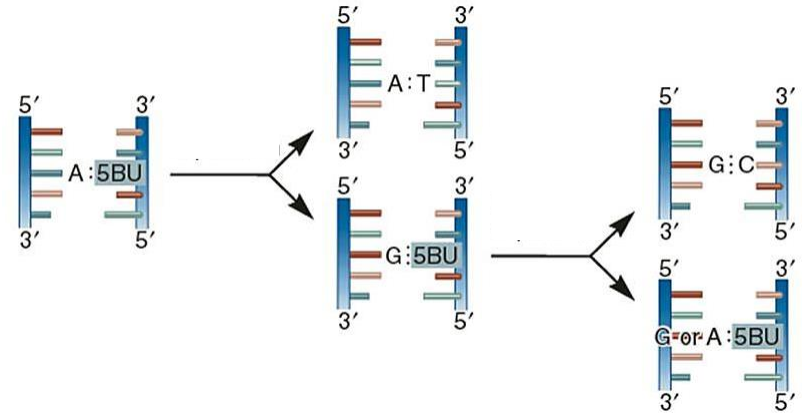
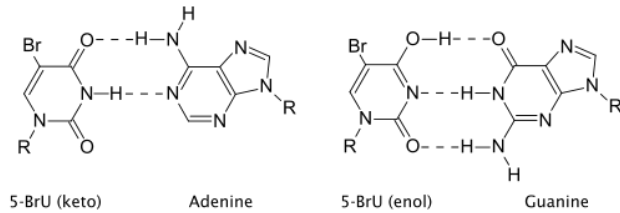
- vyvolává především hydroxylový radikál (OH●)
- 8-oxodeoxyguanozin (8-OxoG) se přednostně se páruje s A
- tyminglykol zastavuje replikaci



# Indukované mutace - chemomutageny

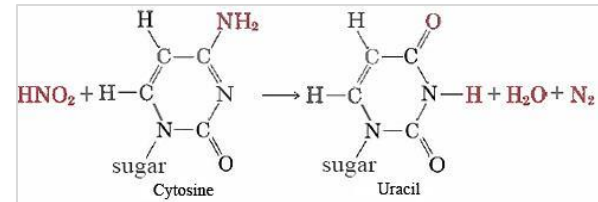
## Analogy bází

- purinové a pyrimidinové deriváty
- strukturálně podobné bázím, inkorporace do NK
- např. 5-brómuracil: analog tyminu, AT → GC



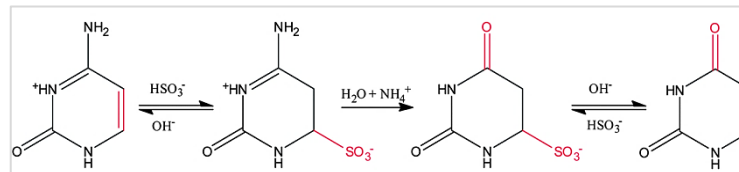
## Kyselina dusitá (HNO<sub>2</sub>)

- oxidativní deaminace bází, AT ↔ GC
- vznik v žaludku z NaNO<sub>3</sub>



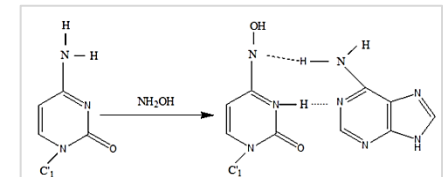
## Hydrogensířičitan (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

- deaminace C, GC → AT



## Hydroxylamin

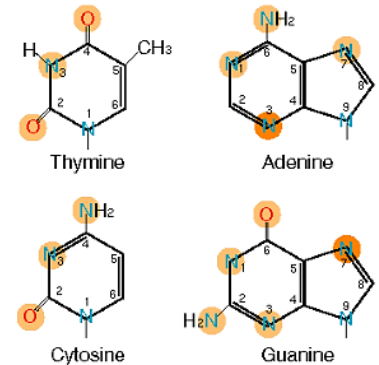
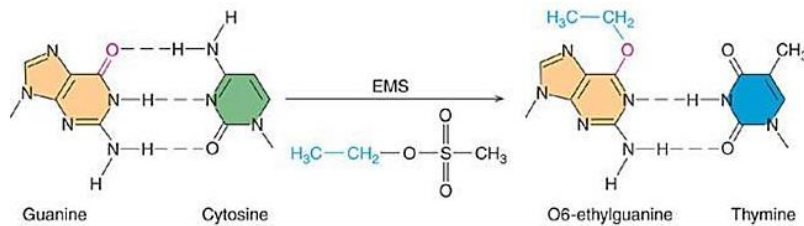
- reaktivita s C
- vznik hydroxyamino skupiny, párování s A, GC → AT



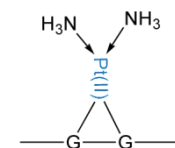
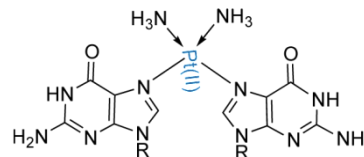
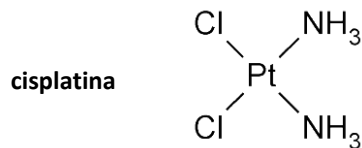
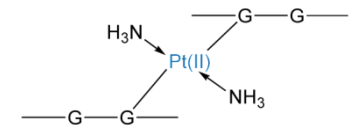
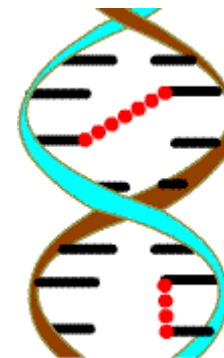
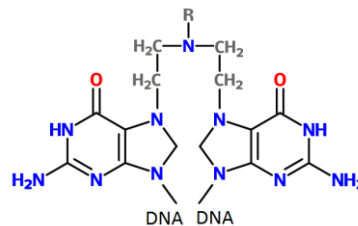
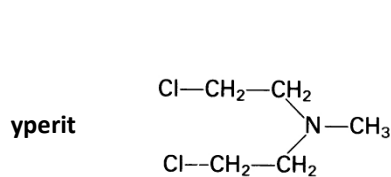
# Indukované mutace - chemomutageny

## Alkylační látky

- alkylace nukleofilních center bází DNA, atomy dusíku a kyslíku
- jednofunkční - jedna reaktivní skupina, alkylace bází mění jejich párování  
- př. ethylmetansulfonát (EMS)



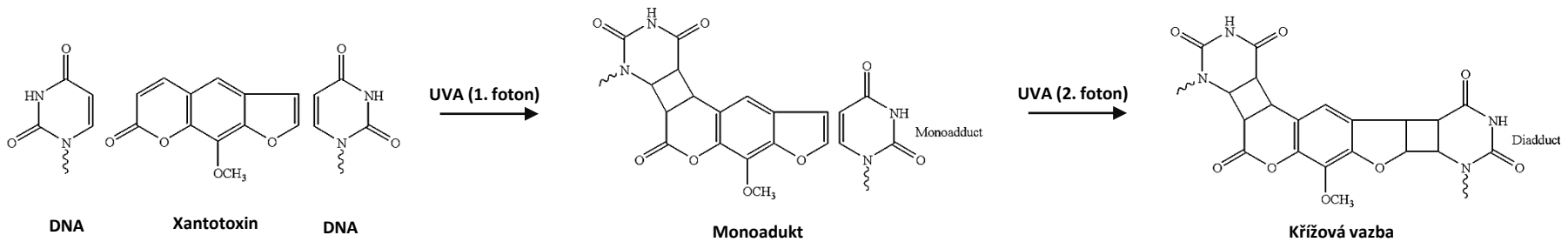
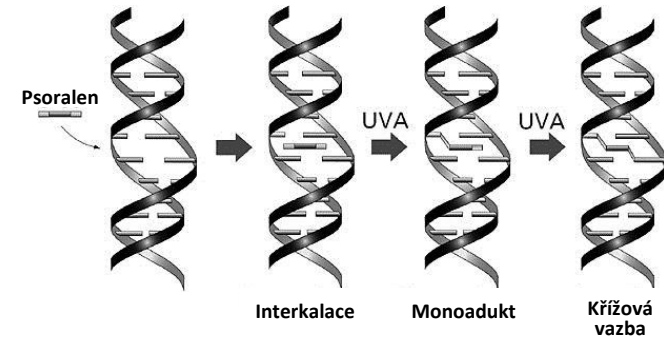
- dvojfunkční - dvě reaktivní skupiny, tvoří křížové vazby mezi dvěma nukleofilními centry  
- zástava replikace DNA, využití v chemoterapii  
- př. yperit (hořčičný plyn)



# Indukované mutace - chemomutageny

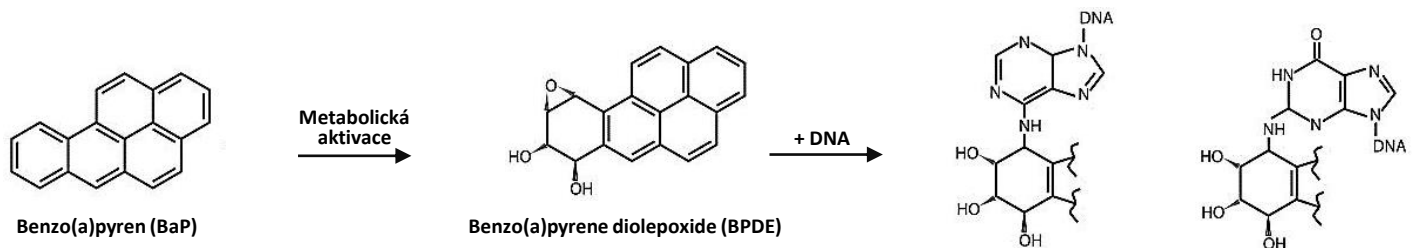
## Psoraleny

- planární tricyklická konfigurace, interkalace mezi sousední nukleotidy v dsDNA, posunové mutace
- fotoreaktivace UVA světlem vede k tvorbě monoadduktů a křížových vazeb na DNA, zástava replikace



## Polyaromatické uhlovodíky

- interkalace do dsDNA, metabolickou aktivací vznikají epoxidy, které tvoří monoaddukty s DNA
- př. benzo(a)pyren



# Indukované mutace - promutageny

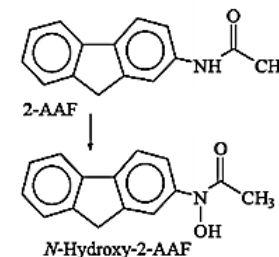
Promutageny jsou samy o sobě neškodné. Vyžadují metabolickou aktivaci, aby se staly mutageny.

## Benzo(a)pyren

- produkt nedokonalého spalování
- uhelný dehet, výfukové plyny, cigaretový kouř, grilované maso
- vznik epoxidů tvořících adukty s DNA

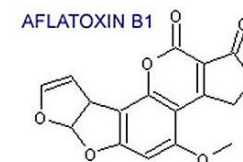
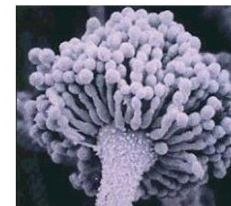
## 2-acetylaminofluoren (AAF)

- původně vyvinut jako insekticid
- vznik N-hydroxy-2-aminofluorenu tvořícího adukty s DNA
- nádory jater, močového měchýře, ledvin



## Aflatoxiny

- mykotoxiny produkované plísněmi rodu *Aspergillus*
- kontaminované potraviny (obilniny, olejniny, koření, ořechy)
- vznik aflatoxinu M<sub>1</sub>, jeden z nejsilnějších jaterních mutagenů



## Dusičnany, dusitany

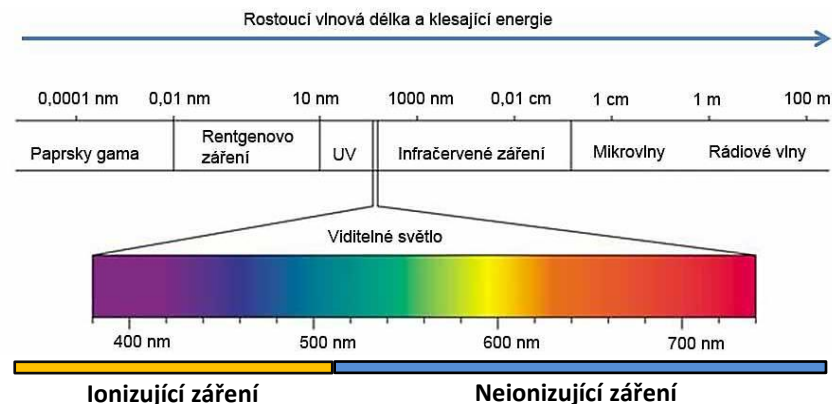
- hnojiva, potravinové konzervanty; potraviny rostlinného i živočišného původu
- vznik nitrosaminů, které modifikují báze DNA a mění jejich párování



# Indukované mutace - fyzikální mutageny

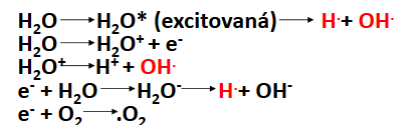
## Ionizující záření

- záření s dostatkem energie pro ionizaci atomů a molekul ozářené látky
- gama záření, paprsky X, část UV záření
- vyvolává vznik modifikovaných bází, křížových vazeb a jednořetězcových i dvouřetězcových zlomů DNA



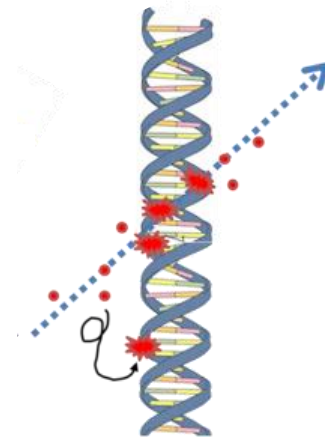
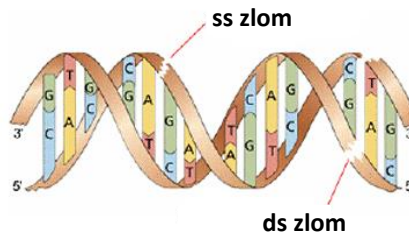
## (i) nepřímý účinek (65 % poškození)

- ionizace vody a vznik vysoce reaktivních radikálů
- modifikace bází: hydroxylace, deaminace, demethylace



## (ii) přímý účinek (35 % poškození)

- absorpce energie molekulou DNA, která se ionizuje a dochází ke štěpení vazeb a zlomům DNA
- př. ozáření dávkou 1 Gy vyvolá v buňce 15 - 60 ds zlomů, > 1000 ss zlomů



# Indukované mutace - fyzikální mutageny

## Ultrafialové záření

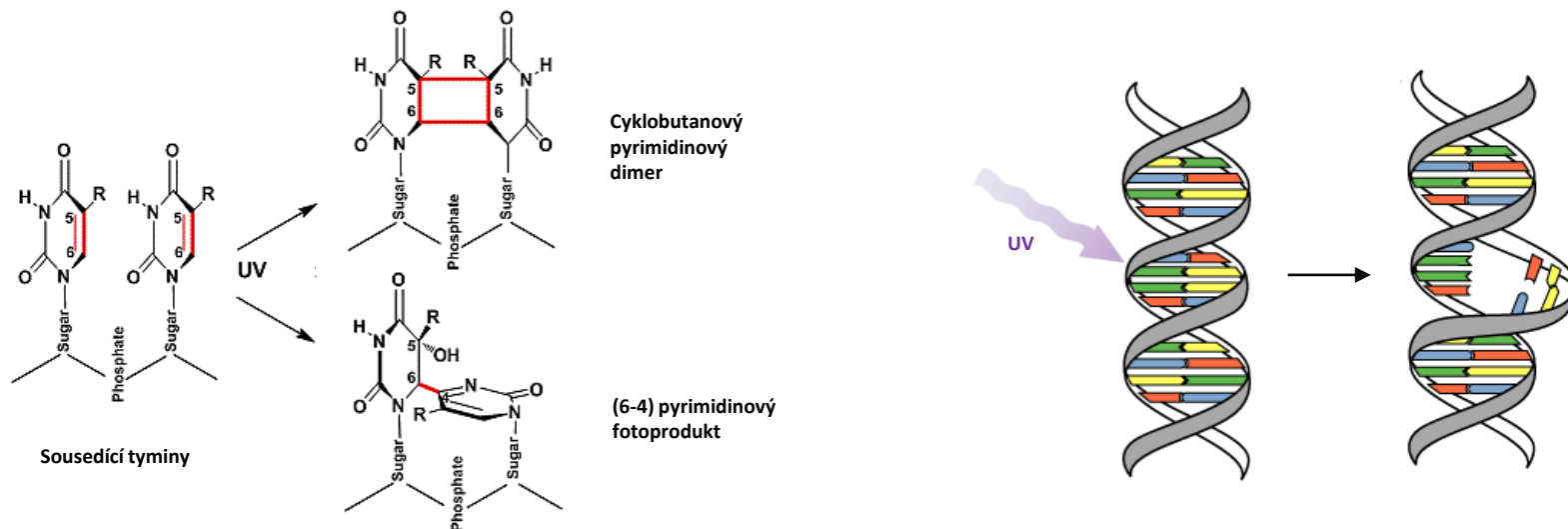
- nižší energie a specifitější účinek než ionizující záření, absorpční maximum bází při 254 nm

### (i) zvýšení frekvence spontánních mutací

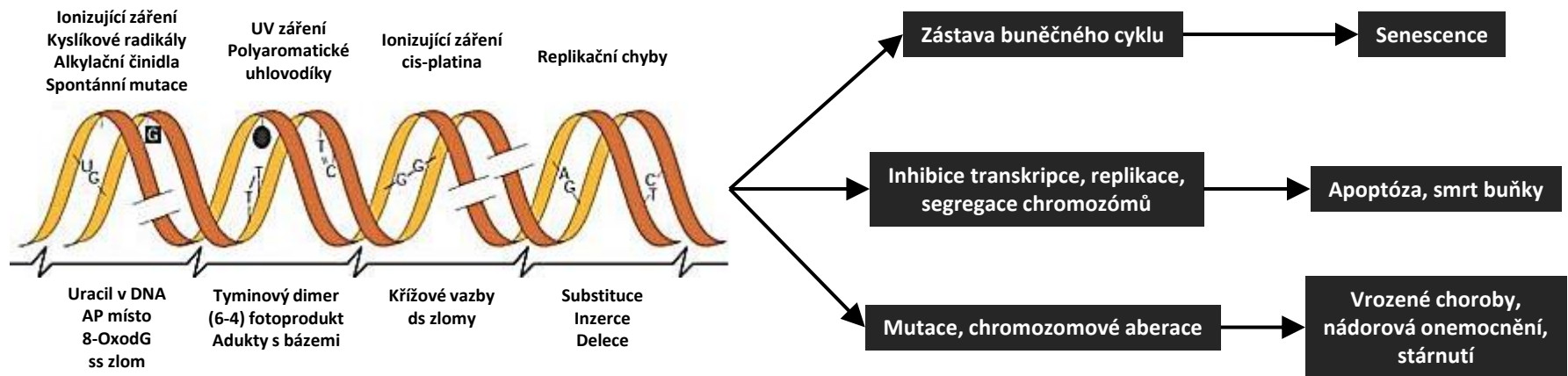
- zachycená energie excituje atomy, které se stávají reaktivnější a přecházejí do tautomerů

### (ii) tvorba pyrimidinových dimerů

- dimerizace dvou sousedních pyrimidinových molekul na stejném řetězci DNA
- kovalentní spojení přes cyklobutanový kruh či (6-4) pyrimidinové fotoprodukty
- porušují strukturu DNA a narušují replikaci
- nejčastěji tyminové dimery



# Opravy poškozené DNA



V buňkách existují mechanismy, pomocí kterých buňka rozezná a úplně nebo do určité míry odstraní poškození DNA. Tyto opravné mechanismy jsou katalyzovány různými sadami enzymů.

Schopnost opravit poškozenou DNA je zásadní pro udržení integrity genomu buněk a pro normální fungování mnohobuněčného organismu.

Tomas R. Lindahl, Paul L. Modrich, Aziz Sancar získali v roce 2015 Nobelovu cenu za chemii za výzkum v oblasti molekulárních mechanismů oprav DNA.

Typy oprav DNA:

- úplná oprava - oprava na původní stav bez syntézy DNA
- excizní oprava - vyštěpení poškozeného místa, syntéza nepoškozené DNA
- tolerantní oprava - obnova funkce DNA bez opravy poškození

# Úplné opravy DNA

## Fotoreaktivace

- odstranění pyrimidinových dimerů v DNA vyvolaných UV zářením
- katalyzována fotolyázou (aktivace VIS o vlnové délce 340 - 400 nm)
- fotolyáza štěpí cyklobutanový kruh v pyrimidinovém dimeru
- fylogeneticky konzervativní mechanismus, u savců excizní oprava

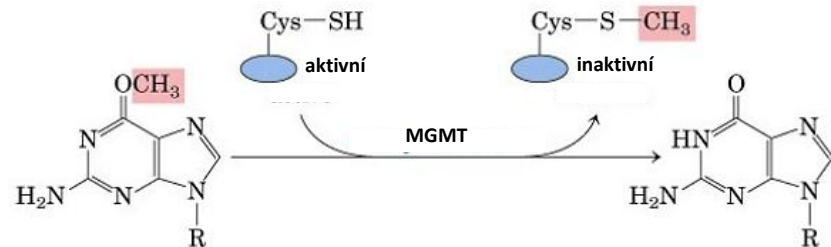
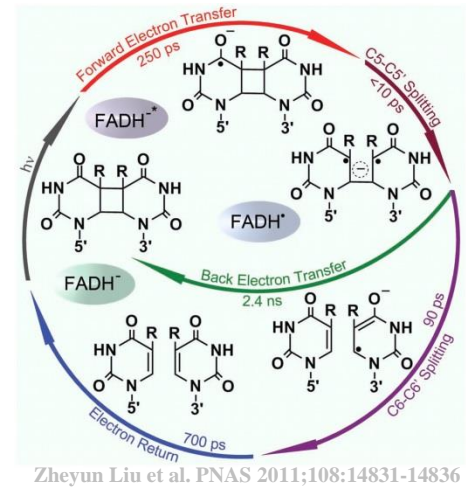
## Přímá oprava alkylovaných bází

### O<sup>6</sup>-metylguanin-DNA-metyltransferáza

- u lidí *MGMT*, u bakterií *Ada*; „sebevražedný enzym“
- demethylace O<sup>6</sup>-metylguaninu na guanin, přenos metyl skupiny na vlastní Cys
- deficity *MGMT* nalezeny u nádorů děložního hrdla, kolorekta, žaludku, jater, glioblastomu
- u bakterií adaptivní odpověď na alkylační poškození
  - *Ada* odstraňuje alkylace z O<sup>6</sup>-metylG a O<sup>4</sup>-metylA (Cys321) i cukrfofátové páteře (Cys69)
  - methylace Cys69 mění *Ada* na silný aktivátor transkripce sebe sama a dalších opravných genů

N<sup>1</sup>-metyIA, N<sup>3</sup>-metylC: demethylace enzymem ALKBH

N<sup>3</sup>-metyIA, N<sup>7</sup>-metylG: excizní opravy



# Excizní opravy DNA

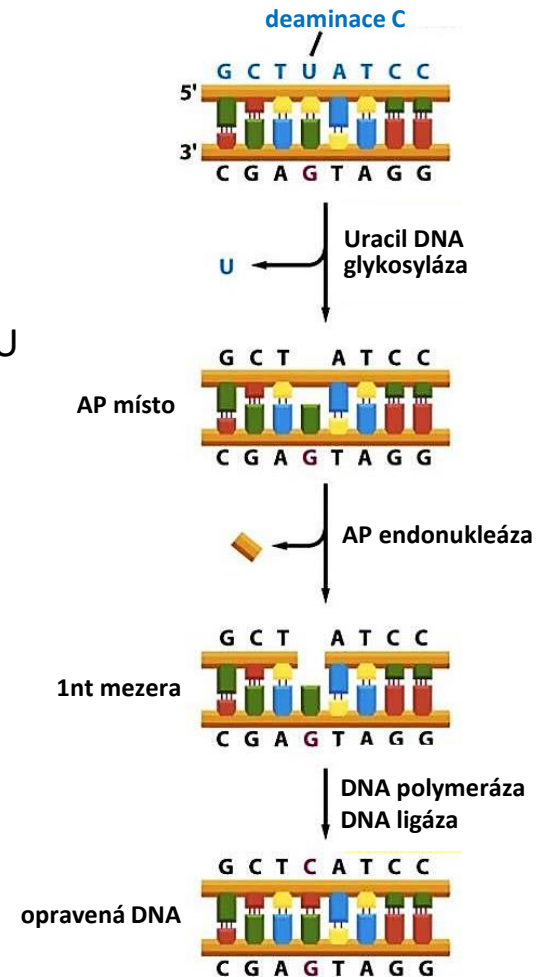
Evolučně konzervativní, u prokaryot i eukaryot.

Třístupňový proces:

1. rozpoznání a vyštěpení poškozené DNA, nukleázy
2. zaplnění mezery správnými nukleotidy, DNA polymerázy
3. spojení zlomu v cukr-fosfátové páteři, DNA ligázy

## Bázová excizní oprava (BER)

- oprava poškozených bází (oxidace, alkylace, deaminace), odstranění U
- DNA glykosyláza
  - rozeznání a odstranění nevhodné báze, tvorba AP míst
  - různé typy na jednotlivá poškození
- AP endonukleáza
  - vyštěpení AP místa, tvorba 3'-OH
  - u člověka APEX1 a APEX2
- DNA polymeráza
  - připojení správného nukleotidu
  - Pol $\beta$  u eukaryot, Pol1 u prokaryot
- DNA ligáza
  - spojení řetězce
  - DNA ligáza III u lidí
- zvýšené riziko kolorektálních nádorů u mutací Pol $\beta$ , DNA glykosylázy



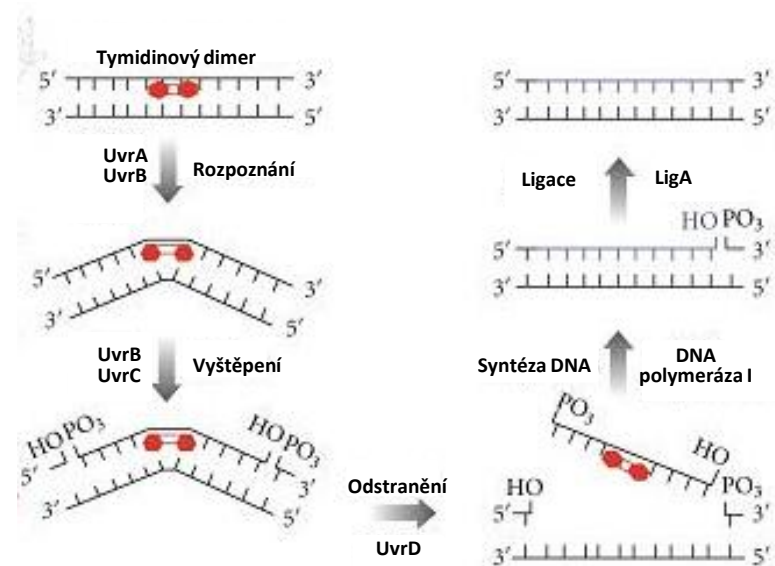
# Excizní opravy DNA

## Nukleotidová excizní oprava (NER)

- oprava rozsáhlejšího poškození DNA, které mění a deformuje dvoušroubovici DNA
- adukty bází, UV fotoprodukty

## Bakterie

- rozeznání poškozeného místa - UvrAB
- vyštěpení poškozeného místa (13 nt) - UvrBC
- uvolnění vyštěpeného úseku - UvrD
- dosyntetizování chybějící DNA - PolI
- spojení řetězce - LigA

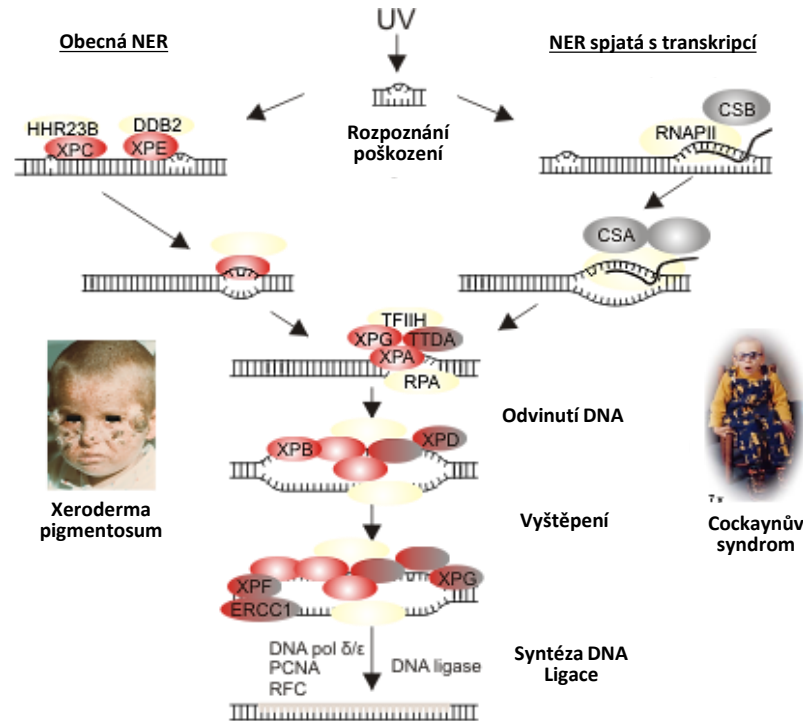


## Člověk

- rozeznání poškozeného místa
- odvinutí DNA
- vyštěpení poškozeného místa (24 nt)
- dosyntetizování chybějící DNA
- spojení řetězce

XPA, XPC, XPE; CSA, CSB  
XPB, XPD  
XPF, XPG  
Polδ/ε  
DNA ligáza I

# Excizní opravy DNA



- deficity v NER mechanismech geneticky podmiňují některé syndromy

**Xeroderma pigmentosum** - autosomálně recesivní choroba, nejčastěji deficit XPA, XPC

- extrémní citlivost k slunečnímu záření

- > 1000 x zvýšeno riziko vzniku kožních nádorů

**Cockaynův syndrom** - autosomálně recesivní choroba, deficit CSA, CSB

- fotosenzitivita, trpaslctví, retinitis pigmentosa



# Excizní opravy DNA

## Oprava chybného párování (mismatch repair)

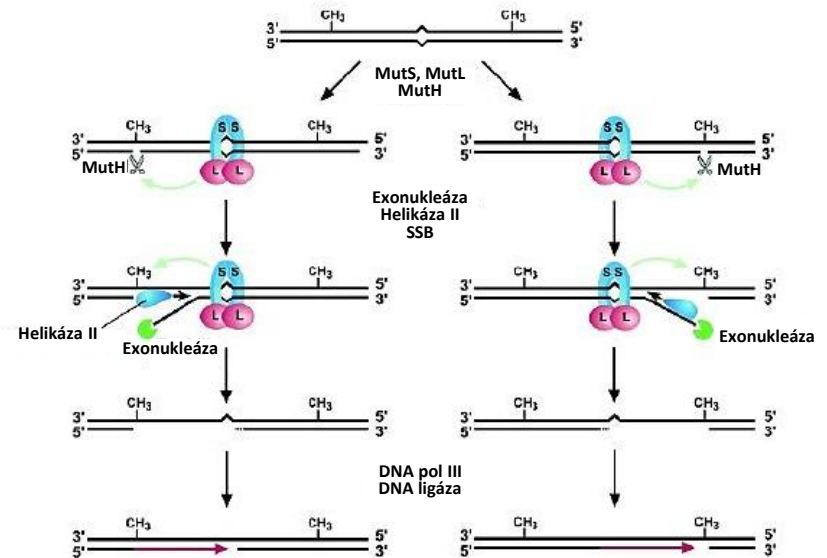
- frekvence chyb při syntéze DNA replikace
- + proofreading
- + opravy

1 : 100.000

1 : 10.000.000

1 : 1.000.000.000

- třeba odlišit nový řetězec s chybou od původního
- u E. coli Dam metyláza, která metyluje A v sekvenci GATC, těsně po replikaci hemimetylovaný stav
- rozpoznání chybného nukleotidu (MutS)
- navázání opravných enzymů (MutL, MutH)
- vyštěpení chybné sekvence
  - MutH rozezná nemetylovanou GATC a štěpí ji
  - exonukleáza spolu s helikázou a SSB proteiny odstraňuje naštěpený řetězec až k chybnému nt
- syntéza DNA podle původního řetězce (Pol3)
- spojení řetězce (DNA ligáza)
- GATC zametylována i v opraveném dceřiném řetězci (Dam metyláza)



- opravný systém používán i u eukaryot a člověka, mutace v opravných genech zvyšují riziko rakoviny



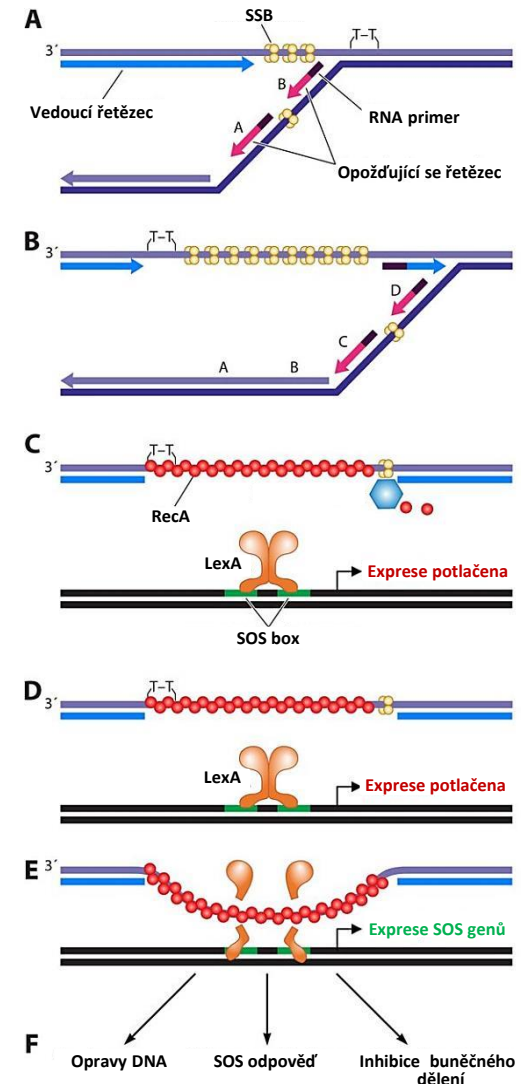
# Tolerantní opravy

## SOS odpověď

- koordinovaná syntéza enzymů a spuštění záchranných opravných mechanismů
- indukována rozsáhlým poškozením DNA, přetížením reparačních mechanismů, akumulací poškozené DNA
- náchylná k chybám, umožňuje buňce přežít za cenu mutageneze
- LexA potlačuje expresi cca 18 genů vazbou na SOS box v jejich promotoru (SOS regulon)

*lexA, recA, umuC, umuD, sulA, uvrA, uvrB, uvrC, ssb,...*

- akumulace ssDNA v poškozených buňkách aktivuje RecA
- aktivní RecA způsobuje rozklad LexA, čímž se zvyšuje exprese genů SOS regulonu
- zastavení buněčného dělení - SulA, SulB
- zvýšená činnost NER - UvrABC
- potlačení exonukleázové aktivity Pol3, začlenění jakékoli báze proti thyminovému dimeru - UmuCD (PolIV), RecA
- vlivem oprav mizí ssDNA, RecA přechází do inaktivního stavu, neštěpený LexA opět potlačuje SOS regulon
- výsledkem je přežití buňky se zvýšenou pravděpodobností mutací



# Opravy dvojřetězcových zlomů

Štěpení cukr-fosfátové kostry a dvouřetězcové zlomy indukovány ionizujícím záření, chybami v replikační vidlici, působením některých chemikálií.

Nebezpečí fragmentace chromozomů, přestaveb genomu, ztráty genetické informace.

## Nehomologní spojování konců (NHEJ)

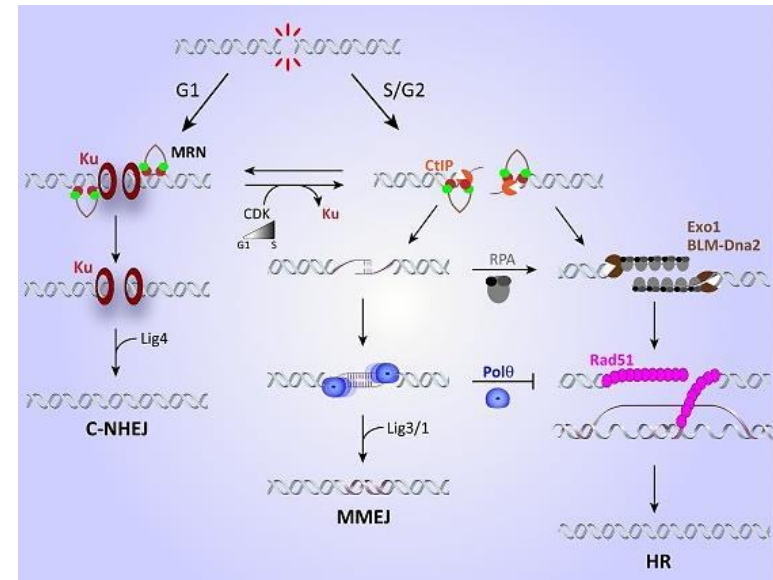
- v G1 fázi buněčného cyklu, před replikací DNA
- zarovnání zlomených řetězců a následné znovu spojení
- náchylné k chybám, možná ztráta nukleotidů

## Spojování konců přes mikrohomologii (MMEJ)

- v brzké S fázi buněčného cyklu
- úprava konců, která odhalí krátkou oblast homologie
- párování homologní oblasti, spojení řetězců

## Homologní rekombinace (HR)

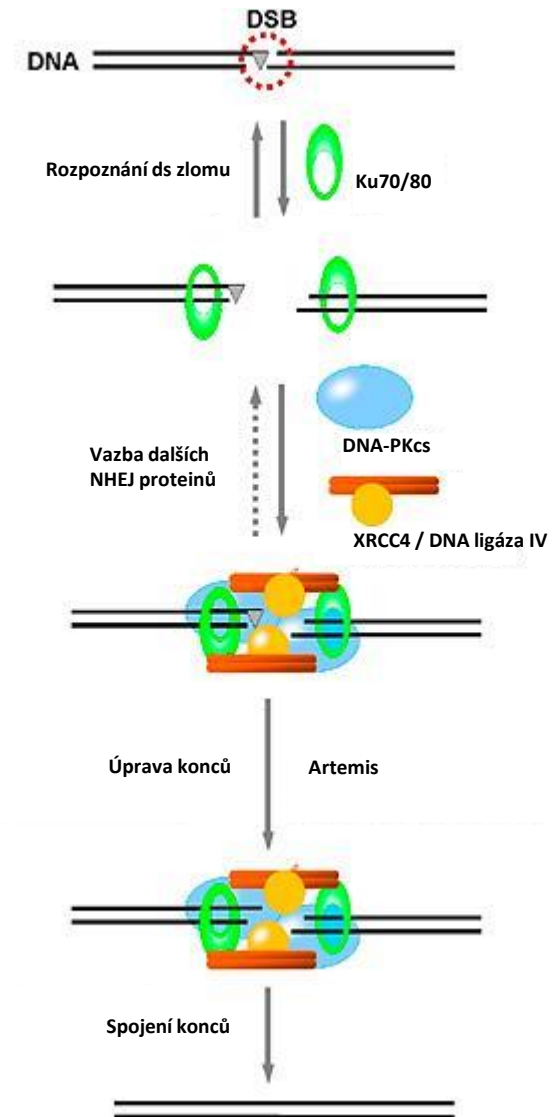
- v S/G2 fázi buněčného cyklu, po replikaci DNA
- bezchybná oprava bez ztráty genetické informace
- tvorba jednořetězcových přesahů, vyhledání homologní DNA, opravná syntéza DNA dle templátu, spojení volných konců



# Opravy dvojřetězcových zlomů

## Nehomologní spojování konců (NHEJ)

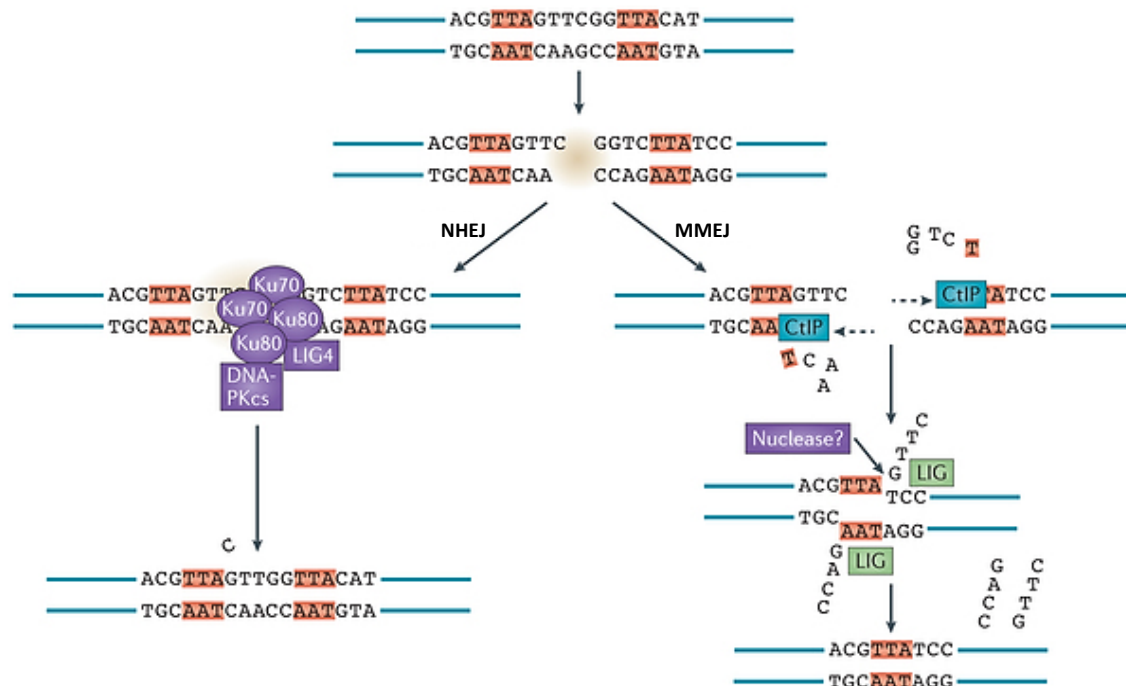
- evolučně konzervativní mechanismus
- převládající oprava ds zlomů v savčích buňkách
- přesnost opravy - spojení tupých konců
  - zarovnání a spojení převislých konců
- prokaryota
  - E.coli pouze homologní rekombinace
  - některé druhy i NHEJ (Ku, LigD)
- člověk
  - rozeznání konců (Ku70/80, DNA-PKcs, MRN komplex)
  - úprava konců (nukleáza Artemis)
  - spojení konců (komplex XRCC4 / DNA ligáza IV)
- mutace v XRCC4 a Lig4 genetickou podstatou syndromů projevujících se citlivostí k ionizujícímu záření, těžkými imunodeficity, mikrocefalií



# Opravy dvojřetězcových zlomů

## Spojení konců přes mikrohomologii (MMEJ)

- rozeznání konců v místě zlomu (PARP1, MRN komplex) a jejich úprava (FEN1)
- nalezeny a spárovány mikrohomologie
- přesahy za homologními oblastmi odbourány (FEN1 ?)
- spojení volných konců řetězců (komplex XRCC1 / DNA ligáza III)
- oprava náchylná k chybám (delece DNA mezi mikrohomologiemi), využívána při inaktivaci NHEJ
- zvýšená exprese či aktivita proteinů MMEJ nalezena u celé řady nádorových onemocnění



# Homologní rekombinace

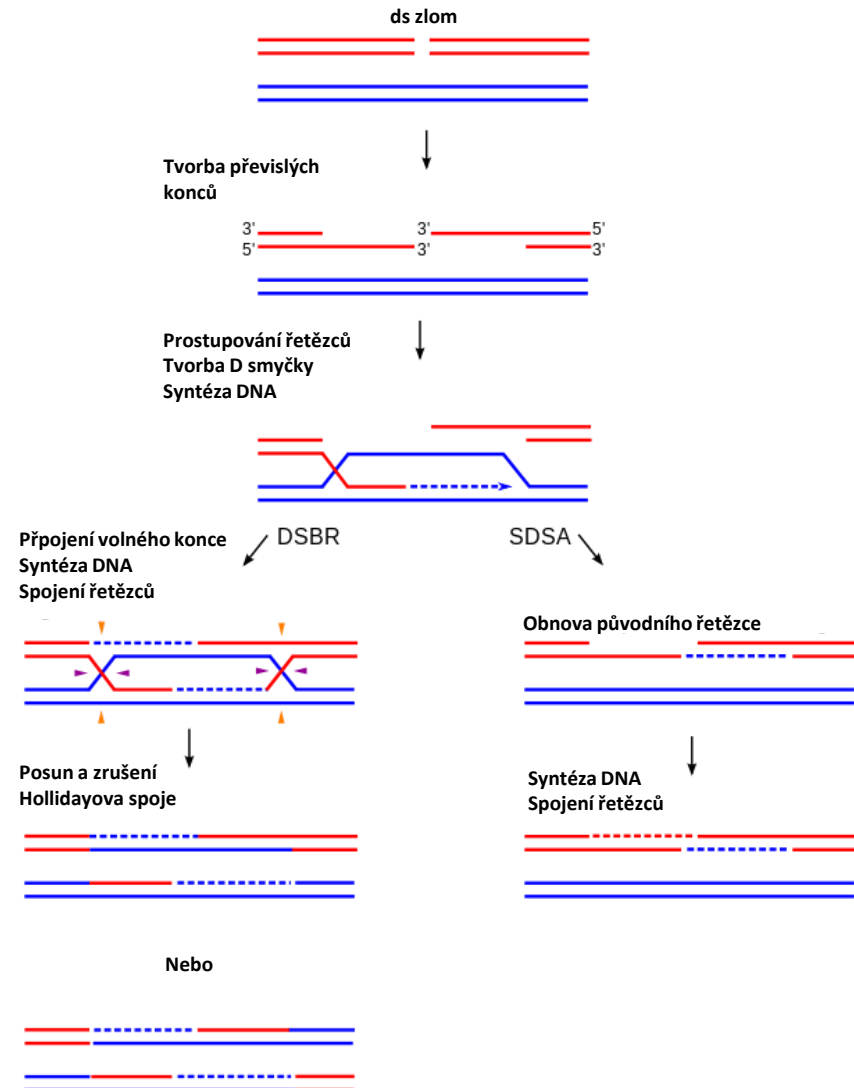
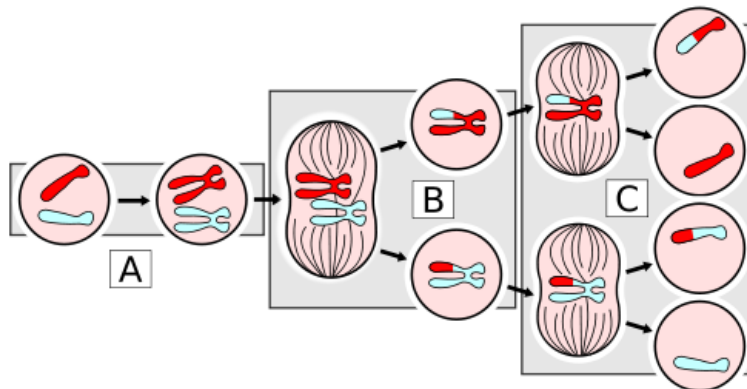
Výměna genetické informace mezi dvěma homologními molekulami DNA.

Probíhá u všech organismů

- mezi virovými genomy v hostitelské buňce
- u bakterií během transformace, konjugace
- během meiózy eukaryotických buněk
- při opravách ds zlomů DNA

Dva modely oprav ds zlomů DNA pomocí homologní rekombinace

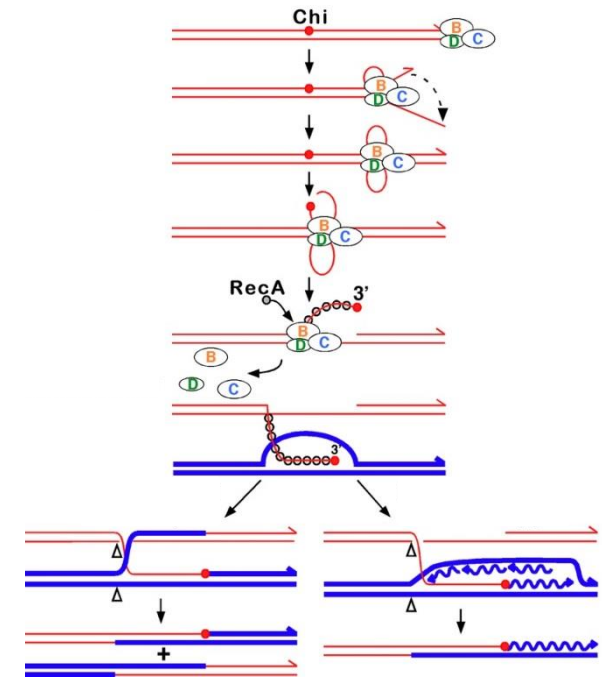
- Hollidayův model (DSBR, double-strand break repair)
- nasedání závislé na syntéze (SDSA, synthesis-dependent strand annealing)



# Homologní rekombinace

## Bakterie

- hlavní opravný mechanismus ds zlomů
- vazba komplexu RecBCD na konec vytvořený ds zlomem
- odvíjení dsDNA helikázovou aktivitou RecBD
- pohyb RecBCD komplexu podél molekuly DNA
- po dosažení místa Chi (5'-GCTGGTGG-3', každých 5 kb) je štěpen jeden z řetězců, na odvíjený řetězec se váže RecA
- vzniklé nukleoproteinové vlákno prostupuje do homologní DNA za vzniku D-smyčky
- vznik a posun Hollidayova spoje (RuvAB), který je zrušeno působením RuvC za vzniku rekombinantních molekul
- 3' konec Chi struktury může být použit pro syntézu nového řetězce, potom vzniká jedna rekombinantní a jedna původní molekula DNA



## Člověk

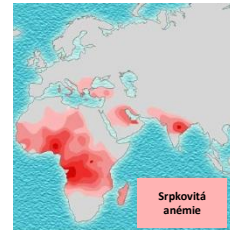
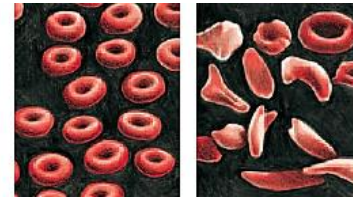
- rozpoznání zlomů a úprava vzniklých konců - BRCA2, Rad52, Rad54, Rad51
- nukleoproteinové vlákno - Rad51
- různé helikázy (RecQ), nukleázy, topoizomerázy
- deficity v procesech HR spjatý s tvorbou nádorů, početními chromozomovými abnormalitami

# Opravy poškozené DNA

Při selhání replikačních a opravných mechanismů dochází ke vzniku mutací. Záměna pouhého jednoho nukleotidu může vážně poškodit zdatnost a zdraví organismu.

- např. srpkovitá anémie

| HbA |     |     |     |     |     |     | HbS |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CTG | ACT | CCT | GAG | GAG | AAG | TCT | CTG | ACT | CCT | GTG | GAG | AAG | TCT |
| Leu | Thr | Pro | Glu | Glu | Lys | Ser | Leu | Thr | Pro | Val | Glu | Lys | Ser |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 3   |     |     | 6   |     |     | 9   | 3   |     |     | 6   |     |     | 9   |



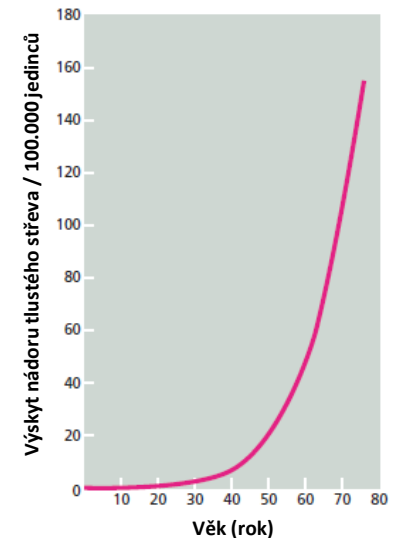
Změny DNA v zárodečných buňkách přenášeny na potomstvo.

Změny DNA v somatických buňkách mohou vést ke vzniku nádorových onemocnění. Pravděpodobnost akumulace dostatečného množství mutací pro vznik nádoru roste s věkem.

Chyby v opravných mechanismech zvyšují frekvenci spontánních mutací a citlivost buněk k mutagenům.

Nalezeno přes 30 mutací v genech pro opravy DNA, které mimojiné zvyšují riziko vzniku nádoru.

Využití chemických i fyzikálních mutagenů při léčbě nádorových onemocnění (chemoterapie, radioterapie).





# Shrnutí

---

- Před tím než se buňka rozdělí, musí replikovat veškerou genetickou informaci uloženou v DNA.
- Vlákna v dvouřetězcové DNA jsou navzájem komplementární, každé z nich proto může sloužit jako templát pro syntézu dalších vláken. Během replikace DNA vznikají dvě úplně stejné molekuly, což umožňuje kopírovat genetickou informaci a předávat ji do dceřiných buněk a z rodičů na potomstvo.
- Během replikace DNA se vlákna dvoušroubovice oddělují za vzniku replikační vidlice ve tvaru „Y“. DNA polymeráza na každém z vláken vytvoří nový komplementární řetězec DNA.
- DNA polymeráza syntetizuje DNA pouze v jednom směru, takže pouze vedoucí řetězec může být v replikační vidlici tvořen nepřerušovaně. Na opoždujícím se řetězci probíhá syntéza DNA přerušovaně, ve formě krátkých fragmentů, které jsou následně spojeny do souvislého řetězce.
- Syntéza DNA začíná od krátkých RNA primerů, které jsou následně odstraněny a nahrazeny DNA.
- Replikace DNA vyžaduje spolupráci mnoha proteinů, které tvoří multienzymový komplex pohybující se podél replikované DNA.
- U eukaryot jsou konce chromozomů replikovány pomocí telomerázy.
- DNA polymeráza se vyznačuje vysokou přesností replikace podporovanou proofreadingovou aktivitou. Případné chybné báze jsou opravovány pomocí oprav chybného párování bází.
- Poškození DNA je opravováno řadou enzymů, které poškozené místo rozeznají, odstraní a nahradí novou DNA, která se tvoří podle nepoškozeného templátu.
- Dvouřetězcové zlomy DNA jsou opravovány v závislosti na fázi buněčného cyklu pomocí nehomologního spojování konců či homologní rekombinace.

# Zvídavé otázky

---

Vysvětlete vlastními slovy, proč se replikace DNA označuje jako „semikonzervativní“?

Proč jsou telomery a telomeráza potřebné pouze pro replikaci eukaryotických chromozomů a prokaryotických ne?

Která z následujících tvrzení jsou pravdivá? Vysvětlete svoji odpověď.

- a) Bakteriální replikační vidlice je asymetrická, protože obsahuje dvě DNA polymerázy, které se liší ve své struktuře.
- b) Okazakiho fragmenty jsou odstraňovány nukleázou, která degraduje RNA
- c) Frekvence replikačních chyb je snižována jak proofreadingovou aktivitou DNA polymerázy tak opravou chybného párování bází.
- d) Při chybění oprav DNA jsou geny nestabilní.
- e) Žádná z chybných bází vzniklých deaminací se v DNA přirozeně nevyskytuje.
- f) Nádory mohou vznikat v důsledku akumulace mutací v somatických buňkách.

# Zvídavé otázky

- V jakém pořadí by denaturovaly následující molekuly DNA při postupném zahřívání jejich roztoku?
  - A) 5'-CCGGGCCAGCCGGTGTGGGTTGCCGAGG - 3'  
3'-GGCCCGGTTCGGCCACACCCAACGGCTCC - 5'
  - B) 5'-AGTGCTTGATCGAT - 3'  
3'-TCACGAACTAGCTA - 5'
  - C) 5'-ATTATAAAATATTTAGATACTATATTTACAA- 3'  
3'-TAATATTTTATAAATCTATGATATAAATGTT- 5'
- Rychlost syntézy DNA u *E.coli* je 100.000 nt / min. Replikace celého chromozomu trvá 45 minut. Kolik párů bází obsahuje chromozom *E.coli*? Jaká je přibližná délka tohoto chromozomu?
- Haploidní genom *D. melanogaster* obsahuje  $1,35 \times 10^8$  bp. Syntéza na jedné replikační vidlici probíhá rychlostí 30 bp/s. Obě kopie genomu se zreplikují během 5 minut. Kolik replikačních počátků je pro takto rychlou syntézu DNA potřeba?
- Jaký bude konečný produkt nebo stav replikace, pokud bude mutací inaktivován následující enzym, a i přes tuto mutaci se bude buňka snažit zreplikovat DNA?
  - a) DNA-polymeráza
  - b) DNA-ligáza
  - c) DNA-helikáza
  - d) primáza

