

**Replikace = tvorba replik (kopií) molekul nukleových kyselin zajišťující přenos genetické informace z DNA do DNA nebo RNA do RNA**

**(z mateřské molekuly se vytvářejí dvě identické dceřiné molekuly)**

# Předpoklady a požadavky pro replikaci nukleové kyseliny

1. Templátový řetězec (matrice)
2. Primer
3. Polymeráza + replikační proteiny
4. dNTP

· Replikon - molekula NK obsahující ori

## Charakteristické rysy replikace

- a. probíhá semikonzervativním způsobem
- b. probíhá semidiskontinuálně

# Tři možné způsoby replikace DNA

Semikonzervativní

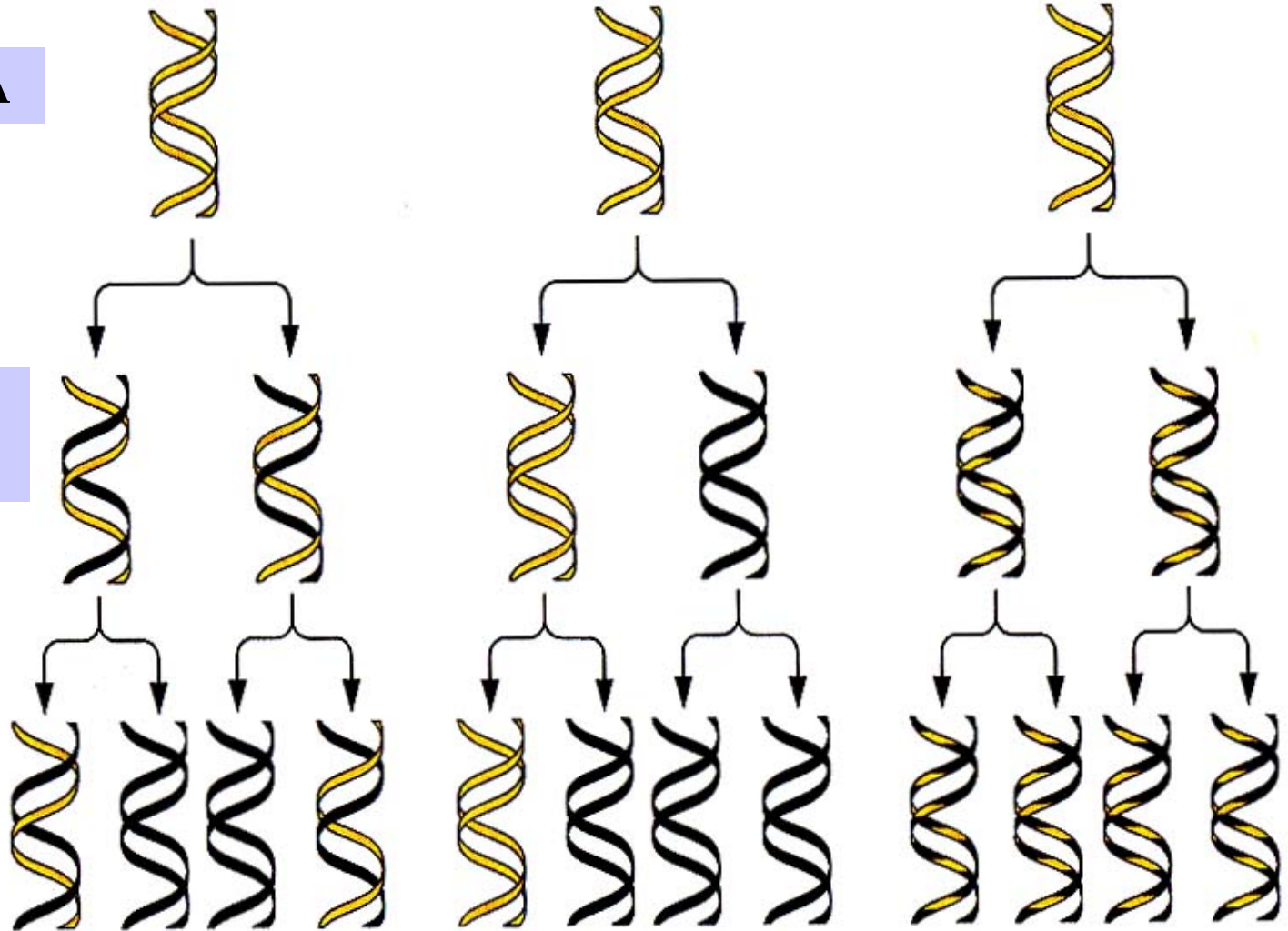
Konzervativní

Disperzní

Rodičovská DNA

DNA po první replikaci

DNA po druhé generaci

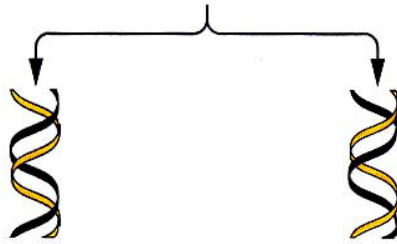


# Experimentální důkaz semikonzervativní replikace DNA

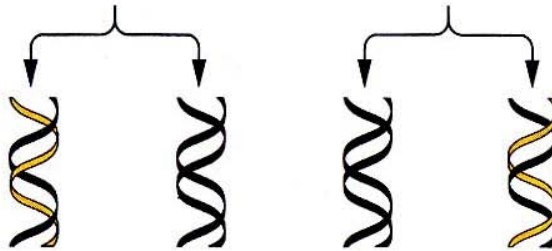
1 *E.coli* cells are grown on  $^{15}\text{N}$  for several generations.



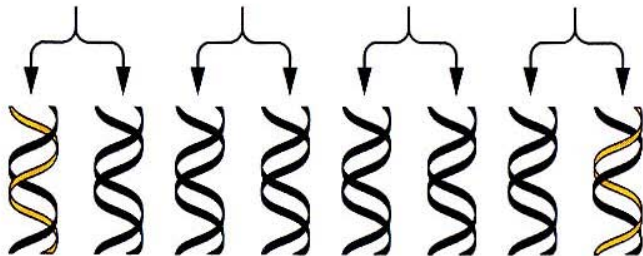
3 Cells are then transferred to medium containing  $^{14}\text{N}$  for one generation.



5 For two generations.



7 For three generations.

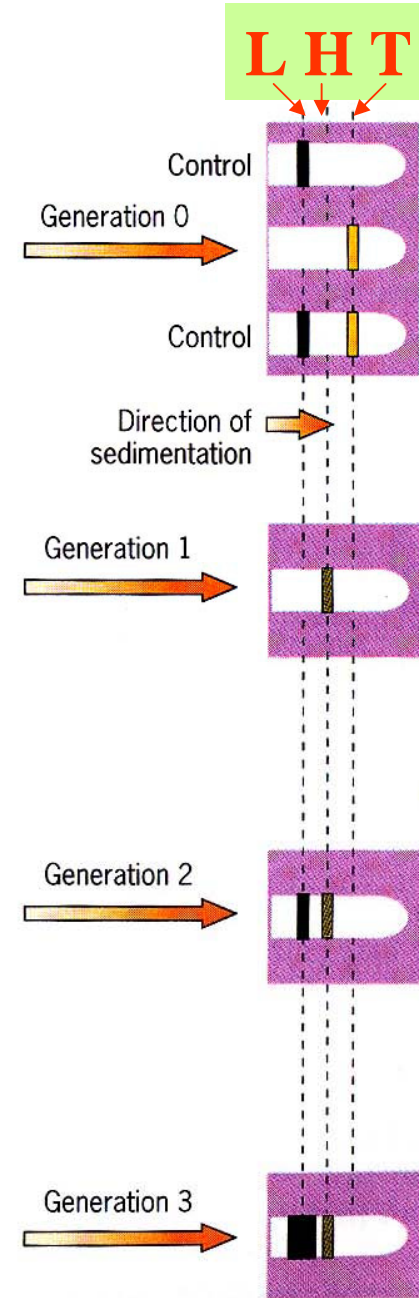


2 DNA is extracted and analyzed by CsCl density gradient centrifugation.

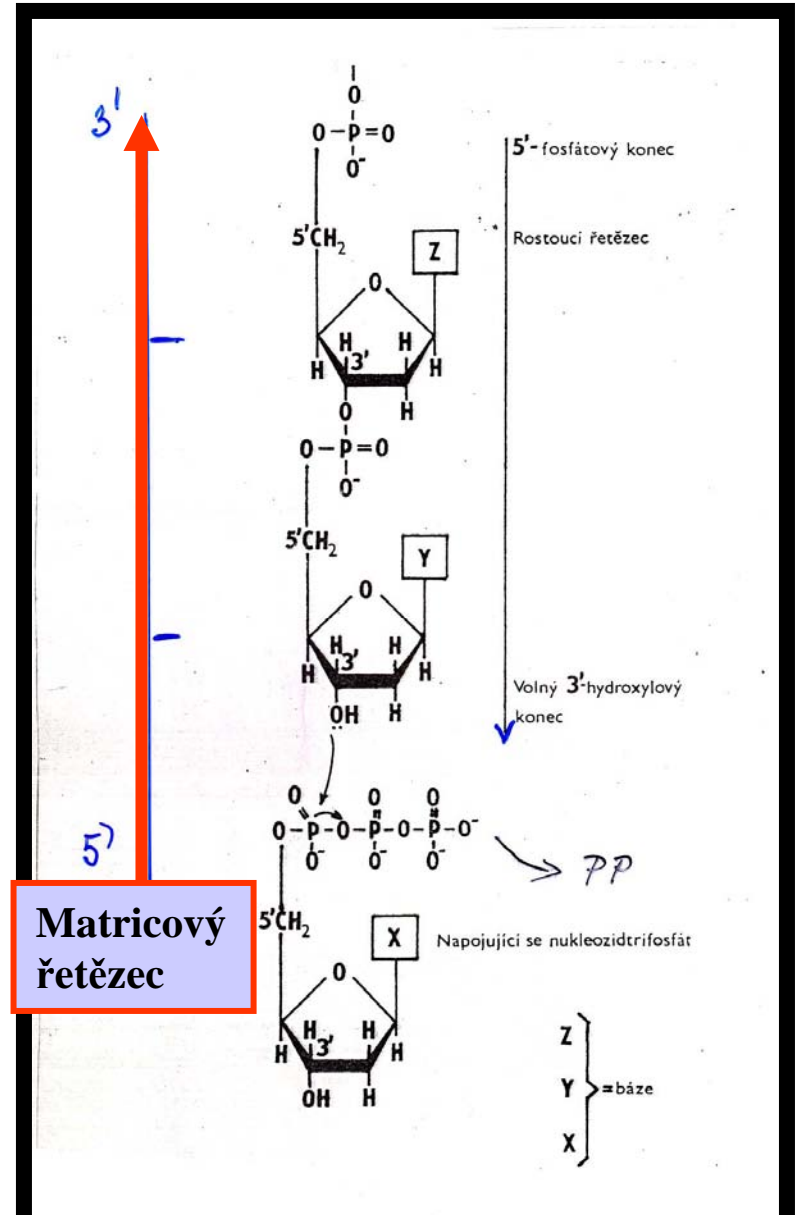
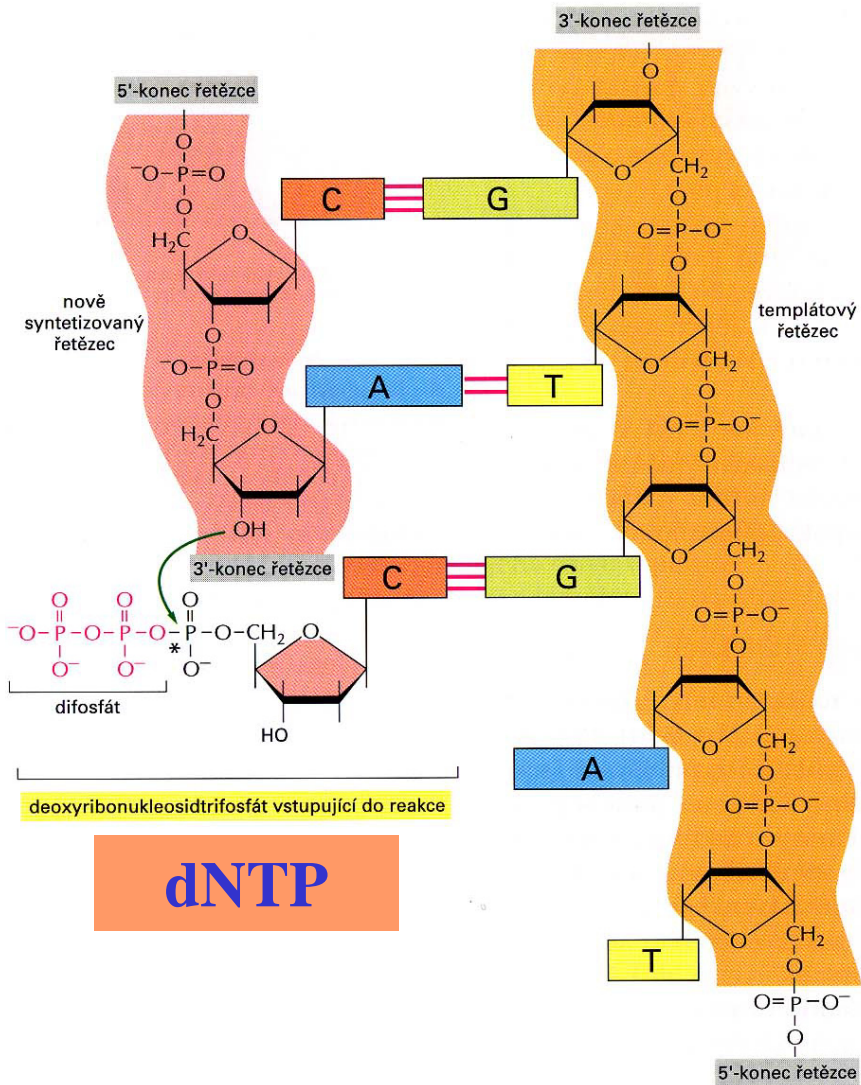
4 DNA is extracted and analyzed.

6 DNA is extracted and analyzed.

8 DNA is extracted and analyzed.



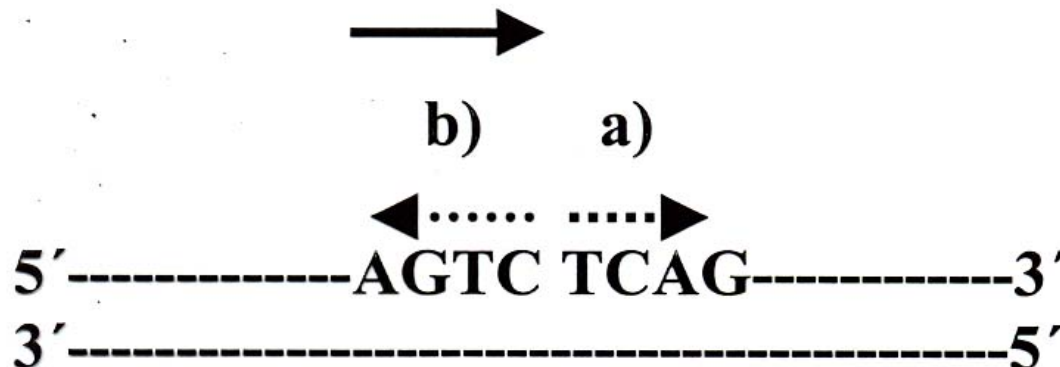
# Syntéza DNA při procesu replikace



# Charakteristika DNA-polymeráz

## DNA-řízené(dependentní)-DNA-polymeázy

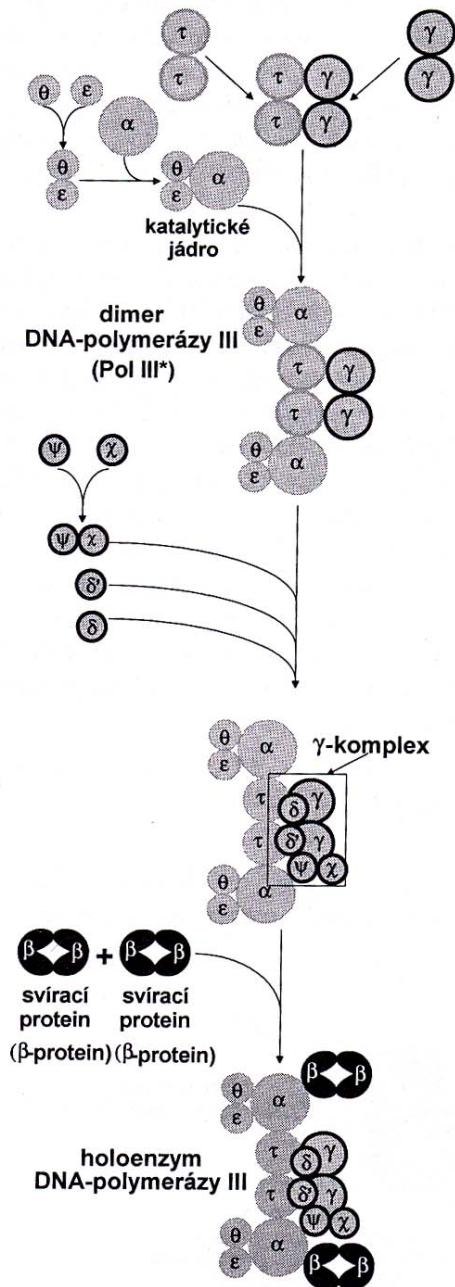
- 1) Polymerizace nukleotidů ve směru 5' - 3'
- 2) Odštěpování nukleotidů
  - a) 5' - 3' exonukleázová aktivita
  - b) 3' - 5' exonukleázová aktivita



## **Enzymy kooperující při replikaci a jejich funkce**

- 1. DNA-polymerázy a DNA-primáza:**  
**katalyzují polymerizaci NTP**
- 2. DNA-helikázy a SSB - proteiny:**  
**otevření DNA-helixu a stabilizace jednořetězců**
- 3. DNA-ligázy a enzym degradující RNA-primer:**  
**katalýza spojení DNA-opožďujícího se řetězce**
- 4. DNA-topoizomeráza:**  
**odstranění helikálního vinutí**
- 5. Iniciátorové proteiny:**  
**vazbou na ori katalyzují vytvoření replikační vidlice**

**POČÁTEK REPLIKACE = ori**  
**specifická sekvence na DNA (dnaA box)**



Obr. 128  
Sestavování holoenzymu  
DNA-polymerázy III

**α-monomer**, který katalyzuje polymeraci. Monomer α se vyznačuje již slabou polymerační aktivitou o rychlosti polymerace 8 nukleotidů/s. Nemá však exonukleázovou aktivitu;

**ε-monomer** vyznačující se **3'-5'** exonukleázovou aktivitou;

**θ-monomer**, který stimuluje účinek ε-exonukleáz;

**γ-monomer** váže ATP;

**δ-monomer** se váže na β;

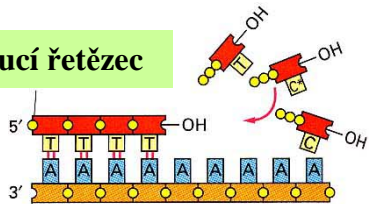
**δ'-monomer** stimuluje účinek monomeru β;

**χ-monomer**, na který se vážou proteiny SSB;

**ψ-monomer** tvoří most mezi χ a γ.

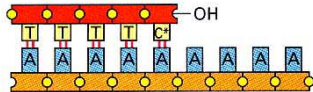


Rostoucí řetězec

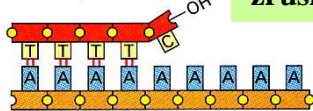


templátový řetězec

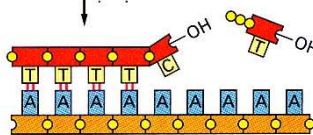
Začlenění chybné báze C\*



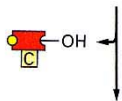
Změna C\* na C zruší párování s A



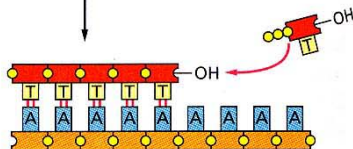
Nespárovaný 3'-OH konec neumožňuje připojení dalšího nukleotidu



C je odštěpen 3'-5' aktivitou DNA-polymerázy



Je připojen správný nukleotid



## Korektorská aktivita DNA-polymeázy

(„proofreading“)

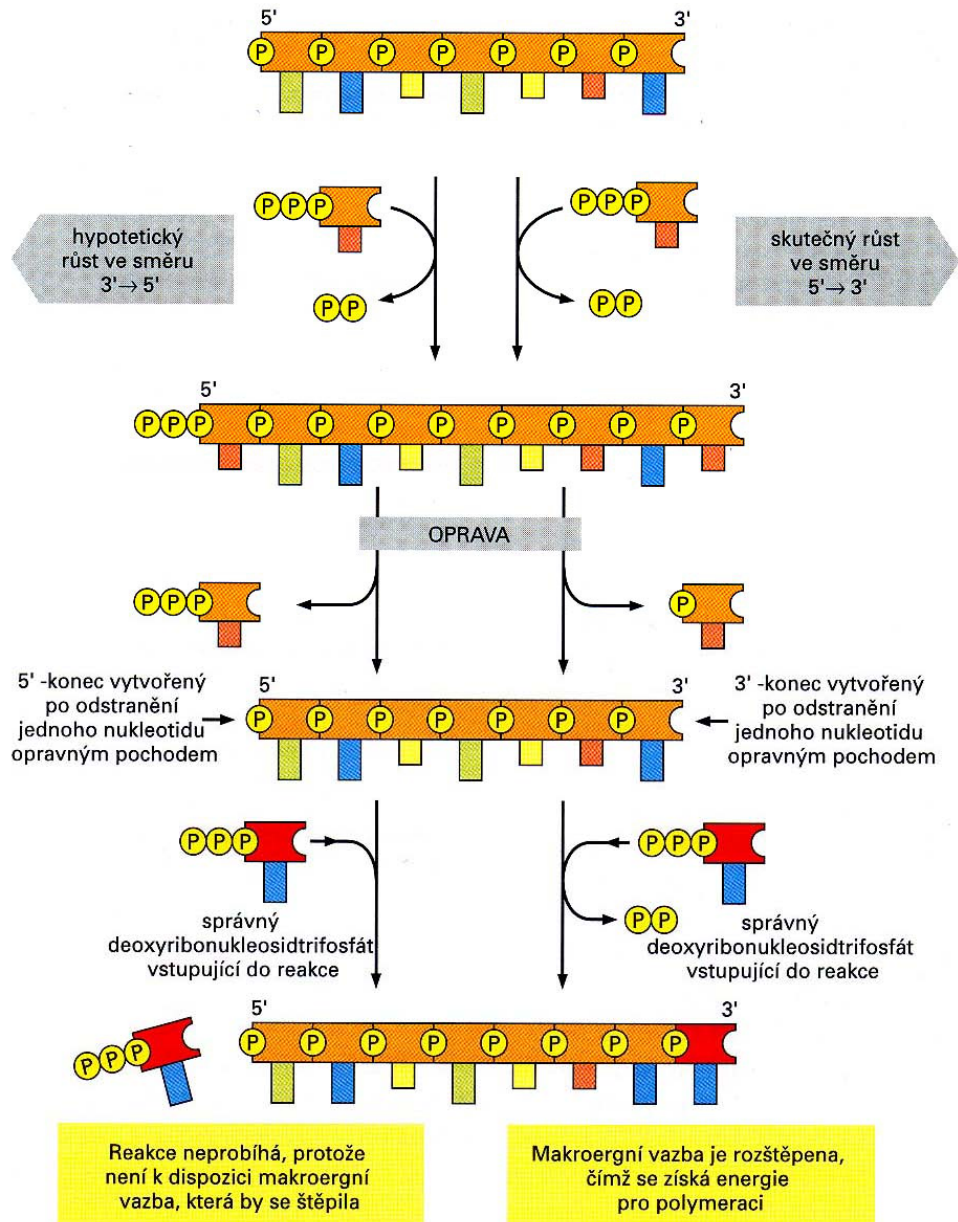
3'--- 5' exonukleázová aktivita DNA-polymerázy

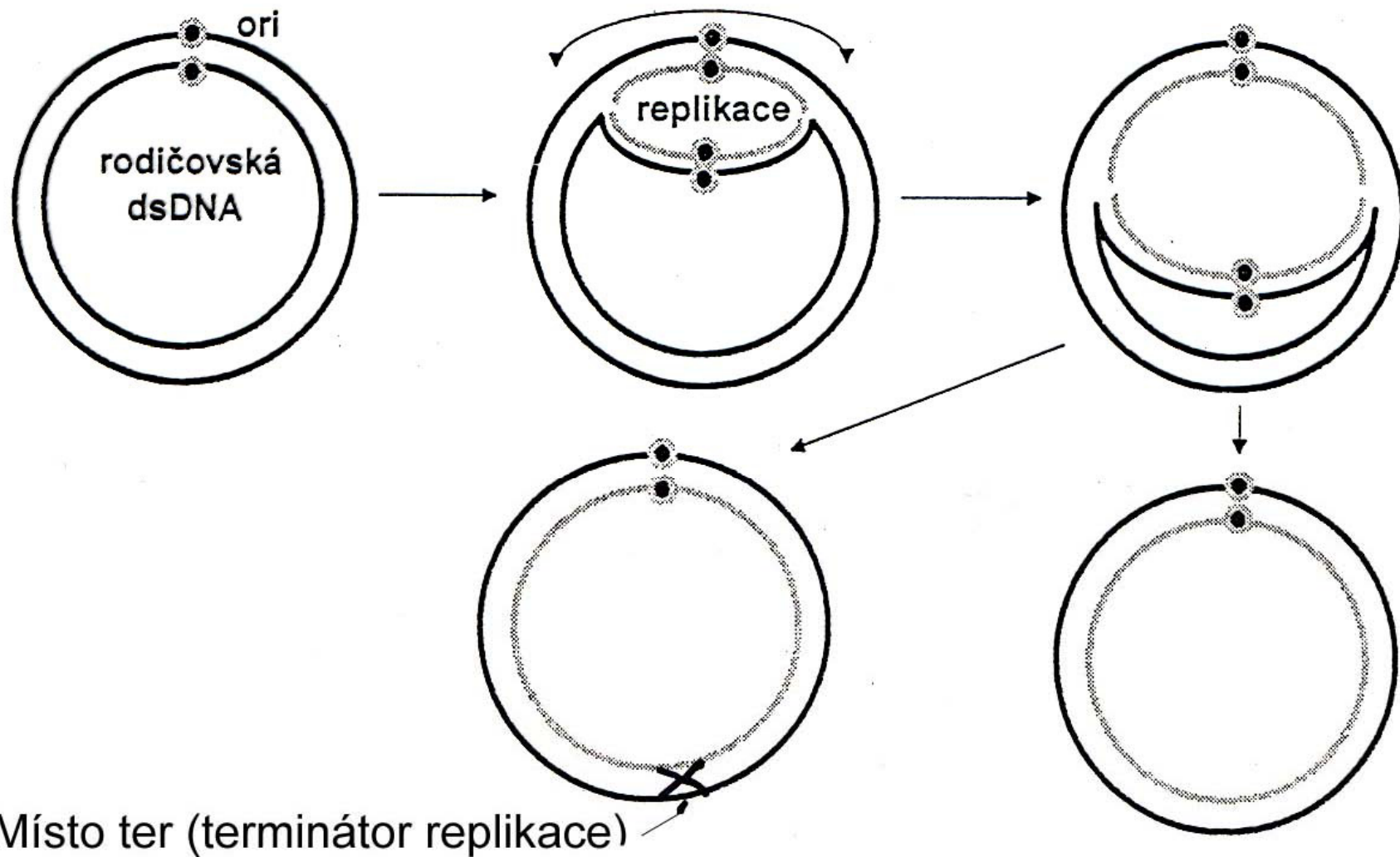
počet chybně zařazených nukleotidů =  $1/10^5$

opravy chyb

výsledný počet chybných bází =  $1/10^9$

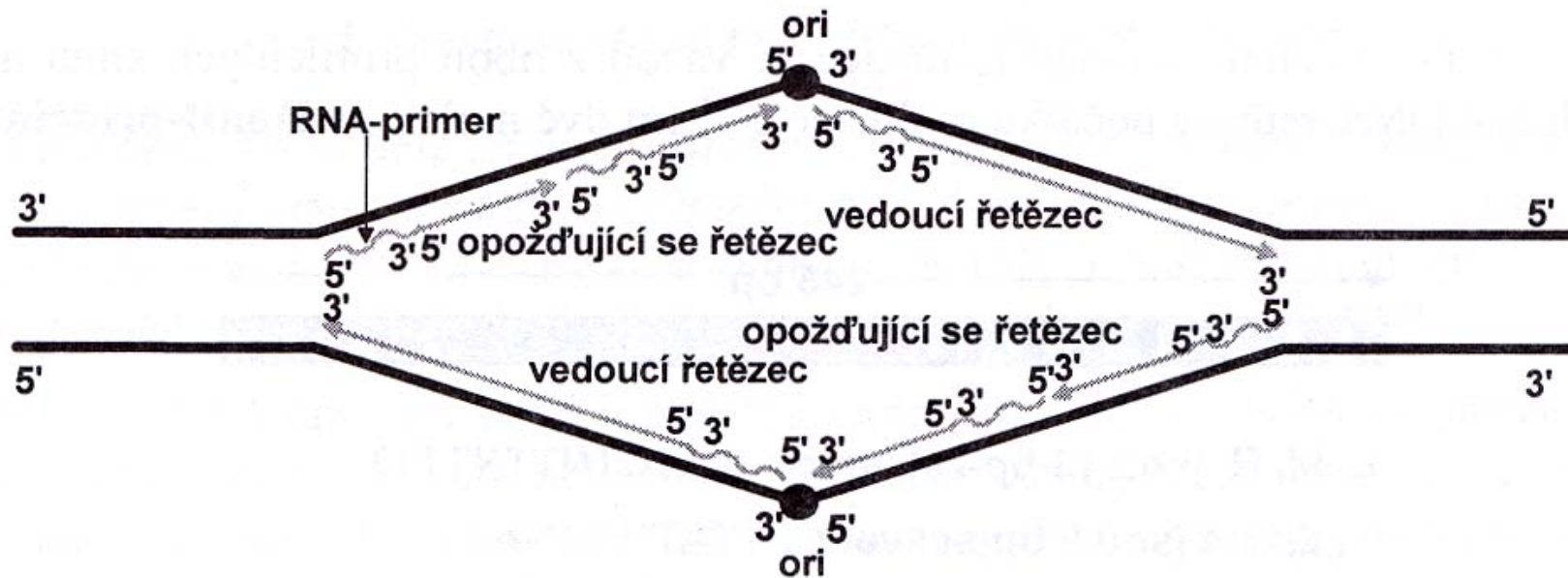
# Vysvětlení, proč se DNA-řetězec prodlužuje ve směru 5'-3'





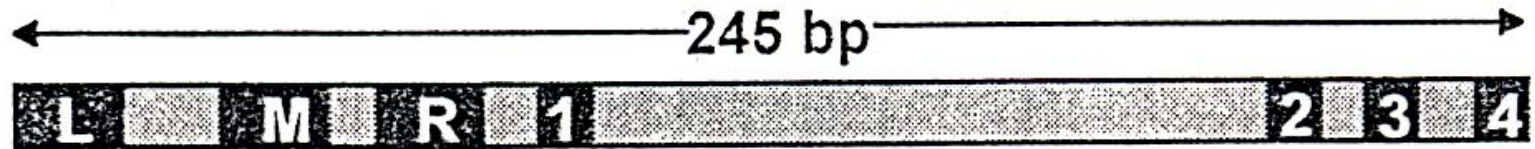
Dvousměrná replikace kružnicové chromozomové dsDNA prokaryot

# Asymetrie replikační vidlice



**Syntéza vedoucího a opožďujícího se řetězce  
při replikaci bakteriálního chromozomu**

## Struktura počátku replikace (oriC) u *E. coli*

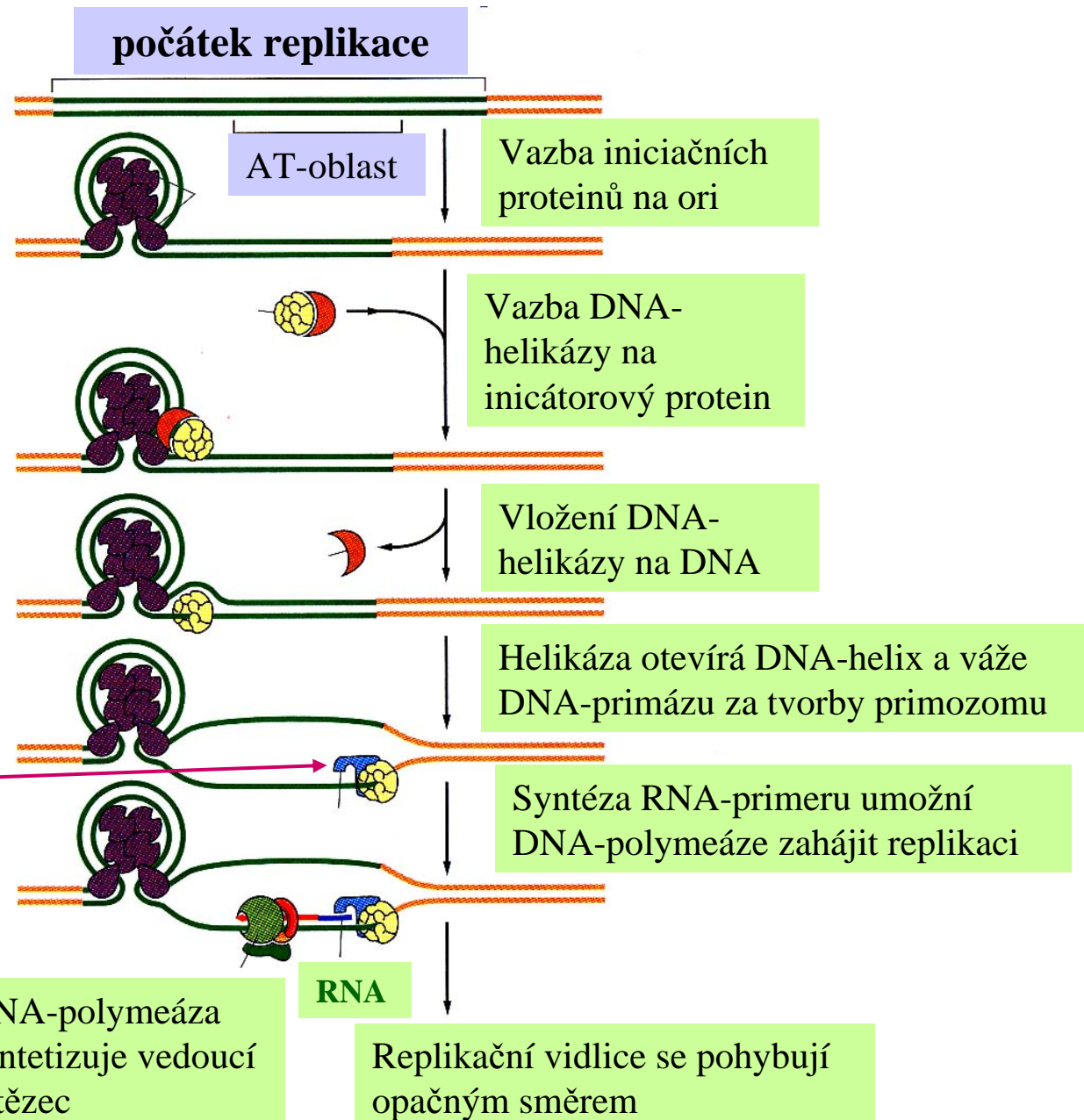


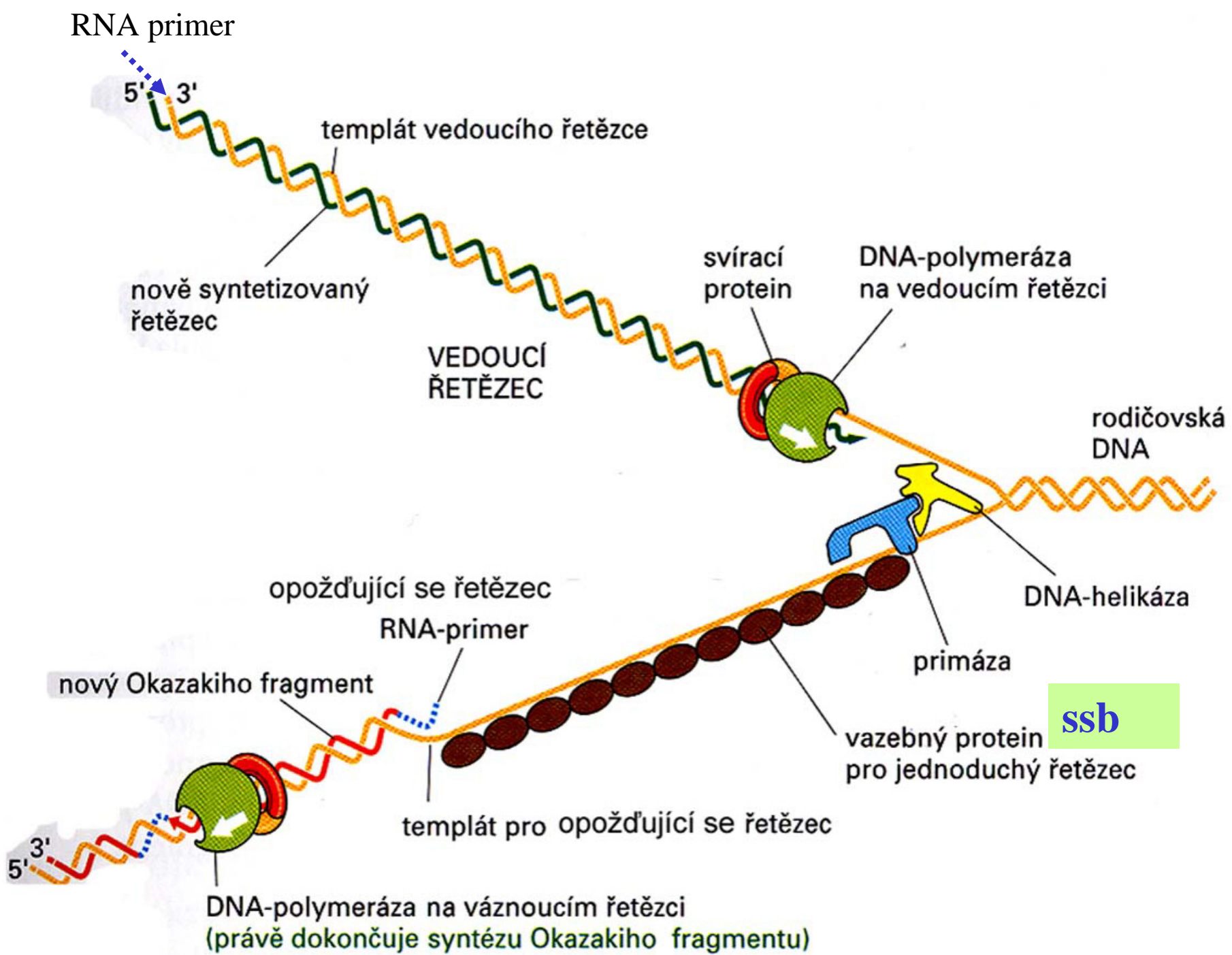
L, M, R jsou 13 bp-sekvence GATCTNTTNTTTT

1, 2, 3, 4 jsou 9 pb-sekvence TTATNCANA

 = neopakující se sekvence

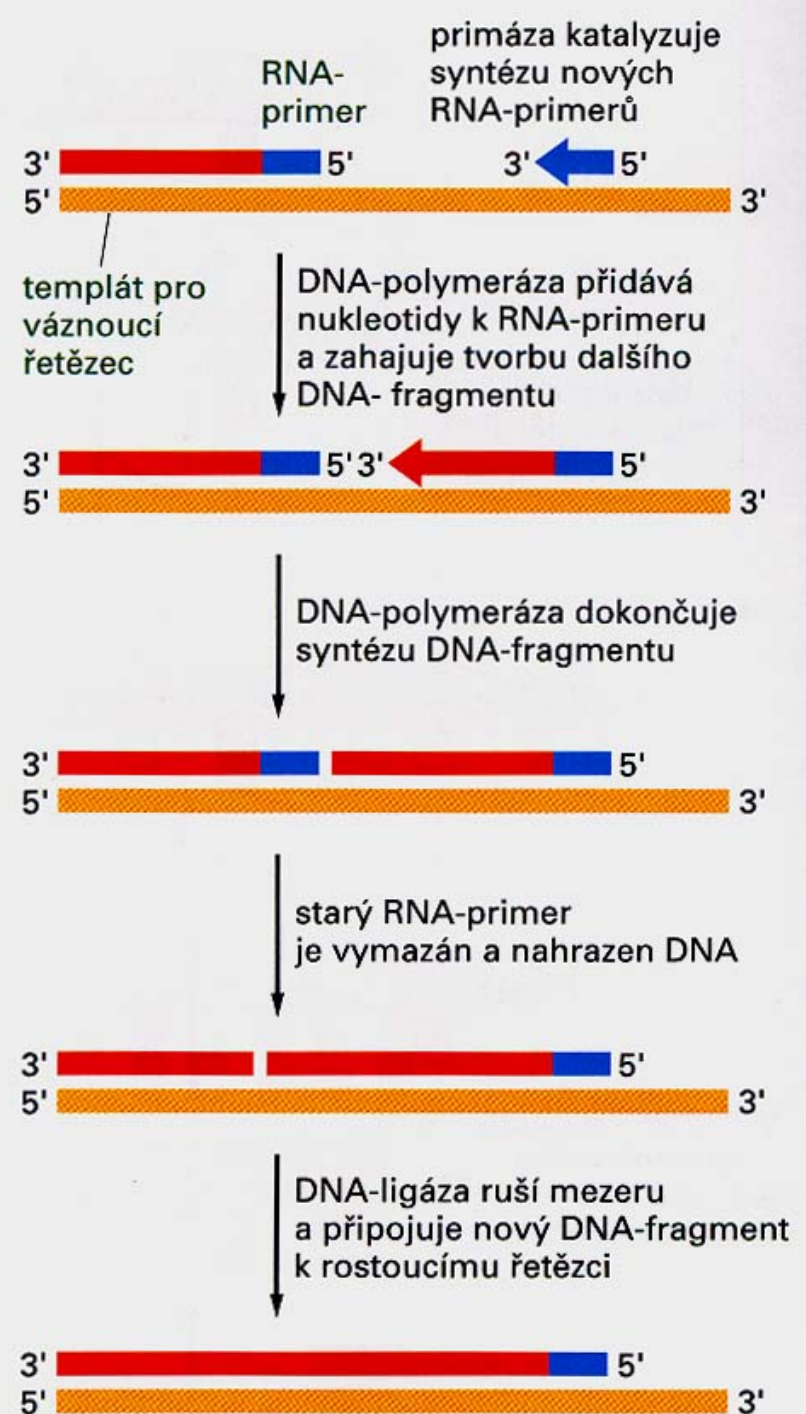
# Iničiační fáze replikace - zúčastněné proteiny





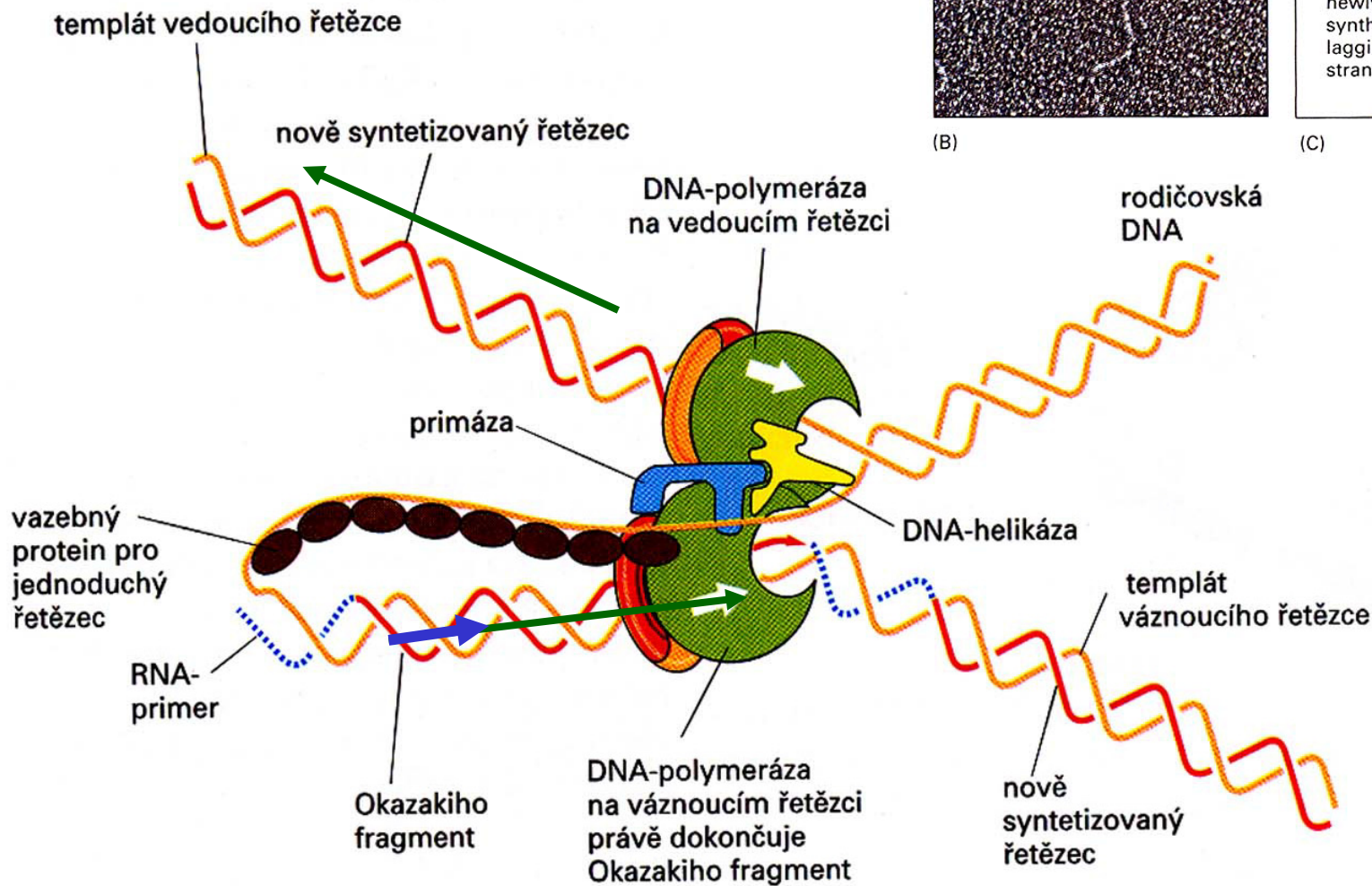
Syntéza Okazakiho fragmentů a proces jejich spojování postupným působením enzymů:

1. DNA-polymerázy
2. Nukleázy
3. Ligázy

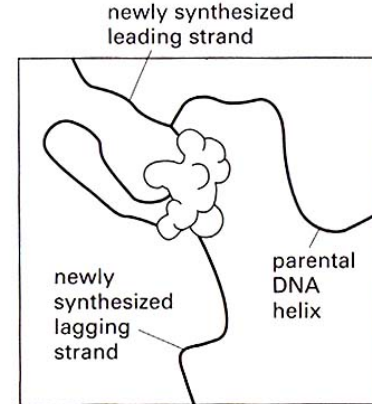




# Pohyb replikační vidlice

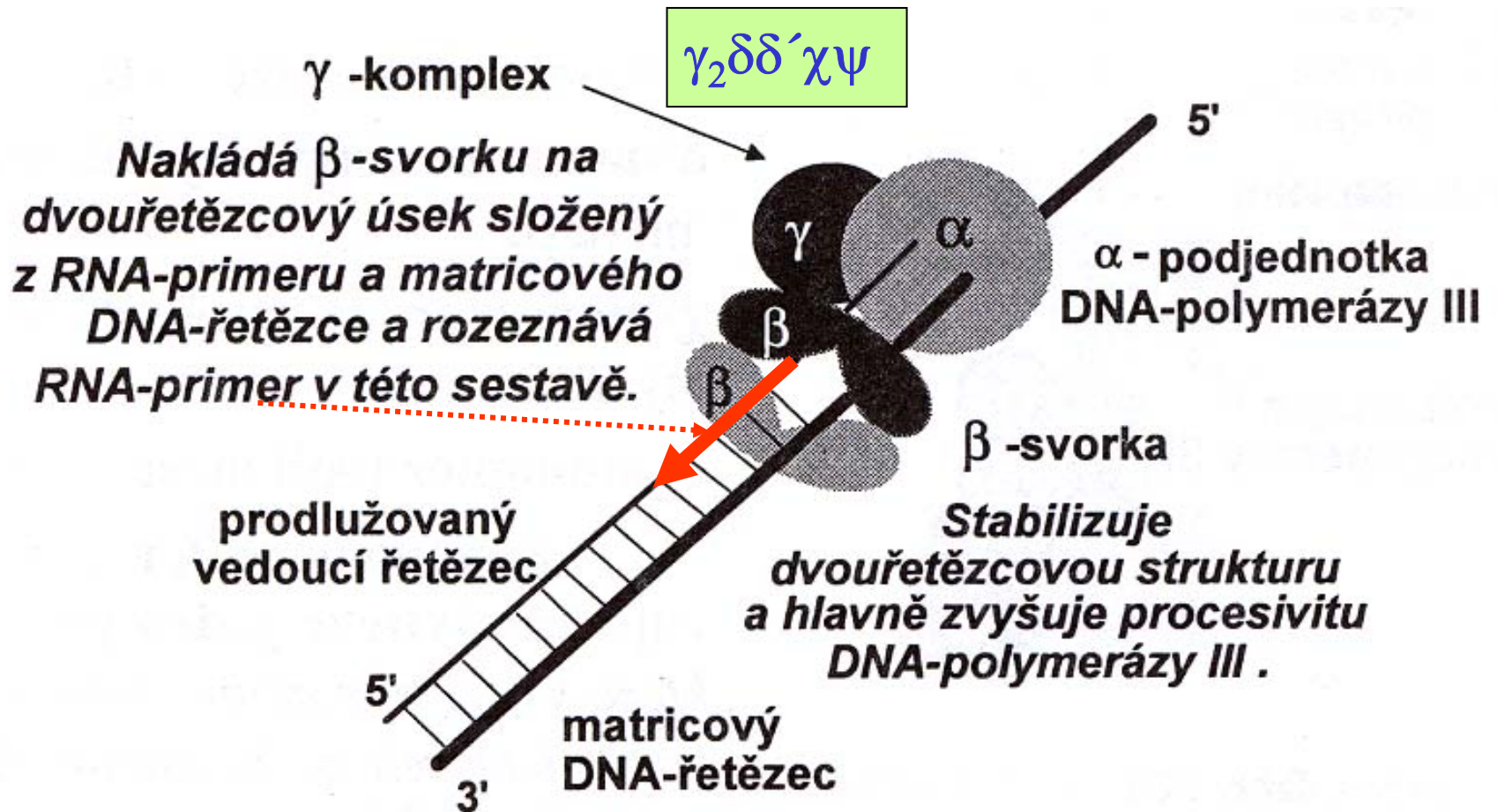


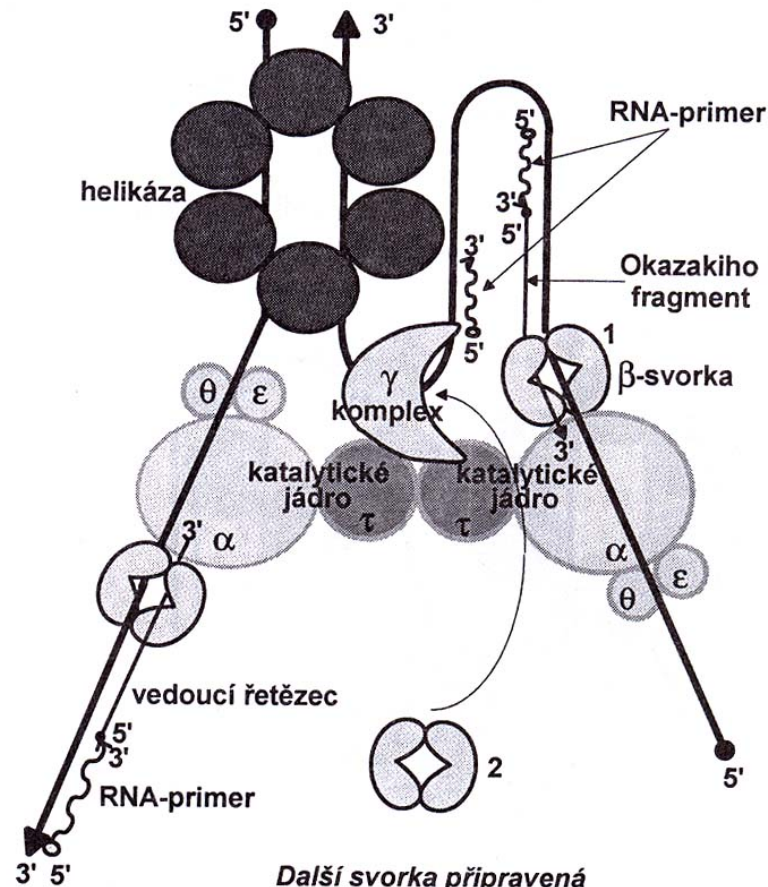
(B)



(C)

# Úloha podjednotek gama a beta při replikaci

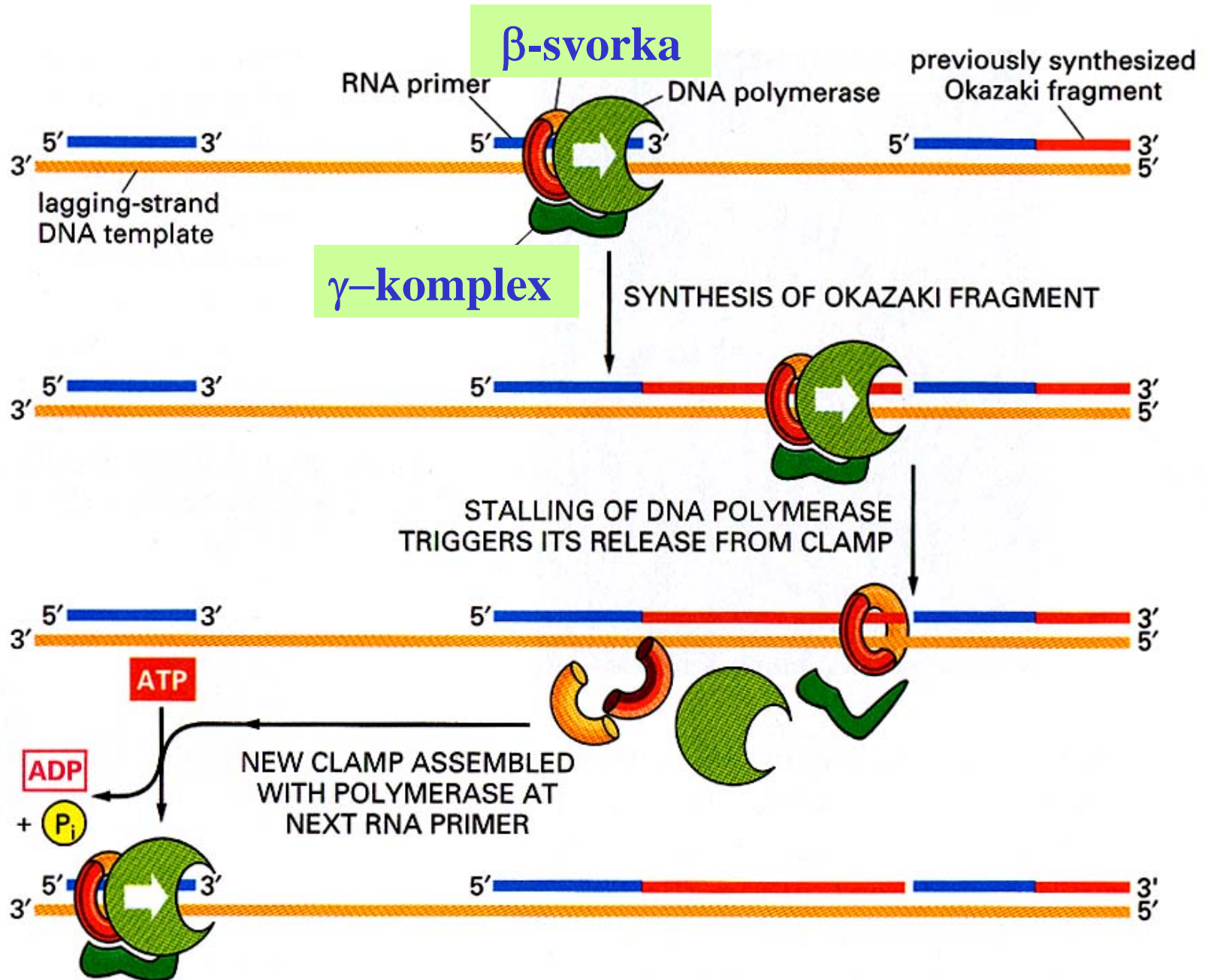


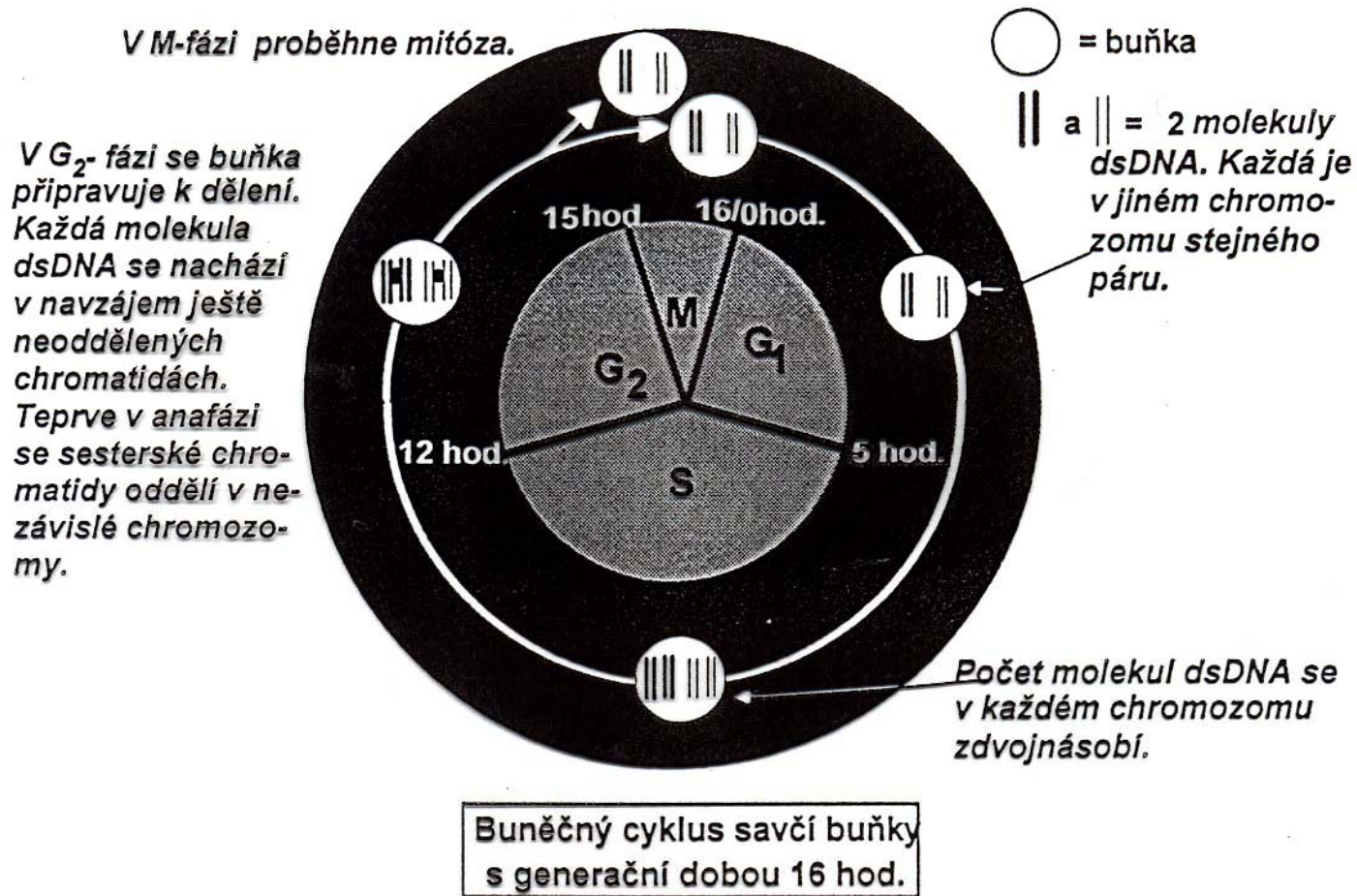


*Další svorka připravená k naložení na volný RNA-primer  $\gamma$ -komplexem.*

*Struktura holoenzymu je umístěna na začátku replikační vidlice tak, že na každém matricovém řetězci je jedno katalytické jádro.  $\gamma$ -komplex je vzhledem k oběma katalytickým jádrům položen asymetricky tak, aby směřoval k opoždujícímu se řetězci a mohl na něj opakovaně nakládat  $\beta$ -svorky k zahájení procesivního prodlužování Okazakiho fragmentů. Tento obrázek znázorňuje situaci, v níž se prodlužuje Okazakiho fragment a  $\gamma$ -komplex je připraven naložit další  $\beta$ -svorku na volný RNA-primer.*

# Nakládání DNA polymerázy na opožďující se řetězec

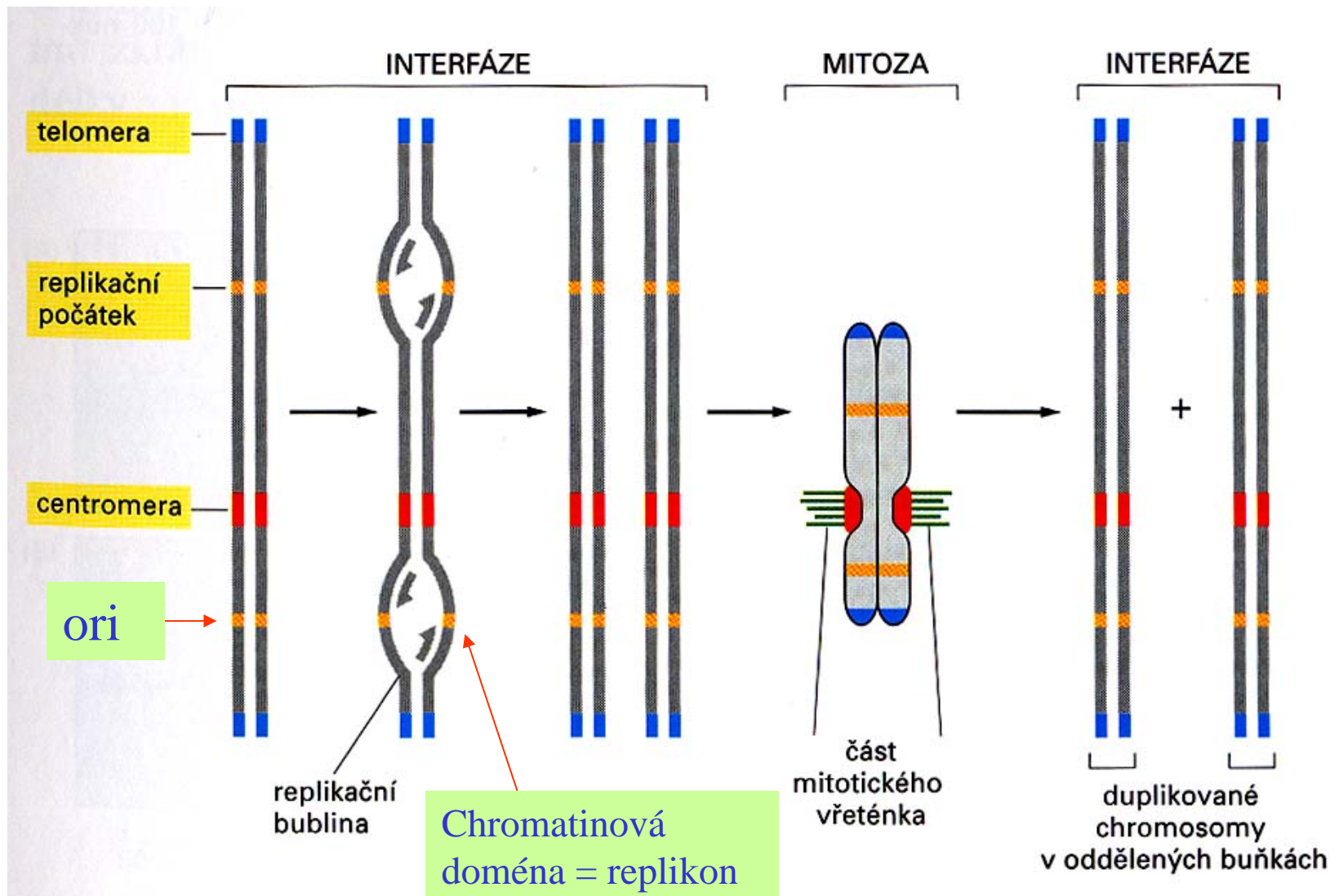




Obr. 190

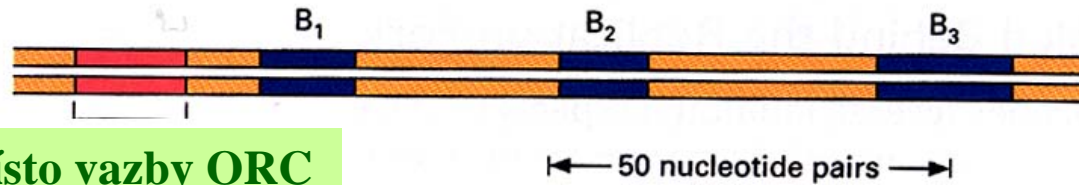
Zjednodušené schéma buněčného cyklu zdůrazňující počet molekul dsDNA v chromozomech v jeho různých fázích

# Struktura chromozomu během dělení buňky



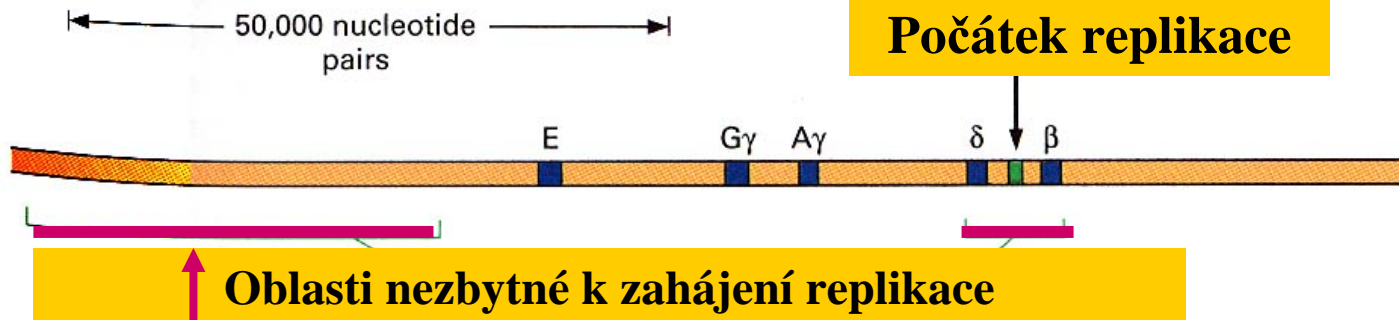
# Struktura počátku replikace u kvasinek

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> = vazebná místa pro další proteiny  
(odlišné pro různé počátky)



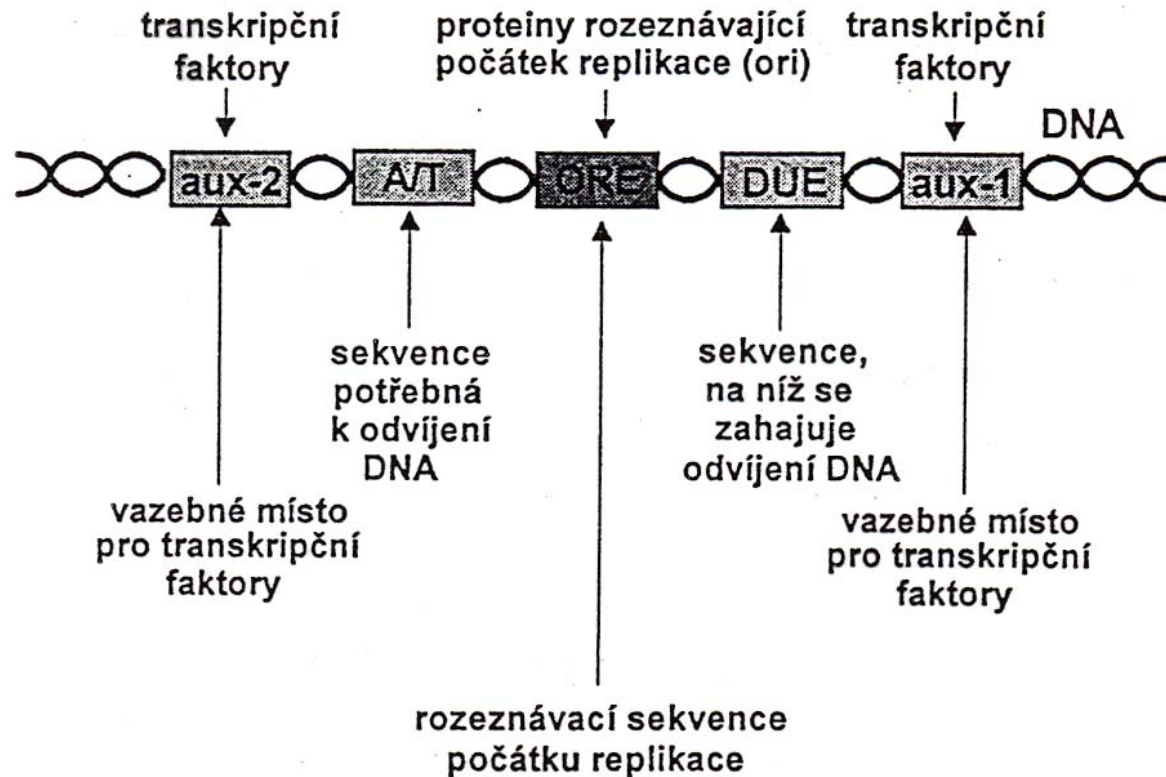
ORC = origin recognition complex,  
komplex složený z mnoha podjednotek,  
vázající se na všechny počátky replikace

# Struktura počátku replikaci u člověka



Sekvence ovlivňující strukturu chromatinu v oblasti počátku replikace

# Struktura počátku replikace u kvasinek



1. Vazba inciačních proteinů na sekvenci ore (helikáza, polymeráza atp)

2. Vazba transkripčních faktorů a jejich interakce s proteiny v místě ORE

3. Iniclace replikace, rozmotání DNA v místě DUE

Různé transkripční faktory aktivují různé počátky replikace



# Počet počátků replikace u různých organismů

---

Organismus	Počet replikonů	Velikost replikonů	Rychlost pohybu vidlice
<i>(E. coli)</i>	1	4200 kb	50,000 bp/min
<i>(S. cerevisiae)</i>	500	40 kb	3,600 bp/min
<i>(D. melanogaster)</i>	3500	40 kb	2,600 bp/min
<i>(X. laevis)</i>	15000	200 kb	500 bp/min
<i>(M. musculus)</i>	25000	150 kb	2,200 bp/min
<i>(V. faba)</i>	35000	300 kb	

Rozdíly v rychlosti syntézy

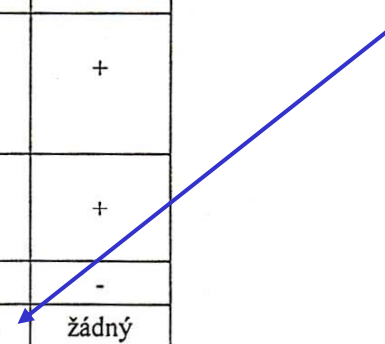
## Složky bakteriálního a eukaryotického replizomu

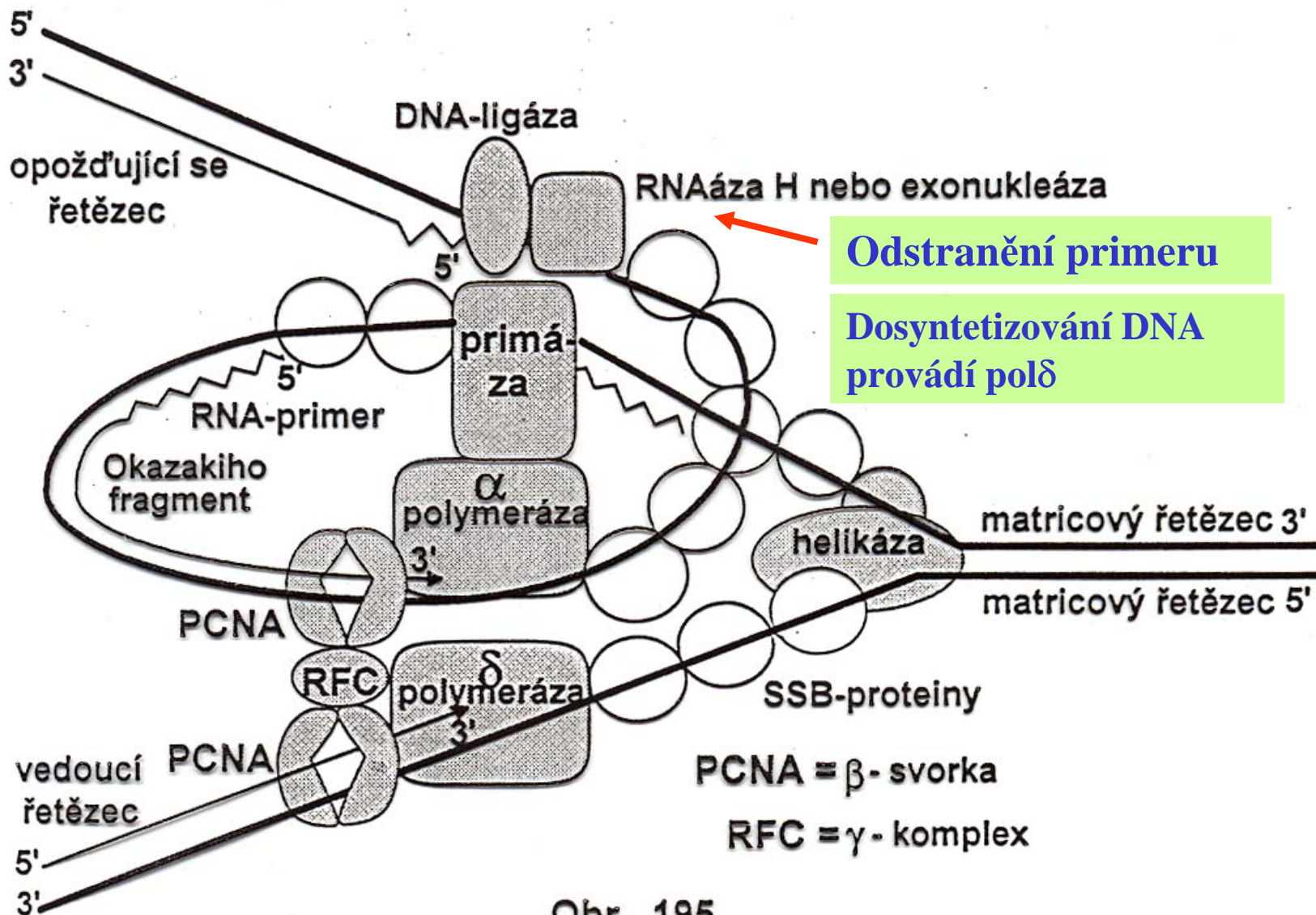
Složka replizomu	U bakterií	U eukaryot
<b>Replikativní polymeráza</b>	Holoenzym polIII*	pol $\alpha$ /primáza v komplexu s pol $\delta$
<b>Faktor zvyšující procesivitu replikativní polymerázy</b>	$\beta$ -svorka	PCNA
<b>Faktor nakládající <math>\beta</math>-svorku (PCNA)</b>	$\gamma$ -komplex	RFC
<b>Primáza</b>	jen DNA-primáza (DnaG-protein)	komplex pol $\alpha$ /primáza
<b>Helikáza</b>	DnaB-protein, n'-protein	?
<b>Odstranění primeru</b>	DNA-polymeráza I	exonukleáza MF1
<b>Oprava opožd'ujícího se řetězce</b>	DNA-polymeráza I a DNA-ligáza	Komplex pol $\delta$ /pol $\epsilon$ ? a DNA-ligáza
<b>DNA-topoizomeráza</b>	II (gyráza)	II
<b>Proteiny vázající se na jednořetězcové úseky DNA</b>	SSB-proteiny	replikační protein A (RP-A) nebo lidský SSB (HSSB)

Přehled vlastností a funkcí eukaryotických DNA-polymeráz

Označení u savců	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$
Označení u kvasinek	pol1	pol4	polM	pol3	pol2
Umístění	v jádře	v jádře	v mitochondriích	v jádře	v jádře
Počet podjednotek	4	1	2	2	>1
Polymerázová aktivita 5'-3'	+	+	+	+	+
Exonukleázová aktivita 3'-5'	-	-	+	+	+
Primáza	+	-	-	-	-
Sdružené faktory	žádný	žádný	žádný	PCNA	žádný
Procesivita	mírná	nízká	vysoká	vysoká ve sdružení s PCNA	vysoká
Funkce	začátek syntézy Okazakiho fragmentů primery	oprava poškozené DNA	katalýza replikace v mitochondriích	syntéza prodlužujícího se řetězce a dokončení syntézy Okazakiho fragmentů	neznámá

Proliferační buněčný antigen -  $\beta$ -svorka

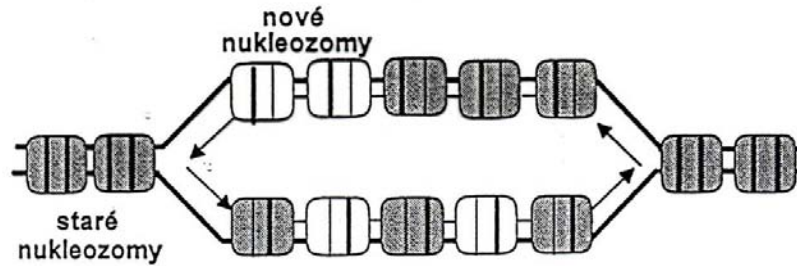




Obr. 195

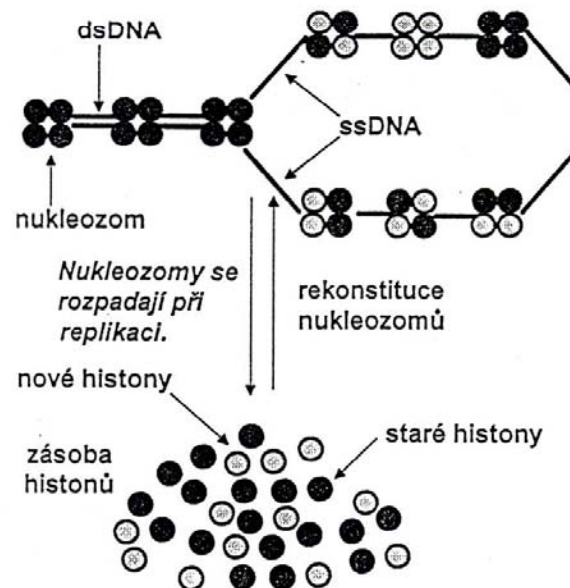
Globální pohled na elongaci vedoucího a opožd'ujícího se řetězce v replikační vidlici eukaryotické chromozomové dsDNA

*Staré a nové nukleozomy se na maticových a podle nich syntetizovaných komplementárních řetězcích rozdělují náhodně.*



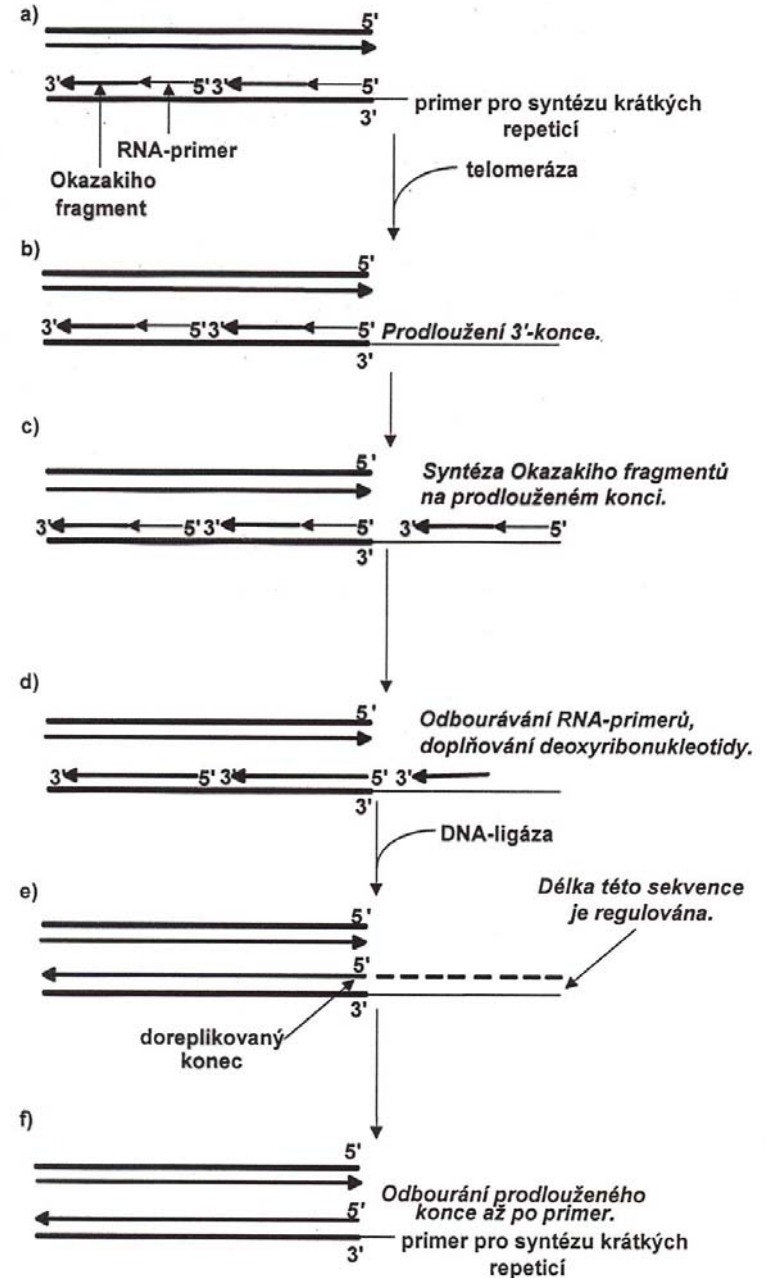
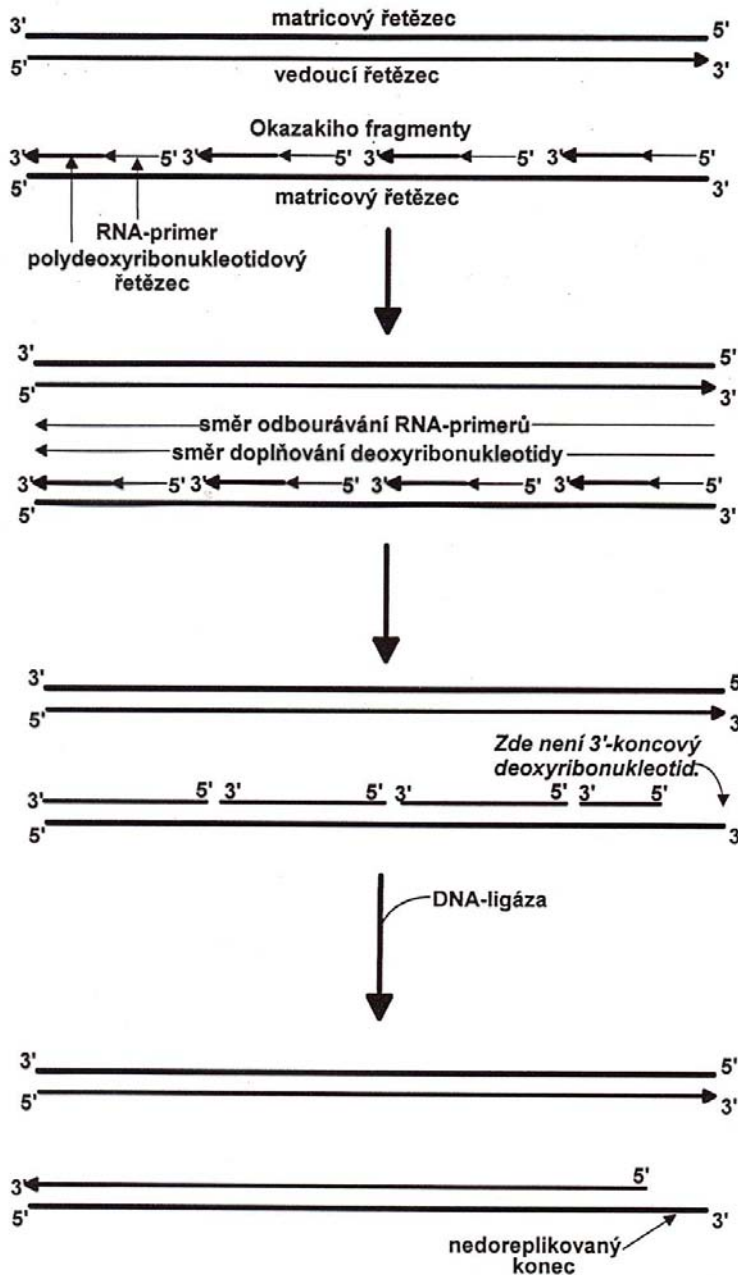
Obr. 191

Schéma replikační vidlice eukaryotické jaderné DNA



*Na obrázku je pro jednoduchost schematického vyjádření nukleozom znázorněn jako tetramer histonů. Ve skutečnosti však jde o oktamer.*

# Problém doreplikování 3' konců lineárních chromozomů



## Sekvence telomer různých organismů

TTGGGG neboli  $T_2G_4$  u *Tetrahymena thermophila* a *Glaucoma chattoni*.

TTTTGGGG neboli  $T_4G_4$  u *Euplotes aediculatus* a *Oxytricha nova*.

TTTAGGGG neboli  $T_3A_1G_3$  u *Arabidopsis thaliana*.

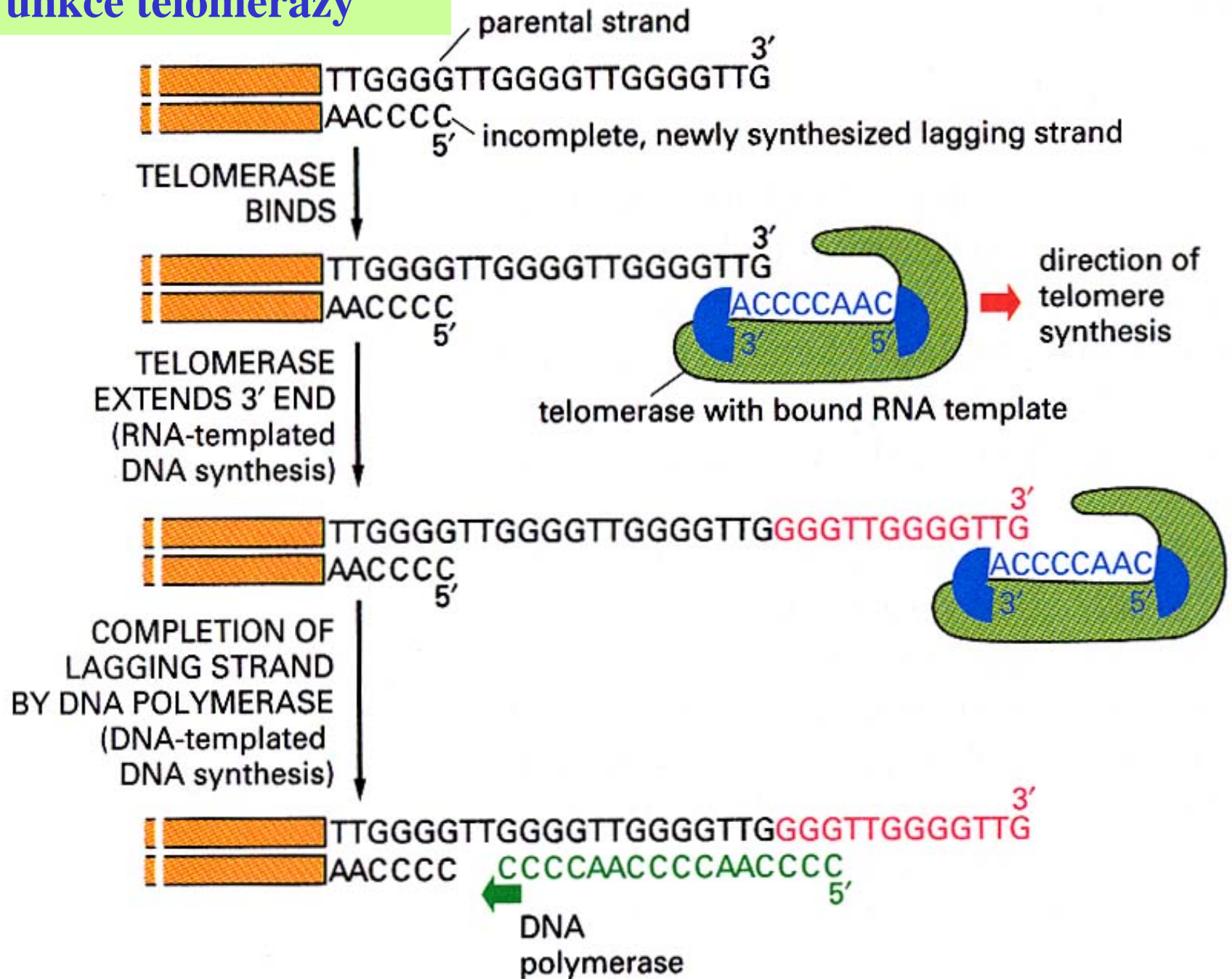
TGGG neboli  $TG_3$  u *Saccharomyces cerevisiae*.

TTAGGG neboli  $T_2A_1G_3$  u člověka, myši a *Trypanosoma brucei*.



5'GGGTTA 3' - 10 000 bp

# Funkce telomerázy





# Struktura telomerázy

Část telomerázy  
tvořená RNA

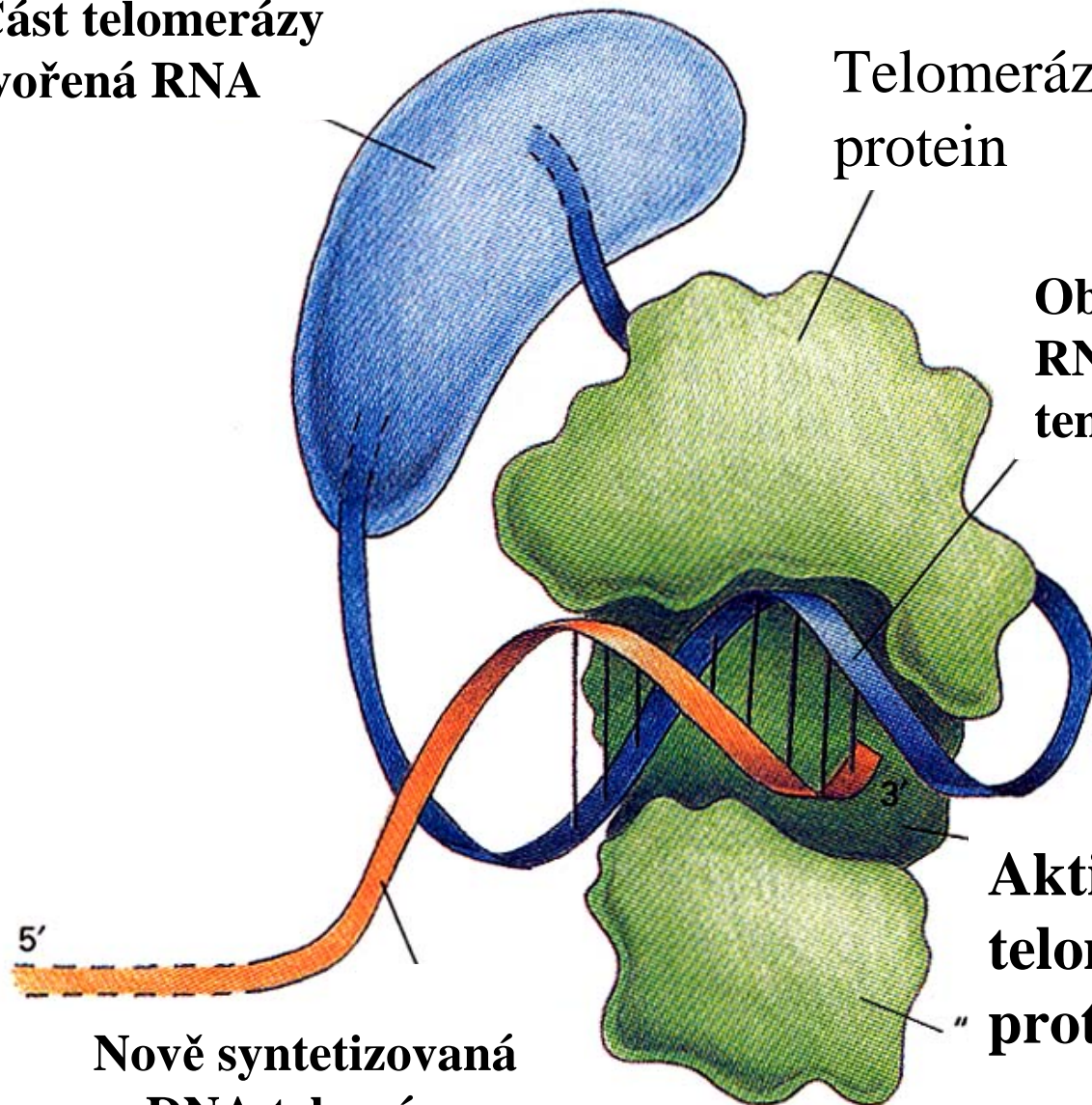
Telomerázový  
protein

Oblast telomerázové  
RNA používaná jako  
templát

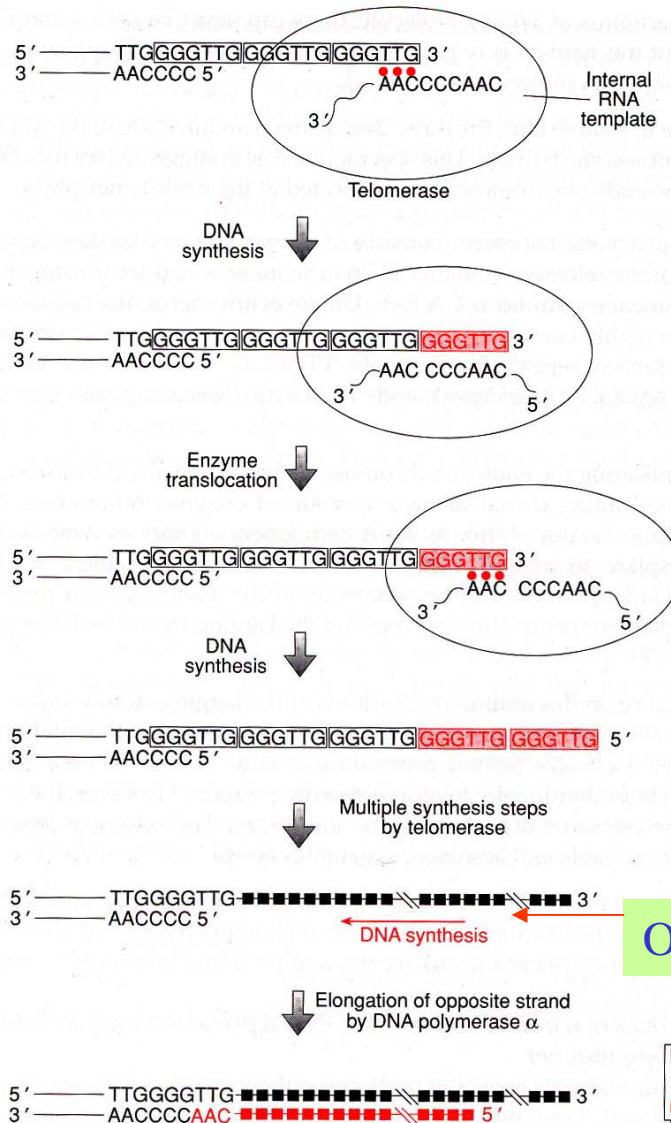
Aktivní místa  
telomerázového  
proteinu

5'

Nově syntetizovaná  
DNA teloméry



# Prodlužování konců telomer telomerázou



Okazakiho fragmenty

Key:  
 ■ 5' GGGTTG 3'  
 ■ 3' CCCAAC 5'

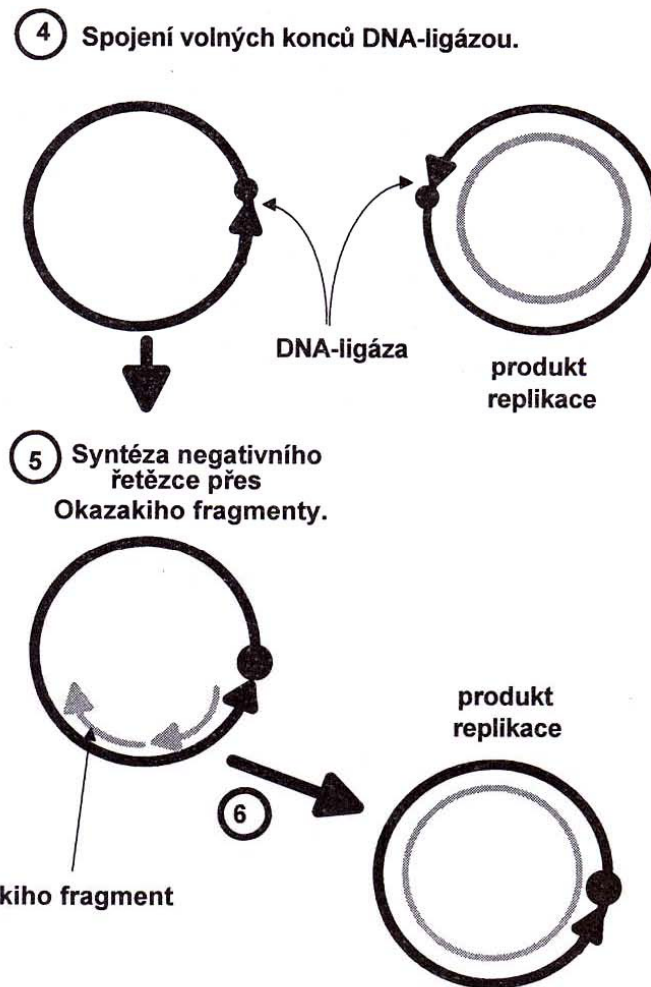
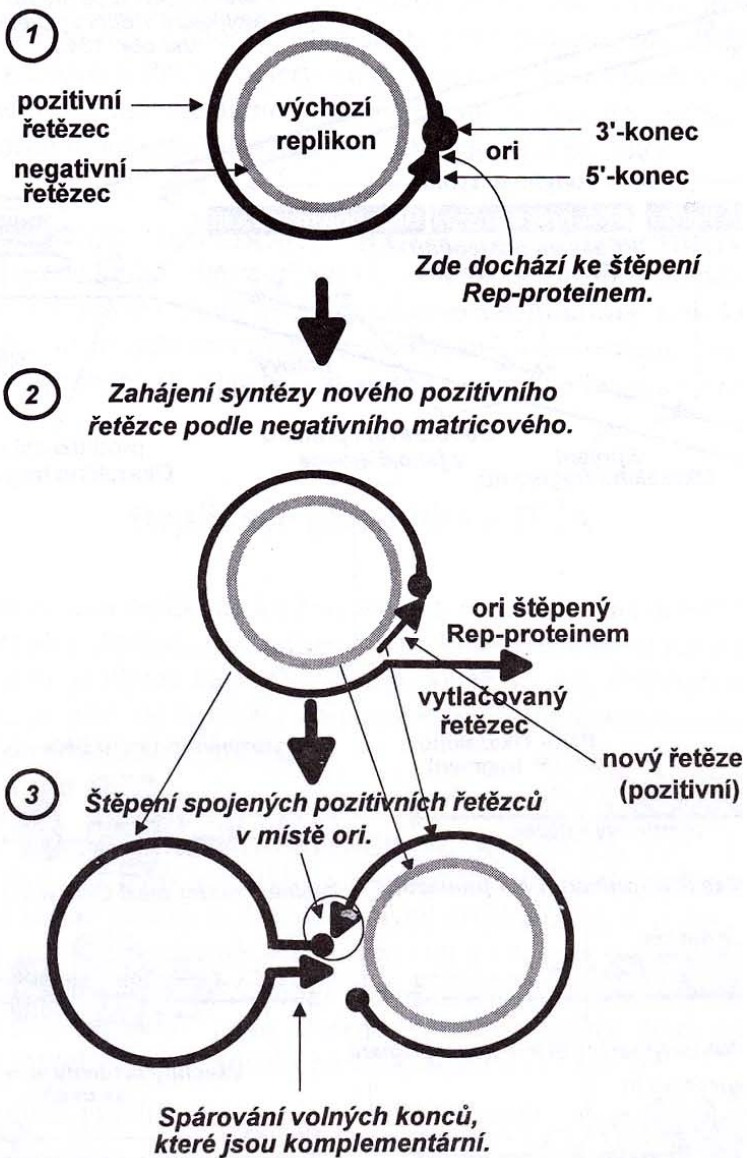
## Telomerová opakování ~ mechanismus pro kontrolu buněčného dělení

- při narození mají v somatických buňkách telomery úplnou délku
- při každém dělení buňky ztrácí telomera 50-100 nt
- po mnoha děleních mají buňky defektní chromozomy a dochází k zástavě dělení buněk = **replicative cell senescence**

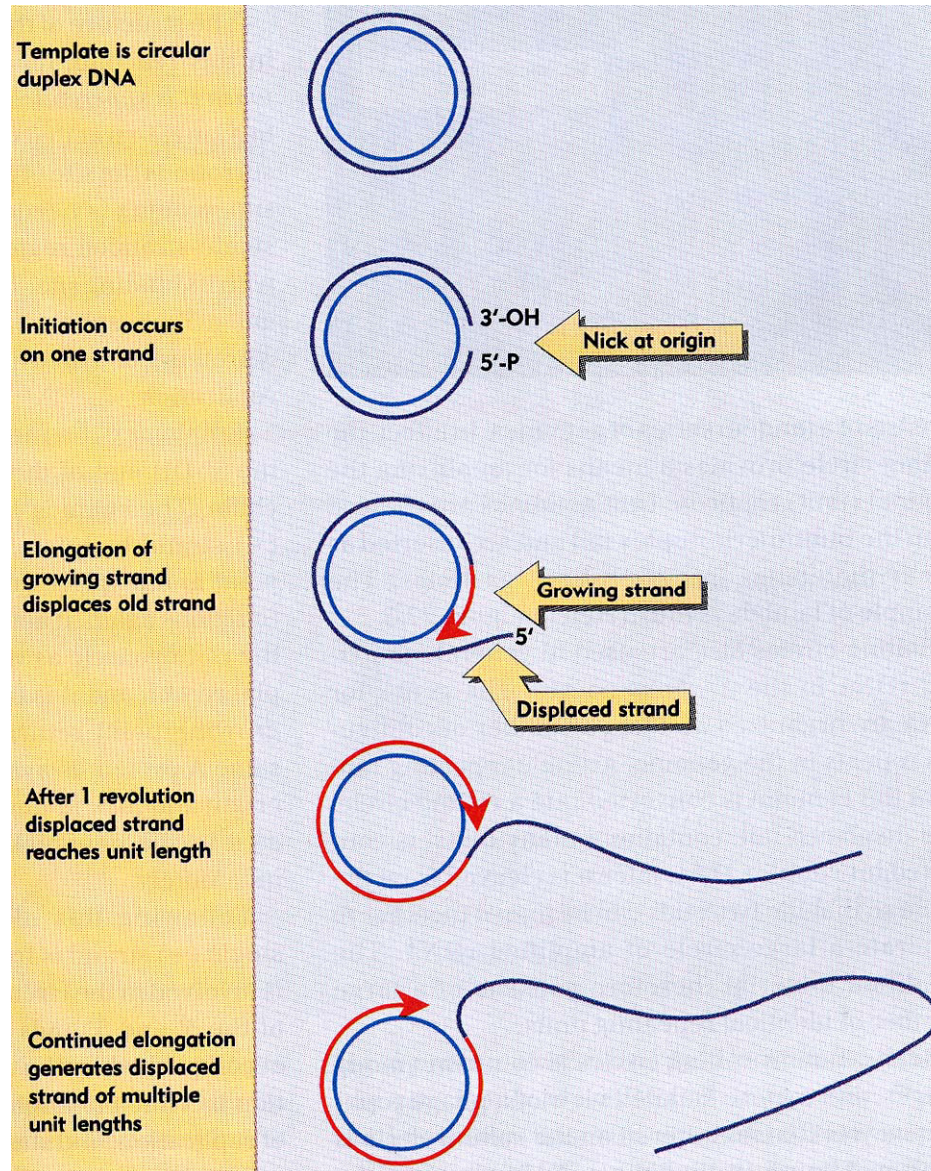
## Mechanismus zajišťuje, že nedochází k nekontrolovatelnému dělení buněk („measuring stick“)

- *lidské fibroblasty ve tkáňové kultuře - po 60 děleních buněk dochází k zástavě tvorby telomerázy*
- *po vložení genu s aktivní telomerázou se délka telomer udržuje a buňky nestárnou*

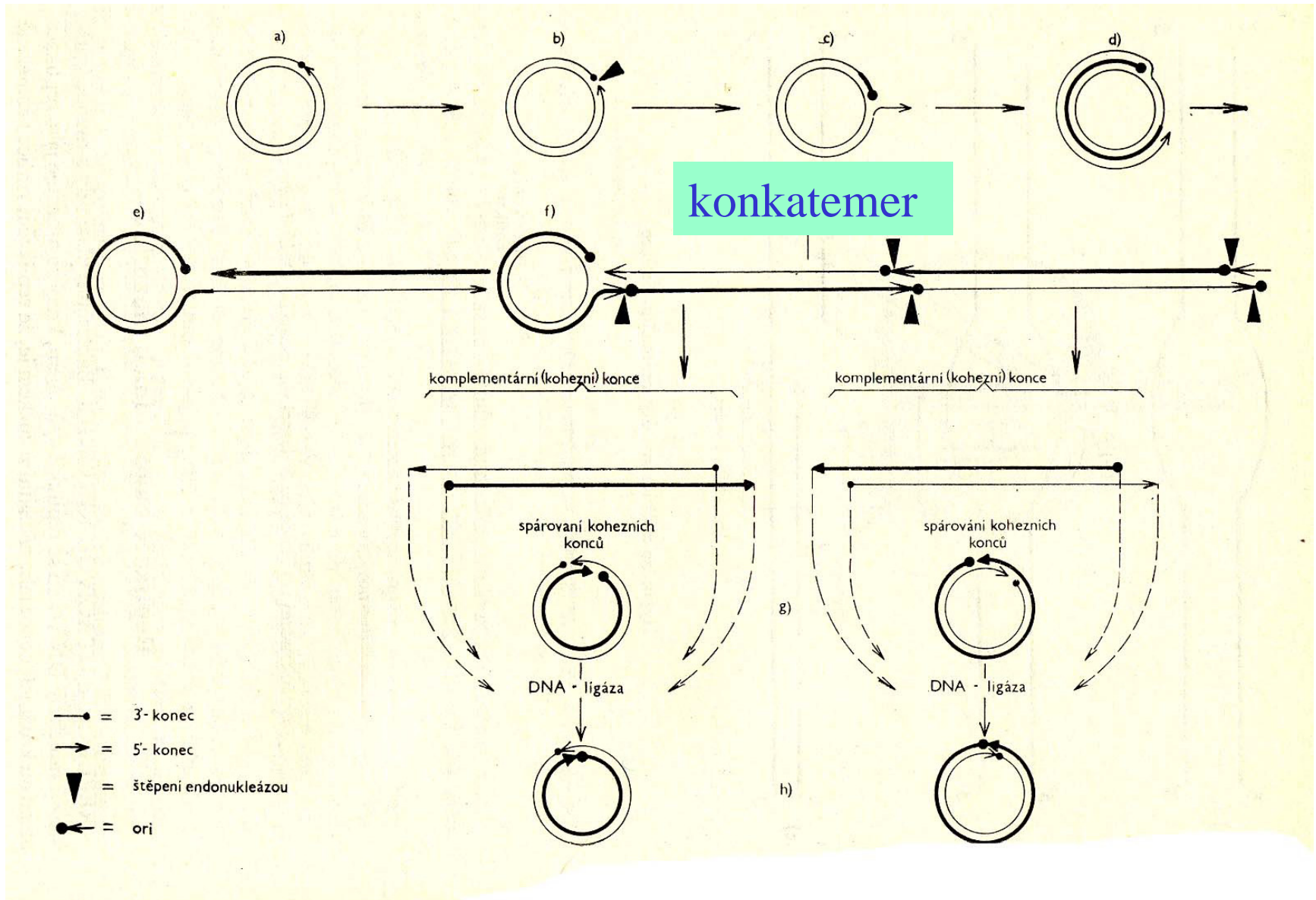
# Replikace plazmidů otáčející se kružnicí



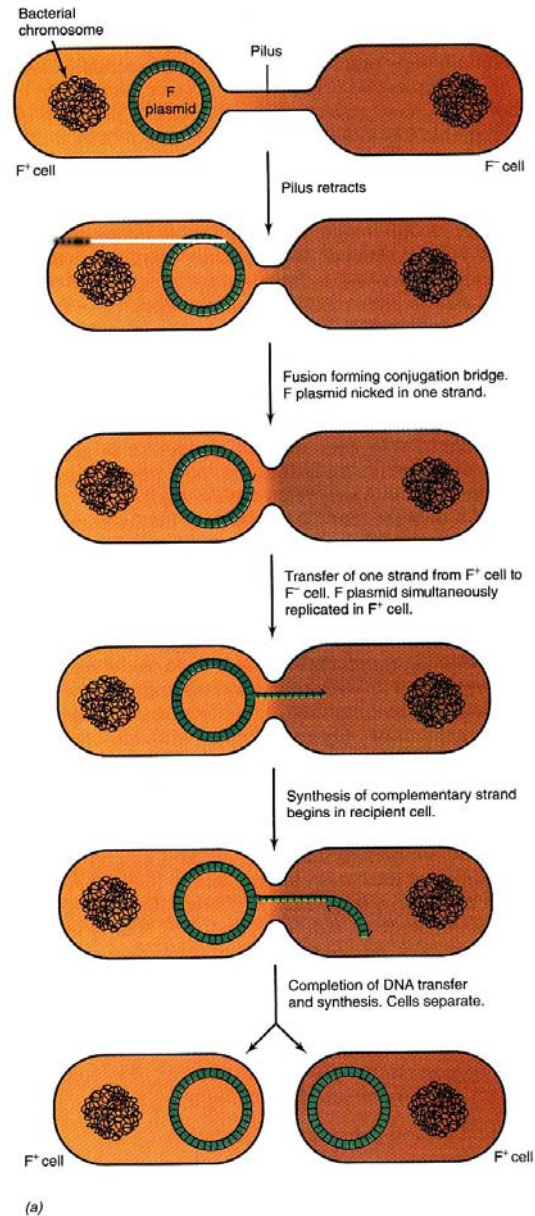
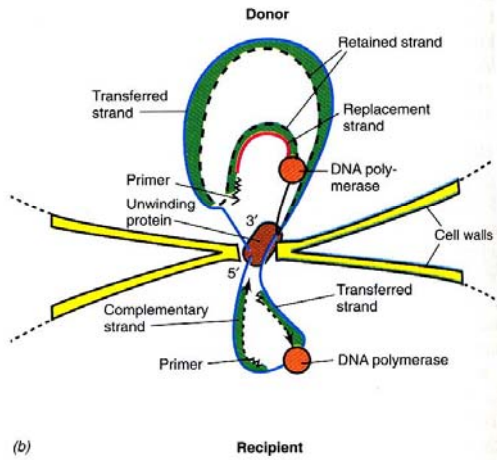
# Replikace DNA mechanismem otáčející se kružnicí



# Replikace bakteriofágů (lambda) otáčející se kružnicí

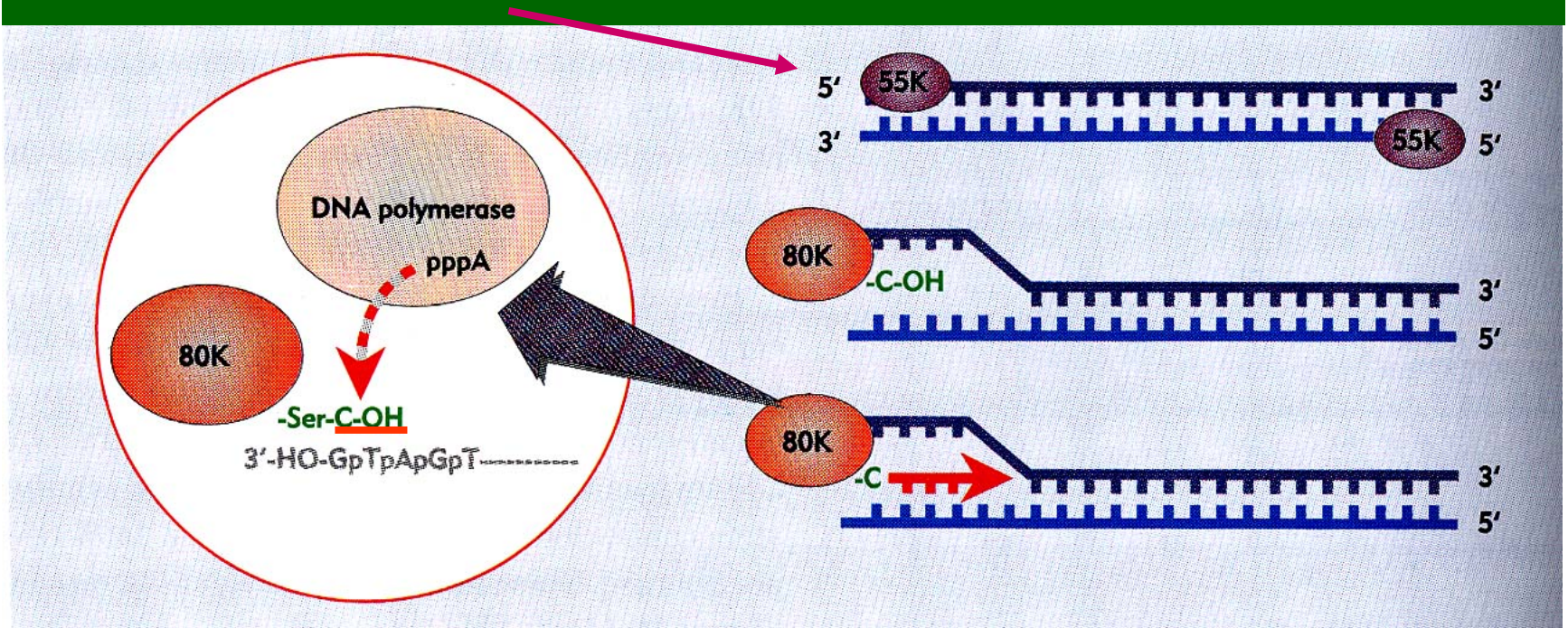


# Replikace konjugativních plazmidů



# Replikace genomu adenoviru

## Specifický protein pro iniciaci replikace



Ostatní viry: vlastní polymerázy nebo polymerázy hostitele;  
proteiny pro iniciaci replikace; retroviry: RT