

Replikace nukleových kyselin

- **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 molekuly dceřiné)

Charakteristické rysy replikace dvouřetězcové DNA

1. Probíhá semikonzervativním způsobem
2. Probíhá semidiskontinuálně

Replikon = oblast nukleové kyseliny, která se replikuje z jednoho počátku replikace (**ori**)

Tři možné způsoby replikace DNA

Semikonzervativní

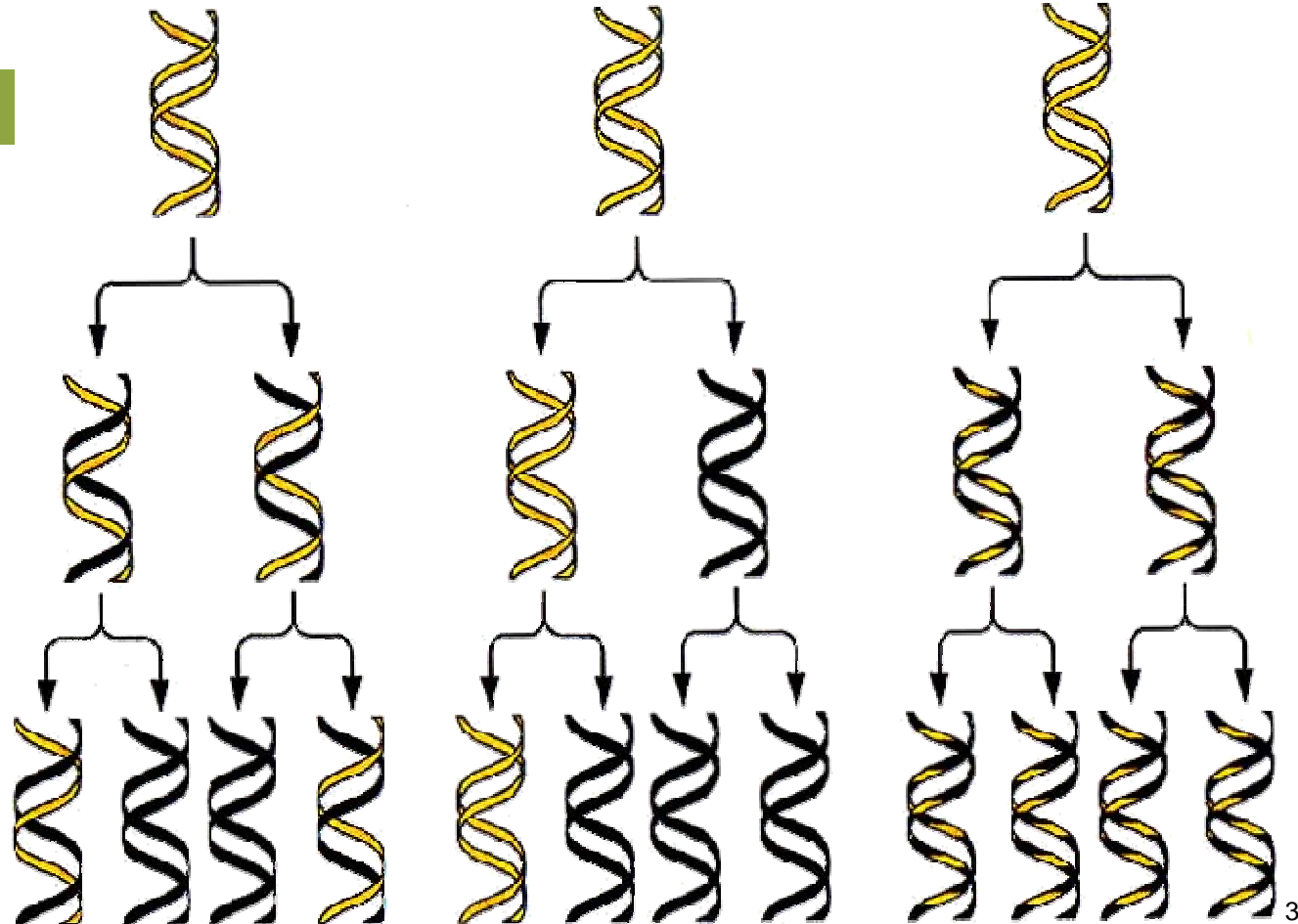
Konzervativní

Disperzní

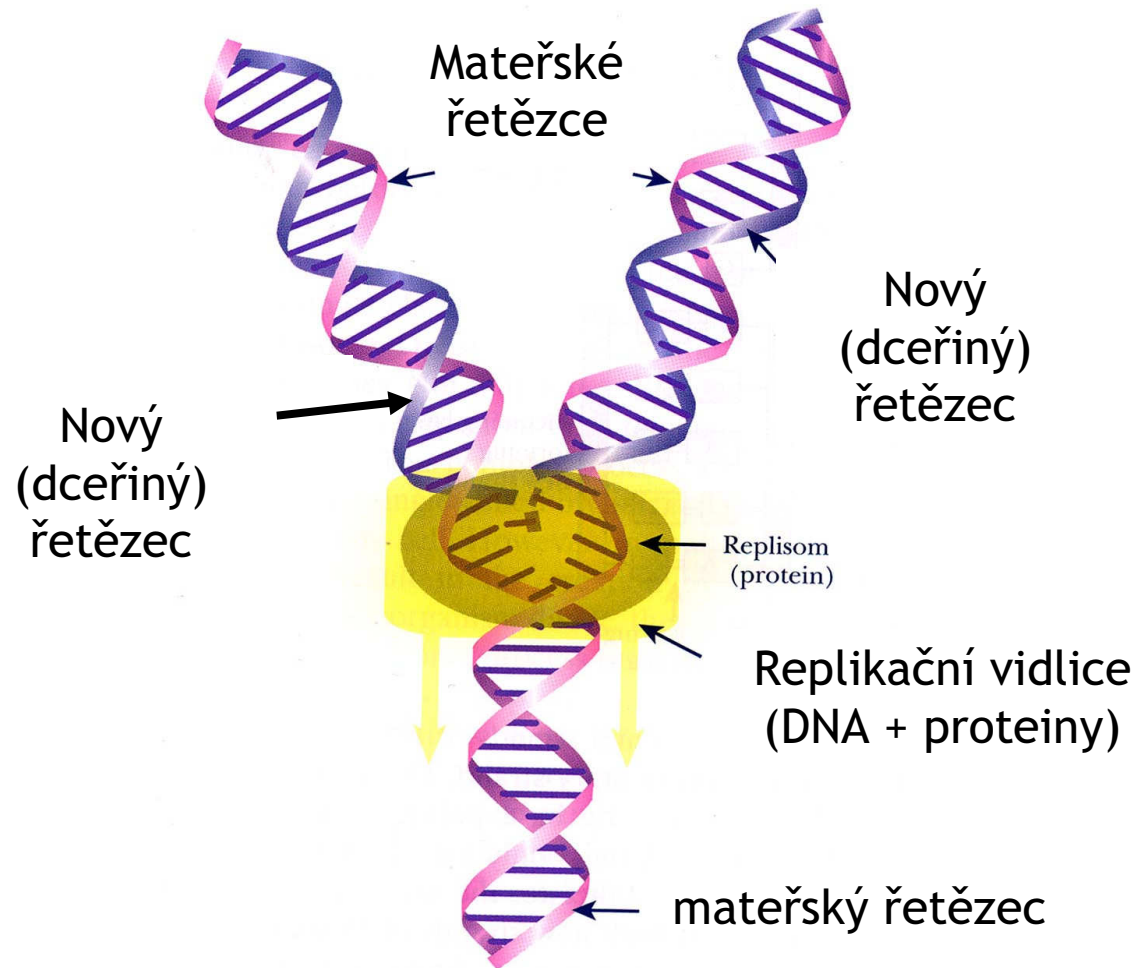
Rodičovská DNA

DNA po první replikaci

DNA po druhé generaci



Semikonzervativní způsob replikace dsDNA

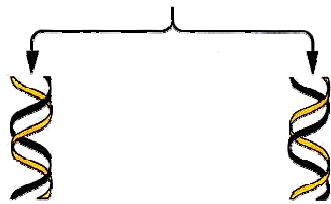


Důkaz semikonzervativní replikace DNA (Meselson a Stahl 1958)

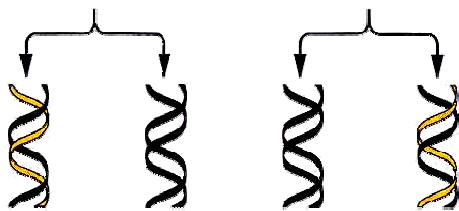
1 *E. coli* cells are grown on ^{15}N for several generations.



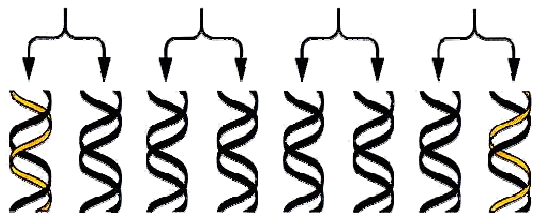
3 Cells are then transferred to medium containing ^{14}N for one generation.



5 For two generations.



7 For three generations.

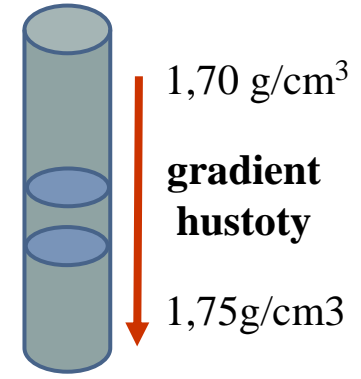
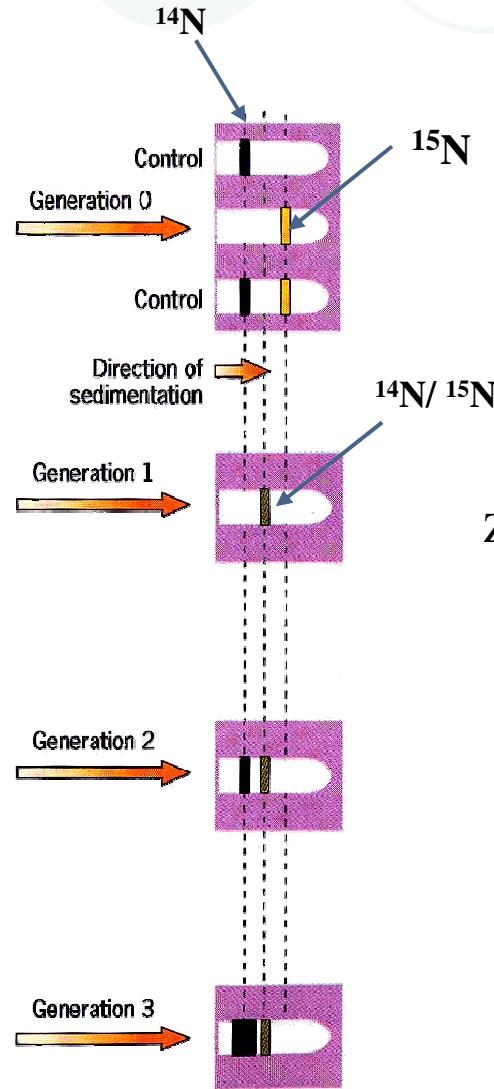


2 DNA is extracted and analyzed by CsCl density gradient centrifugation.

4 DNA is extracted and analyzed.

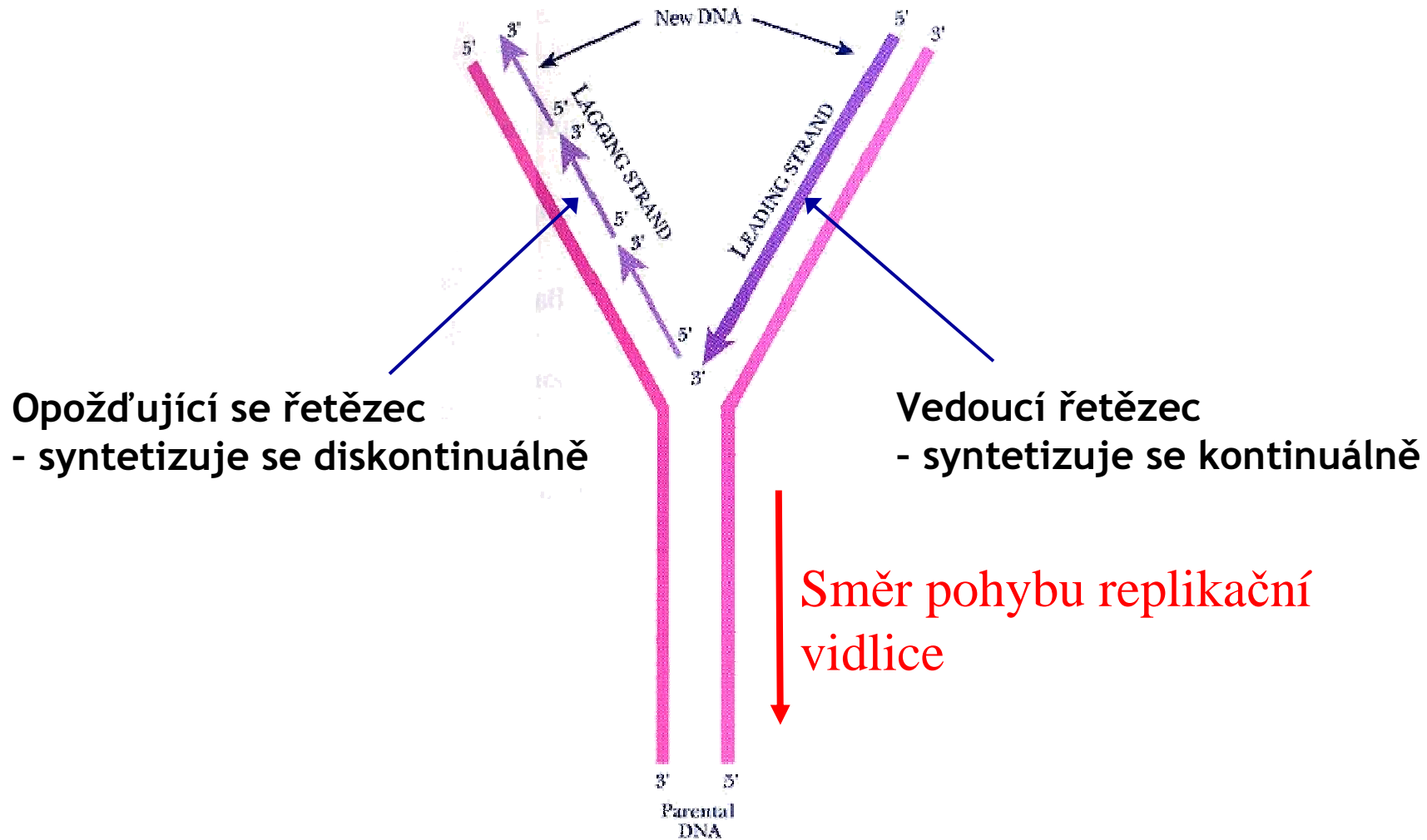
6 DNA is extracted and analyzed.

8 DNA is extracted and analyzed.



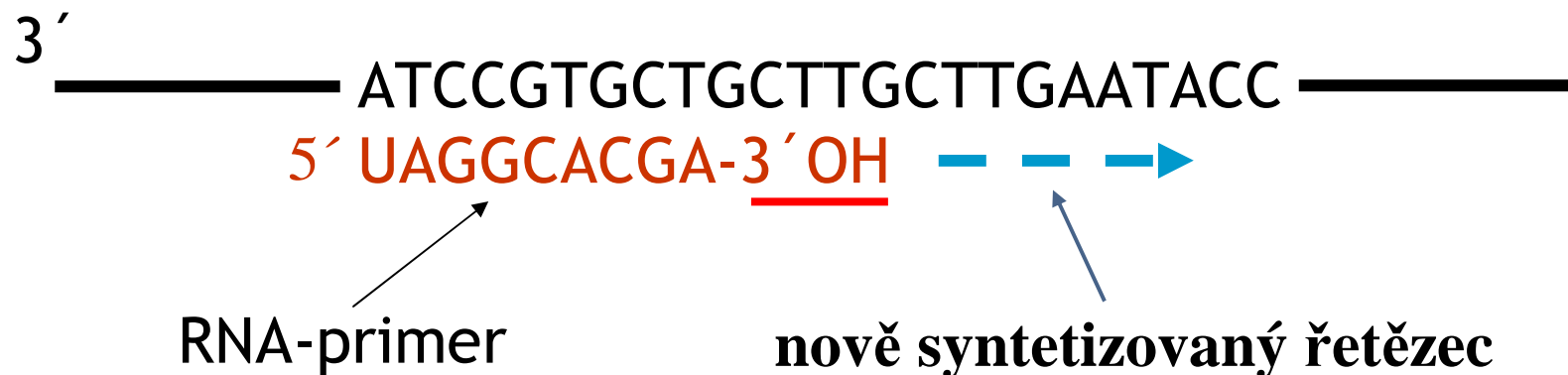
Zkumavka s roztokem CsCl

Semidiskontinuální syntéza řetězců při replikaci

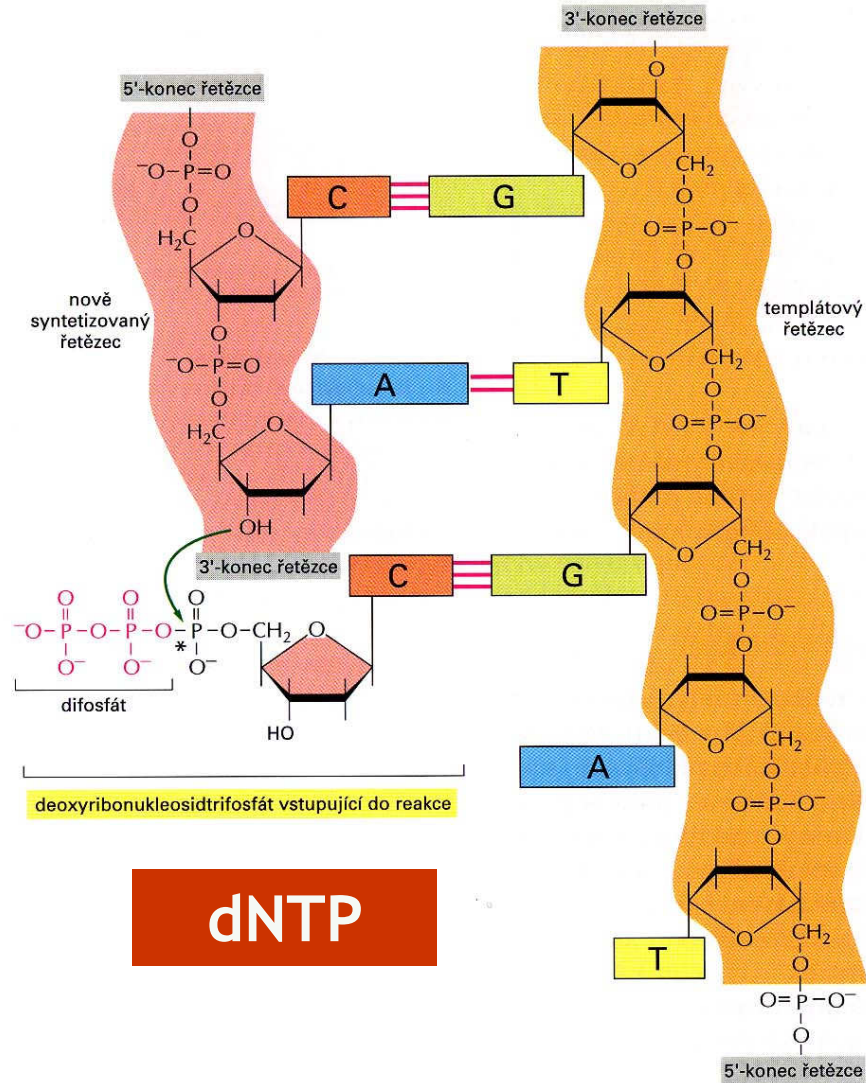


Předpoklady a požadavky pro replikaci nukleových kyselin

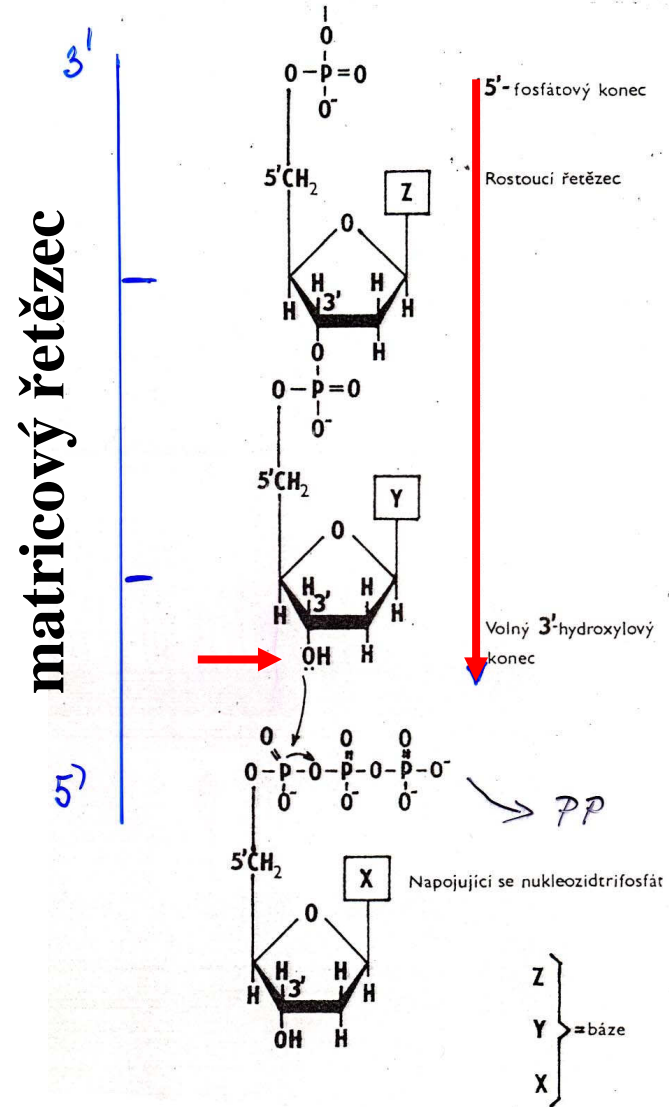
1. **Templát** (matricový řetězec) = mateřská molekula
2. **Primer** = krátký oligoribonukleotid s volným 3' OH koncem (volná 3' OH skupina nukleotidu)
3. **Enzymy katalyzující připojování nukleotidů** (polymeráza, primáza, ligáza)
4. **Nukleotidy** (dNTP)



Syntéza DNA při procesu replikace



Směr syntézy polynukleotidového řetězce



Enzymy kooperující při replikaci a jejich funkce

1. **DNA-polymerázy a DNA-primáza:** katalyzují polymerizaci NTP
2. **DNA-helikázy, DNA-topoizomerázy:** odstranění helikálního vinutí dsDNA otevření DNA-helixu
3. **SSB - proteiny:** stabilizace jednořetězců
4. **Iniciátorové proteiny:** vazbou na ori katalyzují vytvoření replikační vidlice

Počátek replikace = ori
specifická sekvence na DNA (dnaA box)

Proteiny zajišťující replikaci u *E. coli* a jejich funkce

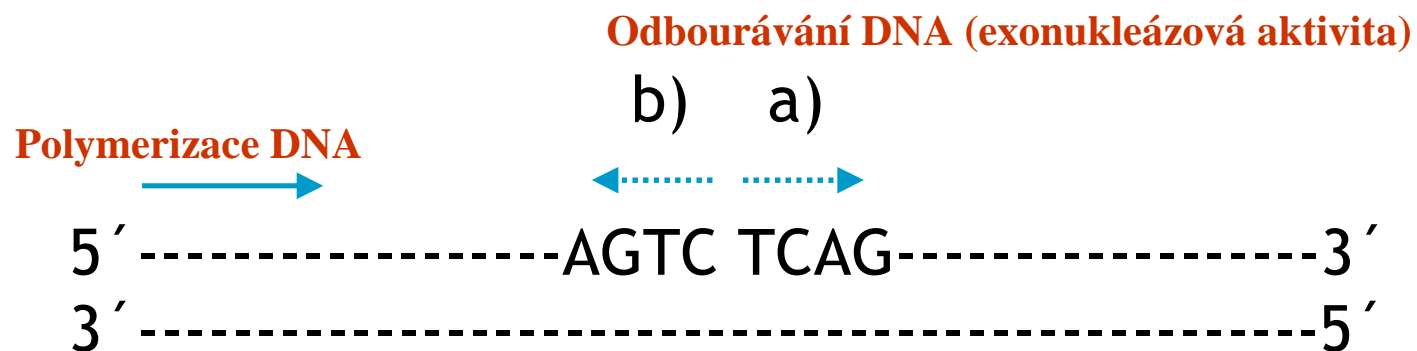
Protein	Gene	Function
DnaA	<i>dnaA</i>	Initiation of chromosome division; binds to the origin replication
Helicase	<i>dnaB</i>	Unwinds the double helix
DnaC	<i>dnaC</i>	Loading of DNA helicase
SSB	<i>ssb</i>	Single strand binding protein
Primase	<i>dnaG</i>	Synthesis of RNA primers
RNase H	<i>rnhA</i>	Partial removal of RNA primers
Pol I	<i>polA</i>	Polymerase I; fills gaps between Okazaki fragments
Polymerase III		DNA polymerase III holoenzyme
α	<i>dnaE</i>	strand elongation
ε	<i>dnaQ</i>	kinetic proof-reading
θ	<i>holE</i>	unknown; part of core enzyme
β	<i>dnaN</i>	sliding clamp
τ	<i>dnaX</i>	dimerization of core enzyme
γ	<i>dnaX</i>	loading of sliding clamp
δ	<i>holA</i>	loading of sliding clamp
δ'	<i>holB</i>	loading of sliding clamp
χ	<i>holC</i>	loading of sliding clamp
ψ	<i>holD</i>	loading of sliding clamp
DNA Ligase	<i>lig</i>	Seals nicks in lagging strand
DNA Gyrase		Introduces negative supercoils
α	<i>gyrA</i>	Makes and seals double strand breaks in DNA
β	<i>gyrB</i>	ATP-using subunit
Topoisomerase IV		Decatenation
A	<i>parC</i>	Makes and seals double strand breaks in DNA
B	<i>parE</i>	ATP-using subunit

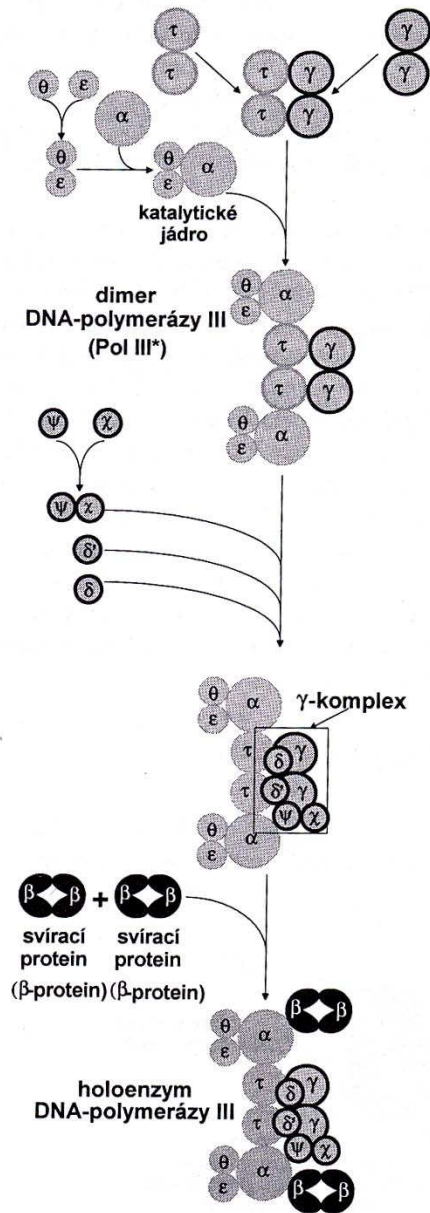
podjednotky

Charakteristika aktivit DNA-polymeráz

- **DNA-dependentní-DNA-polymerázy**

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





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;

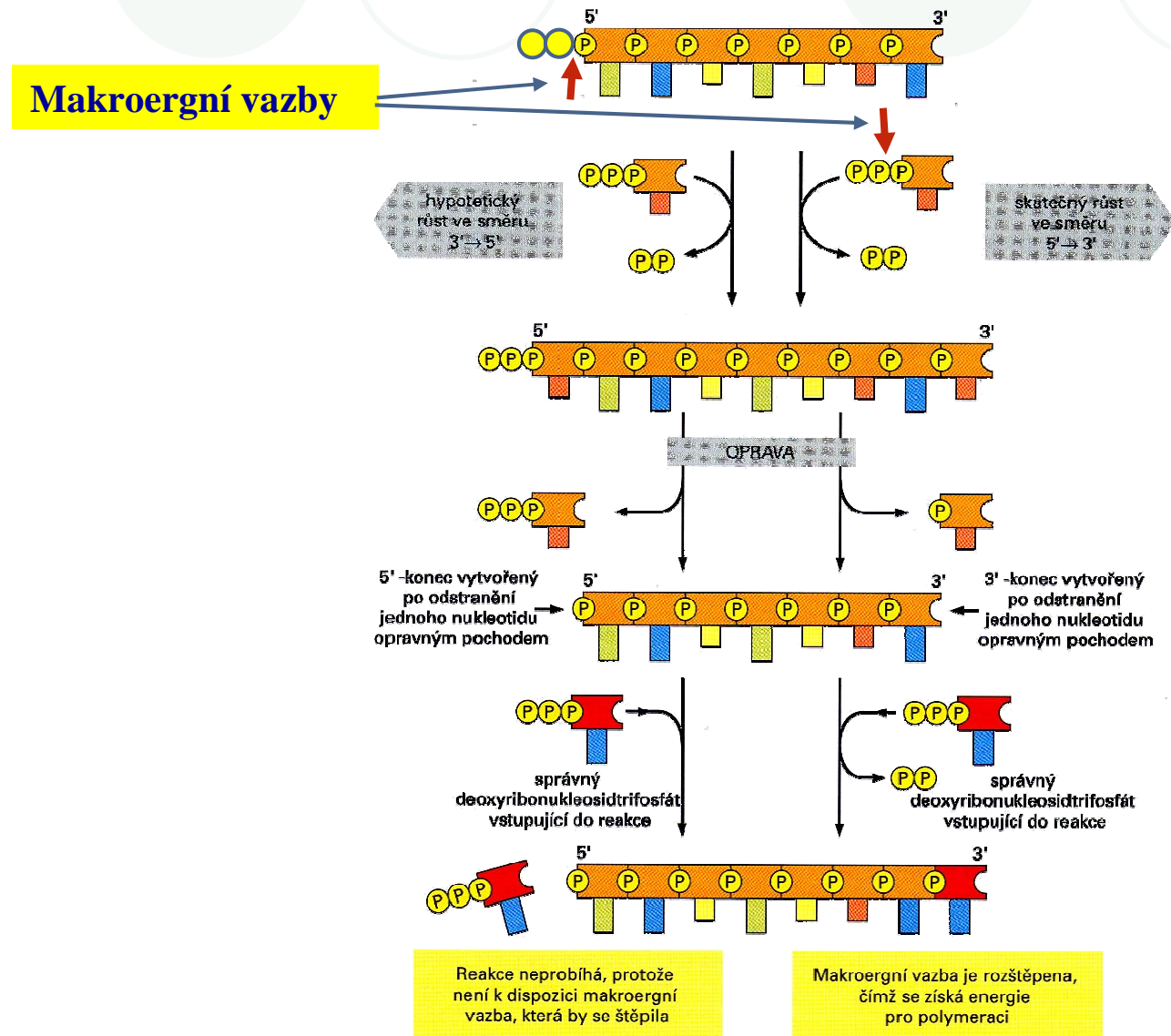
δ -monomer se váže na β ;

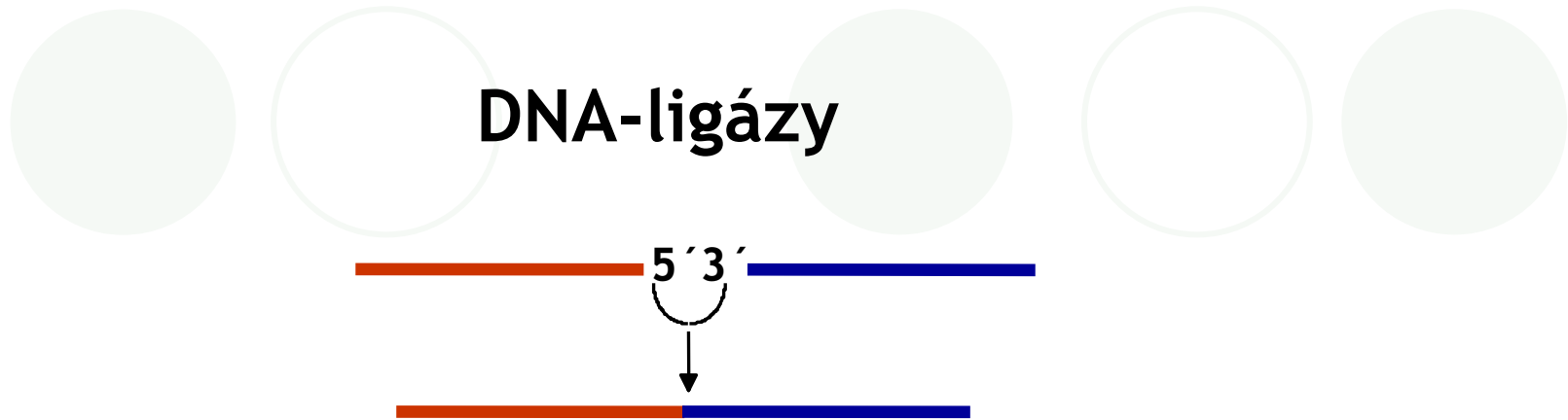
δ' -monomer stimuluje účinek monomeru β ;

χ -monomer, na který se vážou proteiny SSB;

ψ -monomer tvoří most mezi χ a γ .

Proč je DNA syntetizována jen ve směru 5' → 3' ?





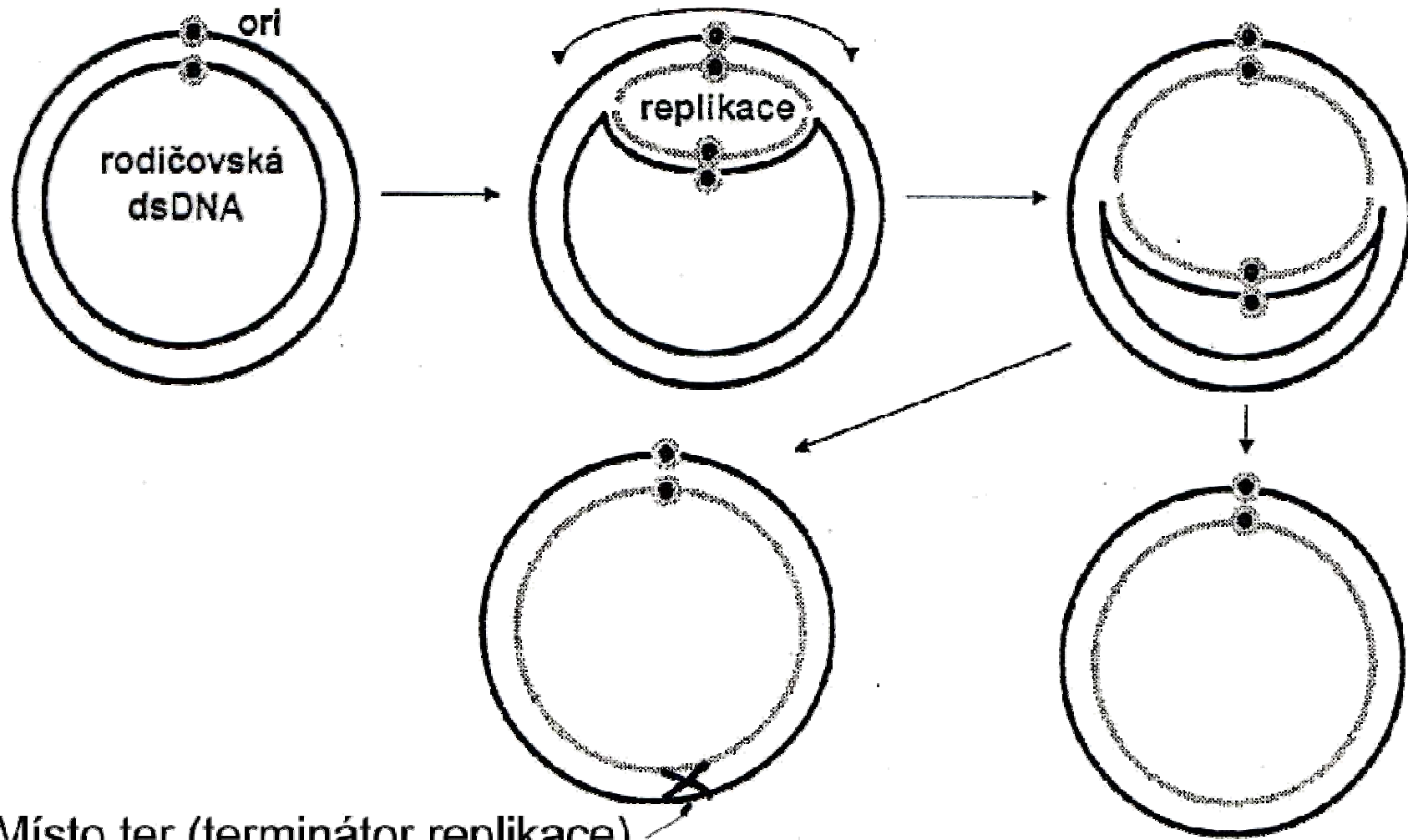
- **DNA-ligáza (ATP)**



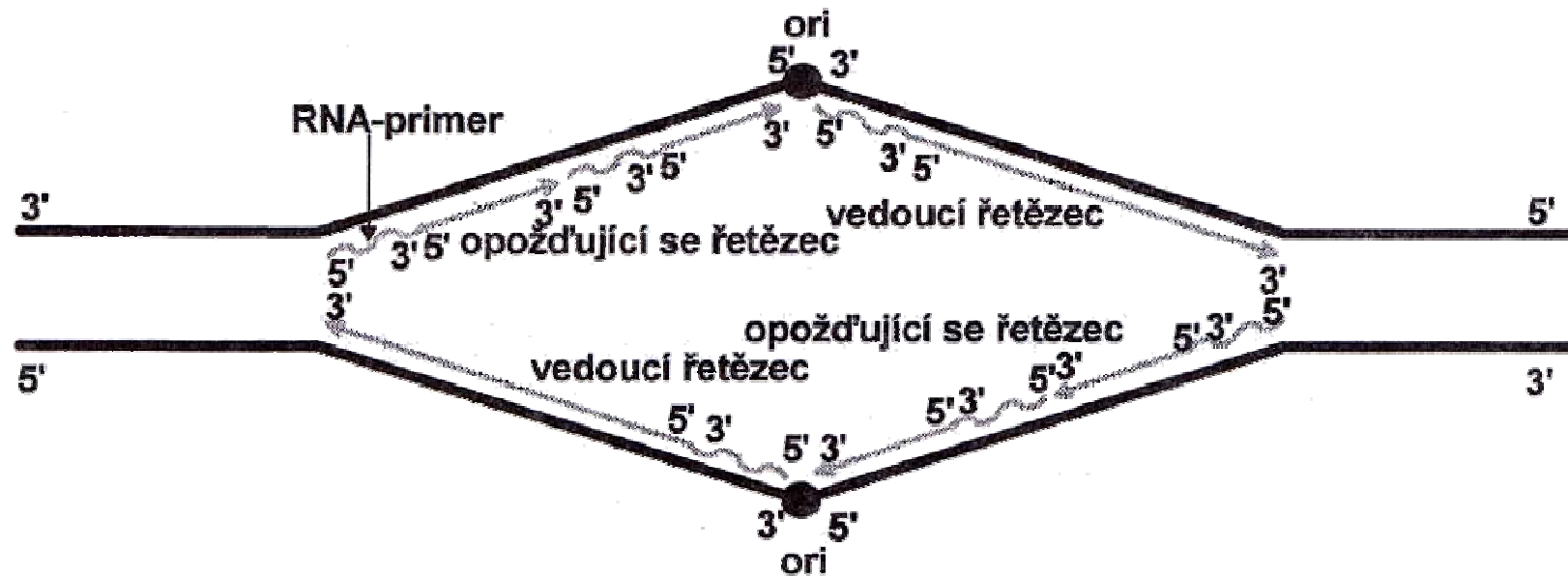
- **DNA-ligáza (NAD⁺)**



Dvousměrná replikace kružnicové chromozomové dsDNA prokaryot

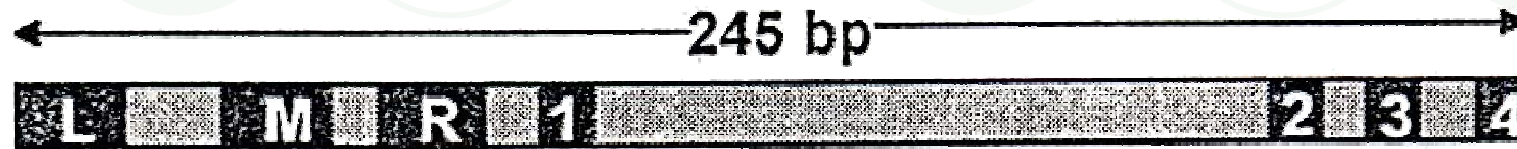


Asymetrie replikační vidlice



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

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

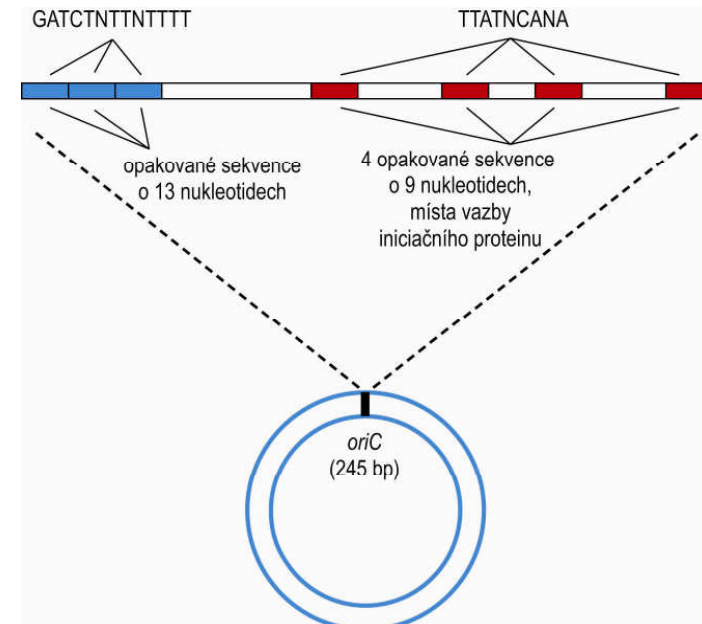


L, M, R jsou 13 bp-sequvence **GATCTNTTNTTTT**

AT

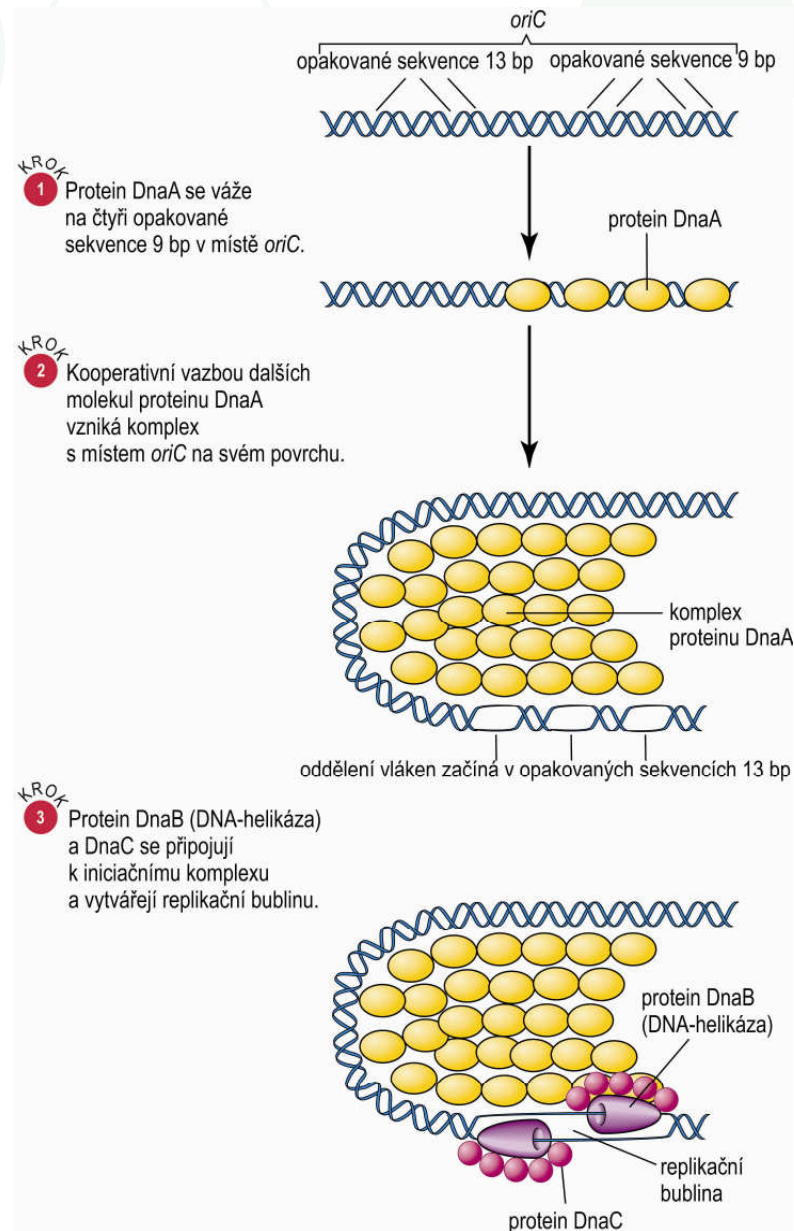
1, 2, 3, 4 jsou 9 pb-sequvence TTATNCANA

 = neopakující se sequvence

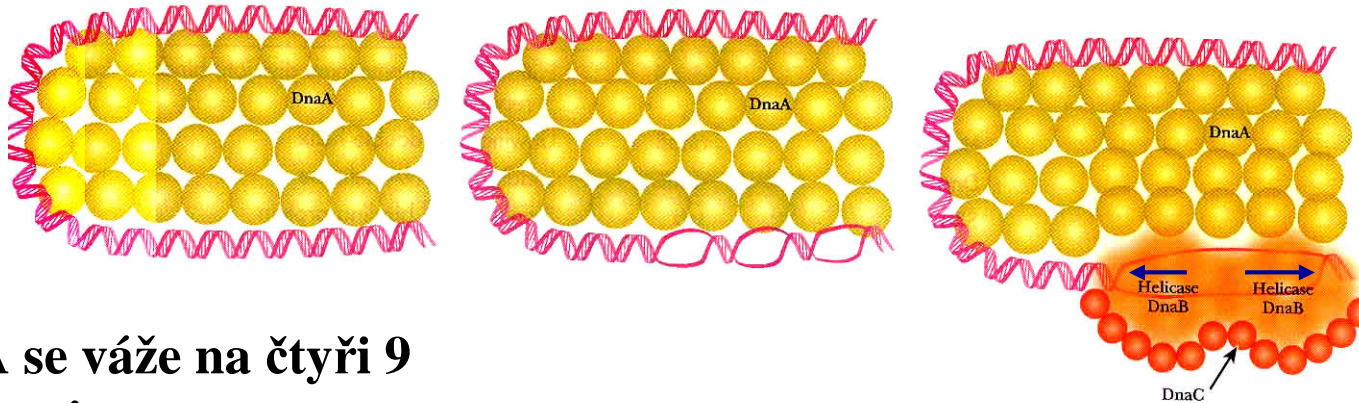


Minireplikon

Předprimerová fáze replikace DNA v *oriC* u *E. coli*



Fungování proteinů DnaA, DnaB a DnaC při iniciaci replikace v oriC



DnaA se váže na čtyři 9 bp repetice

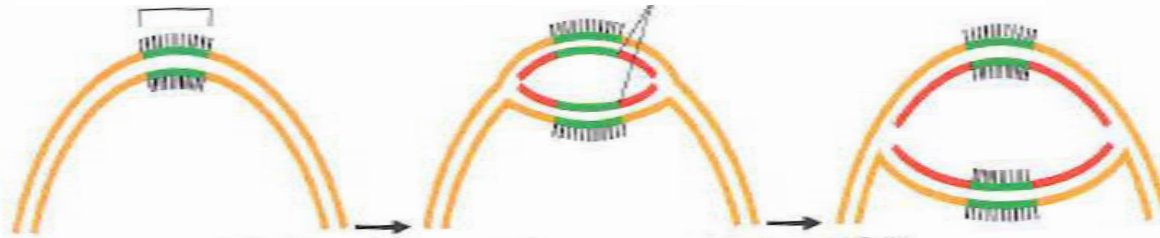
DNA se ohýbá a začíná se rozmotávat v místě tří 13 bp repeticí – zde se pak vážou DnaB a DnaC, což vede k vytěsnění DnaA a rozmotá se celá oblast bohatá na AT páry. DnaB (helikáza) vytváří dvě replikační vidlice – každou v jednom směru

Regulace iniciace replikace u *E. coli* je řízena metylací

**Plně metylovaný
počátek replikace**

**hemimetylovaný
počátek replikace**

**Plně metylovaný
počátek replikace**



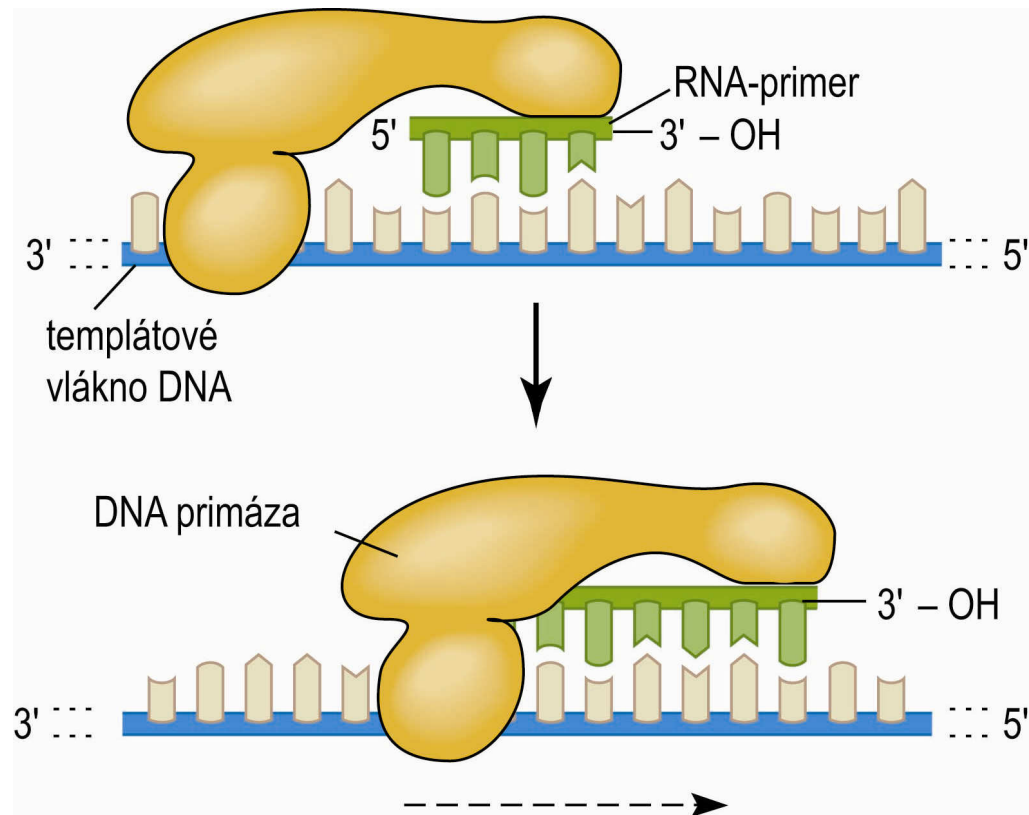
**Inciace replikace je
zahájena, pokud je
dostatek živin**

**Hemimetylovaný
počátek replikace
zabraňuje
replikaci**

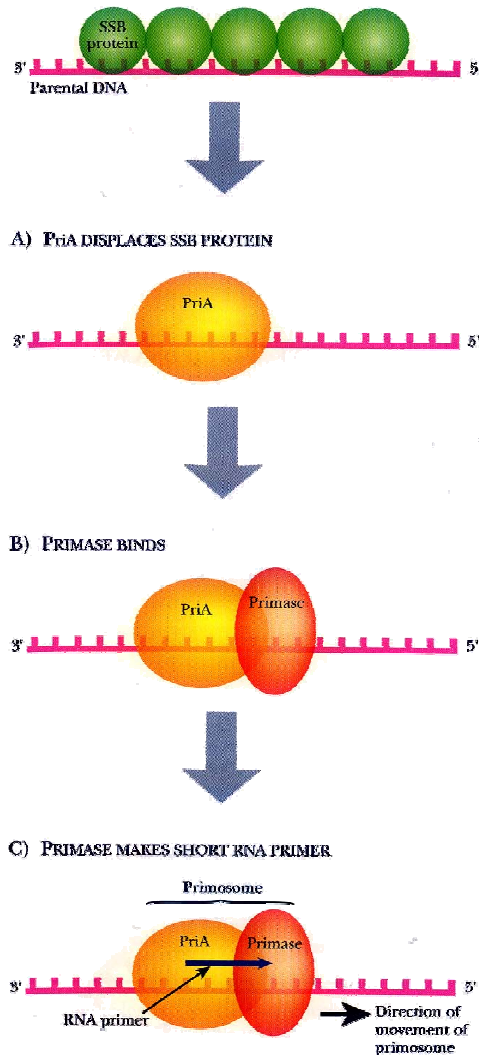
**Plně metylovaný
počátek replikace se
může opět replikovat**

Methylaci provádí Dam-metyláza, která metyluje adenin v sekvenci GATC.

Iniciace replikace DNA prostřednictvím RNA-primerů



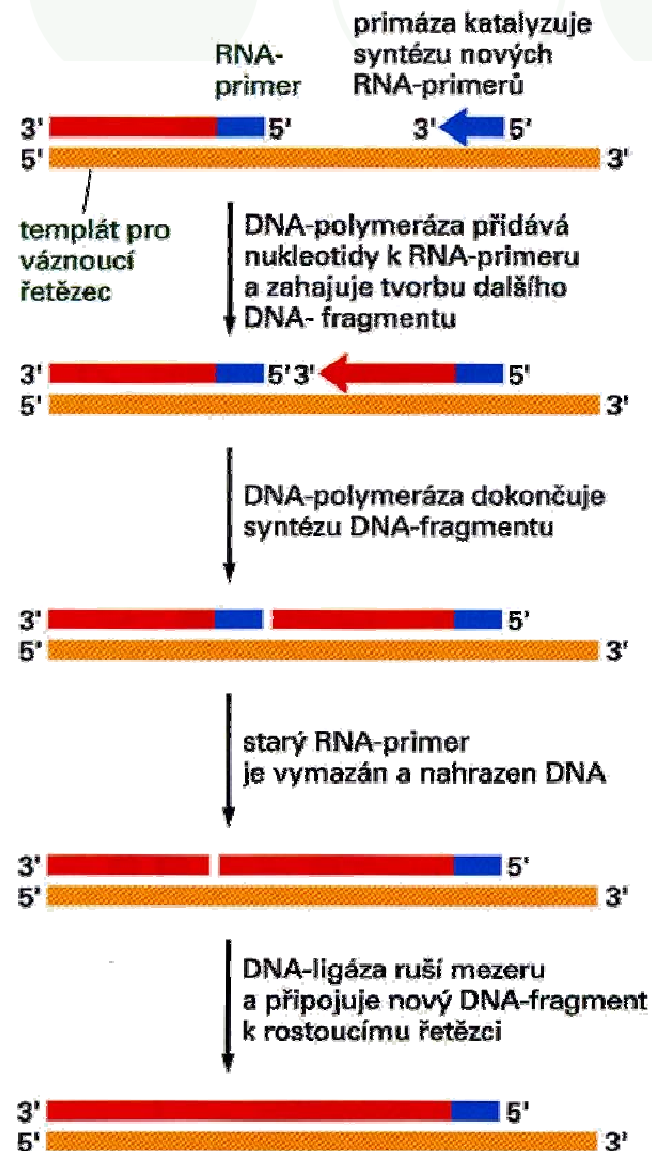
Průběh syntézy primeru DNA-primázou (DnaG)



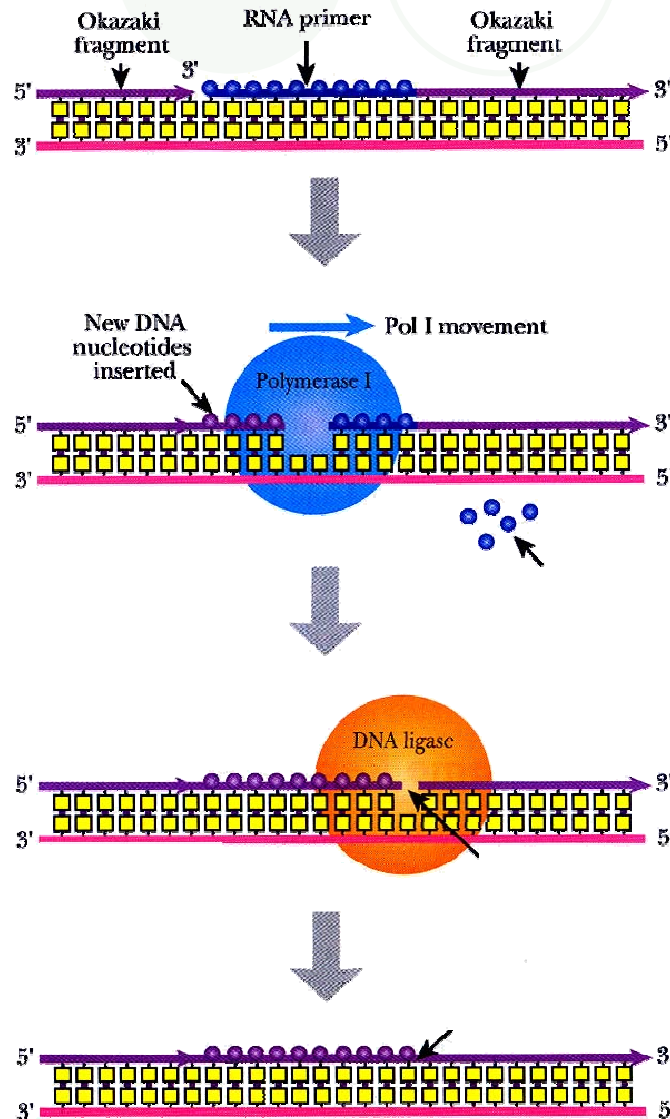
- DNA řetězec uvolněný z mateřské molekuly s navázanými SSB proteiny
- Vytěsnění SSB proteinem PriA - tento protein pak navodí napojení primázy (DnaG)
- Vazba DNA-primázy
- Syntéza 11-12 nt RNA primeru

Syntéza Okazakiho fragmentů a proces jejich spojování postupným působením enzymů:

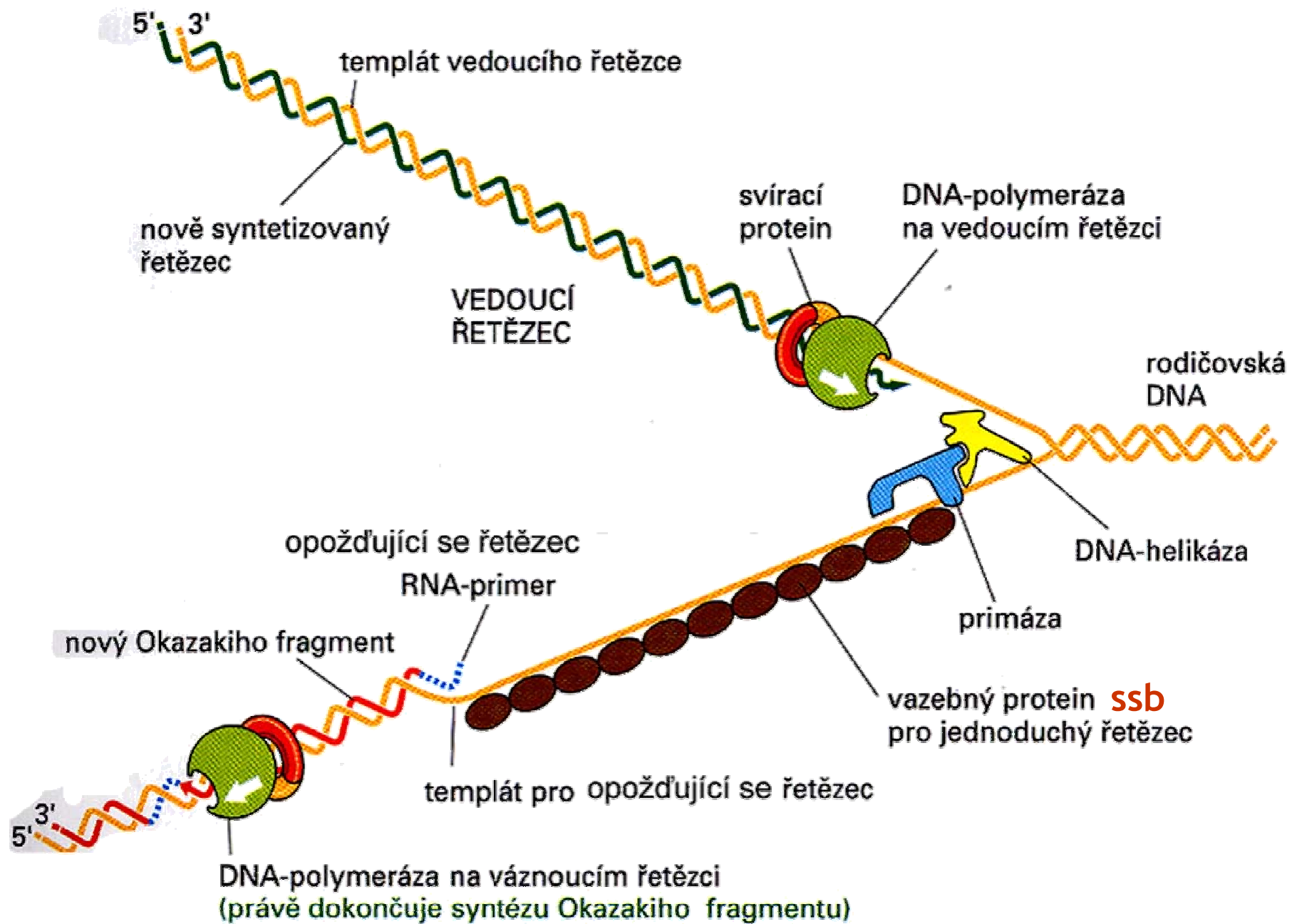
1. DNA-polymerázy
2. Nukleázy (Poll)
3. Ligázy



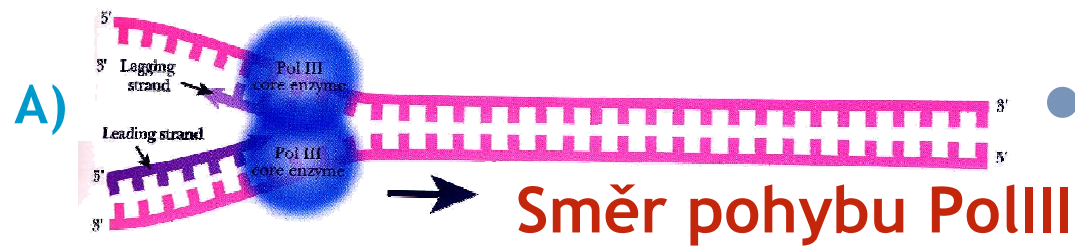
Tři kroky při spojování Okazakiho fragmentů



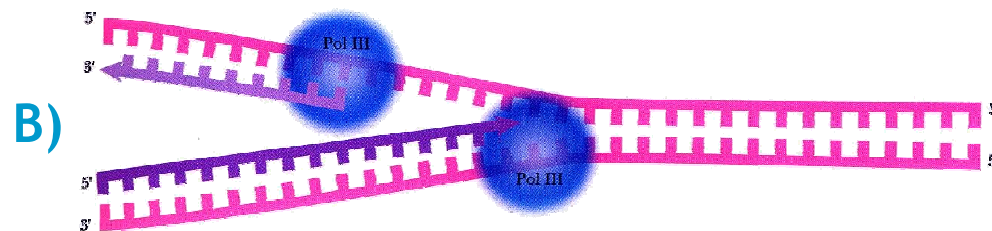
- Nově nasyntetizovaný řetězec tvořený Okazakiho fragmenty
- Vazba polymerázy Pol I a odbourání RNA-primeru
- Spojení mezery v řetězci DNA ligázou



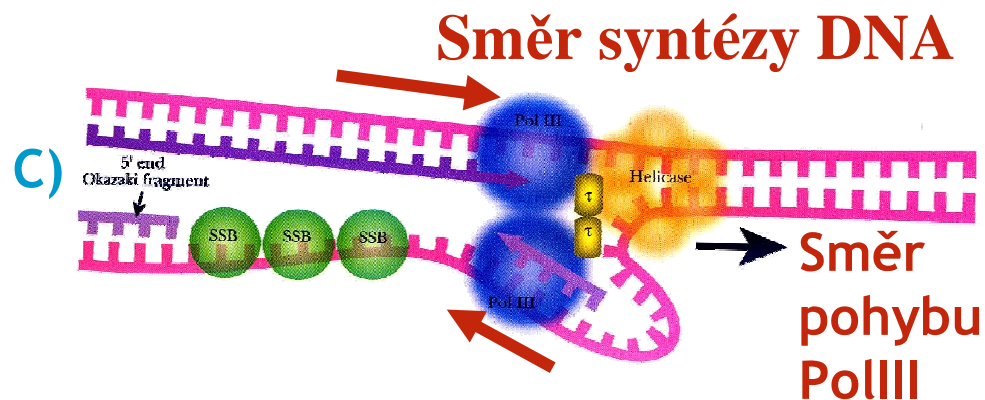
Relativní poloha podjednotek DNA polymerázy III v replikační vidlici



- dvě podjednotky PolIII fungují společně



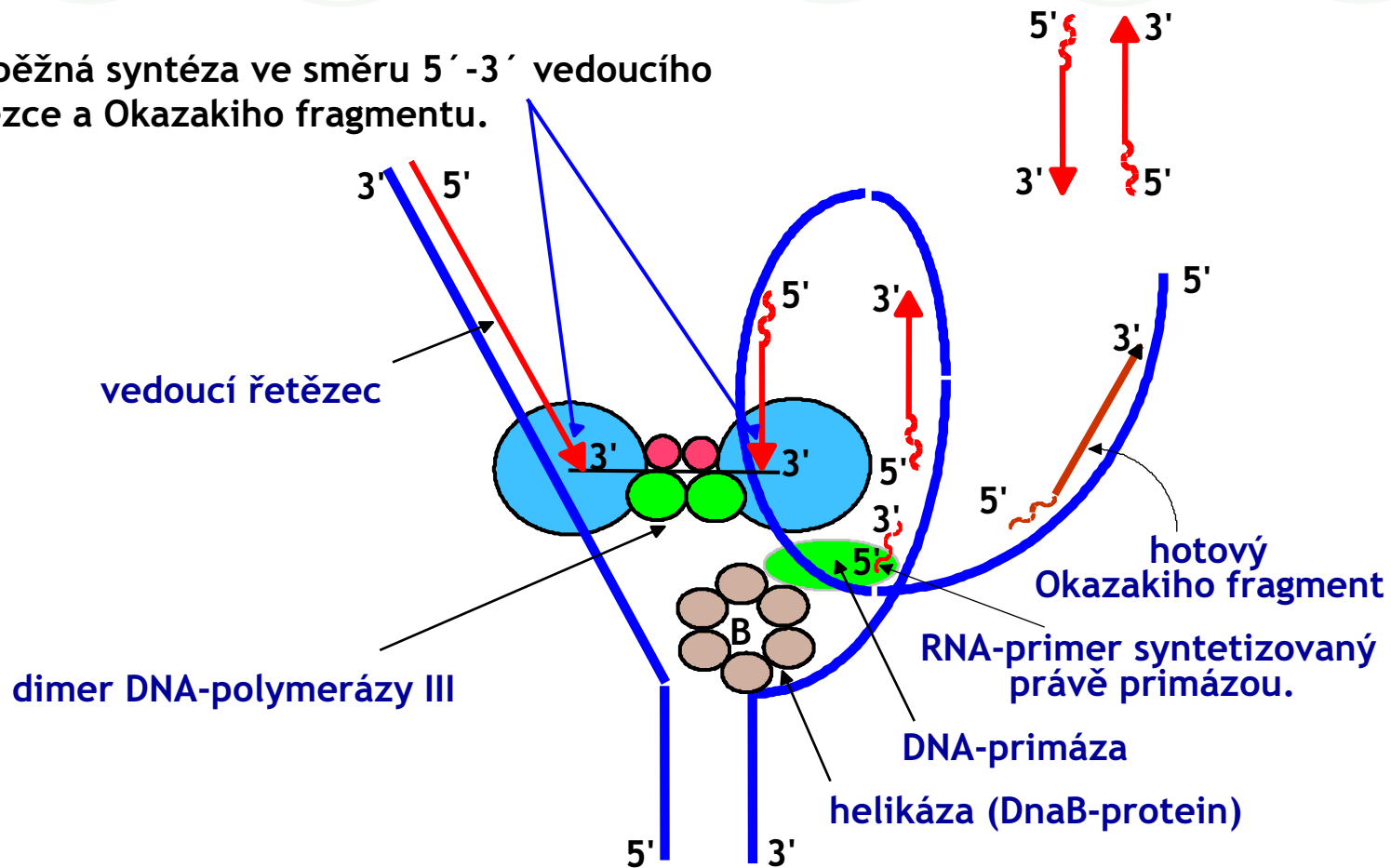
- pokud by DNA nevytvořila ohyb, podjednotky by se oddělily



- ohyb DNA umožní podjednotkám zůstat pohromadě

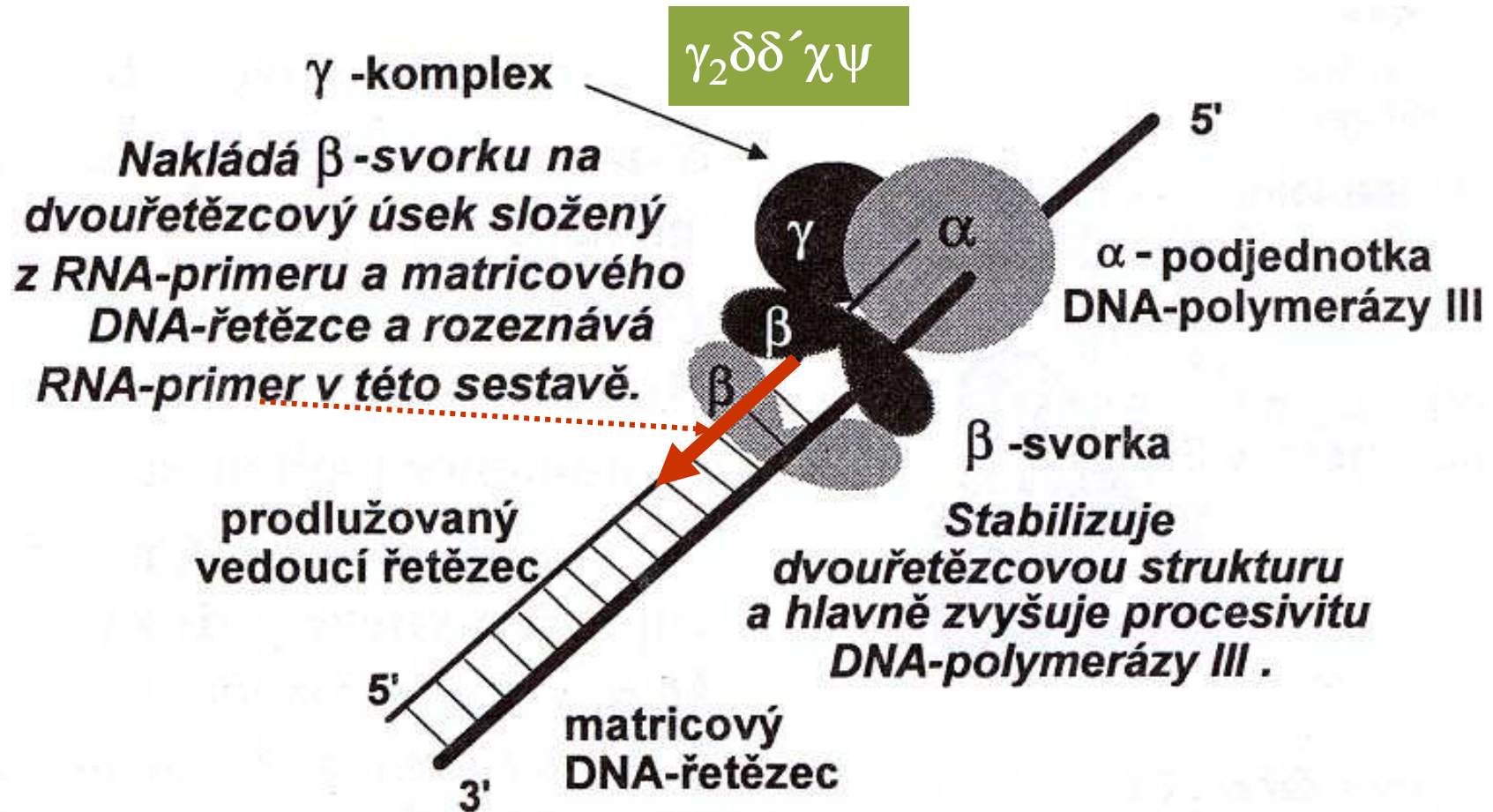
Syntéza vedoucího řetězce a Okazakiho fragmentů

Souběžná syntéza ve směru 5' - 3' vedoucího řetězce a Okazakiho fragmentu.

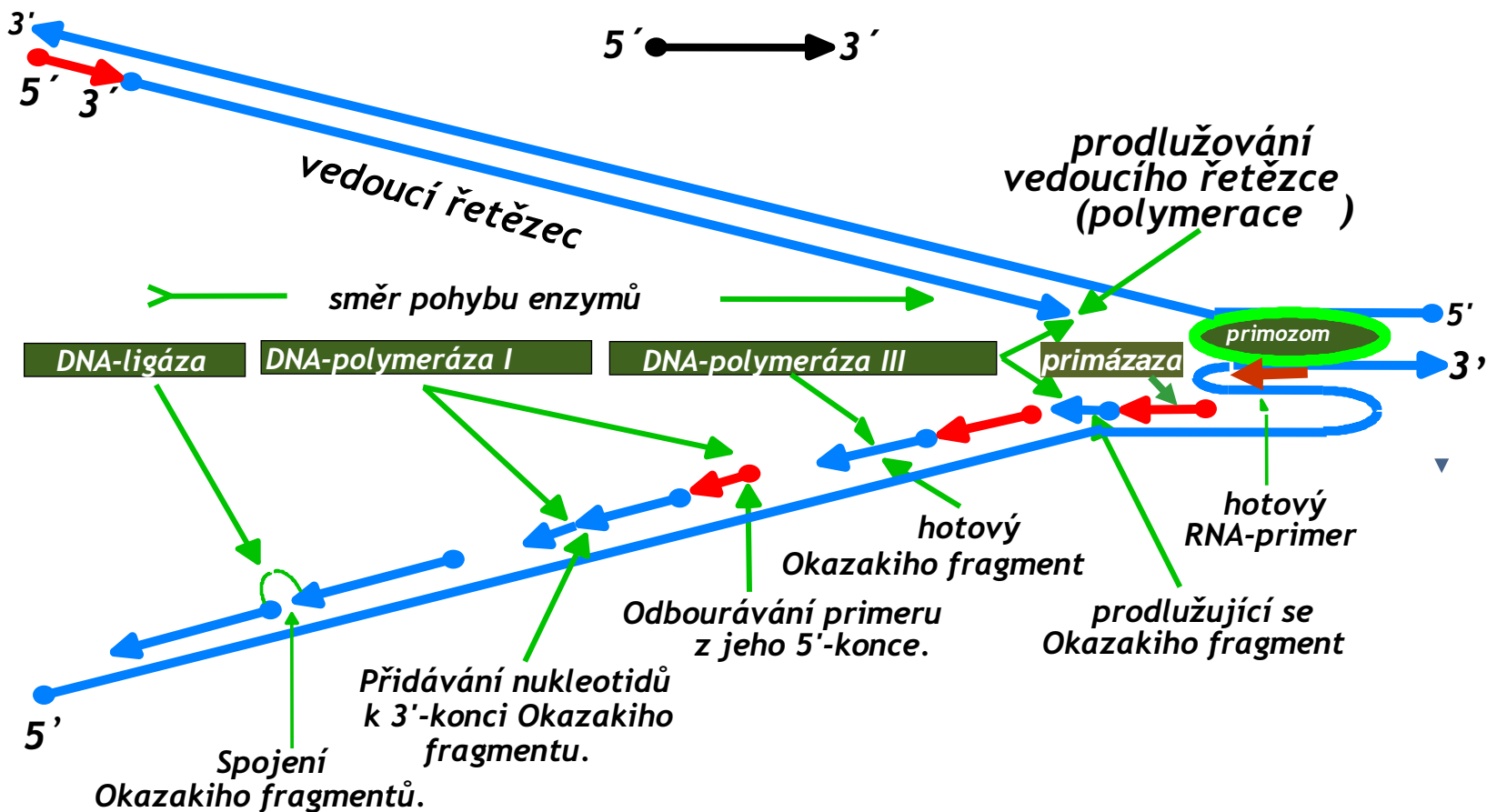


Pro zjednodušení není zakreslena β-svorka a γ-komplex

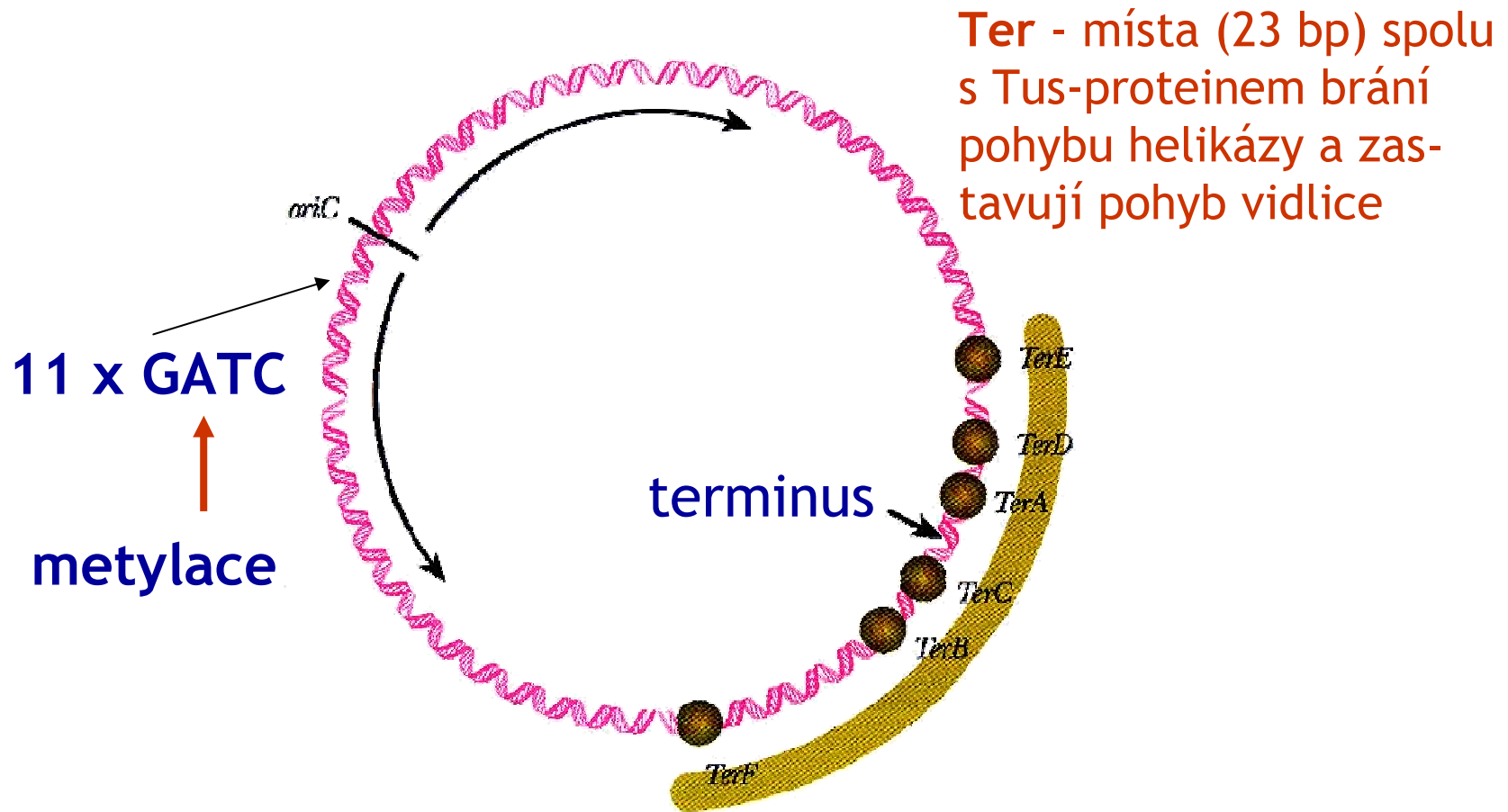
Úloha podjednotek gama a beta při replikaci



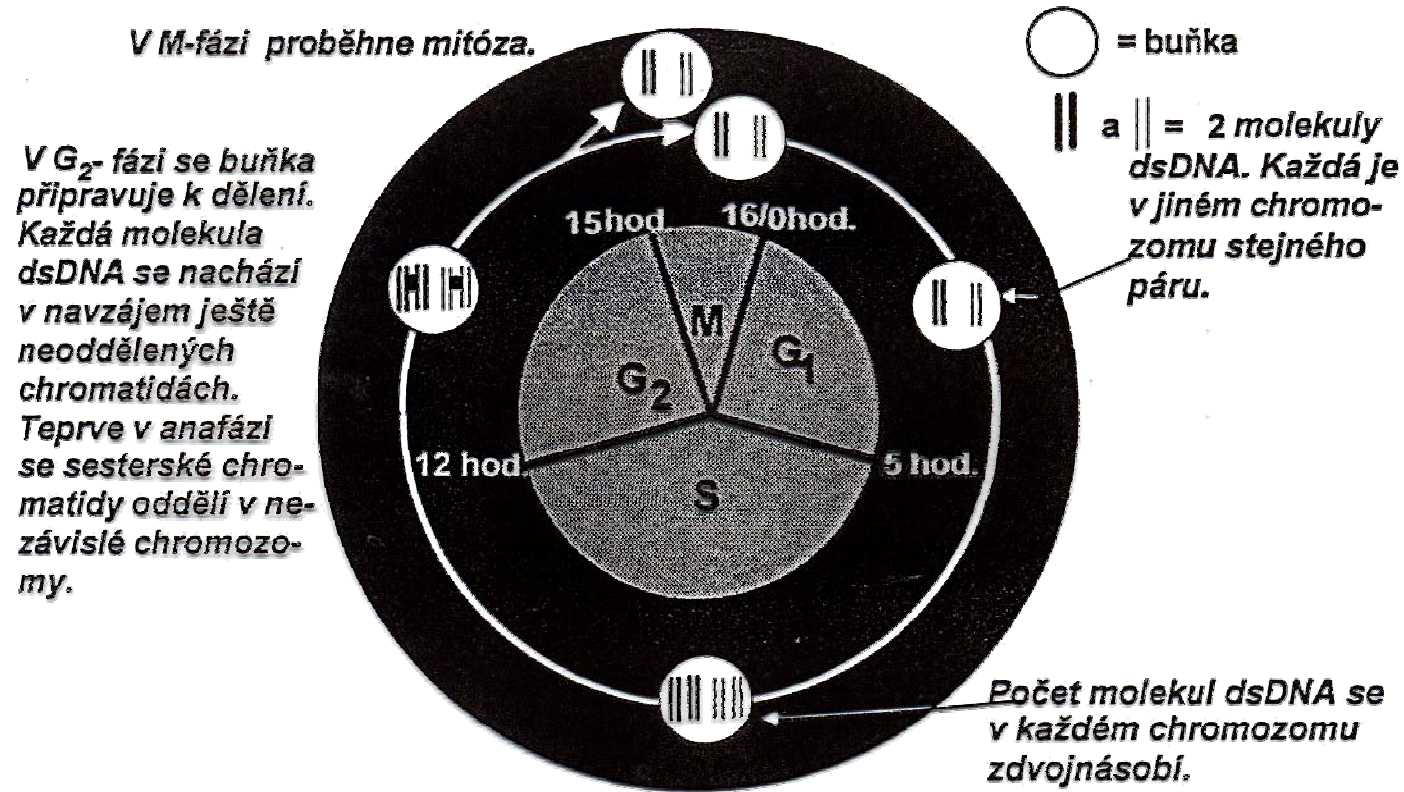
Globální pohled na průběh replikace dsDNA



Terminace replikace bakteriálního chromozomu

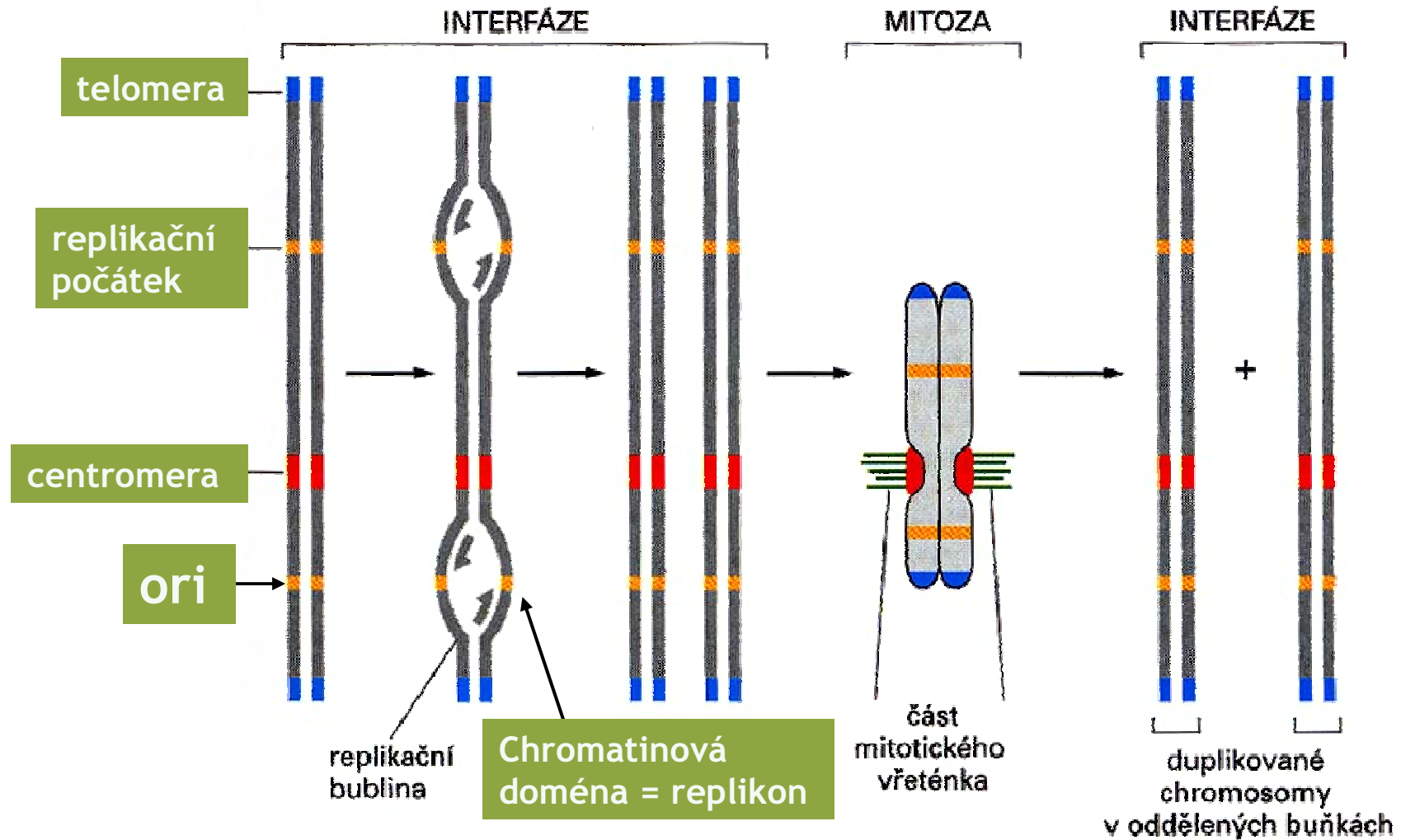


Zjednodušené schéma buněčného cyklu zdůrazňující počet molekul dsDNA v chromozomech v jeho různých fázích



Buněčný cyklus savčí buňky s generační dobou 16 hod.

Struktura chromozomu během dělení buňky



Počet počátků replikace u různých organismů

Organismus	Počet replikonů	Velikost replikonů	Rychlost pohybu vidlice
(E. coli)	1	4200 kb	50 000 bp/min
(S. cerevisiae)	500	40 kb	3 600 bp/min
(D. melanogaster)	3 500	40 kb	2 600 bp/min
(X. laevis)	15 000	200 kb	500 bp/min
(M. musculus)	25 000	150 kb	2 200 bp/min
(V. faba)	35 000	300 kb	

Rozdíly v rychlosti syntézy

Složky bakteriálního a eukaryotického replizomu

Složka replizomu	U bakterií	U eukaryot
Replikativní polymeráza	Holoenzym polIII*	pol α /primáza v komplexu s pol δ
Faktor zvyšující procesivitu replikativní polymerázy	β -svorka	PCNA
Faktor nakládající β -svorku (PCNA)	γ -komplex	RFC
Primáza	jen DNA-primáza (DnaG-protein)	komplex pol α /primáza
Helikáza	DnaB-protein, n'-protein	?
Odstranění primeru	DNA-polymeráza I	exonukleáza MF1
Oprava opoždujícího se řetězce	DNA-polymeráza I a DNA-ligáza	Komplex pol δ /pol ϵ ? a DNA-ligáza
DNA-topoizomeráza	II (gyráza)	II
Proteiny vázající se na jednořetězcové úseky DNA	SSB-proteiny	replikační protein A (RP-A) nebo lidský SSB (HSSB)

Eukaryotické DNA-polymerázy

- α Syntéza Okazakiho fragmentů, **3' -5' exonukleáza**
Je v komplexu s DNA-primázou
- δ Syntéza vedoucího řetězce a dokončení syntézy
opožděujícího se řetězce **3' -5' exonukleáza**
- ϵ Neznámá funkce (možná syntéza vedoucího řetězce)
- β Syntéza krátkých řetězců při reparaci DNA
- γ Syntéza mitochondriové DNA

Odstranění RNA-primerů z Okazakiho fragmentů:

Ribonukleáza H1, Ribonukleáza FEN-1

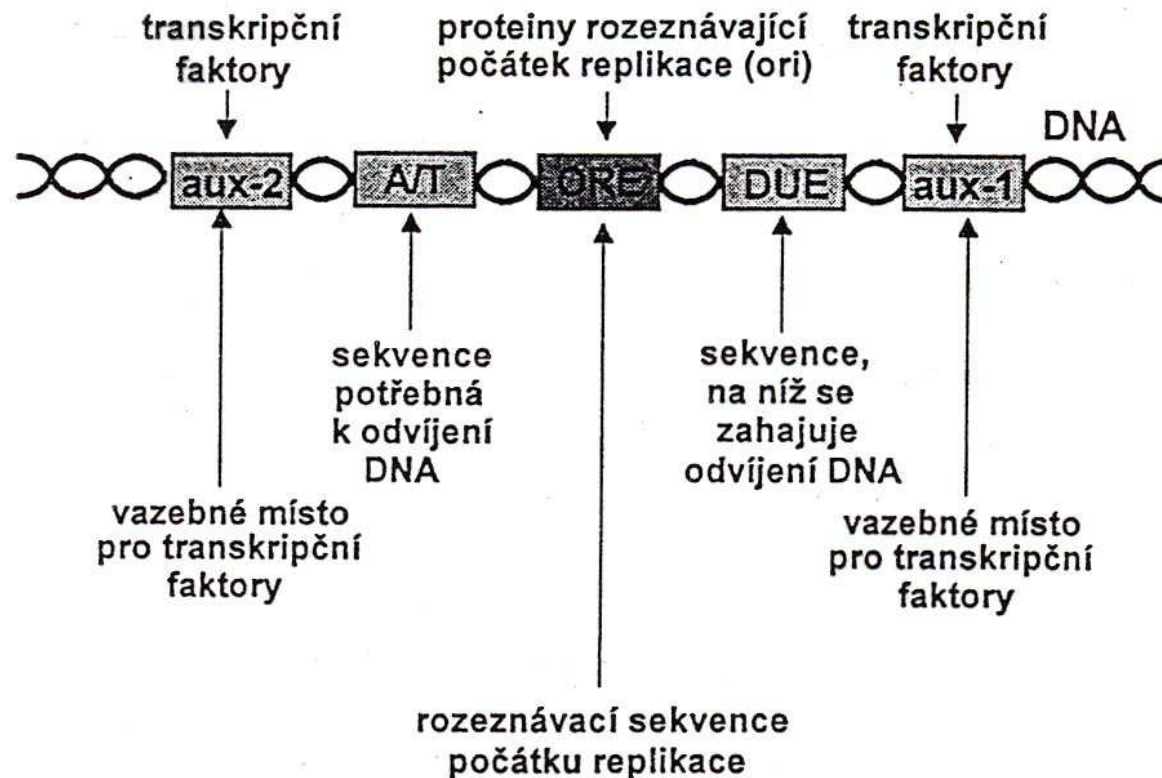
Přehled vlastností a funkcí eukaryotických DNA-polymeráz

Proliferační buněčný antigen (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) ~β-svorka

Označení u savců	α	β	γ	δ	ϵ
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

Struktura počátku replikace u kvasinek

Soubor proteinů = ORIZOM



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

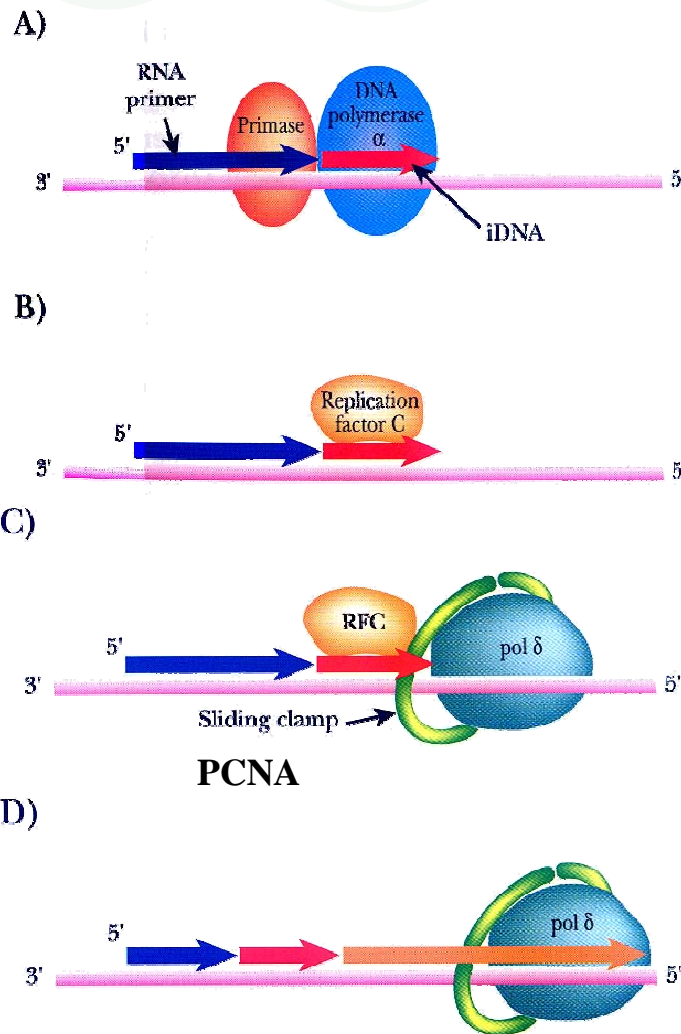
2. Vazba transkripčních faktorů a jejich interakce s proteiny v místě ORE

3. Inicace replikace, rozmotání DNA v místě DUE

Různé transkripční faktory aktivují různé počátky replikace

Před zahájením replikace se poblíž počátku replikace naváže RLF (replication licensing factor), který je po zahájení replikace odstraněn: koordinace iniciace mnoha ori

Iniciace replikace u eukaryot - rozdíly oproti bakteriím



a) Primáza syntetizuje RNA-primer, poté se váže DNA polymeráza α , která nasyntetizuje iDNA (iniciátorová DNA).

RFC slouží u eukaryot k nakládání PCNA podobně jako γ komplex k nakládání beta-svorky u *E. coli*

b) RFC nasedá na iDNA

c) RFC napomáhá navázat DNA-polymerázu δ a PCNA protein (trimer)

d) DNA-polymeráza δ pak prodlužuje nový řetězec DNA

Základní složky replizomu eukaryot

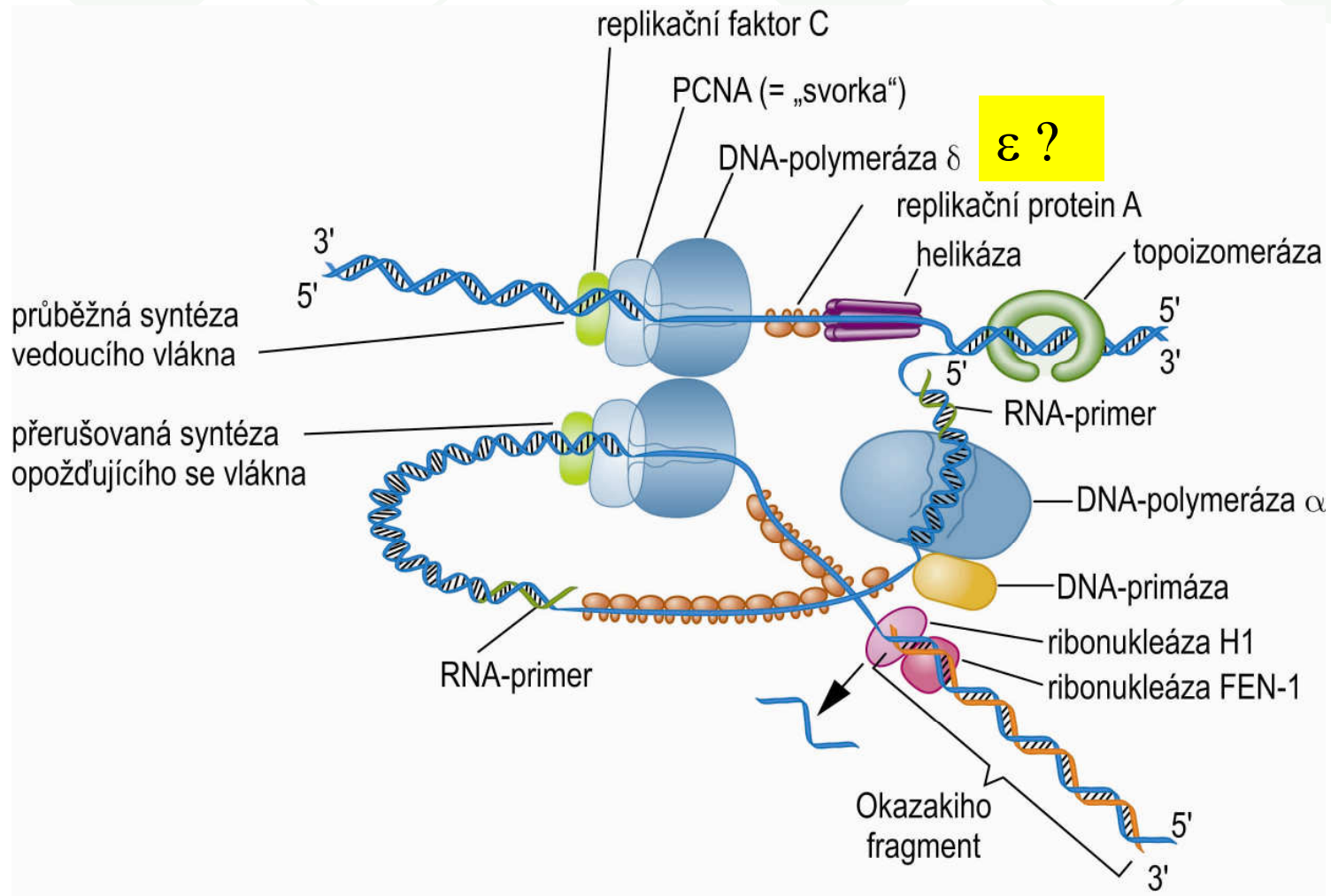
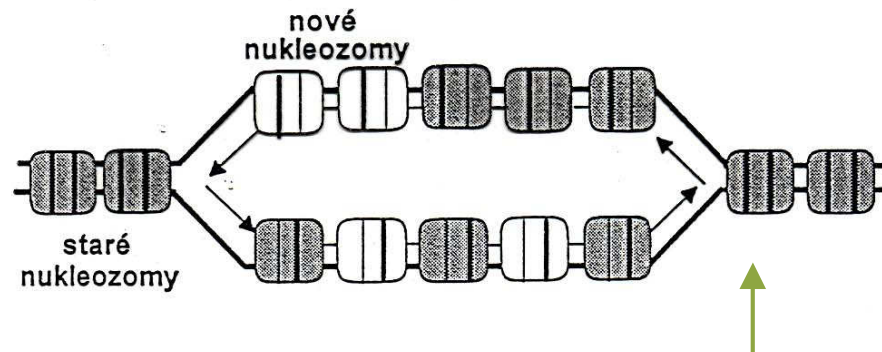
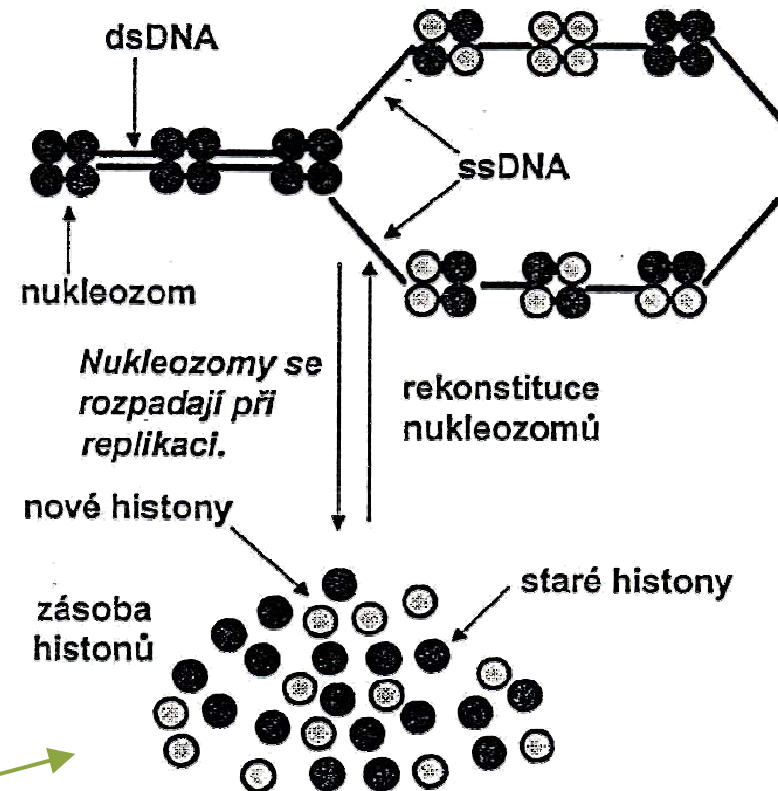


Schéma replikační vidlice eukaryotické jaderné DNA



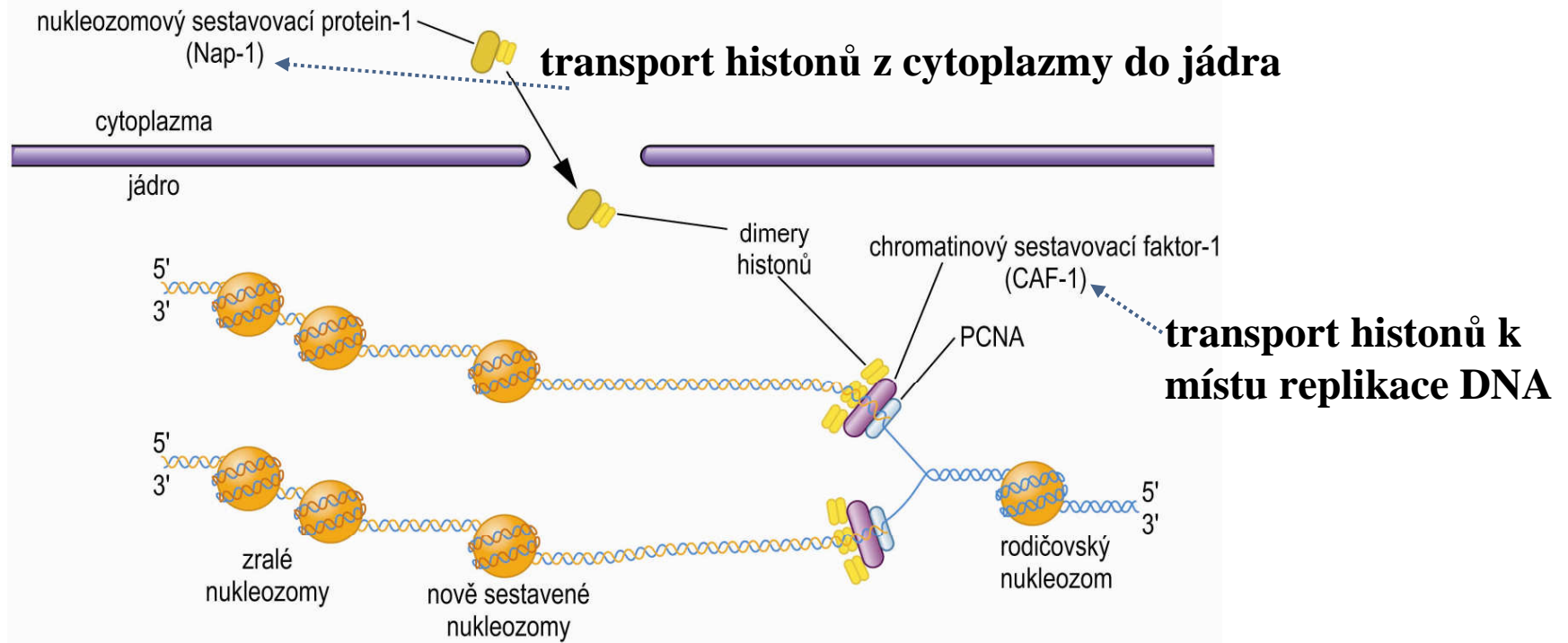
Staré a nové nukleozomy se na maticových a podle nich syntetizovaných komplementárních řetězcích rozdělují náhodně

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



Sestavování nukleozomů během replikace

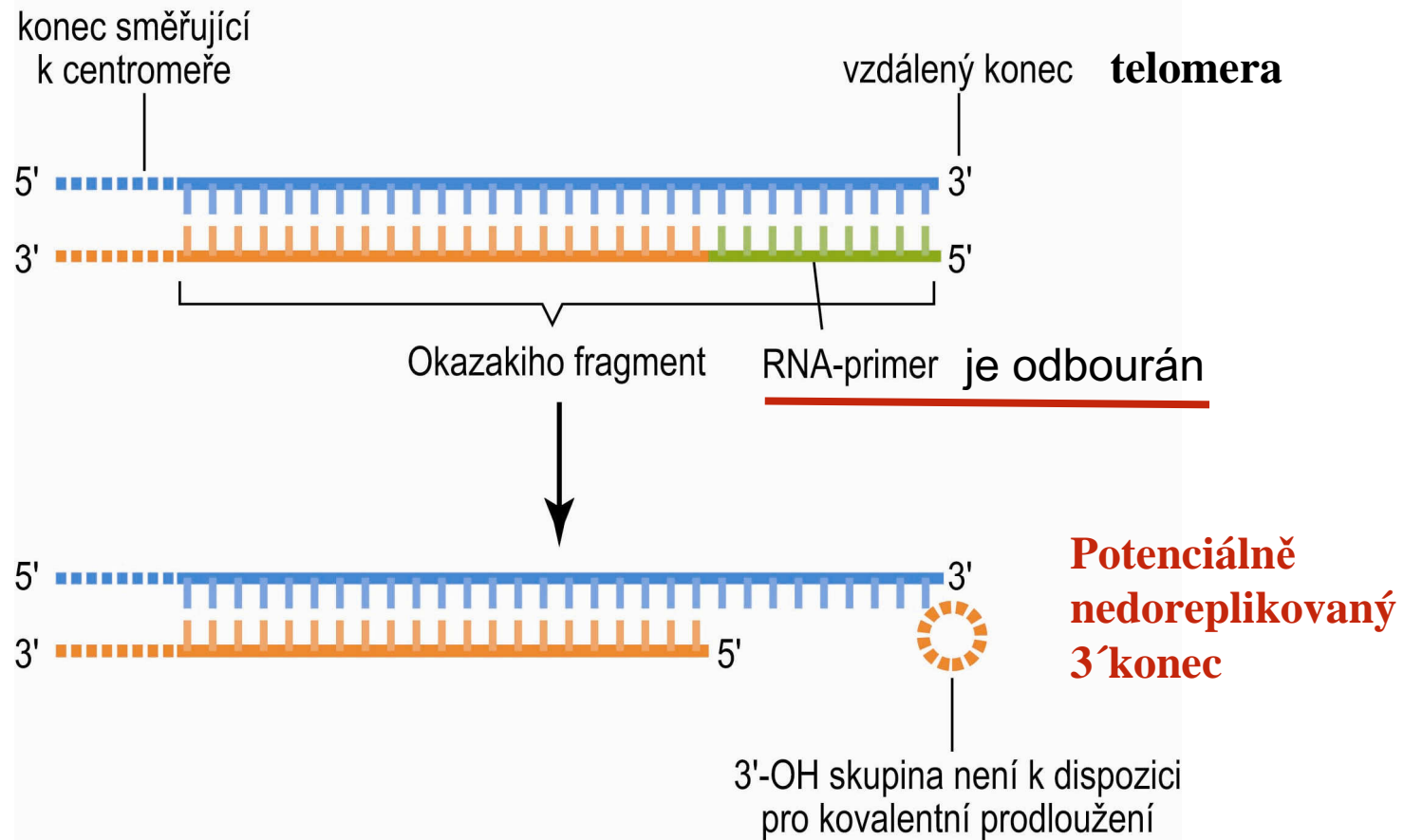
sestavování nukleozomů během replikace chromozomu



(b)

Problém doreplikování 3' konců lineárních chromozomů

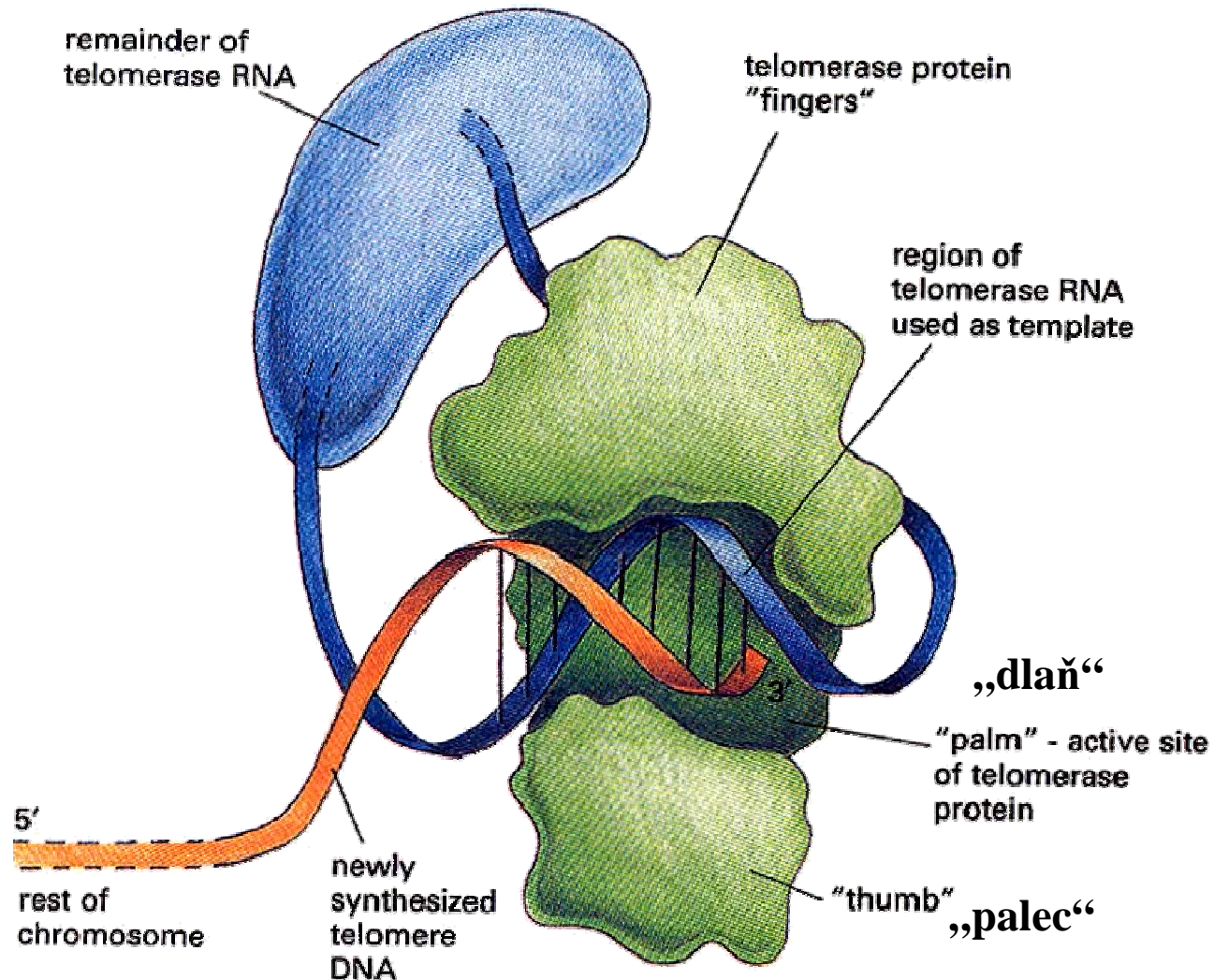
problém s primerem pro telomery na opožďujícím se vlákně

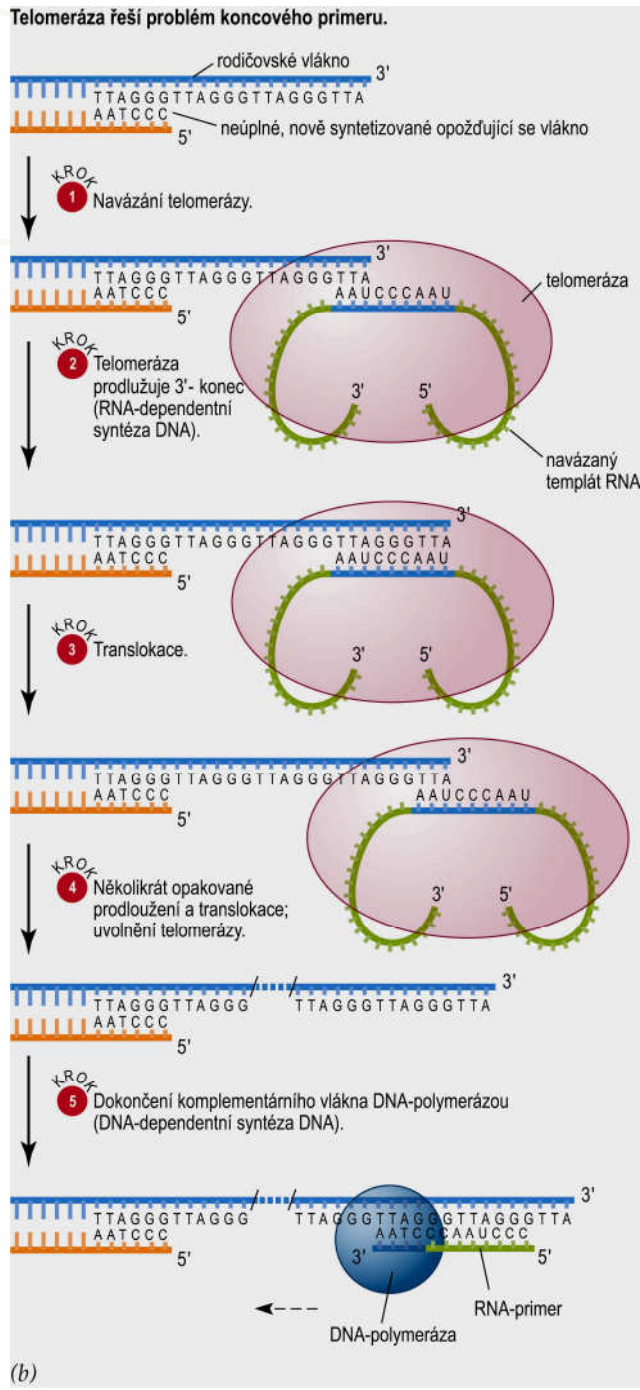


(a)

Struktura telomerázy

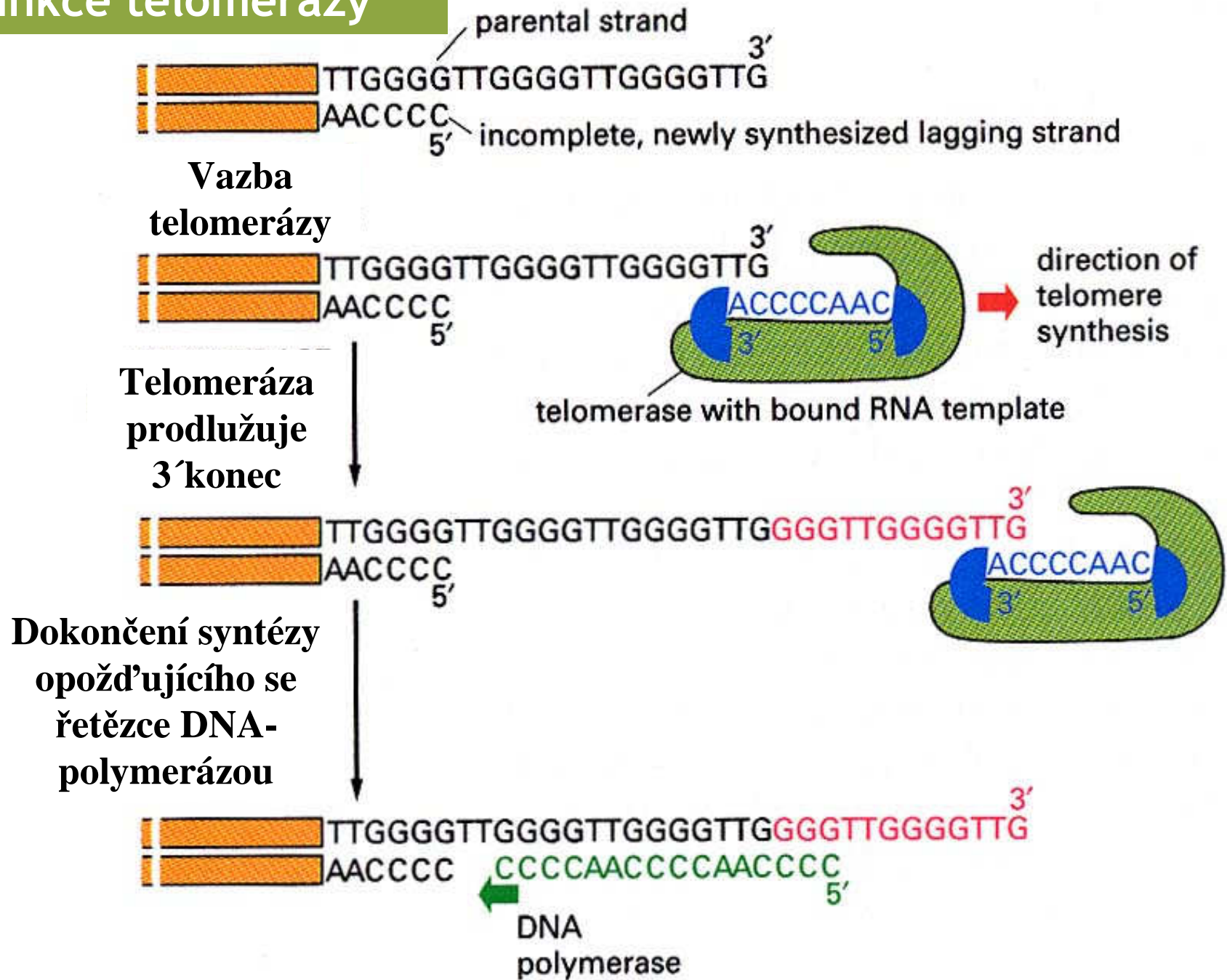
TERT = telomerase reverse transcriptase; TR (TERC) = telomerase RNA





(b)

Funkce telomerázy



Sekvence telomer různých organismů

- **TTGGGG** - T_2G_4 u *Tetrahymena thermophila* a *Glaucoma chattoni*
- **TTTTGGGG** - T_4G_4 u *Euplotes aediculatus* a *Oxytricha nova*
- **TTTAGGG** - $T_3A_1G_3$ u *Arabidopsis thaliana*
- **TGGG** - TG_3 u *Saccharomyces cerevisiae*
- **TTAGGG** - $T_2A_1G_3$ u člověka, myši, a *Trypanosoma brucei*

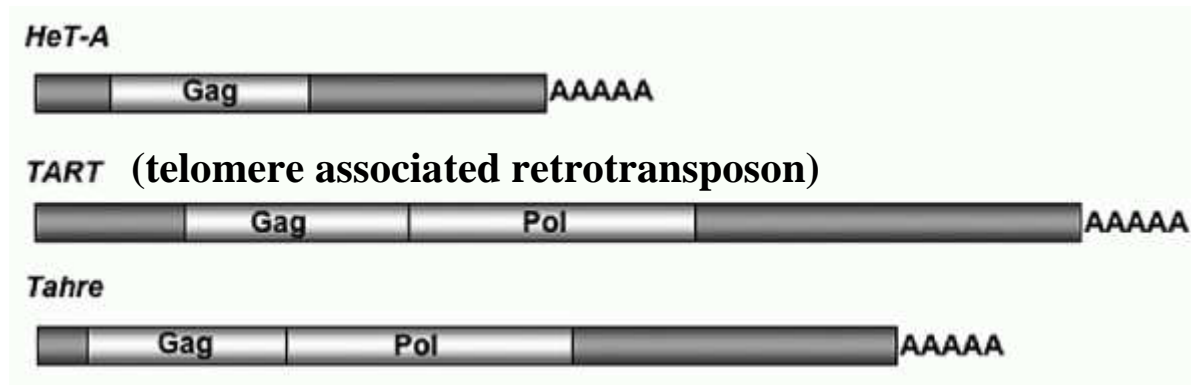
asi 1000 kopií na konci
každé telomery

5' GGGTTA 3'

Prodlužování telomer u drosofilí

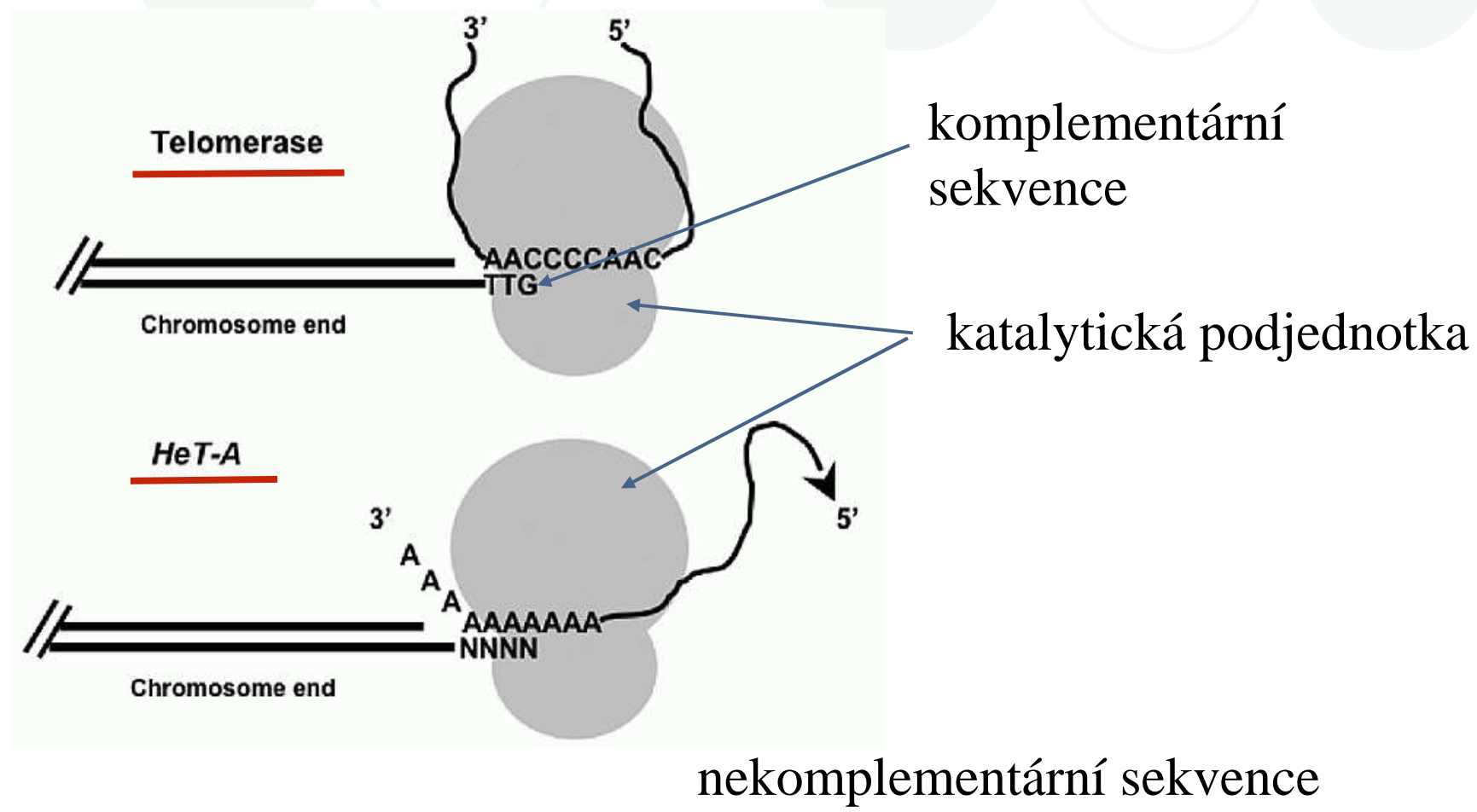
Mobilní elementy (retrotranspozony) Het-A, TART a Tahre (telomere associated retrotransponon)

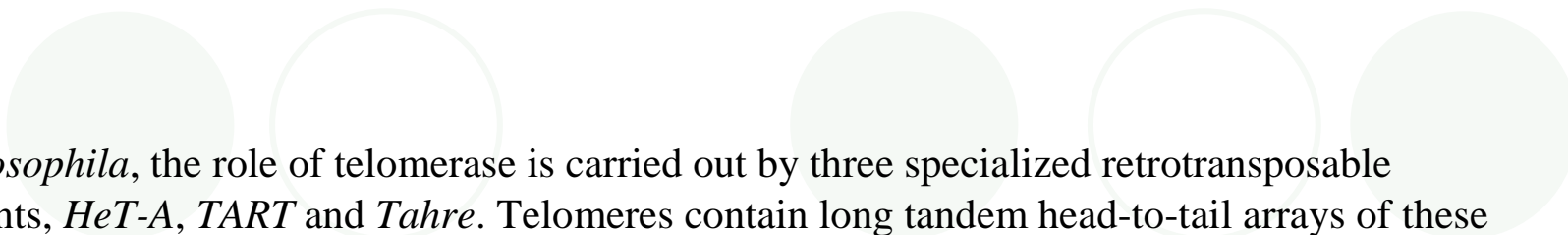
Přednostně se transponují do koncových oblastí chromozomů a tím je prodlužují



The three *D. melanogaster* telomere retrotransposons drawn as their putative RNA transposition intermediates. Coding regions, Gag and Pol, are labeled. Gray regions indicate 5' and 3' untranslated regions. AAAAA indicates the 3' poly(A) tail on each RNA. It is the source of the (dA/T)_n that joins each DNA copy to the chromosome when the element transposes. Sizes are only approximate because individual elements can differ in length of both coding and noncoding regions. *HeT-A* elements are ~6 kb. The 5' end of TART has not been completely defined but subfamilies appear to be 10-13 kb. *Tahre* is ~10.5 kb

Srovnání prodlužování telomer telomerázou a retroelementy



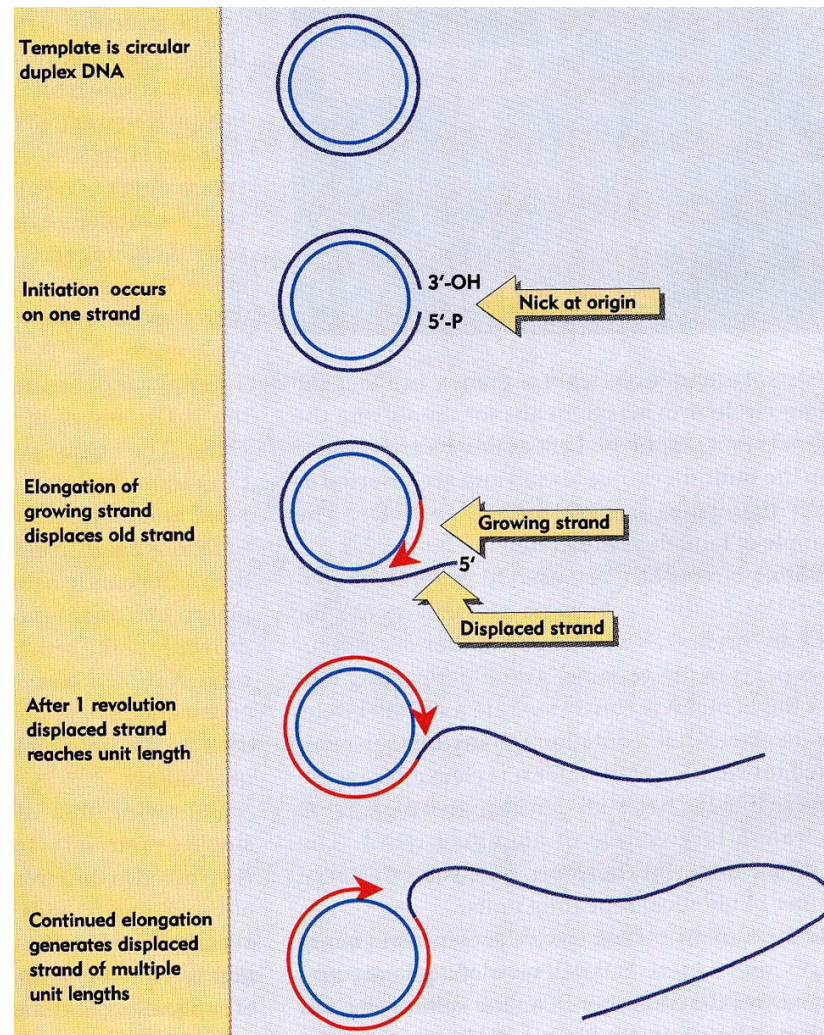


In *Drosophila*, the role of telomerase is carried out by three specialized retrotransposable elements, *HeT-A*, *TART* and *Tahre*. Telomeres contain long tandem head-to-tail arrays of these elements. Within each array, the three elements occur in random, but polarized, order. Some are truncated at the 5' end, giving the telomere an enriched content of the large 3' untranslated regions which distinguish these telomeric elements from other retrotransposons. Thus, *Drosophila* telomeres resemble other telomeres because they are long arrays of repeated sequences, albeit more irregular arrays than those produced by telomerase. The telomeric retrotransposons are reverse-transcribed directly onto the end of the chromosome, extending the end by successive transpositions. Their transposition uses exactly the same method by which telomerase extends chromosome ends—copying an RNA template. In addition to these similarities in structure and maintenance, *Drosophila* telomeres have strong functional similarities to other telomeres and, as variants, provide an important model for understanding general principles of telomere function and evolution

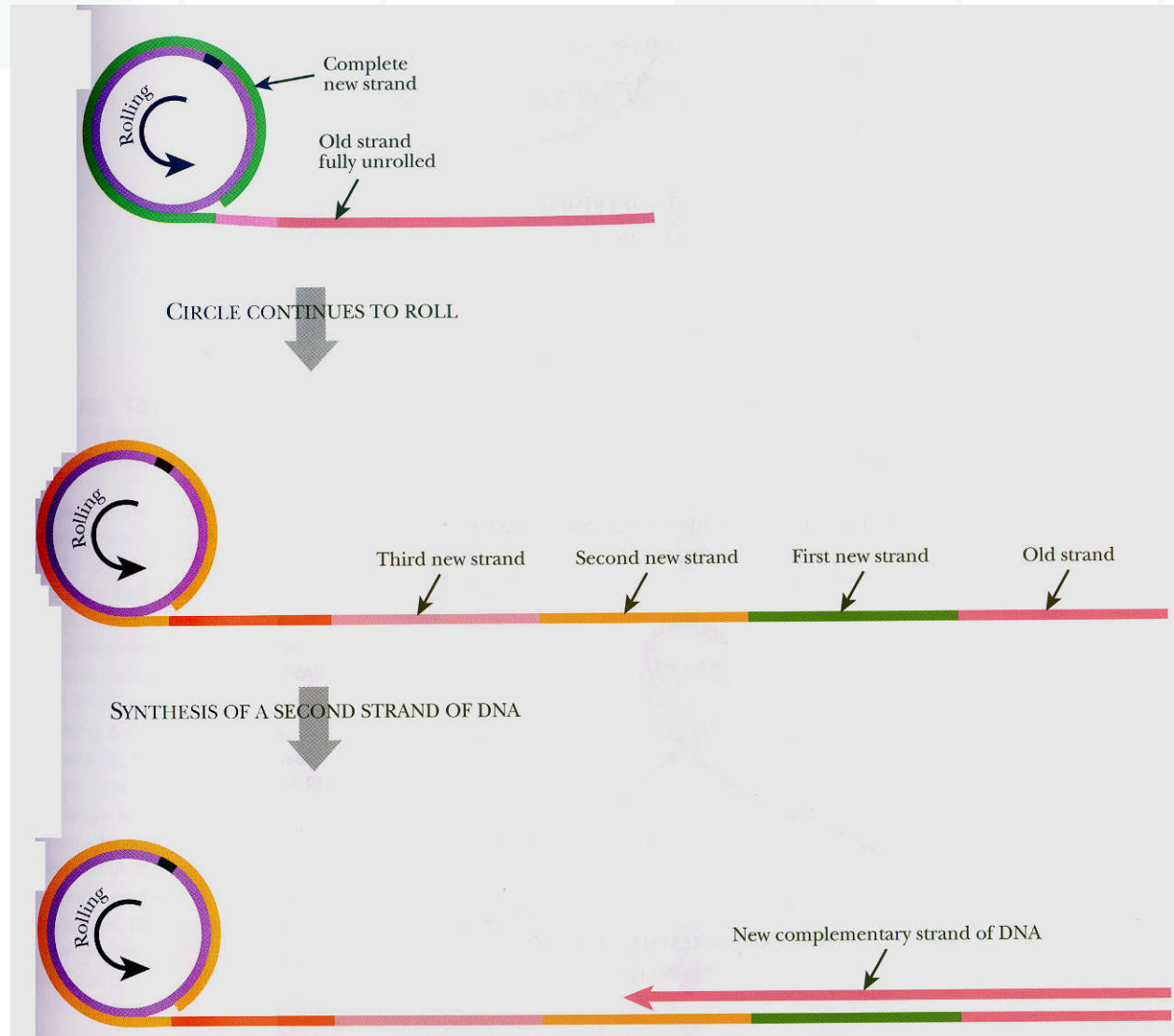
Telomerová opakování ~ mechanismus pro kontrolu buněčného dělení

- při narození mají v somatických buňkách telomery úplnou délku
 - při každém dělení buňky ztrácí telomera 50-100 nt
 - po mnoha děleních zdědí 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*
 - *Vnesení genu pro telomerazu do myši prodlouží jejich život o 1/4*
 - *Deregulace exprese telomerázy může vést k onkogenezi*
- Další funkce telomerázy*
- *Reparace DNA*

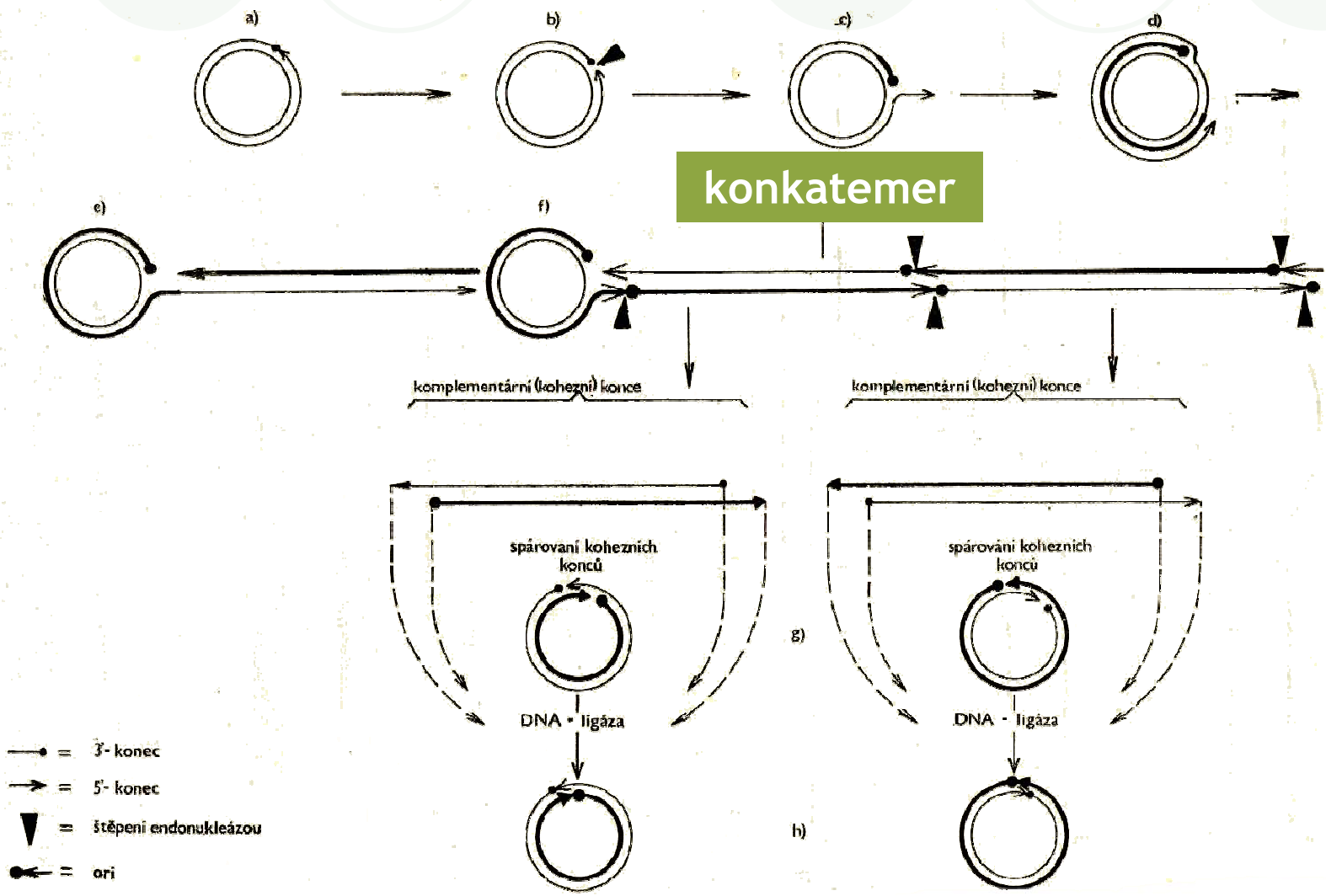
Replikace DNA mechanismem otáčející se kružnicí



Replikace virových molekul otáčející se kružnicí

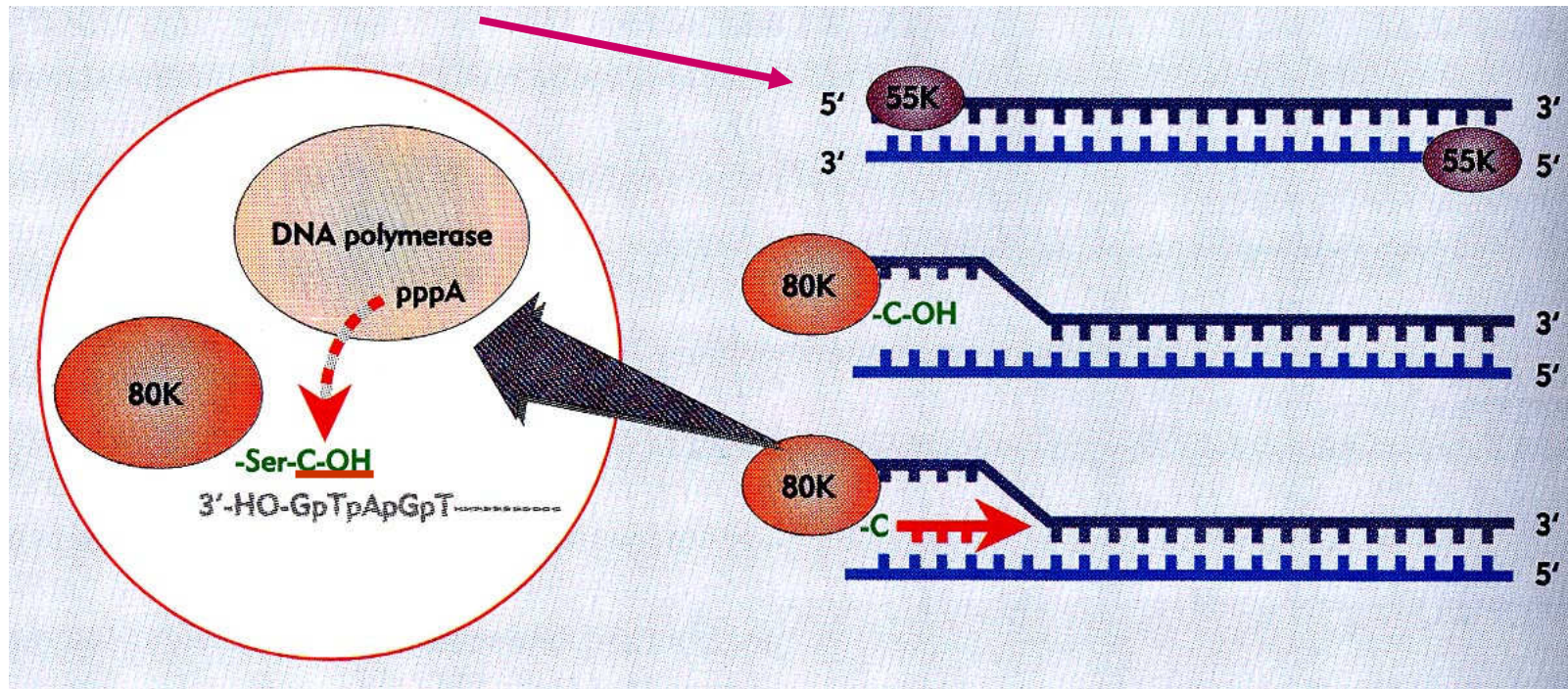


Replikace plazmidů a virů otáčející se kružnicí



Replikace genomu adenoviru (též některé bakteriofágy)

Specifický protein pro iniciaci replikace



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

