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)

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

Prokaryota – jeden nebo několik málo replikonů (chromozom/plazmid)

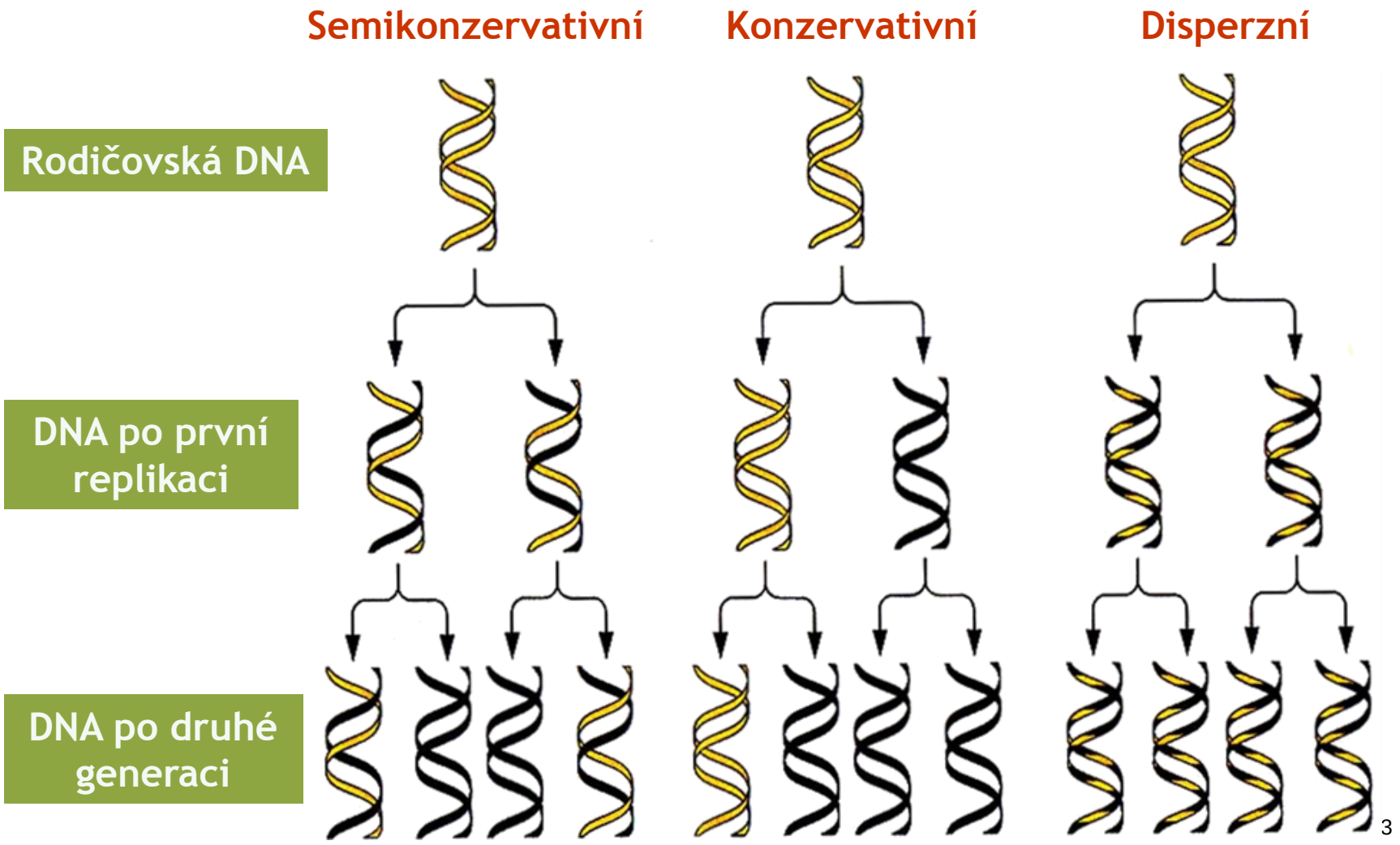
Eukaryota – více replikonů (chromozomy, vzácně plazmidy)

Viry – obvykle jeden replikon

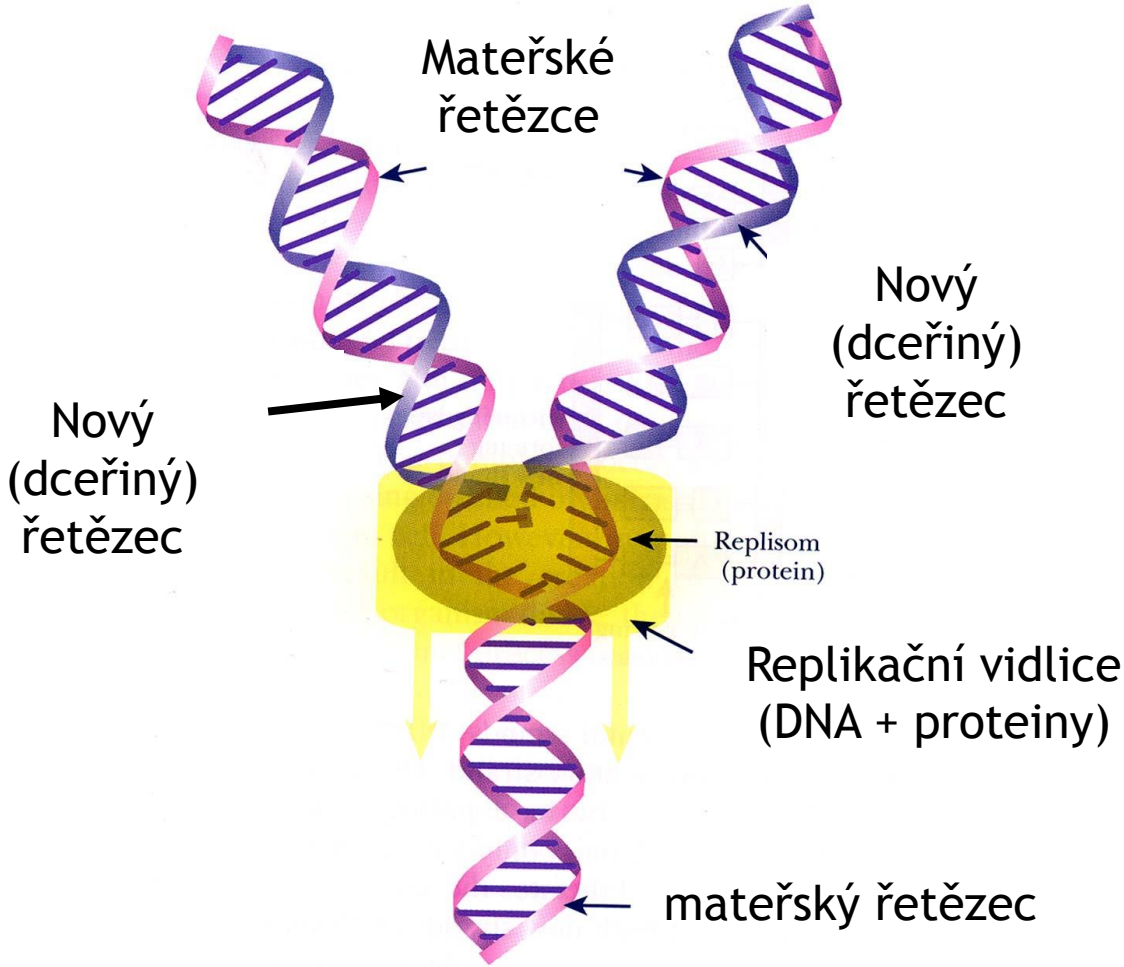
Charakteristické rysy replikace dvouřetězcové DNA

1. Probíhá semikonzervativním způsobem
2. Probíhá semidiskontinuálně

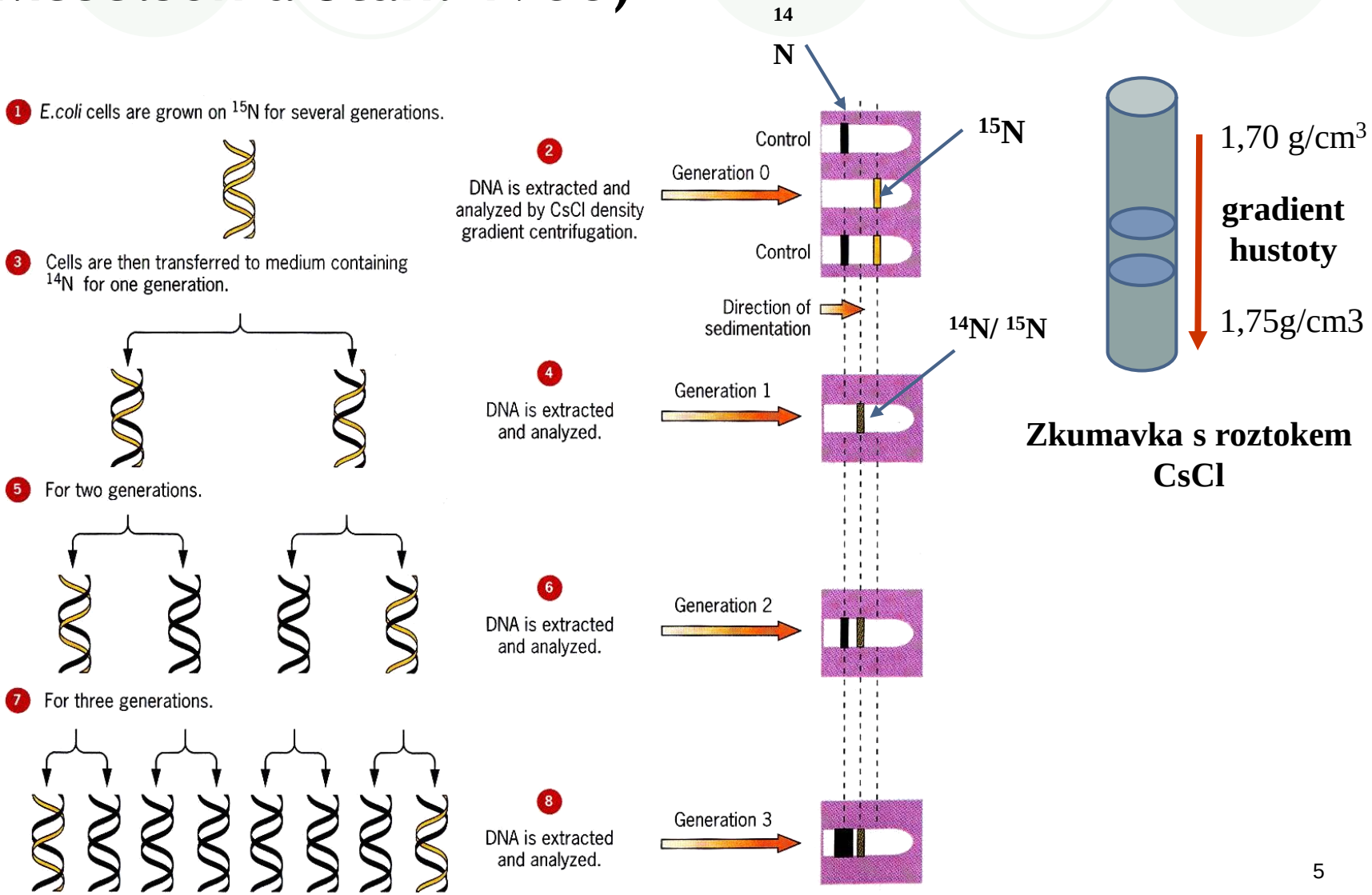
Tři možné způsoby replikace DNA



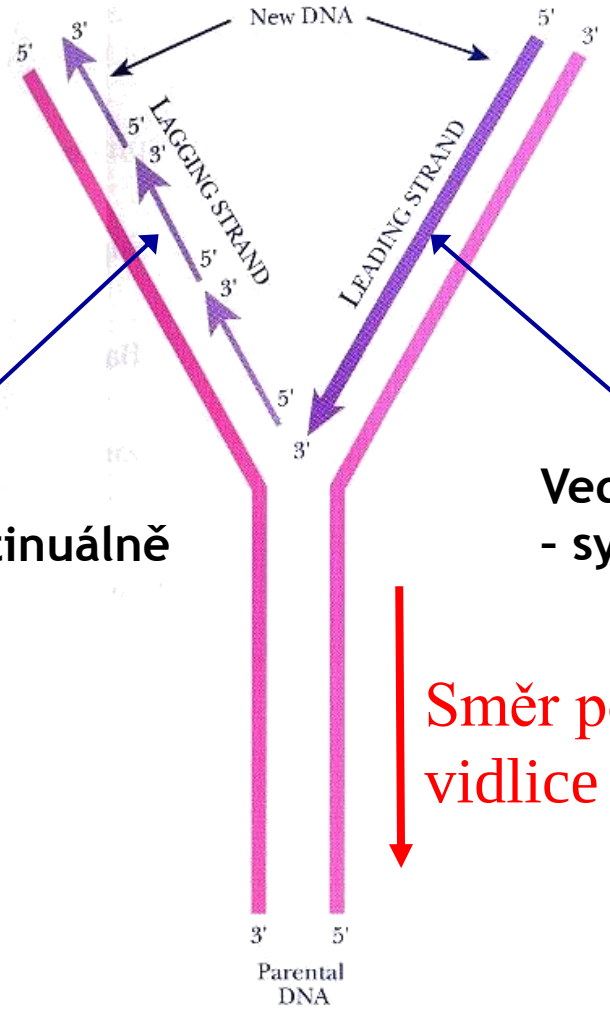
Semikonzervativní způsob replikace dsDNA



Důkaz semikonzervativní replikace DNA (Meselson a Stahl 1958)



Semidiskontinuální syntéza řětězců při replikaci



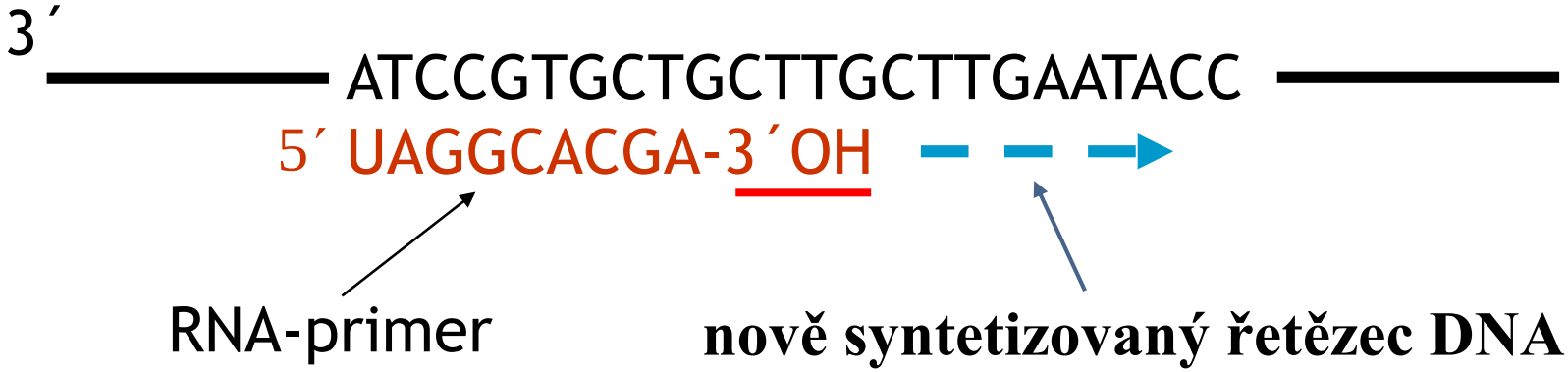
Opožďující se řetězec
- syntetizuje se diskontinuálně

Vedoucí řetězec
- syntetizuje se kontinuálně

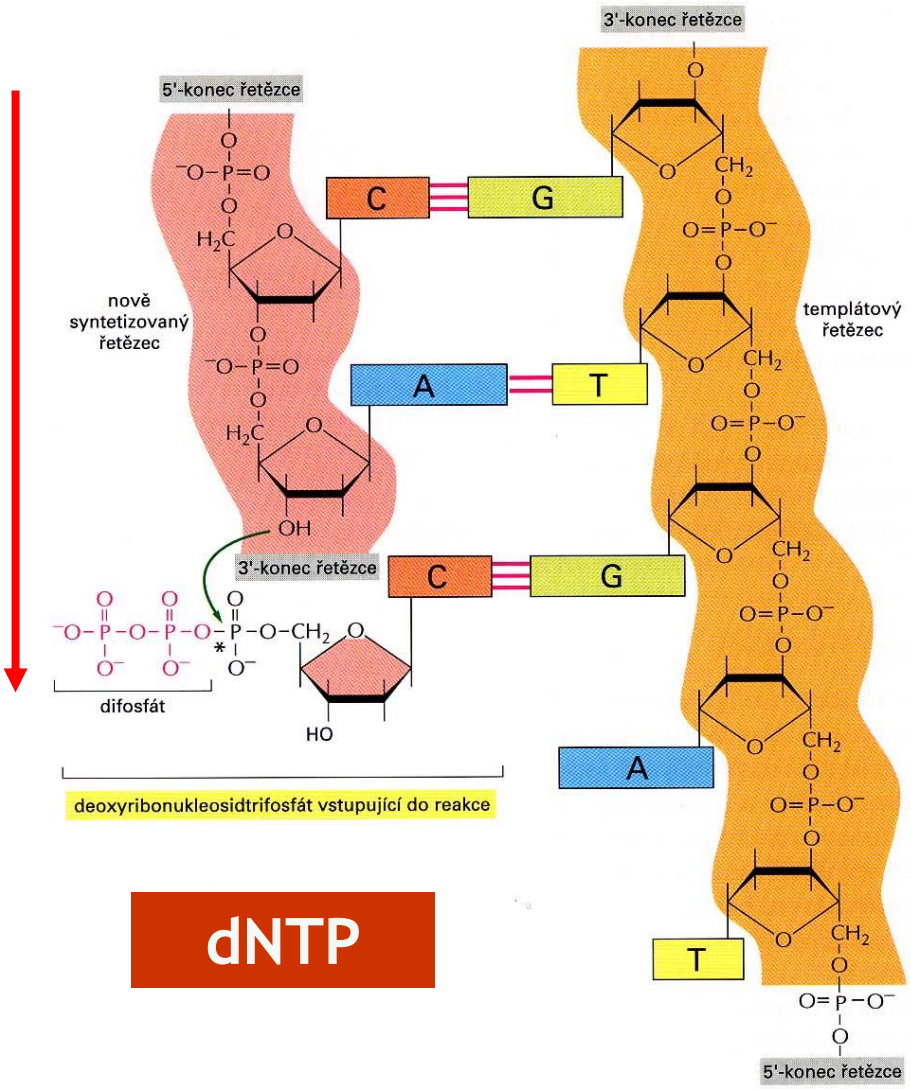
Směr pohybu replikační vidlice

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)

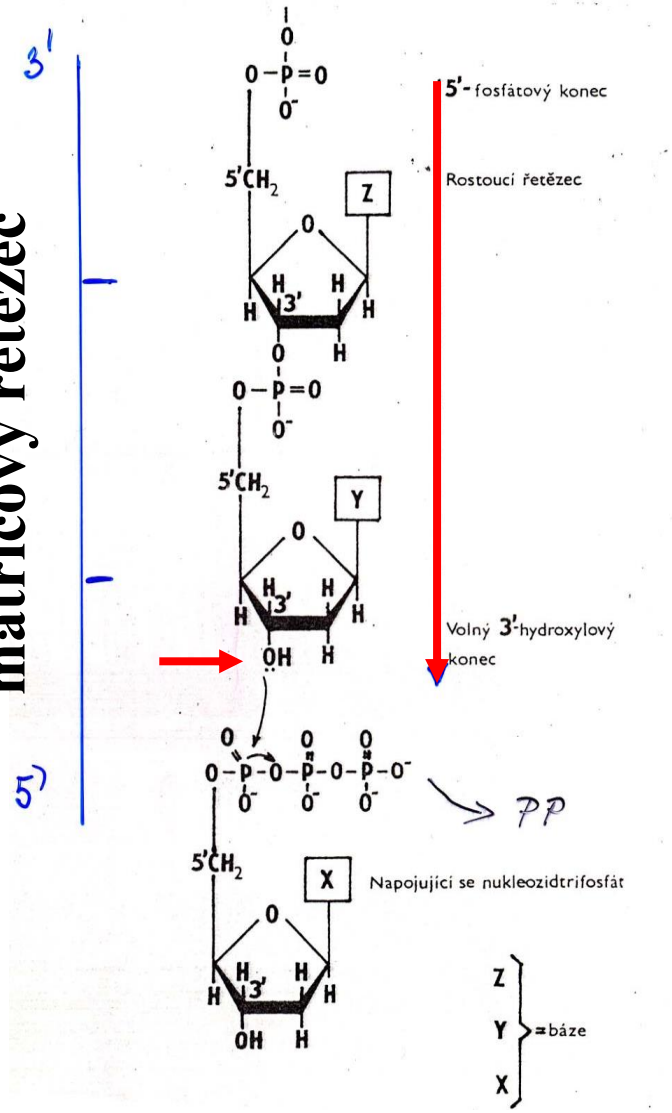


Syntéza DNA při procesu replikace



dNTP

Směr syntézy polynukleotidového řetězce



Enzymy a proteiny kooperující při replikaci a jejich funkce

1. **DNA-polymerázy a DNA-primáza:** katalyzují polymerizaci NTP
2. **DNA-helikázy, DNA-topoizomerázy:** odstranění helikálního vinutí dsDNA a 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	*dnaA*	Initiation of chromosome division; binds to the origin replication
Helicase	*dnaB*	Unwinds the double helix
DnaC	*dnaC*	Loading of DNA helicase
SSB	*ssb*	Single strand binding protein
Primase	*dnaG*	Synthesis of RNA primers
RNase H	*rnhA*	Partial removal of RNA primers
Pol I	*polA*	Polymerase I; fills gaps between Okazaki fragments
Polymerase III		DNA polymerase III holoenzyme
α	*dnaE*	strand elongation
ε	*dnaQ*	kinetic proof-reading
θ	*holE*	unknown; part of core enzyme
β	*dnaN*	sliding clamp
τ	*dnaX*	dimerization of core enzyme
γ	*dnaX*	loading of sliding clamp
δ	*holA*	loading of sliding clamp
δ′	*holB*	loading of sliding clamp
χ	*holC*	loading of sliding clamp
ψ	*holD*	loading of sliding clamp
DNA Ligase	*lig*	Seals nicks in lagging strand
DNA Gyrase		Introduces negative supercoils
α	*gyrA*	Makes and seals double strand breaks in DNA
β	*gyrB*	ATP-using subunit
Topoisomerase IV		Decatenation
A	*parC*	Makes and seals double strand breaks in DNA
B	*parE*	ATP-using subunit

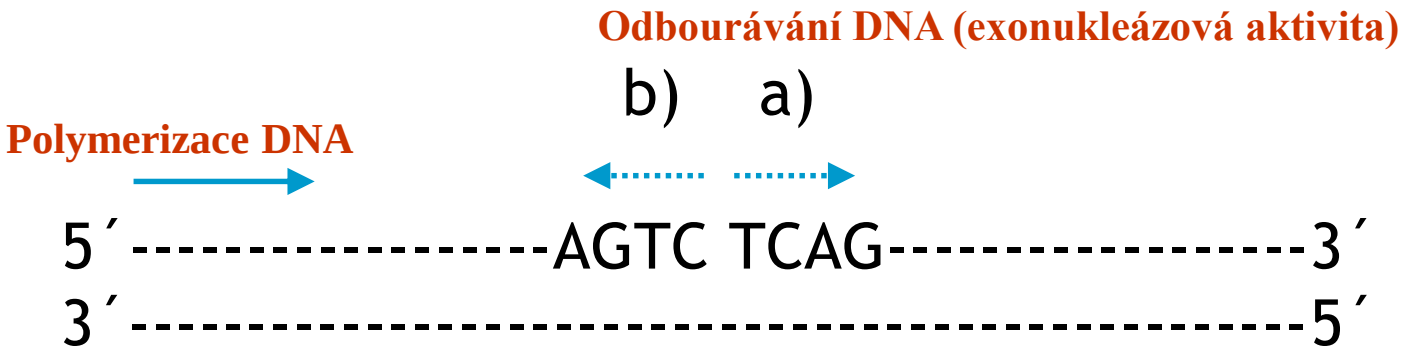
podjednotky

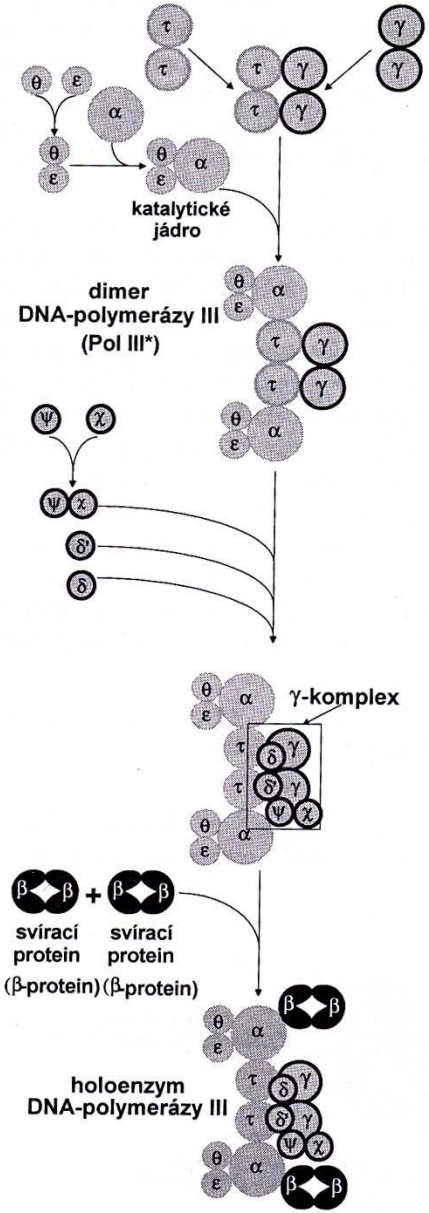
Charakteristika aktivit DNA-polymeráz

- **DNA-dependentní-DNA-polymerázy (replikázy)**

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;

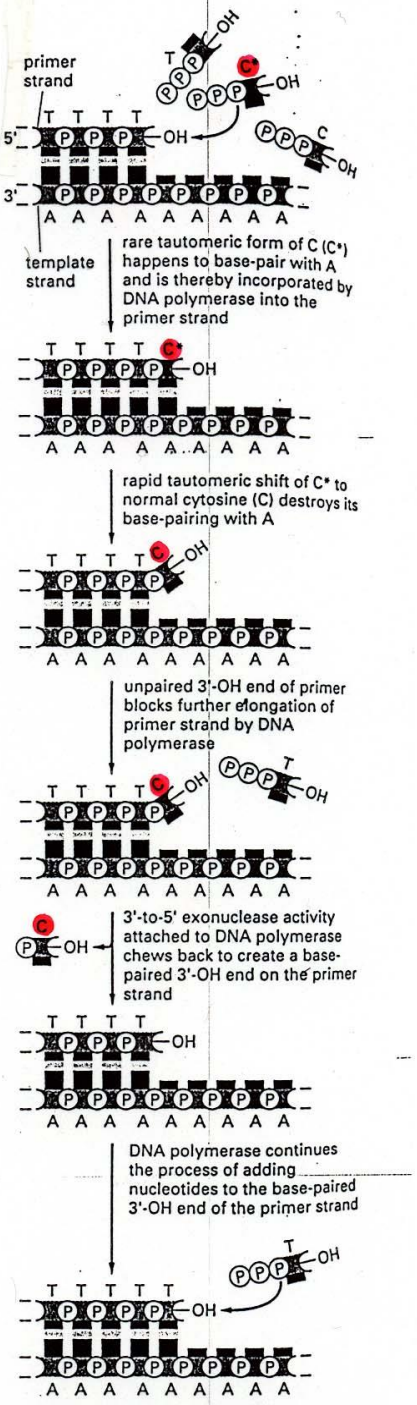
γ-monomer váže ATP;

δ-monomer se váže na β;

δ'-monomer stimuluje účinek monomeru β;

χ-monomer, na který se vážou proteiny SSB;

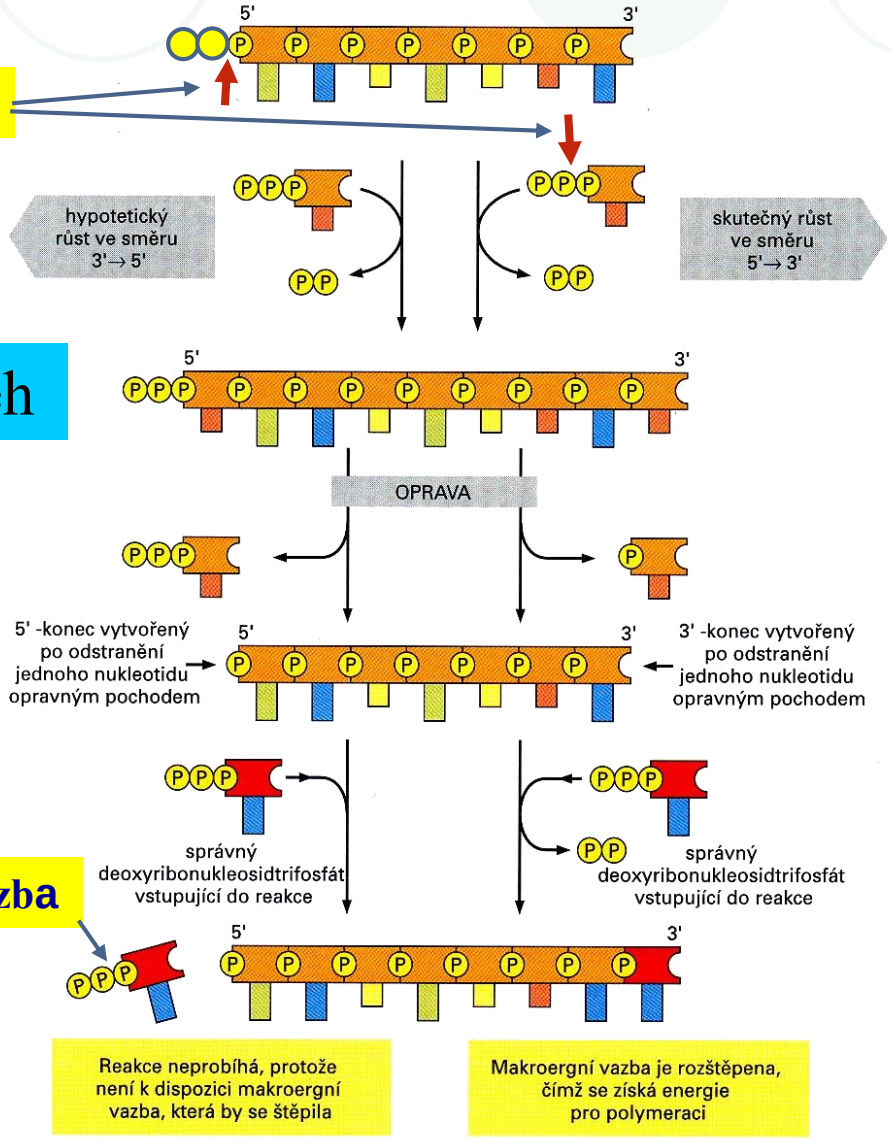
ψ-monomer tvoří most mezi χ a γ.



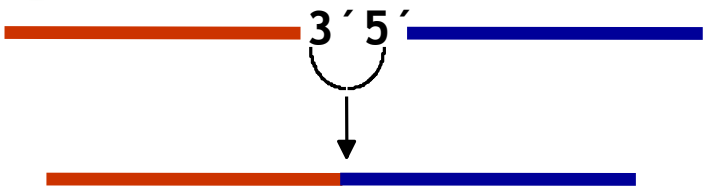
Korektorská aktivita DNA-polymerázy (proofreading)

- **3´⟶5´ exonukleázová aktivita**
- počet chybně zařazených nukleotidů = $1/10^7$
- výsledný počet chybných bází = $1/10^9$

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



DNA-ligázy

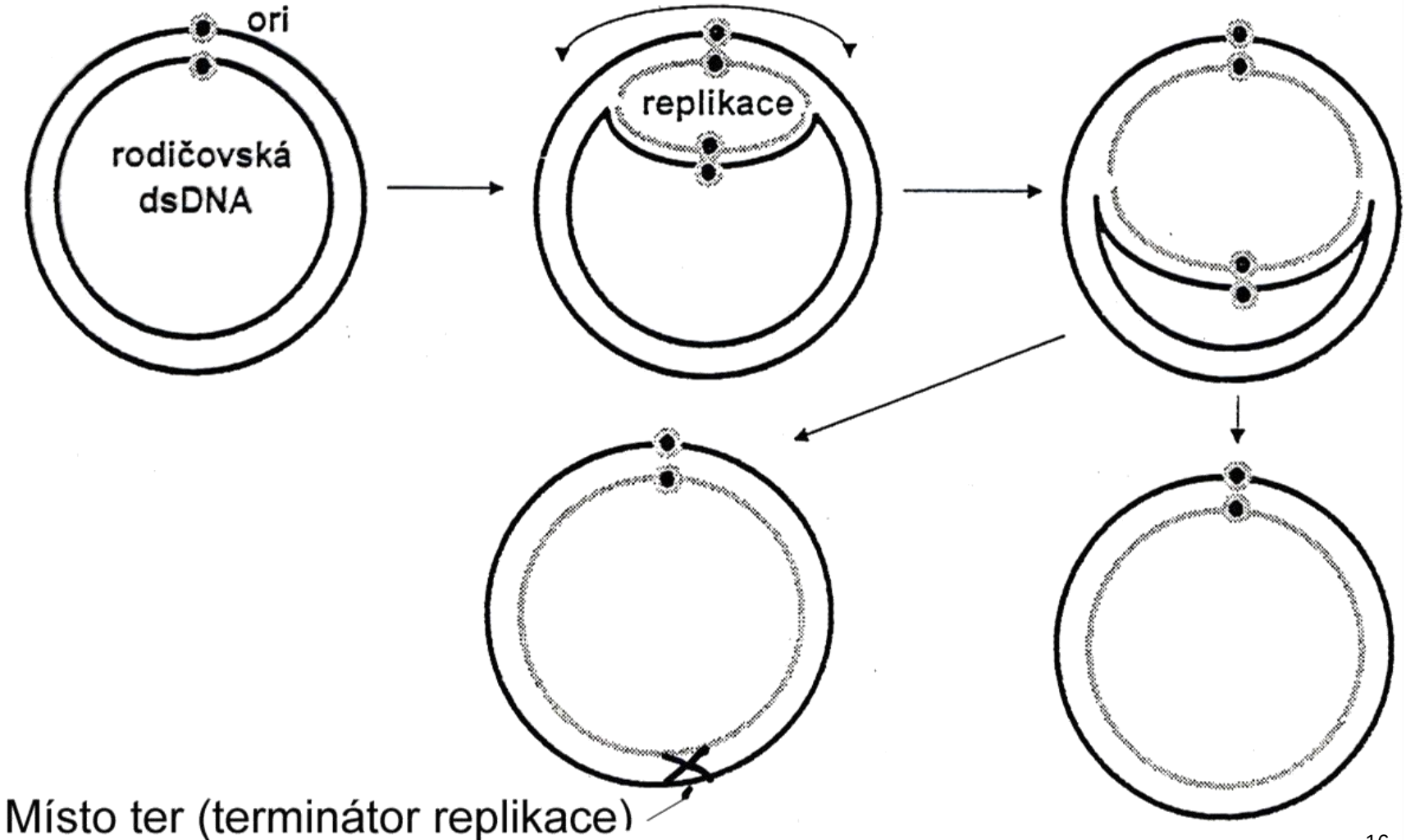


Ligázy vytvářejí fosfodiesterovou vazbu mezi dvěma sousedními nukleotidy v řetězcích DNA

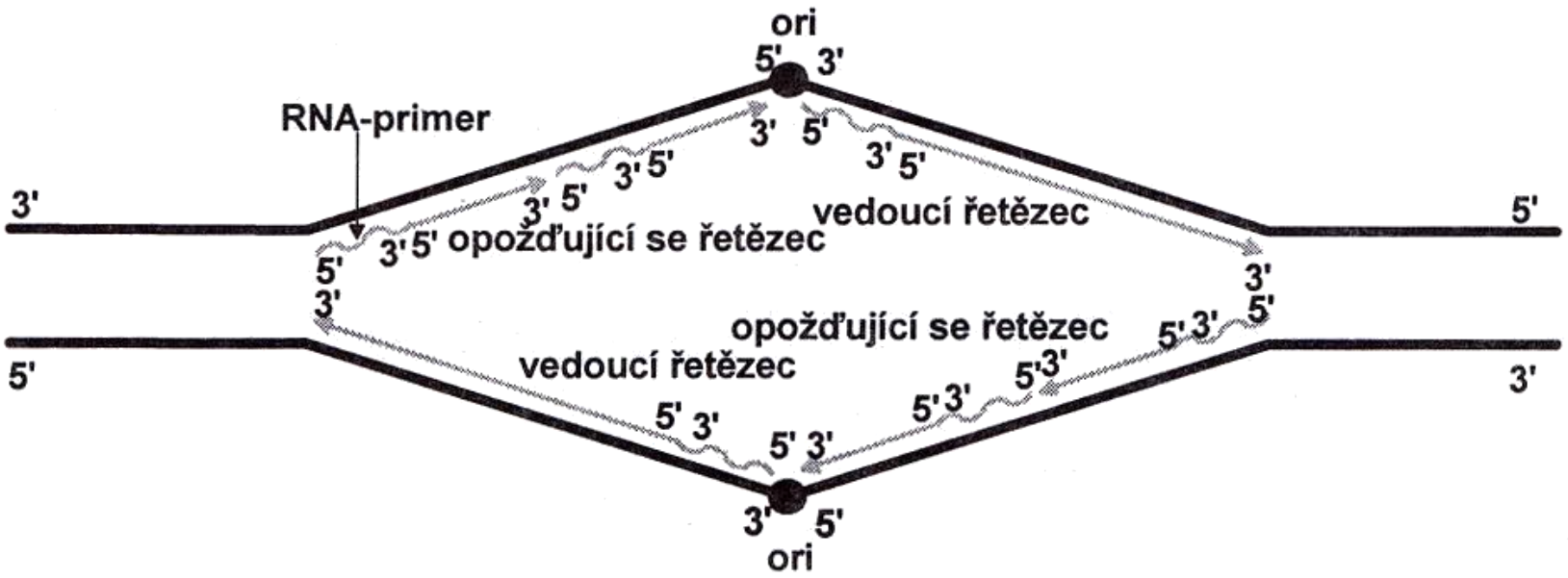
Při spojování řetězců DNA *in vitro* se používá **T4 DNA ligáza**

- **DNA-ligáza (ATP)**
  - $ATP + dNMP_n + dNMP_m = AMP + PP_{an} + dNMP_{n+m}$
- **DNA-ligáza (NAD^+)** $NAD^+ + dNMP_n + dNMP_m = AMP + nAMN + dNMP_{n+m}$

Dvousměrná replikace kružnicové chromozomové dsDNA prokaryot

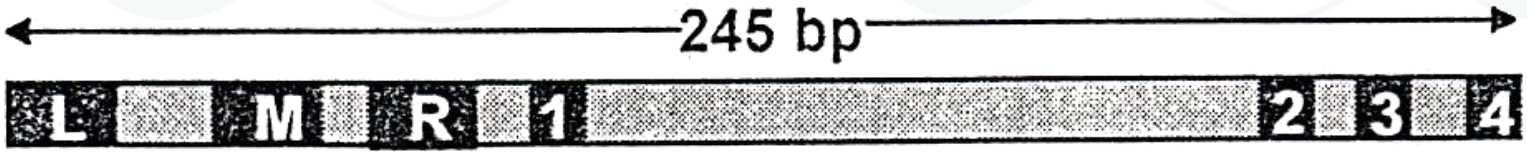


Asymetrie replikační vidlice



Syntéza vedoucího a opožďujícího se řetězce při replikaci bakteriálního chromozomu

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

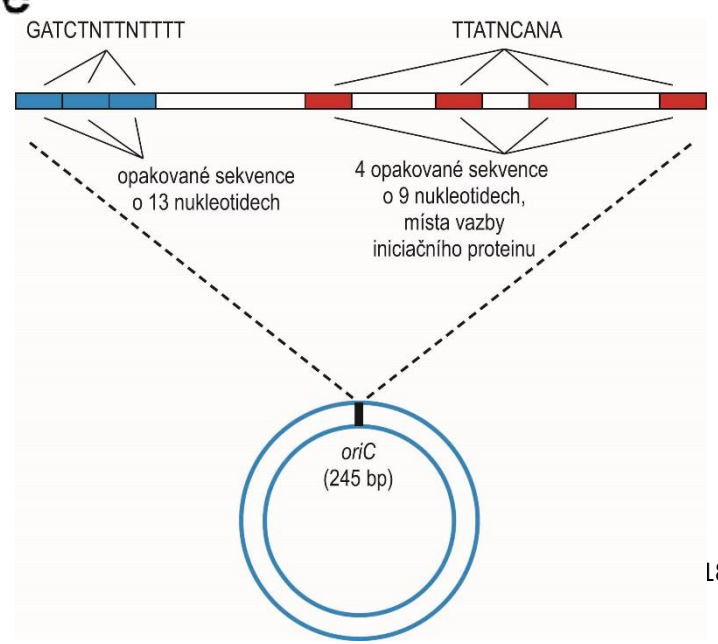


L, M, R jsou 13 bp-sekvence GATCTNTTTNTTTT

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

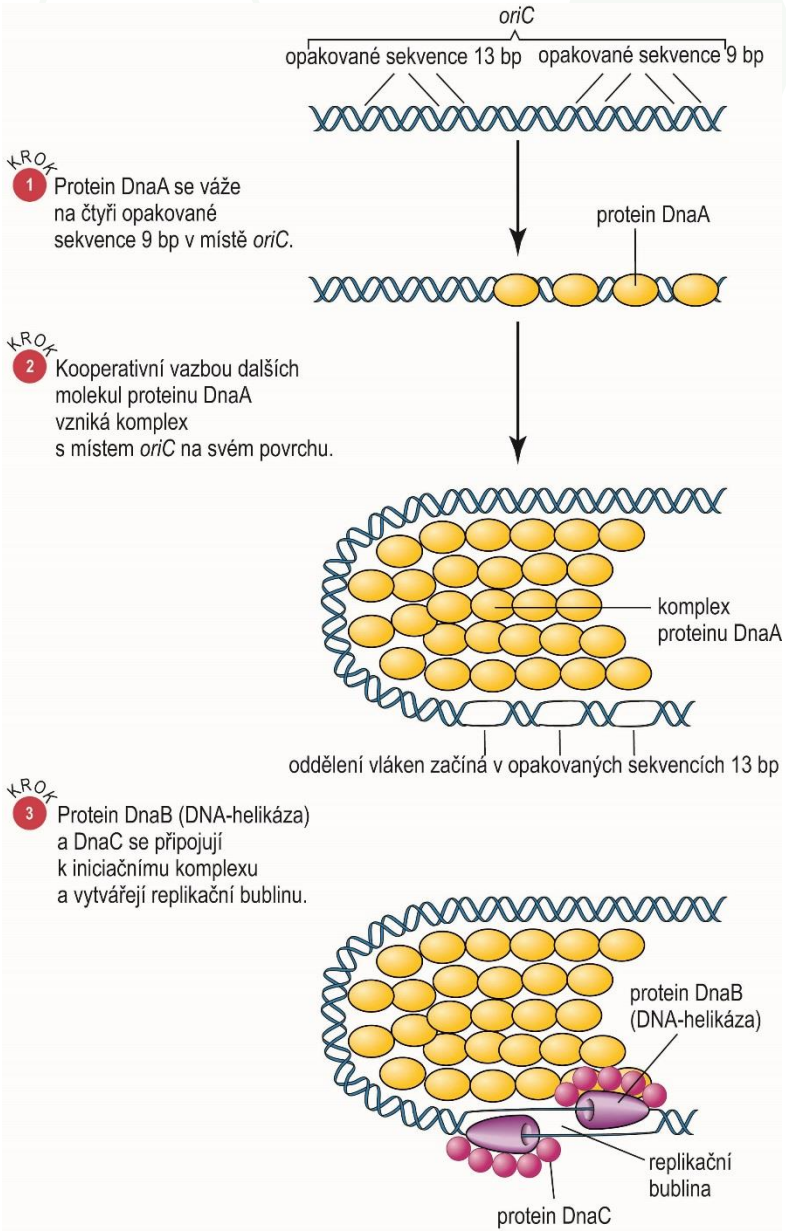
= neopakující se sekvence

A+T

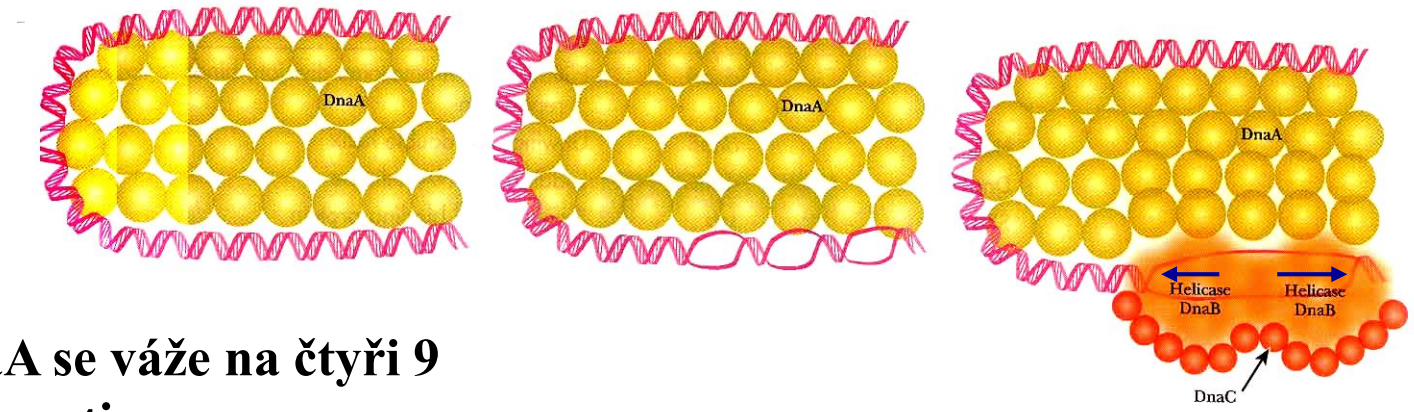


Minireplikon

Předprimerová fáze replikace DNA v oriC u E. coli



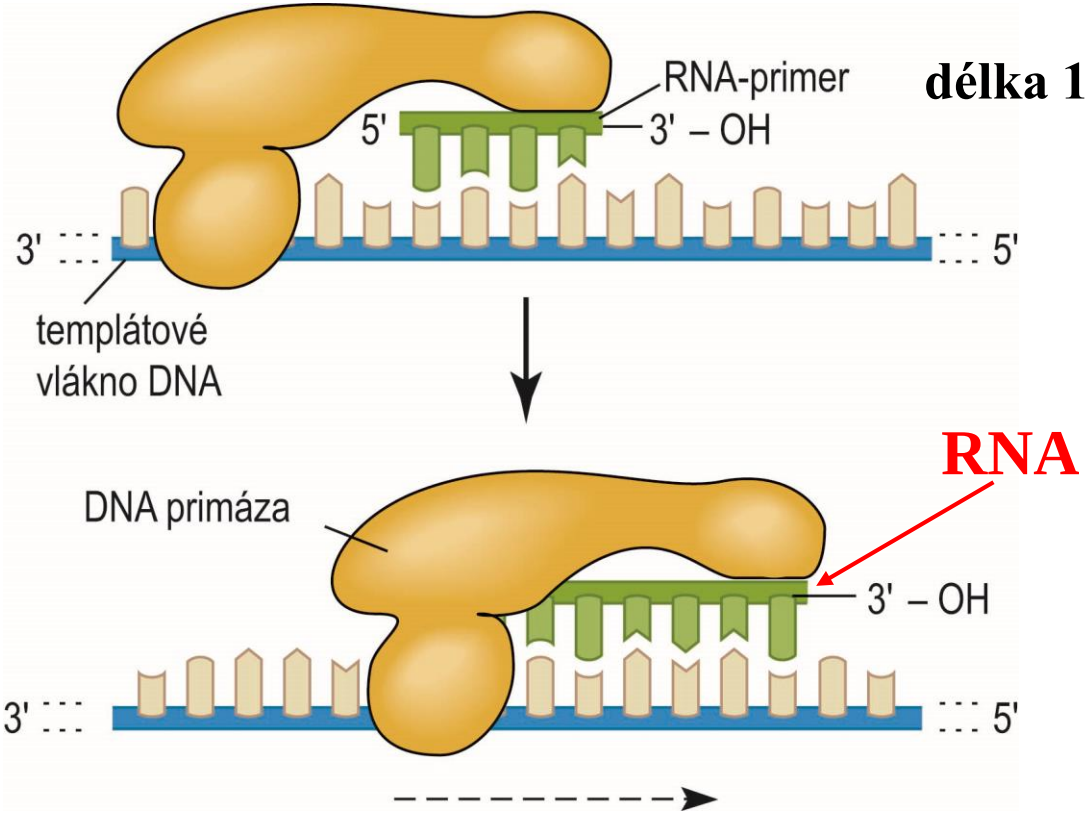
Fungování proteinů DnaA, DnaB a DnaC při iniciaci replikace v oriC



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

Iniciace replikace DNA prostřednictvím RNA-primerů

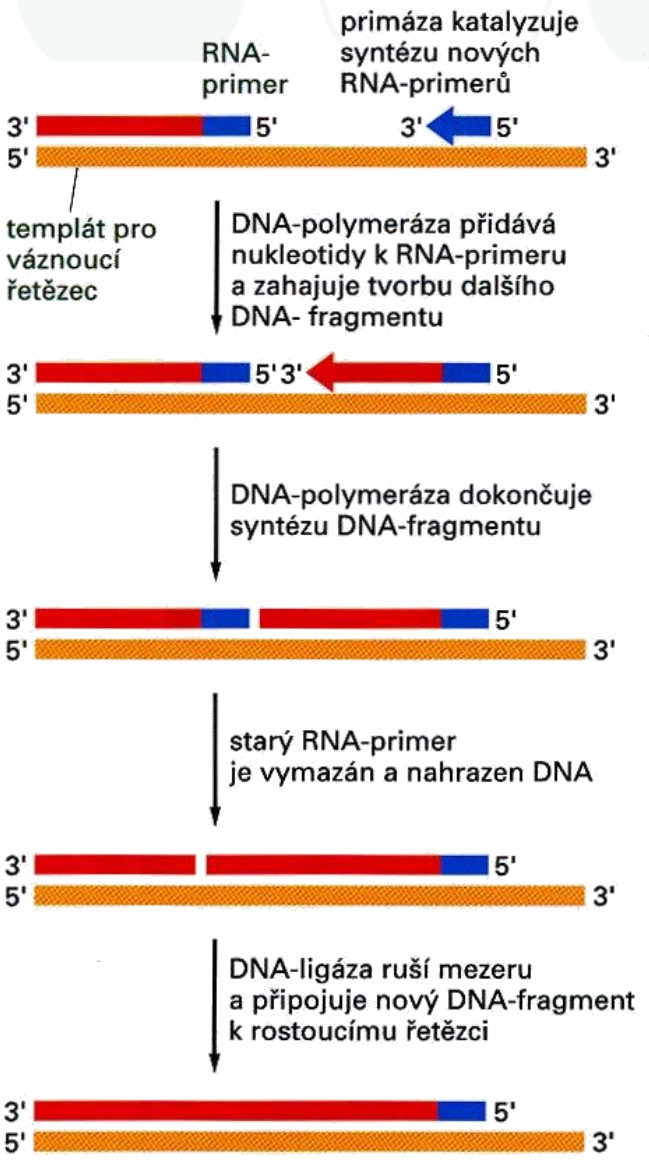


délka 10 -200 nt

DNA-primáza: DNA-dependentní RNA-polymeráza

Syntéza Okazakiho fragmentů a proces jejich spojování postupným působením enzymů:

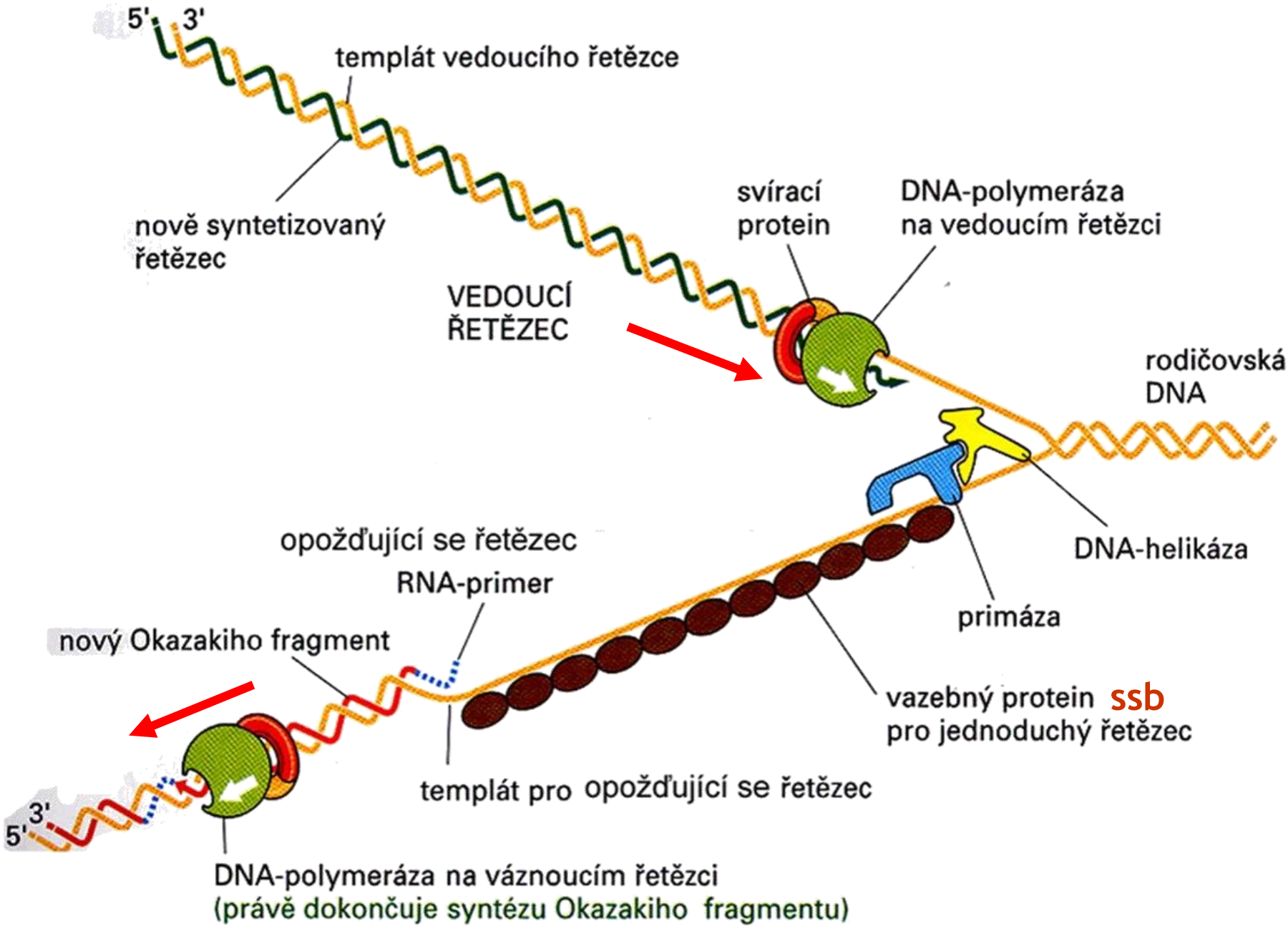
1. Primáza
2. DNA-polymeráza
3. Nukleáza (PolI)
4. Ligáza



Délka Okazakiho fragmentů:

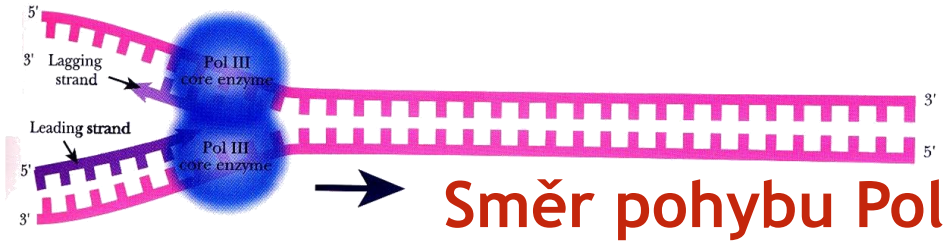
1000-2000 nt u prokaryot

100-200 nt u eukaryot


5'
3'
templát vedoucího řetězce
nově syntetizovaný řetězec
svírací protein
DNA-polymeráza na vedoucím řetězci
VEDOUCÍ ŘETĚZEC
rodičovská DNA
DNA-helikáza
primáza
opožďující se řetězec
RNA-primer
nový Okazakiho fragment
vazebný protein ssb pro jednoduchý řetězec
templát pro opožďující se řetězec
5'
3'
DNA-polymeráza na váznoucím řetězci
(právě dokončuje syntézu Okazakiho fragmentu)

Relativní poloha podjednotek DNA polymerázy III v replikační vidlici

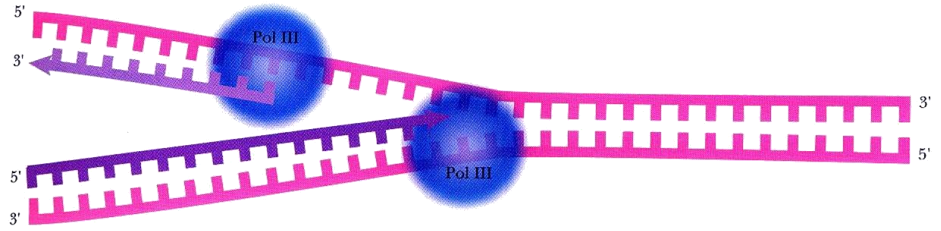
A)



Směr pohybu PolIII

- dvě podjednotky PolIII fungují společně

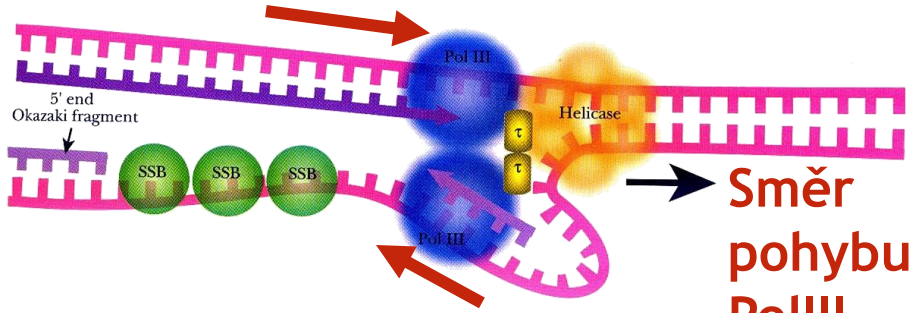
B)



- pokud by DNA nevytvořila ohyb, podjednotky by se oddělily

Směr syntézy DNA 5´→3´

C)

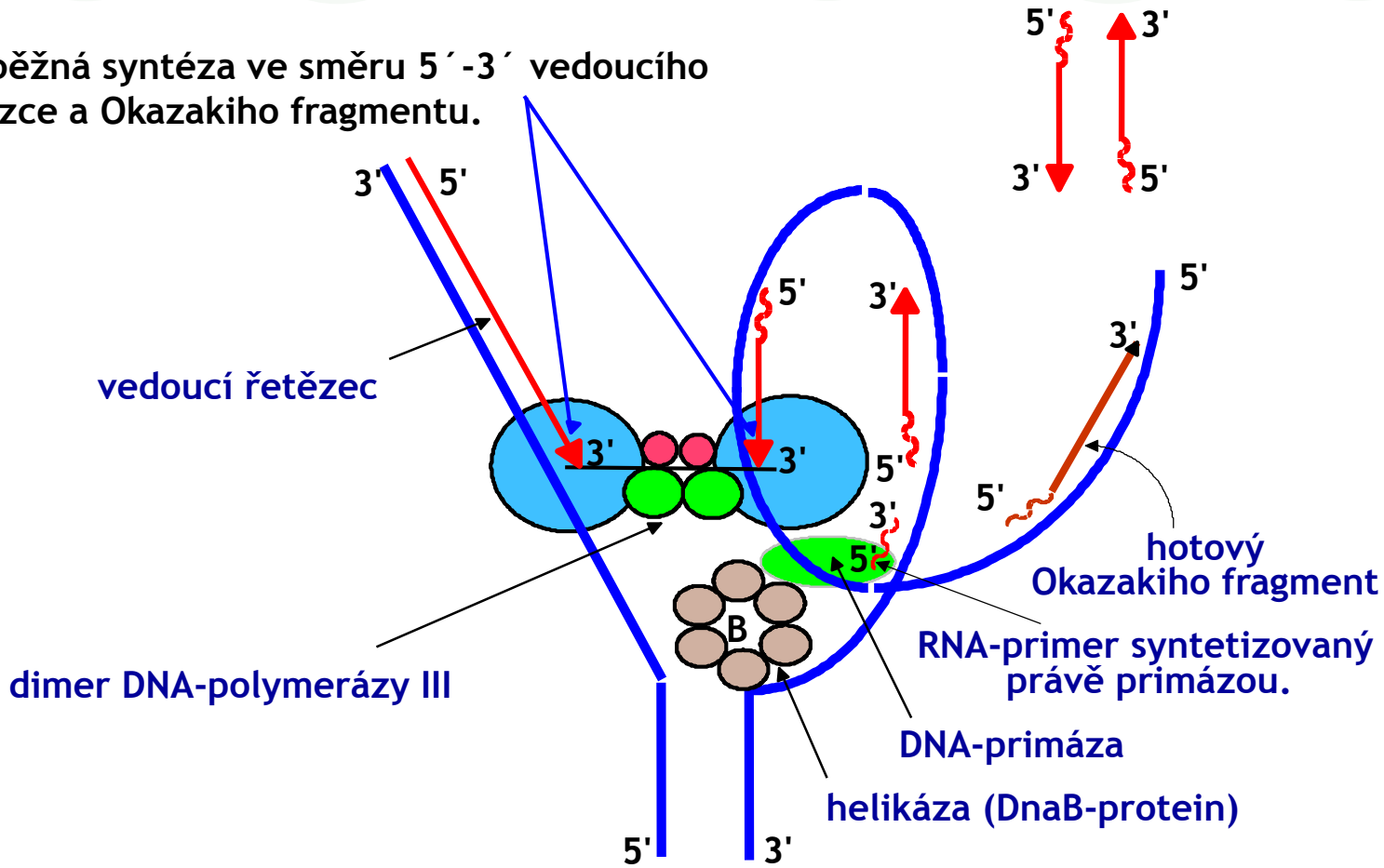


Směr pohybu PolIII

- ohyb DNA umožní podjednotkám zůstat pohromadě

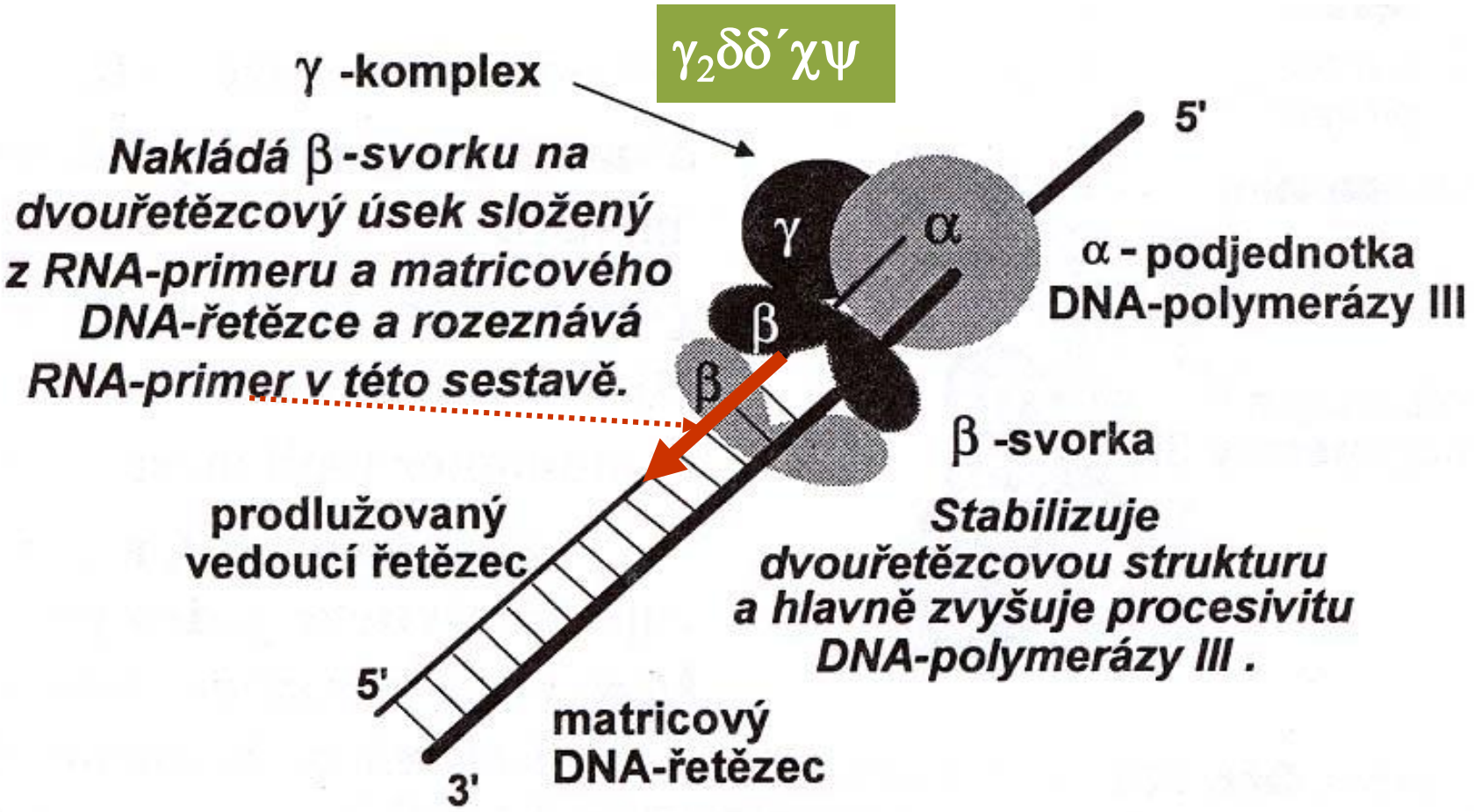
Syntéza vedoucího řetězce a Okazakiho fragmentů

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

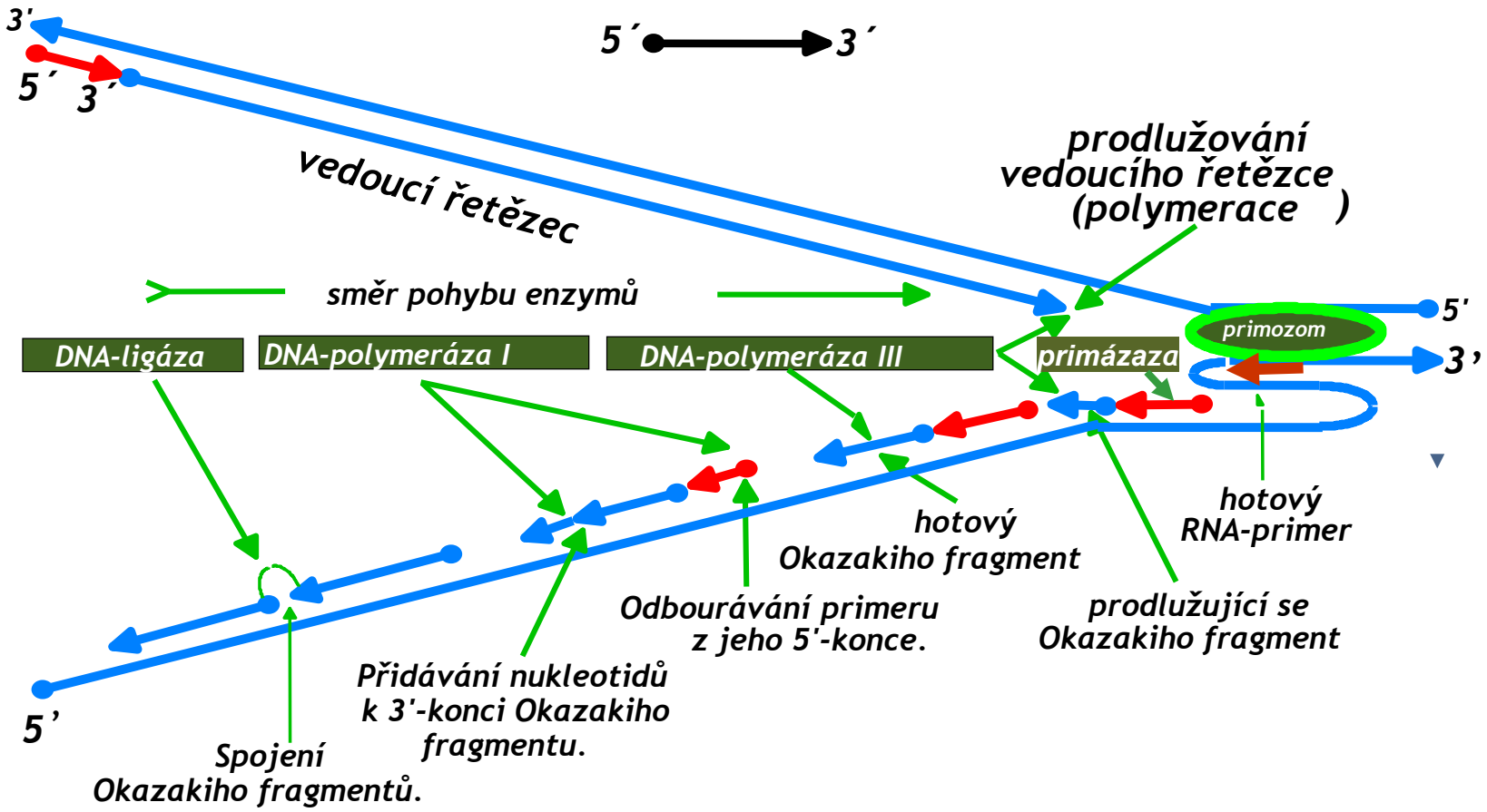


Pro zjednodušení není zakreslena ß-svorka a γ-komplex

Úloha podjednotek gama a beta při replikaci

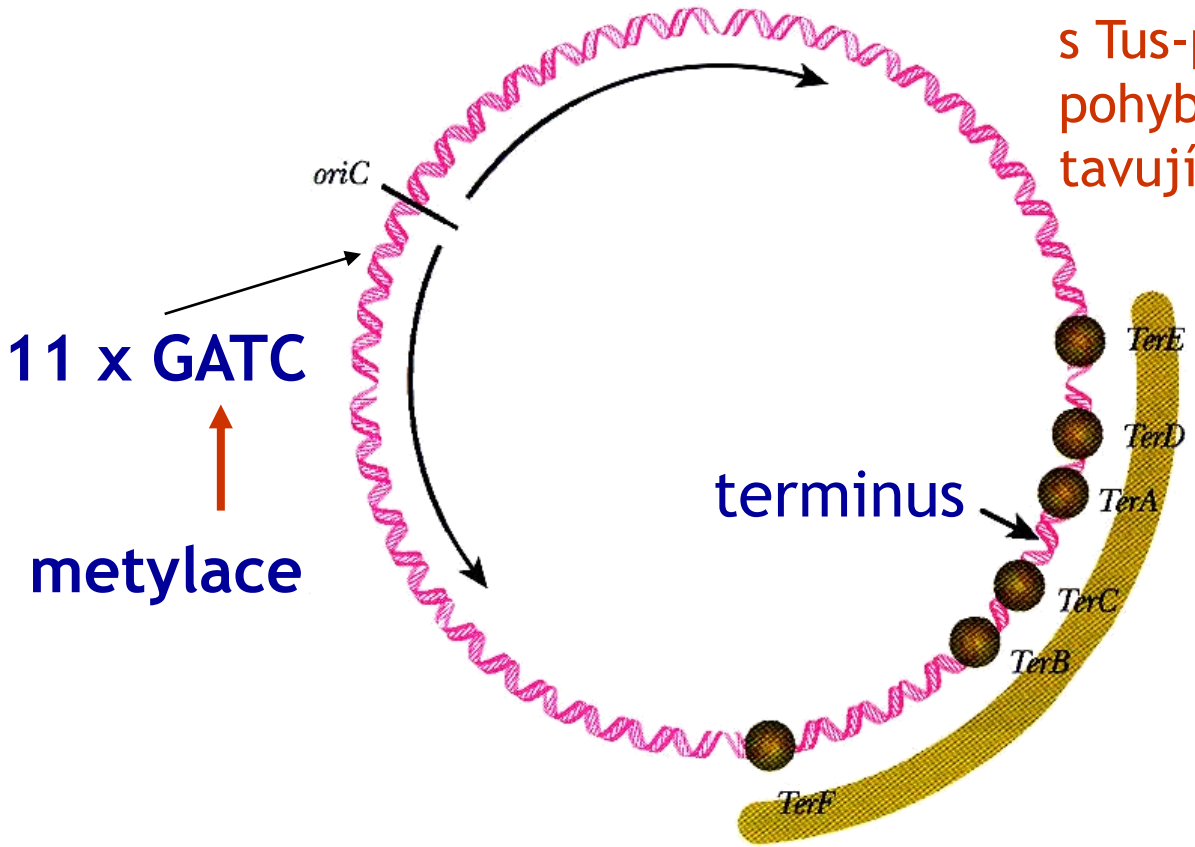


Globální pohled na průběh replikace dsDNA

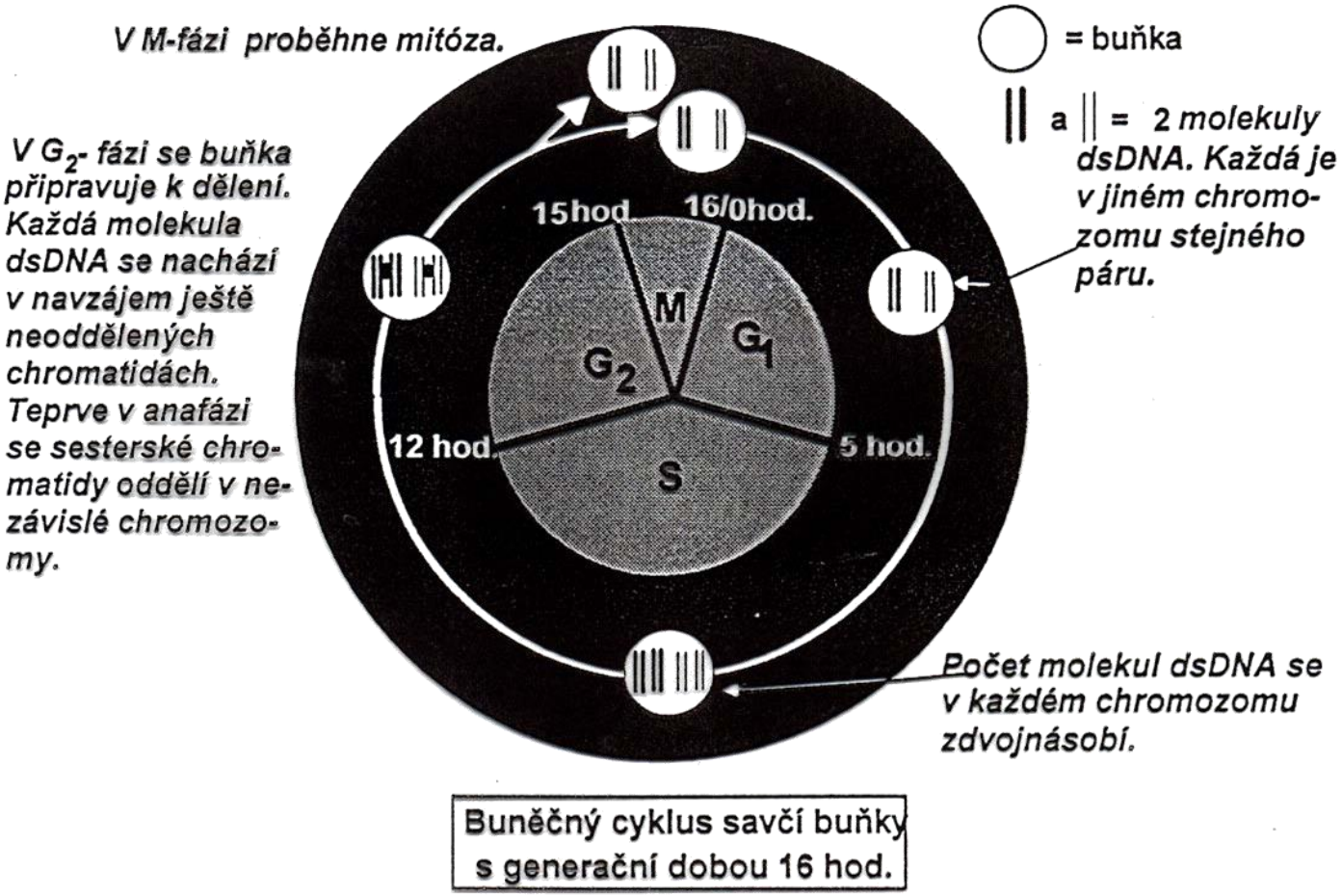


Terminace replikace bakteriálního chromozomu

Ter - místa (23 bp) spolu s Tus-proteinem brání pohybu helikázy a zastavují pohyb vidlice

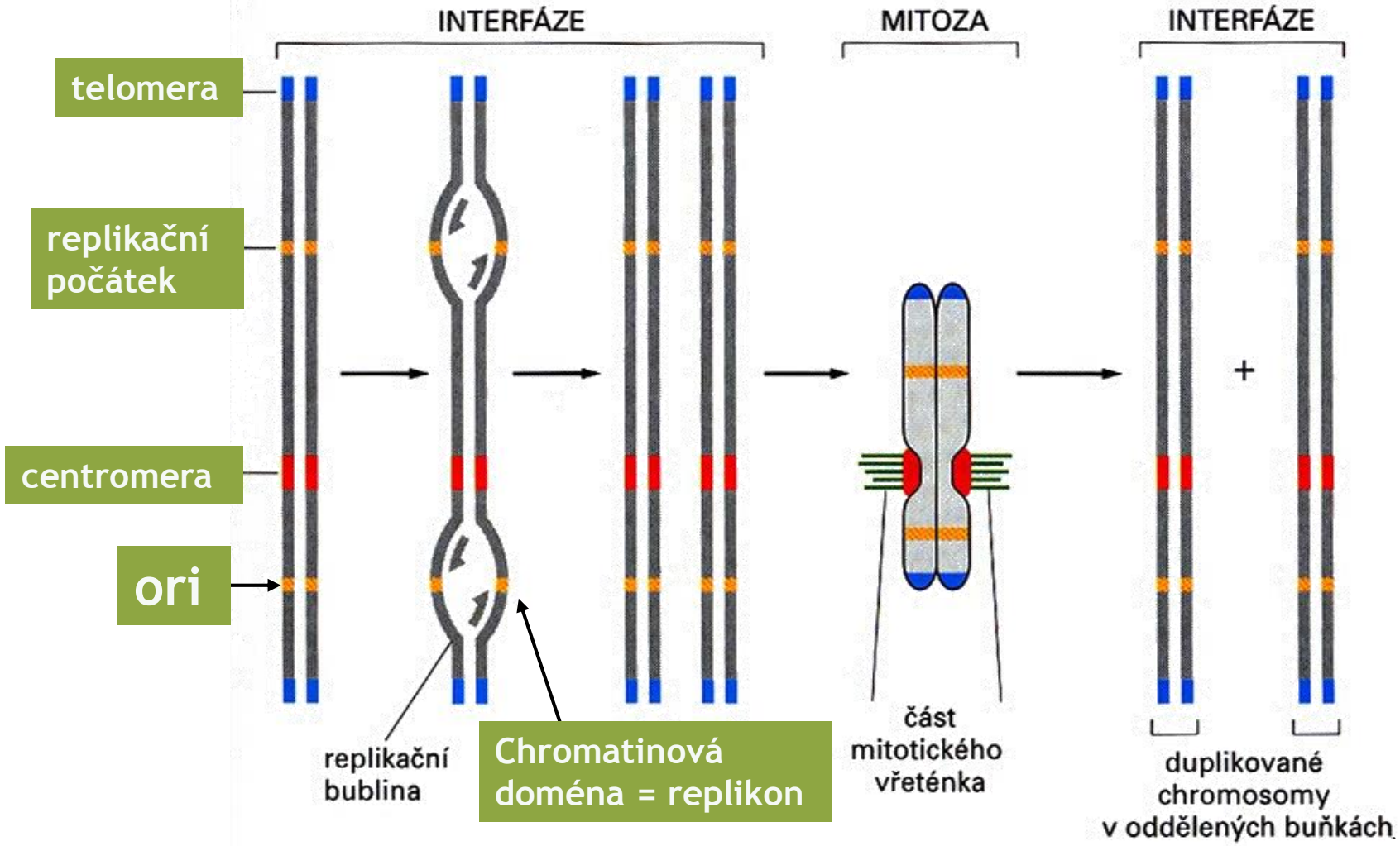


Zjednodušené schéma buněčného cyklu zdůrazňující počet molekul dsDNA v chromozomech v jeho různých fázích



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*	polα/primáza v komplexu s pol δ
Faktor zvyšující procesivitu replikativní polymerá-zy	β-svorka	PCNA
Faktor nakládající β-svorku (PCNA)	γ-komplex	RFC
Primáza	jen DNA-primáza (DnaG-protein)	komplex polα/primáza
Helikáza	DnaB-protein, n'-protein	?
Odstranění primeru	DNA-polymeráza I	exonukleáza MF1
Oprava opožďujícího 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 opožďujícího 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:

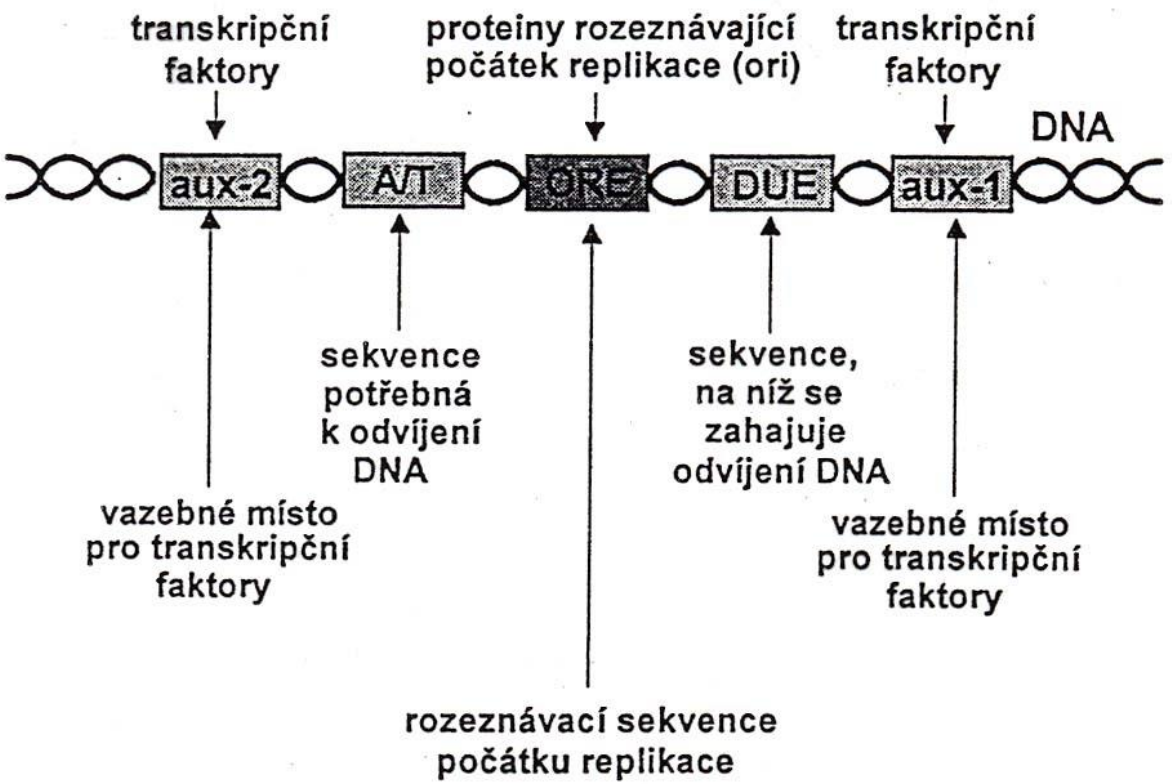
Ribonukleáza H1, Ribonukleáza FEN-1

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 mito-chondriích	v jádře	v jádře
Počet podjedno-tek	4	1	2	2	>1
Polymerá-zová aktivita 5'-3'	+	+	+	+	+
Exonukleá-zová aktivi-ta 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 mito-chondriích	syntéza prodlužují-cího se řetězce a dokonče-ní syntézy Okazakiho fragmentů	neznámá

Struktura počátku replikace u kvasinek
Soubor proteinů = ORIZOM



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

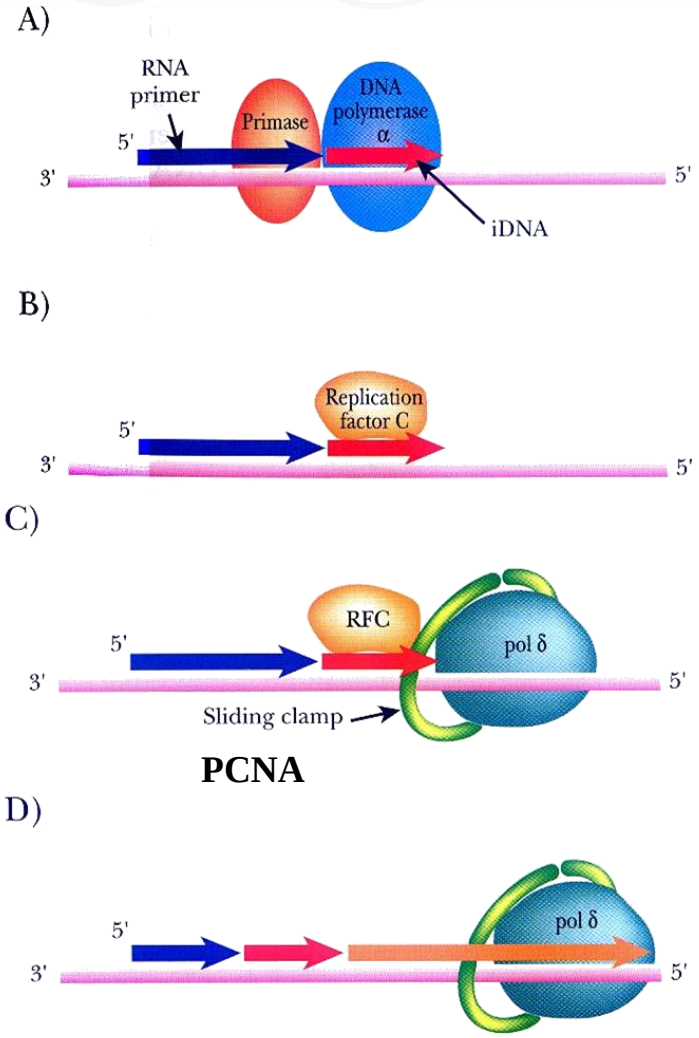
2. Vazba transkripčních faktorů a jejich interakce s proteiny v místě ORE

3. Iniciace 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

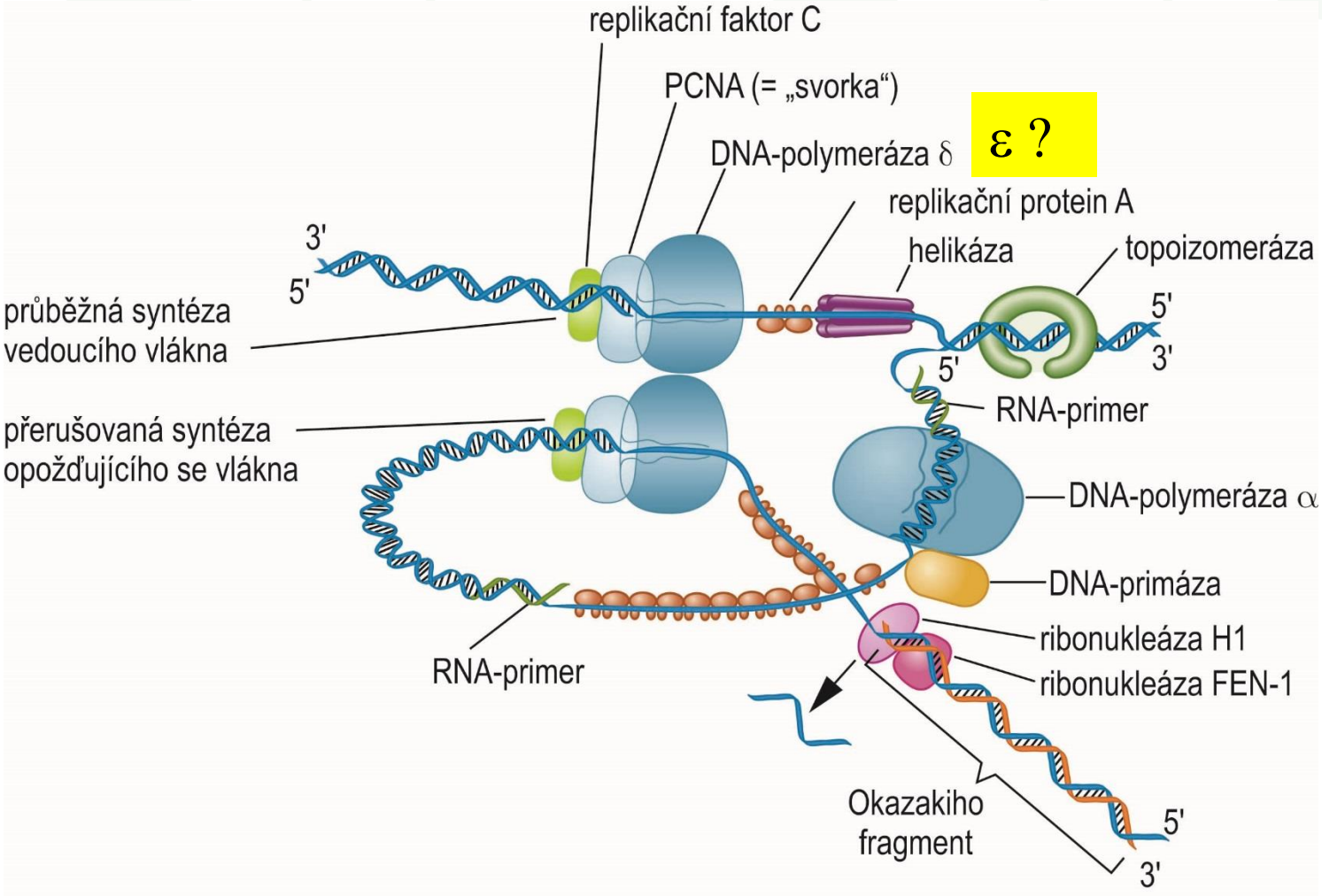
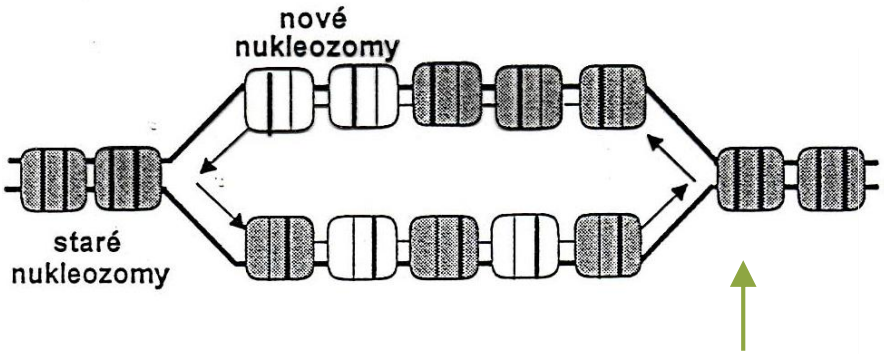
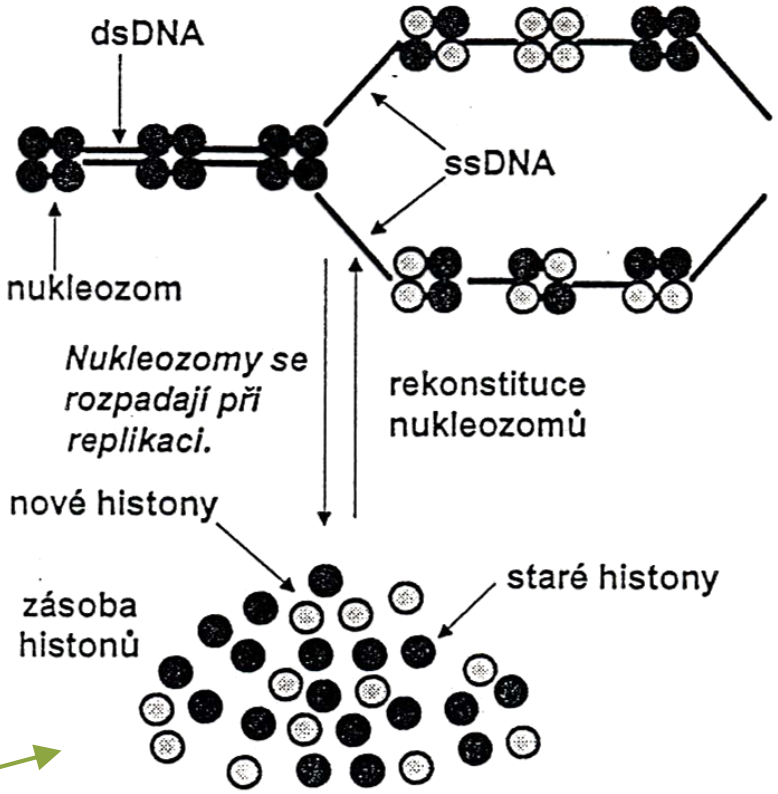


Schéma replikační vidlice eukaryotické jaderné DNA

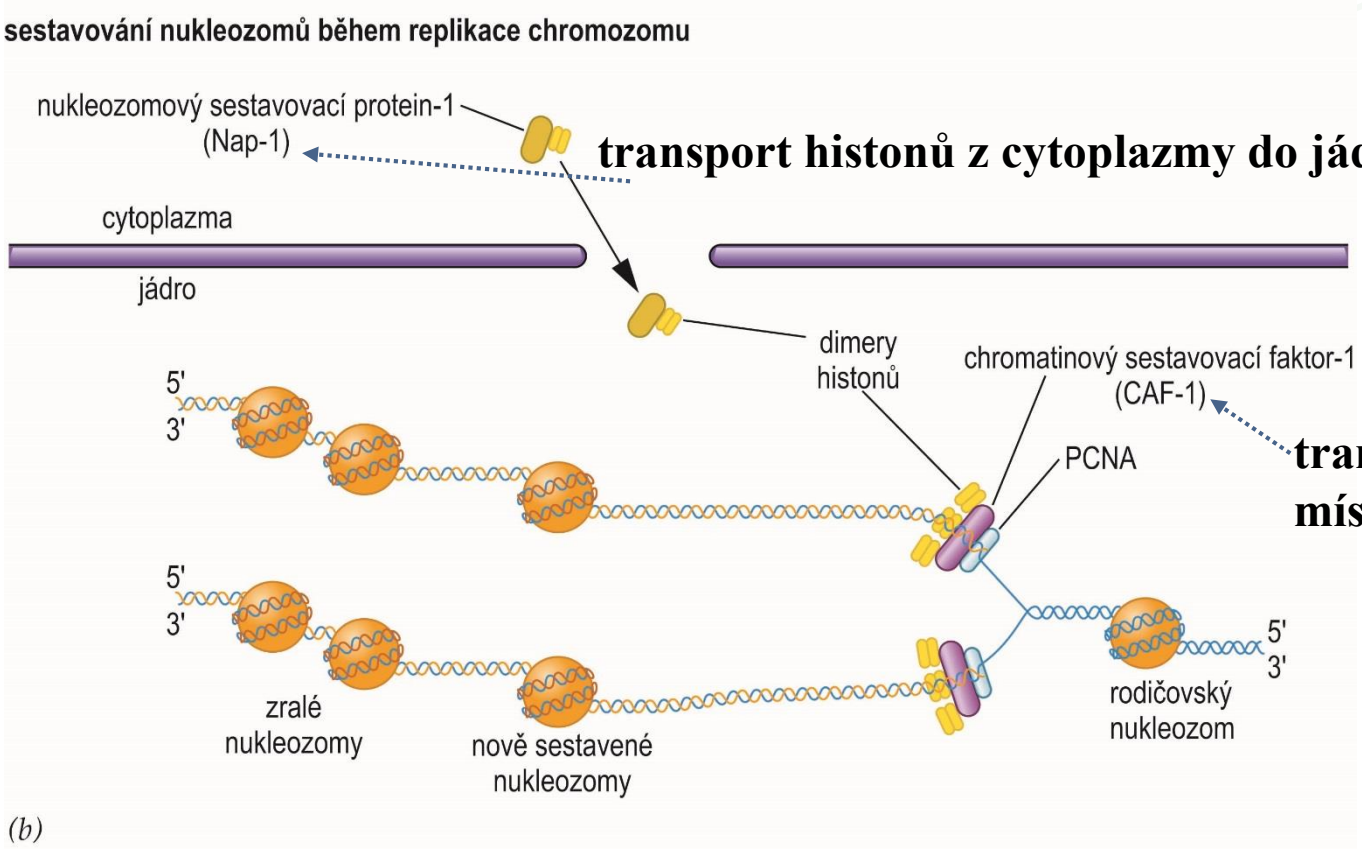


Staré a nové nukleozomy se na matricových a podle nich syntetizovaných komplementárních řetězcích rozdělují náhodně

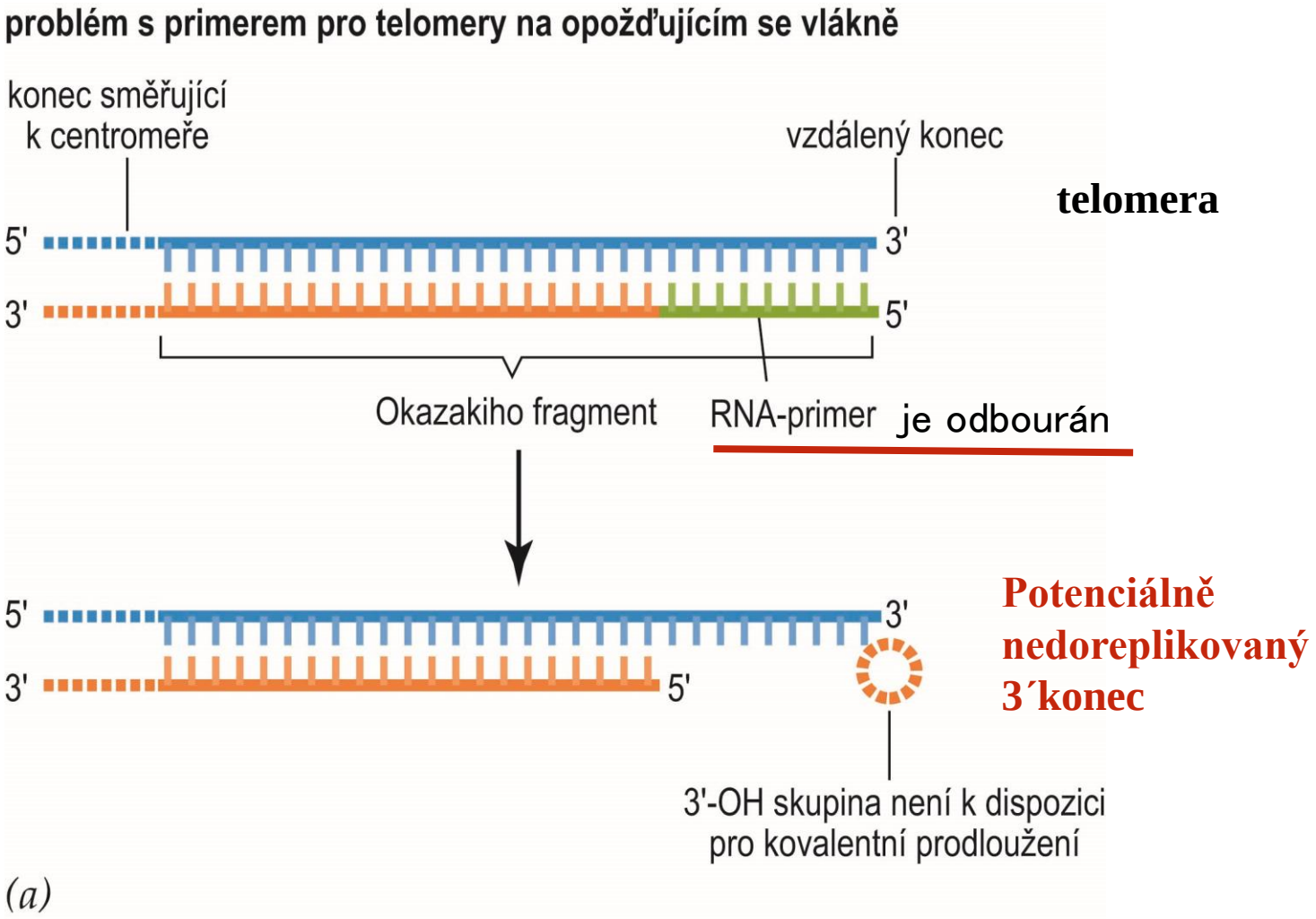


Na obrázku je pro jednoduchost schématického vyjádření nukleozom znázorněn jako tetramer histonů. Ve skutečnosti však jde o oktamer.

Sestavování nukleozomů během replikace

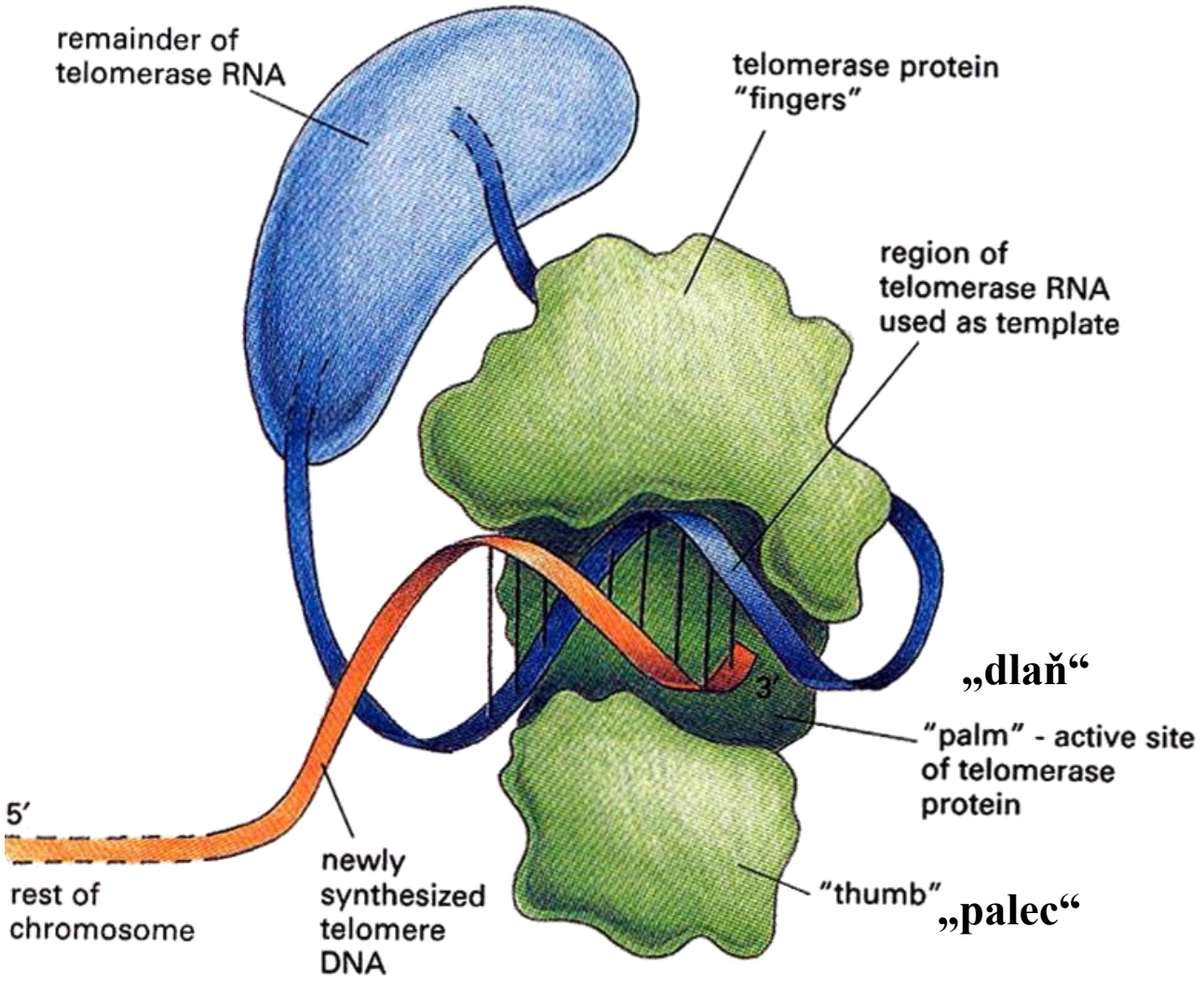


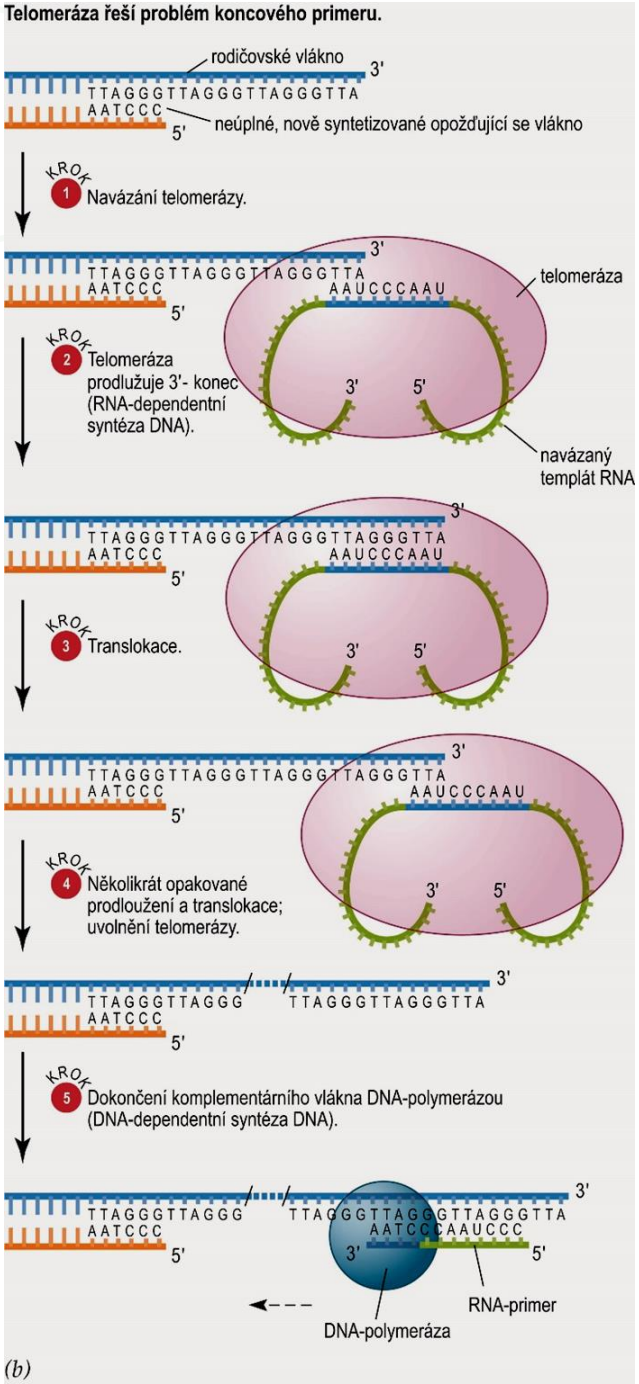
Problém doreplikování 3´konců lineárních chromozomů



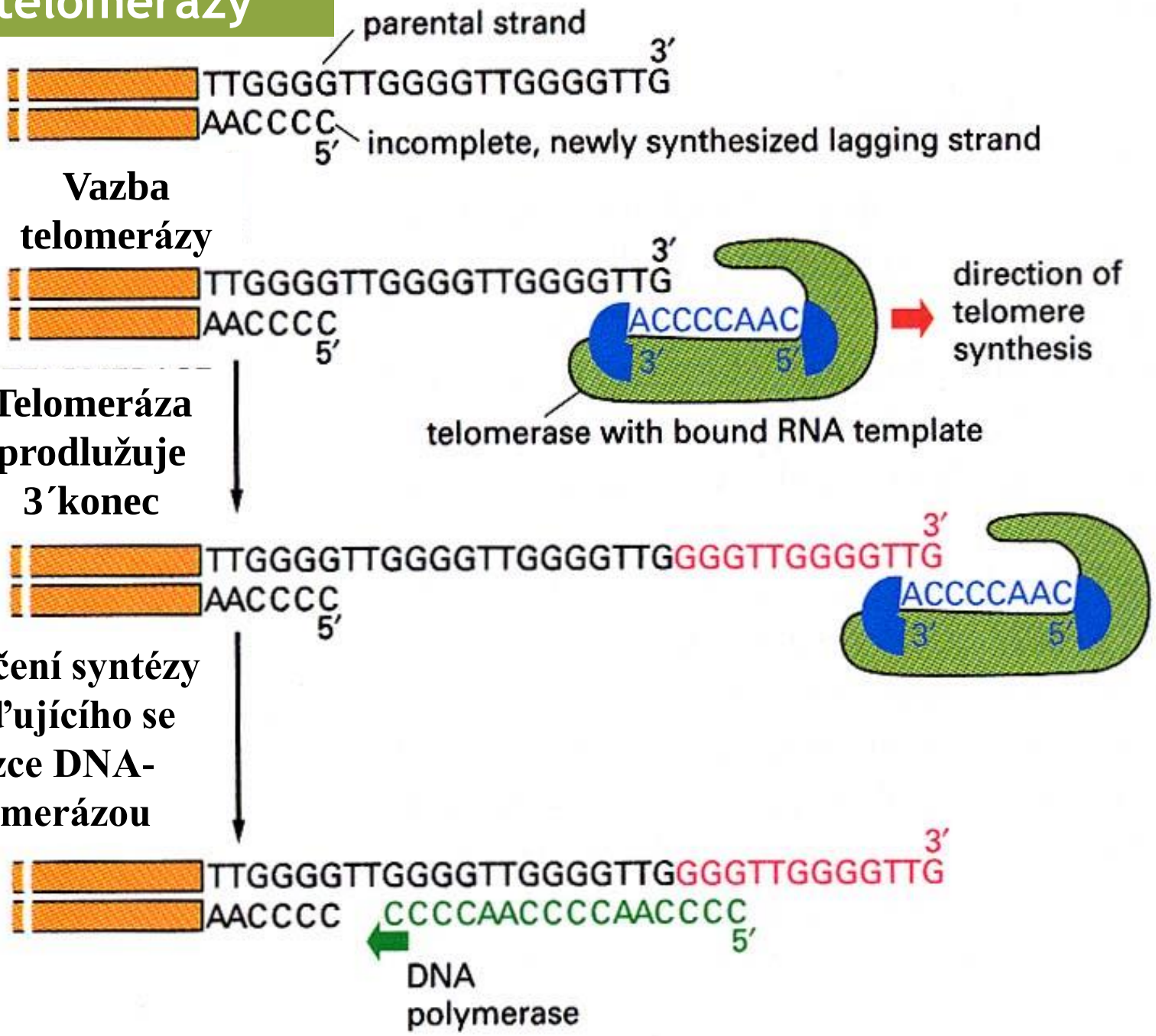
Struktura telomerázy

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




Telomeráza řeší problém koncového primeru.
rodičovské vlákno
3'
TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA
AATCCC
5'
neúplné, nově syntetizované opožďující se vlákno
KROK 1
Navázání telomerázy.
AAUCCCAAU
telomeráza
KROK 2
Telomeráza prodlužuje 3'- konec (RNA-dependentní syntéza DNA).
navázaný templát RNA
KROK 3
Translokace.
KROK 4
Několikrát opakované prodloužení a translokace; uvolnění telomerázy.
TTAGGGTTAGGG
TTAGGGTTAGGGTTA
KROK 5
Dokončení komplementárního vlákna DNA-polymerázou (DNA-dependentní syntéza DNA).
AATCCCAAUCCC
RNA-primer
DNA-polymeráza
(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 thaliama*
- **TGGG** - TG_3 u *Saccharomyces cerevisiae*
- **TTAGGG** - $T_2A_1G_3$ u člověka, myší, a *Trypanosoma brucei*

asi 1000 kopií na konci každé telomery

5'-TTAGGG-3'

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 myší prodlouží jejich život o ¼***
  - ***Deregulace exprese telomerázy může vést k onkogenezi***

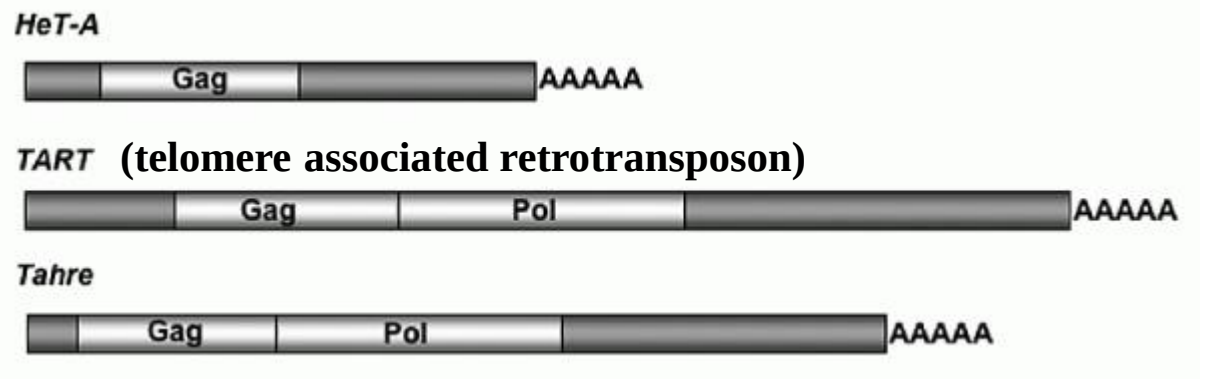
Další funkce telomerázy

- ***Reparace DNA***

Prodlužování telomer u drosofily

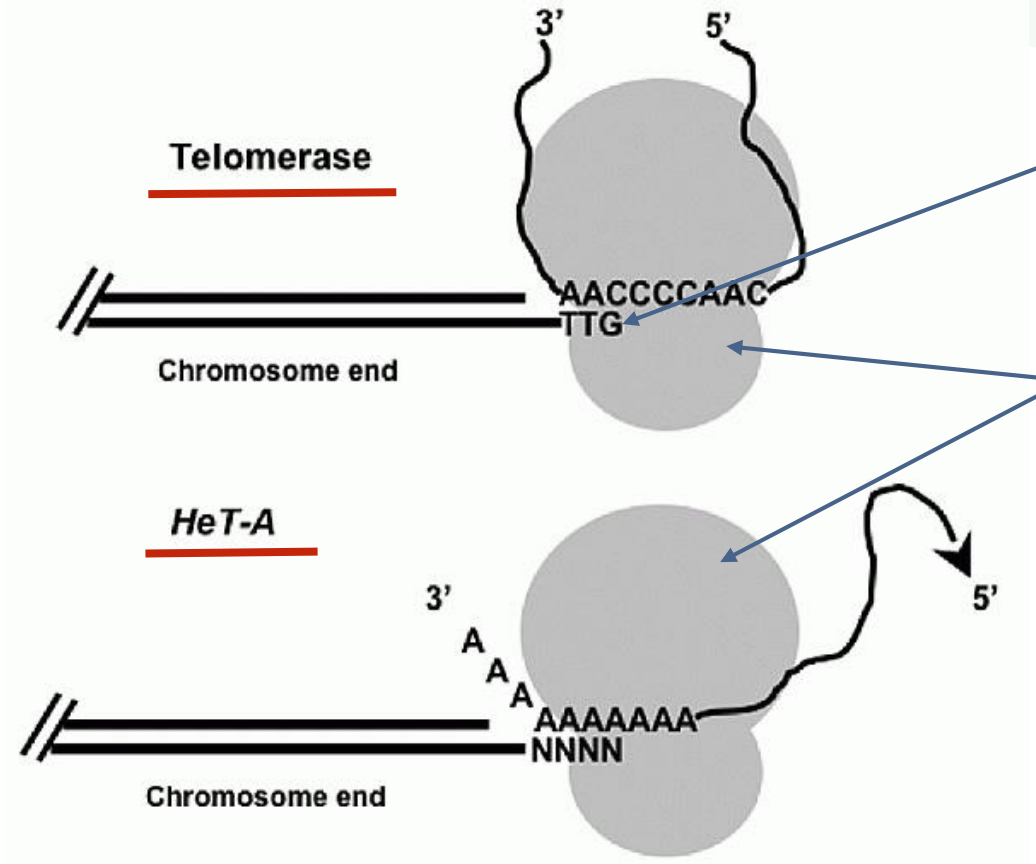
Mobilní elementy (retrotranspozony) Het-A, TART a Tahre (telomere associated retrotranspozon)

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. AAAA 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

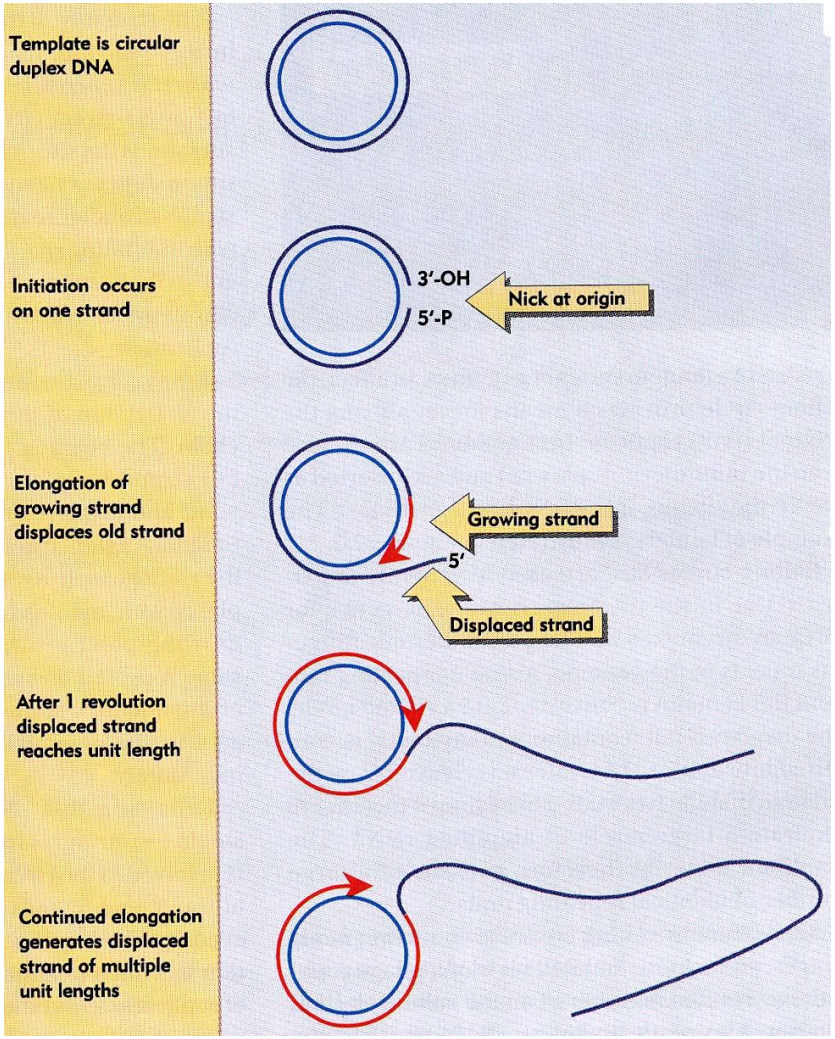


komplementární sekvence

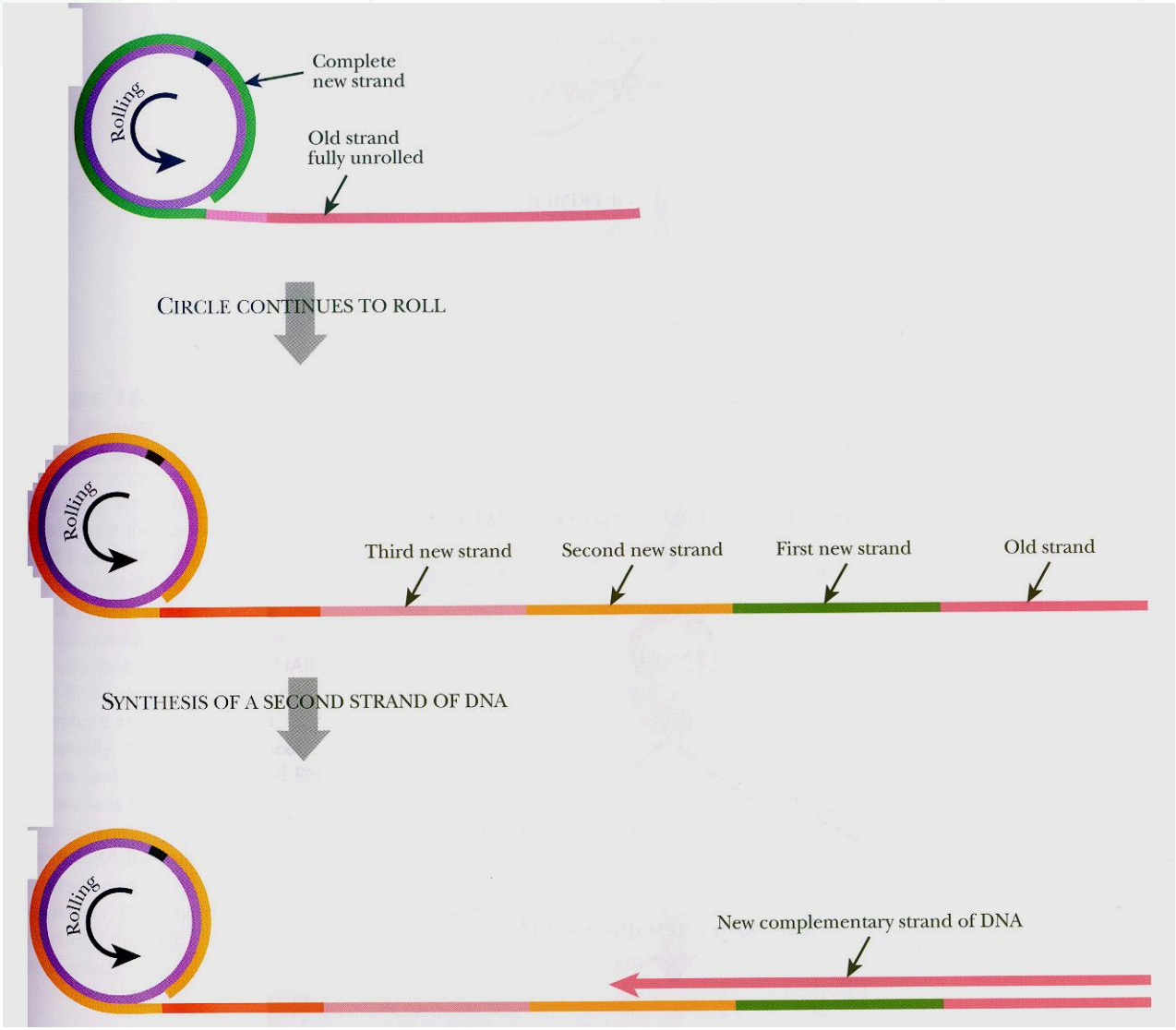
katalytická podjednotka

nekomplementární sekvence

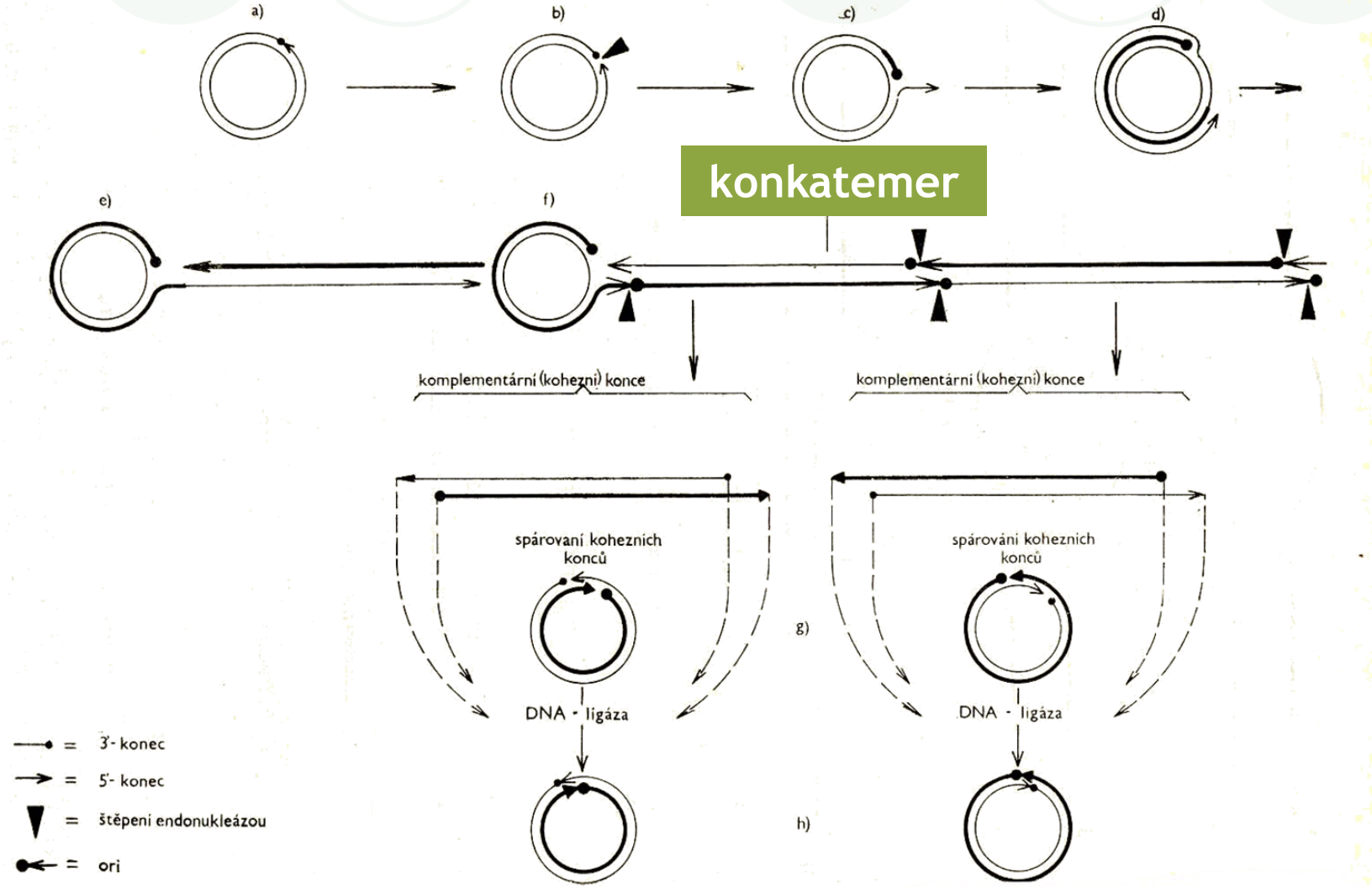
Replikace DNA mechanismem otáčející se kružnicí



Replikace virových molekul otáčející se kružnicí

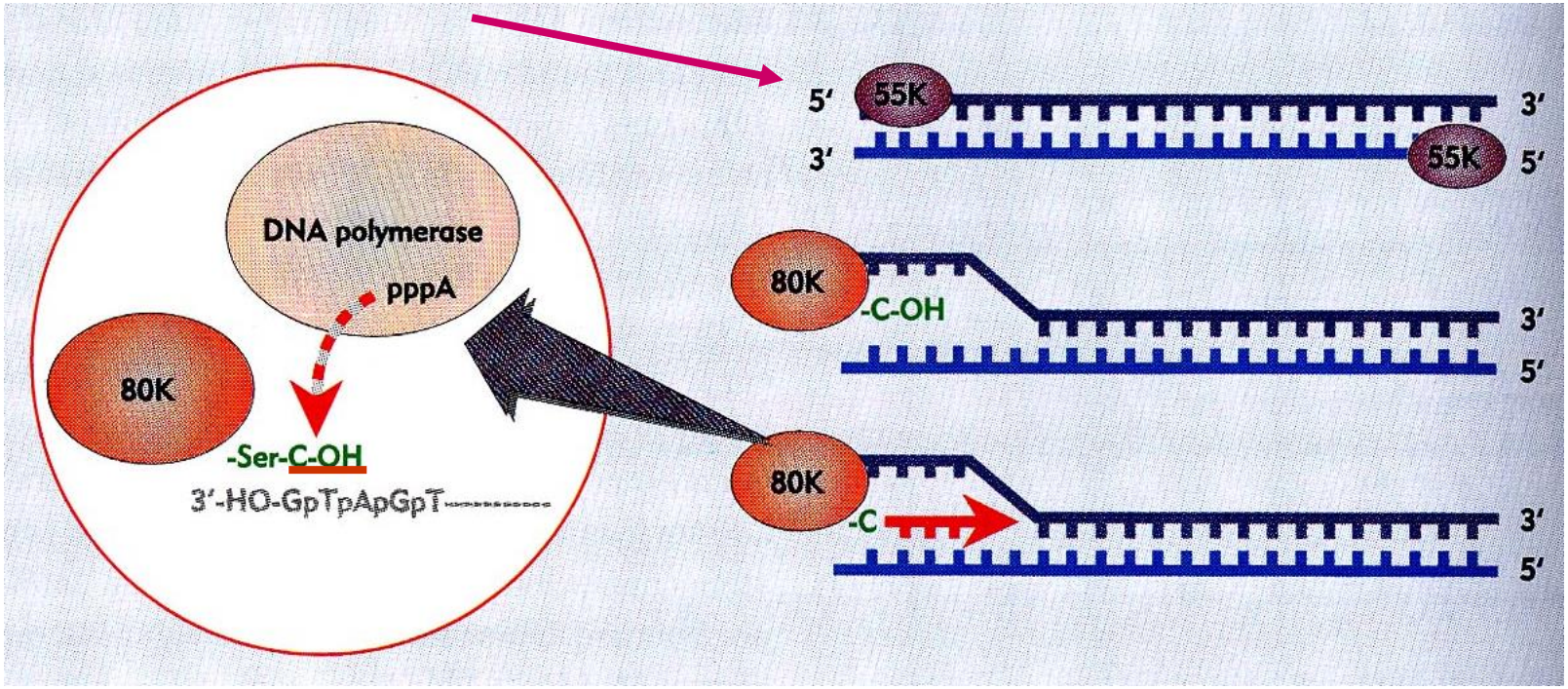


Replikace plazmidů a virů otáčející se kružnicí



Replikace genomu adenoviru (též některé bakteriofágy)

Specifický protein pro iniciaci replikace



Ostatní viry: používají vlastní DNA-polymerázy nebo DNA-polymerázy hostitele; proteiny pro iniciaci replikace; retroviry: využívají reverzní transkriptázu