

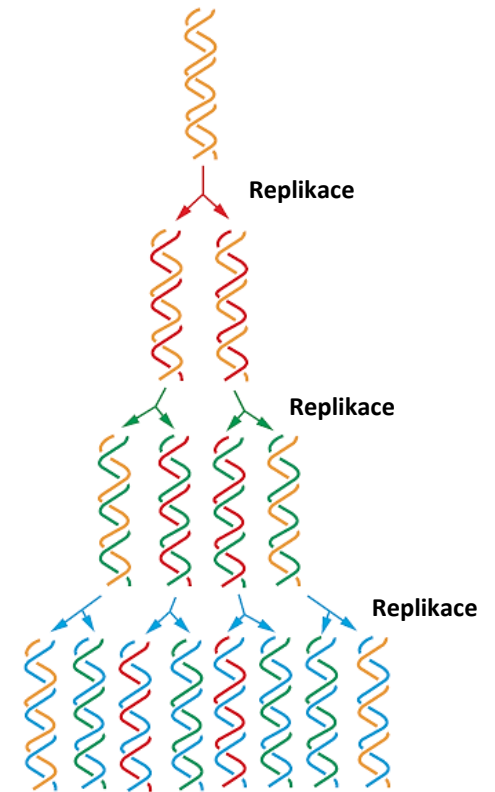
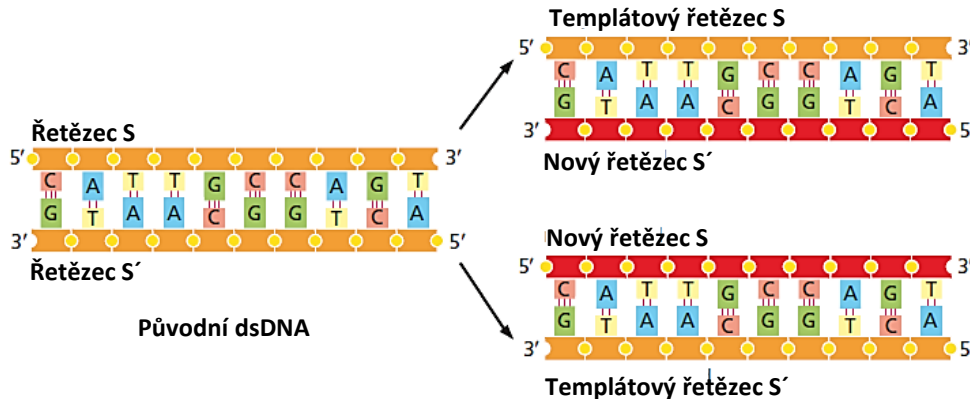
Molekulární biologie pro informatiky - 3

Replikace genomu, reparace a rekombinace DNA

Replikace DNA

Schopnost buňky přežít a množit se závisí na přesném zdvojení genetického materiálu. 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.

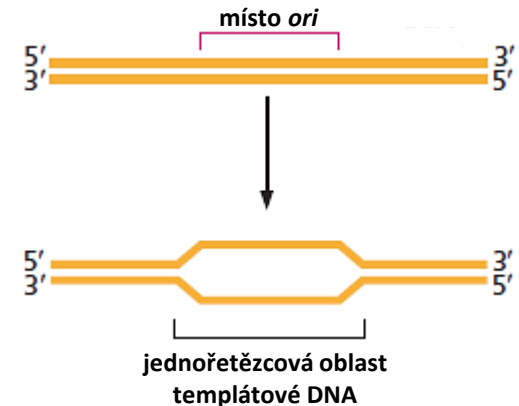


Replikace DNA

- 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*)

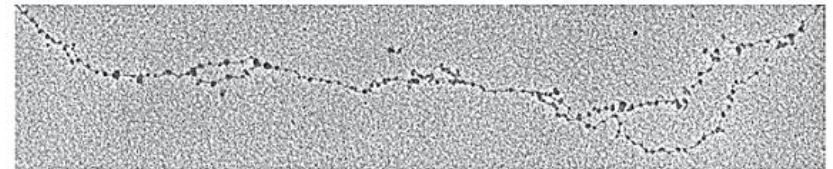
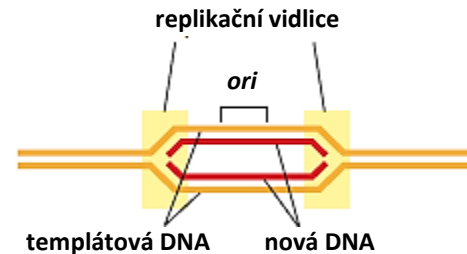
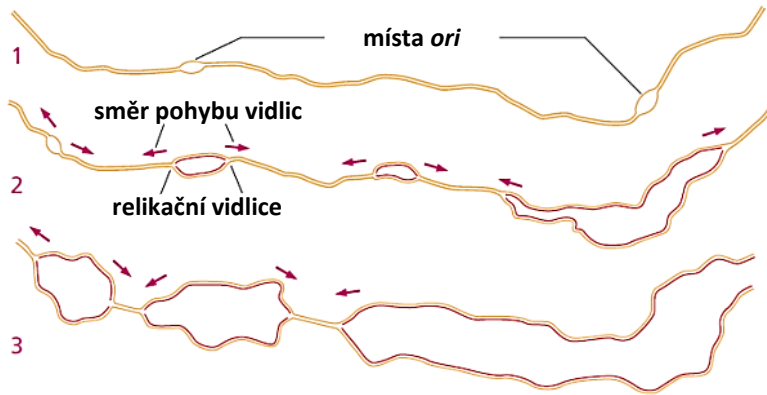
- specifická sekvence DNA bohatá na AT páry
- vazba iniciačních proteinů otvírá strukturu dsDNA
- vazba dalších proteinů zodpovědných za replikaci
- přítomen na každém replikonu
- u bakterií - 1x na chromozomu
- u člověka - 10.000x na jaderné DNA
- 220x na chromozom



Replikace DNA

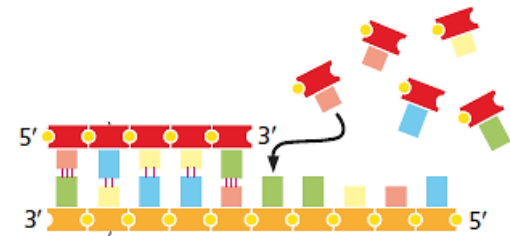
Replikační vidlice

- struktura DNA ve tvaru „Y“ během replikace
- dvousměrná replikace - dvě vidlice pohybující se v opačných směrech od místa *ori*
- rychlost pohybu - bakterie ~ 1000 nukleotidů / s
- člověk ~ 100 nukleotidů / s



DNA polymeráza

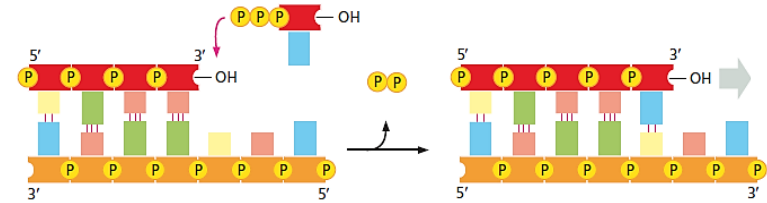
- tvorba nové DNA dle jednoho z původních řetězců
- připojení nukleotidů k 3' konci rostoucího řetězce DNA
- tvorba fosfodiesterové vazby mezi dNTP a DNA



Replikace bakteriální chromozomové DNA

DNA-polymerázy

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



1. DNA-polymeráza I (Kornbergův enzym)

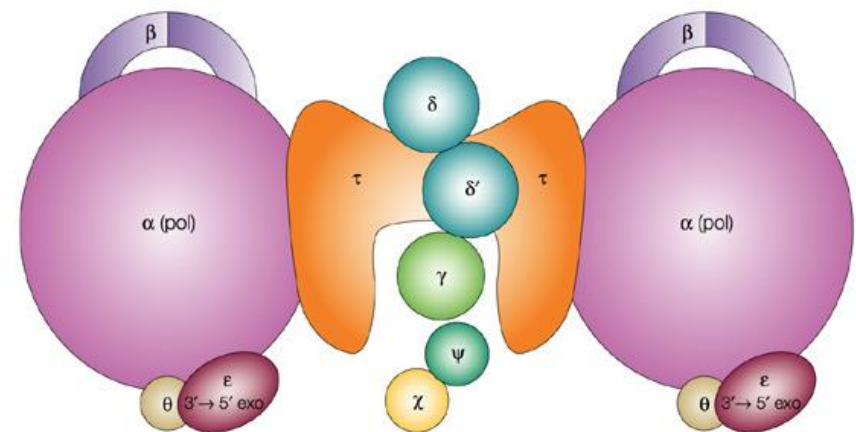
- DNA-primer; odstranění RNA-primerů, syntéza DNA mezi Okazakiho fragmenty, opravy DNA

2. DNA-polymeráza II

- záložní polymeráza, opravy DNA

3. DNA-polymeráza III

- 2x katalytické jádro (α , θ , ϵ) - 8 nt/s
- spojena v dimer (τ) - 20 nt/s
- β -svorka - stabilizace úseků dsDNA
- γ -komplex ($\gamma_2\delta\delta'\psi\chi$) - nakládání β -svorky na DNA v místech RNA-primerů
- 500 nukleotidů/s
- procesivita pro celou molekulu DNA
- 3'-5' exonukleázová aktivita
- RNA-primer; replikace DNA, opravy DNA



Replikace bakteriální chromozomové DNA

DNA-helikáza

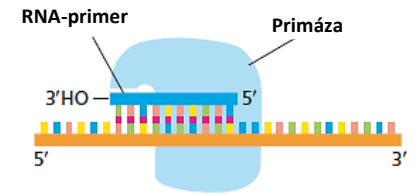
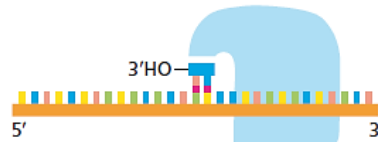
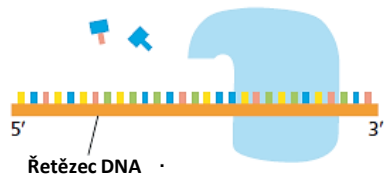
- odvíjení komplementárních řetězců v dsDNA
- DnaB-protein a ν -protein

DNA-gyráza

- topoisomeráza II
- mění kladné nadšroubovicové závitky na záporné

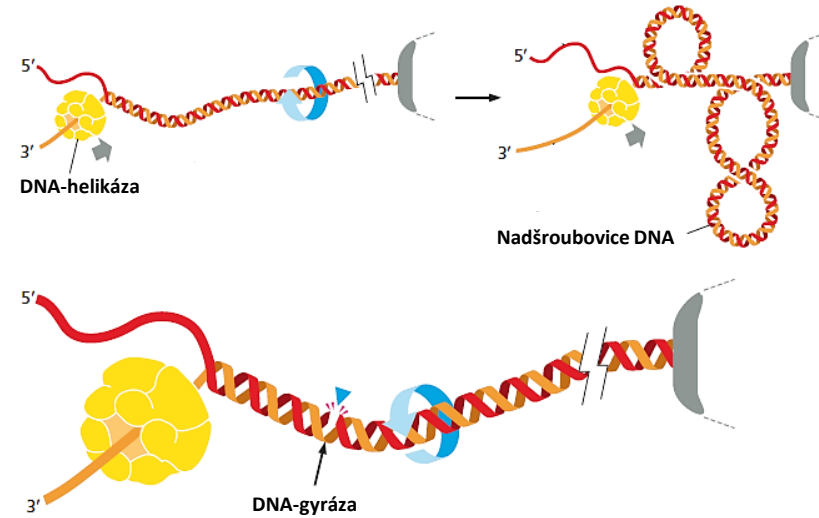
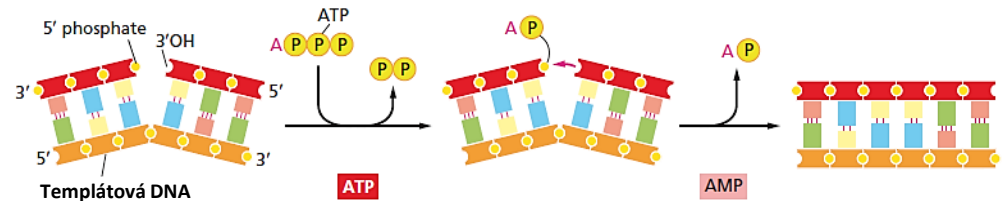
DNA-primáza

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



DNA-ligáza

- ligace polynukleotidových řetězců
- spojení Okazakiho fragmentů



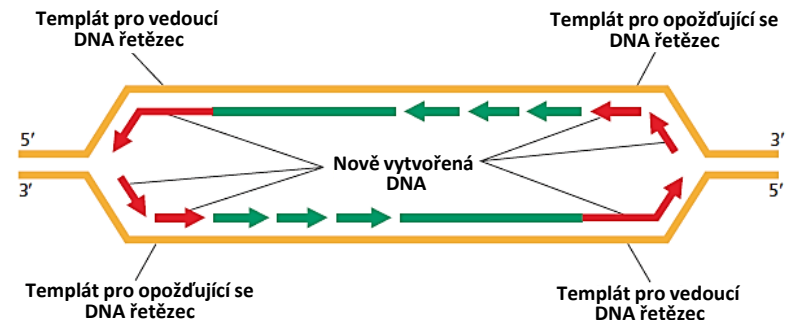
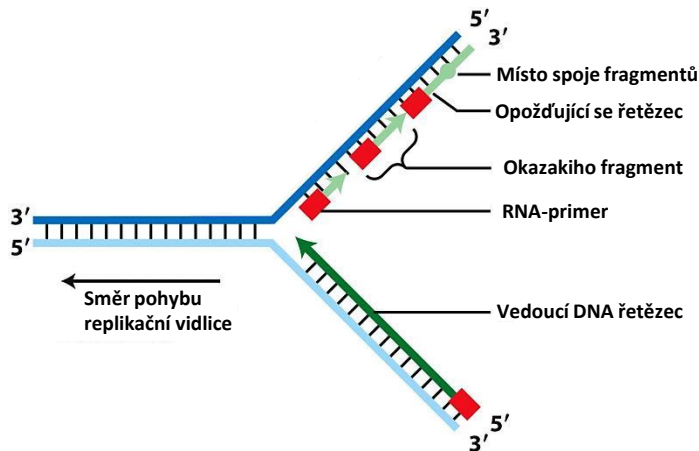
Semikontinuální syntéza dsDNA při replikaci

Vedoucí DNA řetězec

- kontinuální syntéza na řetězci 3' → 5'
- jeden RNA-primer v místě *ori*

Opožďující se DNA řetězec

- diskontinuální syntéza přes Okazakiho fragmenty na řetězci 3' → 5'
- RNA-primer pro každý Okazakiho fragment, odbourány od 5'-konce
- prodloužení Okazakiho fragmentů na 3'-konci, spojení do souvislého řetězce DNA



Iniciace replikace

Počátek replikace *oriC*

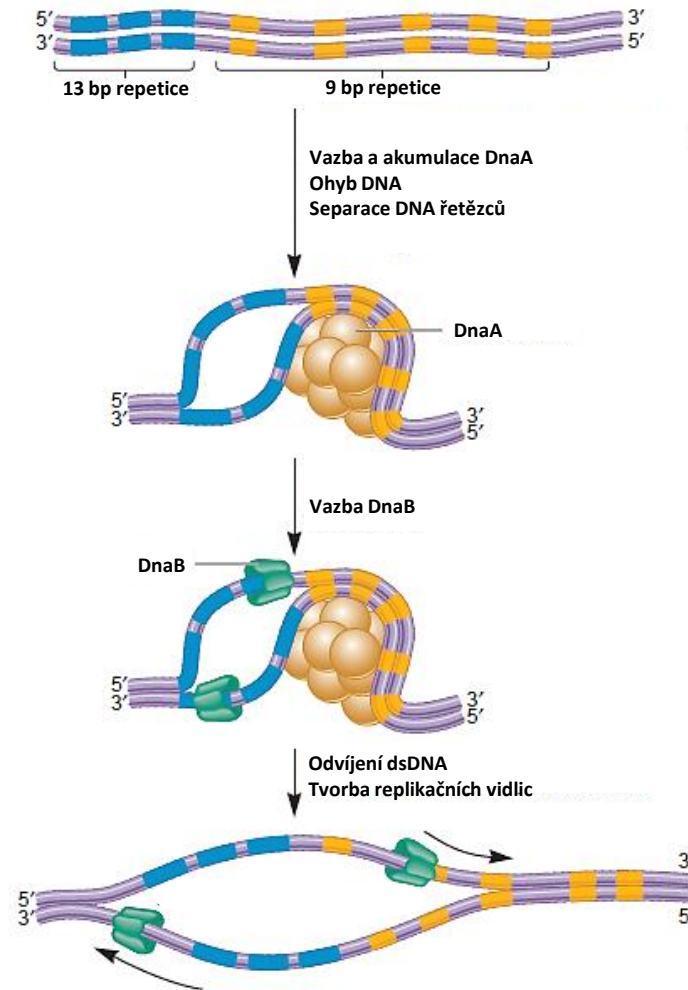
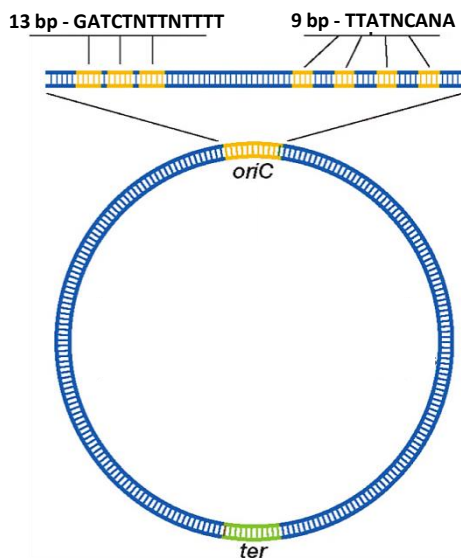
- 13 bp tandemová repetice bohatá na AT páry
- 9 bp repetice: vazba DnaA

DnaA - rozeznání *oriC*, převod do otevřené formy

DnaB - vazba na otevřený úsek DNA

- odvíjení dsDNA, vznik replikačních vidlic

SSB-proteiny - vazba na jednořetězcové úseky

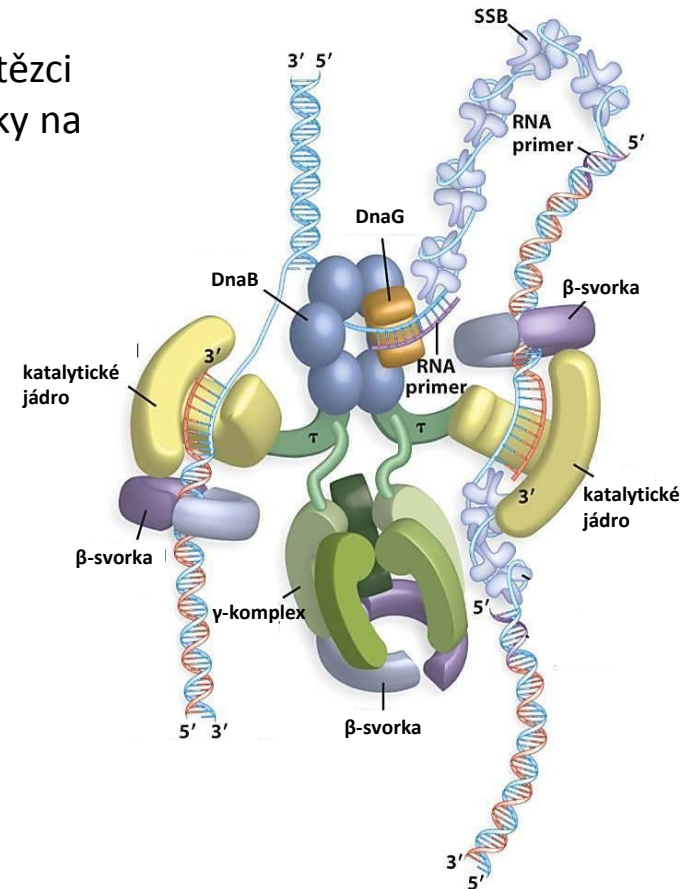
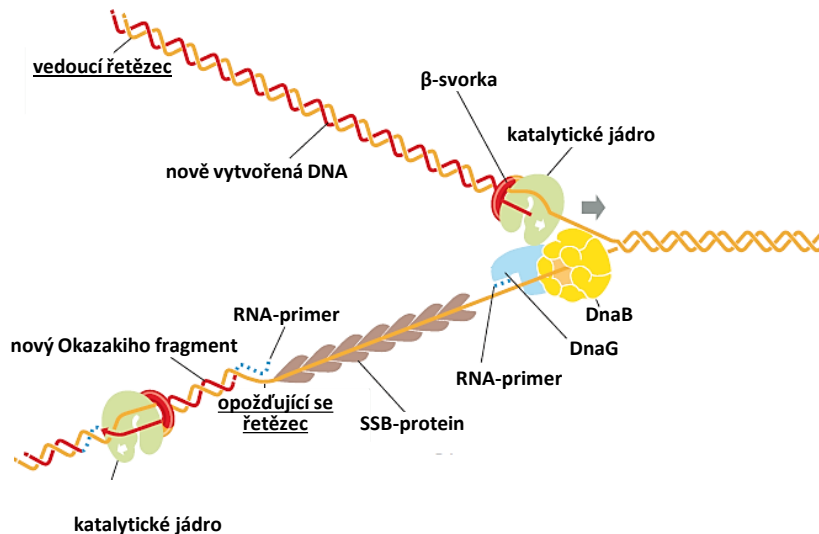


Elongace replikace

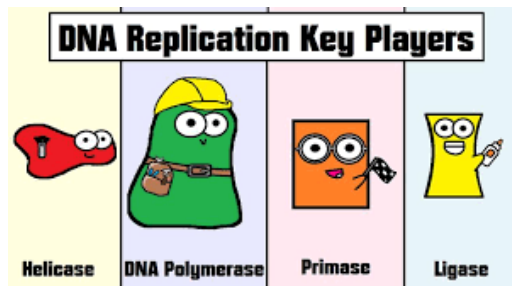
- vedoucí řetězec - RNA-primer na počátku replikace
- opožďující se řetězce - RNA-primer na začátku každého Okazakiho fragmentu
- primozom = komplex DnaB a DnaG (DNA-primáza)

Koordinace syntézy obou DNA řetězců ve směru replikační vidlice

- ohyb DNA, struktura DNA-polymerázy III
- katalytická jádra umístěna každé na jednom matricovém řetězci
- γ -komplex umístěn asymetricky, opakovaně nakládá β -svorky na opožďující se řetězec
- pohyb katalytického jádra mezi jednotlivými β -svorkami



Elongace replikace



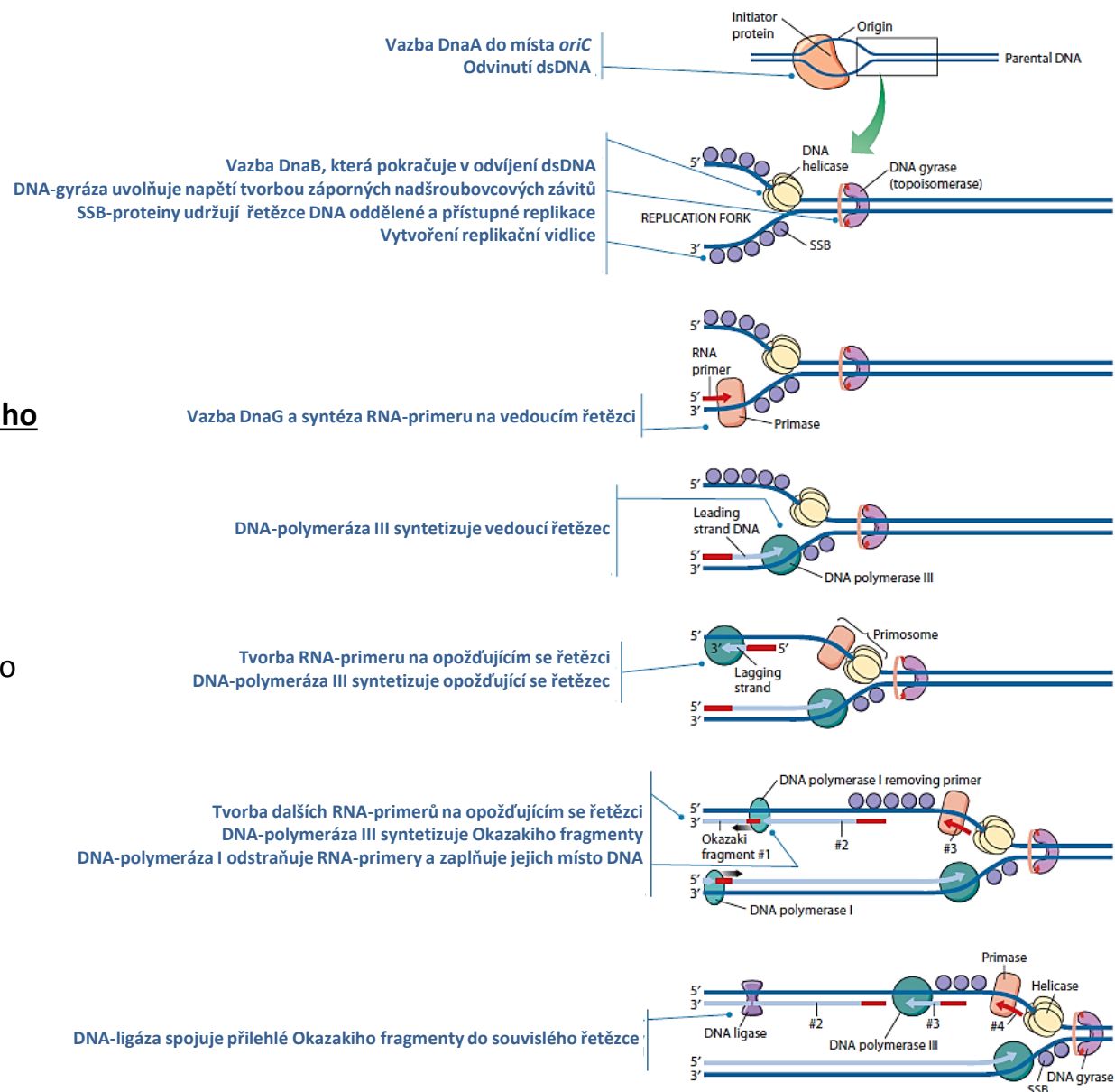
Tvorba souvislého řetězce z Okazakiho fragmentů

DNA-polymeráza I

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

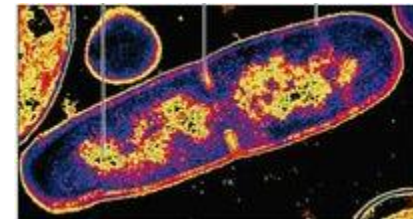
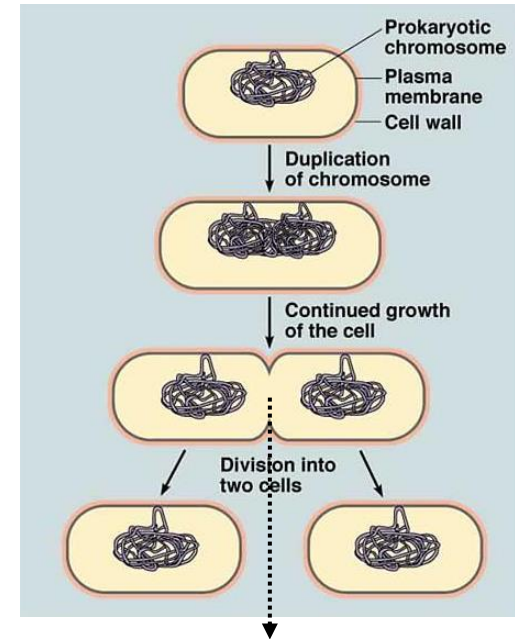
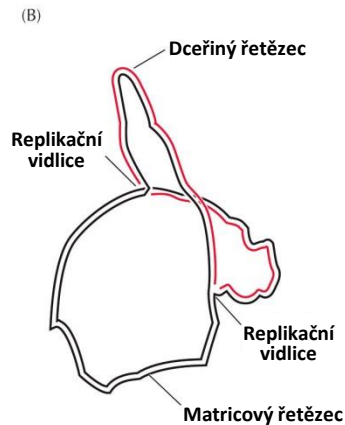
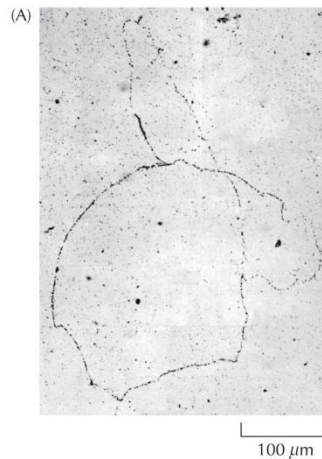
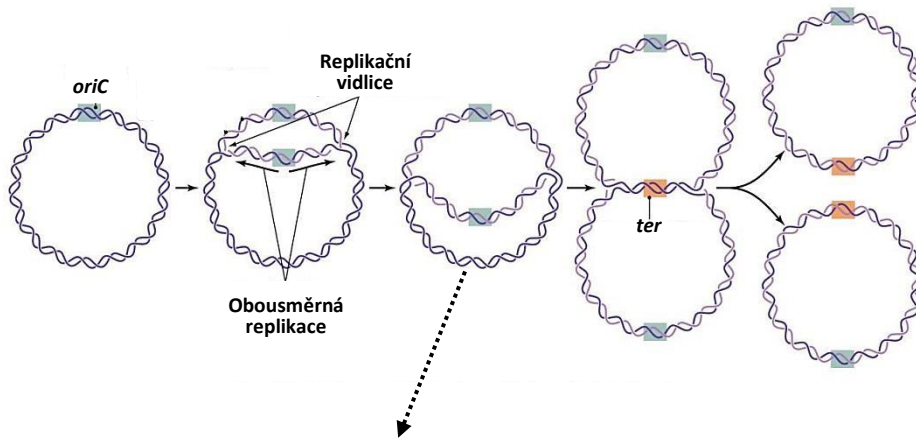
DNA-ligáza

- spojuje doplněné fragmenty



Terminace replikace

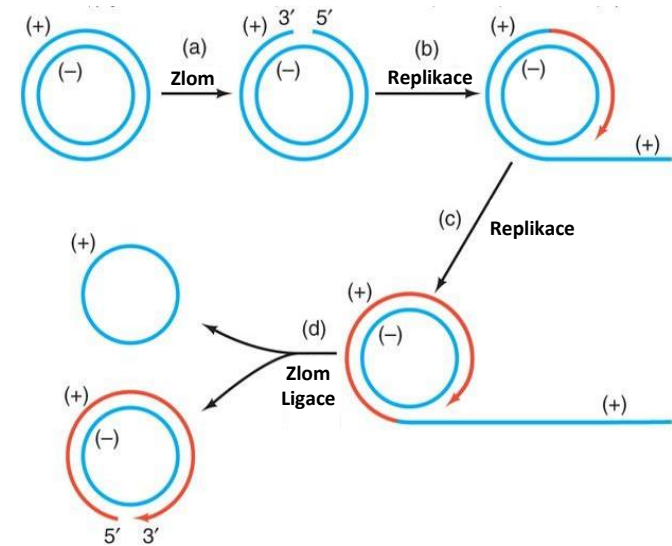
- terminátor replikace, *ter*
- vazba specifických proteinů, které inhibují DnaB a zastavují tvorbu replikační vidlice
- topoizomeráza typu II odděluje vzniklé chromozomy



Replikace plazmidové DNA

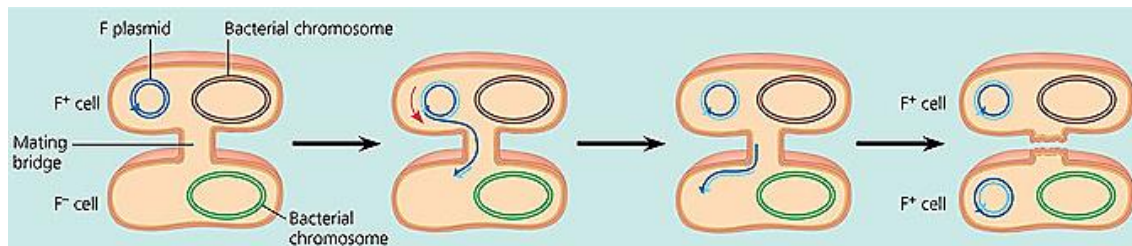
Replikace plazmidů otáčivou kružnicí

- v místě *ori* štěpí Rep-protein (+) řetězec
- vzniklý 3'-konec prodlužován, vytlačení (+) řetězce
- zlom (+) řetězec mezi původní a novou DNA, ligace
- vzniká (i) kružnicová dsDNA
(ii) kružnicová ssDNA (doplnění přes Ok. fr.)



Replikace konjugativních plazmidů během konjugace

- replikaci otáčivou kružnicí, vytlačovaný (+) řetězec přestupuje do recipientní buňky
- (-) řetězec zůstává v donorové buňce, kontinuální syntéza
- (+) řetězec se v recipientní buňce dosyntetizuje přes Okazakiho fragmenty



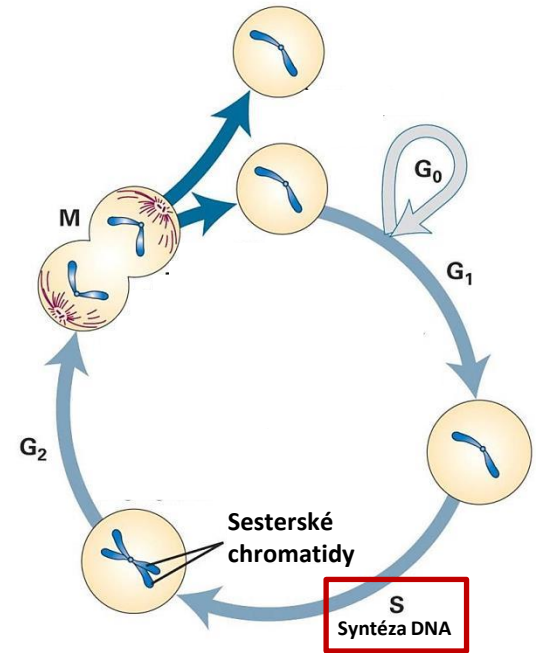
Replikace chromozomové DNA u eukaryot

Podobné rysy jako u replikace bakteriálního chromozomu:

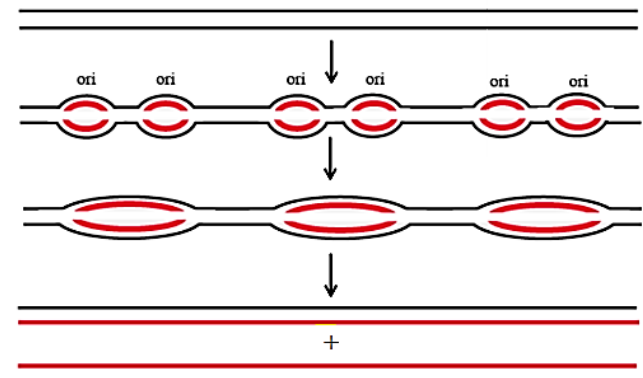
- semikonzervativní a semikontinuální
- replikační vidlice, replikační proteiny
- iniciace, elongace a terminace

Odlišnosti od replikace prokaryot:

- replikace 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 ⁶	30	1
<i>S. cerevisiae</i>	1,4 x 10 ⁷	3	330
<i>D. melanogaster</i>	1,8 x 10 ⁸	2,6	3.500
<i>Mus musculus</i>	2,5 x 10 ⁹	2,2	25.000
<i>Homo sapiens</i>	3,2 x 10 ⁹	3	>10.000 ?



Replikace chromozomové DNA u eukaryot

DNA-polymerázy

u eukaryot nalezeno nejméně 13 druhů

$\alpha, \delta, \varepsilon$	replikace jaderné DNA
β	opravy DNA
γ	replikace mitochondriální DNA
$\tau, \kappa, \eta, \dots$	funkce neznámá

DNA-polymeráza α

- tetramer (RNA-primáza), tvorba RNA-primerů a části Okazakiho fragmentů
- mírná procesivita, 5'-3' exonukleázová aktivita

DNA-polymeráza β

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

DNA-polymeráza γ

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

DNA-polymeráza δ

- 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 ε

- úzce souvisí s δ , hlavní polymeráza pro syntézu vedoucího řetězce

Iniciace replikace

Replikační počátky po 1 - 300 kbp

- na savčích chromozomech bez specifických sekvencí, bohaté na AT páry, 500 - 50.000 bp

Pre-iniciační komplex

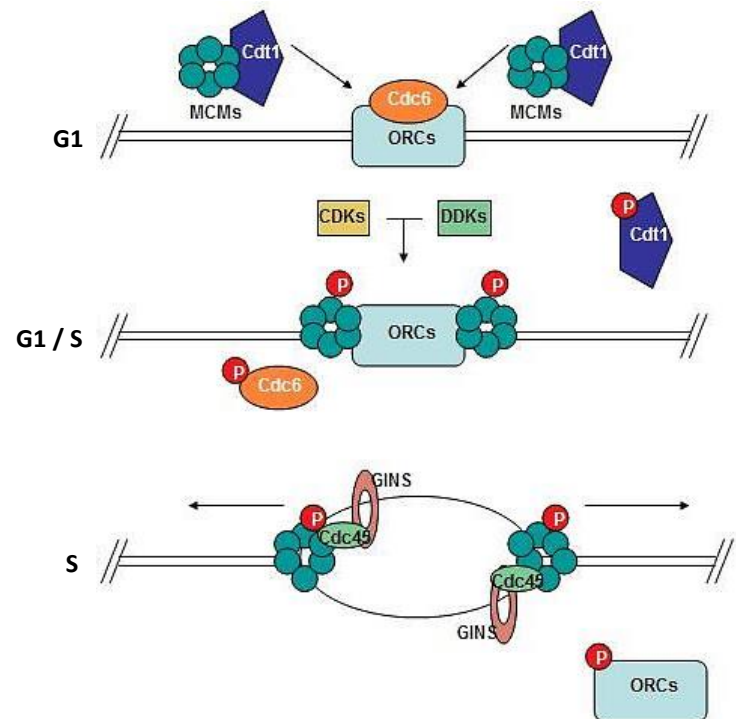
- sestaven v G1 fázi buněčného cyklu
- replikační počátek rozeznán proteinem ORC
- vazba CDC6, CDT1, MCM2-7

Při vstupu do S-fáze jsou složky pre-iniciačního komplexu fosforylovány, uvolnění už nepotřebných složek, aktivace MCM2-7

Iniciační komplex

- Mcm2-7 spolu s dalšími proteiny (CDC45, GINS) plní funkci DNA-helikázy
- vazba DNA-polymeráz do replikační vidlice

Výsledkem iniciace je založení replikační vidlice s navázanými proteiny, které se budou účastnit elongační fáze replikace.



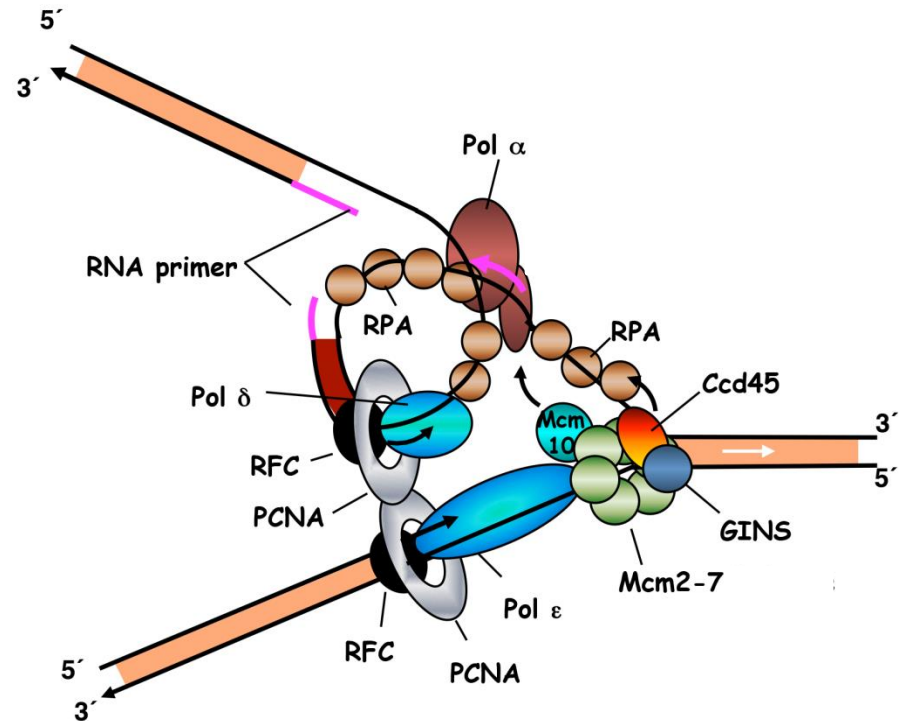
Elongace replikace

Vedoucí řetězec

- jediný primer vytvořený DNA-polymerázou α
- RFC-protein nakládá PCNA na konec RNA-primeru
- PCNA-protein vytěsňuje DNA-polymerázu α a zvyšuje procesivitu DNA-polymerázy ϵ , která se na něj váže a syntetizuje DNA

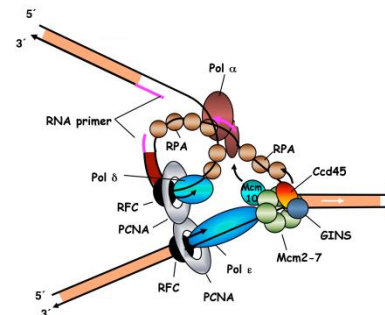
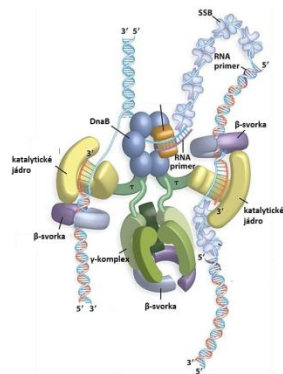
Opožďující se řetězec

- RPA pokrývá jednořetězcové úseky DNA
- DNA-polymeráza α tvoří RNA-primer (10 nt) a část Okazakiho fragmentu (10-20 nt)
- PCNA vytlačuje DNA-polymerázu α
- RNázaH odstraňuje RNA-primery z 5'-konce
- DNA-polymerázou δ dokončuje Okazakiho f.
- DNA-ligáza spojuje Okazakiho f.



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 α
Syntéza vedoucího řetězce	Pol3	Pol ϵ
Syntéza opožďujícího se řetězce	Pol3	Pol α , Pol δ
Posuvná svorka	β -svorka	PCNA
Nakládání svorky	γ -komplex	RCF
Odstranění RNA-primeru	Pol1	RnázaH
Dokončení Okazakiho fragmentů	Pol1	Pol δ
Spojení Okazakiho fragmentů	DNA-ligáza	DNA-ligáza



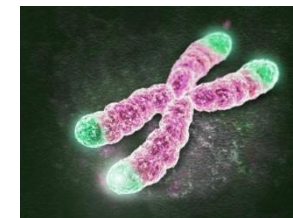
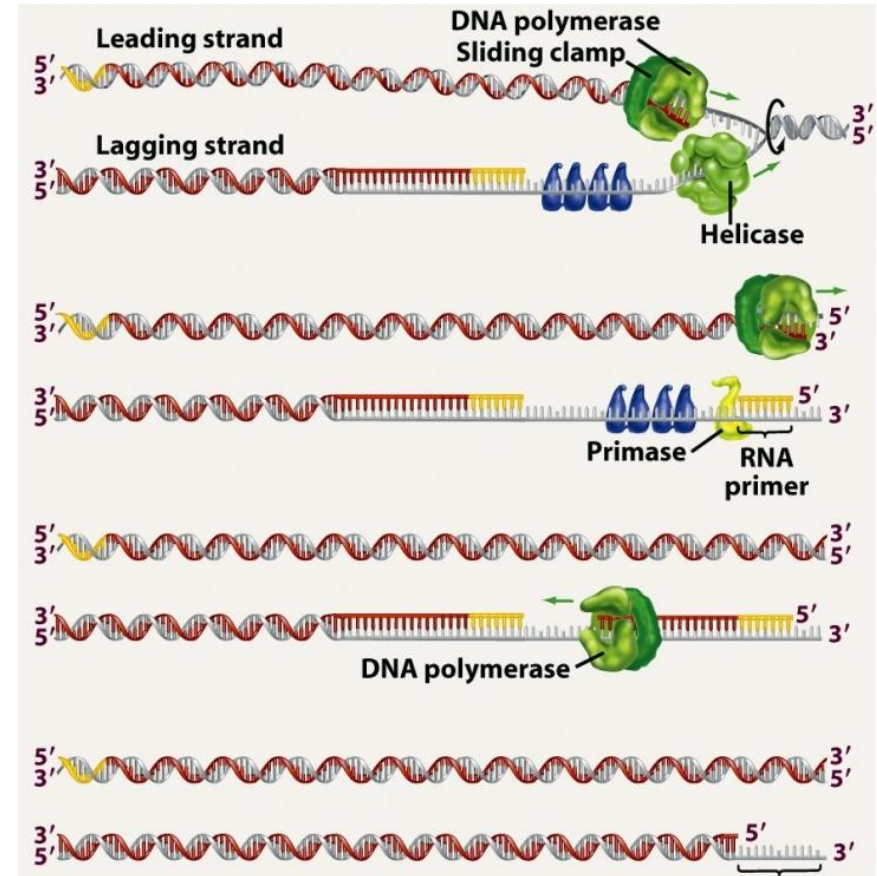
Terminace replikace

Problém zakončení replikace lineárních dsDNA

- po odstranění RNA-primeru na 3'-konci matricového řetězce pro opožďující se řetězec vzniká prázdné místo, které DNA-polymeráza nedokáže zaplnit
- bez strategie, jak tento úsek doreplikovat by docházelo ke zkracování chromozomů a ztrátě genetické informace

Telomery

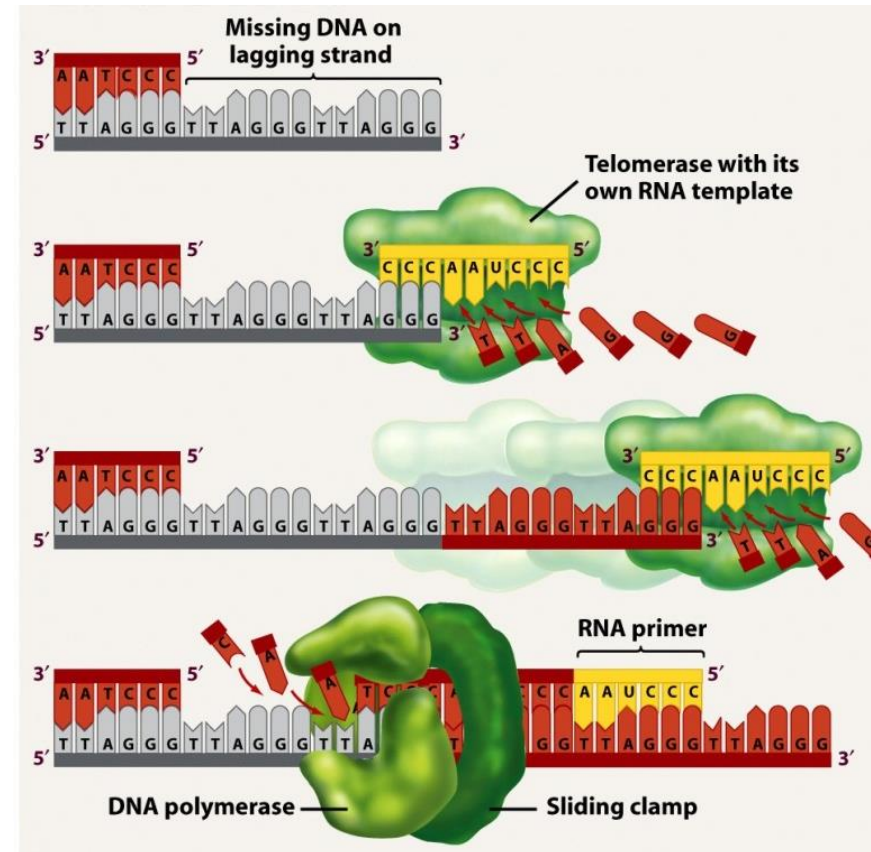
- druhově specifické repetitivní sekvence
- udržovány telomerázou, bez ní dochází ke zkracování telomer (~50-150 bp / dělení)
- senescence či smrt buněk po zkrácení telomer pod kritickou hranici
- ochrana chromozomů před degradací
- rozeznány jako skutečné konce chromozomů, odlišený od dvouřetězcových zlomů uprostřed chromozomů



Terminace replikace

Telomeráza

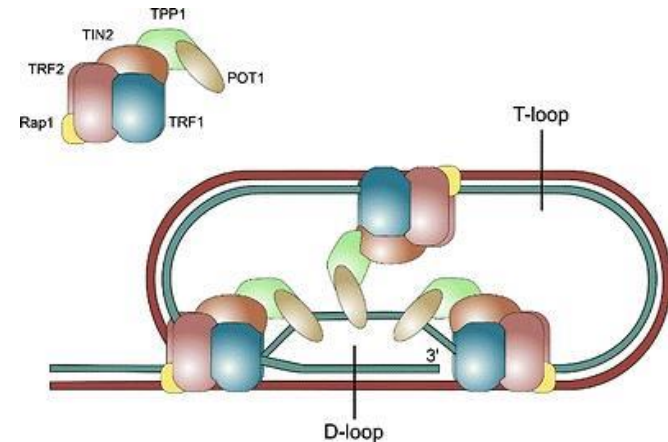
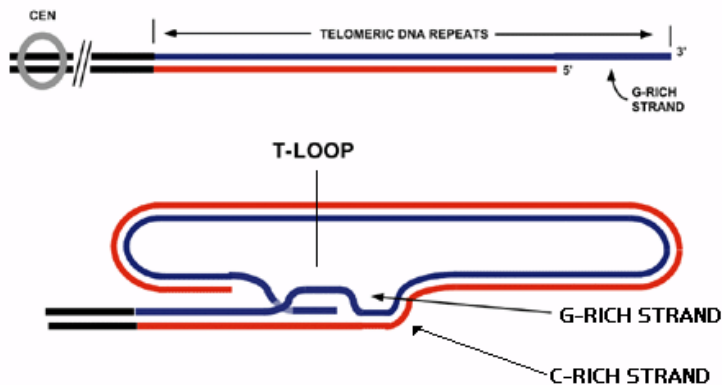
- ribonukleoproteinový komplex složený z
 - (i) RNA (templát)
 - (ii) RNA-dependentní-DNA-polymeráza
- vazba k přečnívajícímu 3'-konci DNA přes RNA
- tento konec je využit jako primer a podle RNA matrice prodloužen o telomerické sekvence
- syntéza tandemových repetit zajištěna translokací telomerázy podél vznikajícího řetězce
- na prodlouženém 3'-konci vytvoří replikační enzymy další Okazakiho fragment
- původní délka chromozomu je zachována
- přítomna v zárodečných/kmenových buňkách, nepřítomna v somatických buňkách
- reaktivace v nádorových buňkách



Terminace replikace

Ochrana přechýlajících 3'-konců 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
 - ochrana před endonukleázami, potlačení oprav DNA, regulace telomerázy

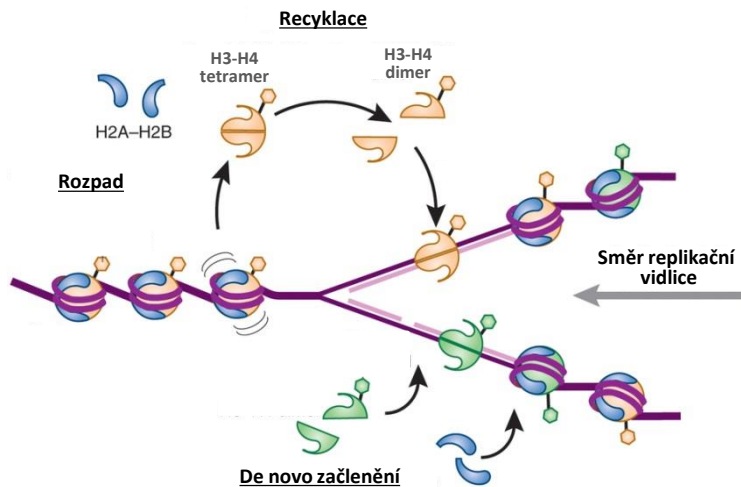
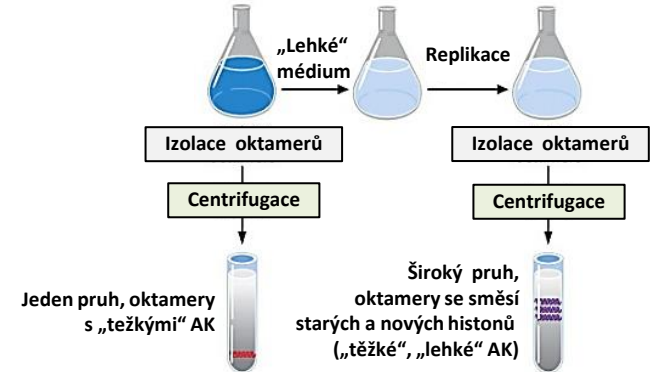
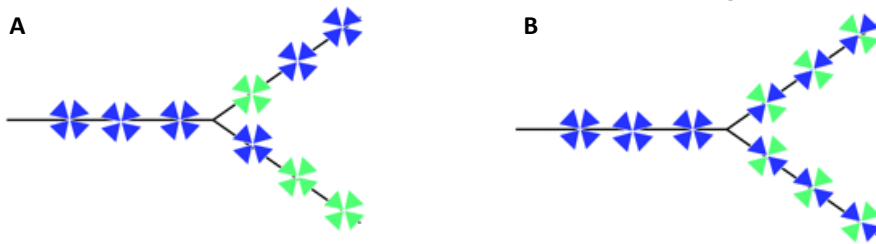


Replikativní senescence

- způsobena zkrácením telomer a rozpadem T-smyčky
- buňky zastaví růst, vstoupí do senescence nebo spustí apoptózu
- obrana před nestabilitami v genomu a vývojem nádorů (telomery by byly rozeznány jako poškození DNA, odhalené konce by mohly vést k fúzi chromozomů)

Nukleozomy během replikace

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



- rozpad nukleozomů během replikace
- rychlé opětovné sestavení
- nové oktamery jsou náhodnou směsí původních a nových histonů

Přesnost replikace DNA

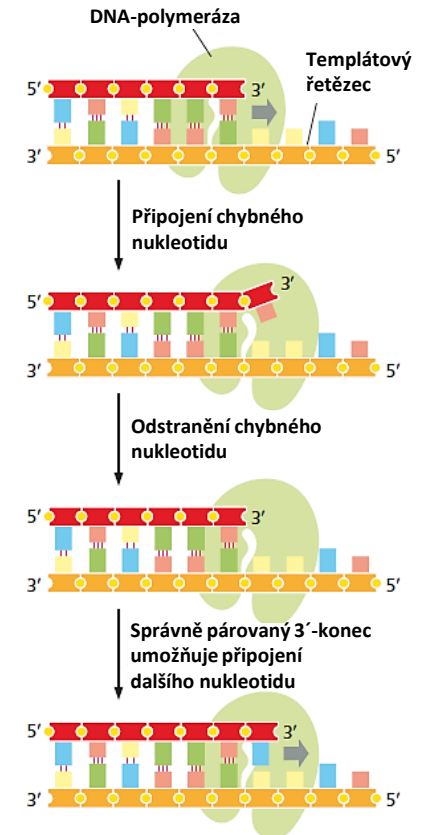
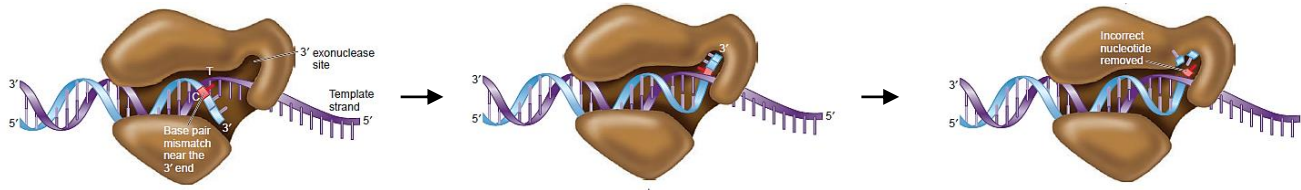
Chybovost DNA-polymerázy: 1 chyba na 10^7 bází

Přesnost replikace zajištěna párováním bází a vlastnostmi DNA-polymerázy

- (i) přednostní připojení nt se správným párováním
- (ii) odstranění chybného nt procesem zvaným proofreading

Proofreading

- kontrola správného párování začleněných nukleotidů během replikace
- špatně začleněný nukleotid odstraněn 3'-5' exonukleázovou aktivitou
- polymerační a korekční aktivita DNA-polymerázy zajištěna různými katalytickými doménami enzymu

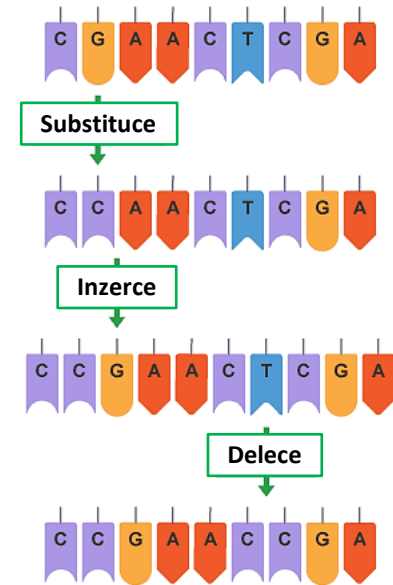


Molekulární podstata mutagenese

- zachování genomu buněk vyžaduje
 - přesnost replikace DNA
 - schopnost opravit poškozenou DNA
- mutace jsou dědičné změny genotypu, jejichž molekulární podstatou jsou nukleotidové substituce, delece a inserce

Substituce

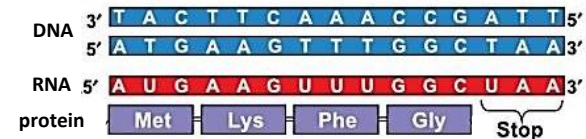
- výměna nukleotidu
- synonymní substituce: vznik kodónu se stejným smyslem
AAG (Lys) ---> AAA (Lys)
- nesmyslná mutace: vznik terminačního kodonu
AAG (Lys) ---> TAG (STOP)
- neutrální substituce: změnou aminokyseliny se nemění konformace peptidového řetězce
AAG (Lys) ---> AGG (Arg)
- mutace měnící smysl kodonu
AAG (Trp) ---> ACG (Thr)



Molekulární podstata mutagenese

Delece, inserce

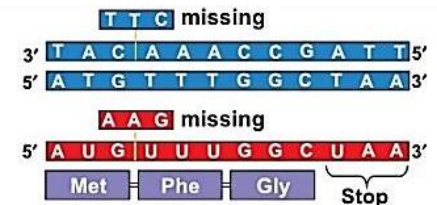
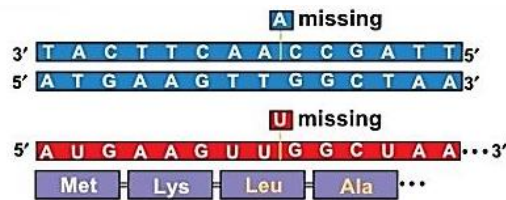
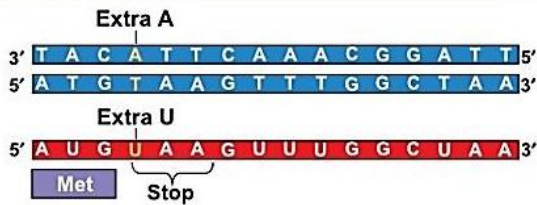
- ztráta / vložení nukleotidu(ů)
- posunové mutace: změna čtecího rámce



jednonukleotidová inserce

jednonukleotidová delece

trinukleotidová delece



Standardní alela: převládá v populaci, funkční

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

Spontánní mutace: vznikají bez účinku mutagenu

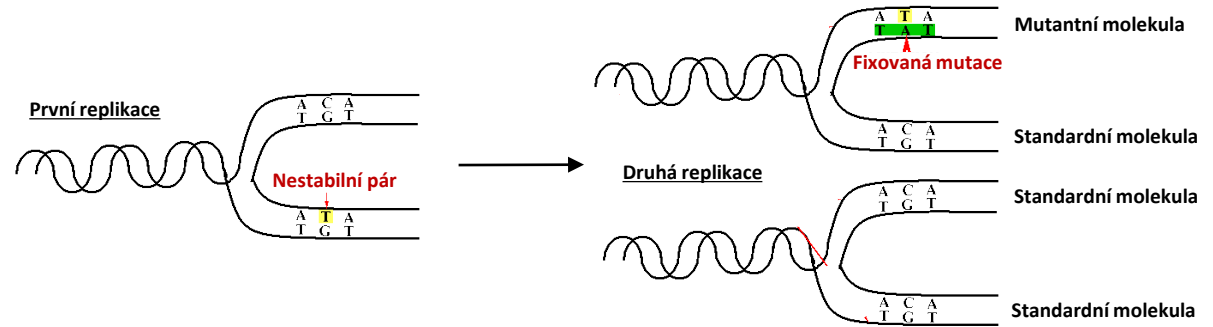
Indukované mutace: vyvolané mutagenem

Mutagen

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

Spontánní mutace

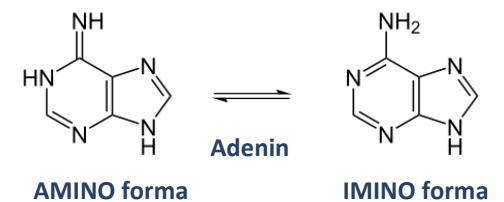
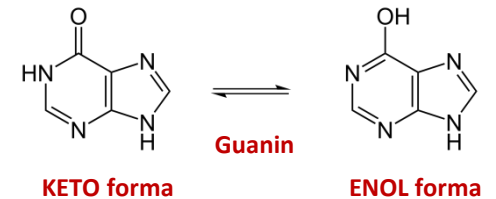
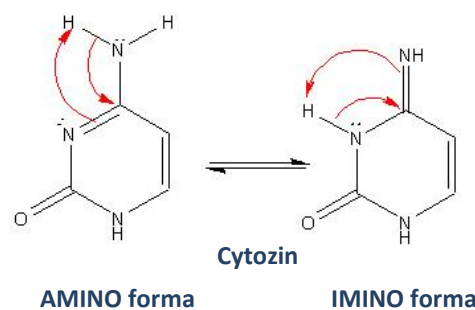
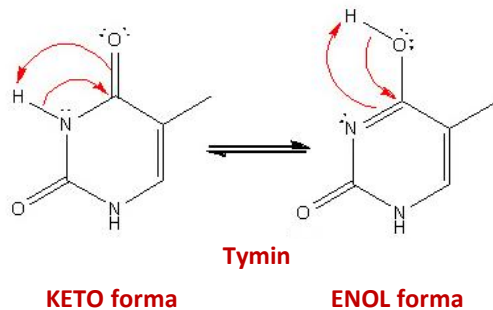
Pokud není chybné párování bází opraveno, dochází při dalších replikacích k fixaci mutace.



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



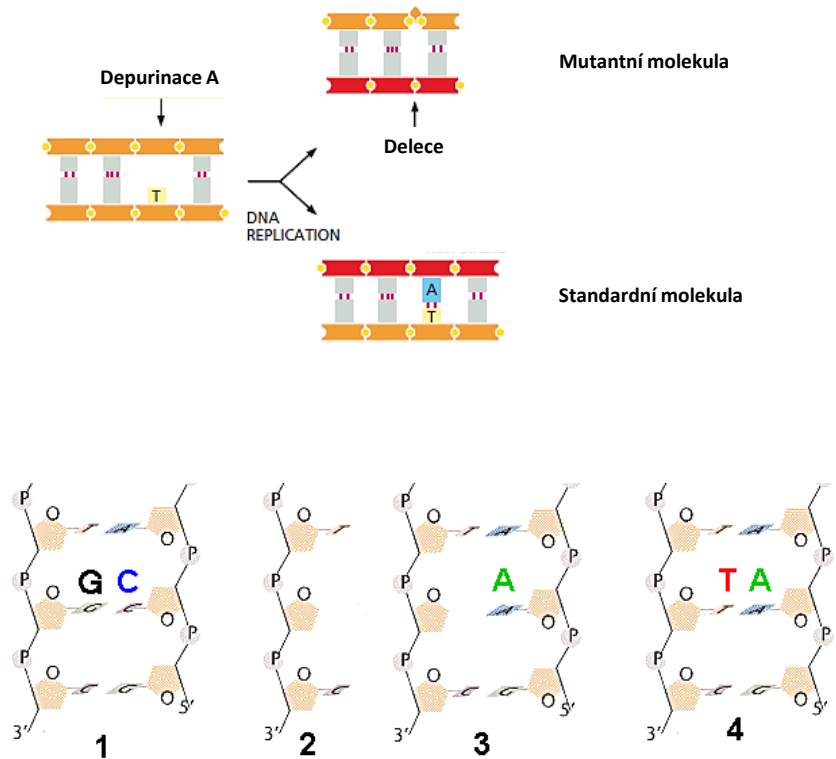
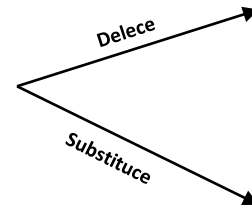
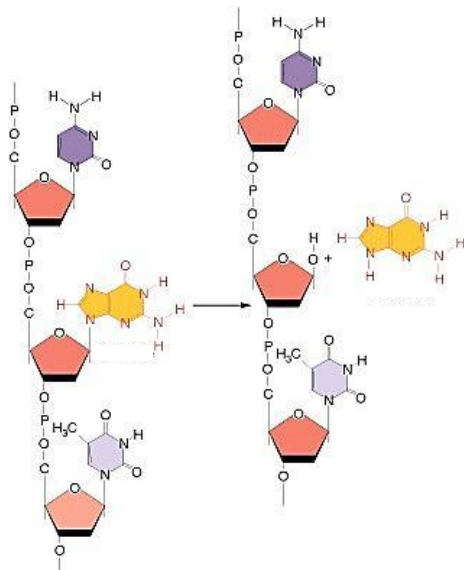
Spontánní mutace

2. Kolísavost párování bází

- vznik párů CT, GA, TG

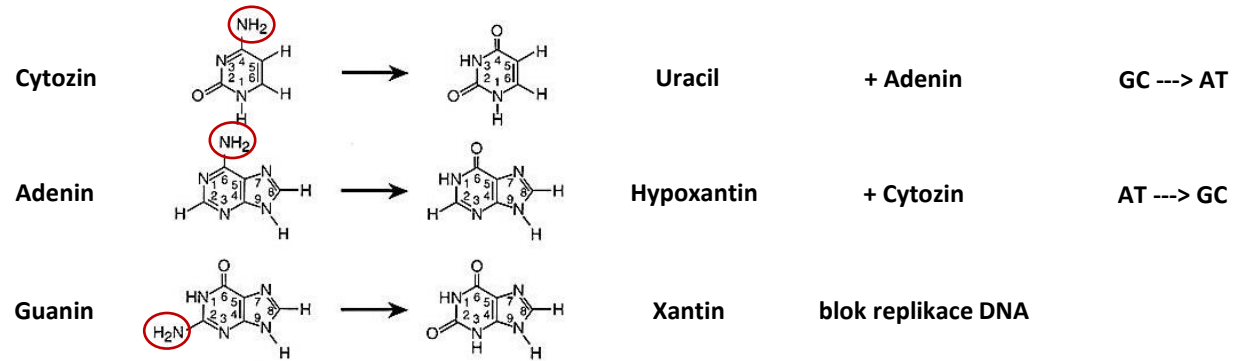
3. Depurace a depyrimidinace

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



Spontánní mutace

4. Deaminace

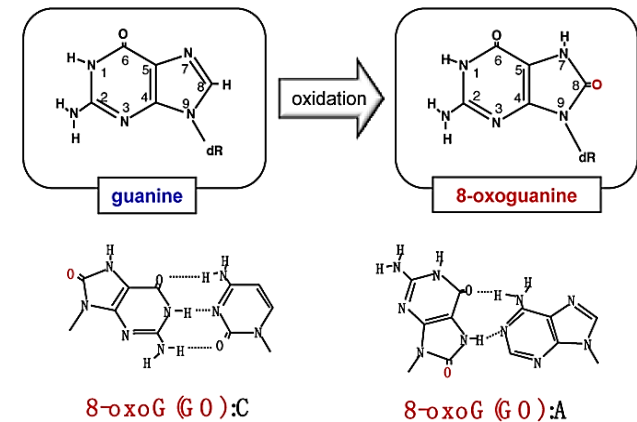
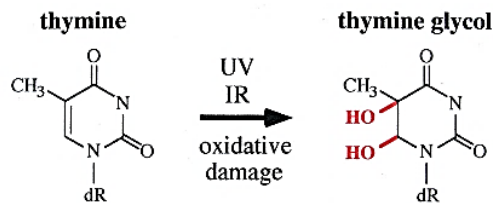


5. Inkorporace uracilu do DNA

- místo thyminu, odstraňován uracil-DNA-glykosylázou

6. Oxidativní poškození DNA

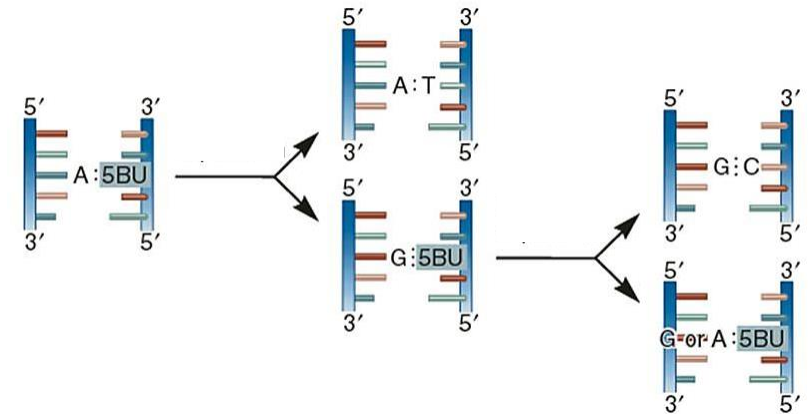
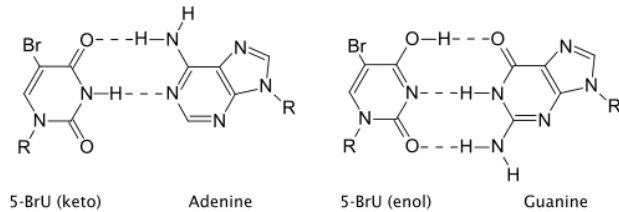
- vyvolává především hydroxylový radikál (OH●)
- 8-oxodeoxyguanozin (8-OxodG) se přednostně páruje s A
- tyminglykol zastavuje replikaci



Indukované mutace - chemomutageny

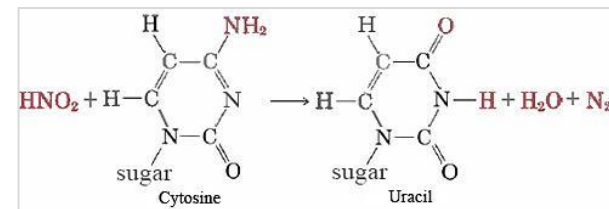
Analogy bází

- purinové a pyrimidinové deriváty
- např. 5-bromuracil: analog tyminu, AT ---> GC



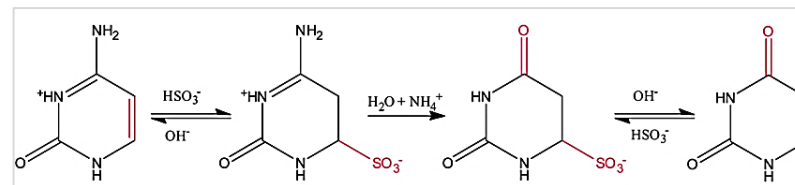
Kyselina dusitá (HNO₂)

- oxidativní deaminace bází, AT <---> GC
- vznik v žaludku z NaNO₃



Hydrogensířičitan (HSO₃⁻)

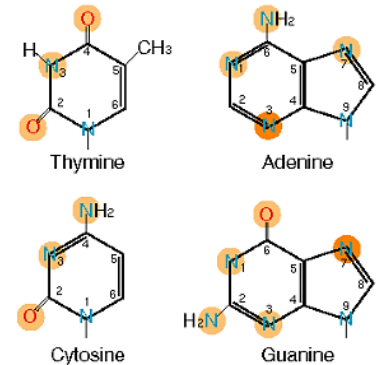
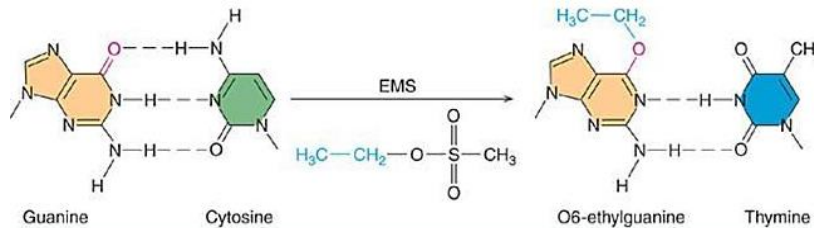
- deaminace C, GC ---> AT



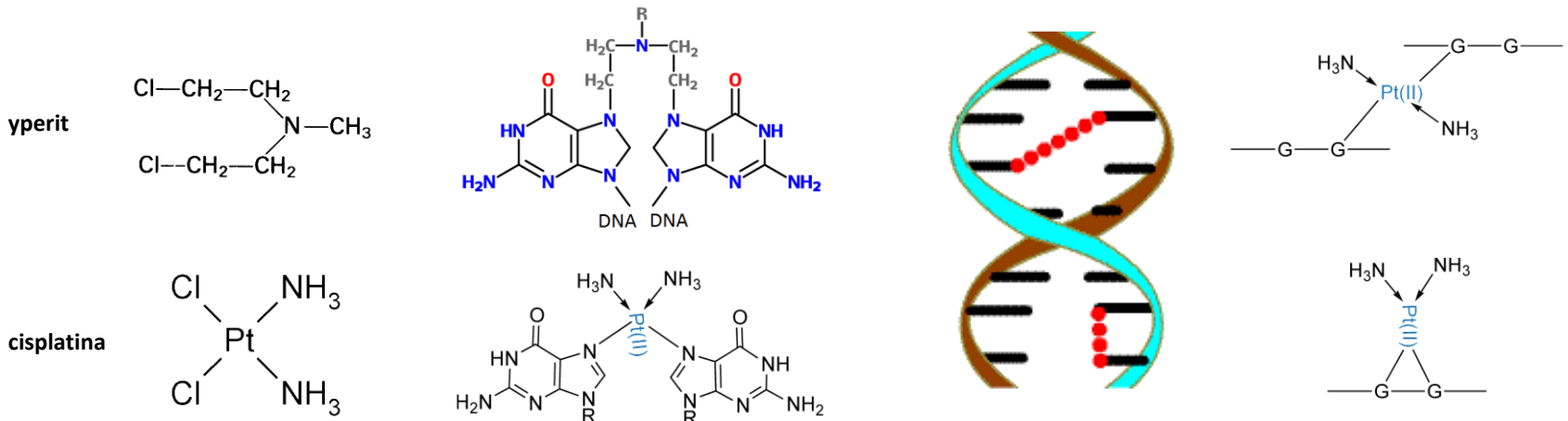
Indukované mutace - chemomutageny

Alkylační látky

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



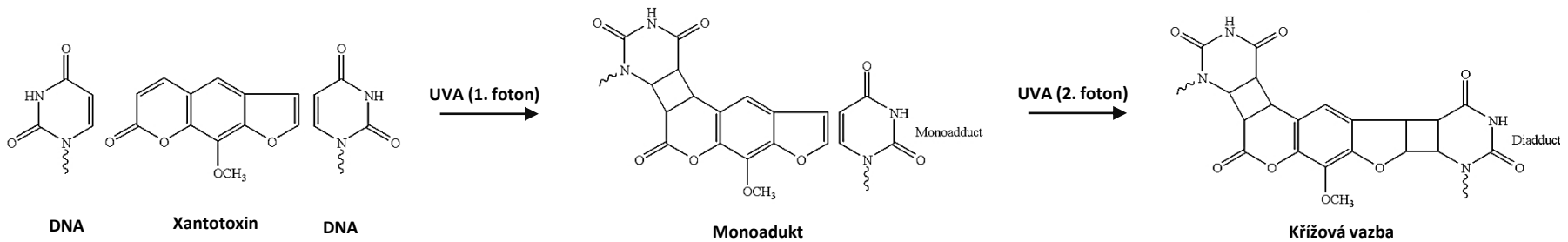
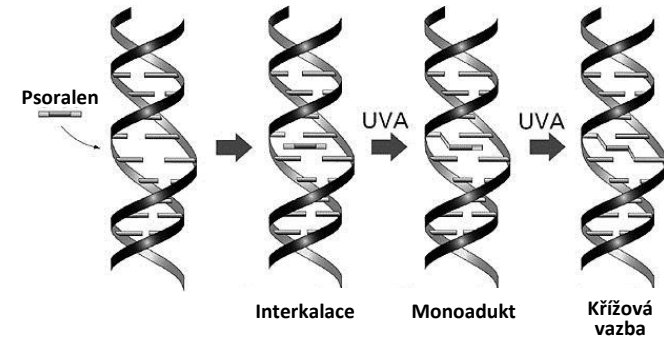
- dvojfunkční** - dvě reaktivní skupiny, křížové vazby mezi dvěma nukleofilními centry
- zástava replikace DNA, př. yperit (hořčičný plyn)



Indukované mutace - chemomutageny

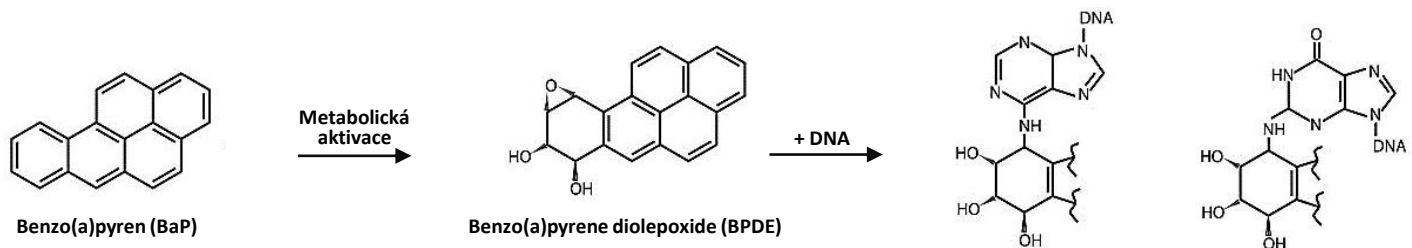
Psoraleny

- interkalace mezi sousední nukleotidy, 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

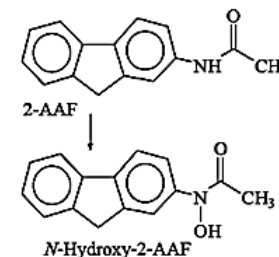
Promutageny jsou samy o sobě neškodné. Vyžadují metabolickou aktivaci, aby se staly mutageny.

Benzo(a)pyren

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

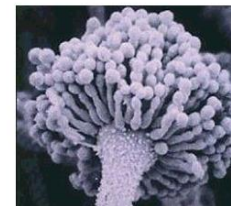
2-acetylaminofluoren (AAF)

- 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)
- aflatoxinu M₁ jeden z nejsilnějších jaterních mutagenů



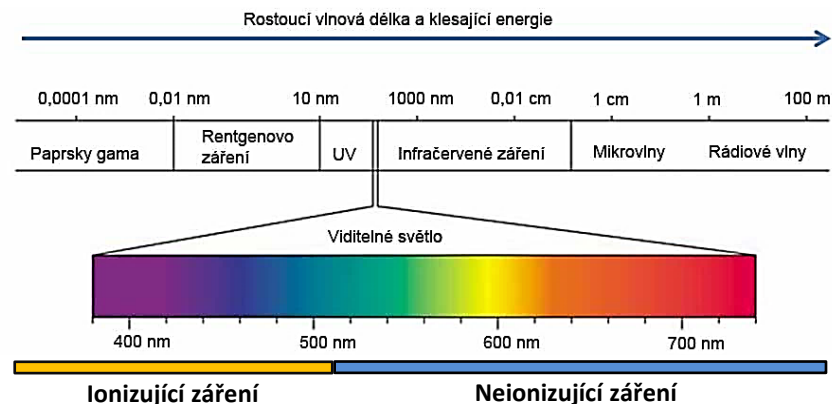
Dusičnany, dusitany

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

Indukované mutace - fyzikální mutageny

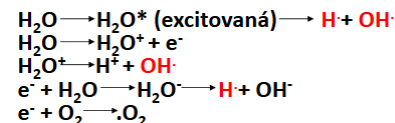
Ionizující záření

- 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 zlomů DNA



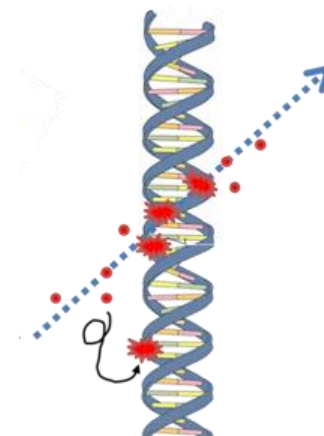
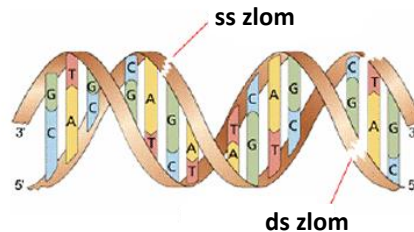
(i) nepřímý účinek (65 % poškození)

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



(ii) přímý účinek (35 % poškození)

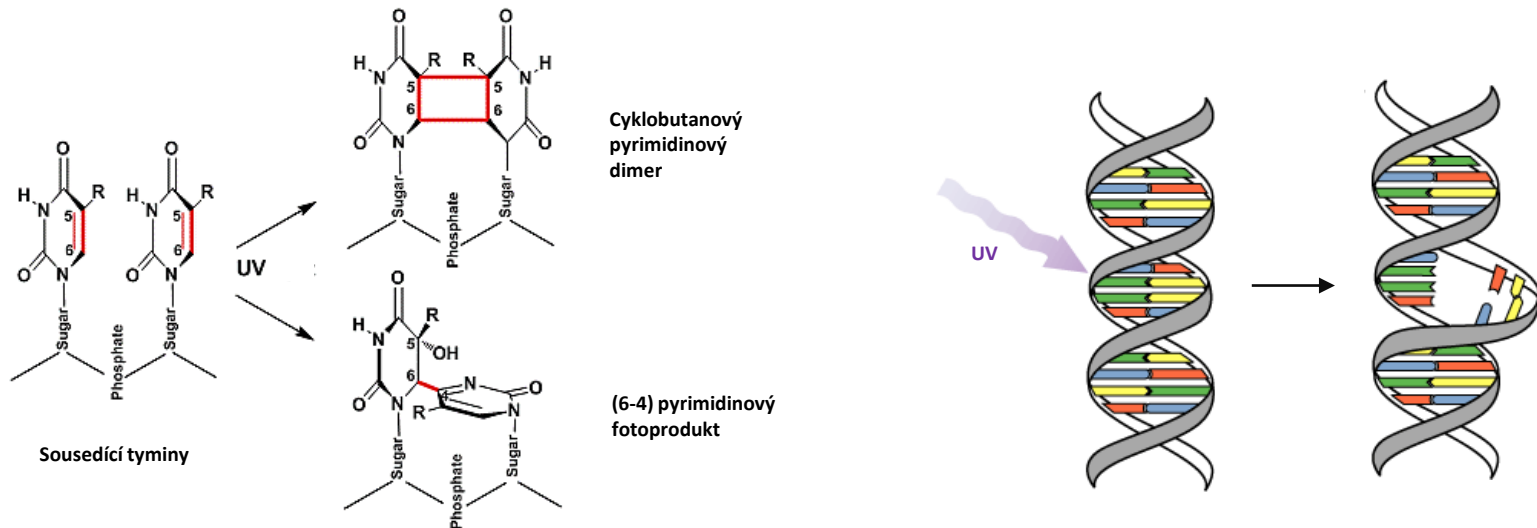
- DNA absorbuje energii a ionizuje se, štěpení vazeb a zlomům DNA
- př. ozáření dávkou 1 Gy vyvolá v buňce 15 - 60 ds zlomů, > 1000 ss zlomů



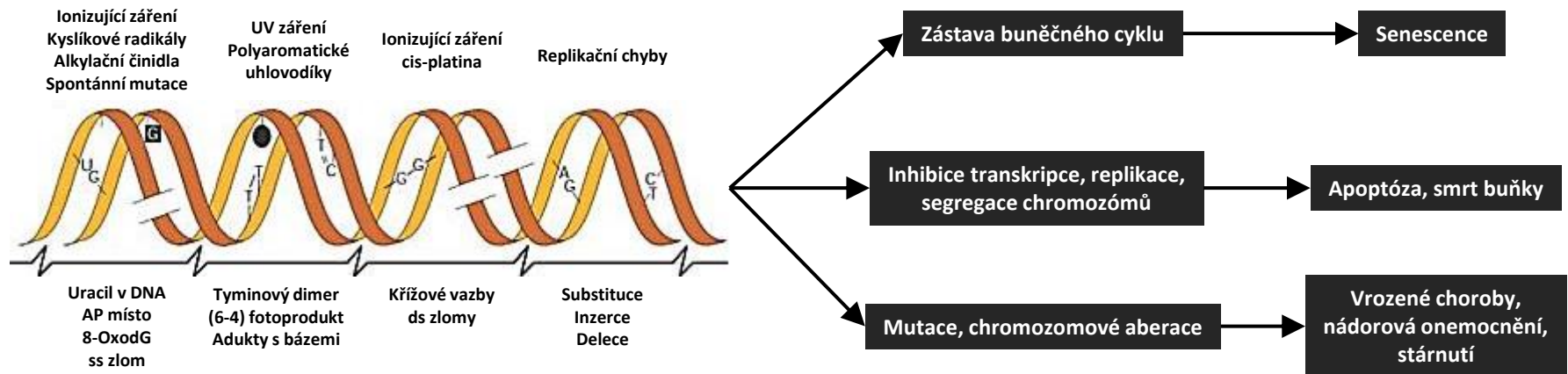
Indukované mutace - fyzikální mutageny

Ultrafialové záření

- nižší energie a specifitější účinek než ionizující záření, absorpční maximum bází při 254 nm
 - (i) zvýšení frekvence spontánních mutací
 - (ii) tvorba pyrimidinových dimerů
 - dimerizace dvou sousedních pyrimidinových molekul (nejčastěji tyminové dimery)
 - kovalentní spojení přes cyklobutanový kruh či (6-4) pyrimidinové fotoprodukty
 - narušena struktura DNA a replikace



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.

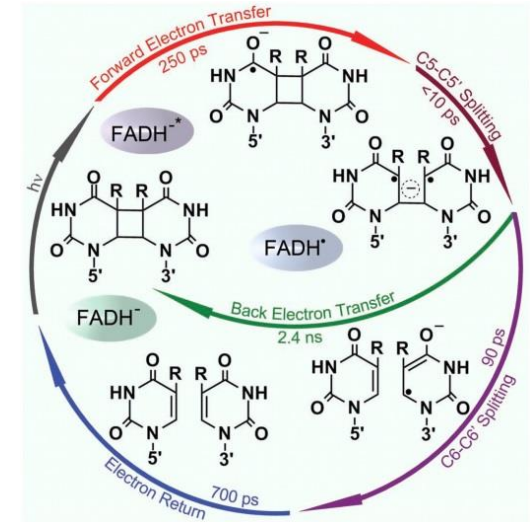
Typy oprav DNA

- 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

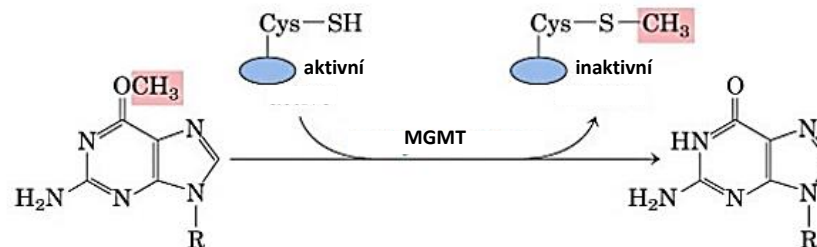


Zheyun Liu et al. PNAS 2011;108:14831-14836

Přímá oprava alkylovaných bází

O⁶-metylguanin-DNA-metyltransferáza

- u lidí *MGMT*, u bakterií *Ada*, „sebevražedný enzym“
- demethylace O⁶-metylguaninu na guanin, přenos methyl skupiny na vlastní Cys
- deficity *MGMT* nalezeny u nádorů děložního hrdla, kolorekta, žaludku, jater, glioblastomu



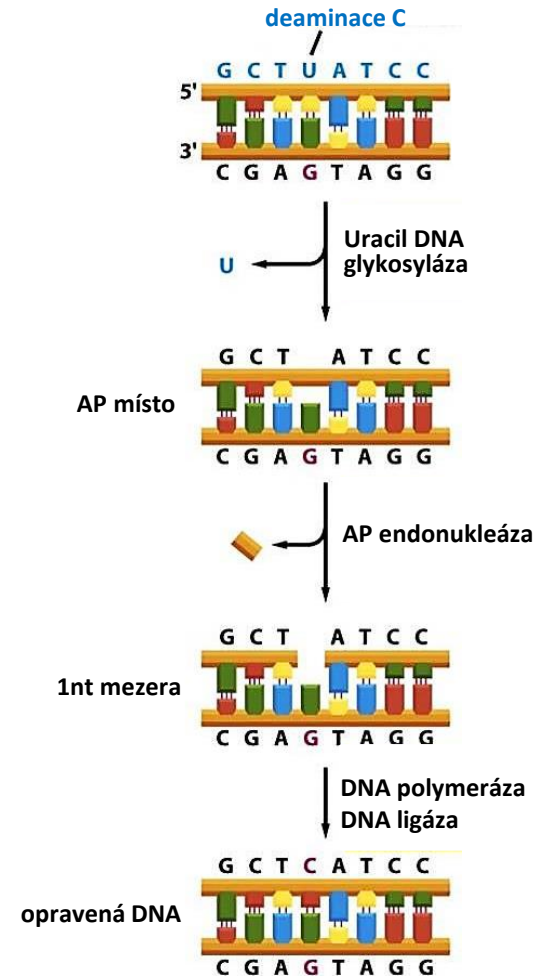
Excizní opravy DNA

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, odstranění U
- DNA glykosyláza
 - rozeznání a odstranění nevhodné báze, tvorba AP míst
- AP endonukleáza
 - vyštěpení AP místa, tvorba 3'-OH
- DNA polymeráza
 - připojení správného nukleotidu
 - Pol β u eukaryot, Pol1 u prokaryot
- DNA ligáza
 - spojení řetězce
- zvýšené riziko kolorektálních nádorů u mutací Pol β , DNA glykosylázy



Excizní opravy DNA

Nukleotidová excizní oprava (NER)

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

Bakterie

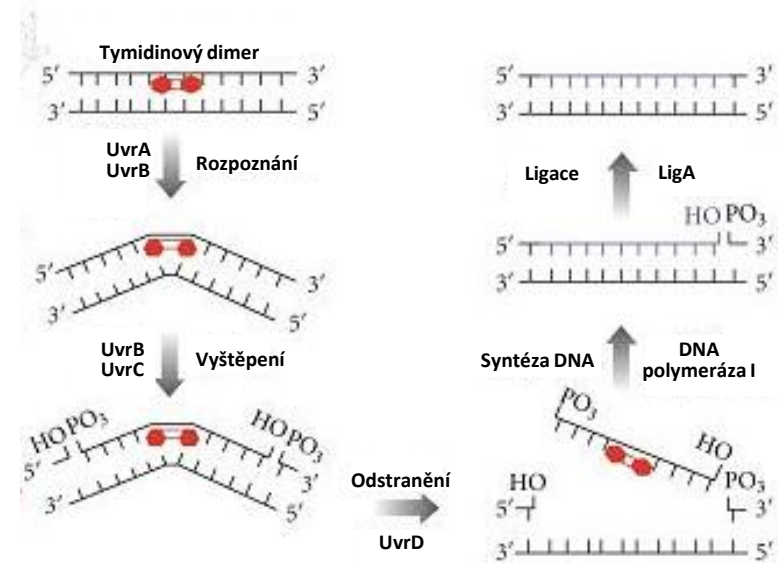
- rozeznání poškozeného místa
- vyštěpení poškozeného místa
- uvolnění vyštěpeného úseku
- dosyntetizování chybějící DNA
- spojení řetězce

UvrAB
UvrBC
UvrD
Pol1
LigA

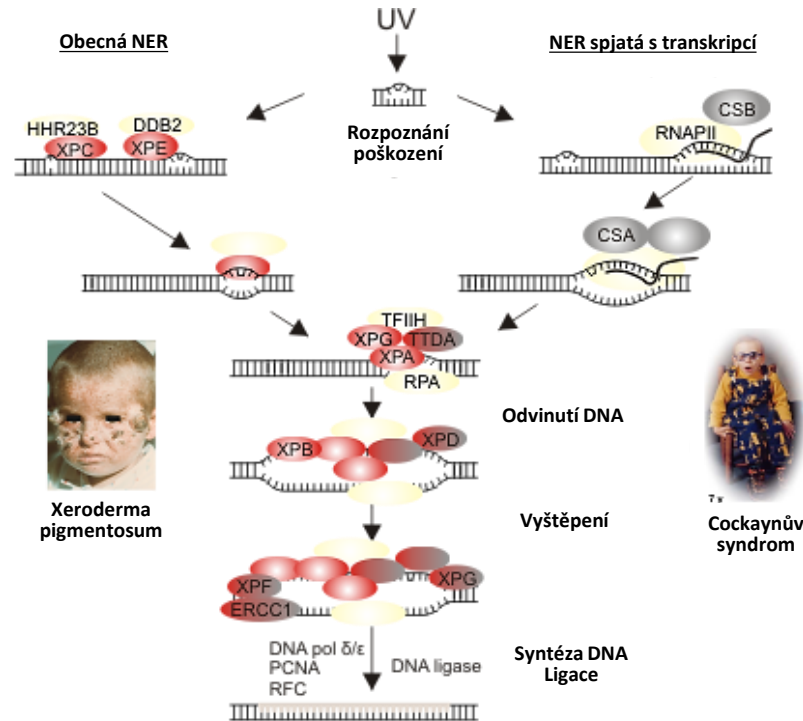
Člověk

- rozeznání poškozeného místa
- odvinutí DNA
- vyštěpení poškozeného místa
- dosyntetizování chybějící DNA
- spojení řetězce

XPA, XPC, XPE; CSA, CSB
XPB, XPD
XPF, XPG
Pol δ/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

Cockayneův syndrom - autosomálně recesivní choroba, deficit CSA, CSB

- fotosenzitivita, trpaslctví, retinitis pigmentosa

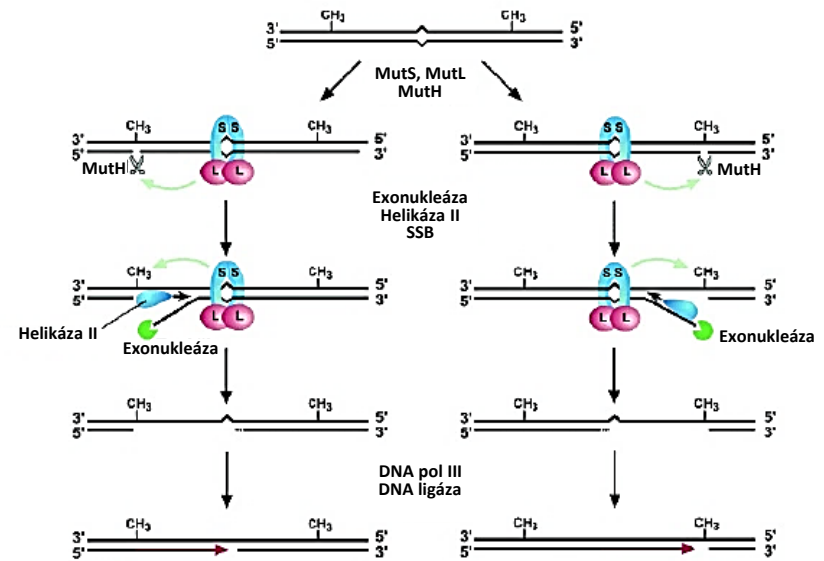
Excizní opravy DNA

Oprava chybného párování (mismatch repair)

- frekvence chyb při syntéze DNA replikace 1 : 100.000
- + proofreading 1 : 10.000.000
- + opravy 1 : 1.000.000.000

E. coli

- Dam metyláza metyluje A v sekvenci GATC
- těsně po replikaci hemimetylovaný stav
- rozpoznání chybného nukleotidu (MutS)
- navázání opravných enzymů (MutL , MutH)
- MutH štěpí řetězec s nemetylovanou GATC
- exonukleáza s helikázou a SSB proteiny odstraňuje naštěpený řetězec až k chybnému nt
- syntéza DNA podle původního řetězce (Pol3)
- spojení řetězce (DNA ligáza)



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

Opravy dvojřetězcových zlomů

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

Nebezpečí fragmentace chromozomů, přestaveb genomu, ztráty genetické informace.

Nehomologní spojování konců (NHEJ)

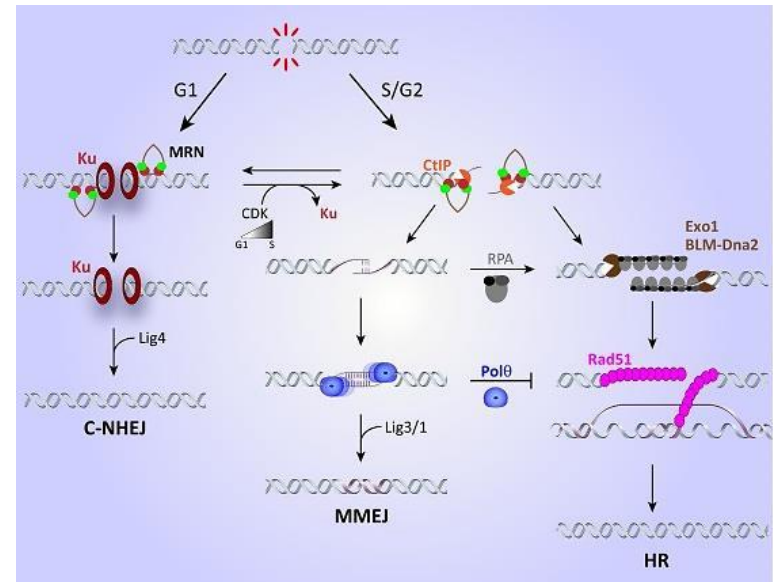
- v G1 fázi buněčného cyklu, před replikací DNA
- zarovnání zlomených řetězců a následné znovu spojení
- náchylné k chybám, možná ztráta nukleotidů

Spojení 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



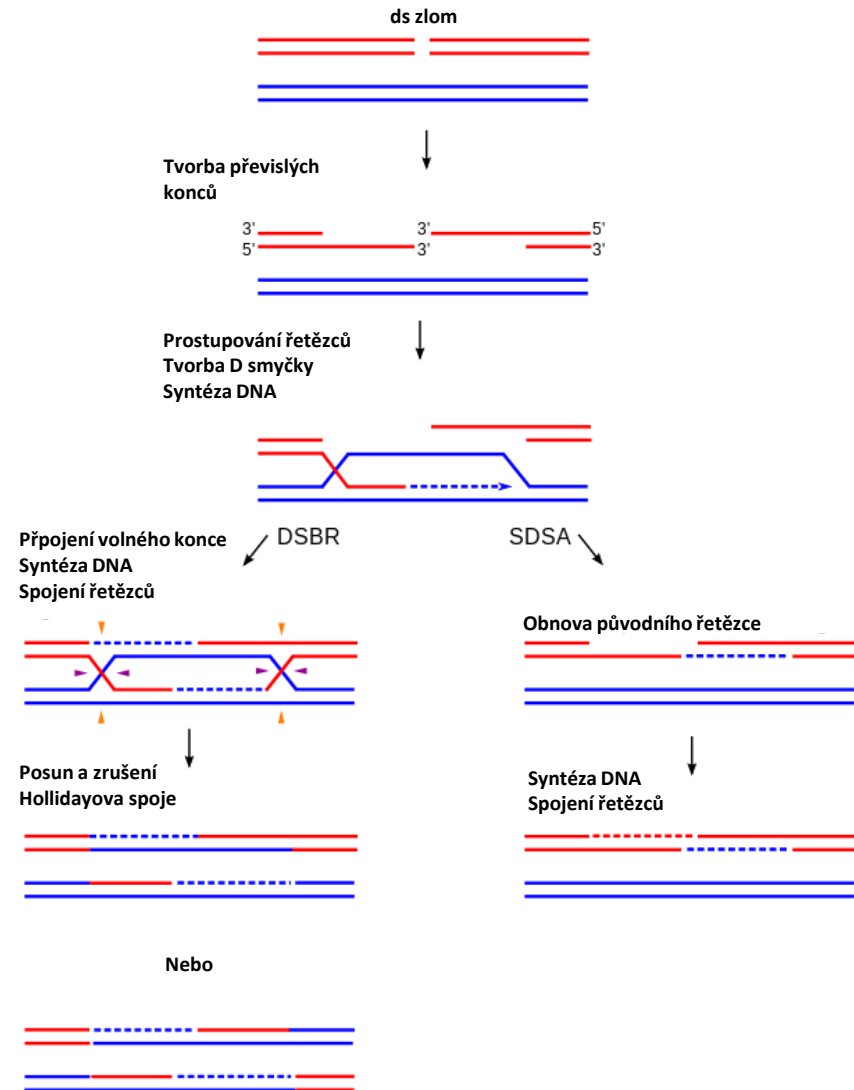
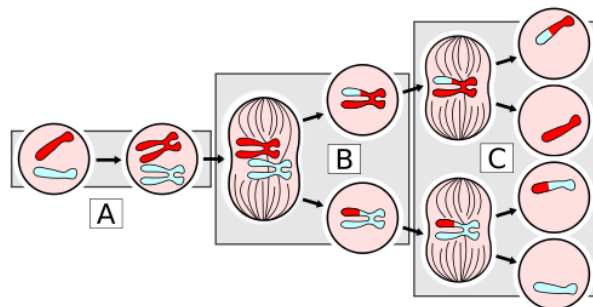
Homologní rekombinace

Dva modely oprav ds zlomů DNA

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

Člověk

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

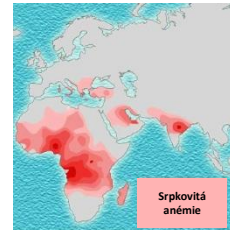
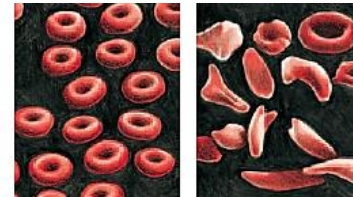


Opravy poškozené DNA

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



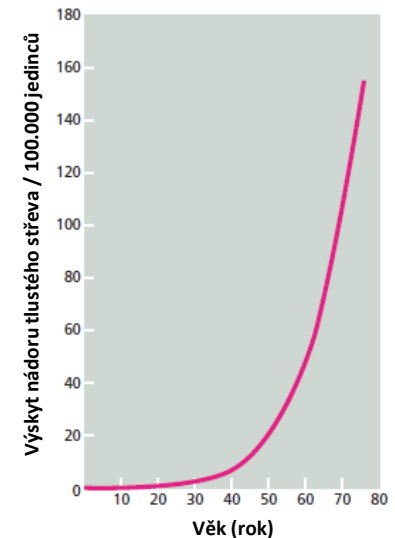
Změny DNA v zárodečných buňkách přenášeny na potomstvo.

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 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'-GGCCCGGTCTGGCCACACCCAACGGCTCC - 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

