

Replikace a transkripce DNA

© Biochemický ústav LF MU
2012 (E.T.)

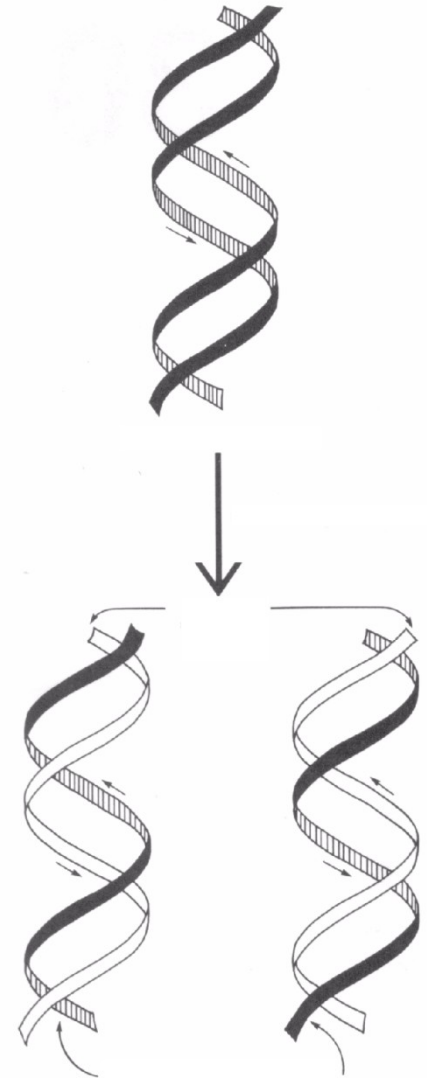
Replikace DNA

Replikace (reduplikace) = zdvojování

Každé ze dvou mateřských vláken DNA slouží jako templát pro syntézu komplementárních vláken

V nových řetězcích se báze řadí na principu komplementarity vůči bazím v templátovém řetězci

Probíhá v jádře



Obecné rysy replikace u prokaryontů a eukaryontů

3 fáze replikace DNA

- Iniclace
- Elongace
- Spojení a terminace

Látkové faktory potřebné k syntéze DNA

- dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Mg^{2+}
- primer RNA
- templát DNA (mateřské vlákno)

Enzymy potřebné pro syntézu DNA (různé u prokaryontů a eukaryontů)

Rozplétací enzym (DNA-helikasa)

RNA- polymerasa

DNA-dependentní DNA-polymerasa

DNA-ligasa

ATP-asa

(topoisomerasa)

Chemická reakce syntézy DNA

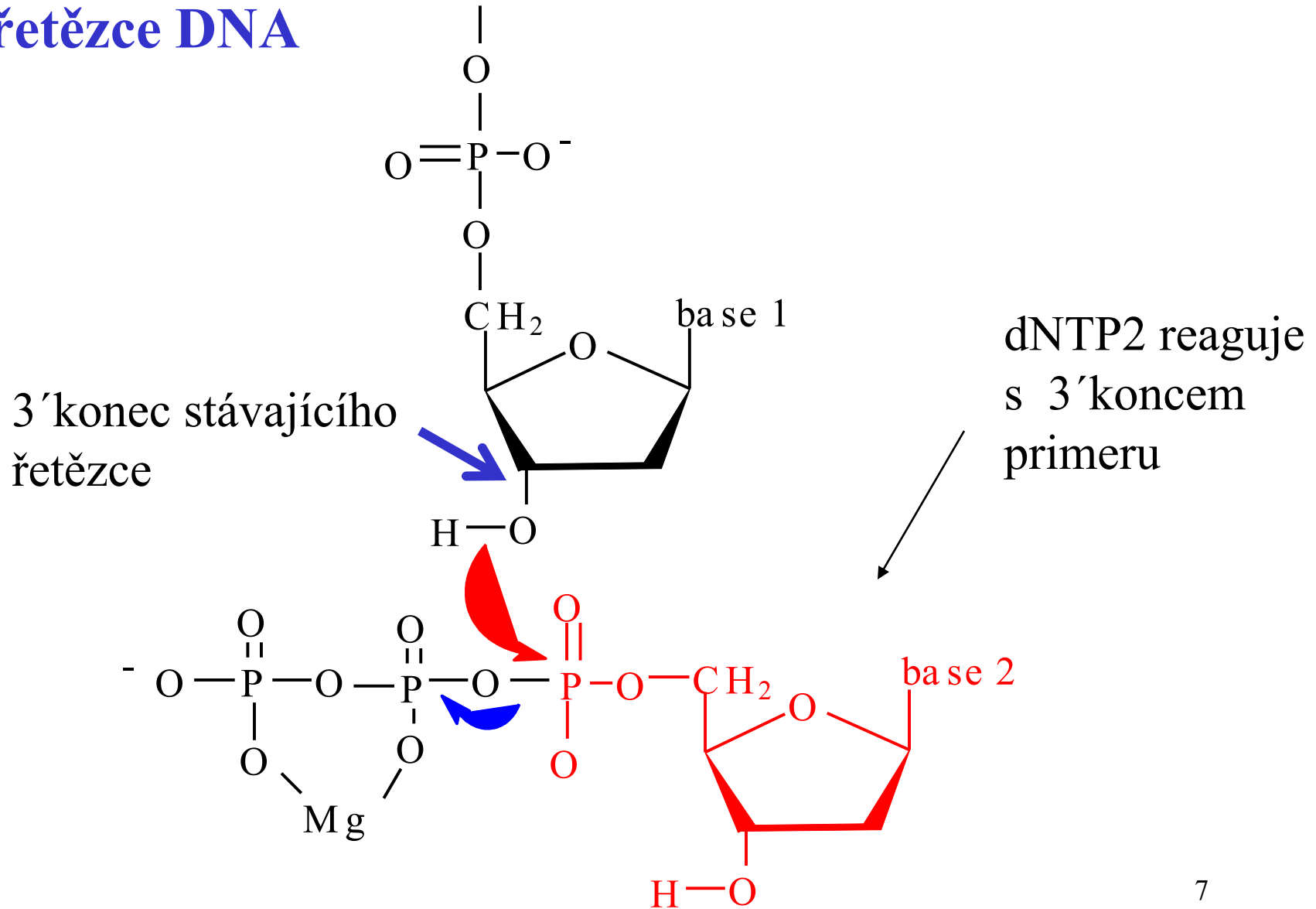
Vlastní syntéza je katalyzována DNA-polymerasami

Do reakcí s již vytvořenou DNA (nebo primerem RNA) vstupuje deoxyribonukleotidtrifosfát (dNTP)

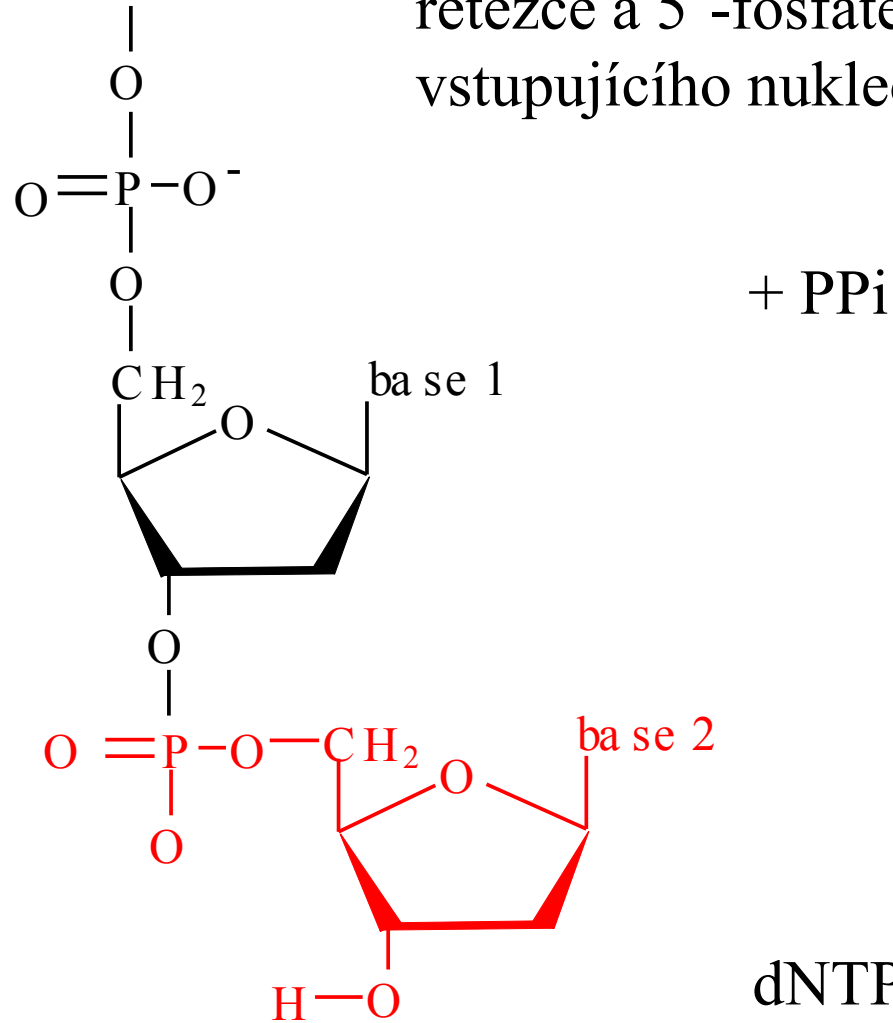
Odštěpuje se difosfát a dNMP se připojí esterovou vazbou

**všechny DNA polymerasy navazují
nukleotidy na 3'-konec primeru
(nová DNA vzniká ve směru 5'→3')**

Připojení deoxynukleotidu při elongaci řetězce DNA



Vzniká esterová vazba mezi 3'-OH skupinou stávajícího řetězce a 5'-fosfátem vstupujícího nukleotidu



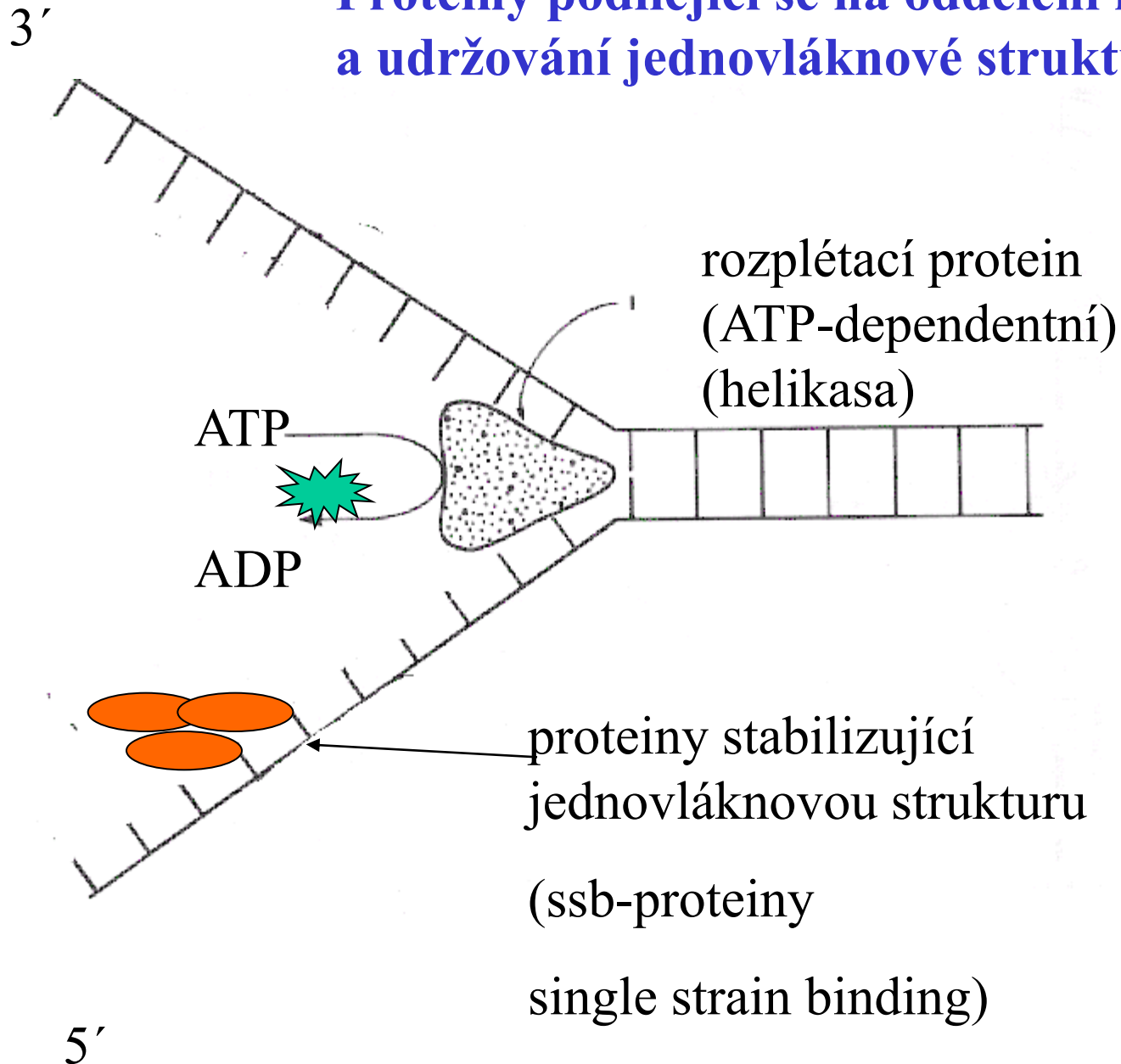
prodlužování
řetězce

dNTP3

Replikace probíhá na obou vláknech

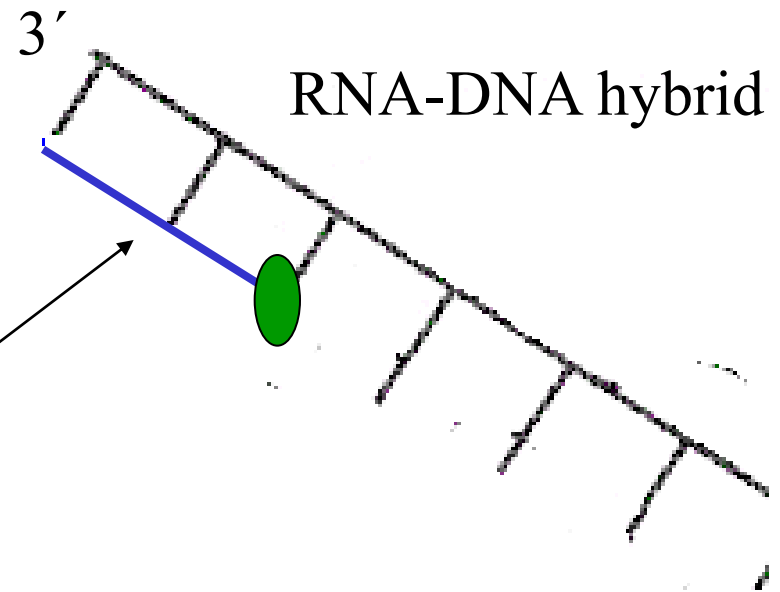
- dvoušroubovice musí být rozvinuta – enzym helikasa
- vytváří se **replikační vidlice**
- reasociaci řetězců zabrání ssb-proteiny (single strand binding protein)
- podle matrice obou mateřských vláken probíhá syntéza vláken nových

Proteiny podílející se na oddělení řetězců a udržování jednovláknové struktury

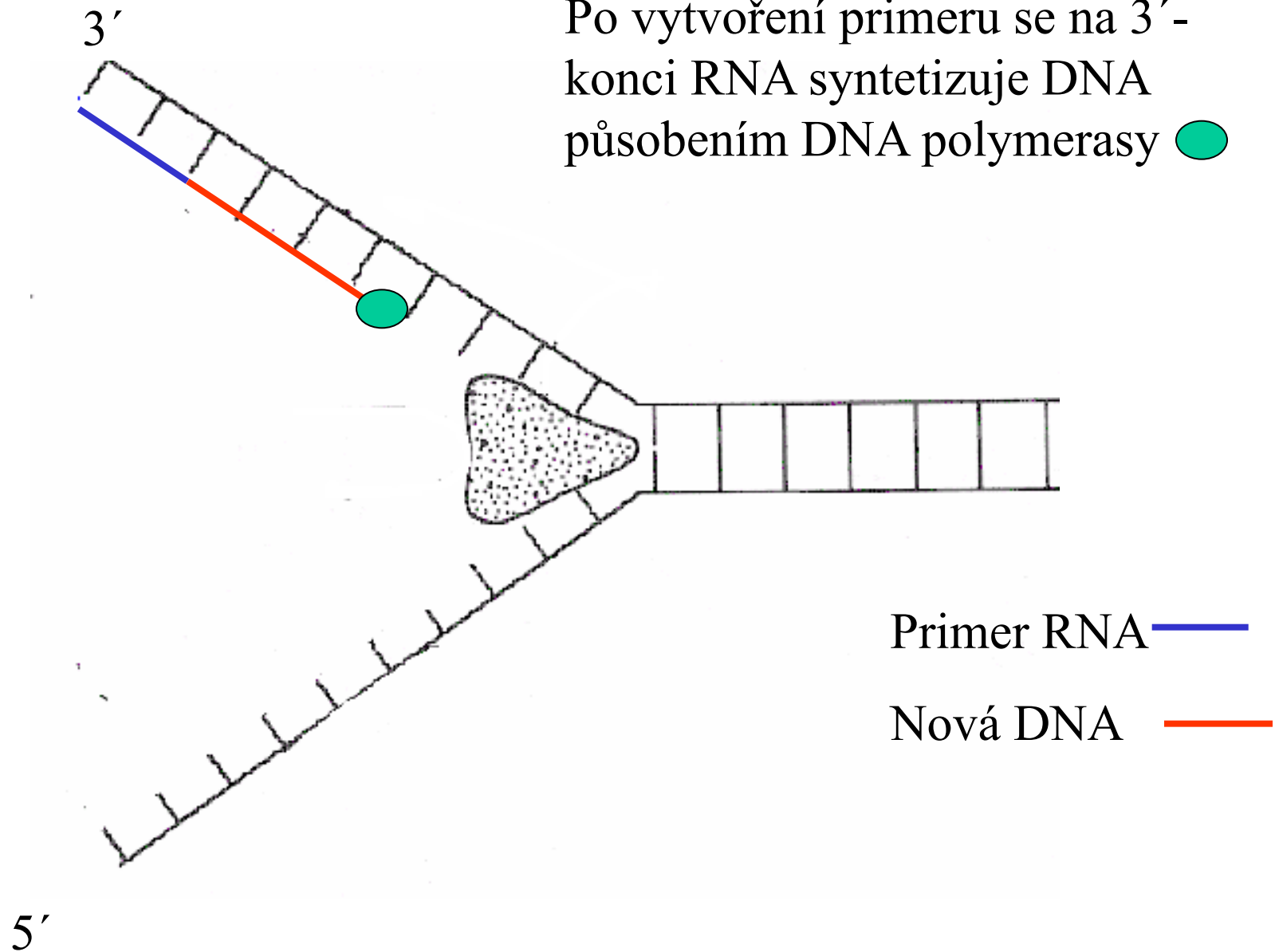


K syntéze DNA je potřebný RNA primer

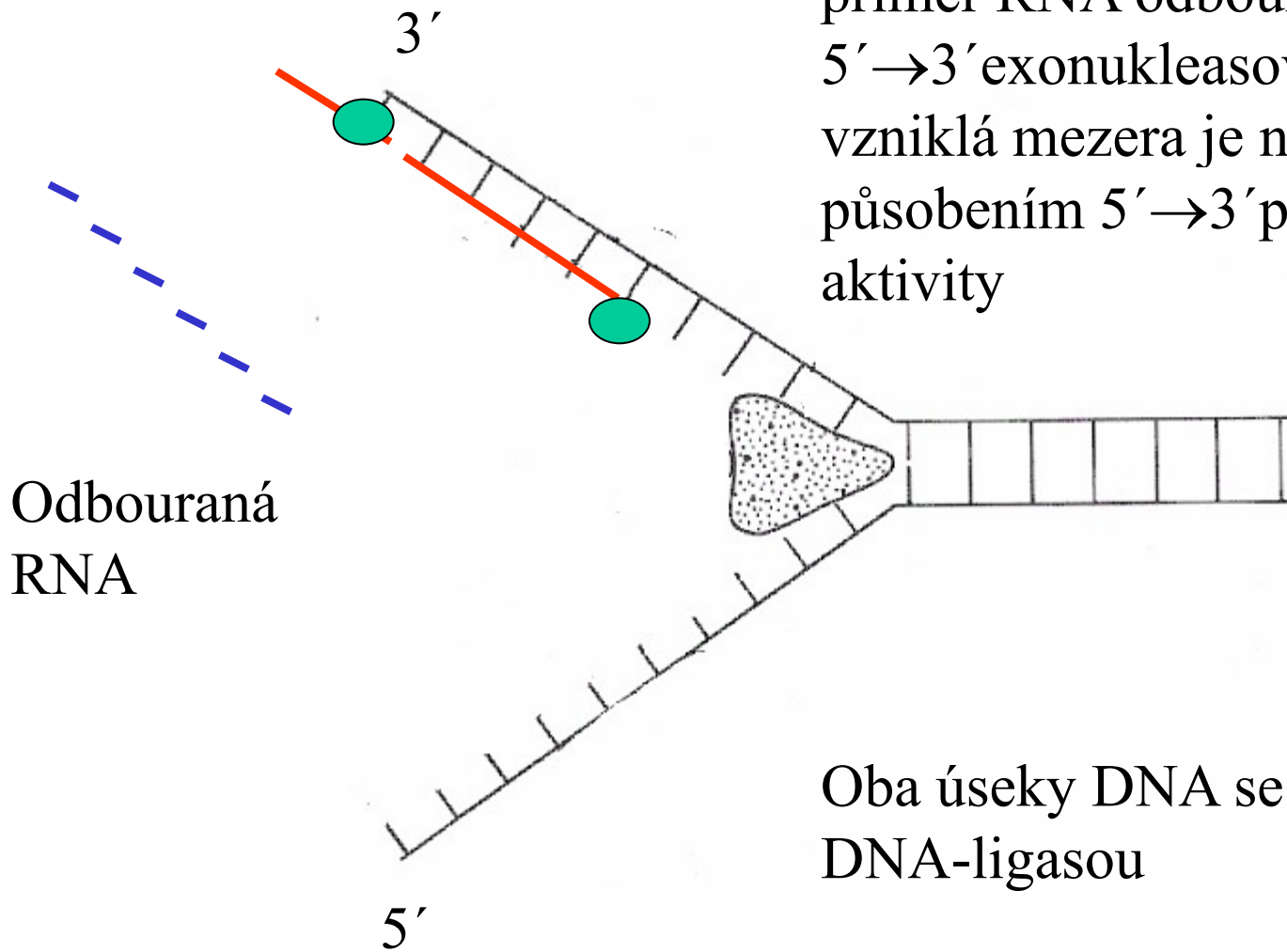
- DNA polymerasa neumí iniciovat syntézu nových řetězců
- Pro svou funkci vyžaduje volnou 3'-OH skupinu
- Tuto skupinu zajišťuje RNA primer (10-20 bází)
- RNA primer je syntetizován ve směru 5' → 3' účinkem RNA polymerasy (primasy)
- Primer je kódován podle odpovídající sekvence templátu



Po vytvoření primeru se na 3'-konci RNA syntetizuje DNA působením DNA polymerasy ●



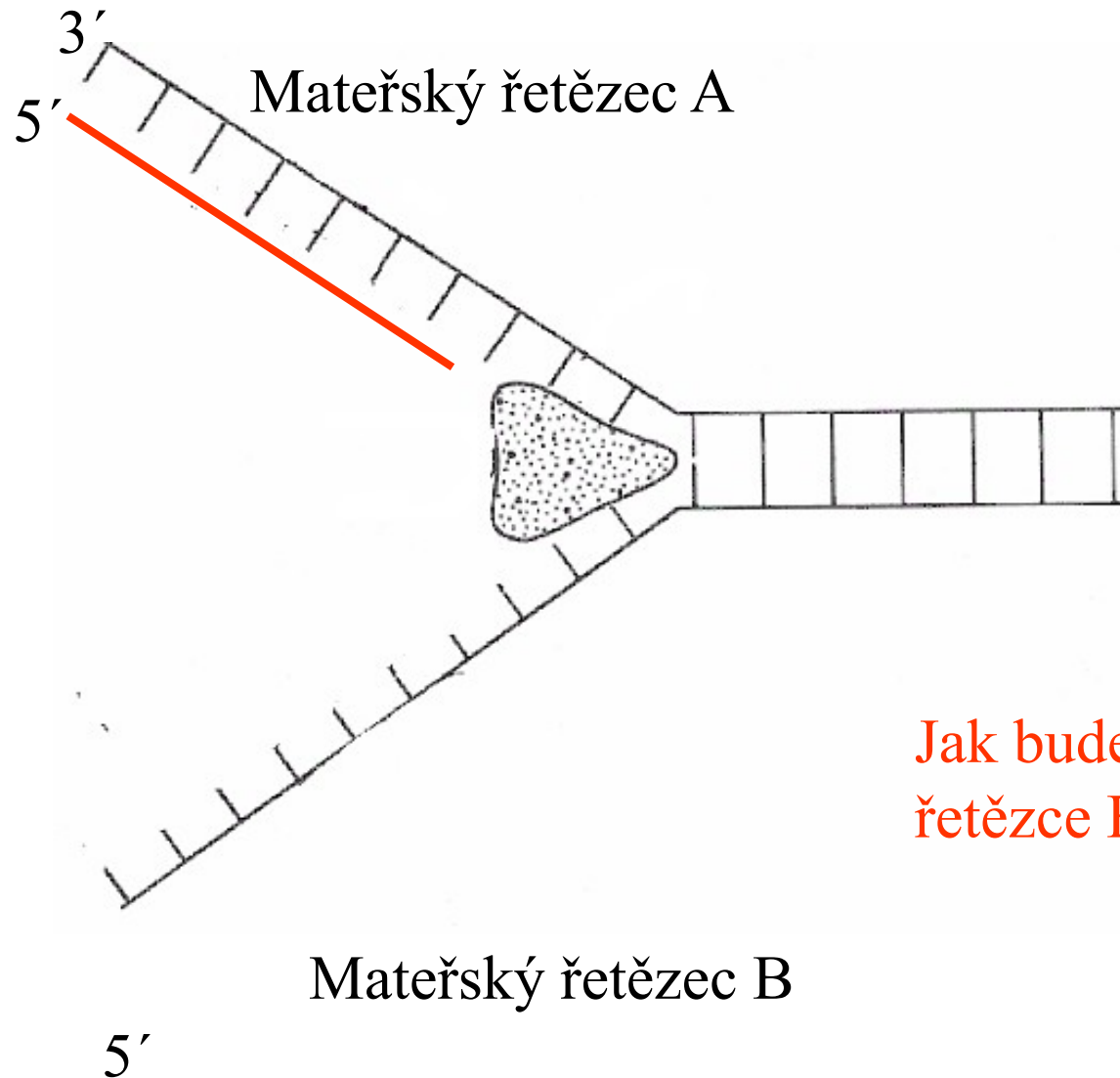
Po ukončení syntézy DNA se primer RNA odbourává 5' → 3' exonukleasovou aktivitou a vzniklá mezera je nahrazena DNA působením 5' → 3' polymerasové aktivity



Oba úseky DNA se spojí DNA-ligasou

Syntéza nové DNA probíhá vždy ve směru 5' → 3'

Bez problému tedy proběhne podél řetězce A



Jak bude probíhat podél řetězce B ?

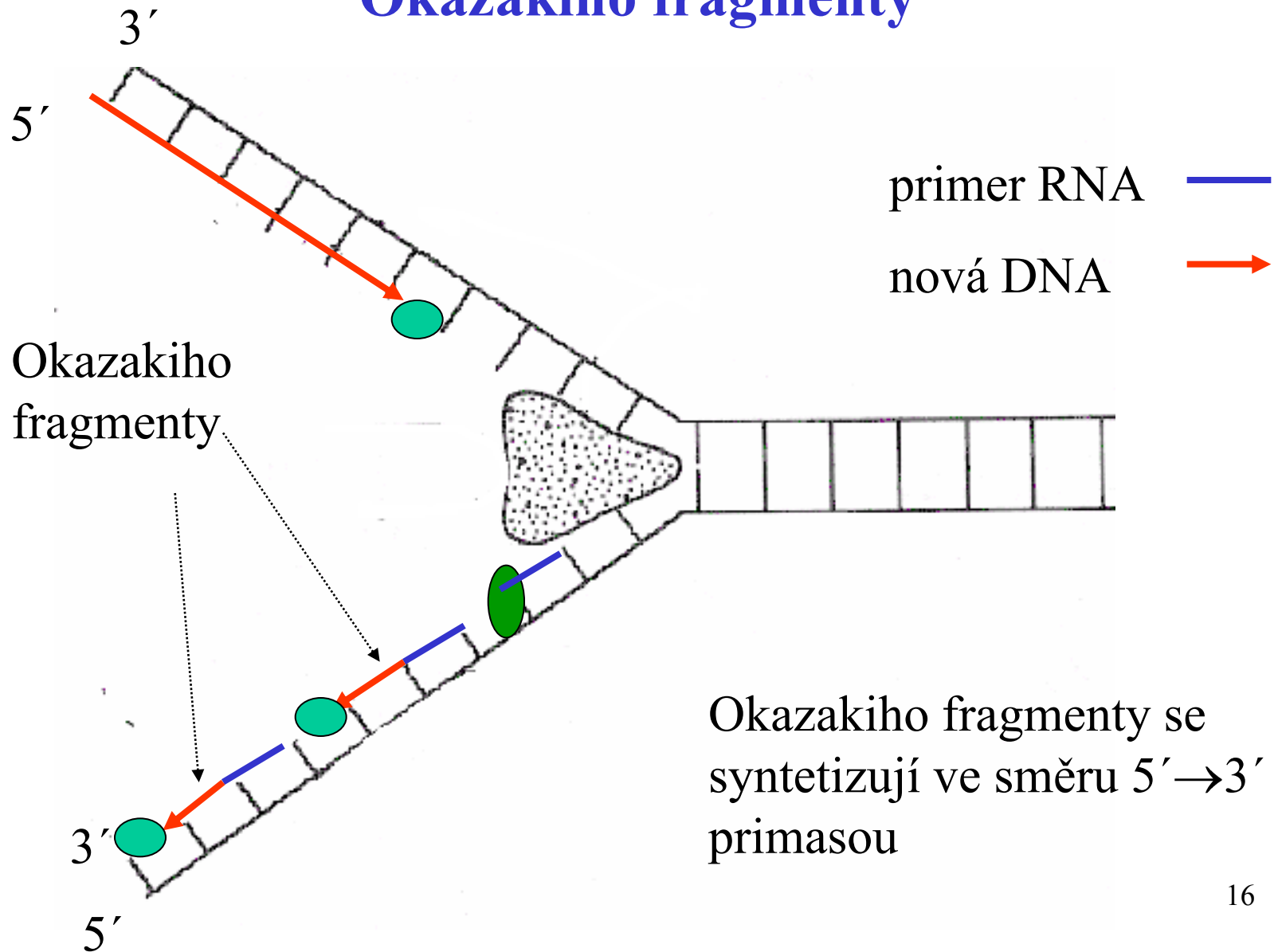
Terminologie

Řetězec A – označuje se jako vedoucí vlákno (leading strand)

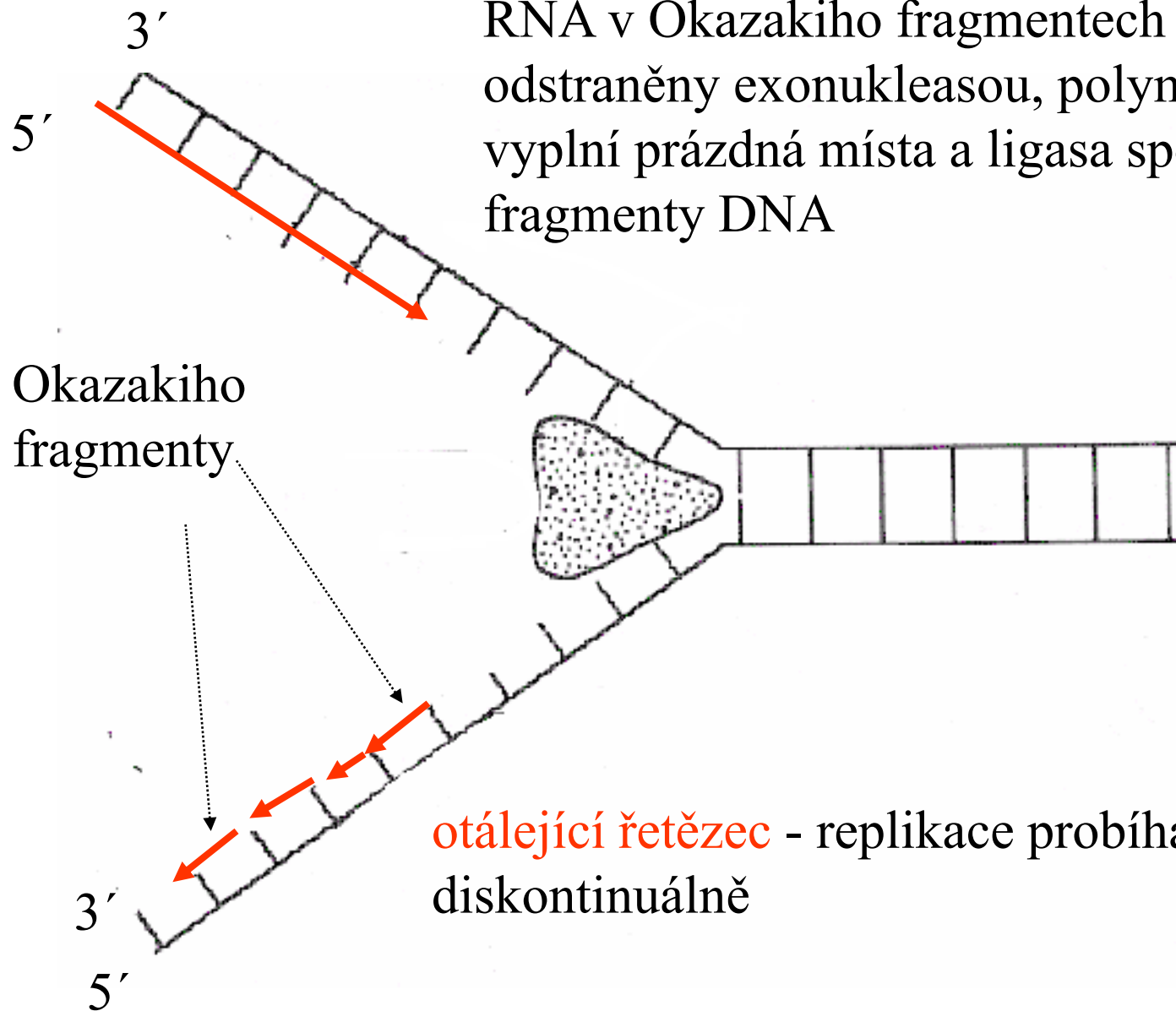
Řetězec B – opožďující se (otálející) vlákno (lagging strand)

Vedoucí vlákno se syntetizuje kontinuálně

Na otálejícím řetězci vznikají Okazakiho fragmenty



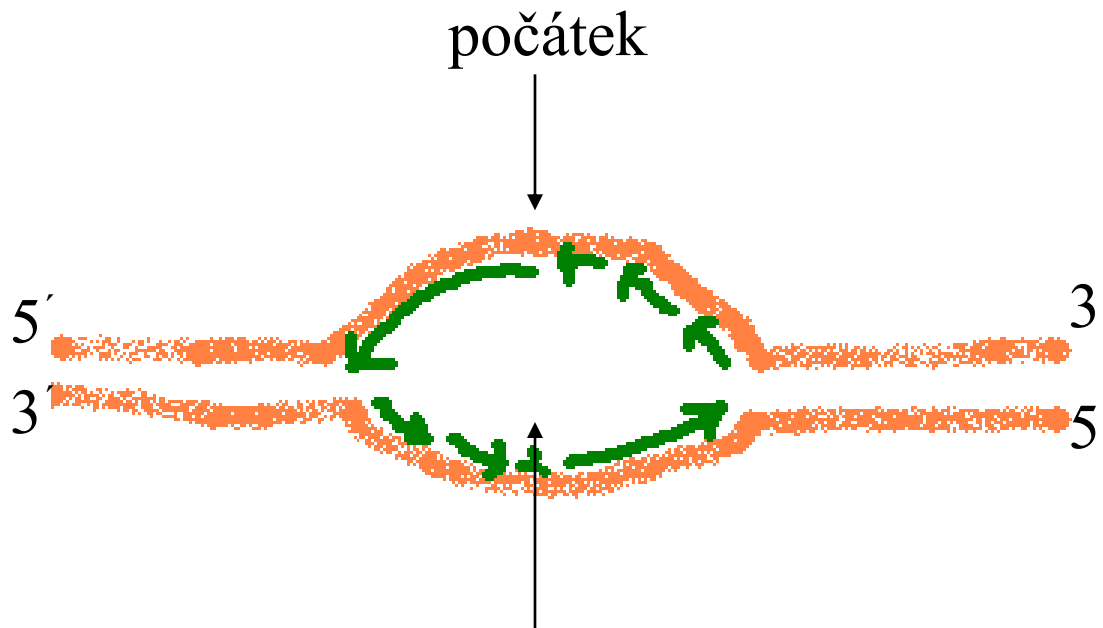
Při pokračující replikaci jsou úseky RNA v Okazakiho fragmentech odstraněny exonukleasou, polymerasa vyplní prázdňá místa a ligasa spojí fragmenty DNA



Rozdíly mezi eukaryonty a prokaryonty

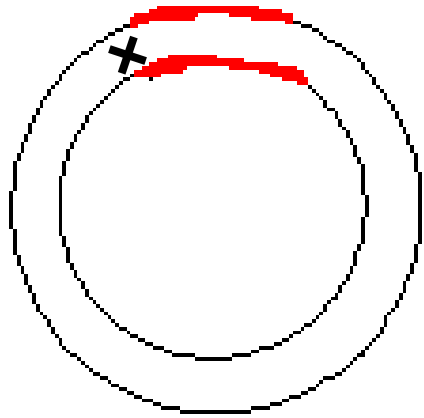
Iniciace replikace

- replikace je prokaryontů i eukaryontů vždy zahájena v počátku
- počátek je určitá specifická sekvence bází a váží se k němu specifické proteiny (předprimerové proteiny)
- replikace probíhá v obou směrech od každého počátku, vznikají dvě replikační vidlice, které se od sebe vzdalují
- vznikají replikační bubliny - replikony

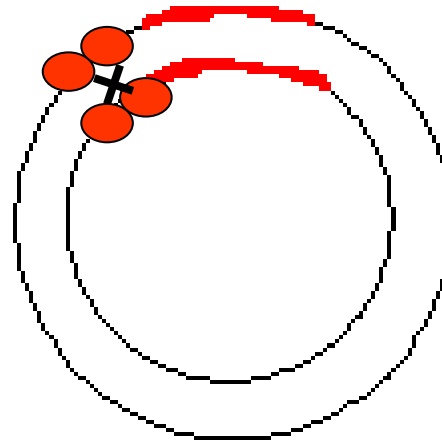


Iniciace replikace u prokaryontů

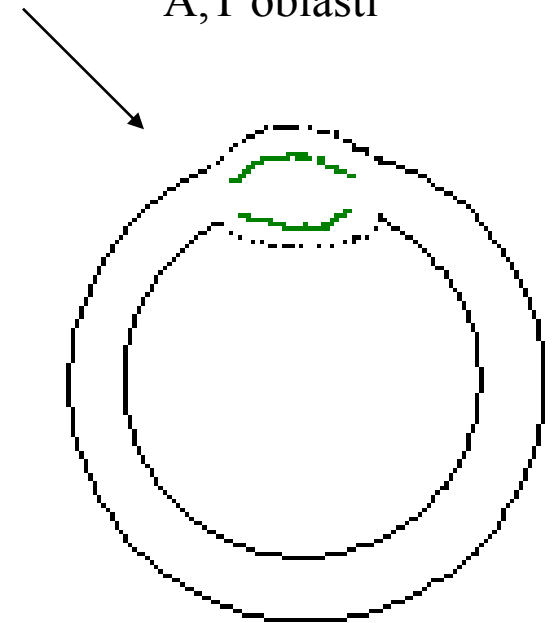
Počátek (bohatý na A,T sekvence)



Ori-vážící proteiny



Denaturace v A,T oblasti

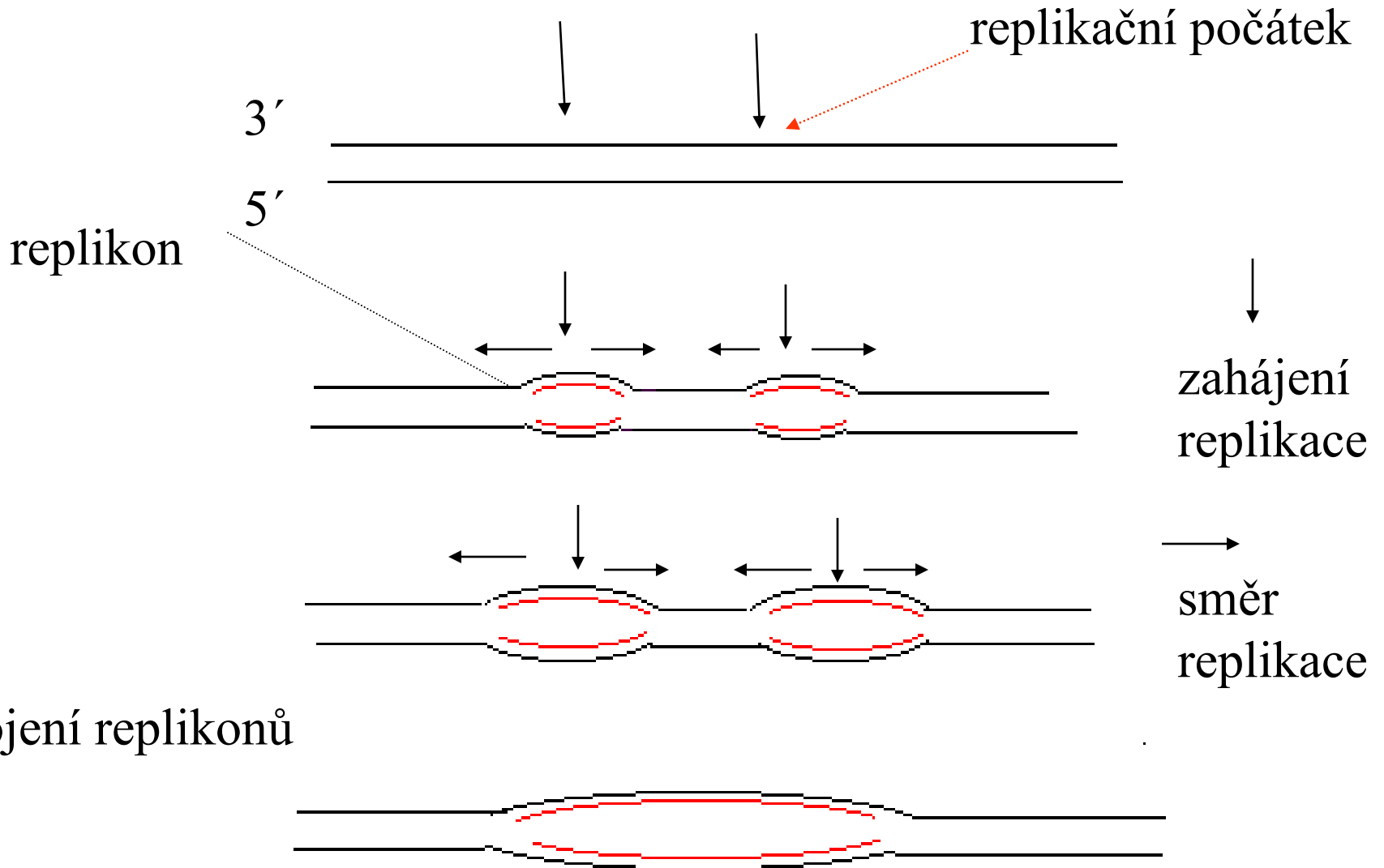


Replikace začíná v počátku a pokračuje, dokud se obě vidlice neseťkají

Iniciace replikace u eukaryontů

- eukaryotické chromozomy jsou tvořeny dlouhými molekulami DNA, který nemohou být replikovány kontinuálně. Proto replikace těchto velkých molekul vyžaduje zahájení na několika místech současně.
- Sekvence počátků u eukaryontů dosud podrobně nepopsány
- počátek replikace - až 30 000 míst současně
- zahájení je řízeno prostorově i časově, nemusí být zahájeno na všech počátcích současně
- rychlost replikace je menší než u prokaryontů
- probíhá v S fázi

Iniciace replikace u eukaryontů



Enzymy prokaryontní replikace

Polymerasa	Polymerázová aktivita (u všech 5' → 3)	Exonukleasová aktivita
DNA polymerasa I	Vyplnění místa po RNA, opravy DNA, odstranění RNA primerů	5' → 3 i 3 → 5
DNA polymerasa II	Opravy DNA	3 → 5
DNA polymerasa III	Replikace	3 → 5
DNA polymerasa IV	Replikace poškozené DNA	
DNA polymerasa V	Replikace poškozené DNA	

Enzymy eukaryontní replikace*

* Je známo kolem 13 polymeras

Polymerasa	Polymerázová aktivita (u všech 5' → 3)	Exonukleasová aktivita
DNA polymerasa α	Primasa, opravy DNA	žádná
DNA polymerasa β	opravy DNA	žádná
DNA polymerasa γ	replikace v mitochondriích	3 →5
DNA polymerasa δ	replikace, opravy DNA	3 →5
DNA polymerasa ϵ	replikace	3 →5

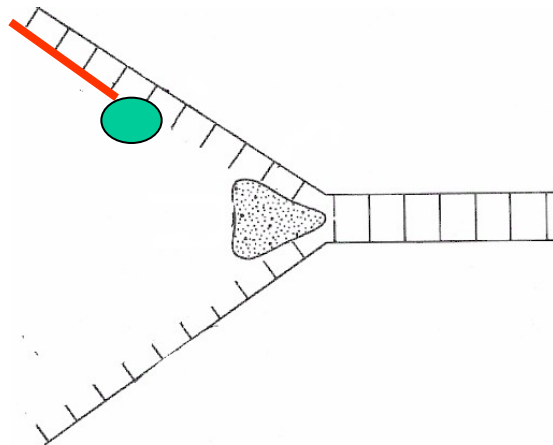
Korekce struktury DNA

Přesnost duplikace struktury ~ 1 chyba/ 10^9

Zajištěno korekční aktivitou DNA-polymeráz.

Kontrola konců vznikajících řetězců – srovnání nově zařazené báze na 3'konci s templátem.

Pokud je zařazena chybná báze, nedojde ke vzniku kovalentní vazby (polymerace), ale pomocí 3'→5' exonukleázové aktivity se chybně spárovaný nukleotid odštěpí



Další enzymy podílející se na replikaci

Helikasa	Oddělují vlákna DNA
SSB-proteiny	Zabraňují reasociaci vláken DNA
topoisomerasy	Uvolňují pnutí vyvolané superstáčením
Enzymy odstraňující primer (RNA-sy)	Hydrolyzují RNA z RNA-DNA hybridů
DNA ligasy	Spojují úseky DNA fosfodiesterovou vazbou
Telomerasy	úprava 3' konce templátu
Sliding clamp (klouzavá svorka)	Udržuje DNA polymerasu ve vazbě na DNA

Okazakiho fragmenty u ekaryontů a prokaryontů

Prokaryonty – 1000-2000 bází

Eukaryonty - ~ 200 bází

Topoisomerasy

(Topologie DNA = trojrozměrná struktura DNA)

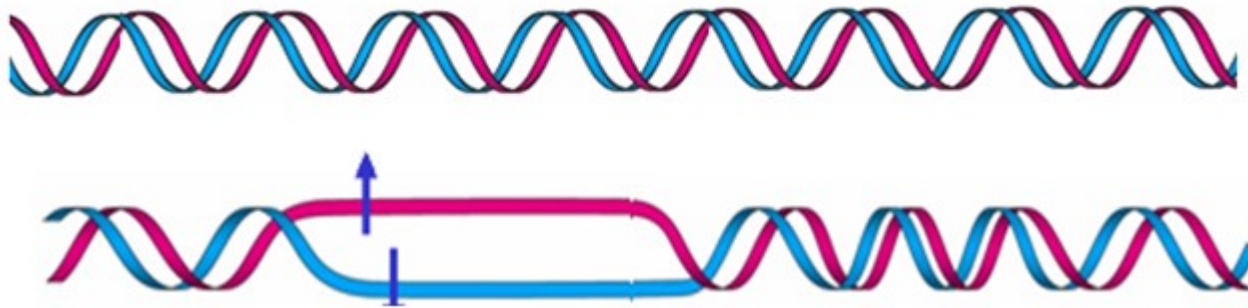
U dvojité DNA dochází často k superstáčení

Superstáčení může být pozitivní (ve stejném směru jako stočení helixu, doleva) nebo negativní (v opačném směru jako helix, doprava)

Superstáčení může být odstraněno topoisomerasami

DNA topoisomerasy mají řadu funkcí (při replikaci, transkripci, ukládání DNA do buněk, při opravách)

Superstáčení při rozvíjení dvojitého helixu DNA



Topoisomerasa I

Reversibilně přerušuje fosfoesterovou vazbu v jednom řetězci, umožní otáčení kolem jednoho řetězce (uvolnění superstočení) a katalyzuje opětové spojení řetězců

Nevyžaduje energii.

Je u prokaryontů i eukaryontů.

Topoisomerasa II

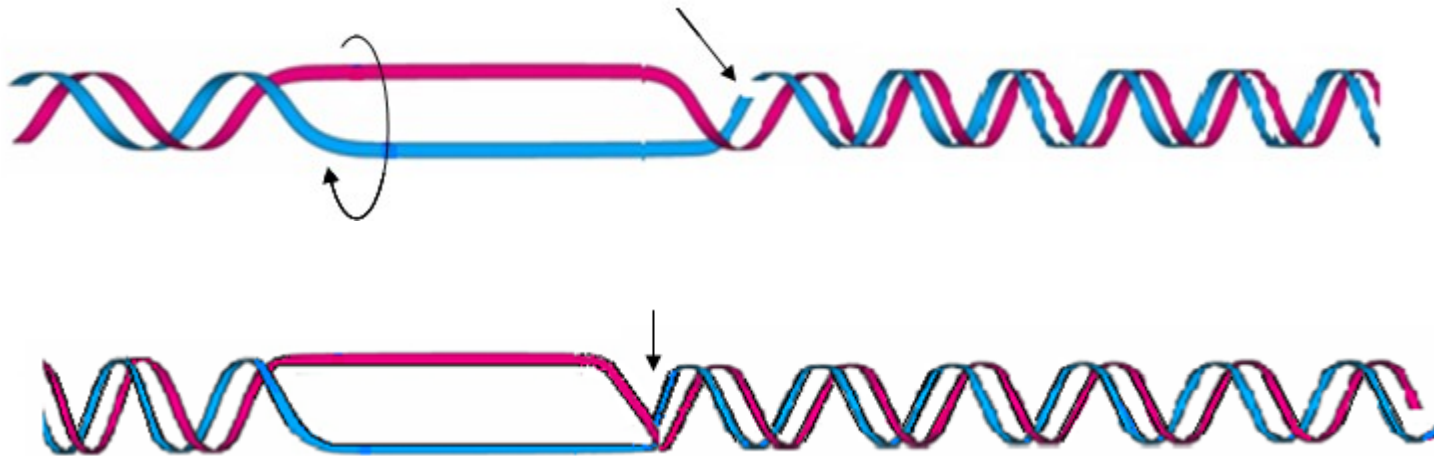
Může relaxovat superstočenou DNA nebo superstáčení zavádět. Štěpí oba řetězce.

Je u prokaryontů (DNA gyrasa) i eukaryontů, má různou specifitu.

Pro spojení řetězců vyžaduje ATP

Účinek topoisomerasy I

Přerušení fosfoesterové vazby následované rotací kolem druhého vlákna a opětovým spojením



Inhibitory lidské topoisomerasy- zabraňují replikaci

protinádorové léky

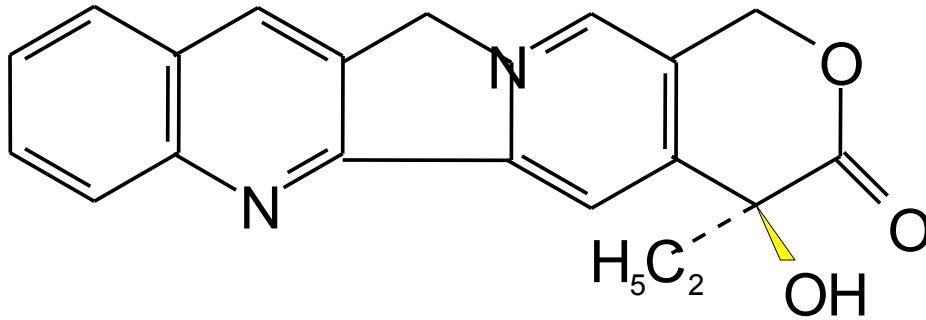
Příklady inhibitorů topoisomerasy

kamptotheцин – rostlinný produkt

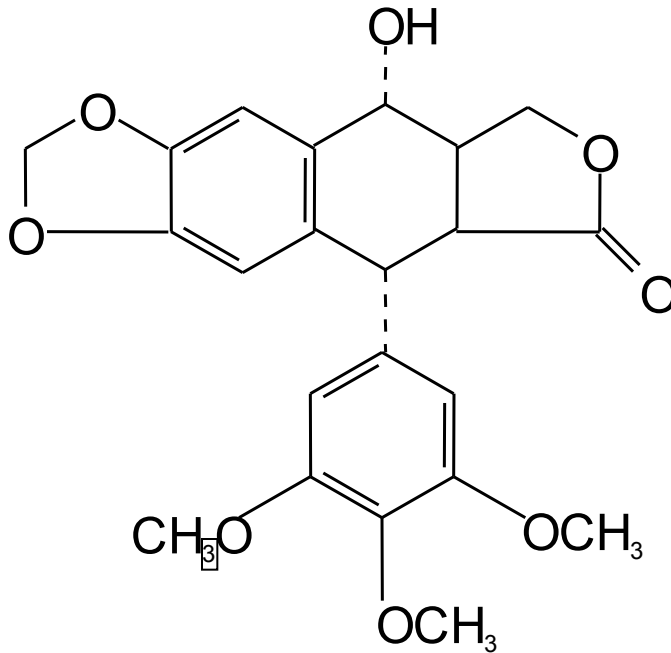
antracykliny (daunorubicin) -bakteriální produkty

podofyllotoxiny-rostlinné produkty

Antibakteriální léky na bázi chinolonů (norfloxacin)
inhibují bakteriální gyrasu – nepůsobí však na humání
gyrasu



kamptothecin
Camptotheca
acuminata



podofyllotoxin
Podophyllum
peltatum ad.

Telomery

zvláštní sekvence DNA na koncích chromosomů

tandemy druhově specifických oligonukleotidů, bohatých na G

(u člověka TTAGGG až 1000x)

mají ochrannou funkci (před působením enzymů)

Při syntéze opožďujícího řetězce vyžaduje replikační aparát přítomnost určité délky templátové DNA za sekvencí, která má být kopírována.

Syntéza opožďující se DNA by se zastavila před koncem templátu.

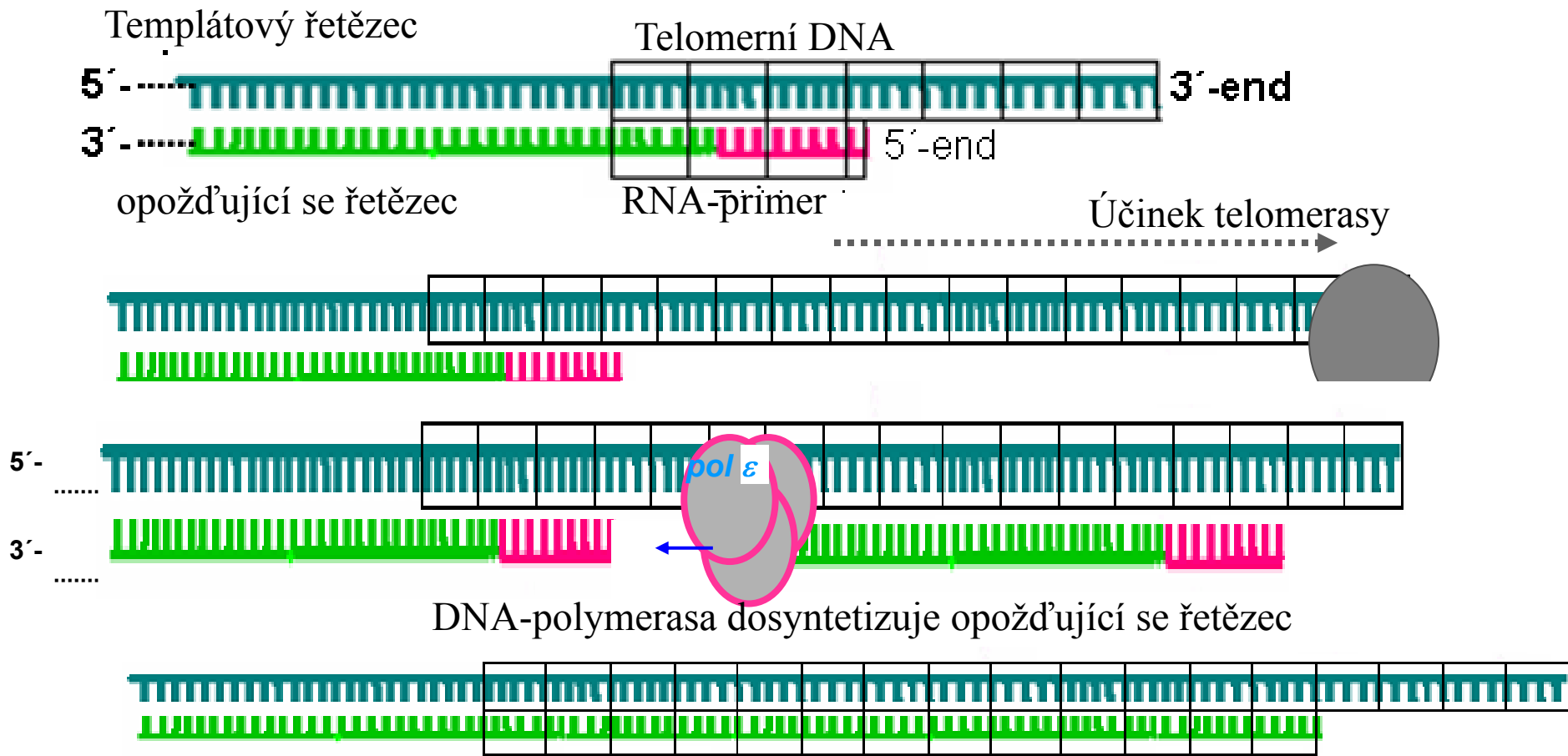
Telomerasa

- dokončení syntézy DNA
- připojuje preformovaný hexanukleotid na 3'-konec templátového vlákna
- je reverzní transkriptasa – ve své struktuře nese RNA templát (CA), ten připojí k 3'konci templátové DNA a podle něj dosyntetizuje příslušnou komplementární sekvenci DNA

<http://faculty.plattsburgh.edu/donald.slish/Telomerase.html>

Dokončení syntézy DNA na 3'-koncích chromozomů

replikující se vedoucí řetězec není zakreslen



? Délka telomer koreluje se stářím a replikační kapacitou buňky ?

- buňky získané od mladších jedinců mají delší telomery a mohou podléhat většímu počtu dělení
- většina somatických buněk nemá telomerasu – pokud jsou pěstovány v kulturách, přežijí určitý počet cyklů, pak odumírají
- snížená aktivita telomerasy pravděpodobně souvisí se stářím organismu
- buňky, které se často dělí (zárodečné, kmenové a nádorové) mají vyšší hladinu telomerasy
- inhibitory telomerasy mohou být užitečné v terapii nádorů

Poškození a opravy DNA.

Hrubý odhad počtu poškozujících zásahů do DNA v lidské buňce:

cca 10^4 - 10^6 /den

⇒ u dospělého člověka (10^{12} buněk) se jedná o 10^{16} - 10^{18} opravných kroků za den.

Poškození a opravy DNA

Typ poškození	Příčina
Chybějící báze	Depurinace (10^4 purinů za den)
Změněná báze	Ionizační záření, alkylační činidla
Nepřesná báze	Spontánní deaminace
Delece-inserce	Interkalační činidla (akridiny)
Formace dimerů	UV záření
Zlomy řetězců	Ionizační záření, chemikálie (bleomycin)
Meziřetězové vazby	Chemické látky (deriváty psoralenu, mitomycin c)
Tvorba tautomerů	Spontánní a dočasná

Poškozená DNA je v buňkách opravována reparačními enzymy

Buňky mají k dispozici opravné systémy :

- přímá oprava (zvratem – jen u bakterií)
- vystřížení porušené báze („base excision repair“)
- vystřížení porušeného nukleotidu („nukleotide excision repair“)
- oprava chybného párování („mismatch repair“)
- opravy dvojitých zlomů - homologní rekombinace, nehomologní spájení konců
- prevence inkorporace porušeného nukleotidu do DNA

Mutace, které vzniknou během DNA replikace jsou opravovány zpětnou kontrolou správného zařazení posledního nukleotidu ($3' \rightarrow 5'$ proofreading)

Příklady oprav vystřižením báze

Deaminace cytosinu na uracil



Uracil-N-glykosylasa odstraní bázi,
vznik AP míst (apyrimidinové místo)



AP endonukleasa štěpí fosfodiesterovou
vazbu v místě chybějící báze, zbylá
ribosa je vyštěpena exonukleasou



Mezera je vyplněna inzercí cytidin
fosfátu účinkem DNA polymerasy β



Spojení ligasou



Příklady oprav vystřížením nukleotidu

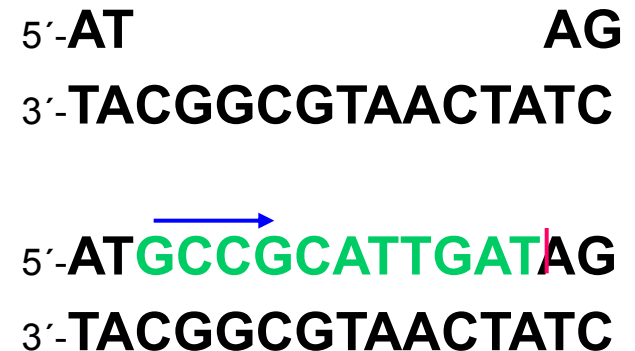
Vznik thyminového dimeru radiací



Zlom vyvolaný dimerem je rozpoznán komplexem endonukleasy nazývané excinukleasa. Ta vystřihne defektní oblast zahrnující kolem 30 nukleotidů (endonukleasový a exonukleasový účinek)



Nahrazení vystřížených bází působením DNA polymerázy a.



Opětné spojení řetězce ligázou

