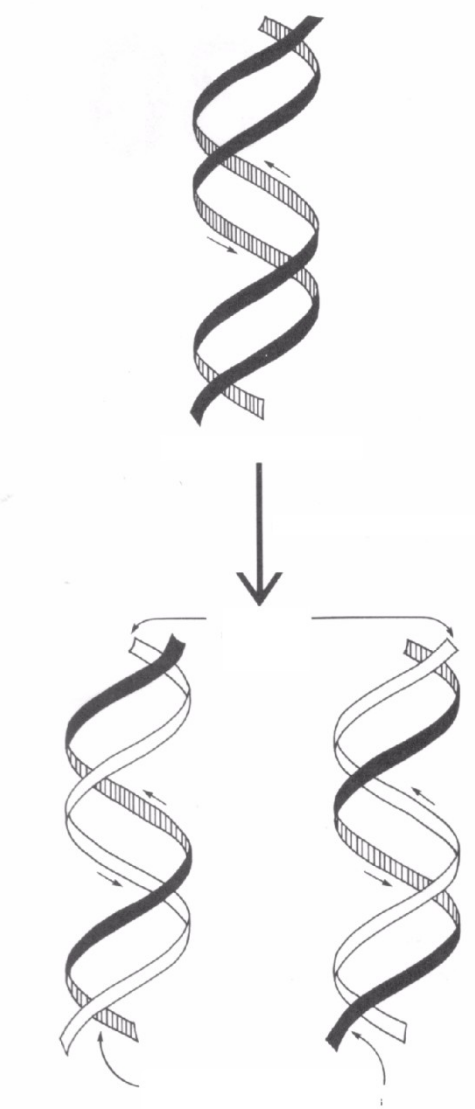
Replikace a transkripce DNA

© Biochemický ústav LF MU 2018 (ET, JG)

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

- ✓ Iniciace
- ✓ 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)

- ✓ DNA-helikáza (rozplétací enzym)
- ✓ RNA-polymeáza
- ✓ DNA-dependentní DNA-polymeráza
- ✓ DNA-ligáza
- ✓ ATP-áza
- ✓ (topoisomeráza)

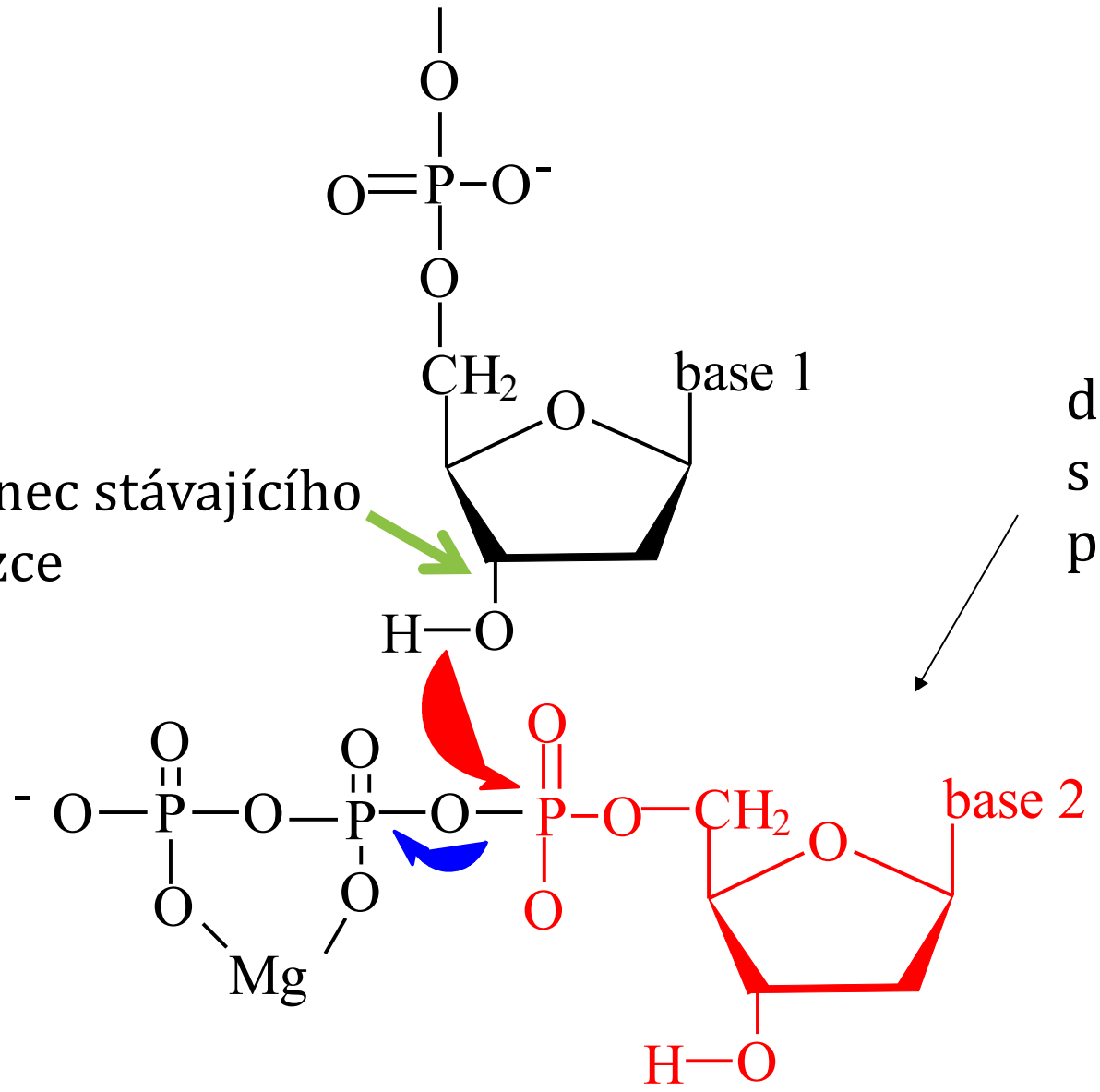
Chemická reakce syntézy DNA

- ✓ Vlastní syntéza je katalyzována DNA-polymerázami
- ✓ Do reakcí s již vytvořenou DNA (nebo primerem RNA) vstupuje deoxyribonukleotidtrifosfát (dNTP)
- ✓ Odštěpuje se difosfát a dNMP se připojí esterovou vazbou

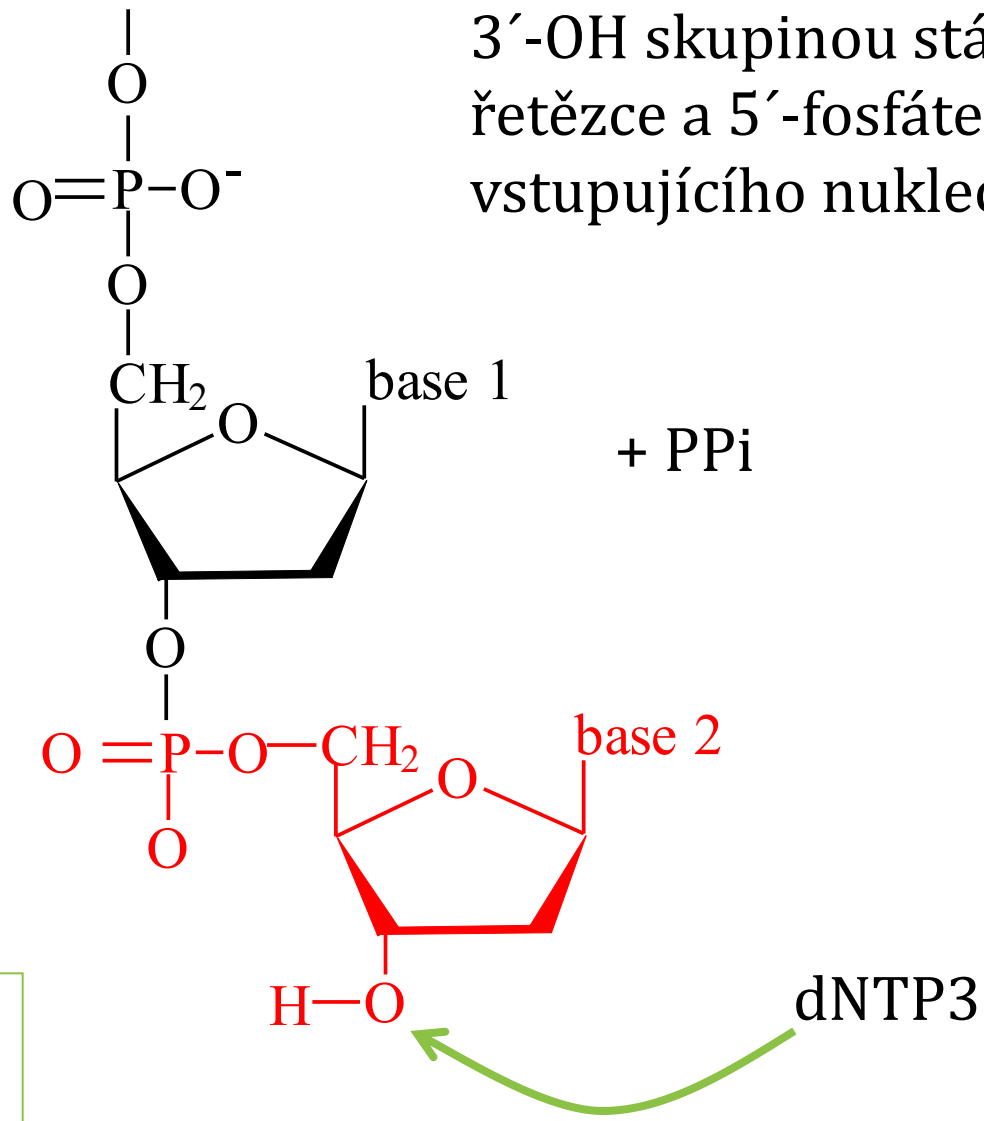
všechny DNA polymerázy navazují nukleotidy na 3´-konec primeru

nová DNA vzniká ve směru 5´→3´

Připojení deoxynukleotidu při elongaci řetězce DNA

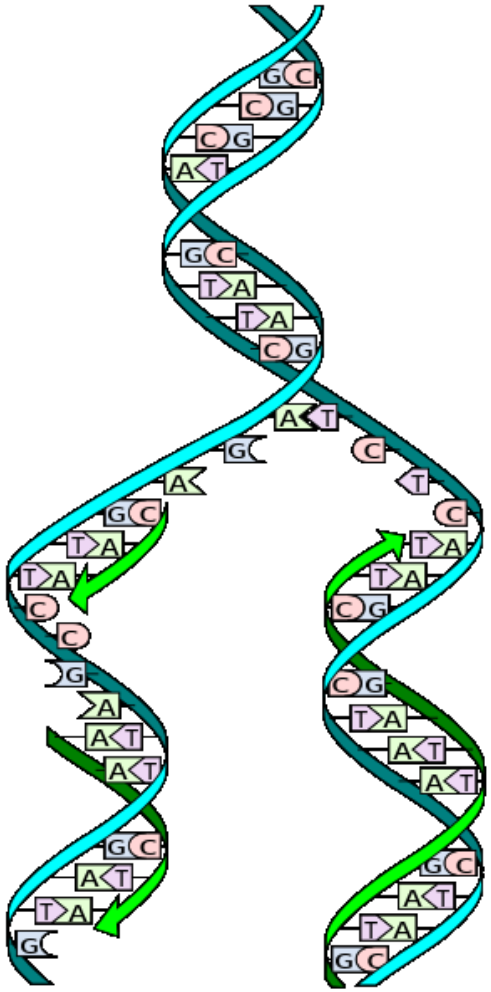


Vzniká esterová vazba mezi 3´-OH skupinou stávajícího řetězce a 5´-fosfátem vstupujícího nukleotidu

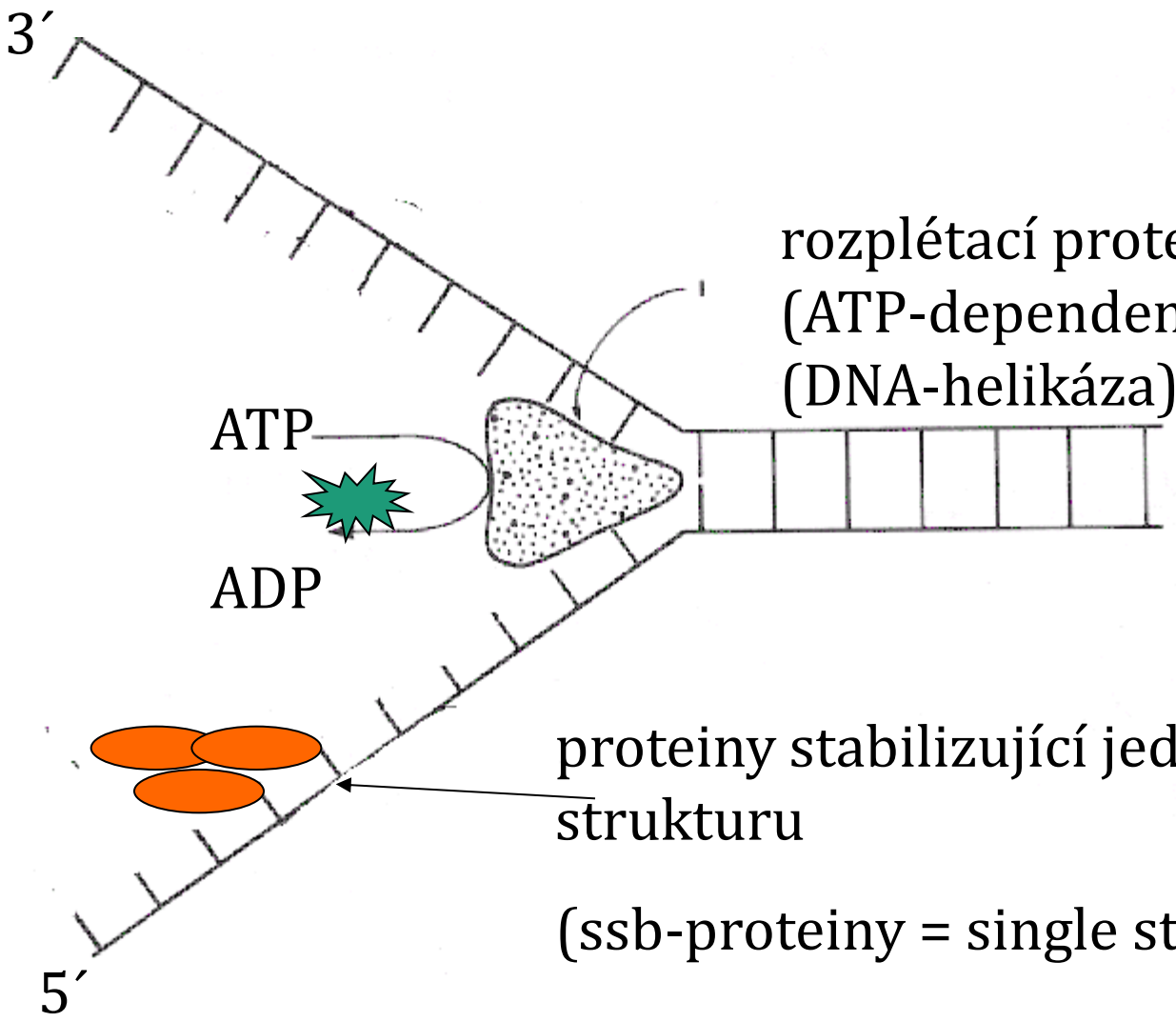


prodlužování řetězce

Co se děje při zahájení replikace

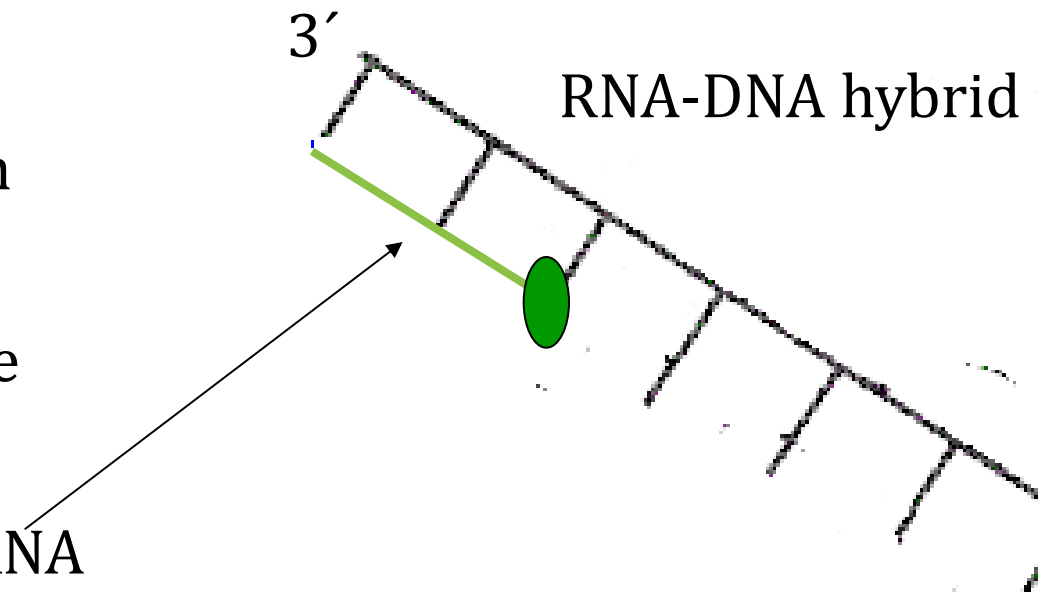


- ✓iniciace replikace – dvoušroubovice DNA musí být rozpojena
- ✓ místo, kde je rozvíjení zahájeno, se nazývá počátek (origin)
- ✓ vytváří se replikační vidlice
- ✓ další rozvíjení provádí enzym helikáza
- ✓ reasociaci řetězců zabrání ssb-proteiny (single strain binding protein, replication protein A RPA u ekaryontů)
- ✓ podle matrice obou mateřských vláken probíhá syntéza vláken nových


3´
rozplétací protein
(ATP-dependentní)
(DNA-helikáza)
ATP
ADP
proteiny stabilizující jednovláknovou strukturu
(ssb-proteiny = single strain binding)
5´

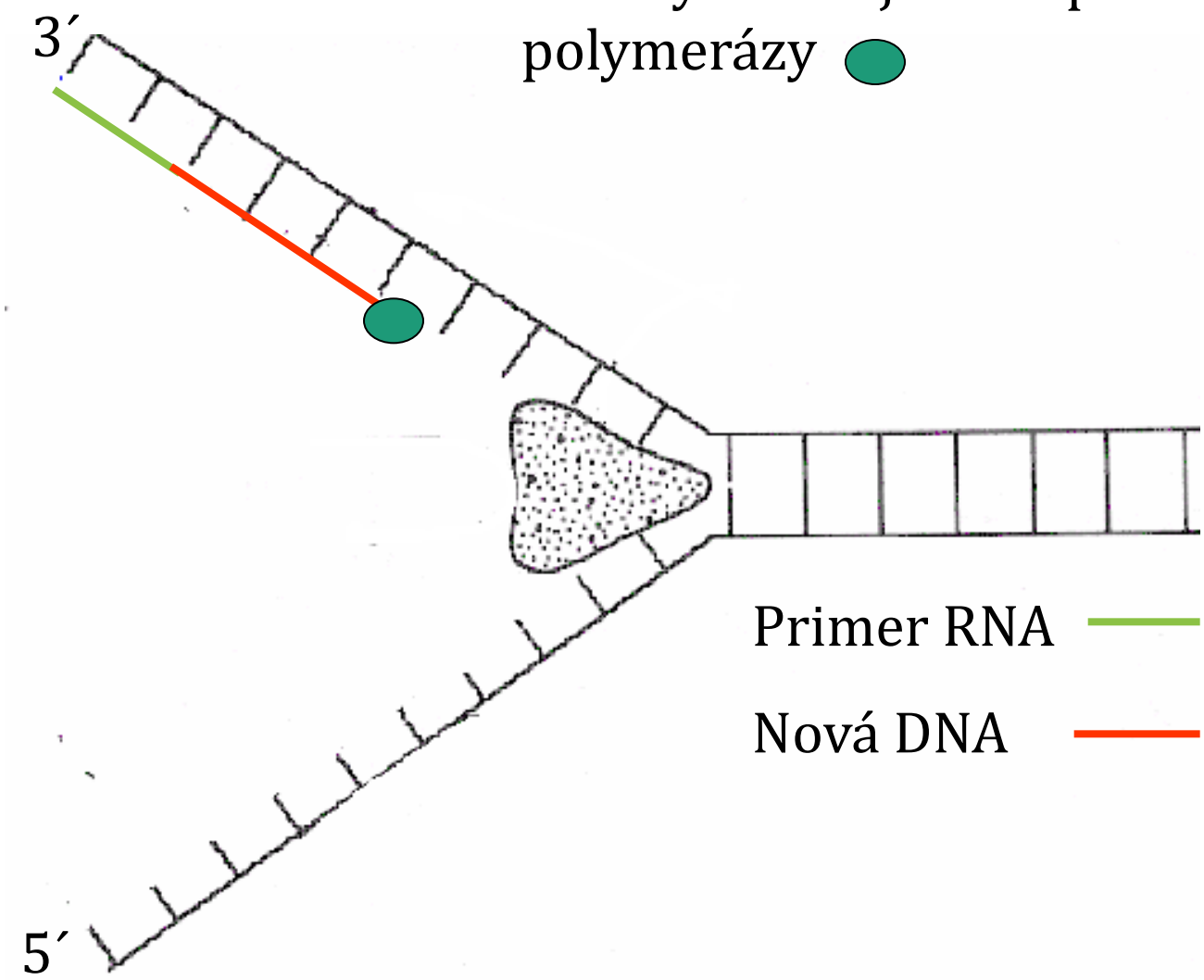
K syntéze DNA je potřebný RNA primer

- ✓ DNA polymeráza 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 polymerázy (primasy)
- ✓ Primer je kódován podle odpovídající sekvence templátu

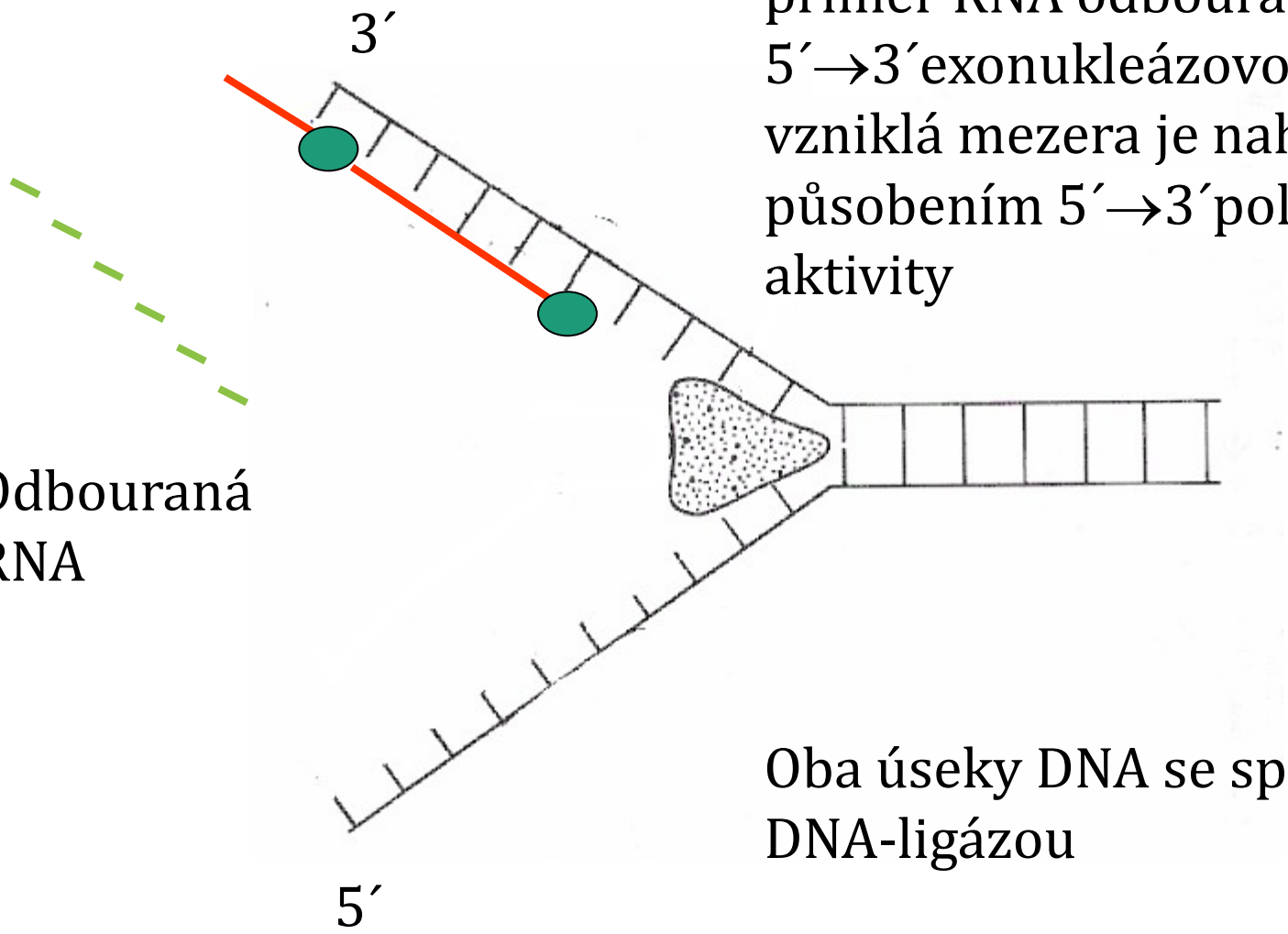


Elongace

Po vytvoření primeru se na 3´-konci RNA syntetizuje DNA působením DNA polymerázy



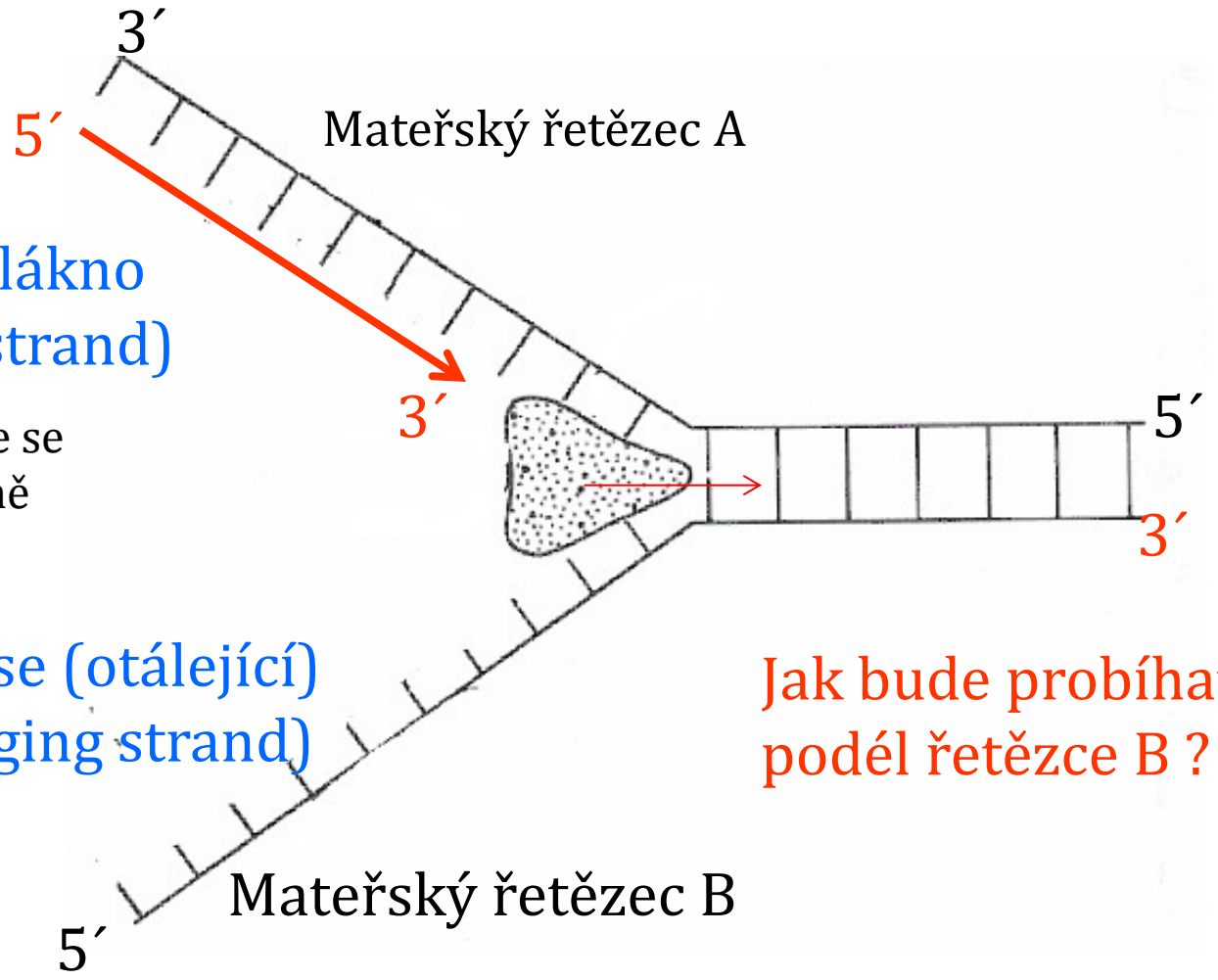
Po ukončení syntézy DNA se primer RNA odbourá 5´→3´exonukleázovou aktivitou a vzniklá mezera je nahrazena DNA působením 5´→3´polymerázové aktivity



Oba úseky DNA se spojí DNA-ligázou

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

Bez problému tedy proběhne podél mateřského řetězce A



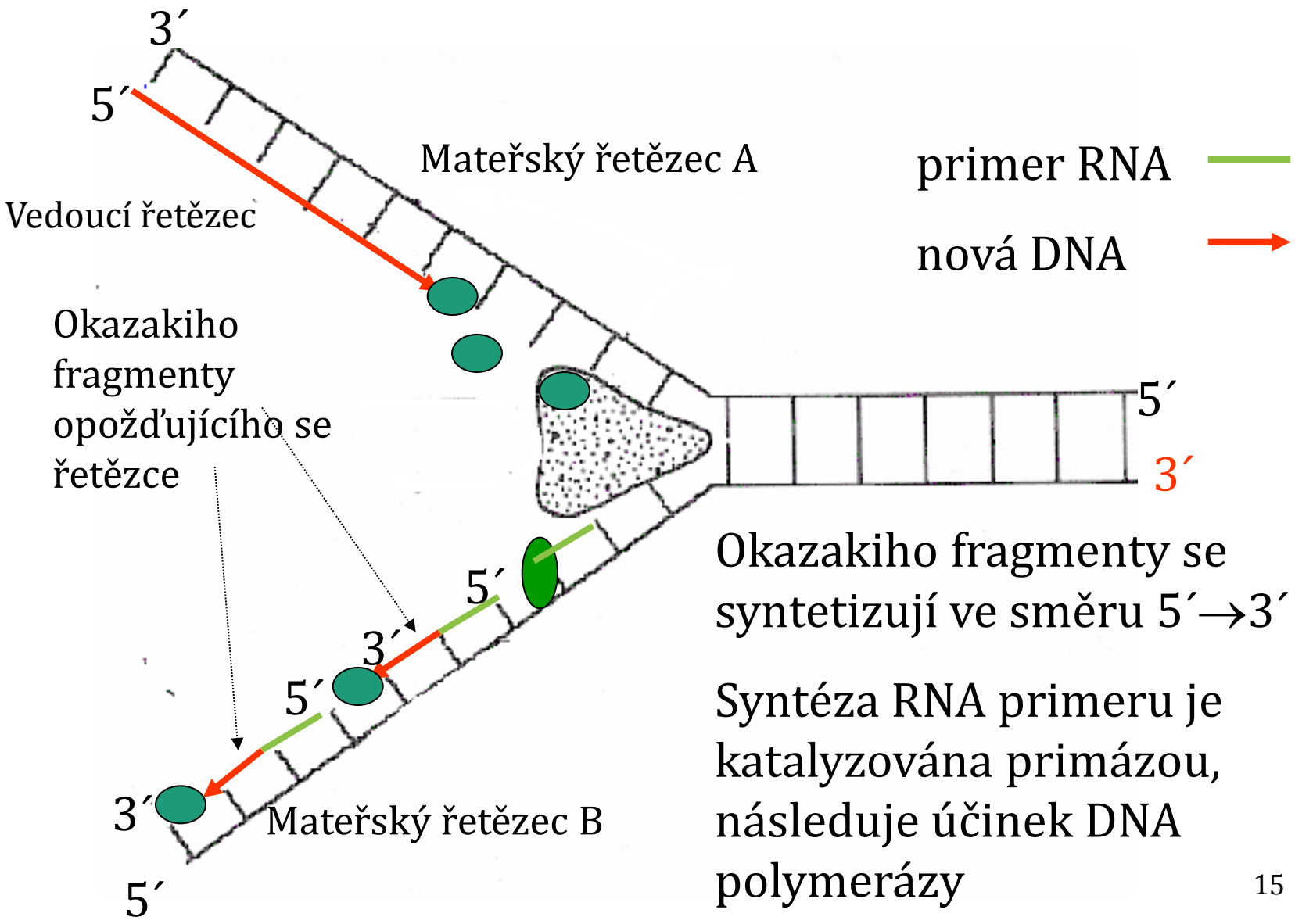
vedoucí vlákno
(leading strand)

Syntetizuje se
kontinuálně

opožďující se (otálející)
vlákno (lagging strand)

Jak bude probíhat syntéza
podél řetězce B ?

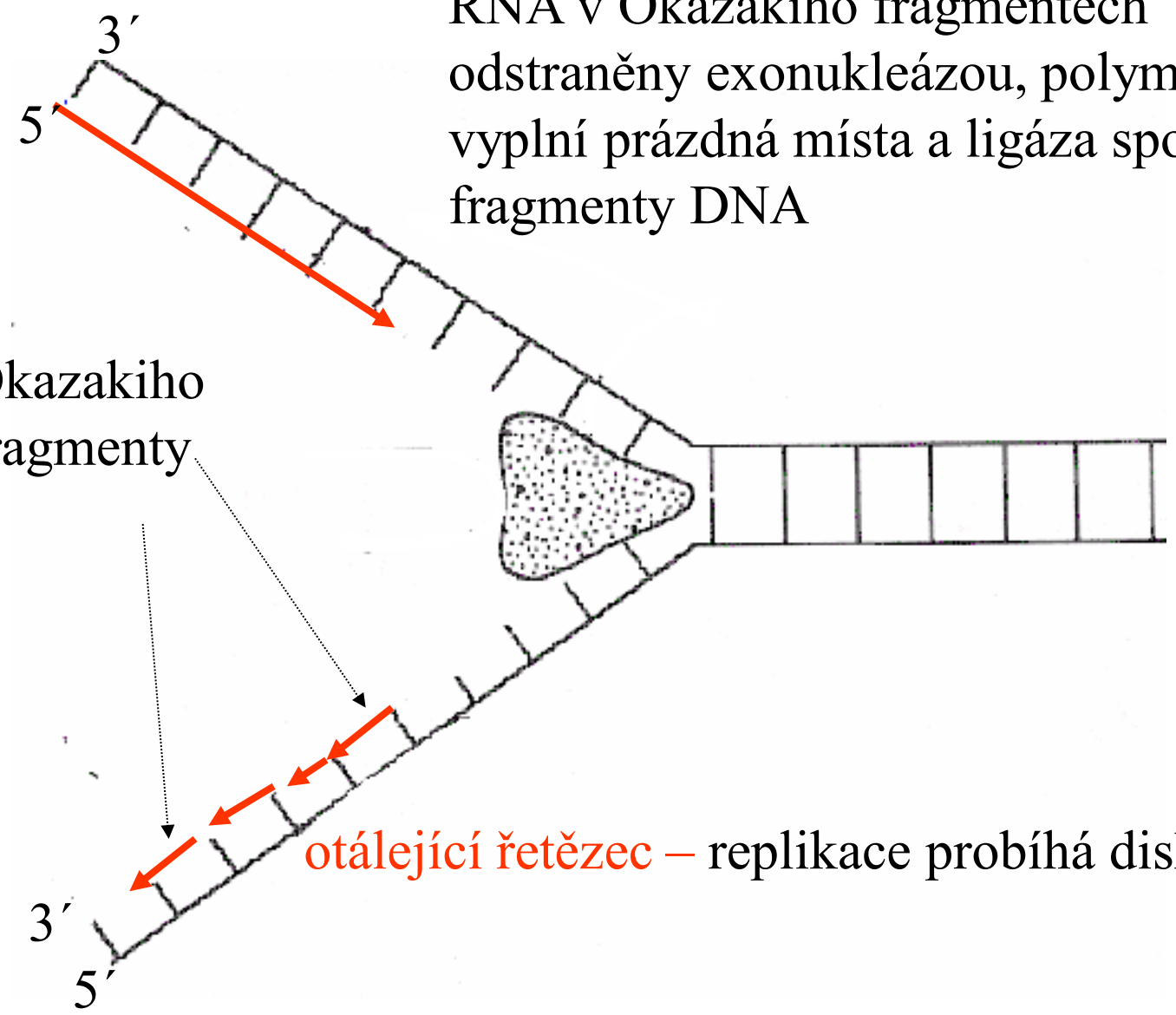
Na otálejícím řetězci vznikají Okazakiho fragmenty



Okazakiho fragmenty se syntetizují ve směru 5´→3´

Syntéza RNA primeru je katalyzována primázou, následuje účinek DNA polymerázy

Při pokračující replikaci jsou úseky RNA v Okazakiho fragmentech odstraněny exonukleázou, polymeráza vyplní prázdná místa a ligáza spojí fragmenty DNA

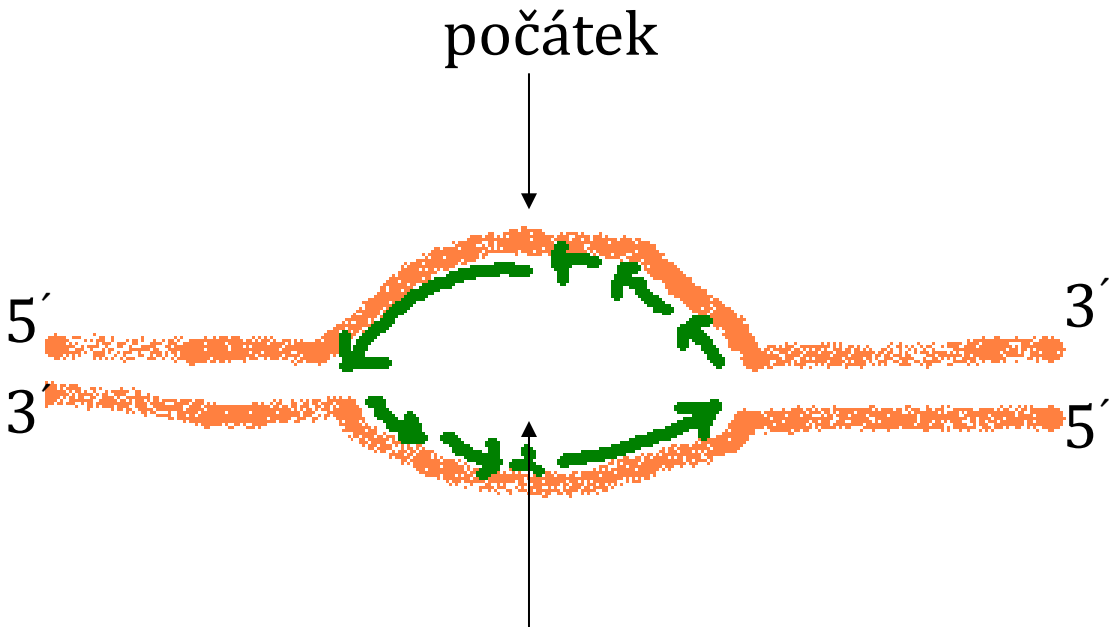


otálející řetězec – replikace probíhá diskontinuálně

Rozdíly mezi eukaryonty a prokaryonty

Iniciace replikace

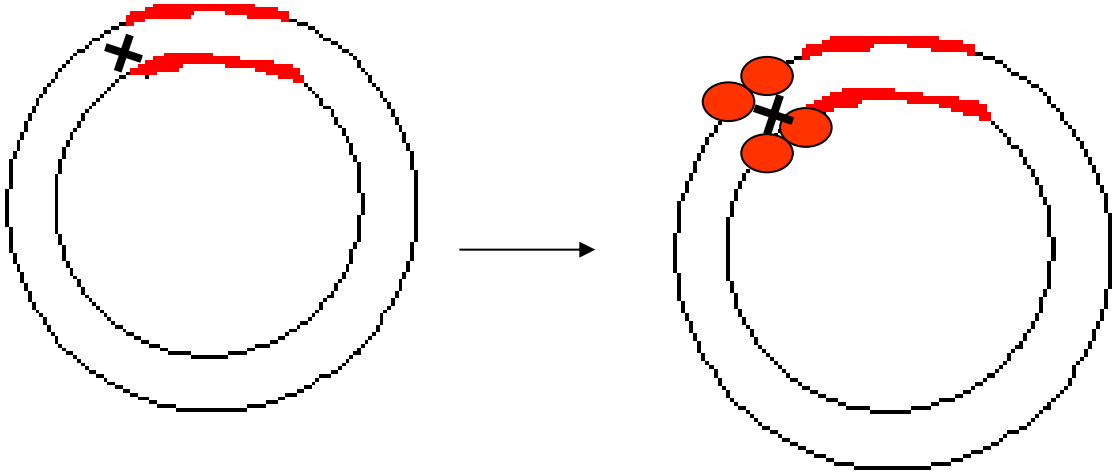
- ✓ replikace je prekaryontů i eukaryontů vždy zahájena v počátku
- ✓ počátek je určitá specifická sekvence bází a váží se k němu specifické proteiny (předprimerové proteiny)
- ✓ replikace probíhá v obou směrech od každého počátku, vznikají dvě replikační vidlice, které se od sebe vzdalují
- ✓ vznikají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



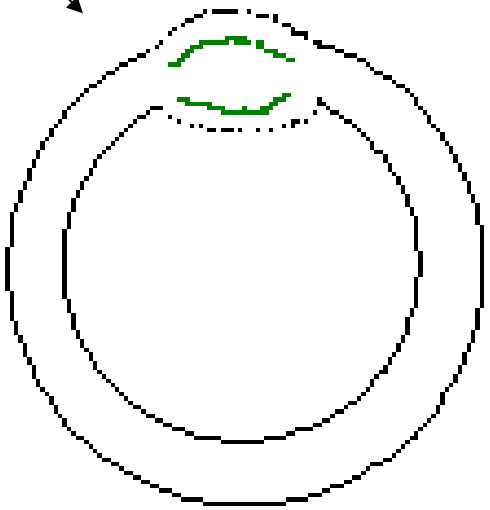
Iniciace replikace u prokaryontů

Počátek (bohatý na A,T sekvence)

Ori-vážící proteiny



Denaturace v A,T oblasti



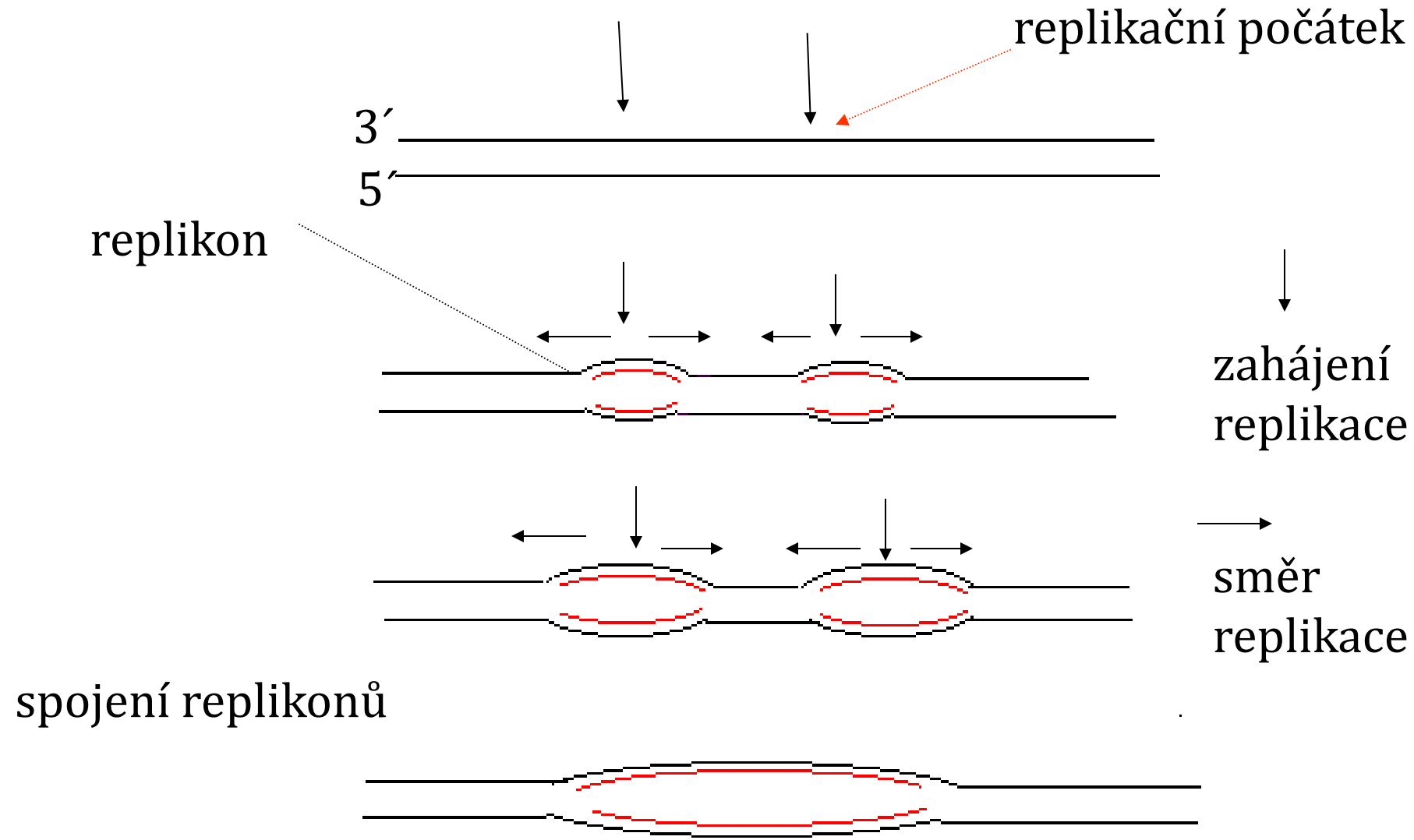
Replikace začíná v počátku a pokračuje, dokud se obě vidlice nesetkají

Iniciace replikace u eukaryontů

- ✓ eukaryotické chromozomy jsou tvořeny dlouhými molekulami DNA, které 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 na 30 000 místech 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

Polymeráza	**Polymerázová aktivita** **(u všech 5´ → 3)**	**Exonukleázová aktivita**
DNA polymeráza I	Vyplnění místa po RNA, opravy DNA, odstranění RNA primerů	5´→3 i 3 →5
DNA polymeráza II	Opravy DNA	3 →5
DNA polymeráza III	Replikace	3 →5
DNA polymeráza IV	Replikace poškozené DNA	
DNA polymeráza V	Replikace poškozené DNA	

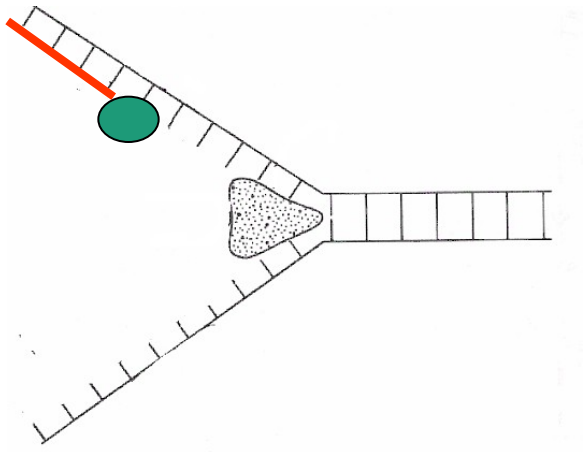
Enzymy eukaryontní replikace*

Polymeráza	**Polymerázová aktivita** **(u všech 5´ → 3)**	**Exonukleázová aktivita**
DNA polymeráza α	Primáza, opravy DNA	žádná
DNA polymeráza β	opravy DNA	žádná
DNA polymeráza γ	replikace v mitochondriích	3 →5
DNA polymeráza δ	replikace, opravy DNA	3 →5
DNA polymeráza ε	replikace	3 →5

* Je známo kolem 13 polymeráz

Korekce struktury DNA

- ✓ Přesnost duplikace struktury ~ 1 chyba/10^9 párů bází
- ✓ Zajištěno korekční aktivitou DNA-polymeráz (proofreading) a kontrolou správného párování (mismatch repair) .
- ✓ Kontrola konců vznikajících řetězců – srovnání nově zařazené báze na 3´konci s templátem.
- ✓ Pokud je zařazena chybná báze, pomocí 3´→5´ exonukleázové aktivity se chybně spárovaný nukleotid odštěpí



DNA-polymerázy mají 5´→3´polymerázovou aktivitu a 3´→5´exonukleázovou aktivitu

Další enzymy podílející se na replikaci

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

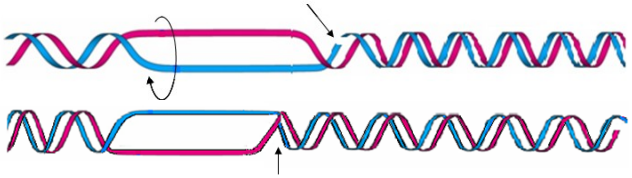
Topoisomerázy

(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 topoisomerázami
- ✓ DNA topoisomerázy mají řadu funkcí (při replikaci, transkripci, ukládání DNA do buněk, při opravách)

Topoisomerázy

Topoisomerázy třídy I



Reversibilně přerušuje fosfoesterovou vazbu v jednom řetězci, umožní otáčení kolem jednoho řetězce (uvolnění superstočení) a katalyzuje opětné spojení řetězců – integruje nukleázovou a ligázovou aktivitu.

Nevyžaduje energii (mezi koncem přerušeného řetězce a enzymem vzniká dočasně vysokoenergetická kovalentní vazba).

Je u prokaryontů i eukaryontů.

Topoisomerázy třídy II

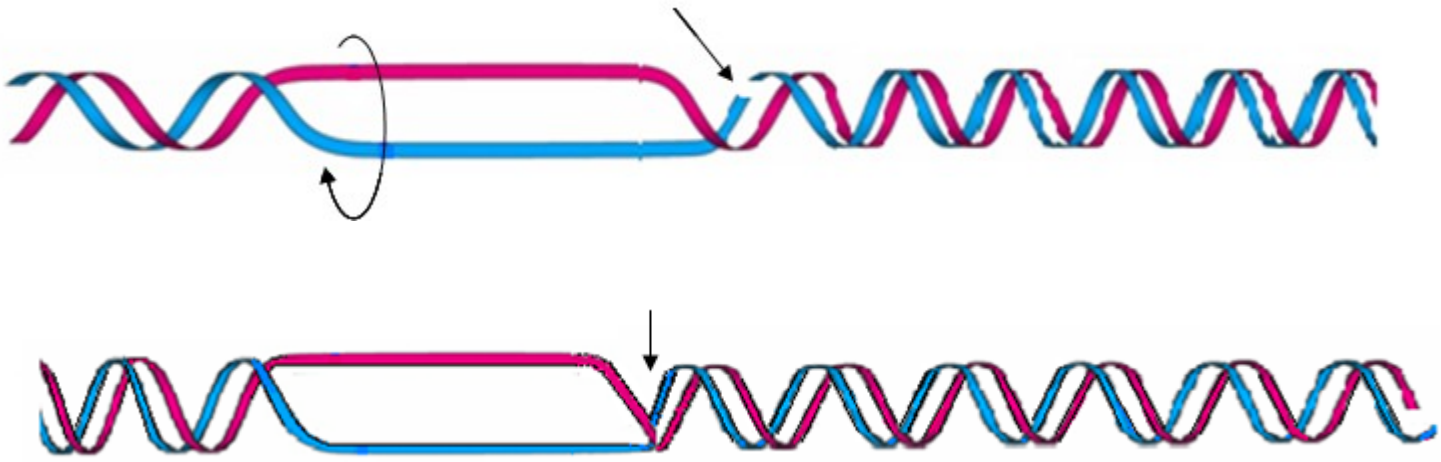
Může relaxovat superstočenou DNA nebo superstáčení zavádět.
Štěpí oba řetězce.

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

Pro spojení řetězců vyžaduje ATP.

Účinek topoisomerázy I

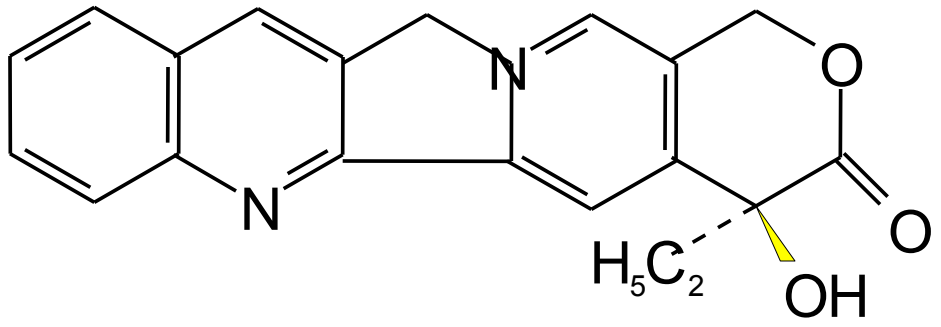
Přerušení fosfoesterové vazby následované rotací kolem druhého vlákna a opětným spojením



Inhibitory lidské topoisomerázy = zabraňují replikaci

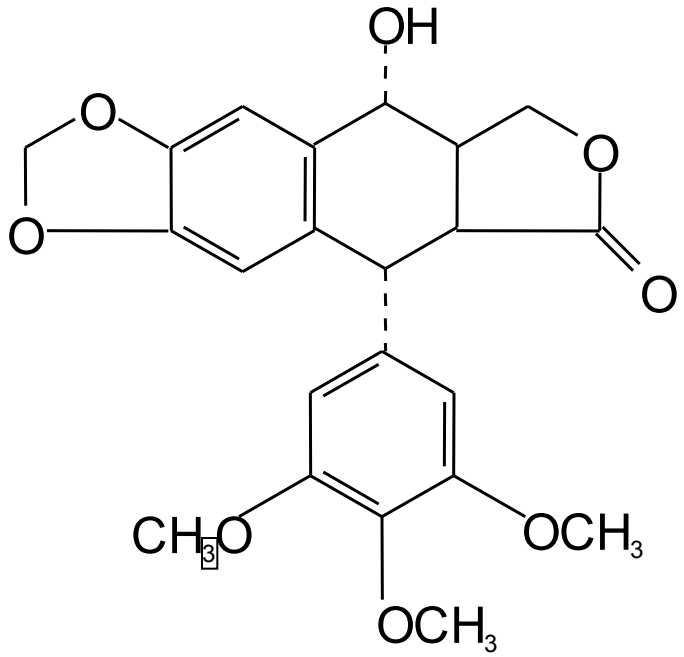
protinádorové léky

Typ inhibitoru	
Inhibitory topoisomerázy I	Topotecan, irinotecan
Inhibitory topoisomerázy II	Etoposid
Inhibitory topoisomerázy II s interkalační aktivitou	Antracykliny (Doxorubicin, Epirubicin)
Inhibitory bakteriální gyrázy	Fluorochinolony (Norfloxacin, Ciprofloxacin, Nalidixin)



kamptothecin

Camptotheca acuminata



podofyllotoxin

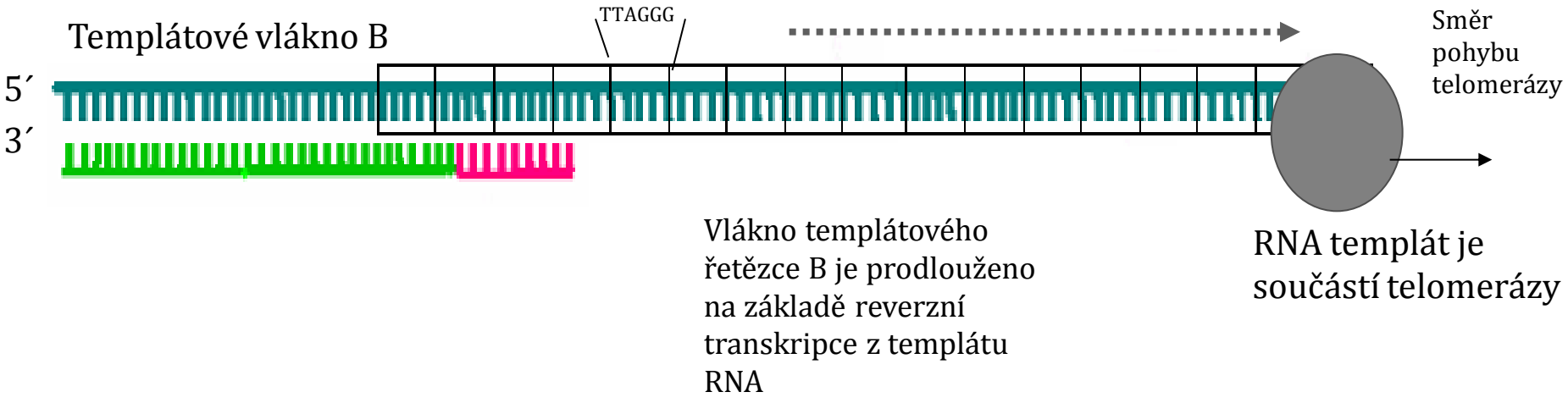
Podophyllum peltatum ad.

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

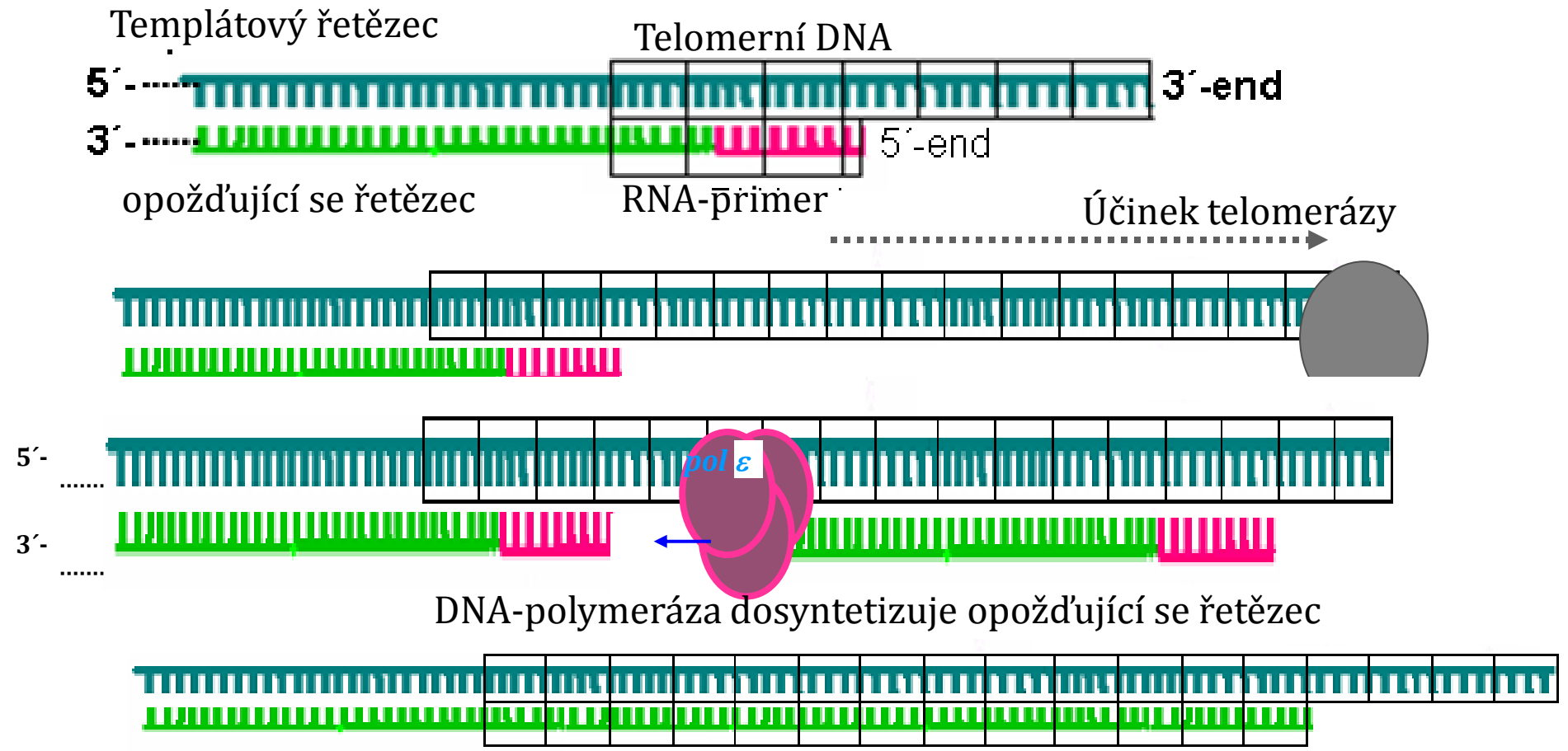
- ✓ nachází se např. v buňkách zárodečné linie, kmenových buňkách kostní dřeně, stimulovaných T a B lymfocytech a v buňkách nádorově transformovaných.
- ✓ dokončení syntézy DNA na opožďujícím se vlákně
- ✓ je reverzní transkriptáza – ve své struktuře nese RNA templát, ten prodlouží 3´konec templátové DNA na základě syntézy DNA přepisem z RNA
- ✓ Hexanukleotid AGGGTT se procesem reverzní transkripce opakovaně připojuje na 3´-konec templátového vlákna



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 telomerázu – pokud jsou pěstovány v kulturách, přežijí určitý počet cyklů, pak odumírají
- ✓ snížená aktivita telomerázy pravděpodobně souvisí se stářím organismu
- ✓ buňky, které se často dělí (zárodečné, kmenové a nádorové) mají vyšší hladinu telomerázy
- ✓ inhibitory telomerázy mohou být užitečné v terapii nádorů

Poškození a opravy DNA

- ✓ Přes důkladný proofreading uplatňovaný během syntézy a mismatch repair se mohou ve struktuře DNA objevit chyby.

- ✓ Navíc je DNA permanentně poškozována vnějšími vlivy jako jsou chemikálie (mutageny), nebo různé typy záření.

Hrubý odhad počtu poškozujících zásahů do DNA v lidské buňce: cca10^4-10^6 bází /den

$\Rightarrow$ 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 (10^4purinů 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)
Mezivřetězové 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)
- ✓ vystřižení porušené báze („base excision repair“)
- ✓ vystřižení 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 kontrolu správného zařazení posledního nukleotidu (3´→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 vystřižením 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 vystřižených bází působením DNA polymerázy a.

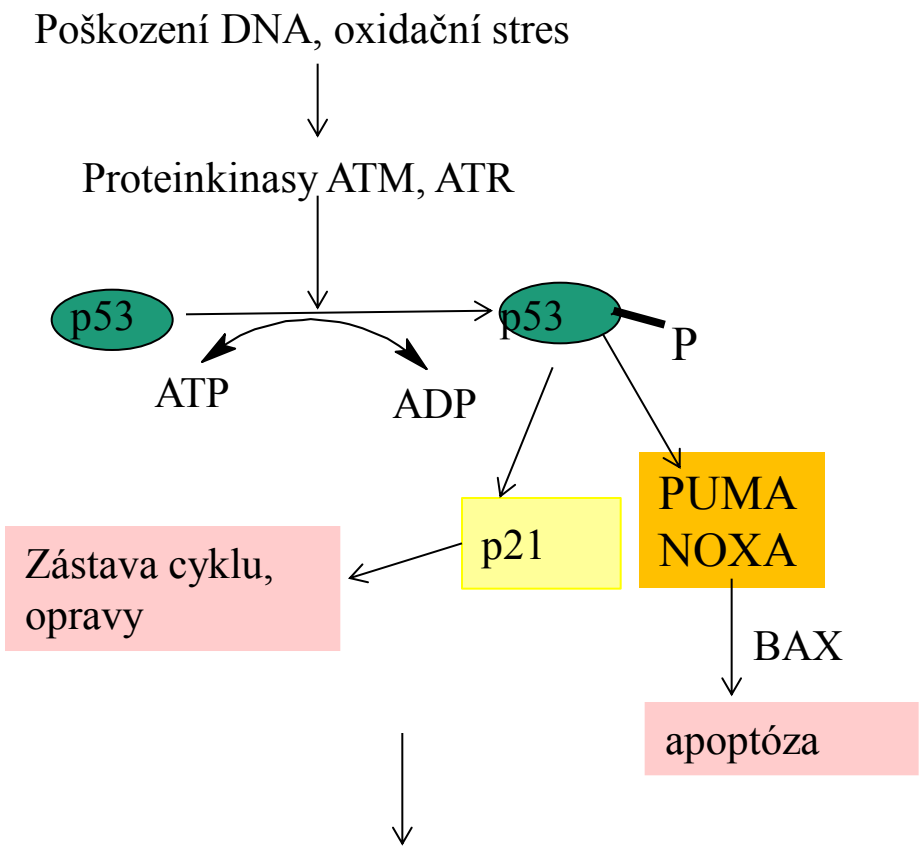
Opětné spojení řetězce ligázou

Mutace mitochondriální DNA

- ✓ mitochondrie jsou 10x náchylnější na poškození DNA více než DNA jaderná
- ✓ nemá takové **množství opravných systémů** jako jaderná DNA
- ✓ **mitochondrií je v buňce mnoho** a jejich DNA se musí dělit stejně často jako se dělí buňka sama, nedělí se však jen jedna mitochondrie, nýbrž všechny mitochondrie v buňce přítomné, tím stoupá pravděpodobnost vzniku chyby
- ✓ mitochondriální DNA nemá histony,
- ✓ mitochondriální DNA je **velice blízko dýchacímu řetězci** a tedy i radikálům, které se při reakcích v dýchacím řetězci tvoří

Protein p53 – strážce genomu

Gen *p53* koduje protein, který brání buňce s poškozenou DNA vstoupit do S-fáze.



- Protein p53 je transkripční faktor aktivovaný fosforylací
- Je aktivován při poškození DNA
- Fosforylovaný p53 působí jako transkripční faktor a indukuje syntézu proteinu p21, příp.PUMA a NOXA
- p21 působí jako Cdk-inhibitor
- Zprostředkuje dočasné **zastavení b. cyklu** v G1/S kontrolním bodě
- zvyšuje expresi proteinů potřebných pro reparaci DNA
- pokud není oprava úspěšná, zvyšuje se exprese Bax → **apoptóza**

Ztráta nebo poškození p53 je spojena s více než 50 % nádorových onemocnění

40