



# Replikace nukleových kyselin

- **Replikace** = tvorba replik (kopií) molekul nukleových kyselin zajišťující přenos genetické informace z DNA do DNA nebo RNA do RNA
- (z mateřské molekuly se vytvářejí dvě identické molekuly dceřiné)

# Charakteristické rysy replikace dvouřetězcové DNA

1. Probíhá semikonzervativním způsobem
2. Probíhá semidiskontinuálně

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

# Tři možné způsoby replikace DNA

Semikonzervativní

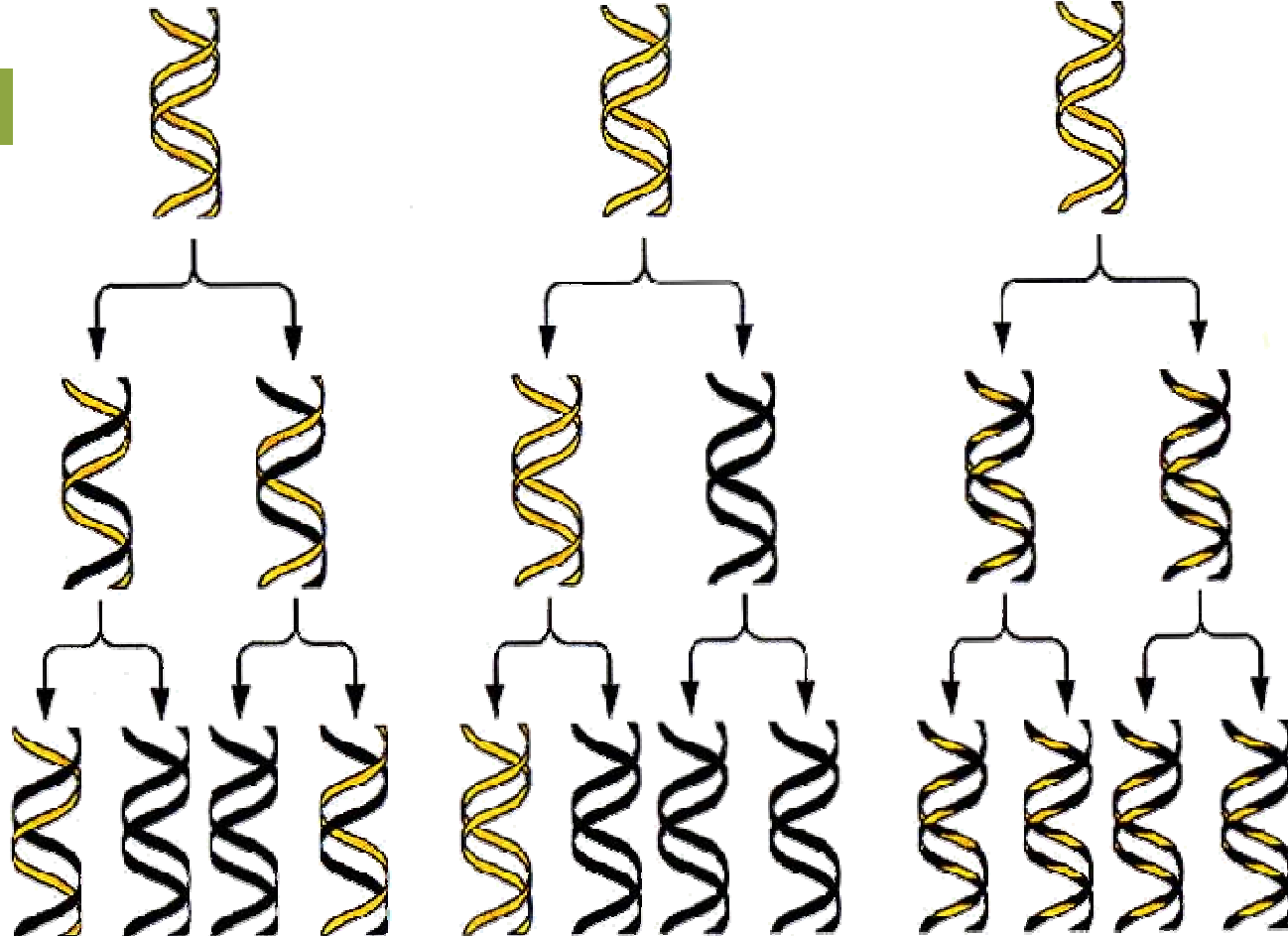
Konzervativní

Disperzní

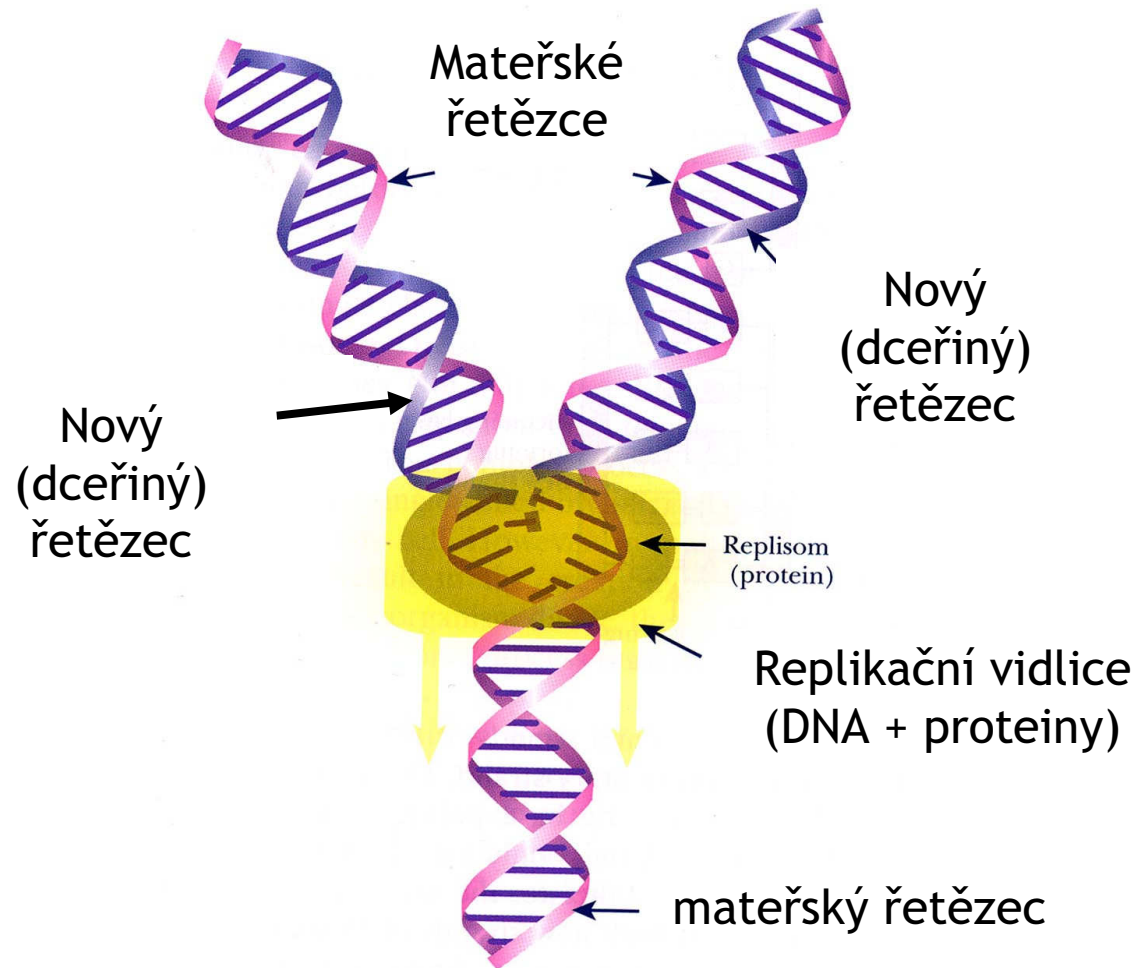
Rodičovská DNA

DNA po první replikaci

DNA po druhé generaci



# Semikonzervativní způsob replikace dsDNA

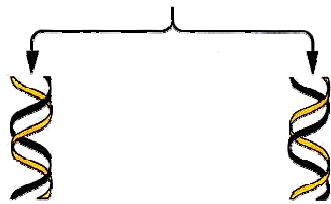


# Důkaz semikonzervativní replikace DNA (Meselson a Stahl 1958)

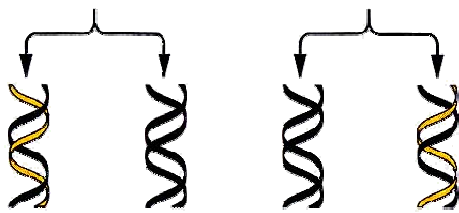
1 *E. coli* cells are grown on  $^{15}\text{N}$  for several generations.



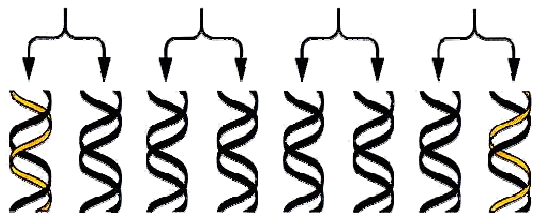
3 Cells are then transferred to medium containing  $^{14}\text{N}$  for one generation.



5 For two generations.



7 For three generations.

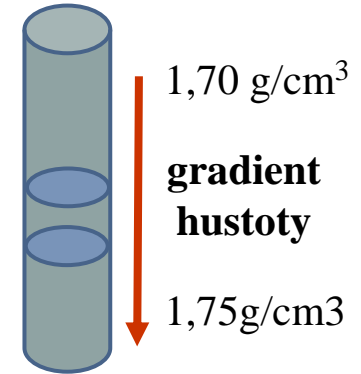
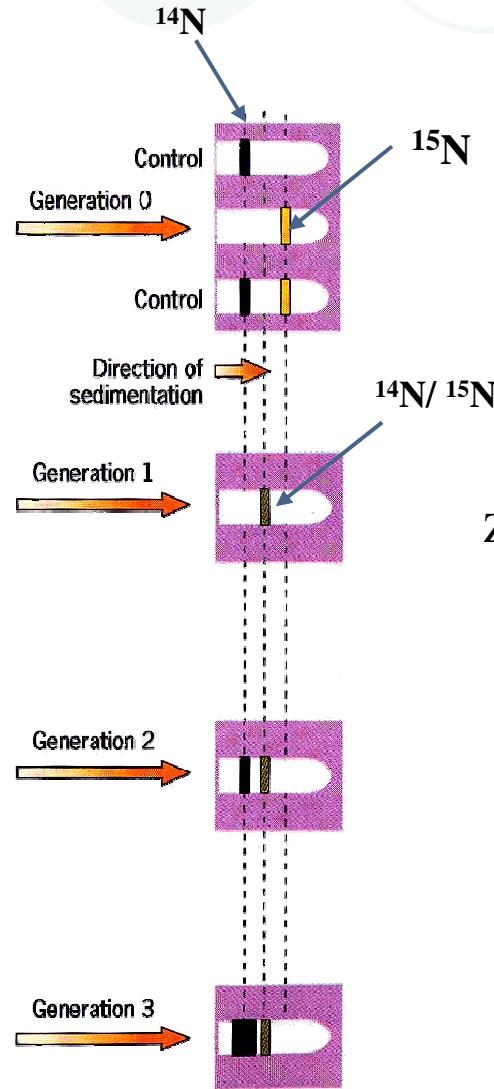


2 DNA is extracted and analyzed by CsCl density gradient centrifugation.

4 DNA is extracted and analyzed.

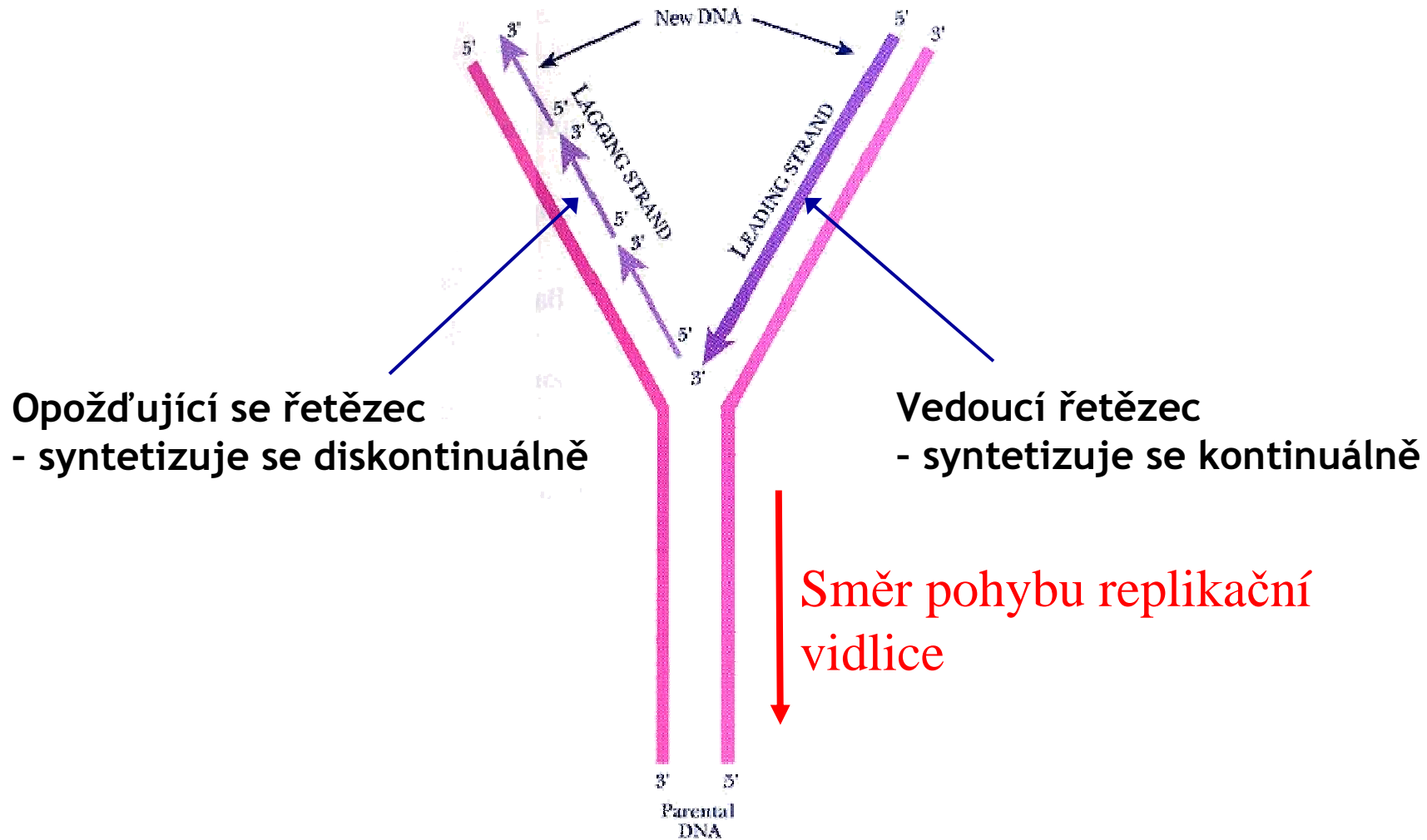
6 DNA is extracted and analyzed.

8 DNA is extracted and analyzed.



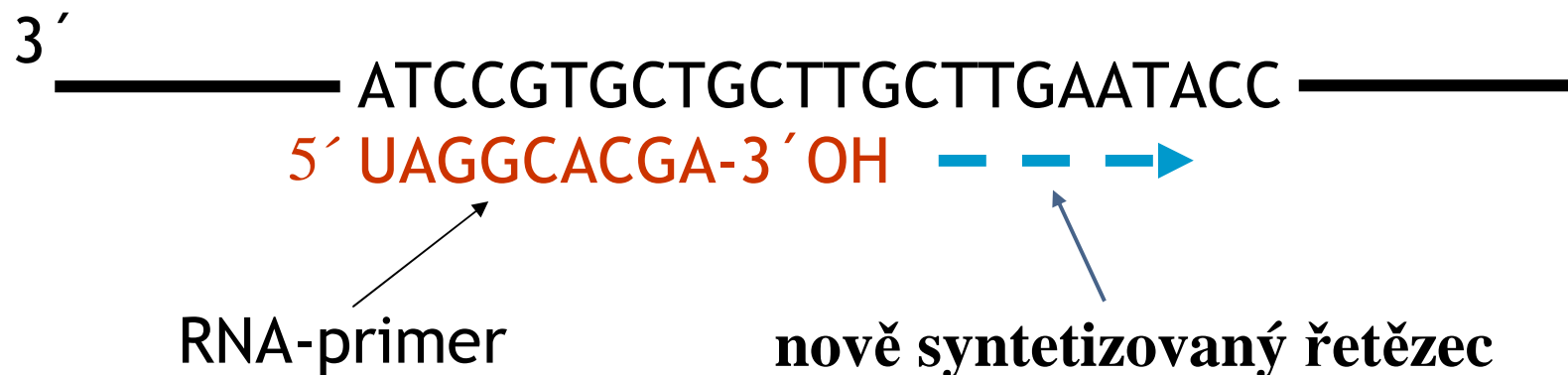
Zkumavka s roztokem CsCl

# Semidiskontinuální syntéza řetězců při replikaci

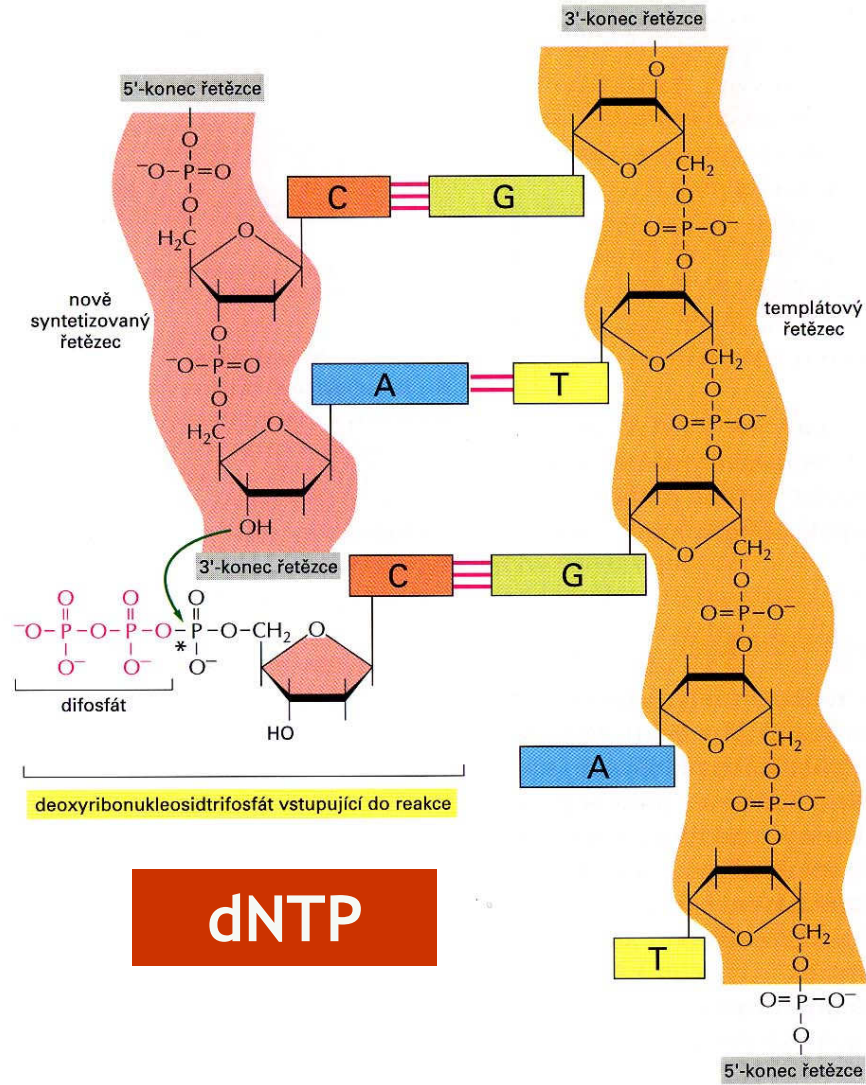


# Předpoklady a požadavky pro replikaci nukleových kyselin

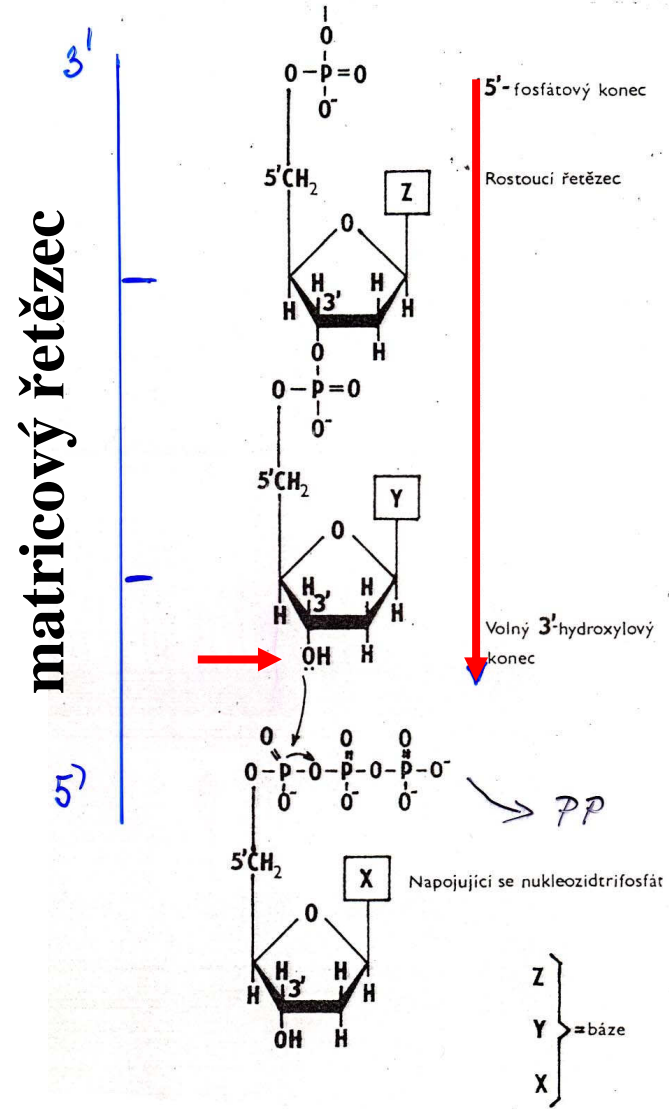
1. **Templát** (matricový řetězec) = mateřská molekula
2. **Primer** = krátký oligoribonukleotid s volným 3' OH koncem (volná 3' OH skupina nukleotidu)
3. **Enzymy katalyzující připojování nukleotidů** (polymeráza, primáza, ligáza)
4. **Nukleotidy** (dNTP)



# Syntéza DNA při procesu replikace



# Směr syntézy polynukleotidového řetězce





# Enzymy kooperující při replikaci a jejich funkce

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

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

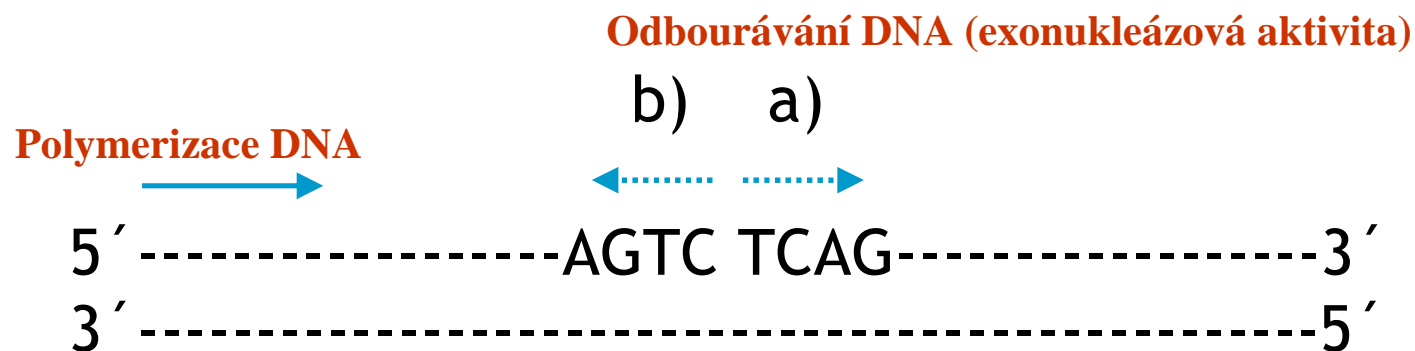
**TABLE 5.01****Proteins Involved in DNA Replication in *E. coli***

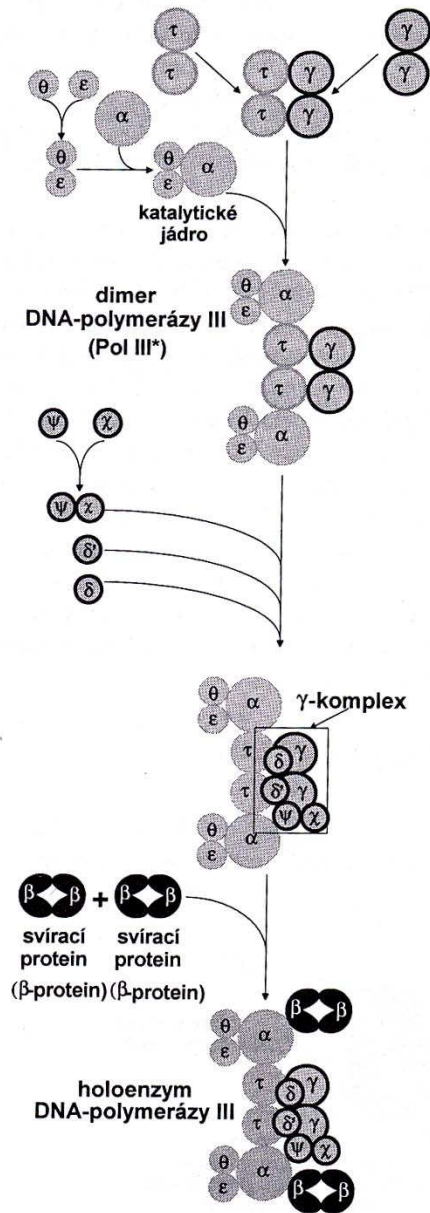
<b>Protein</b>	<b>Gene</b>	<b>Function</b>
DnaA	<i>dnaA</i>	Initiation of chromosome division; binds to the origin replication
Helicase	<i>dnaB</i>	Unwinds the double helix
DnaC	<i>dnaC</i>	Loading of DNA helicase
SSB	<i>ssb</i>	Single strand binding protein
Primase	<i>dnaG</i>	Synthesis of RNA primers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

# Charakteristika aktivit DNA-polymeráz

- **DNA-dependentní-DNA-polymerázy**

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





Obr. 128  
Sestavování holoenzymu  
DNA-polymerázy III

**$\alpha$ -monomer**, který katalyzuje polymeraci. Monomer  $\alpha$  se vyznačuje již slabou polymerační aktivitou o rychlosti polymerace 8 nukleotidů/s. Nemá však exonukleázovou aktivitu;

**$\epsilon$ -monomer** vyznačující se **3'-5'**-exonukleázovou aktivitou;

**$\theta$ -monomer**, který stimuluje účinek  $\epsilon$ -exonukleáz;

**$\gamma$ -monomer** váže ATP;

**$\delta$ -monomer** se váže na  $\beta$ ;

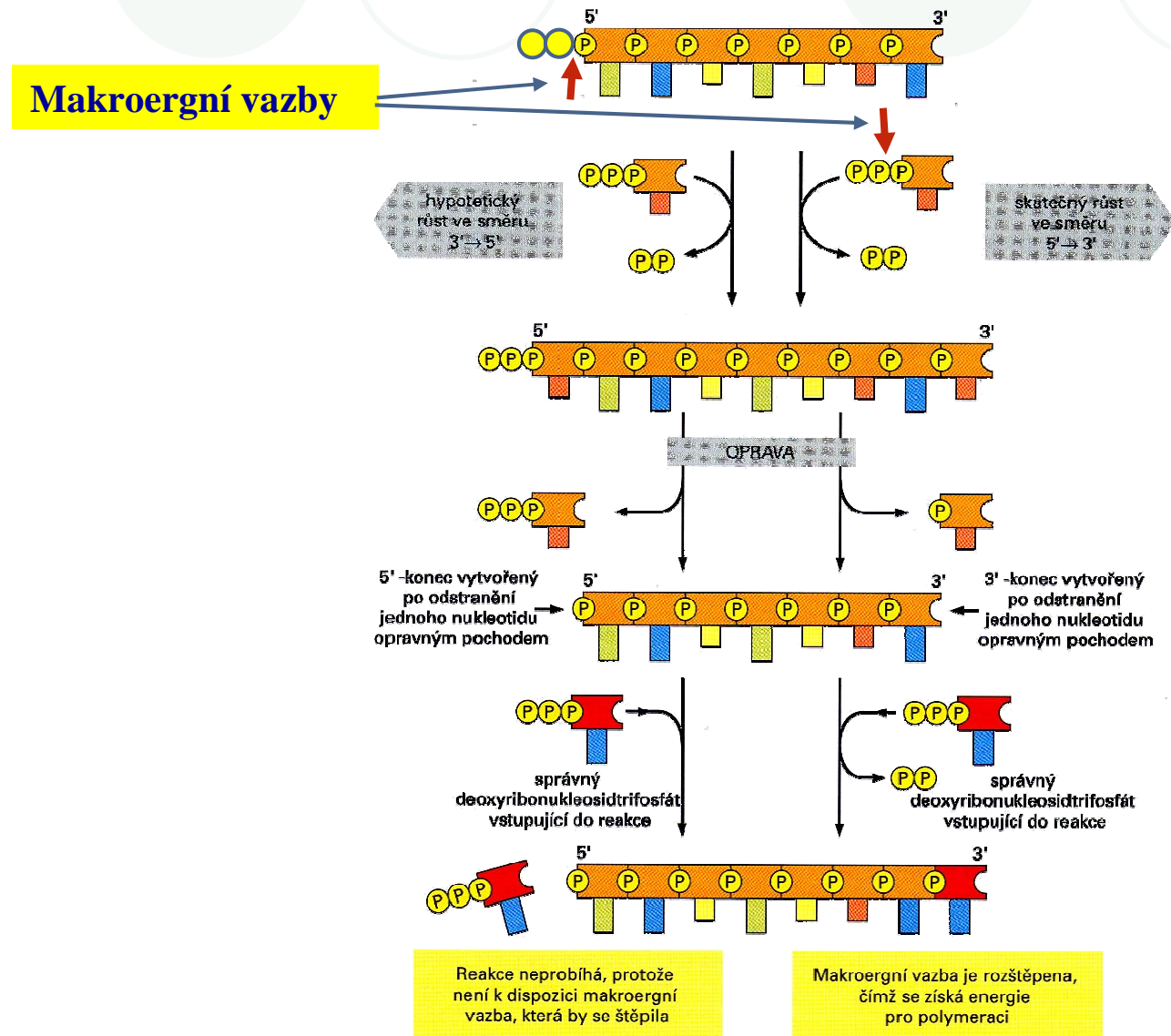
**$\delta'$ -monomer** stimuluje účinek monomeru  $\beta$ ;

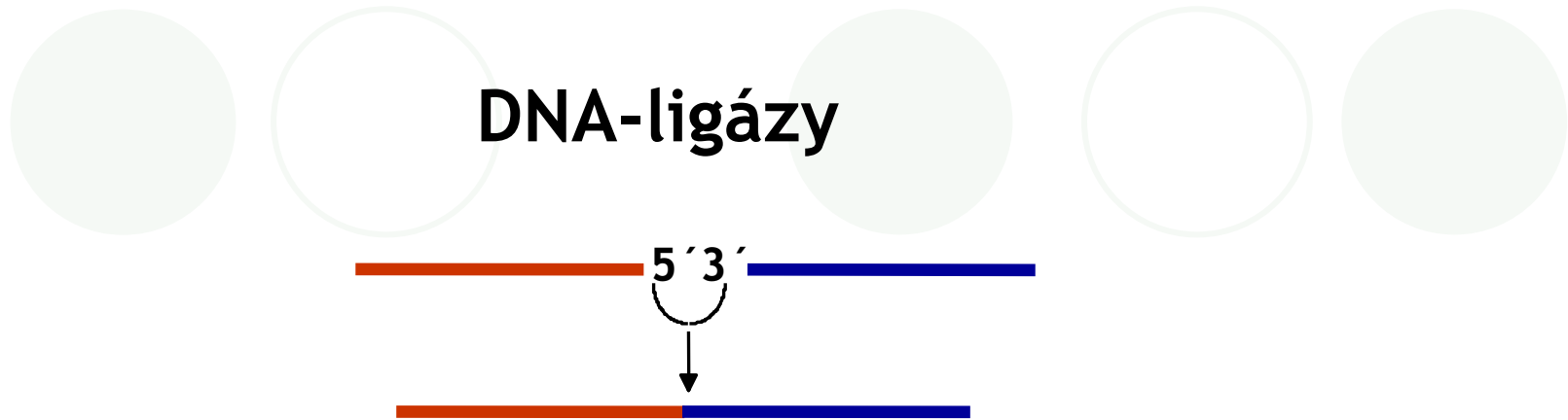
**$\chi$ -monomer**, na který se vážou proteiny SSB;

**$\psi$ -monomer** tvoří most mezi  $\chi$  a  $\gamma$ .



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





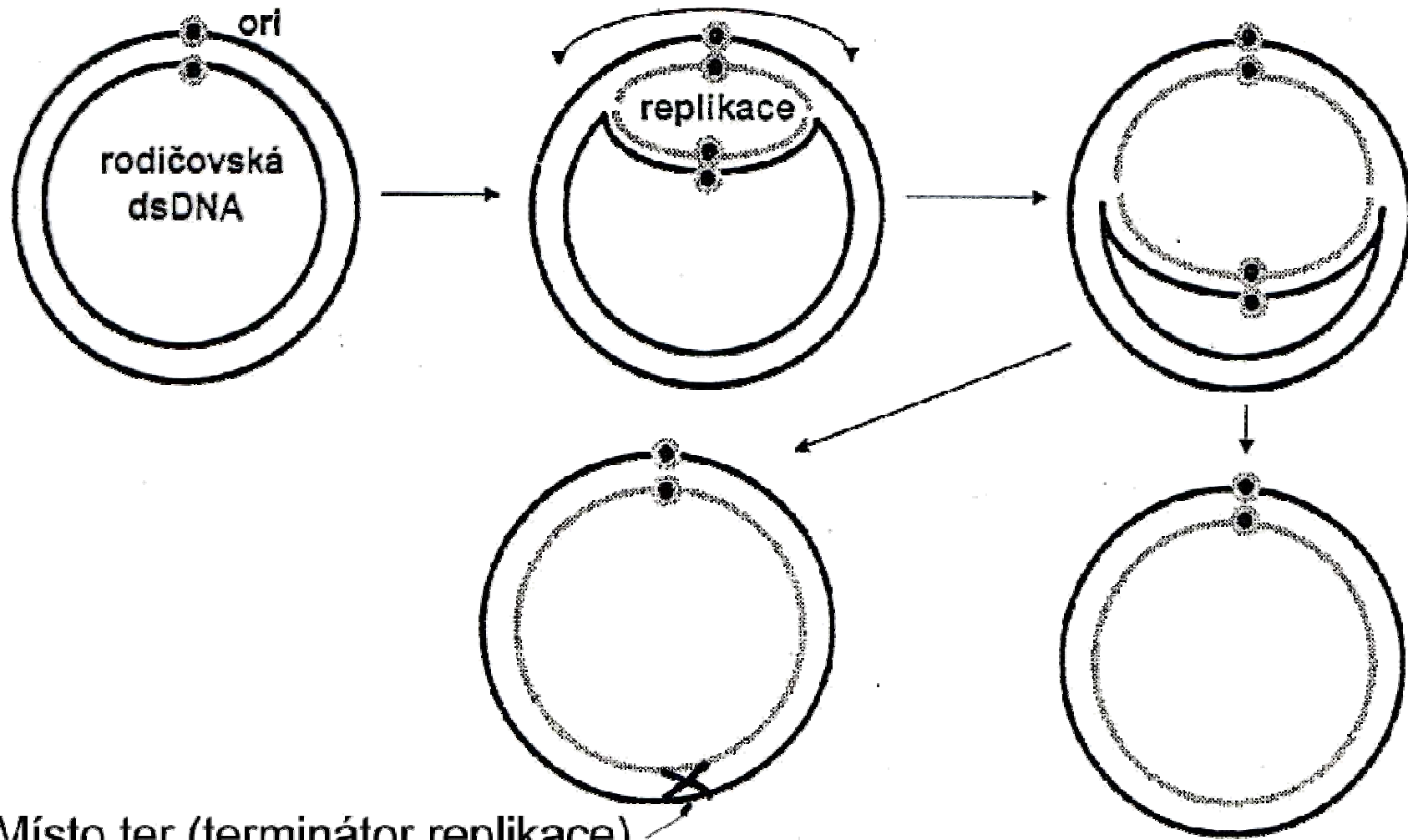
- **DNA-ligáza (ATP)**



- **DNA-ligáza (NAD<sup>+</sup>)**

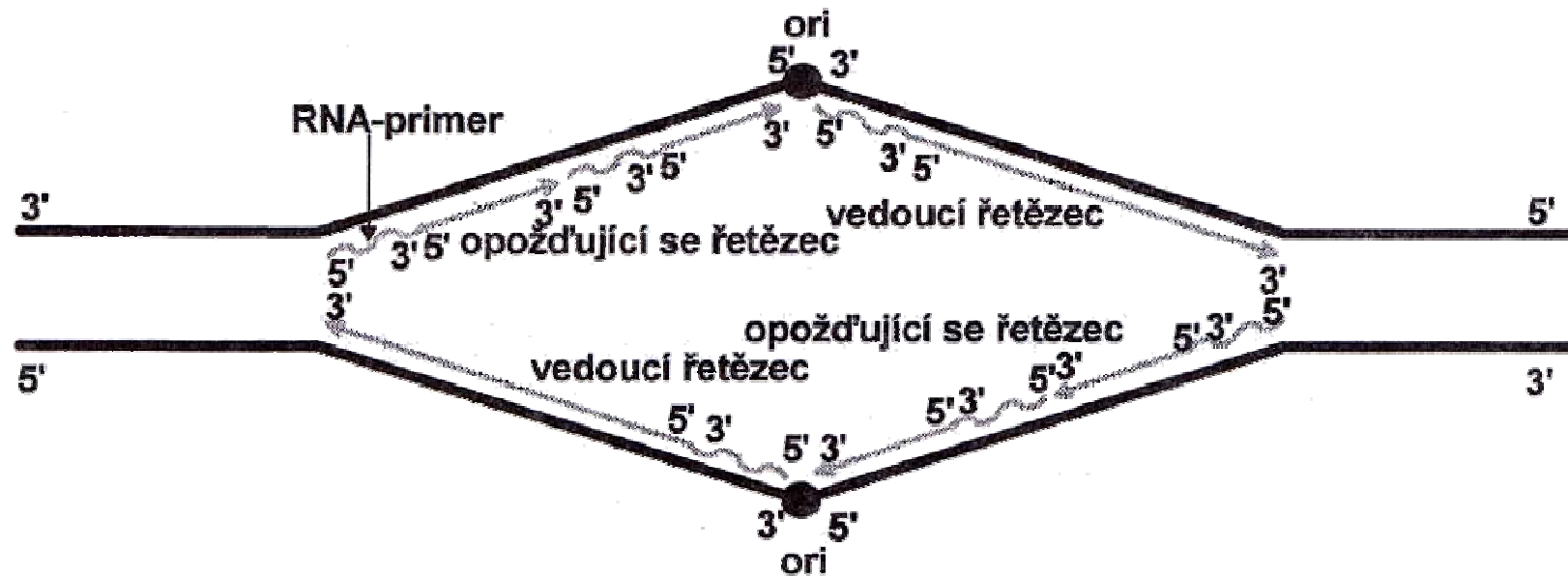


# Dvousměrná replikace kružnicové chromozomové dsDNA prokaryot



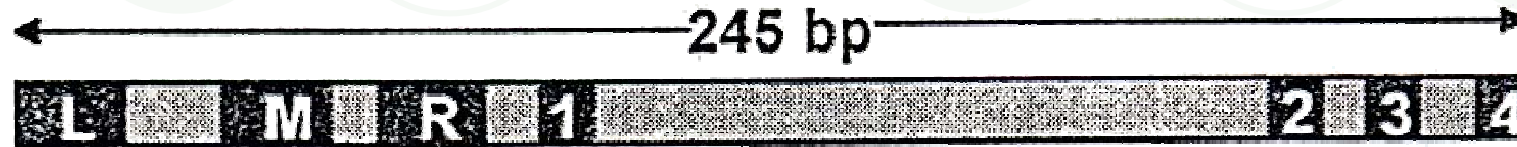


# Asymetrie replikační vidlice



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

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

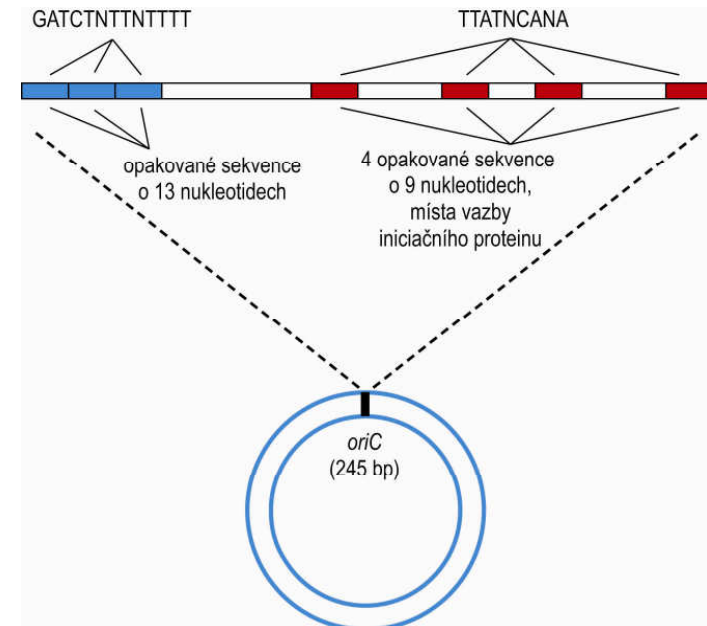


L, M, R jsou 13 bp-sequence GATCTNTTNTTTT

AT

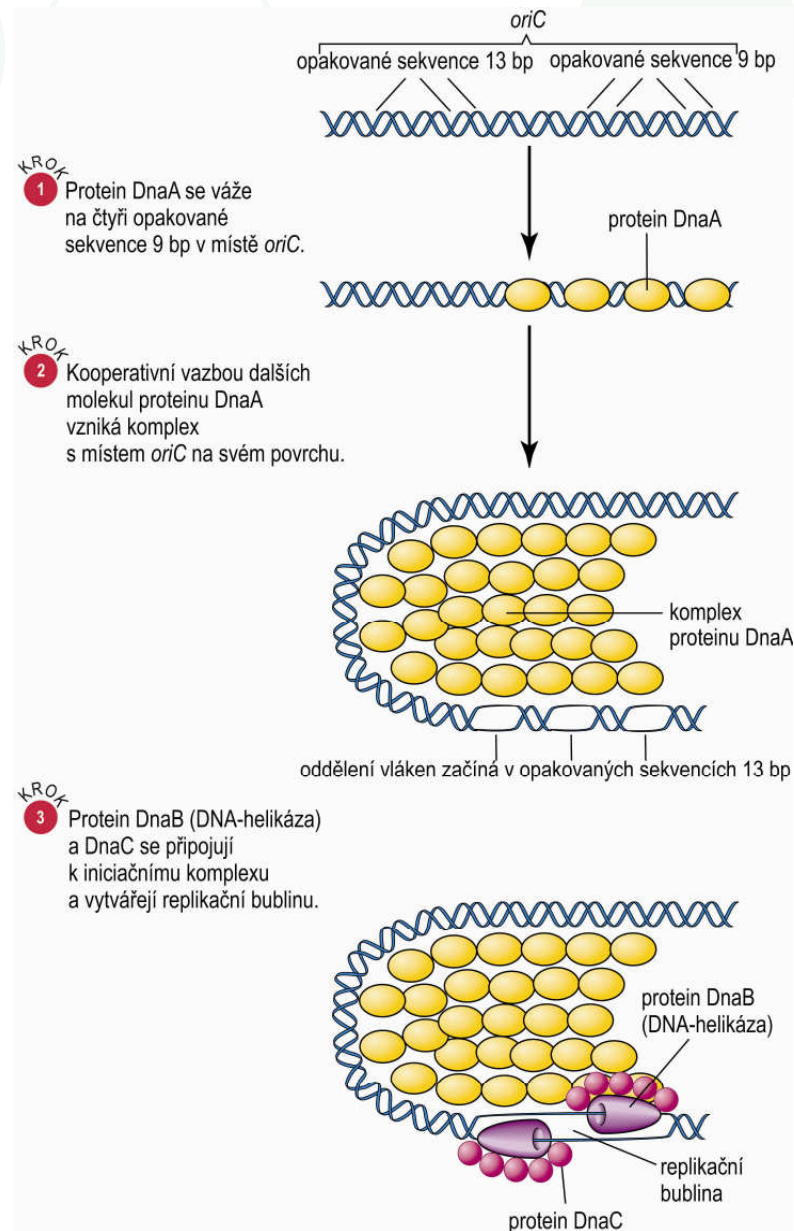
1, 2, 3, 4 jsou 9 pb-sequence TTATNCANA

 = neopakující se sekvence

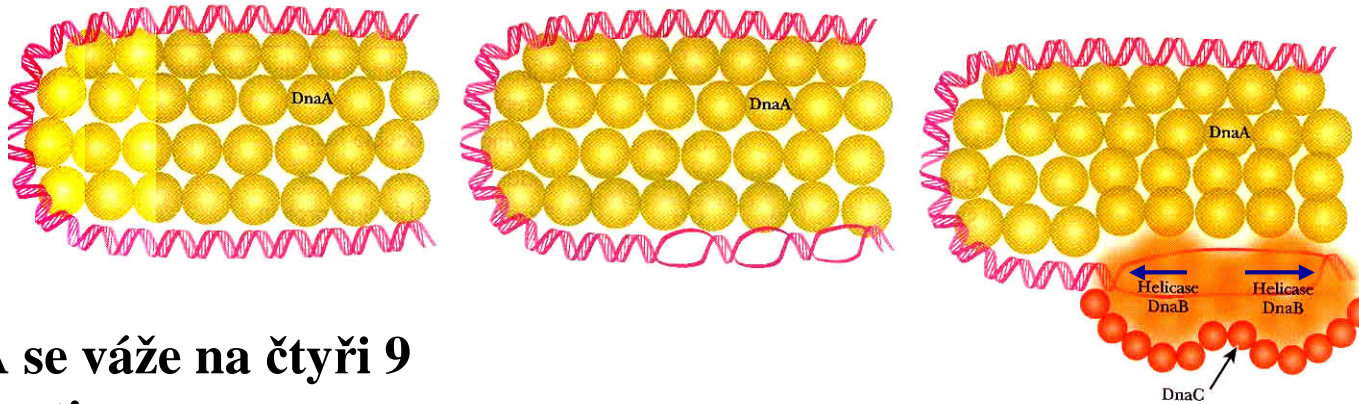


*Minireplikon*

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



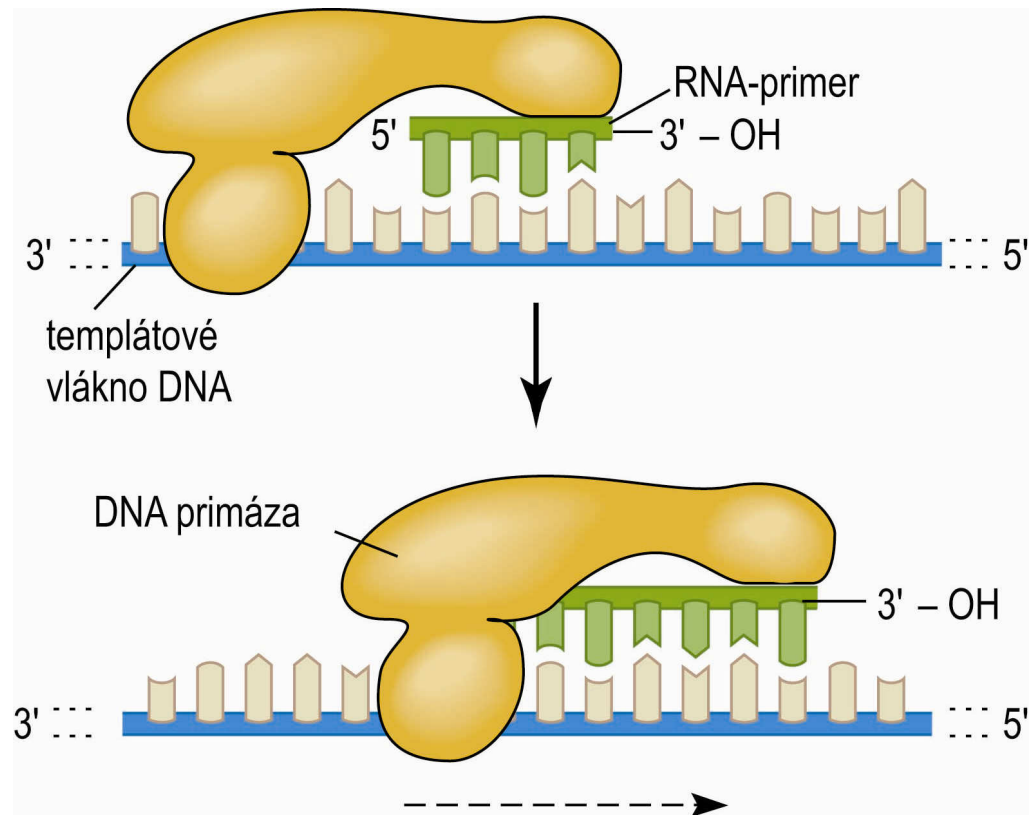
## Fungování proteinů DnaA, DnaB a DnaC při iniciaci replikace v oriC



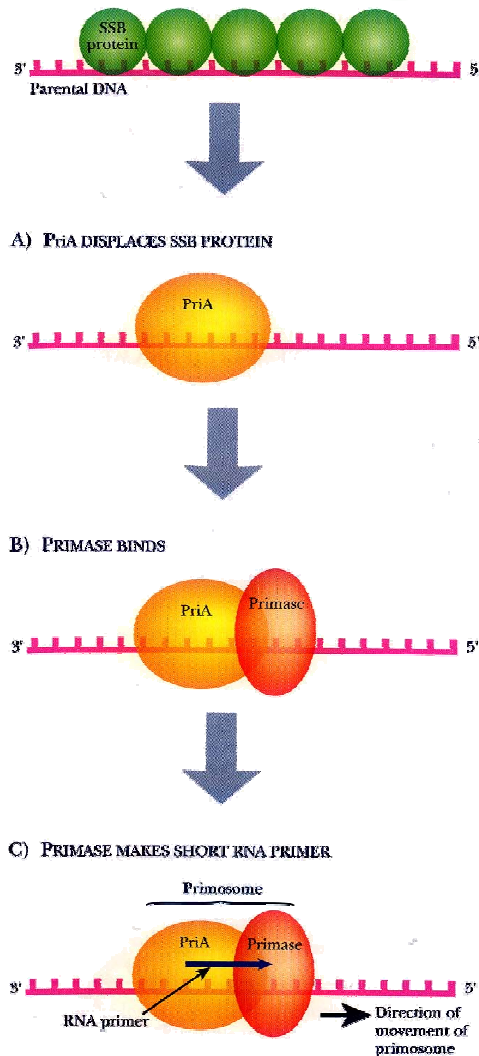
**DnaA se váže na čtyři 9 bp repetice**

**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



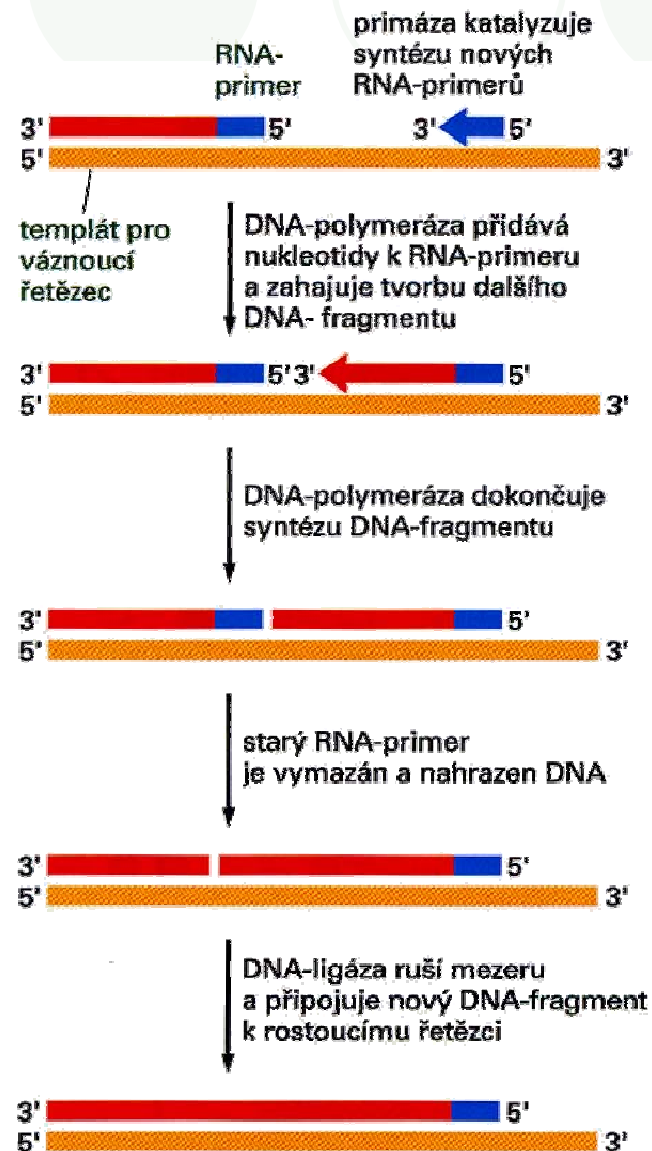
# Průběh syntézy primeru DNA-primázou



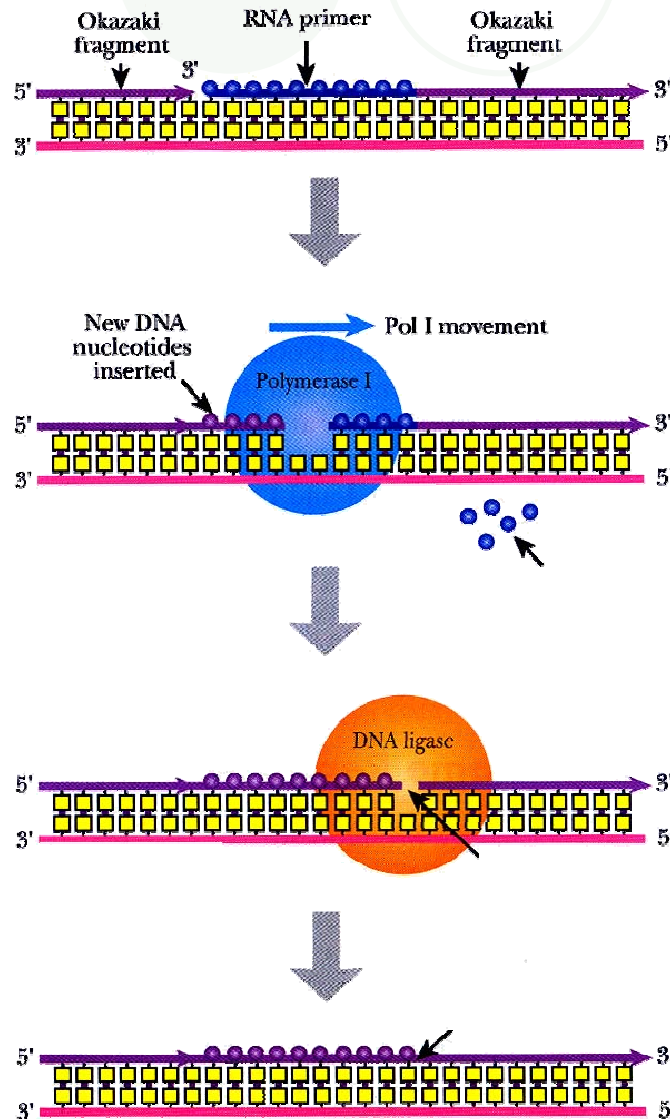
- DNA řetězec uvolněný z mateřské molekuly s navázanými SSB proteiny
- Vytěsnění SSB proteinem PriA - tento protein pak navodí napojení primázy (DnaG)
- Vazba DNA-primázy
- Syntéza 11-12 nt RNA primeru

# Syntéza Okazakiho fragmentů a proces jejich spojování postupným působením enzymů:

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

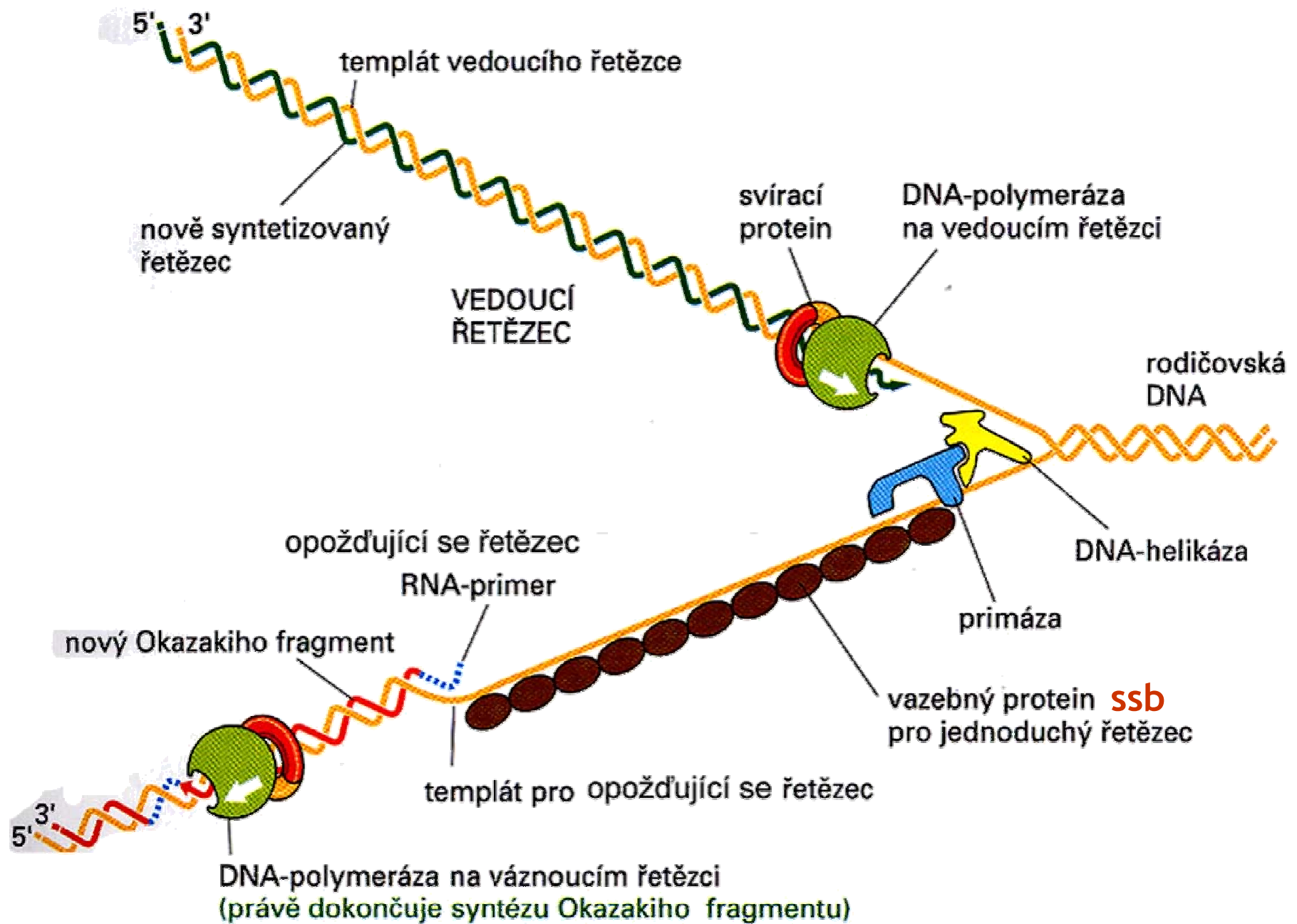


# Tři kroky při spojování Okazakiho fragmentů

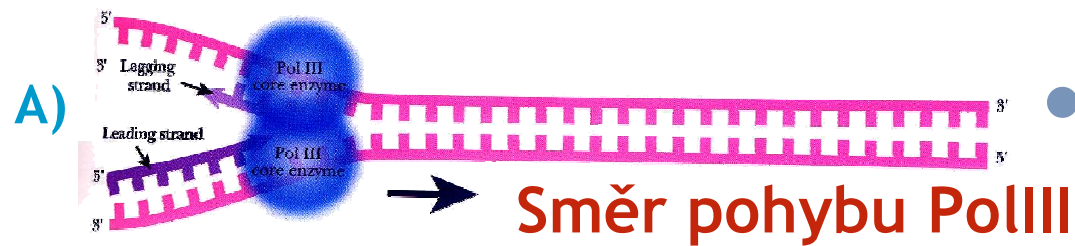


- Nově nasyntetizovaný řetězec tvořený Okazakiho fragmenty
- Vazba Pol I a odbourání RNA-primeru
- Spojení mezery v řetězci DNA ligázou

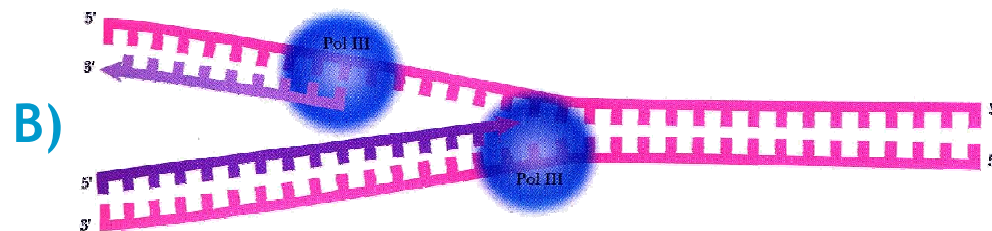




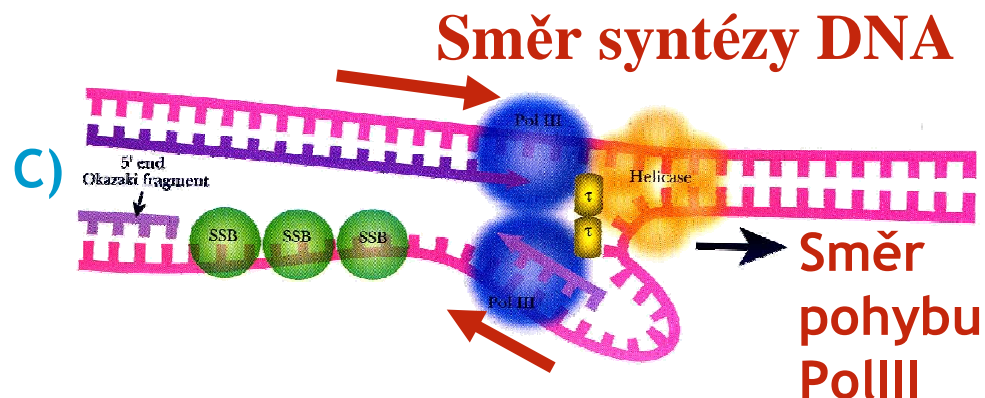
# Relativní poloha podjednotek DNA polymerázy III v replikační vidlici



- dvě podjednotky PolIII fungují společně

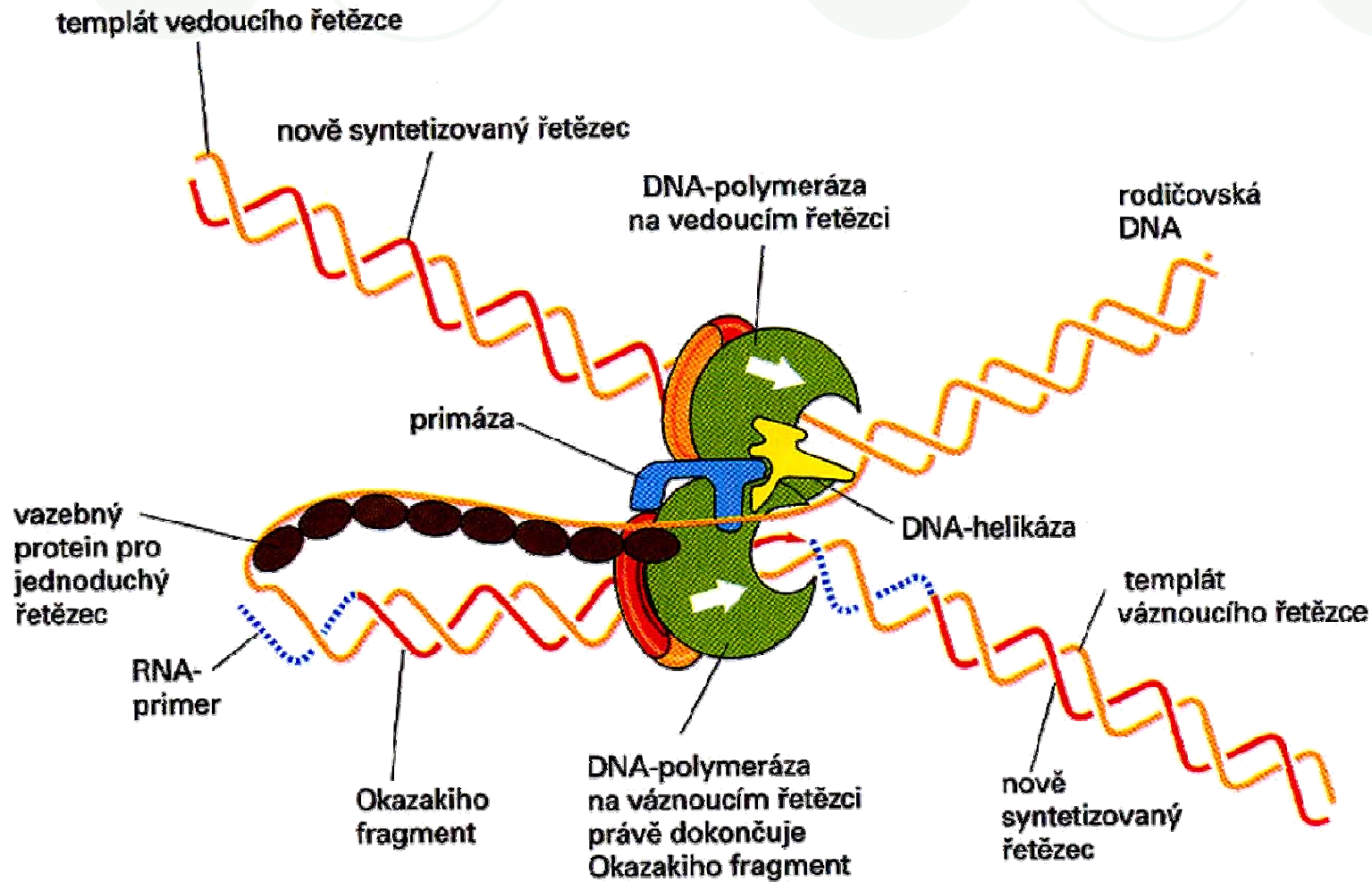


- pokud by DNA nevytvořila ohyb, podjednotky by se oddělily

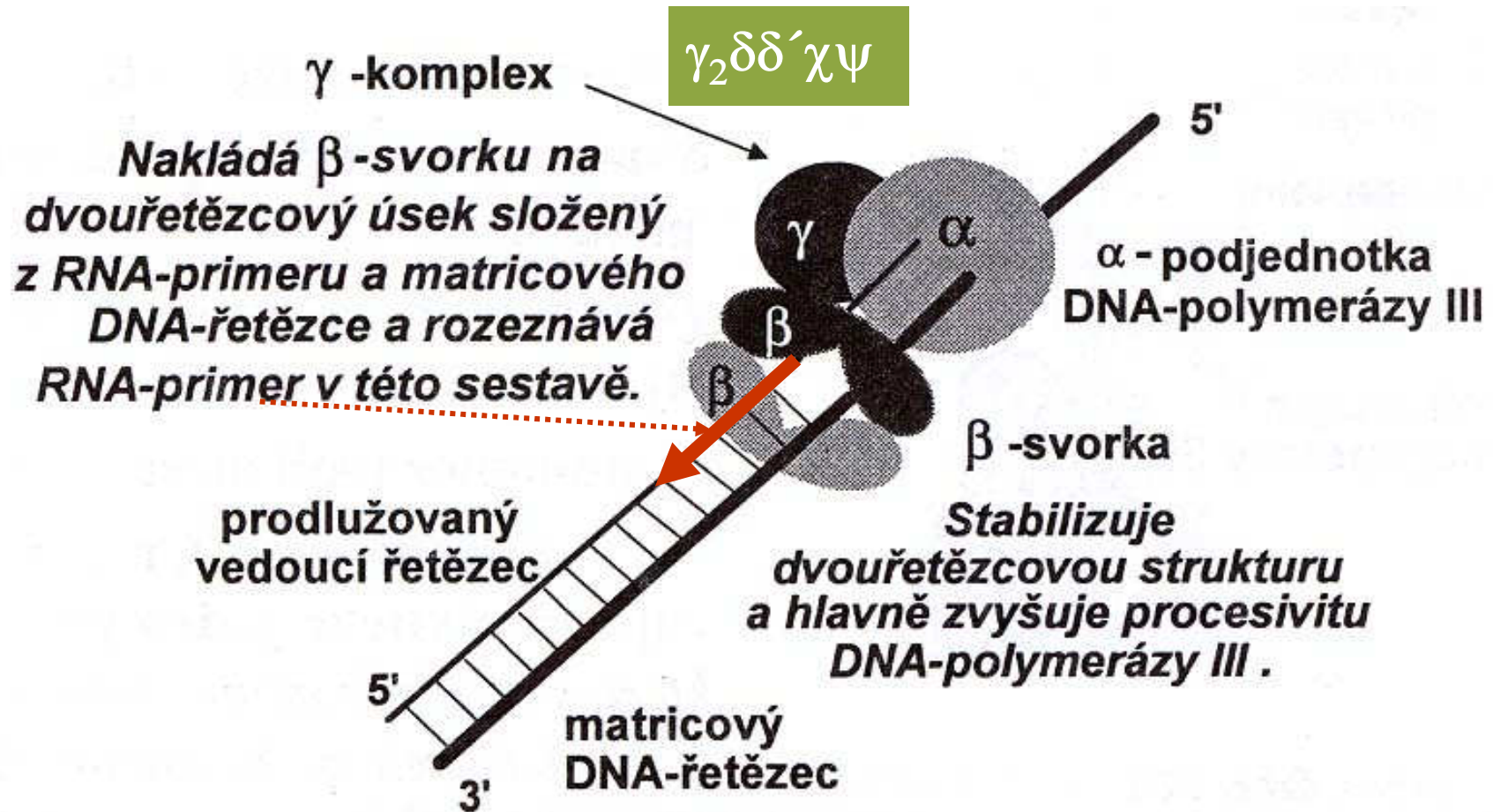


- ohyb DNA umožní podjednotkám zůstat pohromadě

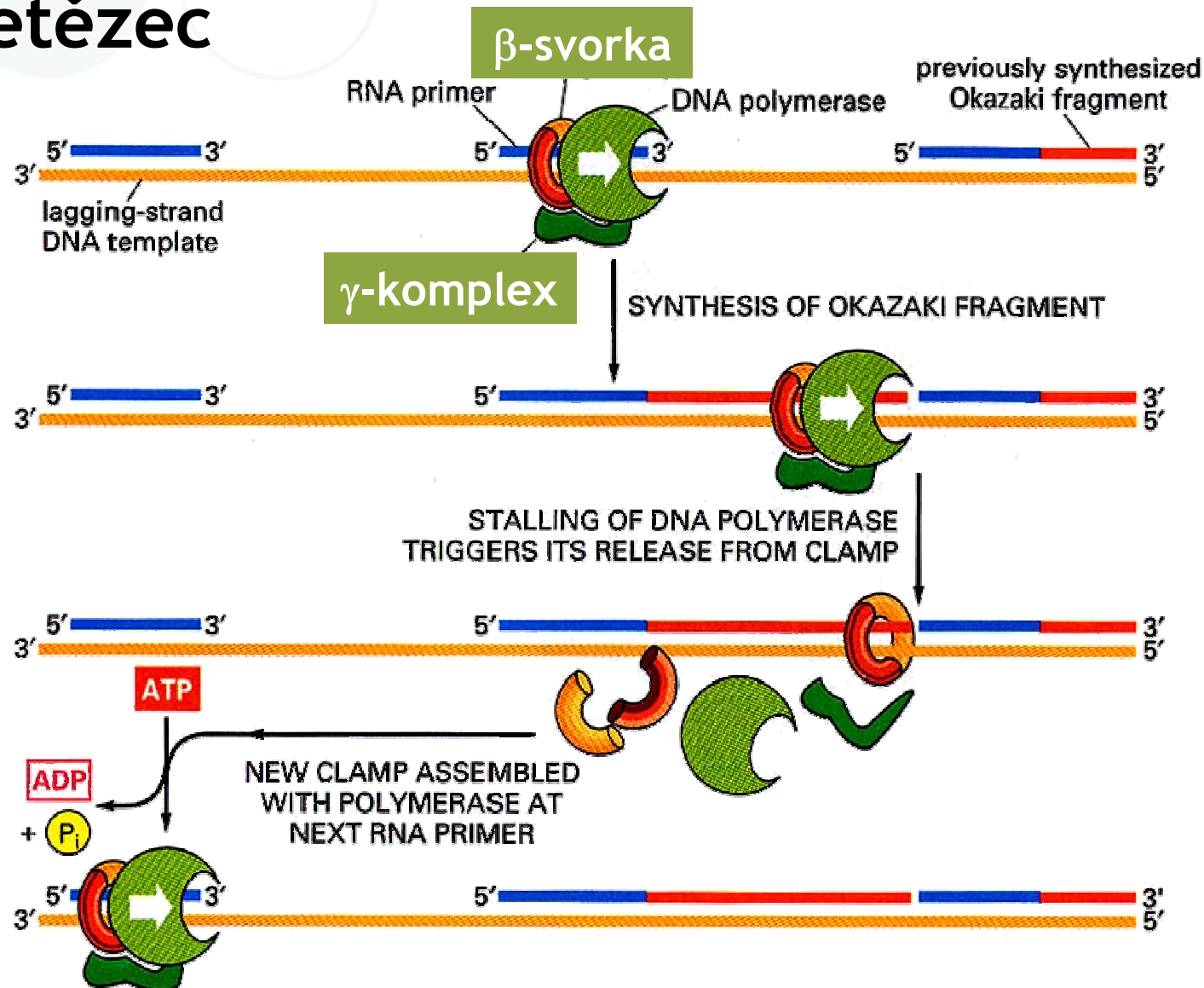
# Průběh syntézy nových řetězců DNA DNA-polymerázou



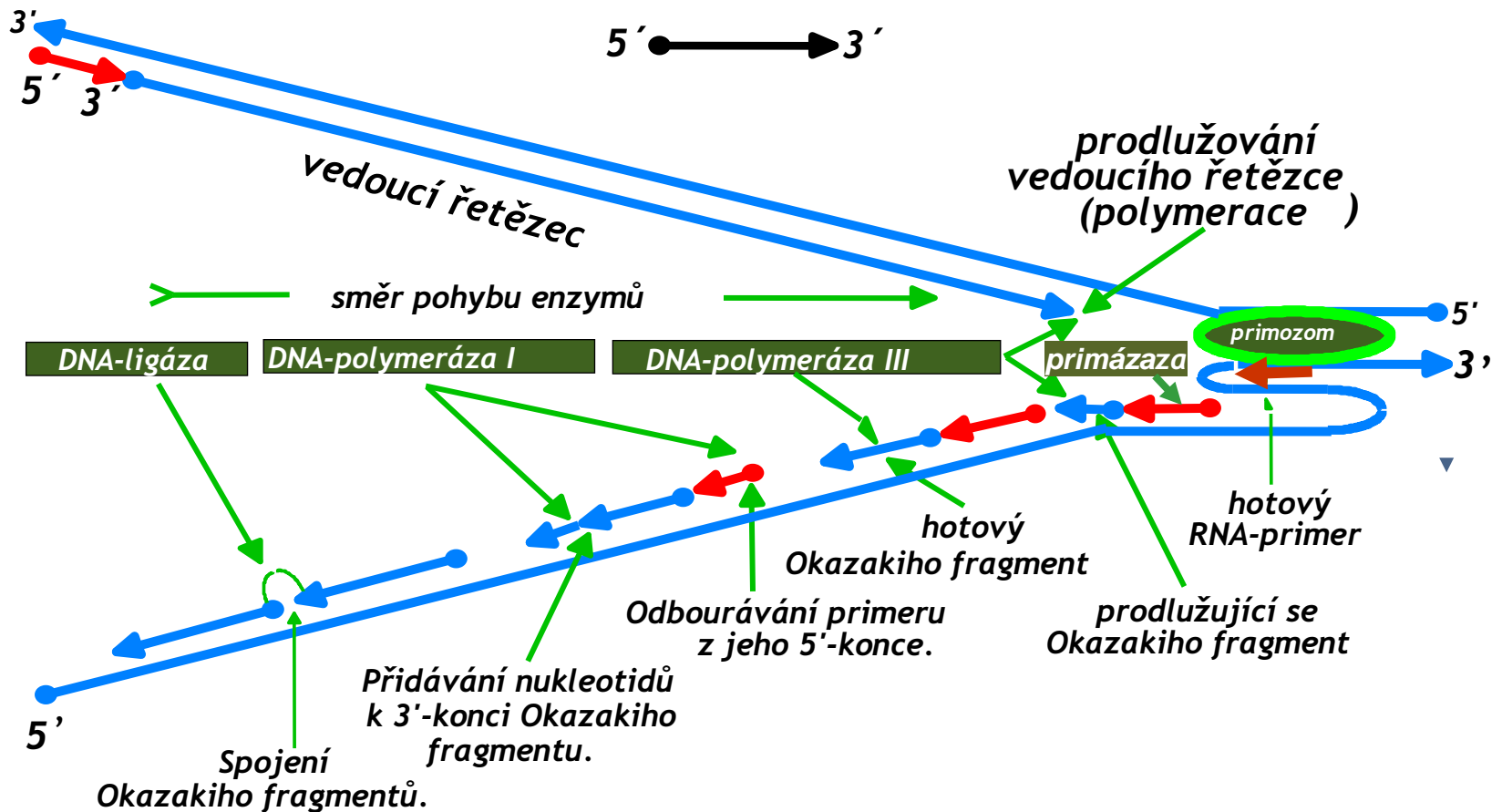
# Úloha podjednotek gama a beta při replikaci



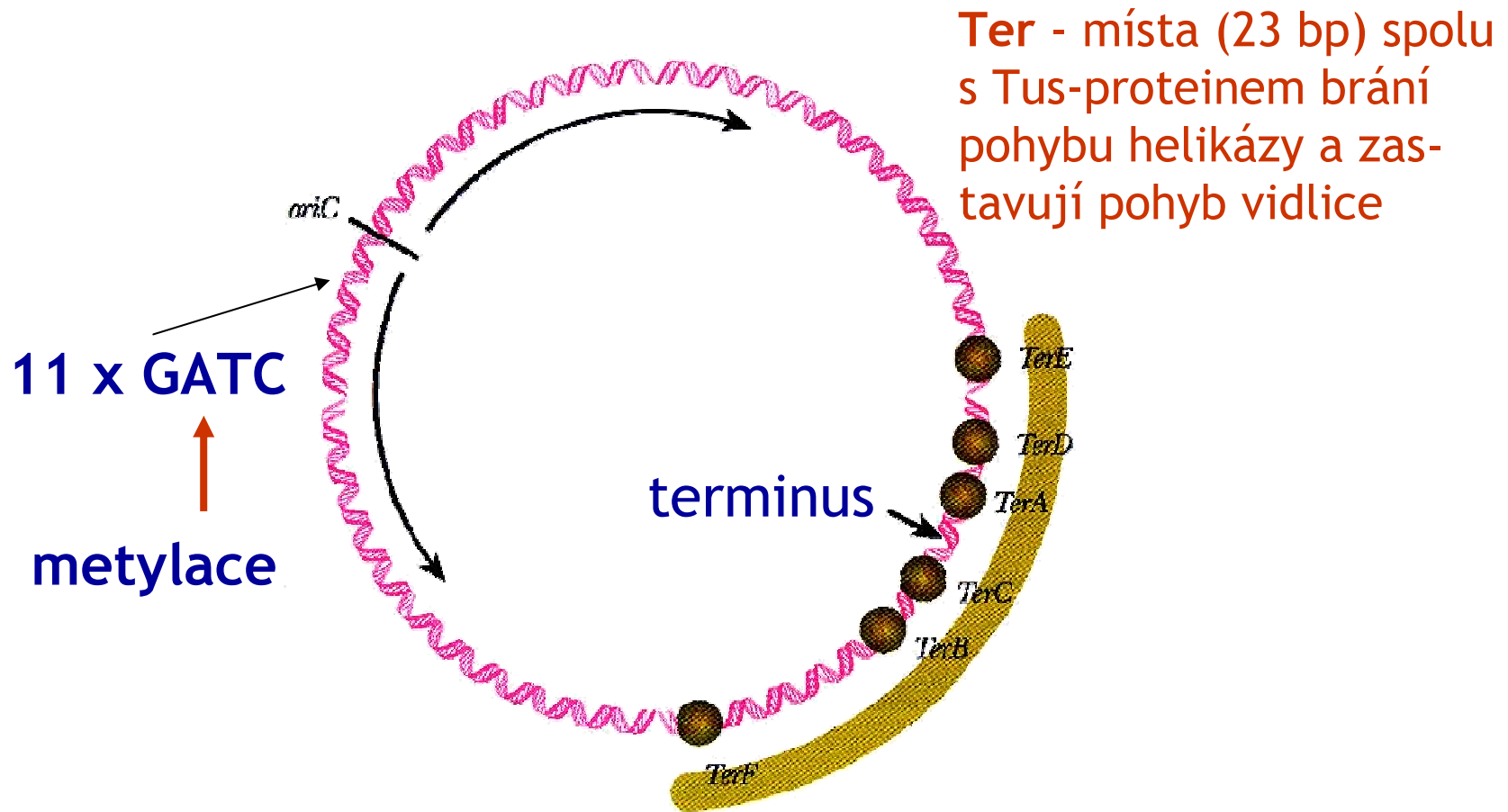
# Nakládání DNA polymerázy na opožďující se řetězec



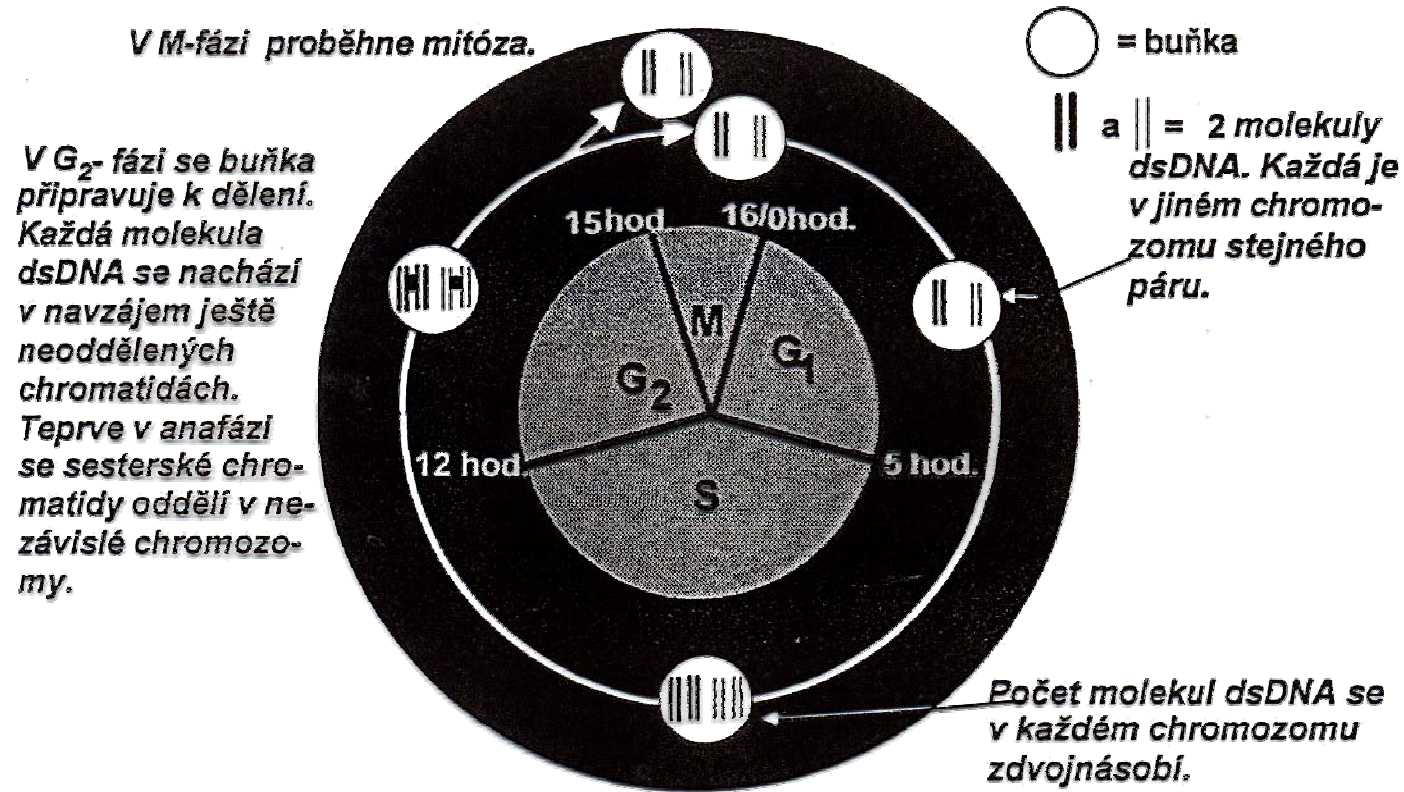
# Globální pohled na průběh replikace dsDNA



# Terminace replikace bakteriálního chromozomu



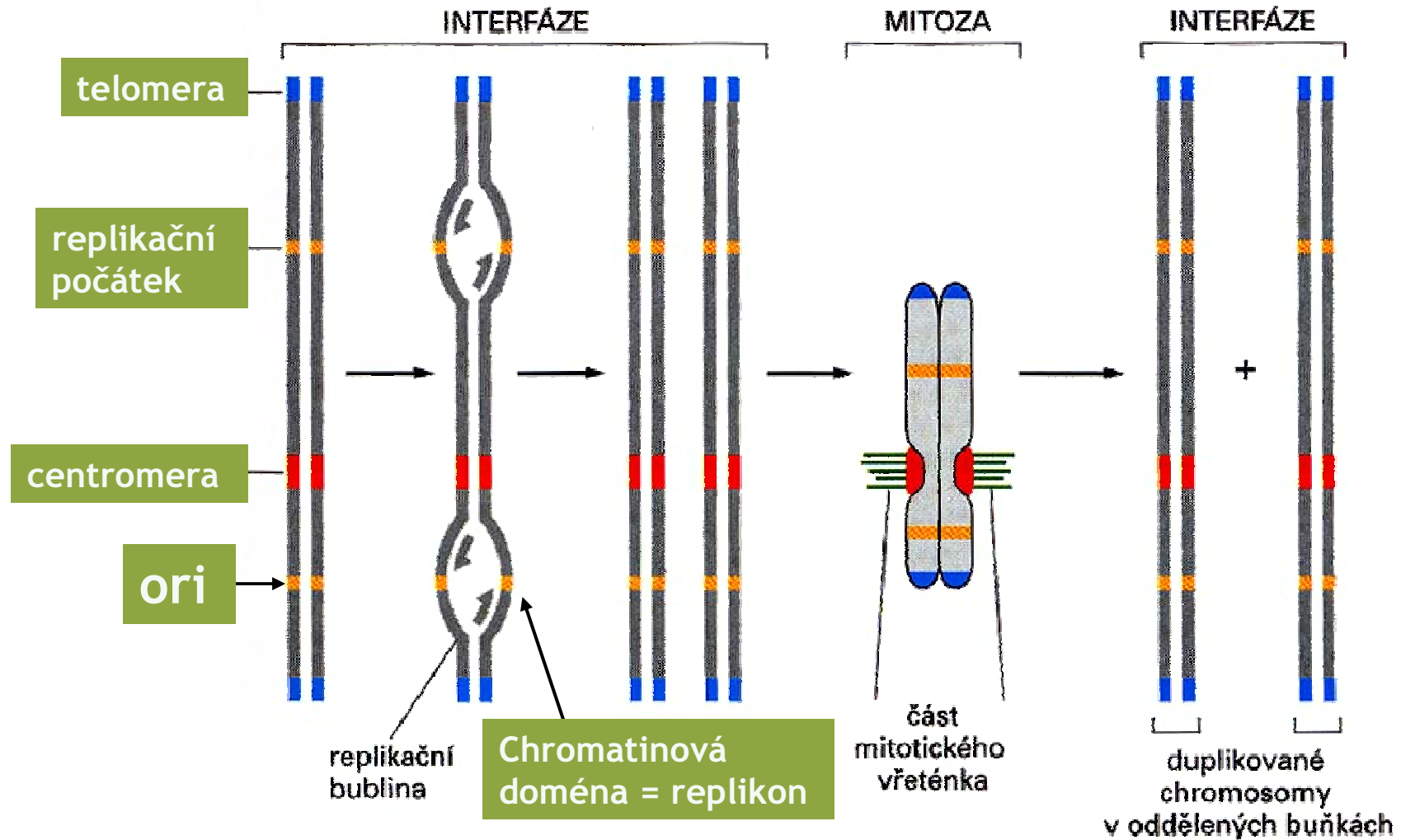
# Zjednodušené schéma buněčného cyklu zdůrazňující počet molekul dsDNA v chromozomech v jeho různých fázích



Buněčný cyklus savčí buňky s generační dobou 16 hod.



# Struktura chromozomu během dělení buňky



# Počet počátků replikace u různých organismů

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

Rozdíly v rychlosti syntézy

# Složky bakteriálního a eukaryotického replizomu

Složka replizomu	U bakterií	U eukaryot
Replikativní polymeráza	Holoenzym polIII*	pol $\alpha$ /primáza v komplexu s pol $\delta$
Faktor zvyšující procesivitu replikativní polymerázy	$\beta$ -svorka	PCNA
Faktor nakládající $\beta$ -svorku (PCNA)	$\gamma$ -komplex	RFC
Primáza	jen DNA-primáza (DnaG-protein)	komplex pol $\alpha$ /primáza
Helikáza	DnaB-protein, n'-protein	?
Odstranění primeru	DNA-polymeráza I	exonukleáza MF1
Oprava opoždujícího se řetězce	DNA-polymeráza I a DNA-ligáza	Komplex pol $\delta$ /pol $\epsilon$ ? 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

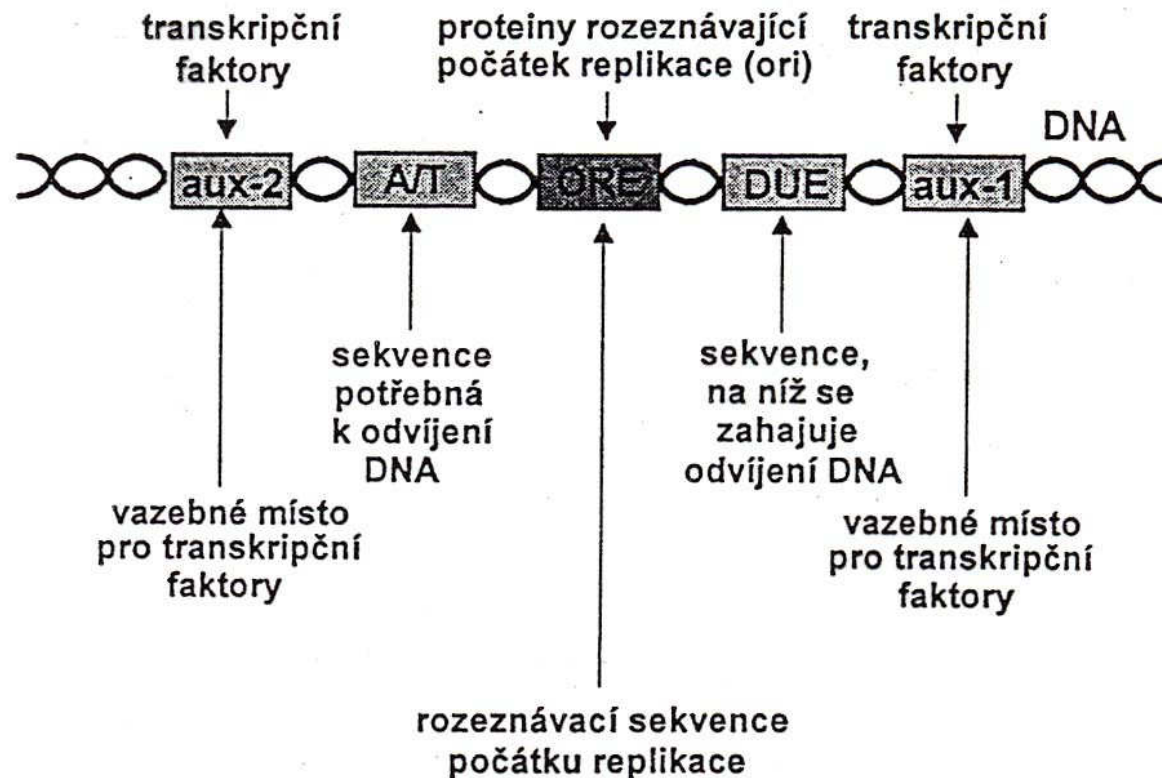
- $\alpha$  Syntéza Okazakiho fragmentů, **3' -5' exonukleáza**  
Je v komplexu s DNA-primázou
- $\delta$  Syntéza vedoucího řetězce a dokončení syntézy  
opoždujícího se řetězce **3' -5' exonukleáza**
- $\epsilon$  Neznámá funkce (možná syntéza vedoucího řetězce)
- $\beta$  Syntéza krátkých řetězců při reparaci DNA
- $\gamma$  Syntéza mitochondriové DNA

**Odstranění RNA-primerů z Okazakiho fragmentů:**

**Ribonukleáza H1, Ribonukleáza FEN-1**

# Struktura počátku replikace u kvasinek

## Soubor proteinů = ORIZOM



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

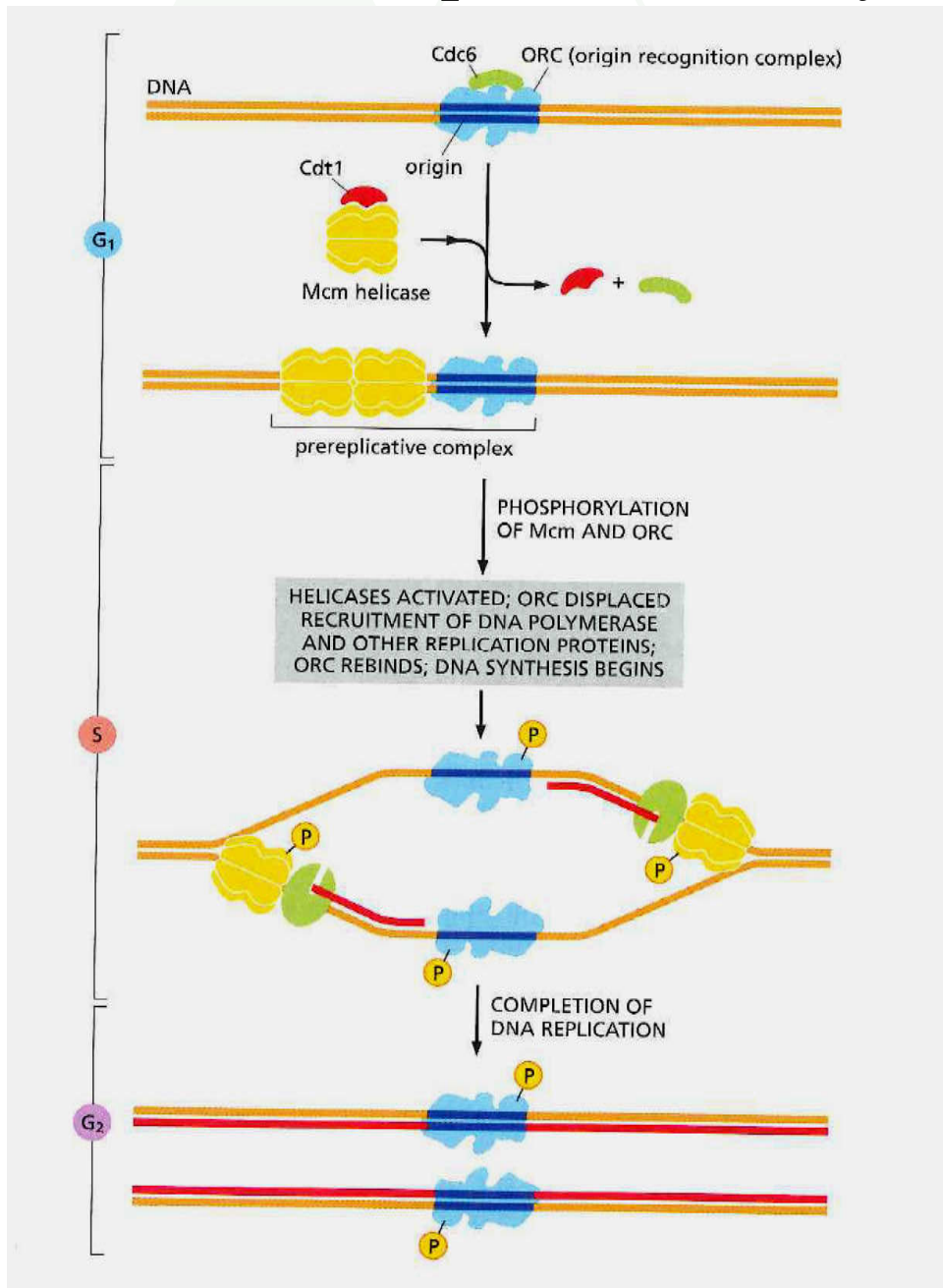
2. Vazba transkripčních faktorů a jejich interakce s proteiny v místě ORE

3. Inicace replikace, rozmotání DNA v místě DUE

Různé transkripční faktory aktivují různé počátky replikace

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

# Iniciace replikace u eukaryot

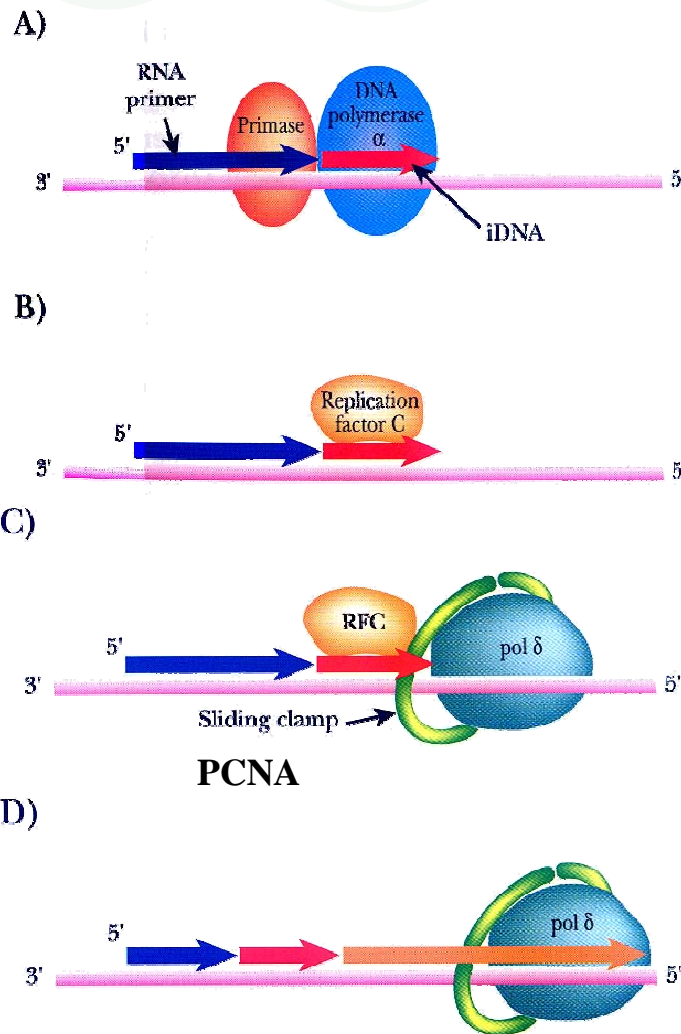


## Počátky replikace obsahují:

1. Vazebné místo pro velký protein složený z více podjednotek (zvaný ORC).
2. Úsek DNA bohatý na A a T usnadňující denaturaci
3. Vazebné místo pro proteiny které usnadňují vazbu ORC patrně úpravou chromatinu.

Počátek replikace je aktivován jen 1x během jednoho buněčného růstového cyklu. Počátek replikace bude fungovat jen pokud se na něm během G<sub>1</sub>-fáze vytvoří prereplikativní komplex. Na začátku S-fáze dochází ke změně aktivity Mcm a ORC. Další prereplikativní komplex se může vytvořit až v dalším cyklu dělení.

# Iniciace replikace u eukaryot - rozdíly oproti bakteriím



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

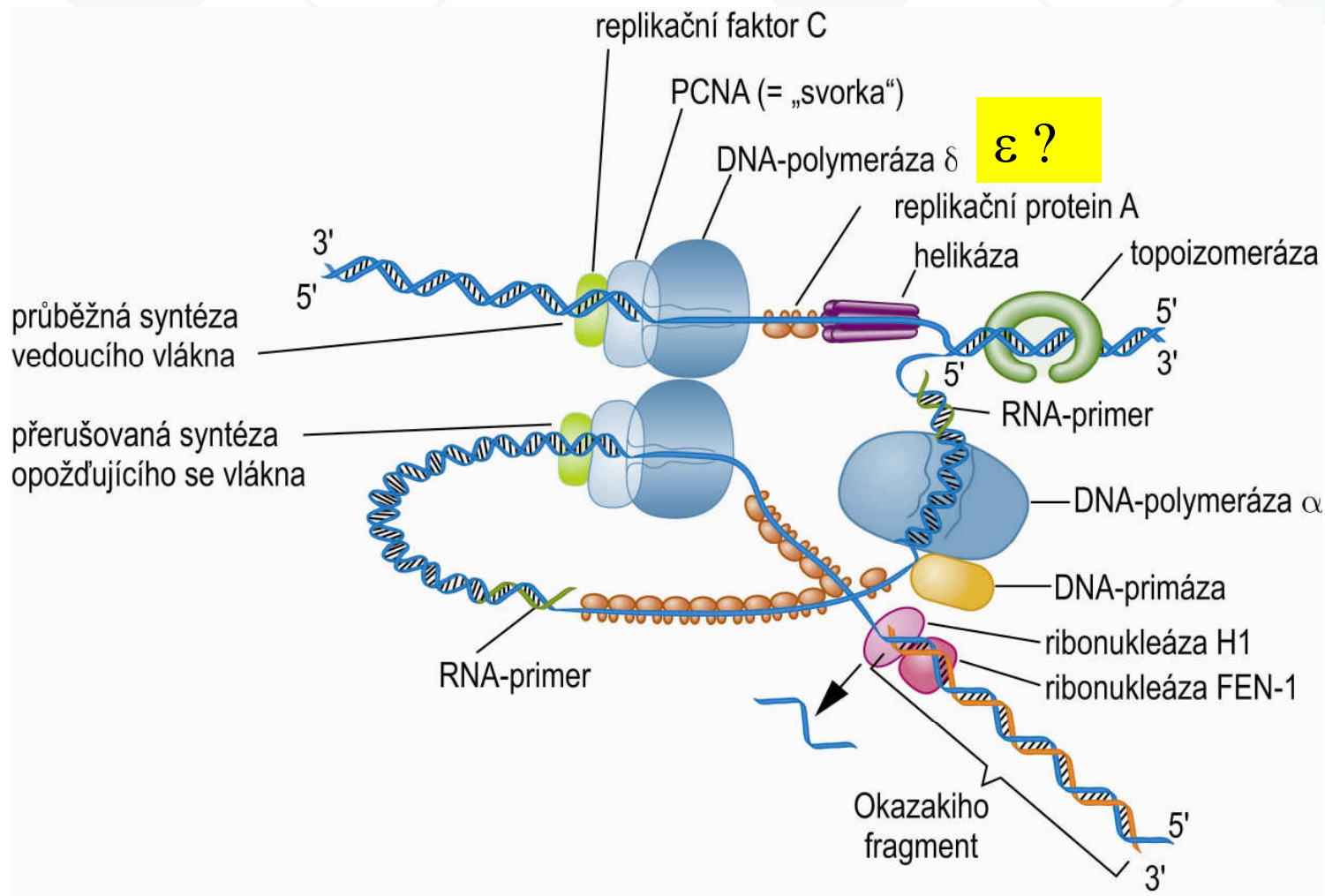
*RFC* slouží u eukaryot k nakládání PCNA podobně jako  $\gamma$  komplex k nakládání beta-svorky u *E. coli*

b) RFC nasedá na iDNA

c) RFC napomáhá navázat DNA-polymerázu  $\delta$  a PCNA protein (trimer)

d) DNA-polymeráza  $\delta$  pak prodlužuje nový řetězec DNA

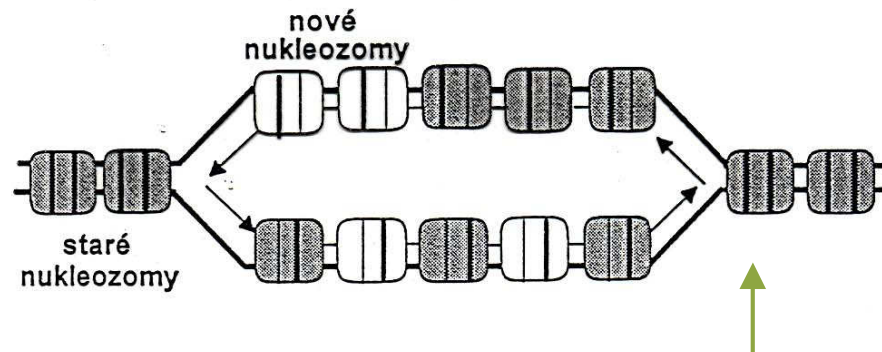
# Základní složky replizomu eukaryot



<https://youtu.be/JZXT2uOcD2w>

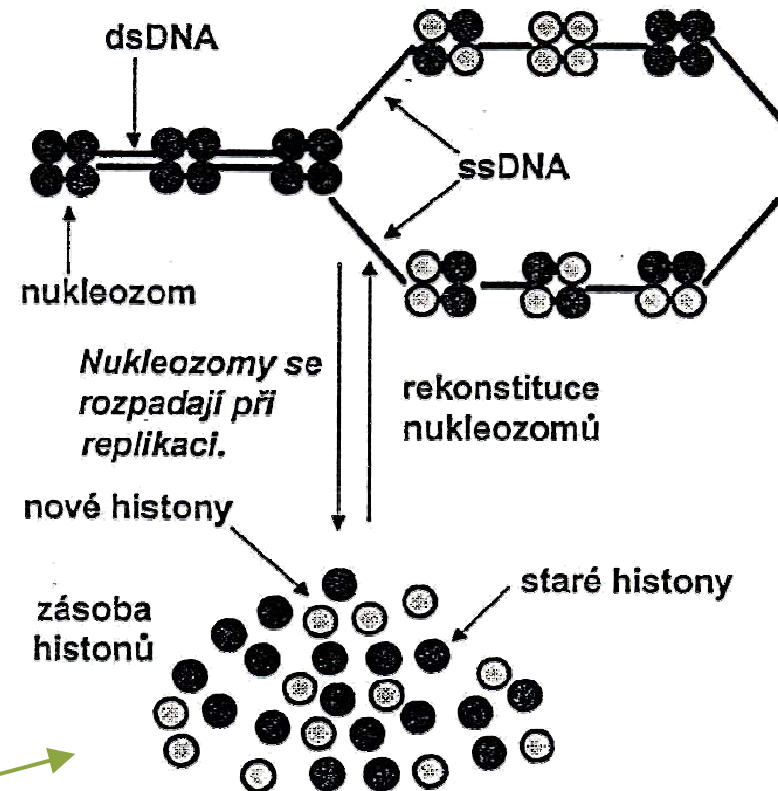


# Schéma replikační vidlice eukaryotické jaderné DNA



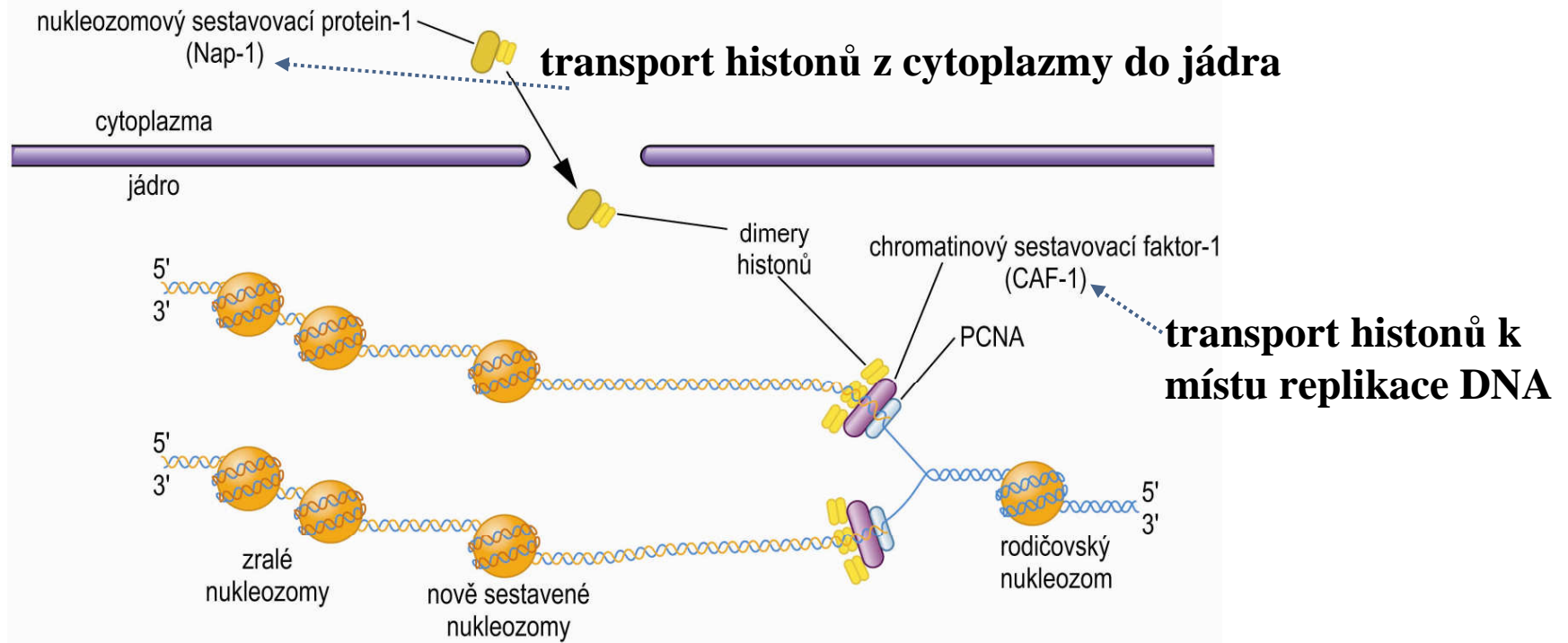
Staré a nové nukleozomy se na maticových a podle nich syntetizovaných komplementárních řetězcích rozdělují náhodně

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



# Sestavování nukleozomů během replikace

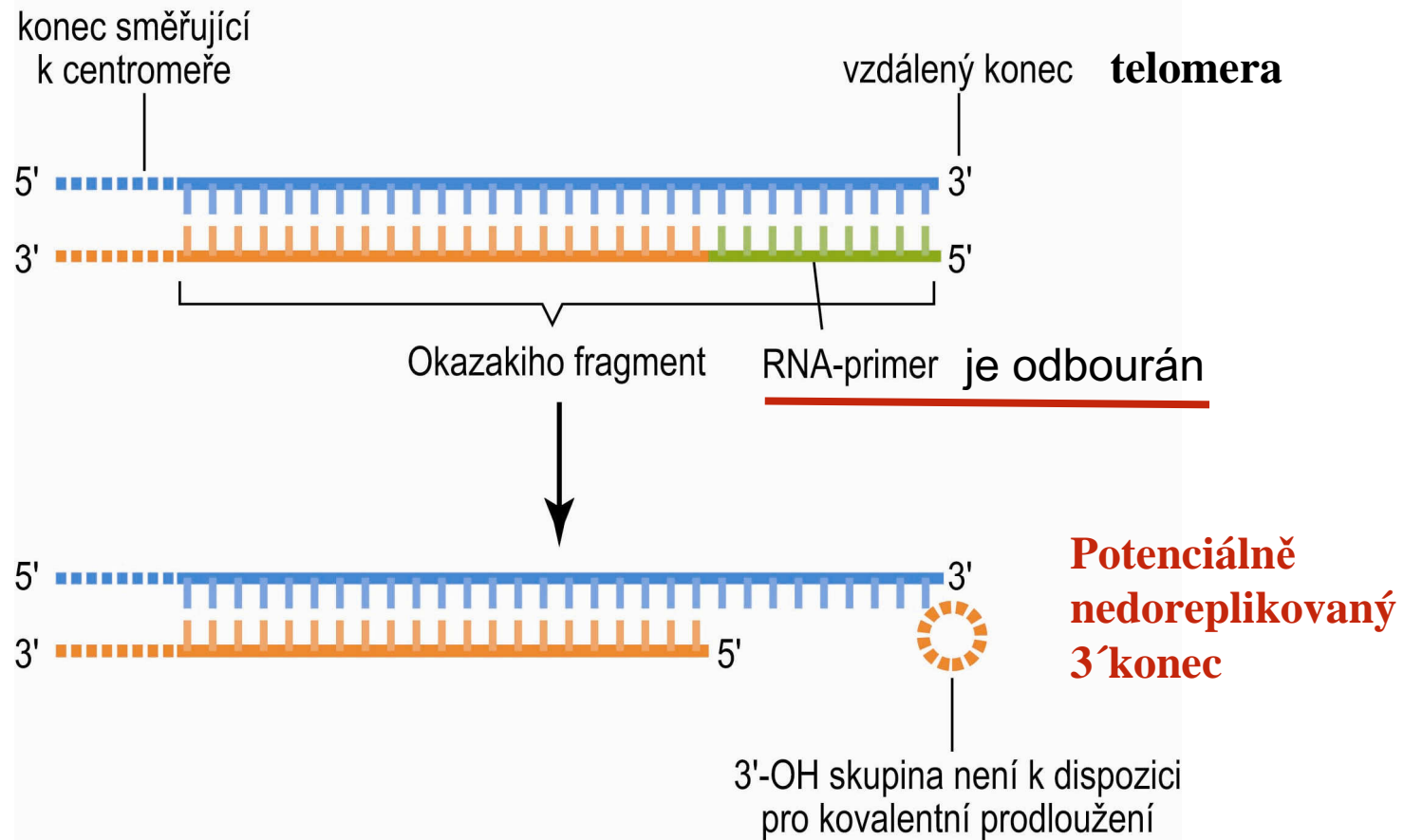
sestavování nukleozomů během replikace chromozomu



(b)

# Problém doreplikování 3' konců lineárních chromozomů

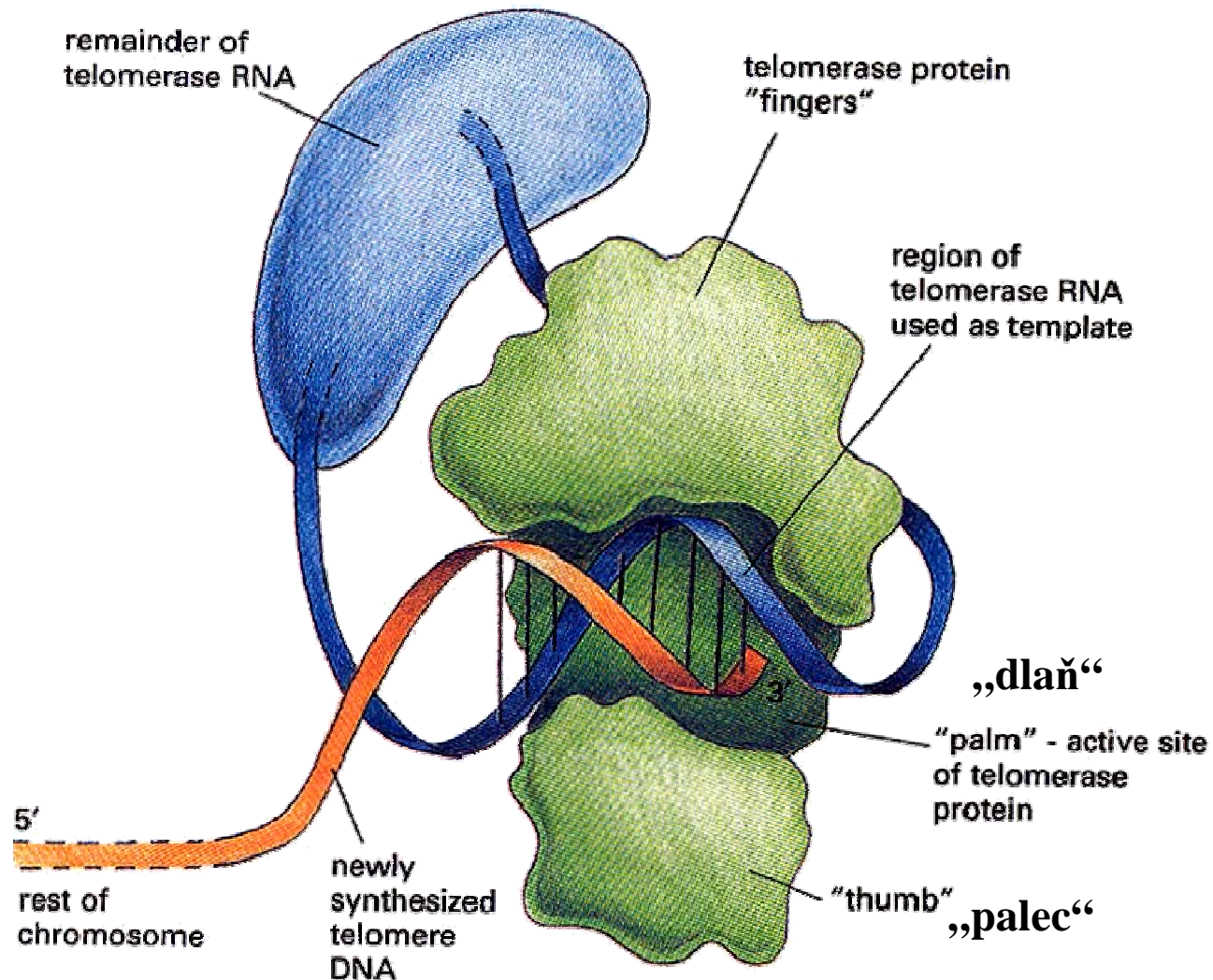
problém s primerem pro telomery na opožďujícím se vlákně



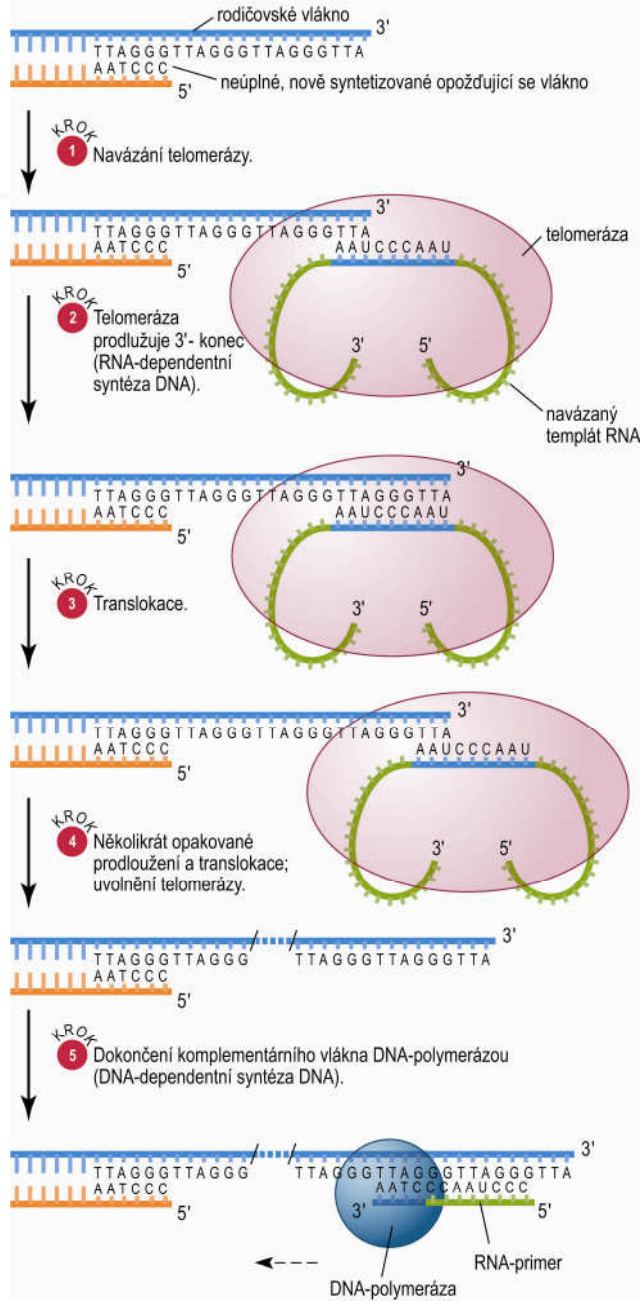
(a)

# Struktura telomerázy

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

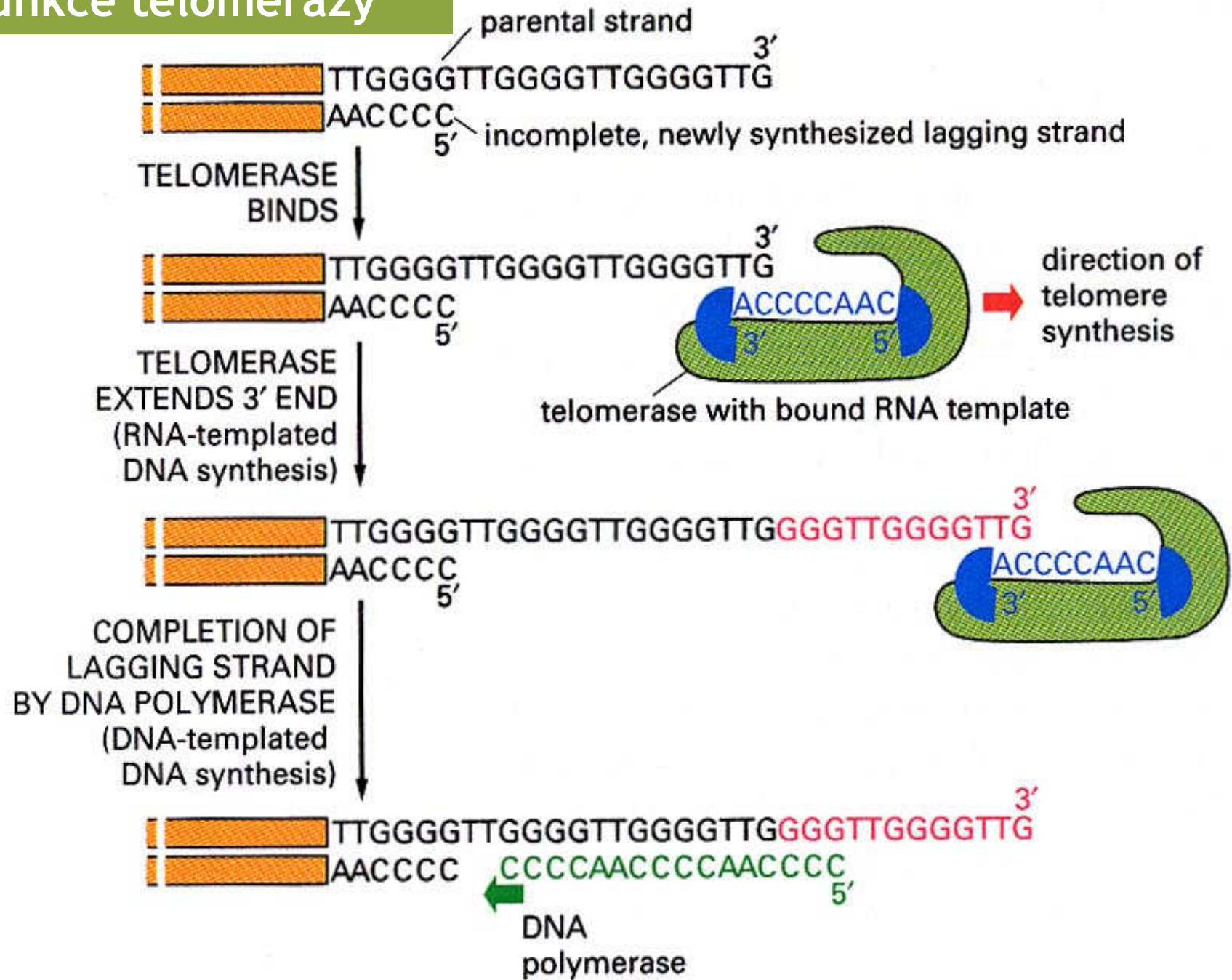


Telomeráza řeší problém koncového primeru.



(b)

# Funkce telomerázy



# Sekvence telomer různých organismů

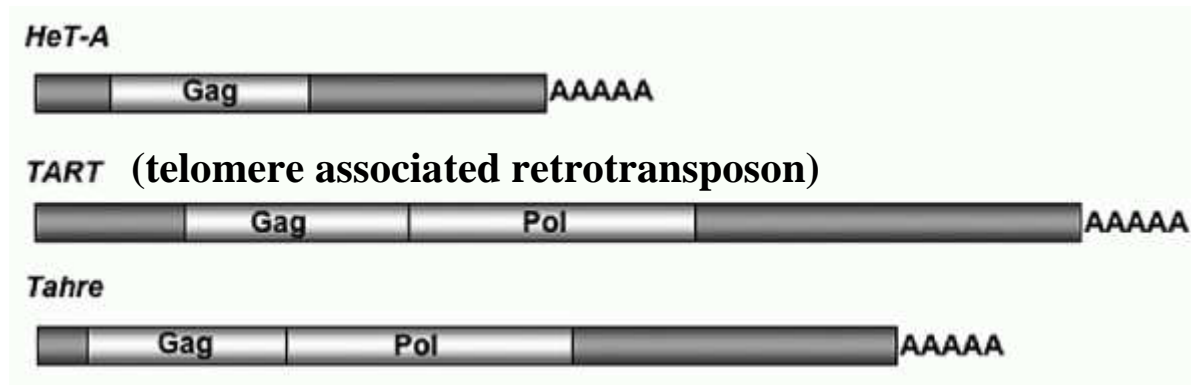
- **TTGGGG** -  $T_2G_4$  u *Tetrahymena thermophila* a *Glaucoma chattoni*
- **TTTTGGGG** -  $T_4G_4$  u *Euplotes aediculatus* a *Oxytricha nova*
- **TTTAGGG** -  $T_3A_1G_3$  u *Arabidopsis thaliana*
- **TGGG** -  $TG_3$  u *Saccharomyces cerevisiae*
- **TTAGGG** -  $T_2A_1G_3$  u člověka, myši, a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

5' GGGTTA 3' - délka 10 000 bp

# Prodlužování telomer u drosofilí

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

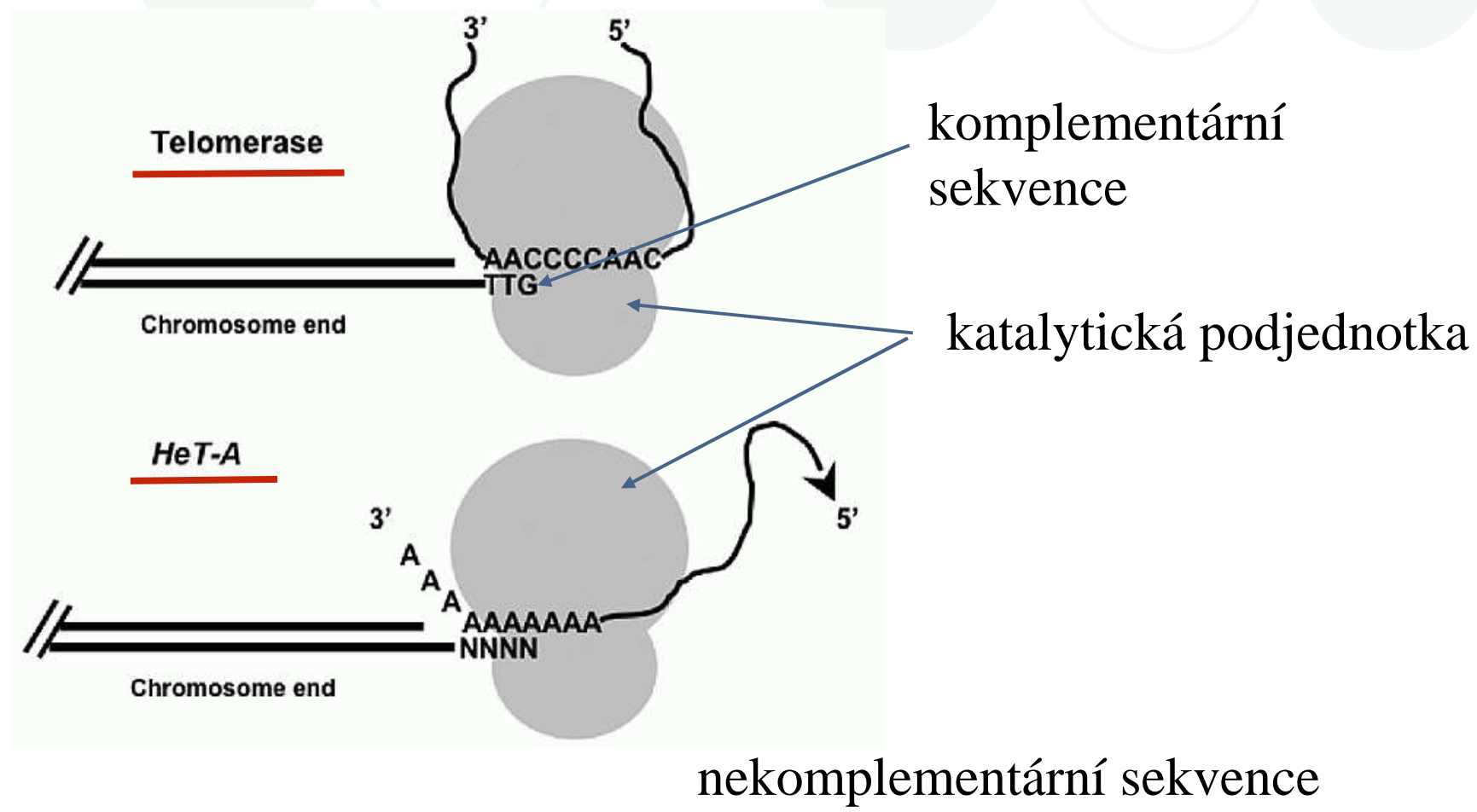
Přednostně se transponují do koncových oblastí chromozomů a tím je prodlužují

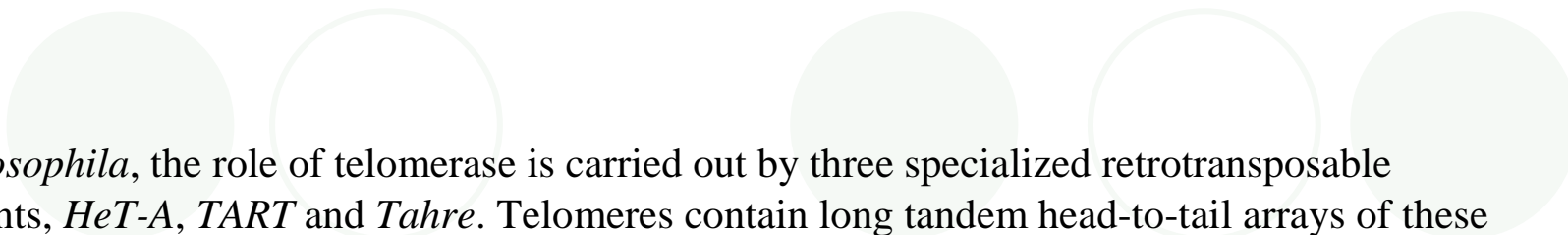


The three *D. melanogaster* telomere retrotransposons drawn as their putative RNA transposition intermediates. Coding regions, Gag and Pol, are labeled. Gray regions indicate 5' and 3' untranslated regions. AAAAA indicates the 3' poly(A) tail on each RNA. It is the source of the (dA/T)<sub>n</sub> that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



# Srovnání prodlužování telomer telomerázou a retroelementy



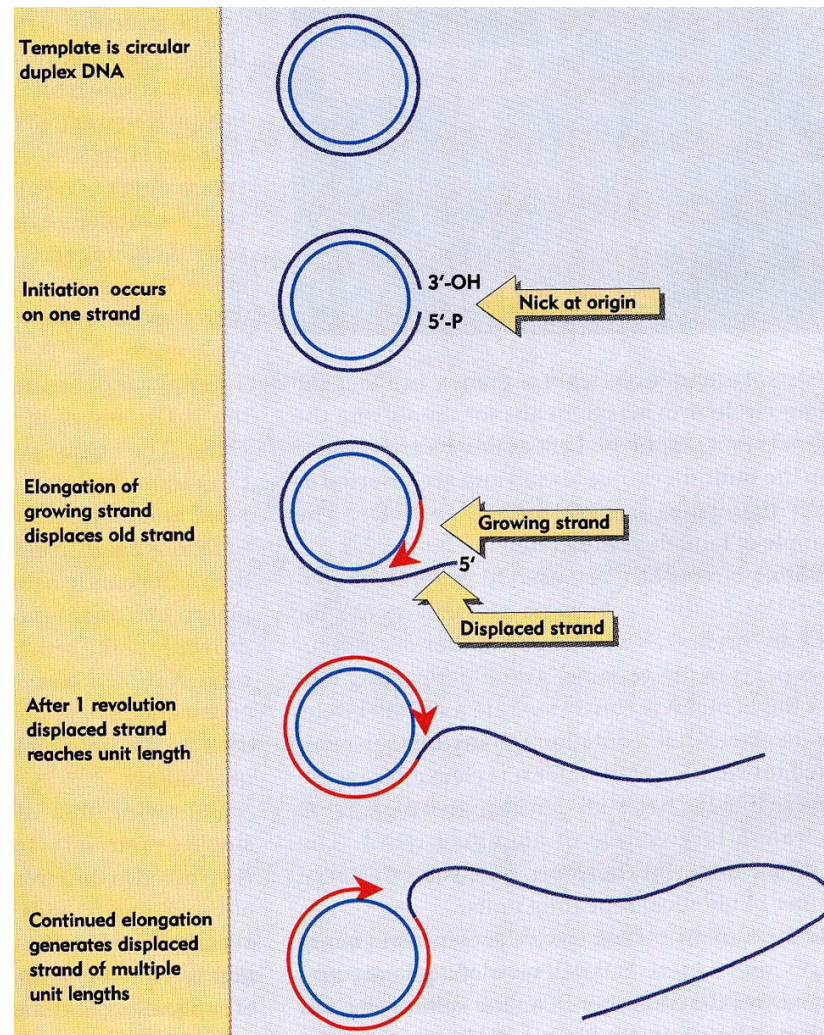


In *Drosophila*, the role of telomerase is carried out by three specialized retrotransposable elements, *HeT-A*, *TART* and *Tahre*. Telomeres contain long tandem head-to-tail arrays of these elements. Within each array, the three elements occur in random, but polarized, order. Some are truncated at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

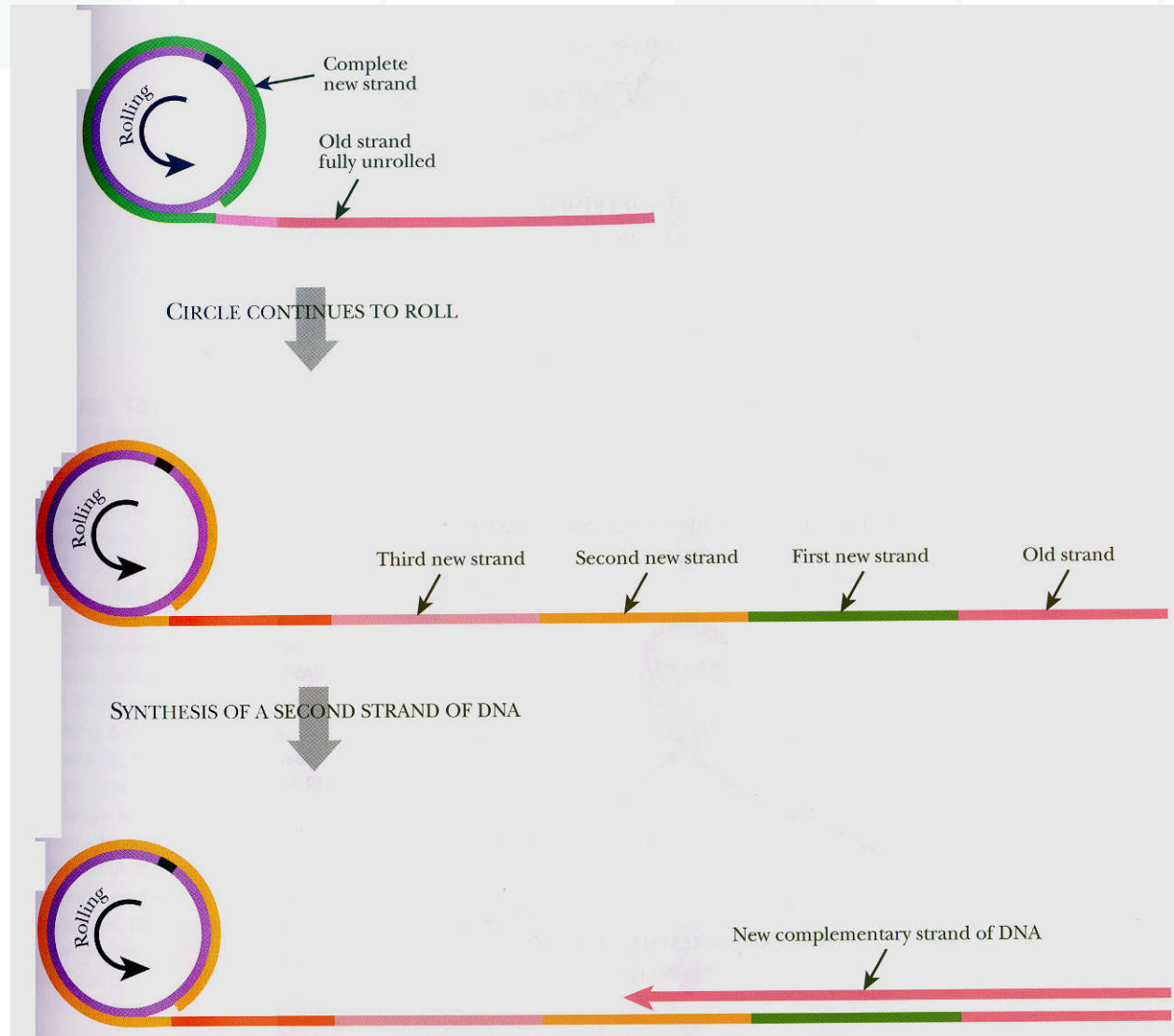
# Telomerová opakování ~ mechanismus pro kontrolu buněčného dělení

- při narození mají v somatických buňkách telomery úplnou délku
  - při každém dělení buňky ztrácí telomera 50-100 nt
  - po mnoha děleních zdědí buňky defektní chromozomy a dochází k zástavě dělení buněk = **replicative cell senescence**
  - **Mechanismus zajišťuje, že nedochází k nekontrolovatelnému dělení buněk („measuring stick“)**
    - *lidské fibroblasty ve tkáňové kultuře - po 60 děleních buněk dochází k zástavě tvorby telomerázy*
    - *po vložení genu s aktivní telomerázou se délka telomer udržuje a buňky nestárnou*
    - *Vnesení genu pro telomerazu do myši prodlouží jejich život o 1/4*
    - *Deregulace exprese telomerázy může vést k onkogenezi*
- Další funkce telomerázy*
- *Reparace DNA*

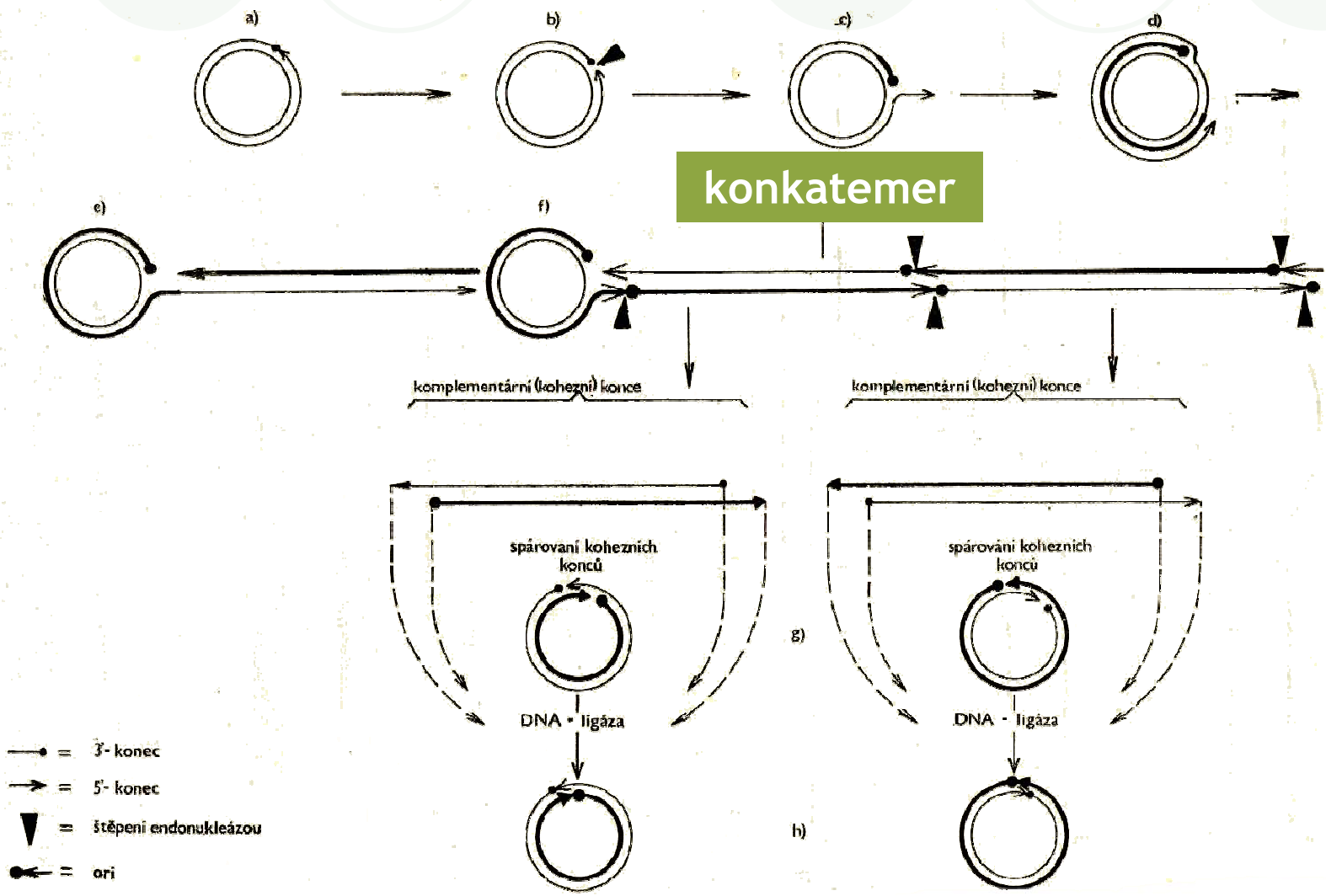
# Replikace DNA mechanismem otáčející se kružnicí



# Replikace virových molekul otáčející se kružnicí

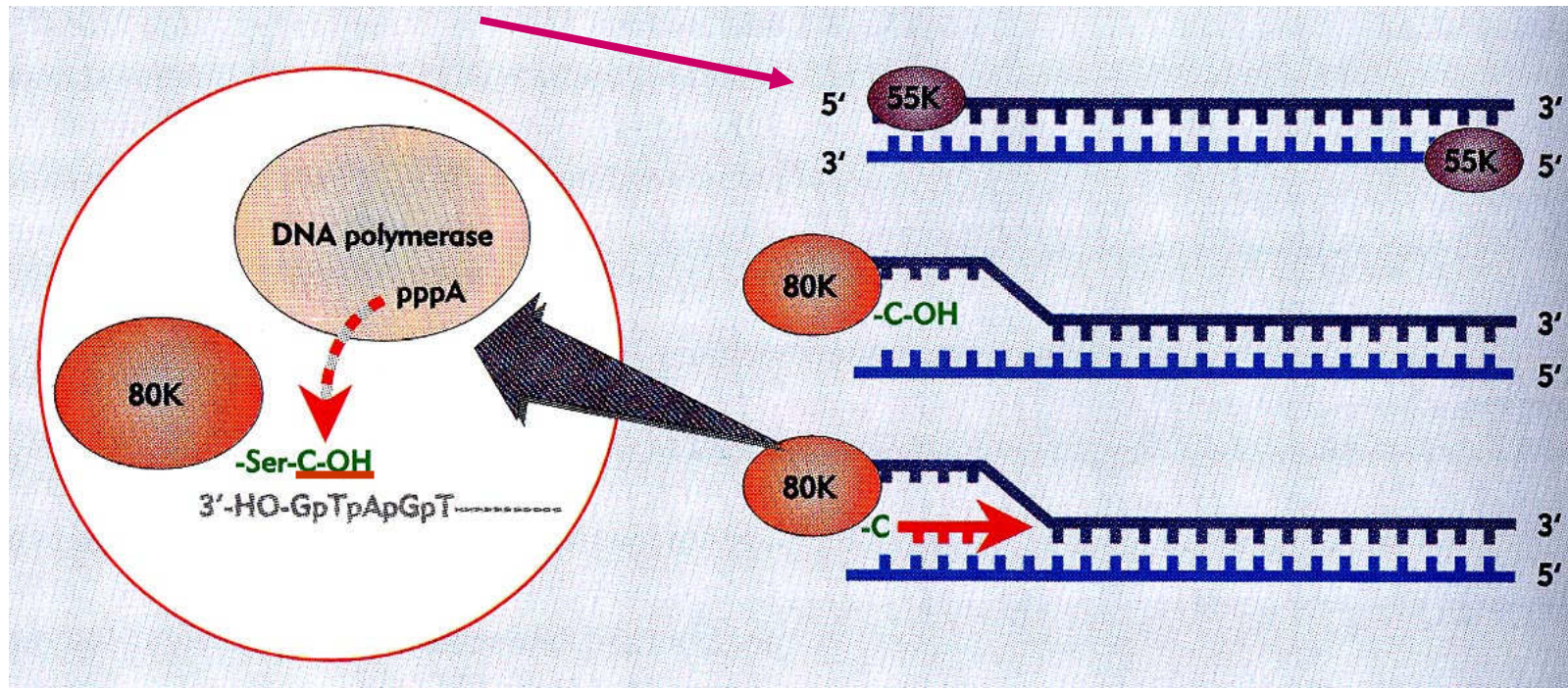


# Replikace plazmidů a virů otáčející se kružnicí



# Replikace genomu adenoviru (též některé bakteriofágy)

## Specifický protein pro iniciaci replikace



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

