



Replikace DNA

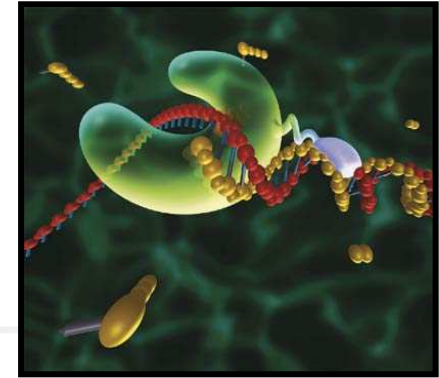
Jan Šmarda
Ústav experimentální biologie, PřF MU



Buněčné dělení a reprodukce

- každá buňka potřebuje svou úplnou sadu genů: rodičovská buňka musí svůj genom před dělením duplikovat
- geny jsou umístěny v DNA chromozomů: každý chromozom je třeba přesně zkopírovat a kopie rozdělit do dceřiných buněk
- jednobuněčné organismy: buněčné dělení = reprodukce
- mnohobuněčné organismy: reprodukce = vznik nových organismů, buněčné dělení = vznik nových buněk bez přímého spojení s rozmnožováním organismu

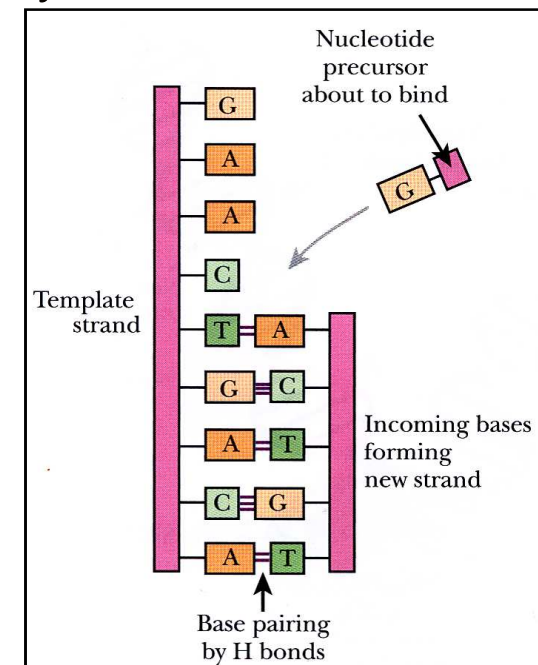
Replikace DNA



- mechanismus duplikace DNA před buněčným dělením

Princip:

- vlákna v duplexech DNA jsou komplementární: po oddělení může každé z nich sloužit jako předloha - **templát** pro syntézu vlákna nového
- nová vlákna vznikají postupným začleňováním nukleotidů na základě pravidel o párování bází
- na konci replikace je každé vlákno templátu spárováno s nově syntetizovaným vláknem
- replikace DNA je katalyzována enzymy





Kontrola replikace DNA

- proces musí proběhnout jen jednou v průběhu buněčného cyklu

Dva hlavní principy:

- o následném buněčném dělení se rozhoduje v okamžiku iniciace replikace – podléhá kontrole jako jiné fáze buněčného cyklu
- buněčné dělení nemůže nastat dokud není replikace dokončena

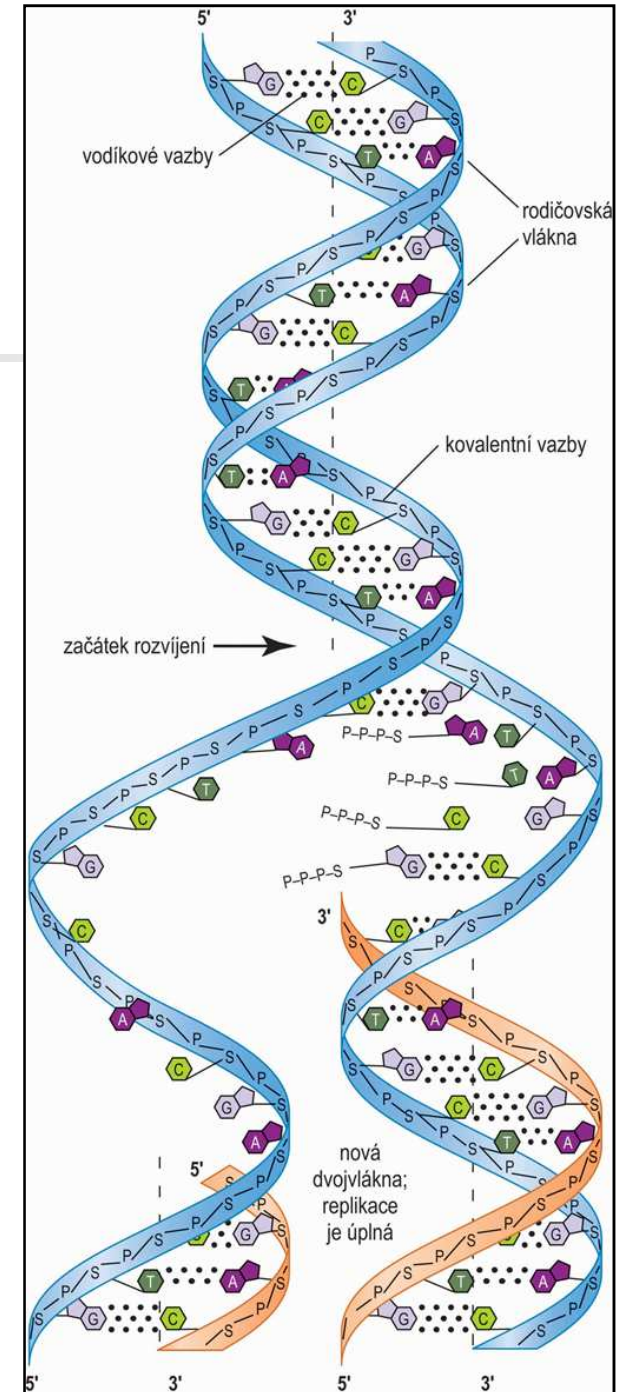
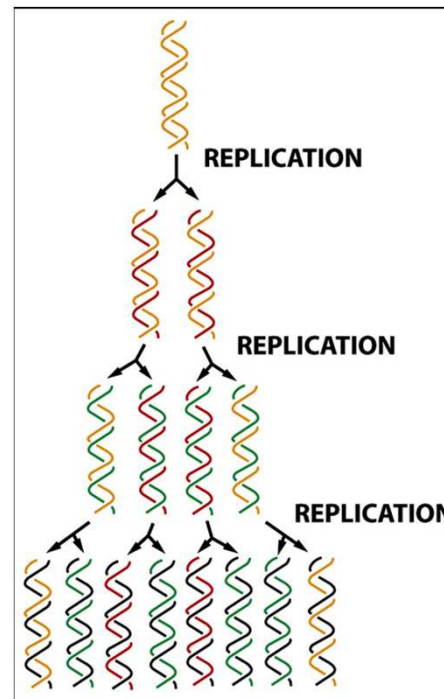


Základní rysy replikace DNA

- DNA se replikuje **semikonzervativně**
- iniciace replikace DNA nastává ve specifických místech - počátcích replikace ("**origins**")
- z místa počátku replikace DNA probíhá **oběma** směry (na každém vlákně jedním směrem)

Replikace DNA je semikonzervativní

- obě vlákna slouží jako templáty
- výsledkem je dvoušroubovice obsahující jeden původní a jeden nově syntetizovaný řetězec
- každé vlákno rodičovské šroubovice zůstává zachováno
- původní řetězce zůstávají intaktní po mnoho generací



Modely replikace DNA

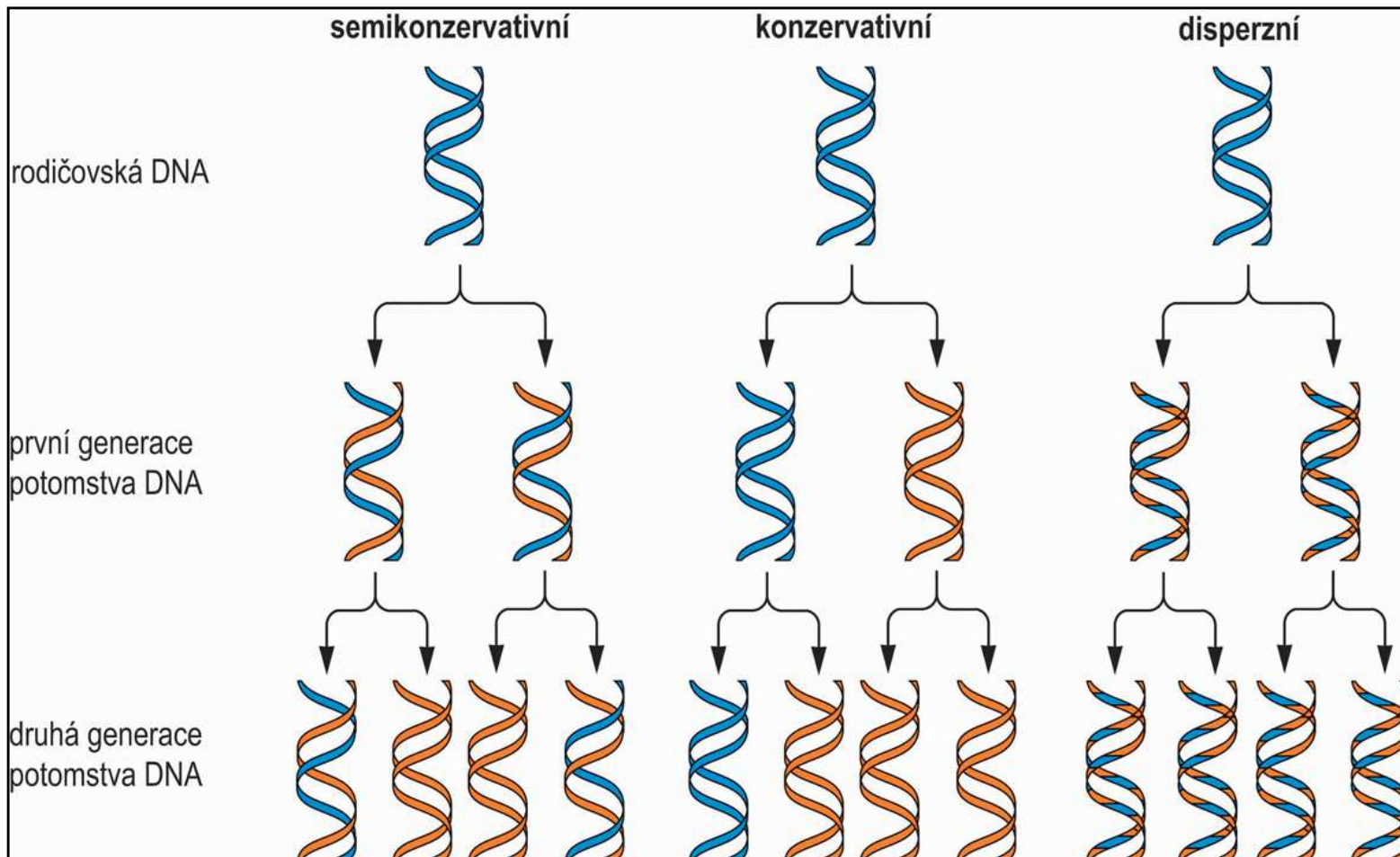


- **semikonzervativní:** každé vlákno rodičovské dvoušroubovice se zachovává a uplatňuje jako templát
- **konzervativní:** rodičovská dvoušroubovice se zachovává a řídí syntézu nové dvoušroubovice
- **disperzní:** segmenty každého rodičovského vlákna se zachovávají a řídí syntézu segmentů nových komplementárních vláken, které se následně spojují

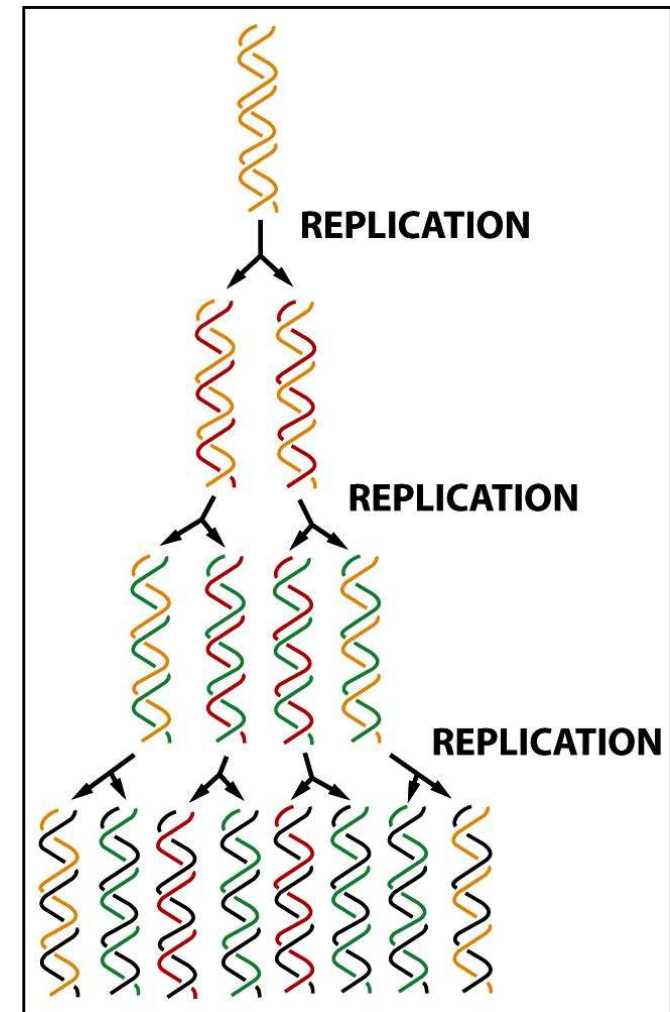
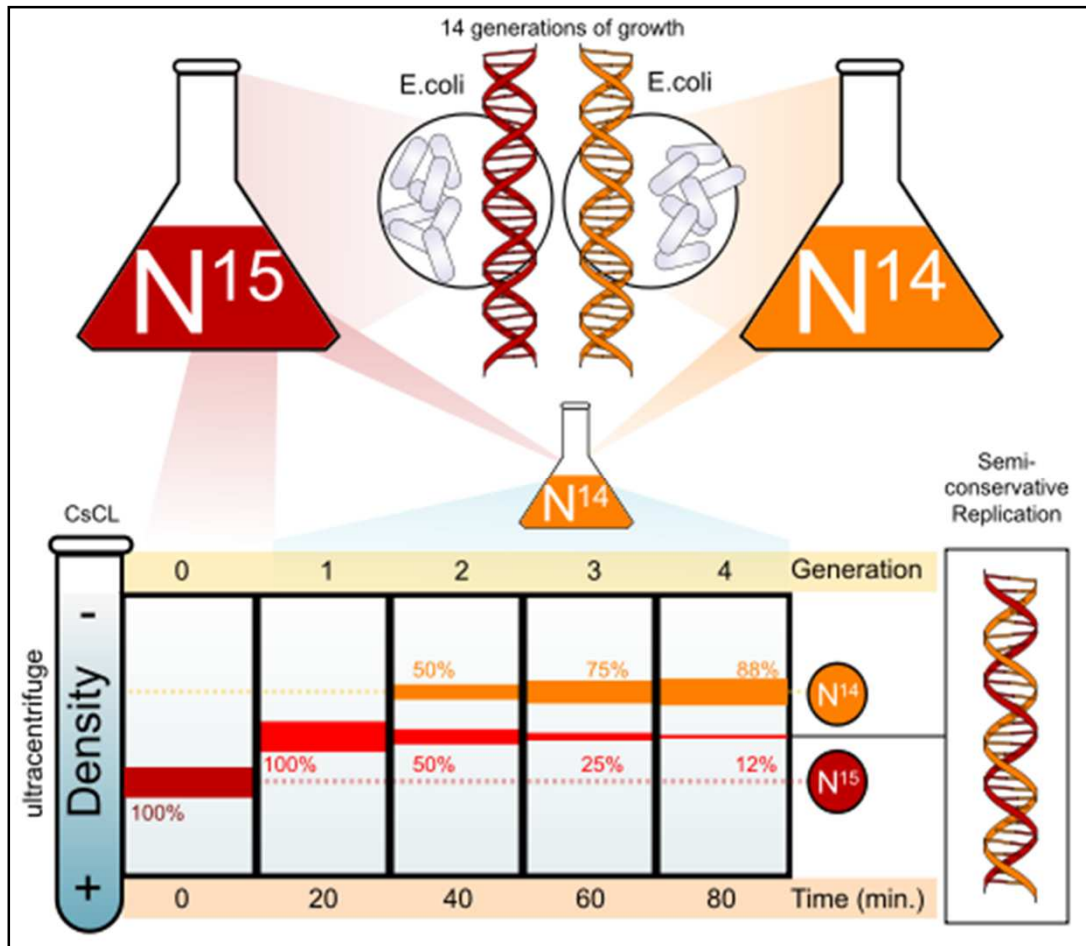
Matthew Meselson a Franklin Stahl (1958) prokázali platnost semikonzervativního modelu navrženého Watsonem a Crickem

- důkaz byl založen na studiu hustoty DNA po označení těžkým dusíkem ^{15}N

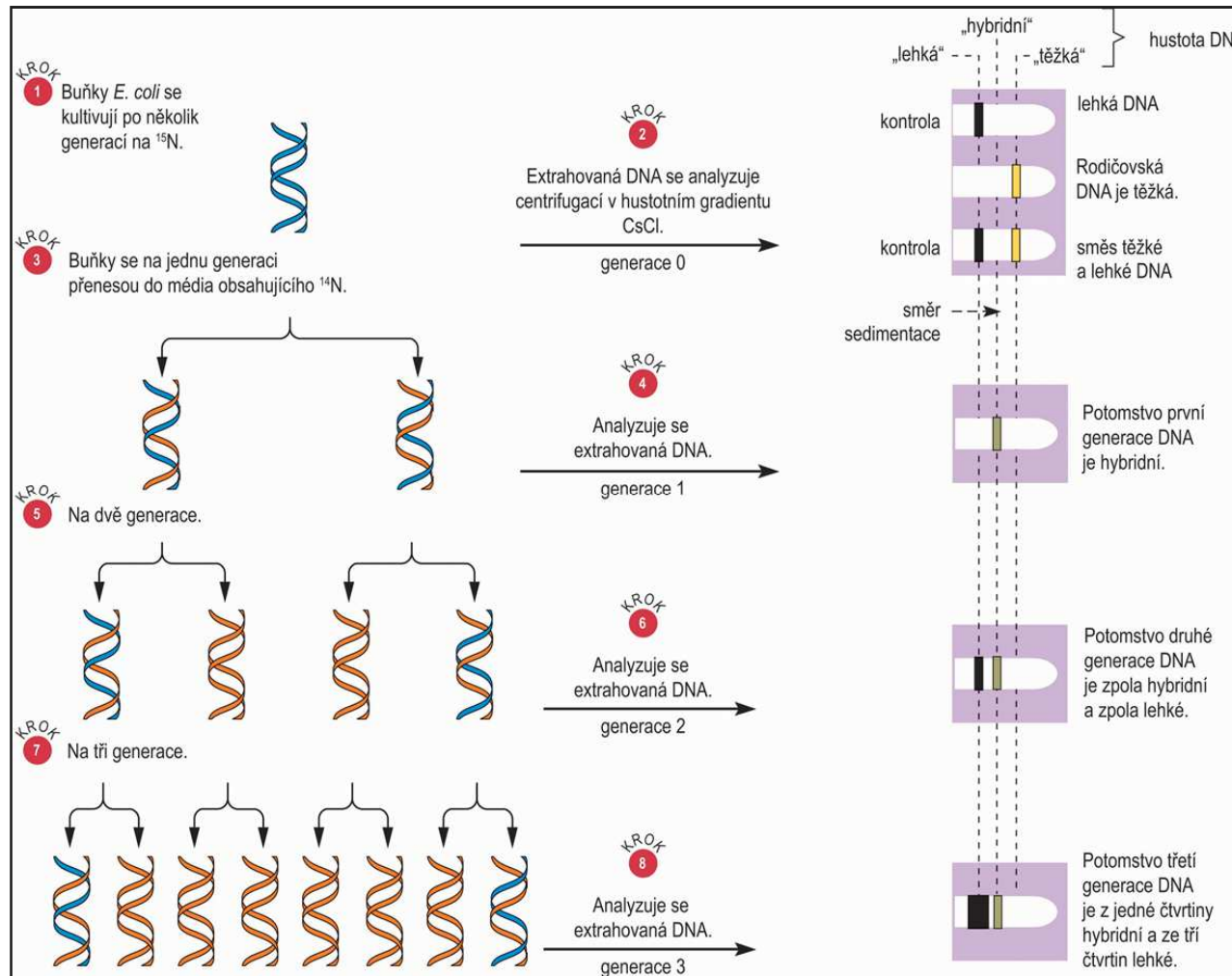
Uvažované modely replikace



Důkaz semikonzervativního modelu



Důkaz semikonzervativního modelu



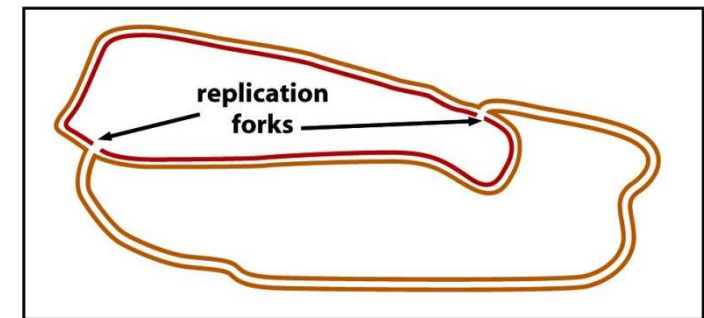
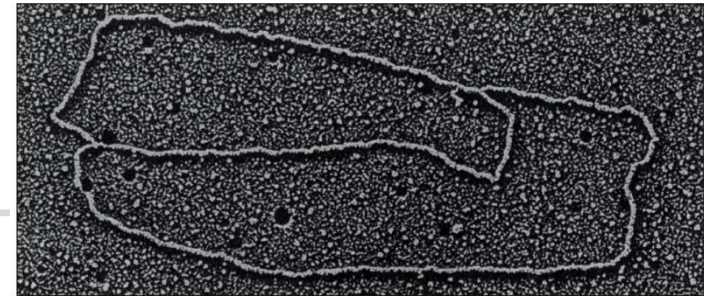


Počátek replikace - "origin"

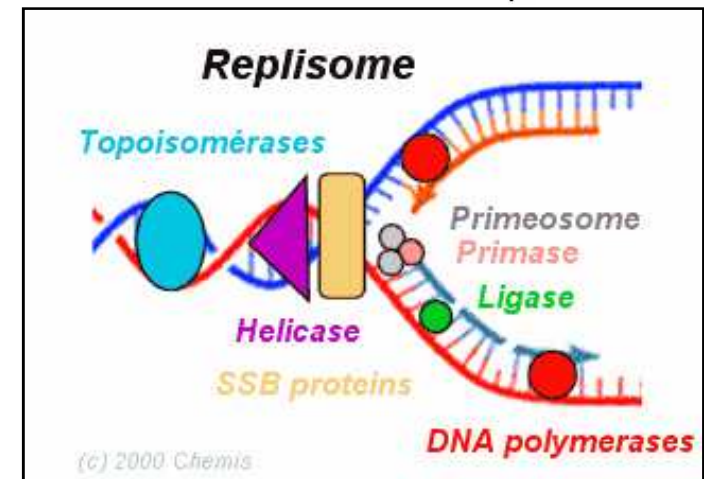
- specifická nukleotidová sekvence (*ori*)
- každý počátek zajišťuje replikaci úseku DNA zvaného **replikon**
- u bakterií a virů je obvykle 1 počátek na chromozom (prokaryotické chromozomy obsahují jediný replikon)
- u velkých chromozomů eukaryot je mnoho počátků replikace (mnoho replikonů)

Replikační bublina a vidlice

- po rozvolnění DNA v místě *ori* působením helikáz se templátové řetězce oddělují a vzniká **replikační bublina**
- od tohoto místa replikace probíhá v obou směrech a vzniká struktura tvaru "Y" zvaná **replikační vidlice**
- rozvolněná DNA a proteinový aparát v replikační vidlici tvoří **replizom**

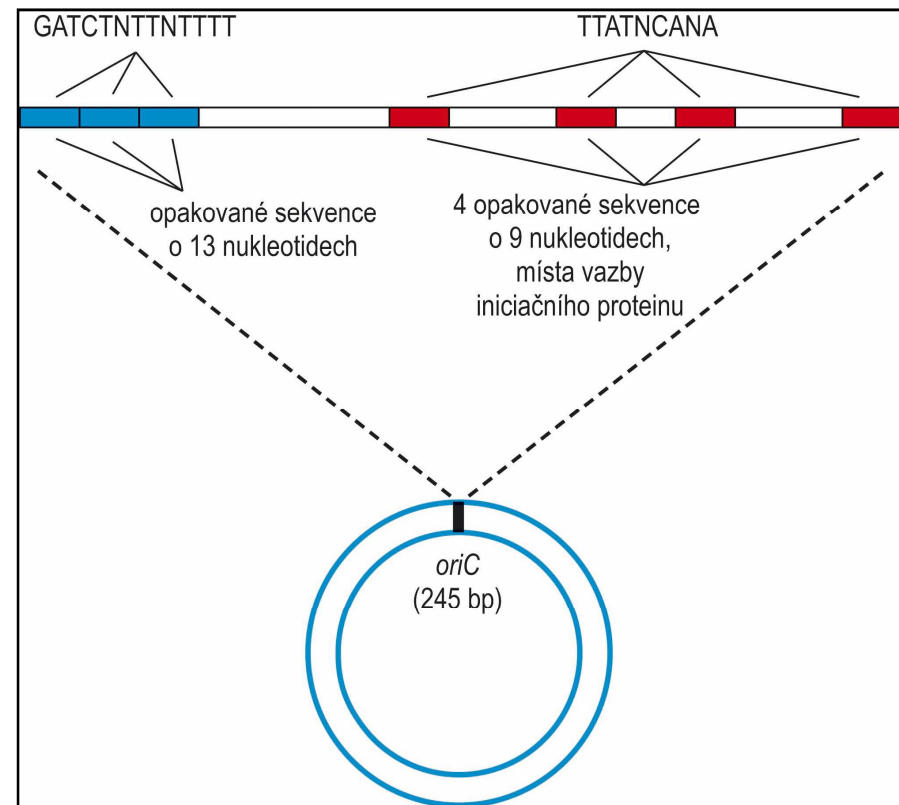


1 μm



Počátek replikace *E. coli* (*oriC*)

- velikost 245 pb
- přítomen v genomu 1x
- obsahuje 2 typy opakujících se sekvencí:
 - sekvenci 13 pb (opakovaná 3x, bohatá na AT, místo rozvolnění)
 - sekvenci 9 pb (opakovaná 4x, místo vazby proteinů, které jsou nezbytné pro tvorbu replikační bubliny)





Počátky replikace u eukaryot

- v genomu přítomny v mnoha kopiích
- u kvasinek označované ARS (autonomně se replikující segmenty)
 - délka cca 50 pb
 - obsahují stěžejní sekvenci bohatou na AT o velikosti 11 pb
- velikost místa *ori* vyšších eukaryot dosahuje až několika tisíc pb

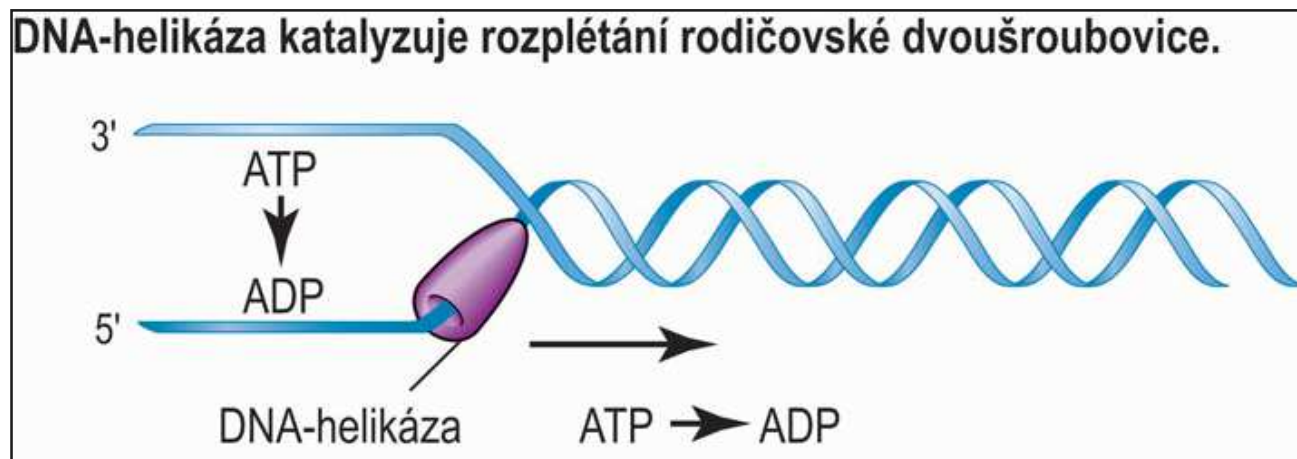


Tvorba RNA-primeru

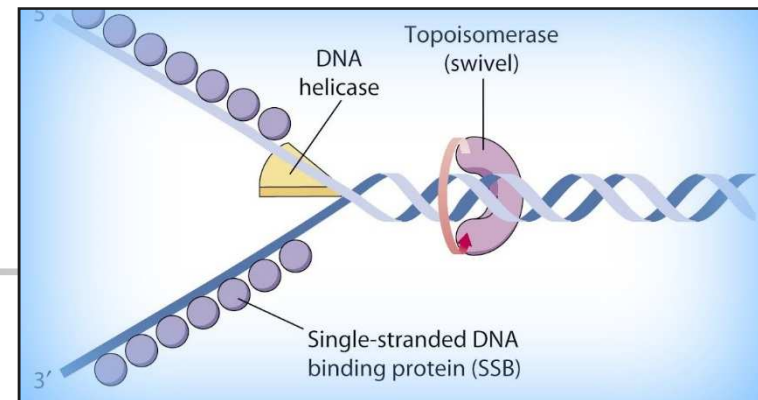
- po rozvinutí DNA v místě *ori* **DNA-helikázou** syntetizuje speciální RNA-polymeráza (**primáza**) krátké úseky RNA – **RNA-primery** – komplementární k odděleným templátům
- RNA-primery se prodlužují **DNA-polymerázou**
- pnutí v utahované šroubovici během replikace se uvolňuje **DNA-topoizomerázou**

Rozvíjení dvoušroubovice před replikační vidlicí

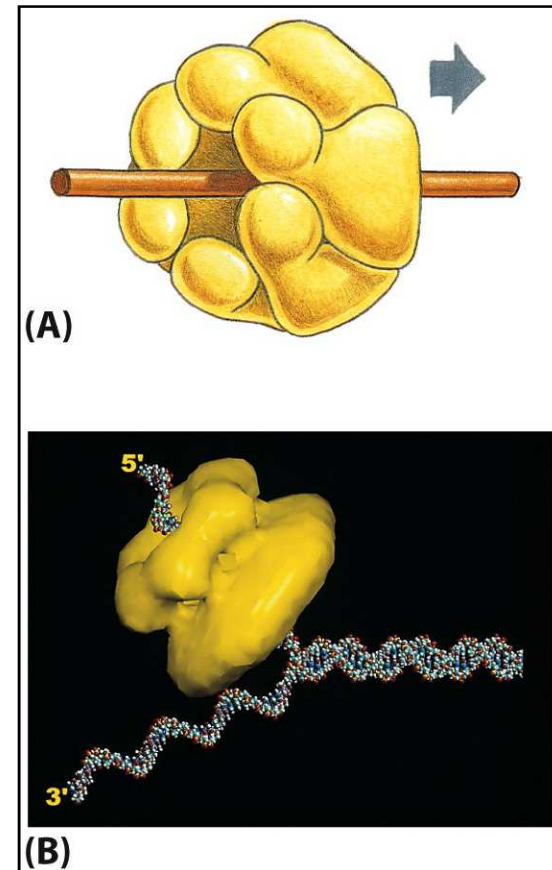
- podmínkou replikace je dostupnost nespárovaných nukleotidů v řetězci DNA
- dvoušroubovice je však stabilní (pro denaturaci je potřeba teplota blízká teplotě varu)
- otevírání dvoušroubovice napomáhají 3 typy replikačních proteinů:
 - **DNA-helikázy**
 - **proteiny vážoucí jednořetězcovou DNA (SSB)**
 - **DNA-topoizomerázy**



DNA-helikázy

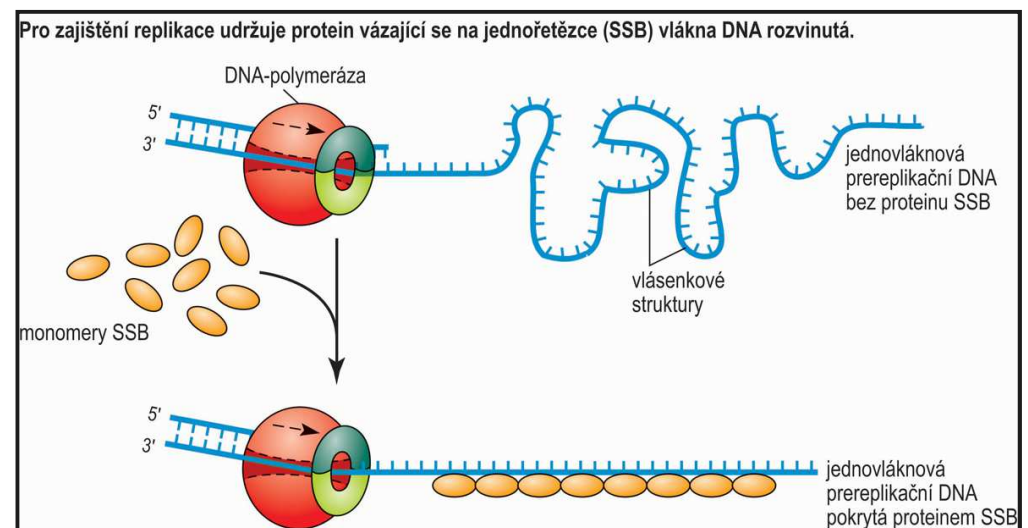


- enzymy tvořící šestipodjednotkové válce, které obklopují jednořetězcovou DNA
- vážou a hydrolyzují ATP a díky tomu se po jednořetězcové DNA pohybují
- když narazí na oblast dvouřetězcové DNA, pokračují ve svém pohybu, přičemž řetězce dvoušroubovice odtlačují od sebe



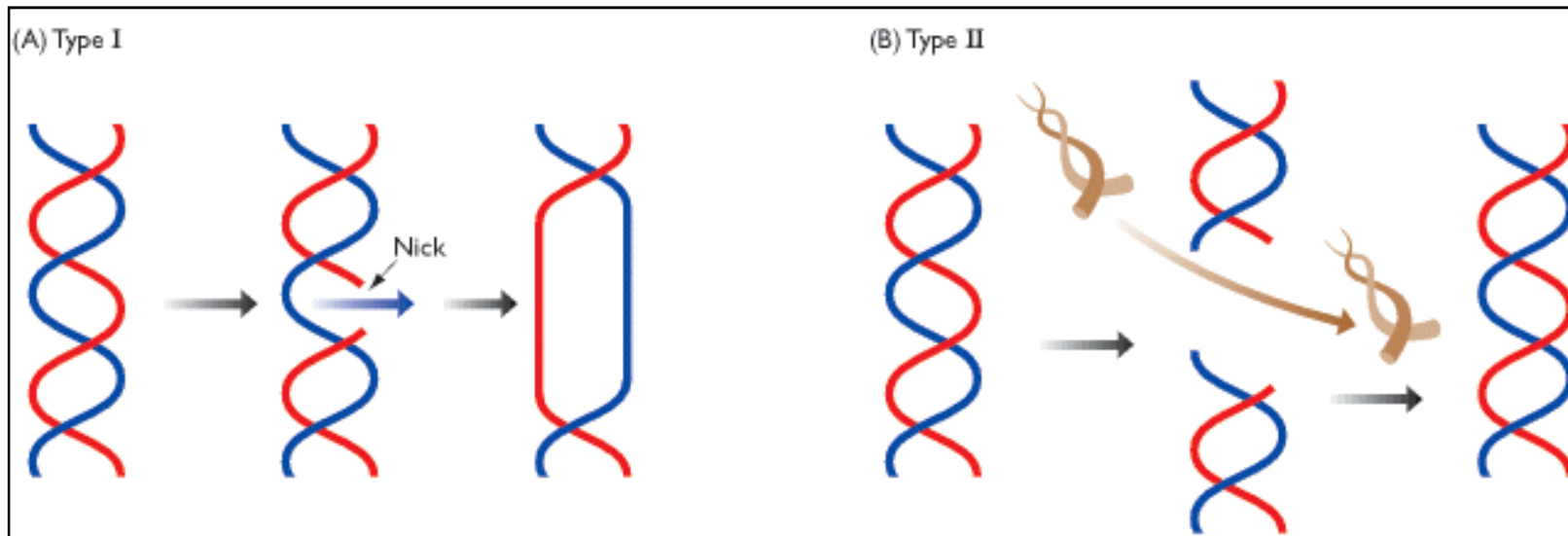
Proteiny vážoucí jednořetězcovou DNA (proteiny SSB)

- pevně se vážou na jednořetězcové úseky DNA vzniklé působením helikáz, aniž by blokovaly báze, které tak zůstávají k dispozici pro párování
- vzniklé jednořetězce tím stabilizují
- brání náhodnému intramolekulárnímu párování (tvorbě vlásenek), které by komplikovaly replikaci DNA
- na DNA se vážou kooperativním způsobem (vazba 1 monomeru stimuluje vazbu druhého)



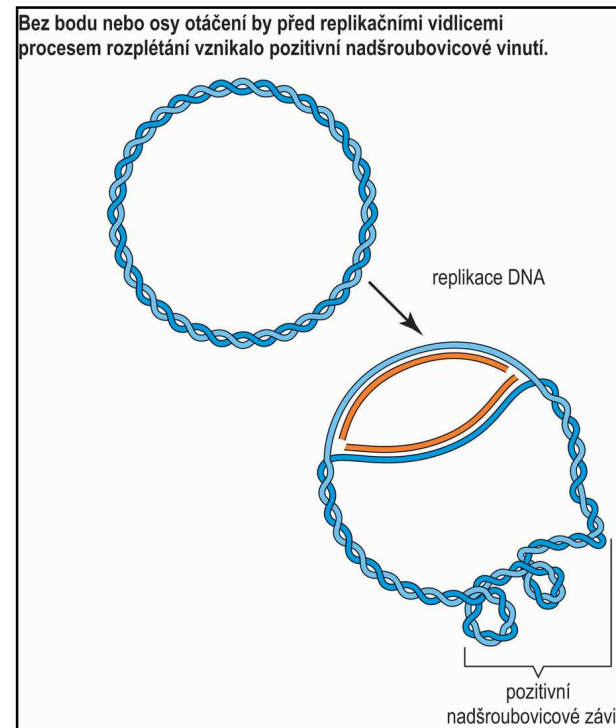
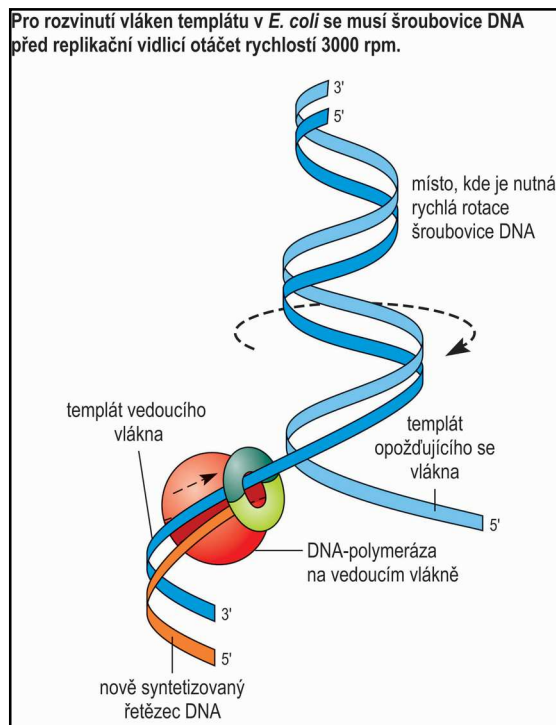
DNA-topoizomerázy

- katalyzují tvorbu přechodných zářezů v DNA
- zářezy v jednom zajišťuje topoizomeráza I
- zářezy v obou vláknkách zajišťuje topoizomeráza II = DNA-gyráza



DNA-topoizomerázy

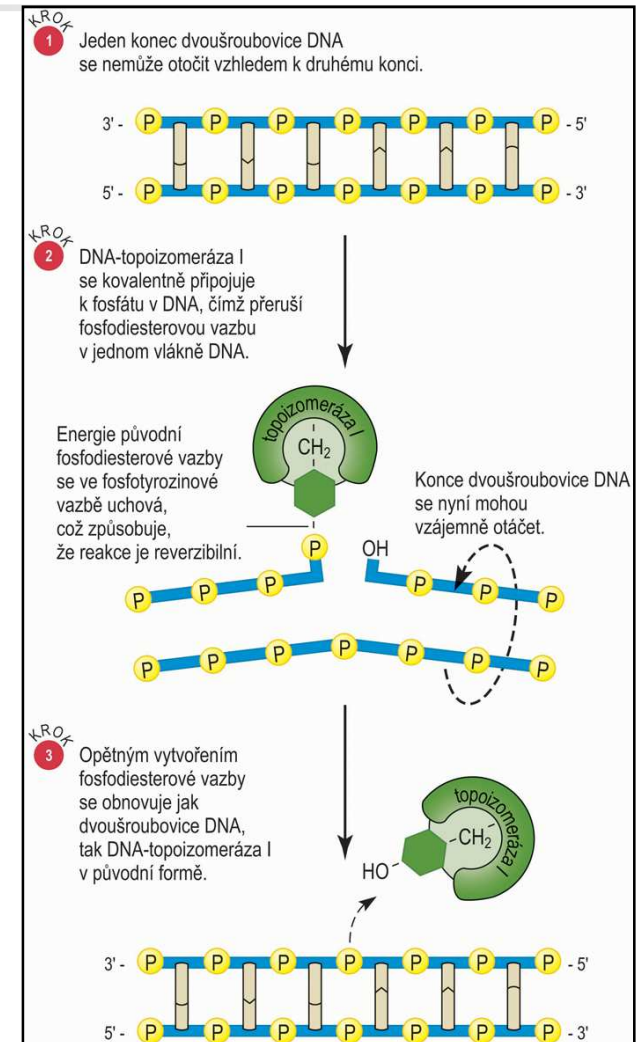
- DNA se před replikační vidličkou otáčí díky rozvíjení šroubovice
- bez přerušení vláken DNA-topoizomerázami by rozvíjení DNA vedlo k tvorbě pozitivních nadšroubovicových závitů



DNA-topoizomeráza I

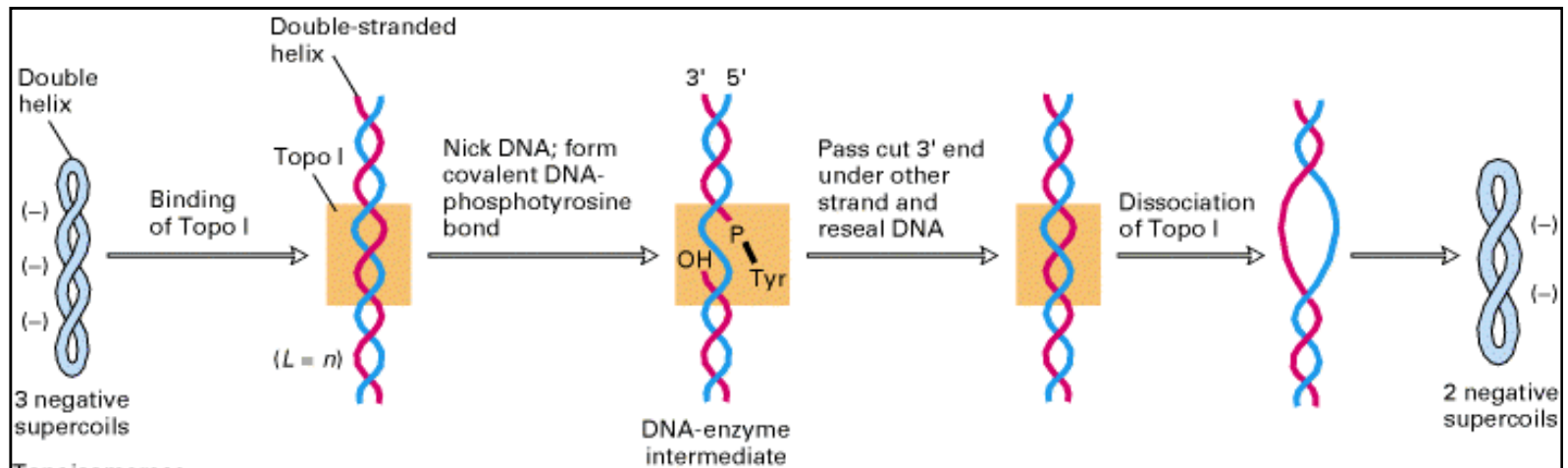
katalyzuje přechodné zářezy v jednom vlákně DNA:

- kovalentně se připojí k jednomu z fosfátů v DNA
- přerušené vlákno DNA se může otočit kolem své podélné osy
- uvolnění tlaku
- obnovení dvoušroubovice
- uvolnění enzymu



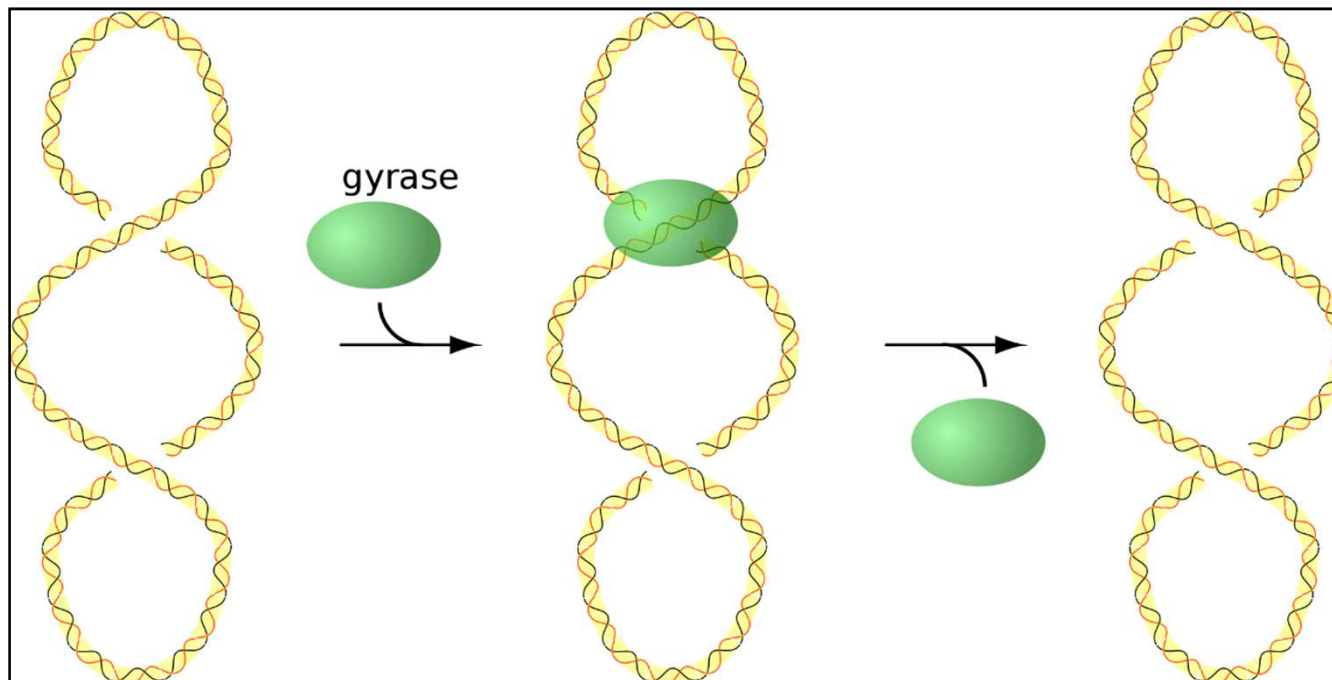
DNA-topoizomeráza I

odstraňuje nadšroubovicové vinutí z DNA



DNA-topoizomeráza II (DNA-gyráza)

katalyzuje přechodné zářezy v obou vlákněch



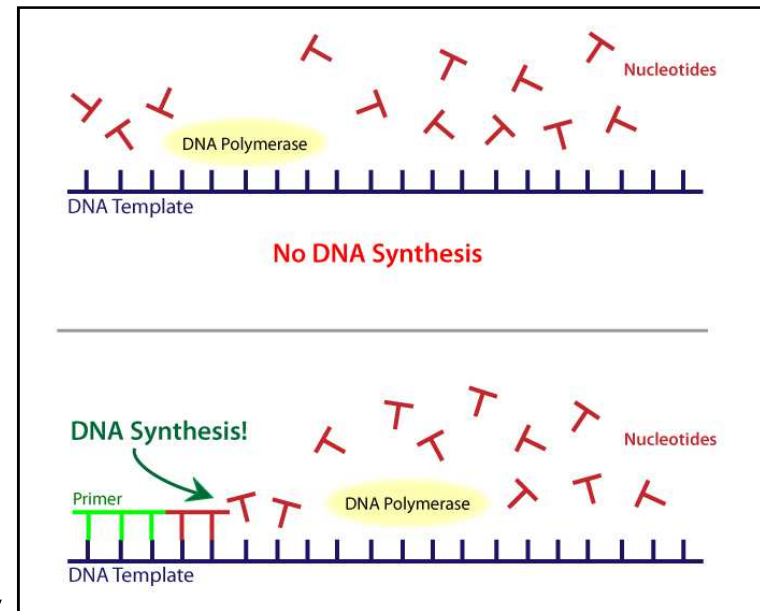
Iniciace replikace: RNA-primery

DNA-polymerázy nesyntetizují DNA *de novo*

- pouze prodlužují již existující řetězec se správně spárovaným nukleotidem disponujícím volnou 3'-OH skupinou
- nemohou tvořit DNA "z ničeho", dokážou prodlužovat krátký oligonukleotid – primer
- jsou velmi přesné

RNA-polymerázy

- méně přesné, chyby jsou více tolerovány
- nedisponují exonukleázovou korektorskou funkcí
- mohou začít tvorbu nových polynukleotidových řetězců bez primeru
- jako primery při replikaci DNA proto slouží krátké úseky RNA

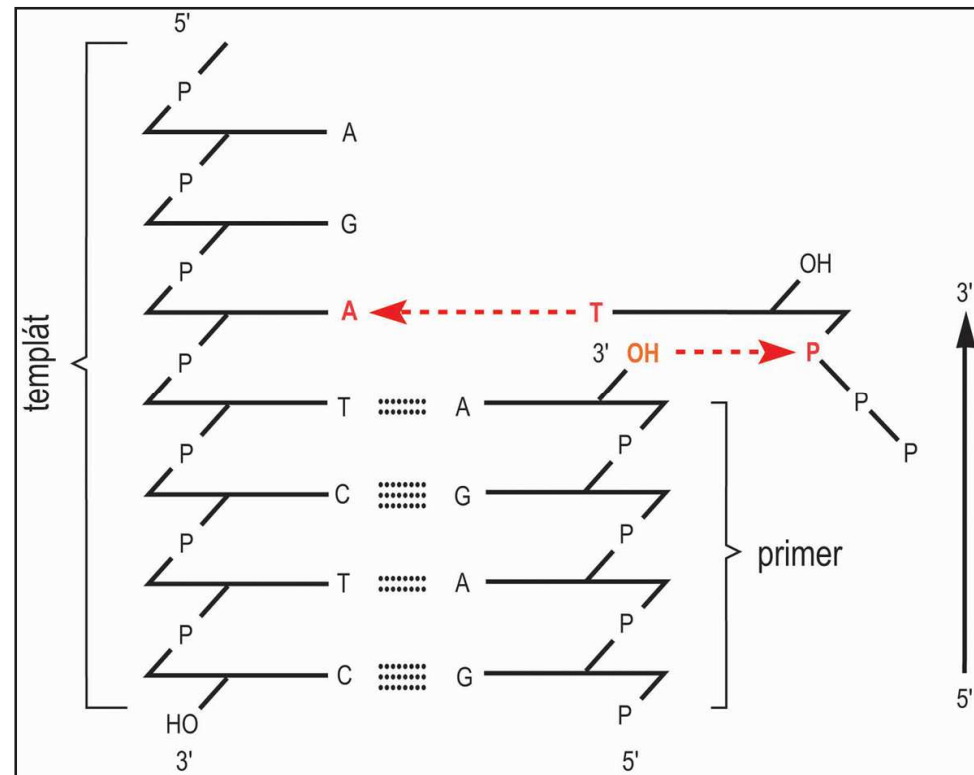


Replikaci DNA katalyzují DNA-polymerázy

- zajišťují připojení deoxyribonukleotidu definovaného templátem k 3'-OH skupině primerového řetězce
- katalyzují tvorbu kovalentní fosfodiesterové vazby mezi nimi

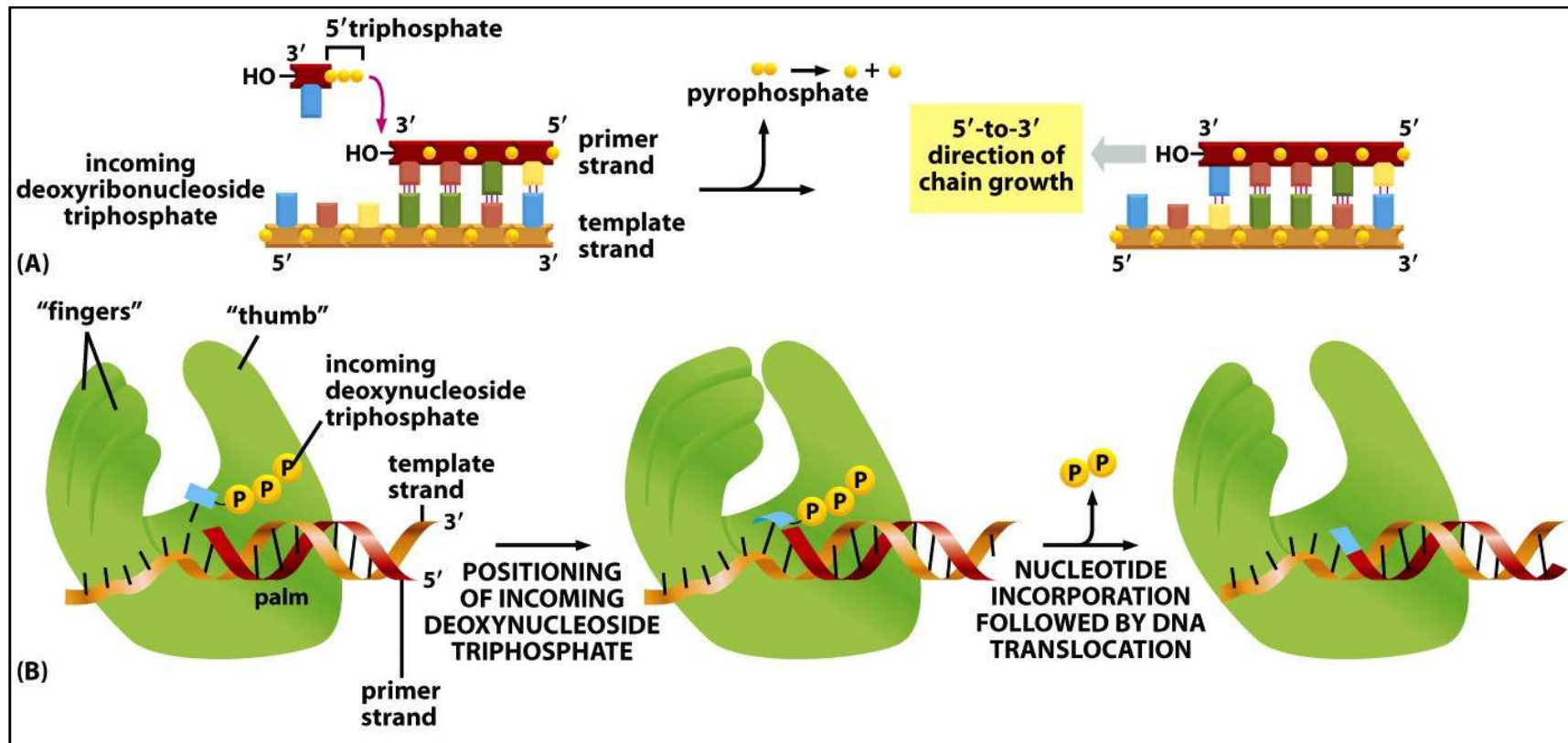
Substrátové požadavky:

- primerové vlákno s volnou 3'-OH skupinou
- templátové vlákno DNA určující sekvenci nového vlákna
- volné dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- Mg^{2+}

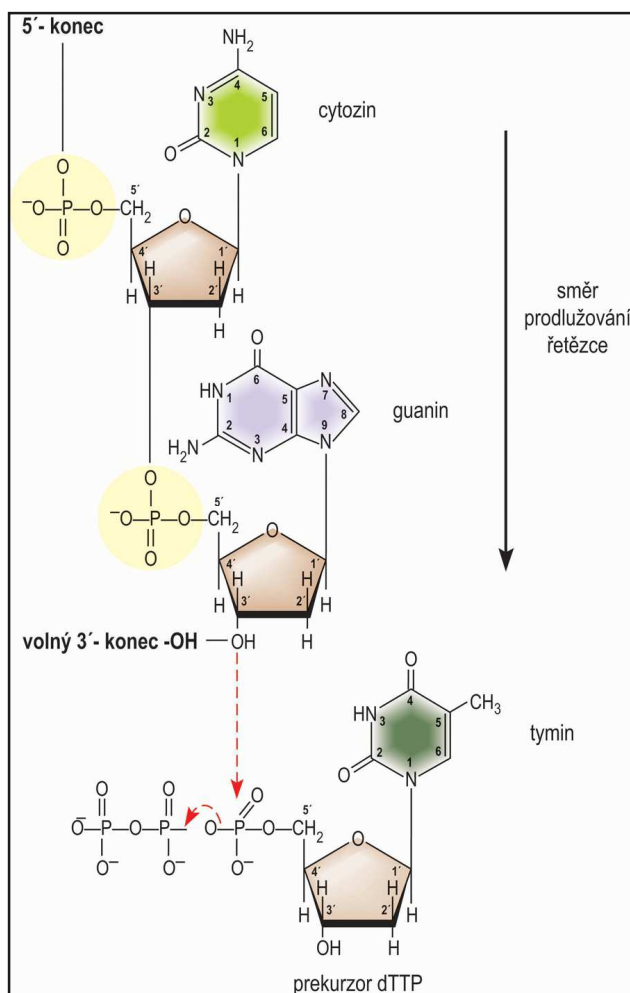
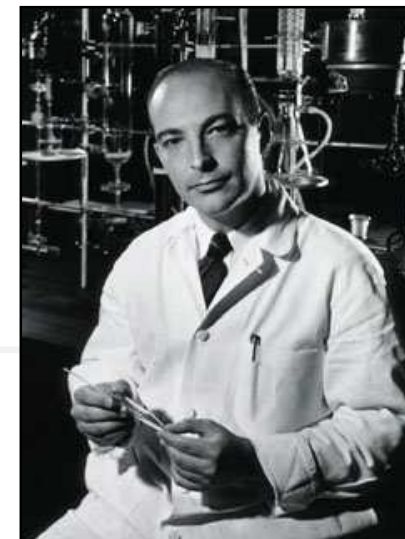


Replikace = kopírování DNA

- polymerace nově tvořeného řetězce probíhá jen ve směru 5' - 3'
- potřebná energie je zajištěna uvolněním pyrofosfátu z dNTP



DNA-polymeráza I



první DNA-polymeráza, kterou se podařilo izolovat (**Arthur Kornberg**, 1957; Nobelova cena 1959)

Zdroj: *E. coli*

Funkce:

- oprava poškozené DNA
- syntéza krátkých úseků DNA
- odstraňování RNA-primerů = hlavní funkce



DNA-polymeráza I má nukleázovou aktivitu

Nukleáza je enzym, který rozkládá nukleové kyseliny:

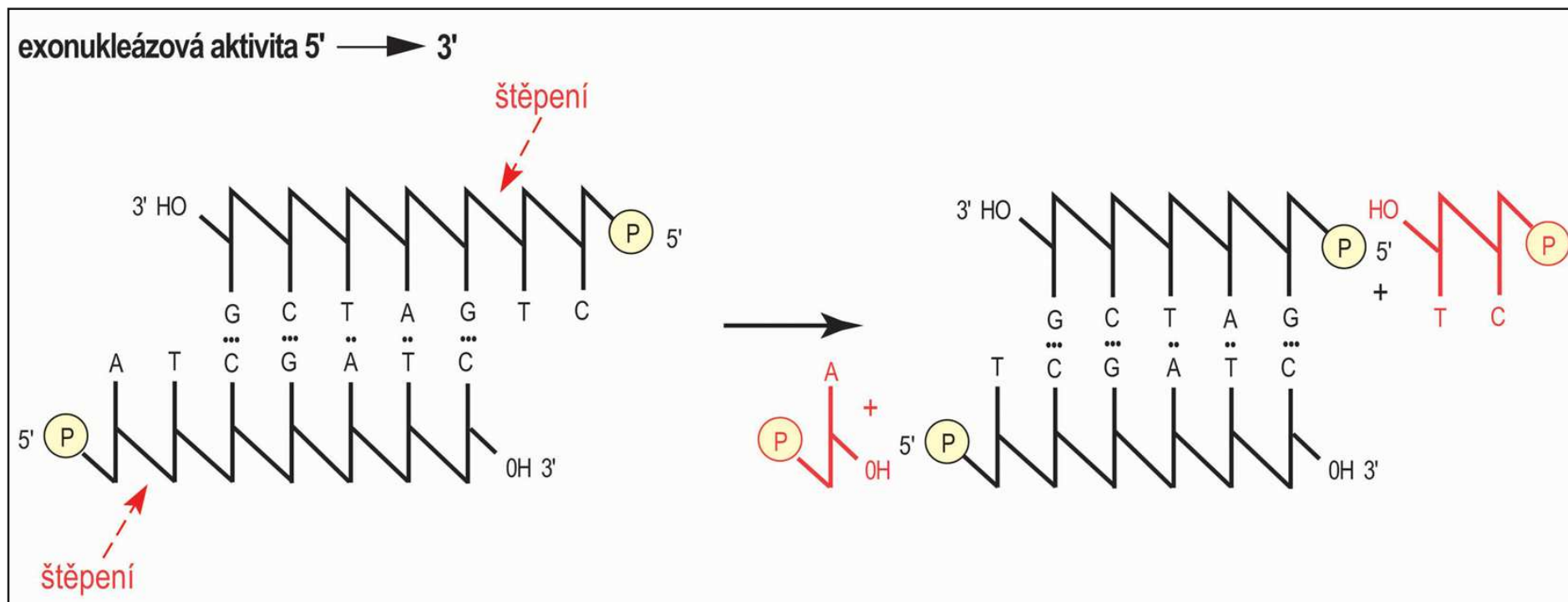
- exonukleáza štěpí nukleové kyseliny od konců
- endonukleáza štěpí DNA uvnitř molekuly

DNA-polymeráza I má dvě nukleázové aktivity:

- $5' \rightarrow 3'$ exonukleázovou aktivitu: odštěpuje krátké **oligonukleotidy od 5'-konce DNA**
- $3' \rightarrow 5'$ exonukleázovou aktivitu: odštěpuje **mononukleotidy od 3'-konce DNA**

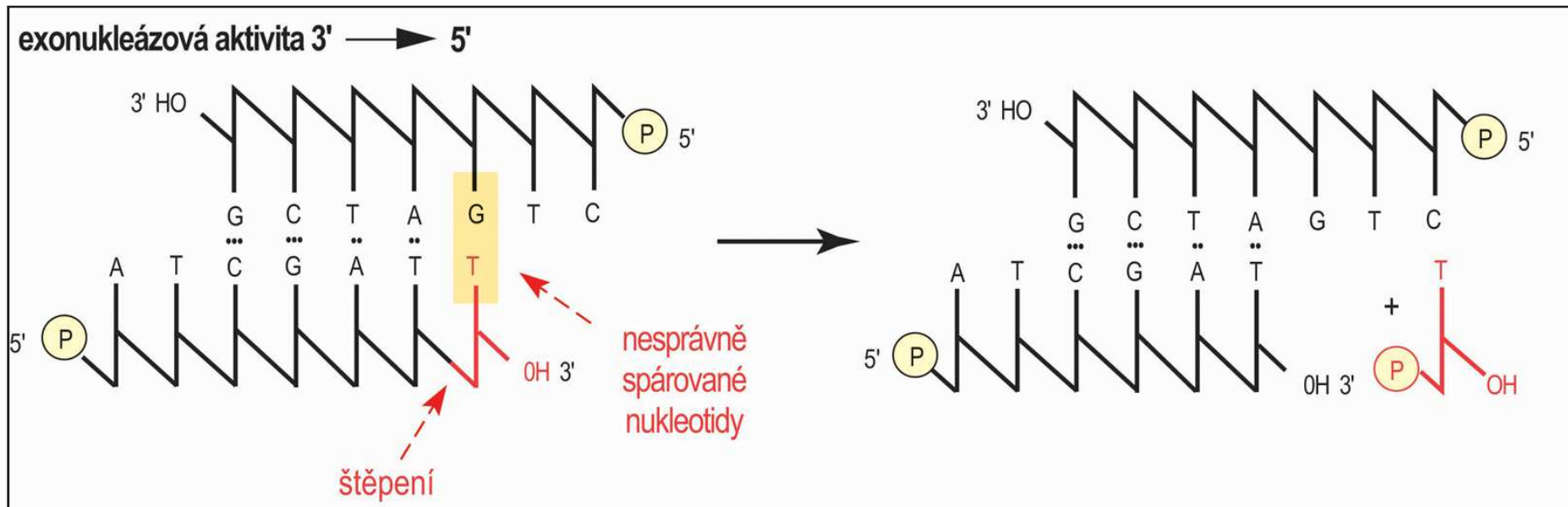
Exonukleázová aktivita 5'-3' DNA-polymerázy

zajišťuje odstraňování RNA-primerů



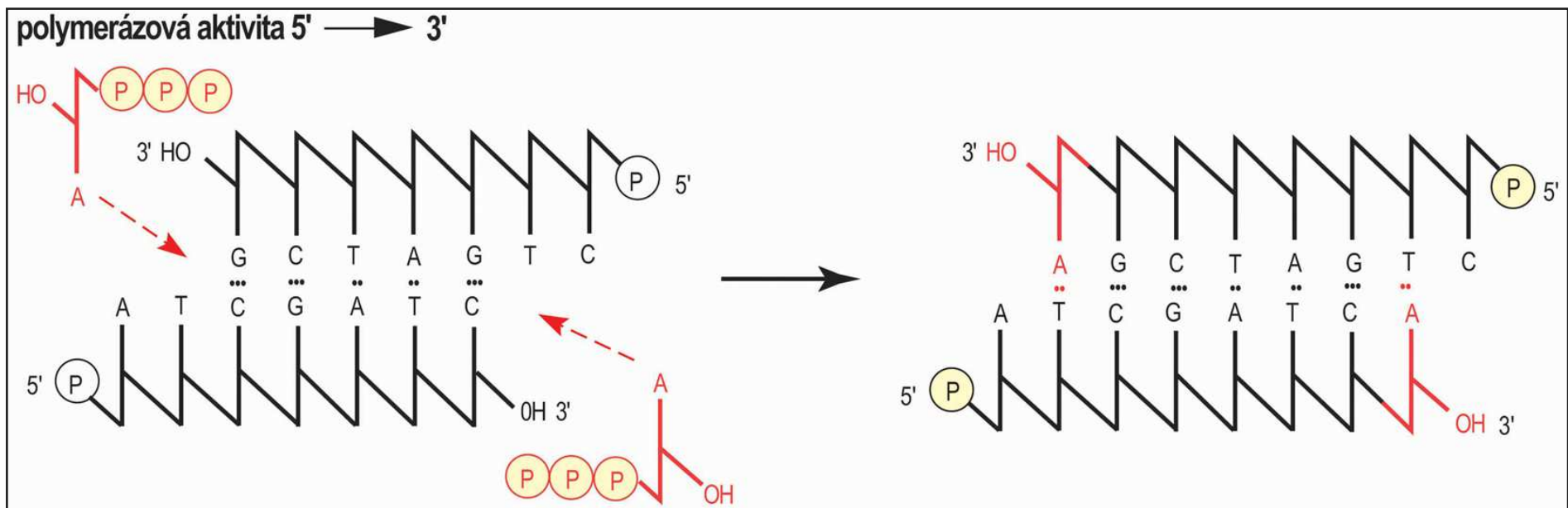
Exonukleázová aktivita 3'-5' DNA-polymerázy

zajišťuje korektorskou funkci DNA-polymerázy



Polymerázová aktivita 5'-3'

DNA-polymerázy





Přehled DNA-polymeráz

u *E. coli*: 5 DNA-polymeráz

- replikaci DNA zajišťují **DNA-polymeráza I** (odstraňuje RNA primery, podíl na opravách DNA) a **DNA-polymeráza III** (vlastní replikáza)
- na opravách DNA se podílejí DNA-polymerázy I, II, IV a V
- rychlost replikace: cca 30 000 nukleotidů za minutu

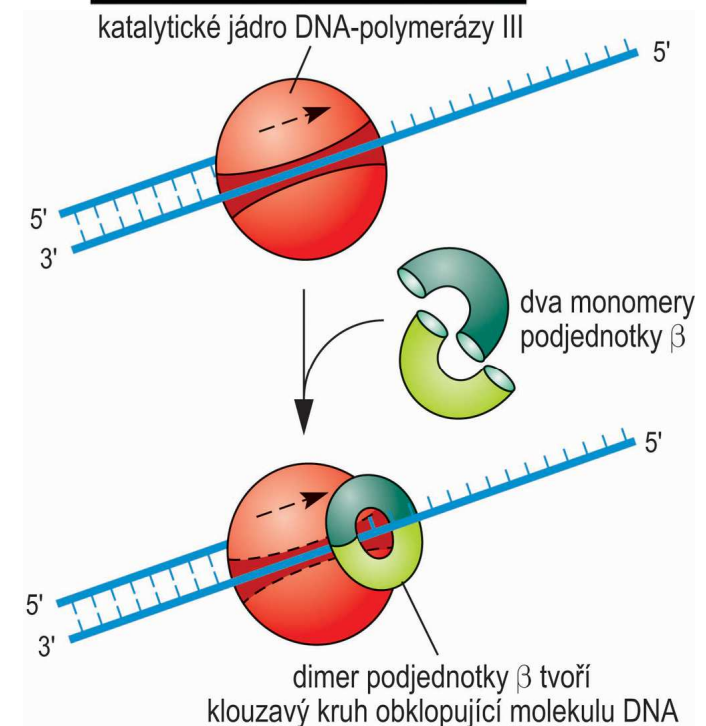
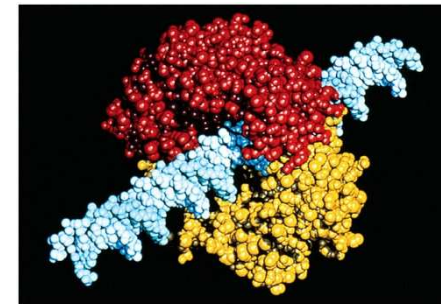
u eukaryot: 15 DNA-polymeráz

- replikaci jaderné DNA zajišťují **DNA-polymerázy α , δ , ϵ**
- replikaci mitochondriální DNA zajišťuje **DNA-polymeráza γ**
- opravy DNA zajišťují **DNA-polymerázy β , ϵ , κ , ζ , μ , a η**
- rychlost replikace: cca 3 000 nukleotidů za minutu

- všechny tyto enzymy syntetizují DNA ve směru 5'- 3' a požadují volnou 3'-OH skupinu na konci primeru

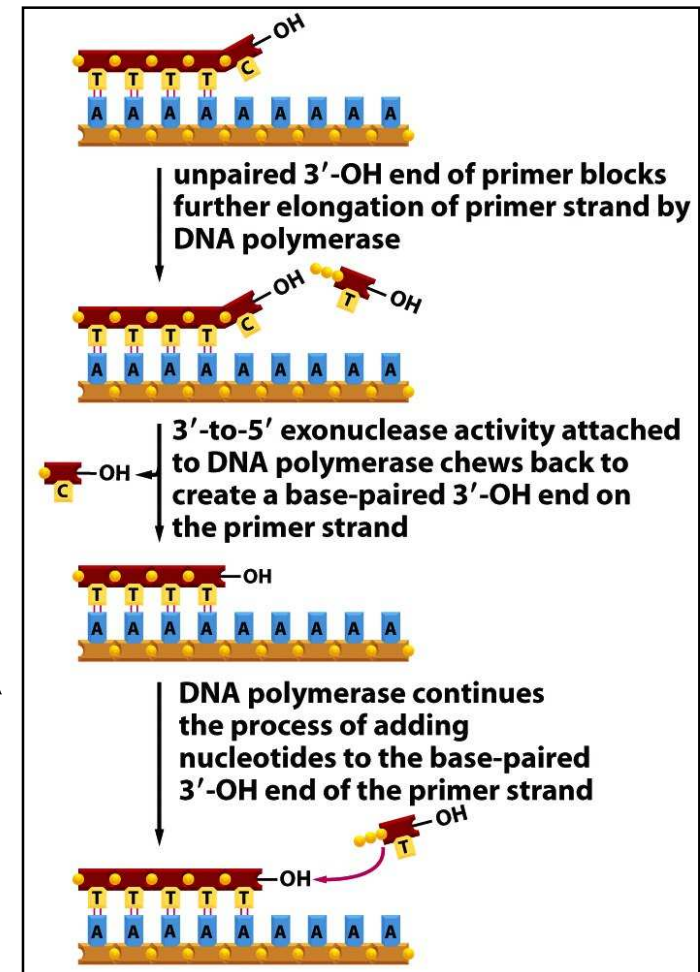
DNA-polymeráza III je hlavní replikázou u *E. coli*

- vícepodjednotkový enzym
- minimální jádro s enzymovou aktivitou *in vitro* obsahuje podjednotky α , ϵ , θ
- podjednotka β tvoří dimer, který brání předčasnému uvolnění DNA-polymerázy z templátu
- syntetizuje dlouhé úseky DNA



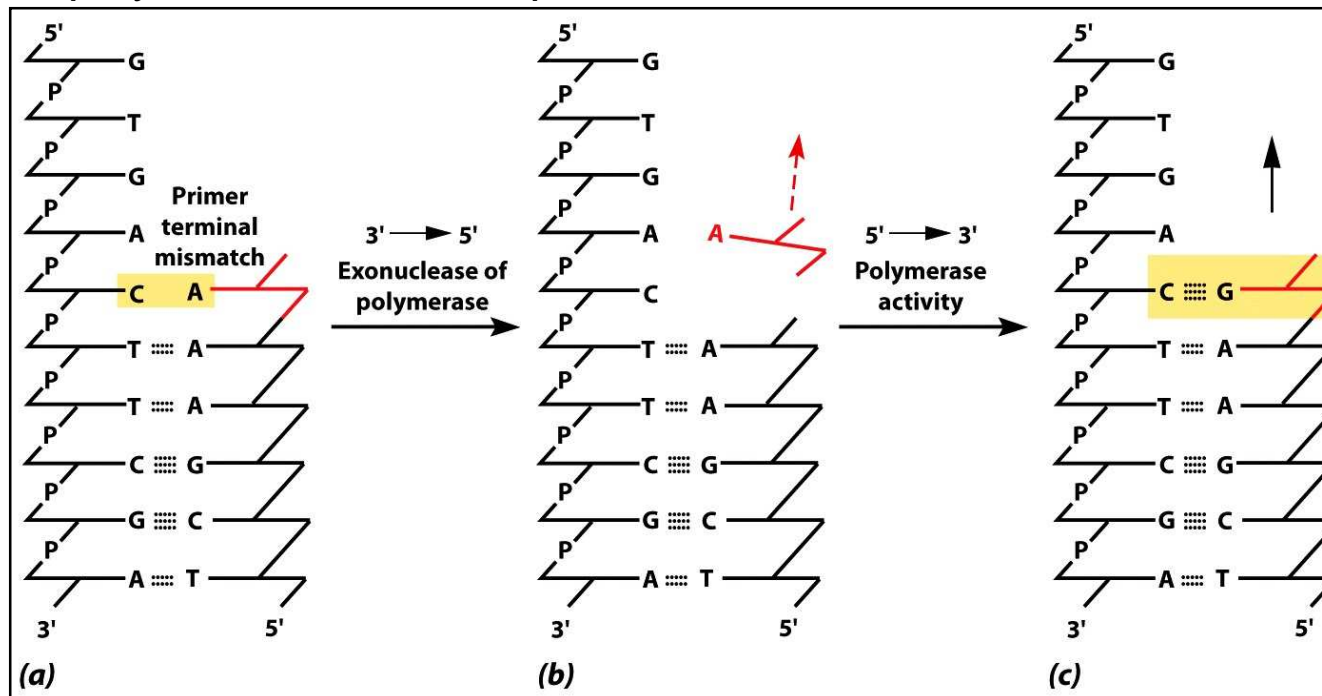
Korektorská funkce: kontrola přesnosti replikace

- přesnost kopírování je překvapivě vysoká: pouze 1 chyba na 10^9 kopírovaných nukleotidů
- korektorská funkce spočívá v kontrole konce právě syntetizovaného vlákna DNA, hledání chyb a jejich opravě
- bez **korektorské funkce** by DNA-polymeráza do DNA často včleňovala chybné nukleotidy a vznikaly by mutace



Korektorská funkce DNA-polymerázy

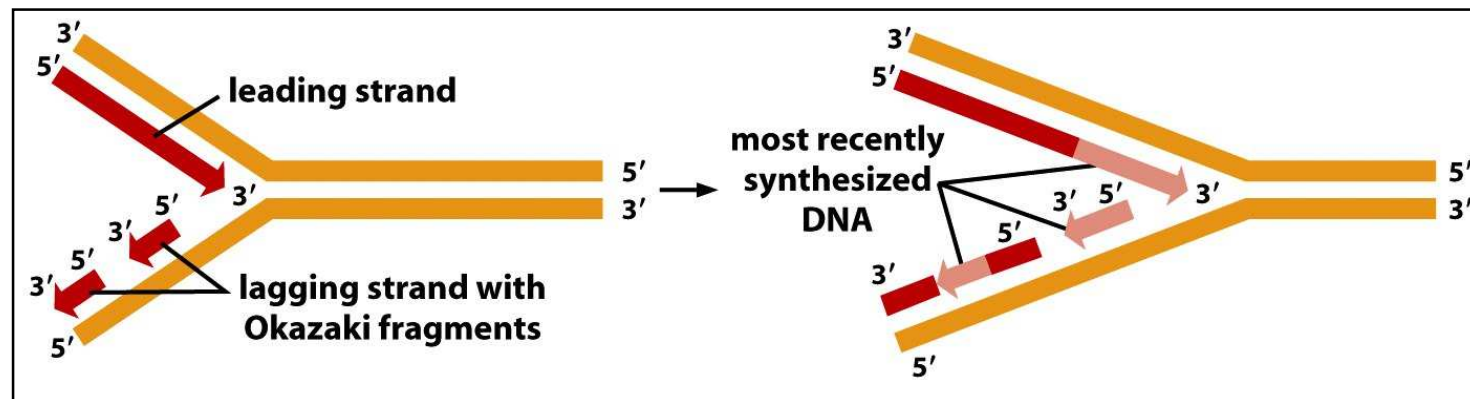
- na 3'-konci primerového vlákna se objevuje chybný (nepárující se) nukleotid
- replikace se pozastaví
- exonukleázovou aktivitou 3'-5' DNA-polymerázy se chybný nukleotid z řetězce uvolní
- DNA-polymeráza obnoví replikaci



Templátová vlákna jsou antiparalelní, ale DNA-polymeráza funguje jen ve směru 5' - 3'!

Jak může DNA růst ve směru 3' - 5'?

- rozlišuje se **vedoucí řetězec** syntetizovaný ve směru 5' - 3' průběžně a **opoždující se řetězec**, syntetizovaný ve stejném směru přerušovaně
- přerušovanou syntézou vznikají krátké tzv. **Okazakiho fragmenty** (dlouhé 1000-2000 nukleotidů u prokaryot, 100-200 nukleotidů u eukaryot)
- Okazakiho fragmenty se následně spojí do jednoho řetězce



Okazaki a jeho fragmenty

Objevitelé:

Reiji Okazaki (1930-1975)

a jeho manželka **Tsuneko Okazaki** (*1933)

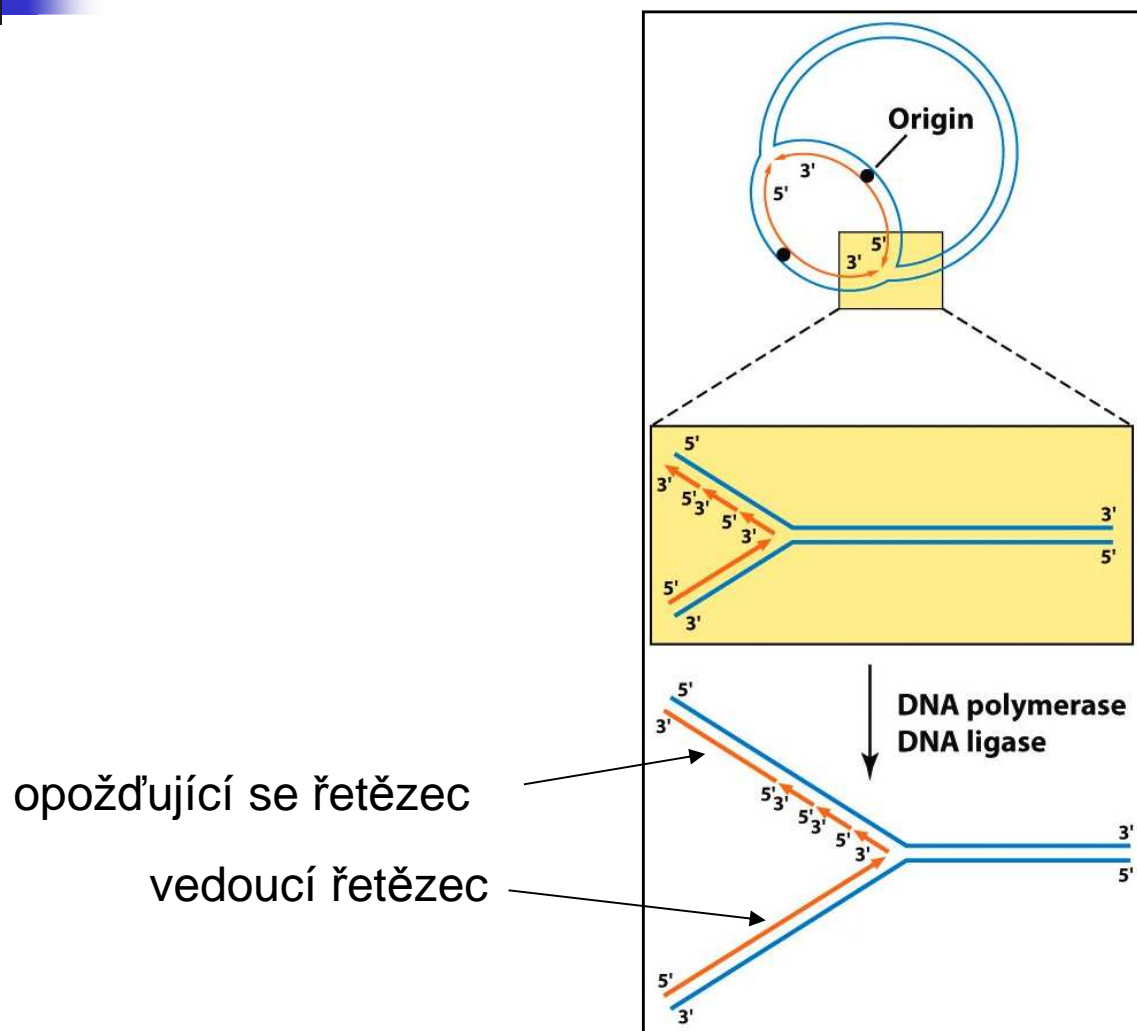
Nagoya University, Japonsko

Reiji zemřel předčasně na leukémii
na následek těžkého ozáření
po bombardování Hiroshimi

Tsuneko – první žena – profesorka v Nagoya
University

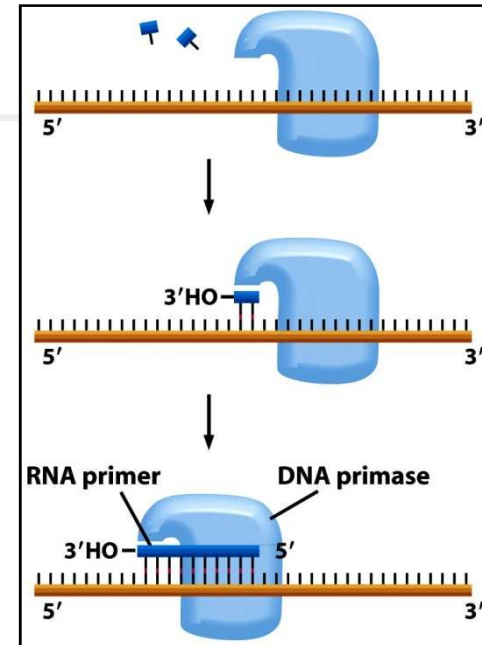


Vedoucí a opožďující se řetězec



Syntéza RNA-primerů při replikaci DNA

- syntézu RNA-primerů zajišťuje komplex **DNA-primázy** a **DNA-helikázy** (tzv. **primozom**)
- primozom se pohybuje po molekule DNA poháněn energií ATP
- DNA-helikázová aktivita uvolňuje jednořetězce rodičovské dvoušroubovice
- DNA-primázová aktivita syntetizuje RNA-primery
- **DNA-primáza** (DNA-dependentní RNA-polymeráza) dokáže spojit dva ribonukleozidtrifosfáty na templátu DNA a dinukleotid prodloužit do krátkého polyribonukleotidu (10-60 nukleotidů u prokaryot, cca 10 nukleotidů u eukaryot) ve směru 5'-3' a vytvořit tak substrát pro DNA-polymerázu



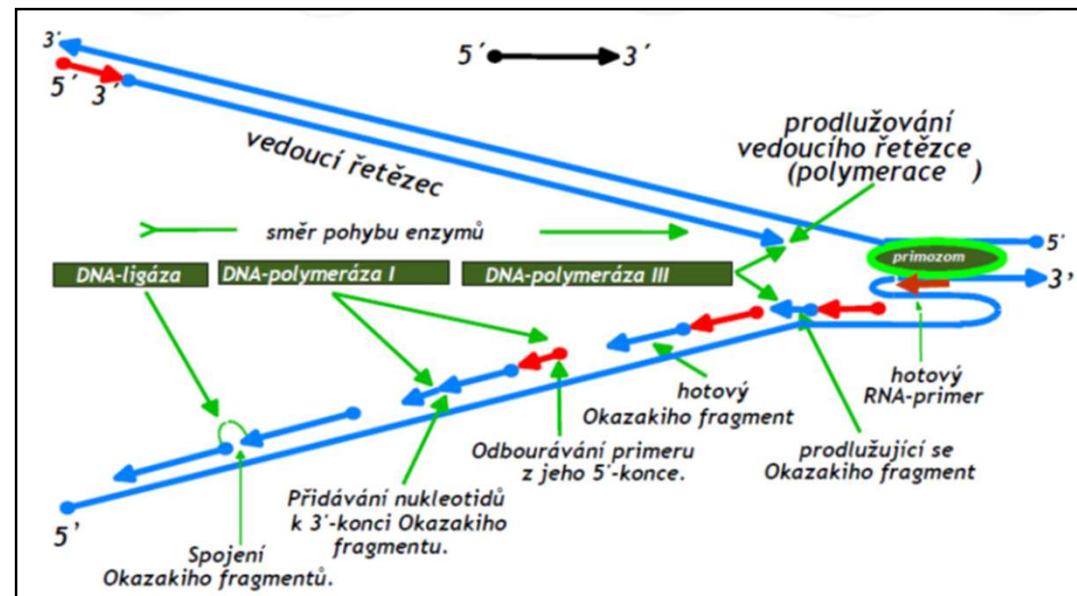
Syntéza RNA-primerů při replikaci DNA

Vedoucí řetězec

- postačuje jeden RNA-primer
- replikace DNA probíhá bez přerušení

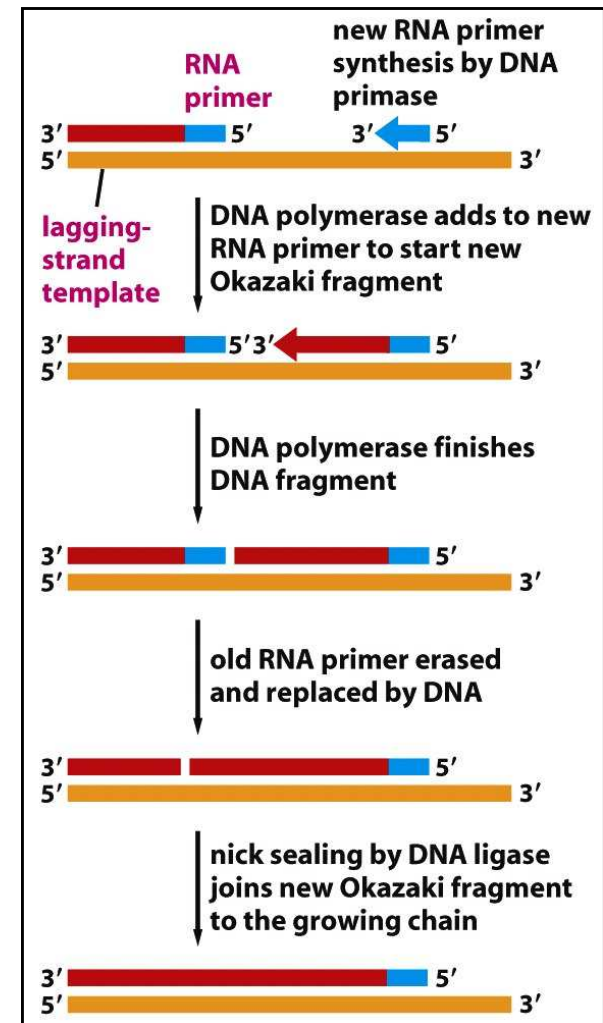
Opoždující se řetězec

- po dokončení syntézy každého Okazakiho fragmentu se syntetizuje další RNA-primer



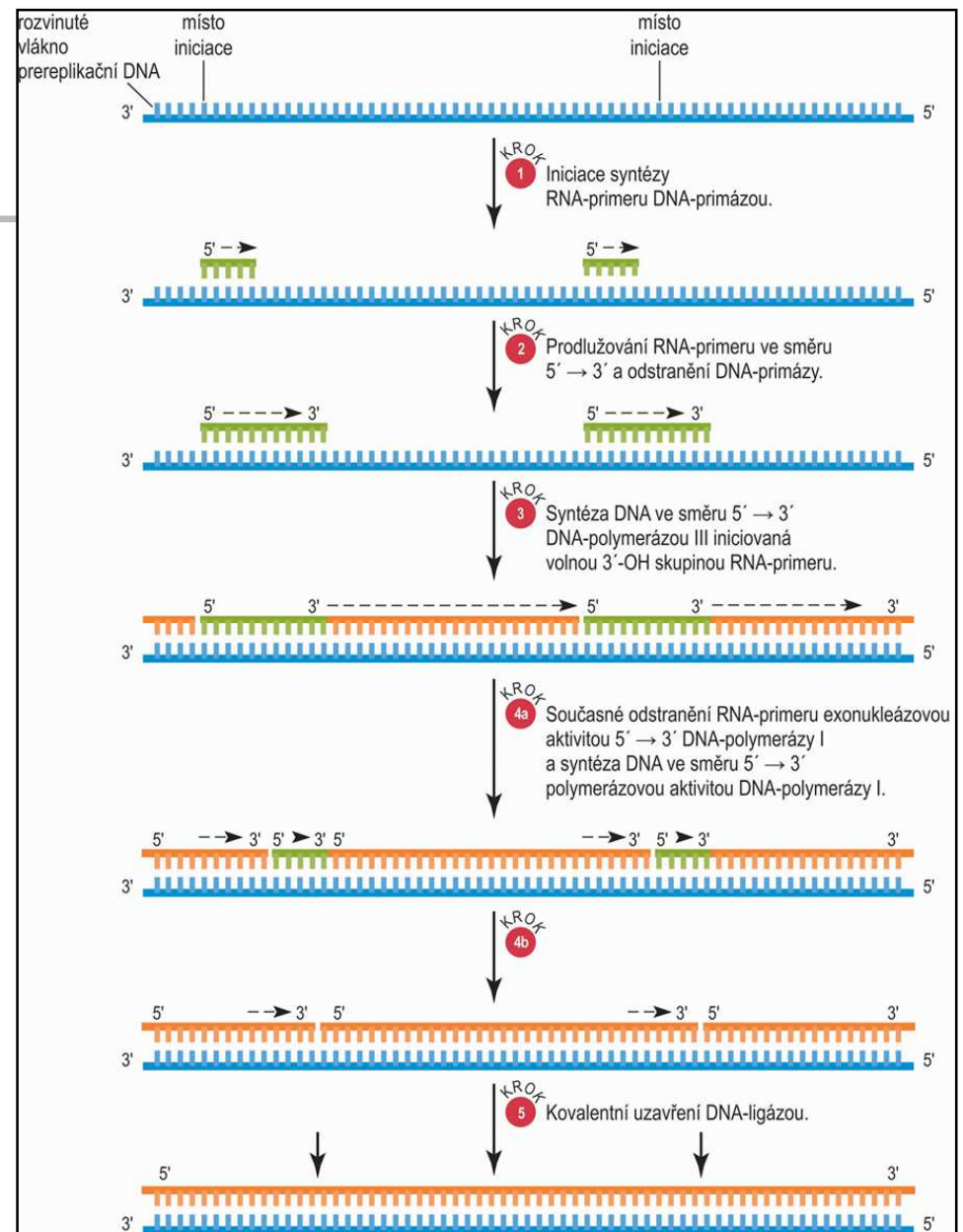
Spojení Okazakiho fragmentů

- DNA-polymeráza prodlužuje RNA-primer a tvoří nové vlákno DNA
- syntéza Okazakiho fragmentu na opožďujícím se řetězci DNA skončí, jakmile DNA-polymeráza narazí na RNA-primer předchozího fragmentu
- při vytvoření celistvé struktury DNA na templátu opožďujícího se řetězce se uplatňují opravné mechanismy: RNA-primery odstraní a nahradí je DNA
- kovalentní spojení 3'-konce jednoho fragmentu DNA s 5'-konce jiného zajistí **DNA-ligáza**



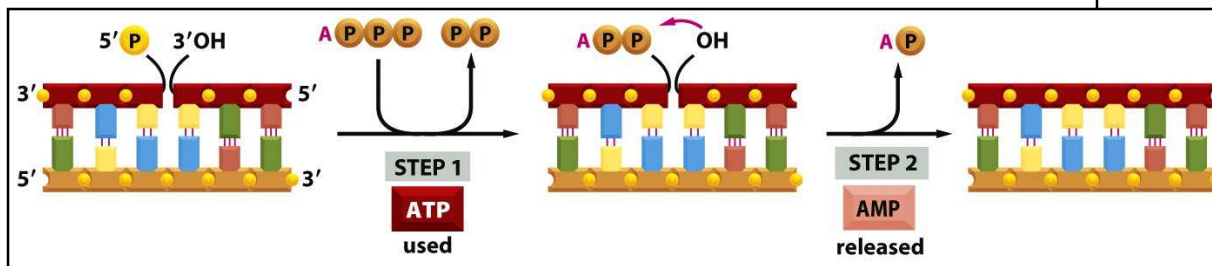
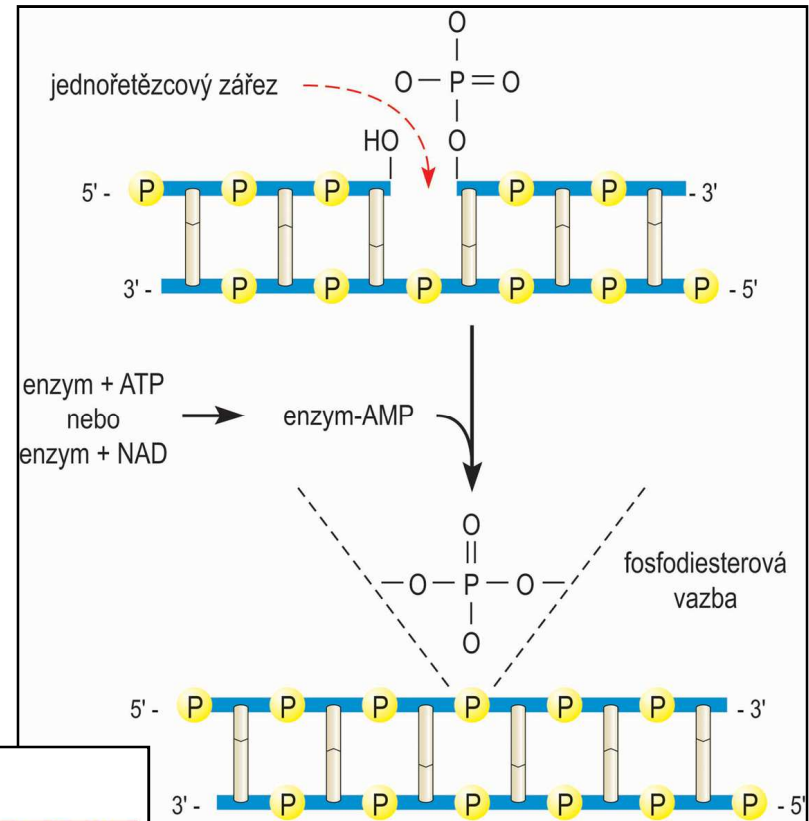
Odstranění RNA-primerů

- RNA-primery jsou odstraněny 5'-3'-exonukleázovou a nahrazeny polymerační aktivitou DNA-polymerázy I
- 3'-OH konec jednoho Okazakiho fragmentu se spojí s 5'P koncem sousedního Okazakiho fragmentu DNA-ligázou



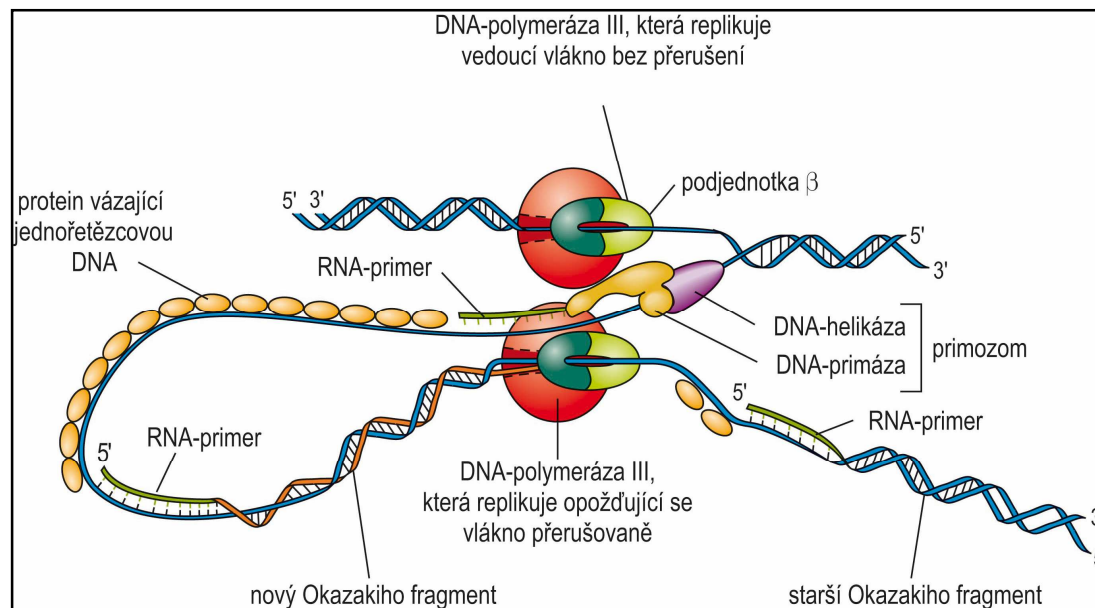
Funkce DNA-ligázy

- DNA-ligáza opravuje "zářezy" v cukr-fosfátové kostře DNA, tj. porušené fosfodiesterové vazby
- DNA-ligáza se aktivuje vazbou ATP a přechodně se připojí k volnému 5'P v místě zářezu (uvolní se P-P)
- uvolněním AMP se obnoví kovalentní vazba v řetězci



Průběh replikace DNA v *E. coli*

- **DNA-topoizomerázy** vytvářejí v DNA přechodné zářezy, aby se DNA nesmotávala
- proteiny vážoucí jednořetězce (**SSB**) pokrývají rozvinutou DNA
- RNA-primery jsou nahrazovány DNA působením **DNA-polymerázy I**
- jednořetězcové zářezy jsou odstraňovány **DNA-ligázou**

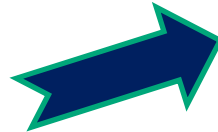


DNA-polymerázy

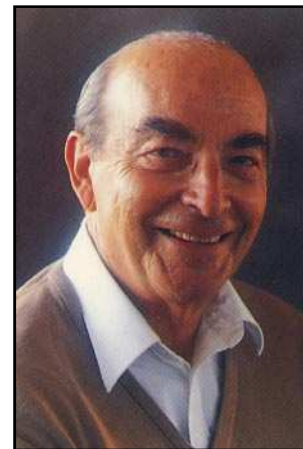


Roger Kornberg (*1947), Stanford University, USA
Nobelova cena za chemii (2006) za výzkum mechanismu eukaryotické transkripce

- DNA polymeráza III
 - 1000 bází/sek
 - hlavní enzym syntézy DNA



- DNA polymeráza I
 - 20 bází/sek
 - editace, reparace DNA a odstranění primerů



Arthur Kornberg (1918-2007), Stanford University
Nobelova cena (1959) za fyziologii a medicínu za objev mechanismu syntézy DNA a RNA



Replikace DNA otáčející se kružnicí

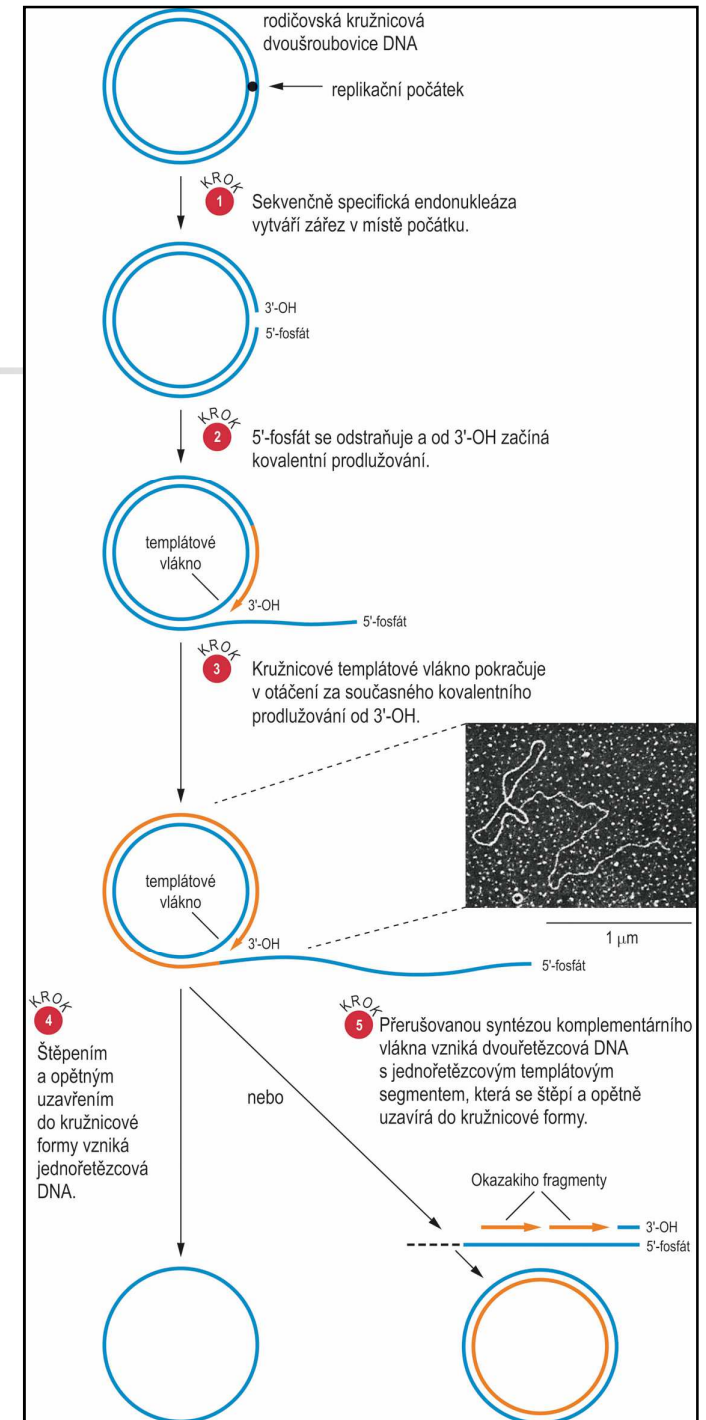
- používaná viry
- používaná bakteriemi pro přenos DNA z donora do recipienta

Princip

- mechanismus replikace kružnicových molekul DNA
- jedno rodičovské vlákno zůstává intaktní a otáčí se a zároveň slouží jako templát pro syntézu nového komplementárního vlákna

Replikace otáčející se kružnicí

- **iniciace**: sekvenčně specifická endonukleáza štěpí jedno vlákno DNA v místě *ori*
- neporušené templátové vlákno se otáčí kolem své osy a zároveň **vytěsňuje 5'-konec druhého vlákna**
- kovalentní **prodlužování** nastává od 3'-OH konce naštěpeného vlákna (není třeba RNA primer)
- replikace DNA je úplná při otáčce templátu o 360°
- **terminace** nastává ve specifických místech **Ter**, kde se zastavuje pohyb helikázy
- mohou vznikat DNA dvou typů:
 - jednořetězcová kružnicová (po štěpení lineární DNA v oblasti *ori* a následné cirkularizaci)
 - dvouřetězcová kružnicová (ssDNA se použije pro syntézu dsDNA přes Okazakiho fragmenty, naštěpí se na jednotkovou délku a cirkularizuje se)





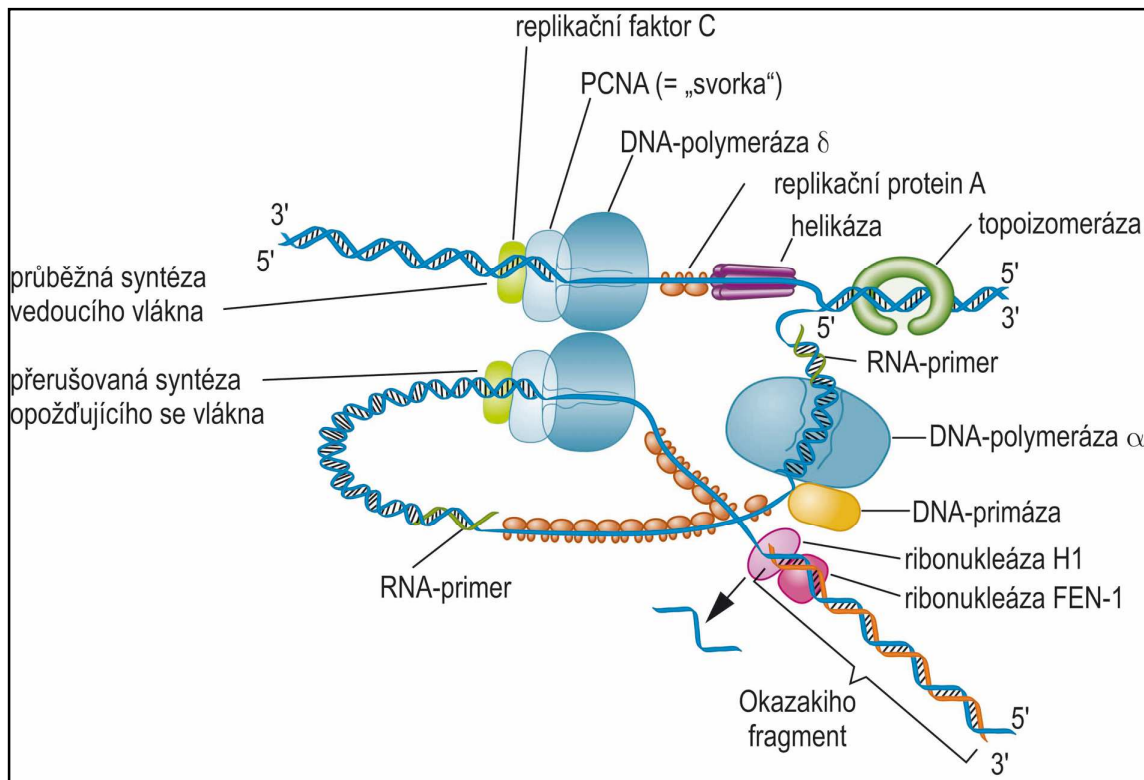
Replikace eukaryotických chromozomů

- základní principy platné stejně jako u prokaryot

Odlišnosti od prokaryot:

- přítomnost mnoha počátků replikace - řádově 10 000
- syntéza DNA probíhá jen v určité fázi buněčného cyklu (S-fázi)
- RNA-primery a Okazakiho fragmenty jsou kratší
- více typů DNA-polymeráz

Složky eukaryotického replizomu



- rozvíjení šroubovice vyžaduje aktivitu **DNA-helikázy** a **DNA-topoizomerázy**

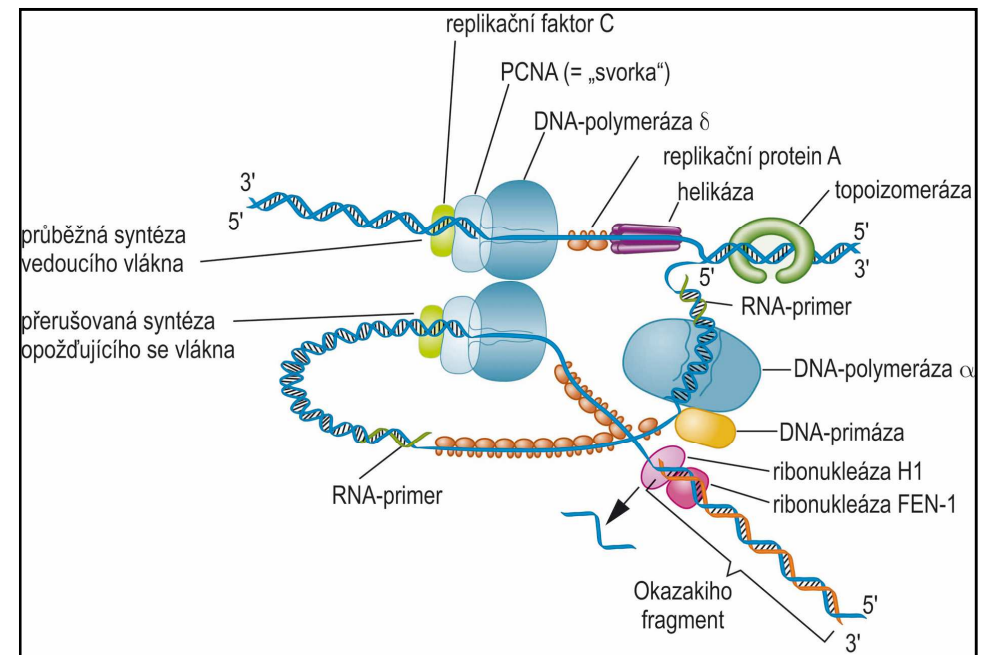
- **PCNA** zvyšuje procesivitu enzymu

- rozvinuté řetězce se obklopují proteinem vážoucím jednořetězce - **replikačním proteinem A**

- replikace jaderné DNA se účastní 3 různé DNA-polymerázy: **Pol α** , **Pol δ** a **Pol ϵ**

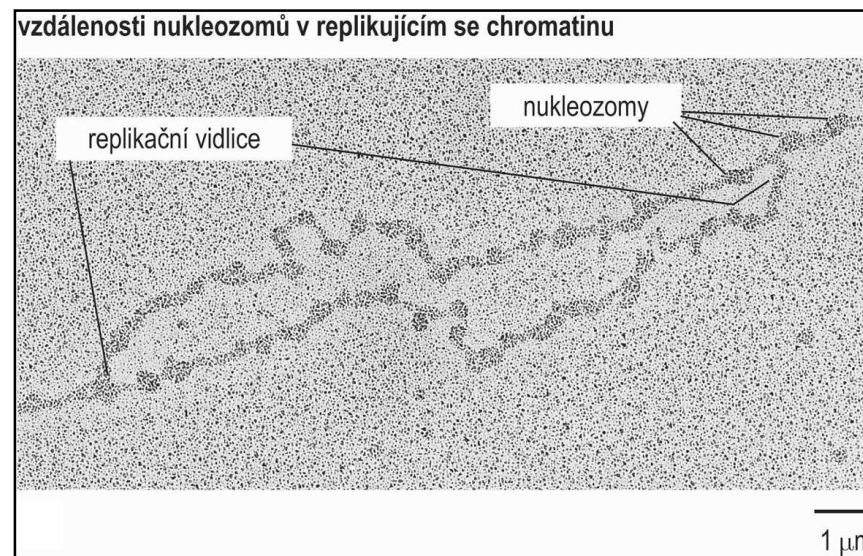
Eukaryotické DNA-polymerázy

- DNA polymerázy δ a ϵ mají vysokou procesivitu, jsou vhodné pro syntézu dlouhých vláken; mají 3'-5' exonukleázovou aktivitu pro korektorskou funkci, ale nemají 5'-3' exonukleázovou aktivitu pro odstranění RNA primerů
- primery syntetizuje DNA-primáza a prodlužuje je Pol α
- Pol α udržuje stabilní komplex s DNA-primázou, napojuje na primery krátké řetězce DNA (cca 30 bp) při syntéze Okazakiho fragmentů
- RNA-primery odstraňují samostatné enzymy: ribonukleázy H1 a FEN1
- mezery po primerech zaplňuje a další prodlužování zajišťuje Pol δ nebo Pol ϵ
- zářezy odstraňuje DNA-ligáza



Duplikace nukleozomů v replikačních vidlicích

EM: nukleozomy si udržují svou strukturu i vzájemnou vzdálenost na obou stranách replikační vidlice

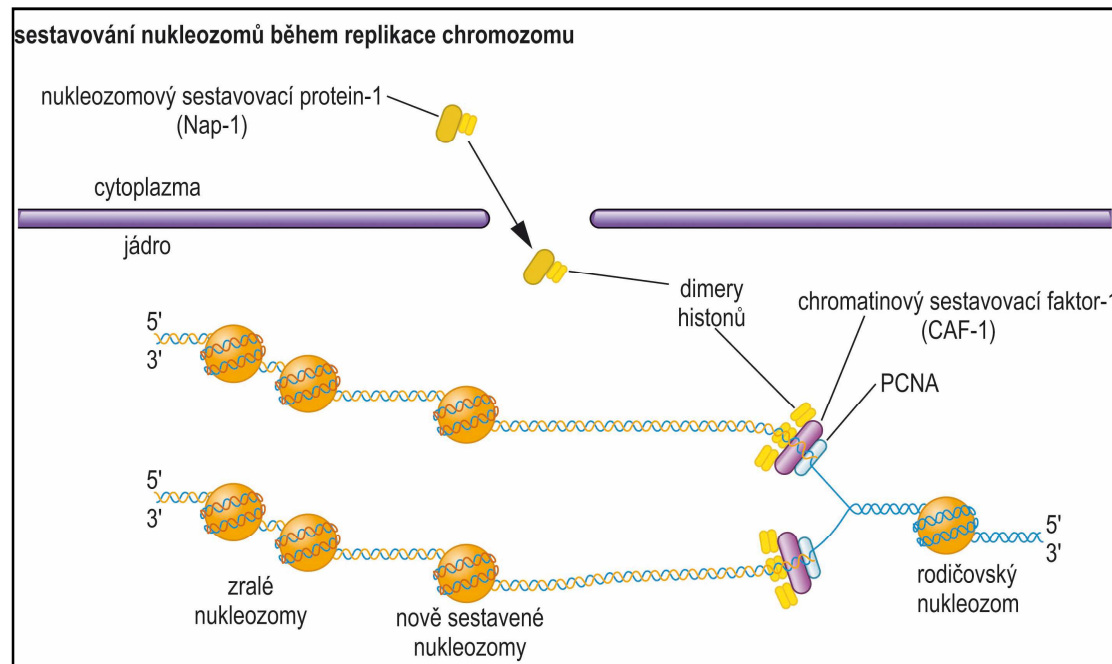


- nukleozomy se rozkládají a zase rychle skládají, aby umožnily duplikaci DNA
- histony se syntetizují preferenčně během S-fáze

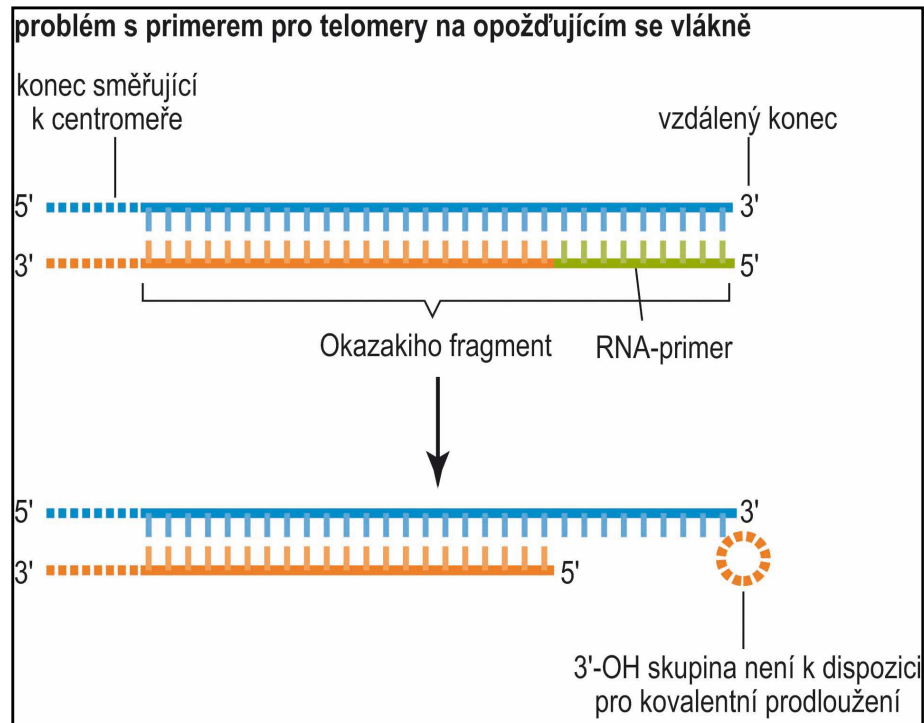
Rozklad a sestavení nukleozomů během replikace DNA

Účast specifických proteinů:

- **Nap-1** (nucleosome assembly protein 1): zajišťuje přenos histonů z místa jejich syntézy v cytoplazmě do jádra
- **CAF-1** (chromatin assembly factor 1): zajišťuje přenos histonů do správných míst na chromozomech, kde mají vytvořit nukleozomy, váže se na **PCNA**



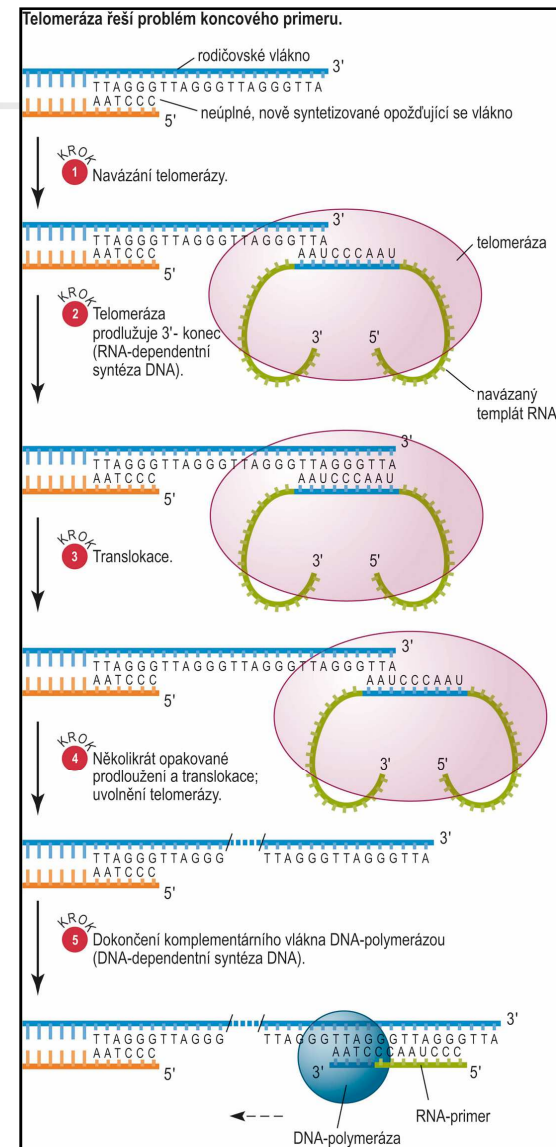
Replikace konců chromozomů: telomeráza



- DNA-polymerázy nedokážou replikovat poslední segment opožďujícího se vlákna DNA lineárního chromozomu
- přidání koncových úseků (telomer) zajišťuje speciální mechanismus, který je založen na aktivitě enzymu **telomerázy**

Telomeráza a replikace konců chromozomů

- zabraňuje zkracování konců chromozomů během každého replikačního cyklu
- disponuje aktivitou zpětné transkriptázy (TERT)
- obsahuje RNA, která slouží jako templát pro zpětnou transkripci
- váže se na 3'-přečnívající konec a prodlužuje jej přidáním několika telomerových sekvencí





Délka telomer a stárnutí

- většina somatických buněk nemá telomerázovou aktivitu (na rozdíl od buněk kmenových nebo nádorových) - telomery se postupně zkracují
- lidské somatické buňky pěstované v kultuře projdou jen omezeným počtem dělení (50 - 70 generací) - pak nastane stárnutí a smrt
- koreluje délka telomer a počet buněčných dělení, které předcházejí stárnutí a smrti
- vzácně se stane, že somatické buňky začnou v kultuře neomezeně proliferovat (= růst a dělit se): na rozdíl od svých předchůdců mají telomerázovou aktivitu
- obdobně se chovají nádorové buňky

Progerie

- dědičná onemocnění typická předčasným stárnutím (např. **Hutchinson-Gilfordův syndrom, Wernerův syndrom**)
- příznaky - předčasná plešatost, vrásčitost, apod.) se objevují krátce po narození
- smrt nastává před 20. rokem věku (HGS) nebo před 40. rokem věku (WS)
- v obou případech jsou v somatických buňkách zkráceny telomery a tyto buňky mají v kultuře sníženou proliferační schopnost



Take home message

- syntézu DNA katalyzují DNA-polymerázy
- všechny DNA-polymerázy požadují primerové vlákno (které se prodlužuje) a templátové vlákno (které se kopíruje)
- všechny DNA-polymerázy striktně požadují volnou 3'-OH skupinu na primerovém vlákně a syntéza veškeré DNA probíhá výhradně ve směru 5' → 3'
- 3'→ 5' exonukleázové aktivity DNA-polymeráz mají korektorskou funkci: kontrolují vznikající vlákna a odstraňují chybně spárované nukleotidy na 3' -koncích primerových vláken
- replikaci konců lineární DNA zajišťuje telomeráza

