

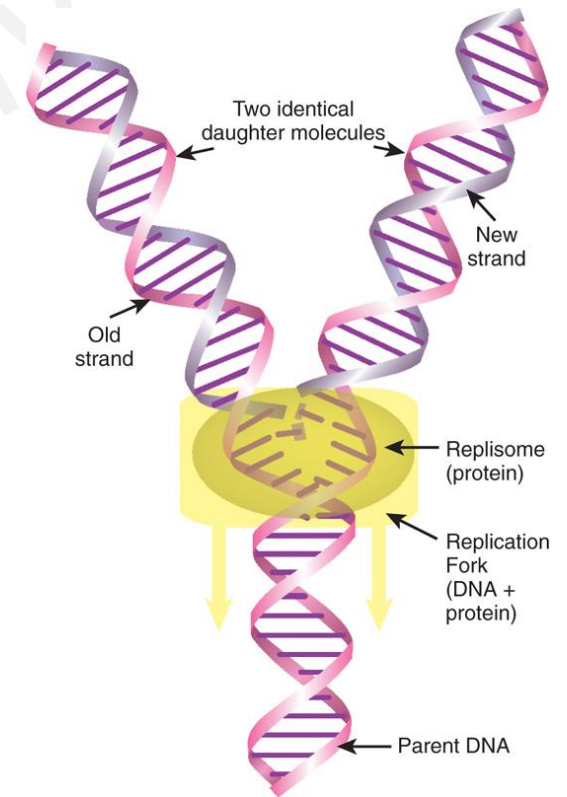
GENOVÉ TECHNOLOGIE

Replikace a syntéza DNA:

Replikace DNA u eukaryot a prokaryot, opravné procesy, in-vitro syntéza DNA (PCR, reverzní transkripce).

Replikace DNA

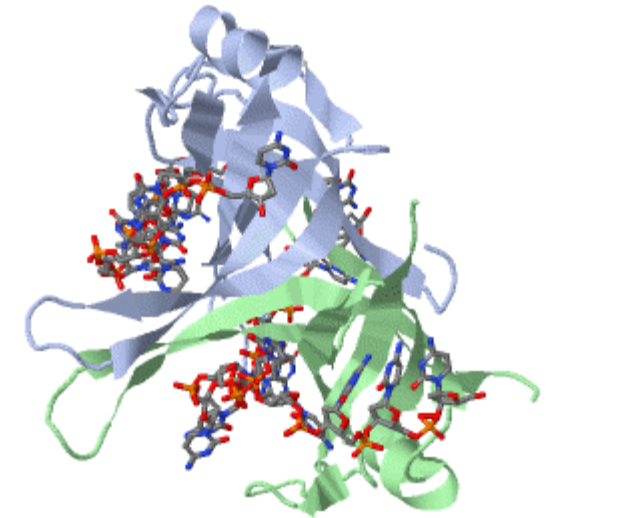
- Zachování integrity organismu vyžaduje kompletní identickou replikaci genomu
- Rozvinutí dvoušroubovice, tvorba Y-replikační vidlice
- Začíná na chromosomu ve specifickém místě označovaném ori (origin of replication)
- ori místo obvykle obsahuje vysoký podíl AT bazí
- Komplementární řetězec je syntetizován komplexem faktorů a enzymů nazývaných replizom
- DNA polymeráza syntetizuje pouze ve směru 5' → 3'
 - vedoucí vlákno se syntetizuje kontinuálně
 - spožďující se vlákno pomocí Okazakiho fragmentů
 - jednotlivé fragmenty na opožďujícím se vlákně jsou spojovány DNA ligázou
- Tento způsob replikace nazýván **semikonzervativní replikace**



Clark and Pazdernik, 2016

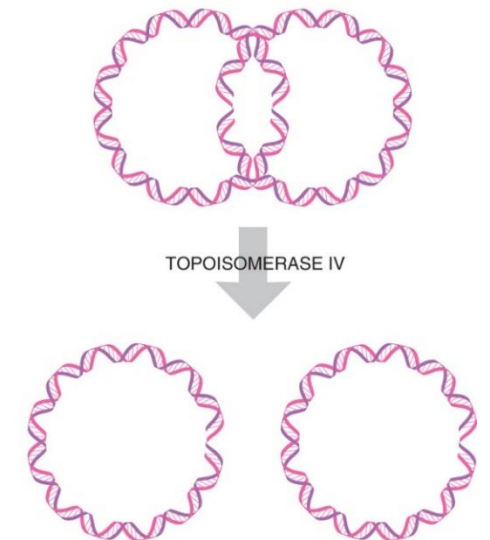
Replikace DNA

- DNA má nad šroubovicové vinutí
- Nutnost relaxace (gyráza) a rozvinutí dvoušroubovice DNA (helikáza)
- Rozvinuté řetězce udržovány pomocí single-stranded binding proteins (SSB)
- Pohyb DNA polymerázy – více pozitivního nad šroubovicového vinutí
- Po replikaci cca. 5% bakteriálního genomu nutno odstraňovat pomocí gyrázy
- V rámci replikace kruhových chromozómu může dojít ke katenaci sesterských kopií



UNTANGLING CHROMOSOMES

'mol

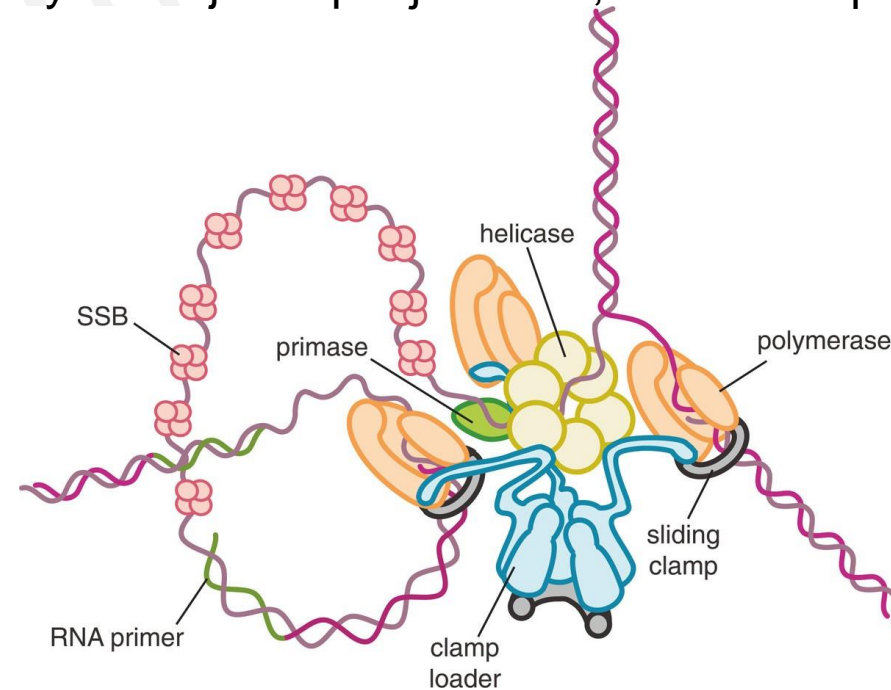
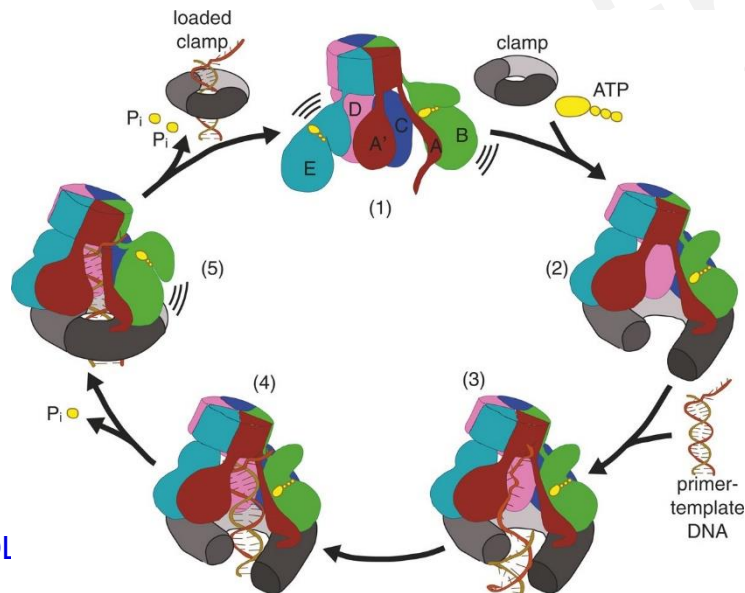


Clark and Pazdernik, 2016

MUNI
SCI

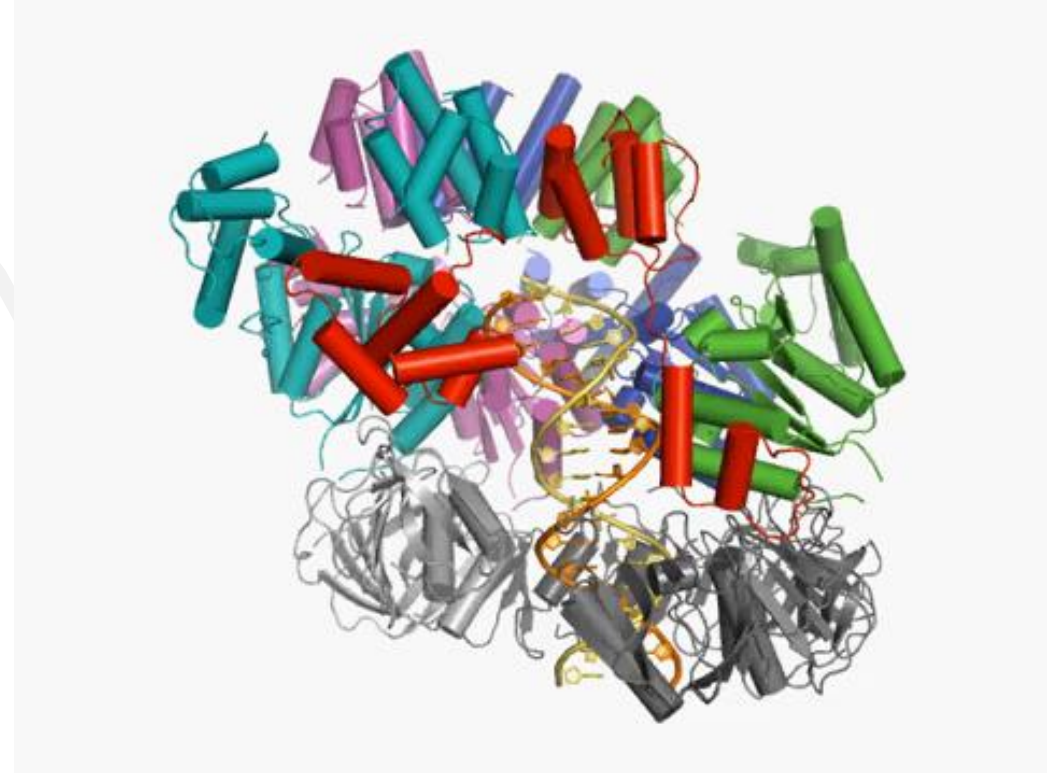
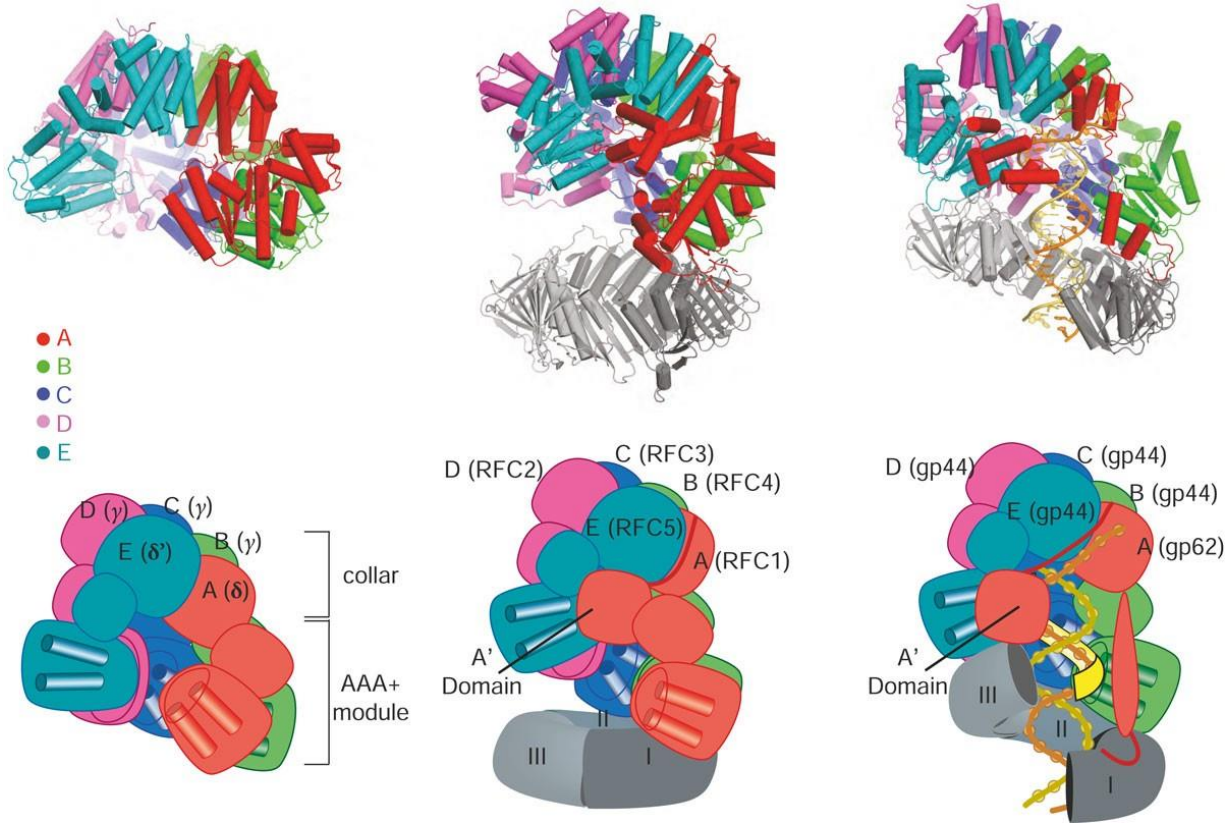
Replikace DNA

- Na počátku replikace RNA polymeráza nazývaná primáza nahrazuje SSB proteiny a syntetizuje krátké RNA primery (11-12 b)
- Bakteriální chromozom je replikován převážně pomocí DNA polymerázy III
- DNA je uzamčena do posuvné svorky pomocí vkládacího komplexu
- Následně svorky váží hlavní enzymy pro replikaci – syntetizující α -podjednotka, korekční ε -podjednotka a stabilizační θ -podjednotka



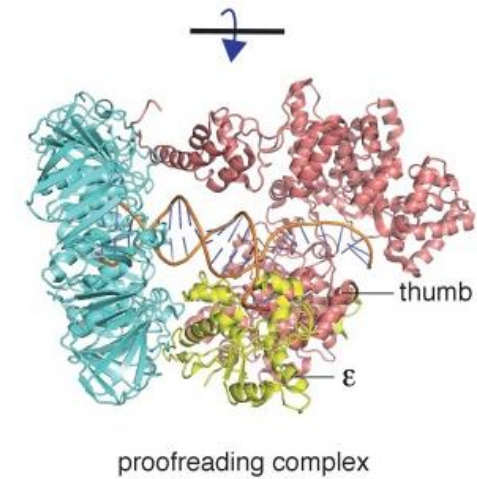
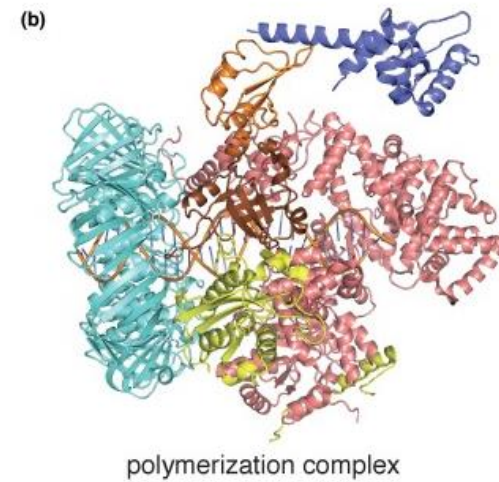
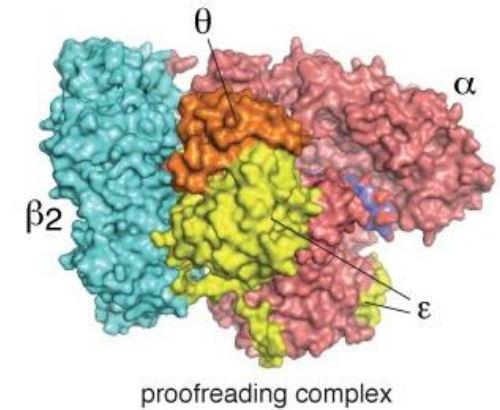
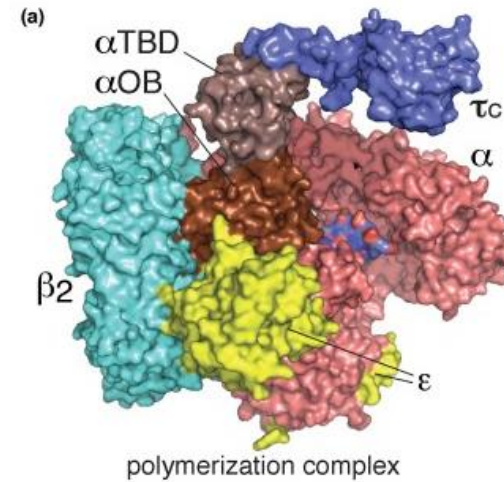
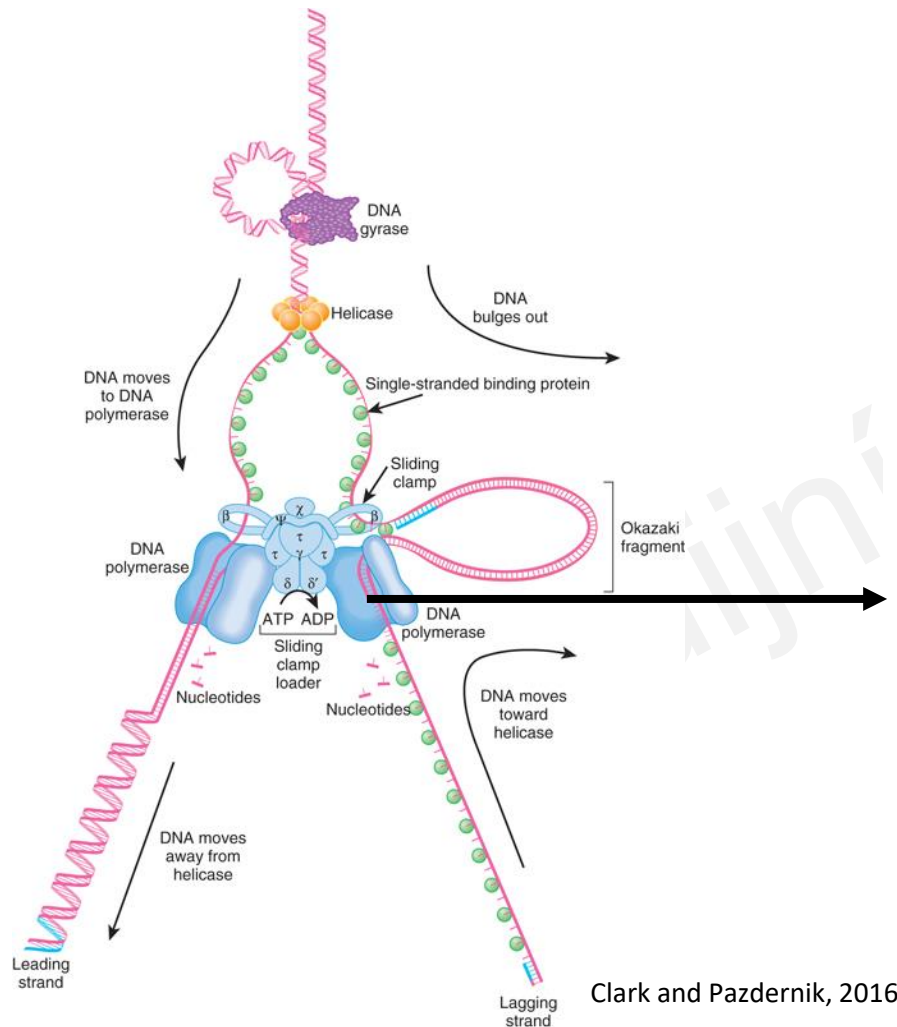
Kelch et al, 2012

Clamp loader ATPase



Kelch et al, 2012

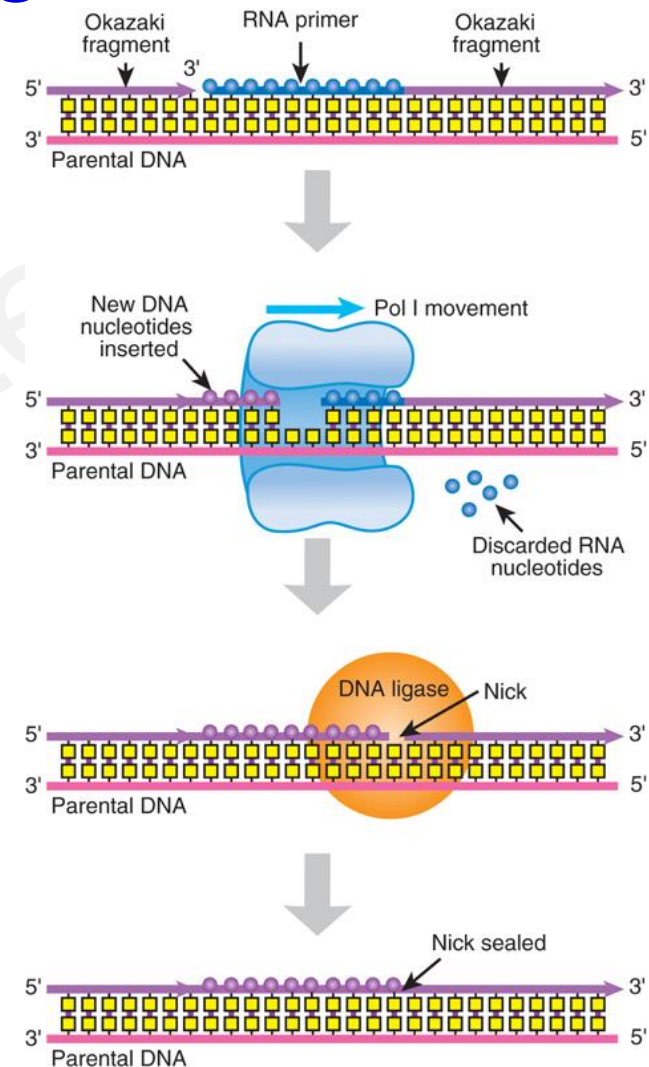
Core enzyme complex



Qiang et al, 2018

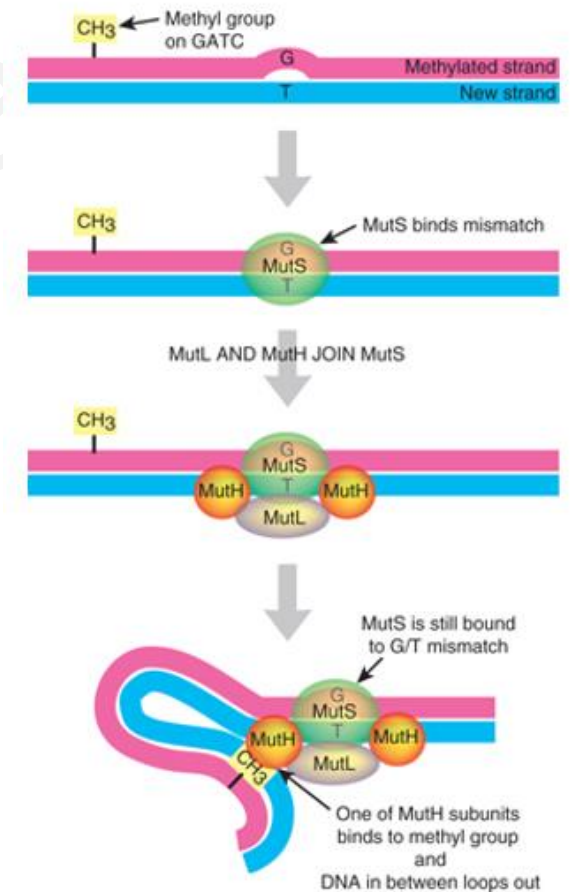
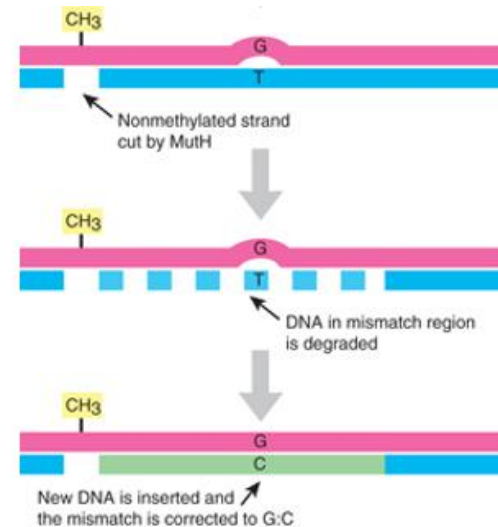
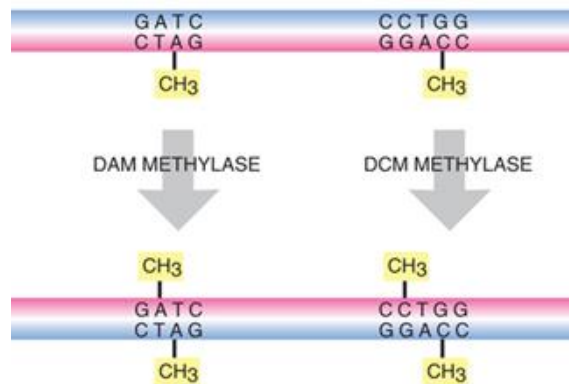
Syntéza opožďujícího řetězce

- Nese celou řadu zlomů, segmentů s RNA nebo mezer
- DNA polymeráza I odstraňuje RNA a dosyntetizovává řetězec
- RNA může být rovněž odstraněna RNasou H (odstraňuje RNA z heteroduplexu)
- Výsledné fragmenty jsou spojeny DNA ligázou



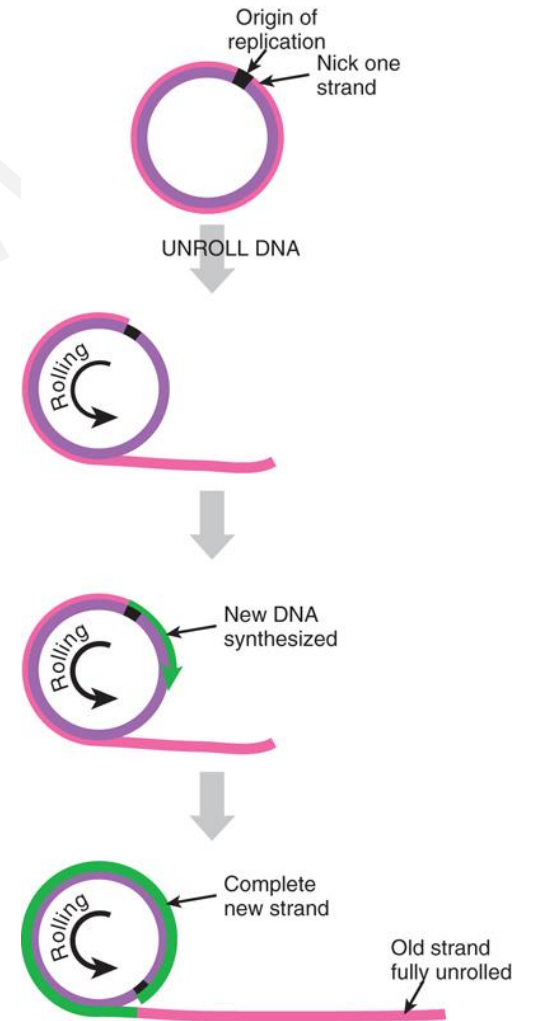
Oprava chyb po replikace

- Po dokončení replikace opravný systém opraví chyby (u *E. coli* MutSHL systém)
- Při začlenění špatné báze vzniká ve dvoušroubovici výdut'
- Buňka předpokládá, že parentální báze je správná, kdy originální vlákno je identifikováno pomocí metylace
- Po replikaci DNA je nové vlákno pomalu dometylováván pomocí DNA Adenosin (Dam) a cytosin (Dcm) methyláz



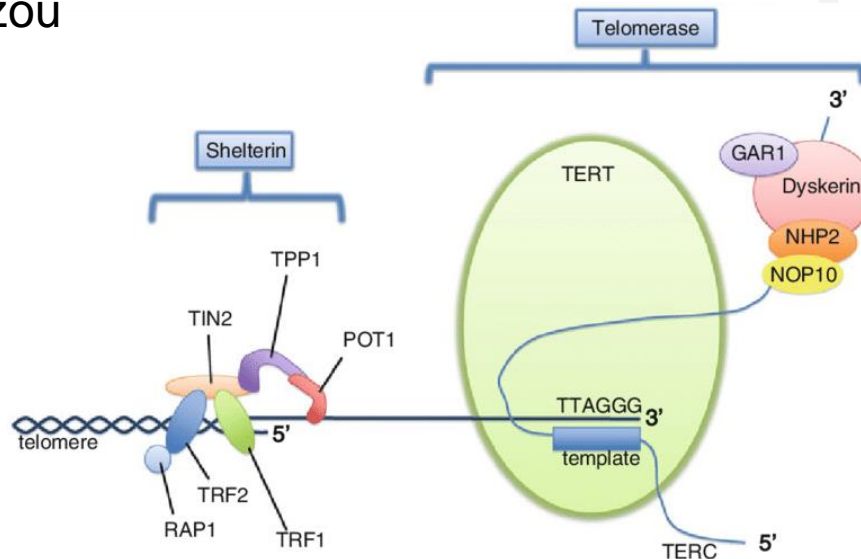
Srovnání replikace - prokaryota

- DNA replikace probíhá běžně dvousměrně – replikační vidlice postupují v opačných směrech
- U bakterií proces replikace nazýváme tzv. theta replikací
- Některé plazmidy a viry replikují genom procesem nazývaným replikace valivou kružnicí

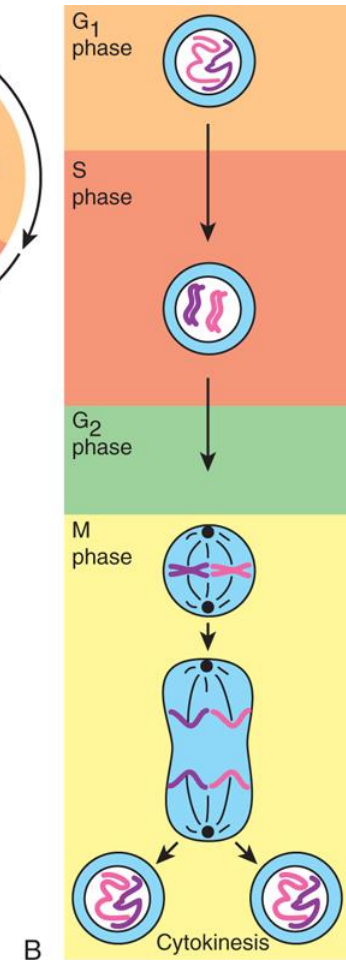
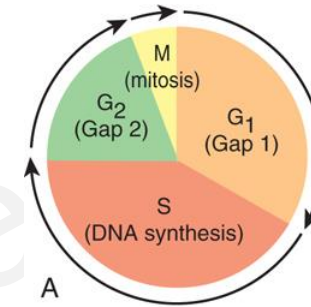


Srovnání replikace - eukaryota

- Eukaryota nemají ekvivalent DNA polymerázy I mající duální aktivitu (exonukleázová a polymerázová)
- Objevuje se problém se zkracování konců lineárních chromozómů
- No koncích chromozómů telomery (TTAGGG opakování u člověka) syntetizované na základě RNA templátu enzymem telomerázou



- telomerase transcriptase (TERT)
- RNA component (TERC)
- dyskerin protein complex (dyskerin, NOP10, NHP2, GAR1)
- shelterin complex (TRF1, TRF2, RAP1, POT1, TPP1 a TIN2)



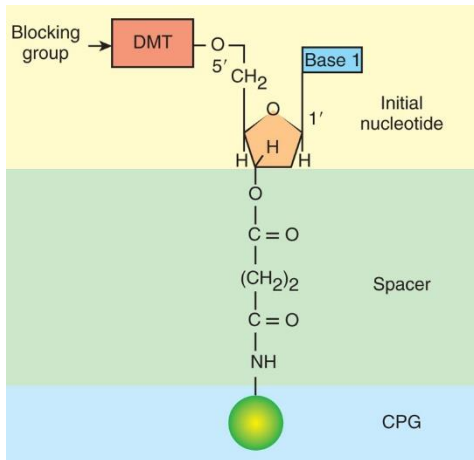
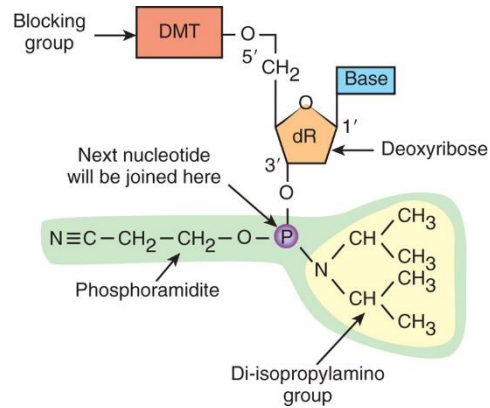
Chemická syntéza DNA

- H. Gobind Khorana syntetizoval první aktivní tRNA molekulu o 72 nukleotidech (1970)
- Arteficiální syntéza DNA je ve směru 3' → 5'
 - přichycení první báze na CPG (controlled pore glass)
 - 5' konec je zablokován pomocí DMT (dimethyloxytrityl)
 - DMT skupina je odstraněna pomocí slabé kyseliny (TCA)
 - další nukleotid je přidán ve formě tzv. phosphoramiditu aktivovaného tetrazolem
 - 5'-OH konce nezreagovaných nukleotidů jsou acetylovány pomocí anhydridu k. octové
 - opakování procesu

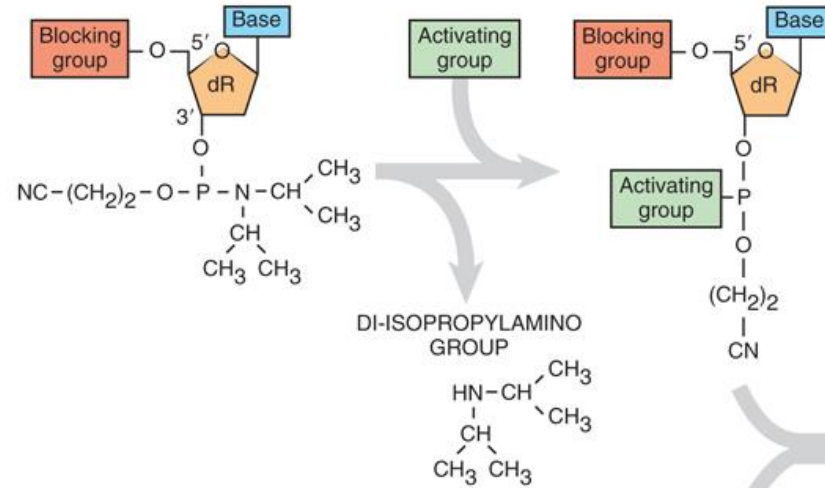


(zleva) Har Gobind Khorana, Robert W Holley, Luis W Alvarez, Marshall W Nirenberg, Lars Onsager and Yasunari Kawabata při udílení Nobelovy ceny v roce 1968.

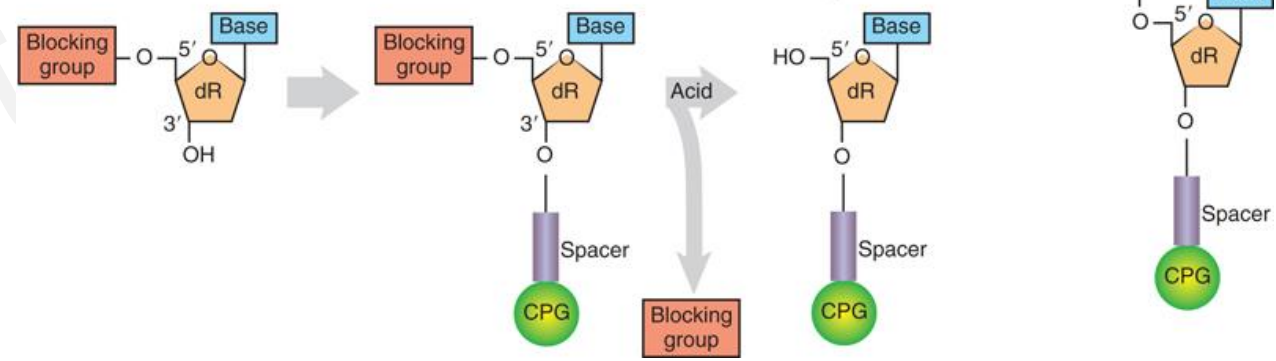
Chemická syntéza DNA



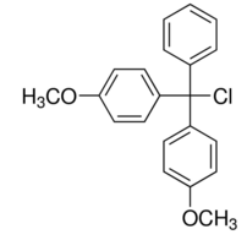
PHOSPHORAMIDITE NUCLEOTIDE ACTIVATION



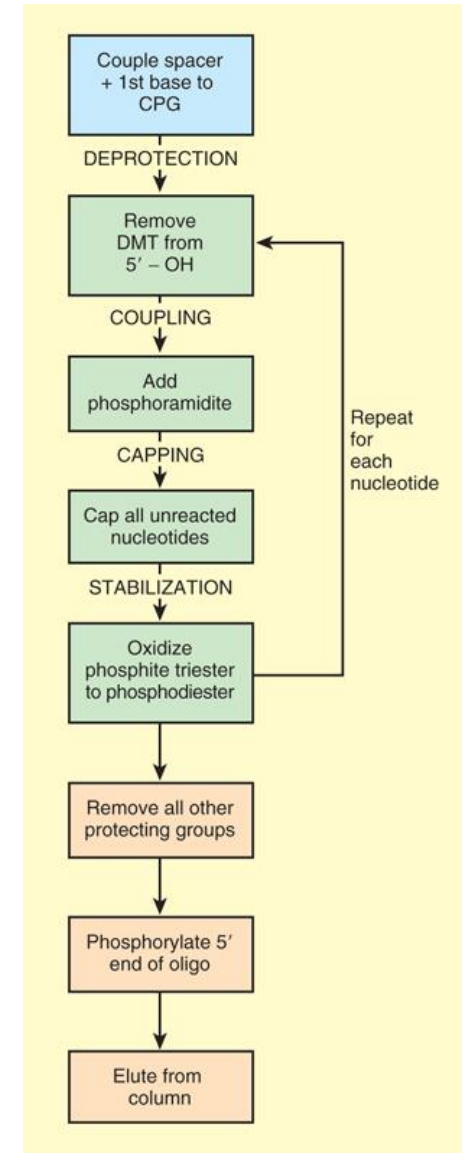
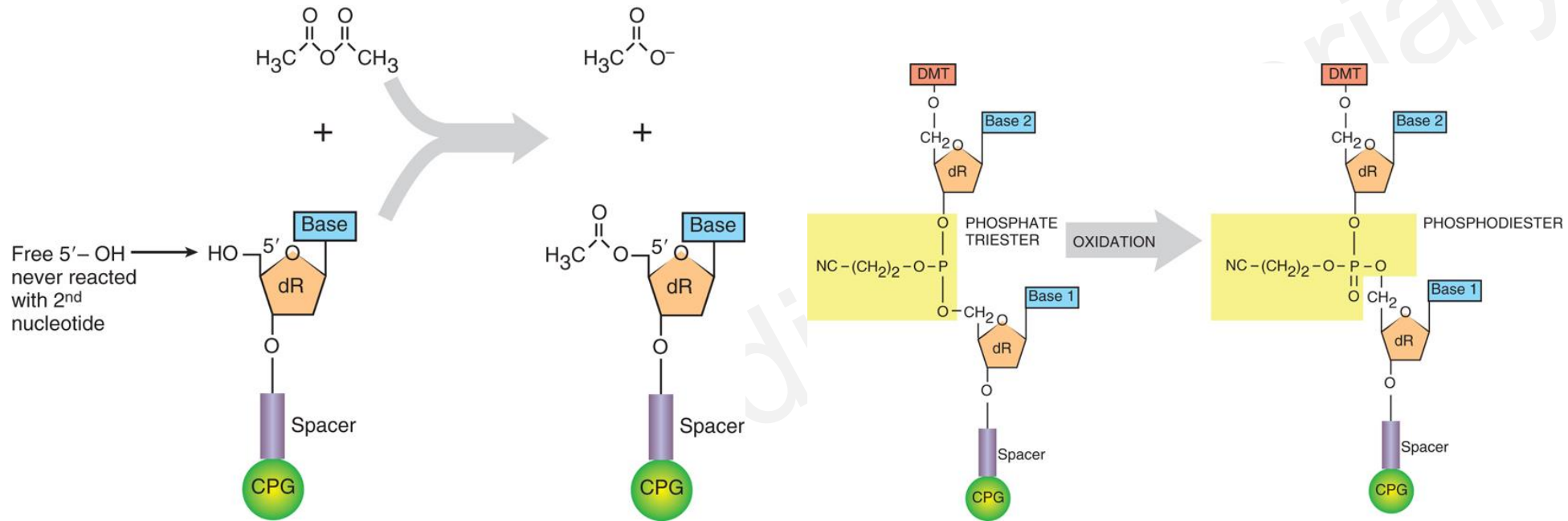
COUPLE 1ST NUCLEOTIDE TO CPG



DMT-Dimethoxytrityl



Chemická syntéza DNA



<https://www.youtube.com/watch?v=1S0x3aRCviM>

Polymerázová řetězová reakce

K Mullis, F Faloona, S Scharf, R Saiki, G Horn, H Erlich.

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol; **1986**;51

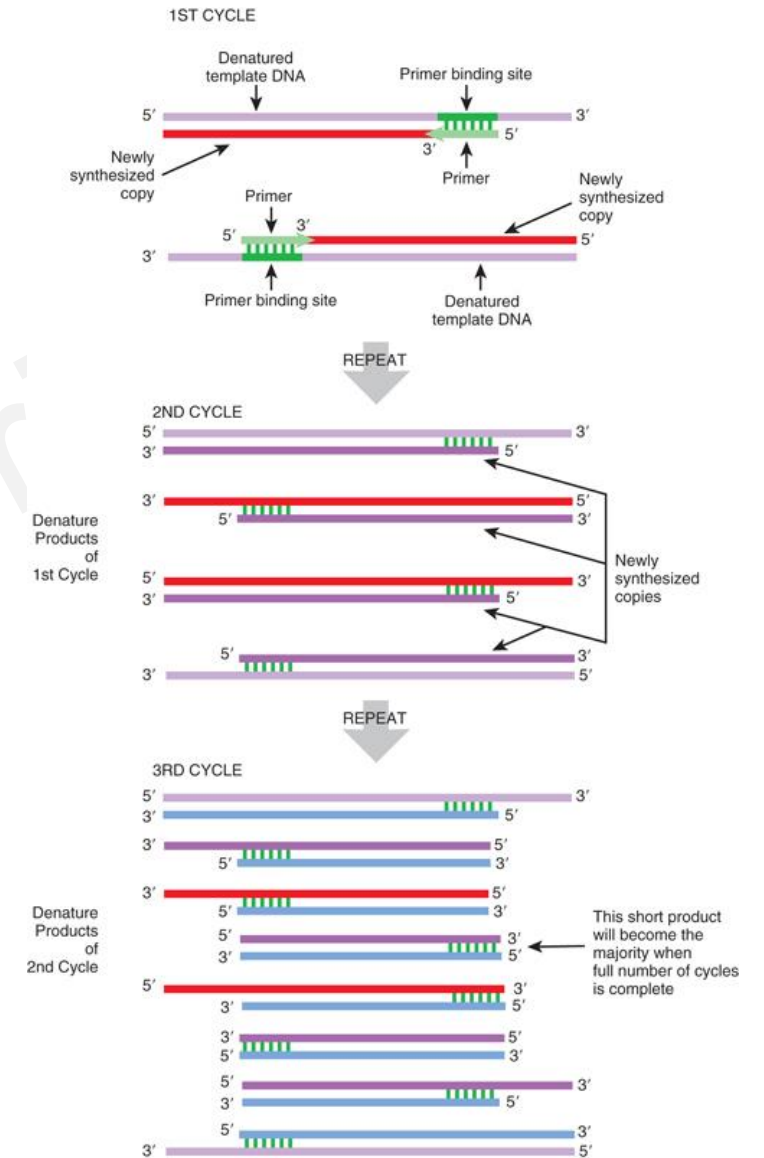
..the idea of PCR came to him
while driving with his girlfriend
on a highway..

*"It was quiet and something
just went, Click!"*

KARY B MULLIS

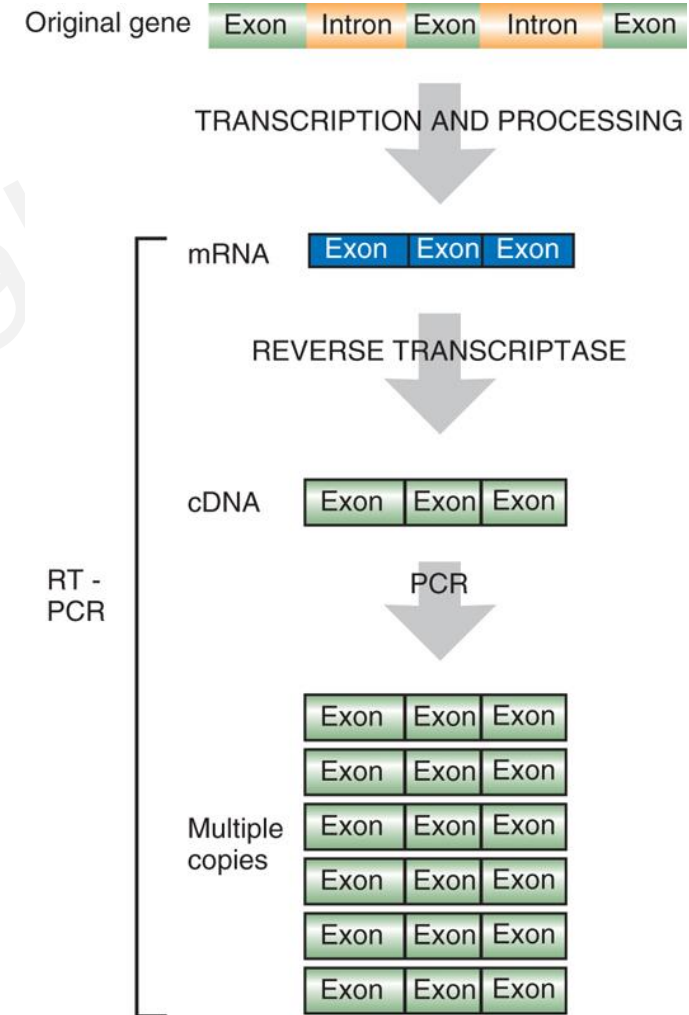
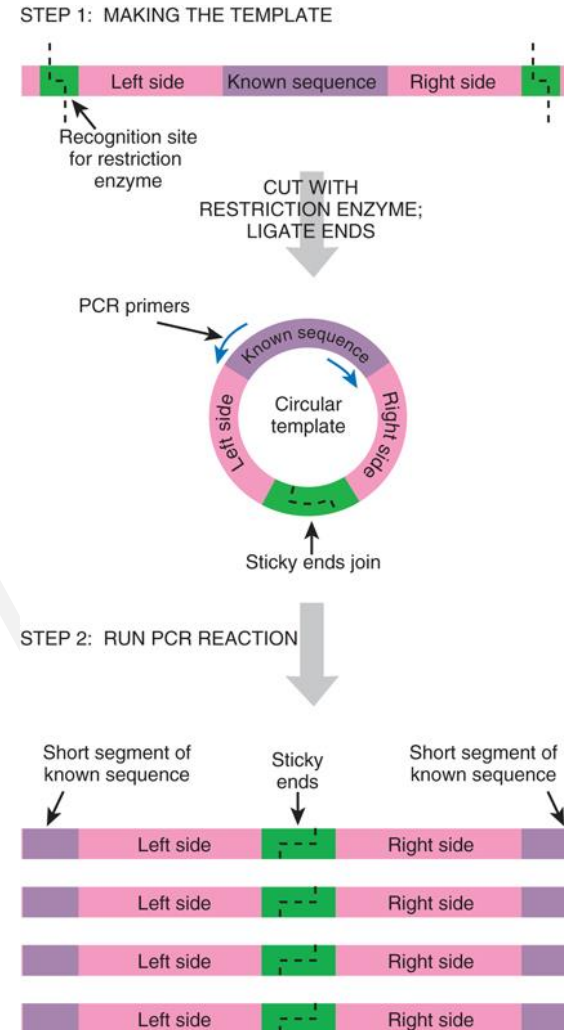
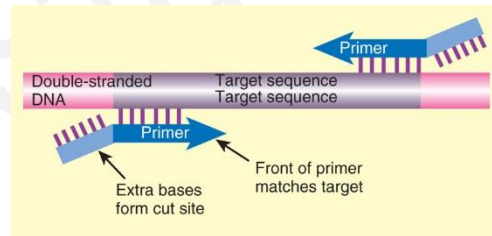
1944 - 2019

Inventor of PCR Technique

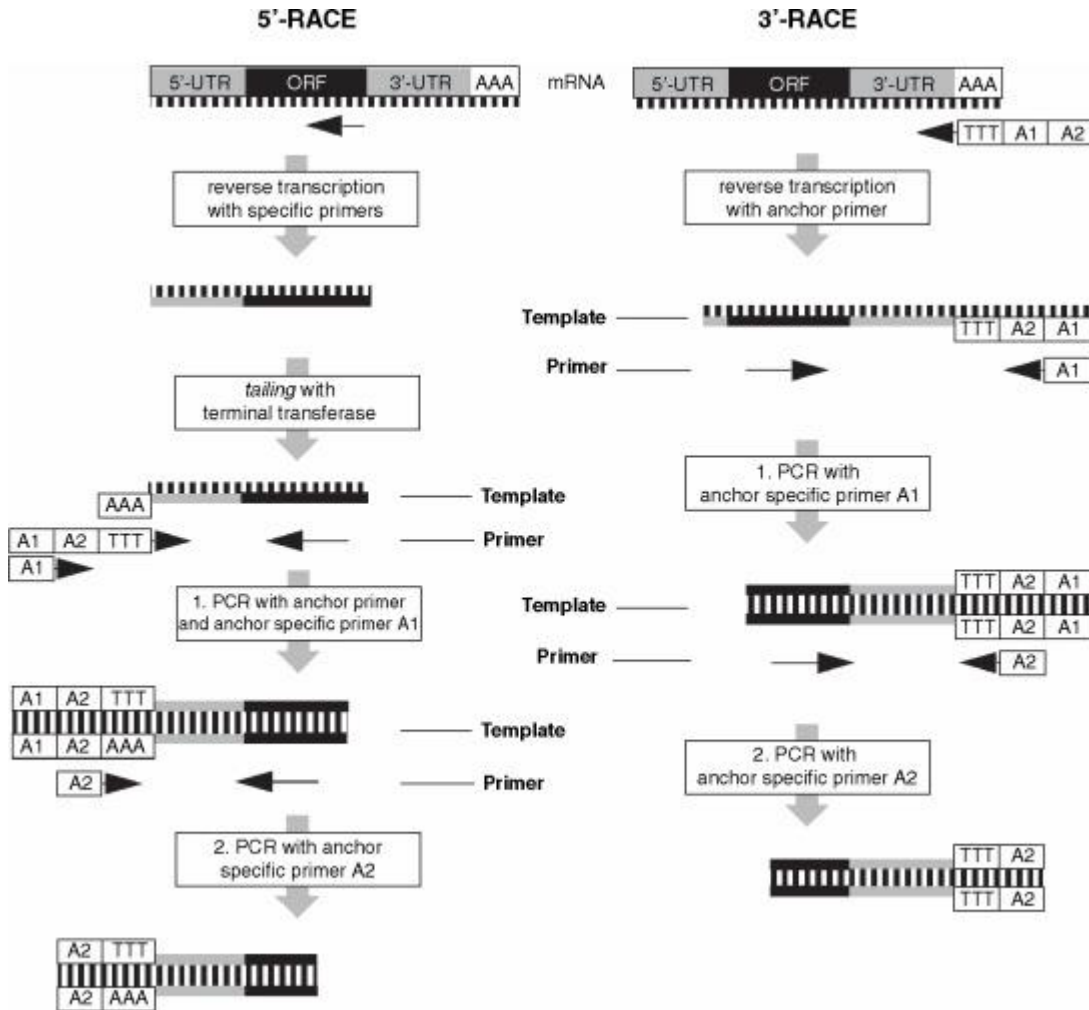


Modifikace PCR

- Inverzní PCR
- Použití degenerovaných bazí, zavedení restrikčních míst
- Reverzně-transkripční PCR (RT-PCR)
 - 5'RACE, 3'RACE
- PCR cílená mutageneze
- Emulzní PCR
- Droplet Digital PCR
- LAMP



RACE PCR



Rapid Amplification of cDNA Ends

PCR cílená mutageneze

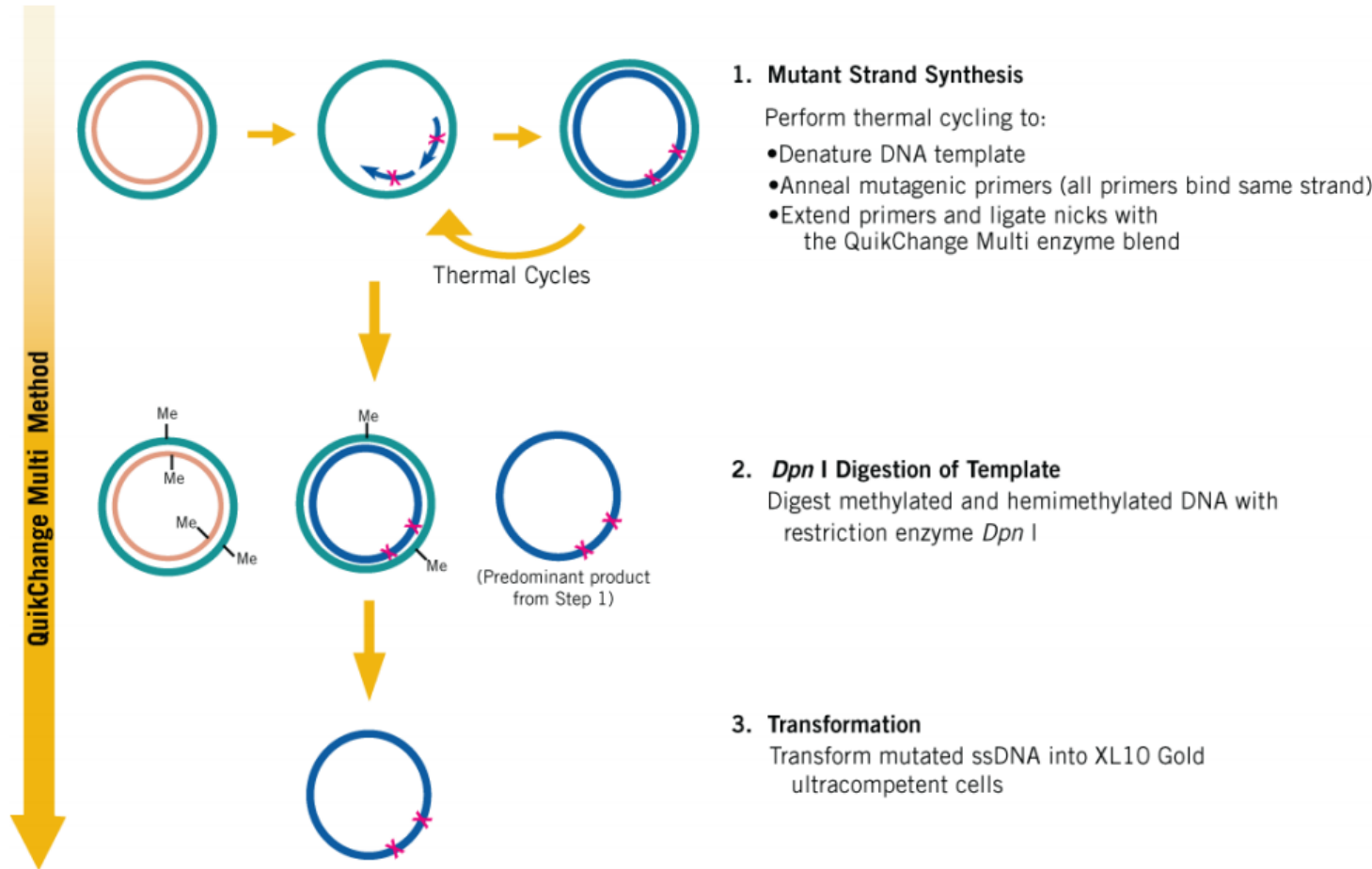
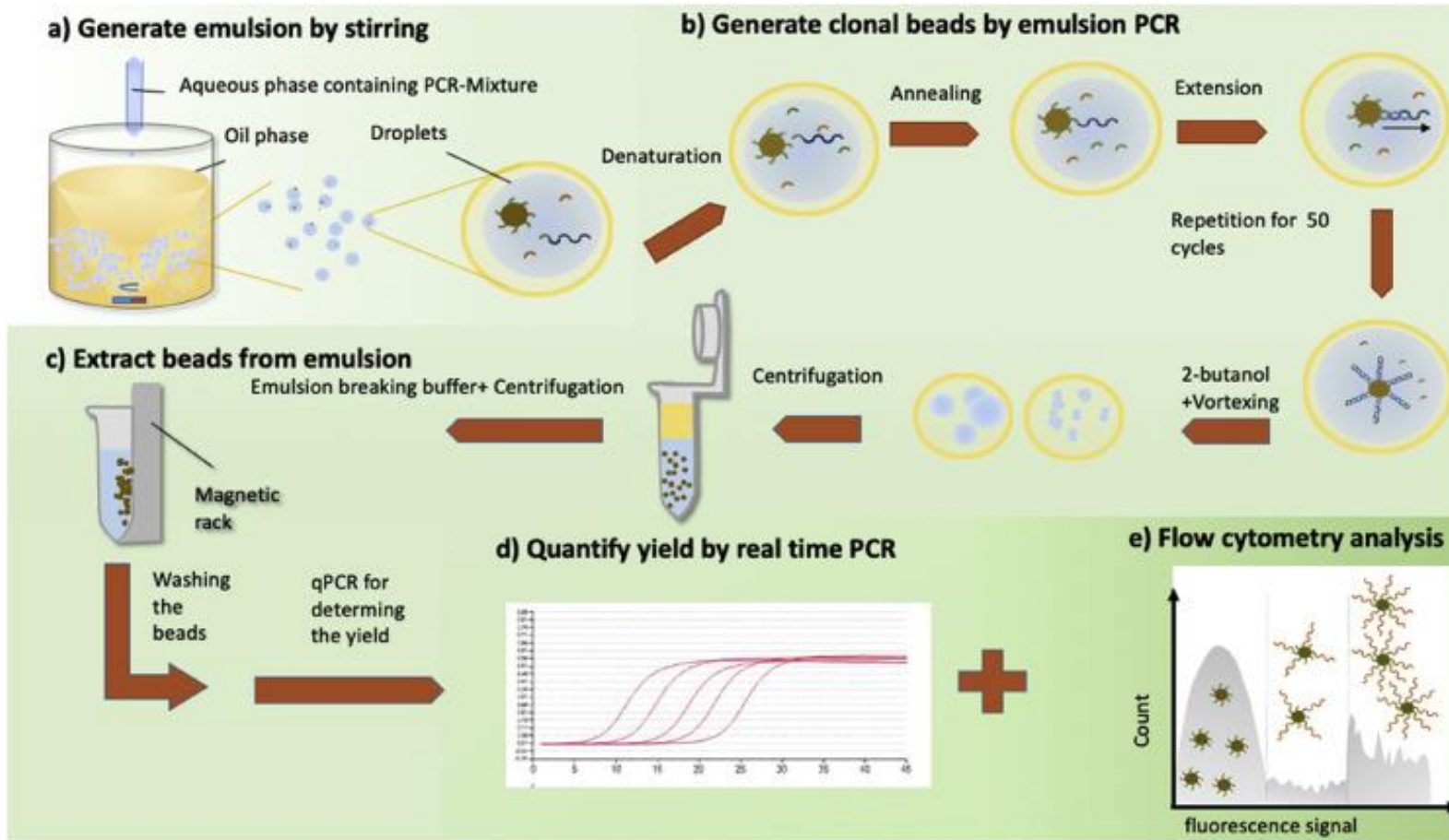


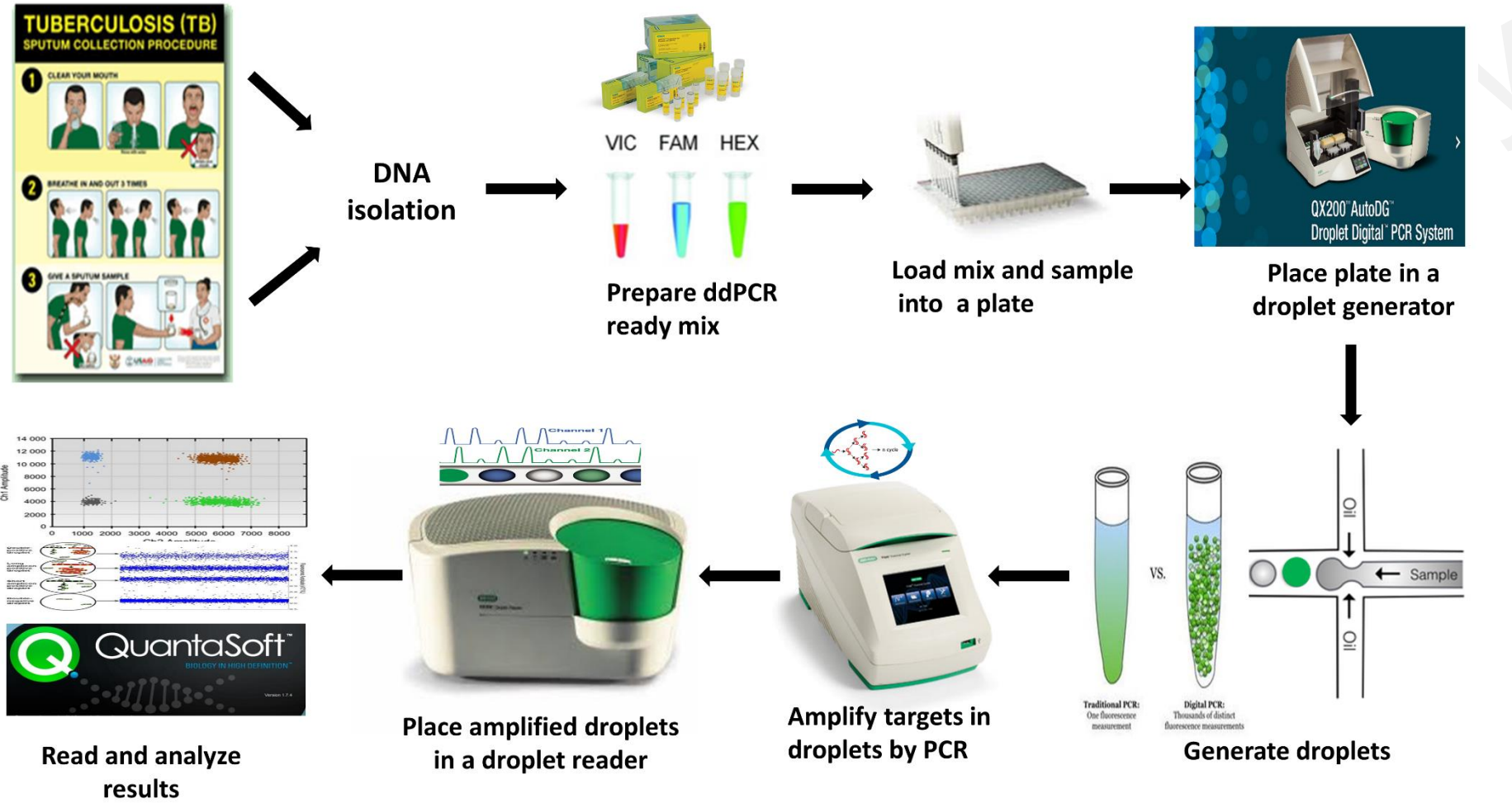
FIGURE 1 Overview of the QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis method.

Emulzní PCR

Použito při NGS technologii (454, ion torrent)



Droplet digital pcr



<https://www.youtube.com/watch?v=IAVVoyZxITU>

Loop-Mediated Isothermal Amplification

- Použití *Bst* polymerázy (Bacillus stearothermophilus DNA Polymerase I)
- Probíhá isotermálně
- Amplifikační faktor až $10E09$ srovnatelný s 30 cykly PCR
- Detekce v rámci 10-30 minut, fluorescence, kolorimetricky, turbidimetricky
- Méně náchylná na inhibice – možno provádět přímo ze vzorku

<https://www.youtube.com/watch?v=L5zi2P4lggw>

