

## DUM č. 5 v sadě

### 37. Bi-2 Cytologie, molekulární biologie a genetika

Autor: Martin Krejčí

Datum: 02.06.2014

Ročník: 6AF, 6BF

Anotace DUMu: centrální dogma molekulární biologie, replikace genetické informace eukaryot a prokaryot, enzymatická výbava replikace DNA.

Materiály jsou určeny pro bezplatné používání pro potřeby výuky a vzdělávání na všech typech škol a školských zařízení. Jakékoliv další využití podléhá autorskému zákonu.



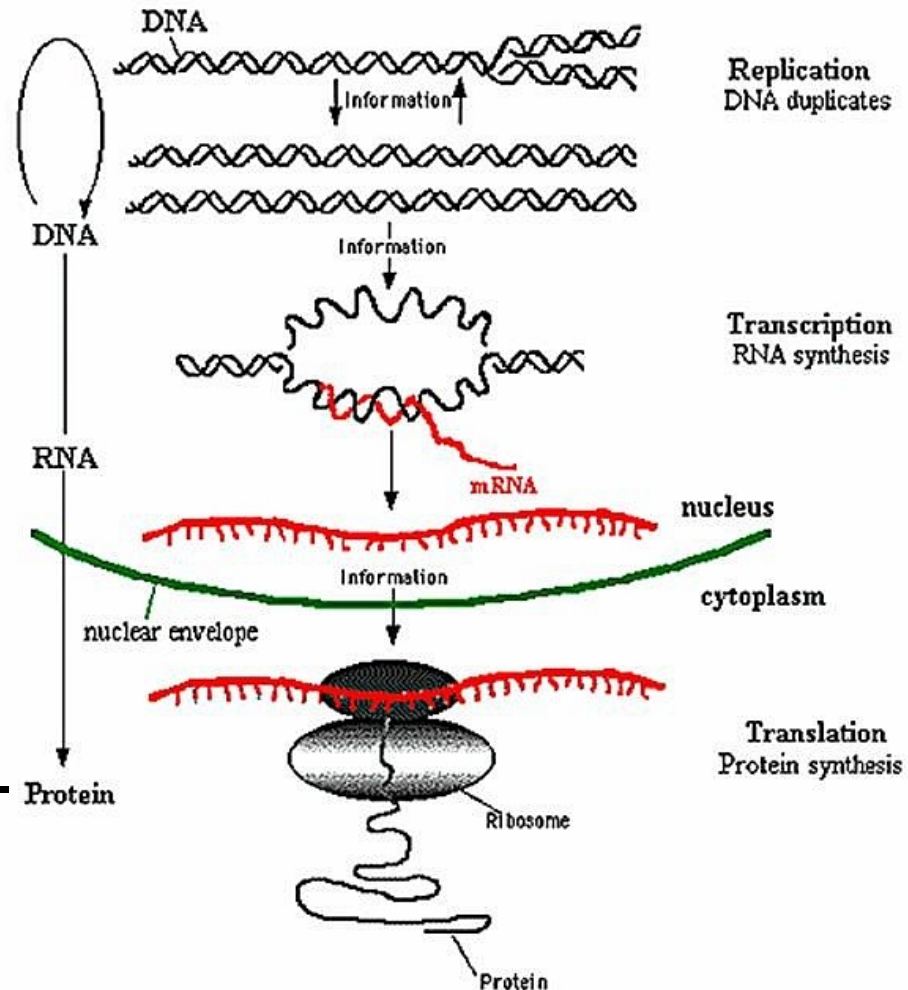
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# REPLIKACE DNA

# Centrální dogma molekulární biologie

Základní biochemické operace s nukleovými kyselinami probíhající v každé živé buňce.

- Vlastní informace, jak má buňka vypadat a jaké má plnit funkce je zapsána v primární struktuře molekul DNA - deoxyribonukleové kyseliny.



# Centrální dogma molekulární biologie

- ⊙ Vlastnosti buňkám udělují bílkoviny (proteiny), které buňka syntetizuje. Prvním krokem pro biosyntézu proteinů je proces transkripce (přepis) genů (sekventů deoxyribonukleotidů) z molekul DNA do sekvence ribonukleotidů molekul RNA - ribonukleových kyselin.
- ⊙ Molekula mRNA (messenger RNA) slouží jako matrice v procesu translace (překlad). Sekvence ribonukleotidů mRNA je překládána do sekvence AMK v polypeptidovém řetězci proteinů.
- ⊙ Jedním ze základních znaků živých organismů je schopnost reprodukce. Na buněčné úrovni je

# Centrální dogma molekulární biologie

Základní myšlenka centrálního dogmatu (Francis Crick 1956) stále platí, v současnosti doplněna o následující procesy:

- ⊙ **Reverzní transkripce** (Temin, Baltimore, 1970) - schopnost retrovirů zpětně přepsat strukturu své RNA do struktury DNA a tuto začlenit do DNA hostitelské buňky. Enzym reverzní transkriptáza.
- ⊙ **Přepis RNA do RNA** - u virů častý jev (namnožení virové RNA).

# Centrální dogma molekulární biologie

Ústřední dogma molekulární biologie:

Přenos genetické informace je možný z nukleové kyseliny do nukleové kyseliny nebo z nukleové kyseliny do proteinu, její zpětný přenos z proteinu do nukleové kyseliny možný není.

# REPLIKACE DNA -

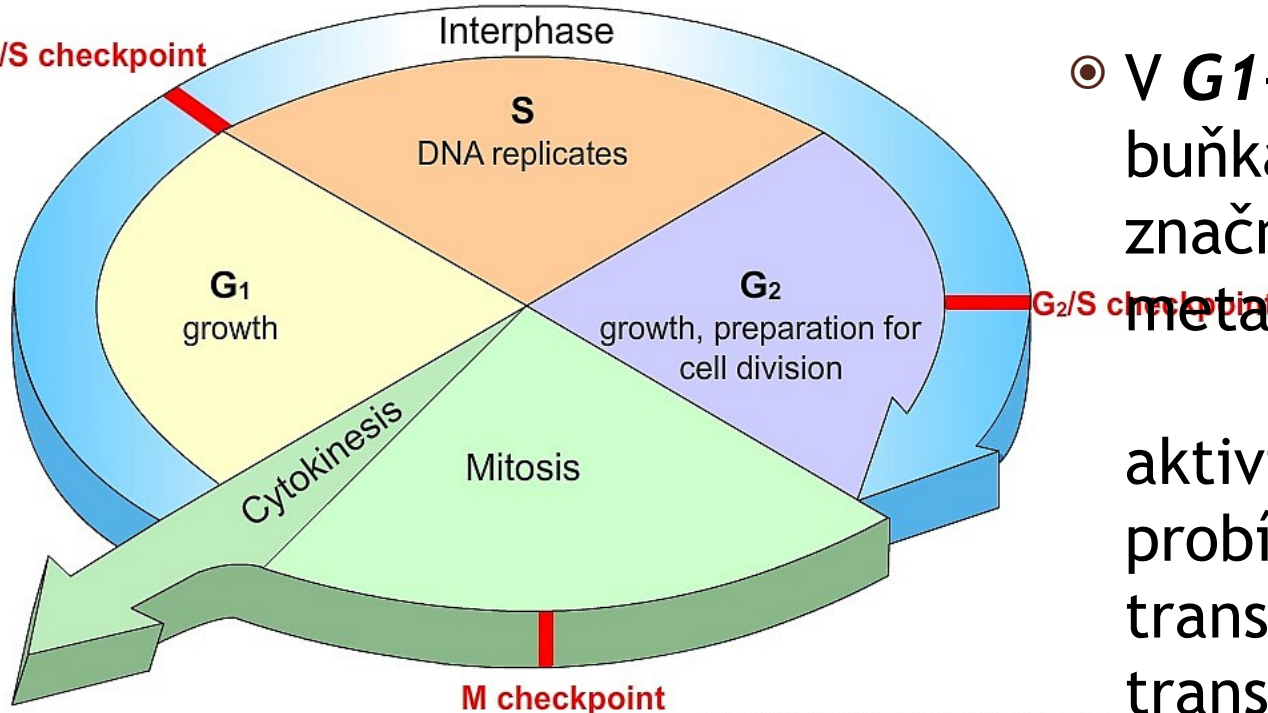
## VÝZNAM

- ◉ Proces re(du)plikace DNA je jedinečný biochemický mechanismus, díky kterému je buňka schopna vytvářet **identické kopie DNA**.
- ◉ Shoda mateřské DNA s dceřinými molekulami je nezbytností pro udržení **konstantní genetické informace** všech somatických buněk těla.
- ◉ Časově vždy proces re(du)plikace **předchází** proces rozdělení i jádra (**karyokinezi**) i buňky (**cytokinezi**).
- ◉ Re(du)plikace je enzymaticky přísně **kontrolovaným** procesem. Případné chyby jsou pomocí reparačních mechanismů v naprosté většině případů opraveny. Případné neopravené chyby se projevují jako **genové (bodové) mutace**.

# REPLIKACE DNA a BUNĚČNÝ

## CYKLUS

- Replikace jaderné dsDNA probíhá u eukaryot v **S-fázi** buněčného cyklu. U prokaryot je replikace zahájena ihned po dokončení buněčného dělení.
- Zreplikované molekuly nDNA segregují během mitózy - **M-fáze** buněčného cyklu.



- V **G1**-a **G2**-fázích buňka vykazuje značnou metabolickou

aktivitu, probíhají procesy transkripce a translace, nikoli však REPLKACE.

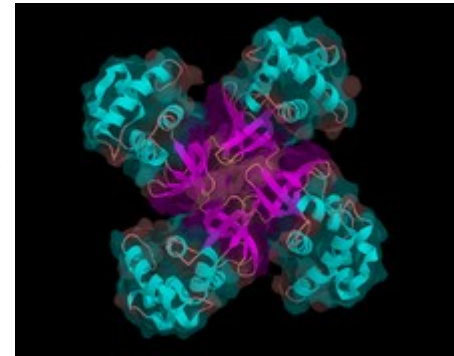


# REPLIKACE DNA a BUNĚČNÝ CYKLUS

- ⊙ Motekula nDNA (jaderné DNA) obsahuje velké množství **REPLIKONŮ** (chromatinových domén) a každý má jedno **ori-místo**.
- ⊙ 1 chromozomová DNA = 130 x 10<sup>6</sup> bp (komplementárních bází)
- ⊙ Při jednom replikonu doba replikace **800 hod.** (**4,8 týdnů**).
- ⊙ Většina rostlinných a živočišných buněk se rozdělí za **10 - 20 hod.** ↗ **více počátků replikace (cca 20 - 80 počátků replikace).**
- ⊙ Nejprve se replikuje euchromatin a potom teprve heterochromatin.

# ENZYMY Při replikaci

- ◉ **Helikáza** - enzym, který se pohybuje přímo podél fosfodiesterových vazeb dsDNA a rozděljuje dvoušroubovici do dvou izolovaných vláken.



<http://cs.wikipedia.org/wiki/Helik%C3%A1za>

- ◉ **Topoizomeráza II** (bakteriální ekvivalent DNA gyráza) - napomáhá rozvinovat superhelix (nadšroubovici) dsDNA v replikační vidlici. Umí také opravovat různé spletnice a uzly vznikající na molekulách dsDNA (mimo jiné při segregaci sesterských chromozomů a po rekombinaci).

- ◉ **Primáza** - je schopná vytvořit podle vzoru v podobě templátového vlákna DNA komplementární úsek RNA dlouhý

# ENZYMY Při replikaci

◎ DNA Polymeráza - enzym účastnící se replikace DNA, který katalyzuje polymeraci řetězce DNA. V replikační vidlici vkládá, na základě komplementarity, volné deoxyribonukleotidy, prodlužuje řetězec.

- 15 různých DNA polymeráz.

DNA polymeráza ✓ -1: (aktivita POLYMERÁZOVÁ 5'·3')

- Umožňuje iniciaci replikace, je totiž schopná v komplexu s primázou RNA-polymerizační (primázové) aktivity, při níž dochází ke vzniku krátké sekvence RNA, tzv. primeru a to jak na vedoucím (*leading*), tak na opožďujícím se (*lagging*) řetězci.!
- Katalyzuje biosyntézu Okazakiho fragmentů na opožďujícím se řetězci.

# ENZYMY Při replikaci

■: (aktivita **POLYMERÁZOVÁ 5'·3'**)

ondriální DNA

■: (aktivita **POLYMERÁZOVÁ 5'·3'**)

(aktivita **EXONUKLEÁZOVÁ 3'·5'**)

ho řetězce + dokončení  
řetězce.

ožená pomocí proteinu PCNA  
ell nuclear antigen“ - kofaktor  
ového komplexu.

(1 chybně přiřazený  
otid na 109 bp).

**aktivita** oprava DNA (proofreading)  
(**samoopravující enzym**).

■:  
likaci, ale i v opravě DNA,  
a v kontrole buněčného cyklu.

A polymeráze  $\delta$



# ENZYMY Při replikaci

## ◎ DNA Ligáza:

- Enzym z třídy ligáz (synthetas), který se podílí na spojování Okazakiho fragmentů, procesu rekombinace „*crossing-overu*“ a opravy DNA. Katalyzuje vznik fosfodiesterové vazby v místech, kde došlo k porušení celistvosti vlákna DNA.

## ◎ Telomerázy:

- slouží k replikaci telomer , konců eukaryotických chromozomů.
- má vlastnosti reverzní transkriptázy - to znamená, že vytváří DNA podle matrice ve formě RNA . Tato RNA matrice je strukturní součástí samotné telomerázy.
- Fungují v buňkách , které potřebují větší počet

# ENZYMY Při replikaci

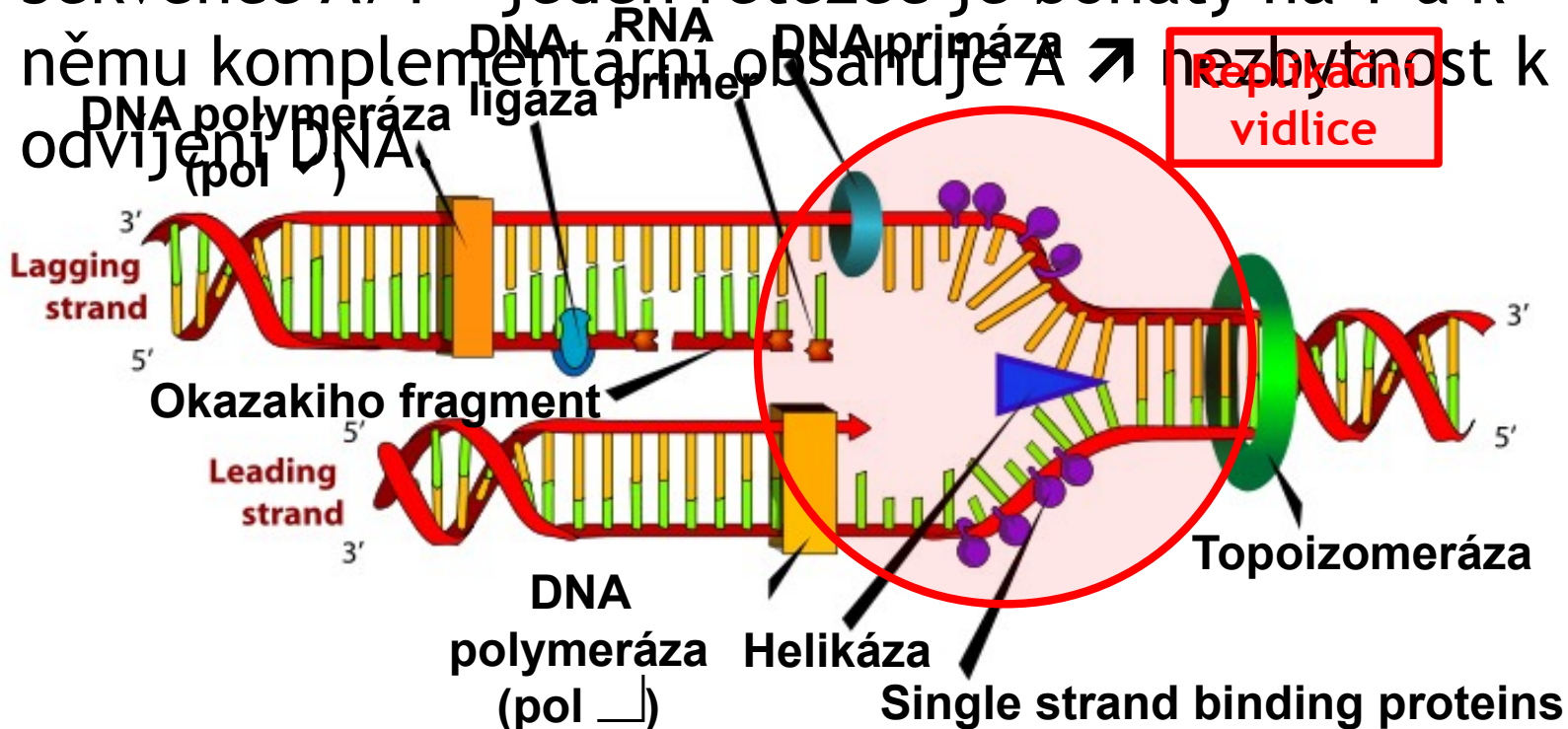
- ⊙ V prokaryontních buňkách je enzymatický aparát obdobný, pouze DNA polymerázy jsou klasifikovány odlišně:
- ⊙ DNA polymeráza I: (polymerázová a. 5' · 3' )  
(exonukleázová a. 3' · 5' )  
(exonukleázová a. 5' · 3' )
  - Je schopná především replikovat krátké úseky DNA.
  - Oprava DNA (proofreading) ve směru 3' → 5'.
  - Rovněž také exonukleotická aktivita ve směru 5' → 3' (nick translation), rovněž během oprav DNA a odstraňovat RNA primery po replikaci opoždujícího se (lagging) vlákna DNA.

# ENZYMY Při replikaci

- ◉ DNA polymeráza III: (polymerázová a. 5' · 3')  
(exonukleázová a. 3' · 5')
- Primární enzym reduplikace DNA u prokaryontních (bakteriálních) buněk.
- Má také korekční schopnosti tzn. umí opravit chyby replikace prostřednictvím své exonukleázové aktivity ve směru 3' → 5'.
- DNA polymeráza III je schopna přiřazovat na bázi komplementarity asi 1000 deoxyribonukleotidů/s.
- ◉ DNA polymeráza II: (polymerázová a. 5' · 3')  
(exonukleázová a. 3' · 5')
- Specializuje se na opravu DNA, a to v případě, kdy se replikační vidlice dostane k DNA, jež jeví známky poškození

# Replikační vidlice „replication fork“

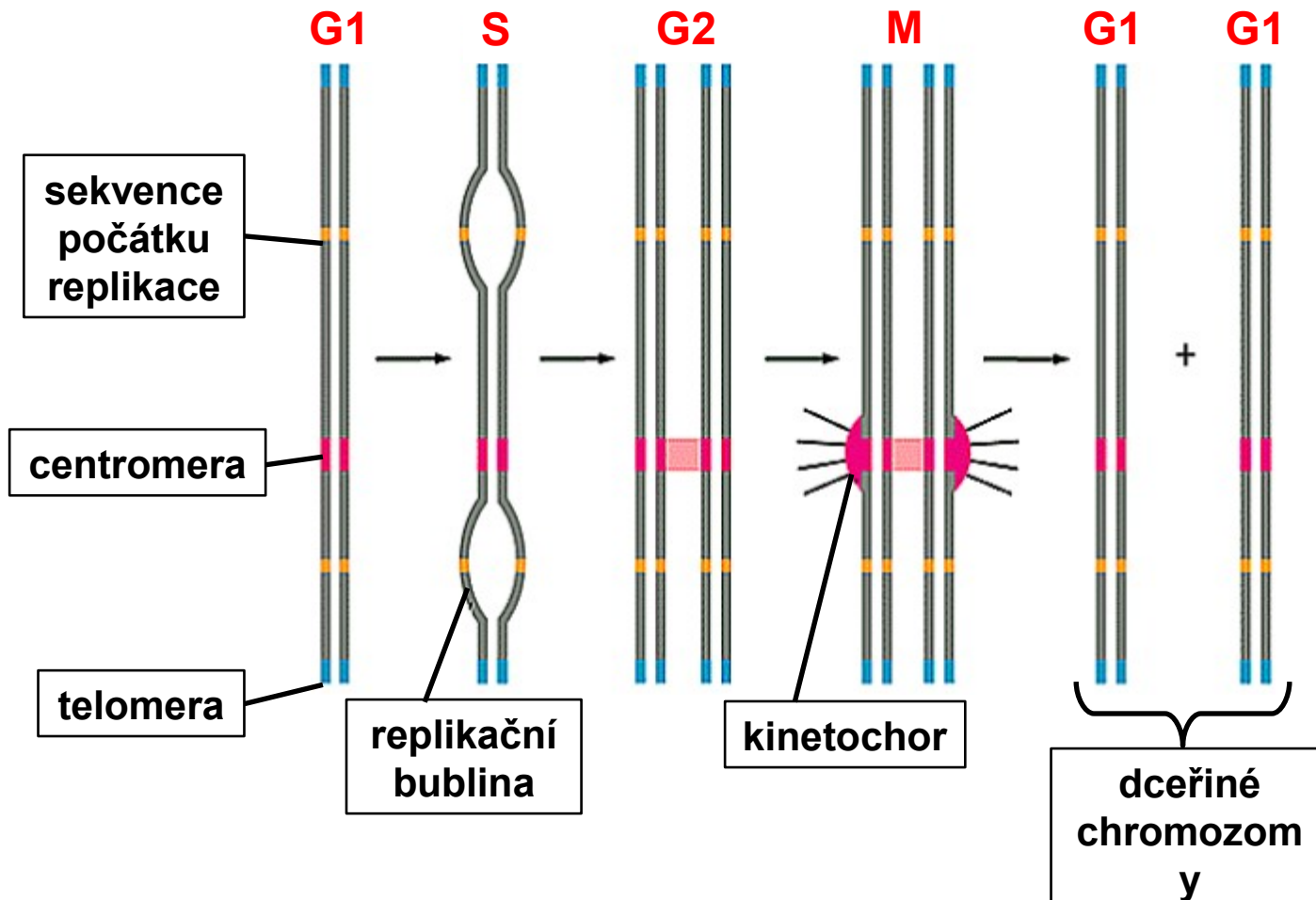
- ◉ Rozpoznávací sekvence počátku replikace „**origin replication element - ORE**“
- ◉ Sekvence na níž se začíná odvíjet DNA „**DNA unwinding element - DUE**“
- ◉ Sekvence A/T - jeden řetězec je bohatý na T a k němu komplementární obsahuje A ↗





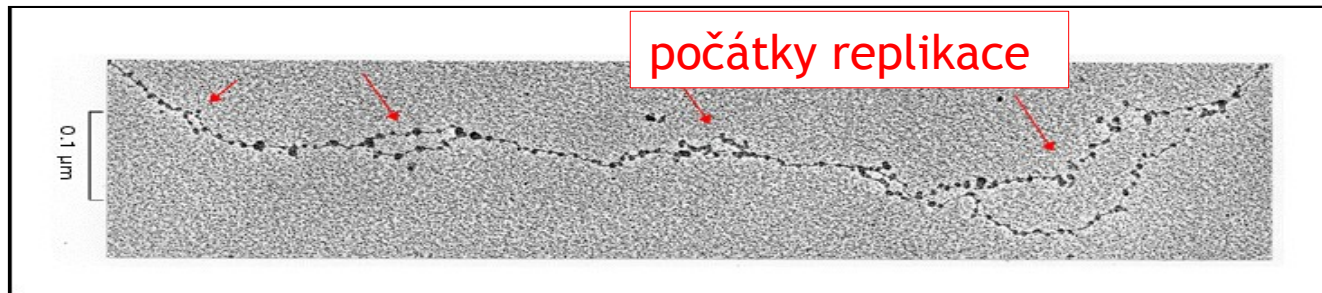
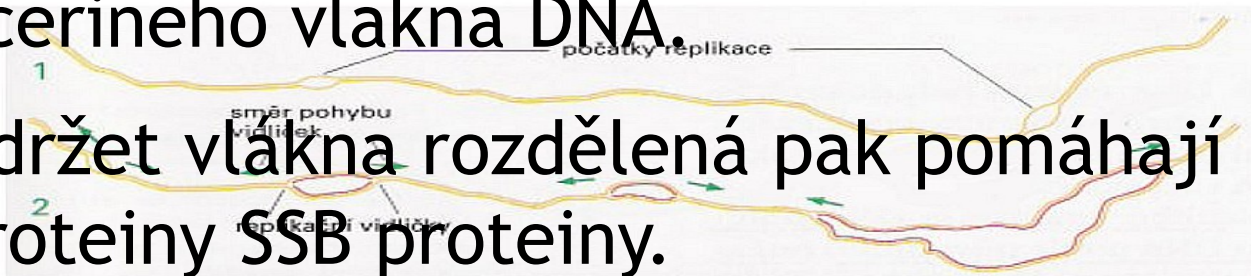
# INICIACE ReplikaCE dsDNA

- Na každém ze zázorněných chromozomů je patrná přítomnost jedné centromery, na terminálních koncích jsou naznačeny telomery a je naznačena přítomnost více míst ORI - počátků replikace dsDNA.
- Chromozomy jsou naznačeny v různých fázích buněčného cyklu.



# INICIACE ReplikaCE dsDNA

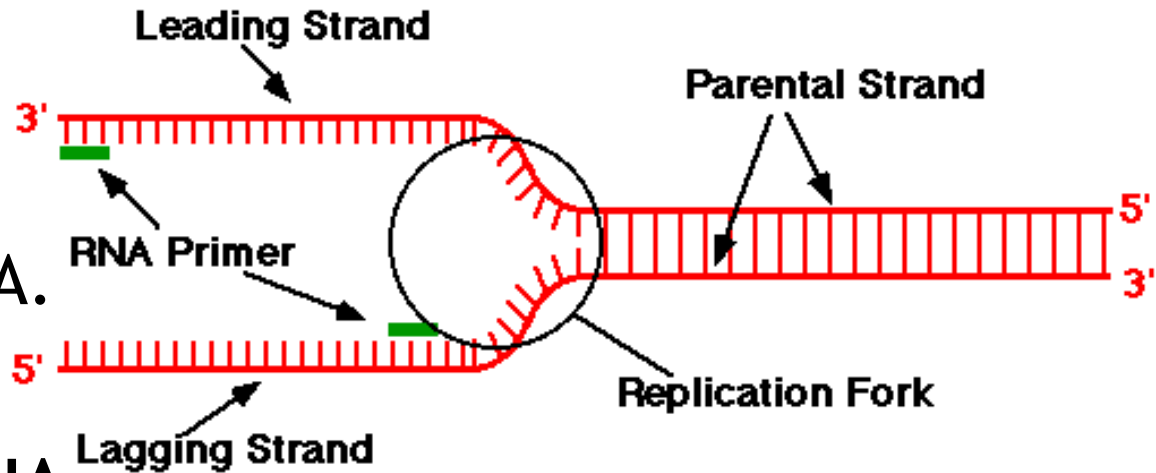
- ◉ Navázání iniciačních proteinů na rozpoznávací sekvenci počátku replikace (ORE)
- ◉ DNA helikáza začíná rozevírat dsDNA - dva oddělené řetězce.
- ◉ Navázání proteinů podílejících se na syntéze dceřiného vlákna DNA.
- ◉ Udržet vlákna rozdělená pak pomáhají proteiny SSB proteiny.



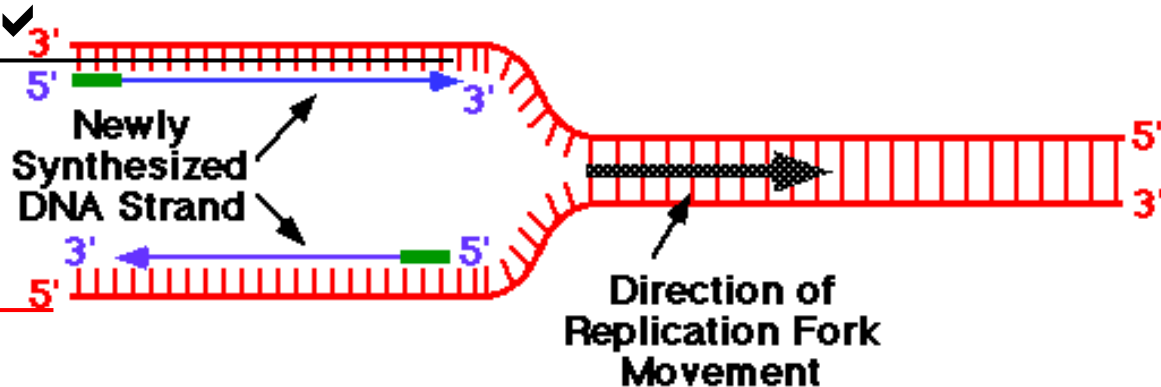
# INICIACE ReplikaCE

## dsDNA

Polymérazová aktivita DNA polymeráz 5' → 3' vyžaduje přítomnost 3' volného hydroxylu pro spuštění replikace. Nutnost syntézy **RNA primeru** na uvolněné templátové vlákno mateřské DNA.



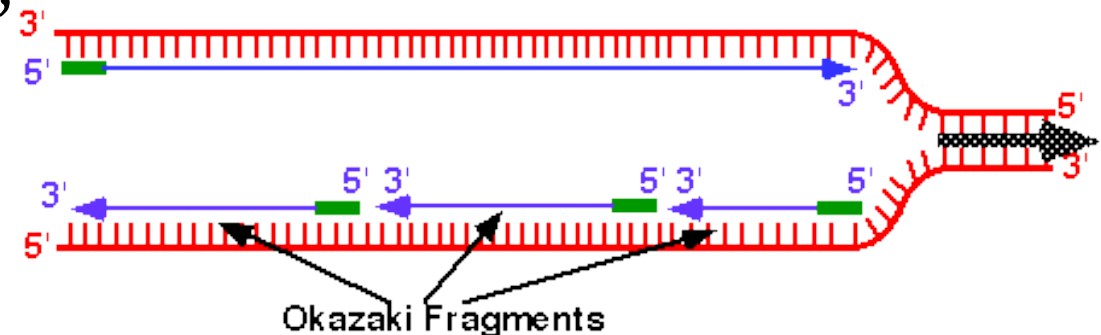
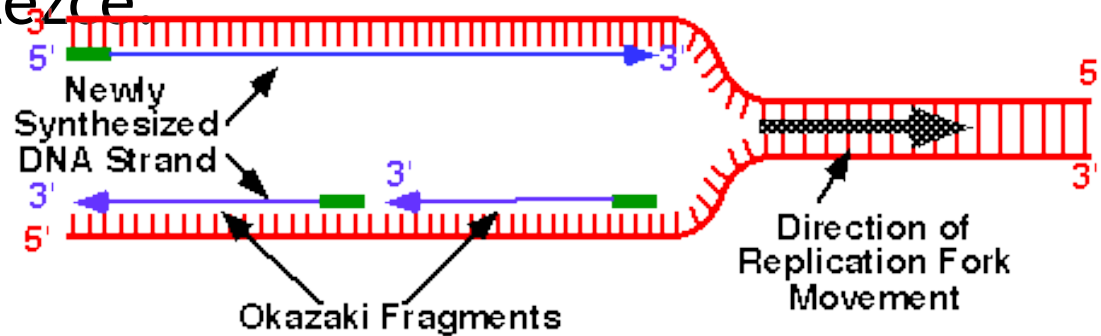
Funkce komplexu DNA polymeráza + primáza označovaný jako **pol** ✓.



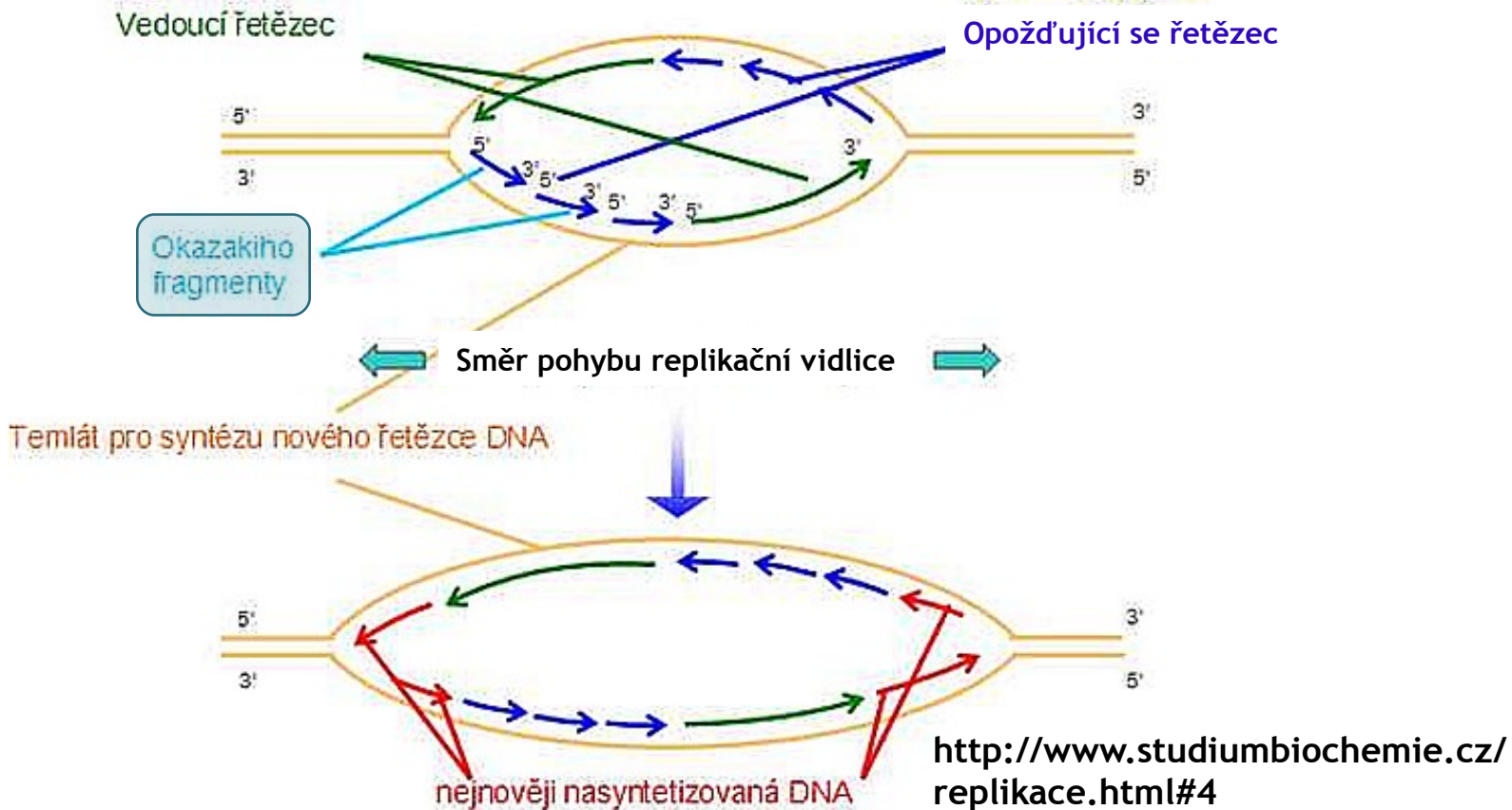
# ELONGACE Replikace dsDNA

## ⊙ Aktivita DNA-polymeráz:

- DNA polymeráza  $\dashv$  - syntéza vedoucího řetězce.
- DNA polymeráza  $\checkmark$  - v komplexu s primázou syntéza opožďujícího řetězce
- DNA polymeráza pevně držena na místě svírací proteiny (tvořící posuvnou svorku, DNA clamp).



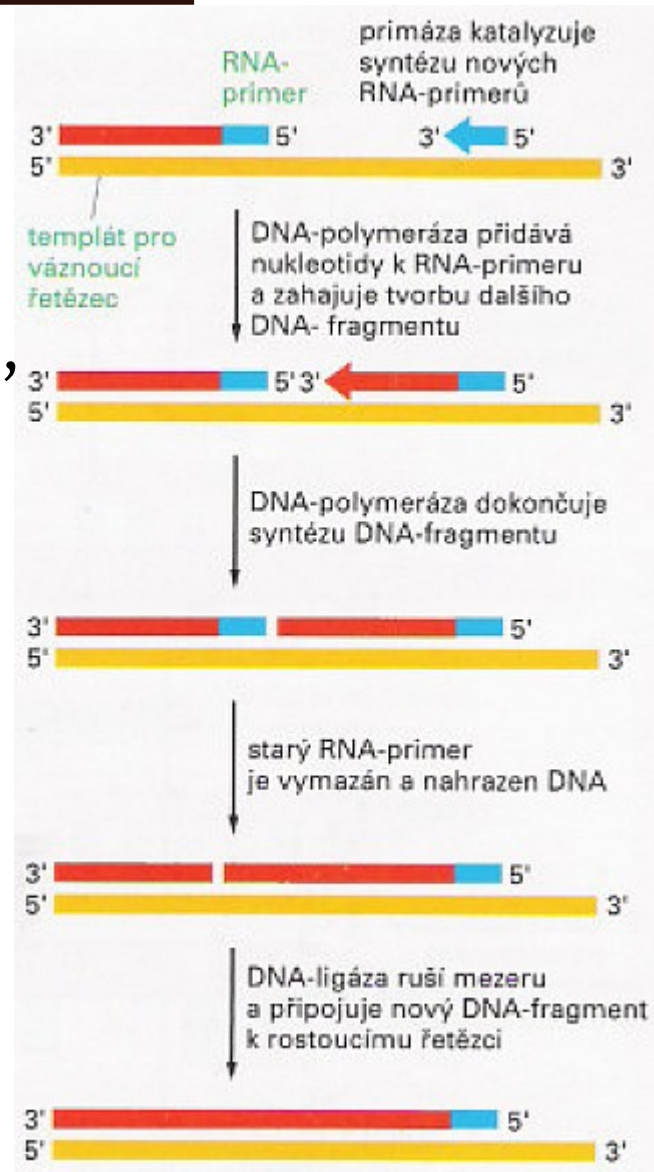
# OKAZAKIHO FRAGMENTY



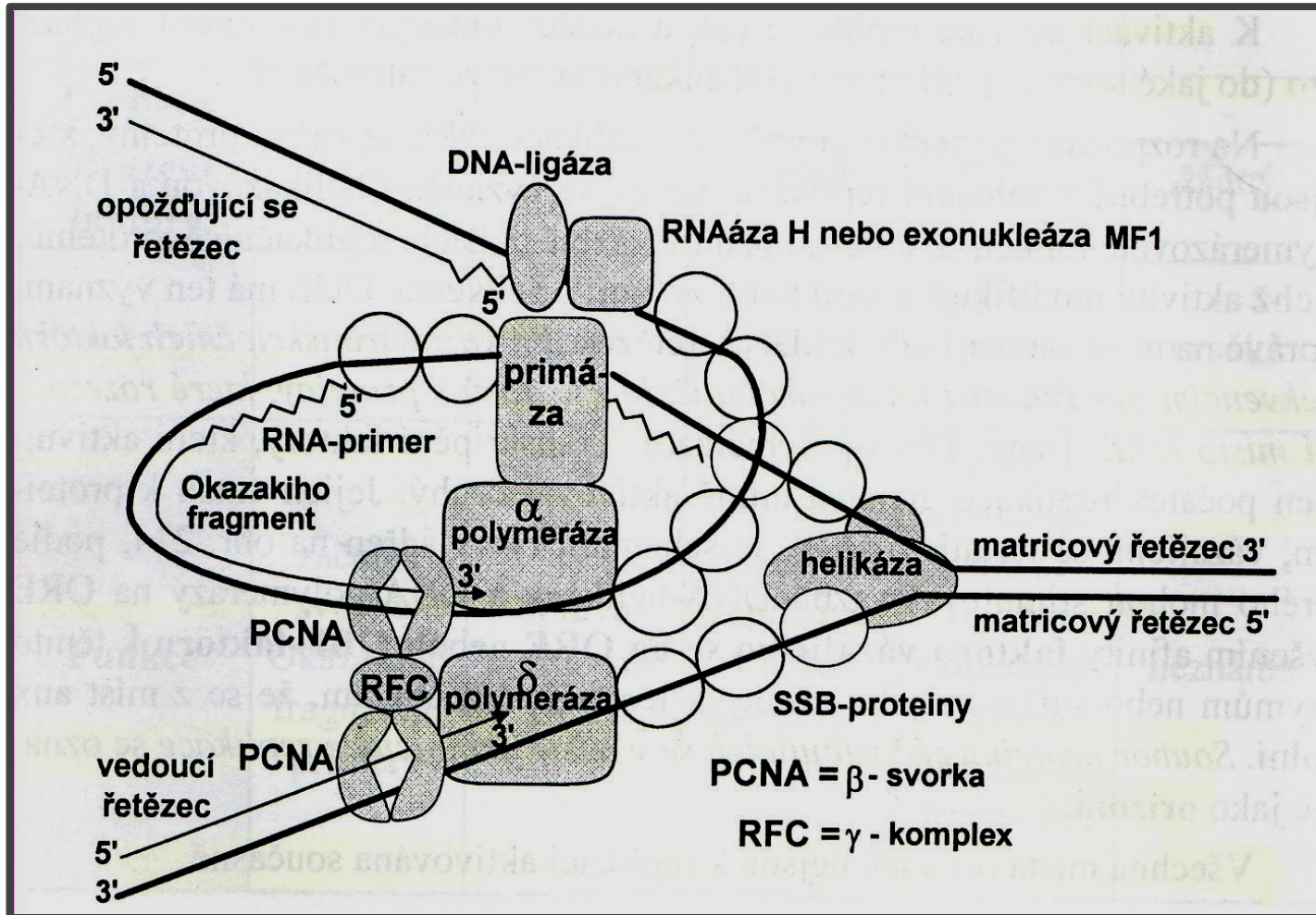
- ⊙ Syntéza DNA pouze ve směru 5' -3' .
- ⊙ Vedoucí a opožd'ující se řetězec.
- ⊙ Ve směru 3' -5' prodlužována DNA diskontinuálně po krátkých úsecích = Okazakiho fragmenty.

# Syntéza Opožd'ujícího se řetězce

- Komplex **DNA-polymeráza** ✓ + **primáza** - syntéza RNA primeru + Okazakiho fragmenty.
- Následně vytlačen **RFC proteinem**, který umožňuje navázání **DNA polymerázy** ┘ na matricový řetězec s Okazakiho fragmenty.
- **Ribonukleáza** (RNáza H) odstraní RNA primery od 5' konců.
- DNA polymeráza ┘ dosyntetizuje chybějící úseky.
- Dosyntetizované úseky jsou spojeny **DNA ligázou**.



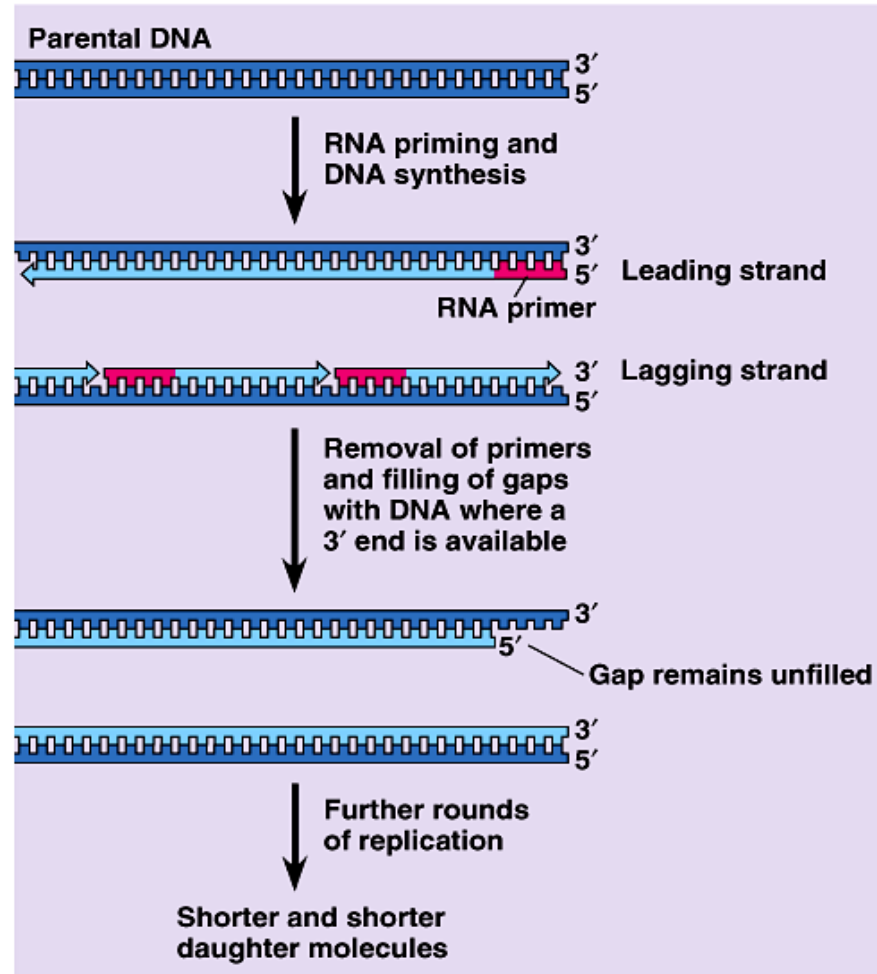
# ELONGACE Replikace dsDNA



# terminace Replikace dsDNA

○ Eukaryotické chromozomy jsou lineární, DNA polymerázy nejsou schopné replikovat jejich koncové části na 3'-koncích, tzv. **telomery**, a tak je dceřiná DNA nepatrně kratší, než matricová DNA.

○ Po určitém počtu buněčných dělení by to začalo vadit (Hayflickův

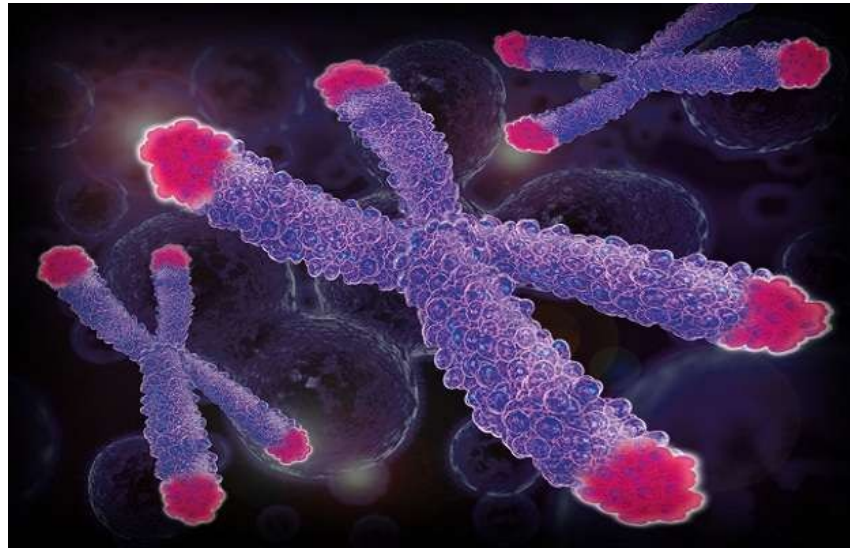


Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



# telomery

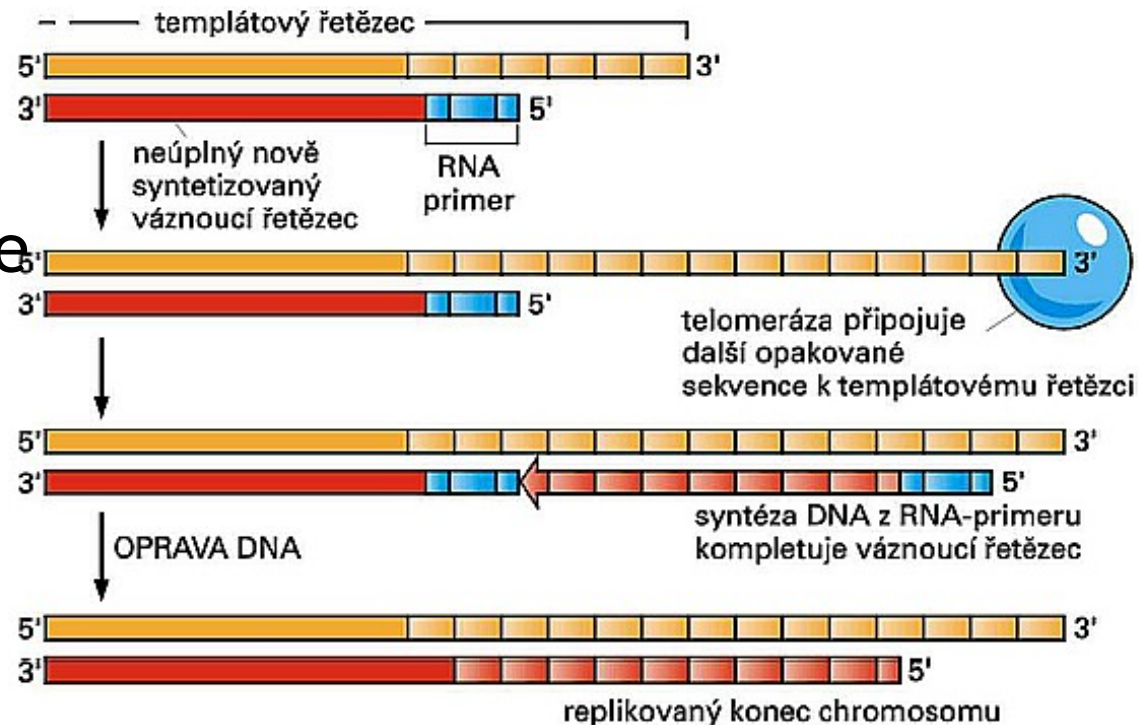
- ◉ Chromosomální DNA eukaryot má na svých koncích speciální sekvence - **telomery**
- ◉ Telomery neobsahují strukturální geny, ale jsou tvořeny krátkými sekvencemi, které se mnohonásobně opakují.
- ◉ Lidské telomery - sekvence TTAGGG (opak. 100x - 1000x).



[http://www.net1news.org/sites/default/files/imagecache/Home\\_immagine\\_evidenza/telomero.jpg](http://www.net1news.org/sites/default/files/imagecache/Home_immagine_evidenza/telomero.jpg)

# Telomeráza

- Enzym katalyzující syntézu telomerických konců (bohatých na G).
- Obsahuje sekvence RNA komplementární k telomerickým sekvencím - templát pro prodloužení 3' konce telomery.
- Aktivní v buňkách zárodečné linie + nádorových.



# terminace Replikace dsDNA

