

2. Funkce DNA: replikace – dědičnost

Tématem této přednášky je Funkce DNA: replikace jako molekulární podstata dědičnosti. Přednáška je součástí modulu 1 Genetika zvířat, který je součástí projektu ISAGREED. Vytvoření této prezentace bylo podpořeno grantem ERASMUS + KA2 Inovace struktury a obsahu studijních programů v oblasti managementu živočišných genetických a potravinových zdrojů s využitím digitalizace.

V rámci přednášky si nejprve vysvětlíme pojem replikace a její význam, řekneme si něco o modelech replikace a enzymech katalyzujících tuto reakci. Podrobně si pak vysvětlíme průběh tzv. semikonzervativní replikace.

Replikace DNA je proces tvorby kopií molekuly deoxyribonukleové kyseliny, čímž se genetická informace přenáší z jedné molekuly DNA do jiné molekuly stejného typu. Jedná se o proces, který předchází buněčnému dělení (mitóze nebo meióze) a je základním předpokladem toho, že po rozdělení buňky získá každá z dceřiných buněk DNA typickou pro daný druh. Během dělení musí buňka zkopírovat celý svůj genom, aby obě dceřiné buňky nesly stejnou informaci.

O navazujících dějích, kterými jsou transkripce a translace se dozvíte v dalších přednáškách.

O struktuře DNA jste již slyšeli v předchozí přednášce, tedy pouze krátce zopakují, že DNA je složena ze dvou komplementárních polynukleotidových vláken (neboli řetězců) stočených do šroubovice (neboli helixu). Tato vlákna jsou vzájemně spojena vodíkovými můstky na základě komplementarity mezi bázemi nukleotidů, kdy adenin je vždy spojen s thyminem a cytosin s guaninem. Komplementarita je základním předpokladem toho, že nově syntetizovaný řetězec bude odpovídat původnímu.

Na každém z vláken rozlišujeme tzv. 3' a 5' konec. Řetězce jsou navzájem orientované antiparalelně, což znamená, že proti 5' konci jednoho řetězce leží 3' konec řetězce druhého a naopak.

Replikace DNA probíhá tzv. semikonzervativně, což znamená, že každá nově vzniklá molekula se skládá z jednoho řetězce původní molekuly DNA, tzv. templátu a jednoho řetězce nově dosyntetizovaného na základě komplementarity bazí. Jako templát, neboli matrice, mohou sloužit obě vlákna původní molekuly DNA.

V minulosti byl navrhován i tzv. konzervativní model replikace, ve kterém obě vlákna dceřiné DNA jsou nově syntetizována a obě templátová vlákna rodičovské molekuly jsou ponechána v původním složení. Tento model už je ale v současné době překonán podobně jako model tzv. disperzní replikace, která produkuje dvě šroubovice, ve kterých každé vlákno obsahuje střídající se segmenty staré a nové DNA.

Replikace je katalyzována řadou enzymů. Jsou to především DNA polymerázy, které katalyzují na matricovém řetězci DNA syntézu komplementárního vlákna DNA z deoxyribonukleotidů. Tato schopnost se nazývá endonukleázová aktivita. Polymerace probíhá vždy ve směru od 5' konce k 3' konci. Pro svoji činnost potřebují DNA polymerázy krátký oligonukleotid, tzv. primer, od jehož 3' konce je zahájena syntéza.

Některé polymerázy mají i exonukleázovou aktivitu, což znamená, že odstraňují nukleotidy z konce dceřiného vlákna. Exonukleázová aktivita je nutná pro odstranění RNA primerů využívaných při replikaci DNA a nazývá se proof-reading neboli kontrolní aktivita. Je důležitá i v případech zařazení nesprávného nukleotidu, kdy umožňuje návrat o krok zpět a opravu - zařazení správné (komplementární) báze. Proof-reading aktivita tedy snižuje frekvenci spontánních mutací zapříčiněných chybami DNA-polymerázy, která je odhadována na průměrně jednu chybu na 10^7 zreplikovaných párů bazí.

U prokaryotických buněk jsou známy tři druhy DNA-polymeráz.

DNA polymeráza I má funkci polymerizační i exonukleázovou aktivitu.

DNA polymeráza II má exonukleázovou aktivitu a uplatňuje se při zakončení polymerace.

DNA polymeráza III je tzv. holoenzym, má 3 podjednotky s více funkcemi, které se pro větší účinnost (neboli procesivitu) spojují do dimeru tvořeného dvakrát třemi podjednotkami. S dalšími proteiny rozpozná komplex RNA primeru s matricovým řetězcem DNA. Polymerizuje rychlostí cca 30 tis. nukleotidů za minutu.

Mezi další důležité enzymy v procesu replikace patří DNA helikázy, které katalyzují odvíjení DNA řetězců šroubovice (neboli helixu) rušením vodíkových vazeb.

Dalším enzymem je primáza, která katalyzuje syntézu RNA primeru (oligoribonukleotidu), od jehož 3' konce se syntetizuje krátký polydeoxyribonukleotid. Tento komplex se nazývá Okazakiho fragment – bude vysvětleno později.

Dále pak DNA ligáza, která katalyzuje spojení polynukleotidů. Uplatňuje se zejména při spojování Okazakiho fragmentů do souvislého řetězce.

Jak již bylo řečeno, replikace DNA probíhá tzv. semikonzervativním způsobem, což znamená, že obě vlákna původní DNA mohou sloužit jako templáty pro syntézu nových (dceřiných vláken). Nová DNA je tedy vždy tvořena jedním vláknem původním a jedním nově dosyntetizovaným na základě komplementarity bazí nukleotidů. Platí, že DNA polymeráza se pohybuje podél templátového řetězce ve směru od 3' k 5' konci a nová vlákna vznikají ve směru opačném, tedy od 5' k 3' konci.

Zde bych chtěla ještě jednou připomenout význam komplementárního párování bazí, které je nezbytně nutné k tomu, aby nově vznikající dceřiná DNA odpovídala původní, rodičovské. Na schématu je vidět, že cytosin se váže vždy s guaninem a to třemi vodíkovými můstky, zatímco adenin s thyminem dvěma vodíkovými můstky. Tato komplementarita je základním předpokladem uchování a předání genetické informace.

Vlastní replikace začíná denaturací dvouvláknové DNA, kdy iniciační proteiny, které se vážou na DNA, rozvíjejí její dvojšroubovicovou strukturu přerušením vodíkových můstků. Místa, kde je struktura DNA nejdříve narušena, se označují jako replikační počátky neboli ori místa (z anglického origin of replication) a jsou určeny speciální nukleotidovou sekvencí.

Proces narušení dvoušroubovicové struktury DNA je katalyzován enzymem DNA helikázou.

Pro začátky replikace jsou typické útvary ve tvaru Y, které se nazývají replikační vidlice. V jednom replikačním počátku se vytvoří dvě vidlice, které se pohybují směrem od sebe, a proto je replikace označována jako obousměrná.

Jakmile jsou iniciační proteiny navázány na DNA a otevřou její dvojšroubovicovou strukturu, váže se na replikační počátek skupina proteinů, které spolupracují při syntéze nového vlákna DNA. Jedná se např. o tzv. SSB-proteiny (z anglického single-strand binding proteins), které ochraňují jednořetězcovou DNA uvolněnou helikázou před opětovným spárováním.

Protože DNA-polymeráza (hlavní enzym katalyzující replikaci) nedokáže začít syntetizovat nové vlákno, musí tedy existovat jiný enzym, který by dokázal spojit dva volné nukleotidy a začal tak syntetizovat nové vlákno podle jednořetězcové DNA. Tento enzym se nazývá primáza a tvoří krátké úseky o délce přibližně deseti nukleotidů, které jsou označovány jako primery. Nejedná se však přímo o úseky DNA, ale o úseky podobné sloučeniny, označované jako ribonukleová kyselina, proto tzv. RNA primery. Tyto RNA primery již mohou být prodlužovány DNA-polymerázou jako nový řetězec DNA. Později jsou pak RNA primery díky exonukleázové aktivitě DNA-polymerázy odstraněny.

Jelikož může být DNA syntetizována pouze ve směru 5' - 3', nastává v replikační vidlici určitý problém. Vzhledem k tomu, že v původní dvojšroubovici jsou vlákna v opačné orientaci, je replikační vidlice asymetrická. Jeden nový řetězec je v replikační vidlici syntetizován podle templátu ve směru 3' → 5'. (Vzniká 5' → 3' řetězec). Druhý nový řetězec je v replikační vidlici syntetizován podle templátu ve směru 5' → 3'. Neexistuje však DNA-polymeráza, která by dokázala prodlužovat 5' konec DNA. Tudíž v tomto směru roste diskontinuálně tzn., že jsou ve směru 5' → 3' syntetizovány krátké úseky DNA (tzv. Okazakiho fragmenty), které jsou následně spojovány v kontinuální řetězec.

Řetězec, který je tvořen kontinuálně, se nazývá **vedoucí řetězec**. Řetězec, který je tvořen diskontinuálně, se nazývá **opožďující se řetězec**.

Opožďující se řetězec je tvořen mnoha oddělenými úseky DNA tzv. Okazakiho fragmenty. Na vytvoření souvislého vlákna DNA z Okazakiho fragmentů jsou třeba tyto enzymy: **DNA-polymeráza I**, která odstraňuje RNA-primery a nahrazuje RNA-primery DNA a **DNA-ligáza**, která nakonec spojí všechny úseky dohromady.

Replikace prokaryotického chromozomu končí na specifických sekvencích, tzv. terminátorech replikace (TER), na které se váže protein inhibující aktivitu *helikázy* a tím se zastaví tvorba replikační vidlice.

Replikace DNA u eukaryotních organismů je podobná prokaryotům. Je však složitější, například replikace na koncích lineárních molekul - telomer tvoří specifický problém, který je řešen RNA obsahujícím enzymem *telomerázou*.

Zde je ještě jednou znázorněn model celého replizomu – rozvolněné DNA a proteinového aparátu v replikační vidlici.

Závěrem si shrneme nejdůležitější poznatky z této přednášky.

Replikace DNA se děje semikonzervativním mechanismem, kdy každý původní řetězec DNA slouží jako templát pro vznik nové molekuly.

Jedná se o proces katalyzovaný řadou enzymů, důležité je zapamatovat si především DNA-polymerázy.

Polymerace nového vlákna probíhá vždy pouze ve směru 5' - 3'.

DNA polymeráza potřebuje k zahájení syntézy krátké úseky, označované jako RNA primery.

Syntéza nového řetězce je na jednom templátovém vlákně kontinuální (jedná se o tzv. vedoucí řetězec) a na druhém templátu diskontinuální s tvorbou tzv. Okazakiho fragmentů (jedná se o tzv. opožďující se řetězec).

U eukaryot k replikaci dochází v S-fázi buněčného dělení, začíná na mnoha místech.

Replikace je nezbytná pro uchování genetické informace a je podstatou dědičnosti na molekulární úrovni.

Já vám tedy tímto děkuji za pozornost a pokud máte nějaké otázky, můžete využít zde uvedený mail.