



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



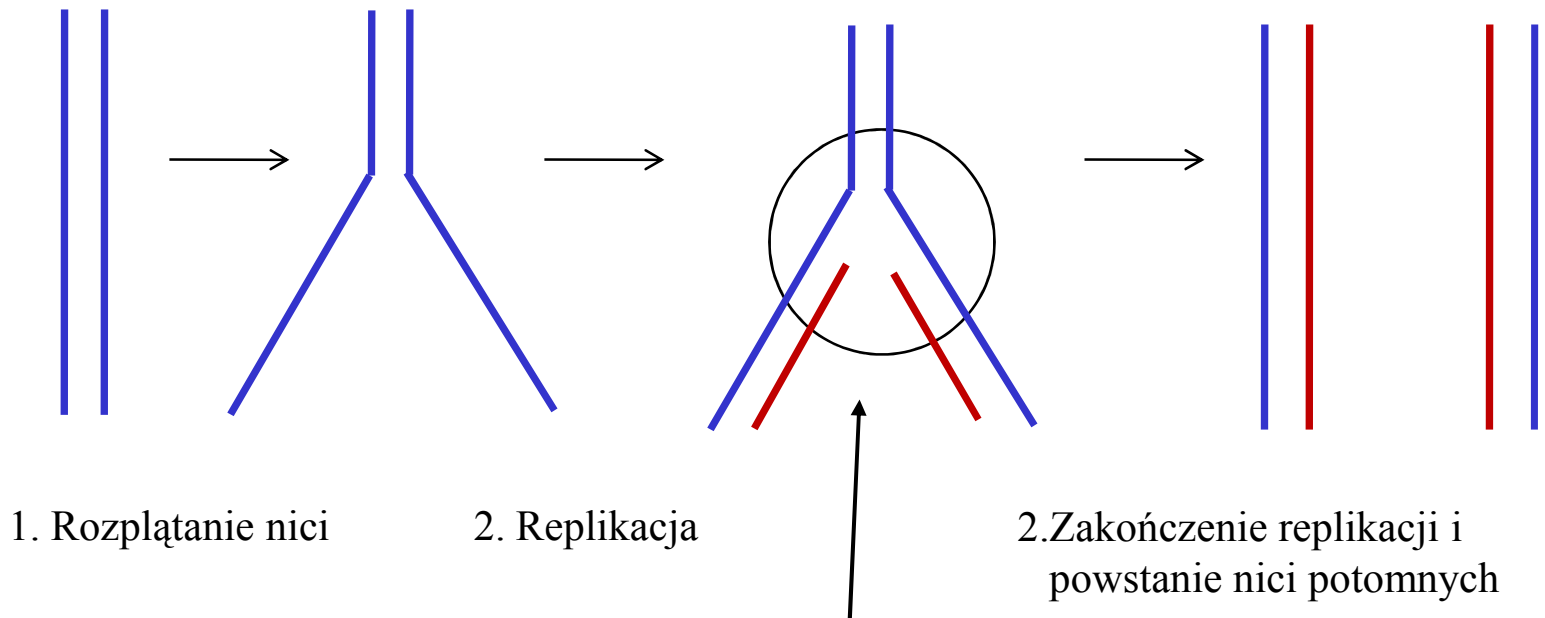
Replikacja DNA

Materiały dydaktyczne współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Replikacja DNA jest bardzo złożonym procesem, w którym biorą udział setki białek.

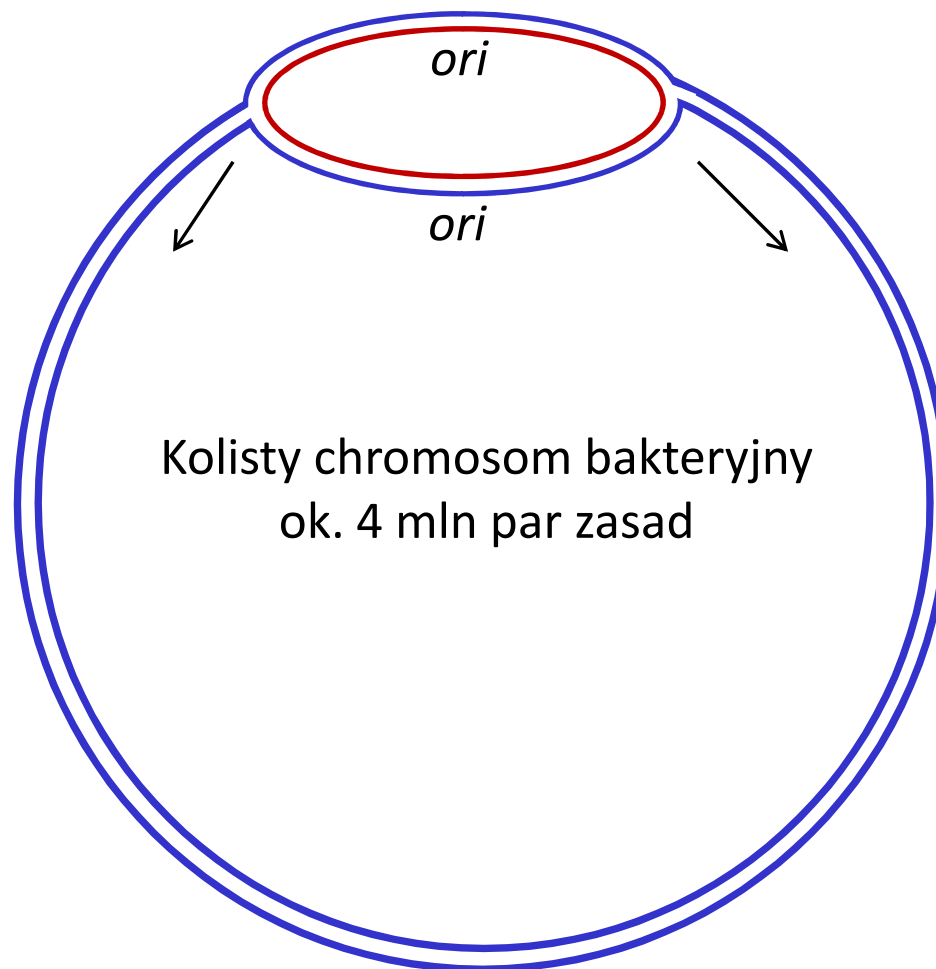
1. Replikacja jest semikonserwatywna.
2. Jest procesem enzymatycznym – polimeraza DNA.
3. Jest napędzana hydrolizą „wysokoenergetycznych wiązań”.
4. Odbywa się przy współudziale białek wiążących się z DNA: histonów i wielu innych.
5. Jest procesem niezwykle dokładnym a pojawiające się błędy mają poważne konsekwencje - choroby.
6. Synteza DNA odbywa się w kierunku 5'→3'.
7. Aktywny region replikacji nosi nazwę widełek replikacyjnych, obie nici syntetyzowane są w skoordynowany sposób.

Niść DNA służąca za instrukcję do syntezy nowej nici zwie się nicią matrycową. Semikonserwatywizm replikacji oznacza, że nowa podwójna niść DNA składa się z jednej nici starej (matrycowej) i jednej nici nowo zsyntetyzowanej.

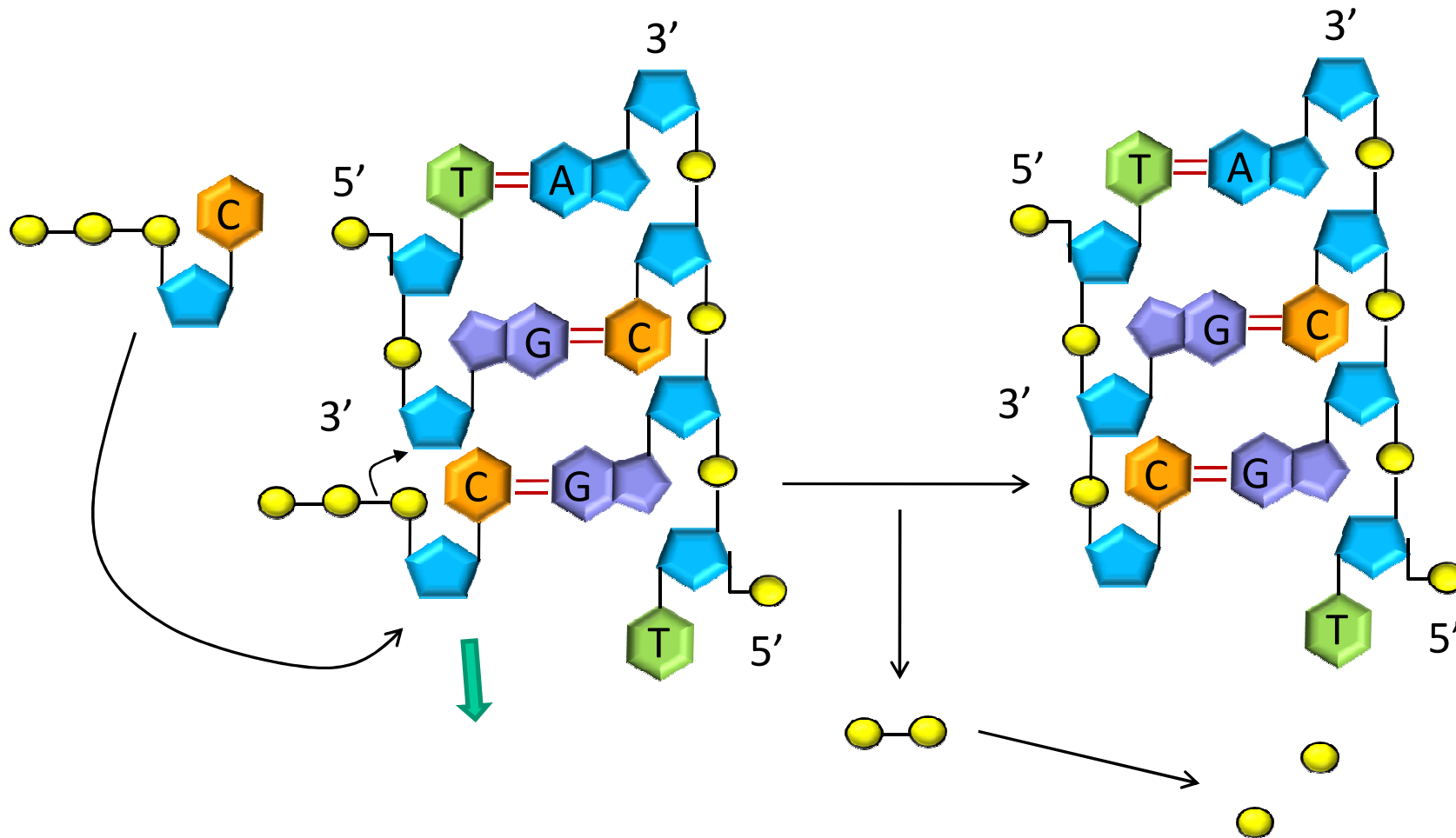


Aktywny region replikacji DNA nosi nazwę widełek replikacyjnych (ang. *replication fork*).

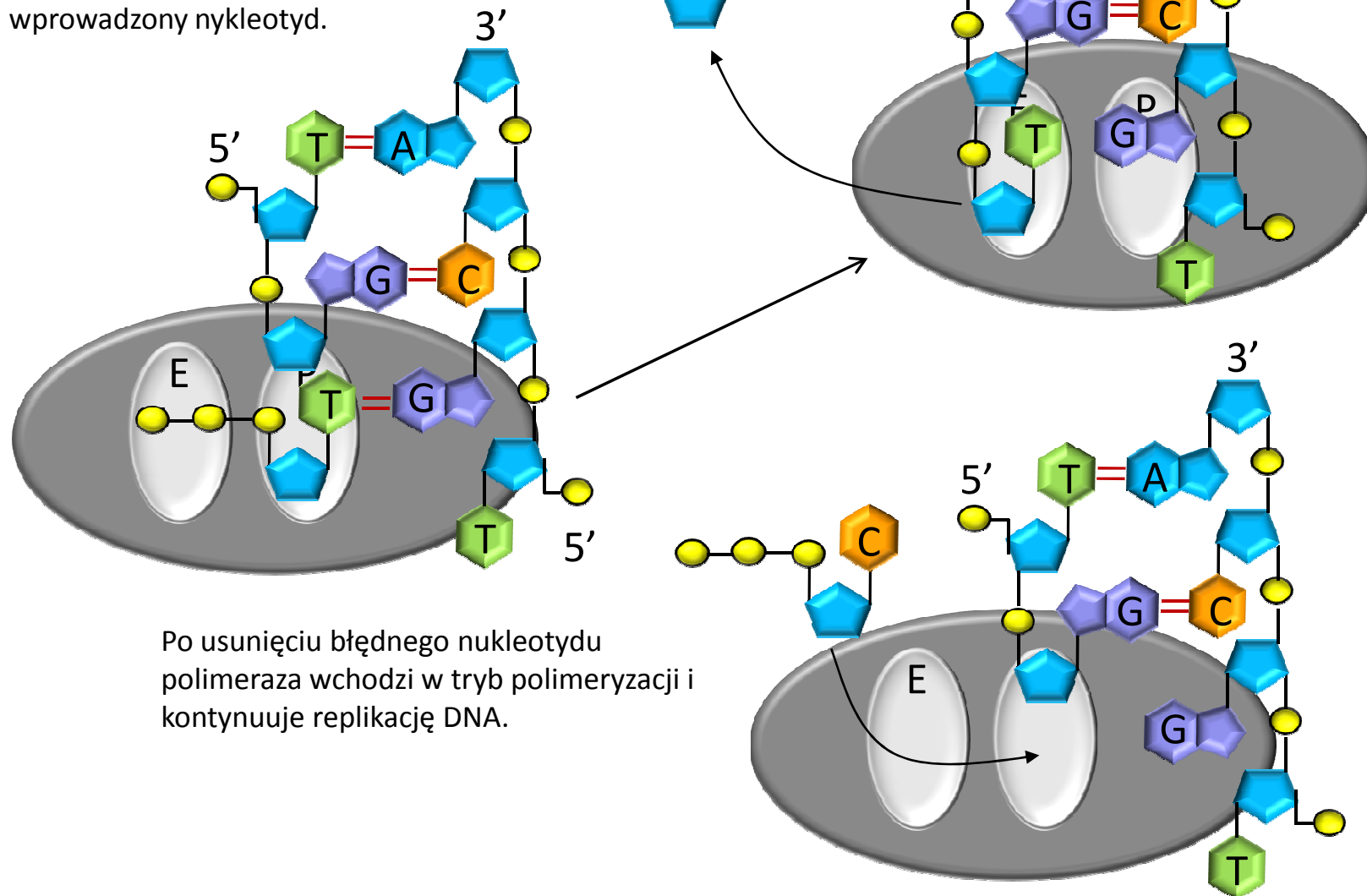
Cząsteczkę DNA ulegającą replikacji można zobaczyć w mikroskopie elektronowym. Na ulustracji przedstawiono schemat replikacji kolistego chromosomu bakteryjnego. Widelki replikacyjne rozpoczynają kopiowanie chromosomu w ściśle określonym miejscu zwanym *ori* i przesuwały się w przeciwnych kierunkach aż do spotkania. W wyniku tego procesu powstają dwie koliste cząsteczki potomne.



Synteza DNA odbywa się poprzez tworzenie wiązania fosfodwiestrowego pomiędzy nukleotydem wbudowanym w łańcuch a trifosforanem deoksyrybonukleozydu. Reakcja syntezy nowej nici DNA jest katalizowana przez enzym polimerazę DNA. Nowy łańcuch DNA rośnie w kierunku 5'→3'. Z termodynamicznego punktu widzenia reakcja jest napędzana przez hydrolizę pirofosforanu.

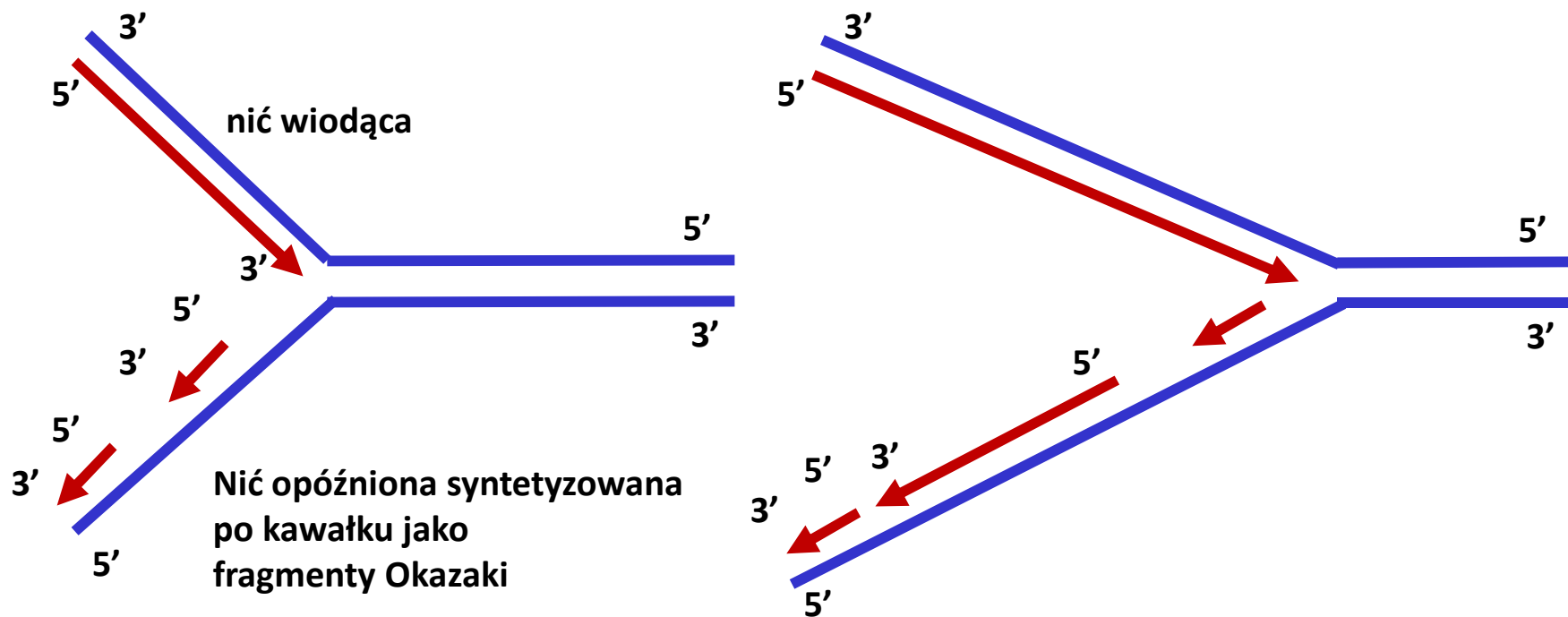


Polimeraza DNA działa w dwóch trybach – polimeryzacji (P) i edycji (E). Jeśli polimeraza wprowadzi błędny nukleotyd do nowej nici, zmienia się jej kształt i wchodzi w tryb edycji. Staje się wtedy 3'-5' egzonukleazą odcinając błędnie wprowadzony nukleotyd.



Po usunięciu błędnego nukleotydu polimeraza wchodzi w tryb polimeryzacji i kontynuuje replikację DNA.

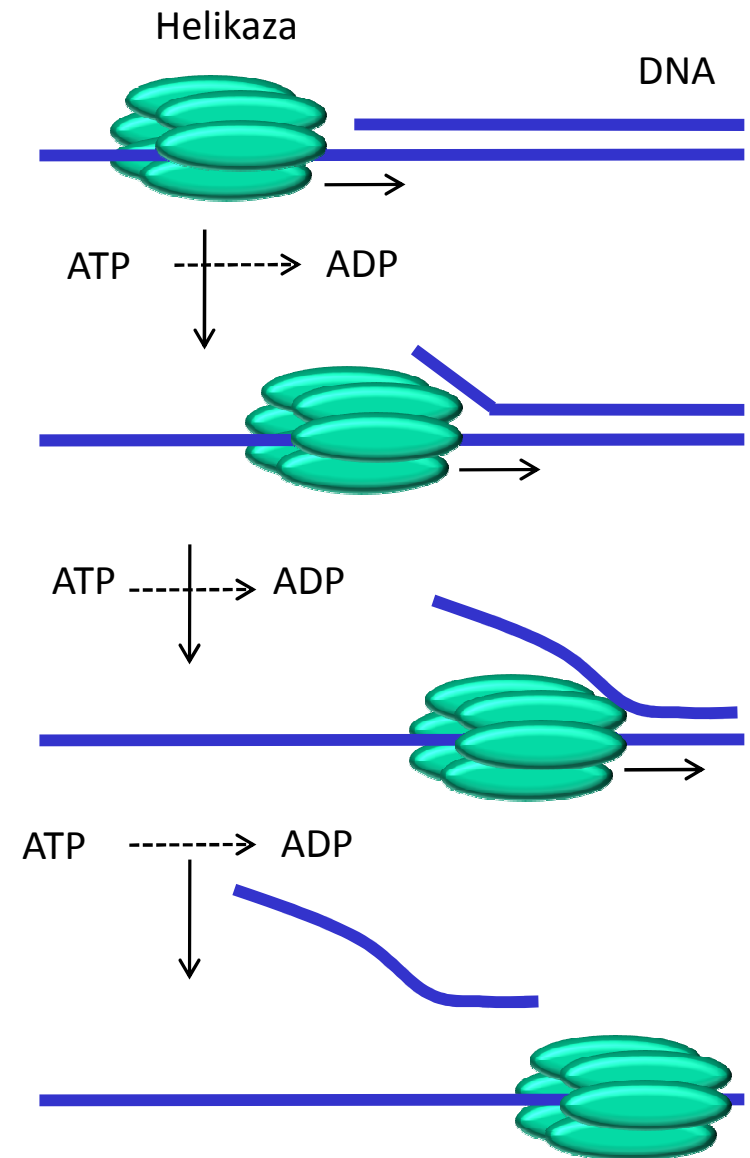
Z powodu antyrównoległego układu nici DNA i syntezy nowej nici odbywającej się w kierunku $5' \rightarrow 3'$, widełki replikacyjne są asymetryczne, tzn. jedna nić jest syntetyzowana ciągle (nić wiodąca ang. *leading strand*), a druga (nić opóźniona, ang. *lagging strand*) - w kawałkach zwanych fragmentami Okazaki.



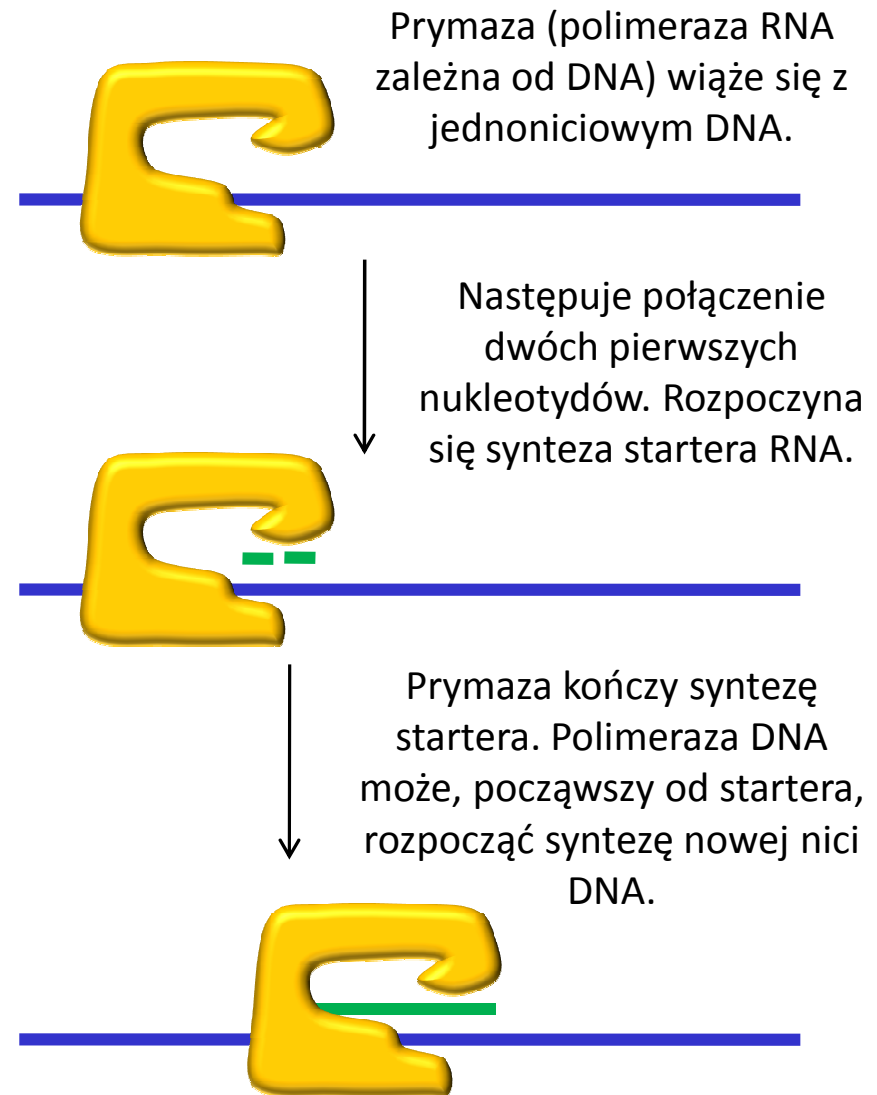
Polimeryzacja DNA jest bardzo dokładnym procesem.

Etap replikacji	Prawdopodobieństwo błędu
Polimeryzacja 5'-3' DNA	10^{-5}
Korekcja 3'-5' przez polimerazę	10^{-2}
Korekta błędów przez MRS	10^{-2}
Razem:	10^{-9}

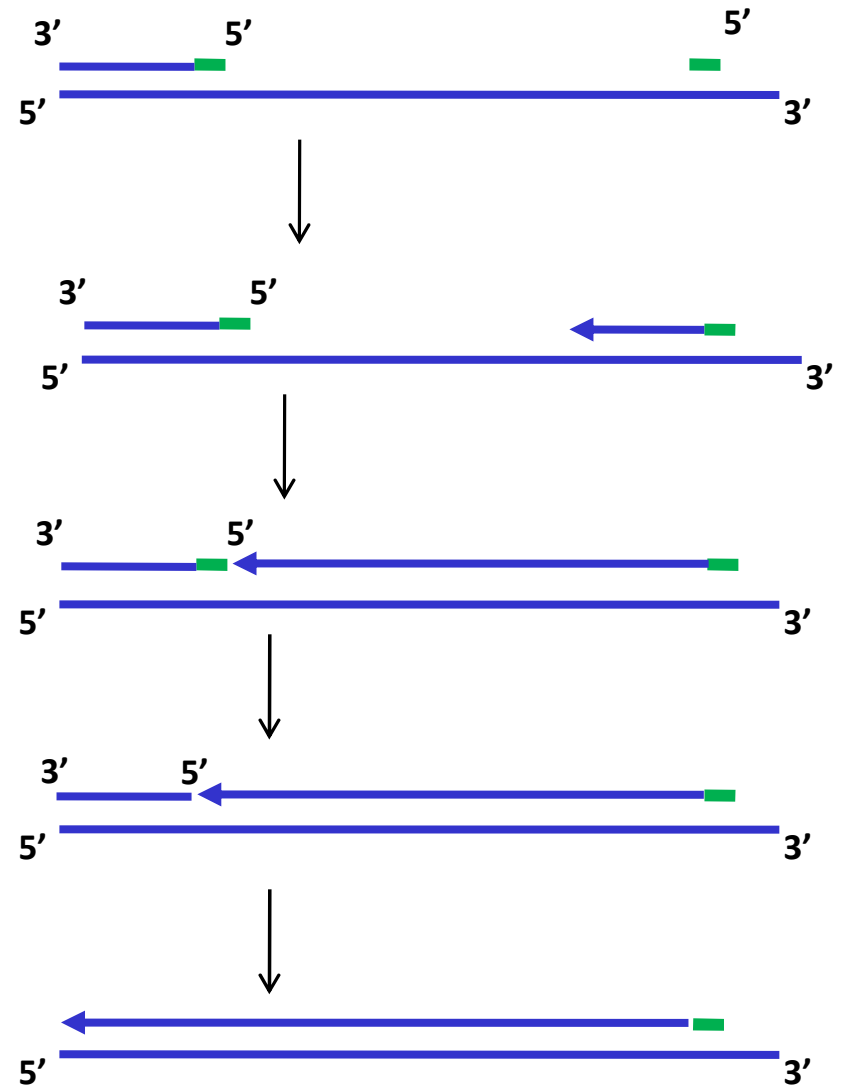
Aby mogła zajść replikacja, komplementarne nici muszą zostać rozdzielone. Proces ten wymaga dostarczenia energii. Pochodzi ona z hydrolizy ATP. Rozdzielanie jest katalizowane przez białko zwane helikazą DNA. Helikaza zwykle składa się z kilku identycznych podjednostek tworzących pierścień obejmujący jedną z nici DNA. Enzym, hydrolizując ATP, porusza się wzdłuż nici rozsuwając komplementarne pasma.



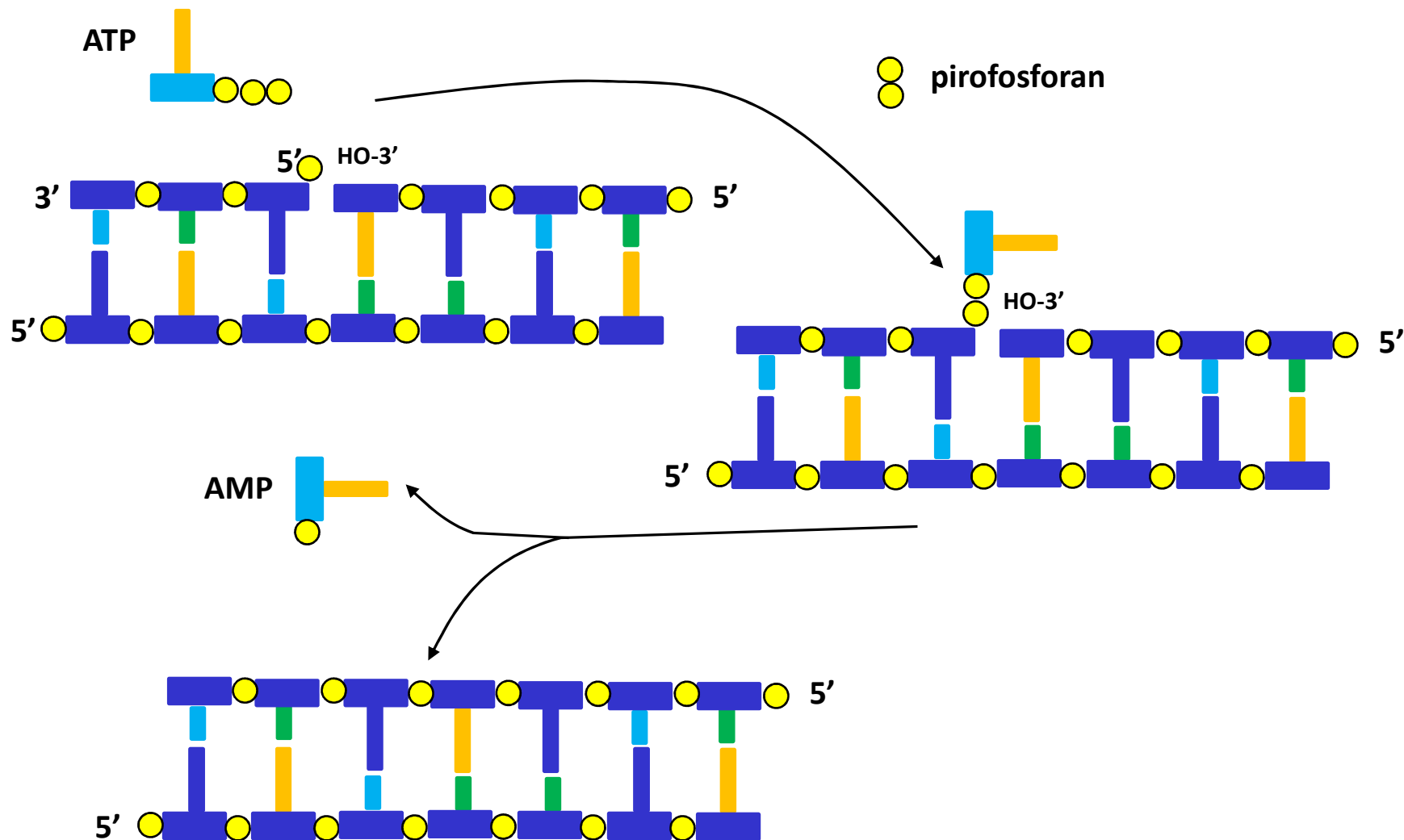
Polimeraza DNA nie jest w stanie rozpocząć syntezy komplementarnej nici od nowa. Może dobudowywać nowe nukleotydy do istniejącego już pasma DNA lub RNA sparowanego z matrycą. Początek syntezy nowej nici wymaga więc startera (ang. *primer*). Jest nim krótki (10 nt) odcinek RNA syntetyzowany przez prymazę DNA. Następnie polimeraza DNA dobudowuje do startera kolejne deoksynukleotydy.



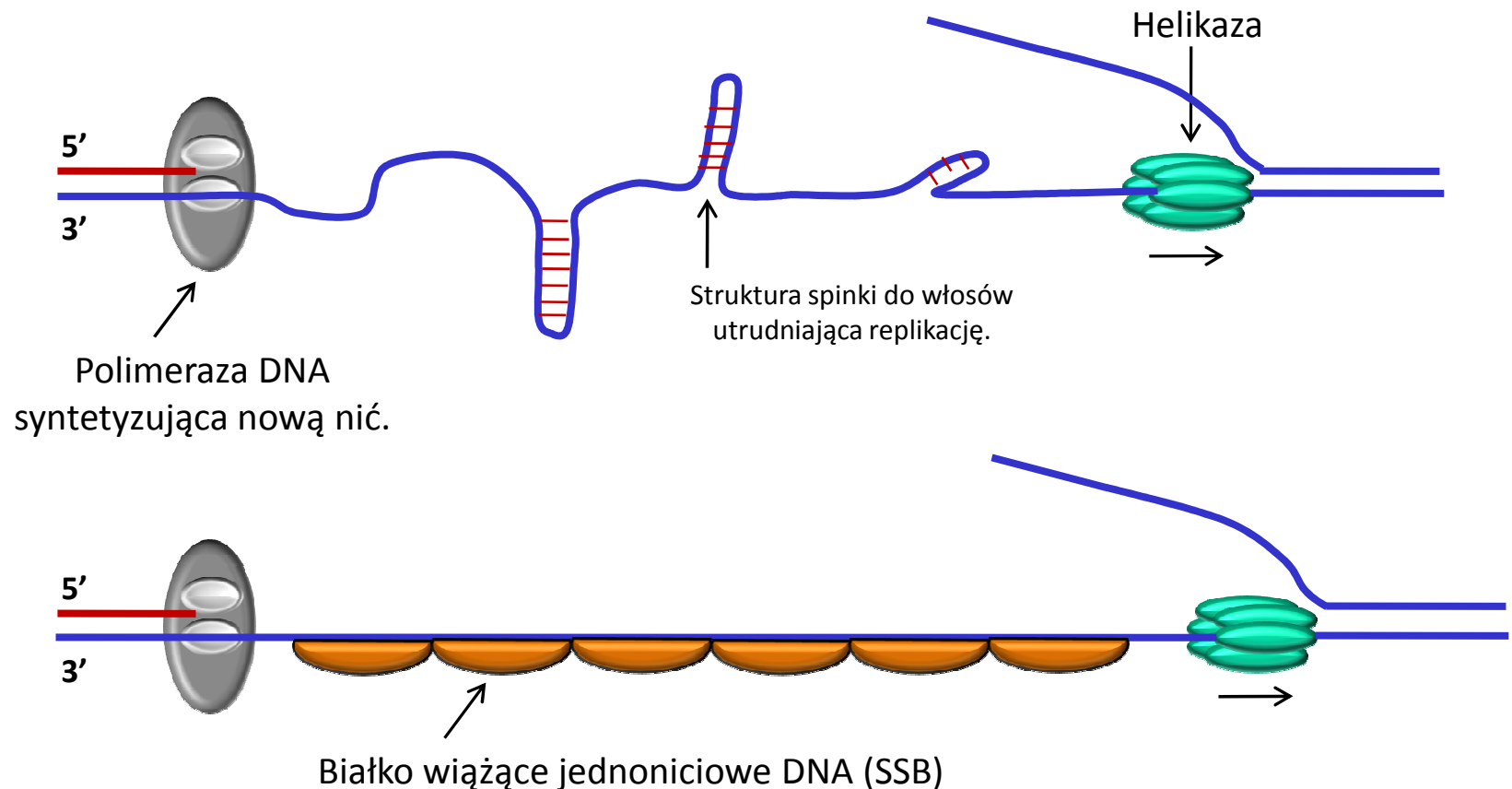
Sposób replikacji DNA na nici opóźnionej. Startery (ang. *primers*) złożone z RNA powstają co ok. 200 nukleotydów. Po wypełnieniu luk przez polimerazę DNA, startery są degradowane przez RNazę H. Polimeraza DNA znów zapełnia luki. Pasma DNA są scalone przez ligazę DNA.



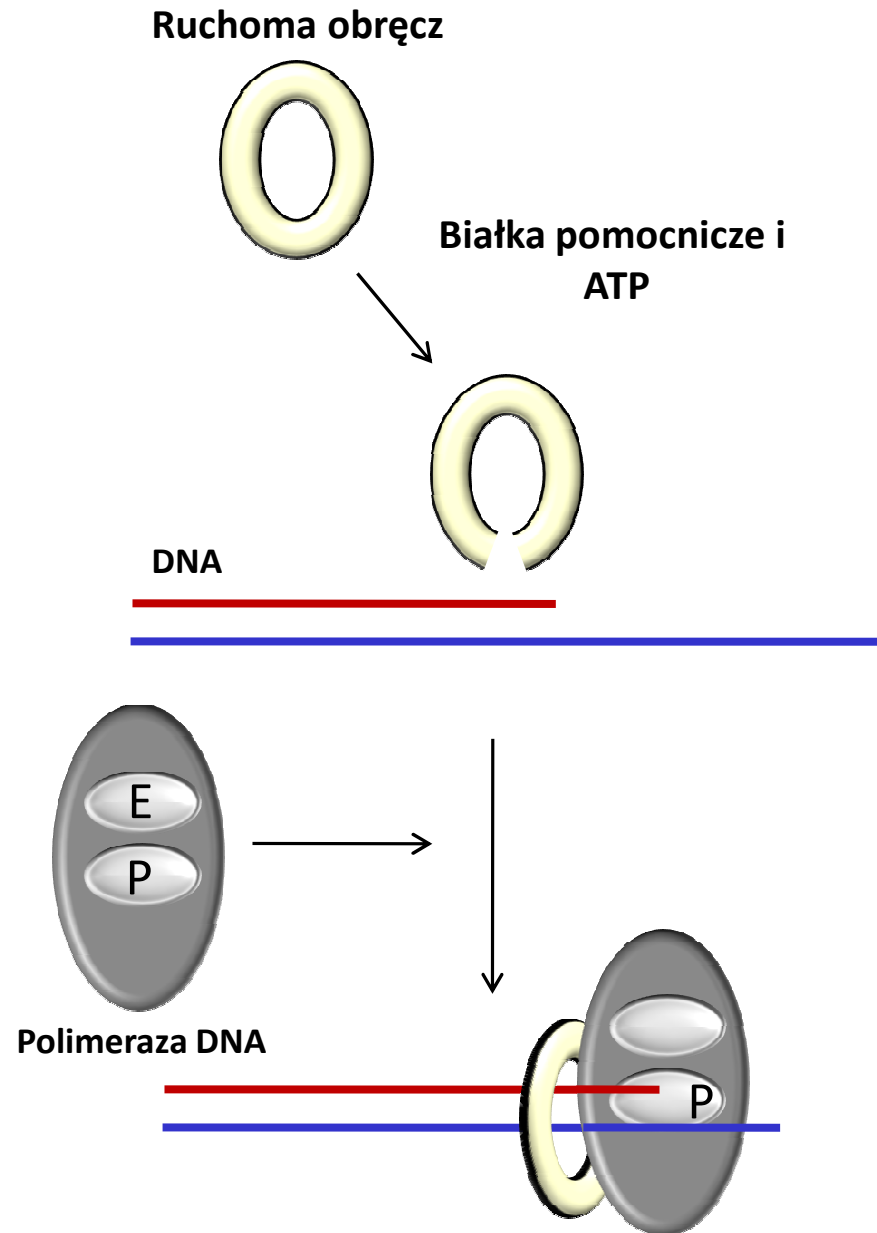
Przebieg reakcji ligacji katalizowanej przez ligazę DNA – ten enzym jest również powszechnie używany w inżynierii genetycznej.



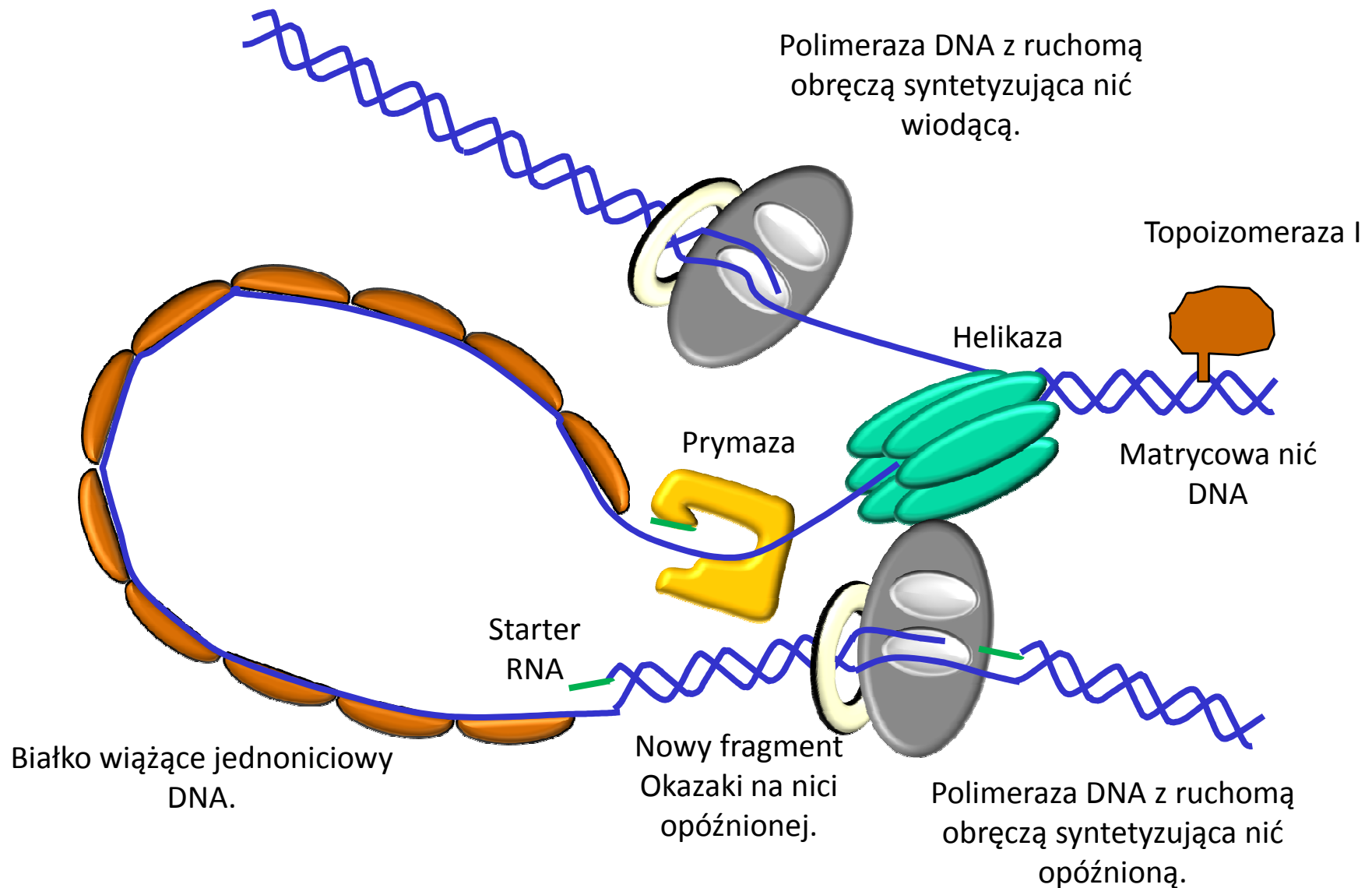
Po rozdzieleniu komplementarnych pasm przez helikazę DNA powstają fragmenty jednoniciowego DNA wykazujące tendencję do tworzenia krótkich, dwuniciowych fragmentów o strukturze spinki do włosów. Stanowią one przeszkodę dla polimerazy. Problem likwiduje białko wiążące jednoniciowy DNA (ang. *single strand binding protein* - SSB), wiążące jednoniciowe fragmenty w sposób umożliwiający polimerazie syntezę nowego łańcucha.



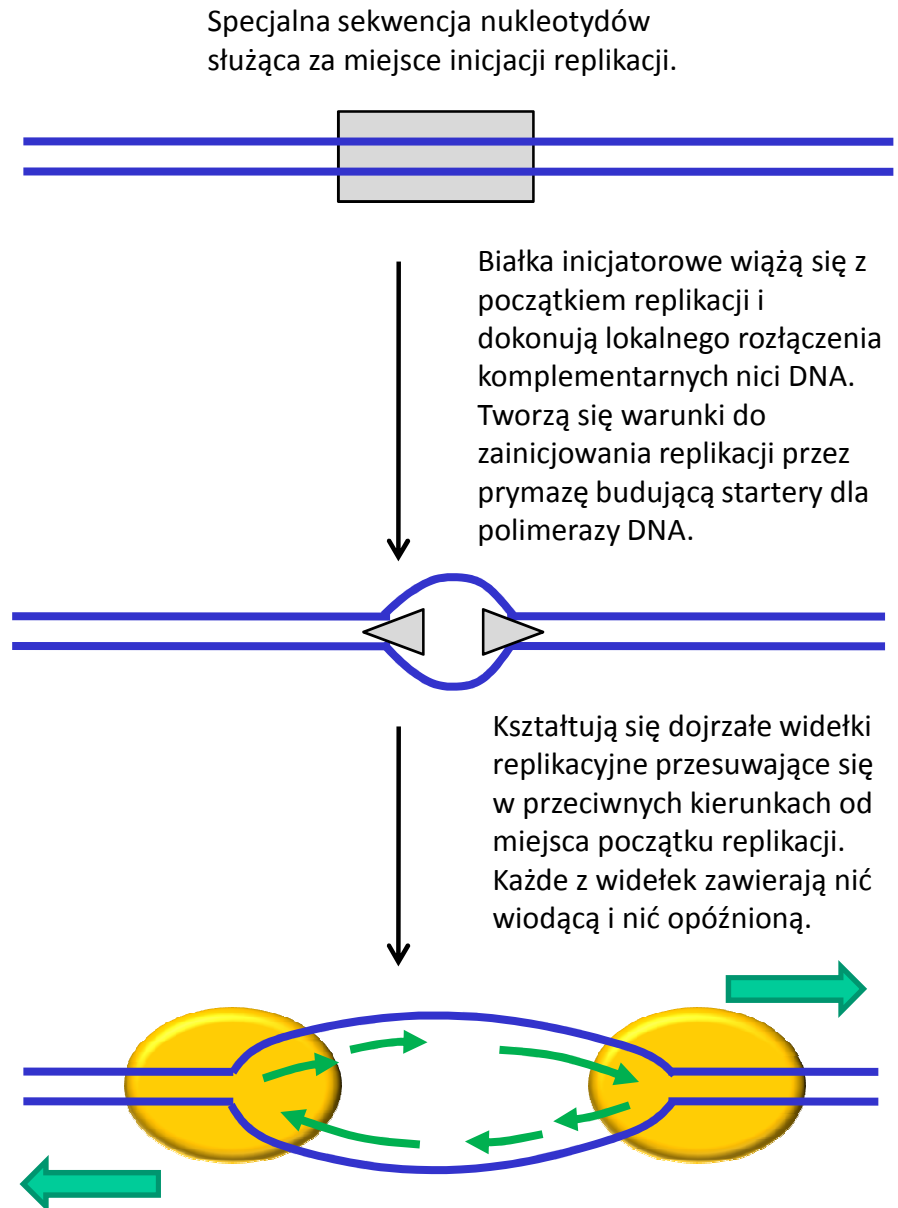
Polimeraza DNA jest utrzymywana na matrycy przez ruchomą obręcz (ang. *sliding clamp*) – chroni to polimerazę przed łatwym odpadaniem od matrycy.



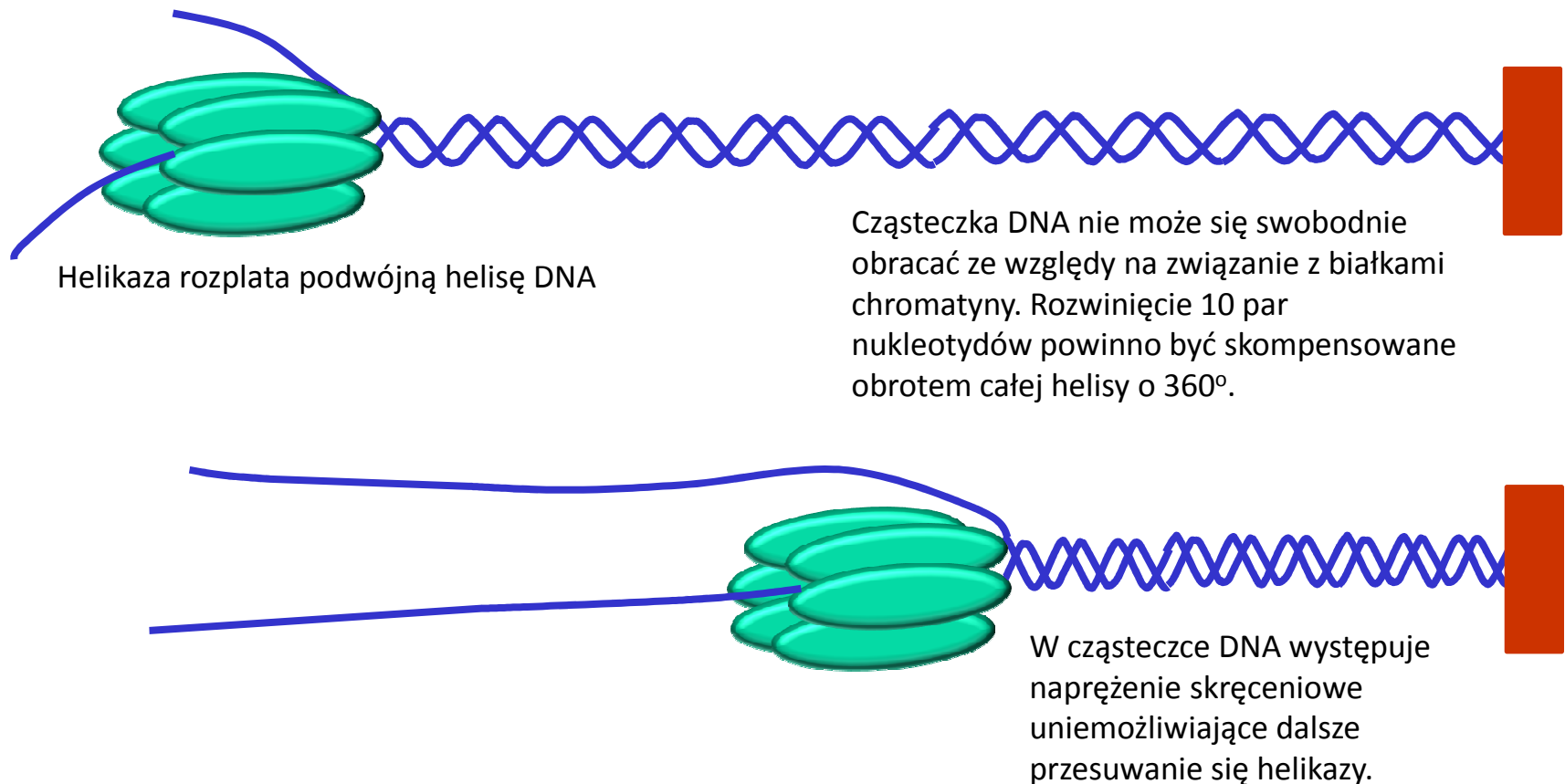
Schemat elementów obecnych w obrębie widełek replikacyjnych.



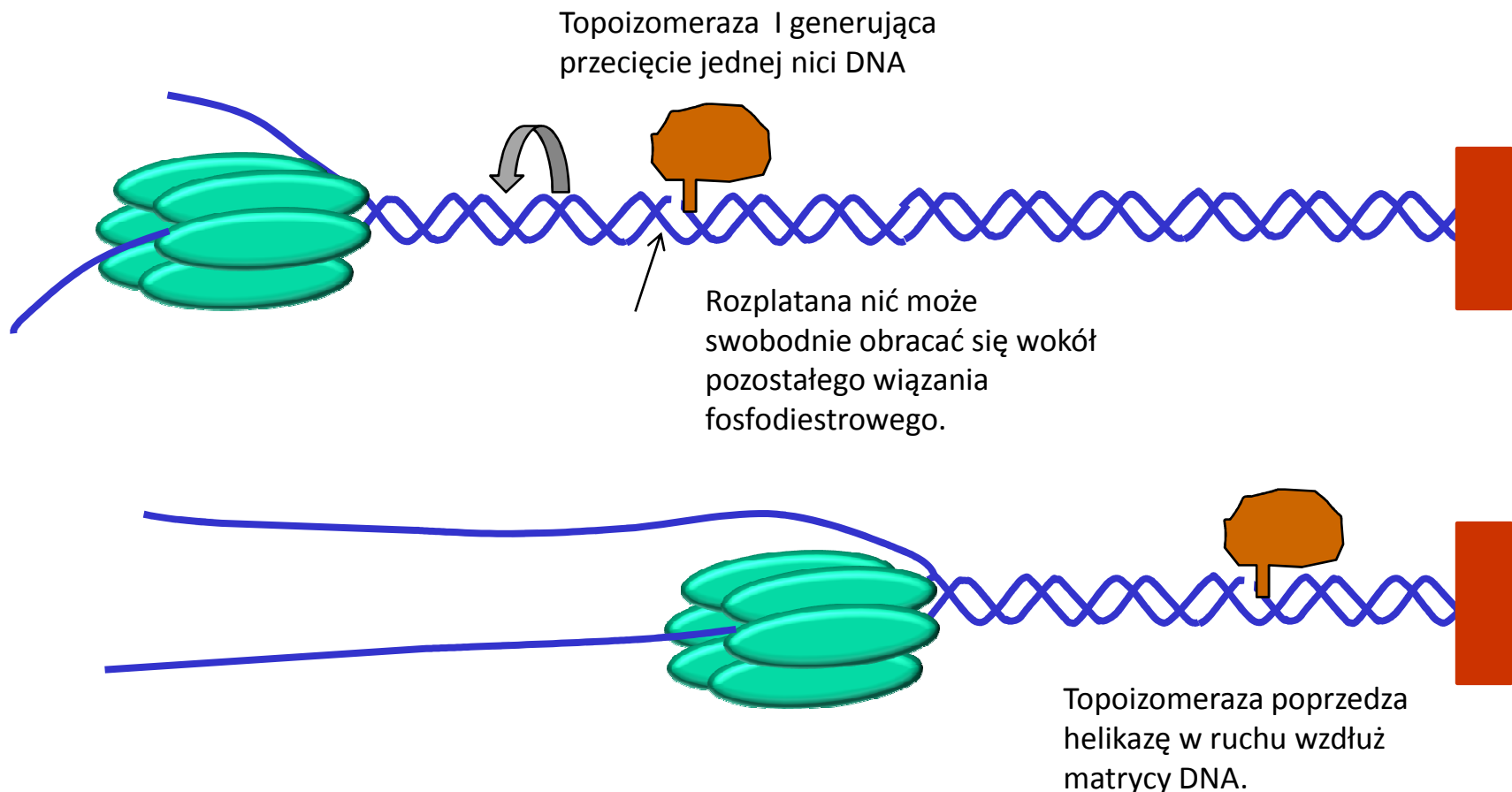
Replikacja DNA nie rozpoczyna się w dowolnym miejscu lecz w obrębie dobrze zdefiniowanych sekwencji w cząsteczkach DNA. Sekwencje te są dobrze poznane i łatwe do wyodrębnienia u organizmów prokariotycznych (bakterie) i u jednokomórkowych eukariotów (np. u drożdży). Występują również u człowieka ale są trudniejsze do zdefiniowania. Sekwencje bakteryjne (o nazwie *ori*) oraz drożdżowe (o nazwie *ARS*) służą w klonowaniu molekularnym do inicjacji replikacji plazmidów.



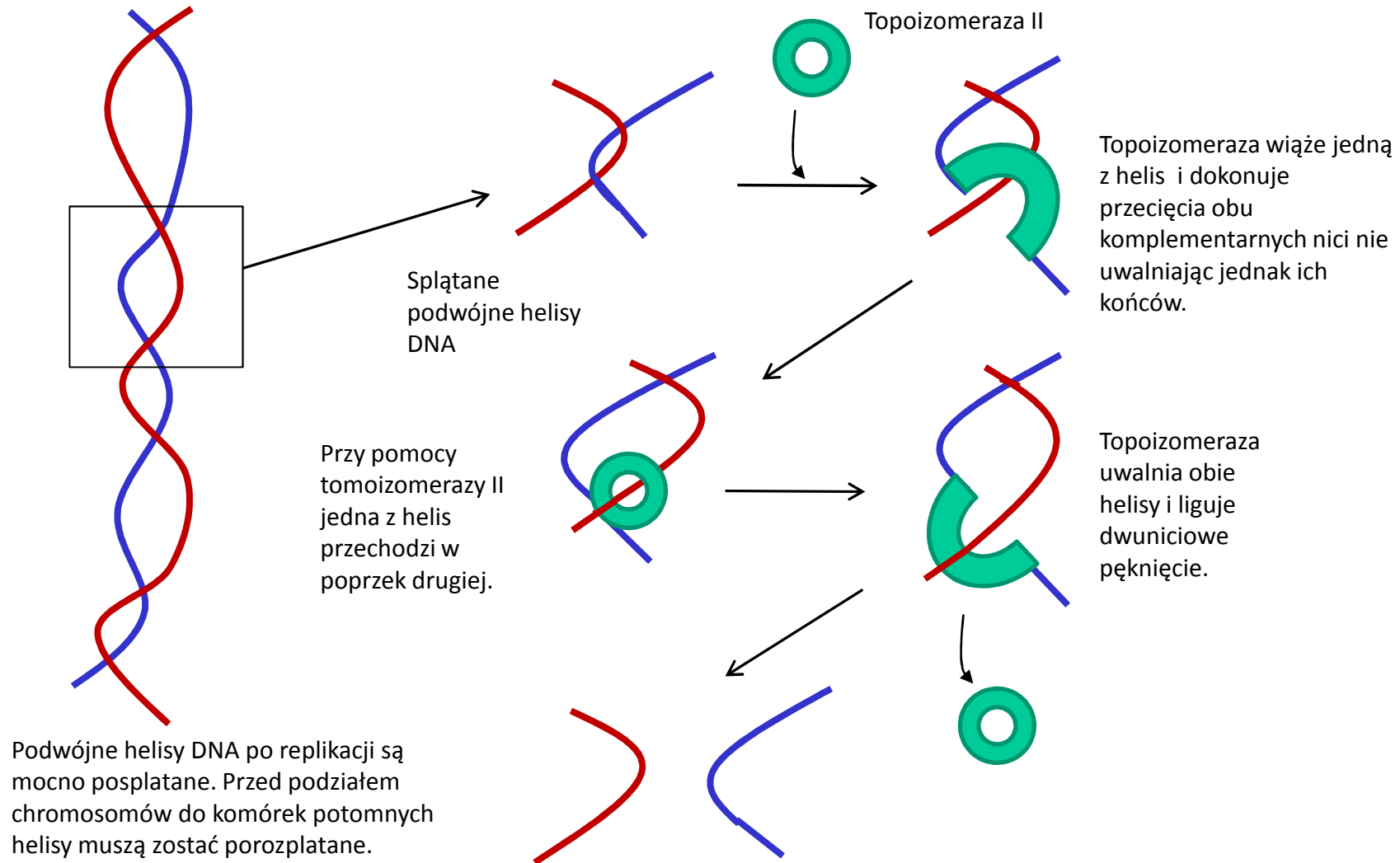
Topoizomerazy zapobiegają zaplątaniu się DNA w trakcie replikacji i rozdziału chromosomów do komórek potomnych. Rozplatanie nici DNA przez helikazę generuje tzw. skręciowe napężenie – gdy jest ono bardzo duże uniemożliwia dalsze rozplatanie. Topoizomeraza I przecinając wiązanie fosfodwuestrowe jednego z pasm umożliwia swobodny obrót wokół drugiego wiązania co likwiduje napężenie.



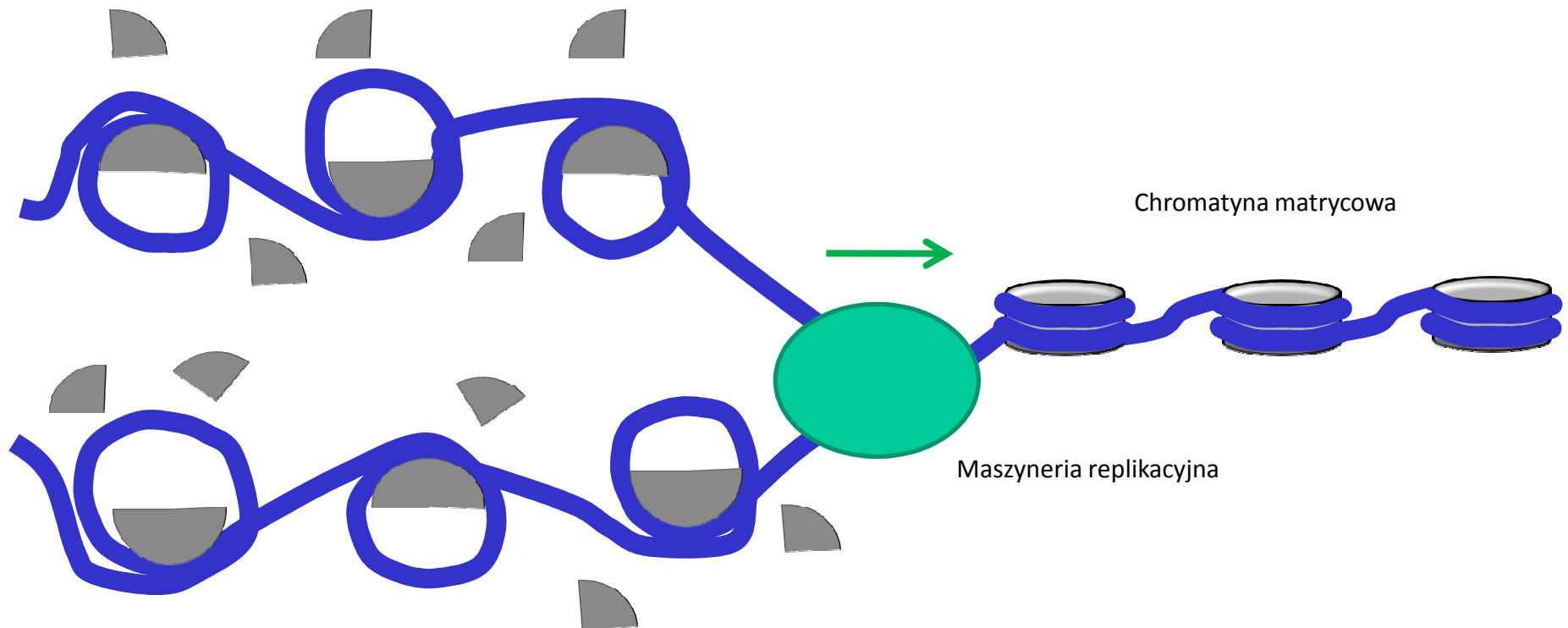
Topoizomeraza I rozwiązuje problem naprężenia skręciowego powstającego w trakcie rozplatania cząsteczki nie mogącej się swobodnie obracać. Topoizomeraza odwracalnie przecina wiązanie fosfodiesterowe jednej z nici DNA. Cała cząsteczka może swobodnie obracać się wokół wiązania obecnego na drugiej nici.



Topoizomeraza II powoduje nacięcie podwójnej nici DNA i przejście jednej cząsteczki poprzez drugą. Umożliwia to rozplątanie cząsteczek DNA. Topoizomeraza II działa jak nożyczki ułatwiające rozplatanie długiej poplątanej nici. Jednak w przeciwieństwie do nożyczek nacięcia wprowadzane przez topoizomerazę są odwracalne i nie pozostawiają śladu.



DNA ulega replikacji w towarzystwie nukleosomów. Po replikacji obie nowe cząsteczki DNA otrzymują nukleosomy z cząsteczki matrycowej. Brakujące histony zostają wyprodukowane w czasie replikacji DNA dzięki translacji licznych kopii genów kodujących białka histonowe.

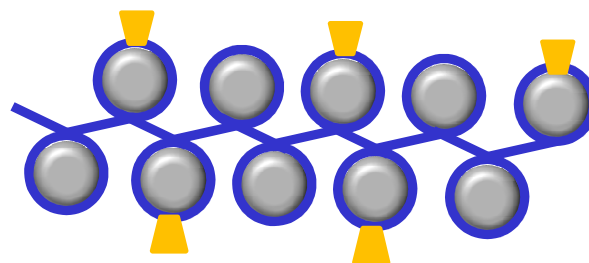
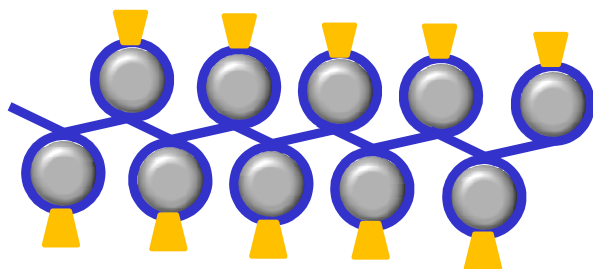


Nowo zsyntetyzowane histony uzupełniają brakujące części nukleosomów w chromatynie potomnej.

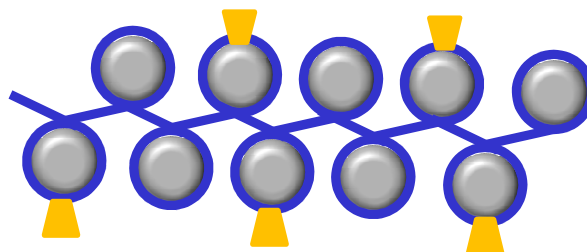
Źródło: *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Po replikacji nowe cząsteczki DNA są nawijane na dodatkowe nukleosomy, które również ulegają modyfikacjom kowalencyjnym tak aby odtworzyć pierwotny układ chromatyny.

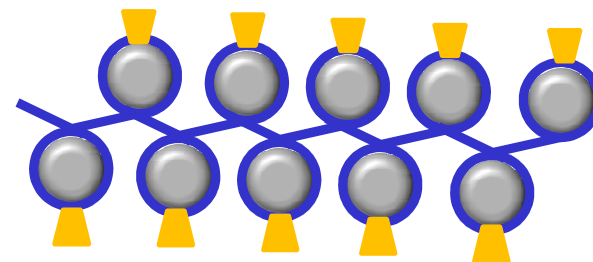
Chromatyna matrycowa ze zmodyfikowanymi histonami i (lub) zmodyfikowanym DNA



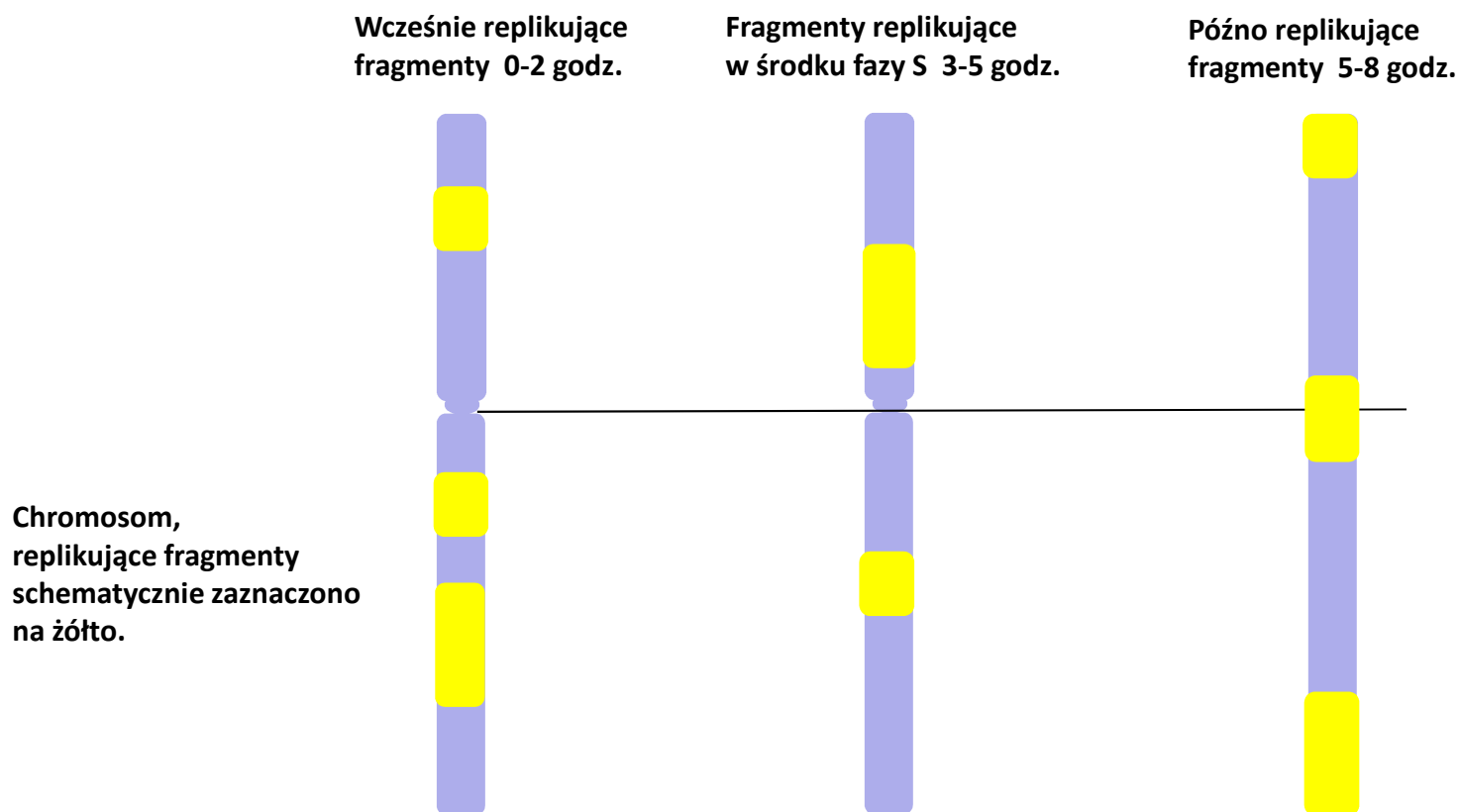
Po replikacji połowa składników chromatyny nie jest zmodyfikowana gdyż powstała *de novo*.



Enzymy odtwarzające stan chromatyny rozpoznają modyfikację starych składników i odpowiednio modyfikują składniki nowe. Po replikacji połowa składników chromatyny nie jest zmodyfikowana gdyż powstała *de novo*.



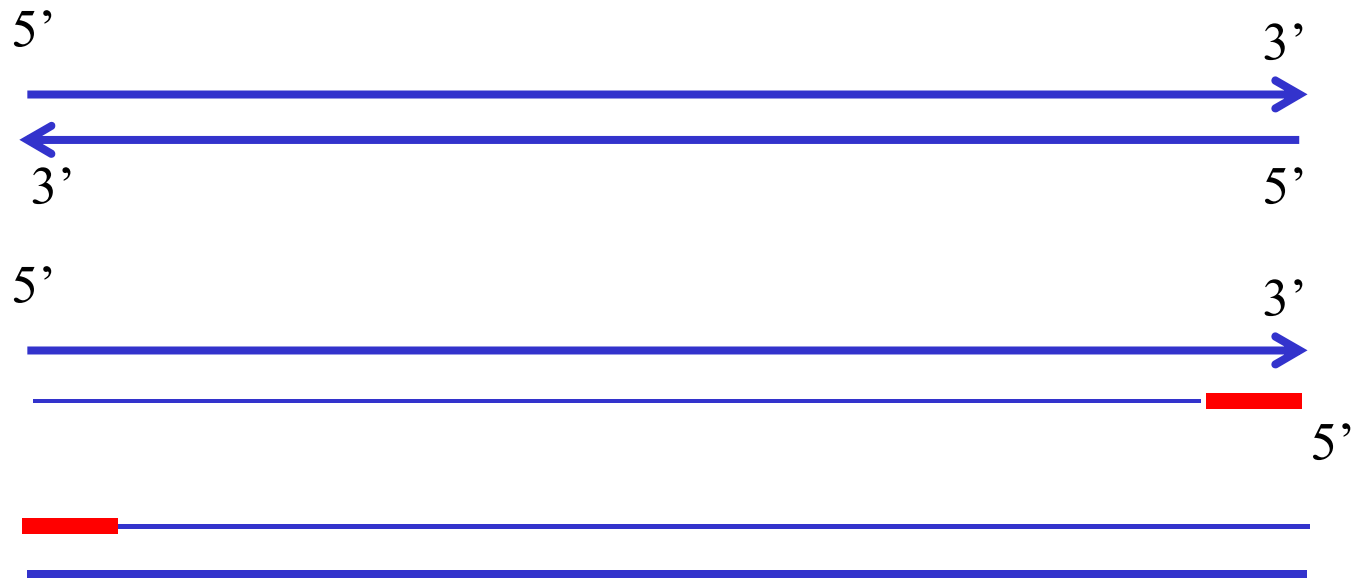
Różne fragmenty DNA ulegają replikacji w różnym czasie. Na ilustracji przedstawiono wybarwione fragmenty DNA przykładowego chromosomu ulegające replikacji w różnych fazach cyklu komórkowego. Replikacja DNA zawartego w komórce człowieka zwykle trwa ok. 8 godzin.



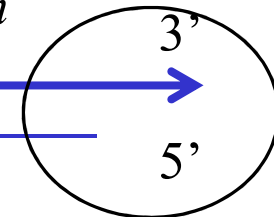
Na podstawie: *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Jak zreplikować końcówkę liniowej cząsteczki DNA.

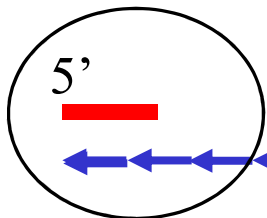
DNA



problem

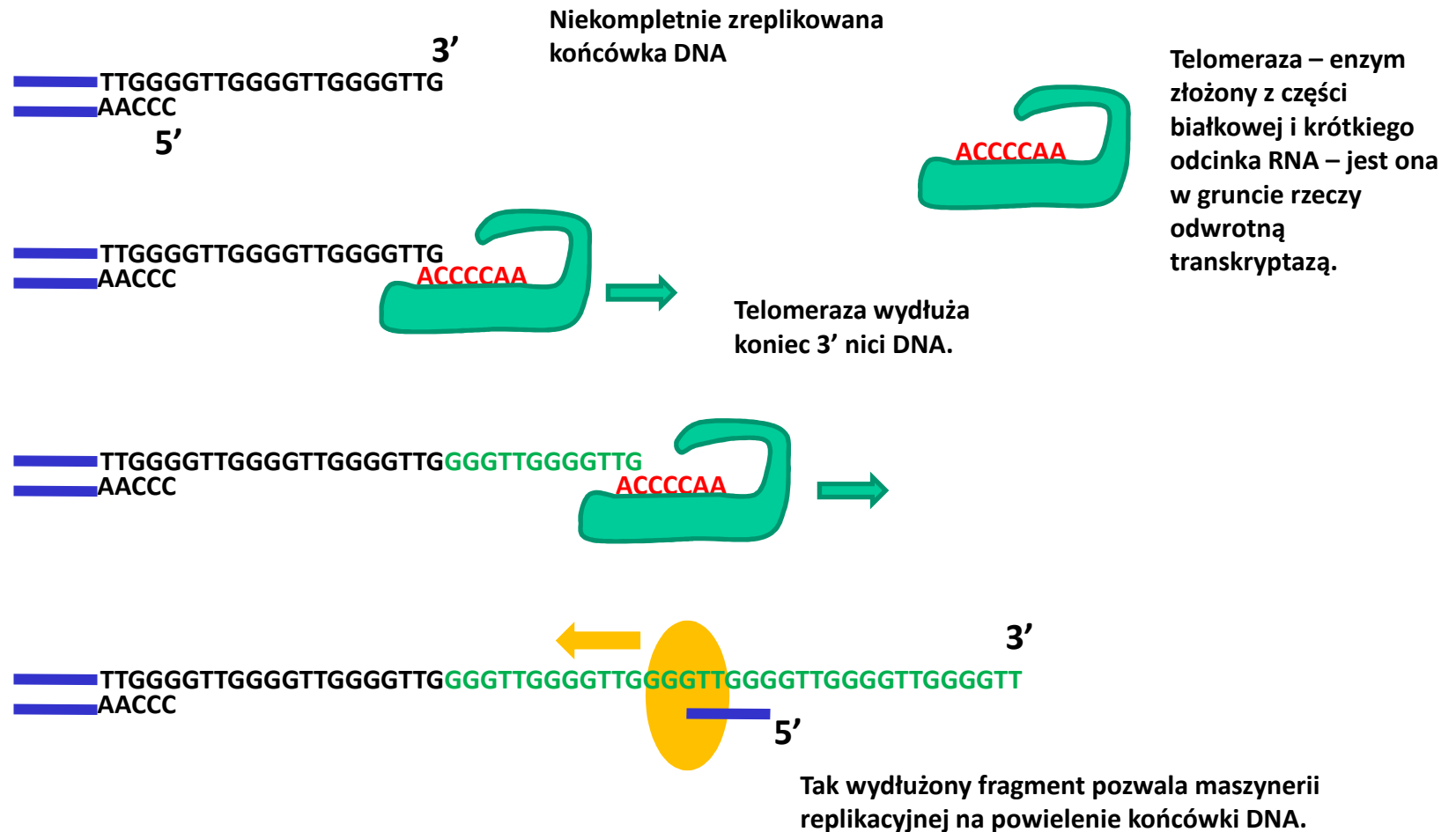


rozwiązanie

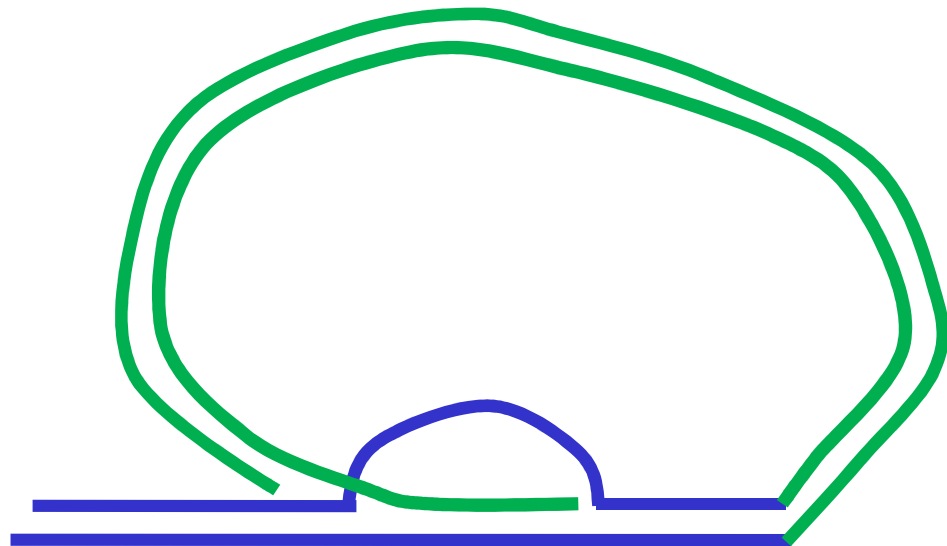


5'
3'

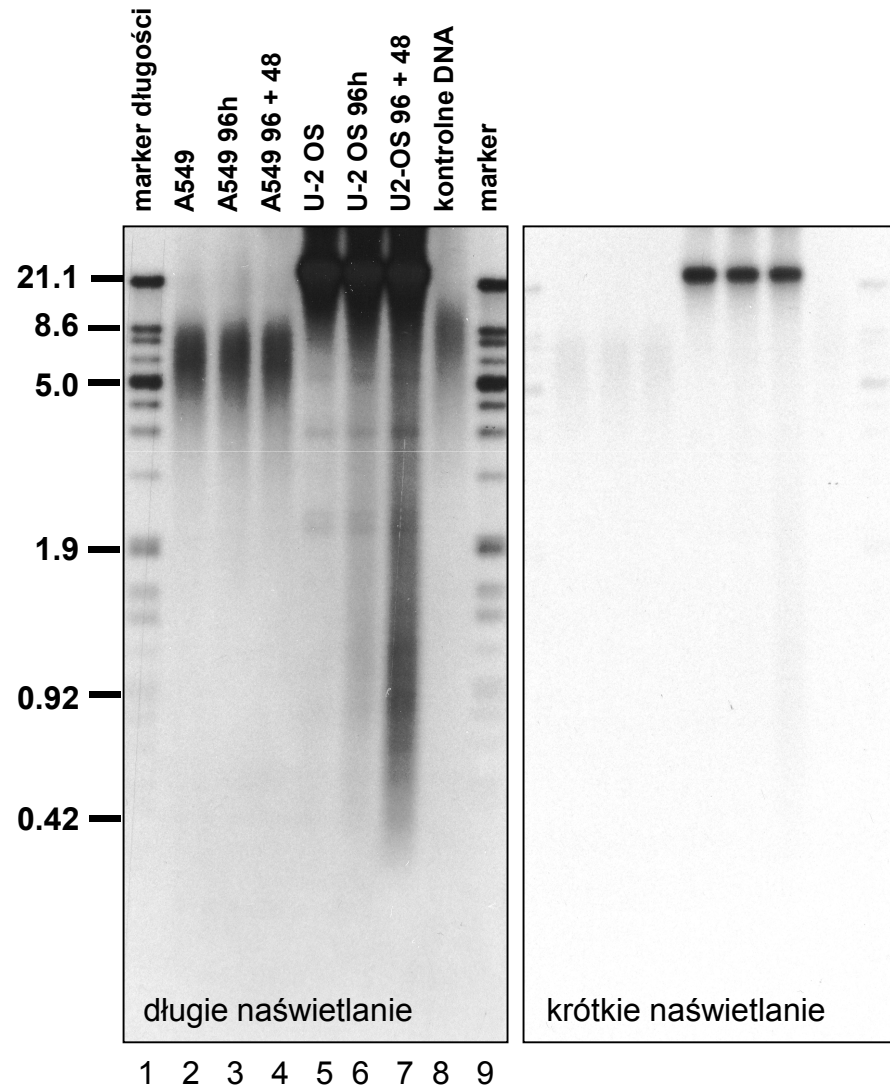
Telomeraza rozwiązuje problem replikacji końca liniowej cząsteczki DNA.



Telomery są zakończone tzw. pętlą T (ang. *t loop*) co ma odróżnić je od podwójnych pęknięć cząsteczki DNA.

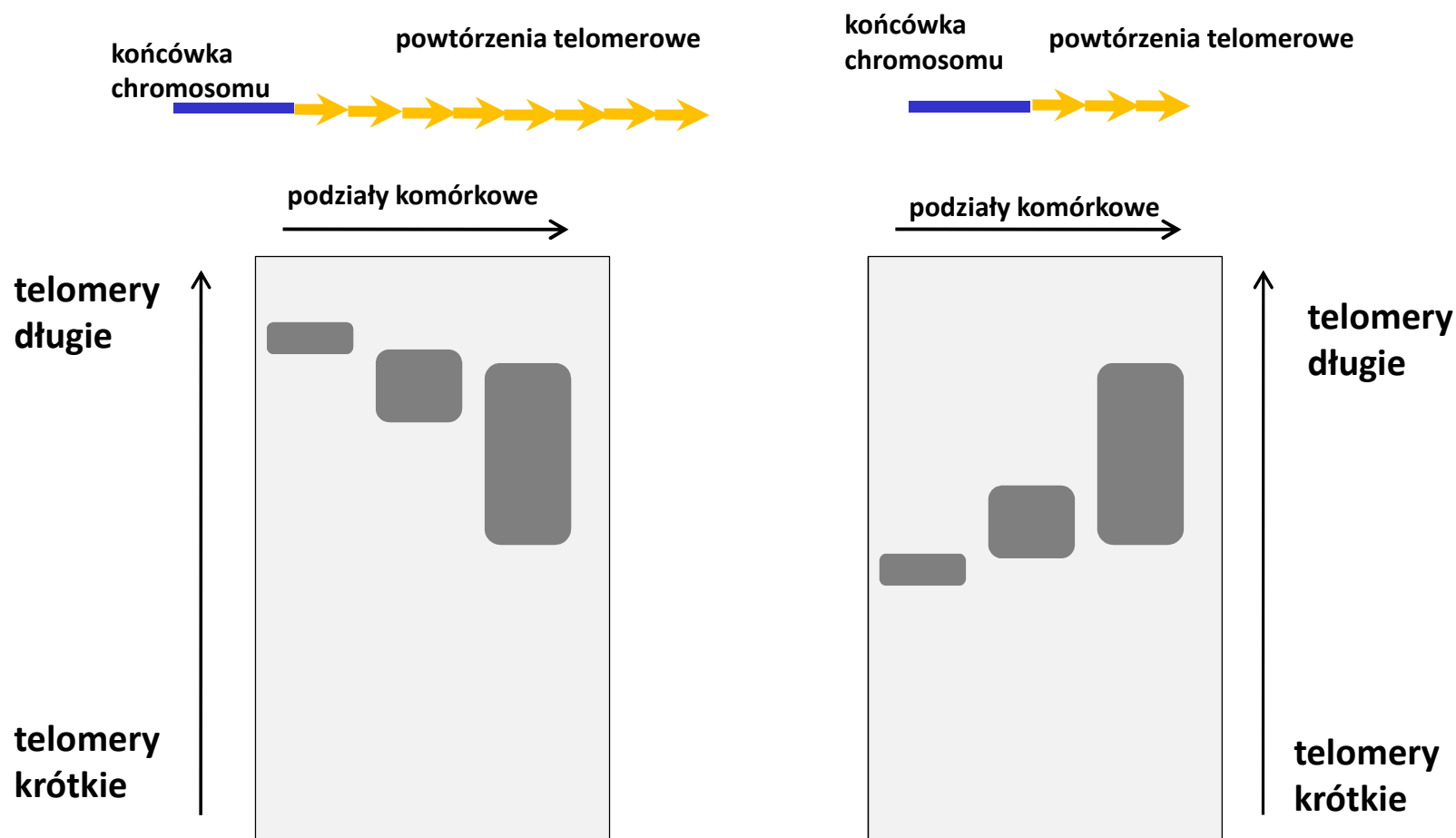


Przykład zróżnicowanej długości telomerów w komórkach utrzymujących je przy pomocy telomerazy oraz w komórkach wykorzystujących do tego celu mechanizmy rekombinacyjne.



Na podstawie: *Rusin i in.*, Mech Ageing Dev. 2009 Aug;130(8):528-37.

Schemat eksperymentu, który wykazał, że istnieje w komórce mechanizm pozwalający utrzymać optymalną długość telomerów.





KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Materiały dydaktyczne współfinansowane ze
środków Unii Europejskiej w ramach
Europejskiego Funduszu Społecznego.
