

Obsah

Replikace DNA	1
Replikační počátky	7
Iniciace replikace	9
Replikace u bakterií	13
Replikace u eukaryot	18
Terminace replikace	23
Buněčný cyklus	25
Replikace organelárních genomů	27

Replikace DNA

- = vznik dvou stejných dceřiných kopií (replik) z jedné mateřské molekuly NK
- princip replikace navržen Watsonem a Crickem na základě modelu dvoušroubovice DNA se dvěma antiparalelními řetězci
- *jak se mohou replikovat tak dlouhé molekuly s přesností na jednu bázi?*
- *jak replikace začíná a jak pokračuje po celé délce chromozomu, respektive po celém genomu?*
- *jak je dosaženo jen jedné replikace genomu během buněčného cyklu? proč existují a jak jsou regulovány výjimky z tohoto pravidla?*
- *které enzymy a buněčné struktury se replikace účastní a jak to, že se vše nezvratně nezamotá? jak jsou opravovány případné chyby?*
- *jak funguje přesné dělení (segregace) chromozomů mezi dceřinými buňkami?*
- odpovědi na tyto otázky se stále upřesňují, není ale vše úplně přesně jasné
- 3 základní fáze
 - *iniciace*
 - *elongace*
 - *terminace*
 - toto dělení není vždy úplně přesné a správné (důvodem pro toto dělení je to, že fáze jsou vždy trochu jinak regulovány a regulace mají různou váhu; obvykle hlavní váha všech regulací jde na *iniciaci*)
- **enzymová syntéza NK probíhá vždy ve směru od 5' konce k 3' konci nového řetězce**
- prekurzory: **5'(deoxy)ribonukleosidtrifosfáty** (5' fosfáty) (=5'dNTP; u RNA 5'DTP)
 - makroergní vazba mezi α fosfátem a pyrofosfátem je využita na zařazení nukleotidu do řetězce, protože syntéza NK je velmi energeticky náročná
 - nukleosidtrifosfát ztrácí při reakci terminální dvě fosfátové skupiny
- *proč syntéza probíhá ve směru 5'->3'?*
 - 5' – fosfát
 - 3' – -OH očko
 - prekurzor: 5'-nuklosidtrifosfát, který má na jedné straně 3 fosfátové skupiny (touto 5' stranou se navazuje na 3'-OH skupinu předchozího nukleotidu) a na druhé straně volné -OH očko
 - zařazení nukleotidu -> odštěpení pyrofosfátu (z 5' konce zařazovaného nukleotidu se uštěpí 2 fosfáty a zůstane jen jeden, který spojuje předcházející a nově zařazený nukleotid)

- Fosfát tvoří fosfodiesterovou vazbu s 3'-OH očkem (resp. 3-OH skupina atakuje fosfátovou skupinu dNTP)
 - G reakce vzniku fosfodiesterové vazby je však nízká a tato reakce je vratná
 - Aby byla kinetika reakce posunuta směrem k tvorbě řetězce, je pyrofosfát štěpen pyrofosfatázou -> uvolní dostatečné množství volné energie na to, aby byla syntéza DNA prakticky nevratná
- pokud buňka potřebuje syntetizovat novou DNA, při které má navazovat nové nukleotidy na volné 3'-OH očko (tedy ne syntéza de novo), je potřeba, aby toto OH očko bylo „čerstvé“ – -OH skupina je reaktivní; ve většině případů, kdy dochází k syntéze DNA na základě očka, prvním krokem je syntéza primeru (s 3'OH očkem) nebo odštěpení několika nukleotidů (popř. rozštěpení existujícího řetězce DNA) tak, že vzniká -OH očko
- možno představit si tento proces jako normální biochemickou reakci, kde máme substrát, enzym a produkt:
 - substrát: deoxynukleosidtrifosfáty, templát
 - produkt: nově vznikající řetězec, pyrofosfát
 - inhibice enzymové reakce: nedostatek substrátu, hromadění produktu (popř. inhibitory); produkt musí být odčerpáván nebo přeměňován
 - replikující se buňka se musí na replikaci připravit tím, že se naplní nukleosidtrifosfáty -> systém na syntézu prekurzorů běží naplno
 - odstraňování produktu: *recyklace pyrofosfátu* (labilní molekula, která je v prostředí buňky rychle hydrolyzována)
 - součástí replikujícího enzymového aparátu jsou *pyrofosfatázy* -> odštěpení pyrofosfátu -> enzymová kinetika se překlápe na stranu syntézy
 - (nepředstavovat jako kuličkovou molekulární biologii – přijde kulička A, narazí do kuličky B, udělají kuličku C a jdou ke kuličce D – blbost, děje jsou dynamické, stochastické, jde o biochemické reakce – enzymové děje, mají svoji vlastní kinetiku, jsou ovlivňovány základy enzymatických reakcí, koncentrací substrátu, produktu apod., role allosterických regulací)
- replikace běží velmi rychle (např. replikace bakteriálního chromozomu trvá 40 minut)
- řada DNA polymeráz má kromě schopnosti syntetizovat nový řetězec (*polymerační aktivita*) ještě 3'-exonukleázovou aktivitu (= umí z jednoho konce odbourávat nukleovou kyselinu: 3'-exonukleázová aktivita = odbourává se nukleová kyselina z 3' konce, 5'-exonukleázová aktivita = odbourává se nukleová kyselina z 5' konce); opravná aktivita – umí opravit chyběně zařazený nukleotid (pokud špatně páruje, vyjme ho a vymění za správný)
 - 5' 3' exonukleasová aktivita umožňuje DNA polymerase syntetizovat a před sebou odbourávat řetězec, vyskytuje se např. u bakterií DNA Pol I, úpravy Okazakiho fragmentu
 - 3' 5' exonukleasová aktivita (*opravná* = “*proofreading*” *aktivita*)
 - opravná aktivita funguje tehdy, když DNA-polymeráza rozpozná špatně párující nukleotid
 - princip: DNA polymeráza sestává ze dvou podjednotek, který mezi sebou navzájem soutěží (polymerasová aktivita + exonukleasová aktivita). Když je třeba z důvodu tautomerie připojená jiná báze, tak DNA začíná tát -> dominantní se stane exonukleasová aktivita a chyběný nukleotid odštěpí. Pro polymerázovou aktivitu DNA Pol je naopak vhodným substrátem plně komplementární řetězec

- rozpoznání se děje pomocí 2 aktivních míst: na jedno se váže nový nukleotid (= *syntetické místo*) a na druhé se váže špatně párovaný nukleotid (= *exonukleázové místo*)
- **enzymy katalyzující syntézu NK**
 - (pozn. u Pospíška dependentní = programované – DNA programované DNA polymerázy)
 - *DNA dependentní DNA polymerázy* (klasické DNA polymerázy)
 - *RNA dependentní DNA polymerázy* (= polymerázy syntetizující DNA podle RNA templátu – telomeráza, reverzní transkriptázy)
 - *DNA dependentní RNA polymerázy* (transkripcie)
 - *RNA dependentní RNA polymerázy* (replikace virových RNA)
 - RNA polymerázy produkují transkripty; nepotřebují pro zahájení činnosti očko (ty RNA polymerázy, které se účastní transkripce, žádné očko nepotřebují – buňka potřebuje regulaci nějakého genu, transkripcie začíná sestavením transkripčního aparátu a zahájením transkripce, nikdy ne tvorbou primeru)
 - DNA polymerázy vždy vyžadují očko (primer) (nezahajují syntézu de novo)
 - mohou nést exonukleázové aktivity -> *opravná = proofreading aktivita*
 - všechny výše uvedené polymerázy potřebují pro svoji činnost předlohy – templát
 - **enzymy syntetizující DNA nebo RNA bez předlohy** (nejsou programované)
 - *terminální nukleotidyl transferáza* (role při tvorbě protilátek -> jejich vyšší variabilita, nespecificky vkládá nukleotidy do genů pro imunoglobuliny, tvorba DNA bez předlohy)
 - *polyA polymeráza* (tvorba RNA bez předlohy – syntetizuje poly A na 3' konci mRNA)
 - *tRNA-CCA nukleotidyl transferáza* (přidává na konec tRNA CCA sekvenci)

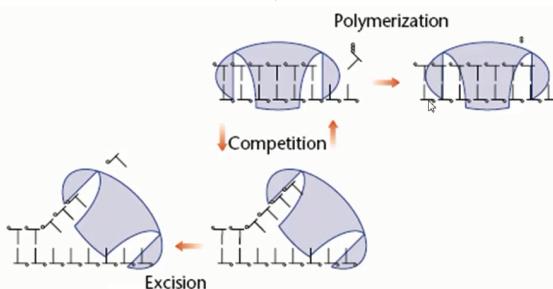


Figure 1 Exonuclease and polymerase active sites compete for binding of the primer terminus. (The exo site is on the left and the pol site is on the right, as drawn.) The primer 3' end generally binds in the pol site, allowing polymerization to occur. Binding in the exonuclease active site is favoured when the primer strand separates from the template strand and presents itself as a short stretch of single-stranded DNA. Separation of the two strands is more likely when base pairs are not correctly matched, biasing exonuclease activity towards excision of mismatches. The small circles represent the phosphates on the dNTPs and the released inorganic pyrophosphate following nucleotide incorporation.

- Exonukleázová a polymerázová strana soutěží o vazbu na primer. Naváže-li se primer 3' koncem na pol stranu, nastává polymerizace. Vazba na exonukleázové straně je upřednostňována, když se primerový řetězec oddělí od templátového řetězce a současně se natáhne jako krátká jednovláknová DNA. Oddělení dvou řetězců nastává, když páry bazí nejsou správně spárovány. Dojde k přerušení exonukleázové aktivity a nastává vystřížení nesprávných spojení.. Po inkorporaci nukleotidu se uvolňuje anorganický pyrofosfát
- důvod k chybnému zařazení bázi: *tautomerie bází* (o tom psali už Watson s Crickem – ve svém modelu vychází z toho, že se báze vyskytuje zejména v keto a amino formách; *tautomerie* – enol a imino forma -> rychlé změny, mohou se velice rychle měnit zpátky;

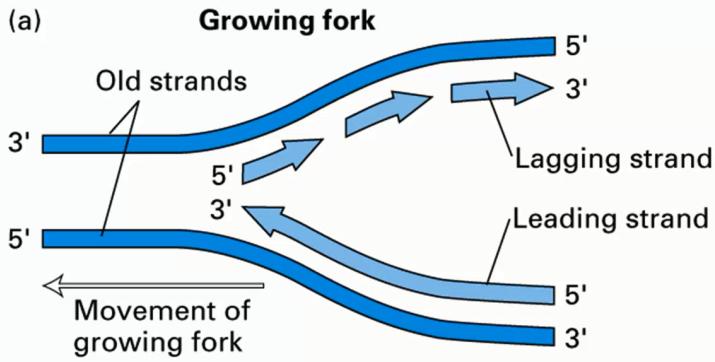
substrát pro aktivní místo polymerázy vypadá jinak a může být méně dobrým substrátem pro polymerázu, ale lepším substrátem pro aktivní místo exonukleázy, která je součástí stejného enzymového komplexu jako polymeráza)

- pravděpodobnost přesmyku báze na enol nebo imino formu – 10^{-4}
- hra mezi podobou substrátu na straně enzymové reakce a podobou produktu může záviset na tom, zda bude převažovat syntéza nebo opravná aktivita; kompetice a větší afinita k jednomu nebo druhému typu substrátu
- *proč viry rychle mutují* – RNA polymerázy RNA virů nemají opravnou aktivitu
- *důkaz proofreading aktivity DNA polymerázy*
 - srovnání jednotlivých konzervovaných domén v proofreadingové aktivitě enzymů (i velmi vzdálených nepříbuzných organismů)
 - objevena značně konzervovaná oblast; zbytek kyseliny asparagové – konzervován a přítomen v exonukleázových doménách naprosto u všech organismů -> vybrán pro analýzu
 - mutace na alanin – *alanine-scanning* (relativně častý způsob, jak něco analyzovat)
 - -> rekombinantní myši – heterozygotní / homozygotní v této pozměněné polymeráze
 - aby bylo něco vidět, museli je 18 měsíců sledovat
 - homozygotní myši: v průměru umíraly po 10 měsících, u řady z nich se vyvinuly nádory
 - heterozygotní / wildtype: nic se nedělo, nízké množství nádorů
 - -> pokud poškodíme v savčím genomu opravnou aktivitu polymerázy delta, má to zásadní význam pro vznik mutací a dalších patologií
 - mutace v aktivním místě polymerázy (v místě s polymerázovou aktivitou, které provádí replikaci)
 - očekávání: nebude probíhat replikace -> myšky se vůbec nenařodí; otázka, jak moc bude polymeráza nefunkční
 - pokusy se dvěma mutacemi v tomto aktivním místě: záměna leucinu za glicin (méně závažné), záměna leucinu za lysin (závažné, obrovská změna)
 - homozygoti – úmrť již v embryu u obou variant mutací
 - heterozygot – nic moc se nedělo (zvýšení nádorovosti), myš se ale narodila a nějakou dobu žila (-> máme-li dvě kopie DNA polymerázy, jedna je vadná a druhá v pořádku, správná kopie je schopná sama fungovat, replikace probíhá)
 - -> Mutace na polymerázové straně myší DNA polymerázy δ vnáší genomovou nestabilitu a akceleruje tumorigenezi
- *replikace DNA je semikonzervativní (Meselson, Stahl – 1958)*
 - konzervativní replikace – dvouřetězec DNA -> mateřský dvouřetězec a dceřiný dvouřetězec (na každém dvouřetězci obě vlákna stejně stará)
 - semikonzervativní replikace – na vznikajících dvouřetězcích je jedno vlákno mateřské a jedno dceřiné
 - replikace mitochondriální DNA – rychlá rekombinace mezi genomy -> úvahy o tom, zda replikace mitochondriální DNA není disperzní (zda polymeráza nepřeskakuje z jednoho řetězce na druhý)
 - *experiment dokazující semikonzervativní replikaci – Meselson, Stahl – 1958*
 - kultivace bakterií na normálním živném médiu -> izolace DNA -> analýza v *izopiknickém gradientu* (cesium chloridu) (= centrifugace v nějakém gradientu, kde se látky uspořádají podle vznášivé hustoty -> vznikne gradient hustot, po dlouhé době centrifugace se molekuly soustředí v místech stejné vznášivé hustoty)

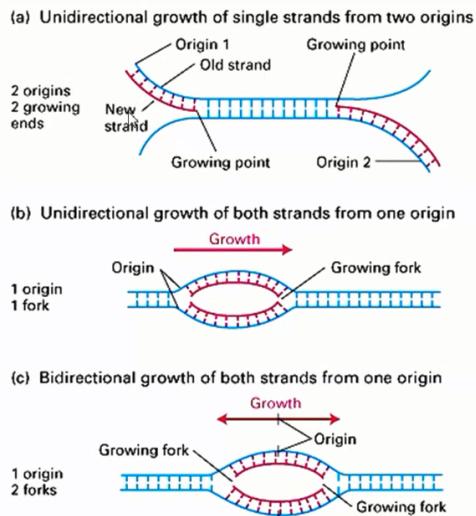
- místo zdroje dusíku do média dali zdroj dusíku obsahující těžký izotop dusíku -> izolace DNA -> analýza stejným způsobem -> vznášivá hustota je těžší (-> byli schopni od sebe oddělit DNA bakterií z média s normálním dusíkem a DNA bakterií z média s těžkým dusíkem)
 - -> příprava synchronní kultury (bakterie z normálního + bakterie z těžkého dusíku) do normálního média: většina bakterií v kultuře se dělí současně
 - 1. generace – po izolaci DNA získali proužek někde mezi (vznášivá hustota byla někde mezi vznášivou hustotou bakterií z média s těžkým a normálním dusíkem) (-> muselo tedy dojít k zakomponování ^{14}N – lehkého izotopu dusíku – DNA do DNA následující generace a to zhruba z poloviny – z tohoto byla vyvozena semikonzervativní replikace)
 - 2. generace – proužek se udržel z předchozí generace + vznikl další proužek (odpovídal kultivaci na médiu s lehkým izotopem)
 - po 10 generacích – obrovské množství DNA by bylo v proužku odpovídajícím lehkému dusíku, v ideálním případě by zůstávalo stále stejné množství DNA v tom „mezistavu“
 - -> semikonzervativní replikace
- *vsuvka – isopiknická x isokinetická sedimentace*
 - *isokinetická sedimentace* – rychlosť sedimentace závisí na tvaru, velikosti..., výsledkem je sedimentační konstanta (třeba u ribosomů, v jednotkách Svedberg)
 - *isopiknická sedimentace* – před nebo v průběhu centrifugace utvoříme ve zkumavce gradient soli, který má proměnlivou hustotu od kraje ke dnu zkumavky, v průběhu centrifugace se ustavoví gradient, molekuly se posunují buď nahoru nebo dolů podle toho, jakou mají vznášivou hustotu
- *může existovat konzervativní replikace?*
 - může: replikace RNA u dsRNA virů (např. rotaviry) – molekula dvouřetězcové RNA replikována uvnitř partikule, ven z partikule jsou produkovány jednořetězcové molekuly RNA, které jsou ve virové kapsidě doplněny o další řetězec
 - -> v mateřské partikuli RNA zůstává, dceřiná partikule je produkována ven a uvnitř je RNA doplněna
 - (v nějakém uzavřeném kompartmentu je nasynthetizován jeden řetězec, ten je pak transportován do jiné partikule a tam je k němu komplementární řetězec dosynthetizován)
- molekula DNA může sestávat z jednoho (A) nebo několika (B) nezávisle replikovaných úseků – *replikonů*
 - A – viry, malé plazmidy, bakteriální chromozom
 - B – velké plazmidy, eukaryotní chromozomy
- *replikační počátek* = start replikace
- *replikační konec – terminus*
- *replikační uzel* = místo replikace na DNA v daném okamžiku (replikační vidlice)
 - pohyb replikačního uzlu po dvojvlákně
- *směr replikace* = směr pohybu replikačního uzlu (replikace jednosměrná, dvousměrná)
 - neplést se směrem syntézy NK – směr replikace je směr pohybu replikačního uzlu!
- *typy primerů* – RNA; DNA; protein
 - primer = cokoliv poskytující volnou –OH skupinu
 - DNA primer – typicky opravy DNA
 - RNA primer – typicky pro zahájení replikace (RNA polymeráza může začít syntézu de novo bez primeru; RNA polymeráza specializovaná na zahájení

replikace, tvorbu prvotního primeru = *primáza*) -> replikace zahajuje specializovaná RNA polymeráza = *primáza*

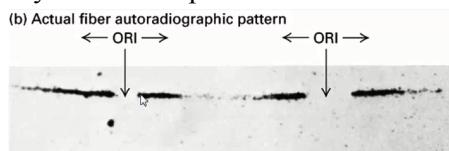
- bílkovina poskytující očko – u některých virů a plazmidů (za situace, kdy máme k dispozici aminokyselinový zbytek s –OH skupinou, na sebe enzym může kovalentně navázat nukleotid, který je buď součástí DNA nebo poskytuje 3'-OH očko, které může sloužit k zahájení replikace; pokud se takový typ primeru dostane na specifický konec specifické DNA sekvence, může zahájit syntézu komplementárního řetězce od prvního nukleotidu, syntéza může běžet až do konce)



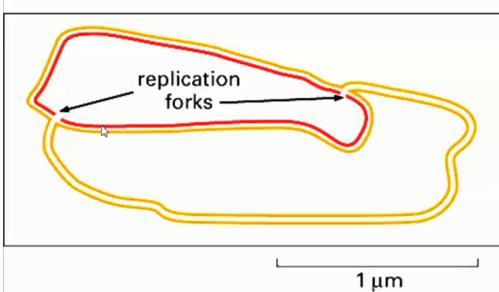
-
- paradox současné syntézy obou řetězců DNA
 - vedoucí (leading) strand – kontinuální syntéza
 - opožďující se (lagging) strand – Okazakiho fragmenty (1000 až 2000 bází u prokaryot, 100 až 200 bází u eukaryot)
 - syntéza nového řetězce vždy probíhá ve směru 5'→3'
- vlákno je replikováno v oblasti, kde se roztahuje replikační vidlička – v místě roztahoucí vidličky funguje spousta bílkovin / enzymů (komplex)
 - uzel se pohybuje po vlákně jedním směrem
 - replikace se účastní celá řada bílkovin; pohyb obrovského komplexu bílkovin je komplikovaný (tentо pohyb si můžeme představit jako pohyb po vlákně nebo tak, že se vlákno pohybuje skrz komplex)
 - „pohyb replikačního uzlu“ znamená vzájemný pohyb vlákna a komplexu bílkovin a enzymů podílejících se na replikaci
 - zatímco se uzel pohybuje jedním směrem, nové vlákno je vždy syntetizováno kontinuálně ve směru 5'→3' (vedoucí řetězec, leading strand); druhé vlákno musí být syntetizováno diskontinuálně (diskontinuální vlákno, lagging strand, opožďující se řetězec)
 - opožďující se vlákno se syntetizuje po kouskách; DNA polymeráza potřebuje vždy –OH očko – pro každý kousek musí být syntéza zahájena znova a pro každý kousek musí být přítomno –OH očko (musí být přítomno něco, co nasynthetizuje očko – RNA polymeráza – primáza – tvoří primery)
 - kratičké řetězce na opožďujícím se vlákně objevil Reiji Okazaki (1930–1975, zemřel na leukémii – pracoval s radioaktivním fosforem, když zkoumal replikaci, narodil se v Hirošimě a zažil zde útok atomovou bombou)



- ○ kterým směrem se pohybuje replikační uzel?
- kultura replikujících se buněk – přídavek radioaktivních prekurzorů syntézy DNA (značených tritiem) – ponechat po nějaký čas – přídavek nadbytku studených neradioaktivních prekurzorů; -> jemná lyze buněk (aby se nepoškodila DNA), lyzované buňky byly pokryty fotografickou emulzí -> vyvolávání -> obrázek pod elektronovým mikroskopem



- výsledný obrázek
- tmavé: radioaktivně značené
- obrázek nám říká, že replikační počátky jsou obousměrné – byla zahájena replikace a 2 replikační uzly se rozbehly dvěma směry (nejčastější příklad – obousměrná replikace; replikační bublina se roztahuje na dvou stranách a na každém konci, tedy v replikačním uzlu, probíhá replikace)
- Do buňky, kde zahájila replikace, byl přidán na krátkou chvíli radioaktivní thymidin. Poté tam bylo přidáno obrovské množství neradioaktivního thymidinu. Příslušná DNA byla vyizolována, vzorek byl exponován ve fotografické emulzi a pak byla jednotlivá vlákna zkoumána pod mikroskopem – byly pozorovány replikační počátky, kde se z obou stran ve stejné vzdálenosti vyskytoval radioaktivní thymidin, a z obou stran se z větší blízkosti vyskytoval neradioaktivní thymidin.



- ○ replikace na kruhové molekule s vyznačenými replikačními vidličkami
- pravděpodobně v tomto případě fungoval jeden replikační počátek, od kterého běží 2 replikační vidličky, každá na 1 stranu -> obousměrný replikační počátek

Replikační počátky

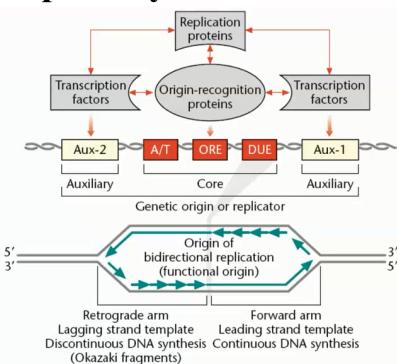


Figure 1 Basic organization of replication origins. Red indicates sequence elements that are required under all conditions (core components), while yellow indicates sequence elements (transcription factor binding sites) that facilitate replication under some conditions (auxiliary components). Arrows indicate protein:protein interactions. Origins contain an A-T-rich element (A/T) with adenines on one strand and thymines on the other, an origin recognition element (ORE), and a DNA-unwinding element (DUE).

- všechny replikační počátky mají společné znaky týkající se funkce a uspořádání
 - replikační počátky musí obsahovat oblasti, kam se váží replikační faktory a rozpoznávají replikační počátek – tyto oblasti jsou často repetitivní, protože často se váže několik faktorů kooperativně, tyto faktory teprve označují replikační počátek (*origin recognition element*) -> existuje oblast, kterou rozpoznávají replikační iniciační elementy
 - replikační počátek by měl být AT bohatý – AT bohaté sekvence snáze tají (zvláště pokud je dvoušroubovice v negativních nadobrátkách)
 - oblasti helikální nestability = oblasti schopné zlomu, kde je větší šance, že se dvouřetězec DNA rozvine a vznikne tam bublina
 - společné vlastnosti archeálních, bakteriálních a eukaryotických genomových replikačních počátků
- vzájemná použitelnost replikačních počátků napříč doménami života; rody, druhy – slabší (např. u bakterií **DnaA** – její homolog nebo tato bílkovina sama je přítomna u všech bakterií, váže se na origin recognition elementy, způsobuje tání dvoušroubovice; sekvence, které tyto bílkoviny rozpoznávají, se liší druh od druhu -> replikační počátky jsou často druhově unikátní nebo fungují jen u velmi blízce příbuzných druhů)
- příklady replikačních počátků
 - *E. coli* – 13 bp (DUE) a 9 bp (DnaA box) repetice, jeden origin na genom (ori C), bohatý na GATC sekvenci (11x v 258 nt)
 - *S. cerevisiae* – 15 bp AT bohatý konsensus, repetice, cca 400 počátků na genom (*ARS – automatically replicating sequence*) (jádro replikačního počátku je dlouhé 15 bp)
 - *S. pombe* – cca 1000 bp, AT bohaté úseky (jádro replikačního počátku je dlouhé kolem 1000 bp = 1 kbp)
 - *SV40* – cca 65 bp konsensus
 - *člověk* – 10^4 až 10^5 počátků na genom
 - *Archaea* – jeden až jednotky (6) počátků na genom či megaplazmid (i plazmidy musí mít své replikační počátky, může jich být více než 1), nalezeny krátké repetice ORF, AT bohaté repetice; ukazuje se, že replikační počátky jsou nahloučeny do jedné oblasti
- replikační počátky se druhově velmi liší, ale mají řadu společných znaků
 - unikátní krátké sekvence -> vazba multimerních faktorů
 - **DUE oblast** = oblast helikální nestability bohatá na AT

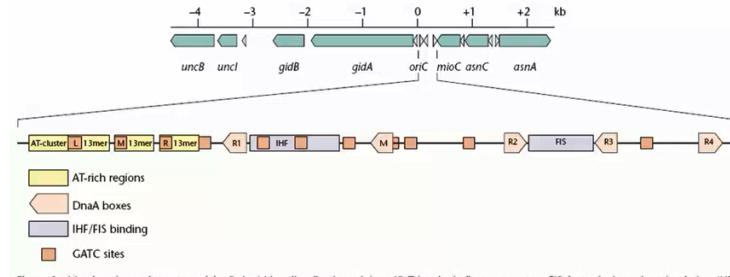


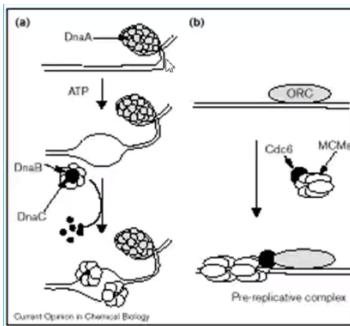
Figure 1 Map location and structure of the *Escherichia coli* replication origin, *oriC*. Triangles indicate promoters. FIS, factor for inversion stimulation; IHF, integration host factor.

- ○ *DnaA boxy* – někdy se značí jako devítinukleotidové repetice, váže se na ně bílkovina DnaA (tyto molekuly jsou schopny kooperovat samy se sebou -> obsadí celou oblast DNA dvoušroubovice)
- další regulační oblasti – *IHF/FIS* – DNA vazebné faktory
- *GATC místa* (GATC je sekvence) – místa, která jsou modifikována (metylována) na adenosinu, slouží jako regulace, jak často bude probíhat replikace
- bakterie – 1 nukleoid / 1 počátek
 - jen jeden replikační počátek (na hlavním chromozomu, na plazmidech zpravidla více)
 - *DUE sekvence* = sekvence bohatá na AT páry, v této sekvenci dochází k prvotnímu rozvolnění
 - *DnaA-boxy* = repetitivní sekvence, na které se vážou proteiny iniciující replikaci (poté může dojít k rozvolnění DUE sekvence)
 - + další vazebná místa pro NAPs a různé regulující proteiny
- eukaryota – mnoho replikačních počátků
 - replikační počátky nejsou definovány sekvenčně (jediná výjimka: *Saccharomyces cerevisiae* – A-element bohatý na AT)
 - ori určeny spíše celkovým stavem chromatinu (bohaté na AT páry, obsah CpG ostrovů, modifikace chromatinu, pozice nukleozomů, topologie DNA... žádný znak není společný pro všechna eukaryota)
 - variabilita mezi organismy
 - ori nemusí být vždy na stejném místě
 - vazba proteinů iniciující replikaci na ori
 - segmentovaný genom, obrovské genomy -> vzrůstá počet počátků
- archaea
 - několik replikačních počátků
 - *DUE sekvence* = sekvence bohatá na AT páry, kde dochází k prvotnímu rozvolnění
 - *ORBs* = repetitivní sekvence, na které se vážou proteiny iniciující replikaci
- zvláště u vyšších eukaryot existuje v genomu celá řada funkčních počátků a celá řada sekvencí, které mohou zaskočit za konkrétní počátek, pokud je např. mutovaný, a samy se stát počátkem (kryptické replikační počátky)

Iniciace replikace

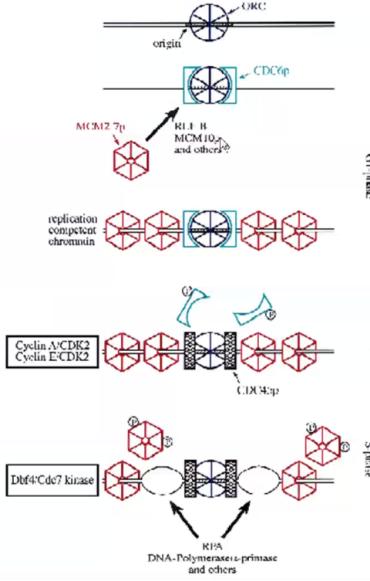
- *molekula rozeznávající replikační počátek*
 - bakterie: DnaA
 - eukaryota: protein ORC komplexu (origin recognition complex) a protein Cdc6 (regulovaný během buněčného cyklu; pozn. jakýkoliv protein jmenující se Cdc něco souvisí s buněčným cyklem – k objevům těchto proteinů docházelo sledování mutací u kvasinek, které měly mutace v buněčném cyklu)
 - Cdc6 rozeznává ORC protein navázané do oblasti počátků a umožňuje iniciaci příslušného replikačního počátku u eukaryot
 - archaea: 1 molekula mající funkci jak ORC, tak Cdc6

- tyto proteiny patří do skupiny AAA+ proteinů (-> ATP hraje u těchto bílkovin roli, různá schopnost se někam vázat s/bez navázáního ATP)
 - -> pozitivní regulace: je přítomen faktor umožňující pozitivní regulaci – je-li přítomen, dochází k iniciaci replikace
 - přítomna ale i celá řada negativních faktorů
- negativně regulující faktory – inhibitory iniciace replikace
 - bakterie: **SeqA** – bílkovina vtahující počátek, na kterém byla zahájena replikace, do membrány -> fyzicky zabranuje násobné replikaci
 - jak je počátek rozpoznán:
 - 
 - - vznikají dvouřetězcové DNA sestávající z mateřského a dceřiného řetězce
 - u bakterií (E. coli) existuje systém s řadou funkcí, který způsobuje metylaci řetězce na různých pozicích, jedna z metylací je metylace na vrcholové aminoskupině adenosinu v sekvenci GATC – 6 aminoskupina adenosinu
 - metylaci probíhá až po určité době od syntézy nového řetězce: chvíli po zahájení syntézy je počátek hemimetylován – metylován je jen mateřský řetězec, dceřiný ne
 - v oblasti počátku je sekvence GATC u E. coli asi 11, velmi nahlučeno
 - ve chvíli, kdy je hemimetylován řetězec v počátku, je rozpoznán SeqA proteinem a je vtažen do membrány -> fyzicky se zabranuje dalšímu zahájení replikace
- není jediná regulace: není již dostupné DnaA, ATP je hydrolyzováno okamžik po sestavení pre-iniciačního komplexu a řada dalších vlivů majících vliv na bránění opakovanému zahájení transkripcie



Origin activation occurs along similar pathways in (a) *E. coli* and (b) eukaryotic cells. An initiator (DnaA or ORC) binds to the origin and recruits the helicase (DnaB or MCMs) to the origin. The helicases are assembled at the origin with the assistance of a third protein (DnaC or Cdc6).

- schéma hromadění DnaA – schopen interagovat s jinými proteiny, tvoří pnutí, které nakonec vede v oblasti helikální nestability k tomu, že DNA taje, je obsazena SSB proteiny -> kaskáda dějů vedoucí k nasednutí helikázy, primázy
- eukaryota, bakterie: analogem DnaA jsou ORC protein a protein Cdc6, který rozeznává ORC a ve své aktivní formě zprostředkovává vazbu replikativní helikázy (její části) ke katalytické – *MCM proteiny*
 - *MCM proteiny* – mini chromosome maintenance – geny pro tyto proteiny nalezeny při studiu buněčného cyklu a chromozomové stability u kvasinek



- na eukaryotní počátek se váže ORC (ten rozeznává počátek), rozeznáván Cdc6 proteinem -> ten umožní nasednutí MCM bílkovin -> rozeznávání komplexu Cdc45 v komplexu s dalšími bílkovinami -> tvorba replikativní helikázy
 - helikáza sestává z heterohexameru – proteinu MCM2–7, Cdc45 a heterotetramerního komplexu GINS -> *replikativní komplex CMG* (název od MCM, Cdc45 a GINS) esenciální pro to, aby probíhala replikace (-> je potřeba si uvědomit, že helikáza není sama o sobě proteinem, ale je to proteinovým komplex CMG)

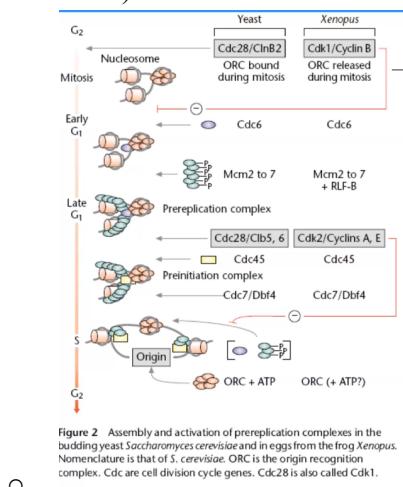
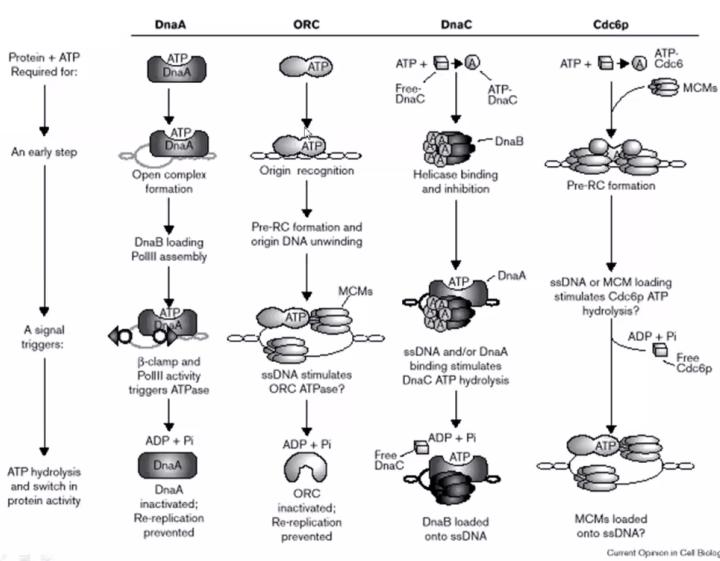


Figure 2 Assembly and activation of prereplication complexes in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* and in eggs from the frog *Xenopus*. Nomenclature is that of *S. cerevisiae*. ORC is the origin recognition complex. Cdc are cell division cycle genes. Cdc28 is also called Cdk1.

- - opětovná asociace MCM s počátkem není možná
 - vázaný Cdc6 je uvolněn v S fázi a objeví se opět v buňce až v G1
 - Cdc/Dbf4 fosforyluje Mem v S fázi a uvolní je z chromatinu
 - Cdk2/cyklin A,E dále fosforyluje Mem a tím inhibuje jejich reasociaci s chromatinem
- zabránění opětovnému zahájení iniciace replikace na daném počátku: počátek již není rozpoznán, není k dispozici to, co ho označuje (= ORC bílkoviny, které jsou uvolněny a objevují se až později; u kvasinek během mitózy), není k dispozici Cdc6 (fosforylován cyklin dependentními kinázami), nejsou navázány MCM proteiny označující pre-replikační komplex -> *počátek vypadá jinak*, bílkoviny jsou odstraňovány tím, že jsou modifikovány (hydrolyzují ATP, které je na ně navázáno, fosforylovány kinázami buněčného cyklu – CDK a jiné, mohou být

poslány do degradace nebo exportovány ven do cytoplazmy) -> funkčně i fyzicky odstraněny (aspoň jedno nebo druhé)



- analogie bílkovin napříč doménami života: jde o funkční analogie (moc ne o strukturní)
- dojde-li k sestavení iniciáčního / pre-iniciačního komplexu (podle toho, která vede k aktivaci vnitřní ATPázy AAA+ ATPázy komplexu) -> hydrolýza ATP, uvolnění ADP z komplexu (DnaA, ORC)
- proteiny vypadají jinak!
- pro celý proces bílkovina vypadá jinak, jinak se chová
- DnaC, Cdc6 protein – patří do AAA+ proteinů, aktivní jsou s navázaným ATP v ATP formě -> hydrolýza ATP, změna affinity funkce a proteinů k pre-iniciačnímu komplexu (helicase loaders)

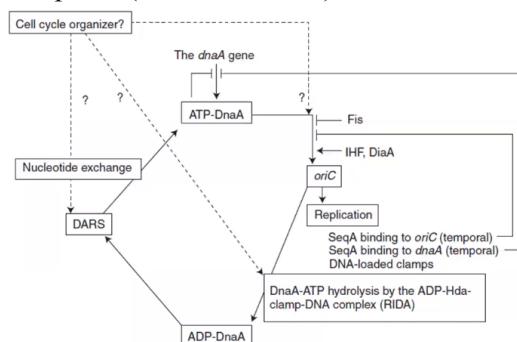


Figure 3. The DnaA cycle and regulation of *oriC* initiation. Transcription of the *dnaA* gene is autoregulated. ATP-DnaA is more active in inhibiting *dnaA* transcription than ADP-DnaA. Also, *dnaA* transcription increases before replication initiation and is repressed after it in a SeqA-dependent manner. Newly synthesized DnaA molecules adopt the ATP form. ATP-DnaA molecules are also generated by nucleotide exchange of ADP-DnaA in a DARS-dependent manner, though the cell cycle-dependent regulation of DARS remains unclear. With the assistance of DiaA and IHF, ATP-DnaA molecules form a multimeric complex on *oriC* in a cooperative manner. The resultant *oriC* complex unwinds DUE and is then engaged in replisome formation. The clamps remain on the synthesized DNA after Okazaki fragments are synthesized and form a complex with ADP-Hda, which interacts with and promotes the hydrolysis of ATP-DnaA (i.e., RIDA). Broken lines indicate expected but unrevealed pathways for cell cycle-coordinated regulation.

- kolem iniciace replikace je ještě mnohem více regulací
- toto je relativně současná představa o regulaci funkce a exprese DnaA bílkoviny (ne dalších faktorů účastnících se iniciace replikace)
- regulována exprese (produkce) proteinu z dnaA genu
- protein je funkční ve formě ATP
- funkční protein DnaA ATP ve zpětné vazbě sám sebe zpětně negativně reguluje (negativně reguluje expresi sebe sama)
- (např. SeqA protein také negativně reguluje expresi DnaA proteinu)

- ADP DnaA protein může být recyklován (bakterie *E. coli* obsahuje v genomu sekvence, které nejsou součástí replikačního počátku, na kterých dochází k uvolnění ADP a navázání nového ATP -> uvolnění aktivovaného proteinu z reaktivní sekvence – DARS)
- proteiny (IHF, FIS) – IHF je jedna z bílkovin, která se váže na bakteriální chromozom, má bridging funkci, pozitivně ovlivňuje aktivaci originu v přítomnosti DnaA ATP
- -> celá řada dalších regulací pozorovatelných jen u DnaA, vyvažovány aktivity ostatních faktorů
- pokud statisticky vše převáží směrem, že má být zahájen replikace, je replikace zahájena -> objeví se nové negativní faktory (např. přítomnost hemimetylované DNA v oblasti originu) -> znepřítomnění funkčních pozitivně regulujících faktorů -> okamžik, kdy je origin přístupný případné opakování replikaci, je rychle překlenut

Table 1. Identity of the factors that catalyze the various stages of DNA replication described in Fig. 1

Factor	Archaea ^a	Eucarya ^a	Bacteria (<i>E. coli</i>)
Initiator	Orc1/Cdc6	ORC	DnaA
Helicase loader	Orc1/Cdc6	Cdc6 + Cdt1	DnaC
Helicase	MCM	MCM complex	DnaB
Single-strand binding	Various ^b	RPA	SSB
Primase	Primase (2)	Primosome (4)	DnaG
Replicative DNA polymerase	B-type (C+E) ^c D-type (E)	Pol δ and ε	DNA Pol III
Sliding clamp	PCNA	PCNA	β-Clamp
Clamp loader	RF-C	RF-C	γ-Complex
Ligase	DNA lig 1	DNA lig 1	Ligase
Processing	RNaseH/Fen1	RNaseH/Dna2/Fen1	RNaseH

^aThe eucaryal ORC complex has six subunits, Orc1 to Orc6. Archaea possess proteins that are homologous to both Orc1 and Cdc6 and are termed Orc1/Cdc6; see the main text for discussion.

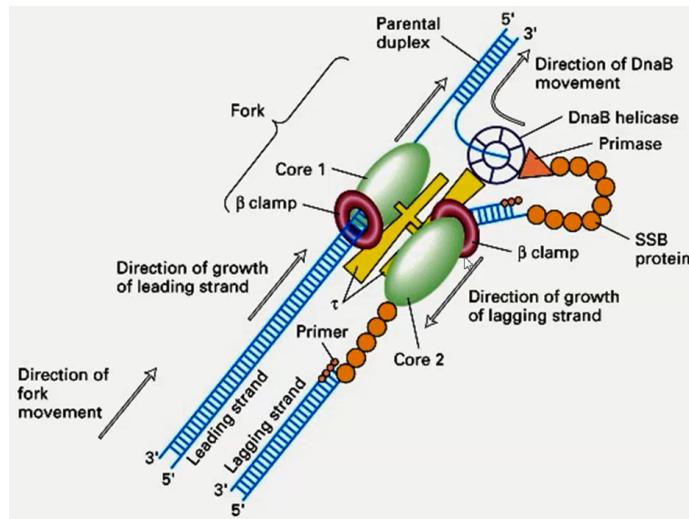
^bDistinct archaeal species have unique single strand binding proteins, hence the designation of "various."

^cThere is a bifurcation in the distribution of polymerases in the Crenarchaeota (C) and Euryarchaeota (E). Crenarchaeota possess only B-type replicative DNA polymerases, whereas euryarchaeota have both B- and D-family enzymes.

- porovnání faktorů účastnících se ve stejném kroku iniciace replikace u různých domén života
- je vidět, že eukaryota a archea jsou si z hlediska bazální regulace replikace více podobné
- zvláštnost eukaryotních replikačních počátků je v tom, že ne všechny musí být v průběhu replikace využity, jsou zapínány postupně
 - replikační vidlička může přejet připravený replikační počátek -> není využit
 - pokud některý z replikačních počátků není využit, může být nahrazen jiným kryptickým replikačním počátkem, který se nachází v genomu poblíž (jiné z hlediska regulace – u bakterií jeden replikační počátek obsluhující celý chromozom)

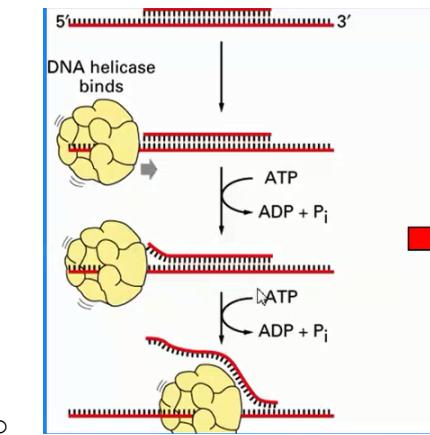
Replikace u bakterií

- replikační uzel u bakterií



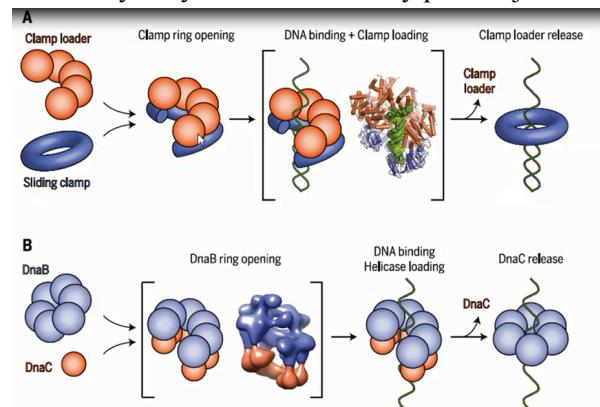
- 2 katalytické podjednotky DNA Pol
- E. coli má několik DNA polymeráz, řada z nich má různé funkce v opravných mechanismech
- *bakteriální replikační DNA polymerázy*
 - *DNA Pol I*
 - Kornbergův enzym – objevil ji
 - kromě polymerační aktivity má i 3' → 5' exonukleasovou aktivitu; 5' → 3' exonukleasovou aktivitu – může využít 3' – OH očko Okazakiho fragmentu, odbourat primer a zároveň syntetizovat DNA
 - musí být nízkoprocesivní, jinak by začala odbourávat DNA
 - syntetizuje a odbourává a posunuje jednořetězcové přerušení – zároveň si konkuruje s DNA ligázou, která umí jednořetězcová přerušení spojit
 - cca 600 b / min.; 400 molekul / buňku
 - *DNA Pol III*
 - cca 15 000 – 30 000 b / min.; 10 molekul / buňku; 3' → 5' exo; 5' → 3' exo
 - specifická pro ssDNA substrát
 - *hlavní replikační enzym*, který opravdu je v replikační vidličce a má obrovskou procesivitu a obrovskou rychlosť (její rychlosť narůstá od aktivního jádra, když se k tomu přidávají další a další bílkoviny)
 - kompletní enzym je složen z více než 10 proteinů
 - když se sestavuje komplex na replikačním počátku, postupně se zvyšuje aktivita a procesivita polymerázy
 - procesivita polymerázy je parametr, který určuje jak dlouho polymeráza vydrží syntetizovat nový řetězec než odpadne. Řada polymeráz je málo procesivní. Syntetizuje podle templátu nový řetězec a nasyntetizuje třeba 20 nukleotidů, spadne, musí přijít nová polymeráza, využije 3'OH očko, nasyntetizuje 100 nukleotidů, odpadne. To jsou málo procesivní enzymy. Vysoké procesivní enzymy jako je kompletní enzym DNA polymeráza III, jsou schopny zahájit syntézu na počátku replikace a odreplikovat minimálně jednu polovinu bakteriálního chromozómu.
 - zvýšení procesivity dimerizací pomocí τ , interakcí se svíracím proteinem β (δ komplexem rozeznávajícím primer ...)
 - katalytické jádro $\alpha\epsilon\Theta$ – nízká procesivita – cca 10 b
 - replikační DNA polymeráza u E. coli se nazývá *DNA polymeráza III*
 - Okazakiho fragmenty – hraje u nich roli DNA polymeráza I

- 2 katalytické pojednotky DNA polymerázy – *dimerizační protein tau* (dimerizuje podjednotky polymeráz), β -svorka
- β -svorka – výrazně zvyšuje procesivitu DNA polymerázy
 - homodimer – 2 bílkoviny interagující head to tail – od N k C konci
 - obepíná nově vznikající řetězec DNA
 - zvyšuje *procesivitu* = parametr, který udává, kolik je polymeráza schopna odsyntetizovat nukleotidů poté, co nasedne na templát a začne syntetizovat (předtím, než odpadne); u některých polymeráz je výhodnější nižší, u některých vyšší procesivita
 - díky β -svorce DNA polymeráza zůstává na DNA
- *DnaB* – helikáza (= enzym rozvolňující dvouřetězec DNA – rozšiřuje replikační bublinu a umožňuje posun replikačního uzlu)
 - homohexamér
 - ATP vazebné oblasti – ATPáza (rozplétá DNA za spotřeby ATP)
- topoizomeráza – *gyráza*
- RNA primery syntetizované *primázou*
- aby byla replikační vidlička stabilní a nezavírala se hned po rozvolnění helikázou, je dobré přenést kinetiku reakce směrem k jednořetězci (ke vzniku bubliny) – jednořetězcová DNA je obsazena bílkovinou, která se specificky váže na jednořetězce – *SSB (single strand binding protein)*
- *DnaG* – bakteriální *primáza*
 - DnaB s navázaným SSB je vhodným substrátem pro primázu
 - DNA dependentní RNA polymeráza – syntetizuje podle templátu a zahajuje syntézu de novo
 - nasyntetizuje krátký řetízek RNA (primer), který má 3' –OH očko, od kterého může syntetizovat DNA polymeráza
 - 3' -OH očka jsou hodně reaktivní, proto musí být rychle využito
- *iniciace replikace u bakterií*
 - do ori C se v průběhu buněčného cyklu váže Dna A (u E. Coli se váže 20–40 molekul Dna A) -> dochází k tání dvojšroubovice (DnaA je iniciační faktor – na jeho koncentraci závisí to, zda vůbec dojde k replikaci, následuje oligomerizace DnaA a tání dsDNA -> vazba oligomerů na DnaA a jeden řetězec DNA -> vznik replikační bubliny)
 - oblast je rozpoznána Dna C (helicase loader), která přináší Dna B (helikáza) (v rozvolněné oblasti se na vlákna ssDNA naváží dva hexamery helikázy)
 - DnaC je zároveň pomocný protein, tzv. loading factor (spolu s DnaI, případně dalšími chaperony), které rozevřou hexamer DnaB a umožní jeho nasednutí na ssDNA
 - komplex jednořetězcové DNA s navázaným SSB proteinem a s helikázou je rozpoznán jako substrát pro Dna G (primáza)

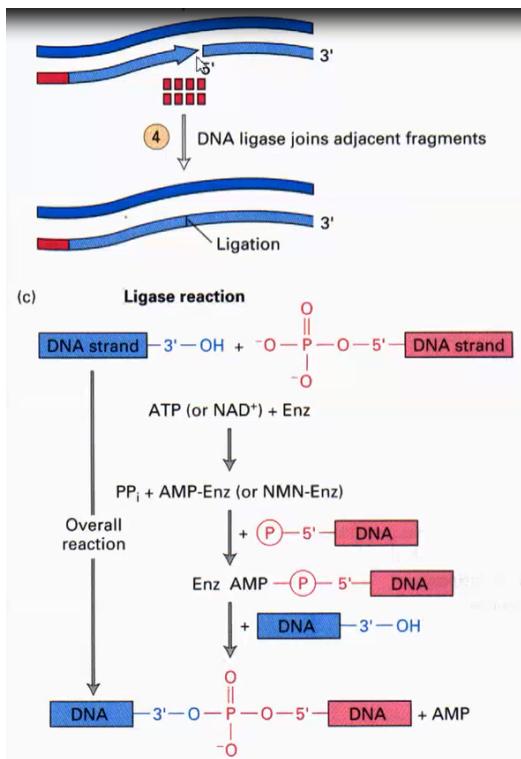


- - jak fungují helikázy – rozvolnění DNA za spotřeby ATP
- pokud bílkovina v buňce tvoří homohexamer nebo heterohexamer a zároveň má ATP vazebné domény -> okamžitě by nás mělo napadnout, že tento komplex bude fungovat jako helikáza
- elongace u bakterií
 - DNA Pol III
 - po nasystetizování primerů dochází v místě rozhraní primer/DNA templát k vazbě svorkových (clamp) proteinů a díky pomocným proteinům (= *clamp loader complex CLC*) a poté k vazbě hlavní (core) replikační DNA polymerázy
 - vyžaduje energii hydrolýzy ATP
 - elongační komplex = svorkové proteiny + CLC + DNA polymeráza (+ různé přídatné proteiny, které interagují s jeho hlavními složkami)
 - svorkové proteiny – nezbytné k tomu, aby DNA polymerázy nemohly snadno disocirovat od DNA -> vysoká procesivita syntézy DNA (u bakterií homodimer β-clamp)
 - *clamp loader complex* – v přítomnosti ATP otevře „svorku“, umožní její nasednutí na DNA templát/primer a opět ji uzavře (hydrolýza ATP umožní uzváření svorky, další hydrolýza její uvolnění) (bakterie – DnaX komplex)
- syntéza opožďujícího se řetězce – Okazakiho fragmenty, následně se buňka musí zbavit RNA primerů a spojit Okazakiho fragmenty (-> potřeba dalších enzymů)
 - pro každé zahájení syntézy je potřeba syntetizovat nový primer, pokaždé je třeba, aby β-svorka byla uvolněna a zároveň zase zpět zpátky přinesena do komplexu po syntéze primerů
 - komplex DNA polymeráz je veliký, DNA polymeráza z komplexu sama neodchází -> můžeme si představit, že vzniká jakási smyčka, vzniká nový Okazakiho fragment, v určitou chvíli dojde k uvolnění β-svorky, syntéze nového primeru, syntéze nového Okazakiho fragmentu a opět vzniká smyčka
 - -> opožďující se řetězec se pohybuje „píďalkovitým pohybem“
 - u bakterií délka Okazakiho fragmentů je cca 1000–2000 bází
 - (u eukaryot je délka Okazakiho fragmentů 100–200 nukleotidů – tedy zhruba 10x kratší)
 - představa byla taková, že rychlosť replikace u bakterií je cca 15 000 bp za minutu, u eukaryot 0,5–max. 5 kbp / min (-> replikace u eukaryot je pomalejší, způsobeno kratšími Okazakiho fragmenty) x není to tak: u archae, kde je syntéza zhruba stejně rychlá jako u bakterií, jsou délky Okazakiho fragmentů eukaryotního typu (-> archae mají enzymový replikační aparát podobný eukaryotům – eukaryota jsou odvozena od Archaea) – u eukaryot dochází nejspíše snáze k pnutí při tvorbě Okazakiho fragmentů, které nedovolí syntetizovat dále a musí se syntéza obnovit dalším primerem

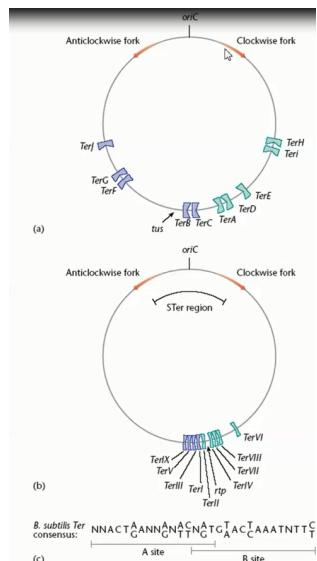
- β -svorka – musí být znovu přinesena do komplexu – pro to slouží přinašeč svorky (*clamp loader, delta-gama komplex* u bakterií) – bílkovinný komplex, který se váže do replikačního aparátu, rozpoznává polymerázu na opožďujícím se řetězci a je schopen periodicky nandavat a sundavat β -svorku
 - Clamp loader má 5 podjednotek a spotřebuje ATP – ATPáza. Na clamp loader se naváže ATP, clamp loader s navázáným ATP váže svorku, otvírá ji, do svorky je vložena DNA. Současná vazba svorky a DNA vyvolá hydrolyzu ATP a svorkový protein je uzavřen



- interakce delta-gama komplexu se svorkou: obecný princip (podobně funguje přinášení DnaB pomocí DnaC do oblasti replikačního počátku)
- podobně jako clamp loader / DnaC funguje řada dalších bílkovin v buňce, které mají rozličné funkce – AAA+ ATPázy (= ATPázy asociované s různými buněčnými aktivitami; celá řada aktivit, řada proteinů má AAA+ doménu)
- enzym nutný pro pospojování Okazakiho fragmentů – nejprve je nutné zbavit Okazakiho fragmenty RNA primeru: bakteriální buňka má DNA polymerázu I, která má nejen opravnou aktivitu exonuklázovou 3'→5', ale i exonukleázovou aktivitu ve směru 5'→3' → je schopna před sebou odbourávat DNA řetězec a zároveň syntetizovat nový – rozeznává jednořetězcové přerušení, kde byl RNA primer
- RNA primer může být odbourán přímo DNA polymerázou I nebo enzymem RNáza H (H – hybrid; tento enzym štěpí RNA v molekule, kde je DNA RNA hybrid)

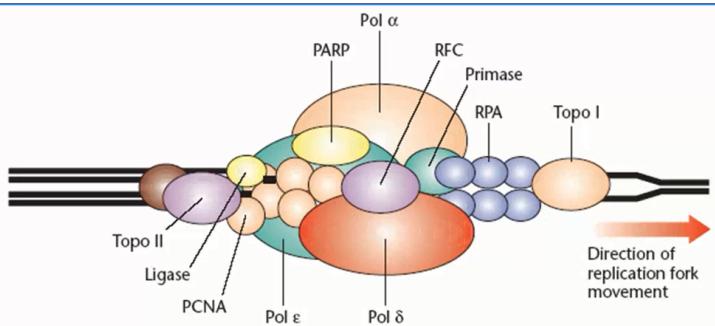


- kombinací DNA polymerázy I a RNázy H dostaneme situaci, kdy je RNA vyštěpena, 3' konec předchozího Okazakiho fragmentu se posouvá, jeho 5' konec je degradován
- je potřeba, aby došlo k tomu, že bude mezera zaplněna a vznikne jednořetězcové přerušení
- DNA polymeráza I nasedne, nasyntetizuje několik nukleotidů a odpadá
- enzym DNA ligáza – enzym schopen zacelit jednořetězcové přerušení -> kompetice mezi DNA Pol I a ligázou, kdo dřív bude na jednořetězcovém přerušení (ligáza – dojde k zacelení – ligaci – templát zmizí pro oba, řetězec je uzavřen)
- *ligáza* – existuje jich celá řada, fungují tak, že je pro ně templátem DNA taková, kde je jednořetězcové přerušení na dvouřetězci
 - existují ligázy, které spojí 2 čistě přerušené dvouřetězce, 2 jednořetězce, spojení RNA a DNA (často virové ligázy)
 - důležité – vyžadují kofaktory (ATP, NAD^+), které využívají podobně jako topoizomerázy – vznikne kovalentní intermediát, kde je energeticky bohatá vazba, kde je navázán nikotinaminmononukleotid nebo AMP, to je přeneseno na 5' konec DNA -> vzniká energeticky bohatá vazba, která je za pomoci enzymu přenesena na volný 3' -OH konec DNA -> dojde k tvorbě kovalentního intermediátu (kde je uchována energie), pak se přenáší esterová vazba a spojují se konce DNA
- *existuje terminace replikace?*
 - u bakterií, které mají 1 replikační počátek, ano – existují násobné terminátory replikace, na které se váže specifický terminační protein (u E. coli TUS protein)



- terminátoři jsou průchozí pro replikační vidličku z jedné strany
- strukturně: „košik“ otevřený jen k jedné straně (z jedné strany je replikační komplex schopen odstranit terminační protein / přejet jej, z druhé strany účinná brzda)
- terminátoři se vyskytují násobně
- vlastní terminace: setkání a fúze dvou replikačních vidliček
- u jiných bakterií se vyvinuly podobné systémy, bílkoviny a sekvence jsou jiné -> konvergence funkce
- vědci se pokusili připravit bakterie s deletovanými terminátořemi, dívali se, jak se bakteriím daří: dařilo se jim úplně normálně -> rozpor: řada protisměrných terminátorů nezávisle vyvinutých u různých bakterií (-> vypadá jako zásadní evoluční záležitost se zásadní funkcí), ale po deleci se nic neděje; odpověď: poté, co se osekvenovalo více bakteriálních genomů, se ukázalo, že silně přepisované geny v bakteriálních genomech jsou orientovány tak, aby jejich transkripce běžela po směru replikace, většina genů je orientována tak, aby nedokázalo ke srážení transkripčního komplexu s replikačním komplexem (to by mohlo být problém – buňky se snaží, aby replikace proběhla jen jednou za buněčné dělení; pokud by transkripce rozhodila replikaci, byl by to problém – nedokončené replikace, nutnosti oprav, nemožnost replikovat -> smrt buňky; pokud replikující se komplex zabránil konkrétnímu transkripčnímu komplexu, nevadí to, gen se může exprimovat po zreplikování, sestaví se nový transkripční komplex)
- rychlosť syntézy DNA u replikace je v tisících nukleotidech /s
- RNA polymeráza při transkripci syntetizuje rychlosť 40–60 nukleotidů /s (řádově méně)

Replikace u eukaryot



Proposed model for the mammalian cell DNA synthesizeosome.

- replikace je u bakterií jednodušší, proto bude replikace eukaryot ukazována spíše jako analogie
- helikáza – heterohexamer MCM 2–7 (*MCM = mini chromosome maintenance*)
- topoizomerázky
- DNA polymerázky – replikační DNA polymerázky eukaryot jsou dvě: polymeráza epsilon (zejména syntéza vedoucího řetězce) a polymeráza delta (syntéza opožďujícího se řetězce)

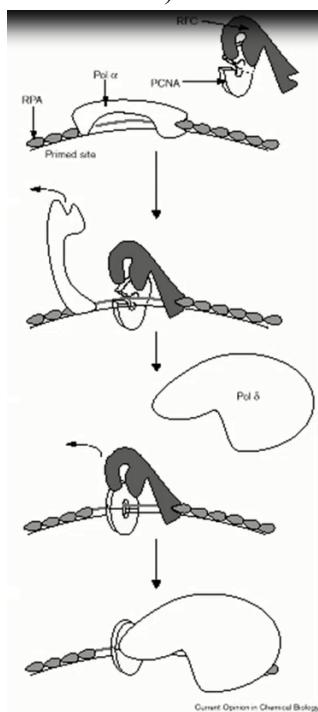
Polymerase	Family	Cellular function
α (alpha)	B	Chromosome replication (initiation, Okazaki fragment priming)
δ (delta)	B	Double-strand break repair Chromosome replication (elongation) Nucleotide-excision repair Base-excision repair Mismatch repair Double-strand break repair
ϵ (epsilon)	B	Chromosome replication (elongation) Nucleotide-excision repair Break-excision repair Mismatch repair Double-strand break repair
ζ (zeta)	B	Translesion synthesis
γ (gamma)	A	Mitochondrial DNA replication
θ (theta)	A	DNA repair
β (beta)	X	Base-excision repair
λ (lambda)	X	Base-excision repair
μ (mu)	X	Nonhomologous end joining
σ (sigma)	X	Sister chromatin cohesion
Telomerase	RT	Telomere maintenance
η (eta)	Y	Translesion synthesis
ι (iota)	Y	Translesion synthesis
κ (kappa)	Y	Translesion synthesis
Rev1	Y	Translesion synthesis

- DNA polymeráza α – aktivity syntézy krátkého RNA řetězce, vzápětí pokračuje jako DNA polymeráza (-> jednak RNA polymeráza, jednak DNA polymeráza, dosyntetizovává primer) -> vzniká 3'-OH očko, které je DNA! -> *eukaryotní primázou je DNA polymeráza α*
- *PCNA* – analog β -svorky, head to tail heterotrimer; syntéza Okazakiho fragmentů -> potřeba *clamp loaderu* (u eukaryot NFC), který přinese PCNA
 - *proliferating cell nuclear antigen*
 - není to dimer, ale NC, NC, NC trimer
- protein, který stabilizuje jednořetězce, aby se celý komplex za helikázou nezavíral – *RPA* (replication protein A, analog SSB)
- helikáza
- *iniciace replikace u eukaryot*
 - *ori licensing* – sestavení pre-RC (pre-replikačního komplexu) se odehrává ještě před zahájením S fáze -> určení potencionálních ori
 - *ori firing* = aktivace některých ori licensing, aby došlo k zahájení replikace (ne všechny licenované ori budou u eukaryot skutečně využity k zahájení replikace)

(vazba tetrameru GINS a proteinů Cdc45 během přechodu z G1 do S fáze -> aktivní CMG helikáza)

- **pre-replikační komplex** – jeho sestavení zahájeno vazbou iniciačního faktoru na příslušné oblasti ori (vyžaduje energii hydrolýzy ATP); iniciační faktor u eukaryot – *ORC komplex* (= origin recognition complex)
- CDC6 rozpoznává ORC (eukaryotní proteiny, které rozpoznávají ORE), který se váže na ORE = origin recognition element (DNA element – vlastnost replikačního počátku)
- dva hexamery helikázy (MCM, minichromosome maintenance) se váží ještě na dsDNA -> rozvolnění dsDNA, vznik replikačních bublin -> helikázy zůstanou navázané pouze na ssDNA
- nasednutí helikázy zprostředkovávají proteiny ORC komplexu (iniciační faktory) + další pomocné proteiny (ty jsou poté uvolněny); není zcela jasné, zda pro nasednutí obou hexamerů helikázy jsou potřeba 2 ORC nebo jeden; jsou na to 2 různé modely)
- *primery*
 - = krátké úseky NK nasynthetizované *primázou* (=DNA dependentní RNA polymeráza)
 - syntéza de novo v 5' → 3' směru
 - potřebný, protože DNA polymerázy nedokáží syntézu nového řetězce DNA zahájit de novo (potřebují volnou –OH skupinu)
 - většinou nově syntetizované krátké oligonukleotidy (ale –OH skupina může být poskytnuta i přímo templátovým řetězcem DNA nebo terminálním proteinem)
 - eukaryota – nejprve krátký RNA primer, následně prodloužen DNA polymerázovou aktivitou velké podjednotky Pol α -> *RNA/DNA primery*
- *elongace* – prakticky totéž, co bakterie
 - hlavní eukaryotní DNA polymerázy: DNA polymeráza alfa, delta (podle opožďujícího se řetězce), epsilon (podle vedoucího řetězce)
 - alfa a epsilon asociovány prostřednictvím trimeru Ctf4 proteinů
- **odstranění Okazakiho fragmentů**
 - bílkoviny účastnící se odstranění Okazakiho fragmentů
 - *RNase H1*
 - odštěpí RNA, zůstane zbyteček RNA (poslední nukleotid) a DNA primer (synthetizovaný polymerázou)
 - *fen1*
 - *dna2*
 - replikační vidličky pod elektronovým mikroskopem: připravily se deficientní kmeny (deficientní v genech pro fen1 a/nebo dna2); Okazakiho fragment je doplňován DNA polymerázou delta, ta má vytěsnovací (displacement) aktivitu, která před sebou vytěsnuje kousek DNA (vznikají vytěsněné 5' kousky Okazakiho fragmentů, které na 5' konci obsahují kratičké úseky RNA); autoři se dívali na tyto vychlípené jednořetězce (které jsou mimo dvouřetězcovou molekulu), kolik jich je, vzdálenost na DNA vlákně
 - pokud se dívali na množství vidliček, kde byli schopni detektovat vychlípeniny, u normálního nemutovaného kmene našli určité množství právě se replikujících vidliček, u kmenů mutovaných v genu pro fen1 jich našli více, kmeny mutované v genu pro dna2 ještě více, kmeny mutované v obou kmenech úplně nejvíce -> *proteiny fen1 a dna2 jsou důležité pro odstranění přesahujících konců a pro dokončení Okazakiho fragmentů, vzájemně se doplňují*
 - vzdálenost na DNA mezi konci Okazakiho fragmentů: u divokého typu obrovské, dvojitý mutant – krátké vzdálenosti

- fen1 i dna2 jsou *endonukleázy*
- **fen1** je schopna odstřihnout kratičký řetízek, který vyčnívá z dvojřetězce, přesahuje ho, a spolupracuje s DNA polymerázou delta, která řetězec vytlačuje ven; *nastupuje po dna2 a odštěpí zbytek*
- **dna2** je také endonukleáza, dělá totéž, na rozdíl od fen1 je schopná odštěpovat i delší úseky (i tak dlouhé, na které se naváže RPA – protein vážící se u eukaryot na jednořetězcové molekuly DNA – je to SSB protein, situaci by stabilizoval); *dokáže odštěpit nukleotidy primeru, které jsou lehce reasociované*
- -> eukaryota využívají *RNasu H*, vytlačovací aktivitu DNA polymerázy delta (která odťalačuje řetězec před sebou), když dojde ke vzniku jednořetězcového přerušení (odštěpí endonukleáza), nastupuje ligáza, nově vznikající řetězec je uzavřen
- *RNasa H* – H, protože funguje na hybridní molekule: DNA párující s RNA; dává pryč většinu primeru (kromě posledního nukleotidu – ten je odstraněn 5‘ exonukleasou)



- i.e. series of competitive switches determines occupation of the primed site. Pol α is replaced by RFC through a competition for interaction with PCNA. Pol δ then replaces RFC through a second competition for RPA.
- příchodem každé další bílkoviny / nízkomolekulárního faktu / polymeru se celá situace mění
- na obrázku: jednořetězcové vlákno obsazené RPA – templát pro primázu -> změna situace: syntéza řetízku DNA Pol α -> změna templátu -> vhodný substrát pro clamp loader -> přichází clamp a clamp loader -> změna templátu -> vhodný substrát pro navázání DNA polymerázy delta
- -> děje se navzájem ovlivňují a příchodem dalšího hráče se situace mění

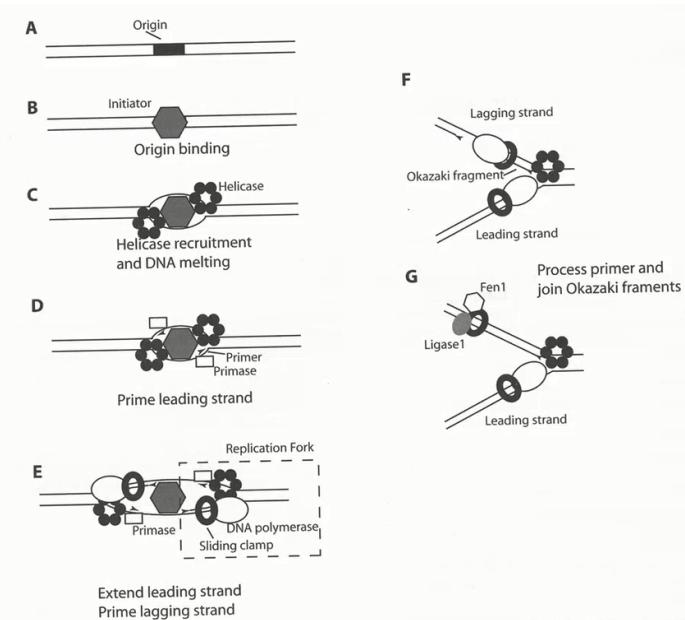


Figure 1. Cartoon of the steps involved in DNA replication. Panels A to E describe the assembly of replication fork components at an origin of replication. SSB has been omitted for visual clarity. Panels F and G show detail at a single replication fork.

- **sumarizace replikace u eukaryot:** replikační počátek musí být něčím rozeznán (ORC komplex) -> rozpoznáno komplexem, který přinese helikázu -> komplex, který přinese primázu -> vznik 2 replikačních vidliček, rozšíří se replikace na obě strany, na opožďujícím se řetězci dochází k odstranění a úpravě Okazakiho fragmentů
- **terminace replikace u eukaryot:**
 - hodně replikačních počátků, nepozorujeme nic jako terminátory; jedinou výjimkou jsou příklady silně přepisovaných genů (geny pro rRNA, tRNA); mezi geny pro rRNA a tRNA (v tzv. mezernících) jsou terminátory bránící replikaci z jedné strany a dochází zde k zastavení replikačního komplexu (i u eukaryot se může stát, že je replikační počátek svým způsobem jednosměrný)

Table 1 Proteins involved in eukaryotic DNA replication

Human protein	Size of human protein (kDa)	<i>E. coli</i> protein	Activities
DNA Pol α , primase	165, 70, 58, 49	Primase and DNA polymerase I or III	RNA primer synthesis, DNA polymerase
DNA Pol δ , DNA Pol ϵ *	125, 48, 255, 55	POLIII core, (subunits $\alpha\theta\epsilon$)	DNA polymerase, 3'-5' exonuclease proofreading
RF-C	140, 40, 38, 37, 36	POLIII γ complex (subunits $\gamma\delta^*\chi\psi$)	DNA-dependent ATPase, PCNA loading
PCNA	36	POLIII β subunit	DNA polymerase processivity factor
RPA	70, 32, 14	SSB	ssDNA-binding, polymerase stimulation, polymerase switching
MCM complex? (T antigen)	(95)	dnaB protein	DNA helicase
FEN1	44	POLI	RNA primer nuclease
RNAase H1	49, 39	RNAase H	RNA primer nuclease
DNA ligase I	102	Ligase	Ligation of DNA
CAF-1	150, 62, 60, 58, 50	-	Chromatin assembly

DNA Pol α , DNA polymerase α ; DNA Pol δ , DNA polymerase δ ; DNA Pol ϵ ; DNA polymerase ϵ ; MCM, minichromosome maintenance; RF-C, replication factor C; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RPA, replication protein A; T antigen, SV40 large T antigen; FEN1/RTH1, flap endonuclease 1/RAD27 two-homologue; RNAase H1, ribonuclease H1; CAF-1, chromatin assembly factor 1; POLIII, *E. coli* DNA polymerase III; POLI, *E. coli* DNA polymerase I; SSB, single-stranded DNA-binding protein.

*DNA polymerase δ and DNA polymerase ϵ are the two candidates for the replicative DNA polymerase in eukaryotic cells. DNA polymerase δ homologues from other species are composed of more than two subunits.

- **porovnání bílkovin v replikaci bakterií a eukaryot**
- u eukaryot musí fungovat *histonové chaperony* (CAF-1), které umožňují nanášení nukleozomů na vlákno (replikace syntézou druhého řetězce nekončí, musí vzniknout celé nukleozomové vlákno)
 - u eukaryot (a archeí) je nutné uvolnit DNA, která má být replikována, z nukleozómů -> nukleozomy, na nichž byla původní dsDNA, se rozpadnou a

vznikají nové histonové oktamery, kolem nichž se obtáčí dceřinná vlákna dsDNA
(> rychý nárůst syntézy histonů na počátku S fáze)

- nukleozomy se rozpadají (pomocí stresu, histonových chaperonů) před replikační vidlicí a za replikační vidlicí zase nově vznikají (pomocí histonových chaperonů)
- histonové chaperony – účastní se na rozpadu, interagují s helikázou, PCNA a dalšími proteiny replizómu
- histonové tetramery / dimery z původních nukleozomů jsou při sestavování nových nukleozomů asociovány s nově syntetizovanými histony (nejspíše náhodně, rovnoměrně s oběma dceřinnými vlákny DNA – seminkonzervativní model)

Table 1. Identity of the factors that catalyze the various stages of DNA replication described in Fig. 1

Factor	Archaea ^a	Eucarya ^a	Bacteria (<i>E. coli</i>)
Initiator	Orc1/Cdc6	ORC	DnaA
Helicase loader	Orc1/Cdc6	Cdc6 + Cdt1	DnaC
Helicase	MCM	MCM complex	DnaB
Single-strand binding	Various ^b	RPA	SSB
Primase	Primase (2)	Primosome (4)	DnaG
Replicative DNA polymerase	B-type (C+E) ^c D-type (E)	Pol δ and ε	DNA Pol III
Sliding clamp	PCNA	PCNA	β-Clamp
Clamp loader	RF-C	RF-C	γ-Complex
Ligase	DNA lig 1	DNA lig 1	Ligase
Processing	RNaseH/Fen1	RNaseH/Dna2/Fen1	RNaseH

^aThe eucaryal ORC complex has six subunits, Orc 1 to Orc6. Archaea possess proteins that are homologous to both Orc1 and Cdc6 and are termed Orc1/Cdc6; see the main text for discussion.

^bDistinct archaeal species have unique single strand binding proteins, hence the designation of “various.”

^cThere is a bifurcation in the distribution of polymerases in the Crenarchaeota (C) and Euryarchaeota (E). Crenarchaea possess only B-type replicative DNA polymerases, whereas euryarchaea have both B- and D-family enzymes.

- u archeí je většina enzymů podobná jako u eukaryot (úprava Okazakiho fragmentů u nich založena spíše na principu endonukleáz)
- v buňce je celá řada helikáz; řada z nich se účastní manipulací s DNA
- jednou ze zajímavých helikáz je *WRN* – helikáza objevená jako helikáza, jejíž mutace je zodpovědná za Wernerův syndrom
 - tato helikáza sama o sobě interaguje s celou řadou bílkovin, které se účastní:
 - přímo replikace (topoizomerázy, polymeráza delta)
 - oprav a stabilizace konců chromozomálních DNA (Ku protein)
 - interagují s bílkovinami, které se účastní odpovědi buňky na poškození genomu (transkripční faktor p53)
 - *Wernerův syndrom* – předčasné stárnutí (patří mezi syndromy předčasného stárnutí) – není jen vizuální záležitost, ale stárnutí se vším všudy (stárne organismus, ubývá mentální kapacita); mutace v jedné z asociovaných replikačních polymeráz
 - WRN helikáza není typická replikační helikáza, ale je to jedna z helikáz, která může pomoci při různých opravných mechanismech (rozplétání řetězců, Hollidayových struktur apod.)
- jak zabránit vícenásobné replikaci?
 - proběhne rozpoznání replikačního počátku díky proteinům, které jej rozeznávají; následně dojde k otevření dvoušroubovice v místě helikální instability, vazba dalších faktorů, následně DNA polymeráza a sestaví se její komplex; k zahájení syntézy by mohlo dojít několikrát za sebou – v jednu chvíli mohu být přítomny všechny složky iniciačního komplexu, nesmí k tomu ale dojít (mohlo by dojít k vyčerpání veškerých zdrojů na jednu replikaci – bakterie) -> organismy musí mít systém, jak bránit tomu, aby docházelo k této vícenásobné iniciaci replikace
 - princip: změní se templát (např. něco, co určuje replikační počátek, je degradováno), popř. DNA je nějak modifikována v oblasti replikačního počátku; zahájení replikace může být signál pro syntézu inhibitorů, které se musí vyředit během replikace; zároveň dochází k tomu, že bílkoviny rozeznávající replikační

- počátek jsou degradovány / pozměněny, aby tuto svoji funkci ztratily -> k další replikaci už na daném počátku nemůže dojít)
- složitá regulace, která má řadu úrovní: vyrovnávání různých faktorů, které jsou zpětnovazebně regulovány
 - více počátků na jednom chromozomu – zapínají se jen jednou – *proč?*
 - eukaryota i archaea – klíčová molekula: Cdc6 – aktivní pouze od M do pozdní G1 fáze, poté deaktivace fosforylací CDK (cyklin-dependentní kináza)
 - některé proteiny (DnaA, Cdc6) aktivní pouze s navázaným ATP
 - titrace iniciačních faktorů jinými vazebnými místy mimo počátek (DnaA)
 - SeqA (*E. coli*) – vtažení hemimetylovaného počátku do membrány

Terminace replikace

- lineární molekula, probíhá replikace: opožďující se řetězec musí být zahajován z nového a nového primeru: dostaneme se na konec, kde už další primer za tímto primerem být nemůže -> zbývající část vlákna už nemůže být zreplikována, není primer (-> potenciální zkracování konců)
- možná řešení tohoto problému:
 - *cirkulární molekula* (plazmidy, bakteriofágy – malé cirkulární molekuly i velké cirkulární molekuly – bakteriální nukleoid) – fúze replikačních vidliček
 - cirkulární molekula DNA nemá problém se zkracováním, ale s ukončením replikace -> replikace systémem valivé kružnice
 - *systém valivé kružnice* – starý řetězec vytěšňován novým řetězcem -> konkaterner genomů (může/nemusí být doplněn druhý řetězec) -> rozstříhání při balení (v případě bakteriofágů, replikace víckrát za sebou – stříhání na jednotlivé genomy) – u kruhových DNA
 - terminace pomocí *proteinového primeru* (u některých virů – zejména adenovirů – genomy vypadají tak, že jsou replikovány z proteinového primeru, který začíná syntézu přesně na začátku řetězce – nová syntéza začíná přesně na začátku řetězce a doběhne až do konce, na druhé straně totéž; součástí iniciačního komplexu jsou proteinové primery -> syntéza běží od konce ke konci -> odpadá problém s koncem opožďujícího se řetězce; nejde použít u větších genomů; součástí na 5' řetězce zůstává bílkovina, plazmidové/virové genomy využívají jako ochranu proti exonukleázám)
 - konec může být *zakončen vlásenkou* (někteří prvoci) -> zpětná replikace z vlásenky
 - *telomery* – variabilní konce většiny eukaryot
- *telomery*
 - struktura telomer: tendemově uspořádané repetice
 - minimálně jeden řetězec je bohatý na guanosin -> vznik složitých struktur (guanosin je schopen tvořit G-kvartety atd.) -> rozpoznáváno specifickými bílkovinami, které vedou k heterochromatinizaci tohoto úseku genomu -> **stabilizace konců** (hlavní funkce telomer), **brání zkracování konců chromozomů při replikaci**

Telomera	Repetice (ve směru 5' → 3' od telomery k centroméře)
<i>Tetrahymena</i> - makronukleus	CCCCAA
<i>Oxytricha</i> - makronukleus	CCCCAAAA
<i>Trypanosoma</i>	CCCTA
<i>Dictyostelium</i> rDNA	CCCTA
<i>Saccharomyces</i>	C _{2,3} A(CA) _{1,3}
<i>Arabidopsis</i>	C ₃ TA ₃
<i>Homo sapiens</i>	C ₃ TA ₃

- 1. syntetizován ribonukleoproteinem - telomeráza
- 2. asociován se specifickými proteiny
- 3. pozitivní vliv na expresi přilehlých genů
- 4. řada somatických buněk je bez aktívni telomerasy ⇒ postupné zkracování telomer při buněčných děleních ⇒ korelace mezi stářím buněk (jedince) a délkou telomer
- 5. asociován s telomerální nekódující RNA (TERRA)

- jak syntetizovat takovéto variabilní konce, které nejsou součástí původního genomu: zprostředkováno enzymem **telomeráza**
 - = ribonukleoprotein (RNA + protein)
 - komplex telomerázy zároveň obsahuje telomerázovou RNA, která je používána jako templát pro syntézu jednoho z řetězců G-bohatého řetězce v telomerách
 - -> telomeráza je tedy **RNA programovaná DNA polymeráza** (v podstatě reverzní transkriptáza)
 - brání zkracování konců chromosomů při replikaci – na 3' konci lagging strand po odstranění primeru chybí –OH očko, od kterého by mohla syntetizovat DNA polymeráza. Telomeráza podle svého RNA templátu prodlouží 3' konec, aby tam mohl být nasynthetizován primer a následně, aby mohl být doreplikován kódující úsek
- telomeráza kopíruje jen krátký úsek odpovídající repetici na konci (video v přednášce nádherně ilustruje)
- rozpoznání telomerických repetitive specifickými SSB -> váže se primáza -> syntéza druhého řetězce; část 3' konce zůstává jako jednořetězec, může invadovat zpátky do DNA řetězce – *t smyčka*
 - tato struktura (kde vznikají G-kvartety a další) rozeznávána specifickými proteiny (*shelteriny* a další) -> tvorba heterochromatinu
 - může vznikat trojřetězec

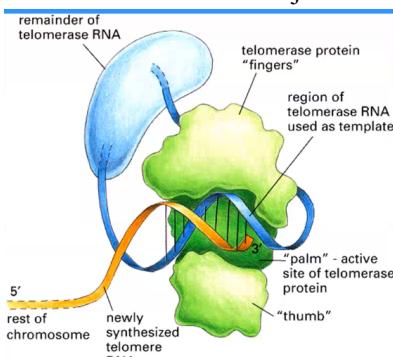


Figure 5-42. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

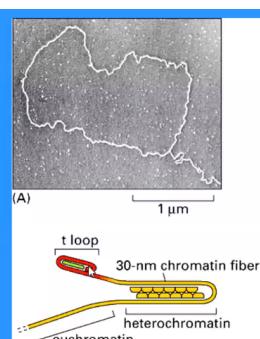
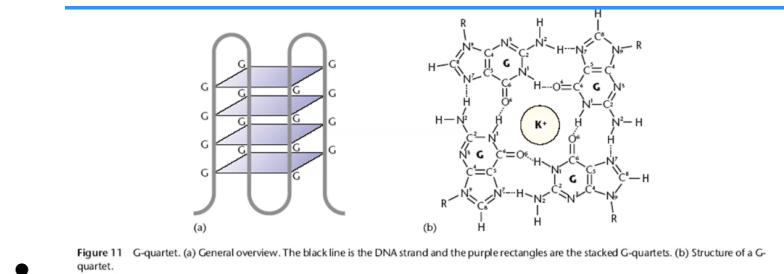


Figure 5-44. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition

- heterochromatin může od telomer expandovat -> může se rozšířit na oblasti, které se normálně exprimují, a snížit jejich expresi (-> pozitivní vliv na expresi přilehlých genů)

- řada somatických buněk je již bez aktivní telomerázy – její aktivita může končit s ukončením embryonálního vývoje, v průběhu dalších dělení dochází ke zkracování telomer (-> stárnutí buněk); některé buňky (kmenové, buňky z tkání dělících se po celý život) mohou mít telomerázu aktivní, u většiny je ale přítomnost telomerázy indikací pro nějaký zvrat / nádorové bujení
- použití při detekci nádorů
- stabilizace konců chromozomu – konce bez telomer (vzniklé zlomem chromozomů) mají tendenci rekombinovat
- telomery nejsou vždy tvořeny telomerázou (např. *Drosophila* – dochází k repetitivním retrotranspozicím retrotranspozonů – transponují se přes RNA -> dochází k reverzní transkripci, telomera je syntetizována transpozicí – postupným přeskakováním – retrotranspozonu; tedy telomera u *Drosophily* je tvořena non LTR retrotranspozomy = genomický mobilní element, který se přesouvá za pomocí reverzní transkripce)
- struktury vznikající v telomerách – specifická ukončení
 - G-kvartet



-
- G-kvartet vyskytuje se v G bohatých oblastech telomer, jedná se o čtyřšroubovici, která vzniká kvůli tomu, že guanosin má hodně možností párování (tzn. Hogsteenovo párování). Aby byly tyto úseky při replikaci překonány, je potřeba speciálních helikáz (např. WRN helikáza)
 - vlásenky
- důležitost funkční telomerázy ukazuje např. to, že pokud nemáme funkční telomerázu, je na to navázaná celá řada genetických onemocnění (např. *Dyskeratosis congenita* – její závažná forma je vázaná na mutace v genu pro diskerin – k němu se dostaneme u posttranskripčních modifikací – pseudouridinsyntáza; diskerin má strukturní roli v telomeráze; tato choroba se projevuje např. problémy s imunitní odpovědí, problémy s tvorbou krevních buněk – přesně tkáně, kde telomeráza zůstává funkční i v průběhu života a kde se nepřítomnost / nedostatečná funkčnost telomerázy projeví nejvýrazněji; kromě dalších poškození jsou velkým problémem pro tyto pacienty hematologická onemocnění a snížená schopnost reagovat na infekční choroby, obvykle nízký věk dožití)
- u kvasinek byla vyřazena telomeráza – ukázalo se, že na telomerických koncích se začaly objevovat retrotranspozony – nejspíš tu byly evolučně dřív, pak byla jejich aktivita utlumená telomerázovou aktivitou

Buněčný cyklus

- celý genom musí být replikován naprosto precizně během jednoho buněčného dělení (ale právě jednou!)
- bakterie – jednoreplikonový genom (pokud nebereme v úvahu plazmidy)
- eukaryota – mnohareplikonový genom
- archaea – jedno- i vícerareplikonový genom

- dva hlavní principy vztahu replikace a buněčného cyklu
 - *iniciace replikace uvádí buňky obvykle do dalšího buněčného dělení*
 - *buněčné dělení nemůže proběhnout bez dokončené replikace*
- polyténní chromozomy ve slinných žlázách dvoukřídlého hmyzu – výjimka: některé úseky genomu byly zmnoženy víckrát a vznikly silné tlusté úseky, kde došlo k replikaci nějakého úseku mnohokrát
- *bakterie*
 - složitější (zvláště u těch druhů, které se rychle množí v případě, že mají dobré podmínky pro život – i Escherichia coli)
 - doba zdvojení $T = 18\text{--}180 \text{ min}$ (podle podmínek – médium, teplota, provzdušnění, živiny atd.)
 - doba replikace $C = 40 \text{ min}$ ($42 \text{ min}, 4639221 \text{ bp} = 1840 \text{ bp} \times s^{-1}$) (pokud je replikace zahájen, je dokončena; doba replikace může být delší než doba zdvojení, po dokončení replikace je potřeba čas na dokončení replikace a dokončení dělení buňky – D)
 - doba mezi dokončením replikace a dokončením dělení buňky $D = 20 \text{ min}$
 - interval mezi dokončením replikace a zahájením replikace = B
 - $B + C + D = T$
 - $C + D > 60 \text{ min}$ pokud $T > 60 \text{ min}$
 - *překryvné cykly* (na 1 bakteriálním chromozomu může běžet více replikací najednou, což urychlí replikaci – děje se jen, pokud má buňka k dispozici mimořádně dobré médium, pokud je vyčerpáno, zase se vrátí k normálu)
 - poměr hmotnosti buňky / počet originů = konstantní
 - replikace je zahájena, pokud buňka syntetizuje bílkoviny tak rychle, že si vytvoří dostatečné množství iniciačních faktorů – např. DnaA, nebo nařídí inhibiční faktory, které blokují počátek k další replikaci)
- *eukaryota*
 - $G1 \rightarrow (G0) \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M \rightarrow \text{cytokinez}$
 - překryvné cykly neexistují
 - mezi fázemi buněčnému cyklu jsou kontrolní body, kde je kontrolováno, v jakém stavu je to, co se dělo předtím (může začít replikace? proběhla syntéza DNA v pořádku? mohu pokročit do mitózy? apod.)
 - podobné kontrolní body jsou u archeí

Table 1**Cell cycle nomenclature in bacteria and eukaryotes.**

Cell cycle stage	Bacteria ^a	Eukaryotes ^a
Pre-replicative	B	G ₁ (gap 1)
Replicative	C (chromosome replication)	S (DNA synthesis)
Post-replicative	D (chromosome partition and cell division)	G ₂ (gap 2) M (mitosis)

^a The relative lengths of the different cell cycle stages vary extensively between different organisms in both domains of life, and depend upon growth conditions, cell differentiation, and developmental stage of the organism etc.

Table 2**Organization of the cell cycle in different archaea.**

	<i>Sulfolobus</i> [28]	<i>Methanocaldococcus</i> [29]	<i>Methanothermobacter</i> [16]	<i>Archaeoglobus</i> [30]
Phylum	Crenarchaeota	Euryarchaeota	Euryarchaeota	Euryarchaeota
Number of genome equivalents in exponential growth phase	1–2	3>10	4–12 ^a	1–2
Number of genome equivalents in stationary phase	2	1–5	2–4	1 or 2
Cell division	Symmetric	Symmetric or asymmetric ^b	Symmetric ^c	Symmetric
Length of G ₁	Short	nd	nd ^d	Short
Length of G ₂	Long	nd	Absent	nd ^e
Time between genome segregation and cell division	Short	nd	Long	nd ^d

Nd, not determined.

^a Filaments consist of multiple cells (Figure 2); individual cells probably restricted to 2–4 genome copies.

^b Daughter cells sometimes of unequal size and with different DNA content.

^c Symmetric in terms of individual cells; filaments might divide asymmetrically (Figure 2).

^d Probably short.

^e Probably long.

- po dokončení replikace je potřeba, aby došlo k *rozchodu genomů* (chromozomů)
 - *eukaryota* – centromery (heterochromatin) + dělící vřeténko (tubulin), druhově specifické sekvence, chráněné silnými terminátoory transkripce z obou stran (na centromery se váže celá řada bílkovin, obrovská regulace)
 - *bakterie* – vliv vazby na membránu v oblasti počátku (účast jakési bakteriální obdobky cytoskeletu)
 - prokaryota (bakterie i archaea) – **FtsZ protein**
 - funkční a strukturní, nikoliv sekvenční homolog tubulinu
 - funguje jako „prstýnek“, který zaškrcuje dělící se buňku, aby došlo k jejímu rozdělení
 - účastní se i participace rozdělených bakteriálních chromozomů do dceřiných buněk)
 - další zúčastněné proteiny u *E. coli* – ParC, ParE (podjednotky topoizomerázy IV); MukB
 - *archea* – euryarcheota – FtsZ protein
- každý buněčný cyklus má fázi, kdy se připravuje k replikaci, fázi replikace, fázi přípravy k dělení a fázi dělení; fáze mají různá jména podle toho, o jakou doménu života jde
- bakterie mají překryvné cykly umožňující jim dělit se rychleji, než je součet trvání všech fází

Replikace organelárních genomů

- *replikace mitochondrálních genomů*
 - původní model byl savčí model (původní představa o kódující kapacitě mitochondrií), existují mitochondrie u hub, rostlin, které mají mitochondrie se stovkami tisíc páru bazí dlouhými genomy
 - replikace zahajována z řady promotorů, kde probíhá zahájení syntézy kódující mitochondriální RNA
 - houby, rostliny, kvasinky – složitější replikace, může probíhat z více úseků, mohou být lineární a následně cirkularizovány / obráceně apod.
 - představa a replikaci mitochondriální DNA stále není uzavřená, různé modely
 - disperzivní replikace – vyvrácena

- replikace začíná na promotoru pro těžký řetězec (HSP), kde dochází k častější transkripci (častější zahajování transkripce RNA polymerázou, která je abortivní -> často není syntetizován celý řetězec); díky tomu, že je transkripcí častá, ale neprobíhá do konce, můžeme vidět D-smyčku: trojřetězec, kdy je jedno vlákno vytlačeno nově vznikajícím RNA řetězcem (RNA řetězec v D-smyčce může být využit mitochondriální DNA polymerázou gama pro prodloužení řetězce a syntézu nového řetězce – ve chvíli, kdy přechází přes promotor lehkého řetězce, je tento promotor aktivován, odhalen, může dojít k tvorbě RNA primerů na lehkém vlákně a syntéze komplementárního řetězce)
 - LSP = light strand promoter, HSP = heavy strand promoter
 - replikace je jednosměrná
 - replikace těžkého řetězce se rozeběhne, až když doběhne do určitého místa, odkryje místo pro replikaci lehkého řetězce
 - je iniciovaná transkriptem z LSP v tzv. D-loop
 - RNA polymeráza, která se účastní transkripce mtDNA, může být za určitých okolností použita pro syntézu nového řetězce (tzn. replikace a transkripcí se kryjí?)
- mitochondriální DNA polymeráza gama má stejně jako katalytické podjednotky eukaryotních DNA polymeráz opravnou aktivitu; vliv poškození této aktivity u DNA polymerázy gama na mnohobuněčný savčí organismus – předčasné stárnutí, vyšší obsah mutací mitochondriální DNA, vznikají defektní genomy / replikační intermediáty, které jsou lineární mitochondriální DNA
- kvasinka – 19 promotorů
 - často je replikace zahajovaná z promotoru, protože je RNA použitá jako primer
 - replikace obousměrná, složitější regulace replikace (více replikačních počátků)
 - hlavní enzymy: primasa, RNasa H, DNA polymerasa
- čeká nás ještě řada nových objevů stran mitochondriální replikace
- replikace chloroplastové DNA
 - Figure 1. Chloroplast DNA Structure and Recombination-Dependent DNA Replication.**

(A) The end of a monomeric genome recombines with another molecule and initiates replication. Replication proceeds to the right to generate product 1, an all-blue head-to-tail concatemer. Digestion with a restriction endonuclease that cleaves the genome once, at the site marked in red, yields a genome-size fragment. An alternative recombination initiates leftward replication to generate product 2, a head-to-tail concatemer containing an inverted (green) segment, that yields a larger-than-genome-sized fragment. Bold arrows indicate the direction of replication. The IRs are indicated by thick gray and black lines.

(B) A multigenomic structure produced by recombination-dependent replication.

(C) Circular forms of the genome produced by intramolecular recombination (flipping). Note that the larger-than-genome-sized fragment predicted by the map of product 2, and detected by Oldenburg and Bendich (2004), cannot be generated from genome-sized circles.
 - viz dříve a články

- po replikaci musí dojít k *rozchodu chromozomů* – u eukaryot zajišťují centromery
- *centromery*
 - silný heterochromatin s navázanými bílkovinami rozeznávající centromeru a zajišťující vazbu na dělicí vřeténko
 - ochrana silnými terminátory transkripce, aby nedošlo k narušení heterochromatinu transkripcí
- *minimální požadavek na lineární eukaryotický chromozom*
 - *replikační počátky* – uchování informace (syntéza kopie)
 - *telomery* – zajišťuje stabilitu a nezkracování
 - *centromera* – zajišťuje segregaci
- umělý chromozom může být připraven – syntetizován de novo
 - můžeme se ho představit jako vektor – nosič genetické informace, která může být k něčemu použita
 - umělé chromozomy v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* byly použity k vložení nějaké cizí DNA -> použití k sekvenování lidského genomu a klonování velikých úseků lidského genomu, které nebylo možné úspěšně klonovat v jiných vektorech
 - (články zabývající se chemickou syntézou chromozomů de novo)
- při přenosu jakékoliv informace dochází k šumu – chybám (příklad – tichá pošta: při přenosu vznikají chyby, někteří hráči nechtějí poslat nesmysl a snaží se chybu opravit – můžou buď opravit nebo ještě přispět k prohloubení chyby)
- k chybám může dojít i mimo replikaci – mutace; buňka se s tím musí vypořádat