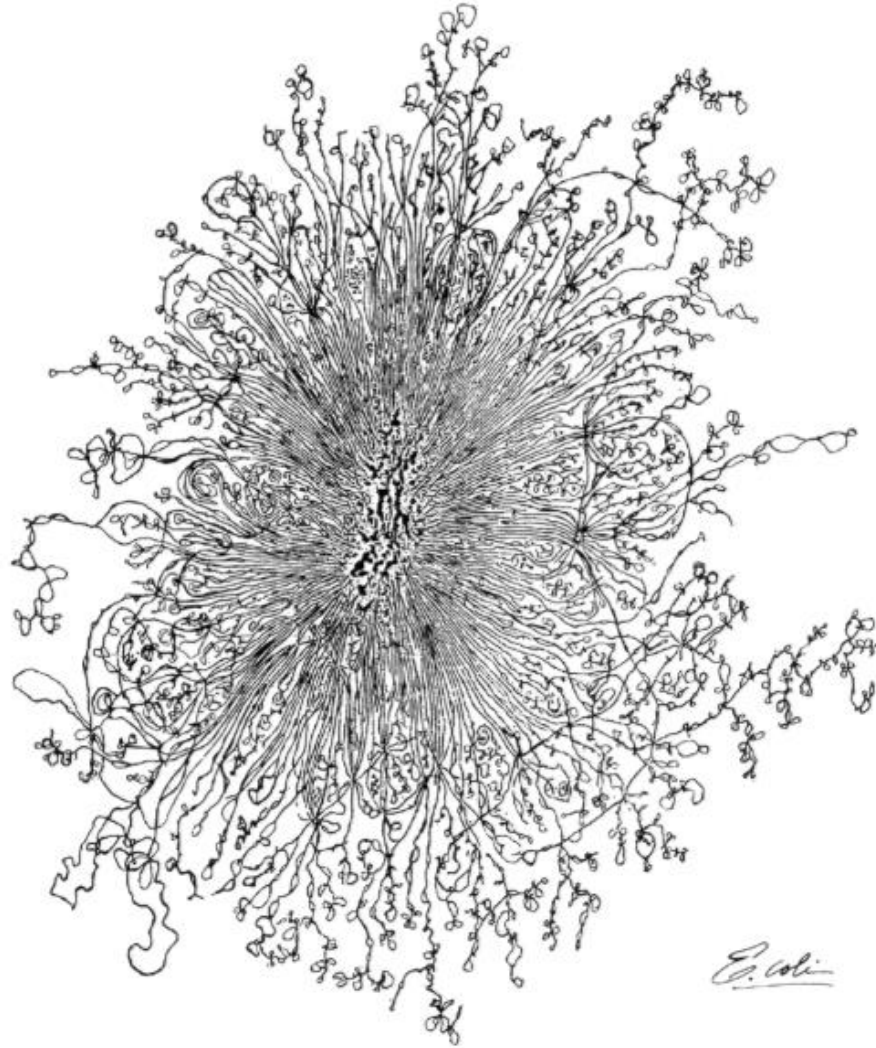


# DNA-replikation



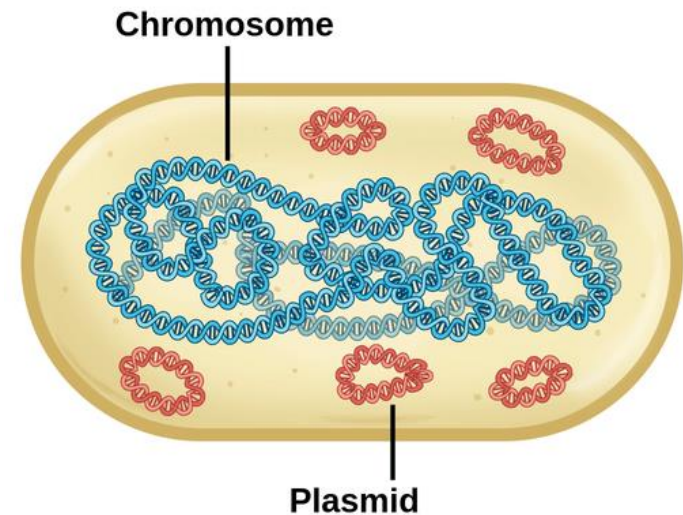
E.Coli DNA spread  
on a slide  
[www.pitt.edu](http://www.pitt.edu)

# Dagens föreläsning

- En jämförelse mellan eukaryota och prokaryota genom
- Grundläggande enzymatiska processer vid eukaryot DNA replikation (mycket lik prokaryot!)
- Föreläsningen täcker bl.a.:
  - Leading och Lagging strand
  - Processivity och proofreading
  - Replikationsgaffel och replisome
  - Superhelicitet och topoisomeraser
  - Nukleaser och ligaser

# Bakteriella genom

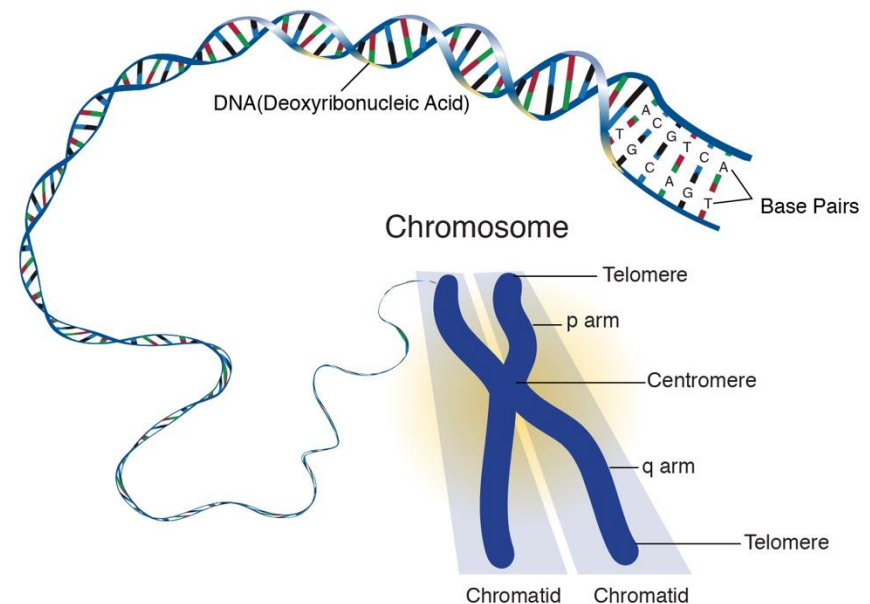
- Cirkulärt, dubbelsträngad DNA-kromosom (haploid)
- Storleken varierar mellan olika typer av bakterier: 0,5 – 11,0 Mbp\*
- Hos *E. coli*: ca. 4400 gener
- Bakterier kan också innehålla plasmider: små, cirkulära, dubbelsträngade DNA-molekyler: 3-5 kbp\*\*
- Plasmider innehåller få gener och kan överföras mellan bakterier – jmf. antibiotikaresistens



\*Mbp = Mega-base-pair, d.v.s. miljoner baspar, \*\*kbp = kilo base pair, d.v.s. tusen baspar

# Eukaryota genom (människa)

- Linjära, dubbelsträngade DNA-kromosomer
- 23 kromosom-par, d.v.s. totalt 46 kromosomer då våra celler är diploida
- Storleken för enskilda kromosomer varierar mellan 50 – 300 Mbp
- En haploid uppsättning kromosomer motsvarar ca. 3 Gbp\*, d.v.s. 3 miljarder baspar och en typisk cell innehåller därför 6 Gbp.
- 30 000 gener (i dubbel uppsättning)



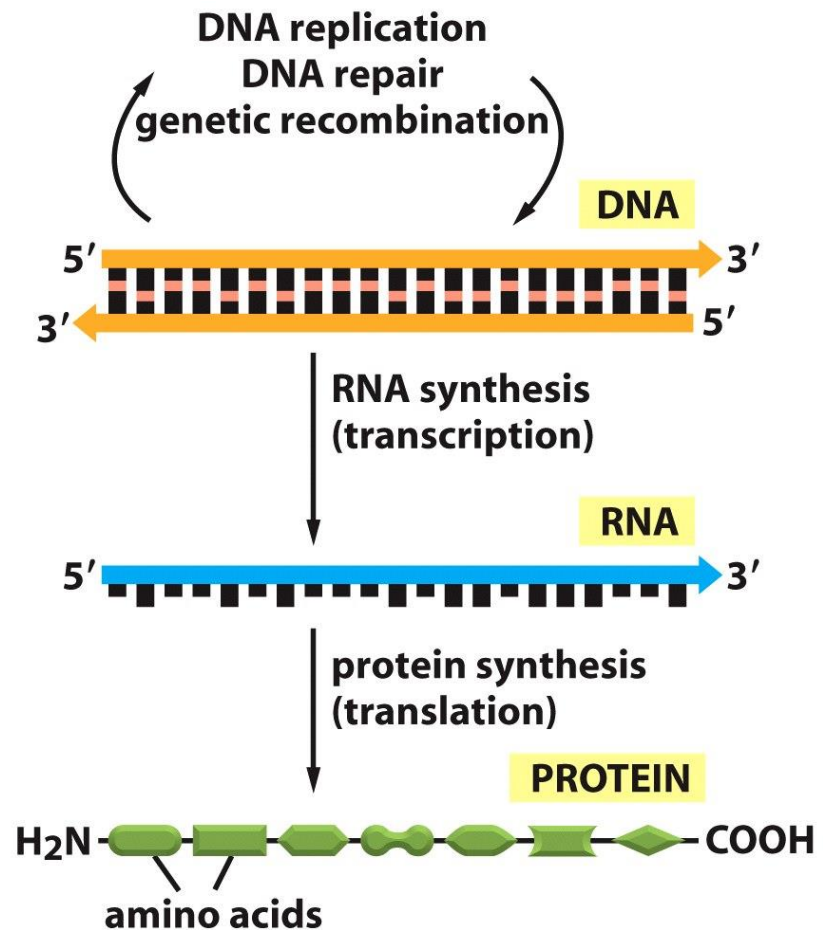
\*Gbp = Giga-base-pair, d.v.s. miljarder baspar

# DNA-replikation

Den centrala dogmen

Innan celldelning så  
måste DNA kopieras:

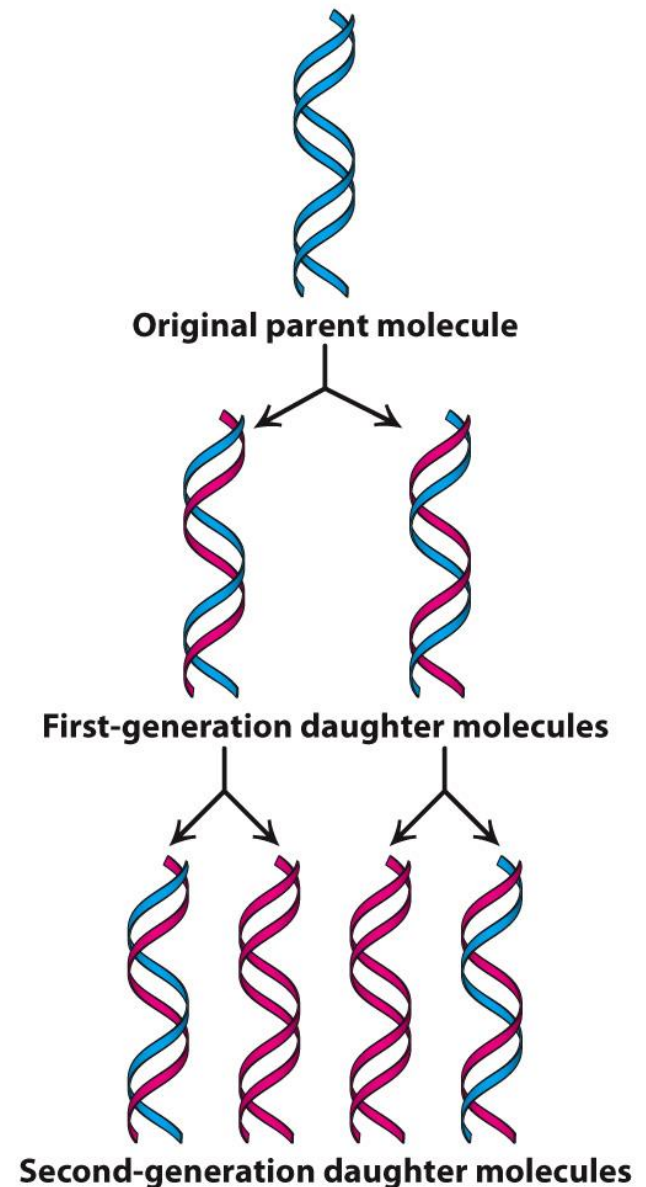
DNA replikation



# DNA replikation är semikonservativ

De två strängarna kan separeras och komplementära sekvenser syntetiseras. På det viset skapas två identiska dotter-molekyler.

På grund av att de två dottermolekylerna som bildas innehåller en gammal (parental) sträng och en nybildad (nascent) sträng, så brukar man säga att DNA replikation är semikonservativ!



**Figure 4.22**

*Biochemistry*, Eighth Edition  
© 2015 Macmillan Education

# Replikationsbubblor och origins

DNA replikation startar vid särskilda ”origins of replication”.

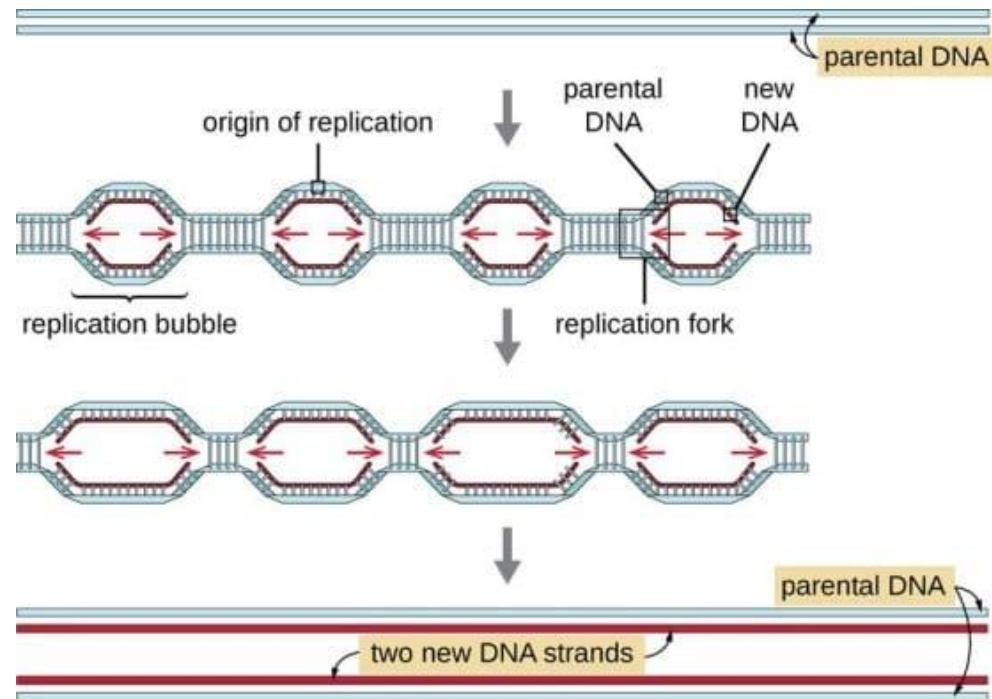
Från dessa origins bildas öppningar i DNA-molkylen: replikationsbubblor

I replikationsbubblor används parentalt DNA som mall för syntes av nytt DNA.

Replikationsbubblor blir allt större och växer i två riktningar.

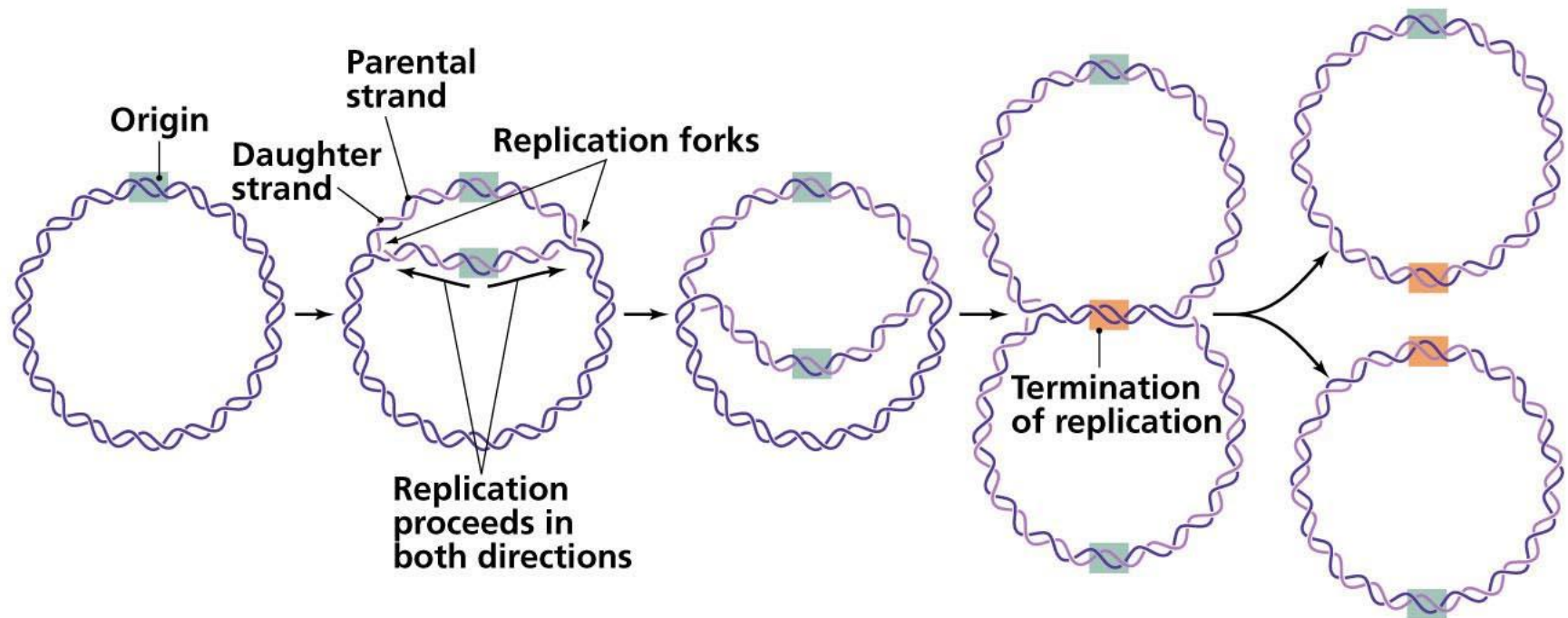
När replikationsbubblor når varandra, smälter de samman.

I ytterkanterna av varje replikationsbubbla finns det två replikationsgafflar, där syntes av nytt DNA sker.



## Bakteriell DNA replikation startar också från ett "origin of replication"

- Bidirektionell
- Ett origin
- Två replikationsgafflar





## **Problem vid DNA-replikation (1)**

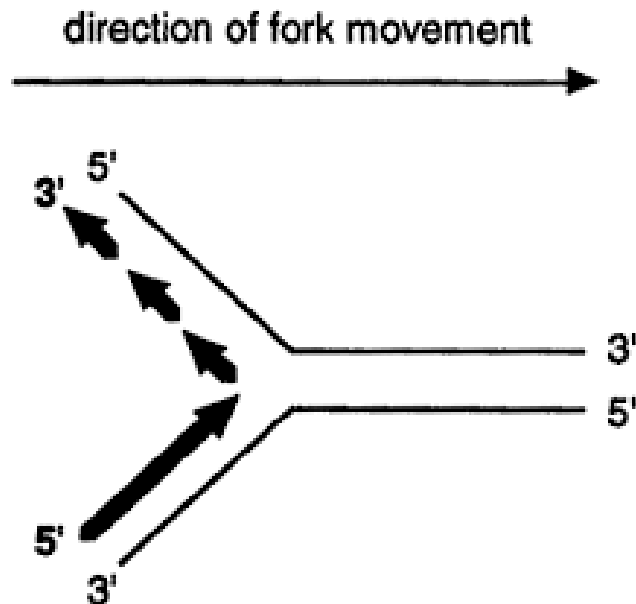
DNA-replikation sker i riktningen 5'-till-3', men de två strängarna i DNA-helixen har motsatt riktning (antiparallella).

**En av DNA strängarna tillverkas genom kontinuerlig DNA-syntes, medan den andra syntetiseras i form av korta fragment.**

Replikationsgaffeln är där DNA-syntes sker.

Gaffeln rör sig i en riktning och båda strängarna kopieras samtidigt.

DNA-polymeraser kan endast syntetisera DNA i 5' → 3'-riktning.



## Vid replikationsgaffeln syntetiseras en av DNA strängarna genom kontinuerlig DNA-syntes, medan den andra syntetiseras som fragment.

Vid replikations-gaffeln syntetiseras en av de två strängarna kontinuerligt i 5' → 3' riktningen. Denna sträng kallas "leading strand"

Den andra strängen syntetiseras också i 5' → 3', men p.g.a. av att DNA helixen är antiparallell, så sker denna syntes i form av små fragment - Okazaki fragment. Denna sträng som skapas som fragment kallas "lagging strand"

Genom att de två strängarna syntetiseras på detta vis så kan replikationsgaffeln hela tiden röra sig i en riktning.

Okazaki-fragment är 100 - 200 nukleotider (nts) långa i eukaryoter, 1000 – 2000 nts i prokaryoter

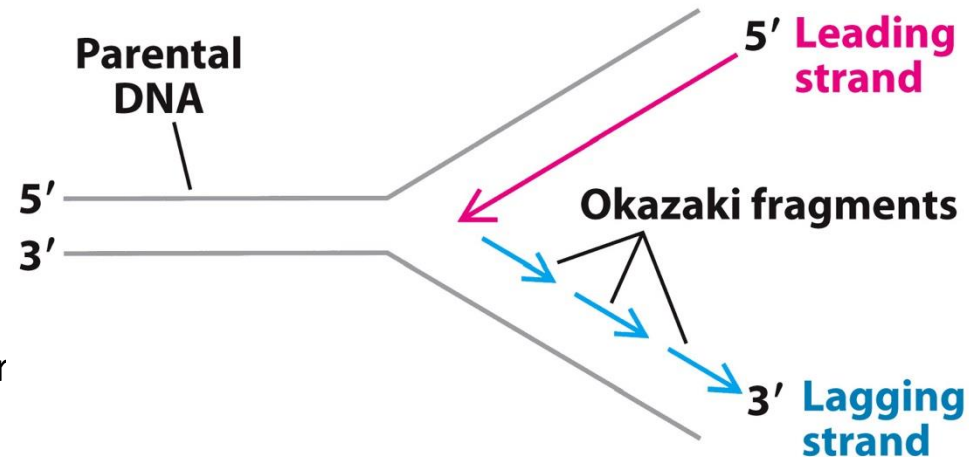
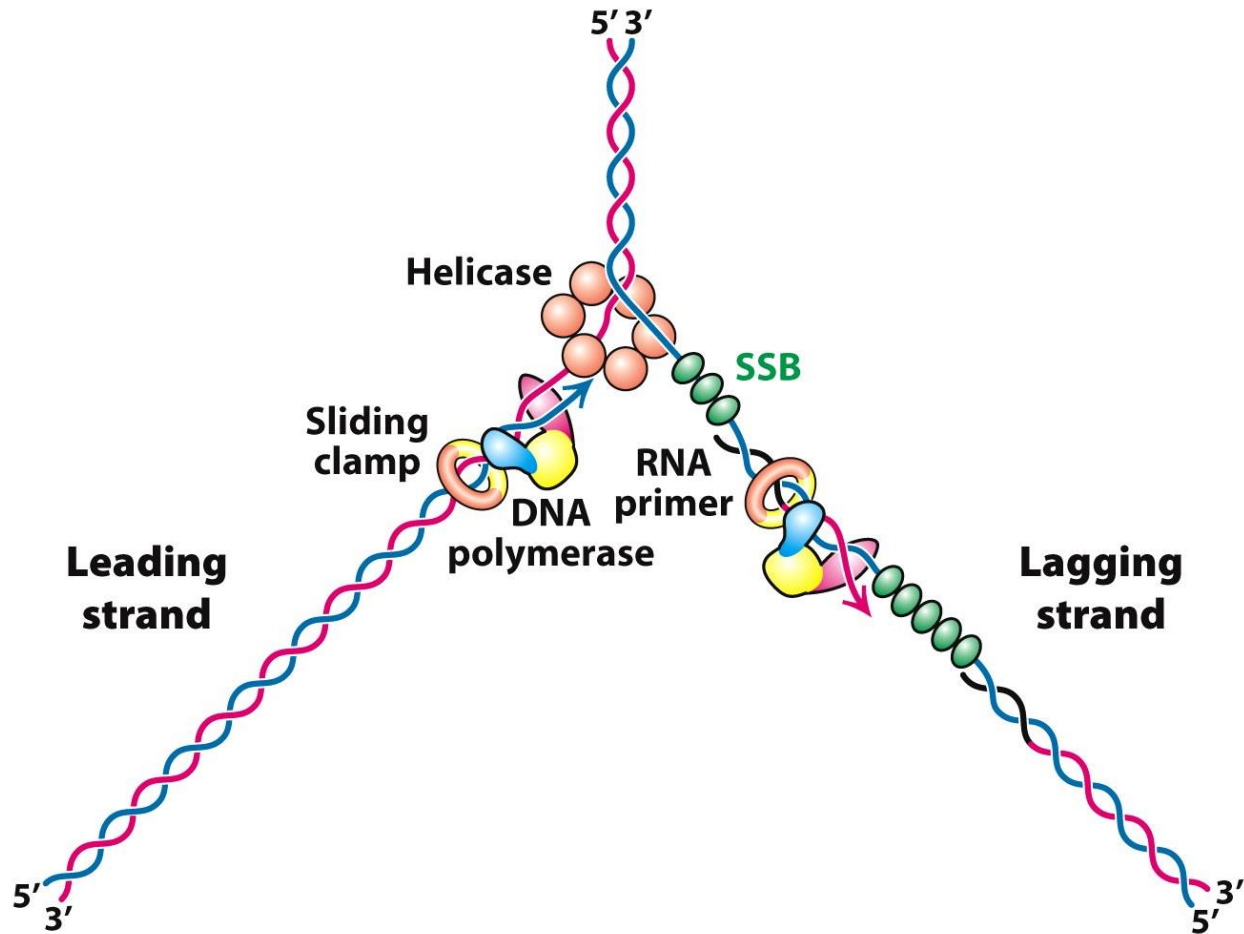


Figure 28.10  
Biochemistry, Eighth Edition  
© 2015 Macmillan Education

# Enzymerna vid replikationsgaffeln



**Figure 28.21**  
*Biochemistry, Seventh Edition*  
© 2012 W. H. Freeman and Company

# DNA-polymeras

Katalyserar påkopplingen av nya nukleotider till 3'-änden på den växande DNA-molekylen.

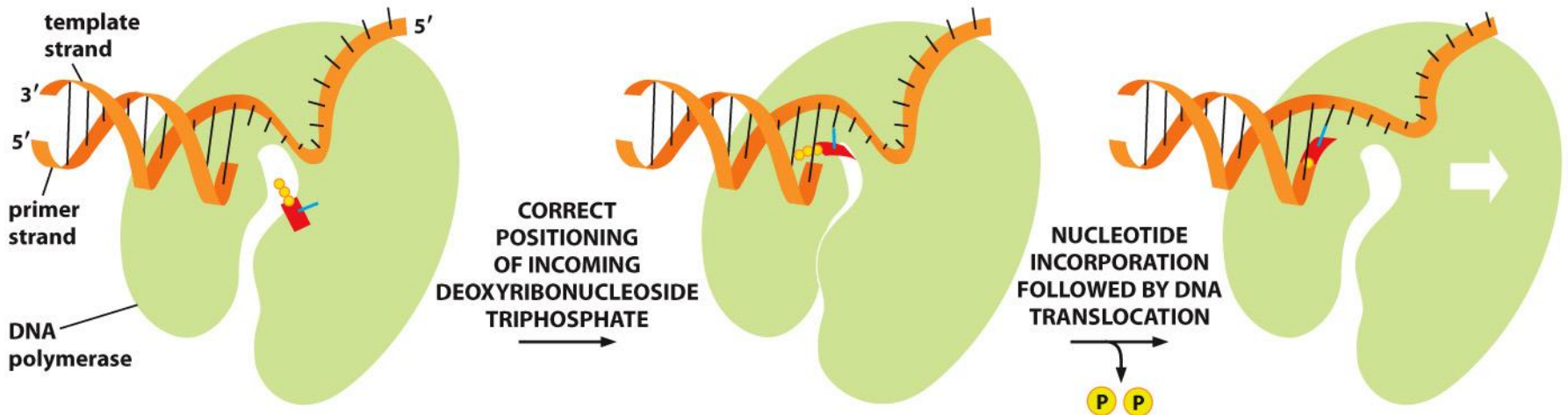


Figure 5-4c Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

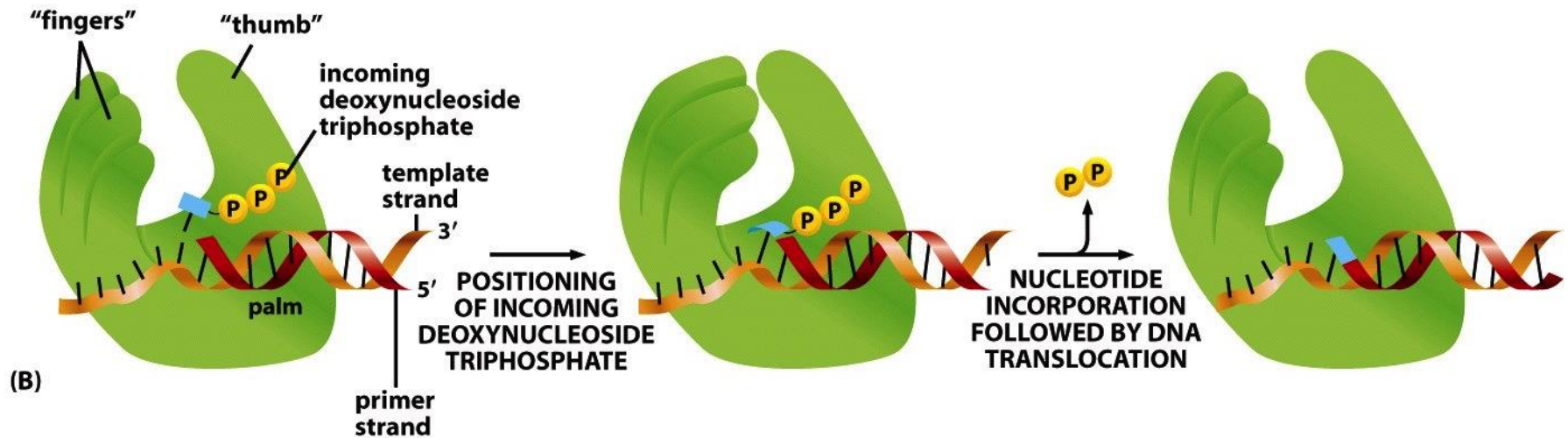
DNA-polymeraset hjälper till att välja ut rätt nukleotid

När rätt nukleotid är på plats, så sker en konformationell förändring i DNA-polymeraset

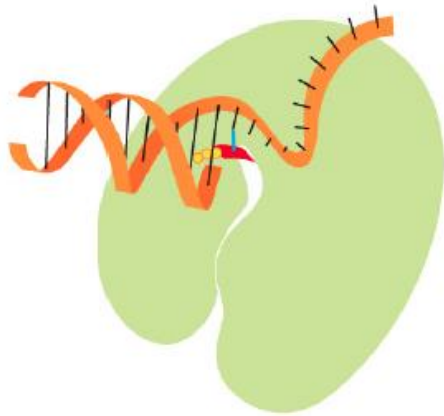
När pyrofosfat spjälkas av, så öppnar sig DNA-polymeraset igen.

Detta stimulerar påkopplingen av den nya nukleotiden.

# DNA-polymeras påminner om en högerhand som öppnar och stänger sig

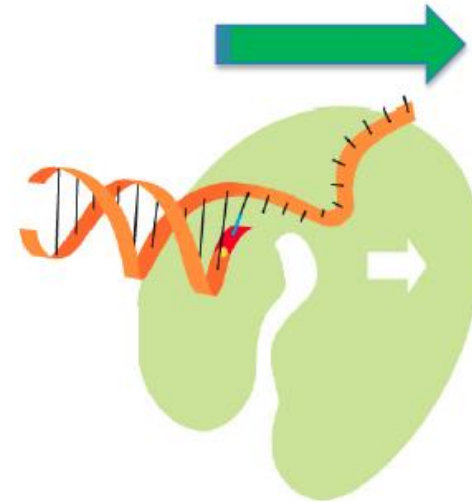


# Ett DNA-polymeras måste både vara noggrant och effektiv



## “Fidelitet”

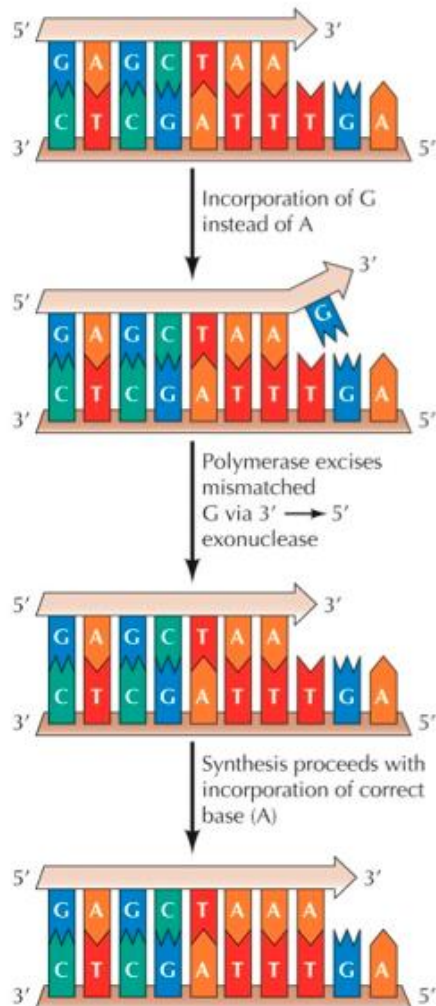
DNA-polymeraset får inte  
göra fel - rätt nukleotid  
måste inkorporeras



## “Processivitet”

DNA-polymeraset måste effektivt  
kunna replikera långa sträckor av  
DNA

# För att öka på fidelitet kontrolläser DNA-polymeraser den nya DNA strängen



DNA-polymeras känner av om en felaktig nukleotid har satts in i strängen.

Om det sker “backar” DNA-polymeraset och använder sin har en 3' → 5' exonukleas-aktivitet för att ta bort den felaktiga nukleotiden. Sedan sätts en ny nukleotid in!

Kontrolläsa = Proofreading

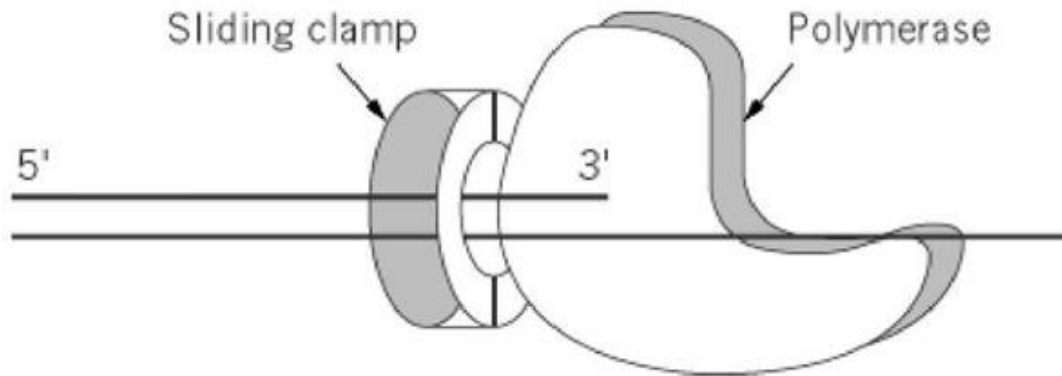


# DNA-polymeraser måste vara processiva!

Processivitet = förmågan att koppla på många nukleotider till den växande DNA-strängen, utan att polymeraset lossnar från mallsträngen.

DNA-polymeraser får hjälp med detta av ett specialiserat protein, som fungerar likt en “sliding clamp” (en glidande klämma!)

Sliding clamp bildar en ring som håller kvar DNA-polymeraset på mallsträngen. Kan inte lossna från DNA lika lätt och hastigheten på DNA-syntesen ökar upp till 50 gånger!



Utan sliding clamp: 10-20 nt/s  
Med sliding clamp: 500-1000 nt/s

## **Problem vid DNA-replikation (2)**

DNA-polymeraser kan inte starta DNA replikation *de novo*. De behöver en primer.

En speciell typ av RNA-polymeras som kallas *primas*, syntetiserar en kort RNA-sträng ( $\approx 5$  nukleotider) som är komplementär till mall-DNA. Denna RNA-sträng används sedan som en *primer* för DNA syntes.

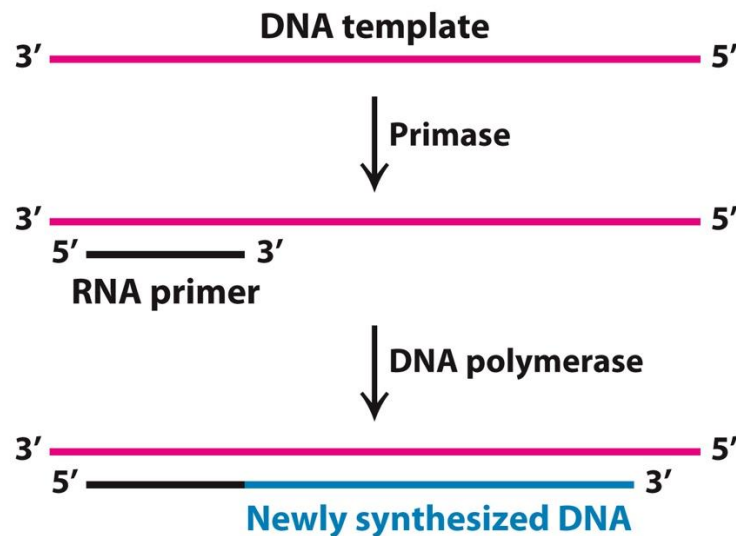
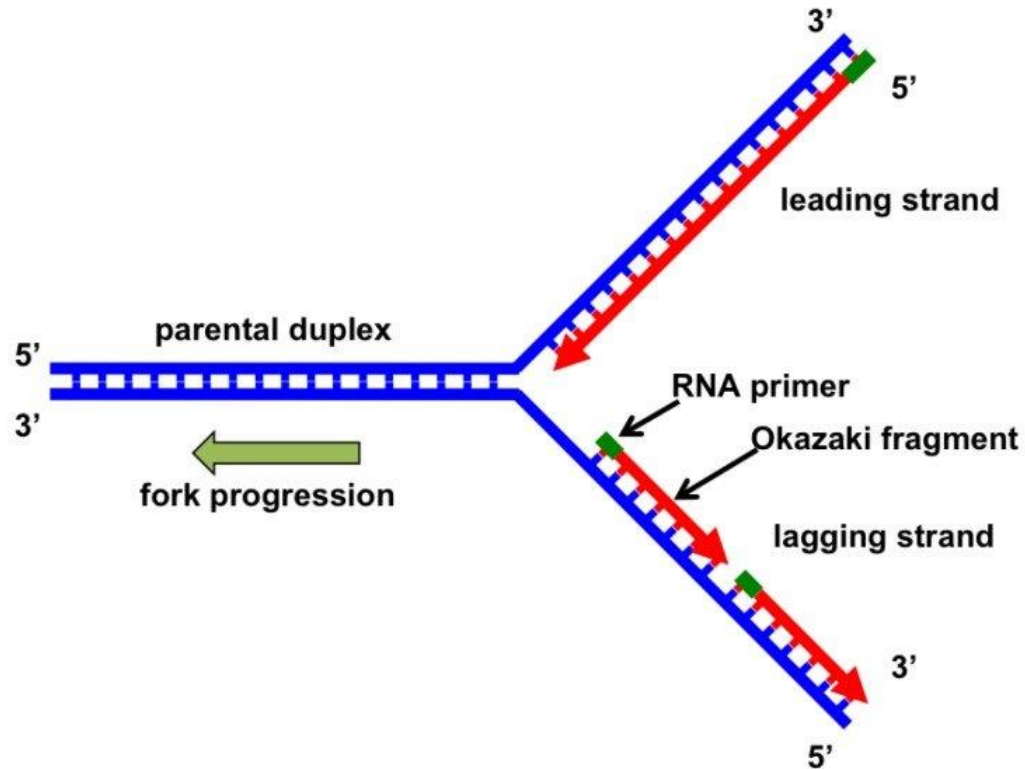


Figure 28.9  
Biochemistry, Eighth Edition  
© 2015 Macmillan Education

En RNA-primer används som startpunkt från vilket DNA polymeras kan starta.

I våra celler sitter primaset tillsammans med ett DNA-polymeras! Mer om denna speciella lösning i morgondagens videoföreläsning!

**RNA primers behövs både för att syntes av såväl leading som lagging strand**



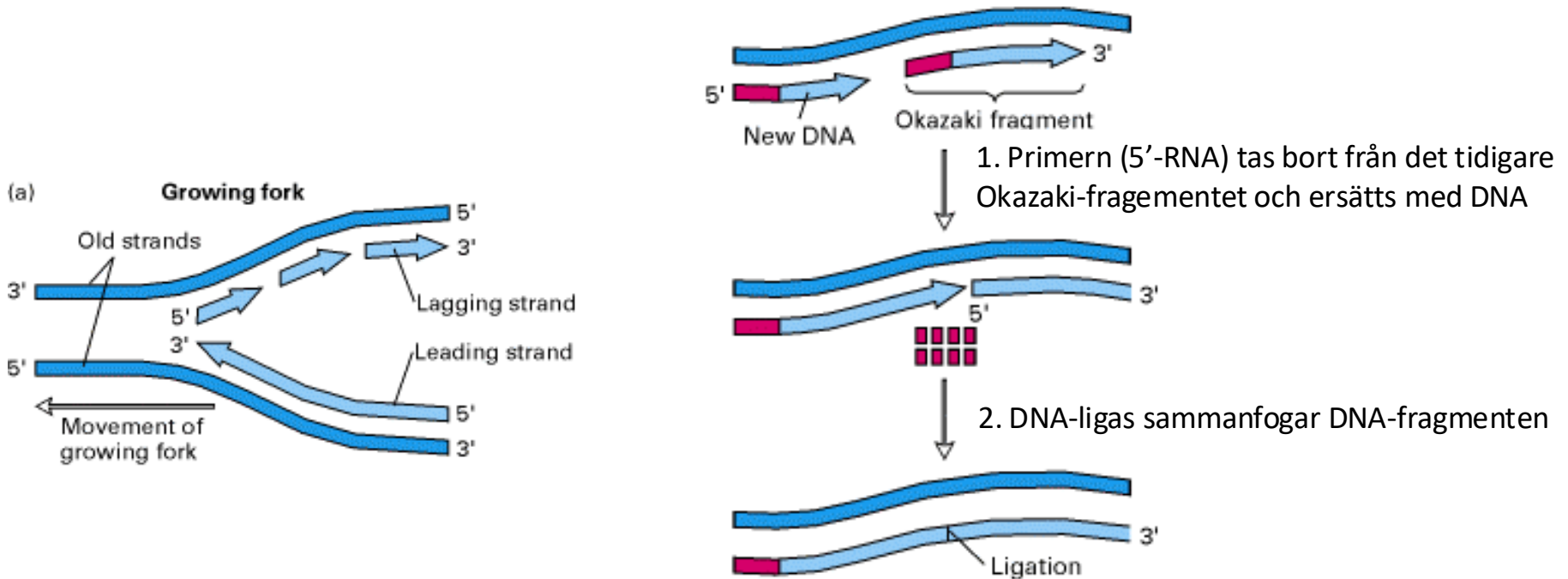
### **Problem vid DNA-replikation (3)**

På lagging-strängen finns en RNA-primer i början av varje Okazaki-fragment!

Vi vill inte ha sträckor av RNA i DNA-molekylen!

Detta är ett problem som måste åtgärdas. RNA-primern måste bort och ersättas med DNA. Sedan måste ryggraden på DNA förslutas så att det inte finns några "nicks", d.v.s. brott i socker-fosfat-ryggraden.

Man brukar tala om: "Okazaki fragment maturation" och denna process sker i två steg!



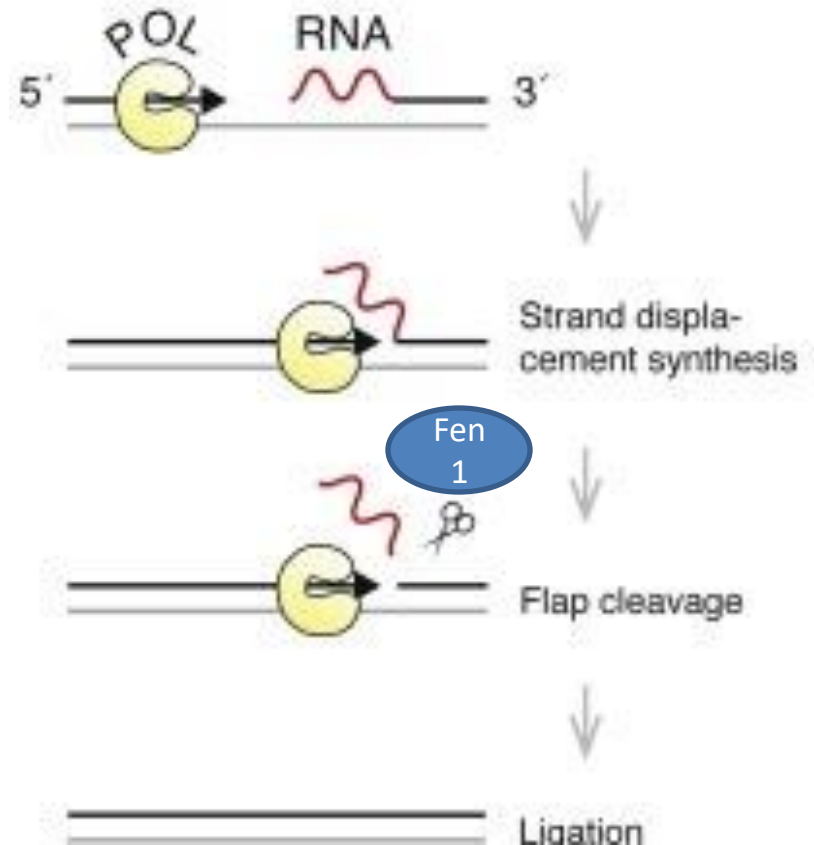
# Hur RNA-primern tas bort i eukaryoter.

DNA polymeras kör in i RNA/DNA hybriden.

Detta leder till att RNA primern lämnar DNA och bildar en "flap"-struktur. Detta kallas *strand displacement synthesis*.

RNA-flappen klyvs av flap endonuclease 1 (FEN1).

Nicken i DNA ryggraden repareras sedan av DNA-ligas.



**Nukleaser är enzymer som bryter ner polynukleotidkedjor (DNA eller RNA) genom att bryta fosfodiesterbindningar.**

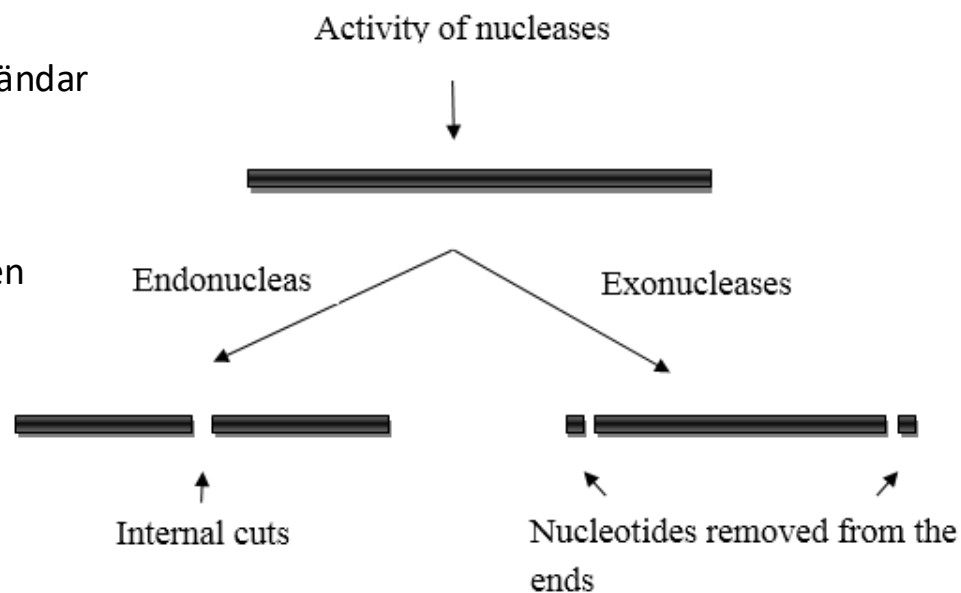
*Två typer av nukleaser:*

**Exonukleaser** klyver av en nukleotid åt gången från ändrar (antingen från 5' eller 3'-änden).

5' till 3' exonukleas alt. 3' till 5' exonukleas.

**Endonukleaser** klyver fosfodiesterbindningar i mitten av en längre polynukleotidkedja.

t.ex. restriktionsenzymer som klyver vid en viss sekvens





När Okazaki-fragmentet har förlängts så allt RNA är borta och endast DNA finns kvar, lämnar DNA polymeras platsen. Istället anländer enzymet DNA-ligas, som binder till platsen för brottet i DNA-strängen.

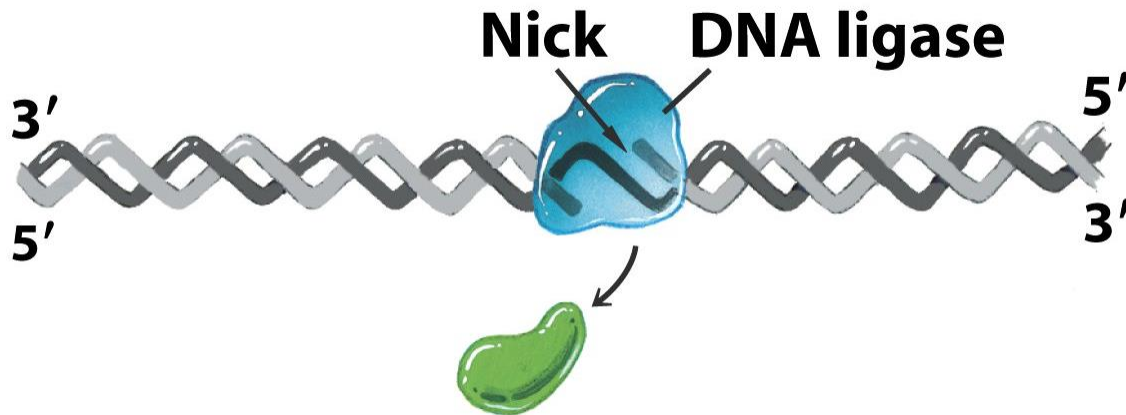


Figure 20-13c Principles of Biochemistry, 4/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

DNA-ligaset katalyserar bildandet av en fosfodiester-bindning, som sluter brottet i DNA-strängen. Sedan lämnar DNA-ligaset och en kontinuerlig DNA-sträng har skapats!

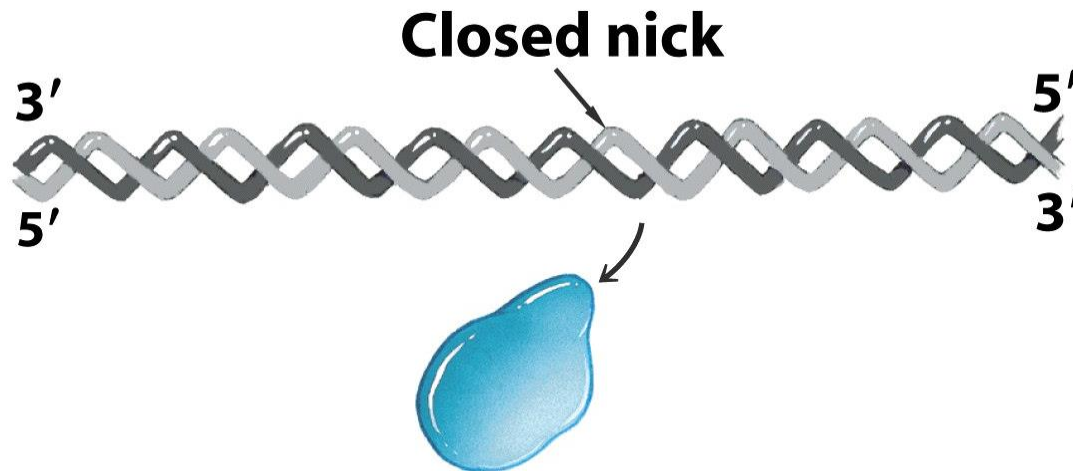
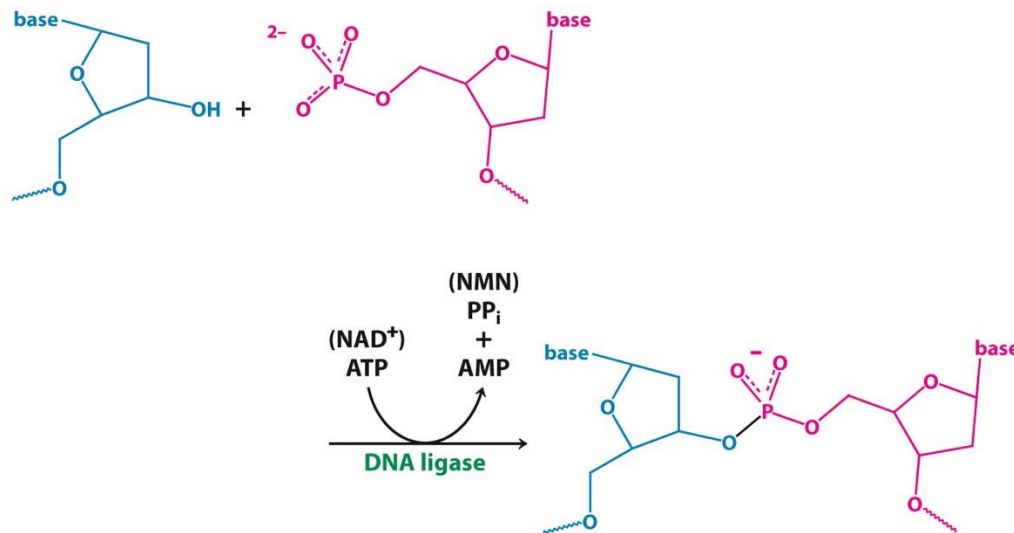


Figure 20-13d Principles of Biochemistry, 4/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

DNA-ligaser kan koppla samman DNA fragment. Enzymet katalyserar bildningen av en fosfodiesterbindning i en reaktion som kräver tillförd energi. Vanligtvis används ATP.



**Figure 28.11**  
*Biochemistry, Eighth Edition*  
© 2015 Macmillan Education

## **Problem vid DNA-replikation (4)**

DNA är dubbelsträngat! Hur kan vi dela på strängarna så att DNA replikation kan ske?

För att syntetisera DNA måste vi också separera på de gamla strängarna. Det görs av en typ av enzym som kallas "Helikas".

Helikaser är motorproteiner som rör sig längs nukleinsyrors fosfodiester-ryggrad och vars funktion är att separera två sammanlänkade DNA strängar och på så vis öppnar upp helix-strukturen. Det finns även helikaser som fungerar på RNA!

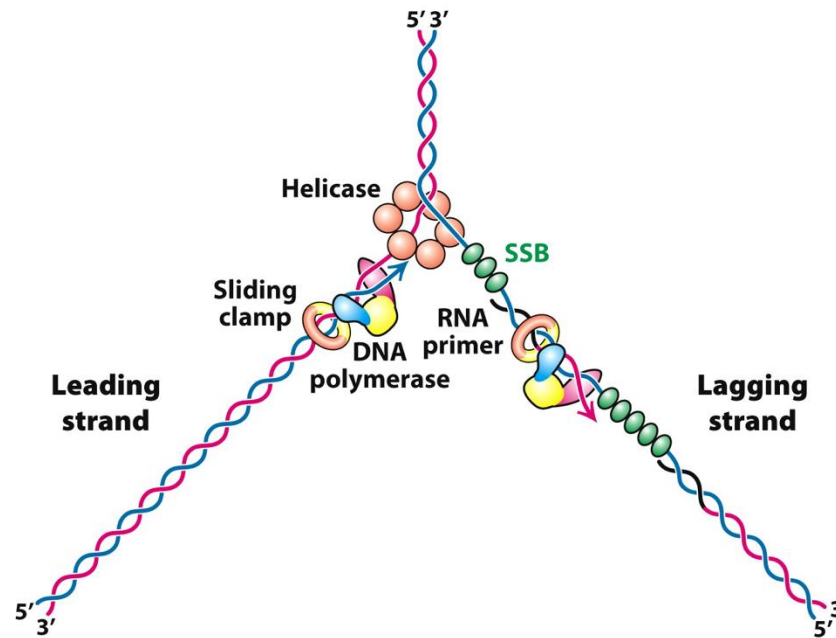


Figure 28.21  
Biochemistry, Seventh Edition  
© 2012 W. H. Freeman and Company

# Helikas

Helikaset består av en ring-liknande struktur med sex likadana subenheter.

Ringen sitter runt ena DNA-strängen och rör sig fram utmed strängen i steg som är beroende av ATP-hydrolysis. Helikaset fungerar som en kil som ser till att den dubbelsträngade DNA molekylen separeras och två enkelsträngar skapas.

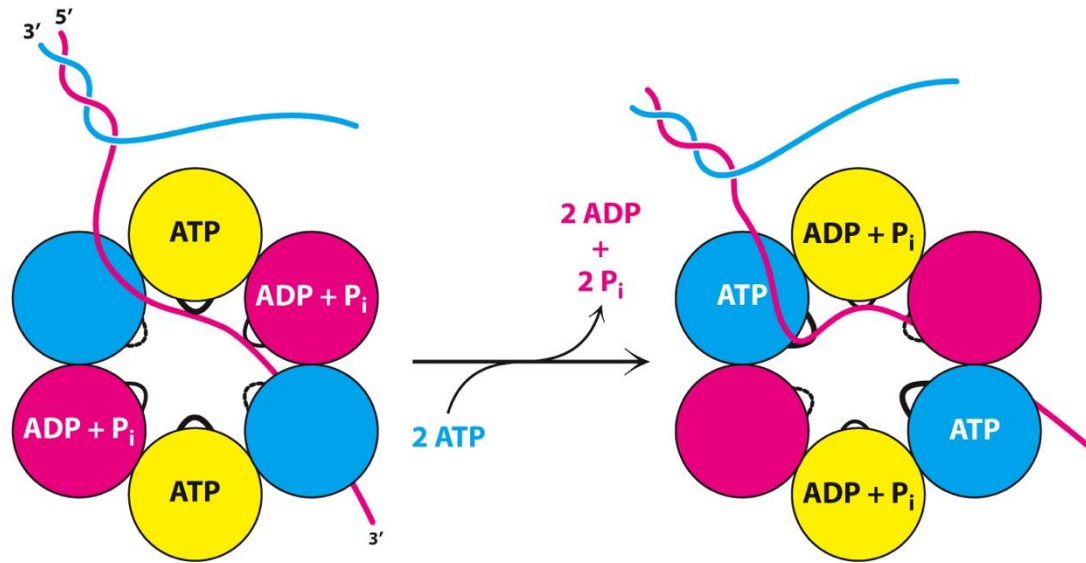


Figure 28.14  
Biochemistry, Eighth Edition  
© 2015 Macmillan Education

# Enkelsträngsbindande proteiner\*

Enkelsträngat DNA har en tendens att baspara med sig själv och skapa underliga sekundärstrukturer. Det riskerar att störa DNA-polymeraset!

För att förhindra att detta sker finns i särskilda proteiner som binder till enkelsträngat DNA och stabiliserar detta.

I våra celler heter det enkelsträngsbindande proteinet "Replication protein A" (RPA)

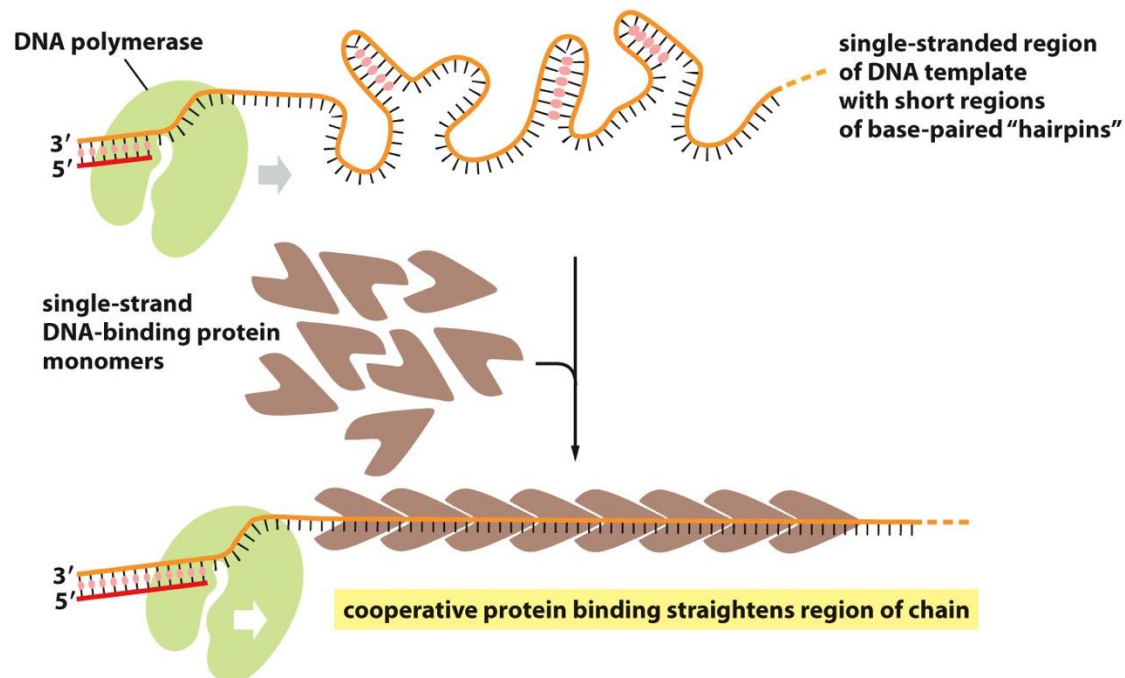


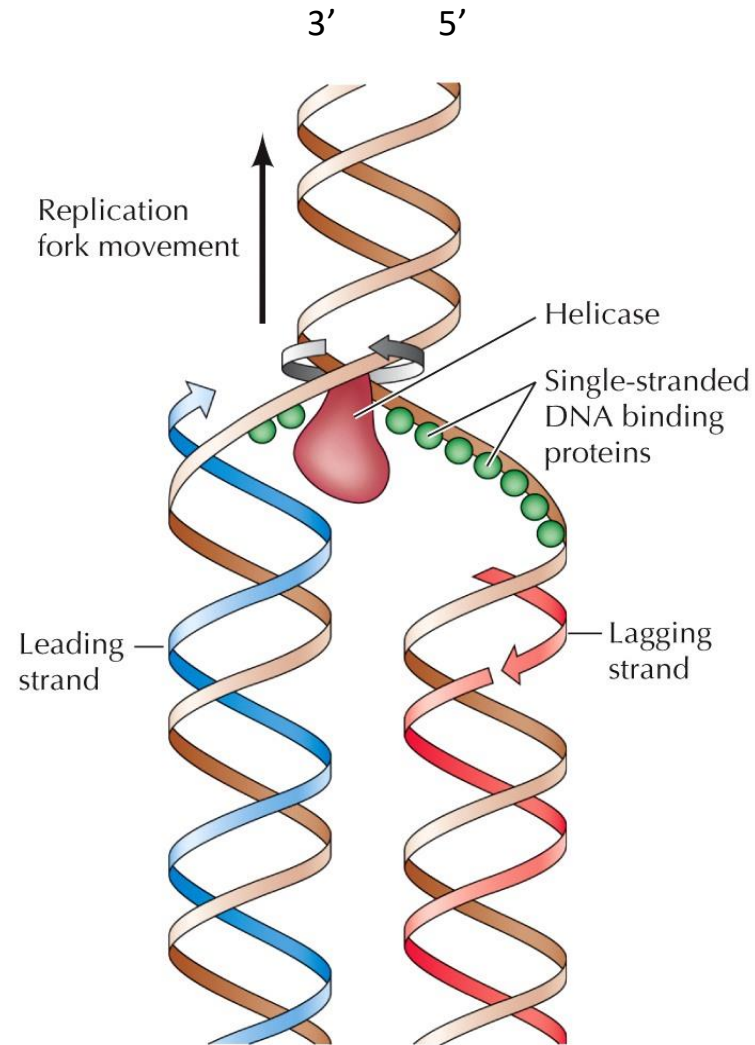
Figure 5-15 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

\*På engelska kallas denna grupp av proteiner single-stranded DNA-binding proteins – förkortas SSB

# Helikas och SSB-proteiner samverkar vid replikationsgaffeln

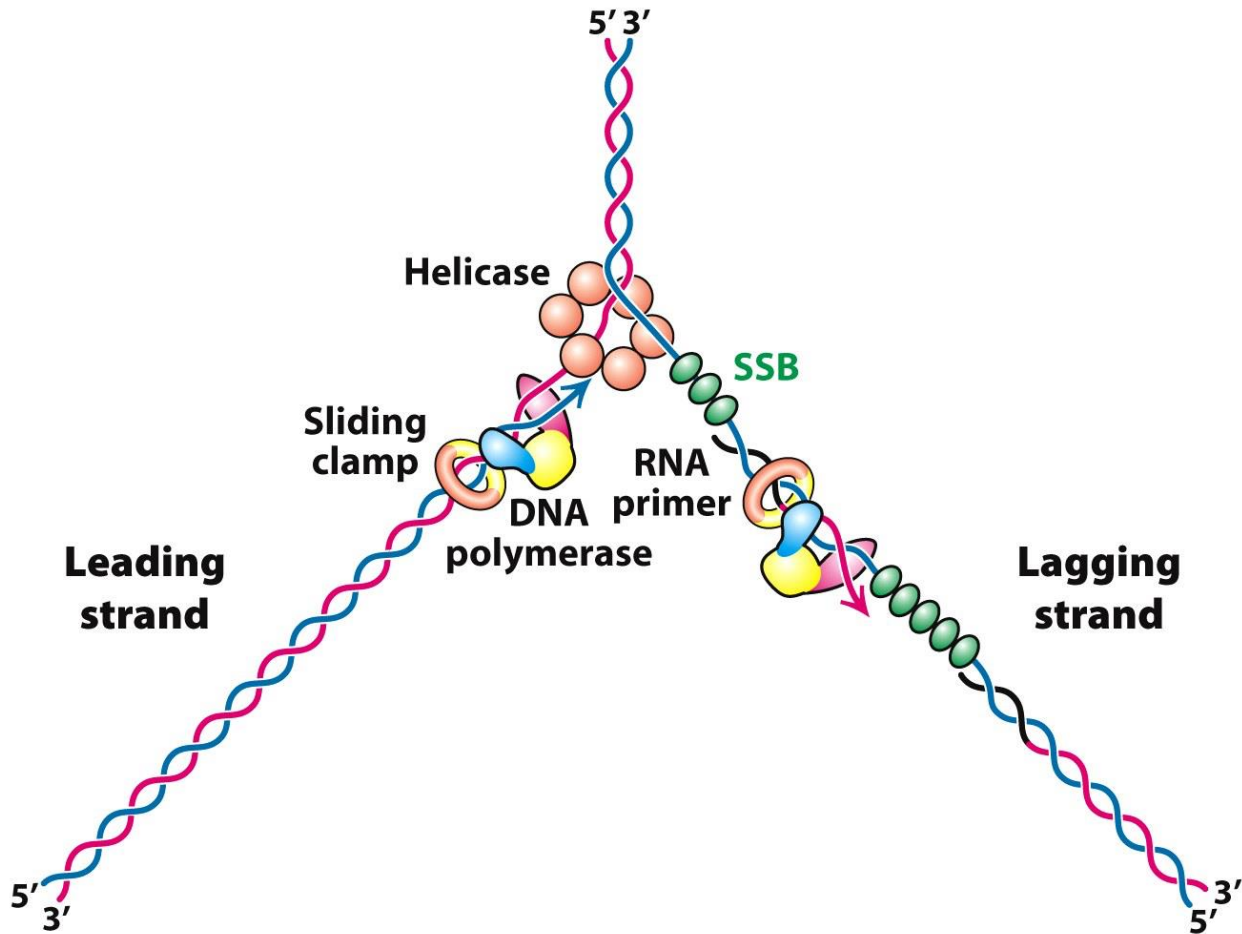
SSB-proteiner stimulerar helikaset och gör att replikationsgaffeln rör sig snabbare framåt

Särskilt lagging strand är täckt med SSB-proteiner





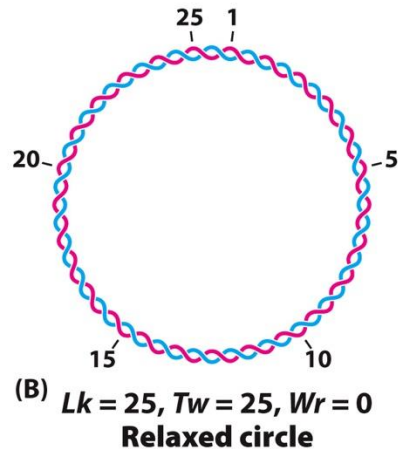
# Enzymerna vid replikationsgaffeln



**Figure 28.21**  
*Biochemistry, Seventh Edition*  
© 2012 W. H. Freeman and Company

## **Problem vid DNA-replikation (5)**

När man tvingar isär dubbelhelixen så skapas topologiska problem.  
Varför och hur löser cellen detta?



Strängarna i ett linjärt, DNA fragment på 260 bp vrider sig 25 hela varv kring varandra (10,4 bp per varv).

Vi säger att Linking number ( $Lk$ ) är 25 för denna molekyl.

Om vi försöker få in samma antal hela varv på en kortare molekyl, så får vi problem!

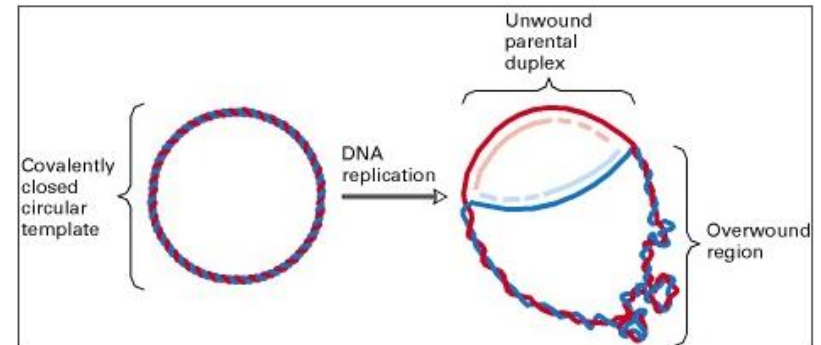
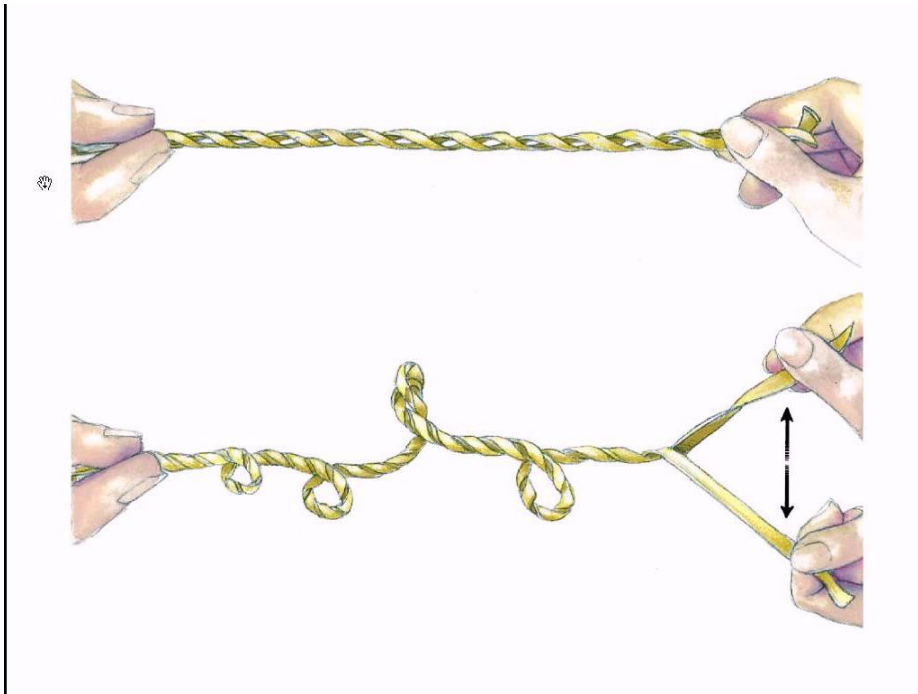
Man brukar tala om topologisk stress!

Om man har samma linking number på en kortare DNA molekyl, då skapas en topologisk stress.

När man tvingar in fler varv på kortare sträcka, så bildas s.k. supercoils.

Supercoils bildas t.ex. framför replikationsgaffeln när man tvingar isär DNA.

**Detta kallas positiva supercoils!!**



# Supercoils bildas framför replikationsgaffeln när man tvingar isär DNA.

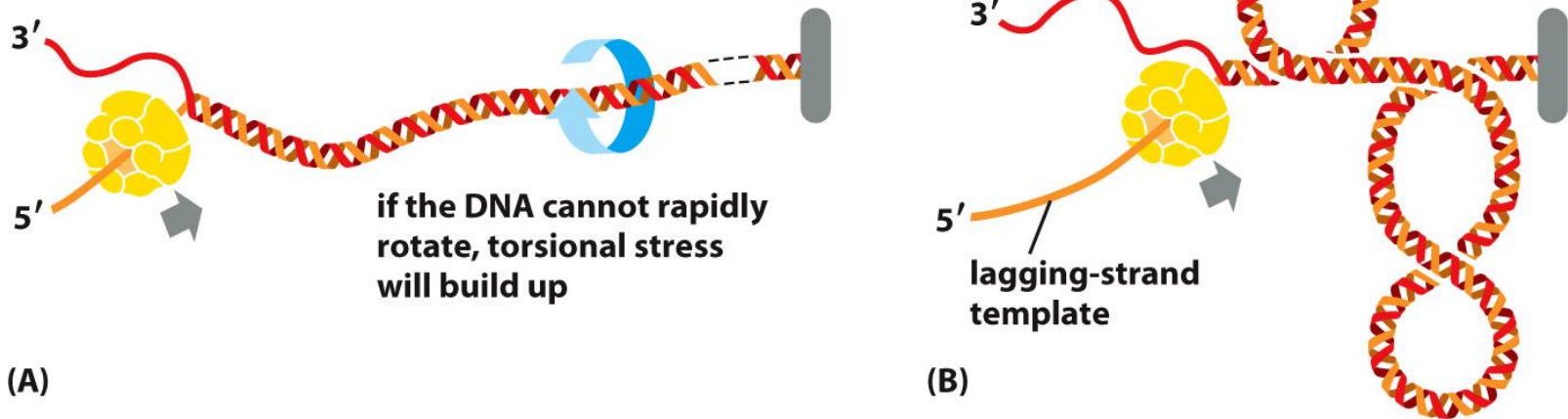


Figure 5-20 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# Finns det möjligheter att ta bort supercoils?

**Topoisomeraser är enzymer som kan ta förändra linking number (Lk) hos DNA!**

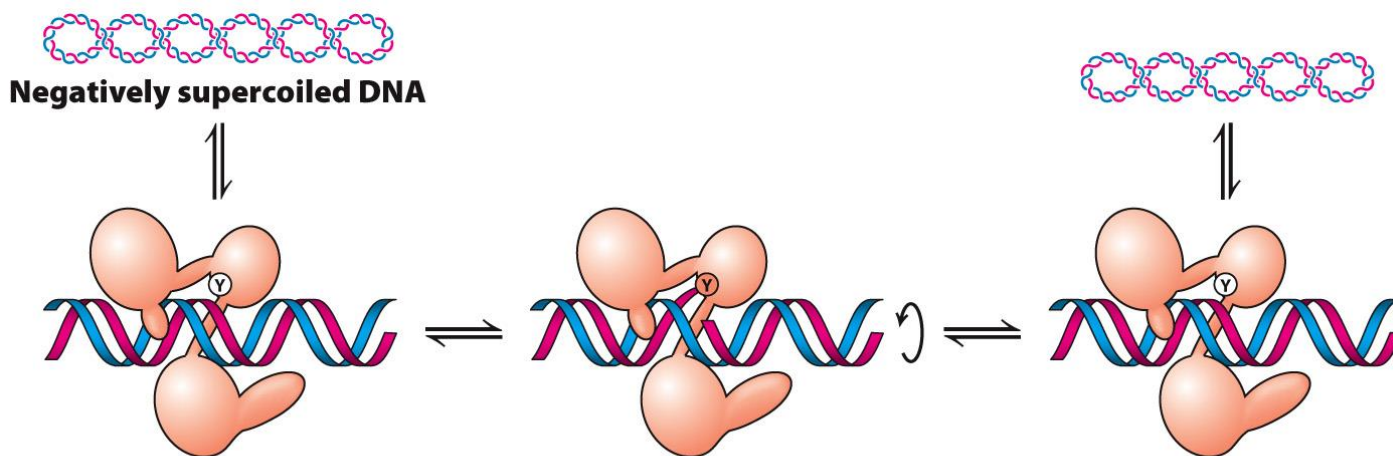
Det finns två typer av topoisomeraser:

**Typ I** tar bort supercoils. Det är en termodynamiskt gynnsam reaktion och sker därför utan att man behöver tillföra extra energi.

**Typ II** tar bort, men kan också skapa supercoils. Denna reaktion behöver ATP.

# Typ I topoisomeraser – klyver ena strängen i DNA

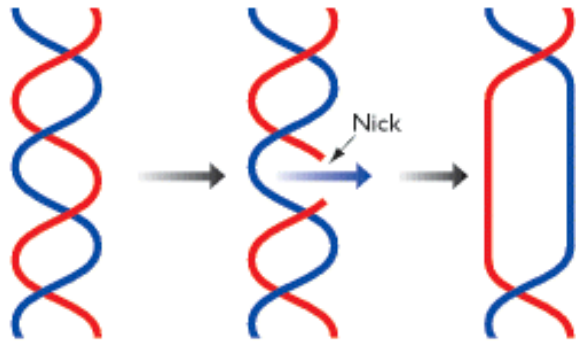
- Typ I topoisomeraser klyver ena DNA strängen
- Den klyvda strängen roterar ett varv runt den andra strängen.
- DNA klyvda DNA strängen försluts.
- $Lk$  förändras på detta sätt med 1.
- Reaktionen kan upprepas.



**Figure 28.18**  
*Biochemistry*, Eighth Edition  
© 2015 Macmillan Education

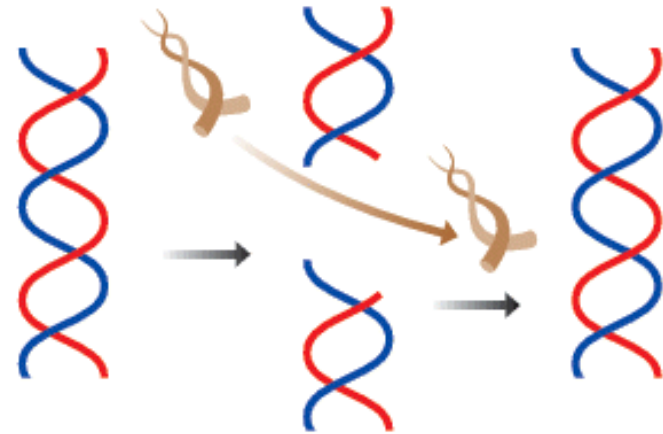
# Topoisomeras II - klyver båda strängarna i DNA och för en annan dubbelsträngad sträcka igenom.

(A) Type I



*Topoisomeras I*  
Lk förändras med en faktor 1.

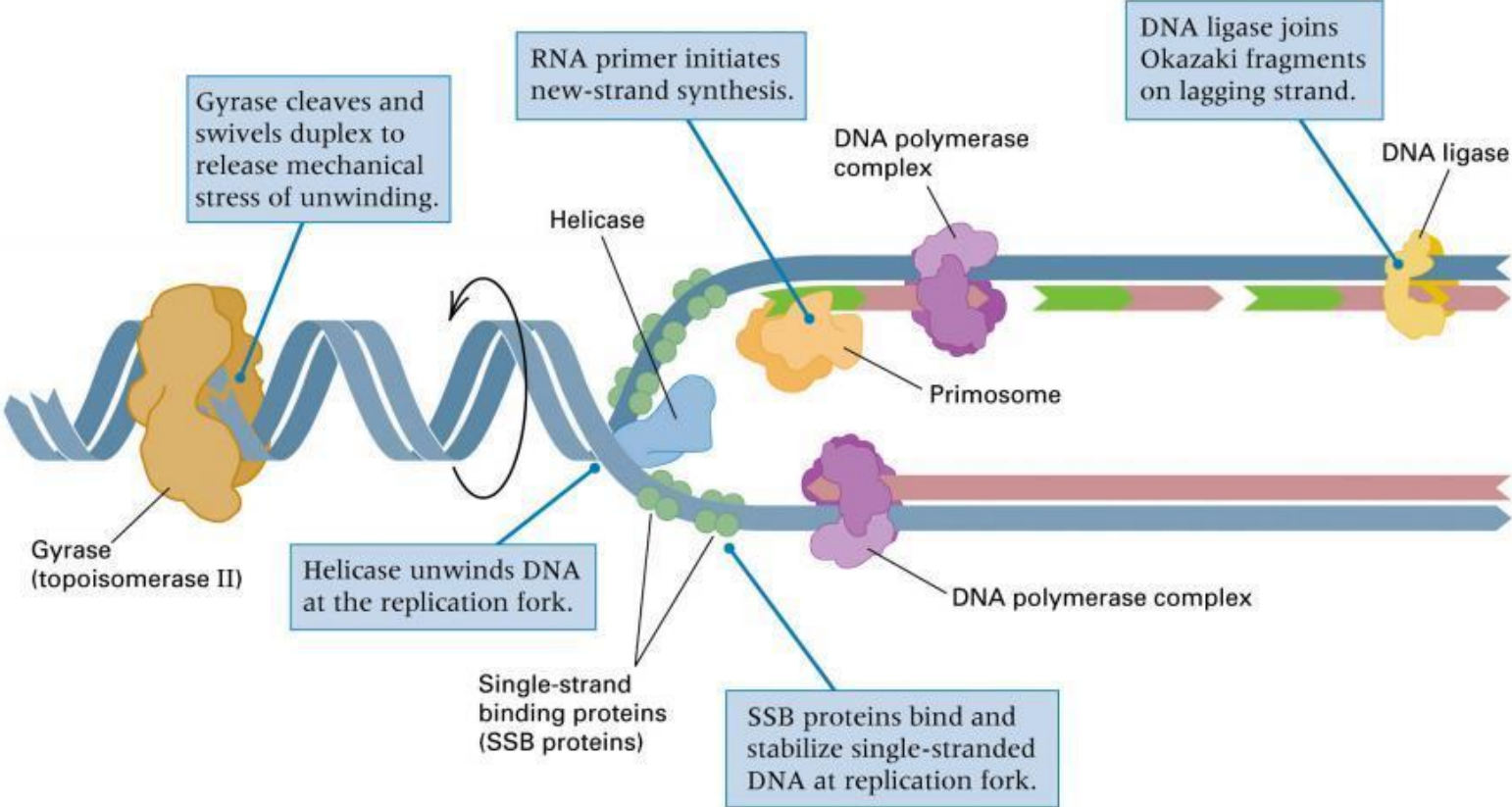
(B) Type II



*Topoisomeras II*  
Lk förändras med en faktor 2.



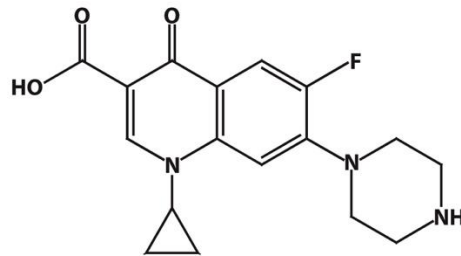
# Topoisomeras II sitter framför replikationsgaffeln och tar bort positiva supercoils!



I bakterier kallas topoisomeras typ II ofta för Gyras.  
Gyras-hämmare är en viktig grupp av antibiotika!

Ett exempel är Ciprofloxacin - ett bredspektrum-  
antibiotika som bl.a. ges vid svåra urinvägsinfektioner.

Topoisomeras-hämmare används även vid  
cancerbehandling. Camptothecin inhiberar humant  
topoisomeras.



**Ciprofloxacin**