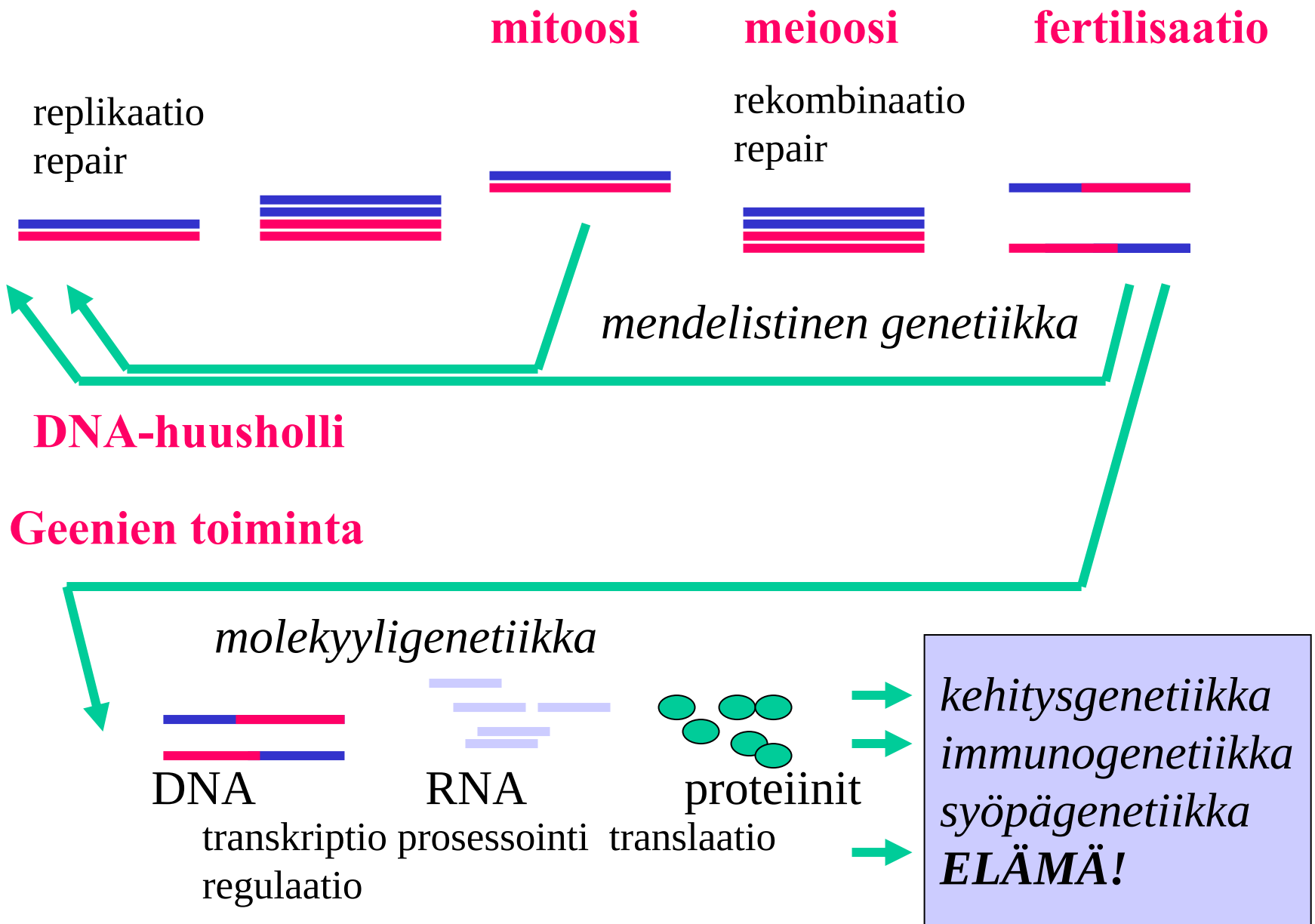




Genetiikan perusteiden miellekartta

CELL 263-

replikaatio
repair

mitoosi

meioosi

fertilisaatio

rekombinaatio
repair

mendelistinen genetiikka

DNA-huusholli

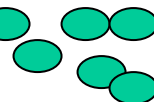
Geenien toiminta

molekyylogenetiikka

DNA

transkriptio
regulaatio

RNA

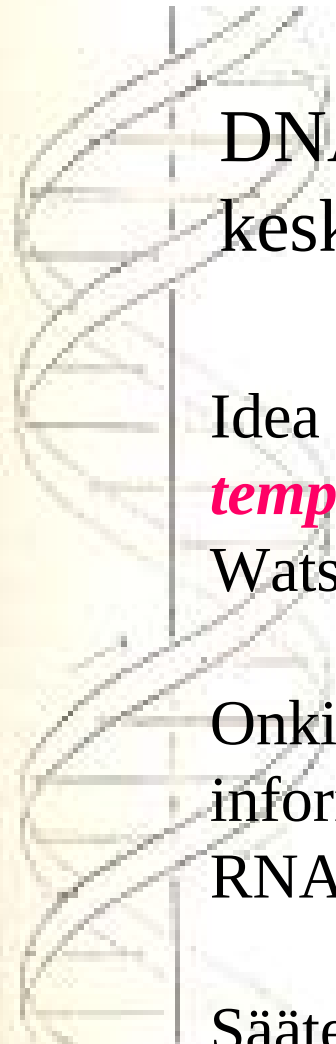


proteiinit

translaatio

kehitysgenetiikka
immunogenetiikka
syöpägenetiikka
ELÄMÄ!

Genetiikan perusteiden miellekartta: tänään replikaatio



DNA:n replikaatio eli kahdentuminen on aika keskeinen asia koko eliökunnan kannalta

Idea siitä, että yksinkertainen juoste (strand) voi toimia *templaattina*, on yksinkertainen ja nerokas, ja sen lausuivat jo Watson ja Crick helmikuun 28 päivänä 1953

Onkin yleensä niin, että vain toisessa juosteessa on informaatiota (koodia), eli vain toinen transkriboidaan RNA:ksi. Toinen juoste on varastointia varten.

Säätelyasioissa tosin kaksijuosteinen DNA kyllä sisältää informaatiota: säätelytekijät “lukevat” kaksoisjuostetta

This figure is a schematic diagram of a DNA double helix. The two strands are represented by two parallel ribbons, one for each strand. The ribbons are connected by horizontal lines representing the base pairs. The vertical lines represent the sugar-phosphate backbone. The diagram illustrates the structure of DNA and how it can store information.

DNA

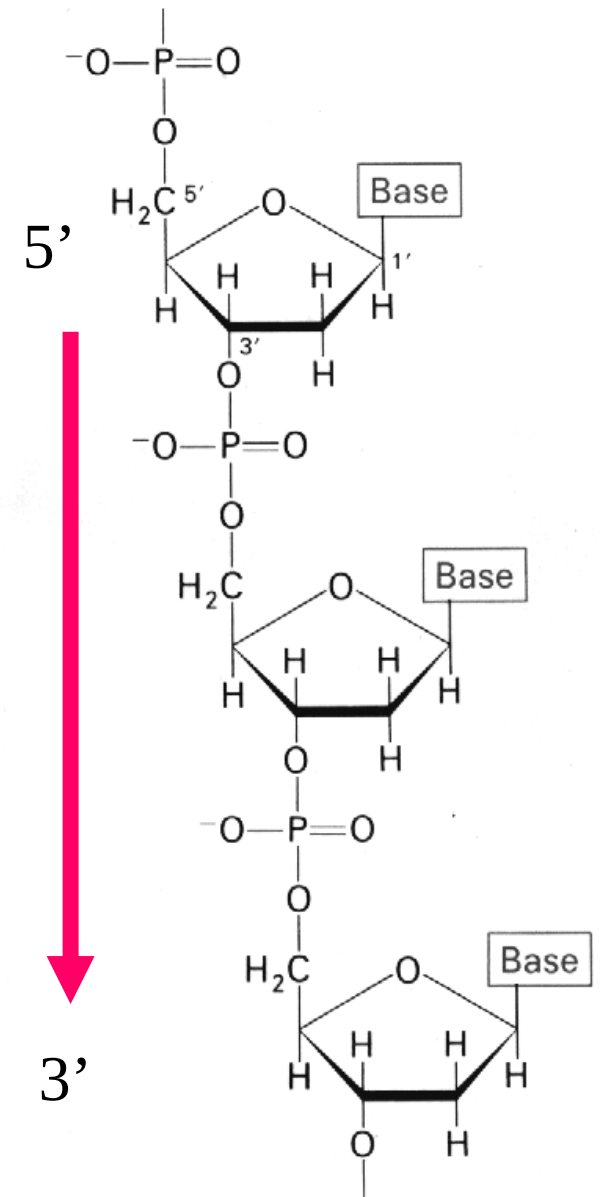
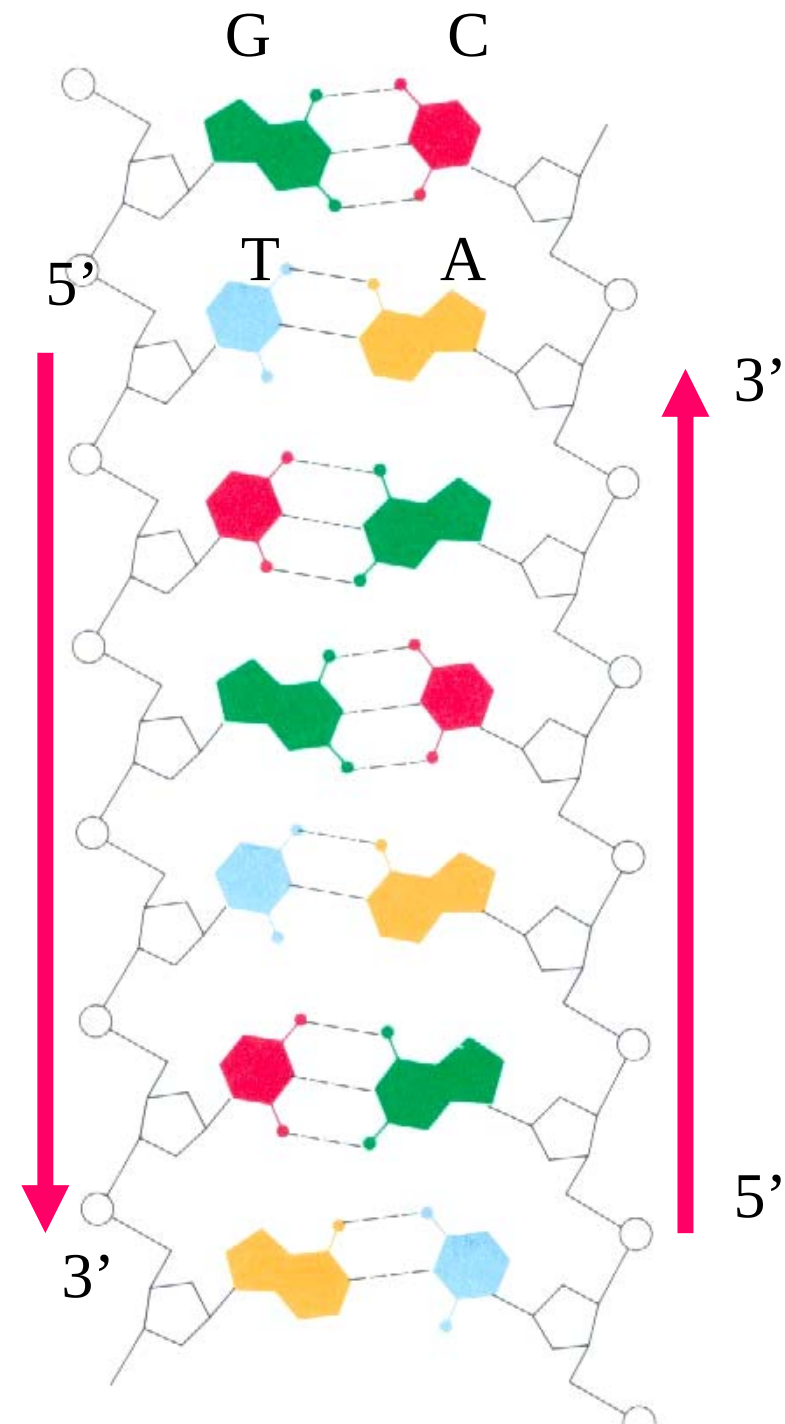


Figure 4-2
Structure of part of a DNA chain.

DNA:n replikaatio

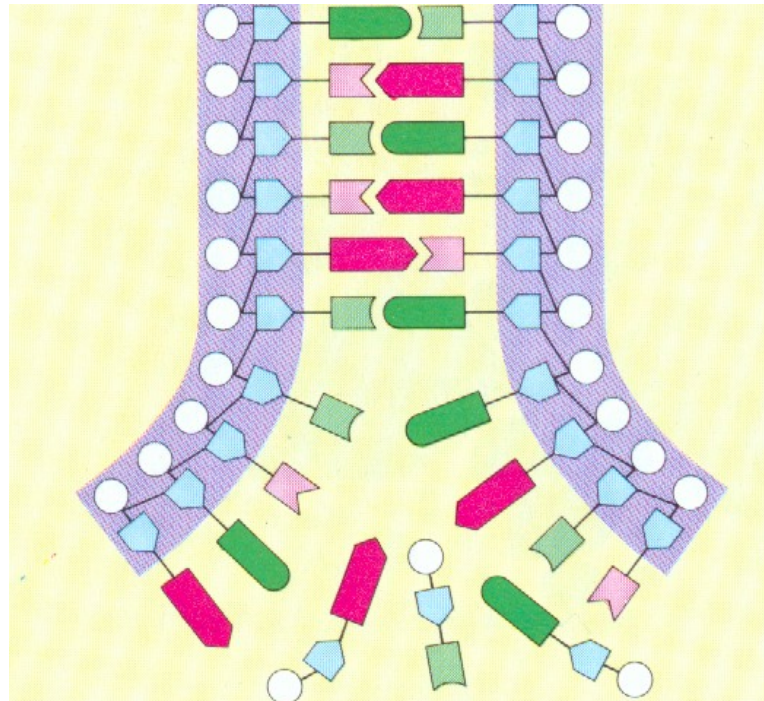
DNA:n rakenteen keksimisen yhteydessä Watson ja Crick hoksasivat, että rakenteessa sinänsä on kopioitumisen idea

Kuuluisa lause:

"It has not escaped our notice that ..."

Kotitehtävä #5: hanki tämän lauseen sisältäneen lyhyen klassikkokirjoituksen kopio ja näytä se luennolla

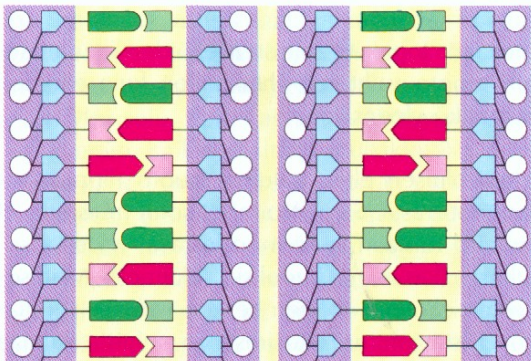
DNA:n replikaation koulukirjamallissa
“vapaiksi jääneiden emäsosien pariin järjestyy vapaita nukleotideja. Emästen liittymissäännöt määräävät niiden paikat”



CELL 267-

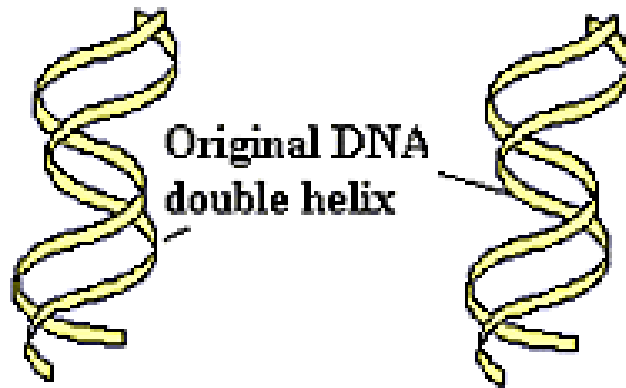
Vapaiksi jääneiden emäsosien pariin järjestyy vapaita nukleotideja.
 Emästen liittymissäännöt määräävät niiden paikat.

Replikaation päättyessä on valmiina kaksi identtistä DNA molekyyliä.

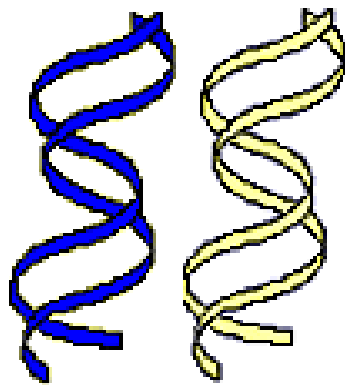


43.1. DNA:n ominaispiirre on kyky kaksinkertaistua eli replikoitua, jolloin syntyvät identtiset tytärmolekyylit.

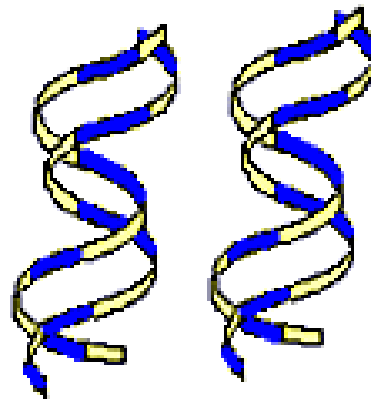
Virheet: juosteet samansuuntaiset = riboosin nurkat
 ajattelemattomasti, rakentumissuunta siksi
 ajattelematta, autokatalyyysi



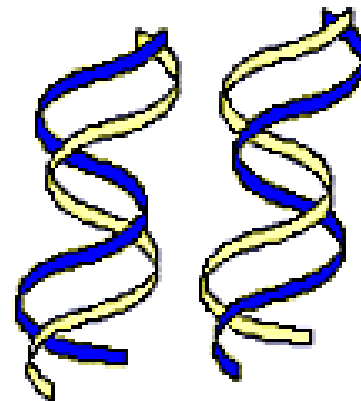
Conservative
replication



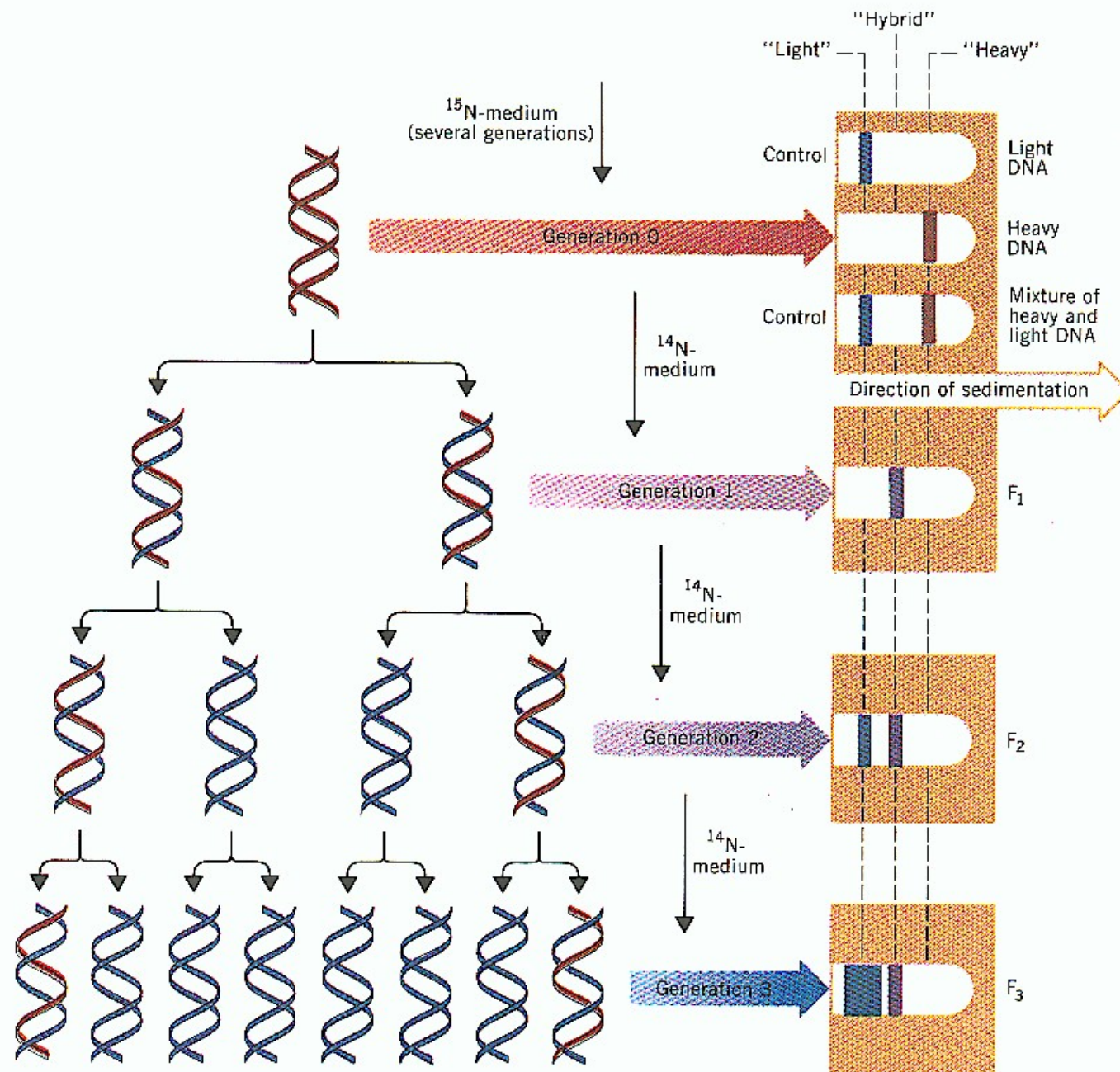
Dispersive
replication



Semiconservative
replication



Possible Models of DNA Replication



Meselson & Stahl 1958

Semikonservatiivisen replikaation osoitus



Original DNA
double helix

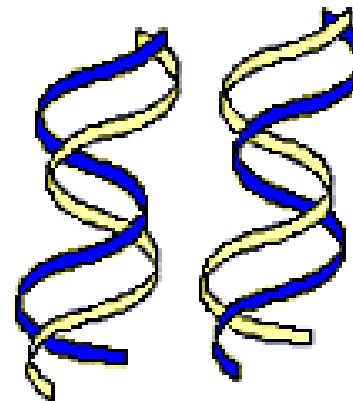
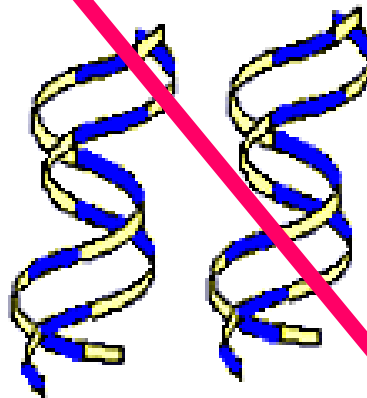
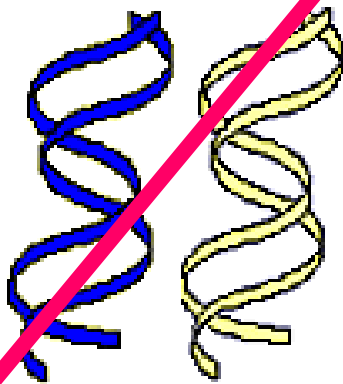


Semikonservatiivinen

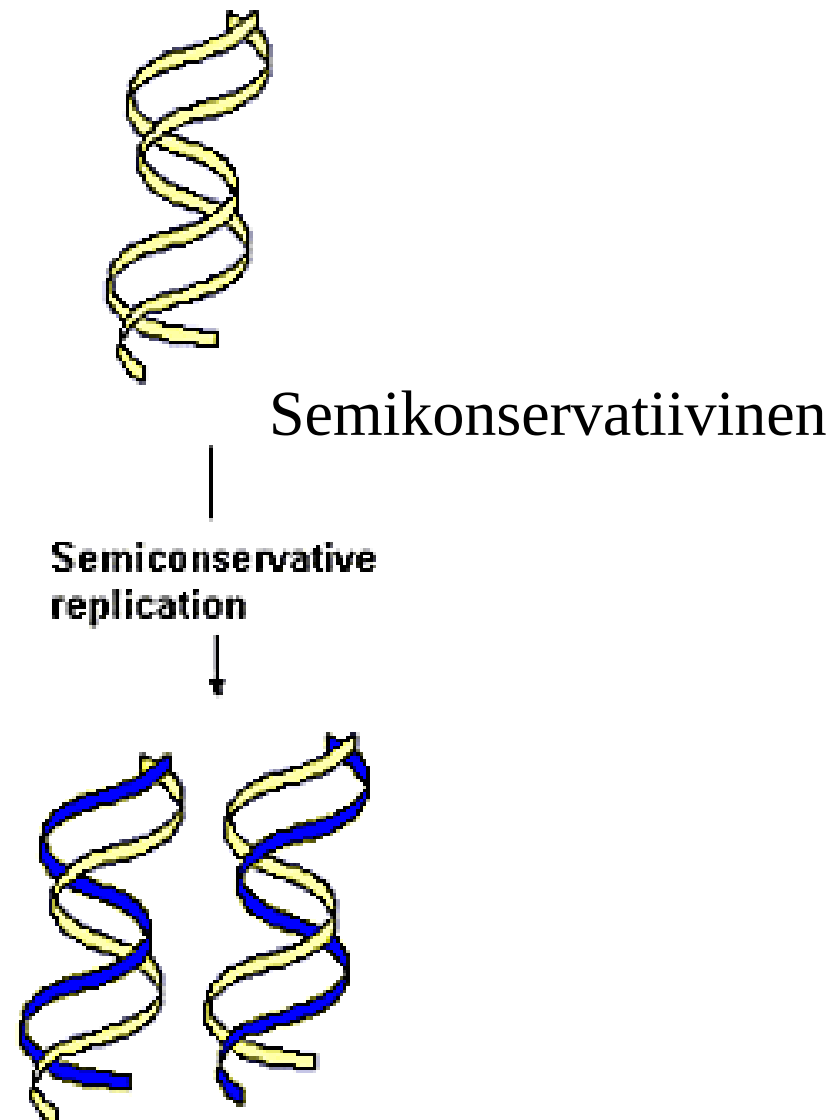
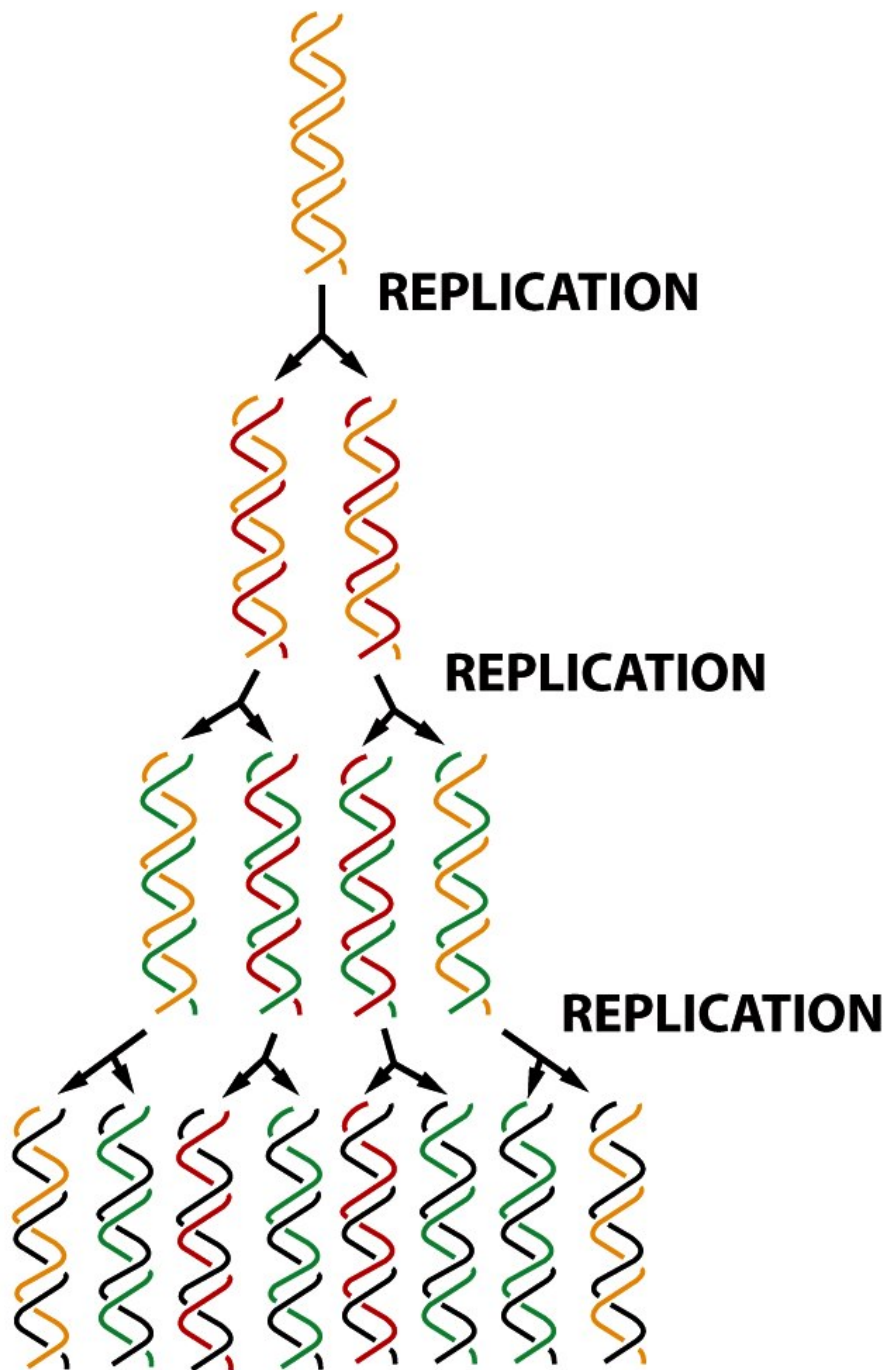
Conservative
replication

Dispersive
replication

Semiconservative
replication

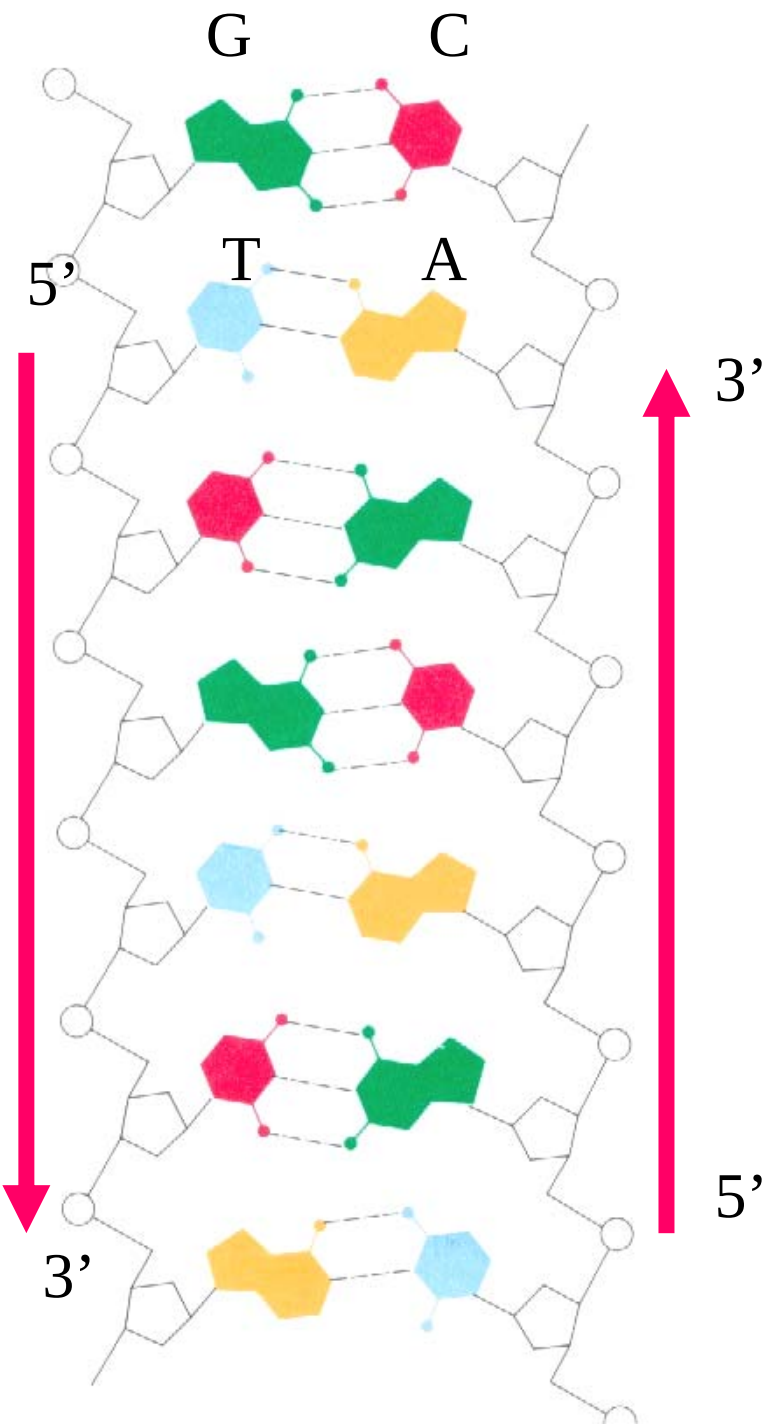


Possible Models of DNA Replication



Meselson & Stahl
1958; **CELL 268**

DNA



CELL 267

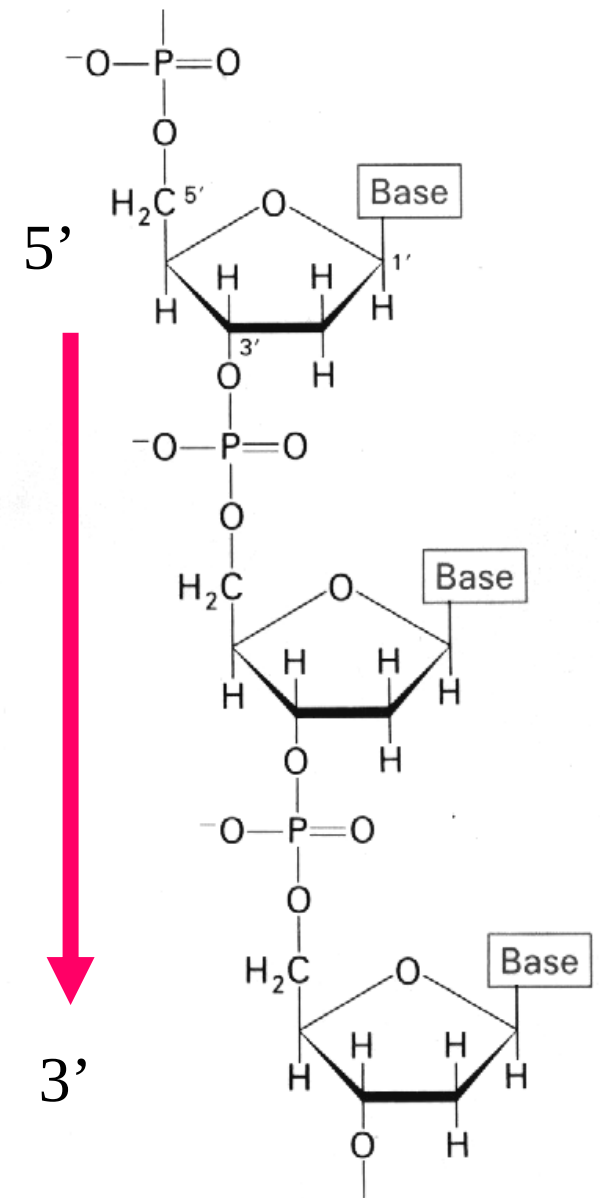


Figure 4-2
Structure of part of a DNA chain.

Ihan vähän kemiaa:

Nukleotidit **ATP**, **GTP**, **CTP** ja **TTP** saapuvat paikalle täynnä energiaa, siis trifosfaatteina. Replikaatiokone kuluttaa energiaa, jota se saa joka askeleella kahden fosfaatin sidoksen purkamisen verran, kun kasvavaan DNA-ketjuun liitetään mono-fosfaatteja AMP, GMP, CMP ja TMP

Huomannette, että **ATP** ja **GTP** ovat solun muissakin energiaa vaativissa töissä energian tuojina ja luovuttajina!

CELL 267

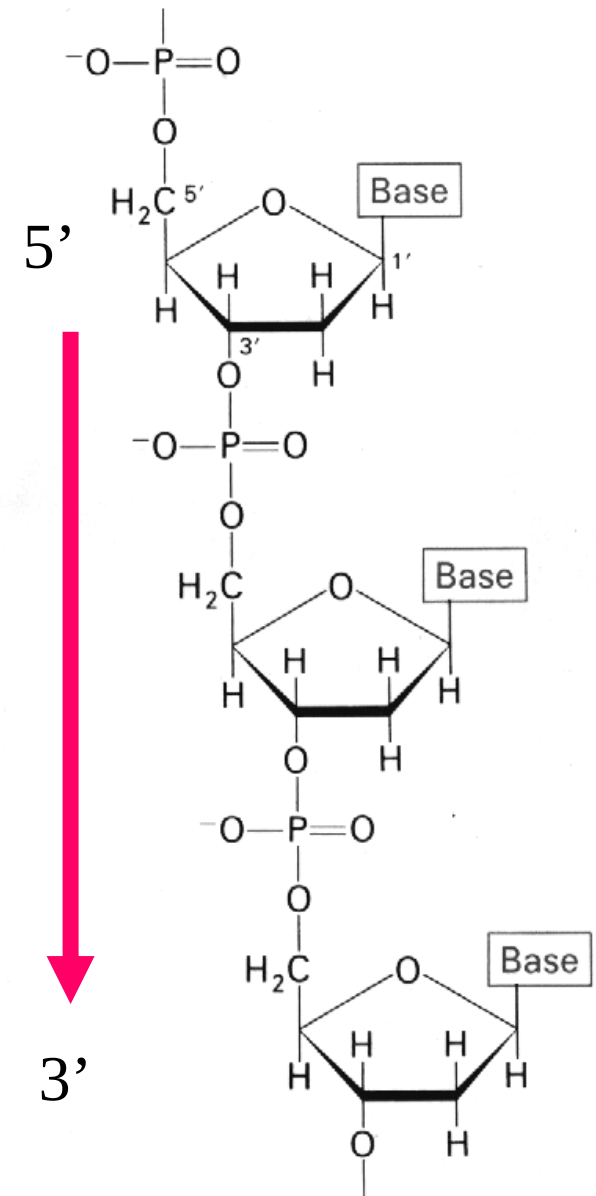
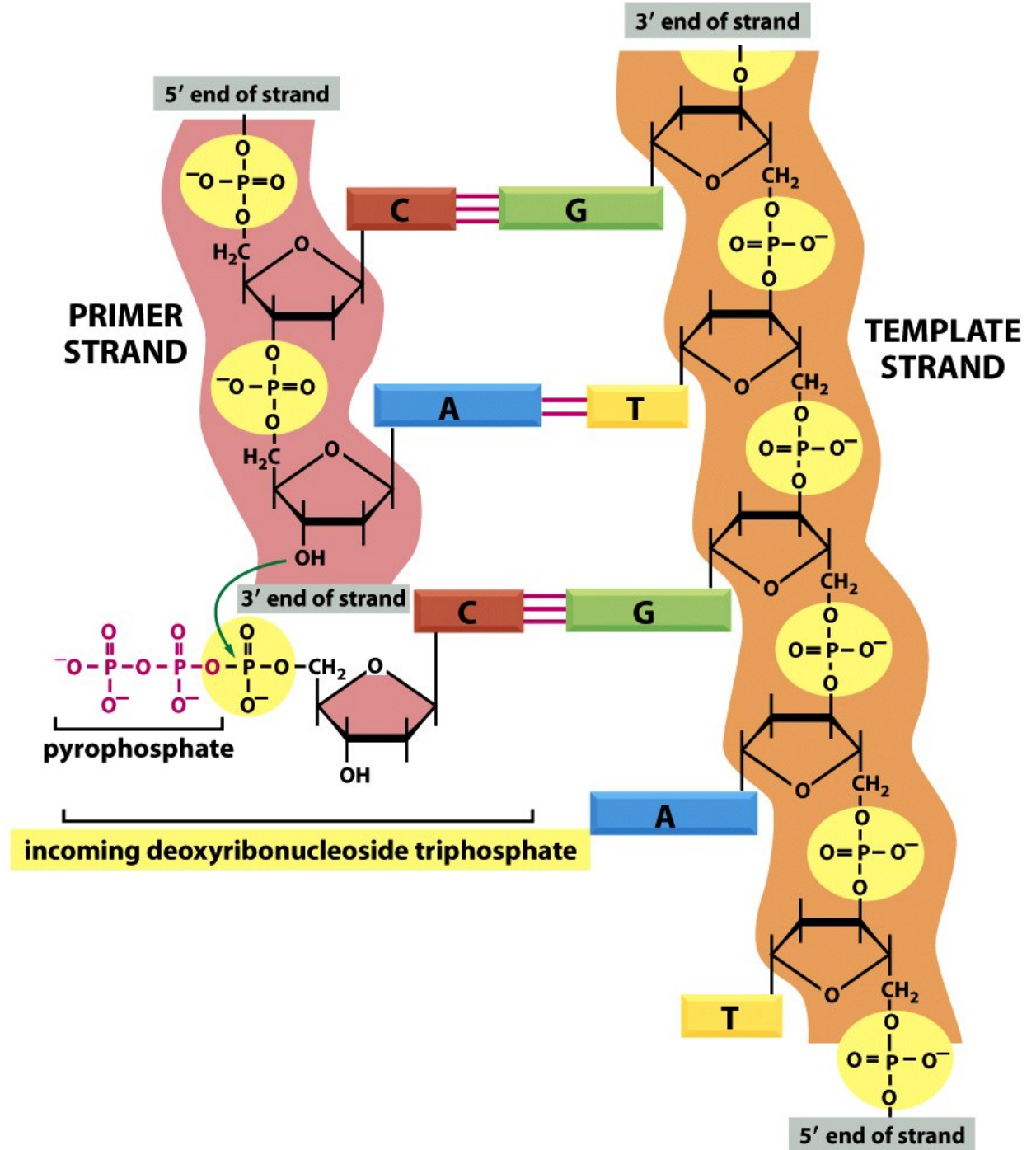
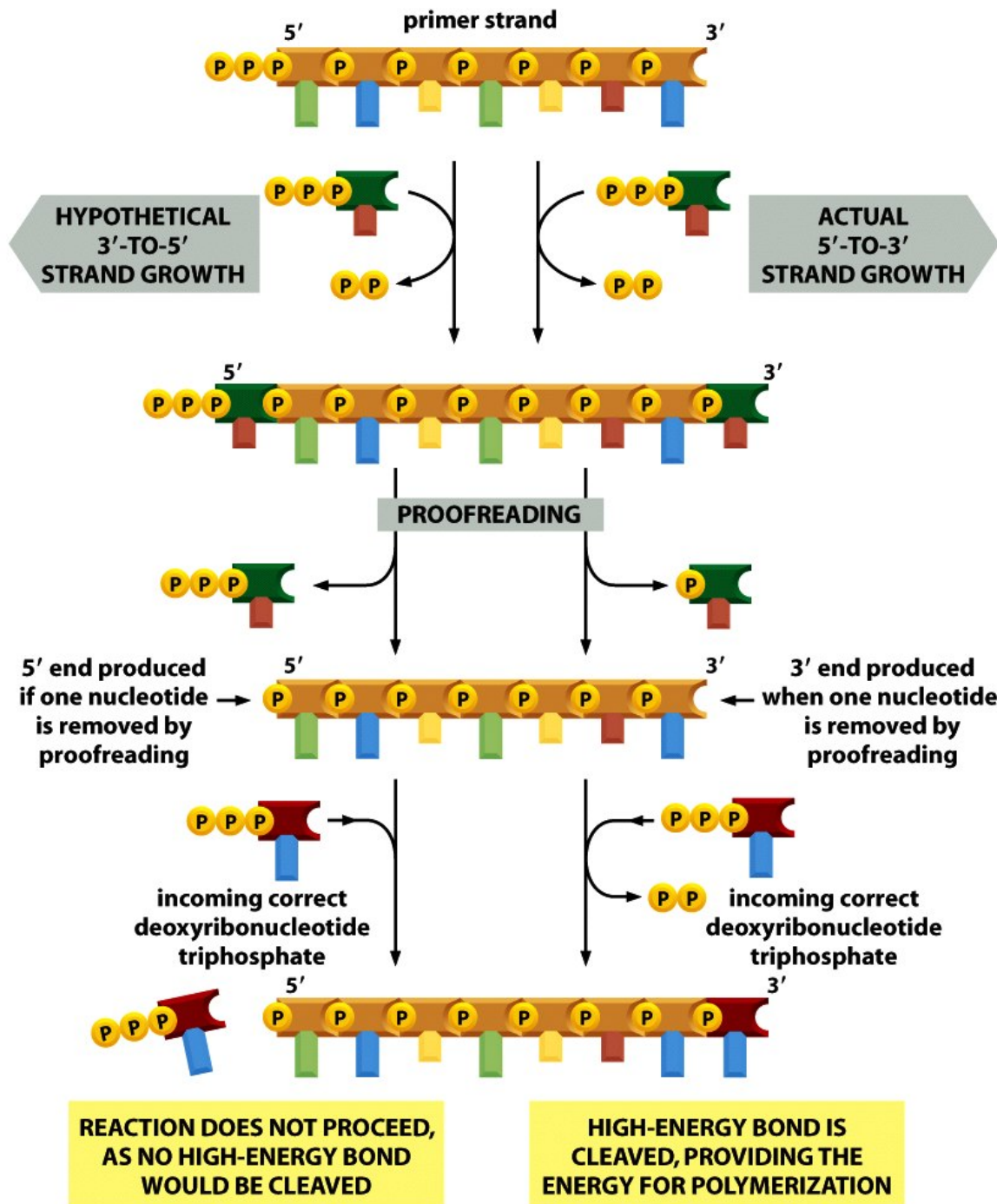


Figure 4-2
Structure of part of a DNA chain.

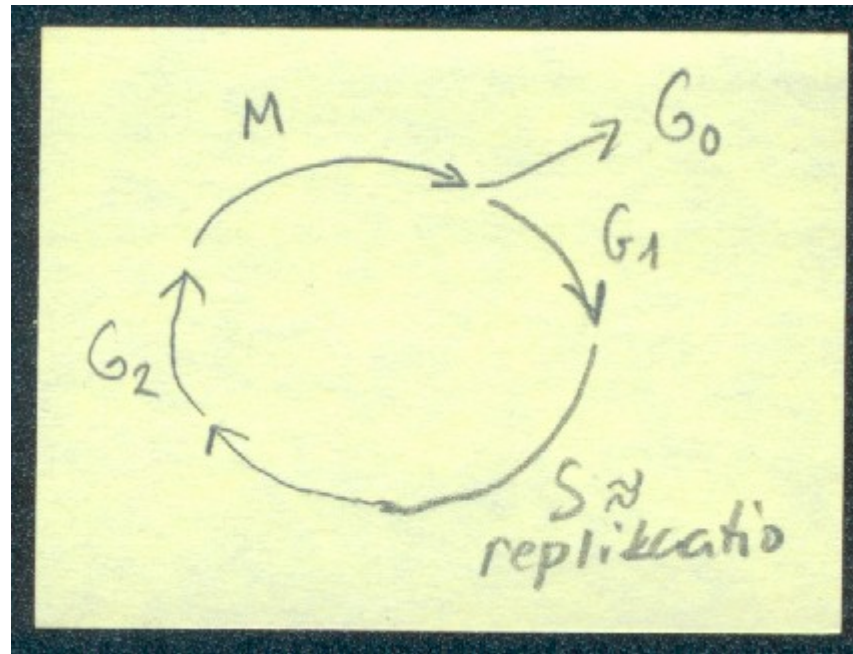




Selitys sille, miksi yksisuuntainen replikaatio mahdollistaa tärkeän oikoluvun ja on siksi meidän mielestä oikein hyvä asia.

Replikaation pitää tapahtua **kerran** ja **vain kerran** solusykklissä, **kokonaan**

G2 = tuliko
valmiiksi?



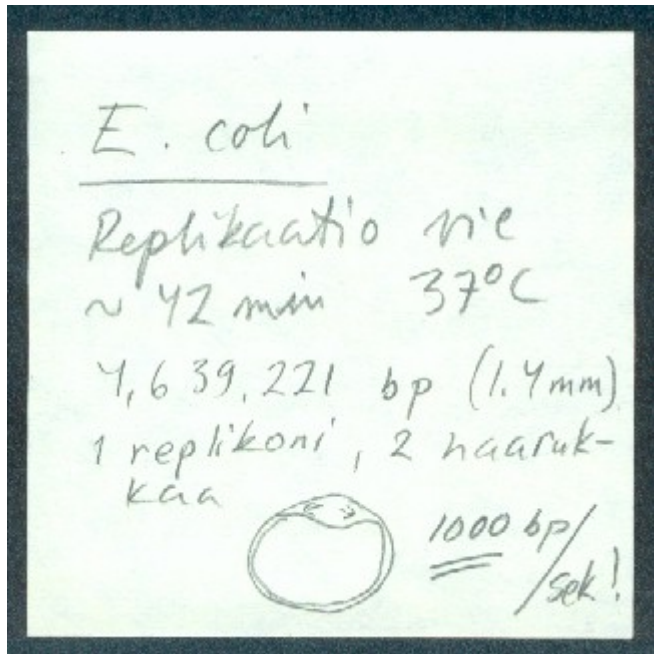
G1 = jooko?
No joo.

S = replikaatio

Kertaa: solusykli CELL kappale 17

Replikoni on replikaatioyksikkö

	lkm	pituus	nopeus
Bakteerit	1	4200 kb	50 000 bp/min
Hiiwa (17 kr)	400	40 kb	3 600 bp/min
<i>Drosophila</i>	3 500	40 kb	2 600 bp/min
Nisäkäs	25 000	150 kb	2 200 bp/min



Jotta kerran-ja-vain-kerran replikaatiota voitaisiin kontrolloida, tarvitaan viestintää ja informaatiota (Solusykli: **CELL 1062**)

- Solusyklin sanomantuoja (*joo*) >> priming complex (**CELL 284, 1067**)
- Replikaation aloituskohdat kromosomissa, jotka sitten eivät aloita toista kertaa (**CELL 287, 1068**)
- Replikaation (ja korjauksen) lopullisuudesta kertova viesti: p53:n on saatava tietää, että katkenneita DNA:n päitä yms sotkua ei ole, vaan kaikki on korjattu (**CELL 1071**)

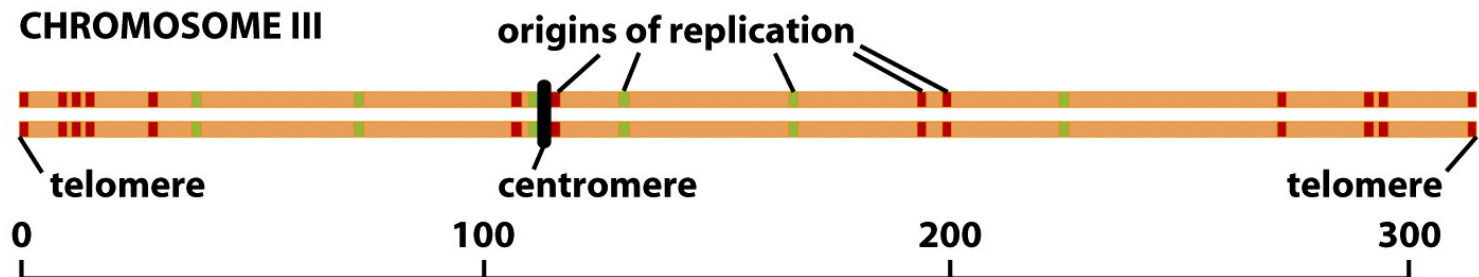
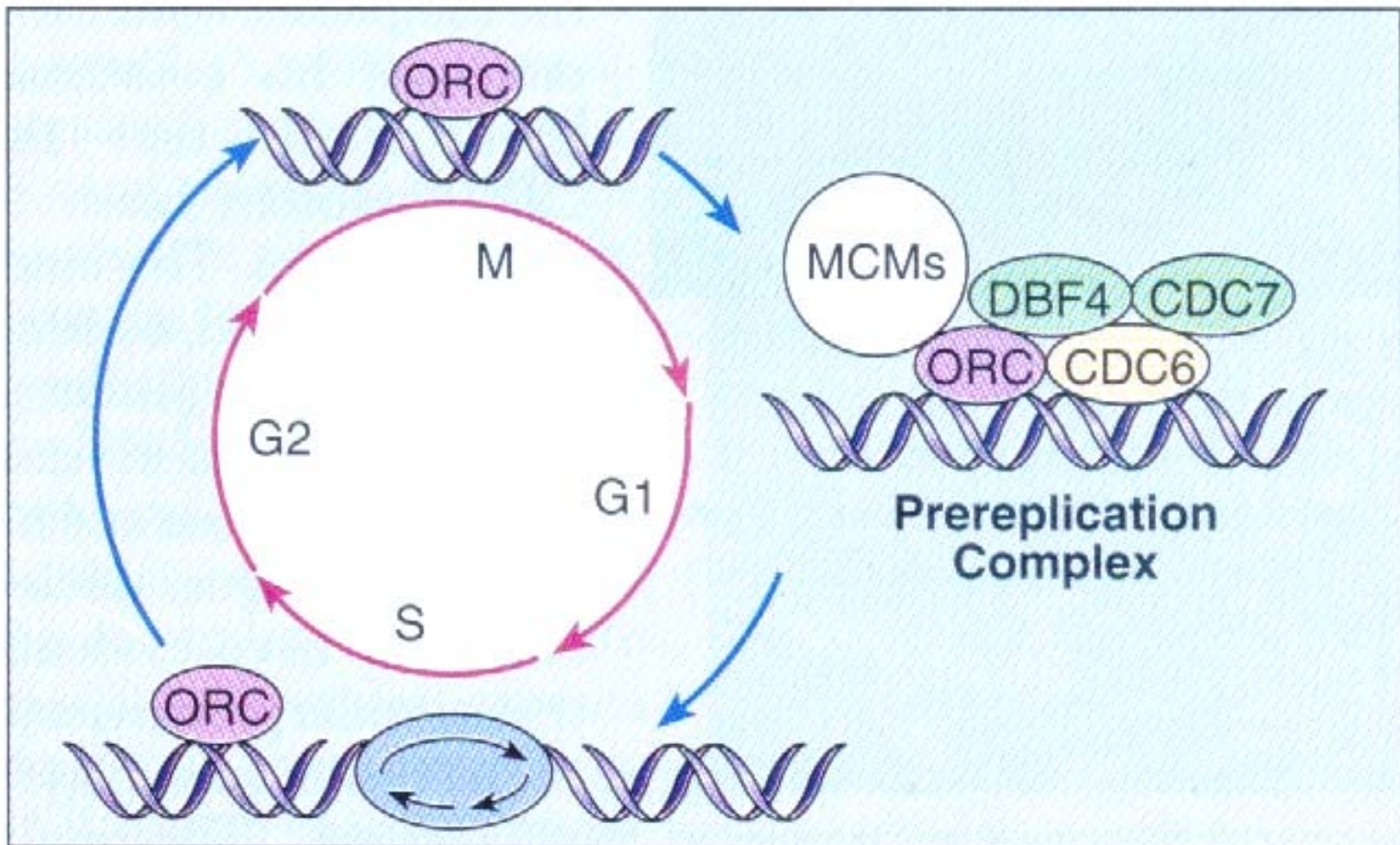


Figure 5-34 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



Getting ready. An essential step in initiating DNA replication seems to be the building on ORC of a “prereplication complex” containing several proteins, possibly including CDC6, the MCM proteins, the kinase CDC7, and its partner DBF4.

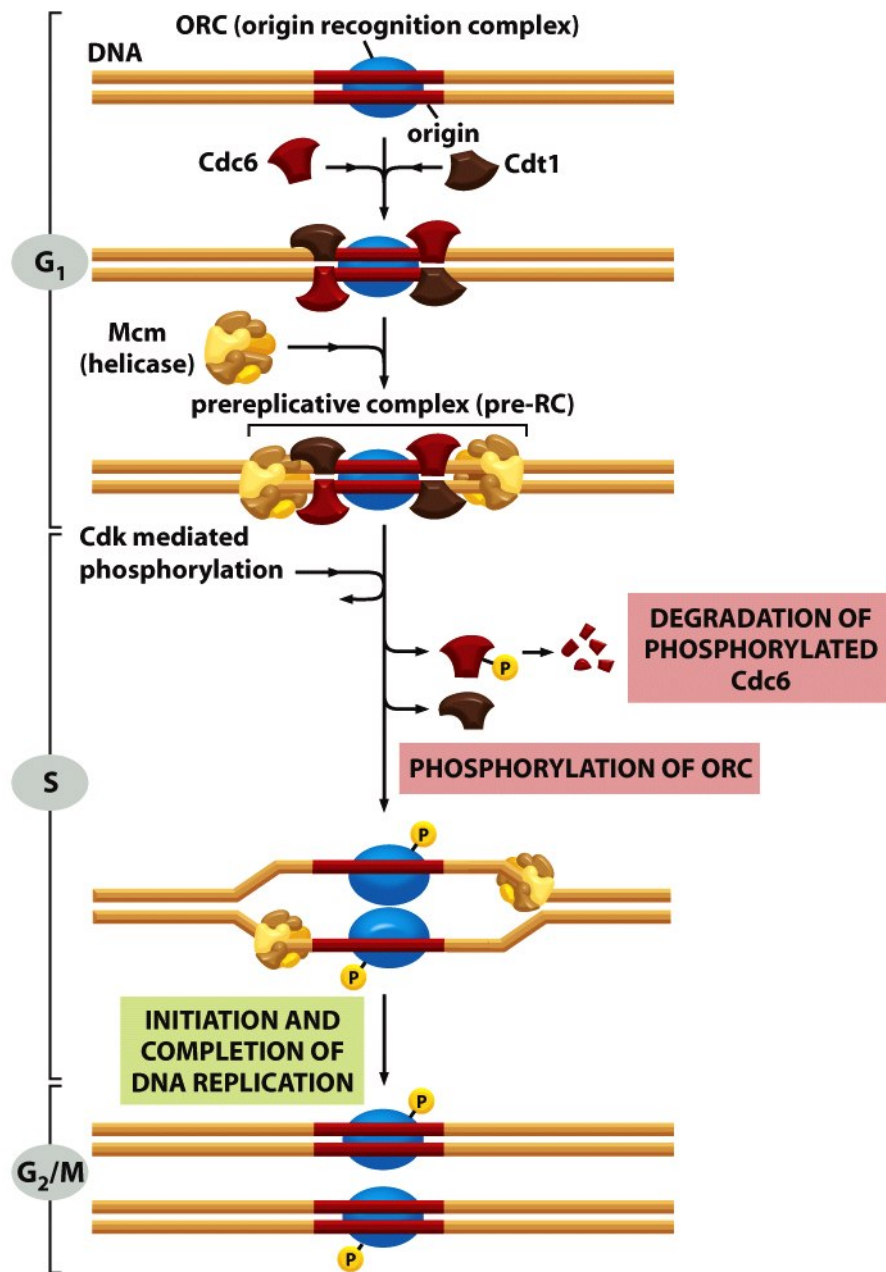


Figure 5-36 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

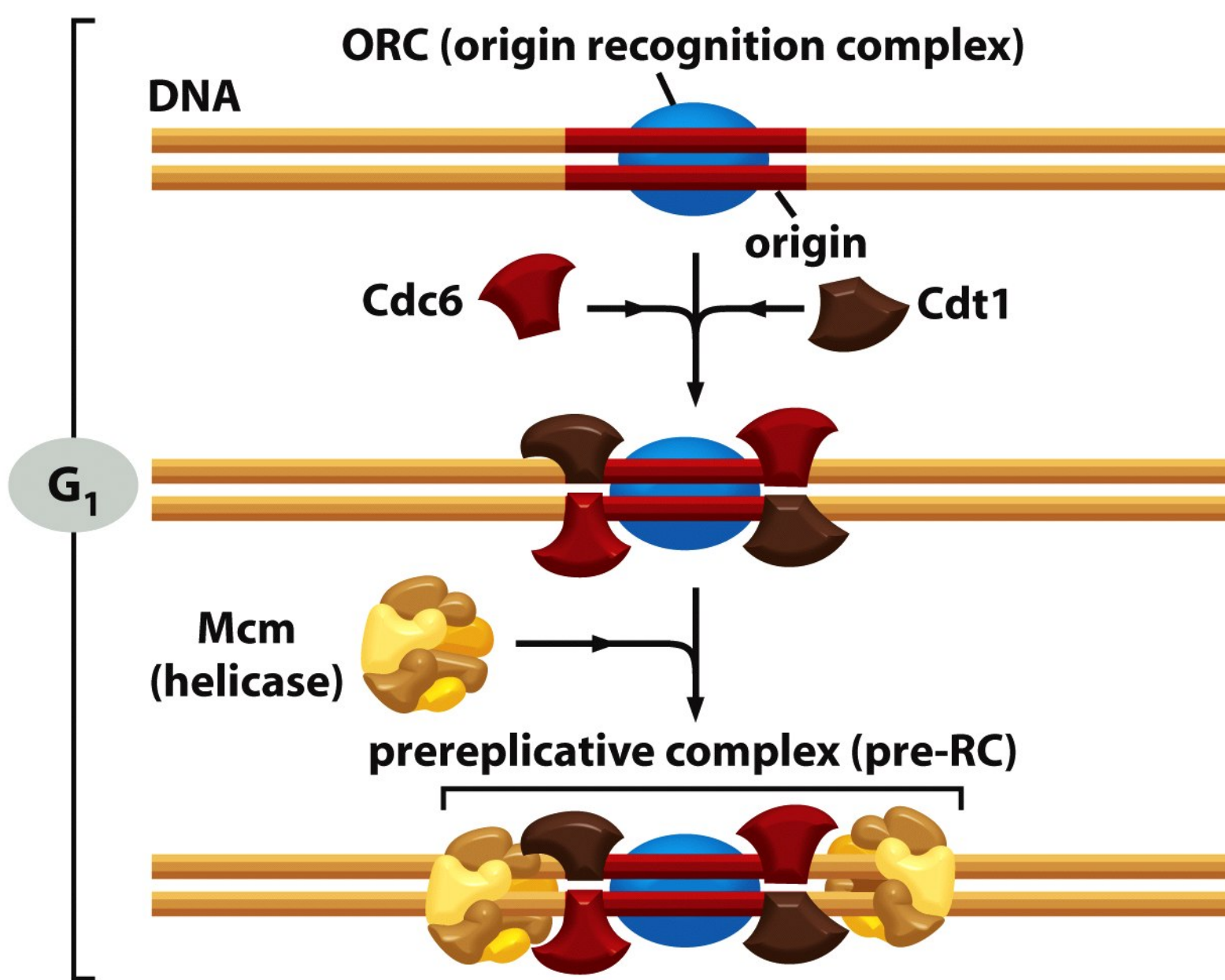


Figure 5-36 part 1 of 3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

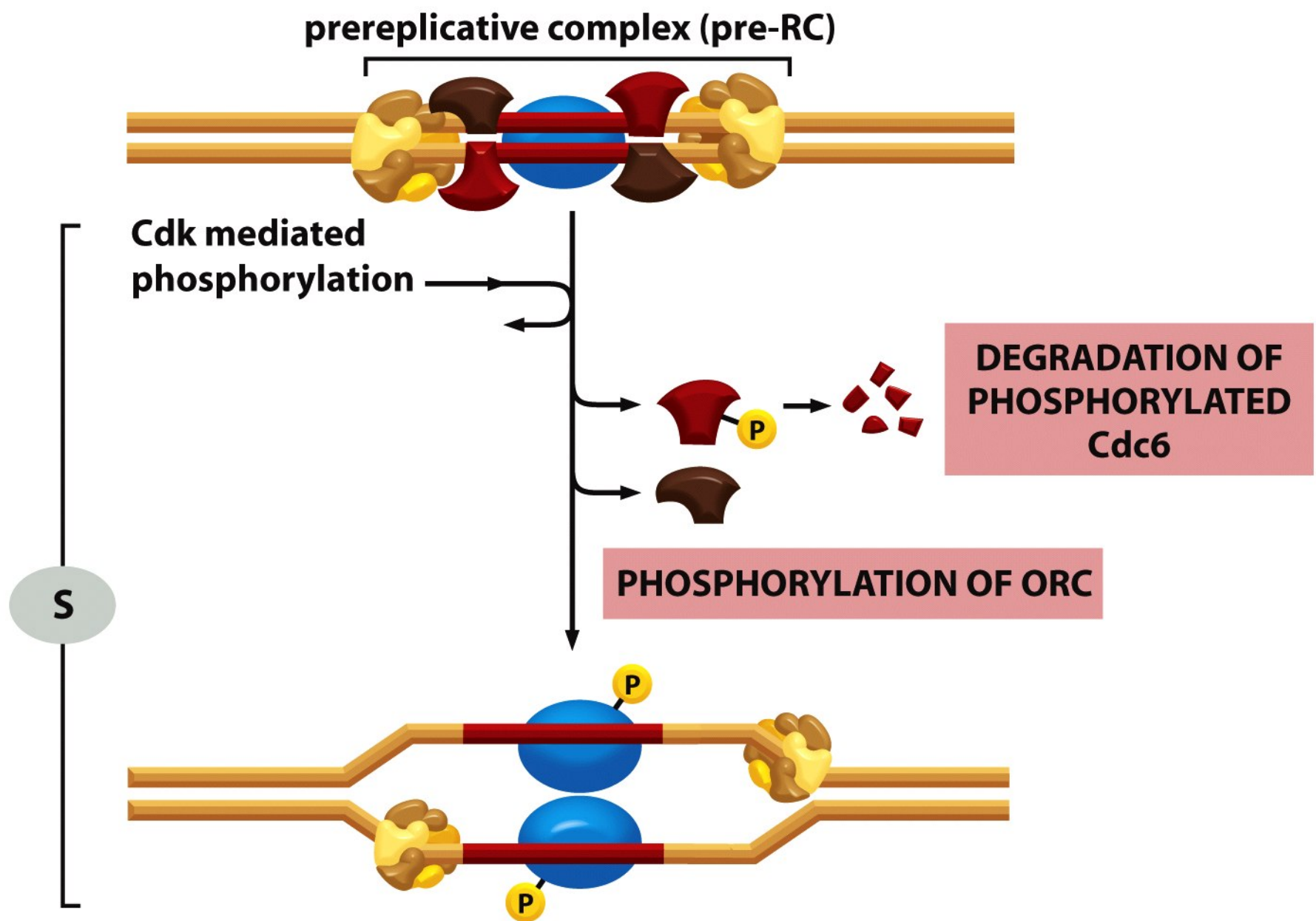


Figure 5-36 part 2 of 3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

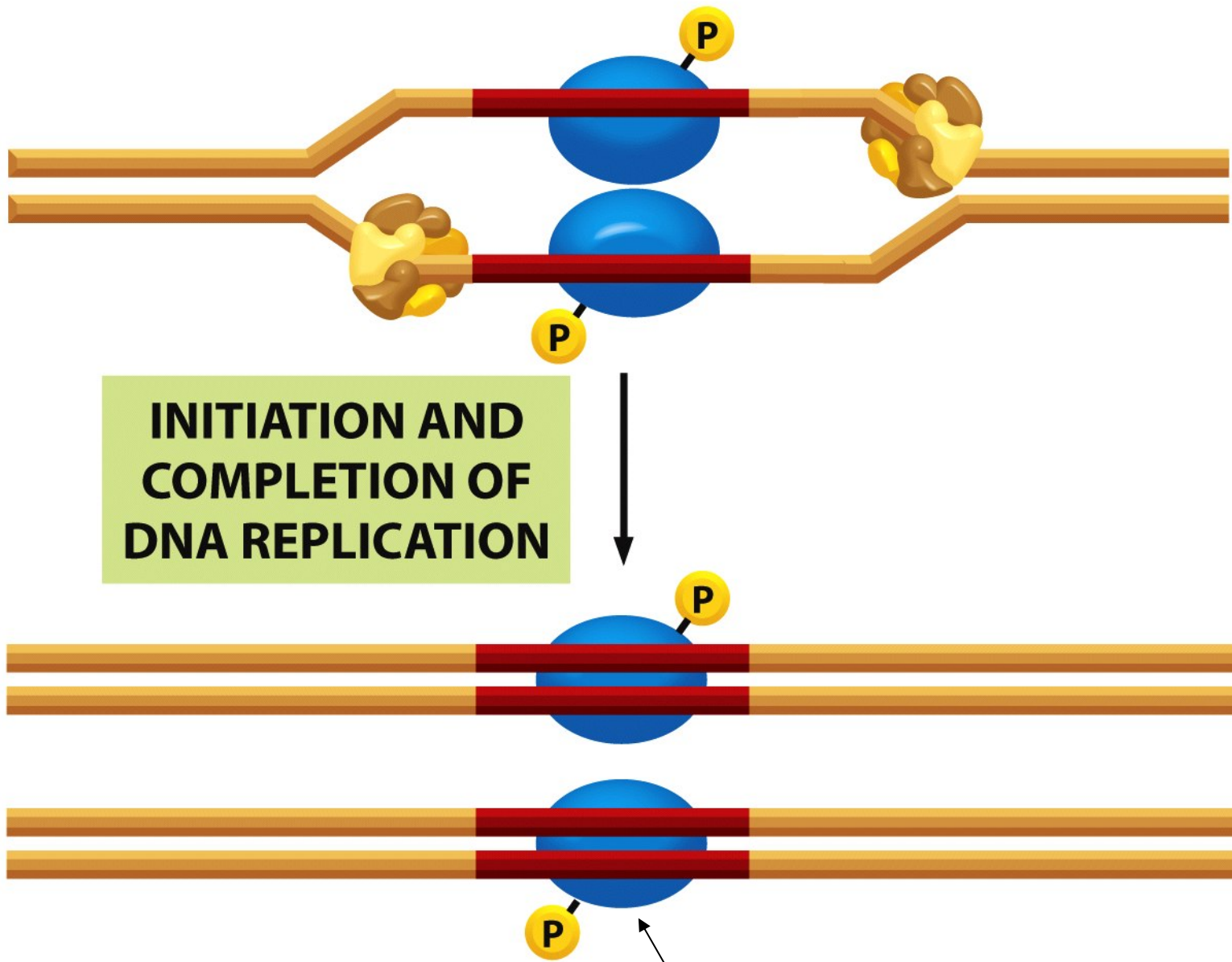


Figure 5-36 part 3 of 3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

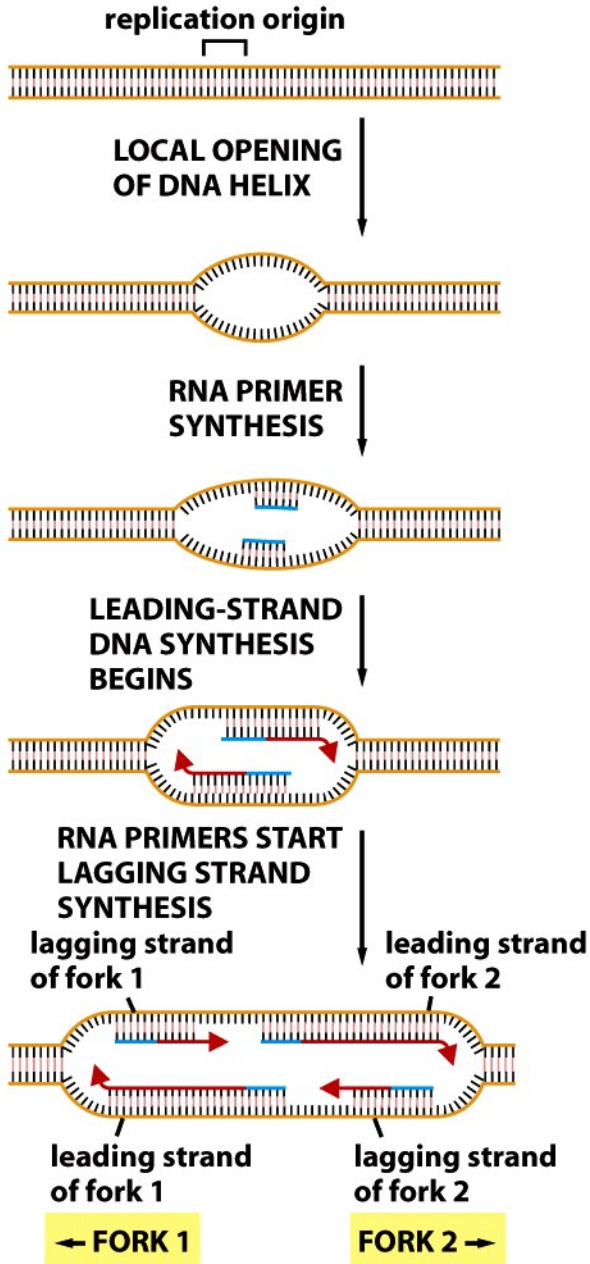


Figure 5-25 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

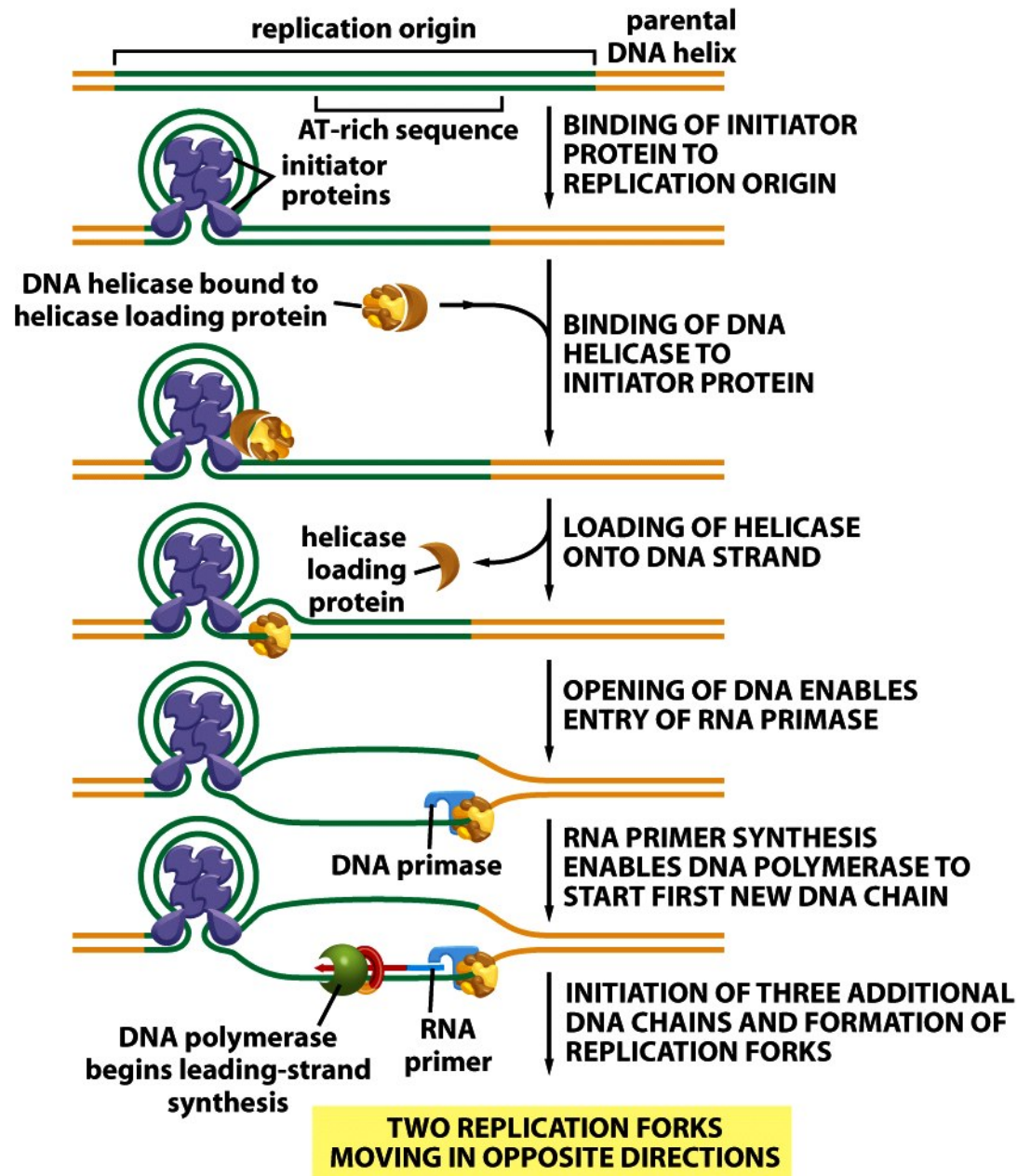


Figure 5-27 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

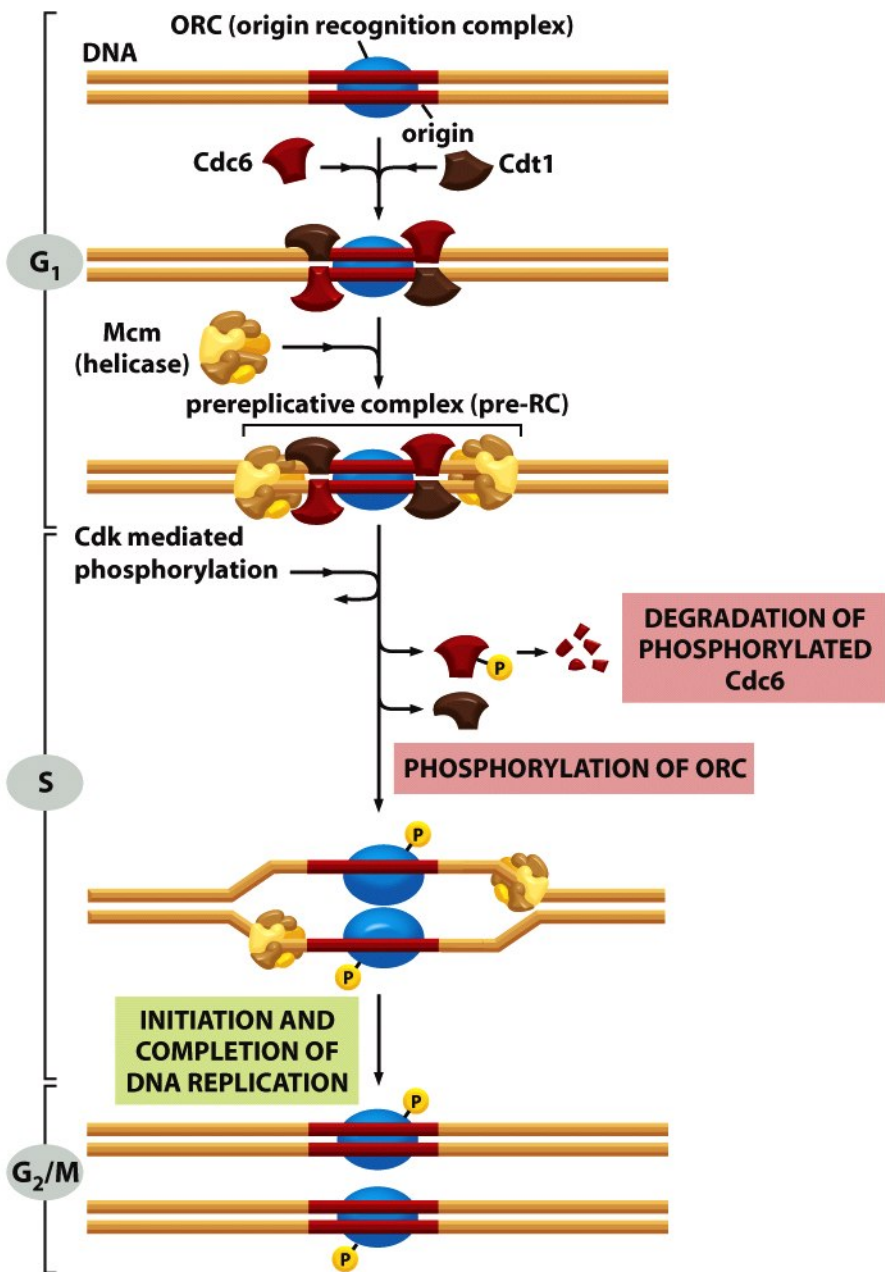


Figure 5-36 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

CELL kappale 5

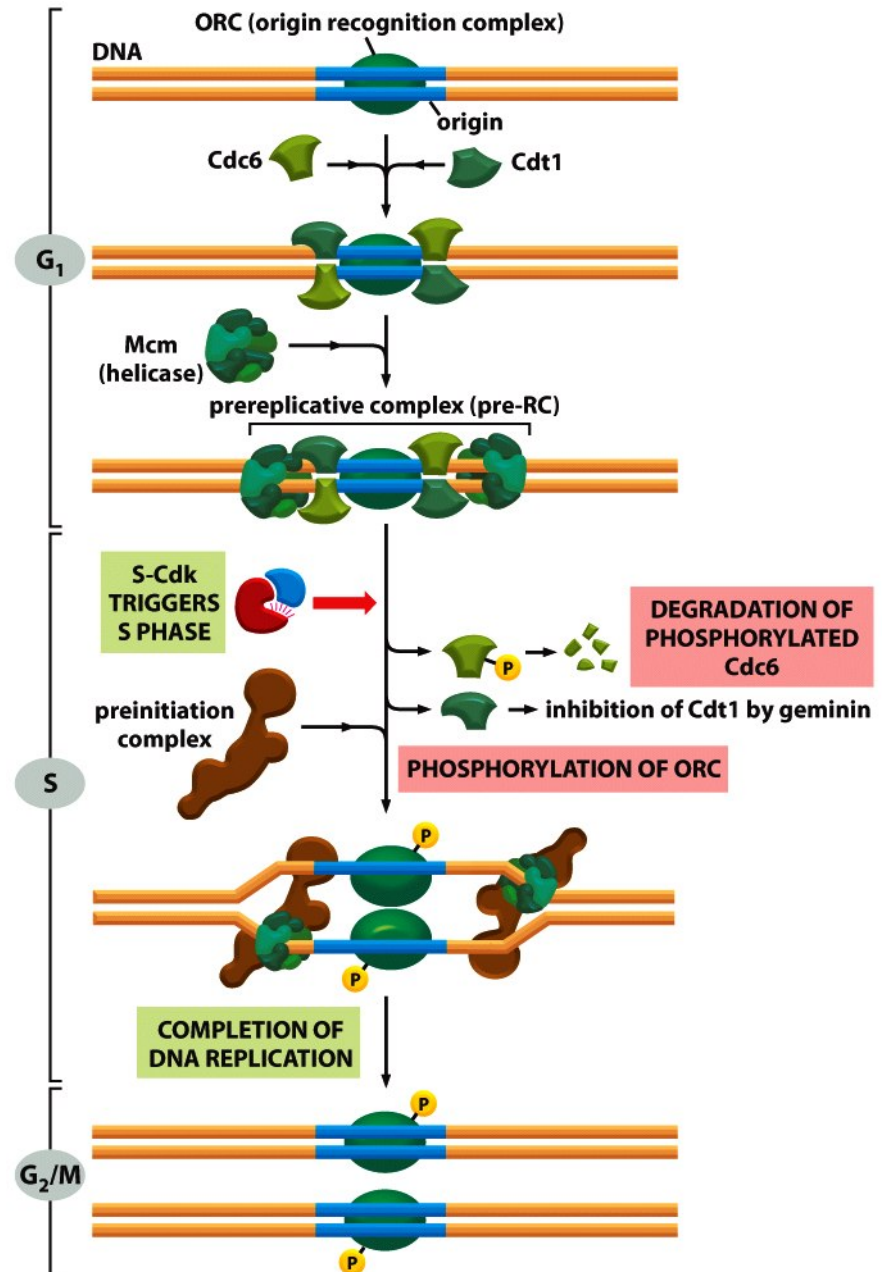
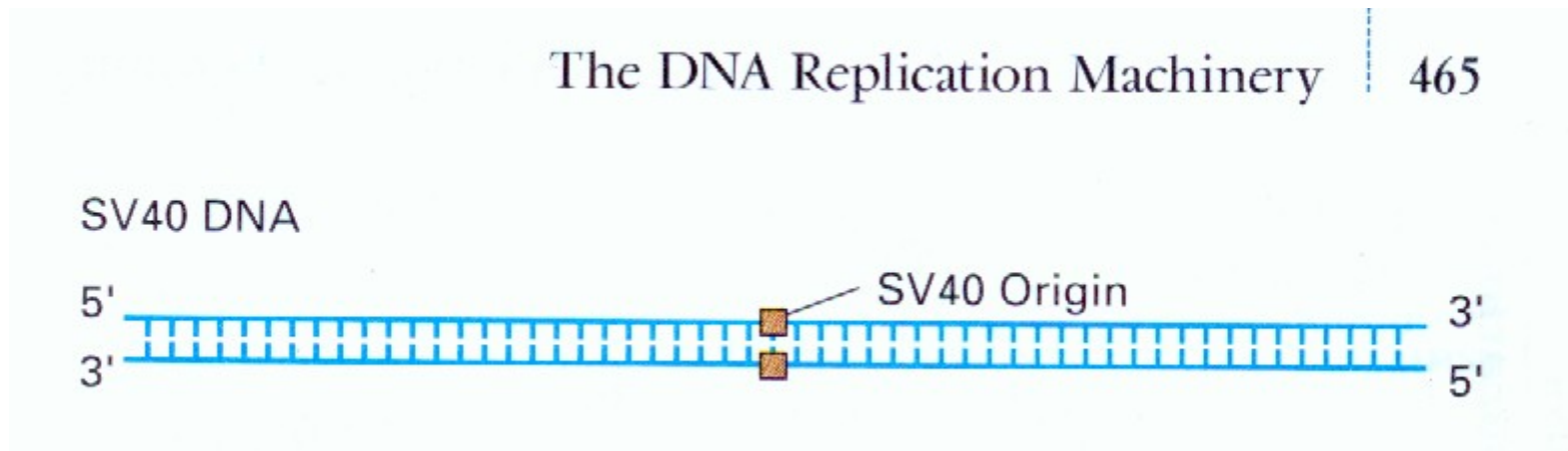


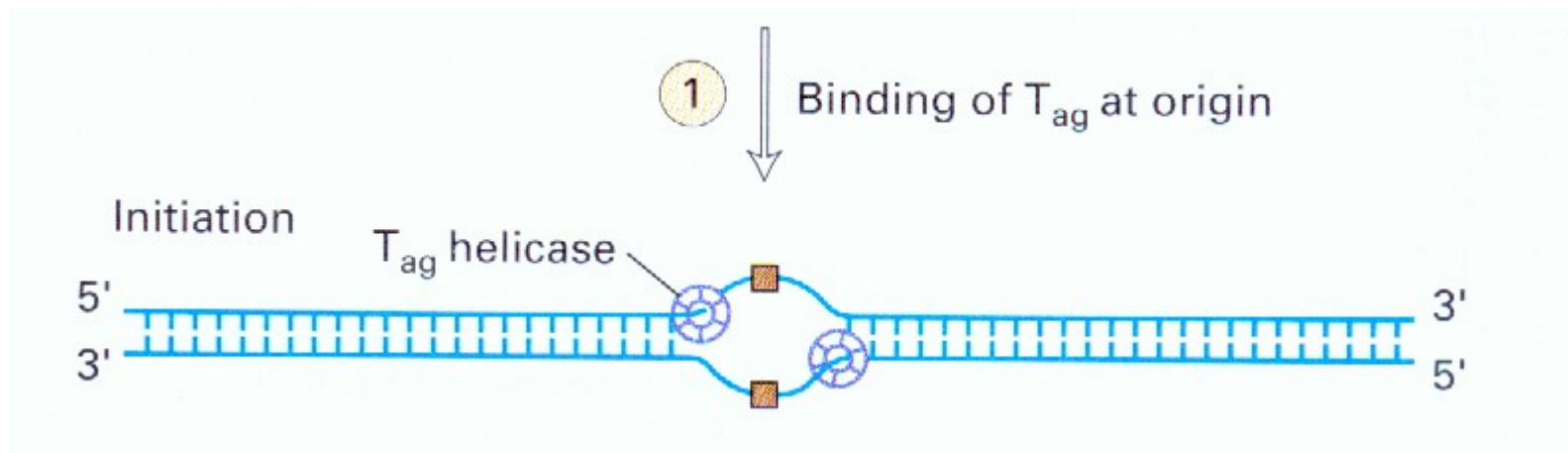
Figure 17-23 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

CELL kappale 17

Koko prosessi säälittävinä vanhoina kuvina

SV40 on DNA-virus. Kun se on solussa, se haluaa replikoitua solusyklistä riippumatta, tietenkin, eihän kerta/ solusykli riitä virukselle mitenkään. Sitä käytetään tutkimuksiin paljon, ihmisen tai apinan soluviljelmissä





Replikaation työntekijöitä:

helikaasi avaa kaksoisjuostetta kahteen suuntaan

T_{ag} helikaasi on viruksen oma erikoinen aloitusmolekyyli, joka osaa huijata solua. Loput prosessin värkkiä solu toimittaa paikalle omista varastoista, typerää kyllä

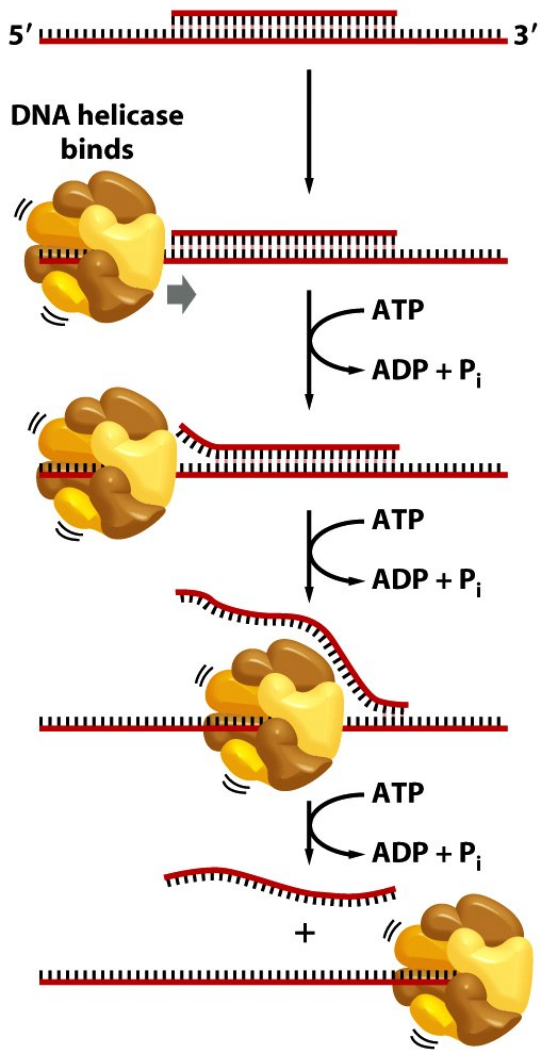
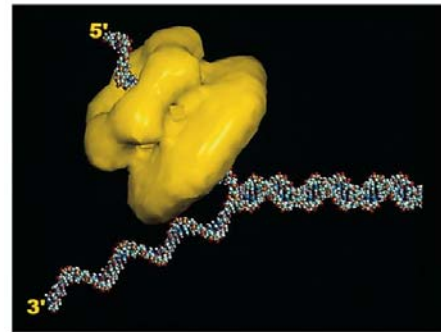
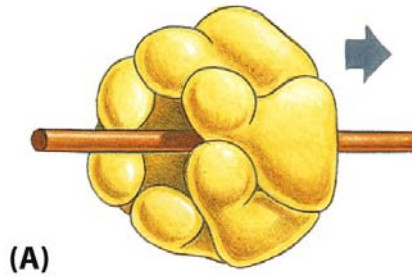


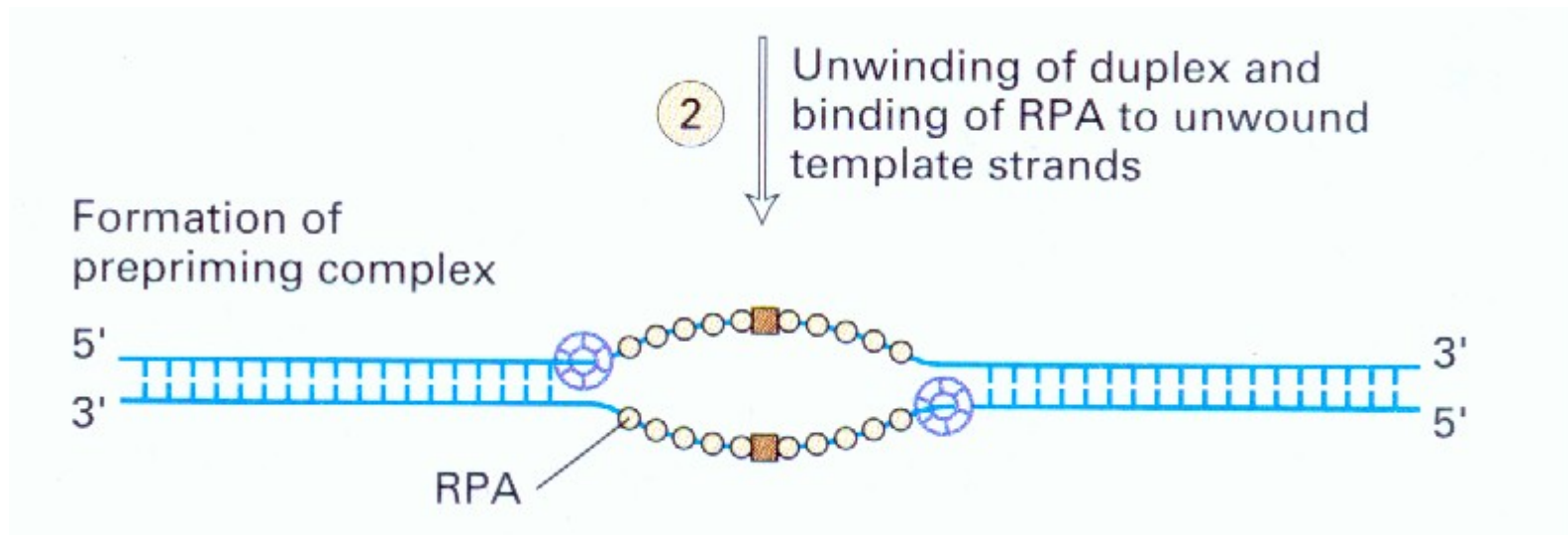
Figure 5-14 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



(B) Figure 5-15 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

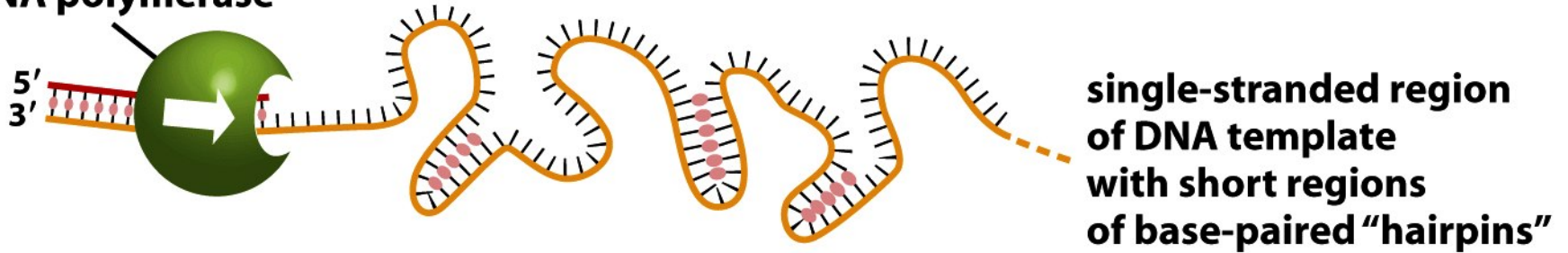


DNA kaksoisjuosteen avaamiseen tarvitaan *helikaasi*

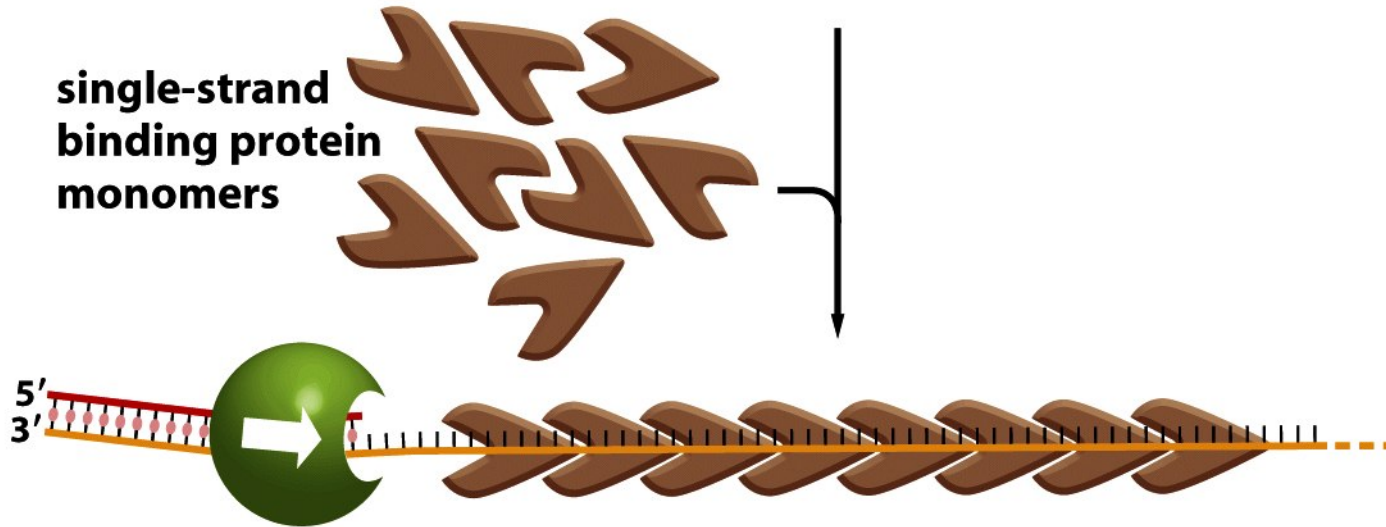


RPA = *replication protein A* pitää yksinkertaisen juosteen auki

DNA polymerase



single-strand binding protein monomers



cooperative protein binding straightens region of chain

Figure 5-16 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Juosteen pitäminen yksinkertaisena vaatii "single strand binding proteiinin"

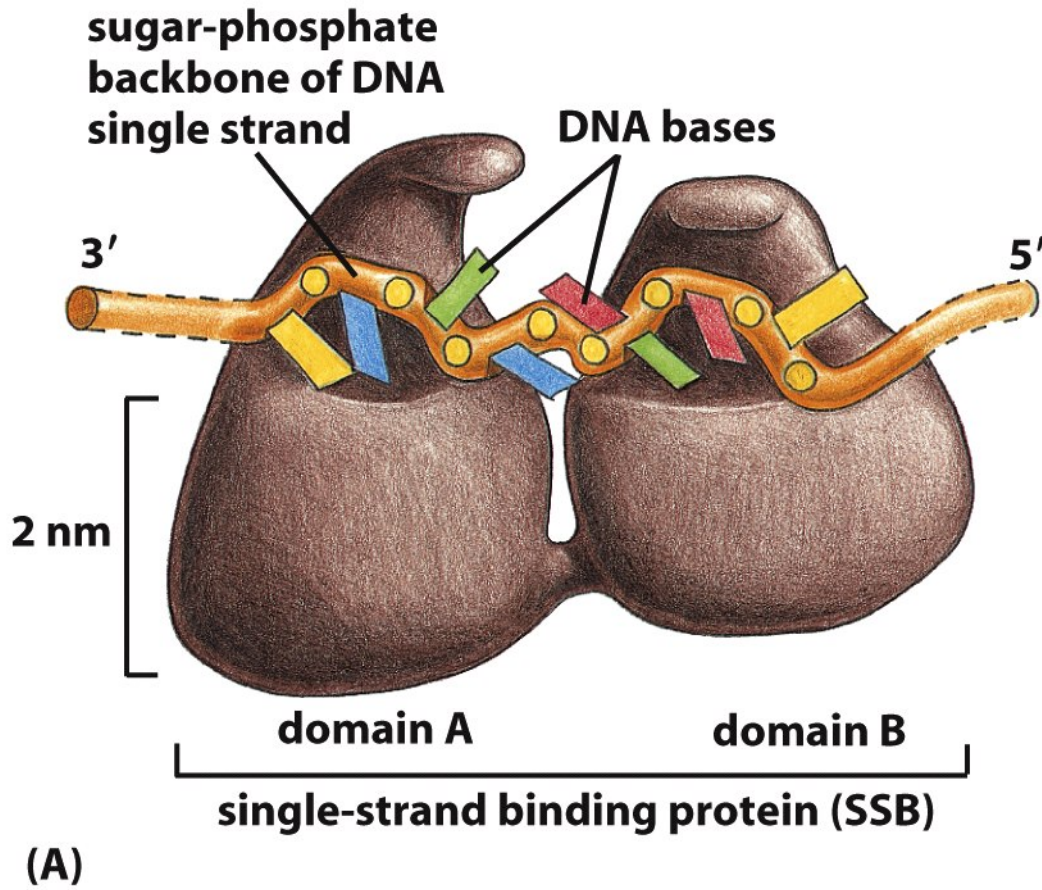
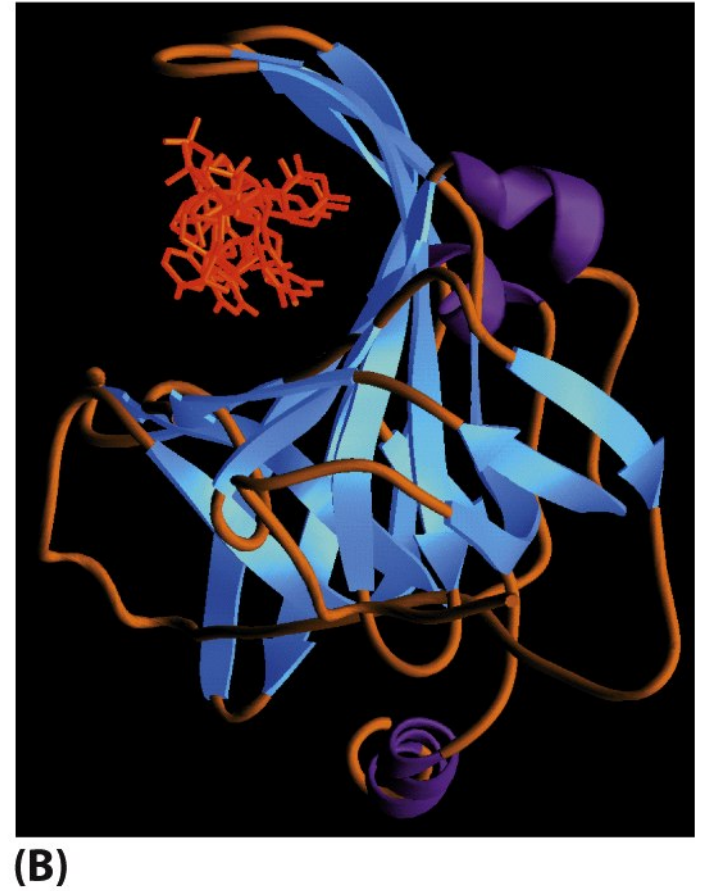
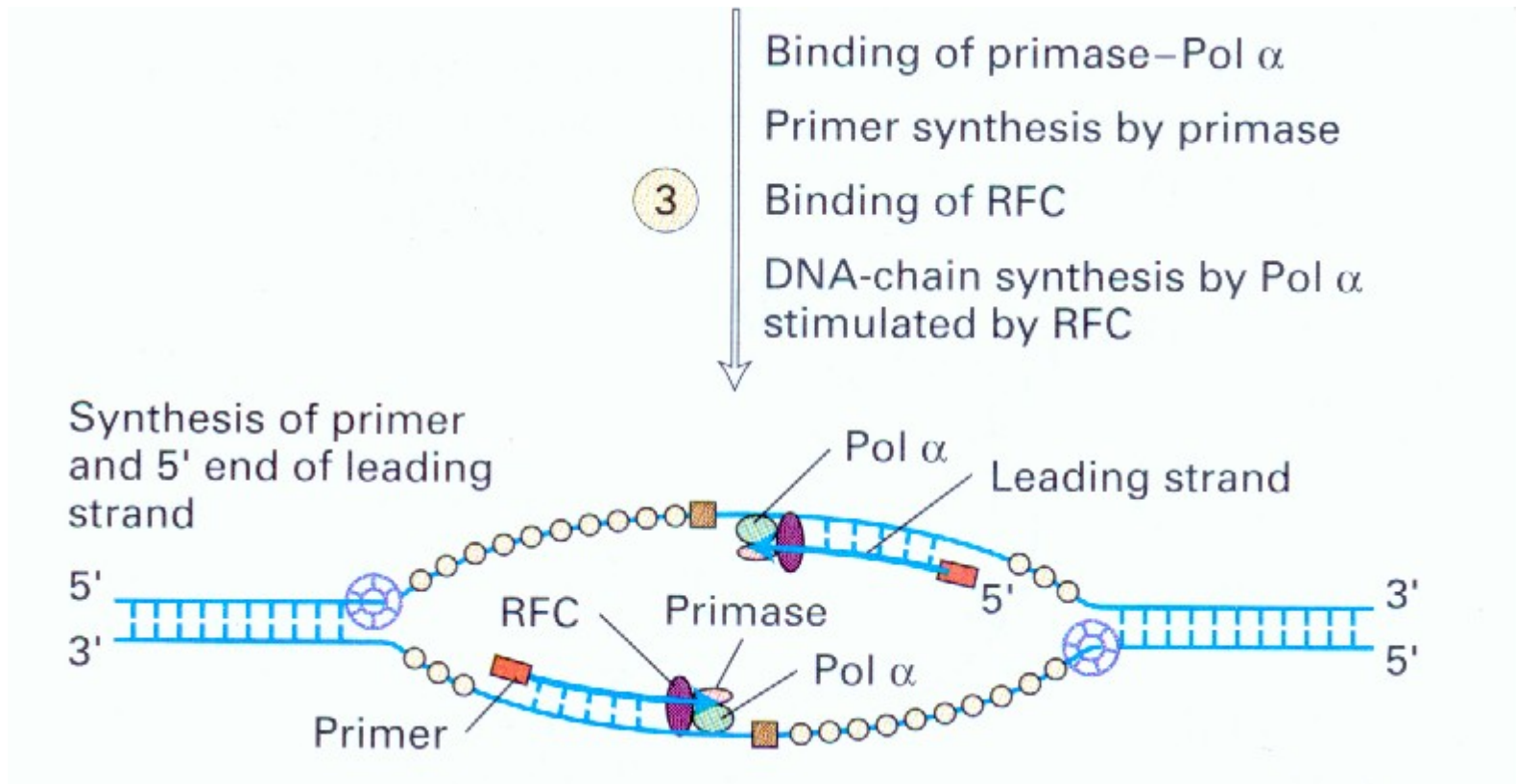


Figure 5-17 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

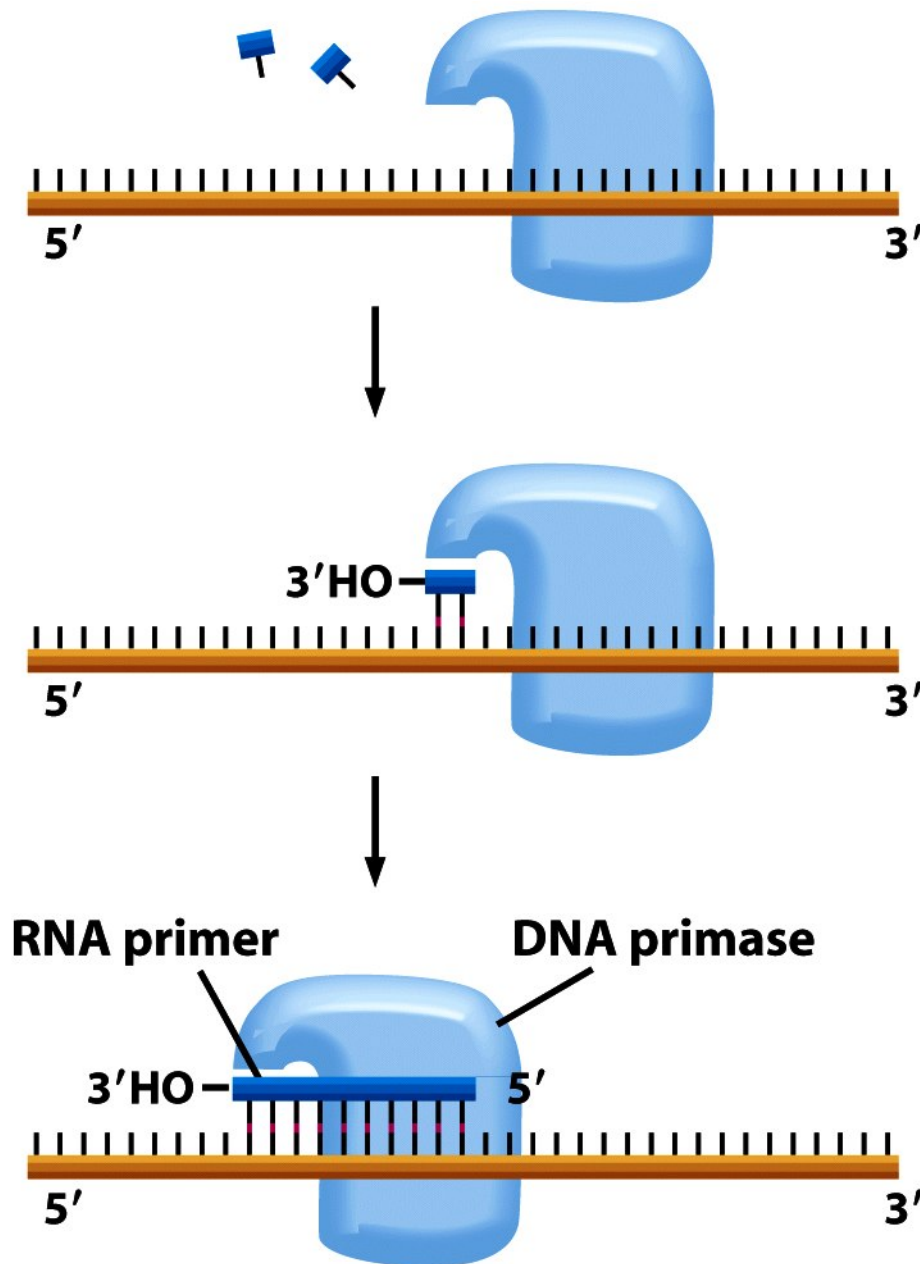


Ihmisen SSB:n rakenne



Primaasi tekee hiukan RNA-kopiota (**primer**) DNA:n rinnalle, sillä mikään DNA-polymeraasi ei osaa aloittaa pelkästä yksinkertaisesta juosteesta!

RFC = *replication factor C* + **Polymerase alpha**



Primaasi laittaa alukkeeksi pätjän RNAta, josta DNA-polymeraasi voi aloittaa synteesin

Ilmiö "primer" toistuu PCR-metodissa. Aluke on silloin DNA:ta ja osoittaa polymeraasille aloituspaikan, jonka tutkija määrää (**CELL 545**)

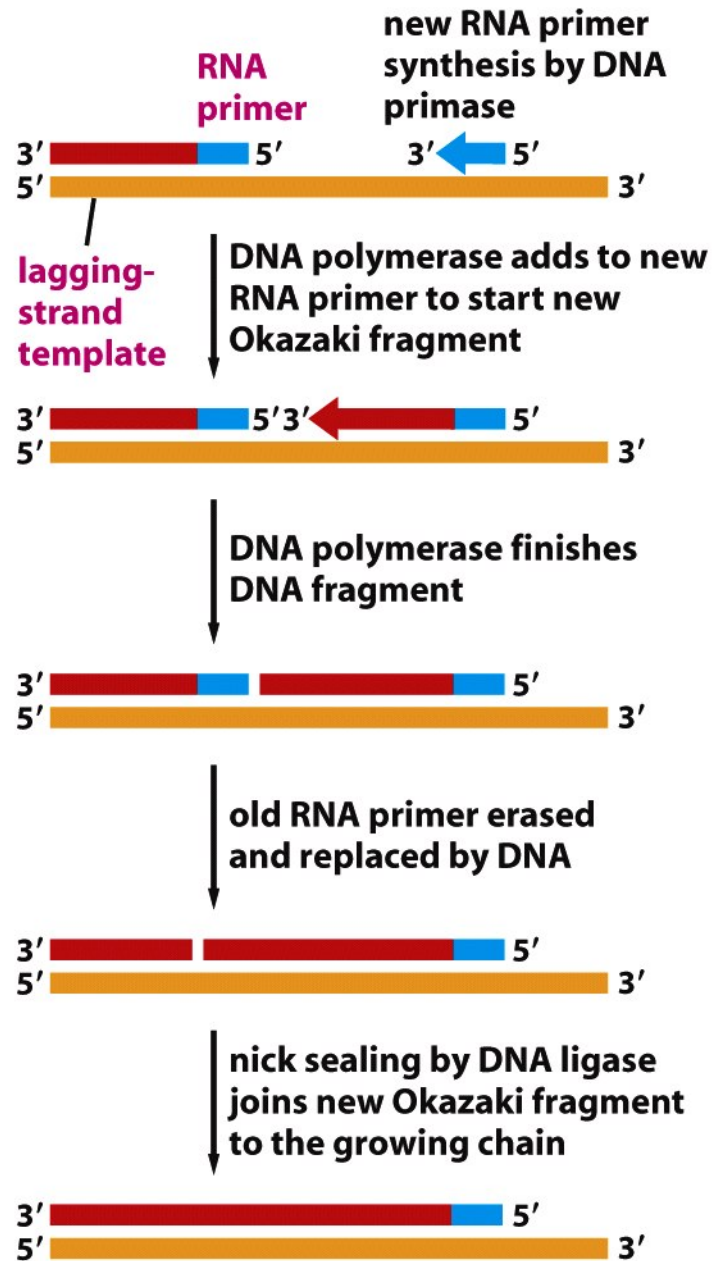
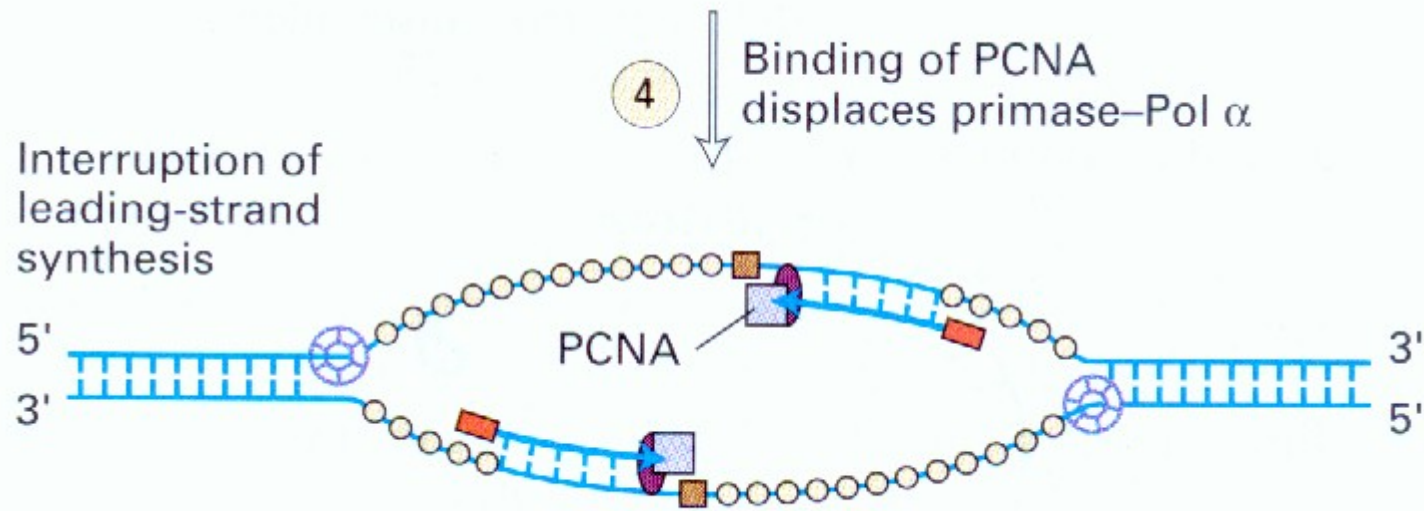
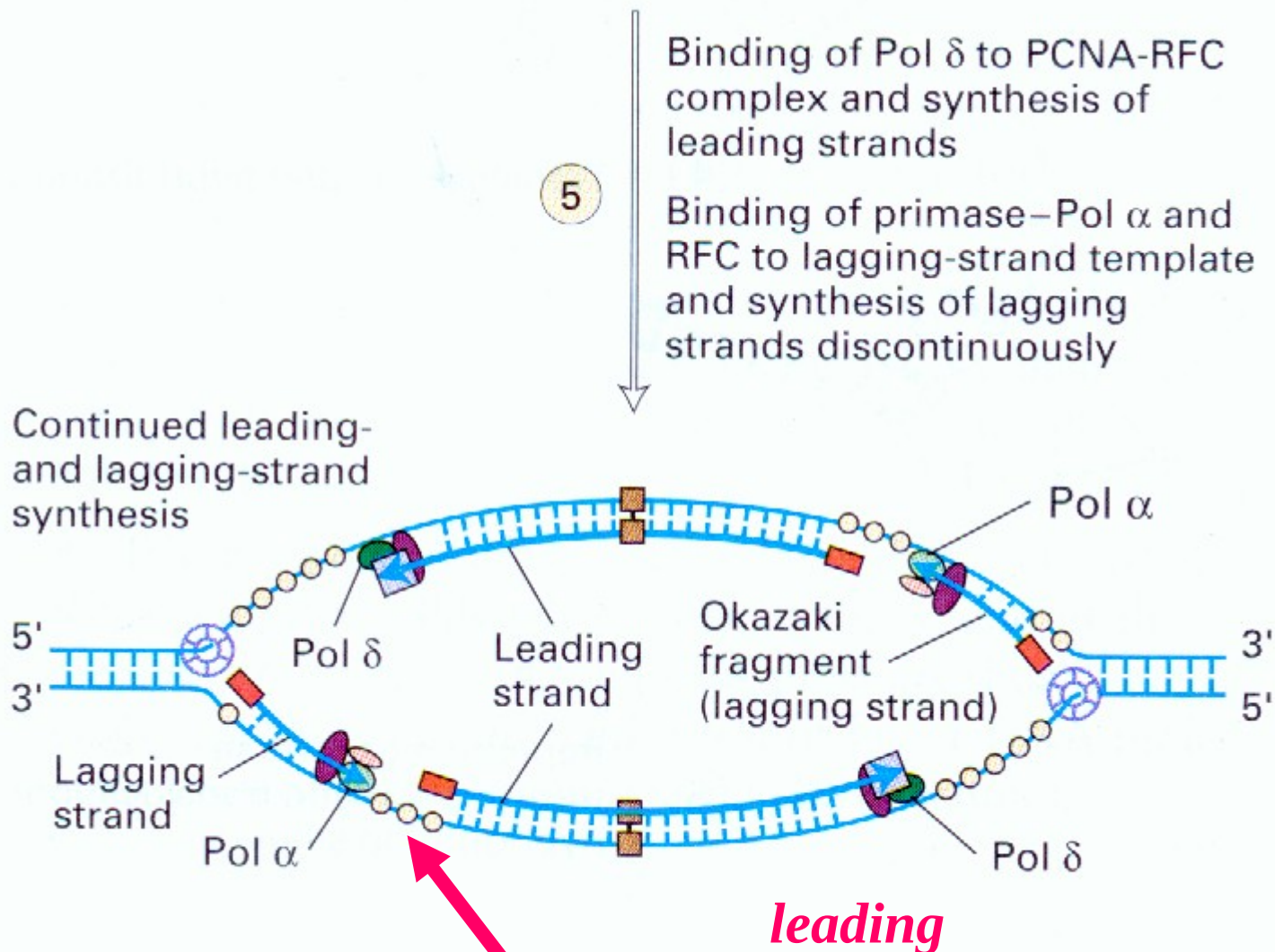


Figure 5-12 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

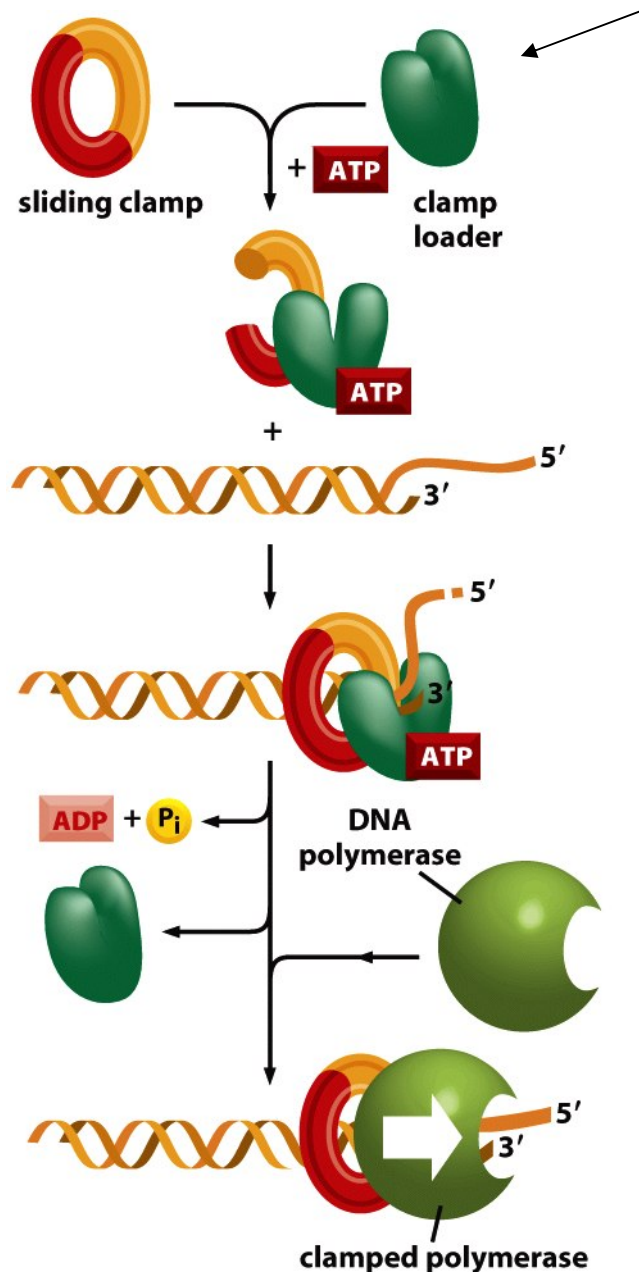


PCNA *proliferating cell nuclear antigen* vaihtuu primaasin tilalle ja vaihtaa polymeraasiksi *alphan* tilalle *deltan*! Huomatkaa, että tämä kaikki on tapahtunut vain toisessa juosteessa, vastakkaisiin suuntiin.

Noissa prosesseissa uutta DNA juostetta syntyy 5' >>> 3' päinvastoin juoksevan **templaatin** rinnalle



Jotta toinenkin juoste (*lagging*) kopioituisi, tarvitaan aloitusvälineitä uudelleen



"Sliding clamp" pitää
etenevän
polymeraasikompleksin
kiinni juosteessa ja estää
luiskahdukset

"Clamped polymerase" on
paljon kalliimpaa kuin
tavallinen, ja jos se on vielä
oikolukevaa, siitä pitää
maksaa maltaita!

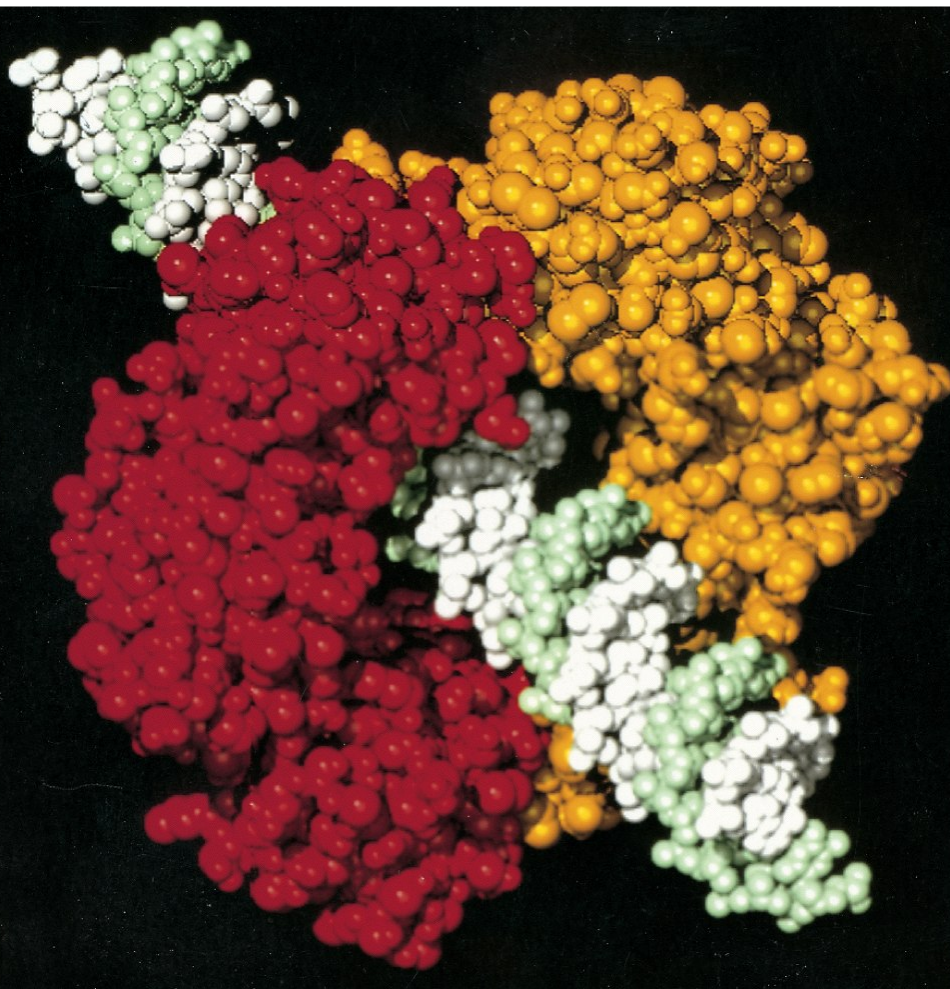


Figure 5-18a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

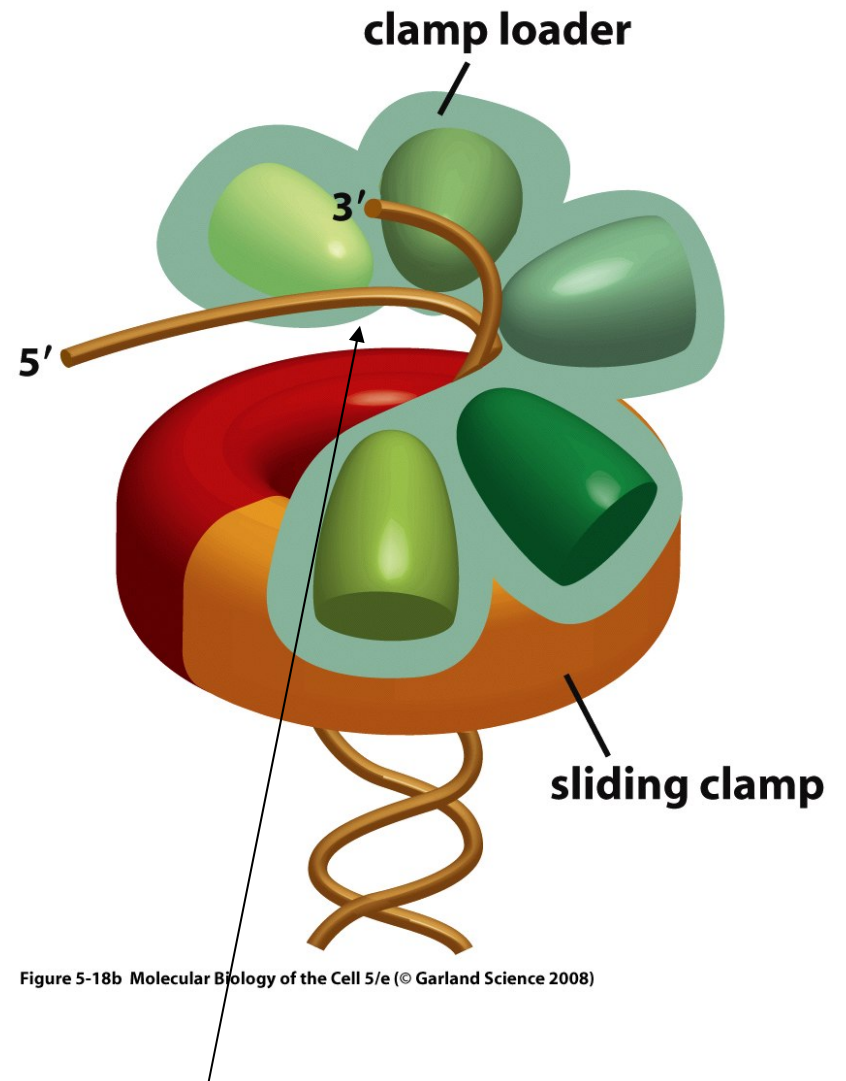


Figure 5-18b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

clamp loader on kuin mutteri

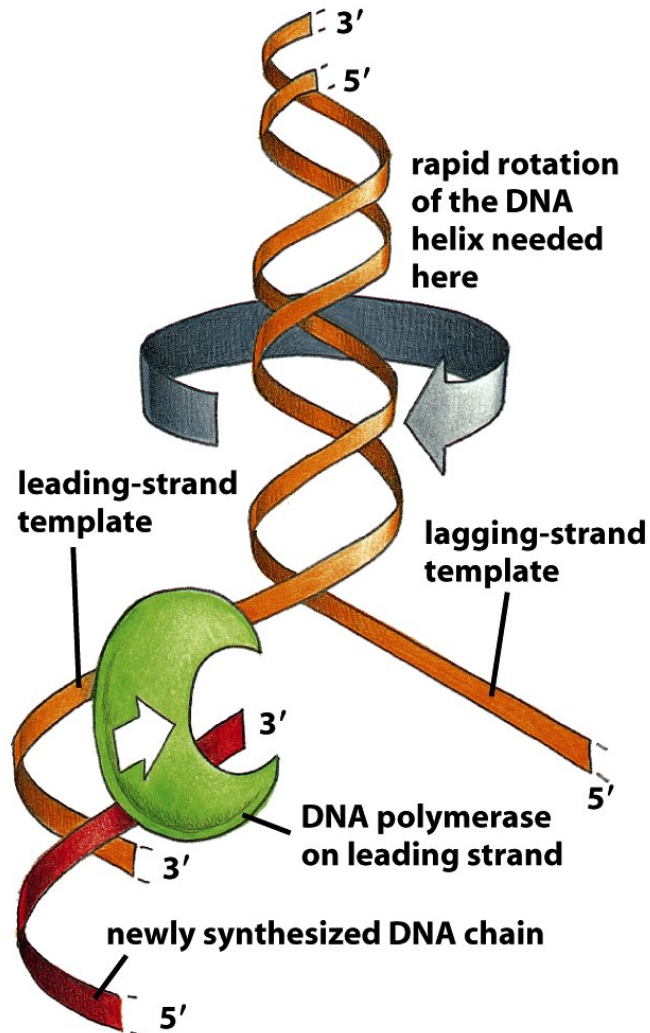


Figure 5-21 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

one end of the DNA double helix cannot rotate relative to the other end

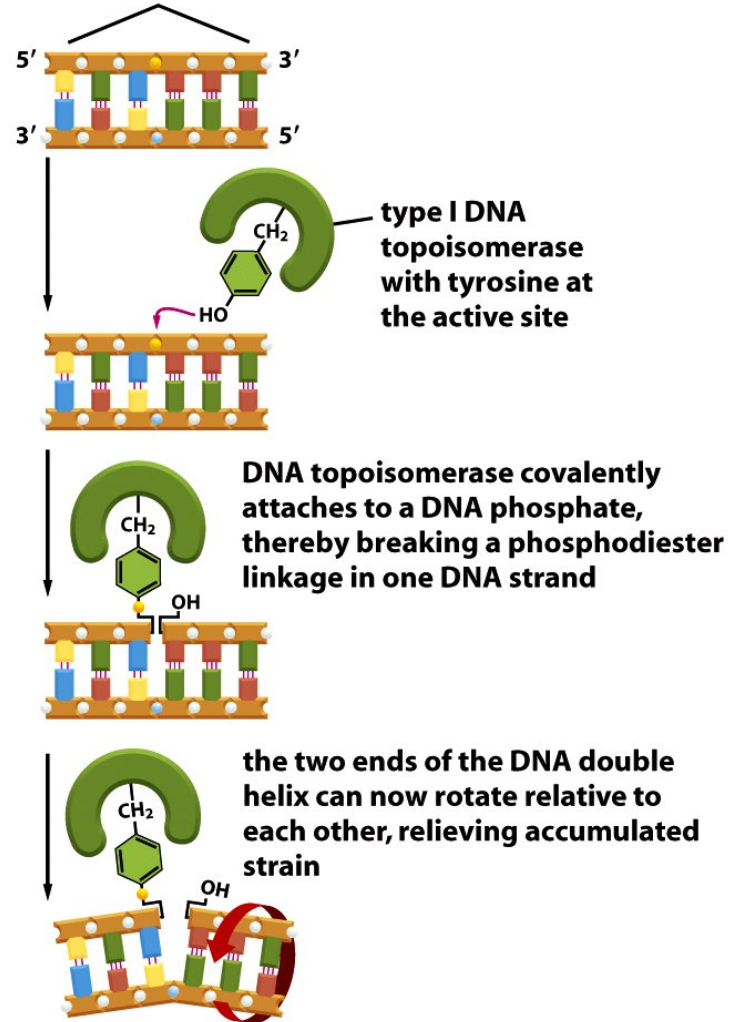
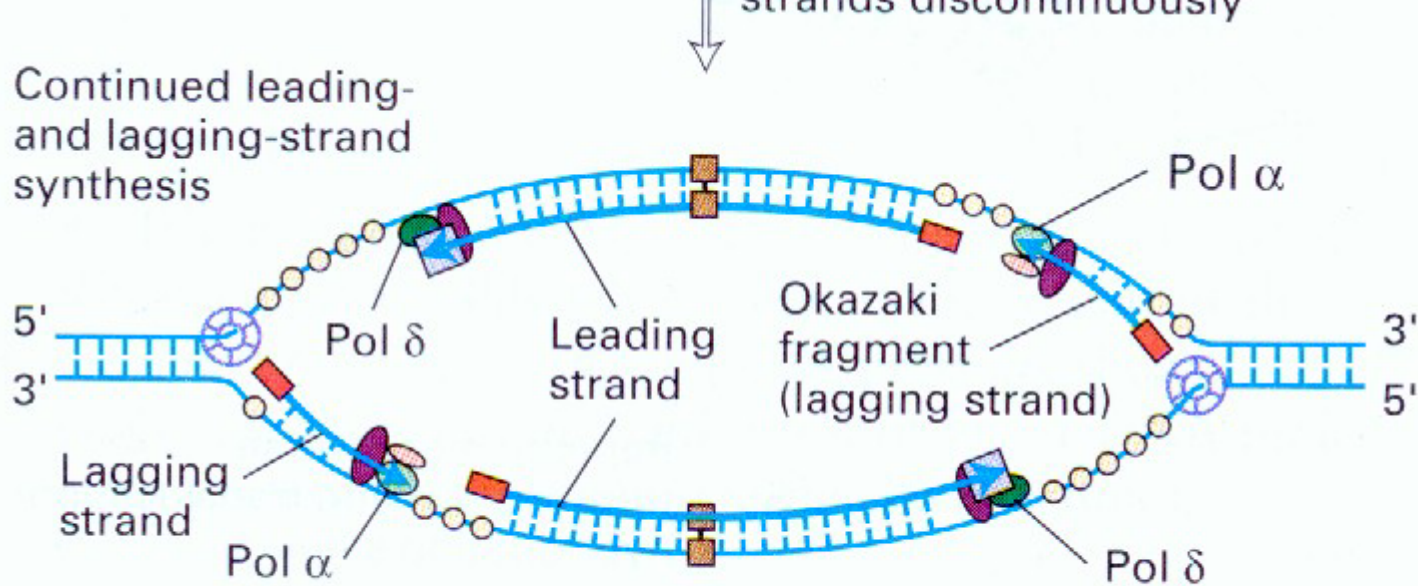


Figure 5-22 part 1 of 2 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Kierre kiristyy avatessa. Tarvitaan leikkuri, topoisomeraasi I



Jotta tämä lagging-strand juoste saataisiin vielä lopulliseen kuntoon, täytyy RNA-primerit poistaa (**RNAasi**) ja korvata DNA:lla, ja pätkät liittää yhteen (**ligaasi**)

Etenevän replikonin edessä tarvitaan kierrettä vapauttava **topoisomeraasi I**

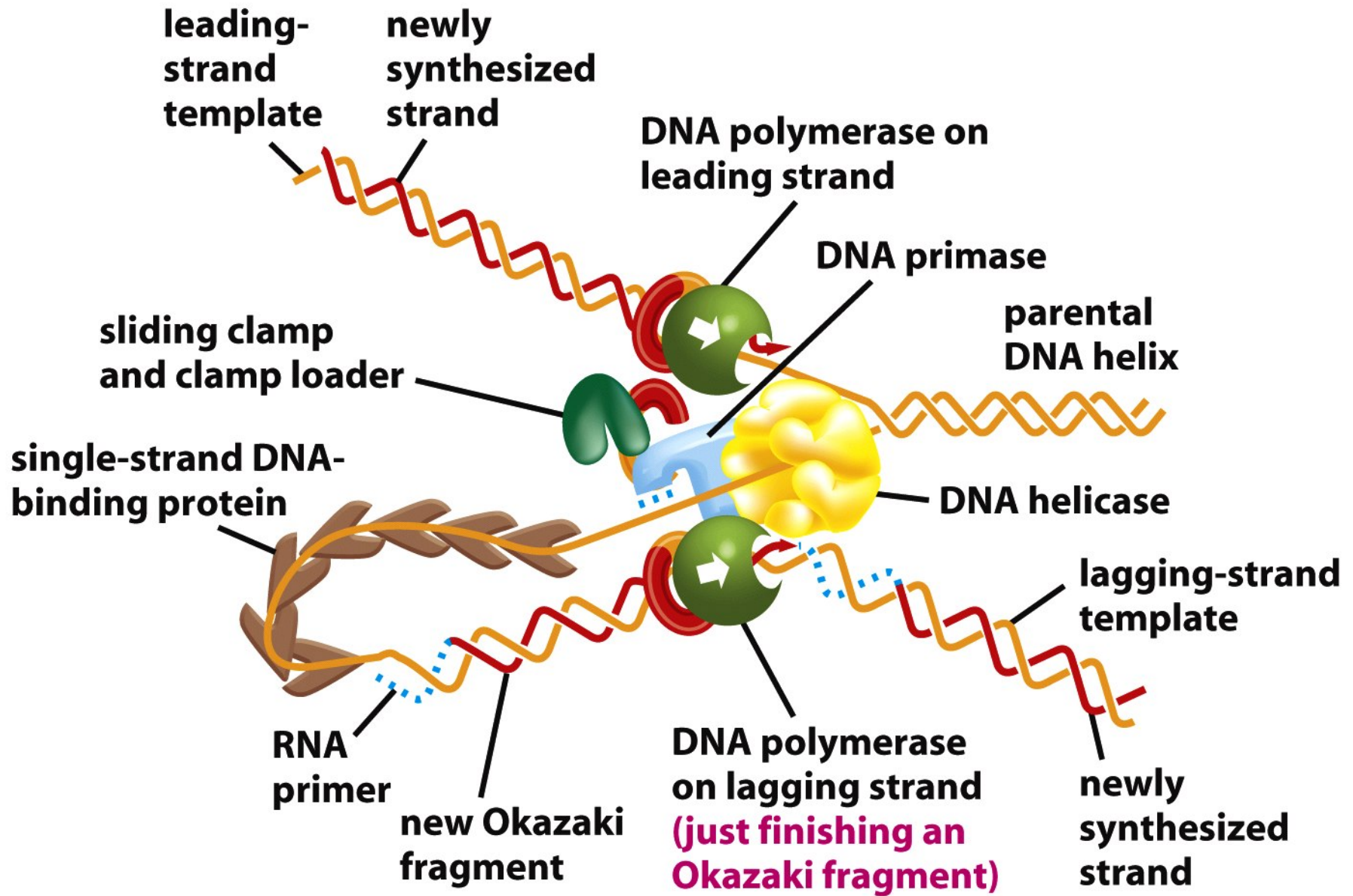
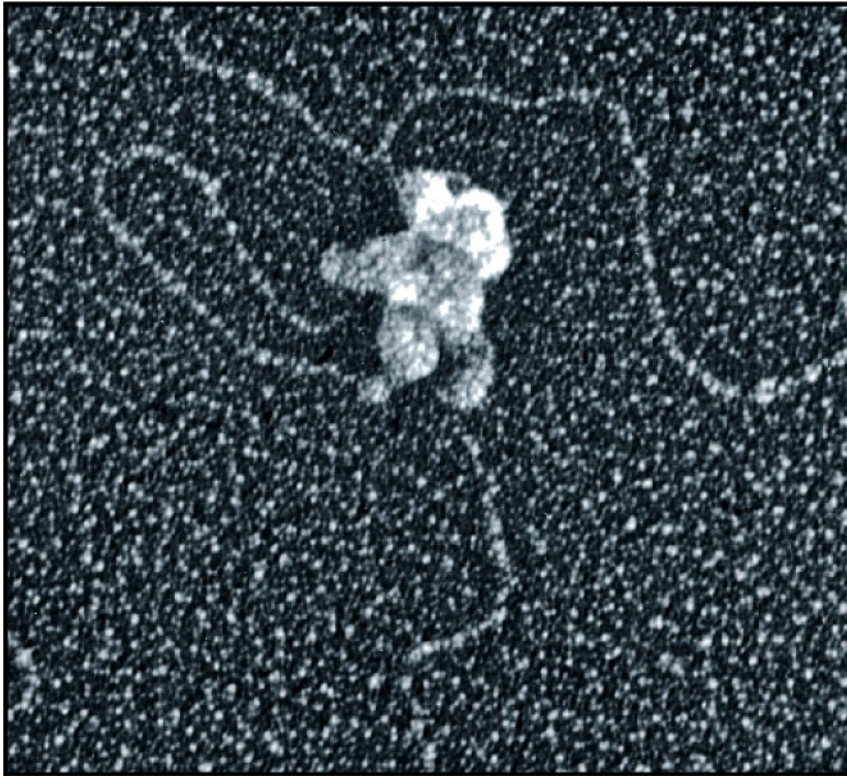


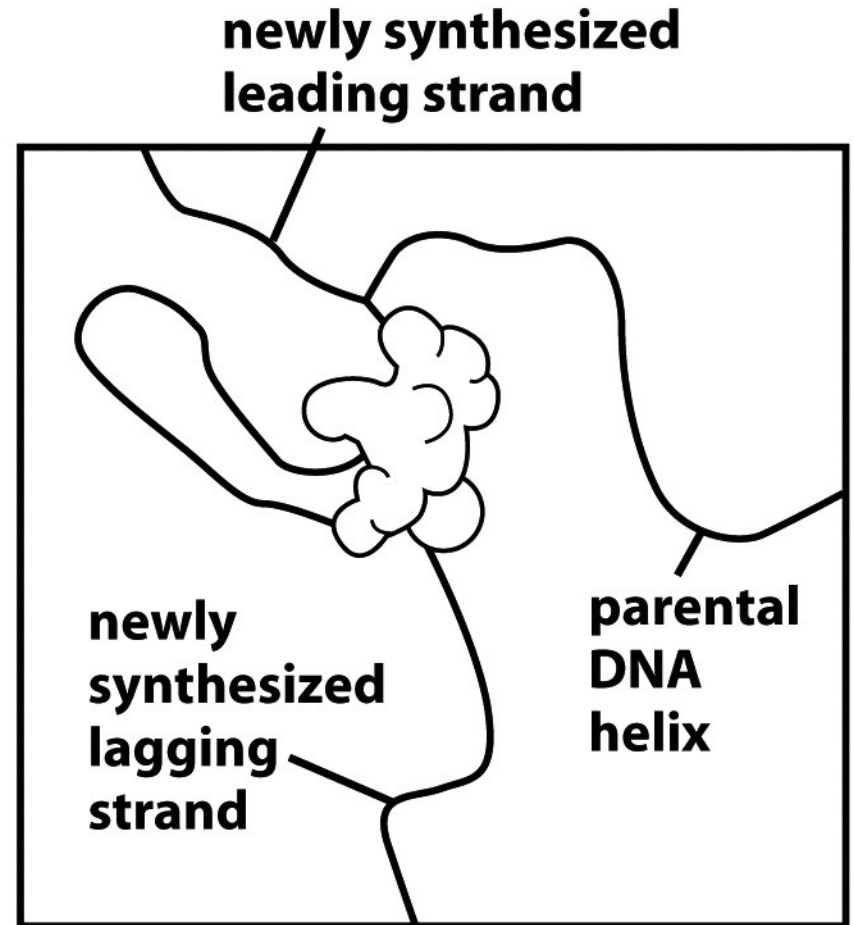
Figure 5-19a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Koko kalusto paikalla!



(B)

Figure 5-19bc Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



(C)

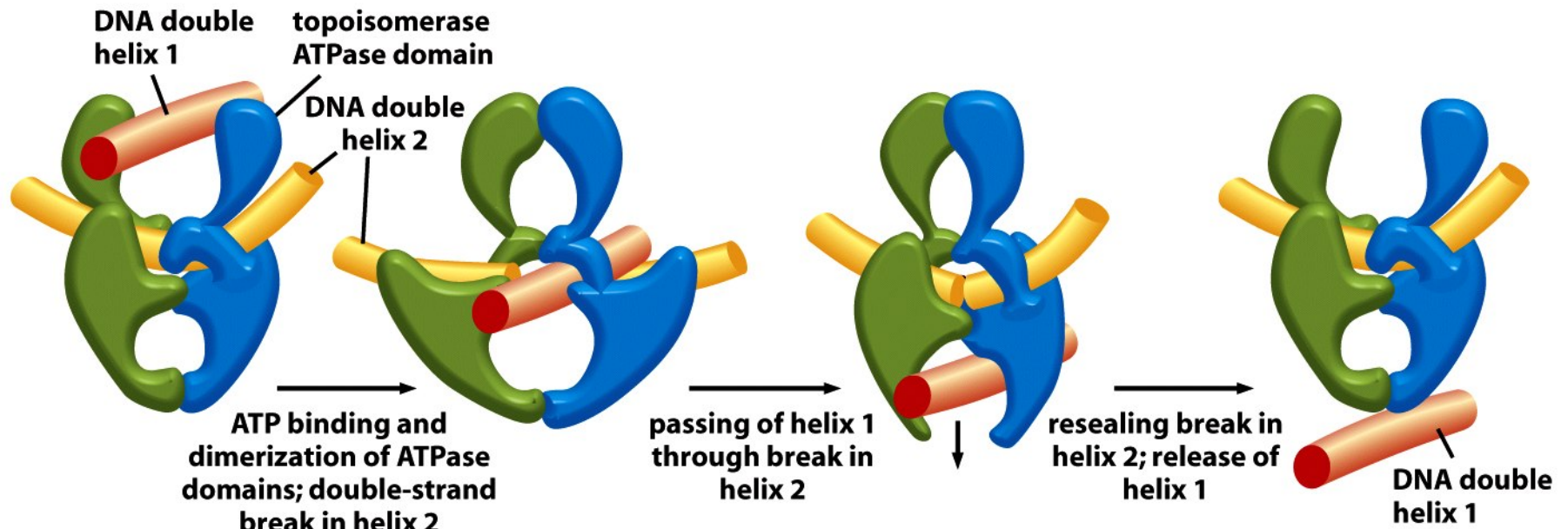


Figure 5-23 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Jotta koko vyyhti voitaisiin joskus saada selvitettyä,
tarvitaan toinenkin leikkuri, topoisomeraasi II

Tästä meillä oli puhetta jo solubilsassa!

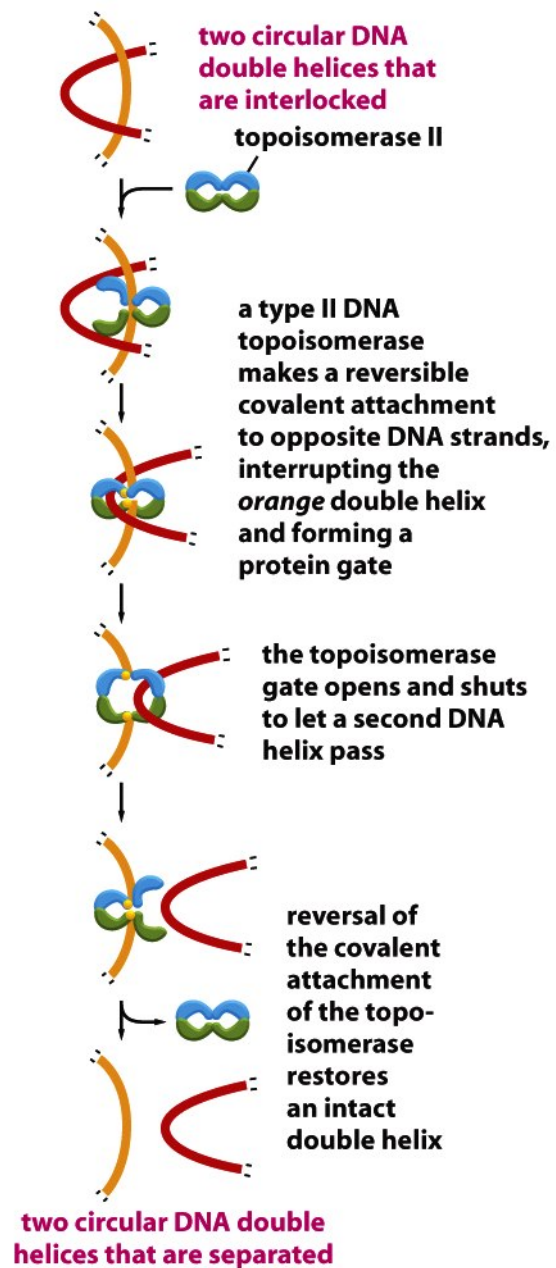


Figure 5-24 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

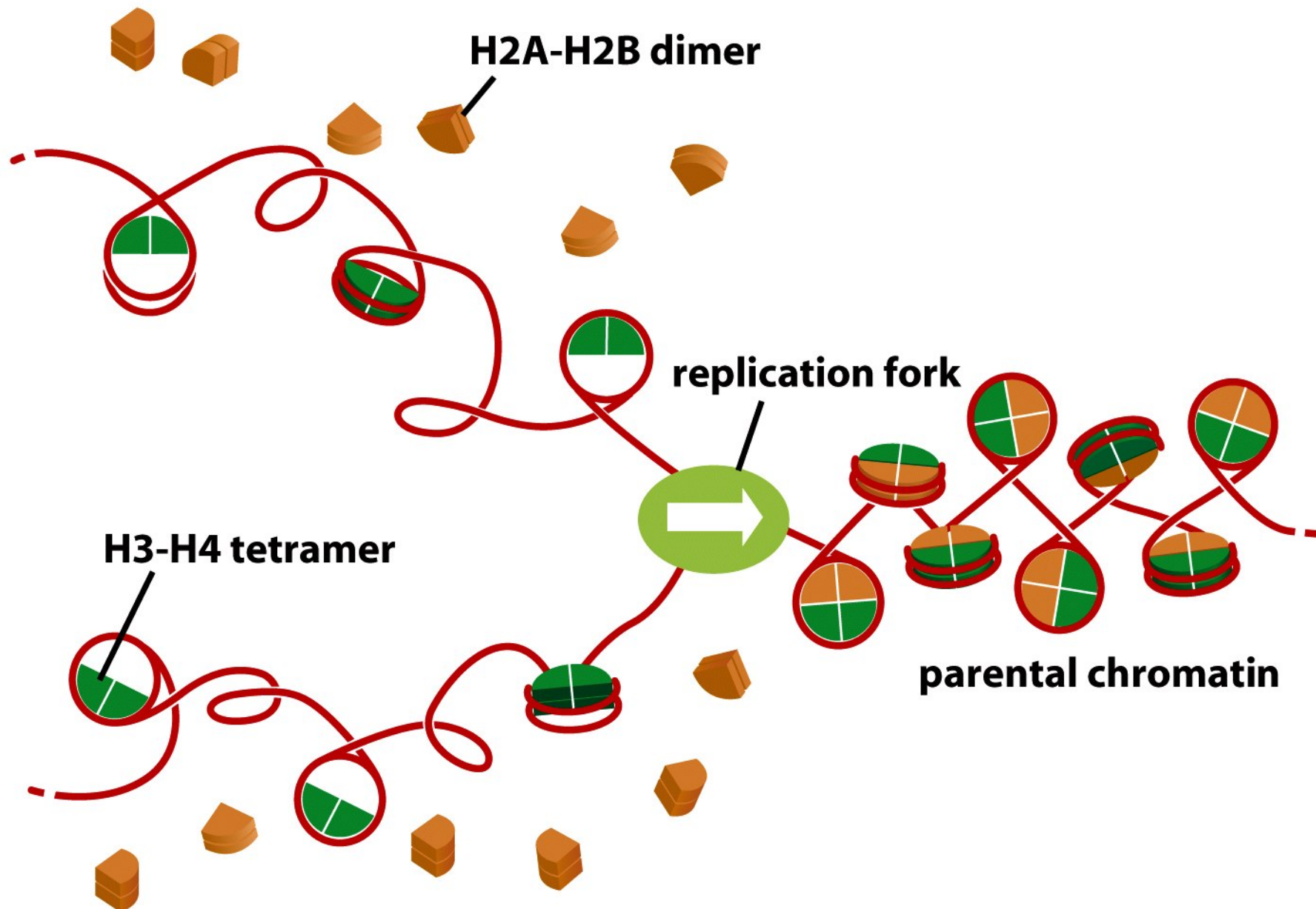


Figure 5-38a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

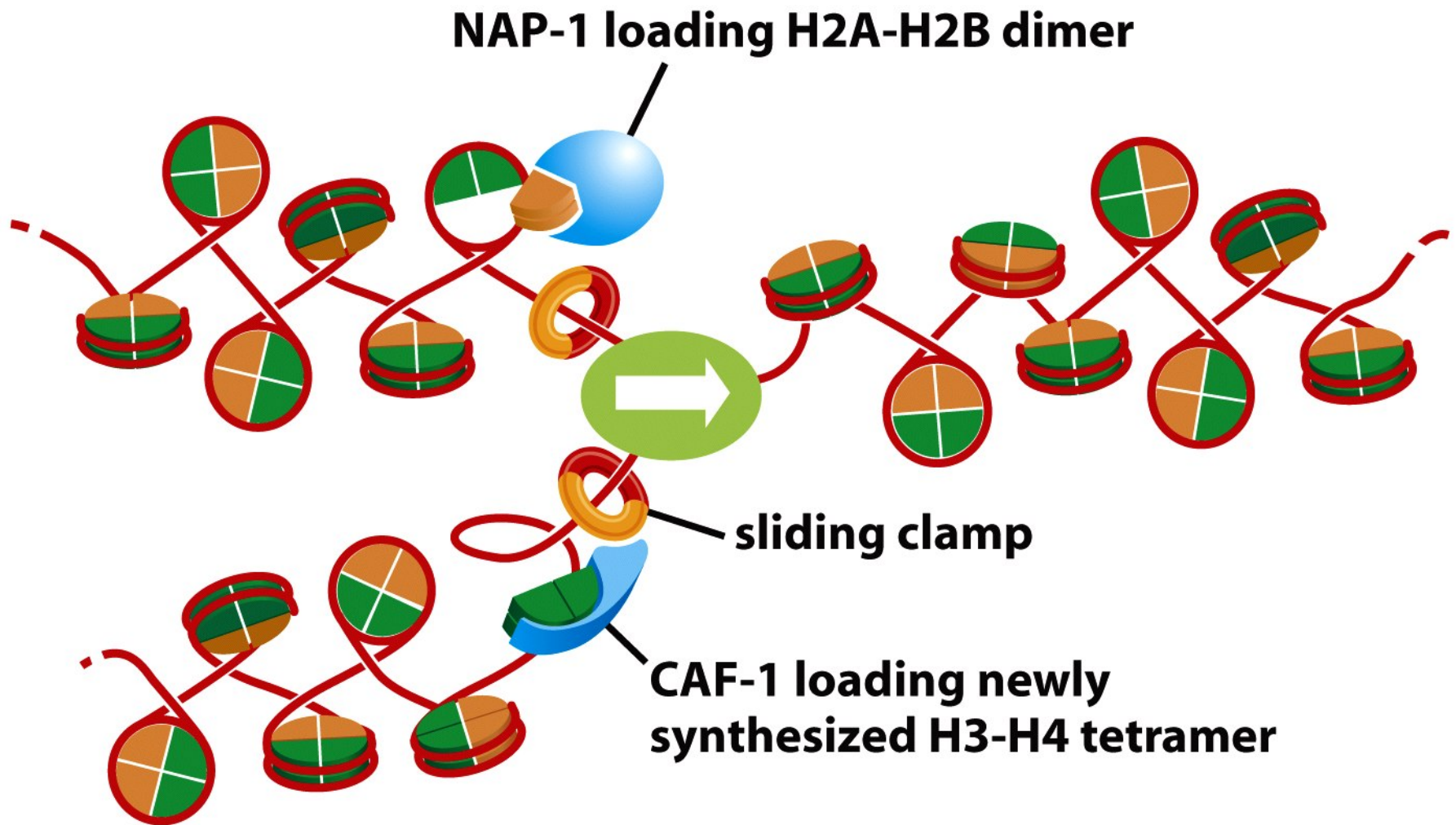


Figure 5-38b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Histonit liitetään juosteeseen melko pian. Tässä prosessissa voidaan säilyttää "epigeneettistä informaatiota", eli uusi juoste "muistaa", miten sitä on aikaisemmissa vaiheissa säädelty.

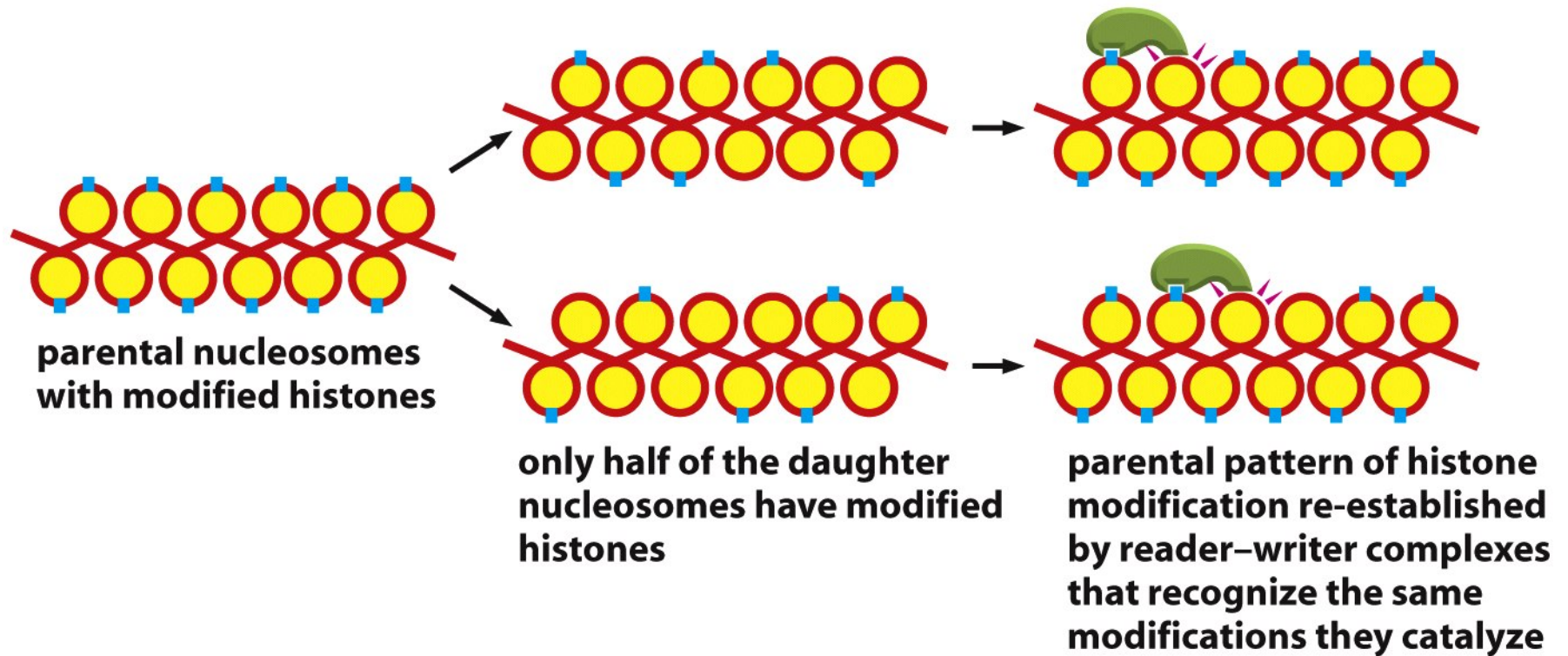
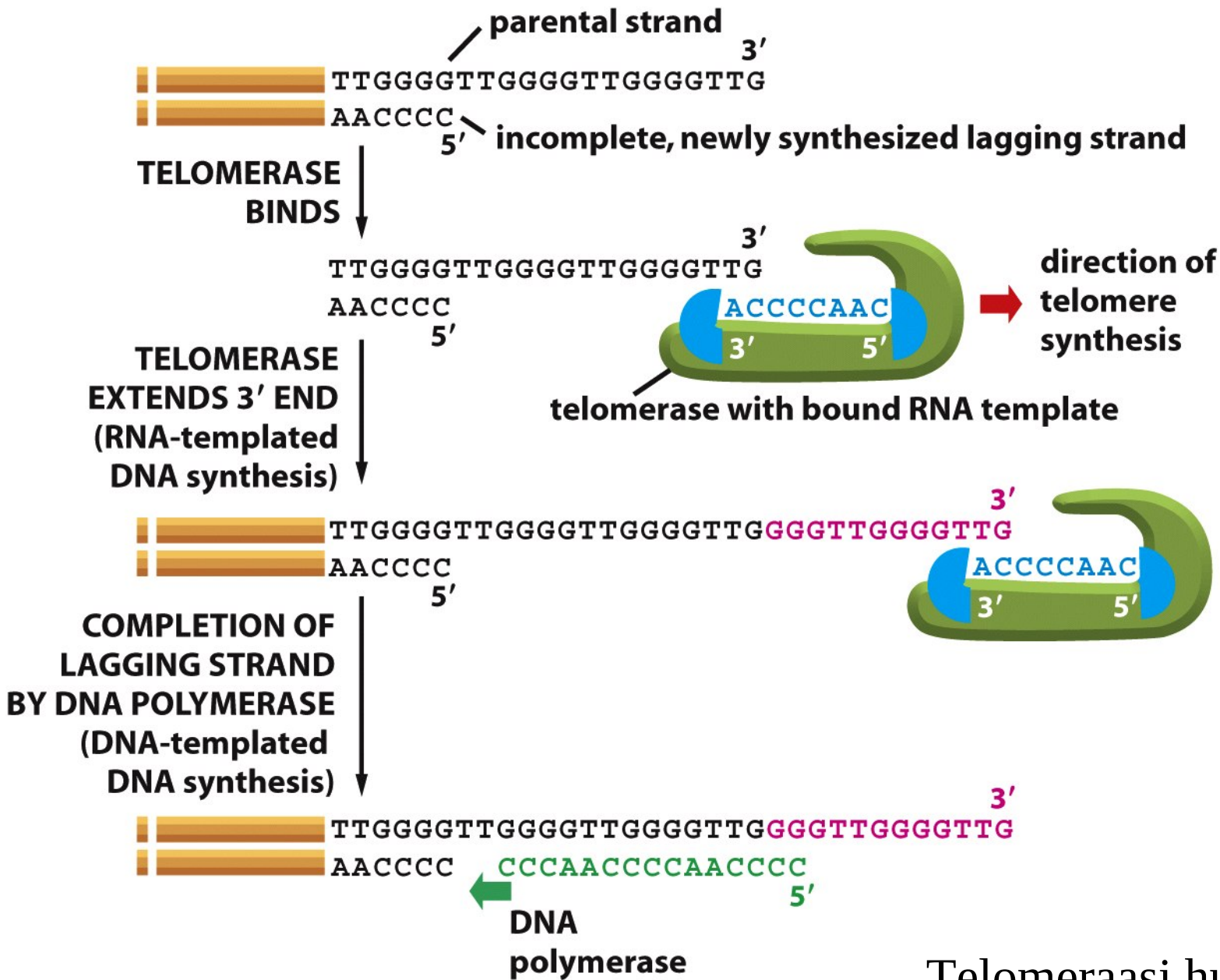


Figure 5-39 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Samaa juttua: näin histonimodifikaatio voi periytyä



Telomeraasi huolittelee
kromosomien päät

Figure 5-41 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

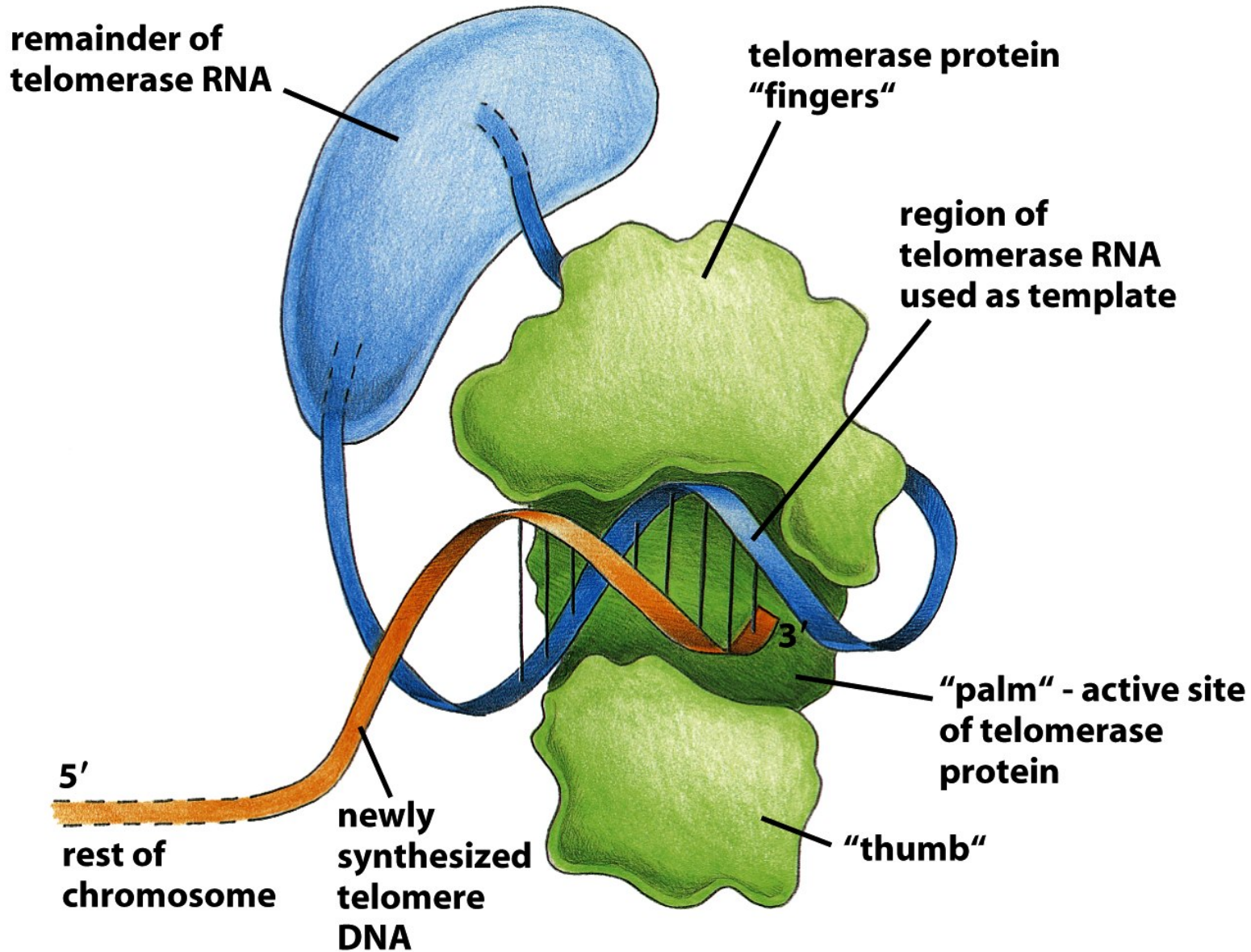


Figure 5-40 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

<http://www.dnalc.org/>

Tuossa osoitteessa voi kerrata kaiken (ja oppia lisääkin)

DNA-polymeraasit ovat keskeiset työn suorittajat

E. coli I, II, III

Nisäkäs	α (I)	δ (III)	ϵ (II)	β	γ
	tuma	tuma	tuma	tuma	mitokondrio
	lagg.	leading	repair	repair	

Mikään DNA-polymeraasi ei osaa aloittaa yksijuosteisesta templaatista. Aina tarvitaan aluksi RNA-primeri (primaasi-entsyymi tekee sen) tai (labrassa) valmis primeri, joka osuu sitoutumaan aloituskohtaan (PCR)

Erikoisempia DNA-polymeraaseja

Taq -polymeraasi *Thermus aquaticus*

Pwo-polymeraasi *Pyrococcus woesei*

Tth-polymeraasi *Thermus thermophilus*, myös RNA>DNA

Näitä käytetään PCR:ssä (Polymerase Chain Reaction), koska ne kestävät denaturoinnin kuumuuden

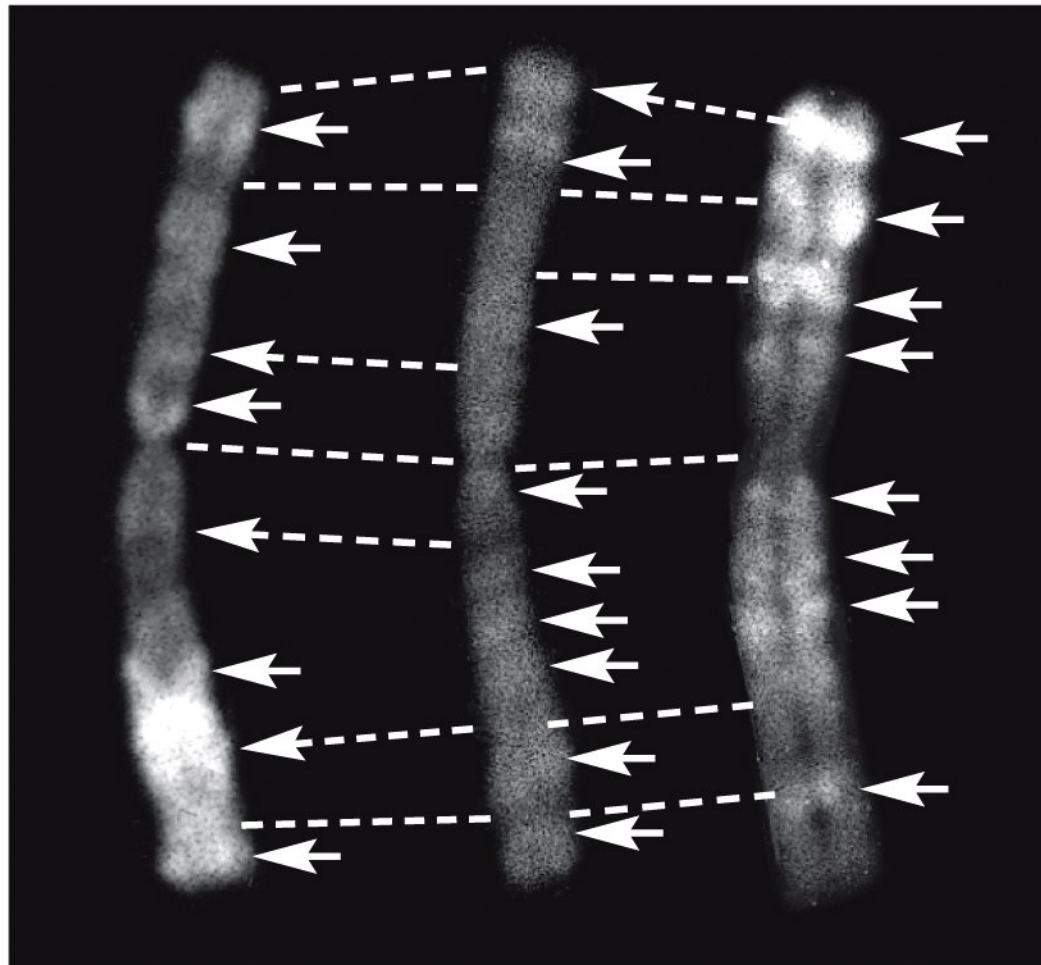
Käänteistranskriptaasi = RNA-templaattilla toimiva DNA-polymeraasi

Muuttaa esimerkiksi mRNA:n DNA:ksi, jota on helpompi tutkia ja hyvä säilyttää;

RNA-virukset käyttävät sellaista päästäkseen nauttimaan solun eduista DNA-muodossa

Telomeraasi laittelee kromosomin päät kuntoon

early S middle S late S
0–2 hours 3–5 hours 6–8 hours



5 μm

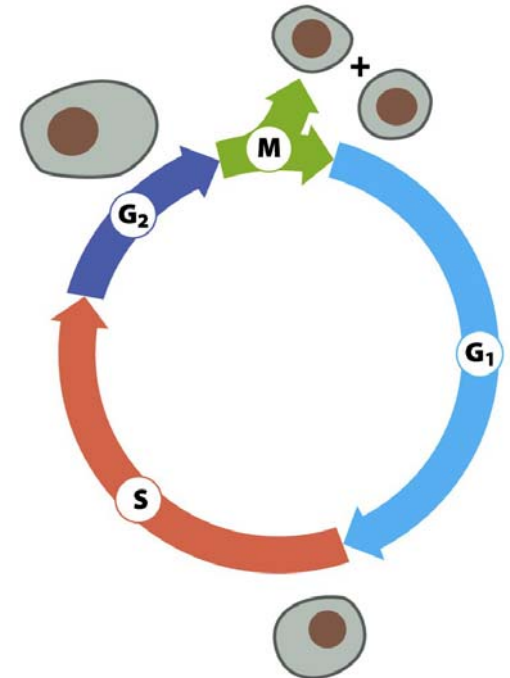


Figure 5-30 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figure 5-31 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)