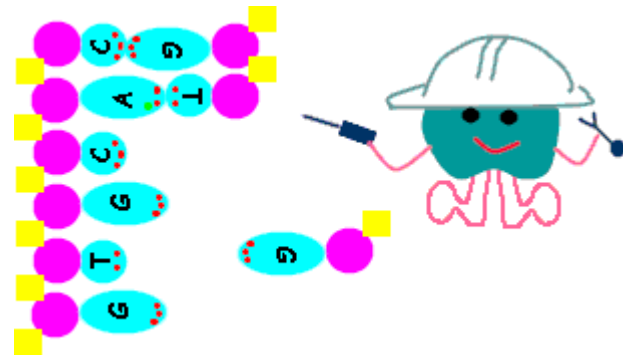


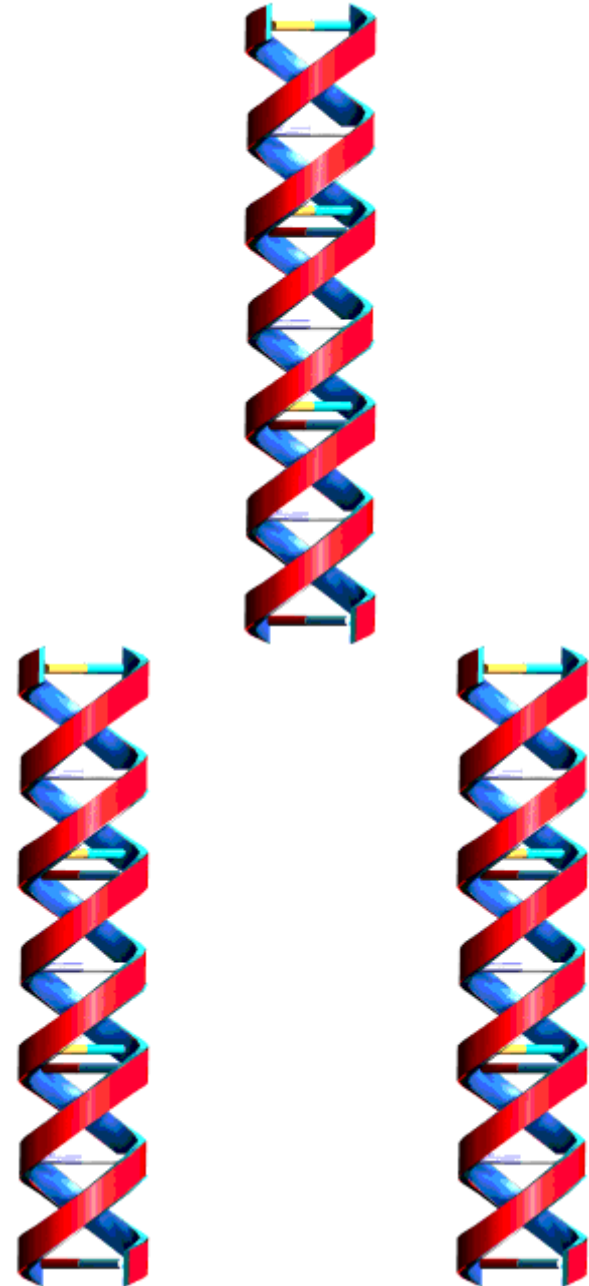
REPLIKACIJA DNK



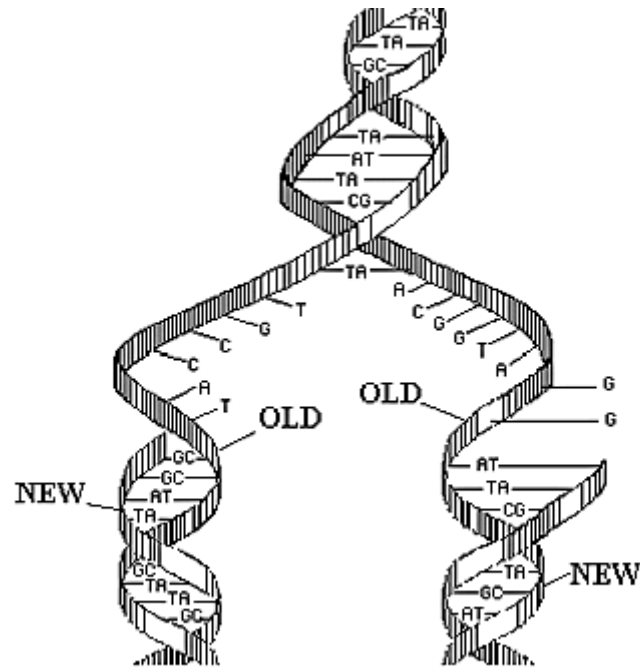
Replikacija DNK

Replikacija DNK - tačna duplikacija dvolančanog molekula DNK.

Tako ćelija može stvoriti dve genetski identične ćerke ćelije.

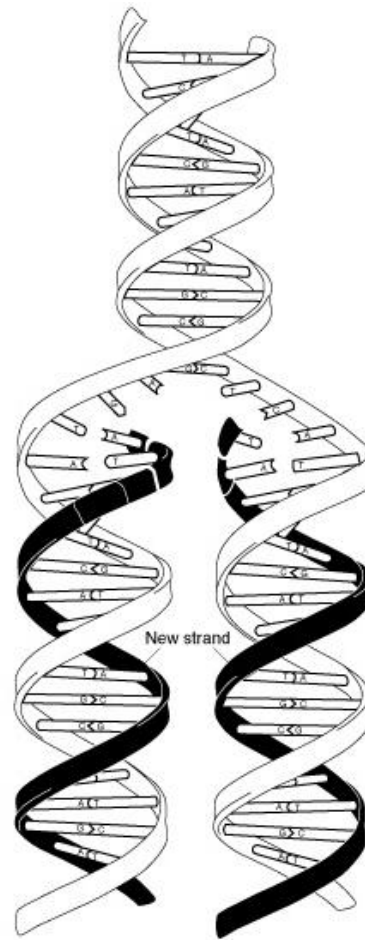


Replikacija DNK

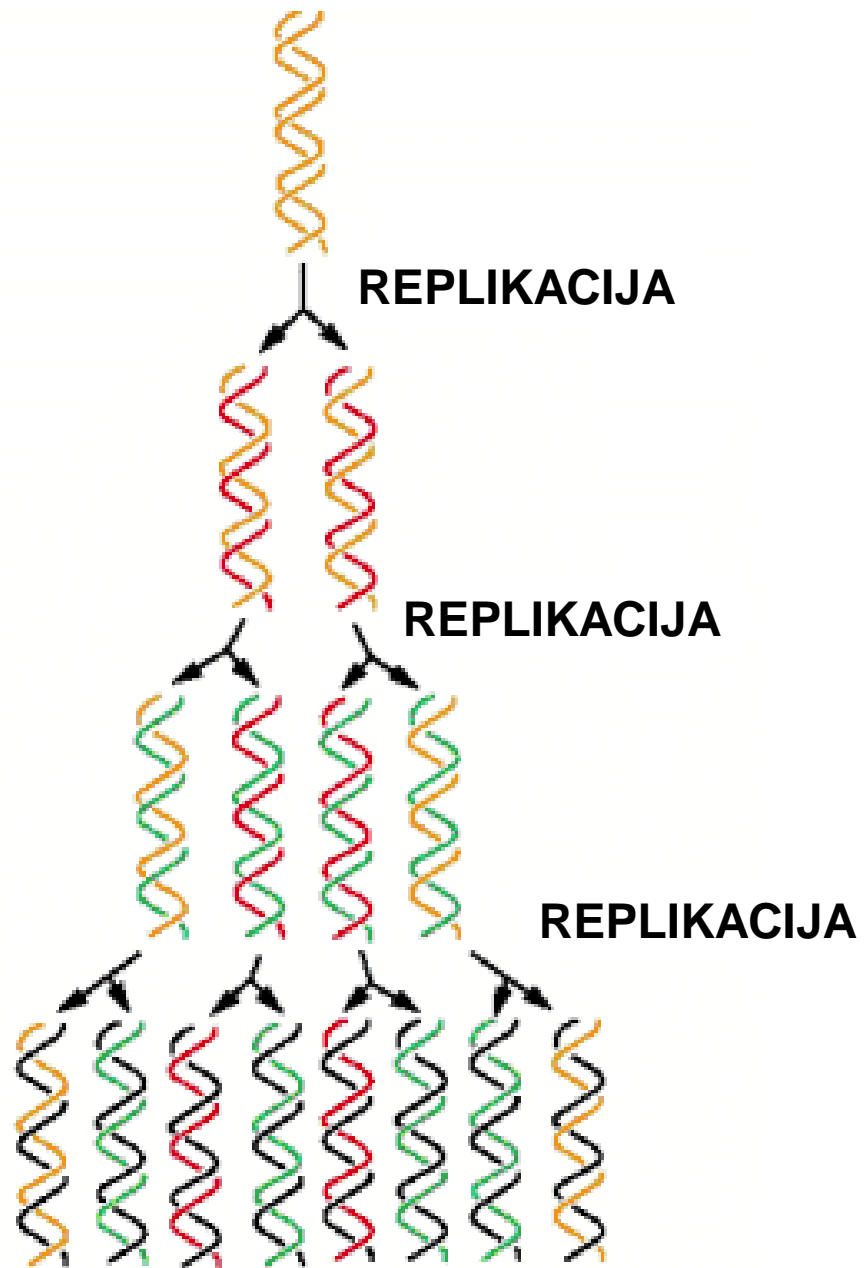


Sinteza novih lanaca se odvija **polimerizacijom nepolimerizovanih nukleotida koji se komplementarno** sparuju sa odgovarajućim nukleotidima u matričnom lancu.

Replikacija DNK



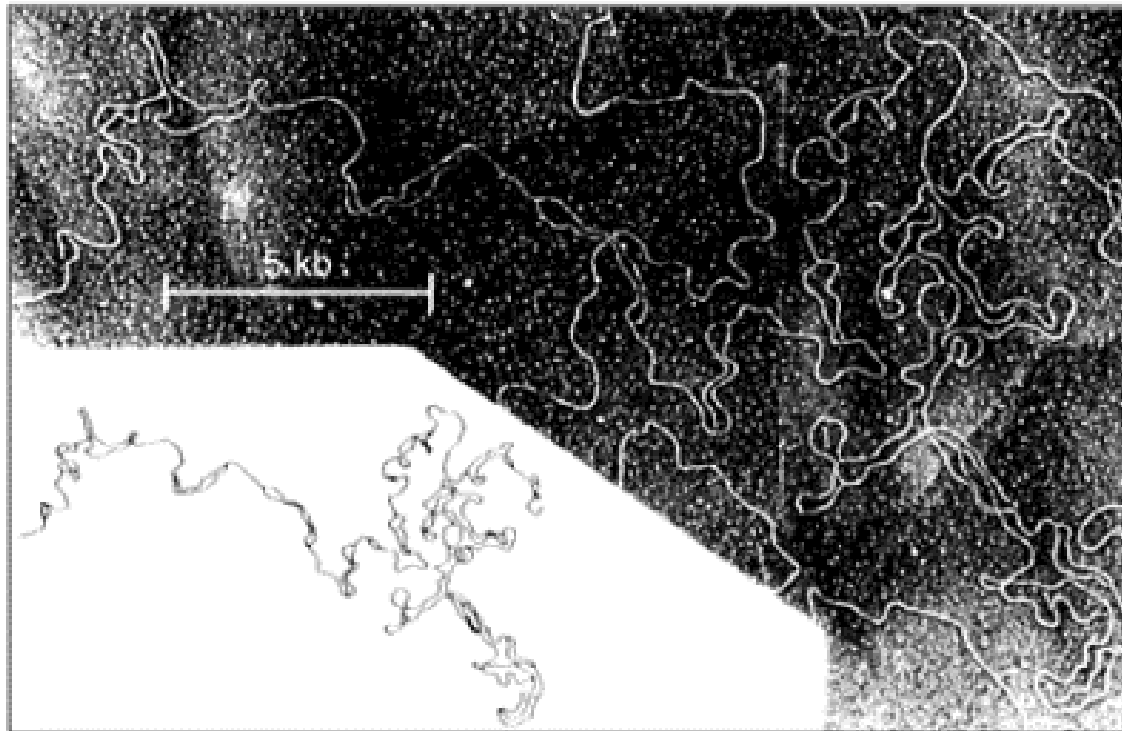
Svaki novi molekul DNK nastao procesom replikacije sadrži **po jedan roditeljski lanac i jedan novosintetisani lanac**, što znači da je replikacija DNK **semikonzervativan proces**.



Replikacija DNK - početna mesta replikacije

Replikacija započinje na određenim sekvencama DNK koje se nazivaju **početna mesta replikacije**. Ona su bogata AT parovima koji se lakše raskidaju.

- Potreban je veliki broj početnih mesta replikacije da bi se hromozom efikasno replikovao. (prokariote 1 početno mesto replikacije)
- ~ 30,000 u jednoj ćeliji sisara.



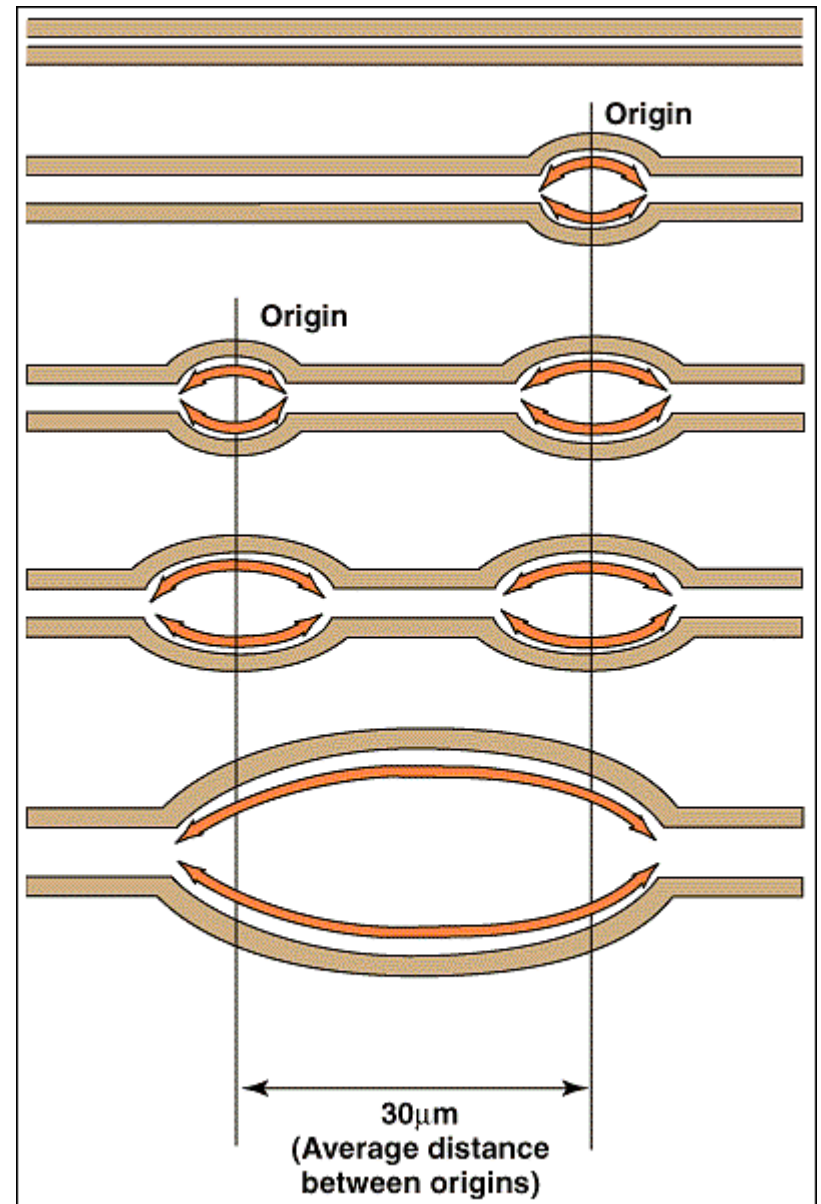
Replikacija DNK - početna mesta replikacije

Od početnog mesta replikacije, sinteza novih lanaca odvija se u oba pravca, i označava kao **dvosmerna**.

Na svakom početnom mestu replikacije postoje **dva aktivna regiona** u kojima se formira novi polinukleotidni lanac.

Zbog svog karakterističnog oblika slova Y ovi regioni se nazivaju **replikacione viljuške**.

Replikacioni mehurić koga grade novosintetisani regioni DNK između dva regiona originalne DNK, je posledica prisustva dve replikacione viljuške koje se kreću u suprotnim smerovima.



Replikacija DNK - početna mesta replikacije

Bakterije - jedno početno mesto replikacije (40 minuta)

Eukariote - više početnih mesta replikacije (radioaktivni timidin)

Replikaciona viljuška - oko 50 NT/sek

Prosečan hromozom 150 miliona NT

Vreme potrebno za replikaciju je oko 800h

Veoma je koordinisano vreme uključivanja početnih mesta u replikaciju

Početna mesta replikacije (20-80) se grupišu u replikacione jedinice

Unutar replikacione jedinice početna mesta su razdvojena sa po 30 000- 300 000 NT

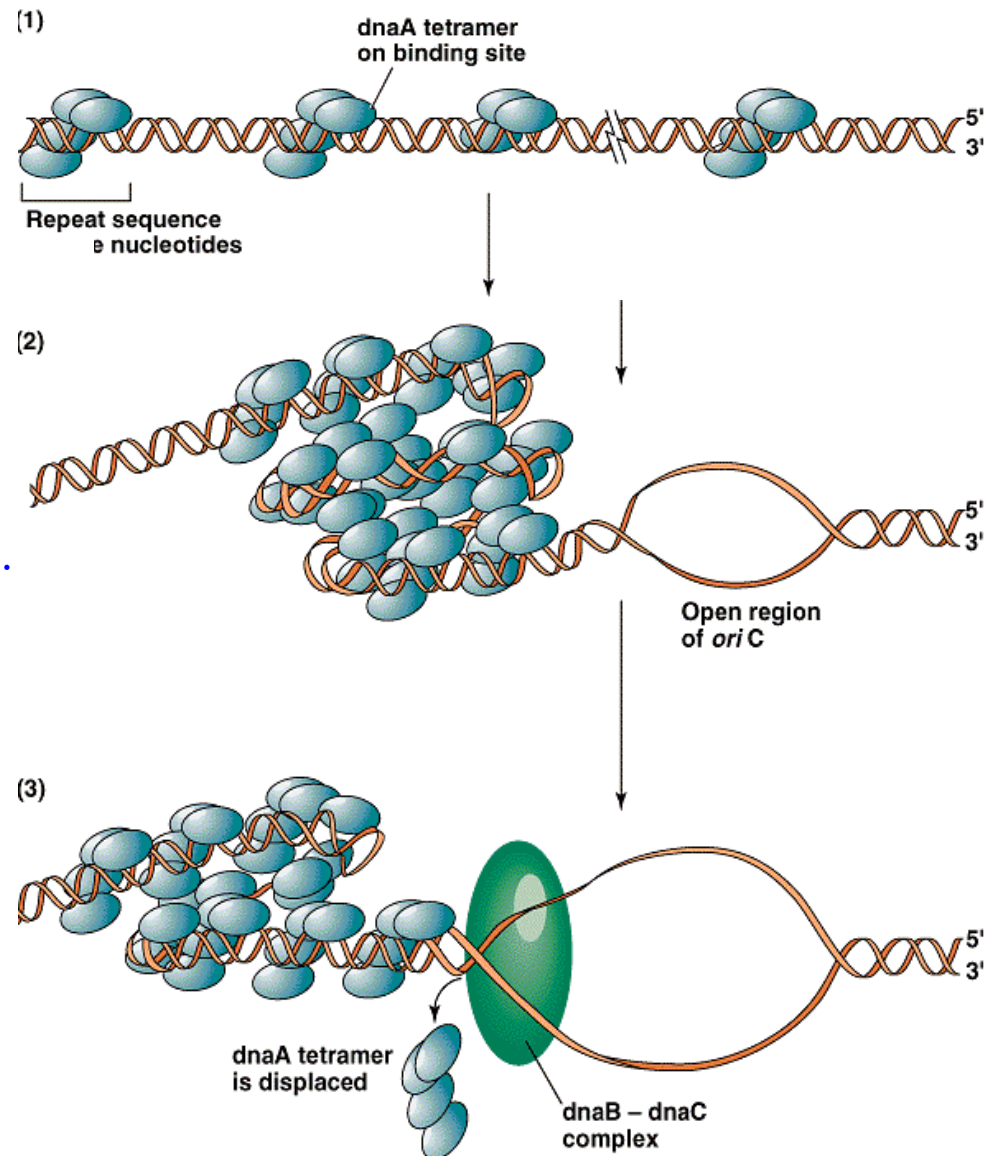
Replikacija DNK - početna mesta replikacije

Početna mesta replikacije su mesta vezivanja proteina koji započinju replikacioni proces i nazivaju se **proteini inicijatori**.

Proteini inicijatori se u višestrukim kopijama, vezuju za početna mesta replikacije.

Uvijajući dvostruki heliks DNK oko sebe oni obrazuju **veliki protein-DNK kompleks**.

Formiranje ovog kompleksa omogućava **početno odvajanje dva lanca DNK** (raskidanje H veza i razdvajanje dva lanca) i uključivanje drugih proteina koji učestvuju u procesu replikacije.



Replikacija DNK - proteini koji pomažu otvaranje DNK heliksa ispred replikacione viljuške

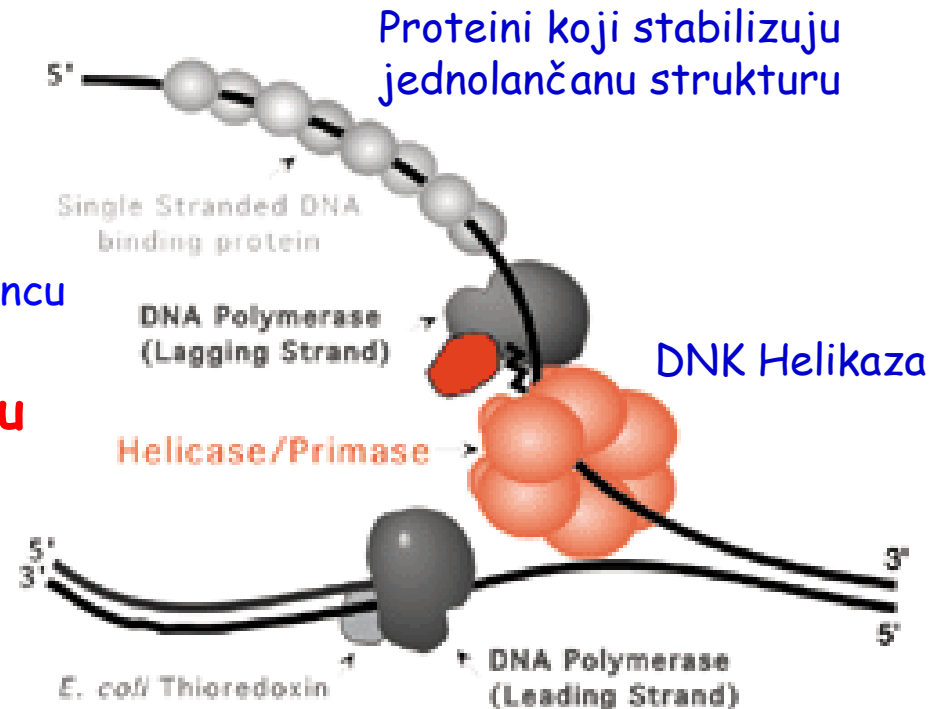
DNK helikaza

- enzim koji katališe kontinuirano razdvajanje dva lanca DNK
- hidrolizuje ATP i ciklično menja konformaciju vršeći mehanički rad
- razdvaja 1000 nukleotidnih parova u sekundi.

Dva tipa helikaze-dominantna je na vodećem lancu

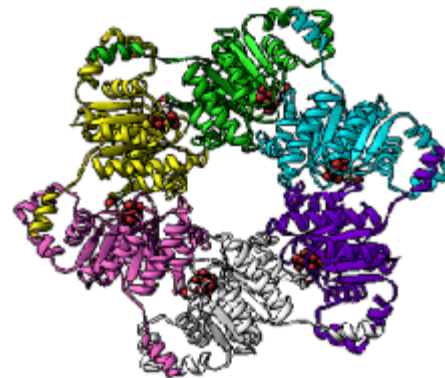
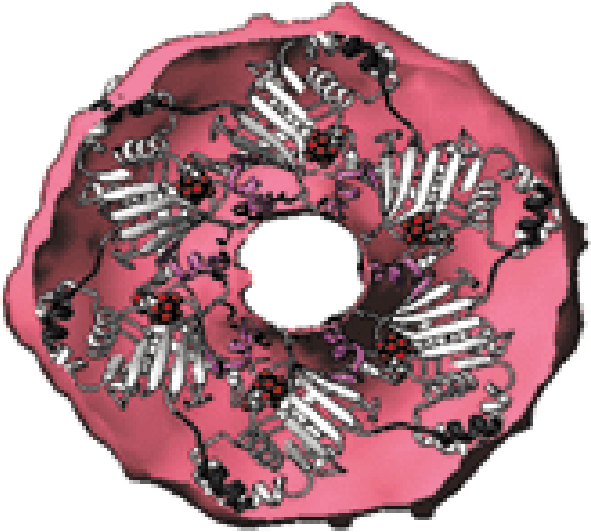
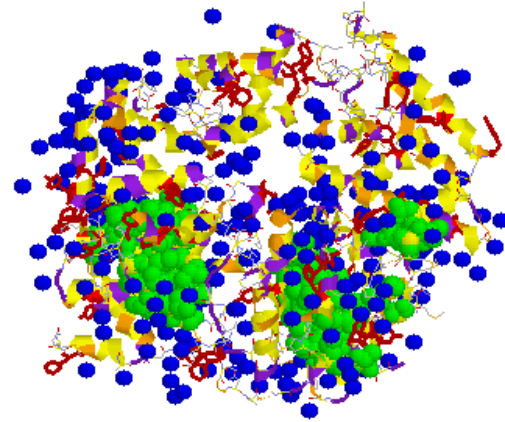
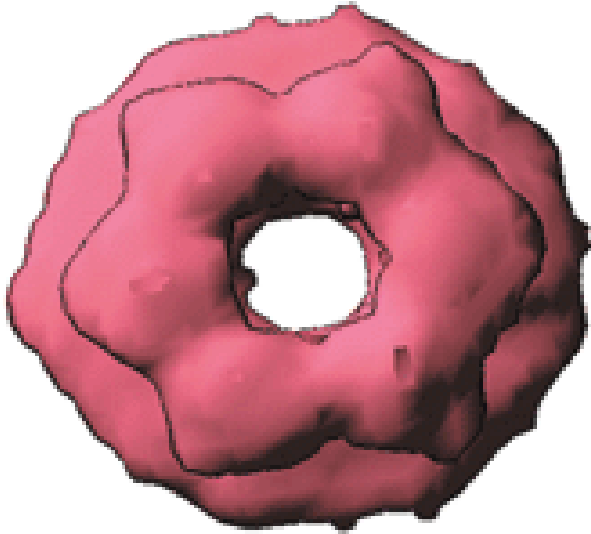
Proteini koji stabilizuju jednolančanu strukturu (Single Strand Binding Protein, SSB; 3 subjedinice)

- vezuju se za jednolančani DNK molekul
- sprečavaju međusobno sparivanje komplementarnih baza, pomažu helikazi
- sprečavaju degradaciju DNK lanca pod uticajem nukleaza
- ne pokrivaju baze
- ne koriste ATP
- ne pokazuju nikakvu enzimsku aktivnost.



DNK helikaza i proteini koji stabilizuju jednolančanu strukturu ne rade sekvencijalno već simultano.

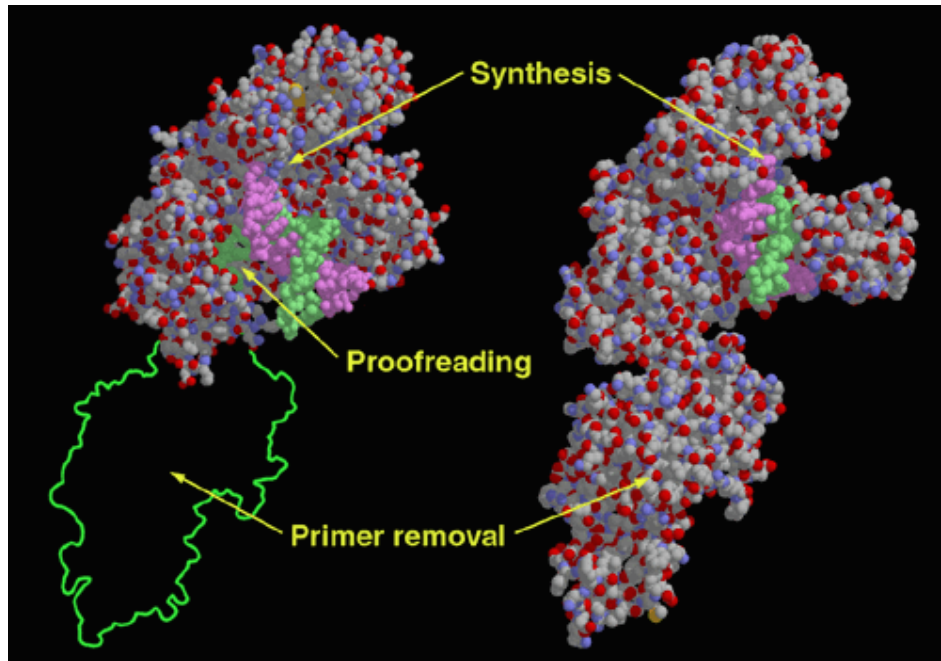
DNK Helikaza



Replikacija DNK - sinteza komplementarnih lanaca

Glavni enzim koji katališe vezivanje slobodnih deoksiribonukleozid 3-fosfata u rastući lanac DNK je

DNK polimeraza. (1957)

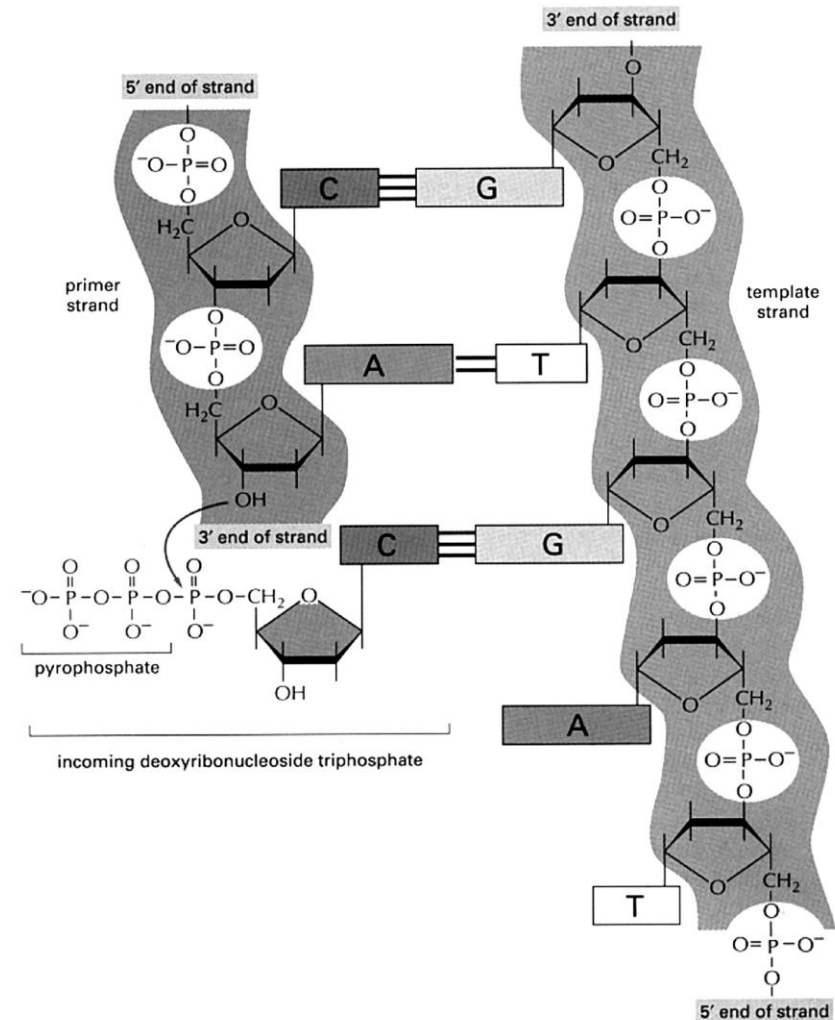


Replikacija DNK - sinteza komplementarnih lanaca

Zajednička svojstva svih poznatih

DNK polimeraza su:

- ne mogu da iniciraju sintezu DNK *'de novo'* katalisanjem polimerizacije slobodnih dNTP
- mogu ih dodavati samo na prethodno sintetisani početni lanac RNK, koji je vodoničnim vezama vezan za matricu.
- mogu da sintetišu DNK samo u 5' → 3' pravcu
- dodaju deoksiribonukleozid trifosfate na 3' hidroksilnu grupu rastućeg lanca,



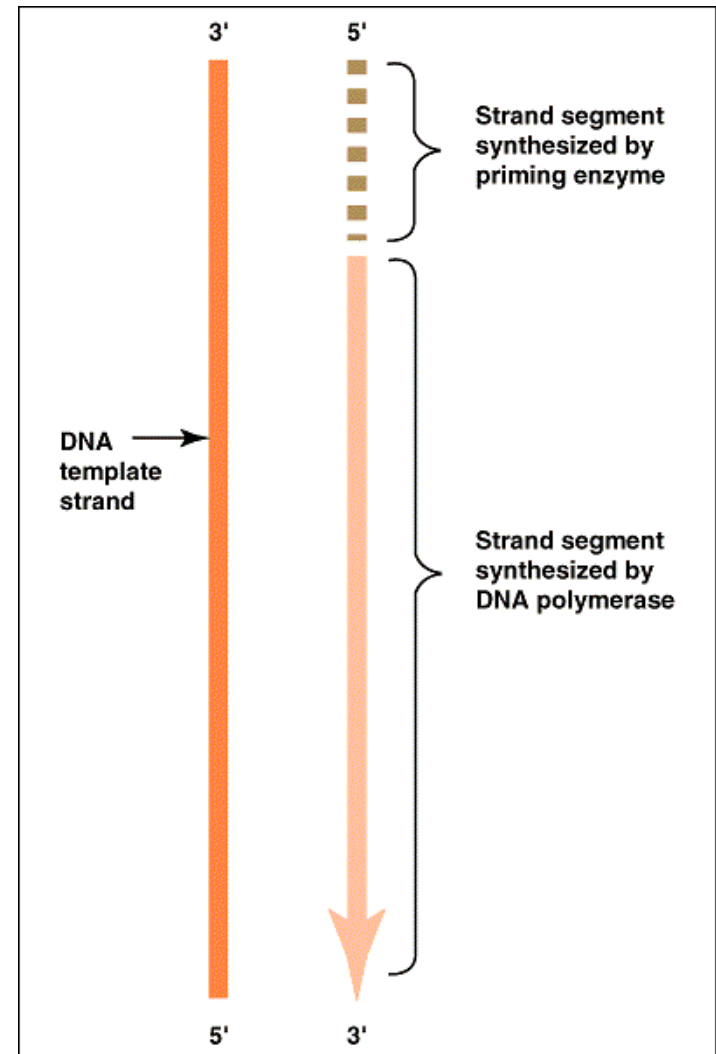
Replikacija DNK - sinteza komplementarnih lanaca

RNK polimeraze mogu započeti sintezu
'de novo'.

DNK primaza

- je RNK polimeraza
- katališe polimerizaciju ribonukleozid trifosfata
- nastaju lanci RNK (3-10 nukleotida), komplementarni roditeljskim lancima DNK na replikacionoj viljušci - RNK početnica.

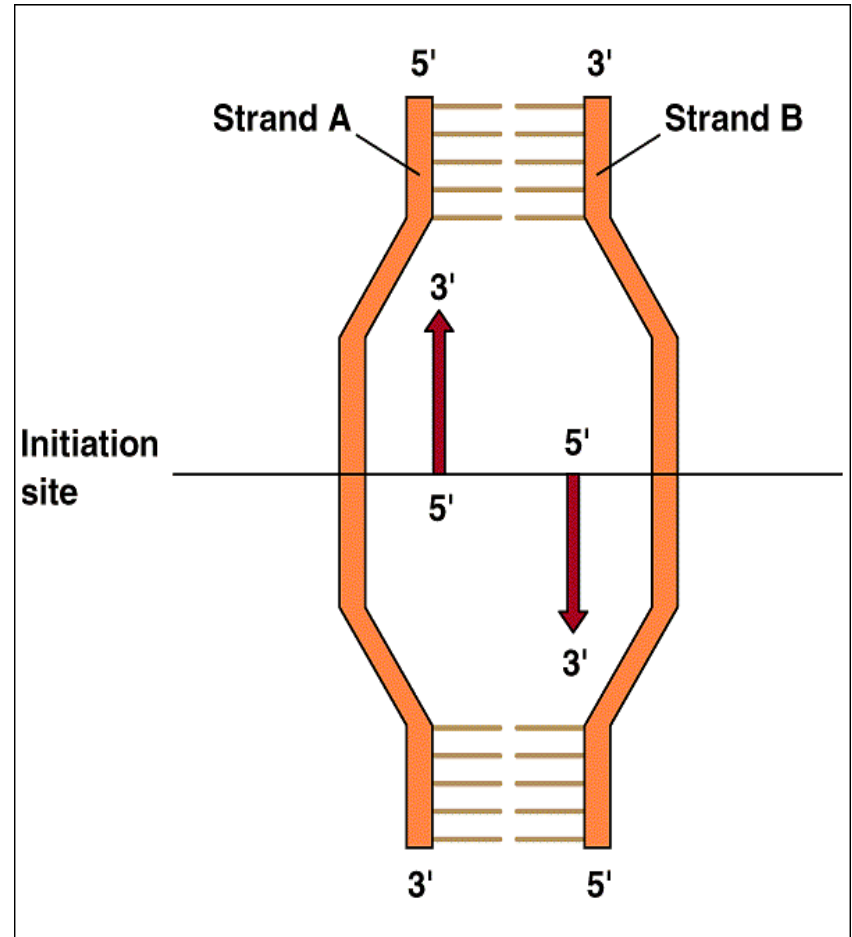
RNK početnica čini stabilnu strukturu na koju se dodaje novi lanac DNK, koji počinje da raste gradeći kovalentne veze sa 3' hidroksilnom grupom RNK.



Replikacija DNK - sinteza komplementarnih lanaca

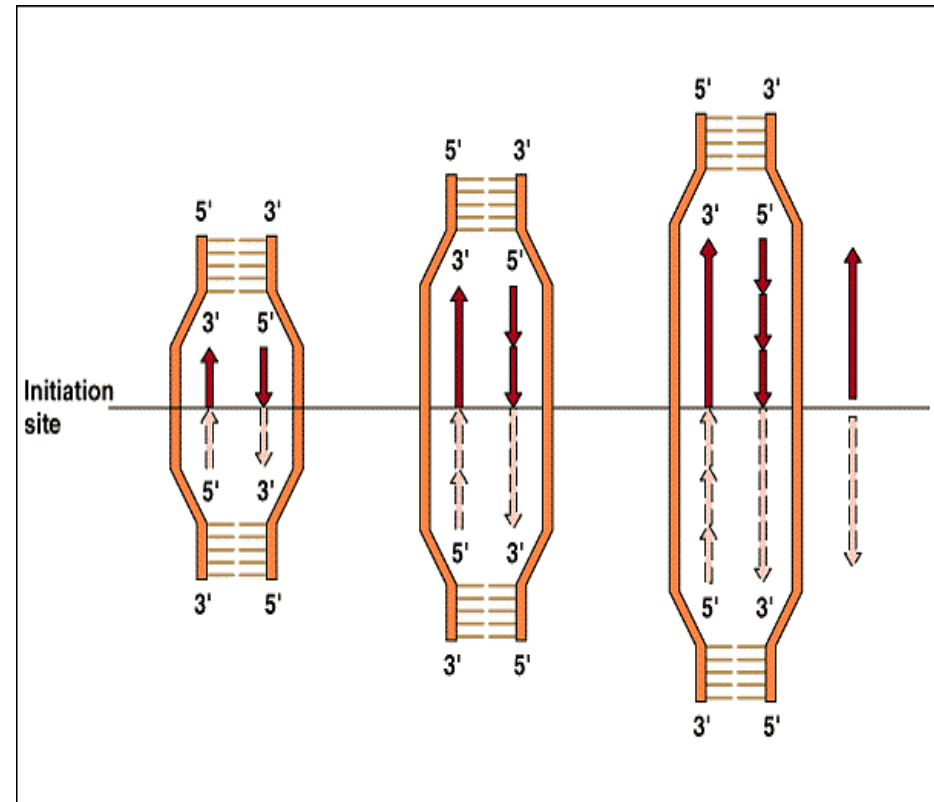
Oba lanca DNK služe kao matrice za sintezu DNK.

S obzirom da se sinteza novog lanca vrši samo u $5' \rightarrow 3'$ pravcu **kontinuirana sinteza** oba lanca na jednoj replikacionoj viljušci **nije moguća**.



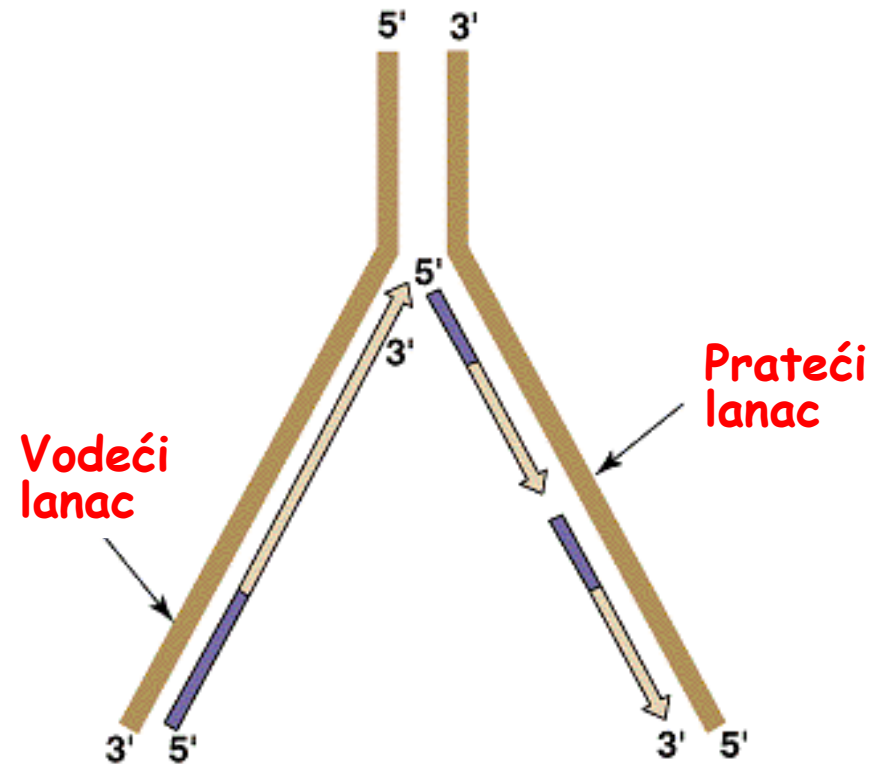
Replikacija DNK - sinteza komplementarnih lanaca

- Jedan lanac se sintetiše **kontinuirano**, dok se drugi gradi **u malim fragmentima**, koji se sintetišu unazad u odnosu na pravac replikacione viljuške.
- Ovi mali delovi novosintetisanog lanca se nazivaju **Okazaki fragmenti**.



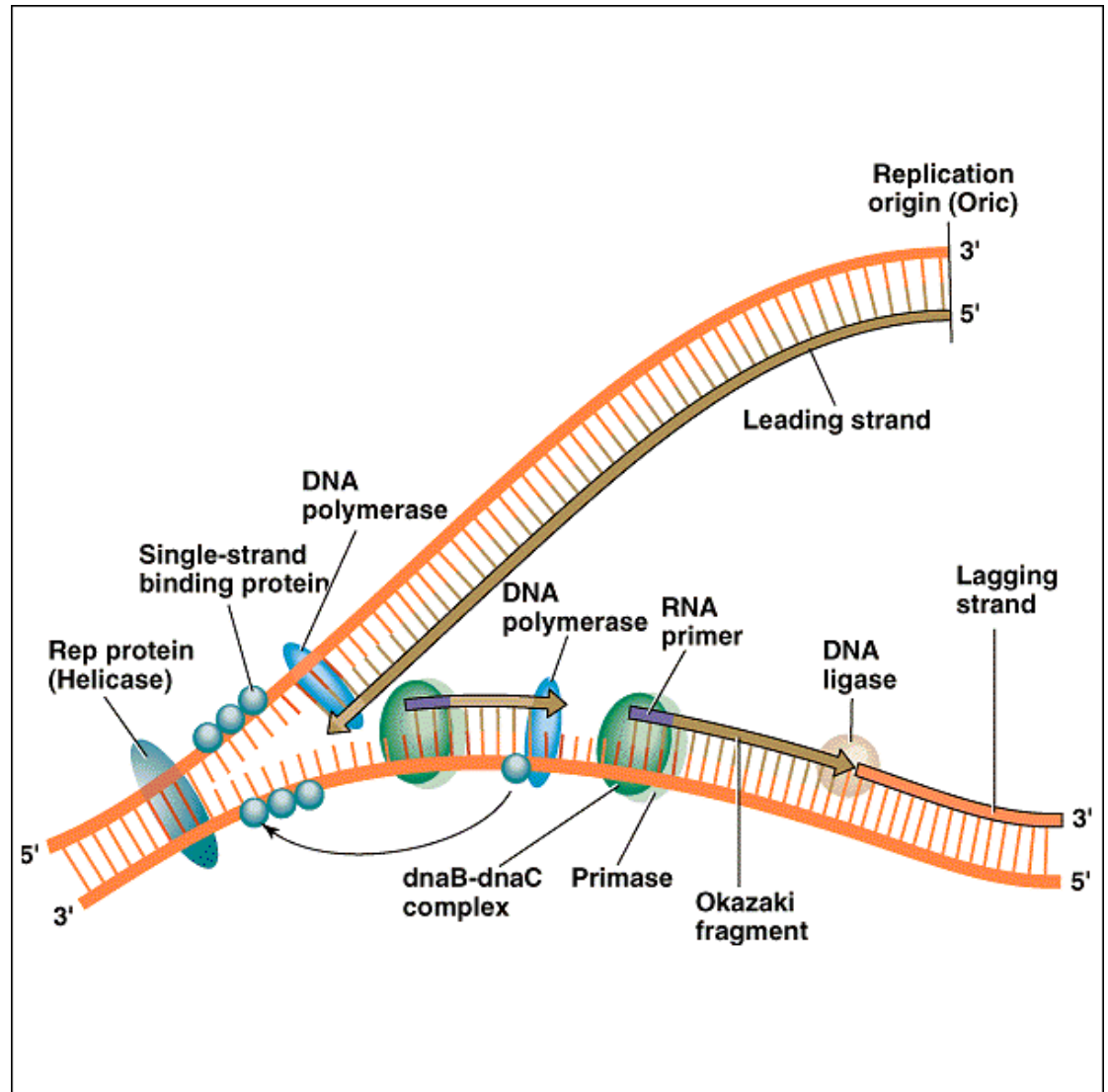
Replikacija DNK - sinteza komplementarnih lanaca

- Kontinuirano sintetisani lanac se naziva **vodeći lanac**
- Diskontinuirano sintetisan lanac se naziva **prateći (zaostajući) lanac**.



Replikacija DNK - sinteza komplementarnih lanaca

- **Vodeći lanac DNK** - poseban molekul RNK početnice neophodan samo na početku replikacije
- **Prateći lanac** - molekuli RNK početnice se sintetišu u intervalima.

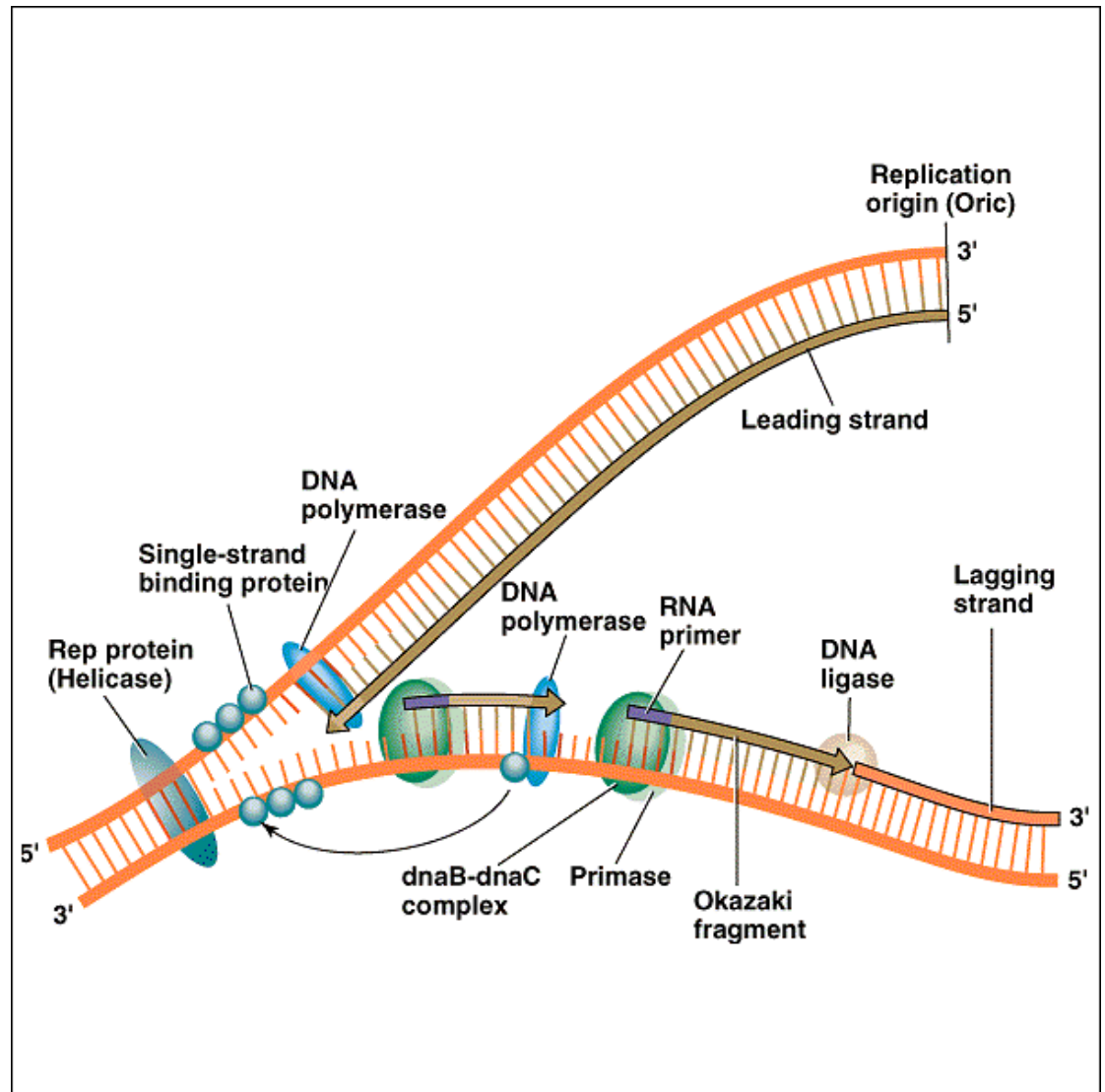


Replikacija DNK - sinteza komplementarnih lanaca

Uklanjanje RNK početnice sa 5' kraja Okazaki fragmenta vrši udružena

➤ 5'→3' egzonukleazna aktivnost DNK polimeraze i

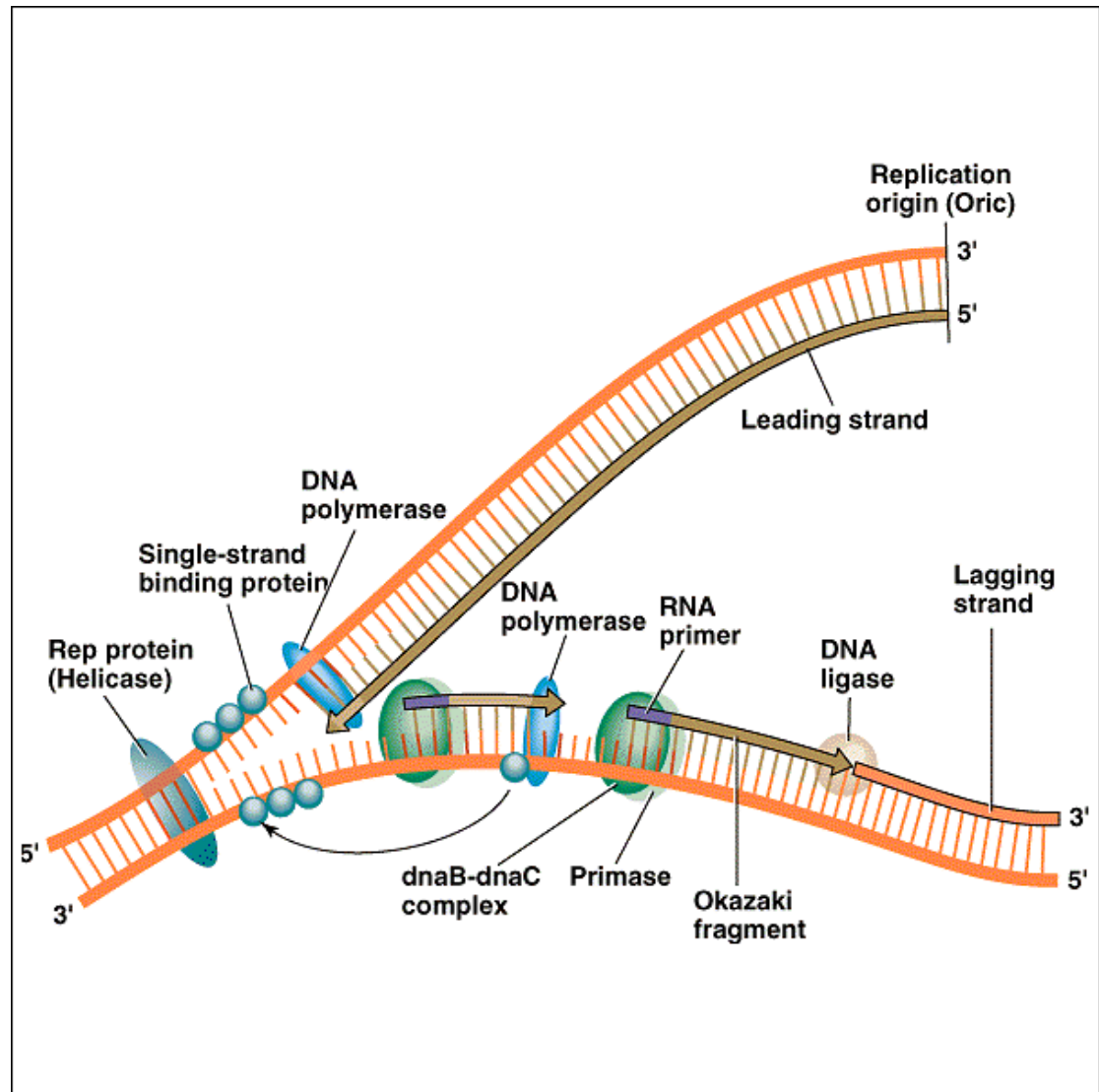
➤ aktivnost enzima RNaze H



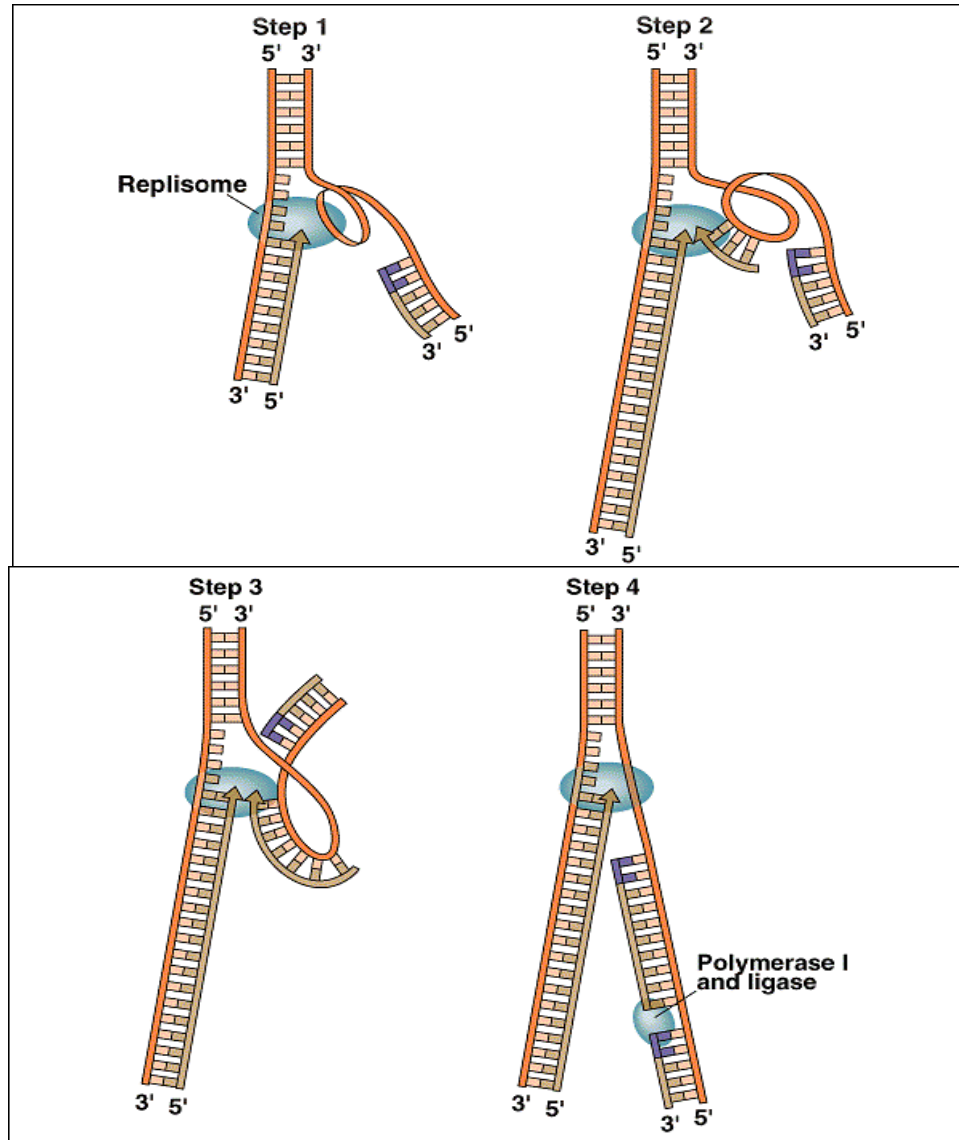
Replikacija DNK - sinteza komplementarnih lanaca

DNK ligaza

- katališe spajanje Okazaki fragmenata duž pratećeg lanca.
- funkcioniše jedino kada joj je supstrat dvostruki heliks



Replikacija DNK - sinteza komplementarnih lanaca



Kako se osigura da početno mesto replikacije bude aktivno samo jedanput?

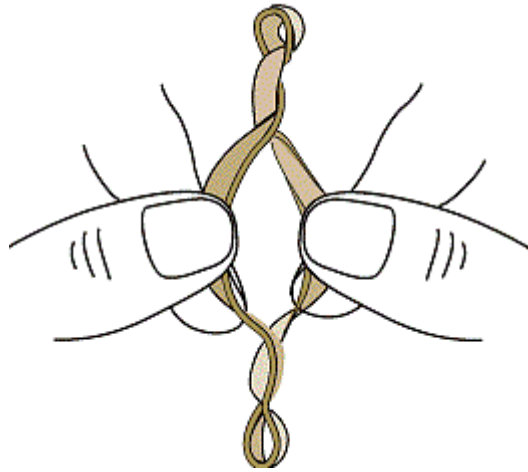
Za početno mesto replikacije se vezuje veliki multimerni kompleks-ORIGIN RECOGNITION COMPLEX (ORC)

Interakcija ORC sa početnim mestom replikacije je stabilna. Prereplikativni kompleks protiena, koji sadrži helikazu i Cdc6 i Mcm proteine, se veže za ORC u G1 fazi. S faza započinje aktivacijom protein kinaze....do inaktivacije kinaze

Novi nukleozomi se organizuju iza replikacione viljuške

CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR-vezan za replikacionu viljušku pakuje novosintetisanu DNK u nukleozom

Replikacija DNK - problem uvijanja dvostrukog heliksa

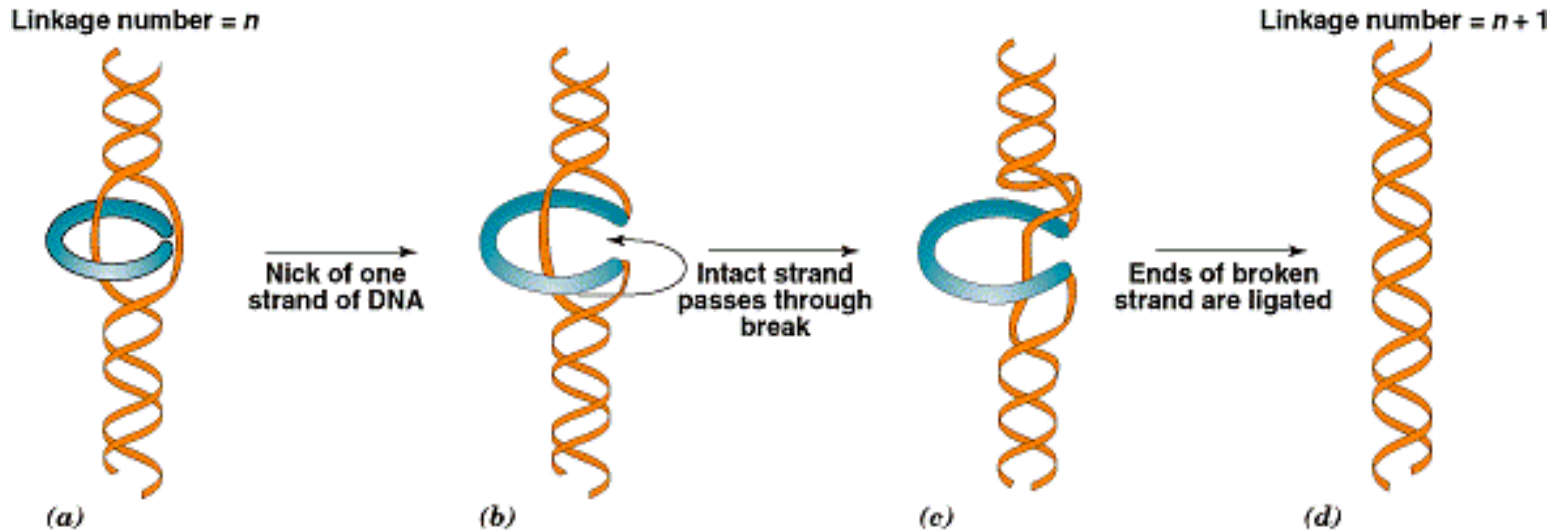


Problem uvijanja dvostrukog heliksa tokom replikacije prevazilazi
se pomoću enzima
topoizomeraza

Replikacija DNK - problem uvijanja dvostrukog heliksa

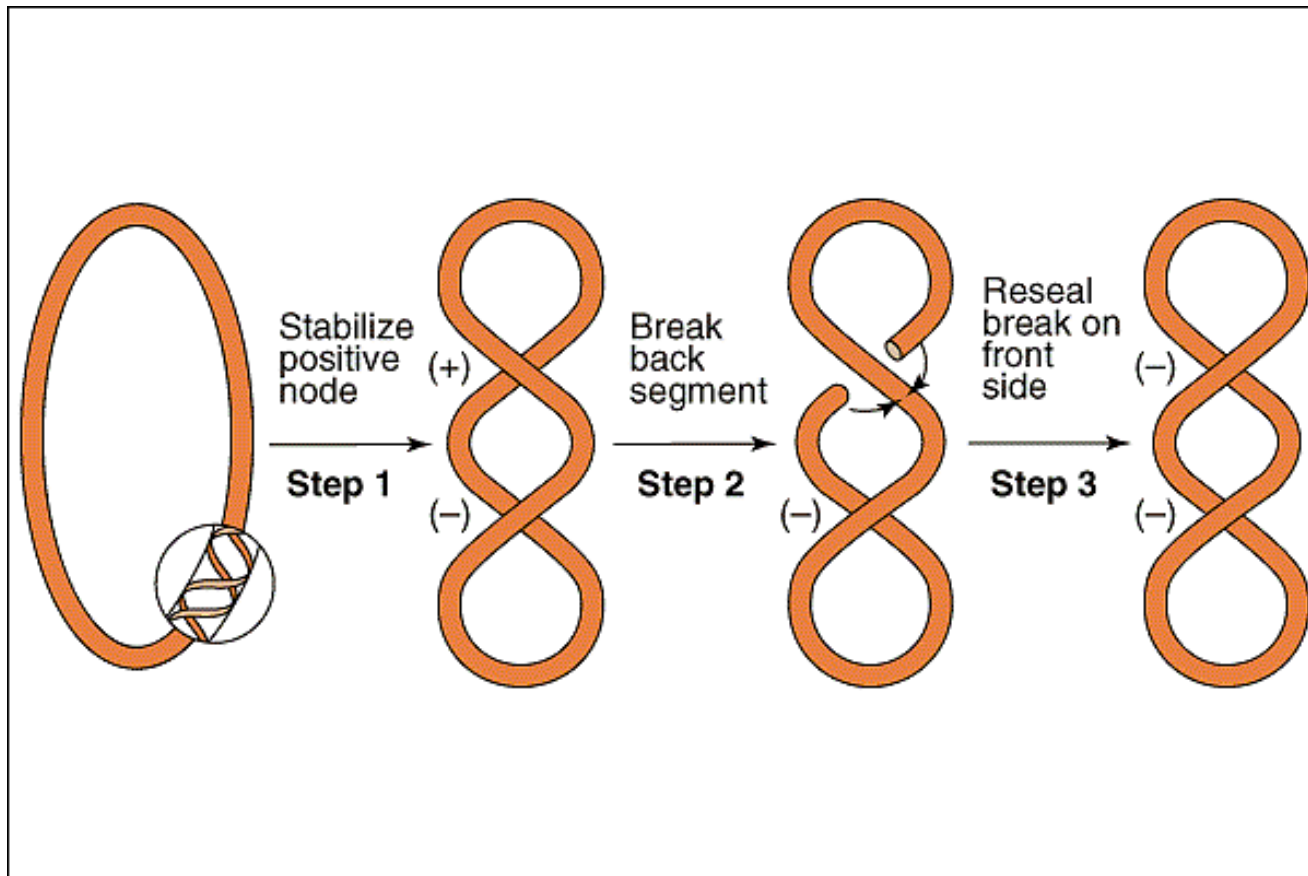
DNK topozomeraze su enzimi koji pokazuju aktivnost reverzibilnih nukleaza.

Topoizomeraza I



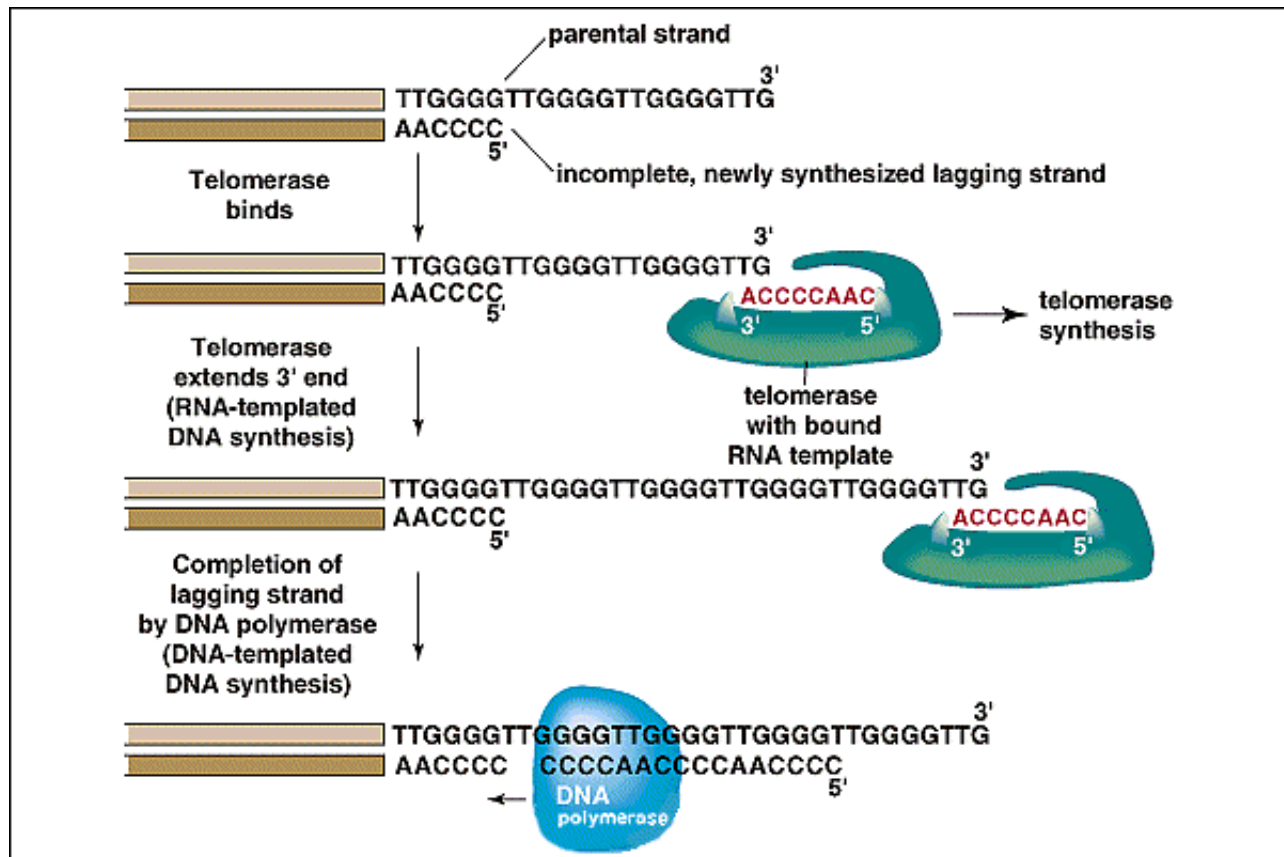
Replikacija DNK - problem uvijanja dvostrukog heliksa

Topoizomeraza II



Replikacija DNK - replikacija telomera

Telomeraza je reverzna transkriptaza i pripada posebnoj klasi DNK polimeraza koja sintetiše DNK sa RNK matrice.



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

GGGTTG – Tetrahymena

GGGTTA – Ljudi (~10,000 puta uzastopno ponovljena sekvenca)

Replikacija DNK - DNK polimeraze

Ćelije eukariota poseduju 5 različitih DNK polimeraza

α , β , γ , δ , ϵ .

DNK polimeraza α

- U kompleksu sa primazom vrši sintezu kratkih početnih segmenata DNK lanca
- Građena iz 4 subjedinice.
 - Najveća subjedinica poseduje polimeraznu i 3'→5' egzonukleaznu aktivnost.
 - Dve manje subjedinice pokazuju primaznu aktivnost,
 - Četvrta subjedinica sprečava da enzim funkcioniše kao nukleaza.

DNK polimeraza δ

- sintetiše vodeći i prateći lanac
- popunjava praznine između Okazaki fragmenata

DNK Polimeraza β

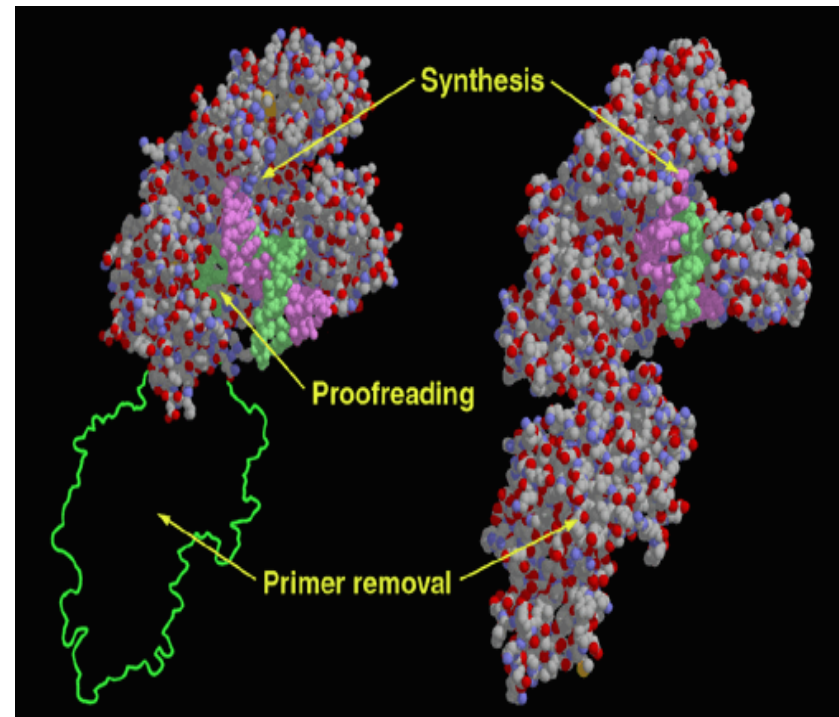
- ne učestvuje u samoj replikaciji
- ima 5'→3' egzonukleaznu aktivnost
učestvuje u popravci grešaka nastalih u toku sinteze DNK.

DNK polimeraza γ

- nalazi se u mitohondrijama

DNK polimeraza ϵ

- Uloga nije još razjašnjena.



Replikacija DNK - ispravljanje grešaka

Greške u molekulu DNK nastale tokom replikacije mogu biti popravljene :

➤ **U toku replikacije DNK**

- uloga DNK polimeraza

➤ **Posle replikacije DNK**

- delovanjem enzima koji direktno modifikuju izmenjene baze

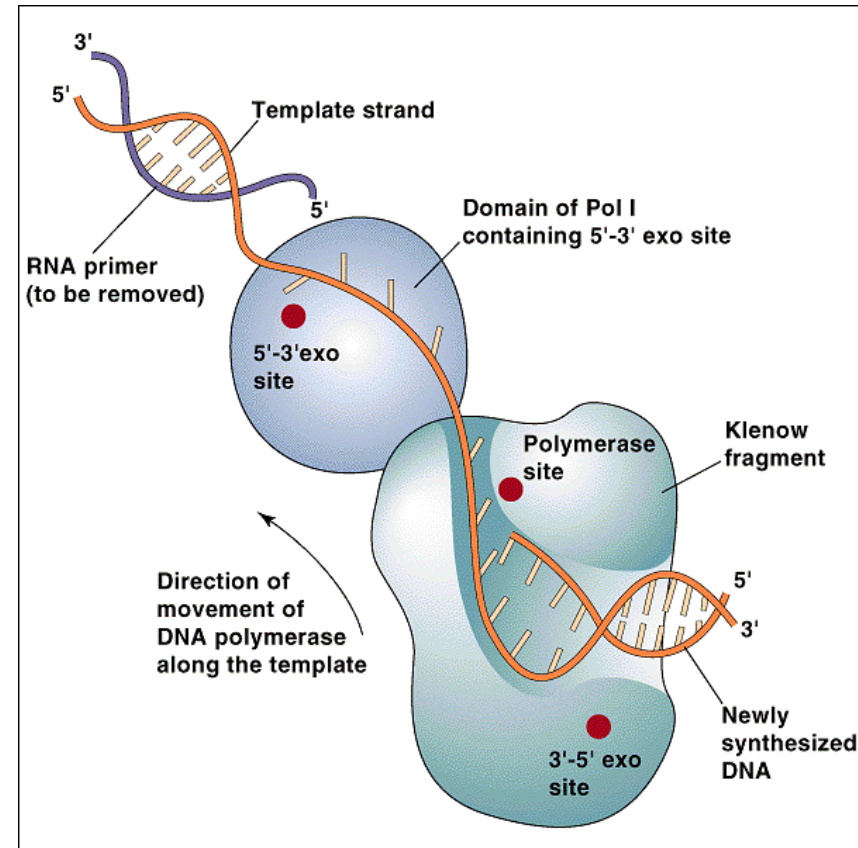
- isecanjem dela oštećenog lanca DNK

- rekombinacijom nakon replikacije

Replikacija DNK - ispravljanje grešaka

U toku procesa replikacije DNK polimeraza:

- Pomaže u izboru odgovarajuće baze koja se ugrađuje u novosintetisani lanac, adaptiranjem na konformaciju odgovarajućeg para
- Ukoliko ipak dođe do pogrešnog sparivanja baza **selektivno iseca pogrešno sparenu bazu sa 3' kraja novosintetisanog lanca.**
 - Ispravljanje greške omogućava $3' \rightarrow 5'$ egzonukleazna aktivnost DNK polimeraze
 - Znači DNK polimeraza ima sposobnost da prepozna (engl. *proofreading*) i sama koriguje grešku (samokorigujući enzim).

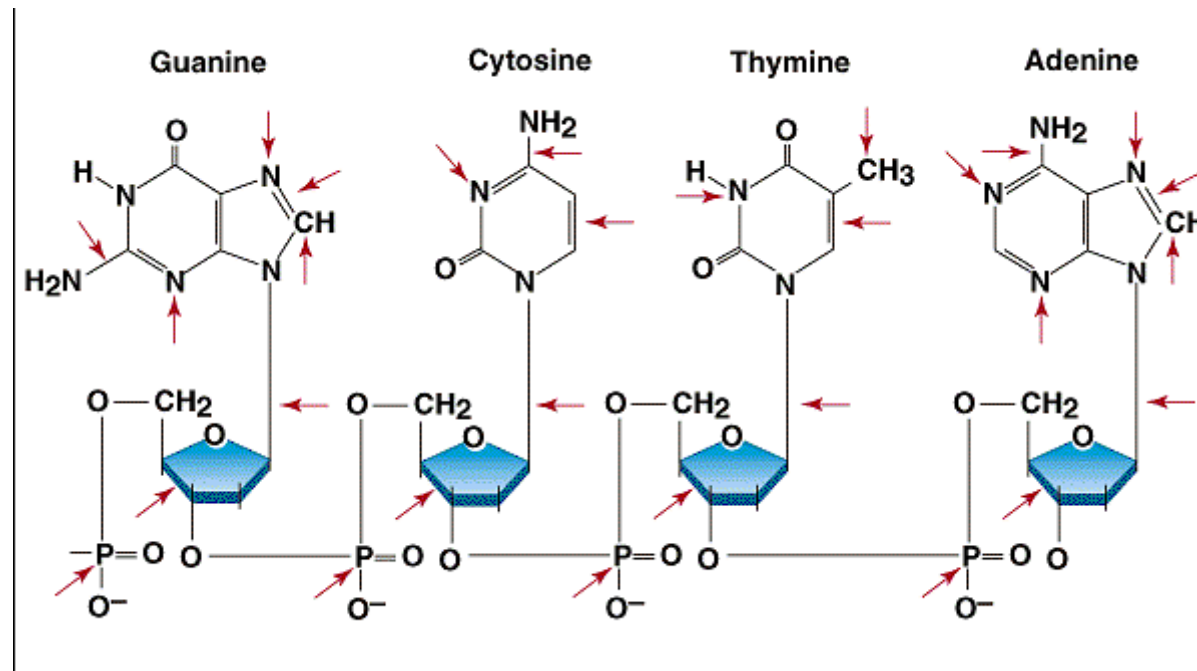


Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Potreba za postojanjem ovakvog načina ispravljanja grešaka nastalih u toku replikacije objašnjava zašto se proces replikacije može odvijati samo u $5' \rightarrow 3'$ pravcu.

Replikacija DNK - ispravljanje grešaka

DNK je stabilan genetički materijal, ali je kompleksan pa i osetljiv organski molekul, tako da i pri normalnim uslovima može da dođe do spontanih promena koje bi dovele do mutacija ukoliko bi ostale nepopravljene.

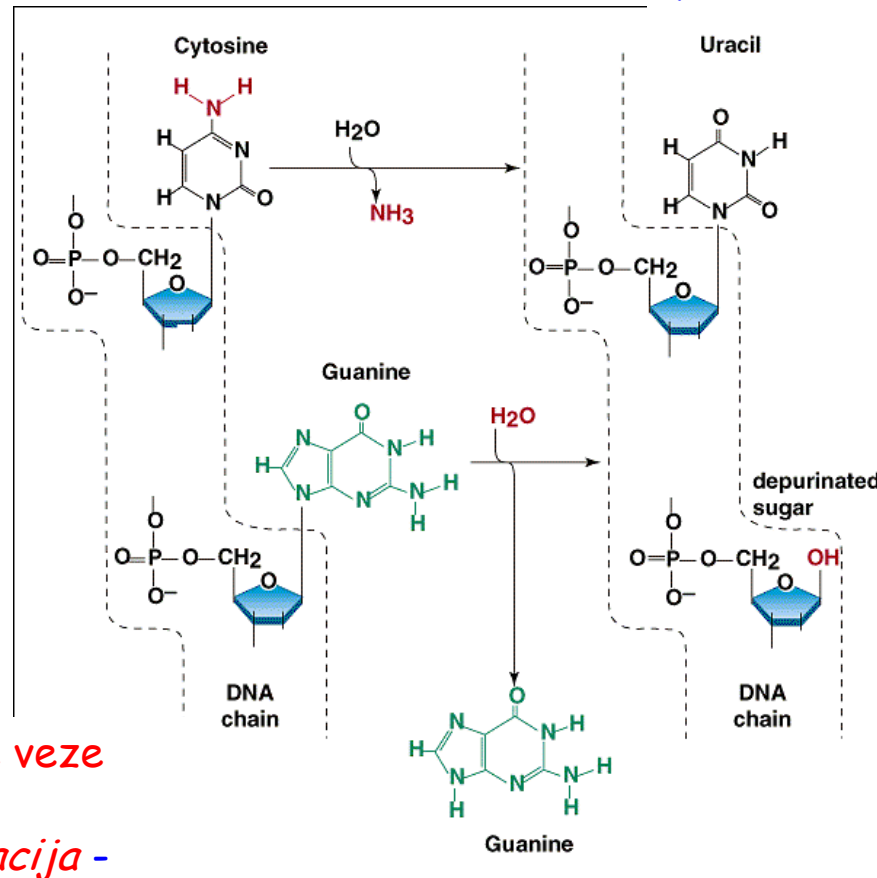


Nukleotidi mogu biti modifikovani

- oksidativnim oštećenjem
- hidrolitičkim atakom
- metilacijom

Replikacija DNK - ispravljanje grešaka

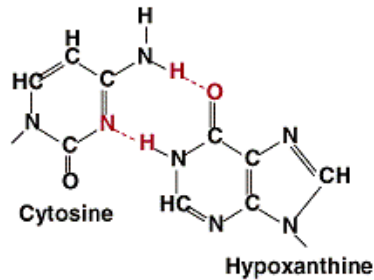
Spontana *deaminacija*
citozina u uracil
(100 baza dnevno u jednoj ćeliji)



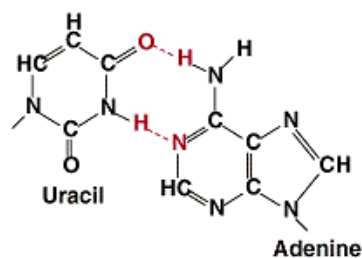
Hidroliza N - glikozidne veze
(adenina i guanina) sa
deoksiribozom - *depurinacija* -
(oko 5000 baza se gubi dnevno u
svakoj humanoj ćeliji)

Replikacija DNK - ispravljanje grešaka

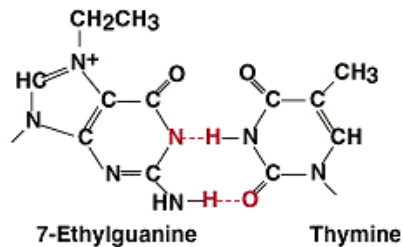
Pairing of hypoxanthine with cytosine



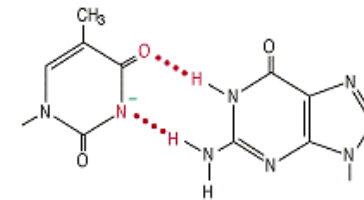
Pairing of uracil with adenine



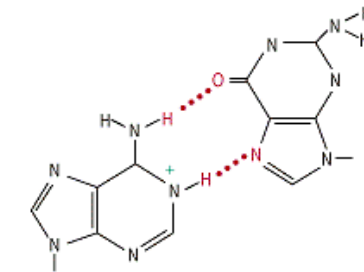
Pairing of 7-ethylguanine with thymine



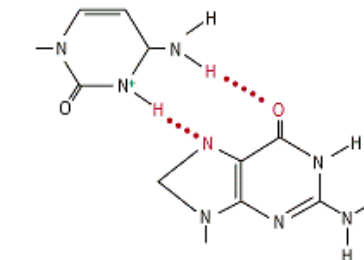
Hemijske modifikacije utiču na uspostavljanje vodoničnih veza



Thymine (ionized) Guanine



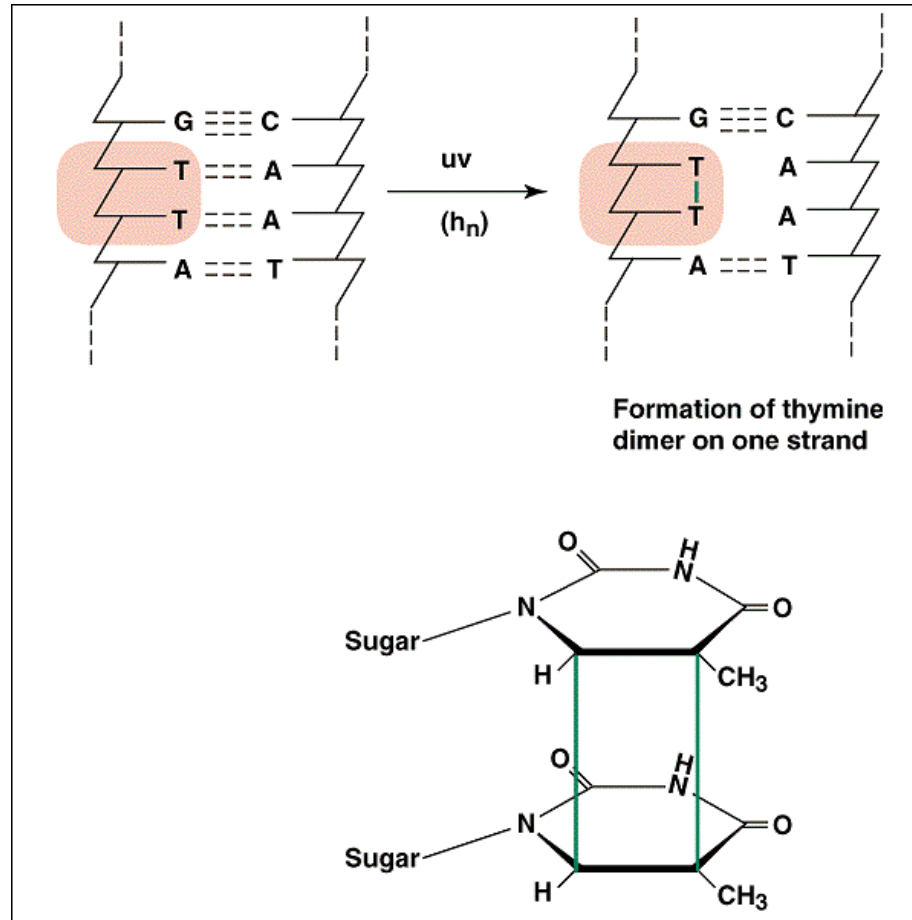
Adenine (ionized) Guanine (syn)



Cytosine (ionized) Guanine
Hoogsteen

Jonizovane forma baza se pogrešno sparuju (nizak pH)

Replikacija DNK - ispravljanje grešaka



Dimerizacija susednih pirimidinskih nukleotida nastaje kada se ćelija izloži UV zracima (sunčeva svetlost).

Replikacija DNK - ispravljanje grešaka

Isecanje i popravka baze- DNK glikozilaze

6 tipova enzima:

Za deaminisane C

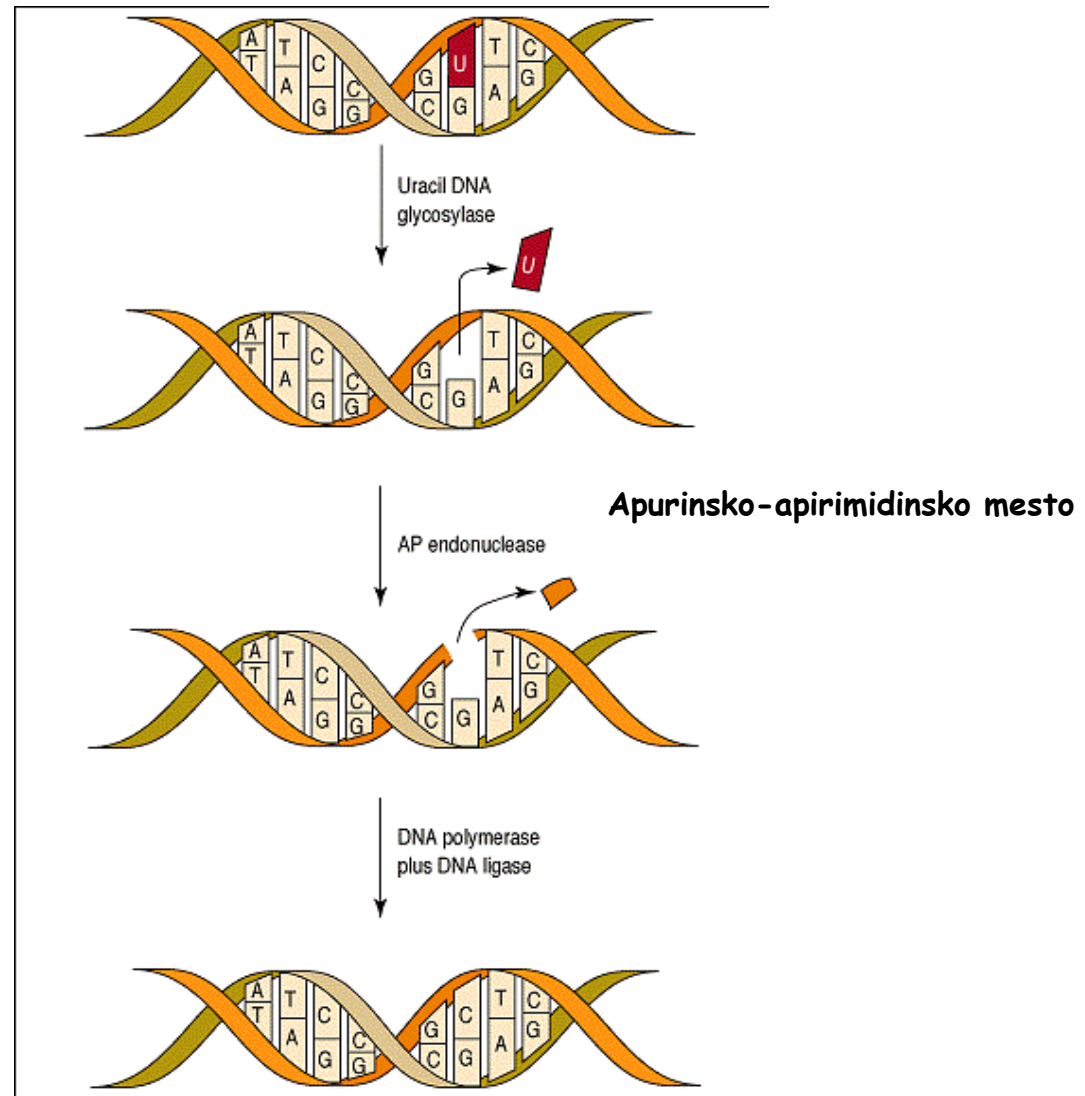
Za deaminisane A

Za alkilirane baze

Za oksidovane baze

Za baze sa otvorenim prstenom

Za baze sa redukovanom = vezom



Popravka isecanjem baze

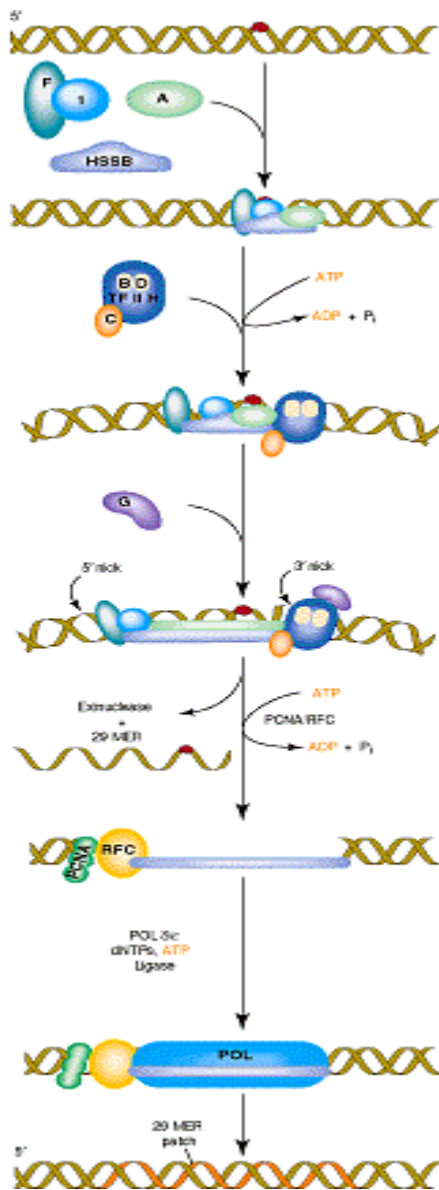
Replikacija DNK - ispravljanje grešaka

Multienzimski kompleks prepoznaje mesto oštećenja

Stvaraju se prekidi sa obe strane lezije

Pridružena DNK helikaza uklanja čitav deo oštećenog lanca

DNK polimeraza i ligaza popunjavaju nastalu prazninu



Popravka isecanjem nukleotida

Replikacija DNK - ispravljanje grešaka

Prekidi oba lanca se takođe mogu efikasno popraviti

Prekide ovog tipa uzrokuju:

- jonizujuće zračenje
- oksidativni agensi
- greške u replikaciji
- neki metabolički proizvodi u ćeliji

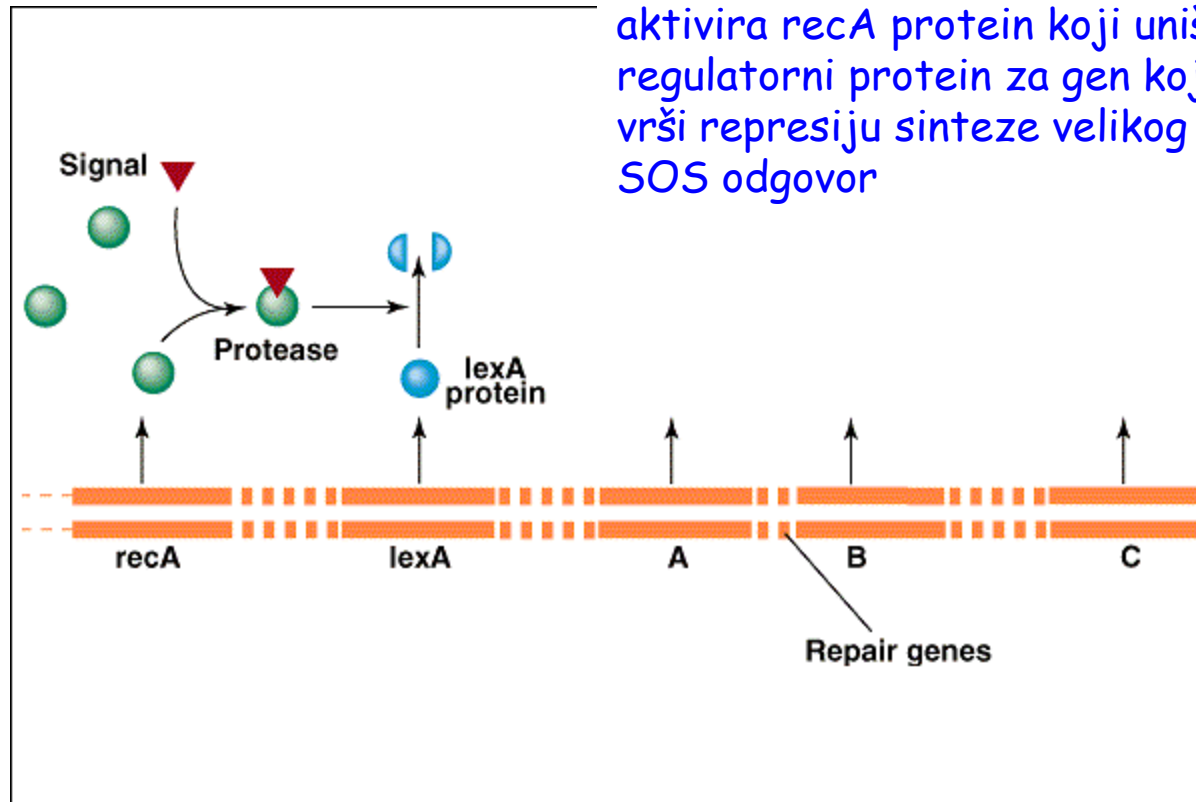
Ove greške ublažavaju dva različita mehanizma:

- nehomologo spajanje krajeva sa gubitkom jednog ili više nukleotida
- homologo povezivanje krajeva

Potrebni su posebni proteini za rekombinaciju koje sparuju sekvence dva hromozoma i približavaju ih. Tada se replikuje neoštećeni hromozom i popravlja grešku

Replikacija DNK - ispravljanje grešaka

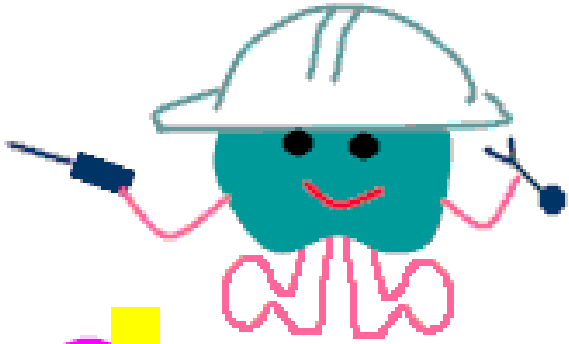
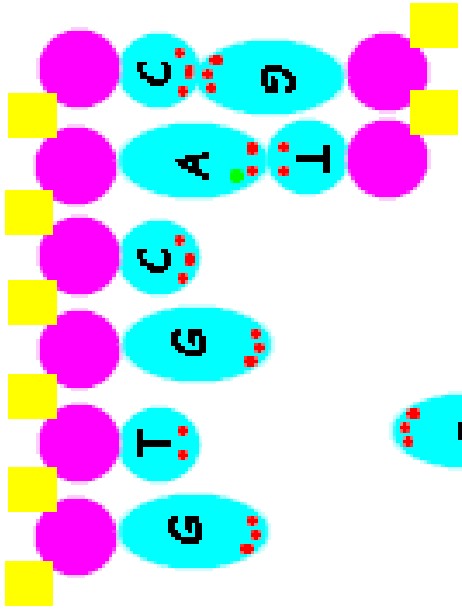
Signal (može biti i višak jednolančane DNK) aktivira recA protein koji uništava regulatorni protein za gen koji normalno vrši represiju sinteze velikog seta gena za SOS odgovor



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

SOS odgovor - povećana sinteza više od 15 enzima popravke

Izaziva izlaganje ćelije neuobičajeno visokim temperaturama



Rekombinacija DNK

❖ Opšta rekombinacija

- homologa rekombinacija

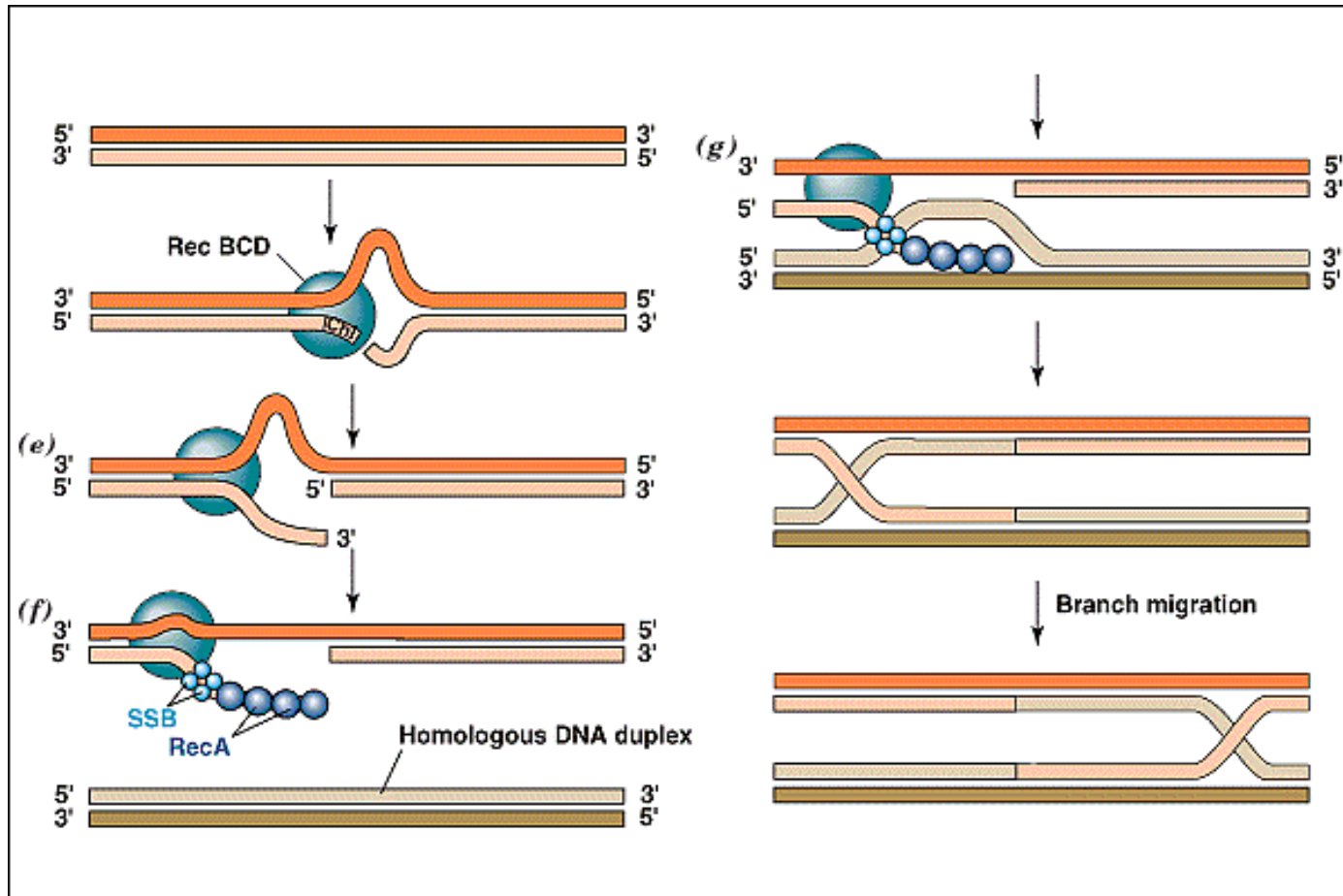
❖ Rekombinacija specifična za mesto

- transpoziciona rekombinacija specifična za mesto
 - DNA - transpozoni
 - retrotranspozoni slični retrovirusima
 - neretrovirusni retrotranspozoni
- konzervativna rekombinacija specifična za mesto

Rekombinacija DNK

Opšta rekombinacija

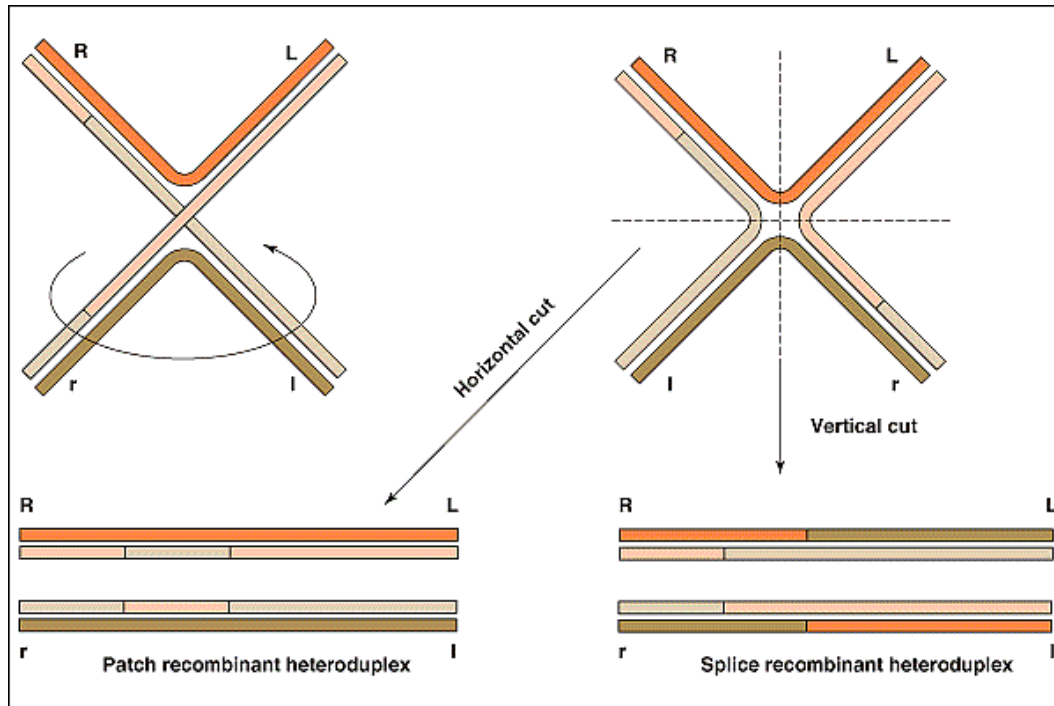
- homologa rekombinacija



Rekombinacija DNK

Opšta rekombinacija

- homologa rekombinacija



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Holliday junction

Rekombinacija DNK **Rekombinacija specifična za mesto**

- **transpoziciona rekombinacija specifična za mesto**
 - DNA - transpozoni
 - retrotranspozoni slični retrovirusima
 - neretrovirusni retrotranspozoni
- **konzervativna rekombinacija specifična za mesto**

Rekombinacijom specifičnom za mesto kreću se specifične nukleotidne sekvence zvane **mobilni genetski elementi** između nehomologih mesta u genomu.

Može promeniti redosled gena i uvesti nove gene u genom.

Mobilni genetski elementi 100 - 10,000 nukleotidnih parova.

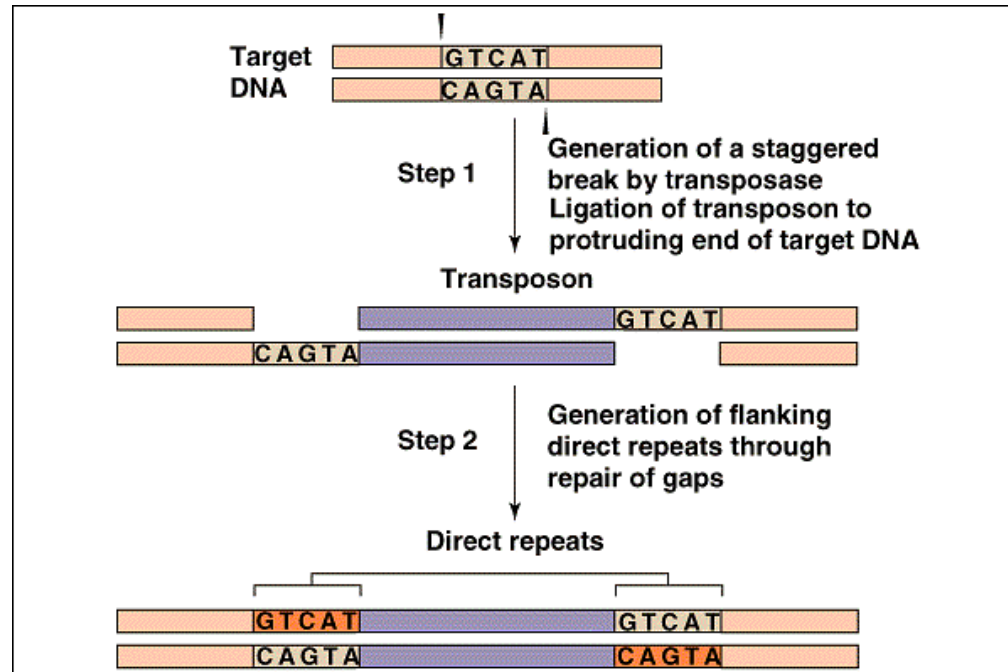
Transpoziciona rekombinacija specifična za mesto ne zahteva homologiju između donorskog i akceptorskog mesta

Specifični enzim - transpozaza deluje na specifične sekvence na krajevima

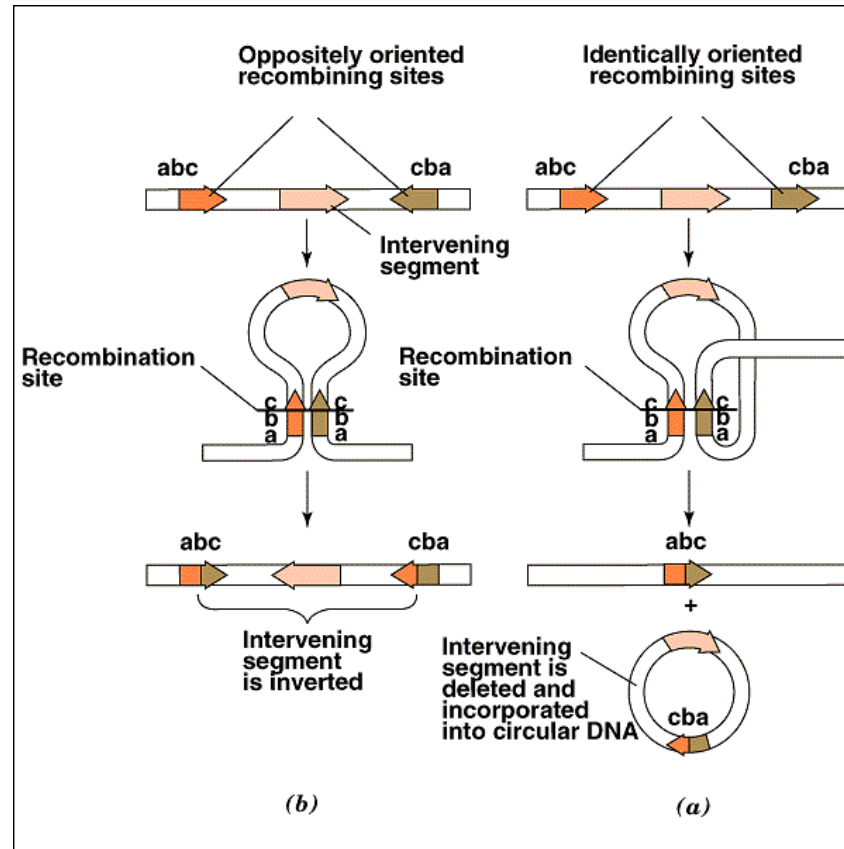
Transpozona izdvajajući je od preostalog DNK molekula, i zatim je ubacuje na novo mesto u DNK.

Rekombinacija DNK -rekombinacija specifična za mesto

- transpoziciona rekombinacija specifična za mesto
 - **DNA - transpozoni**
 - retrotranspozoni slični retrovirusima
 - neretrovirusni retrotranspozoni
- konzervativna rekombinacija specifična za mesto



Rekombinacija DNK -rekombinacija specifična za mesto

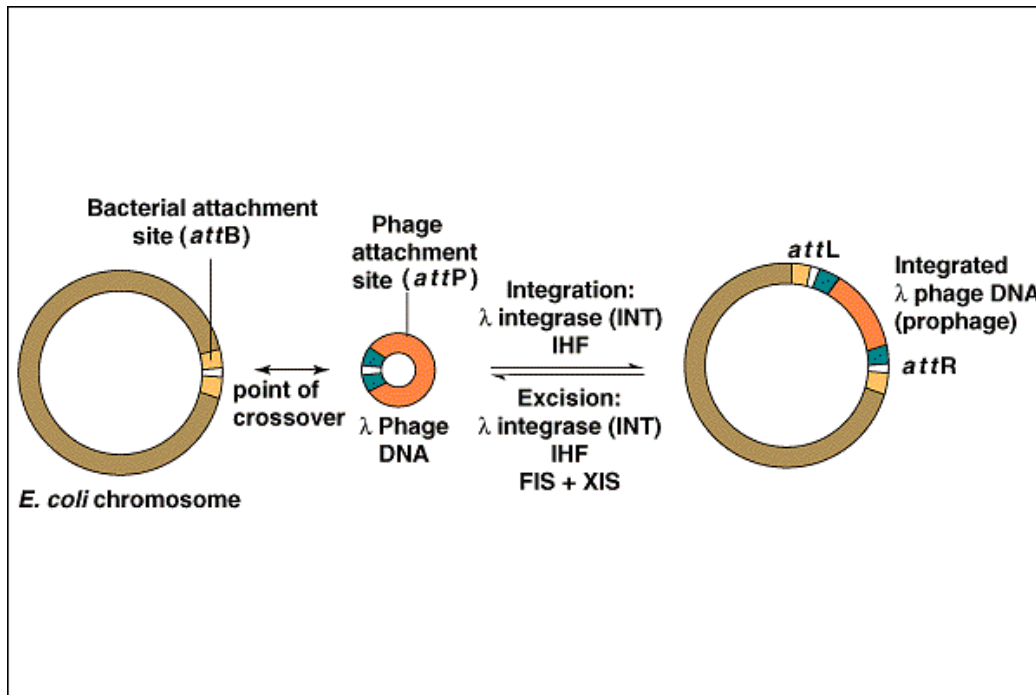


Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Genetsko preuređenje uzrokovano transpozonima

Rekombinacija DNK -rekombinacija specifična za mesto

- transpoziciona rekombinacija specifična za mesto
 - DNA - transpozoni
 - retrotranspozoni slični retrovirusima
 - neretrovirusni retrotranspozoni
- konzervativna rekombinacija specifična za mesto



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.