Semikonzervativna replikacija DNA

Kujavec, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:286415

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Martina Kujavec

Semikonzervativna replikacija DNA

Završni rad

Mentor: prof. dr. sc. V.Cesar

Osijek, 2016. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju

Završni rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Semikonzervativna replikacija DNA

Martina Kujavec

Rad je izrađen u:

Mentor: prof.dr.sc.. V.Cesar

Kratak sažetak završnog rada: Semikonzervativna replikacija proces je umnažanja DNA molekule koji uključuje razdvajanje roditeljskog lanca, replikaciju istog te nastanak dvije molekule DNA od kojih svaka ima po jedan roditeljski lanac i jedan novosintetizirani lanac koji je komplementaran roditeljskom. Proces replikacije složen je i izvodi ga mnoštvo enzima. Tijekom replikacije, ali i zbog okolišnih čimbenika događaju se pogrješke. Te pogrješke moraju biti ispravljene mehanizmima popravka kojih ima nekoliko i također ih izvode razni enzimi.

Broj stranica: 20

Broj slika: 8

Broj tablica: 1

Broj literaturnih navoda: 18

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: DNA, replikacija, polimeraza, telomere, translezijska sinteza

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Biology

Semiconservative DNA replication

Martina Kujavec

Thesis performed at:

Supervisor: PhD Vera Cesar, professor

Short abstract: Semiconservative DNA replication is the proces of duplicating DNA molecule which involves the separation of parental chains and replicating them. When they replicate two daughter molecule appear and they each have one parental strand and one newly sintesized strand complementary to parental strand. Replication process is very complex and involves a number of enzymes. During replication and because of environmental factors mistakes in Dna molecule appear. Mistakes need to be corrected with repair mechanisms which also involve different enzymes.

Number of pages: 20

Number of figures: 8

Number of tables: 1

Number of references: 18

Original in: Croatian

Key words: DNA, replication, polimerases, telomeres, translezion syntesis

Sadržaj

1. Uvod.....5

1.1 Modeli replikacije.....6

1.2 Povijesni pregled.....6

1.2.1 Meselsonov i Stahlov eksperimet.....6

2. Mehanizam replikacije.....8

2.1 Početak.....8

2.2 Tijek.....9

2.2.1 Replikacijske rašlje.....10

2.2.2 DNA-polimeraze.....13

2.3 Terminacija.....14

2.4 Telomere.....14

3. Popravak DNA.....15

3.1 Translezijska sinteza DNA.....17

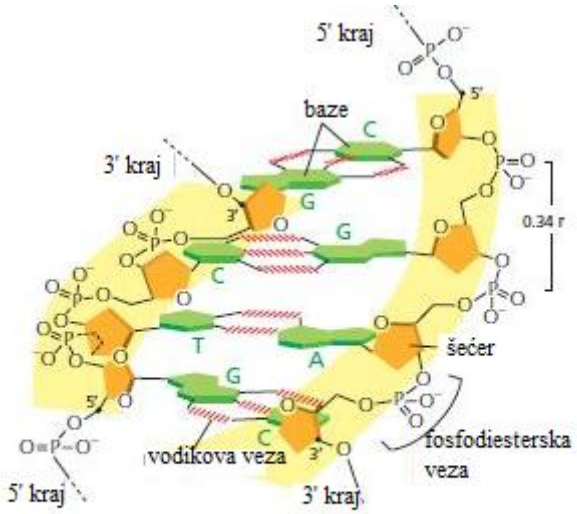
3.2 Popravak dvolančanih lomova.....17

4. Zaključak.....19

5. Literatura.....19

1. Uvod

DNA je molekula nasljeđa koja je izgrađena od dva antiparalelna polinukleotidna lanca. Osnovna jedinica DNA molekule jest nukleotid koji je građen od dušićne baze, šećera pentoze i fosfata. Okosnica se sastoji od šećera deoksiriboze i fosfata koji su povezani fosfodiesterskim vezama. Fosfat je vezan na šećer na 5' mjestu, baza se veže na 1' mjesto, a 3' OH skupina je slobodna i reaktivna. Jedan lanac DNA na jednom kraju ima slobodan 3' kraj, a na drugom 5' kraj. Dušićne baze su glikozidnim vezama povezane sa deoksiribozom i čine nukleozid. Dušićne baze dijelimo na purine i pirimidine. Purini se sastoje od dva prstena i njima pripadaju adenin (A) i gvanin (G). Pirimidini su dušične baze građene od jednog šesteročlanog prstena koje uključuju citozin (C) i timin (T). Baze su smještene u unutrašnjosti heliksa, a fosfati i šećeri u vanjskom dijelu. U paru dušićnih baza zbog steričkih razloga uvijek je jedan purin a drugi pirimidin. Baze se povezuju specifično tako da je A povezan s T, a G s C. Baze su povezane vodikovim vezama koje osiguravaju komplementarnost i stabiliziraju uzvojnicu. A je povezan s T pomoću dvije vodikove veze, a G s C pomoću tri vodikove veze. Replikacija DNA proces je u kojem se DNA molekula dijeli i umnaža kako bi nastala molekula kćeri identična roditeljskoj DNA. Replikacija DNA proces je koji se događa u S fazi staničnog ciklusa i događa se samo jednom u istome.



Slika 1. Struktura odsječka DNA molekule. DNA molekula sastoji se od dva polinukleotidna lanaca. Lanci su suprotno usmjereni i antiparalelni tako da na jednom kraju molekule jedan lanac završava 5' krajem, a drugi 3' krajem. Na slici su prikazana po četiri nukleotida sa svake strane lanca. Nukleotidi jednog lanca povezani su fosfodiesterskim vezama koje povezuju 3'

kraj jednog šećera sa 5' krajem drugog šećera. 3' OH grupa šećera je slobodna i reaktivna, a na 5' kraju povezan je fosfat. Baza se veže za 1' mjesto u šećeru. Nasuprotne baze su međusobno povezane komplementarno tako da je G povezan sa C pomoću tri vodikove veze, a A s T pomoću dvije vodikove veze (Slika je modificirana i preuzeta iz Alberts i sur., 2015).

1.1 Modeli replikacije

U prošlosti su predložena tri moguća modela kojim bi se DNA mogla replicirati.
Prvi model je semikonzervativan model u kojem se dva roditeljska lanca odvoje i koriste se za sintezu lanaca kćeri. Svaka molekula kćeri sastoji se od jednog roditeljskog lanca i jednog novosintetiziranog lanca kćeri sintetiziranog po kalupu roditeljskog lanca. Drugi model je konzervativan model u kojem roditeljska molekula sintetizira u cijelosti novu molekulu DNA. Treći model je disperzivan model koji je opisan kao model u kojem se materijal roditeljske DNA molekule nasumično umeće između dvije molekule kćeri (Russell, 2010). Od predložena tri modela replikacije, semikonzervativna replikacija dokazana je pomoću Meselson-Stahlova eksperimenta kao ispravan način kojim se DNA replicira.

1.2 Povijesni pregled

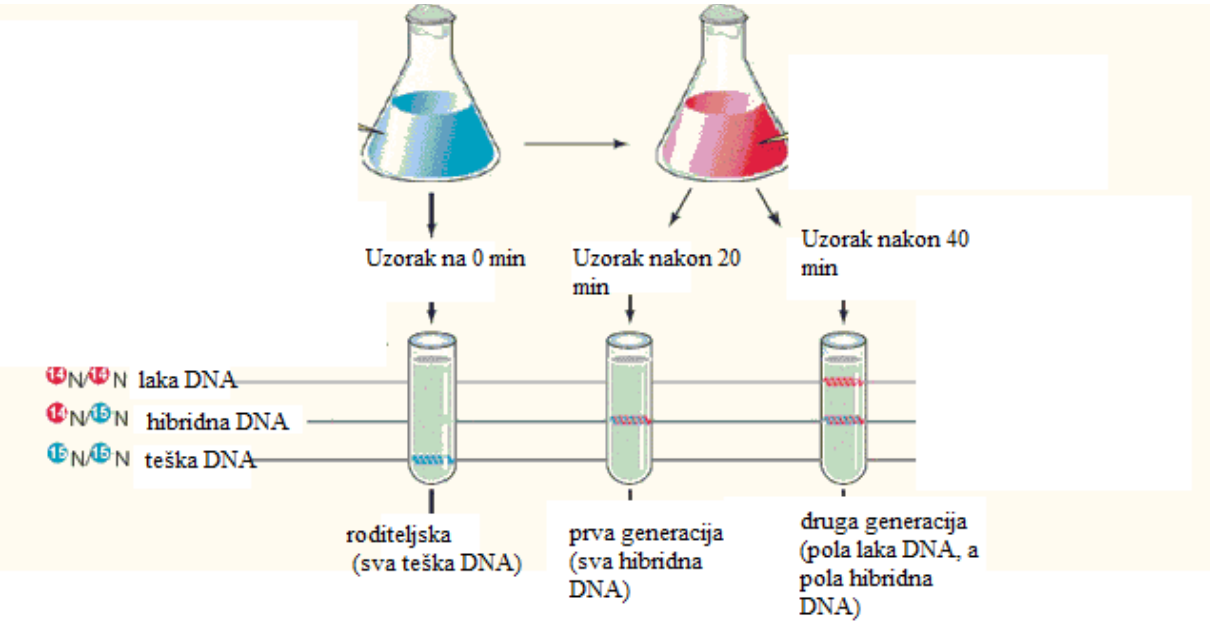
Friedrich Mieschler 1869. godine prvi je izolirao DNA iz bijelih krvnih stanica. Tada još nije bila poznata uloga DNA u stanici, a Mieschler ju je nazvao nuklein. Griffithov transformacijski eksperiment, iz 1928. godine, kojega je proveo na *Streptococcus pneumoniae* pokazao je da se genetička informacija transformira iz jednog soja bakterija u drugi. Nedugo kasnije, 1944. godine Avery, MacLeod i McCarty dokazali su svojim eksperimentom da je taj transformacijski princip upravo DNA molekula. Iako je tada još uvijek bilo uvriježeno mišljenje da je protein genetički materijal. Napokon 1953. godine Hershey i Chase svojim eksperimentima s bakteriofagom pomogli su dokazati da je uistinu DNA genetički materijal (Russell, 2010). Griffithov, Avery-MacLeod-McCartyev i Hershey-Chaseov eksperiment dokazali su da je DNA nasljedna tvar. Vrlo bitno otkriće za kasnije razumijevanje replikacije DNA bilo je ono Watsona i Cricka 1958. godine kada su otkrili trodimenzionalnu strukturu DNA uzvojnice. Sva navedena otkrića pomogla su u otkrivanju i boljem razumijevanju DNA replikacije.

1.2.1 Meselsonov i Stahlov eksperimet

Kako bi otkrili da je upravo semikonzervativan model uistinu i točan, Meselson i Stahl 1958. izveli su eksperiment. *E.coli* su nekoliko generacija uzgajali prvo na mediju bogatom 15N, zatim im je DNA izolirana i centrifugirana u gradijentu gustoće CsCl. Sva izolirana DNA

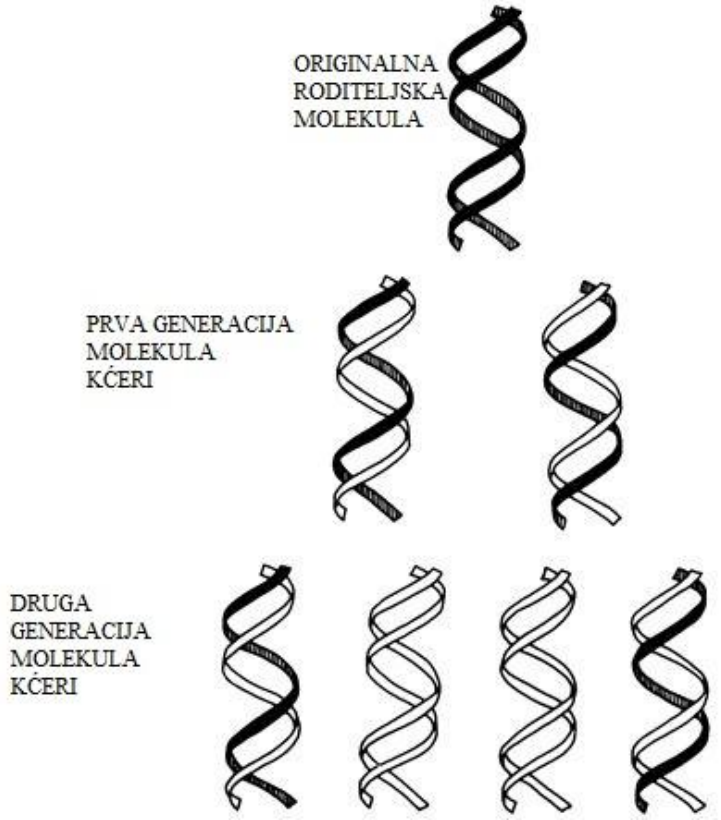
nalazila se na dnu kivete jer je boravak na mediju bogatom 15N uzrokovao inkorporiranje teškog dušika u DNA. Zatim su prebačene u medij sa 14N u kojem su se podijelile. Nakon toga ponovno im je izolirana DNA i centrifugirana u gradijentu gustoće CsCl. DNA stanica prve generacije nalazila se u sredini kivete. Ta generacija sadržavala je hibridnu 14N/15N DNA. *E.coli* omogućeno je još jedno dijeljenje te su DNA pononvno izolirali i centrifugirali. DNA druge generacije nalazila se pola pri vrhu, a pola u sredini kivete. Treća i četvrta generacija sadržavale su sve manje hibridne DNA, a sve više DNA s lakim dušikom. Takav rezultat potvrđuje da je model semikonzervativne replikacije ispravan tj. da se DNA na taj način replicira (Meselson i Stahl, 1958).

Semikonzervativna replikacija DNA proces je od najveće važnosti za živu stanicu. Semikonzervativna replikacija uključuje odvajanje dva roditeljska lanca te korištenje istih kao kalupa za sintezu novih lanaca. Slijed baza novog lanca određen je komplementarnim sparivanjem baza.



Slika 2. Eksperimentalan dokaz semikonzervativne replikacije DNA. Bakterije koje su uzgajane u 14N mediju sadrže laku DNA koja se nalazi na vrhu kivete. Bakterije koje su uzgajane u 15N mediju sadrže tešku DNA koja se nalazi na dnu kivete jer ima veću gustoću od lake DNA. Prijenosom bakterija uzgajanih na 15N mediju u medij bogat 14N te dozvoljavanjem jedne diobe, izolirana hibridna DNA nalazi se u sredini kivete i ima gustoću između lake i teške DNA. Hibridna DNA nalazi se u sredini kivete jer se sastoji od jednog teškog i jednog lakog lanca. U prvoj generaciji sve DNA molekule bile su hibridne, dok u

drugoj generaciji imamo pola DNA molekula koje su hibridne, a pola lakih DNA molekula (Slika je modificirana i preuzeta iz Web 1).



Slika 3. Semikonzervativan model predložen eksperimentom Meselsona i Stahla. Crni lanac predstavlja roditeljsku molekulu DNA. Nakon prve generacije dobivene su hibridne molekule kćeri koje sadrže jedan roditeljski i jedan novosintetizirani (bijeli) lanac. Nakon daljne duplikacije svaka novonastala DNA molekula sadrži jedan lanac stare, a drugi lanac novosintetizirane DNA (Slika je modificirana i preuzeta iz Meselson i Stahl, 1958).

2. Mehanizam replikacije

2.1 Početak

DNA replikacija započinje na ishodištu replikacije (ORI). ORI je građen od sekvence od oko 250 parova baza. Sekvence ORI-a najčešće su građene od adenina (A) i timina (T), zbog toga što vezu između A-T čine samo dvije vodikove veze pa ih je lakše pokidati. Ishodišta replikacije mogu biti jednostruka ili višestruka, ovisno o organizmu. Tako bakterijske stanice imaju jednostruka ishodišta, dok eukariotske stanice imaju višestruka ishodišta.

ARS ili autonomno replicirajući slijedovi sadrže ORI. ARS element se sastoji od 4 regije (ACS dug 11pb i još 3 dodatna elementa B1, B2 i B3). ORC ili kompleks ishodišta replikacije veže se na B1 i ACS regije. ORC kompleks sastoji se od 6 proteina (ORC1p – ORC6p) i potreban mu je ATP. Nakon što se veže za DNA ORC regrutira dodatne replikacijske faktore kao što su Cdc6, Cdt1 i MCM kompleks koji djeluje kao helikaza (Bell, 2002).

Replikacija prokariota razlikuje se od replikacije eukariota. Replikacija *E. coli* počinje na jedinstvenom mjestu za razliku od početka replikacije eukariota. Replikacija *E. coli* traje kraće nego replikacija npr. *S. cerevisiae* koji ima 16 kromosoma koji se moraju replicirati za razliku od jednog kružnog *E.coli*. Kod *E. coli* na ishodište replikacije nazvano locus oriC veže se DnaA koja uzrokuje ″otapanje″ DNA. Zbog toga vodikove veze između A-T pucaju na točno određenim regijama. Veze između A-T pucaju jer je za to potrebno manje energije jer su povezane s dvije veze, za razliku od G-C koji su povezani trima vodikovim vezama. Nakon vezanja DnaA na DNA se veže i protein DnaB. DnaB se veže za mjesta na kojima su pukle A-T veze, a na kojima će se formirati replikacijske rašlje. Vezanje DnaB na DNA potpomažu DnaC proteini čijom se disocijacijom DnaB proteini povezuju u helikazu (Stryer i sur., 2013).

Prokarioti	Eukarioti
DnaA	ORC
DnaB	MCM DNA helikaza
DnaC	Cdc6, Cdt1

Tablica 1. Funkcionalni analozi inicijacije replikacije prokariota i eukariota.

2.2 Tijek

Kako bi došlo do replikacije lanci DNA moraju se razdvojiti kako bi enzimi mogli djelovati. Svaki lanac molekule DNA postaje kalup za sintezu novog lanca DNA. Razdvajanje dvolančane DNA omogućuju heksamerni enzimi, DNA helikaze koji kataliziraju razmatanje dvostrukog lanca DNA ispred replikacijskih rašlji. Kreću se u smjeru 5’ → 3’ koristeći energiju hidrolize ATPa.

Nakon razdvajanja lanaca DNA helikazom SSDB (single stranded DNA-binding) proteini se vežu za jednolančanu DNA i tako ju stabiliziraju i štite od djelovanja nukleaza.

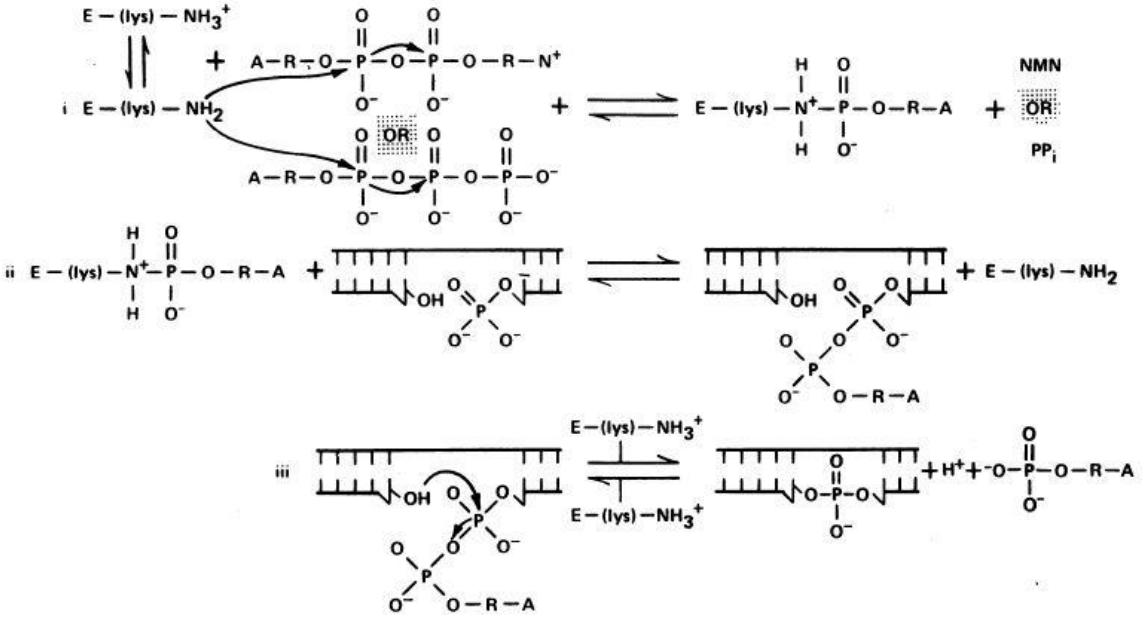
Tijekom razmatanja lanaca DNA može doći do nekontrolirane rotacije koja bi dovela do omatanja DNA lanca oko samog sebe i u konačnici blokiralo replikaciju. Enzimi topoizomeraze kontroliraju i modificiraju topološka stanja DNA. Topoizomeraze lome lanac DNA i provlače dio DNA kroz taj lom (Topoizomeraza I.) ili lome komplementarne lance DNA i provlače drugi dvostuki segment DNA kroz taj lom (Topoizomeraza II.) (Wang, 1985).

2.2.1 Replikacijske rašlje

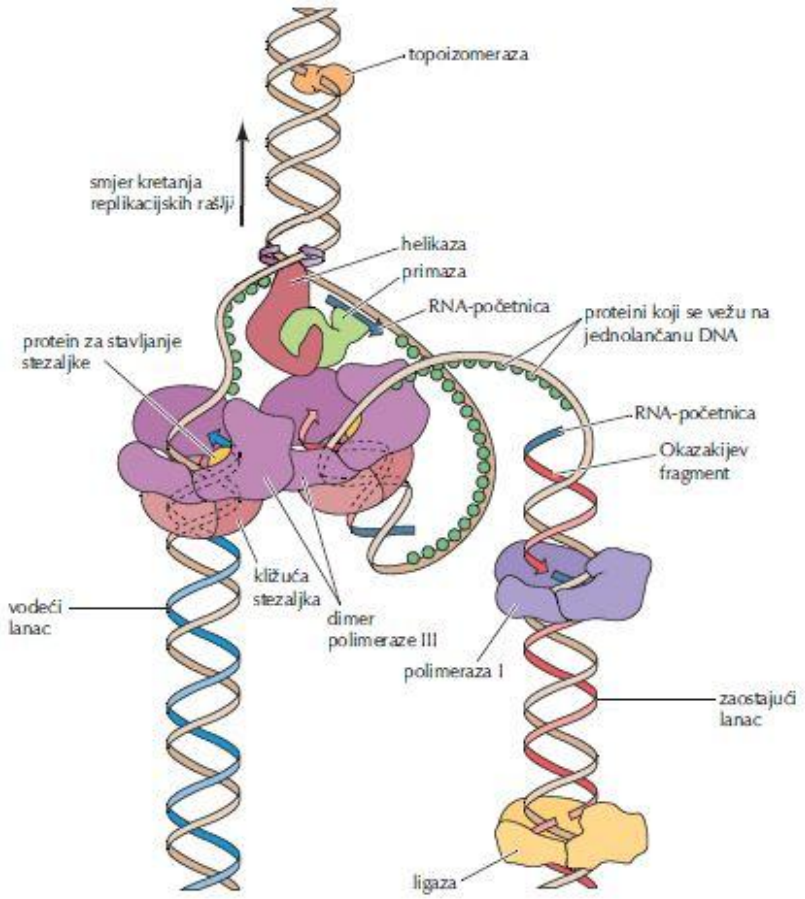
Replikacijske rašlje nastaju tijekom sinteze DNA djelovanjem helikaza koji razdvajaju DNA na dva lanca. Prvi, kontinuirani ili vodeći lanac sintetiziran je kontinuirano djelovanjem DNA polimeraze, dok je drugi lanac kojeg nazivamo diskontinuirani ili tromi sintetiziran diskontinuirano tj. sintetiziran je iz kratkih fragmenata DNA koje nazivamo Okazaki-jevi fragmenti. Sinteza vodećeg lanca događa se uvijek u smjeru 5‘ prema 3‘. DNA polimeraza sintetizira vodeći lanac. Vodećem lancu je potrebna samo jedna RNA početnica za sintezu dok je tromom potrebno nekoliko. Helikaza odmotava DNA molekulu kako bi DNA polimeraza mogla kontinuirano sintetizirati vodeći lanac bez odvajanja od njega. Kada helikaza razdvoji DNA molekule na njih se povežu proteini koji ih štite od nukleaza,ali i od ponovnog povezivanja. Odmotavanjem DNA molekule može doći do nekontrolirane rotacije te do blokiranja replikacije. Kako bi se to spriječilo enzimi topoizomeraze kataliziraju uvođenje jednolančanih ili dvoančanih lomova te nakon toga ponovna spajanja DNA molekule.

Sinteza tromog lanca razlikuje se od sinteze vodećeg lanca u nekoliko bitnih karakteristika. Tromi lanac usmjeren je od 3‘ kraja prema 5‘ kraju. Kako bi se sintetizirao potrebna je formacija petlje koja omogućuje sintezu u 5‘-3‘ usmjerenju. Sinteza tromog lanca događa se u fragmentima, sintezom Okazaki-jevih fragmenata koja je inicirana enzimom primaza. Okazaki-jevi fragmenti sastoje se od oko 1000 nukleotida. Budući da DNA-polimeraza ne može započeti sintezu DNA *de novo* primaza će sintetiziratki kratke fragmente RNA koji će služiti kao početnice za daljnu sintezu DNA pomoću polimeraze kao i kod vodećeg lanca. RNA početnice se moraju ukloniti i to djelovanjem polimeraze I. koja ima egzonukleazno djelovanje ili djelovanjem Rnaze H. Nakon što je RNA početnica uklonjena polimeraza popunjava pukotine (Cooper i Hausman, 2004). Zatim je potrebno spajanje 3' i 5' kraja što DNA polimeraza ne može učiniti jer su joj potrebni aktivni nukleotidi koji nose energiju, a ugrađeni nukleotidi nemaju na 3' kraju vezanu energiju. Stoga za spajanje 3' i 5' kraja potrebna je DNA ligaza koja za svoju aktivnost troši dodatan ATP. Uloga DNA ligaze bitna je

u spajanju Okazaki-jevih fragmenata, popravku DNA i rekombinaciji. Energiju za sintezu fosfodiesterske veze DNA ligaza dobiva hidrolizom ATP-a. DNA ligaza sastoji se od jednog polipeptidnog lanca (Lehman, 1974).



Slika 4. Mehanizam djelovanja ligaze. Prvi korak je adenilacija aktivnog mjesta Lys ostatka u aktivnom mjestu enzima. Zatim se AMP prenosi sa Lys na 5' fosfatni kraj. Tada 3' OH kraj napada AMP fosfatnu vezu te dolazi do stvaranja fosfodiesterske veze, a AMP se otpušta. AMP u aktivnom mjestu enzima mora biti zamijenjen ATP-om kako bi enzim nastavio biti aktivan (Lehman, 1974).



Slika 5. Replikacijske rašlje. Slika pokazuje proteine replikacijskih rašlji koji sudjeluju u replikaciji DNA. DNA helikaza hidrolizira DNA i tako razdvaja dvostruku zavojnicu DNA te ju tako priprema za reakcije sa ostalim proteinima replikacije. Kako helikaza odmotava DNA, tako se na jednolančanu DNA vežu proteini koji zaustavljaju ponovno spajanje lanaca te štite od djelovanja nukleaza. DNA helikaza sa DNA primazom tvori promosom. Primaza sintetizira kratke RNA fragmente koji služe kao početnice za sintezu DNA pomoću DNA polimeraze III. Vodeći lanac sintetizira se kontinuirano u 5'-3' smjeru pomoću DNA polimeraze III. Za sintezu vodećeg lanca potrebna je jedna RNA početnica. DNA polimeraza I. uklanja RNA početnice. DNA ligaza spaja Okazakijeve fragmente u cjelovit tromi lanac. Kako ne bi došlo do nekontrolirane rotacije tijekom razmatanja DNA topoizomeraze uvode lomove i tako smanjuju stres izazvan rotacijom. Kližajuća stezaljka udružena je sa DNA polimerazom te ju drži vezanom za DNA i povećava njenu aktivnost. Proteini za stavljanje kližajuće stezaljke postavljaju kompleks DNA polimeraze i kližajuće stezaljke na mjesto početnice (Slika je preuzeta iz Cooper i Hausman, 2004).

2.2.2 DNA-polimeraze

DNA polimeraze kataliziraju dodavanje nukleotida na 3' hidroksilni kraj rastućeg polinukleotidnog lanca i to samo u 5'-3' smjeru. DNA polimeraza vrši nukleofilni napad na aktivne nukleotide, tj. nukleozidtrifosfate od kojih odcjepljuje pirifosfat (PPi) kako bi dobila potrebnu energiju za ugradnju monofosfata. Kada bi katalizirala dodavanje nukleotida na 5' kraj energija bi morala dolaziti iz trifosfatnih skupina već ugrađenih nukleotida i to bi onemogućilo korektivnu aktivnost polimeraza. DNA polimeraza dodaje nukleotide na temelju komplementarnosti dušikovih baza. Ako su baze komplementarne formirat će se vodikove veze te će DNA polimeraza dalje vezati novi nukleotid. Ako baze nisu komplementarne neće se formirati vodikove veze te će nukleotid biti uklonjen egzonukleaznom aktivnošću. Za aktivnost polimeraze potrebni su: kalup, početnica i aktivni nukleotidi.

Pet DNA-polimeraza pronalazimo u eukariotskim stanicama. To su α , β, γ i ε koje se nalaze u jezgri i δ koja se nalazi u mitohondriju te replicira mitohondrijsku DNA. Polimeraza α nalazi se u kompleksu sa DNA primazom te zajedno sudjeluju u sintezi kratkih Okazaki-jevih fragmenata tromog lanca. Polimeraza β nema pronađenih enzimatskih aktivnosti dok DNA polimeraze γ,δ i ε imaju 3'-5' egzonukleaznu aktivnost koja može ukloniti DNA u suprotnom smjeru od smjera sinteze DNA te tako sudjeluju u provjeravanju točnosti replikacije (Wang, 1996).

Kod prokariota pronalazimo tri DNA polimeraze. Polimeraza I. koja je uključena u replikaciju i popravak DNA, polimeraza II. i polimeraza III. koja je glavna replikacijska DNA polimeraza. DNA polimeraza I. posjeduje veliku podjedinicu koja ima 3'-5' egzonukleazno djelovanje, kao i malu podjedinicu koja ima 5'-3' egzonukleazno djelovanje. Polimeraza I. popunjava praznine između Okazaki-jevih fragmenata nakon što Rnaza H ukloni RNA primer. Za razliku od polimeraze I, polimeraze II. i III. ne mogu vršiti egzonukleazno djelovanje u 5'-3' smjeru.

Strukture DNA polimeraza vrlo su slične. Imaju oblik koji podsjeća na oblik ruke. Sastoje se od dvije regije. Polimerizacijske regije koja uključuje tri domene, domena dlana, prstiju i palca. Domene prstiju i palca omotavaju se oko DNA i drže ju u aktivnom mjestu, dok se u domeni dlana nalazi aktivno mjesto polimerizacijske regije. Druga domena je egzonukleazna domena koja ima 3'-5' egzonukleaznu aktivnost (Steitz, 1999).

Brzina kretanja replikacijskih rašlji ovisi o brzom stavljanju klizajuće stezaljke, pomoću proteina za stavljanje (RFC), koji su ovisni o ATP-u, na tromi lanac. Zbog toga brzina sinteze

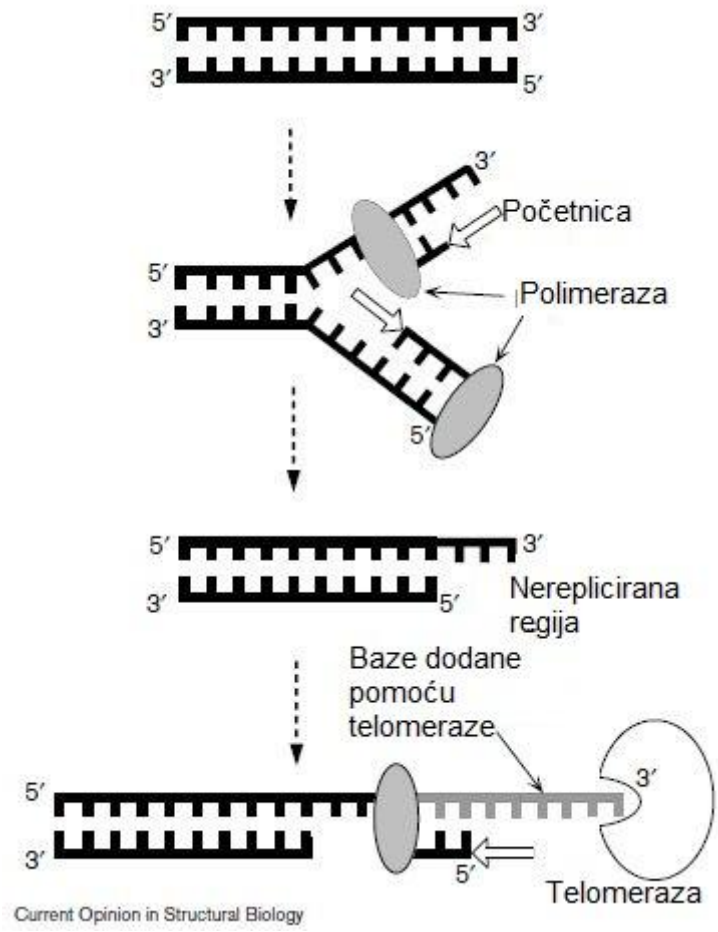
Okazaki-jevih fragmenata na tromom lancu može držati korak sa kontinuiranom sintezom vodećeg DNA lanca. RFC disociraju sa klizajuće stezaljke čime se stvara prsten oko DNA kalupa spreman za primitak nove DNA polimeraze (Bowmann i sur., 2004).

2.3 Terminacija

Mehanizam terminacije DNA replikacije još uvijek nije toliko dobro istražen. Do terminacije dolazi u trenutku kada replikacijske rašlje susretnu druge replikacijske rašlje iz suprotnog smjera. Otkriveno je da do terminacije kod kvasca dolazi na specifičnim RTS1 mjestima. Na tim RTS mjestima nalaze se specijalizirane barijere replikacijskih rašlji koje uzrokuju terminaciju (Singh, 2014.). Nakon terminacije dolazi do recikliranja proteina replikacijskih rašlji kako bi sudjelovali u novoj sintezi DNA. Mcm2-7 proteini se dodaju na replikacijske rašlje tek u idućoj mitotskoj diobi kako se DNA ne bi replicirala više puta u jednom staničnom ciklusu (Cox, 2009).

2.4 Telomere

Sinteza DNA pomoću DNA polimeraza ne uspijeva replicirati 3' krajeve DNA tijekom kromosomalne replikacije. Ta nemogućnost repliciranja 3' krajeva dovela bi do skraćivanja telomera tijekom stanične diobe. Stoga enzim telomeraza, koji se sastoji od proteinskih podjedinica i RNA, katalizira sintezu krajnje DNA tj. telomerne DNA. Katalitička podjedinica telomeraze jest reverzna transkriptaza. Telomerna DNA uglavnom se sastoji od tandemskih sekvenci bogatih gvaninom. Telomeraze sintetiziraju te sekvence pomoću RNA primera (O'Reilly i sur., 1999). Telomere su bitne jer stabiliziraju kromosome i služe kao zaštite krajeva linearnih DNA molekula te spječavaju degradaciju. Misli se da kada telomere dostignu određenu minimalnu duljinu stanica se prestaje dijeliti. Gubitak telomerne DNA narušava kromatinsku strukturu na krajevima kromosoma što zapravo uzrokuje izmjenu ekspresije gena koji su terminalno smješteni (Shippen, 1993).



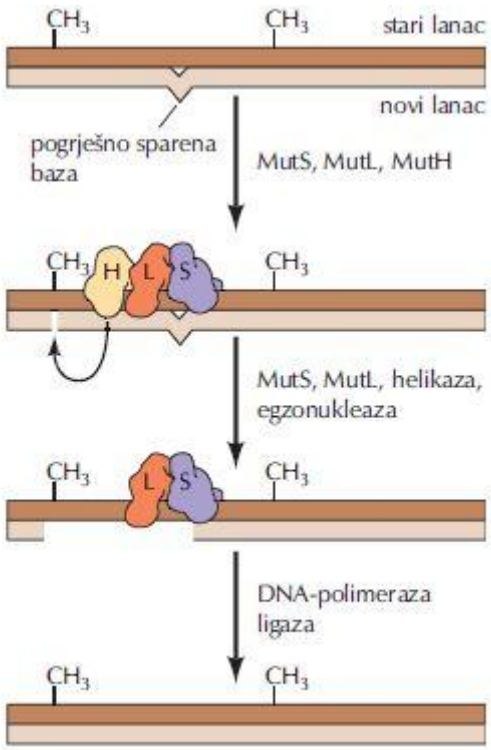
Slika 6. Mehanizam djelovanja telomeraze.Budući da DNA polimeraza ne može replicirati terminalne 3' krajeve DNA potrebno je djelovanje telomeraze. 3' kraj roditeljskog lanca produžuje se pomoću RNA kalupa koju telomeraza kao reverzna transkriptaza posjeduje. To omogućuje nepotpunom, novosintetiziranom lancu DNA produženje u 5' smjeru (Slika je modificirana i preuzeta iz O'Reilly i sur., 1999).

3. Popravak DNA

Tijekom replikacije DNA može doći do pogrješaka. Iako DNA polimeraza ima vrlo veliku vjernost replikacije one se ipak događaju. Procjenjeno je da DNA polimeraza radi 1 pogrješku na svakih 100 000 nukleotida. Stanice su razvile mehanizme popravaka tih pogrješaka. Neke pogrješke se popravljaju tijekom replikacije pomoću korektivne aktivnosti DNA polimeraze. Kada DNA polimeraza prepozna krivo sparenu bazu koristi se svojom 3'-5' egzonukleaznom aktivnošću, uklanja krivo sparenu bazu te popravlja pogrješku dodatkom nove, ispravne baze. Iako DNA polimeraza uvelike povećava vjernost replikacije stanice su morale razviti dodatne mehanizme popravka DNA.

U popravku izrezivanjem baze (PIB) sudjeluje porodica enzima DNA-glikozilaze. Ti enzimi kidaju vezu između baze i deoksiriboze u okosnici DNA i otpuštaju slobodnu bazu. DNA-glikozilaze su specifični enzimi koji prepoznaju samo neke oblike oštećenih baza. Npr. uracil-DNA-glikozilaza uklanja samo uracil koji se u DNA pojavljuje deaminacijom citozina. Uklanjanjem uracila nastaje apirimidinsko (AP) mjesto. Ako bi se uklonio purin mjesto bi se nazvao apurinsko (AP) mjesto. U popravku AP mjesta sudjeluju AP-endonukleaze koje kataliziraju rez na 5' AP mjestu te ostaju 3' OH i 5' fosfatni ostatak. U dovršetku PIB sudjeluju AP endonukleaze koje uklanjaju 5' fosfatni ostatak te kasnije DNA polimeraza popravlja sintezom, a DNA ligaza popunjava pukotinu. Popravak izrezivanjem nukleotida popravlja oštećene baze nastale izlaganjem karcinogenima, okolišnim mutagenima . Također popravlja i pirimidinske dimere nastale UV zračenjem kod ljudi. PIN uklanja oštećene baze izrezivanjem oligonukleotida na kojem je pogrješka.

Popravak pogrješno sparenih baza (PPSB) uklanja baze koje su pogrješno ugrađene tijekom replikacije DNA, a koje nisu uklonjene pomoću DNA polimeraze. PPSB najbolje je istražen kod *E.coli* kod koje su otkriveni proteini mutH, mutL i mutS. Ovaj mehanizam popravka može popraviti DNA samo ako se novoreplicirana DNA razlikuje od roditeljske jer još nije metilirana u GATC sekvenci (Friedberg i Wood, 1996).



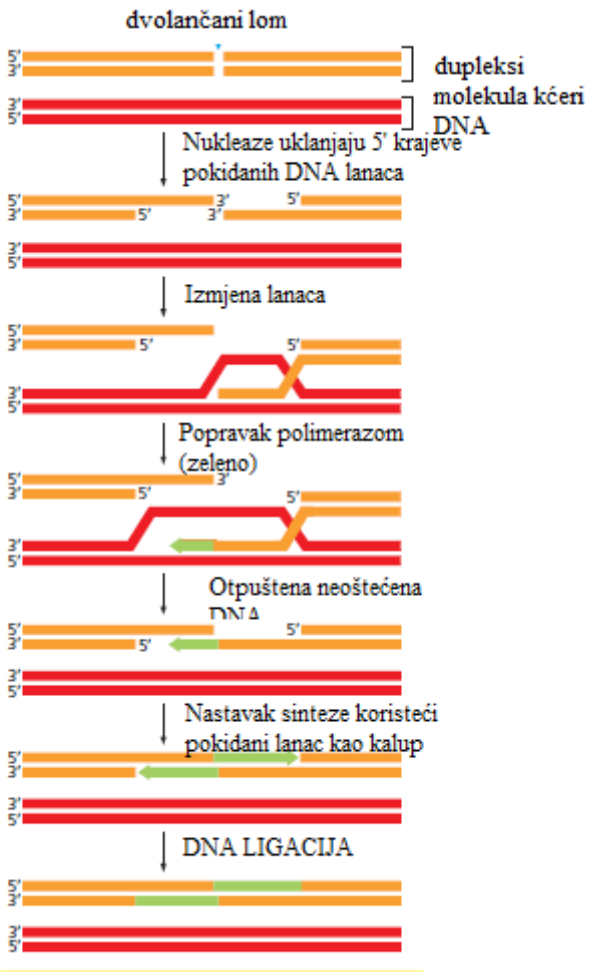
Slika 7. Popravak pogrješno sparenih baza. Protein mutH veže se za stari lanac DNA koji nije metiliran. Njegovo vezanje prati vezanje još dva proteina mutL i mutS. Zatim mutH kida novi, nemetilirani lanac. Zatim mutS i mutL kidaju drugi dio novog lanca uz pomoć helikaze i egzonukleaze. Pogrješno sparena baza je izrezana, a DNA polimeraza sintetizira dio lanca koji nedostaje, dok DNA ligaza lijepi pukotinu (Slika je preuzeta iz Cooper i Hausman, 2004).

3.1 Translezijska sinteza DNA

Procesom translezijske sinteze DNA (TLS) stanice imaju mogućnost replikacije preko oštećene DNA. Posebne polimeraze nazvane TLS polimeraze sintetiziraju DNA preko mjesta oštećenja roditeljske DNA tj. oštećenog DNA kalupa. Prvotno otkrivene u *E.coli* TLS DNA polimeraze nemaju homologne sekvence sa replikativnim DNA polimerazama. Također TLS DNA polimeraze nemaju 3'-5' egzonukleazno djelovanje kojim bi mogle provjeriti novosintetiziran lanac DNA te popraviti moguće pogrješke. Upravo zbog toga TLS DNA polimeraze imaju veću stopu pogrješaka i potencijalnu mutagenu aktivnost. Iako unose mutacije u genetički materijal TLS DNA polimeraze u konačnici unose genetičku varijabilnost te omogućuju da replikacija ne bude blokirana na mjestima oštećenja (Waters i sur., 2009).

3.2 Popravak dvolančanih lomova

Tijekom replikacije zbog pogrješaka, ali i zbog ionizacijskog zračenja i drugih okolišnih čimbenika može doći do dvolančanih lomova. Dvolančani lomovi mogu se popraviti rekombinacijom DNA. Prvi način popravka rekombinacijom je nehomologna rekombinacija kod koje se krajevi pokidane DNA spajaju DNA ligacijom i takav popravak dovodi do promjene u sekvenci DNA i često gubitka baze. Za ovakav popravak potrebni su Ku proteini koji se vežu za krajeve pokidane DNA (Alberts i sur., 2015). Drugi način je homologna rekombinacija kod koje ne dolazi do gubitka sekvence DNA. Homologna rekombinacija proces je popravka dvolančanih lomova koji uključuje izmjenu informacija između DNA molekula s homolognim slijedovima. Popravak DNA homolognom rekombinacijom događa se uglavnom nakon replikacije DNA jer su dvije molekule kćeri tada relativno blizu.



Slika 8. Popravak DNA homolognom rekombinacijom. U prvom koraku na krajeve pokidanih lanaca djeluju nukleaze koje uklanjaju 5' krajeve. Zatim dolazi do izmjene lanaca između pokidane DNA i ne pokidane DNA. 3' kraj pokidane DNA ulazi u dupleks ne pokidane DNA i traži homologne parove pomoću komplementarnog sparivanja baza. Zatim DNA polimeraza produžuje pokidani lanac DNA pomoću kalupa koji čini ne pokidani lanac DNA. Zadnji korak popravka DNA homolognom rekombinacijom jest ligacija pokidanih lanaca čime su pokidani lanci spojeni, a nije došlo do gubitka DNA slijedova (Slika je modificirana i preuzeta iz Alberts i sur., 2015).

U popravku homolognom rekombinacijom sudjeluje RecA protein koji se veže za jednolančanu DNA koja je pokidana. Nakon toga veže i dvolančanu DNA koja nije pokidana i služi kao kalup te stvara kompleks između te dvije DNA. RecA protein drži DNA u izduženijoj konformaciji kako bi se lakše razdvojila te kako bi jednolančana DNA mogla pronaći komplementaran slijed (Alberts i sur., 2015).

4. Zaključak

Replikacija DNA najvažniji je proces u stanici jer replikacijom se umnožava DNA koja je nosilac genetičkog materijala te se osigurava prijenos iste stanicama kćeri. Svaka stanica kćeri sadržava jedan roditeljski lanac DNA i jedan novosintetizirani lanac koji je komplementaran roditeljskom lancu DNA stoga je taj proces nazvan semikonzervativnim. Mehanizam replikacije DNA vrlo je složen ali svaki korak je bitan kako bi se ispravna informacija replicirala i prenijela te u konačnici osigurala rast i razvitak organizma. Najvažniji enzim replikacije, DNA polimeraza katalizira ugradnju komplementarnih nukleotida te svojom korektivnom aktivnošću uvelike povećava vjernost replikacije. Za replikaciju DNA potrebni su i ostali enzimi replikacijskih rašlji. Helikaza koja ih odmotava, topoizomeraza koja smanjuje stres uzrokovan odmotavanjem, primaza koja postavlja početnice potrebne DNA polimerazi, ligaza koja spaja Okazaki-jeve fragmente. Kranji dijelovi linearnih DNA, telomere, moraju se sintetizirati pomoću novog enzima, telomeraze jer polimeraza ne može sintetizirati krajeve. Iako polimeraze posjeduju korektivne aktivnosti pogrješke se događaju. Stanice su uspjele proizvesti različite mehanizme popravka DNA te su tako sačuvale integritet. Popravkom se osigurava precizan i točan prijenos genetskog materijala. Replikacija je važna zbog prijenosa gena i genoma iz generacije u generaciju čime se osigurava genetička dosljednost.

5. Literatura

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P 2015. *Molecular Biology of the Cell.* 6th ed. Garland science, Taylor & Francis Group, New York, US, 177, 279 pp

Bell SP. 2002. The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *GenesDev* 16: 659-672

Berg JM, Tymoczko JL, and Stryer L 2013. *Biokemija.* šesto izdanje, Školska knjiga, Zagreb, HR, 801 pp

Bowman GD, O'Donnell M, Kuriyan J. 2004. Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature* 429: 724–730

Cooper GM, Hausman RE 2004. *Stanica, molekularni pristup*. treće izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, HR, 97, 187, 201 pp

Cox SL 2009. *Molecular Themes in DNA Replication*, RSC Publishing, Oxford, UK, 14 pp

Friedberg E, Wood R. 1996. 8 DNA Excision Repair Pathways. *Cold Spring Harbour Monograph* 31: 249-269

Lehman IR. 1974. DNA ligase: structure, mechanism and function. *Science* 186.4166:790-7

Meselson M, Stahl FW. 1958. The replication od DNA in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 44.7: 671-682

O'Reilly M, Teichmann SA, Rhodes D. 1999. Telomerases. *Curr Opin Struct Biol* 9:56–65.

Russell PJ 2010. *iGenetics : a molecular approach 3rd-ed*. Pearson, San Francisco, US, 9-13, 36 pp

Shippen ED. 1993. Telomeres and telomerases. *Curr Opin Gen and Develop* 3:759-763

Singh J. 2014. Role of DNA Replication in Establishment and Propagation of Epigenetic States of Chromatin. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 30:131-43

Steitz TA. 1999. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem*. 274:17395-17398.

Wang JC. 1985. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 54:665–97.

Wang T. 1996. 15 Cellular DNA Polymerases. *Cold Spring Harbour Monograph* 31:461-493

Waters LS, Minesinger BK, Wiltrout ME, D'Souza S, Woodruff RV, Walker GC. 2009. Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73.1: 134-154

Web izvor

1. http://www.nature.com/scitable/content/the-meselson-stahl-experiment-18551