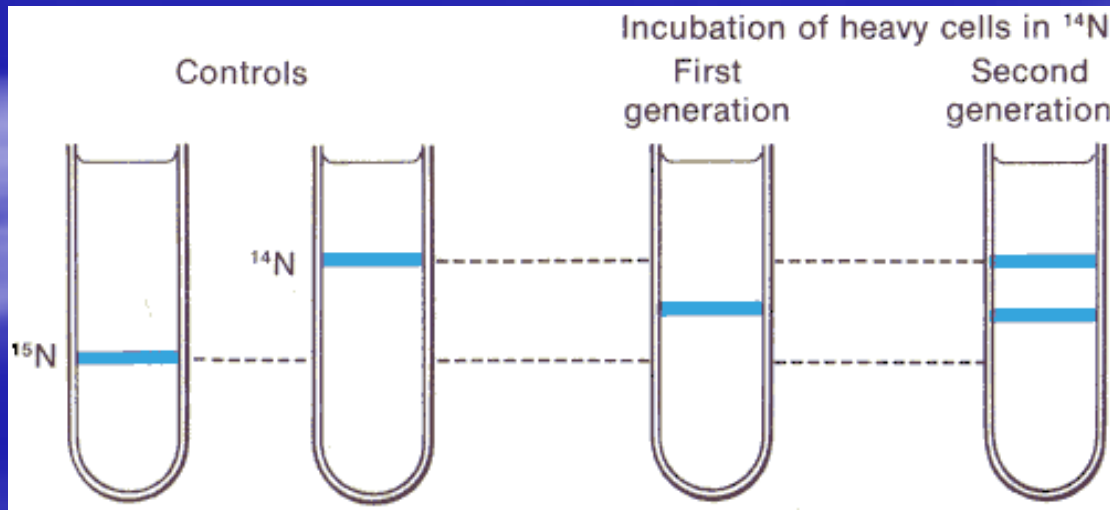
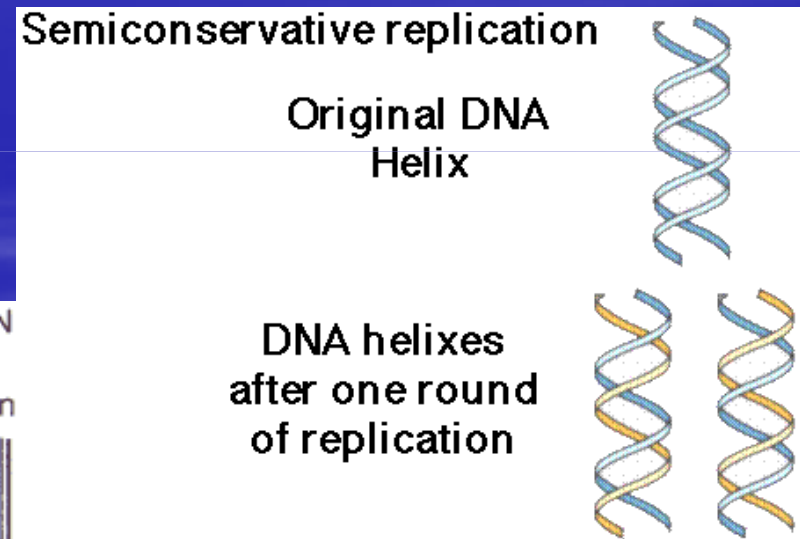
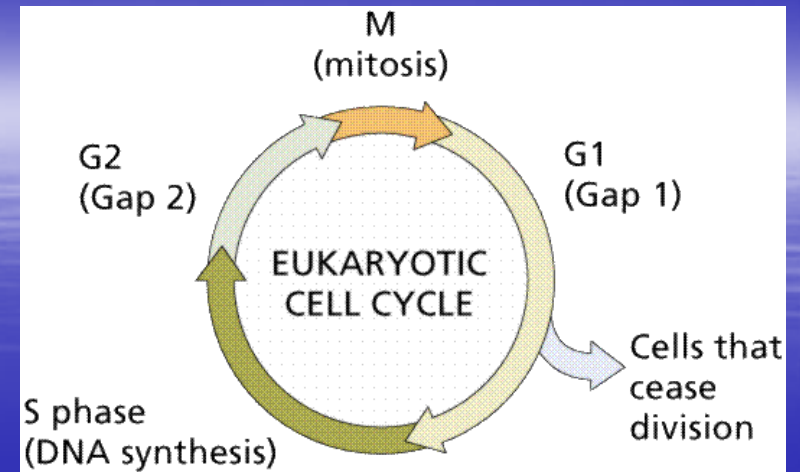


REPLIKACIJA

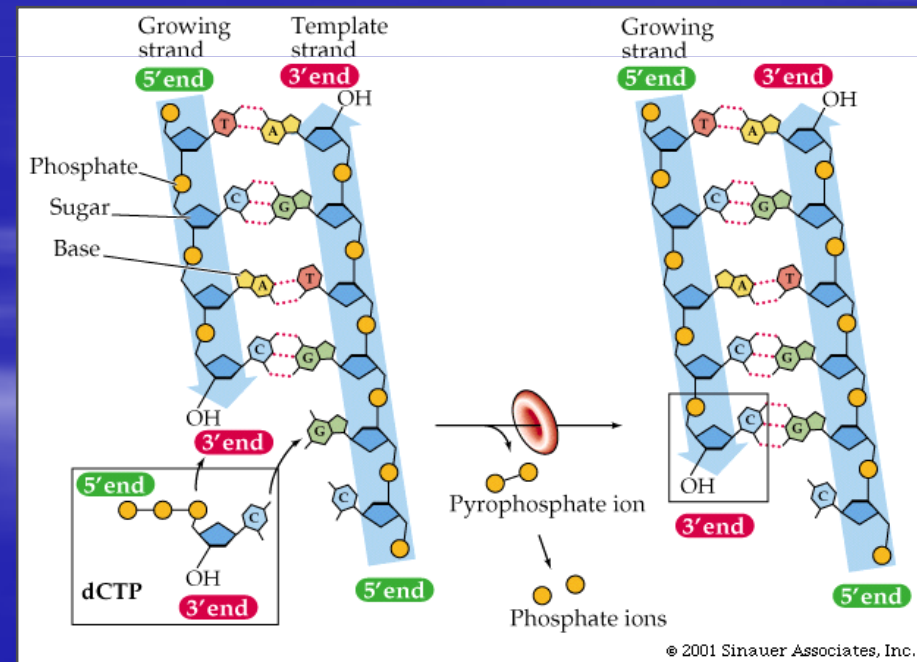
Doc. dr Snežana Marković
Institut za biologiju i ekologiju
Prirodno-matematički fakultet
Univerzitet u Kragujevcu

REPLIKACIJA DNK

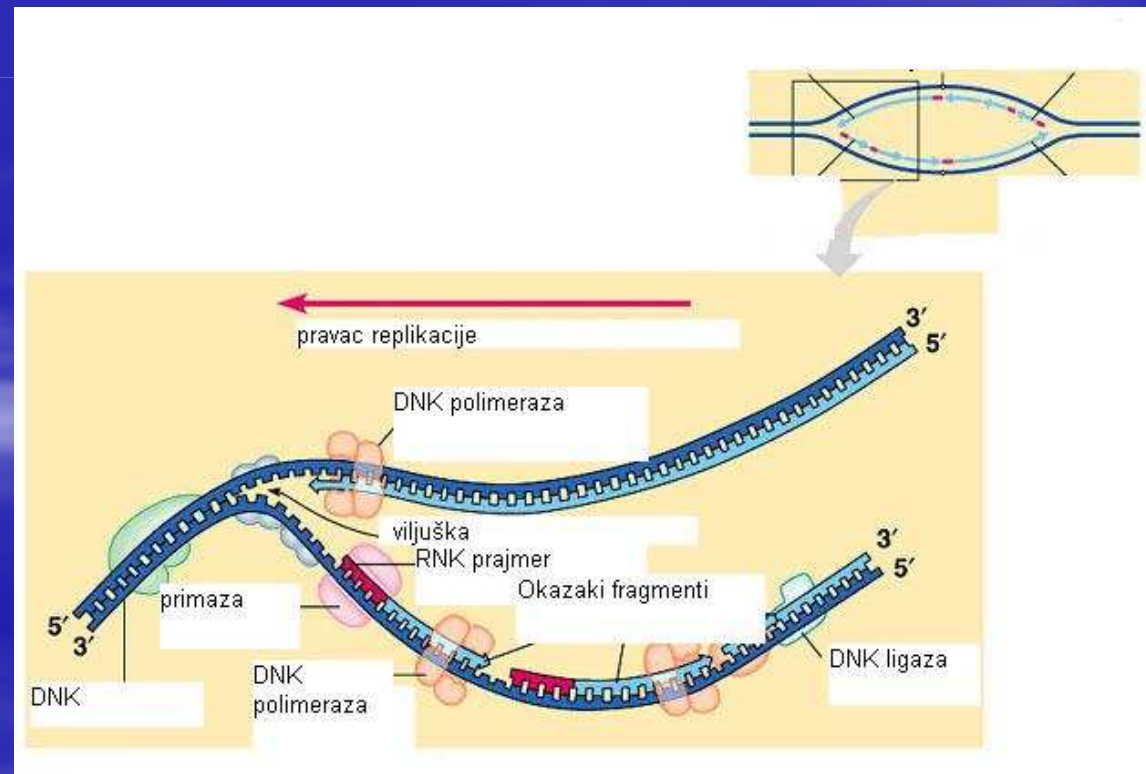
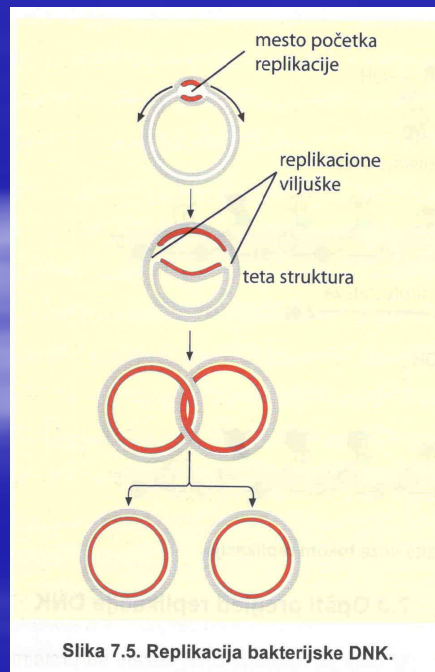
- Semikonzervativan proces
- Eksperimenti Mezelsona i Stala 1957.g.
 - metoda centrifugiranja DNK u gradijentu gustine CsCl
 - E. coli rasle naizmenično u medijumu sa “teškim” (N^{15}) i “lakim” (N^{14}) izvorom azota



- **Hemizam replikacije DNK**
- **DNK polimeraze**
 - potreban je matrični lanac
 - princip komplementarnog sparivanja baza (AT i GC)
 - specifično prepoznaju dezoksiribonukleozidtrifosfate i sterne geometrije pravilno sparenih nukleotida
- **Formiranje fosfodiesterne veze između novog dezoksiribonukleotida i 3'-OH kraja rastućeg lanca DNK**
- **Novi lanci naspram starih (matrice)**
- **Nukleofilni napad 3'-OH grupe rastućeg lanca na α -P atom dNTP; DNK polimeraze; pirofosfatna hidroliza NTP \rightarrow energija za formiranje fosfodiesterne veze**
- **Neorganska pirofosfataza hidrolizuje pirofosfat \rightarrow energija za dalju sintezu polinukleotidnog lanca.**

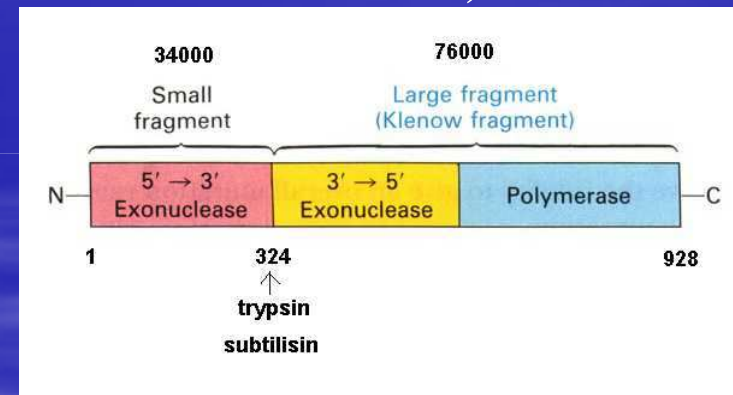


- **OPŠTI PREGLED REPLIKACIJE**
- DNK molekuli su superspiralizovani
- Replikacioni početak
- Replikativna viljuška; dve replikativne viljuške – bidirekcionni proces
- Novosintetisani lanci u 5'-3' pravcu
- Vodeći i zaostajući (Okazakijevi fragmenti) lanac – semidiskontinuirani proces
- **Replizom**



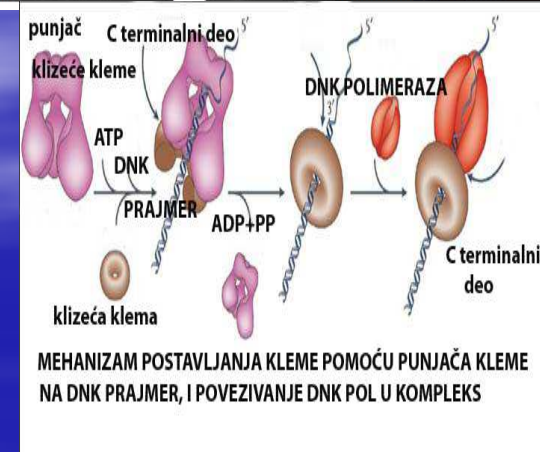
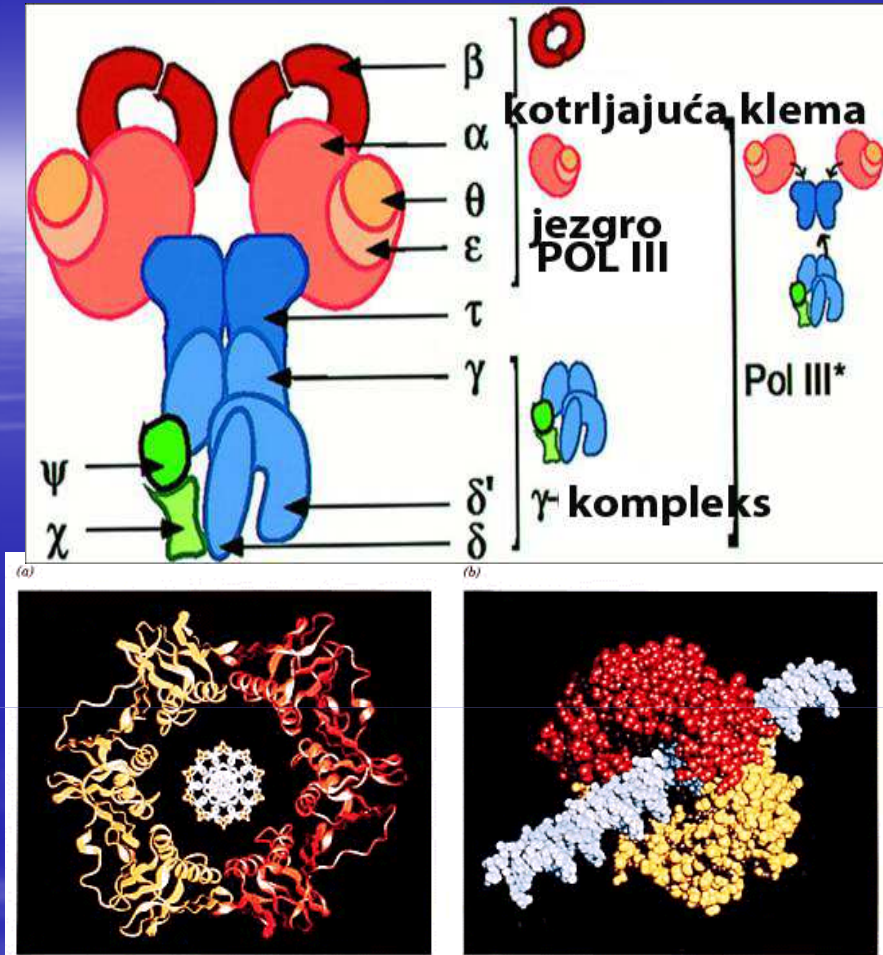
ENZIMI REPLIKACIJE

- DNK POLIMERAZE (5 kod prokariota, a oko 15 kod eukariota)
- Kronebrg 1958. g. izolovao iz E. coli DNK polimerazu I
 - 1 polipeptidni lanac
 - Ne započinje novi lanac, već dodaje nukleotide na prajmer (polimerazna aktivnost); ugrađuje 20tak nukleotida (procesivnost - broj nukleotida koji polimeraza ugrađuje u kontinuitetu kada se veže za prajmer-matricu); efikasnost (broj ugrađenih nukleotida u jedinici vremena – 10/s)
 - Aktivna samo u prisustvu matrice
 - Egzonukleazna aktivnost u 3'-5' i 5'-3' smeru
 - Tri aktivna centra
 - Kinetička selekcija – polimerazna reakcija se odvija samo u prisustvu komplementarnog nukleozid trifosfata kao supstrata; prepoznaju geometriju ispravno sparenog baznog para (A-T, G-C)
- DNK polimeraza II, IV, V
 - Polimerazna aktivnost u smeru 5'-3'
 - Egzonukleazna aktivnost samo u 3'-5' smeru
 - Uloga u reparaciji oštećene DNK



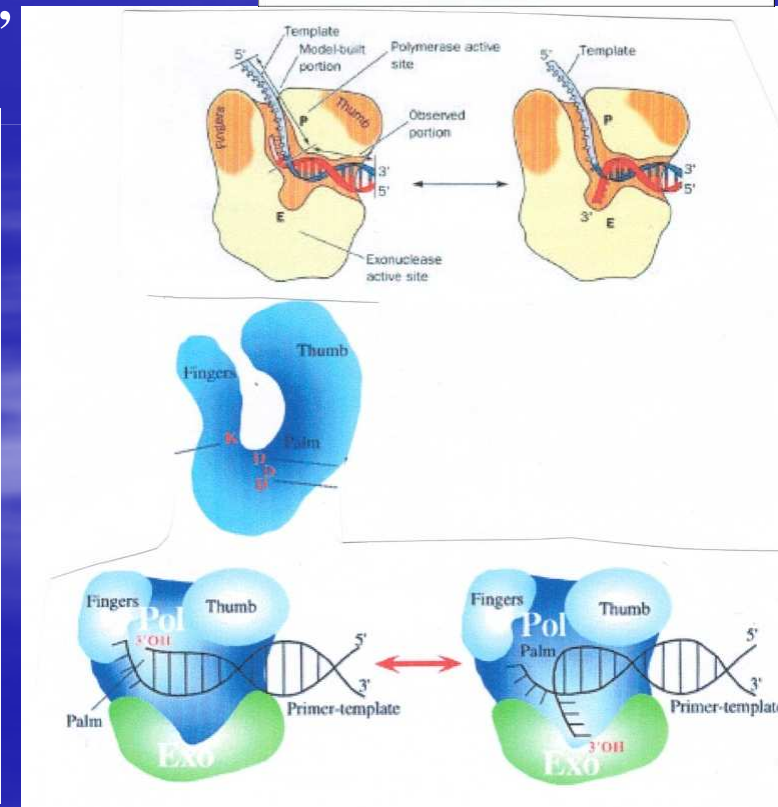
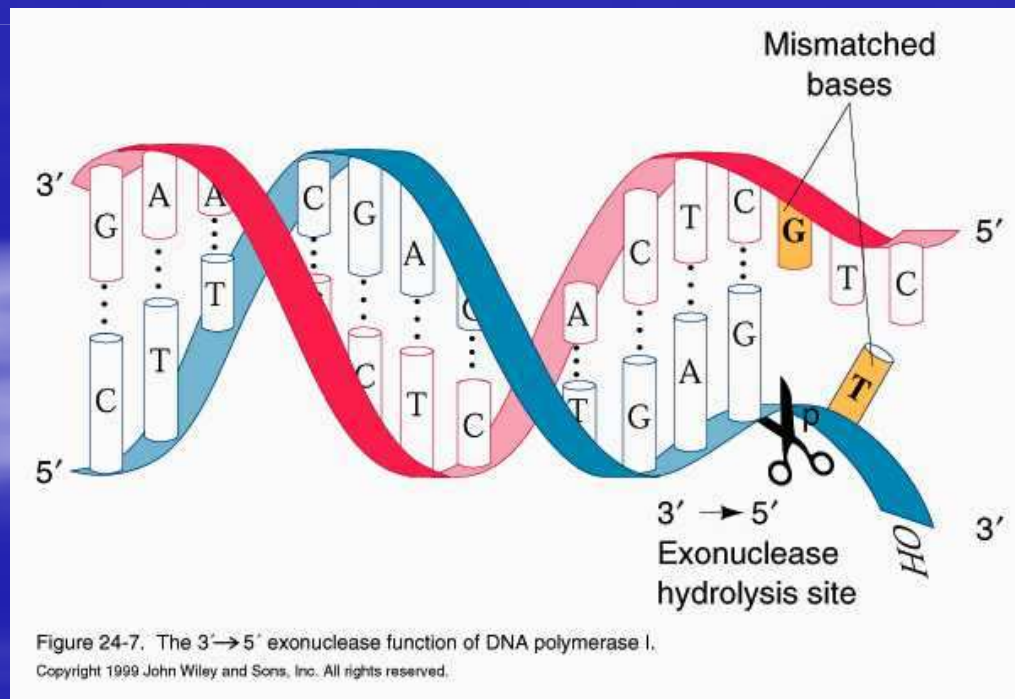
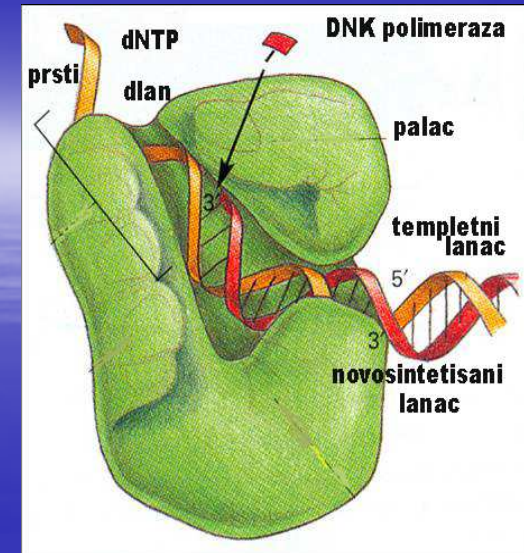
- **DNK polimeraza III (replikaza)**

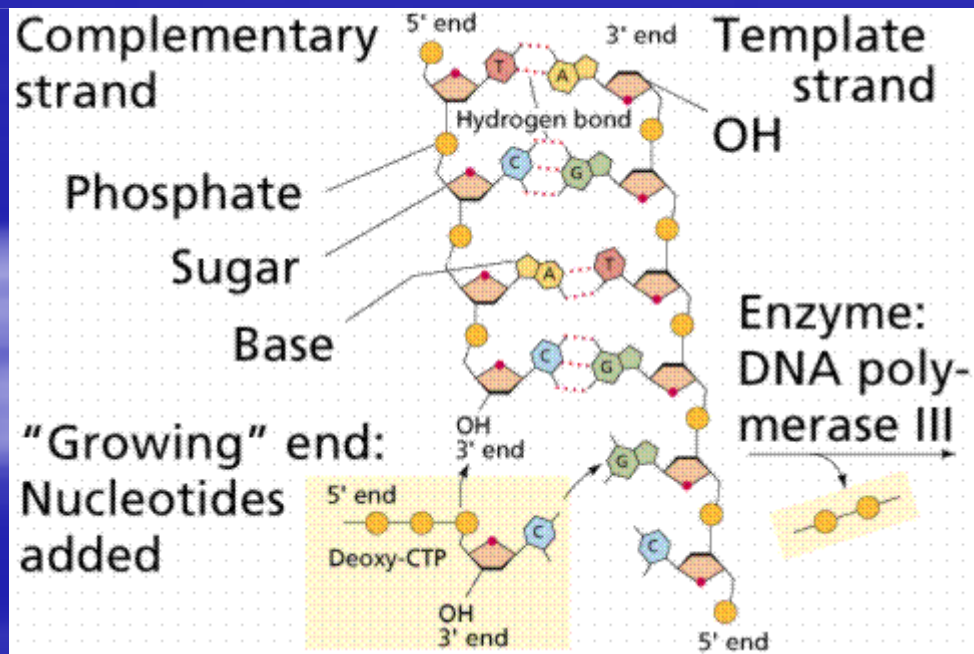
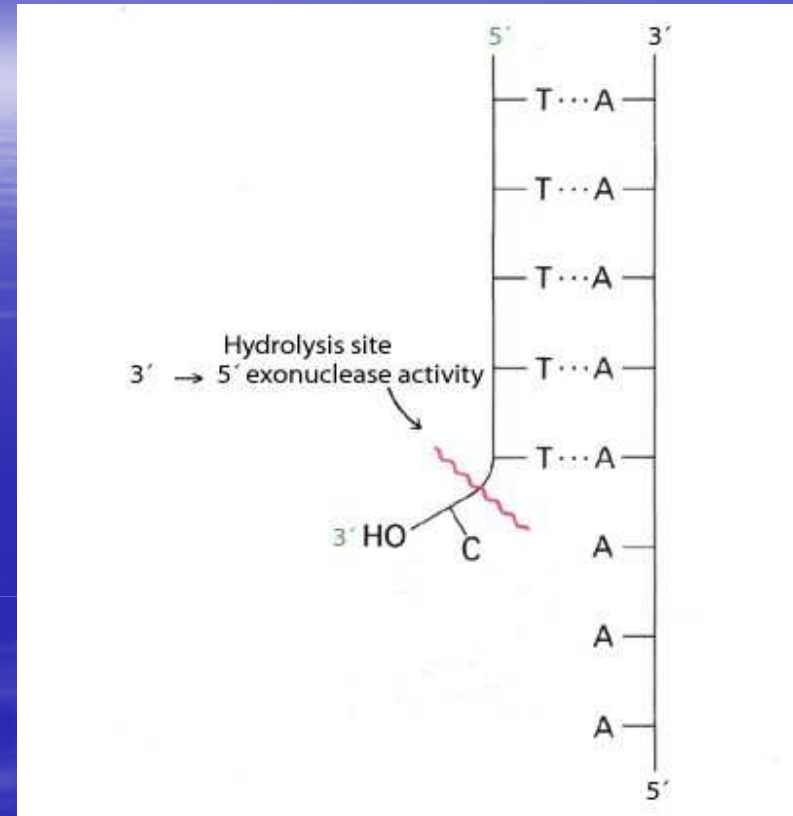
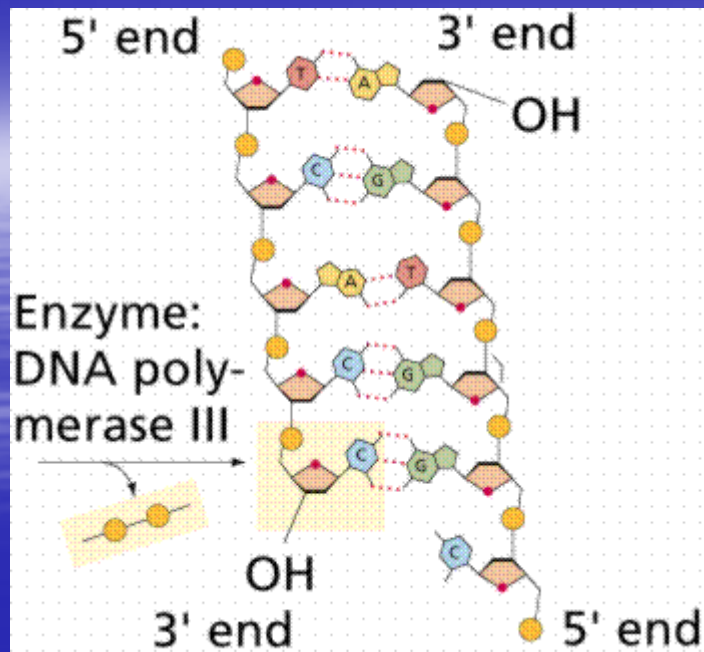
- Sinteza najvećeg dela DNK, ugrađuje više hiljada nukleotida u kontinuitetu (procesivnost), a može da ugradi 1000 nukleotida/s (efikasnost)
- Multimerni kompleks, oko 10 vrsta subjedinica
- Jezgro od α (polimerazna akt.), ϵ (egzonukleazna akt.) i θ
- Subjedinica β je dimer prstenastog oblika sa centralnom šupljinom (klizeća klema) gde prolazi DNK
- γ kompleks (pet proteina) – nosač klizeće kleme – otvara prestenastu strukturu klizeće kleme i vezuje/odvaja je za/od DNK lanca;
- Za klizeću klemu se vezuje γ kompleks ili jezgro DNK polimeraze III
- τ protein (deo γ kompleksa) vezuje dve DNK polimeraze III (polimerazu vodećeg i polimerazu zaostajućeg lanca)



- **DNK polimeraza III (replikaza)**

- Egzonukleazna aktivnost u 3'-5' smeru – visoka tačnost replikacije
- Model šake (dlan - polimerazna i egzonukleazna aktivnost i prepoznavanje ispravno sparenog baznog para; prsti – prolazi jednolančani deo matičnog lanca, omogućavaju zatvaranje ispravnog baznog para; palac – održava položaj prajmera, odnosno nosintetisane DNK)

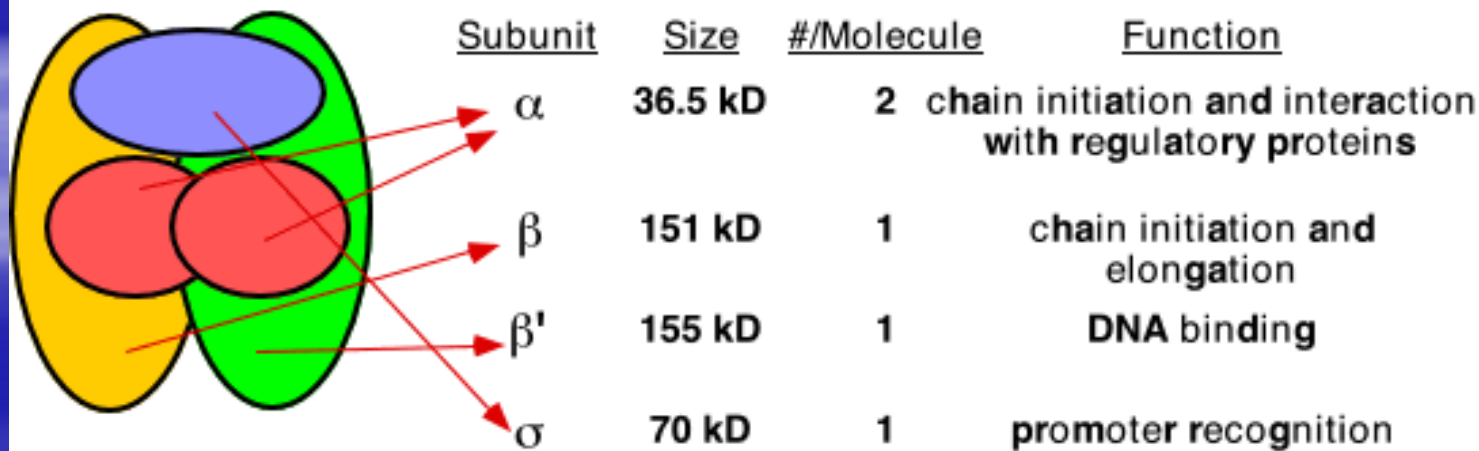




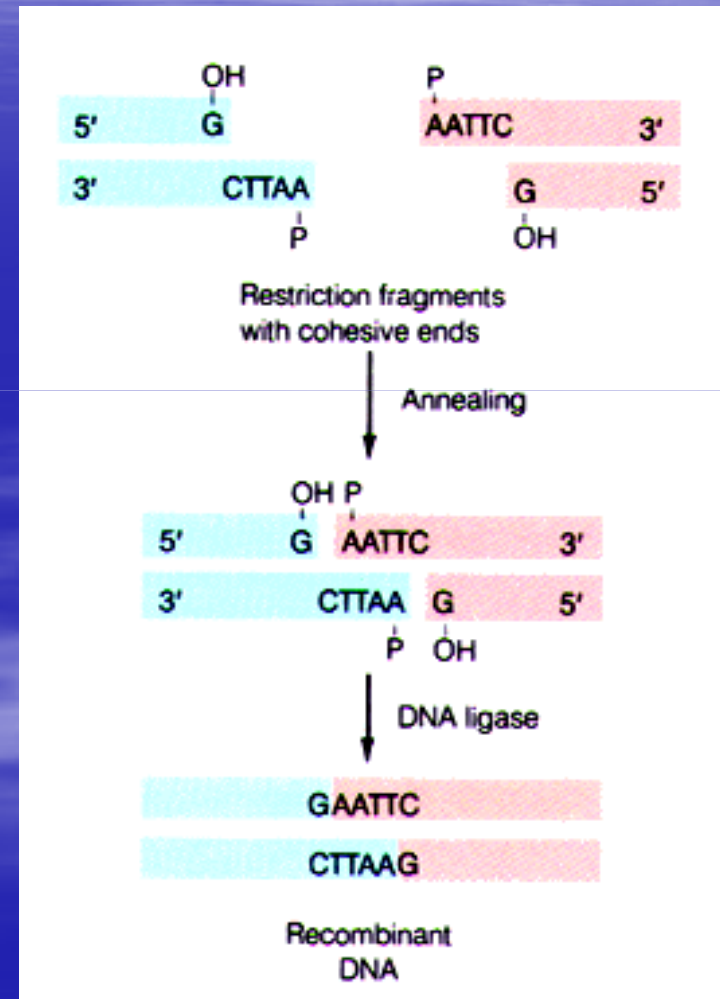
- **RNK polimeraza i primaza**

- Prajmeri – oligoribonukleotidi od 10-60 nukleotida spareni sa DNK lancem matricom; slobodna 3'OH grupa
- Primaza povezuje ribonukleoziddifosfate; započinje sintezu novog lanca
- RNK pol. i primaza sintetišu prajmere za vodeći lanac, a samo primaza za Okazakijeve fragmente

**Prokaryotic RNA Polymerase:
Holoenzyme Enzyme**

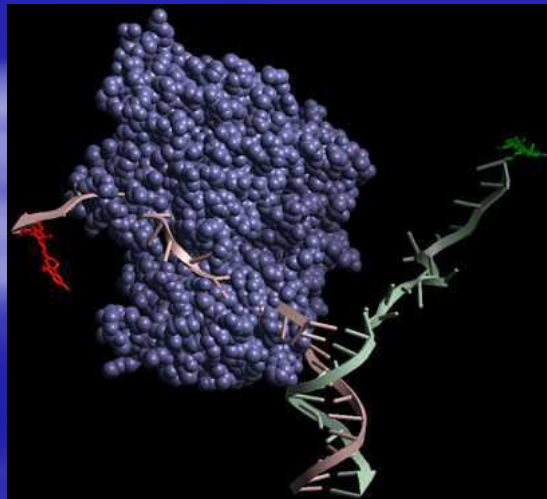


- Rnaza H – specifično prepoznaje i uklanja RNK u hibridu DNK-RNK
- DNK ligaza
 - Povezuje 3'-OH kraj jednog O. fragmenta sa 5'-PO₄ susednog
 - Supstrat dvolančana DNK
 - Energija hidrolize NAD⁺ (prokarioti) i ATP (eukarioti)



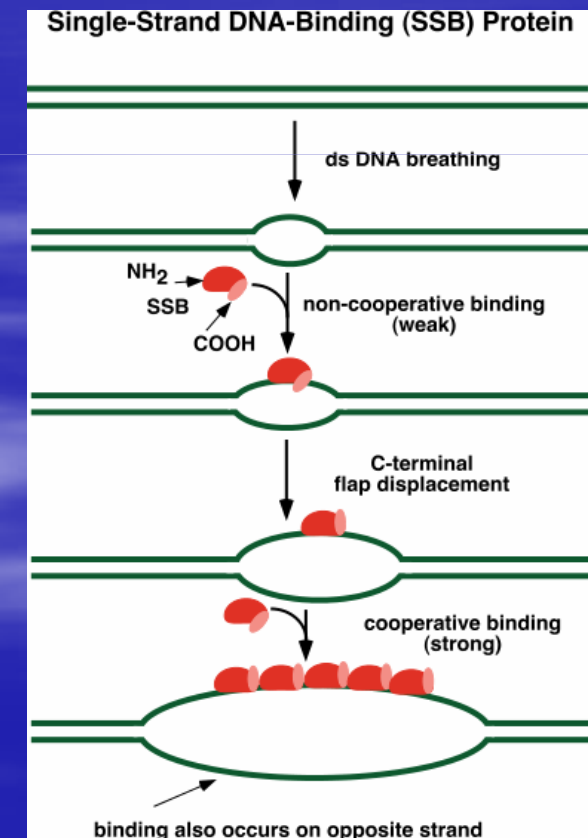
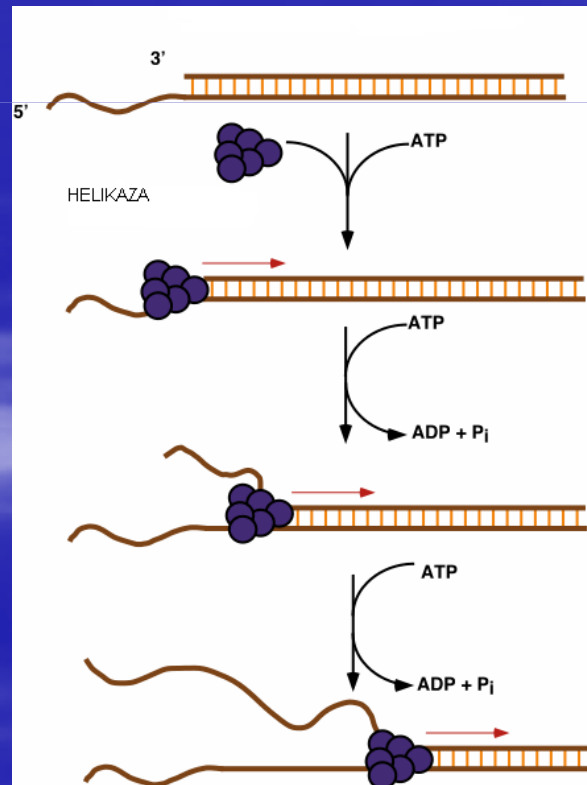
■ DNK helikaze

- Mašine na ATP pogon
- Raskidaju H-veze, otvaranje dvolančane zavojnice, kreću se u smeru 5'-3' i 3'-5'
- 12 različitih enzima (DnaB, DnaC)
- τ protein vezuje istovremeno helikazu i jezgro DNK polimeraze III

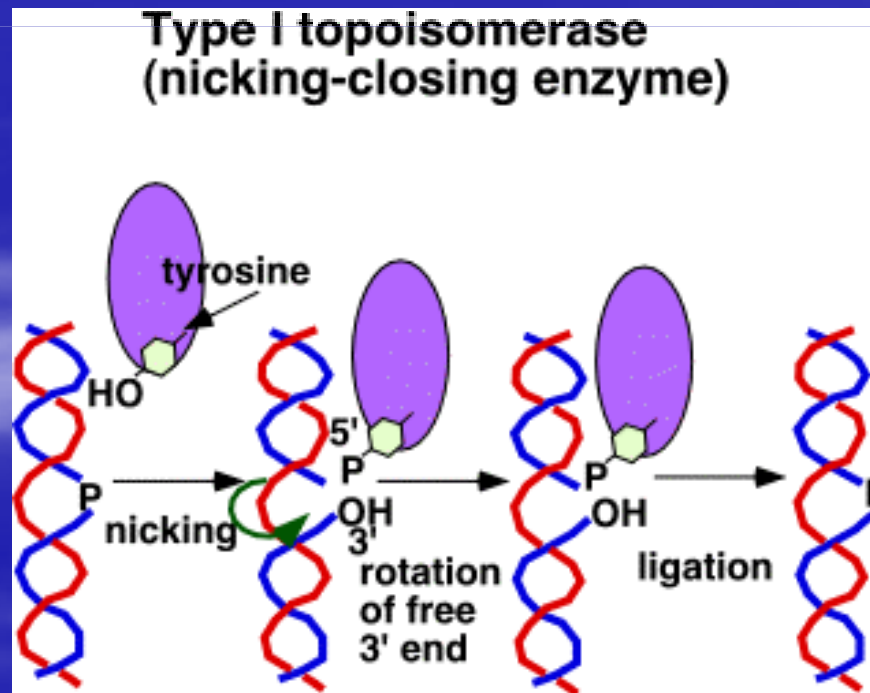


■ SSB proteini (proteini koji destabilizuju dvolančanu zavojnicu)

- Vezuju se kooperativno za pojedinačne lance DNK

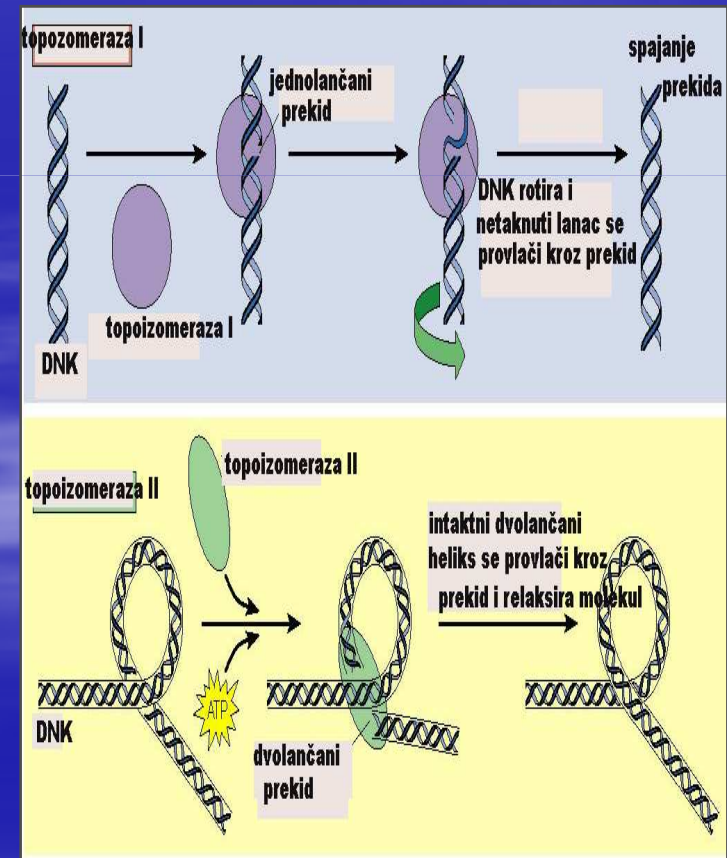
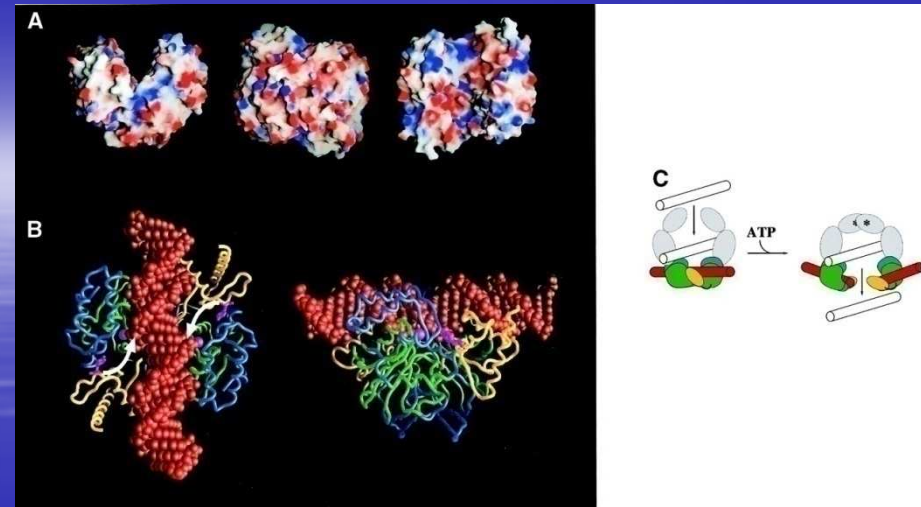


- DNK topoizomeraze - menjaju topografiju molekula DNK
- DNK topoizomeraze tipa I
 - Reverzibilne endonukleaze koje uklanjaju supernavoje dvolančane zavojnice DNK, oslobađajući molekul tenzije uvrtnanja
 - Preseca jedan lanac DNK prekidanjem fosfodiesterne veze, vezuje se za njega i kroz “prolaz” provlači drugi lanac; energija iz prekinute veze za stvaranje nove fosfodiesterne veze



DNK topoizomeraza II

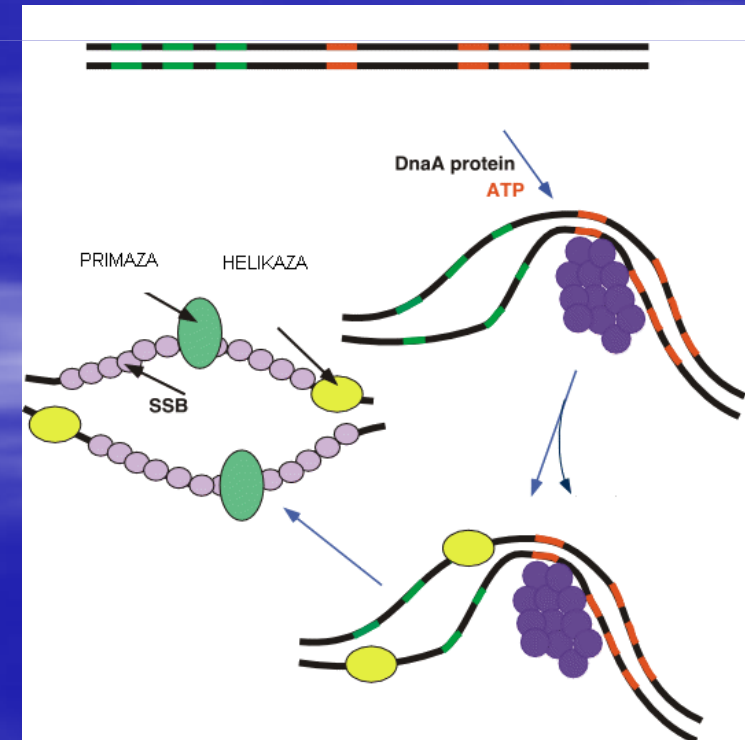
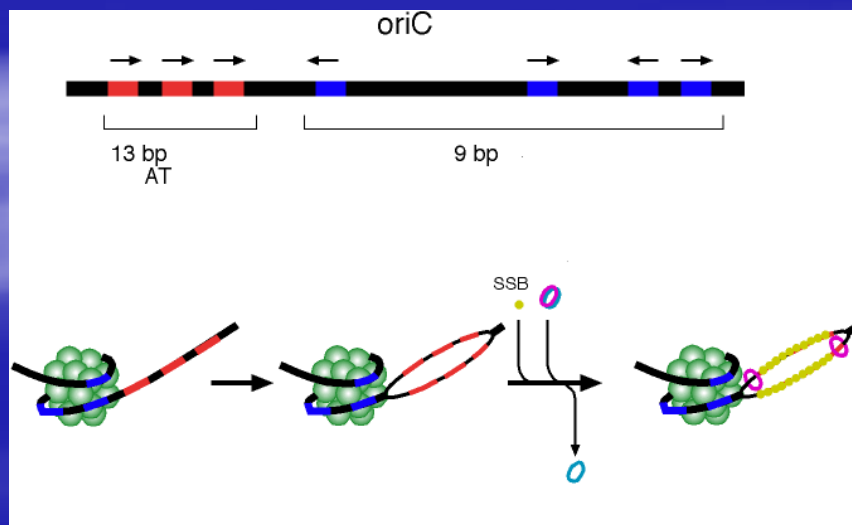
- Bakterijska (DNK žiraza) – slobodnu energiju hidrolize ATP prevodi u energiju uvrtnanja molekula DNK, umetanje negativnih supernavoja
- Omotavanje dvolančane DNK (oko 200 bp) oko enzima, raskidanje oba lanca (uz ATP), 5' krajevi vezani za enzim, kroz “prolaz” enzim provlači segment DNK u pravcu negativnog supernavoja, prekinuti krajevi se ponovo spajaju
- Novobiocin i nalidixic
- Eukariotske DNK topoizomeraze II – relaksiraju molekul DNK uklanjajući supernavoje DNK
- Pakovanjem DNK sa histonima uvode se negativni supernavoji, a topoII uklanja stvorene pozitivne supernavoje.



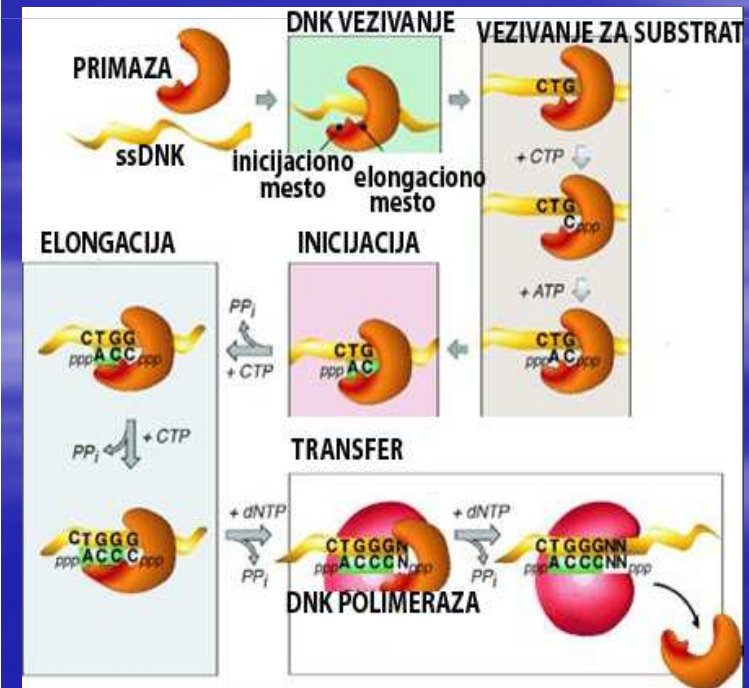
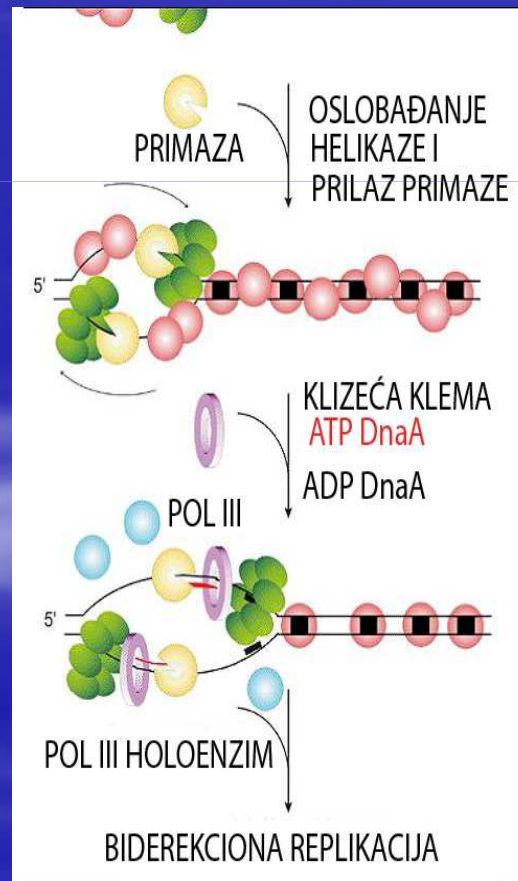
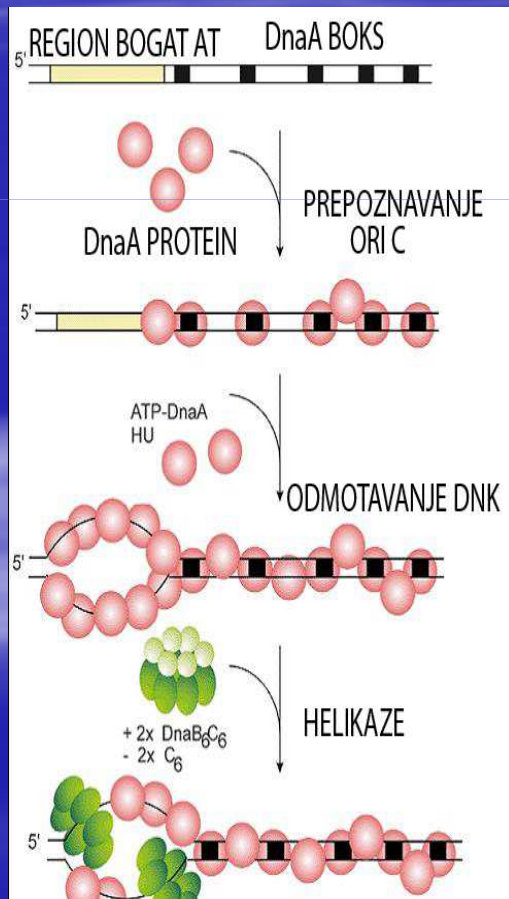
MEHANIZAM REPLIKACIJE KOD PROKARIOTA

■ INICIJACIJA

- Replikon (segment DNK koji se replikuje sa jednog mesta inicijacije replikacije); replikator (sekvence DNK gde počinje replikacija); inicijator (proteini koji prepoznaju replikator)
- Mesta početka replikacije – lokus *oriC*, 250 bp
- 4 x 9 bp za koje se vezuje protein *DnaA* (oko 30 subjedinica), a uz pomoć HU proteina DNK se obavlja oko *DnaA* = inicijacioni kompleks
- 3 x 13 bp (u blizini lokus *oriC*), dosta A=T, olakšano razdvajanje lanaca DNK
- *DnaA* protein katalizuje hidrolizu ATP i energiju koristi za razdvajanje lanaca → formira se otvoreni kompleks
- Proteini *DnaC* (nosač helikaze) se vezuju za suprotne krajeve otvorenog kompleksa, vezuju i helikaze (*DnaB*) → preinicijacioni kompleks

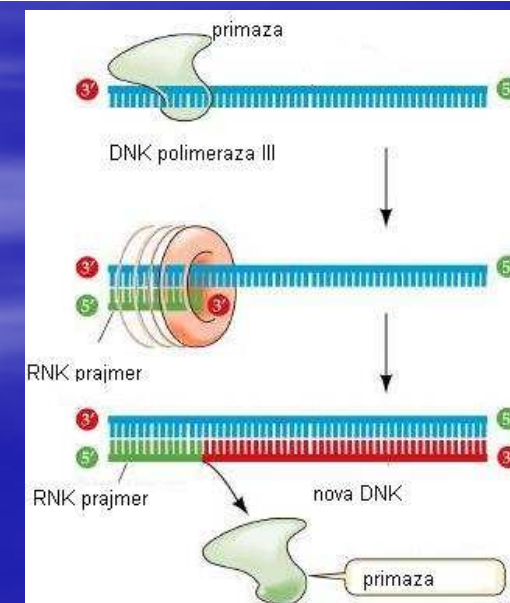
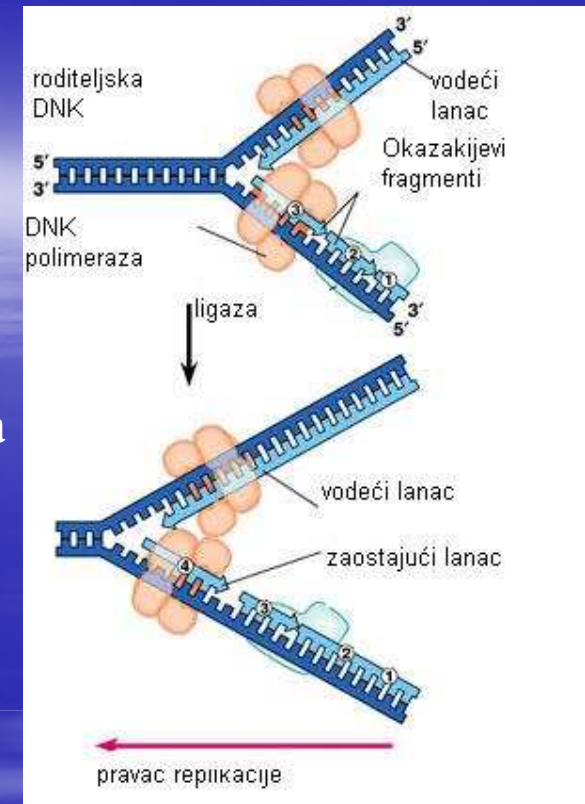


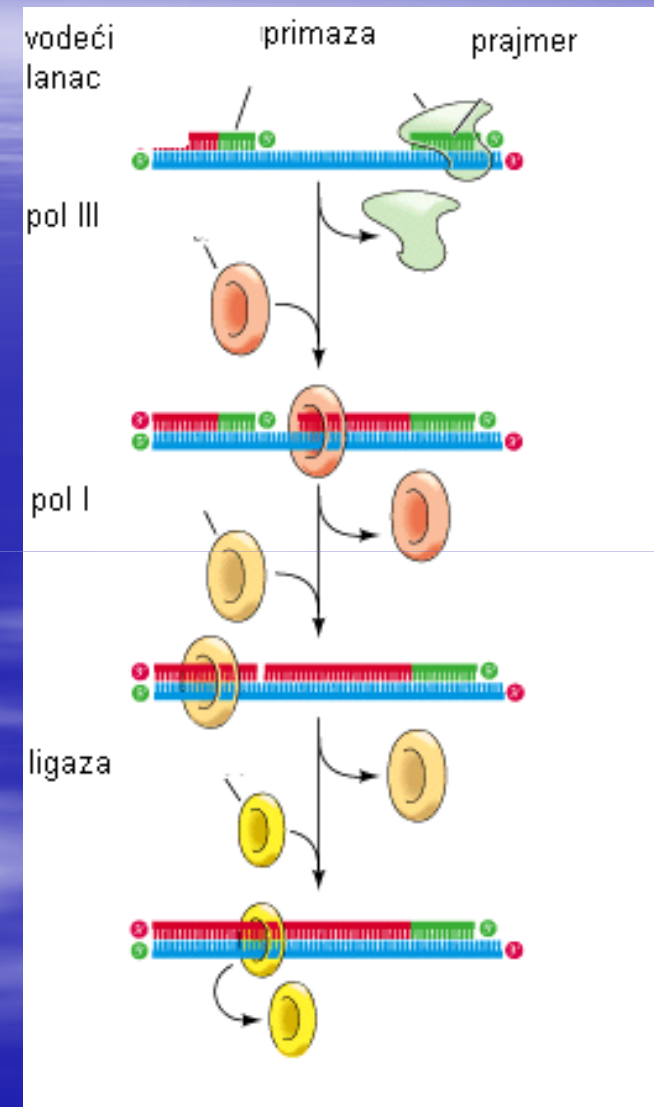
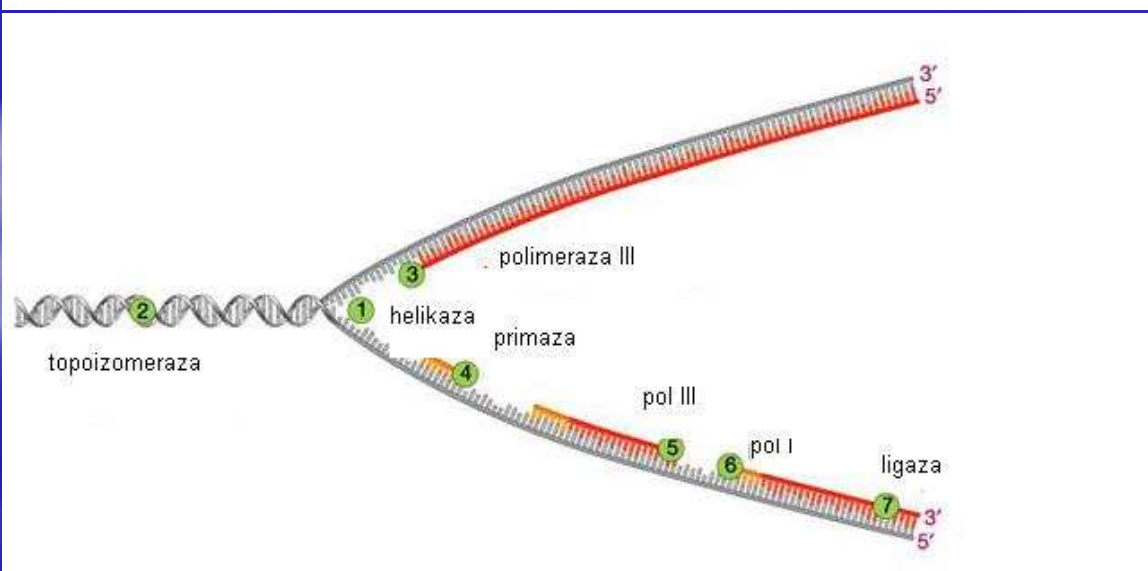
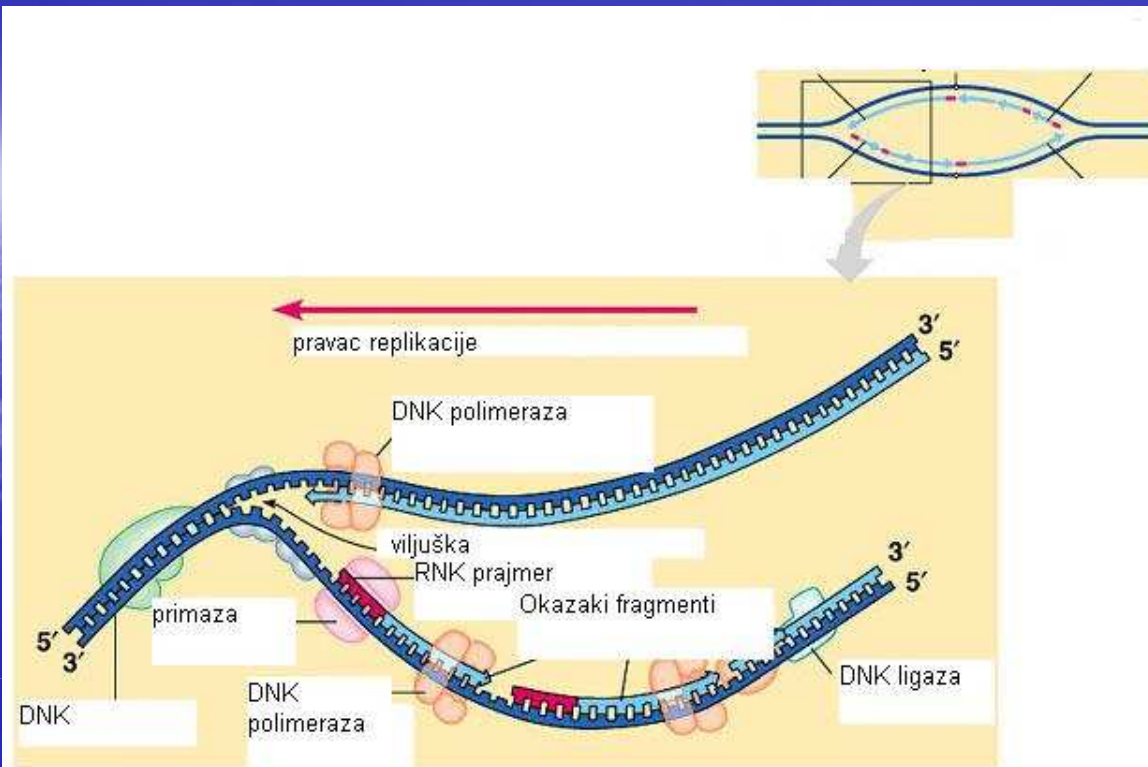
- **Formiranje dve replikativne viljuške**
- **Helikaze vezuju najpre primaze (sintetišu prajmere na vodećim lancima), a zatim se za hibrid prajmer-matrica vezuju nosači klizećih klema, klizeće kleme i jezgro enzima DNK polimeraze III**
- **Za svaku replikativnu viljušku se vezuje po jedan holoenzim DNK polimeraze III (za vodeće lance); holoenzim sadrži dve kopije DNK polimeraze III**
- **Nakon toga se sintetišu prajmeri na zaostajućim lancima, vezuju se se klizeće kleme i jedna od dve DNK polimeraze II iz holoenzima**



■ ELONGACIJA

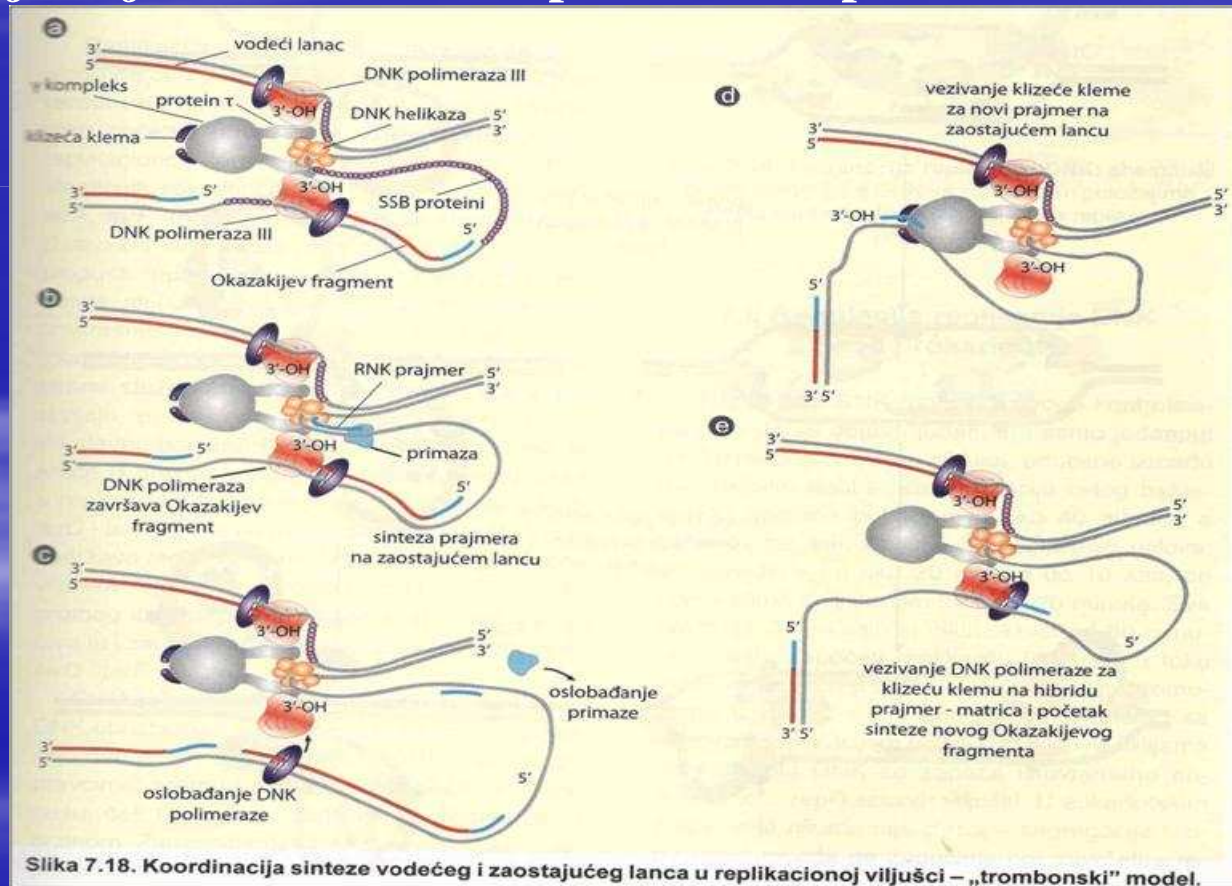
- Napredovanje replikativnih viljuški ide u oba pravca
- Helikaze, SSB proteini, DNK topoizomeraze
- Sinteza vodećeg i zaostajućeg lanca je istovremena; dimer holoenzima DNK pol III
- Vodeći lanac: sinteza prajmera – RNK polimeraza (aktivira primazu) i primaza (sintetiše prajmere)
- DNK polimeraza III nastavlja sintezu lanca
- Zaostajući lanac: u fragmentima, polimerizacija u pravcu suprotnom od kretanja replikativne viljuške
- Primozom – primaza, helikaze, pet različitih proteina, kreće se u 5'-3' smeru
- Smer sinteze prajmera i Okazakijevih fragmenata je suprotan smeru kretanja primozoma
- Okazakijevi fragmenti se sintetišu uključivanjem sledećih enzima: Primaza, DNK pol III, RNazaH, DNK pol I, DNK ligaza
- Dužina Okazakijevih fragmenta kod bakterija iznosi od 1000-2000 nukleotida, a kod eukariota od 100-400 nukleotida.





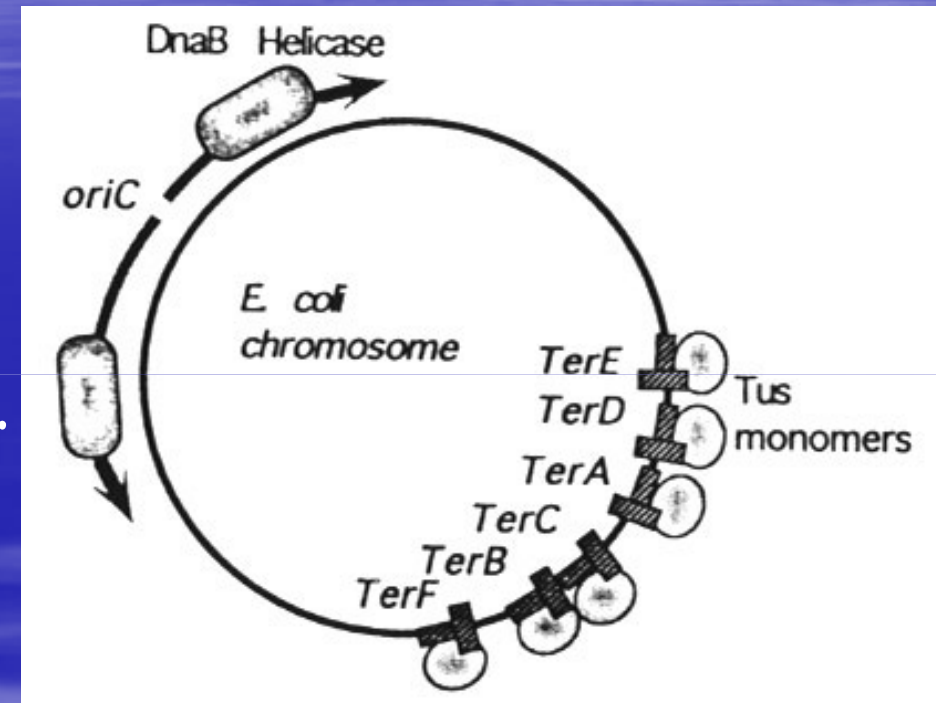
■ Trombonski model replikacije

- Vodeći i zaostajući lanac se sintetišu istovremeno
- Replizom; protein-protein interakcije (helikaza sa primazom / DNK polimerazom se povezuje preko τ proteina)
- Dve DNK polimeraze su povezane u replikativnoj viljušci
- Petlja matrice zaostajućeg lanca (formira se, raste, nestaje)
- Smenjivanje aktivnosti DNK polimeraze i primaze na zaostajućem lancu



■ TERMINACIJA

- Replikativni terminus (350 bp), nasuprot *oriC*
- 6 x 23 bp (*Ter E, TerD, TerA, TerF, TerB i TerC*), propuštaju RV u terminacioni region, ali sprečavaju izlazak iz njega
- Protein *Tus* vezuje se za *Ter* segmente, interaguje sa helikazom i sprečava dalje razdvajanje DNK lanaca
- DNK topoizomeraza II odvaja dva novonastala kružna molekula DNK

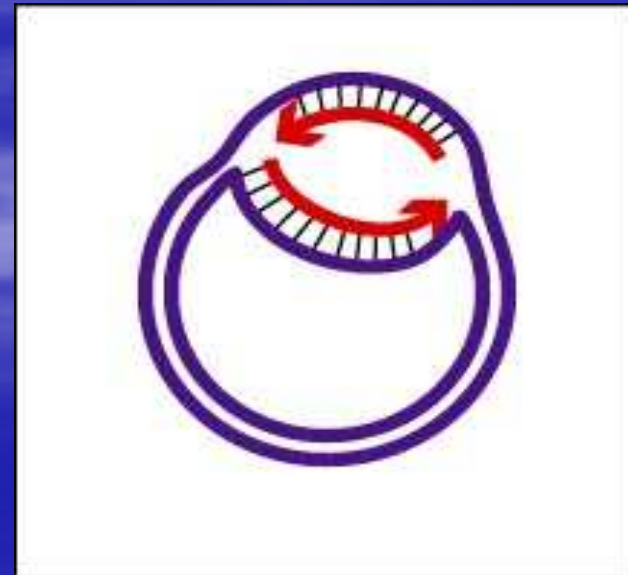
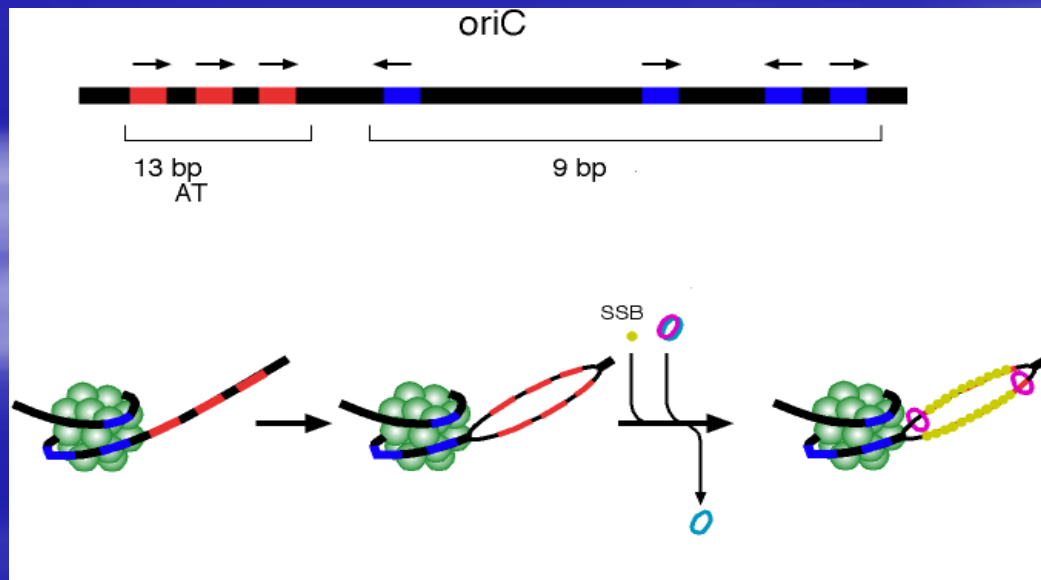


■ REGULACIJA REPLIKACIJE KOD PROKARIOTA

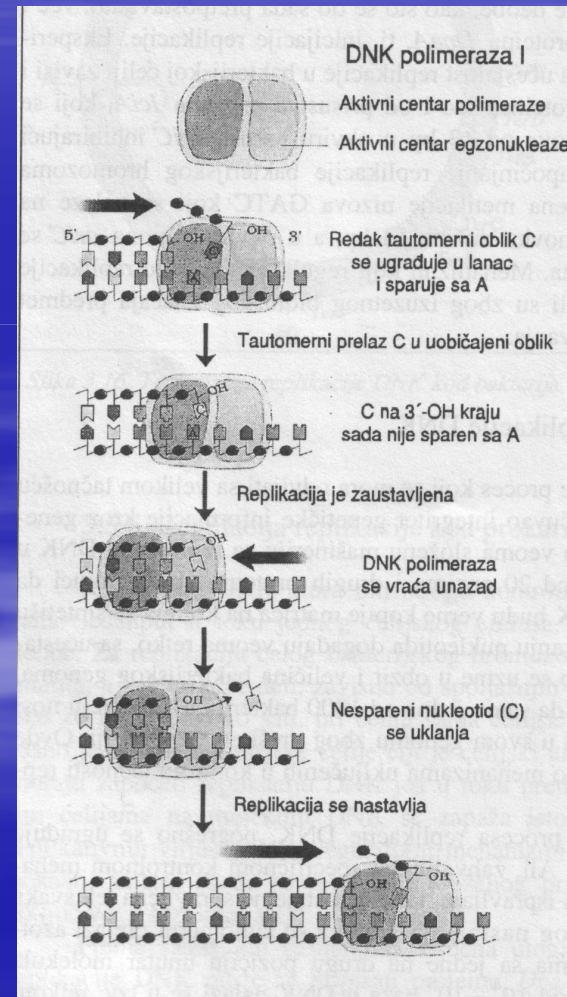
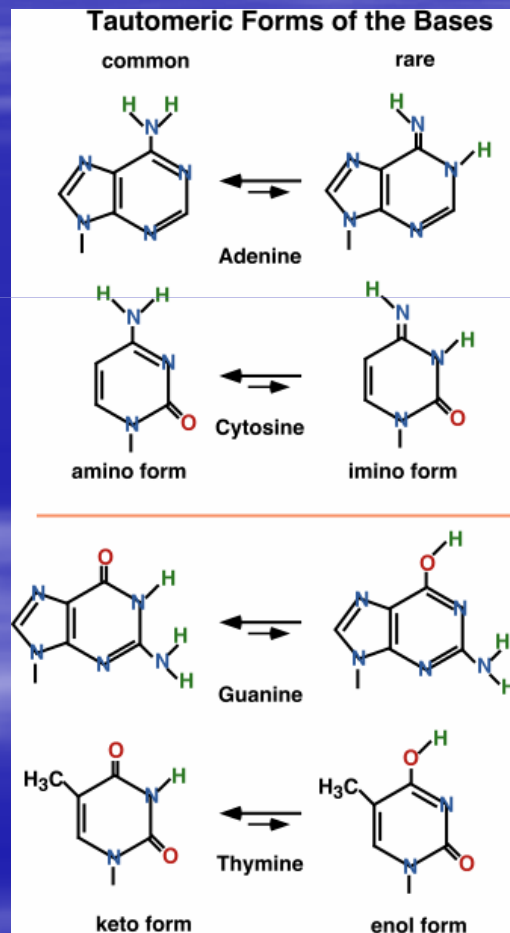
■ 40 min za replikaciju celog hromozoma

■ Regulacija na nivou inicijacije: (1) protein *DnaA*, (2) metilacija nizova nukleotida u *oriC*

- $DnaA + ATP \rightarrow DnaA-ADP$ → interakcija sa kiselim fosfolipidima plazme gde je vezan hromozom
- Protein *IciA* vezuje se za ponovljene nizove od 13 bp u *oriC* i inhibira inicijaciju replikacije
- Stepenn metilacije GATC na početku ponovaka od 13 bp (Dam metil transferaza) – protein SeqA se vezuje za hemimetilovan niz – inhibicija replikacije



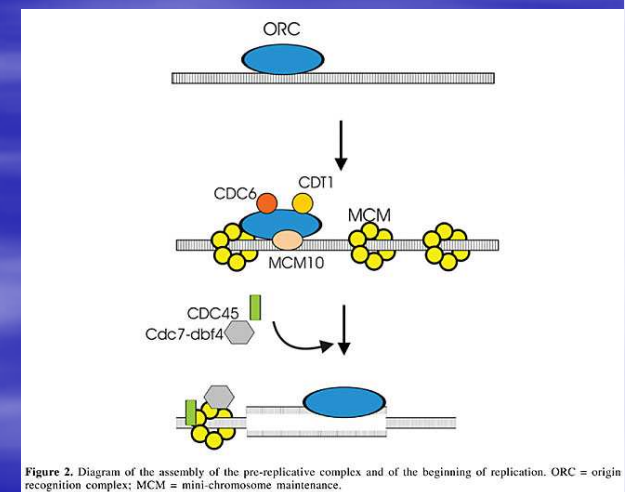
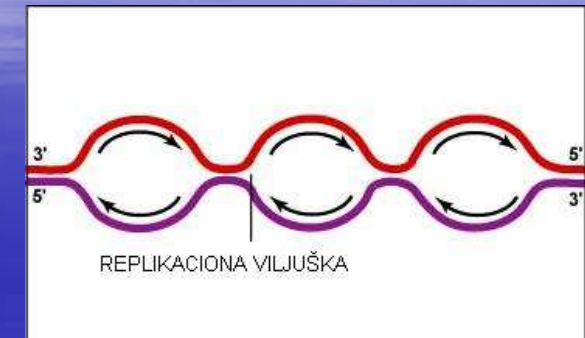
- **TAČNOST REPLIKACIJE DNK**
- Greške pri ugrađivanju novih nukleotida su 10^{-10}
- 1. U toku replikacije pogrešno se ugradi jedan od 10^4 nukleotida (tautomerni prelazi azotnih baza); DNK polimeraza III svojom egzonukleaznom aktivnošću (3'-5' smer) ispravlja greške



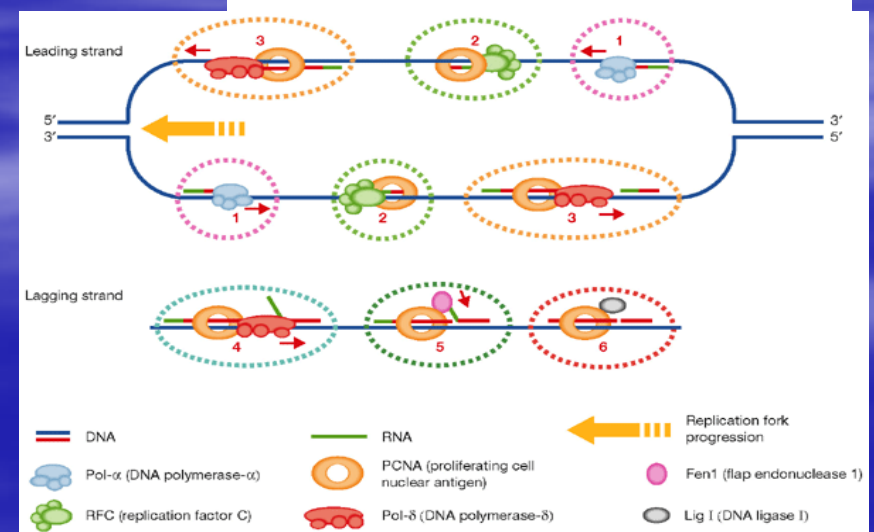
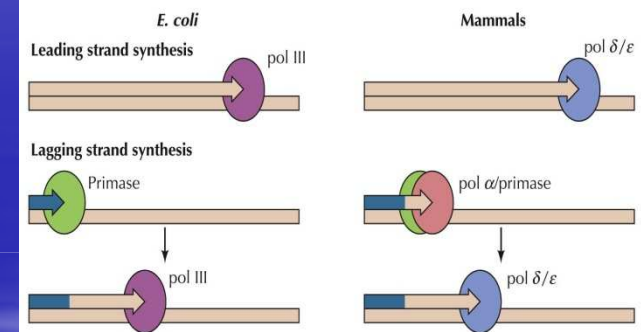
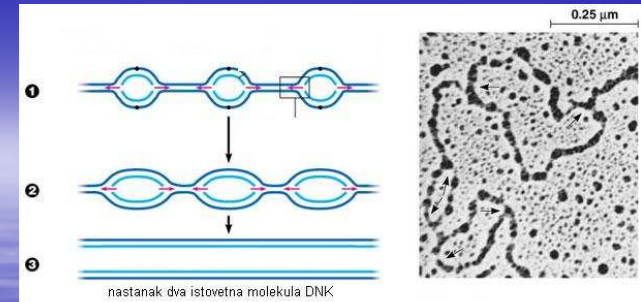
- **2. Mehanizam interakcije DNK polimeraze sa dezoksiribonukleozid 5'-trifosfatima**
 - Prva faza: nukleotid se sparuje sa odgovarajućim nukleotidom u lancu matrici, enzim neaktivan (otvorena konformacija)
 - Druga faza: enzim proverava da li je novi nukleotid pravilno sparen, ugrađuje ga (konformaciona promena enzima) ili odbacuje (izostaje k.p.e.)
- **3. Uloga prajmera: DNK pol I iskraja prajmer; smanjena verovatnoća grešaka na početku lanca**
- **4. Semidiskontinuiranost replikacije – problemi sa sintezom lanca u 3'-5' smeru**
 - Nova polimeraza
 - Terminalni nukleotid u obliku nukleozid trifosfata
 - Ispravljanjem pogrešno sparenog nukleotida ostajala bi slobodna 5'-OH ili 5'-PO₄ grupa, koje ne mogu da obezbede energiju za sledeću fosfodiesterarsku vezu

MEHANIZAM REPLIKACIJE KOD EUKARIOTA

- DNK molekuli veći od prokariotskih, vezani za proteine
- Replikacija je semikonzervativna, semidiskontinuirana, bidirekciona
- Replikacija počinje istovremeno na mnogo mesta u hromozomu i završava se za nekoliko sati (više replikona)
- ARS (*autonomously replicating sequences*) elementi - mesta početka replikacije, oko 300 bp sa evolutivno očuvanim nizovima nukleotida; u kvascu oko 400 ARS
- Replikativni počeci se nalaze u intervalu 50-300 kb - genom čoveka ima 30000 rep. poč.
- Replikon – region ARS gde započinje i odvija se replikacija; replikator i inicijator
- Sukcesivno aktiviranje ARS
- Regulatorni proteini
- Inicijator - kompleks od šest proteina koji prepoznaje oridžin (ORC - *origin recognition complex*).
- ORC prepoznaje konzervativnu sekvencu u replikatoru kvasca (A element), i manje konzervisan B region; ORC se vezuje i hidrolizuje ATP; ORC regrutuje replikacione proteine do replikatora.



- **DNK polimeraze - oko 15 vrsta (obeležene grčkim alfabetom).**
 - Replikacija mitohondrijske DNK (γ)
 - Reparacija oštećene DNK ($\beta, \theta, \lambda, \kappa, \mu$)
 - Replikacija hromozomske DNK (α, δ i ϵ)
 - **DNK pol α** od više subjedinica, primaza, polimeraza; sinteza lanca u 5'-3' smeru; nema egzonukleaznu aktivnost; niska procesivnost
 - glavne replikaze - **DNK pol ϵ** (vodeći lanac) i **DNK pol δ** (Okazakijevi fragmenti); neograničena procesivnost; 3'-5' egzonukleazna aktivnost
 - + **PCNA** (*proliferating cell nuclear antigen*) – klema, egzonukleaza
 - DNK pol δ iseca prajmer;
 - Replikacioni faktori :
 - **RFA** (uloga SSB proteina) i
 - **RFC** (nosač klizeće kleme PCNA; formiranje aktivnih replikativnih kompleksa)

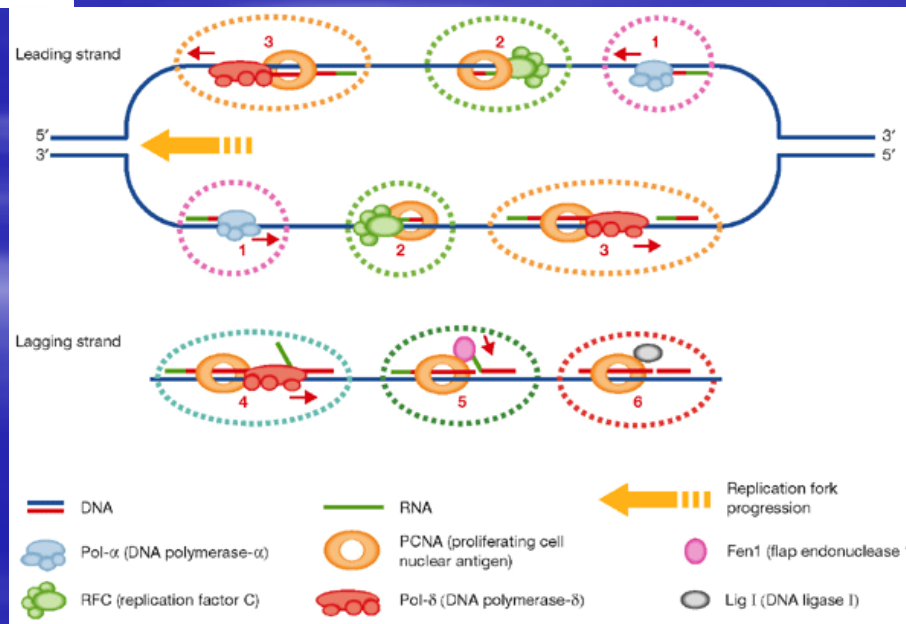
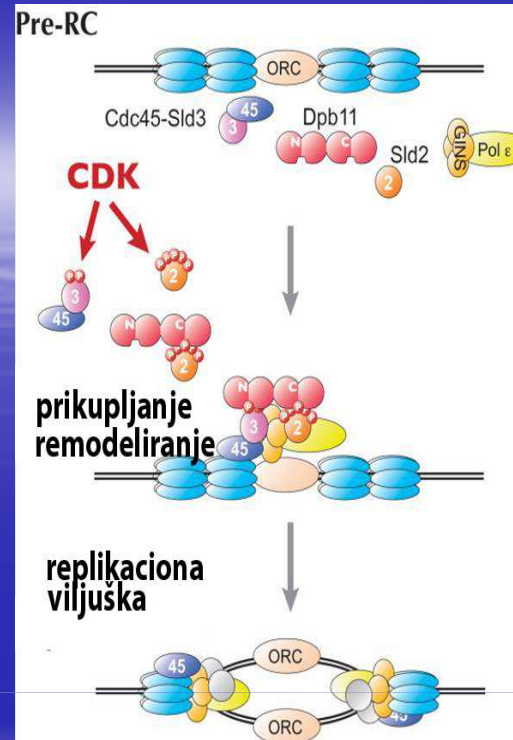
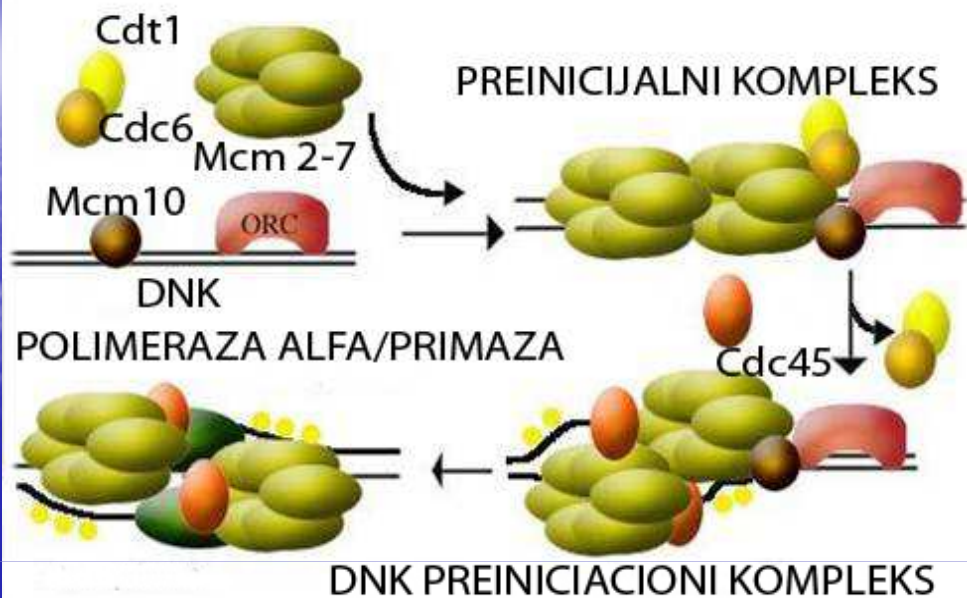


Prokariotske DNK polimeraze	Eukariotske DNK polimeraze
Polimeraza I Uklanja početnicu, DNK reper	Polimeraza α Sinteza prajmera za vreme DNK replikacije
Polimeraza II DNK reper	Polimeraza β Osnovni ekscizionii reper
Polimeraza III Replikaza	Polimeraza γ Mitohondrijalna DNK replikacija i reper
Polimeraza IV DNK reper, TLS (<i>Trans Lesion Synthesis</i>)	Polimeraza δ DNK replikacija, osnovni ekscizionii reper
Polimeraza V TLS	Polimeraza ϵ DNK replikacija, osnovni ekscizionii reper
	Polimeraza θ DNK reper kroslinkinga
	Polimeraza ζ TLS
	Polimeraza λ Reper vezan za mejozu
	Polimeraza μ Somatske hipermutacije
	Polimeraza κ TLS
	Polimeraza η TLS

Eukariotski hromozomi se replikuju samo jednom u ćelijskom ciklusu; inicijacija replikacije

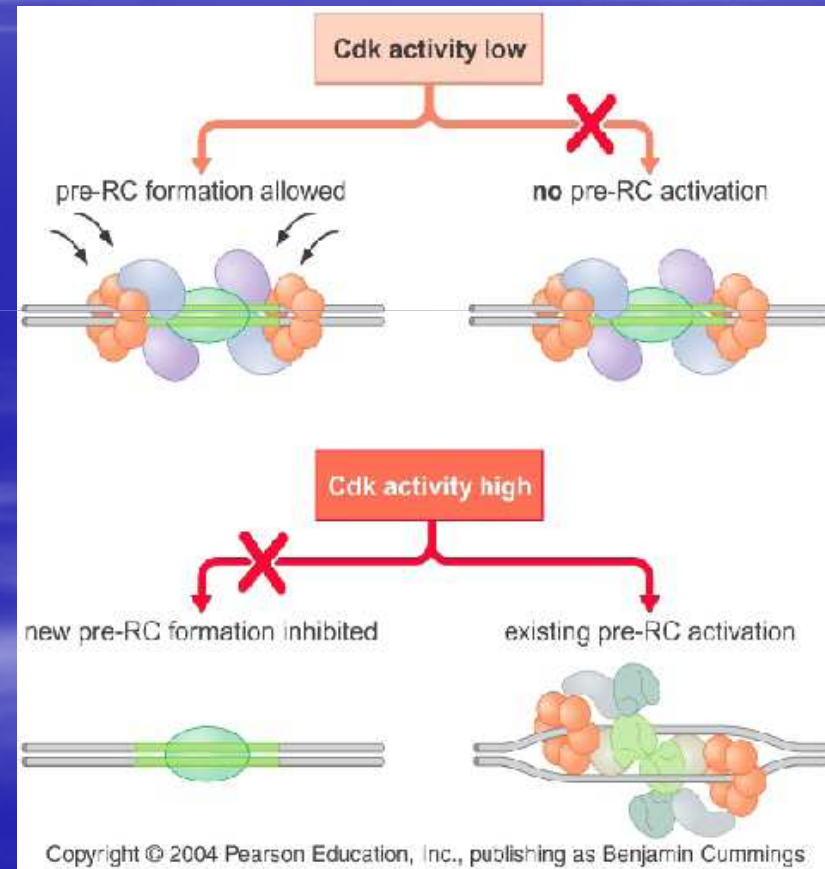
- Hromozomalna DNK replikacija se dešava za vreme S faze ćelijskog ciklusa; svaki bazni par svakog hromozoma replikuje se samo jednom u toku eukariotske ćelijske deobe.
- **Potrebni uslovi**
 - dovoljan broj replikatora mora biti aktiviran na svakom hromozomu
 - replikatori nakon replikacije, bilo da su učestvovali u inicijaciji replikacije ili da su pasivno replicirani, moraju da ostanu inaktivni do sledeće ćelijske deobe.
- **1. Replikatorska selekcija - proces identifikacije sekvence koja će inicirati replikaciju (u G1 fazi); spajanje multiproteinskog kompleksa na svakom replikatoru u genomu i formiranje pre-replikativnog kompleksa;**
- **2. Aktivacija pojedinih replikatora u S fazi - DNK rasplitanje i regrutacija DNK polimeraza.**
- **Pre-replikativni kompleks (preRC) upravlja inicijacijom replikacije kod eukariota.**
 - prepoznavanje replikatora od strane inicijatora (ORC); ORC od 6 proteina, vezuje ATP, prepoznaje replikator i regrutuje druge proteine za replikaciju.
 - ORC regrutuje dva proteina Cdc6 i Cdt1 (punjači helikaze).
 - ORC, Cdc6 i Cdt1 regrutuju eukariotske helikaze u viljušci (Mcm2-7 kompleks).
 - Formiranje preRC ne mora da dovede obavezno do otvaranja originalne DNK.
- **PreRC inicira replikaciju preko dve kinaze Cdk i Ddk; inaktivne u G1, aktivne u S fazi; aktivirane kinaze se vezuju za preRC i replikatorne proteine i fosforilišu ih.**
- **Novi proteini: tri eukariotske DNK polimeraze i brojni proteini potrebni za njihovu regrutaciju; DNK pol ϵ i δ se vezuju, a zatim se vezuje DNK pol α –primaza; sinteza prvog RNK prajmera; punjača klizeće kleme RF-C koji vezuje klizeću klemu PCNA oko kompleksa prajmer matrica.**

INICIJACIJA REPLIKACIJE



Regulacija replikacije kod Eukariota

- Regulacija formiranja i aktivacije preRC putem ciklin zavisne kinaze Cdk-2;
 - (i) Cdk-2 su potrebne za aktivaciju preRC da bi započela DNK replikacija;
 - (ii) Cdk-2 aktivnost inhibira formiranje novih preRC.
- Visoka Cdk aktivnost je potrebna za postojanje preRC kompleksa za otpočinjanje replikacije (S faza), ali ne dozvoljava formiranje preRC.
- Niska Cdk aktivnost je stimulatívna za formiranje novih preRC (G1 faza), ali je neadekvatna da otpočne DNK replikaciju inicijacijom novoformiranih preRC.
- Čvrsta povezanost između preRC uloge, Cdk nivoa i faze ćelijskog ciklusa - eukariotski genom se replikuje samo jednom u ćelijskom ciklusu.



■ Replikacija DNK u telomerama

- Uklanjanje prajmera sa 3' kraja matrice za lanac koji zaostaje – ne može da se sintetiše 5' kraj
- 3' krajevi linearnih molekula DNK su jednolančani (12-16 bp) i oko 1000 umnožaka kratkog nukleotidnog niza sa mnogo G, TER sekvence (5'-TTAGGG-3')
- Telomeraza – ribonukleoproteinski kompleks; RNK sadrži segment komplementaran nizu u telomeri i taj segment služi kao matrica za sintezu 3' krajeva lanaca DNK (proces sličan reversnoj transkripciji)

