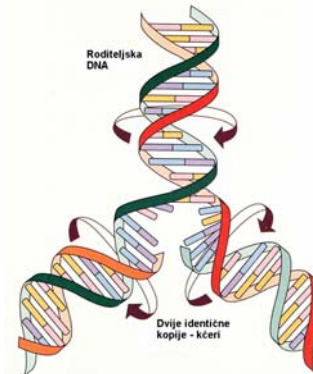


## Replikacija, održavanje i preslagivanje genomske DNA

## Umnažanje (replikacija) DNA



### Replikacija DNA vrlo je složen proces

Replikacija DNA obuhvaća:

- razmatranje dupleksa roditeljske DNA i razdvajanje dviju niti
- potpuno i točno kopiranje svake od roditeljskih niti DNA
- pribavljanje potrebnih količina sva četiri deoksiribonukleotida za sintezu novih niti DNA
- pribavljanje potrebnih količina histona za organizaciju nove DNA u nukleosome i pakiranje u kromosome ( $6 \times 10^9 / 200 \times 8 = 240\,000\,000$ )

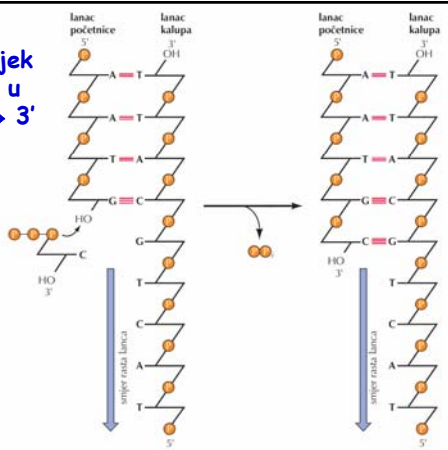
### Enzime koji umnažaju DNA nazivamo DNA-polimerazama

Opća reakcija DNA-polimeraze je:

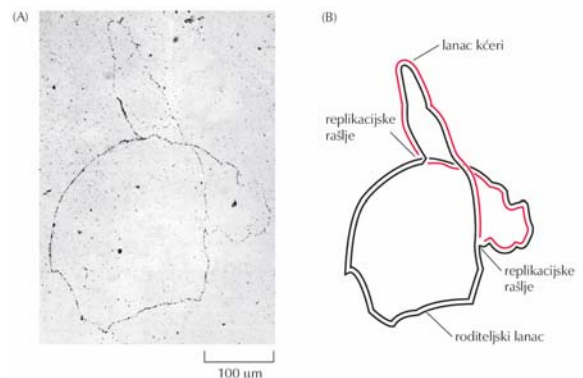


- DNA-polimeraze uvijek sintetiziraju novi lanac u smjeru  $5' \rightarrow 3'$
- DNA-polimeraze ne mogu započeti (inicirati) sintezu novog lance DNA
  - započinje ju primaza (RNA polimeraza)
- DNA-polimeraze kopiraju DNA s vrlo visokom točnošću

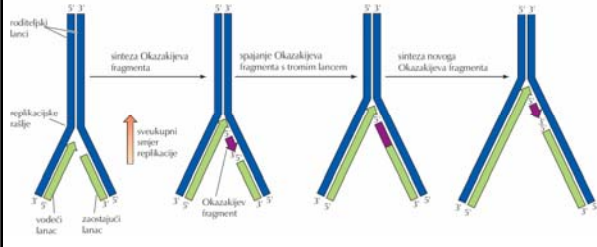
DNA se uvijek sintetizira u smjeru  $5' \rightarrow 3'$



### U replikacijskim rašljama sintetiziraju se oba lanca DNA (i $5' \rightarrow 3'$ i $3' \rightarrow 5'$ )



### Zaostajući (tromi) lanac sintetizira se u kratkim Okazakijskim fragmentima

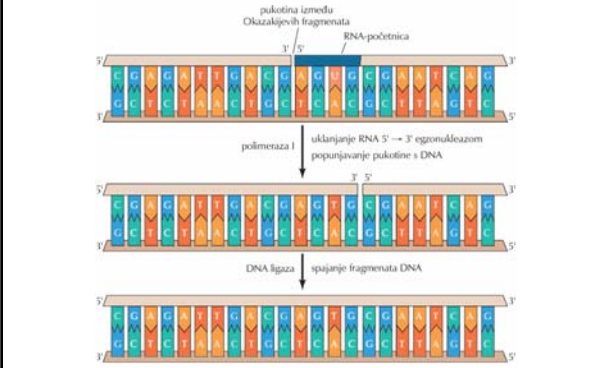


- Bakterijski Okazaki fragmenti dugi su oko 1000 - 2000 nukleotida i njihova sinteza traje oko 2 sec.
- Eukariotski Okazaki fragmenti dugi su svega 100 - 200 nukleotida

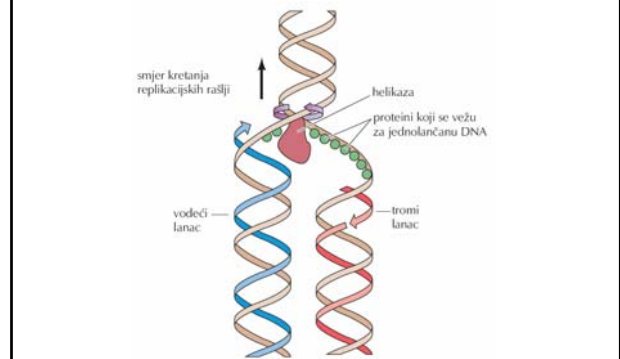
### Sinteza DNA počinje kratkom RNA početnicom



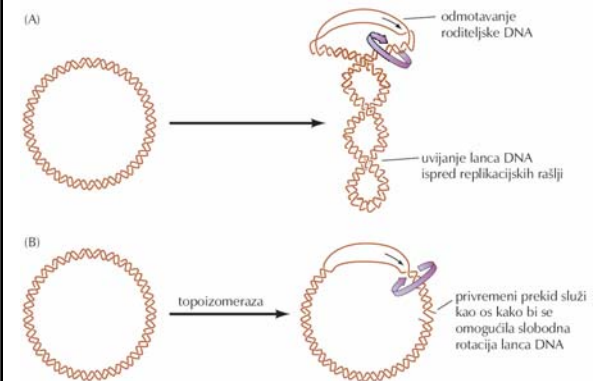
### DNA-polimeraza uklanja RNA-početnicu, a DNA-ligaza zatvara pukotinu u DNA



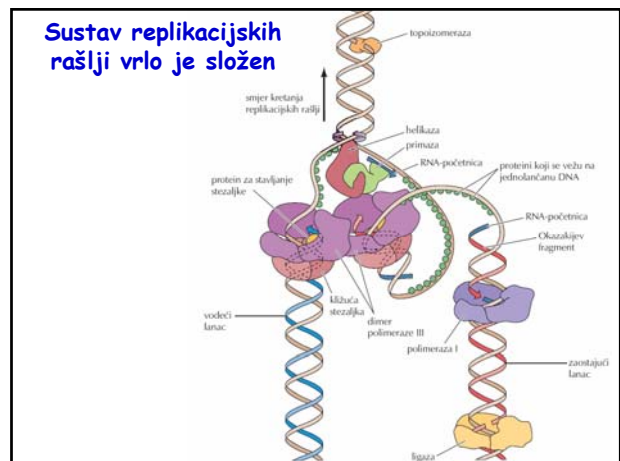
### Helikaza razmatra dvolančanu DNA, a proteini koji se vežu za jednolančanu DNA stabiliziraju jednolančanu DNA

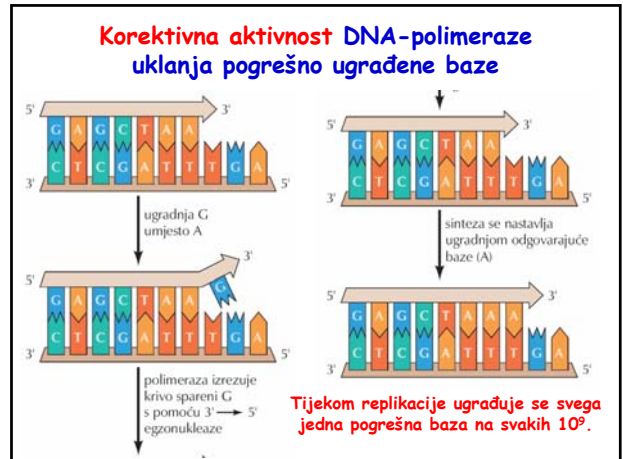
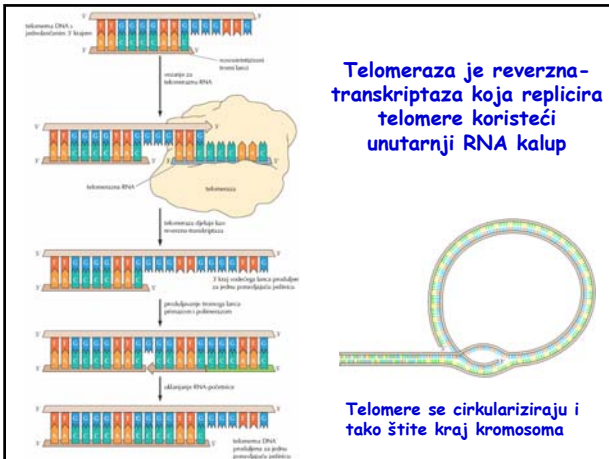


### Topoizomeraza uklanja napetost u strukturi nastalu zbog razmatanja uzvojnice



### Sustav replikacijskih rašlji vrlo je složen





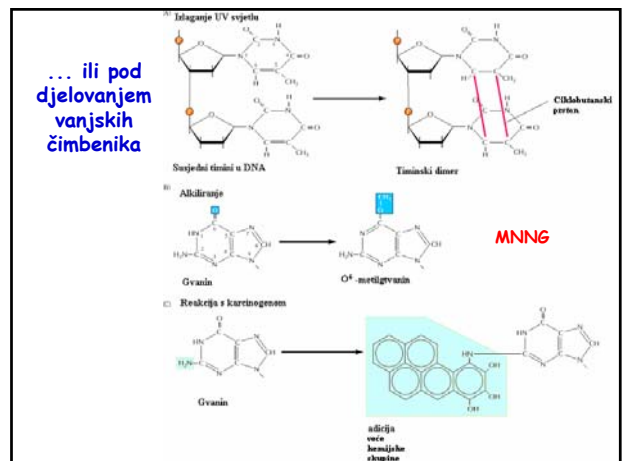
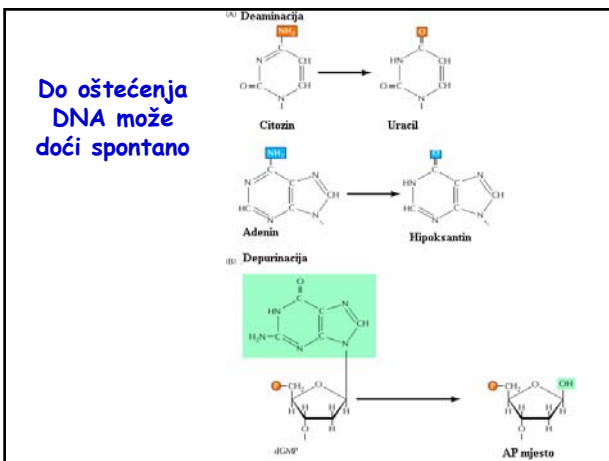
**DNA polimeraza I katalizira tri reakcije**

- polimerizaciju nukleotida u smjeru 5' → 3'
  - sinteza nove niti DNA
- hidrolizu polinukleotida u smjeru 3' → 5'
  - korektivna aktivnost
- hidrolizu polinukleotida u smjeru 5' → 3'
  - zamjenjuje RNA-početnicu s DNA

**Arthur Kornberg 1956.**

**Koliko su česte pogreške u replikaciji DNA?**

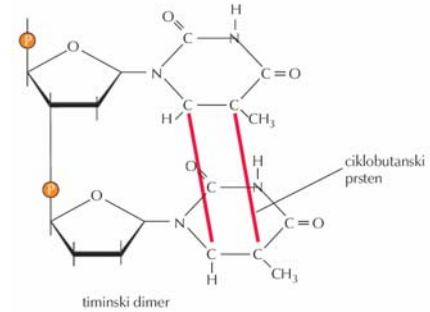
Razlika u slobodnim energijama sparivanja 5'-3' polimerazna aktivnost DNA-Pol III	10 <sup>-3</sup>
3'-5' egzonukleazna aktivnost DNA-Pol III	10 <sup>-6</sup>
Popravak DNA	10 <sup>-9</sup>
	10 <sup>-10</sup> - 10 <sup>-11</sup>



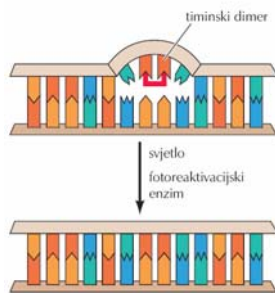
Oštećenja u DNA popravljaju se na više načina

1. Izravni obratom oštećenja
2. Popravak izrezivanjem nukleotida (*nucleotide excision repair - NER*)
3. SOS odgovor - popravak sklon pogreškama
4. Rekombinacijski popravak

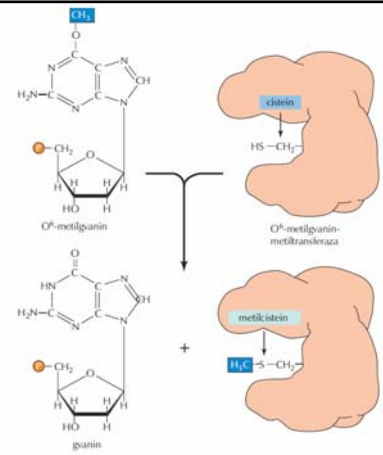
Pirimidinski dimeri nastaju kad se DNA izlaže UV zračenju



Mehanizam koji nazivamo fotoreaktivacija se pirimidinske baze vraćaju u izvorno stanje



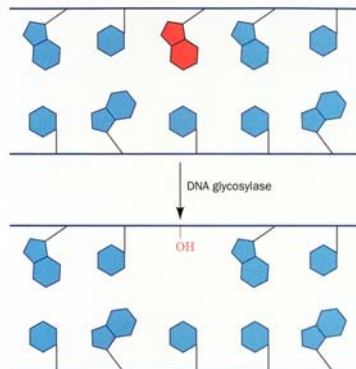
Alkiltransferaze dealkiliraju alkilirane nukleotide



DNA-glikozilaze uklanjaju modificirane baze iz DNA

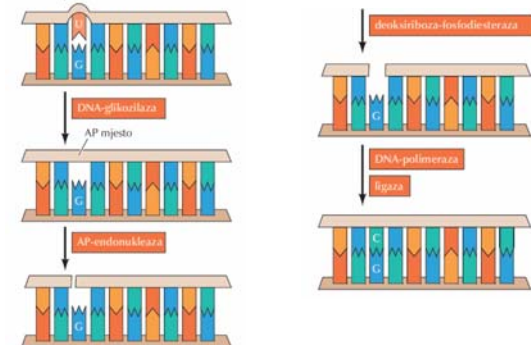
deaminacijom citozina → uracil

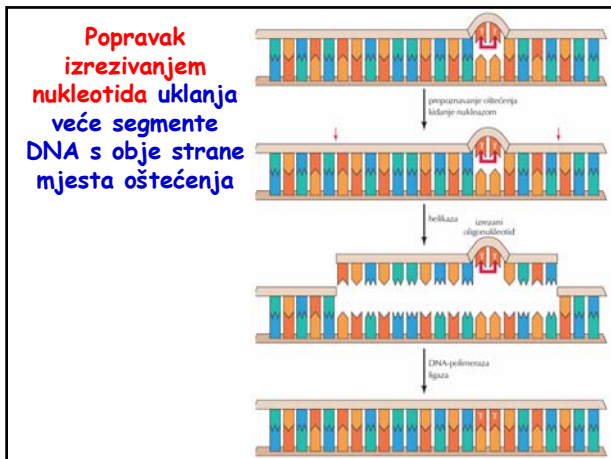
deaminacijom gvanina → hipoksantin



Popravkom izrezivanjem baze uklanja se oštećena baza iz DNA

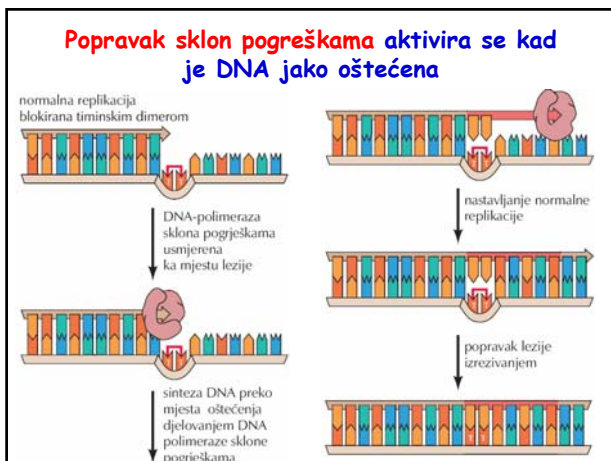
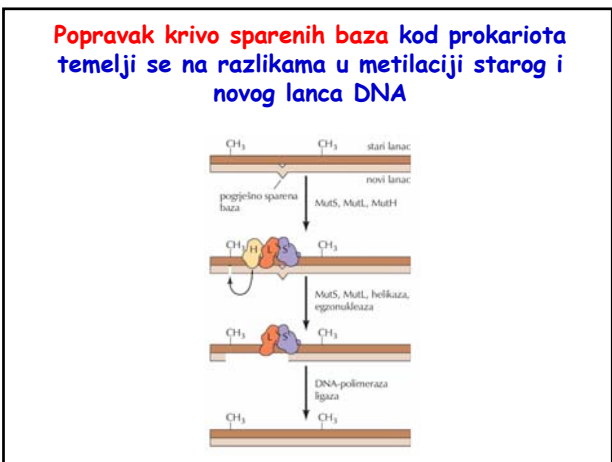
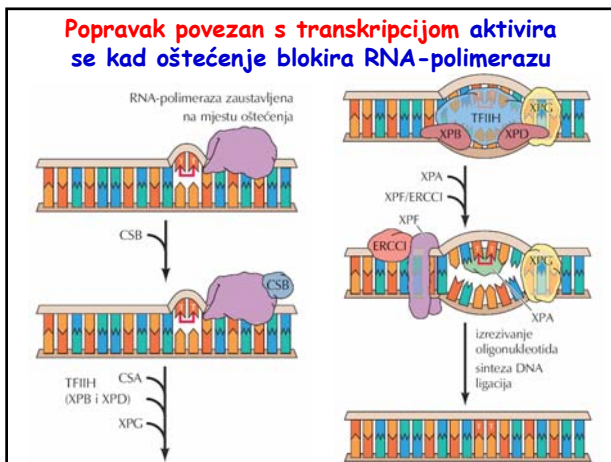
DNA sadržava U stvoren deaminacijom C





**Oštećenja popravka izrezivanjem uzrok su nasljedne bolesti kseroderma pigmentozum**

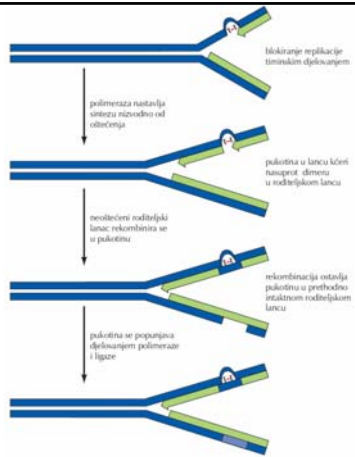
preosjetljivost na svjetlo, 2.000 puta veća učestalost raka kože



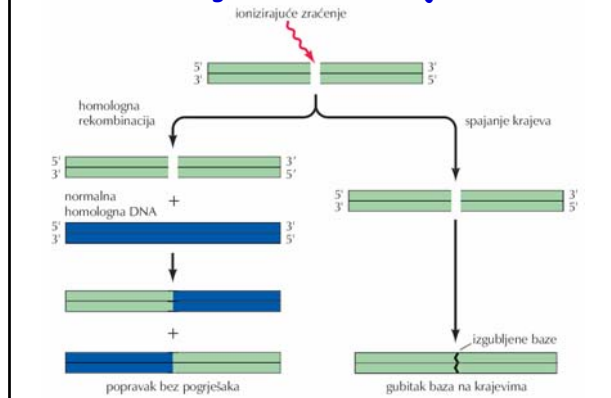
**SOS odgovor**

- induciraju ga agensi koji oštećuju DNA
  - jednolančana DNA potiče autolizu LexA proteina koji je represor recA, uvr A i uvr B gena
- SOS odgovor omogućava popravak i onih oštećenja koja normalno nije moguće popraviti
  - uništena je informacija s obje niti DNA
- popravak sklon pogreškama (*error-prone*)
  - DNA-polimeraze sklone pogreškama
- SOS odgovor je mutagen, tj. uzrokuje mutacije

**U rekombinacijskom popravku oštećena DNA zamjenjuje se neoštećenom molekulom**



**Dvolančane lomove u DNA moguće je popraviti homolognom rekombinacijom**



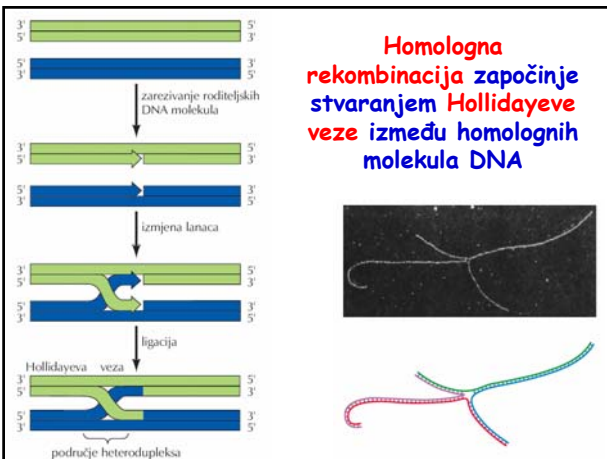
**Apoptoza je jedan od načina na koje se organizam brani od mutacija**

- apoptoza je programirana smrt stanice
- uzrokuju ju različiti agensi koji oštećuju stanicu
- značajna oštećenja DNA također uzrokuju apoptozu
  - brojna oštećenja u molekuli DNA rezultirat će značajnim brojem mutacija od kojih neke mogu biti vrlo opasne za organizam (npr. tumorska transformacija)
  - organizam se brani od te opasnosti i štiti svoj originalnu genetičku informaciju tako da potiče samouništenje potencijalno opasnih stanica
- apoptoza je jedan od osnovnih kontrolnih mehanizama kod višestaničnih organizama

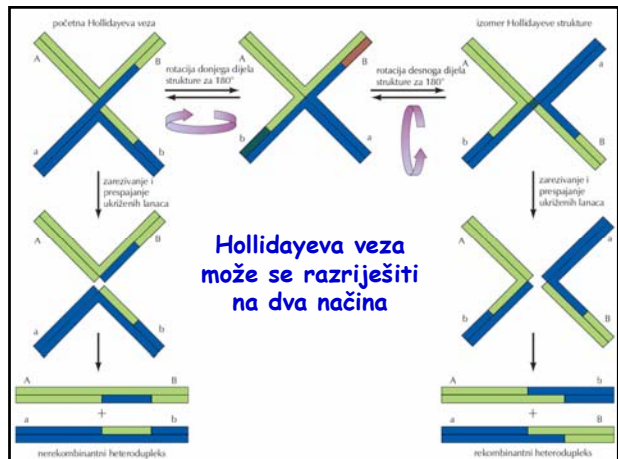
**Rekombinacija DNA**

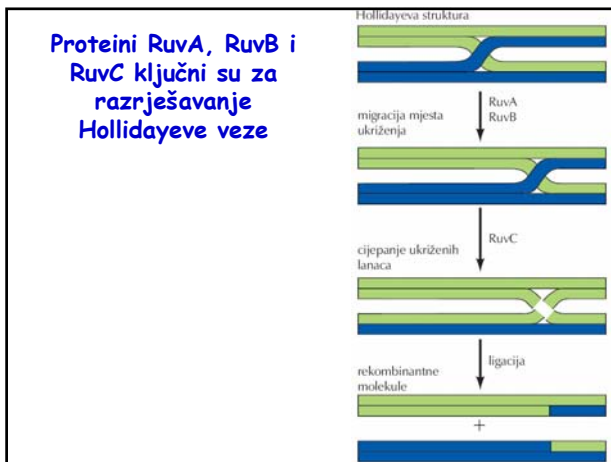
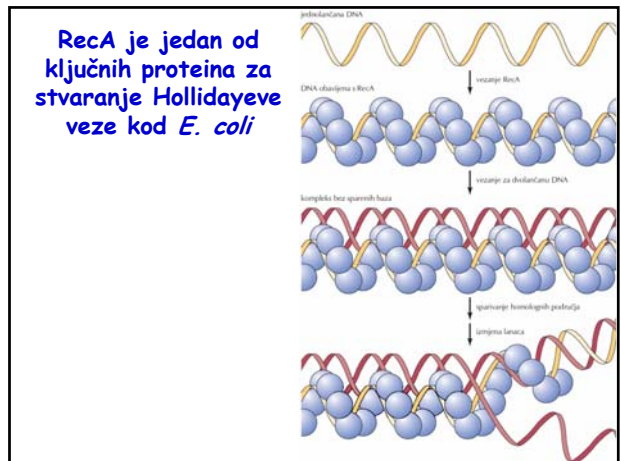
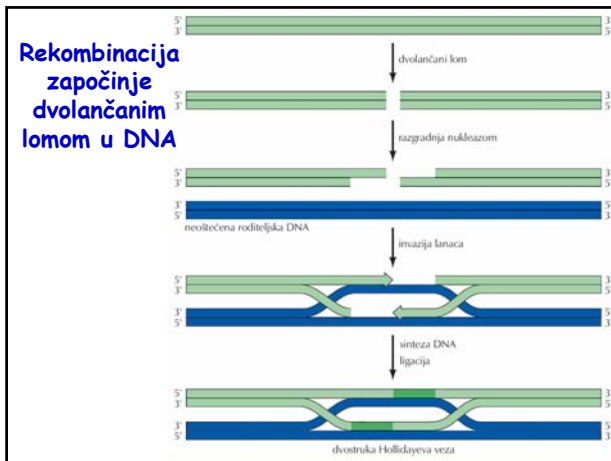
- **Homologna rekombinacija**
  - Rekombinacijski popravak DNA
  - Rekombinacija homolognih kromosoma u mejozi
  - ne mijenja se sadržaj genoma
- **PRESLAGIVANJE GENA**
  - **Mjesno-specifična rekombinacija**
    - Nije nužna potpuna homologija sljedova
    - Preslagivanje imunoglobulinskih gena
  - **Transpozicija**
    - Posredovana DNA intermedijarima
    - Posredovana RNA intermedijarima (retrotranspozicija)
  - **Amplifikacija gena**

**Homologna rekombinacija započinje stvaranjem Hollidayeve veze između homolognih molekula DNA**

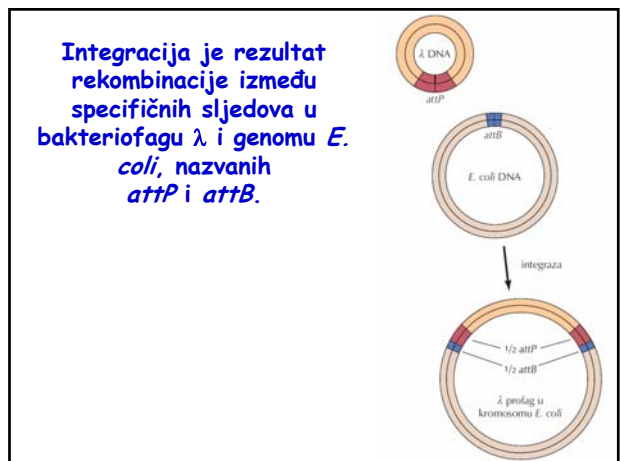
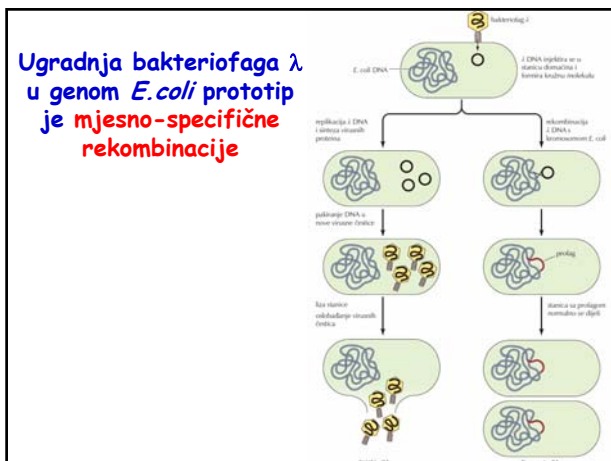


**Hollidayeva veza može se razriješiti na dva načina**

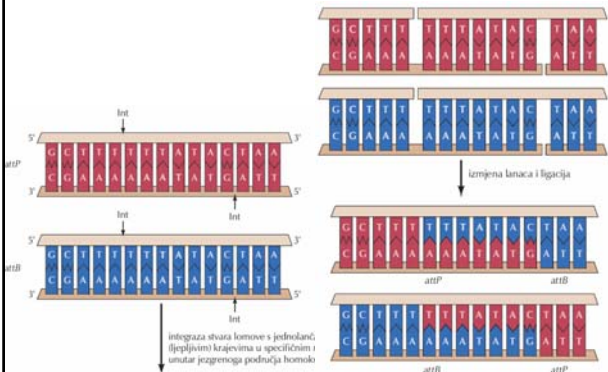




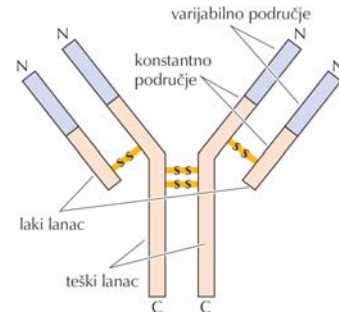
**Preslagivanje DNA**



Protein nazvan **integraza** uvodi dvolančane lomove u DNA i katalizira rekombinaciju

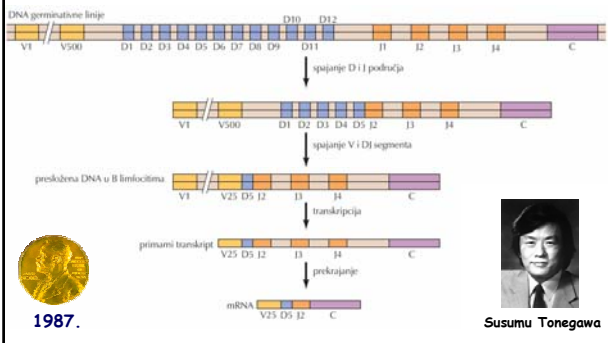


Varijabilna područja imunoglobulina omogućuju specifično prepoznavanje svih stranih antigena



?

Mjesno-specifična rekombinacija omogućuje preslagivanje gena za imunoglobuline i stvaranje velik broj različitih protutijela



Somatska mutagenaza igra važnu ulogu u stvaranju visokoafinitetnih protutijela

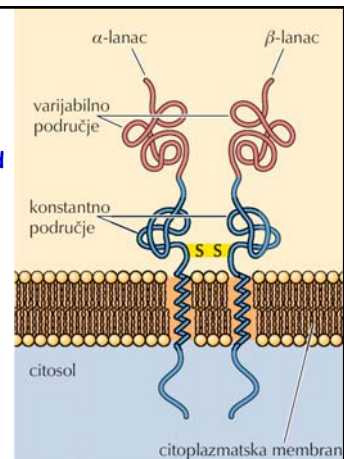
- varijabilne regije protutijela mijenjaju se brzinom od  $10^{-3}$  promjena po nukleotidu po generaciji
  - to je više no milijun puta brže od brzine spontanih mutacija u drugim genima
  - točan mehanizam nije poznat
- B limfociti čija protutijela čvršće vežu antigen se brže dijele → **mikroevolucija protutijela**
  - s vremenom protutijela sve čvršće vežu antigen, tj. postaju sve bolja
  - IgM uvijek ima manje pojedinačne konstante vezanja, ali to nadoknađuje pentamernom strukturom
- zbog somatske mutagenaze je ukupni repertoar protutijela bitno veći od 11,000,000,000 koliko ih može nastati rekombinacijama postojećih gena

Protutijela stupaju u vrlo bliske molekularne interakcije s antigenom



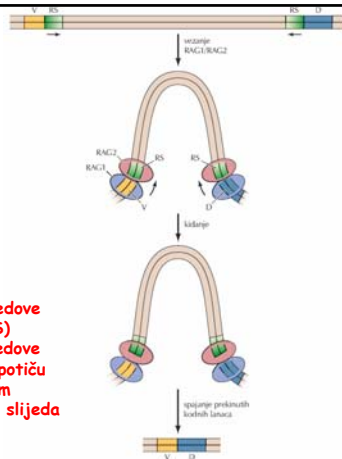
kompleks protutijelo-antigen (peptid iz influenza virusa)

Varijabilna područja receptora T-stanica također se preslaguju mjesno-specifičnom rekombinacijom, no kod njih nije pronađena somatska mutagenaza



### Mjesno-specifičnu rekombinaciju imunoglobulinskih gena kataliziraju specifični proteini RAG1 i RAG2

RAG proteini prepoznaju sljedove rekombinacijskog signala (RS) smještene uz kodirajuće sljedove svakoga genskog područja i potiču preslagivanje DNA uvođenjem dvolančanog loma između RS slijeda i kodirajućeg slijeda.



### Transpozoni su pokretni genetički elementi koji ne trebaju homologiju za premještanje

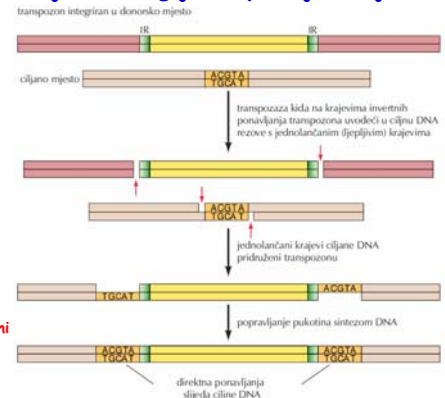


Barbara McClintock



1983.

DNA-transpozoni čine oko 3% ljudske DNA



### Transpozicija posredovana RNA-intermedijarima puno je složenija i uključuje replikaciju transpozona



Ljudska DNA sadržava oko 3.000.000 kopija retrotranspozona koji čine oko 40% genoma.

### Ponavljajući sljedovi čine preko polovine ljudskoga genoma

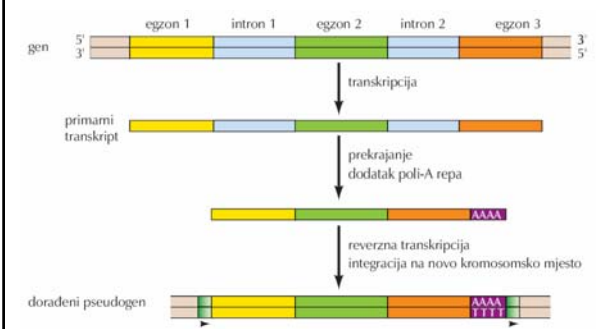
Tablica 4-1. Repetitivni sljedovi u humanom genu

Vrsta sekvence	Broj kopija	Dio genoma
Ponavljanje jednostavnih sljedova*	>1.000.000	~10%
Retrotranspozoni		
LINE	850.000	21%
SINE	1.500.000	13%
Elementi slični retrovirusu	450.000	8%
DNA transpozoni	300.000	3%

\* Količina ponavljanja jednostavnih sljedova procijenjena je prema udjelu heterokromatina u ljudskom genomu.

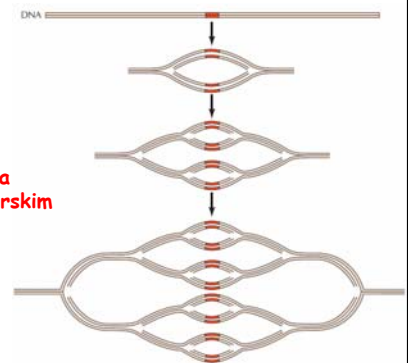
Značajna uloga u evoluciji!

### Integracijom DNA nastale obrnutim prepisivanjem dorađene mRNA nastaju dorađeni pseudogeni

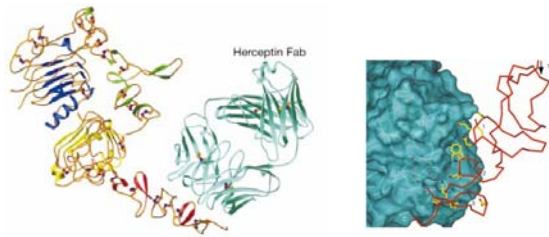


### U određenim tipovima stanica dolazi do kontrolirane amplifikacije pojedinih gena

Amplifikacija gena česta je i u tumorskim stanicama.



**Herceptin se primjenjuje kod raka dojke koji ima povećanu ekspresiju HER2 receptora**



Prekomjerna ekspresija HER2 (jedan od receptora za epidermalni faktor rasta) javlja se u 20%-30% slučajeva raka dojke i povezana je s lošom prognozom.