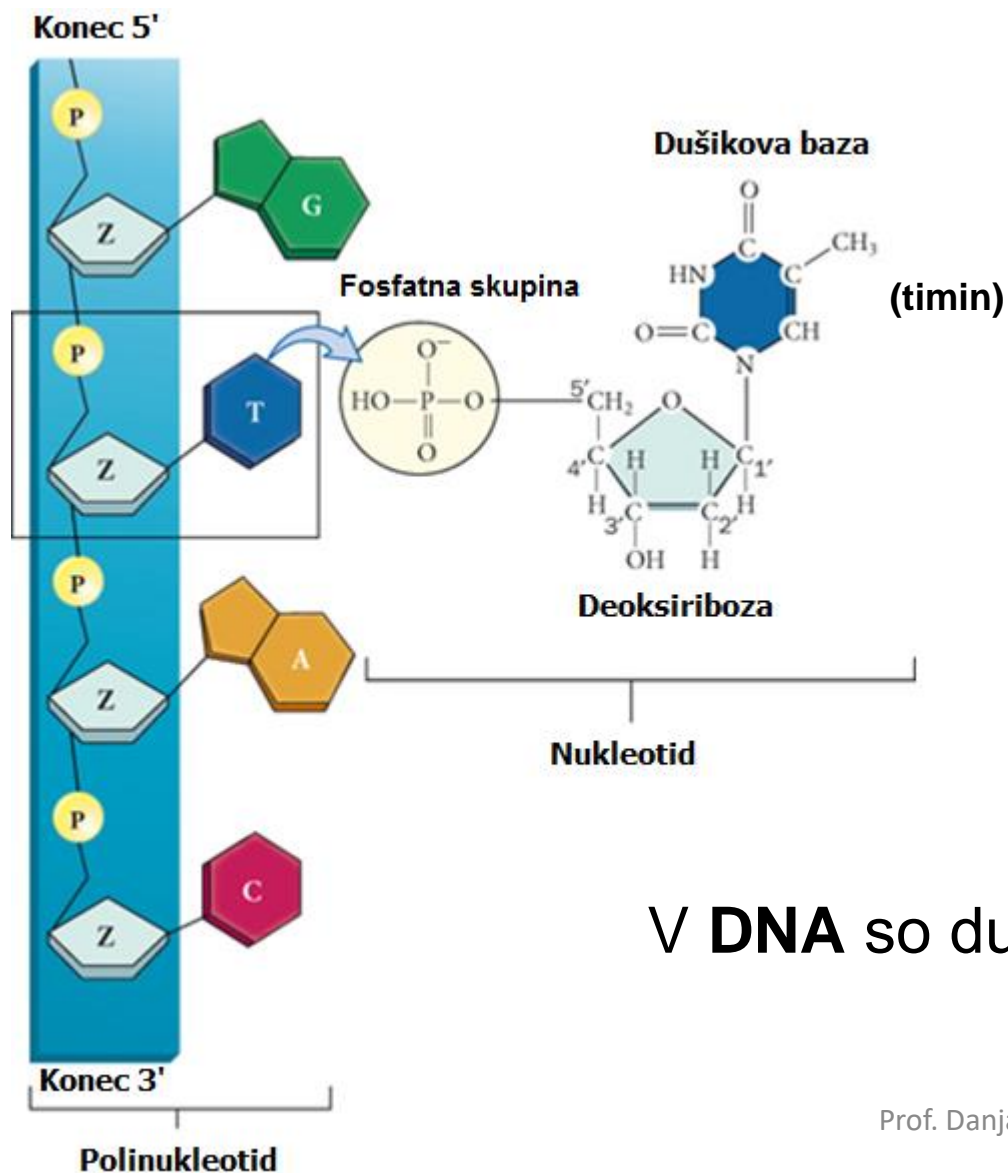




# STRUKTURA IN PODVOJEVANJE MOLEKULE DNA

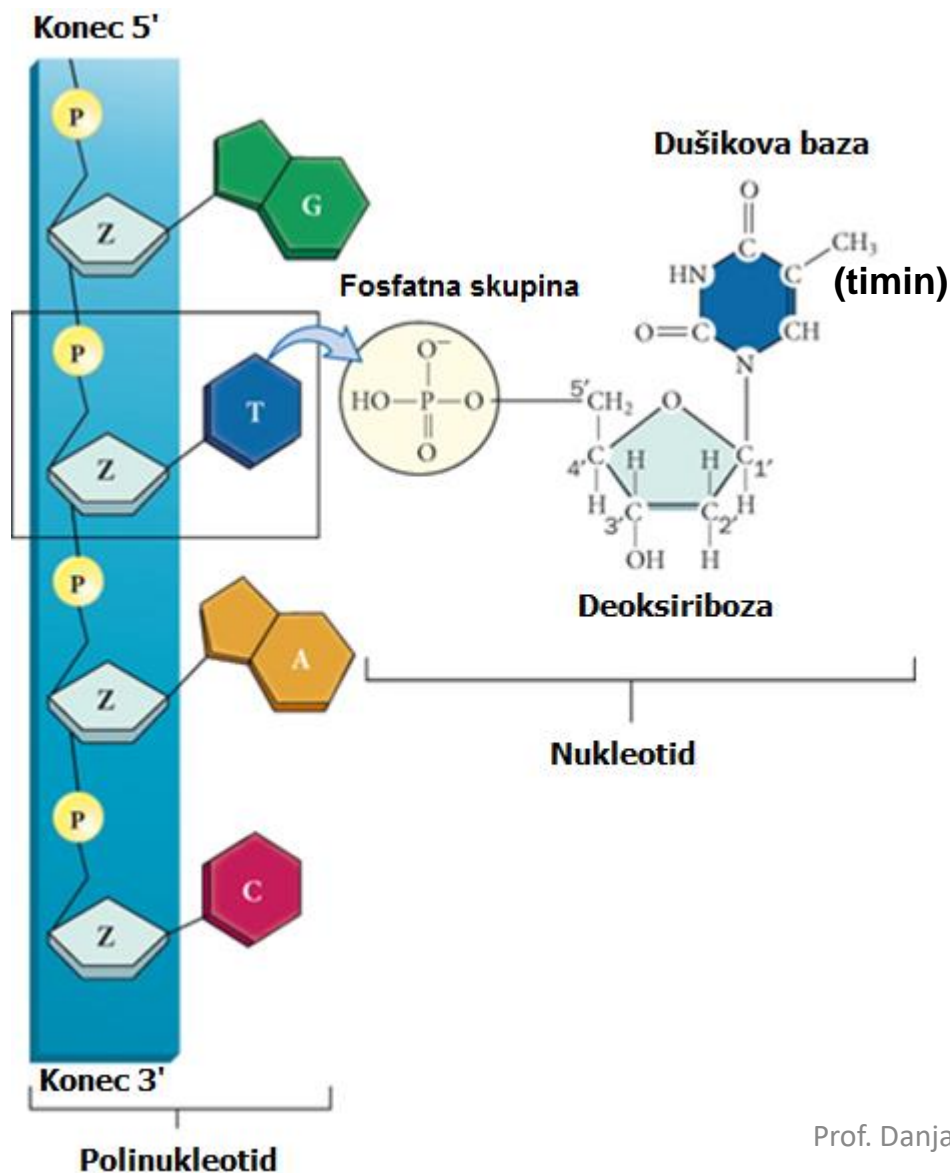
# Struktura molekule DNA



- **DNA (deoksiribonukleinska kislina)** je polinukleotid.
- Vsak nukleotid sestoji iz treh delov:
  - sladkorja **desoksiriboze** ( $\text{C}_5$ ),
  - **fosfatne** skupine
  - **dušikove** baze.

V **DNA** so dušikove baze **adenin**, **timin**, **gvanin** in **citozin**.

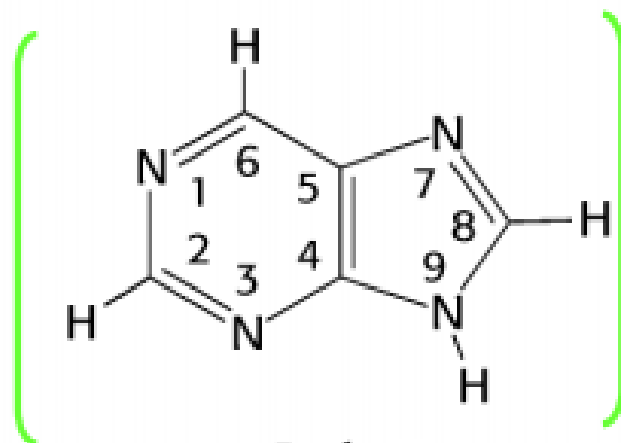
# Struktura molekule DNA



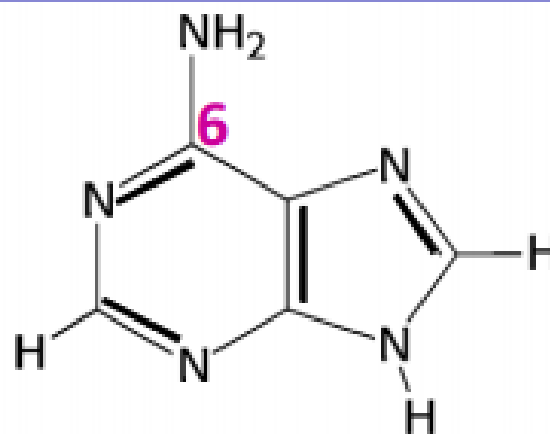
- Vsaka veriga DNA ima dva konca:
- **5'- konec** je tisti konec verige, na katerem je **prosta fosfatna skupina** (ki je vezana na 5.ogljikov atom deoksiriboze).
- **3'- konec** je pa tisti, kjer je **prosta OH skupina** (ki je vezana na 3.ogljikov atom deoksiriboze).

# HETEROCIKLIČNE DUŠIKOVE BAZE

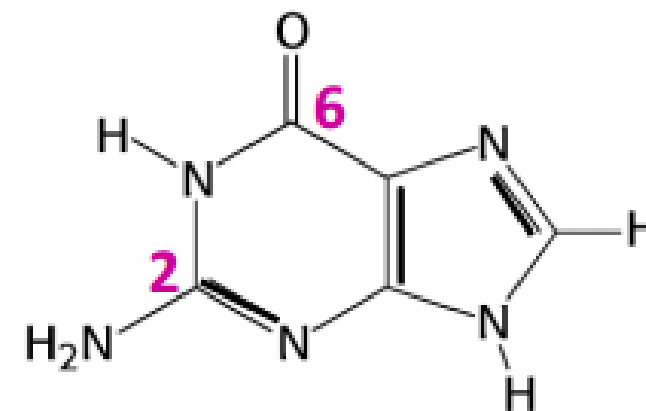
Purinske  
baze



**Purin**

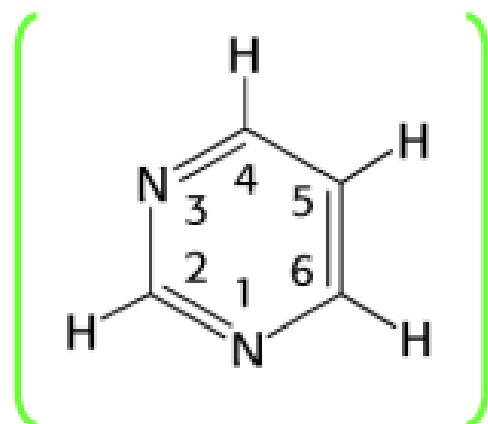


**ADENIN (A)**

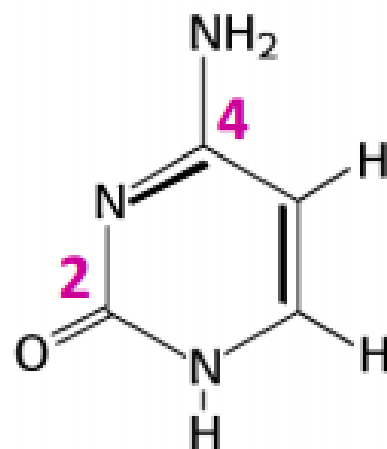


**GVANIN (G)**

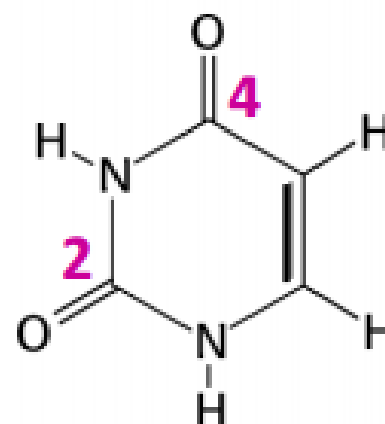
Pirimidinske  
baze



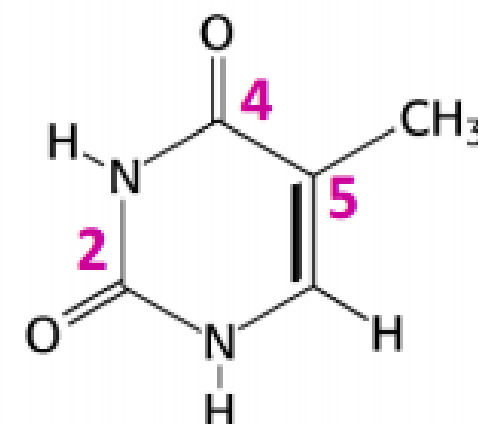
**Pirimidin**



**CITOZIN (C)**



**URACIL (U)**

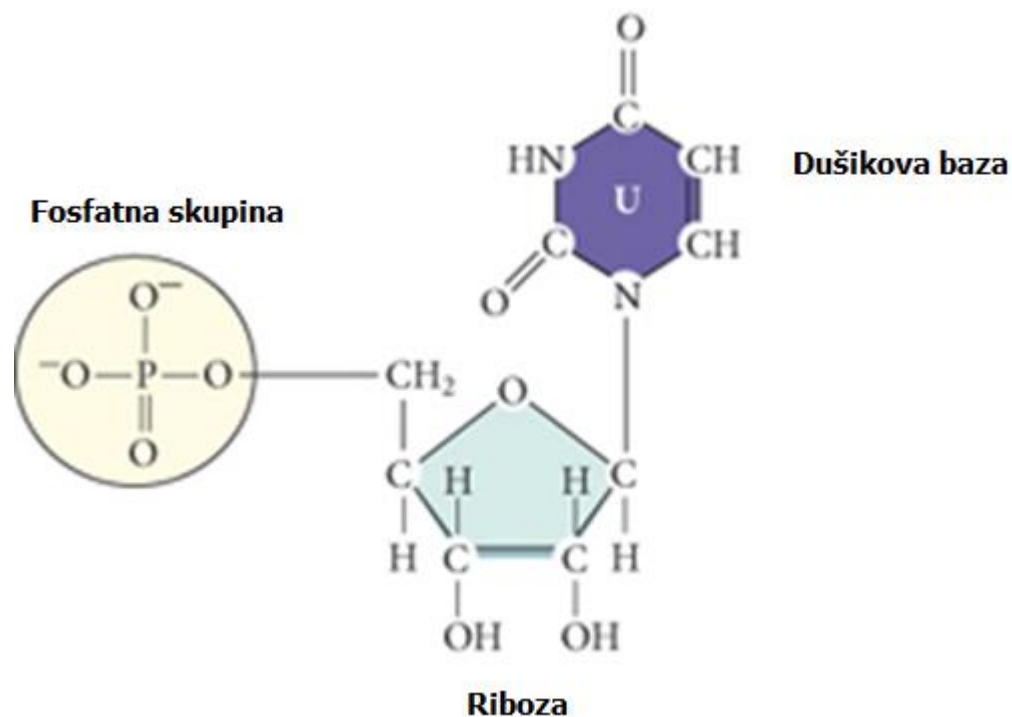


**TIMIN (T)**

# RNA

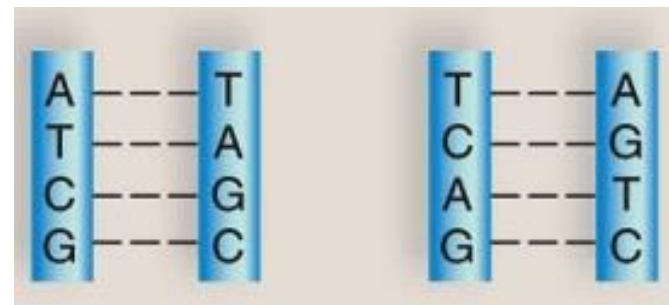
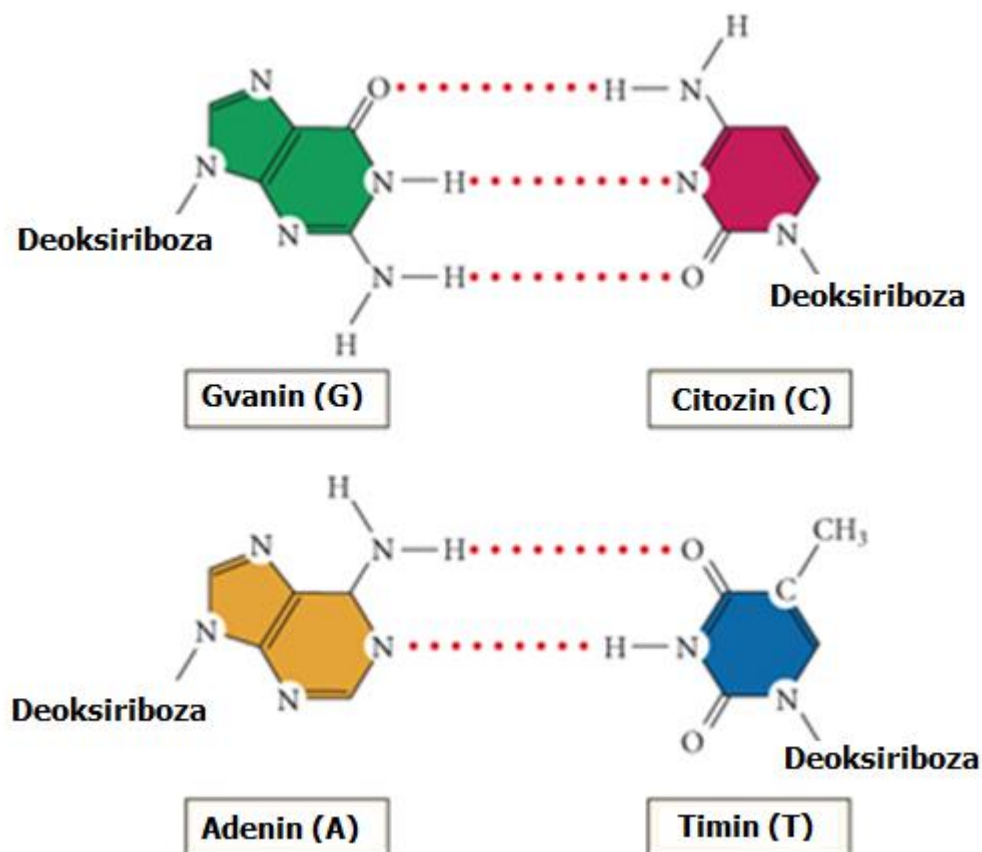
**RNA (ribonukleinska kislina)** se razlikuje od DNA po sladkorju C<sub>5</sub>, **ribozi** in ker vsebuje namesto timina drugo pirimidinsko bazo, **uracil (U)**.

**RNA nukleotid**



# Povezovanje dušikovih baz

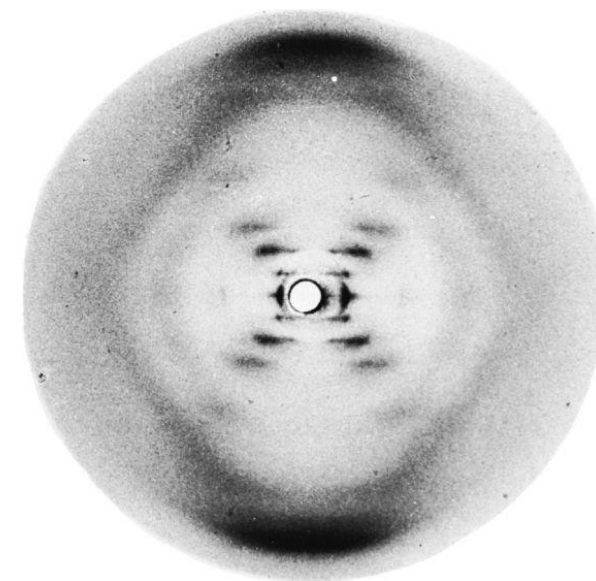
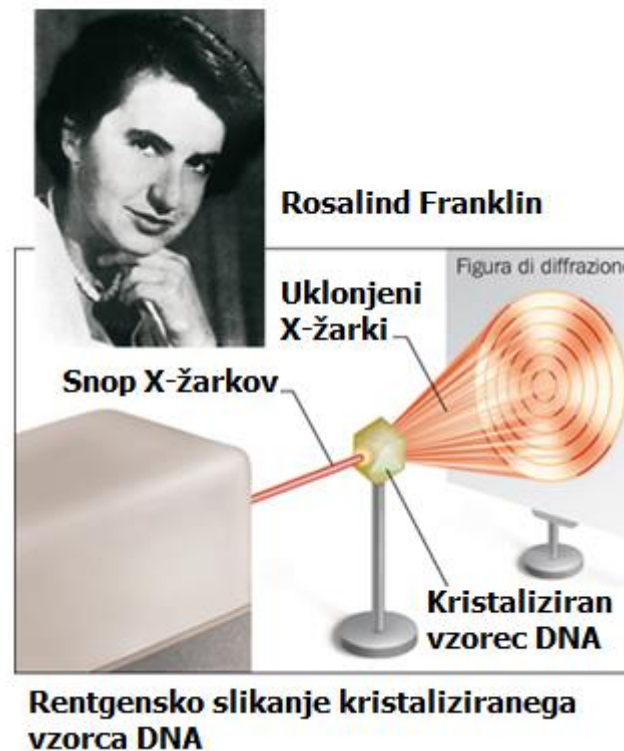
Molekula DNA ima obliko dvojne vijačnice nukleotidov, v kateri je baza **A** vedno v paru z bazo **T**, baza **C** pa vedno z bazo **G**.





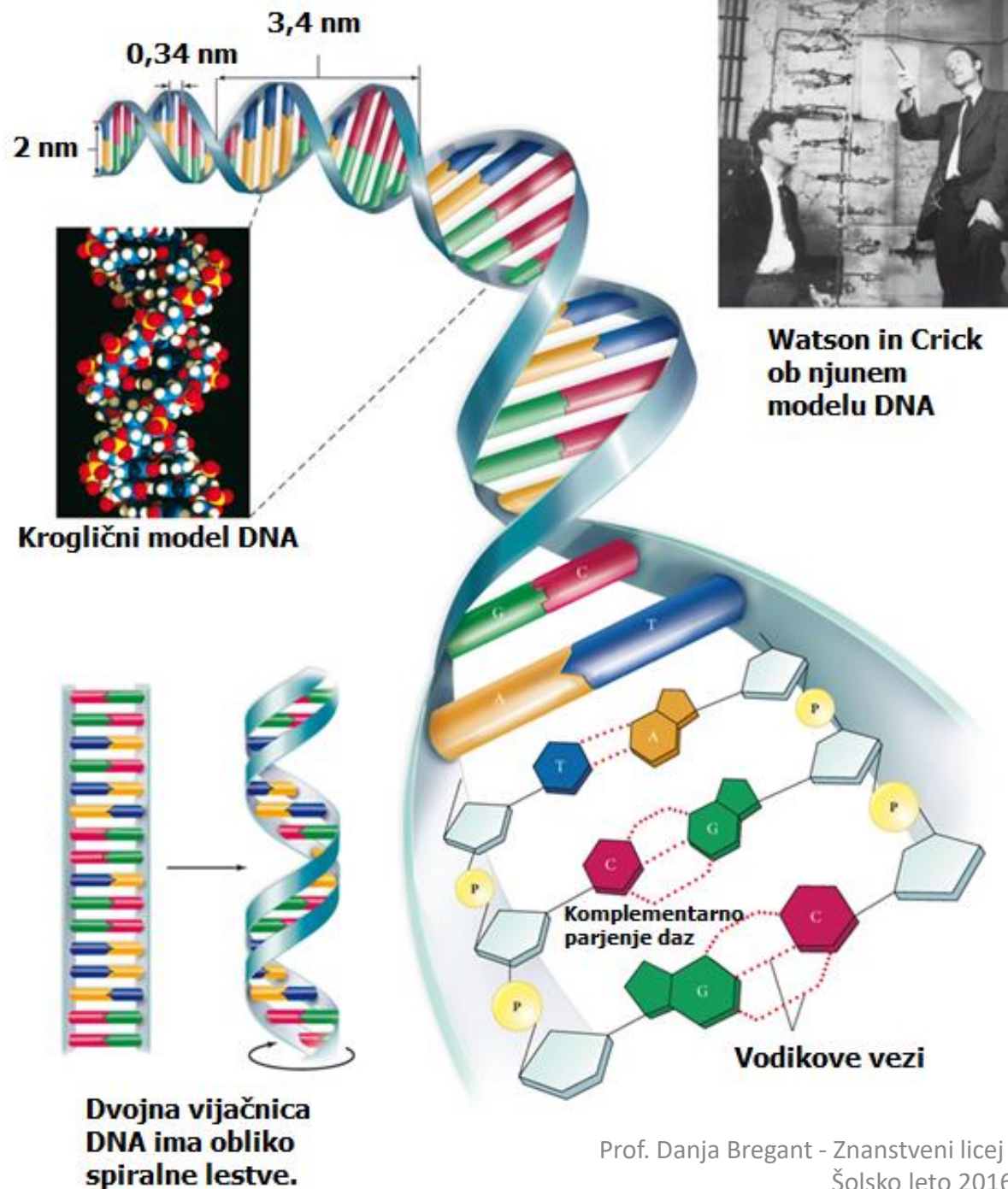
# Molekula DNA ima obliko dvojne vijačnice

**James Watson** in **Francis Crick** sta zgradila prvi tridimenzijski model DNA na osnovi rezultatov znanstvenega dela **Rosalind Franklin** in **Maurica Wilkinsa**, ki sta proučevala strukturo DNA z uporabo kristalografije z žarki X.



**Rentgenska slika DNA**

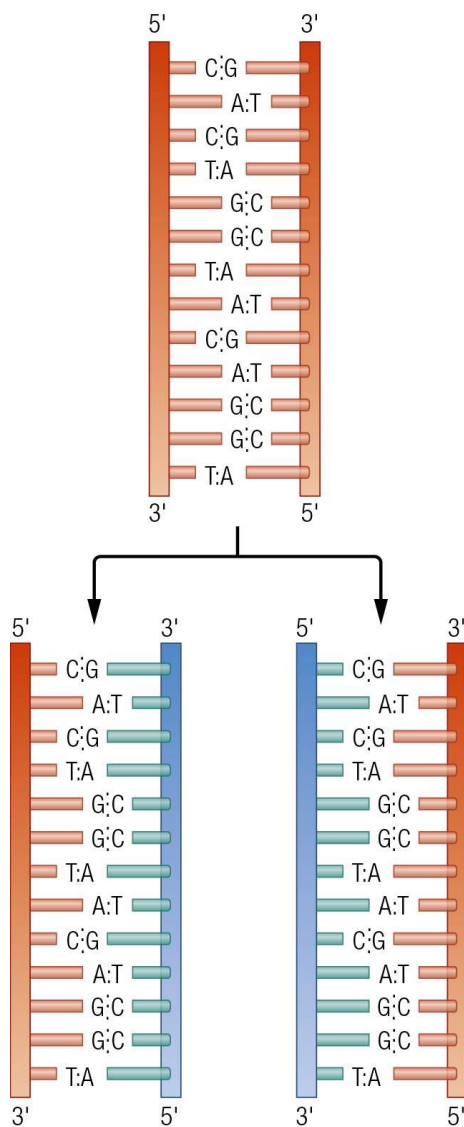
# Molekula DNA ima obliko dvojne vijačnice



Dvojno vijačnico gradita dve verigi nukleotidov, oviti druga okrog druge. Molekula DNA ima obliko **spiralno zavite lestve**, kjer sta **nosilca** sestavljena iz **sladkorja in fosfata**, **prečke** pa iz **komplementarnih baz**, ki jih povezujejo **vodikove vezi**.



# Podvojevanje molekule DNA

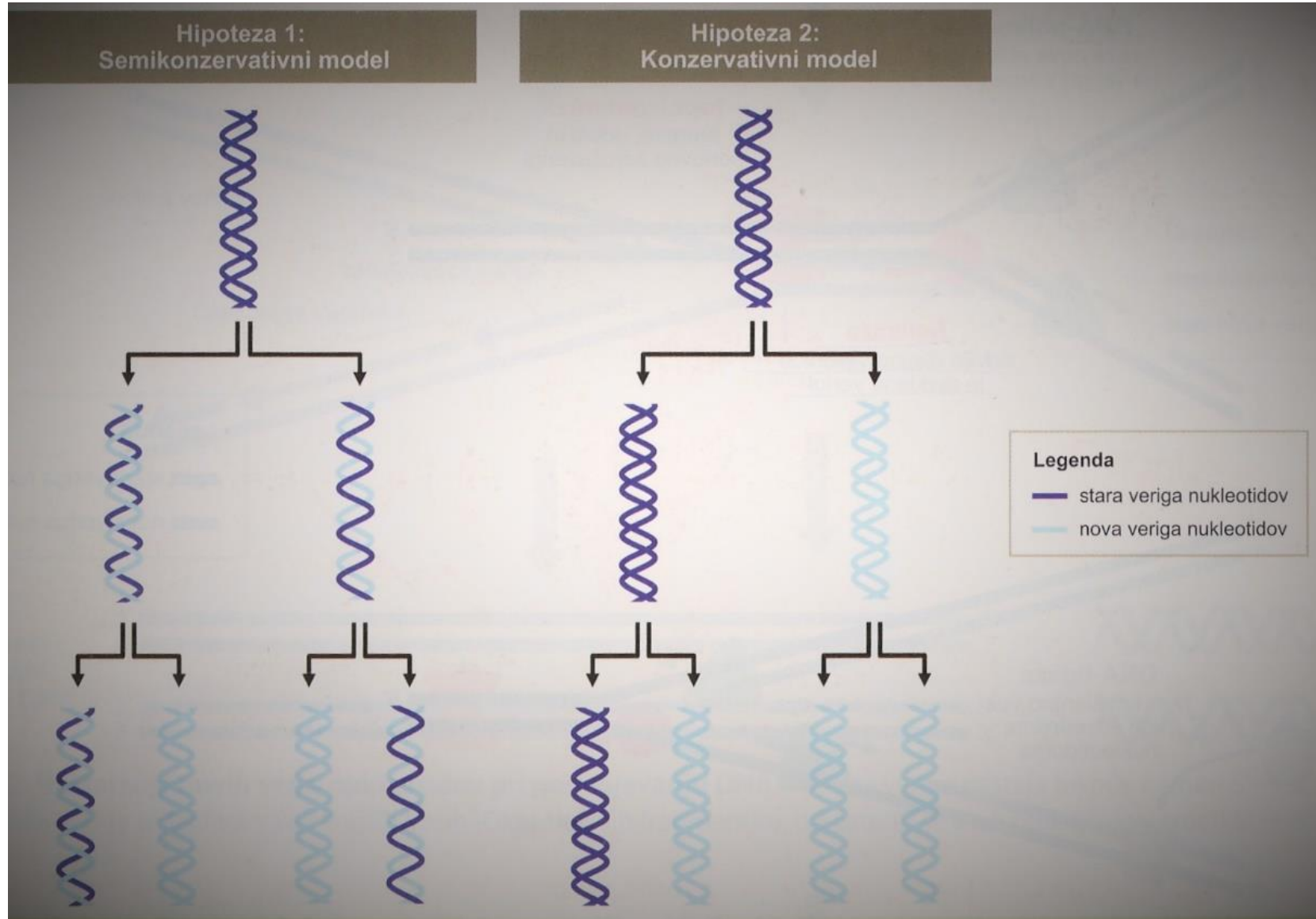


- Molekula DNA se razpre in vsaka veriga deluje kot model za sintezo nove verige;
- Podvojevanje je **semikonzervativno**, ker vsebuje vsaka izmed novonastalih molekul **eno staro** verigo in **eno novo**.

# Odkrivanje načina podvojevanja DNA

- Leta 1954, eno leto po odkritju zgradbe DNA, sta obstajali dve hipotezi o načinu podvojevanja DNA: konzervativna in semikonzervativna hipoteza.
- Po semikonzervativnem modelu po podvojevanju vsaka molekula DNA vsebuje eno staro in eno novo verigo nukleotidov.
- Po konzervativnem modelu po podvojevanju ena molekula DNA vsebuje obe stari verigi, druga molekula DNA pa dve na novo nastali verigi nukleotidov.

# Dve hipotezi o načinu podvojevanja DNA



# Poskus Meselsona in Stahla

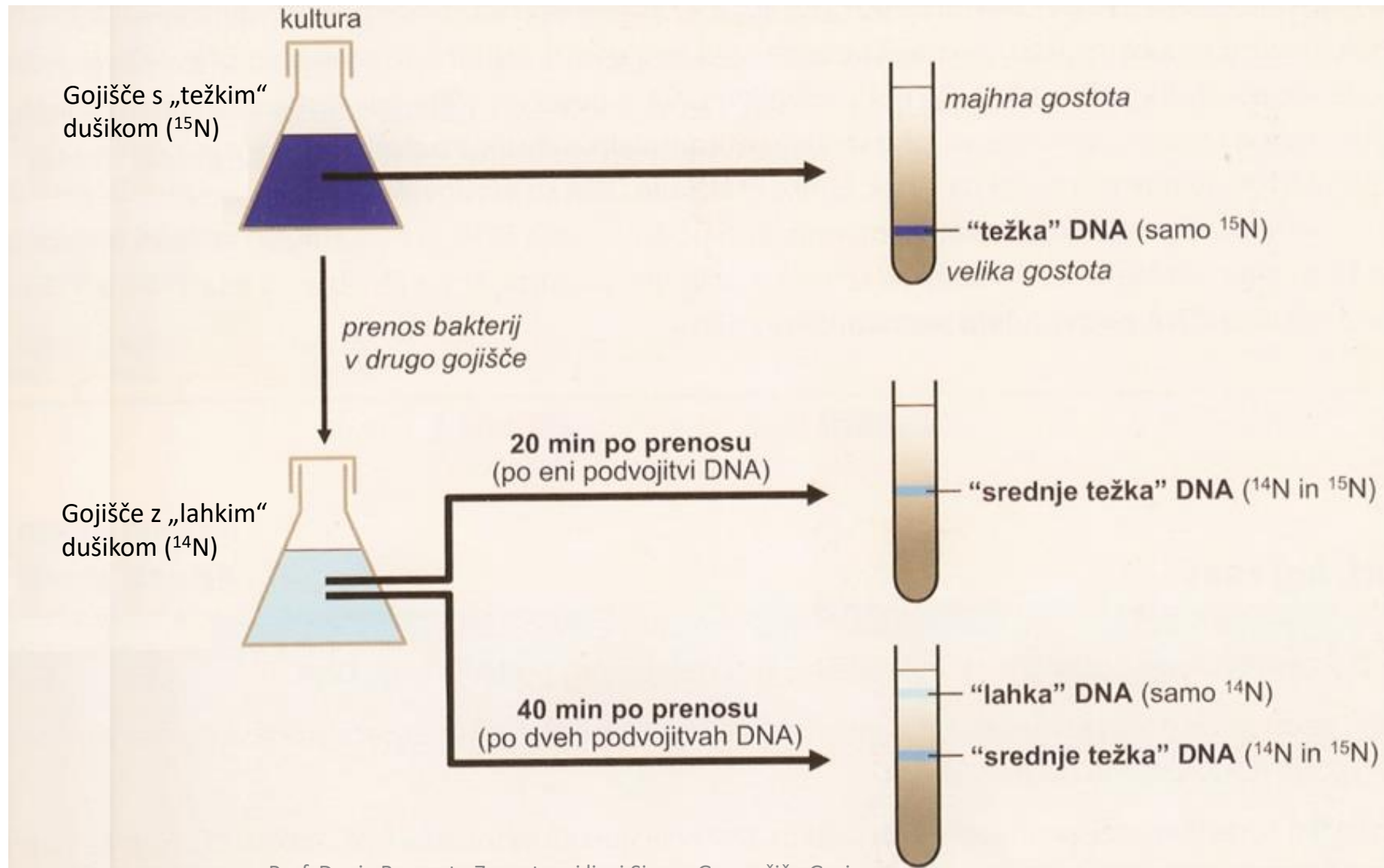
- Dokazni poskus sta izvedla ameriška molekulska biologa Matthew Meselson in Franklin Stahl.
- Bakterije *Escherichie coli* sta gojila v gojišču, ki je poleg sladkorja in drugih hranilnih snovi vsebovalo dušikove spojine s „težkim“ dušikom ( $^{15}\text{N}$ ).
- Iz dela teh bakterij sta izolirala molekule DNA.
- Drugi del bakterij sta prenesla v gojišče z „lahkim“ dušikom ( $^{14}\text{N}$ ).
- Po 20 minutah (ena podvojitev DNA) sta odvzela vzorec bakterij in iz njega izolirala DNA.
- Po 40 minutah (dve podvojitvi DNA) sta odvzela še drugi vzorec bakterij in iz njega izolirala DNA.

# Poskus Meselsona in Stahla

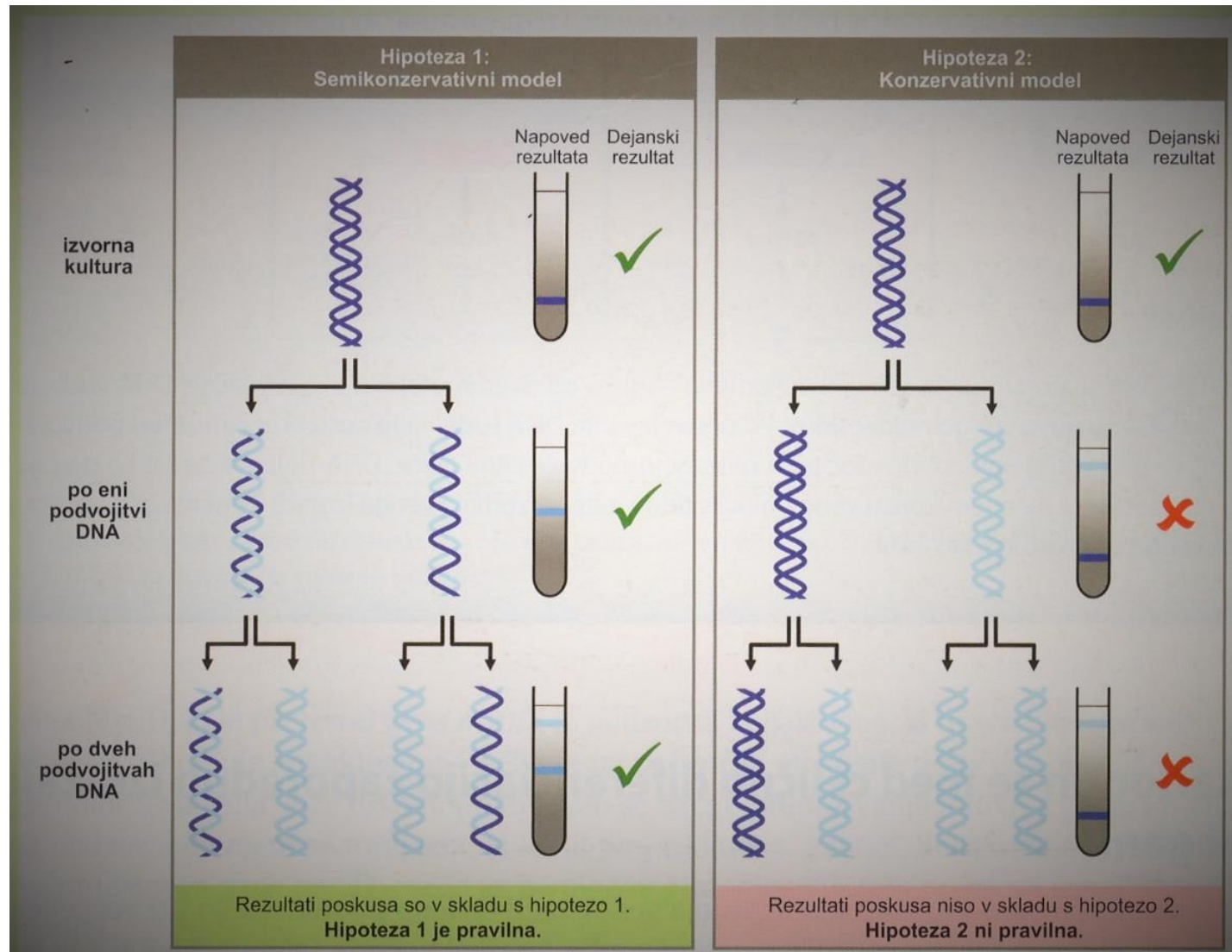
- Vse tri vzorce sta centrifugirala.
- Molekule DNA so se ločile po gostoti: lažje molekule so bile na vrhu epruvete, težje na dnu.
- Ugotovitve:
  - 1. vzorec: vse molekule težke (vsebujejo le  $^{15}\text{N}$ )
  - 2. vzorec: vse molekule srednje težke (vsebujejo tako  $^{15}\text{N}$  kot  $^{14}\text{N}$ )
  - 3. vzorec: del molekul srednje težkih (vsebujejo tako  $^{15}\text{N}$  kot  $^{14}\text{N}$ ), del lahkih (vsebujejo le  $^{14}\text{N}$ ).



# Poskus Meselsona in Stahl

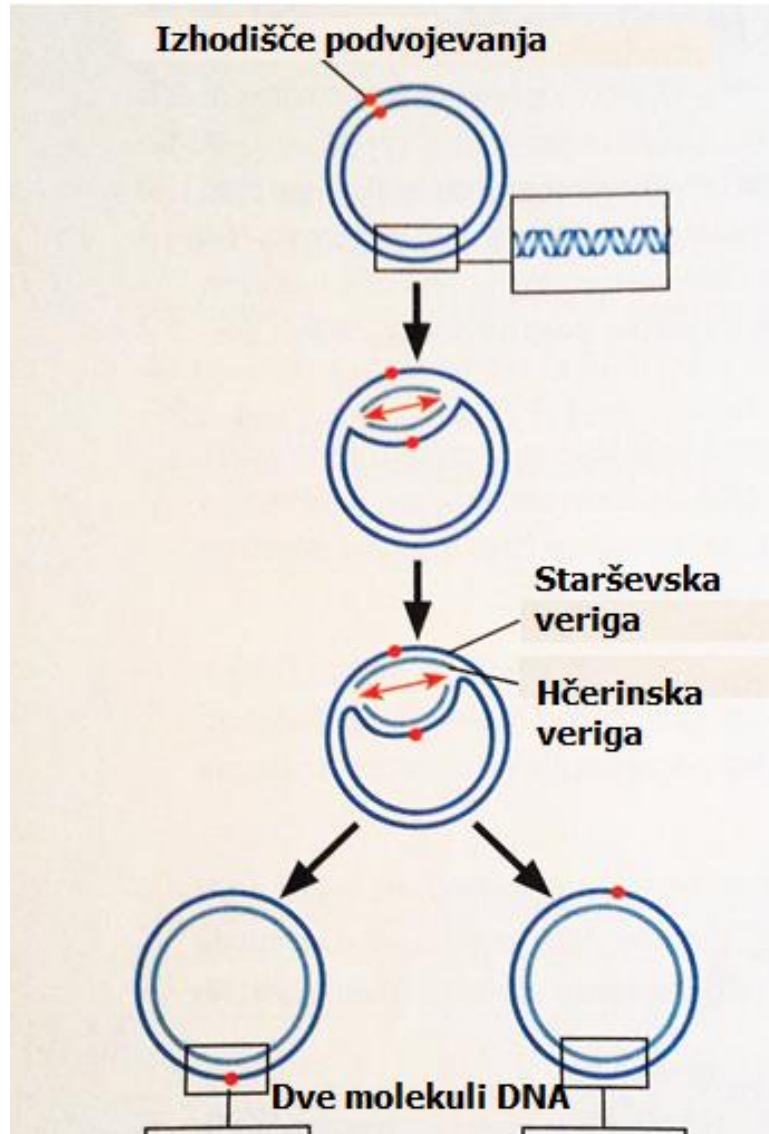


# Dokaz za semikonzervativno podvojevanje DNA



- Rezultati poskusa so bili v skladu s hipotezo o **semikonzervativnem podvojevanju DNA**.

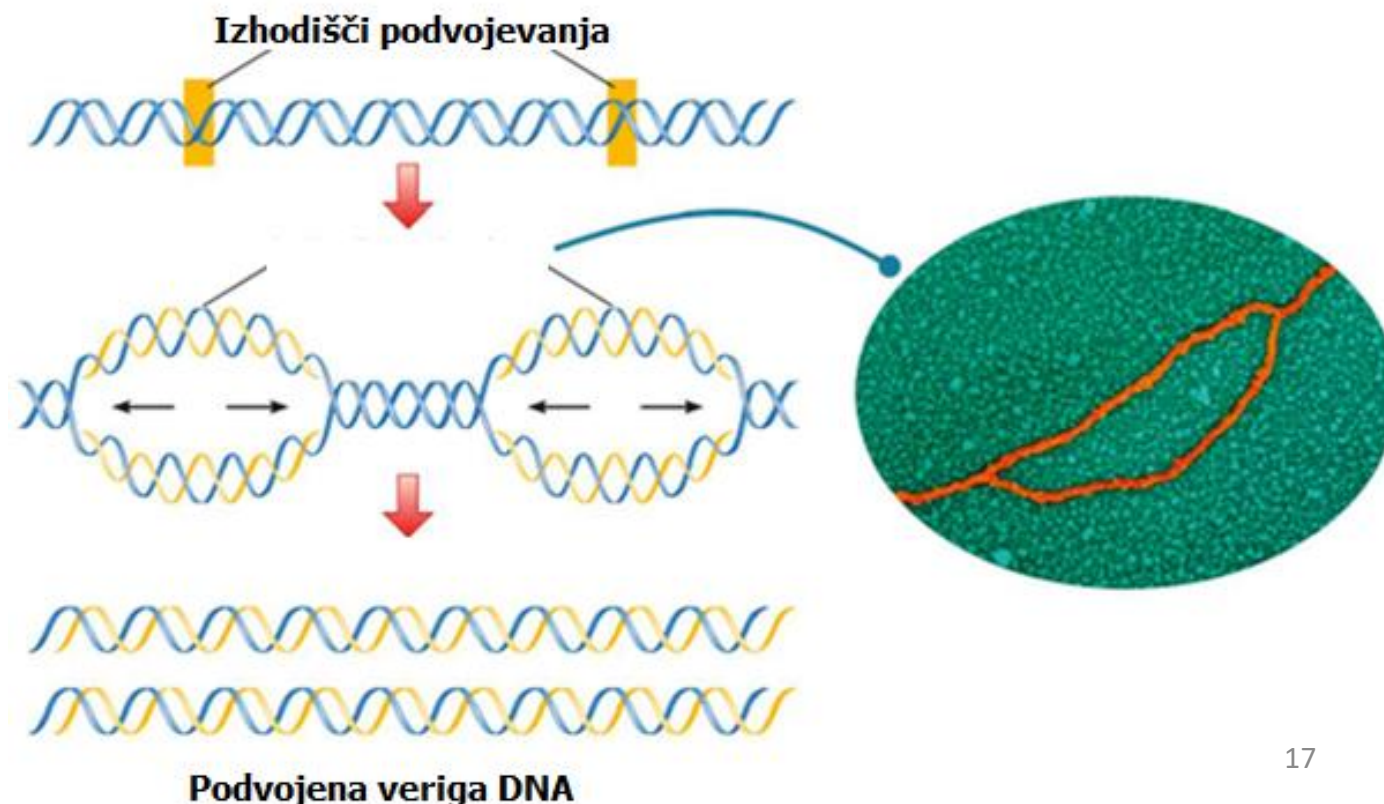
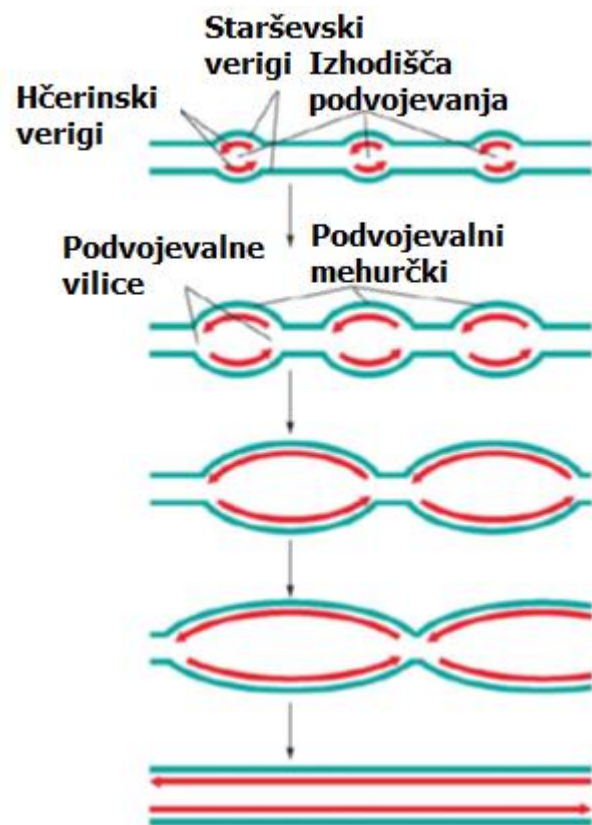
# Mehanizem podvojevanja DNA



- V **bakterijah** se začne DNA podvojevati na enem mestu, ki mu pravimo „**izhodišče podvojevanja**“.
- Od izhodišča podvojevanja se DNA podvojuje **v obeh smereh**.

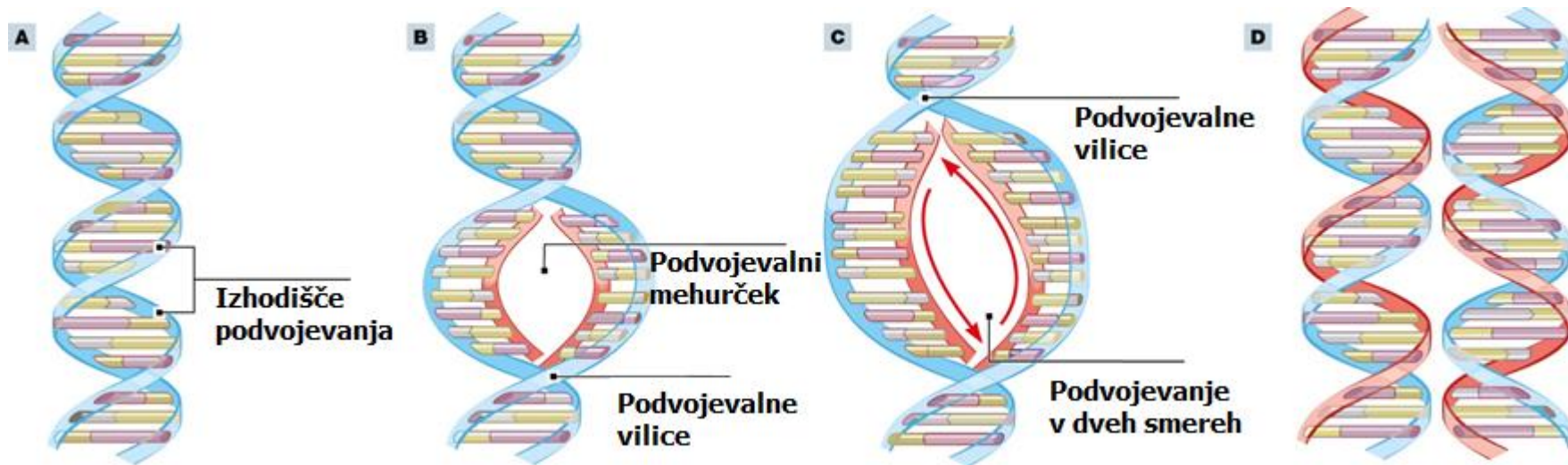
# Mehanizem podvojevanja DNA

- V **evkariontih** ima vsak kromosom več „**izhodišč podvojevanja**“.
- Izhodišča podvojevanja so bogata na adeninih in timinih, ki so povezani s samo dvema vodikovima vezema in se torej laže ločujejo. Izhodiščem pravimo **TATA box** (npr. TTATTAAATTAATA)
- Od vsakega izhodišča se DNA podvojuje v obeh smereh, tako da se čas podvojevanja močno skrajša.





# Mehanizem podvojevanja DNA



- Podvojevanje katalizira encim **DNA polimeraza**;
- Na vsakem izhodišču podvojevanja nastane **podvojevalni mehurček**, ki ima na vsaki strani ene **podvojevalne vilice** v obliki črke Y.
- Podvojevanje poteka **v dveh smereh**.



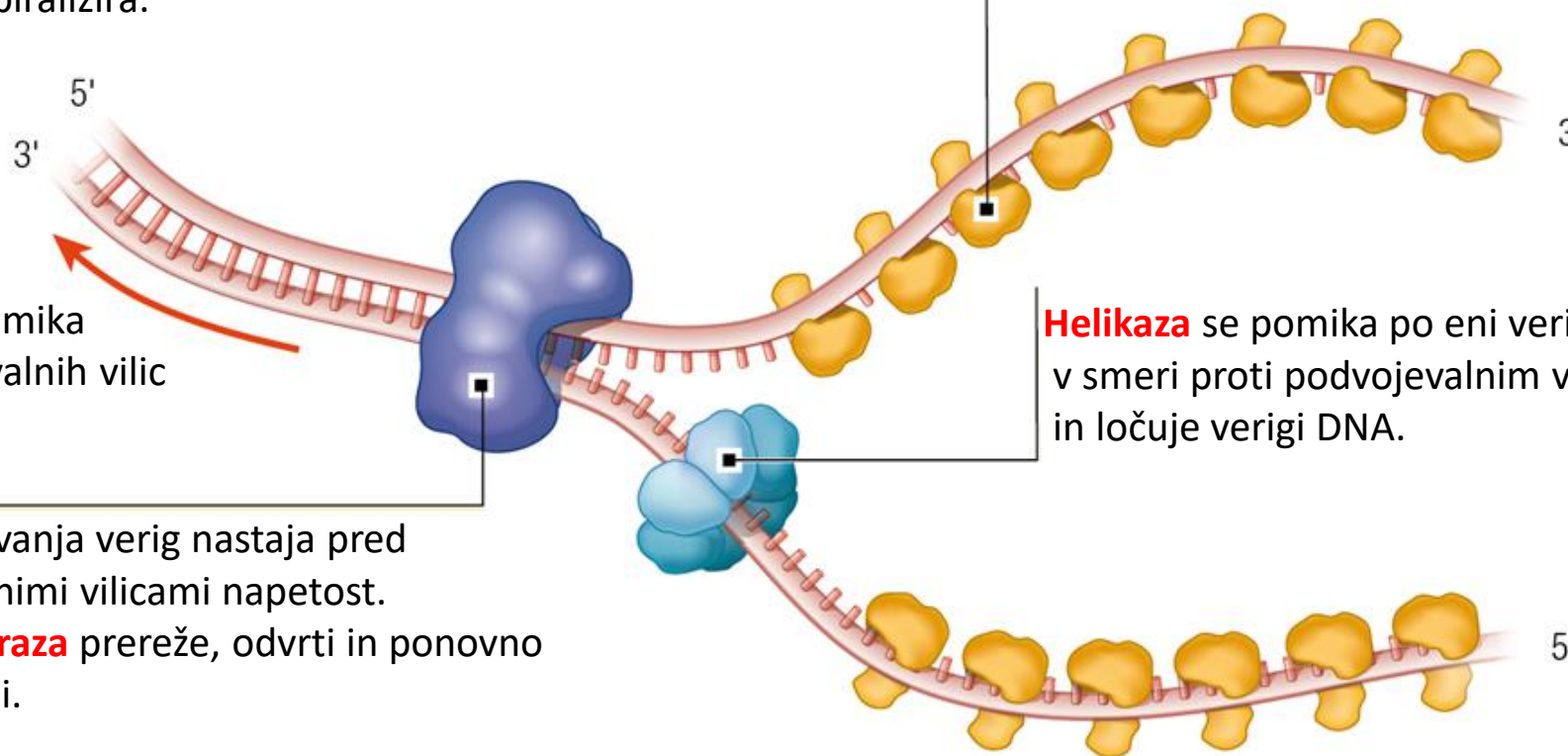
# Encimi, ki sodelujejo pri podvojevanju

Encimi **single strand binding proteins (SSBP)** se vežejo na verigo, zato da se ne ponovno spiralizira.

Smer premika podvojevalnih vilic

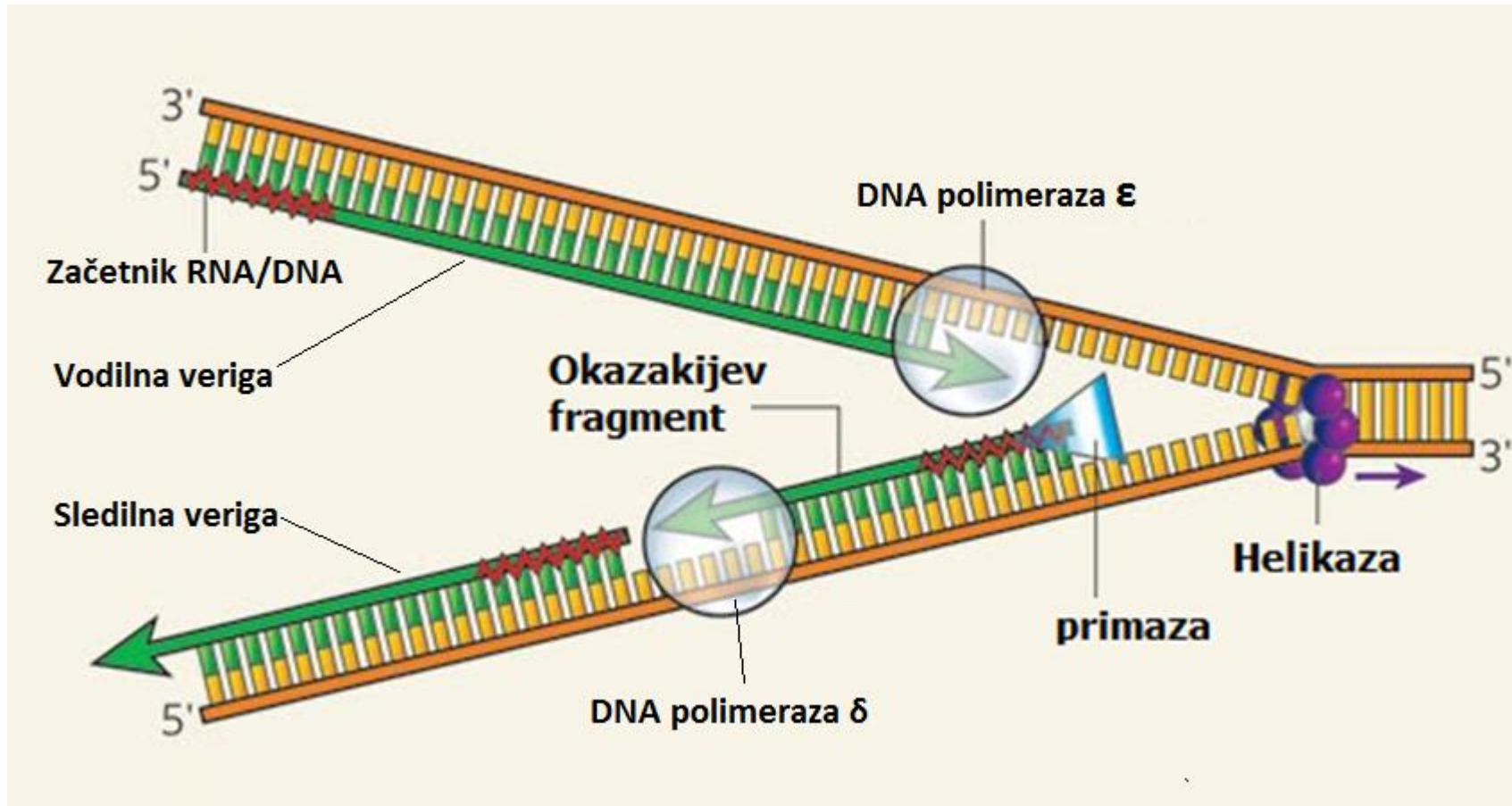
Zaradi ločevanja verig nastaja pred podvojevalnimi vilicami napetost. **Topoizomeraza** prereže, odvrti in ponovno združi verigi.

**Helikaza** se pomika po eni verigi v smeri proti podvojevalnim vilicam in ločuje verigi DNA.



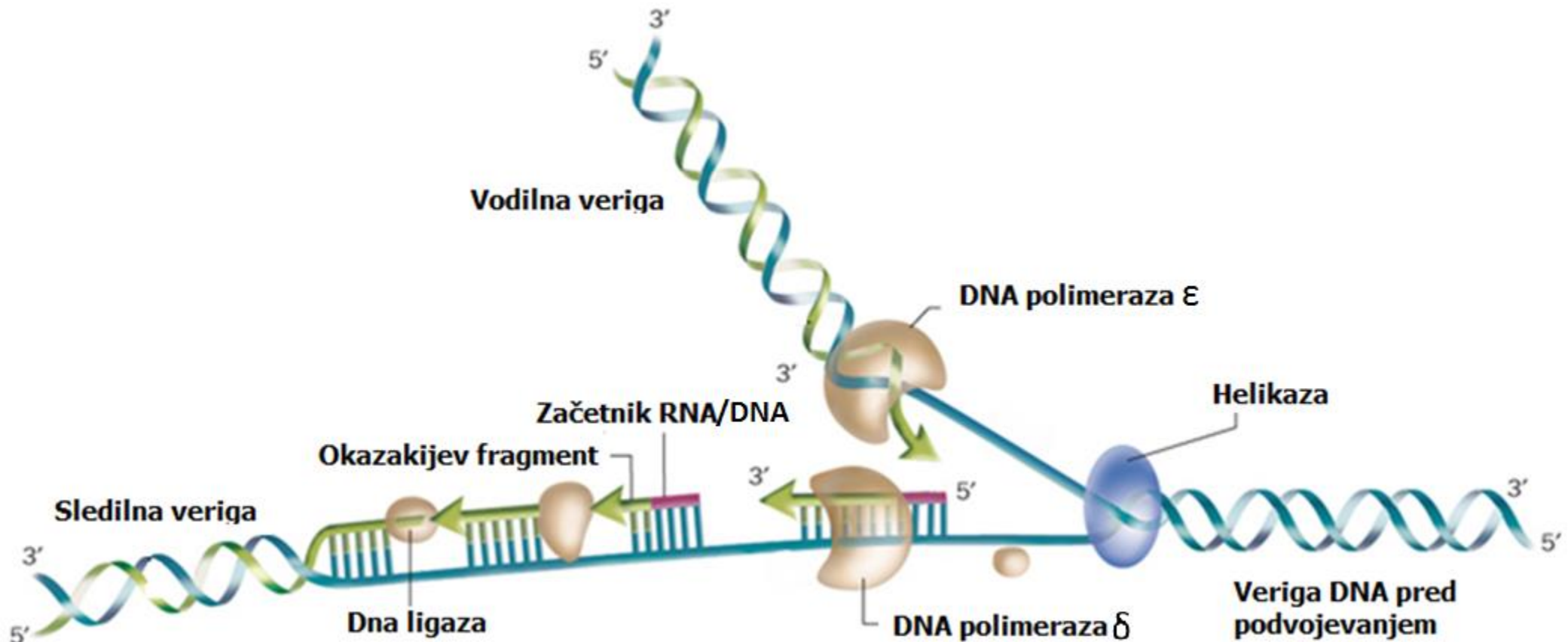
# Podvojevanje DNA ni simetrično

Podvojevanje poteka delno tekoče in delno v Okazakijevih fragmentih.

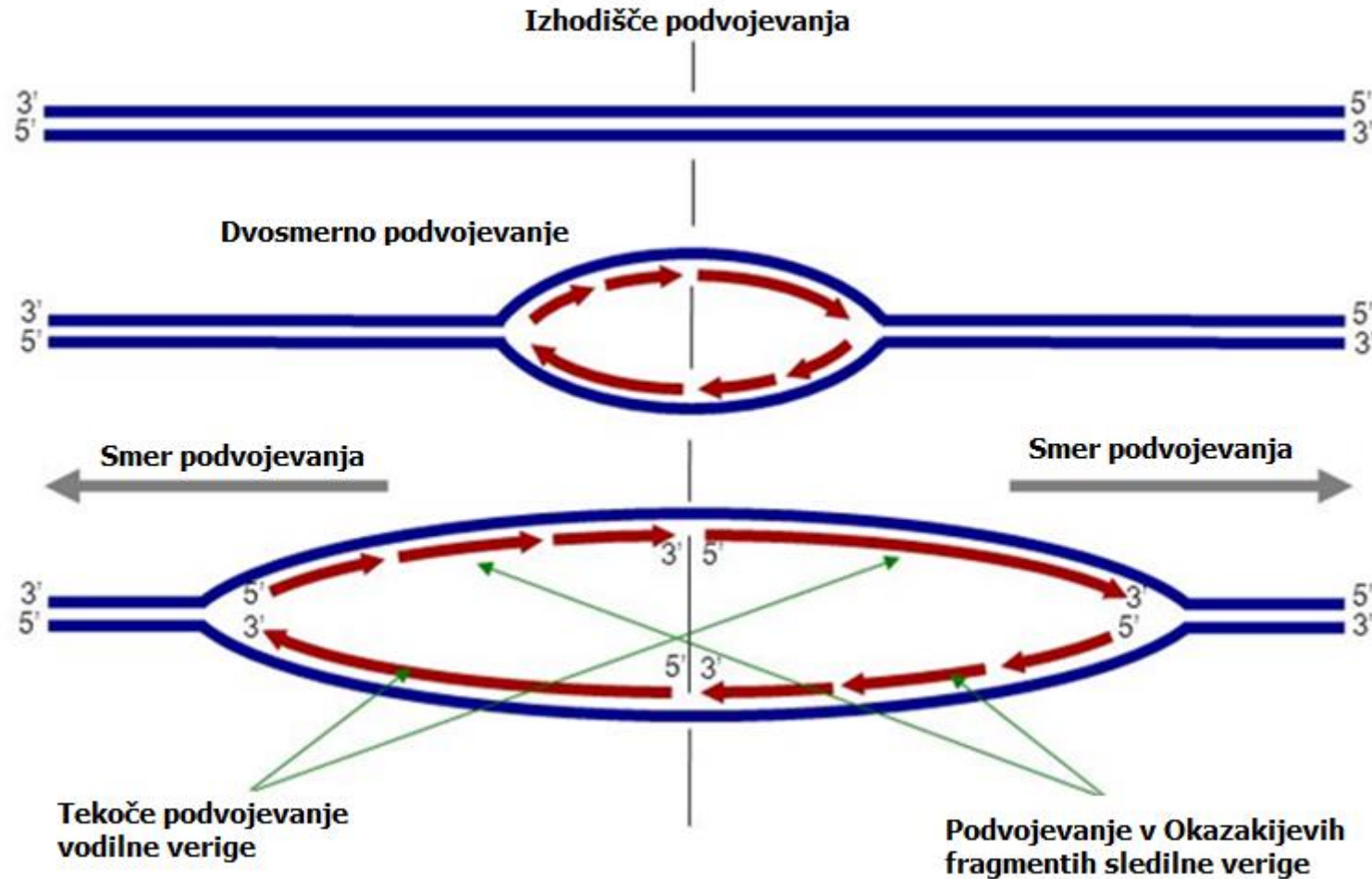


# Podvojevanje DNA ni simetrično

- **Vodilna veriga** nastaja tekoče v smeri proti podvojevalnim vilicam (v smeri  $5' \rightarrow 3'$ ).
- **Sledilna veriga** nastaja v fragmentih (Okazakijevi fragmenti) v smeri proč od podvojevalnih vilic (v smeri  $5' \rightarrow 3'$ ).



# Podvojevanje DNA v replikacijskem mehurčku

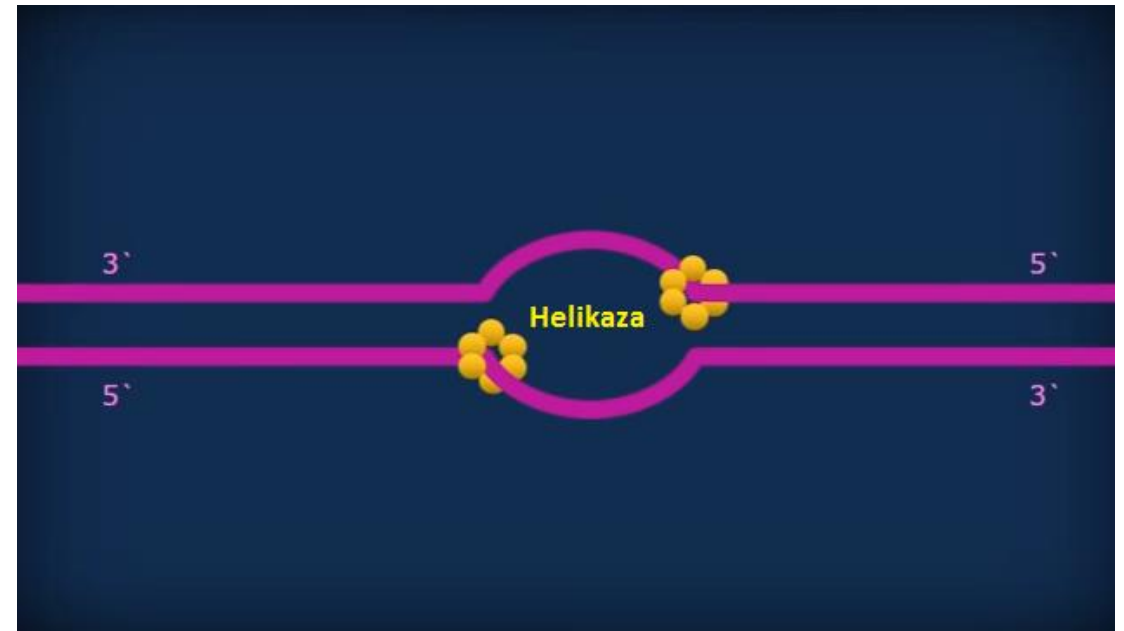
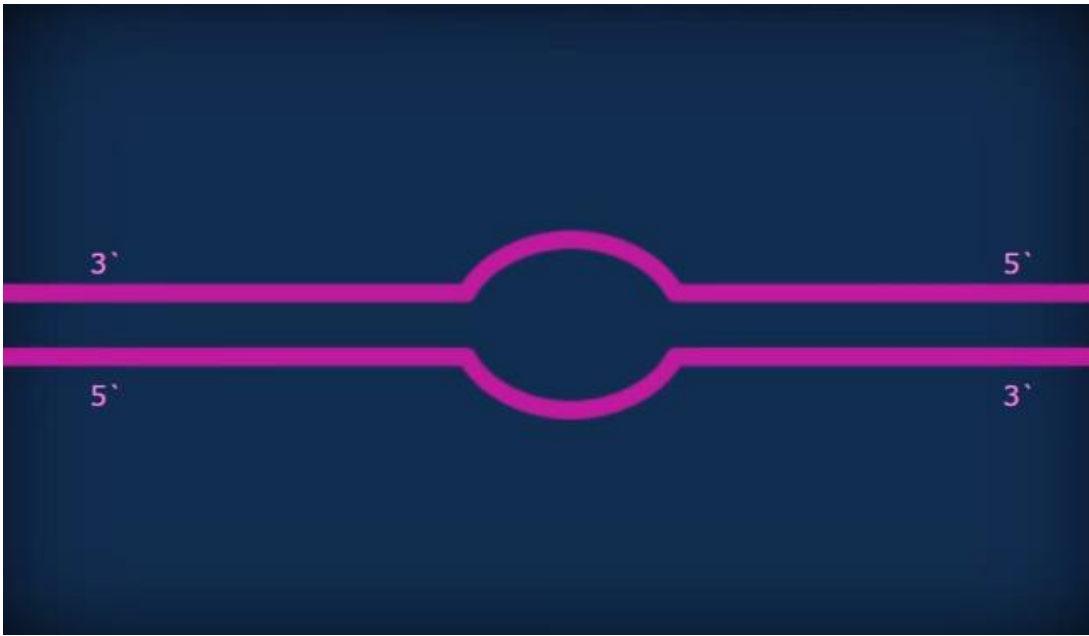


# Mehanizem podvojevanja DNA

- Pri podvojevanju DNA sodeluje **več vrst DNA polimeraz**, ki imajo različne funkcije: sinteza DNA in razne oblike popravljanja napak.
  - Pri **prokariontih** so to DNA polimeraza I, II, III, IV, V.
  - Pri **evkariontih** pa DNA polimeraza  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ .

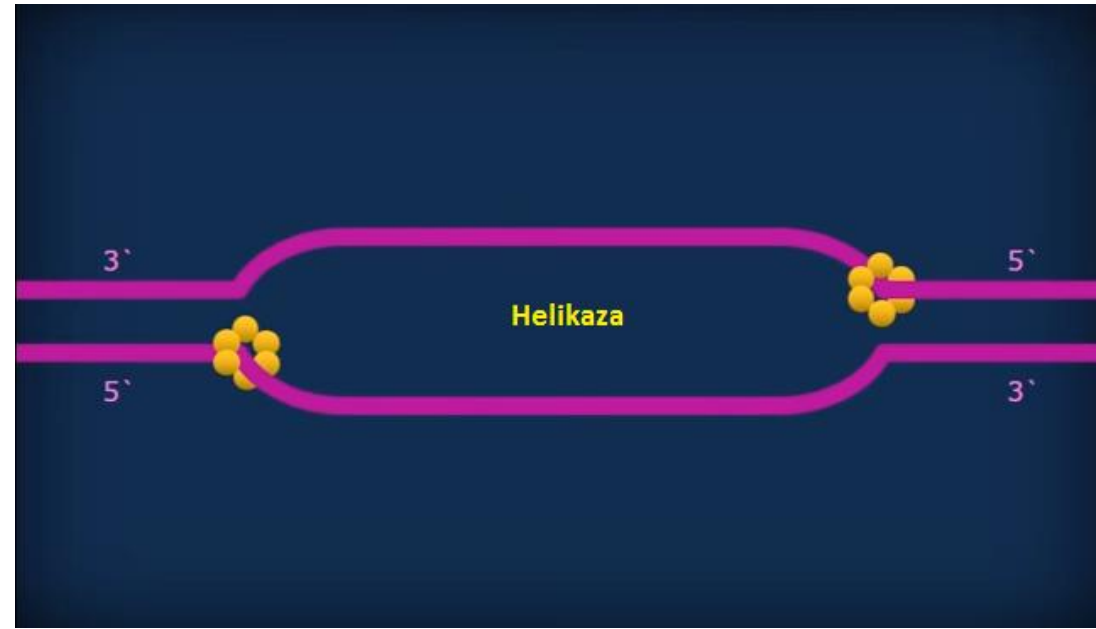
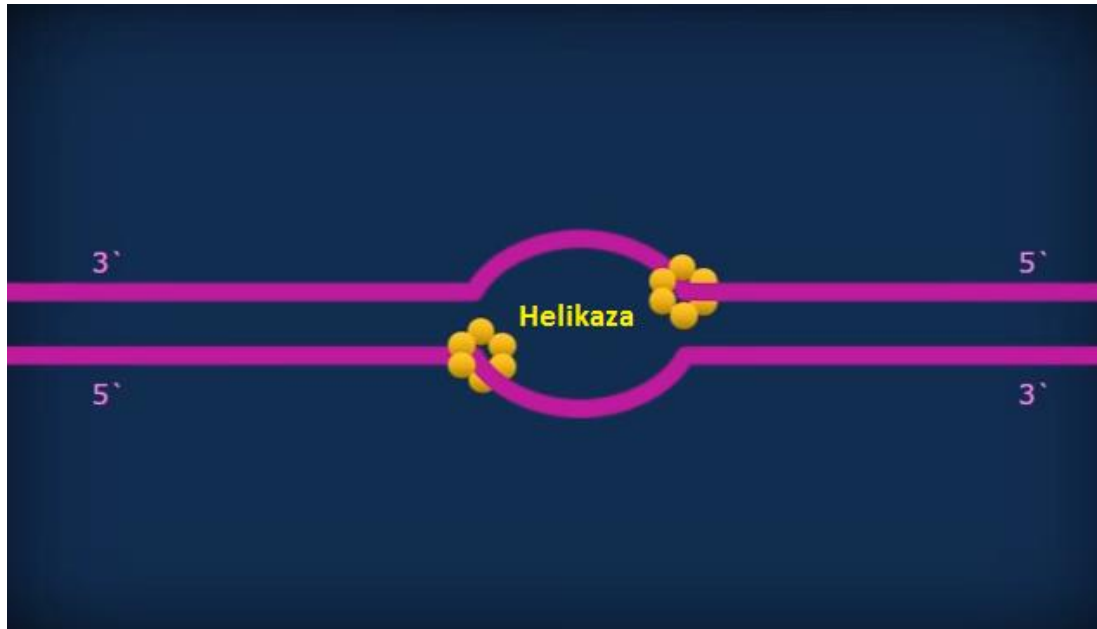


# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



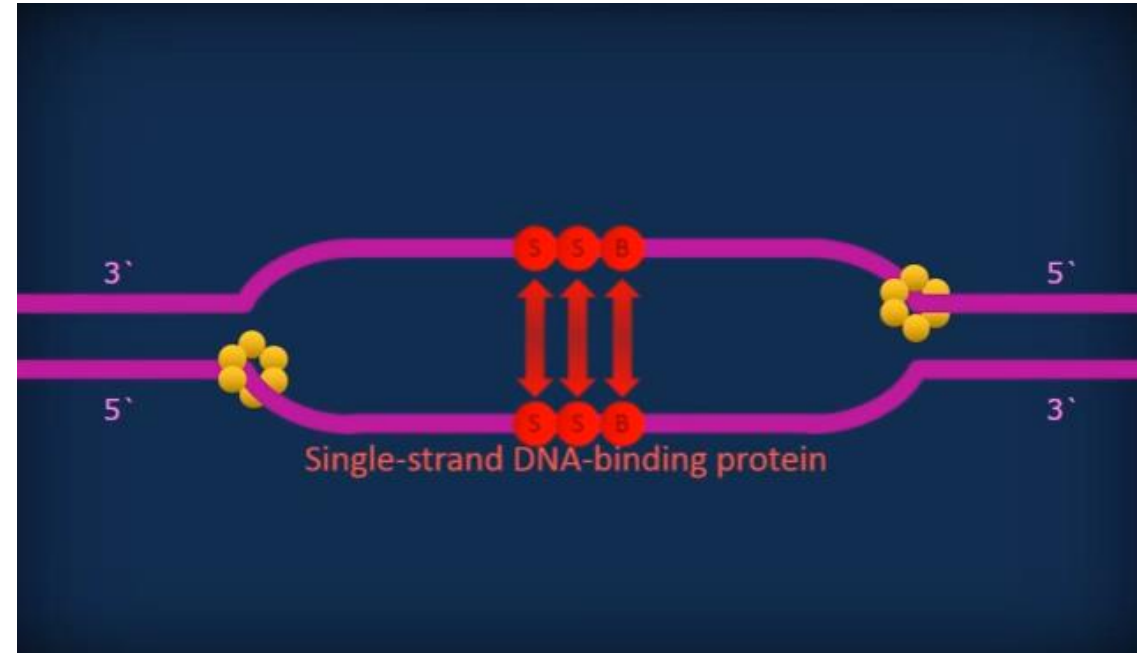
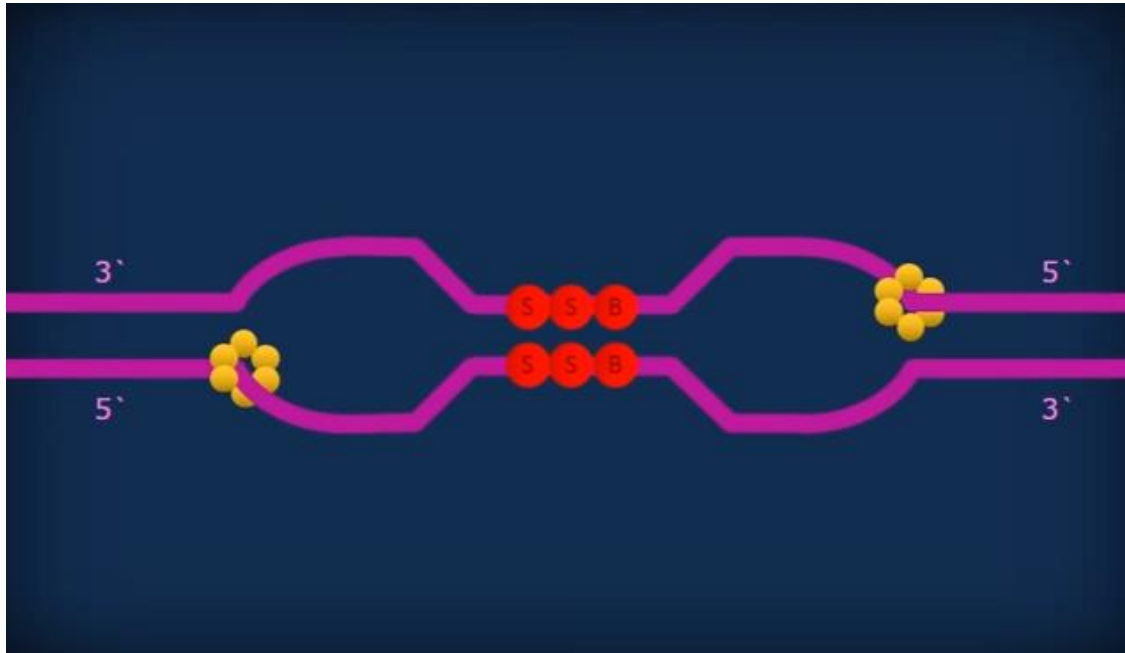
- **Helikaza** se poveže na izhodišče podvojevanja.

# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



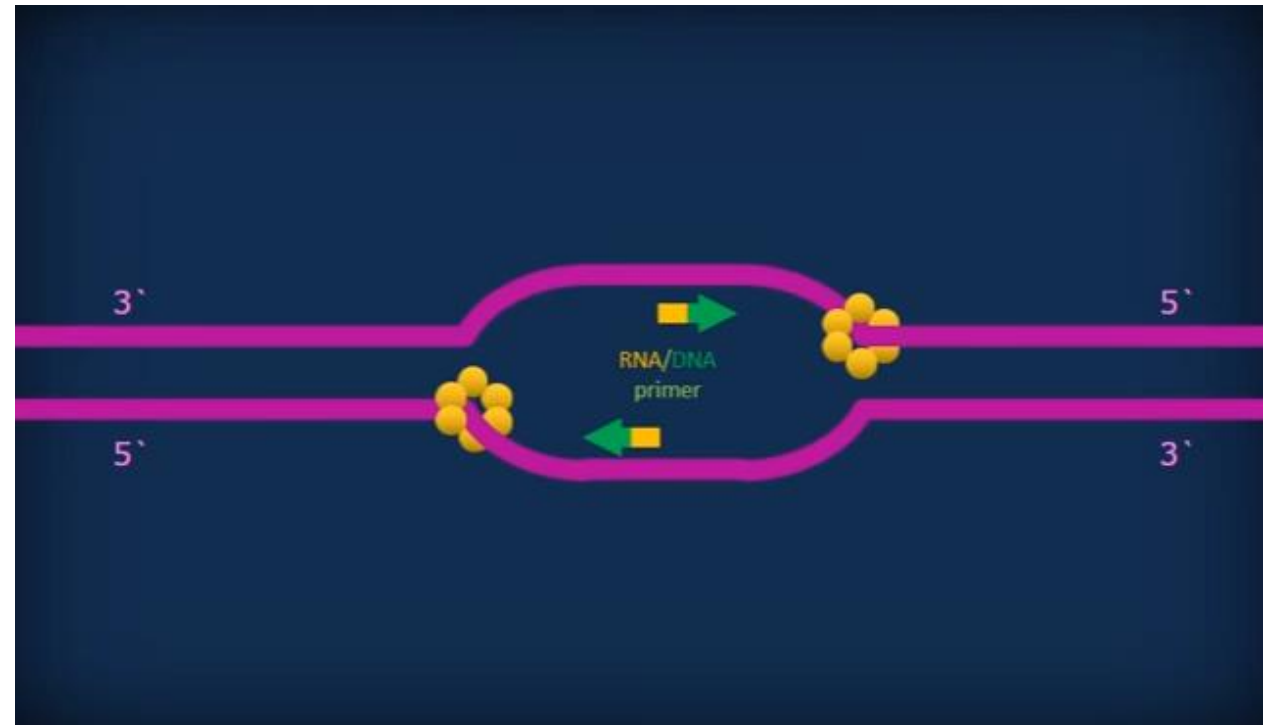
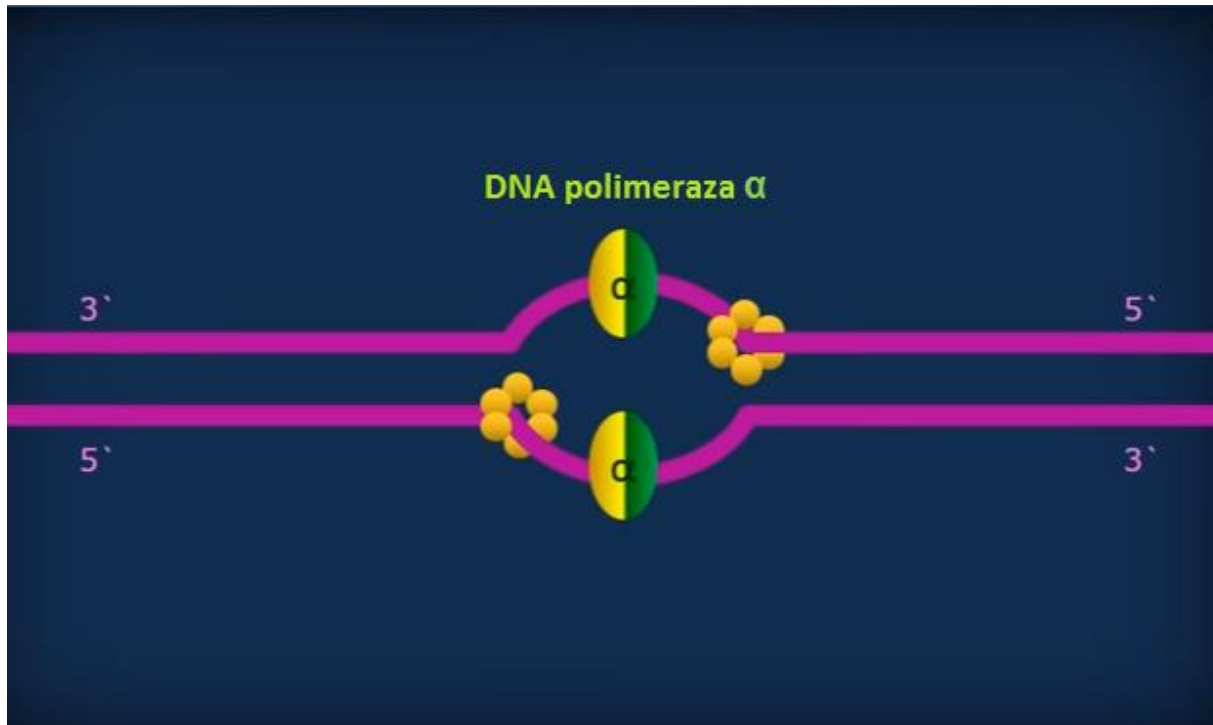
- **Helikaza** se začne premikati iz izhodišča podvojevanja v obe smeri in povečuje podvojevalni mehurček (razpre dvojno vijačnico).

# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



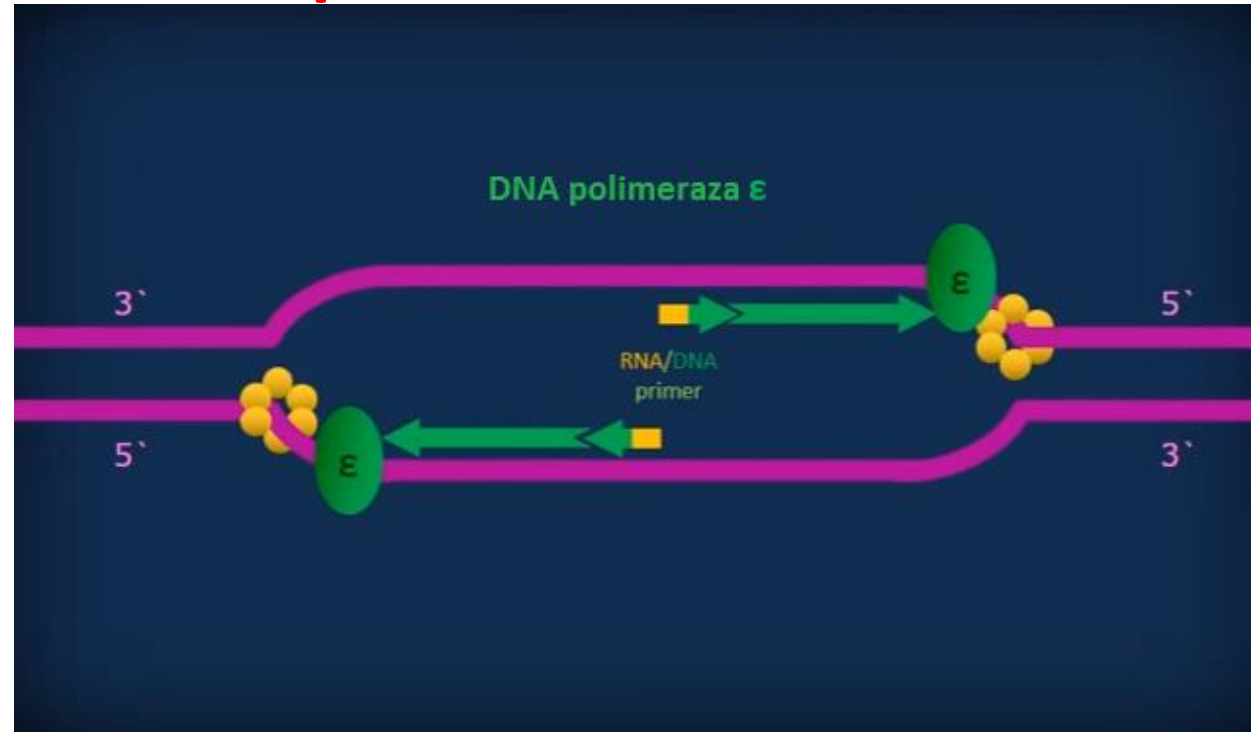
- Zaradi elektrostatskega privlaka težita ločeni verigi DNA po ponovni združitvi.
- Da bi se to ne zgodilo, se nanju povežejo SSBP, ki se med sabo odbijajo in tako ponovno ločijo komplementarni verigi DNA.

# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



- Za začetek sinteze potrebuje **DNA polimeraza  $\epsilon$**  3'-OH konec, na katerega lahko veže naslednje nukleotide.
- **DNA polimeraza  $\alpha$**  (ali **primaza**) sintetizira začetnika RNA/DNA (**RNA/DNA primer**), ki je sestavljen iz nekaj nukleotidov RNA in ostalih nukleotidov DNA.

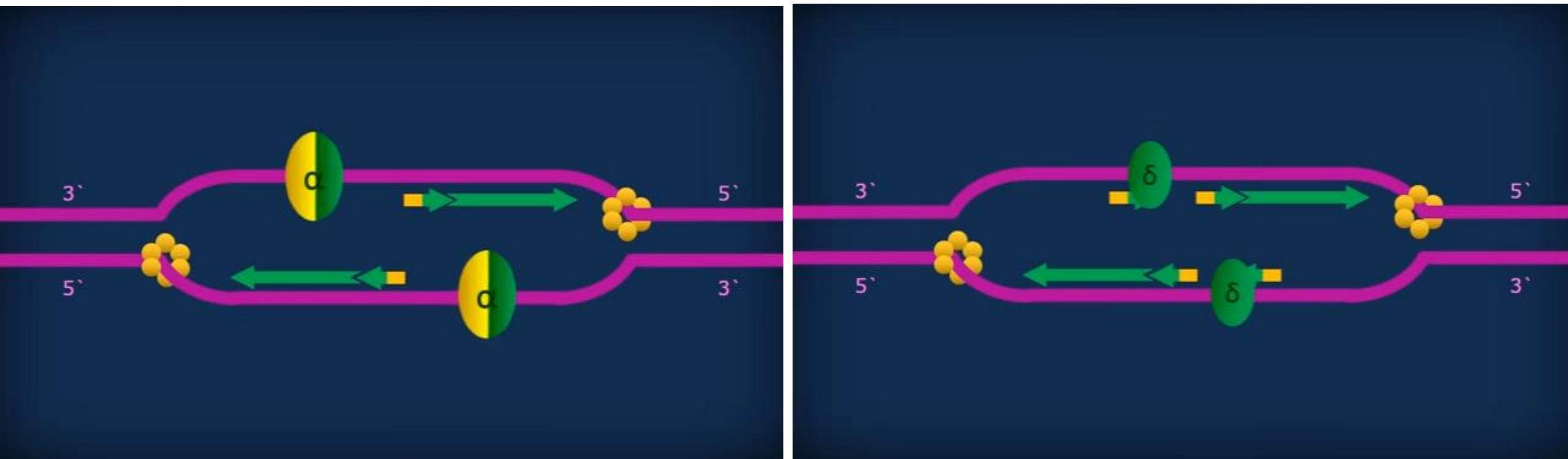
# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



- Vodilni verigi nastaneta tako, da se DNA polimeraza ε veže na 3'-OH konec začetnika RNA/DNA in dodaja nukleotide v smeri 5' → 3'.

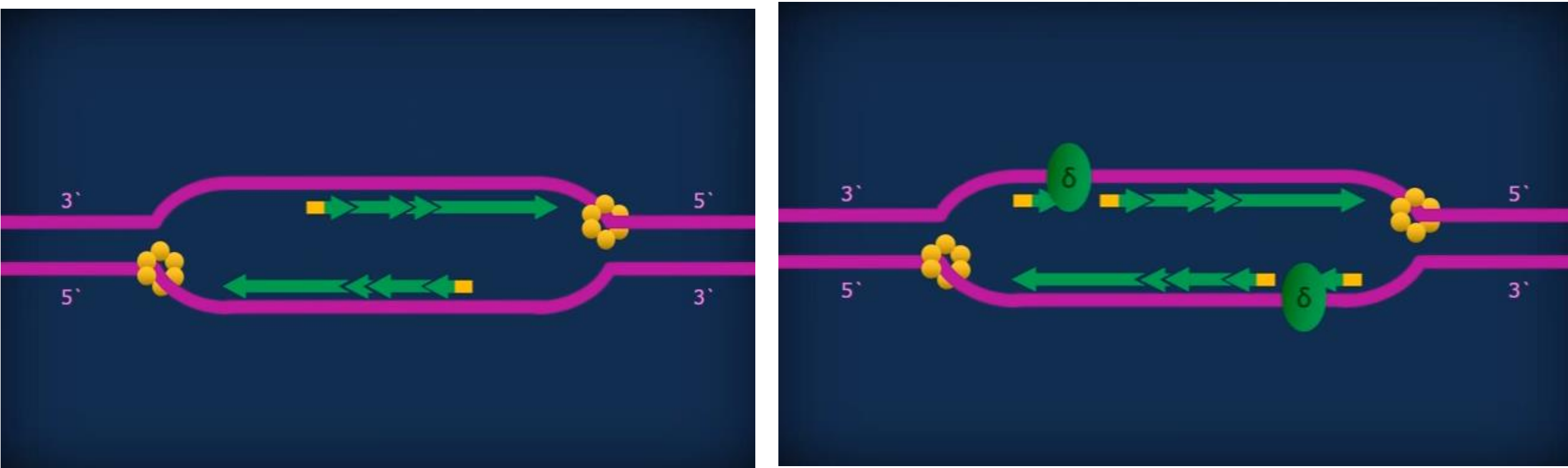


# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



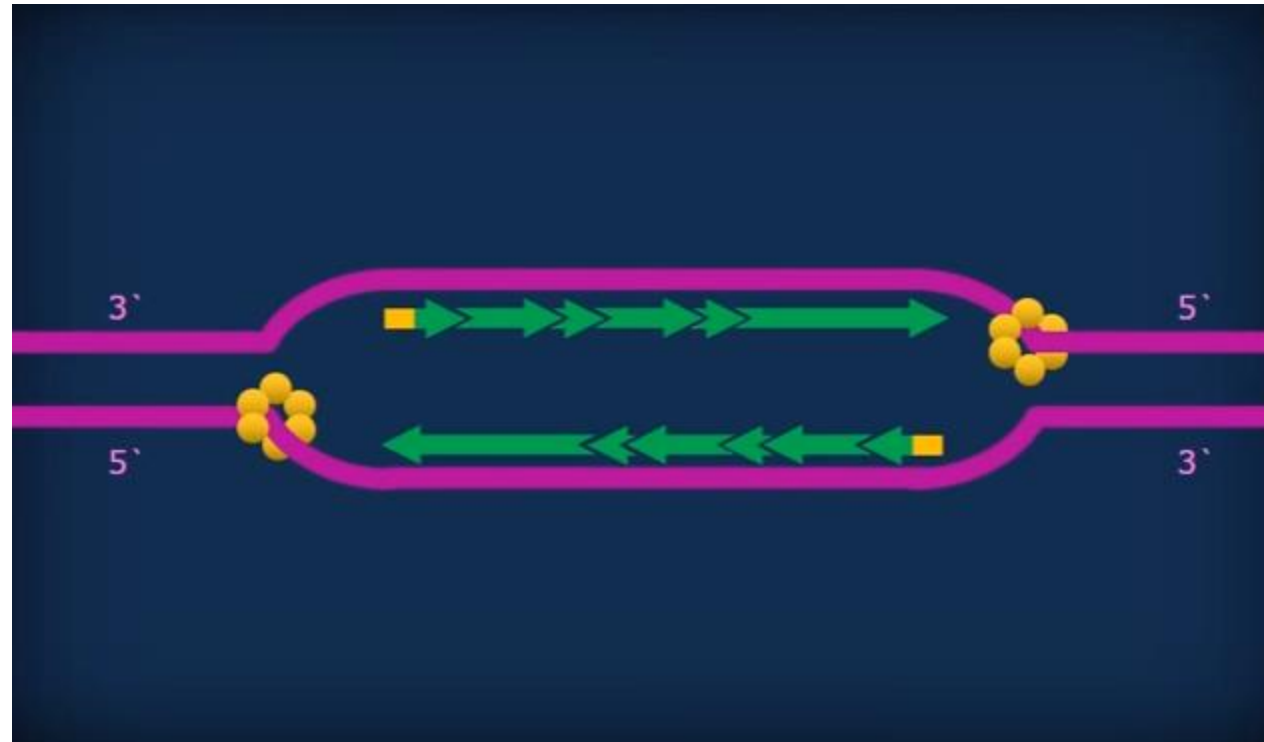
- Na podoben način nastaneta sledilni verigi, vendar v fragmentih:
- DNA polimeraza  $\alpha$  (ali primaza) sintetizira začetnika RNA/DNA (RNA/DNA primer).
- DNA polimeraza  $\delta$  se veže na 3'-OH konec začetnika RNA/DNA in dodaja nukleotide v smeri  $5' \rightarrow 3'$ .
- Za vsak fragment se mehanizem ponovi.

# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



- Za vsak fragment se mehanizem ponovi.
- Ko **DNA polimeraza  $\delta$**  doseže začetnika RNA/DNA, ki se nahaja pred njo, zamenja njegove nukleotide RNA z nukleotidi DNA.

# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



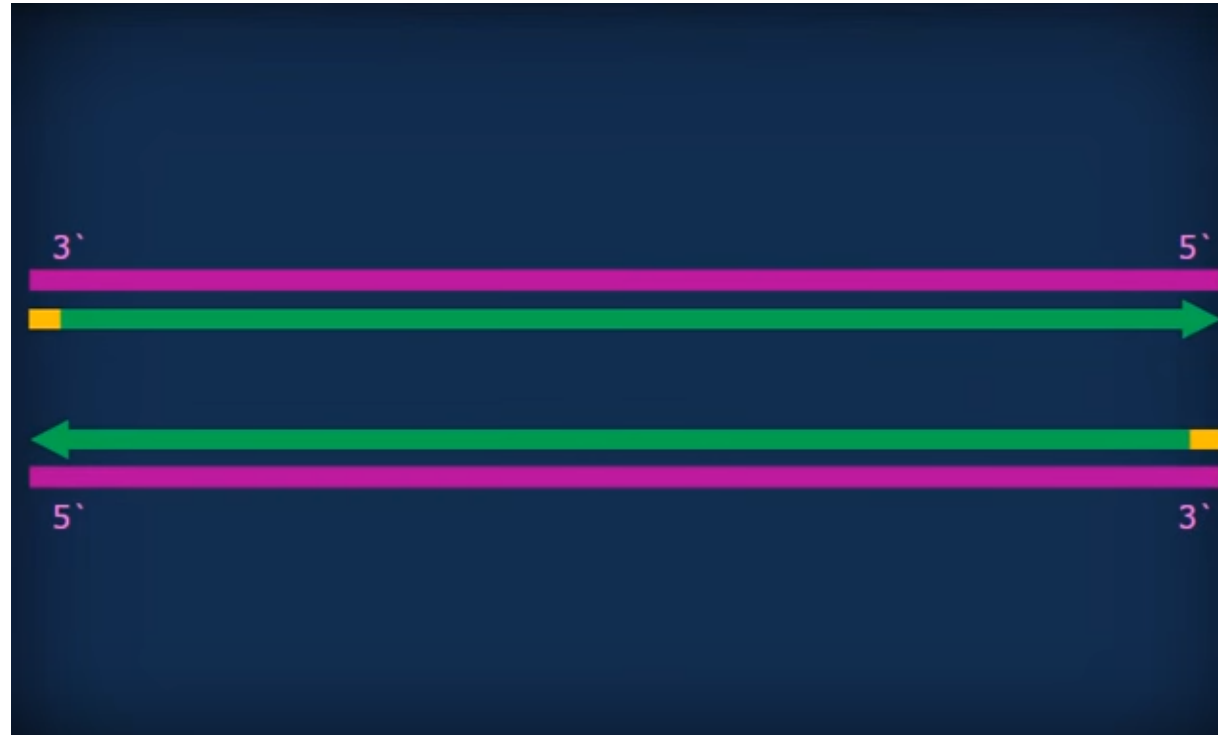
- Tako izginejo vsi nukleotidi RNA, razen tistih, ki se nahajajo na koncih podvojevalnega mehurčka.

# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



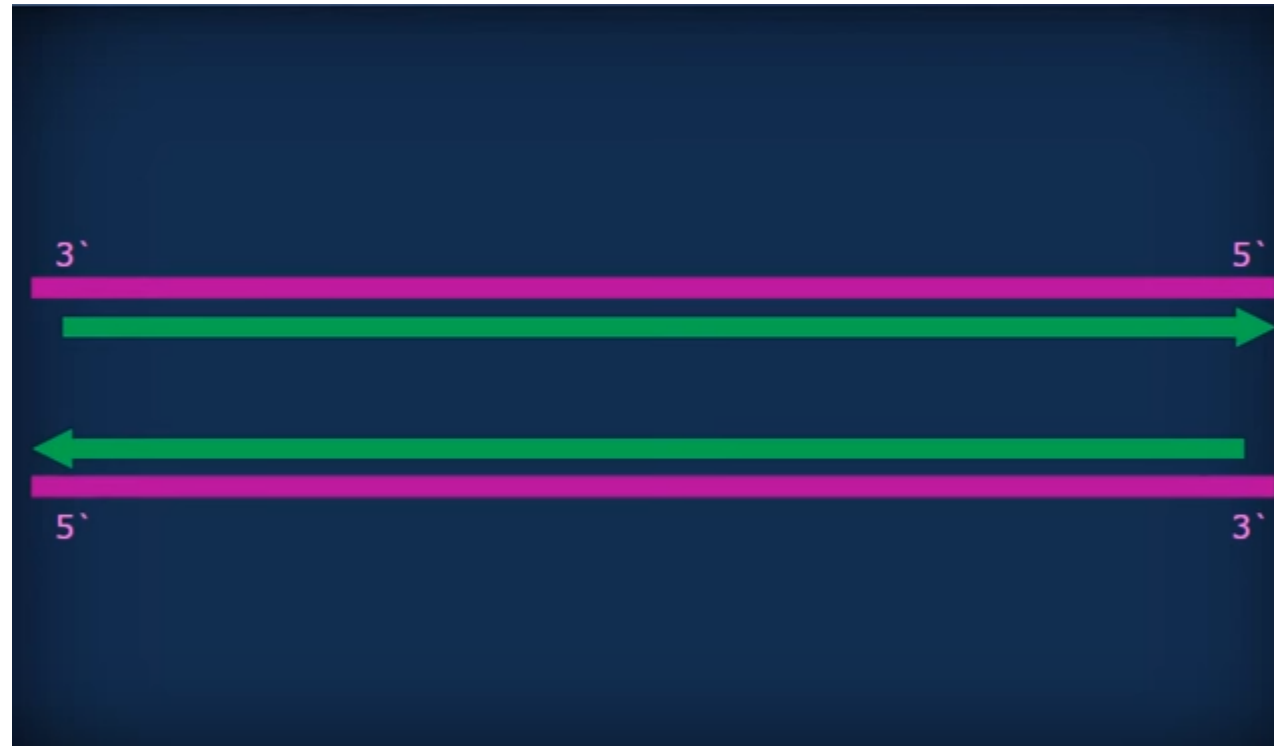
- DNA ligaza poveže med sabo vse fragmente.

# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



- Ob koncu podvojevanja DNA, ostaneta na obeh koncih kromosoma fragmenta RNA.
- Za njima se namreč ne pojavi več nobena DNA polimeraza  $\delta$ , ki bi fragmente odstranila.

# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih

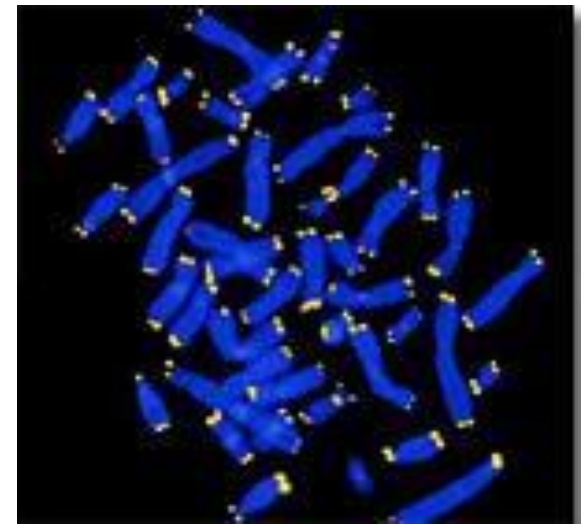


- Encim **RNAza H** odstrani fragment RNA, tako da postaneta novonastali verigi na konceh 5' nekoliko krajši.
- Ob vsaki naslednji delitvi bosta novonastali verigi čedalje krajši.

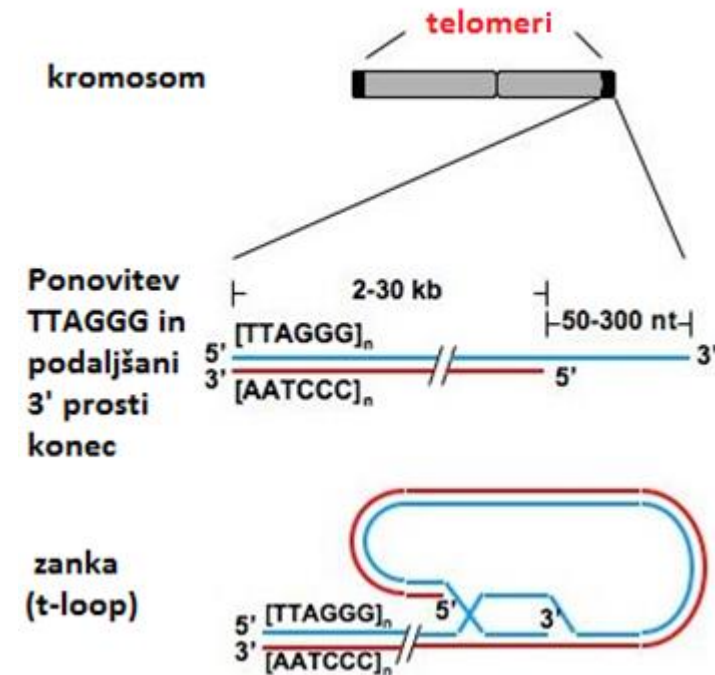


# Telomere

- Telomere so strukture **na koncih** evkariontskih **kromosomov**, ki imajo pomembno **varovalno vlogo** v preprečevanju **razgradnje kromosomskih koncev**.
- Telomere so zgrajene iz **ponavljajočih se zaporedij *TTAGGG*** v smeri **5'→3'** proti **koncu kromosoma**, in obsegajo **od 2 do 30 kilobaz**.
- Sledita še dva konca, od katerih je 3' konec za 50-300 nukleotidov daljši.
- Konca se zvijeta in tvorita **zankasto strukturo (t-loop)**.



Človeška telomerna DNA

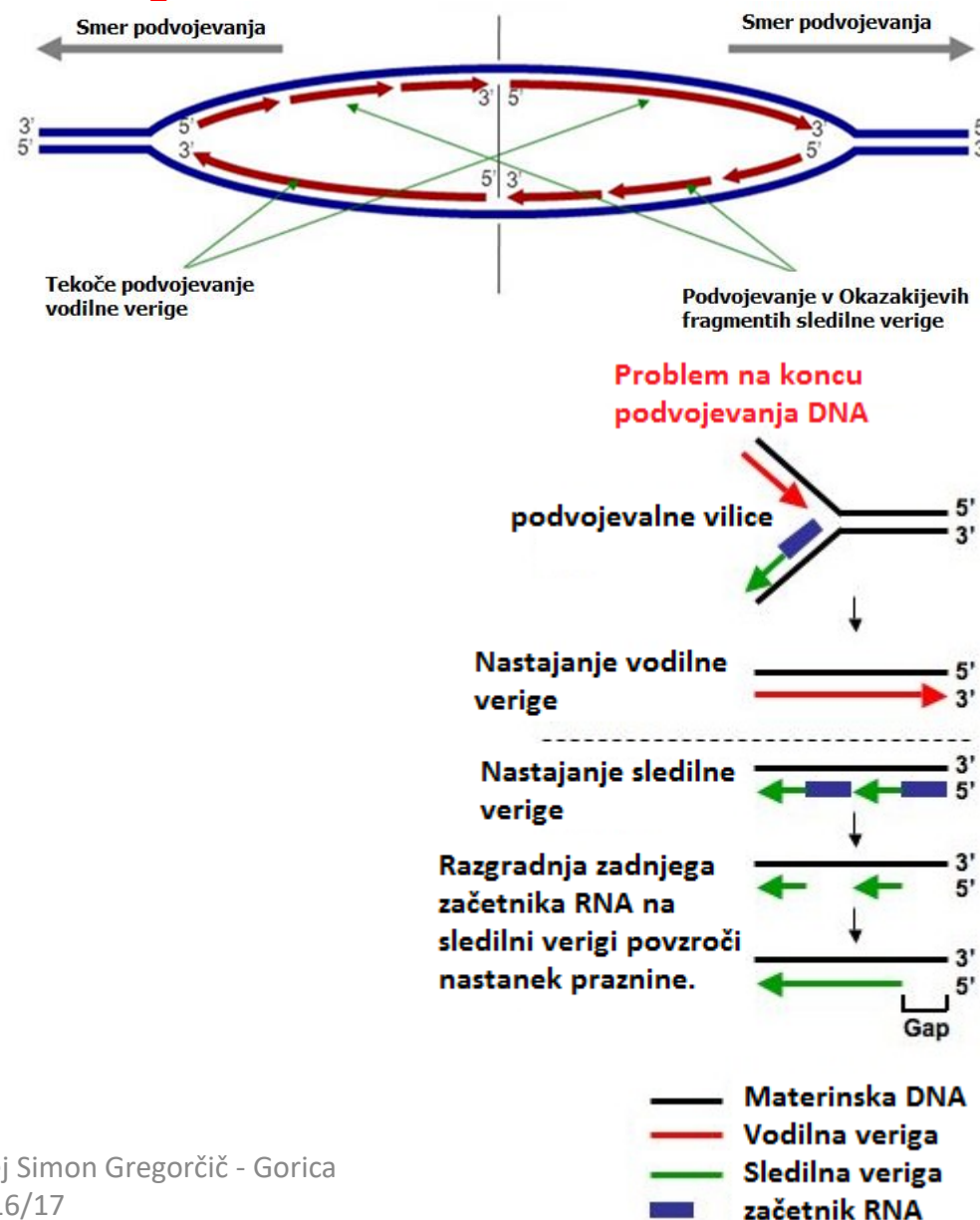


# Telomere

- Pri vsaki delitvi somatskih celic se izgubi del telomer.
- V odsotnosti telomer bi se izgubile informacije na koncu kromosoma.
- V **zarodnih celicah** so prisotne **telomeraze**, ki podaljšujejo telomere in tako omogočajo veliko število celičnih delitev.
- V **somatskih celicah** **telomeraze ne nastajajo**, zato imajo te celice omejeno obdobje podvajanja, ki traja približno 50 delitev.
  - Ko se izgubijo celotne telomere je to znak, da je **celica stara**, zato se usmeri v programirano celično smrt (**apoptozo**).
- **Tumorske celice** pa imajo **veliko količino encima telomeraze**, ki podaljšuje telomere, kar povzroči daljšo življensko dobo rakavih celic.
- Razlog za to je **mutacija tumorskega supresorja**, ki ne more več zadrževati telomeraze v neaktivni obliki.

# Mehanizem krajšanja telomer

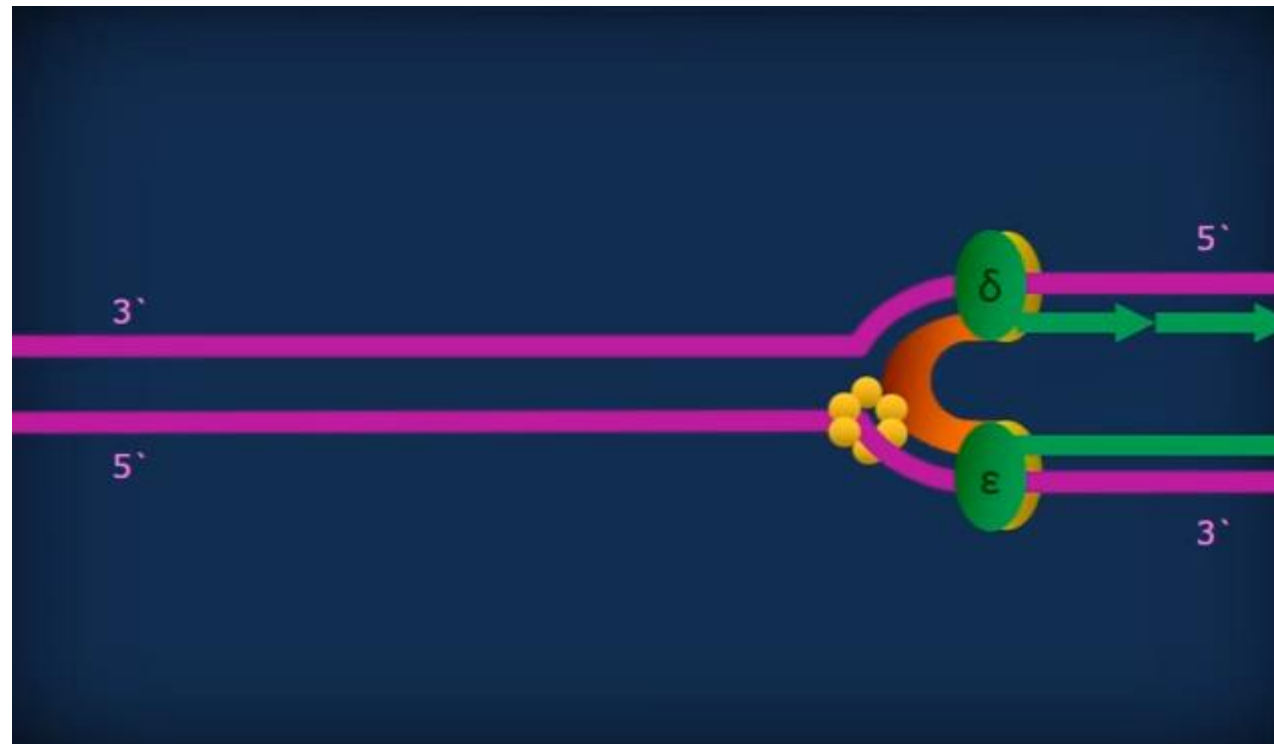
- Podvojevanje DNA se začne na sredini polinukleotidne verige.
- Podvajata jo encima DNA polimeraza  $\epsilon$  in  $\delta$  ki vedno potujeta od 5'-konca proti 3'-koncu.
- Vodilno verigo DNA polimeraza  $\epsilon$  popolnoma prepiše.
- Ko pridejo podvojevalne vilice do konca kromosoma, encim RNAza H razgradi zadnjega začetnika RNA sledilne verige.
- Na 5' koncu sledilne verige ostane praznina.



# Mehanizem krajšanja telomer

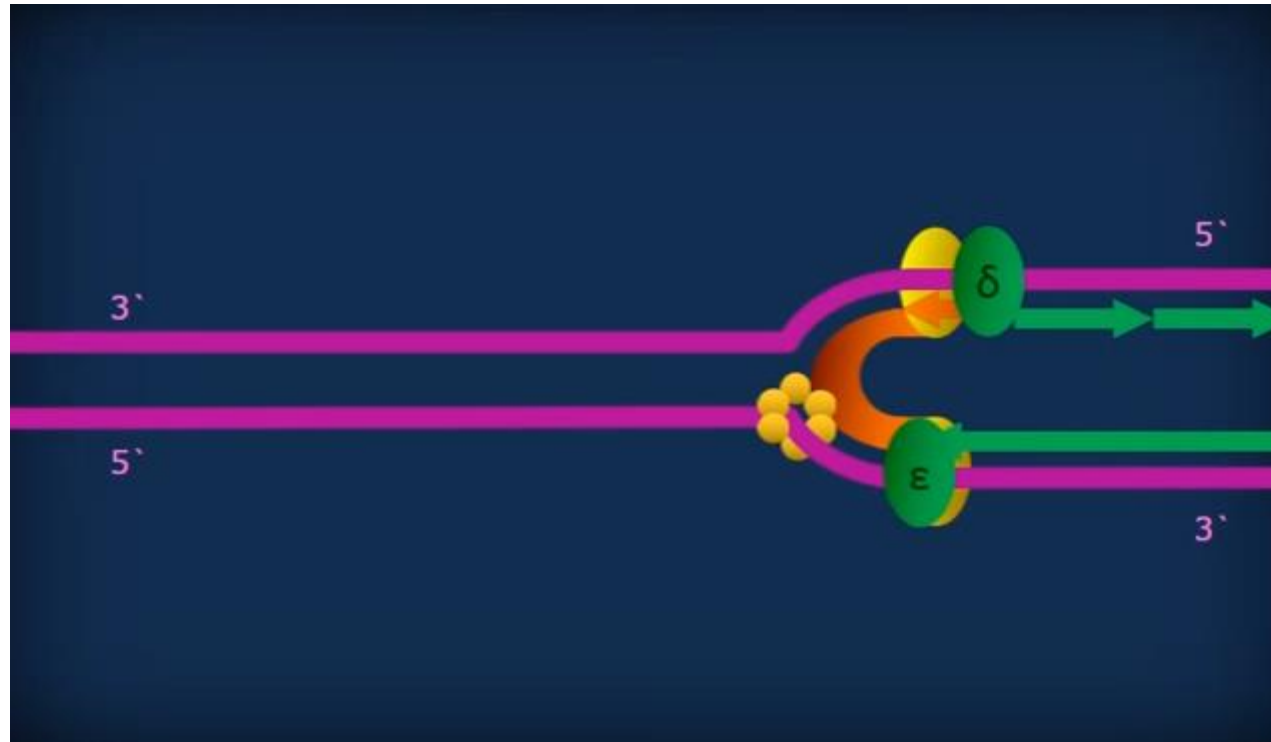
- To povzroči, da se **vsak 5'-konec nove DNA ne more v celoti podvojiti** in da ima **vsak hčerinski kromosom krajšo telomerno regijo**.
- Ugotovili so, da se **v posamezni mitози izgubi 100 baznih parov** iz telomerne regije DNA.

# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



- V resnici je delovanje DNA polimeraze  $\epsilon$  in  $\delta$  bolj kompleksno, ker sta pri svojem delu povezani na helikazo.
- Zato se morata obe, skupaj s helikazo premikati v isti smeri.

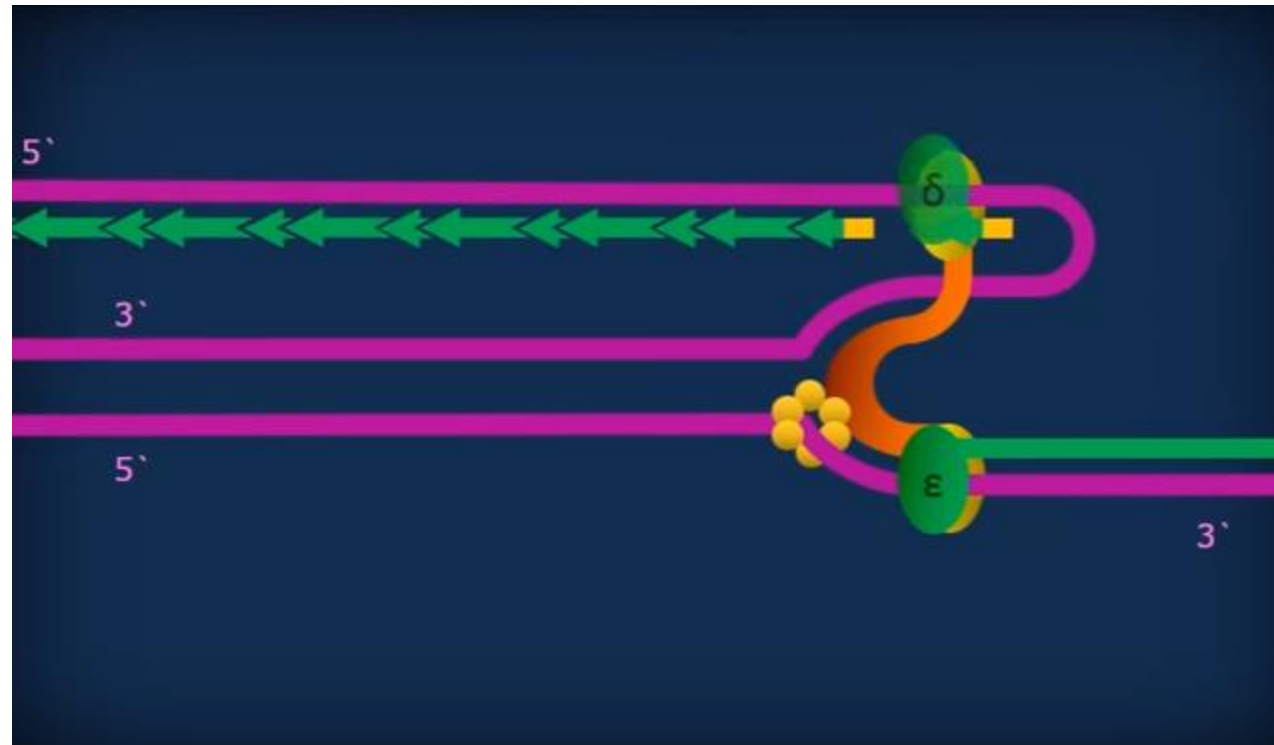
# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



- Zato se morata obe, skupaj s helikazo premikati v isti smeri.
- To je za DNA polimerazo  $\delta$  nemogoče, saj se mora premikati v smeri  $5' \rightarrow 3'$ .

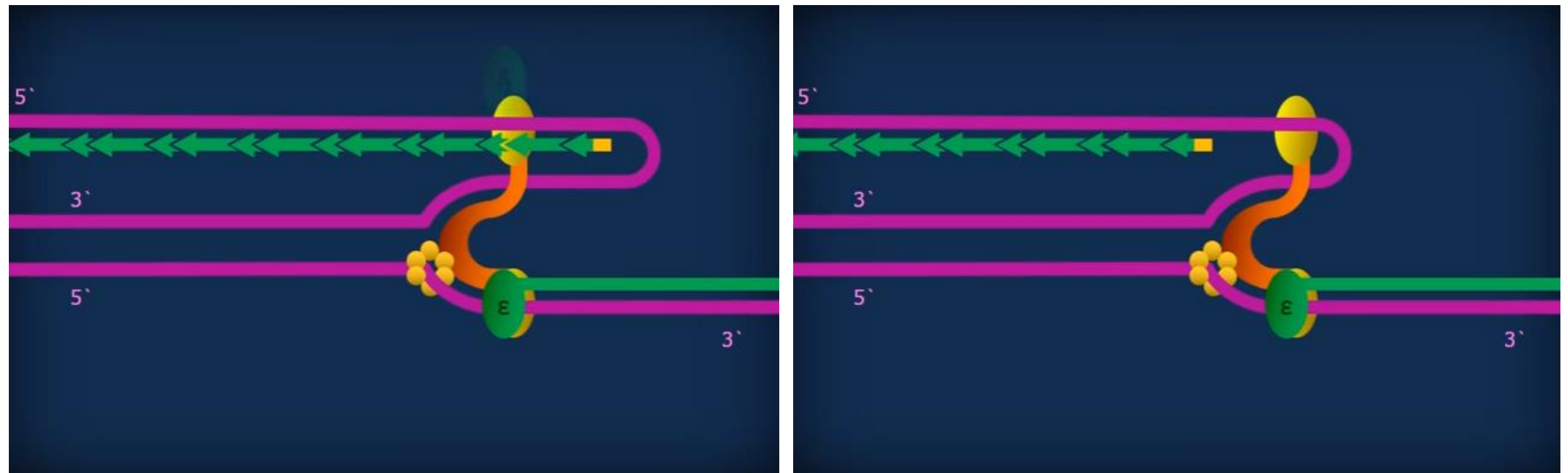


# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



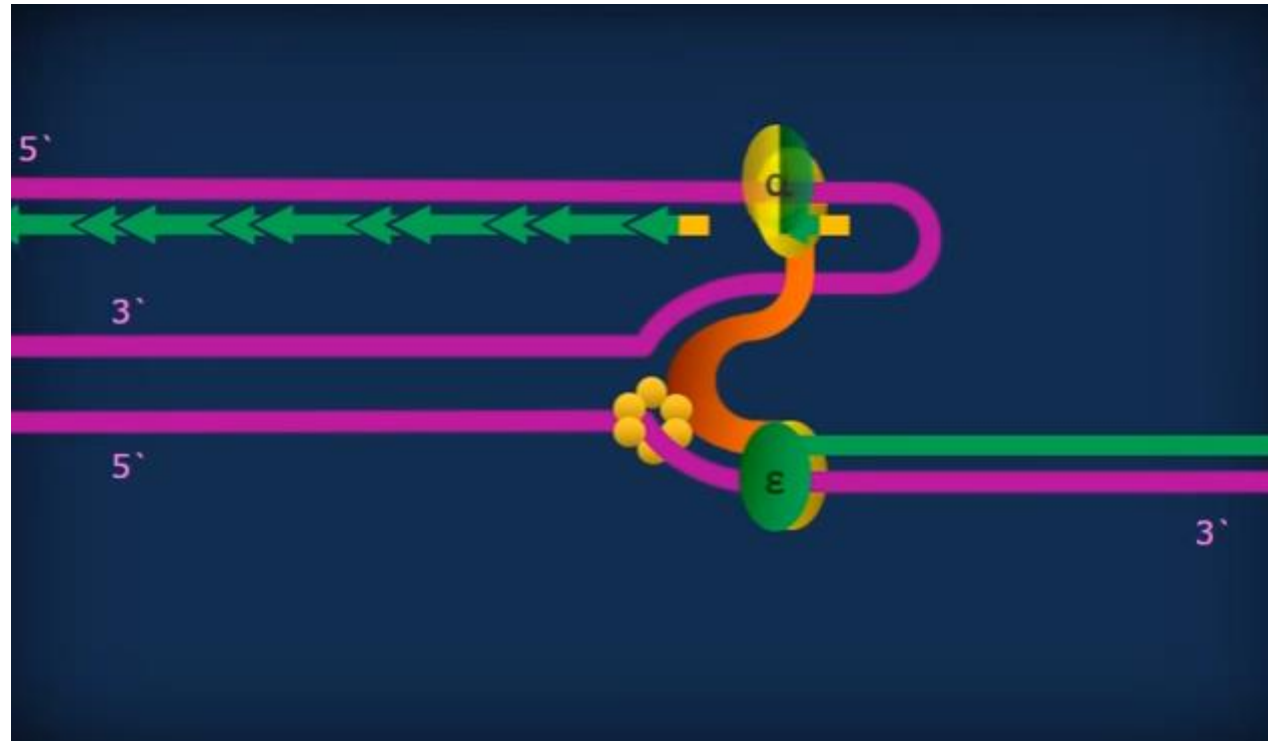
- Zato se mora sledilna veriga upogniti in tvoriti replikacijsko zanko.
- Na tak način se bo lahko DNA polimeraza  $\delta$  lahko premikala v isti smeri kot DNA polimeraza  $\epsilon$  in istočasno v smeri  $5' \rightarrow 3'$ .

# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



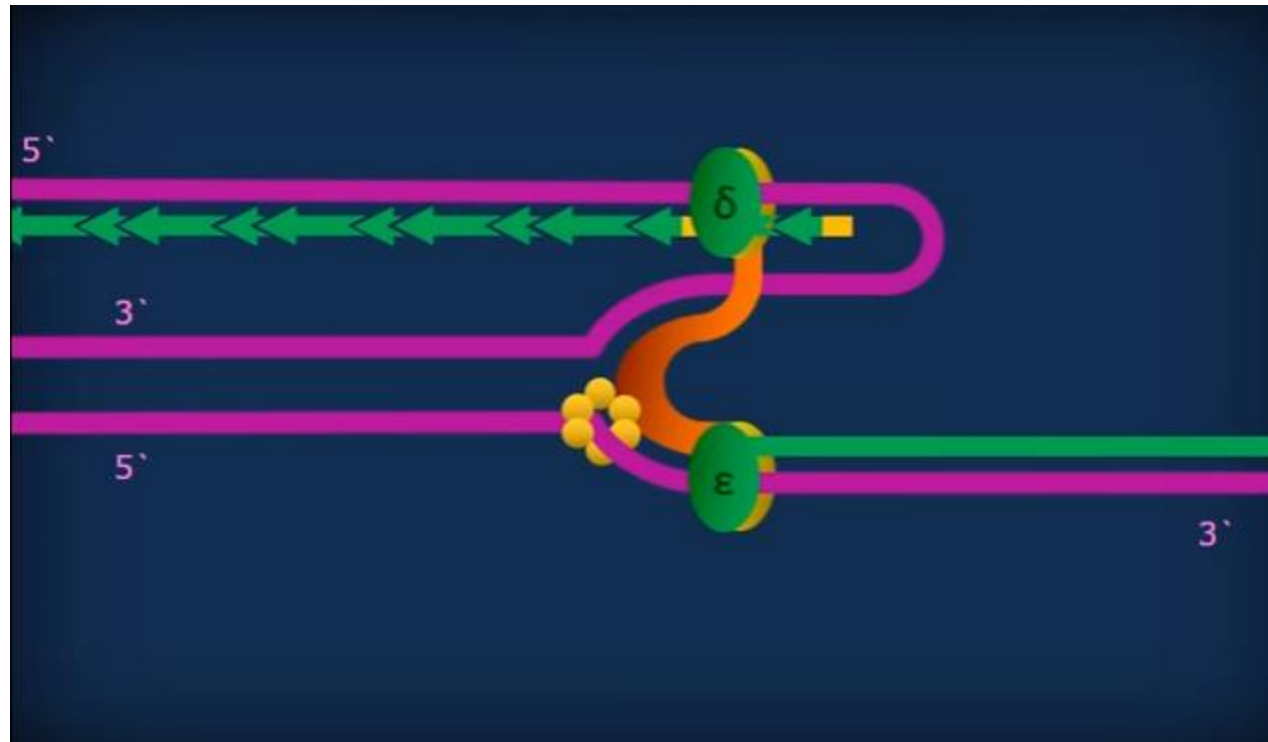
- Ko DNA polimeraza  $\delta$  doseže začetnika RNA/DNA in odstrani RNA nukleotide, se zanka nekoliko odvije in pomakne v smeri premikanja helikaze.

# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



- Tako se del enojne verige izpostavi delovanju DNA polimeraze  $\alpha$ , ki bo sintetizirala začetnika naslednjega Okazakijevega fragmenta.

# Mehanizem podvojevanja DNA pri evkariontih



- Tako se del enojne verige izpostavi delovanju DNA polimeraze  $\alpha$ , ki bo sintetizirala začetnika naslednjega Okazakijevega fragmenta.
- Sledila ji bo DNA polimeraza  $\delta$ , ki bo sintetizirala novo DNA in zamenjala prejšnjega začetnika.

# Proofreading

- DNA polimeraza **sproti kontrolira svoje delo**: preden doda nov nukleotid preveri, ali je zadnji nukleotid pravilno izbran; v nasprotnem primeru ga odstrani in ga zamenja z drugim.
- DNA polimeraza lahko namreč deluje kot **nukleaza** v nasprotnem smislu sinteze ( $3' \rightarrow 5'$ ).
- Pravimo, da se DNA polimeraza **sama lektorira** (*proofreading*).
- Zato je **možnost**, da stori **napako** izredno majhna ( $1/10^8$  nukleotidnih parov).

# Značilnosti podvojevanja DNA

- Podvojevanje DNA je:
  - Dvosmerno
  - Semikonzervativno
  - Precizno (možnost napake je  $1/10^9$ )
  - Hitro (1000 nukleotidov na sekundo)

Replicazione del DNA:

<https://www.youtube.com/watch?v=bxLSTMmELWY&t=520s>