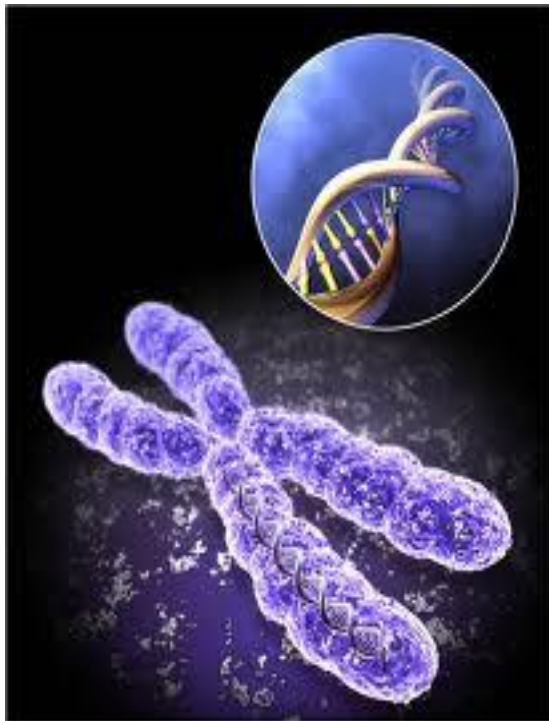


# REPLIKASI DNA



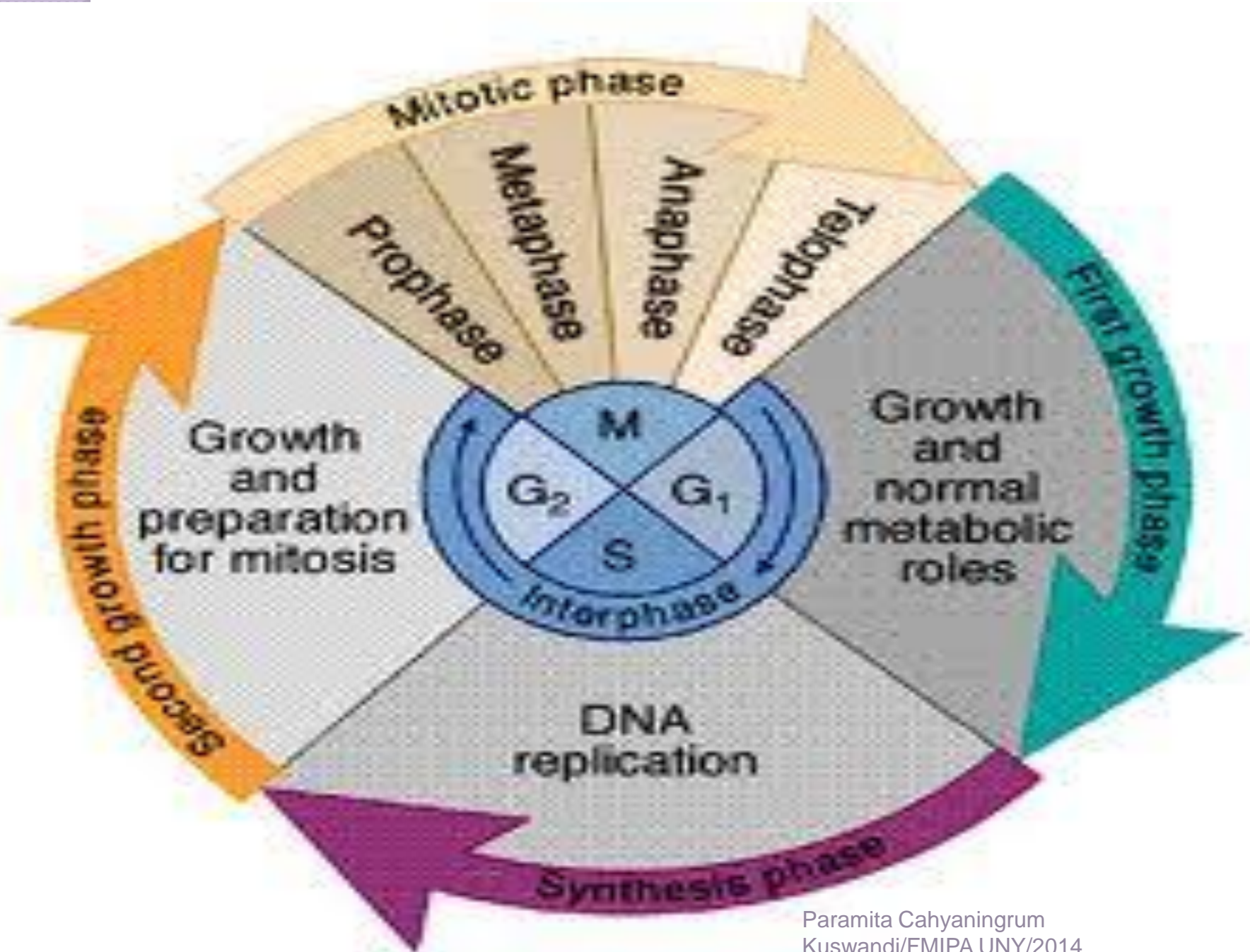
Paramita Cahyaningrum Kuswandi  
(email : [paramita@uny.ac.id](mailto:paramita@uny.ac.id))

FMIPA UNY

2014

# Why study DNA replication ?

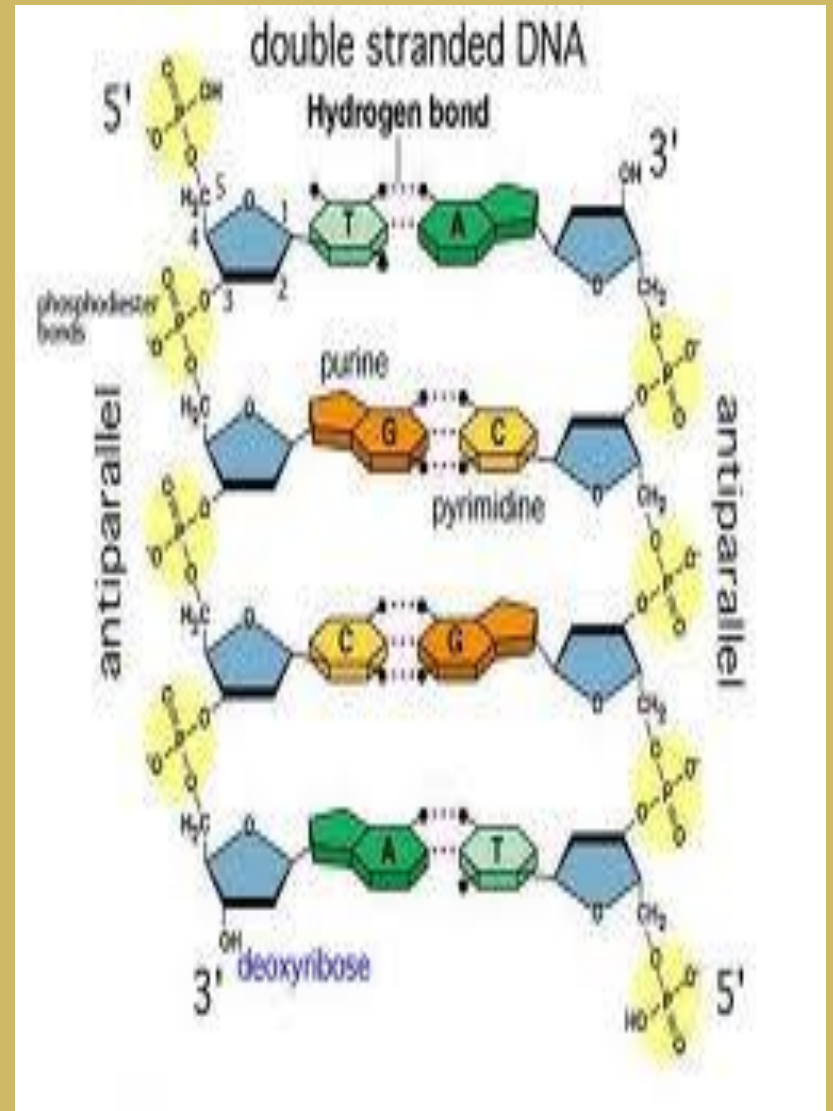
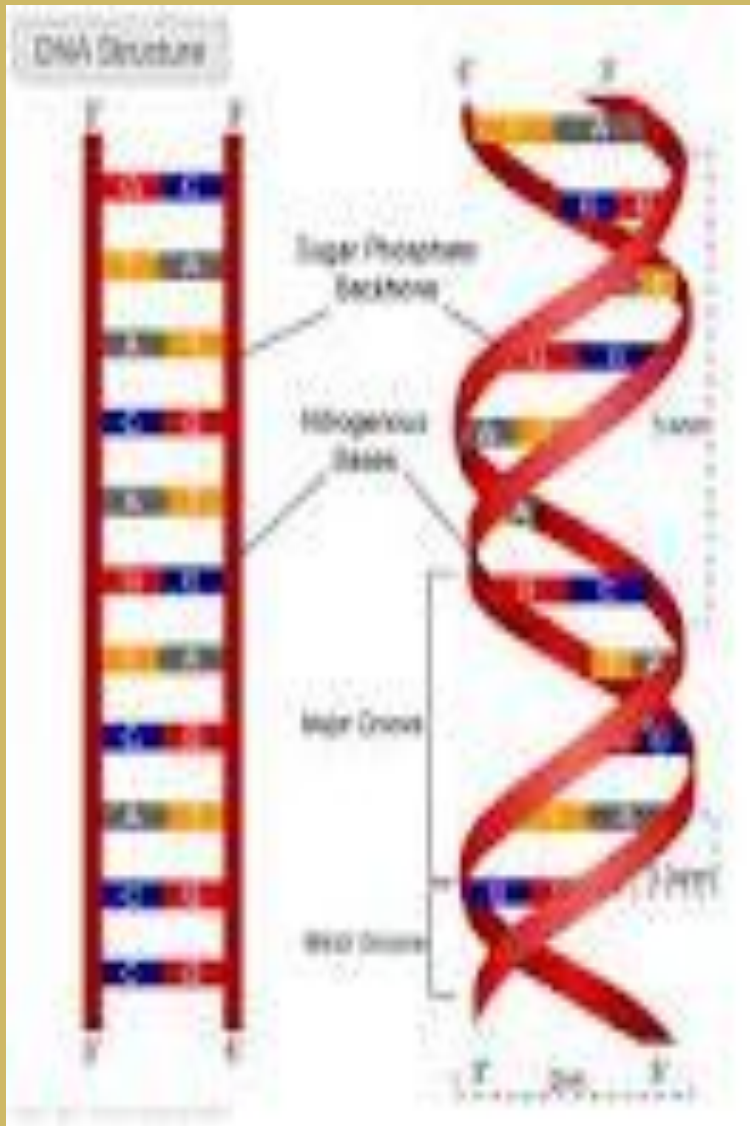
- **Materi genetis** : perlu diketahui untuk melihat pewarisan sifat
- **Replikasi materi genetis** : perlu diketahui untuk mengetahui cara materi tersebut diperbanyak dan diwariskan dari satu sel ke sel berikutnya dan dari satu generasi ke generasi baru makhluk hidup
- Bagaimana materi genetis diperbanyak secara tepat dan cepat ?



# Dimulai dari struktur molekul DNA...

- DNA adalah materi genetis dan membawa informasi tersebut pada urutan basanya
- Model DNA yang ditemukan oleh Watson dan Crick menunjukkan bahwa ‘ pasangan basa dapat menjadi dasar mekanisme penggandaan molekul DNA ‘
- Karena nukleotida berpasangan maka satu untai DNA dapat menjadi **cetakan (template)** untuk untai yang lain



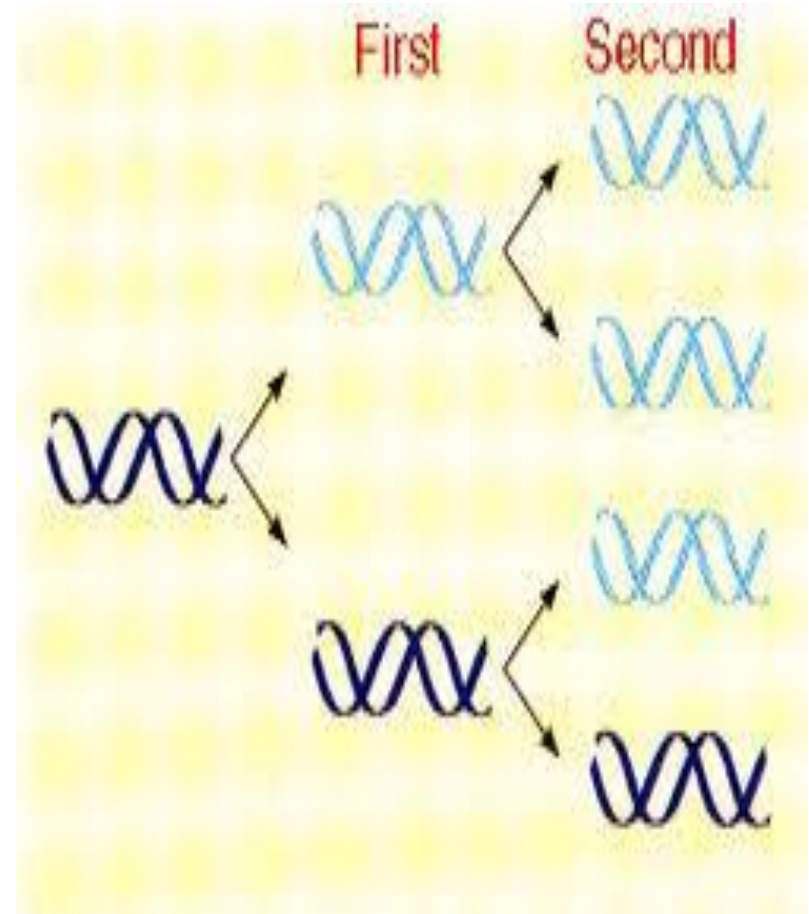


# 3 model replikasi yang diusulkan pada tahun 1950an...

1. Conservative model
2. Semiconservative model
3. Dispersive model

# Conservative model

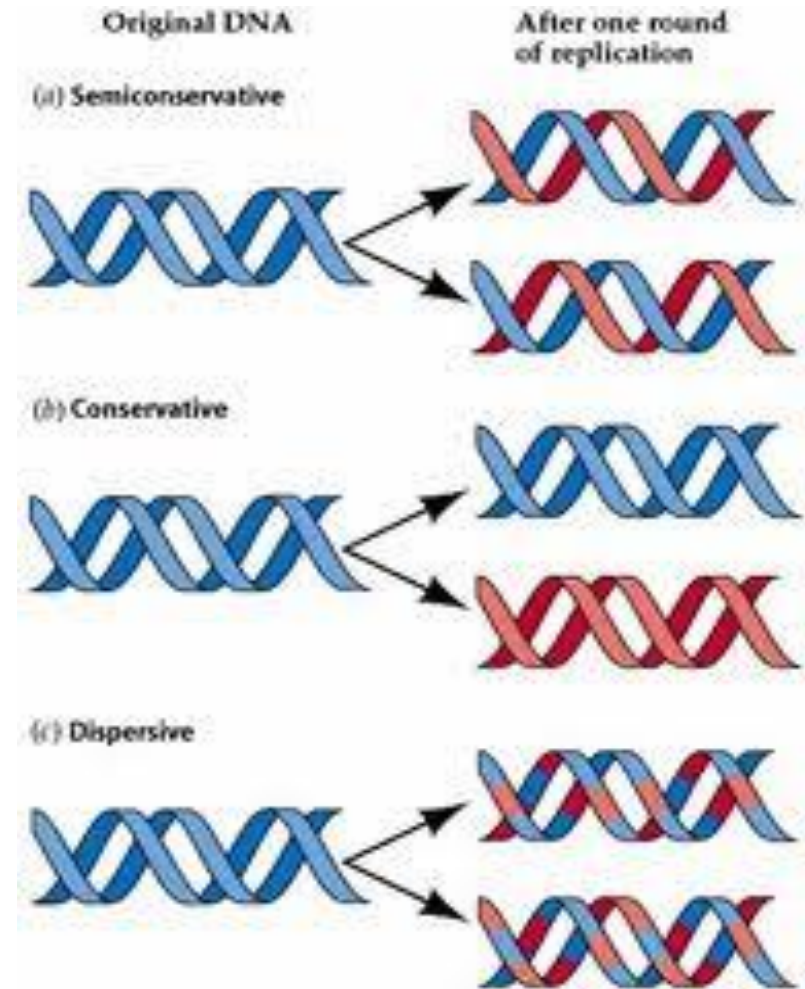
1. Kedua untai asal bertindak sebagai template / cetakan
2. Dihasilkan 2 molekul DNA :
  - \* 1 molekul asal/parent
  - \* 1 molekul baru





# Semiconservative model

1. Tiap untai bertindak sebagai cetakan
2. Dihasilkan 2 molekul DNA baru, masing-masing terdiri dari 1 untai asal dan 1 untai baru



# Dispersive model

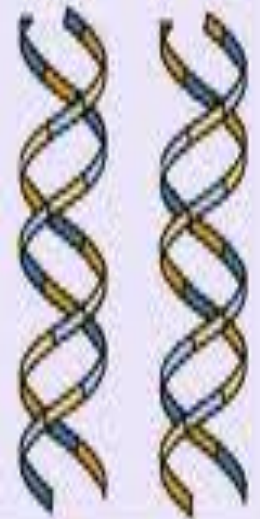
1. Molekul DNA terpotong-potong saat replikasi
2. Potongan-potongan tersebut melakukan replikasi
3. Terbentuk potongan-potongan baru
4. Potongan DNA asal dan yang baru membentuk 2 molekul DNA yang terdiri dari potongan-potongan DNA baru dan lama secara acak

Dispersive replication

Original DNA double helix



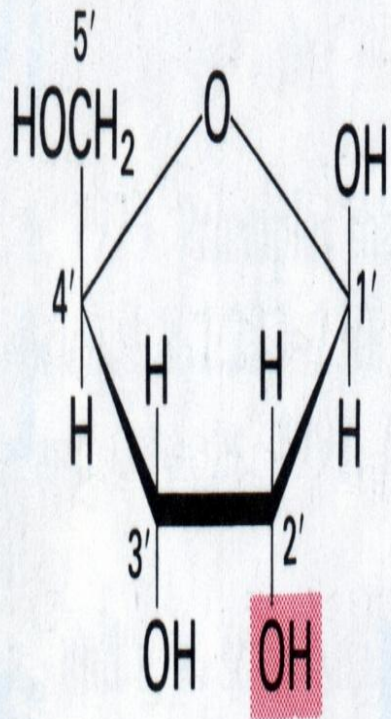
DNA molecules after one round of replication



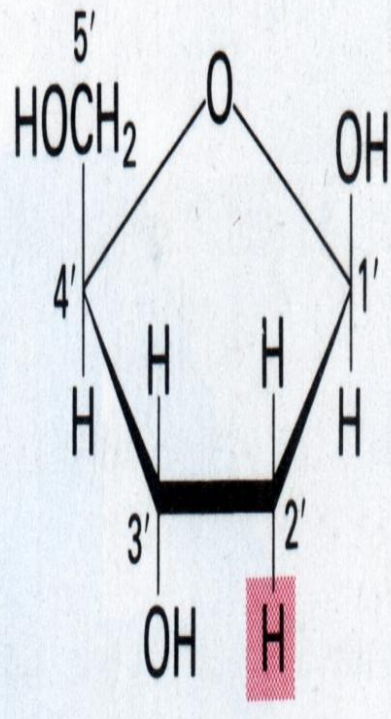
# Percobaan Meselson & Stahl

- Tahun 1958, membuktikan model replikasi semiconservative
- Menggunakan bakteri *E.coli*
- Bakteri ditumbuhkan pada media yang mengandung N15 dalam bentuk  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .
- Bakteri kemudian ditumbuhkan pada media yang megandung N14

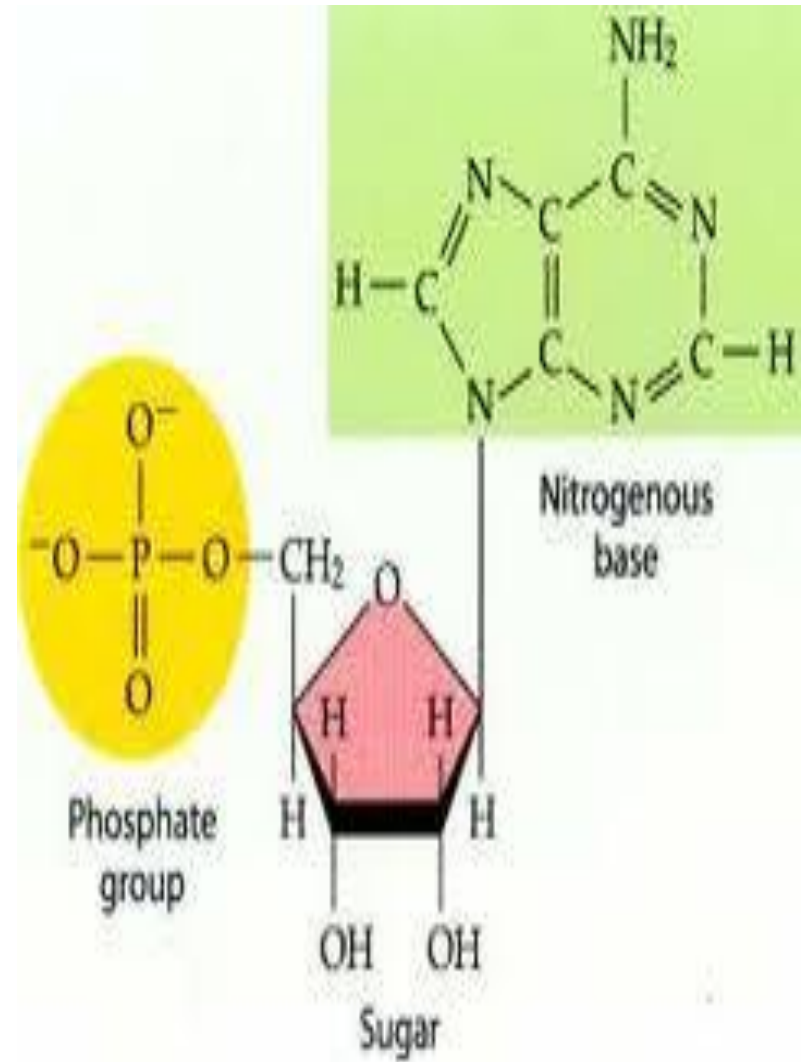
- Sampel bakteri diambil pada waktu tertentu dan dilihat densitasnya
- Menggunakan equilibrium density gradient centrifugation
- Densitas lebih besar akan berada di bagian yang lebih bawah di dalam tabung



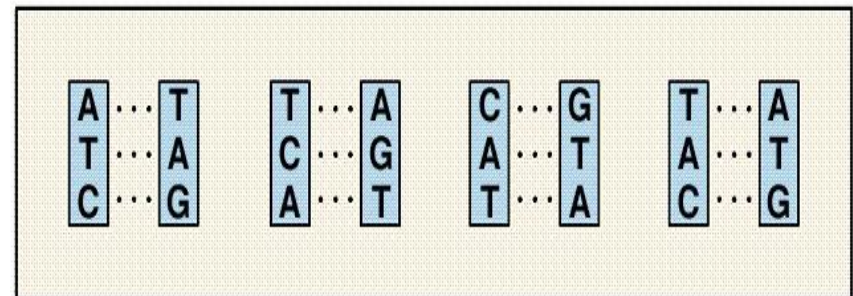
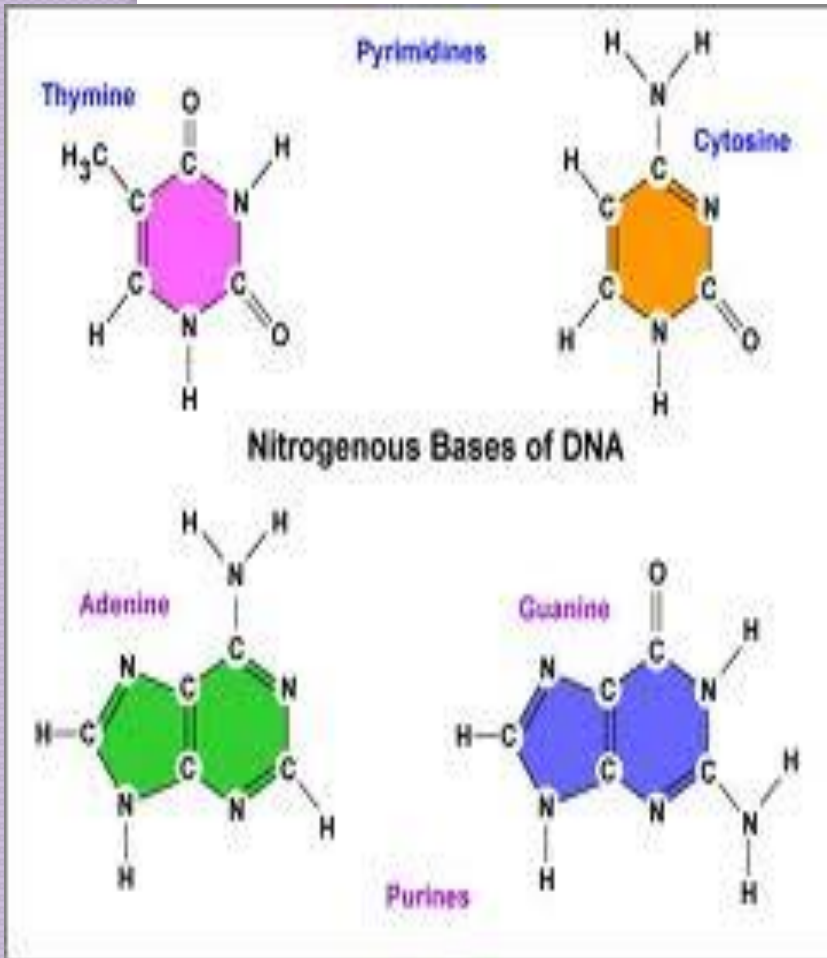
**Ribose**

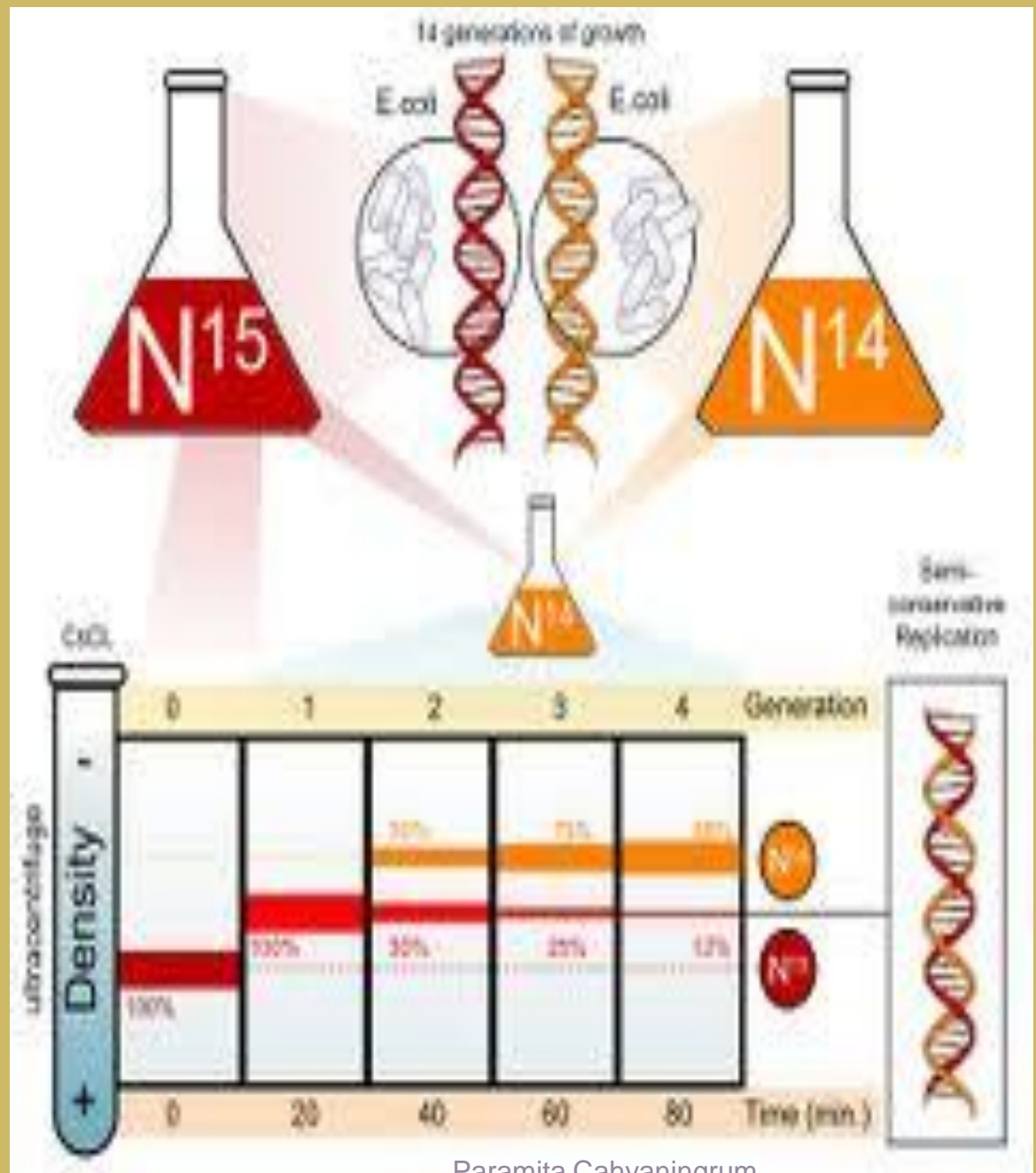


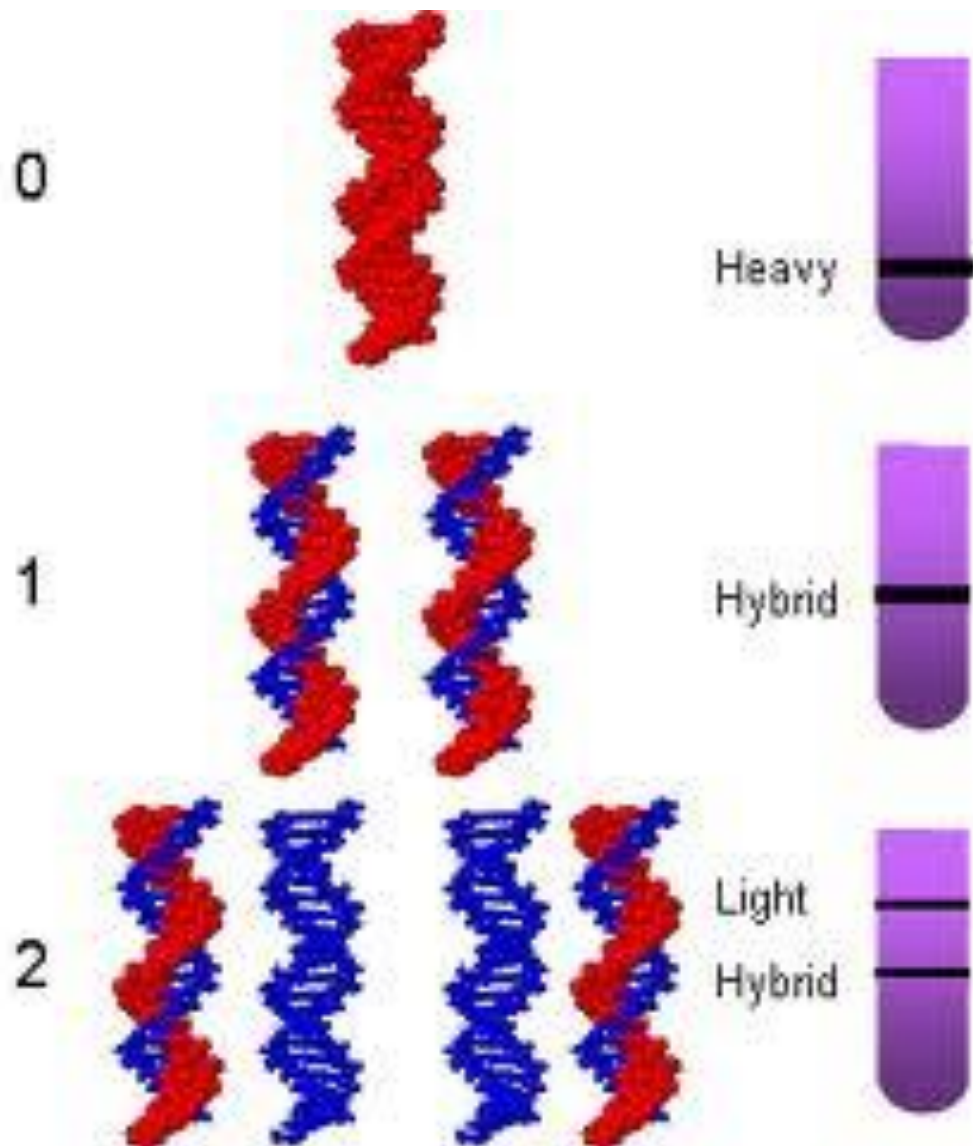
**2-Deoxyribose**



## Base pairing









# Jika model conservative

- Garis densitas yang lebih berat selalu ada (dari pita DNA asal)
- Tidak ada densitas intermediate/hybrid
- Densitas yang lebih ringan akan selalu bertambah pada tiap replikasi

# Jika model dispersive

- Setelah satu kali replikasi akan terlihat garis intermediate
- Pada replikasi selanjutnya hanya akan terlihat satu garis (1 densitas)
- Garis tersebut akan semakin keatas (makin ringan)

# Apa saja yang diperlukan untuk replikasi DNA ?

- Arthur Kornberg dkk., pada tahun 1955 menemukan suatu **enzim** yang dibutuhkan untuk replikasi DNA
- Percobaan dilakukan pada bakteri

# Percobaan Kornberg

- Melakukan sintesis DNA dengan campuran :
  1. Fragmen DNA
  2. Campuran dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) = deoxyribonucleic triphosphate precursor. dNTP diberi label radioaktif untuk mengukur jumlah DNA yang disintesis
  3. Ekstrak E.coli
  4. Dilakukan secara in vitro

# Apa hasilnya ???

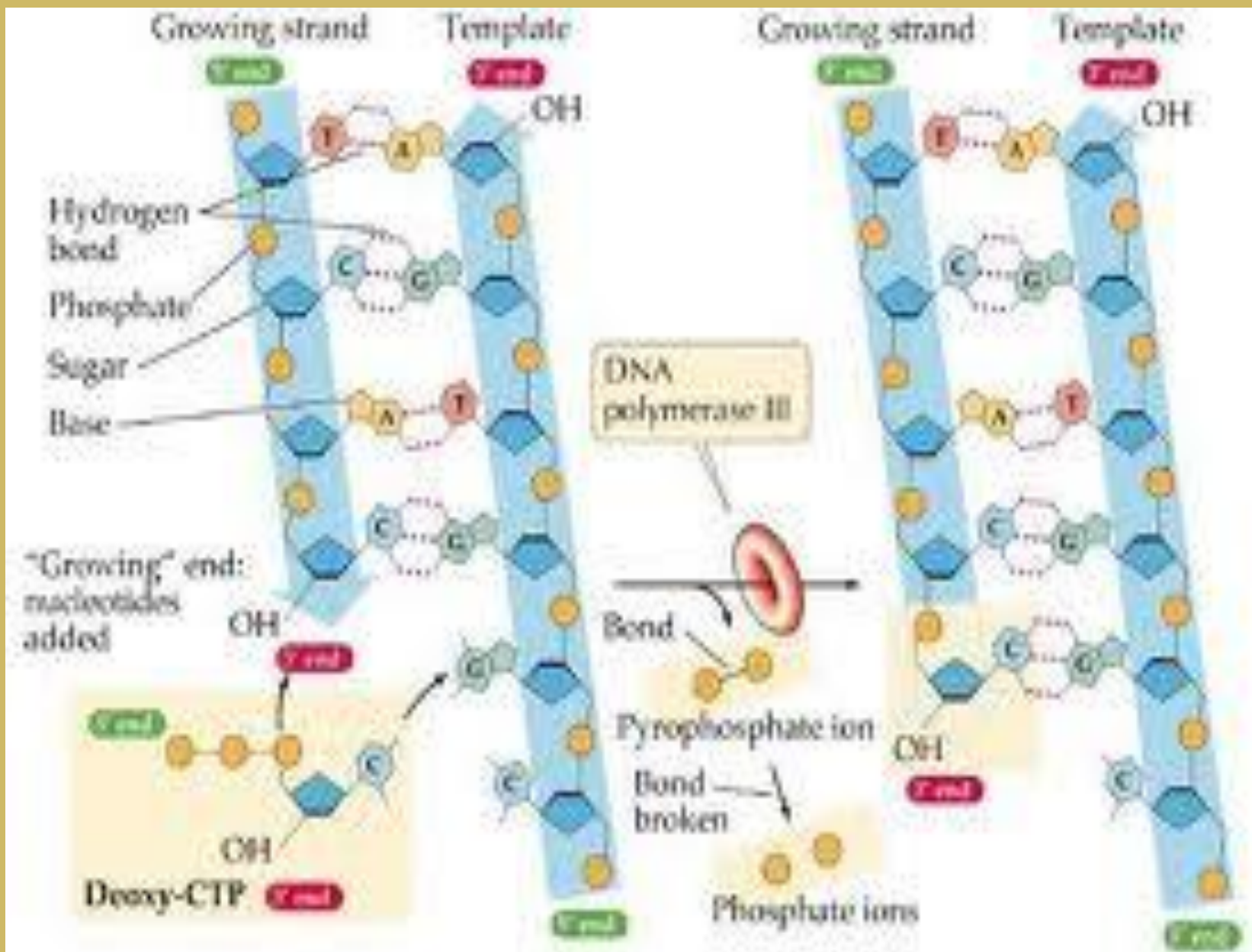
- Ditemukan enzim yang mampu melakukan sintesis DNA
- Disebut Kornberg enzyme = DNA polymerase I (DNA Pol I)

# Percobaan lanjut...

- Dilakukan lagi penelitian secara in vitro :
  1. Keempat macam dNTP
  2. DNA Pol I
  3. DNA E.coli, sebagai template
  4. Primer (potongan kecil DNA yang digunakan untuk memulai sintesis)
  5. Ion magnesium supaya kerja Pol I secara maksimal

# Peran DNA polymerase

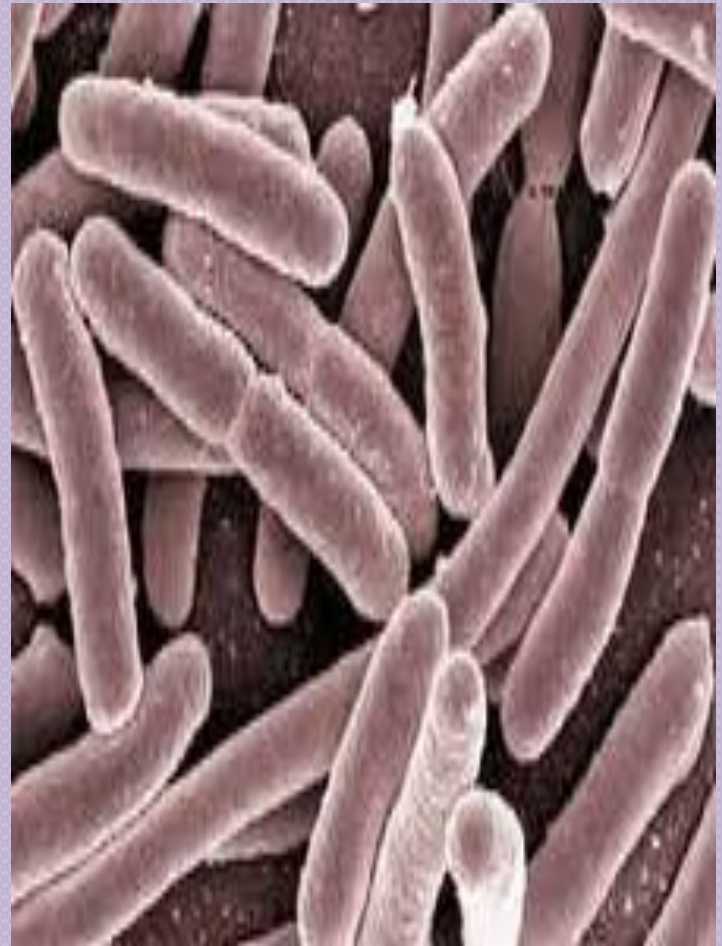
- Pada ujung untai DNA yang sedang terbentuk, DNA polimerase menjadi katalis untuk pembentukan ikatan fosfodiester antara 3'-OH dari deoksi dengan 5'-fosfat nukleotida berikutnya
- Mencari prekursor dNTP yang tepat , yang komplementer dengan DNA template. Penambahan sekitar 850 nukleotida tiap detik pada E.coli dan 60-90 per detik pada manusia
- Arah sintesis untai DNA yang baru adalah dari 5'-3'





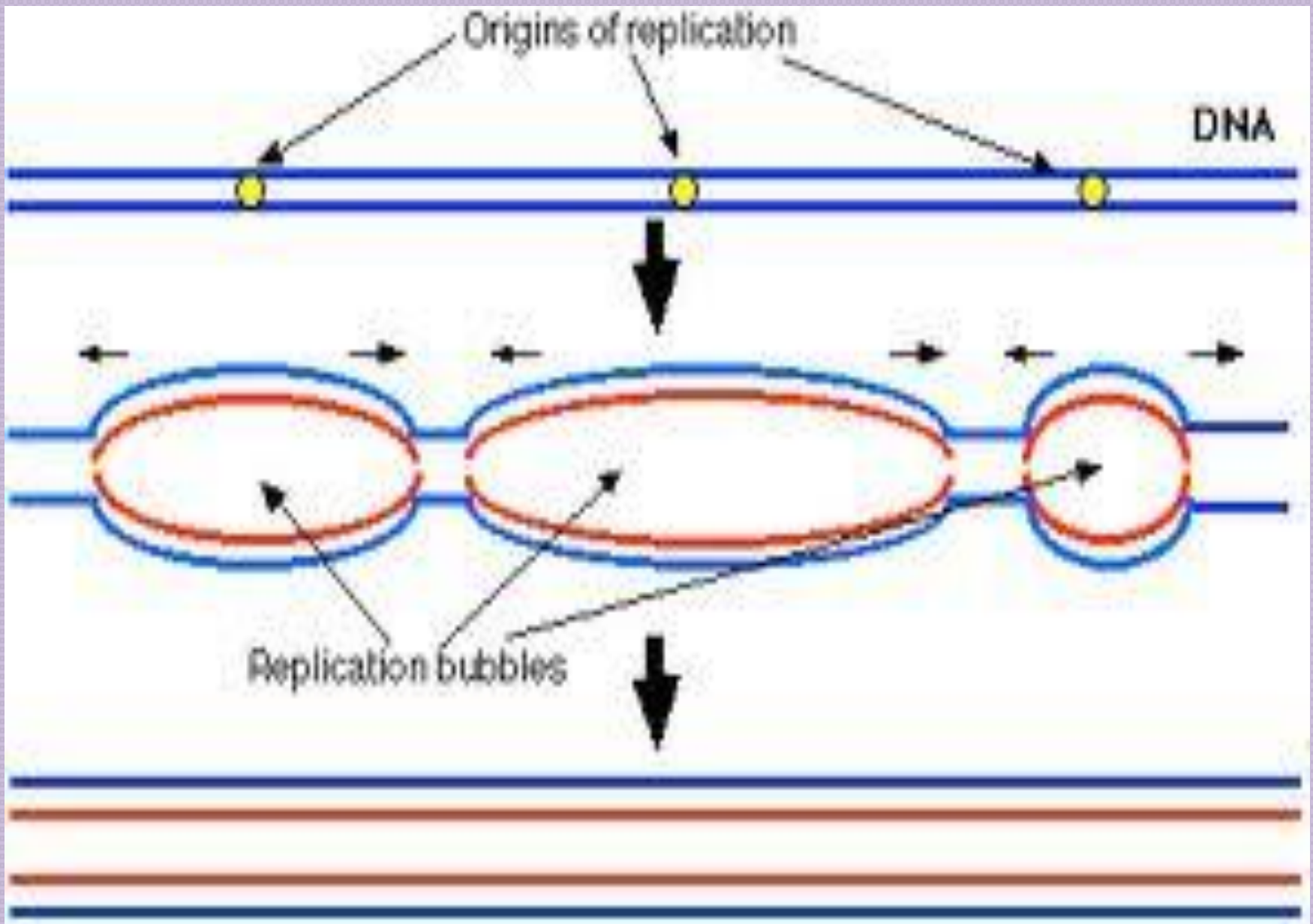
# REPLIKASI DNA PADA PROKARYOT

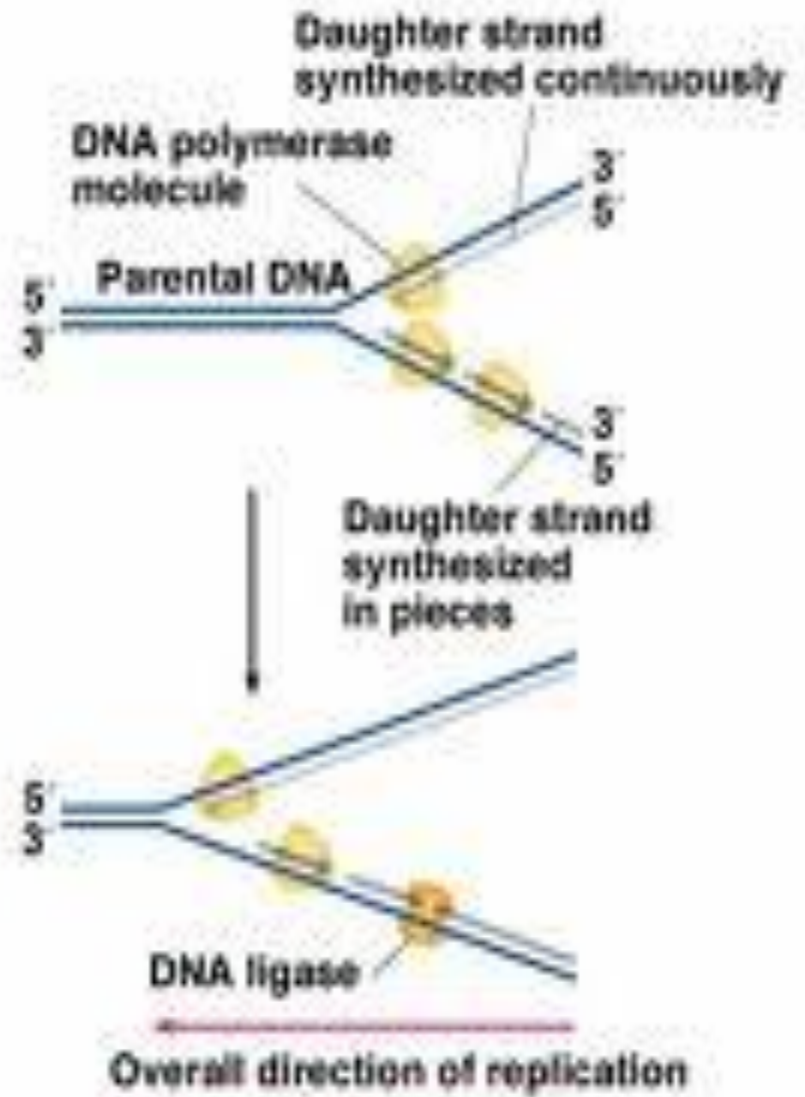
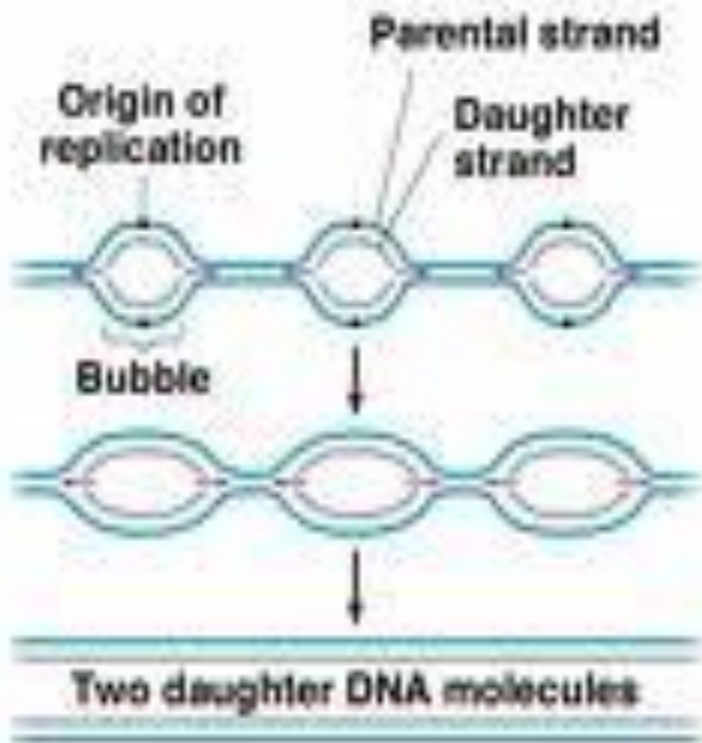
1. Inisiasi
2. Replikasi DNA secara 'semidiscontinuous'
3. Rolling Circle Replication



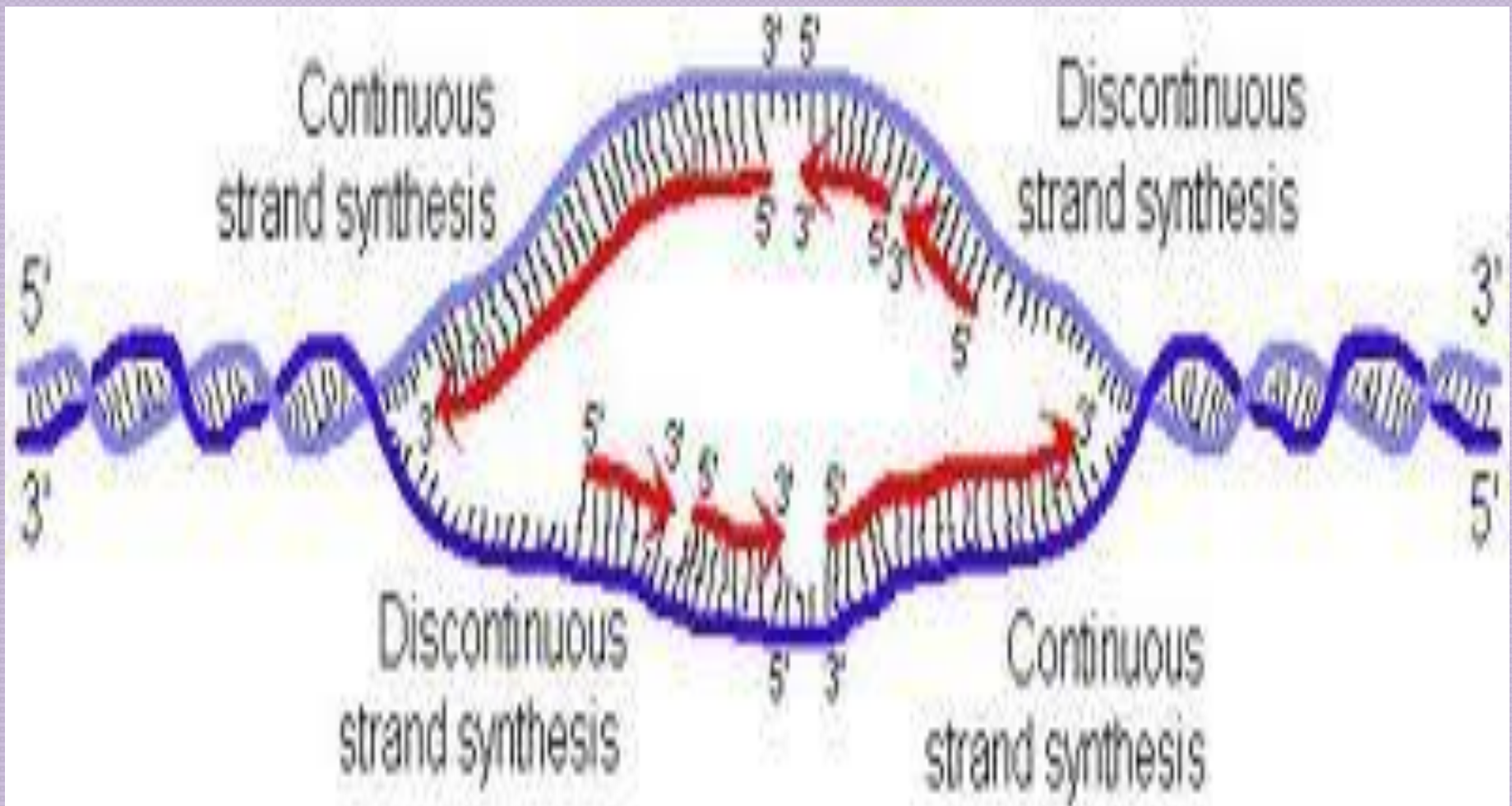
# I. INISIASI

- Inisiasi replikasi dimulai dengan adanya sekuen DNA yang disebut **replicator**
- Pada replicator terdapat **origin of replication**
- Bagian pada untai DNA yang 'membuka' untuk direplikasi, disebut **replication bubble**
- Untai DNA yang digunakan sebagai template/cetakan, disebut **template strands**

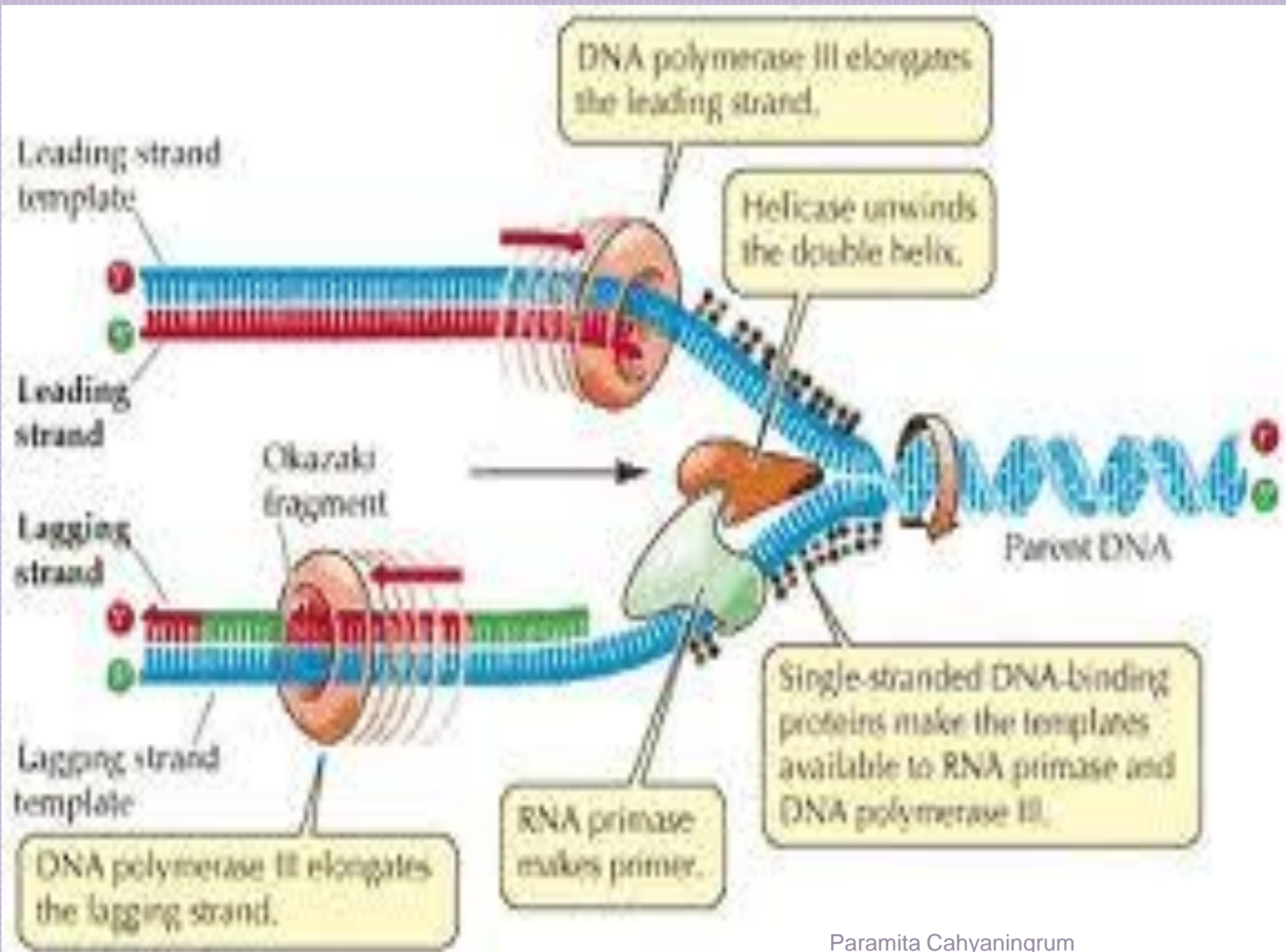




- Saat DNA membuka, terbentuk struktur seperti sendok, yang disebut **replication fork**
- Pada satu replication bubbles, terdapat 2 replication fork
- Secara umum, replikasi DNA berjalan dua arah = **bidirectional**



A replication bubble showing old DNA strands in blue, and newly synthesized DNA strands in red. The new strand is made only in the 5' to 3' direction.



# Inisiasi replikasi pada E.coli

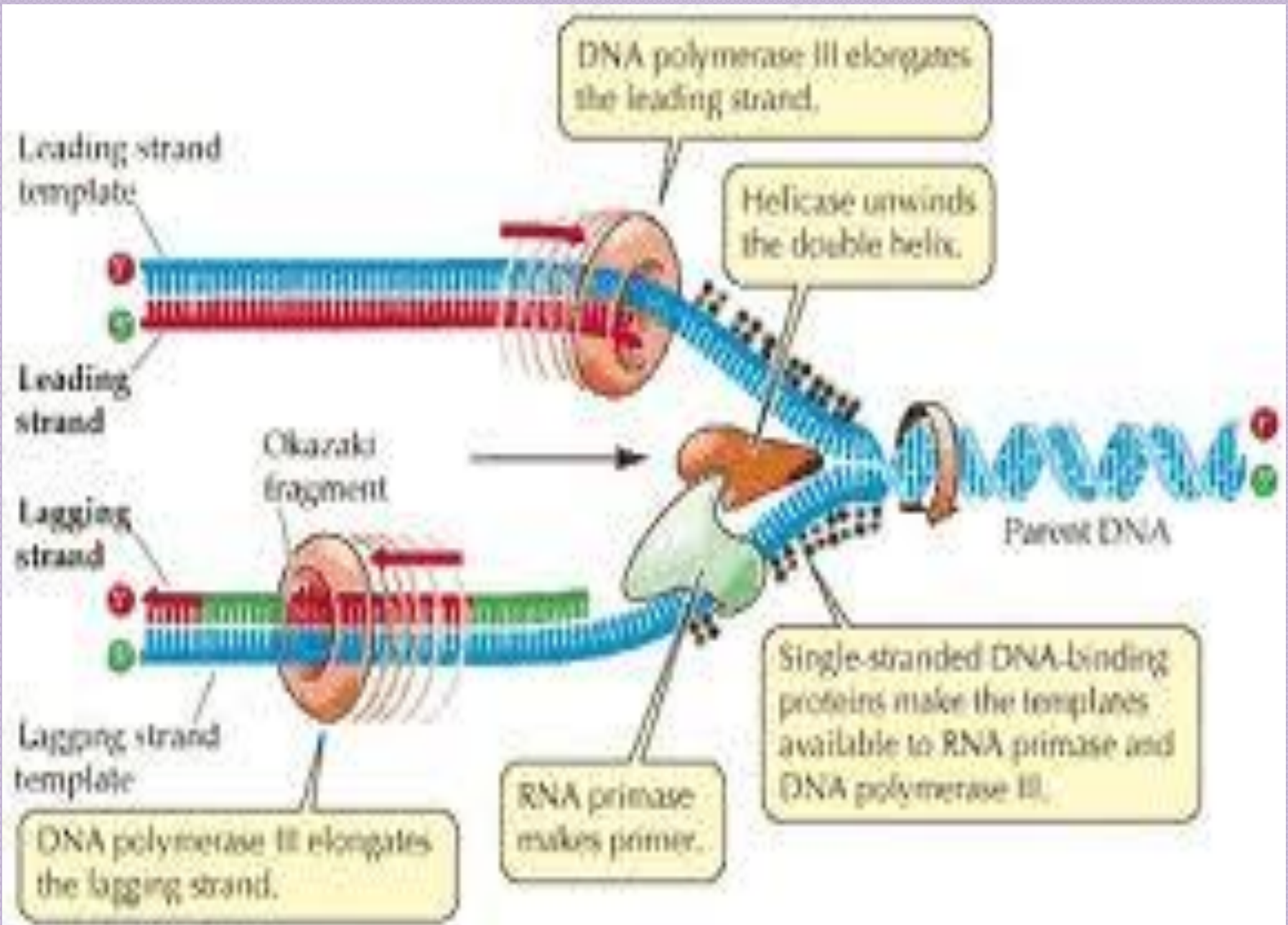
- Replicator pada E.coli adalah oriC (245 bp DNA)
- oriC terdiri dari : 3 sekuen dengan banyak AT (13 bp)
- **Initiator protein (dihasilkan oleh dnaA gene)** melekat pada replicator dan menghancurkan daerah yang mengandung AT banyak
- Kemudian **DNA helicase** dibawa oleh **DNA helicase loader protein**, untuk membuka untai DNA



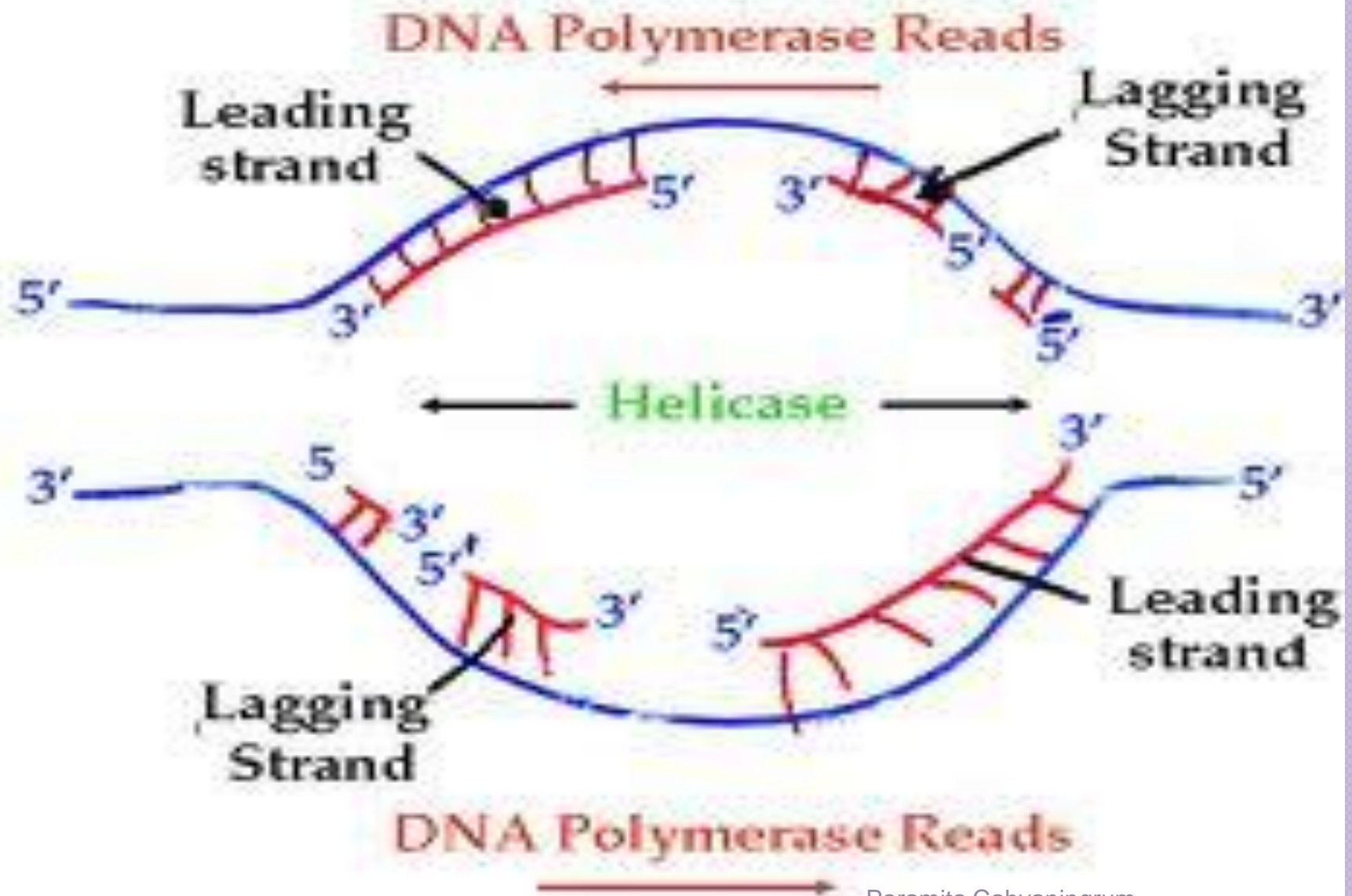
- Kemudian, **DNA helicase** merekrut **DNA primase** (dihasilkan oleh dnaG gene), membentuk suatu kompleks yang disebut **primosome**
- DNA primase berfungsi membentuk **RNA primer** (sekitar 5-10 nukleotida) yang kemudian dilanjutkan oleh DNA polymerase
- Primer berfungsi sebagai untai awal DNA yang baru

## 2. Semidiscontinuous DNA replication

- Setelah DNA helicase berhasil membuka untai ganda DNA (disebut **DNA denaturation = DNA melting**), **protein SSB** (single-strand DNA-binding protein) menempel pada tiap untai DNA yang sudah membuka, menjaga supaya tidak menutup lagi
- RNA primer berada pada ujung 5' untai baru DNA untuk satu untai template DNA
- RNA primer juga terdapat pada template DNA yang lain



# Replication Bubble



- DNA helicase terus bergerak maju, membuka 2 untai DNA asal/parent
- Terdapat **DNA gyrase** (enzim topoisomerase) yang berada di depan replication fork untuk mengurangi tegangan pada untai DNA
- **DNA polymerase III** menambah nukleotida pada RNA primase membentuk untai DNA yang baru
- DNA polymerase hanya dapat menambahkan nukleotida pada ujung 3' untai nukleotida sehingga replikasi DNA berjalan dari arah 5' 3'



# Leading strand & Lagging strand

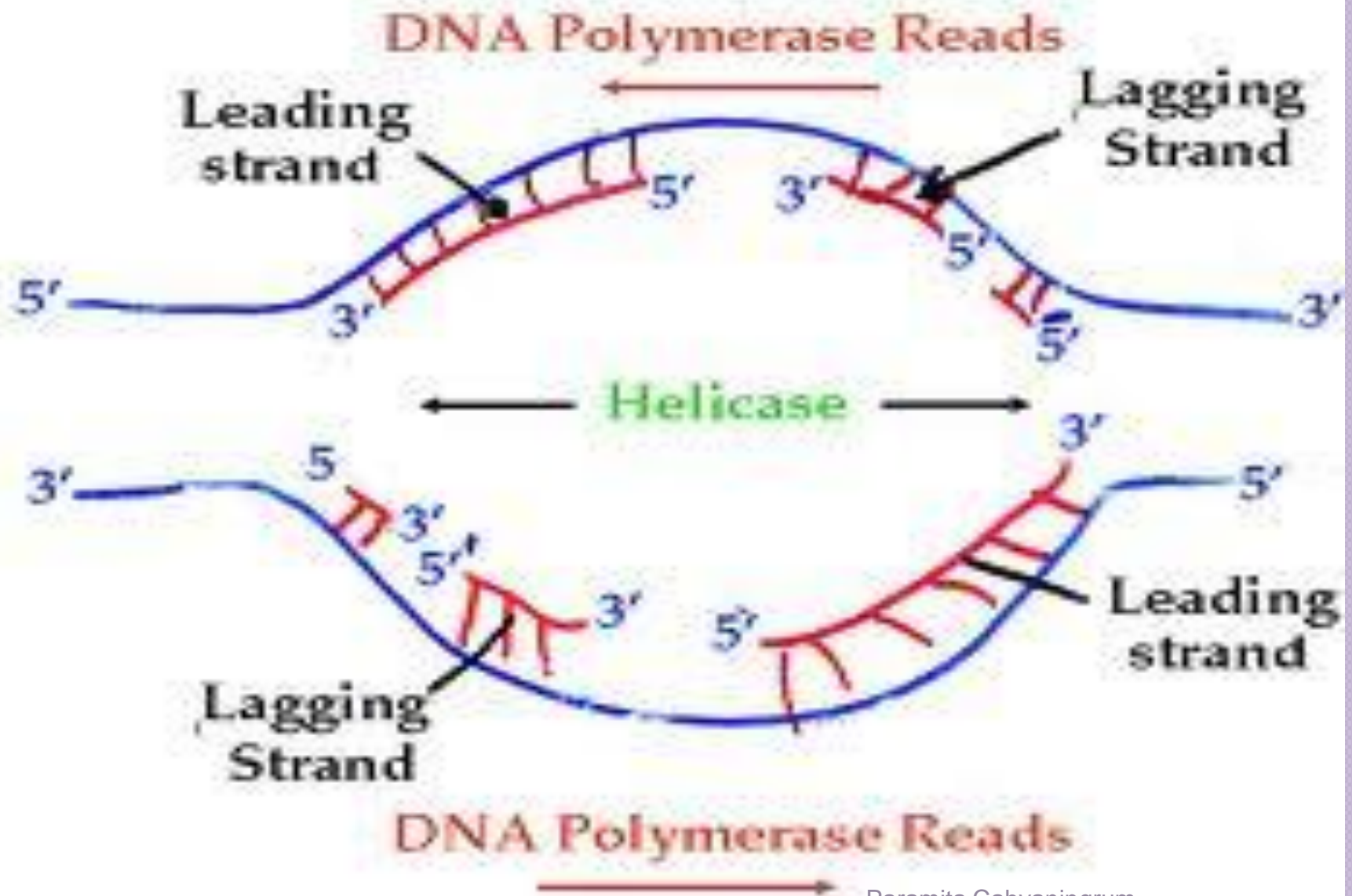
- **Leading strand :**

Pada salah satu template DNA (1 untai DNA yang direplikasi), dengan RNA primase yang selalu menjauh dari arah replikasi, akan terbentuk untai baru yang kontinu

- **Lagging strand**

Pada template yang lain, akan terbentuk untai baru secara bertahap, terdiri dari potongan-potongan DNA yang baru

# Replication Bubble



# Pada lagging strand....

- Potongan-potongan DNA baru disebut **Okazaki fragments** (ditemukan oleh Reiji & Tuneko Okazaki, dkk)
- Okazaki fragments membentuk untai DNA yang utuh dengan bantuan 2 enzim : **DNA polymerase I** dan **DNA ligase**
- **DNA polymerase I** menghilangkan RNA primer dan menambah sisa nukleotida yang dibutuhkan
- **DNA ligase** memperbaiki celah yang terbentuk setelah primer dihilangkan

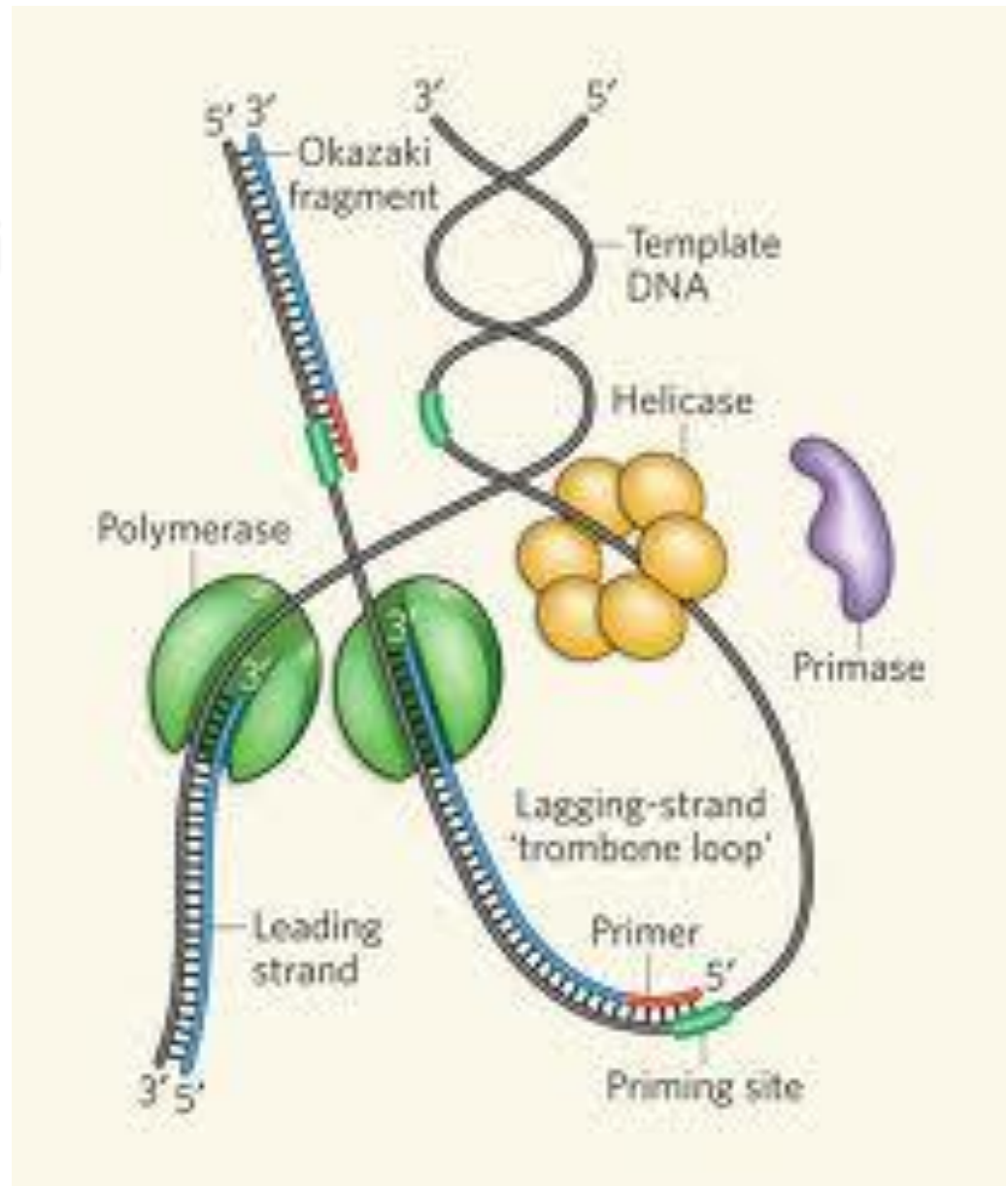


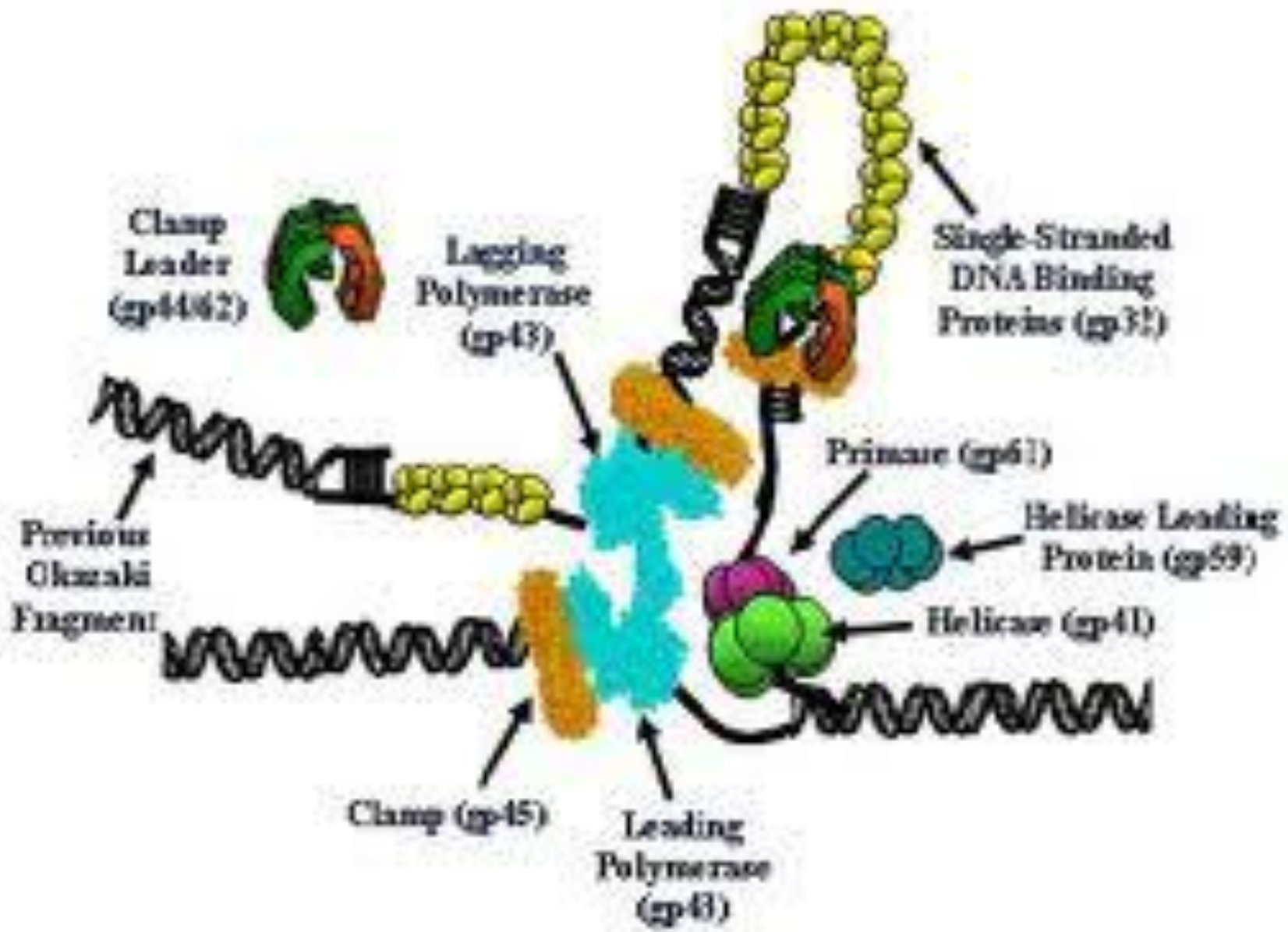
# Semidiscontinuous

- Karena leading strand terbentuk secara kontinu dan lagging strand terbentuk secara bertahap maka replikasi DNA secara keseluruhan bersifat semidiscontinuous

# Replisome = mesin replikasi DNA

- Replisome terdiri dari protein-protein / enzim yang diperlukan dalam replikasi DNA





# 3. Rolling circle replication

- Biasanya terjadi pada virus e.g. Bacteriophage  $\lambda$
- DNA double strand berbentuk cincin / lingkaran mereplikasi membentuk DNA linear
- Dibuat suatu celah (nick) pada salah satu strand DNA
- Ujung 5' ditarik keluar dari model cincin untuk membuat replication fork (seperti pada contoh sebelumnya)
- Ujung 3' bertindak sebagai primer supaya DNA polymerase dapat memulai sintesis

- Dari ujung 5' yang keluar dari bentuk cincin, akan terbentuk untai DNA baru
- Metode ini merupakan metode **discontinuous** karena pembentukan untai DNA baru dari lagging strand

