

Topik 10.

REPLIKASI DNA

(Introduction & Prokaryot)



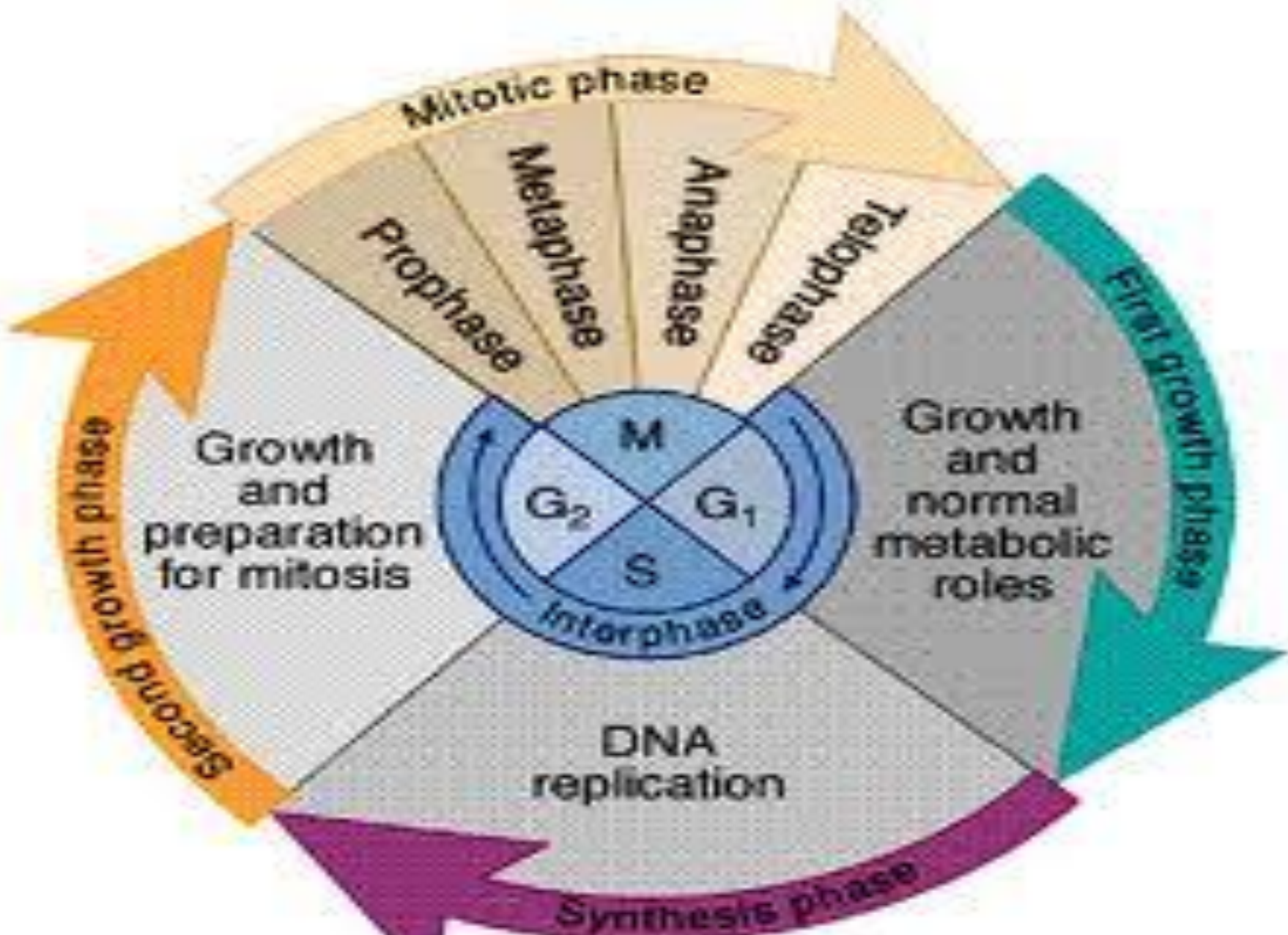
Paramita Cahyaningrum Kuswandi
(email : paramita@uny.ac.id)

FMIPA UNY

2013

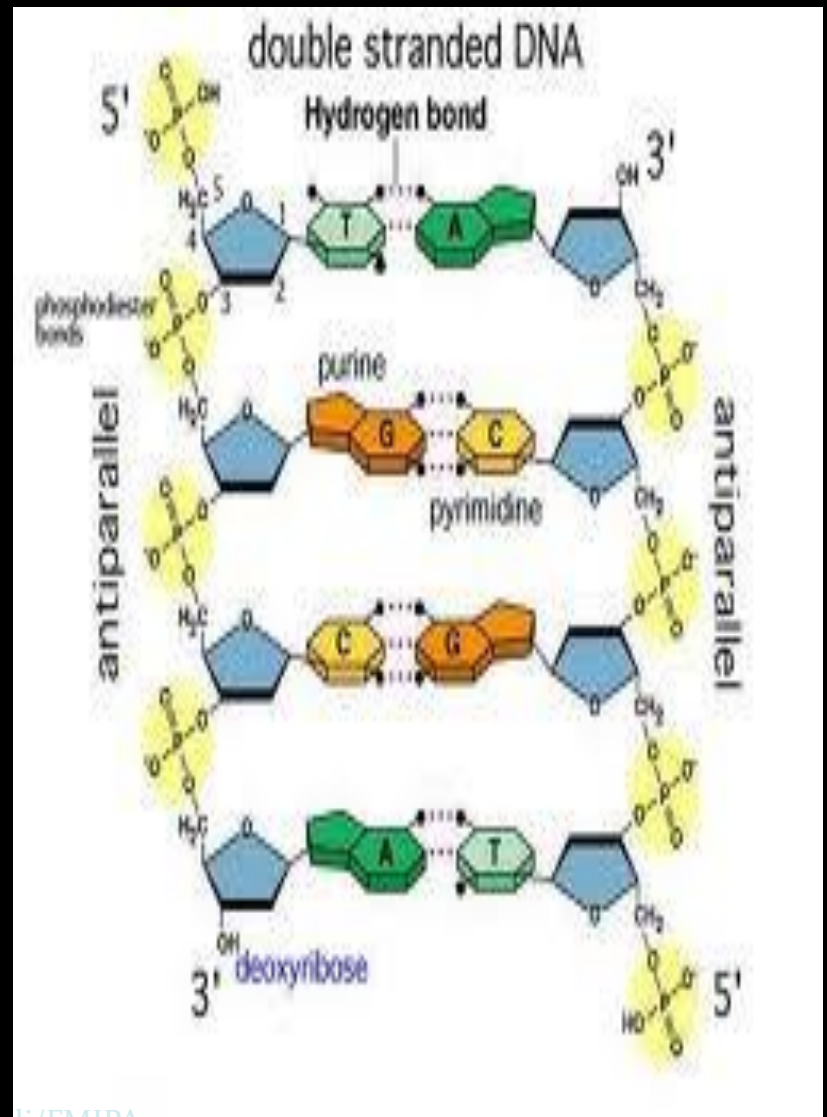
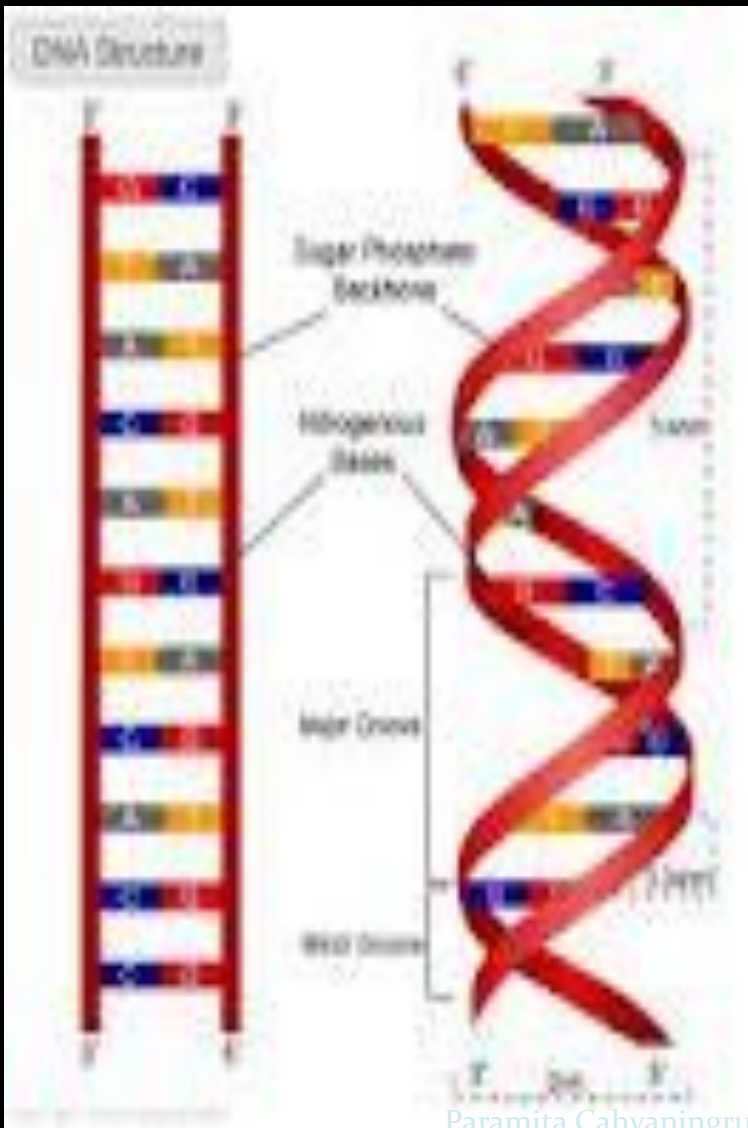
Why study DNA replication ?

- **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 genetik 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

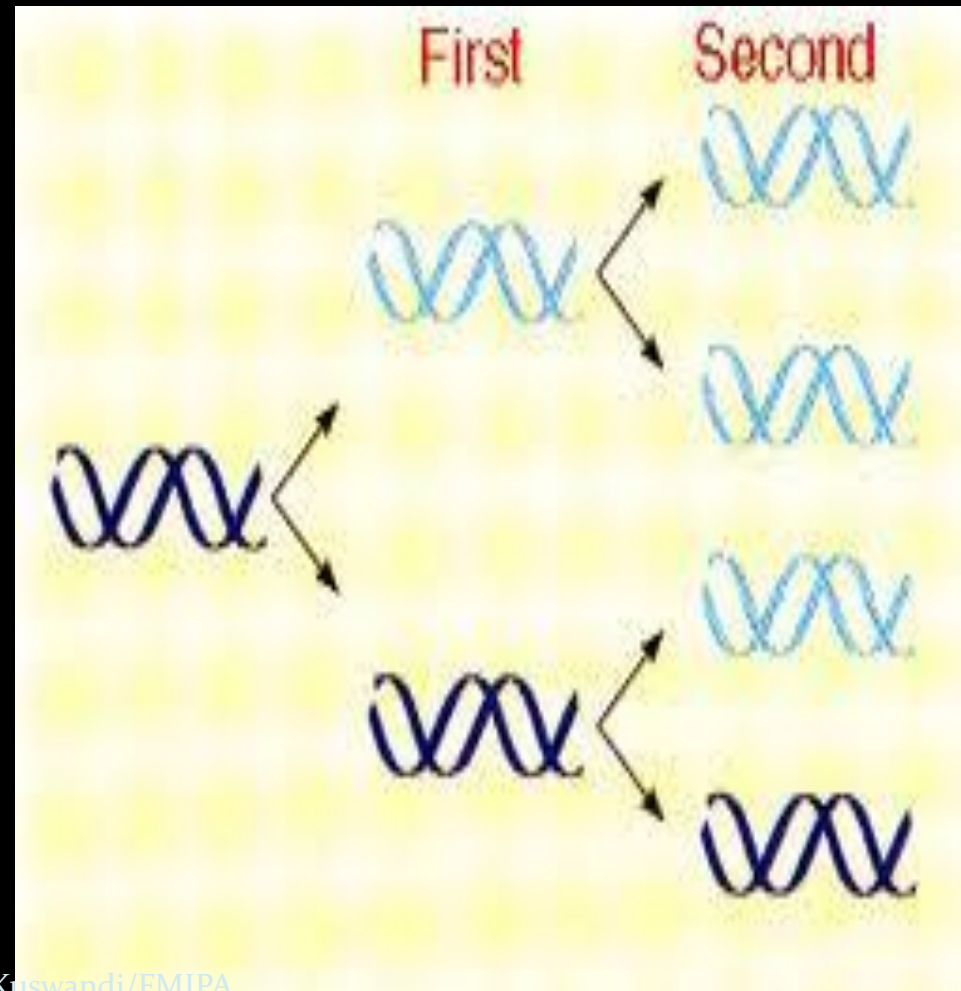


3 model replikasi yang diusulkan pada tahun 1950an...

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

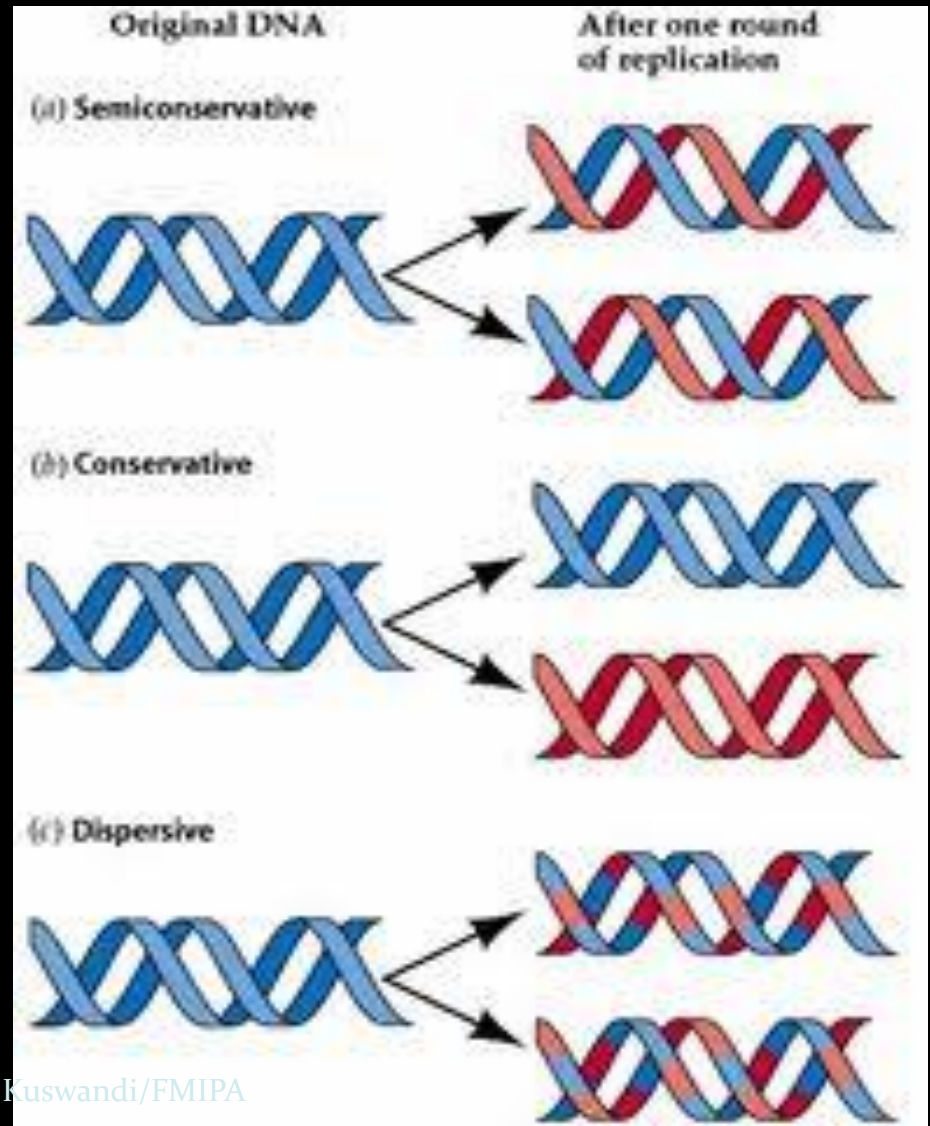
Conservative model

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

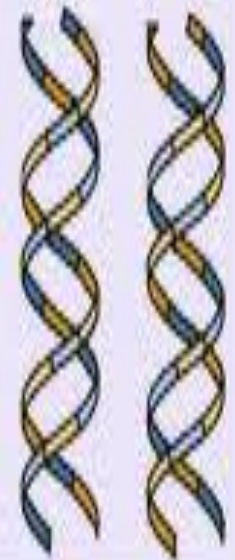
1. Molekul DNA terpotong-potong saat replikasi
2. Potongan-potongan tersebut melakukan replikasi
3. Terbentuk potongan-potongan baru
4. Potongan DNA asal dan yang baru membentuk 2 molekul DNA yang terdiri dari potongan-potongan DNA baru dan lama secara acak

Dispersive replication

Original DNA
double helix

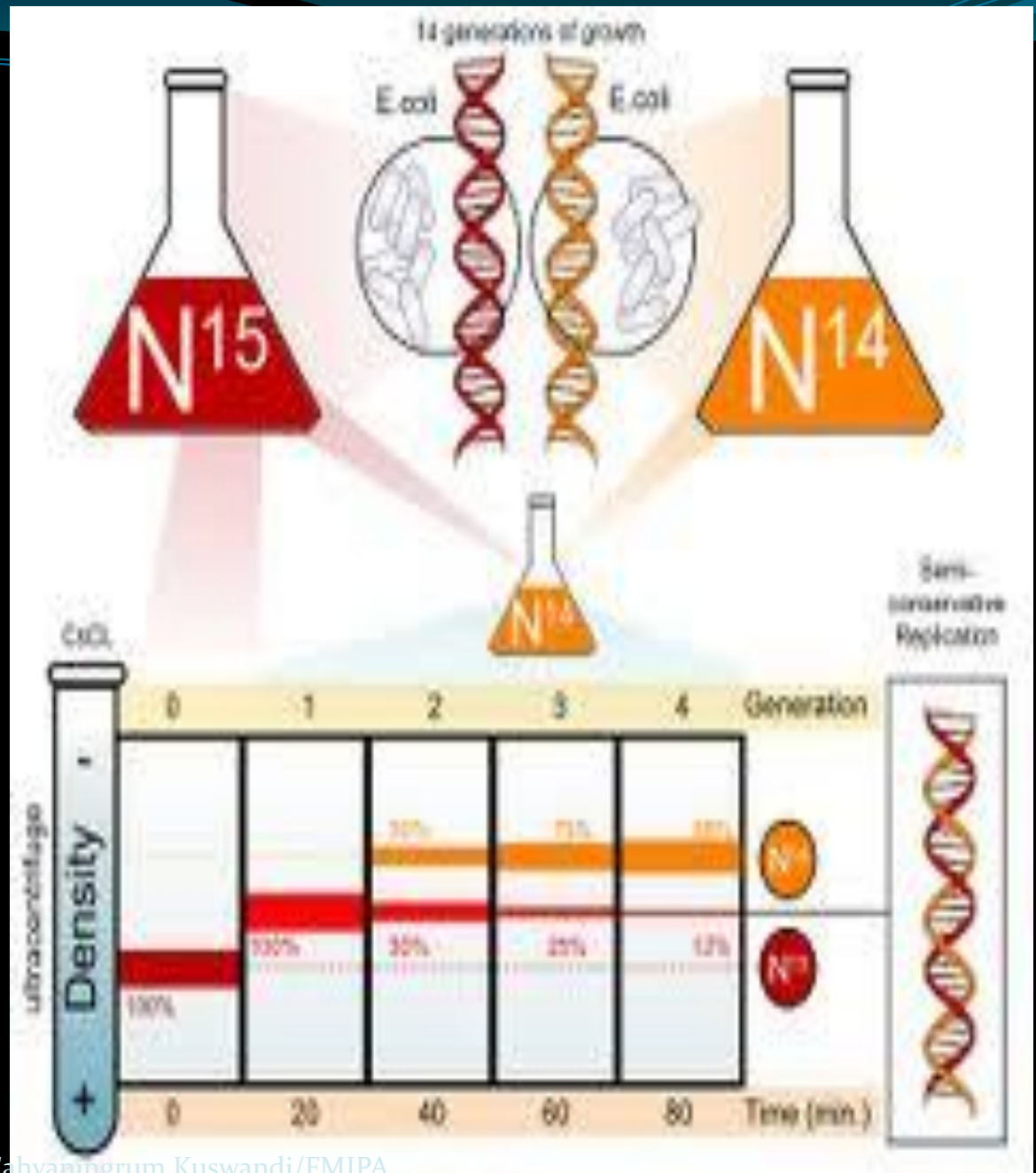


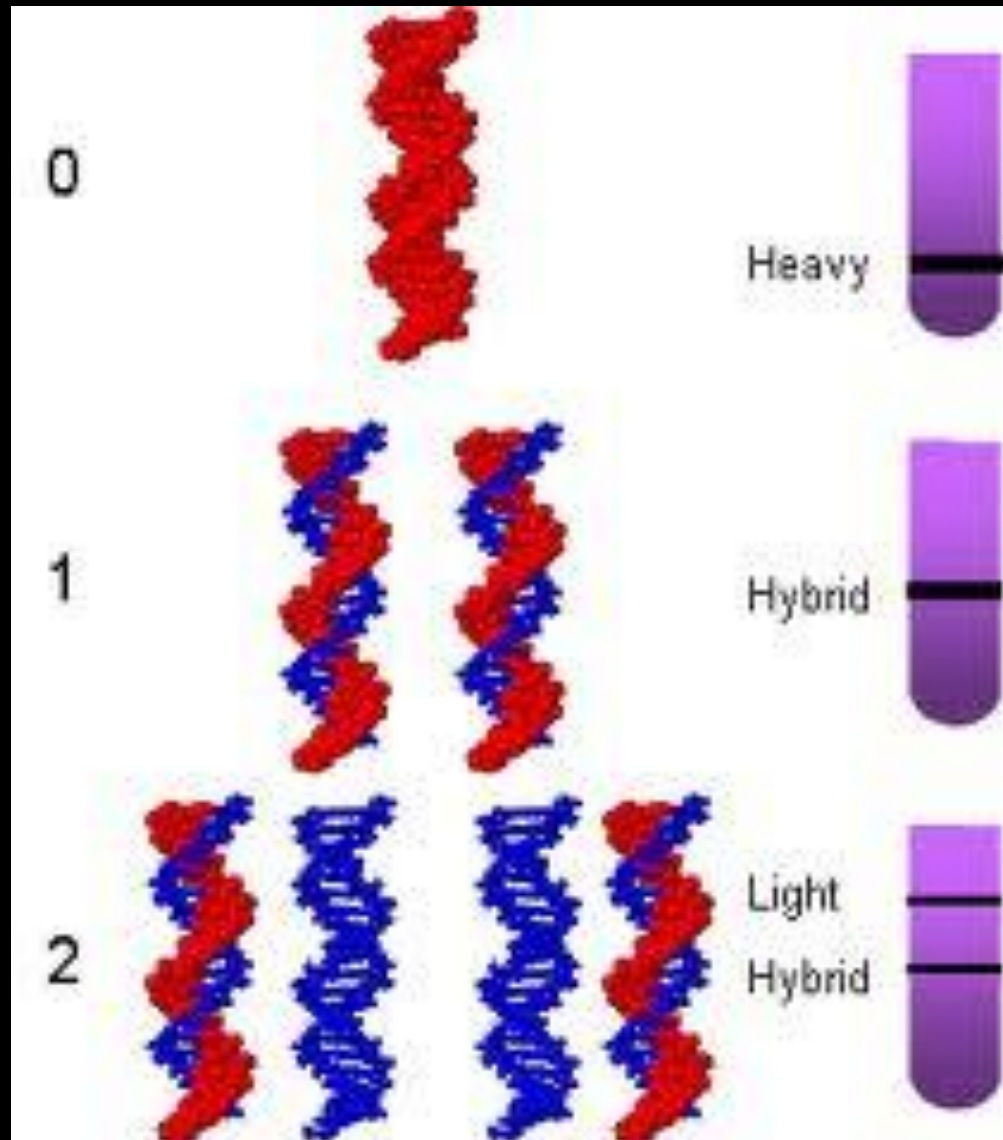
DNA molecules
after one
round of
replication



Percobaan Meselson & Stahl

- Tahun 1958, membuktikan model replikasi semiconservative
- Menggunakan bakteri *E.coli*
- Bakteri ditumbuhkan pada media yang mengandung nitrogen-15 dalam bentuk NH_4Cl .





- video percobaan Meselson-Stahl

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 ???

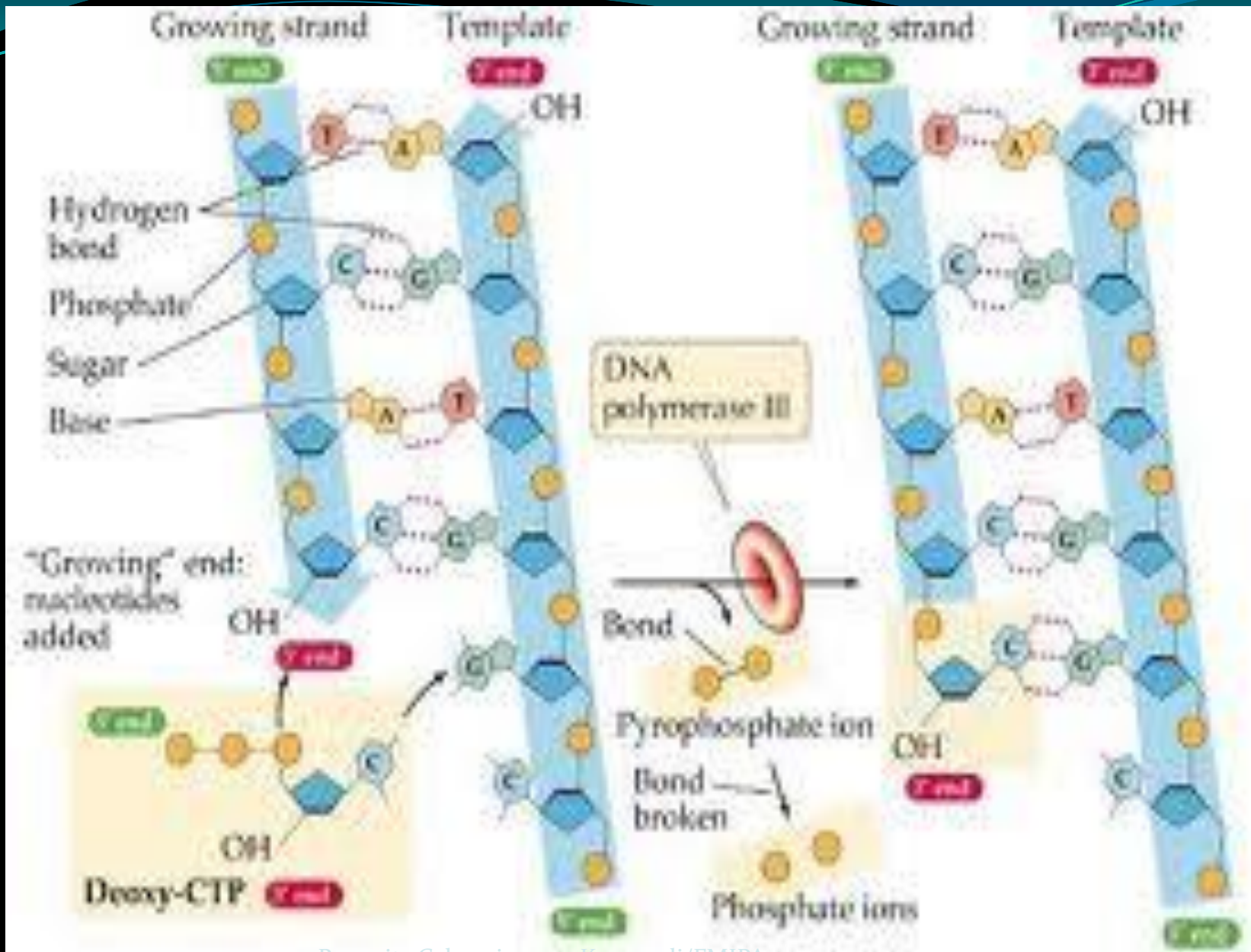
- Ditemukan enzim yang mampu melakukan sintesis DNA
- Disebut Kornberg enzyme = DNA polymerase I (DNA Pol I)

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

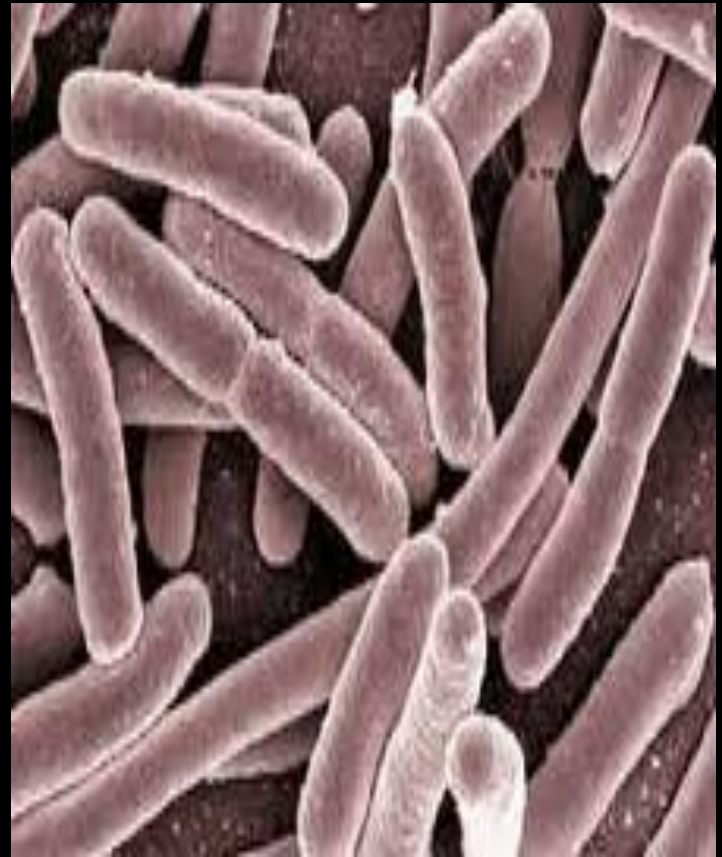
Peran DNA polymerase

- 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'



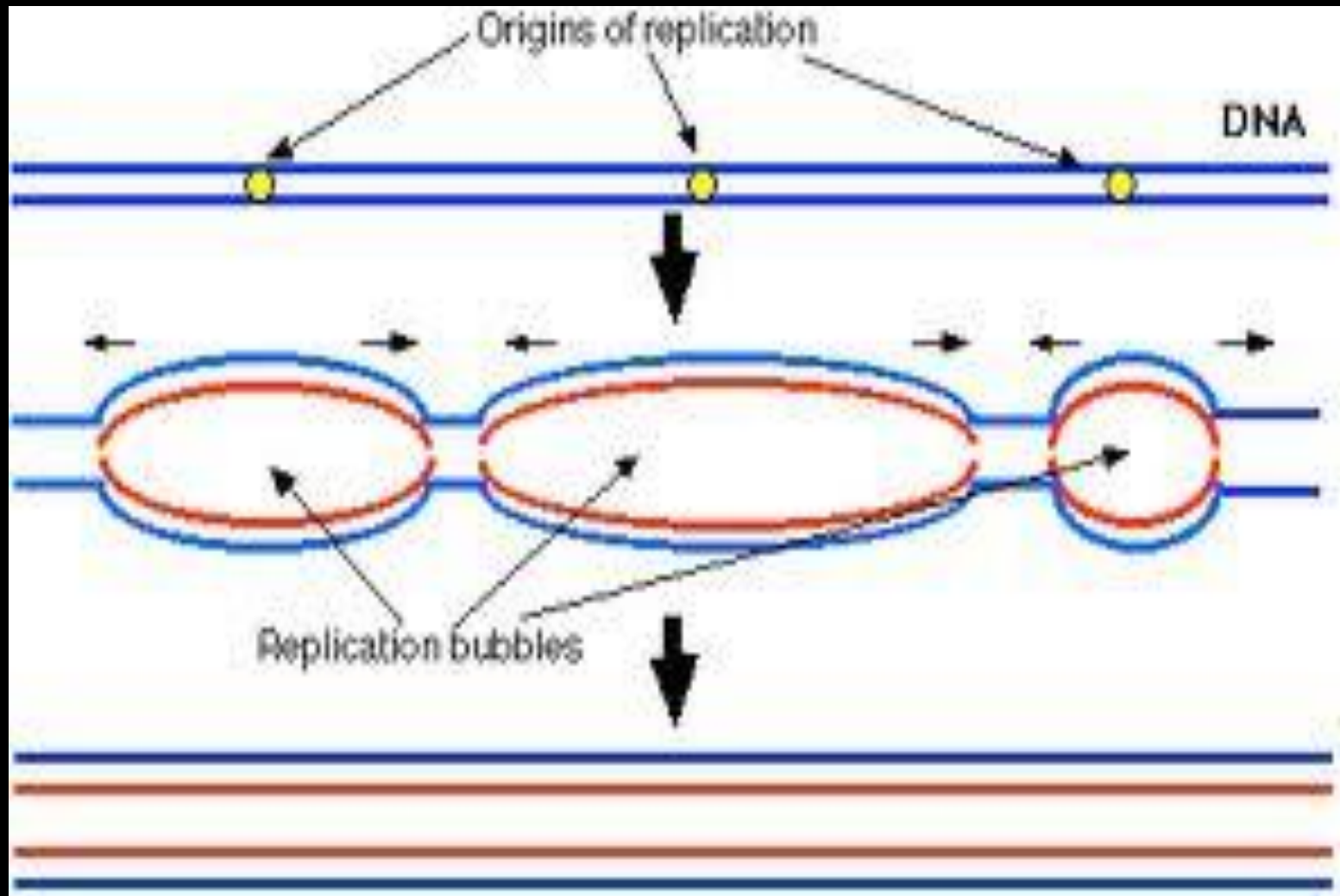
REPLIKASI DNA PADA PROKARYOT

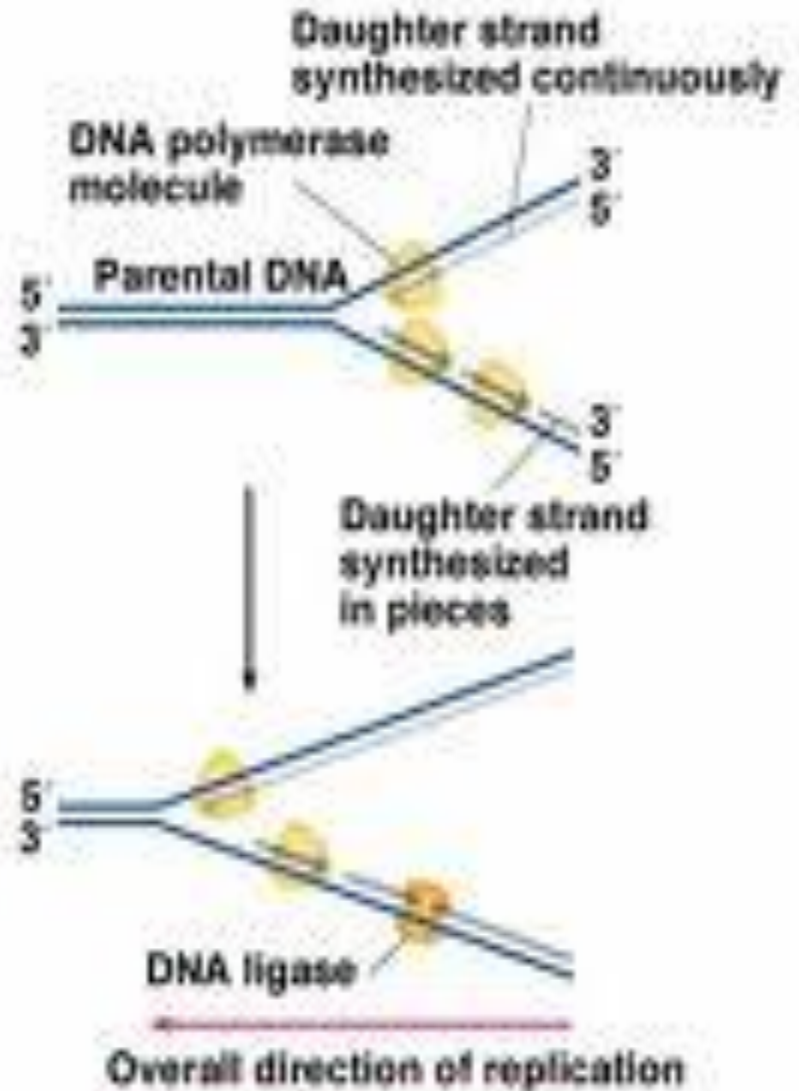
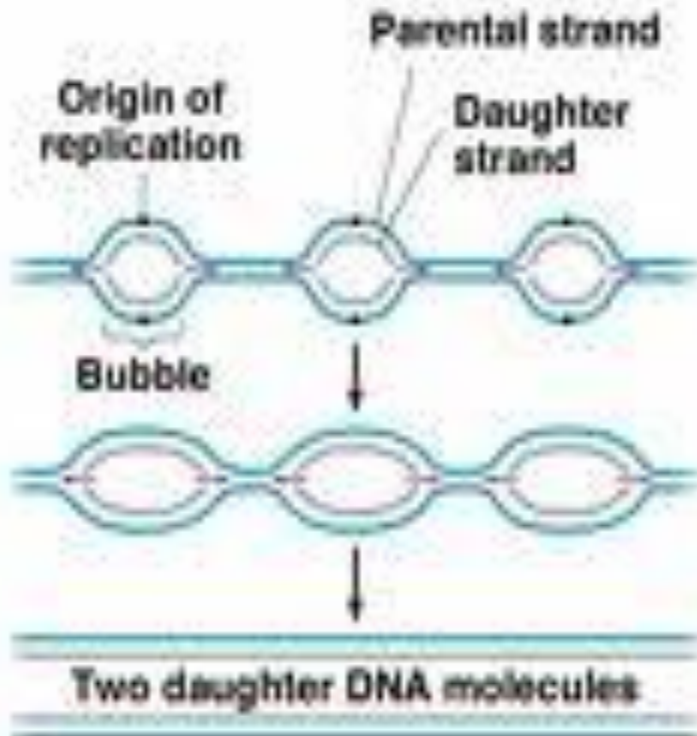
1. Inisiasi
2. Replikasi DNA secara 'semidiscontinuous'
3. Rolling Circle Replication



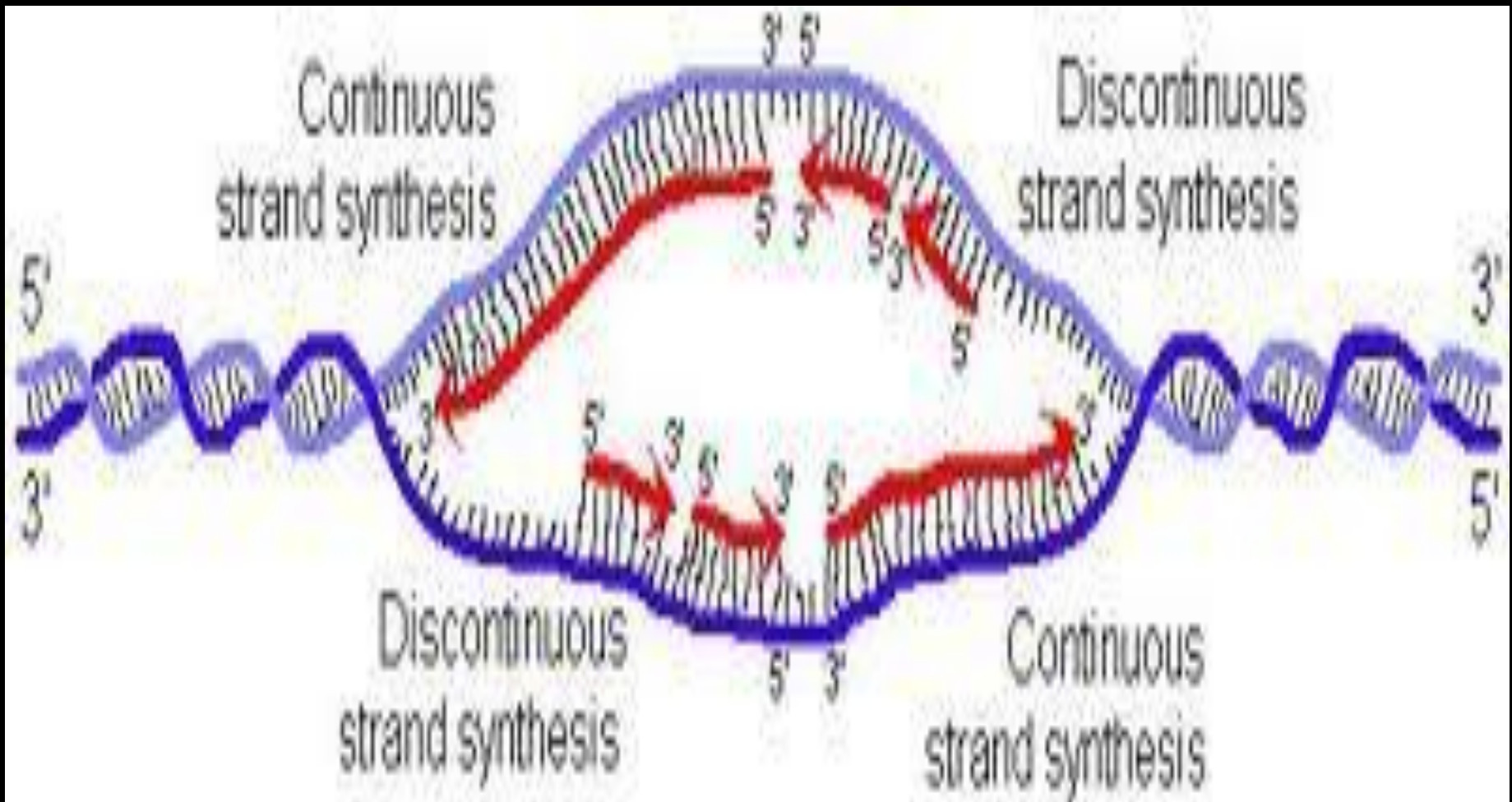
1. INISIASI

- 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**

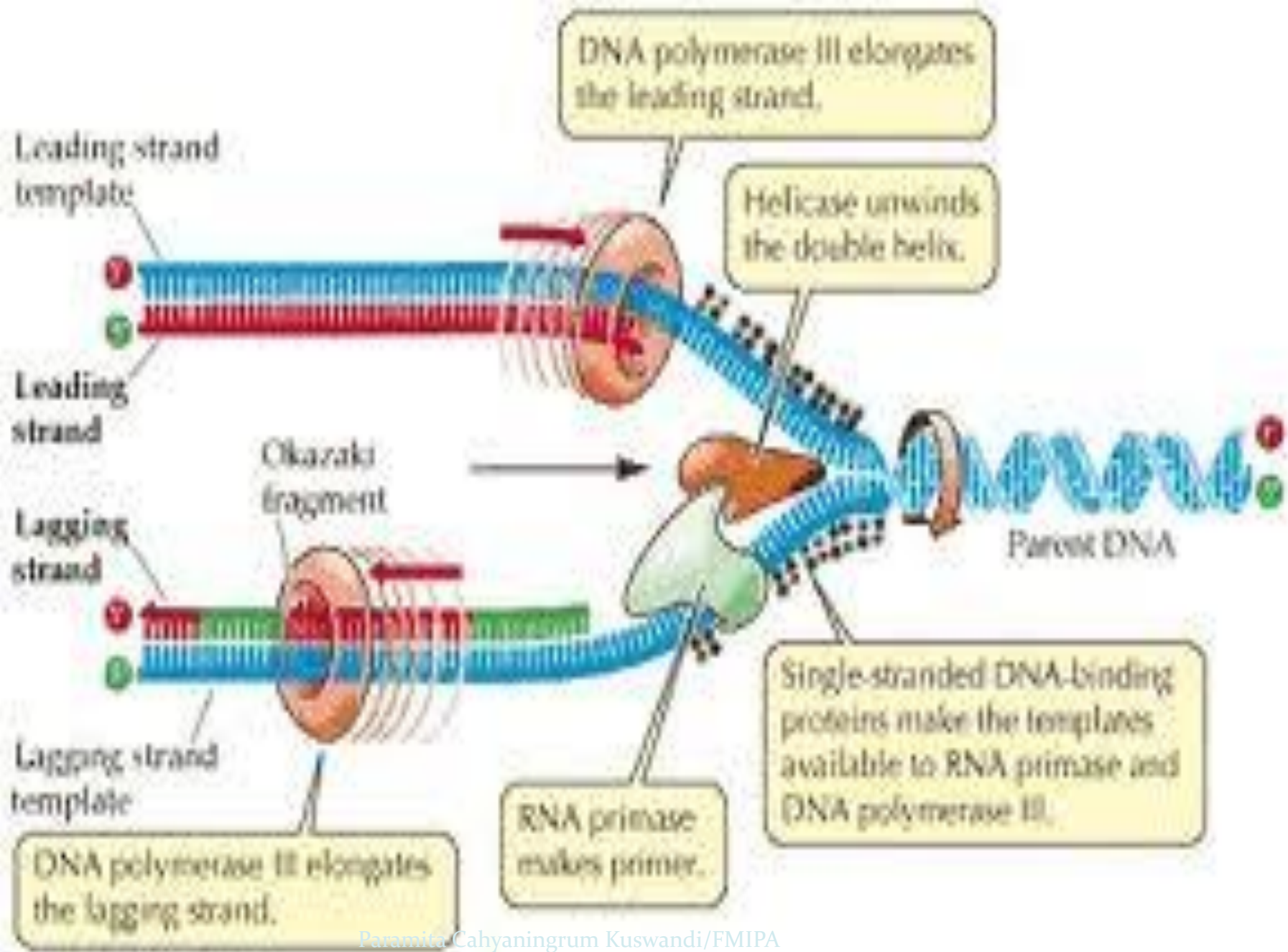




- Saat DNA membuka, terbentuk struktur seperti sendok, yang disebut **replication fork**
- Pada satu replication bubbles, terdapat 2 replication fork
- Secara umum, replikasi DNA berjalan dua arah = **bidirectional**



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.



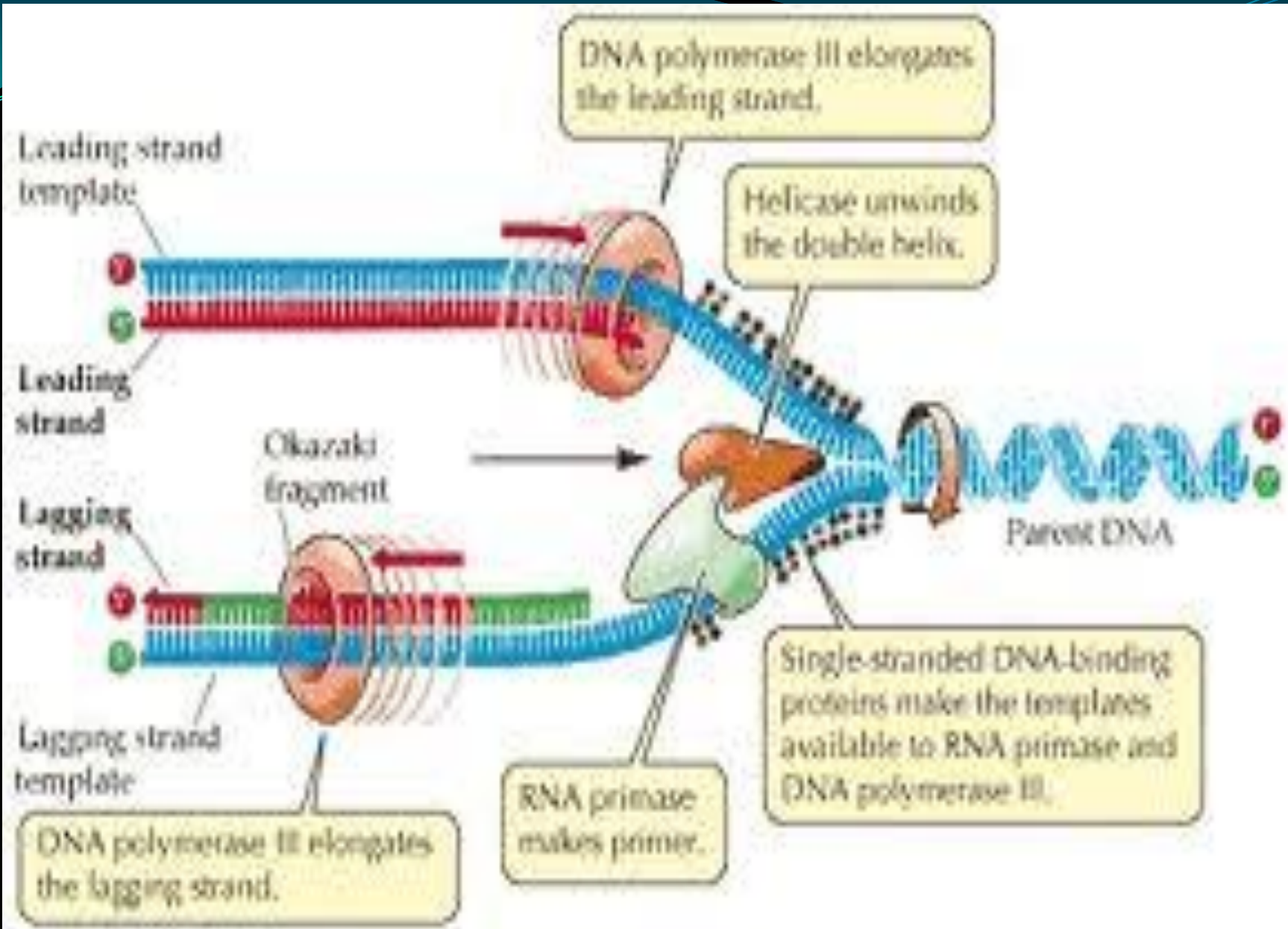
Inisiasi replikasi pada E.coli

- Replicator pada E.coli adalah oriC (245 bp DNA)
- oriC terdiri dari : 3 sekuen dengan banyak AT (13 bp)
4 sekuen 9 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

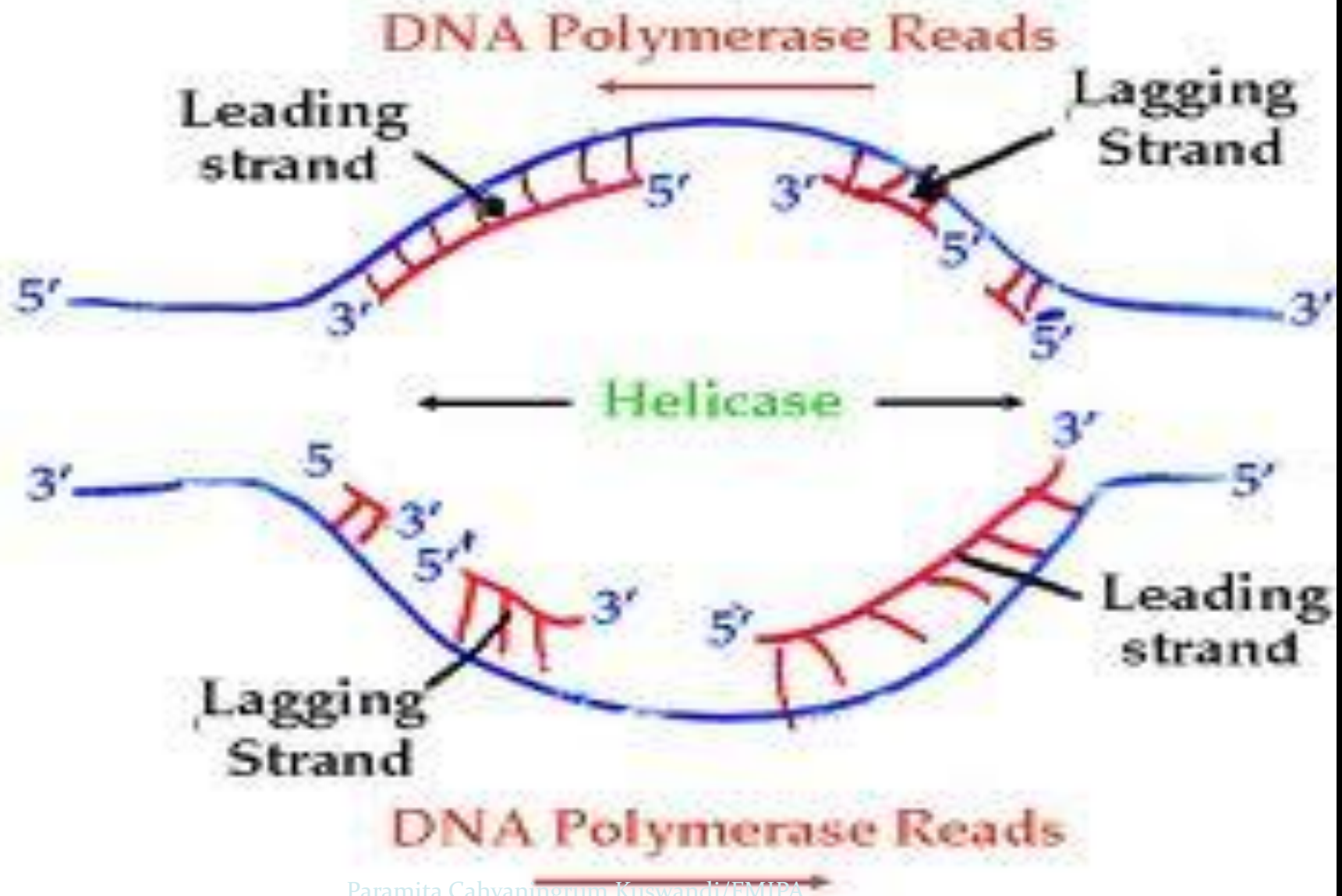
- Kemudian, **DNA helicase** merekrut **DNA primase** (dihasilkan oleh dnaG gene), membentuk suatu kompleks yang disebut **primosome**
- DNA primase berfungsi membentuk **RNA primer** (sekitar 5-10 nukleotida) yang kemudian dilanjutkan oleh DNA polymerase
- Primer berfungsi sebagai untai awal DNA yang 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' \longrightarrow 3'

Leading strand & Lagging strand

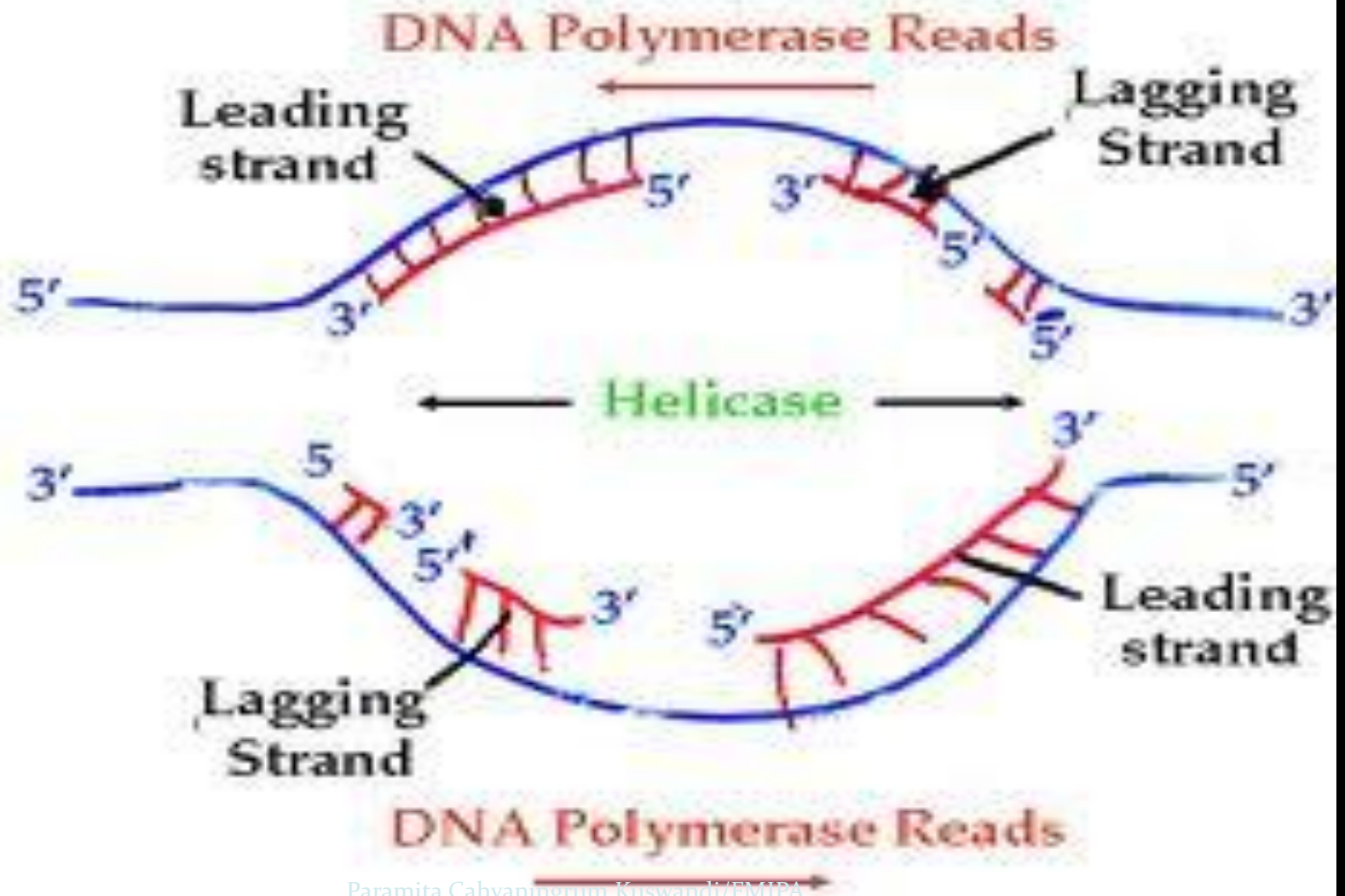
- **Leading strand :**

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....

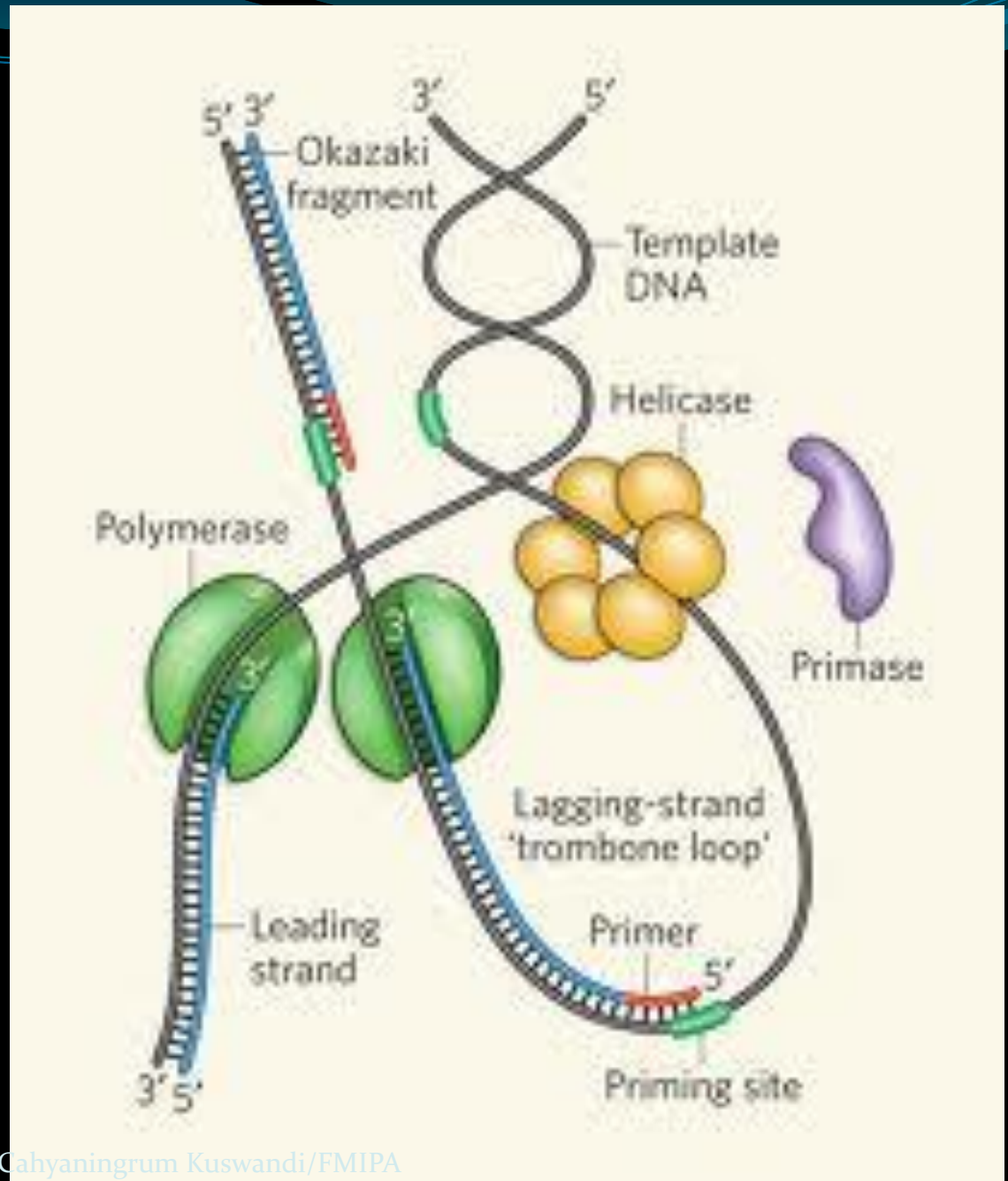
- Potongan-potongan DNA baru disebut **Okazaki fragments** (ditemukan oleh Reiji & Tuneko Okazaki, dkk)
- Okazaki fragments membentuk untai DNA yang utuh dengan bantuan 2 enzim : **DNA polymerase I dan DNA ligase**
- **DNA polymerase I** menghilangkan RNA primer dan menambah sisa nukleotida yang dibutuhkan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

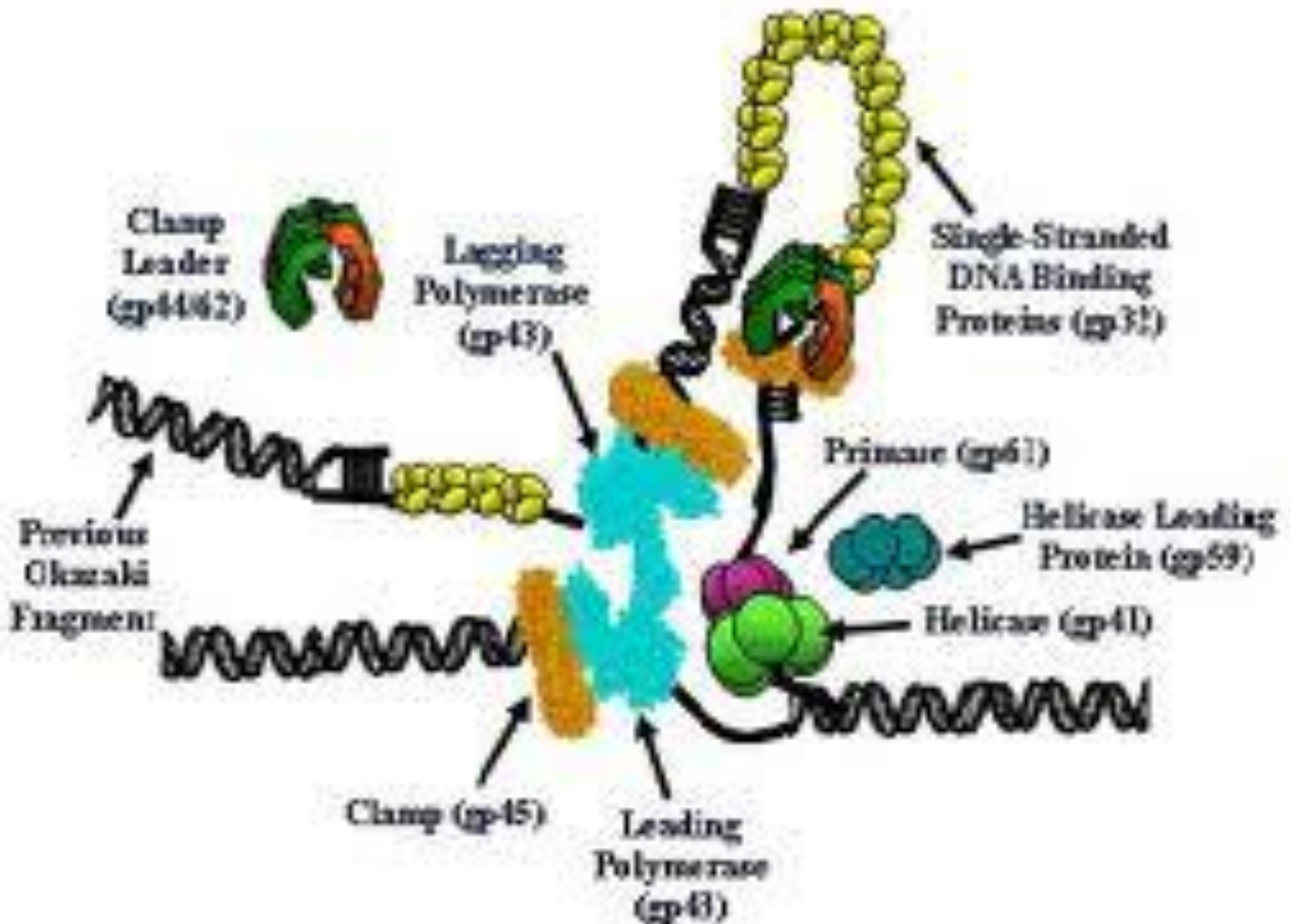
Semidiscontinuous

- 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

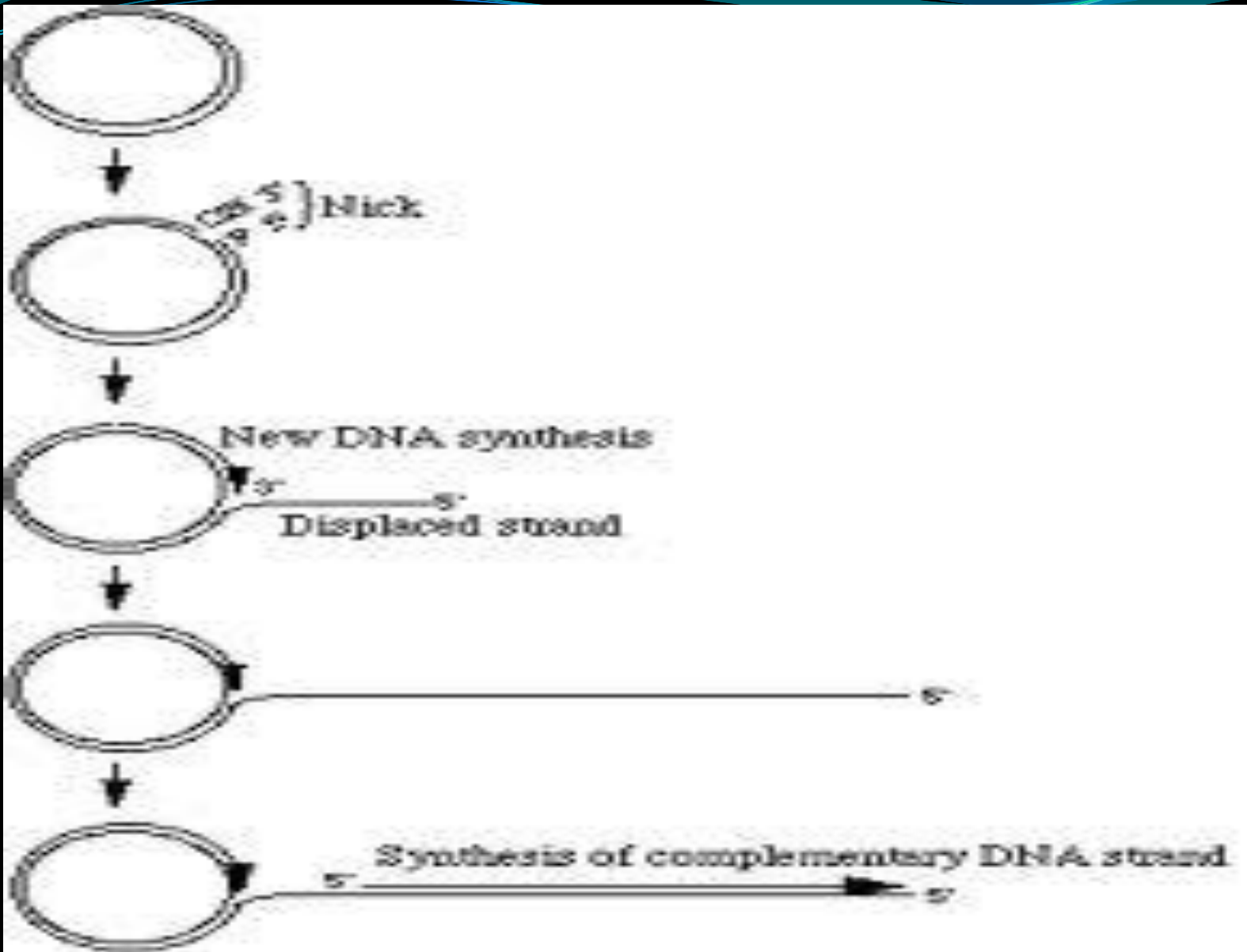




3. Rolling circle replication

- Biasanya terjadi pada virus e.g. Bacteriophage λ
- 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



video animasi DNA replication

Tugas kelompok

- Bagaimana mekanisme replikasi (secara rolling circle) terjadi pada phage λ ?
- Jelaskan secara detail
- Semua kelompok membuat tugas
- Hanya salah satu maju minggu depan
- Diskusi