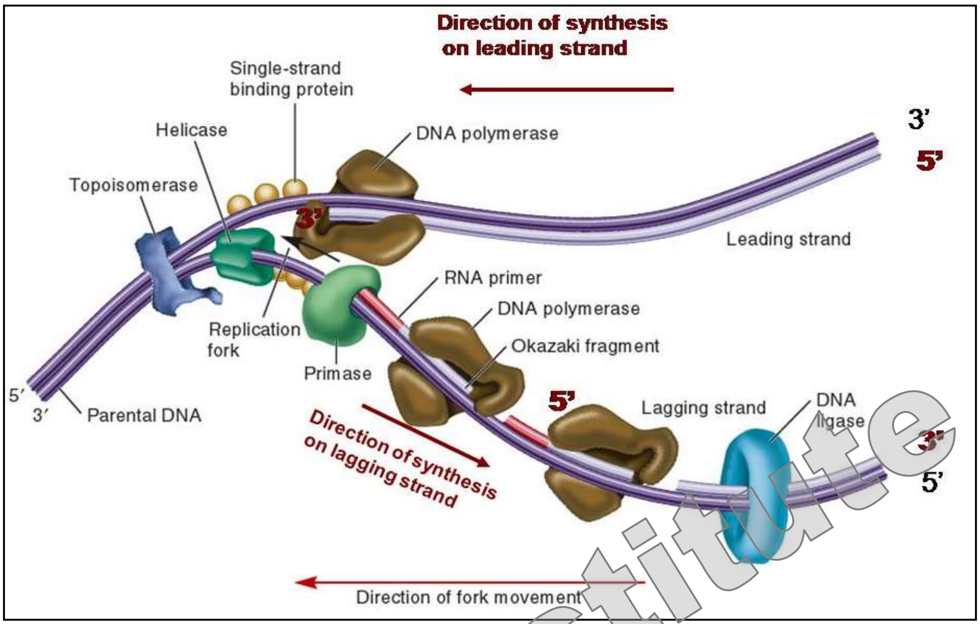


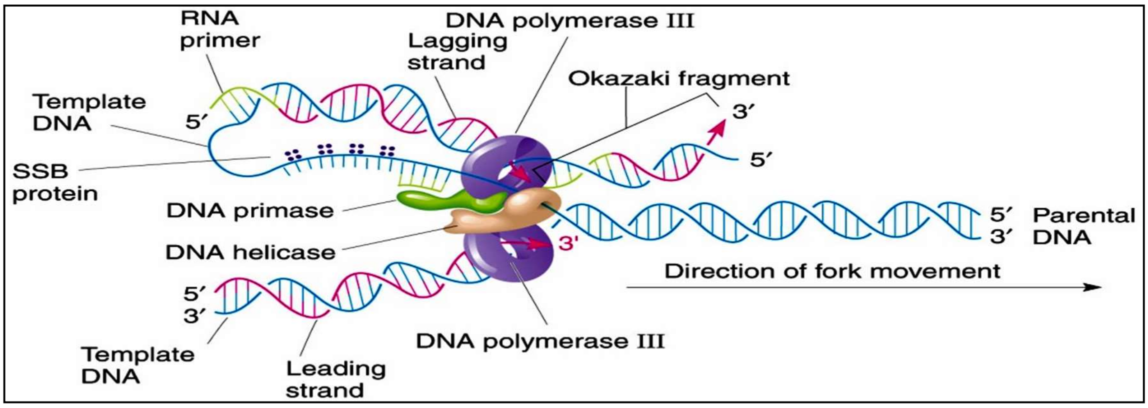
Eukaryotes में primase DNA polymerase α का एक अभिन्न अंग है, यह 10 nucleotides का RNA primer संश्लेषित करता है और फिर मुख्यreplicative enzyme से पहले इसे extend करने के लिए 30 nucleotides का DNA जोड़ देता है।

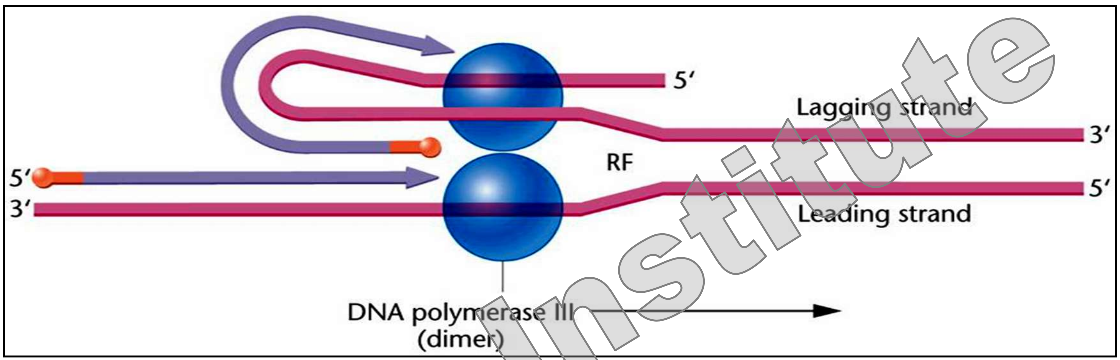
* **Event at the bacterial replication fork:-** Helicase (Dna B) के origin से bound होकर prepriming complex बना लेने के बाद, primase नियुक्त (or जुड़कर) होकर primosome बना लेता है, जो leading strand के replication को initiate करता है।

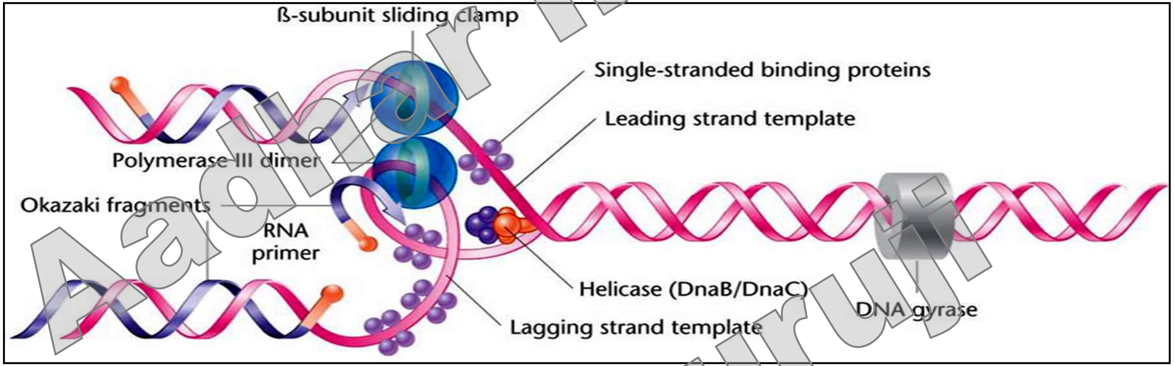
[Helicase double strand DNA की बजाय single strand से bind होता है और helicase की specifity के अनुसार, polynucleotide के साथ साथ 3' → 5' or 5' → 3' दिशा में आगे बढता है।

- 2 separated ssDNA (यदि गुंजाईश हो तो) तुरन्त वापस बन सकते है।
- **Leading strand के 1000-2000 Nucleotides replicate होने के बाद, lagging strand पर discontinuous strand संश्लेषण का पहला चरण शुरू हो सकता है।**
- कुछ DNA pol III complex, जो leading strand संश्लेषित करते हैं, lagging strand को भी extend करते है।
- Actually β subunit दोनों strands पर खिसकती है, और 2 α subunits, γ subunit से bound होती है, जो फिर β subunit से bound होती है।
- यहाँ γ-complex का प्रमुख कार्य β-subunit से क्रिया करना है और इस प्रकार template से enzyme के जुडने और हटने को नियंत्रित करता है। यह function मुख्यतः lagging strand replication के समय आवश्यक होता है, जब enzyme repeatedly Okazaki fragment के शुरू और अन्त में जुडते और हटते है।
- DNA pol III और primosome के योग (संगठन) को replisome कहते है। यह parent DNA के साथ साथ आगे बढता है और अधिकतर replicative कार्य पूरे करता है।
- इसके गुजरने के बाद, हर Okazaki fragments को जोड़कर replication प्रक्रिया को पूरा करना आवश्यक होता है। लेकिन प्रत्येक Okazaki fragment का RNA primer उस जगह पर जुड़ा होता है, जहां ligation होना चाहिए, और इसे DNA pol III द्वारा हटाया नहीं जा सकता (क्योंकि यह 5'→3' exonuclease गतिविधि नहीं रखता)। इसीलिए DNA polymerase III lagging strand को छोड़ देता है और इसकी जगह Pol I ले लेता है, जो primer को हटा adjacent fragments को template के खुले हिस्से में बढाता है।
- 2 Okazaki fragment (नए संश्लेषित) को DNA ligase द्वारा phosphodiester bond से जोड़ दिया जाता है और इस प्रकार lagging strand के इस भाग region का replication पूर्ण हो जाता है।

Aadhar Institute iguruji







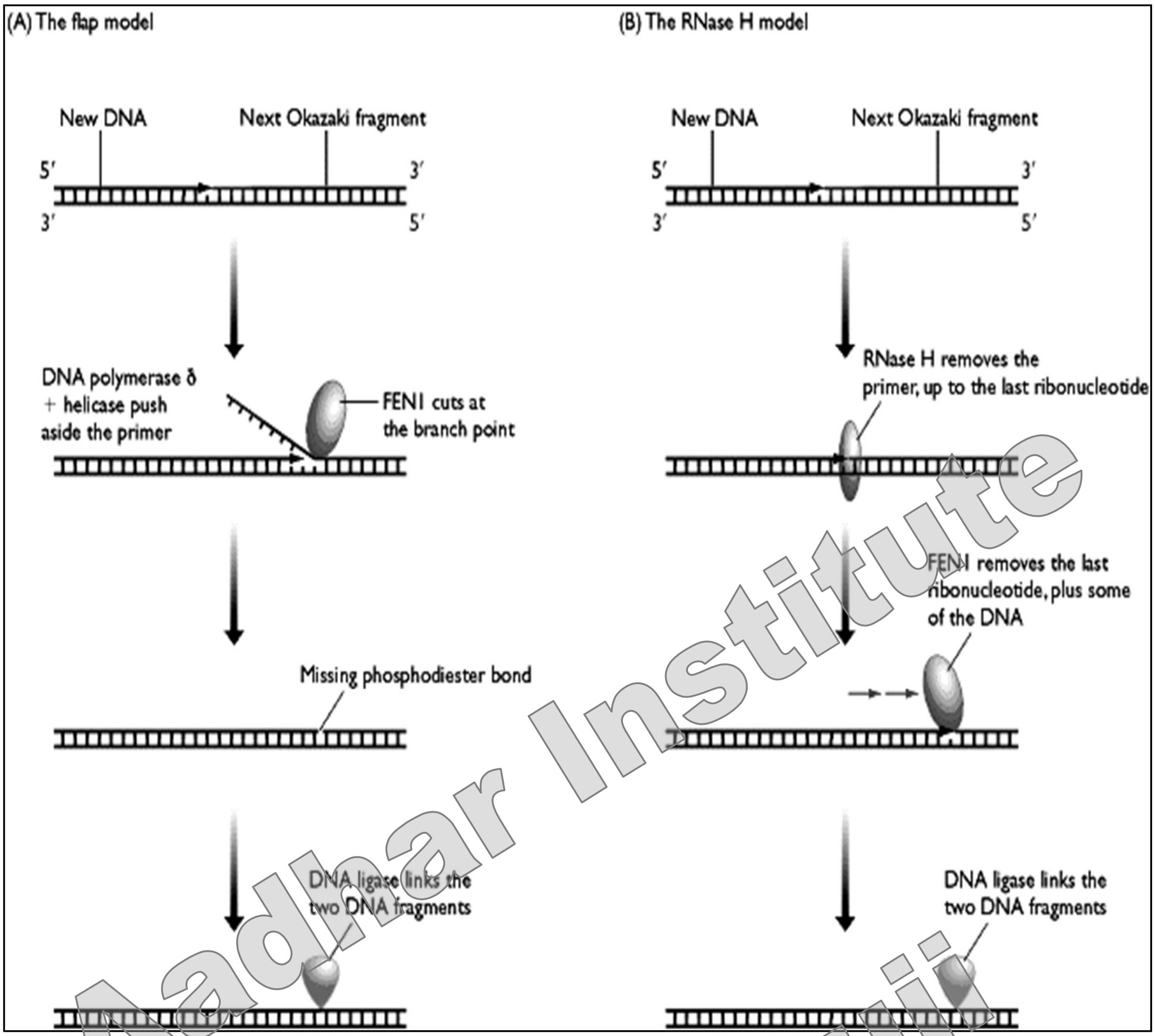
Aadhar Institute Iguruji

The Eukaryotic replication fork:-

- यह अभी तक स्थापित नहीं हो पाया है कि कौन सा helicase DNA की unwinding के लिए जिम्मेदार है।
- RPA (replication protein A) अलग हो चुके Polynucleotides को फिर से जुडने से रोकता है।
- DNA polymerase α RNA primer को संश्लेषित भी कर सकता है और इसे 30 nucleotides से extend भी कर सकता है। लेकिन इसमें sliding clamp का स्थायित्व प्रदान करने वाला प्रभाव नहीं होता (Pol III के β और Pol δ के PCNA के समान)। इसलिए इसे मुख्य replicating enzyme DNA polymerase δ से बदलना जरूरी है।
- E.coli polymerase के γ- complex का कार्य multisubunit सहायक protein (replication factor जो Eukaryotes में कहलाता हैं) द्वारा पूर्ण किया जाता है।

Removal of RNA Primers from okazaki:-

किसी भी eukaryotic DNA polymerase में 5’→3’ exonuclease गतिविधि नहीं होती है। इस काम में FEN1 (flap endonucleases) मुख्य भूमिका निभाता है। यह adjacent fragment के 5’ end से primer को degrade करने के लिए DNA pol δ complex के साथ जुड़ा होता है।



FEN1 primer के extreme 5' सिरे पर ribonucleotides को नहीं हटा सकता क्योंकि इस ribonucleotide के साथ 5'-triphosphate group होता है जो FEN1 की गतिविधि को अवरूद्ध कर देता है।

Mode 1 Helicase → Pol δ Primer को धकेलता है → FEN activity RNA-DNA जोड़ पर Phosphodiester को काट देती है।

Mode 2 RNase → FEN1 → FEN activity RNA-DNA joint पर Phosphodiester को काटती है।

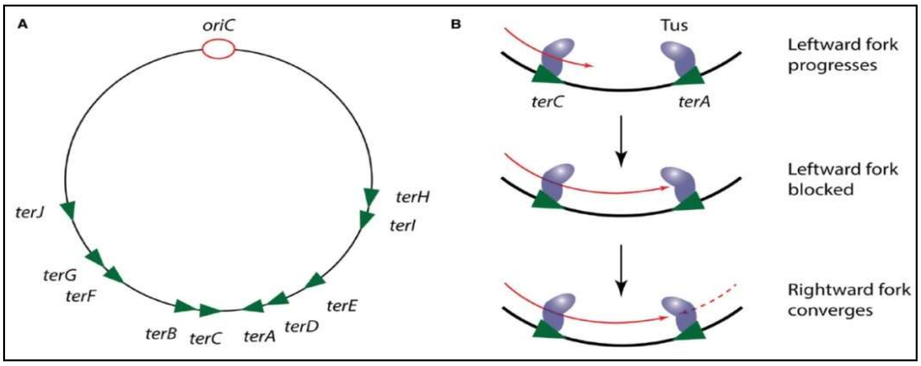
- Eukaryotes में कोई replisome नहीं होता है, बल्कि replication में शामिल enzymes और proteins nucleus के अन्दर काफी बड़ी संरचना बनाते है, प्रत्येक में 100 से 1000 अलग–अलग (विशिष्ट) replication complexes होते है।
- Nuclear matrix के साथ जुडे होने की वजह से ये संरचनाएँ अचल होती है, इसलिए DNA molecules जैसे–जैसे replicate होते है, वैसे–वैसे complexes के बीच में से गुजरते है। इन संरचनाओं को replication factories कहा जाता है।

<u>Termination of Replication</u>:- Bacterial genomes केवल एक स्थान से दोनों दिशाओं में replicate होते है। Termination sequences "Ter" (7 की संख्या में) की वजह से अलग–अलग गति से चलने वाली 2 replication forks बिल्कुल diagonal स्थान पर मिलती है। Ter sequences, sequence specific DNA binding protein "Tus" के लिए recognition site की तरह काम करती है। Ter से bound होकर "Tus" protein replication fork को केवल एक दिशा में गुजरने देता है और विपरीत दिशा में आगे बढ़ने से रोकता है।

Double helix पर Tus protein की orientation के आधार पर उसकी directionality तय होती है।

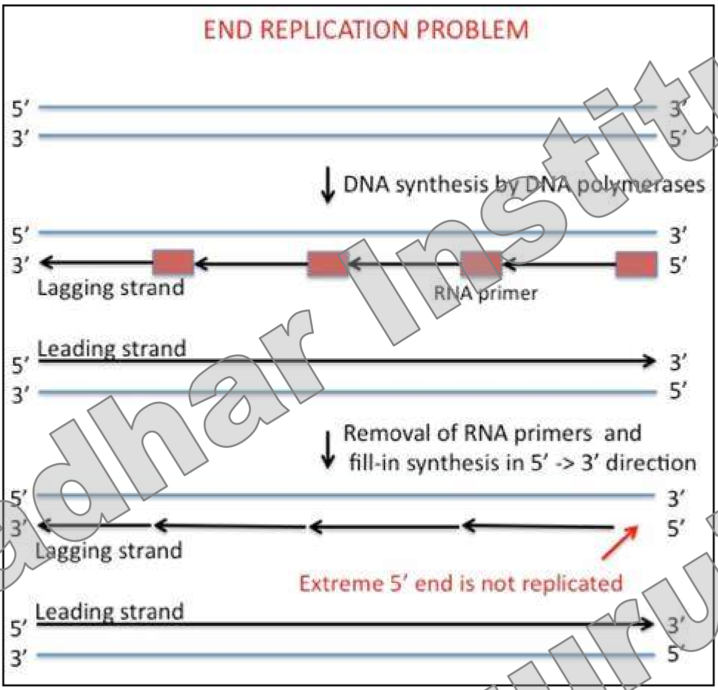
Eukaryotes में termination के बारे में बहुत कम जानकारी उपलब्ध है। यह possible है कि replication forks random positions पर meet करती है।

Aadhar Institute
igurujii



Telomeres

Telomerase protein और RNA से बना होता है। यह RNA 5' end पर human telometric repeat (5' TTAGGG3') से complementarity रखता है। यह RNA प्रत्येक extension step के लिए template की तरह उपयोग होता है। DNA synthesis enzyme के protein component द्वारा किया जाता है, जो reverse transcriptase है।



⇒ Telomere की लम्बाई telomere binding proteins (TBPs) द्वारा नियंत्रित होती है। जैसे human में TRF1.

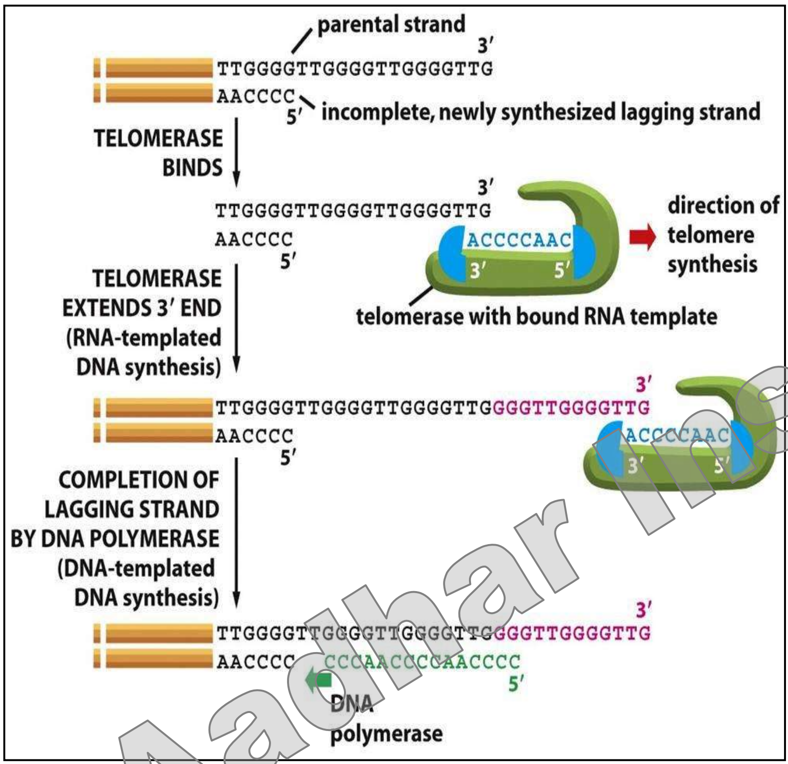
⇒ Mutation जो TBPs की DNA से binding को रोकती है, telomere को सामान्य से लम्बा कर देती है। यदि mutation ज्यादा उत्पादन करती है तो telomere shortening होती है।

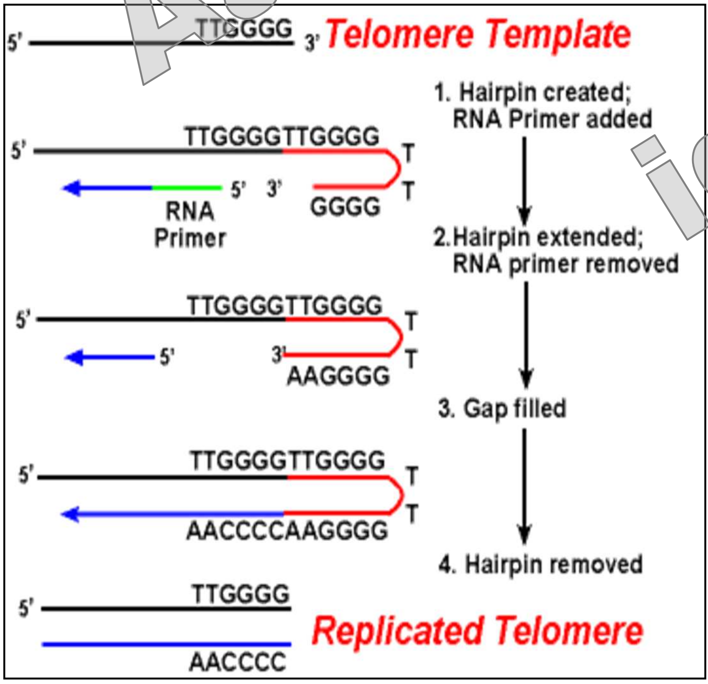
Aadhar Institute igururji

Telomere Replication: -

- Eukaryotic chromosome में linear DNA का replication एक समस्या पैदा करती है। जो bacterial circular DNA molecule के replication में नहीं होती है। DNA synthesis की सामान्य प्रक्रिया में lagging strand के 3' end का replication नहीं होता है। यह chromosome के अंत पर एक रिक्त स्थान उत्पन्न करता है और इस प्रकार double-stranded replicated portion को छोटा करता है।
- इसका असर यह होगा कि chromosomal DNA प्रत्येक replication के बाद छोटा होता जाएगा, इस समस्या को हल करने के लिए कई प्रक्रियाएँ विकसित हुए है। कई जीवों में chromosome ends (telomeres) को replicate करने के लिए telomerase enzyme उपयोग किया जाता है।
- प्रत्येक telomere G-rich hexanucleotide repeat की कई प्रतियाँ रखता है, (और Tetrahymena में यह GGGTTG है।) Telomerase अपनी संरचना के अभिन्न अंग की तरह एक छोटा RNA molecule रखता है जो इस G-rich sequence के एक हिस्से का complementary है।

- Telomerase का RNA molecule, telomere end से H-bond होता है। RNA को template की तरह उपयोग करके, telomerase RNA template को प्रतिलिपि बनाता है, (इस प्रकार यह एक reverse transcriptase enzyme है) और telomere DNA के सिरे पर 6 deoxy nucleotides जोडता है। फिर Telomerase DNA से अलग होकर, नये telomere end पर bind करता है और extension प्रक्रियाँ की पुनरावृत्ति करता है।
- अंतिम रूप से अलग होने से पहले Telomerase इस प्रकार सैकडों बार तक यह प्रक्रिया कर सकता है। नया बना DNA strand सामान्य DNA replication के लिए template की तरह कार्य करके double-stranded chromosomal DNA बना सकता है। सामान्य replication द्वारा DNA के सिरों की shortening और telomerase के उपयोग से lengthening, दोनों प्रक्रियाएँ मोटे तौर पर संतुलित होती है, इस प्रकार प्रत्येक chromosome की लम्बाई लगभग बराबर रहती है।





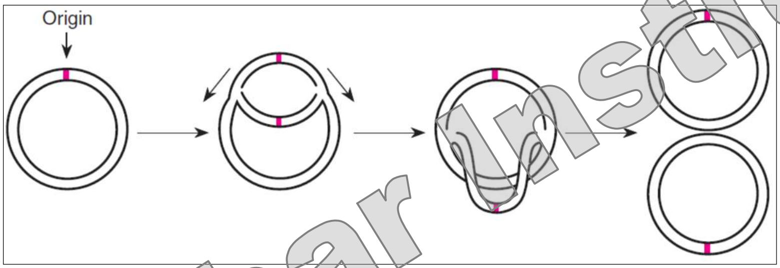
Aadhar Institute iguruji

Fig:- Replication of telomeric DNA. Telomerase has a bound RNA molecule that is used as template to direct DNA synthesis and hence extension of the ends of chromosomal DNA.

➯**Theta replication**: -

यह circular DNA, के replication का एक सामान्य प्रकार है जैसे कि *E. coli* और अन्य bacteria में पाया जाता है। इसमें double-stranded DNA, nucleotide strand बनता है, जो template की तरह काम करता है और जिस पर नया DNA synthesis होता है। Doble helix की uncoiling एक loop बनाता है जो replication bubble कहलाता है।

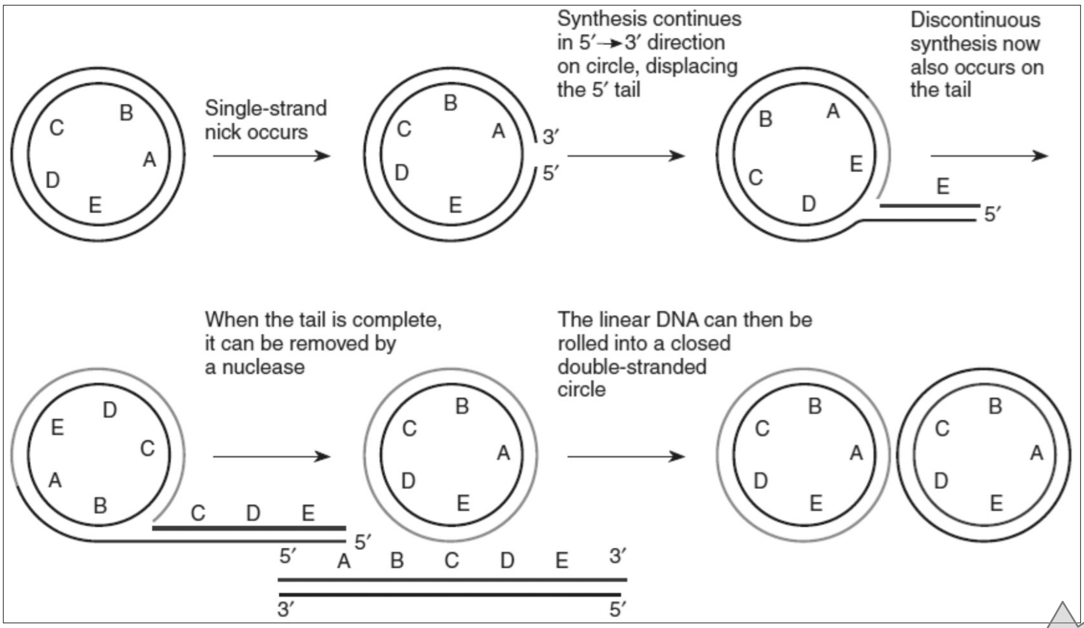
- Unwinding bubble के एक या दोनों सिरों पर शुरू होकर उसे लगातार बड़ा बनाती जाती है। दोनों template strands पर DNA replication, unwinding के साथ–साथ चलता है।
- Unwinding का वह स्थान जहाँ से single strands, double stranded DNA helix से अलग होते है उसे replication fork कहते है।
- अलग replication bubble के दोनों सिरों पर replication fork हो, तो वे बाहर की तरफ दोनों दिशाओं में आगे बढ़ते है और इसीलिए यह bidirectional replication कहलाता है। दोनों fork एक साथ unwinding DNA replication करते हुए आगे बढ़ते है और अंत में एक दूसरे में मिल जाते है।
- अगर सिर्फ एक ही replication fork है तो, वह पूरे circle के चारों ओर दिशा में आगे बढ़ते हुए दो पूर्ण रूप से circular DNA molecules बनाता है जिनमें से हर एक मे एक पुराना और एक नया nucleotide strand होता है।
- Theta replication का सबसे पहला प्रमाण 1963 में John Cairns ने radioactive nucleotides के साथ bacteria को grow करके दिखाया था।



➯ **Rolling-circle replication** कुछ viruses और *E.coli* के F factor में होता है। यह replication किसी एक nucleotide strand में break द्वारा शुरू किया जाता है जो एक 3'-OH group और एक 5'-phosphate group बनाता है। Broken strand के 3' सिरे पर नए nucleotides जोडे जाते हैं जो template strand की मदद से किया जाता है। जैसे–जैसे 3' सिरे पर नए nucleotides जोडे जाते हैं, template से टूटे हुए strand का 5' सिरा अलग कर दिया जाता है। ऐसा लगता है जैसे एक धागे की रील में से धागा बाहर निकलता रहता है, इससे circle के चारो ओर 3' सिरा वृद्धि करता है इसीलिए इसे rolling-circle model कहते हैं।

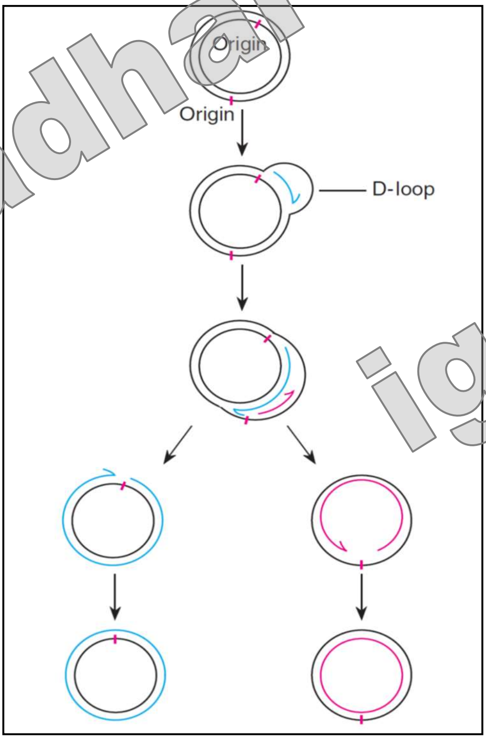
Replication fork एक circle के चारो ओर बहुत बार लगातार काम कर सकता है, जो एक जैसी बहुत सारी sequences की आपस मे जुडी हुयी प्रतियाँ बनाता है। Circle के चारो ओर हर revolution के साथ बढ़ता हुआ 3' सिरा प्रत्येक पहले वाले revolution में बनने वाले nucleotide strand को हटाता है। अंत में circle से linear DNA molecule को हटाया जाता है जिससे एक double stranded circular DNA और एक single stranded linear DNA molecule बनता है। यह linear DNA molecule या तो अपने complementary strand को बनाने में template के रूप में काम आने के बाद या पहले फिर से circle में तबदील हो जाता है।

Aadhar Institute iguruji



Loop Mode Replication

Chloroplasts और mitochondria (eukaryotic cells में) में खुद का circular DNA molecule होता है, जो थोडी सी अलग प्रक्रिया के द्वारा replicate होता है। दोनों parental template strand पर अलग अलग बिन्दुओ पर origin of replication होते हैं। एक strand पर replication शुरू होता है जो displacement loop या D-loop संरचना बनाते हुऐ दूसरे strand को हटाता हैं। Replication तब तक चलता है जब तक कि यह प्रक्रिया दूसरे strand के origin of replication न गुजर जाए। Replication दूसरे strand पर विपरीत दिशा में शुरू होता है। Mitochondrial DNA में कुछ growth conditions में normal Y-junction replication भी होता है।



Aadhar Institute
iguruji

CHAPTER : 4

DNA REPAIR

- जीवित कोशिकाओं में DNA को कई रासायनिक परिवर्तनों का सामना करना पड़ता है। (अक्सर सूखे या frozen नमूनों से DNA sequencing करने में सक्षम होने की उत्सुक्ता में इस तथ्य को भूला दिया जाता है।
- यदि DNA में encode की गई genetic information भ्रष्ट होने से बचाना है, तो किसी भी रासायनिक परिवर्तन को ठीक किया जाना चाहिये।
- DNA repairing में कोई भी गलती mutations को पैदा करती है।

Agents that Damage DNA

► कुछ wavelengths वाली radiation
- ionizing radiation जैसे कि gamma rays और x-rays
- ultraviolet rays, खासकर UV-C rays (~260 nm) यह DNA द्वारा strongly absorb की जाती है और longer-wavelength UV-B भी जो ozone shield को penetrate करती है।

► Highly-reactive oxygen radicals जो normal cellular respiration यहां तक कि अन्य biochemical pathways के समय बनते है।

► वातावरण में उपस्थित रासायन :–

बहुत से hydrocarbons, cigarette smoke में पाये जाने वालों सहित ! कुछ plant और microbial उत्पाद, जैसे कि aflatoxins जो moldy peanuts में बनता है।

► खासतौर पर Cancers की chemotherapy में उपयोग किये जाने वाले रासायन।

Types of DNA Damage

1. DNA में उपस्थित सभी 4 प्रकार के bases (A, T, C, G) को अलग–अलग स्थानों पर covalently modify किये जा सकते हैं।
   - ज्यादातर Deamination (एक amino group का हटना) होता है। जैसे: C nucleotide U में बदल जाना।
2. <u>DNA replication</u> के दौरान proofreading के असफल हो जाने के कारण गलत base pairs का बनना।
   - साधारण example: T की बजाय U <u>pyrimidine</u> (यह सामान्यतः सिर्फ RNA में मिलता है।) का इस्तेमाल।
3. Backbone में Break हो जाये:
   - ऐसा सिर्फ एक strand में हो (एक single-stranded break, SSB) या
   - दोनों strands (एक double-stranded break (DSB) में हो
   - Ionizing radiation-इसका मुख्य कारण होती है, कुछ रासायन भी break बना देते हैं।
4. Bases के बीच covalent linkage के कारण Cross linking हो जाती है।
   - एक ही DNA strand ("intrastrand") पर या
   - दो विपरीत strands ("interstrand") पर।

Cancers की chemotherapy में उपयोग किये जाने वाले रासायन DNA crosslinking का मुख्य कारण होते हैं।

Repairing Damaged Bases

Damaged या अनुचित bases अनेक प्रक्रियाओं के द्वारा repair किया जा सकता है:

<u>A. Direct chemical reversal</u> of the damage

<u>B. Excision Repair</u>, इसमें damaged bases को पहले हटाया जाता है और फिर सही bases से DNA संश्लेषण द्वारा बदल दिया जाता है। यहां 3 तरह के excision repair होते हैं:

1. Base Excision Repair (BER)
2. Nucleotide Excision Repair (NER)
3. Mismatch Repair (MMR)

Aadhar Institute iguruji

A. Direct Reversal of Base Damage

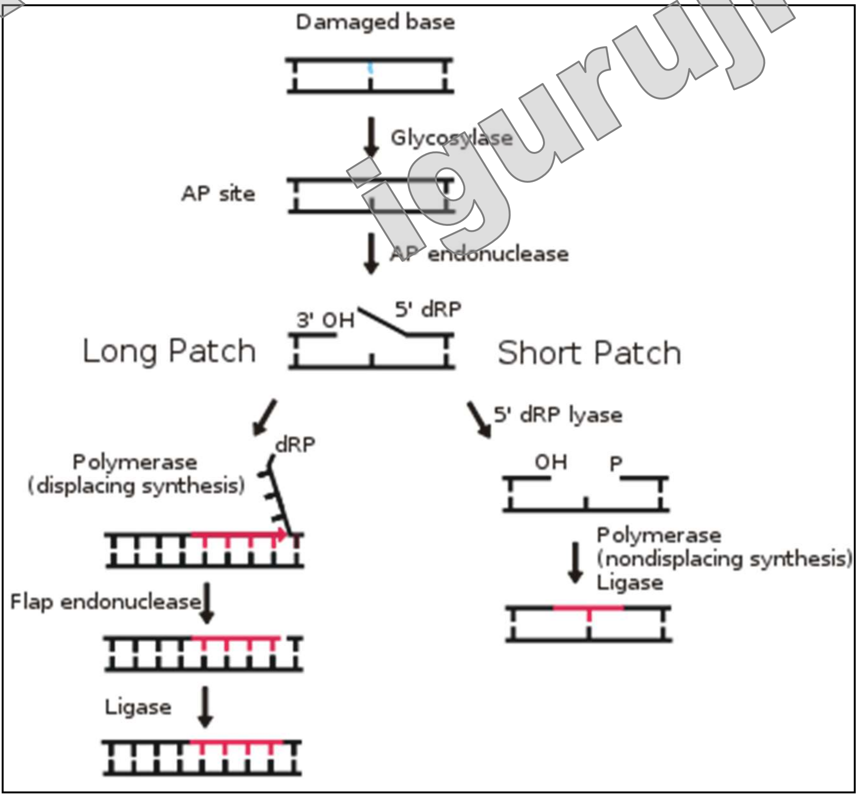
Humans में point mutations का मुख्य कारण स्वाभाविक रूप से Cytosines में (CH_3-) methyl group का जुडना (an example of alkylation) और उसके बाद deamination का होना है। इसके कारण C, T में बदल जाता है। ज्यादातर इस तरह का परिवर्तन glycosylases enzyme द्वारा ठीक कर दिया जाता है जो mismatched T को हटा करके सही C को दुबारा बना देता है। ऐसा बिना DNA backbone को break करे हो जाता है। Cancer chemotherapy में उपयोग की जाने वाली drugs भी alkylation द्वारा DNA को क्षति पहुँचा सकती है। कुछ methyl groups एक protein (MGMT द्वारा encoded) द्वारा हटा दिए जाते है। यह protein सिर्फ एक बार काम कर सकता है इसीलिए हर methyl group को हाटाने के लिए एक अलग protein molecule की जरूरत होती है। यह DNA का direct reversal mechanism द्वारा repair process की सबसे बडी दुविधा है।

- Bases को ठीक करने के लिय सभी प्रकार के रासायनिक संशोधनों को अपने आपकी कार्यविधि की जरूरत होती है। लेकिन कोशिका को ज्यादा सामान्य तरह की कार्यविधि की आवश्यकता होती है जो सीमित संसाधनों से ही सब प्रकार की रासायनिक हानि को ठीक करने की क्षमता रखते है। इस आवश्यकता हो excision repair की प्रक्रिया पूरी करता है।

B1. Base Excision Repair (BER)

Steps कुछ इस प्रकार हैं:

1. DNA glycosylase enzyme damaged base को हटाता है (ऐसा अनुमान है कि यह प्रक्रिया हमारे शरीर की हर कोशिका में एक दिन में लगभग 20,000 बार होती है)। इंसानों में कम से कम 8 genes होते हैं जो अलग–अलग DNA glycosylases को encode करते है और हर enzyme एक विशिष्ट प्रकार के base damage को पहचानने और उसे हटाने के लिए जिम्मेदार होता है।
2. Backbone में से deoxyribose phosphate को हटाने से एक रिक्त स्थान बनता है।
3. सही nucleotide के द्वारा इसकी जगह भरी जाती है। यह **DNA polymerase β** पर निर्भर करता है।
4. Strand में break को जोड़ दिया जाता है। दोनों enzymes आवश्यक ऊर्जा के लिए ATP पर निर्भर करते हैं।



Aadhar Institute igurujI