



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Η Μεταλλακτικότητα και η Επιδιόρθωση του DNA

Παναγιώτης Αδαμόπουλος

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α

Μεταλλακτικότητα και η Επιδιόρθωση του DNA

- Η διαιώνιση του γενετικού υλικού από γενιά σε γενιά προϋποθέτει τη διατήρηση των ποσοστών μεταλλαγής σε χαμηλά επίπεδα.
- Υψηλά ποσοστά μεταλλαγών στη γαμετική σειρά θα κατέστρεφε τα είδη. Για να έχουν οι απόγονοι μια καλή πιθανότητα επιβίωσης, οι αλληλουχίες DNA πρέπει να μεταβιβαστούν σε μεγάλο βαθμό αναλλοίωτες στη γαμετική σειρά.
- Υψηλά ποσοστά μεταλλαγών στις σωματικές κυτταρικές σειρές θα προκαλούσαν σοβαρές βλάβες στον οργανισμό.
- Ο καρκίνος προκύπτει από κύτταρα, τα οποία έχουν χάσει την ικανότητά τους να αυξάνονται και να διαιρούνται κατά ελεγχόμενο τρόπο ως συνέπεια βλάβης σε γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο.

Μεταλλακτικότητα και η Επιδιόρθωση του DNA

Παράλληλα...

- Αν το γενετικό υλικό διαιωονιζόταν με απόλυτη πιστότητα, η γενετική ποικιλότητα που απαιτείται προκειμένου να κατευθύνει την εξέλιξη θα έλειπε.
- Συνεπώς, νέα είδη, όπως και ο άνθρωπος, δε θα είχαν προκύψει.

Άρα...

Η ζωή και η βιοποικιλότητα εξαρτώνται από μια **ισορροπία** μεταξύ της **μεταλλαγής** και της **επιδιόρθωσής της**

Μεταλλακτικότητα και η Επιδιόρθωση του DNA

Υπάρχουν δύο σημαντικές πηγές μεταλλαγών:

1. Η ανακρίβεια στην αντιγραφή του DNA

➤ Η ενζυμική μηχανή της αντιγραφής του DNA επιχειρεί να αντιμετωπίσει τη λάθος ενσωμάτωση (**misincorporation**) λανθασμένων νουκλεοτιδίων μέσω ενός μηχανισμού διορθωτικού ελέγχου (**proofreading**), ωστόσο ορισμένα λάθη «ξεφεύγουν».

2. Η χημική βλάβη στο γενετικό υλικό

- Το DNA είναι ένα σύνθετο και εύθραυστο οργανικό μόριο πεπερασμένης χημικής σταθερότητας.
- Υφίσταται αυθόρμητη βλάβη, όπως απώλεια βάσεων.
- Δέχεται επιθέσεις από χημικές ουσίες και ακτινοβολία που διασπούν το σκελετό και αλλάζουν χημικά τις βάσεις του.

Μεταλλακτικότητα και η Επιδιόρθωση του DNA

**Μια ακόμα πηγή μεταλλαγών είναι
οι προσθήκες που παράγονται από στοιχεία DNA
όπως τα τρανσποζόνια (transposons)**

Μεταλλακτικότητα και η Επιδιόρθωση του DNA

Μεταλλαγή: Η μόνιμη αλλαγή στο DNA

Τα λάθη της αντιγραφής και η βλάβη στο DNA έχουν δύο συνέπειες



Μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν να αλλάξουν την κωδική αλληλουχία ενός γονιδίου ή ρυθμιστικών του αλληλουχιών

Αρκετές χημικές αλλαγές στο DNA αποτρέπουν τη χρήση του ως εκμαγείο για την αντιγραφή και μεταγραφή.

Η φύση των μεταλλαγών

Οι πιο απλές μορφές μεταλλαγών είναι **αντικαταστάσεις (substitutions)** μιας βάσης από μια άλλη.

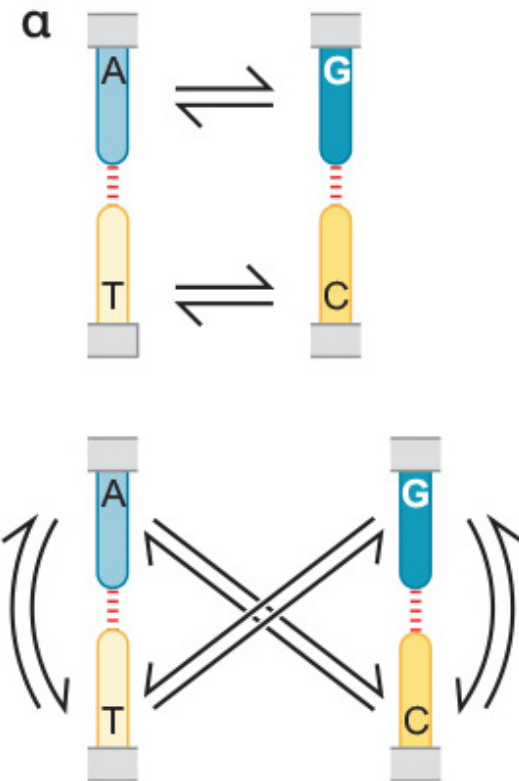
Υπάρχουν δύο είδη μεταλλαγών αντικατάστασης:

1.Οι μεταπτώσεις (transitions)

Αντικατάσταση πουρίνης από πουρίνη και πυριμιδίνης από πυριμιδίνη.

2.Οι μεταστροφές (transversions)

Αντικατάσταση πουρίνης από πυριμιδίνη και πυριμιδίνης από πουρίνη.



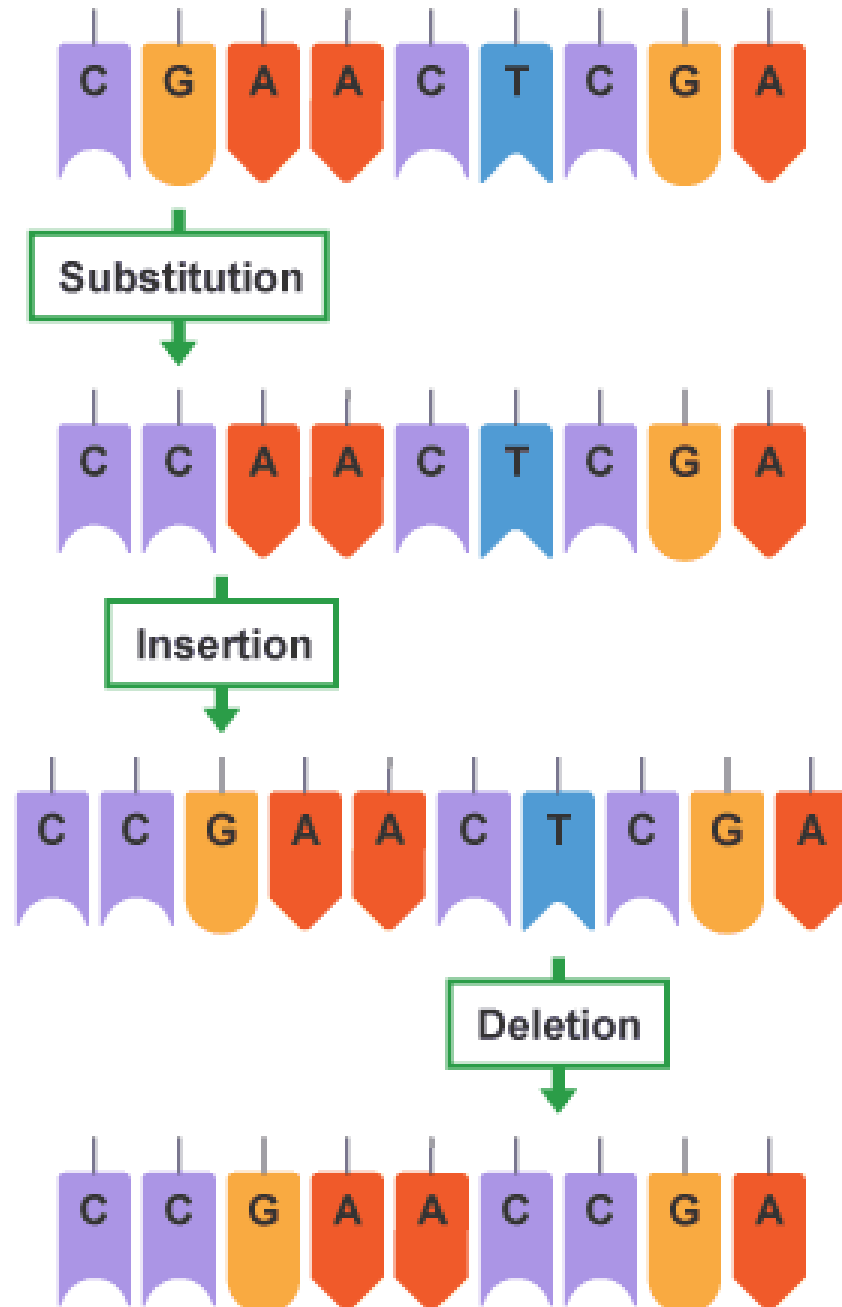
Η φύση των μεταλλαγών

Άλλες απλές μεταλλαγές είναι οι **προσθήκες (insertions)** και οι **απαλοιφές (deletions)** ενός dNTP ή ενός μικρού αριθμού dNTPs.

Ο όρος **Indel** (insertion-deletion) έχει καθιερωθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία για να περιγράψει καταστάσεις στις οποίες πραγματοποιείται προσθήκη ή απαλοιφή νουκλεοτιδίου(ων) στο γονιδίωμα ενός οργανισμού.

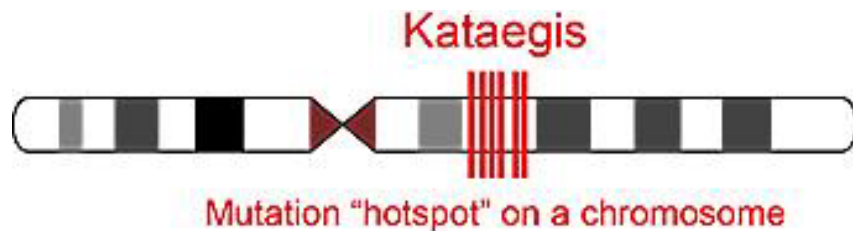
Τα **Indels** ≥ 50 νουκλεοτιδίων θεωρούνται **δομικές αλλαγές (structural variants)**.

Οι μεταλλαγές που αλλάζουν ένα νουκλεοτίδιο ονομάζονται **σημειακές μεταλλαγές (point mutations)**.

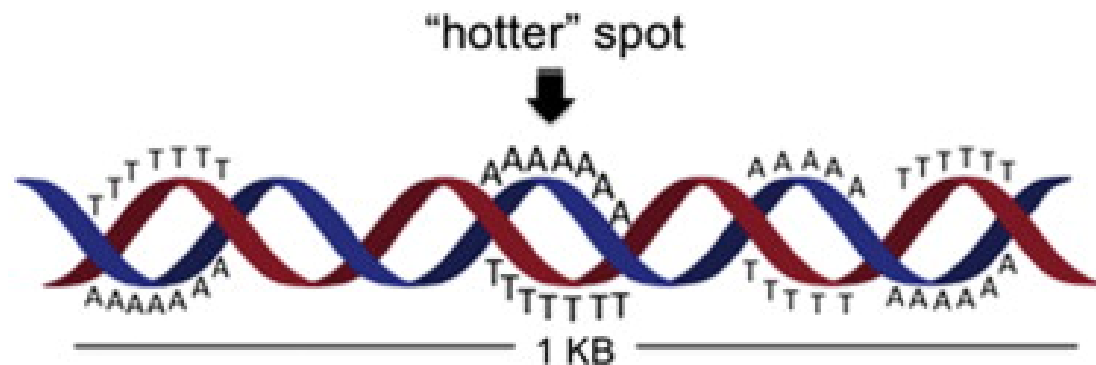
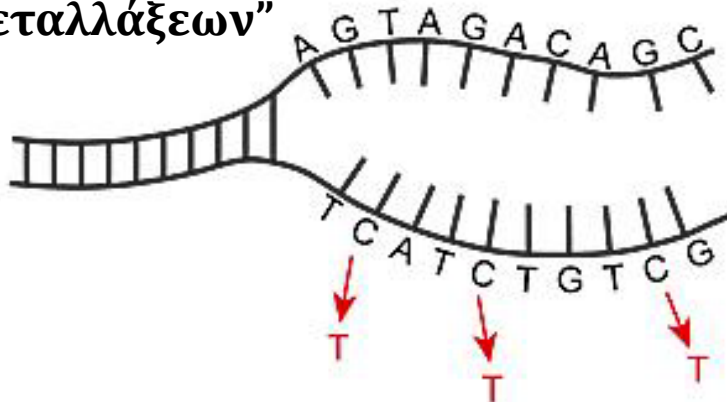


Η φύση των μεταλλαγών

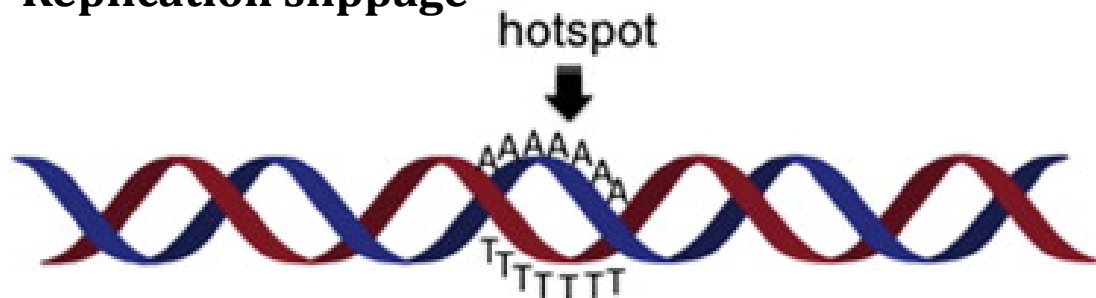
- Η συχνότητα με την οποία νέες μεταλλάξεις μπορεί να προκύπτουν σε οποιαδήποτε θέση στο χρωμόσωμα κυμαίνεται από περίπου 10^{-6} έως 10^{-11} ανά κύκλο αντιγραφής του DNA.
- Ωστόσο, ορισμένες θέσεις στο χρωμόσωμα χαρακτηρίζονται από υψηλή συχνότητα μεταλλαγών και ονομάζονται “θερμά σημεία” ή “hotspots”.



φαινόμενο “καταιγίδας
μεταλλάξεων”



Replication slippage

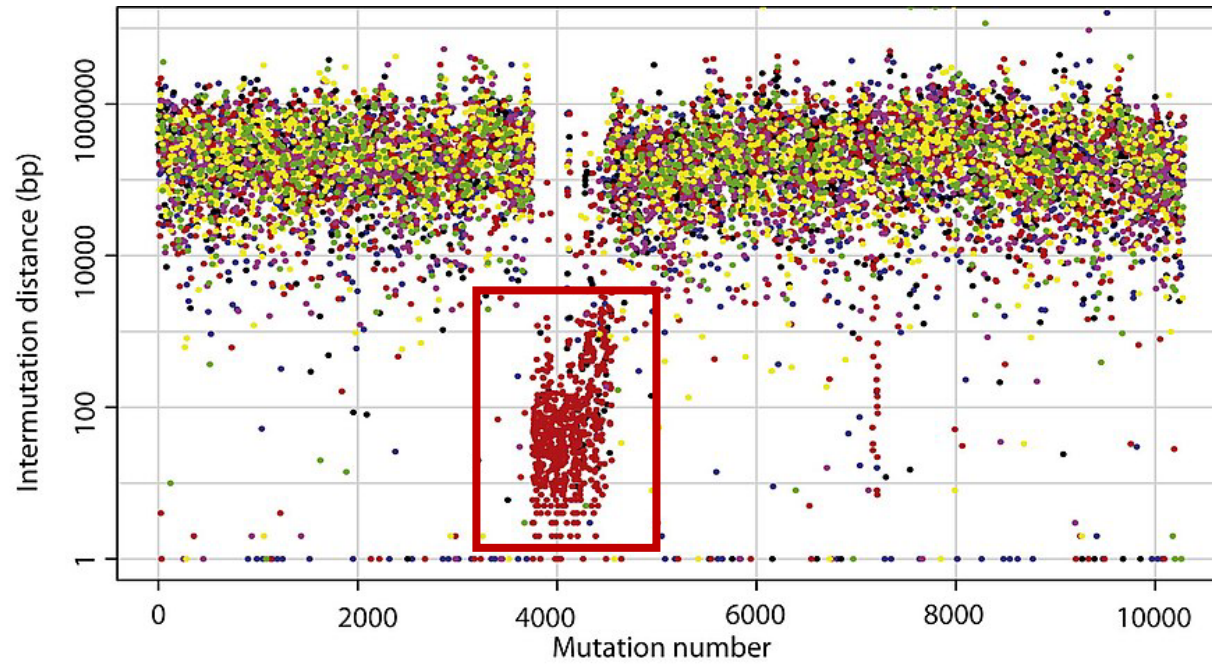


DNA polymerase slippage

Η φύση των μεταλλαγών

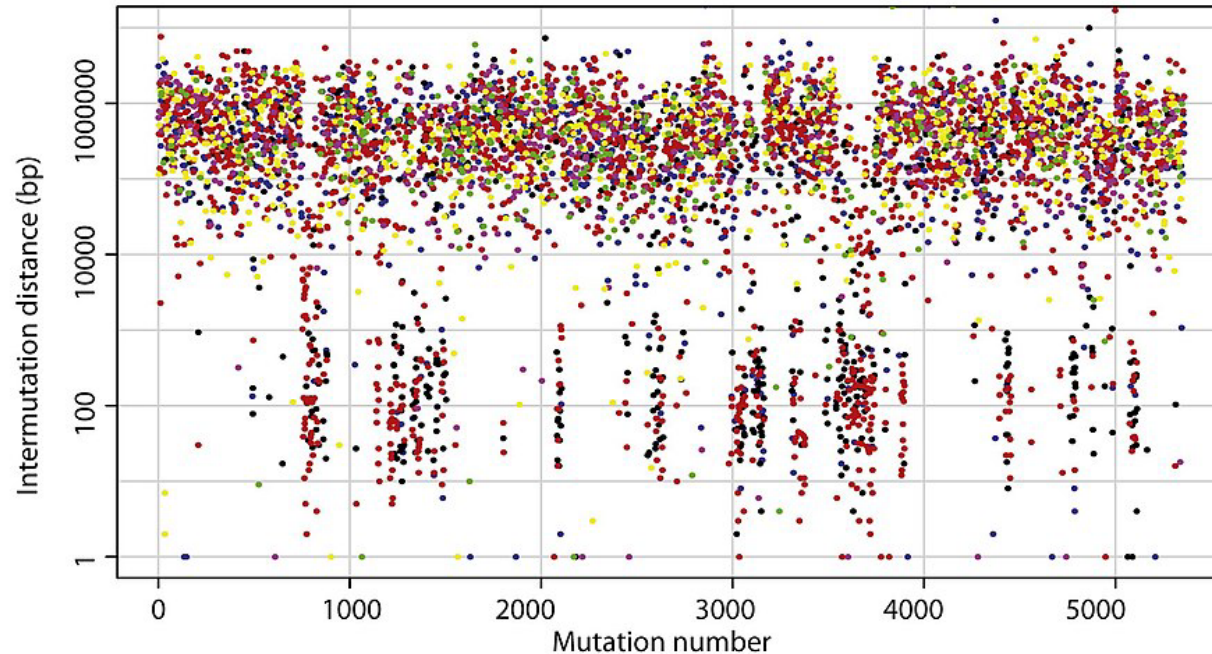
A

PD4107a
germline BRCA1



B

PD4103a
ER +ve, HER2 -ve



- C>A
- C>G
- C>T
- T>A
- T>C
- T>G

Η φύση των μεταλλαγών

Διπλασιασμός DNA – DNA duplication

1

Small duplication

DNA
... AGTCGTTAAATTAATTAATTAATTAAGCTATCC ...
... TCAGCAATTAATTAATTAATTAATTAATTCGATAGG ...

2

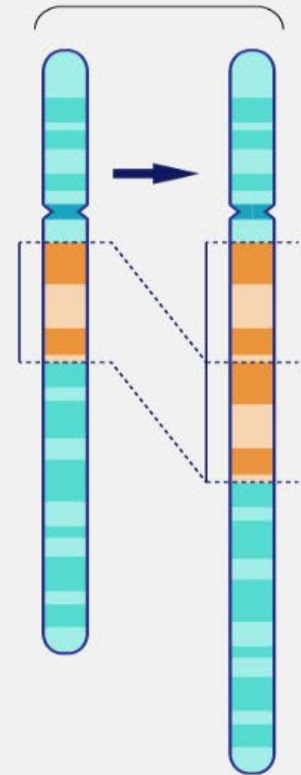
Gene duplication

Gene 1

Gene 1 duplicated

3

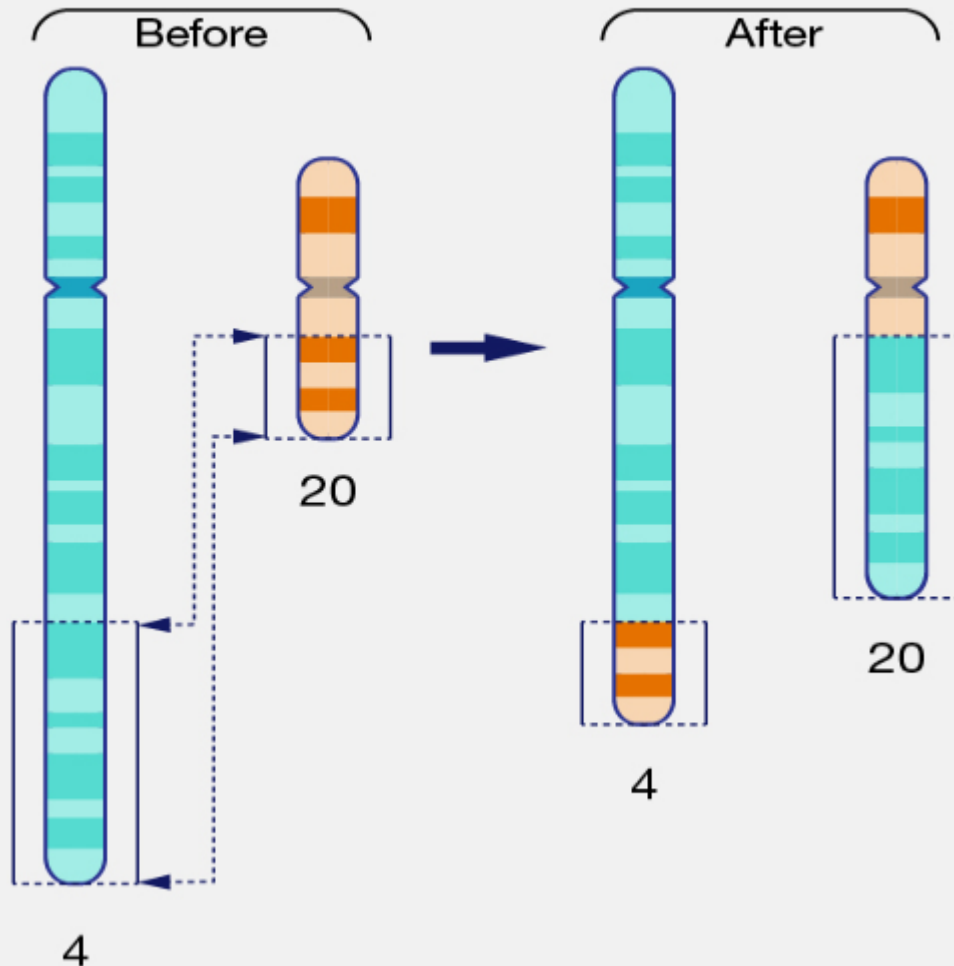
Chromosomal region duplication



Η φύση των μεταλλαγών

Μετατόπιση DNA – DNA translocation

Translocation



Η μετατόπιση DNA (DNA translocation) είναι μια διαδικασία κατά την οποία ένα **τμήμα ενός χρωμοσώματος μετακινείται σε διαφορετικό χρωμόσωμα ή σε άλλη θέση του ίδιου χρωμοσώματος.**

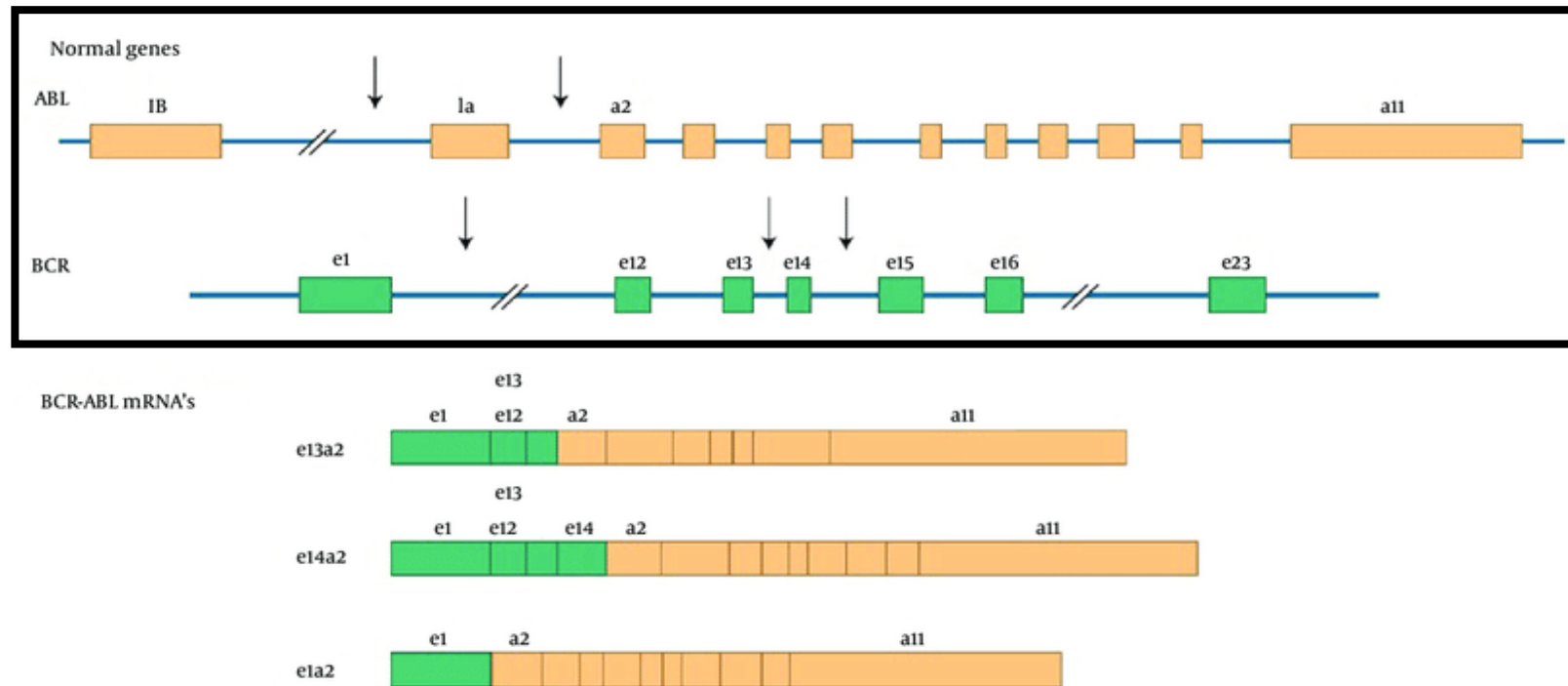
Αυθόρμητη γενετική αναδιάταξη, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε **γενετικές διαταραχές ή μορφές καρκίνων.**

Οι συνέπειες μιας χρωμοσωμικής μετατόπισης ποικίλλουν — μπορεί να είναι **ακίνδυνες ή σοβαρές,** ανάλογα με τα **γονίδια που επηρεάζονται.**

Χιμαιρικά γονίδια – Chimeric genes

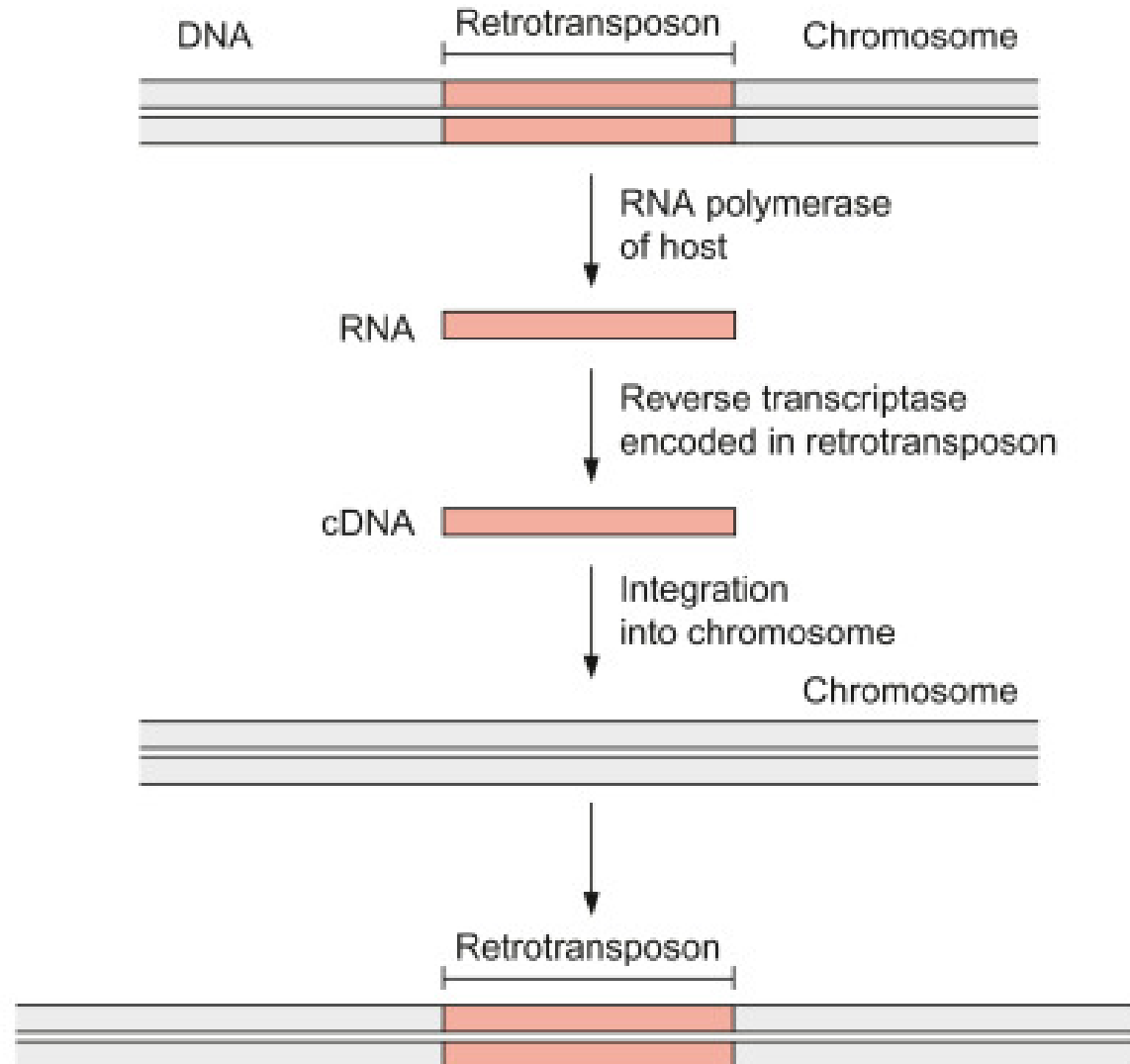
Χιμαιρικά γονίδια – Chimeric genes

- Η γονιδιακή αλληλουχία **BCR-ABL** σχηματίζεται όταν κομμάτια του χρωμοσώματος 9 και χρωμοσώματος 22 σπάνε και ανταλλάσσουν θέσεις.
- Όταν αυτό συμβεί, η **ABL περιοχή στο χρωμόσωμα 9** συγχωνεύεται με την γονιδιακή **περιοχή BCR στο χρωμόσωμα 22**.
- Το παραγόμενο χρωμόσωμα 22 με την γονιδιακή αλληλουχία BCR-ABL είναι γνωστό και ως **χρωμόσωμα Philadelphia(Ph)**.
- Έχει σχέση με την **χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ)** και, σε μικρότερο βαθμό, με την **οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ)**.
- Το 90-95% των περιπτώσεων ΧΜΛ εμφανίζουν την χρωμοσωμική μετατόπιση BCR-ABL.
- Η θεραπεία αυτών των λευχαιμιών βασίζεται κυρίως σε έναν **αναστολέα τυροσινικής κινάσης (Tyrosine Kinase Inhibitor- TKI)**.



Η φύση των μεταλλαγών

Μεταφορά DNA από ρετροτρανσποζόνια



Κατηγοριοποίηση των μεταλλαγών

Σιωπηλές (συνώνυμες) – Silent (synonymous)

Οι σιωπηλές (συνώνυμες) μεταλλάξεις είναι **αλλαγές στην αλληλουχία του DNA που δεν μεταβάλλουν την αλληλουχία αμινοξέων** της παραγόμενης πρωτεΐνης — ένα φαινόμενο που οφείλεται στην **εκφυλισμένη φύση του γενετικού κώδικα**.

Παραδοσιακά θεωρούνταν **αβλαβείς («σιωπηλές»)**, ωστόσο πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι οι **συνώνυμες μεταλλάξεις** μπορούν πράγματι να έχουν **σημαντικές επιδράσεις**, επηρεάζοντας τη **μετα-επεξεργασία του mRNA**, την **ταχύτητα της μετάφρασης** και την **αναδίπλωση πρωτεϊνών**.

Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να επηρεάσουν τη **λειτουργία της πρωτεΐνης**, τα **επίπεδα έκφρασής της** και τελικά να **αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών**.

Κατηγοριοποίηση των μεταλλαγών

Μη νοηματικές – Nonsense

Μεταλλαγές στο DNA που μετατρέπουν ένα κωδικόνιο που κωδικοποιεί ένα αμινοξύ σε ένα **κωδικόνιο λήξης (stop codon)**, οδηγώντας στην πρόωρη παραγωγή μιας μικρότερης (**truncated protein**) και συνήθως μη λειτουργικής πρωτεΐνης.

Αυτή η αλλαγή έχει ως αποτέλεσμα τον **πρόωρο τερματισμό της σύνθεσης της πρωτεΐνης** και μπορεί να επηρεάσει τον φαινότυπο του οργανισμού.

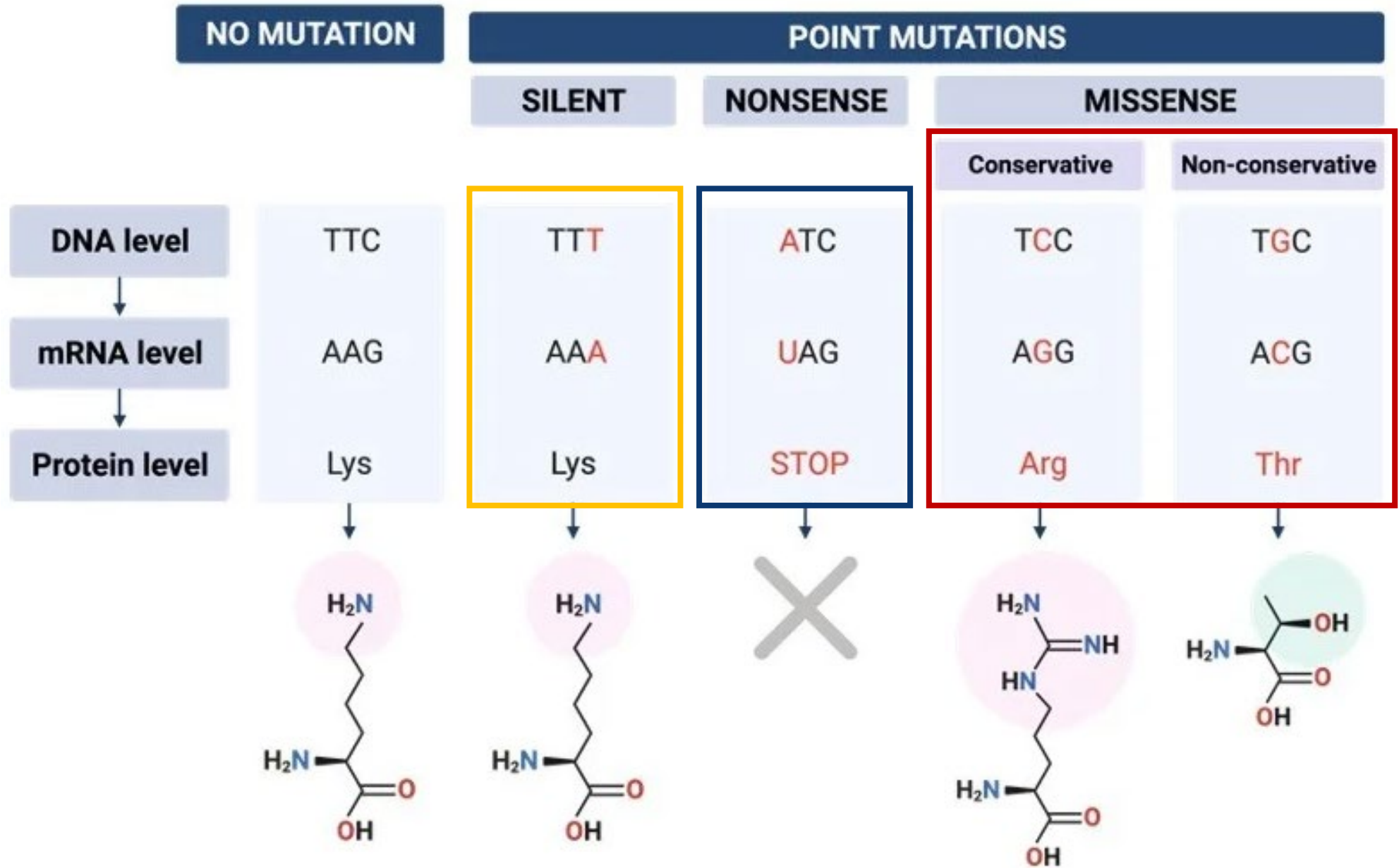
Παρανοηματικές – Missense

Μεταλλαγές που οδηγούν στην **αντικατάσταση ενός αμινοξέος από ένα άλλο** στην αλυσίδα μιας πρωτεΐνης, εξαιτίας μιας αλλαγής στο κωδικόνιο του DNA.

Η σοβαρότητα των συνεπειών τους εξαρτάται από την αλλαγή, τη θέση της στο γονίδιο και τη δομή της πρωτεΐνης, και μπορεί να είναι από αμελητέες έως σοβαρές

Κατηγοριοποίηση των μεταλλαγών

Κατηγορίες μεταλλάξεων με βάση τη λειτουργική τους επίδραση (Functional effect)

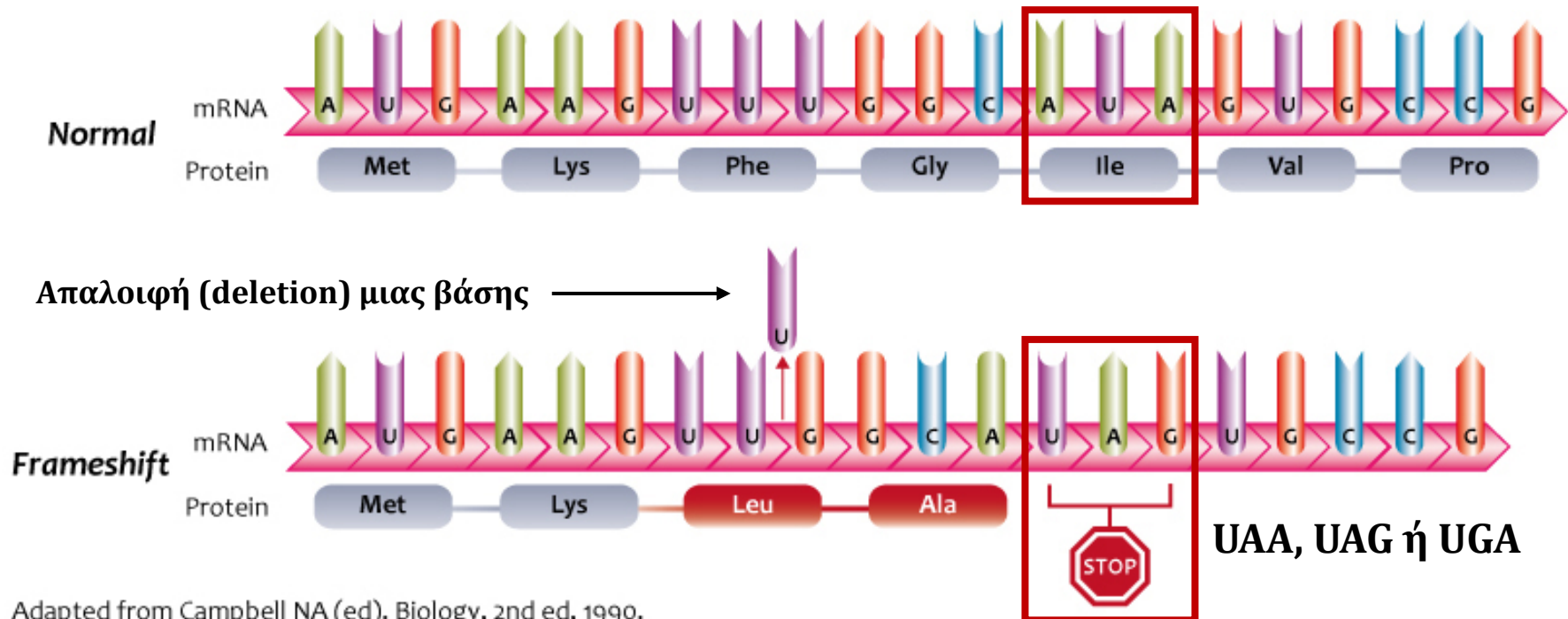


Κατηγοριοποίηση των μεταλλαγών

Μεταλλαγές μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης – Frameshift mutations

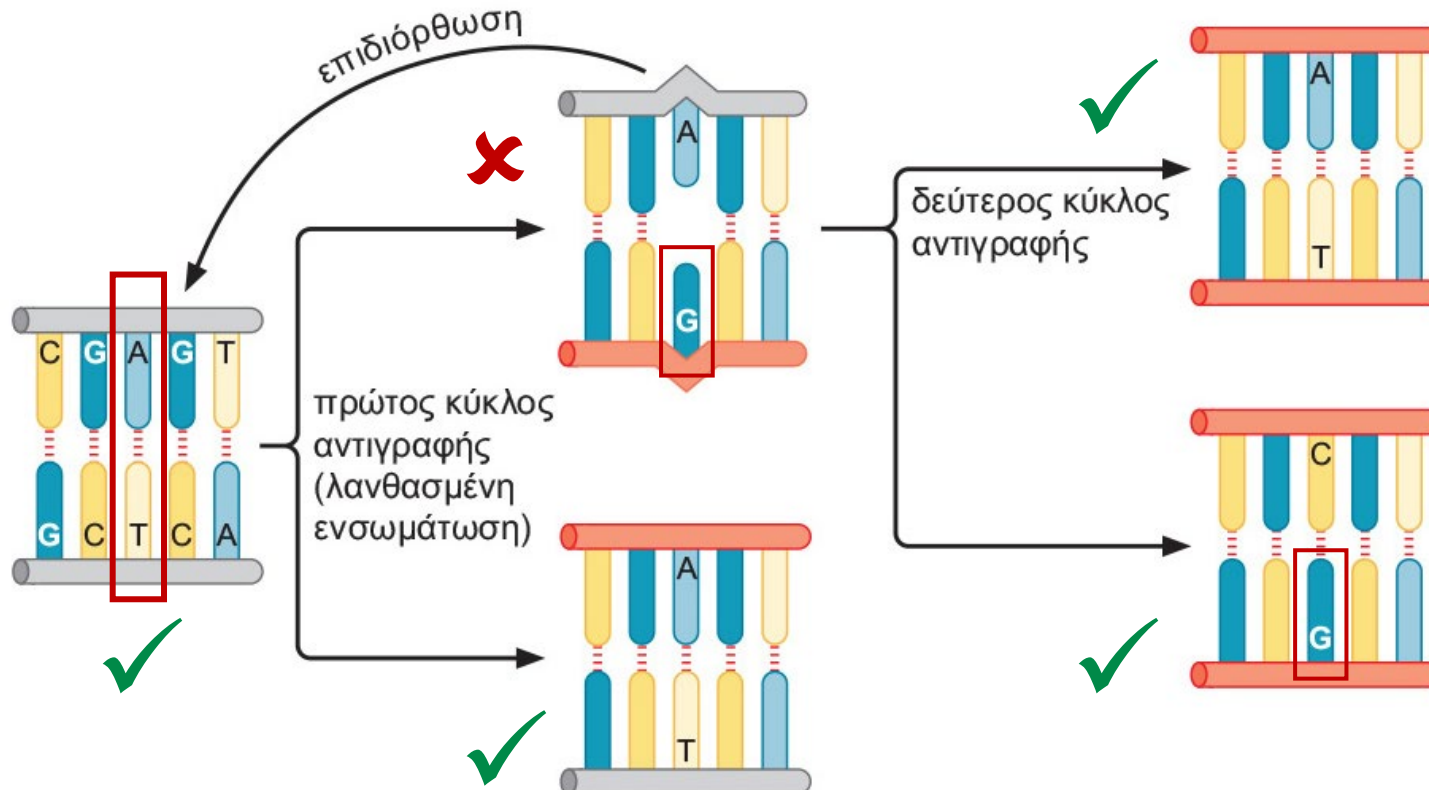
Στις περιπτώσεις αυτές προστίθενται ή αφαιρούνται νουκλεοτίδια στο DNA, μετατοπίζοντας το πλαίσιο ανάγνωσης των κωδικονίων και προκαλώντας την **κωδικοποίηση διαφορετικών αμινοξέων μετά τη μετάλλαξη**.

Αυτή η αλλαγή οδηγεί συνήθως σε **μη λειτουργική πρωτεΐνη**, είτε πολύ μικρότερη είτε πολύ μεγαλύτερη από τη φυσιολογική, και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές γενετικές ασθένειες, όπως η νόσος Tay-Sachs, ή αυξημένη ευαισθησία σε ασθένειες όπως ορισμένοι καρκίνοι.



Η φύση των μεταλλαγών

- Η ενεργότητα 3' → 5' εξωνουκλεάσης δεν μπορεί να διορθώσει πλήρως το γονιδίωμα.
- Ορισμένα λάθος ενσωματωμένα νουκλεοτίδια διαφεύγουν το διορθωτικό έλεγχο και υπάρχουν κατά παράβαση του κανόνα συμπληρωματικότητας στο ζεύγος μητρικής και θυγατρικής αλυσίδας.



Αν το λάθος dNTP δεν ανιχνευτεί και αντικατασταθεί, η αλλαγή θα γίνει μόνιμη στο γονιδίωμα.

Κατά τη διάρκεια του **δεύτερου κύκλου της αντιγραφής**, το λάθος dNTP αποτελεί μέρος της αλυσίδας εκμαγείου και θα χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση της θυγατρικής αλυσίδας.

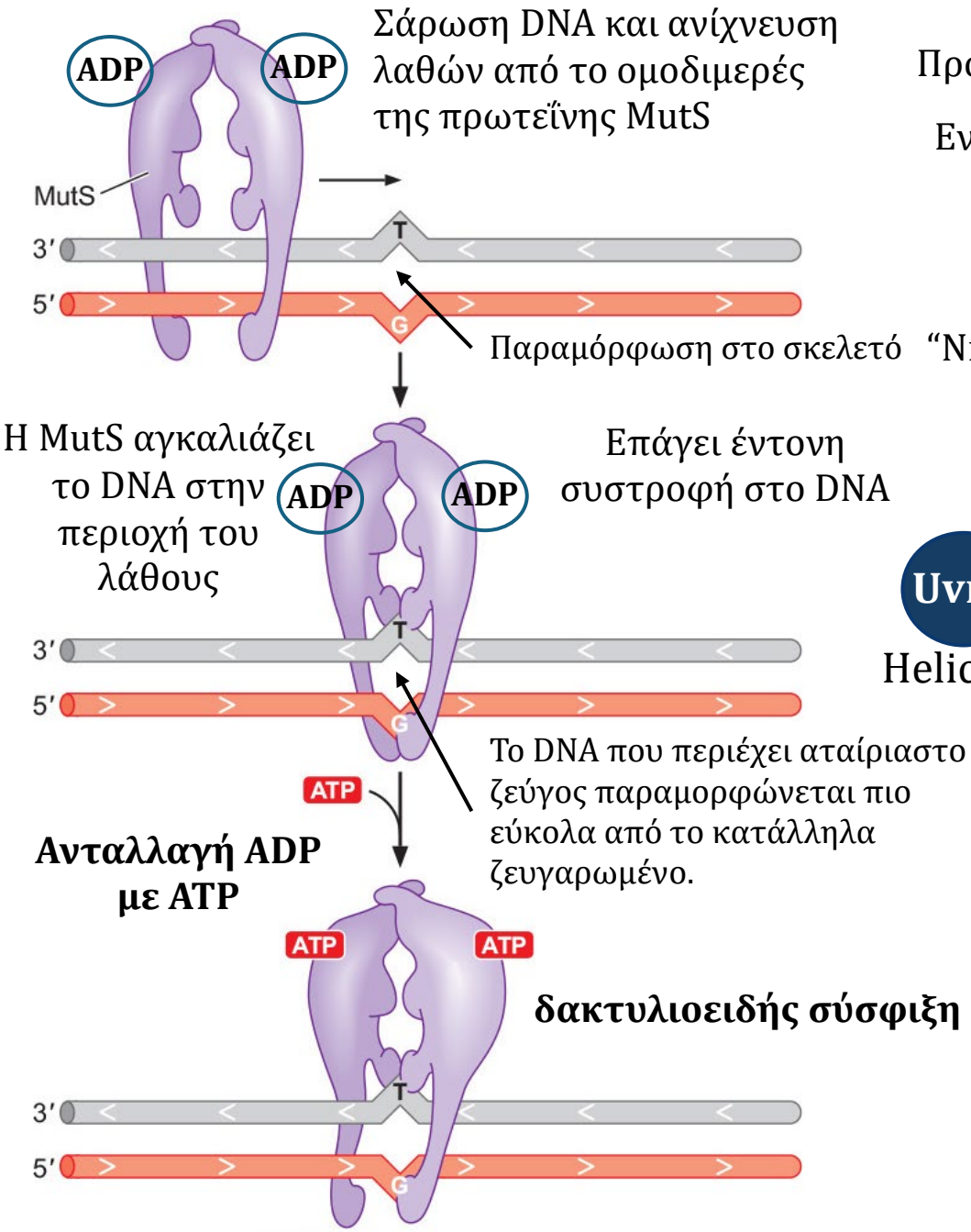
Σύστημα επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών

Η τελική ευθύνη για την ανίχνευση και επιδιόρθωση των λανθασμένων νουκλεοτιδίων εναπόκειται στο **σύστημα επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών (mismatch repair system, MMR)**. Το σύστημα αυτό αυξάνει την ακρίβεια της σύνθεσης DNA κατά επιπλέον δύο έως τρεις τάξεις μεγέθους.

Το σύστημα αυτό αντιμετωπίζει δύο σημαντικές προκλήσεις:

1. Οφείλει να σαρώσει το γονιδίωμα **πολύ γρήγορα**, καθώς τα λάθος ζεύγη βάσεων εξαλείφονται μετά από έναν δεύτερο κύκλο αντιγραφής.
2. Πρέπει να διορθώσει το λάθος με ακρίβεια, δηλαδή **πρέπει να αντικαταστήσει το λάθος dNTP στη νεοσυντηθέμενη αλυσίδα και όχι το σωστό dNTP στη μητρική!**

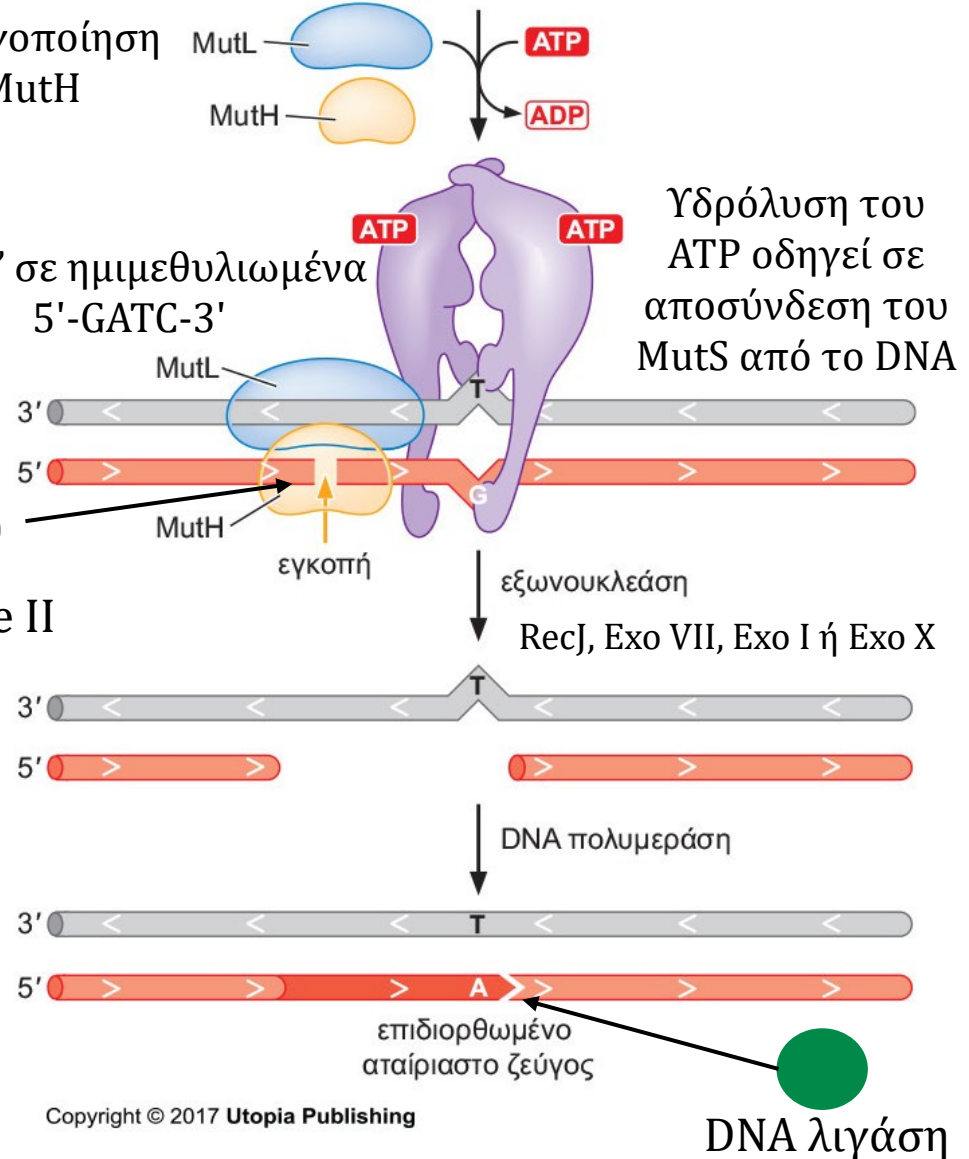
Οδός επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών – *E. Coli*



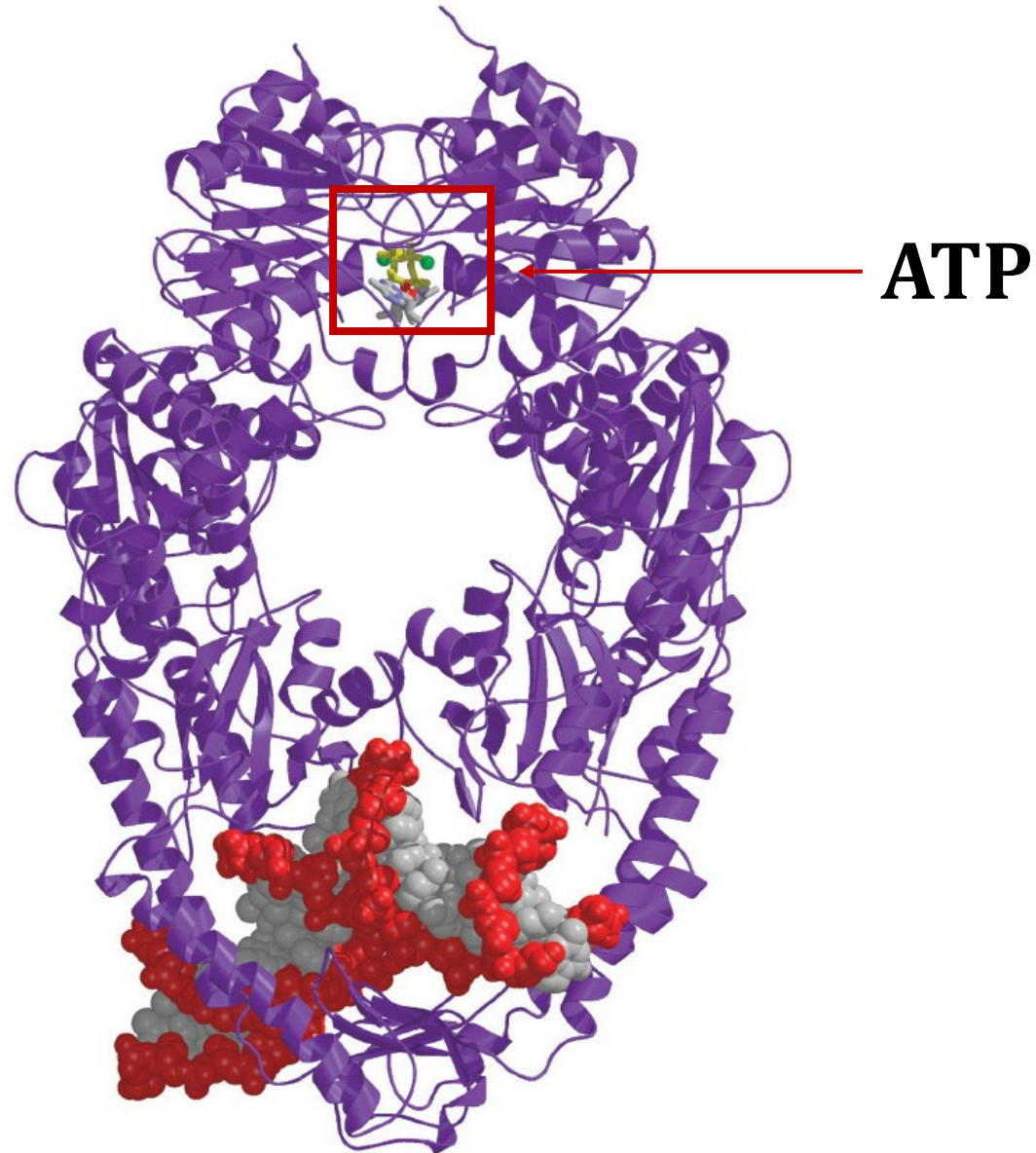
Προσέλκυση MutL και δημιουργία συμπλόκου MutS-MutL

Ενεργοποίηση MutH

UvrD
Helicase II



Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου MutS-DNA

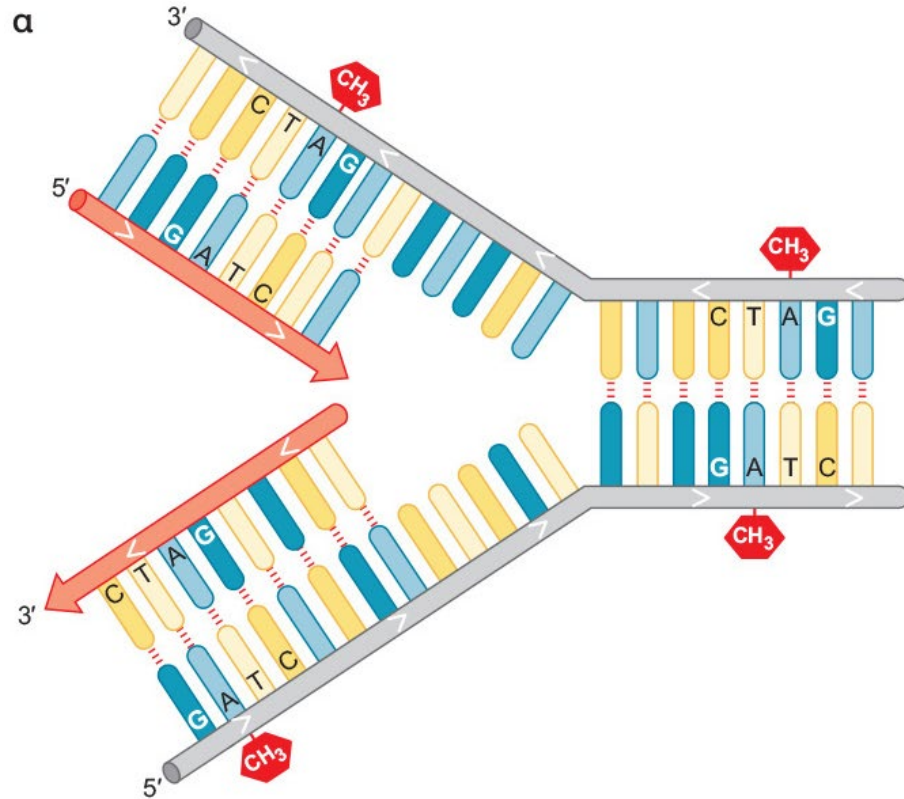


Οδός επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών – *E. Coli*

Πως γνωρίζει το σύστημα επιδιόρθωσης της *E. Coli* ποιο από τα δύο αταίριαστα dNTPs να αντικαταστήσει;

Η *E. Coli* σημαδεύει τη γονική αλυσίδα μέσω παροδικής ημιμεθυλίωσης και τη λειτουργία του ενζύμου Dam

Οδός επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών – *E. Coli*

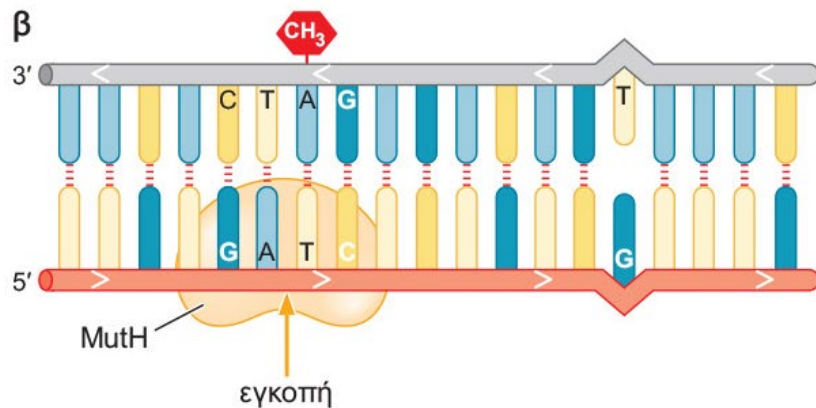


Το ένζυμο Dam μεθυλιώνει αδενίνες στις αλληλουχίες 5'-GATC-3' και στις δύο αλυσίδες.

Στο γονιδίωμα της *E. Coli* οι αλληλουχίες αυτές είναι αρκετά συχνές (1 φορά ανά 256 bp).

Μετά την αντιγραφή, τα θυγατρικά δίκλωνα μόρια DNA θα είναι **ημιμεθυλιωμένα**, δηλαδή **μεθυλιωμένα MONO** στη μητρική αλυσίδα.

Για λίγα λεπτά, μέχρι η Dam να ολοκληρώσει τη μεθυλίωση, τα θυγατρικά μόρια DNA είναι σε ημιμεθυλιωμένη κατάσταση.

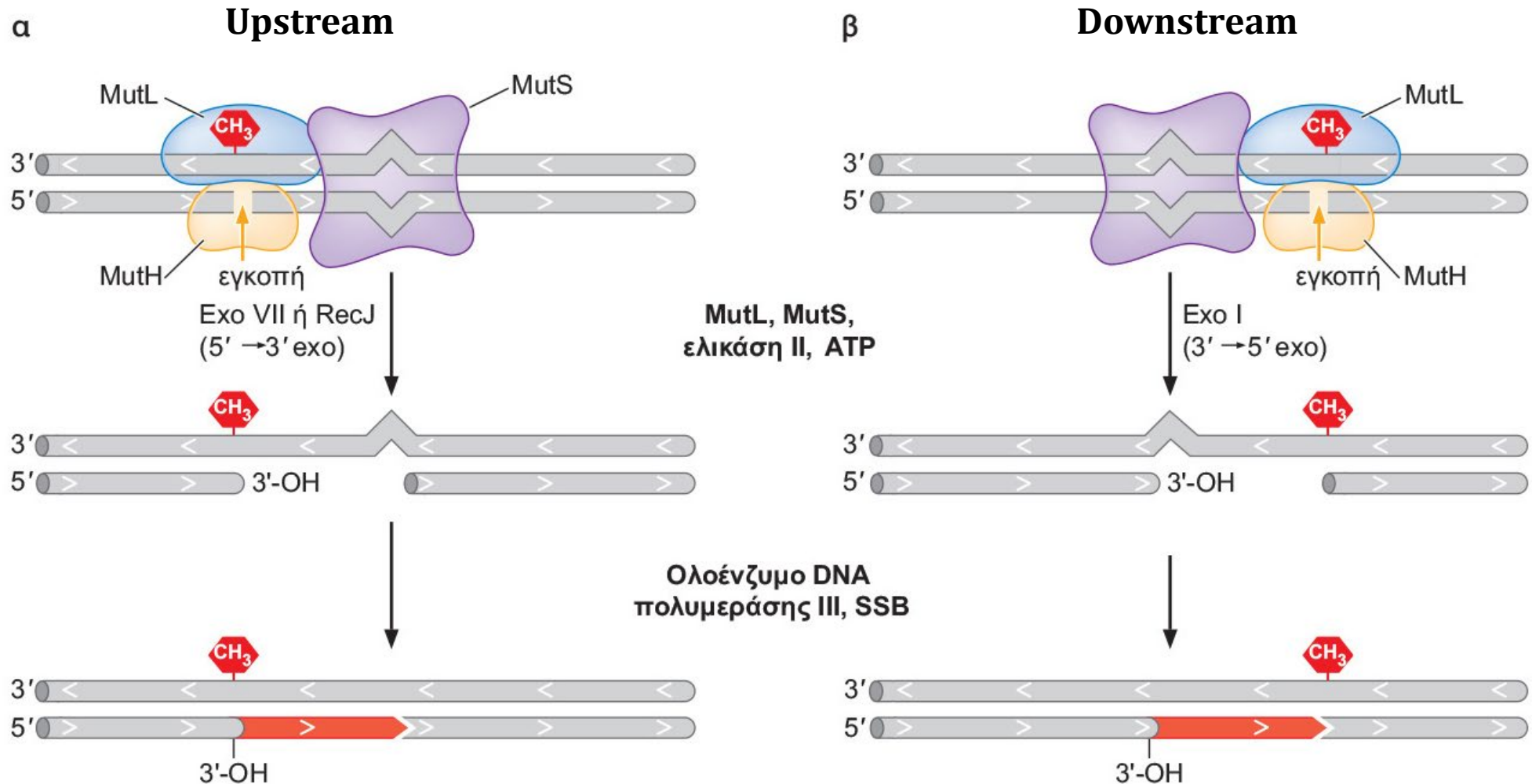


Η **μη μεθυλιωμένη** αλυσίδα επισημαίνεται ως η αλυσίδα που χρειάζεται επιδιόρθωση.

Η MutH πραγματοποιεί τομή στη **μη μεθυλιωμένη** θυγατρική αλυσίδα.

Οδός επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών – *E. Coli*

Η *E. Coli* διαθέτει αρκετές εξωνουκλεάσες, ανάλογα με το εάν η MutH κόβει το DNA στην 5' ή στην 3' πλευρά του λανθασμένου dNTP.



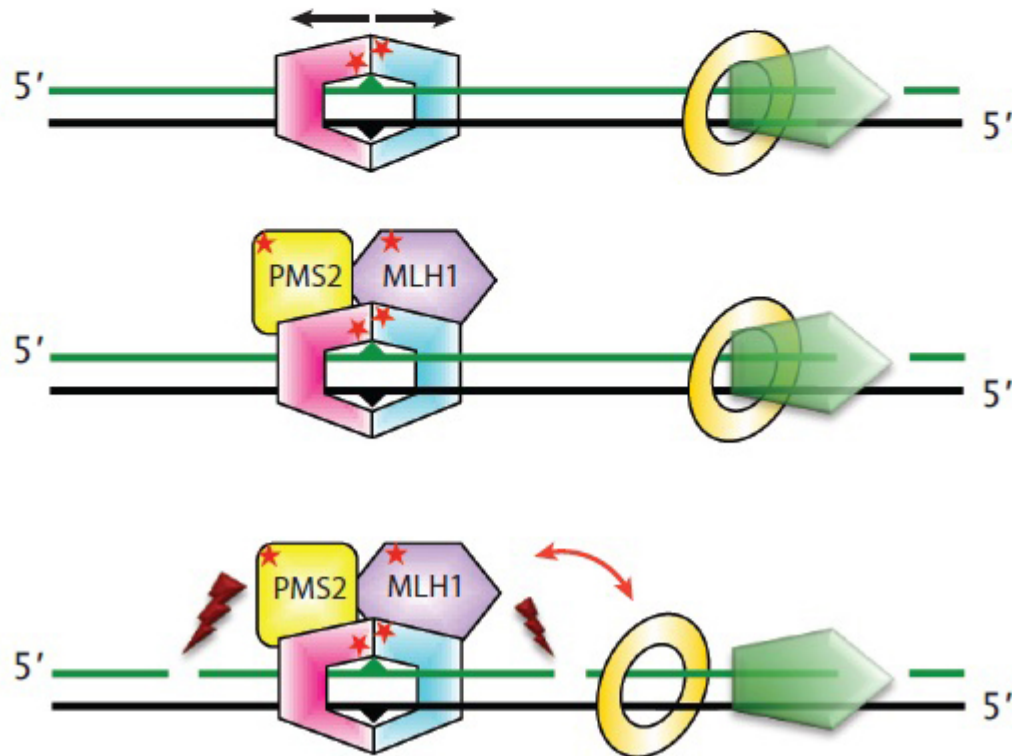
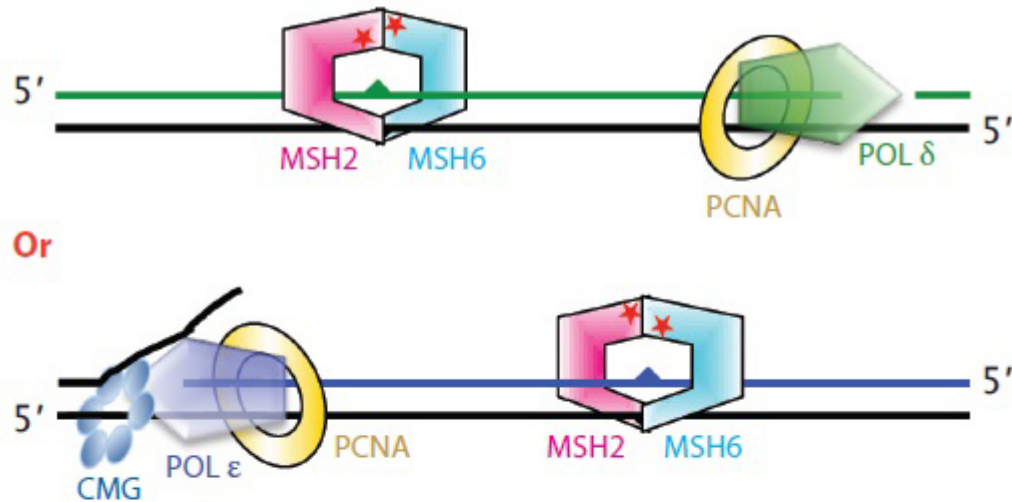
Οδός επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών

- Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (όπως ο άνθρωπος), το σύστημα επιδιόρθωσης (**Mismatch Repair, MMR**) λειτουργεί με παρόμοια λογική, όπως στο βακτήριο *E. coli*, αλλά με **σημαντικές διαφορές** σε μηχανισμό και δομή.
- Οι ευκαρυώτες διαθέτουν **ομόλογες πρωτεΐνες των MutS και MutL**.
- **ΔΕΝ** διαθέτουν MutH.
- Αντίθετα, η **τομή της νεοσυντεθειμένης αλυσίδας** (strand incision/nicking) πραγματοποιείται **απευθείας** από το σύμπλοκο MutLα.

Οδός επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών

Μονοπάτι MutSα-MutLα

Επιδιόρθωση της πλειονότητας των σφαλμάτων αντιγραφής

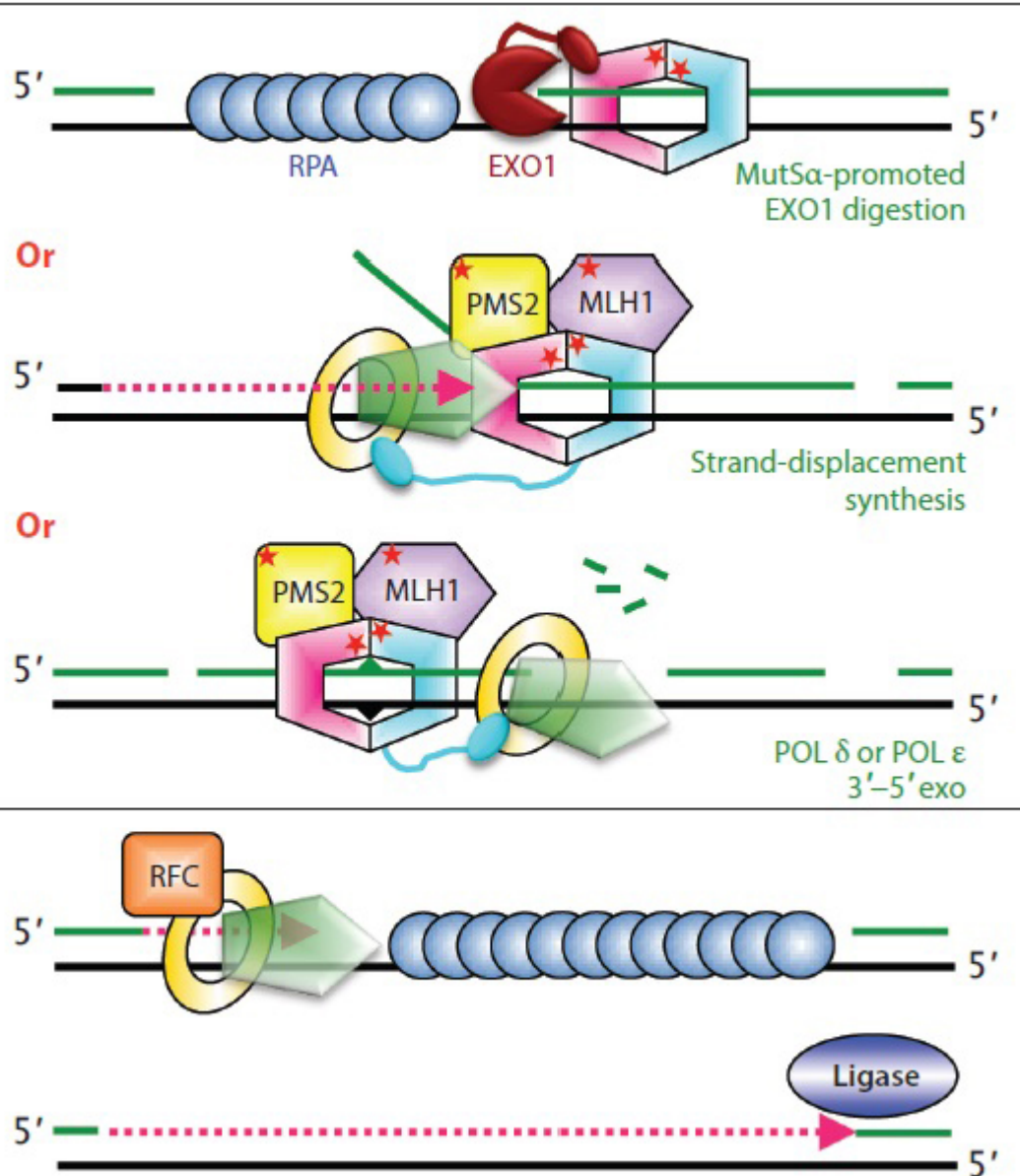


1. Το ετεροδιμερές **MutSα**, αποτελούμενο από τις πρωτεΐνες **MSH2** και **MSH6**, προσδένεται σε μια θέση με λάθος dNTP.
2. Το MutSα διαθέτει **δύο ενεργά κέντρα ATPάσης**, τα οποία είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του MMR.
3. Η δέσμευση του ATP προκαλεί αλλαγή διαμόρφωσης στο MutSα, με αποτέλεσμα να σχηματίζει έναν δακτύλιο (clamp).
4. Αυτή η ενεργοποιημένη από ATP κατάσταση του MutSα του επιτρέπει να αλληλεπιδράσει με το **MutLα**, ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από τις πρωτεΐνες **MLH1** και **PMS2**.

Οδός επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών

Μονοπάτι MutSα-MutLα

Επιδιόρθωση της πλειονότητας των σφαλμάτων αντιγραφής



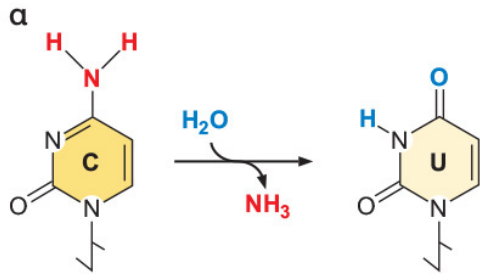
5. Ο δακτύλιος PCNA, ο οποίος τοποθετείται στο DNA από τον Replication Factor C (RFC), ενεργοποιεί το MutLα, ώστε να πραγματοποιήσει τομή (incision) στη θυγατρική αλυσίδα, με εξάρτηση από το ATP.

6. Η EXO1 αναλαμβάνει να απομακρύνει το τμήμα DNA από το nick μέχρι να φτάσει στο mismatch

7. Η επιδιόρθωση ολοκληρώνεται με σωστή επανασύνθεση DNA από την DNA πολυμεράση δ (Pol δ), ή πιθανώς από την Pol ε, και ακολουθεί η δράση της λιγάσης.

Βλάβες του DNA

- Μεταλλαγές προκύπτουν όχι μόνο από λάθη κατά την αντιγραφή, αλλά και από βλάβη στο DNA.
- Ορισμένες βλάβες στο DNA προκαλούνται από **περιβαλλοντικούς παράγοντες**, όπως η **ακτινοβολία** και **χημικοί παράγοντες** που ονομάζονται **μεταλλαξιγόνα (mutagens)**.
- Το DNA υφίσταται αυθόρμητες βλάβες από τη **δράση του H_2O** .

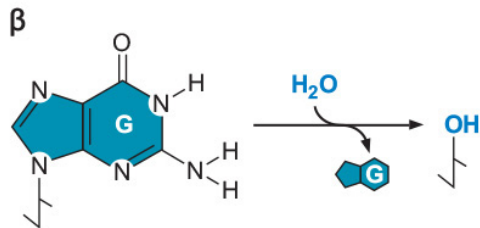


Το πιο συχνό είδος υδρολυτικής βλάβης είναι η **απαμίνωση (deamination)** της C που δημιουργεί U.

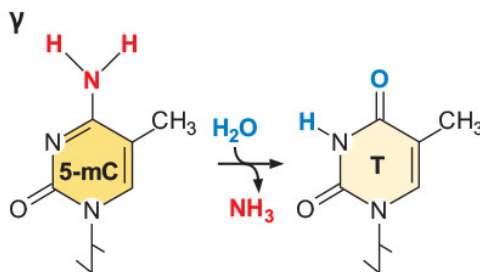
Παράλληλα:

➤ **απαμίνωση της A** οδηγεί σε **υποξανθίνη (Hx)**

➤ **απαμίνωση της G** δημιουργεί **ξανθίνη (X)**



Αποπουρίνωση (depurination): Αυθόρμητη υδρόλυση του N-γλυκοζυτικού δεσμού και **παραγωγή μιας αβασικής (abasic) θέσης**.



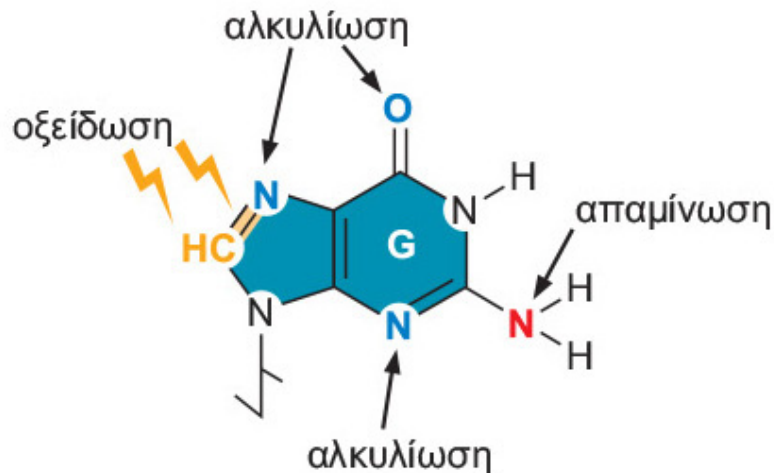
Απαμίνωση της 5mC παράγει **θυμίνη**, η οποία είναι φυσική βάση του DNA.

Βλάβες του DNA

Το DNA δέχεται βλάβες από την **αλκυλίωση**, την **οξειδωση** και την **ακτινοβολία**

➤ Αλκυλίωση

Μεταφορά μεθυλικής ή αιθυλικής ομάδας σε θέσεις αντίδρασης στις βάσεις ή στις φωσφορικές ομάδες στο σκελετό του DNA. Οι αλκυλιωτικές χημικές ουσίες περιλαμβάνουν τις **νιτροζαμίνες** και το **N-μεθυλο-N¹-νιτρο-νιτροζογουανιδίνη**.



Μια από τις πιο ευπαθείς θέσεις αλκυλίωσης είναι το οξυγόνο του 6^{ου} C της γουανίνης.
O⁶ - μεθυλογουανίνη

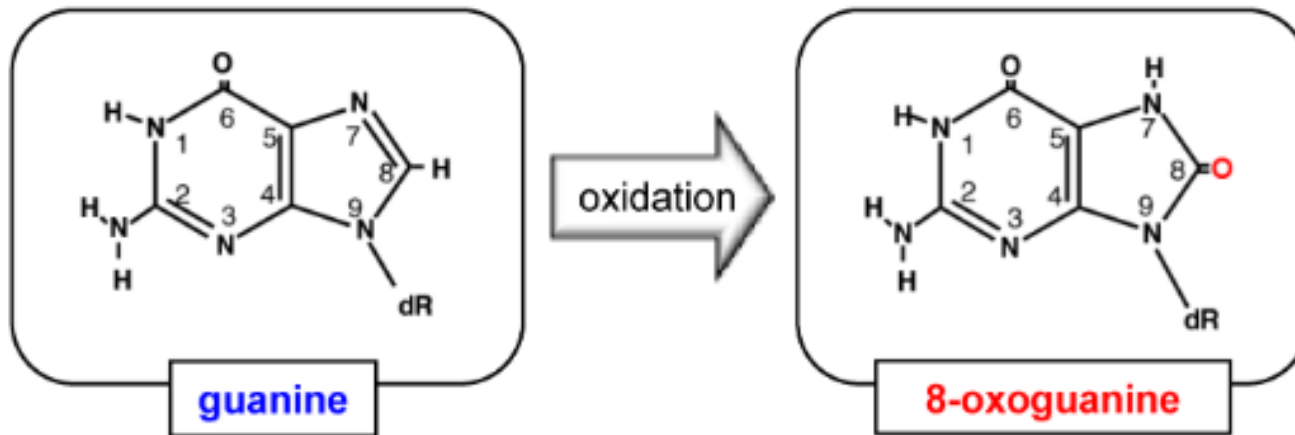
Δημιουργία δεσμών υδρογόνου με θυμίνη!!

Βλάβες του DNA

Το DNA δέχεται βλάβες από οξειδωτικούς παράγοντες όπως είδη δραστικού οξυγόνου (O_2 , H_2O_2 και OH)

Οξείδωση γουανίνης

- Παράγει την **7,8-διϋδρο-8-οξογουανίνη (oxoG)**, η οποία είναι ιδιαίτερα μεταλλαξιγόνος επειδή μπορεί, εκτός από την κυτοσίνη, να σχηματίσει **ζεύγος βάσεων με την αδενίνη**.
- Αυτό οδηγεί σε **G→T μεταλλάξεις** κατά την αντιγραφή του DNA.
- Η παρουσία 8-oxoG μπορεί να προκαλέσει τοπικές στρεβλώσεις στη διπλή έλικα, επηρεάζοντας την αναγνώριση από DNA πολυμεράσες και πρωτεΐνες επιδιόρθωσης.



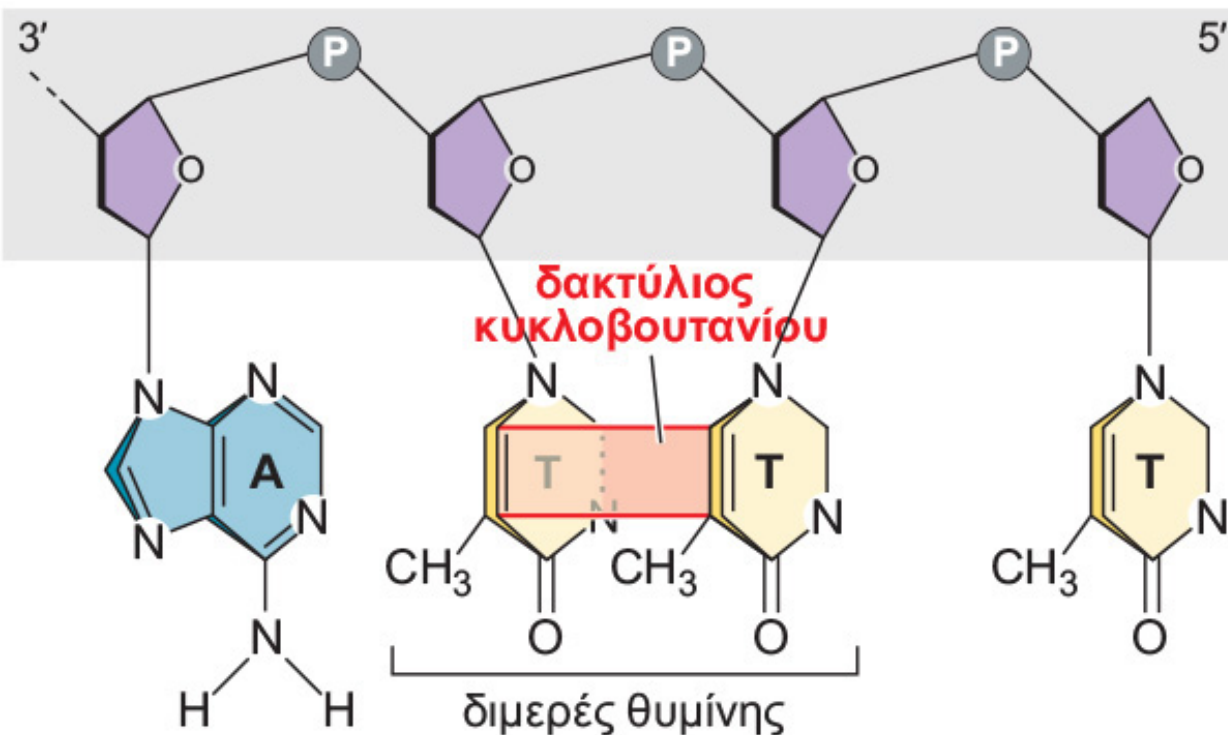
Αξιόπιστος βιοδείκτης
οξειδωτικής βλάβης
του DNA

Αν ζευγαρώσει με την αδενίνη δημιουργείται μια **μεταστροφή G:C σε T:A**, η οποία είναι από τις συνηθέστερες μεταλλαγές στις ανθρώπινες κακοήθειες.

Βλάβες του DNA

Διμερή θυμίνης (Thymine dimers)

- Προκαλούνται από το **υπεριώδες φως (ultraviolet light)** με μήκος κύματος **~260nm**, το οποίο απορροφάται ισχυρά από τις βάσεις.
- Συνέπεια είναι η **φωτοχημική ένωση** δύο πυριμιδινών που καταλαμβάνουν παρακείμενες θέσεις στην ίδια νουκλεοτιδική αλυσίδα.



Το διμερές θυμίνης περιλαμβάνει ένα **δακτύλιο κυκλοβουτανίου (CPD)** που δημιουργείται από δεσμούς μεταξύ των **ατόμων 5C και 6C** των παρακείμενων θυμινών.

Τα **διμερή θυμίνης** είναι ανίκανα να σχηματίσουν ζεύγη βάσεων και **προκαλούν την παύση της DNA πολυμεράσης** κατά τη διάρκεια της αντιγραφής.

Βλάβες του DNA

Η ακτινοβολία γ και η ακτίνες X (ιονίζουσα ακτινοβολία) προκαλούν βλάβες στο DNA επειδή δημιουργούν **δίκλωνες θραύσεις** που είναι δύσκολο να επιδιορθωθούν

Η ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA **άμεσα** ή **έμμεσα**:

➤ **Άμεση δράση:** Η ακτινοβολία **πλήττει απευθείας το DNA**, προκαλώντας **ιονισμό της δεοξυριβόζης**.

➤ **Έμμεση δράση:** Πιο συχνά, η ενέργεια της ακτινοβολίας **ιονίζει τα μόρια H_2O** , παράγοντας **δραστικές ρίζες**, όπως ρίζες υδροξυλίου ($\bullet OH$), υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και ρίζες υπεροξειδίου ($\bullet O_2^-$). Αυτές οι **ελεύθερες ρίζες** επιτίθενται στο DNA προκαλώντας **οξειδωτικές βλάβες**.

Βλάβες του DNA

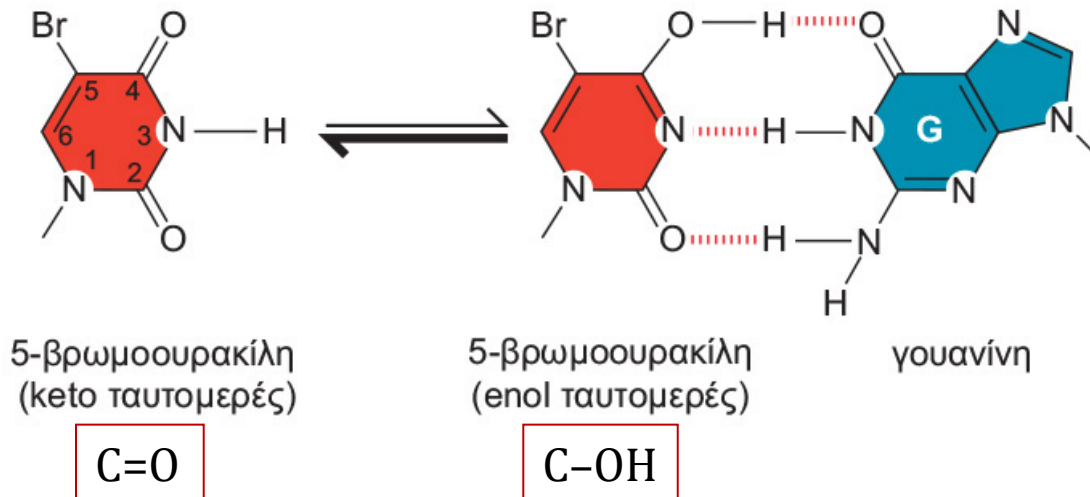
Μεταλλαγές μπορεί επίσης να προκληθούν από **ανάλογα βάσεων** και **παρεμβαλλόμενους παράγοντες**

Ανάλογα βάσεων: Χημικές ενώσεις που αντικαθιστούν τις φυσιολογικές βάσεις.

➤ Μπορούν να μετατραπούν σε τριφωσφορικά νουκλεοσίδια και να ενσωματωθούν στο DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής.

➤ Λόγω των δομικών αλλαγών τους **οδηγούν σε λάθος ζεύγη βάσεων** κατά τη διάρκεια της αντιγραφής.

Ανάλογο της θυμίνης: 5-βρωμοουρακίλη



Η 5-βρωμοουρακίλη είναι **ανάλογο βάσης** που μοιάζει με τη θυμίνη (T) και μπορεί να ενσωματωθεί στο DNA στη θέση της.

➤ Στην **κετο μορφή** (πιο σταθερή): Δημιουργεί ζεύγος **κανονικά με αδενίνη (A)**, όπως και η θυμίνη.

➤ Στην **ενολική μορφή** (λιγότερο σταθερή): Αλλάζει τη δομή δεσμών υδρογόνου και μπορεί να **ζευγαρώσει με γουανίνη (G)**.

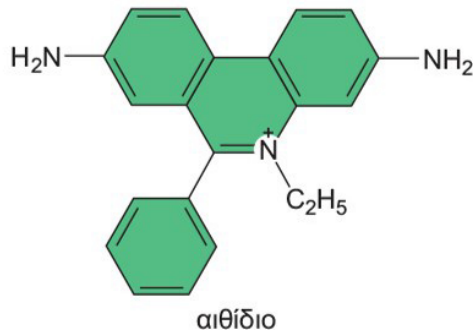
Βλάβες του DNA

Μεταλλαγές μπορεί επίσης να προκληθούν από **ανάλογα βάσεων** και **παρεμβαλλόμενους παράγοντες**

Παρεμβαλλόμενοι παράγοντες: Αρωματικές, επίπεδες (planar) οργανικές ενώσεις που παρεμβάλλονται (intercalate) ανάμεσα στα διαδοχικά ζεύγη βάσεων του DNA.

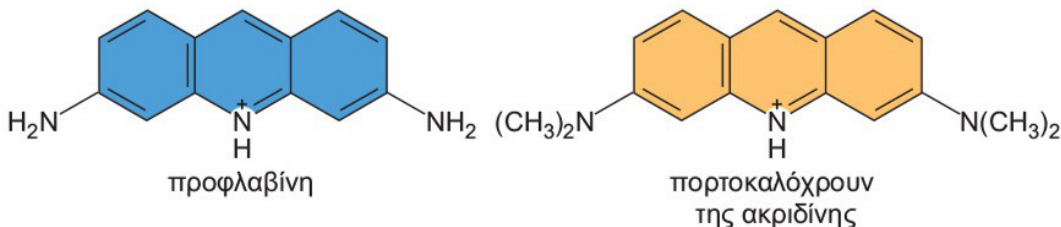
➤ Έχουν **πολυκυκλική αρωματική δομή**, που τους επιτρέπει να **ολισθαίνουν ανάμεσα στα επίπεδα των βάσεων** της διπλής έλικας του DNA.

➤ Προκαλούν διάταση και παραμόρφωση της έλικας, επηρεάζουν τη χωρική διάταξη του DNA και τη λειτουργία των DNA πολυμερασών κατά την αντιγραφή.



Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι **προφλαβίνη**, **ακριδίνη** και το **αιθίδιο**, τα οποία προκαλούν προσθήκη ή έλλειψη ενός ή περισσότερων ζευγών βάσεων.

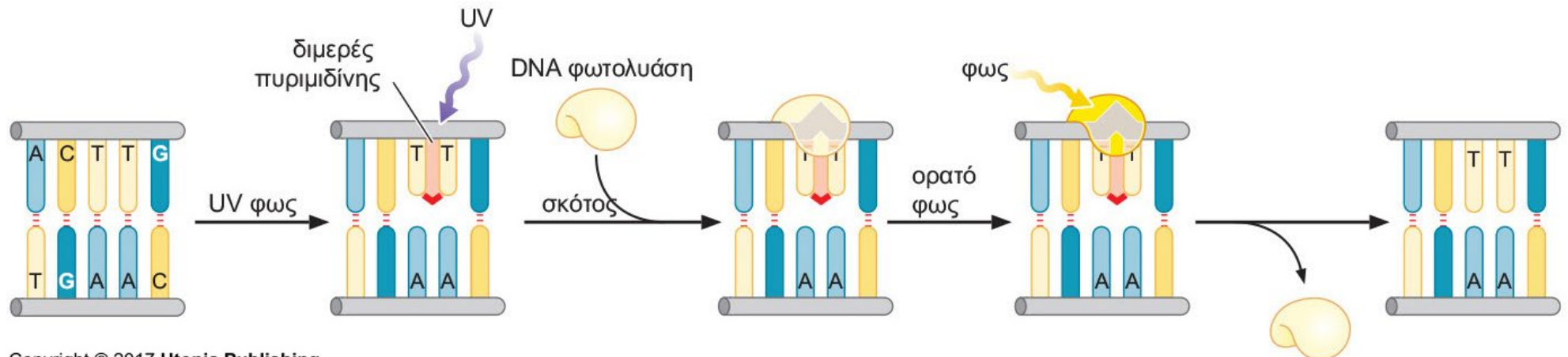
ΔΕΝ είναι φυσιολογικά προϊόντα του κυττάρου, δηλαδή δεν σχηματίζονται ενδογενώς



Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών του DNA

Ένας βασικός μηχανισμός επιδιόρθωσης μέσω **άμεσης αναστροφής** της βλάβης είναι η **φωτοενεργοποίηση (photoreactivation)**

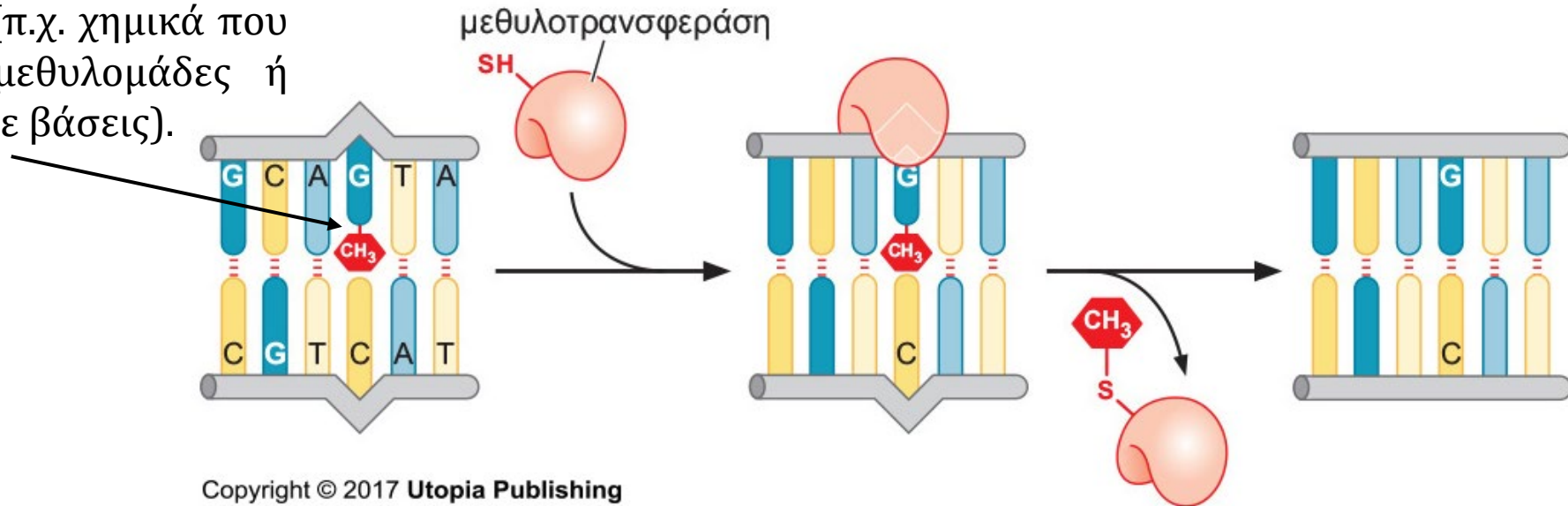
- **Φωτοεξαρτώμενη επιδιόρθωση DNA**, δηλαδή χρειάζεται **ορατό φως** (κυρίως μπλε φως, 300–500 nm) για να λειτουργήσει.
- Ενεργοποιείται από ένα ειδικό ένζυμο, τη **DNA φωτολυάση (photolyase)**, η οποία **χρησιμοποιεί ενέργεια φωτός** για να **σπάσει τους δεσμούς** που ενώνουν τις δύο θυμίνες στο διμερές.
- Είναι **πολύ γρήγορη** και **ενεργειακά αποδοτική**.
- **Άμεση επιδιόρθωση**: δεν απαιτεί αφαίρεση ή αντικατάσταση νουκλεοτιδίων.
- **Δεν υπάρχει στους ανθρώπους και τα θηλαστικά.**
- Υπάρχει σε **βακτήρια, φυτά, φύκη, ορισμένους μύκητες και ασπόνδυλα.**



Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών του DNA

Παράδειγμα **άμεσης αναστροφής** αποτελεί και η **αφαίρεση της μεθυλικής ομάδας από τη βάση Ο⁶-μεθυλογουανίνη**

βλάβη από **αλκυλιωτικούς παράγοντες** (π.χ. χημικά που μεταφέρουν μεθυλομάδες ή αιθυλομάδες σε βάσεις).



1. Η **δράση της μεθυλοτρανσφεράσης MGMT**, αναγνωρίζει τη μεθυλιωμένη γουανίνη.
2. Η μεθυλοτρανσφεράση συνδέεται απευθείας με το σημείο της βλάβης. Στο ενεργό της κέντρο έχει μια **θειολική ομάδα (-SH)** από κατάλοιπο **κυστεΐνης**.
3. Η μεθυλομάδα **μεταφέρεται** από το κατάλοιπο γουανίνης στην κυστεΐνη του ενζύμου.
4. Η γουανίνη επανέρχεται στην κανονική της μορφή, και το DNA αποκαθίσταται.
5. Το ένζυμο **“θυσιάζεται”** — αφού δεσμεύσει τη μεθυλομάδα, **απενεργοποιείται μόνιμα** και **αποικοδομείται**.

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών του DNA

Ο πιο κυρίαρχος τρόπος με τον οποίο το DNA απαλλάσσεται από βλάβες που έχουν υποστεί βλάβη είναι μέσω **συστημάτων επιδιόρθωσης που αφαιρούν και αντικαθιστούν** τις τροποποιημένες βάσεις.

Τα δύο βασικά συστήματα είναι:

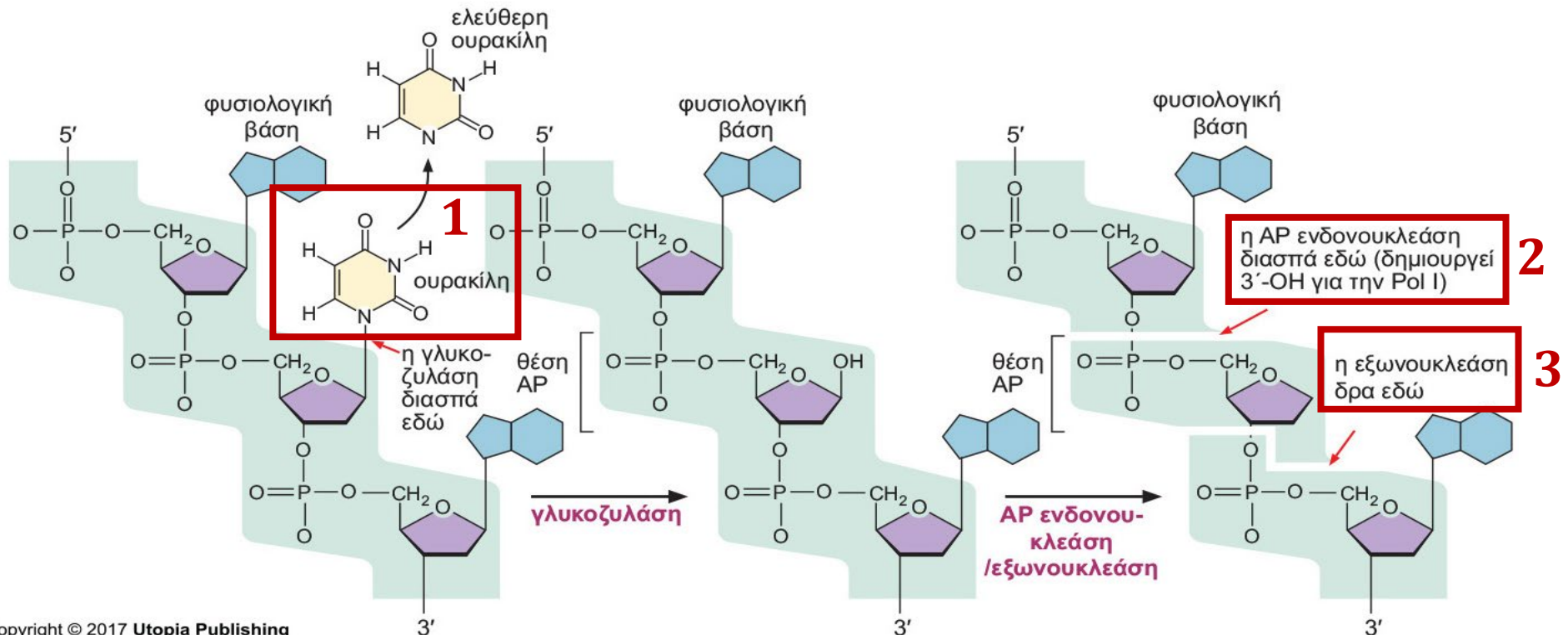
- 1.Επιδιόρθωση εκτομής βάσεων (Base Excision Repair, BER)
- 2.Επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair, NER)

Base Excision Repair (BER)

- Ο **BER (Base Excision Repair)** είναι ένας μηχανισμός επιδιόρθωσης μικρών, μη παραμορφωτικών βλαβών του DNA — δηλαδή βλαβών που **δεν αλλοιώνουν σημαντικά τη δομή της διπλής έλικας**, αλλά **αλλοιώνουν τη χημεία μιας βάσης**.
- Αποτελεί **θεμελιώδη μηχανισμό επιδιόρθωσης DNA** και λειτουργεί **σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς**, από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο.
- Στηρίζεται στη λειτουργία του ενζύμου **DNA γλυκοζυλάση (DNA glycosylase)**.
- Λειτουργεί **συνεχώς** στα κύτταρα για να διορθώνει **φυσιολογικές αυθόρμητες βλάβες**.
- Είναι **ουσιώδης για τη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας**.
- Ανεπάρκεια του BER έχει συνδεθεί με **γήρανση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και καρκινογένεση**.

Base Excision Repair (BER)

1. Η **DNA γλυκοζυλάση** αναγνωρίζει το είδος της βλάβης και **κόβει τον δεσμό** μεταξύ της βάσης και της δεοξυριβόζης, δημιουργώντας ένα **AP site (apurinic/apyrimidinic)**.
2. Η **AP ενδονουκλεάση (AP endonuclease)** κόβει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό στην 5' πλευρά της AP θέσης, δημιουργώντας ένα κενό (nick) και ένα **ελεύθερο 3' άκρο**.
3. Η **εξωνουκλεάση** κόβει στο **3' άκρο της θέσης AP** δημιουργώντας ένα ελεύθερο 5' άκρο.
4. Η **DNA πολυμεράση I (στα βακτήρια)** ή η **Pol β (στους ευκαρυώτες)** προσθέτει το σωστό νουκλεοτίδιο χρησιμοποιώντας το **3'-OH** άκρο.
5. Η **DNA λιγάση** σφραγίζει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό και αποκαθιστά τη συνεχή έλικα.

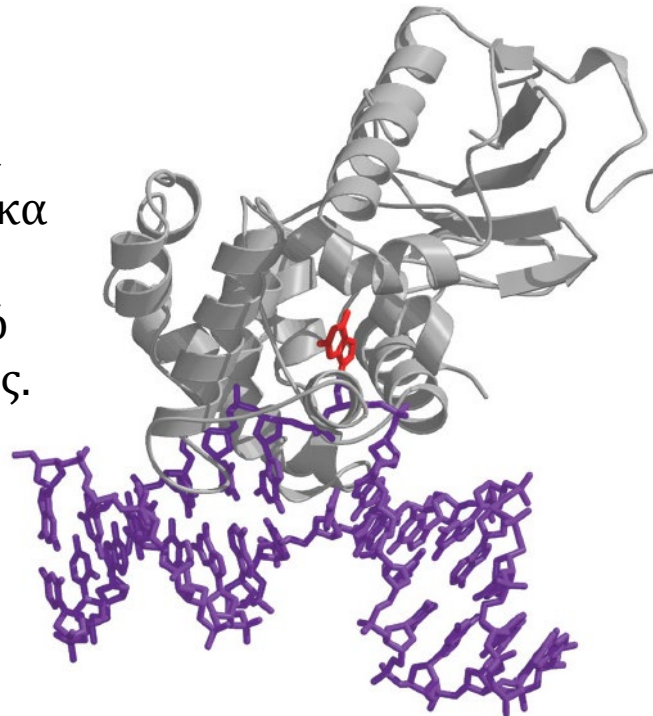


Base Excision Repair (BER)

Τα κύτταρα διαθέτουν πολλές DNA γλυκοζυλάσες με διαφορετικές ειδικότητες:

- Μια ειδική γλυκοζυλάση αναγνωρίζει την **U** που παράγεται ως συνέπεια της **απαμίνωσης της κυτοσίνης**.
- Άλλη ειδική γλυκοζυλάση αναγνωρίζει την **oxoG** που παράγεται ως συνέπεια της **οξειδωσης της γουανίνης**.
- Μέχρι σήμερα, στον άνθρωπο έχουν αναγνωριστεί 11 διαφορετικές DNA γλυκοζυλάσες.

Η βάση που έχει βλάβη είναι «εξοστρακισμένη» από την έλικα του DNA και μπορεί να αλληλεπιδράσει με το ενεργό κέντρο της DNA γλυκοζυλάσης.

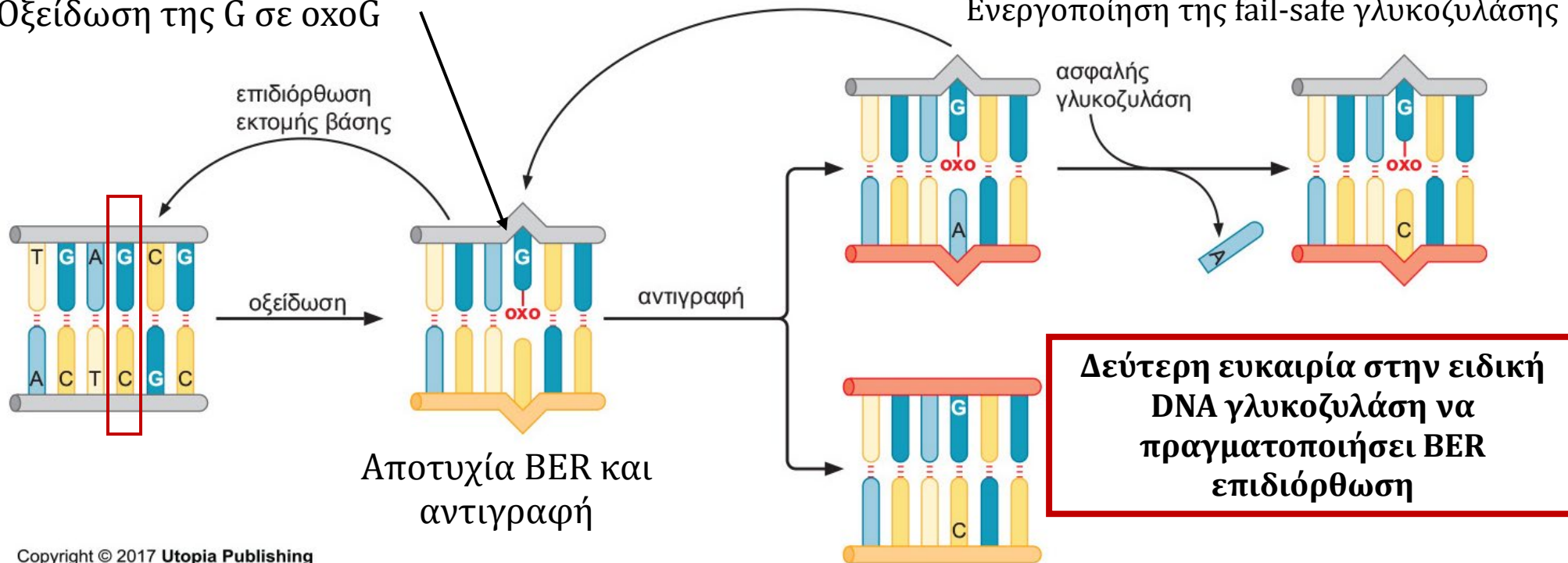


Τι θα συμβεί αν μια βάση που φέρει βλάβη δεν απομακρυνθεί από το σύστημα BER;

Η βλάβη θα προκαλέσει σίγουρα αλλαγή;

Base Excision Repair (BER)

Οξείδωση της G σε oxoG

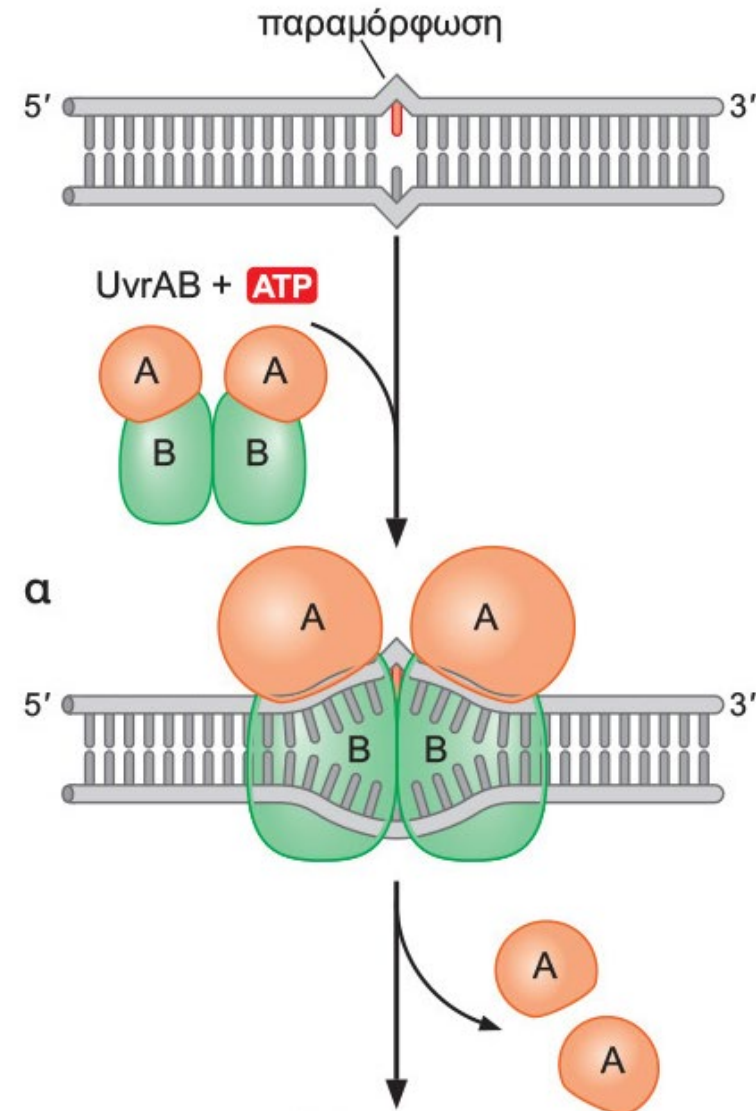


Nucleotide Excision Repair (NER)

- Σε αντίθεση με τον μηχανισμό BER, τα ένζυμα επιδιόρθωσης που συμμετέχουν στον μηχανισμό NER **ΔΕΝ αναγνωρίζουν συγκεκριμένη βλάβη**.
- Ο NER είναι **πολυενζυμικός μηχανισμός** επιδιόρθωσης DNA που **αφαιρεί παραμορφωτικές βλάβες** του DNA, οι οποίες στρεβλώνουν τη δομή της διπλής έλικας.
- Διορθώνει βλάβες που δεν μπορούν να αναγνωριστούν ή να επιδιορθωθούν από τον BER, επειδή **περιλαμβάνουν πολλές βάσεις ή χημικά πρόσθετα μεγάλης μάζας**.
- Βασίζεται στην **εκτομή (αποκοπή)** ενός μικρού ολιγονουκλεοτιδίου (~12–30 nt) που **περιέχει τη βλάβη**, και στην επανασύνθεση του σωστού τμήματος DNA με βάση τη συμπληρωματική αλυσίδα.
- Είναι εξαιρετικά **συντηρημένος εξελικτικά** και απαντάται από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο.
- Ο NER είναι ο **κύριος μηχανισμός επιδιόρθωσης βλαβών από υπεριώδη (UV) ακτινοβολία στους ανθρώπους**, αφού τα ανθρώπινα κύτταρα δε διαθέτουν ενεργή φωτολύαση (φωτοενεργοποίηση).

Ο μηχανισμός NER στο βακτήριο *E. Coli*

Ο NER μηχανισμός παργματοποιείται σε μεγάλο βαθμό από 4 πρωτεΐνες **UvrA**, **UvrB**, **UvrC** και **UvrD**.



Το σύμπλοκο **UvrA₂UvrB₂**, με τη βοήθεια **ATP**, "σκανάρει" το DNA. Η δέσμευση του ATP επιτρέπει **διαμορφωτική αλλαγή** στο σύμπλοκο.

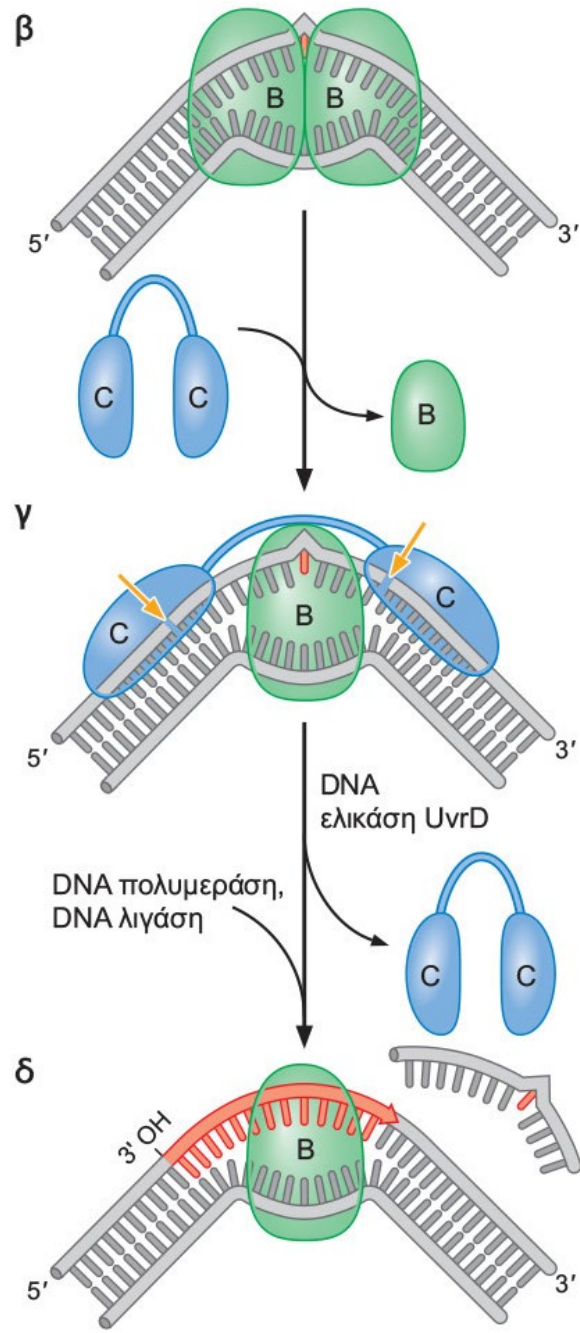
Η **UvrA** λειτουργεί ως **αισθητήρας** της παραμόρφωσης και είναι υπεύθυνη για την ανίχνευση της βλάβης.

Στο στάδιο αυτό, το σύμπλοκο **UvrA₂UvrB₂** συνδέεται στην περιοχή της βλάβης.

Μόλις επιβεβαιωθεί η βλάβη, η **UvrA** υδρολύει το ATP και αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο, αφήνοντας τη **UvrB** συνδεδεμένη στο DNA.

Η **UvrB** τώρα παραμένει προσδεδεμένη στην περιοχή της βλάβης και μέσω υδρόλυσης ATP ανοίγει μερικώς την έλικα, δημιουργώντας μια τοπική "φούσκα" DNA.

Ο μηχανισμός NER στο βακτήριο *E. Coli*



Η **UvrB** προσελκύει την **UvrC** στην περιοχή της βλάβης και σχηματίζεται το σύμπλοκο **UvrB-UvrC**.

Η **UvrC** είναι η ενδονουκλεάση που εκτελεί δύο εκτομές:

1. μία **στην 8^η θέση νουκλεοτιδίου 5'** από τη βλάβη.

2. μία **στην 4^η – 5^η θέση 3'** από τη βλάβη.

Με τον τρόπο αυτό, αποκόπτεται ένα **ολιγονουκλεοτίδιο μήκους περίπου 12–13 nt** που περιέχει τη βλάβη.

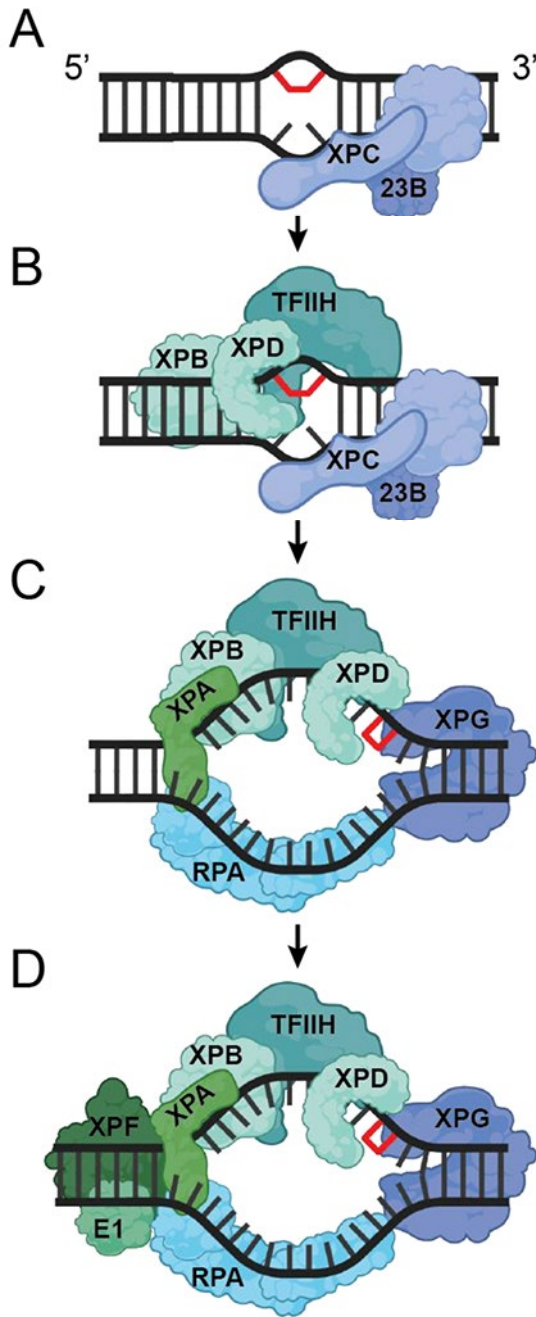
Η **UvrD (helicase II)** προσδένεται και **μέσω υδρόλυσης ATP** ξετυλίγει το τμήμα DNA που περιέχει τη βλάβη, επιτρέποντας την **απομάκρυνσή του**.

Η **UvrB** παραμένει προσωρινά για να σταθεροποιήσει τη δομή.

Το κενό που απομένει (περίπου 12–13 νουκλεοτίδια) **συμπληρώνεται από τη DNA πολυμεράση I**, χρησιμοποιώντας τη **συμπληρωματική αλυσίδα** ως εκμαγείο.

Η **DNA λιγάση** σφραγίζει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό, ολοκληρώνοντας την αποκατάσταση του DNA.

Ο μηχανισμός NER στον άνθρωπο



Το σύμπλοκο **XPC-HR23B** “σκανάρει” το DNA για **παραμορφώσεις** στη διπλή έλικα (πχ. διμερή θυμίνης). Το **XPC** λειτουργεί σαν “αισθητήρας” (όπως η UvrA στο βακτήριο *E. Coli*).

Όταν ανιχνευτεί η βλάβη, **προσδένεται στο DNA** και προσελκύει το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο **TFIIH** με δύο κρίσιμες ελικάσες (**XPB** και **XPD**).

Το **TFIIH** προσδένεται στη θέση της βλάβης και οι **XPB** και **XPD** είναι DNA ελικάσες, με τη βοήθεια ATP, **ξετυλίζουν** το DNA γύρω από τη βλάβη (~25–30 βάσεις).

Οι πρωτεΐνες **XPA** και **RPA** προσδένονται στο ξετυλιγμένο DNA:

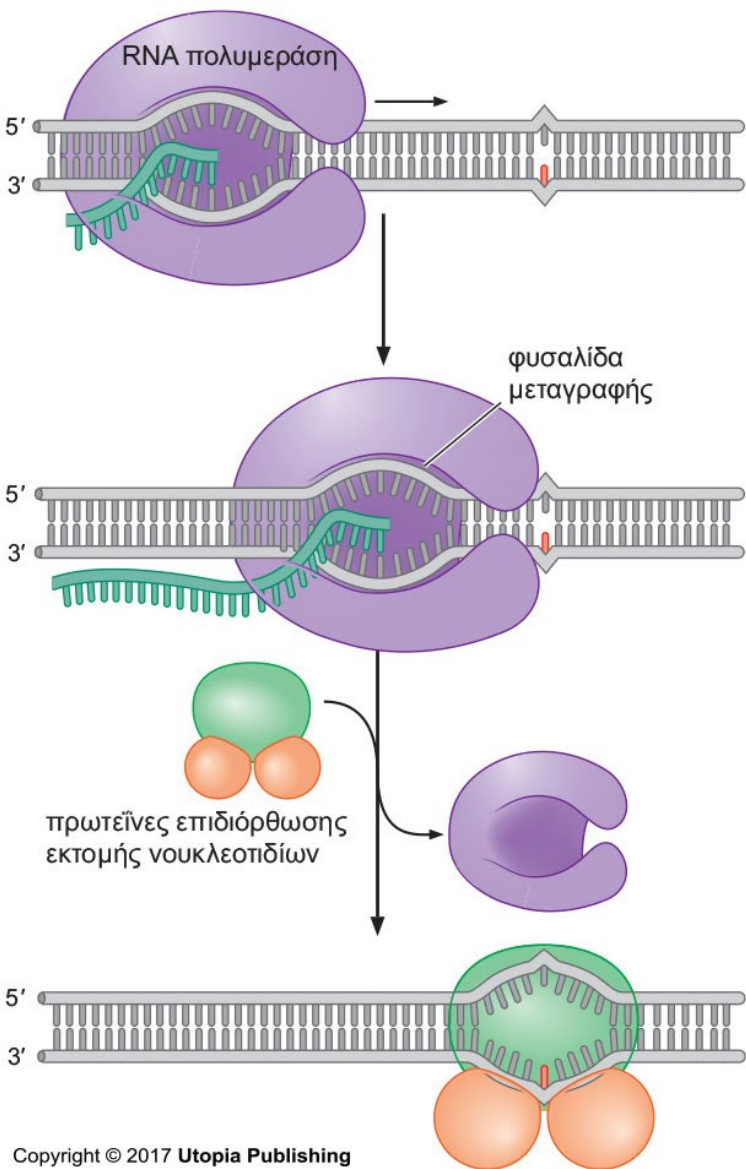
1. Η **XPA** αναγνωρίζει τη γεωμετρία της βλάβης και **συντονίζει τις ενδονουκλεάσες**.

2. Η **RPA (Replication Protein A)** δεσμεύει το **μονόκλωνο DNA** και το **σταθεροποιεί**, εμποδίζοντας την επανασύζευξη.

Η **XPG** εκτελεί την **3' τομή**, ενώ το σύμπλοκο **XPF-ERCC1** εκτελεί την **5' τομή**. Ένα τμήμα ~24–32 nt **απομακρύνεται** με τη βοήθεια του TFIIH.

Στη συνέχεια, **DNA πολυμεράση δ ή ε** συνθέτει το νέο τμήμα χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλυσίδα ως εκμαγείο και η **DNA λιγάση I** σφραγίζει τη δομή.

Transcription-Coupled Repair (TCR)



Η RNA πολυμεράση μεταγράφει ένα εκμαγείο DNA με βλάβη. Μόλις συναντήσει τη βλάβη, η RNA πολυμεράση δε μπορεί να συνεχίσει τη σύνθεση και η μεταγραφή σταματάει. Η παύση της RNA πολυμεράσης λειτουργεί ως σήμα “SOS” που προσελκύει πρωτεΐνες του NER, όπως ο TFIIF.

Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται **Transcription-Coupled Repair (TCR)**, είναι μια ειδική παραλλαγή του μηχανισμού NER και αποτελεί ένα από τα πιο εντυπωσιακά παραδείγματα “προτεραιότητας” επιδιόρθωσης στο κύτταρο.

- Ο TCR είναι ένας εξειδικευμένος μηχανισμός του NER που εστιάζει αποκλειστικά στις βλάβες του DNA που βρίσκονται σε ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια.
- Ο “κλασικός” NER (Global Genome NER – GG-NER) επιδιορθώνει βλάβες οπουδήποτε στο γονιδίωμα.

Ο μηχανισμός NER στον άνθρωπο

Γιατί υπάρχει ο ξεχωριστός μηχανισμός TCR;

Οι ενεργά μεταγραφόμενες περιοχές είναι λειτουργικά κρίσιμες. Αν παραμείνει βλάβη εκεί,

- η μεταγραφή σταματά
- η πρωτεΐνη δεν παράγεται
- το κύτταρο μπορεί να πεθάνει ή να υποστεί μεταλλάξεις.

Άρα...

Ο μηχανισμός TCR εξασφαλίζει **γρήγορη και στοχευμένη επιδιόρθωση** στα ενεργά γονίδια, ενώ ο GG-NER επιδιορθώνει πιο αργά το “υπόλοιπο” γονιδίωμα.

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών του DNA

Οι επιδιορθώσεις εκτομής χρησιμοποιούν την άθικτη αλυσίδα του DNA ως εκμαγείο για να αντικαταστήσουν το τμήμα DNA που έχει υποστεί βλάβη στη συμπληρωματική αλυσίδα.

Ωστόσο...

Πως επιδιορθώνουν τα κύτταρα τις δίκλωνες θραύσεις στο DNA στις οποίες και οι δύο αλυσίδες είναι σπασμένες;

Double-Strand Break Repair Pathways

- Οι **θραύσεις διπλής αλυσίδας DNA (Double-Strand Breaks, DSBs)** είναι οι πιο σοβαρές μορφές βλάβης στο γονιδίωμα.
- Είναι **οι πιο επικίνδυνες μορφές βλάβης DNA**, γιατί αν δεν επιδιορθωθούν σωστά, μπορούν να οδηγήσουν σε **χρωμοσωμικές ανωμαλίες, απώλεια γενετικού υλικού, μεταλλάξεις ή καρκινογένεση**.
- Οι μηχανισμοί **Double-Strand Break (DSB) Repair** στηρίζονται σε μεγάλο βαθμό στον **μηχανισμό του γενετικού ανασυνδυασμού**.
- Ο όρος “ανασυνδυασμός” (recombination) αναφέρεται στην **ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ ομόλογων αλληλουχιών DNA**.
- Το κύτταρο χρησιμοποιεί **μια δεύτερη, άθικτη αλληλουχία DNA (την αδελφή χρωματίδα)** ως “οδηγό” (template) για να **αντιγράψει πιστά** το τμήμα στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί μια θραύση.

Double-Strand Break Repair Pathways

Επομένως...

Η οδός επιδιόρθωσης DSB βασίζεται στην πληροφορία της αλληλουχίας DNA στην αδελφή χρωματίδα, προκειμένου να αποκτήσει εκμαγείο και να αποκαταστήσει τη θραύση.

Ωστόσο...

Τι γίνεται στην περίπτωση που ένα χρωμόσωμα που ΔΕΝ έχει ακόμα αντιγραφεί, υποστεί μια θραύση και δεν υπάρχει αδελφή χρωματίδα για να χρησιμεύσει ως εκμαγείο;

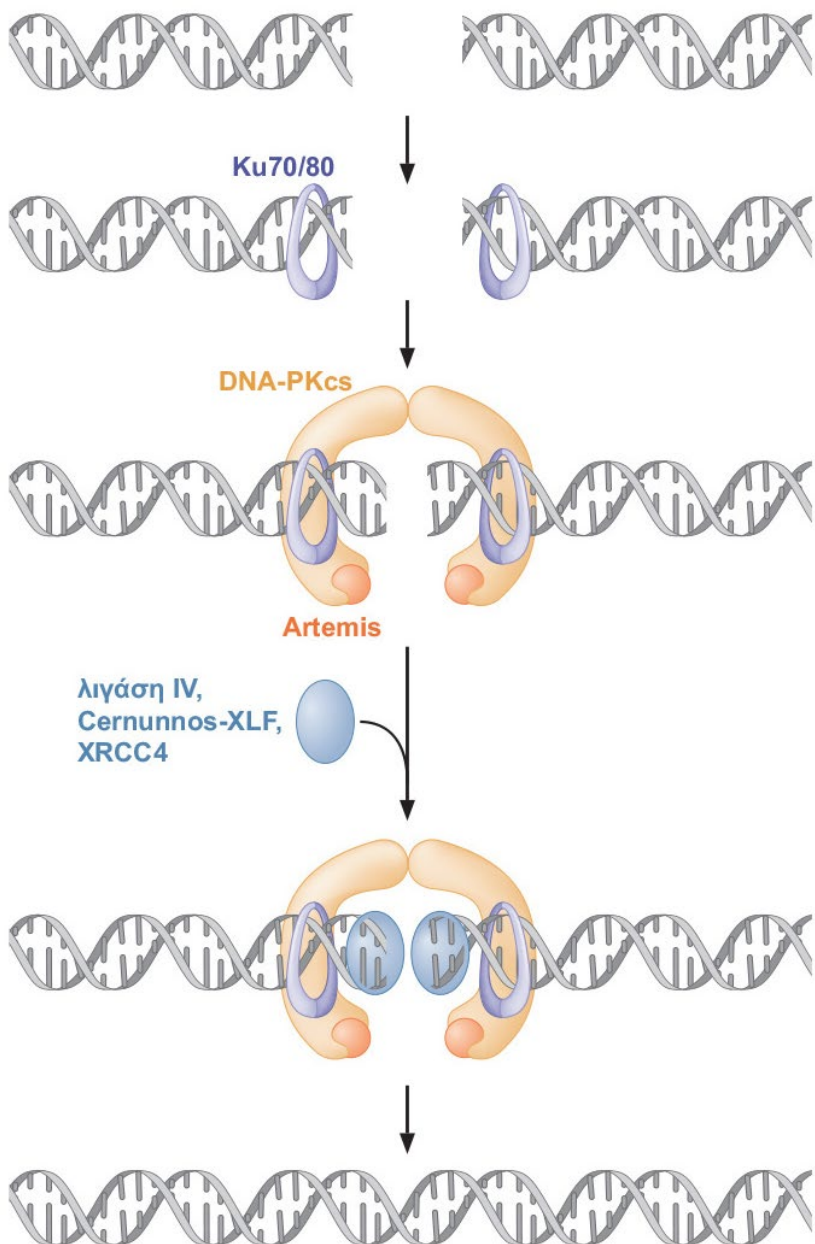
Σύστημα σύνδεσης μη ομόλογων άκρων
Non-homologous end joining (NHEJ)

Non-homologous end joining (NHEJ)

- Πρόκειται για έναν άμεσο και “επείγοντα” τρόπο επιδιόρθωσης θραύσεων διπλής αλυσίδας (DSBs).
- Λειτουργεί σε όλα τα κύτταρα (προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά), κυρίως **όταν δεν υπάρχει διαθέσιμο ομόλογο εκμαγείο**.
- Επειδή η πληροφορία της αλληλουχίας έχει χαθεί από τη θραύση και των δύο αλυσίδων, **η αποκατάσταση δεν γίνεται με πιστότητα**.
- Η οδός NHEJ είναι **μεταλλαξιγόνος**.

Οι μεταλλαξογόνες συνέπειες της οδού επιδιόρθωσης NHEJ είναι **πολύ λιγότερο επικίνδυνες** για το κύτταρο συγκριτικά με τις συνέπειες που θα υπήρχαν αν είχε αφεθεί το DNA σπασμένο!!!

Non-homologous end joining (NHEJ)



- Τα **ετεροδιμερή Ku70/80** δεσμεύονται στα άκρα του DNA που έχουν προκύψει από τη θραύση.

Ρόλος των **Ku70/80** είναι να:

1. **προστατεύουν τα άκρα** από αποικοδόμηση.
2. **στρατολογούν τις επόμενες πρωτεΐνες.**

- Προσελκύεται η πρωτεϊνική κινάση **DNA-PKcs**, η οποία προσδένεται και **ενώνει τα δύο Ku70/80**, φέρνοντας τα άκρα του DNA κοντά.

- Η **DNA-PKcs** σχηματίζει σύμπλοκο με την **Artemis**, η οποία έχει ταυτόχρονα:

1. Ενεργότητα **5' εξωνουκλεάσης**.
2. Ενεργότητα **3' εξωνουκλεάσης**.
3. Μια **λαθάνουσα ενεργότητα ενδονουκλεάσης** που ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης.

- Οι ενεργότητες αυτές επεξεργάζονται τα σπασμένα άκρα και προετοιμάζουν τη σύνδεση.

- Η σύνδεση πραγματοποιείται από τη **λιγάση IV** σε ένα σύμπλεγμα με την **XRCC4** και **Cernunnos-XLF**.

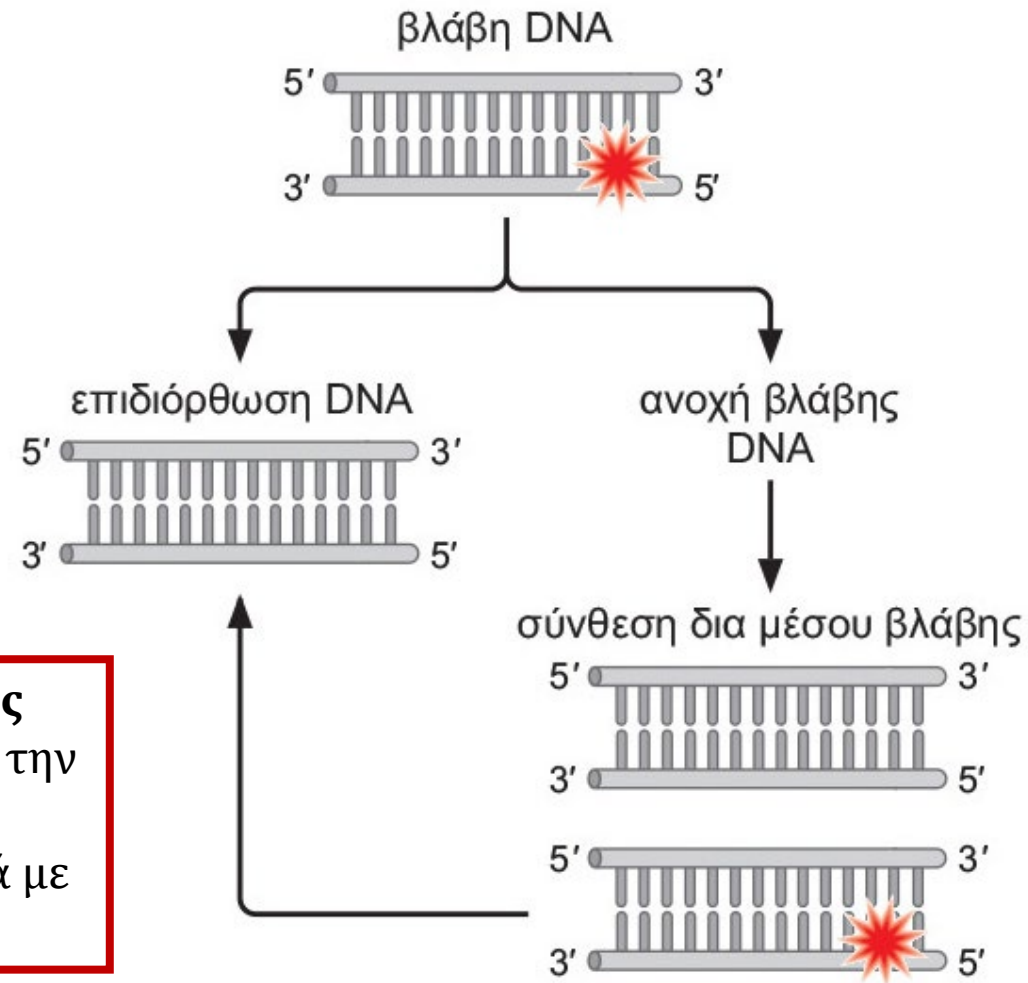
Σύνθεση διαμέσου βλάβης (Translesion Synthesis, TLS)

Όταν το DNA υποστεί βλάβη (π.χ. από UV ή οξείδωση), η **κλασική DNA πολυμεράση** (Pol δ ή Pol ε) **σταματά** και δεν μπορεί να συνεχίσει την αντιγραφή. Αν δεν επιδιορθωθεί η βλάβη, η **αντιγραφή “κολλάει”** και το σύμπλοκο αντιγραφής (replisome) **κινδυνεύει να καταρρεύσει**.

Για να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο, το κύτταρο ενεργοποιεί ειδικές **“πολυμεράσες ανοχής βλάβης”**, που επιτρέπουν **συνέχιση της αντιγραφής “μέσα” από τη βλάβη**. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **“σύνθεση διαμέσου βλάβης”** (translesion synthesis, TLS).

Ανθρώπινες TLS πολυμεράσες: Pol η, Pol ι, Pol κ, Pol ζ και Rev1.

Η **translesion synthesis** είναι ένας **μηχανισμός ανοχής βλάβης**: ειδικές πολυμεράσες συνεχίζουν την αντιγραφή **μέσα από βλάβες DNA**, εξασφαλίζοντας την επιβίωση του κυττάρου αλλά με **πιθανό τμήμα μικρές μεταλλάξεις**.



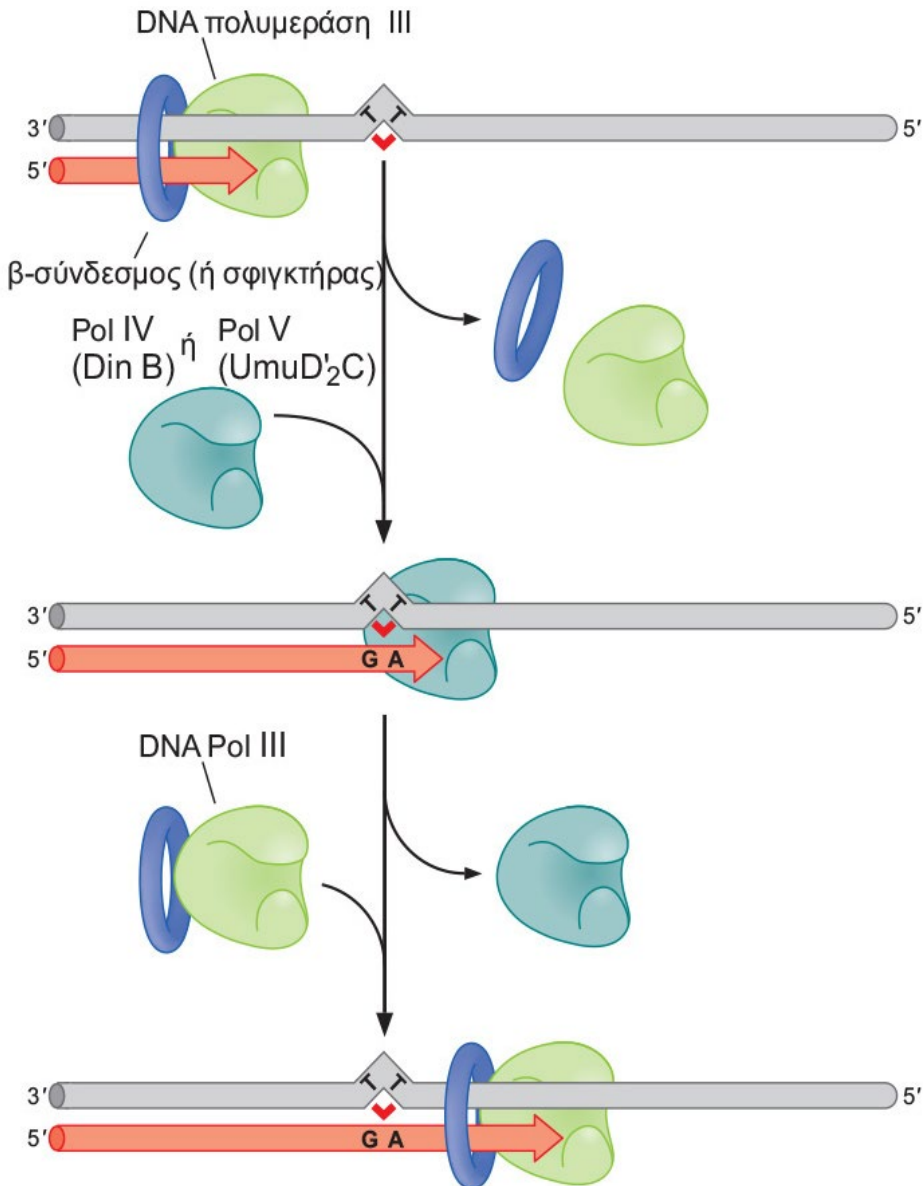
Πολυμεράσες της οικογένειας Υ (DNA polymerases Υ)

- Είναι ειδικές DNA πολυμεράσες χαμηλής πιστότητας που ανήκουν στους μηχανισμούς TLS, δηλαδή επιτρέπουν στο κύτταρο να αντιγράψει DNA “μέσα” από βλάβες όταν οι κανονικές πολυμεράσες σταματούν.
- Έχουν μεγαλύτερο και πιο “ευέλικτο” ενεργό κέντρο, το οποίο μπορεί να αλληλεπιδρά με αλλοιωμένες βάσεις.
- ΔΕΝ διαθέτουν ενεργότητα 3'→5' εξωνουκλεάσης και γι' αυτό δεν μπορούν να διορθώσουν λάθη.
- Συχνά ενεργοποιούνται μέσω ουβικουιτινίωσης του PCNA που επιτρέπει την εναλλαγή με τις κανονικές πολυμεράσες.

DNA πολυμεράσες στο βακτήριο *E. Coli*

DNA Polymerase	5'→3' Polymerase Activity	3'→5' Exonuclease Activity	5'→3' Exonuclease Activity	Function
I	Yes	Yes	Yes	Removes and replaces primers
II	Yes	Yes	No	DNA repair; restarts replication after damaged DNA halts synthesis
III	Yes	Yes	No	Elongates DNA
IV	Yes	No	No	DNA repair
V	Yes	No	No	DNA repair; translesion DNA synthesis

Σύνθεση διαμέσου βλάβης στο βακτήριο *E. Coli*



- Η DNA pol III προχωρά την αντιγραφή, αλλά σταματά όταν συναντήσει **βλάβη στο DNA**.
- Η πολυμεράση III συνθέτει με μεγάλη πιστότητα, αλλά **δεν μπορεί να “διαβάσει” παραμορφωμένες βάσεις**. Η βλάβη παραμένει μπροστά της και η αντιγραφή κινδυνεύει να σταματήσει οριστικά.
- Η DNA pol III αποσυνδέεται προσωρινά μαζί με την πρωτεΐνη συνδετήρα από το DNA και αντικαθίσταται από την DNA pol IV (DinB) ή την DNA pol V (UmuC-UmuD).
- Οι TLS πολυμεράσες επεκτείνουν τη σύνθεση του DNA διαμέσου της βλάβης (πχ. διμερές θυμίνης) με πολύ **χαμηλότερη πιστότητα**.
- Αφού η TLS πολυμεράση “περάσει” τη βλάβη, **απομακρύνεται**.
- Η Pol III ξαναπροσδένεται και συνεχίζει την αντιγραφή με υψηλή ακρίβεια.
- **Η βλάβη μπορεί να επιδιορθωθεί αργότερα από BER ή NER.**

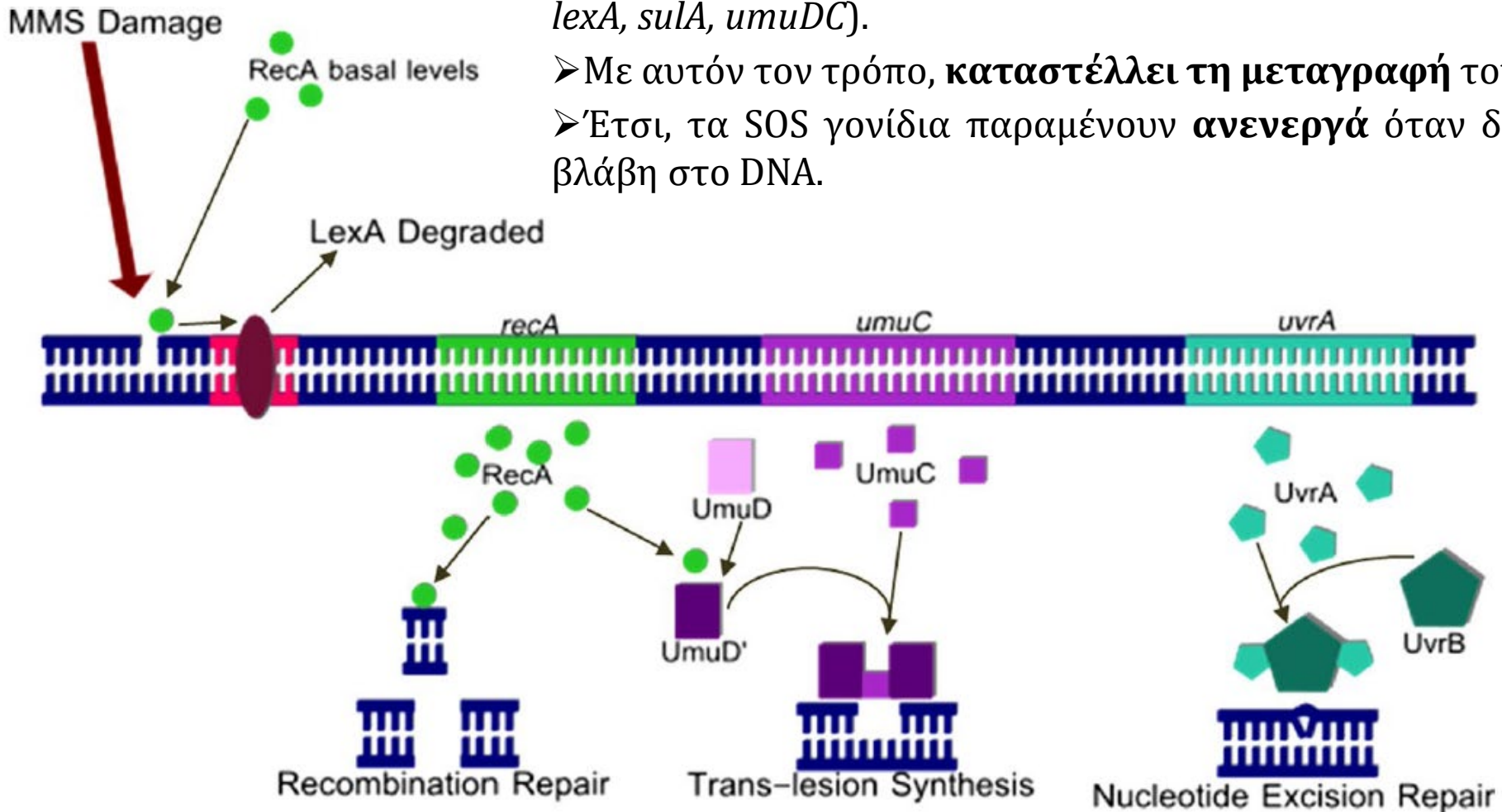
Σύνθεση διαμέσου βλάβης στο βακτήριο *E. Coli*

- Στην *E. Coli*, οι TLS πολυμεράσες δεν είναι παρούσες υπό φυσιολογικές συνθήκες.
- Η σύνθεσή τους επάγεται μόνο σε απόκριση στη βλάβη του DNA.
- Τα γονίδια που κωδικοποιούν την TLS πολυμεράση εκφράζονται μόνο ως μέρος της οδού που είναι γνωστή ως **απόκριση SOS (SOS Response)**.
- Το **SOS Response** είναι ένας μηχανισμός επείγουσας απόκρισης των βακτηρίων σε **εκτεταμένες βλάβες του DNA** (όπως θραύσεις, διασταυρώσεις ή λάθη αντιγραφής).
- Ενεργοποιείται όταν το κύτταρο αντιμετωπίζει συνθήκες που εμποδίζουν την ομαλή αντιγραφή ή μεταγραφή του DNA.
- Κεντρικοί ρυθμιστές του SOS συστήματος είναι οι πρωτεΐνες **LexA** και **RecA**.

SOS response στο βακτήριο *E. Coli*

Υπό φυσιολογικές συνθήκες

- Ο LexA λειτουργεί ως **καταστολέας (repressor)**.
- Συνδέεται σε ειδικές περιοχές του DNA, που ονομάζονται **SOS boxes**, μπροστά από γονίδια του SOS συστήματος (π.χ. *recA*, *uvrA*, *lexA*, *sulA*, *umuDC*).
- Με αυτόν τον τρόπο, **καταστέλλει τη μεταγραφή** τους.
- Έτσι, τα SOS γονίδια παραμένουν **ανενεργά** όταν δεν υπάρχει βλάβη στο DNA.



SOS response στο βακτήριο *E. Coli*

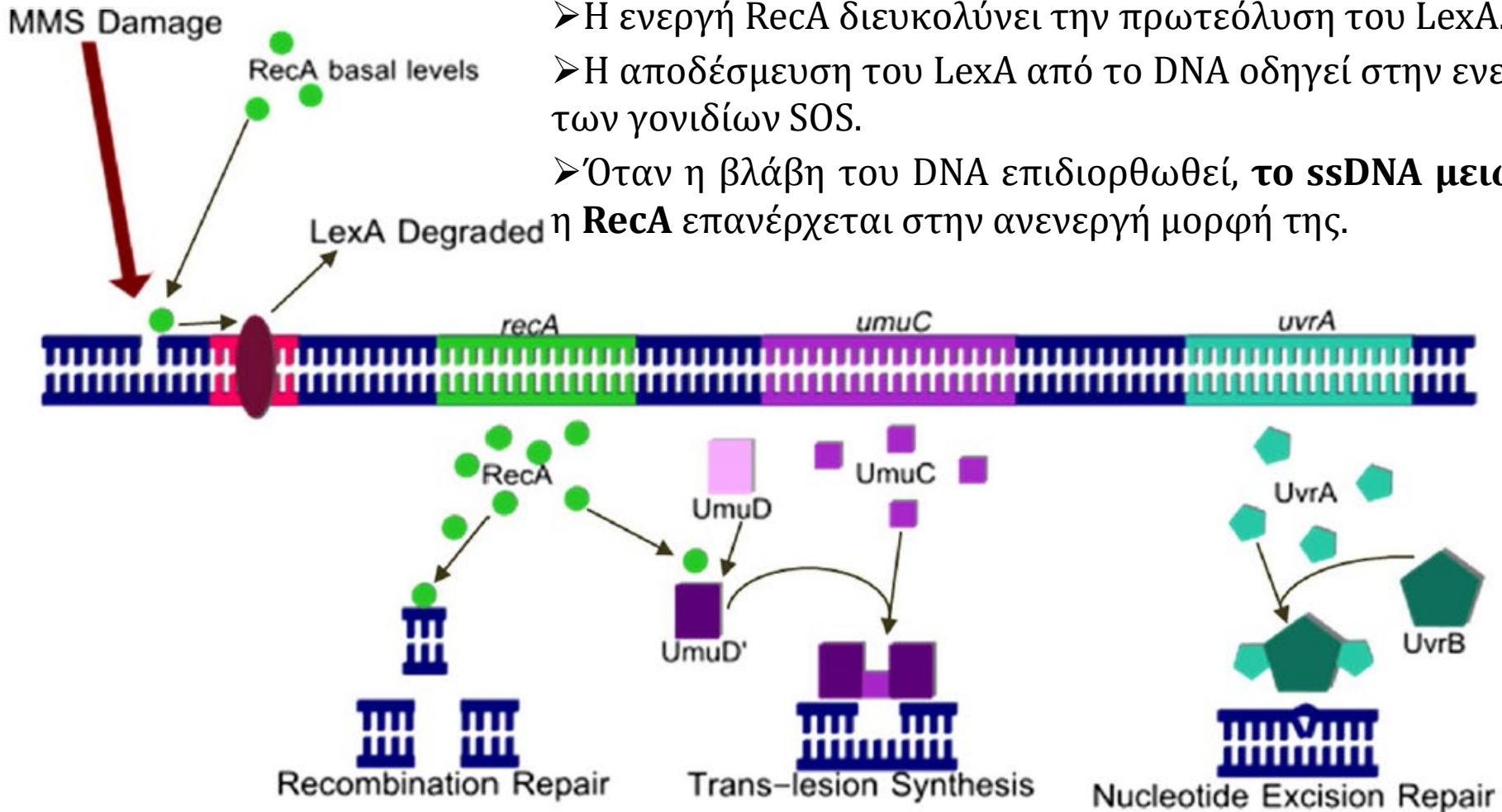
Όταν προκύψει βλάβη στο DNA

➤ Οι βλάβες οδηγούν στη δημιουργία ssDNA, στο οποίο προσδένεται η πρωτεΐνη RecA. Η πρόσδεση αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση της RecA.

➤ Η ενεργή RecA διευκολύνει την πρωτεόλυση του LexA.

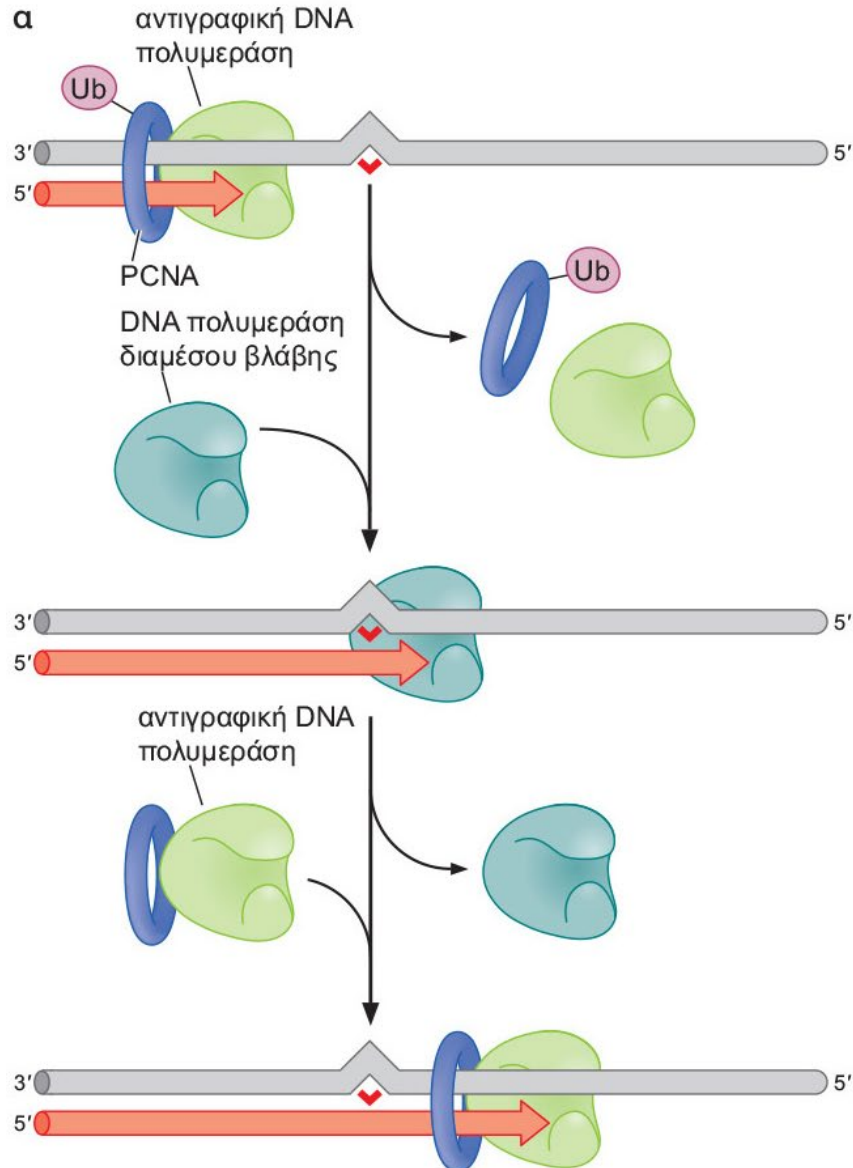
➤ Η αποδέσμευση του LexA από το DNA οδηγεί στην ενεργοποίηση των γονιδίων SOS.

➤ Όταν η βλάβη του DNA επιδιορθωθεί, το ssDNA μειώνεται και η **RecA** επανέρχεται στην ανενεργή μορφή της.

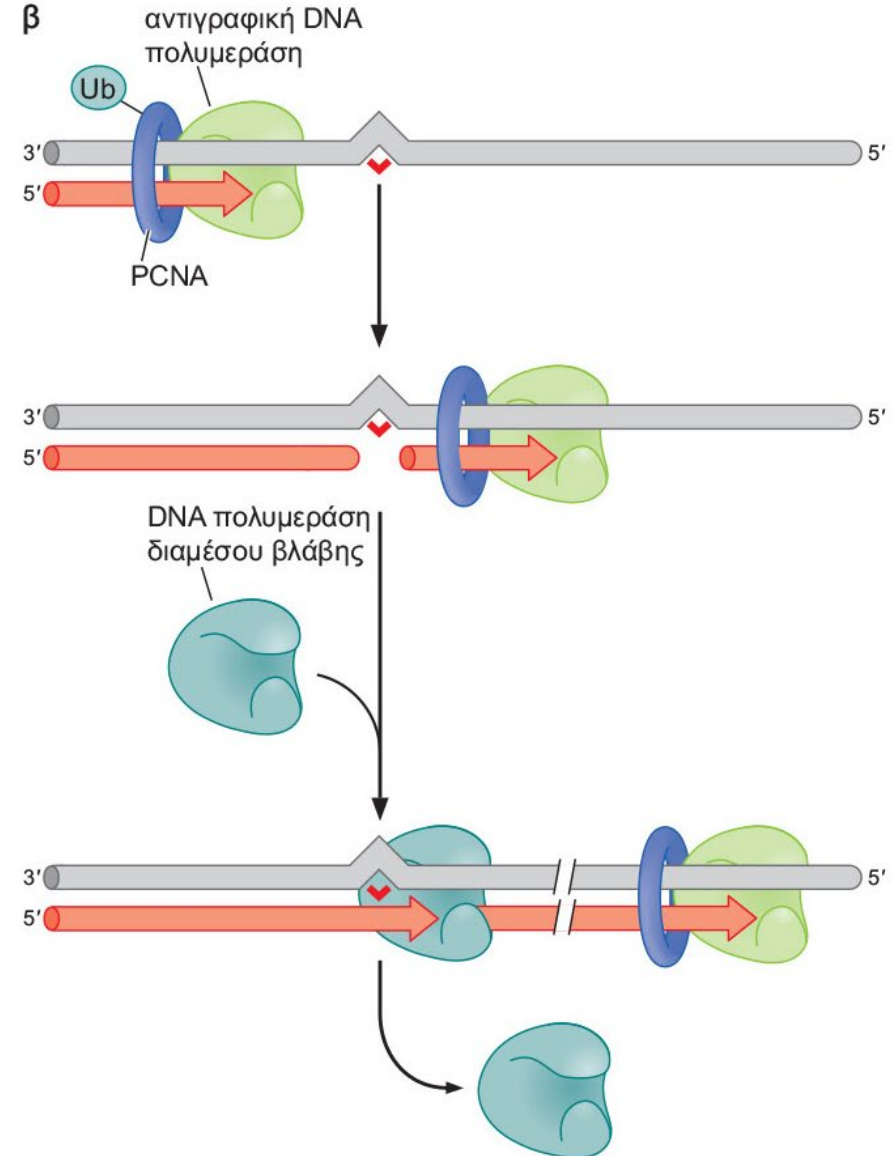


Εναλλακτικά μοντέλα σύνθεσης διαμέσου βλάβης

Μοντέλο αλλαγής πολυμεράσης



Μοντέλο συμπλήρωσης κενού



Τύπος	Βλάβη	Ένζυμο
Επιδιόρθωση αταίριαστων ζευγών	Λάθη αντιγραφής	MutS, MutL και MutH στην <i>E. coli</i> · MSH, MLH και PMS στον άνθρωπο
Φωτοενεργοποίηση	Διμερή πυριμιδίνης	DNA φωτολυάση
Επιδιόρθωση εκτομής βάσης	Βλαφθείσα βάση	DNA γλυκοζυλάση
Επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων	Διμερή πυριμιδίνης Ογκώδες προϊόν προσθήκης σε βάση	UvrA, UvrB, UvrC, και UvrD στην <i>E. coli</i> · XPC, XPA, XPD, ERCCI-XPF και XPG στον άνθρωπο
Επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων	Δίκλωνες θραύσεις	RecA και RecBCD στην <i>E. coli</i>
Σύνθεση DNA διαμέσου της βλάβης	Διμερές πυριμιδίνης ή απουρινική θέση	Υ-οικογένεια DNA πολυμερασών, όπως η UmuC στην <i>E. coli</i>