



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Η Αντιγραφή του DNA

Παναγιώτης Αδαμόπουλος

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

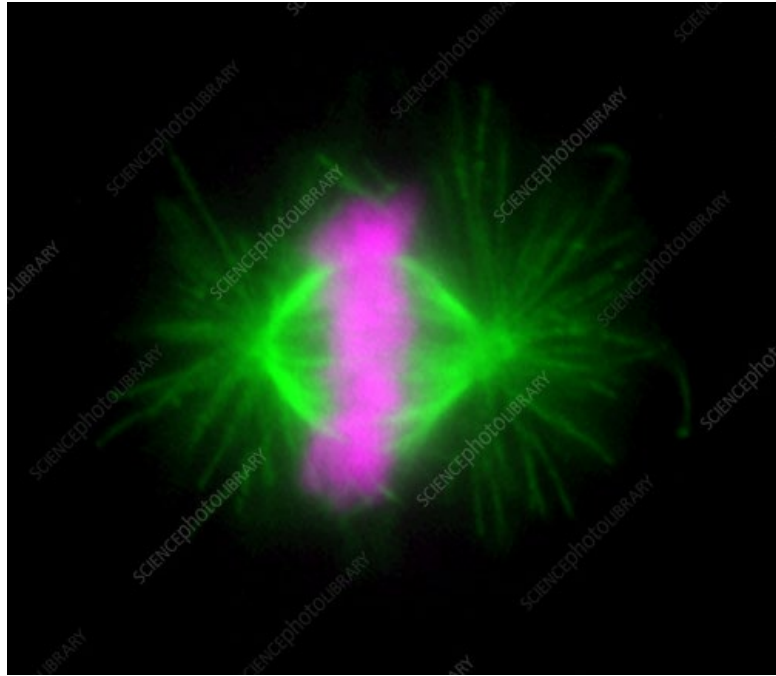
Η αντιγραφή του DNA

***Η ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ DNA ΕΙΝΑΙ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΗ ΜΕ ΤΗΝ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ***

***Η ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ DNA ΣΥΜΒΑΙΝΕΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ S ΦΑΣΗ ΤΟΥ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ***

***Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ***

Η αντιγραφή του DNA



- Στη Μοριακή Βιολογία, η **αντιγραφή του DNA** είναι η βιολογική διαδικασία παραγωγής **δύο πανομοιότυπων αντιγράφων του DNA** από ένα αρχικό μόριο DNA.
- Η αντιγραφή του DNA λαμβάνει χώρα σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και αποτελεί το βασικότερο μέρος της **βιολογικής κληρονομικότητας**. Είναι απαραίτητη για την κυτταρική διαίρεση κατά την ανάπτυξη και την επιδιόρθωση κατεστραμμένων ιστών, ενώ παράλληλα εξασφαλίζει ότι κάθε ένα από τα νέα κύτταρα λαμβάνει το δικό του αντίγραφο του DNA.
- Το κύτταρο διαθέτει τη χαρακτηριστική ιδιότητα της διαίρεσης, η οποία καθιστά την αντιγραφή του DNA απαραίτητη.

Η αντιγραφή του DNA

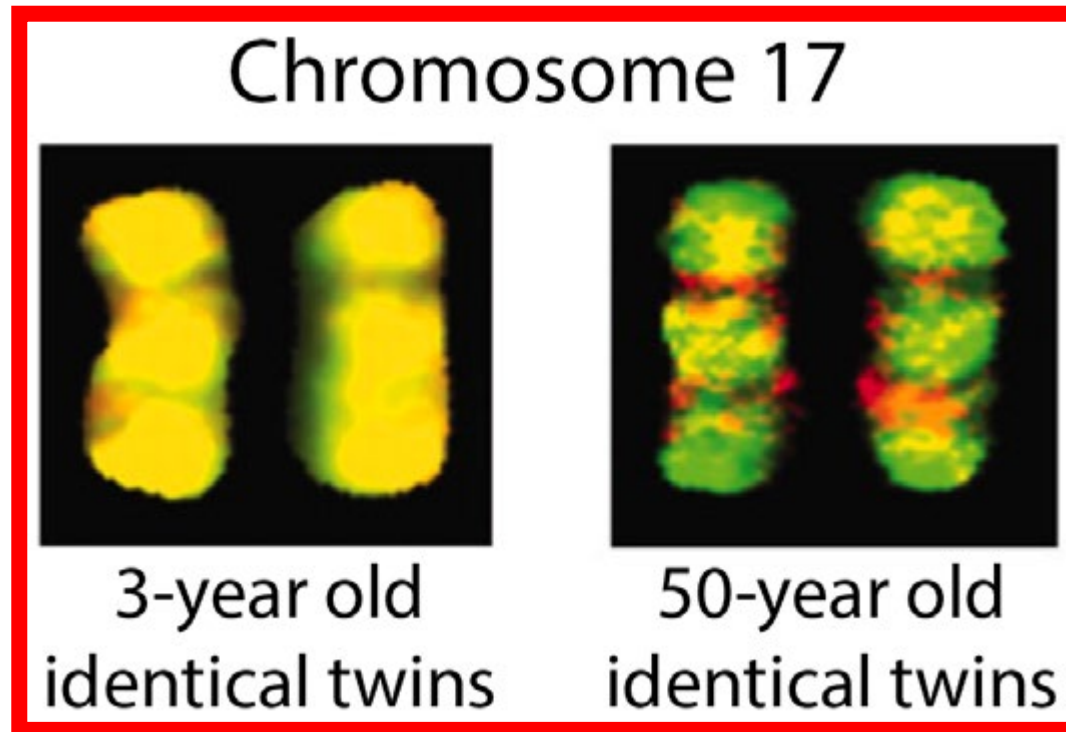


Τα μονοζυγωτικά δίδυμα είναι γενετικά πανομοιότυπα (εκτός κι αν υπάρξει μετάλλαξη στη διάρκεια της ανάπτυξης). Σε σπάνιες περιπτώσεις, τα μονοζυγωτικά δίδυμα μπορεί να εκφράσουν διαφορετικό **φαινότυπο** (κυρίως εξαιτίας κάποιου περιβαλλοντικού παράγοντα ή την απενεργοποίηση διαφορετικών χρωμοσωμάτων X στα δίδυμα κορίτσια)

Τα μονοζυγωτικά δίδυμα έχουν σχεδόν πανομοιότυπο DNA.

Η διαδικασία με την οποία διπλασιάζονται τα γονίδια αυτά είναι πολύ ακριβής (διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες στη διάρκεια των ζωών τους επηρεάζουν την ενεργοποίηση ή μη ορισμένων γονιδίων).

Η αντιγραφή του DNA



Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 July 26; 102(30): 10604– 10609.

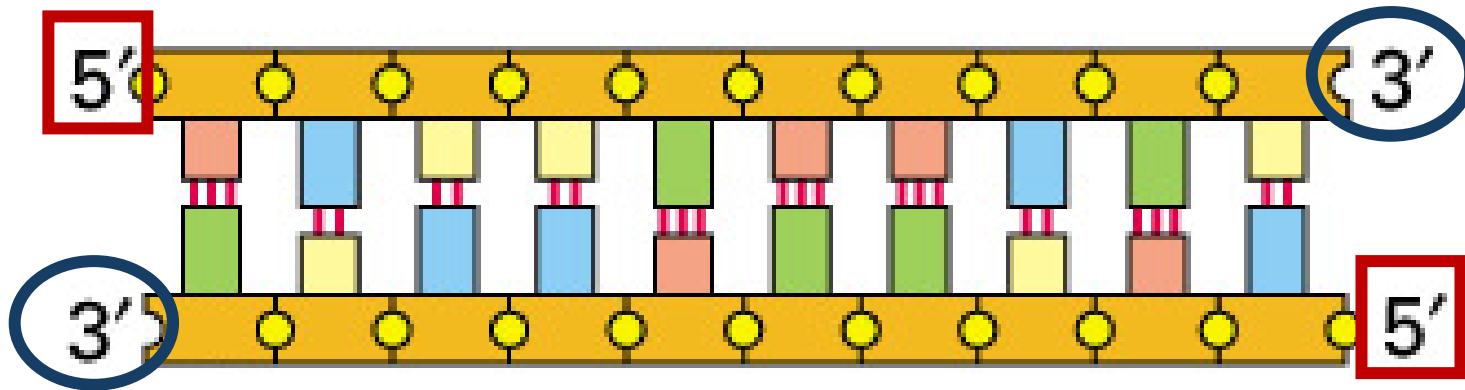
Στην ηλικία των τριών ετών, οι επιγενετικοί δείκτες του χρωμοσώματος 17 πανομοιότυπων διδύμων είναι αρκετά παρόμοιοι (εμφανίζεται με κίτρινο χρώμα).

Ωστόσο, η σύγκριση μεταξύ των 50 χρονων διδύμων παρουσιάζει σημαντικές διαφορές στην εικόνα των επιγενετικών δεικτών (κόκκινο –πράσινο).

Η αντιγραφή του DNA

- Η αντιγραφή του DNA είναι μια από τις πιο θεμελιώδεις διεργασίες στη ζωή. Κάθε φορά που ένα κύτταρο διαιρείται, πρέπει να δημιουργήσει ένα **ακριβές αντίγραφο** του γενετικού του υλικού, ώστε κάθε θυγατρικό κύτταρο να λάβει την ίδια γενετική πληροφορία.
- Η αντιγραφή εξασφαλίζει τη **σταθερότητα της γενετικής πληροφορίας** μέσα στον χρόνο. Από τη μια γενιά κυττάρων στην επόμενη — και από τη μια γενιά οργανισμών στην επόμενη — το DNA μεταβιβάζεται με εκπληκτική πιστότητα.
- Η αντιγραφή είναι μια **πολύπλοκη, αυστηρά ελεγχόμενη** διεργασία. Δεν γίνεται τυχαία, αλλά ξεκινά σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος και απαιτεί τη **συνεργασία πολλών ενζύμων και πρωτεϊνών**.
- Παρότι η βασική αρχή της αντιγραφής είναι κοινή για όλους τους οργανισμούς, **υπάρχουν διαφορές μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων**: στα βακτήρια το DNA είναι κυκλικό και έχει ένα σημείο έναρξης, ενώ στα ευκαρυωτικά κύτταρα το DNA είναι γραμμικό και η αντιγραφή ξεκινά ταυτόχρονα σε πολλές θέσεις.
- Η ακρίβεια της αντιγραφής είναι εντυπωσιακή: στα ευκαρυωτικά κύτταρα, γίνεται **λιγότερο από ένα λάθος ανά δισεκατομμύριο βάσεις**.

Η αντιγραφή του DNA



- Οι δύο αλυσίδες του DNA είναι **αντιπαράλληλες**, και αυτό είναι θεμελιώδες χαρακτηριστικό της δομής του.
- Η **συμπληρωματικότητα** των βάσεων (A-T και G-C) μπορεί να διατηρηθεί μόνο με αυτή την αντιπαράλληλη διάταξη.

Η αντιγραφή του DNA



- Το DNA αποτελείται από μια **διπλή έλικα δύο συμπληρωματικών κλώνων**. Η διπλή έλικα περιγράφει την εμφάνιση ενός δίκλωνου DNA, το οποίο αποτελείται έτσι από δύο γραμμικές αλυσίδες που διατρέχουν η μια απέναντι από την άλλη και συστρέφονται μεταξύ τους σχηματίζοντας έλικα.
- Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, οι κλώνοι αυτοί διαχωρίζονται. Κάθε κλώνος του αρχικού μορίου DNA χρησιμεύει στη συνέχεια ως **πρότυπο-εκμαγείο (template)** για την παραγωγή του αντίστοιχου, μια διαδικασία που αναφέρεται ως **ημισυντηρητική αντιγραφή**.

Η αντιγραφή του DNA

Το κύτταρο χρησιμοποιεί **εκμαγείο-κατευθυνόμενο μηχανισμό αντιγραφής** της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός κλώνου DNA σε μια συμπληρωματική αλληλουχία DNA.

Η μέθοδος **προϋποθέτει** την αναγνώριση του κάθε νουκλεοτιδίου της αλυσίδας εκμαγείου, ελεύθερα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια, και **απαιτεί** τον διαχωρισμό των δύο αλυσίδων της έλικας του DNA. Το πρώτο νουκλεοτίδιο-πολυμεριστικό ένζυμο, η **DNA πολυμεράση**, ανακαλύφθηκε το 1957.

Τα ελεύθερα νουκλεοτίδια, **τριφωσφορικοί δεοξυριβονουκλεοζίτες** χρησιμεύουν ως **υποστρώματα** για το ένζυμο.

Η αντιγραφή του DNA

ΠΡΟΣΟΧΗ

Το DNA διατηρείται σε **συμπιεσμένη, υπερελικωμένη** μορφή.

Η βάση όμως της αντιγραφής είναι ο σχηματισμός των κλώνων με αντιστοίχιση συγκεκριμένων βάσεων με τις συμπληρωματικές βάσεις τους.

Πριν την αντιγραφή του, **το DNA πρέπει να καταστεί προσιτό, δηλαδή, πρέπει να είναι «ξετυλιγμένο».**

Η αντιγραφή του DNA

Matthew Meselson and
Franklin Stahl, 1958

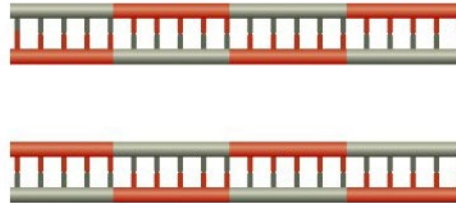
Parent double helix



KEY

 **Parent DNA**
 **New DNA**

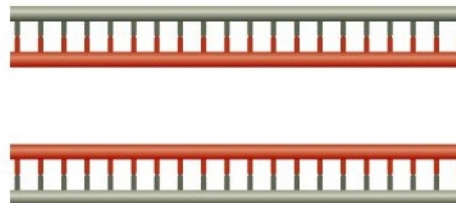
(A) Dispersive



Διασπαρτικό μοντέλο

Μητρική έλικα σπάει σε
θραύσματα, τα θραύσματα
αντιγράφονται και στη
συνέχεια συναρμολογούνται σε
δύο νέες έλικες.

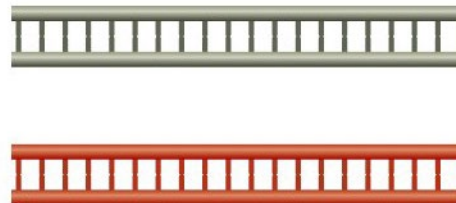
(B) Semiconservative



Ημισυντηρητικό μοντέλο

Θυγατρικά μόρια DNA
περιέχουν μία γονική
αλυσίδα και μια νέα.

(C) Conservative



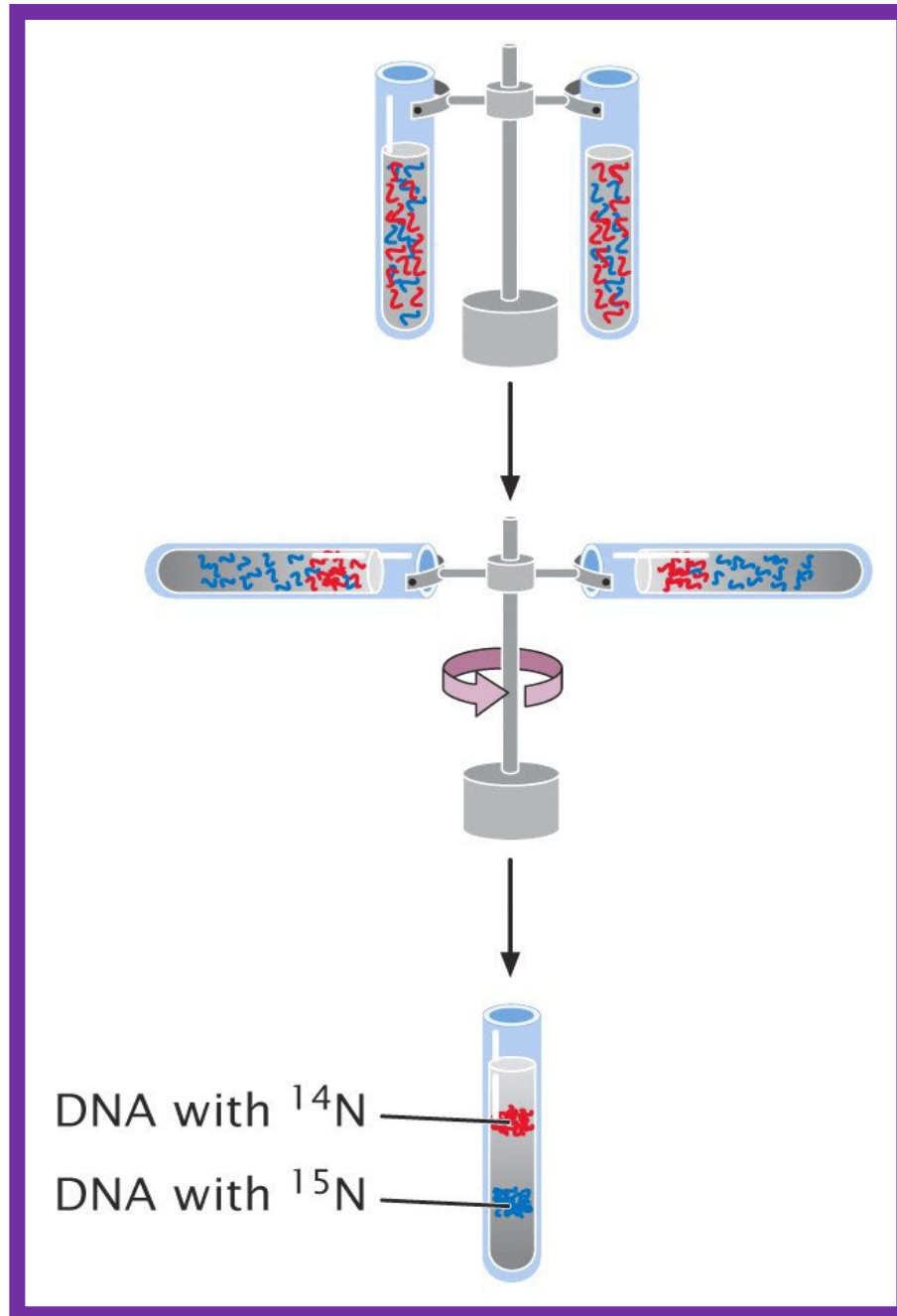
Συντηρητικό μοντέλο

Μητρική αλυσίδα μεταφέρει
πληροφορίες για ένα ενδιάμεσο
(?) που αντιγράφεται.
Η μητρική έλικα διατηρείται, η
θυγατρική
έλικα είναι εντελώς νέα.

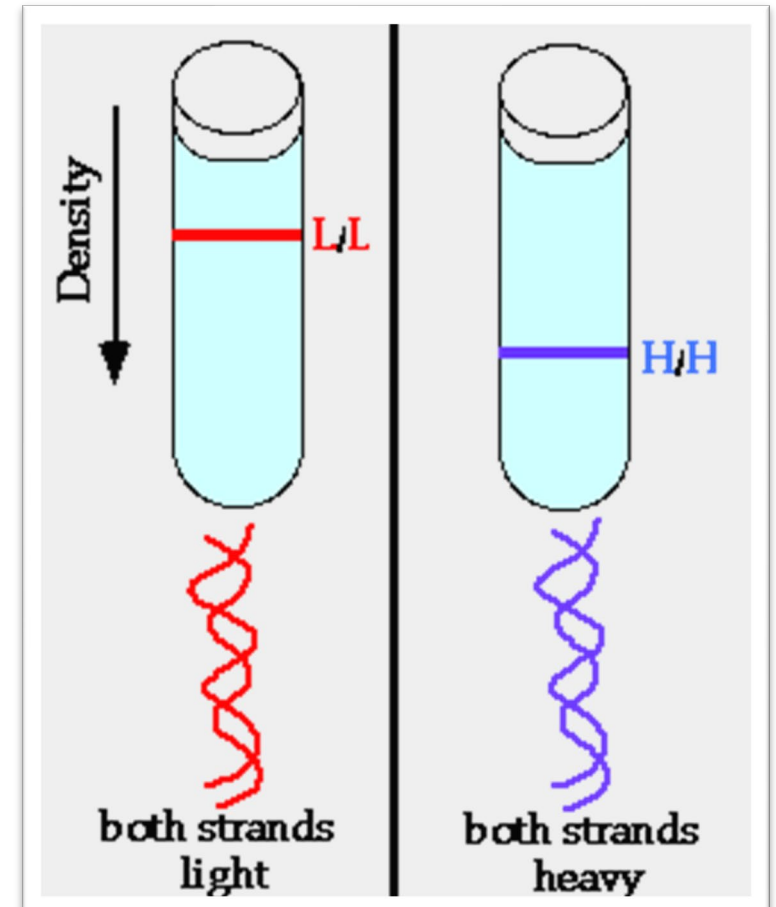
Πείραμα Meselson και Stahl

- ✓ Ήξεραν από τη δομή του DNA ότι περιείχε άζωτο.
- ✓ Ανέπτυξαν βακτήρια σε θρεπτικό που περιείχε μόνο **βαρύ άζωτο (15N)**
- ✓ Μετά από πολλές γενεές, όλο το DNA στα βακτήρια βαρύ και δεν περιείχε **άζωτο 14N**
- ✓ Χρησιμοποιήθηκε η δυνατότητα που προσφέρει η υπερφυγοκέντρωση, **σε βαθμίδωση πυκνότητας για διαχωρισμό ακόμη και πολύ παρόμοιων μορίων.**
- ✓ Κατά την υπερφυγοκέντρωση σε βαθμίδωση πυκνότητας χλωριούχου καισίου, μόρια DNA που διαφέρουν ως προς τον ατομικό αριθμό του αζώτου (N) που διαθέτουν, **μπορούν να κατανεμηθούν** σε διαφορετικές ζώνες στο σωλήνα της φυγοκέντρου.

Πείραμα Meselson και Stahl



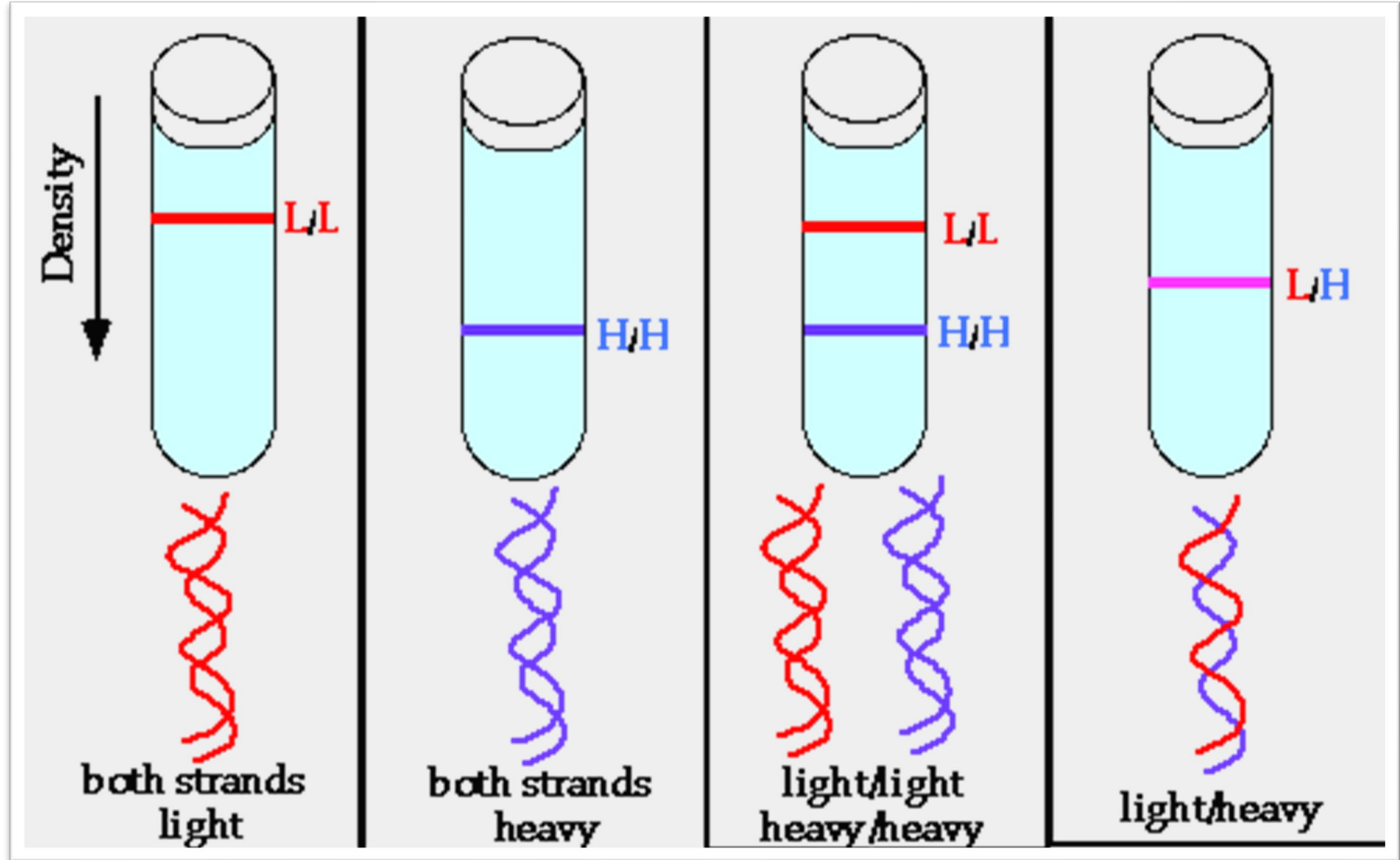
Ένα δίκλωνο μόριο DNA που έχει ενσωματώσει στις αζωτούχες βάσεις του το 'βαρύ' ισότοπο ^{15}N **κινείται πιο γρήγορα και σταματάει πιο χαμηλά στο σωλήνα της φυγοκέντρου από το DNA που διαθέτει ^{14}N**



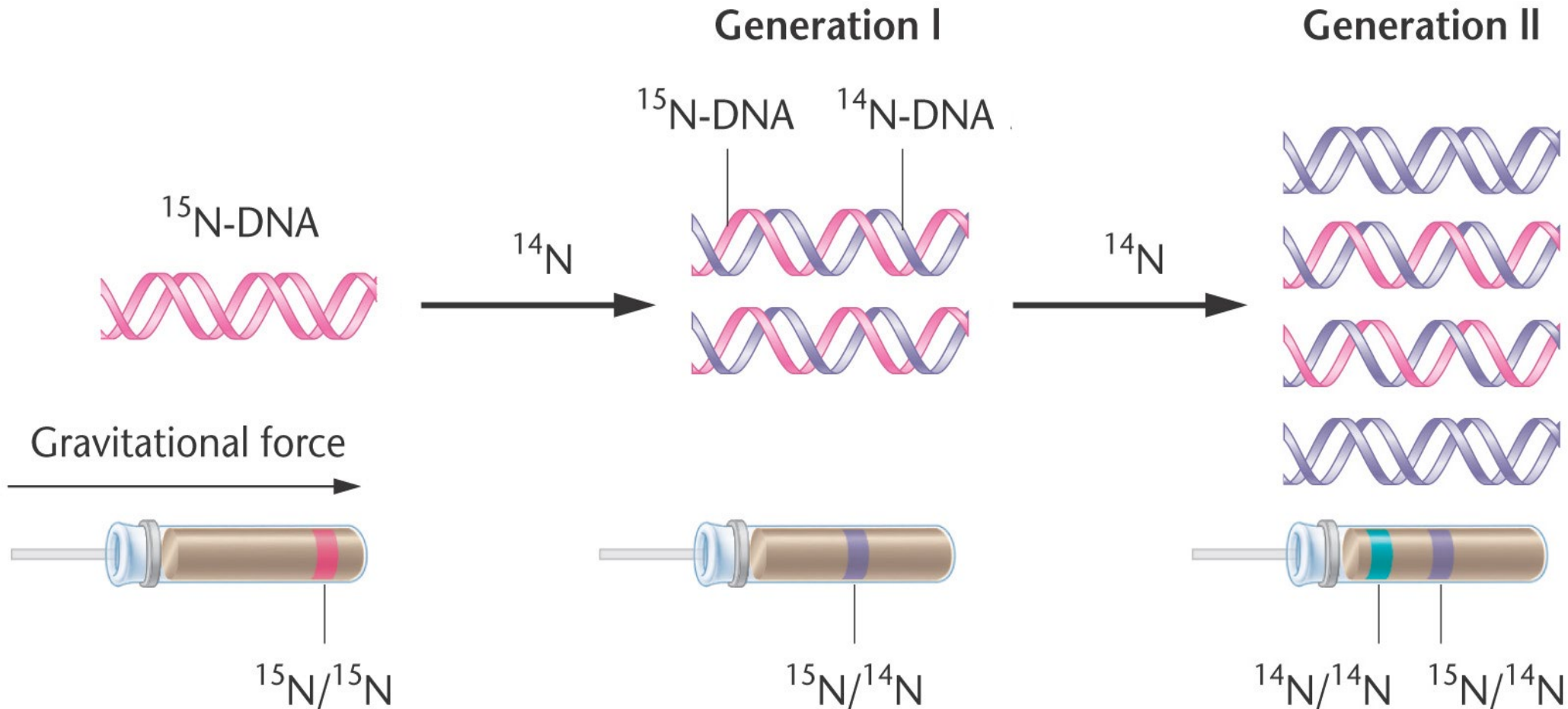
Πείραμα Meselson και Stahl

- ✓ Μετέφεραν έναν πληθυσμό βακτηρίων σε θρεπτικό υλικό που περιέχει **μόνο ^{14}N** , με τον τρόπο αυτό τα μόνα νουκλεοτίδια που ήταν διαθέσιμα στο DNA για την λειτουργία της αντιγραφής περιείχαν ^{14}N και με τον τρόπο αυτό η πυκνότητα του DNA που θα προέκυπτε θα μπορούσε να μετρηθεί.
- ✓ Η διαδικασία επαναλήφθηκε και για τις επόμενες γενεές.

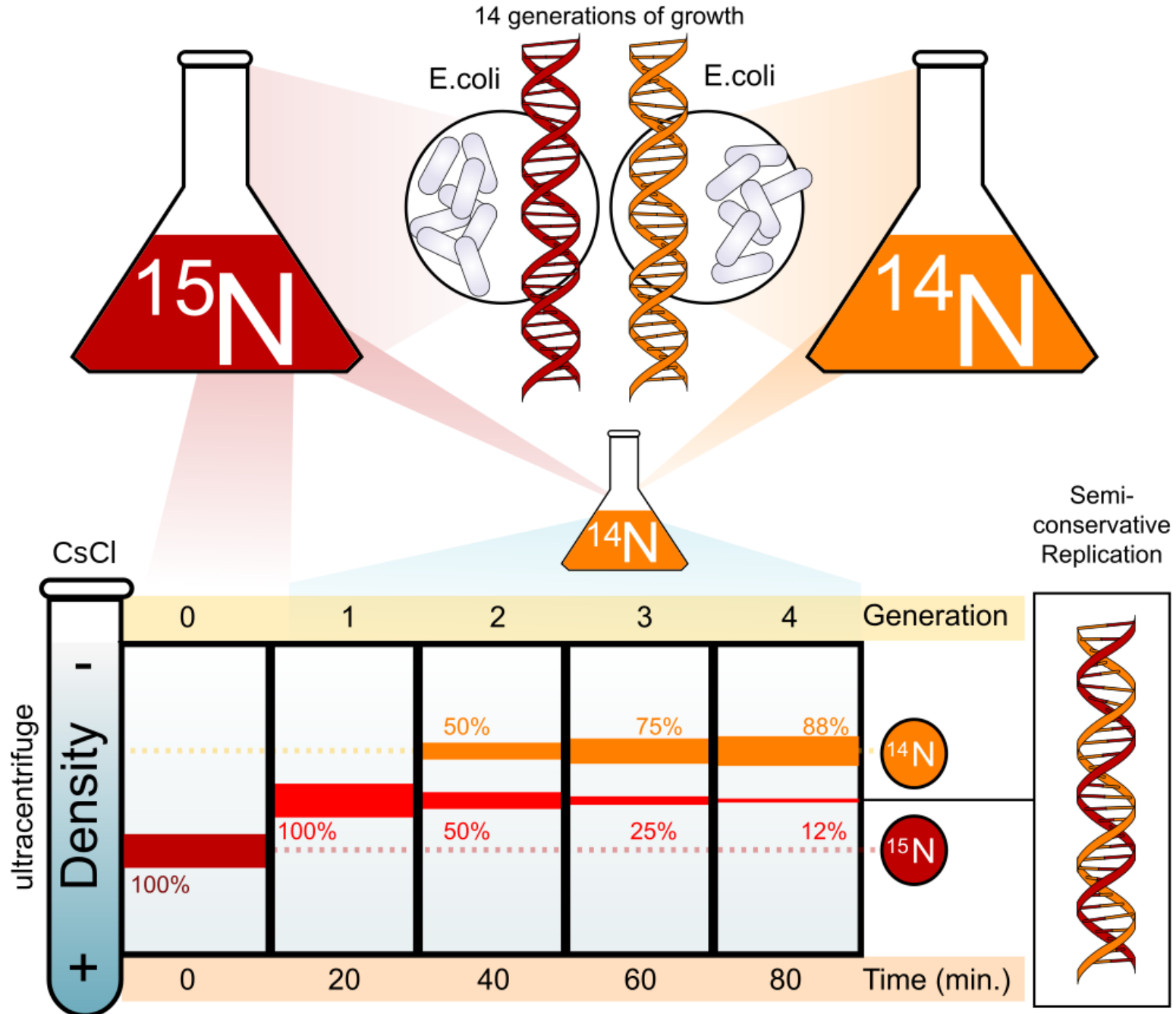
Πείραμα Meselson και Stahl



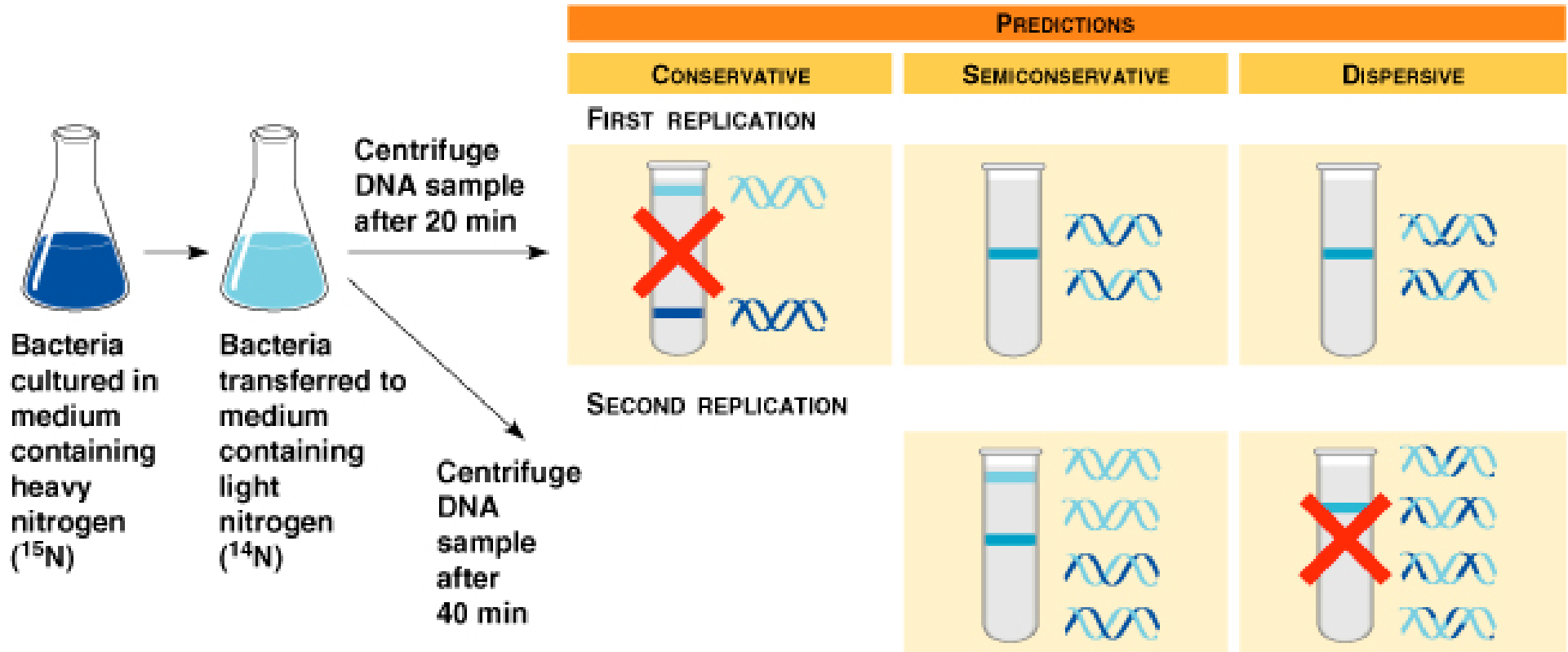
Πείραμα Meselson και Stahl



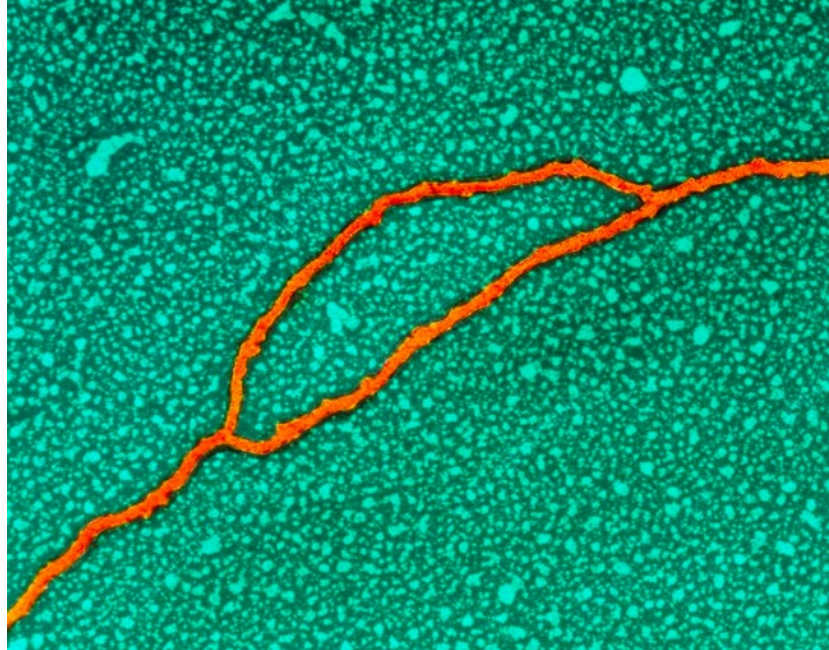
Πείραμα Meselson και Stahl



Πείραμα Meselson και Stahl



Η αντιγραφή του DNA



Ως αποτέλεσμα της ημισυντηρητικής αντιγραφής, **η νέα έλিকা θα αποτελείται από μια αρχική αλυσίδα DNA καθώς και από μια νεοσυντιθέμενη αλυσίδα.** Οι κυτταρικοί μηχανισμοί διόρθωσης και ελέγχου σφαλμάτων εξασφαλίζουν **σχεδόν τέλεια πιστότητα** για την αντιγραφή του DNA.

Η αντιγραφή του DNA

Η αντιγραφή του DNA χωρίζεται σε **τρία κύρια στάδια**:

1. Έναρξη (initiation)

- Το DNA αναγνωρίζεται σε συγκεκριμένες θέσεις έναρξης, οι οποίες ονομάζονται **origins of replication** (Ori).
- Το διπλό DNA ξετυλίγεται και δημιουργείται μια “**φούσκα αντιγραφής**” (**replication bubble**), σχηματίζονται οι **διχάλες αντιγραφής** (**replication forks**) προς τις δύο κατευθύνσεις.
- Προσδένονται οι πρώτες πρωτεΐνες και ένζυμα που θα ξεκινήσουν τη διαδικασία.

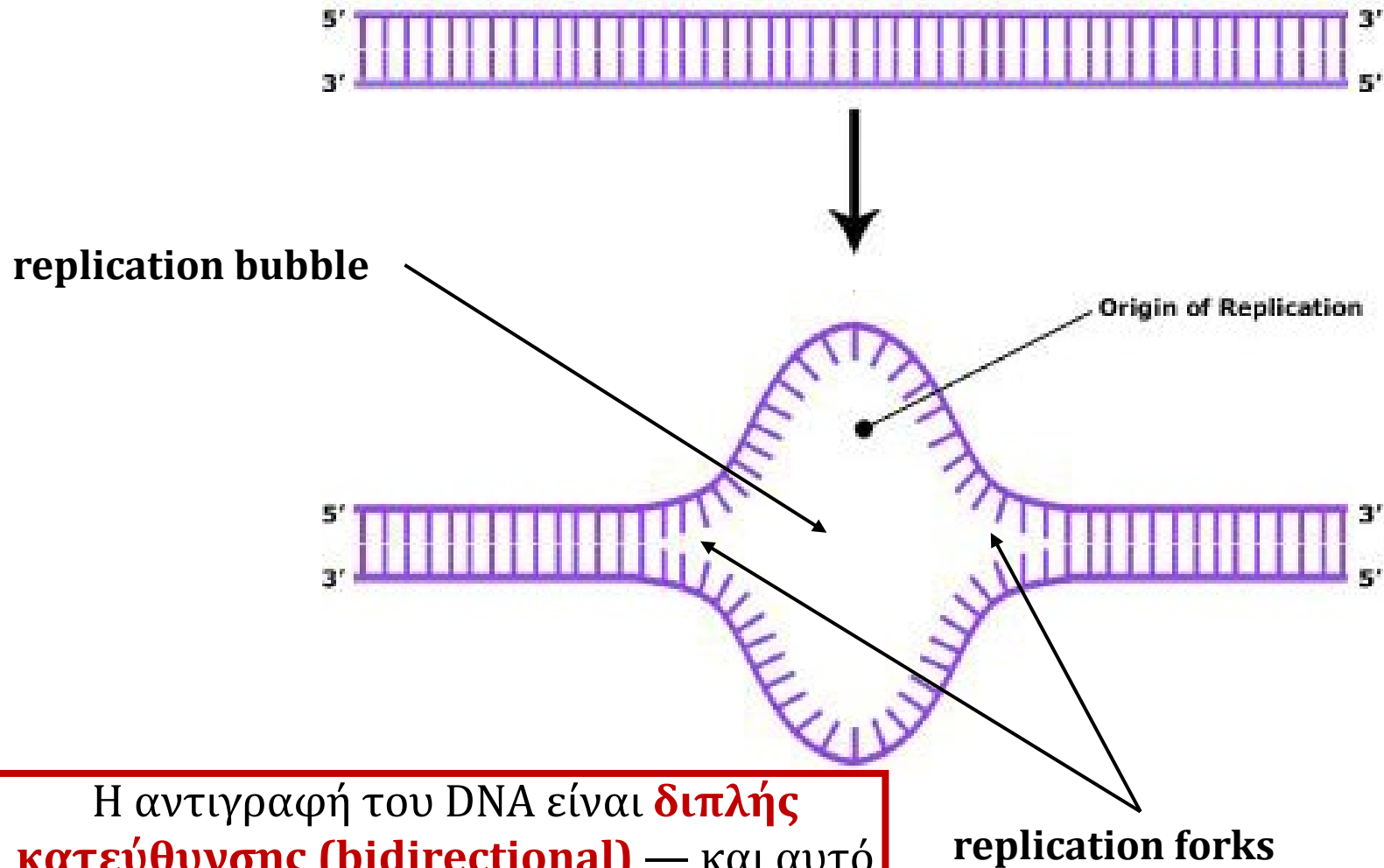
2. Επιμήκυνση (elongation)

- Είναι το κύριο στάδιο της αντιγραφής, όπου συντίθενται οι νέοι κλώνοι DNA.
- Οι DNA πολυμεράσες προσθέτουν **δεοξυριβονουκλεοτίδια** στη νέα αλυσίδα με βάση τη **συμπληρωματικότητα των βάσεων**.

3. Τερματισμός (termination)

- Δύο πλήρη, διπλά μόρια DNA, το καθένα με έναν παλαιό και έναν νέο κλώνο (ημισυντηρητικό μοντέλο).

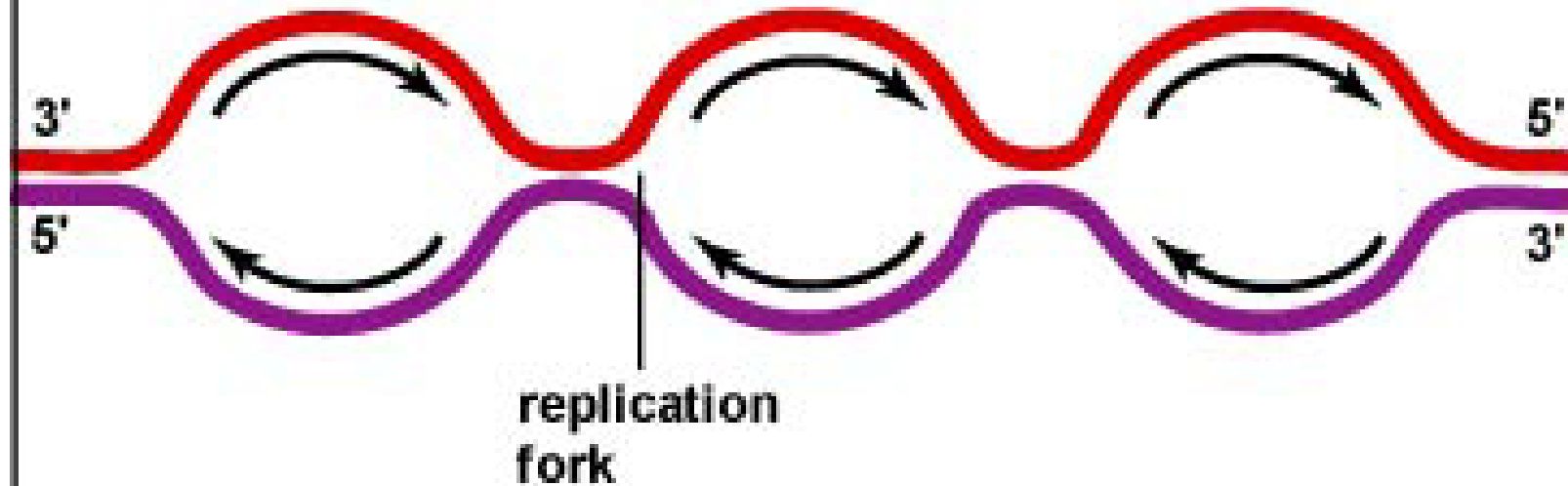
Η αντιγραφή του DNA



Η αντιγραφή του DNA είναι **διπλής κατεύθυνσης (bidirectional)** — και αυτό είναι **βασικό χαρακτηριστικό** της στους περισσότερους οργανισμούς, τόσο προκαρυωτικούς όσο και ευκαρυωτικούς

Η αντιγραφή του DNA

**Η ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ DNA ΓΙΝΕΤΑΙ ΜΕ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ
ΣΤΟ 3'-ΟΗ ΑΚΡΟ ΤΗΣ ΝΕΟΣΥΝΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΕΤΣΙ ΩΣΤΕ
Η ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΧΕΙ 5' ΠΡΟΣ 3' ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ.**



Η αντιγραφή του DNA



Σε ένα κύτταρο, η αντιγραφή του DNA **αρχίζει σε συγκεκριμένες και πολυάριθμες θέσεις** αντιγραφής στο γονιδίωμα.

Η εκτύλιξη του DNA στην αφετηρία και η σύνθεση νέων κλώνων, που διευκολύνεται από ένα ένζυμο γνωστό ως **ελικάση**, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διχαλών αντιγραφής αμφίδρομα από την αφετηρία.

Ορισμένες πρωτεΐνες συνδέονται με τη διχάλα αντιγραφής για να βοηθήσουν στην έναρξη και τη συνέχιση της σύνθεσης του DNA. Η DNA πολυμεράση συνθέτει τις νέες αλυσίδες προσθέτοντας νουκλεοτίδια που συμπληρώνουν κάθε αλυσίδα (πρότυπο).

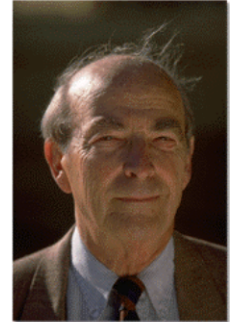
Η αντιγραφή του DNA

1955: Arthur Kornberg

Worked with *E. coli*.
Discovered the mechanisms of DNA synthesis.

Four components are required:

1. dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP
(deoxyribonucleoside 5'-triphosphates)
(sugar-base + 3 phosphates)
2. DNA template
3. DNA polymerase I (formerly the *Kornberg enzyme*)
(DNA polymerase II & III discovered soon after)
4. Mg^{2+} (optimizes DNA polymerase activity)

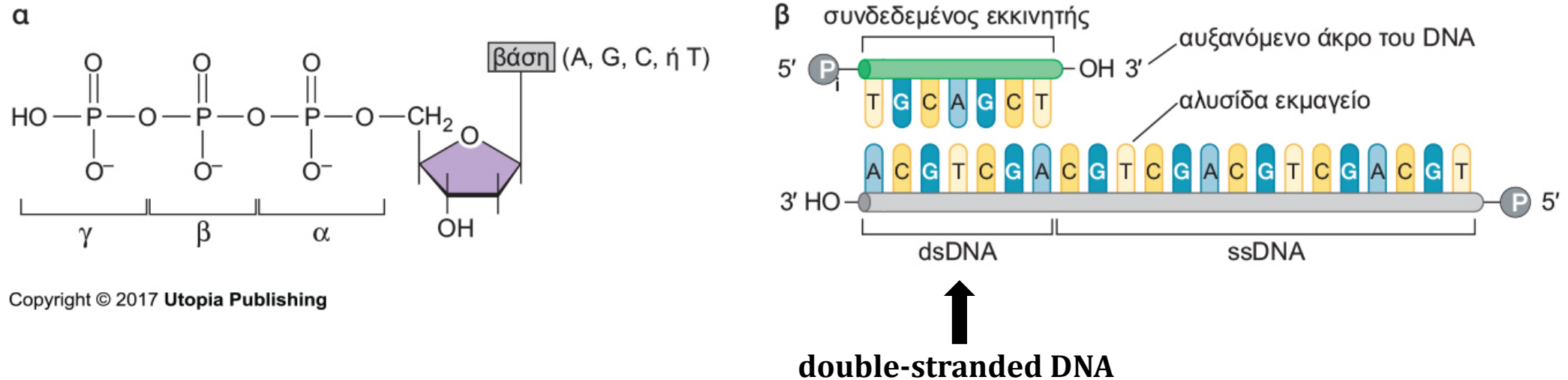


1959: Arthur Kornberg (Stanford University) & Severo Ochoa (NYU)

Arthur Kornberg, 1918–2007

Η χημεία της σύνθεσης του DNA

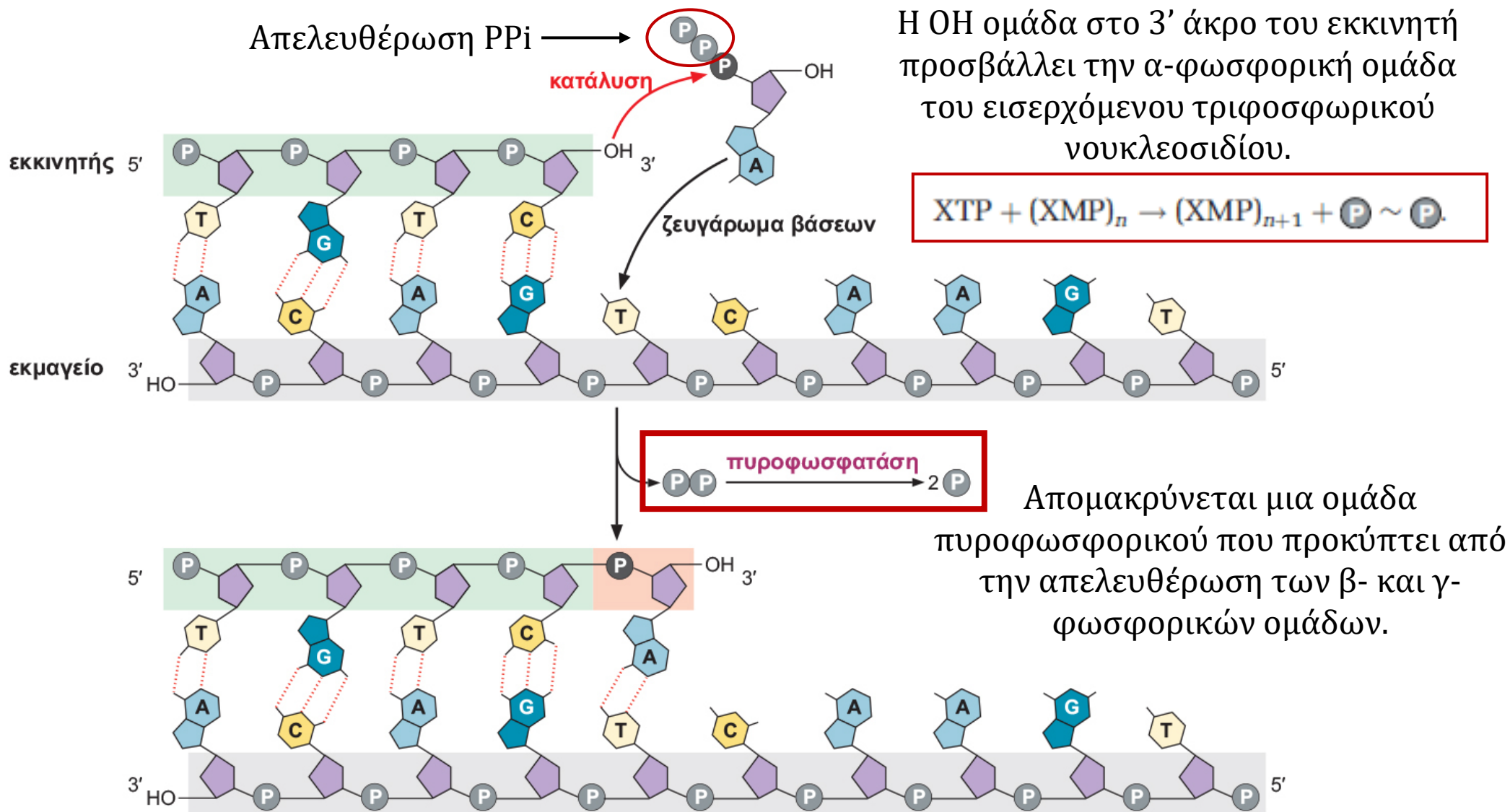
Η νέα σύνθεση απαιτεί τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοσίδια
dGTP, dCTP, dATP και dTTP



Copyright © 2017 Utopia Publishing

- Το εκμαγείο είναι μια αλληλουχία **ssDNA (single-stranded DNA)** που κατευθύνει την προσθήκη κάθε συμπληρωματικού dNTP.
- Ο **εκκινητής (primer)** είναι συμπληρωματικός, αλλά βραχύτερος από το εκμαγείο.
- Ο εκκινητής πρέπει να περιέχει ένα **εκτεθειμένο 3'-OH** παρακείμενο στην μονόκλωνη περιοχή του εκμαγείου.
- Το DNA συντίθεται με **επέκταση του 3' άκρου του εκκινητή** και με **κατεύθυνση 5' → 3'**.

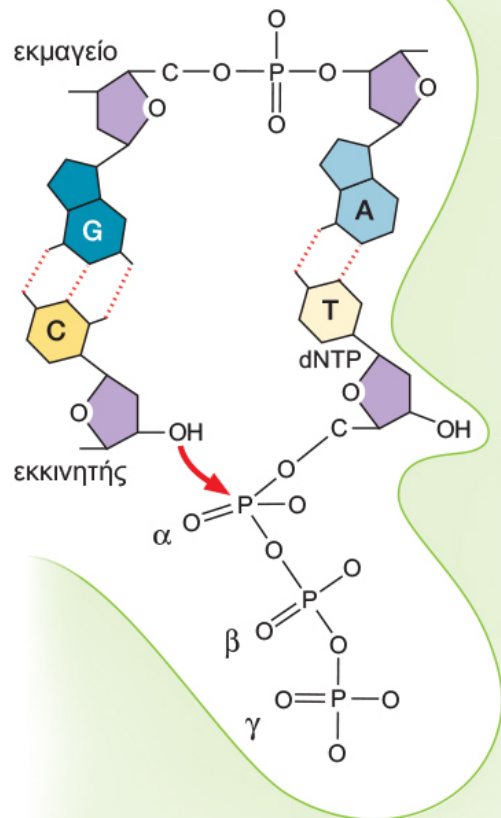
Η χημεία της σύνθεσης του DNA



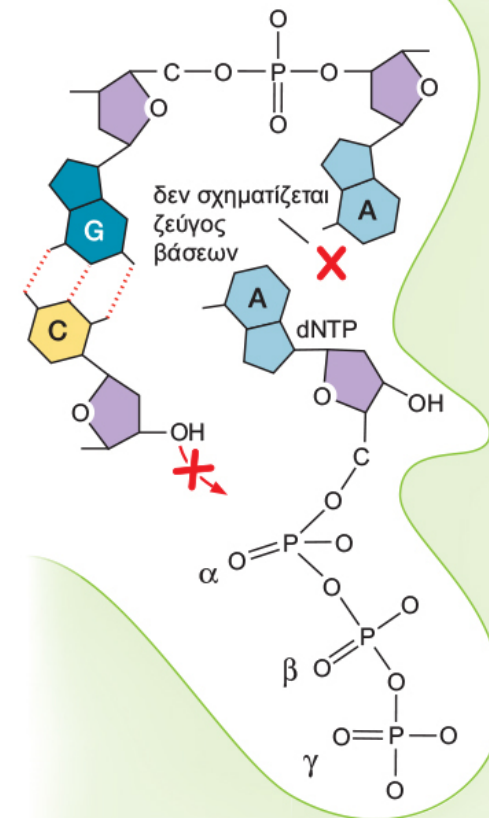
Ο μηχανισμός της DNA πολυμεράσης

- Η σύνθεση του DNA καταλύεται από μια τάξη ενζύμων που ονομάζονται **DNA πολυμεράσες (DNA polymerases)**.
- Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ένα **μονήρες ενεργό κέντρο** για καταλύει την προσθήκη κάθε dNTP.

α ορθό ζεύγος βάσεων



β λανθασμένο ζεύγος βάσεων

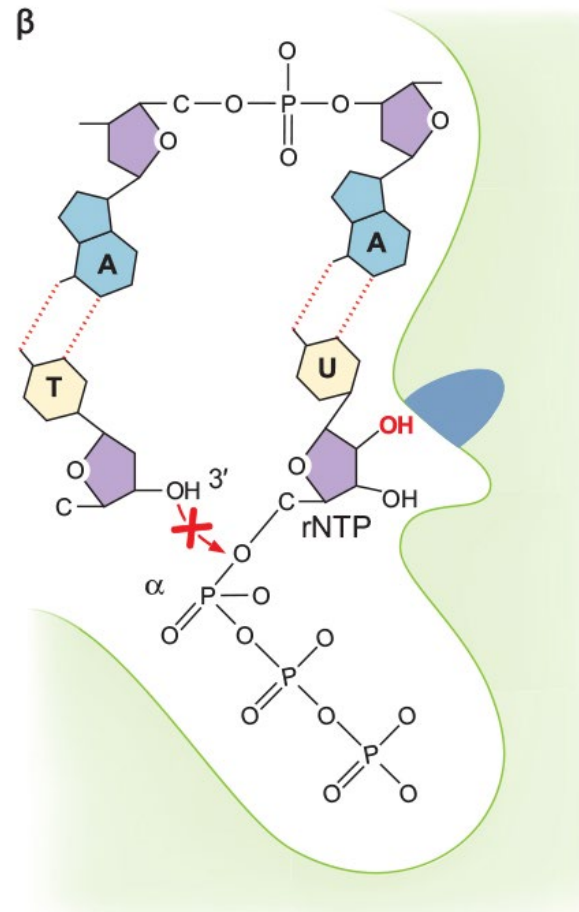
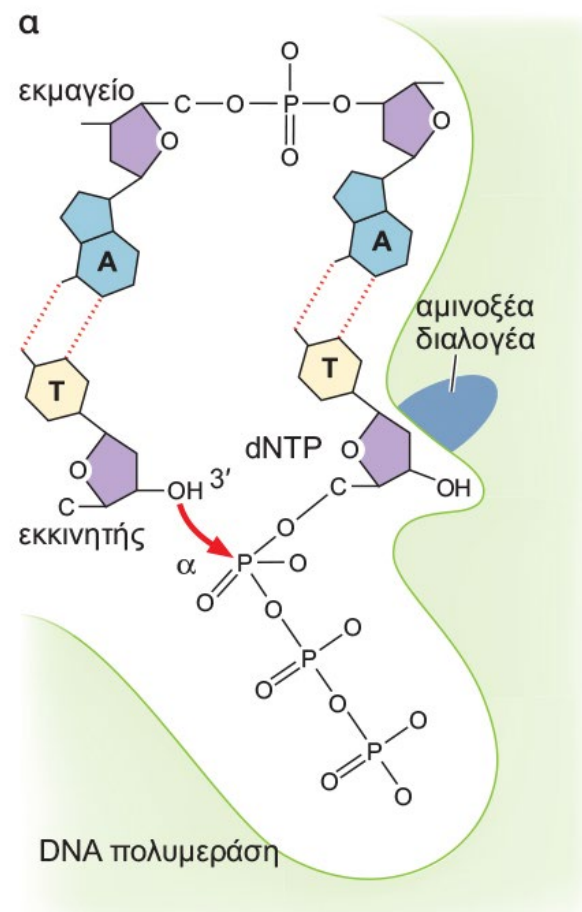


Το **λανθασμένο ζευγάρι βάσεων** οδηγεί σε **δραματικά χαμηλότερες ταχύτητες προσθήκης dNTPs** που προκύπτει από μη ευνοούμενη ευθυγράμμιση των υποστρωμάτων.

Η ταχύτητα ενσωμάτωσης ενός λανθασμένου νουκλεοτιδίου είναι έως και **10.000 φορές πιο αργή** έναντι της ταχύτητας στη σωστή ενσωμάτωση.

Ο μηχανισμός της DNA πολυμεράσης

- Οι DNA πολυμεράσες έχουν την ικανότητα να **διακρίνουν τα dNTP από τα rNTP**.
- Μολονότι τα **rNTPs** βρίσκονται στο κύτταρο σε περίπου 10 φορές υψηλότερη συγκέντρωση, ενσωματώνονται με περίπου **1000 φορές χαμηλότερη ταχύτητα**.



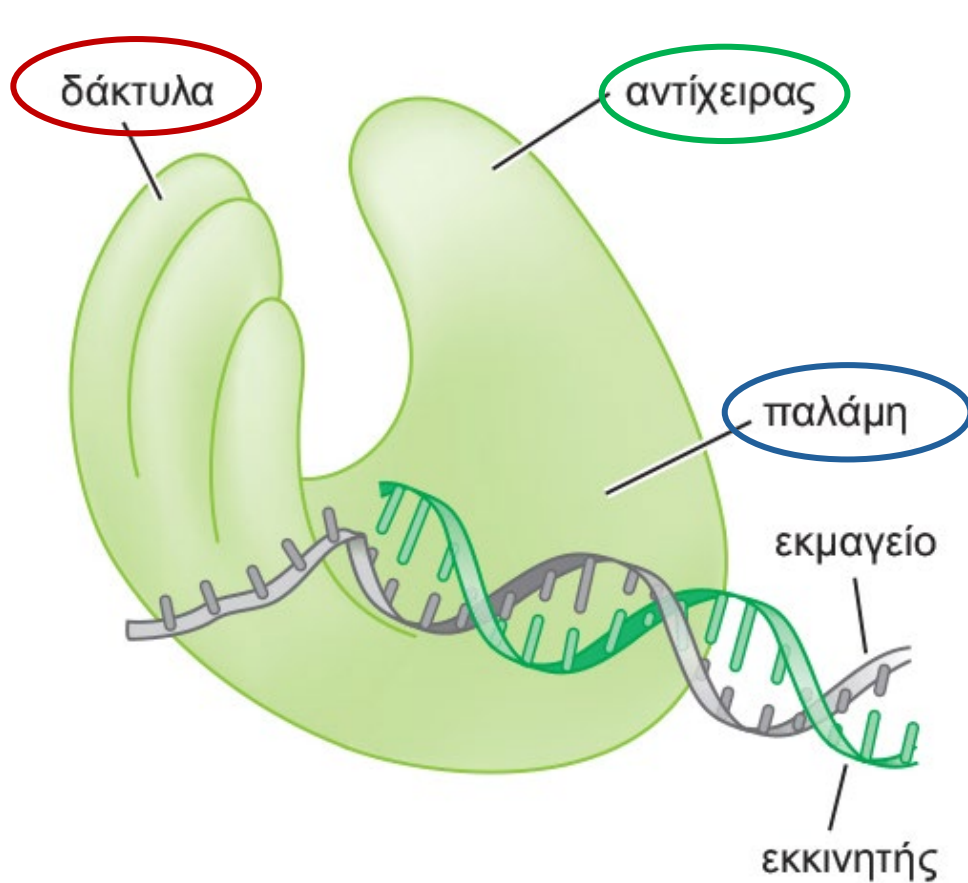
Η διάκριση διαμεσολαβείται από το στεreoχημικό αποκλεισμό των rNTP από το ενεργό κέντρο της DNA πολυμεράσης.

Στη DNA πολυμεράση, ο θύλακας δέσμευσης της νουκλεοτιδίου είναι πολύ μικρός για να επιτρέψει την παρουσία ενός 2'-OH στο εισερχόμενο νουκλεοτίδιο.

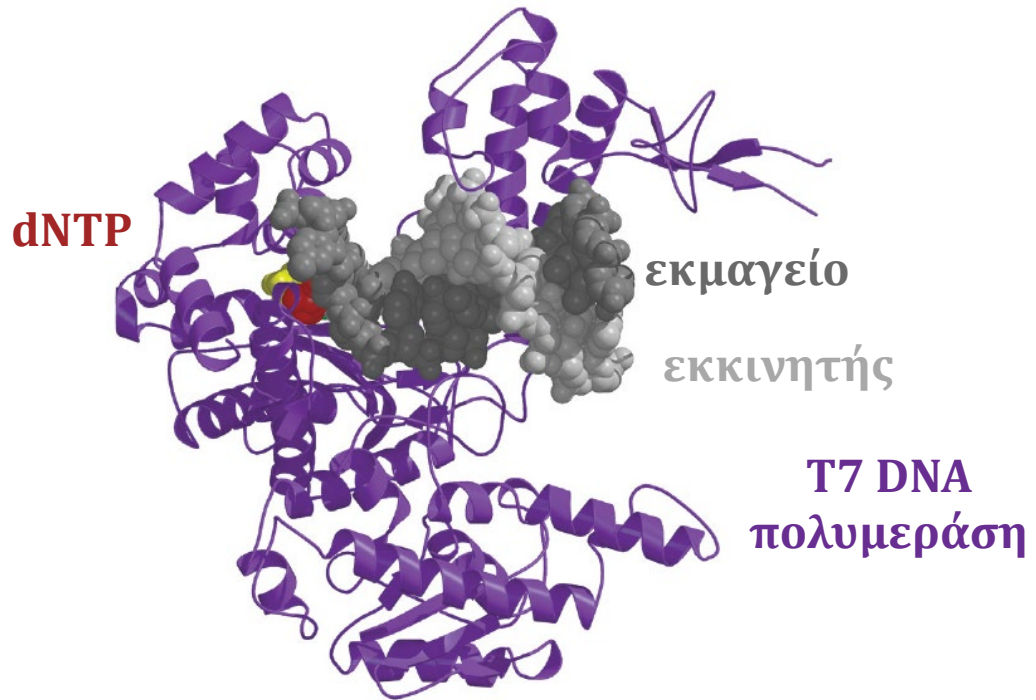
Ο χώρος αυτός καταλαμβάνεται από δύο αμινοξέα που αναπτύσσουν επαφές van der Waals με το δακτύλιο του σακχάρου.

Η α-φοσφορική ομάδα του dNTP είναι ανακριβώς ευθυγραμμισμένη με την 3'-OH ομάδα του εκκινητή, μειώνοντας δραματικά την ταχύτητα κατάλυσης.

Ο μηχανισμός της DNA πολυμεράσης

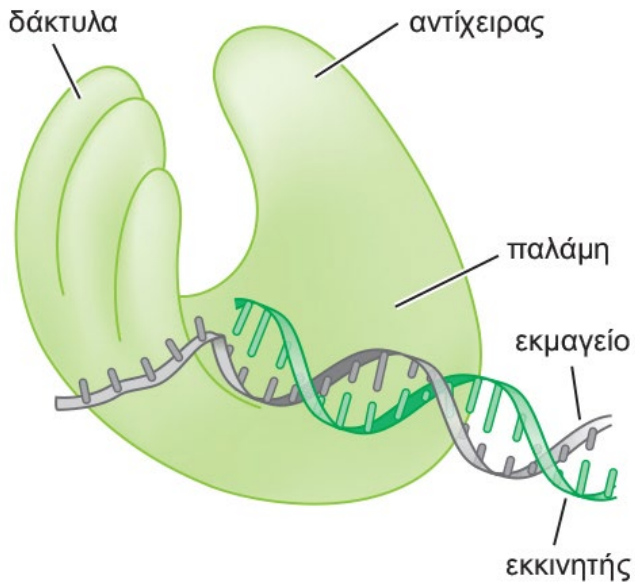


Copyright © 2017 Utopia Publishing



- Το DNA τοποθετείται κάθετα σε μια μεγάλη σχισμή που μοιάζει με ένα μερικώς κλειστό δεξί χέρι.
- Στη βάση της αναλογίας με το χέρι, οι τρεις επικράτειες (domains) της πολυμεράσης καλούνται **αντίχειρας**, **δάκτυλα** και **παλάμη**.

Ο μηχανισμός της DNA πολυμεράσης



Copyright © 2017 Utopia Publishing

Επικράτεια της παλάμης

- Αποτελείται από μια **β πτυχωτή επιφάνεια (β sheet)** και περιέχει τα κύρια στοιχεία του καταλυτικού κέντρου.
- Η περιοχή αυτή **δεσμεύει δύο δισθενή μεταλλικά ιόντα (Mg^{2+} ή Zn^{2+})**, τα οποία μεταβάλλουν το χημικό περιβάλλον γύρω από το σωστά ζευγαρωμένο dNTP και το 3'-OH του εκκινητή.
- Το **πρώτο μεταλλικό ιόν** μειώνει τη συγγένεια του 3'-OH για το υδρογόνο του και έτσι το κάνει πιο "επιθετικό" προς το φωσφορικό.

- Το **δεύτερο μεταλλικό ιόν** προσανατολίζει τα αρνητικά φορτία των β- και γ- φωσφορικών ομάδων του dNTP και **σταθεροποιεί το πυροφωσφορικό** που παράγεται από την ένωση του εκκινητή με το εισερχόμενο νουκλεοτίδιο.
- Παράλληλα η περιοχή αυτή «ελέγχει» την ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων που έχουν ενσωματωθεί πιο πρόσφατα. Δημιουργεί εκτεταμένες **επαφές μέσω δεσμών υδρογόνου με τα ζεύγη βάσεων στη μικρή αύλακα** του νεοσυντεθέντος DNA. Οι επαφές αυτές σχηματίζονται μόνο όταν υπάρχει απόλυτη συμπληρωματικότητα εκμαγείου-εκκινητή. Σε περίπτωση λαθών (**mismatched DNA**) εμποδίζονται οι επαφές και μειώνεται δραστικά η ταχύτητα κατάλυσης.
- Στις περιπτώσεις αυτές πραγματοποιείται απελευθέρωση της αλυσίδας εκκινητή από το ενεργό κέντρο του ενζύμου και η αλυσίδα υφίσταται μια δράση νουκλεάσης, η οποία απομακρύνει το λανθασμένα ζευγαρωμένο DNA.

Ο μηχανισμός της DNA πολυμεράσης

Επικράτεια της παλάμης

Η επικράτεια της παλάμης περιέχει **μοτίβα (motifs)**, δηλαδή μικρές, συντηρημένες ακολουθίες αμινοξέων, που επαναλαμβάνονται σε όλες σχεδόν τις DNA πολυμεράσες.

Motif A

- Τυπική ακολουθία: **DXXD** ή **DX₂D**, όπου D = Aspartate (ασπαρτικό οξύ).
- Το πρώτο Asp συνδέεται με ένα ιόν **Mg²⁺** και το δεύτερο με το δεύτερο ιόν **Mg²⁺**.
- Καταλύει τη σύνδεση του 3'-OH με το α-φωσφορικό του εισερχόμενου dNTP.

Motif B

- Λιγότερο συντηρημένο και βρίσκεται κοντά στην είσοδο του dNTP.
- Περιλαμβάνει αμινοξέα όπως **Y (Τυροσίνη)**, **G (Γλυκίνη)**, ή **K (Λυσίνη)**.
- Συμμετέχει στην **τοποθέτηση του εισερχόμενου νουκλεοτιδίου και στον έλεγχο της συμπληρωματικότητας**.
- Εξασφαλίζει ότι το σωστό dNTP είναι τοποθετημένο στη σωστή θέση πριν από την καταλυτική αντίδραση.

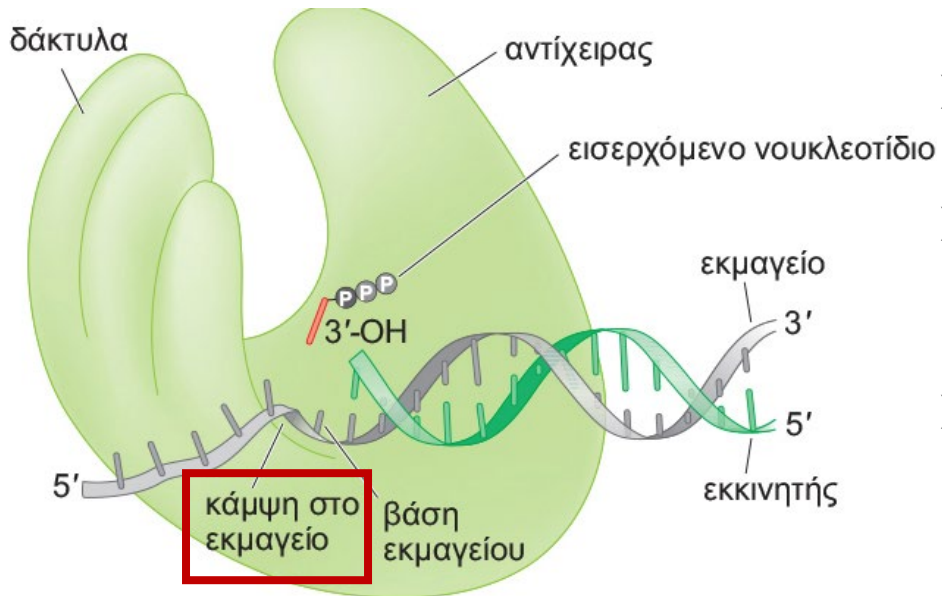
Motif C

- Συνήθως **HDE** ή **QHDE**, όπου το **Asp** είναι καταλυτικό.
- **Συντονίζει τα μεταλλικά ιόντα ή σταθεροποιεί το μεταβατικό στάδιο** της αντίδρασης.
- Συνεργάζεται στενά με το Motif A.
- Συμπληρώνει τη θέση δέσμευσης των μεταλλικών ιόντων και βοηθά στη σταθεροποίηση του ενεργού κέντρου.

Ο μηχανισμός της DNA πολυμεράσης

Επικράτεια δακτύλων

Περιλαμβάνει κυρίως **α-έλικες**, και μία χαρακτηριστική **επιμήκη έλικα** που ονομάζεται **O-helix** "κλείνει" πάνω από το ενεργό κέντρο όταν μπει το σωστό dNTP.



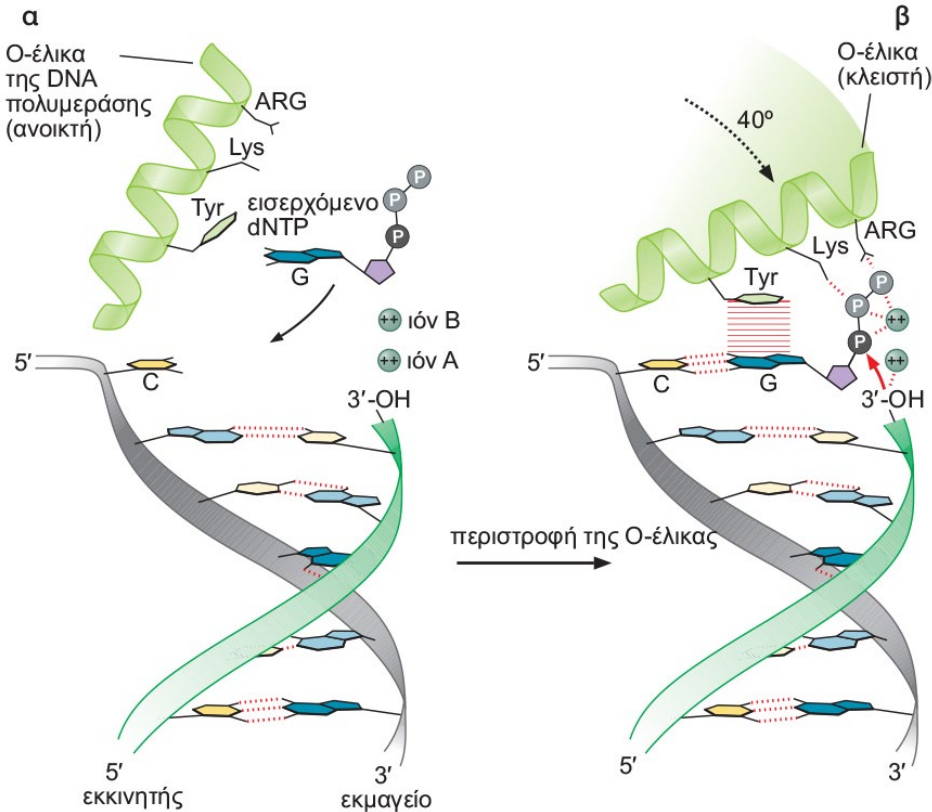
Copyright © 2017 Utopia Publishing

- Αρκετά αμινοξικά κατάλοιπα που εδράζονται στην επικράτεια αυτή δεσμεύουν το εισερχόμενο dNTP.
- Μόλις σχηματιστεί το σωστό ζεύγος βάσεων, η επικράτεια των δακτύλων μετακινείται για να εγκλείσει το dNTP.
- Η **κλειστή μορφή του χεριού της πολυμεράσης προάγει την κατάλυση** οδηγώντας το εισερχόμενο νουκλεοτίδιο σε στενή επαφή με τα καταλυτικά μεταλλικά ιόντα.

- Η επικράτεια δακτύλων ενώνεται με την περιοχή του εκμαγείου και οδηγεί σε μια στροφή σχεδόν 90° του φωσφοδιεστερικού σκελετού μεταξύ της πρώτης και δεύτερης βάσης του εκμαγείου.
- Η κάμψη αυτή εκθέτει μόνο την πρώτη βάση του εκμαγείου μετά τον εκκινητή στο καταλυτικό κέντρο και αποτρέπει οποιαδήποτε σύγχυση για το ποια βάση του εκμαγείου θα πρέπει να ζευγαρώσει με το νέο dNTP.

Ο μηχανισμός της DNA πολυμεράσης

Επικράτεια δακτύλων



- Στην ανοιχτή διαμόρφωση, η **O-έλικα (O-helix)** βρίσκεται σε απόσταση από το νέο dNTP.
- Όταν σχηματιστεί το σωστό ζεύγος βάσεων με το εκμαγείο DNA πραγματοποιείται μια **περιστροφή της O-έλικας κατά 40°** και η επικράτεια των δακτύλων «κλείνει».
- Στην κλειστή διαμόρφωση, αυτή η O-έλικα μετακινείται και δημιουργεί σημαντικές αλληλεπιδράσεις με το νέο dNTP.

Αλληλεπιδράσεις της επικράτειας των δακτύλων σε κλειστή διαμόρφωση

1. Ένα κατάλοιπο **τυροσίνης** αλληλεπιδρά με τη **βάση του dNTP**.
2. Δύο κατάλοιπα **λυσίνης** και **αργινίνης** συνδέονται με τη **β-** και **γ-** φωσφορική ομάδα, αντίστοιχα.

Upstream

Downstream

5'

3'

3'

5'

Downstream

Upstream



Ο μηχανισμός της DNA πολυμεράσης

Επικράτεια αντίχειρα

- Δεν εμπλέκεται στενά στην κατάλυση της επιμήκυνσης.
- Ο αντίχειρας **αλληλεπιδρά με το DNA**, το οποίο έχει συντεθεί πιο πρόσφατα.
- Διατηρεί τη σωστή θέση του εκκινητή και του ενεργού κέντρου.
- Βοηθά να διατηρηθεί μια ισχυρή ένωση μεταξύ της DNA πολυμεράσης και του υποστρώματός της.

Σύνοψη

- Το νέο dNTP ζευγαρώνει με την επόμενη διαθέσιμη βάση του εκμαγείου.
- Αυτή η αλληλεπίδραση προκαλεί τα «δάκτυλα» να κλείσουν γύρω από το ζευγαρωμένο dNTP.
- Η κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου τοποθετεί τα κρίσιμα μεταλλικά ιόντα σε θέση να καταλύσουν το σχηματισμό του επόμενου φωσφοδιεστερικού δεσμού.
- Η πρόσδεση του ζευγαρωμένου νουκλεοτιδίου στον εκκινητή οδηγεί εκ νέου στο άνοιγμα των δακτύλων και στη μετακίνηση της συμβολής εκκινητή:εκμαγείου κατά ένα ζεύγος βάσεων.
- Η πολυμεράση είναι τότε έτοιμη για τον επόμενο κύκλο προσθήκης.

Ο μηχανισμός της DNA πολυμεράσης

Η DNA πολυμεράση αλληλεπιδρά με το DNA με τρόπο που **δεν είναι ειδικός αλληλουχίας**.

Οι αλληλεπιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν:

- Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ **φωσφορικού σκελετού** και της **επικράτειας «αντίχειρα»**.
- Αλληλεπιδράσεις της **μικρής αύλακας** και της **επικράτειας «παλάμης»**.

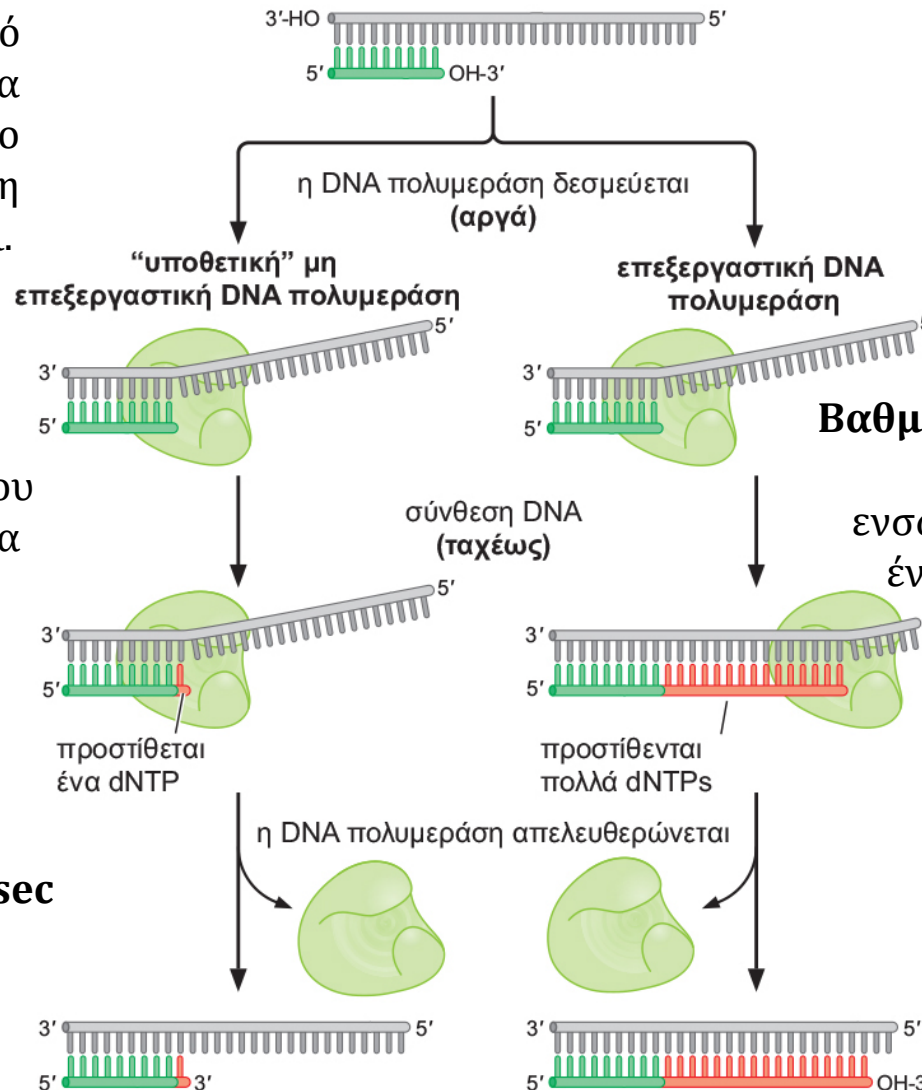
Κάθε φορά που προστίθεται ένα dNTP, το DNA απελευθερώνεται μερικώς από την πολυμεράση ως εξής:

- Οι δεσμοί υδρογόνου με τη μικρή αύλακα διασπώνται.
- Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με την επικράτεια «αντίχειρα» διατηρούνται.

Ο μηχανισμός της DNA πολυμεράσης

Οι DNA πολυμεράσες συνθέτουν DNA κατά επεξεργαστικό (processive) τρόπο

Το μη επεξεργαστικό ένζυμο προσθέτει ένα μονήρες dNTP στο 3' άκρο του εκκινητή και στη συνέχεια απελευθερώνεται.



Μια επεξεργαστική πολυμεράση προσθέτει πολλά dNTPs κάθε φορά που δεσμεύεται στο εκμαγείο.

Βαθμός επεξεργαστικής ικανότητας:
μέσος αριθμός dNTPs που ενσωματώνονται κάθε φορά που το ένζυμο προσδένεται σε συμβολή εκκινητή:εκμαγείο.

Ταχύτητα σύνθεσης έως και 1.000 φορές αυξημένη σε σχέση με το υποθετικό «μη επεξεργαστικό» μοντέλο.

Χρειάζεται ~1 sec προκειμένου το ένζυμο να εντοπίσει και να προσδεθεί σε μια συμβολή εκκινητή:εκμαγείου



Ταχύτητα σύνθεσης ~1bp/sec

Διορθωτικός έλεγχος - Proofreading

Ο διορθωτικός έλεγχος επιτρέπει τη διόρθωση λαθών που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA.

Διαμεσολαβείται από νουκλεάσες (nucleases).

Εξωνουκλεάσες (exonucleases): Αποικοδομούν μόνο από ένα άκρο του DNA.

Ενδονουκλεάσες (endonucleases): Κόβουν στο μέσο μιας αλυσίδας DNA.

Ενεργότητα εξωνουκλεάσης έχει ταυτοποιηθεί στο ίδιο πολυπεπτίδιο με την DNA πολυμεράση.

Η ενεργότητα εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης ονομάζεται **εξωνουκλεάση διορθωτικού ελέγχου (proofreading exonuclease)**.

Απομακρύνει το λάθος dNTP από το 3' άκρο της αλυσίδας του εκκινητή.

Δίνει μια δεύτερη ευκαιρία στη DNA πολυμεράση να προσθέσει το σωστό dNTP.

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

Διορθωτικός έλεγχος - Proofreading

Η DNA πολυμεράση εισάγει λάθος **1 ανά κάθε 10^5 dNTP**.

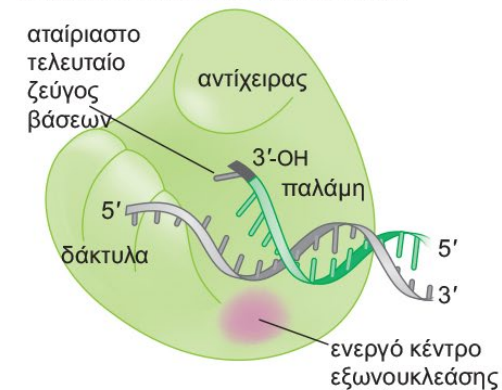
Η proofreading εξωνουκλεάση μειώνει τη συχνότητα λάθους σε **1 ανά κάθε 10^7 dNTPs**.

Ο πραγματικός ρυθμός μεταλλαγών σε ένα τυπικό κύτταρο είναι **1 λάθος ανά κάθε 10^{10} dNTPs**.

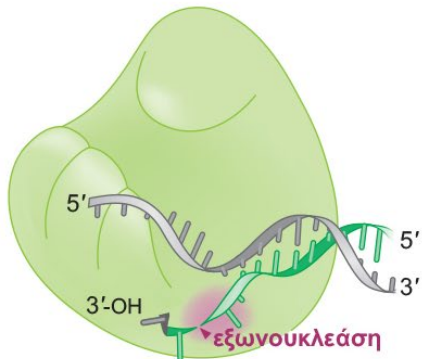
Αυτό το επιπλέον επίπεδο ακρίβειας παρέχεται από τη μετα-αντιγραφική διαδικασία επιδιόρθωσης αταίριαστων ζευγών με τη συμμετοχή επιπλέον πρωτεϊνών.

Διορθωτικός έλεγχος - Proofreading

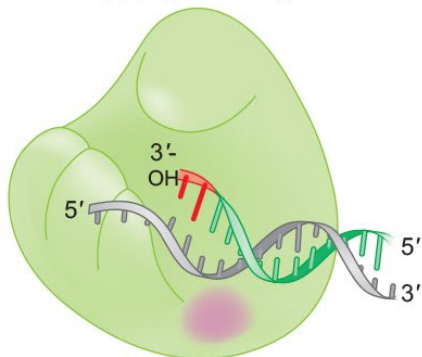
α βραδεία ή καθόλου σύνθεση DNA



β απομάκρυνση του (των) αταίριαστού (-ων) νουκλεοτιδίου (-ων)



γ επανέναρξη της σύνθεσης DNA



➤ Η πολυμεράση έχει μειωμένη ικανότητα να προσθέσει νέο dNTP δίπλα σε λάθος ζευγάρωμα, λόγω αλλαγής της γεωμετρίας του 3'-OH και του νέου dNTP εξαιτίας των ασθενών αλληλεπιδράσεων με την «παλάμη».

➤ **Αύξηση ενεργότητας εξωνουκλεάσης proofreading.** Κατά τη διάρκεια του διορθωτικού ελέγχου το DNA **δεν** απελευθερώνεται από το ένζυμο.

➤ Το αταίριαστο εκμαγείο δεσμεύεται από το ενεργό κέντρο της πολυμεράσης. Αντίθετα, το ενεργό κέντρο της εξωνουκλεάσης έχει 10 φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τα μονόκλωνα 3' άκρα.

➤ Το αζευγάρωτο 3' άκρο **μετακινείται** από το ενεργό κέντρο της πολυμεράσης στο ενεργό κέντρο της εξωνουκλεάσης.

➤ Η απομάκρυνση του dNTP επιτρέπει στη συμβολή εκκινητή:εκμαγείου να ανασχηματισθεί και να προσδεθεί εκ νέου στο ενεργό κέντρο της πολυμεράσης.

Η διχάλα αντιγραφής

Στο κύτταρο και οι δύο αλυσίδες του DNA αντιγράφονται **ταυτόχρονα**. Αυτό απαιτεί **διαχωρισμό των δύο αλυσίδων** για να δημιουργηθούν δύο εκμαγεία DNA.

Η συμβολή μεταξύ των νεοδιαχωρισμένων αλυσίδων του εκμαγείου και του μη αντιγραμμένου δίκλωνου DNA ονομάζεται **διχάλα αντιγραφής (replication fork)**.

Η διχάλα αντιγραφής κινείται πάντα προς τη περιοχή του μη αντιγραμμένου DNA, αφήνοντας πίσω της δύο εκμαγεία ssDNA που κατευθύνουν το σχηματισμό των δύο θυγατρικών αλυσίδων.

Η αντιγραφή του DNA

- ✓ Οι DNA πολυμεράσες απαιτούν έναν εκκινητή (primer) με ένα ελεύθερο 3'-OH.
- ✓ Δεν μπορούν να ξεκινήσουν μια νέα αλυσίδα *de novo*.

Πως αρχίζει η σύνθεση νέων αλυσίδων DNA;

- ✓ Το κύτταρο εκμεταλλεύεται την ικανότητα των **RNA πολυμερασών** να κάνουν αυτό που δεν μπορούν οι DNA πολυμεράσες: να ξεκινήσουν νέες RNA αλυσίδες *de novo*.
- ✓ Η **πριμάση (primase)** είναι μια εξειδικευμένη RNA πολυμεράση επιφορτισμένη με τη **δημιουργία μικρών RNA εκκινητών (primers)** μήκους ~5-10nt σε ένα εκμαγείο ssDNA.
- ✓ Οι εκκινητές αυτοί στη συνέχεια επεκτείνονται από την DNA πολυμεράση.
- ✓ Μολονότι οι DNA πολυμεράσες ενσωματώνουν μόνο dNTPs στο DNA, **μπορούν να εκκινήσουν τη σύνθεση είτε RNA είτε DNA εκκινητή.**

Και οι δύο αλυσίδες απαιτούν τη δράση της πριμάσης, ωστόσο η συχνότητα της λειτουργίας της στις δύο αλυσίδες είναι δραματικά διαφορετική.

Η μια αλυσίδα απαιτεί ένα μοναδικό RNA εκκινητή.

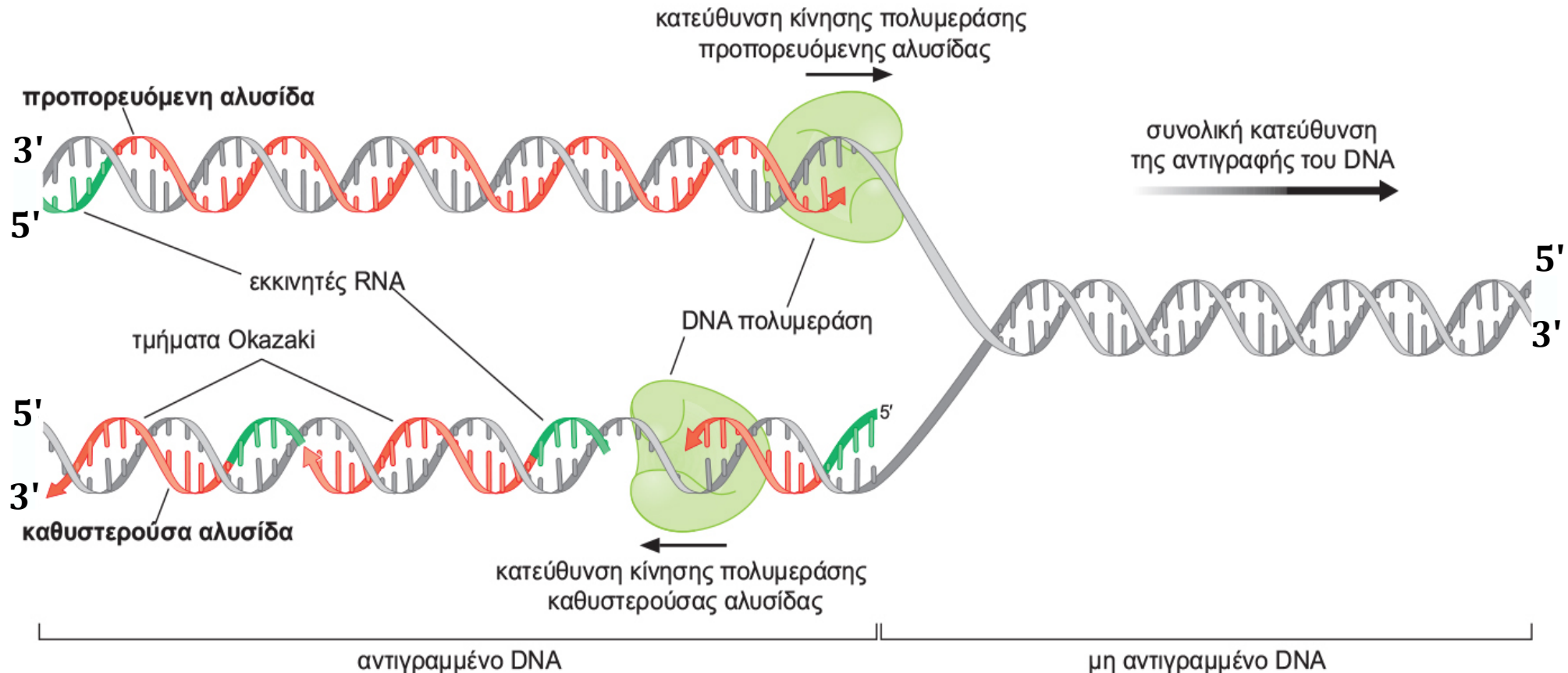
Η συμπληρωματική αλυσίδα απαιτεί νέους εκκινητές για κάθε τμήμα Okazaki.

Η διχάλα αντιγραφής

Η αντιπαράλληλη φύση το DNA δημιουργεί μια περιπλοκή για την ταυτόχρονη αντιγραφή.

Επειδή το DNA συντίθεται μόνο με επιμήκυνση ενός 3' άκρου, μόνο μια από τις δύο αλυσίδες μπορεί να αντιγραφεί κατά συνεχή τρόπο, όπως κινείται η διχάλα. Η αλυσίδα αυτή ονομάζεται **προπορευόμενη αλυσίδα (leading strand)** και συντίθεται με **συνεχή** τρόπο.

Στη δεύτερη αλυσίδα, η DNA πολυμεράση κινείται αντίθετα της διχάλας αντιγραφής. Η αλυσίδα αυτή ονομάζεται **καθυστερούσα αλυσίδα (lagging strand)** και συντίθεται με **ασυνεχή** τρόπο.

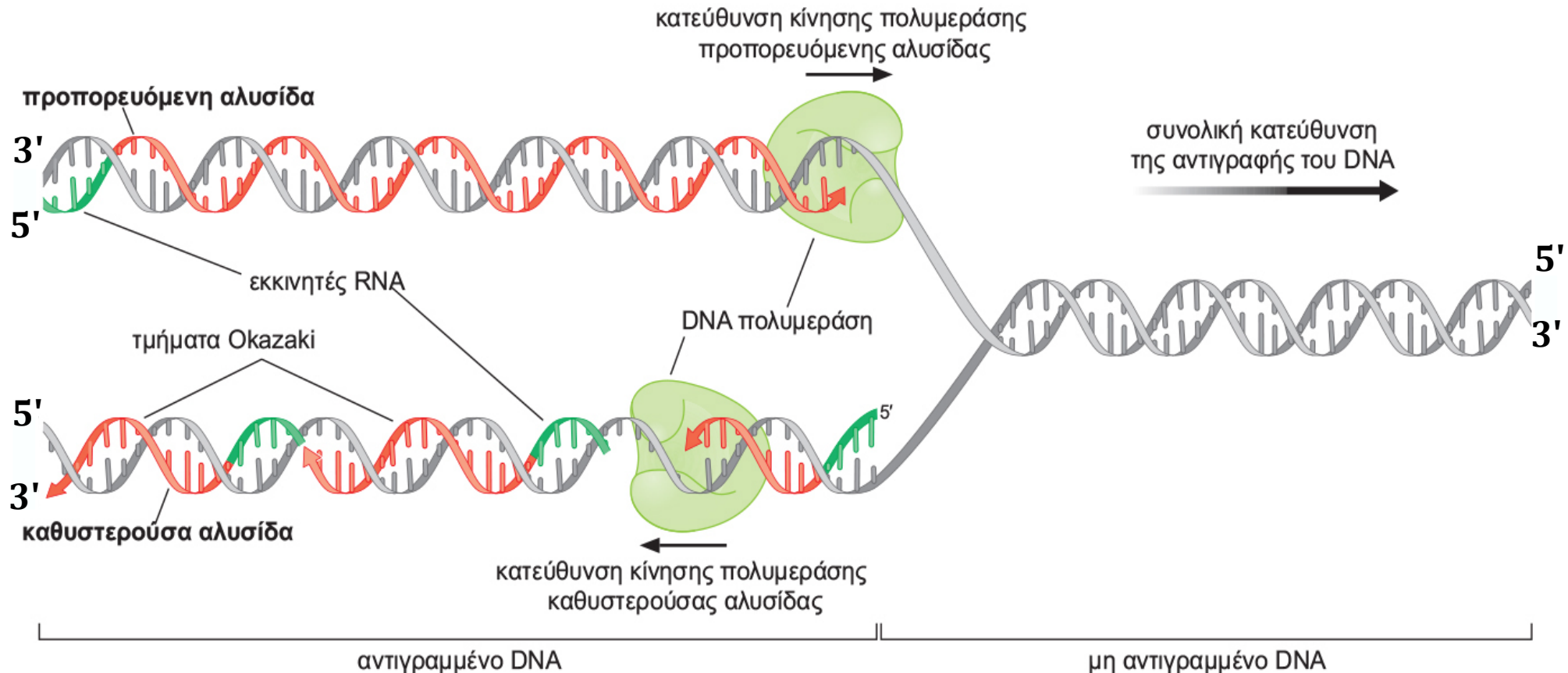


Η διχάλα αντιγραφής

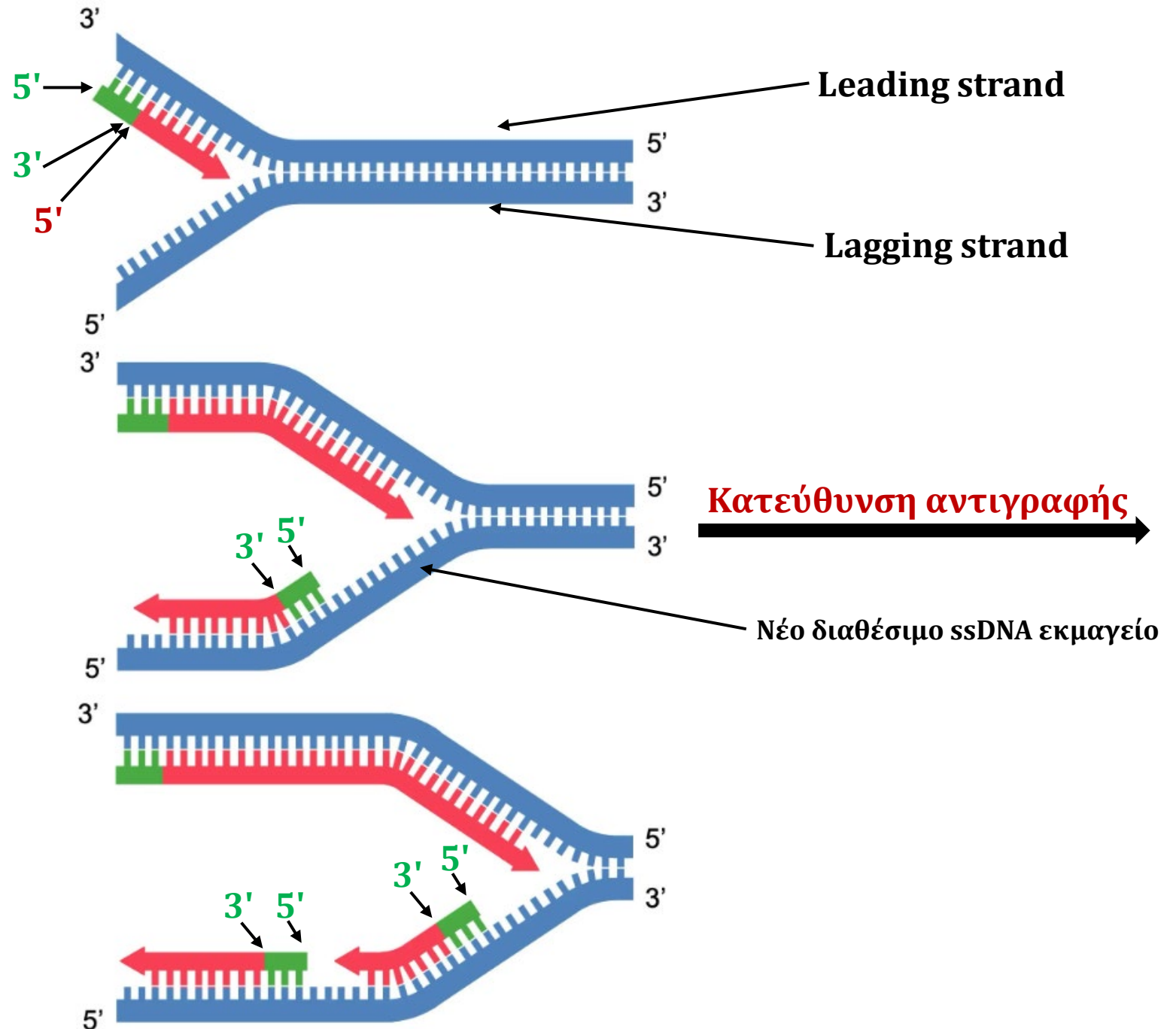
Η σύνθεση της **καθυστερούσας αλυσίδας** πρέπει να περιμένει την κίνηση της διχάλας αντιγραφής προκειμένου πρώτα να εκτεθεί ένα σημαντικό μέρος του εκμαγείου.

Η σύνθεση του DNA αρχίζει και συνεχίζεται μέχρις ότου προσεγγίσει το 5' άκρο του προηγούμενου νεοσυντηθέμενου τμήματος της καθυστερούσας αλυσίδας.

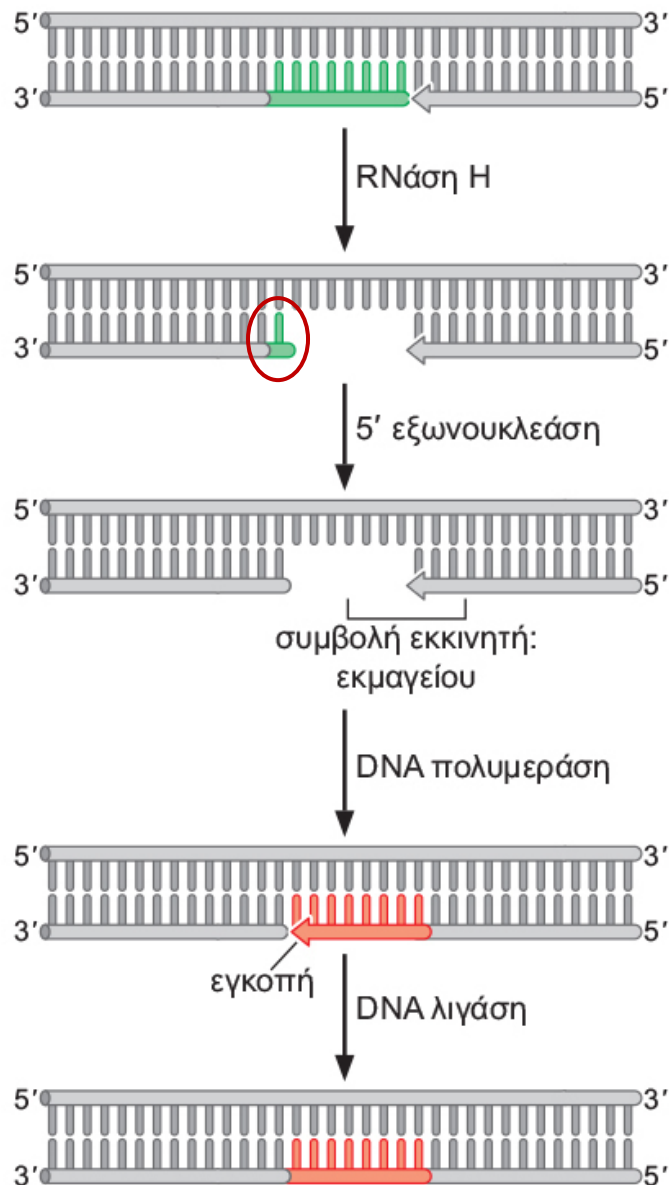
Τα προκύπτοντα μικρά τμήματα νέου DNA που σχηματίζονται στην καθυστερούσα αλυσίδα ονομάζονται **τμήματα Okazaki (Okazaki fragments)**.



Η διχάλα αντιγραφής



Απομάκρυνση των RNA εκκινητών

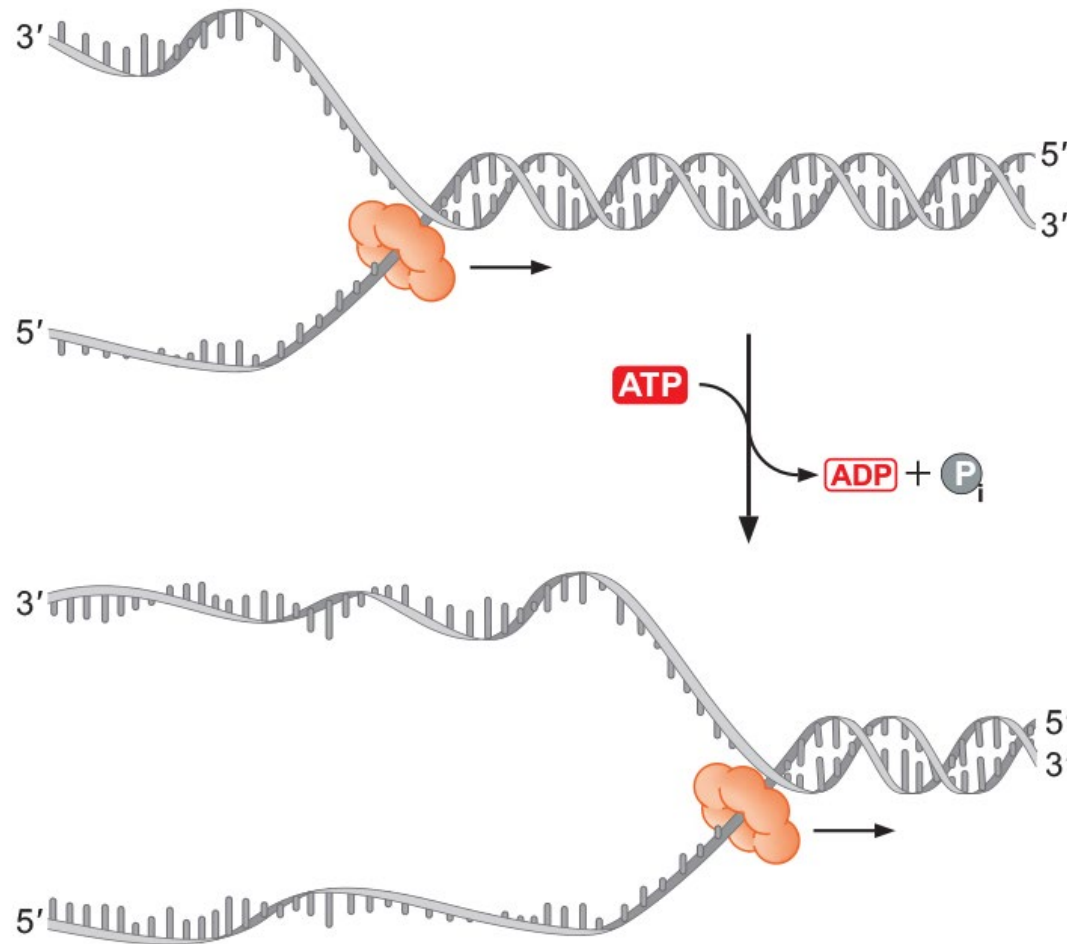


- ✓ Οι RNA εκκινητές πρέπει να απομακρυνθούν για να ολοκληρωθεί η αντιγραφή του DNA.
- ✓ Το ένζυμο **RNάση H (Rnase H)** αναγνωρίζει και απομακρύνει το μεγαλύτερο μέρος κάθε RNA εκκινητή. Αποικοδομεί ειδικά το RNA που είναι ζευγαρωμένο με το DNA (**υβρίδιο DNA:RNA**).
- ✓ Το rNTP που είναι άμεσα συνδεδεμένο με το DNA δεν αφαιρείται από την RNάση H, αλλά από μια **5' εξωνουκλεάση**.
- ✓ Η απομάκρυνση του RNA εκκινητή αφήνει ένα «κενό» στο DNA που λειτουργεί ως υπόστρωμα για την **DNA πολυμεράση**.
- ✓ Η πολυμεράση συμπληρώνει το κενό με dNTPs, ωστόσο μένει ένα «ρήγμα» στο σκελετό μεταξύ 3'-OH και της 5' φωσφορικής ομάδας.
- ✓ Αυτή η «εγκοπή» (nick) επιδιορθώνεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται **DNA λιγάση (DNA ligase)**.

Μόνο όταν όλοι οι RNA εκκινητές έχουν αντικατασταθεί από DNA και οι «εγκοπές» έχουν σφραγιστεί, τότε έχει ολοκληρωθεί η αντιγραφή του DNA.

Η διχάλα της αντιγραφής

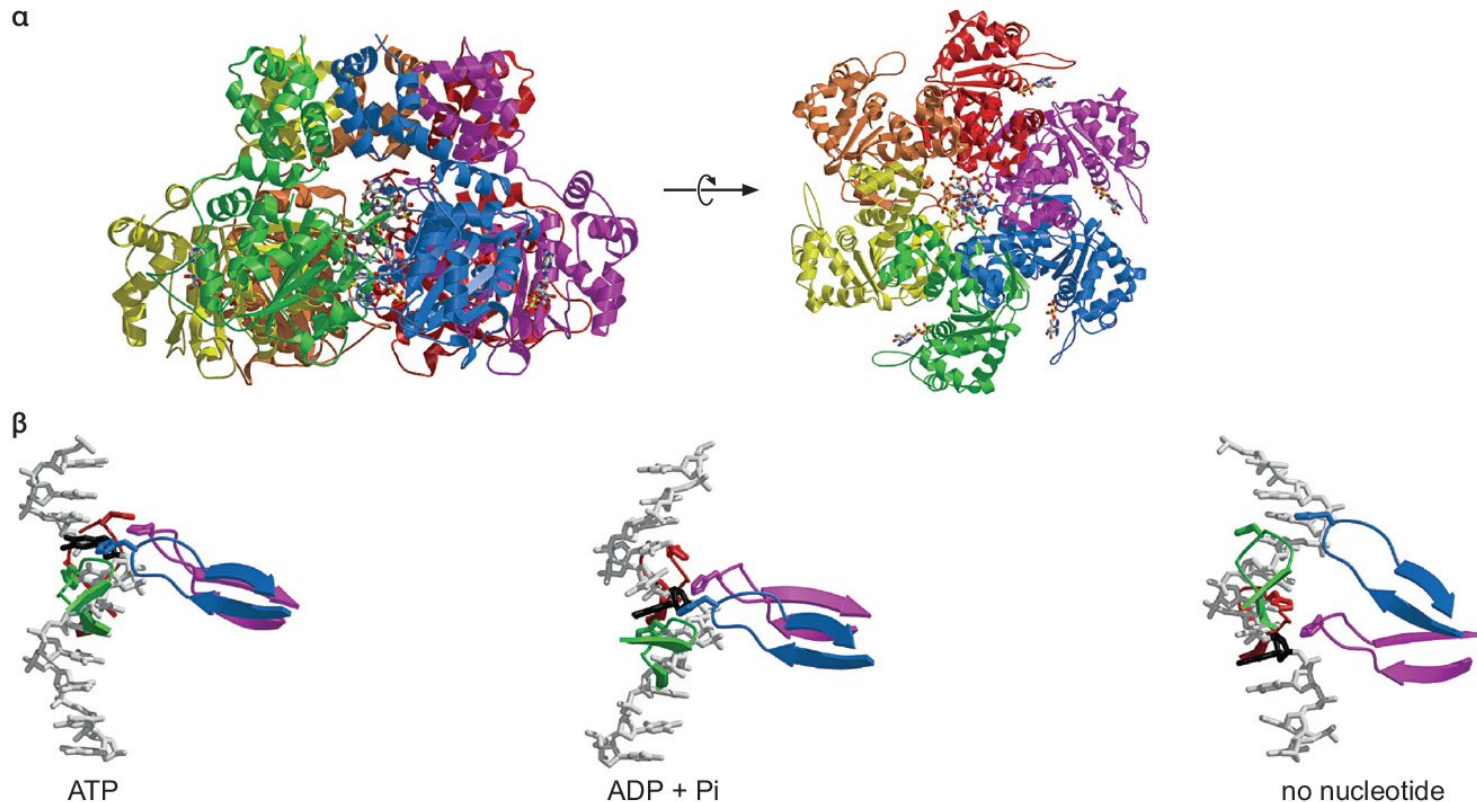
- ✓ Στις διχάλες αντιγραφής, οι **DNA ελικάσες (DNA helicases)** καταλύουν το διαχωρισμό των δύο αλυσίδων του δίκλωνου DNA.
- ✓ Είναι **εξαμερείς πρωτεΐνες** που παίρνουν το σχήμα ενός **δακτυλίου**. Προσδένονται στη μια εκ των δύο αλυσίδων στη διχάλα αντιγραφής.



- ✓ **Δρουν επεξεργαστικά.** Προσδένονται και κινούνται προσανατολισμένα κατά μήκος του ssDNA χρησιμοποιώντας ενέργεια από την υδρόλυση του ATP.
- ✓ Κάθε DNA ελικάση κινείται κατά μήκος του ssDNA με καθορισμένη κατεύθυνση, ένα χαρακτηριστικό που ονομάζεται **πολικότητα (polarity)**.
- ✓ Οι DNA ελικάσες **μπορούν να έχουν πολικότητα είτε 3'→5', είτε 5'→3'.** Η κατεύθυνση ορίζεται πάντα από την αλυσίδα που δεσμεύεται από την ελικάση.

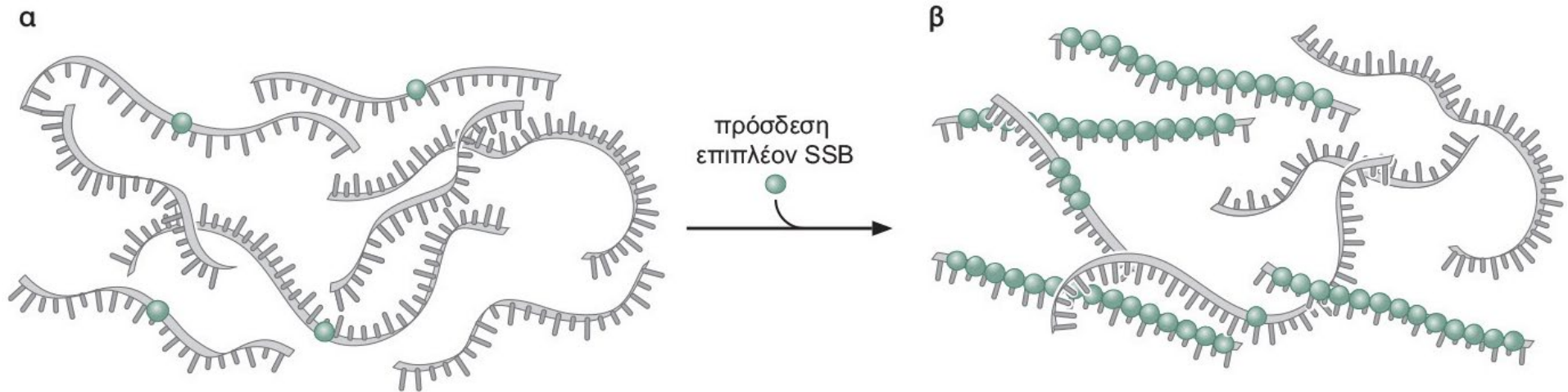
Η DNA ελικάση

- ✓ Κάθε υπομονάδα έχει ένα **πρωτεϊνικό βρόχο τύπου «φουρκέτας»**, η οποία δεσμεύεται σε μια φωσφορική ομάδα του σκελετού του DNA και τις δύο παρακείμενες του ριβόζες.
- ✓ Η συντονισμένη κίνηση αυτών των πρωτεϊνικών φουρκετών μπορεί να τραβήξει το ssDNA μέσω του κεντρικού πόρου της ελικάσης.



Η αντιγραφή του DNA

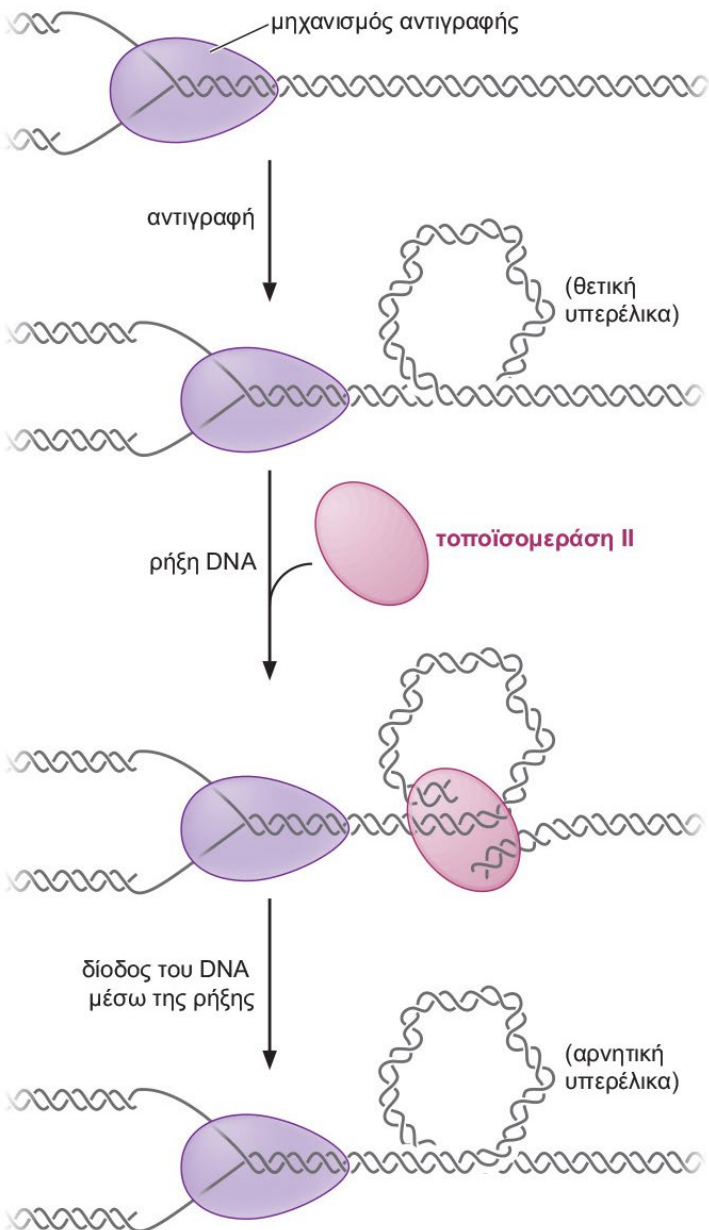
- ✓ Για να σταθεροποιηθούν οι διαχωρισμένες αλυσίδες, οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε ssDNA (**single-stranded binding proteins, SSBs**) προσδένονται με μεγάλη ταχύτητα στις διαχωρισμένες αλυσίδες.



Copyright © 2017 Utopia Publishing

- ✓ Πραγματοποιείται **συνεργατική δέσμευση (cooperative binding)**, καθώς η δέσμευση μιας SSB προάγει τη δέσμευση μιας άλλης SSB και τελικά μόρια SSB που έχουν δεσμευτεί σε παρακείμενες περιοχές του DNA δεσμεύονται και μεταξύ τους.
- ✓ Οι SSBs διατηρούν το ssDNA σε επιμήκη κατάσταση, η οποία διευκολύνει τη χρήση του ως υπόστρωμα για τη σύνθεση των RNA εκκινητών.
- ✓ Οι SSBs προσδένονται στο DNA με τρόπο ανεξάρτητο της αλληλουχίας.
- ✓ Σχηματίζουν λίγους, αν όχι καθόλου, δεσμούς υδρογόνου με τις βάσεις του ssDNA.

Η αντιγραφή του DNA

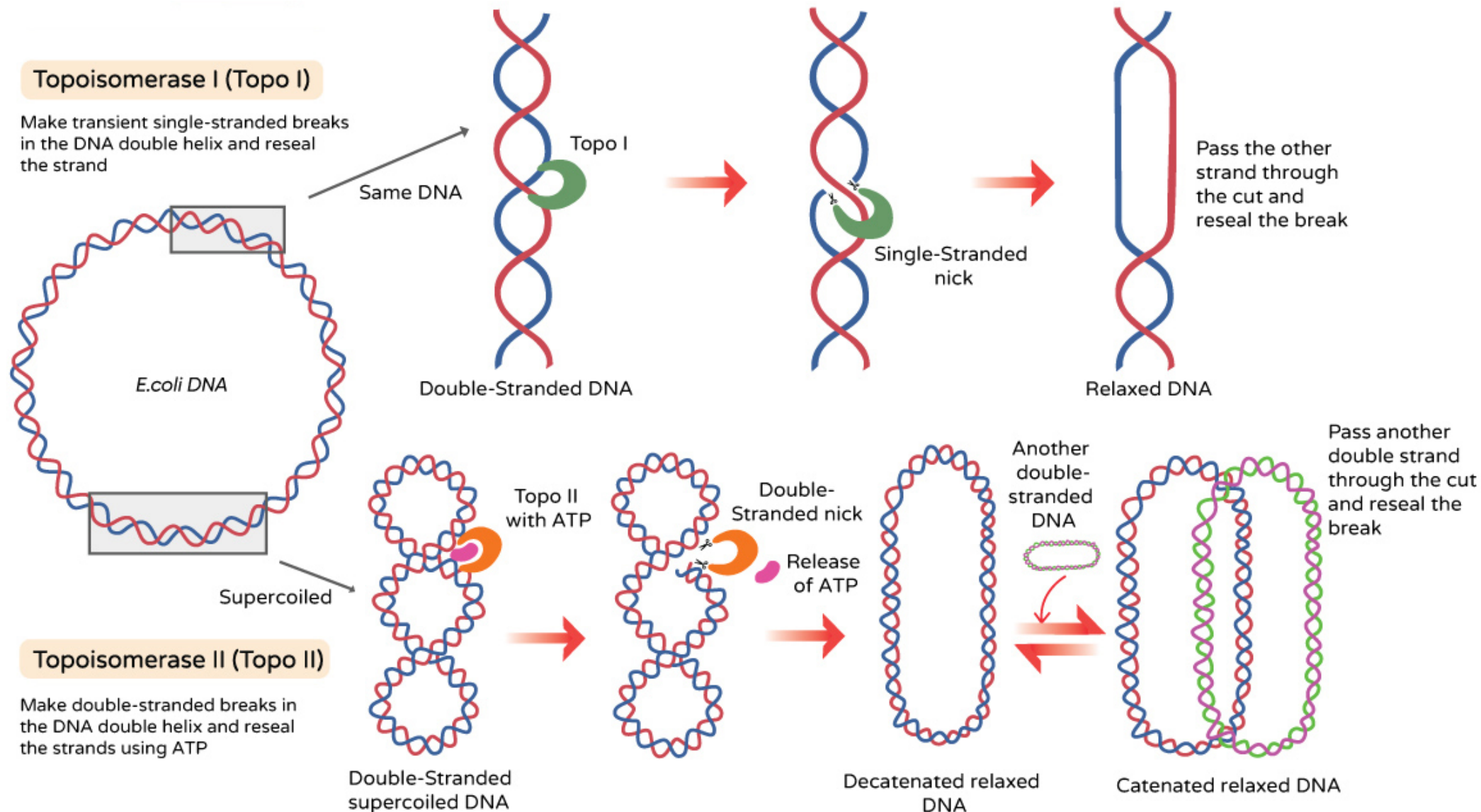


- ✓ Καθώς οι αλυσίδες διαχωρίζονται μπροστά στη διχάλα αντιγραφής προκαλούνται **θετικές υπερέλικες**.
- ✓ Καθώς η DNA ελικάση προχωρά, το DNA πρέπει να φιλοξενήσει τον ίδιο αριθμό περιελίξεων εντός του ολοένα μικρότερου αριθμού ζευγών βάσεων.
- ✓ Προκειμένου να παραμείνει χαλαρό το DNA μπροστά στη διχάλα αντιγραφής, πρέπει να αφαιρείται ένας δεσμός DNA περίπου κάθε 10bp εκτυλιγμένου DNA.
- ✓ Οι υπερέλικες που εισάγονται από τη δράση της DNA ελικάσης απομακρύνονται από **τοποϊσομεράσες (topoisomerases)**, οι οποίες λειτουργούν μπροστά από τη διχάλα αντιγραφής.
- ✓ Διασπούν είτε τη μια είτε και τις δύο αλυσίδες του DNA.

Οι τοποϊσομεράσες

Δύο βασικές κατηγορίες:

- **Τύπου I** → κόβουν **μία** αλυσίδα DNA
- **Τύπου II** → κόβουν **και τις δύο** αλυσίδες DNA



Η αντιγραφή του DNA

Το ίδιο σύνολο ενζυμικών ενεργοτήτων χρησιμοποιείται από οργανισμούς τόσο διαφορετικούς, όσο τα βακτήρια, οι ζυμομύκητες και ο άνθρωπος, προκειμένου να πραγματοποιήσουν την αντιγραφή του DNA.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Άνθρωπος
Πριμάση (Primase)	DnaG	Πριμάση (PRI I/PRI 2)	Πριμάση
DNA ελικάση (DNA helicase)	DnaB	Σύμπλοκο Mcm	Σύμπλοκο Mcm
SSB	SSB	RPA	RPA
Τοποϊσομεράσες (Topoisomerases)	Γυράση (Gyrase), Topo I	Topo I, II	Topo I, II

Copyright © 2017 Utopia Publishing

ΠΡΟΣΟΧΗ

- Η DNA ελικάση και η τοποϊσομεράση ΔΕΝ μεταβάλλουν μόνιμα τη χημική δομή του DNA.
- Η DNA ελικάση διασπά μόνο τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των δύο αλυσίδων και όχι κάποιον ομοιπολικό δεσμό.
- Η τοποϊσομεράση διασπά ομοιπολικούς δεσμούς, όπως πραγματοποιείται ανασχηματισμός του δεσμού πριν το ένζυμο απελευθερώσει το DNA.

Η εξειδίκευση των DNA πολυμερασών

- Τα κύτταρα έχουν εξελίξει πολλαπλές εξειδικευμένες DNA πολυμεράσες.
- ***E. Coli***: Διαθέτει τουλάχιστον 5 DNA πολυμεράσες με διακριτές ενζυμικές ιδιότητες, σύσταση σε υπομονάδες και αφθονία.
- Η **DNA πολυμεράση III (DNA pol III)** είναι το πρωταρχικό ένζυμο που εμπλέκεται στην αντιγραφή του χρωμοσώματος.
- Όλο το γονιδίωμα των 4.6 Mb της *E. Coli* αντιγράφεται από **δύο διχάλες αντιγραφής**, η DNA pol III είναι ιδιαίτερα επεξεργαστική.
- Αποτελεί μέρος ενός μεγαλύτερου συμπλόκου, το οποίο προσφέρει μεγάλη επεξεργαστική ικανότητα, και ονομάζεται **ολοένζυμο της DNA Pol III (DNA Pol III holoenzyme)**.
- Αντίθετα, η **DNA πολυμεράση I (DNA pol I)**, είναι εξειδικευμένη για την απομάκρυνση των RNA εκκινητών που χρησιμοποιούνται για την έναρξη της σύνθεσης του DNA. Για το λόγο αυτό, διαθέτει ενεργότητα 5' εξωνουκλεάσης, η οποία της επιτρέπει να απομακρύνει RNA ή DNA νουκλεοτίδια αμέσως ανοδικά (upstream).
- Η **DNA πολυμεράση I (DNA pol I)** δεν είναι ιδιαίτερα επεξεργαστική, καθώς προσθέτει μόνο 20-100 dNTPs ανά γεγονός δέσμευσης στο DNA. Άρα, ιδανική για αφαίρεση RNA εκκινητών!
- Τόσο η DNA pol III, όσο και η DNA pol I, φέρουν ενεργότητα εξωνουκλεάσης διορθωτικού ελέγχου (proofreading).
- Οι υπόλοιπες τρεις πολυμεράσες της *E. Coli* είναι εξειδικευμένες για την επιδιόρθωση του DNA και δε διαθέτουν ενεργότητα proofreading.

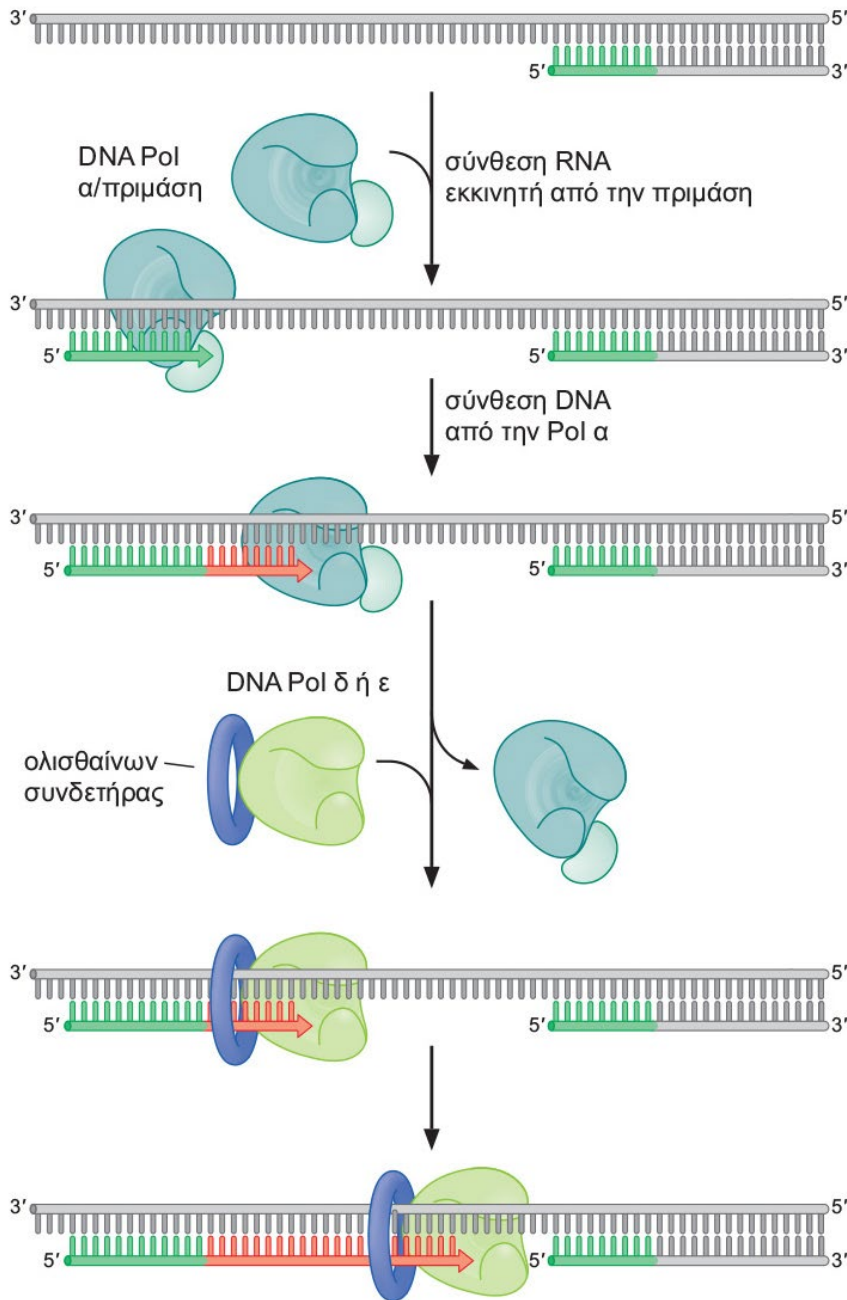
Η εξειδίκευση των DNA πολυμερασών

Προκαρυωτικές (<i>E. coli</i>)	Αριθμός υπομονάδων	Λειτουργία
Pol I	1	Απομάκρυνση RNA εκκινητή, επιδιόρθωση DNA
Pol II (Din A)	1	Επιδιόρθωση DNA
Pol III πυρήνας (core)	3	Αντιγραφή χρωμοσώματος
Pol III ολοένζυμο	9	Αντιγραφή χρωμοσώματος
Pol IV (Din B)	1	Επιδιόρθωση DNA, σύνθεση διαμέσου της βλάβης (translesion synthesis, TLS)
Pol V (UmuC, UmuD' 2C)	3	TLS
Ευκαρυωτικές	Αριθμός υπομονάδων	Λειτουργία
Pol α	4	Σύνθεση εκκινητή κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA
Pol β	1	Επιδιόρθωση εκτομής βάσης
Pol γ	3	Αντιγραφή και επιδιόρθωση μιτοχονδριακού DNA
Pol δ	2 – 3	Σύνθεση της καθυστερούσας αλυσίδας DNA (lagging strand), επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων και βάσεων
Pol ε	4	Σύνθεση προπορευόμενης αλυσίδας DNA, επιδιόρθωση εκτομής βάσεων και νουκλεοτιδίων
Pol θ	1	Επιδιόρθωση DNA των διασταυρούμενων συνδέσεων (cross-links)
Pol ζ	1	TLS
Pol λ	1	Επιδιόρθωση DNA συνδεδεμένη με τη Μείωση
Pol μ	1	Σωματική υπερμεταλλαγή (hypermutation)
Pol κ	1	TLS
Pol η	1	Σχετικά ακριβής σύνθεση διαμέσου της βλάβης (TLS) πέρα από τα cis-syn διμερή κυκλοβουτανίου
Pol ι	1	TLS, σωματική υπερμεταλλαγή
Rev1	1	TLS

TLS: Σύνθεση διαμέσου της βλάβης (translesion synthesis)

Στοιχεία από Sutton M.D. and Walker G.C. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 8342–8349, και αναφορές στο εν λόγω άρθρο.

Η εξειδίκευση των DNA πολυμερασών



DNA pol α:

- 2 υπομονάδες πολυμεράσης
- 2 υπομονάδες πριμάσης

Η DNA pol α διαθέτει μικρή επεξεργασιμότητα και αντικαθίσταται από τις DNA Pol δ και Pol ε.

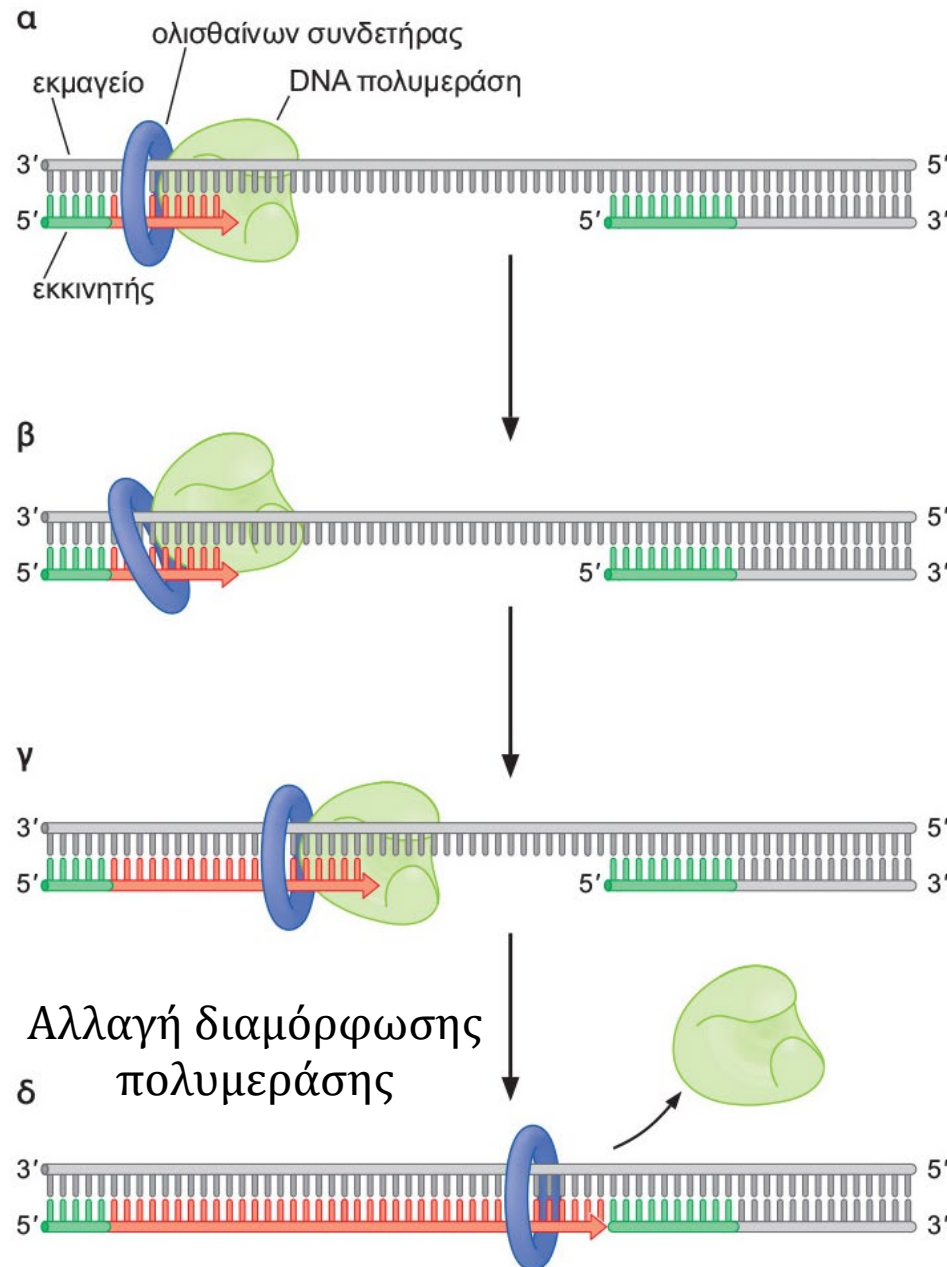
Η διαδικασία της αντικατάστασης ονομάζεται **εναλλαγή πολυμεράσης (polymerase switching)**.

Το κλειδί για την υψηλή επεξεργαστική ικανότητα των DNA πολυμερασών που δρουν στις διχάλες αντιγραφής είναι η ένωσή τους με πρωτεΐνες που ονομάζονται **ολισθαίνοντες DNA συνδετήρες (sliding DNA clamps)**.

Οι συνδετήρες αποτελούνται από πανομοιότυπες υπομονάδες, οι οποίες σχηματίζουν ένα σχήμα δακτυλίου. Η οπή στο κέντρο του συνδετήρα του επιτρέπει να ολισθαίνει στο DNA χωρίς να αποσυνδέεται από αυτό.

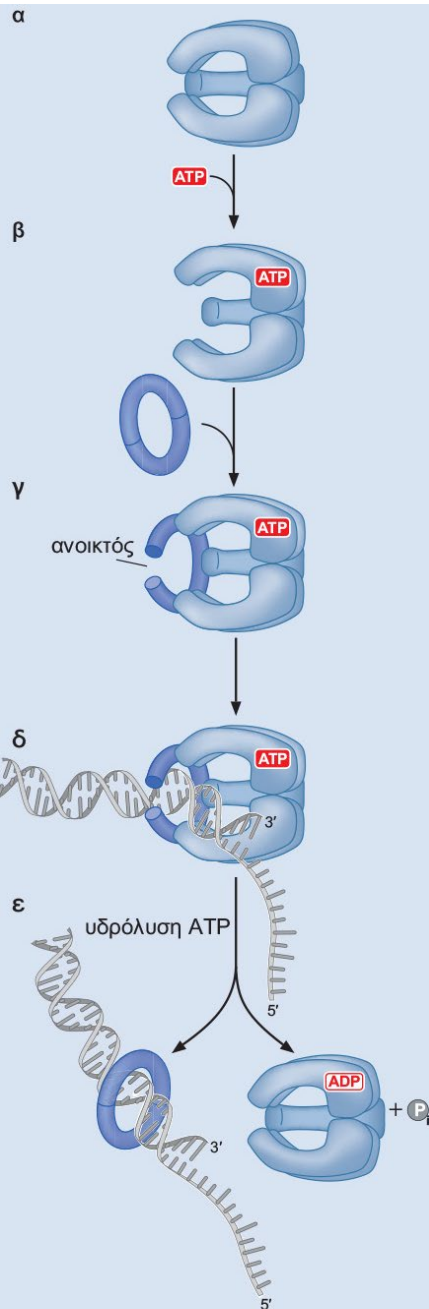
Η ένωση με τον συνδετήρα αποτρέπει την πολυμεράση από το να απομακρύνεται πολύ από το DNA.

Η εξειδίκευση των DNA πολυμερασών



- Όταν η DNA πολυμεράση βρίσκεται στη συμβολή εκμαγείου:εκκινητή, διαθέτει **υψηλή συγγένεια με τον συνδετήρα**.
- Αντίθετα, όταν η πολυμεράση πλησιάζει το τέλος του εκμαγείου ssDNA, πραγματοποιείται αλλαγή στη διαμόρφωσή της.
- Η αλλαγή αυτή πραγματοποιείται λόγω της παρουσίας dsDNA στο ενεργό της κέντρο και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγγένειας με τον συνδετήρα.
- Μετά την απελευθέρωση της πολυμεράσης, **οι ολισθαίνοντες συνδετήρες παραμένουν συνδεδεμένοι στο DNA** και αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες που πρέπει να λειτουργήσουν στο νεοσυντιθέμενο DNA.
- Οι συνδετήρες τοποθετούνται και απελευθερώνονται από το DNA μέσω της λειτουργίας ειδικών πρωτεϊνών που ονομάζονται **πρωτεΐνες φόρτωσης (sliding clamp loaders)**.

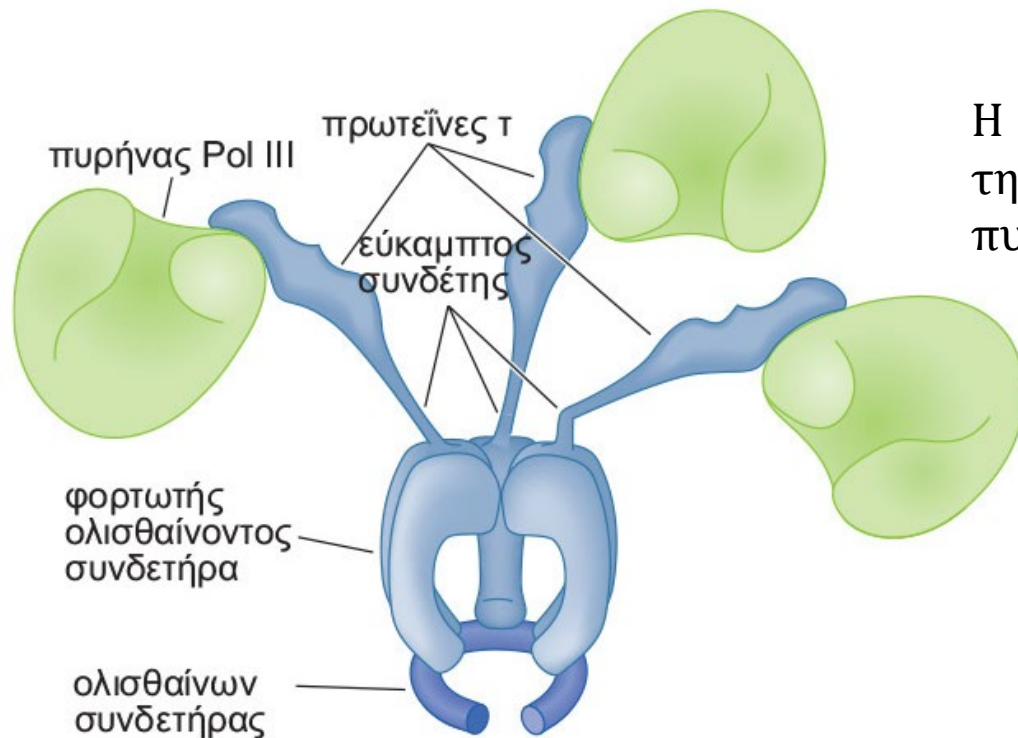
Οι πρωτεΐνες φόρτωσης



- Οι **πρωτεΐνες φόρτωσης** των συνδετήρων είναι πρωτεϊνικά **σύμπλοκα πέντε υπομονάδων**, η ενεργότητα των οποίων ελέγχεται από τη δέσμευση και υδρόλυση του ATP.
 - Για να καταλύσει το άνοιγμα της δομής του συνδετήρα, η πρωτεΐνη φόρτωσης **πρέπει να δεσμευθεί με το ATP**.
1. Μόλις δεσμευθεί στο ATP, η πρωτεΐνη φόρτωσης δεσμεύει το συνδετήρα και **πραγματοποιεί άνοιγμα του δακτυλίου** μεταξύ δύο υπομονάδων.
 2. Το σύμπλοκο που προκύπτει μπορεί να συνδεθεί πλέον με το DNA. Η δέσμευση πραγματοποιείται από την πρωτεΐνη φόρτωσης.
 3. Η δέσμευση έχει δύο συνέπειες:
 - a. Ο ανοιγμένος συνδετήρας τοποθετείται έτσι ώστε το dsDNA να βρίσκεται εντός της «οπής» του δακτυλίου.
 - b. Η ATP υδρολύεται από την πρωτεΐνη φόρτωσης.
 4. Η υδρόλυση του ATP έχει ως αποτέλεσμα την **αποσύνδεση της πρωτεΐνης φόρτωσης από τον συνδετήρα και το DNA**, καθώς και το **άμεσο κλείσιμο του συνδετήρα**.

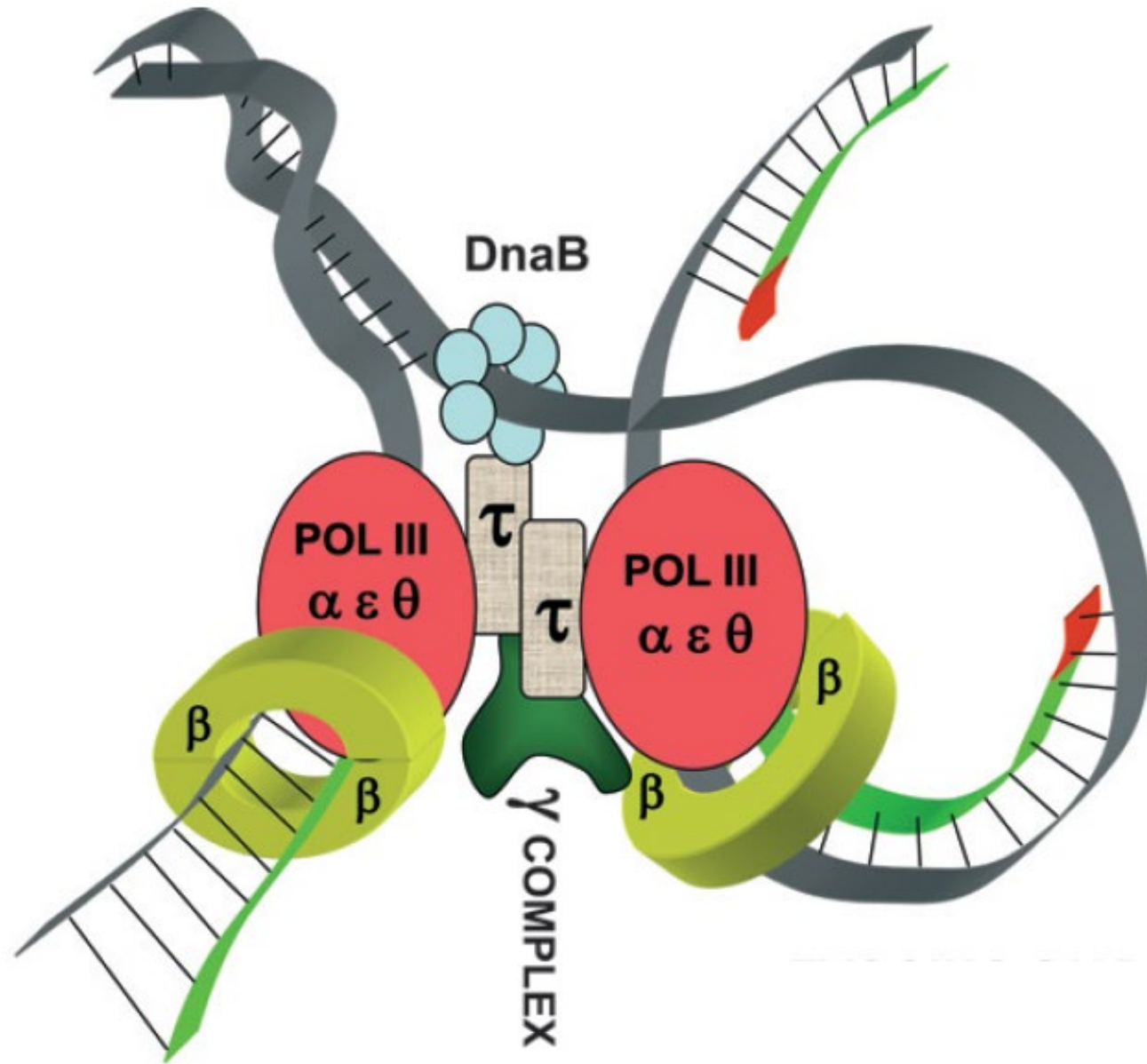
Η σύνθεση του DNA στη διχάλα αντιγραφής

- Ο περιορισμός του χρόνου κατά τη διάρκεια του οποίου το DNA είναι μονόκλωνο είναι κρίσιμος. Αυτό συμβαίνει διότι, αν διασπαστεί το ssDNA υπάρχει πλήρης θραύση στο χρωμόσωμα, η οποία είναι πολύ δύσκολο να επιδιορθωθεί. Για το λόγο αυτό, στη διχάλα αντιγραφής λειτουργούν πολλαπλές πολυμεράσες, προκειμένου να συντονιστεί σωστά και γρήγορα η διαδικασία.
- Στην *E.Coli* η συντονισμένη δράση των πολυμερασών διευκολύνεται από τη σύνδεσή τους στο ολοένζυμο της Pol III.
- Το ολοένζυμο της Pol III περιλαμβάνει: **τρία αντίγραφα του ενζύμου «πυρήνα»** και **ένα αντίγραφο της πρωτεΐνης φόρτωσης** του ολισθαίνοντος συνδετήρα.

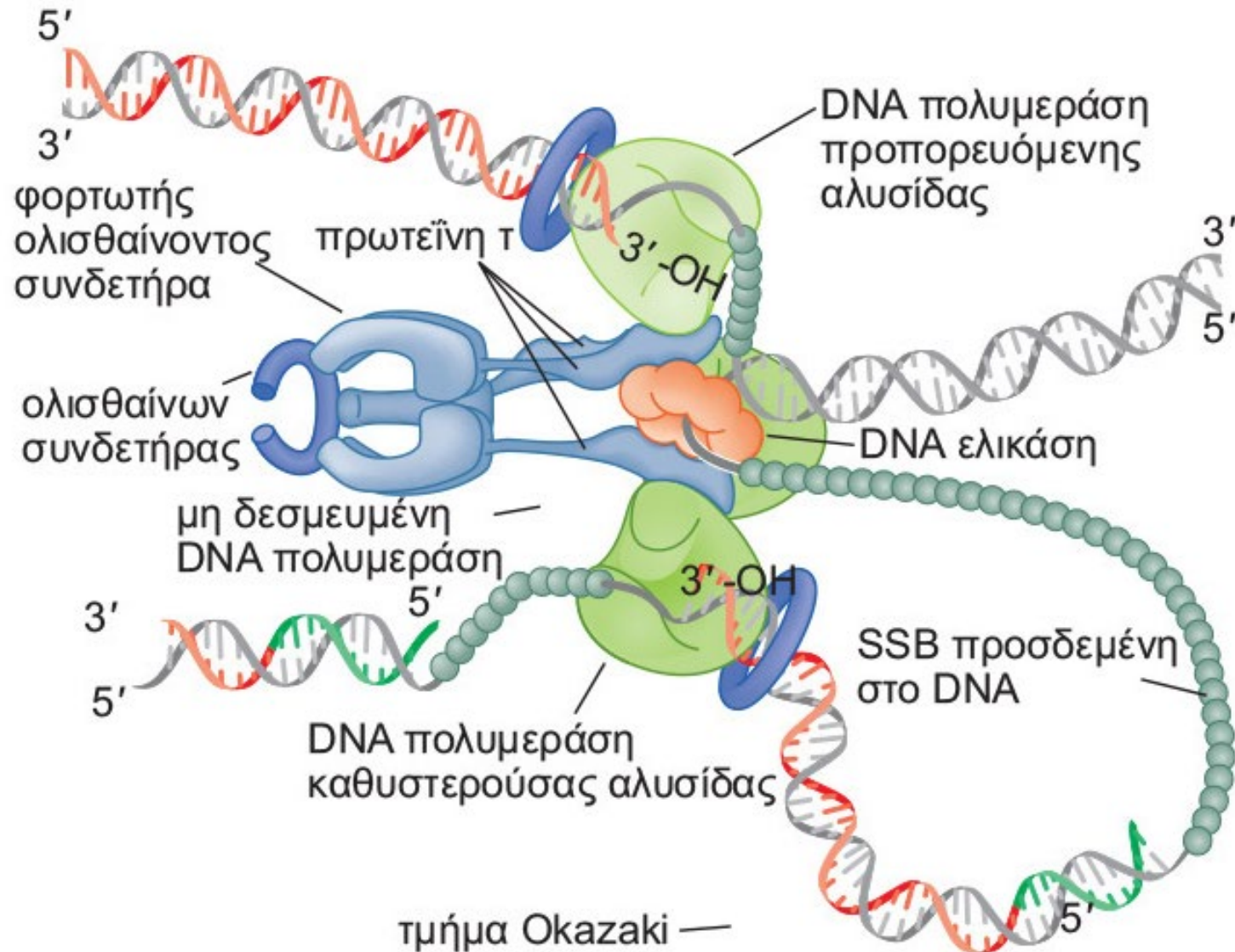


Η πρωτεΐνη φόρτωσης περιλαμβάνει τρία αντίγραφα της **πρωτεΐνης τ**, καθένα από τα οποία δεσμεύει ένα πυρήνα ενζύμου DNA Pol III.

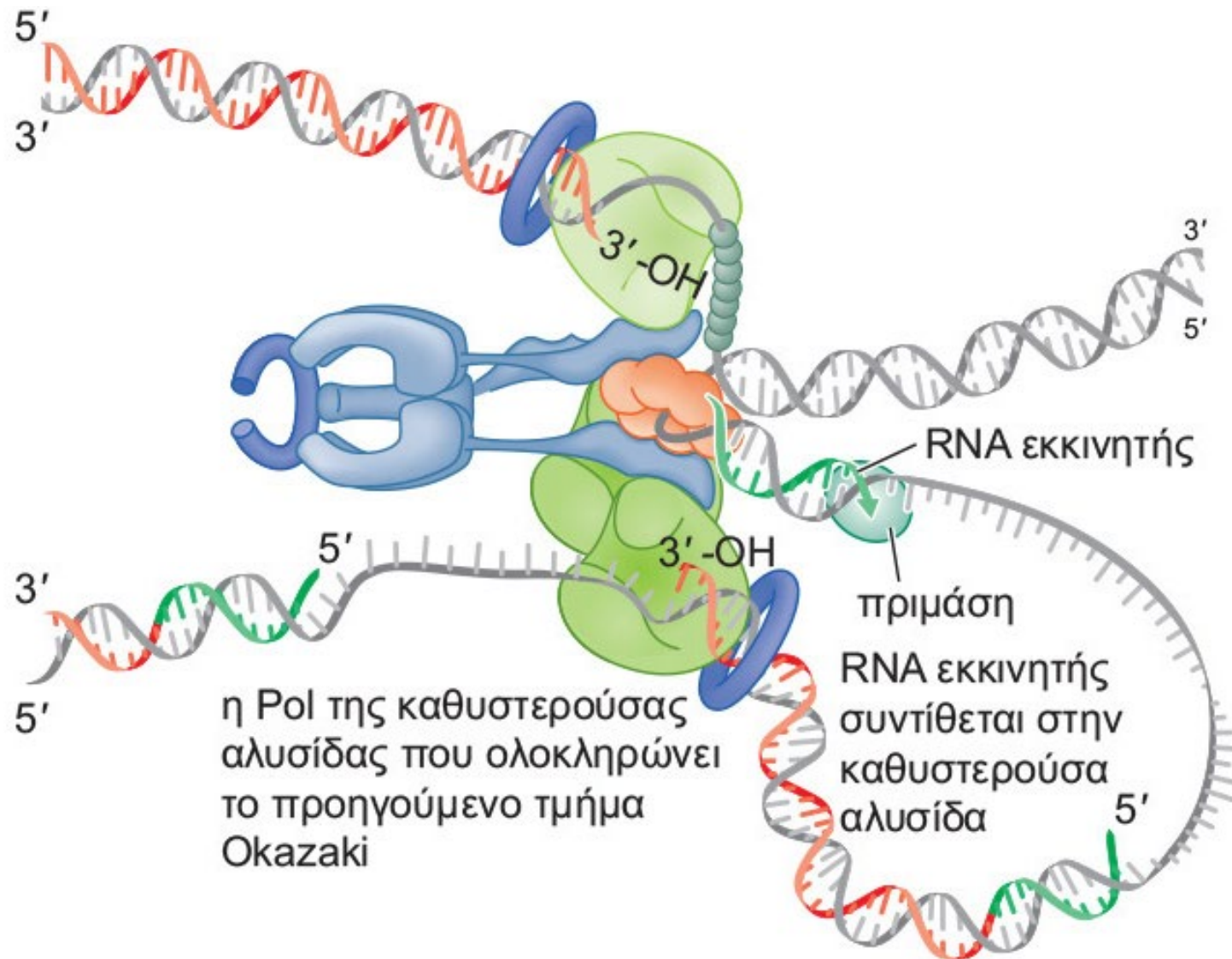
Η σύνθεση του DNA στη διχάλα αντιγραφής



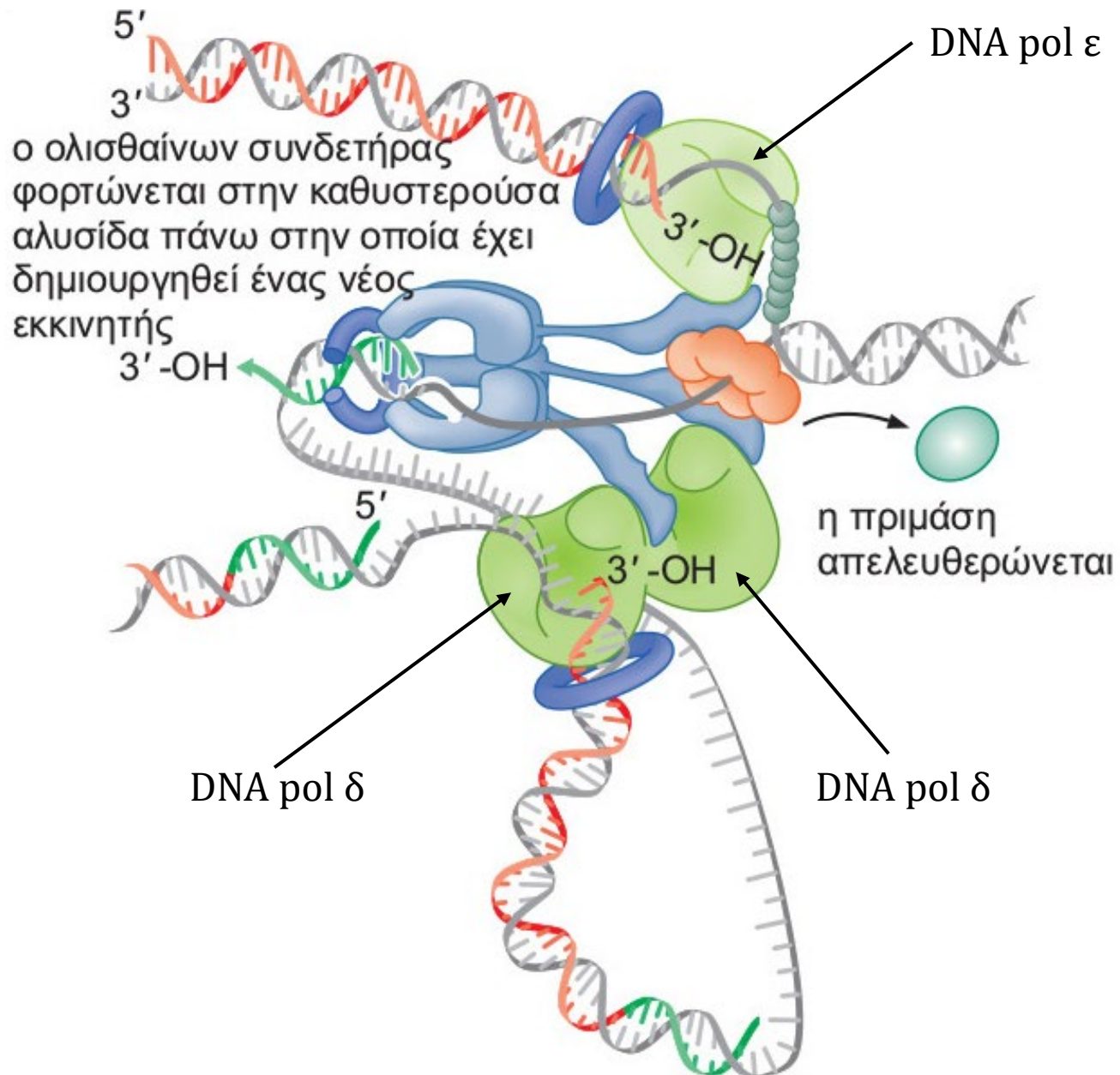
Το ολοένζυμο της DNA Pol III



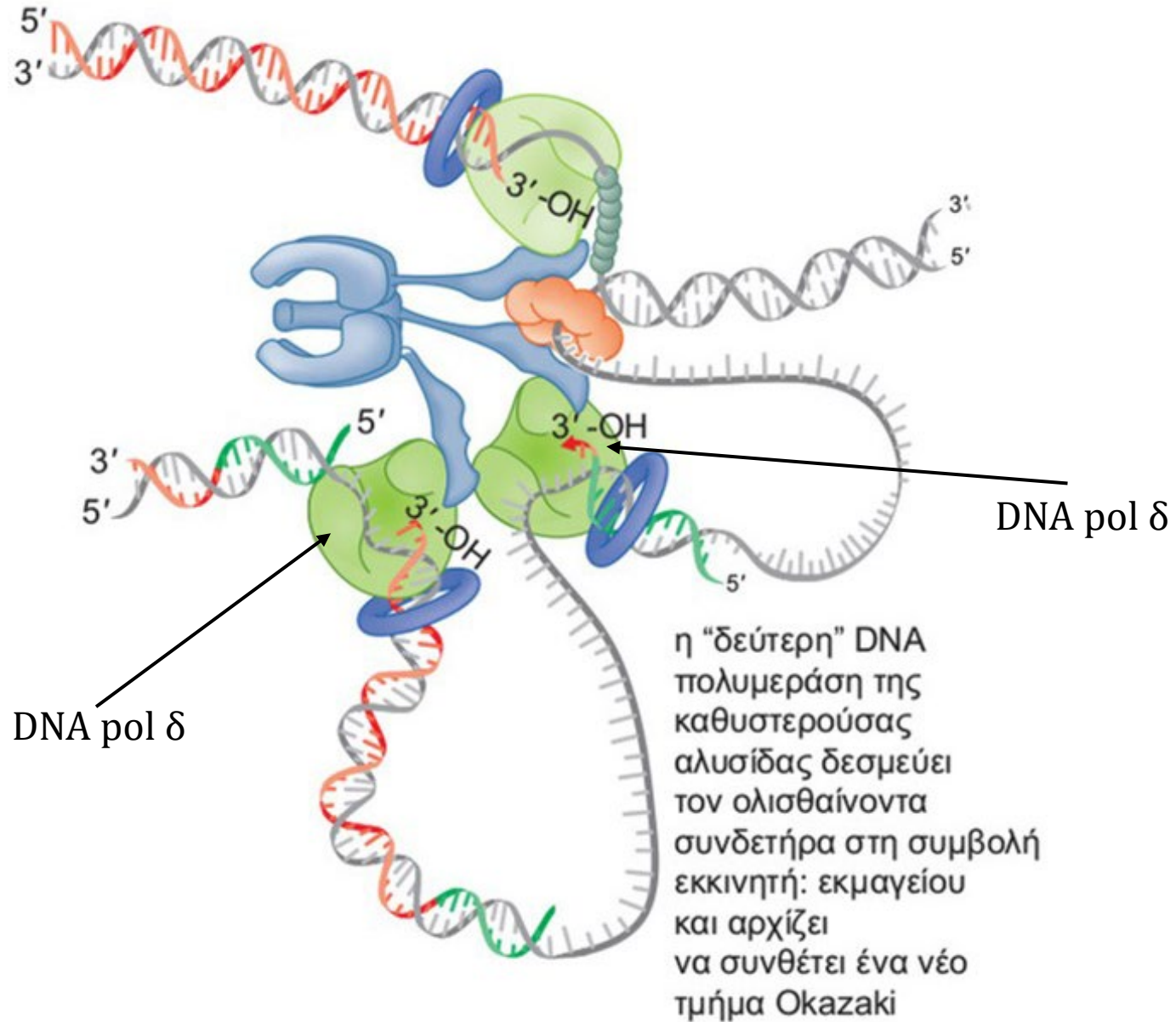
Το ολοένζυμο της DNA Pol III



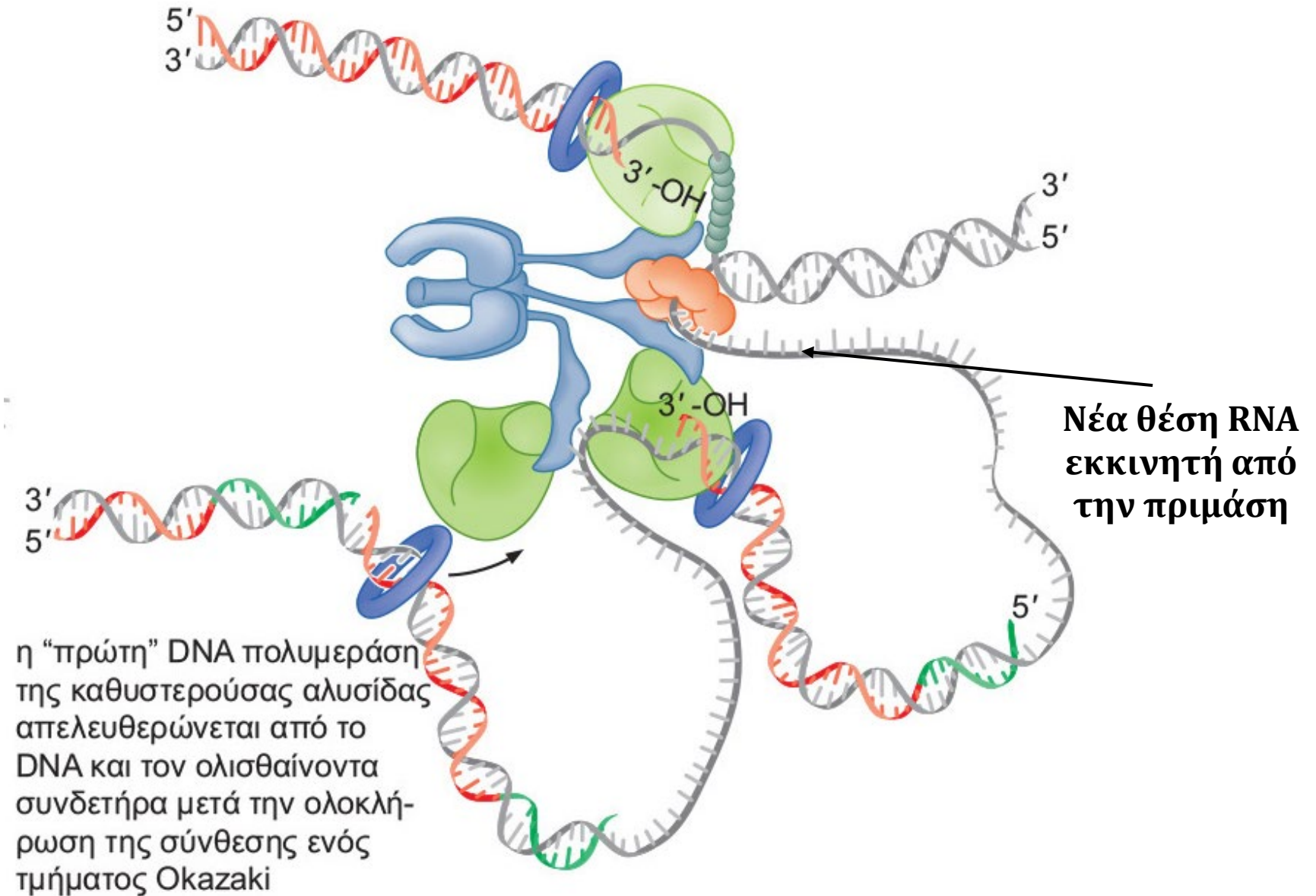
Το ολοένζυμο της DNA Pol III

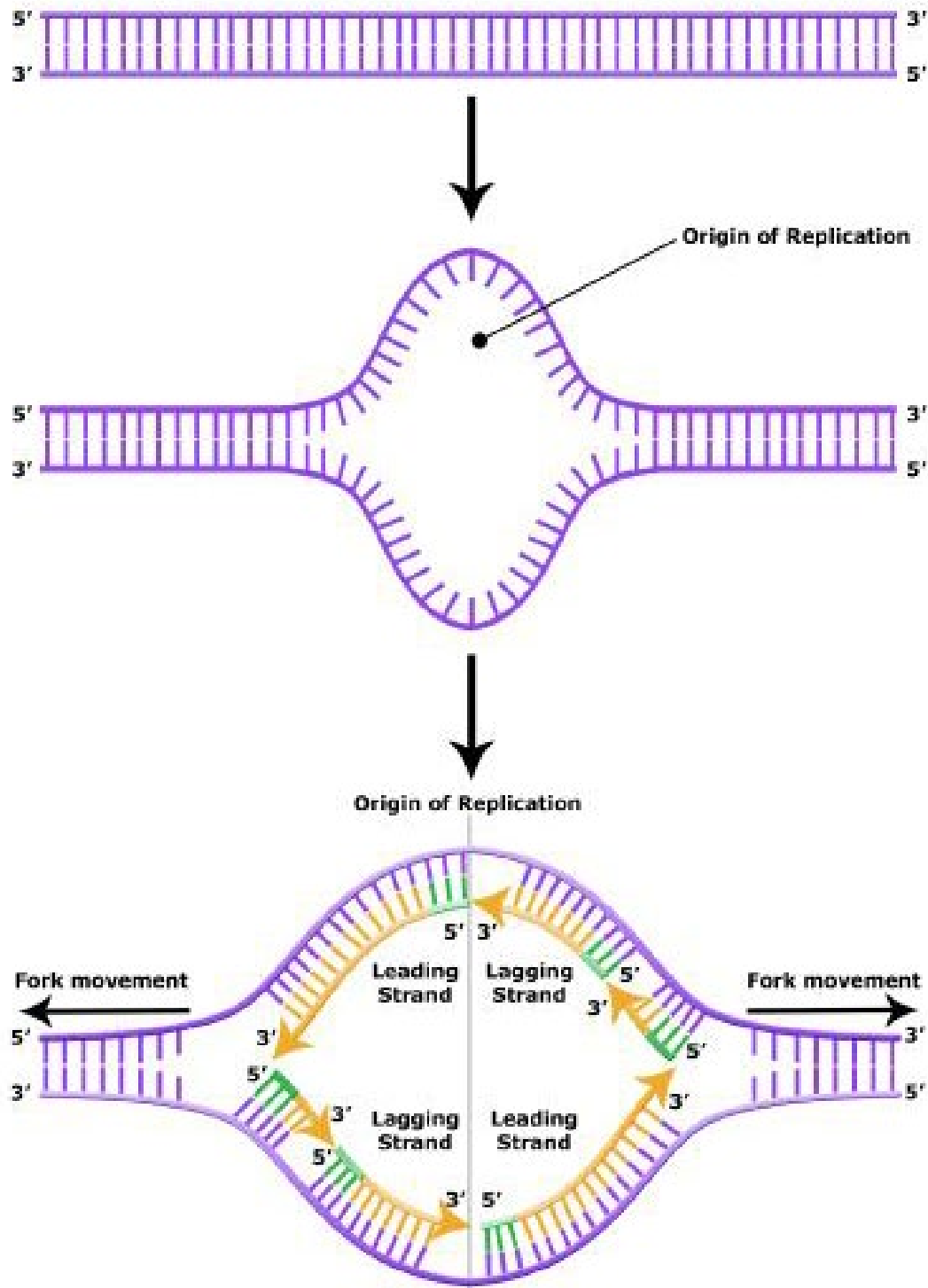


Το ολοένζυμο της DNA Pol III



Το ολοένζυμο της DNA Pol III





Η σύνθεση του DNA στη διχάλα αντιγραφής

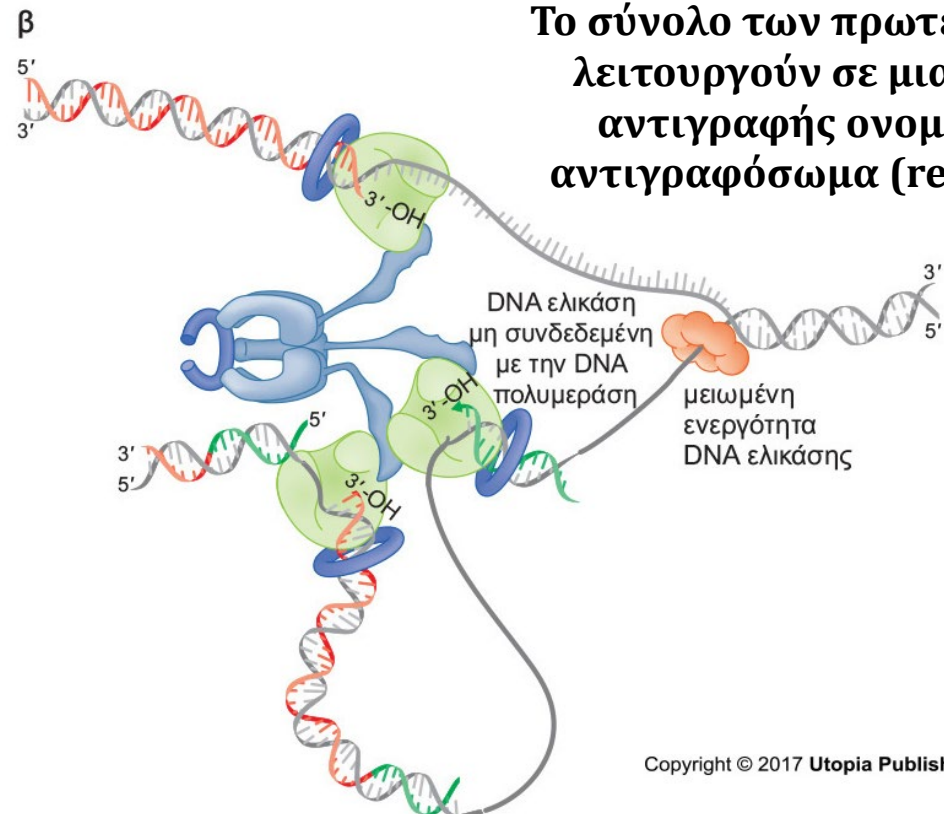
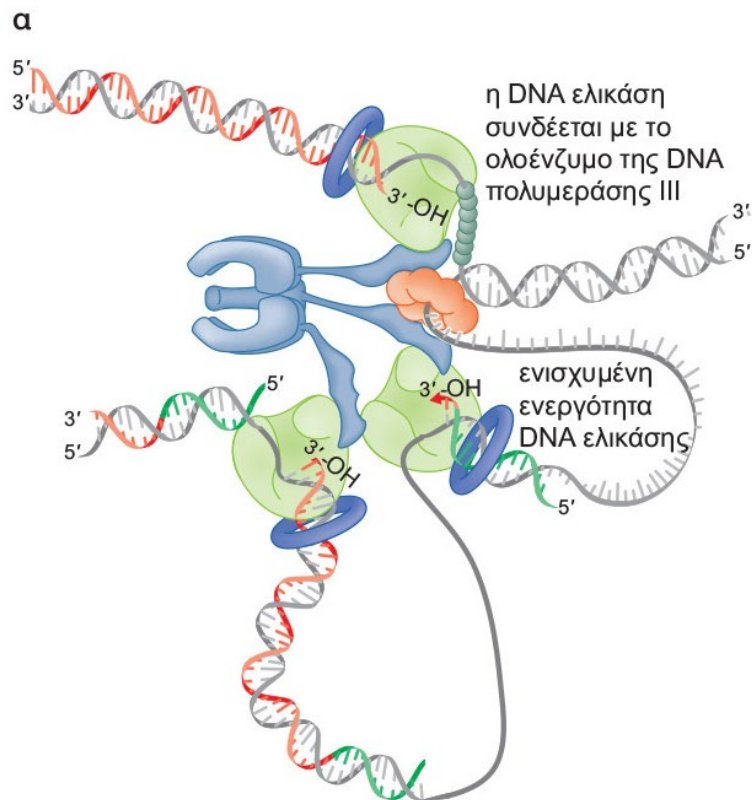
- Καθώς η ελικάση ξετυλίγει το DNA στη διχάλα αντιγραφής, το εκμαγείο της προπορευόμενης αλυσίδας εκτείνεται αμέσως στη δράση της πολυμεράσης, η οποία συνθέτει μια νέα συμπληρωματική αλυσίδα.
- Αντιθέτως, το εκμαγείο της καθυστερούσας αλυσίδας δε δέχεται αμέσως τη δράση της πολυμεράσης, αλλά ξετυλίγεται ως ssDNA και δεσμεύεται από SSB πρωτεΐνες.
- Περιοδικά, η πριμάση αλληλεπιδρά με την ελικάση και ενεργοποιείται για να συνθέσει έναν νέο RNA εκκινητή στο εκμαγείο της καθυστερούσας αλυσίδας.
- Το υβρίδιο RNA:DNA που δημιουργείται αναγνωρίζεται από τις πρωτεΐνες φορτωτές, γεγονός που οδηγεί στη συγκρότηση ενός μορίου συνδετήρα στη θέση του εκκινητή.
- Η DNA Pol III ξεκινά τη σύνθεση της καθυστερούσας αλυσίδας από το σημείο εκκίνησης.

Η σύνθεση του DNA στη διχάλα αντιγραφής

Η αλληλεπίδραση μεταξύ της **DNA ελικάσης** και του **ολοενζύμου της DNA Pol III** είναι πολύ κρίσιμη για την αντιγραφή του DNA

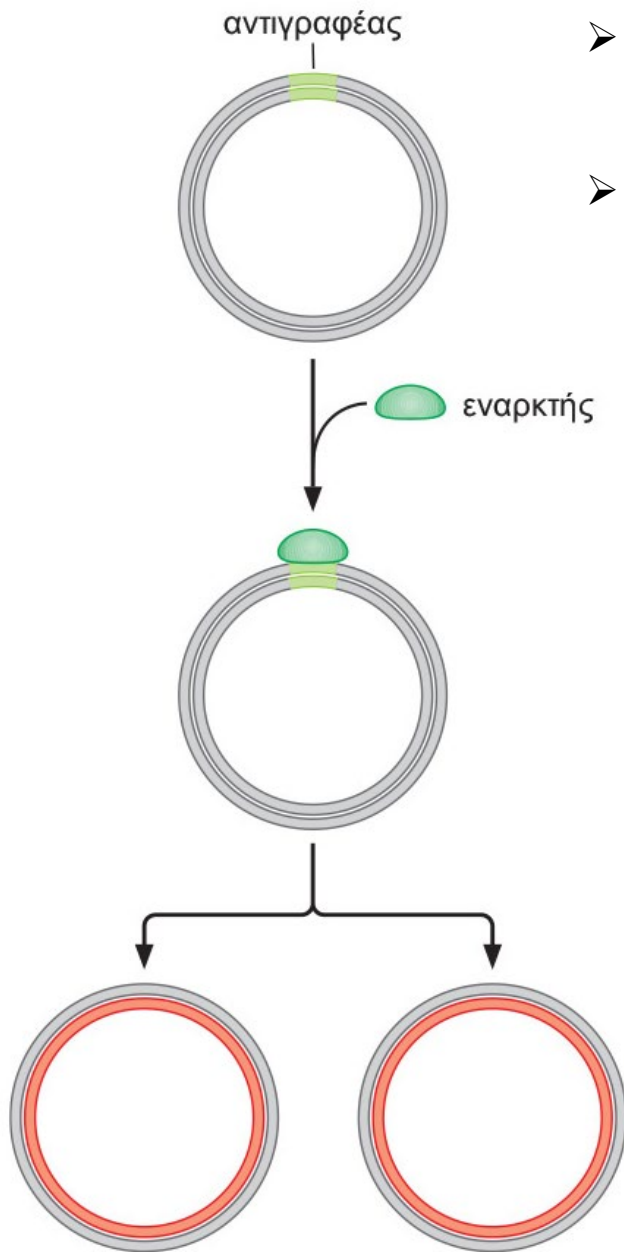
Όταν πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση, η DNA ελικάση ξετυλίγει το DNA στον ίδιο ρυθμό με τον οποίο γίνεται η αντιγραφή από τις πολυμεράσες.

Αν δεν πραγματοποιηθεί αλληλεπίδραση, η εκτύλιξη του DNA επιβραδύνεται περίπου 10 φορές.



Το σύνολο των πρωτεϊνών που λειτουργούν σε μια διχάλα αντιγραφής ονομάζεται αντιγραφόσωμα (replisome)

Το μοντέλο του ρεπλικονίου



- Οι ειδικές θέσεις στις οποίες λαμβάνει χώρα η εκτύλιξη του DNA και η έναρξη της αντιγραφής ονομάζονται **θέσεις έναρξης της αντιγραφής (origins of replication)**.
- Το 1963, οι Francois Jacob, Sydney Brenner και Jacques Cuzin πρότειναν ένα μοντέλο για να εξηγήσουν τα γεγονότα που ελέγχουν την έναρξη της αντιγραφής. Όρισαν το σύνολο του DNA που αντιγράφεται από μια συγκεκριμένη θέση έναρξης αντιγραφής ως ένα **ρεπλικόνιο (replicon)**. Για παράδειγμα, επειδή το μοναδικό χρωμόσωμα της E. Coli έχει μια μόνο θέση αντιγραφής, όλο το χρωμόσωμα θεωρείται ένα ρεπλικόνιο.

Το μοντέλο του ρεπλικονίου προτείνει δύο συστατικά που ελέγχουν την έναρξη της αντιγραφής:

1. Τον αντιγραφέα (replicator)

2. Την εναρκτήρια πρωτεΐνη ή πρωτεΐνη εναρκτή (initiator protein)

- Ο αντιγραφέας ορίζεται ως ολόκληρο το σύνολο των cis-δρώντων DNA αλληλουχιών, οι οποίες είναι επαρκείς για να κατευθύνουν την έναρξη της αντιγραφής.
- Η εναρκτήρια πρωτεΐνη αναγνωρίζει ειδικά ένα DNA στοιχείο στον αντιγραφέα και ενεργοποιεί την έναρξη.
- Εναρκτήριες πρωτεΐνες έχουν αναγνωριστεί σε πολλούς διαφορετικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ιών και ευκαρυωτικών κυττάρων και όλες ρυθμίζονται από τη **δέσμευση και υδρόλυση του ATP**.
- Η εναρκτήρια πρωτεΐνη είναι η μόνη που εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής και δεσμεύεται σε **DNA ειδικής αλληλουχίας!**

Το μοντέλο του ρεπλικονίου

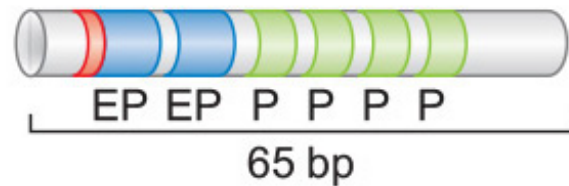
Οι αλληλουχίες **replicators** μοιράζονται δύο κοινά χαρακτηριστικά:

1. Περιλαμβάνουν μια **θέση δέσμευσης** για την εναρκτήρια πρωτεΐνη.
2. Περιλαμβάνουν ένα **τμήμα πλούσιο σε AT**.

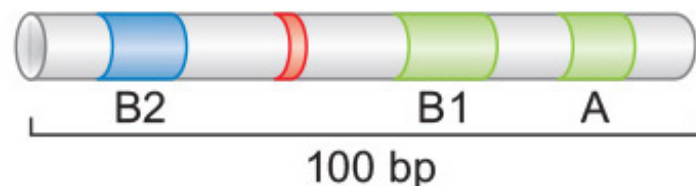
α Το **9-μερές** μοτίβο είναι η θέση δέσμευσης της **εναρκτήριας πρωτεΐνης DnaA** και επαναλαμβάνεται **5 φορές** στο *oriC* (*E. coli*)



β Το **13-μερές** μοτίβο επαναλαμβάνεται **3 φορές** και είναι η αρχική θέση σχηματισμού ssDNA κατά τη διάρκεια της έναρξης.



γ
S. cerevisiae



Η DnaA δεσμεύεται στα επαναλαμβανόμενα 9-μερή και ρυθμίζεται από την ATP.

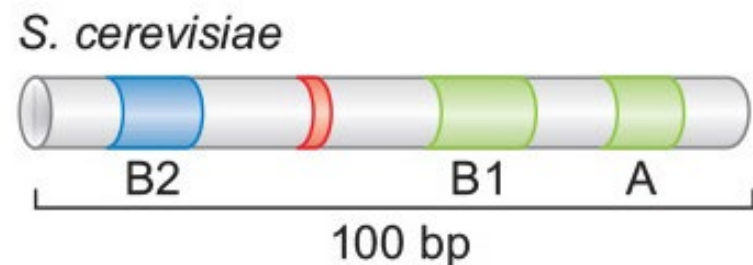
Όταν δεσμεύεται στην ATP (αλλά όχι στην ADP) αλληλεπιδρά επίσης με την περιοχή των επαναλαμβανόμενων 13-μερών.

Επιλογή και ενεργοποίηση θέσεων έναρξης αντιγραφής

Οι εναρκτήριες πρωτεΐνες εκτελούν πάντοτε τουλάχιστον δύο διαφορετικές λειτουργίες κατά τη διάρκεια έναρξης της αντιγραφής:

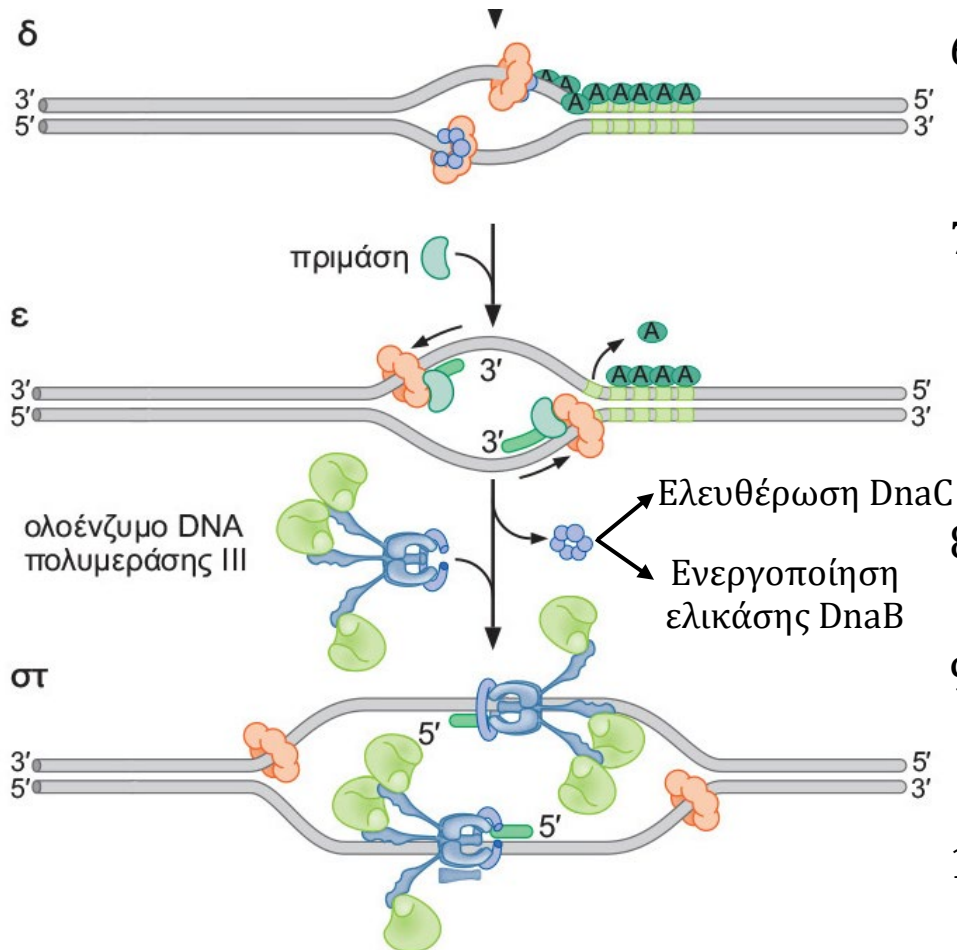
1. Προσδένονται στο DNA της περιοχής έναρξης αντιγραφής (replicator).
2. Αλληλεπιδρούν με παράγοντες που απαιτούνται για την έναρξη της αντιγραφής και τους προσελκύουν στην περιοχή που θα ξεκινήσει η αντιγραφή.
3. Ορισμένες εναρκτήριες πρωτεΐνες παραμορφώνουν ή εκτυλίσσουν μια περιοχή DNA κοντά στη θέση δέσμευσής τους για να διευκολύνουν την αρχική διάνοιξη του dsDNA.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η **εναρκτήρια πρωτεΐνη** είναι ένα **σύμπλοκο έξι πρωτεϊνών** που ονομάζεται **σύμπλοκο αναγνώρισης της θέσης έναρξης της αντιγραφής (origin recognition complex, ORC)**



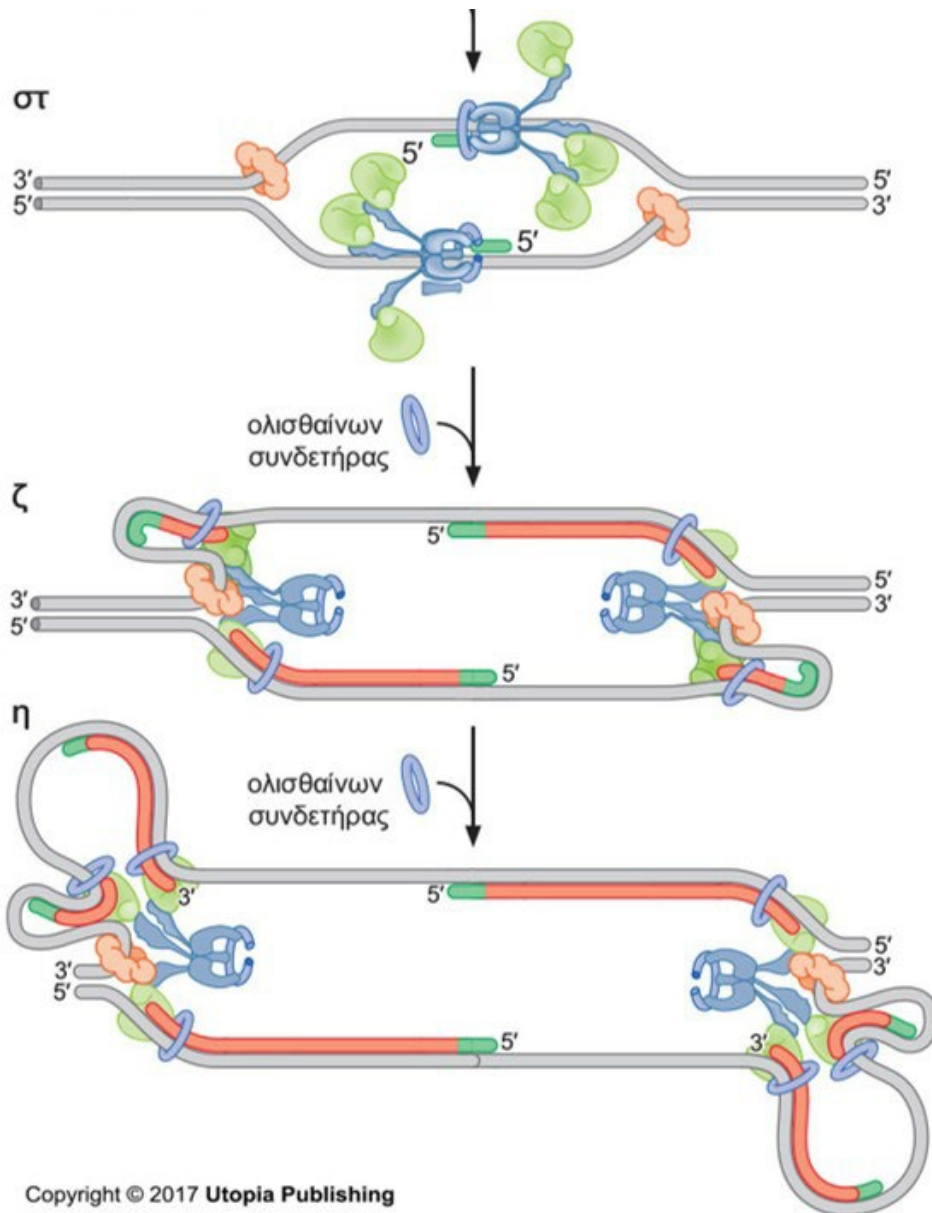
- Όπως η DnaA, το ORC δεσμεύει και υδρολύει το ATP.
- Η δέσμευση ATP είναι απαραίτητη για τη δέσμευση του ORC στα στοιχεία A και B1.
- Η υδρόλυση του ATP απαιτείται για τη συμμετοχή του ORC στη φόρτωση της ευκαρυωτικής ελικάσης.
- Η πρόσδεση του ORC **ΔΕΝ οδηγεί σε διαχωρισμό των αλυσίδων στο DNA**, σε αντίθεση με την DnaA.

Μοντέλο έναρξης αντιγραφής στην E. Coli (2)



6. Κάθε μια από τις DNA ελικάσες στρατολογεί μια **πριμάση**, η οποία συνθέτει έναν RNA εκκινητή σε κάθε εκμαγείο.
7. Ο **RNA εκκινητής προκαλεί την απελευθέρωση της DnaC από την DnaB**, με αποτέλεσμα να **ενεργοποιείται η DnaB**. Η ενεργοποίηση αυτή απομακρύνει τις DnaA που είναι συνδεδεμένες στο εκμαγείο.
8. Το ολοένζυμο της DNA πολυμεράσης III μεταφέρεται στις θέσεις έναρξης.
9. Οι εκκινητές αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη φόρτωσης του ολοενζύμου, το οποίο οδηγεί στη συγκρότηση των συνδετήρων σε κάθε εκκινητή.
10. Η αντιγραφή της προπορευόμενης αλυσίδας ξεκινά από ένα «ένζυμο-πυρήνα» της DNA Pol III.
11. Καθώς νέο ssDNA εκτίθεται από τη δράση της ελικάσης, δεσμεύεται από πρωτεΐνες SSB και η DNA πριμάση συνθέτει τους πρώτους εκκινητές της καθυστερούσας αλυσίδας.

Μοντέλο έναρξης αντιγραφής στην E. Coli (3)



12. Αφού κάθε ελικάση έχει μετακινηθεί ~1kb, ένας δεύτερος εκκινήτης συντίθεται σε κάθε καθυστερούσα αλυσίδα και φορτώνεται ένας συνδετήρας.

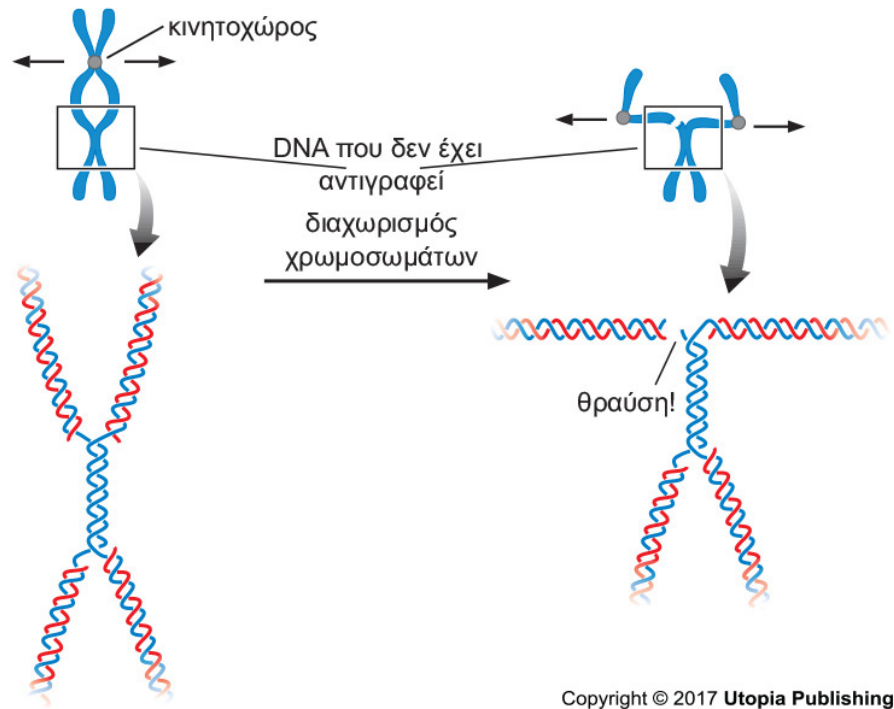
13. Η δομή αυτή αναγνωρίζεται από ένα δεύτερο «ένζυμο-πυρήνα» της DNA Pol III, το οποίο ξεκινά τη σύνθεση.

14. Κάθε διχάλα αντιγραφής θα σταματήσει στο τέλος του εκμαγείου ή μέχρι να συναντήσει άλλη διχάλα αντιγραφής που μετακινείται αντίθετα.

Η αντιγραφή του DNA

Τα ευκαρυωτικά χρωμοσώματα αντιγράφονται
μια μόνο φορά ανά κυτταρικό κύκλο

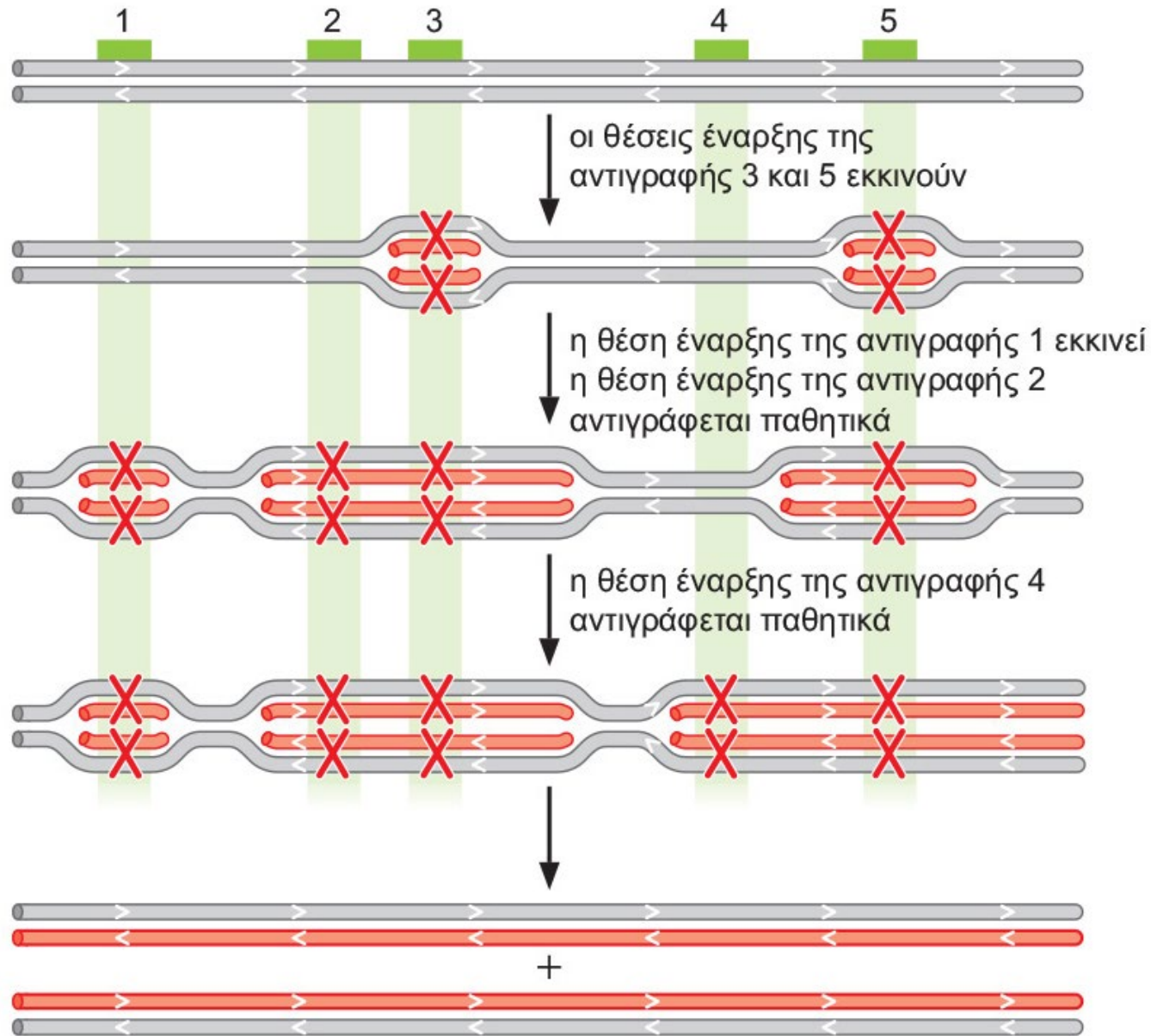
Η αντιγραφή των χρωμοσωμάτων πραγματοποιείται μόνο στη φάση S και όλο το DNA του κυττάρου πρέπει να έχει διπλασιαστεί μια φορά



Copyright © 2017 Utopia Publishing

- Η ατελής αντιγραφή οποιουδήποτε μέρους ενός χρωμοσώματος προκαλεί ακατάλληλες διασυνδέσεις μεταξύ των θυγατρικών χρωμοσωμάτων και οδηγεί σε **χρωμοσωματική θραύση ή απώλεια** κατά το διαχωρισμό.
- Η **επαναντιγραφή (rereplication)** ακόμη και περιορισμένων περιοχών DNA μπορεί να οδηγήσει σε **βλάβες**, οι οποίες δεν μπορούν να επιδιορθωθούν εύκολα από το κύτταρο.
- Προσπάθειες να επιδιορθωθούν τέτοιες βλάβες είναι πιθανό καταλήξουν σε **ενίσχυση του DNA (amplification)**, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μη φυσιολογικά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης.

Η αντιγραφή του DNA



Έναρξη αντιγραφής του DNA στους ευκαρυώτες

Η έναρξη της αντιγραφής στα **ευκαρυωτικά κύτταρα** περιλαμβάνει δύο γεγονότα που λαμβάνουν χώρα σε διακριτούς χρόνους στον κυτταρικό κύκλο.

- 1.Τη **φόρτωση της ελικάσης** που συμβαίνει σε όλες τις θέσεις έναρξης αντιγραφής κατά τη διάρκεια της **G₁ φάσης** (πριν τη φάση S).
- 2.Την **ενεργοποίηση της θέσης έναρξης αντιγραφής** που περιλαμβάνει: α) την **ενεργοποίηση της ελικάσης** και β) τη **συγκρότηση του αντιγραφοσώματος**. Τα γεγονότα αυτά λαμβάνουν χώρα κατά τη **φάση S** του κυτταρικού κύκλου.

Αντίθετα, στα **προκαρυωτικά κύτταρα** η πρόσδεση της εναρκτήριας πρωτεΐνης στο DNA οδηγεί άμεσα στην εκτύλιξη του DNA, στη φόρτωση της ελικάσης και τη συγκρότηση του αντιγραφοσώματος.

Ο **χρονικός διαχωρισμός** της φόρτωσης της ελικάσης από την ενεργοποίησή της και τη συγκρότηση του αντιγραφοσώματος **εξασφαλίζει ότι κάθε χρωμόσωμα αντιγράφεται μια και μόνο φορά** κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου

Έναρξη αντιγραφής του DNA στους ευκαρυώτες

Η φόρτωση της ελικάσης προϋποθέτει τη δράση **τεσσάρων διαφορετικών πρωτεϊνών** σε κάθε θέση έναρξης αντιγραφής.

1. Πρώτο βήμα στη φόρτωση της ελικάσης είναι η αναγνώριση της θέσης αντιγραφής από την **εναρκτήρια πρωτεΐνη ORC**, η οποία είναι συνδεδεμένη με ATP.

2. Καθώς τα κύτταρα εισέρχονται στη **φάση G₁**, ο προσδεδεμένος ORC προσελκύει:

- την πρωτεΐνη φόρτωσης **Cdc6** (συνδεδεμένη με ATP).

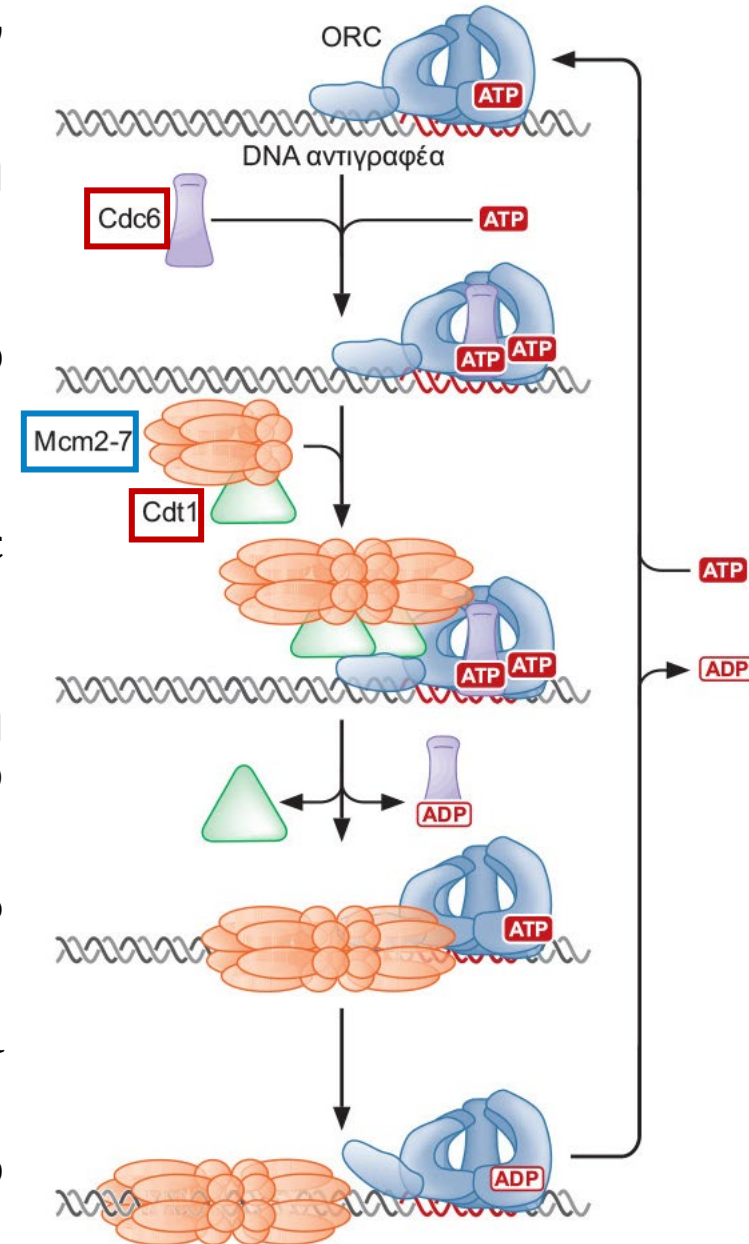
- δύο αντίγραφα της ελικάσης **Mcm2-7** είναι προσδεδεμένα σε πρωτεΐνες φόρτωσης, τις **Cdt1**.

3. Η **υδρόλυση του ATP από την Cdc6** οδηγεί στη φόρτωση ενός **διμερούς συμπλόκου Mcm2-7**, το οποίο περικυκλώνει το δίκλωνο DNA στη θέση έναρξης.

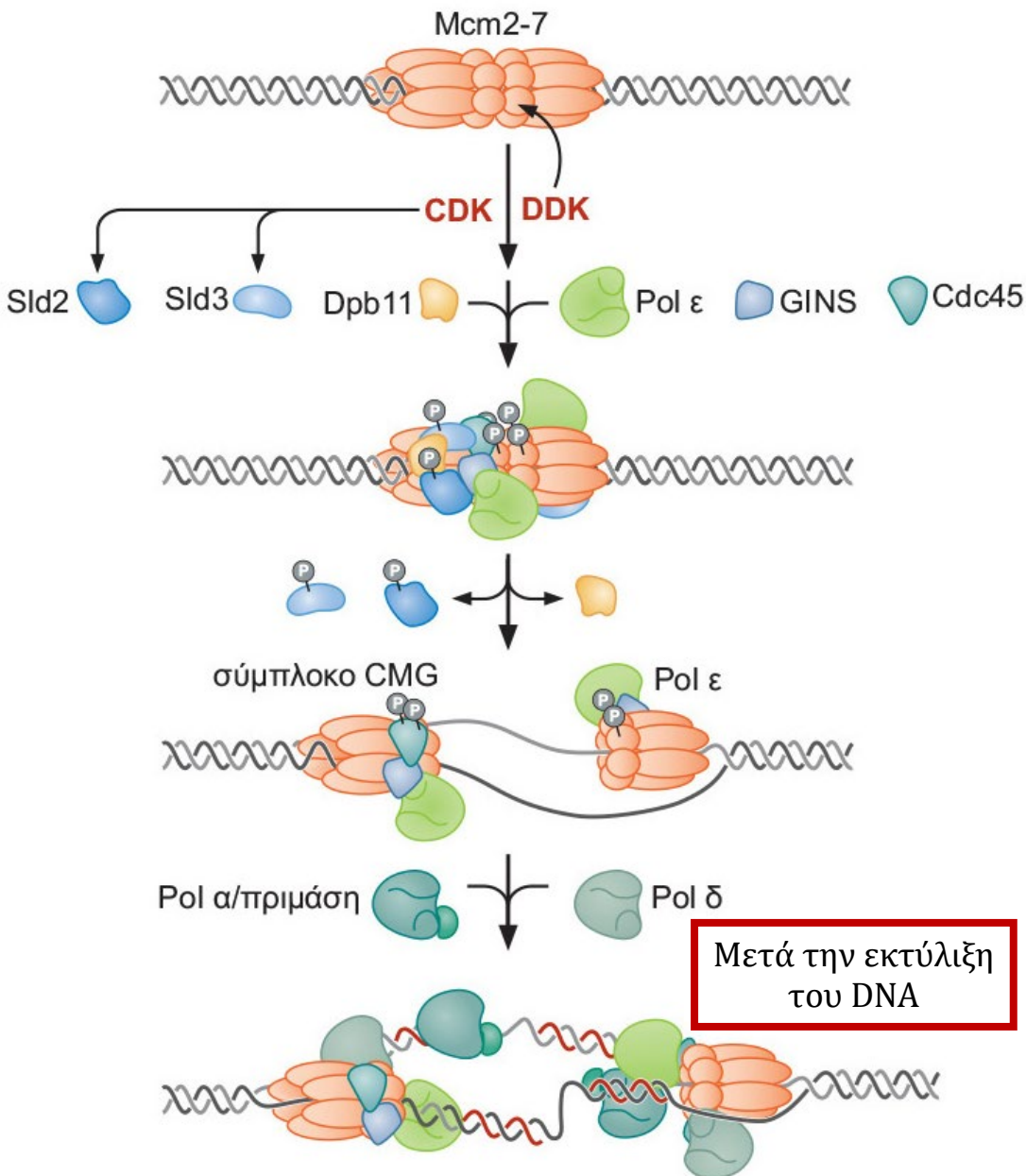
4. Η επιτυχής φόρτωση οδηγεί στην **απελευθέρωση των Cdc6 και Cdt1** από τη θέση έναρξης.

5. Η επακόλουθη **υδρόλυση της ATP από το ORC** είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να επανεκκινηθεί η διαδικασία.

6. Η ανταλλαγή του ATP με ADP επιτρέπει σε ένα νέο κύκλο φόρτωσης ελικάσης στη θέση έναρξης αντιγραφής.



Έναρξη αντιγραφής του DNA στους ευκαρυώτες



1. Οι προσδεμένες ελικάσες ενεργοποιούνται από δύο **κινάσες πρωτεϊνών**: α) την **CDK** και β) την **DDK**.

Κινάσες: Πρωτεΐνες που συνδέουν ομοιοπολικά φωσφορικές ομάδες σε πρωτεΐνες-στόχους.

2. Οι κινάσες αυτές ενεργοποιούνται κατά την S φάση και πραγματοποιούνται τα παρακάτω:

- Η **DDK** φωσφορυλιώνει την **Mcm2-7**
- Η **CDK** φωσφορυλιώνει τις **Sld2** και **Sld3**.

3. Οι φωσφορυλιωμένες Sld2 και Sld3 προσδένονται στην Dpb11.

4. Έτσι, διευκολύνεται η πρόσδεση των πρωτεϊνών Cdc45 και GINS στην ελικάση.

5. Οι πρωτεΐνες Cdc45 και GINS σχηματίζουν ένα σταθερό σύμπλοκο με την ελικάση Mcm2-7, το οποίο ονομάζεται **σύμπλοκο CMG**.

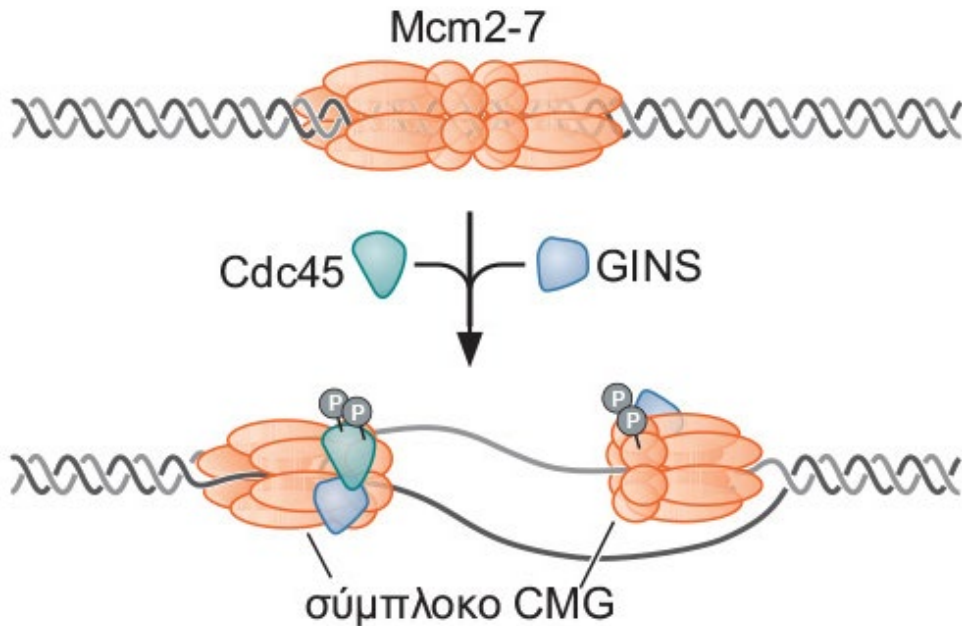
6. Η δημιουργία του συμπλόκου CMG προκαλεί **αύξηση της ενεργότητας της Mcm2-7**.

7. Η Pol ε συνδέεται ταυτόχρονα με την Cdc45 και GINS και δρα στην προπορευόμενη αλυσίδα.

8. Οι Sld2, Sld3 και Dpb11 απομακρύνονται από τη θέση έναρξης.

9. Προσελκύονται οι Pol α(πριμάση) και η Pol δ, οι οποίες δρουν κυρίως στην καθυστερούσα αλυσίδα.

Έναρξη αντιγραφής του DNA στους ευκαρυώτες



Πριν την ενεργοποίηση της Mcm2-7

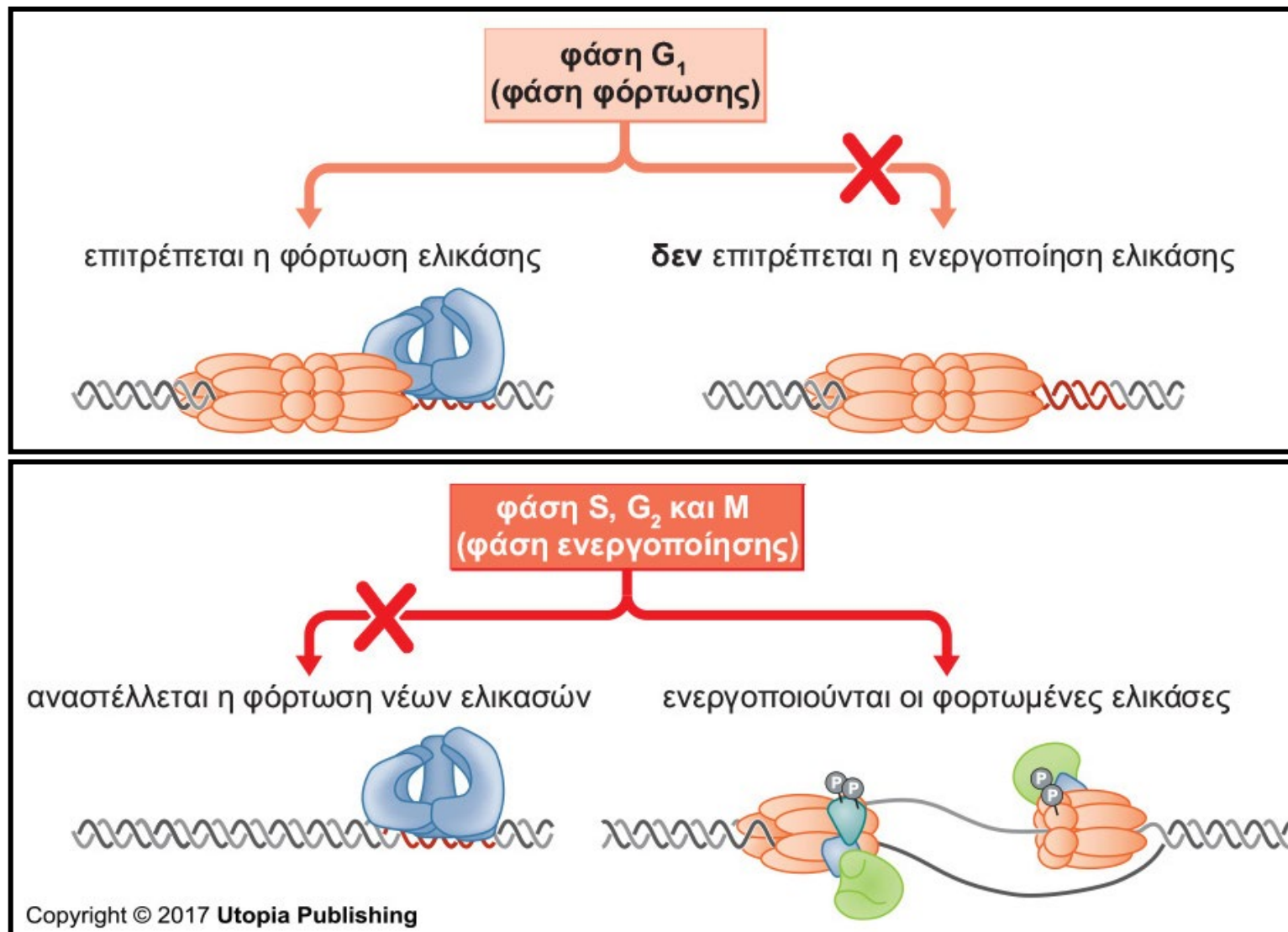
Οι ελικάσες περικυκλώνουν το **dsDNA** και σχηματίζουν ένα διμερές σύμπλοκο.

Μετά την ενεργοποίηση της Mcm2-7

Η πρωτεΐνη Mcm2-7 στο σύμπλοκο CMG θεωρείται ότι περικυκλώνει **ssDNA!!**, ενώ το διμερές σύμπλοκο παύει να υφίσταται.

Ρύθμιση της έναρξης αντιγραφής του DNA

Πως τα ευκαρυωτικά κύτταρα ελέγχουν τη δραστηριότητα εκατοντάδων ή και χιλιάδων θέσεων έναρξης αντιγραφής έτσι ώστε ούτε μια να ενεργοποιείται περισσότερες από μια φορές κατά τη διάρκεια ενός κυταρικού κύκλου;

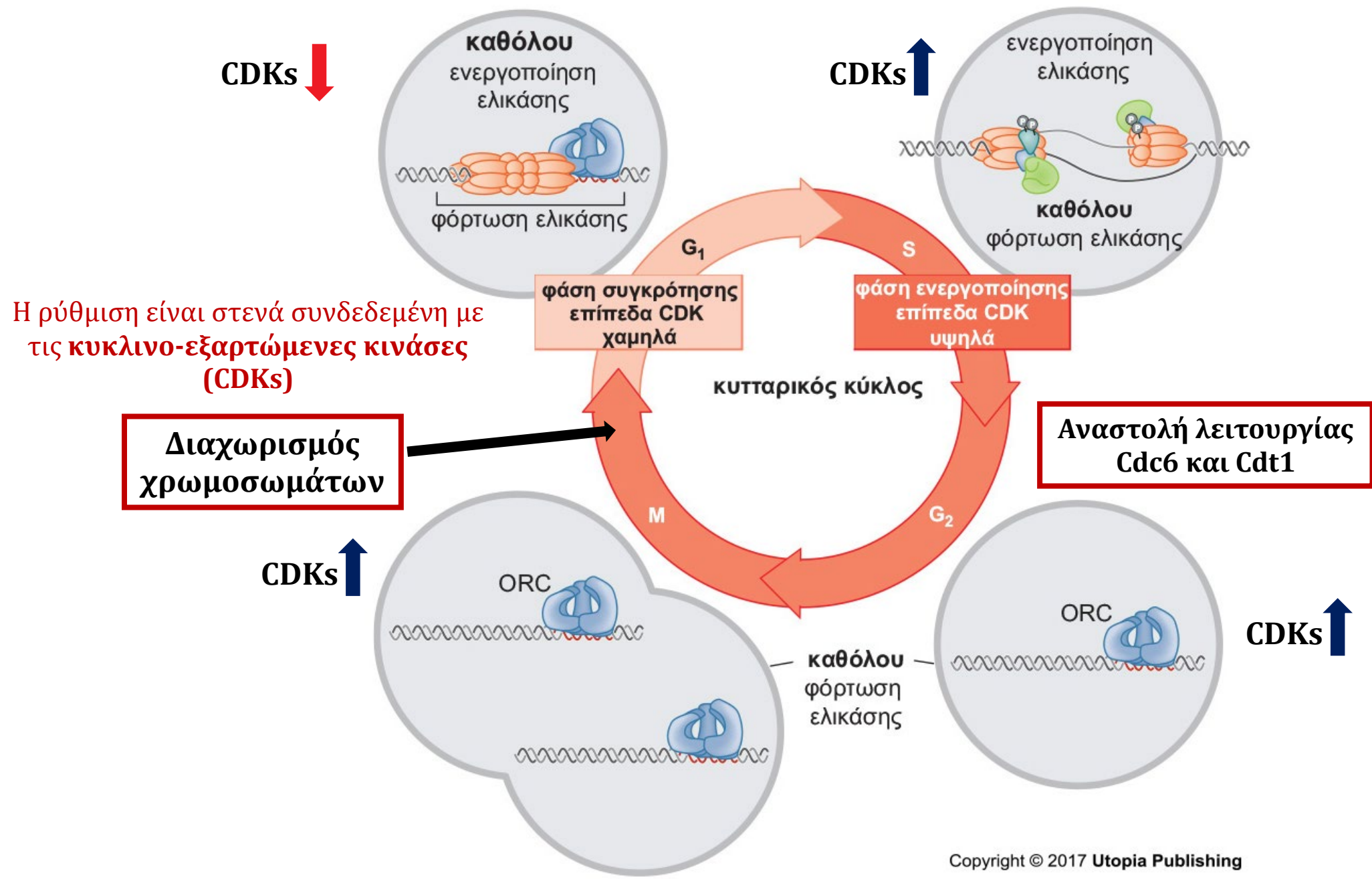


Ρύθμιση της έναρξης αντιγραφής του DNA

Μόνο όταν τα κύτταρα διαχωρίσουν τα διπλασιασμένα τους χρωμοσώματα και διαιρεθούν είναι σε θέση να εισέλθουν πάλι στη φάση G_1 και να φορτώσουν ελικάσες στις θέσεις έναρξης αντιγραφής

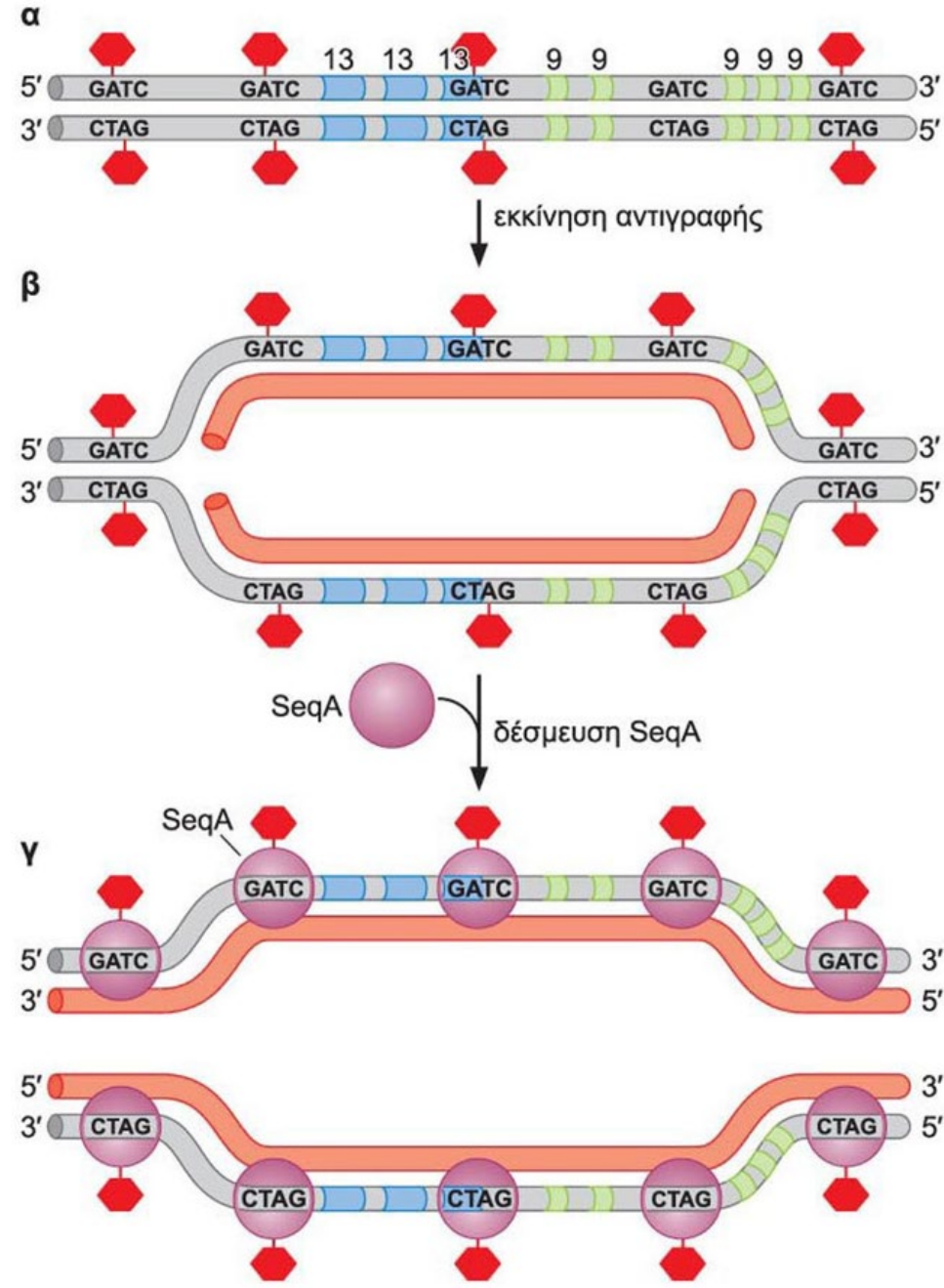
ΠΩΣ ΕΠΙΤΥΓΧΑΝΕΤΑΙ ΑΥΤΗ Η ΡΥΘΜΙΣΗ;

Ρύθμιση της έναρξης αντιγραφής του DNA



Ρύθμιση της έναρξης αντιγραφής του DNA στην E.Coli

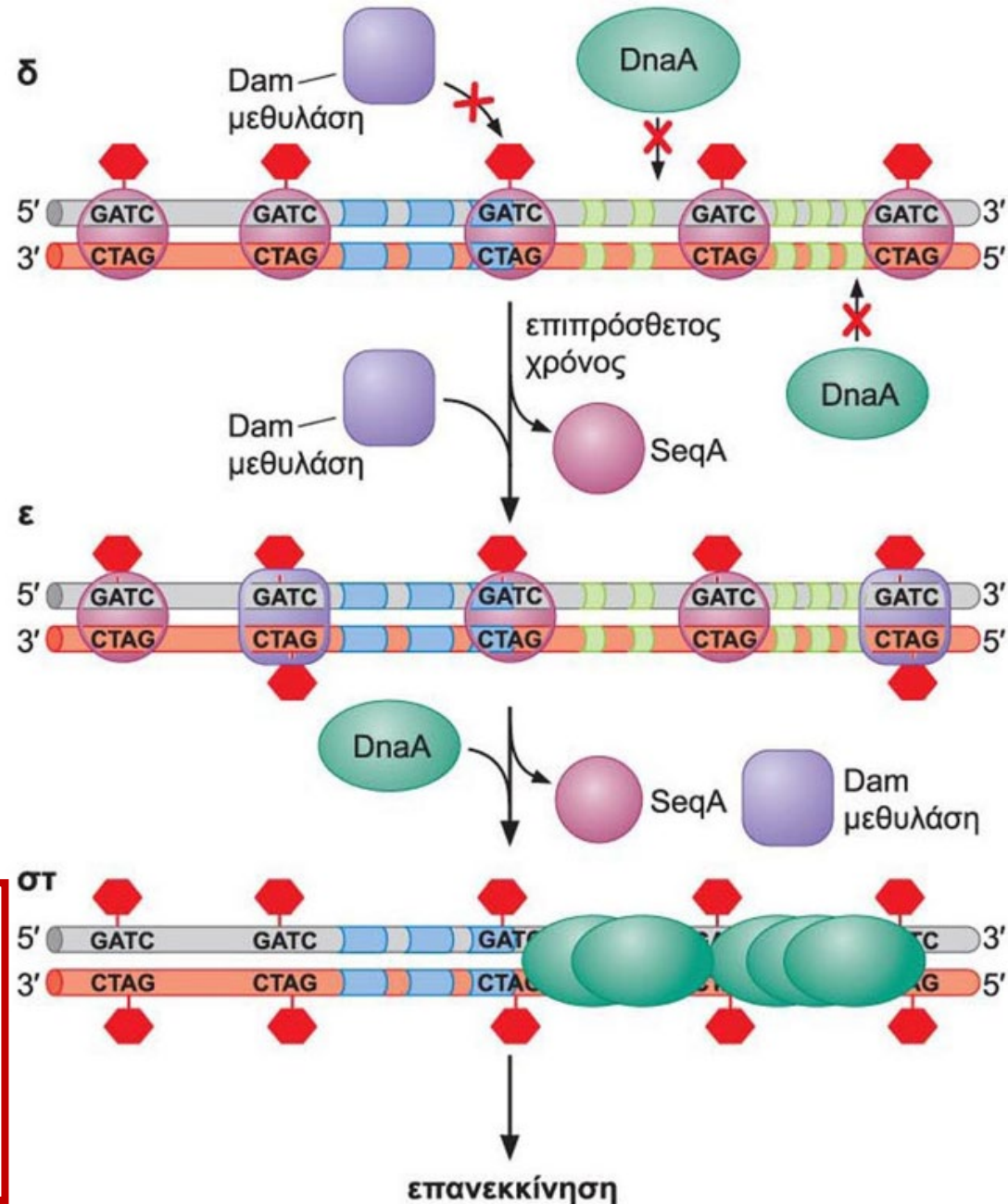
1. Η *E. Coli* μπορεί και **εκμεταλλεύεται αλλαγές στη μεθυλιωμένη κατάσταση του DNA** πριν και μετά την αντιγραφή.
2. Πριν την αντιγραφή του DNA, οι αλληλουχίες **GATC** είναι **«πλήρως» μεθυλιωμένες** σε όλο το γονιδίωμα της *E.Coli*.
3. Η **μεθυλοτρασφεράση Dam** μεθυλιώνει μια αδενίνη εντός κάθε αλληλουχίας **GATC**.
4. Επειδή τα κατάλοιπα A στις νέες αλυσίδες DNA δεν είναι μεθυλιωμένα, οι θέσεις που έχουν αντιγραφεί πρόσφατα θα είναι **ημιμεθυλιωμένες**, δηλαδή θα διαθέτουν μεθυλιωμένη αδενίνη στη μια αλυσίδα.
5. Η ημιμεθυλιωμένη κατάσταση ανιχνεύεται από την πρωτεΐνη **SeqA**. Η SeqA δεσμεύεται ισχυρά στην αλληλουχία GATC, αλλά μόνο όταν είναι ημιμεθυλιωμένη.



Ρύθμιση της έναρξης αντιγραφής του DNA στην E.Coli (2)

6. Η δεσμευση της πρωτεΐνης SeqA έχει δύο συνέπειες:
- αναστέλλει την πλήρη μεθυλίωση.
 - Αναστέλλει τη δέσμευση της DnaA στην περιοχή *oriC*.
7. Η SeqA σταδιακά αποσυνδέεται από τις θέσεις GATC και οι αλληλουχίες μπορούν να μεθυλιωθούν από την Dam.
8. Η πλήρης μεθυλίωση αναστέλλει την επαναπρόσδεση της SeqA στις θέσεις αυτές.
9. Όταν οι θέσεις GATC καθίστανται πλήρως μεθυλιωμένες, η DnaA μπορεί να δεσμεύσει τα 9-μερή στην περιοχή *oriC* και να κατευθύνει το νέο κύκλο αντιγραφής.

Η ημιμεθυλιωμένη κατάσταση των GATC είναι επακόλουθο της έναρξης αντιγραφής και αποτρέπει την ταχεία επανεκκίνηση της αντιγραφής από τα δύο νέα θυγατρικά αντίγραφα.



Ρύθμιση της έναρξης αντιγραφής του DNA στην E.Coli (3)

- Μόνο η DnaA που είναι συνδεδεμένη με ATP μπορεί να κατευθύνει την έναρξη της αντιγραφής.
- Κατά τη διαδικασία έναρξης, η ATP μετατρέπεται σε ADP.
- Συνεπώς, η διαδικασία έναρξης της αντιγραφής οδηγεί σε **απενεργοποίηση της DnaA και αποτρέπει την επαναχρησιμοποίησή** της.
- Η διαδικασία ανταλλαγής ADP με ATP είναι αργή. Το γεγονός αυτό καθυστερεί τη συσσώρευση ικανής ποσότητας ενζύμου DnaA, προκειμένου να ξεκινήσει την έναρξη νέου κύκλου αντιγραφής.

Ρύθμιση της έναρξης αντιγραφής του DNA στην *E.Coli*

Ο απαιτούμενος χρόνος για την αντιγραφή του γονιδιώματος της *E.Coli* είναι **~40 min**

Τα βακτήρια *E.Coli* διαιρούνται κάθε **~ 20 min**

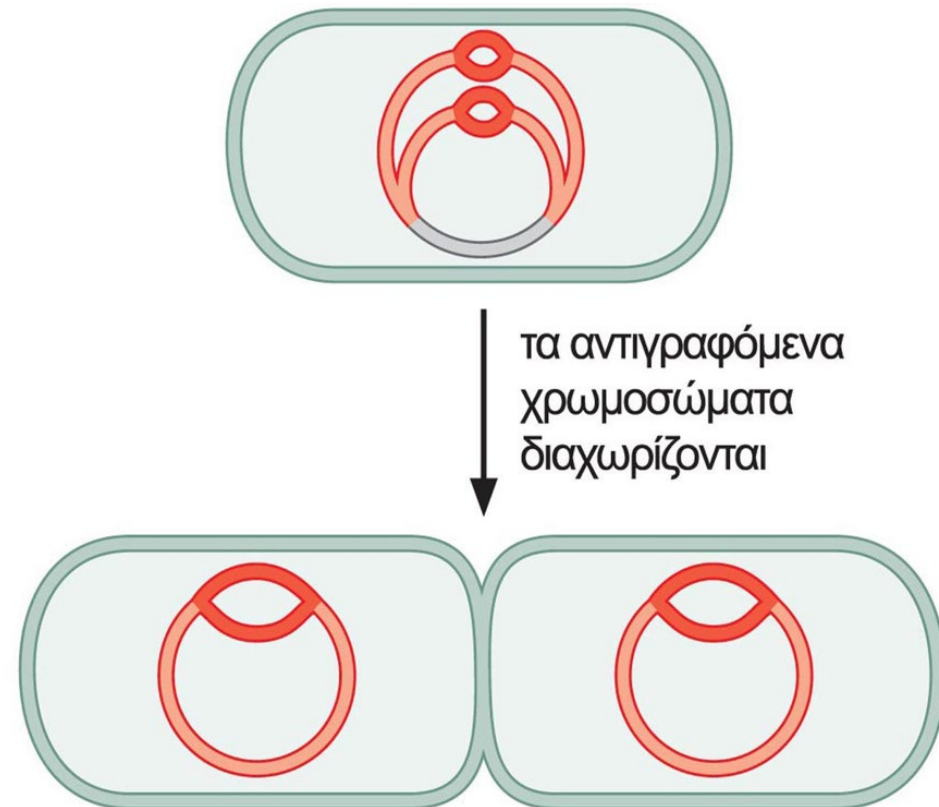
Πως εξηγείται το γεγονός αυτό;

Ρύθμιση της έναρξης αντιγραφής του DNA στην E.Coli

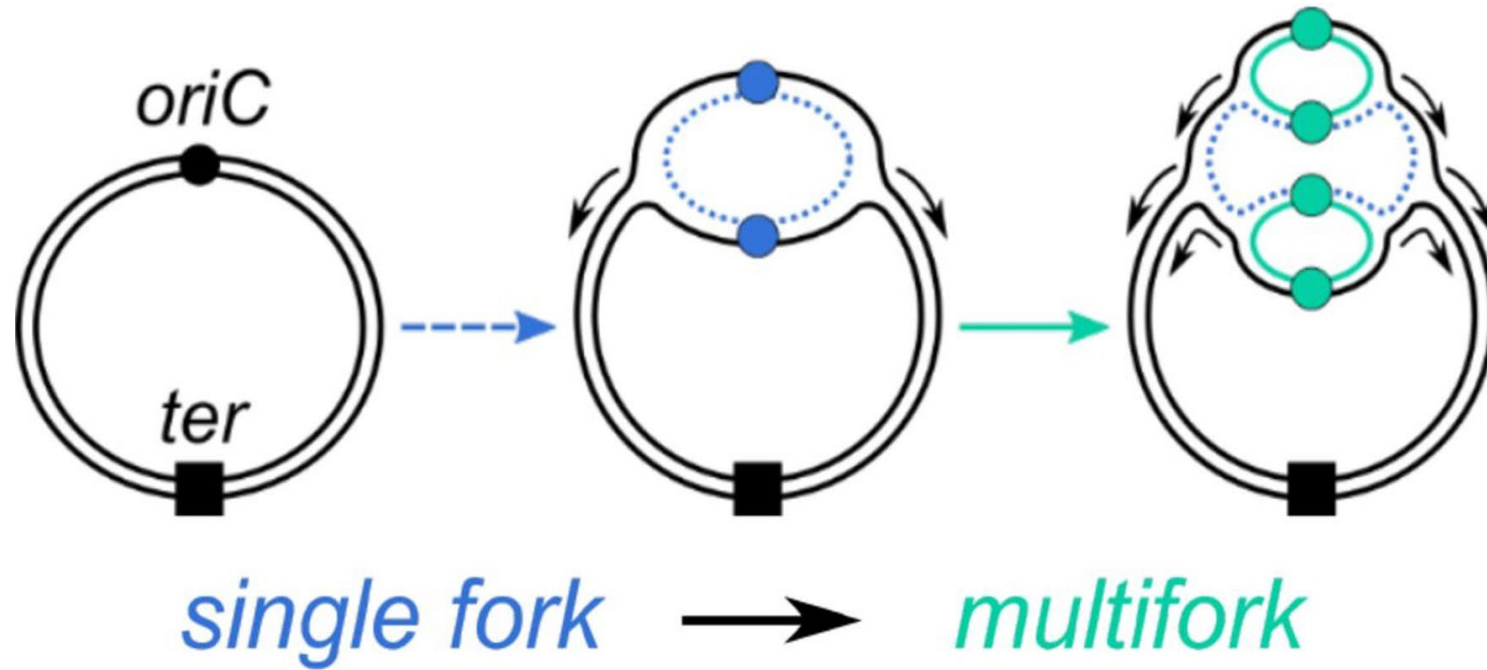
- Προκειμένου να μπορέσουν τα κύτταρα *E. Coli* να διαιρούνται στο μέγιστο ρυθμό, τα θυγατρικά αντίγραφα πρέπει να εκκινήσουν την αντιγραφή **ΠΡΙΝ** την ολοκλήρωση του προηγούμενου κύκλου αντιγραφής.
- Τα κύτταρα *E. Coli* επανεκκινούν την αντιγραφή μια φορά πριν την ολοκλήρωση των προηγούμενων κύκλων αντιγραφής.
- **ΩΣΤΟΣΟ**: Η εκκίνηση ΔΕΝ πραγματοποιείται περισσότερες από μια φορές ανά κύκλο κυτταρικής διαίρεσης.

Στην E.Coli τα χρωμοσώματα που διαχωρίζονται στα θυγατρικά κύτταρα είναι **ενεργώς αντιγραφόμενα**

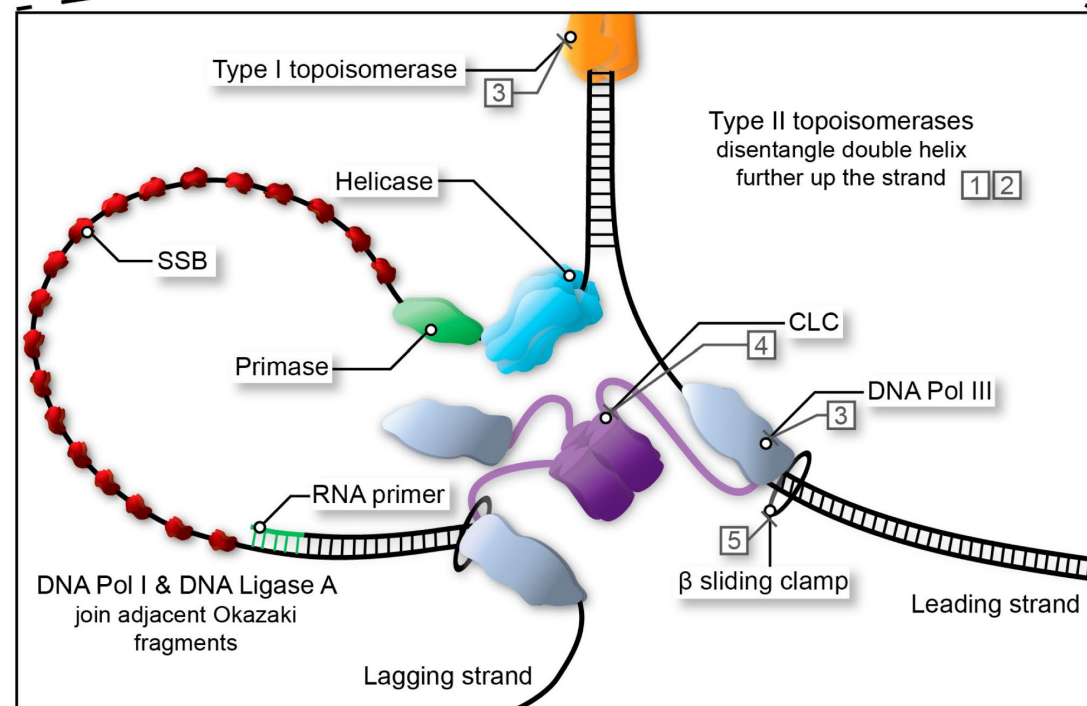
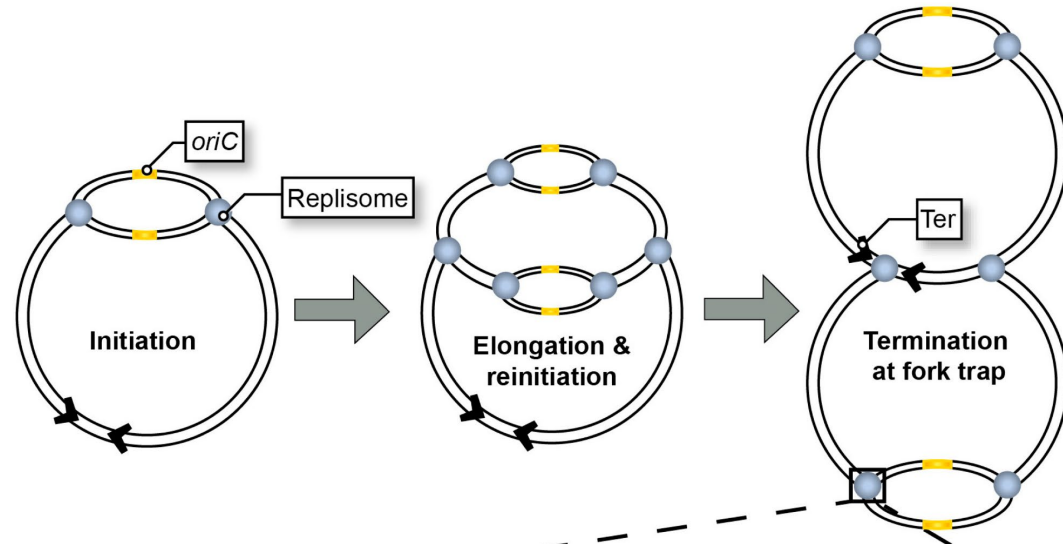
Αυτό είναι πλήρως αντίθετο με ότι συμβαίνει στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα οποία δεν ξεκινούν το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων αν δεν έχει ολοκληρωθεί η αντιγραφή.



Ρύθμιση της έναρξης αντιγραφής του DNA στην E.Coli



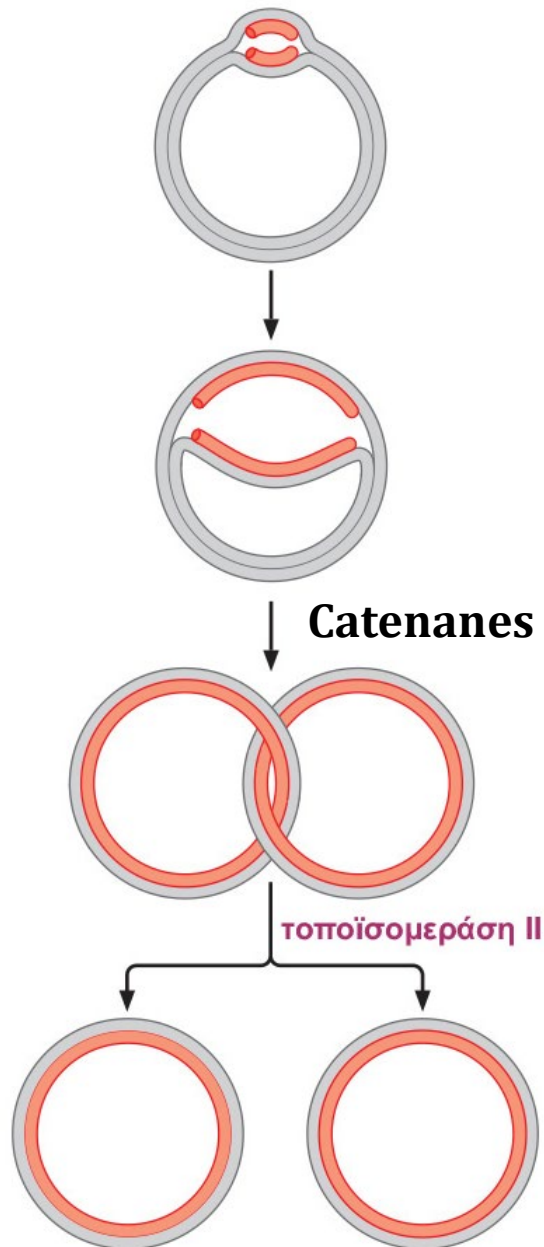
Ρύθμιση της έναρξης αντιγραφής του DNA στην E.Coli



Η ολοκλήρωση της αντιγραφής

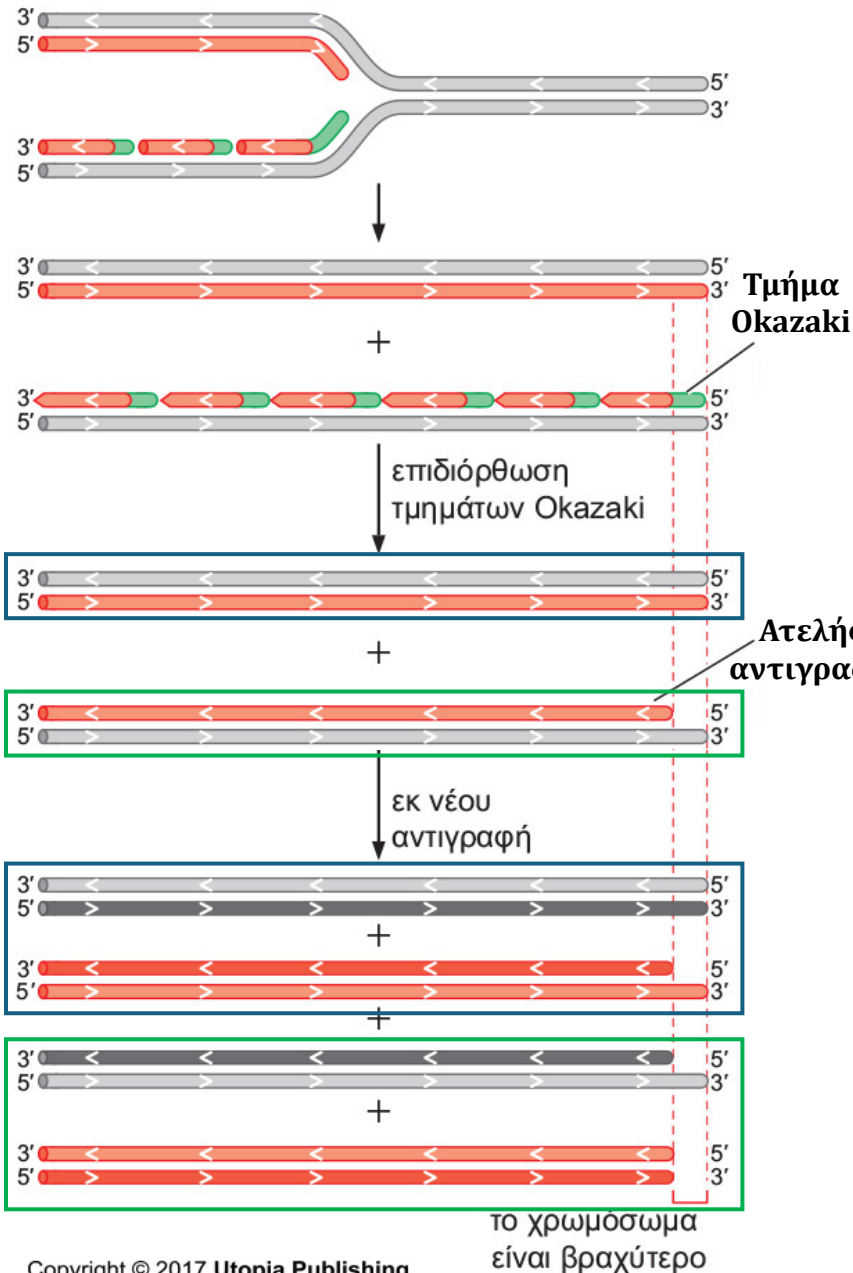
- Απαιτεί ένα σύνολο ειδικών γεγονότων.
- Τα γεγονότα αυτά είναι διαφορετικά για τα κυκλικά, συγκριτικά με τα γραμμικά χρωμοσώματα.
- Για ένα κυκλικό χρωμόσωμα, η διχάλα αντιγραφής μπορεί να αντιγράψει ολόκληρο το μόριο, αλλά τα θυγατρικά μόρια που προκύπτουν είναι τοπολογικά συνδεδεμένα το ένα με το άλλο.
- Στα γραμμικά χρωμοσώματα, η αντιγραφή των άκρων δε μπορεί να ολοκληρωθεί από τη συμβατική διχάλα αντιγραφής.

Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε κυκλικά DNA



- Αφού έχει ολοκληρωθεί η αντιγραφή ενός κυκλικού χρωμοσώματος, τα **θυγατρικά μόρια DNA παραμένουν συνδεδεμένα μεταξύ τους.**
- Για να διαχωριστούν αυτά τα χρωμοσώματα στα θυγατρικά κύτταρα, τα δύο κυκλικά μόρια πρέπει να αποσυνδεθούν το ένα από το άλλο ή να σπάσει η αλυσίδα.
- Ο διαχωρισμός των δύο χρωμοσωμάτων πραγματοποιείται με τη δράση των **τοποϊσομερασών τύπου II.**
- Τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα να διασπούν ένα μόριο dsDNA και να περνούν ένα δεύτερο μόριο DNA μέσα από αυτή τη θραύση.

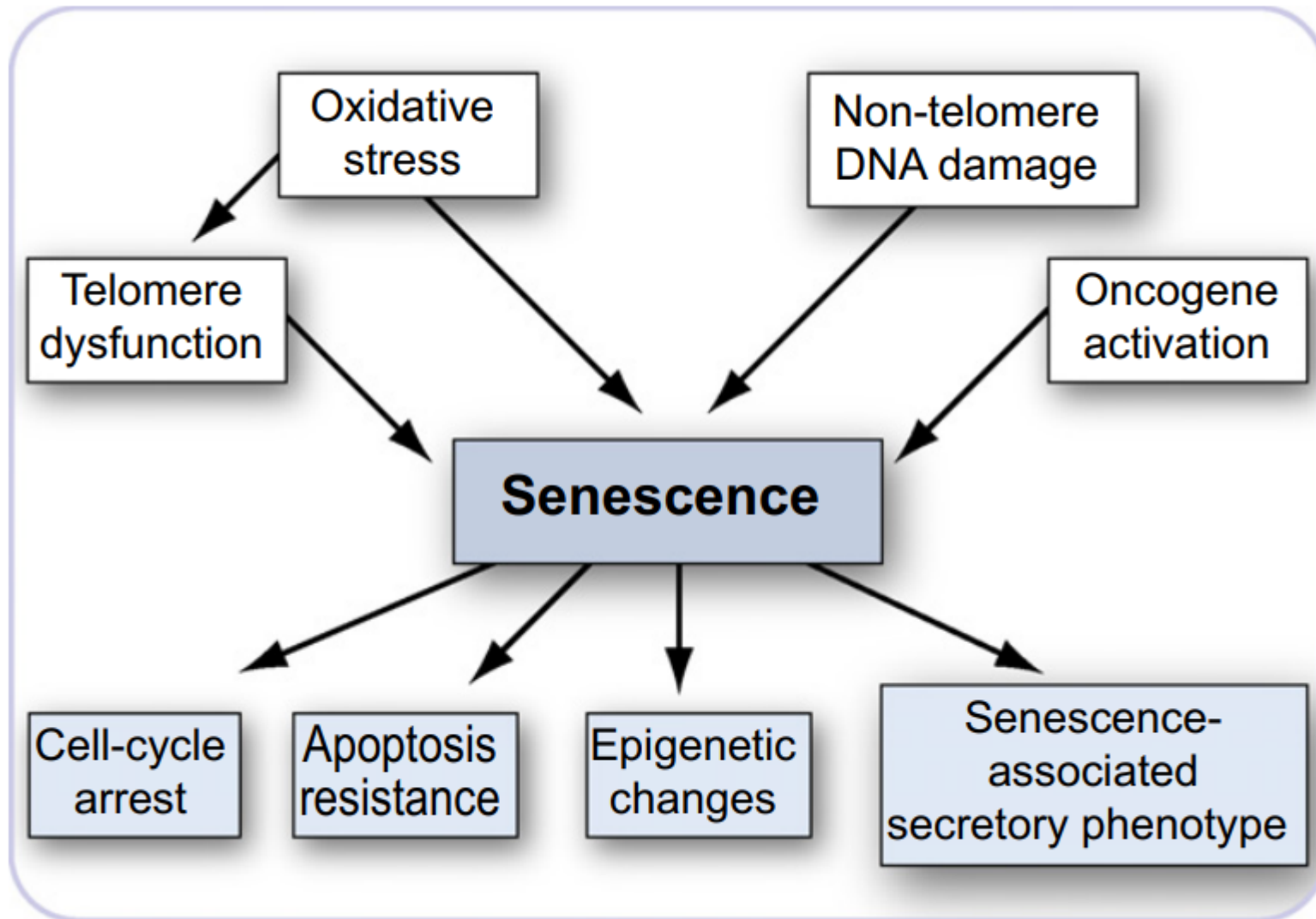
Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA



- Στην προπορευόμενη αλυσίδα, ένας RNA εκκινητής είναι ικανός να κατευθύνει την έναρξη της αντιγραφής μέχρι το 5' άκρο του εκμαγείου.
- Η σύνθεση της καθυστερούσας αλυσίδας ΔΕΝ είναι ικανή να αντιγράψει τα άκρα των γραμμικών χρωμοσωμάτων.
- Σε κάποιο σημείο κοντά στο άκρο, η πριμάση δεν έχει πλέον επαρκή χώρο για να συνθέσει νέο εκκινητή.
- Έτσι η αντιγραφή στην αλυσίδα αυτή είναι **ατελής** και υπάρχει μια **μικρή περιοχή ssDNA στο 3' άκρο**.

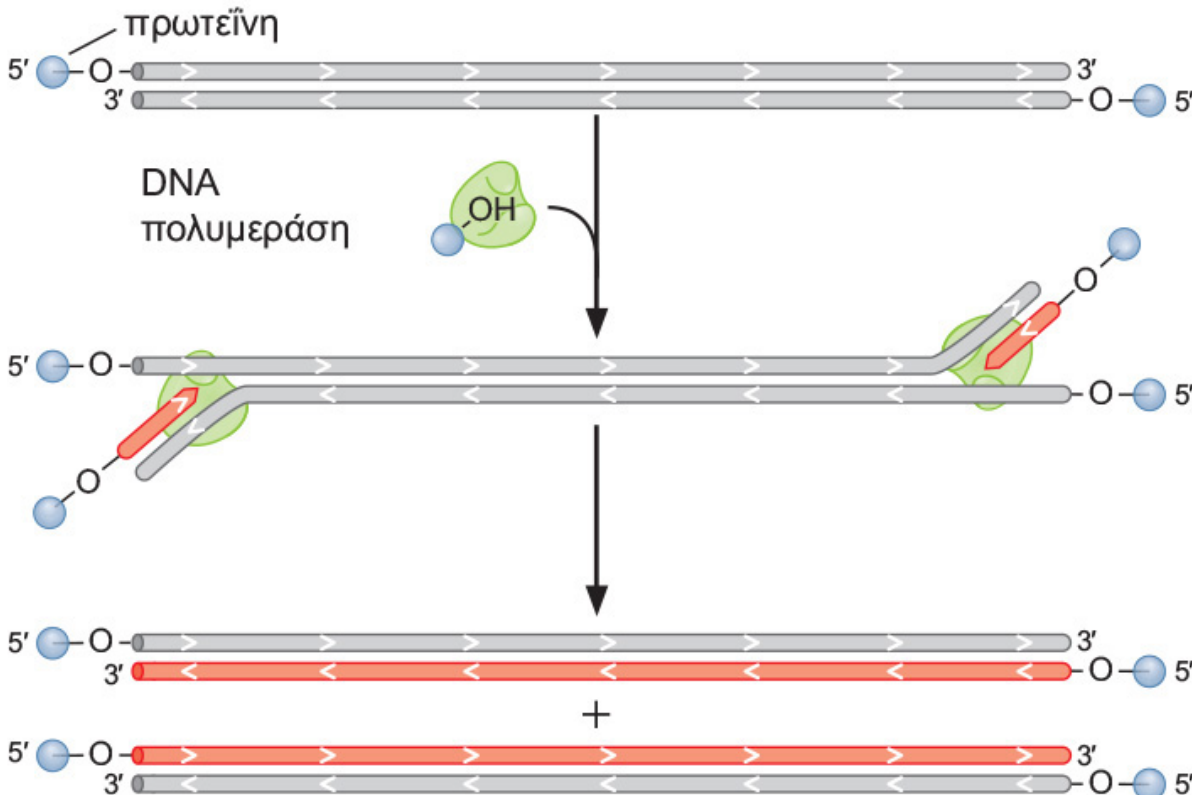
Hayflick limit

Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA



Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA

- Το πρόβλημα αυτό μπορεί να επιλυθεί με πολλούς τρόπους.
- Μια λύση είναι η χρήση της «**πρωτεΐνης εκκίνησης**» (**priming protein**).
- Η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως RNA εκκινητής για το τελευταίο τμήμα Okazaki σε κάθε άκρο του χρωμοσώματος.



Η πρωτεΐνη εκκίνησης δεσμεύεται στο εκμαγείο της καθυστερούσας αλυσίδας.

Χρησιμοποιεί ένα αμινοξύ για να παρέχει το OH που αντικαθιστά το 3'-OH, το οποίο φυσιολογικά παρέχεται από έναν RNA εκκινητή.

Συνδέεται ομοιοπολικά στο 5' άκρο του χρωμοσώματος.

Ο μηχανισμός αυτός πραγματοποιείται σε γραμμικά χρωμοσώματα βακτηρίων, καθώς επίσης και σε γραμμικά DNA συγκεκριμένων βακτηριακών και ζωικών ιών

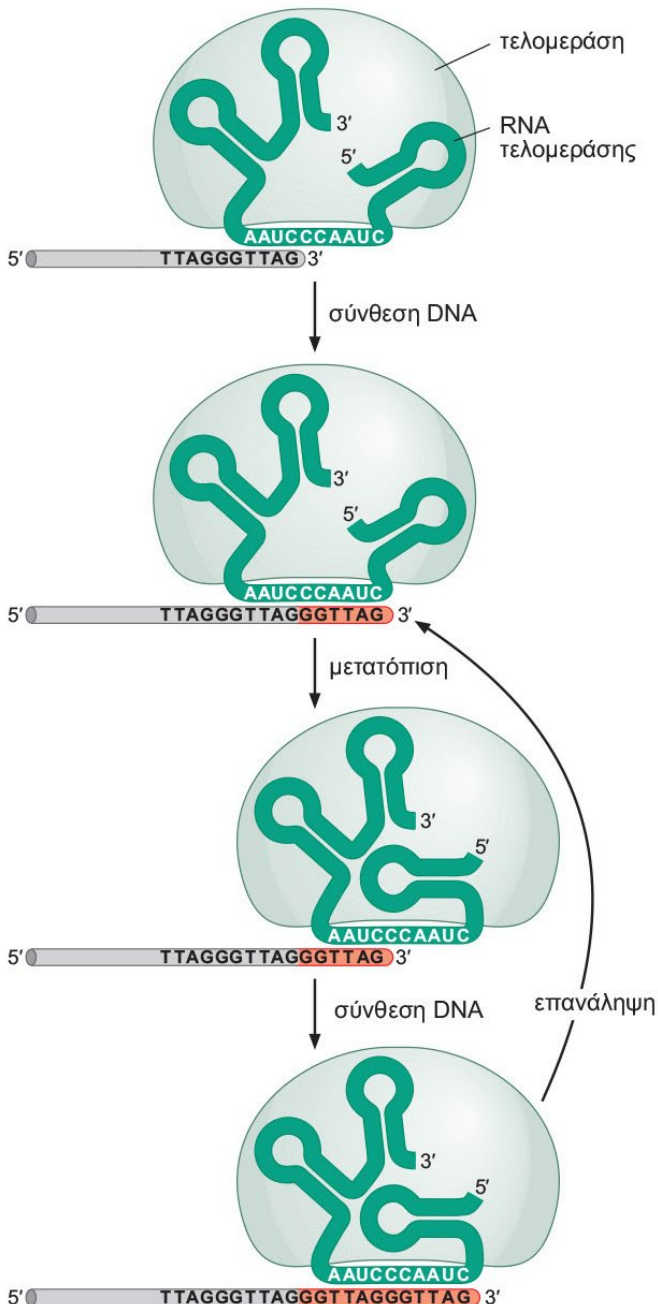
Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA

- Διαφορετική λύση στα ευκαρυωτικά κύτταρα!
- Τα τελομερή στα ευκαρυωτικά κύτταρα αποτελούνται κατά κανόνα από πολλές διαδοχικές επαναλήψεις της αλληλουχίας 5'-TTAGGG-3'.
- Πολλές επαναλήψεις είναι δίκλωνες.
- Το 3' άκρο κάθε χρωμοσώματος εκτείνεται περισσότερο από το 5' άκρο ως ssDNA.
- Η δομή αυτή δρα ως σημείο έναρξης της αντιγραφής αλλά ΔΕΝ αλληλεπιδρά με τις ίδιες πρωτεΐνες, όπως οι υπόλοιπες θέσεις εντός των γραμμικών χρωμοσωμάτων.
- Αντίθετα, στρατολογείται μια **ειδική DNA πολυμεράση**, η οποία ονομάζεται **τελομεράση**.

Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA

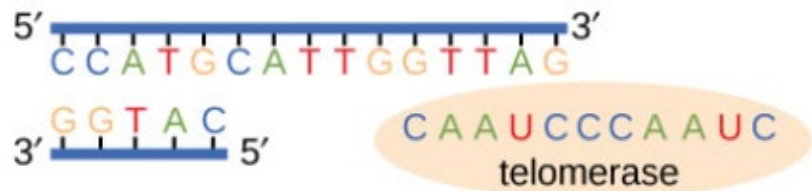
- Η τελομεράση είναι μια **ριβονουκλεοπρωτεΐνη**, δηλαδή αποτελείται από **RNA** και πολλαπλές πρωτεϊνικές υπομονάδες.
- Το συστατικό RNA του ενζύμου ονομάζεται **TER (telomerase RNA)**.
- Επεκτείνει το 3' άκρο του υποστρώματος.
- **ΔΕΝ** χρειάζεται εξωγενές εκμαγείο **dsDNA** προκειμένου να πραγματοποιηθεί η κατεύθυνση της σύνθεσης του DNA.
- Αντίθετα, το συστατικό RNA που διαθέτει η τελομεράση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθεί το κατάλληλο υπόστρωμα που θα κατευθύνει τη σύνθεση.

Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA

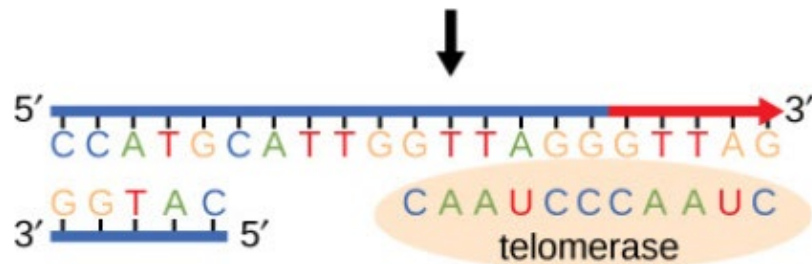


- Μια από τις πρωτεϊνικές υπομονάδες της τελομεράσης ονομάζεται **αντιστροφή μεταγραφάση της τελομεράσης (telomerase reverse transcriptase, TERT)**.
- Η **ενεργότητα TERT** του ενζύμου χρησιμοποιεί το RNA εκμαγείο για να συνθέσει DNA στο άκρο της περιοχής του εκμαγείου του TER.
- Ωστόσο, δεν μπορεί να συνεχίσει να αντιγράφει το RNA μετά από αυτό το σημείο.
- Σε αυτό το σημείο το RNA εκμαγείο αποδεσμεύεται από το DNA, υβριδοποιείται στα τελευταία τέσσερα νουκλεοτίδια του τελομερούς και πραγματοποιείται επανάληψη της διαδικασίας.
- Πρέπει να έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το RNA εκμαγείο της από το DNA, προκειμένου να επιτρέψει επαναλαμβανόμενους κύκλους.

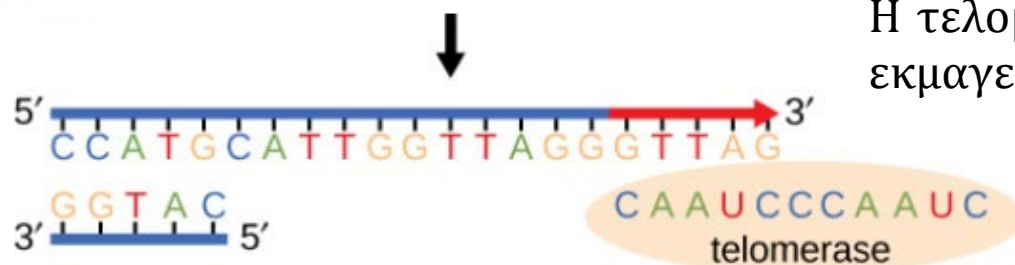
Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA



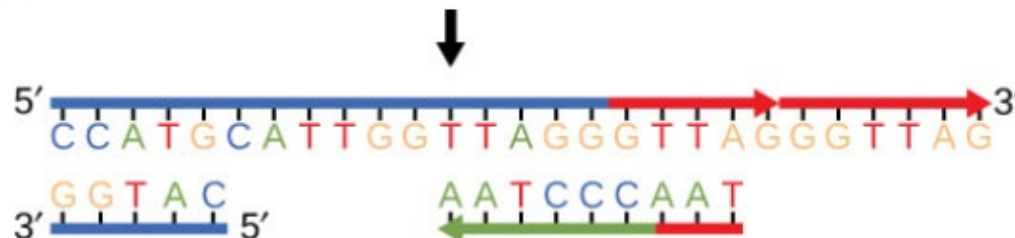
Η τελομεράση χρησιμοποιεί το TER, προκειμένου να υβριδοποιηθεί στο 3' άκρο της ssDNA περιοχής του χρωμοσώματος.



Το RNA εκμαγείο χρησιμοποιείται προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA.

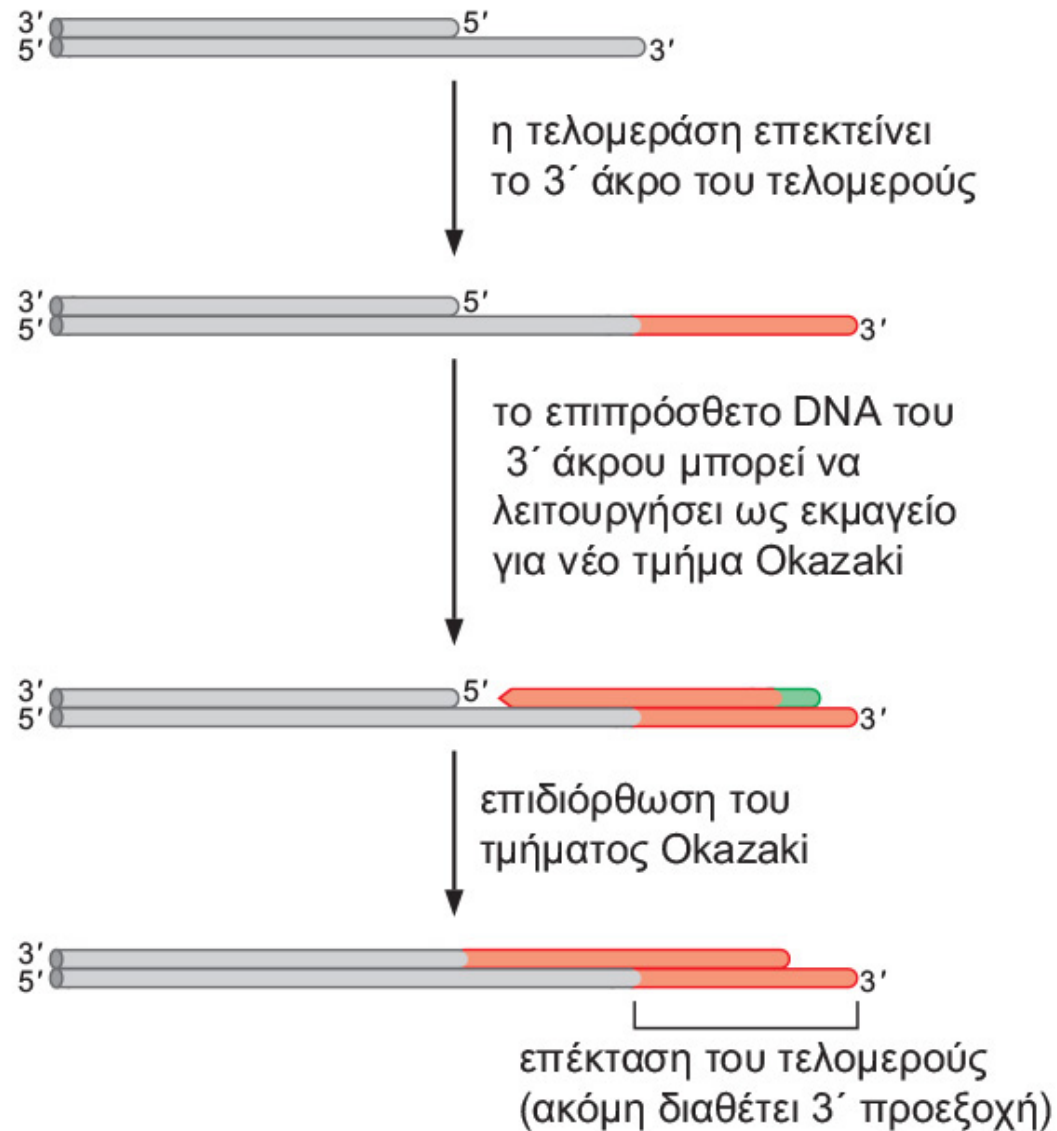


Η τελομεράση μετακινείται μέσω αποδέσμευσης του RNA εκμαγείου και υβριδοποίησής του στο νέο 3' άκρο.

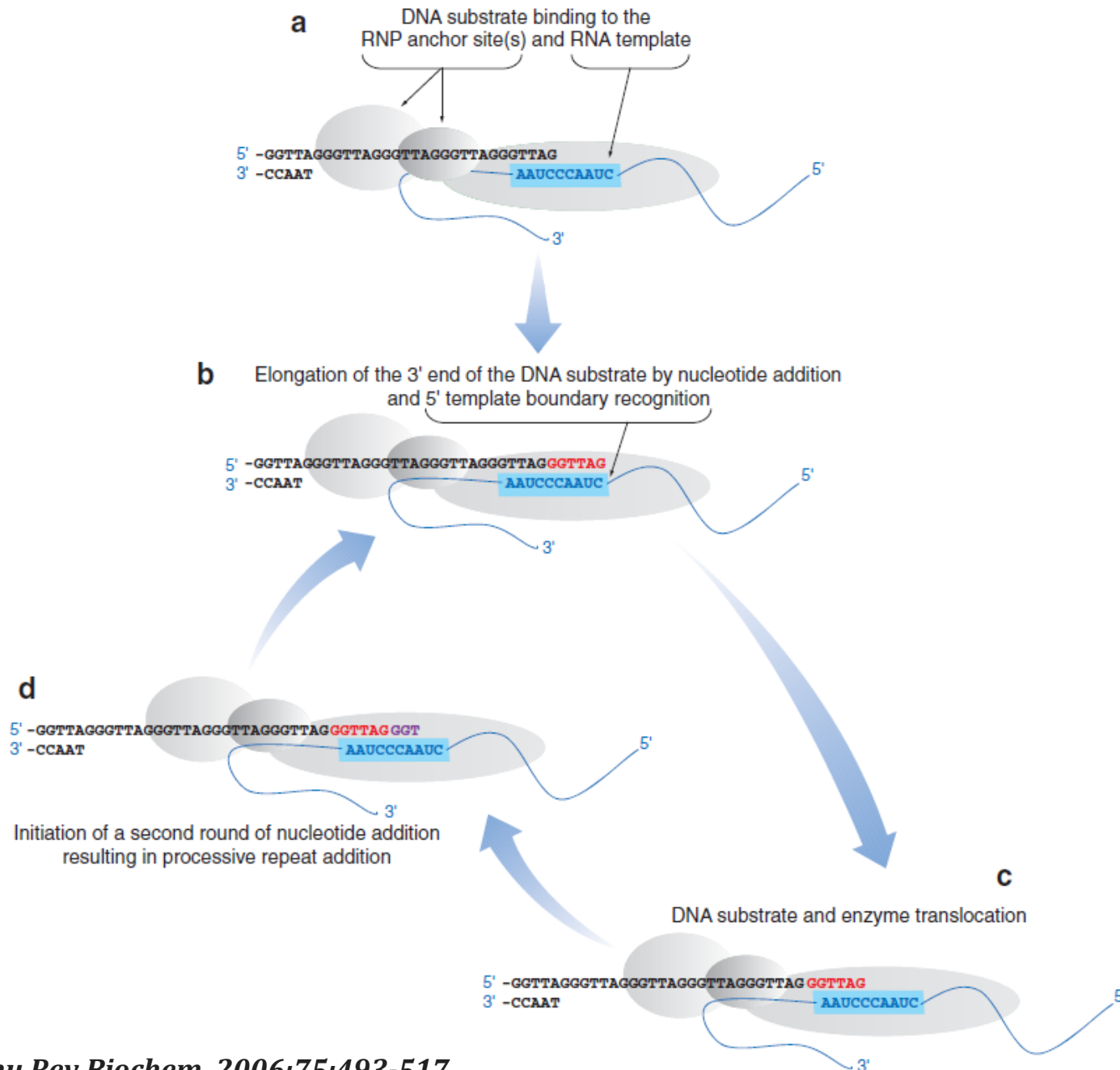


Μέσω της DNA πριμάσης και της DNA πολυμεράσης, πραγματοποιείται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας.

Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA



Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA



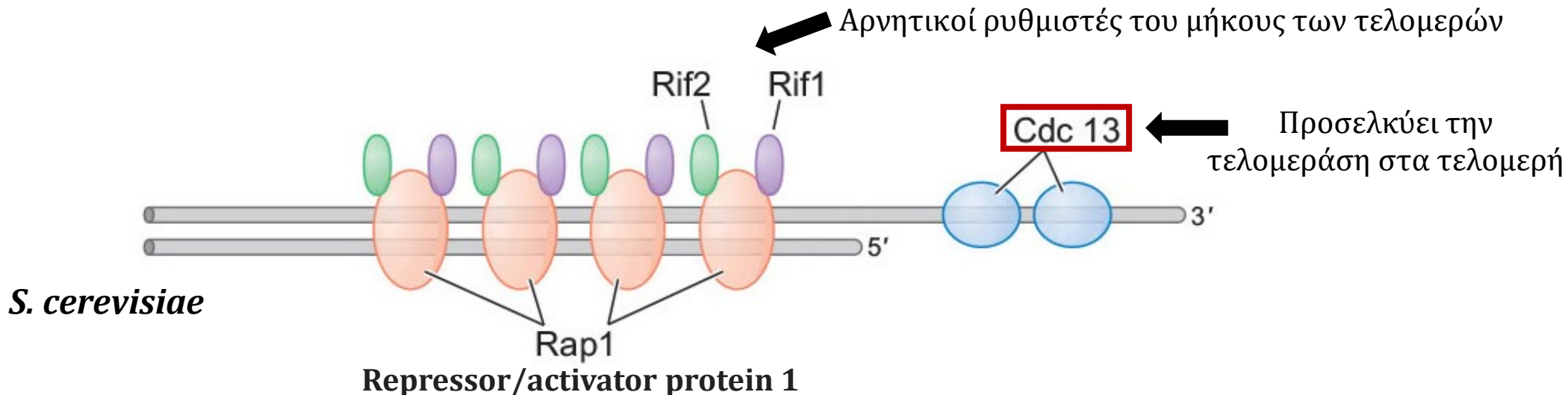
Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA

**Πως ρυθμίζεται ο αριθμός επαναλήψεων
επέκτασης των άκρων από την τελομεράση;**

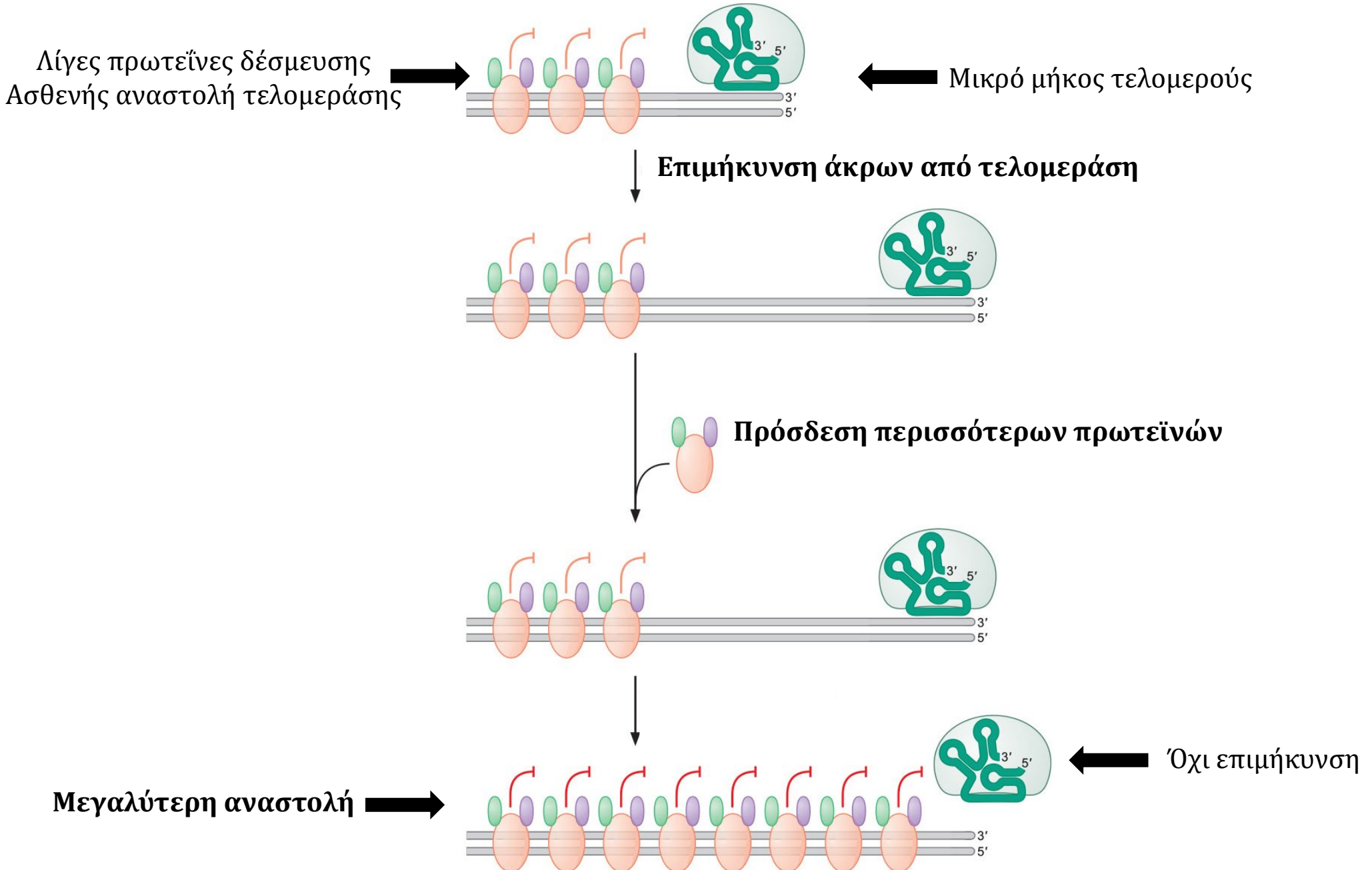
Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA

Μηχανισμός βρόχου αρνητικής ανάδρασης – Negative feedback loop

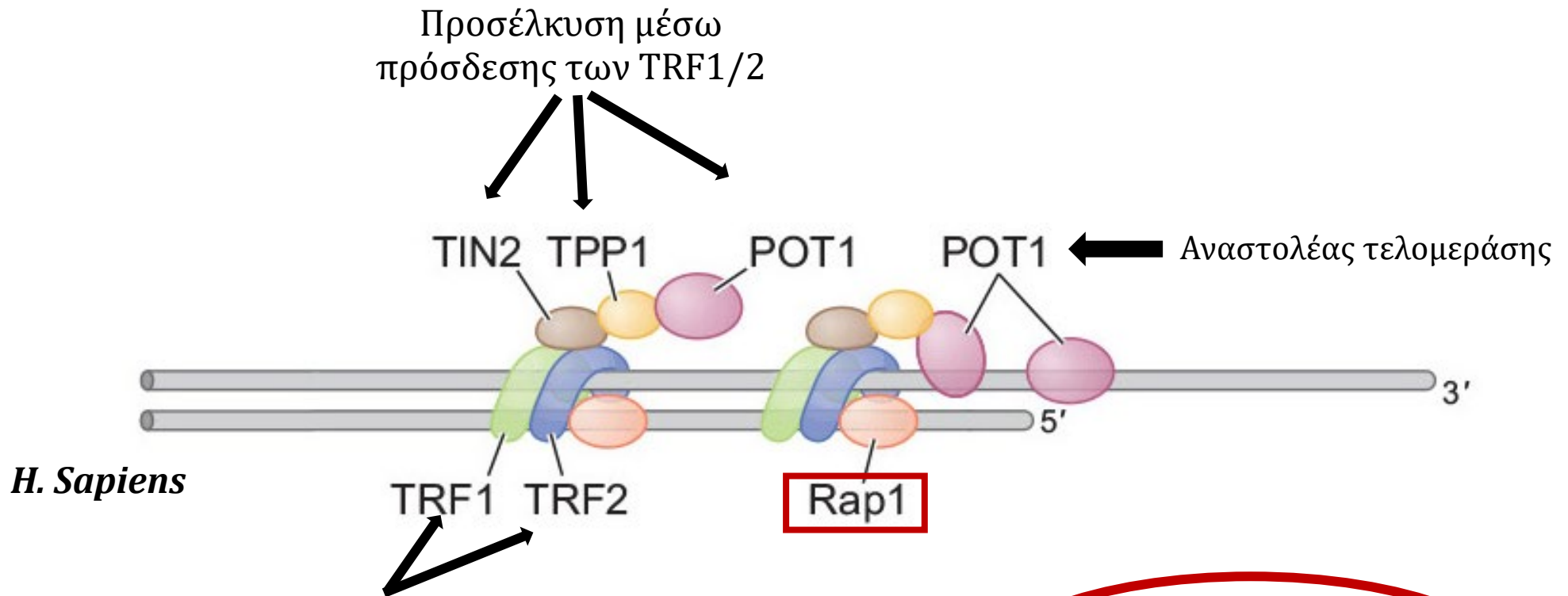
- Η επέκταση των τελομερών ρυθμίζεται από **ειδικές πρωτεΐνες**, καθώς η επέκταση θα μπορούσε θεωρητικά να συνεχίζεται επ' άοριστο.
- Οι πρωτεΐνες αυτές **προσδένονται στο dsDNA του τελομερούς** και δρουν ως **ασθενείς αναστολείς** της ενεργότητας της τελομεράσης.
- Λίγα αντίγραφα πρωτεϊνών προσδεδεμένα στο dsDNA του τελομερούς δεν μπορούν να εμποδίσουν την τελομεράση να επεκτείνει το 3'-OH άκρο του τελομερούς.
- Αύξηση της αλληλουχίας του τελομερούς δίνει τη δυνατότητα σε περισσότερες πρωτεΐνες να δεσμευτούν στο dsDNA, οδηγώντας σε αναστολή δράσης του ενζύμου.



Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA



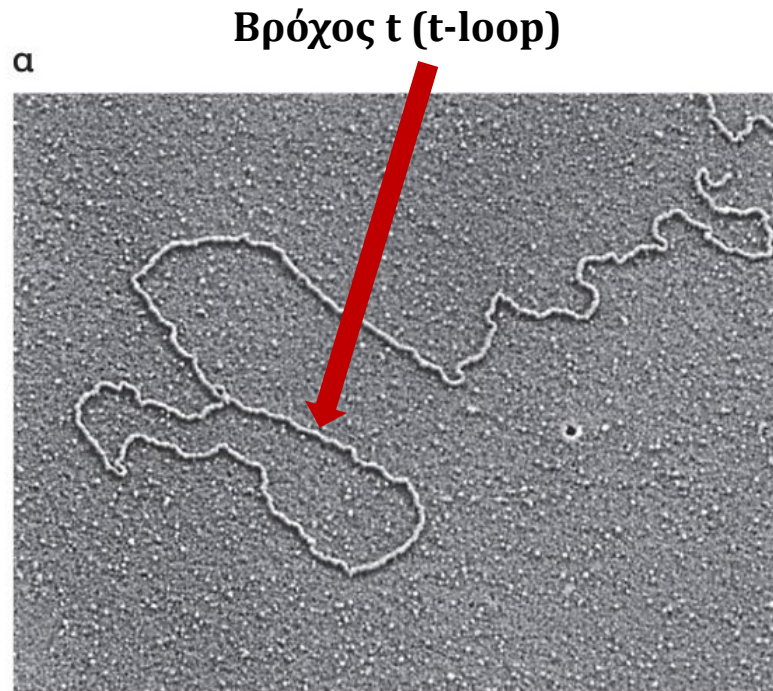
Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA



1. Πρόσδεση στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες «TTAGGG» στο dsDNA.
2. Αλληλεπίδραση με TIN2, TPP1 και POT1.

Shelterin

Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA

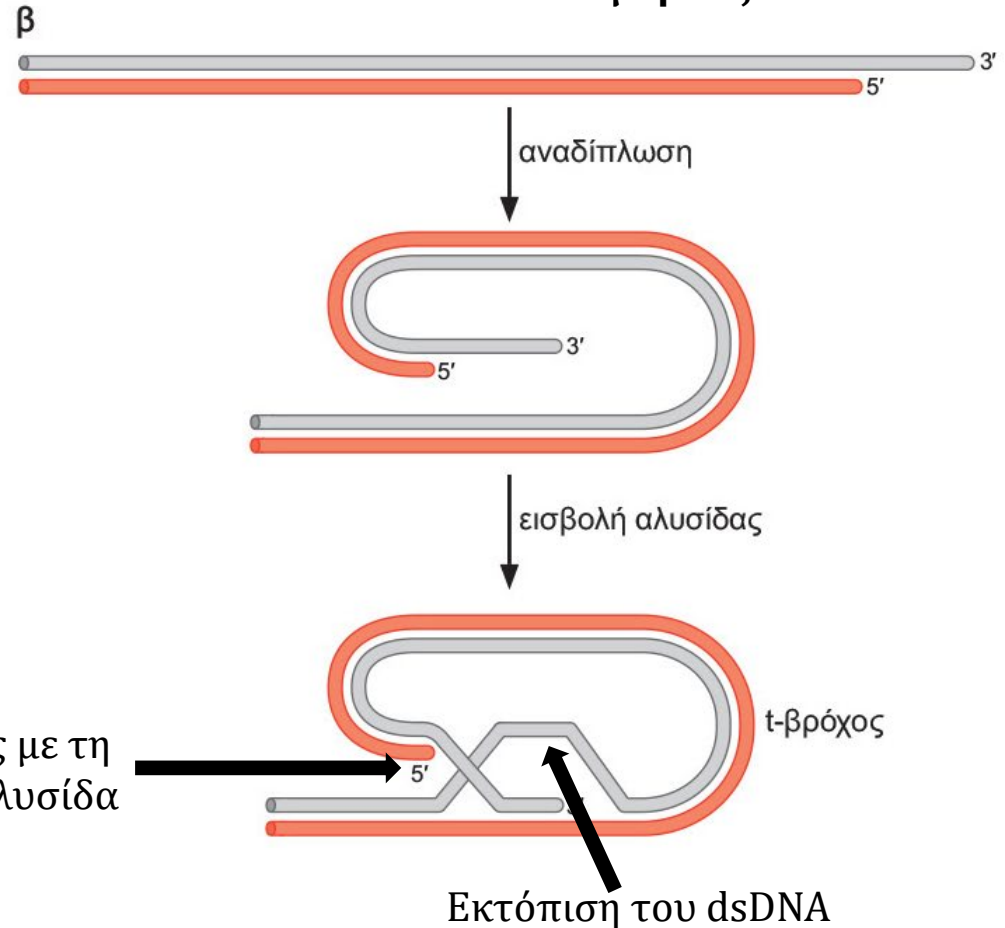


Copyright © 2017 Utopia Publishing

Σχηματισμός έλικας με τη συμπληρωματική αλυσίδα

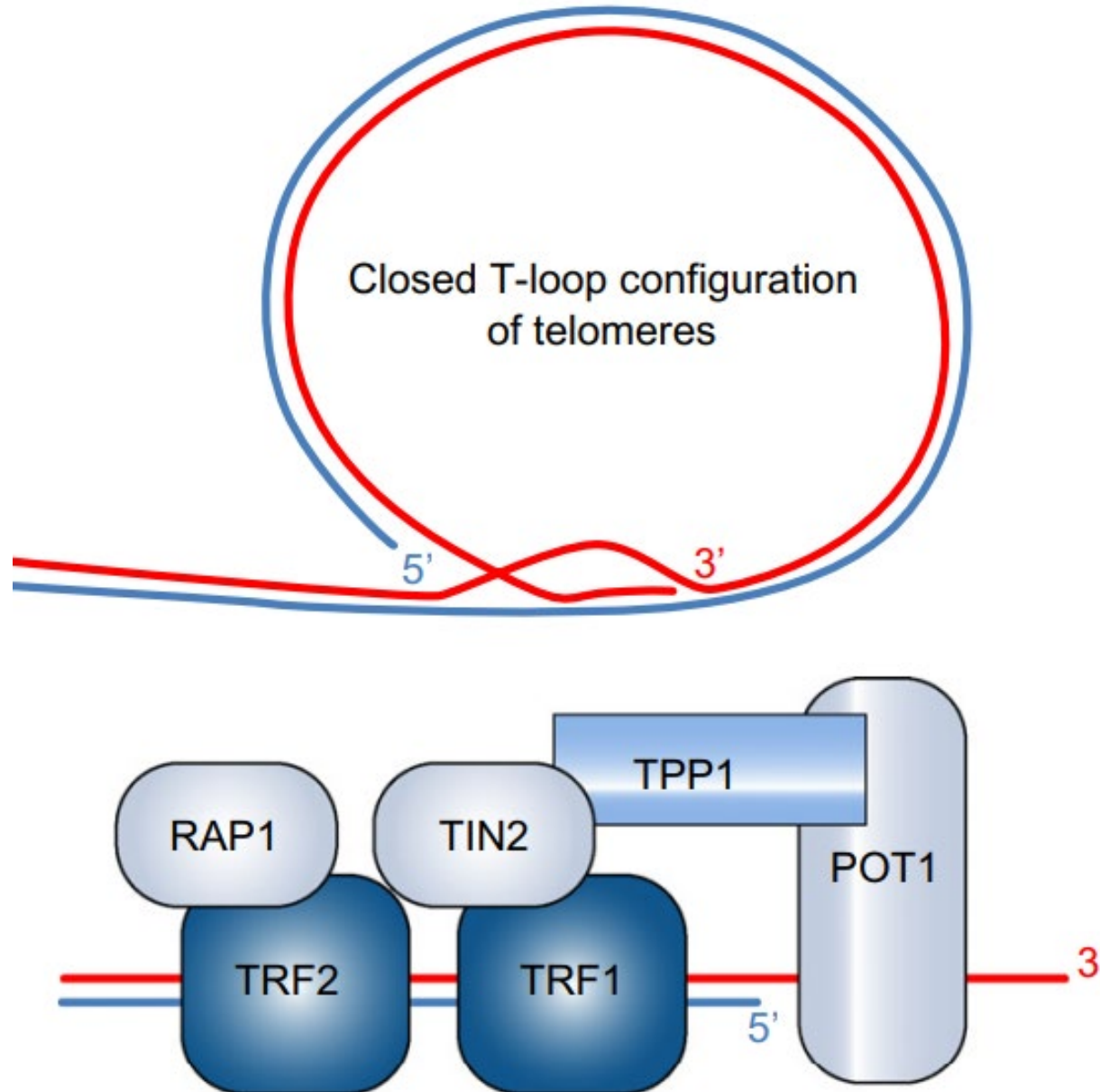
β

Το 3' άκρο του ssDNA «εισβάλλει» στην dsDNA περιοχή του τελομερούς

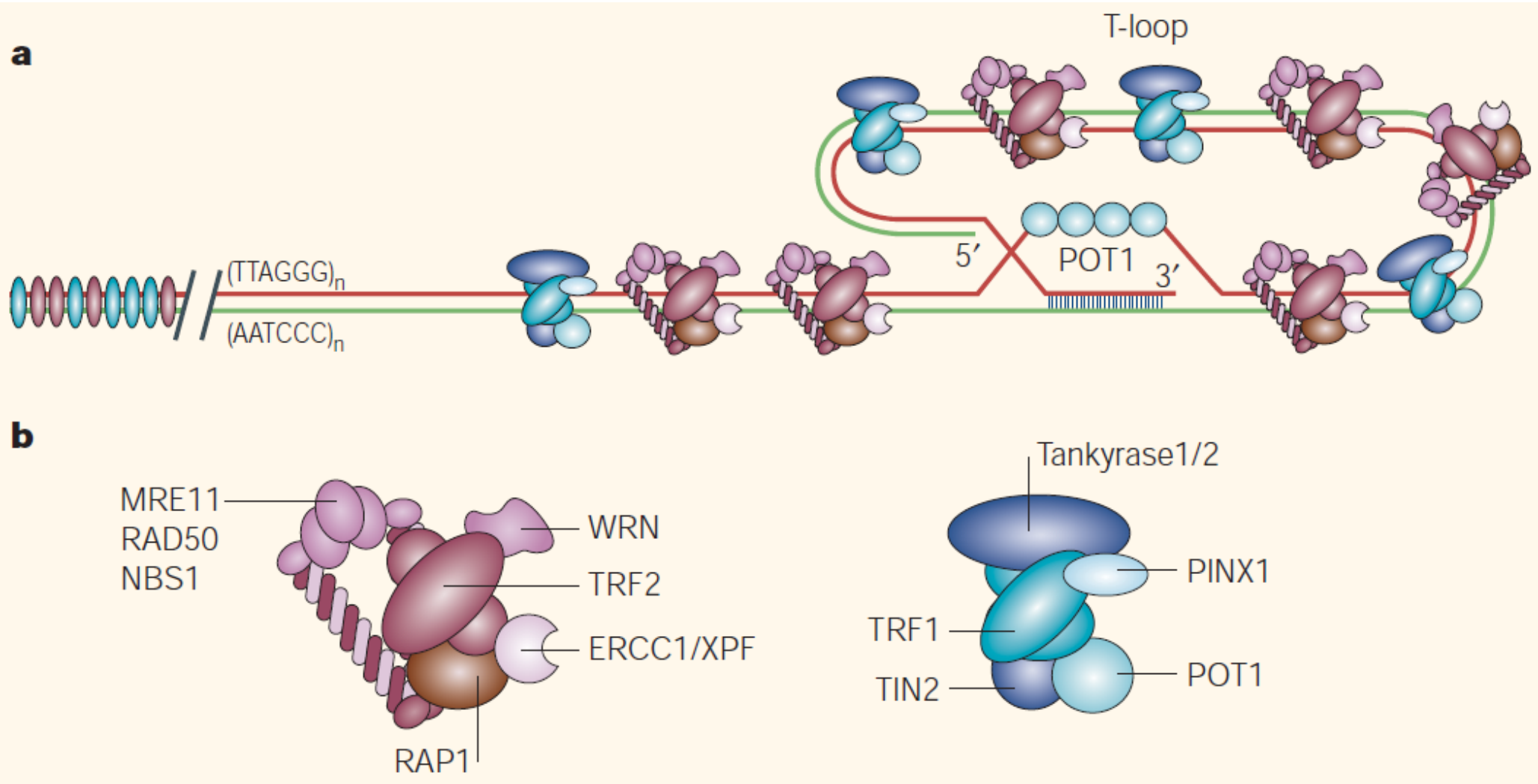


Η διαδικασία αναδίπλωσης είναι όλο και πιο δύσκολη όσο το μήκος του τελομερούς γίνεται μικρότερο!!

Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA



Η ολοκλήρωση της αντιγραφής σε γραμμικά DNA



Αλληλεπίδραση Shelterin – Ολοενζύμου τελομεράσης

