

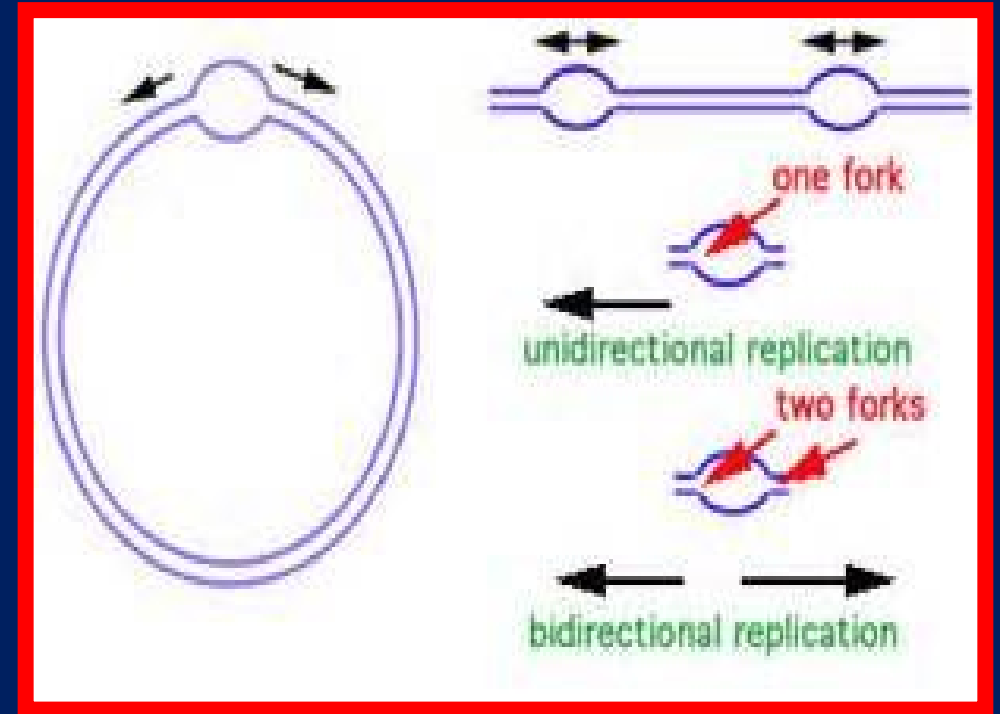
Η αντιγραφή του DNA είναι απαραίτητη για τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας στα δύο θυγατρικά κύτταρα.

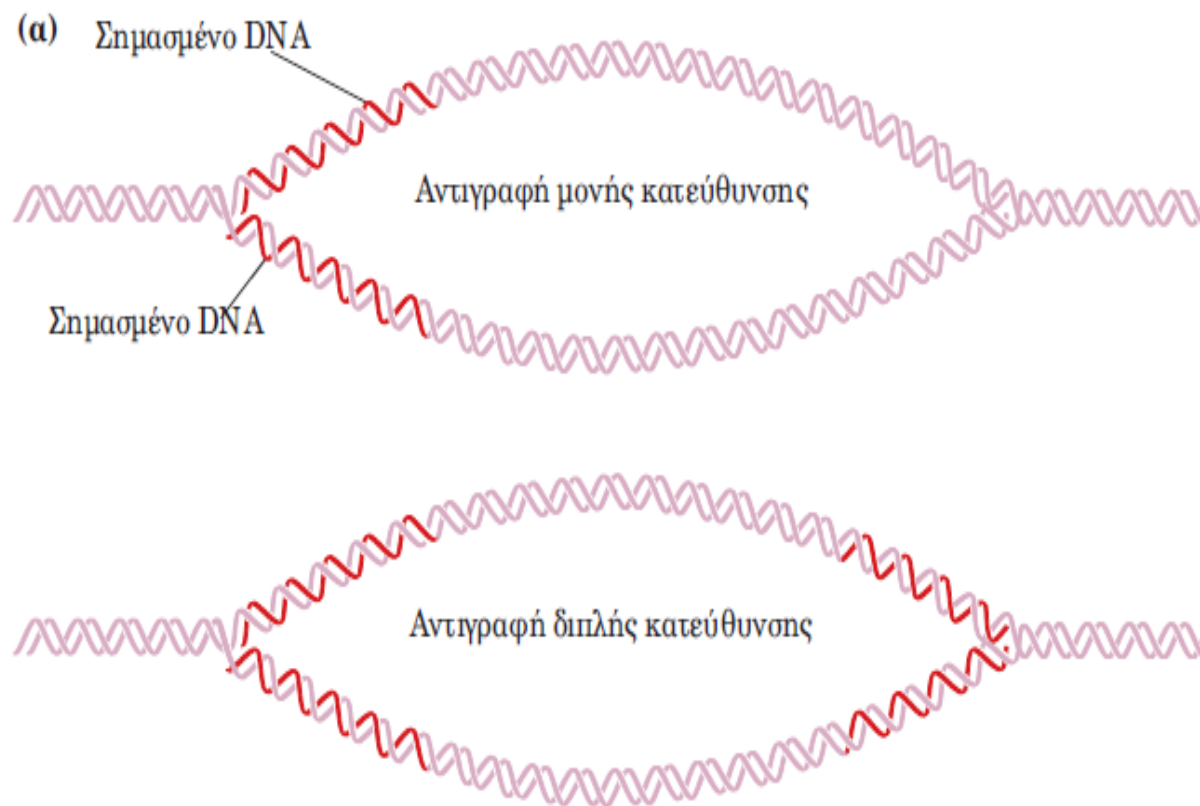
Επειδή το DNA είναι ευάλωτο σε βλάβες από ενδογενείς διεργασίες, ζημιογόνες χημικές ουσίες και ακτινοβολία, υπόκειται σε συνεχή έλεγχο και επιδιόρθωση.

Κάθε κύτταρο διαθέτει πολύπλοκους μηχανισμούς για την ακριβή αντιγραφή της γενετικής του πληροφορίας, καθώς και εξειδικευμένα ένζυμα που επιδιορθώνουν τις βλάβες του DNA.

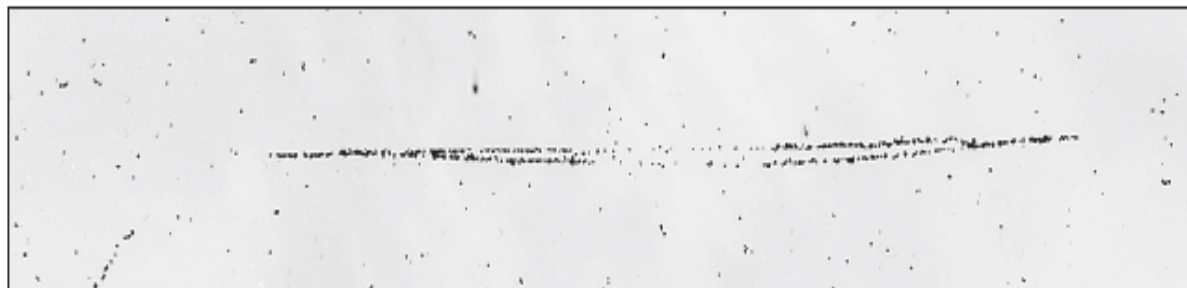
Η αντιγραφή του DNA είναι αμφίδρομη.

Η αντιγραφή αρχίζει σε μία ή περισσότερες συγκεκριμένες περιοχές του DNA που ονομάζονται θέσεις έναρξης της αντιγραφής (origins of replication). Από κάθε θέση έναρξης, η αντιγραφή προχωρά συνήθως προς δύο αντίθετες κατευθύνσεις, με εξαίρεση ορισμένα χρωμοσώματα βακτηριοφάγων και ορισμένα πλασμίδια όπου η αντιγραφή μπορεί να είναι μονόδρομη.





(β)



ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ-ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΜΟΣ

- Φωσφοδιεστερικός δεσμός: 3'–5'
- Κατεύθυνση νουκλεοτιδικής αλυσίδας: 5'–3'
- Τρόπος δράσης DNA πολυμεράσης:
Συνδέει το εισερχόμενο νουκλεοτίδιο στο ελεύθερο
3'-OH άκρο της αναπτυσσόμενης αλυσίδας
- Κατεύθυνση αντιγραφής: 5'–3'

Αντιγραφή σε ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα

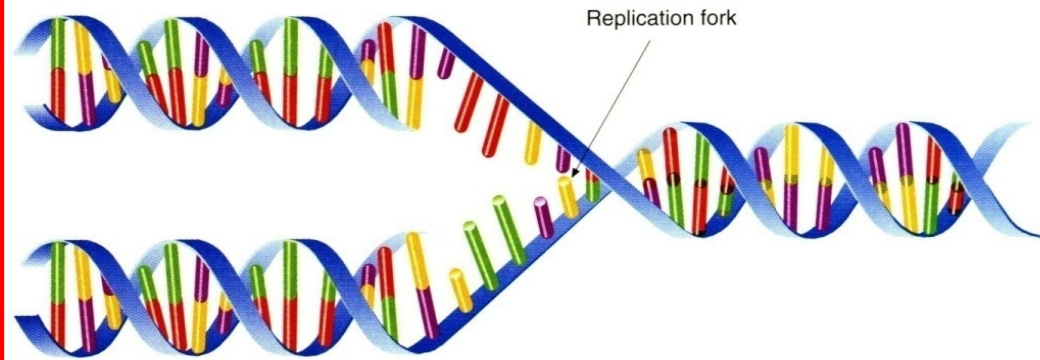
**Οι βασικοί μηχανισμοί αντιγραφής του DNA είναι παρόμοιοι
σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα.**

**Στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχουν πολλά σημεία έναρξης
της αντιγραφής, ενώ στα προκαρυωτικά συνήθως ένα.**

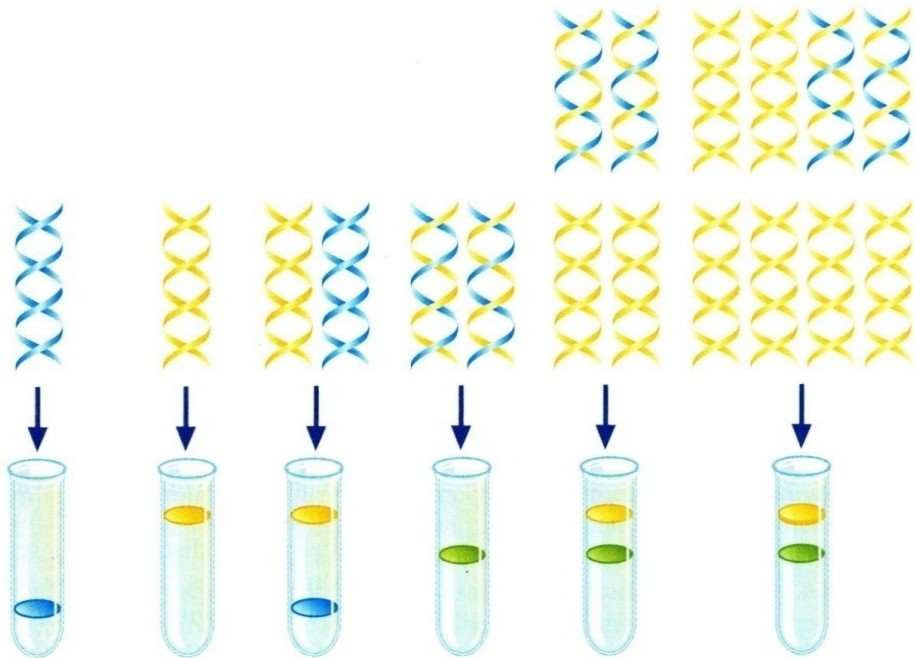
**Σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο δρουν ταυτόχρονα χιλιάδες
διχάλες αντιγραφής.**

**Οι συνολικές μονάδες αντιγραφής (replicons) στο απλοειδές
γονιδίωμα των θηλαστικών είναι περίπου 20.000–30.000.**

**Η ταχύτητα αντιγραφής σε κάθε διχάλα στα θηλαστικά είναι
περίπου 1000–3000 ζεύγη βάσεων ανά λεπτό, ενώ στα
βακτήρια περίπου 50.000 ζεύγη βάσεων ανά λεπτό.**



Το πείραμα των
Messelson και Stahl
αποδεικνύει ότι ο
μηχανισμός αντιγραφής
του DNA είναι
ημισυντηρητικός.



1. Heavy DNA 2. Light DNA 3. Mixture of 1 and 2 4. DNA one generation 5. DNA two generations 6. DNA three generations

- Οι DNA πολυμεράσες μπορούν να καταλύουν τη σύνθεση DNA *in vitro* εφόσον παρέχονται:
 - τα τέσσερα 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dCTP, dGTP),
 - μία αλυσίδα εκμαγείο DNA,
 - ένας εκκινητής (primer) με ελεύθερο 3'-OH,
 - και ιόντα Mg^{2+} ως συμπράγοντας.

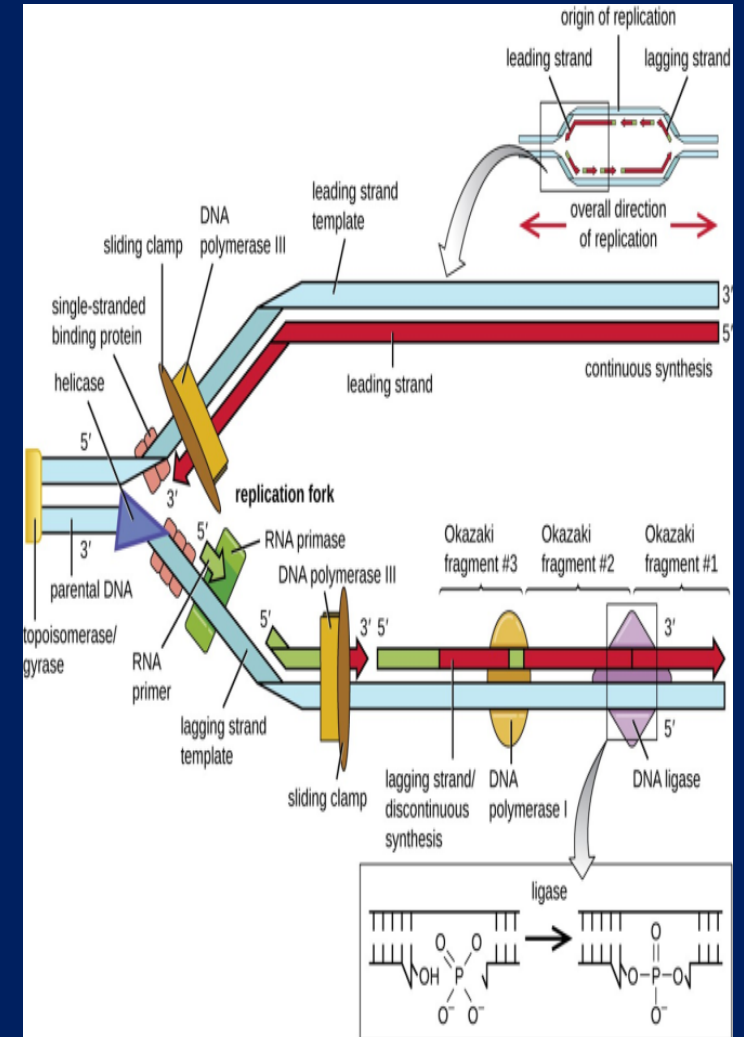
- Η αντιγραφή του DNA έχει μελετηθεί εκτενώς στα βακτήρια, κυρίως λόγω του μικρού μεγέθους του γονιδιώματος και της διαθεσιμότητας πολλών μεταλλαγμένων στελεχών.
- Η E. coli διαθέτει περίπου 4,6 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων (Mbp) σε ένα κυκλικό χρωμόσωμα. Το γονιδίωμα αυτό αντιγράφεται σε περίπου 42 λεπτά.
- Η αντιγραφή ξεκινά από μία μοναδική αρχή αντιγραφής και προχωρά αμφίδρομα.
- Ο ρυθμός αντιγραφής είναι περίπου 1000 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο.
- Η E. coli διαθέτει μία μοναδική περιοχή έναρξης της αντιγραφής, που ονομάζεται oriC. Η περιοχή oriC έχει μήκος περίπου 245 ζεύγη βάσεων και είναι πλούσια σε αλληλουχίες αδερίνης-θυμίνης (AT).

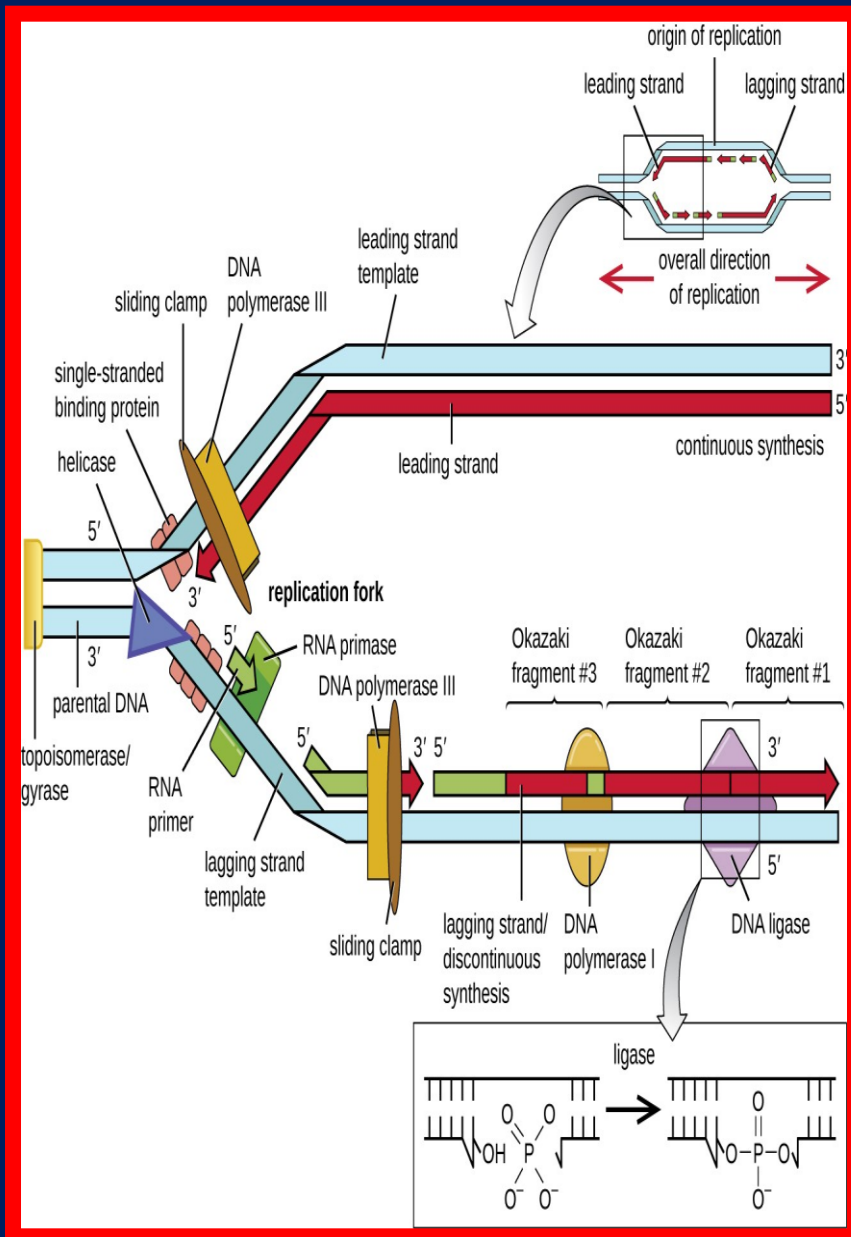
Γενική επισκόπηση της διαδικασίας της αντιγραφής

- Η διαδικασία ξεκινά στην περιοχή *oriC*, όπου προκαλείται τοπική τήξη του DNA από τη δράση της πρωτεΐνης έναρξης DnaA, με αποτέλεσμα τη δημιουργία περιοχών μονόκλωνου DNA (ssDNA) που λειτουργούν ως πρότυπα αντιγραφής.
- Στη συνέχεια φορτώνεται η ελικάση DnaB στην περιοχή με τη βοήθεια του φορτωτή ελικάσης DnaC.
- Ακολουθεί η στρατολόγηση της primase, η οποία συνθέτει τους εκκινητές RNA που χρησιμοποιούνται για την έναρξη της σύνθεσης του DNA. Στη συνέχεια προσδένεται το ολοένζυμο της DNA πολυμεράσης III και αρχίζει η επιμήκυνση των νέων κλώνων DNA.
- Τα νέα μόρια DNA συντίθενται αμφίδρομα και η διαδικασία της αντιγραφής ολοκληρώνεται σε συγκεκριμένες περιοχές τερματισμού.

•Γενική επισκόπηση των γεγονότων στη διχάλα αντιγραφής

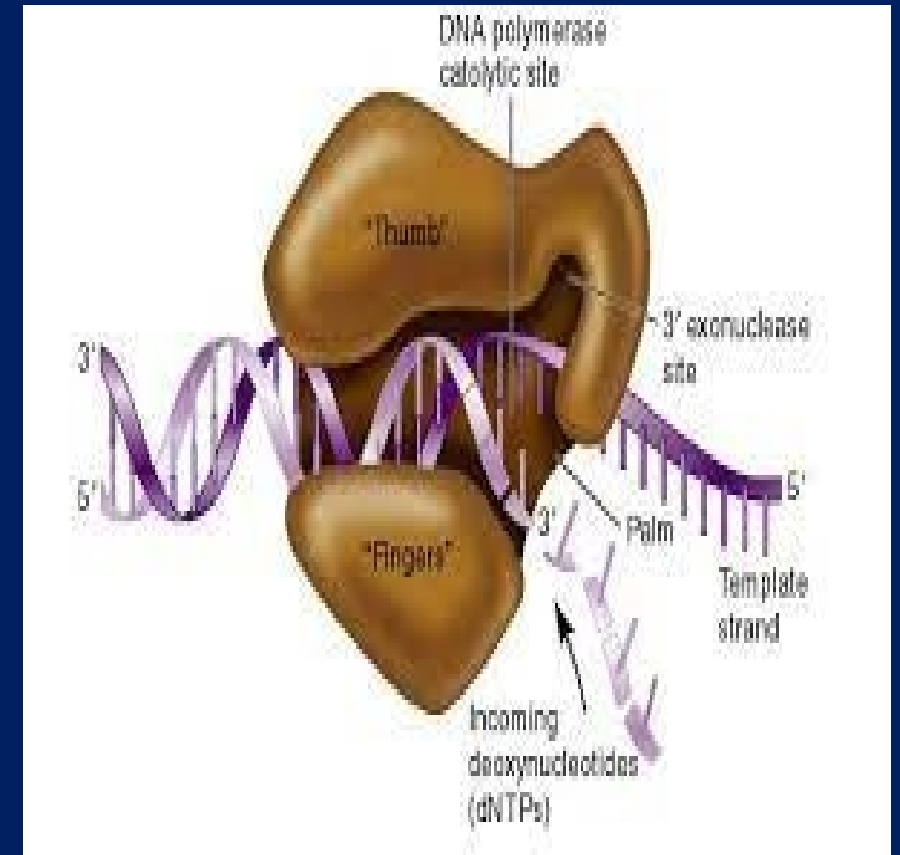
- Κατά την έναρξη της αντιγραφής σχηματίζονται δύο διχάλες αντιγραφής. Με το άνοιγμα του δίκλωνου DNA, η ελικάση διαχωρίζει τους δύο κλώνους, οι οποίοι καλύπτονται από SSB πρωτεΐνες που τους διατηρούν διαχωρισμένους. Η σύνθεση του DNA προχωρά και προς τις δύο κατευθύνσεις.
- Οι εκκινητές RNA, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί προς τον μητρικό κλώνο, συντίθενται από την πριμάση και επιμηκύνονται από την DNA πολυμεράση III με προσθήκη νουκλεοτιδίων στο ελεύθερο 3'-OH άκρο.
- Στον προπορευόμενο κλώνο το DNA συντίθεται συνεχώς, ενώ στον καθυστερούντα κλώνο το DNA συντίθεται τμηματικά, δημιουργώντας τα θραύσματα Okazaki. Οι εκκινητές RNA απομακρύνονται μέσω της εξωνουκλεολυτικής δράσης της DNA πολυμεράσης I και τα θραύσματα Okazaki ενώνονται με τη δράση της DNA λιγάσης.

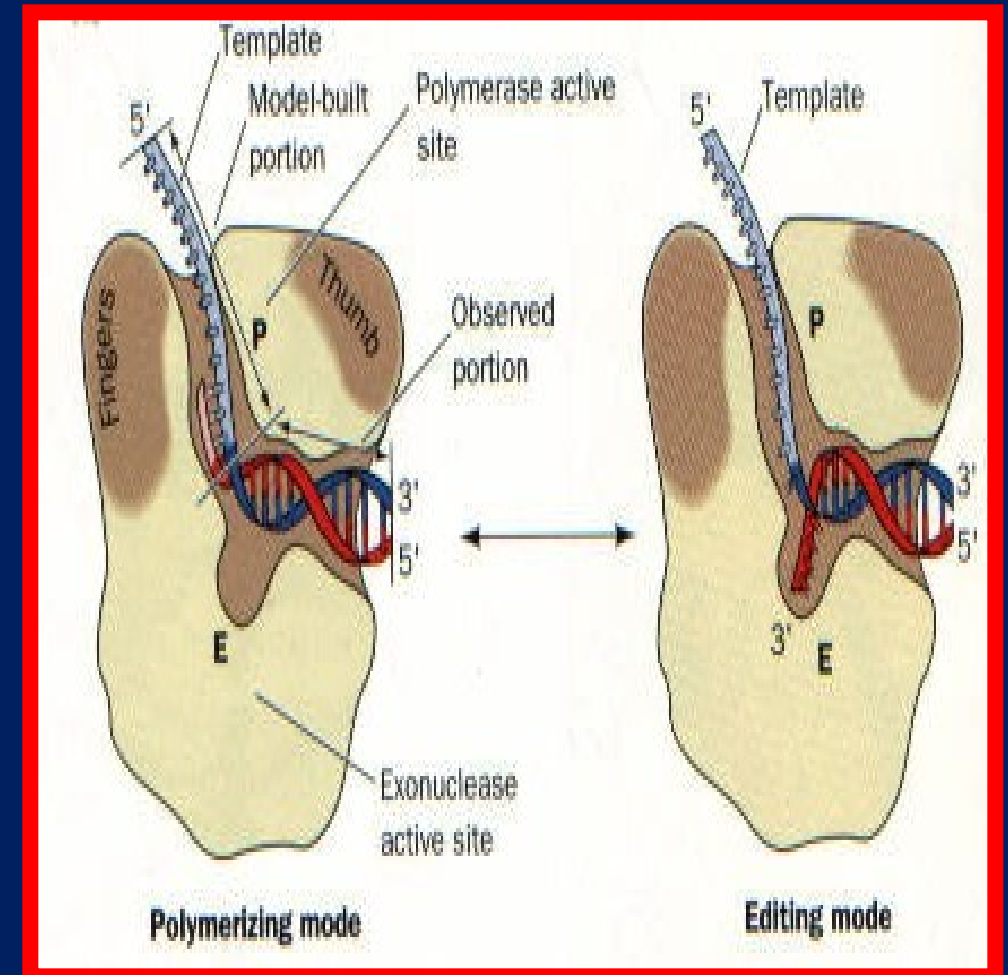
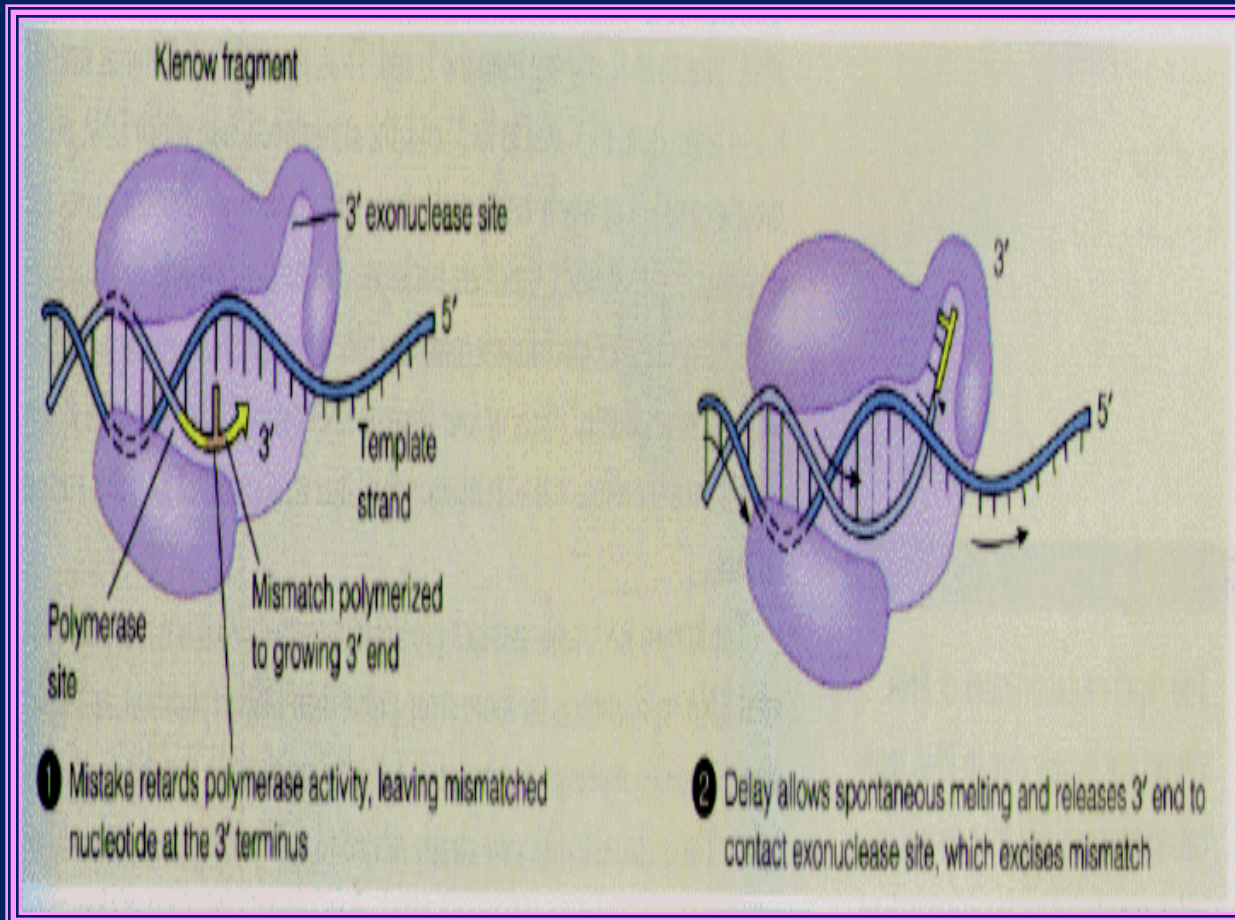




•Οι DNA πολυμεράσες απαιτούνται για τη σύνθεση των θυγατρικών κλώνων κατά μήκος των κλώνων του εκμαγείου DNA. Όλες οι DNA πολυμεράσες απαιτούν ένα DNA εκμαγείο και έναν εκκινητή για να ξεκινήσει η διαδικασία αντιγραφής. Ο εκκινητής είναι RNA που συντίθεται συμπληρωματικά προς το εκμαγείο DNA από την πριμάση.

•Οι DNA πολυμεράσες μπορούν να προσθέσουν νέα νουκλεοτίδια μόνο στην κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$ κατά τη σύνθεση των θυγατρικών κλώνων. Επειδή οι δύο κλώνοι του DNA είναι αντιπαράλληλοι, ο ένας κλώνος συντίθεται συνεχώς (προπορευόμενος κλώνος), ενώ ο άλλος συντίθεται τμηματικά σχηματίζοντας τα θραύσματα Okazaki (καθυστερών κλώνος).

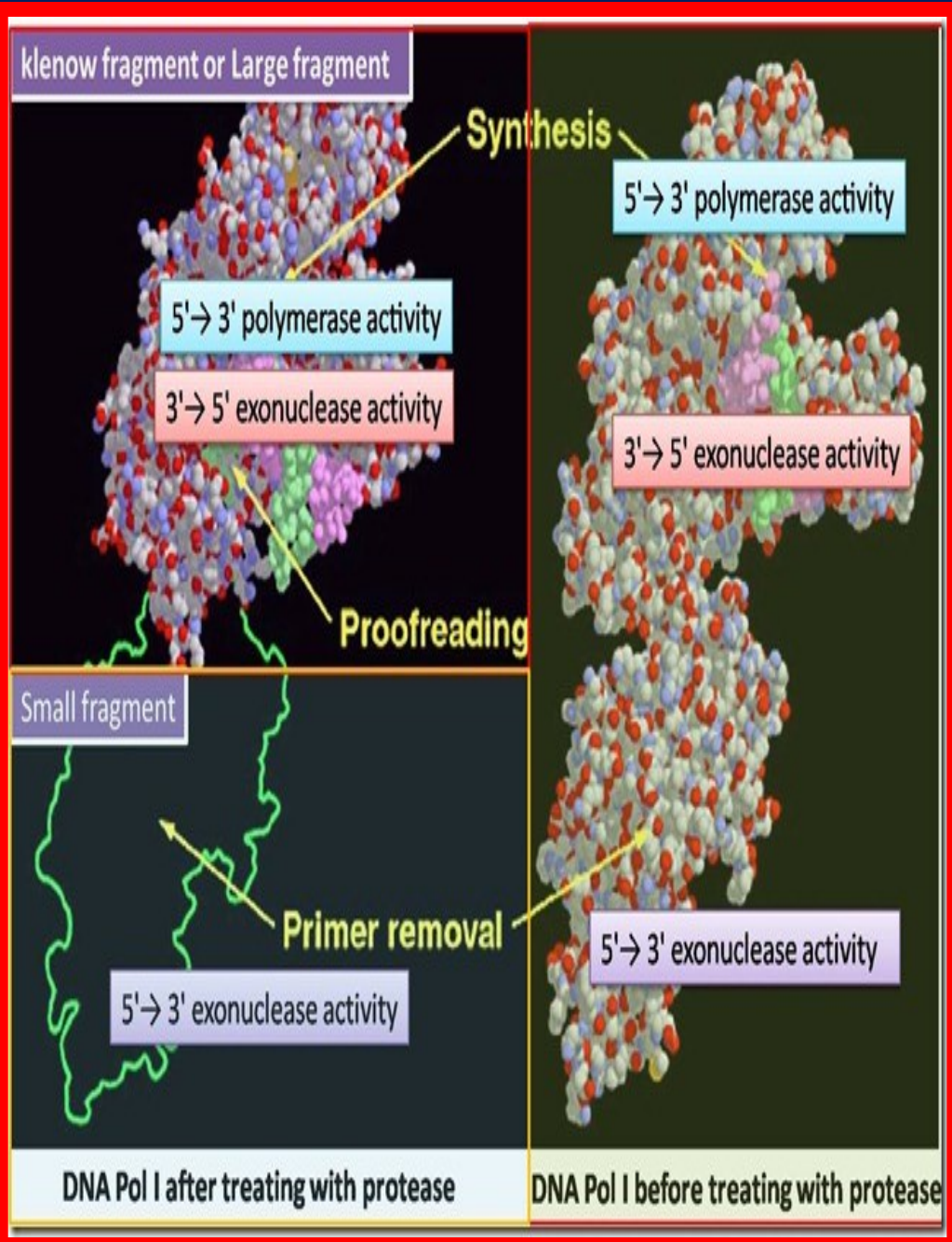




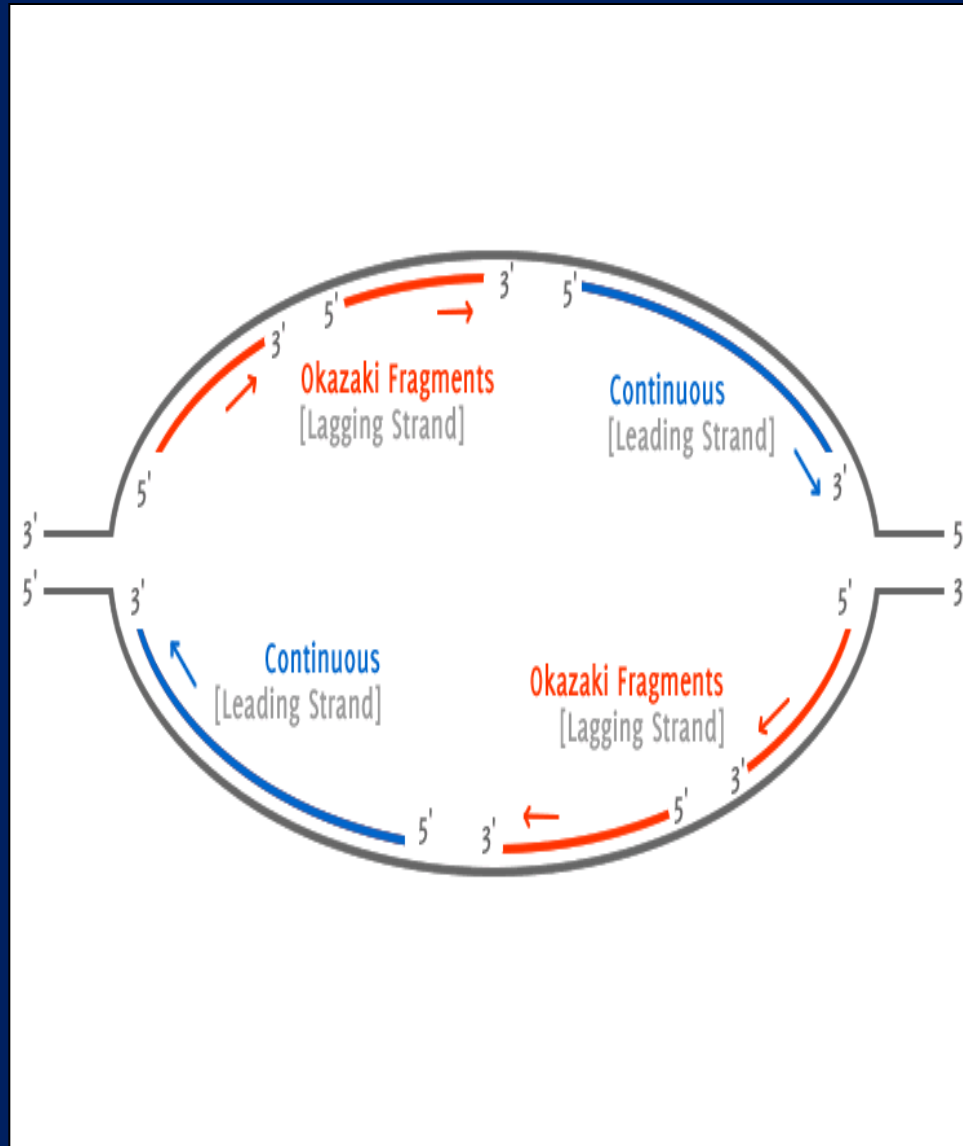
• Η DNA πολυμεράση I της E. coli διαθέτει τρεις καταλυτικές ενεργότητες:

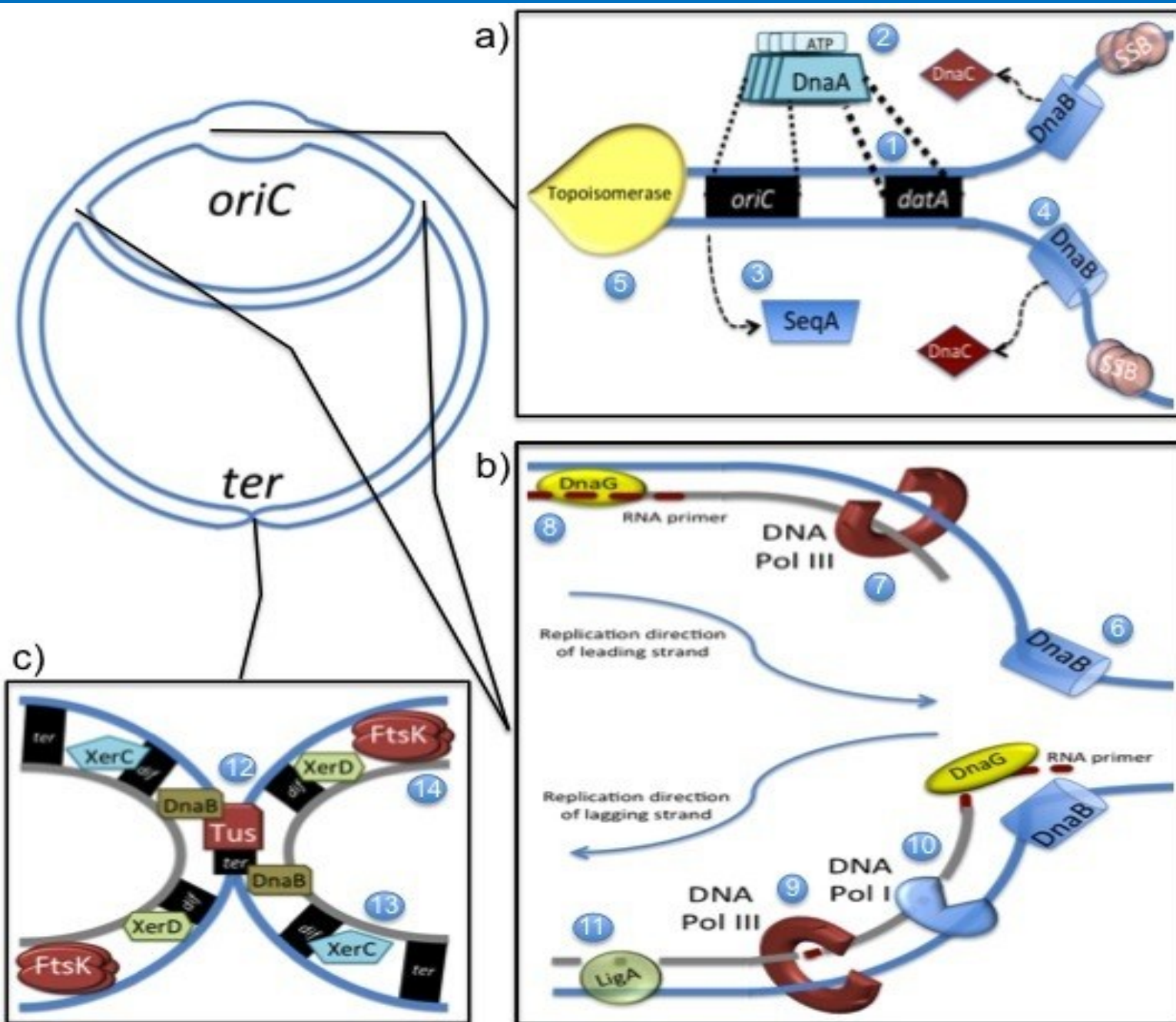
- πολυμερασική ενεργότητα $5' \rightarrow 3'$,
- εξωνουκλεολυτική ενεργότητα $3' \rightarrow 5'$ (proofreading),
- εξωνουκλεολυτική ενεργότητα $5' \rightarrow 3'$.

• Οι τρεις αυτές ενεργότητες βρίσκονται σε διαφορετικές καταλυτικές θέσεις του ενζύμου. Η ενεργότητα $5' \rightarrow 3'$ εξωνουκλεάσης δεν αποτελεί συνηθισμένη ιδιότητα των DNA πολυμερασών και είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση των εκκινητών RNA κατά την αντιγραφή του DNA.



Ασυνεχής Σύνθεση





Κοινά χαρακτηριστικά των σημείων έναρξης

Σε όλους τους οργανισμούς:

- (1) Μοναδικές περιοχές DNA με πολλές επαναλήψεις μικρού μήκους**
- (2) Αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες έναρξης που προσδένονται ως πολυμερή**
- (3) Συμπεριλαμβάνουν συνήθως μια περιοχή πλούσια σε A-T**

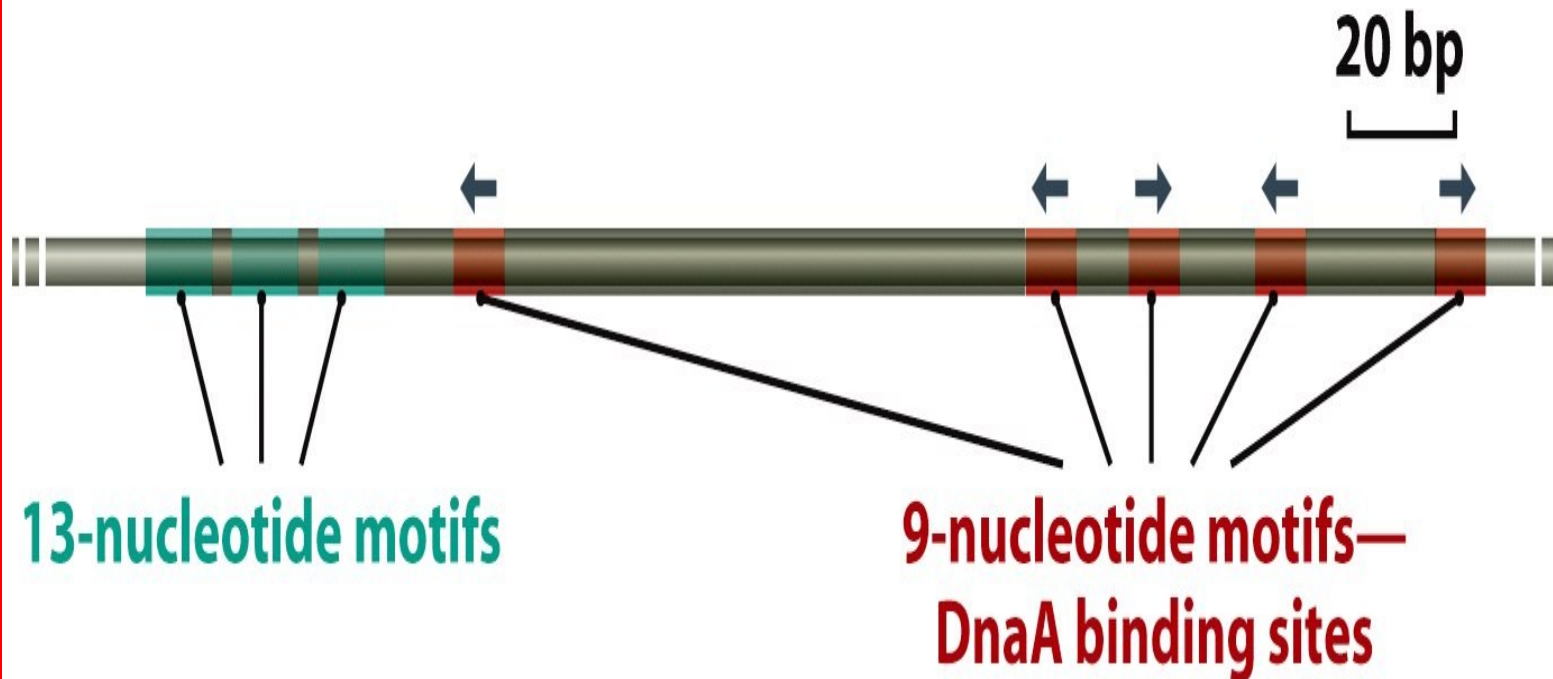
• Η αντιγραφή του βακτηριακού χρωμοσώματος ξεκινά στην περιοχή *oriC*, όπου η πρωτεΐνη εκκίνησης DnaA δεσμεύεται για να ξεκινήσει η διαδικασία.

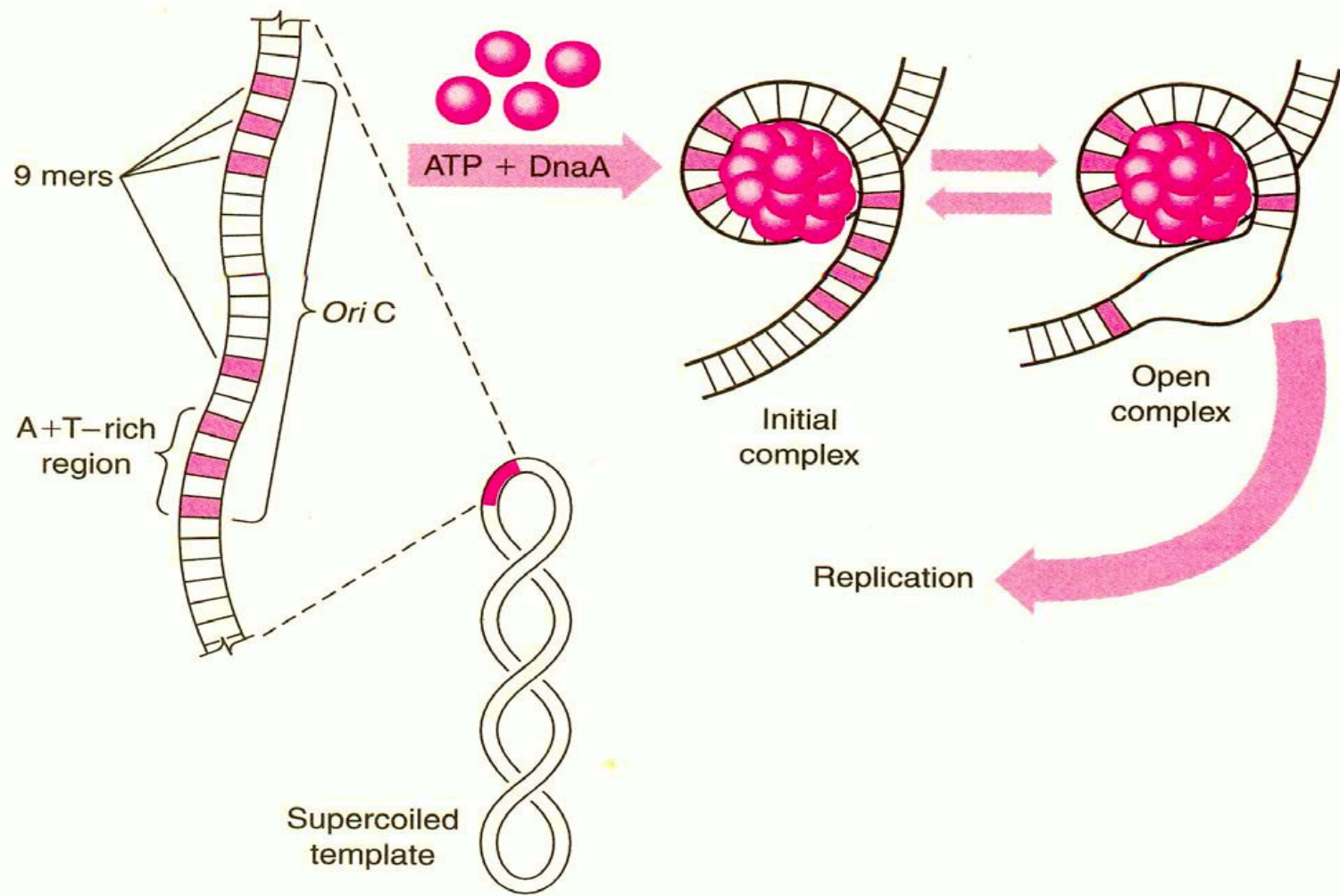
• Τα αρχικά στάδια περιλαμβάνουν τη συναρμολόγηση του εκκινητοσώματος (primosome), το οποίο συμμετέχει στο ξετύλιγμα του DNA στις διχάλες αντιγραφής και επιτρέπει τη σύνθεση εκκινητών RNA από την πριμάση. Μετά την αναδιαμόρφωση της εκκινητήριας περιοχής που προκαλείται από την DnaA, φορτώνεται η ελικάση και αρχίζει η αποδιάταξη του DNA.

• Η συναρμολόγηση του εκκινητοσώματος λαμβάνει χώρα σε διακριτά στάδια και περιλαμβάνει τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές πρωτεΐνες (πρωτεΐνη εκκίνησης, ελικάση, φορτωτή ελικάσης και πριμάση), οι οποίες δρουν με συντονισμένο και διαδοχικό τρόπο.

Το μοναδικό σημείο έναρξης της αντιγραφής στο E. Coli έχει μήκος 245 bp και περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 9 bp και 13 bp

The structure of *oriC*





ΠΙΝΑΚΑΣ 28.1 Ιδιότητες των DNA πολυμερασών της *E. coli*

Ιδιότητα	Pol I	Pol II	Pol III (πυρήνας)
Μάζα (kD)	103	88	130(<i>a</i>), 27,5(<i>ε</i>), 8,6(<i>θ</i>)
Μόριο/κύτταρο	400		40
Αριθμός μετατροπής †	20	400	1000
Πολυμερισμός 5' → 3'	Ναι	Ναι	Ναι
Εξονουκλεάση 3' → 5'	Ναι	Ναι	Ναι
Εξονουκλεάση 5' → 3'	Ναι	Όχι	Όχι