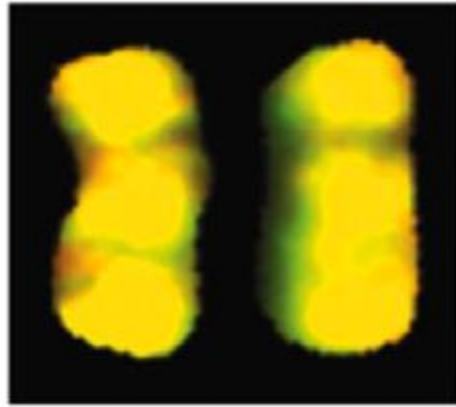


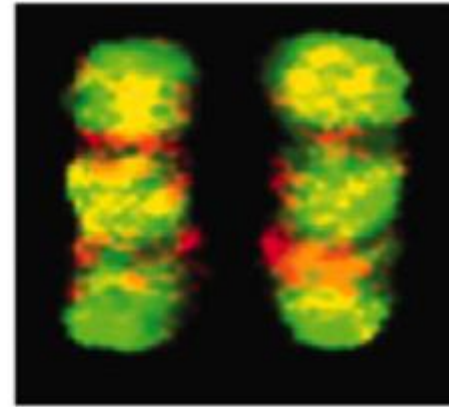
# ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ DNA



## Chromosome 17



3-year old  
identical twins



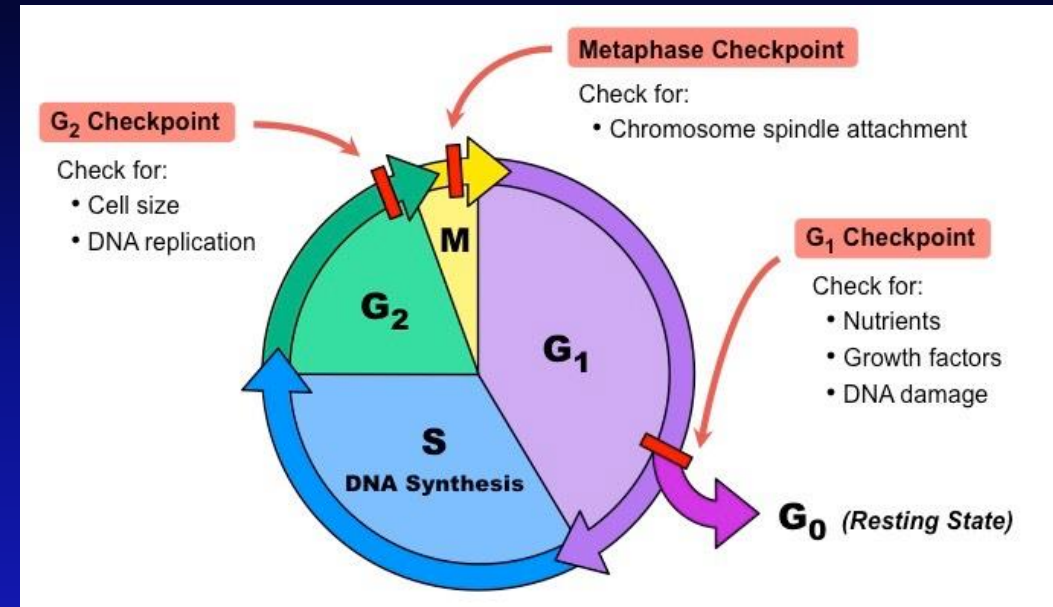
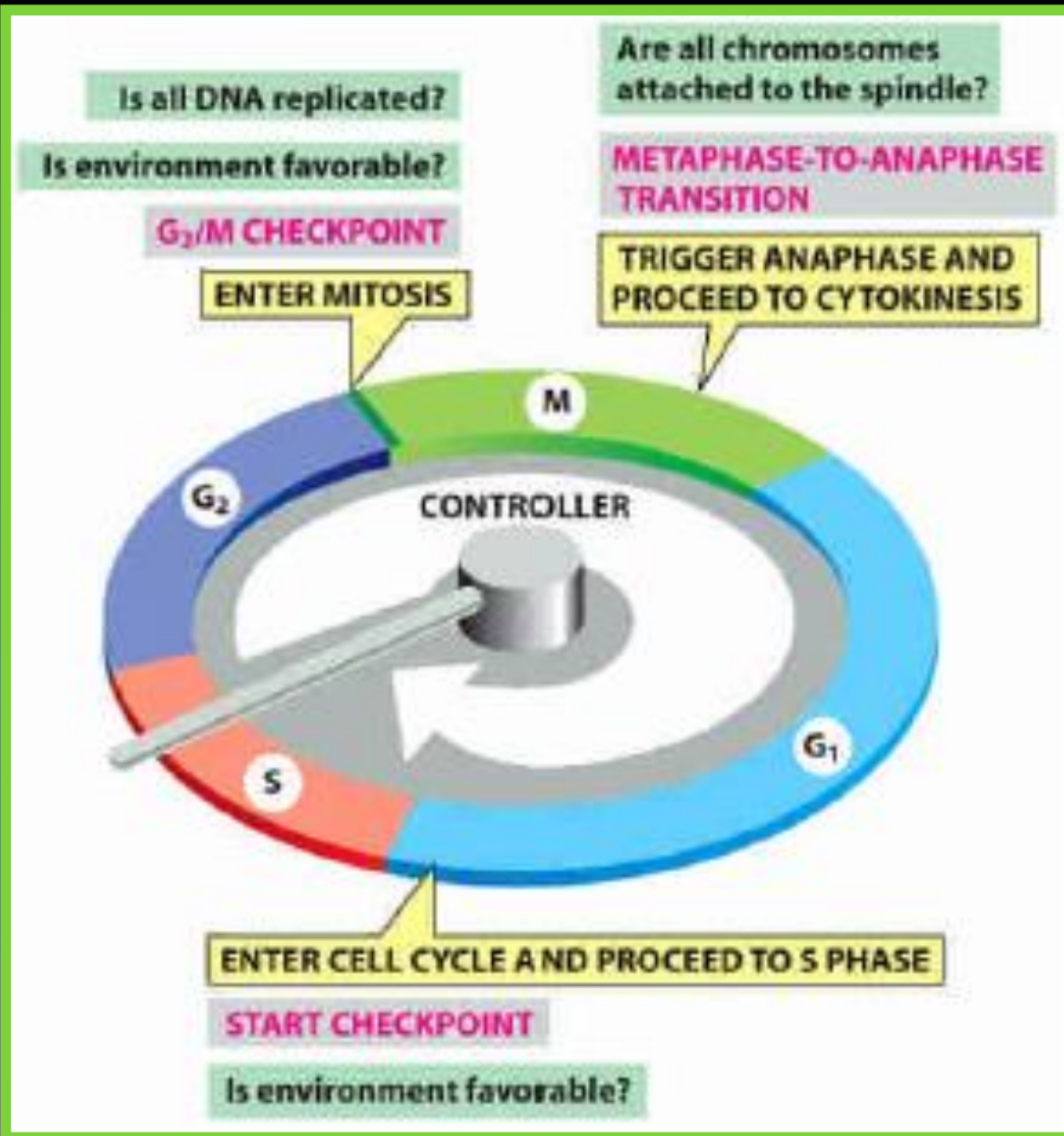
50-year old  
identical twins

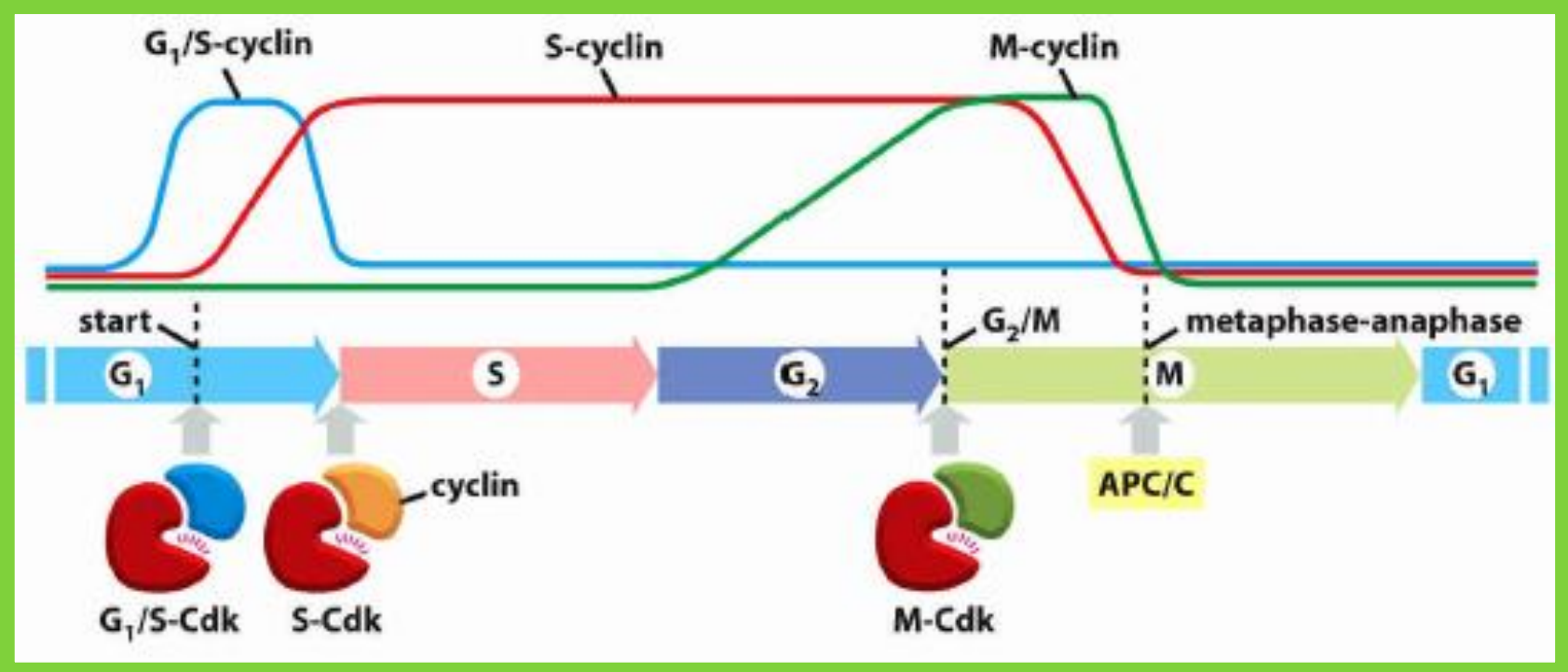
Στην ηλικία των τριών ετών, οι επιγενετικοί δείκτες του χρωμοσώματος 17 πανομοιότυπων διδύμων είναι αρκετά παρόμοιοι (εμφανίζεται με κίτρινο χρώμα). Ωστόσο, η σύγκριση μεταξύ των 50 χρονων διδύμων παρουσιάζει σημαντικές διαφορές στην εικόνα των επιγενετικών δεικτών (κόκκινο –πράσινο). *Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 July 26; 102(30): 10604– 10609. Copyright (2005) National Academy of Sciences, U.S.A.*

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

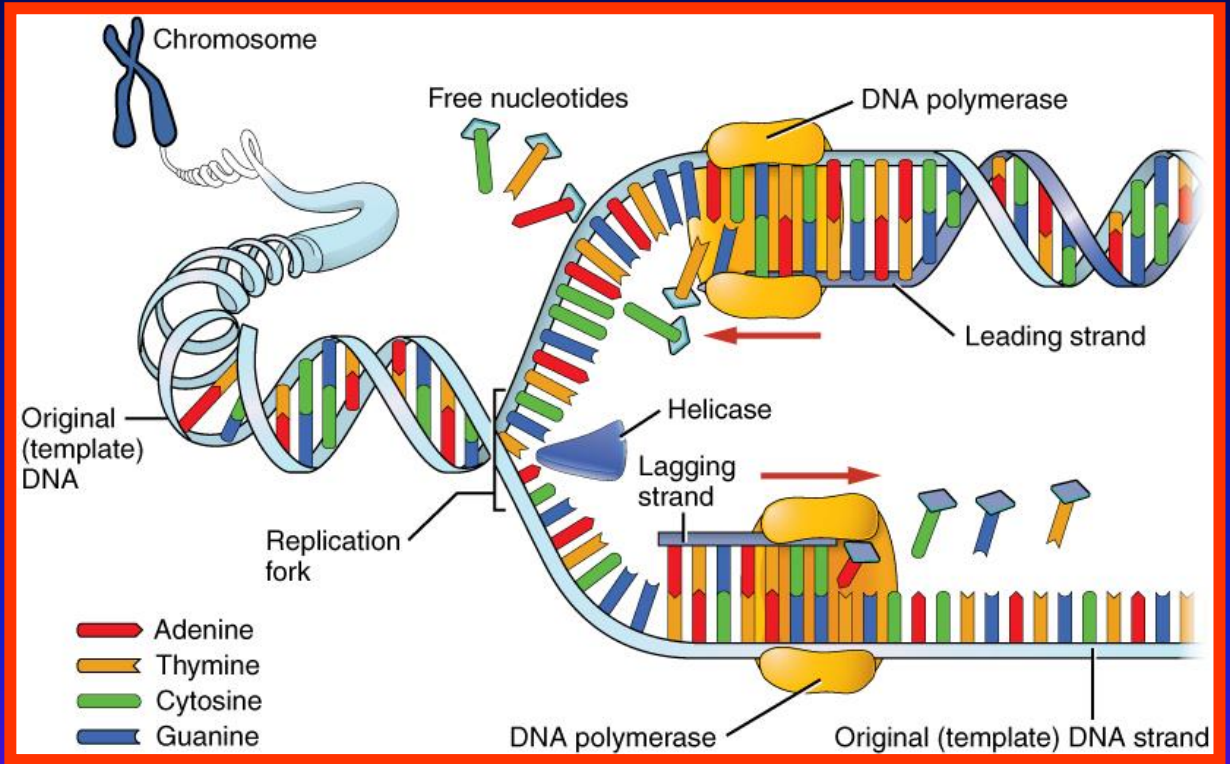
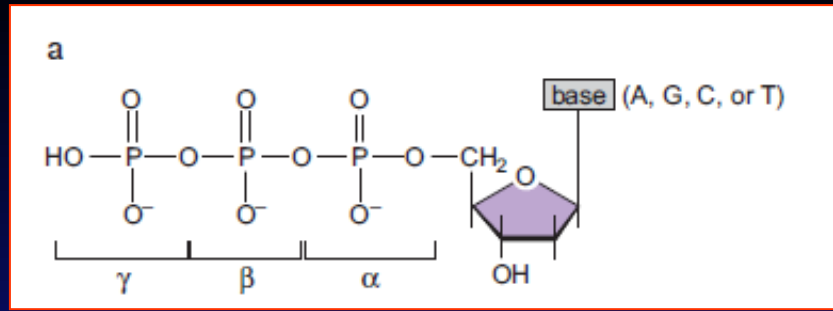
***Η ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ DNA ΣΥΜΒΑΙΝΕΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ S ΦΑΣΗ ΤΟΥ  
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ***

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









**Η σύνθεση του DNA απαιτεί ότι η νέα αλυσίδα αυξάνεται κατά επέκταση του 3' άκρου του εκκινητή.**

Μόλις έγινε γνωστή η αυτο-συμπληρωματική φύση του DNA, η ιδέα ότι τα πρωτεϊνικά πρότυπα μπορεί να διαδραματίσουν κάποιο ρόλο στην αναπαραγωγή του DNA απομακρύνθηκαν.

Ήταν πάρα πολύ απλούστερο να υποθέσουμε ότι κάθε ένας από τους δύο κλώνους κάθε γονικού μορίου DNA χρησίμευσε ως πρότυπο για το σχηματισμό ενός συμπληρωματικού θυγατρικού σκέλους.

Ωστόσο έπρεπε να δημιουργηθεί πειραματική υποστήριξη. Μέσα σε 5 χρόνια από την ανακάλυψη της διπλής έλικας, προέκυψαν αποφασιστικά στοιχεία για τον διαχωρισμό των συμπληρωματικών κλώνων κατά την αντιγραφή του DNA (Meselson και Stahl) και οι ενζυμολογικές μελέτες έδειξαν ότι μόνο το DNA είναι το πρότυπο για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA.

Ο αναδιπλασιασμός των μεγάλων γραμμικών χρωμοσωμάτων στα ευκαρυωτικά είναι ακόμα πιο δύσκολος.

Αυτά τα χρωμοσώματα απαιτούν πολλές θέσεις έναρξης αντιγραφής για να διασφαλιστεί ότι η αντιγραφή σε ολόκληρο το χρωμόσωμα.

Η έναρξη της αντιγραφής πρέπει να είναι συντονισμένη ώστε να εξασφαλίζεται ότι όλες οι αλληλουχίες αντιγράφονται ακριβώς μία φορά.

Επιπλέον

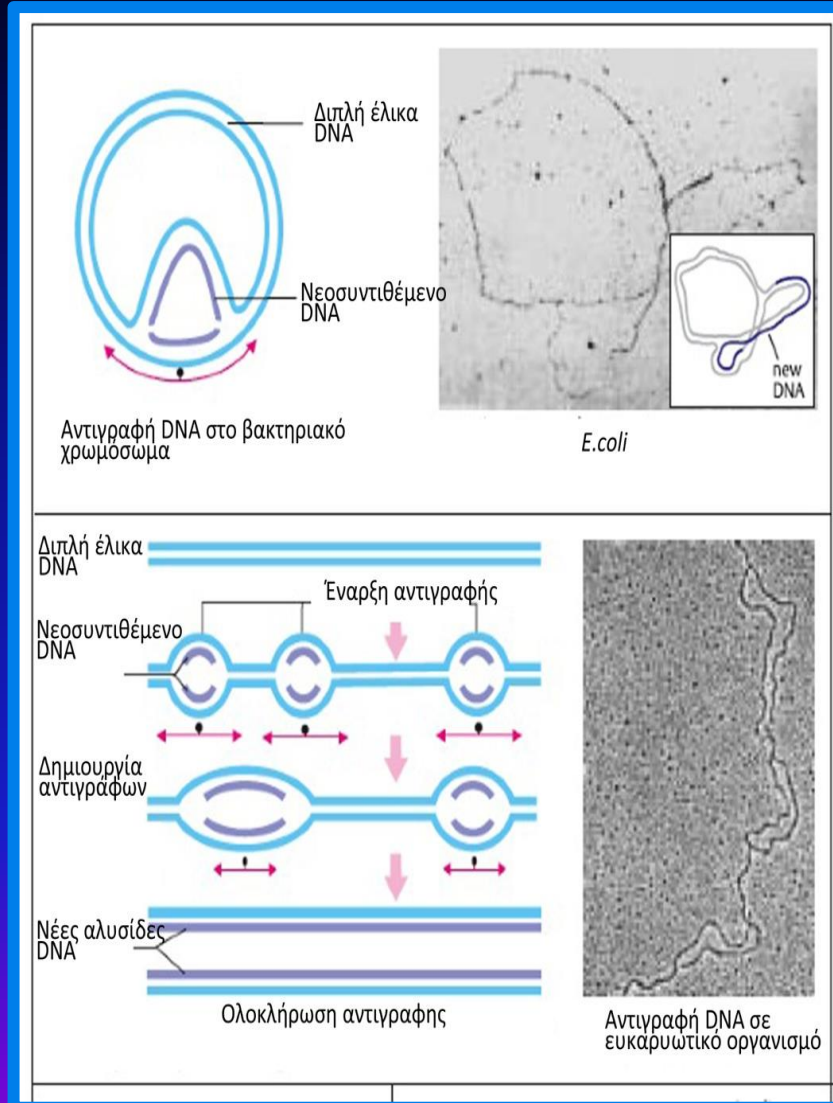
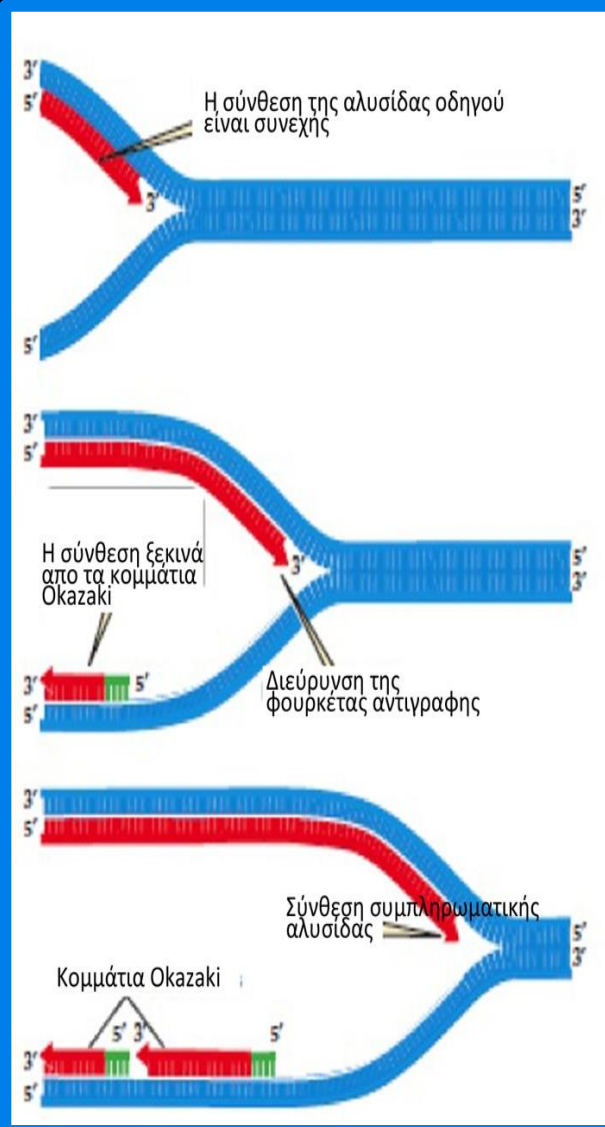
ο συμβατικός αναδιπλασιασμός του DNA δεν μπορεί να αναπαράγει πλήρως τα άκρα των χρωμοσωμάτων (που ονομάζονται τελομερή).

Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μια μέθοδο για να διατηρήσουν την ακεραιότητα αυτού του τμήματος του χρωμοσώματος.

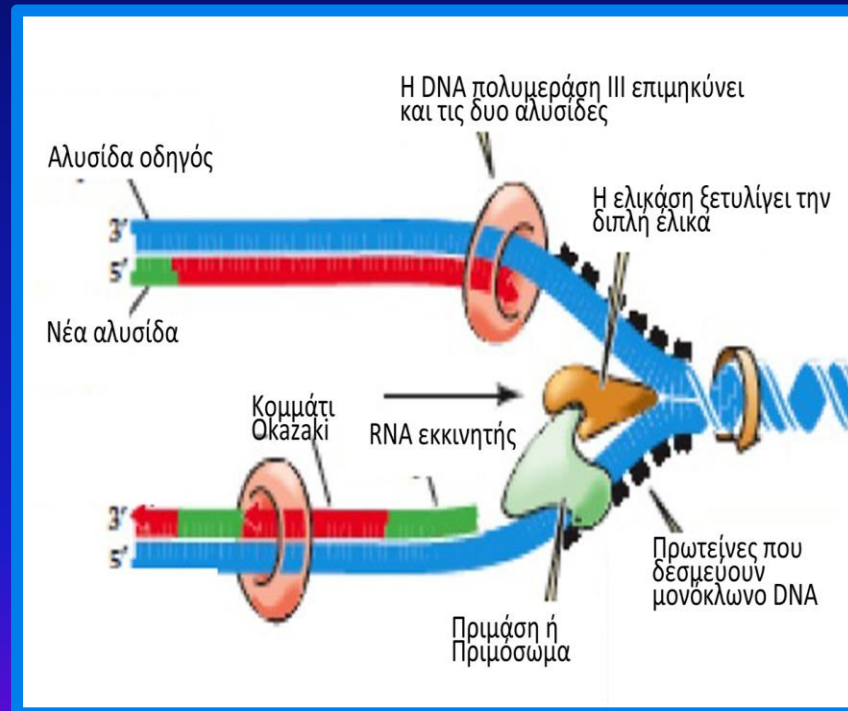
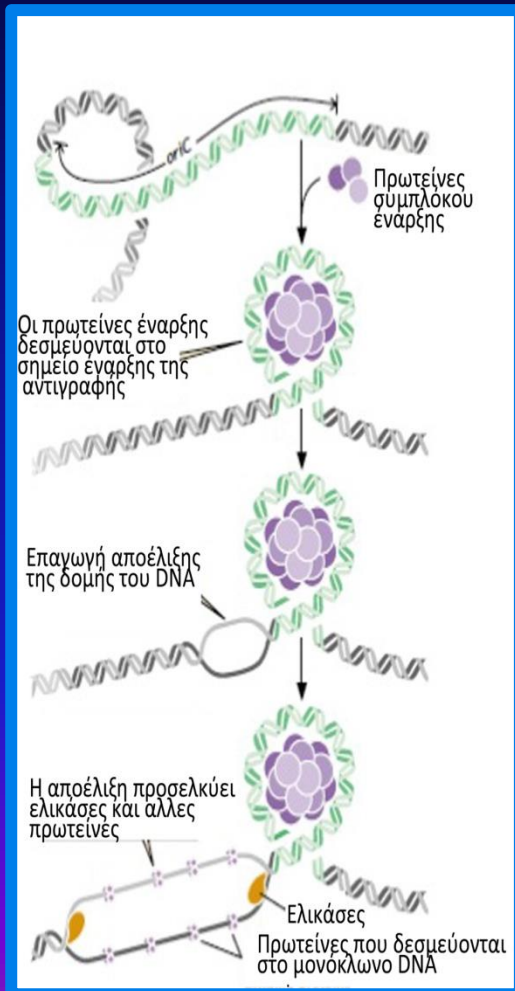


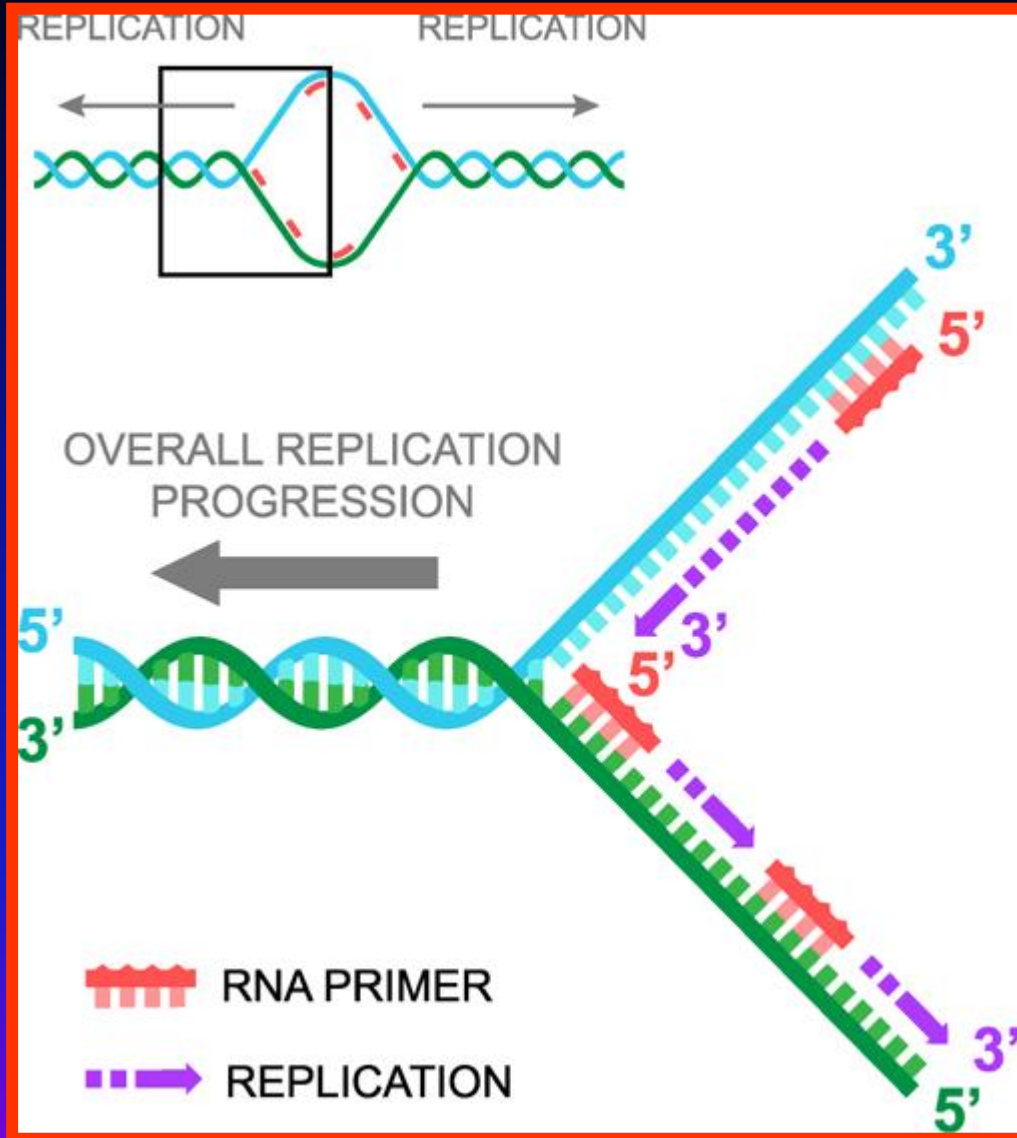
Η μελέτη της αντιγραφής του DNA  
αποκαλύπτει τον τρόπο με τον οποίο  
πολλαπλές πρωτεΐνες σχηματίζουν μια  
πολύπλοκη ενζυμική μηχανή  
που εκτελεί αυτήν την κρίσιμη διαδικασία  
με εκπληκτική την ταχύτητα, την ακρίβεια  
και πληρότητα.

# Ημισυντηρητικός μηχανισμός διπλασιασμού του DNA



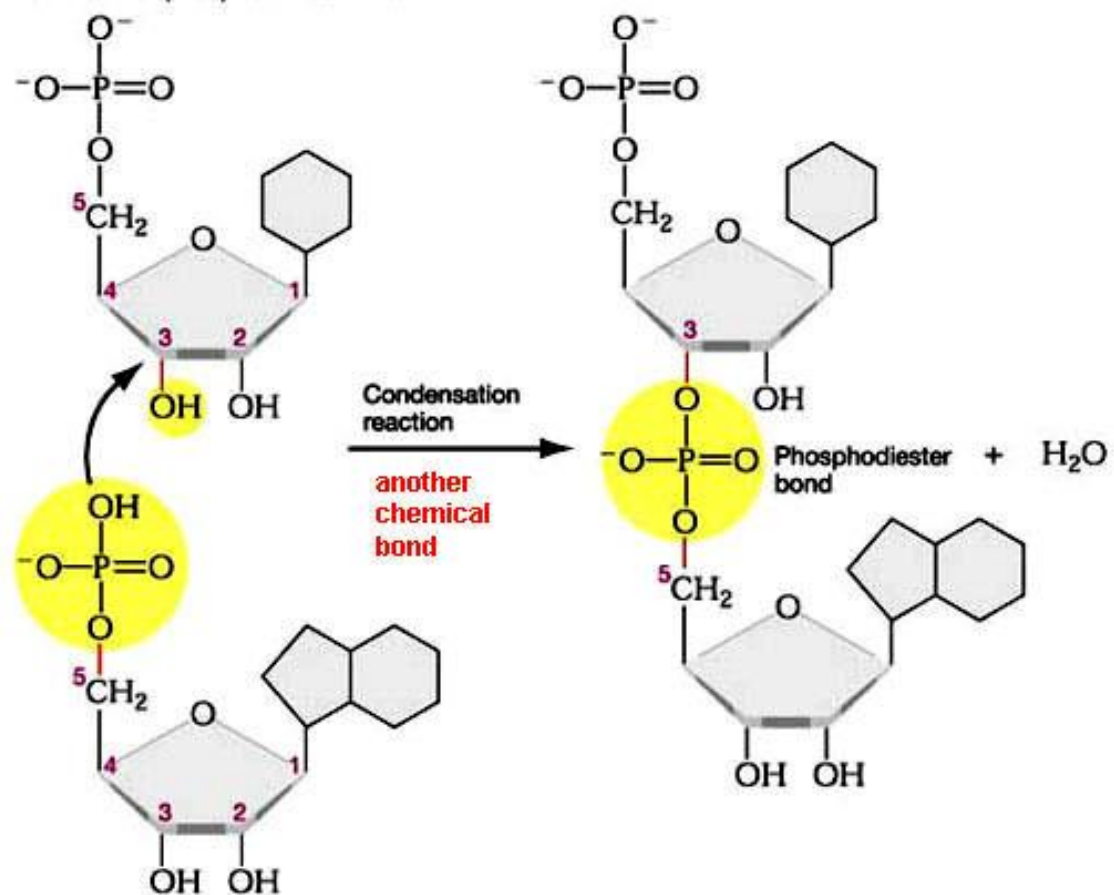
# Η ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ DNA ΠΡΟΥΠΟΘΕΤΕΙ ΤΗΝ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΠΟΛΛΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ





**Η ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ  
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ  
ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΓΙΝΕΤΑΙ  
ΠΑΝΤΑ ΣΤΗΝ  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ  
5' -> 3'**

Formation of phosphodiester bond



# ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ DNA

Γίνεται μόνο μια φορά πριν την κυτταρική διαίρεση, στη διάρκεια της μεσόφασης

- **Ευκαρυωτικά κύτταρα:** πυρήνας, μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες
- **Προκαρυωτικά κύτταρα:** κυτταρόπλασμα
- **Ιοί:** εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή

**Ημισυντηρητικός μηχανισμός διπλασιασμού του DNA:**

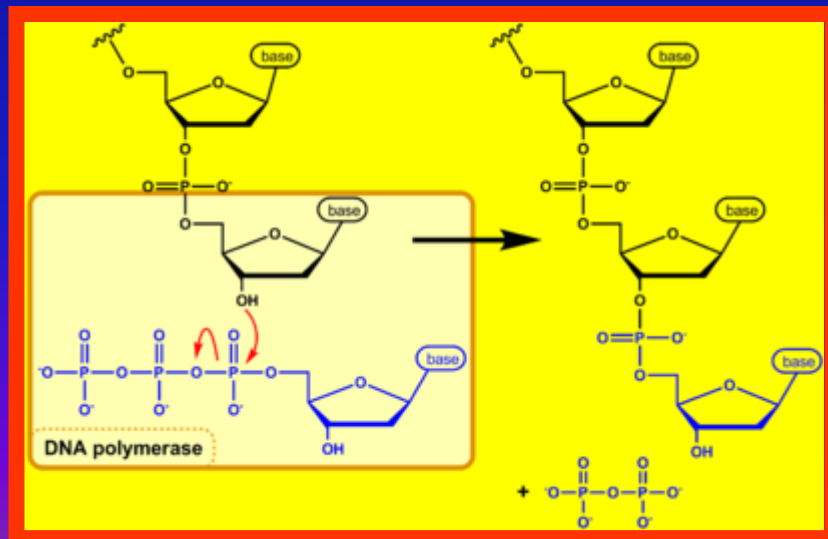
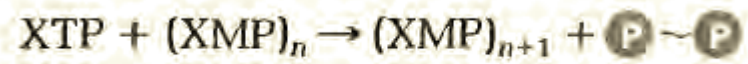
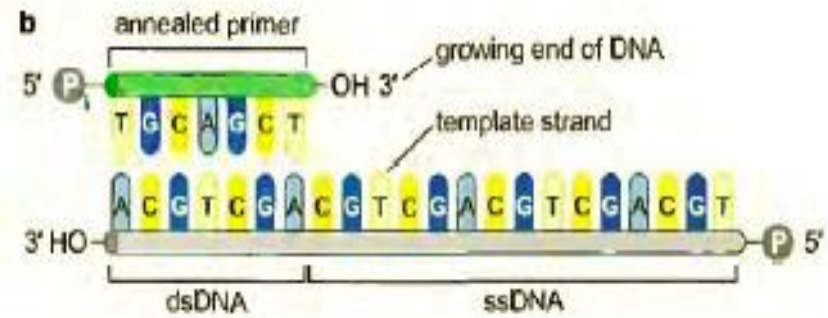
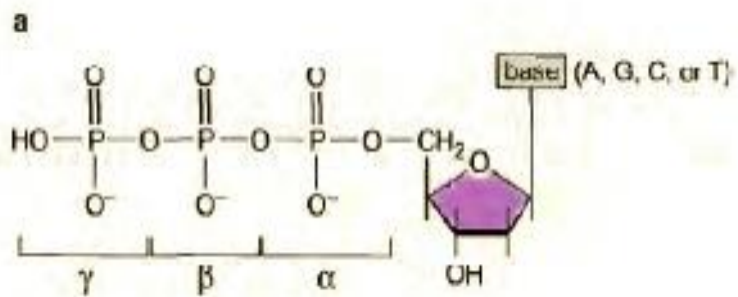
- 2 θυγατρικά μόρια, πανομοιότυπα με το μητρικό
- Αποτελούνται από 1 παλιά και 1 καινούργια αλυσίδα



**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 DNA  
πρέπει το υπόστρωμα να καταστεί  
προσιτό, δηλαδή, πρέπει να είναι  
«ξετυλιγμένο»**



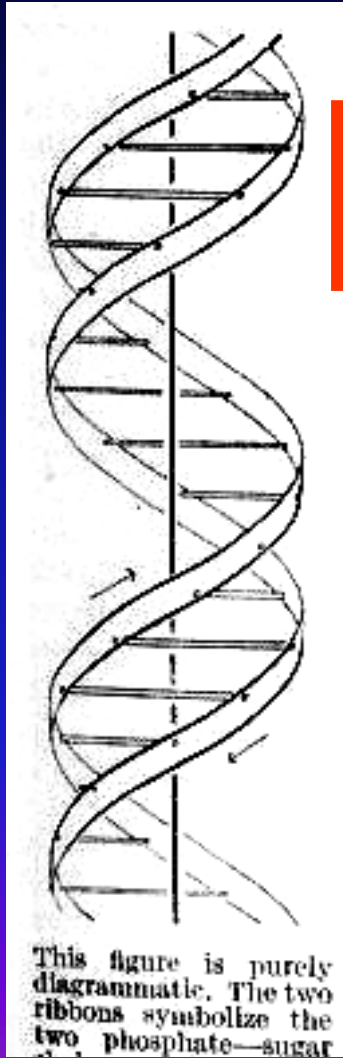
Αντιγραφή του DNA: το κύτταρο χρησιμοποιεί εκμαγείο-κατευθυνόμενο μηχανισμό αντιγραφής της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός κλώνου DNA σε μια συμπληρωματική αλληλουχία DNA.

Η μέθοδος προϋποθέτει την αναγνώριση του κάθε νουκλεοτιδίου της αλυσίδας εκμαγείου, ελεύθερα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια, και απαιτεί τον διαχωρισμό των δύο κλώνων της έλικας του DNA.

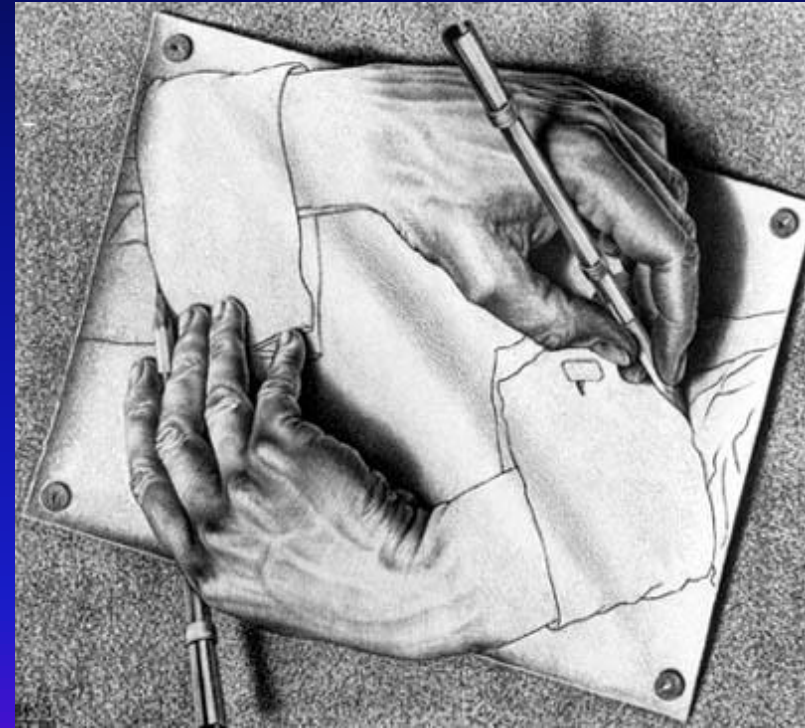
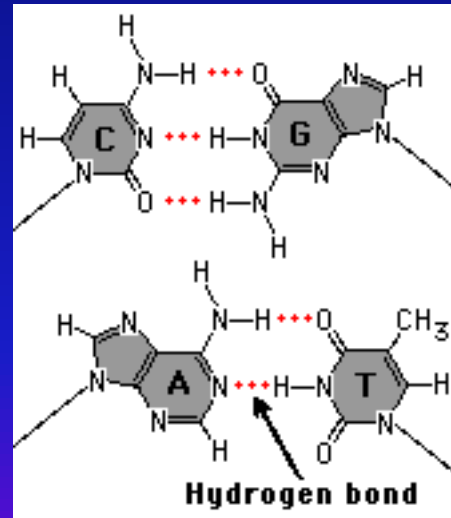
Το πρώτο νουκλεοτίδιο-πολυμεριστικό ένζυμο, η DNA πολυμεράση, ανακαλύφθηκε το 1957.

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

# ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΜΕΡΗ ΣΤΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ



## Watson-Crick base pairs



**1) Ημισυντηρητικό μοντέλο :**

Θυγατρικά Μόρια DNA περιέχουν μία  
γονική

αλυσίδα και μια νέα

2)

**2) Συντηρητικό μοντέλο:**

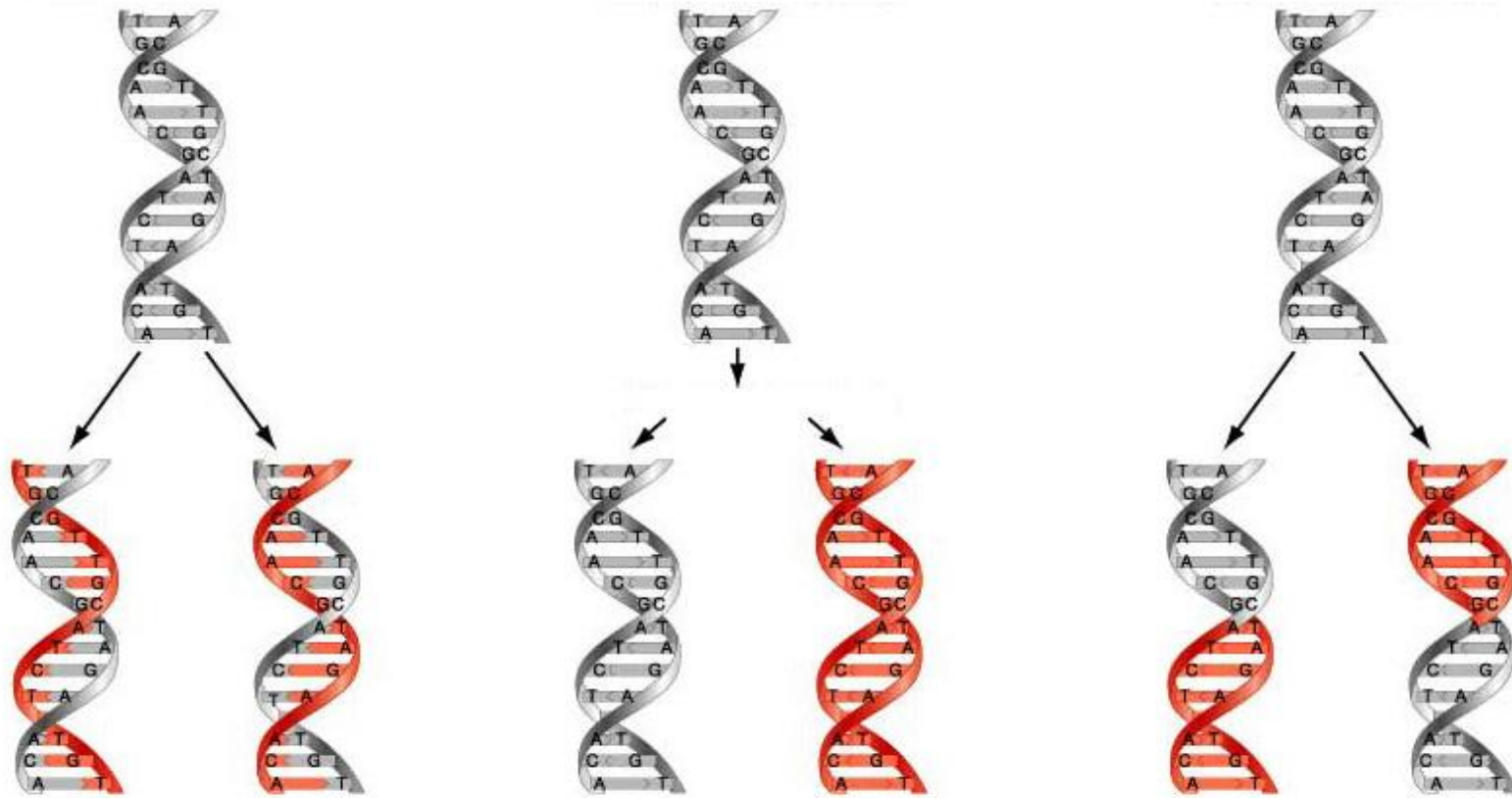
Μητρική αλυσίδα μεταφέρει πληροφορίες  
για ένα ενδιαμέσο (?) που αντιγράφεται.

Η μητρική έλικα διατηρείται, η  
θυγατρική

έλικα είναι εντελώς νέα

**3) Διασπαρτικό μοντέλο :**

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

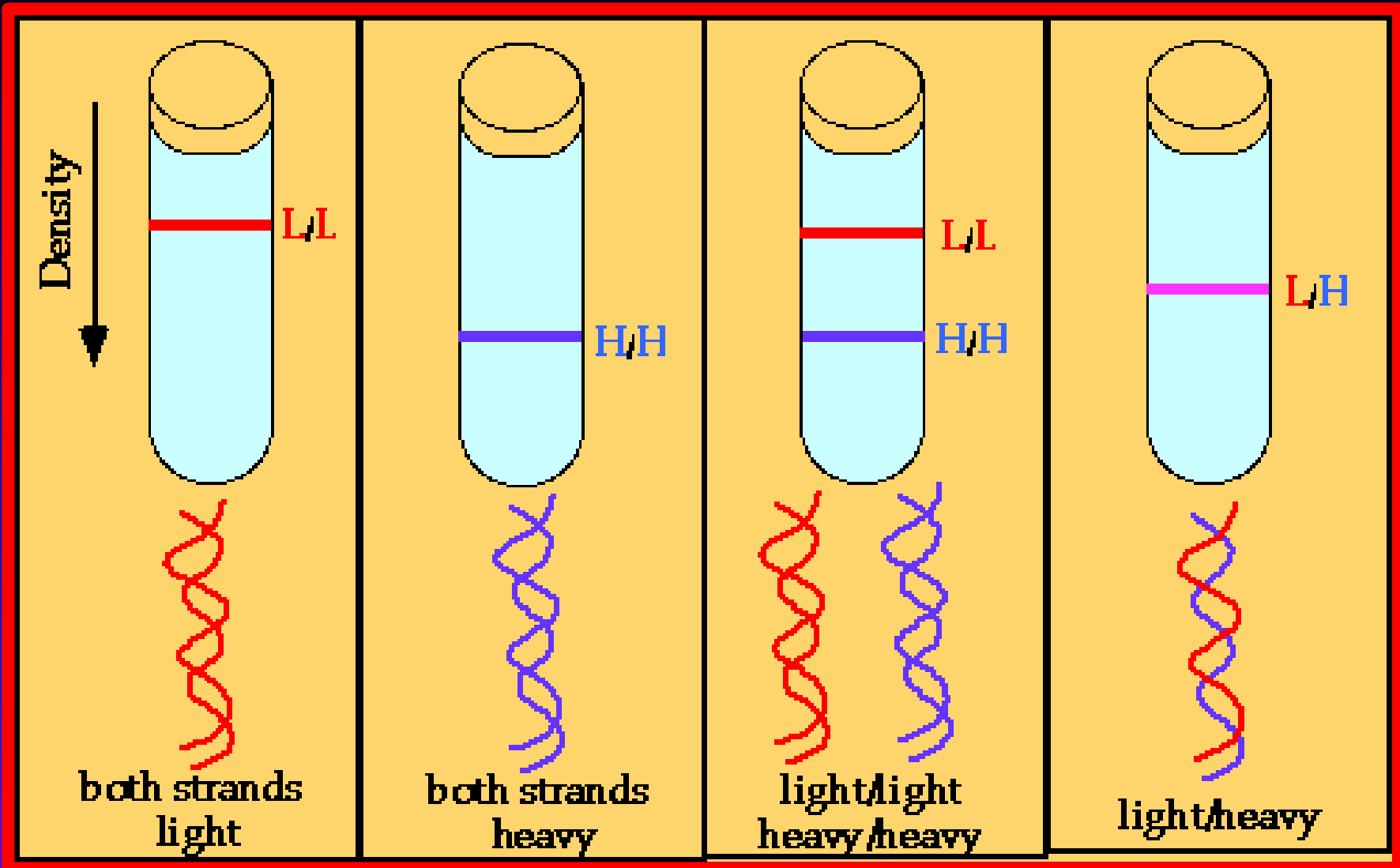


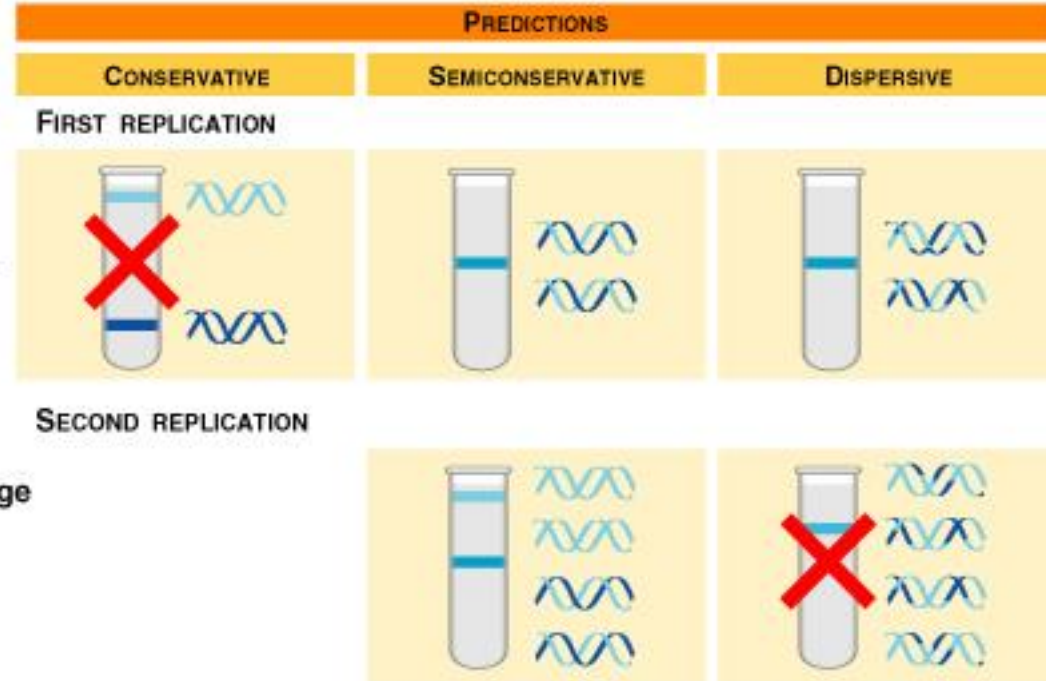
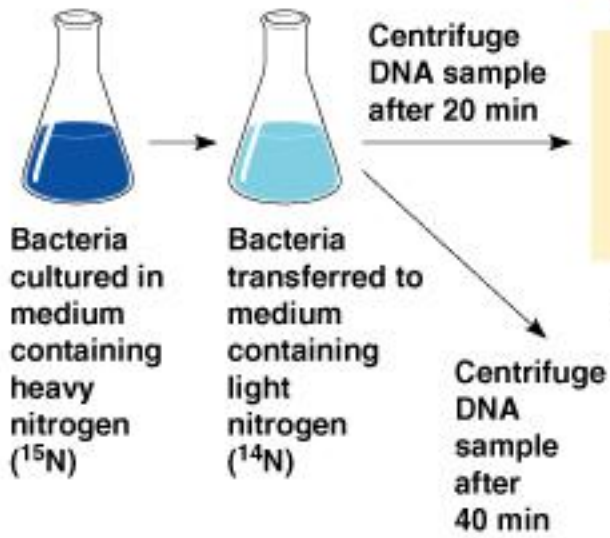


# The most beautiful experiment in the world

- Matthew Messelson and Franklin Stahl in the late 1950s

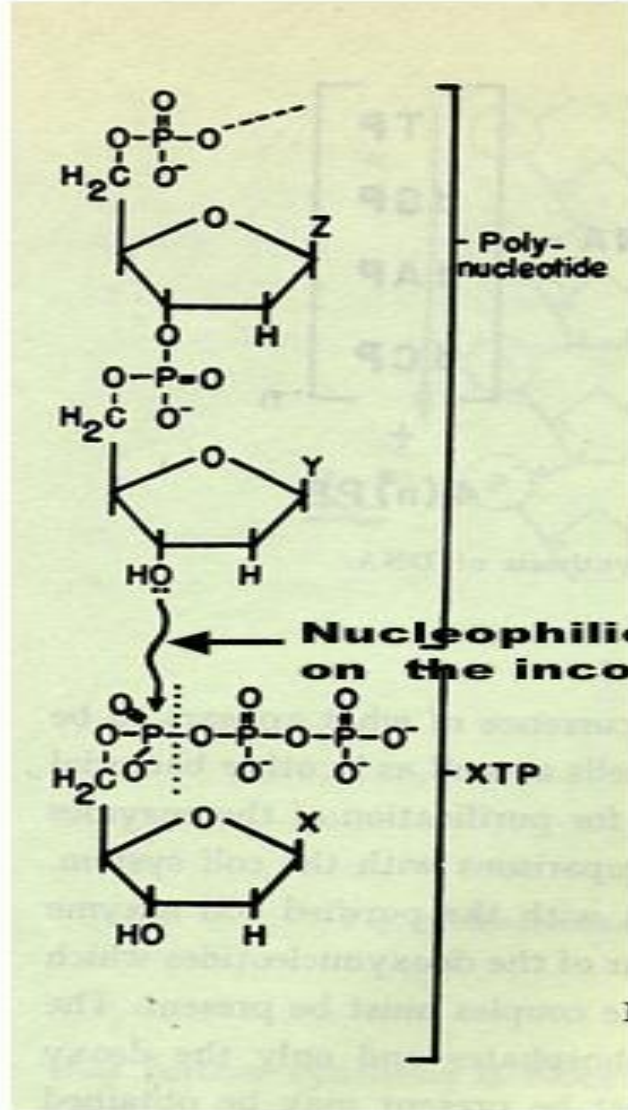






# The Biologic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid

Arthur Kornberg, Nobel Lecture, December 11, 1959



The excitement over Kornberg's demonstration of DNA synthesis in a test tube lead to an amazing quick period from publication in the Journal of Biological Chemistry (1958) to the Nobel Prize in 1959! As it turned out it was too quick! After he received the Nobel Prize, Kornberg discovered that the enzyme he isolated (pol I) from

*E. coli* was not the replicative enzyme. In typical "nobel fashion", however, he corrected himself with the elucidation of the true replicative enzyme, pol III, several years later! Pol I, however, is still affectionately referred to as the "Kornberg Enzyme".

# DNA Replication

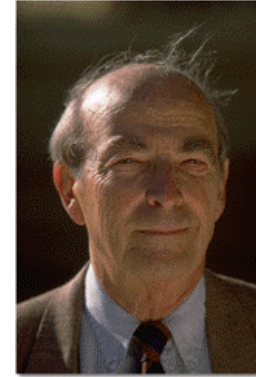
## **1955: Arthur Kornberg**

**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<sup>2+</sup> (optimizes DNA polymerase activity)**



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

ΟΙ DNA Πολυμεράσες χρησιμοποιούν ένα μοναδικό ενεργό κέντρο για την κατάλυση της σύνθεσης DNA

Η DNA πολυμεράση παρακολουθεί την ικανότητα του εισερχόμενου νουκλεοτιδίου να σχηματίσει ένα ζεύγος βάσεων

Η κατάλυση μπορεί να συμβεί μόνο όταν σχηματίζεται το σωστό ζεύγος βάσεων μεταξύ του 3'-OH του εκκινητή και του α-φωσφορικού του εισερχόμενου τριφωσφορικού νουκλεοσιδίου.

Λανθασμένη εισερχόμενη βάση οδηγεί σε σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά προσθήκης νουκλεοτιδίων που είναι αποτέλεσμα της καταλυτικά δυσμενούς ευθυγράμμισης των υποστρωμάτων



Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί ένα παράδειγμα κινητικής επιδιόρθωσης, κατά τον οποίο ένα ένζυμο ευνοεί την κατάλυση χρησιμοποιώντας ένα από τα πιθανά υποστρώματα και αυξάνοντας σημαντικά τον ρυθμό σχηματισμού δεσμών μόνο όταν υπάρχει το σωστό υπόστρωμα

Ο ρυθμός ενσωμάτωσης του ορθού υποστρώματος είναι 10.000 φορές μεγαλύτερος από αυτόν της ενσωμάτωσης λανθασμένου νουκλεοτιδίου

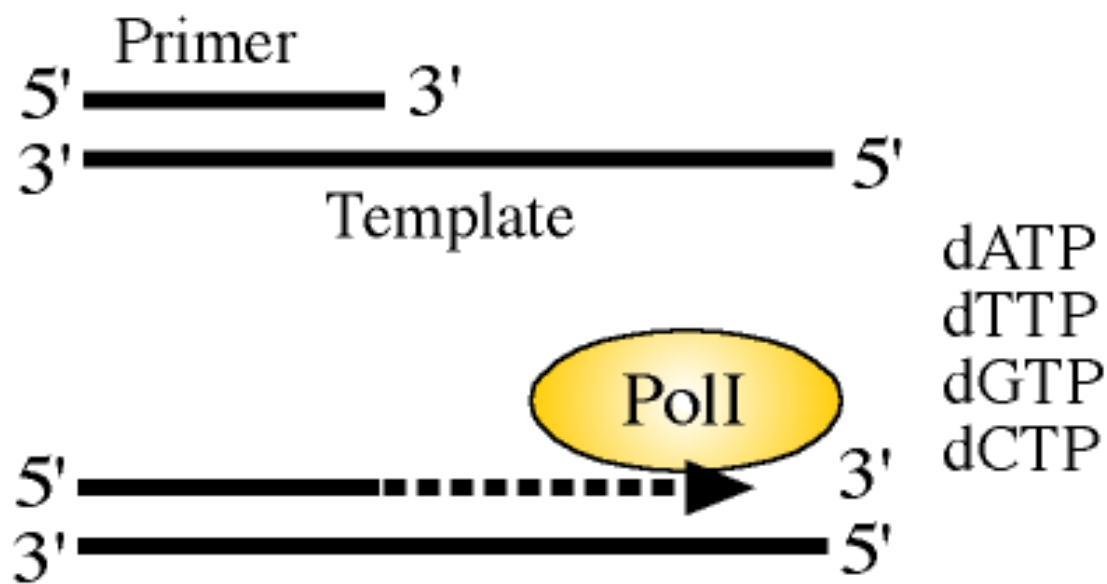
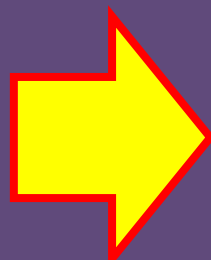
DNA replication requires:

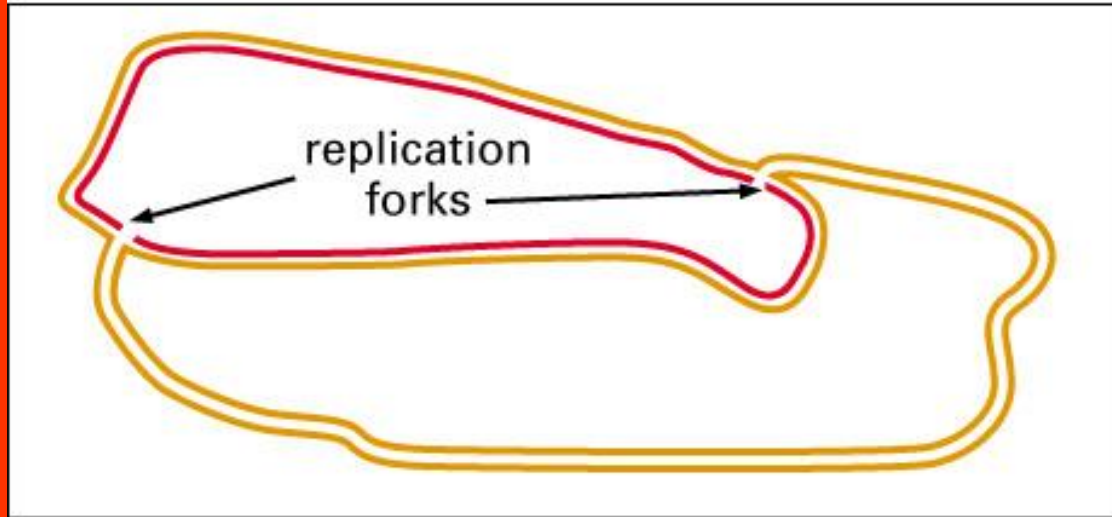
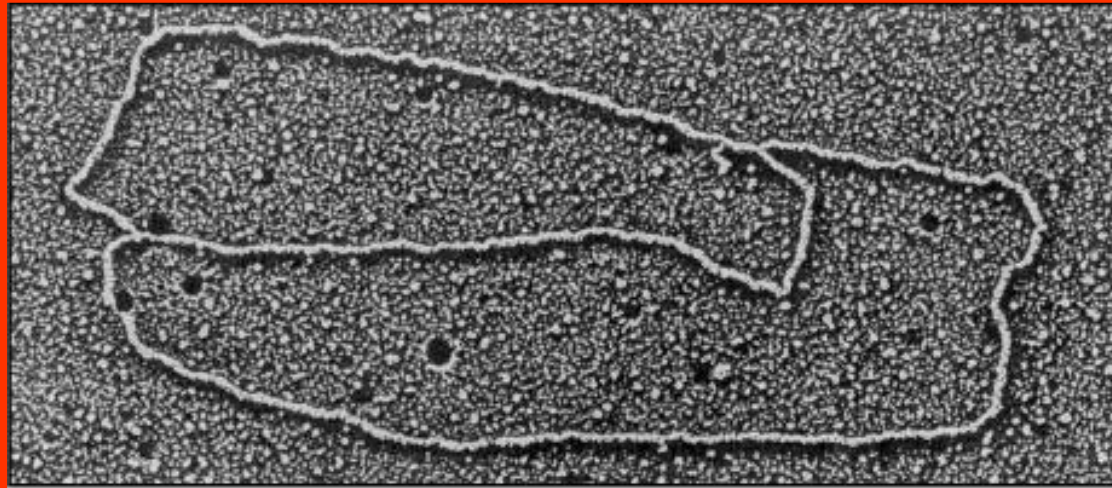
Template

Primer

DNA-dependent DNA polymerase

dNTPs

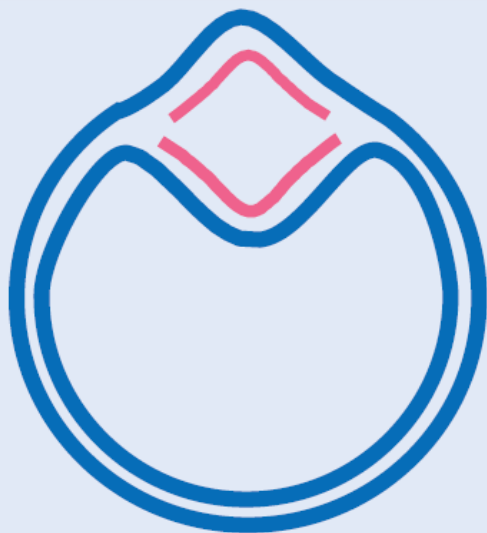




1  $\mu\text{m}$

Figure 5-6. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Οι αντιγραφικές θηλιές είναι ορατές  
στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο



Αντιγραφόμενη  
δομή θ



Εμφάνιση της δομής  
θ στο ηλεκτρονικό  
μικροσκόπιο

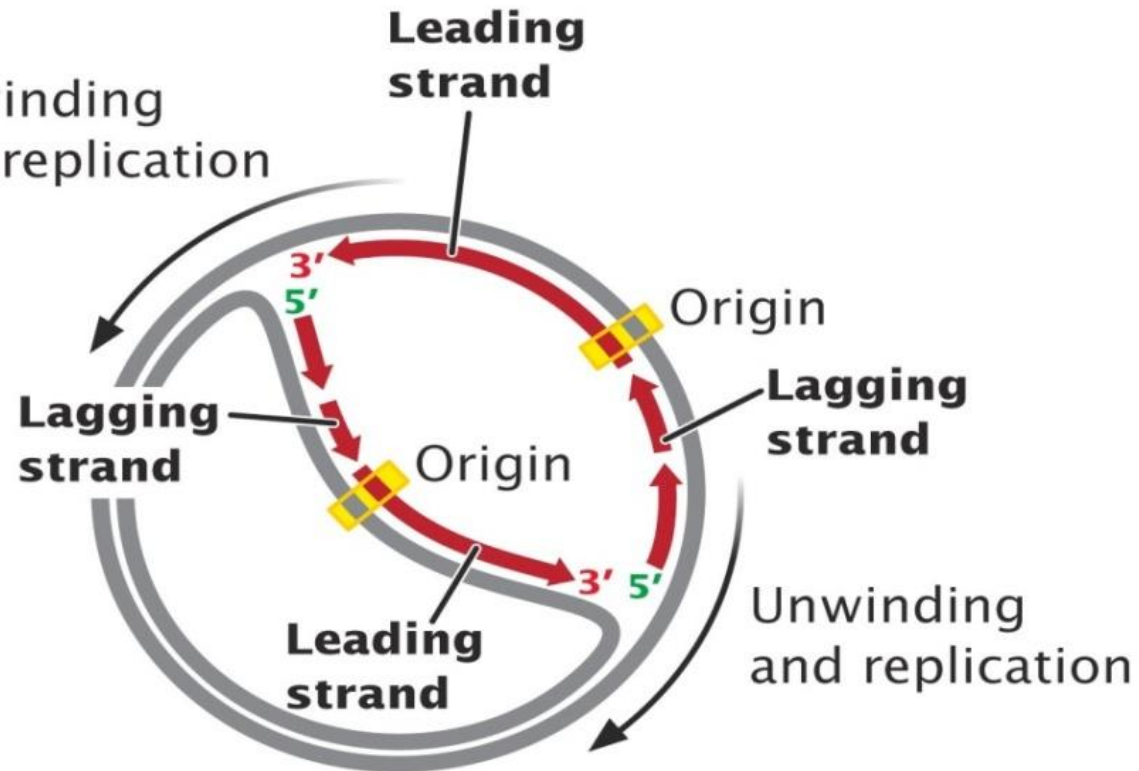
©virtualtext [www.ergito.com](http://www.ergito.com)

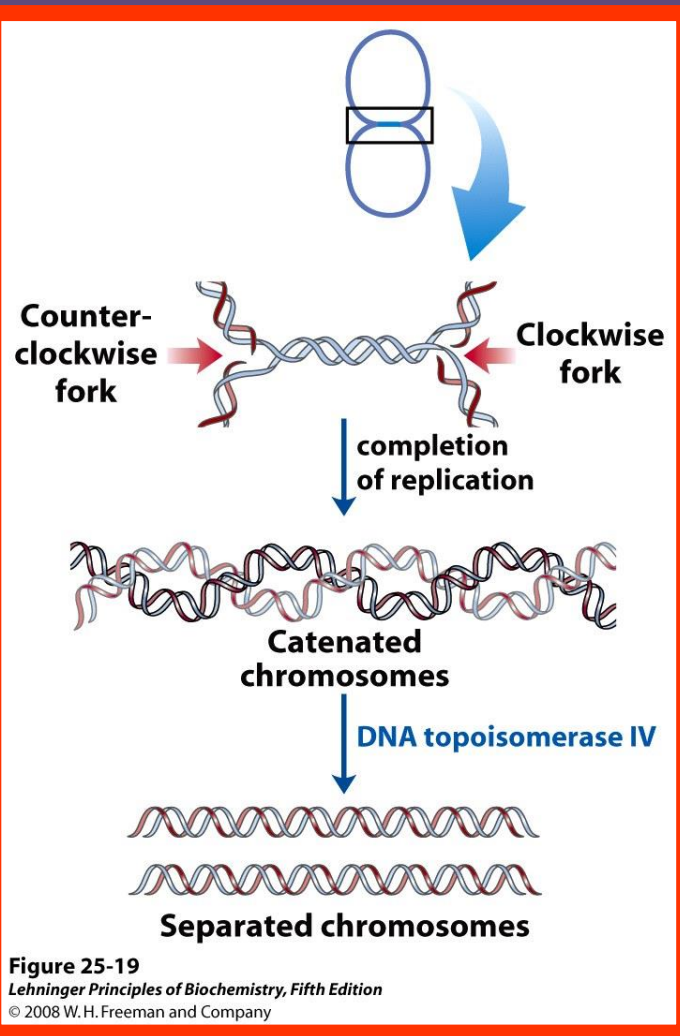
Κατά την αντιγραφή ενός κυκλικού DNA, η  
φουσαλίδα αντιγραφής σχηματίζει μία δομή  
θ.

# Process in Theta Replication

## (a) Theta model

Unwinding  
and replication





Ο ρόλος των τοποϊσομερασών στον τερματισμό της αντιγραφής. Στο τέλος του διπλασιασμού του DNA έχει ως αποτέλεσμα τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα να βρίσκονται υπό τη μορφή τοπολογικά αλληλένδετων κύκλων. Οι κύκλοι δεν συνδέονται με ομοιοπολικούς, δεσμούς αλλά επειδή είναι το καθένα είναι ομοιοπολικά κλειστό, δεν μπορούν να διαχωριστούν, χωρίς παρέμβαση των τοποϊσομερασών..





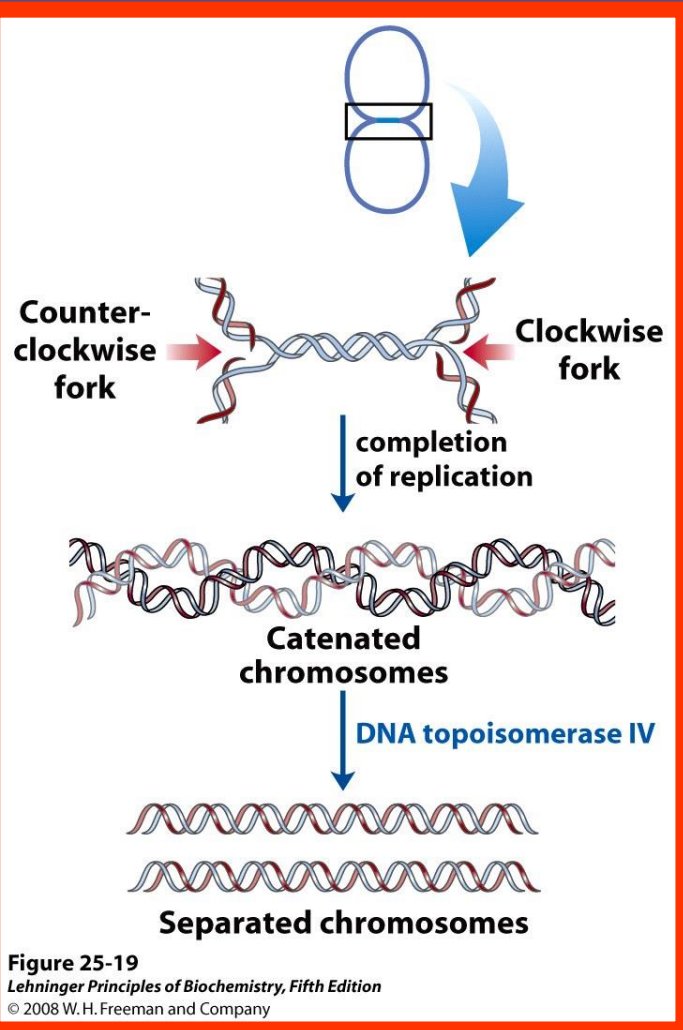
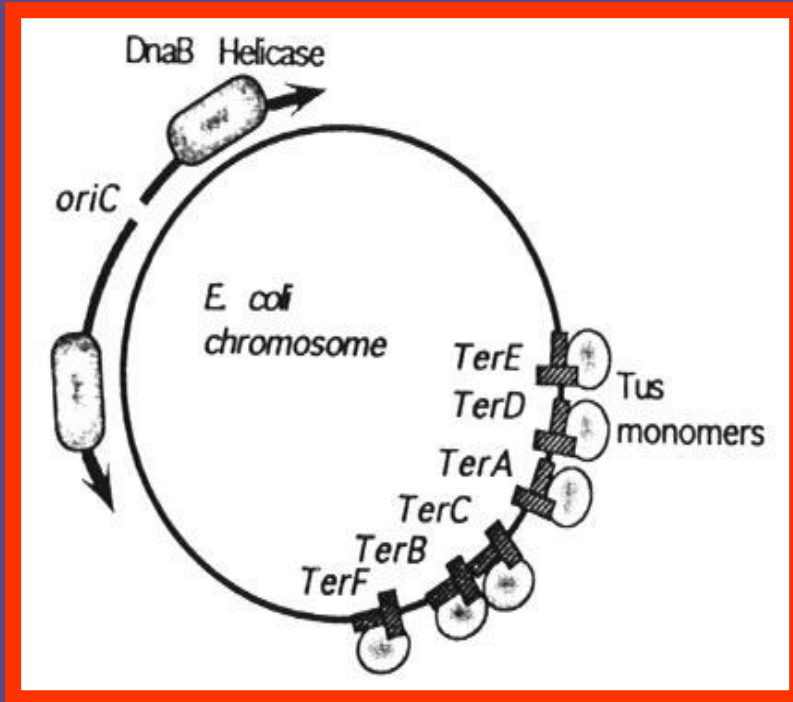


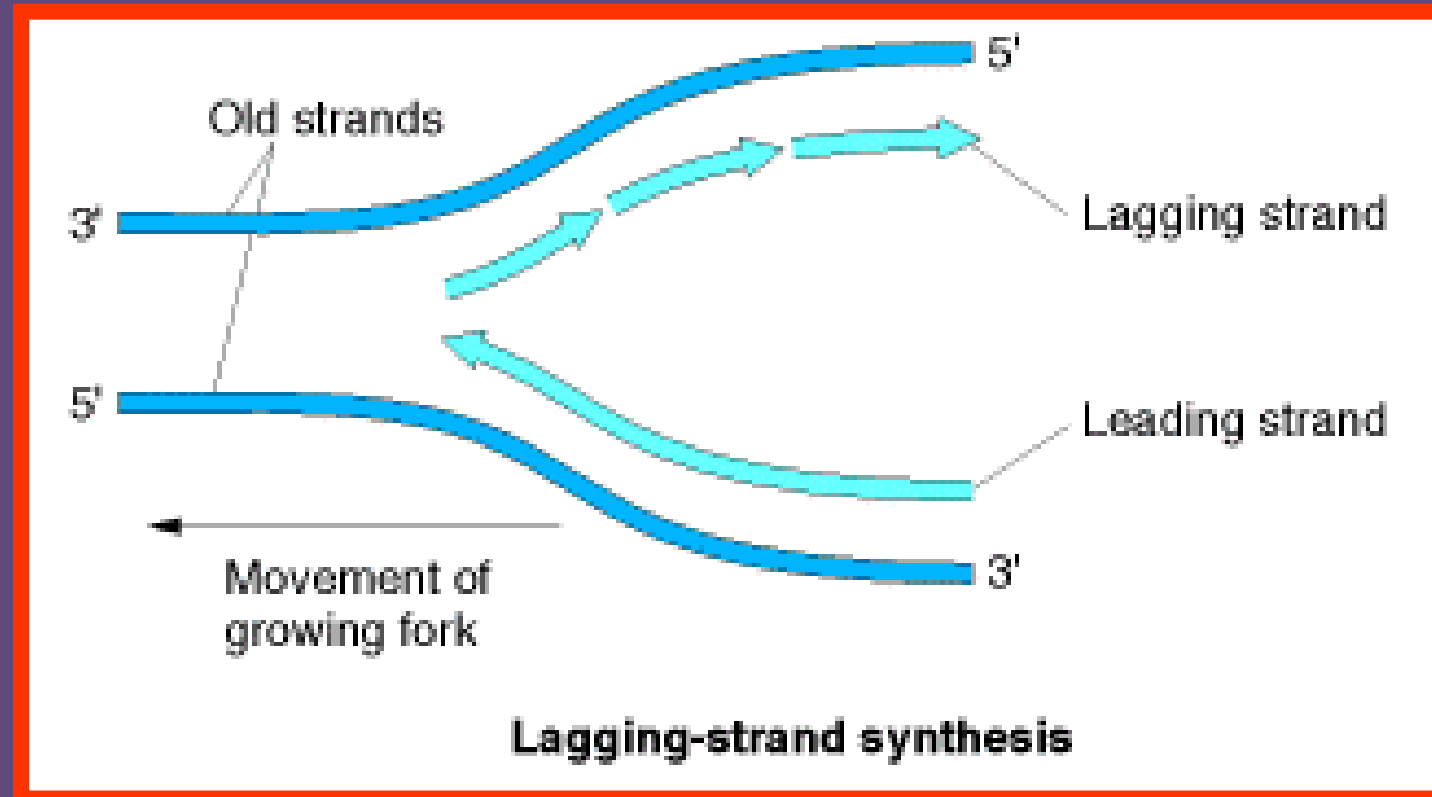
Figure 25-19  
 Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
 © 2008 W.H. Freeman and Company

Στην *E. coli*, η τοποϊσομεράση τύπου II, γνωστή ως DNA τοποϊσομεράση IV, έχει τον πρωταρχικό ρόλο στο διαχωρισμό των χρωσωμάτων (δύο δίκλωνων κύκλων catenated) με παροδική διάσπαση των δύο κλώνων ενός χρωμοσώματος και έτσι επιτρέποντας στο άλλο χρωμόσωμα να περάσει μέσα από το σημείο διάσπασης

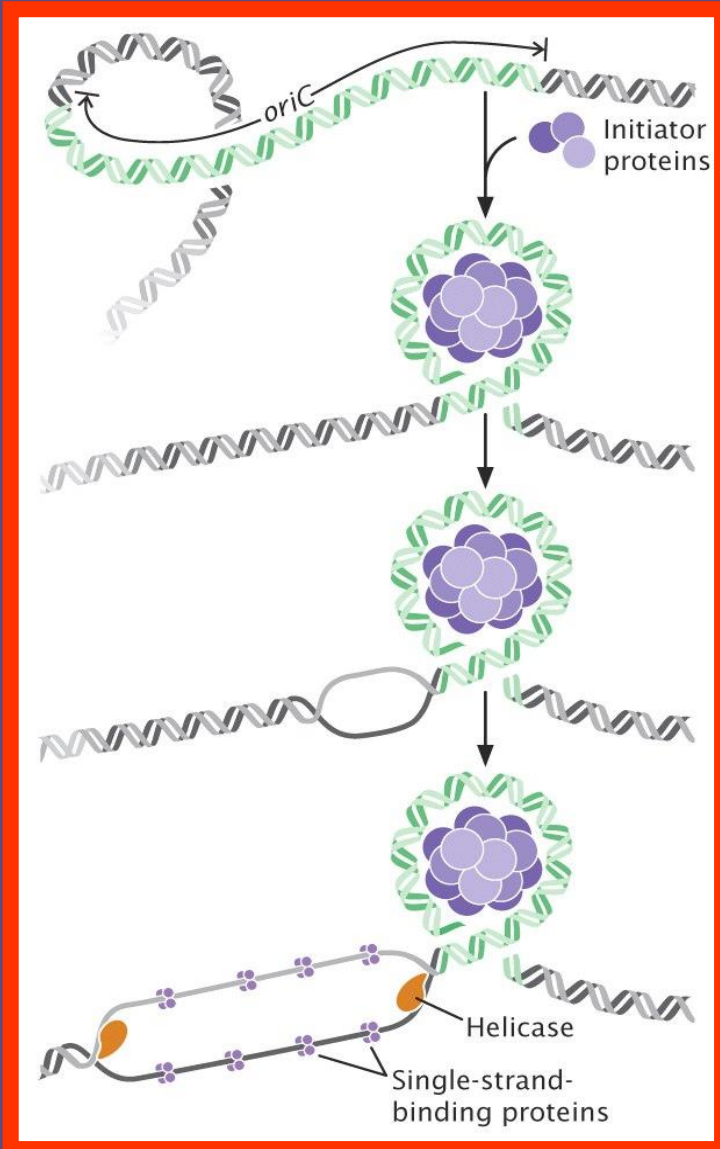


Το σχήμα T του χώρου τερματισμού δηλώνει την πολικότητα της περιοχής. Οι διχάλες αντιγραφής συναντώνται την επίπεδη πλευρά (κορυφή T) (δηλαδή, η δεξιά διχάλα θα διέρχεται από περιοχές TerE, TerD, και TerA, αλλά θα σταματήσει σε TERC, TerB, ή TerF). Μια πρωτεΐνη που ονομάζεται Tus συνδέεται με τις περιοχές Ter, και η δέσμευση αυτή αναστέλλει την δράση της DnaB (ελικάση)

## Ασυνεχής Σύνθεση



## *E. coli* DNA



Έναρξη  
Μοναδική περιοχή  
έναρξης της  
αντιγραφής (*oriC*)

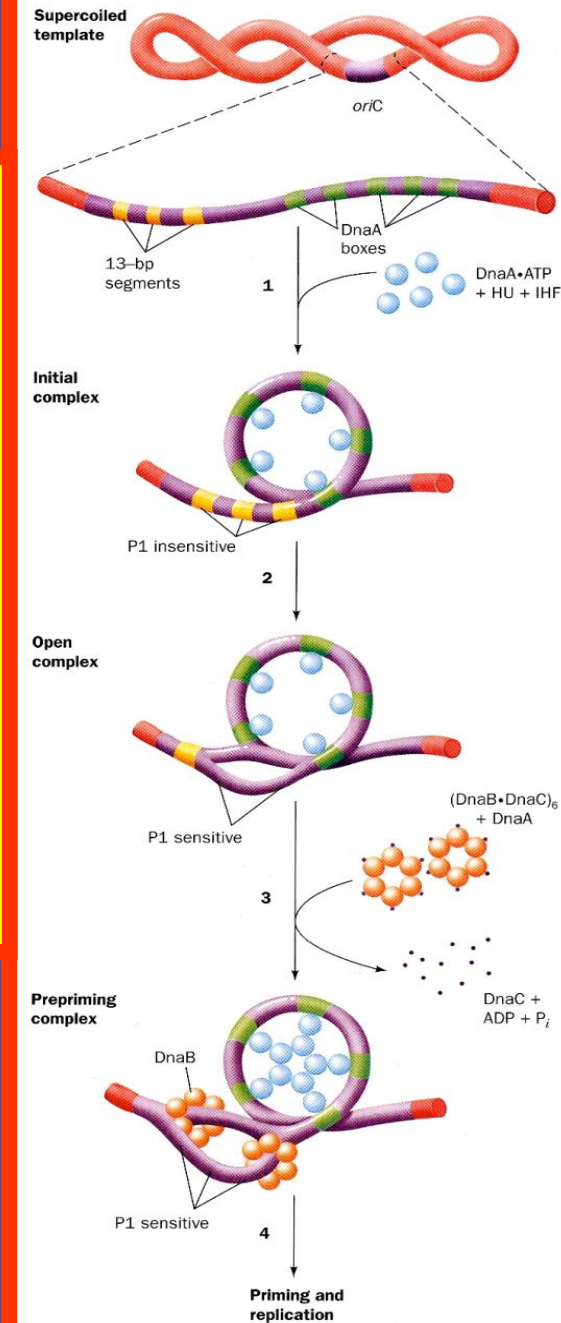
Πρωτεΐνες συνδέονται  
με *oriC*

Τμήμα του DNA  
ξετυλίγεται

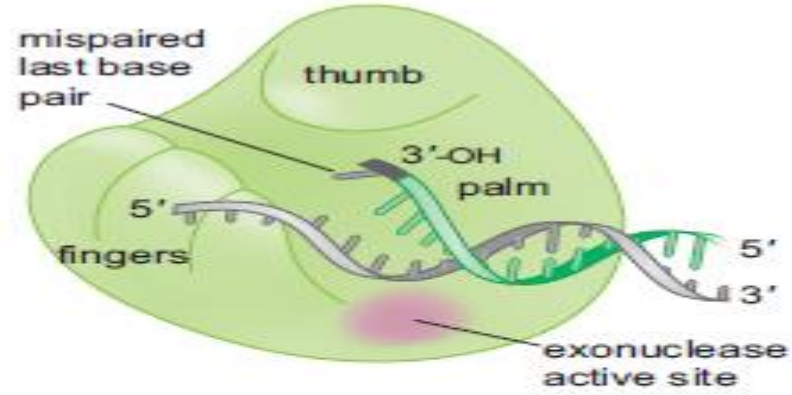
Γίνεται εφικτή η  
δέσμευση της ελικάσης  
& ssDNA πρωτεΐνων

**1) Αρχικό σύμπλοκο:**  
Η συνεργατική πρόσδεση των DnaA πρωτεϊνών στα DnaA boxes προκαλεί σχηματισμό αρνητικής υπερελίκωσης

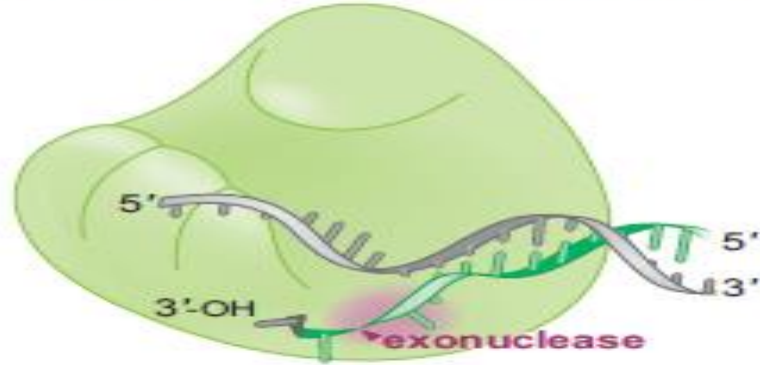
**2) Ανοιχτό σύμπλοκο:**  
Η DnaA σταδιακά προκαλεί αποδιάταξη και των 3 13 bp επαναλήψεων (AT-rich). Η αντίδραση υποβοηθείται από την υδρόλυση του ATP. Μόλις σχηματιστεί το ανοιχτό σύμπλοκο, οδηγείται στην ανοιχτή περιοχή το σύμπλοκο DnaB-DnaC, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό συμπλόκου που προηγείται της σύνθεσης πρωταρχικού τμήματος



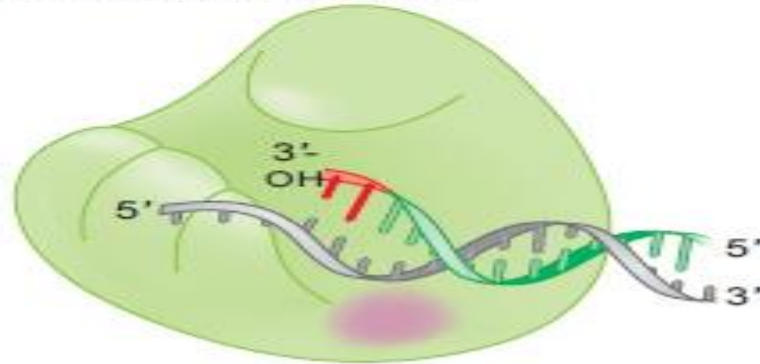
a slow or no DNA synthesis



b removal of mismatched nucleotide(s)



c resume DNA synthesis





**TABLE 25–1****Comparison of Three DNA Polymerases of *E. coli***

	DNA polymerase		
	I	II	III
<b>Structural gene*</b>	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
<b>Subunits (number of different types)</b>	1	7	≥10
<b><math>M_r</math></b>	103,000	88,000 <sup>†</sup>	791,500
<b>3'→5' Exonuclease (proofreading)</b>	Yes	Yes	Yes
<b>5'→3' Exonuclease</b>	Yes	No	No
<b>Polymerization rate (nucleotides/s)</b>	16–20	40	250–1,000
<b>Processivity (nucleotides added before polymerase dissociates)</b>	3–200	1,500	≥500,000

\*For enzymes with more than one subunit, the gene listed here encodes the subunit with polymerization activity. Note that *dnaE* is an earlier designation for the gene now referred to as *polC*.

<sup>†</sup>Polymerization subunit only. DNA polymerase II shares several subunits with DNA polymerase III, including the  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\delta'$ ,  $\chi$ , and  $\psi$  subunits (see Table 25–2).

Table 25-1

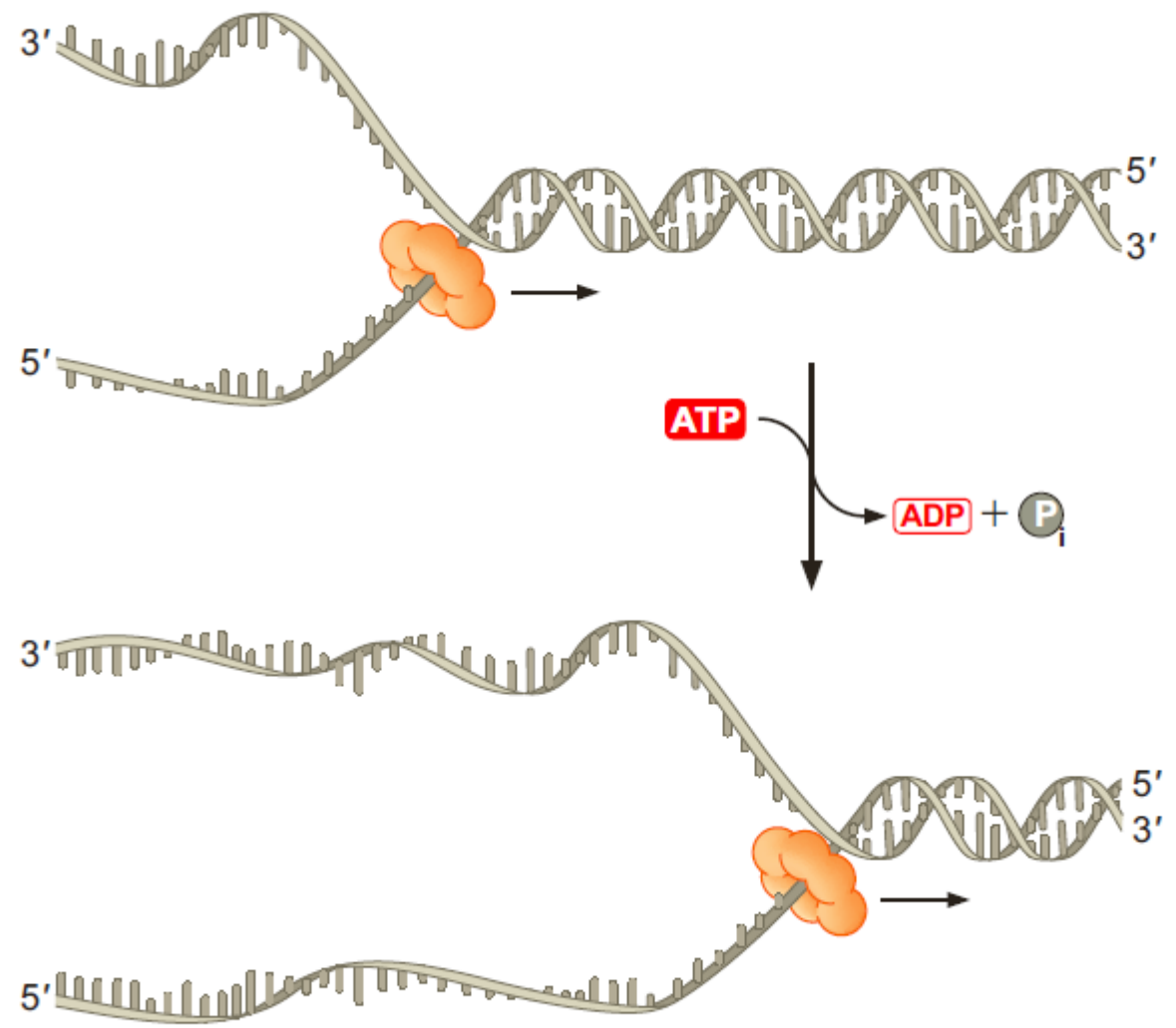
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company



Τυπικά, οι DNA ελικάσες που δρουν σε διχάλες αντιγραφής είναι εξαμερής πρωτεΐνες που έχουν το σχήμα ενός δακτυλίου. Αυτά τα σύμπλοκα πρωτεΐνης σε σχήμα δακτυλίου περικυκλώνουν μία από τις μονόκλωνες αλυσίδες στη διχάλα αντιγραφής δίπλα στην

**διασταύρωση που οριοθετεί τοπολογικά το όριο μονόκλωνης - διπλής έλικας**



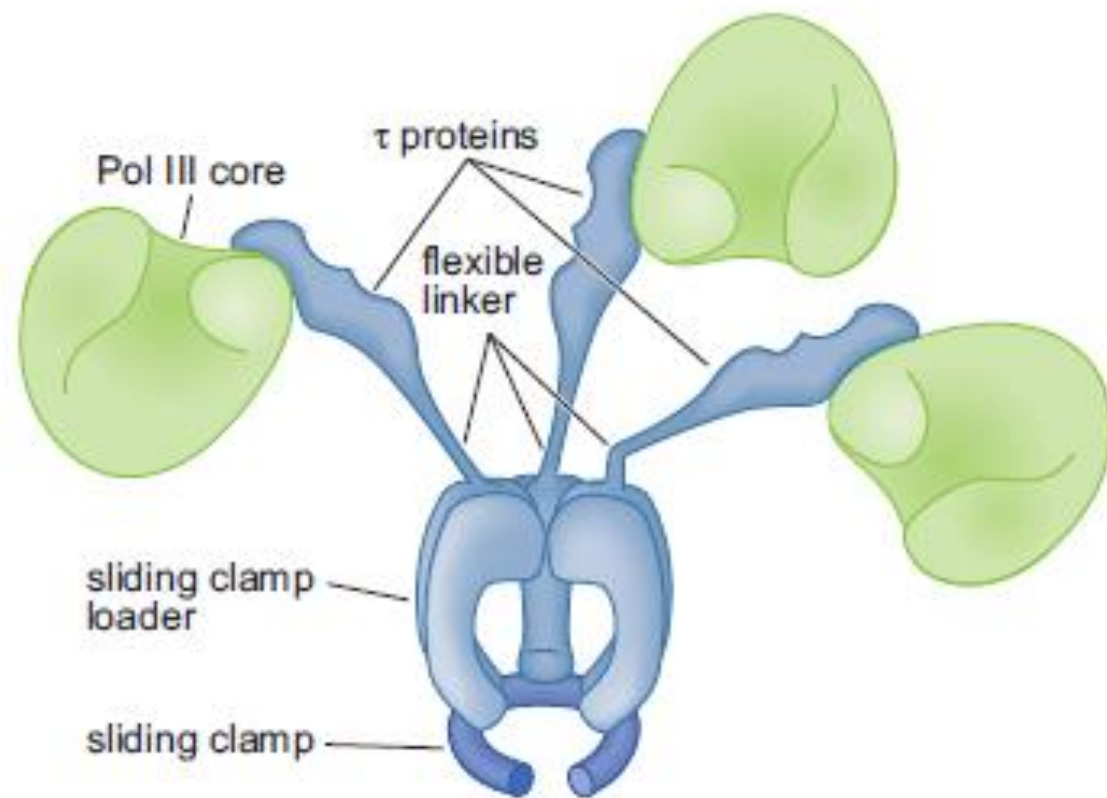
Οι κεντρικός ρόλος των DNA πολυμερασών είναι στην αποδοτική και ακριβή αντιγραφή του γονιδιώματος, και έχει ως αποτέλεσμα την εξέλιξη πολλαπλών εξειδικευμένων DNA πολυμερασών. **Για παράδειγμα, E. coli έχει τουλάχιστον**

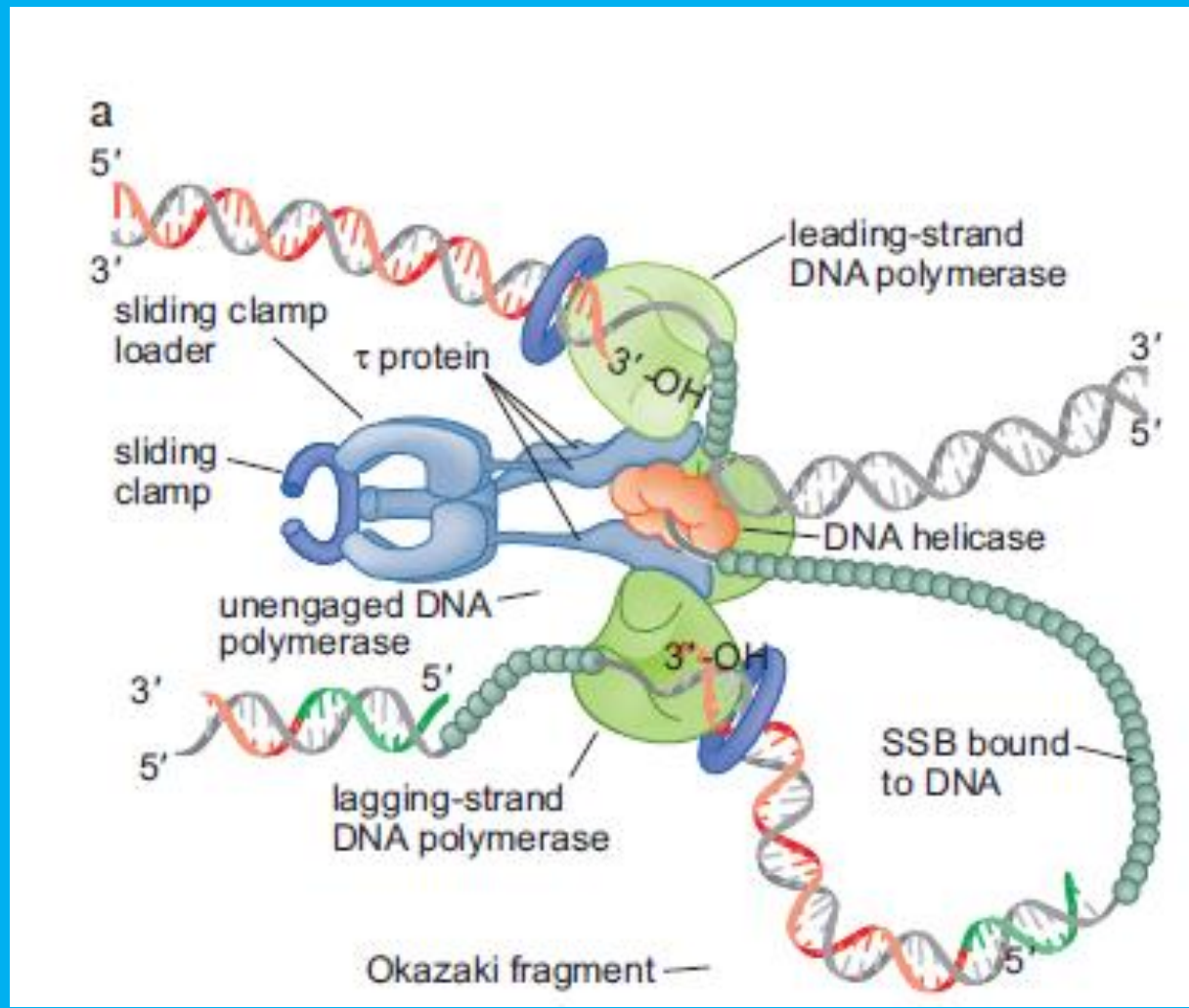
**πέντε πολυμεράσες, οι οποίες**  
**διακρίνονται από ξεχωρές ενζυμικές ιδιότητες, υπομονάδες, και αριθμό .** Η DNA πολυμεράση III , είναι το κύριο

ένζυμο που εμπλέκεται στην αντιγραφή του χρωμοσώματος. Επειδή το σύνολο του γονιδιώματος (4,6 Mb ) στην E. coli αναπαραχθεί από δύο διχάλες αντιγραφής η DNA Pol III πρέπει να είναι εξαιρετικά επεξεργαστική.

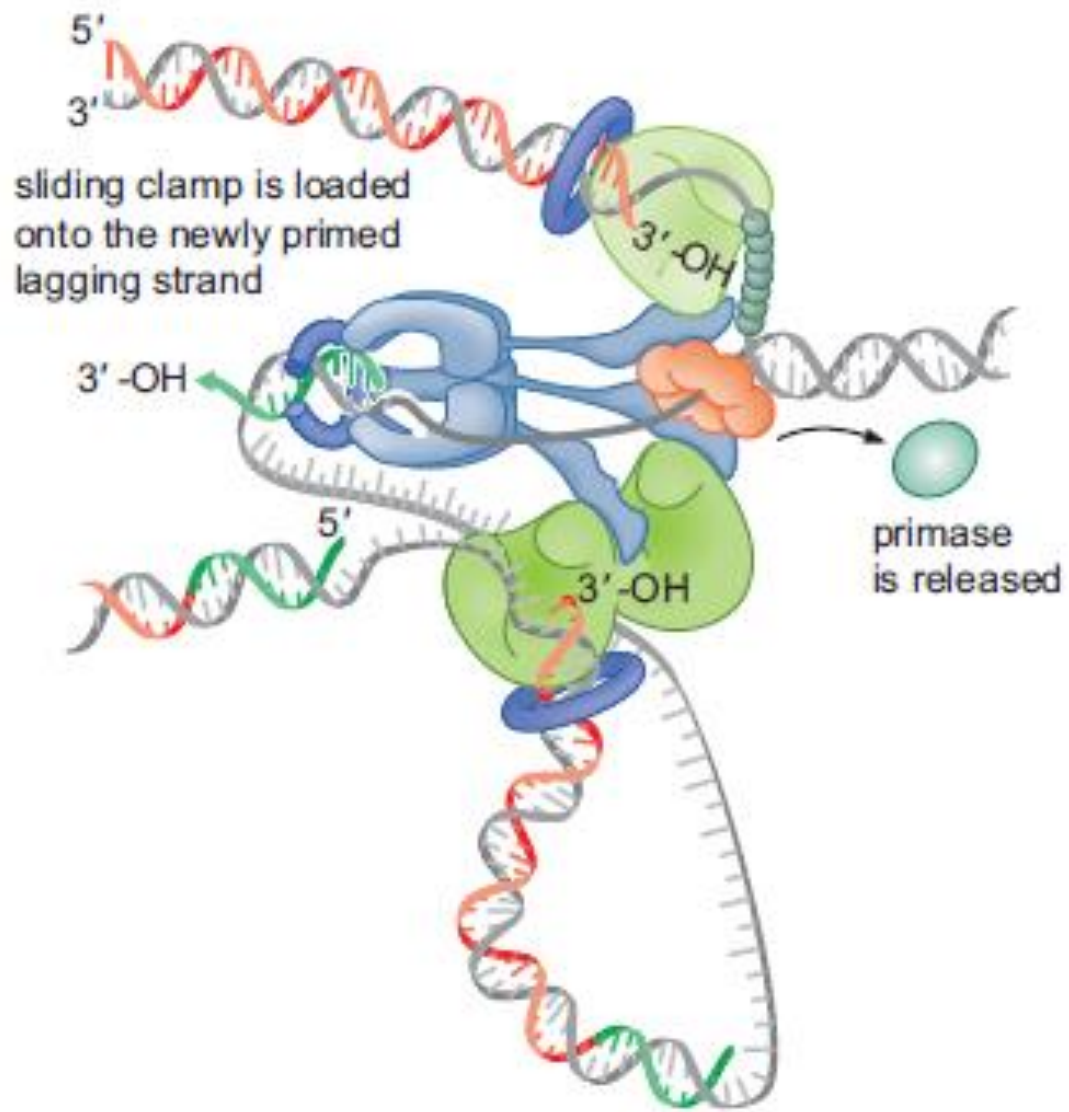
Συνεπώς με τις απαιτήσεις αυτές, η DNA Pol III βρέθηκε να είναι μέρος ενός μεγαλύτερου συμπλόκου που προσδίδει πολύ υψηλή επεξεργαστικότητα

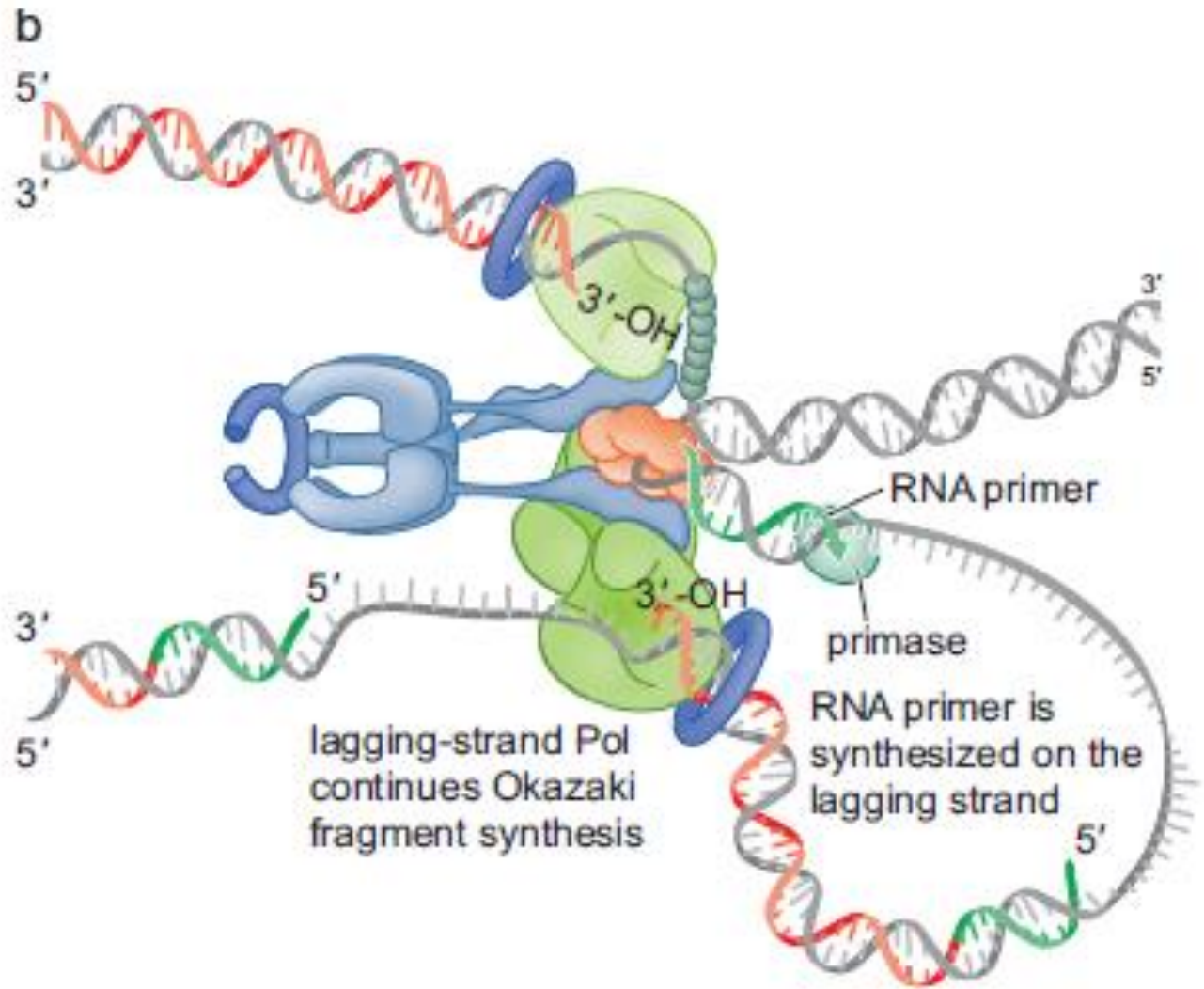
**ένα σύμπλοκο γνωστό ως ολοένζυμο DNA Pol III.**





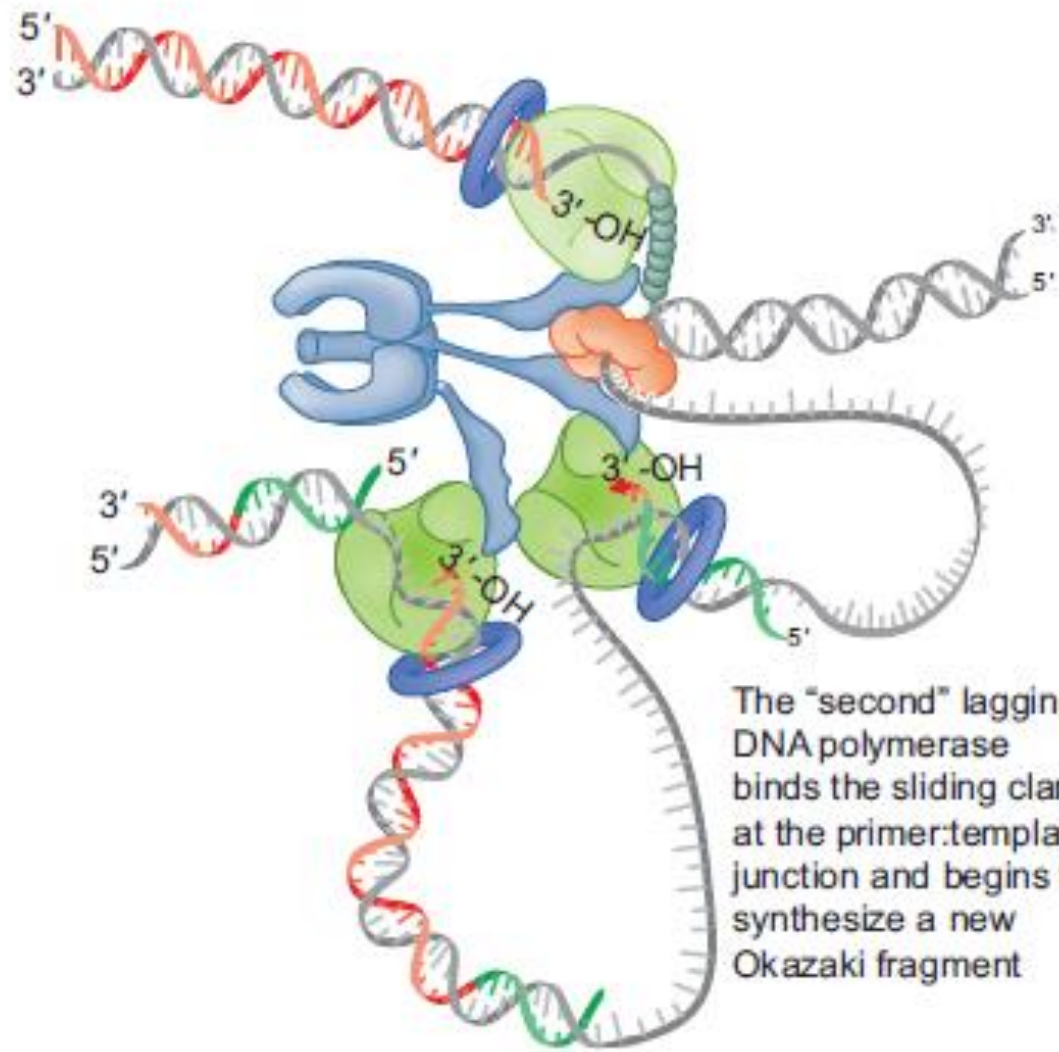
c





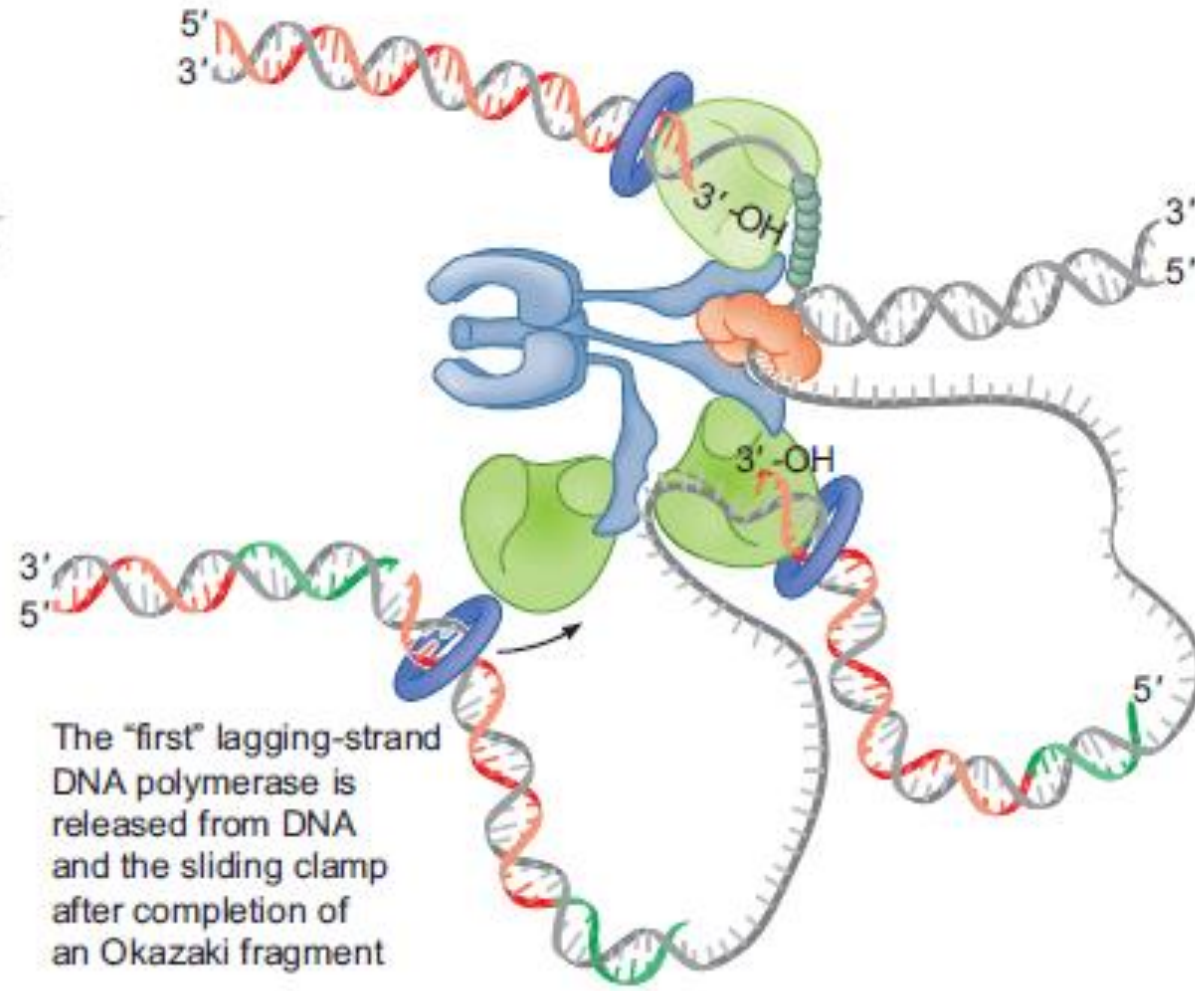


d

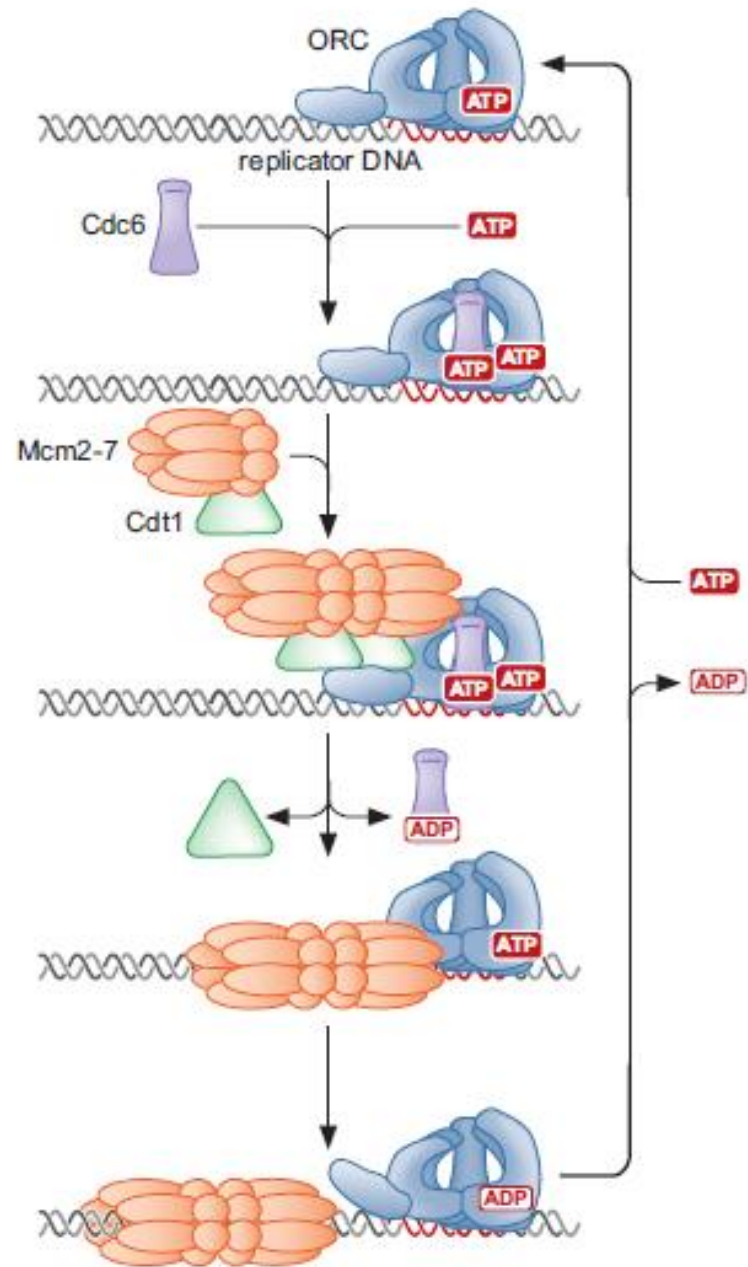


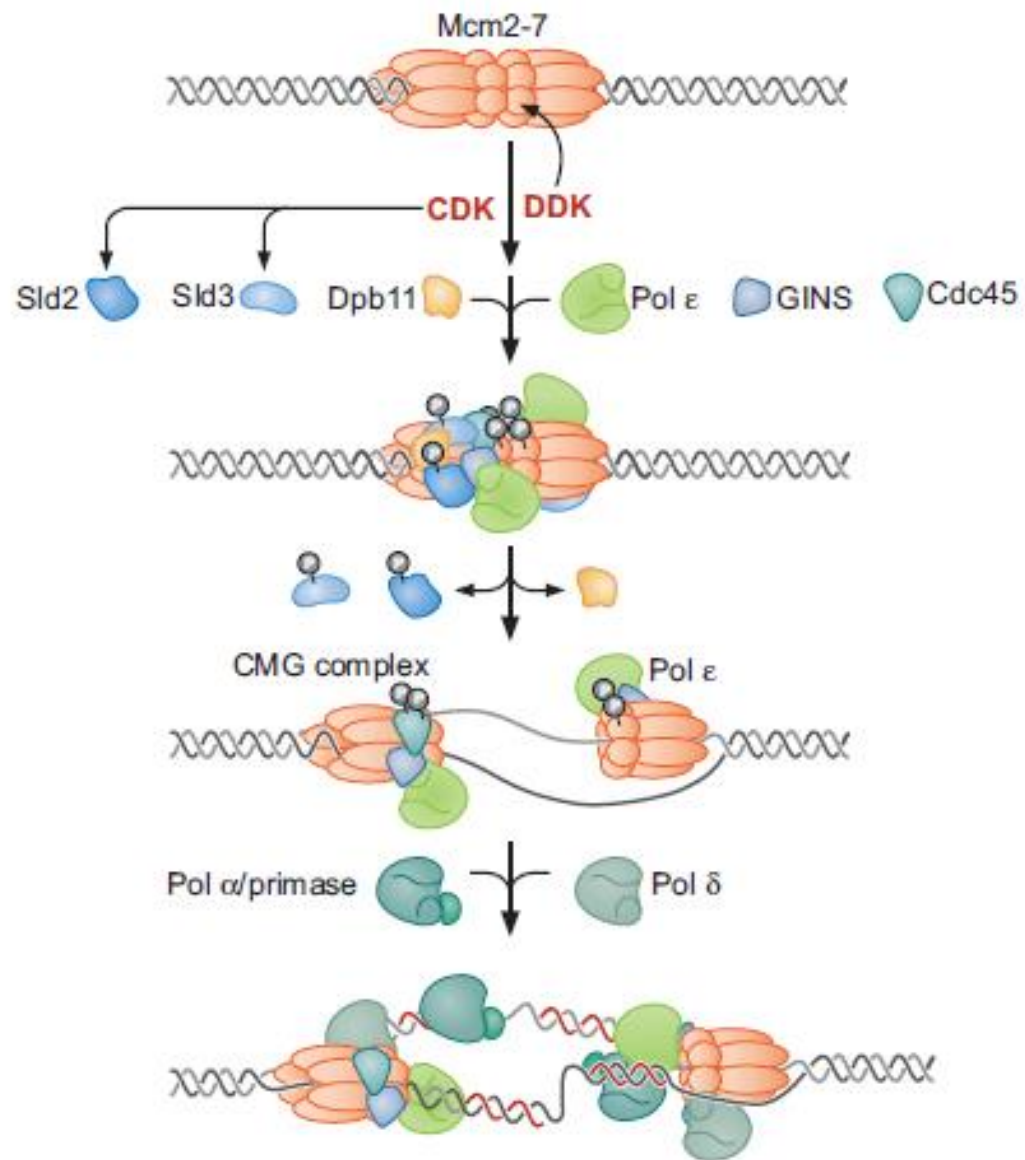
The "second" lagging-strand DNA polymerase binds the sliding clamp at the primer:template junction and begins to synthesize a new Okazaki fragment

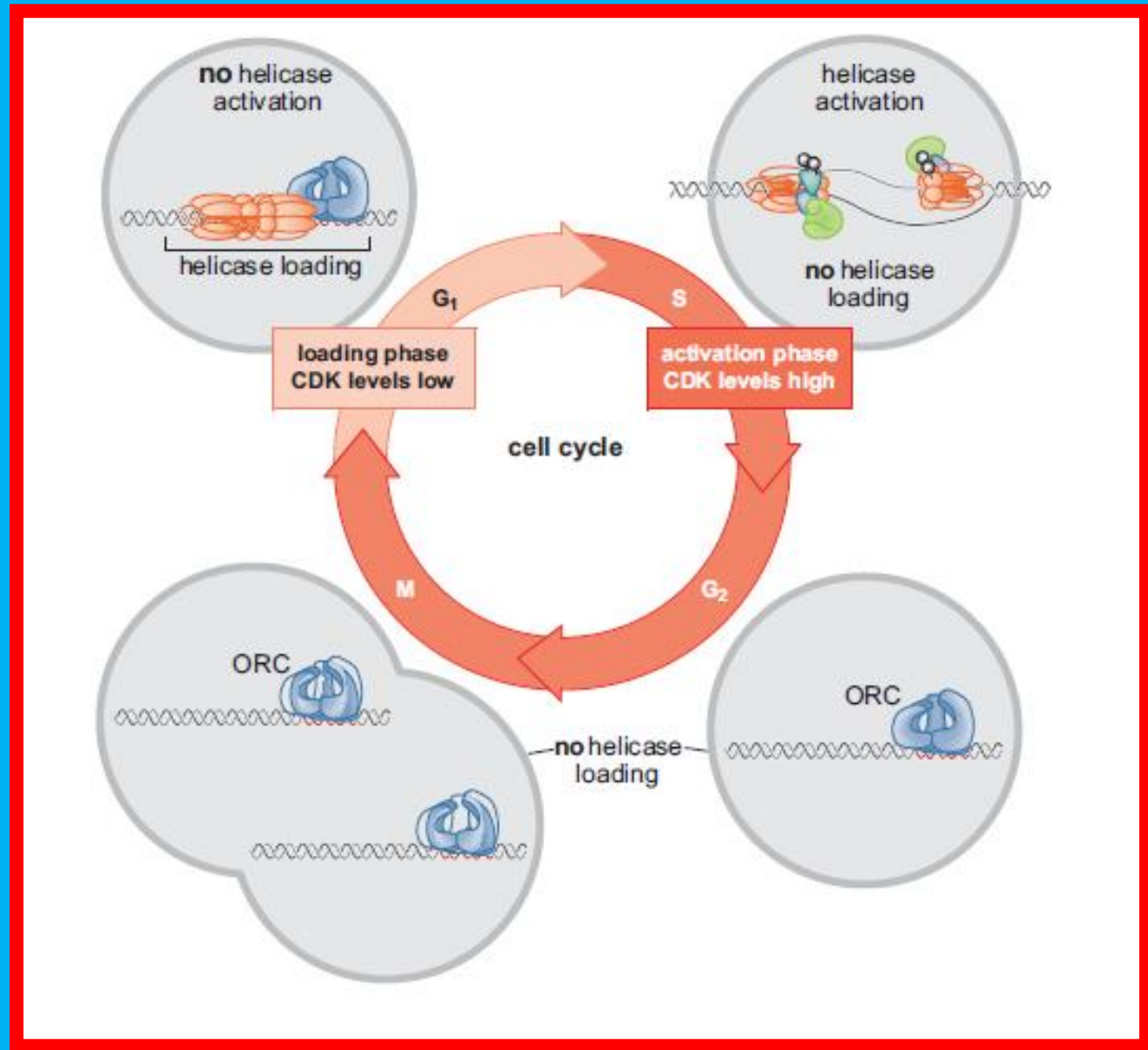
e

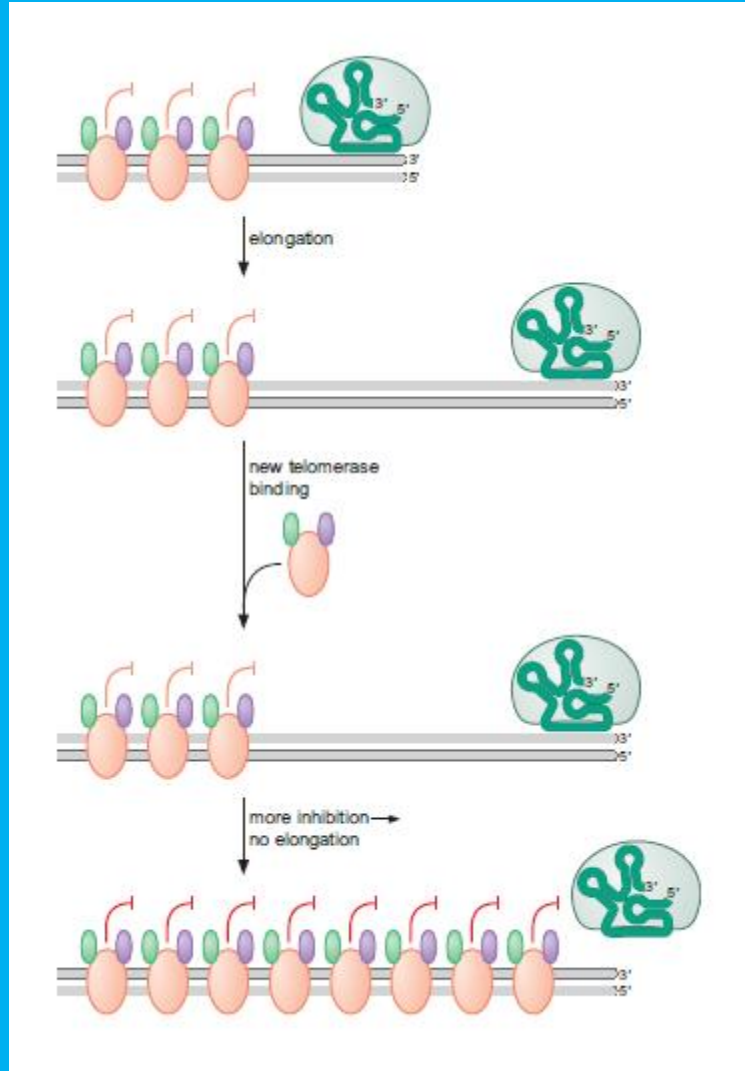


The "first" lagging-strand DNA polymerase is released from DNA and the sliding clamp after completion of an Okazaki fragment.









- **Αντιγραφή DNA**
- **Αφαίρεση βάσεων πουρίνης και απαμίνωση**
- **Υπεριώδης ακτινοβολία**
- **Οξείδωση**
- **Χημικές ουσίες**



## Κατηγορίες μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA

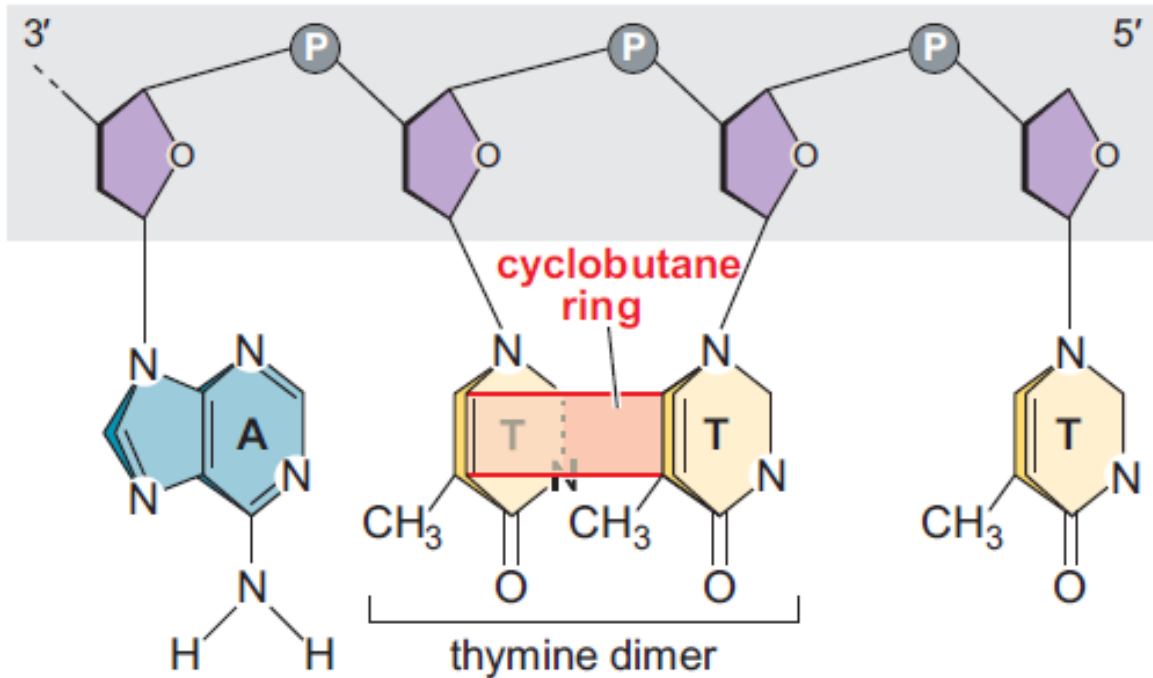
I. Άμεση επιδιόρθωση

II. Αποκοπή νουκλεοτιδίων

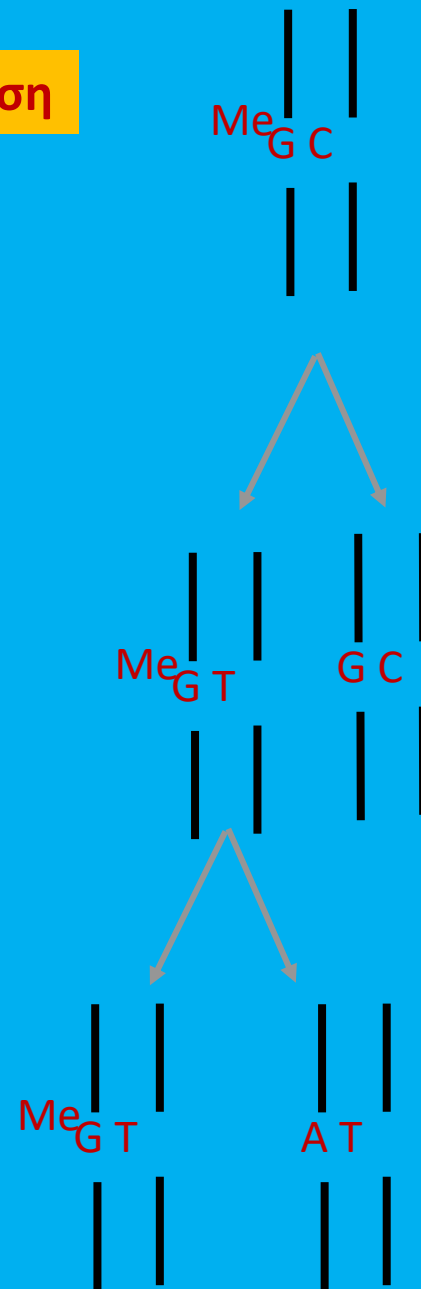
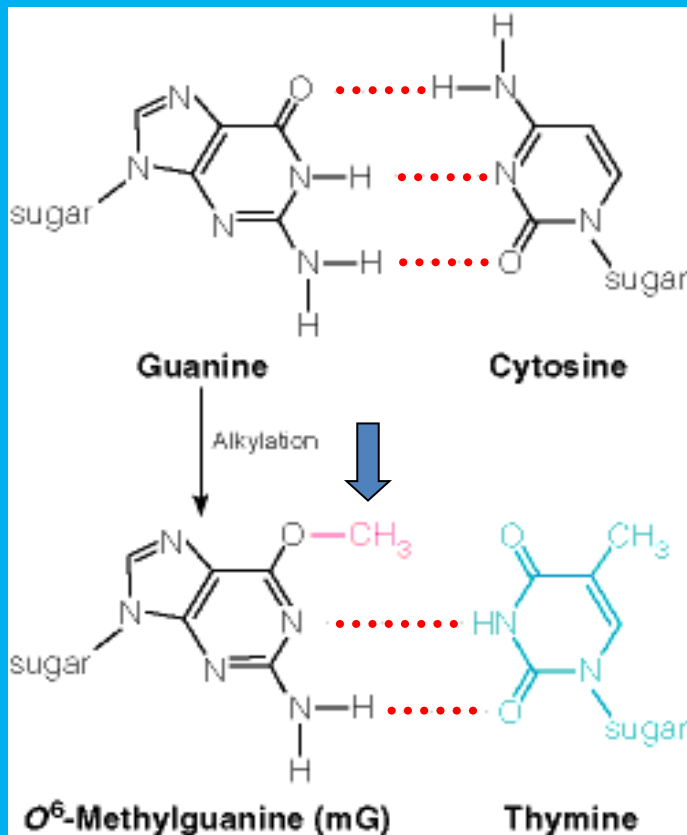
III. Αποκοπή βάσεων

IV. Επιδιόρθωση μετά την αντιγραφή

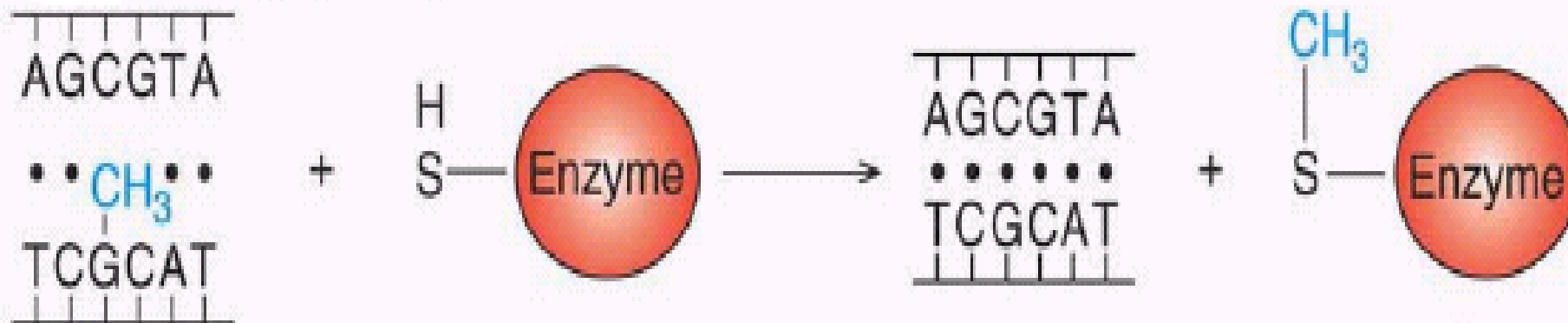
V. Επιδιόρθωση μη ορθά ζευγαρωμένων βάσεων



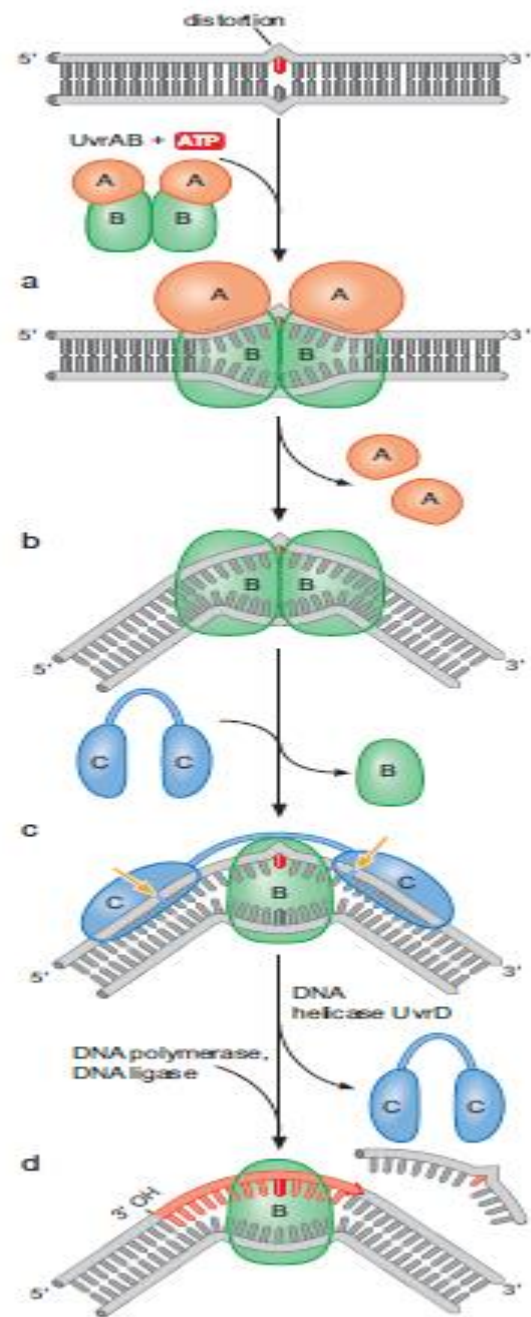
## Άμεση επιδιόρθωση

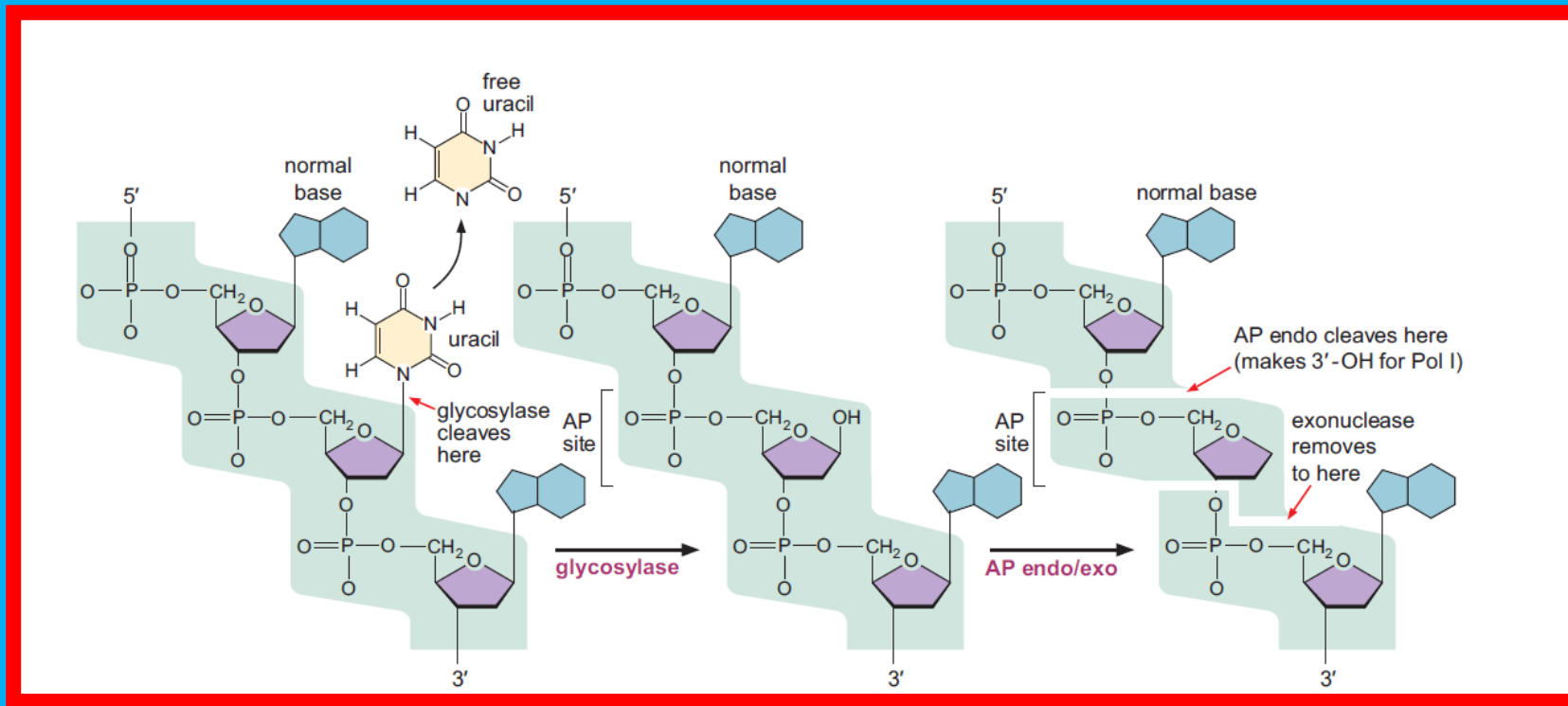


## Άμεση επιδιόρθωση

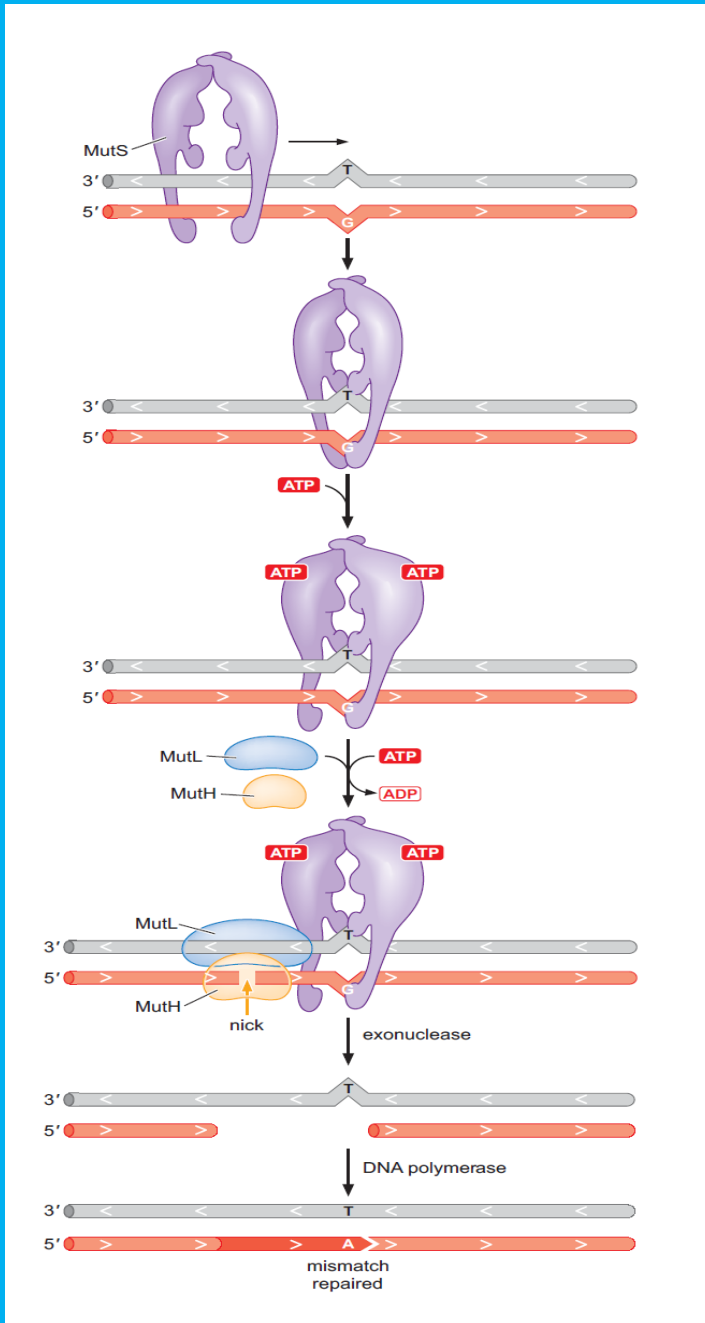


O6-methylguanine methyl transferase





Εκτομή βάσης: η αντίδραση γλυκοζυλάσης ουρακίλης. Η γλυκοζυλάση της ουρακίλης υδρολύει τον γλυκοσιδικό δεσμό για να απελευθερώσει την ουρακίλη από το DNA για να αφήσει μια θέση AP. Η AP ενδονουκλεάση κόβει το σκελετό του DNA στη θέση 5' της θέσης AP, αφήνοντας ένα 3'OH. Η εξωνουκλεάση κόβει στη θέση 3' της θέσης AP, αφήνοντας ένα 5'-φωσφορικό. Το κενό που προκύπτει συμπληρώνεται από την DNA Pol I.



Επισκευή αναντιστοιχίας – κακοσύζευξης  
 επιδιόρθωση σφαλμάτων αναδιπλασιασμού.

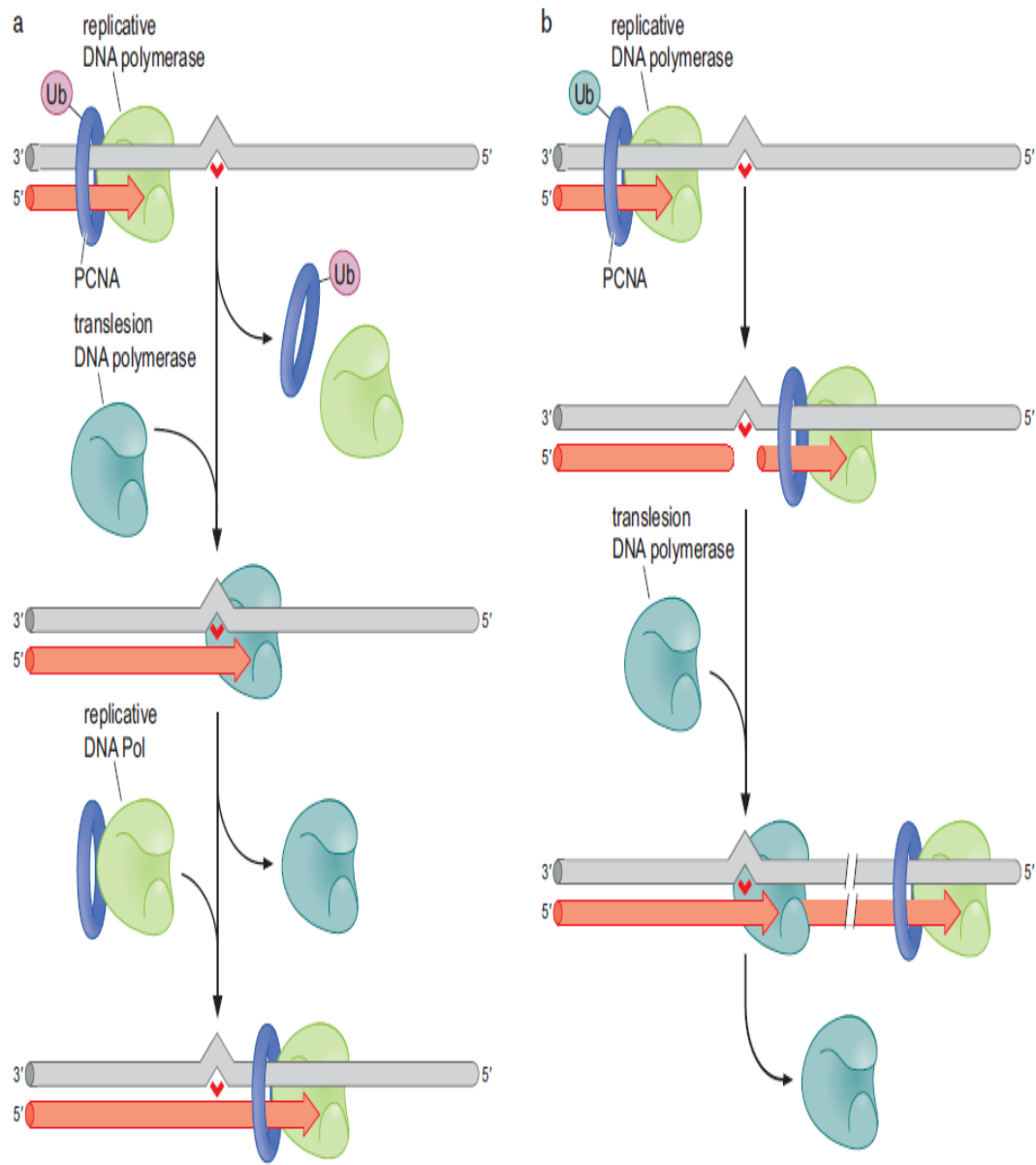
Το MutS περικλείει το DNA που περιέχει αναντιστοιχία, προκαλώντας μια συστροφή.

Σε επόμενα στάδια, ο MutS προσλαμβάνει MutL και MutH, και η δραστικότητα ATPάσης του MutS καταλύει την υδρόλυση του ATP.

Η MutH είναι μια ενδονουκλεάση που δημιουργεί ένα κόψιμο στο DNA κοντά στο σημείο της αναντιστοιχίας.

Στη συνέχεια, μία εξωνουκλεάση διασπά τον κλώνο στον οποίο υπάρχει η συστροφή που κινείται προς και πέρα από την αναντιστοιχία. Τελικά, το προκύπτον κενό πολυμερίζεται από την DNA πολυμεράση, εξαλείφοντας την αναντιστοιχία.





## Εναλλακτικά μοντέλα για σύνθεση translesion.

(α) Η επεξεργαστική, DNA πολυμεράση συνθέτει DNA έως ότου η πολυμεράση συναντήσει αλλοίωση DNA. Η DNA πολυμεράση σταματά και μετατοπίζεται από μία ή περισσότερες ειδικές πολυμεράσες, οι οποίες συνθέτουν DNA κατά μήκος και λίγο μετά την αλλοίωση. Μετά η επεξεργαστική πολυμεράση επιστρέφει και αντικαθιστά την ειδική πολυμεράση

(β) Στο μοντέλο πλήρωσης κενού, η επεξεργαστική, DNA πολυμεράση συνθέτει το DNA έως ότου συναντήσει βλάβη στο DNA. Αντί να σταματήσει στη βλάβη του DNA, η πολυμεράση παραλείπει, συνεχίζοντας τη σύνθεση DNA αφήνοντας πίσω ένα κενό.

Στη συνέχεια, μία ή περισσότερες ειδικές πολυμεράσες αναλαμβάνουν να καλύψουν το κενό.