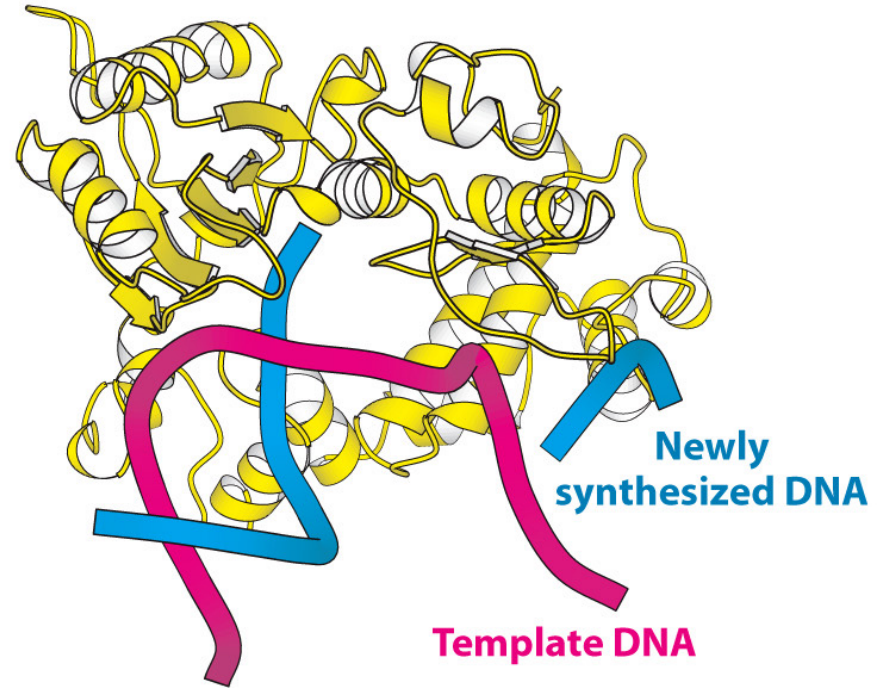


# Αντιγραφή, διόρθωση και ανασυνδυασμός του DNA



## Chapter 28 Opener

Biochemistry, Eighth Edition

© 2015 Macmillan Education [Photo: The Pierpont Morgan Library/Art Resource]

Πιστή αντιγραφή είναι απαραίτητη για την αποθήκευση των γενετικών πληροφοριών.

# «Κεντρικό Δόγμα» της ροής των πληροφοριών στα βιολογικά συστήματα

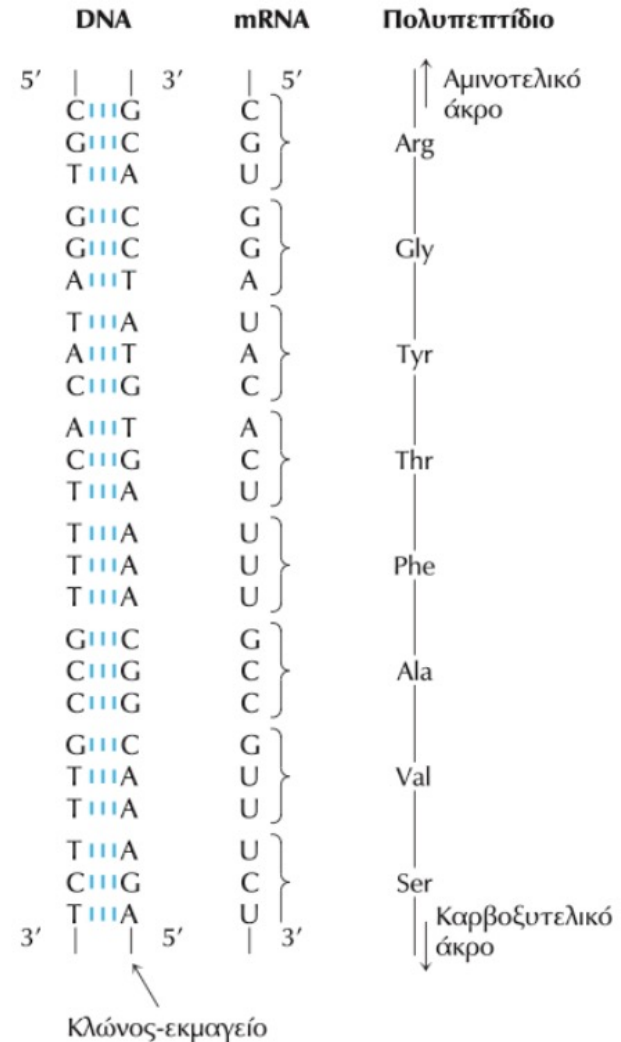
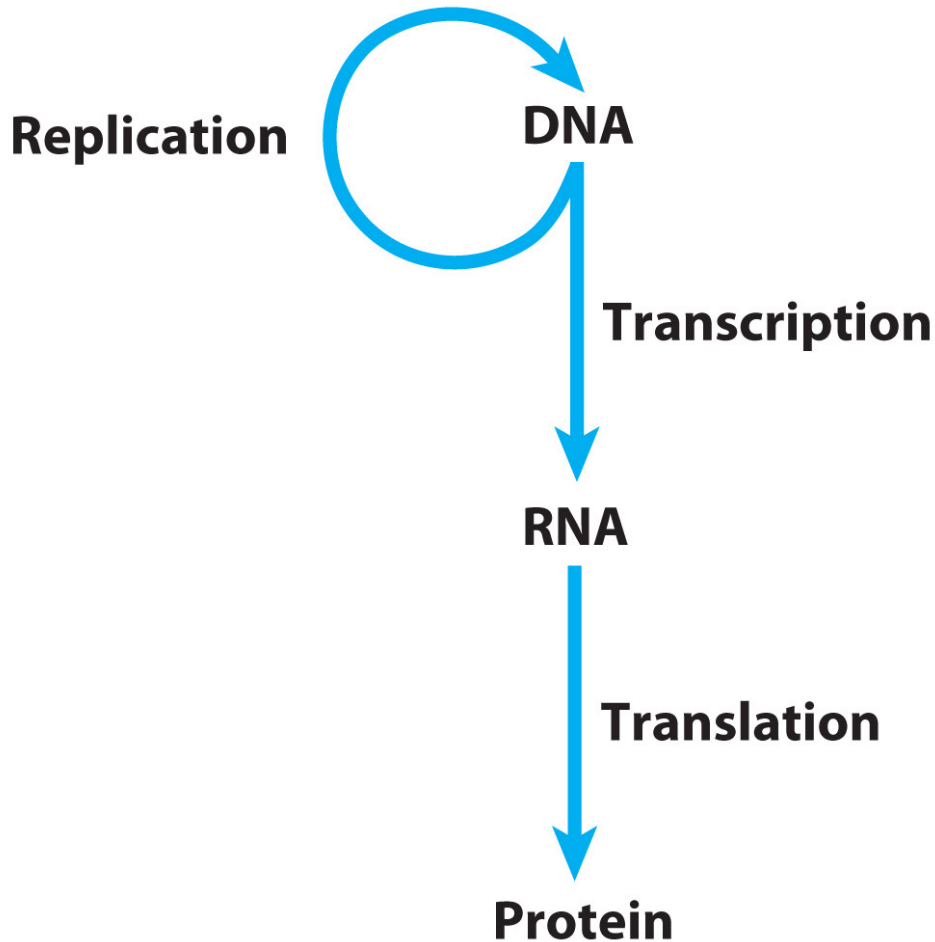
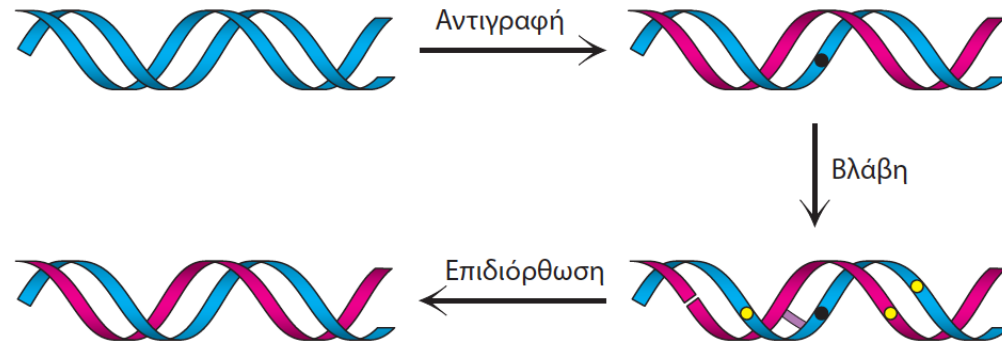


Figure III-1  
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition  
© 2017 W. H. Freeman and Company

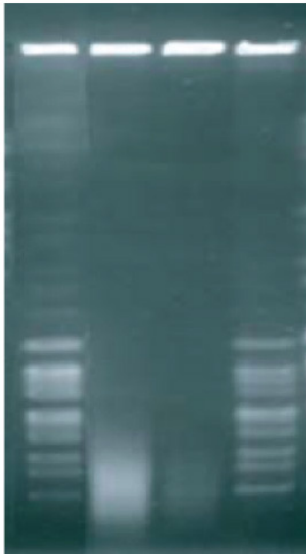
**ΕΙΚΟΝΑ 24-2** Η γραμμική αντιστοιχία μεταξύ των κωδικοποιητικών αλληλουχιών νουκλεοτιδίων του DNA και του mRNA και της αλληλουχίας αμινοξέων

# Επισκευή DNA σε δράση

Starting genome  
Irradiated genome  
(fragmented)  
Spontaneously  
Reassembled genome



C 0 1.5 3



Το DNA μπορεί να καταστραφεί από μια σειρά περιβαλλοντικών παραγόντων. Συνεπώς, απαιτούνται μηχανισμοί επισκευής DNA για την επισκευή του κατεστραμμένου DNA.

Το βακτήριο *Deinococcus radiodurans* έχει ιδιαίτερα ισχυρούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA

Ανθεκτικό σε δόσεις γ- ακτινοβολίας περισσότερες από 1000 φορές μεγαλύτερες από εκείνες που θα σκότωναν έναν άνθρωπο.

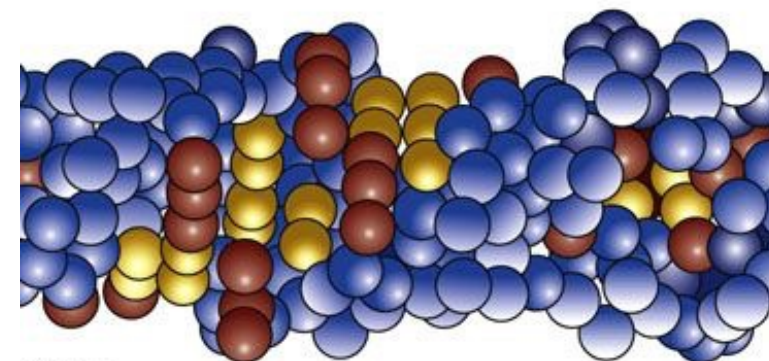
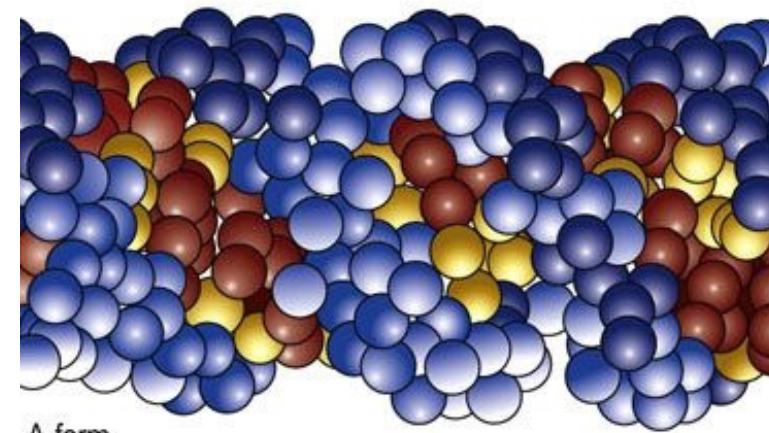
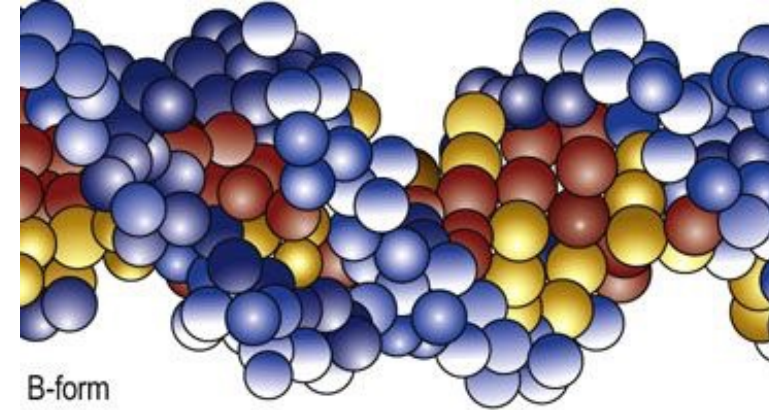
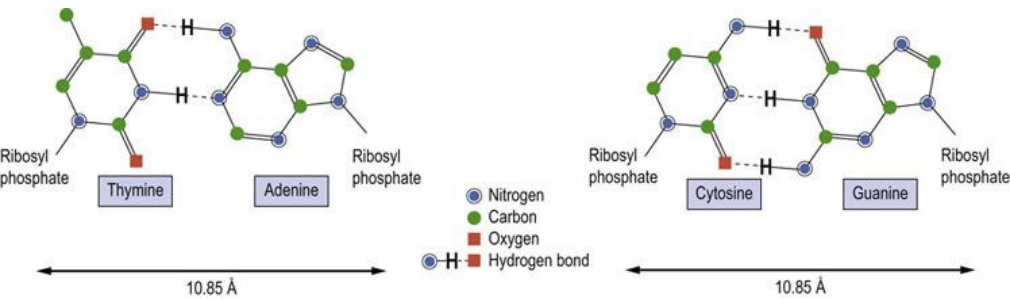
Figure 28.3

Biochemistry, Eighth Edition

Adapted from K. Zahradka et al., *Nature* 445:569–573, 2006



# Δομή του DNA



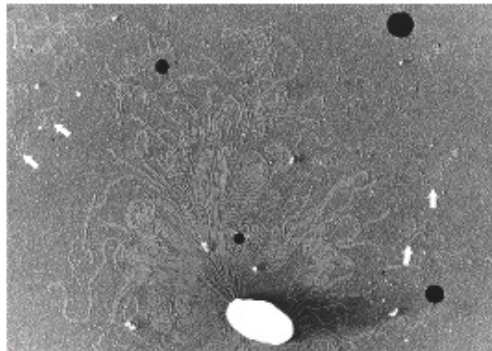
DNA σχηματίζει διπλη έλικα δύο χωριστών κλώνων με συμπληρωματικές αλληλουχίες.

	A form	B form	Z form
<b>Helical sense</b>	Right handed	Right handed	Left handed
<b>Diameter</b>	~26 Å	~20 Å	~18 Å
<b>Base pairs per helical turn</b>	11	10.5	12
<b>Helix rise per base pair</b>	2.6 Å	3.4 Å	3.7 Å
<b>Base tilt normal to the helix axis</b>	20°	6°	7°
<b>Sugar pucker conformation</b>	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo for pyrimidines; C-3' endo for purines
<b>Glycosyl bond conformation</b>	Anti	Anti	Anti for pyrimidines; syn for purines

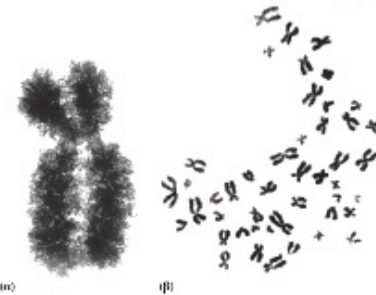


# Μήκος του *E. Coli* DNA vs μήκος του κυττάρου

**ΕΙΚΟΝΑ 24-3** Το μήκος του χρωμοσώματος του *E. coli* (1,7 mm) απεικονίζεται σε χρωματισμένη οπή με το μήκος ενός απεικονισμένου κυττάρου *E. coli* (2 μm).



**ΕΙΚΟΝΑ 24-4** Το DNA ενός κυττάρου *E. coli* που υπόκειται λύση. Στην ηλεκτρονιομικρογραφία φαίνονται αρκετά μικρά, κλειστά, πύκνωσικά DNA (σπείρα [σπ]). Τα μαύρα και άσπρα σπείρα είναι τεχνητά (artifacts) της μεθόδου. [Πηγή: Huntington Potter, University of Colorado School of Medicine, and David Dressler, Balliol College Oxford University].



**ΕΙΚΟΝΑ 24-5** Τοικρινοσώμα χρωμοσώματα. (α) Ένα ζεύγος συμπυκνωμένο και συμπυκνωμένο ομόλογο χρωμοσώμα από ένα χρωμόσωμα κυττάρου φαίνεται ενόψει χρώματι. Τα αναρρινωσώμα χρωμοσώματα βρίσκονται συχνά στη θέση μετά την αντήγαξη και κατά τη μετάβαση της μίτωσης. (β) Μια ομάδα χρωμοσώμα από ένα λευκοκύτταρο ενός από τους συγγενείς του βίβλου. Σε κάθε φυσιολογικό σωματικό κύτταρο του ανθρώπου υπάρχουν 46 χρωμοσώματα. [Πηγές: (α) Don W. Fawcett/Science Source. (β) © Michael M. Cox].



**ΕΙΚΟΝΑ 24-6** Ένα βακτηριοφάγο. Μερικές μεταγονοσώμας πρωτεΐνες και RNA κωδικοποιούνται από ένα από τα αντιγράφα του μεταγονοσώμα DNA (ένα είναι ορατό στην εικόνα). Το mtDNA απεικονίζεται κάθε φορά που διασπάται το μεταγονοφάγο, πριν την κυτταρική διάσπαση. [Πηγή: D.W. Fawcett/Science Source].

**ΠΙΝΑΚΑΣ 24-2** Περικείμενα Οργανικά Γενεϊώματα σε DNA, Γονίδια και Χωμοσώματα

	Συνολικό DNA (bp)	Αριθμός χρωμοσώματων*	Αριθμός γονιδίων
Βακτήρια ( <i>Escherichia coli</i> )	4.641.652	1	4.094 <sup>†</sup>
Ψίμα (αυτοαυτοσπείρα σπείρας)	12.152.105	16 <sup>‡</sup>	6.140 <sup>†</sup>
Νηματοειδής (καρποσώματός είδατος)	90.269.800	12 <sup>‡</sup>	23.500
Φύμα (αυτοαυτοσπείρα σπείρας)	119.186.200	10	33.500
Φυκοζύμα (αυτοαυτοσπείρα σπείρας)	120.367.260	18	20.500
Φύμα (αυτοαυτοσπείρα σπείρας)	480.000.000	24	57.000
Πανίο (αυτοαυτοσπείρα σπείρας)	2.634.266.500	40	27.000
Ανθρώπος ( <i>Homo sapiens</i> )	3.070.128.600	46	20.000

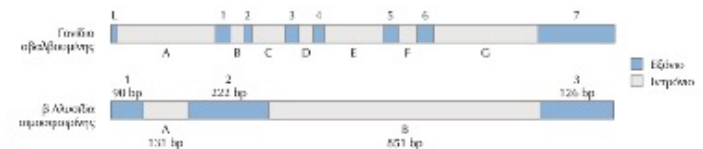
Σημειώνεται: Αυτές οι πληροφορίες αναφέρονται αναπαραστάσεις. Για τις πρόσφατες πληροφορίες, συμβουλευθείτε τις ιστοσελίδες από τα προγράμματα αναπαραστάσεων των κυττάρων προβαδίζοντας.

\* Για άλλες, αυτοαυτοσπείρα σπείρας, της ζύμης, των φυτών, των ζωικών, αριθμός των χρωμοσώματων.

<sup>†</sup> Περικείμενα γονίδια γονίδια που κωδικοποιούν RNA.

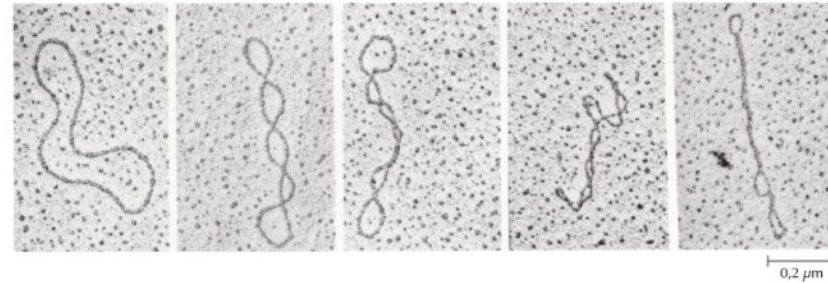
<sup>‡</sup> Απλοειδής αριθμός χρωμοσώματων. Τα φυσιολογικά κύτταρα ζύμης (αυτοαυτοσπείρα σπείρας) έχουν οκτώ ζευγάρια ζευγάρια ή παρακάτω αριθμούς αυτών των χρωμοσώματων.

<sup>§</sup> Αριθμός για θηλυκό με δύο X χρωμοσώματα. Τα αρσενικά έχουν ένα X αλλά δύο Y χρωμοσώματα. Ο συνολικός αριθμός είναι 11 χρωμοσώματα.



**ΕΙΚΟΝΑ 24-7** Άνθρωπος σε δύο συσχετισμένα γονίδια. Το γονίδιο της αβηβλομίνης έχει επτά αντίγραφα (Α έως Γ), τα οποία διατηρούν τις κωδικοποιητές αλλαγές σε ορισμένα L, 1 έως 7. Το γονίδιο της β-αλιουβίνης της αμοινοβάρνης έχει δύο αντίγραφα και πέντε εξόνια. Τα ένα αντίγραφο περιέχει πέντε από τα πέντε ζεύγη βιτών του γονιδίου.

# Υπερσυσπείρωση του DNA

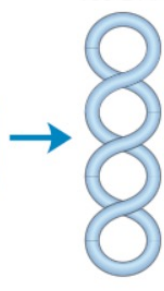


Διπλή έλικα του DNA (σπείρα)

Άξονας

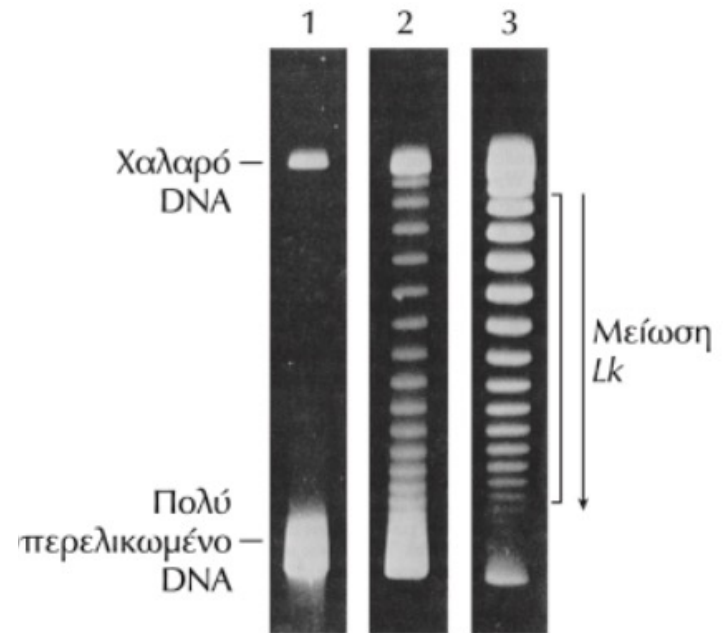


Υπερέλικα του DNA



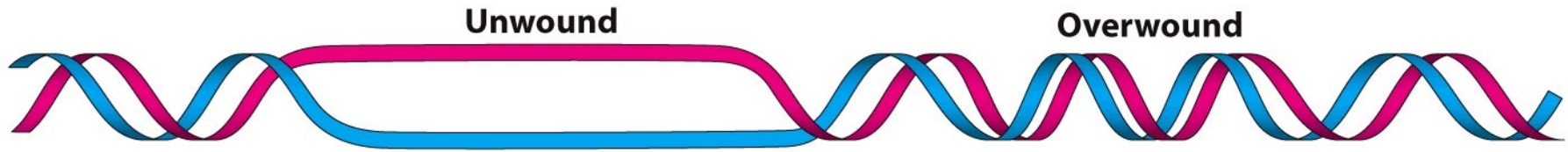
**ΕΙΚΟΝΑ 24-12 Χαλαρό και υπερελικωμένο πλασμιδικό DNA.** Το μόριο στην πρώτη ηλεκτρονιομικρογραφία από αριστερά είναι χαλαρό. Ο βαθμός υπερελίκωσης αυξάνει από αριστερά προς τα δεξιά. [Πηγή: Laurien Polder, from A. Kornberg, *DNA Replication*, p. 29, W. H. Freeman, New York, 1980].

**ΕΙΚΟΝΑ 24-10 Υπερέλικση του DNA.** Όταν περιστραφεί ο άξονας της διπλής έλικας του DNA από μόνος του, θα σχηματιστεί μια νέα έλικα (υπερέλικα). Η υπερέλικα του DNA καλείται συνήθως υπερσπείραμα.



# Τοποισομεράσεις

## Topoisomerases Prepare the Double Helix for Unwinding



**Figure 34.8**

*Biochemistry: A Short Course*, Second Edition

© 2013 W. H. Freeman and Company

Τοποϊσομεράσεις είναι ένζυμα που επάγουν ή εξαλείφουν υπερσπειρώσεις.

Οι τοποϊσομεράσες τύπου I χαλαρώνουν τις υπερσυσπειρώσεις, μια θερμοδυναμικά ευνοϊκή αντίδραση, ενώ οι τοποϊσομεράσες τύπου II, όπως η DNA γυράση σε *E. Coli*, εισάγουν υπερσυσπειρώσεις με χρήση ATP.

Οι τοποϊσομεράσες αλλάζουν τον αριθμό σύνδεσμων σε μια αντίδραση τριών βημάτων:

1. Διάσπαση ενός (τύπου I) ή και των δύο (Τύπου II) κλώνων του DNA.
2. Μετάβαση τμήματος DNA μέσω του διάσπασμένου DNA.
3. Επανασύνδεση του DNA.



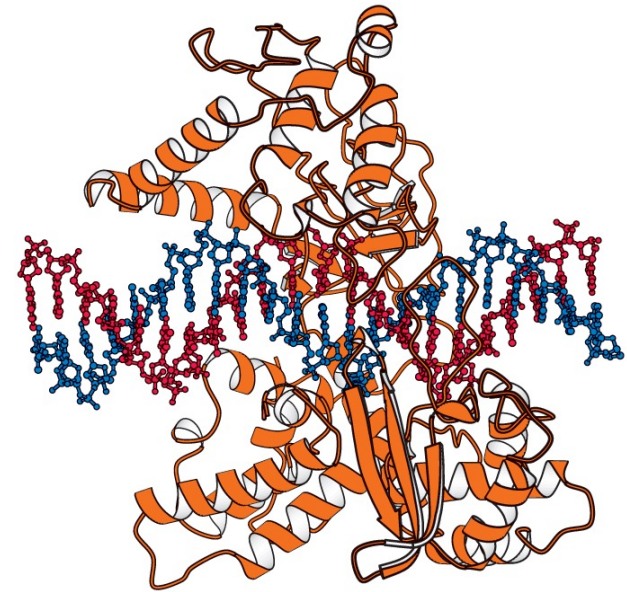
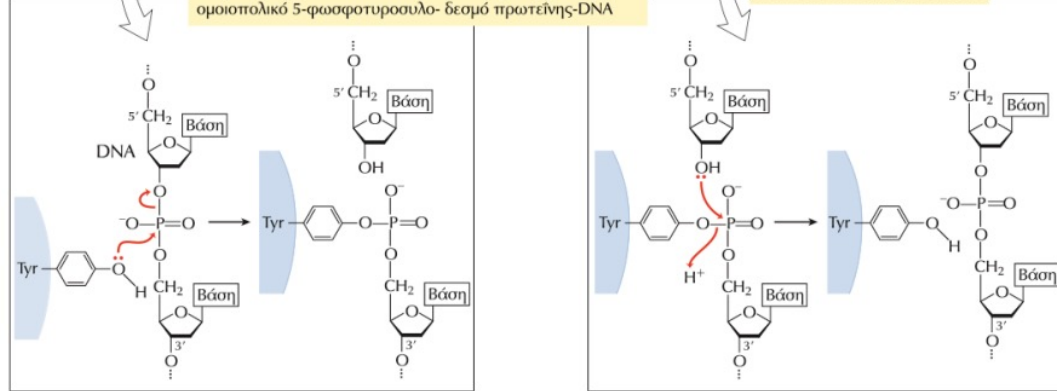
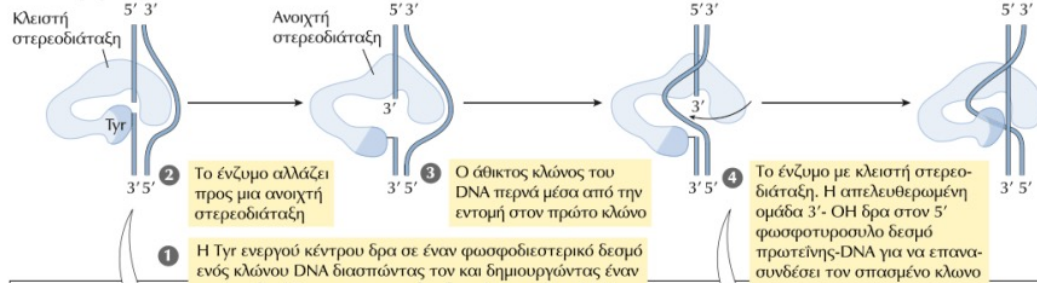
# Τοποισομεράση I



## Τοποισομεράση I-Χαλάρωση

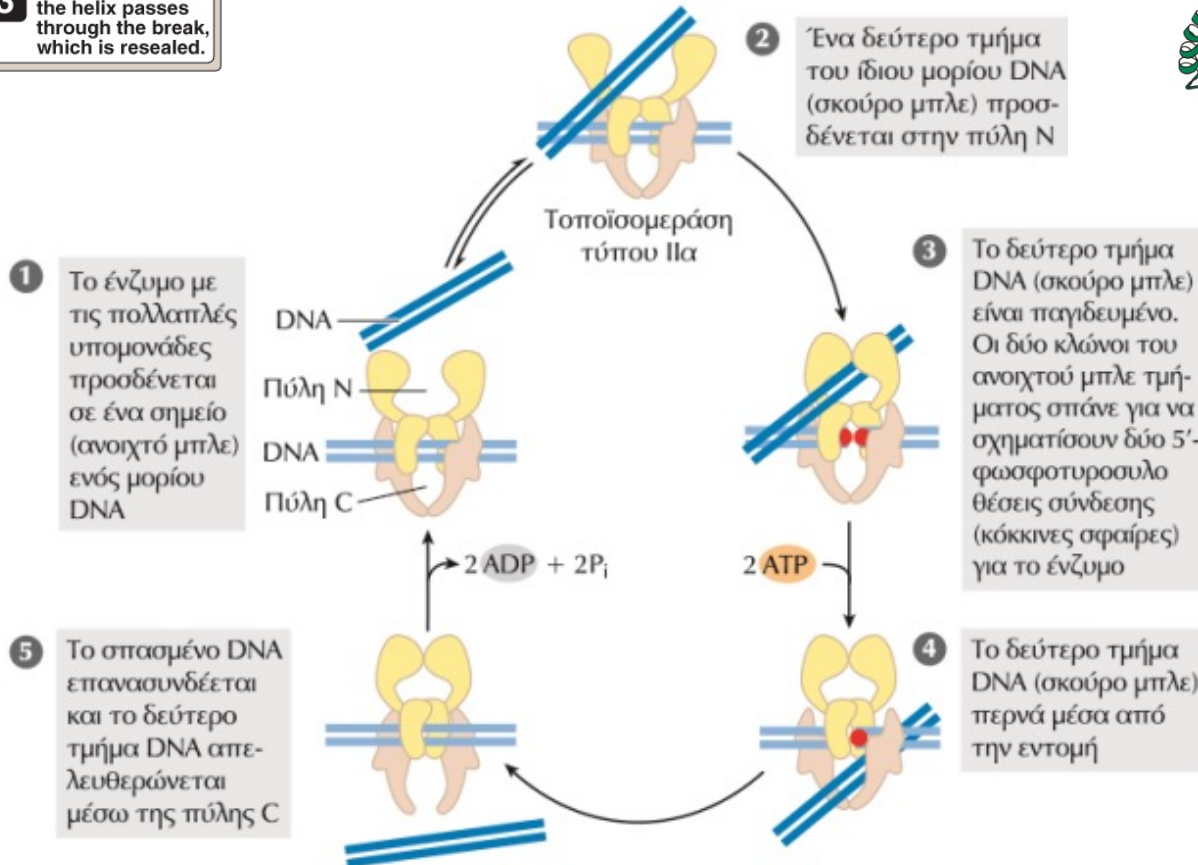
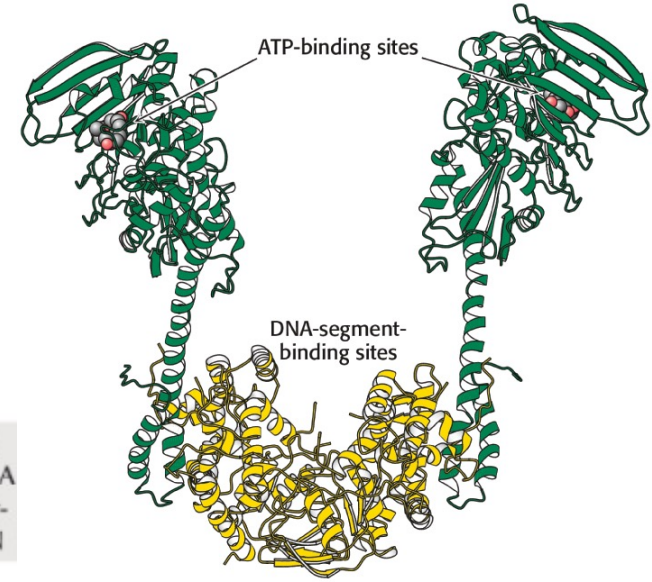
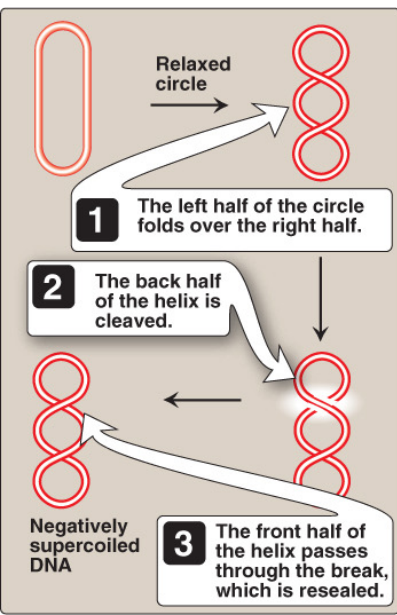


### Τοποίσομεράση τύπου I

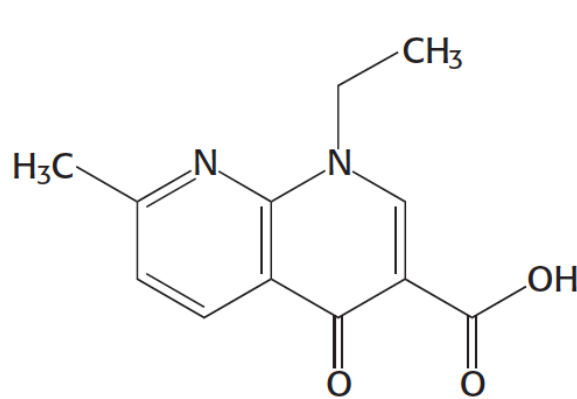


**ΕΙΚΟΝΑ 24-19 Η αντίδραση τοποίσομεράσης τύπου I.** Η βακτηριακή τοποίσομεράση I αυξάνει τον Lk με εντομή ενός κλώνου DNA, πέρασμα τον άθικτου κλώνου διαμέσου της εντομής και στη συνέχεια επανασυνδράση της. Η νουκλεοφιλική προσβολή από τη δραστήρια θέση Tyr σπάει έναν κλώνο DNA. Τα άκρα επανασυνδέονται με μια δεύτερη πυρηνόφιλη επίθεση. Σε κάθε βήμα, ένας δεσμός υψηλής ενέργειας αντικαθιστά έναν άλλον. [Πηγή: J. Champroux, *Annu. Rev. Biochem.* 70:369, 2001, Fig. 3].

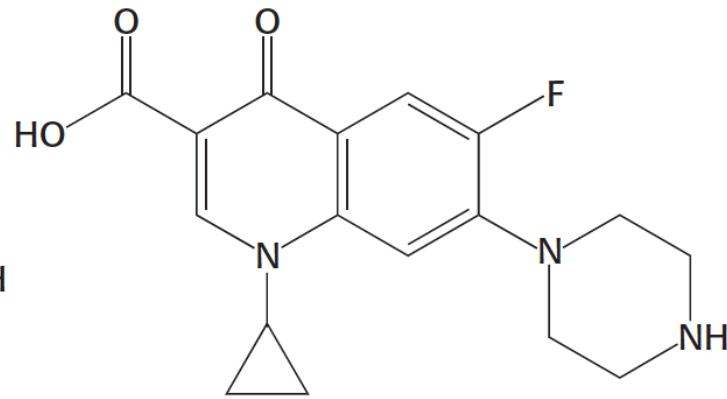
# Τοποισομεράση II



# Τοποισμεράσες: Στόχοι αντιβιοτικών



Ναλιδιξικό οξύ



Σiproφλοξασίνη

Το ναλιδιξικό οξύ και η σiproφλοξασίνη είναι αναστολείς της γυράσης του DNA που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων.

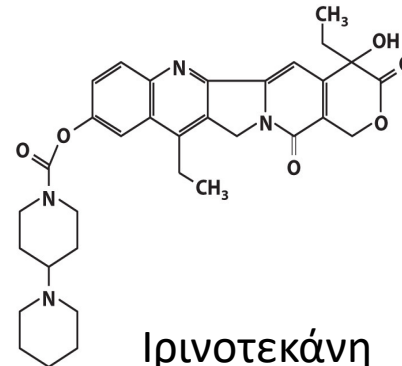
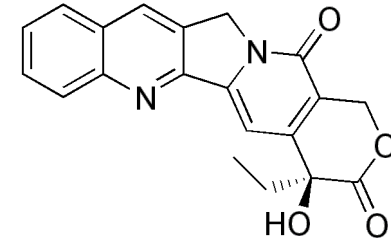
Η σiproφλοξασίνη αποτρέπει τη δηλητηρίαση από τον άνθρακα.



# Τοποισμεράσες: Στόχοι αντικαρκινικών

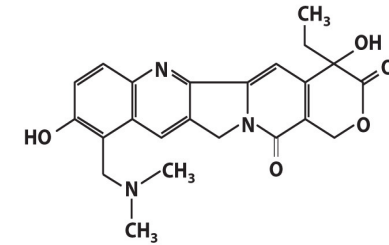
Η καμποθηκίνη, ένας αντικαρκινικός παράγοντας, αναστέλλει την ανθρώπινη τοποϊσομεράση I σταθεροποιώντας τη μορφή του ενζύμου που συνδέεται με το DNA.

Καμποθηκίνη



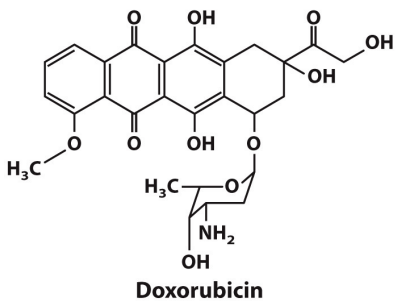
Ιρινοτεκάνη

Box 24-1 part 1  
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition  
© 2017 W. H. Freeman and Company

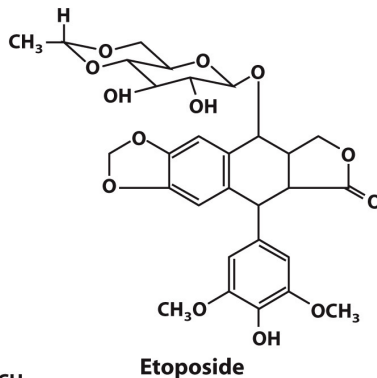


Τοποτεκάνη

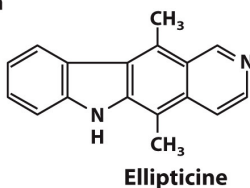
αντικαρκινικοί παράγοντες,  
ανθρώπινη τοποϊσομεράση II



Doxorubicin

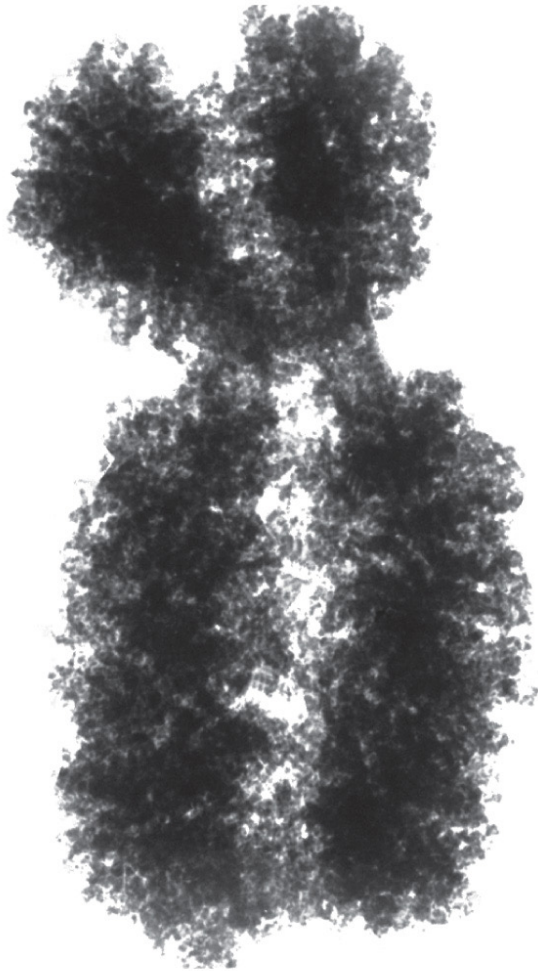


Etoposide



Ellipticine

# Ευκαρυωτικό χρωμόσωμα



Don W. Fawcett/Science Source

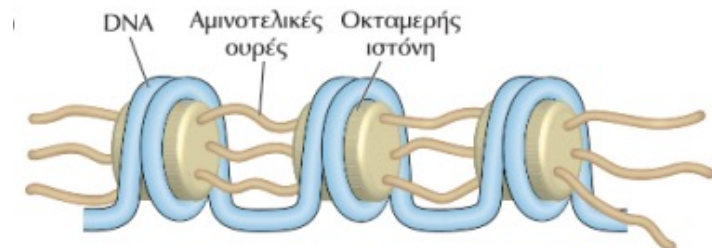
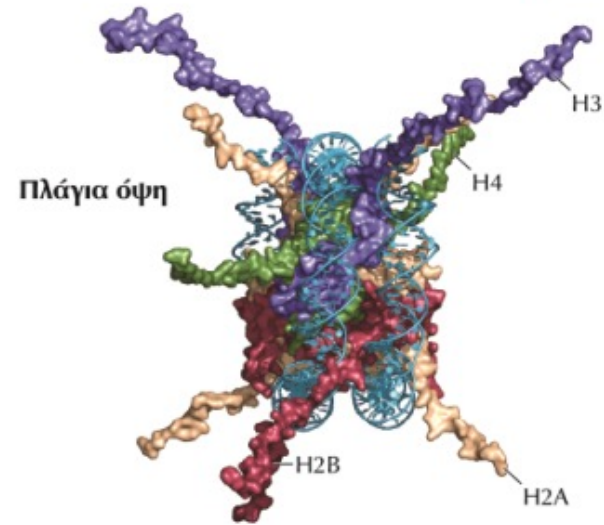
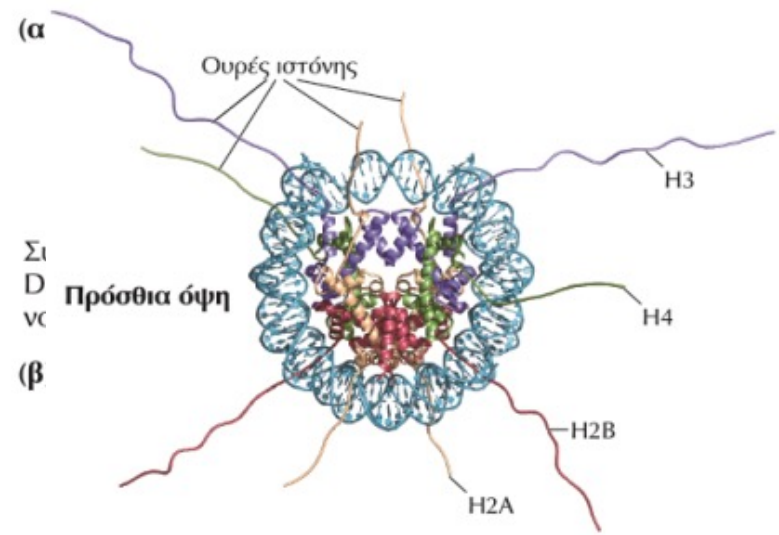


Figure 24-5a  
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition  
© 2017 W. H. Freeman and Company

# Αντιγραφή DNA

## DNA Polymerase Catalyzes Phosphodiester-Linkage Formation

Η αντίδραση που καταλύεται από την DNA πολυμεράση είναι:



Βασικά χαρακτηριστικά της σύνθεσης του DNA είναι:

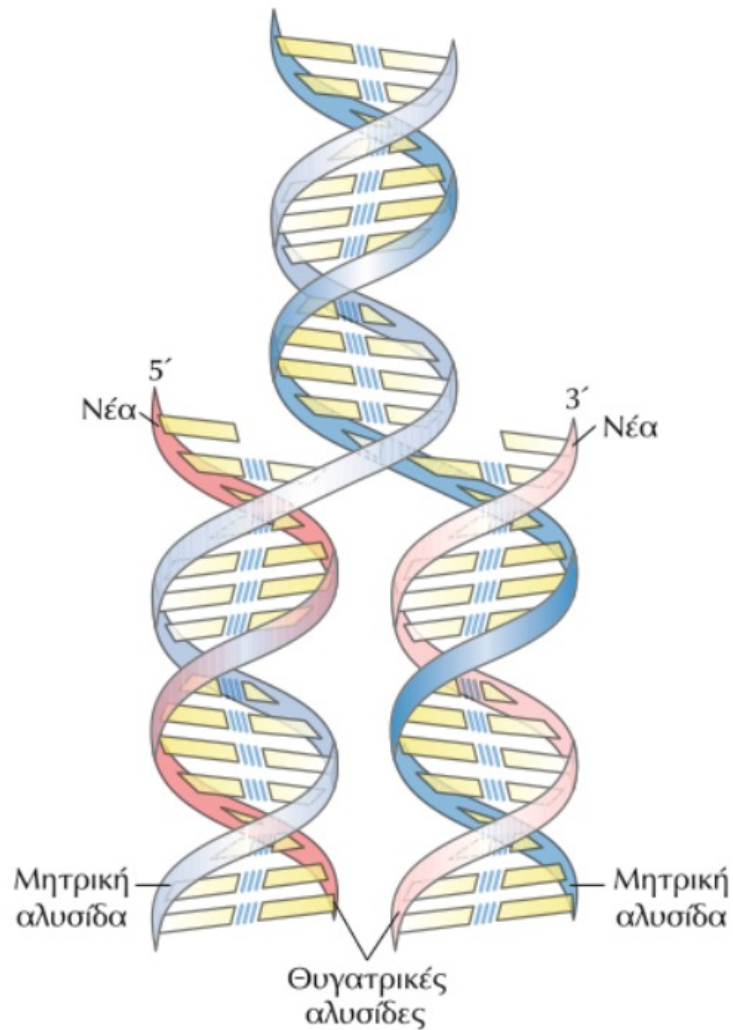
Οι τέσσερις τριφωσφορικοί δεοξυνουκλεοζίτες και  $\text{Mg}^{2+}$ .

Ένας κλώνος πρότυπο χρησιμοποιείται για να κατευθύνει τη σύνθεση του DNA.

Ένας εκκινητής από τον οποίο ο νέος κλώνος αναπτύσσεται



# Σύνθεση DNA



DNA, η γενετική πληροφορία που μεταφέρεται από τη μια γενιά στην επόμενη

Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, οι δύο κλώνοι πρέπει να διαχωριστούν, με τον καθένα να είναι εκμαγείο για τον νέο κλώνο

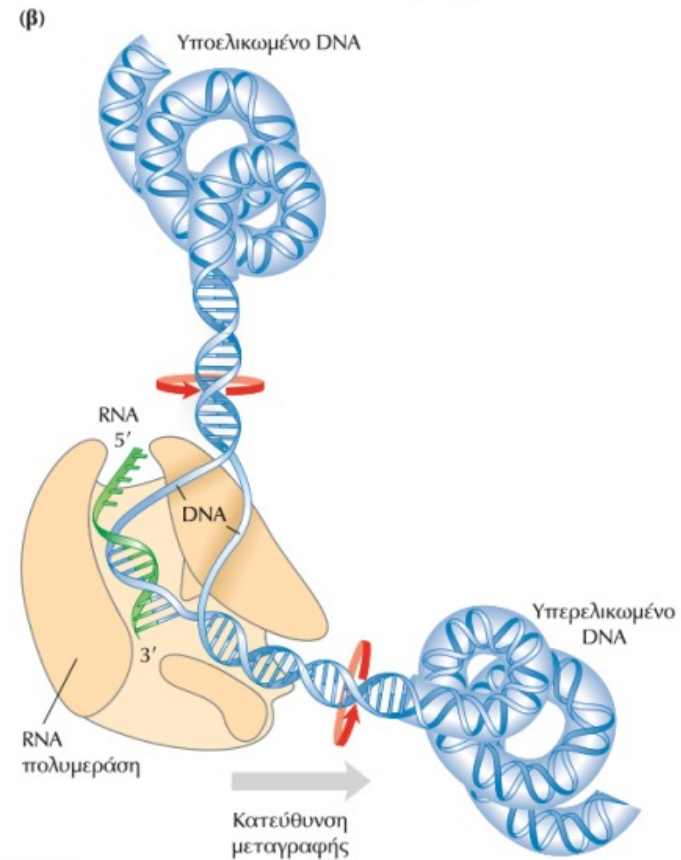
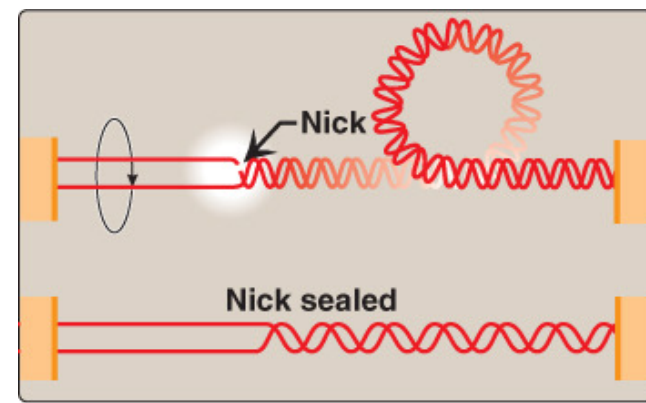
**ΕΙΚΟΝΑ 8-15** Η αντιγραφή του DNA σύμφωνα με τους Watson και Crick. Οι προϋπάρχουσες ή «μητρικές» αλυσίδες διαχωρίζονται και καθεμία αποτελεί εκμαγείο για μια συμπληρωματική «θυγατρική» αλυσίδα (με ροζ).

# Σύνθεση DNA

Προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν κατά την σύνθεση του DNA:

Οι δύο κλώνοι της έλικας πρέπει να διαχωριστούν ώστε η μηχανή της αντιγραφής για να έχει πρόσβαση στην ακολουθία των νουκλεοτιδίων.

Ο διαχωρισμός των κλώνων δημιουργεί υπερσπειρώσεις που πρέπει να επιλυθούν για να συνεχιστεί η σύνθεση.



# Αντιγραφή του DNA

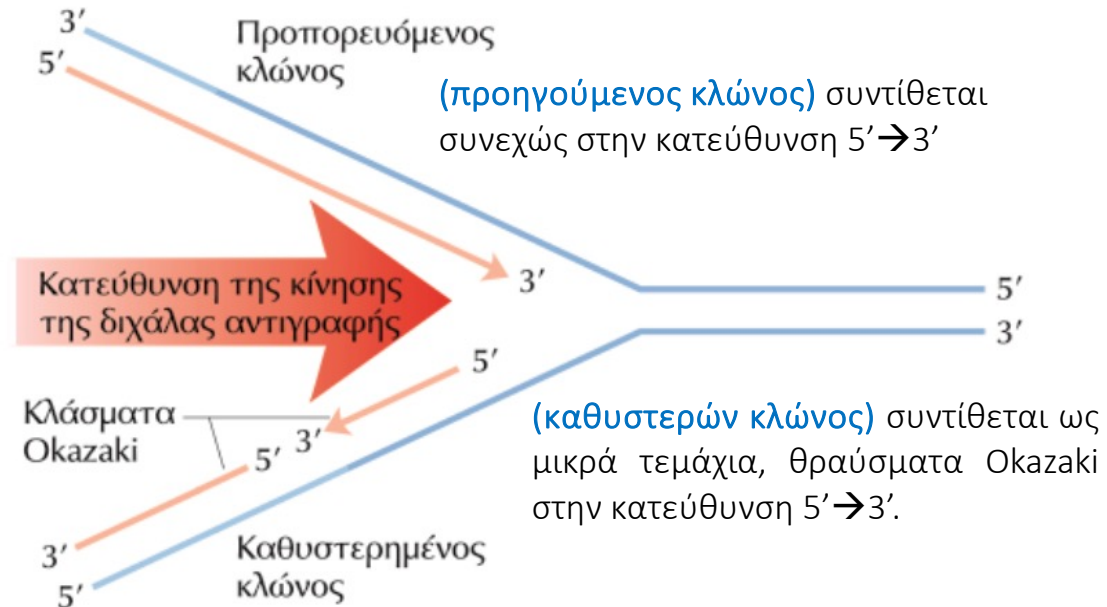
One strand of DNA is made continuously, whereas the other strand is synthesized in fragments

Η σύνθεση DNA προχωρά στην κατεύθυνση  $5' \rightarrow 3'$ , αλλά οι δύο κλώνοι της έλικας έχουν αντίθετη κατεύθυνση.

DNA πολυμεράσες συνθέτουν μόνο στην κατεύθυνση  $5' \rightarrow 3'$ .

Οι δυο κλώνοι αντιγράφονται ταυτόχρονα.

Διχάλα αντιγραφής: θέση σύνθεσης κινείται προς τη μία κατεύθυνση



Η ασυνεχής σύνθεση επιτρέπει την κίνηση της διχάλας αντιγραφής στην κατεύθυνση  $3' \rightarrow 5'$ , ενώ τα θραύσματα γίνονται στην κατεύθυνση  $5' \rightarrow 3'$ .

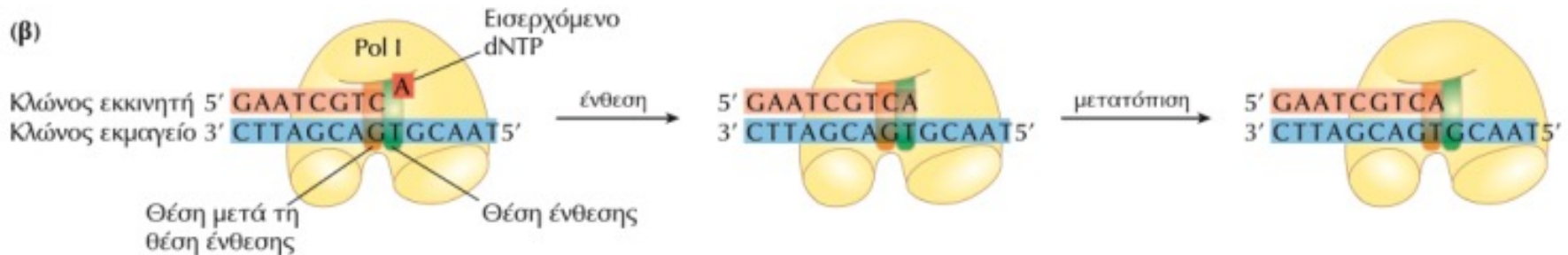


# Σύνθεση DNA

Οι DNA πολυμεράσες καταλύουν την κατευθυνόμενη από το **εκμαγείο** σύνθεση του DNA.

A template is a sequence of nucleic acids that determines the sequence of a complementary nucleic acid.

A primer is the initial segment of a polymer that is to be extended on which elongation depends.



Οι DNA πολυμεράσες δεν μπορούν να ξεκινήσουν μια αλυσίδα de novo, χρειάζονται έναν **εκκινήτη** (RNA)

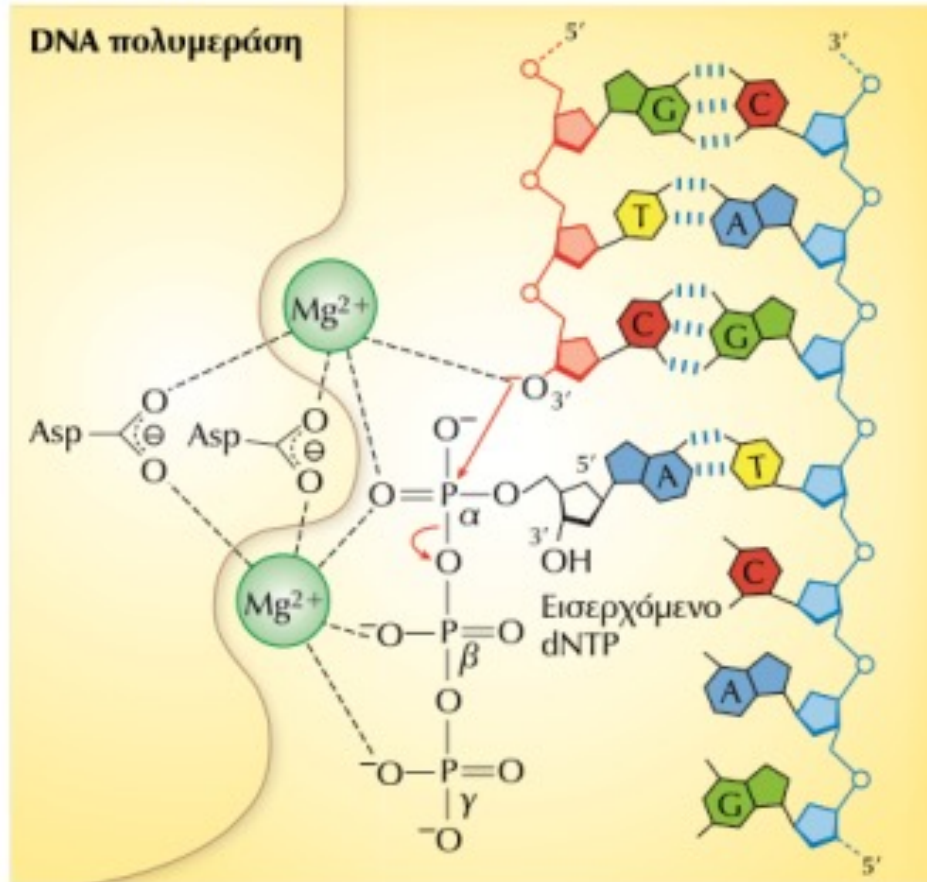
Ένας ειδικός τύπος RNA πολυμεράση (**εκκινήτωση**) συνθέτει έναν σύντομο κλώνο RNA ( $\approx 5$  νουκλεοτίδια) συμπληρωματικό σε έναν κλώνο DNA που στη συνέχεια χρησιμεύει ως εκκινήτης για τη σύνθεση DNA.

Η DNA πολυμεράση I, χρησιμοποιώντας μια τρίτη ενζυμική δραστηριότητα, εξωνουκλεάσης 5'--->3', στη συνέχεια αφαιρεί τους εκκινήτες και αντικαθιστά το RNA με DNA

# Μηχανισμός της DNA πολυμεράσης

Two bound metal ions participate in the polymerase reaction

(α) Σύνθεση του DNA



Ο καταλυτικός μηχανισμός περιλαμβάνει δύο ιόντα Mg<sup>2+</sup>

Βοηθούν στον προσανατολισμό του εισερχόμενου νουκλεοτιδίου με τον εκκινητή και σταθεροποιούν τα αρνητικά φορτία του πυροφωσφορικού προϊόντος.

Σταθεροποιούν τη δομή της μεταβατικής κατάστασης

Η 3'-OH θα λειτουργήσει ως ένα πυρηνόφιλο

Τρία κατάλοιπα ασπαραγινικού, δύο από τα οποία είναι εξαιρετικά διατηρημένα σε όλες τις DNA πολυμεράσες.

# Εξειδίκευση

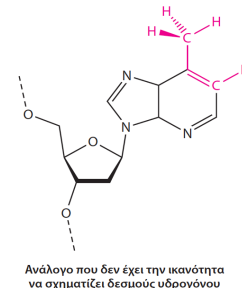
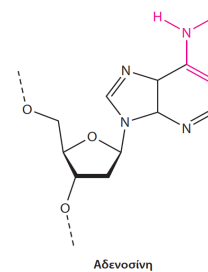
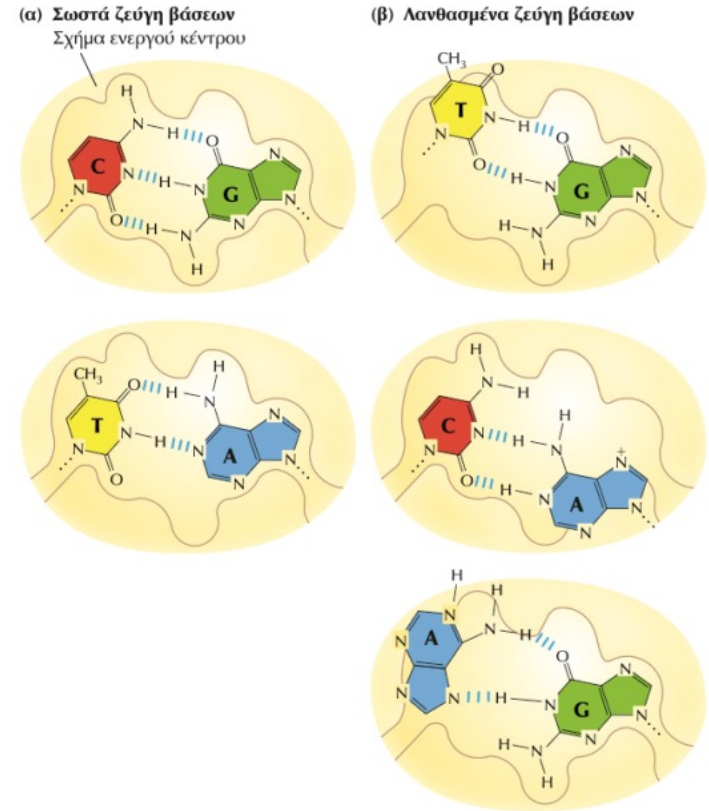
## The Specificity of Replication Is Dictated by the Complementarity of Bases

Σφάλματα στο E. coli: 1 σε  $10^9 - 10^{10}$  bp  
(1 ανά 1.000-10.000 αντιγραφές)

Το ενεργό κέντρο της DNA πολυμεράσης  
εξαιρεί ζεύγη βάσεων με λανθασμένη  
γεωμετρία

ΑΛΛΑ οι πολυμεράσες DNA εξακολουθούν να  
εισάγουν λάθος βάση  $10^{-4} - 10^{-5}$  φορές.

Οι μηχανισμοί επισκευής διορθώνουν αυτά  
τα σφάλματα.

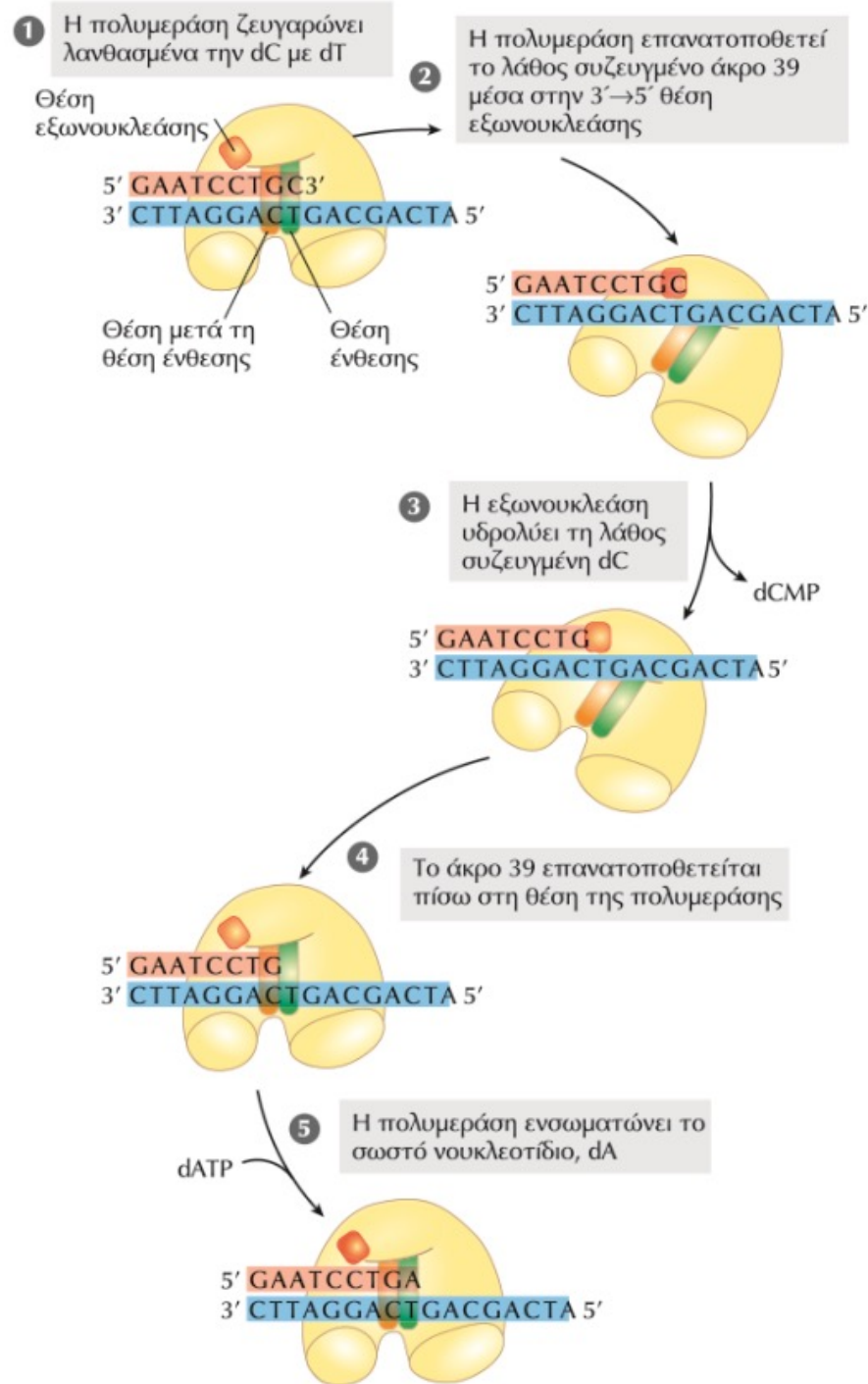
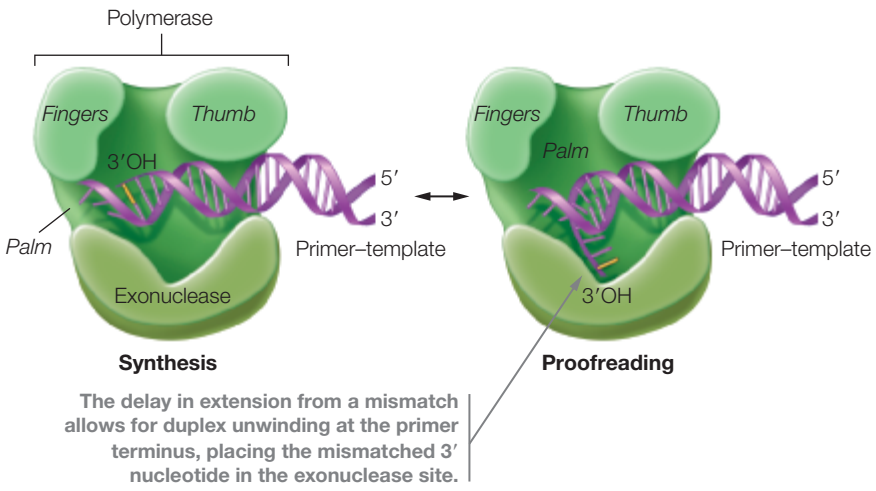


# Διόρθωση σφάλματος

Όλες οι πολυμεράσες DNA έχουν επιπλέον δράση.

Ενεργότητα 3' → 5' εξωνουκλεάσης  
Ελεγχος πιστότητας του αντίγραφου

Η μετατόπιση του ενζύμου στην επόμενη θέση αναστέλλεται έως ότου το ένζυμο μπορεί να απομακρύνει το λανθασμένο νουκλεοτίδιο





# Πολυμεράσεις του DNA σε *E. coli*

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

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

© 2013 W. H. Freeman and Company

Ο σύνθεση του DNA είναι γρήγορη.

Το γονιδίωμα *E. Coli*, που αποτελείται από 4,6 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων, αντιγράφεται σε <40 min, με ρυθμό 2000 b/sec.

# DNA πολυμεράση III

**TABLE 25-2** Subunits of DNA Polymerase III of *E. coli*

	Number of subunits per Subunit	holoenzyme $M_r$ of subunit	Gene	Function of subunit	
$\alpha$	2	129,900	<i>polC (dnaE)</i>	Polymerization activity	} Core polymerase
$\epsilon$	2	27,500	<i>dnaQ (mutD)</i>	3'→5' Proofreading exonuclease	
$\theta$	2	8,600	<i>holE</i>	Stabilization of $\epsilon$ subunit	
$\tau$	2	71,100	<i>dnaX</i>	Stable template binding; core enzyme dimerization	} Clamp-loading ( $\gamma$ ) complex that loads $\beta$ subunits on lagging strand at each Okazaki fragment
$\gamma$	1	47,500	<i>dnaX*</i>	Clamp loader	
$\delta$	1	38,700	<i>holA</i>	Clamp opener	
$\delta'$	1	36,900	<i>holB</i>	Clamp loader	
$\chi$	1	16,600	<i>holC</i>	Interaction with SSB	
$\psi$	1	15,200	<i>holD</i>	Interaction with $\gamma$ and $\chi$	
$\beta$	4	40,600	<i>dnaN</i>	DNA clamp required for optimal processivity	

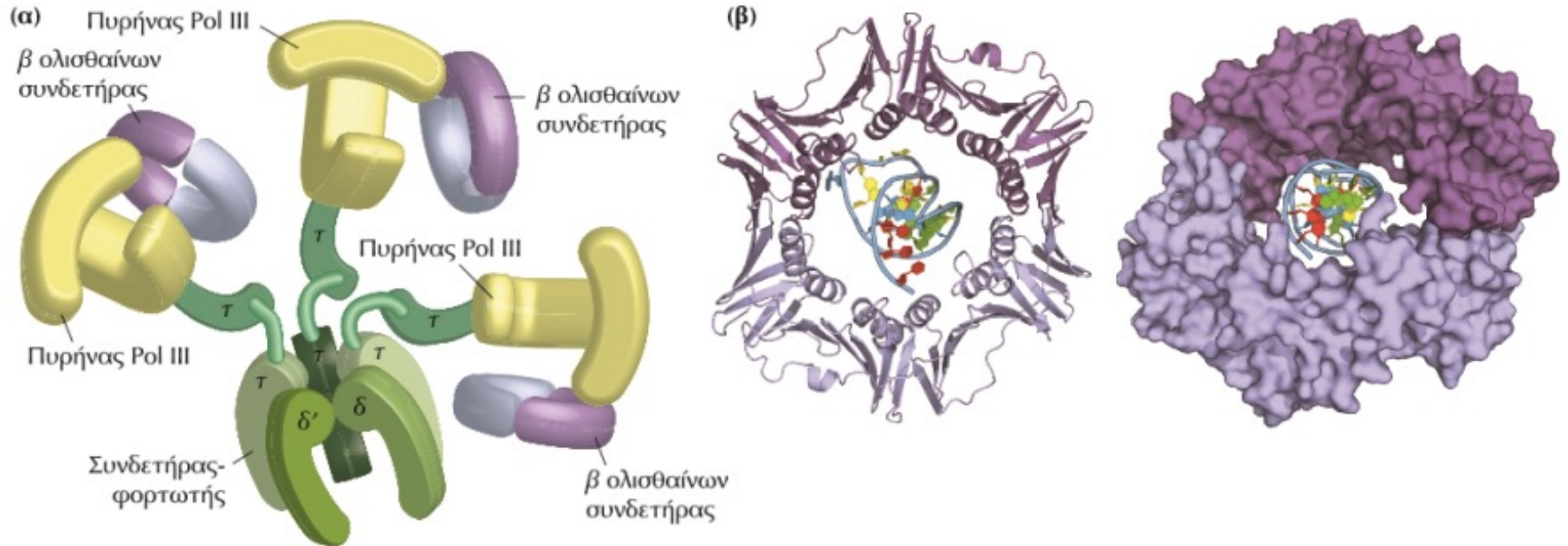
\*The  $\gamma$  subunit is encoded by a portion of the gene for the  $\tau$  subunit, such that the amino-terminal 66% of the  $\tau$  subunit has the same amino acid sequence as the  $\gamma$  subunit. The  $\gamma$  subunit is generated by a translational frameshifting mechanism (p. 1111) that leads to premature translational termination.

Table 25-2

Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition

© 2013 W. H. Freeman and Company

# Ολοένζυμο της DNA III πολυμεράσης



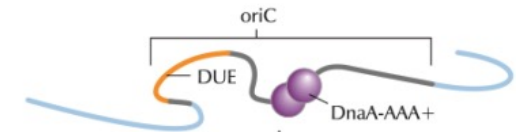
Τα ένζυμα αντιγραφής εμφανίζουν μεγάλη καταλυτική ισχύ, πιστότητα και επεξεργαστικότητα. Η DNA πολυμεράση III έχει μεγάλη επεξεργαστικότητα, μόλις ξεκινήσει η κατάλυση, σπάνια απελευθερώνει το υπόστρωμα.

Η πηγή της επεξεργαστικότητας είναι ο ολισθένων σφιγκτήρας (β2 υπομονάδα)

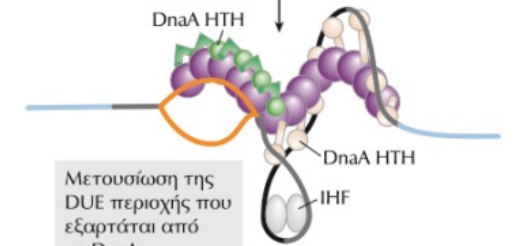
Ο ολισθένων σφιγκτήρας προσδένεται στο DNA από μια πρωτεΐνη που ονομάζεται φορτωτής σφιγκτήρα, ο οποίος χρησιμοποιεί την ενέργεια της υδρόλυσης ATP για να ανοίξει και να κλείσει τον σφιγκτήρα.

# Εναρξη της αντιγραφής

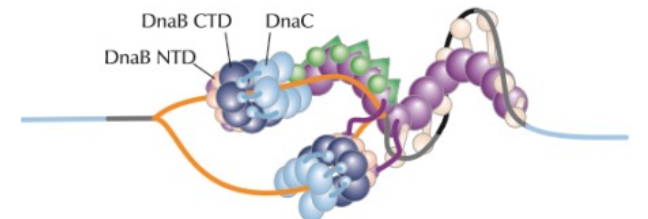
## DNA Replication in *Escherichia coli* Begins at a Unique Site



Περιοχή πρόσδεσης



Φόρτωση της DnaB ελικάσης που εξαρτάται από το DnaC



Η DnaA πρωτεΐνη προσδένεται σε διακριτές θέσεις (σημείο *oriC*)

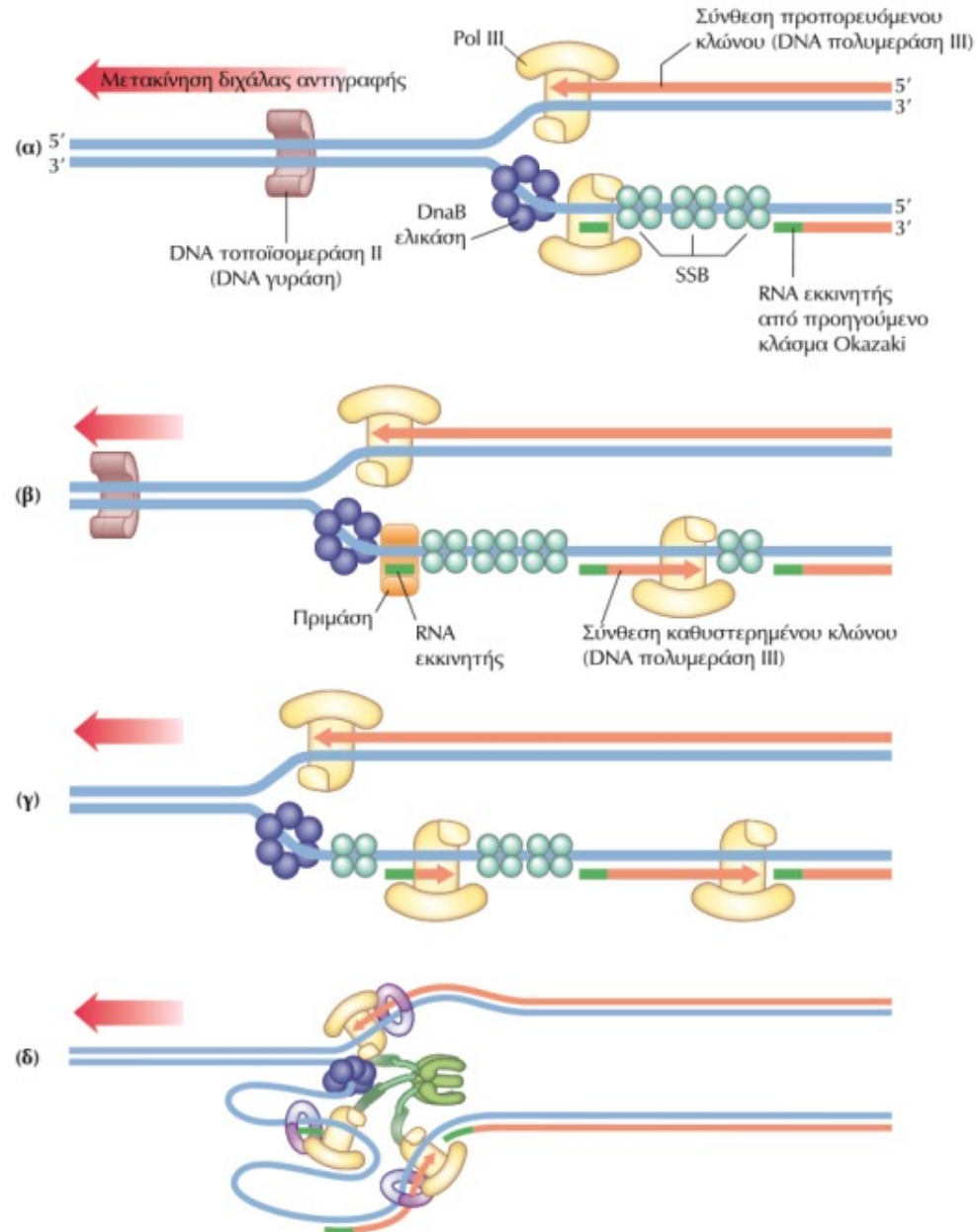
Η DnaA χρειάζεται την DnaB, μια ελικάση που χρησιμοποιεί υδρόλυση ATP για να χαλαρώσει το σημείο έναρξης. Η DnaB προσδένεται με την βοήθεια της DnaC.

Πρωτεΐνες δέσμησης μονόκλωνου DNA (SSB) συνδέονται σε AT-πλούσιες περιοχές του σημείου *oriC*. Σύμπλοκο προέναρξης

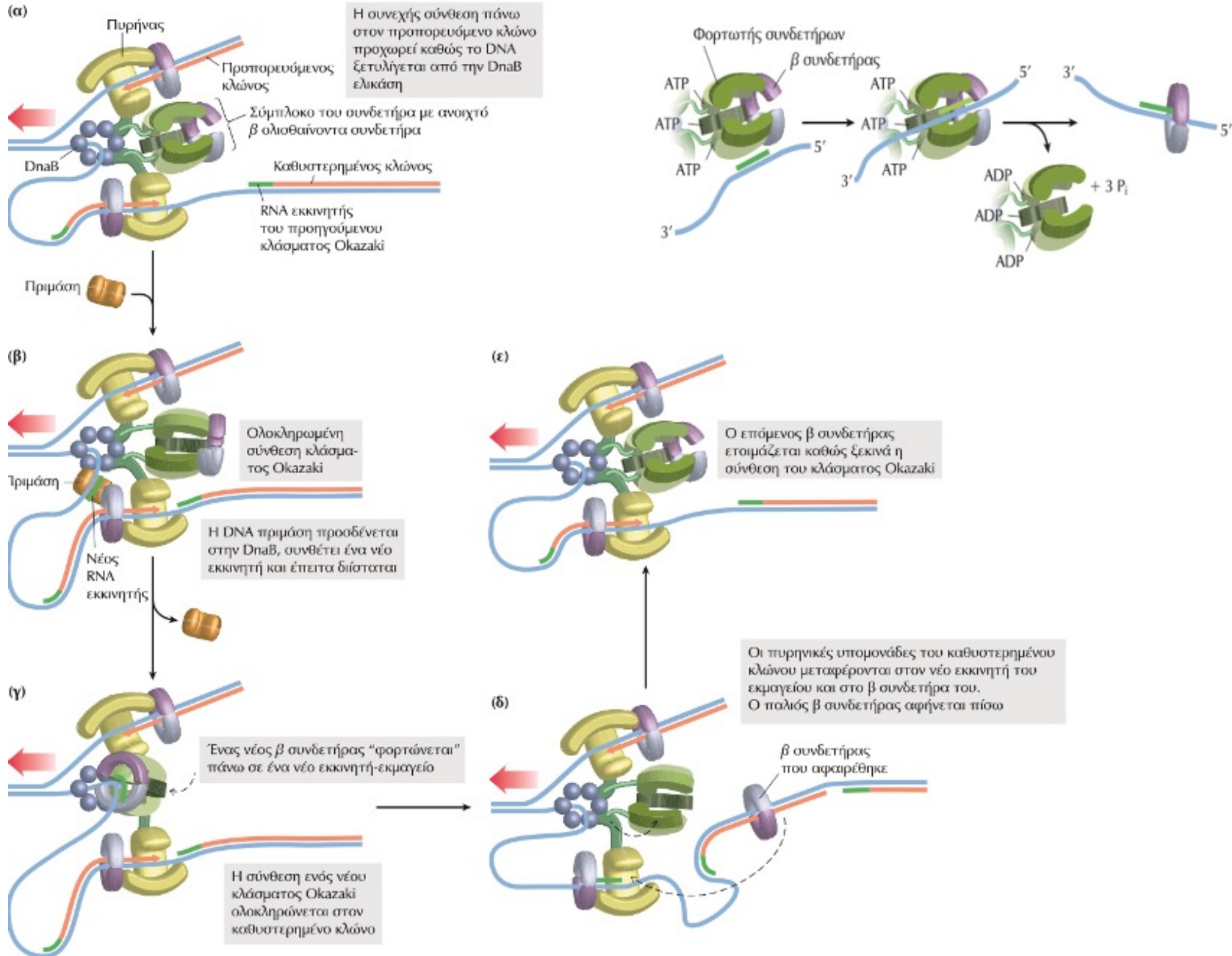
Η DNA πολυμεραση III προσδένεται στο σύμπλοκο προέναρξης.



# Αντιγραφή



# Μοντέλο τρομπονιού



# Αντιγραφή DNA

The separation of DNA strands requires specific helicases and ATP hydrolysis

## Σύνδρομο Werner

Ελικάσεις διαχωρίζουν μέσω υδρόλυσης ATP, τους κλώνους της διπλής έλικας για να κάνει το DNA διαθέσιμο για την DNA πολυμεράση.

Η ελικάση, το οποίο αποτελείται από μια δομή δακτυλίου και αποτελείται από έξι υπομονάδες, δρα ως σφήνα για να διαχωρίσει τους κλώνους

Ελαττώματα στη ελικάση μπορεί να οδηγήσει στο σύνδρομο Werner

Παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από την πρόωρη γήρανση.

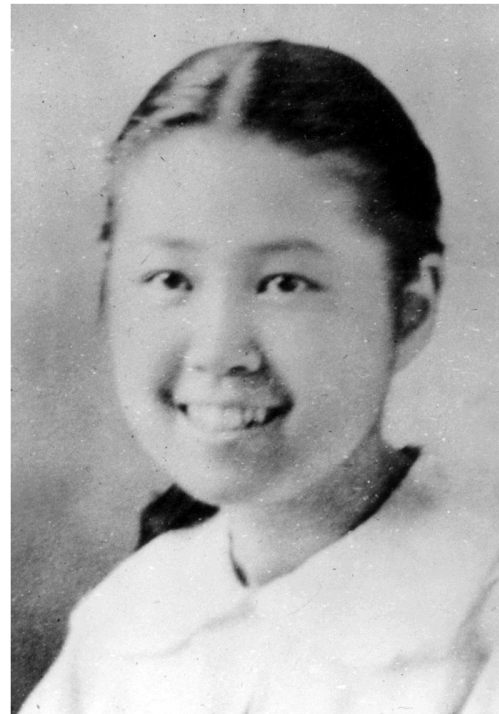


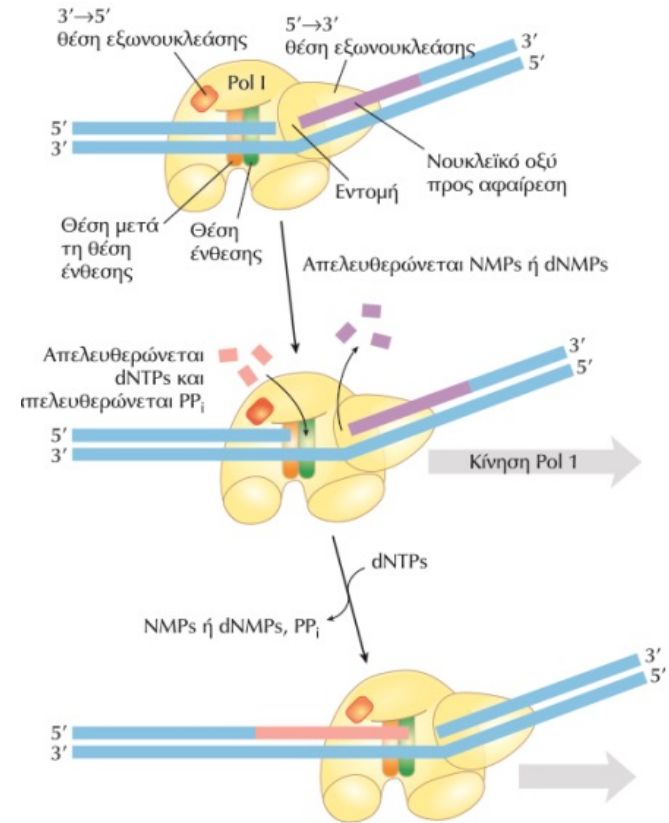
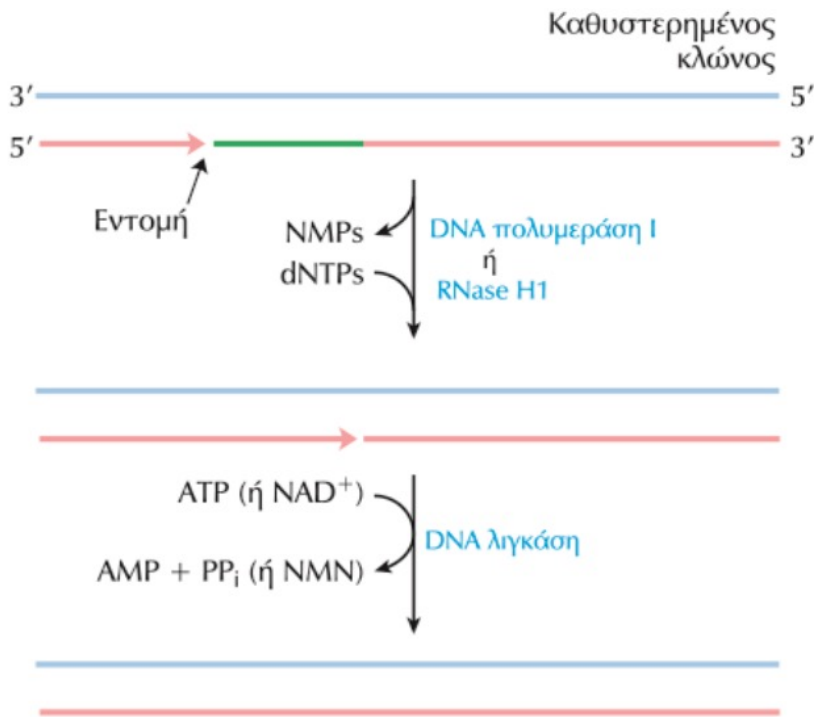
Figure 34.6a  
Biochemistry: A Short Course, Second Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company



Figure 34.6b  
Biochemistry: A Short Course, Second Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

# Αντιγραφή του DNA

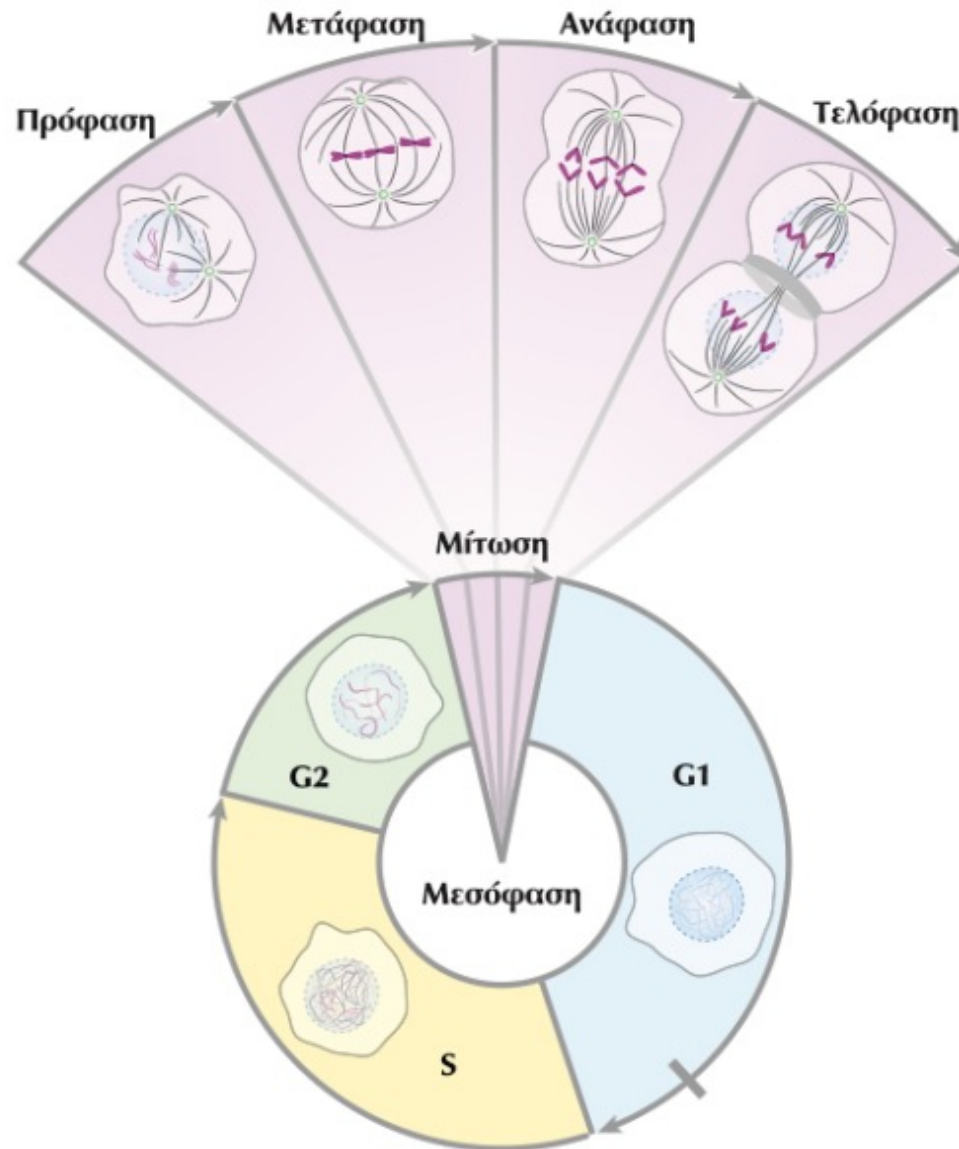
DNA ligase joins ends of DNA in duplex regions



Η DNA λιγκάση καταλύει την ένωση ενός θραύσματος DNA με μια ελεύθερη 3-OH στην φωσφορυλιωμένη 5-OH ομάδα, σε μία αντίδραση που απαιτεί ενέργεια, συνήθως ATP. Τα βακτήρια χρησιμοποιούν  $\text{NAD}^+$  ως πηγή ενέργειας.

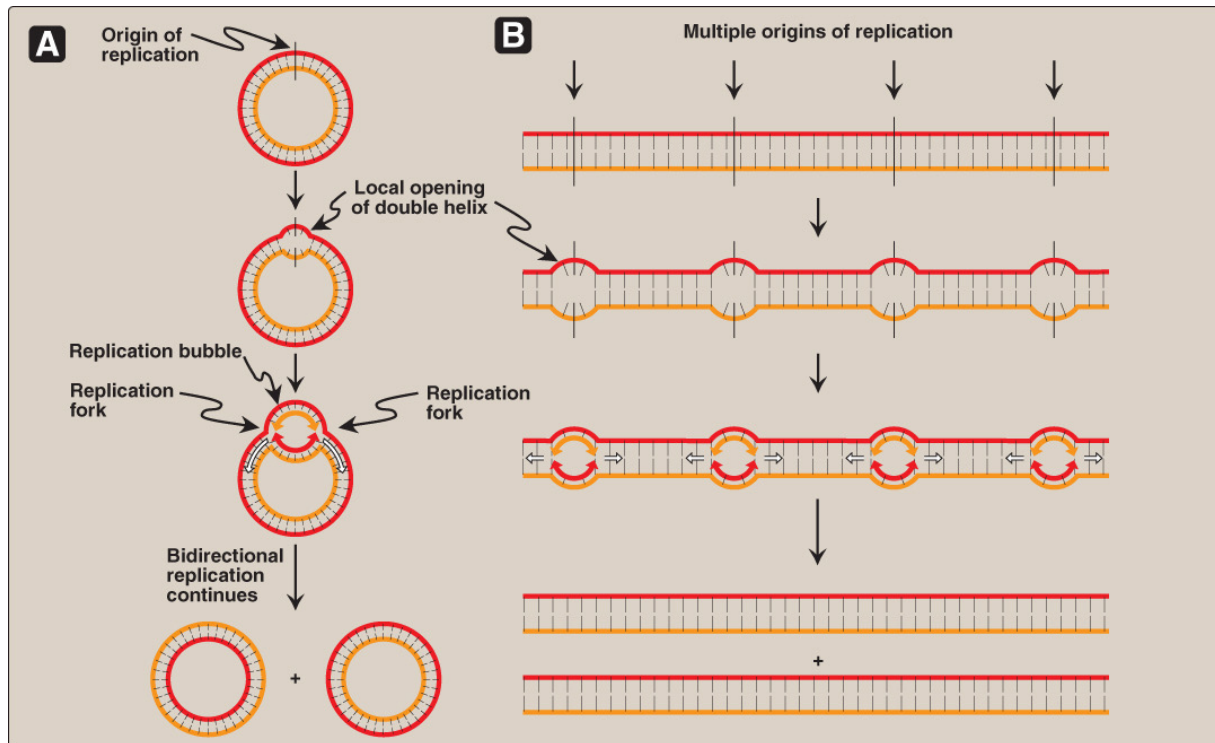


# Αντιγραφή του DNA στους ευκαρυωτικούς



# Αντιγραφή του DNA στους ευκαρυωτικούς

DNA synthesis in eukaryotes is initiated at multiple sites



Ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν πολύ μεγαλύτερο DNA από τα βακτήρια, γραμμικό σε πολλαπλά χρωμοσώματα.

Πολλαπλά σημεία έναρξης ORC **μονάδα αντιγραφής** η **ρεπλικόνιο** . Οι άνθρωποι έχουν  $\approx 30.000$  θέσης έναρξης.

# Αντιγραφή του DNA στους ευκαρυωτικούς

DNA synthesis in eukaryotes is initiated at multiple sites



**Figure 28.28**

*Biochemistry*, Eighth Edition

Courtesy Aaron Bensimon. Data from C. Conti, et al., *Mol. Biol. Cell.* 18:3059-3067, 2007

Η έναρξη από το ORC μπορεί να παρατηρηθεί χρησιμοποιώντας τεχνικές ενός μορίου.

Οι πρωτεΐνες που ονομάζονται παράγοντες αδειοδότησης επιτρέπουν μόνο μία αντιγραφή ανά ρεπλικόνιο ανά γύρο σύνθεσης DNA.

# Αντιγραφή του DNA στους ευκαρυωτικούς

DNA πολυμεράση α (δεν έχει 3'-δραστικότητα εξωνουκλεάσης), εκκινεί την αντιγραφή του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα, δημιουργώντας ένα μόριο DNA  $\approx$  20 dNTP σε μήκος.

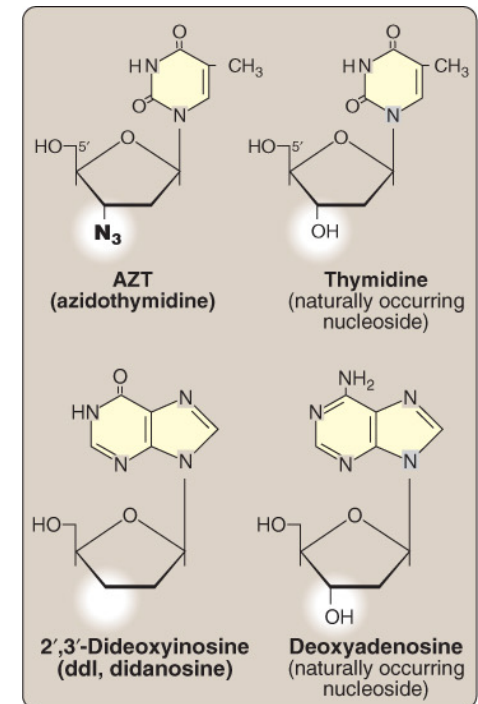
δ πολυμεράση DNA, ένα πιο επεξεργαστικό ένζυμο, επεκτείνει τις αλυσίδες.

Η μετάβαση από την πολυμεράση α έως δ ονομάζεται εναλλαγή πολυμεράσης.

DNA πολυμεράση ε (πυρήνας)

DNA πολυμεράση γ (μιτοχόνδρια)

DNA πολυμεράση β (διόρθωση)





## G-rich strand



Figure 34.22

Biochemistry: A Short Course, Second Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

Τα ελεύθερα άκρα των γραμμικών μορίων DNA παρουσιάζουν δύο βιοχημικές δυσκολίες.

Είναι ευαίσθητα σε βλάβες από νουκλεάσες.

Λόγω της φύσης της σύνθεσης του DNA, ένας κλώνος θα μειώνεται μετά από κάθε γύρο σύνθεσης του DNA.

Τα άκρα των χρωμοσωμάτων ονομάζονται τελομερή.

Η μεγαλύτερη από τις δύο έλικες, η οποία αντιπροσωπεύει τον κλώνο εκμαγείο, είναι πλούσια σε γουανίνη που σχηματίζει μία δομή βρόχου για την προστασία του άκρου του χρωμοσώματος.

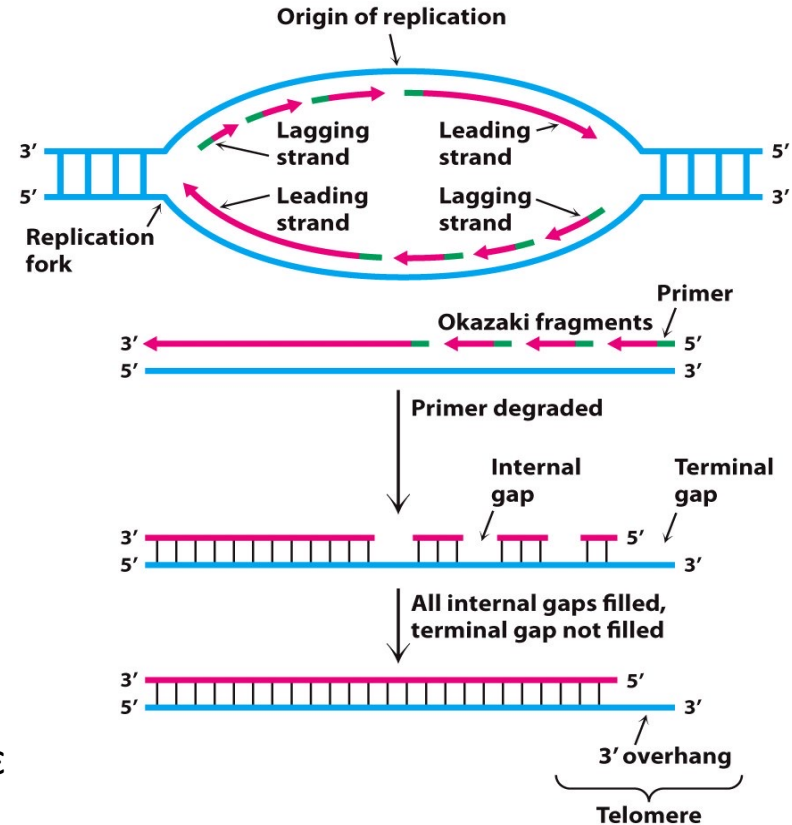


Figure 34.21a

Biochemistry: A Short Course, Second Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

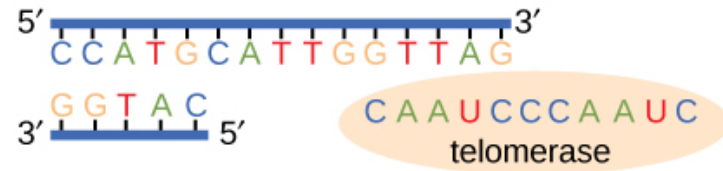
# Τελομερή

Η G πλούσια περιοχή των τελομερών μπορεί να διατηρηθεί από το ένζυμο τελομεράση.

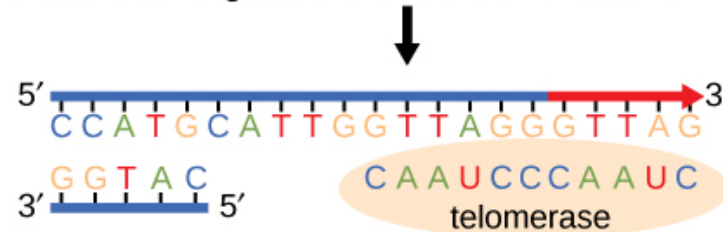
Η τελομεράση περιέχει ένα πρότυπο RNA που χρησιμοποιεί για να επεκτείνει το σκέλος.

Στην ταχέως διαιρούμενα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων, τα τελομερή πρέπει να διατηρείται από την τελομεράση για να αποτρέψει μείωση της υστέρηση, η οποία θα οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο.

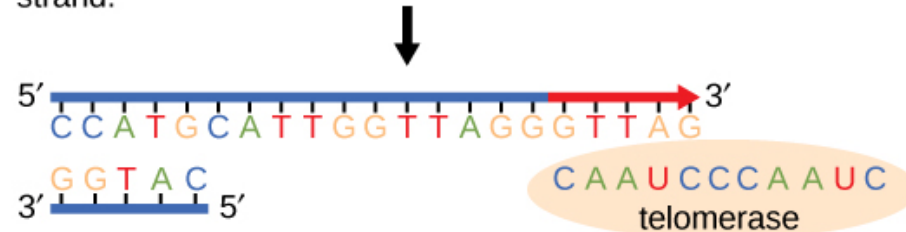
Υψηλή δραστικότητα τελομεράσης είναι ένα χαρακτηριστικό των κυττάρων καρκίνου.



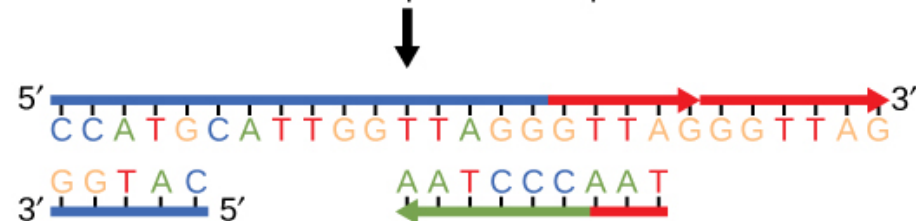
Telomerase has an associated RNA that complements the 3' overhang at the end of the chromosome.



The RNA template is used to synthesize the complementary strand.



Telomerase shifts, and the process is repeated.



Primase and DNA polymerase synthesize the complementary strand.

# Επιδιόρθωση και ανασυνδυασμός του DNA

Η βλάβη του DNA είναι αναπόφευκτη και οφείλεται σε σφάλματα στην αντιγραφή ή περιβαλλοντικές προσβολές.

Μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο ή ανεξέλεγκτη αναπαραγωγή, όπως όταν τα φυσιολογικά κύτταρα μετασχηματίζονται σε καρκινικά κύτταρα.

Η απλούστερη πηγή βλάβης του DNA είναι η ενσωμάτωση λάθος βάσεως κατά τη διάρκεια της αντιγραφής που διαφεύγει την διόρθωση της πολυμεράσης του DNA.

Άλλα σφάλματα περιλαμβάνουν την εισαγωγή, διαγραφή ή διακοπές σε ένα ή και τα δύο σκέλη, που μπορεί να σταματήσει εντελώς τη σύνθεση του DNA.

Υπάρχουν συστήματα επισκευής για την αναγνώριση και την επιδιόρθωση ζημιών στο DNA.

Ειδικές DNA πολυμεράσες, που ονομάζονται επιρρεπείς σε σφάλματα πολυμεράσες, μπορούν να συνθέσουν την ολοκλήρωση της κατεστραμμένης αλληλουχίας.

# Αλλαγές

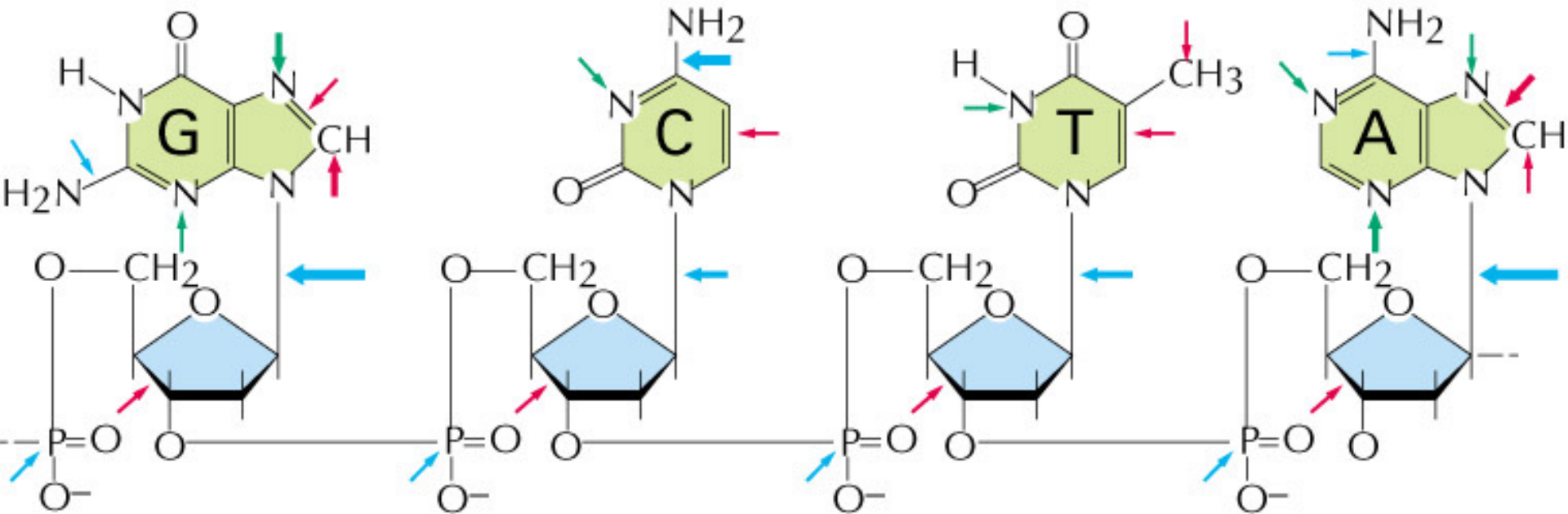
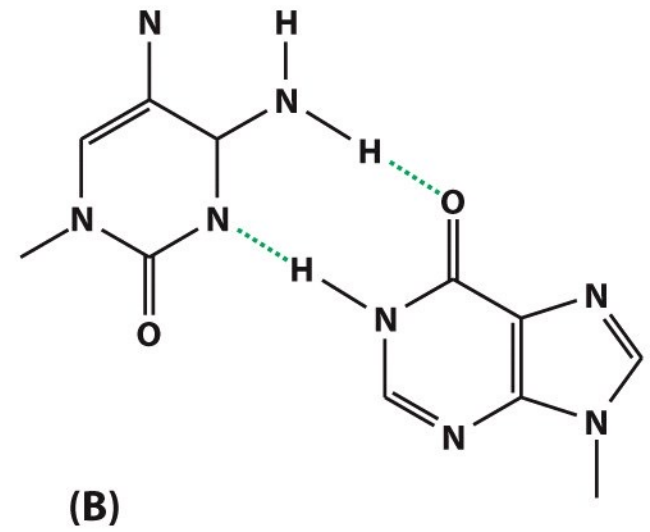
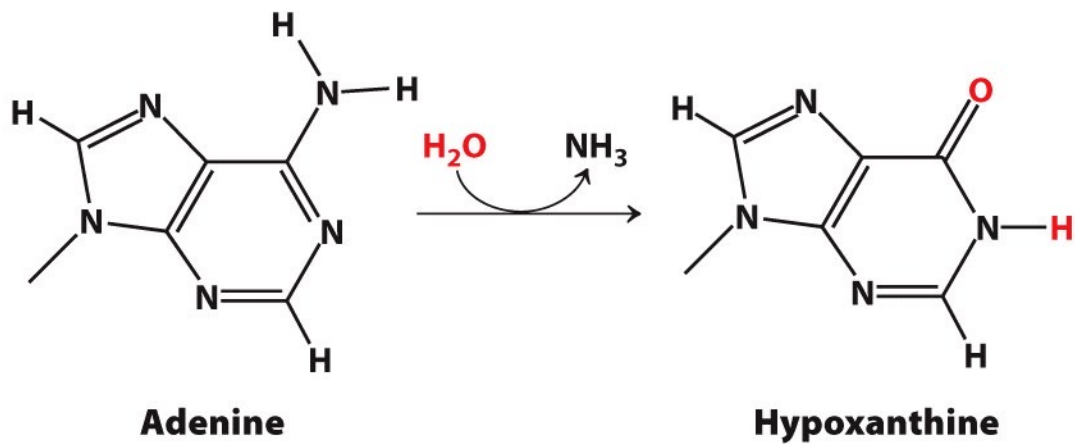


Figure 5-46. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Οξειδωτική βλάβη

Υδρόλυση

Μη ελεγχόμενη μεθυλίωση



**(A)**

**Figure 35.3**  
*Biochemistry: A Short Course, Second Edition*  
 © 2013 W. H. Freeman and Company

**Μεταλλαξιγόνα:** χημικές ουσίες που αλλοιώνουν συγκεκριμένες βάσεις μετά την αντιγραφή

**Ρίζες υδροξυλίου** οξειδώνουν γουανίνη σε 8-οξογουανίνη, η οποία δημιουργεί ζεύγη βάσεων με αδενίνη αντί της κυτοσίνης κατά τον επόμενο γύρο αντιγραφής.

**Αποαμινίωση:** Αδενίνη μπορεί να αποαμινωθεί, σχηματίζοντας υποξανθίνη, η οποία ζευγαρώνει με την κυτοσίνη αντί της θυμιδίνης.



# Λάθη στο DNA

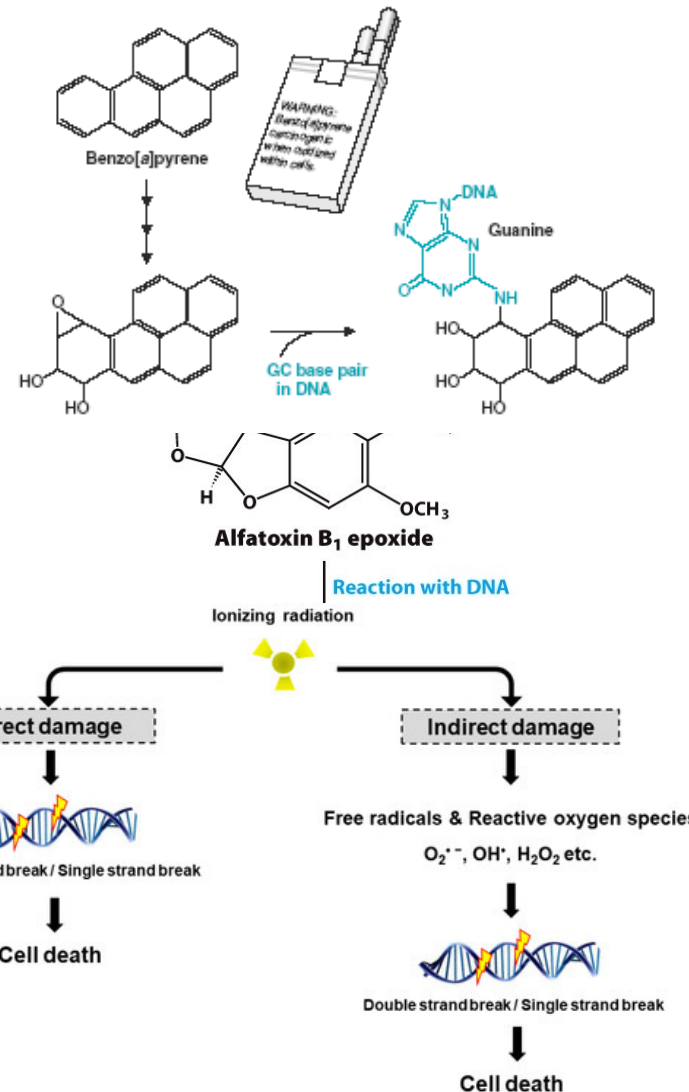
Bases Can Be Damaged by Oxidizing Agents, Alkylating Agents, and Light

Βάσεις μπορούν επίσης να αντιδράσουν με υδρογονάνθρακες σε μία αντίδραση αλκυλιώσεως.

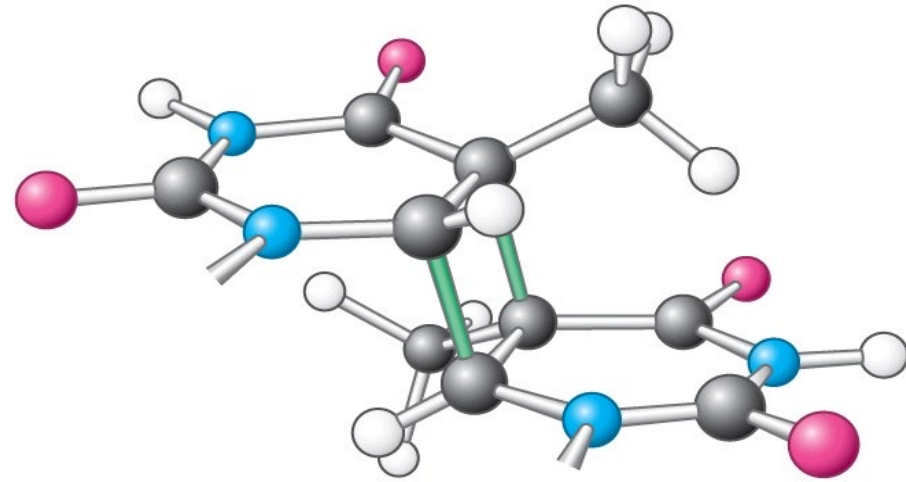
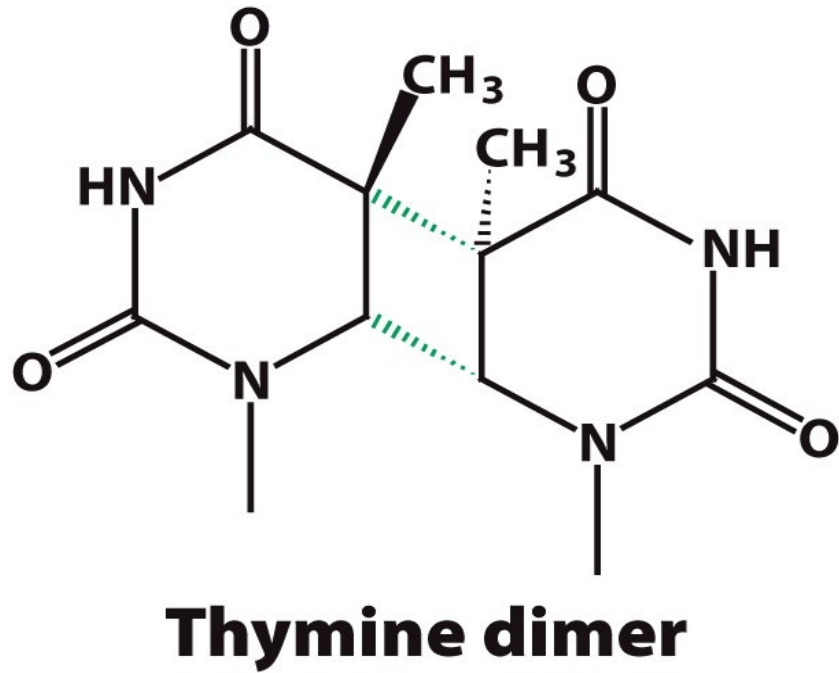
Αφλατοξίνη μετατρέπεται σε ένα ιδιαίτερα δραστικό εποξειδίο που αντιδρά με γουανίνη σχηματίζουν μια ένωση η οποία, κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, μετατρέπει ένα ζεύγος βάσεων GC σε ένα ζεύγος βάσεων AT.

Χημικές ουσίες στον καπνό του τσιγάρου και καυσαέρια των αυτοκινήτων μπορούν να μετατραπούν σε δραστικά εποξειδία επίσης.

Υψηλής ενέργειας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, όπως ακτίνες-Χ, μπορεί να προκαλέσει διάσπαση στους κλώνους του DNA.



# Μαύρισμα

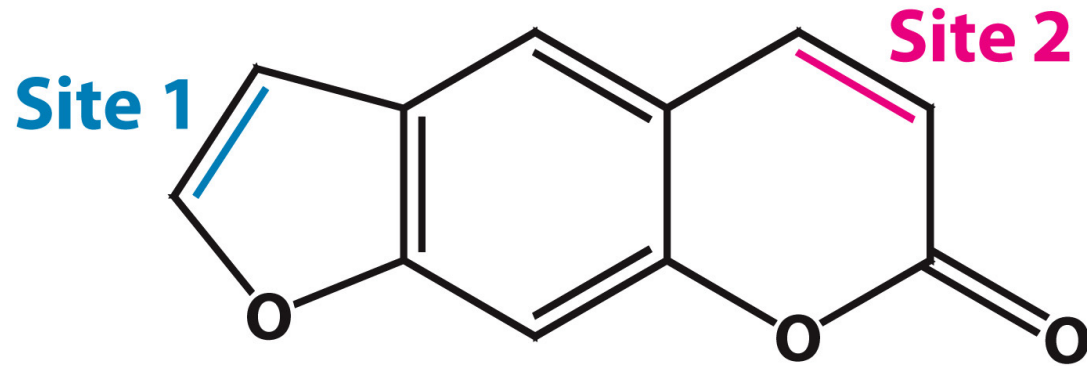


**Figure 35.6**  
*Biochemistry: A Short Course, Second Edition*  
© 2013 W. H. Freeman and Company

Figure 35.6  
*Biochemistry: A Short Course, Second Edition*  
© 2013 W. H. Freeman and Company

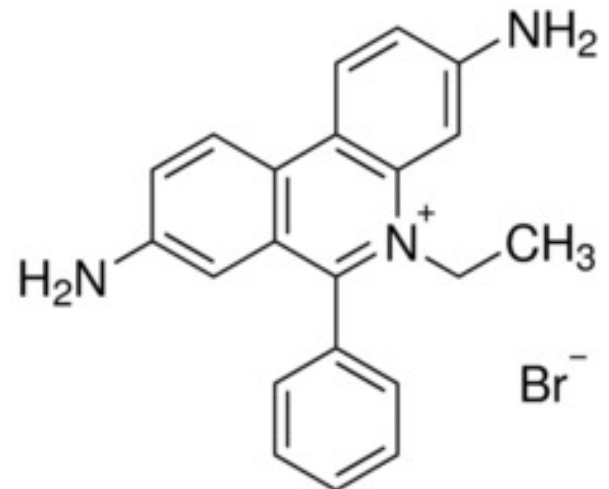
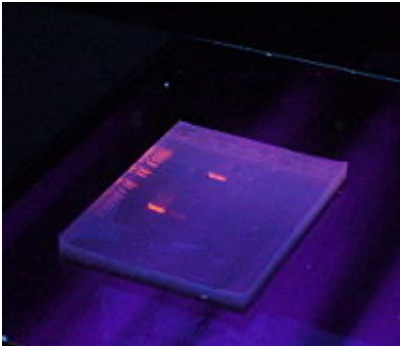
Υπεριώδης ακτινοβολία αυξάνει τη χρώση του δέρματος αλλά προκαλεί και βλάβες στο DNA

Συνδέει ομοιοπολικά γειτονικές πυριμιδίνες εμποδίζοντας έτσι την αντιγραφή.



# Psoralen

Figure 28.36  
*Biochemistry*, Eighth Edition  
© 2015 Macmillan Education



# Βλάβη στο DNA μπορεί να ανιχνευθεί και να επισκευαστεί

Συστήματα επιδιόρθωσης του DNA ακολουθούν την ίδια διαδικασία:

1. Αναγνώριση της ακατάλληλης βάσης (εσ).
2. Αφαίρεση της ακατάλληλης βάσης (εσ).
3. Συμπλήρωση του κενού με DNA πολυμεράση I και DNA λιγάση.

Ο πρώτος μηχανισμός επιδιόρθωσης DNA εμφανίζεται όταν η DNA πολυμεράση διορθώνει το νέο κλώνο DNA.

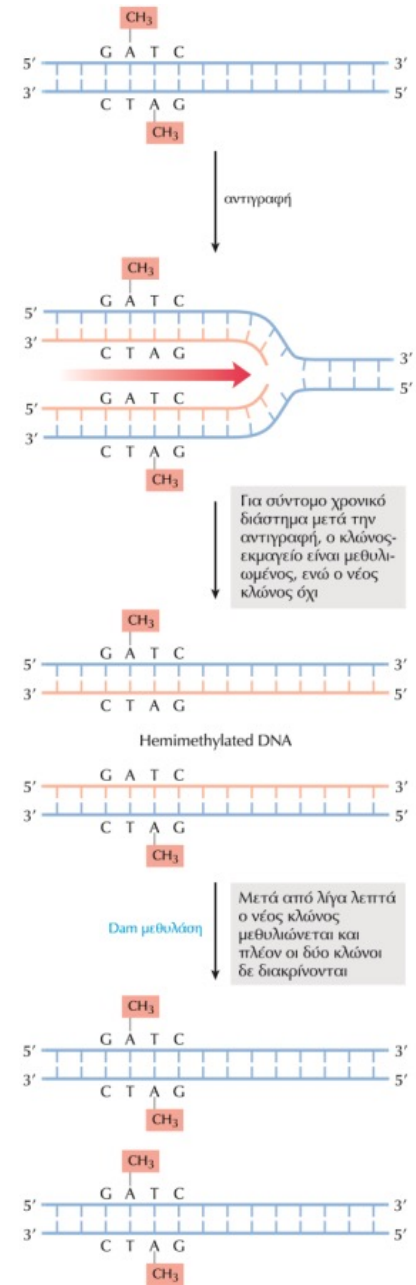


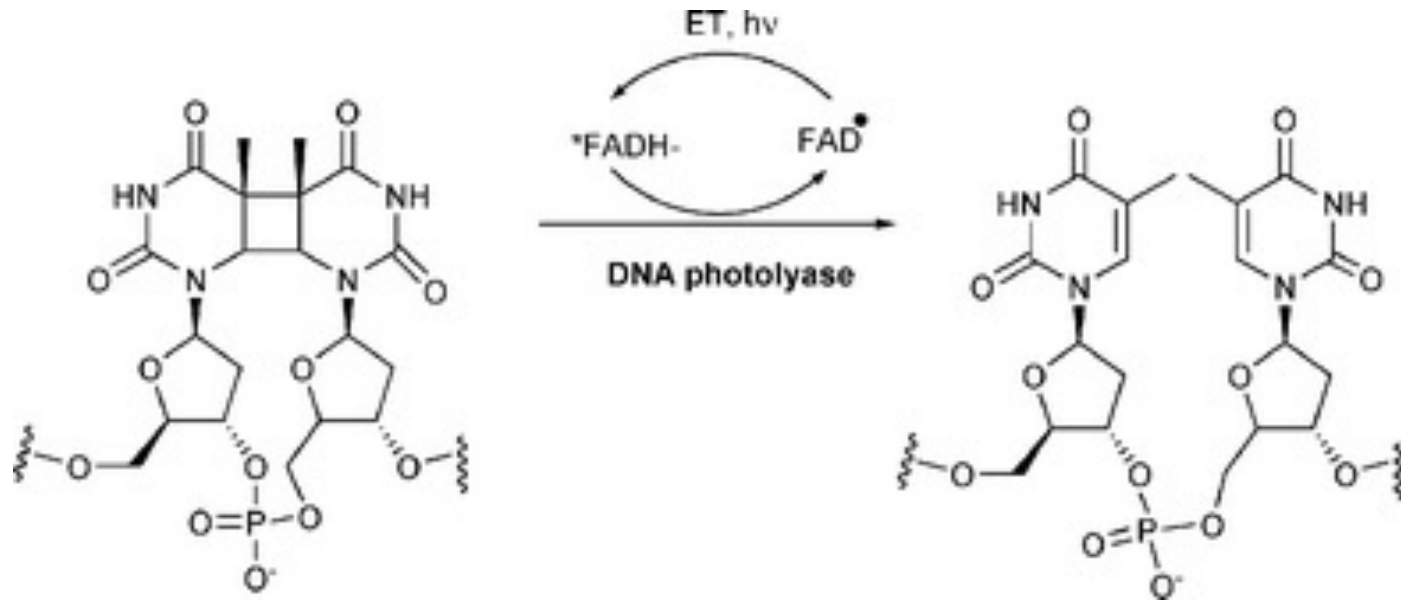
TABLE 25-5

Types of DNA Repair Systems in *E. coli*

Enzymes/proteins	Type of damage
<b>Mismatch repair</b> Dam methylase MutH, MutL, MutS proteins DNA helicase II SSB DNA polymerase III Exonuclease I Exonuclease VII RecJ nuclease Exonuclease X DNA ligase	Mismatches
<b>Base-excision repair</b> DNA glycosylases AP endonucleases DNA polymerase I DNA ligase	Abnormal bases (uracil, hypoxanthine, xanthine); alkylated bases; in some other organisms, pyrimidine dimers
<b>Nucleotide-excision repair</b> ABC excinuclease DNA polymerase I DNA ligase	DNA lesions that cause large structural change (e.g., pyrimidine dimers)
<b>Direct repair</b> DNA photolyases	Pyrimidine dimers
<i>O</i> <sup>6</sup> -Methylguanine-DNA methyltransferase	<i>O</i> <sup>6</sup> -Methylguanine
AlkB protein	1-Methylguanine, 3-methylcytosine



# Άμεση επιδιόρθωση



Άμεση επιδιόρθωση διορθώνει τα λάθη χωρίς να χρειάζεται να αφαιρεθεί οποιαδήποτε κομμάτια του DNA.

**DNA φωτολύση** χρησιμοποιεί την ενέργεια του φωτός για να διασπαστούν διμερή πυριμιδίνης.

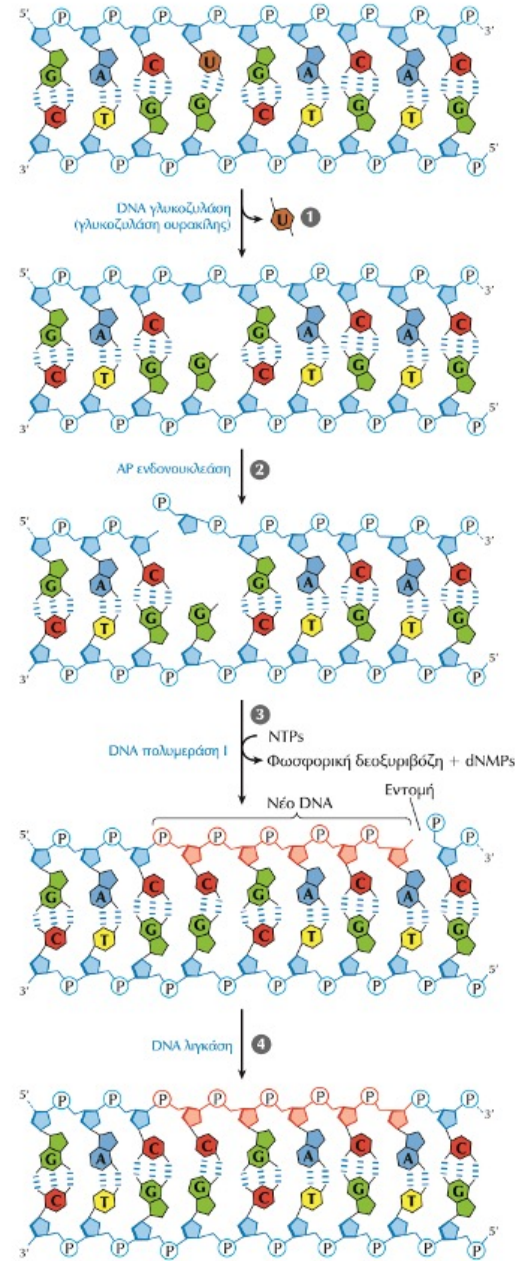
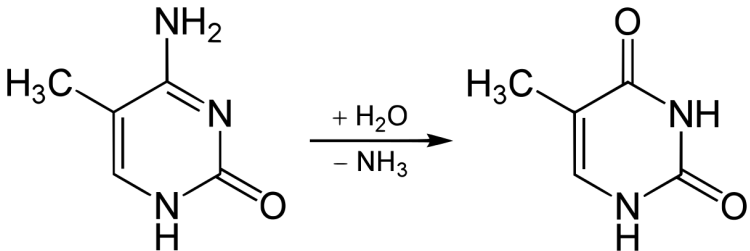
# Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης

Το ένζυμο AlkA διασπά τη βάση. Το σημείο που λείπει η βάση ονομάζεται AP σημείο.

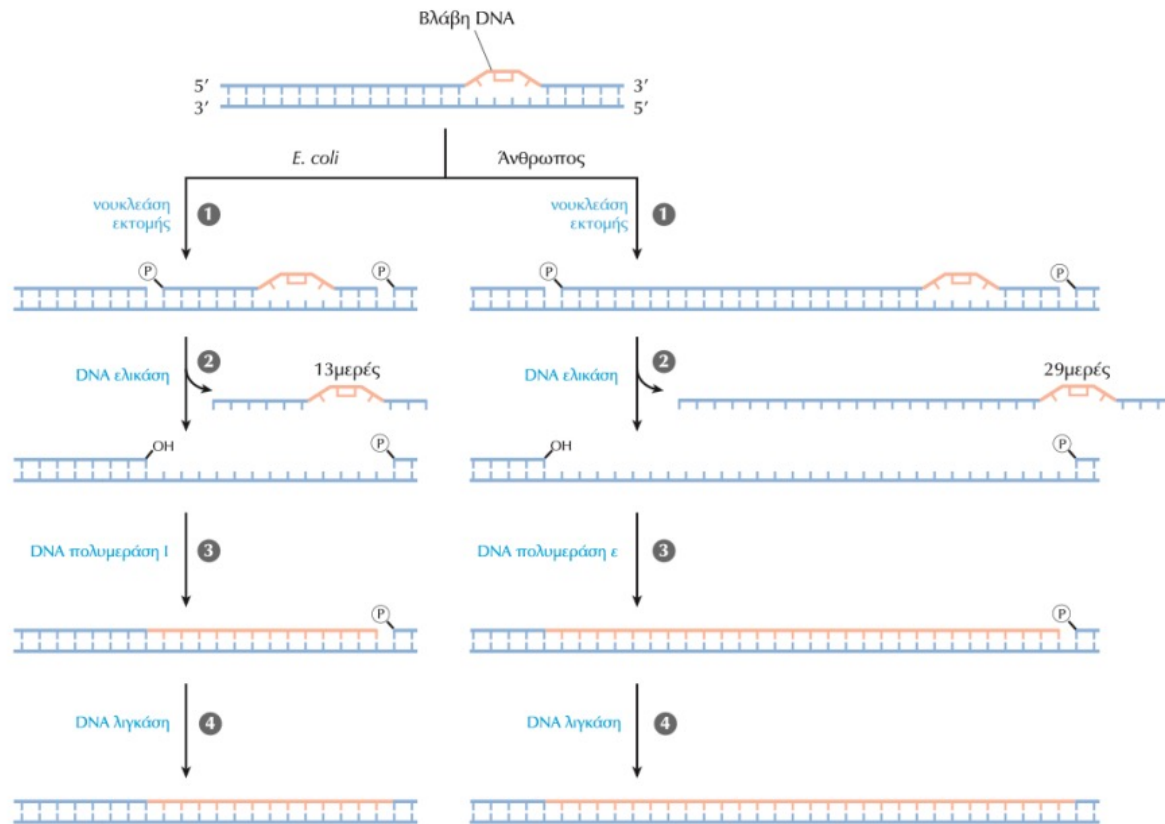
Διασπάση του DNA στην θέση AP από την AP ενδονουκλεάση και μια φωσφοδιεστεράσης αποκόπτει την φωσφορική δεοξυριβόζη.

DNA πολυμεράσης I και DNA λιγάσης.

Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης διορθώνει την πιο κοινή μετάλλαξη σημείου στον άνθρωπο, την **απαμίνωση της μεθυλο κυτοσίνης σε θυμίνη.**



# Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίων

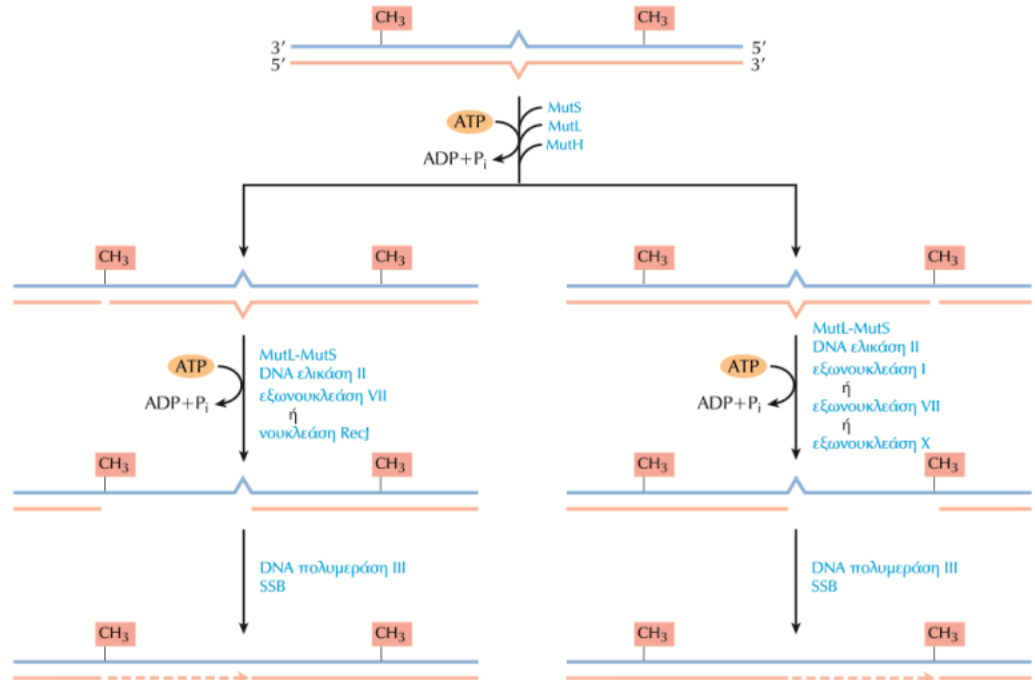
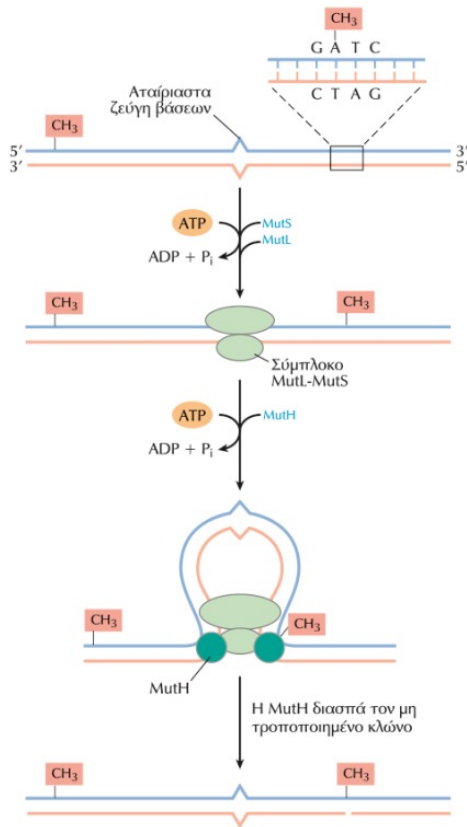


Εάν η εκτομή βάσης αποτυγχάνει, η μετάλλαξη μπορεί να διορθωθεί από το σύστημα επιδιόρθωσης εκτομής νουκλεοτιδίων.

Ένα σύμπλοκο ένζυμο αναγνωρίζει την παραμόρφωση του DNA που προκαλείται από λαθος βάση.

Η **UvrABC excinuclease** διασπά το DNA σε δύο θέσεις (4/3' 8/5')

# Επιδόρθωση με εκτομή βάσεων



Mismatch repair systems ερευνά την διπλή έλικα του DNA για λάθος βάσης, αποκοπή της περιοχής και αντικατάσταση

Methyl-directed μονοπάτι στο *E. coli*

Επειδή η μεθυλίωση συμβαίνει μετά την αντιγραφή, οι πρωτεΐνες επισκευής αναγνωρίζουν το μεθυλιωμένο ινίδιο ως το μητρικό και αντικαθιστούν τις βάσεις από το άλλο

# Σπουδαιότητα της θυμίνης στο DNA

The Presence of Thymine Instead of Uracil in DNA Permits the Repair of Deaminated Cytosine

Θυμίνη στο DNA χρησιμοποιείται αντί της ουρακίλης για να διατηρηθεί η ακεραιότητα της γενετικής πληροφορίας,

Ουρακίλη ζεύγη με αδενίνη A-U

Κυτοσίνη απαμινώνει αυθόρμητα για να σχηματίσει ουρακίλη.

Χρήση της θυμιδίνης αντί ουρακίλη επιτρέπει την ανίχνευση απαμίνωση της κυτοσίνης.

Αν ουρακίλη ανιχνεύεται στο DNA, αφαιρείται με ουρακίλη DNA γλυκοζυλάση και το προκύπτον AP επισκευάζεται με την εισαγωγή της κυτοσίνης.

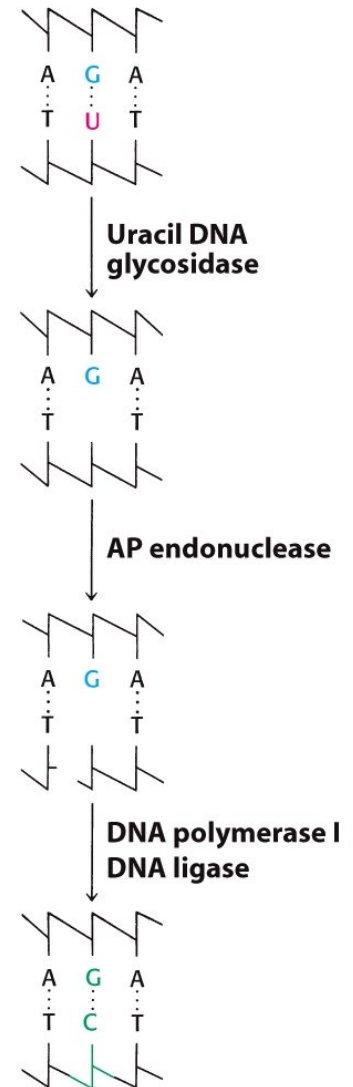
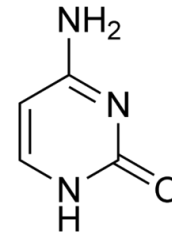


Figure 35.11  
Biochemistry: A Short Course, Second Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company



# Καταστρέφοντας το DNA-αναστολή ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων

Many cancers are caused by the defective repair of DNA

Οι καρκίνοι προκαλούνται από μεταλλάξεις σε γονίδια που ελέγχουν την ανάπτυξη.

Ένζυμα επισκευής DNA δρουν ως καταστολείς όγκου.

Αν αντίγραφα ενζύμου επιδιόρθωσης DNA είναι μεταλλαγμένο, ο καρκίνος είναι πιο πιθανό να αναπτύχθει (ξηροδερμία).

Επειδή οι όγκοι δεν διαθέτουν συστήματα επισκευής DNA, βλάβες του DNA με χημικά όπως η κυκλοφωσφαμίδη και σισπλατίνη είναι μια στρατηγική για την πρόληψη της ανάπτυξης του καρκίνου.

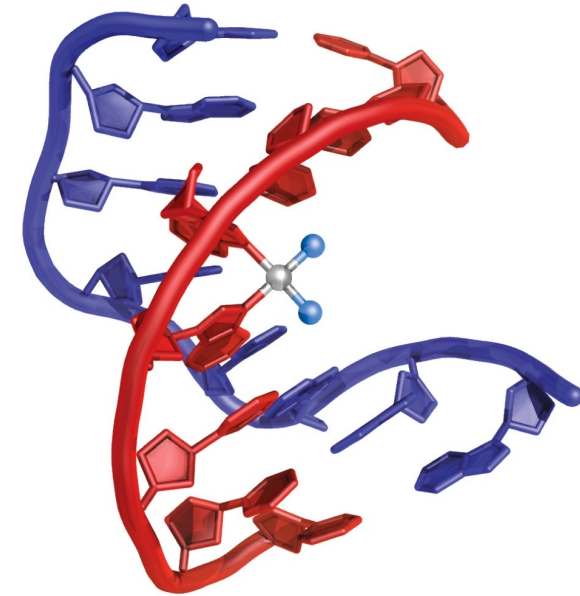
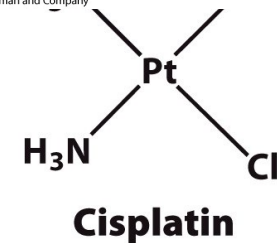


Figure 33.29  
Biochemistry: A Short Course, Second Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company



# Ελατώματα στον DNA

**TABLE 28.2**

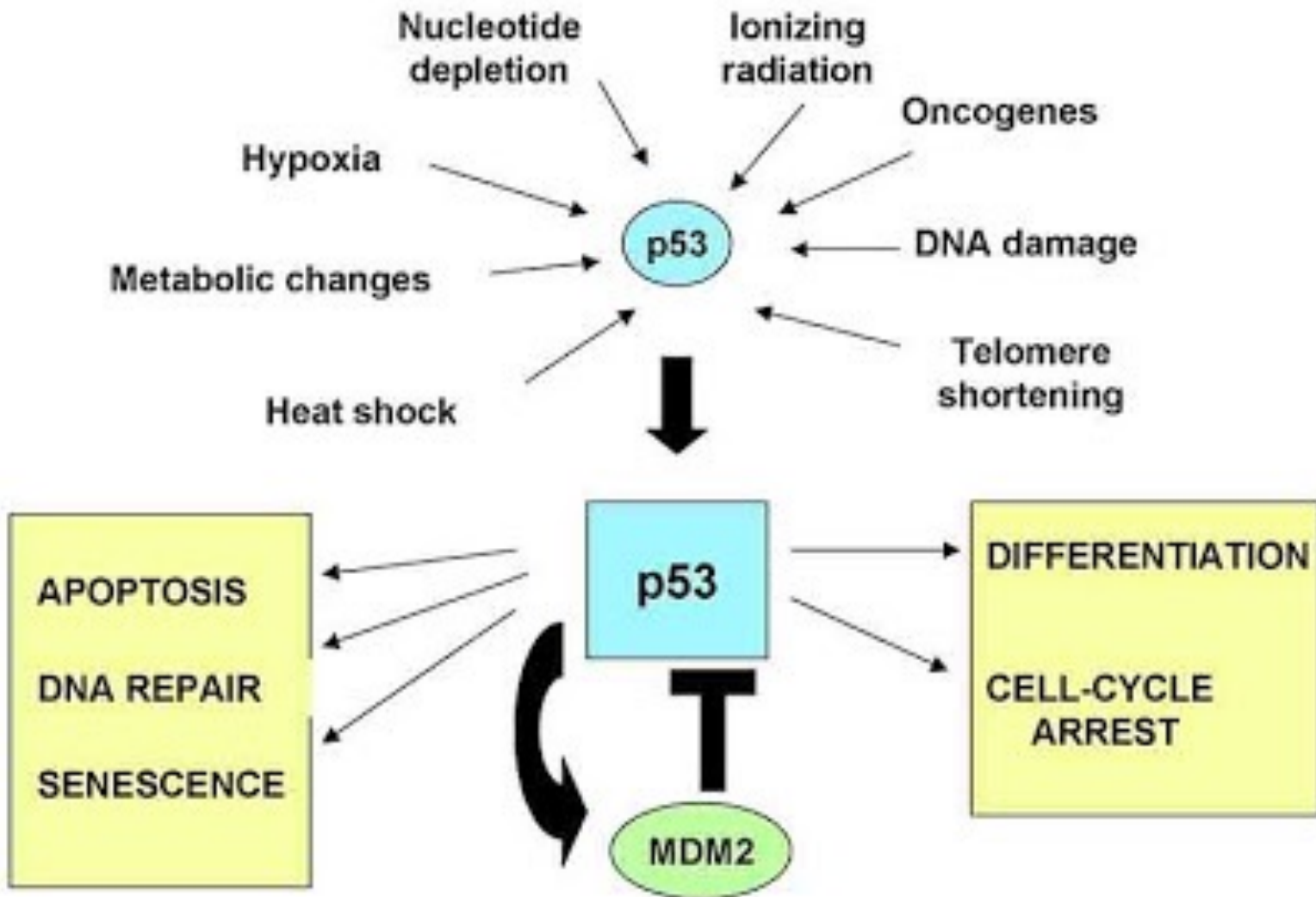
Disease	Repair Pathway
Xeroderma pigmentosum (skin cancer)	Nucleotide excision repair
Lynch syndrome (colon cancer)	Mismatch repair
Breast and ovarian cancer	Double-strand break repair
Renal and lung cancer	Base excision repair

**Table 28.2**  
*Biochemistry*, Eighth Edition  
© 2015 Macmillan Education



**Figure 35.12**  
*Biochemistry: A Short Course*, Second Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

# Απόκριση της p53



# Λάθη στην αντιγραφή του DNA

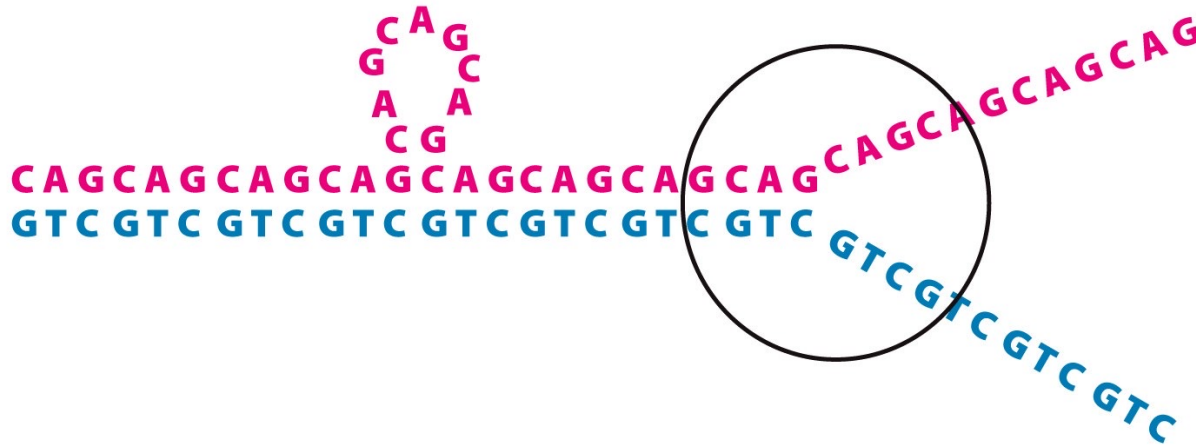


Figure 35.1  
*Biochemistry: A Short Course, Second Edition*  
© 2013 W. H. Freeman and Company

Τα γονίδια που περιέχουν ακολουθίες τρινουκλεοτιδικών πολλαπλών επαναλήψεων είναι ευαίσθητα σε σφάλματα.

Αυτές οι αλληλουχίες των επαναλήψεων μπορεί να επεκταθεί κατά την επιδιορθωση.

Στην περίπτωση της νόσου του Huntington, η αλληλουχία CAG, η οποία κωδικοποιεί γλουταμίνη, επεκτείνεται με αποτέλεσμα την παθολογική κατάσταση.

Επειδή οι συστοιχίες επεκτείνει κατά την αντιγραφή, τα παιδιά των γονέων με την ασθένεια μπορούν να παρουσιάζουν την κατάσταση νωρίτερα και πιο σοβαρά.

# Ο ανασυνδυασμός του DNA παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και επισκευή



**Figure 28.43**

*Biochemistry*, Eighth Edition  
© 2015 Macmillan Education

Ανασυνδυασμός είναι η ανταλλαγή γενετικών πληροφοριών μεταξύ των δύο μορίων DNA.

Δύο θυγατρικά μόρια του DNA σχηματίζονται από την ανταλλαγή των δύο γονικών κλώνων.



# Ο ανασυνδυασμός του DNA παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και επισκευή

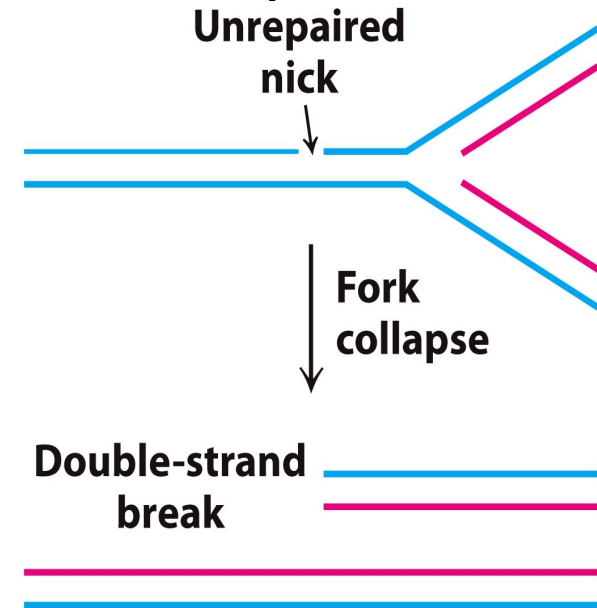


Figure 35.14  
Biochemistry: A Short Course, Second Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

Ανασυνδυασμός είναι χρήσιμος  
Επαναφορά της αντιγραφής εάν σταματήσει.

Επισκευή διχαλωτών διακοπών.

Ανταλλαγή γενετικού υλικού κατά τη διάρκεια της μείωσης.

Δημιουργία ποικιλίας στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Ενσωμάτωση γονιδίων ιών στο DNA ξενιστή.

Δημιουργία ποντικών "knockout" γονιδίων.

# Ο ανασυνδυασμός του DNA παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και επισκευή

## Double-Strand Breaks Can Be Repaired by Recombination

Ανασυνδυασμός απαιτεί πολλές πρωτεΐνες

Το διπλό σπάσιμο κλώνου αναγνωρίζεται και στα 5' άκρα δημιουργείται μονής έλικος όπου δεσμεύονται ειδικές πρωτεΐνες.

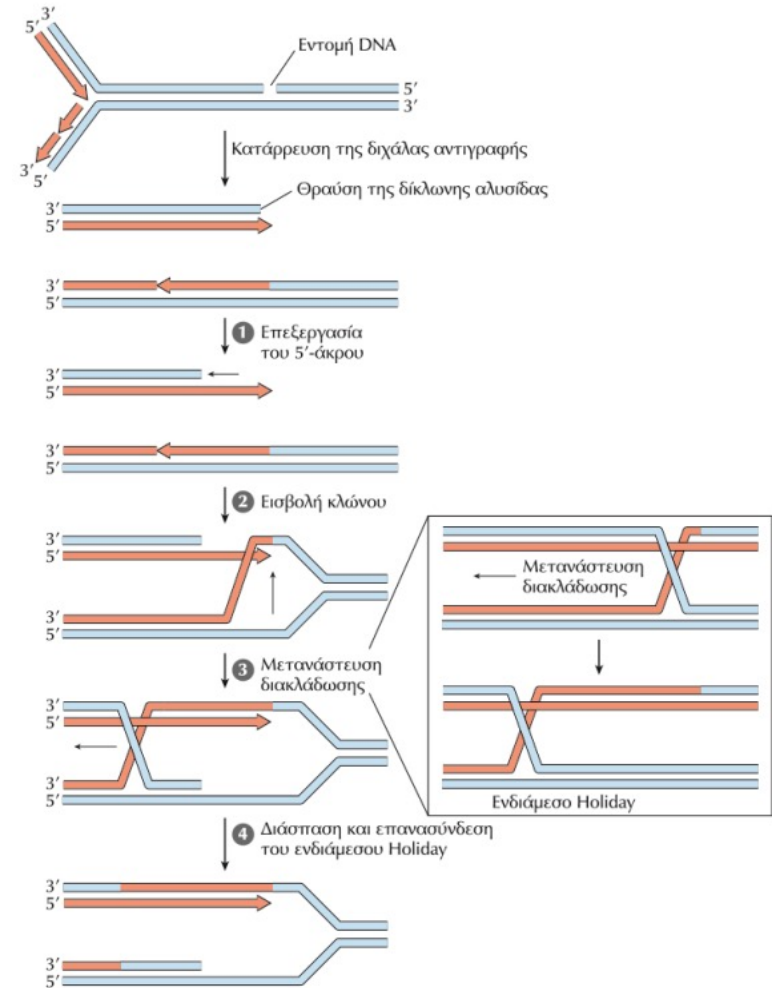
Εισβολή κλώνου συμβαίνει όταν ένα μόνο σκέλος από το κατεστραμμένο DNA αντικαθιστά ένα σκέλος άθικτου DNA.

Σύνθεση του DNA χρησιμοποιώντας το ακέραιο DNA ως εκμαγείο.

Μια δεύτερη εισβολή κλώνου εμφανίζεται, σχηματίζοντας μια δομή που ονομάζεται διασταύρωση Holliday

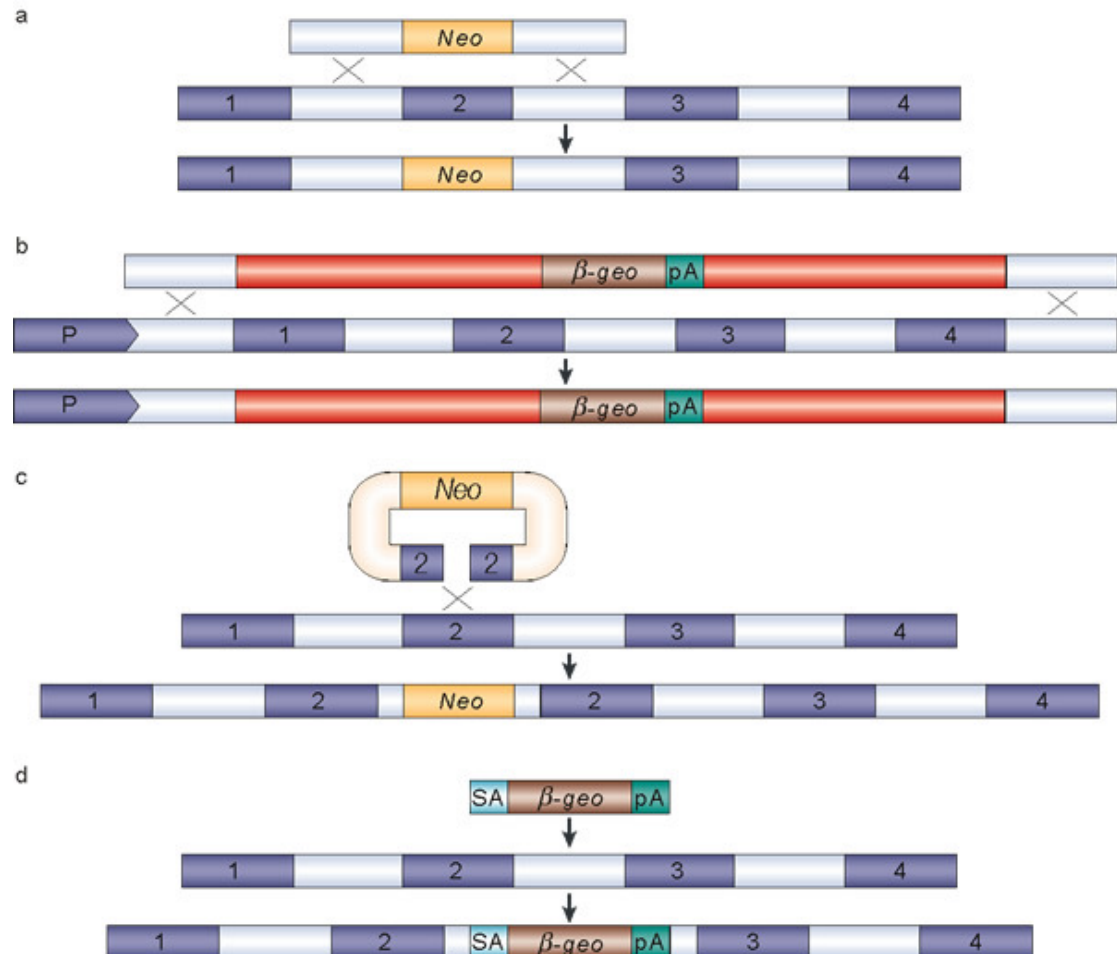
Ολοκλήρωση της επισκευής.

Διάσπαση και απόδοση δύο ακέραιων έλικων.



# Ανασυνδυασμός

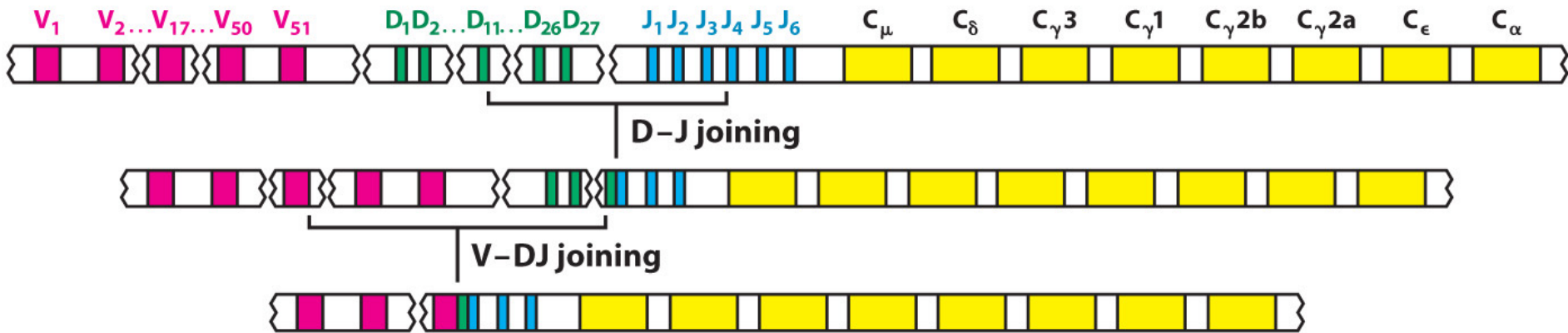
DNA Recombination Is Important in a Variety of Biological Process



Ανασυνδυασμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα ισχυρό πειραματικό εργαλείο για μετακίνηση, αφαίρεση ή προσθήκη γονιδίων στο γονιδίωμα.

Ανασυνδυασμός είναι ένα μέσο για τη δημιουργία ποικιλότητας στο ανοσοποιητικό σύστημα.

# Ποικιλομορφία



**Figure 34.20**  
*Biochemistry*, Eighth Edition  
© 2015 Macmillan Education

Οι αλυσίδες Η έχουν ένα άλλο τμήμα DNA που συμβάλλει στην περιοχή V, τα γονίδια D.

Οι V περιοχές των αλυσίδων Η σχηματίζονται με ανασυνδυασμό V (D) J.

# Ποικιλομορφία

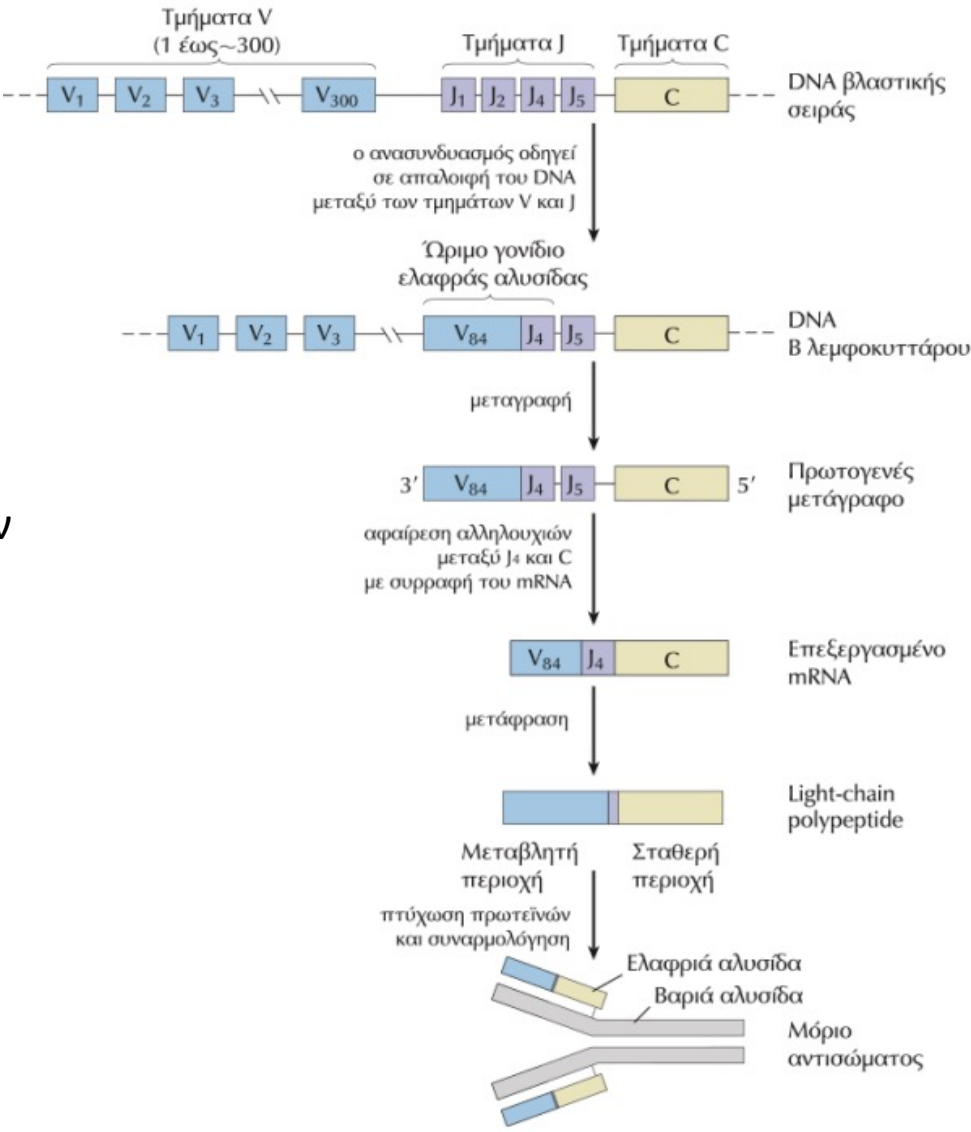
Τα γονίδια που κωδικοποιούν μεταβλητές περιοχές (V) και σταθερές (C) περιοχές βρίσκονται πολύ μακριά στο εμβρυϊκό DNA.

Αυτές οι περιοχές αναδιατάσσονται σε κύτταρα που παράγουν αντισώματα.

Η μεταβλητότητα της αλυσίδας L των γονιδίων V αυξάνεται όταν ενώνεται με τα γονίδια J, τα οποία βρίσκονται κοντά στα γονίδια C.

Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων που παράγουν αντισώματα, ένα γονίδιο V συνδέεται με ένα γονίδιο J, μια διαδικασία που ονομάζεται ανασυνδυασμός VJ.

Το μάτισμα RNA αποδίδει ένα mRNA για την πλήρη αλυσίδα L.





# Σύνοψη

Η αντιγραφή προχωρεί μεσω πολυμερισμού dNTP και ενος εκμαγείου

Η εκτύλιξη και η υπερσυσπείρωση του DNA ελέγχονται απο τοποισομεράσες

Η αντιγραφή είναι συντονισμένη διαδικασία

Βλάβες του DNA μπορούν να επιδιορθωθούν

Ο ανασυνδυασμός του DNA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο