



Κυτταρική Βιολογία

Ενότητα **04** : Αντιγραφή της γενετικής πληροφορίας και επιδιόρθωση λαθών

Παναγιωτίδης Χρήστος
Τμήμα Φαρμακευτικής ΑΠΘ



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.





Αντιγραφή της γενετικής πληροφορίας και επιδιόρθωση λαθών



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

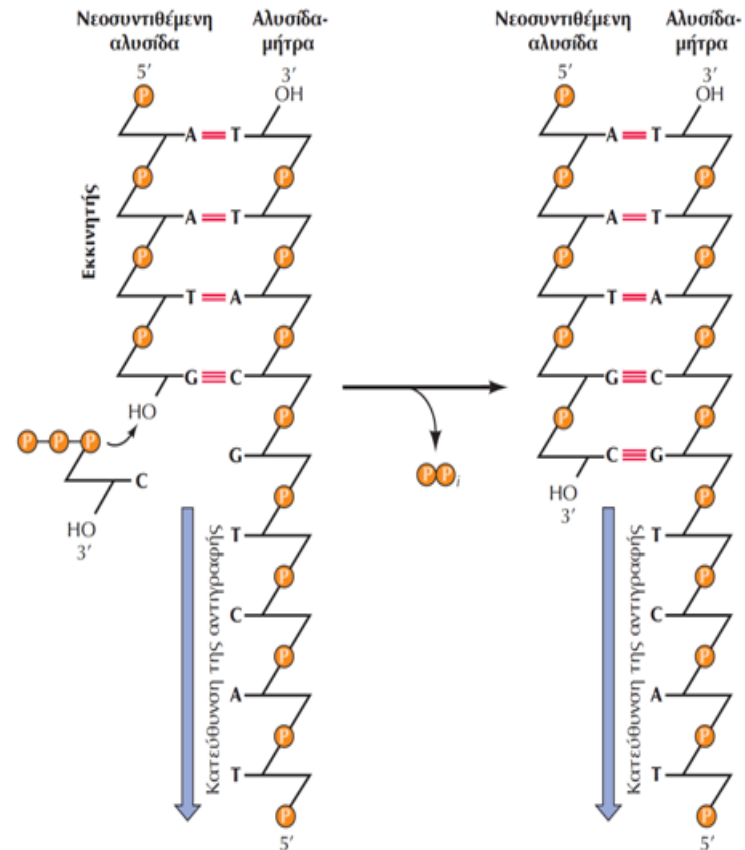
Σκοποί ενότητας

- Να περιγραφεί η διαδικασία αντιγραφής του DNA.
- Να κατανοηθεί ο τρόπος επιδιόρθωσης των λαθών.
- Να περιγραφεί το πρόβλημα της αντιγραφής στα άκρα.



Ο μηχανισμός αντιγραφής (1)

- Ο μηχανισμός αντιγραφής του DNA βασίζεται στη συμπληρωματικότητα των βάσεων, δηλαδή στο επιλεκτικό ζευγάρωμά τους.
- Στην αντιγραφή οι δύο αλυσίδες διαχωρίζονται.
- Ειδικά ένζυμα χρησιμοποιούν την κάθε μία από τις δύο αλυσίδες ως εκμαγείο ώστε να συνθέσουν τις νέες αλυσίδες.



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

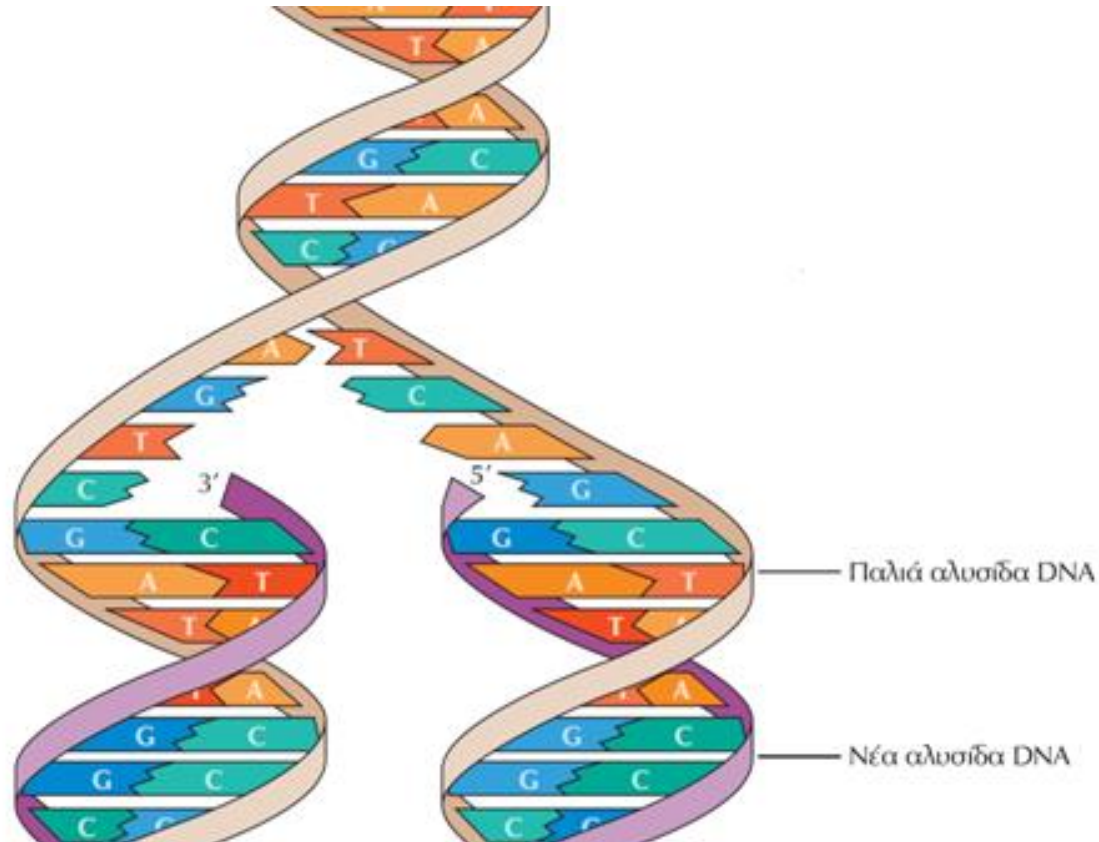


Ο μηχανισμός αντιγραφής (2)

- Το «ξετύλιγμα» τις διπλής έλικας του DNA είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αντιγραφή του.



Ο μηχανισμός της αντιγραφής είναι ημισυντηρητικός

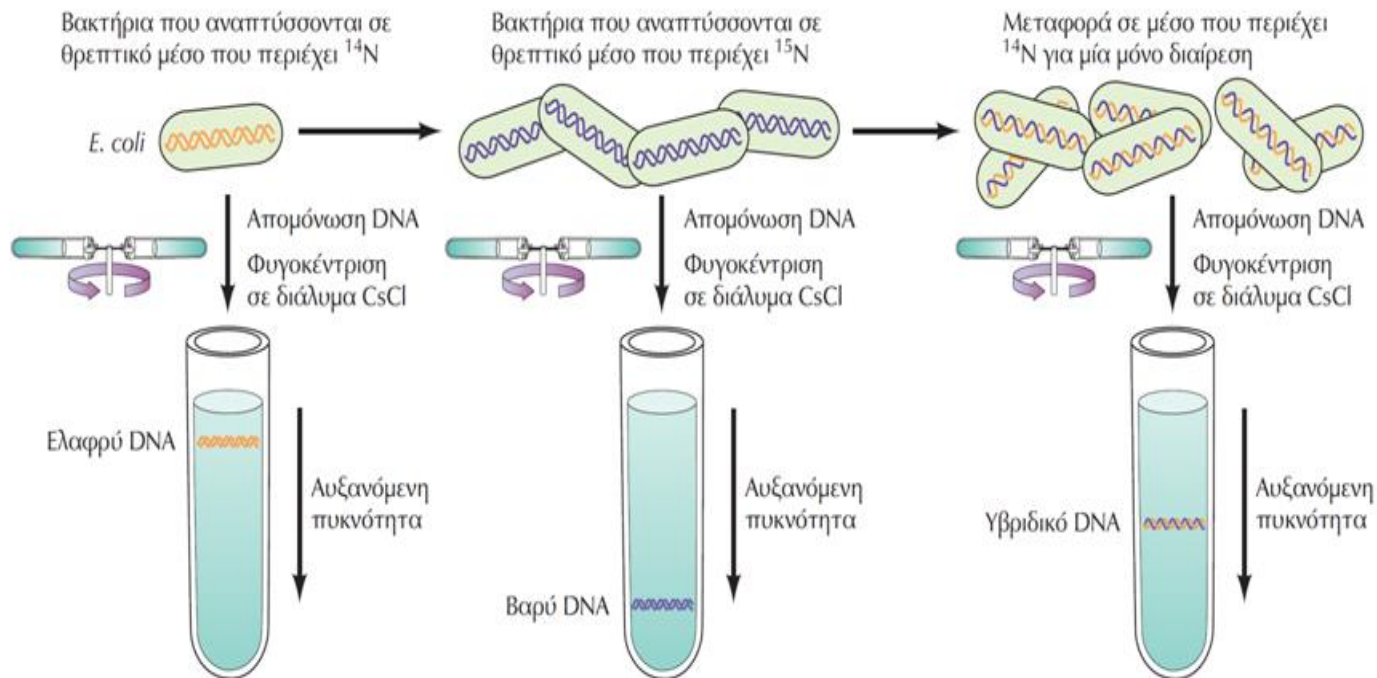


Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση



Πειραματική απόδειξη του ημισυντηρητικού μηχανισμού αντιγραφής



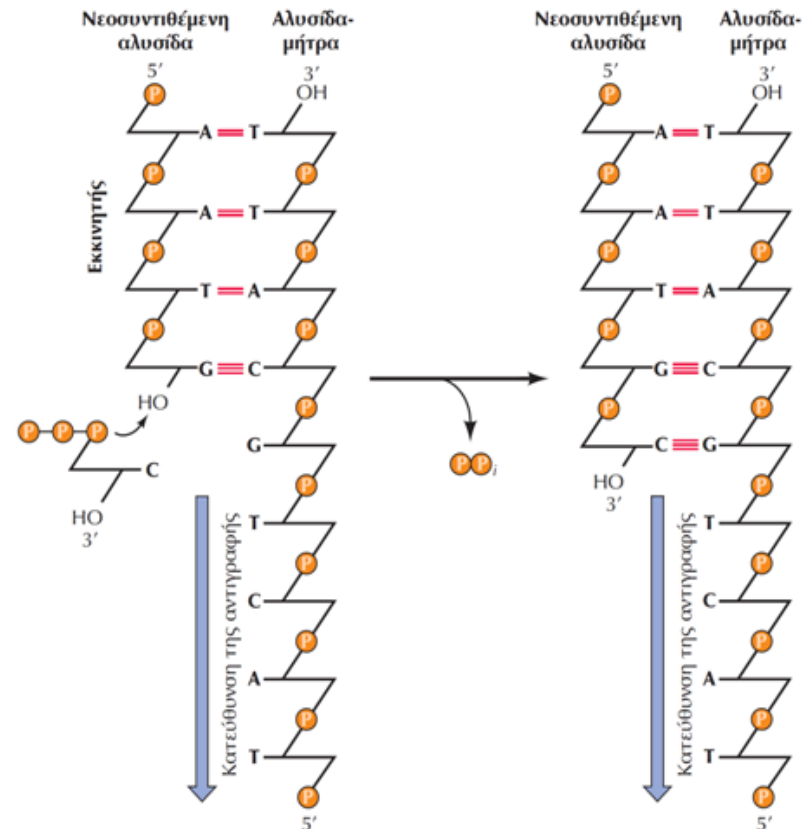
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το κύτταρο-Μια Μοριακή Προσέγγιση



Η σύνθεση του DNA

- Η σύνθεση των νουκλειϊκών οξέων προχωρά στην κατεύθυνση 5' → 3'.
- Στο άκρο της αναπτυσσόμενης αλυσίδας υπάρχει ένα ελεύθερο 3' -OH.
- Το εισερχόμενο νουκλεοτίδιο είναι τριφωσφορικό.
- Με την ενσωμάτωση του νουκλεοτιδίου στην αλυσίδα απελευθερώνεται μία πυροφωσφορική ομάδα.



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

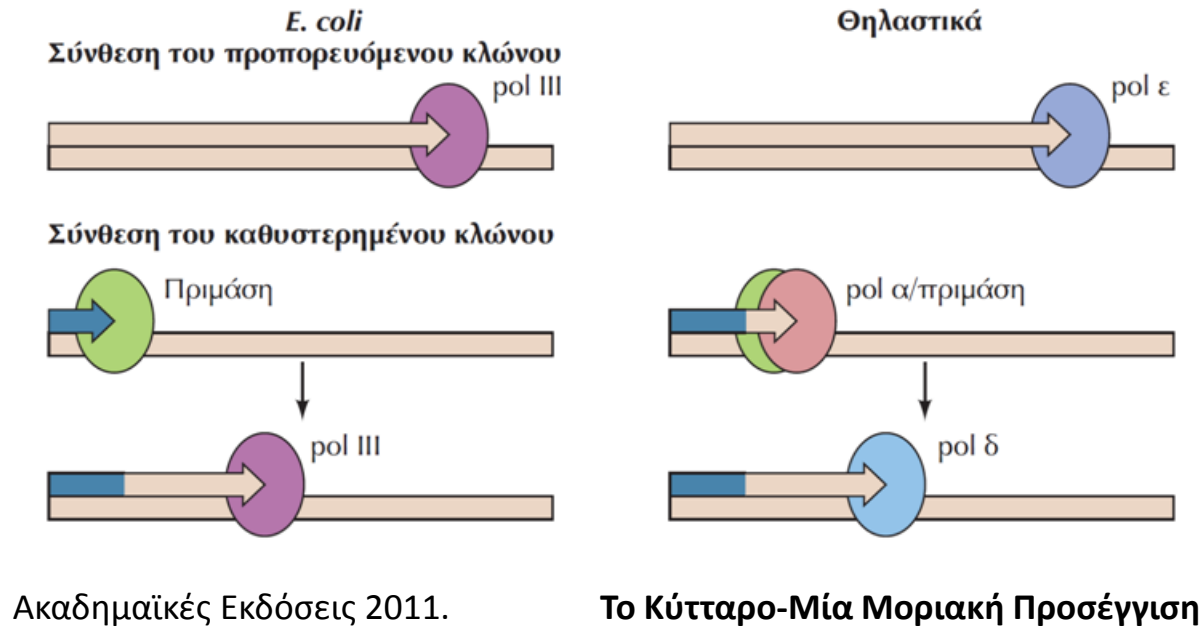


Η αντιγραφή του DNA είναι μία ενζυμική διαδικασία

- Ποια ένζυμα εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA;



Οι DNA-πολυμεράσες είναι τα ένζυμα που βιοσυνθέτουν το DNA



- Ρόλοι των DNA-πολυμερασών στην *E. coli* και σε κύτταρα θηλαστικών

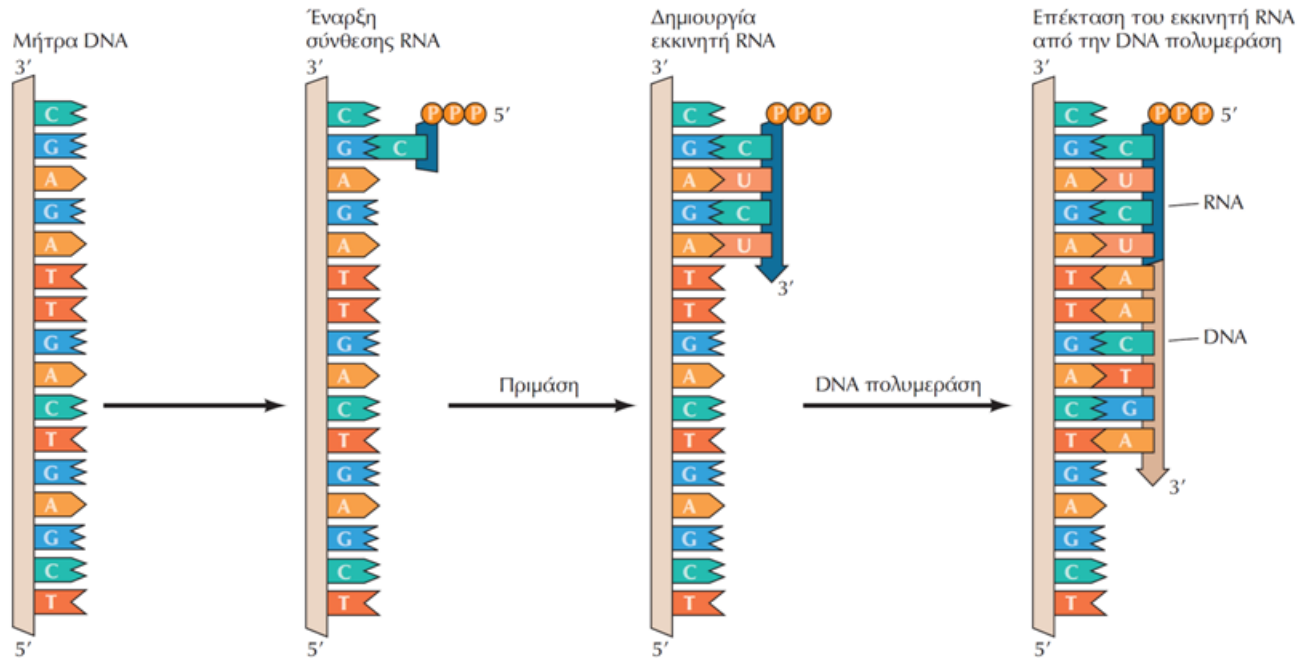


Ποιά από τις τρεις DNA-πολυμεράσες της *E. coli* αντιγράφει το DNA;

- Με βιοχημικά πειράματα απομονώθηκαν τουλάχιστον τρεις DNA πολυμεράσες από κύτταρα *E. coli*.
- Με γενετικά πειράματα δείχθηκε ότι οι DNA πολυμεράσες 1 & 2 δεν είναι απαραίτητες για τη ζωή του κυττάρου, αντίθετα με την DNA πολυμεράση 3, απουσία της οποίας τα κύτταρα πεθαίνουν.
- Οι DNA-πολυμεράσες 1 & 2 δεν μπορούν να αναπληρώσουν το κενό που δημιουργείται από απώλεια της λειτουργικότητας της DNA πολυμεράσης 3.



Η DNA-πολυμεράση δεν μπορεί να ξεκινήσει την αντιγραφή μόνη της



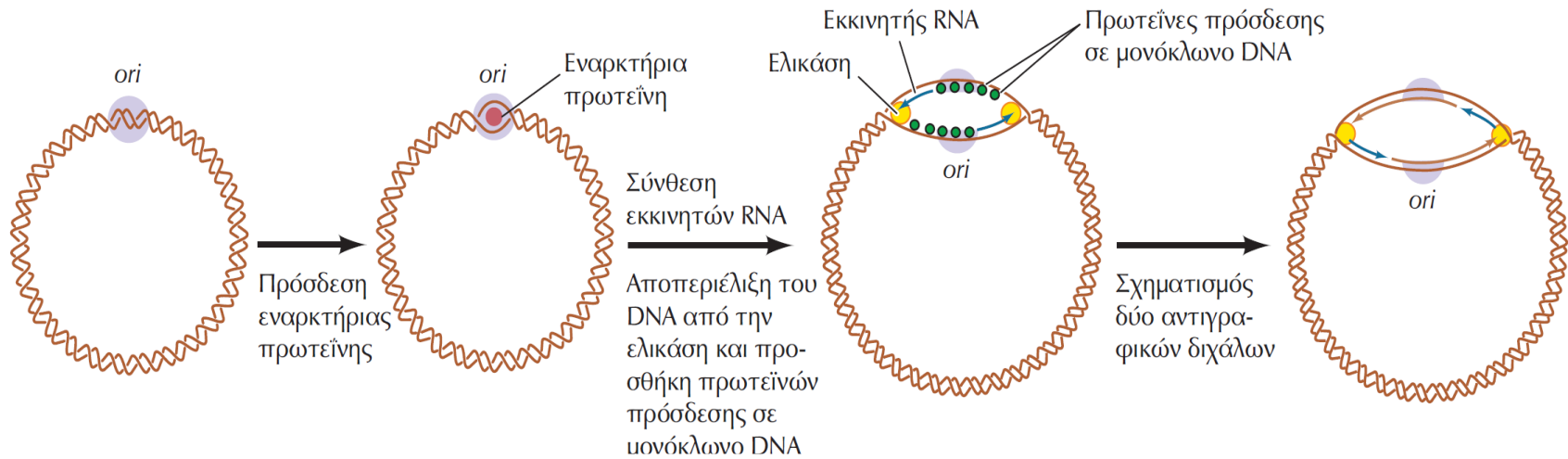
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Βραχέα τμήματα RNA λειτουργούν ως εκκινήτες που μπορούν να επιμηκυνθούν από την DNA πολυμεράση.



Η αντιγραφή ξεκινά πάντα σε συγκεκριμένες αλληλουχίες έναρξης (1)

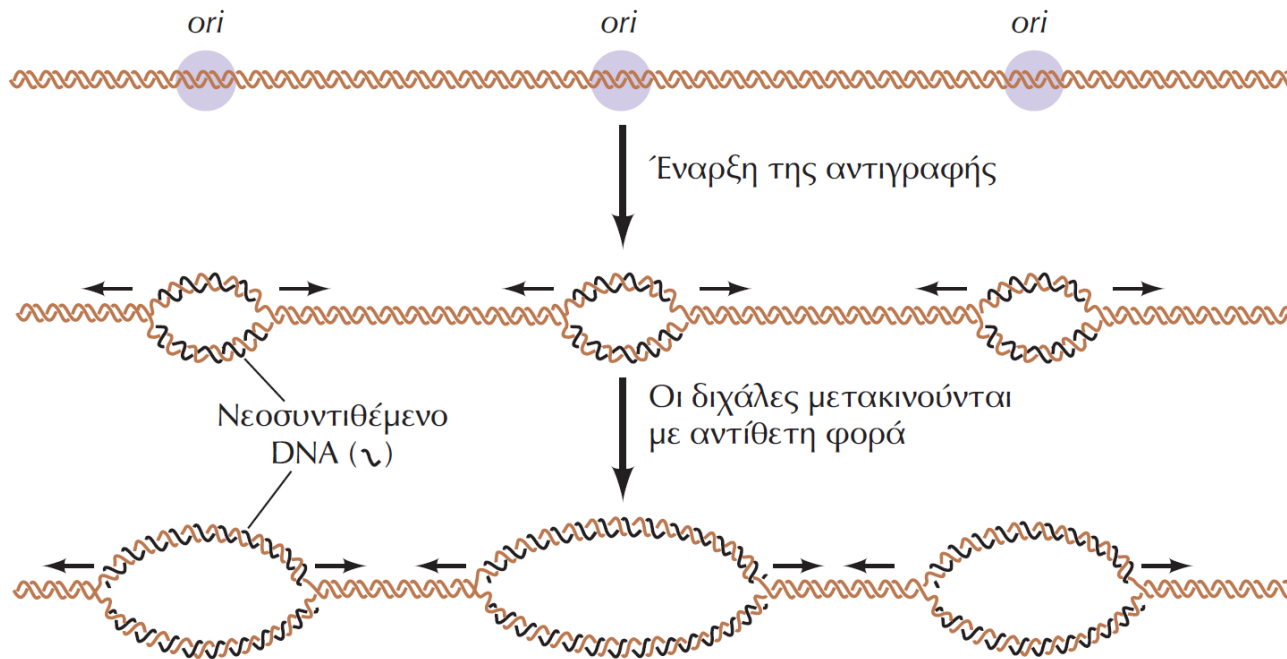


Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Προκαρυωτική αντιγραφή στην *E. coli*.

Η αντιγραφή ξεκινά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες έναρξης (2)



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Θέσεις έναρξης αντιγραφής σε ευκαρυωτικά χρωμοσώματα.

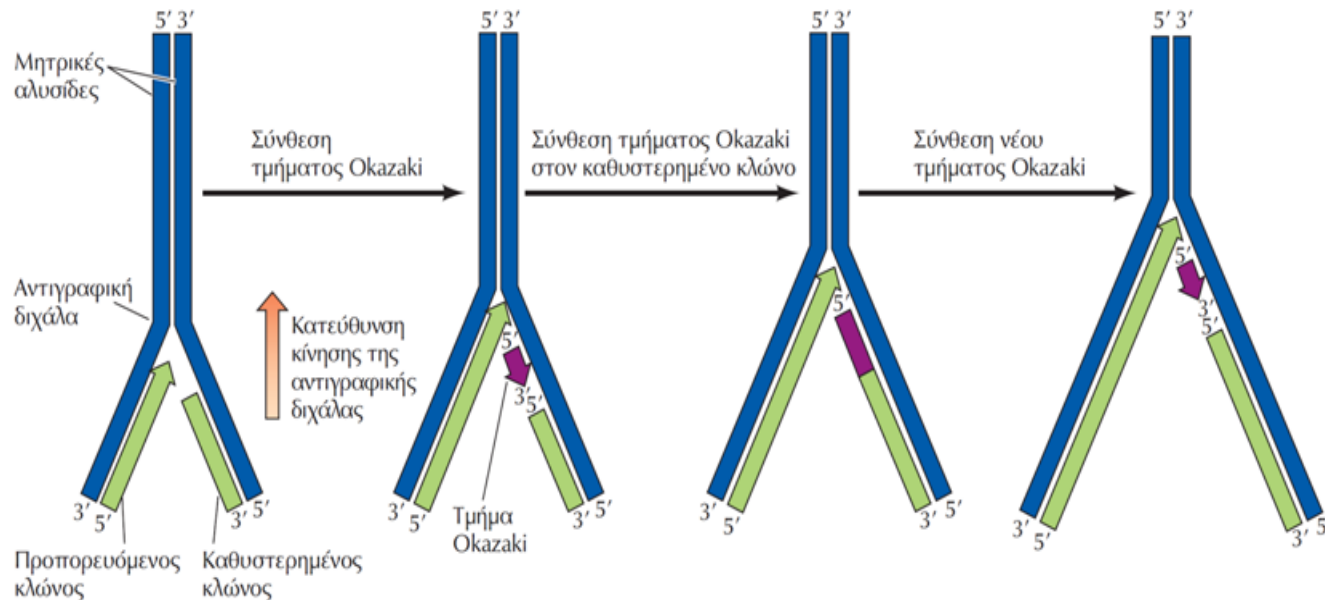


Πολλαπλές διχάλες στην αντιγραφή του ευκαρυωτικού DNA

- Στην αντιγραφή του ευκαρυωτικού DNA δημιουργούνται πολλαπλές διχάλες αντιγραφής που κινούνται προς αντίθετες κατευθύνσεις.



Οι αλυσίδες του DNA αντιγράφονται με διαφορετικούς μηχανισμούς



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Ο προπορευόμενος κλώνος συντίθεται συνεχόμενα προς τη φορά της κίνησης της αντιγραφικής διχάλας.
- Ο καθυστερημένος κλώνος συντίθεται τμηματικά, σε βραχέα τμήματα (τα τμήματα Okazaki) που η επιμήκυσή τους πραγματοποιείται με αντίθετη φορά σε σχέση με αυτήν προς την οποία κινείται η αντιγραφική διχάλα.
- Τα τμήματα Okazaki συνενώνονται μεταξύ τους με τη δράση της DNA λιγάσης.

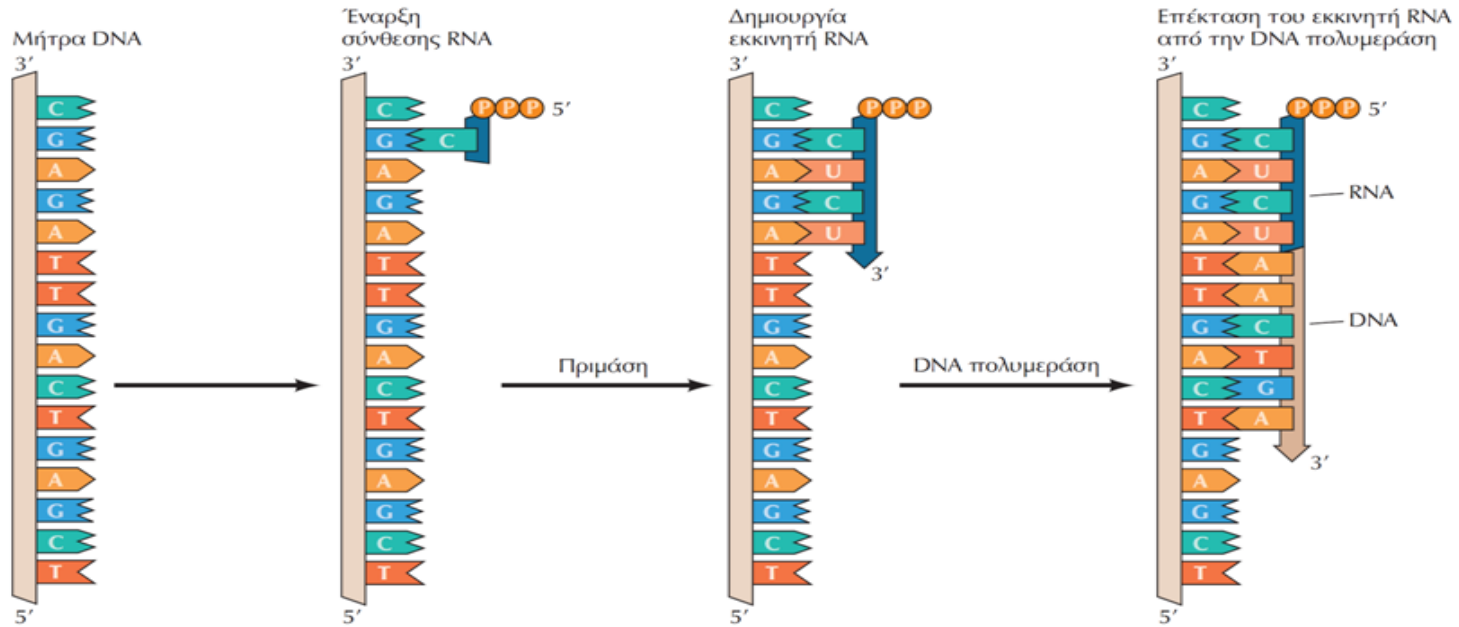


Χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA

- Οι διχάλες αντιγραφής είναι ασύμμετρες.
- Η σύνθεση του προπορευόμενου κλώνου είναι συνεχής ενώ του καθυστερημένου ασυνεχής.
- Οι DNA-πολυμεράσες του προπορευόμενου και του καθυστερημένου κλώνου κινούνται προς αντίθετες κατευθύνσεις.



Τα κλάσματα Okazaki στην αντιγραφή (1)



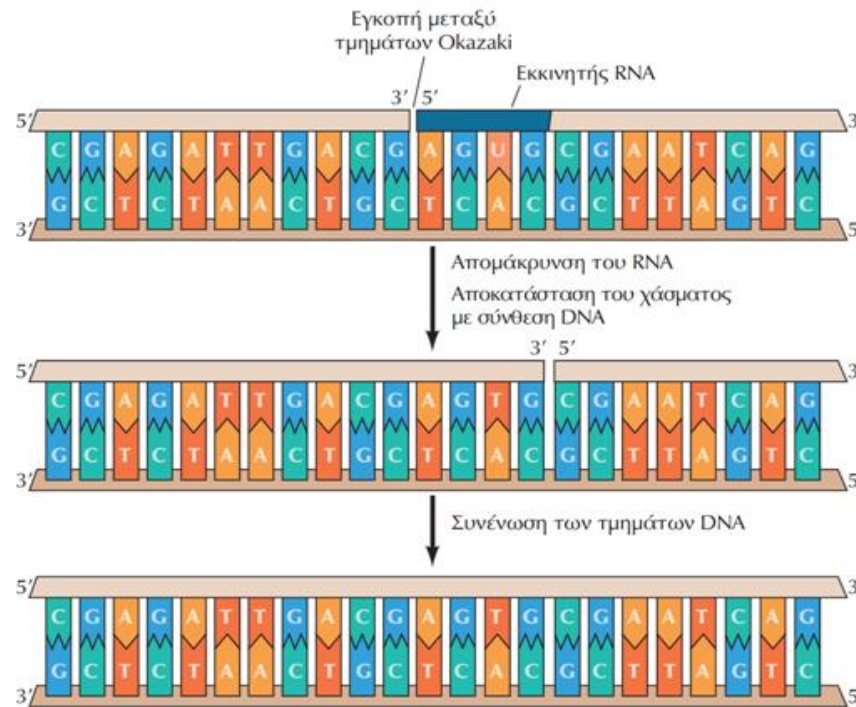
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Η πριμάση συνθέτει έναν εκκινητή RNA.
- Η DNA- πολυμεράση III επεκτείνει τον εκκινητή συνθέτοντας ένα τμήμα Okazaki.



Τα κλάσματα Okazaki στην αντιγραφή (2)



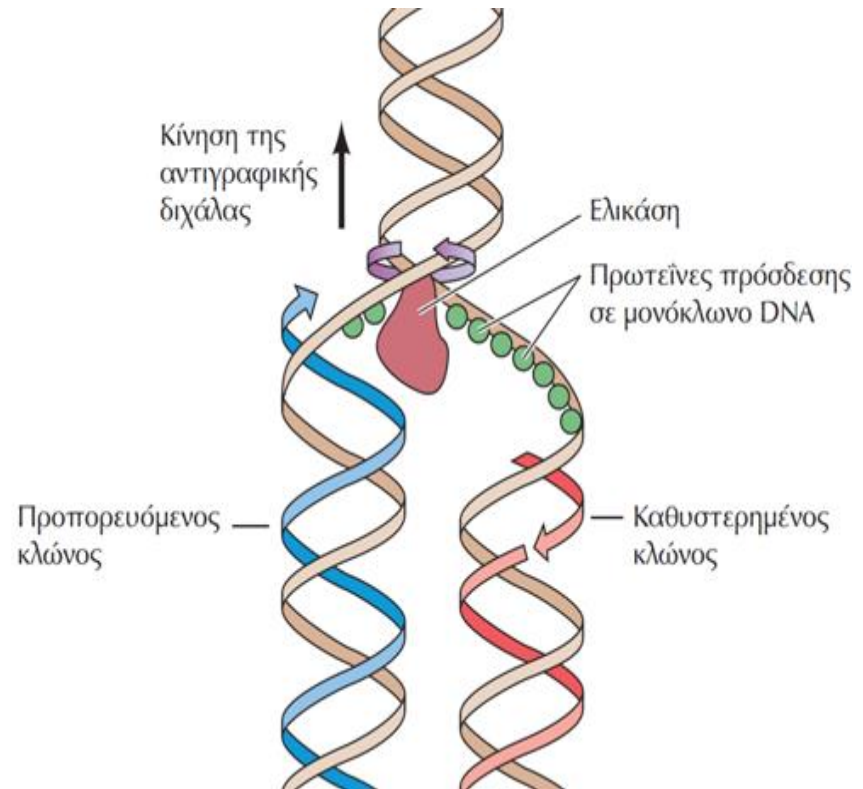
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Οι εκκινητές RNA απομακρύνονται και η DNA πολυμεράση συμπληρώνει με δεοξυριβονουκλεοτίδια τα χάσματα μεταξύ των τμημάτων Okazaki.
- Τα τμήματα DNA που δημιουργούνται συνενώνονται στη συνέχεια από την DNA λιγάση.

Η DNA-ελικάση «ξετυλίγει» τις δύο αλυσίδες του DNA

- Μία εξαμερής ελικάση διατρέχει τη μία αλυσίδα του DNA.
- Όταν η ελικάση προσδένεται στο δίκλωνο DNA, η διαμόρφωση της αλλάζει, και υδρολύει ATP, για να διαχωρίσει τις δύο αλυσίδες.
- Μετά το διαχωρισμό, υιοθετεί πάλι τη διαμόρφωση που έχει όταν είναι προσδεμένη σε μονόκλωνο DNA.

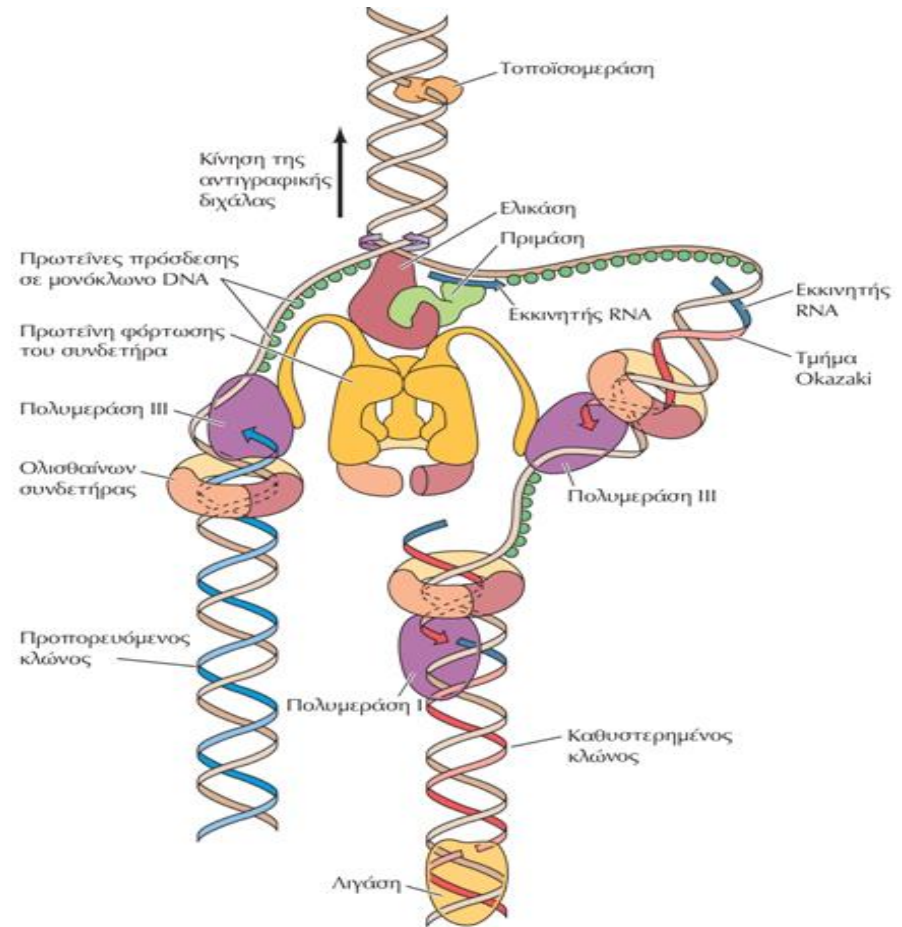


Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση



Η οργάνωση των ενζύμων της αντιγραφικής διχάλας

- Η ελικάση της αντιγραφικής διχάλας συνδέεται και με τις δύο μονάδες κατάλυσης της DNA πολυμεράσης, καθεμία από τις οποίες συγκρατείται στο DNA από έναν ολισθαίνοντα σφιγκτήρα. Η πολυμεράση που συνθέτει την προπορευόμενη αλυσίδα μετακινείται συνεχώς. Η πολυμεράση που συνθέτει την καθυστερημένη αλυσίδα αποσυνδέεται στο τέλος κάθε τμήματος Okazaki και επανασυνδέεται με τον επόμενο εκκινητή στο βρόχο της μονόκλωνης αλυσίδας-μήτρας για να συνθέσει το επόμενο τμήμα.

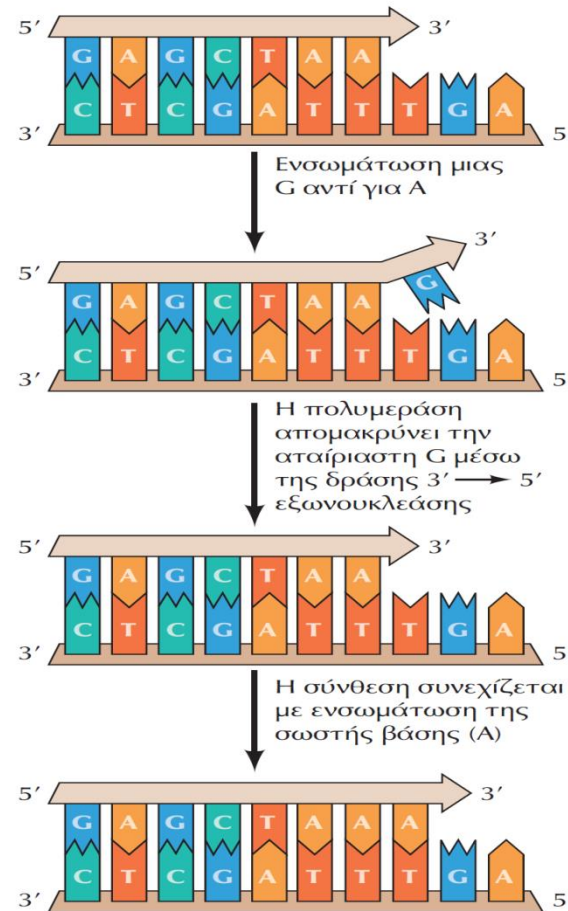


Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση



Η DNA-πολυμεράση επιδιορθώνει τα λάθη της

- Μετά την ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, το ζευγάρι μεταξύ των βάσεων του τελευταίου ζεύγους εξετάζεται από τη βακτηριακή DNA πολυμεράση. Σε περίπτωση λάθους, το νουκλεοτίδιο αφαιρείται από τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα.
- Επομένως, η DNA-πολυμεράση έχει και ενεργότητα $3' \rightarrow 5'$ εξωνουκλεάσης.



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

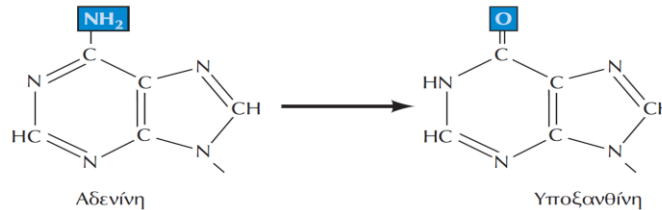
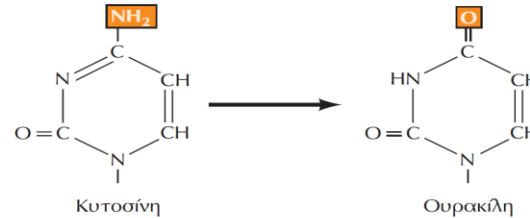
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση



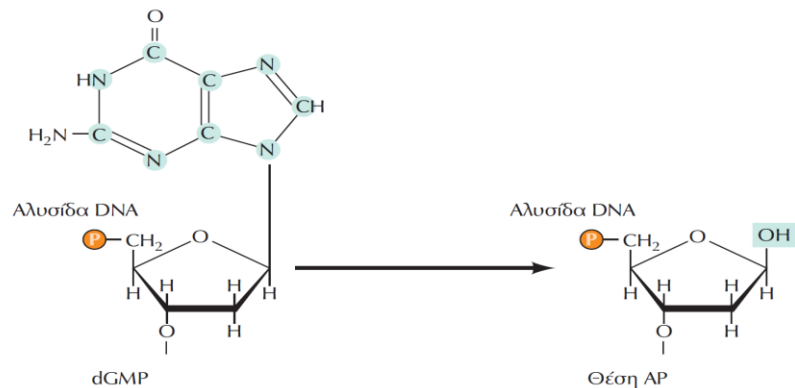
Βλάβες του DNA (1)

- Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι αυθόρμητων βλαβών του DNA: (A) η απαμίνωση της αδενίνης, της κυτοσίνης και της γουανίνης και (B) η αποπουρίνωση (απομάκρυνση πουρινών) λόγω της διάσπασης του δεσμού μεταξύ μιας πουρίνης και της δεοξυριβόζης, οπότε προκύπτει στο DNA μια απουρινική θέση (AP, Apurinic).
- dGMP = μονοφωσφορική δεοξυγουανοσίνη (deoxyguanosine Monophosphate).

(A) Απαμίνωση



(B) Αποπουρίνωση

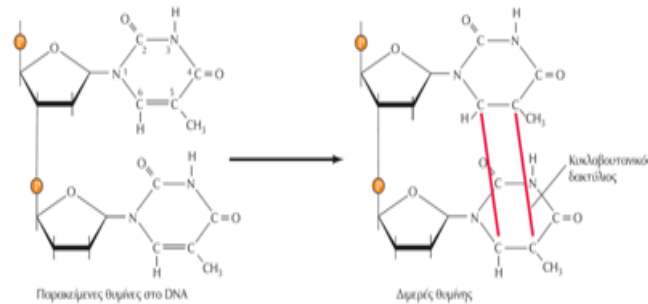


Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση



Βλάβες του DNA (2)



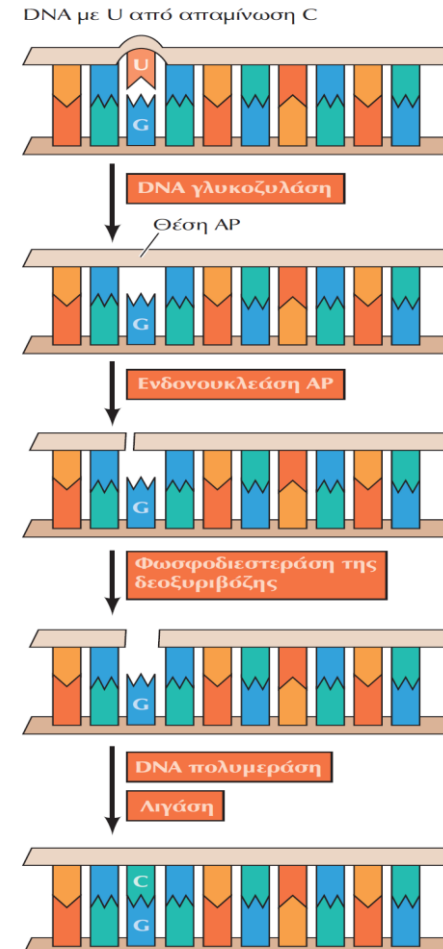
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Το υπεριώδες φως επάγει τον σχηματισμό διμερών πυριμιδίνης στα οποία δύο παρακείμενες πυριμιδίνες (π.χ. θυμίνες) συνδέονται με έναν κυκλοβουτανικό δακτύλιο.



Τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA

- Η επιδιόρθωση εκτομής αφαιρεί άμεσα την περιοχή που έχει υποστεί βλάβη και την αντικαθιστά με ένα νέο τμήμα DNA.



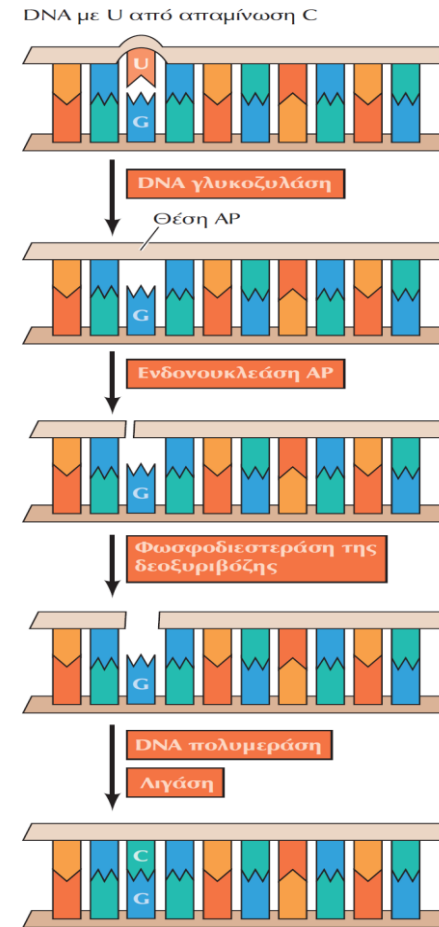
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση



Τα στάδια της επιδιόρθωσης εκτομής

- Η μεταλλαγμένη βάση δεν ζευγαρώνει σωστά ή/και παραμορφώνει τη δομή της διπλής έλικας.
- Μία ενδονουκλεάση εισάγει εγκοπές εκατέρωθεν της βλάβης.
- Μία εξωνουκλεάση απομακρύνει το τμήμα του DNA που βρίσκεται μεταξύ των εγκοπών.
- Μία πολυμεράση καλύπτει το χάσμα με σύνθεση νέου DNA.
- Η λιγάση συγκολλά τις εγκοπές.



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

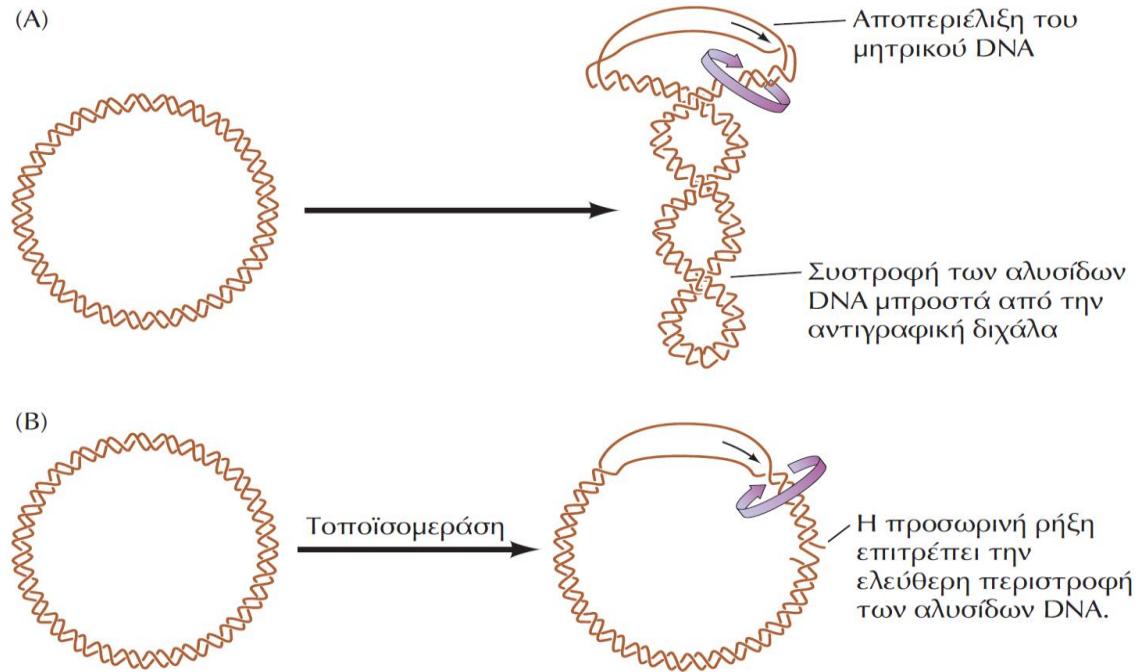


Το DNA είναι υπερελικωμένο

- Το κυκλικό DNA μπορεί να είναι υπερελικωμένο.
- Το γραμμικό DNA είναι απλωμένο.
- Το κυκλικό DNA παραμένει απλωμένο αν είναι χαλαρό (μη υπερελικωμένο), αλλά αποκτά περιστραμμένη και συμπυκνωμένη μορφή αν είναι υπερελικωμένο.



Ο ρόλος των τοποϊσομερασών στην αντιγραφή



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Οι βακτηριακές τοποϊσομεράσες τύπου I αναγνωρίζουν μερικώς αποπεριελιγμένα τμήματα DNA και περνούν τον ένα κλώνο μέσα από ένα ρήγμα που έχει γίνει στον άλλο κλώνο.

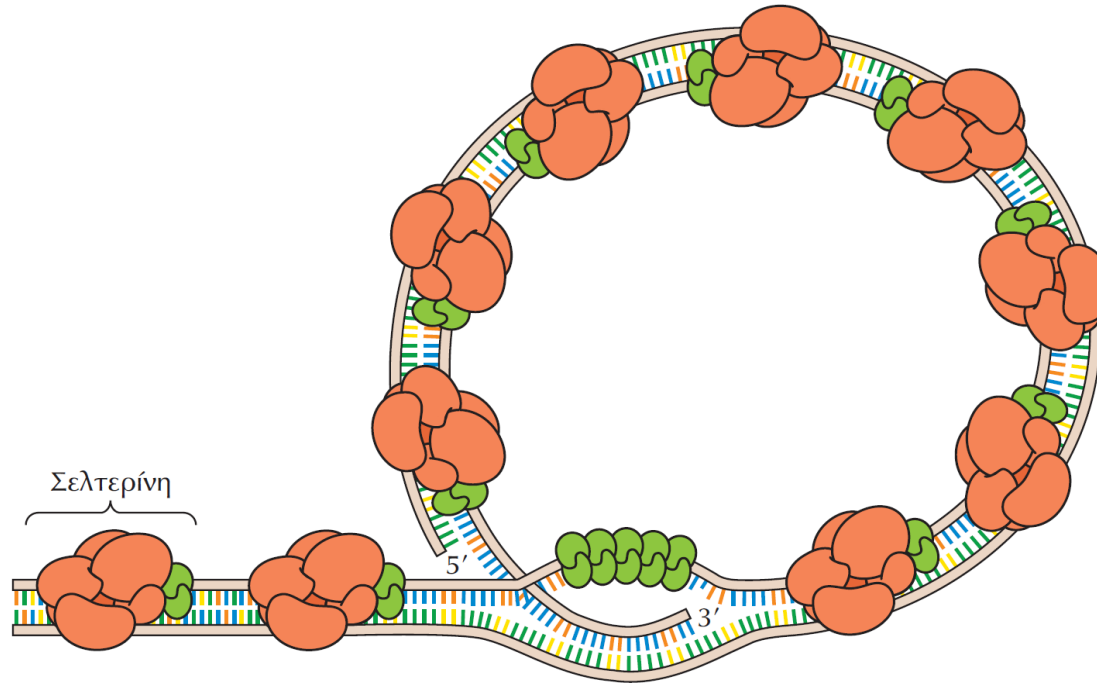


Φαρμακολογικές χρήσεις των αναστολέων των τοποϊσομερασών

- **Αντιβακτηριακά:** Κινολόνες (Ναλιδιξικό οξύ, σιπροφλοξασίνη, ενοξασίνη, λεβοφλοξασίνη, νορφλοξασίνη κλπ).
- **Αντινεοπλασματικά:** Ετοποσίδη, ιρινοτεκάνη, τοποτεκάνη κλπ.



Τελομερίδια



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- **Δομή των Τελομεριδίων.** Το DNA των τελομεριδίων αναδιπλώνεται, σχηματίζει μια κυκλική δομή βρόχου και συνδέεται με ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο (σελτερίνη), προστατεύοντας τα άκρα των χρωμοσωμάτων.



Η διατήρηση του μήκους των τελομεριδίων

- Η διατήρηση του μήκους των τελομεριδίων είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ζωής.
- Η μετάλλαξη της τελομεράσης προκαλεί τη βράχυνση των τελομερών από τον ένα κυτταρικό κύκλο στον άλλο.
- Τελικά, η ολοκληρωτική απώλεια του τελομερούς προκαλεί χρωμοσωμικές ρήξεις και επαναδιατάξεις.

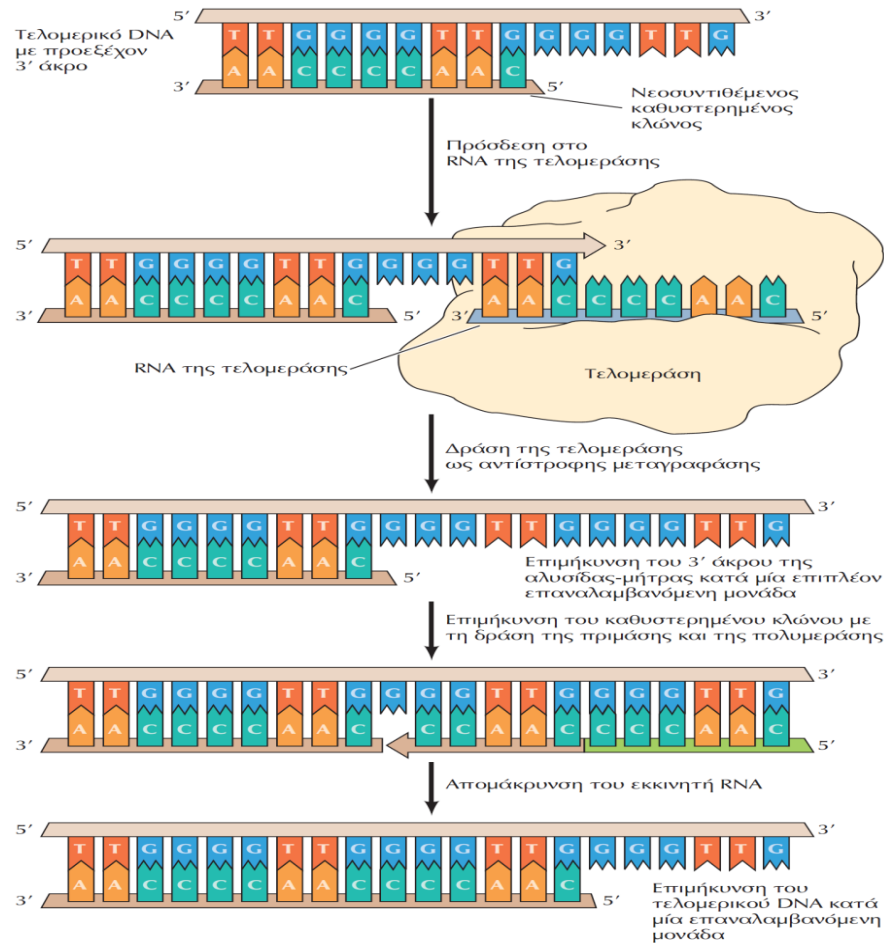


Η δράση της τελομεράσης (1)

- Το τελομερικό DNA είναι μια απλή επαναλαμβανόμενη αλληλουχία με ένα προεξέχον 3' άκρο. Η τελομεράση, ως τμήμα του ενζυμικού συμπλόκου, φέρει ένα μόριο RNA το οποίο είναι συμπληρωματικό με το τελομερικό DNA. Το προεξέχον άκρο του τελομερικού DNA προσδένεται στο RNA της τελομεράσης, το οποίο στη συνέχεια λειτουργεί ως μήτρα για την επιμήκυνση της αλυσίδας-μήτρας κατά μία επαναλαμβανόμενη μονάδα. Ο καθυστερημένος κλώνος του τελομερικού DNA μπορεί στη συνέχεια να επιμηκυνθεί με τη χρήση συμβατικών εκκινητών RNA και τη δράση της DNA πολυμεράσης.



Η δράση της τελομεράσης (2)



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση





Τέλος ενότητας

Επεξεργασία: Τσαχουρίδου Βαϊλική
Θεσσαλονίκη, Εαρινό Εξάμηνο 2013-2014



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ