

Αντιγραφή

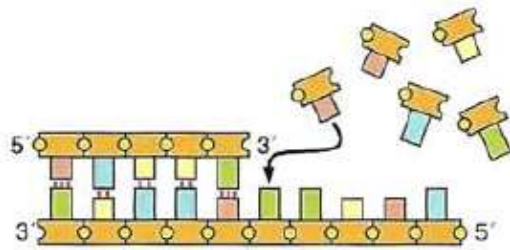
Δρ. Γκατζίδου Ελισάβετ

Μέλος Ε.ΔΙ.Π.

Εργαστήριο Βιολογίας
Τμήμα Ιατρικής ΔΠΘ

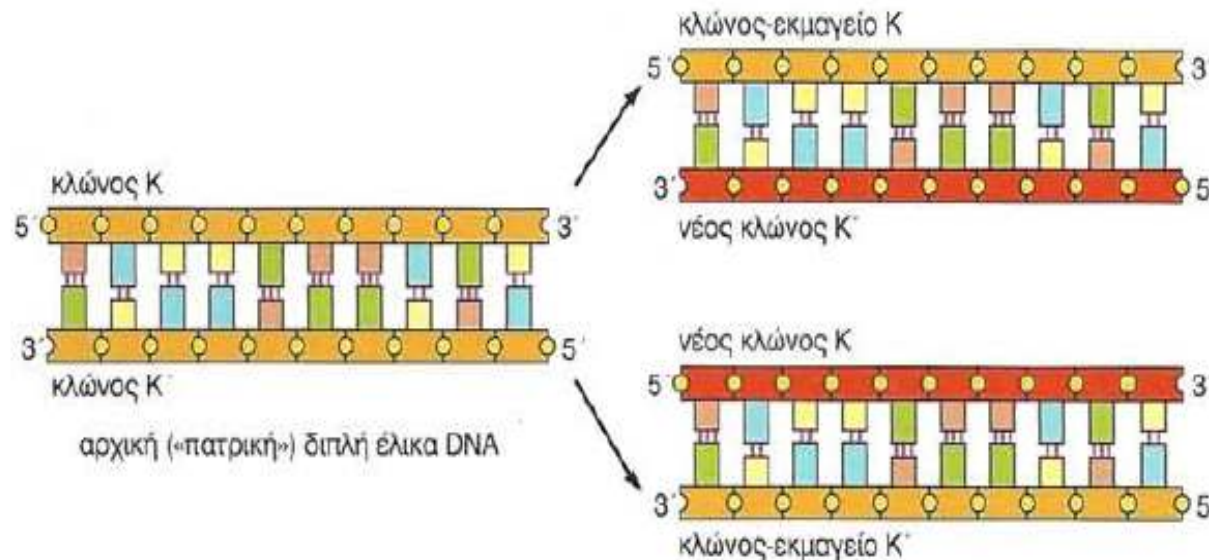
Αντιγραφή DNA

- ▶ Ημισυντηρητικός τρόπος αντιγραφής
- ▶ Η αντιγραφή διεκπαιρεύεται με πιστότητα και ταχύτητα.
- ▶ Πραγματοποιείται από ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών, οι οποίες συλλογικά σχηματίζουν ένα είδος «**αντιγραφικής μηχανής**»
- ▶ Παράγει δύο πλήρεις διπλές έλικες από το αυθεντικό μόριο του DNA.



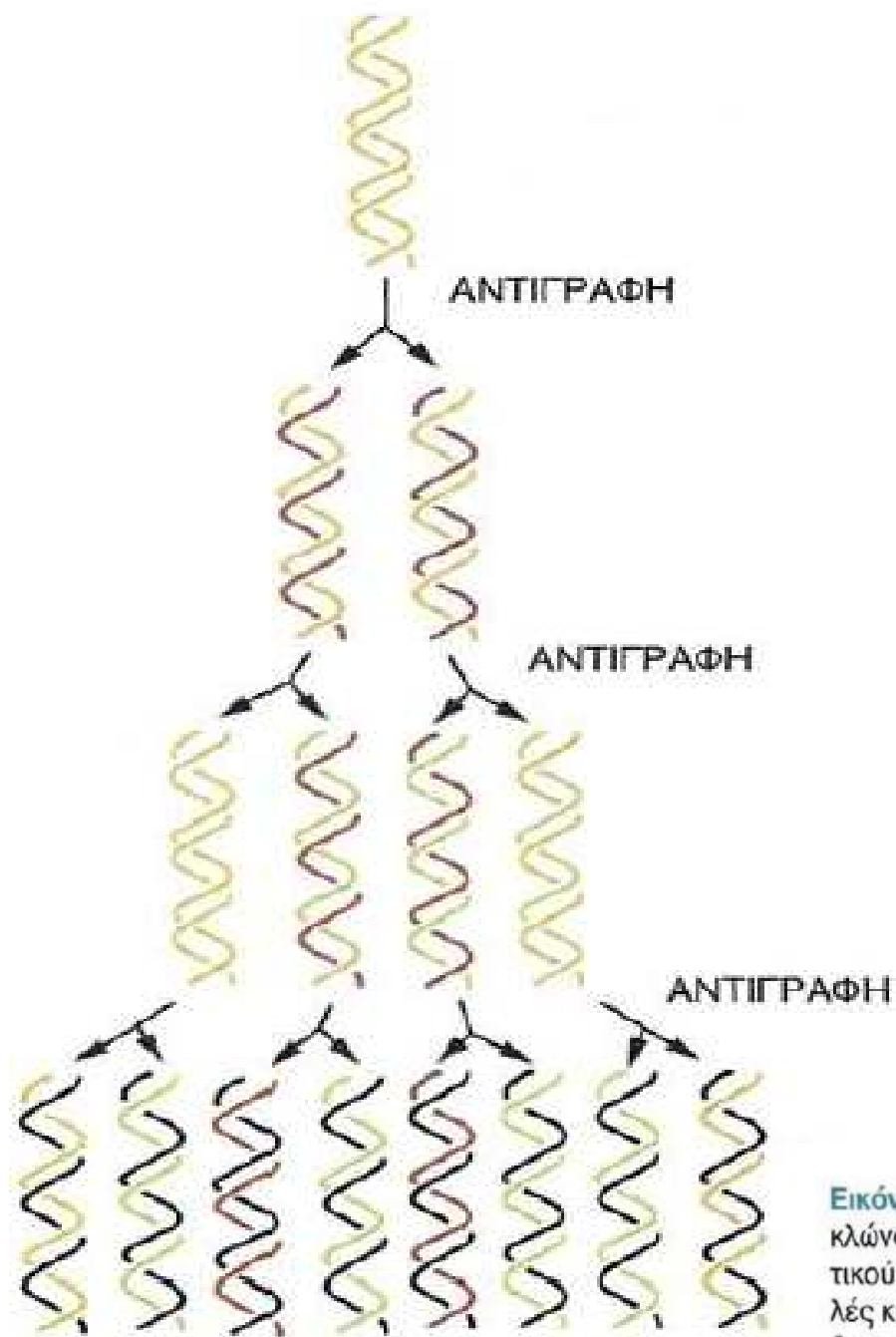
Εικόνα 6-2. Ένας κλώνος DNA ως εκμαγείο. Επιλεκτική σύνδεση κατά προτίμηση συμβαίνει ανάμεσα σε νουκλεοτίδια ικανά να σχηματίζουν ζεύγη βάσεων (Α με Τ, και G με C). Αυτό επιτρέπει στον κάθε κλώνο να δρα ως εκμαγείο για τον σχηματισμό του συμπληρωματικού του κλώνου.

Η αντιγραφή του DNA διευκολύνεται από το ζευγάρωμα των βάσεων.



Εικόνα 6-3. Το DNA δρα ως εκμαγείο για τον διπλασιασμό του. Καθώς το νουκλεοτίδιο Α ζευγαρώνει επιτυχώς μόνο με το Τ και το G μόνο με το C, ο κάθε κλώνος του DNA μπορεί να καθορίσει την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του συμπληρωματικού του κλώνου. Κατ' αυτόν τον τρόπο, το δίκλωνο DNA αντιγράφεται με πιστότητα. Παρά το διαφορετικό χρώμα τους, οι κλώνοι-εκμαγεία (πορτοκαλί) και οι νέοι κλώνοι (κόκκινοι) είναι χημικώς ταυτόσημοι.

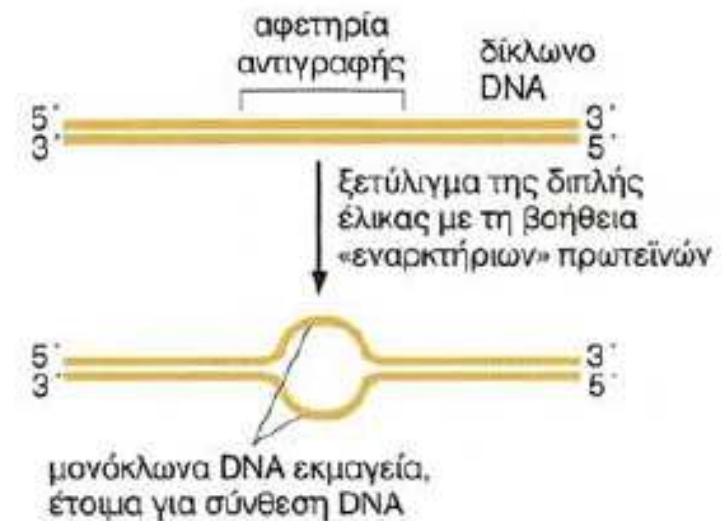
Η αντιγραφή του DNA



Εικόνα 6-4. Η αντιγραφή του DNA. Σε κάθε γύρο αντιγραφής, ο καθένας από τους δύο κλώνους του DNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για το σχηματισμό ενός συμπληρωματικού κλώνου DNA. Επομένως, οι αρχικοί κλώνοι παραμένουν ανέπαφοι μετά από πολλές κυτταρικές διαιρέσεις. Η αντιγραφή του DNA είναι «ημισυντηρητική», επειδή κάθε θυγατρική διπλή έλικα DNA αποτελείται από έναν παλιό (συντηρημένο) και έναν νεοσυντιθέμενο κλώνο.

Σημεία έναρξης της αντιγραφής

- ▶ Η διεργασία αντιγραφής ξεκινά με τη βοήθεια ειδικών εναρκτήριων πρωτεϊνών.
- ▶ Αφετηρίες ή σημεία έναρξης της αντιγραφής
- ▶ Ομάδα πρωτεϊνών που διενεργούν την αντιγραφή



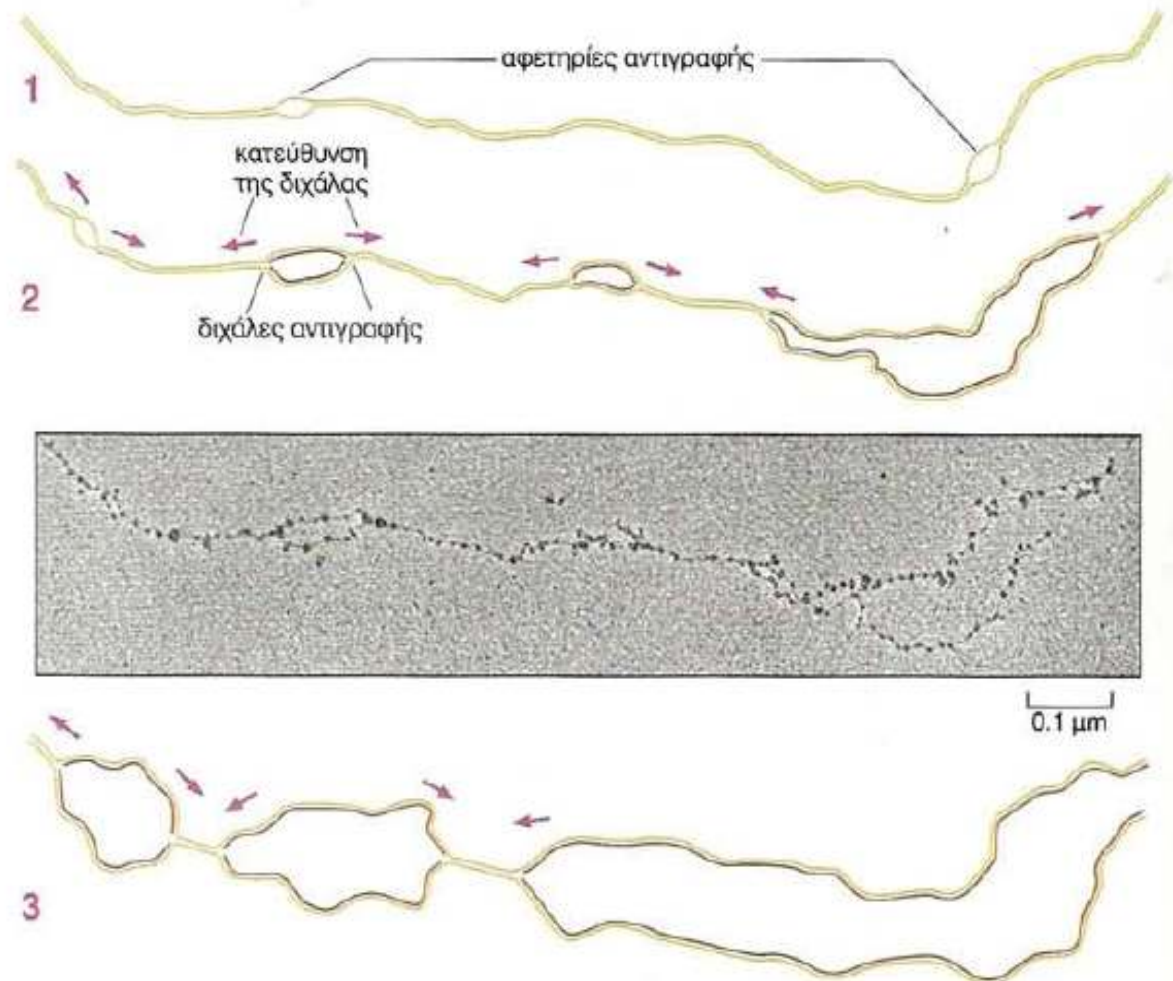
Εικόνα 6-5. Η διάνοιξη της διπλής έλικας του DNA σε μια αφετηρία αντιγραφής. Ειδικές «εναρκτήριες» πρωτεΐνες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA στις αφετηρίες αντιγραφής και τοπικά αποδιατάσσουν τους δύο κλώνους της διπλής έλικας. Οι προκύπτοντες εκτεθειμένοι μονοί κλώνοι μπορεί κατόπιν να λειτουργήσουν ως εκμαγεΐα για την αντιγραφή του DNA.

Η σύνθεση του DNA πραγματοποιείται στις διχάλες αντιγραφής

- ▶ Διχάλες αντιγραφής (replication forks), συνδέσεις σε σχήμα Υ.
- ▶ Η πρωτεϊνική μηχανή μετακινείται κατά μήκος του DNA: ανοίγει τους 2 κλώνους της διπλής έλικας και χρησιμοποιεί τον κάθε κλώνο για τη σύνθεση ενός θυγατρικού κλώνου.
- ▶ Από κάθε αφετηρία αντιγραφής σχηματίζονται 2 διχάλες που απομακρύνονται από την αφετηρία προς αντίθετες κατευθύνσεις και παράλληλα ανοίγουν το DNA.
- ▶ Οι διχάλες μετακινούνται γρήγορα.

Η σύνθεση του DNA πραγματοποιείται στις διχάλες αντιγραφής

Εικόνα 6-9. Στο ευκαρυωτικό χρωμόσωμα, οι διχάλες αντιγραφής μετακινούνται προς αντίθετες κατευθύνσεις ξεκινώντας από πολλαπλές αφετηρίες αντιγραφής. Η ηλεκτρονική μικροφωτογραφία απεικονίζει ένα μόριο DNA ενώ αντιγράφεται σ' ένα πρώιμο έμβρυο μιας μύγας. Τα σωματίδια που είναι ορατά κατά μήκος του DNA ονομάζονται νουκλεοσωμάτια. Είναι δομές των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων στις οποίες το DNA περιέλιξε αρκετές φορές γύρω από έναν «πυρήνα» πρωτεϊνών. Τα σχεδιαγράμματα (1), (2) και (3) αφορούν στο ίδιο τμήμα ενός μορίου DNA και αποδίδουν την πιθανή εμφάνισή του σε διαδοχικά στάδια της αντιγραφής με βάση αποτελέσματα αναλύσεων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Το (2) αποτελεί ένα σχηματικό πρότυπο της ηλεκτρονικής μικροφωτογραφίας. Οι πορτοκαλί γραμμές παριστούν τους παλαιούς («πατρικούς») κλώνους DNA, ενώ οι κόκκινες το νεοσυντιθέμενο DNA. (Η ηλεκτρονική μικροφωτογραφία αναπαράγεται με την άδεια της Victoria Foe).



DNA πολυμεράση

- ▶ Συνθέτει το νέο DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο έναν από τους παλαιούς κλώνους.
- ▶ Καταλύει την προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο ενός επιμηκυνόμενου κλώνου DNA, μέσω του σχηματισμού ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του 3' άκρου και της 5' φωσφορικής ομάδας του εισερχόμενου νουκλεοτιδίου.
- ▶ Η DNA πολυμεράση δεν αποσυνδέεται από το DNA κάθε φορά που προσθέτει ένα νουκλεοτίδιο στην αυξανόμενη αλυσίδα.

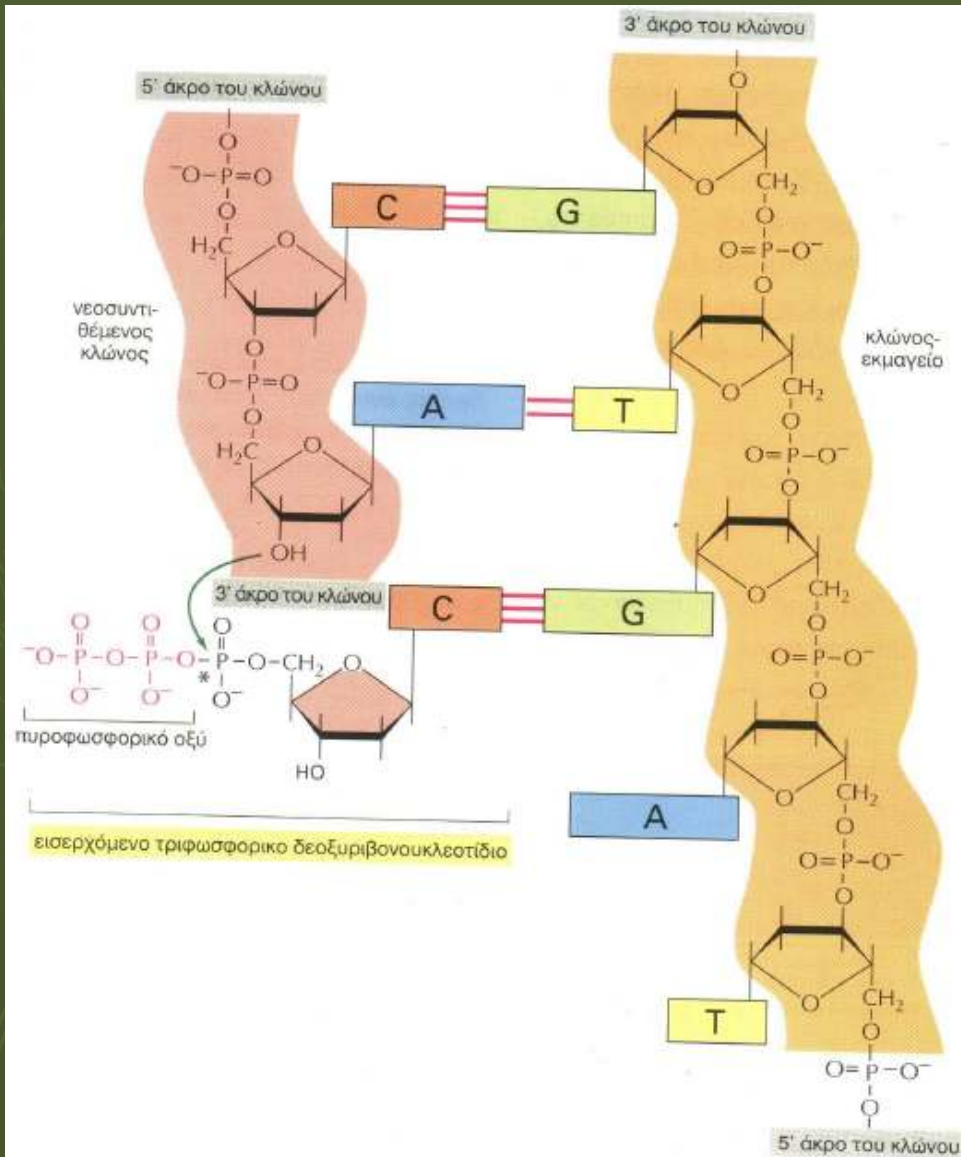
Η πολικότητα των κλώνων του DNA σε μια διχάλα αντιγραφής

- ▶ Η DNA πολυμεράση καταλύει την αύξηση μιας αλυσίδας DNA μόνο προς **μία** κατεύθυνση.
- ▶ Κλάσματα Οκαζάκι
- ▶ Καθυστερημένος κλώνος (lagging strand)
- ▶ Προπορευόμενος κλώνος (leading strand)

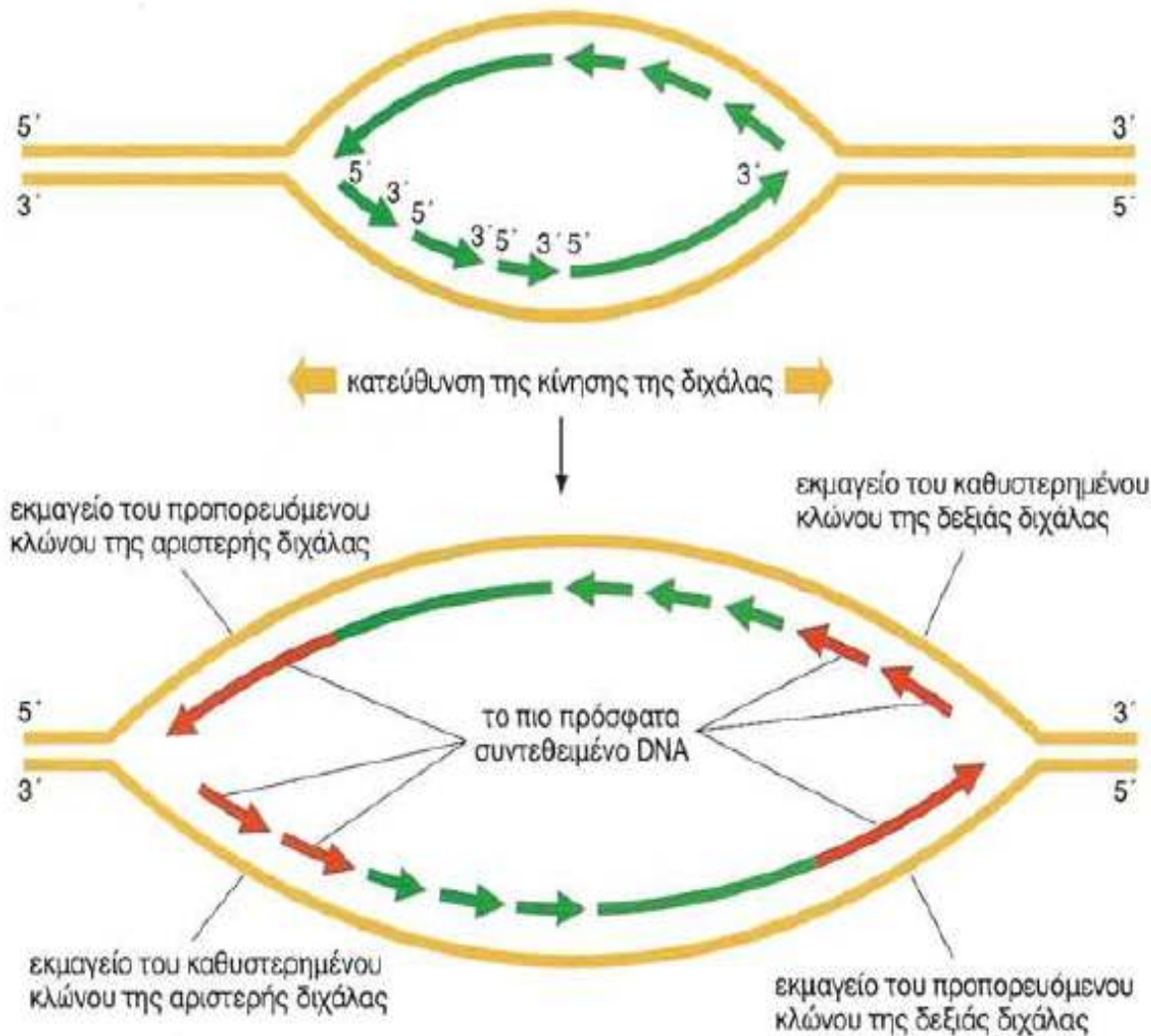


Εικόνα 6-11. Η πολικότητα των κλώνων του DNA σε μια διχάλα αντιγραφής.

Η αντιγραφή του DNA

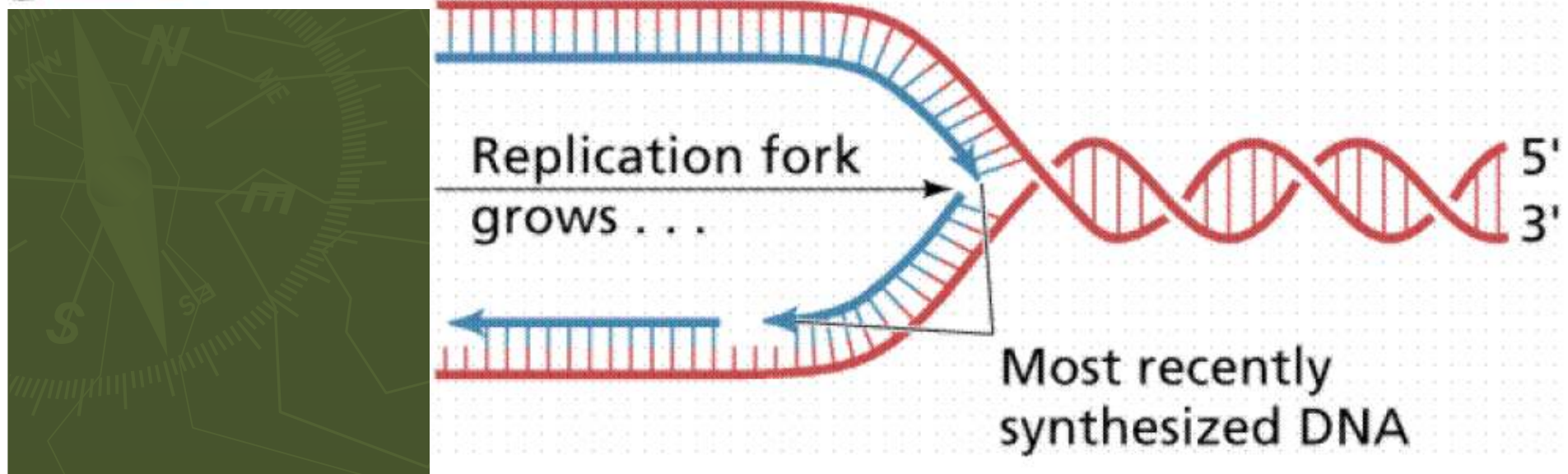
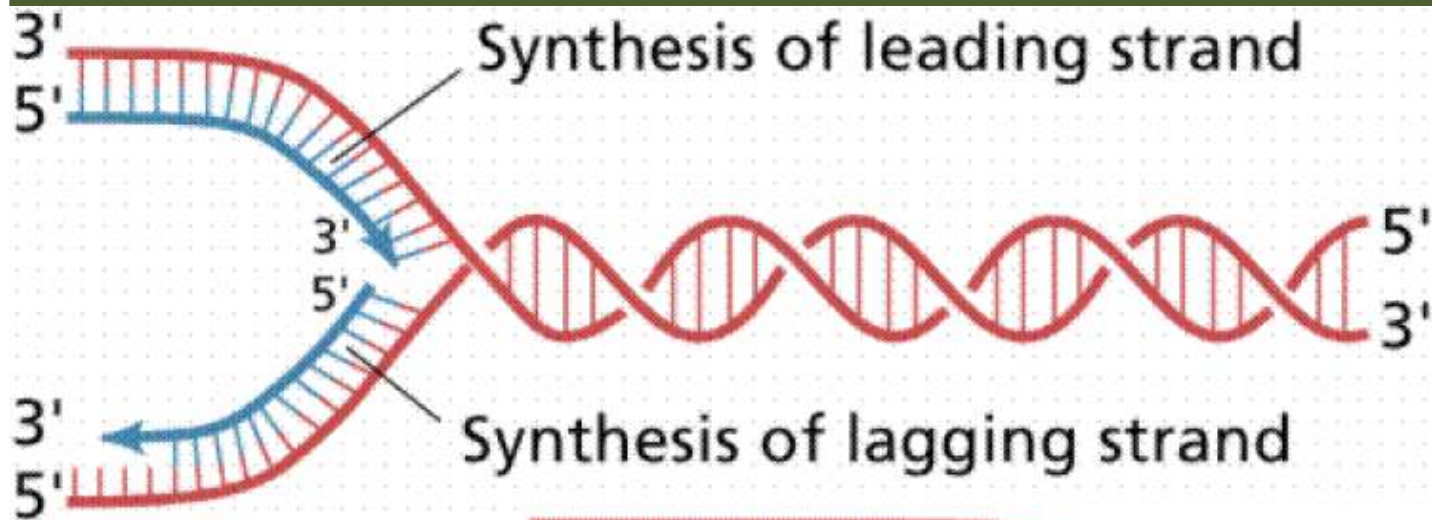


Η διχάλα αντιγραφής είναι ασύμμετρη



Εικόνα 6-12. Οι διχάλες αντιγραφής του DNA είναι ασύμμετρες. Επειδή και οι δύο νέοι κλώνοι του DNA συντίθενται πάντα με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$, το DNA που συντίθεται στον καθυστερημένο κλώνο, αρχικά παράγεται υπό μορφή μιας σειράς βραχέων τμημάτων DNA τα οποία αργότερα ενώνονται μεταξύ τους. Στο πάνω σχεδιάγραμμα παρουσιάζονται δύο διχάλες αντιγραφής που μετακινούνται σε αντίθετες κατευθύνσεις. Το κάτω σχεδιάγραμμα απεικονίζει τις δύο διχάλες όπως φαίνονται λίγο αργότερα. Στον καθυστερημένο κλώνο, η DNA πολυμεράση «ράβει με πισωβελονιά»: πρέπει να συνθέσει βραχέα κλάσματα προς την κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$ (που ονομάζονται κλάσματα Okazaki) και κατόπιν, να μετακινηθεί προς την αντίθετη κατεύθυνση κατά μήκος του κλώνου-εκμαγείου προς τη διχάλα, προτού συνθέσει το επόμενο κλάσμα.

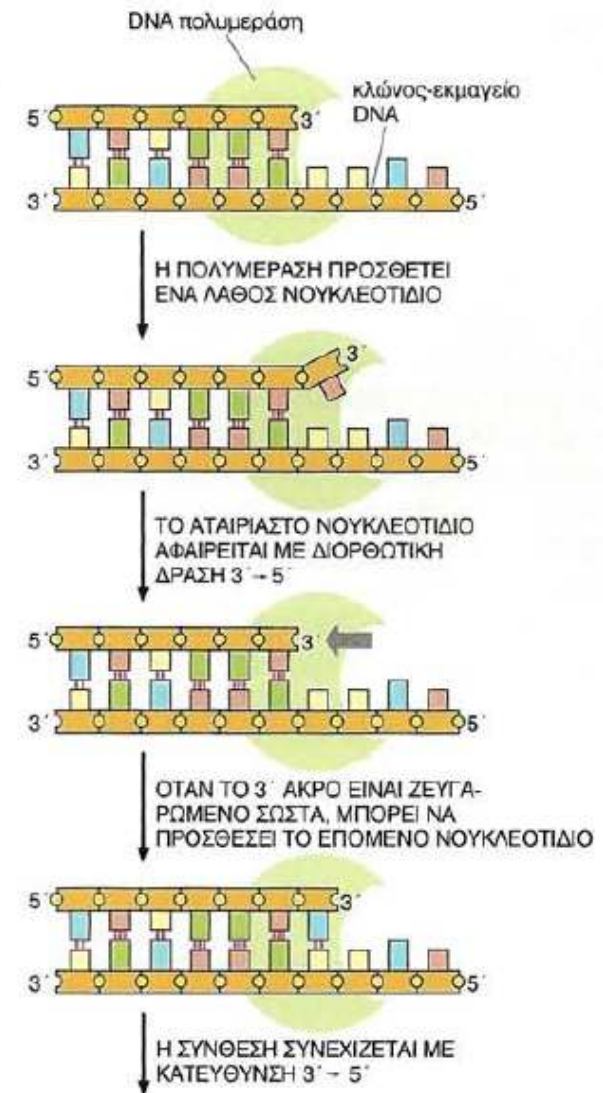
Η διχάλα αντιγραφής είναι ασύμμετρη



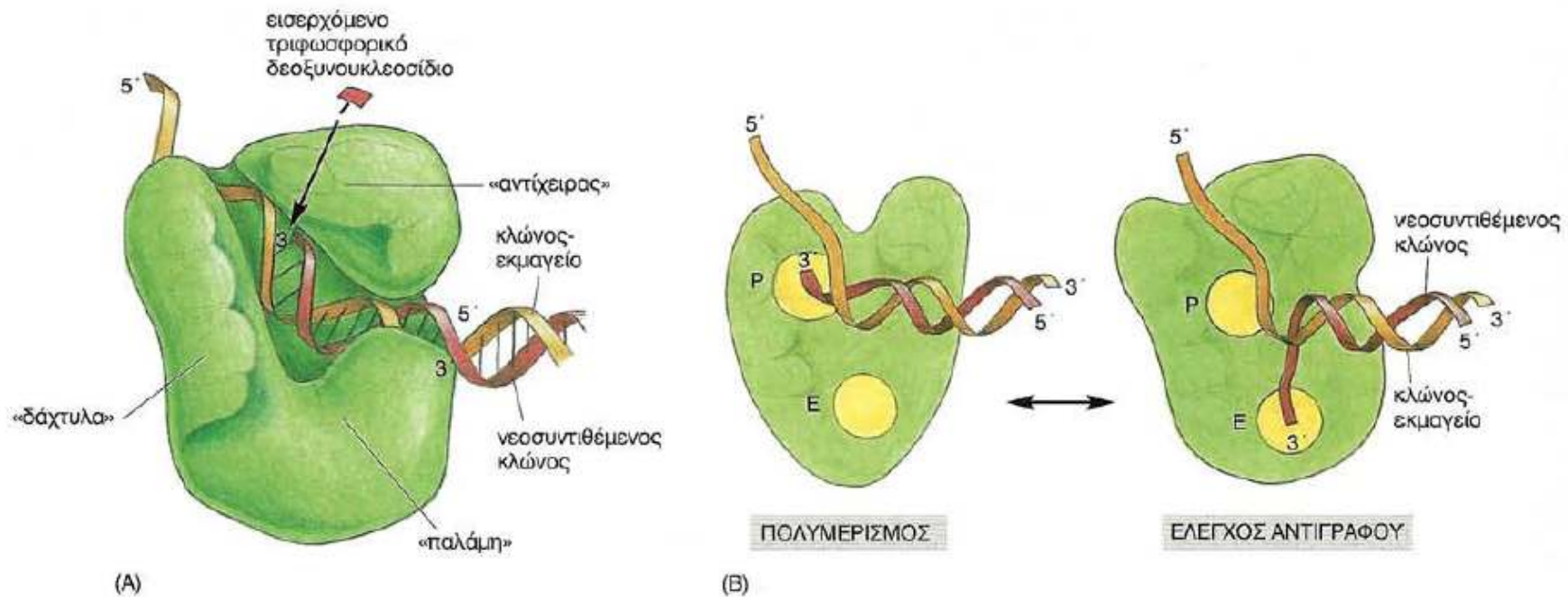
Ιδιότητες DNA Πολυμεράσης

1. Παρακολουθεί προσεκτικά το ζευγάρι των βάσεων και καταλύει την αντίδραση προσθήκης του νουκλεοτιδίου μόνο όταν το ζευγάρι είναι σωστό.
 2. Αν κάνει κάποιο σπάνιο λάθος, μπορεί να διορθώσει το λάθος με τη διαδικασία **διόρθωσης δοκιμίου**.
- ▶ Η DNA πολυμεράση διαθέτει δύο πολύ ακριβείς δραστηριότητες: μία πολυμερισμού $5' \rightarrow 3'$ και μία διόρθωσης δοκιμίου $3' \rightarrow 5'$.

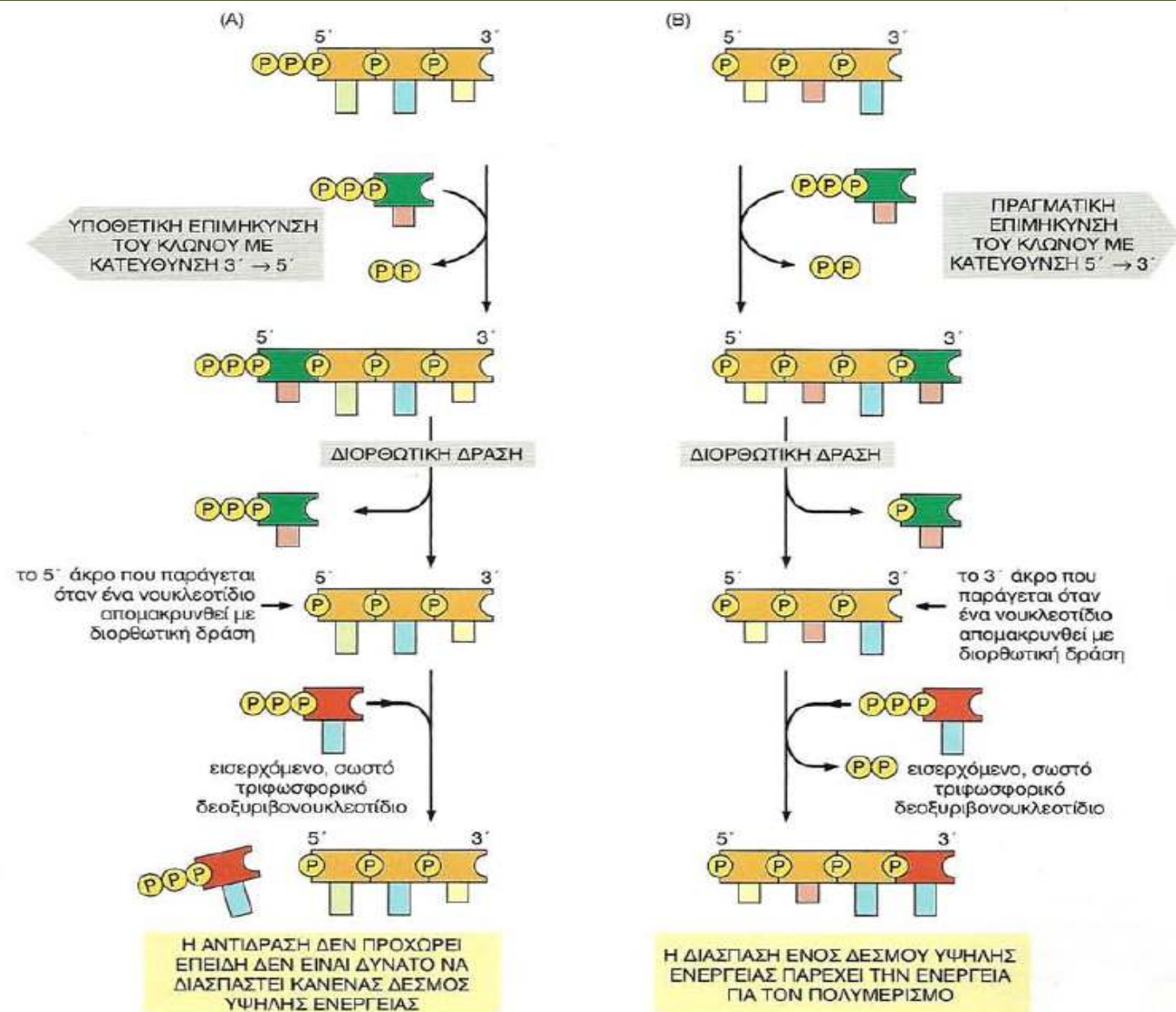
Η DNA πολυμεράση διορθώνει τα λάθη της



Εικόνα 6-13. Η DNA πολυμεράση ελέγχει την πιστότητα της αντιγραφής. Αν σ' έναν επιμηκυνόμενο κλώνο προστεθεί ένα λανθασμένο νουκλεοτίδιο, προτού συνεχίσει τον πολυμερισμό, η DNA πολυμεράση το απομακρύνει από τον κλώνο και το αντικαθιστά με το σωστό νουκλεοτίδιο.



Εικόνα 6-14. Η DNA πολυμεράση περιέχει ξεχωριστές θέσεις για σύνθεση DNA και για διορθωτική δράση. (A) Η δομή της DNA πολυμεράσης του *E. coli*, σύμφωνα με τ' αποτελέσματα κρυσταλλογραφίας των ακτίνων x. Το ένζυμο μοιάζει αδρά μ' ένα δεξιό χέρι στο οποίο η παλάμη, τα δάχτυλα και ο αντίχειρας «γραφώνουν» το DNA. (B) Το σύμπλοκο DNA πολυμεράσης-DNA εκμαγείου κατά τον πολυμερισμό (αριστερά) και κατά τη διορθωτική δράση (δεξιά). P: η καταλυτική θέση (ενεργό κέντρο) για τον πολυμερισμό, E: η καταλυτική θέση για τη διορθωτική δράση (διορθωτική δράση εξωνουκλεάσης). Για να καθοριστούν αυτές οι δομές με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, οι ερευνητές «πάγωσαν» την πολυμεράση σε αυτές τις δύο καταστάσεις, χρησιμοποιώντας μια μεταλλαγμένη πολυμεράση ελαττωματική στην περιοχή της εξωνουκλεάσης (δεξιά) ή στερώντας το Mg^{2+} που απαιτείται για τον πολυμερισμό (αριστερά). Αυτά τα σχεδιαγράμματα εικονίζουν μια DNA πολυμεράση κατά την επιδιόρθωση του DNA. Παρόμοια χαρακτηριστικά έχουν και τα ένζυμα που αντιγράφουν το DNA. (A, Προσαρμοσμένο από L.S. Beese, V. Derbyshire and T.A. Steitz, *Science* 260:352-355, 1993).

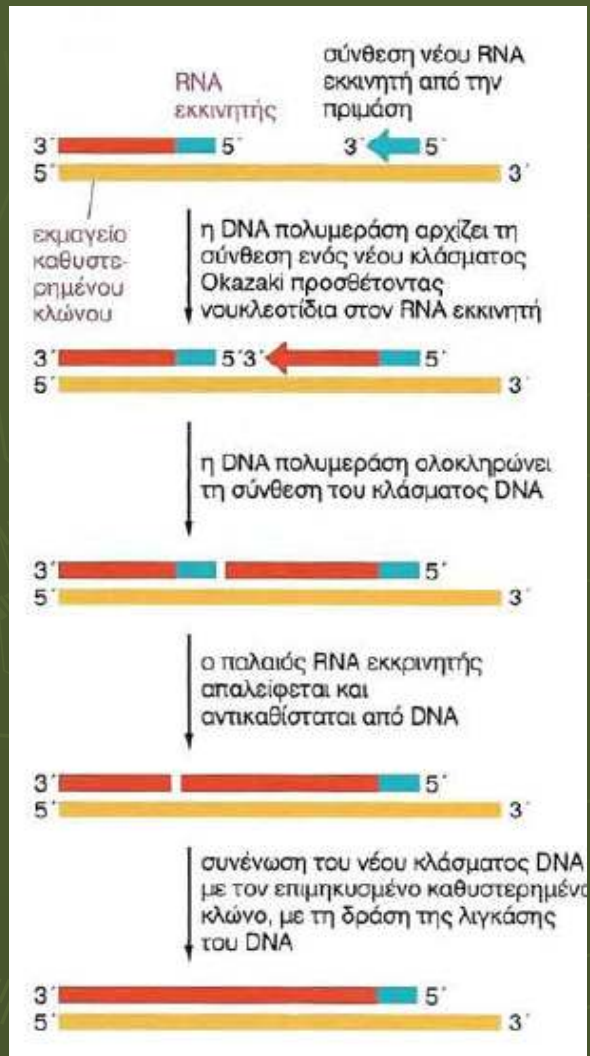


Εικόνα 6-15. Μια εξήγηση για την αύξηση μιας αλυσίδας DNA με κατεύθυνση 5' → 3'. Η επιμήκυνση προς την κατεύθυνση 5' → 3' που παρουσιάζεται στο δεξιό μέρος της εικόνας επιτρέπει στην αλυσίδα να συνεχίσει να επιμηκύνεται μετά την αφαίρεση ενός αταίριαστου νουκλεοτιδίου μέσω της διορθωτικής δράσης της DNA πολυμεράσης (βλ. Εικόνα 6-13). Αντίθετα, η διορθωτική δράση στο υποθετικό υπόδειγμα πολυμερισμού 3' → 5', που παρουσιάζεται στο αριστερό μέρος της εικόνας, θα σταματούσε την περαιτέρω επιμήκυνση της αλυσίδας. Για λόγους απλούστευσης, εικονίζεται μόνο ο ένας κλώνος της διπλής έλικας του DNA.

Εκκινητές για τη σύνθεση του DNA

- ▶ Η πολυμεράση μπορεί να συνδέει ένα νουκλεοτίδιο μόνο σε ήδη ζευγαρωμένο νουκλεοτίδιο μιας διπλής έλικας.
- ▶ Δεν είναι σε θέση να ξεκινήσει τη σύνθεση ενός εντελώς νέου κλώνου.
- ▶ **Πριμάση:** Χρησιμοποιεί ως εκμαγείο τον κλώνο του DNA και παράγει ένα μικρό τμήμα RNA. Σχηματίζει ένα ζευγαρωμένο 3' – άκρο το οποίο μπορεί να αποτελέσει το σημείο έναρξης για την DNA πολυμεράση.

Η σύνθεση κλασμάτων DNA στον καθυστερημένο κλώνο



Εικόνα 6-16. Η σύνθεση κλασμάτων DNA στον καθυστερημένο κλώνο. Στους ευκαρυώτες, οι εκκινητές RNA συντίθενται πάνω στον καθυστερημένο κλώνο περίπου κάθε 200 νουκλεοτίδια. Κάθε εκκινητής RNA έχει μήκος 10 νουκλεοτιδίων. Στο βακτήριο *E. coli*, οι εκκινητές και τα κλάσματα Okazaki έχουν μήκος περίπου 5 και 1000 νουκλεοτιδίων, αντιστοίχως. Οι εκκινητές αφαιρούνται από νουκλεάσες, οι οποίες αναγνωρίζουν μια αλληλουχία RNA σε μια έλικα RNA/DNA και την εκτέμνουν. Έτσι, αφήνουν κενά, τα οποία καλύπτονται από μια DNA πολυμεράση επιδιόρθωσης η οποία επιδιορθώνει καθώς καλύπτει το κενό. Τα ολοκληρωμένα κλάσματα τελικά συνδέονται μεταξύ τους με τη δράση ενός ενζύμου γνωστού ως λιγκάση του DNA. Το ένζυμο αυτό καταλύει το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού ανάμεσα στο 3'-OH άκρο ενός κλάσματος και το 5'-P άκρο του επόμενου κλάσματος εξασφαλίζοντας έτσι τη συνοχή του σακχαρο-φωσφορικού σκελετού.

Η σύνθεση κλασμάτων DNA στον καθυστερημένο κλώνο

Απαιτούνται 3 ένζυμα:

1. Μία νουκλεάση
2. Μία DNA πολυμεράση – πολυμεράση επιδιόρθωσης
3. Το ένζυμο λιγάση του DNA

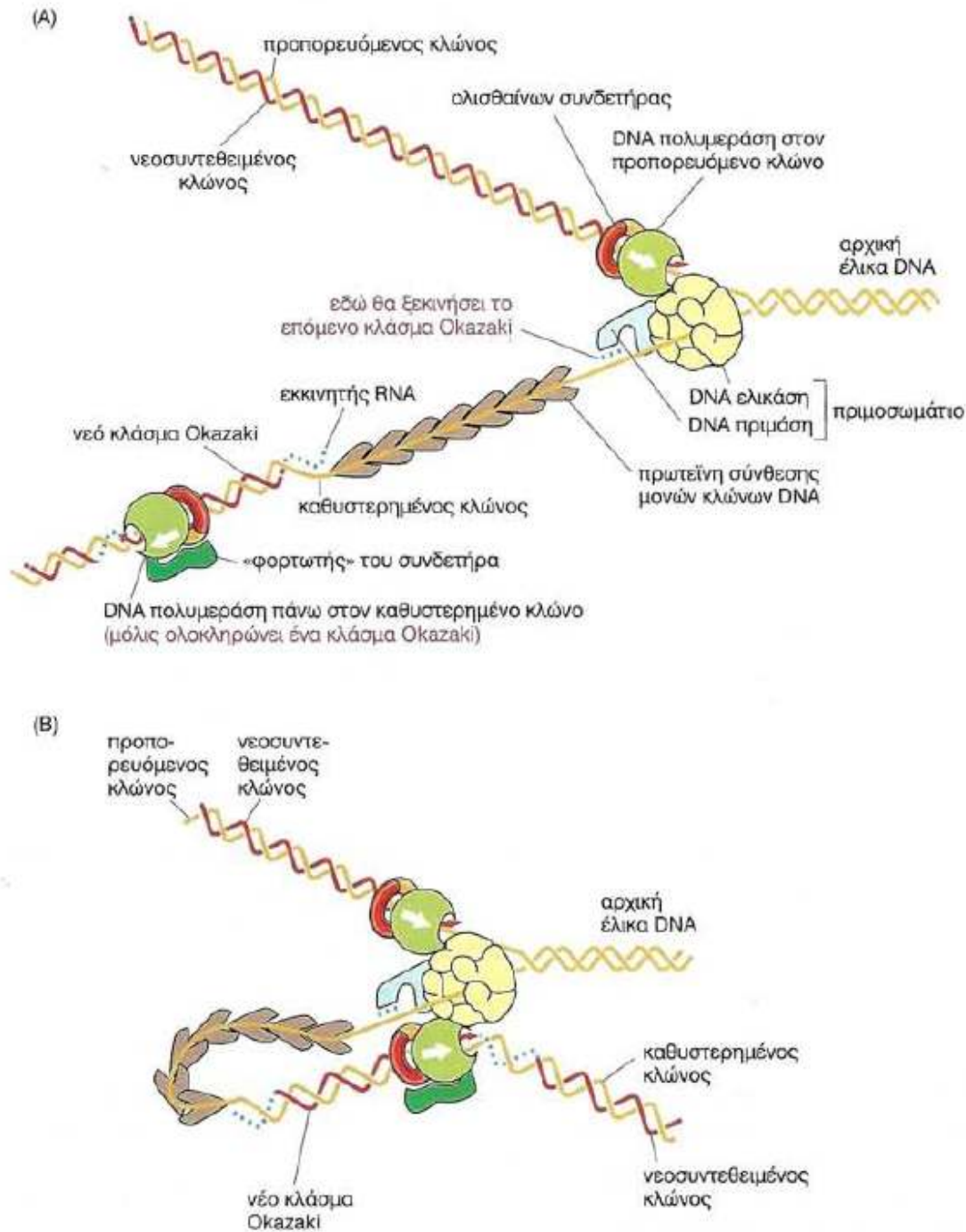
Διαφορετικές πρωτεΐνες σχηματίζουν μία «αντιγραφική μηχανή»

Πρωτεϊνική αντιγραφική μηχανή:

- προωθεί τη διχάλα αντιγραφής προς τα εμπρός και συνθέτει νέο DNA πίσω της. Εκτός από την DNA πολυμεράση και την πριμάση.
- Μεγάλο πολυενζυμικό σύμπλοκο που μετακινείται ως ενιαία μονάδα κατά μήκος του DNA, επιτρέποντας να συντίθεται και οι δύο κλώνοι με συντονισμένο ρυθμό.

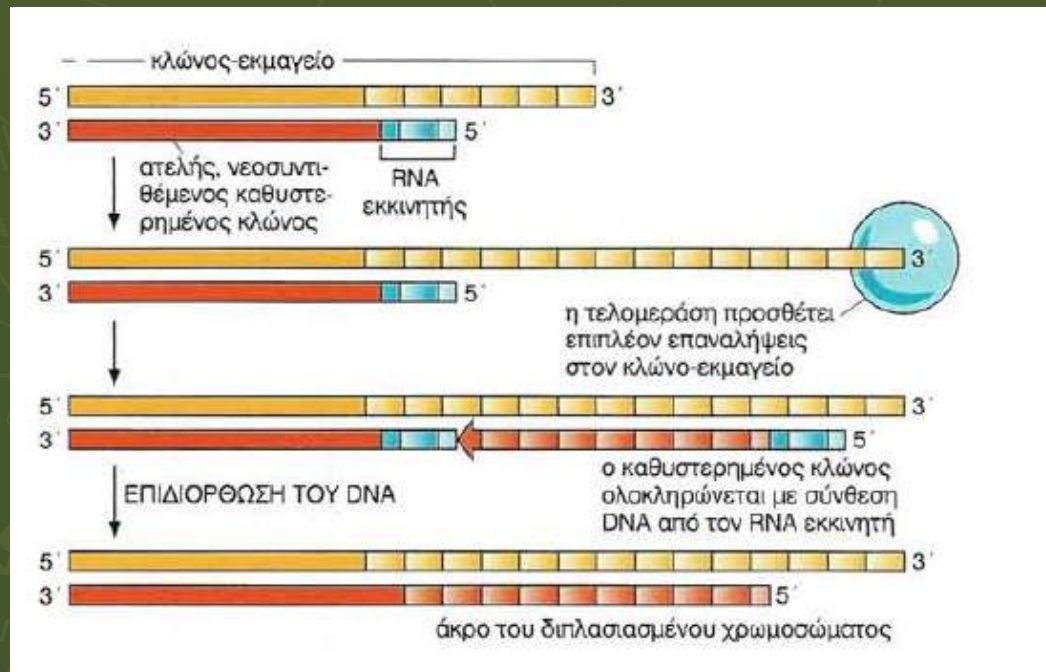
Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή:

- ▶ DNA ελικάσες
- ▶ Πρωτεΐνες που συνδέονται με μονούς κλώνους
- ▶ Ολισθαίνων συνδετήρας
- ▶ Φορτωτή του ολισθαίνοντα συνδετήρα



Εικόνα 6-17. Οι πρωτεΐνες που δρουν σε μια διχάλα αντιγραφής. (A) Παρουσιάζονται δύο μόρια DNA πολυμεράσης, το ένα πάνω στον προπορευόμενο και το άλλο πάνω στον καθυστερημένο κλώνο. Και τα δύο συγκροτούνται πάνω στο DNA από μια ειδική πρωτεΐνη που επιτρέπει στην πολυμεράση να ολισθαίνει. Η ελικάση του DNA η οποία προπορεύεται της πολυμεράσης χρησιμοποιεί την ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση του ATP για να προωθείται και με τον τρόπο αυτό να διαχωρίζει (ξετυλίγει) τους κλώνους της «πατρικής» διπλής έλικας του DNA. Ειδικές πρωτεΐνες προσδένονται στους διαχωρισμένους μονούς κλώνους και διατηρούν το DNA ως μονόκλωνο, εξασφαλίζοντας έτσι την πρόσβαση στην πριμάση και στην πολυμεράση. Για λόγους απλούστευσης, στην εικόνα αυτή οι πρωτεΐνες φαίνονται να λειτουργούν ανεξάρτητα. Στην πραγματικότητα, στα κύτταρα συγκροτούνται σε μια μεγάλη «μηχανή» ή σύστημα αντιγραφής, μια άποψη της οποίας φαίνεται στο (B). (B) Το σχεδιάγραμμα αυτό αποδίδει τις τρέχουσες απόψεις μας σχετικά με τη διάταξη των πρωτεϊνών αντιγραφής στη διχάλα αντιγραφής καθώς μετακινείται. Η δομή του (A) έχει τροποποιηθεί διπλώνοντας το DNA του καθυστερημένου κλώνου έτσι ώστε το μόριο της DNA πολυμεράσης του καθυστερημένου κλώνου να έλθει σε επαφή με το μόριο της DNA πολυμεράσης του προπορευόμενου κλώνου. Το δίπλωμα αυτό φέρνει επίσης το 3' άκρο κάθε ολοκληρωμένου κλάσματος Okazaki κοντά στο σημείο έναρξης για το επόμενο κλάσμα Okazaki. Επειδή η DNA πολυμεράση του καθυστερημένου κλώνου συγκρατείται από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες αντιγραφής, μπορεί να χρησιμοποιείται επαναληπτικά για τη σύνθεση διαδοχικών κλασμάτων Okazaki. Στο σχεδιάγραμμα αυτό, είναι έτοιμη να ελευθερώσει το τμήμα του DNA που μόλις συνέθεσε για να μετακινηθεί προς τον RNA εκκινητή που θα σχηματιστεί εκεί κοντά, όπως απαιτείται για να αρχίσει η σύνθεση του επόμενου κλάσματος DNA του καθυστερημένου κλώνου.

Η τελομεράση αντιγράφει τα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων



Εικόνα 6-18. Η ολοκλήρωση της σύνθεσης του DNA στα άκρα (τελομερίδια) των χρωμοσωμάτων. Ο ένας από τους δύο νέους κλώνους του DNA που παράγεται από ένα δίκλωνο μόριο DNA συντίθεται ασυνεχώς (βλ. Κεφάλαιο 6) και αναφέρεται ως καθυστερημένος κλώνος. Προκειμένου να συντεθεί ο καθυστερημένος κλώνος, ο μηχανισμός της αντιγραφής του DNA απαιτεί την ύπαρξη ενός τμήματος DNA-εκμαγείου το οποίο να εκτείνεται πέρα από τις αλληλουχίες του DNA που προορίζονται να αντιγραφούν. Επομένως, σ' ένα γραμμικό μόριο DNA, η σύνθεση του καθυστερημένου κλώνου σταματά αμέσως πριν από το τέλος του εκμαγείου. Το ένζυμο τελομεράση προσθέτει στον κλώνο-εκμαγείο ορισμένες επαναλήψεις μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Όπως φαίνεται στην εικόνα, αυτό επιτρέπει στην DNA πολυμεράση να ολοκληρώσει τη σύνθεση του καθυστερημένου κλώνου. Στον άνθρωπο, η αλληλουχία που επαναλαμβάνεται είναι η GGGGTTA. Η τελομεράση εμπεριέχει ένα βραχύ τμήμα RNA συμπληρωματικό με την επαναληπτική αλληλουχία του DNA. Αυτό το RNA δρα ως εκμαγείο για τη σύνθεση του DNA από την τελομεράση.

Βιβλιογραφία

- ▶ **Alberts et.al. 2015. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας.** Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- ▶ **Cooper GM και Hausman RE. 2011. Το κύτταρο: Μία Μοριακή Προσέγγιση.** Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι.Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.