



# Βιοσύνθεση μακρομορίων – ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

## 1. Η αντιγραφή του DNA

## **Ρόλος του γενετικού υλικού**

**“A genetic material must carry out two jobs: duplicate itself and control the development of the rest of the cell in a specific way.”**

-Francis Crick

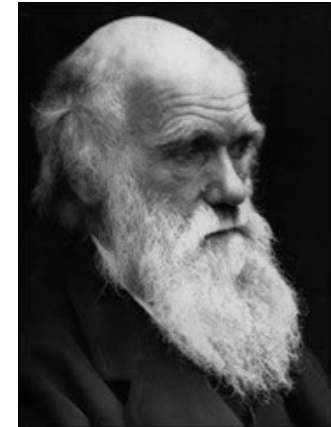
# DNA - πρωτεΐνη

- Αρχικά: Η πρωτεΐνη είναι το γενετικό υλικό, διότι είναι πιο πολύπλοκο από το DNA
- Οι πρωτεΐνες απαρτίζονται από 20 διαφορετικά αμινοξέα σε μακριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες

## Ρόλος του γενετικού υλικού

### **Charles Darwin, 1859 'The Origin of Species'**

Τα έμβια όντα είναι σχεδιασμένα, αλλά είναι αποτέλεσμα φυσικής επιλογής, και εξελίσσονται για γενεές με μικρές αλλαγές



### **Gregor Mendel, δεκαετία 1860**

Υποστήριξη ιδιέων του Darwin

Παράγοντες που καθορίζουν τα χαρακτηριστικά του έμβιου όντος.

Τα γονίδια περνούν στις επόμενες γενεές, όπου ο απόγονος κληρονομεί γονίδια και από τους δύο γονείς.



G. Mendel  
1823-1884



# Αναζήτηση του γενετικού υλικού

## Johannes Friedrich Miescher, 1869

Απομόνωση χημικών ουσιών που εντόπισε σε πυρήνες λευκών αιμοσφαιρίων (από πύον).

Η κύρια ουσία που εντόπισε περιείχε φωσφόρο, άζωτο, αλλά όχι θείο και την ονόμασε *νουκλεΐνη* (το **DNA**).



1844-1895

Miescher, Friedrich (1871). "Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen".

*Medicinish-chemische Untersuchungen* **4: 441–460.**

# Αναζήτηση του γενετικού υλικού

## Η ανακάλυψη της «αρχής του μετασχηματισμού»

### Frederick Griffith, 1928

- Pneumonia (*Diplococcus pneumoniae*). Μόλυνση ποντικών.
- Τα ποντίκια εκδηλώνουν πνευμονία

### Δύο τύποι βακτηρίων:

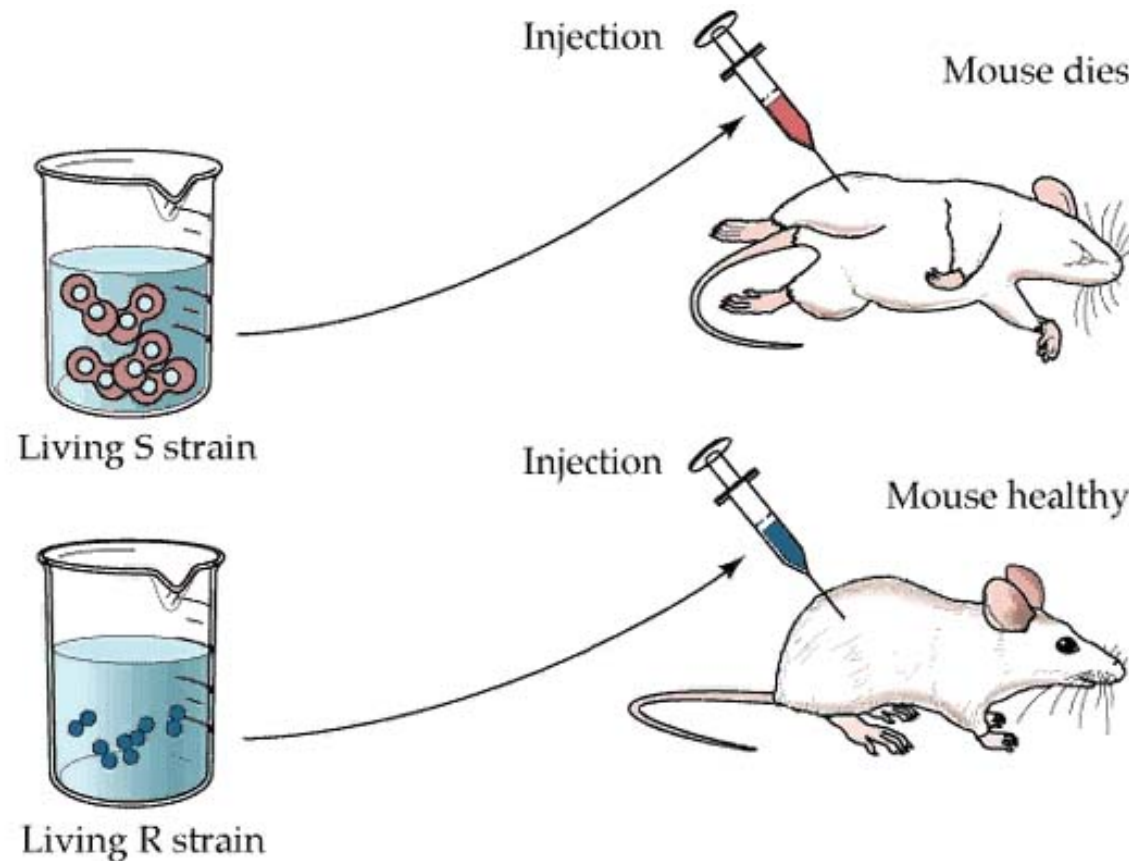
- S βακτήρια, έντονη μορφή πνευμονίας (λείο τοίχωμα, smooth coat – pneumonia)
- R βακτήρια, ήπια μορφή πνευμονίας (αδρό τοίχωμα, rough coat - no pneumonia)



1881 - 1941

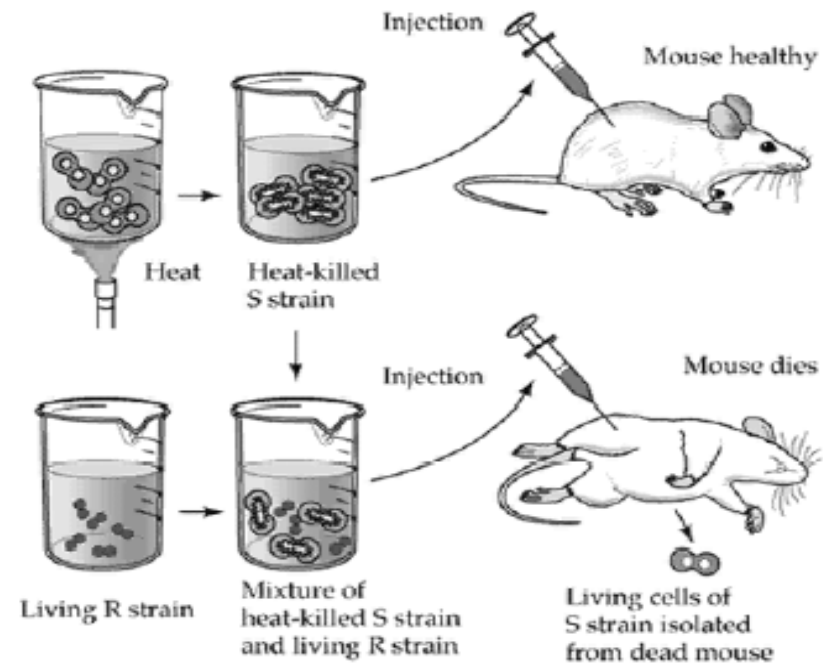
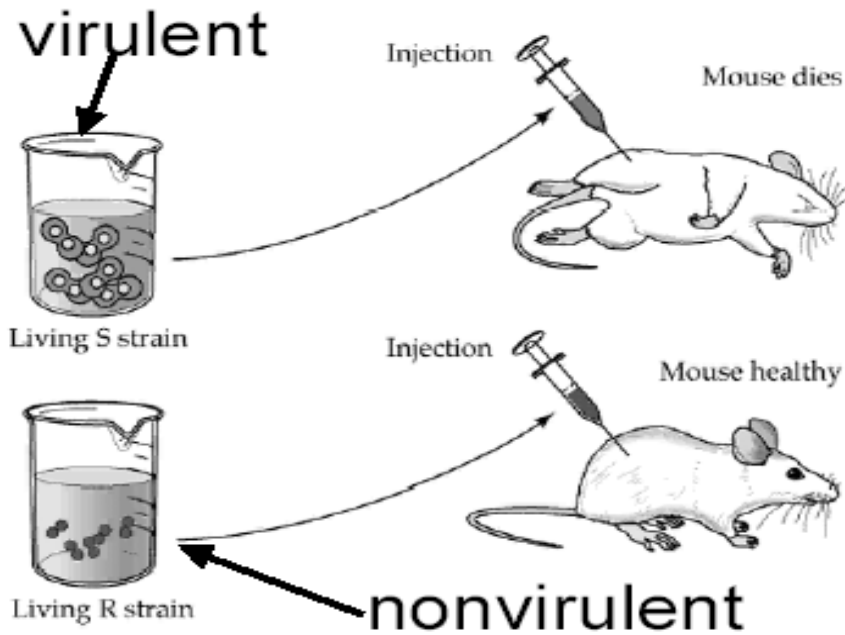
# Αναζήτηση του γενετικού υλικού

## Η ανακάλυψη της «αρχής του μετασχηματισμού»



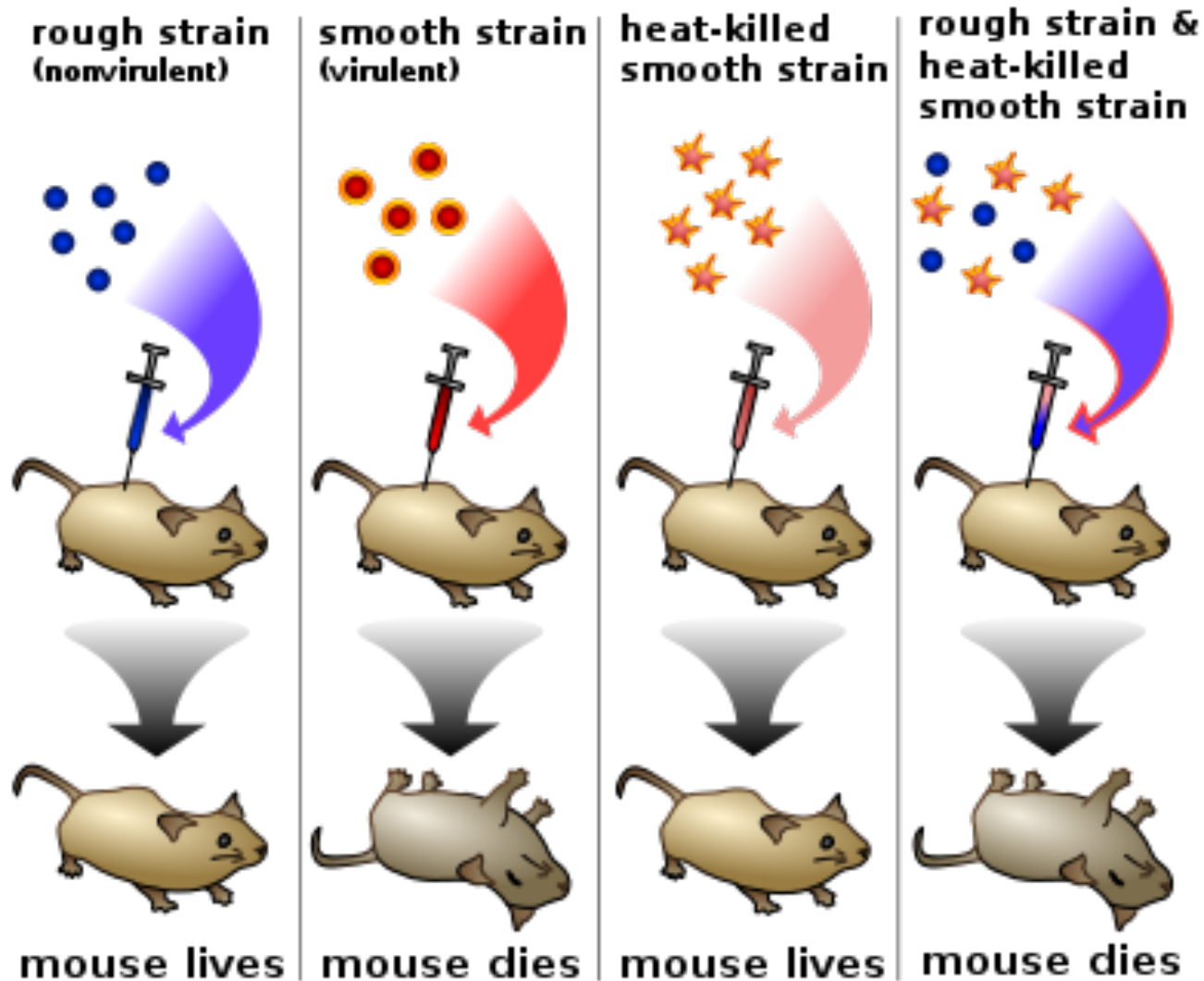
Griffith, 1928

# Frederick Griffith's 1928 Experiment



# Αναζήτηση του γενετικού υλικού

## Το πείραμα των Avery–MacLeod–McCarty



**Oswald Avery**  
(1877-1955)



# Avery–MacLeod–McCarty



Oswald Avery



Colin MacLeod



Maclyn McCarthy  
(with J. Watson and F. Crick)

# INDEPENDENT FUNCTIONS OF VIRAL PROTEIN AND NUCLEIC ACID IN GROWTH OF BACTERIOPHAGE\*

BY A. D. HERSHEY AND MARTHA CHASE

*(From the Department of Genetics, Carnegie Institution of Washington, Cold Spring Harbor, Long Island)*

(Received for publication, April 9, 1952)

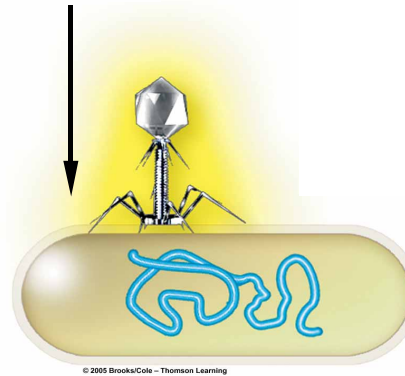
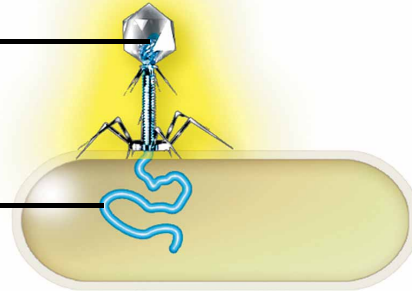
The work of Doermann (1948), Doermann and Dissosway (1949), and Anderson and Doermann (1952) has shown that bacteriophages T2, T3, and T4 multiply in the bacterial cell in a non-infective form. The same is true of the phage carried by certain lysogenic bacteria (Lwoff and Gutmann, 1950). Little else is known about the vegetative phase of these viruses. The experiments reported in this paper show that one of the first steps in the growth of T2 is the release from its protein coat of the nucleic acid of the virus particle, after which the bulk of the sulfur-containing protein has no further function.



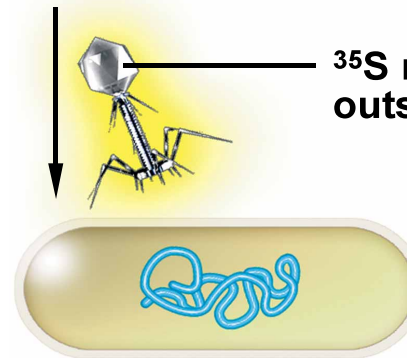
# Η αναζήτηση του γενετικού υλικού Hershey-Chase 1952

virus particle  
labeled with  $^{35}\text{S}$

DNA being  
injected into  
bacterium



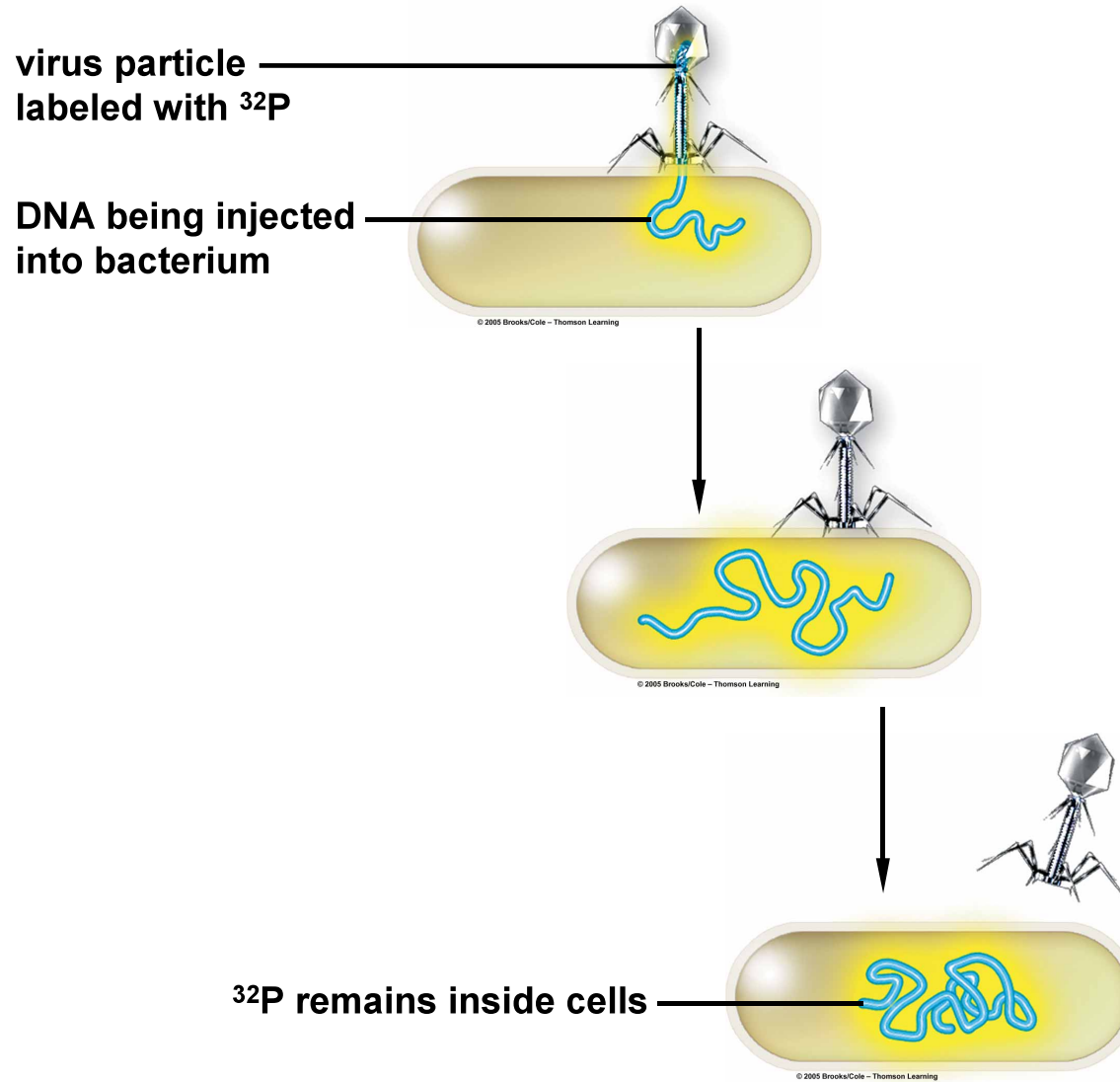
$^{35}\text{S}$  remains  
outside cells



*Η πρωτεΐνη δεν μολύνει το βακτήριο*

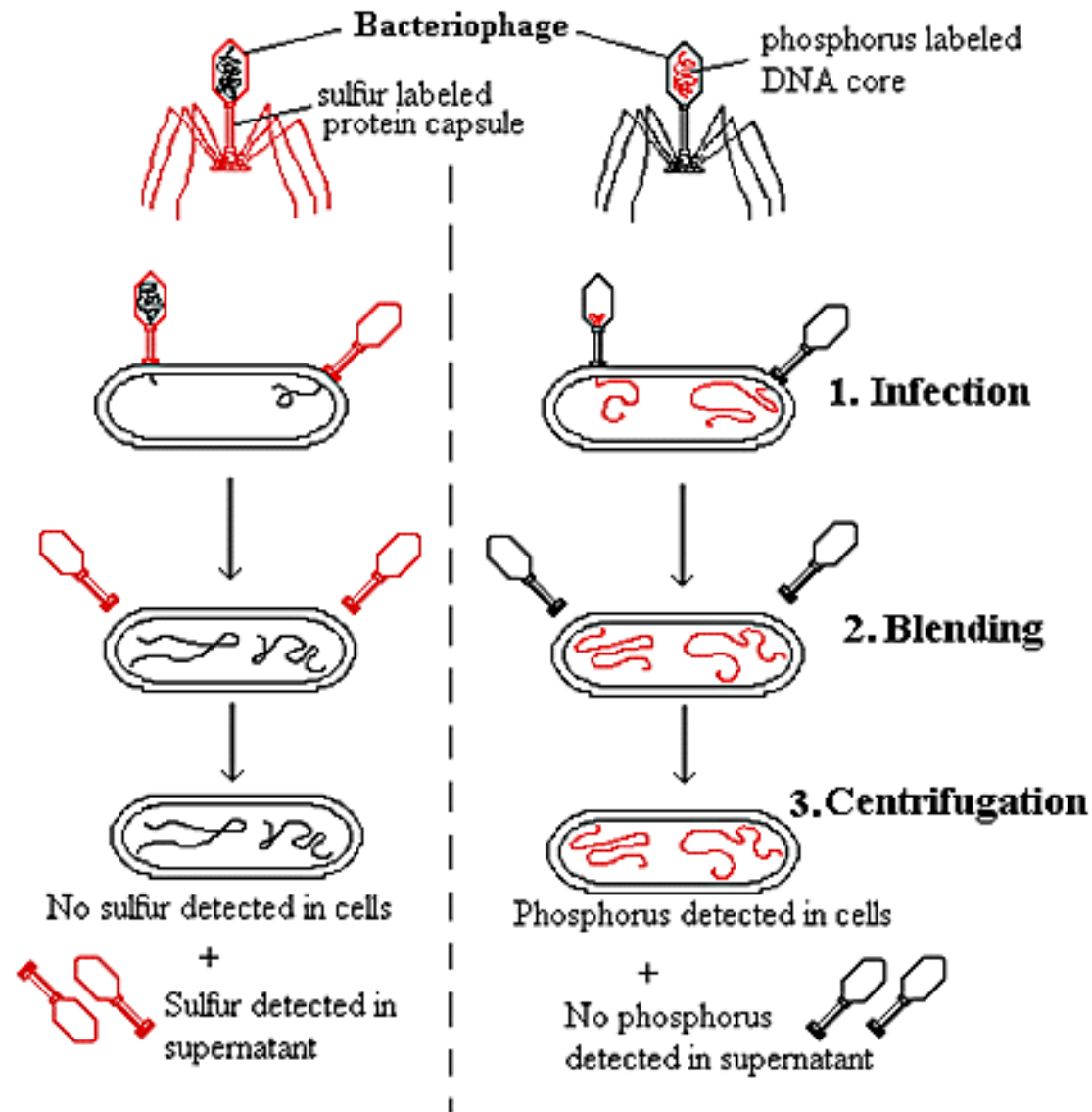


# Η αναζήτηση του γενετικού υλικού Hershey-Chase 1952



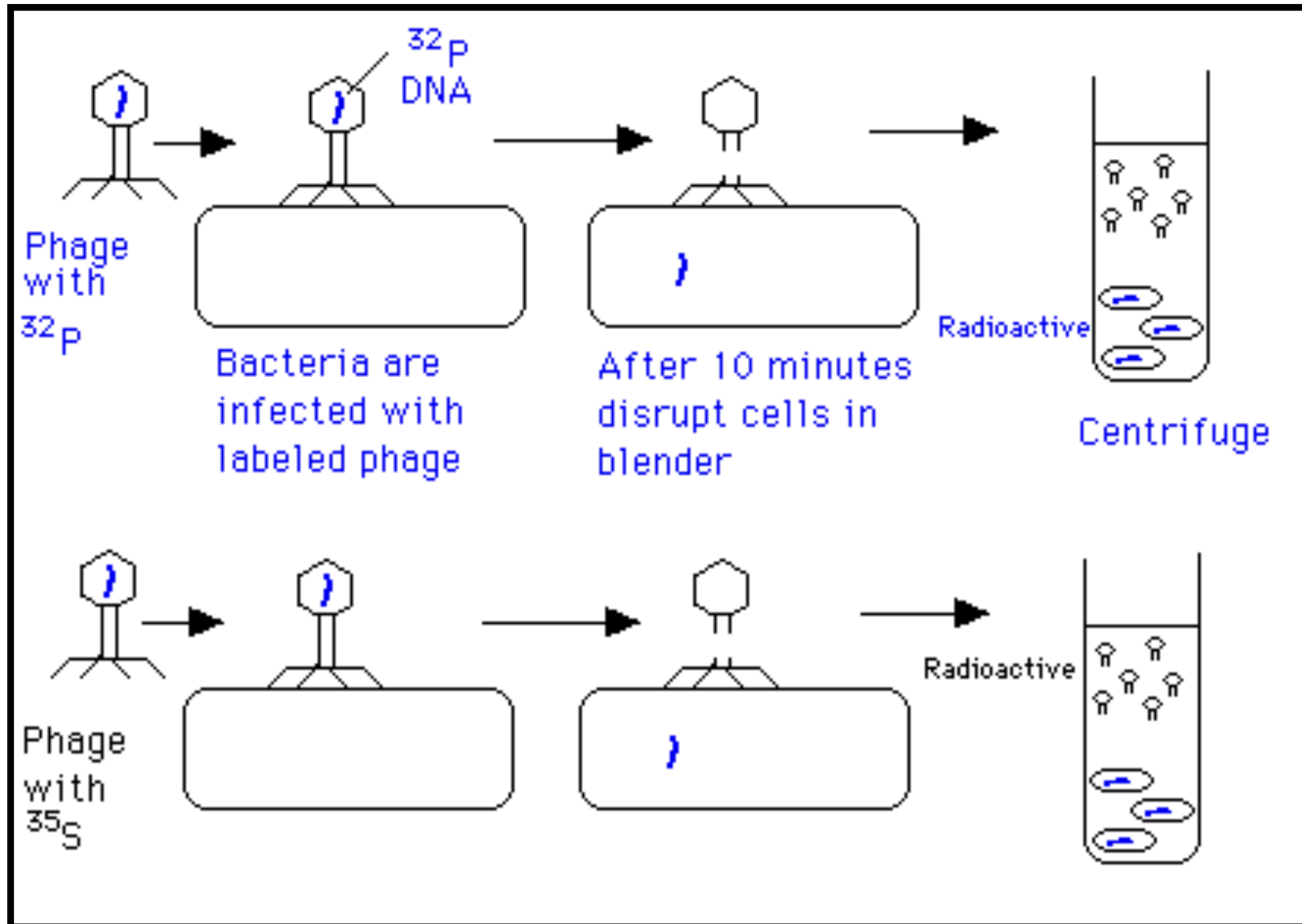
*Το DNA μολύνει το βακτήριο*

# DNA discovery Hershey-Chase 1952

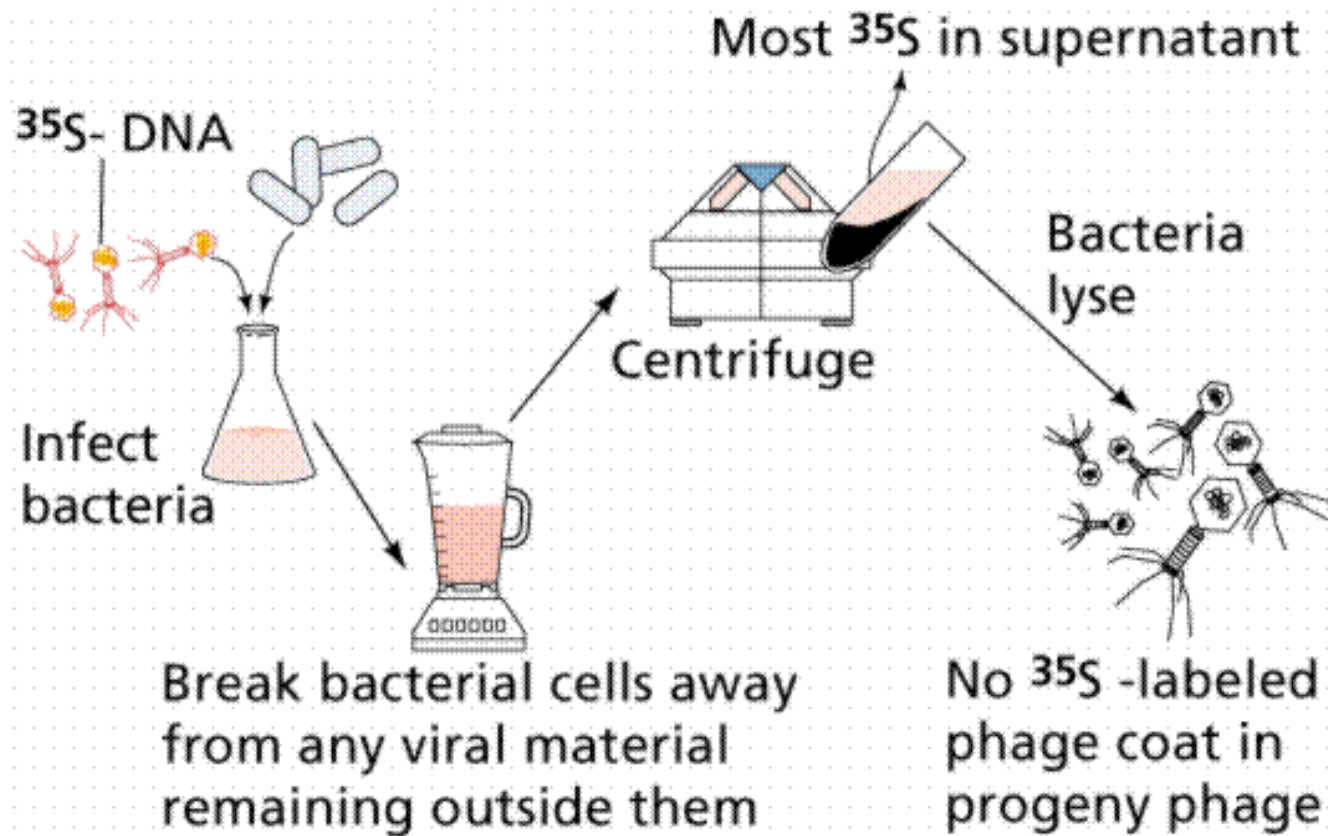


**The Hershey-Chase Experiment**

# Η αποκάλυψη του γενετικού υλικού Hershey-Chase 1952



# Η αναζήτηση του γενετικού υλικού Hershey-Chase 1952





© simonho.org





**DNA Double Helix 1953**

**“The secret of life”**

**For decades the Eagle was the local  
pub for scientists from the nearby  
Cavendish Laboratory.**

**It was here on February 28<sup>th</sup> 1953 that  
Francis Crick and James Watson first  
announced their discovery of how  
DNA carries genetic information.**

**Unveiled by James Watson**

**25<sup>th</sup> April 2003**

**Insight and discovery are functionally separable.  
The one precedes the other.  
Insight can happen every day.  
Discovery does not.  
Insight takes more intelligence,  
but it is discovery that is rewarded...**



**—*Francis HC Crick***



# Watson JD, Crick FHC

## “A Structure for Deoxyribonucleic Acid”

### Nature 1953; 4356: 736-737

equipment, and to Dr. G. E. R. Deacon and the captain and officers of R.R.S. *Discovery II* for their part in making the observations.

<sup>1</sup> Young, P. B., Gossard, H., and Jerns, W., *PAM. Mag.*, **48**, 149 (1923).  
<sup>2</sup> Longuet-Higgins, M. S., *Mos. Nat. Hist. Soc., Geophys. Supp.*, **4**, 285 (1949).  
<sup>3</sup> Van Aarts, W. S., *Woods Hole Papers in Phys. Oceanog. Meteor.*, **11** (3) (1944).  
<sup>4</sup> Ekman, V. W., *Astron. Mat. Astron. Fysik. (Stockholm)*, **8**(11) (1905).

#### MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

##### A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey<sup>1</sup>. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.



This figure is partly diagrammatic. The two ribbons encircling the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining 3'-D-deoxyribofuranose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There

is a residue on each chain every 3.4 Å, in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-co-ordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on these assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally<sup>2,3</sup> that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data<sup>4,5</sup> on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

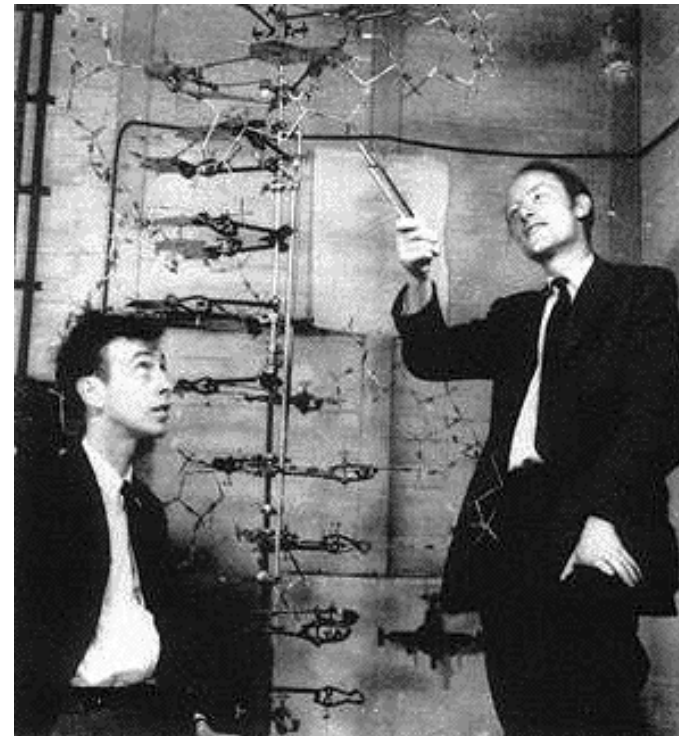
We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at

King's College, London. One of us (J. D. W.) has been aided by a fellowship from the National Foundation for Infantile Paralysis.

J. D. WATSON  
F. H. C. CRICK

Medical Research Council Unit for the Study of the Molecular Structure of Biological Systems, Cavendish Laboratory, Cambridge, April 2.

<sup>1</sup> Pauling, L., and Corey, R. B., *Nature*, **171**, 369 (1953); *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.*, **38**, 94 (1950).  
<sup>2</sup> Furberg, S., *Acta Chem. Scand.*, **6**, 634 (1952).  
<sup>3</sup> Chargaff, E., for references see Zaccarelli, S., Shewman, G., and Chargaff, E., *Biochim. et Biophys. Acta*, **2**, 402 (1952).  
<sup>4</sup> Wynn, G. R., *J. Gen. Physiol.*, **38**, 501 (1952).  
<sup>5</sup> Astbury, W. T., *Supp. Soc. Exp. Biol.*, **1**, Nucleic Acid, 66 (Camb. Univ. Press, 1947).  
<sup>6</sup> Wilkins, M. H. F., and Randall, J. T., *Biochim. et Biophys. Acta*, **18**, 192 (1952).





## GENETICAL IMPLICATIONS OF THE STRUCTURE OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID

By J. D. WATSON and F. H. C. CRICK

Medical Research Council Unit for the Study of the Molecular Structure of Biological Systems, Cavendish Laboratory, Cambridge

THE importance of deoxyribonucleic acid (DNA) within living cells is undisputed. It is found in all dividing cells, largely if not entirely in the nucleus, where it is an essential constituent of the chromosomes. Many lines of evidence indicate that it is the carrier of a part of (if not all) the genetic specificity of the chromosomes and thus of the gene itself.

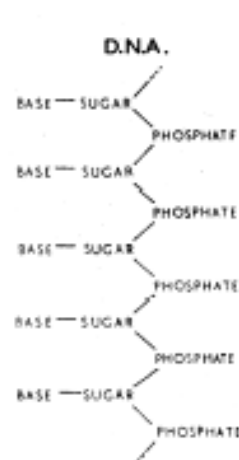


Fig. 1. Chemical formula of a single chain of deoxyribonucleic acid.



Fig. 2. This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis.

Until now, however, no evidence has been presented to show how it might carry out the essential operation required of a genetic material, that of exact self-duplication.

We have recently proposed a structure<sup>1</sup> for the salt of deoxyribonucleic acid which, if correct, immediately suggests a mechanism for its self-duplication. X-ray evidence obtained by the workers at King's College, London<sup>2</sup>, and presented at the same time, gives qualitative support to our structure and is incompatible with all previously proposed structures<sup>3</sup>. Though the structure will not be completely proved until a more extensive comparison has been made with the X-ray data, we now feel sufficient confidence in its general correctness to discuss its genetical implications. In doing so we are assuming that fibres of the salt of deoxyribonucleic acid are not artefacts arising in the method of preparation, since it has been shown by Wilkins and his co-workers that similar X-ray patterns are obtained from both the isolated fibres and certain intact biological materials such as sperm head and bacteriophage particles<sup>4,5</sup>.

The chemical formula of deoxyribonucleic acid is now well established. The molecule is a very long chain, the backbone of which consists of a regular alternation of sugar and phosphate groups, as shown in Fig. 1. To each sugar is attached a nitrogenous base, which can be of four different types. (We have considered 5-methyl cytosine to be equivalent to cytosine, since either can fit equally well into our structure.) Two of the possible bases—adenine and guanine—are purines, and the other two—thymine and cytosine—are pyrimidines. So far as is known, the sequence of bases along the chain is irregular. The monomer unit, consisting of phosphate, sugar and base, is known as a nucleotide.

The first feature of our structure which is of biological interest is that it consists not of one chain, but of two. These two chains are both coiled around

a common fibre axis, as is shown diagrammatically in Fig. 2. It has often been assumed that since there was only one chain in the chemical formula there would only be one in the structural unit. However, the density, taken with the X-ray evidence<sup>6</sup>, suggests very strongly that there are two.

The other biologically important feature is the manner in which the two chains are held together. This is done by hydrogen bonds between the bases, as shown schematically in Fig. 3. The bases are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other. The important point is that only certain pairs of bases will fit into the structure. One member of a pair must be a purine and the other a pyrimidine in order to bridge between the two chains. If a pair consisted of two purines, for example, there would not be room for it.

We believe that the bases will be present almost entirely in their most probable tautomeric forms. If this is true, the conditions for forming hydrogen bonds are more restrictive, and the only pairs of bases possible are:

adenine with thymine;  
guanine with cytosine.

The way in which these are joined together is shown in Figs. 4 and 5. A given pair can be either way round. Adenine, for example, can occur on either chain; but when it does, its partner on the other chain must always be thymine.

This pairing is strongly supported by the recent analytical results<sup>7</sup>, which show that for all sources of deoxyribonucleic acid examined the amount of adenine is close to the amount of thymine, and the amount of guanine close to the amount of cytosine, although the cross-ratio (the ratio of adenine to guanine) can vary from one source to another. Indeed, if the sequence of bases on one chain is irregular, it is difficult to explain these analytical results except by the sort of pairing we have suggested.

The phosphate-sugar backbone of our model is completely regular, but any sequence of the pairs of bases can fit into the structure. It follows that in a long molecule many different permutations are possible, and it therefore seems likely that the precise sequence of the bases is the code which carries the genetical information. If the actual order of the

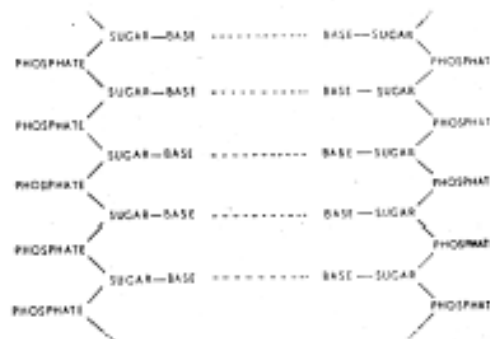
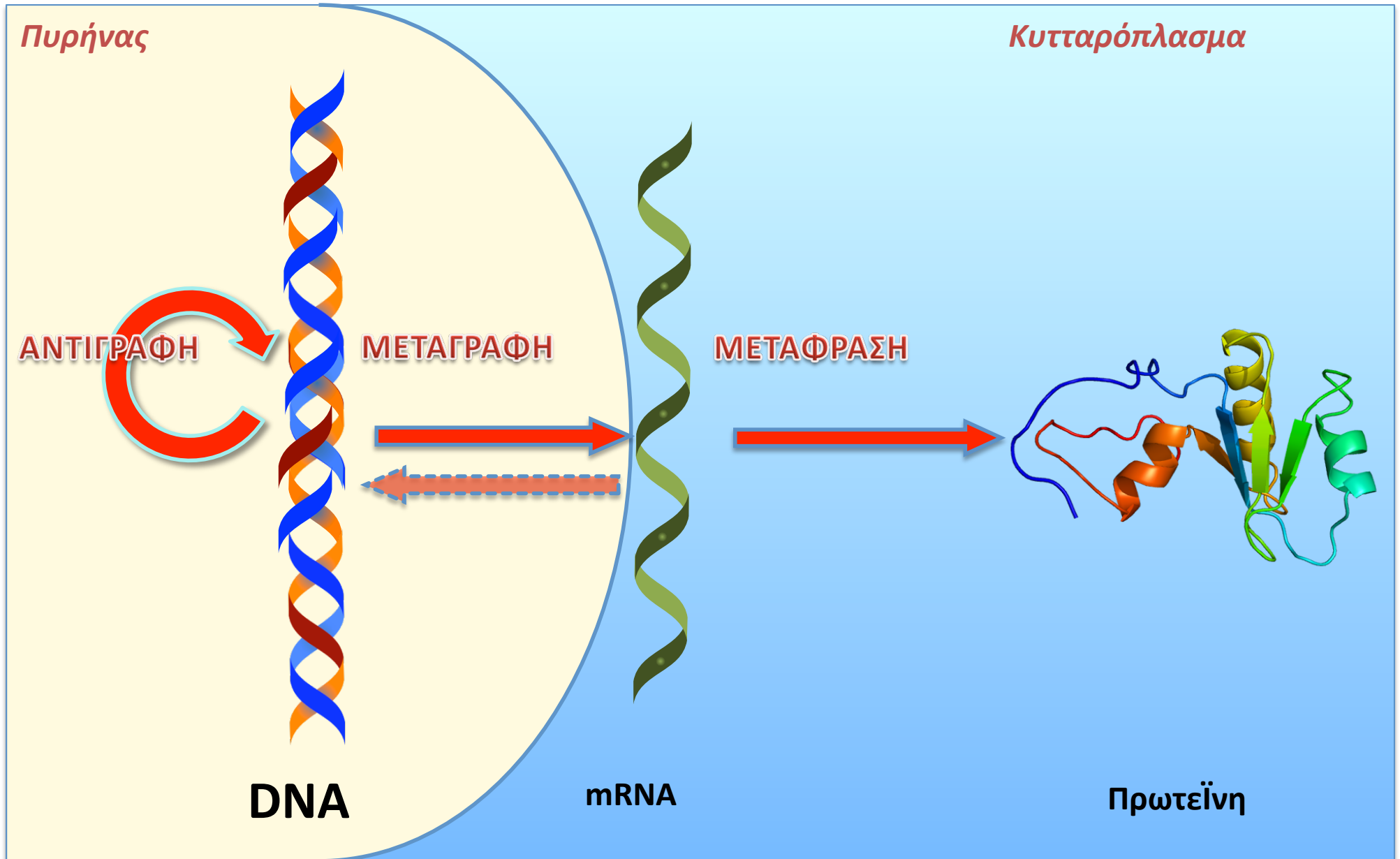


Fig. 3. Chemical formula of a pair of deoxyribonucleic acid chains. The hydrogen bonding is symbolized by dotted lines.

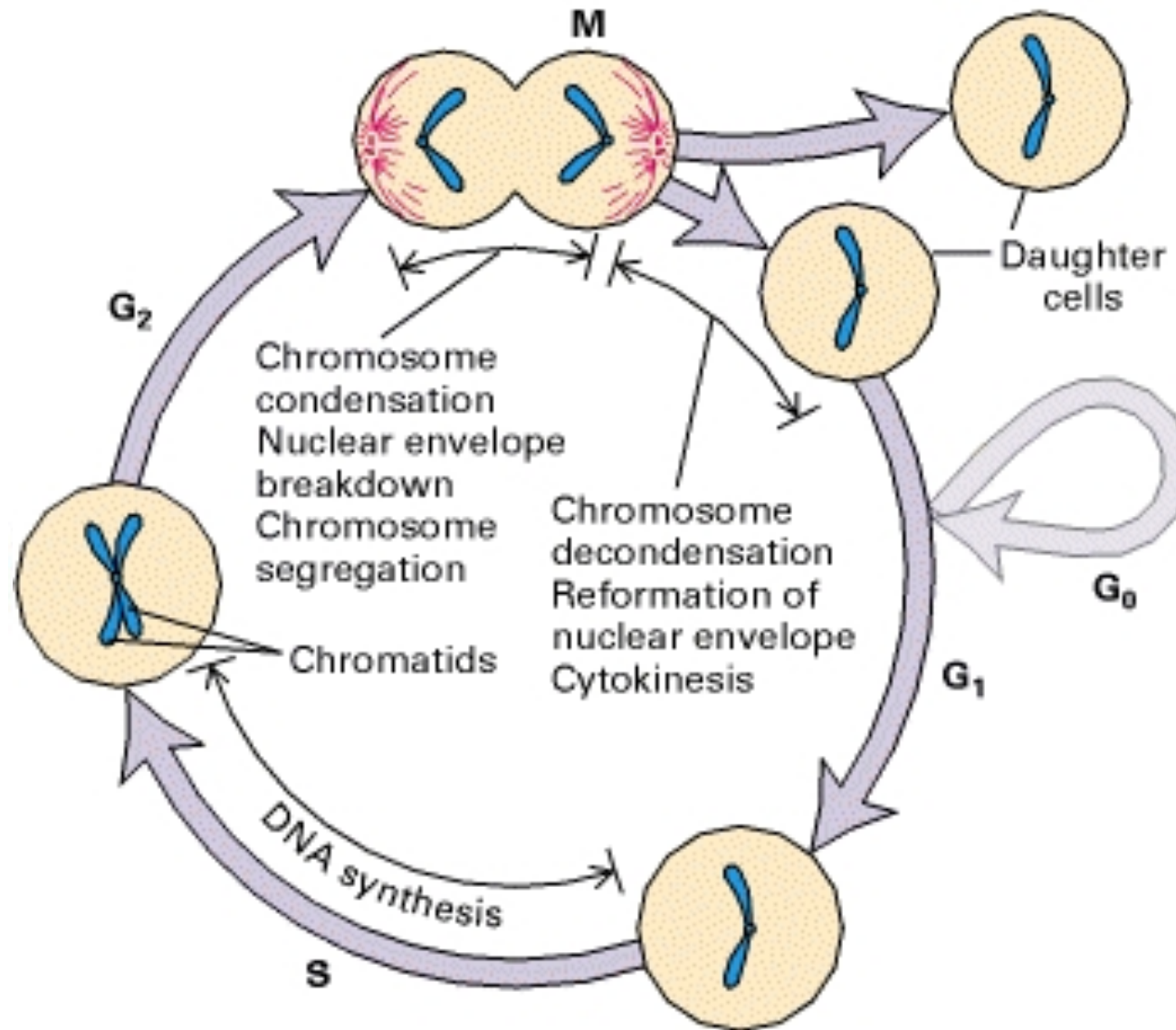
**«DNA contains all of the secrets of nature.  
If we could only sequence the human genome  
we could understand every human disease.  
Unfortunately, this will not happen  
in any of our lifetimes»**

**James D. Watson  
Durham, NC, 1967**

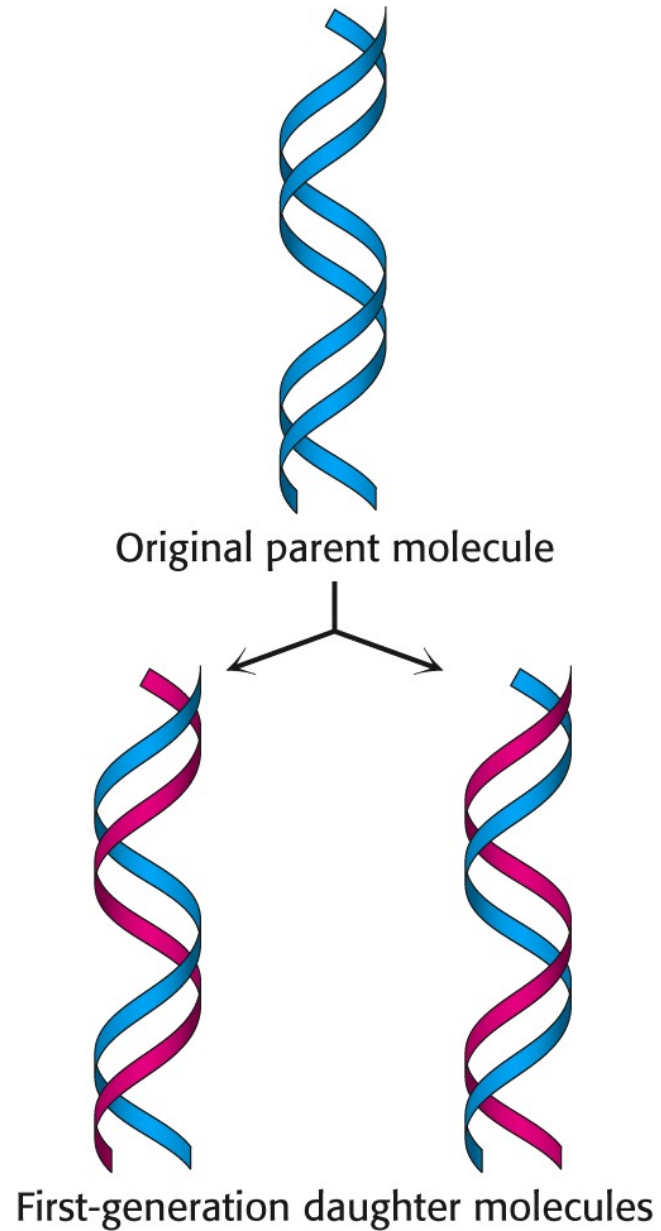
# Το κεντρικό δόγμα



# Γιατί αντιγράφεται το DNA



# Η αντιγραφή του DNA



# Η έναρξη της αντιγραφής

# Τα τρία στάδια της έναρξης της αντιγραφής του DNA

- Αναγνώριση περιοχής DNA έναρξης
- «λιώσιμο» διπλής έλικας (σπάσιμο δεσμών H)
- Δέσμευση ελικάσης  
(διάσπαση δεσμών H, απομάκρυνση κλώνων)

# Η περιοχή έναρξης της αντιγραφής

- Εναρξη από συγκεκριμένες -μη τυχαίες- περιοχές του χρωμοσώματος
- Προκαρυωτικά χρωμοσώματα (κυκλικά): περιοχή έναρξης αντιγραφής
- Ευκαρυωτικά χρωμοσώματα: πολλαπλές περιοχές
- Οι περιοχές αναγνωρίζονται από ειδικές πρωτεΐνες (**εναρκτήριες**)
- **Ρεπλικόνιο**: Κάθε μονάδα αντιγραφής (το σύνολο της περιοχής DNA που αντιγράφεται υπό τον έλεγχο μιας και μόνης περιοχής έναρξης)



# Εναρξη της αντιγραφής

## 🌈 Εναρκτήριες πρωτεΐνες:

- αναγνωρίζουν εναρκτήριες περιοχές,
- εξουδετερώνουν δεσμούς υδρογόνου ( $\delta$ -H) στην περιοχή του DNA όπου δεσμεύονται
- τοπικό «λιώσιμο» δομής DNA

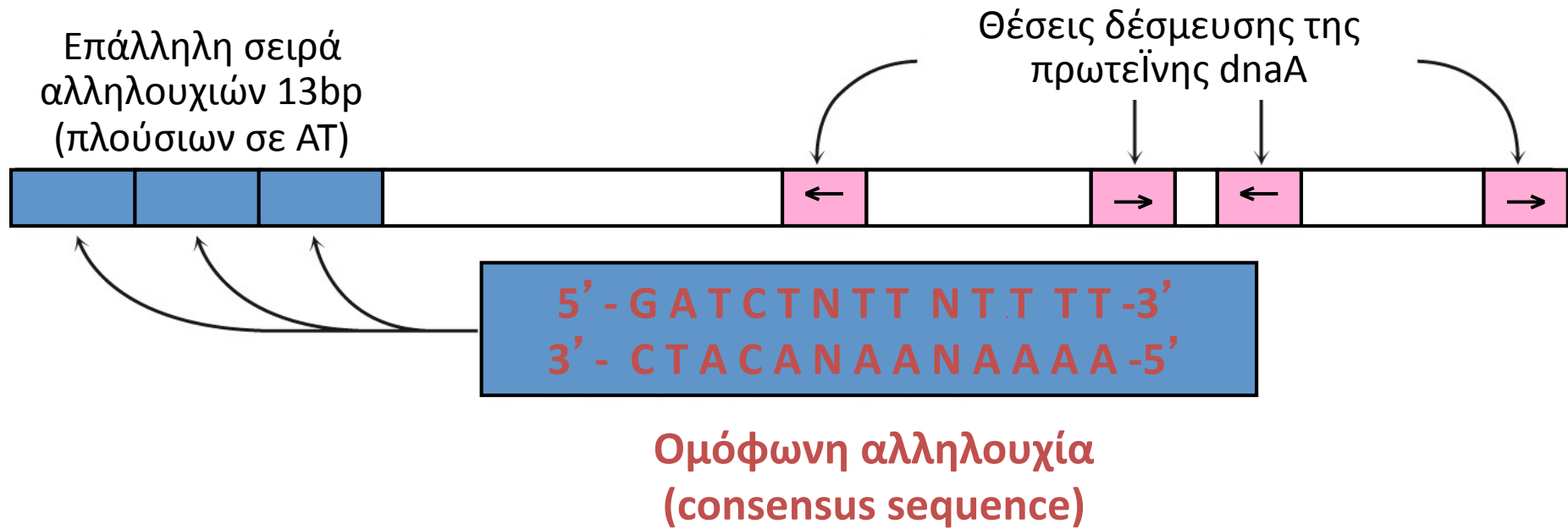
## 🌈 Ελικάση: Κινείται στη δίκλωνη περιοχή διασπώντας $\delta$ -H

- εξειδίκευση ως προς τη φορά των κλώνων  
(διαφορετικές ελικάσες δεσμεύονται στον  $5' \rightarrow 3'$  και  $3' \rightarrow 5'$  κλώνο)

## 🌈 Ενέργεια από υδρόλυση ATP

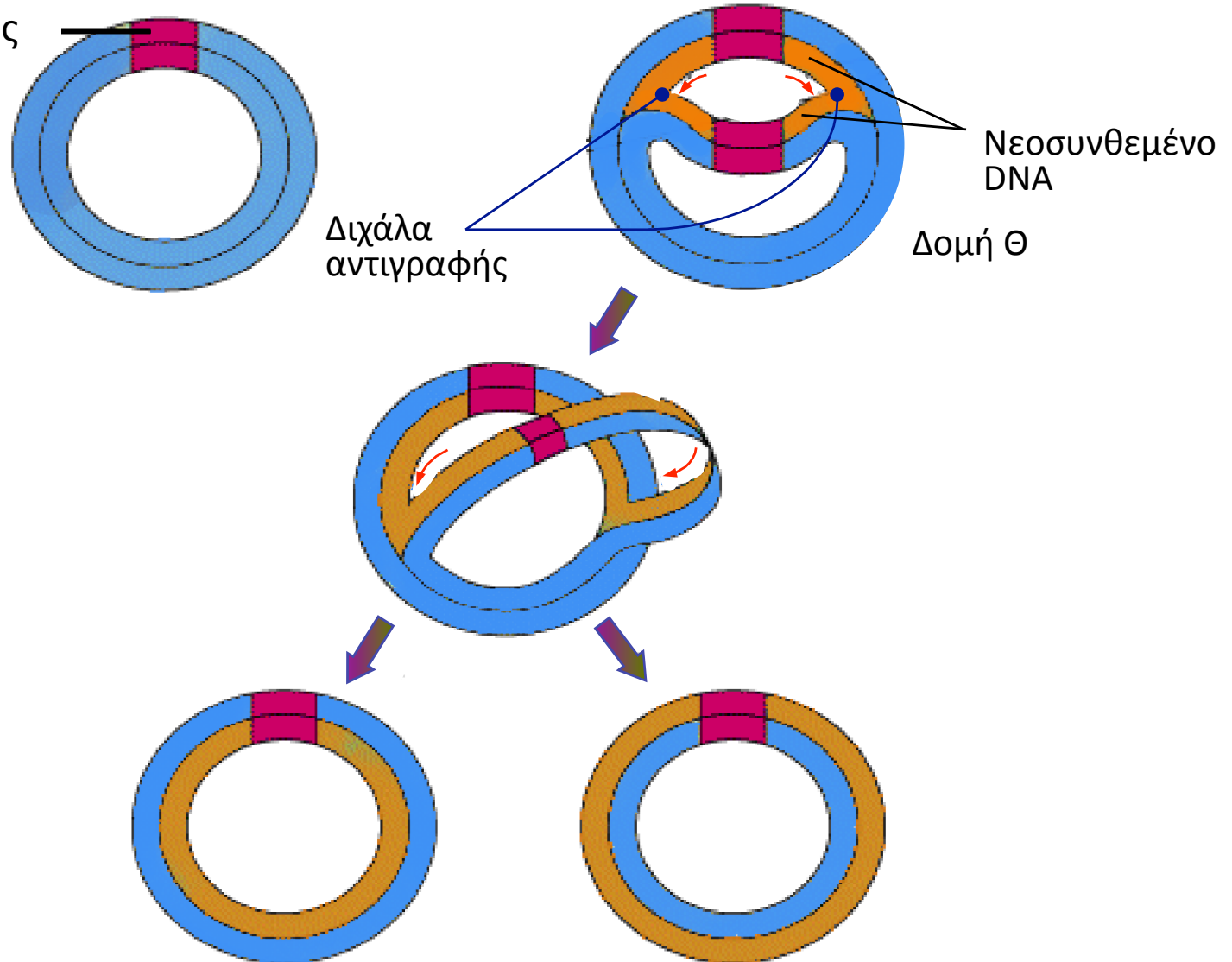
# Περιοχή έναρξης της αντιγραφής

*Escherichia coli*

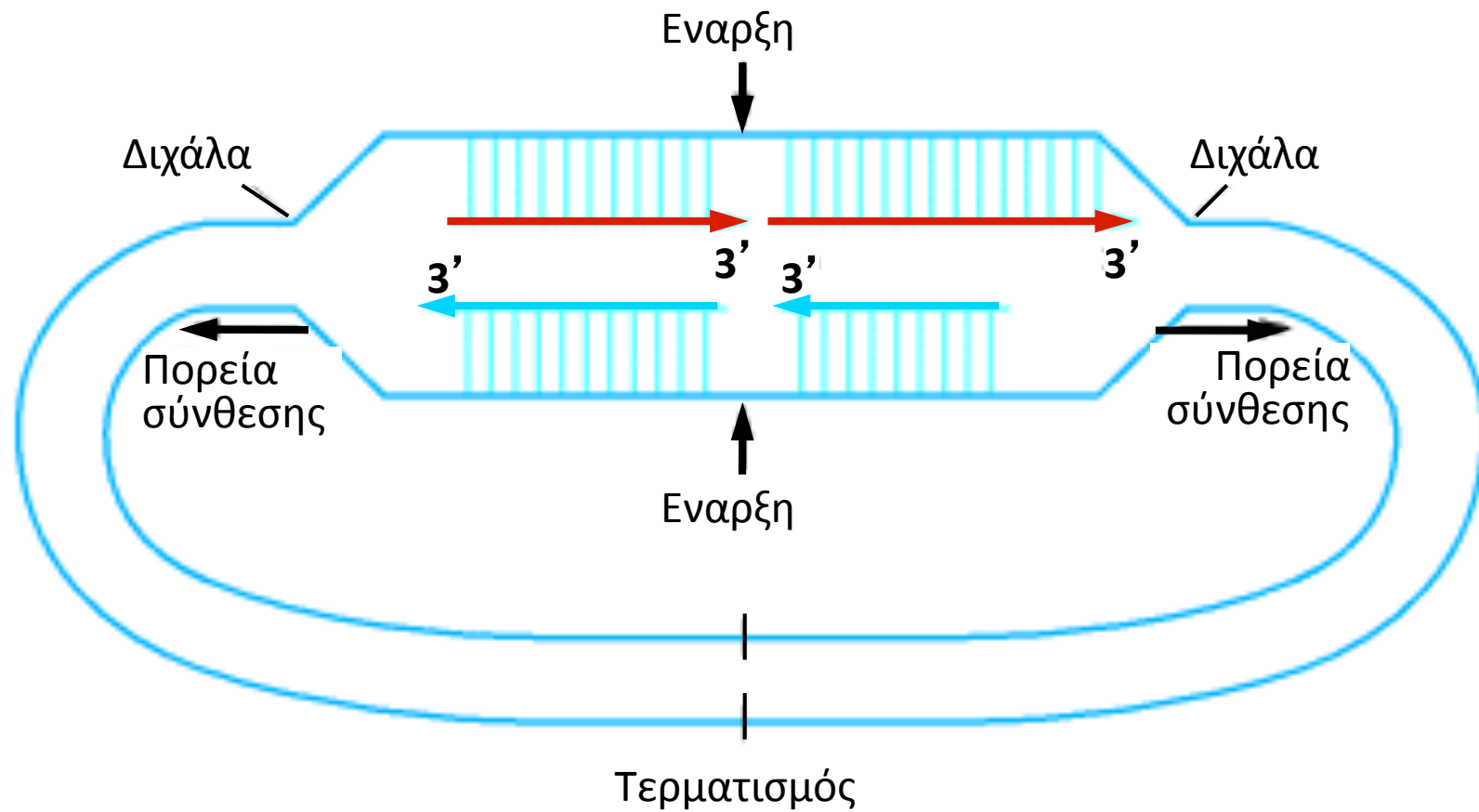


# Η αντιγραφή αρχίζει σε ειδική θέση: έναρξη της αντιγραφής (origin of replication)

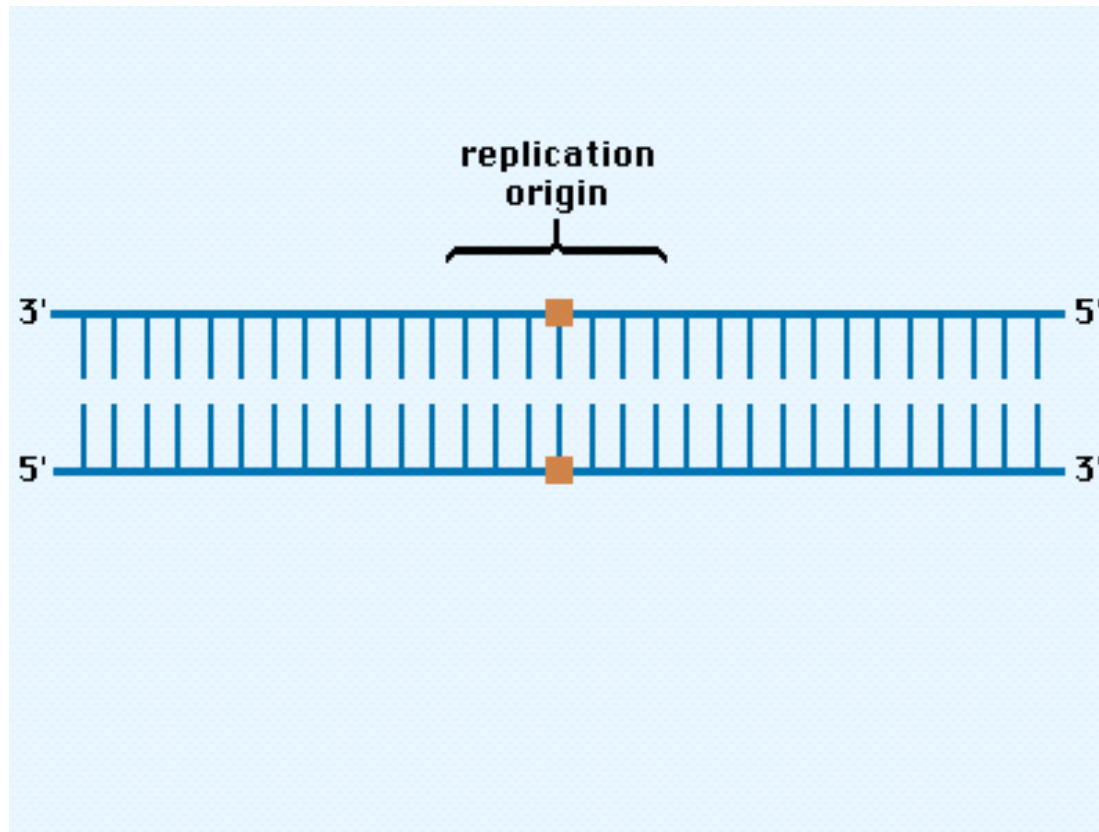
Εναρξη αντιγραφής



# Η αντιγραφή προχωρά προς τις δύο κατευθύνσεις σχηματίζοντας τις δομές Θ

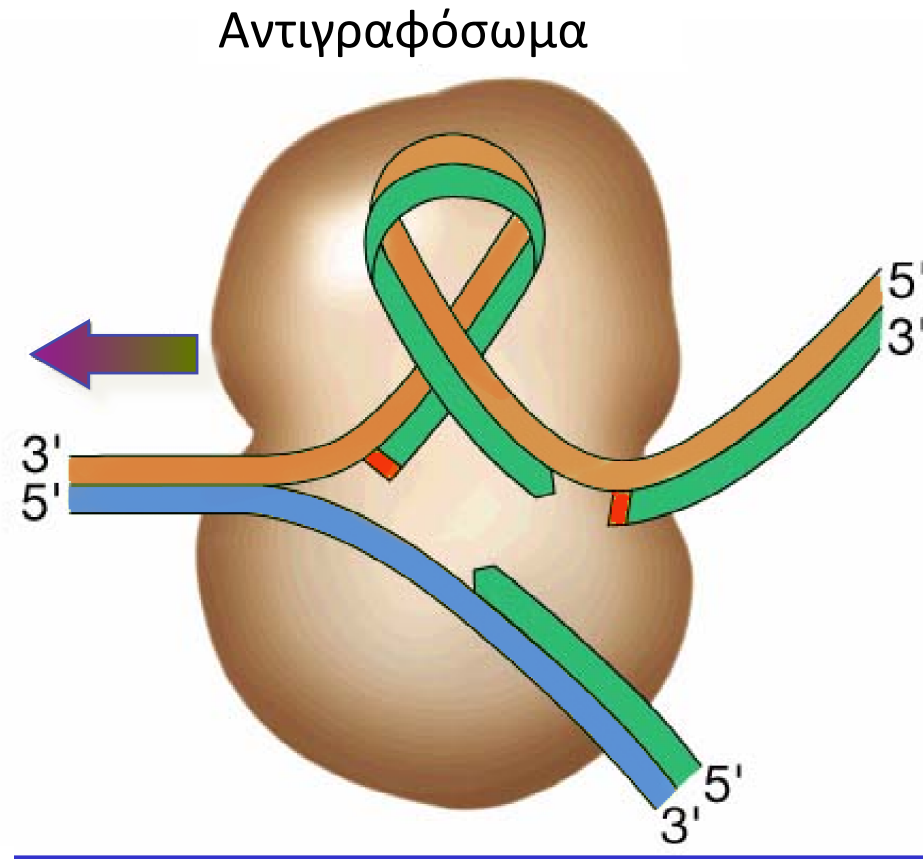


# Η έναρξη της αντιγραφής



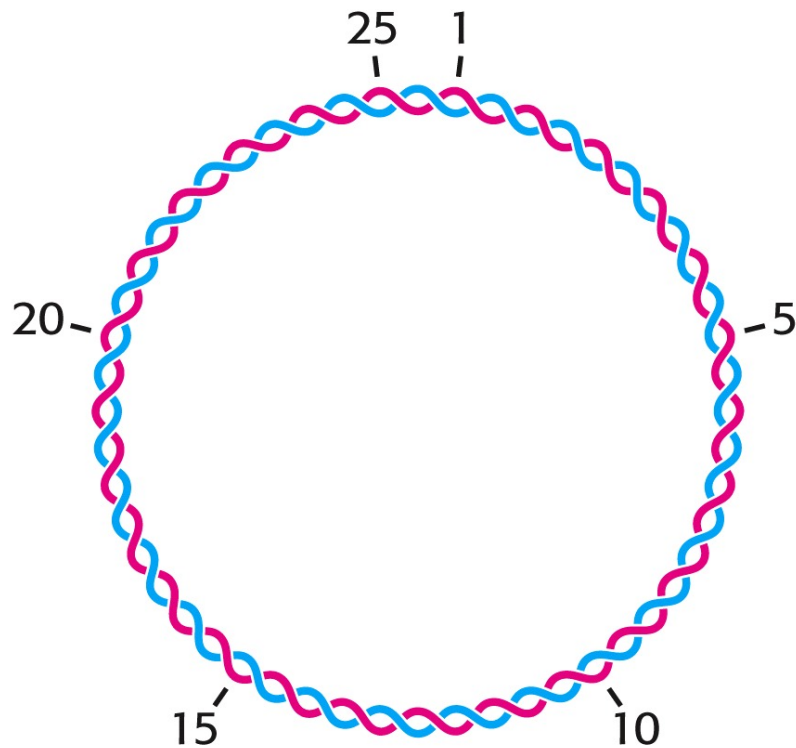
Molecular Cell Biology, 4<sup>th</sup> Edition

# Αντιγραφώσωμα (Replisome ή replication factory)



Ο ρυθμός αντιγραφής στα βακτήρια είναι 750-1000 βάσεις / sec

# Στρέψη DNA



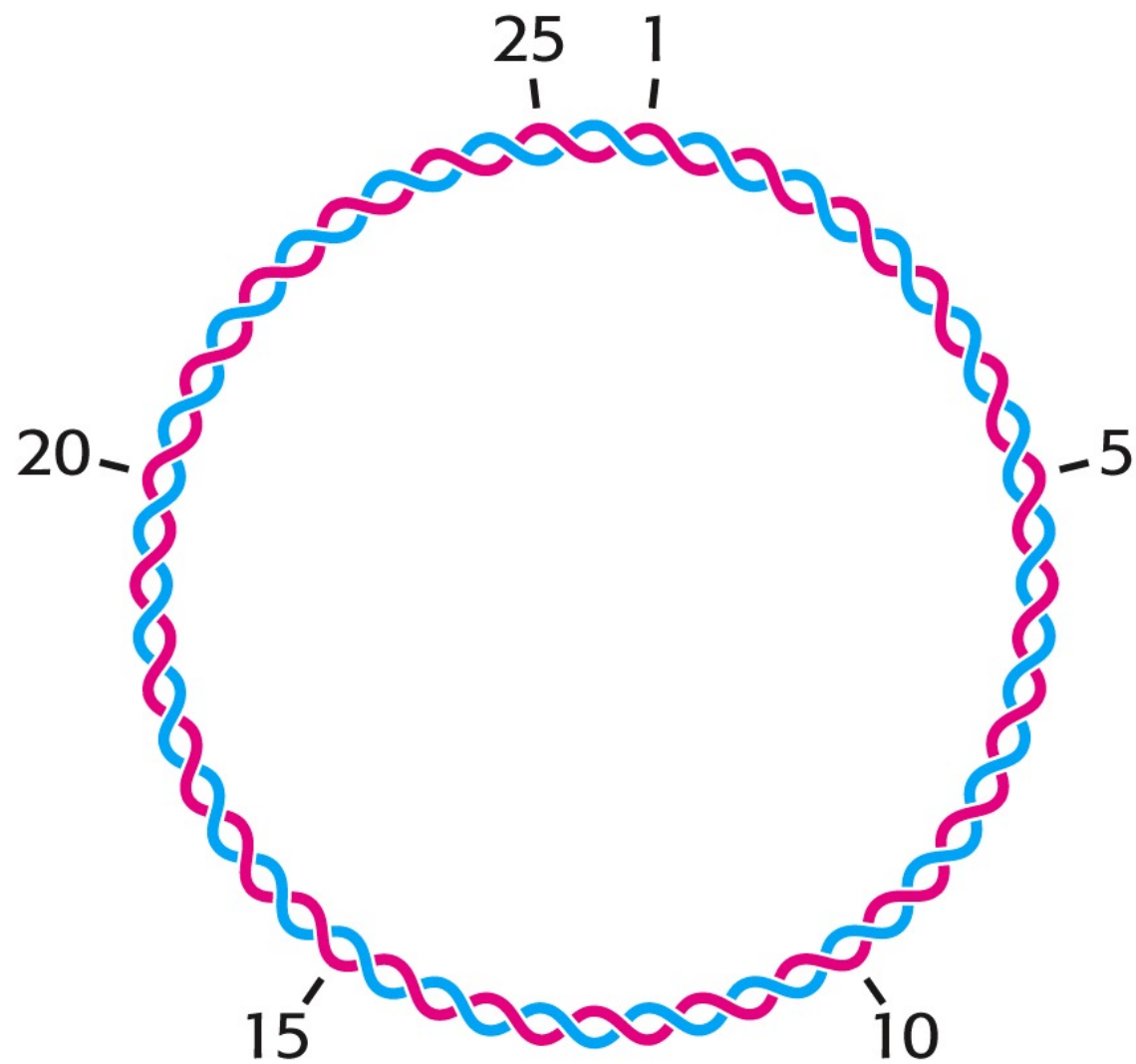
$Lk = 25, Tw = 25, Wr = 0$   
**Χαλαρός κύκλος**

**$Lk$ : Αριθμός συνδέσεων (linking number)**

πόσες φορές ένας κλώνος DNA περιστρέφεται  
περί τον άξονα της έλικας **δεξιόστροφα**.

**$Tw$ , Αριθμός συστροφών**

**$Wr$ , Αριθμός περιστροφών**



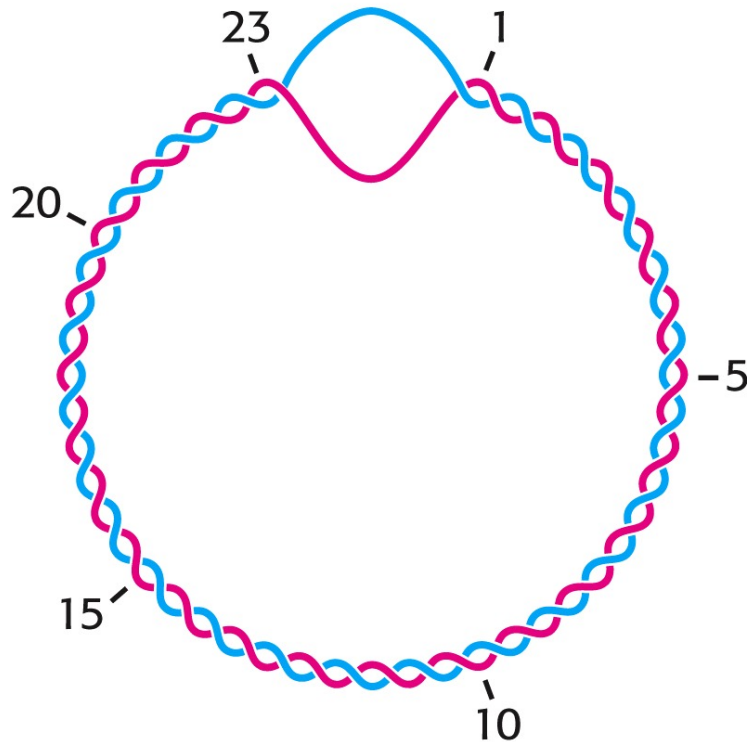
(B)  $Lk = 25, Tw = 25, Wr = 0$   
**Relaxed Circle**



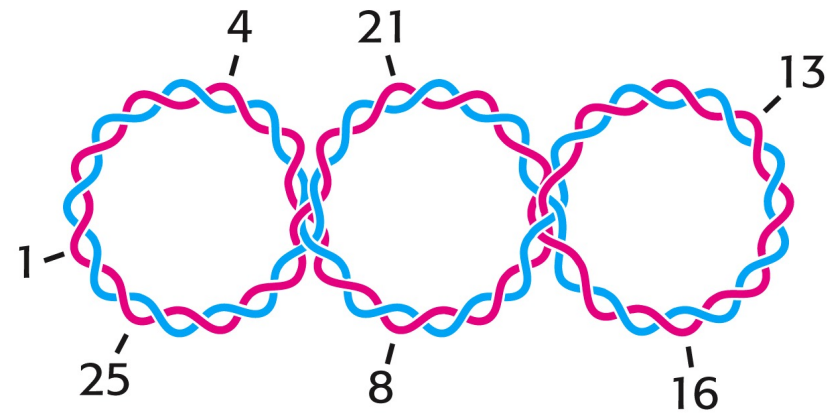
# Στρέψη DNA



(C) Γραμμικό DNA εκτυλιγμένο κατά δύο πλήρεις δεξιές στροφές

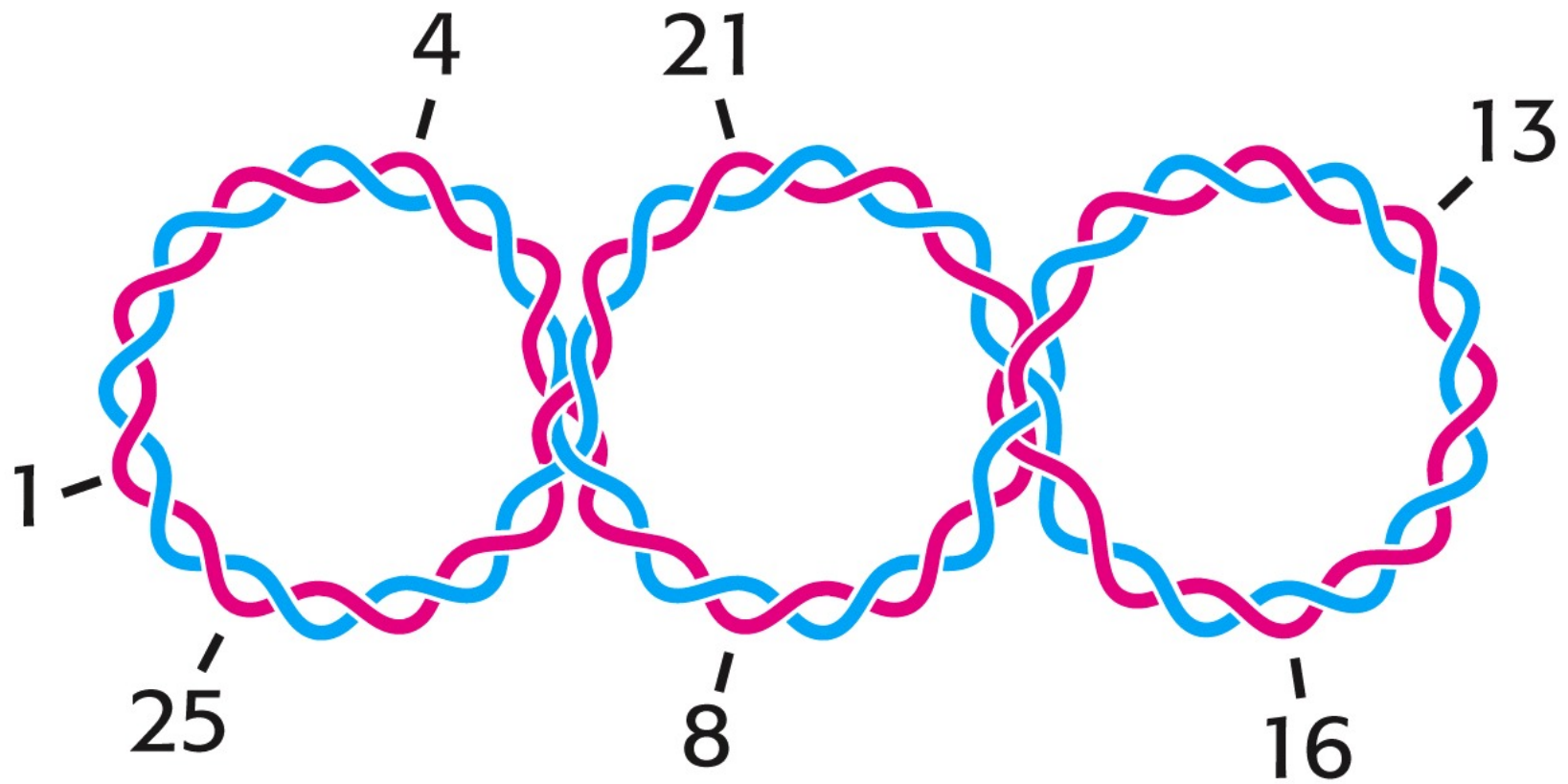


(D)  $Lk = 23, Tw \sim 23, Wr \sim 0$   
Εκτυλιγμένος κύκλος

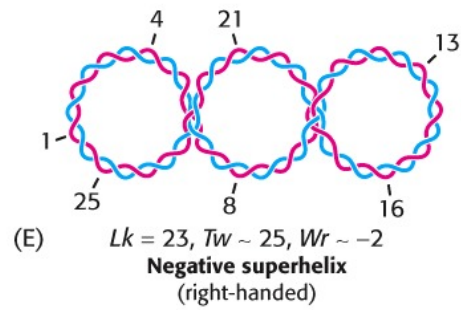
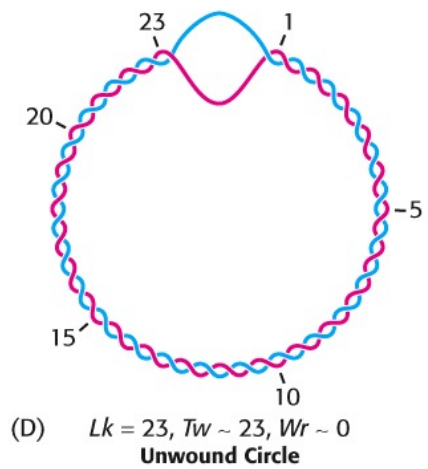
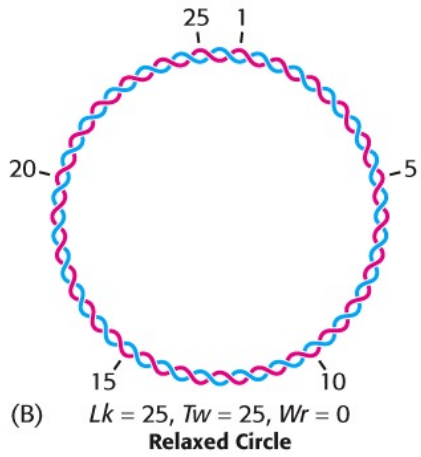


(E)  $Lk = 23, Tw \sim 25, Wr \sim -2$

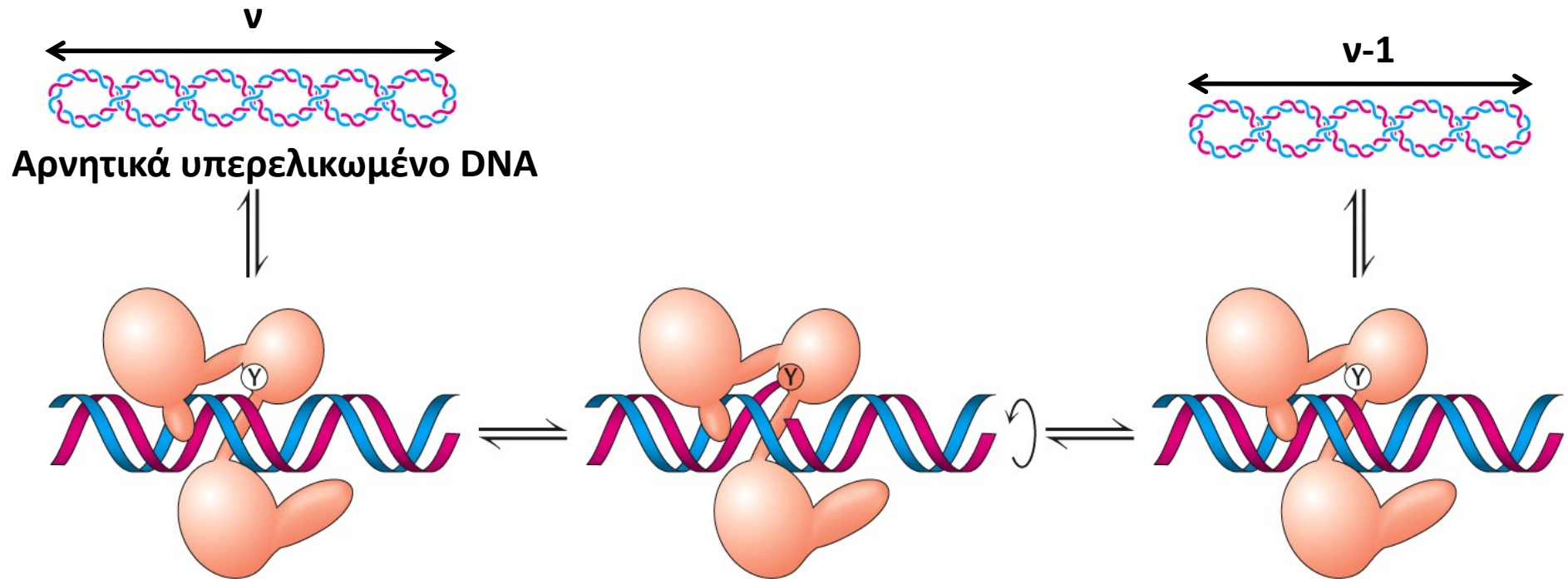
**Αρνητική υπερέλικα**  
(δεξιόστροφη)



(E)  $Lk = 23, Tw \sim 25, Wr \sim -2$   
**Negative superhelix**  
 (right-handed)

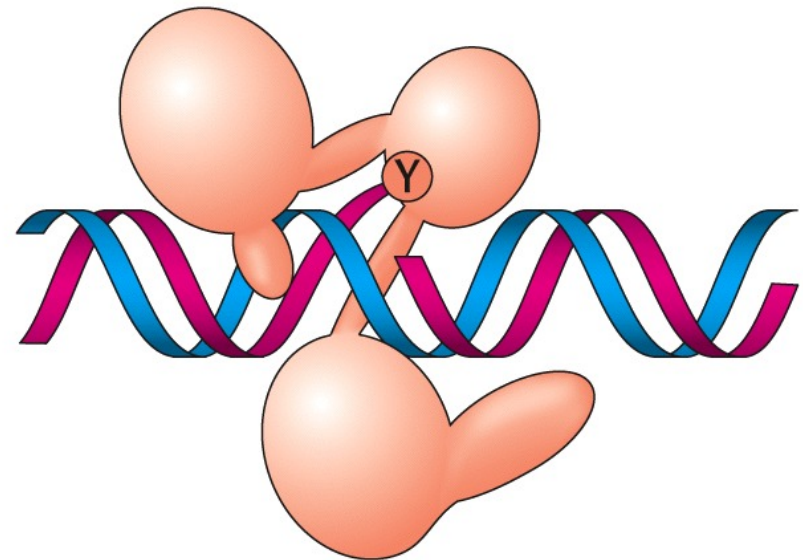
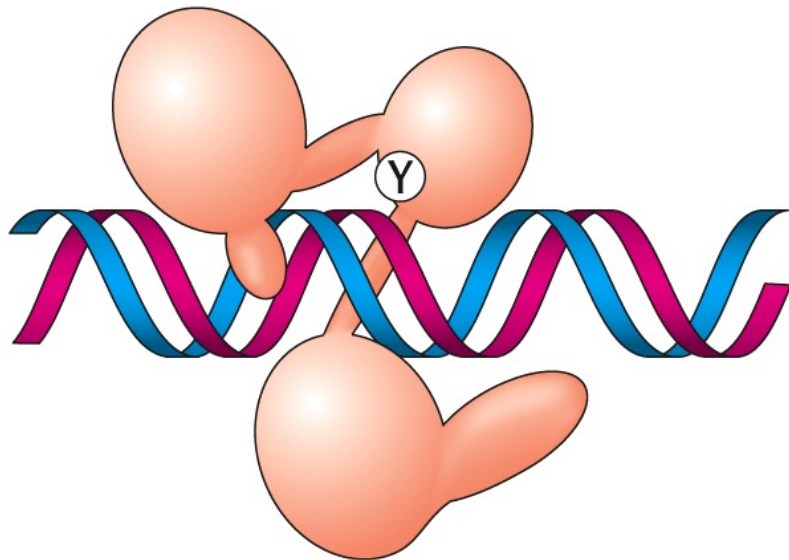


# Τοποϊσομεράση I

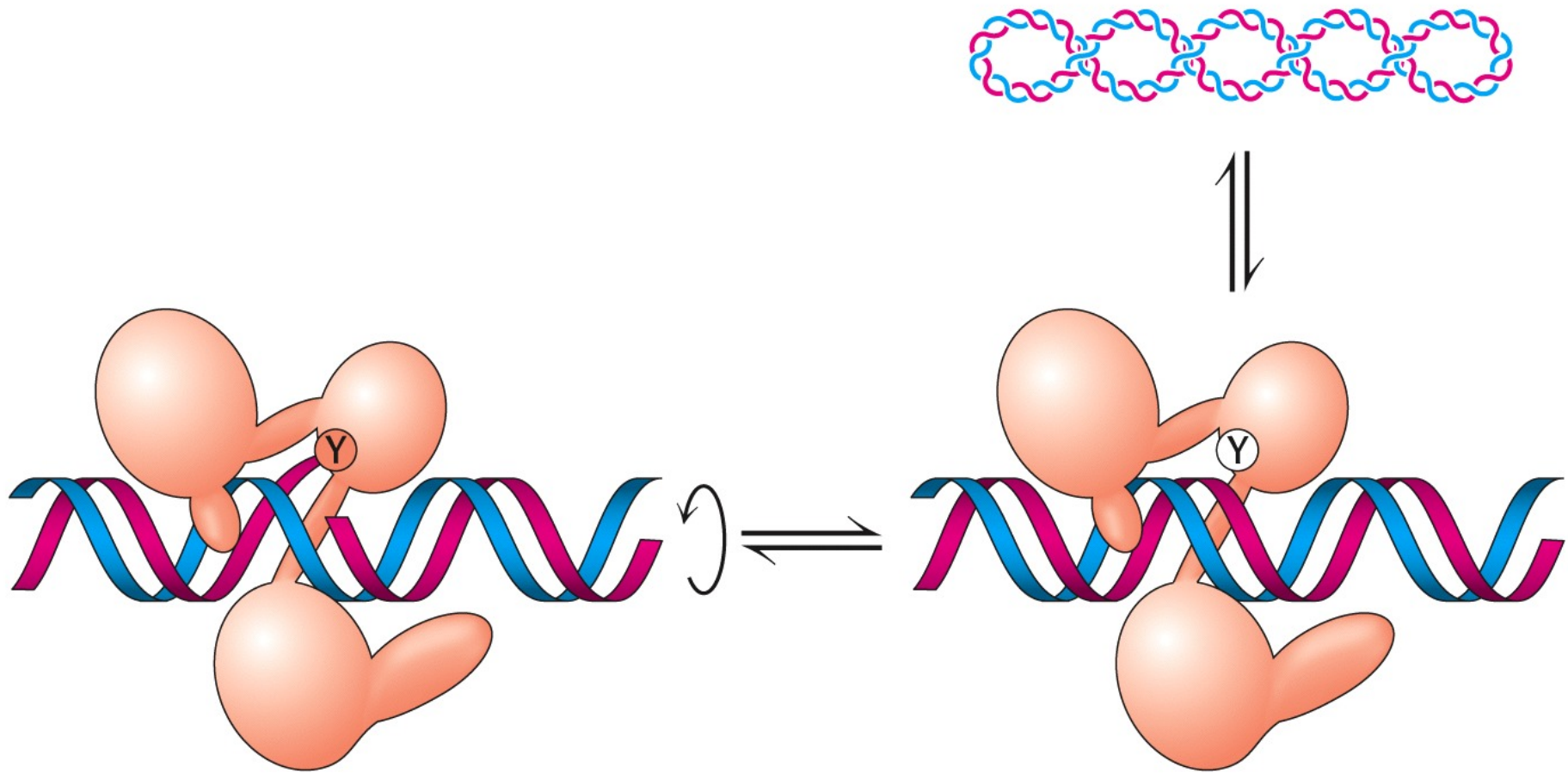




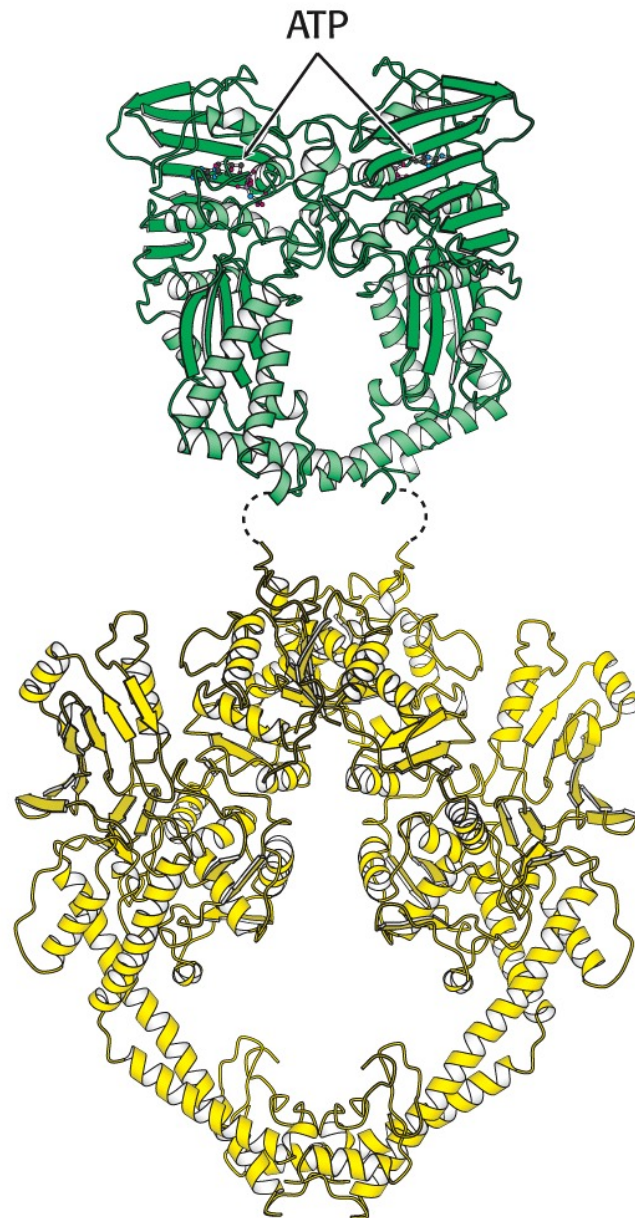
**Αρνητικά υπερελικωμένο DNA**







## Τοποϊσομεράση τύπου II



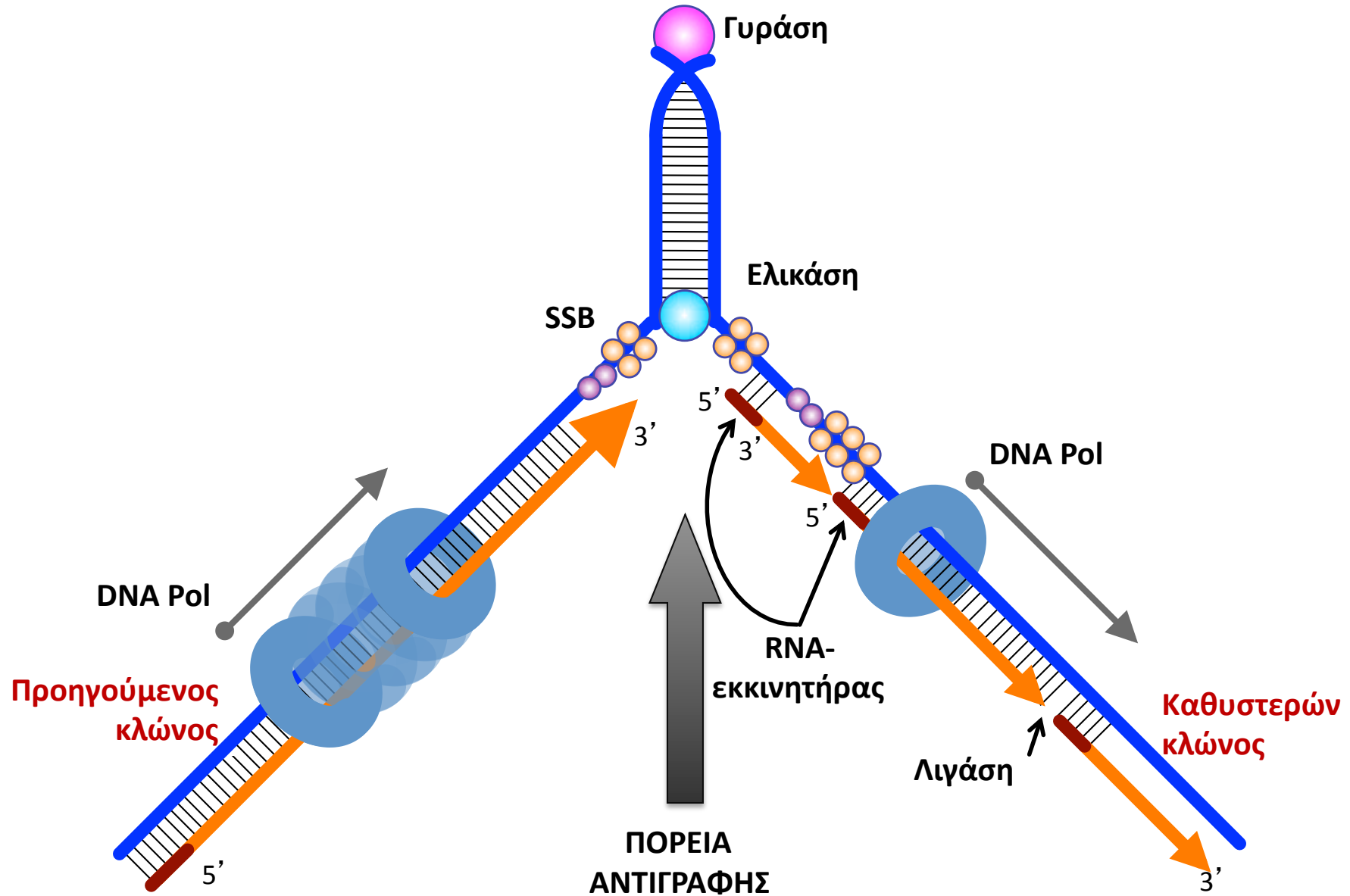
- DNA γυράση
- Κόβει και τους δύο κλώνους και εισάγει αρνητικές υπερελικώσεις (με κατανάλωση ATP)

# Τοποϊσομεράσες



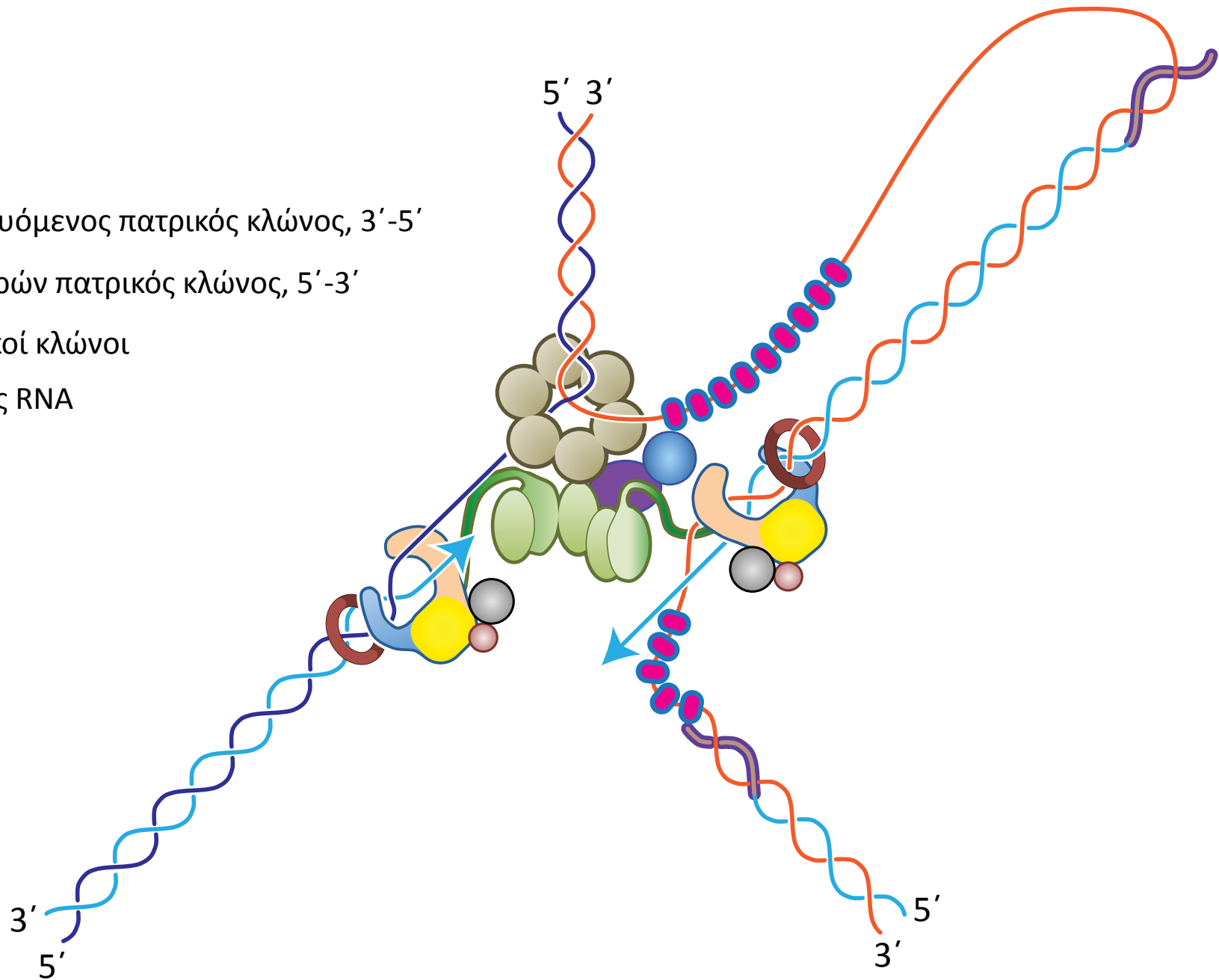


# Σχηματική αναπαράσταση των γεγονότων σε μια διχάλα αντιγραφής



# Η αντιγραφή των δύο κλώνων

- Προπορευόμενος πατρικός κλώνος, 3'-5'
- Καθυστερών πατρικός κλώνος, 5'-3'
- Θυγατρικοί κλώνοι
- Εκκινητής RNA



# Το ολοένζυμο της Πολυμεράσης III του DNA, pol III

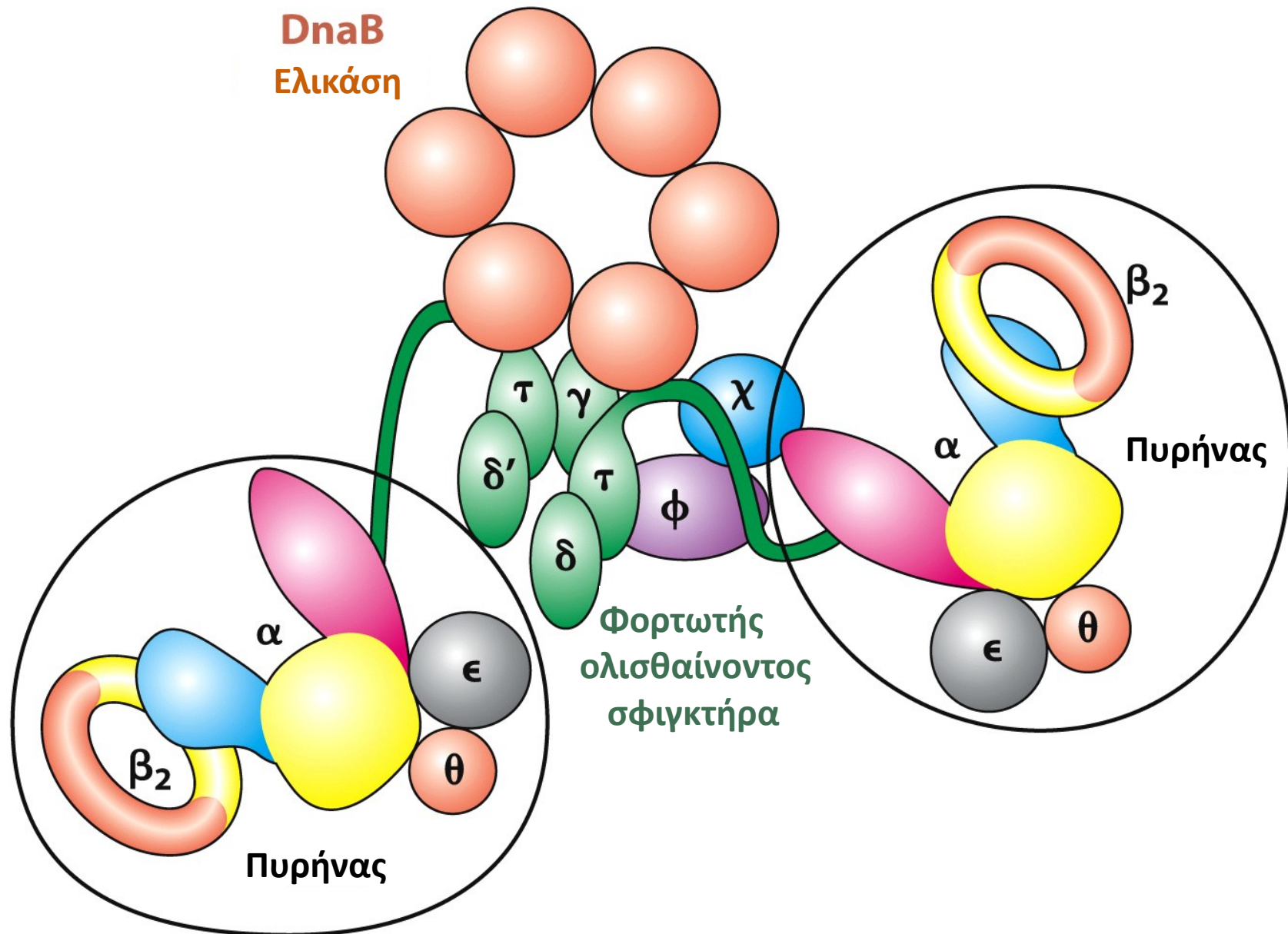
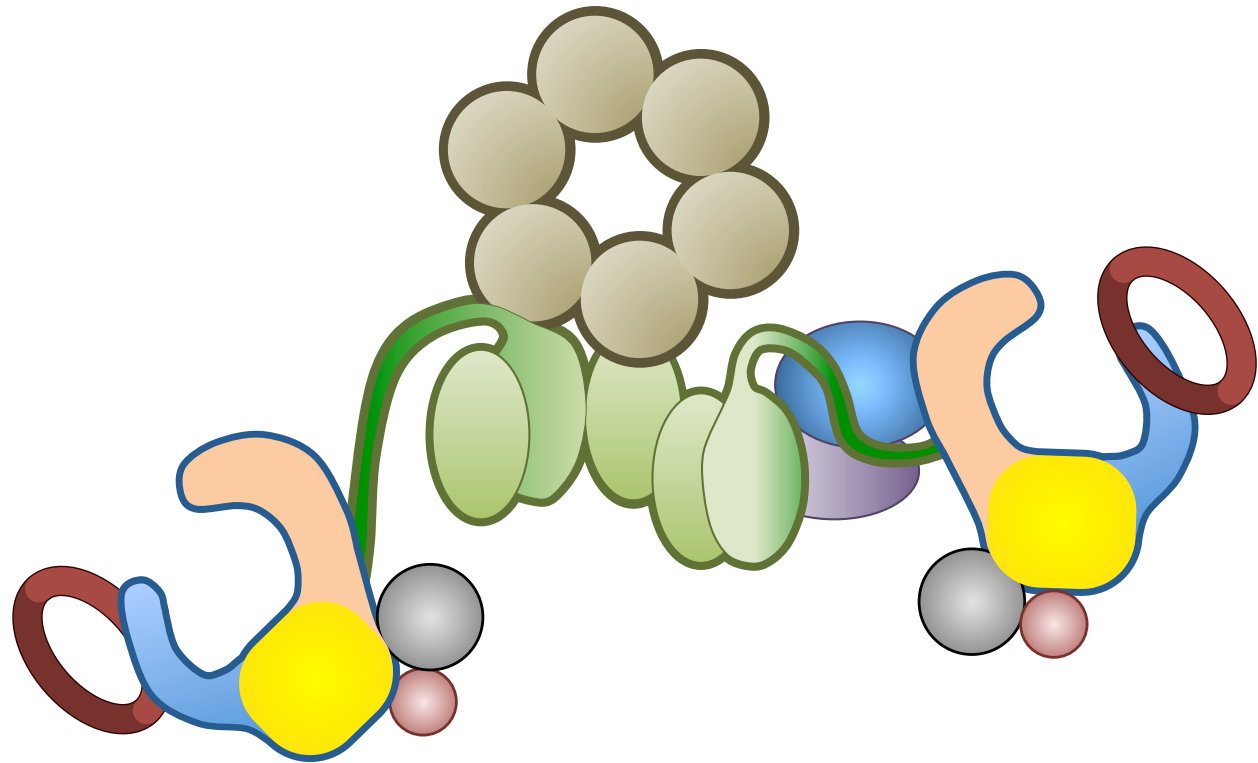
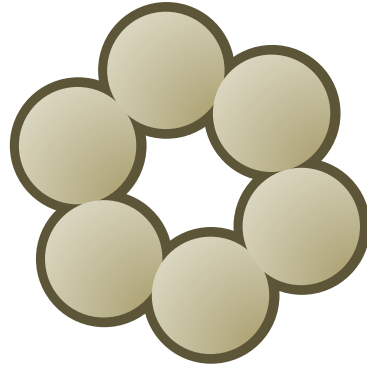


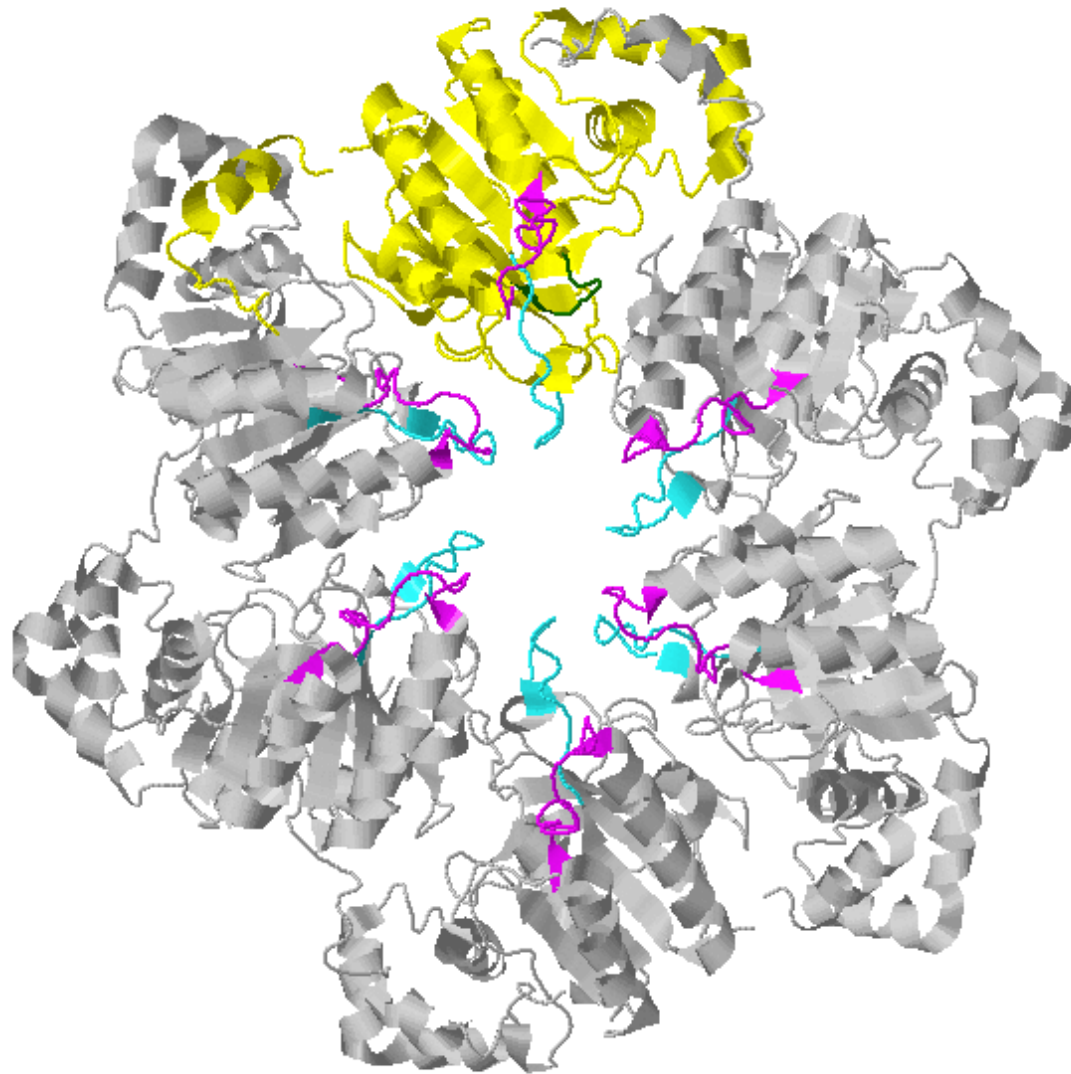
Figure 28.22  
Biochemistry, Seventh Edition  
© 2012 W. H. Freeman and Company



# Ελικάση του DNA



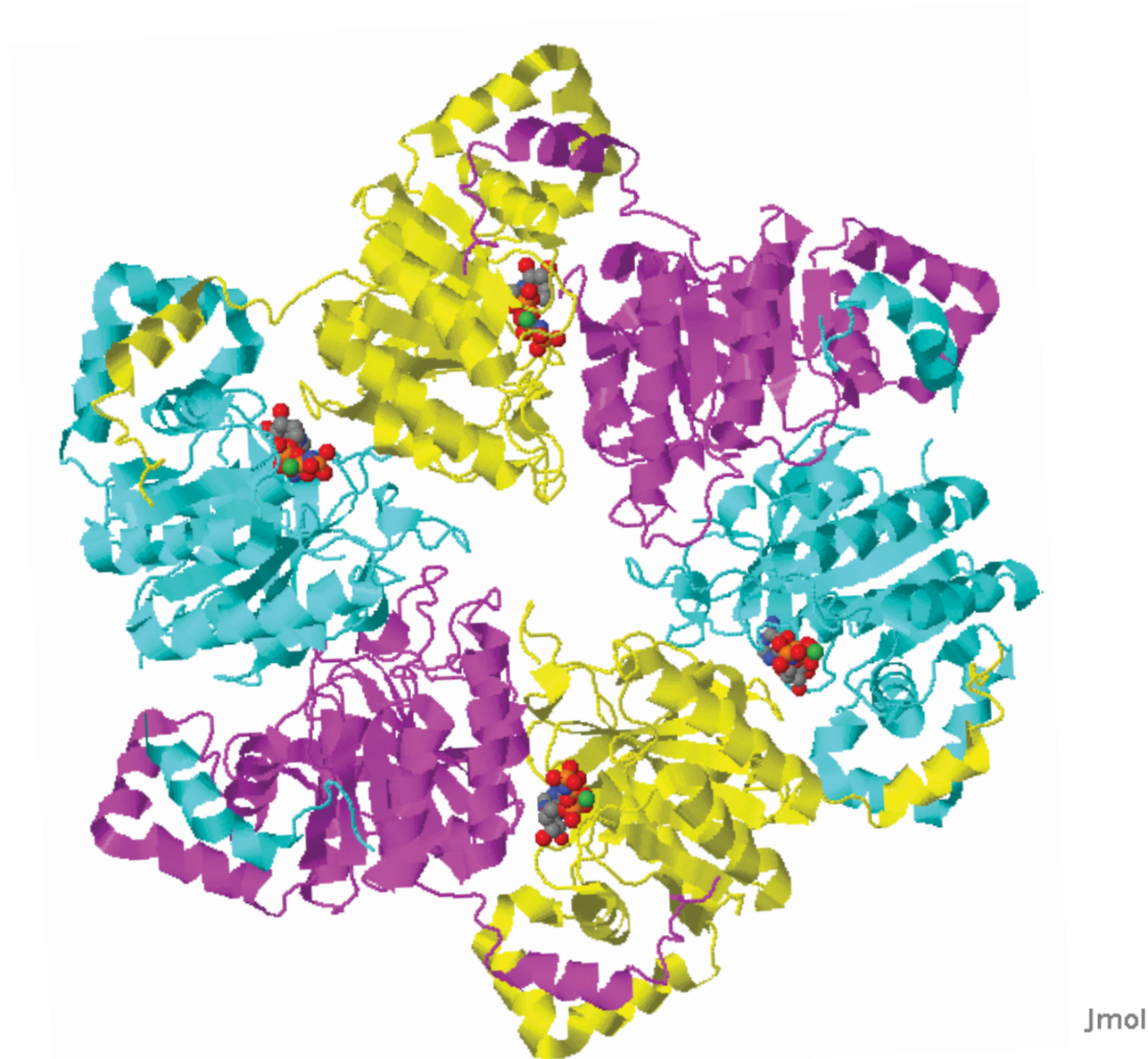
# Ελικάση του DNA



Jmol

**Figure 28.11 Helicase structure.** The structure of the hexameric helicase from bacteriophage T7. One of the six subunits is shown in yellow with the P-loop NTPase shown in purple. The loops that participate in DNA binding are highlighted by a yellow oval. Notice that each subunit interacts closely with its neighbors and that the DNA-binding loops line the hole in the center of the structure. [Drawn from 1E0K.pdb.]

# Η ασύμμετρη δομή της ελικάσης του DNA

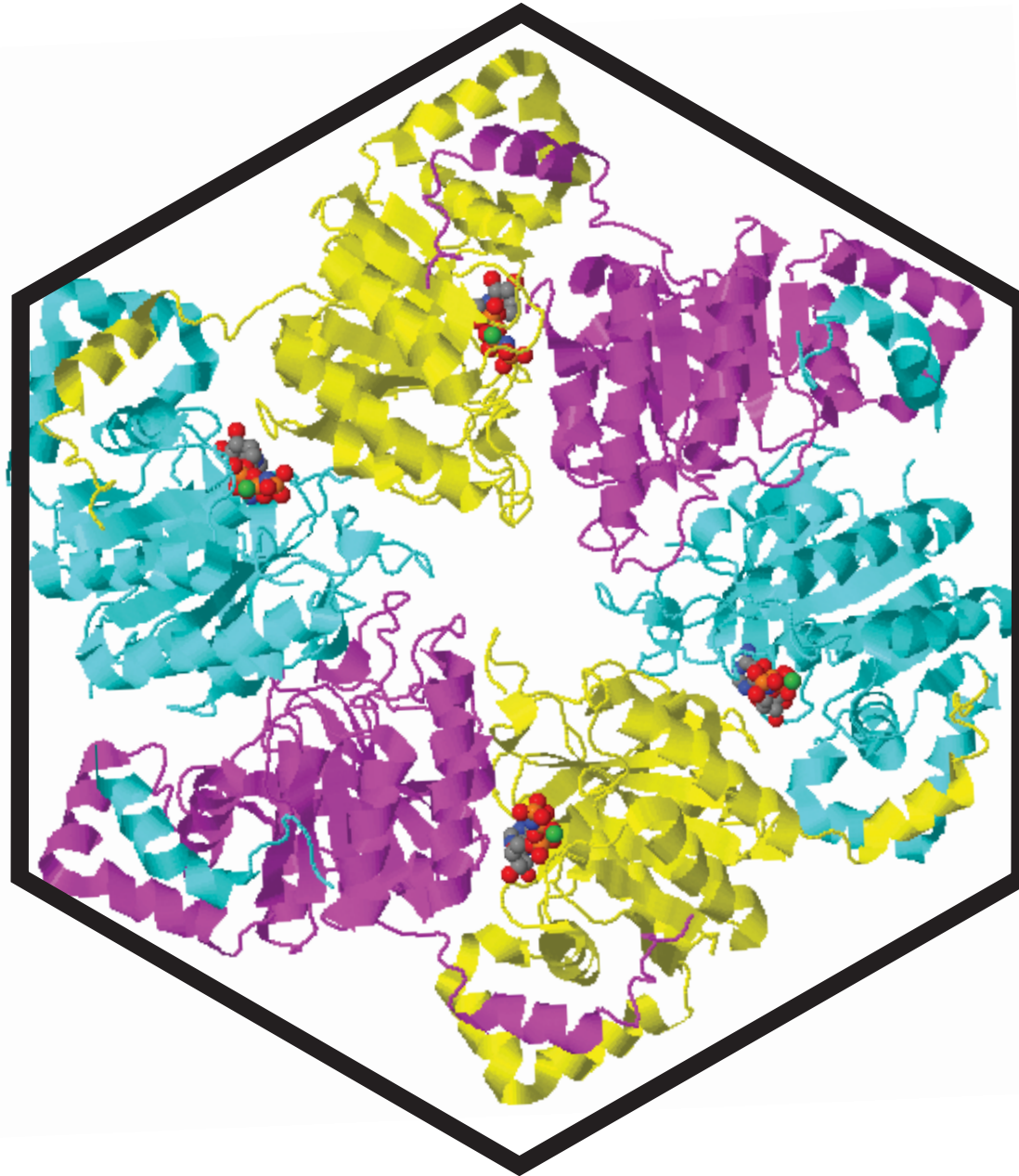


**Figure 28.12 Helicase asymmetry.** The structure of the T7 helicase complexes with the ATP analog AMP-PNP is shown. The three classes of helicase subunits are shown in blue, red, and yellow. The rotation relative to the plane of the hexamer is shown for each subunit. *Notice* that only four of the subunits, those shown in blue and yellow, bind AMP-PNP. [Drawn from 1E0K.pdb.]

[http://bcs.whfreeman.com/berg7e/#644431\\_\\_644713\\_\\_](http://bcs.whfreeman.com/berg7e/#644431__644713__)

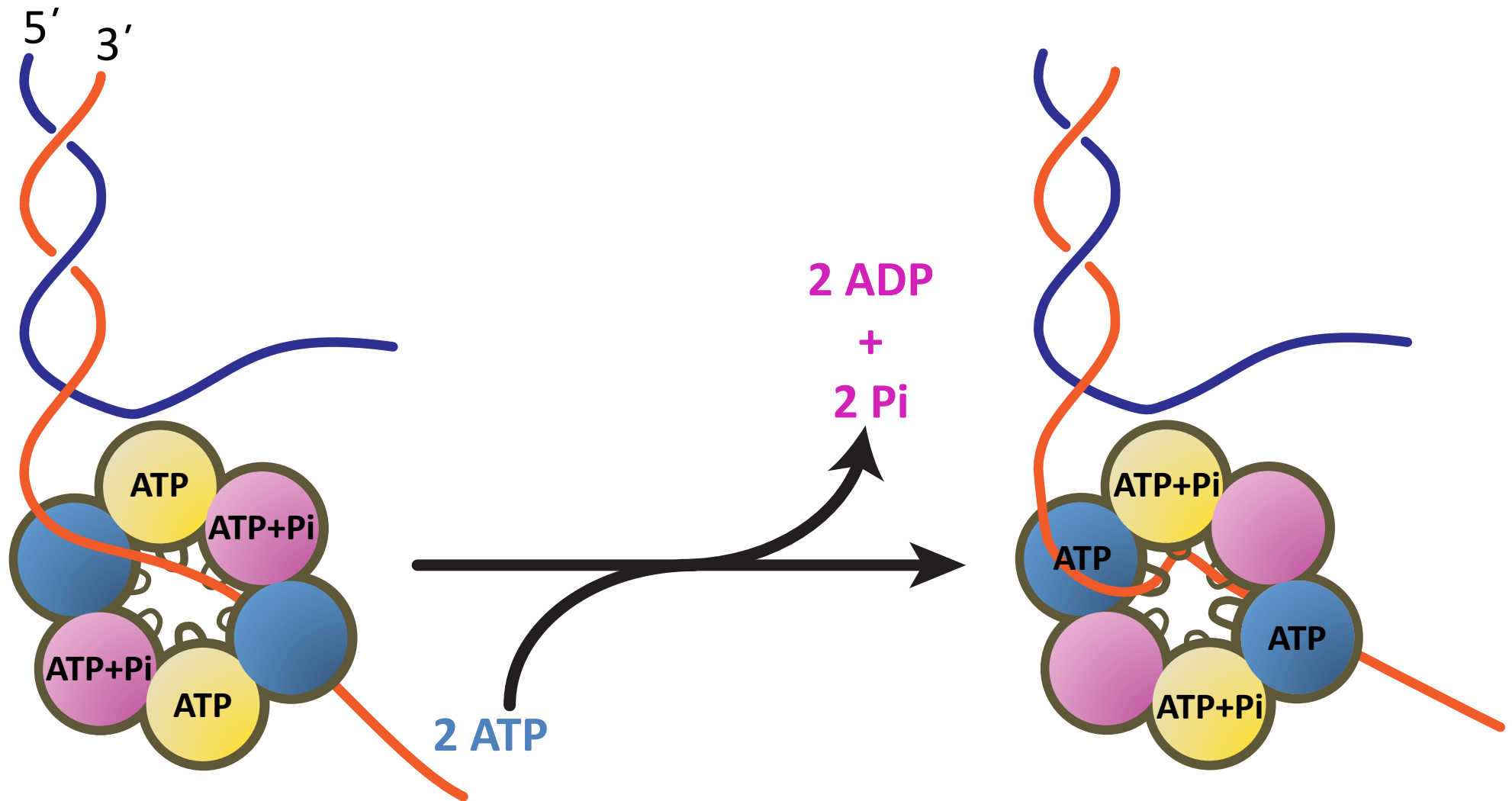


# Η ασύμμετρη δομή της ελικάσης του DNA

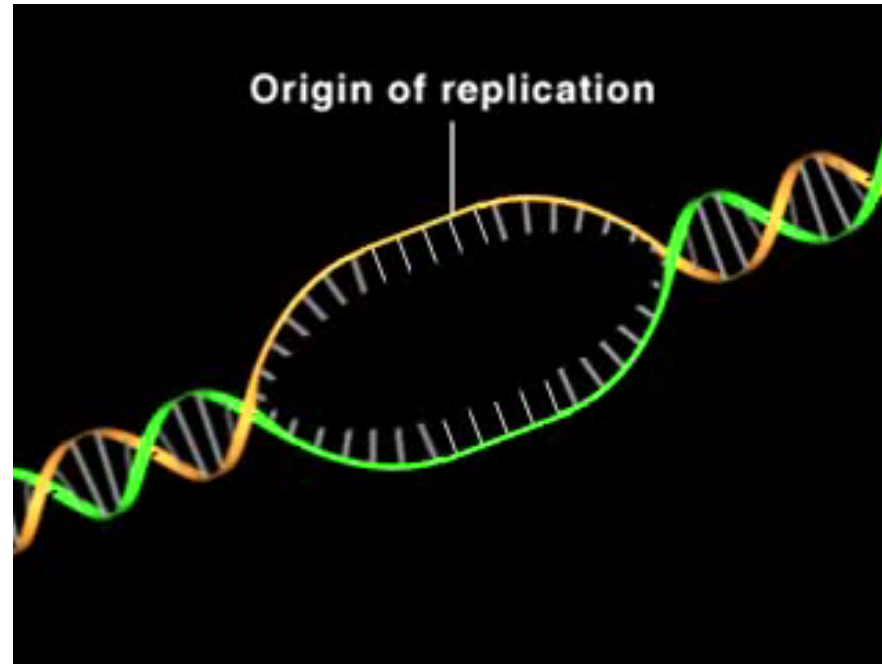




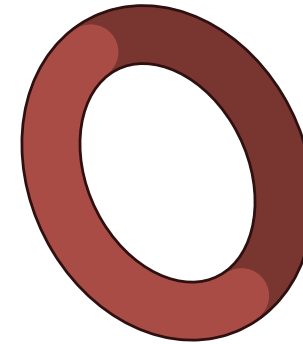
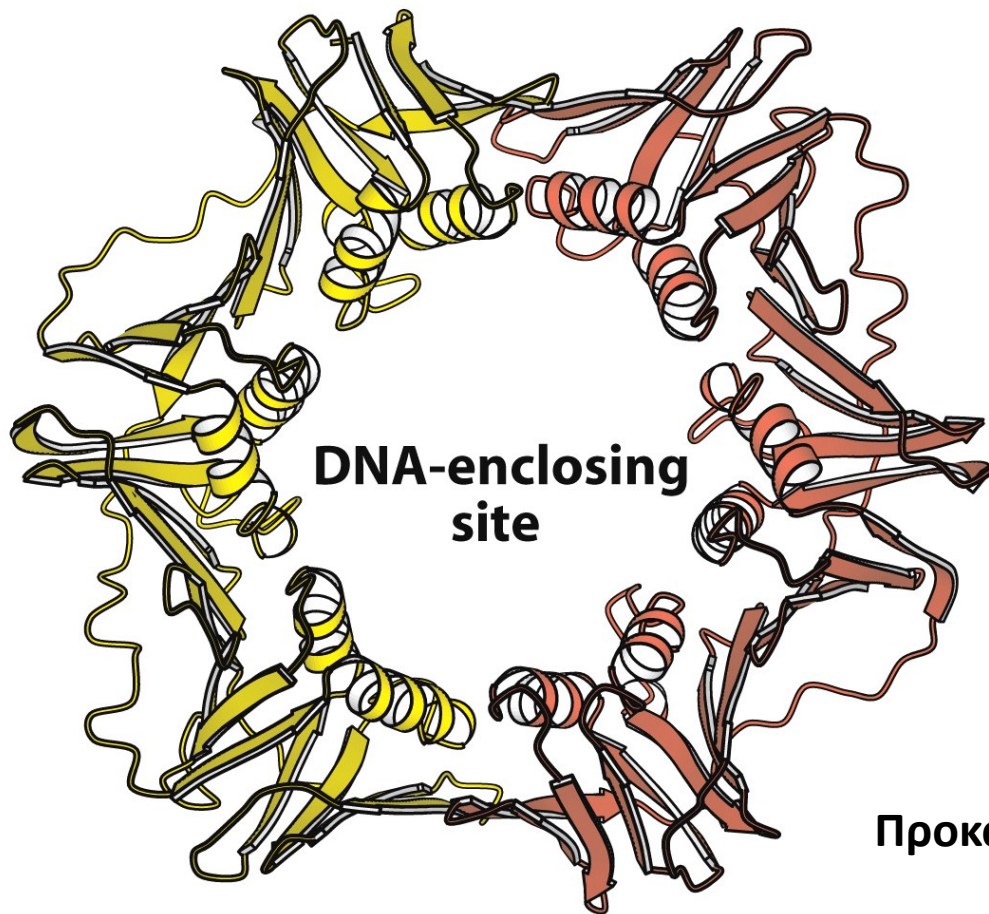
# Ο μηχανισμός της ελικάσης του DNA



# Ο μηχανισμός της ελικάσης του DNA



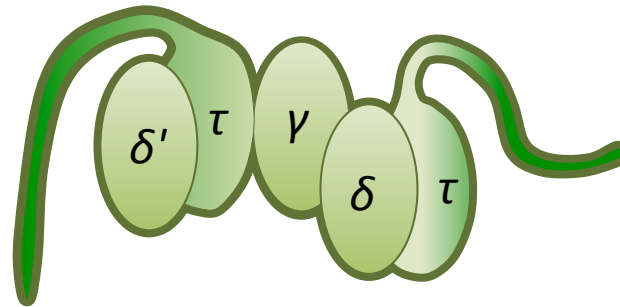
# Ο ολισθαίνων σφιγκτήρας



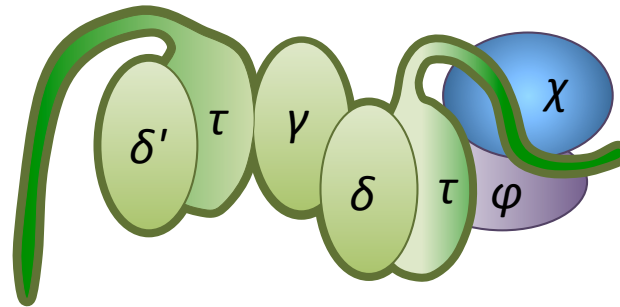
**Προκαρυωτικοί:** υπομονάδα  $\beta 2$  DNAP III

**Ευκαρυωτικοί:** PCNA, (πυρηνικό αντιγόνο  
πολλαπλασιαζόμενου κυττάρου,  
*proliferating cell nuclear antigen*)

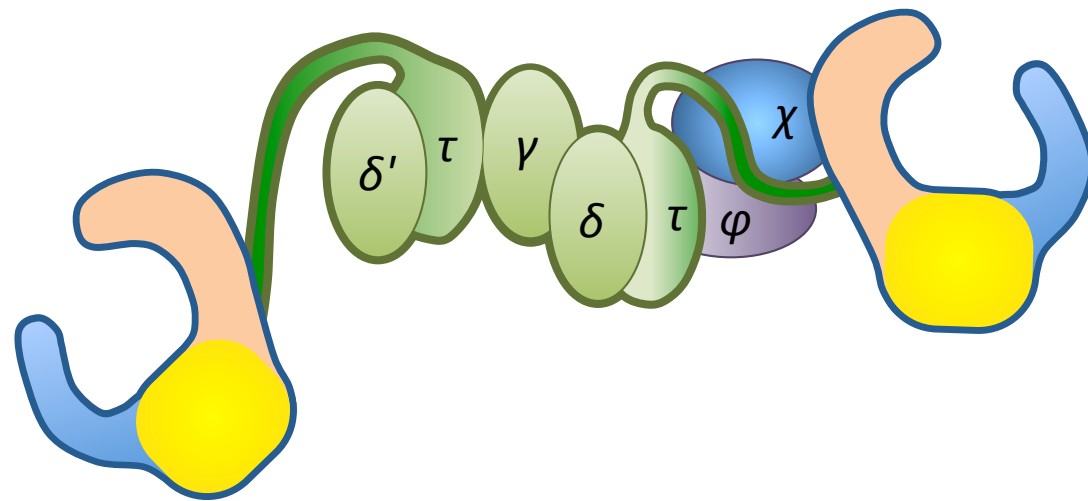
# Ο φορτωτής του ολισθαίνοντος σφιγκτήρα

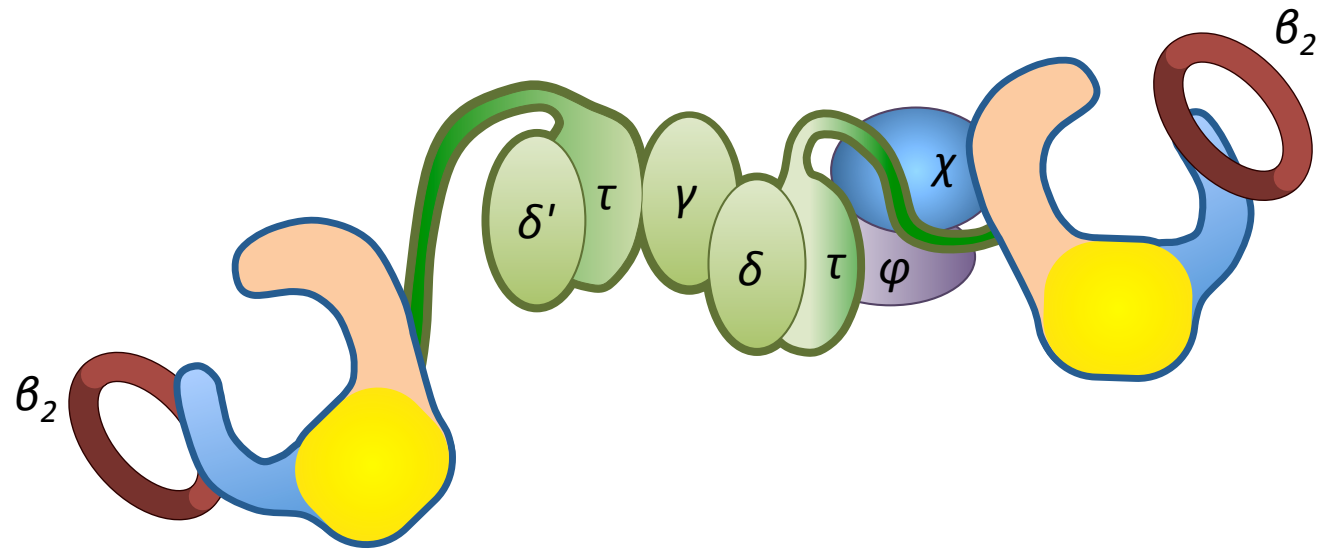


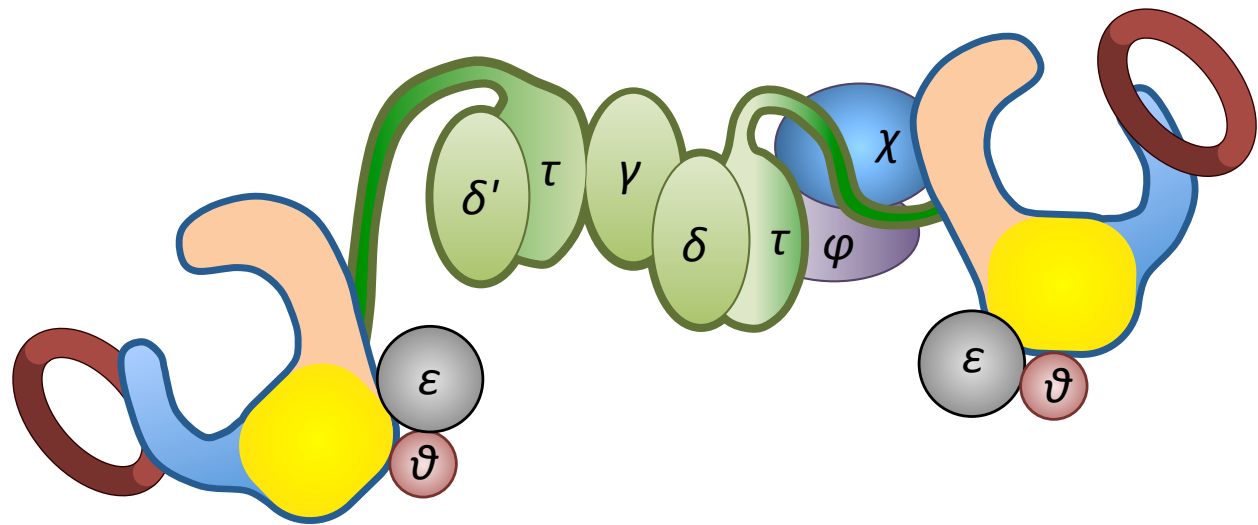
# Υπομονάδες $\chi$ και $\varphi$ , Αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες SSB



**SSB:** Single-stranded-binding protein, πρωτεΐνη δέσμευσης μονόκλωνου DNA

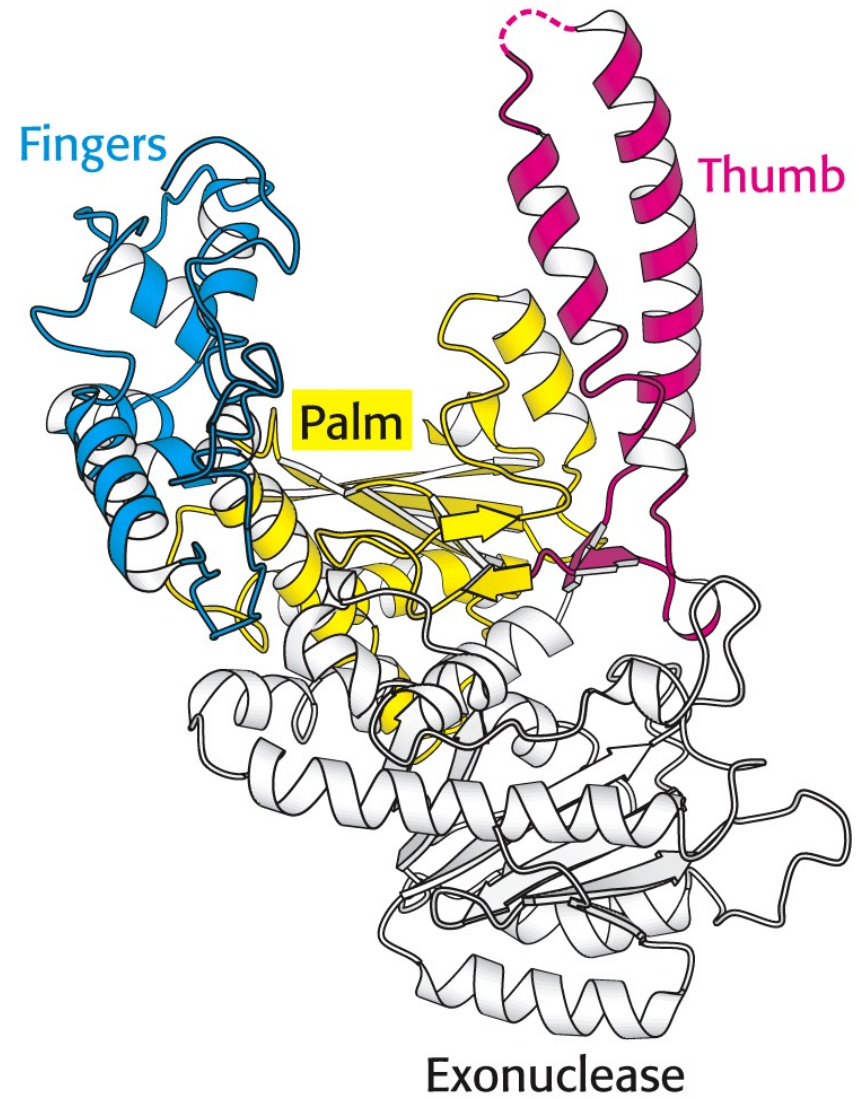
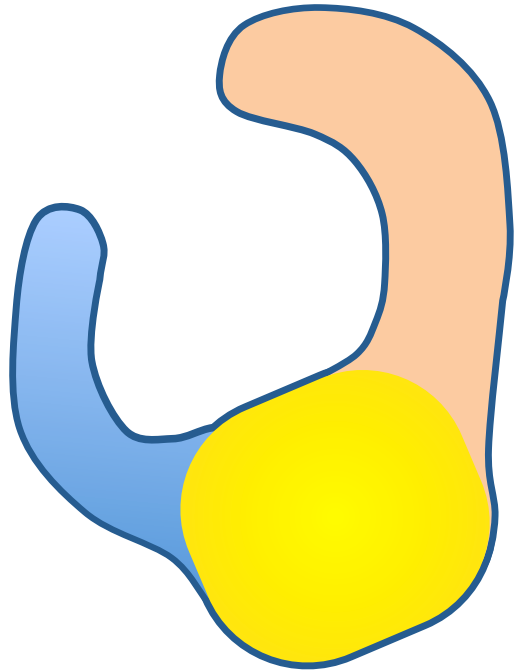








# Οι αντιγραφικές πολυμεράσες του DNA



# Οικογένειες πολυμερασών DNA

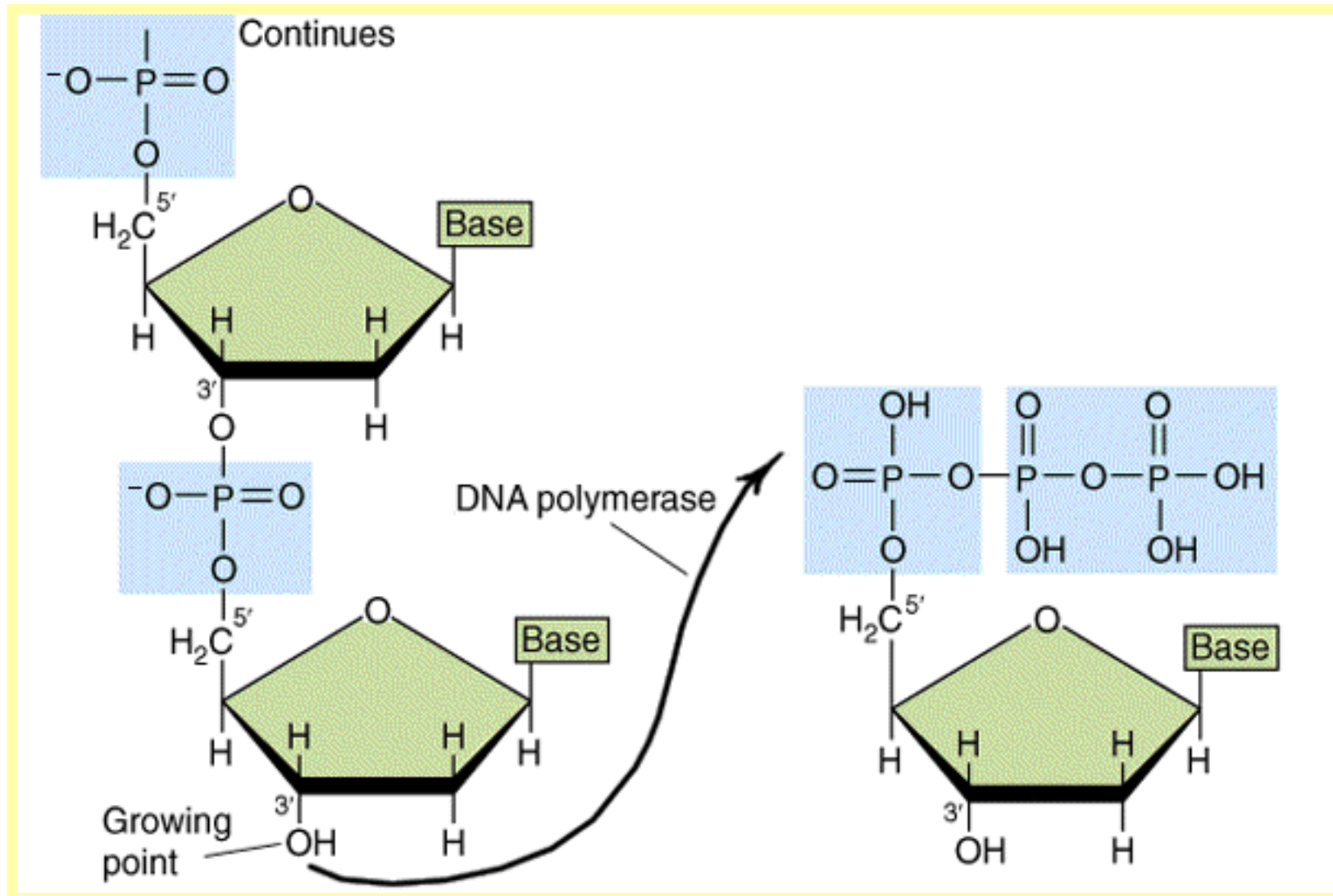
Οικογένεια	Τύπος πολυμεράσης DNA	Είδος*	Παραδείγματα
<b>A</b>	Αντιγραφική και Επιδιορθωτική	Ε, Π	T7 πολυμεράση, Pol I, γ, θ
<b>B</b>	Αντιγραφική και Επιδιορθωτική	Ε, Π	Pol II, Pol B, Pol ζ, α, δ, ε
<b>C</b>	Αντιγραφική	Π	Pol III
<b>D</b>	Αντιγραφική	Ευρυαρχαιότα	Ελλιπής χαρακτηρισμός
<b>X</b>	Αντιγραφική και Επιδιορθωτική	Ε	Pol β, σ, λ, μ, Τελική μεταφοράση δεοξυνουκλεοτιδίων
<b>Y</b>	Αντιγραφική και Επιδιορθωτική	Ε, Π	Pol ι, κ, Pol IV, Pol V
<b>RT</b>	Αντιγραφική και Επιδιορθωτική	Ιοί, Ρετροϊοί, Ε	Τελομεράση, Ιός Ηπατίτιδας Β

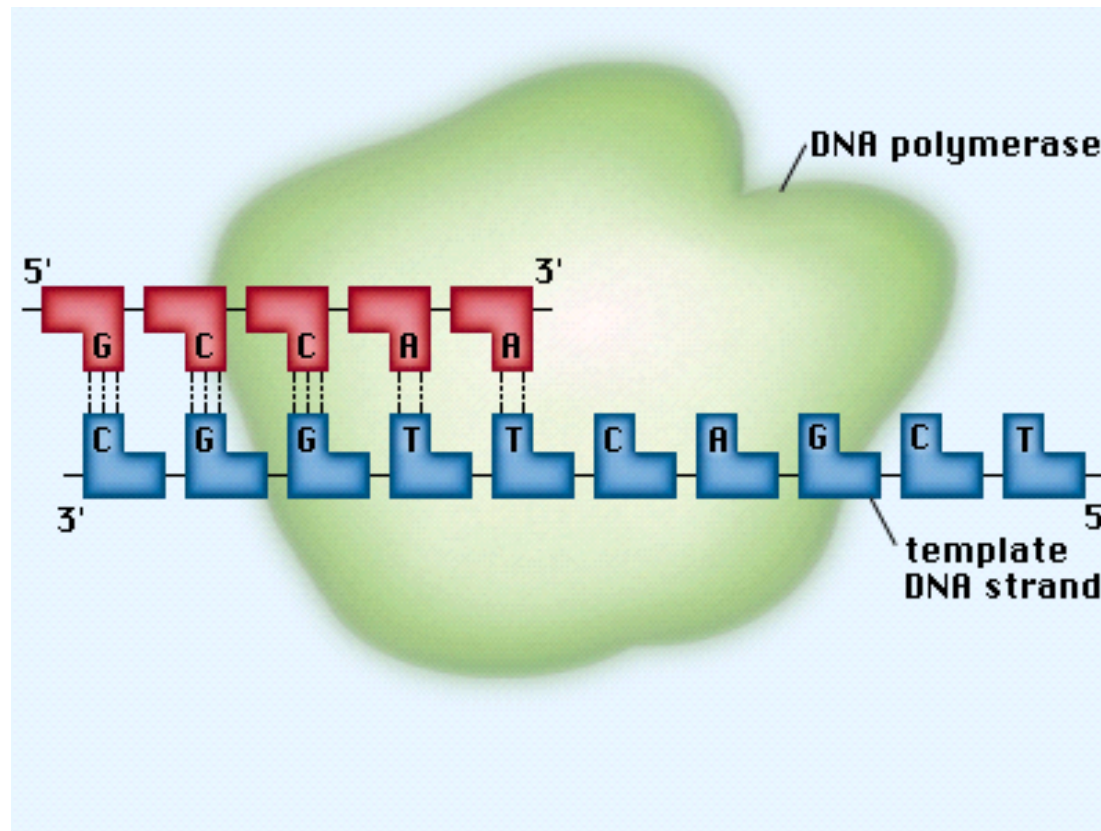
\* Ε, Ευκαρυωτικοί οργανισμοί. Π, προκαρυωτικοί οργανισμοί

# Πολυμεράσες του DNA

Όνομασία ενζύμου	Λειτουργία	Ταχύτητα
<b>Πολυμεράσες προκαρυωτικών</b>		
Πολυμεράση I του DNA	Απομάκρυνση εκκινητών Συμπλήρωση κενών σε καθυστερών κλώνο	15-20 nt/s
Πολυμεράση II του DNA	Επιδιόρθωση του DNA	
Πολυμεράση III του DNA	Το κύριο ένζυμο σύνθεσης του DNA	~1000 nt/s
<b>Πολυμεράσες ευκαρυωτικών</b>		
Πολυμεράση $\alpha$ του DNA Υπομονάδα εκκινητάσης Μονάδα πολυμεράσης DNA	Πολυμεράση εκκίνησης Συνθέτει εκκινητές RNA Προσθέτει στους εκκινητές τμήματα μήκους περίπου 20 νουκλεοτιδίων	
Πολυμεράση $\beta$ του DNA (πολυμεράση επιρρεπής σε σφάλματα)	Επιδιόρθωση DNA	
Πολυμεράση $\delta$ του DNA	Το κύριο ένζυμο σύνθεσης του DNA	

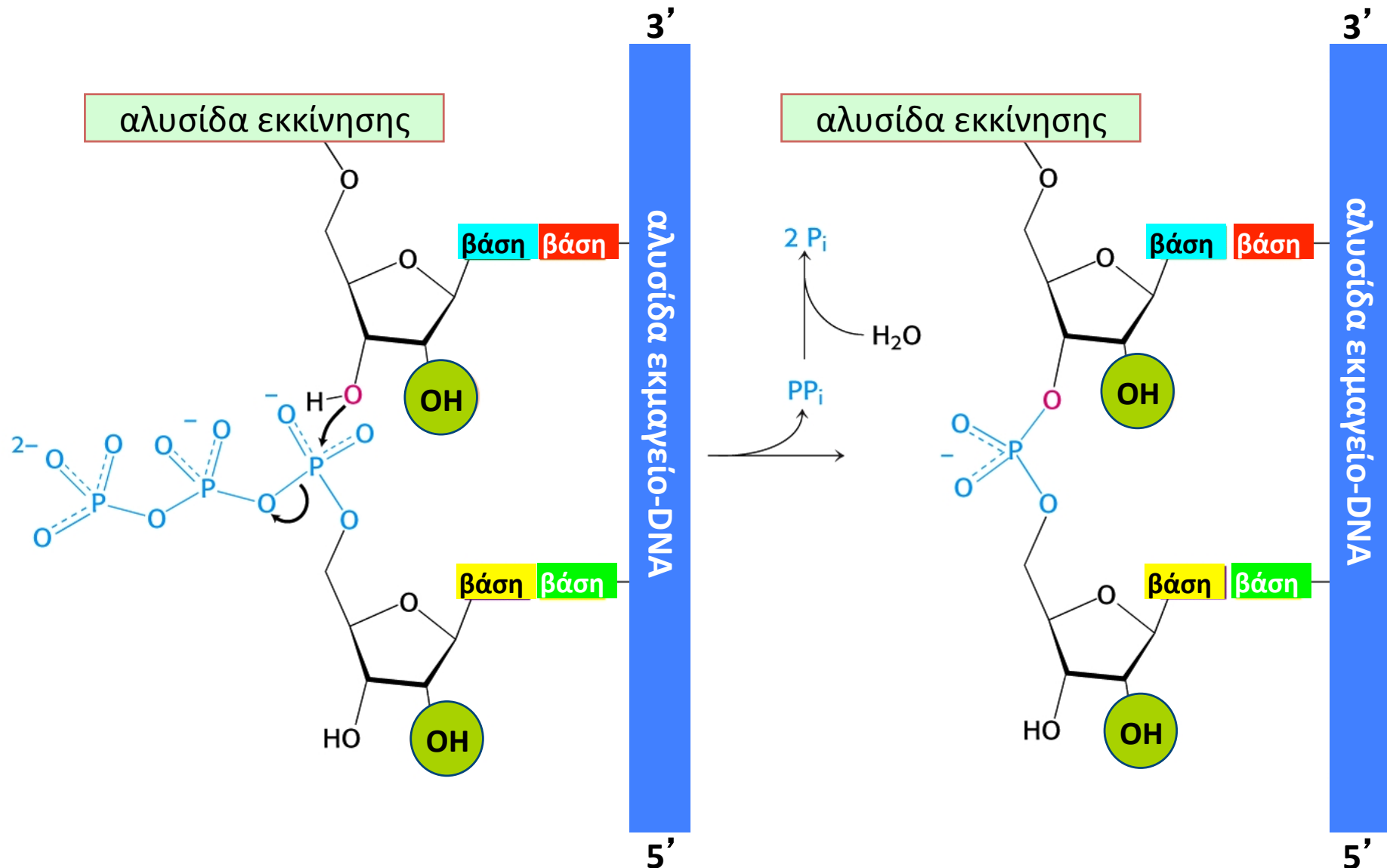
Φωσφοδιεστερικός δεσμός –  
Η αλυσίδα του DNA αυξάνεται πάντα 5'→3'



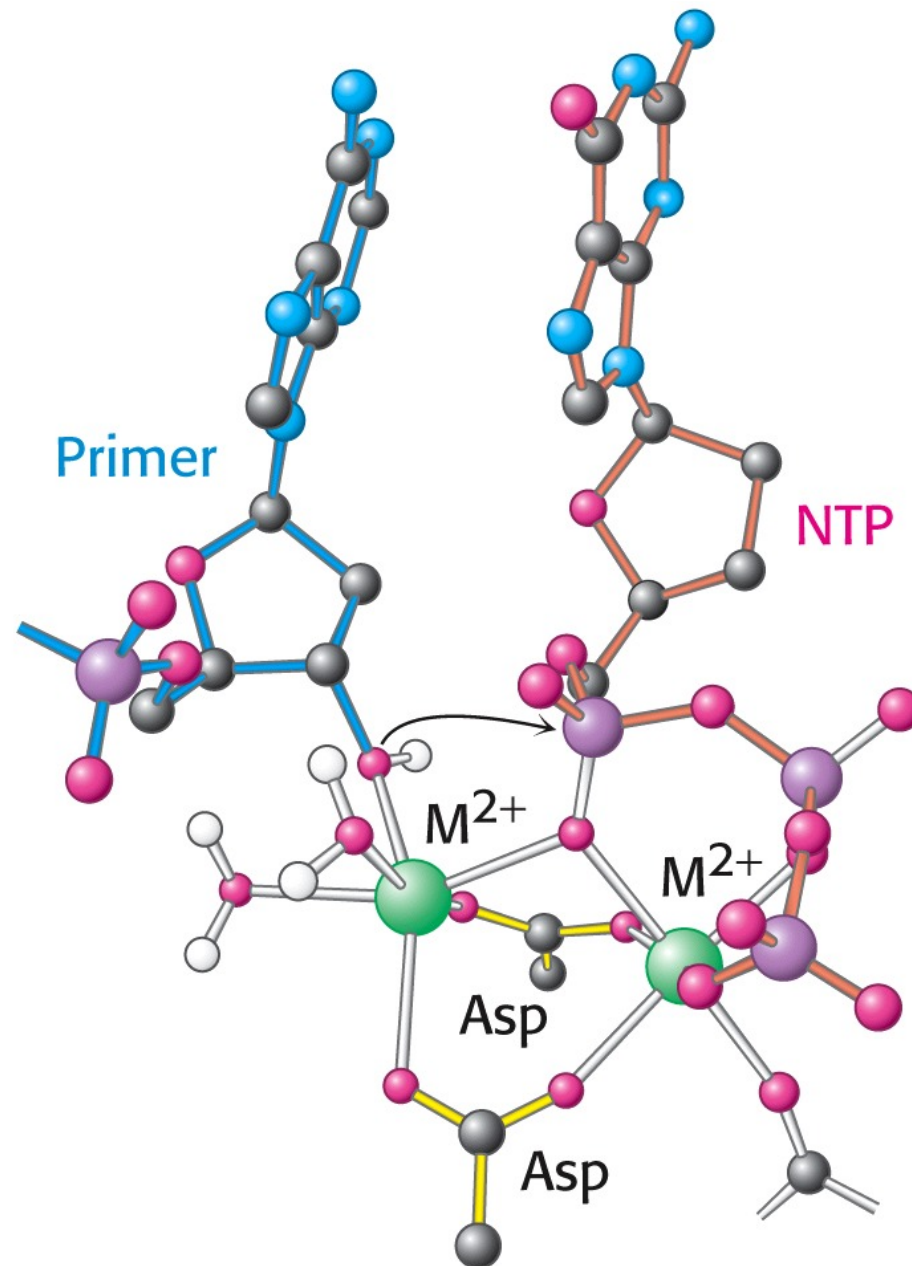


**Molecular Cell Biology, 4<sup>th</sup> Edition**

# Η 5' φωσφορική ομάδα του νεοεισερχόμενου νουκλεοτιδίου ενώνεται με την 3'-OH του τελευταίου

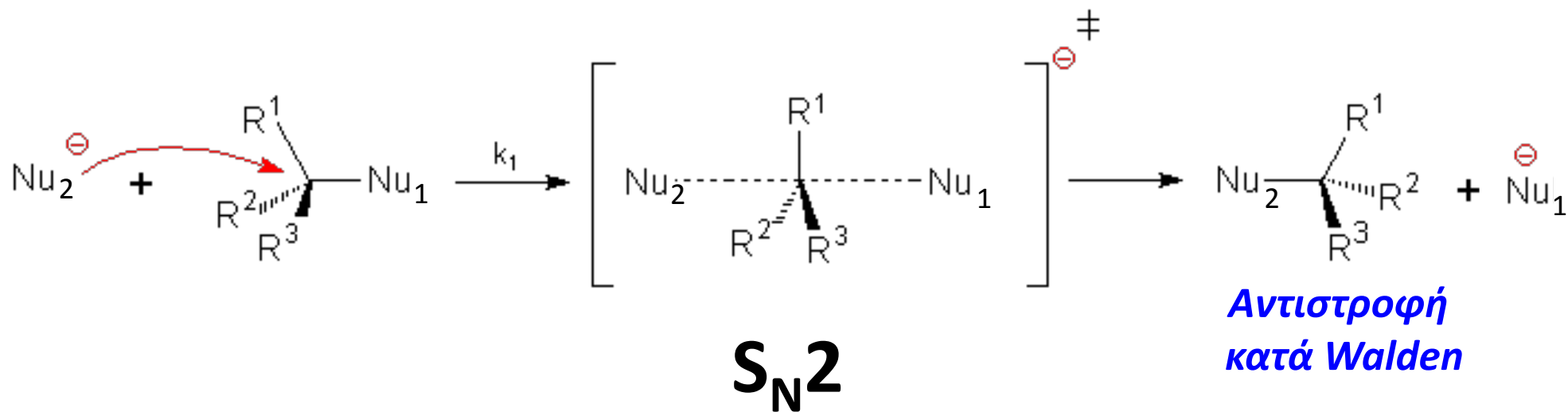
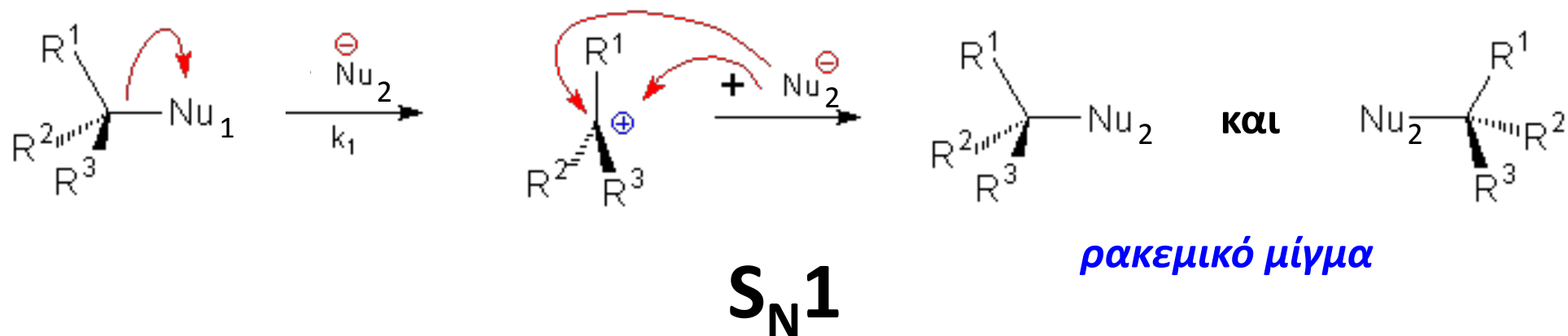


# Μηχανισμός της πολυμεράσης του DNA

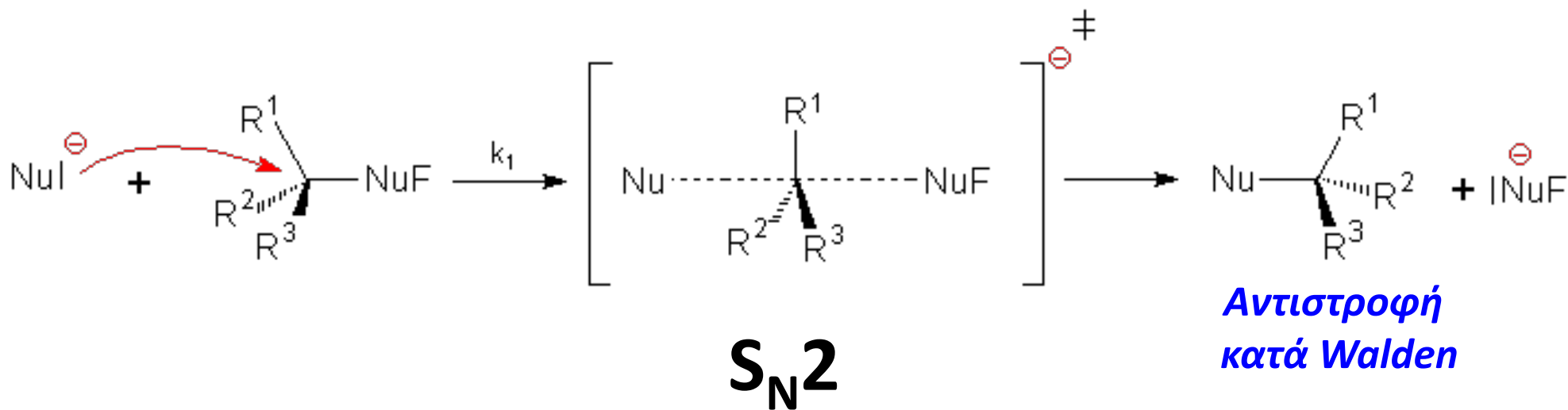
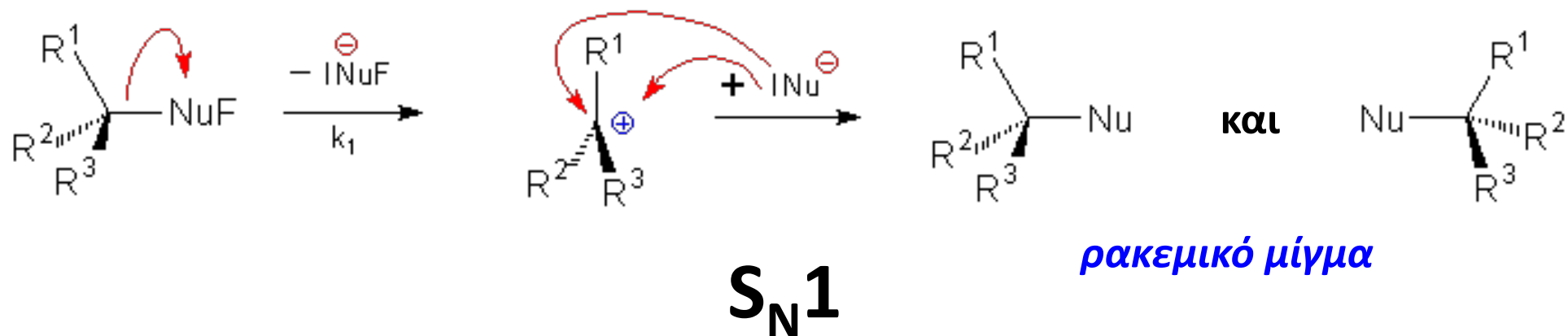




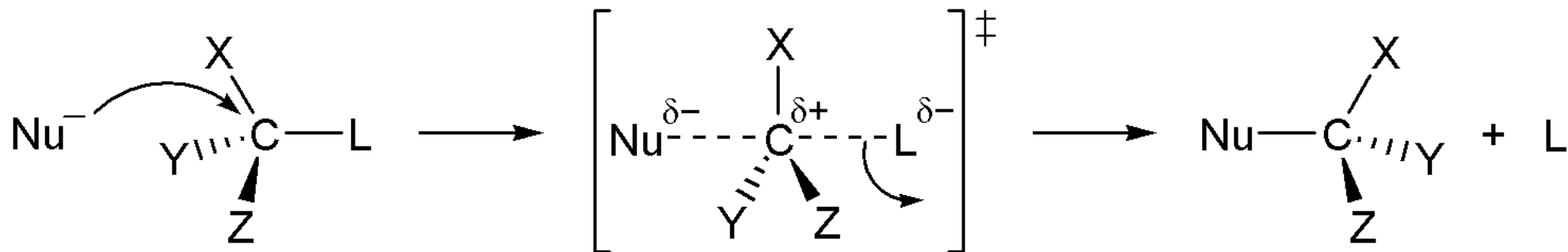
# Πυρηνόφιλη υποκατάσταση $S_N1$ και $S_N2$



# Πυρηνόφιλη υποκατάσταση $S_N1$ και $S_N2$



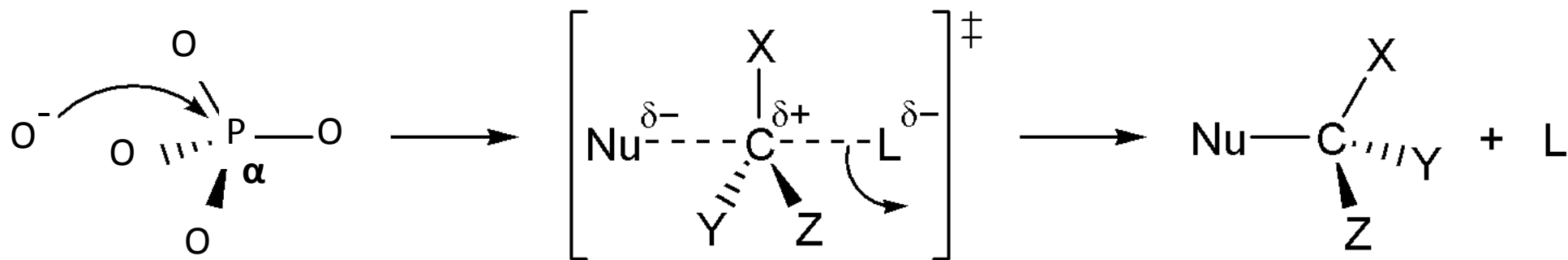
# Μηχανισμός της DNA πολυμεράσης



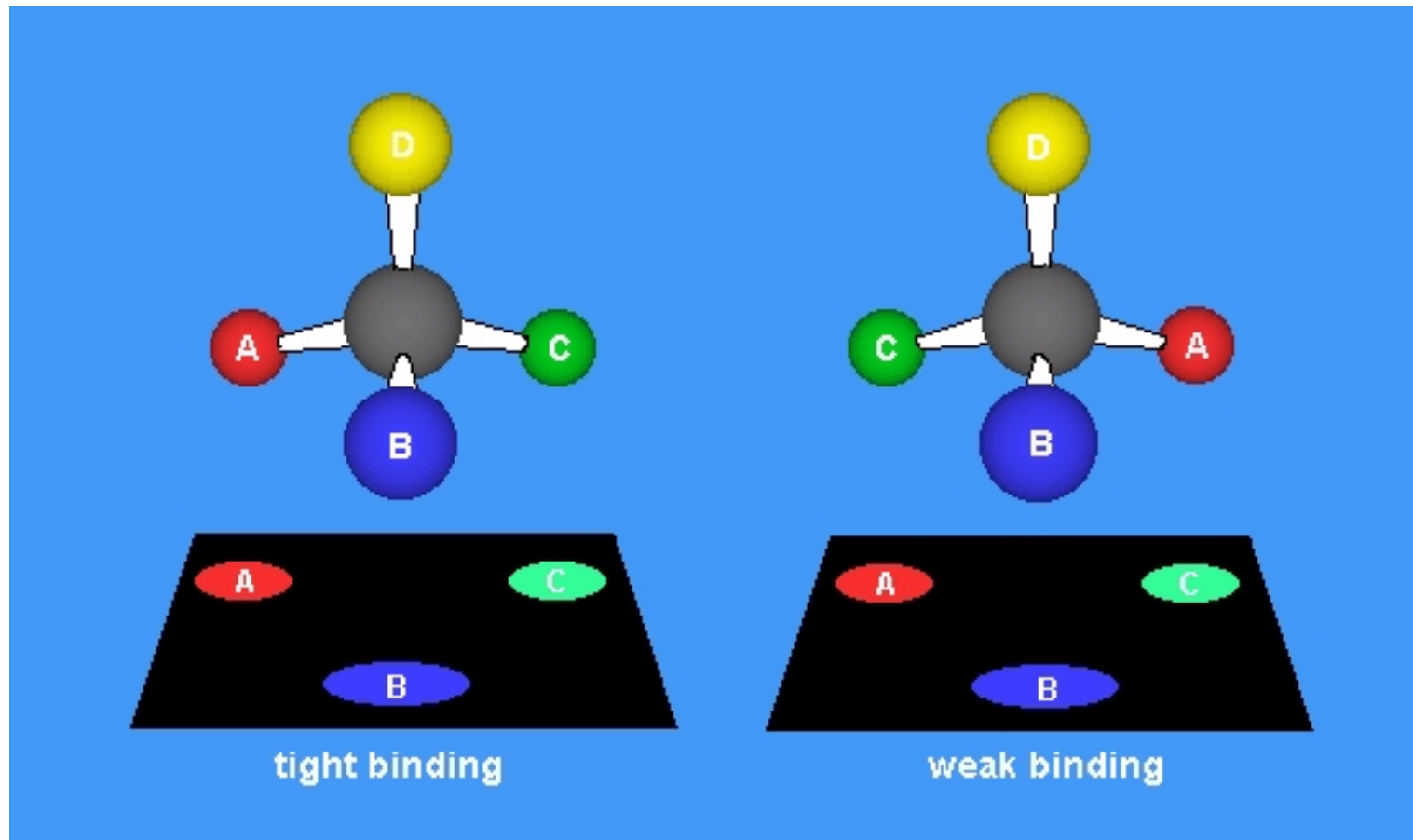
$S_N2$

Πυρηνόφιλη υποκατάσταση

*Αντιστροφή κατά Walden*

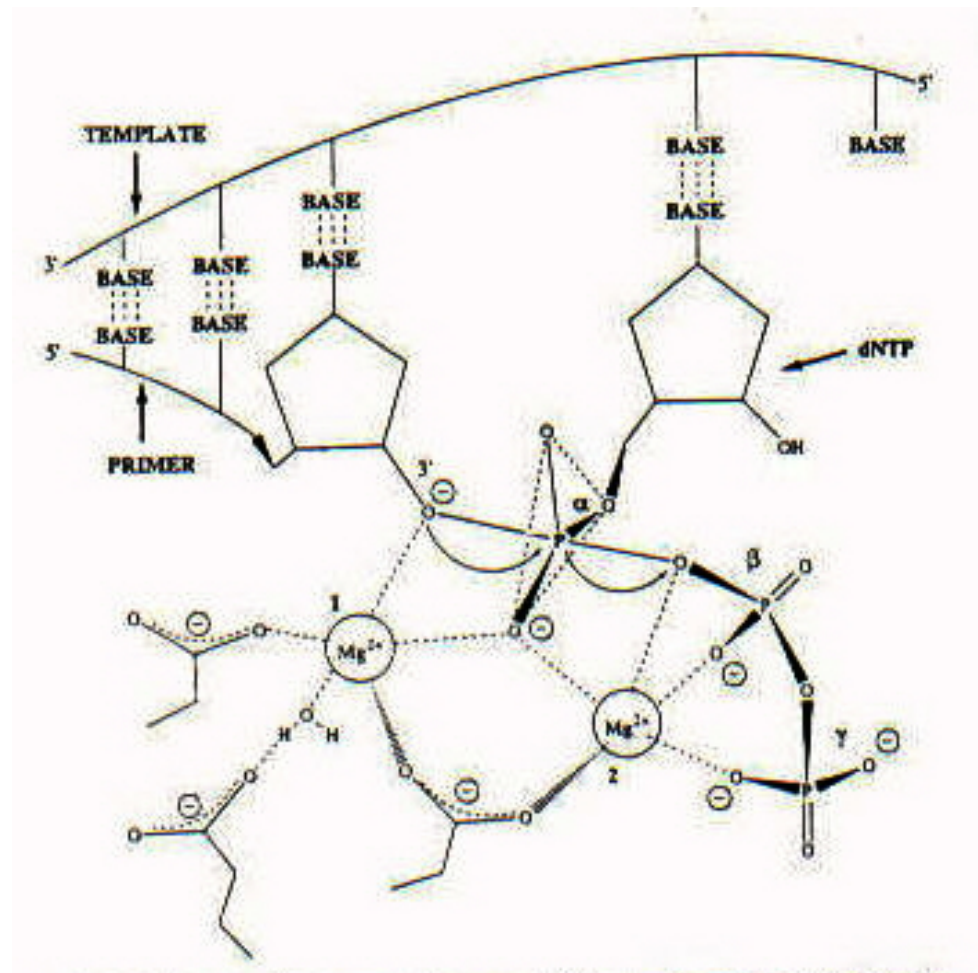
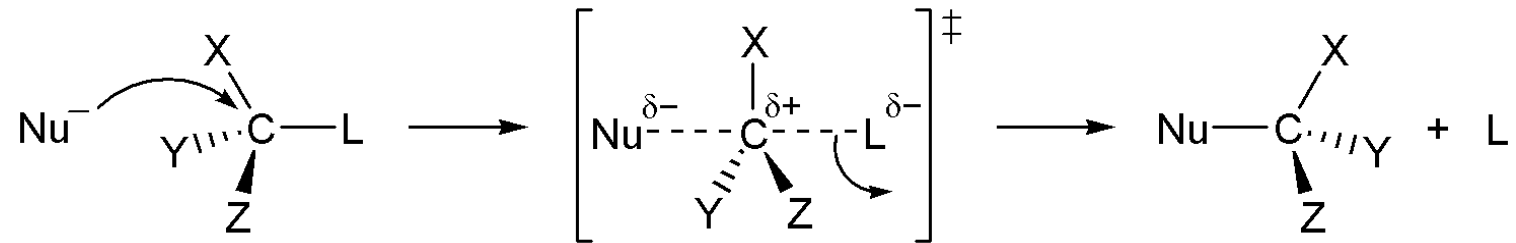


Γιατί είναι σημαντικό πως η αντίδραση που καταλύει η DNAP ροί γίνεται με το μηχανισμό  $S_N2$

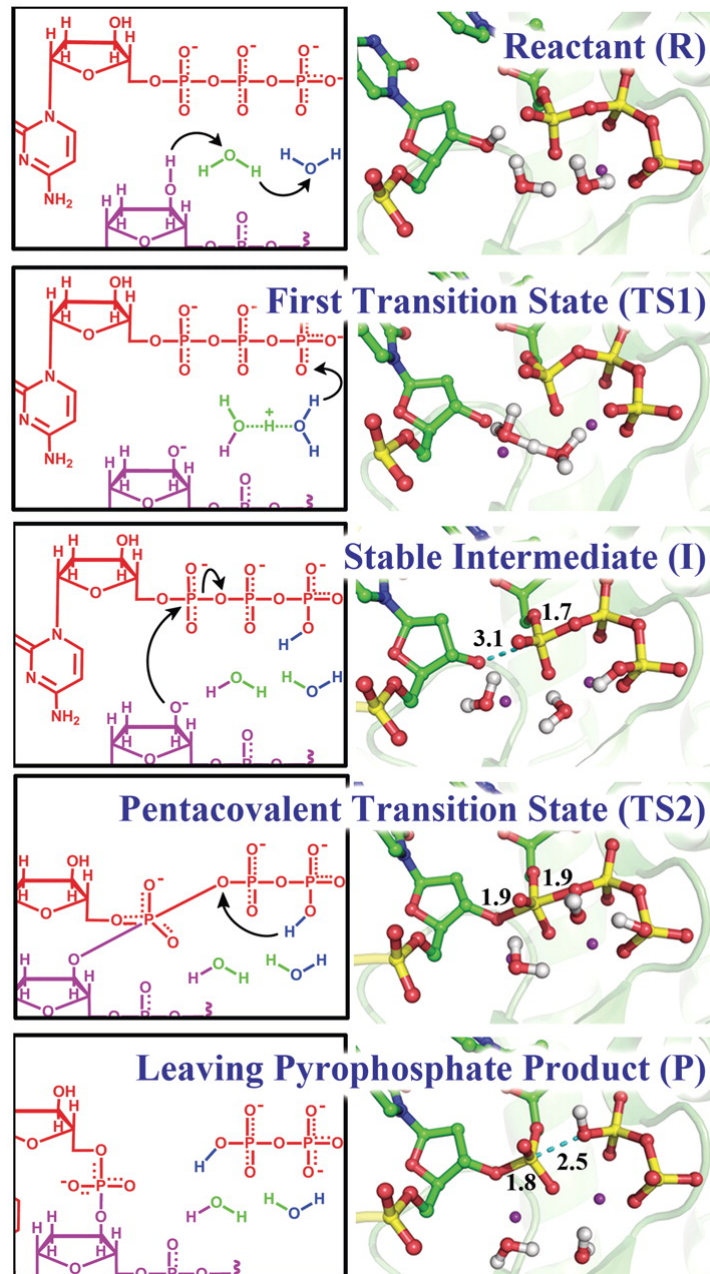


*Αν γινόταν με τον  $S_N1$ , η DNA ροί θα έπρεπε να αναγνωρίζει ταυτόχρονα δύο διαμορφώσεις*

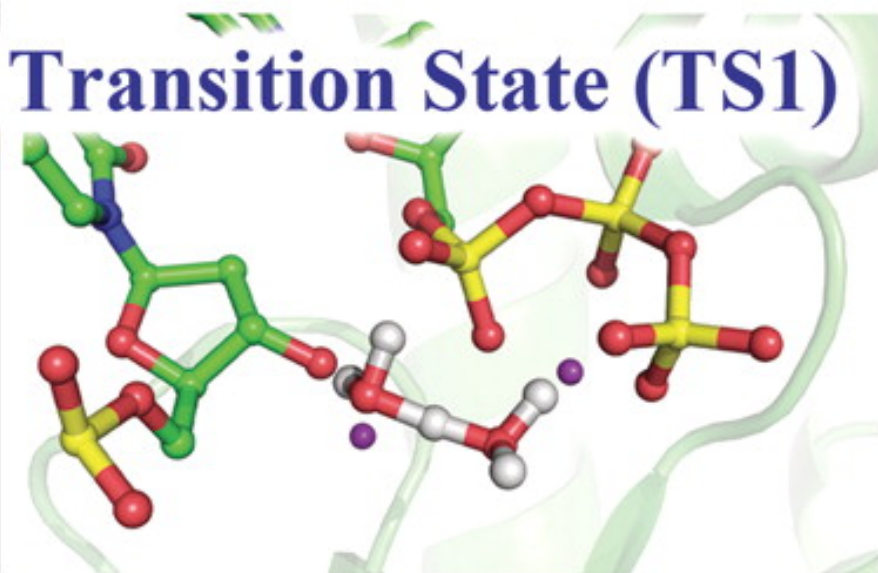
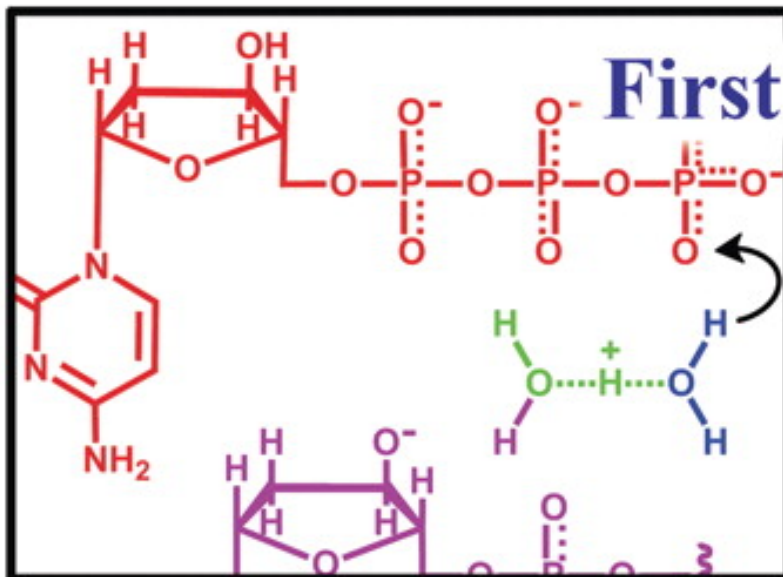
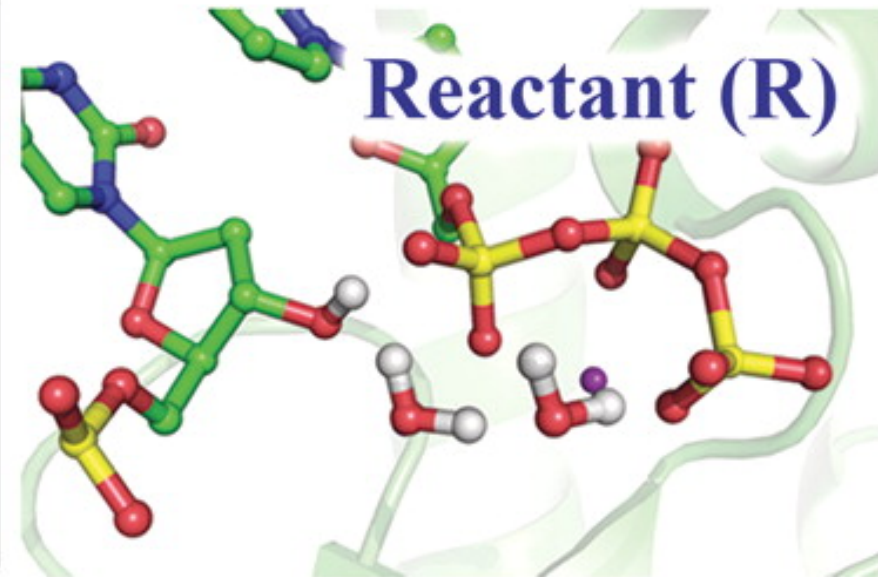
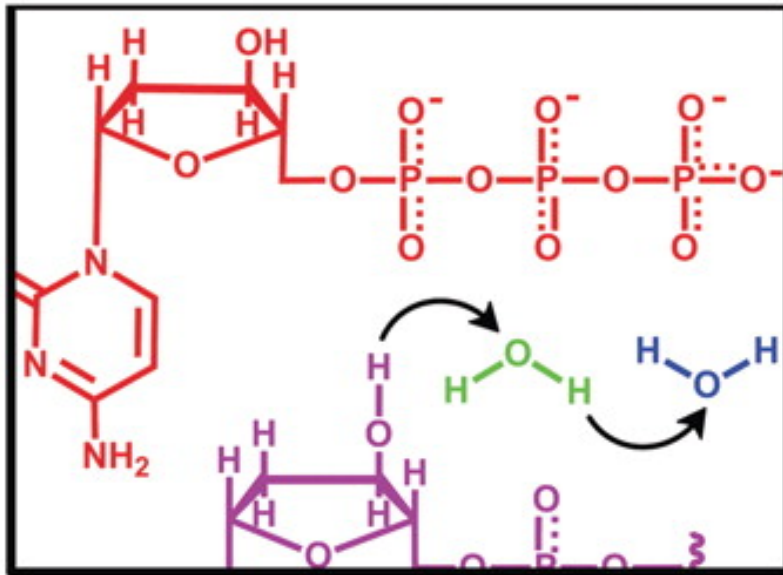
# Μηχανισμός της DNA πολυμεράσης



# Μηχανισμός της ανθρώπινης DNA Pol κ

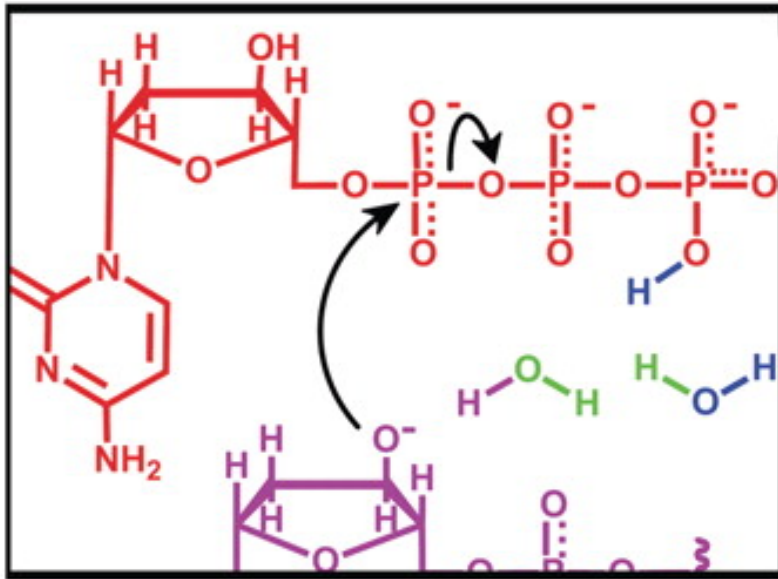


# Μηχανισμός της ανθρώπινης DNA Pol κ

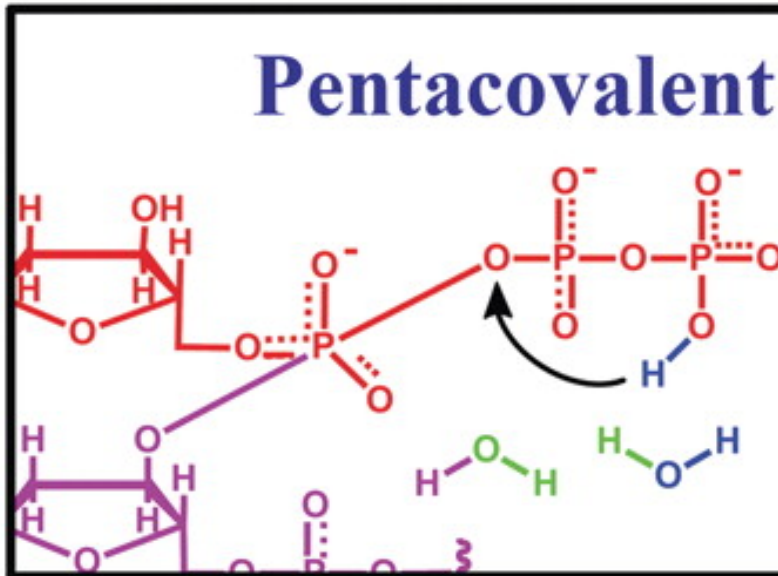
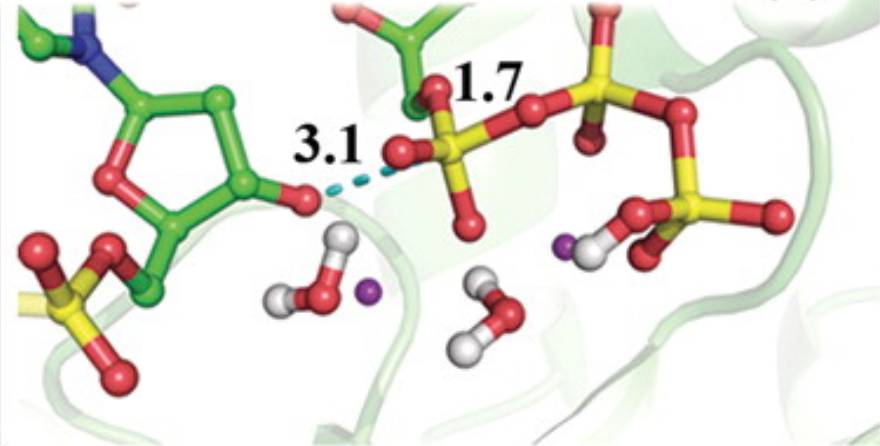




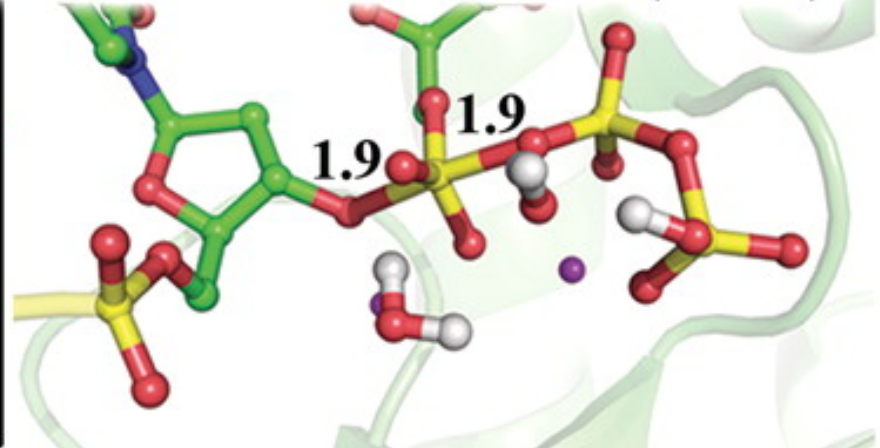
# Μηχανισμός της ανθρώπινης DNA Pol κ



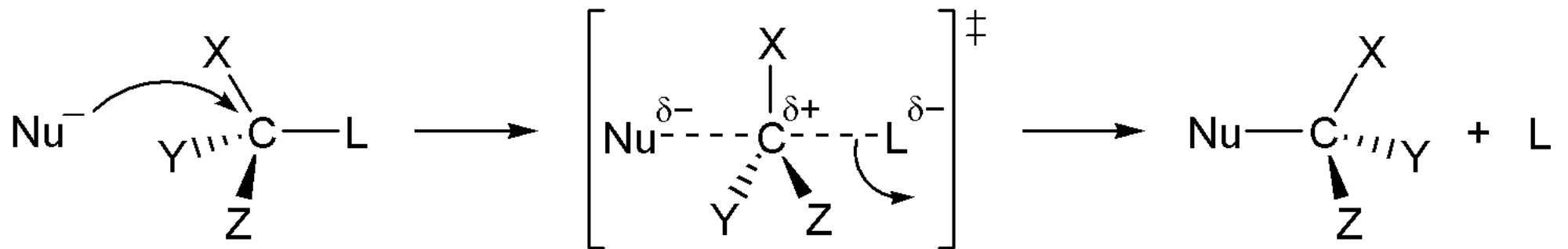
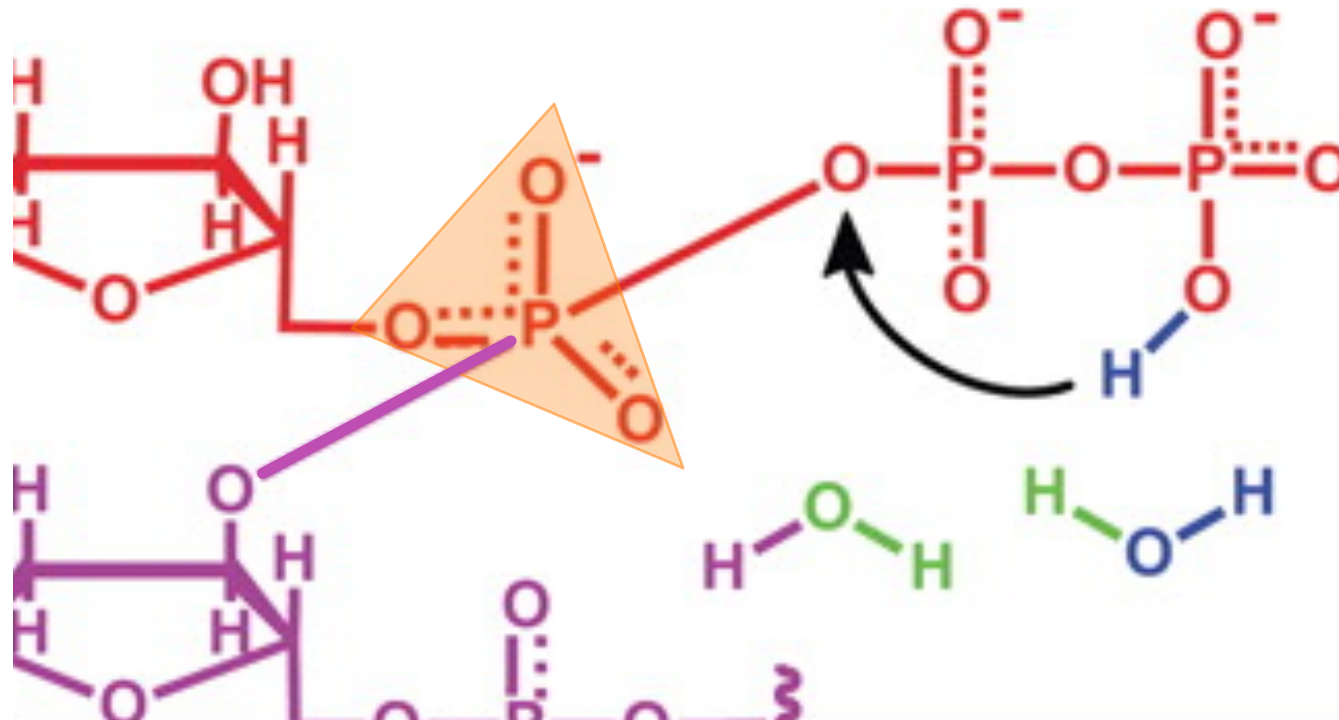
## Stable Intermediate (I)



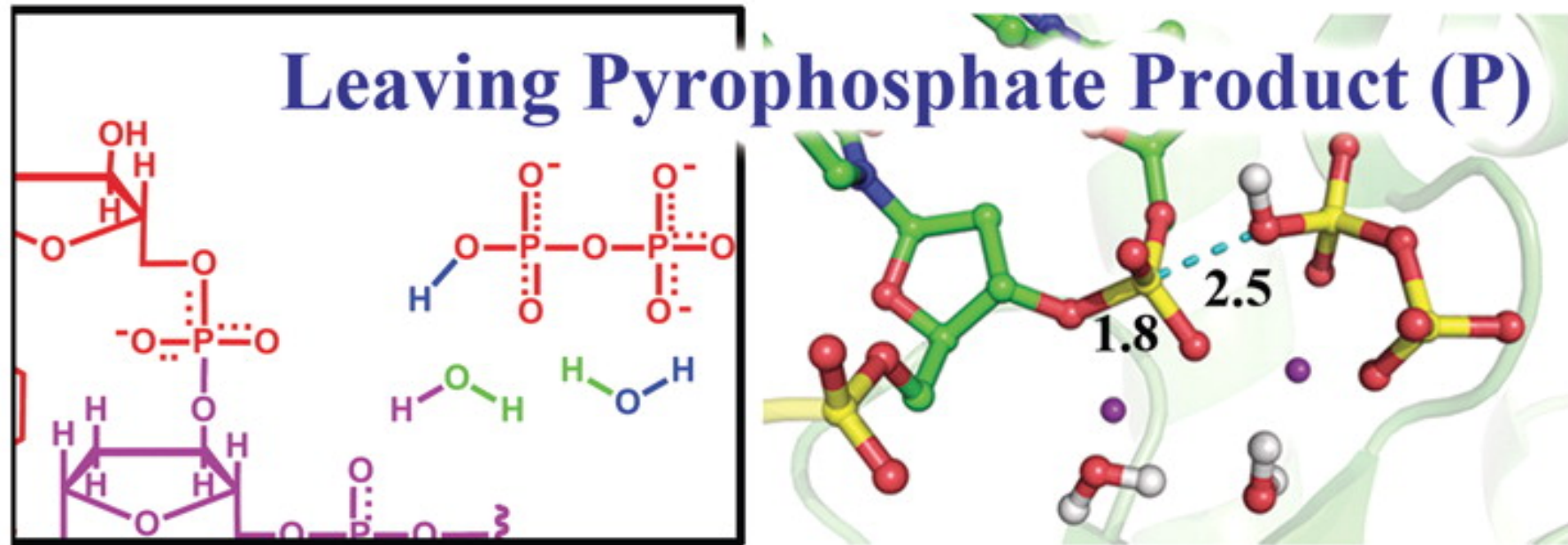
## Pentacovalent Transition State (TS2)



# Μηχανισμός της ανθρώπινης DNA Pol κ



# Μηχανισμός της ανθρώπινης DNA Pol κ



# Μηχανισμός της ανθρώπινης DNA Pol κ

[http://nar.oxfordjournals.org/content/suppl/2012/06/29/gks653.DC1/Movie\\_S1\\_Step\\_1.mp4](http://nar.oxfordjournals.org/content/suppl/2012/06/29/gks653.DC1/Movie_S1_Step_1.mp4)

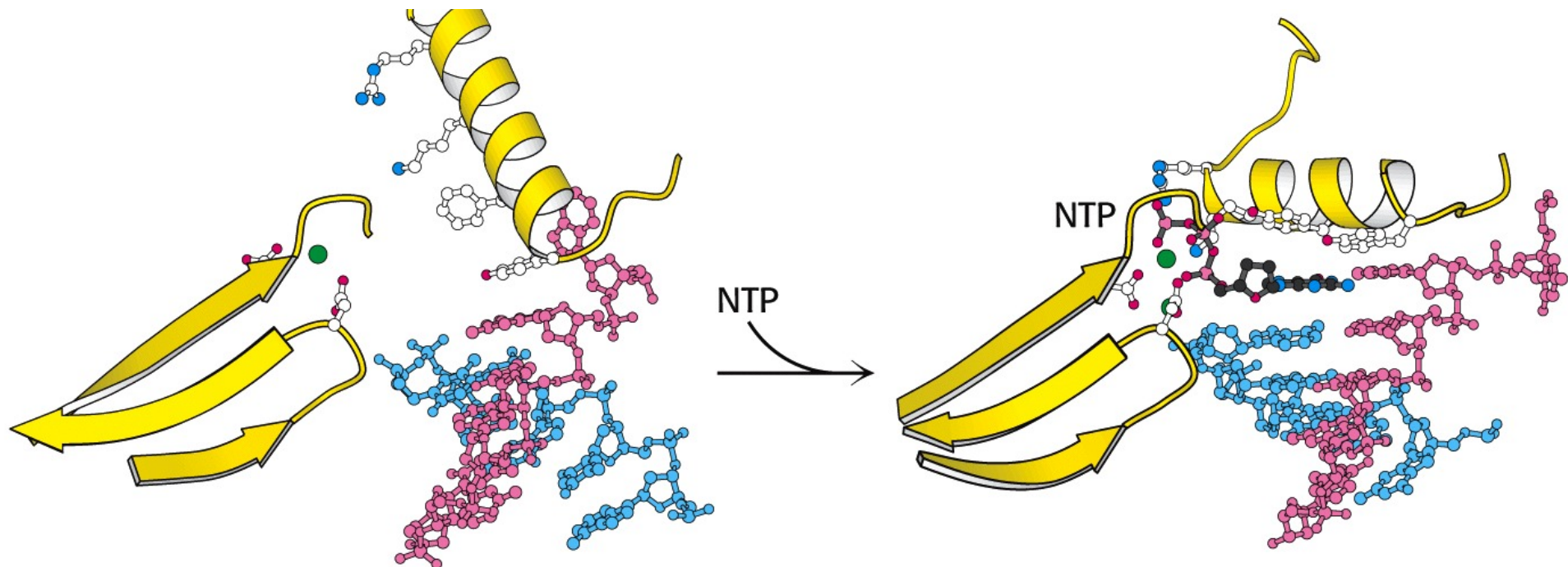
[http://nar.oxfordjournals.org/content/suppl/2012/06/29/gks653.DC1/Movie\\_S2\\_Step\\_2.mp4](http://nar.oxfordjournals.org/content/suppl/2012/06/29/gks653.DC1/Movie_S2_Step_2.mp4)

[http://nar.oxfordjournals.org/content/suppl/2012/06/29/gks653.DC1/Movie\\_S3\\_BP.mp4](http://nar.oxfordjournals.org/content/suppl/2012/06/29/gks653.DC1/Movie_S3_BP.mp4)

# Επιλογή μέσω σχήματος

Η δέσμευση ενός νεοεισερχόμενου NTP στο ένζυμο, επάγει αλλαγή στην διαμόρφωσή του δημιουργώντας μια εσοχή για το νέο ζεύγος βάσεων.

Τέτοια αλλαγή διαμόρφωσης είναι δυνατή μόνο όταν το νέο ζεύγος που θα σχηματισθεί μπορεί να ταιριάξει στερεοχημικά



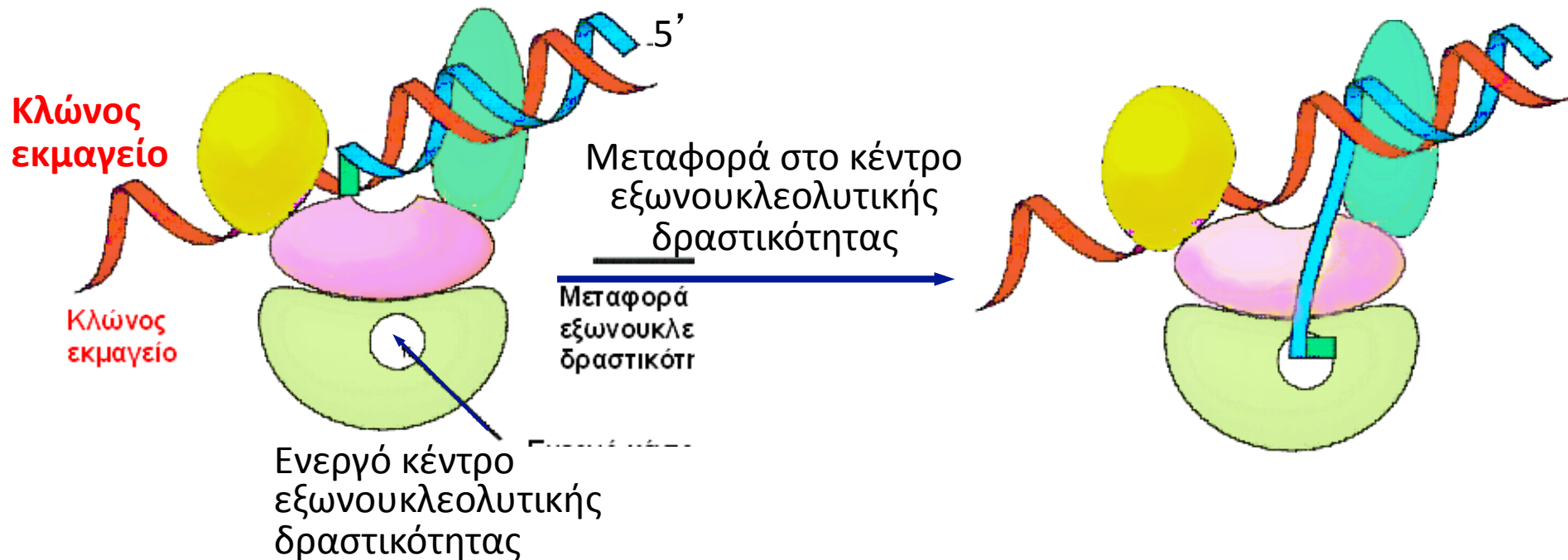


# Η pol I έχει πολλές δράσεις

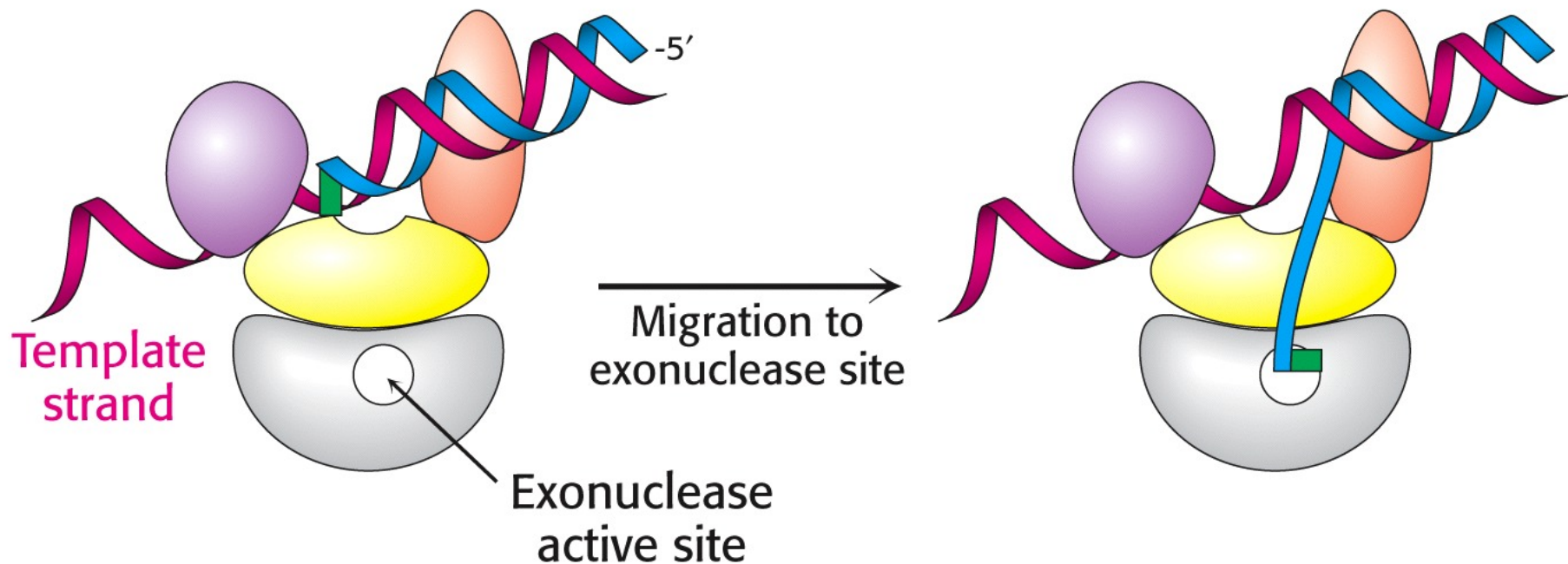
Η pol I έχει δράση

- πολυμεράσης και
- 3'-5' εξωνουκλεολυτικής δράσης (θραύσμα Klenow)
- 5'-3' εξωνουκλεολυτική δράση

Η τελευταία δράση είναι υπεύθυνη κυρίως για την απομάκρυνση λανθασμένων βάσεων



# Ανάγνωση και διόρθωση



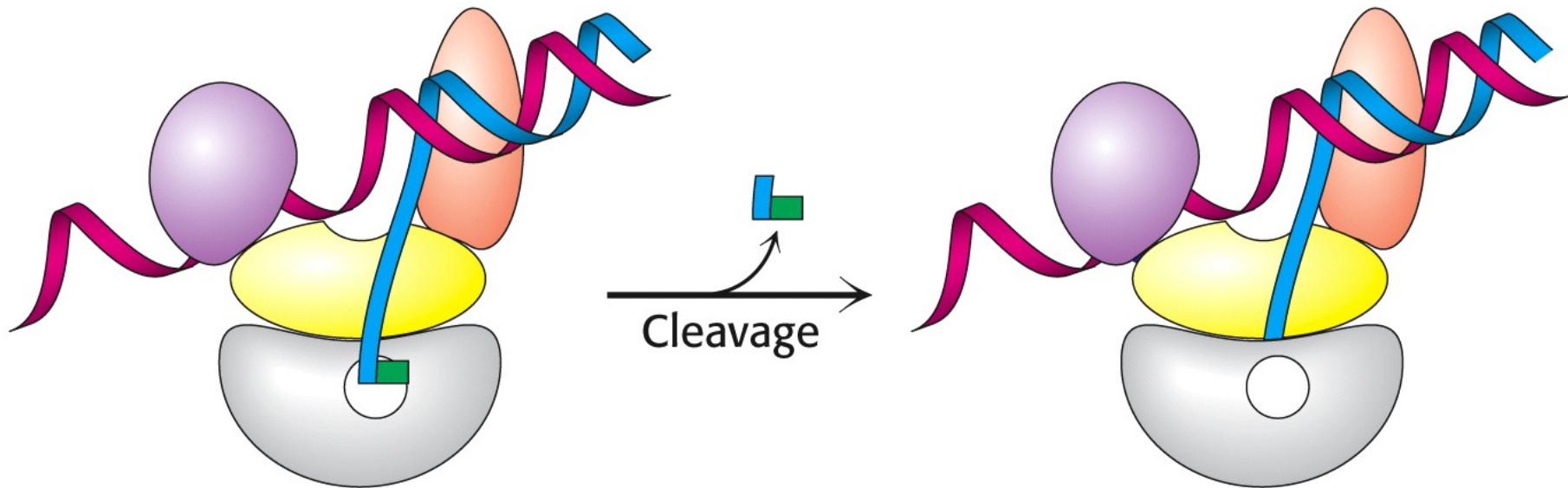
Η DNA πολυμεράση I έχει δράσεις:

1. Πολυμεράσης
2. 3'-5' εξωνουκλεολυτικής δράσης (Klenow fragment), και
3. 5'-3' εξωνουκλεολυτική δράσης

Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη κυρίως για απομάκρυνση λανθασμένων βάσεων

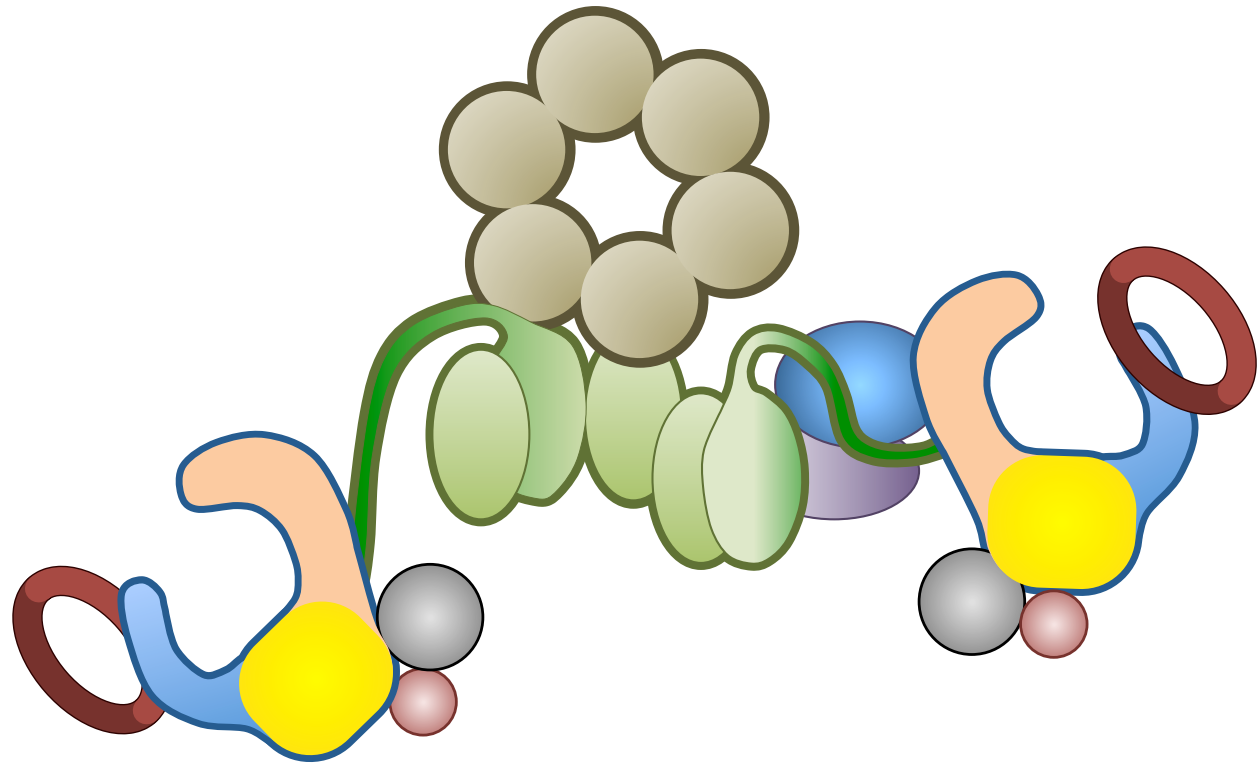


# Ανάγνωση και διόρθωση πώς αντιλαμβάνεται το ένζυμο τα λάθη;

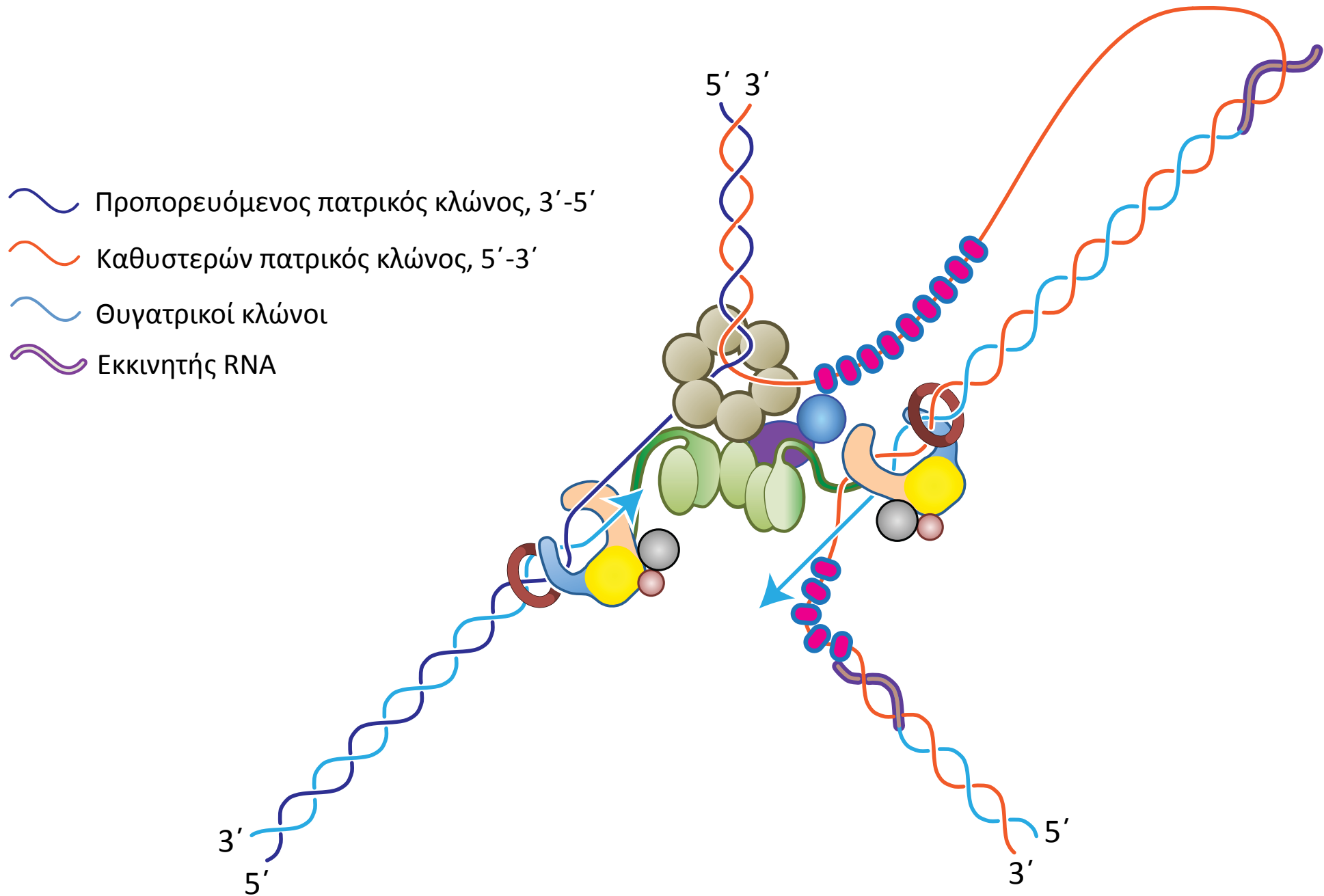


1. Μέγεθος και σχήμα νεοεισερχόμενων νουκλεοτιδίων
2. Αταίριαστο ζευγάρι
3. Διαφορετική αλληλεπίδραση με το εκμαγείο

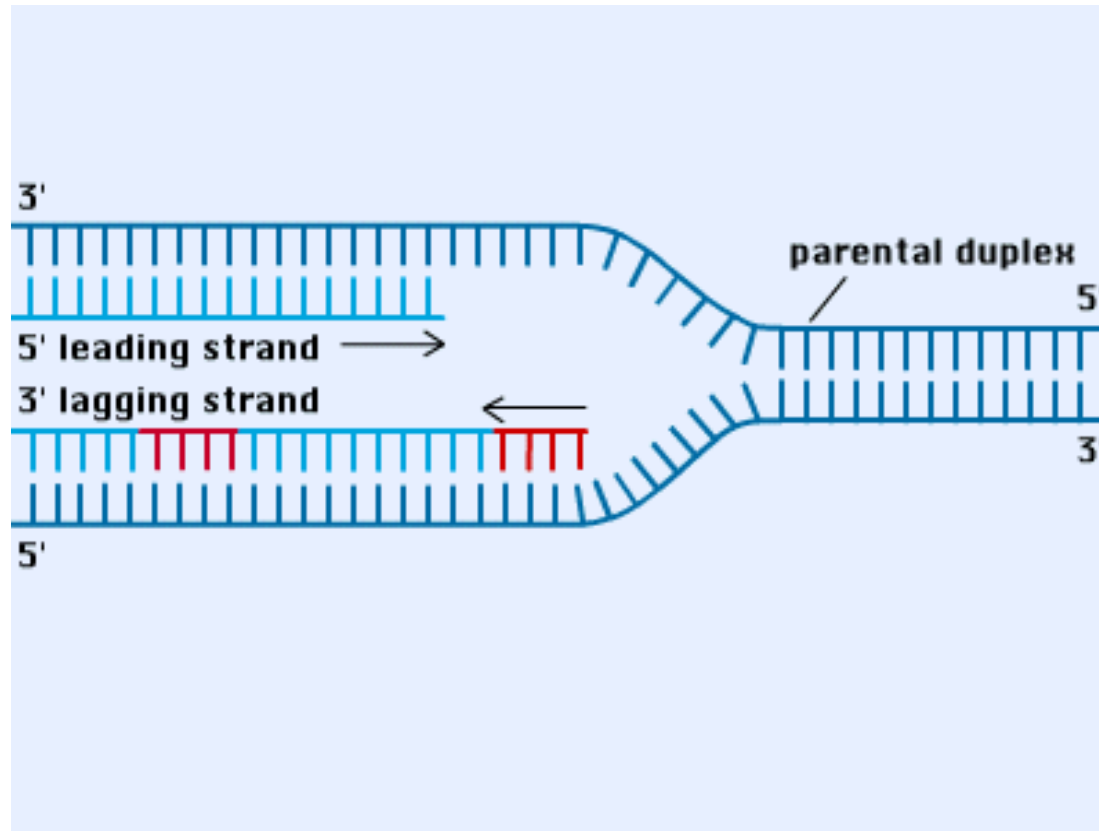
Η απομάκρυνση είναι ενεργειακά πολυέξοδη,  
αλλά βελτιώνει σημαντικά την ποιότητα των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων



# Η αντιγραφή των δύο κλώνων

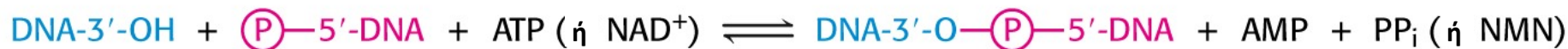
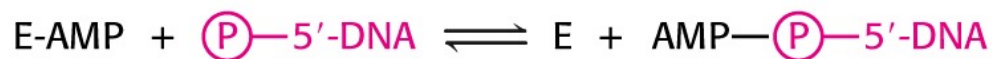
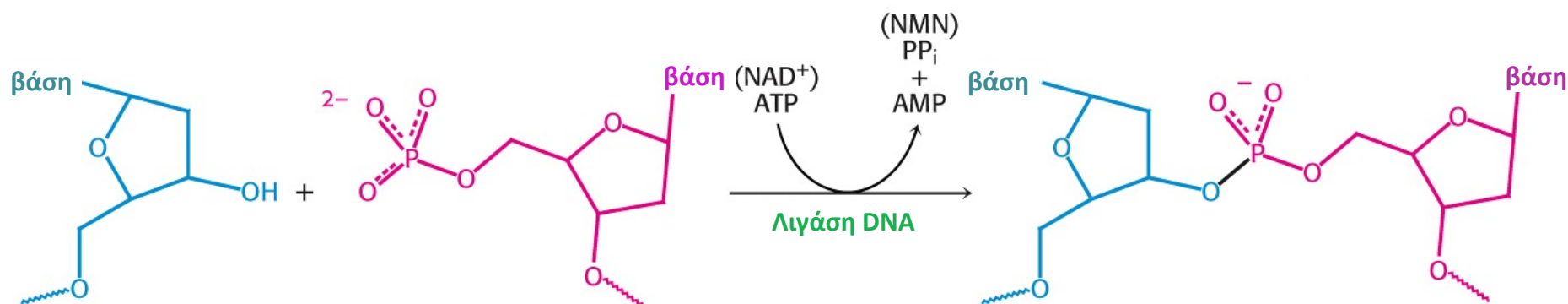


# Επιμήκυνση της αντιγραφής

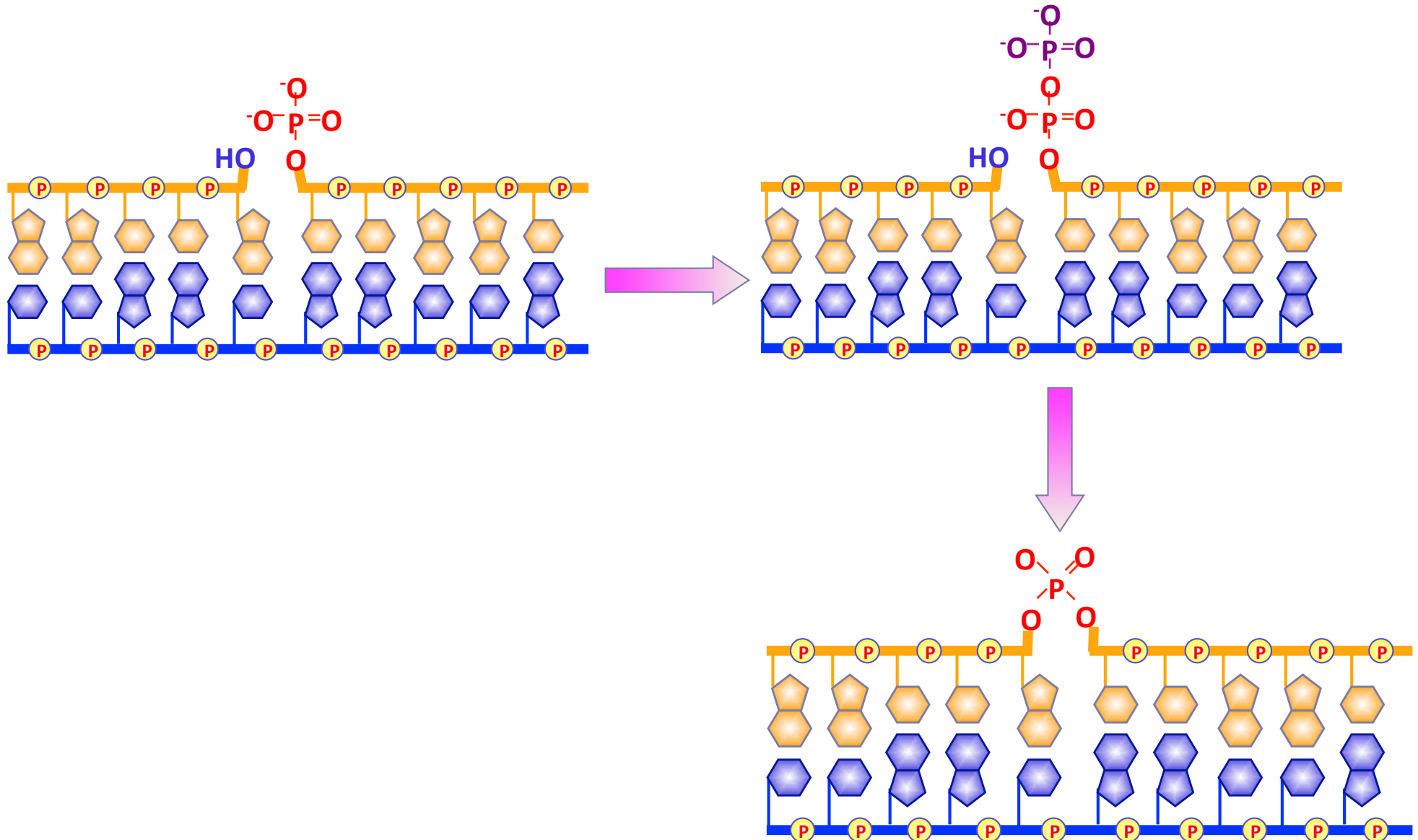


Molecular Cell Biology, 4<sup>th</sup> Edition

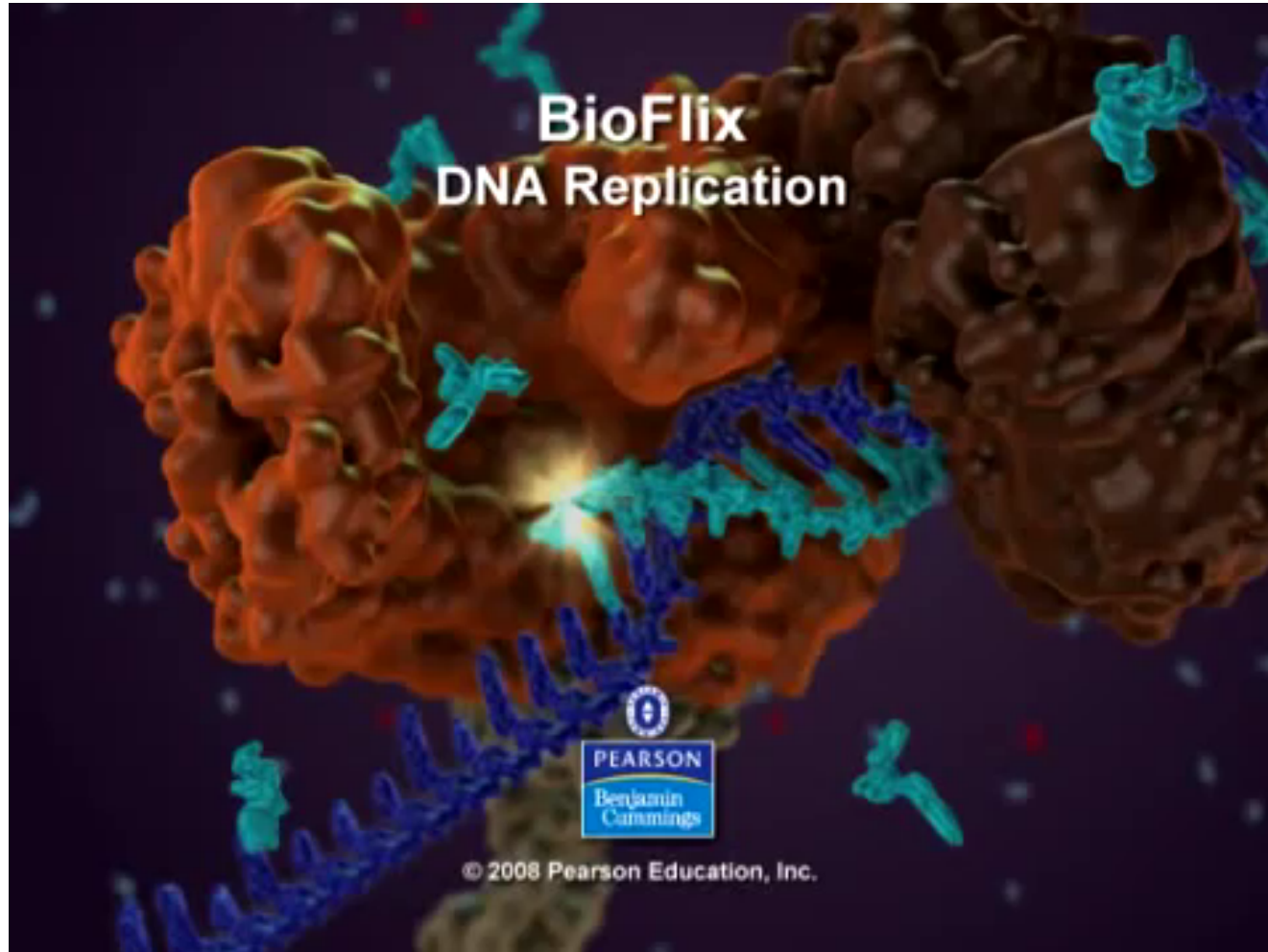
# Η σύνδεση των τμημάτων Okazaki: Αντίδραση και μηχανισμός δράσης της DNA λιγάσης



# Η DNA λιγάση ενώνει τα γειτονικά νουκλεοτίδια σε περίπτωση που υπάρχει εγκοπή

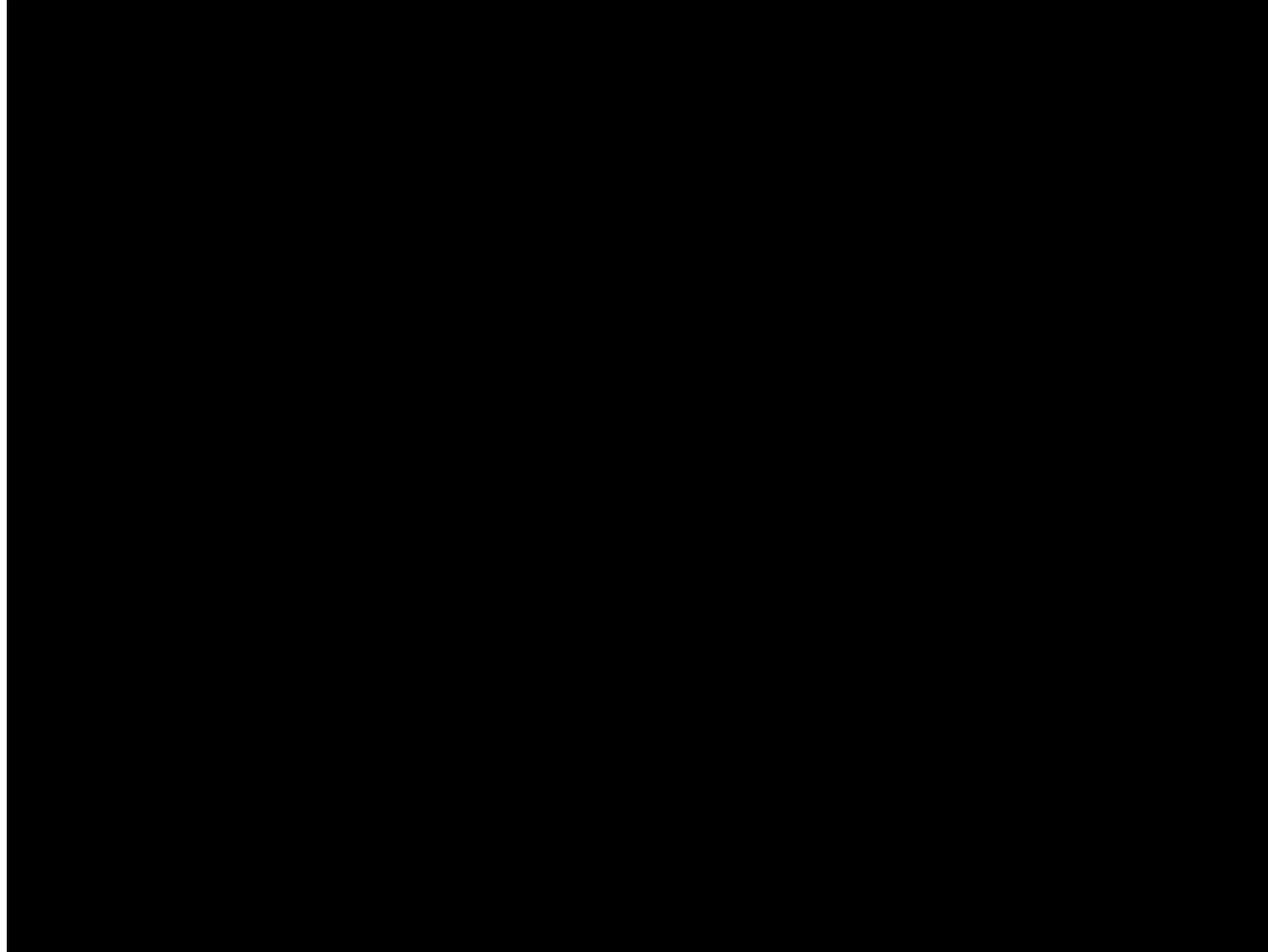


# Η Αντιγραφή του DNA

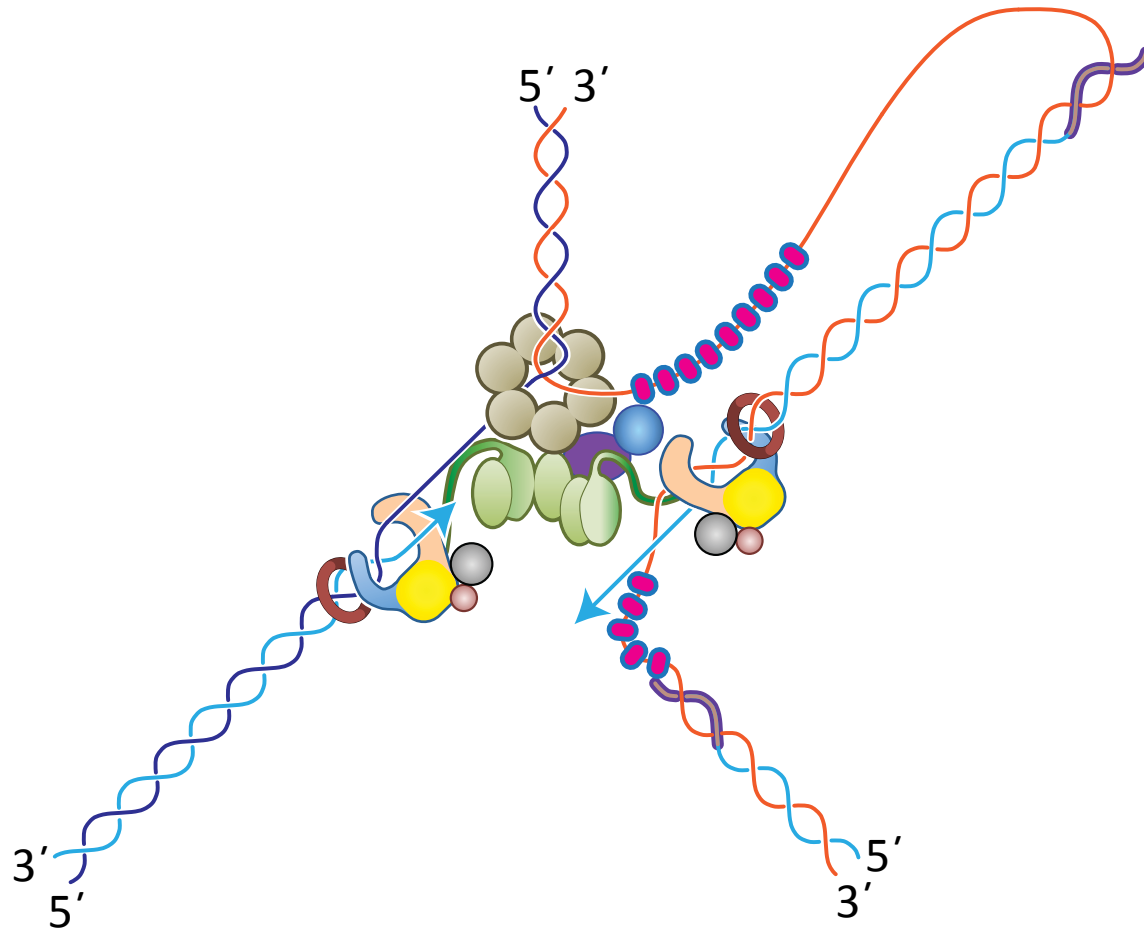




**Η αντιγραφή των δύο κλώνων  
σε (σχεδόν) πραγματικό χρόνο**



# Η αντιγραφή των δύο κλώνων – το μοντέλο του «τρομπονιού»



# Ο ρυθμός αντιγραφής των πολυμερασών του DNA και η φάση της αντιγραφής

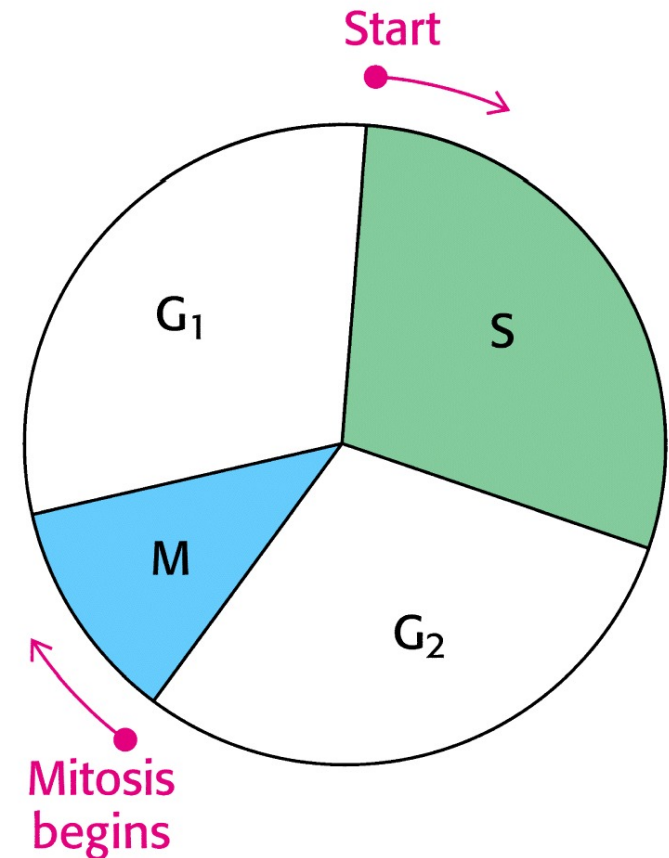
Γονιδίωμα *E. Coli* ~ 4.6 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων (base pairs, bp).  
Αντιγράφεται σε < 40 min.

Αρα:

ενσωματώνονται ~ 2000 νουκλεοτίδια/s.

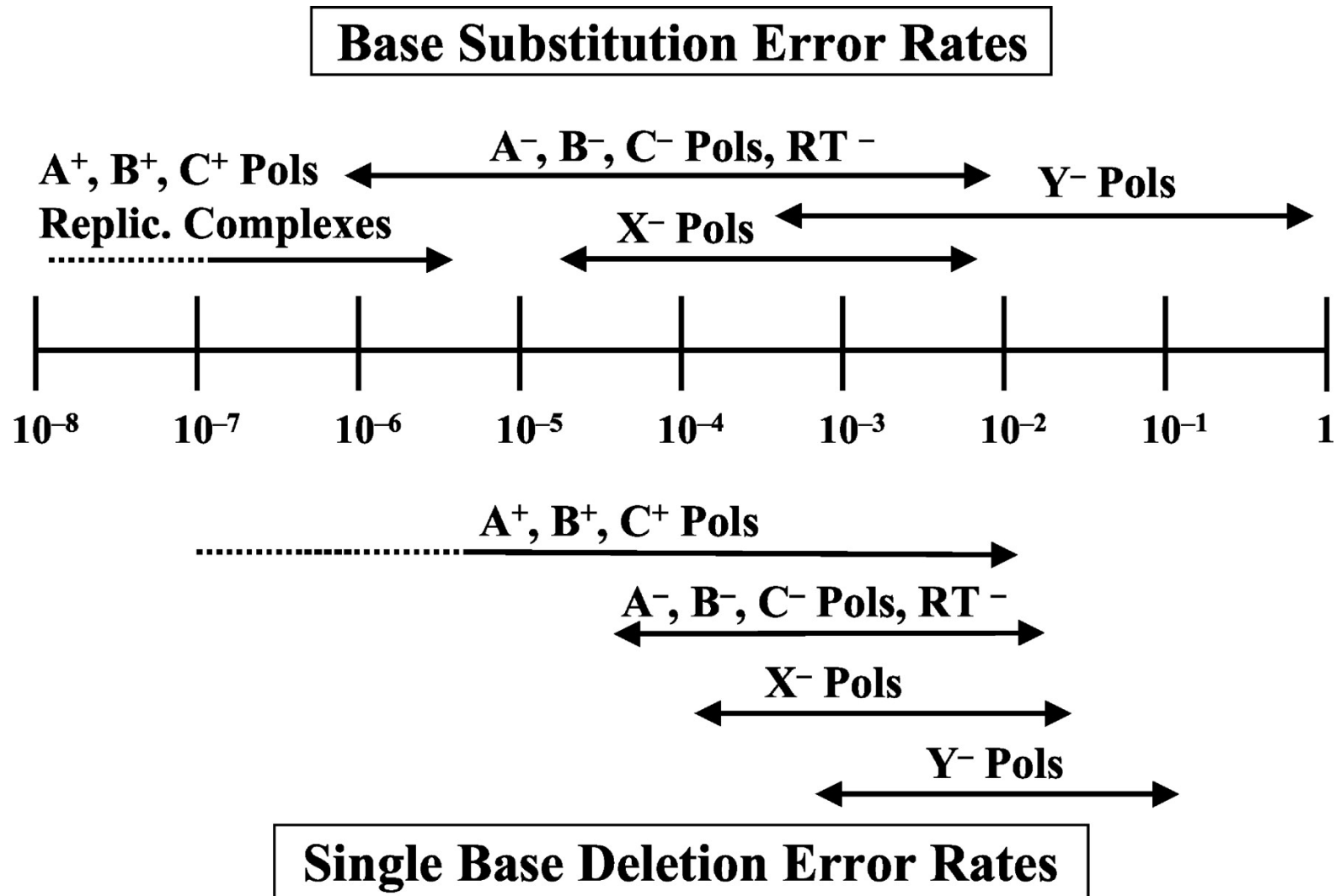
Ολισθαίνουν ~ 100 βήματα δίκλωνης έλικας/s,

δηλ. 3400 Å ή 0.34nm/s.



# Ρυθμοί λαθών κατά την αντιγραφή

Replication error rates.



# Οι αντιγραφικές πολυμεράσες του DNA

Εξαιρετικά υψηλή

- **Καταλυτική ισχύς**
- **Πιστότητα**
- **Επεξεργαστικότητα**

# Επεξεργαστικό ένζυμο – Επιμεριστικό ένζυμο

## Processivity – Distributivity

### Επεξεργαστικό ένζυμο (processive enzyme)

καταλύει συνεχόμενες αντιδράσεις  
επιμήκυνσης (π.χ. πολυμεράση)  
ή πέψης (π.χ. εξωριβονουκλεάσες)

χωρίς να απελευθερώνει το υπόστρωμά του (π.χ. το νουκλεϊκό οξύ)

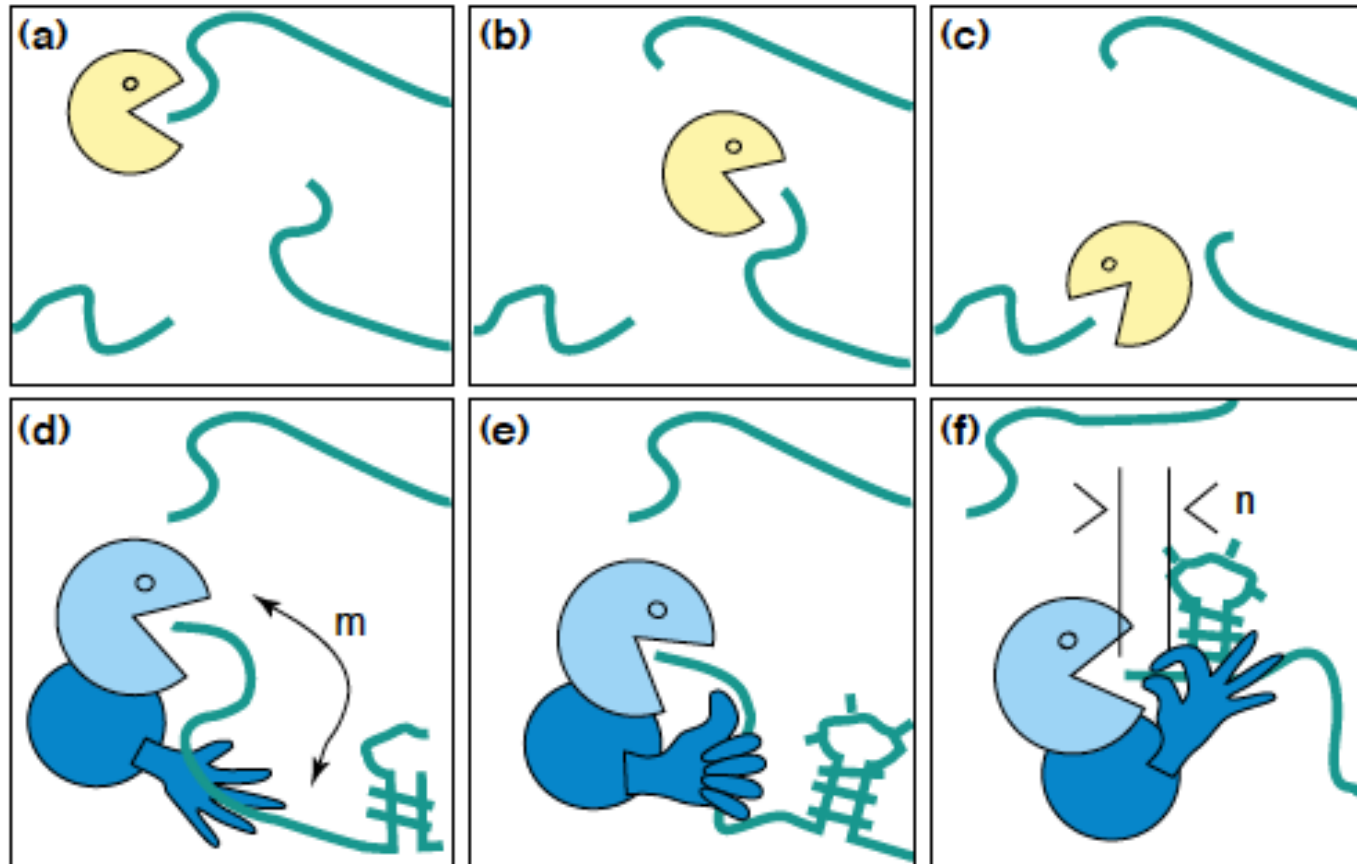
### Επιμεριστικό ένζυμο

απελευθερώνει το υπόστρωμά του  
μεταξύ διαδοχικών καταλυτικών βημάτων  
(που μπορεί να γίνονται σε διαφορετικά υποστρώματα).

---

Οι διεργασίες ονομάζονται αντίστοιχα,  
**Επεξεργασσιμότητα – Processivity** και  
**Επιμεριστικότητα (Διανεμητικότητα) - Distributivity**

# Επεξεργαστικές vs Επιμεριστικές εξωριβονουκλεάσες

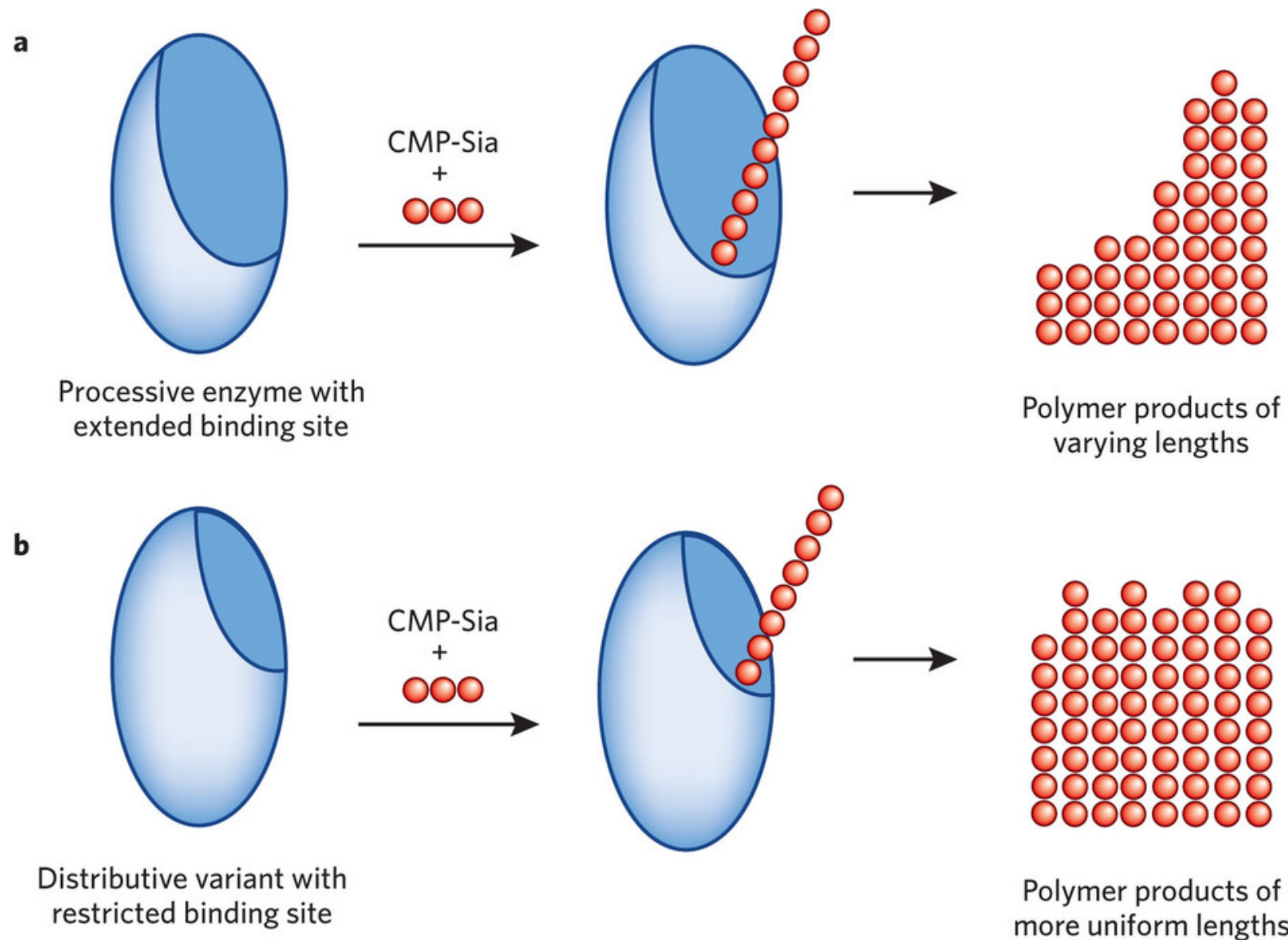


TiBS

Symmons et al. 2002, *TiBS*

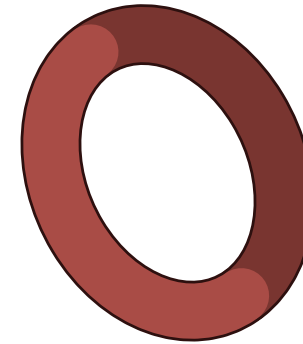
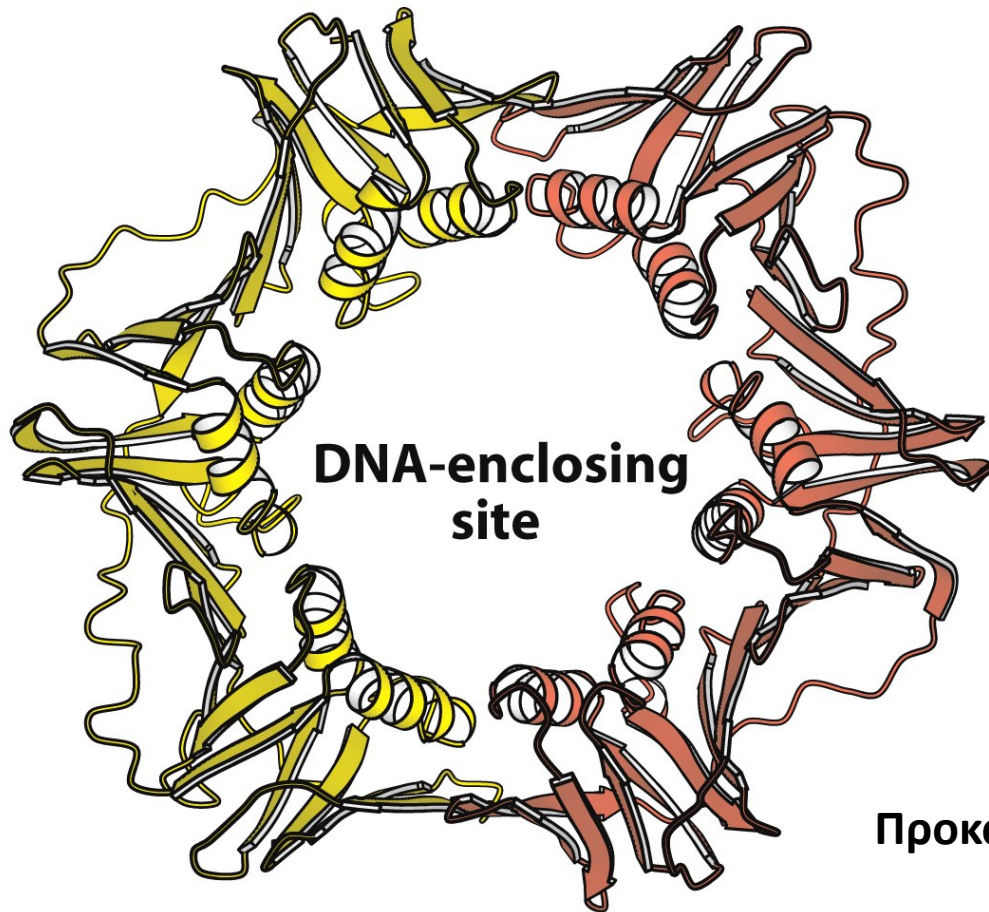


# Επεξεργαστικές vs Επιμεριστικές πολυμεράσεις



Colley et al. 2014, *Nat Chem Biol*

# Ο ολισθαίνων σφιγκτήρας προσδίδει την επεξεργαστικότητα στο ολοένζυμο της πολυμεράσης του DNA



**Προκαρυωτικοί:** υπομονάδα  $\beta 2$  DNAP III

**Ευκαρυωτικοί:** PCNA, (πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενου κυττάρου, *proliferating cell nuclear antigen*)



## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1959

"for their discovery of the mechanisms in the biological synthesis of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid"



**Severo Ochoa**

1/2 of the prize  
USA  
New York University,  
College of Medicine New York, NY, USA

b. 1905 (in Luarca, Spain) d. 1993



**Arthur Kornberg**

1/2 of the prize  
USA  
Stanford University Stanford,  
CA, USA

b. 1918 d. 2007

**Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. I. Preparation of Substrates and Partial Purification of an Enzyme from *Escherichia coli***  
**Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S., and Kornberg, A.**  
*J. Biol. Chem.* (1958) 233, 163–170)

**Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. II. General Properties of the Reaction**  
**Bessman, M. J., Lehman, I. R., Simms, E. S., and Kornberg, A.**  
*J. Biol. Chem.* (1958) 233, 171–177)

**Τερματισμός της αντιγραφής**

# Τερματισμός της αντιγραφής

- Δεν υπάρχει συγκεκριμένη στρατηγική
- Ο τερματισμός της αντιγραφής ενός κυκλικού χρωμοσώματος τελειώνει με διαφορετικό τρόπο από ένα ευθύγραμμο

# Τερματισμός της αντιγραφής κυκλικού μορίου DNA

# Τερματισμός της αντιγραφής κυκλικού DNA

- Με συνάντηση των δύο ρεπλισωμάτων που ξεκινούν από την περιοχή έναρξη με αντίθετες φορές.
- Όταν τα ρεπλισώματα φτάσουν σε μία περιοχή τερματισμού (που αποτελείται από συγκεκτριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων)



**Ο τερματισμός της αντιγραφής στους  
ευκαρυωτικούς οργανισμούς**

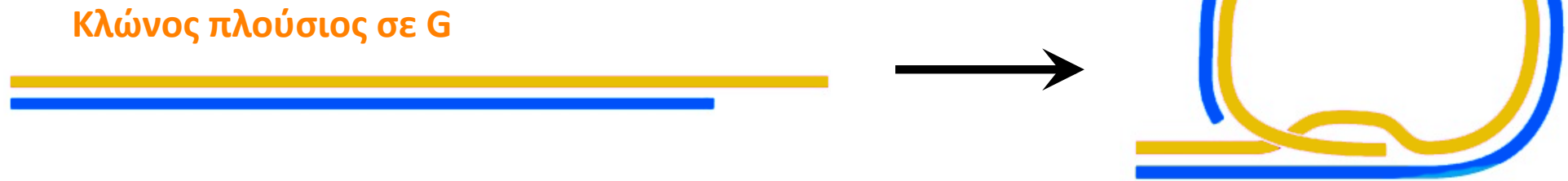
# Το πρόβλημα του τερματισμού της αντιγραφής στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

- Όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση του κλώνου που προηγείται (κλώνος  $5' \rightarrow 3'$ ) δεν μπορεί να ολοκληρωθεί η σύνθεση του καθυστερώντος κλώνου ( $3' \rightarrow 5'$ )
- Αυτό γιατί δεν θα υπάρχει DNA να λειτουργήσει ως εκμαγείου για τη σύνθεση του RNA-εκκινητήρα για τη σύνθεση του τελευταίου τεμαχίου Okazaki
- Η λύση του προβλήματος είναι τα τελομερή

# Τελομερή

- Ανάλυση και μελέτη της αλληλουχίας των άκρων των χρωμοσωμάτων (Τελομερή).
- Αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εξανουκλεοτιδίων (στον άνθρωπο: AGGGTT)
- Ενας από τους δύο κλώνους είναι πλούσιος σε G
- Τα τελομερή αντιγράφονται από το ένζυμο τελομεράση

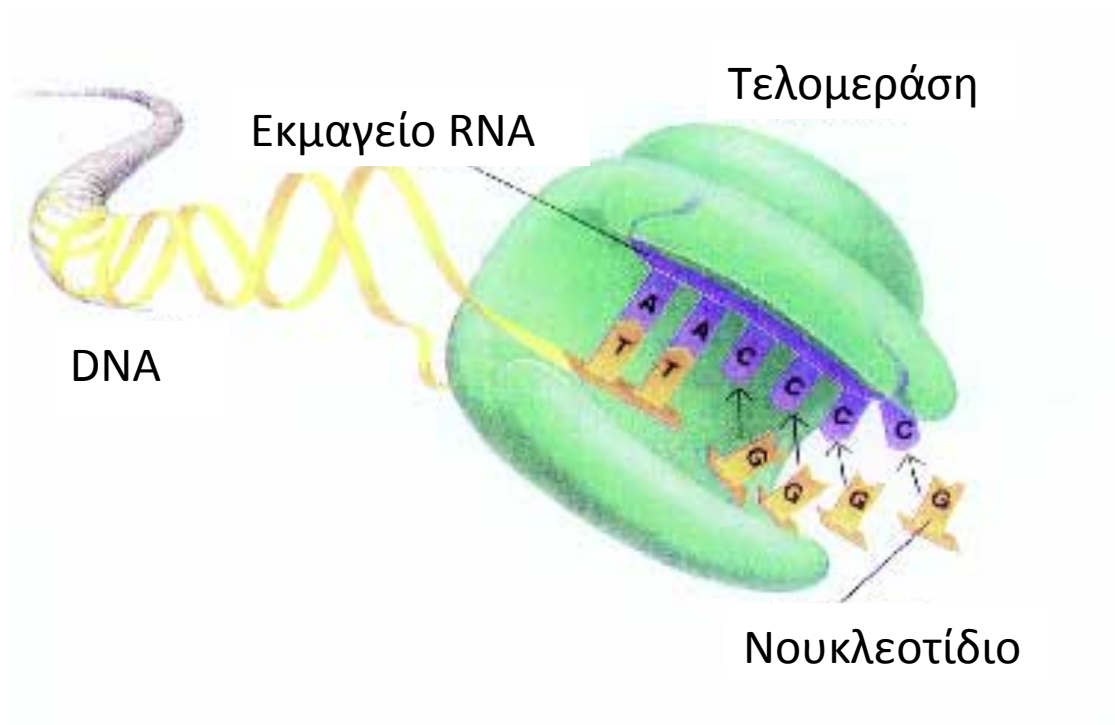
## Προτεινόμενο μοντέλο για τα τελομερή



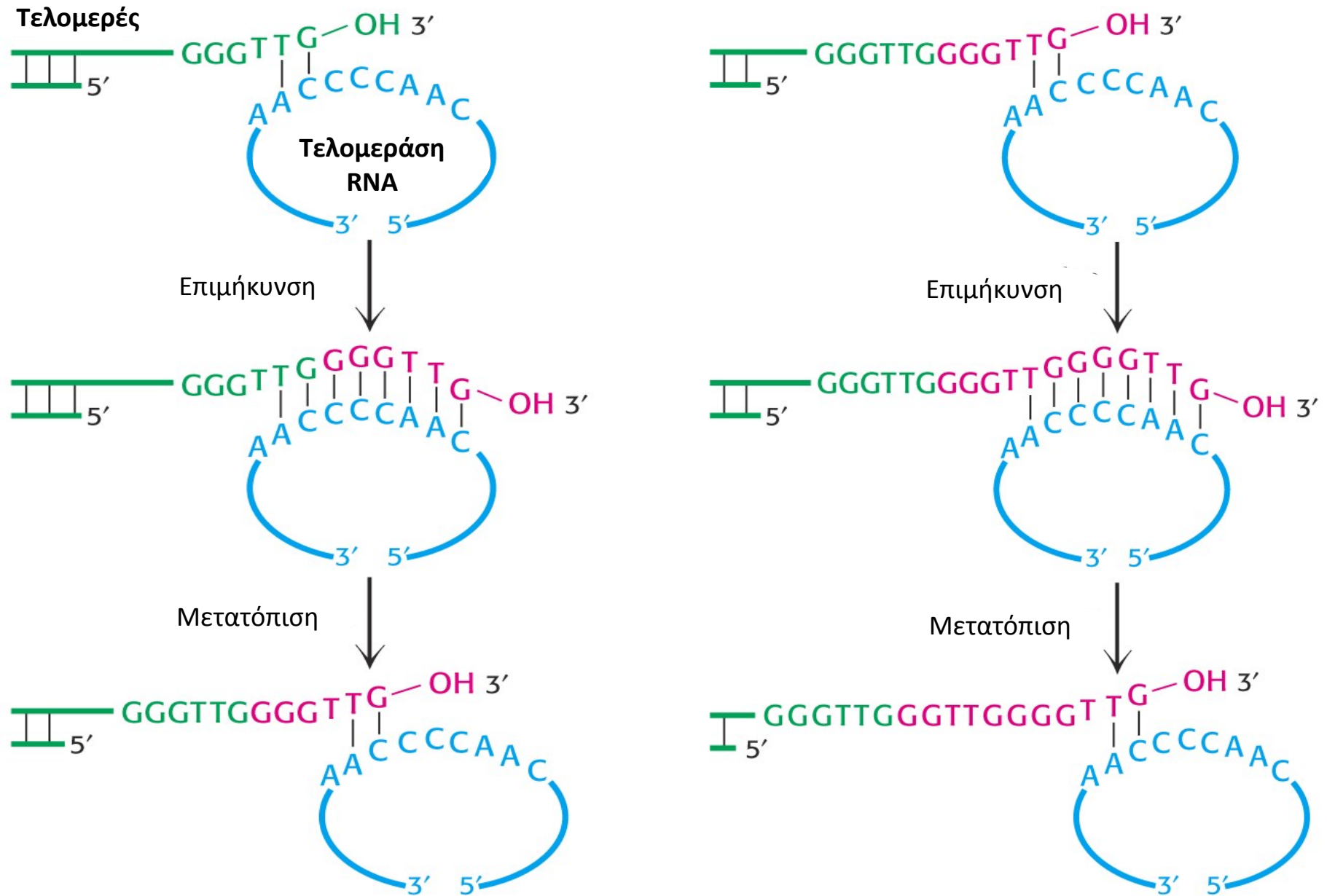
Ενα τμήμα του κλώνου πλούσιου σε G προεξέχει από το άκρο του τελομερούς.  
Η μονόκλωνη αυτή περιοχή διεισδύει στη δίκλωνη περιοχή.  
Σχηματίζεται έτσι μια δίκλωνη θηλειά.

# Τελομεράση

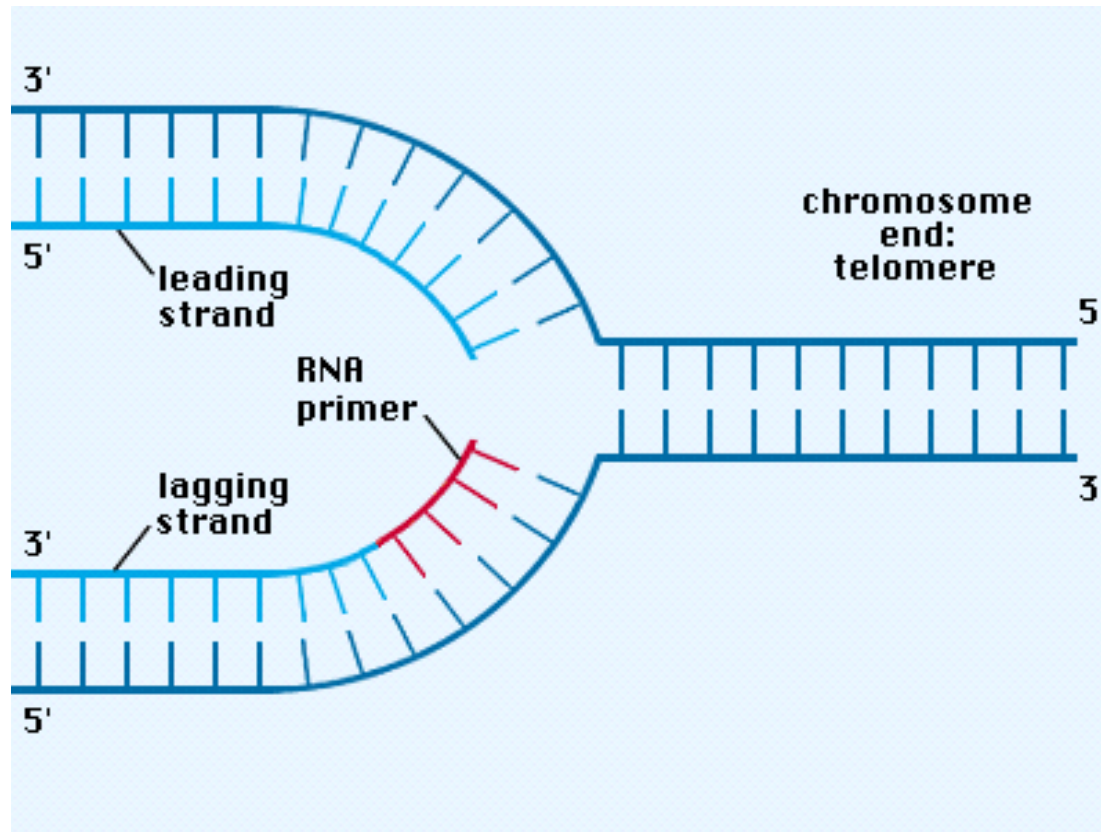
- Η τελομεράση είναι μια πολυμεράση που φέρει το δικό της εκμαγείο RNA
- Είναι μια εξειδικευμένη αντίστροφη μεταγραφάση



# Σχηματισμός τελομερών



# Τελομερή - Τελομεράση



Molecular Cell Biology, 4<sup>th</sup> Edition



## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009

"for the discovery of how chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase"



**Elizabeth H. Blackburn**

1/3 of the prize

USA

b. 1948

(in Hobart,  
Tasmania, Australia)



**Carol W. Greider**

1/3 of the prize

USA

b. 1961

[nobelprize.org](http://nobelprize.org)



**Jack W. Szostak**

1/3 of the prize

USA

b. 1952

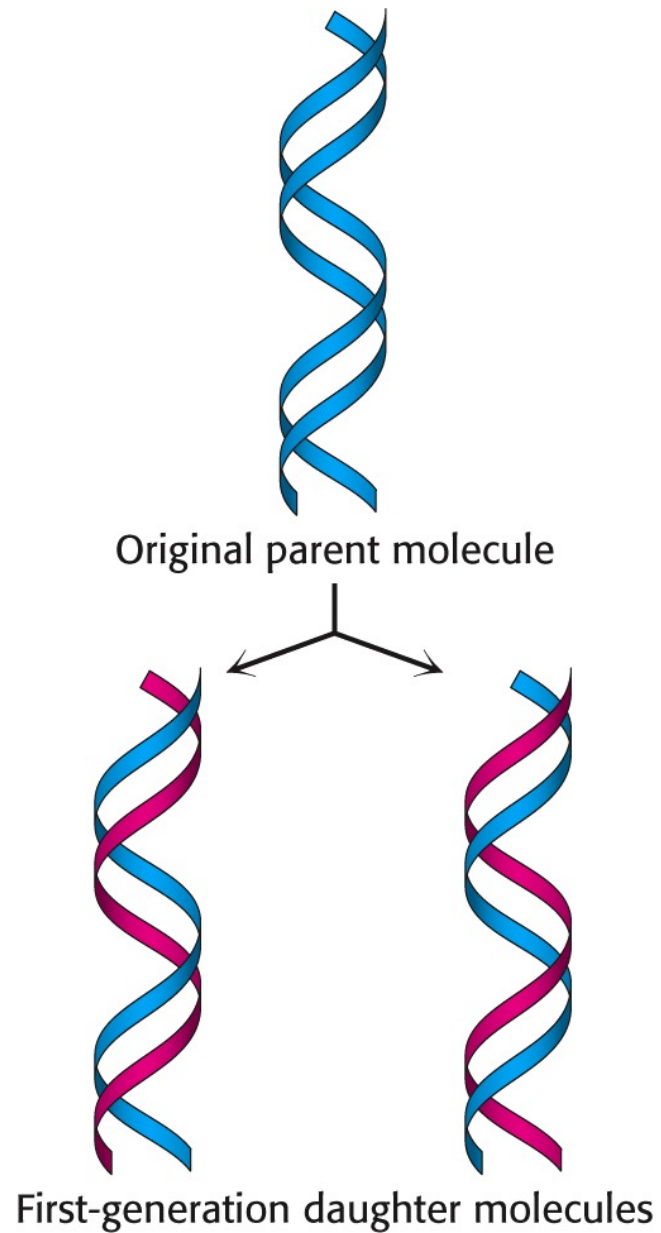
(in London,  
United Kingdom)



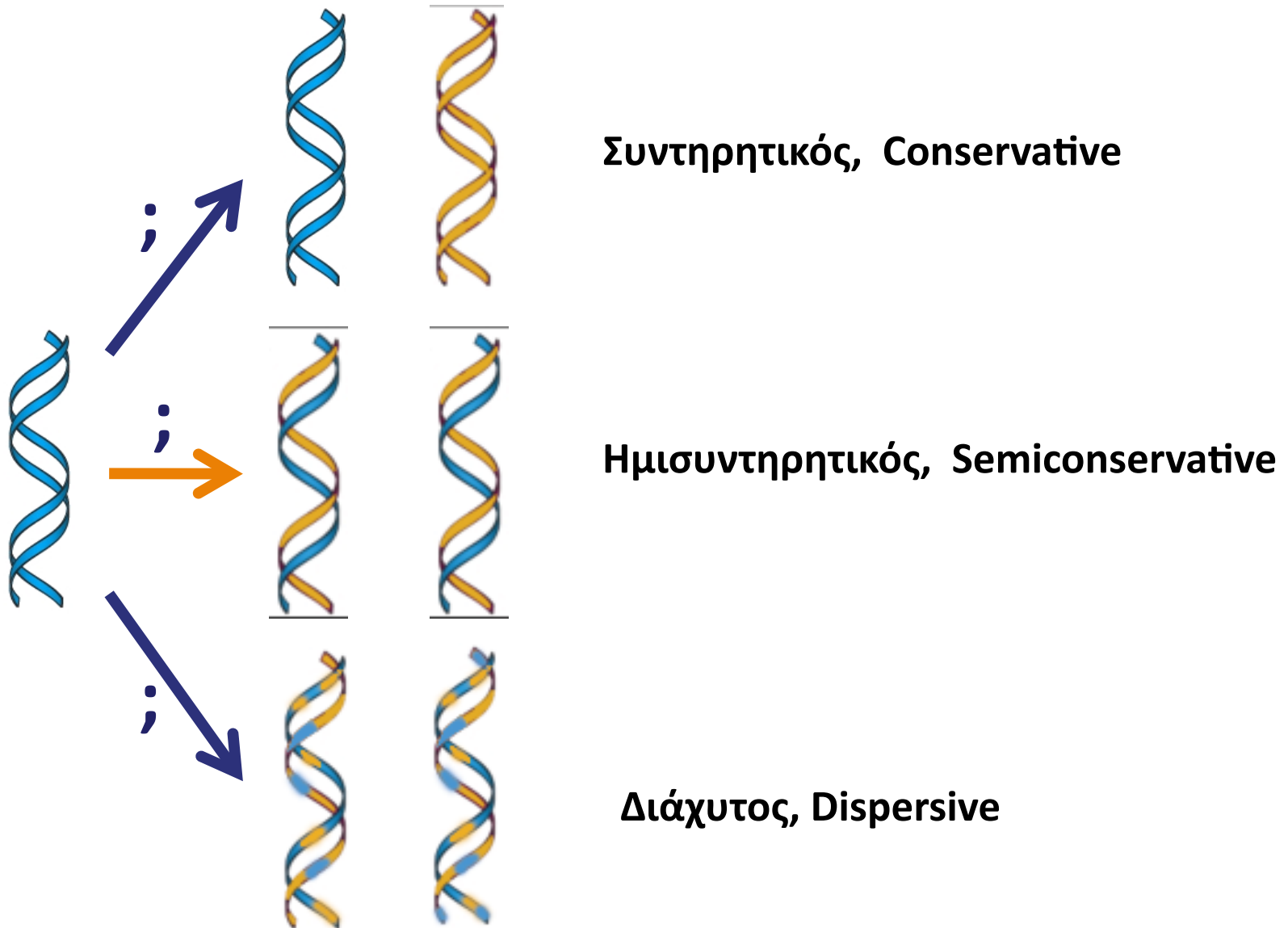
# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Ο μηχανισμός της αντιγραφήs του DNA

# Η αντιγραφή του DNA

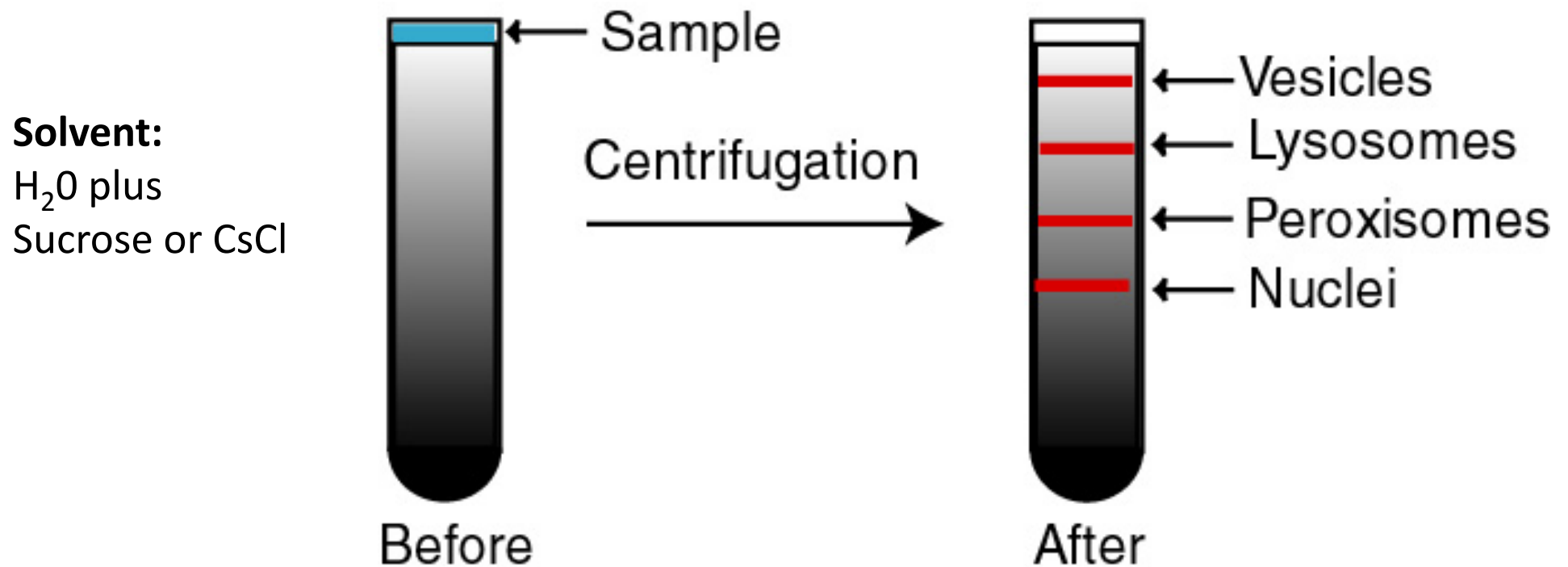


# Ο μηχανισμός αντιγραφής



# Σημαντικά τεχνολογικά επιτεύγματα της Βιοχημείας

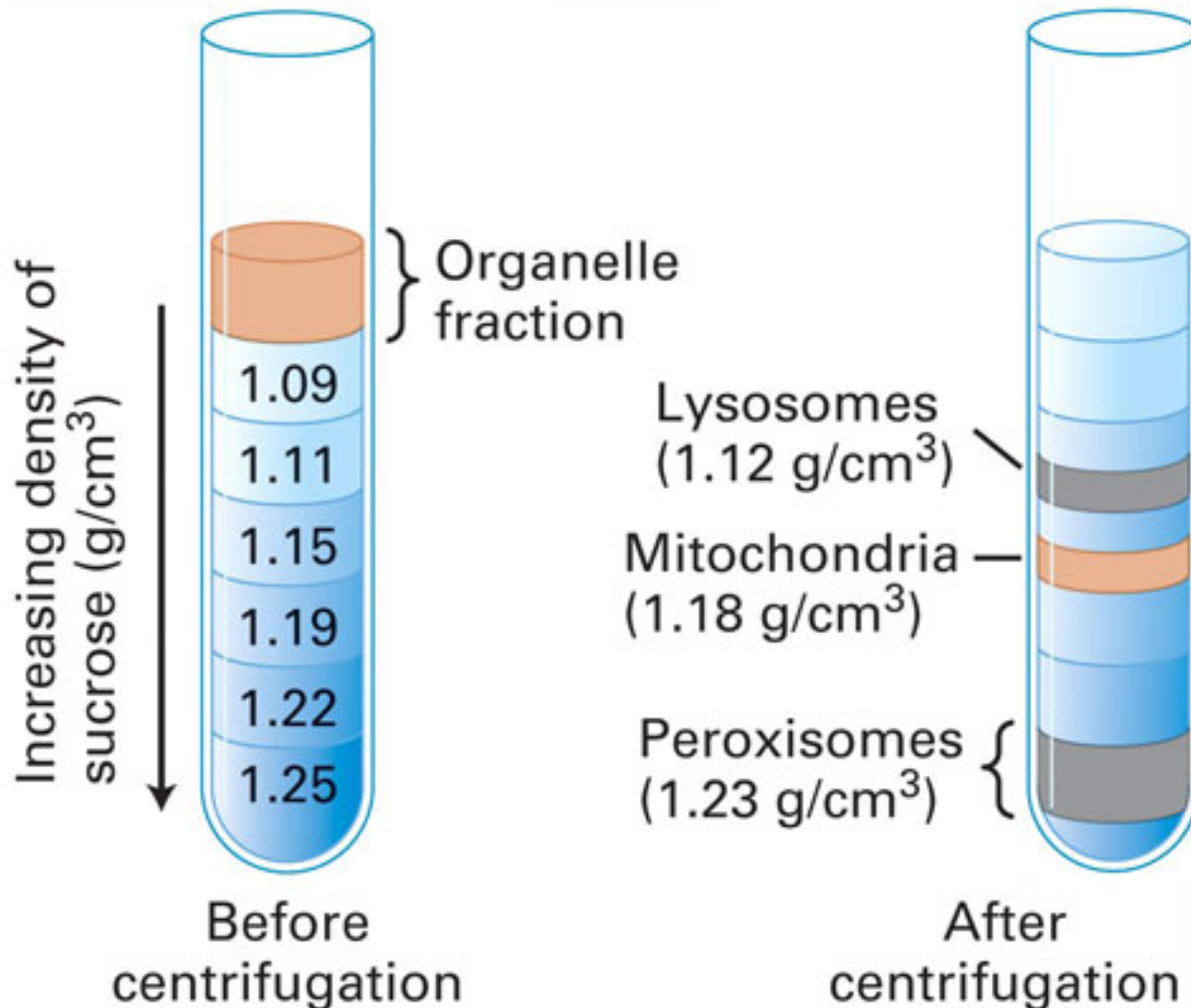
Φυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας, Density gradient centrifugation



<http://bio.winona.edu/berg/ILLUST/gradient.jpg>

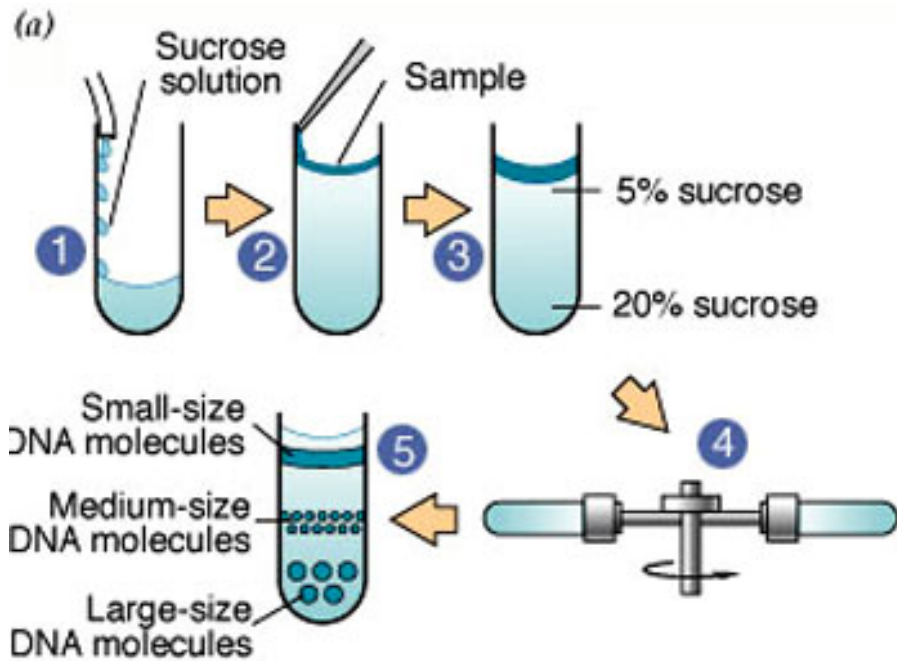
# Σημαντικά τεχνολογικά επιτεύγματα της Βιοχημείας

## Φυγοκέντρηση βαθμίδωσης ισορροπίας, Equilibrium density centrifugation

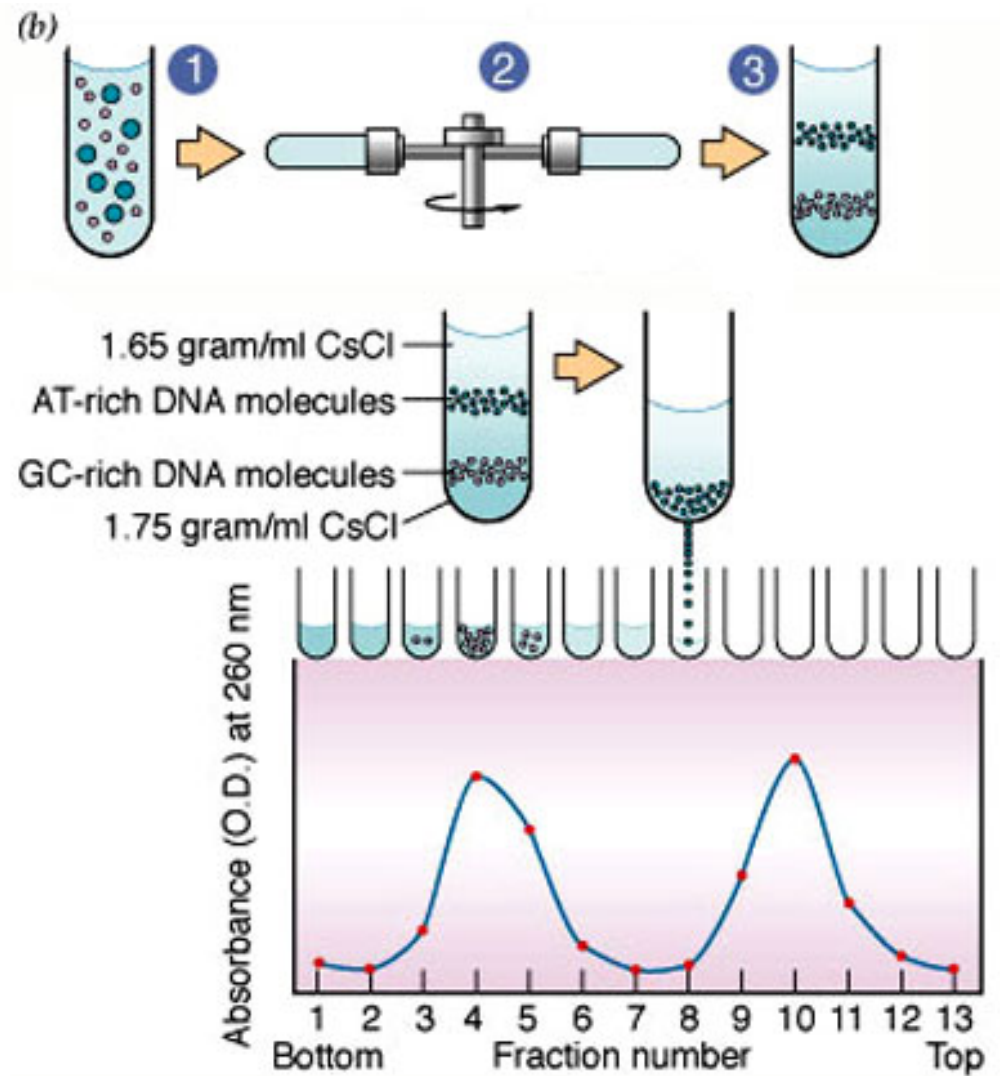


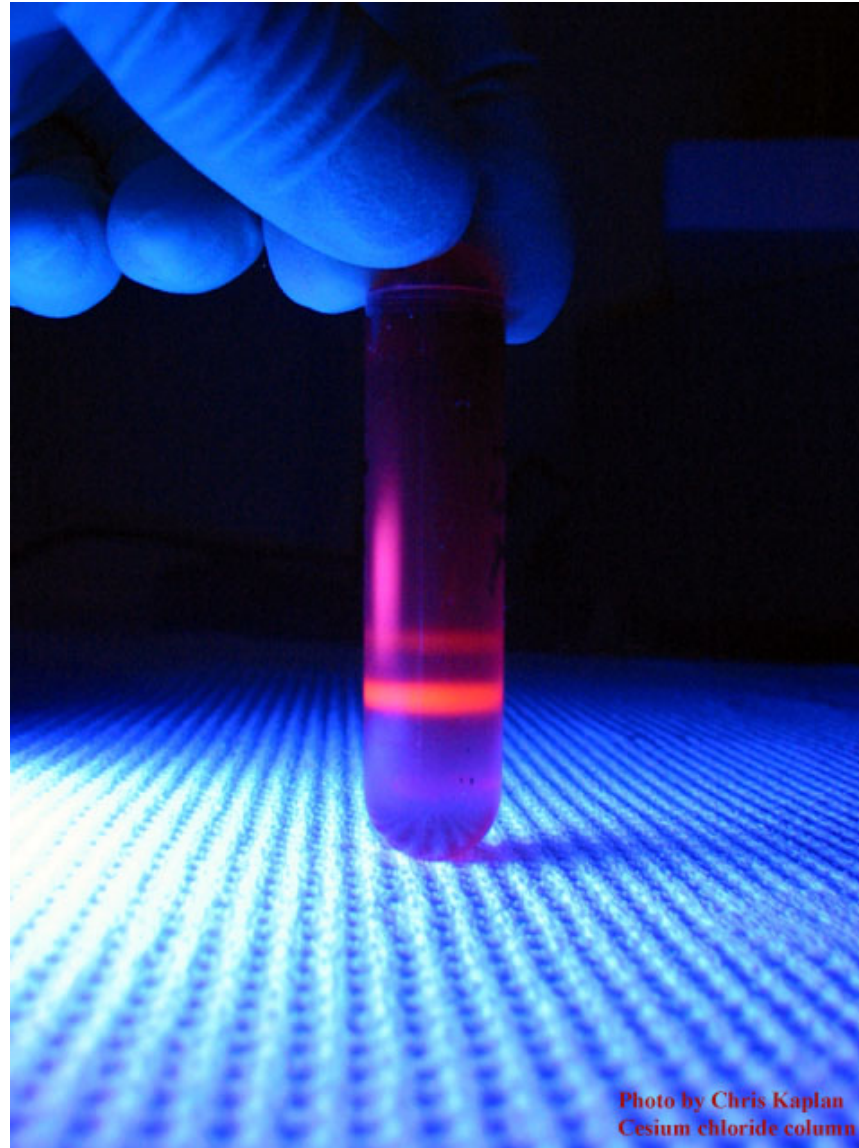
### EQUILIBRIUM SEDIMENTATION

The ultracentrifuge can also be used to separate cellular components on the basis of their **buoyant density**, independently of their size or shape. The sample is usually either layered on top of, or dispersed within, a steep density gradient that contains a very high concentration of sucrose or cesium chloride. Each subcellular component will move up or down when centrifuged until it reaches a position where its density matches its surroundings and then will move no further. A series of distinct bands will eventually be produced, with those nearest the bottom of the tube containing the components of highest buoyant density. The method is also called **density gradient centrifugation**.



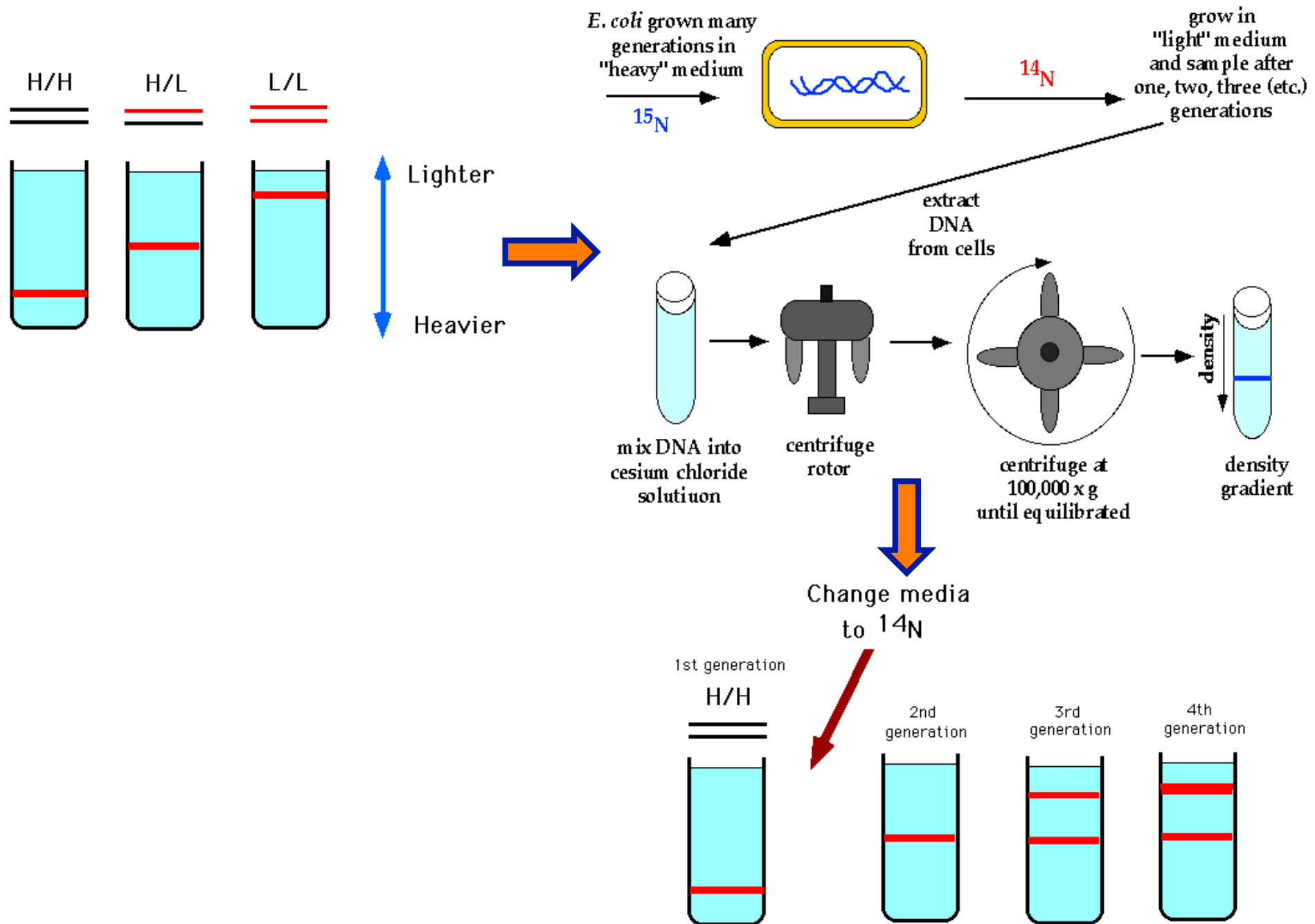
Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.



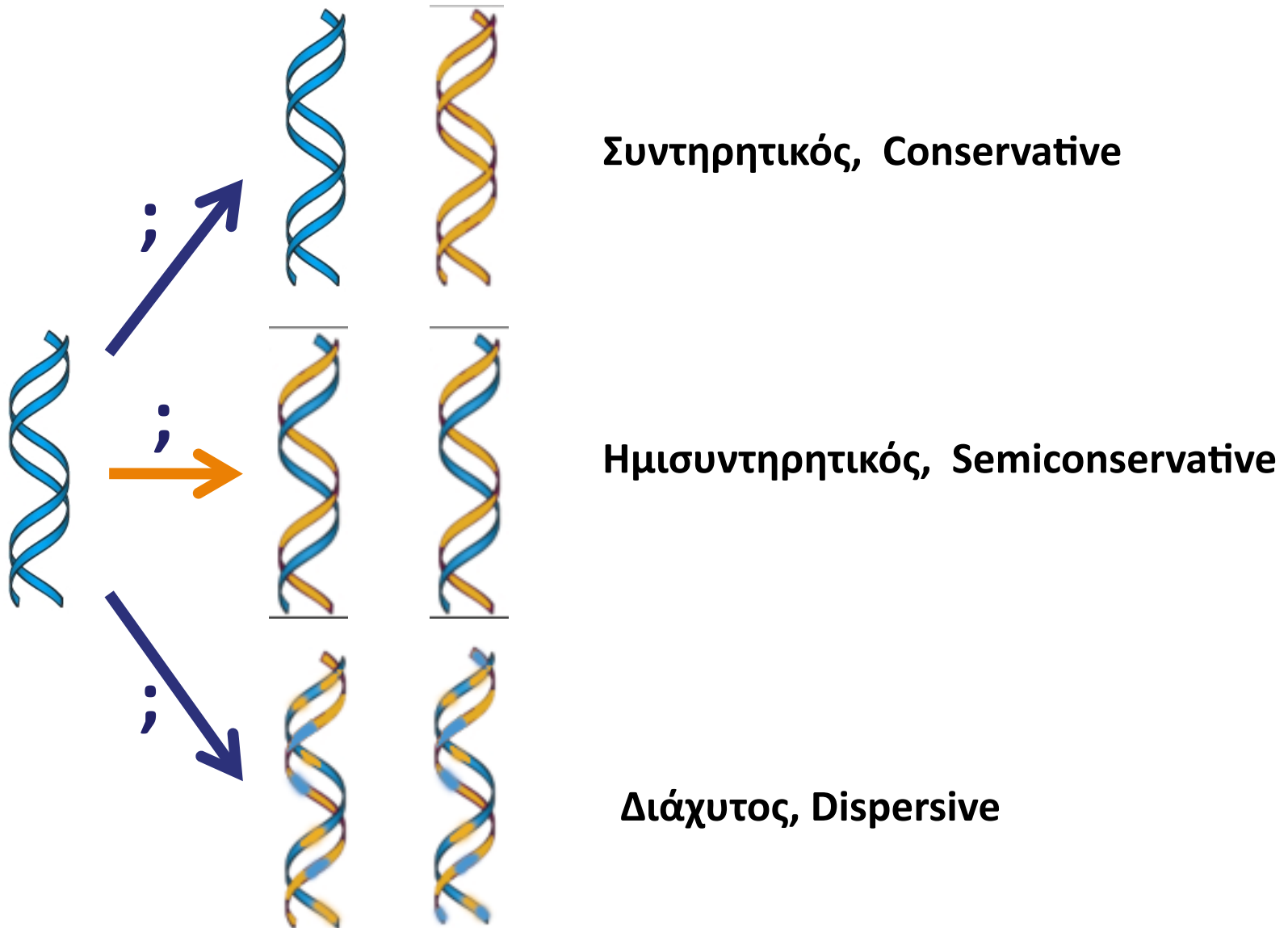


CsCl density gradient column illuminated with UV light after ultra centrifugation for two days. The bright band fluorescing in the column is plasmid DNA that will be used to create a site directed mutation in a bacterium allowing us to study its pathogenesis.  
<http://www.mbi.ucla.edu/IDP/Kaplanimage1.htm>





# Ο μηχανισμός αντιγραφής



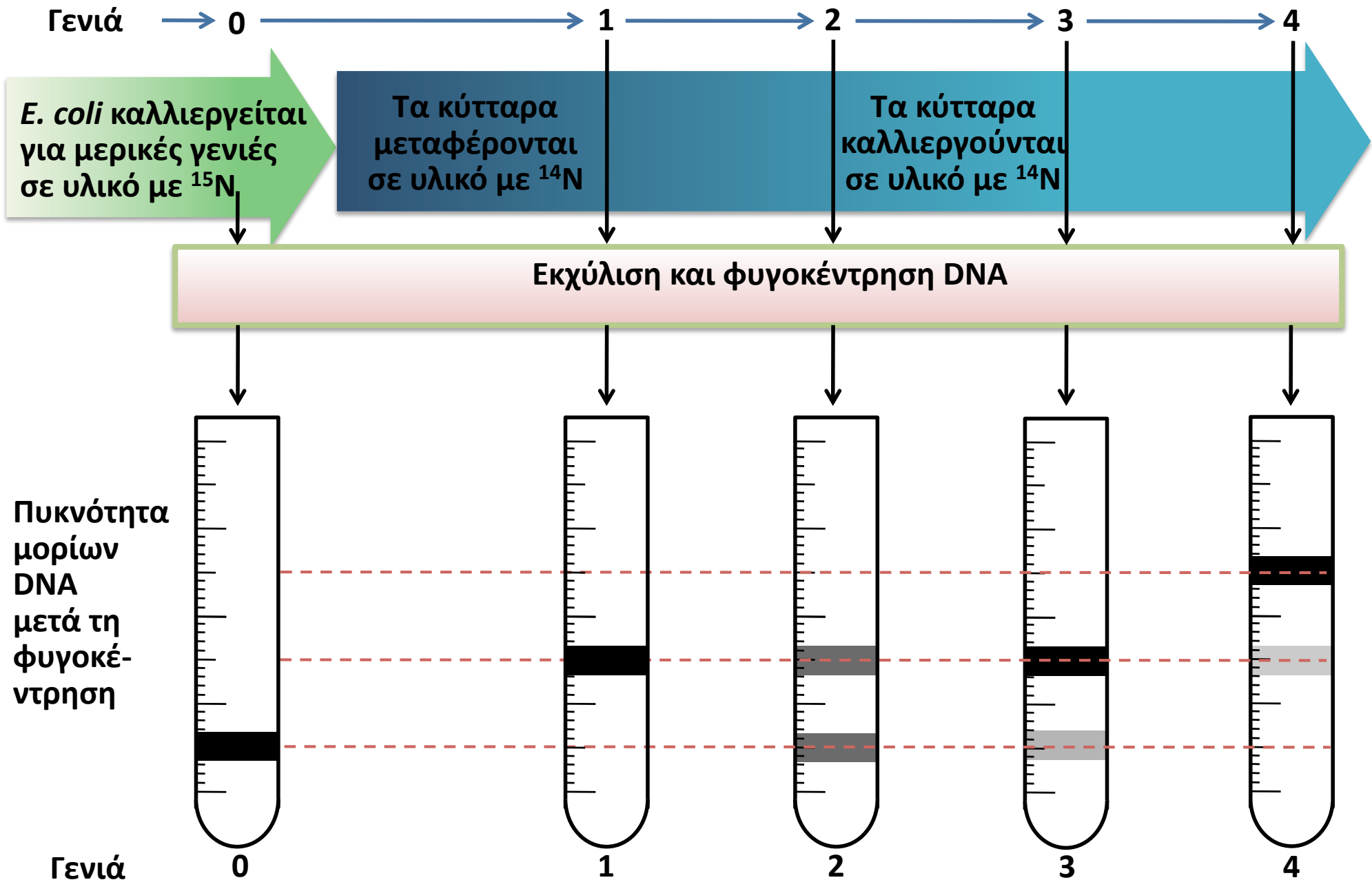
*THE REPLICATION OF DNA IN ESCHERICHIA COLI\**

By MATTHEW MESELSON AND FRANKLIN W. STAHL

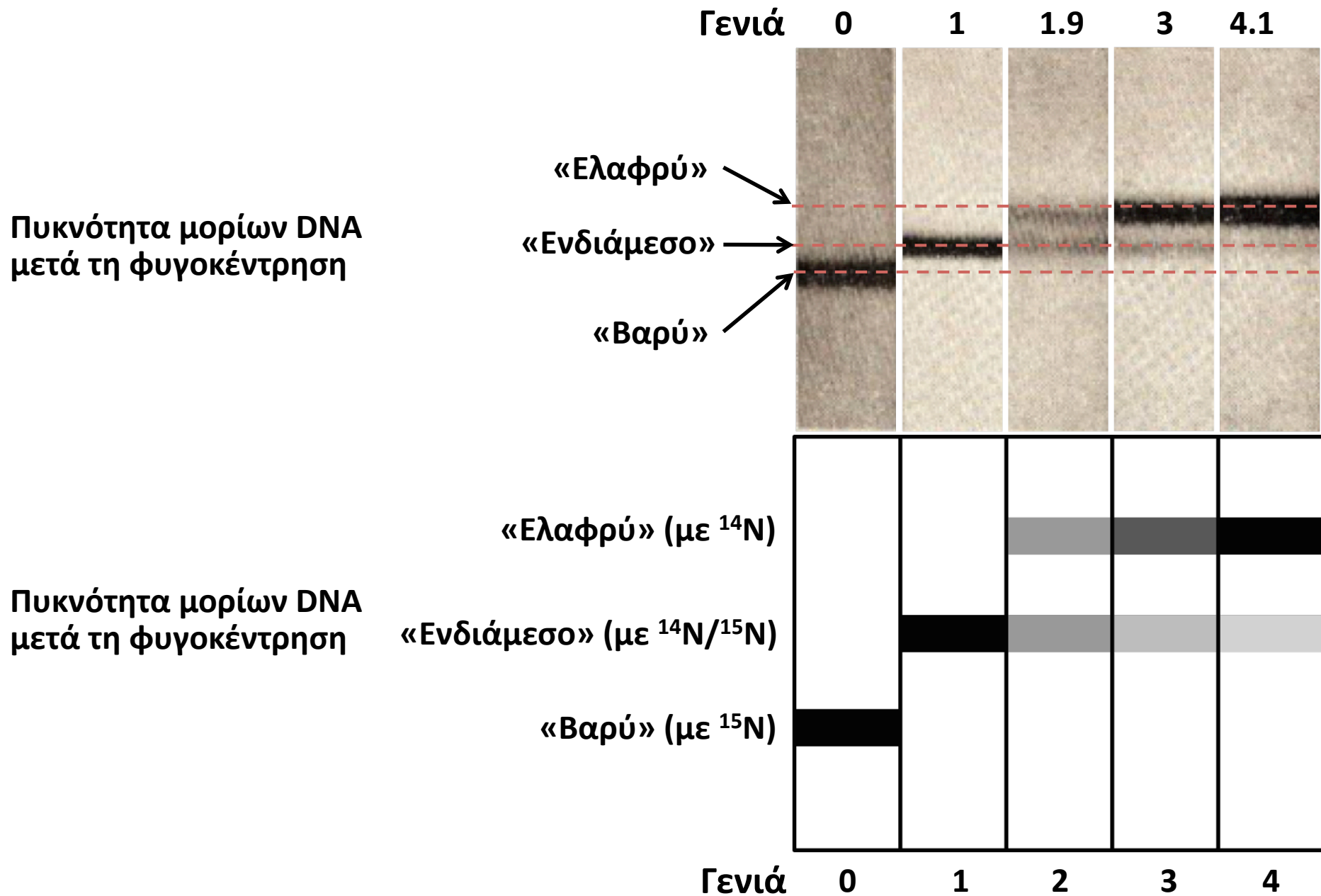
GATES AND CRELLIN LABORATORIES OF CHEMISTRY,† AND NORMAN W. CHURCH LABORATORY OF  
CHEMICAL BIOLOGY, CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY, PASADENA, CALIFORNIA

. *Communicated by Max Delbrück, May 14, 1958*

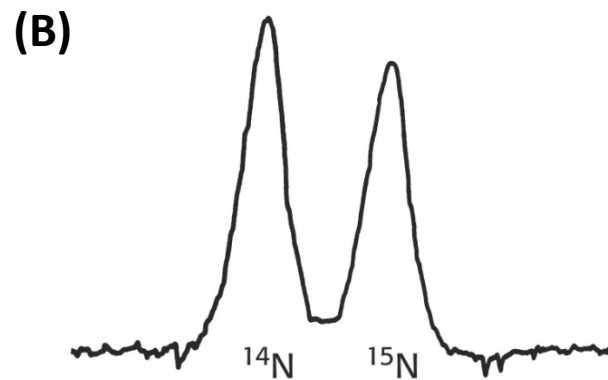
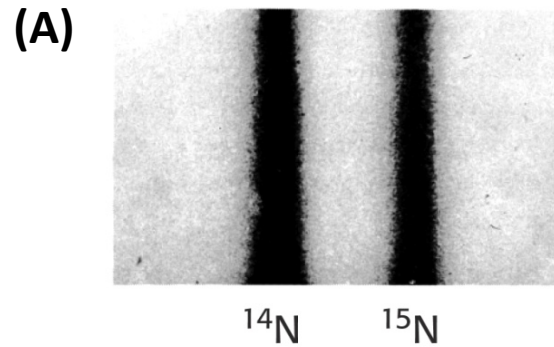
# Αντιγραφή: Ο ημισυντηρητικός μηχανισμός



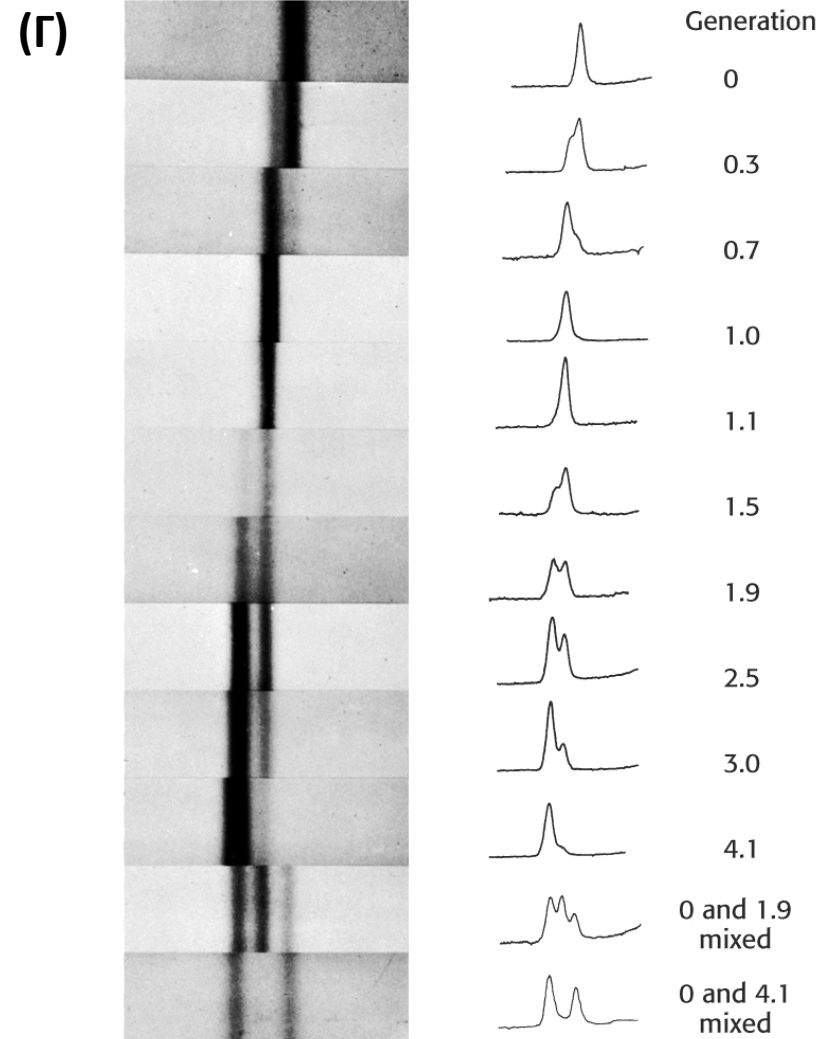
# Αντιγραφή: Ο ημισυντηρητικός μηχανισμός



# Ανίχνευση του ημισυντηρητικού μηχανισμού αντιγραφής σε *E.coli* με φυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας



Διαχωρισμός  
<sup>14</sup>N DNA και <sup>15</sup>N DNA  
 (A) Απορρόφηση UV  
 φυγοκεντρικού σωλήνα



Η θέση της ζώνης DNA εξαρτάται από την περιεκτικότητά της σε <sup>14</sup>N και <sup>15</sup>N

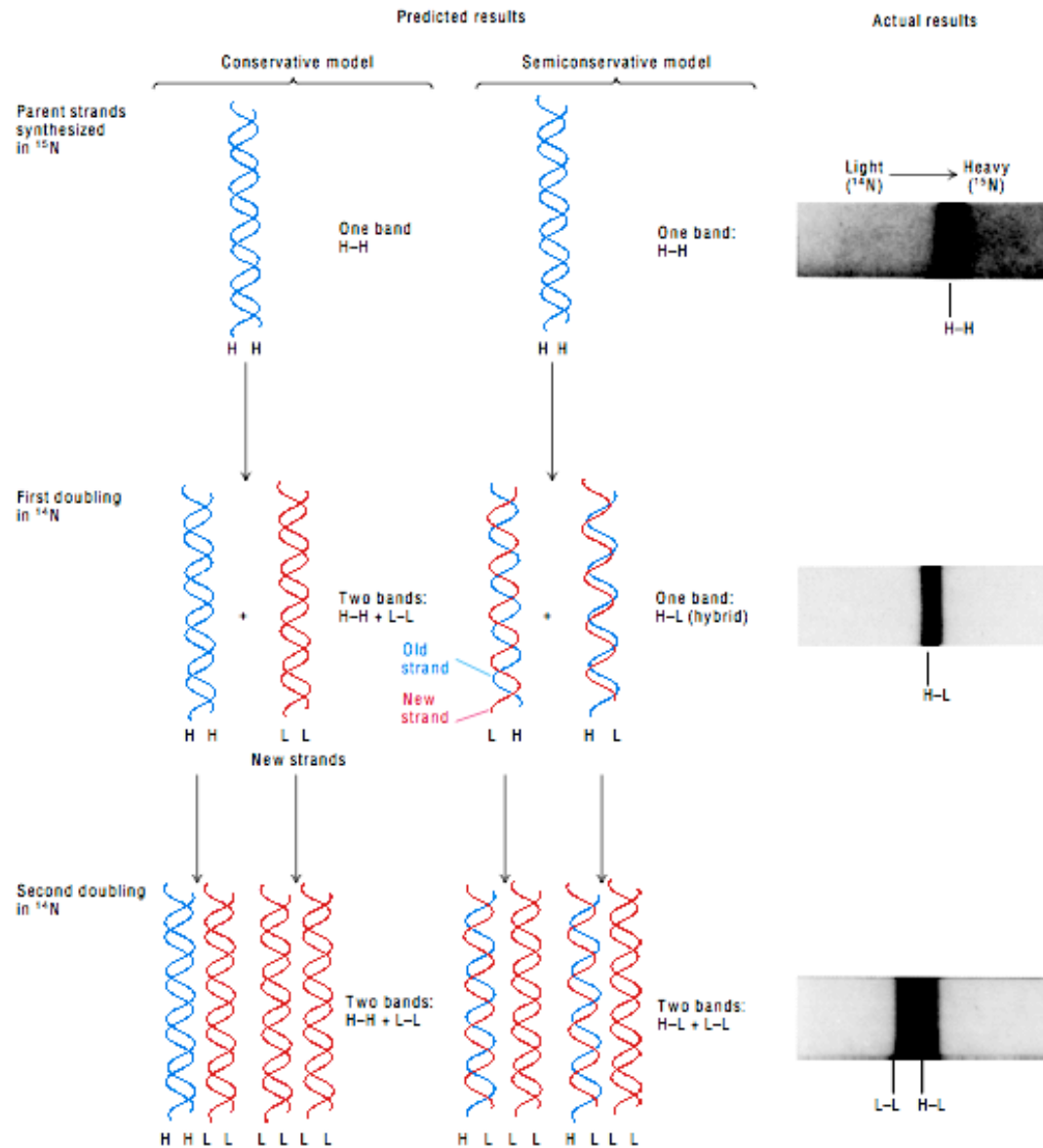
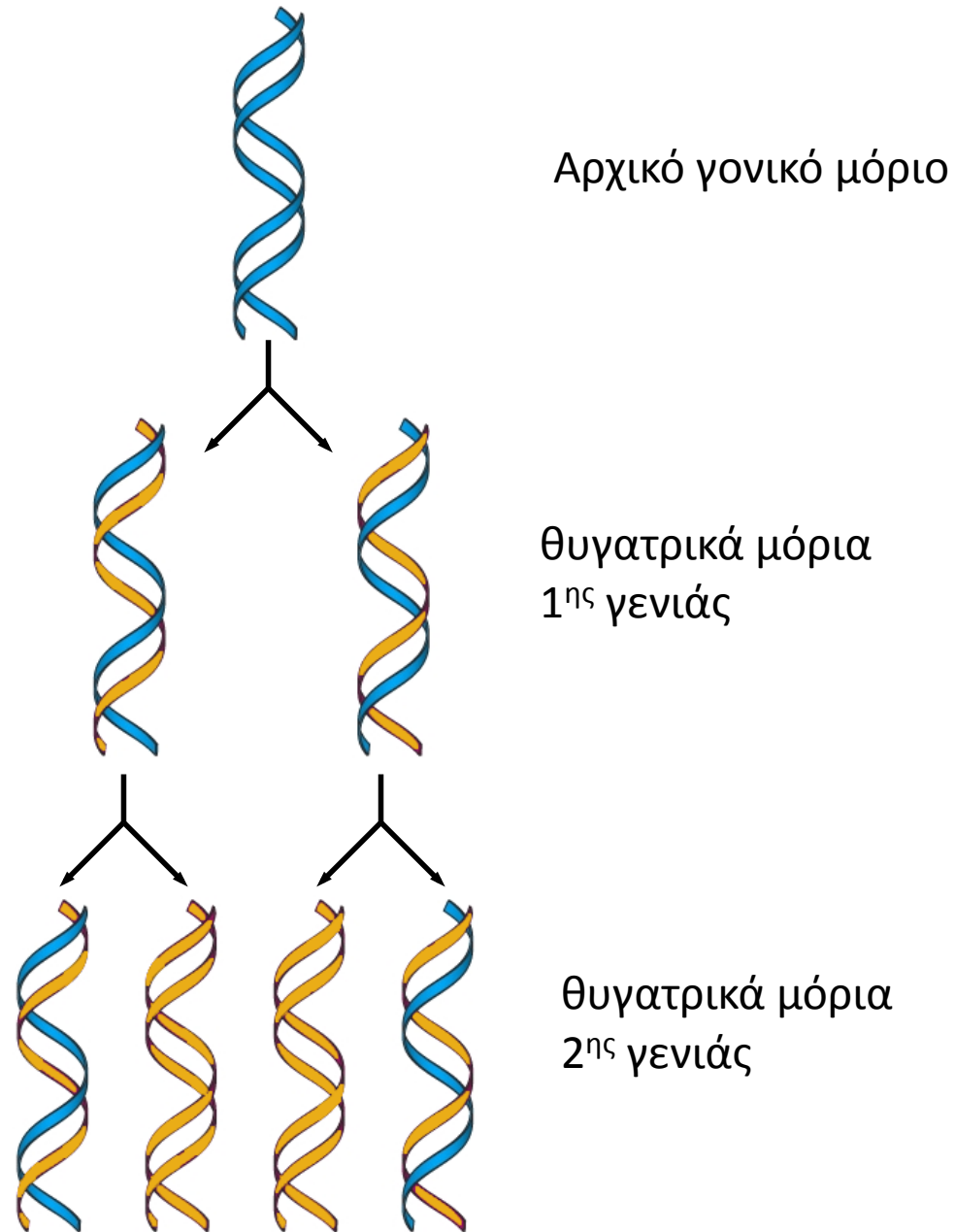


Figure 12.1  
 Experimental demonstration by Meselson and Stahl that DNA replication is semiconservative. After several generations of growth in a medium containing "heavy" ( $^{15}\text{N}$ ) nitrogen, *E. coli* were transferred to a medium containing the normal "light" isotope ( $^{14}\text{N}$ ). Samples were removed from the cultures periodically and analyzed by equilibrium density-gradient centrifugation in  $\text{CsCl}_2$  to separate heavy-heavy (H-H), light-light (L-L), and heavy-light (H-L) duplexes into distinct bands. The actual banding patterns observed were consistent with the semiconservative mechanism. [From H. Lodish et al., 1995, *Molecular Cell Biology*, 3rd ed. W. H. Freeman and Company. See M. Meselson and W. F. Stahl, 1958, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 44:671; photographs courtesy of M. Meselson.]



# Ο μηχανισμός αντιγραφής είναι ημισυντηρητικός



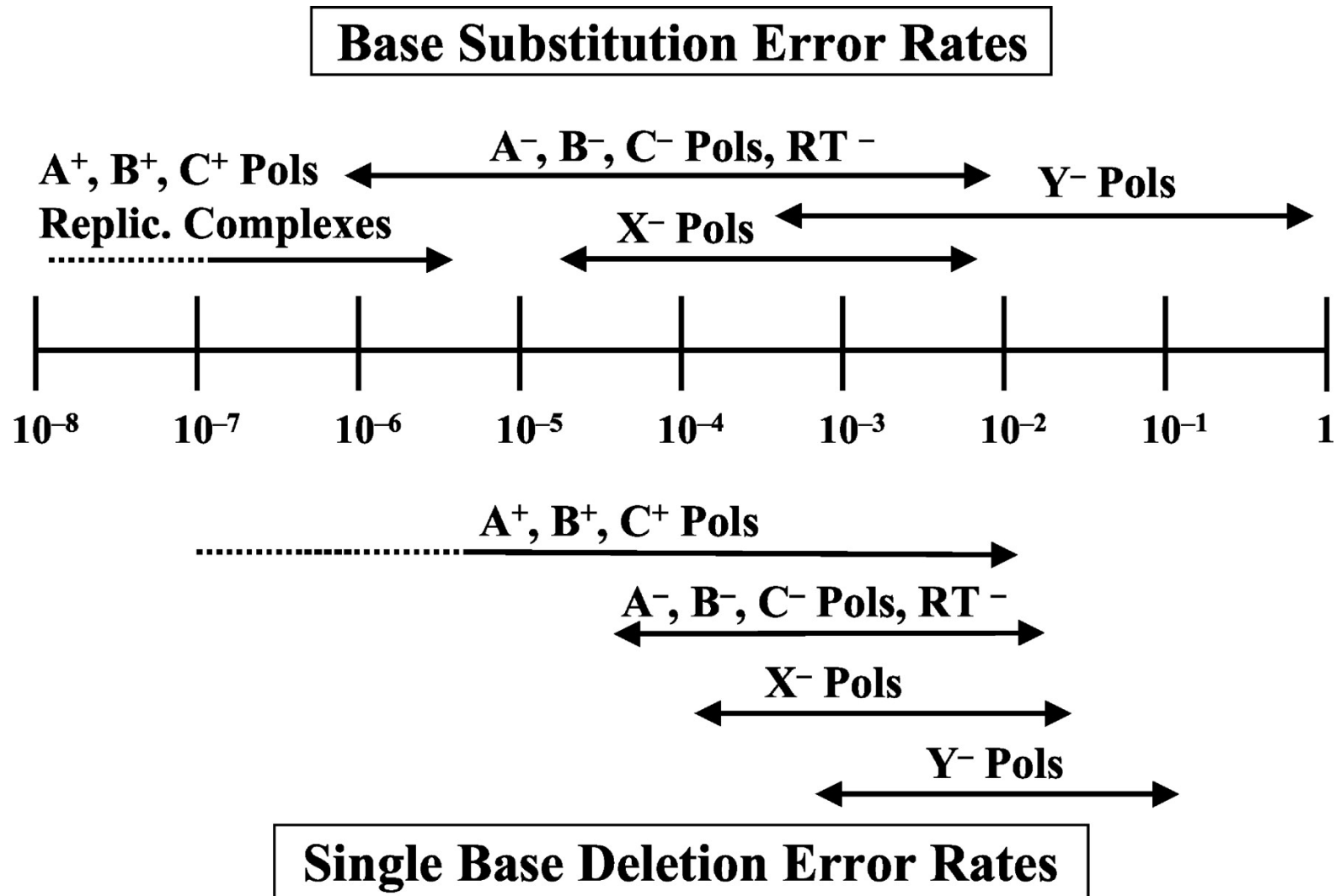


# **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2**

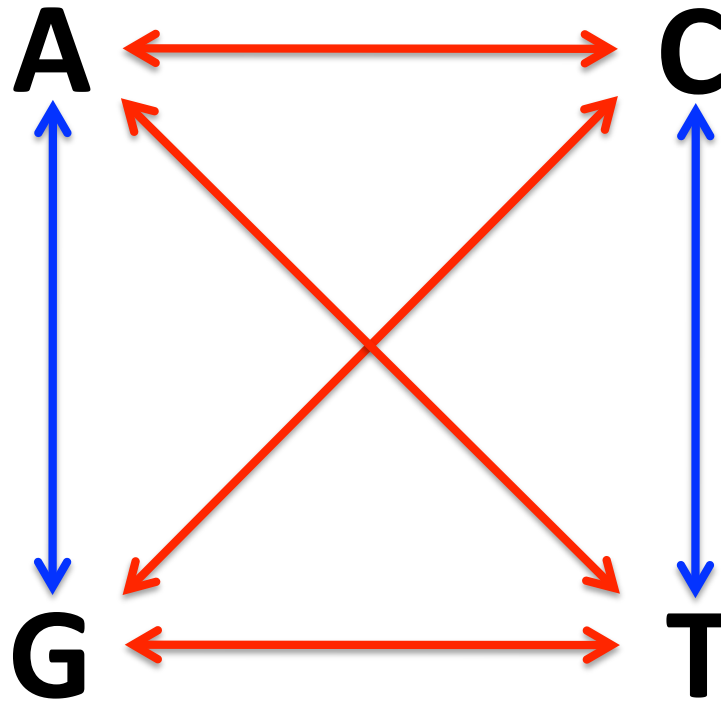
## **Βλάβες και επιδιόρθωση του DNA**

# Ρυθμοί λαθών κατά την αντιγραφή

Replication error rates.



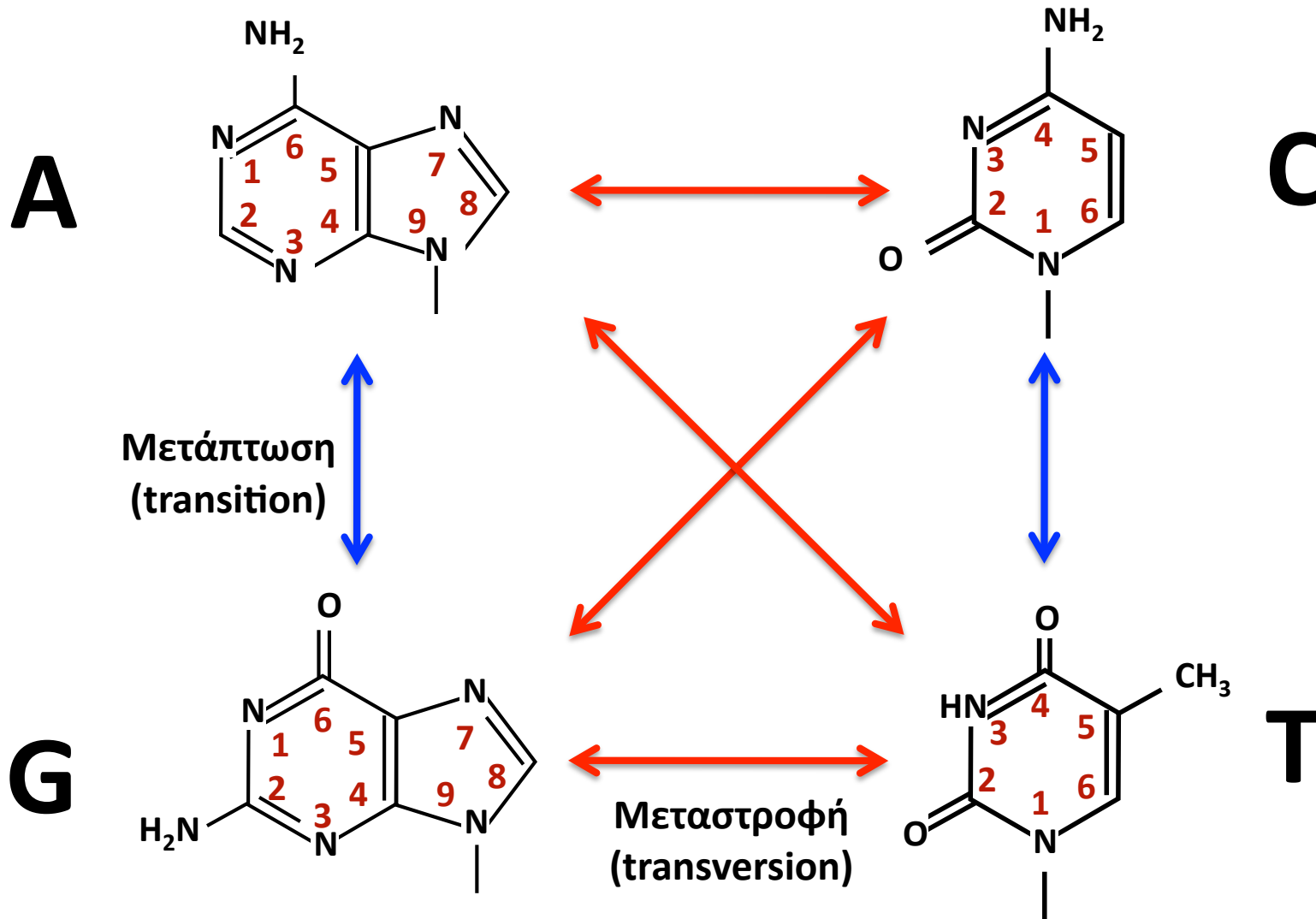
# Τύποι μεταλλάξεων



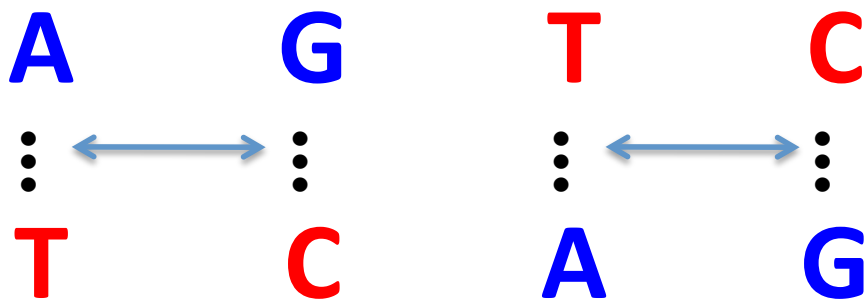
 Μετάπτωση (transition)

 Μεταστροφή (transversion)

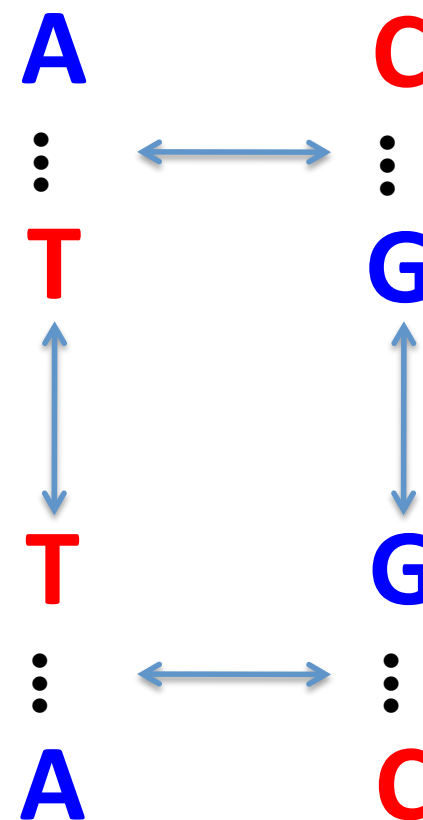
# Τύποι μεταλλάξεων



# Μεταλλάξεις: Αντικατάσταση ζεύγους βάσεων

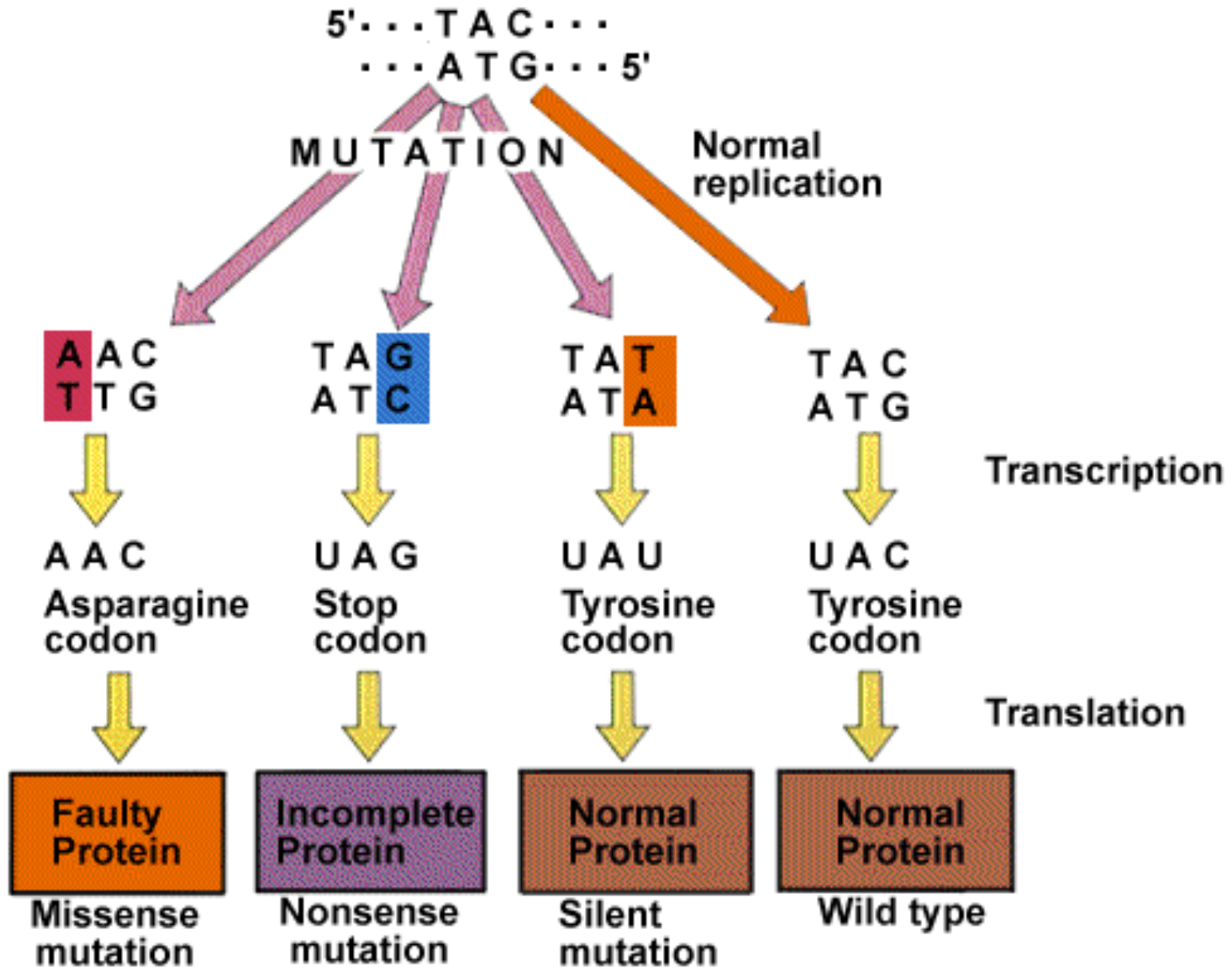


**Μετάπτωση**  
πουρίνη με πουρίνη  
πυριμιδίνη με πυριμιδίνη



**Μεταστροφή**  
πουρίνη με πυριμιδίνη  
και αντίστροφα

# Παράδειγμα





# Τύποι μεταλλάξεων

Σημειακές μεταλλάξεις: αντικατάσταση μιας βάσης ή ενός ζεύγους βάσεων

# Τύποι μεταλλάξεων

## Μεταλλάξεις στο επίπεδο του DNA

- Αντικατάσταση βάσεων: Μετάπτωση (transition mutation)  
Μεταστροφή (transversion mutation)
- Αντικατάσταση ενός ζεύγους βάσεων

## Μεταλλάξεις στο επίπεδο της πρωτεΐνης

- Σιωπηλές μεταλλάξεις (Silent mutations) (AGG – CGG και τα δύο για Arg)
- Ουδέτερες μεταλλάξεις (AAA-Lys σε AGA-Arg και τα δύο βασικά αμινοξέα)
- Παρανοηματικές μεταλλάξεις (Missense mutations) διαφορετικά αμινοξέα
- Μη νοηματικές μεταλλάξεις (Non sense mutations) τερματισμός (CAG-Gln σε UAG)

# Τύποι μεταλλάξεων

## Μεταλλάξεις αναγνωστικού πεδίου (Frameshift mutations)

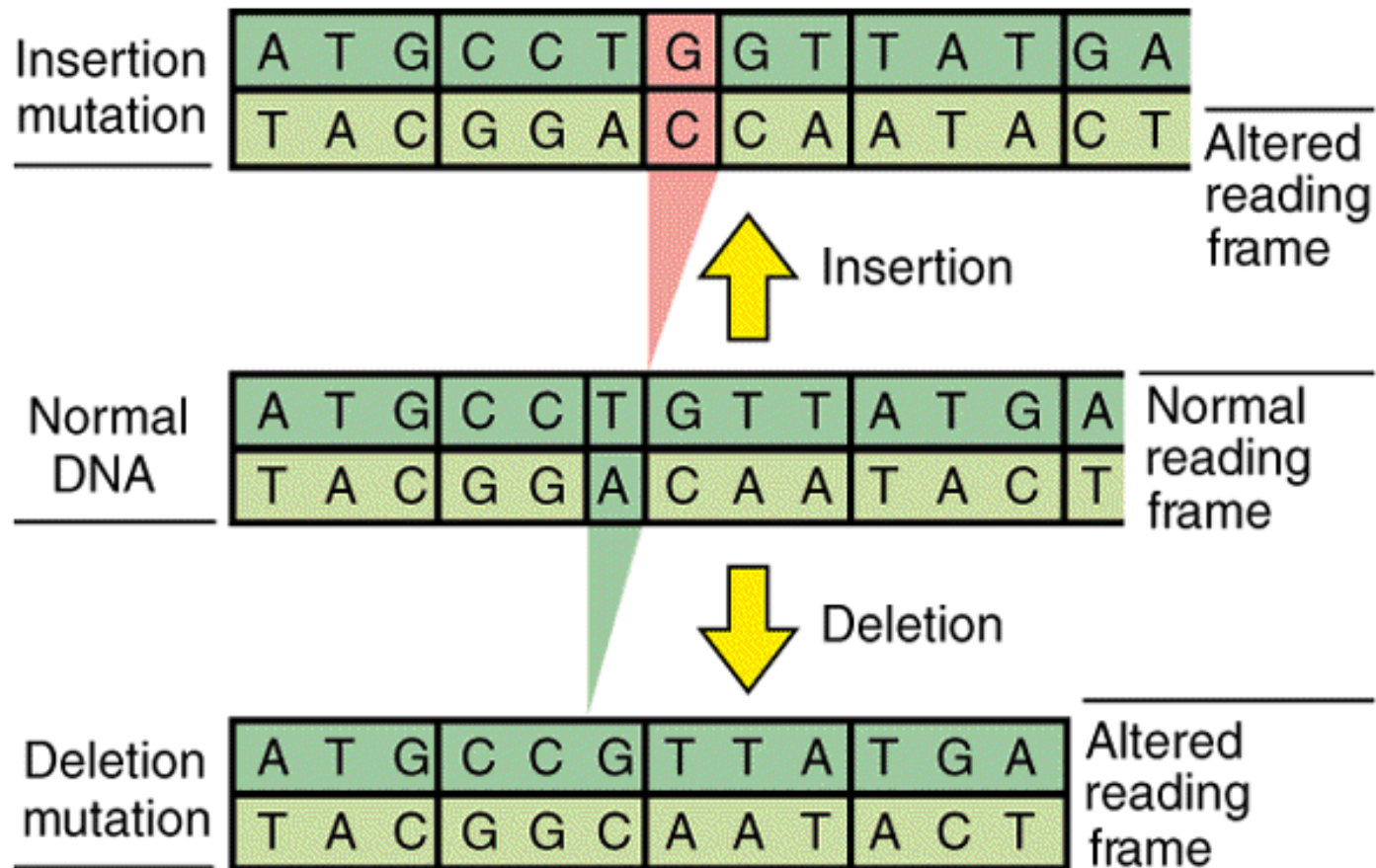
προσθήκη ή διαγραφή μιας βάσης ή ενός ζεύγους βάσεων.

Οδηγεί σε αλλαγή τής ανάγνωσης των πληροφοριών που κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη

## Μεταλλάξεις διαγονιδιακής προσθήκης ή αφαίρεσης μεγάλων τμημάτων DNA

Παράδειγμα: Μεταθετά στοιχεία, Γενετικός ανασυνδυασμός

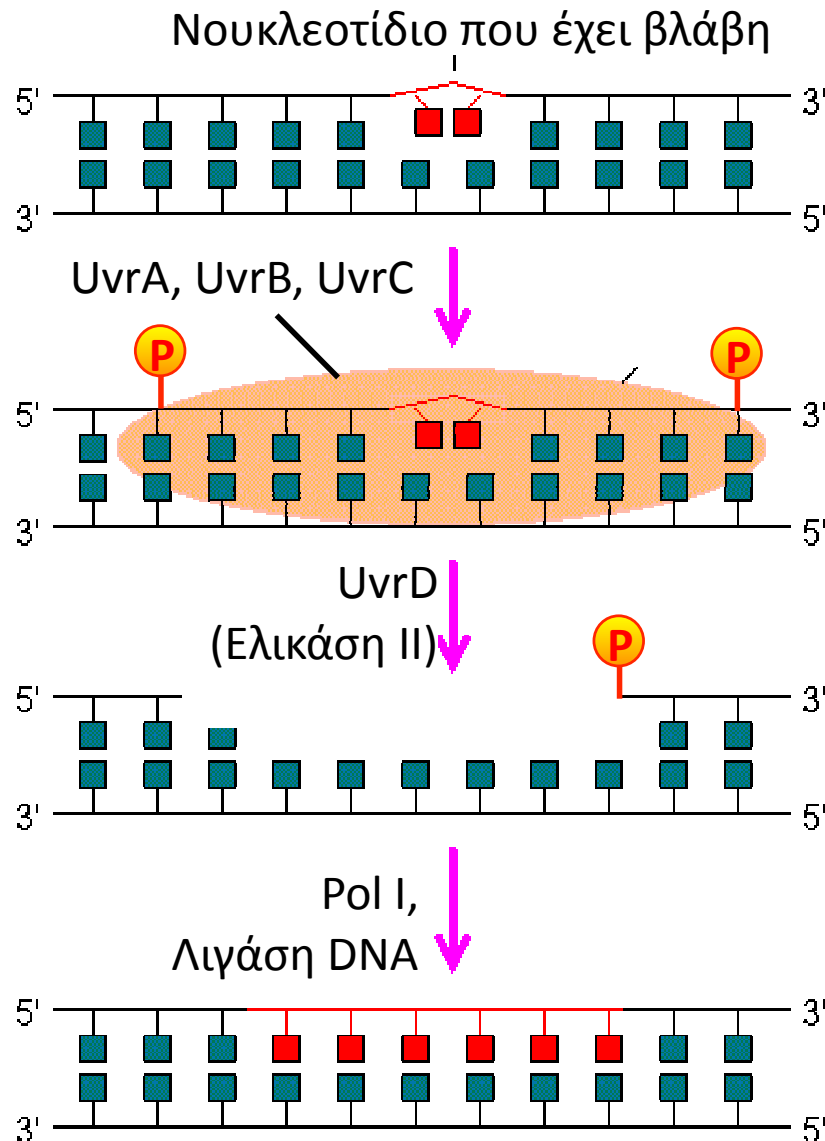
# Παράδειγμα



# Μέθοδοι επιδιόρθωσης των μεταλλάξεων

1. Διόρθωση με αποκοπή βάσης
2. Απομάκρυνση βλάβης
3. Μετα-αντιγραφική διόρθωση
4. Επιδιόρθωση με ανασυνδυασμό

# Επιδιόρθωση με αποκοπή νουκλεοτιδίου Nucleotide Excision Repair, NER



- UvrA και UvrB ανιχνεύουν αλλαγές στην τρισδιάστατη δομή του DNA
- Η UvrA απομακρύνεται
- Οι UvrB και UvrC συνδέονται στο DNA και το κόβουν εκατέρωθεν της βλάβης
- Η UvrD αφαιρεί τη μία αλυσίδα
- DNA πολυμεράση
- DNA λιγάση

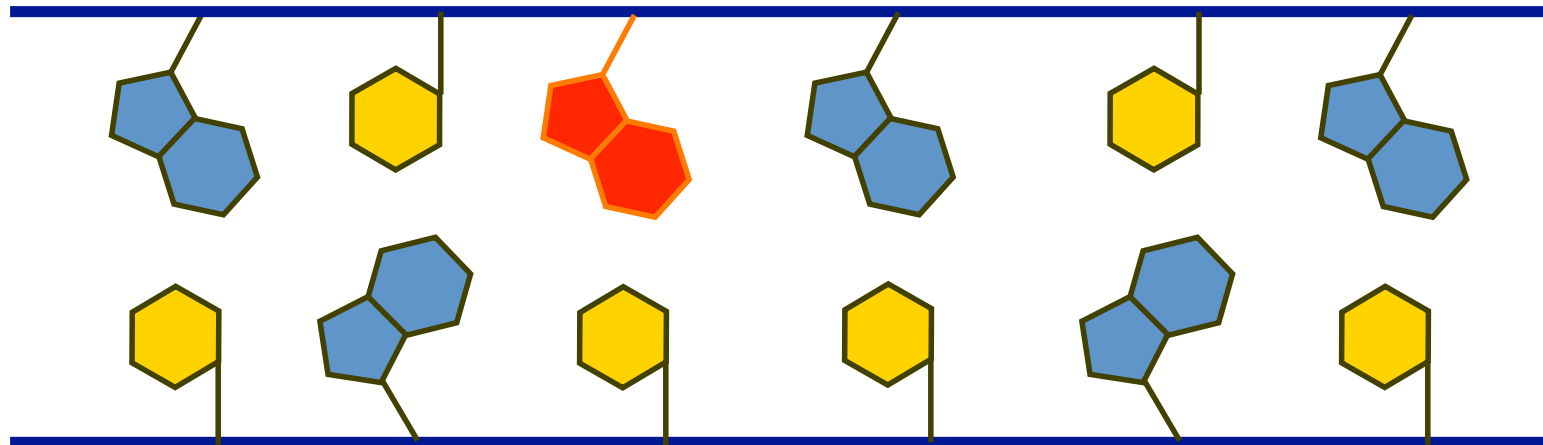
Με σύνθεση νέου DNA

# Base Excision Repair, BER

## Αφαίρεση βάσης (BER)

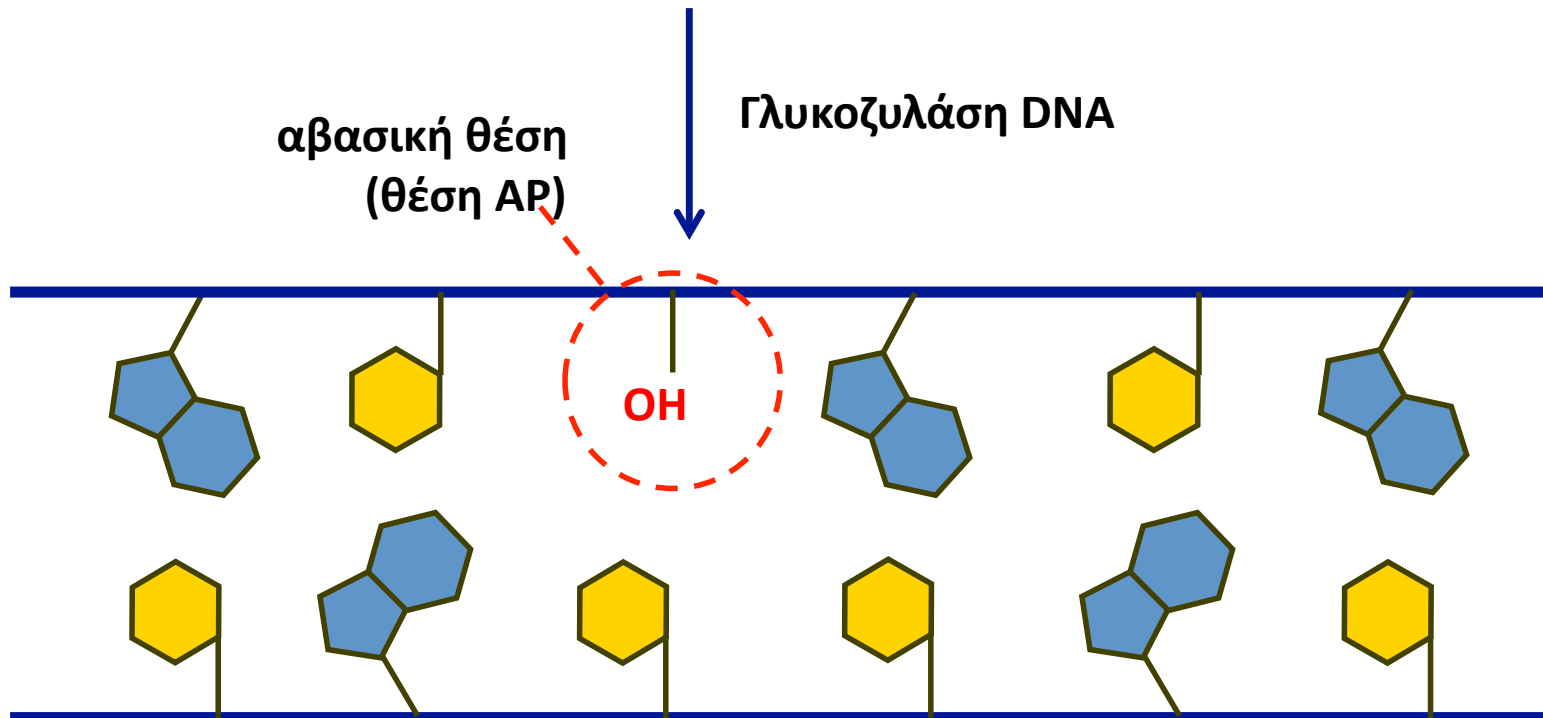
- 1) DNA γλυκοσυλάση: αφαίρεση βάσης
- 2) AP ενδονουκλεάση: κόβει το σκελετό του DNA
- 3) Δεοξυριβοφωσφοδιεστεράση: αφαίρεση νουκλεοτιδίου
- 4) DNA πολυμεράση: τοποθέτηση νέου νουκλεοτιδίου
- 5) DNA λιγάση (δεσμάση)

# DNA γλυκοζυλάσες



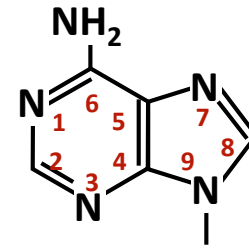
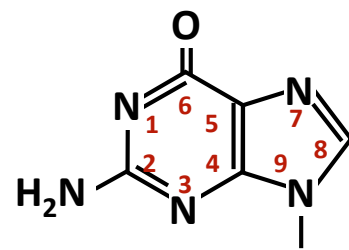
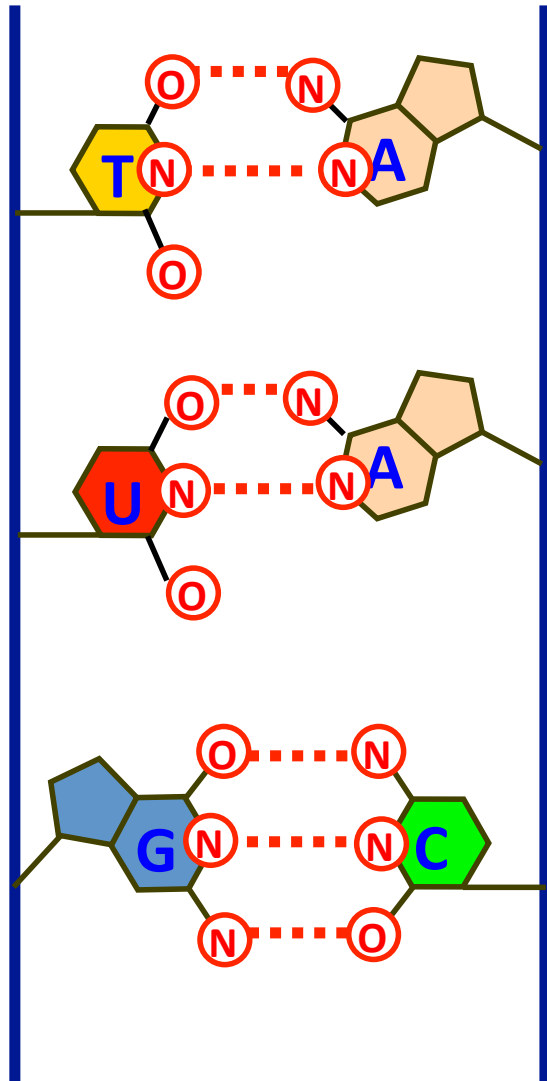
αβασική θέση  
(θέση AP)

Γλυκοζυλάση DNA



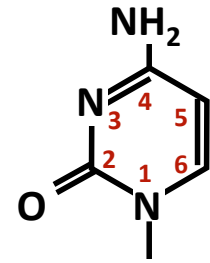
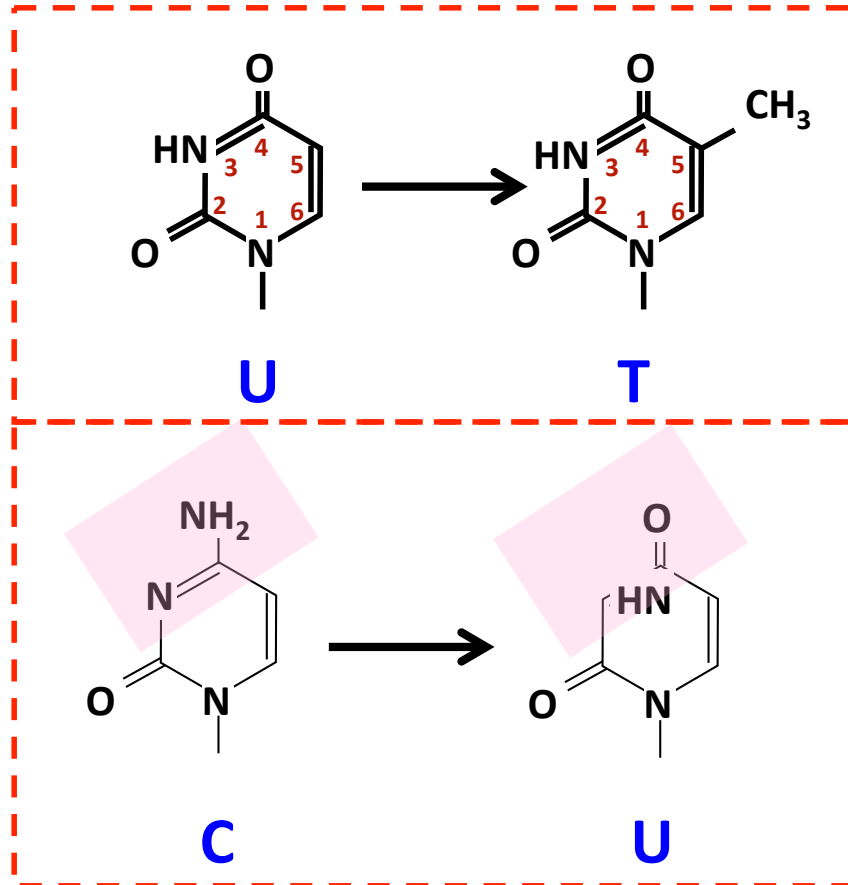


# DNA και U



G

A



C

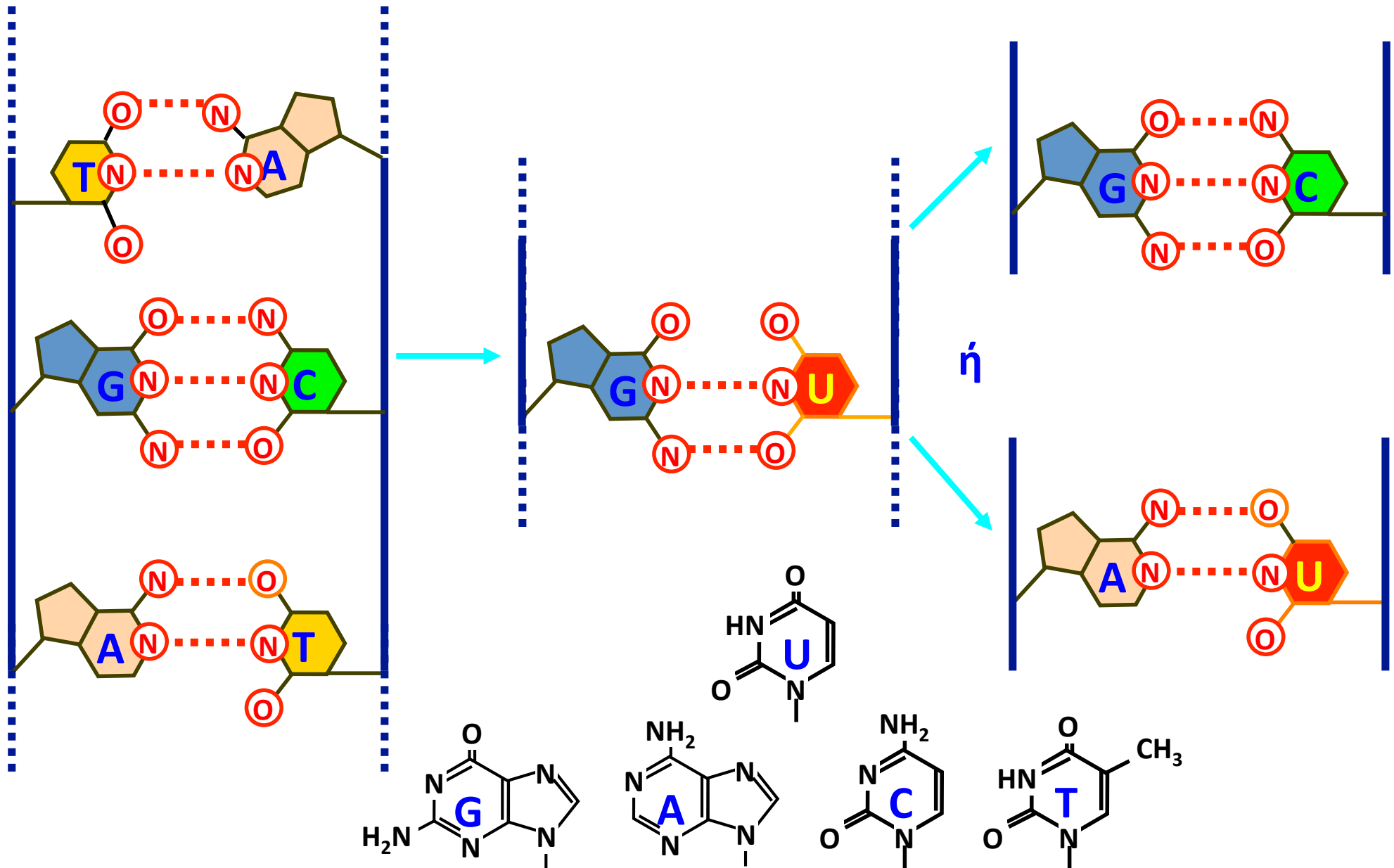
U

T

C

U

# DNA και U



# DNA, U και BER

