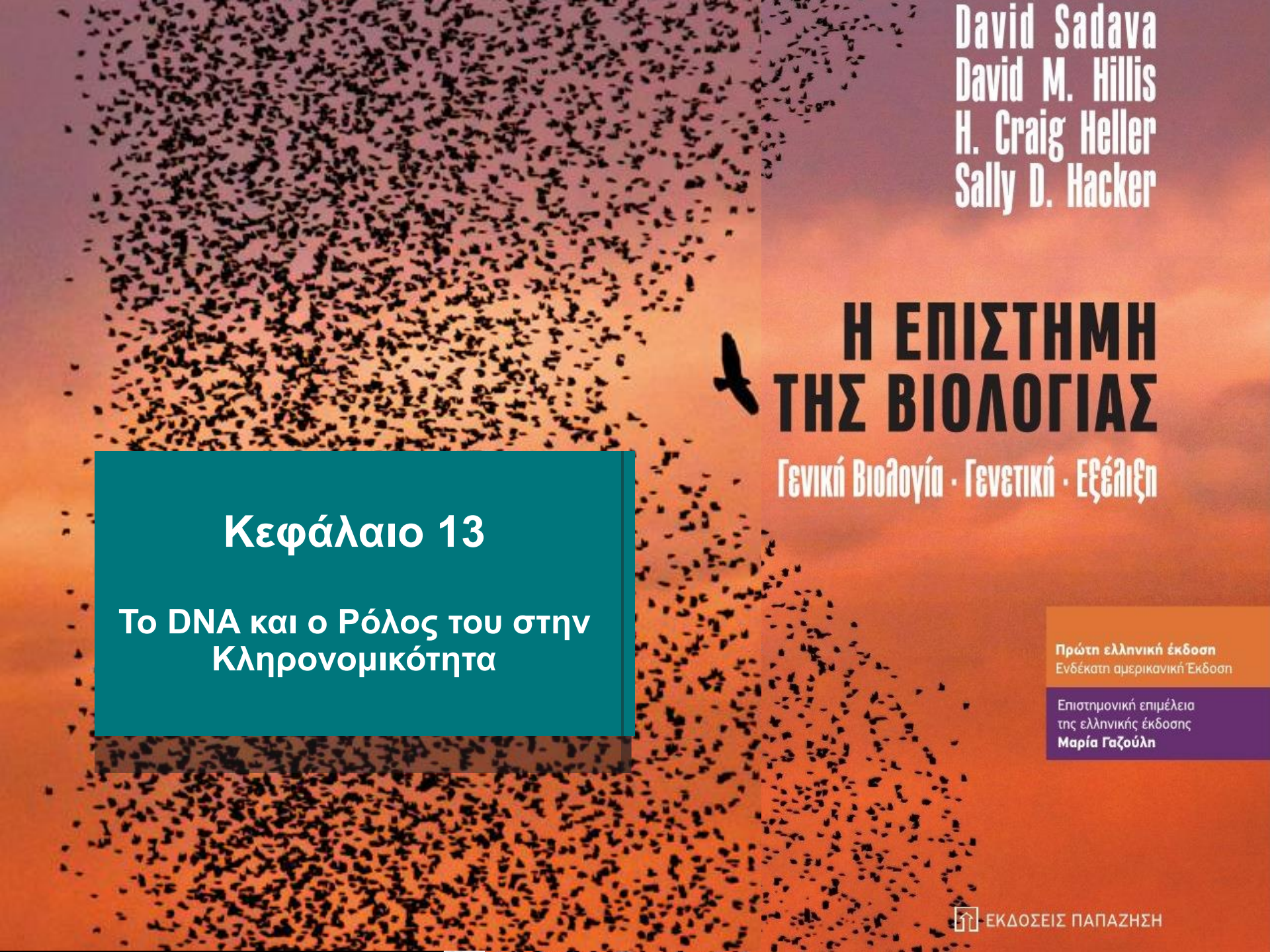


Κεφάλαιο 7

Αντιγραφή, διατήρηση και αναδιατάξεις του γονιδιωματικού DNA

Ακαδημαϊκές Εκδόσεις




David Sadava
David M. Hillis
H. Craig Heller
Sally D. Hacker
Η ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Γενική Βιολογία · Γενετική · Εξέλιξη
Κεφάλαιο 13
Το DNA και ο Ρόλος του στην Κληρονομικότητα
Πρώτη ελληνική έκδοση
Ενδέκατη αμερικανική Έκδοση
Επιστημονική επιμέλεια της ελληνικής έκδοσης
Μαρία Γαζούλη
ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ

Κεφάλαιο 13

Το DNA και ο Ρόλος του στην Κληρονομικότητα

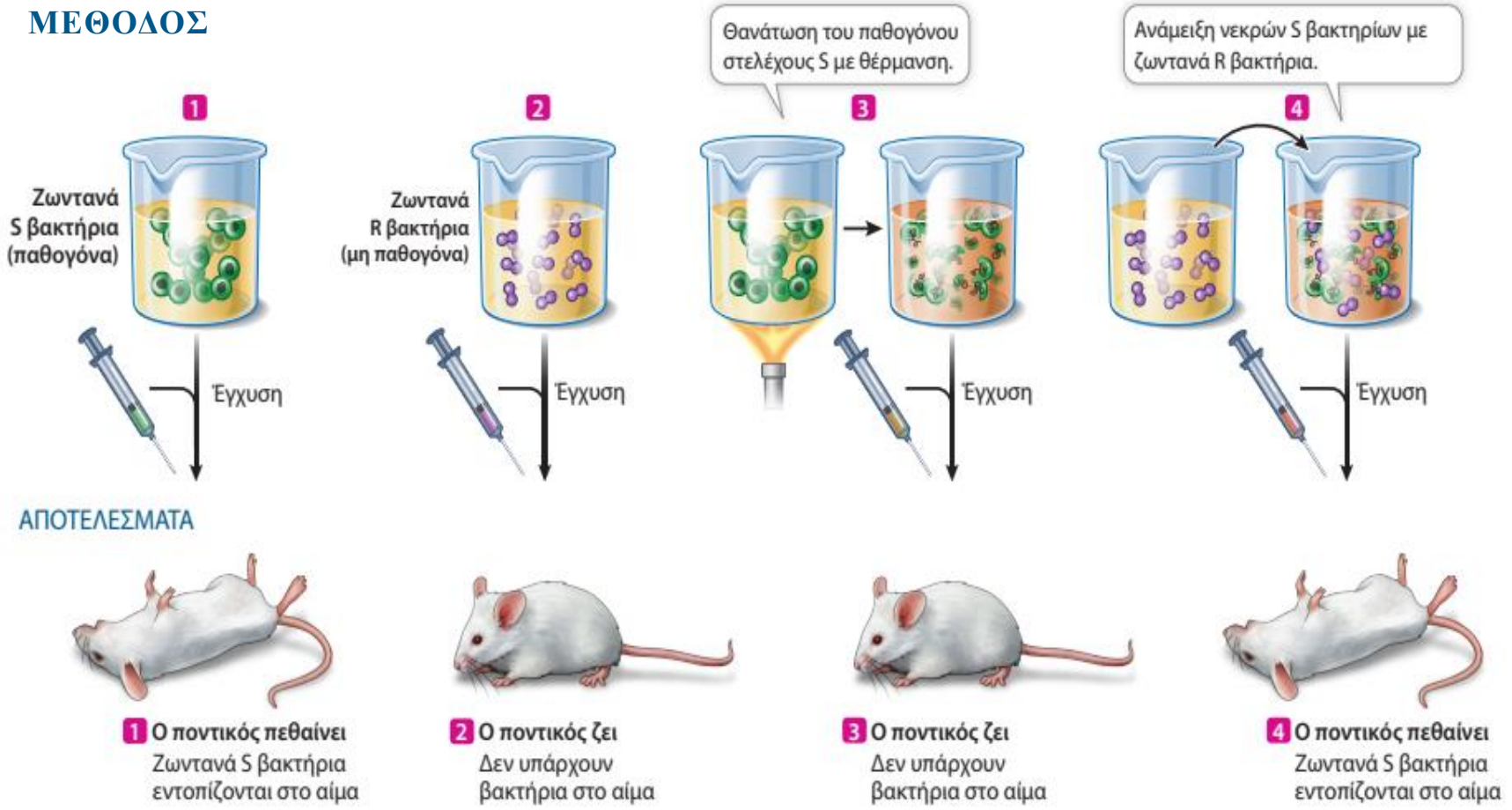
Αλέξιος Βλάμης
avlamis@upatras.gr

copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ

Αρχικά πειράματα που συνέδεσαν το DNA με την κληρονομικότητα

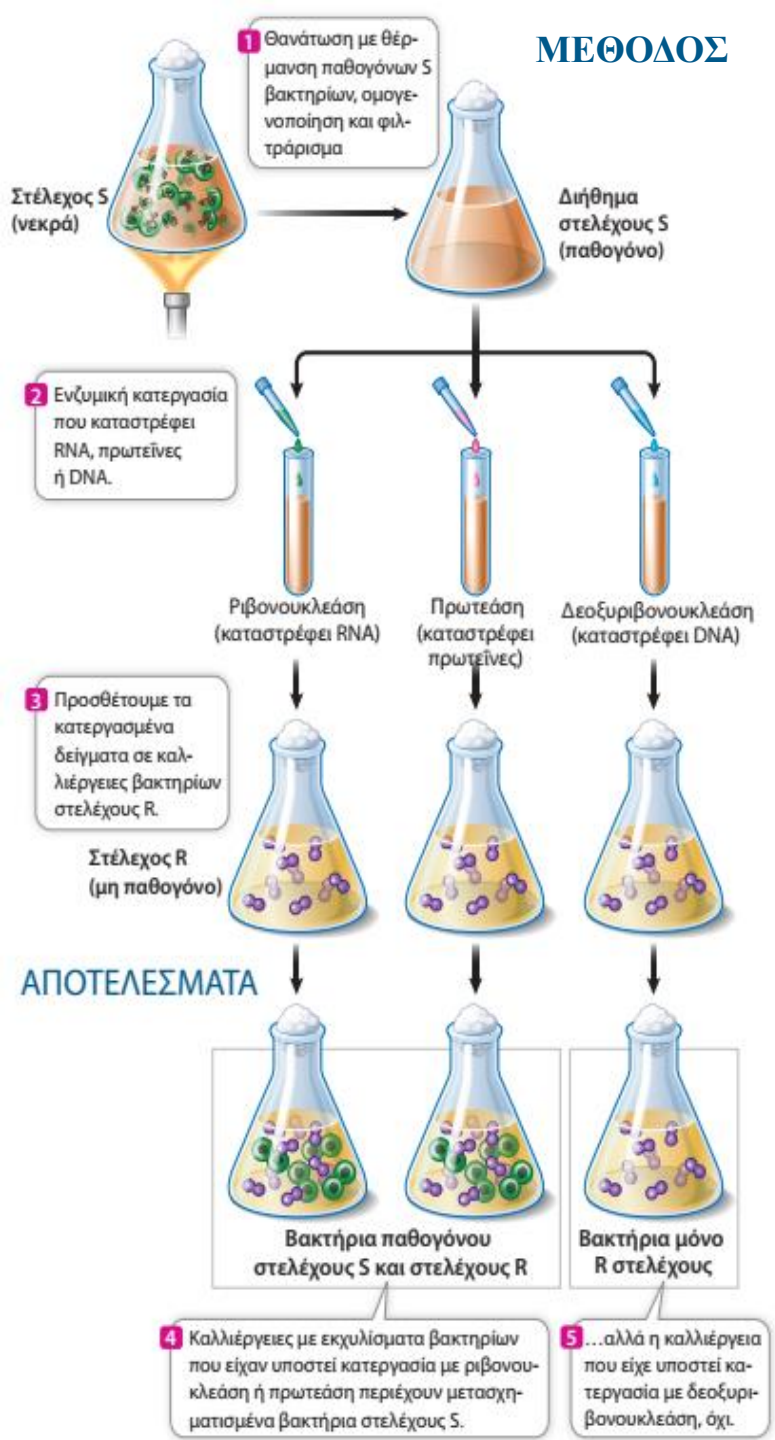
Εικόνα 13.1 Γενετικός Μετασχηματισμός.

Πρωτότυπη Εργασία: Griffith, F. 1928. The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene* 27: 113–159. Τα πειράματα του Γκρίφιθ έδειξαν ότι κάτι μέσα στο παθογόνο στέλεχος του πνευμονιόκοκκου μετασχημάτιζε το μη παθογόνο στέλεχος R του βακτηρίου σε θανατηφόρο μορφή, ακόμα και όταν τα βακτήρια στελέχους S είχαν θανατωθεί με υψηλές θερμοκρασίες. ΥΠΟΘΕΣΗ► Υλικό από τα νεκρά βακτηριακά κύτταρα μπορεί να μετασχηματίσει γενετικά ζωντανά βακτήρια.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ► Μια χημική ουσία από ένα κύτταρο είναι ικανή να μετασχηματίσει γενετικά ένα άλλο κύτταρο.

copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ



Εικόνα 13.2 Γενετικός Μετασχηματισμός μέσω DNA.

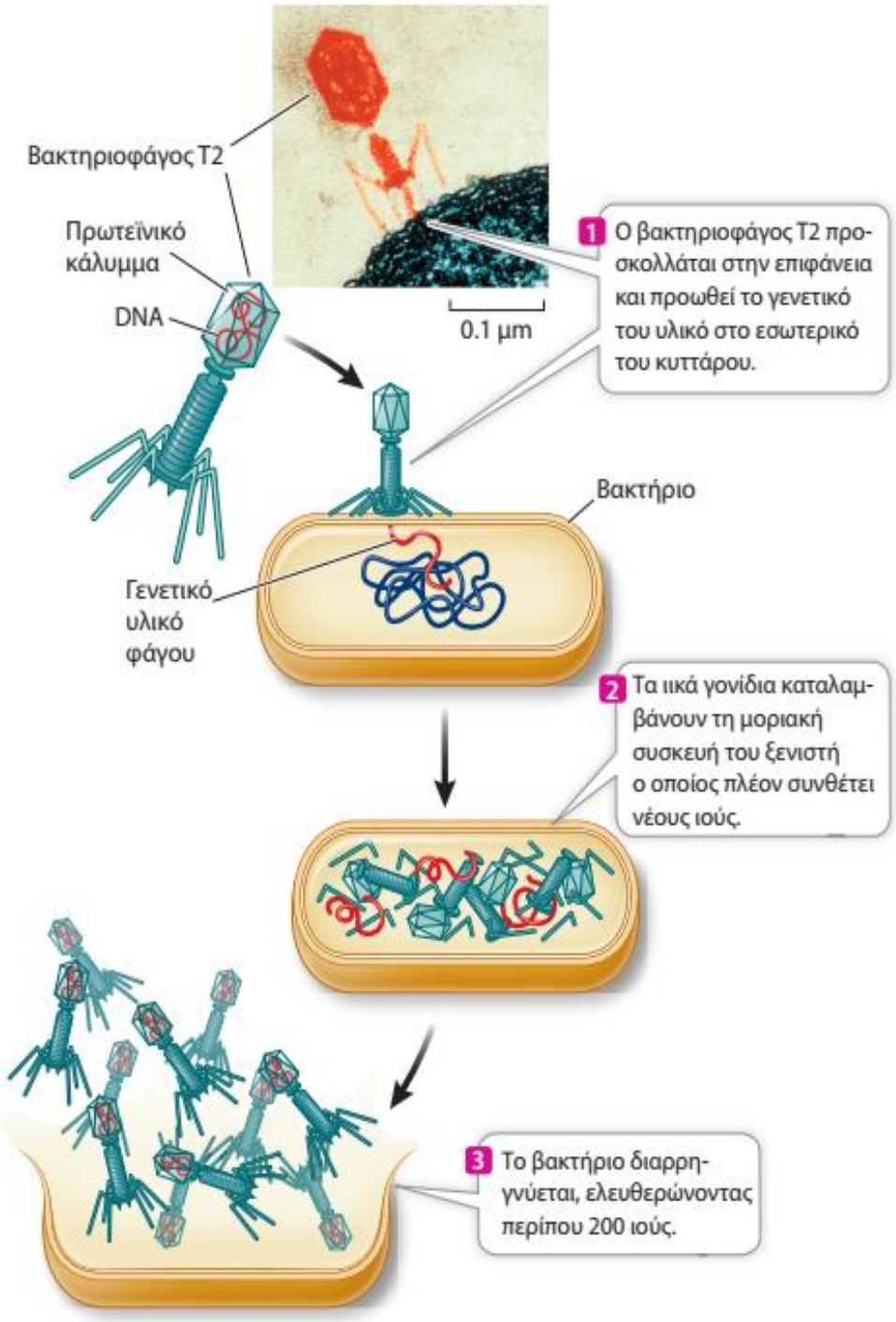
Πρωτότυπη Εργασία: Avery, O. T., C. M. MacLeod and M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of the pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine* 79: 137–158.

Πειράματα από τον Έιβερυ και τους συνεργάτες του έδειξαν ότι **το DNA από το παθογόνο στέλεχος S** του πνευμονιόκοκκου ήταν υπεύθυνο για τον μετασχηματισμό στα πειράματα του Γκρίφιθ (βλ. Εικόνα 13.1).

ΥΠΟΘΕΣΗ► Η χημική φύση της ουσίας μετασχηματισμού από τον πνευμονιόκοκκο είναι DNA.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ ► Λόγω του ότι μόνο η δεοξυριβονουκλεάση κατέστρεψε την ουσία μετασχηματισμού, η ουσία αυτή πρέπει να είναι DNA.

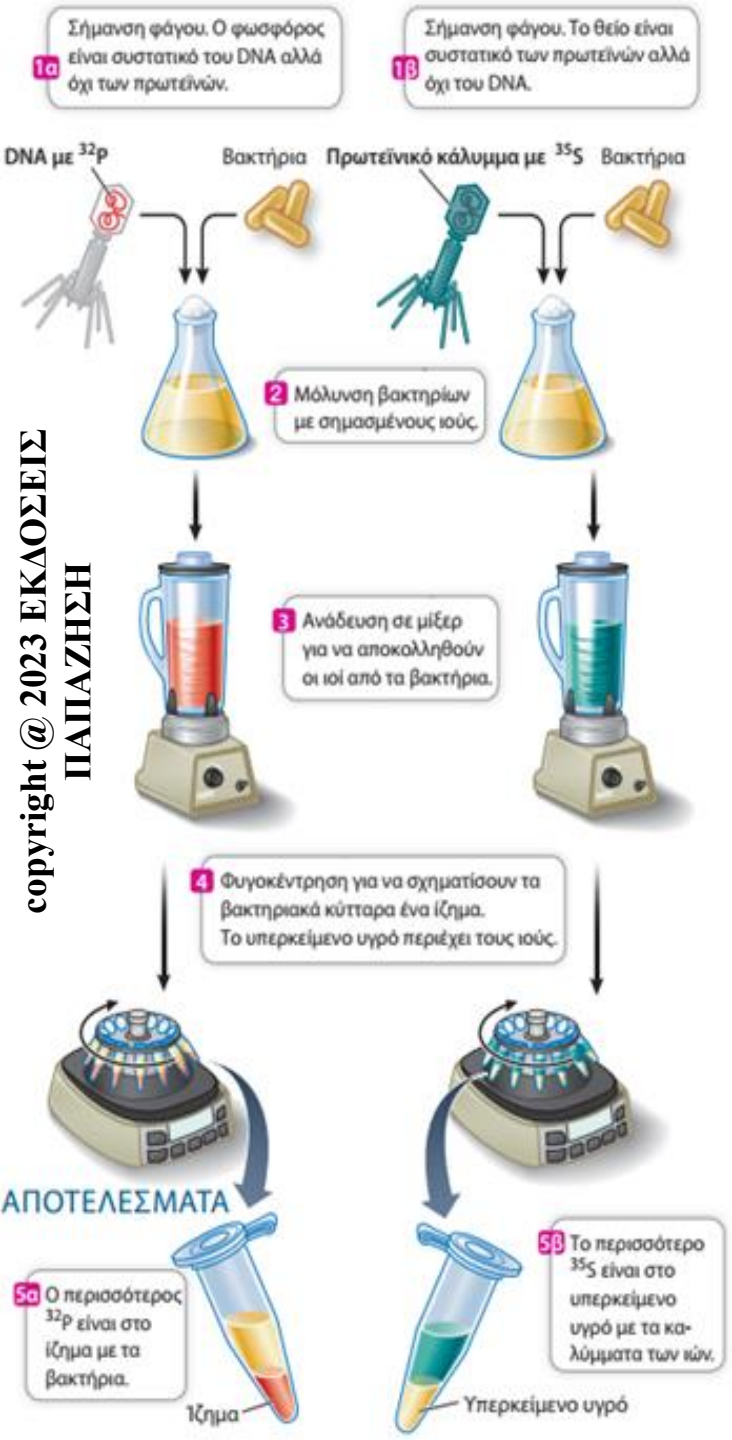
copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ



Εικόνα 13.3 Βακτηριοφάγος Τ2: Αναπαραγωγικός Κύκλος.

Ο βακτηριοφάγος Τ2 αναπτύσσεται στην *E. coli* και εξαρτάται από το βακτήριο για να παράγει νέους ιούς. Οι εξωτερικές δομές του βακτηριοφάγου Τ2 αποτελούνται αποκλειστικά από πρωτεΐνη. Το DNA βρίσκεται μέσα στο πρωτεϊνικό κάλυμμα. Όταν ο ιός προσβάλλει το βακτήριο και προωθεί το γενετικό του υλικό μέσα σε αυτό.

copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ



copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ

Εικόνα 13.4 Το Πείραμα των Χέρσεϋ-Τσέις.

Πρωτότυπη Εργασία: Hershey, A. D. and M. Chase. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *The Journal of General Physiology* 36: 39–56.

ΕΡΩΤΗΣΗ► Το DNA ή η πρωτεΐνη αποτελεί κληρονομικό υλικό το οποίο εισέρχεται στο βακτηριακό κύτταρο για να **κατευθύνει τη συναρμολόγηση νέων ιικών σωματιδίων;**

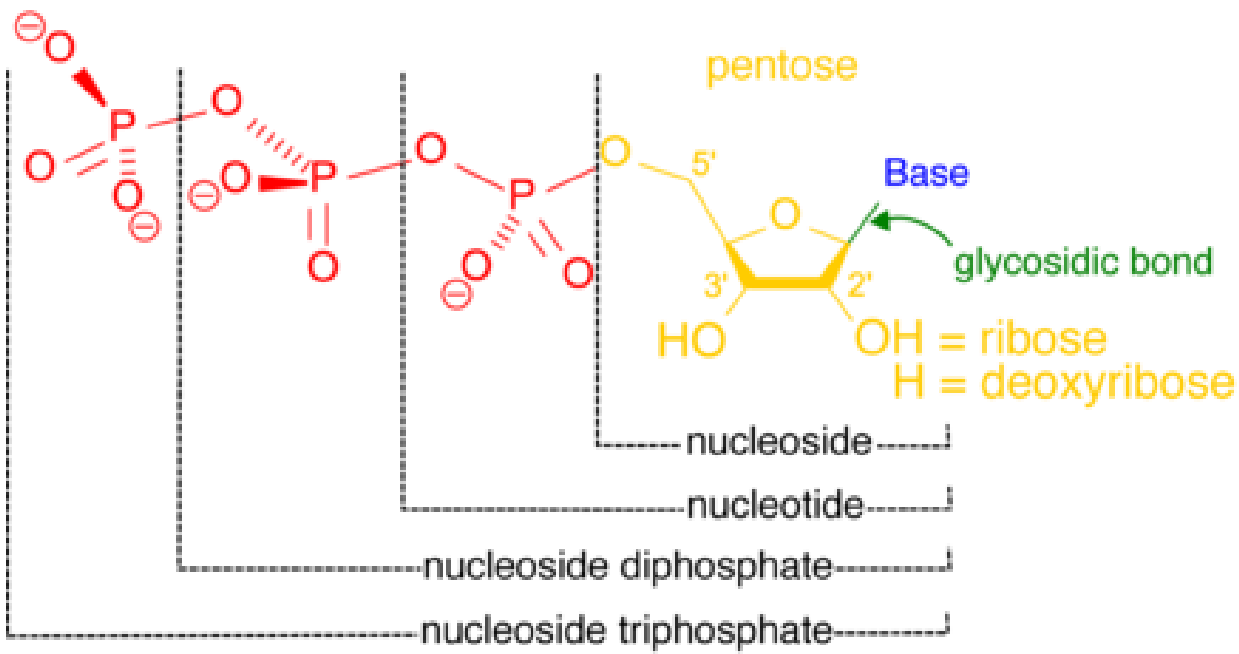
ΠΕΙΡΑΜΑ

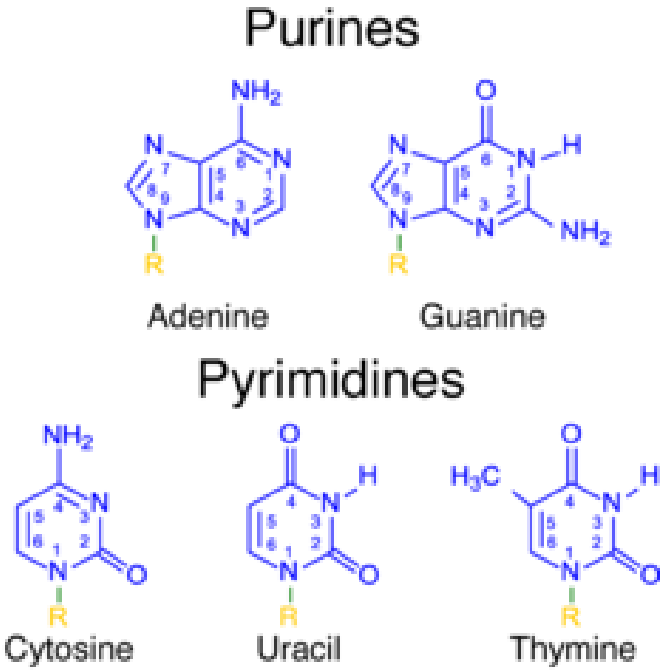
Αρχικά έγινε επιμόλυνση βακτηριακών κυττάρων με ραδιενεργά σημασμένους βακτηριοφάγους Τ2 (^{32}P για DNA , ^{35}S για πρωτεΐνες) ώστε να δημιουργηθούν νέοι φάγοι χωρίς να σπάσουν τα κύτταρα. Τα μολυσμένα κύτταρα *E. coli* αναδεύτηκαν ώστε να αποχωριστούν οι φάγοι από αυτά. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε, τα βακτήρια συγκεντρώθηκαν στο ίζημα, οι φάγοι στο υπερκείμενο. Η ραδιενεργός πρωτεΐνη (από φάγους) παρέμεινε στο υπερκείμενο. Ραδιενεργό DNA βρέθηκε μόνο μέσα στα βακτηριακό ίζημα. Αυτό υπέδειξε ότι το DNA, και όχι οι πρωτεΐνες, είναι το γενετικό υλικό των φάγων.

Α. Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και ο πολυμερισμός αυτών

Α. 1.Τριφοσφωρικά ριβονουκλεοσίδια

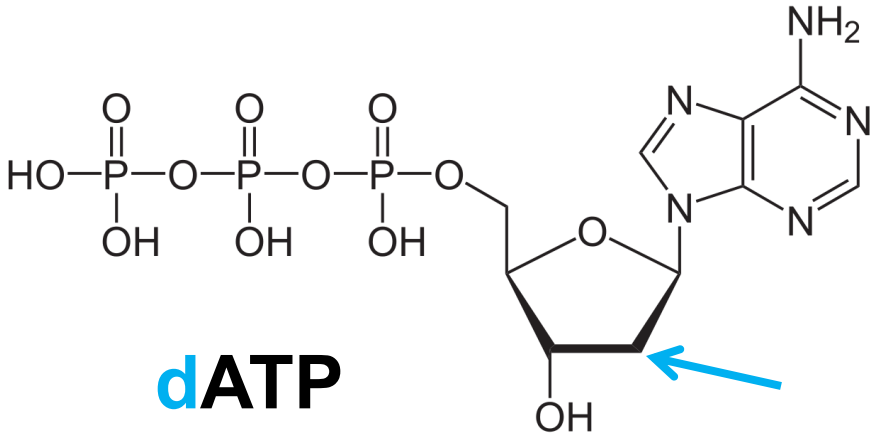
ή ριβονουκλεοτίδια



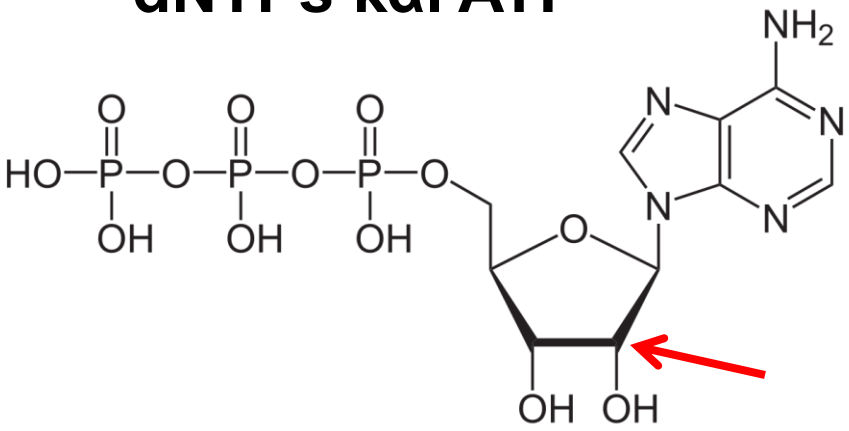


https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleoside_triphosphate

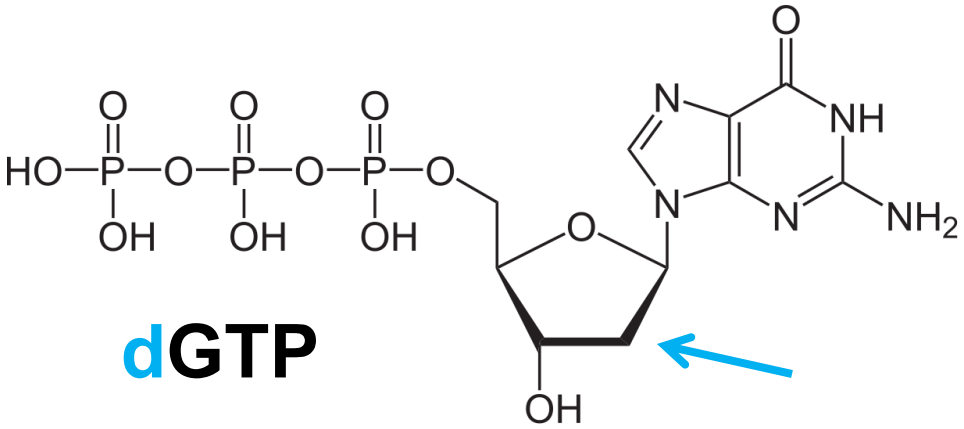
dNTPs και ATP



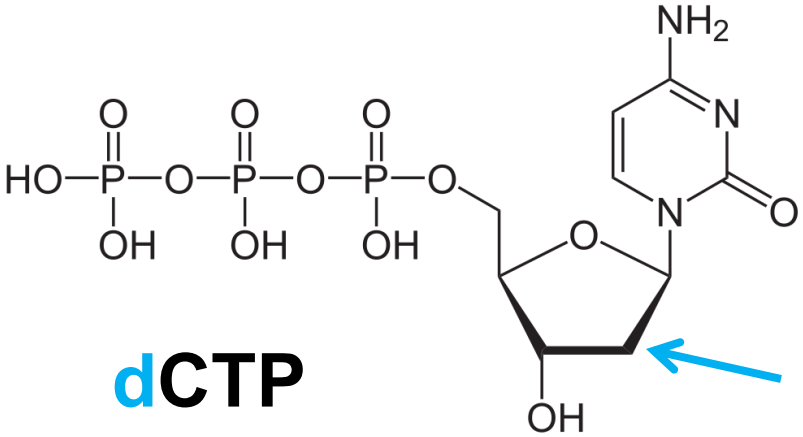
dATP



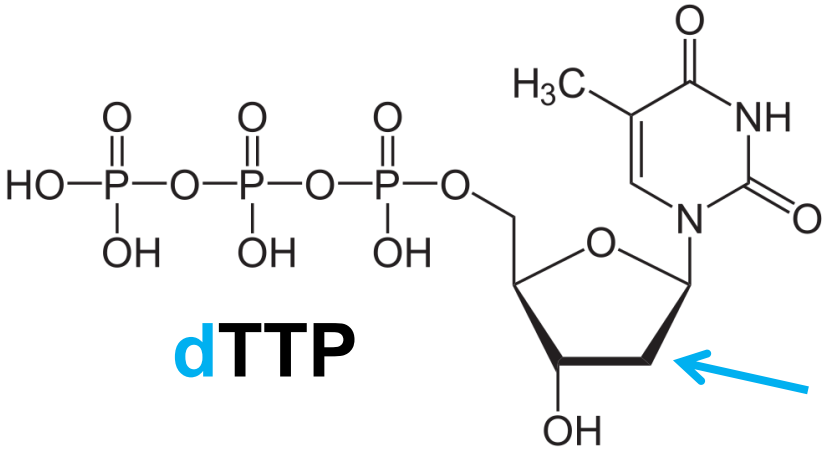
Τριφοσφωρική αδενοσίνη (ATP)



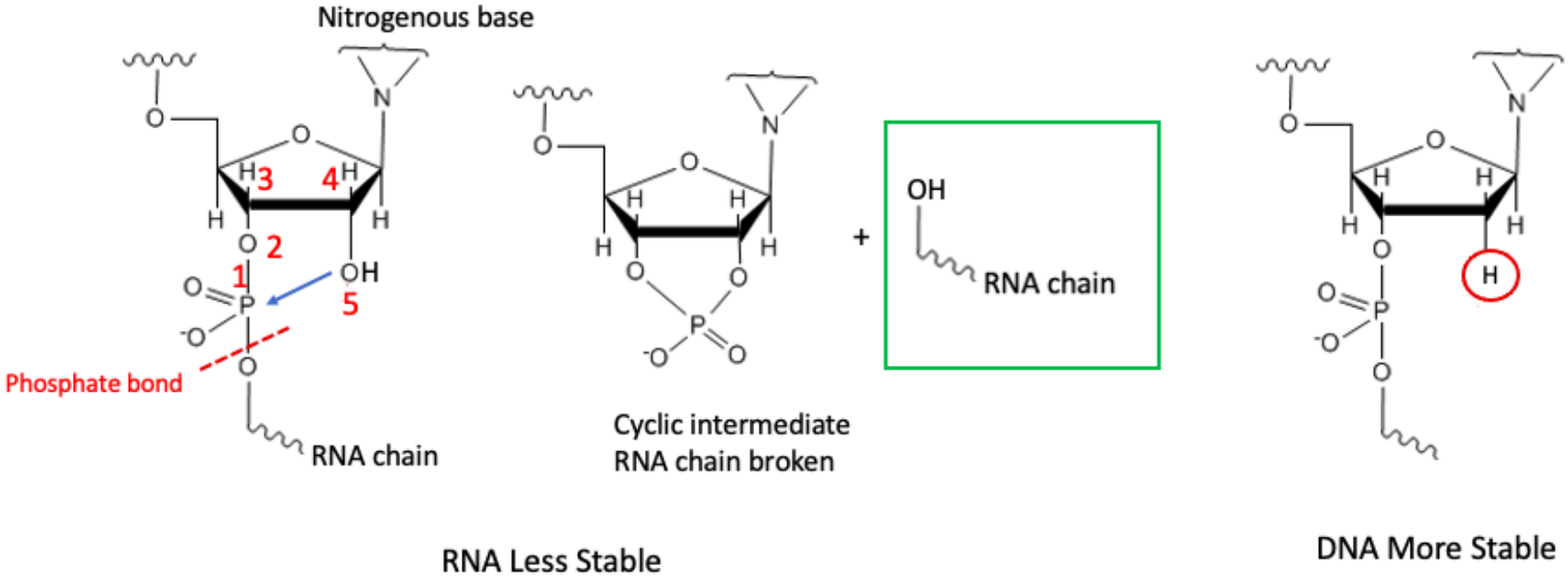
dGTP



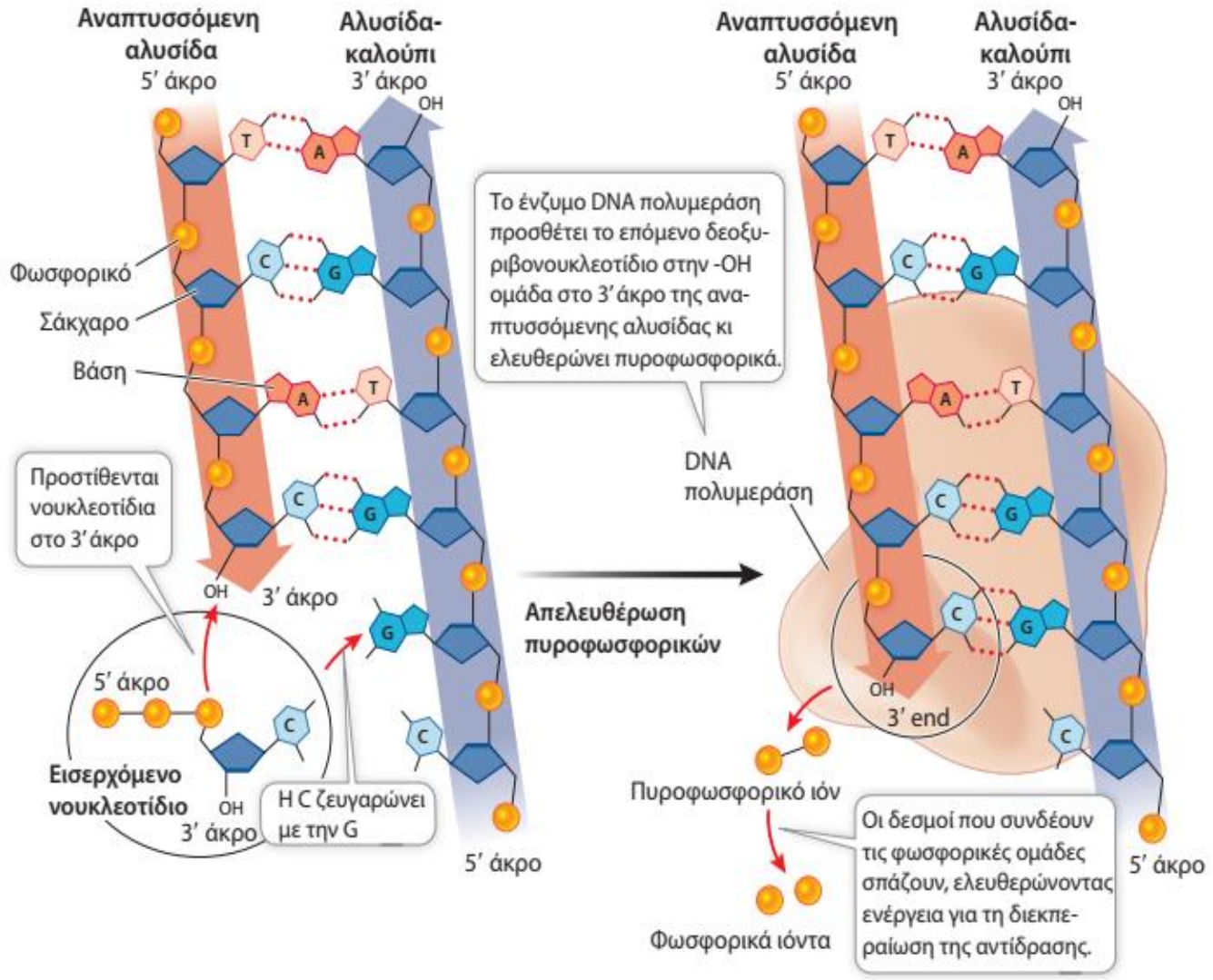
dCTP



dTTP



Γιατί το DNA είναι πιο σταθερό μόριο από το RNA;

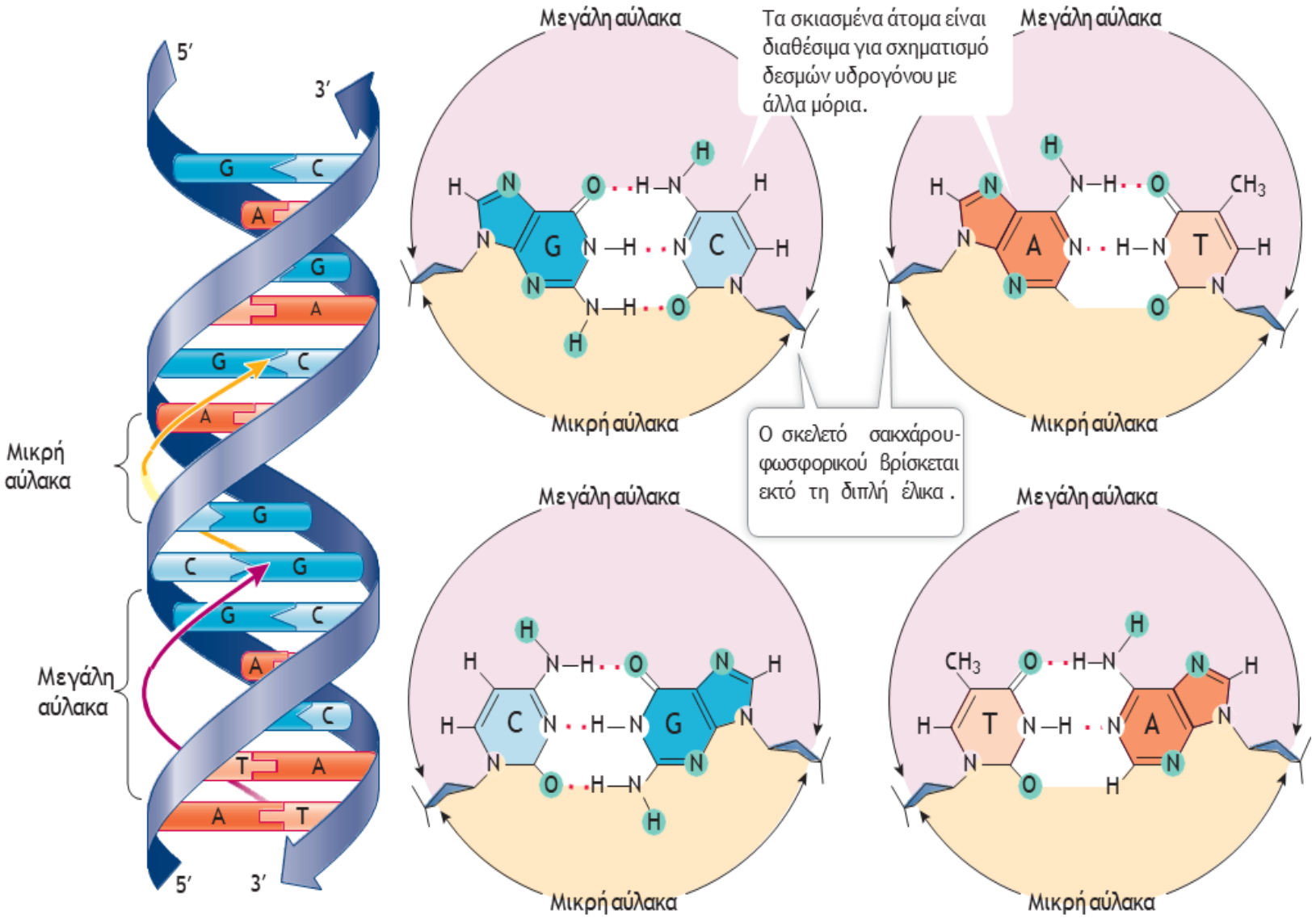


Εικόνα 13.9 Κάθε Νέα Αλυσίδα Αναπτύσσεται από το 5΄ στο 3΄ Άκρο της.

Η αλυσίδα DNA στα δεξιά (μπλε) είναι το καλούπι για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας η οποία αναπτύσσεται στα αριστερά (ροζ). Εδώ προστίθεται dCTP (σε κύκλο).

copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ

Εικόνα 13.7 Τα Ζεύγη Βάσεων στο DNA Μπορούν να Αλληλεπιδρούν με Άλλα Μόρια. Αυτά τα σχεδιαγράμματα παρουσιάζουν τις τέσσερις πιθανές διαμορφώσεις των ζευγών βάσεων εντός της διπλής έλικας. Τα σκιασμένα με πράσινο χρώμα άτομα είναι διαθέσιμα για σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με άλλα μόρια, όπως πρωτεΐνες.



copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ

Β. Ενεργειακοί παράγοντες πολυμερισμού των (δεοξυ)ριβονουκλεοτιδίων

Ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση φωσφοεστερικών δεσμών υψηλής ενέργειας

Reaction	ΔG [kJ/mol]
$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$	-30.5
$ADP + H_2O \rightarrow AMP + P_i$	-30.5
$ATP + H_2O \rightarrow AMP + PP_i$	-40.6
$PP_i + H_2O \rightarrow 2\ P_i$	-31.8

Η ενέργεια που απελευθερώνεται από την πλήρη υδρόλυση του ATP ισούται με -72,4 kJ/mol

https://en.wikipedia.org/wiki/High-energy_phosphate

Γιατί ευνοείται η υδρόλυση του ATP

και κατ' επέκταση **όλων** των τριφωσφορικών τριφωσφορικών(δεοξυ)ριβονουκλεοτιδίων;

1. Διότι υπάρχει **ηλεκτροστατική απώθηση** των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων που ευνοεί την υδρόλυση των εστερικών δεσμών.

2. Τα προϊόντα που προκύπτουν από την υδρόλυση σταθεροποιούνται με **συντονισμό**. Καθώς οι εστερικοί δεσμοί σπάνε, σχηματίζονται φωσφορικά με αυξημένη σταθερότητα λόγω συντονισμού.

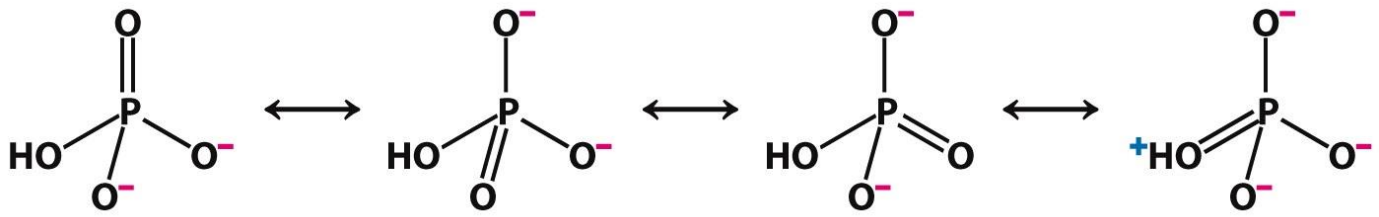


Figure 15.4
***Biochemistry*, Seventh Edition**
© 2012 W. H. Freeman and Company

3. Η **εντροπία** αυξάνεται.

Ελεύθερη ενέργεια (G) ενός συστήματος: $G=H-TS$

H: η ενθαλπία (θερμικό περιεχόμενο)

T: η θερμοκρασία

S: η εντροπία (βαθμός αταξίας)

Μεταβολή ελεύθερης ενέργεια (ΔG) ενός συστήματος:

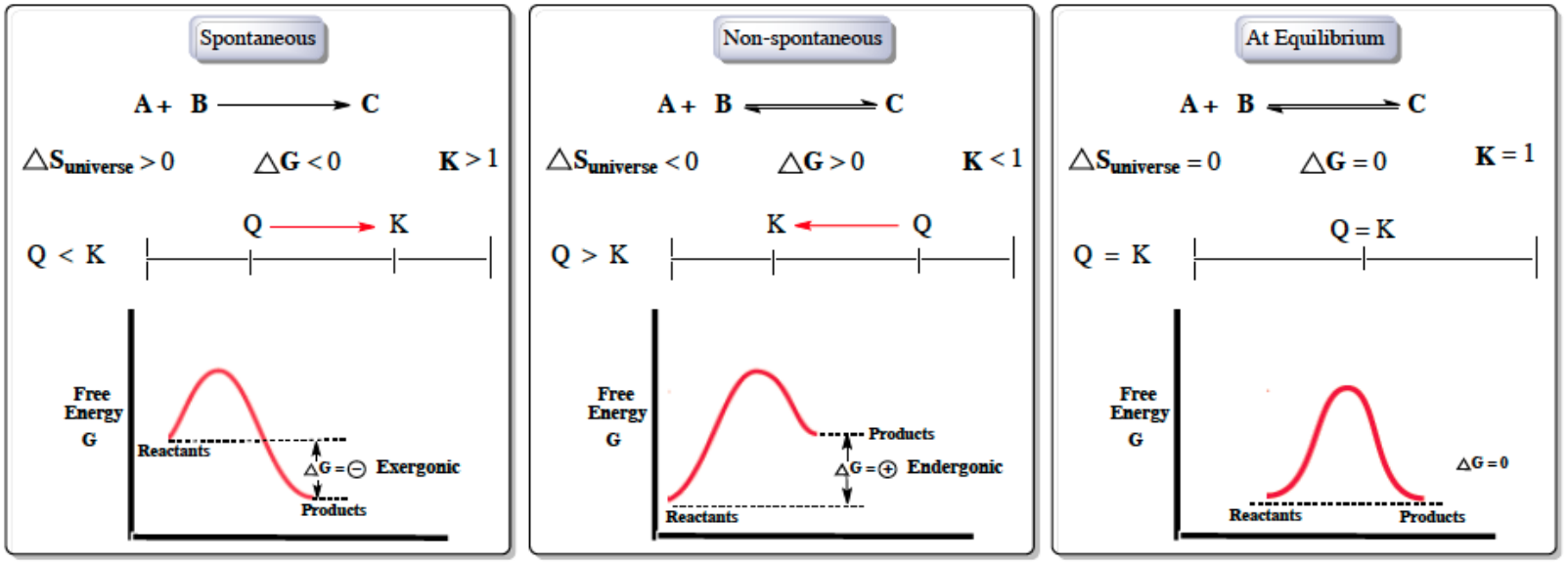
$$\Delta G=\Delta H-T\Delta S$$

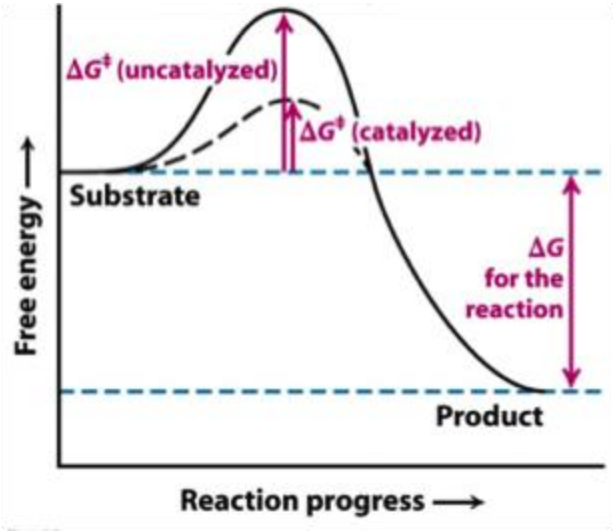
Αν μια αντίδραση ευνοείται από θερμοδυναμικής απόψεως ($\Delta G<0$), αυτό δεν σημαίνει ότι η αντίδραση θα συμβεί αυθόρμητα:

υπάρχει το ενεργειακό φράγμα από την ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης ($G^{\ddagger}$).

https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book:_Chem1_(Lower)/15:_Thermodynamics_of_Chemical_Equilibria/23.4:_Free_Energy_and_the_Gibbs_Function

Για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση **αυθόρμητα** πρέπει η **τελική ελεύθερη ενέργεια νάναι μικρότερη από την αρχική** (2ος νόμος της θερμοδυναμικής)



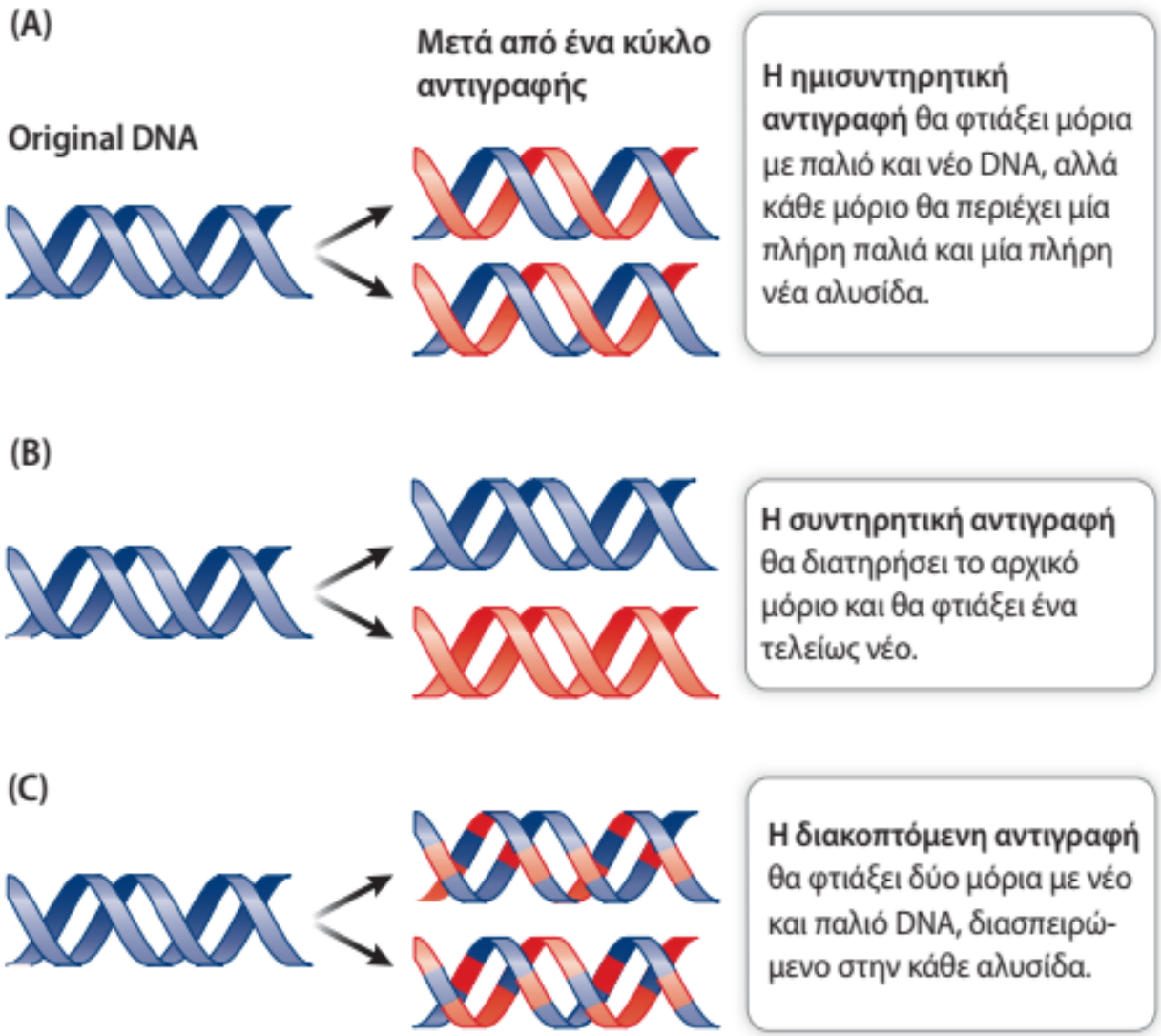


Τα **ένζυμα** (**καταλύτες**) ελαττώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης που απαιτείται για μια αντίδραση.

Έτσι οι αντιδράσεις συμβαίνουν **γρηγορότερα.**

https://www.clutchprep.com/analytical-chemistry/chemical-thermodynamics-gibbs-free-energy

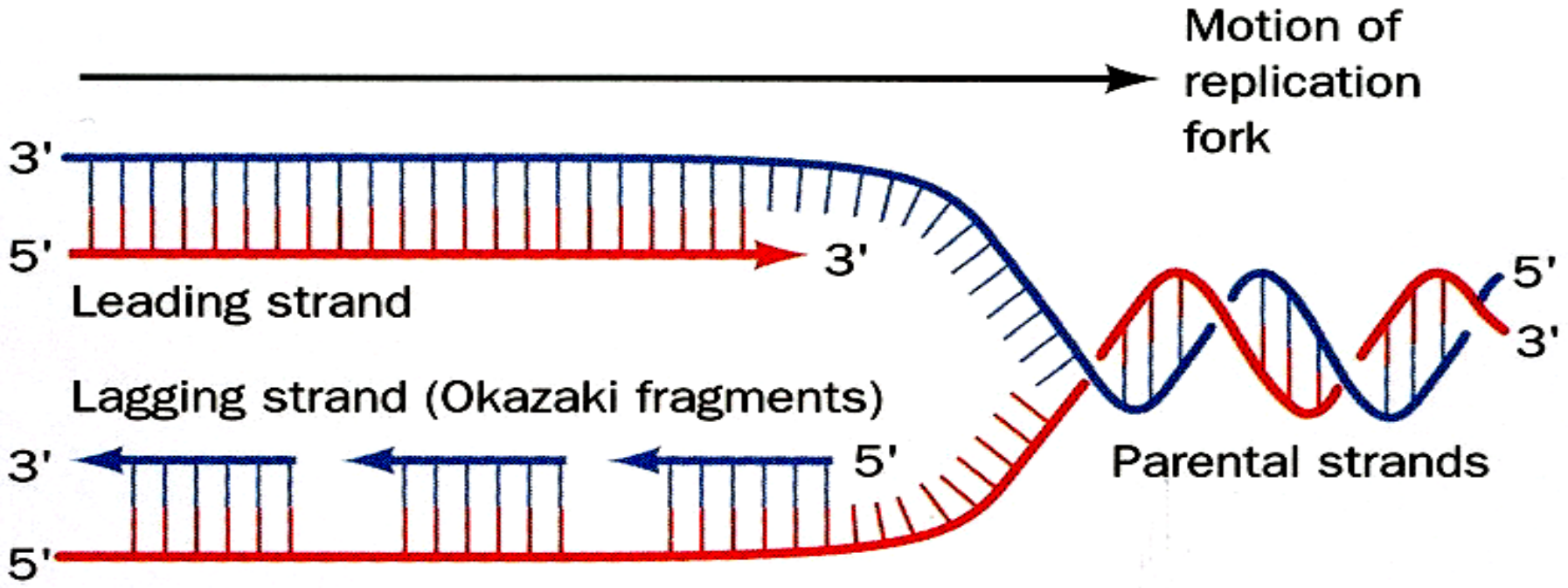
Γ. Η αντιγραφή του DNA



Εικόνα 13.8 Τα Τρία Μοντέλα για την Αντιγραφή του DNA.

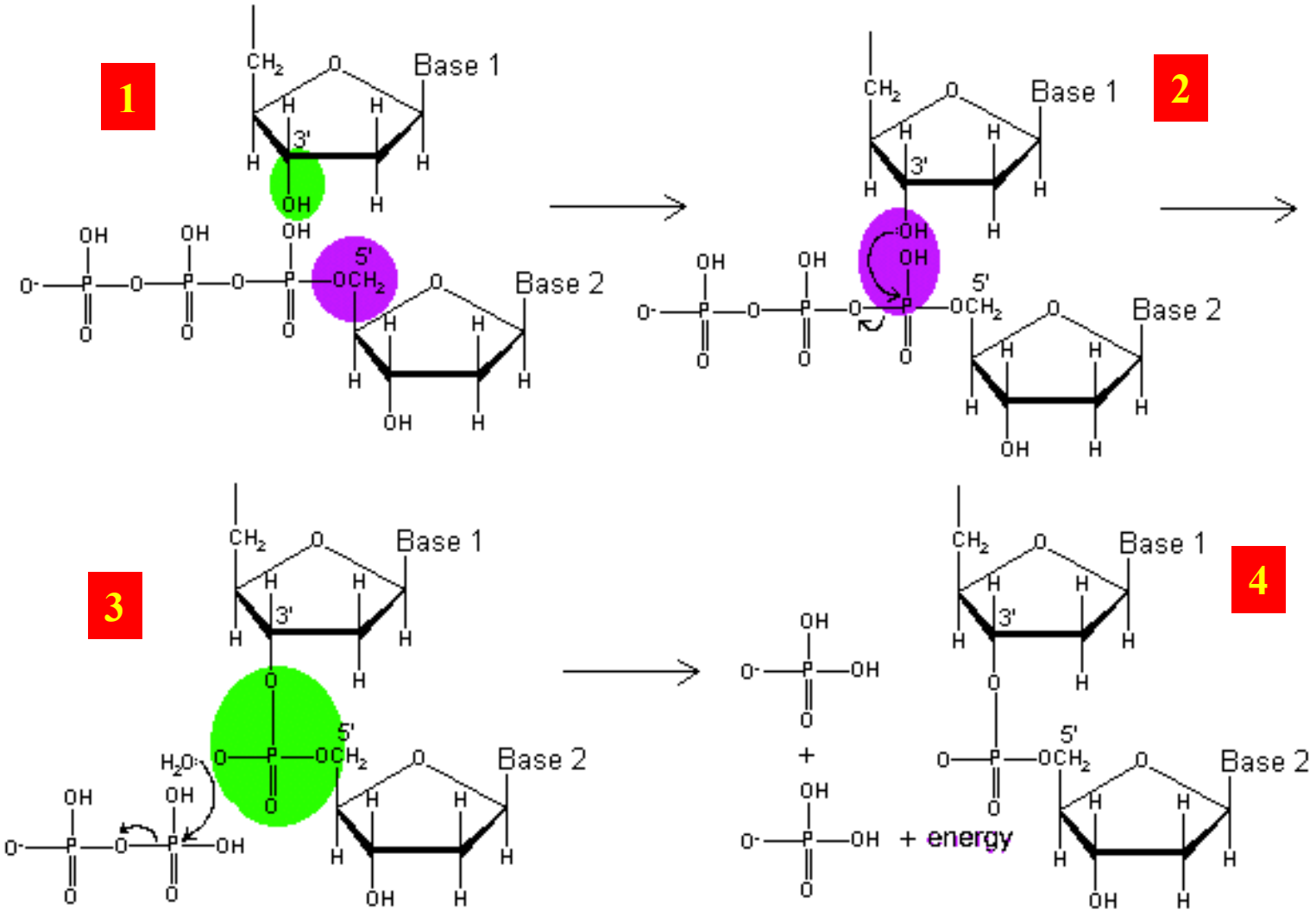
Σε κάθε μοντέλο, το αρχικό DNA παρουσιάζεται μπλε και το νεοσχηματιζόμενο DNA παρουσιάζεται κόκκινο.

copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ



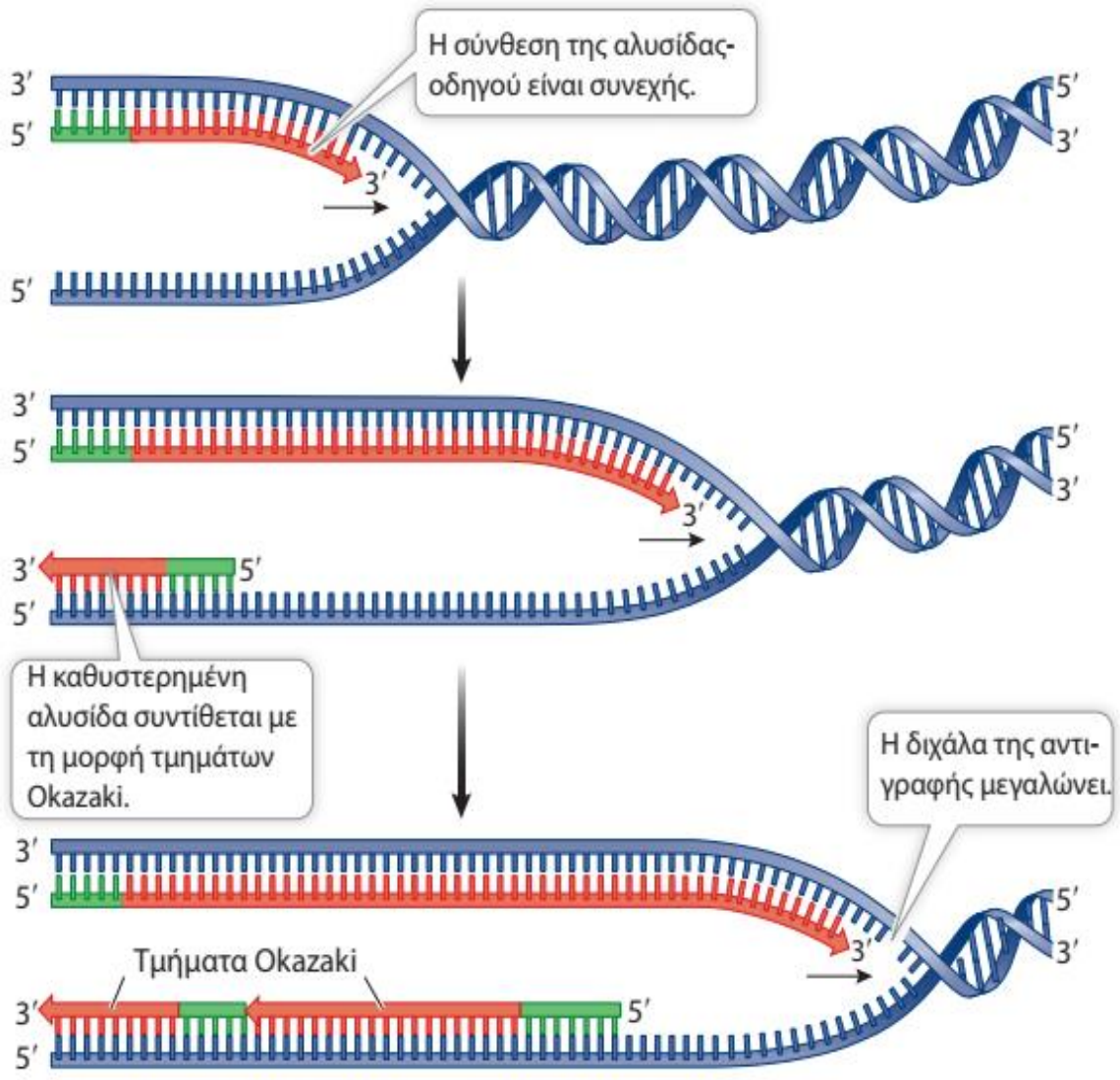
Φορά της αντιγραφής του DNA στην **αντιγραφική διχάλα**

Συνεχής και ασυνεχής αντιγραφή, τμήματα Οκαζάκι.



Η υδρόλυση ενός τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου ευνοεί την αντίδραση πολυμερισμού από θερμοδυναμικής απόψεως

https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/General_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_ChemPRIME_(Moore_et_al.)/20Molecules_in_Living_Systems/20.20%3A_DNA_Replication

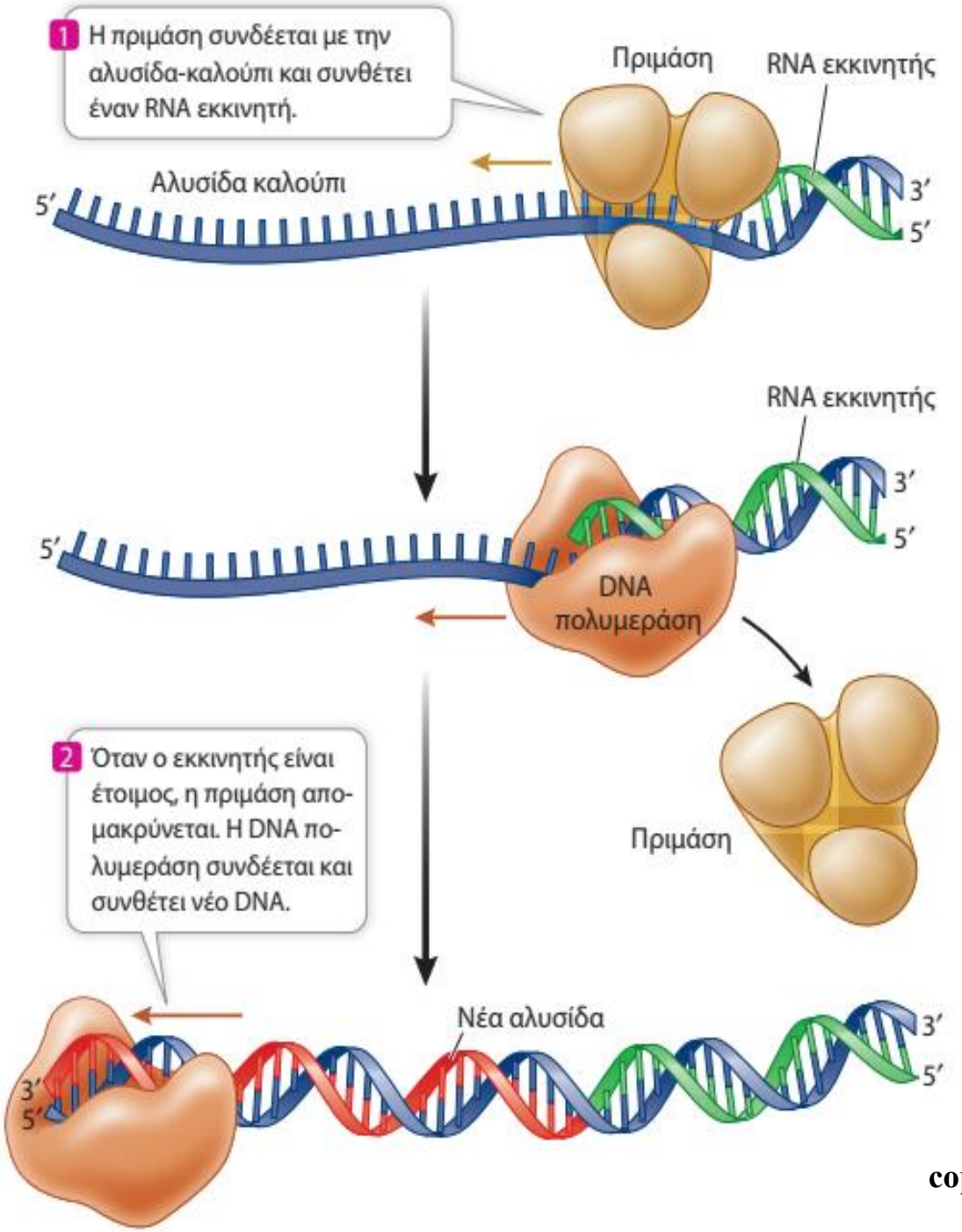


Εικόνα 13.14 Οι Δύο Νέες Αλυσίδες Σχηματίζονται με Διάφορους Τρόπους.

Καθώς η πατρική αλυσίδα DNA ξετυλίγεται, συντίθενται και οι δύο νέες αλυσίδες με κατεύθυνση 5΄ προς 3΄, παρά το γεγονός ότι οι αλυσίδες-καλούπια τους είναι αντιπαράλληλες. Η αλυσίδα-οδηγός μεγαλώνει συνεχώς προς τα μπροστά, αλλά η καθυστερημένη αλυσίδα αναπτύσσεται σε μικρά, ασυνεχή κομμάτια που λέγονται τμήματα Okazaki. Τα τμήματα Okazaki στα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν μήκος εκατοντάδες νουκλεοτίδια, με κενά μεταξύ τους.

Η σύνθεση του DNA γίνεται μέσω ενζύμων!

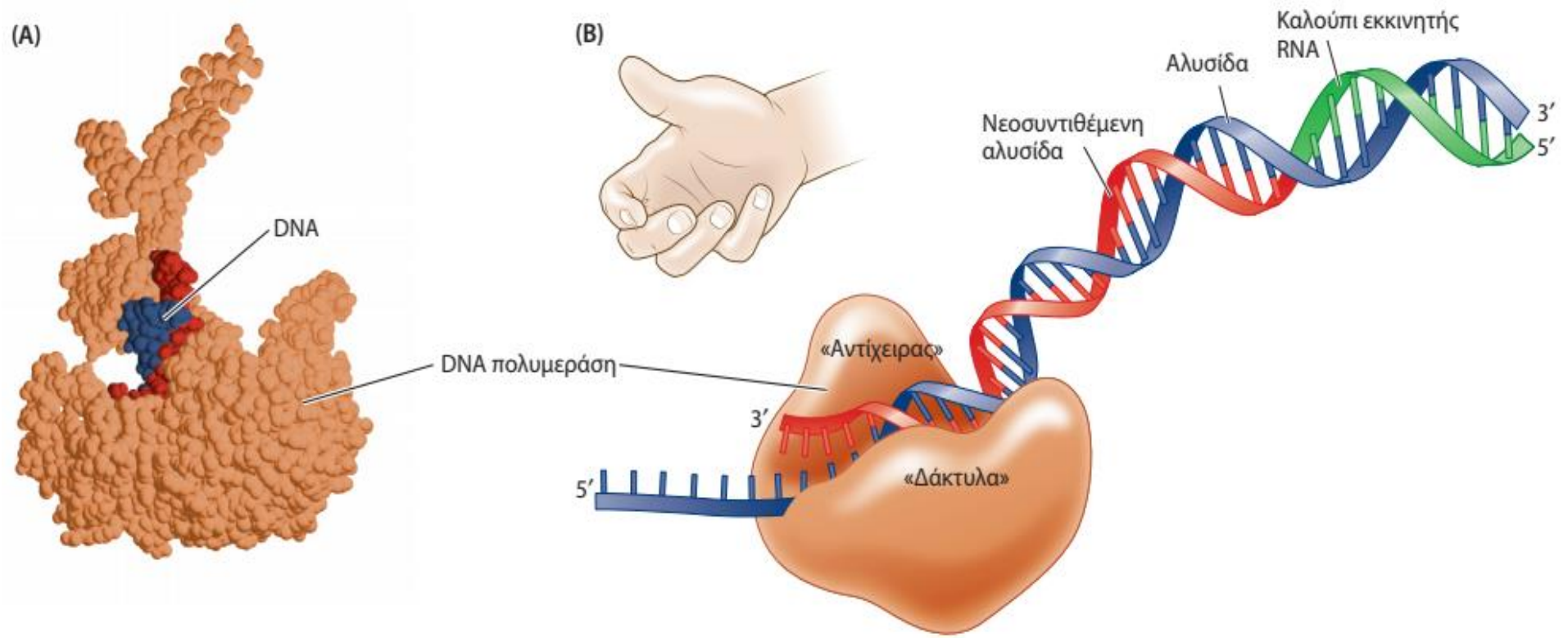
copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ



Εικόνα 13.11 Το DNA Σχηματίζεται με έναν Εκκινητή.

Η πολυμεράση του DNA απαιτεί έναν εκκινητή – ένα «πρωταρχικό τμήμα» DNA ή RNA στο οποίο μπορεί να προσθέσει νέα νουκλεοτίδια.

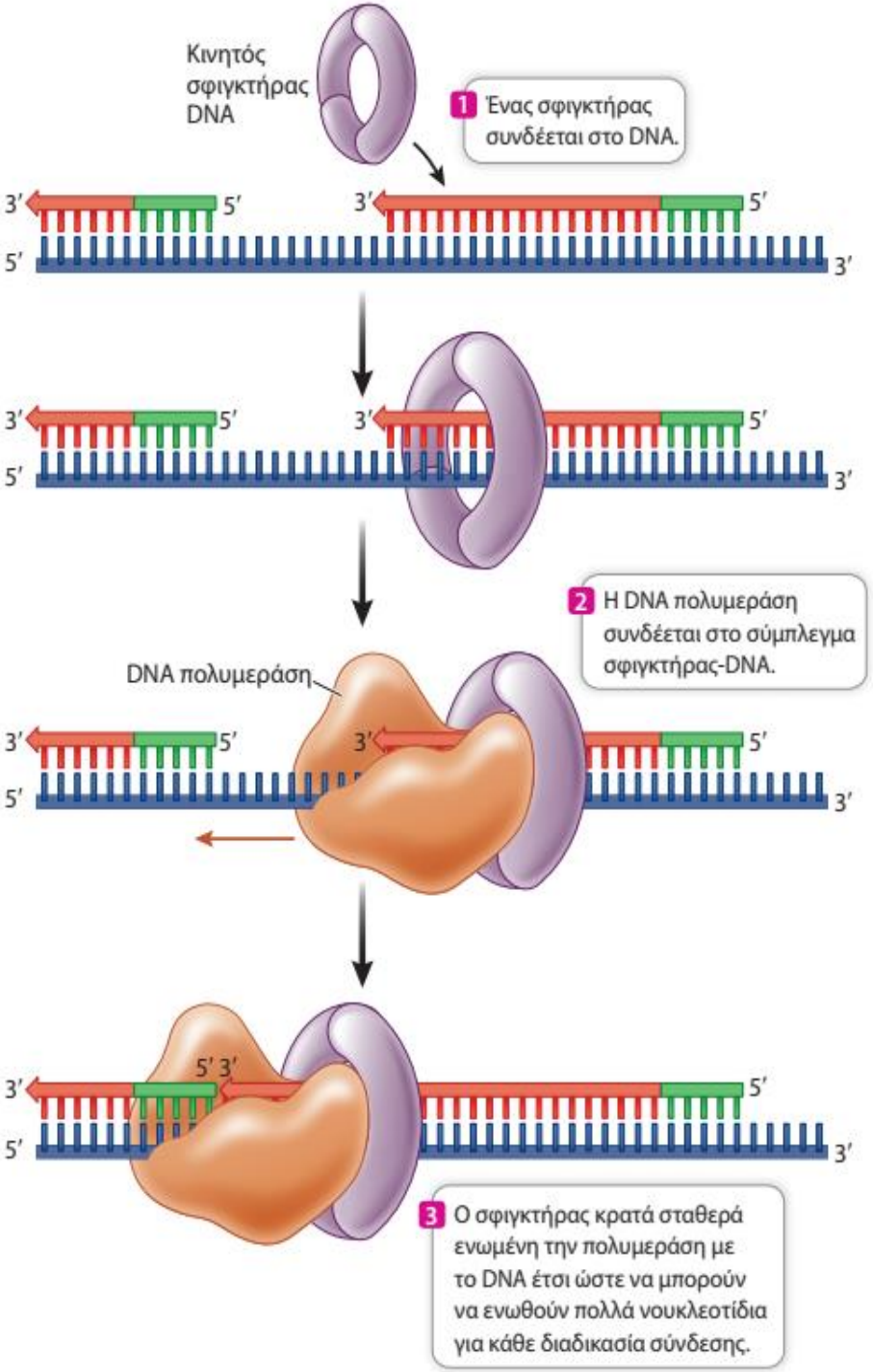
copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ



Εικόνα 13.12 Η Πολυμεράση του DNA Δεσμεύεται στην Αλυσίδα-Καλούπι.
(A) Το ένζυμο της πολυμεράσης του DNA (ανοιχτό καφέ) είναι αρκετά μεγαλύτερο από το μόριο του DNA (κόκκινο και μπλε).
(B) Η DNA πολυμεράση έχει σχήμα χεριού, και κοιτάζοντάς τη από αυτή τη μεριά, τα «δάκτυλά» της φαίνεται σαν να τυλίγονται γύρω από το DNA. Αυτά τα «δάκτυλα» μπορούν να αναγνωρίζουν τα χαρακτηριστικά σχήματα των τεσσάρων βάσεων.

https://www.youtube.com/watch?v=TNKWgcFPHqw

copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ



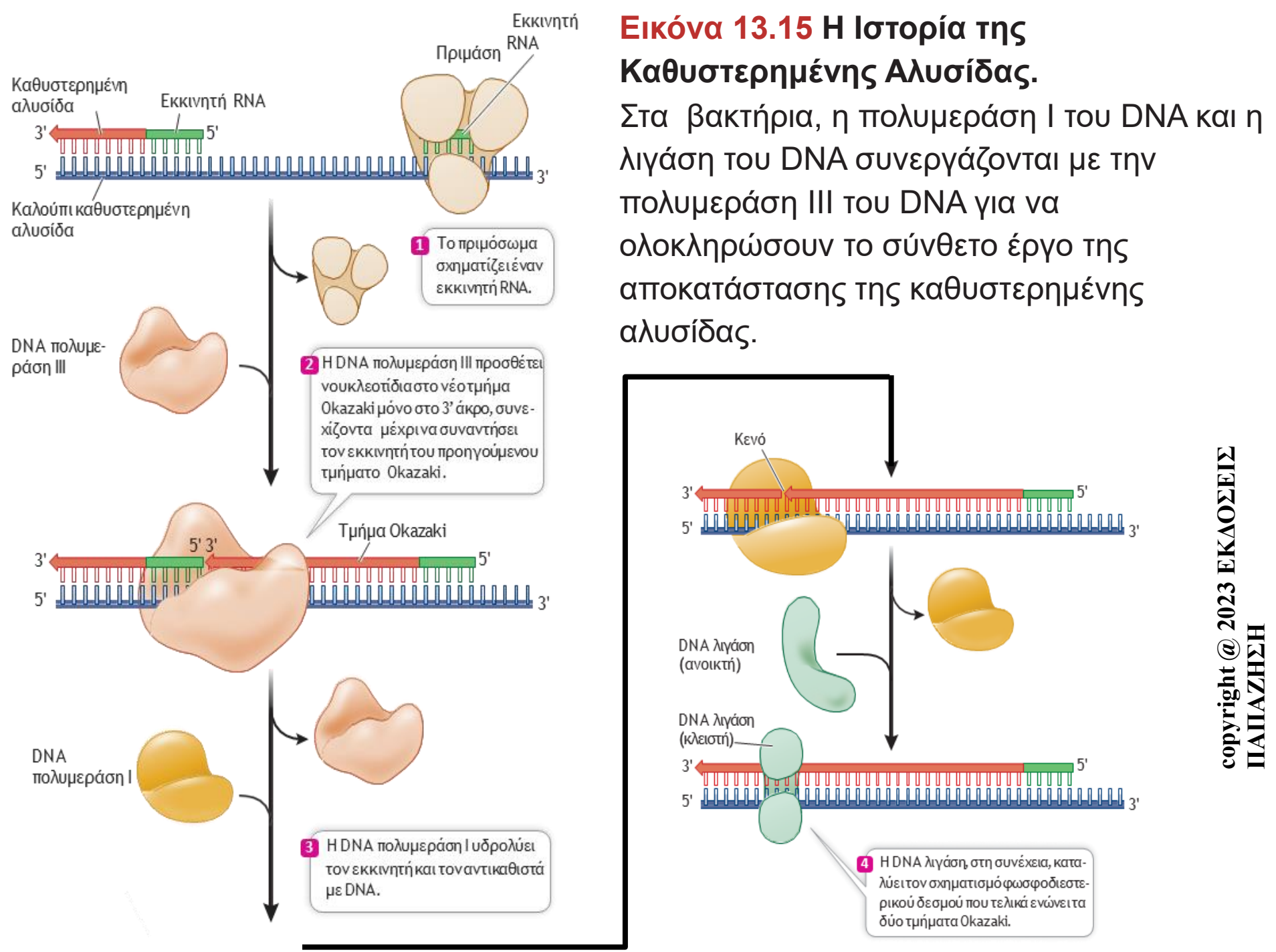
Εικόνα 13.16 Ένας Κινητός DNA Σφιγκτήρας (ή συνδετήρας) Αυξάνει την Αποτελεσματικότητα του Πολυμερισμού του DNA.

Ο σφιγκτήρας αυξάνει την αποτελεσματικότητα του πολυμερισμού, συγκρατώντας το ένζυμο συνδεδεμένο στο υπόστρωμα, έτσι ώστε να μη χρειάζεται να συνδέεται επανειλημμένα το ένζυμο με το υπόστρωμα.

copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ

Εικόνα 13.15 Η Ιστορία της Καθυστερημένης Αλυσίδας.

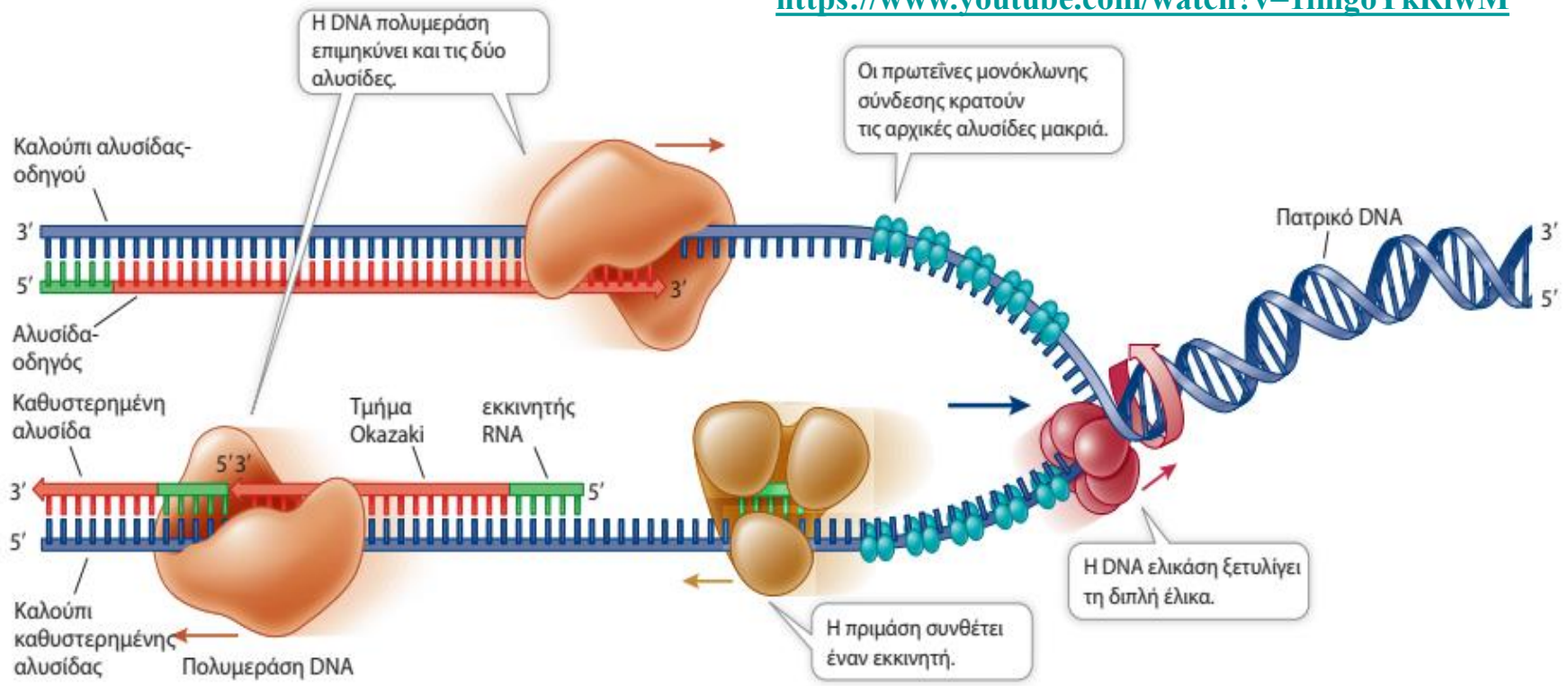
Στα βακτήρια, η πολυμεράση I του DNA και η λιγάση του DNA συνεργάζονται με την πολυμεράση III του DNA για να ολοκληρώσουν το σύνθετο έργο της αποκατάστασης της καθυστερημένης αλυσίδας.



copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ

σημείο εστίασης: βασική εικόνα

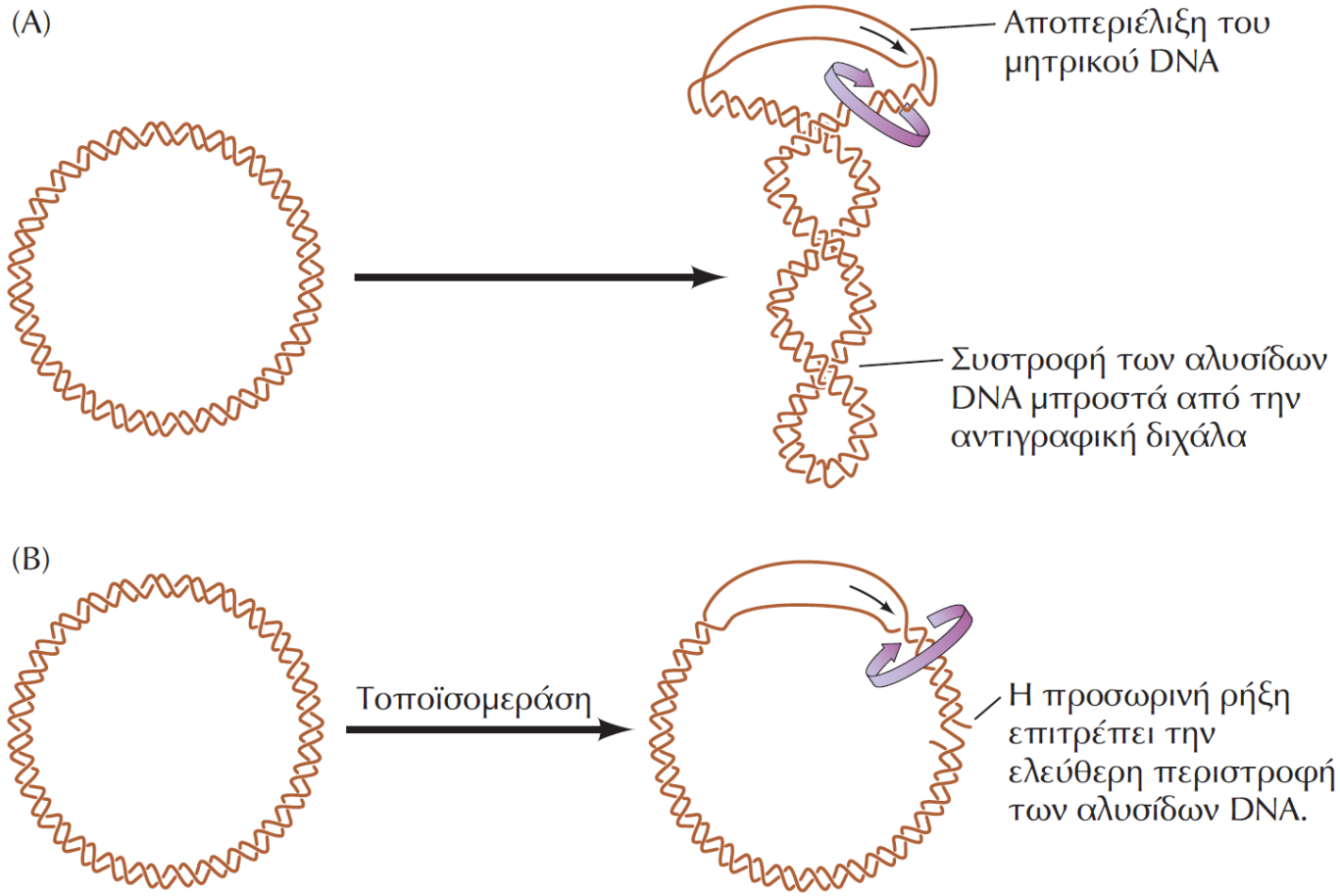
https://www.youtube.com/watch?v=1lmgoYkRlwM



Εικόνα 13.13 Πολλές Πρωτεΐνες Συνεργάζονται στο Σύμπλοκο της Αντιγραφής του DNA. Διάφορες πρωτεΐνες, εκτός από την πολυμεράση του DNA , εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA. Τα δύο μόρια πολυμεράσης του DNA που απεικονίζονται εδώ αποτελούν, επί της ουσίας, μέρος του ίδιου συμπλόκου.

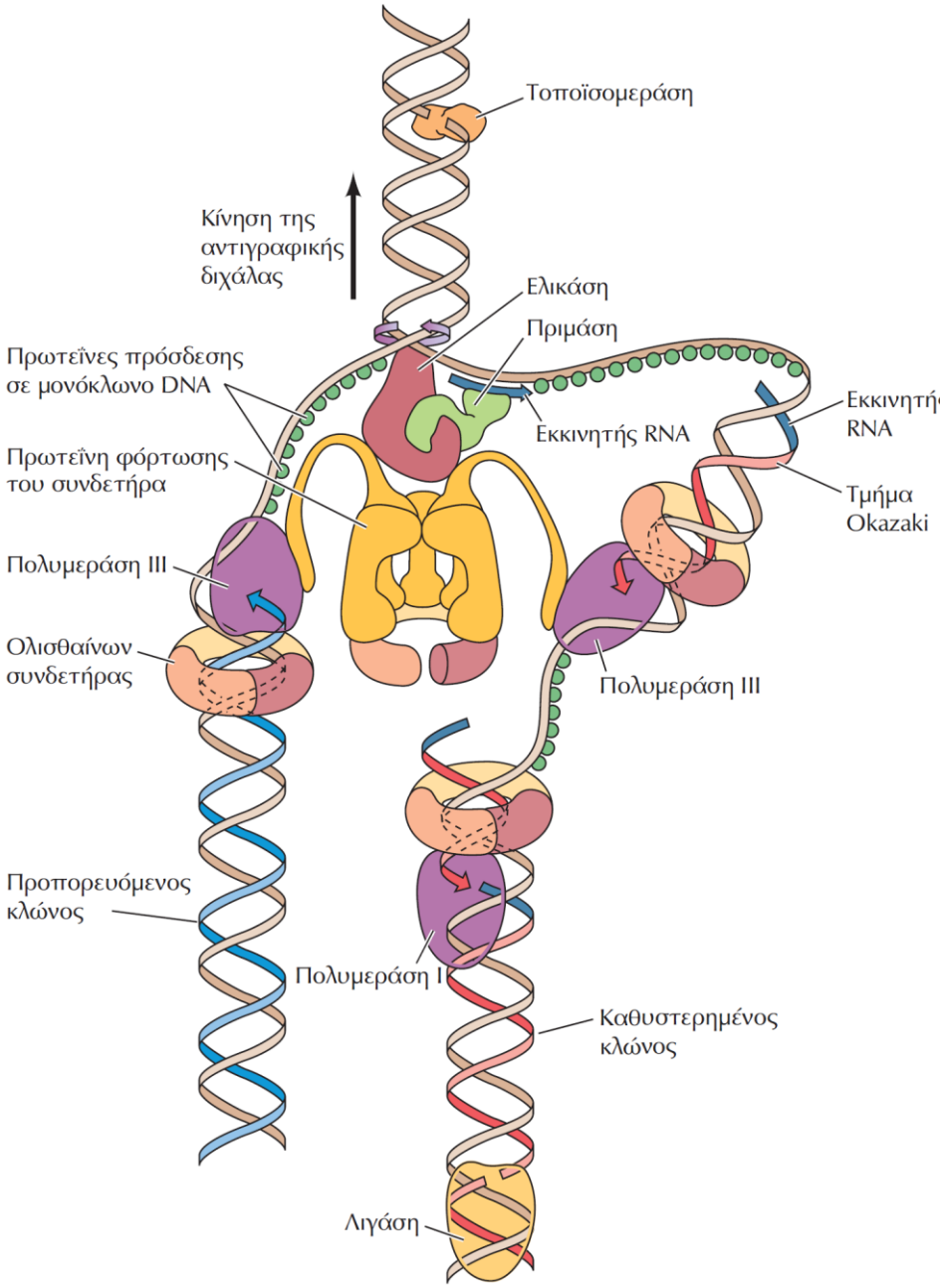
Ε: Στη διπλής κατεύθυνσης αντιγραφή με ένα σημείο έναρξης, με δύο διχάλες αντιγραφής σε αντίθετες κατευθύνσεις, οι ίδιες αλυσίδες θα είναι η μία αλυσίδα-οδηγός και η άλλη καθυστερημένη;

copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ



ΕΙΚΟΝΑ 6.9 Δράση των τοποϊσομερασών κατά την αντιγραφή του DNA. (A) Καθώς αποπεριελίσσονται οι δύο αλυσίδες της μήτρας DNA, το DNA μπροστά από την αντιγραφική διχάλα αναγκάζεται να περιστραφεί, με αποτέλεσμα την **αυτοπεριέλιξη** των κυκλικών μορίων. (B) Το πρόβλημα επιλύεται από τις **τοποϊσομεράσες**, οι οποίες καταλύουν την **κοπή και την επανένωση** των αλυσίδων DNA. Οι προσωρινές ρήξεις που προκαλούνται από τις τοποϊσομεράσες επιτρέπουν στις δύο αλυσίδες DNA να περιστρέφονται ελεύθερα η μία γύρω από την άλλη.

file:///E:/TheCell/cooper5e/animation0601.html



https://www.youtube.com/watch?v=IjVLhoyfGAM&t=3s

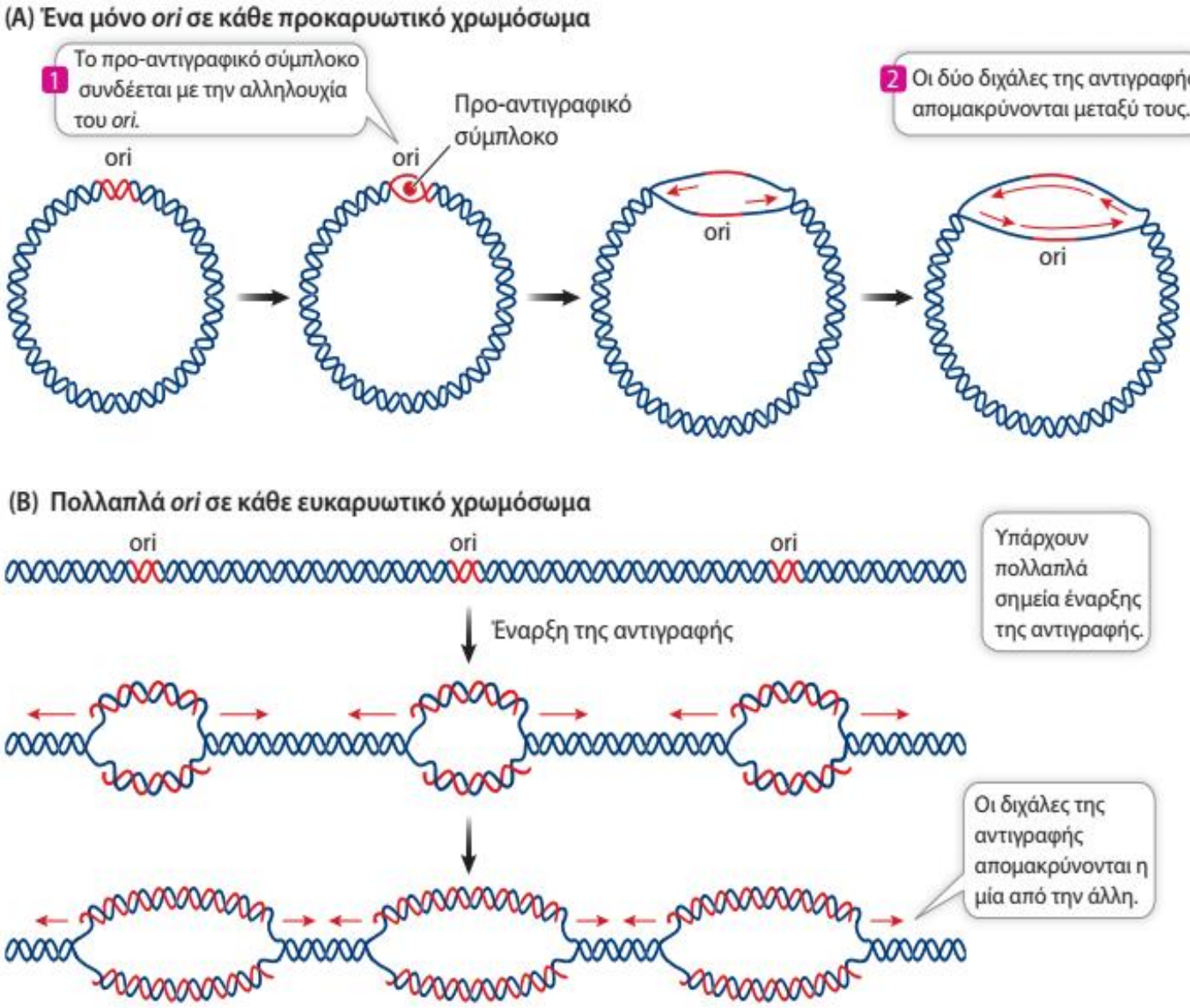
ΕΙΚΟΝΑ 6.10 Μοντέλο της αντιγραφικής διχάλας της *E. coli*.

Η **ελικάση**, η **πριμάση** και δύο μόρια **DNA πολυμεράσης** διεξάγουν συντονισμένα τη σύνθεση τόσο του προπορευόμενου όσο και του καθυστερημένου κλώνου του DNA. Και τα δύο μόρια DNA πολυμεράσης συνδέονται με την **πρωτεΐνη φόρτωσης του συνδετήρα**, η οποία με τη σειρά της συνδέεται με την ελικάση στην αντιγραφική διχάλα. Η μήτρα του καθυστερημένου κλώνου αναδιπλώνεται, έτσι ώστε η πολυμεράση που διεκπεραιώνει τη σύνθεσή του να κινείται στην ίδια φορά με αυτή που κινείται η αντιγραφική διχάλα. Η **τοποϊσομεράση** επιτρέπει στις δύο αλυσίδες DNA να περιστρέφονται ελεύθερα η μία γύρω από την άλλη μπροστά από τη διχάλα. Πίσω από τη διχάλα, η DNA πολυμεράση I απομακρύνει τους εκκινητές RNA και η **DNA λιγάση** (δεσμάση) συνενώνει τα τμήματα Okazaki.

Διευκρινήσεις του μοντέλου της αντιγραφικής διχάλας της *E. coli* (ΕΙΚΟΝΑ 6.10)

Η RFC (πρωτεΐνη φόρτωσης του συνδετήρα) μπορεί να συνδέεται ταυτόχρονα με την DNA πολυμεράση και με την PCNA (ολισθαίνων συνδετήρας). Κατά την αντιγραφή του DNA, η RFC πρώτα τοποθετεί την PCNA στη θέση του εκκινητή και μετά τοποθετεί την DNA πολυμεράση κολλητά με την PCNA. Το σύμπλοκο πολυμεράσης-PCNA διατηρείται και ξεκινά ο πολυμερισμός του DNA.

Όταν ο πολυμερισμός γίνεται στον προπορευόμενο κλώνο, η RFC παραμένει συνεχώς συνδεδεμένη με την πολυμεράση που είναι συνδεδεμένη με την PCNA. Όταν η αντιγραφή γίνεται στον καθυστερημένο κλώνο, η RFC παραμένει πάλι συνδεδεμένη με την πολυμεράση (και αυτή με την PCNA), μέχρις ότου η πολυμεράση συναντήσει τον επόμενο εκκινητή. Τότε η PCNA ξεκολλά από την πολυμεράση που εξακολουθεί όμως (η πολυμεράση) να είναι συνδεδεμένη με τον εύκαμπτο βραχίονα της RFC. Η RFC προσλαμβάνει μια νέα PCNA στον καινούργιο εκκινητή, μεταφέρει την πολυμεράση στη νέα PCNA και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.



Εικόνα 13.10 Σημεία Έναρξης της Αντιγραφής του DNA.

(Α) Τα προκαρυωτικά χρωμοσώματα συνήθως έχουν ένα μοναδικό σημείο έναρξης όπου η αντιγραφή του DNA ξεκινά και προχωρά και προς τις δύο κατευθύνσεις.

(Β) Το συνήθως μεγαλύτερο ευκαρυωτικό χρωμόσωμα διαθέτει, κατά κανόνα, πολλαπλά σημεία έναρξης.

copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ

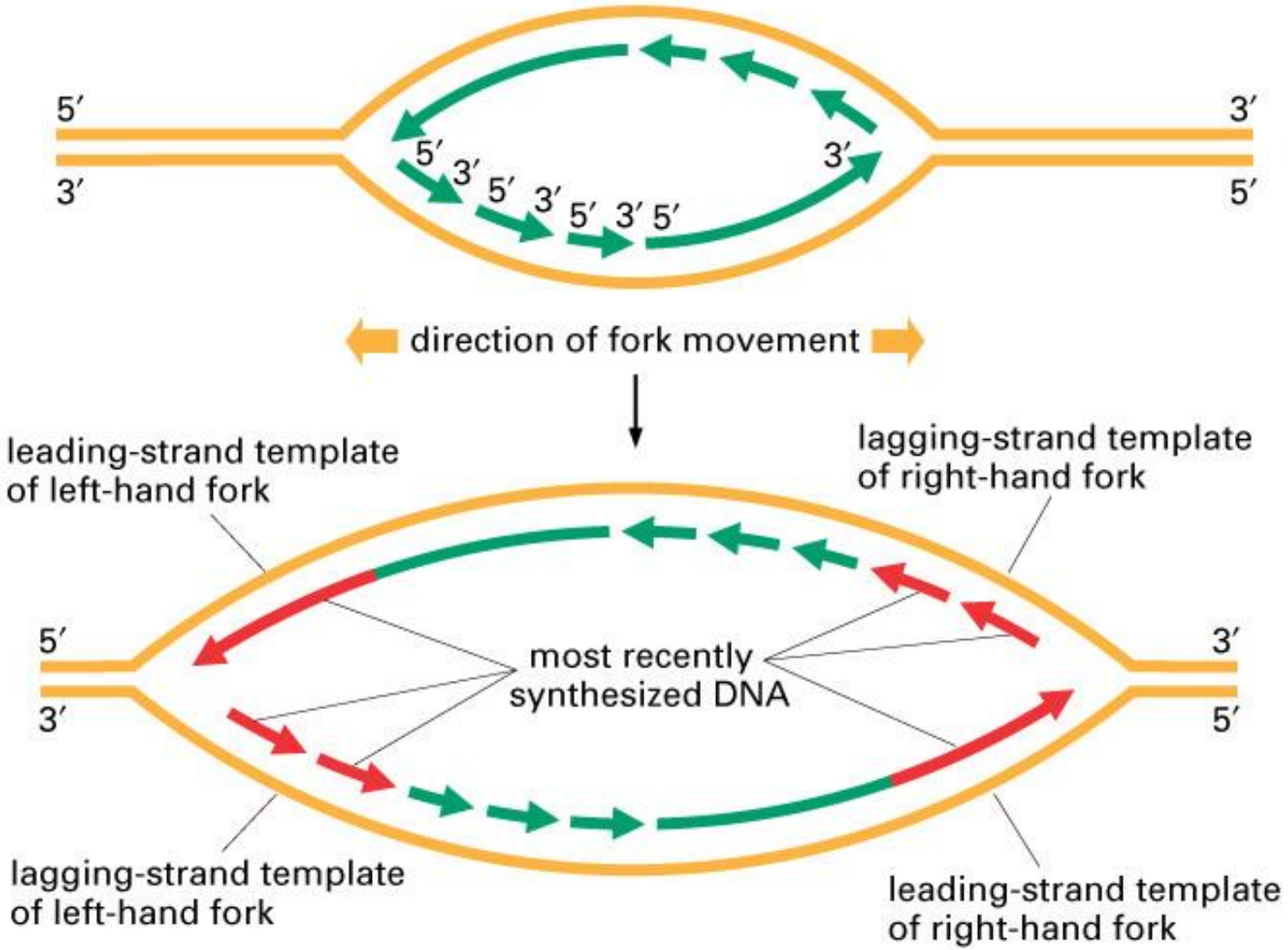
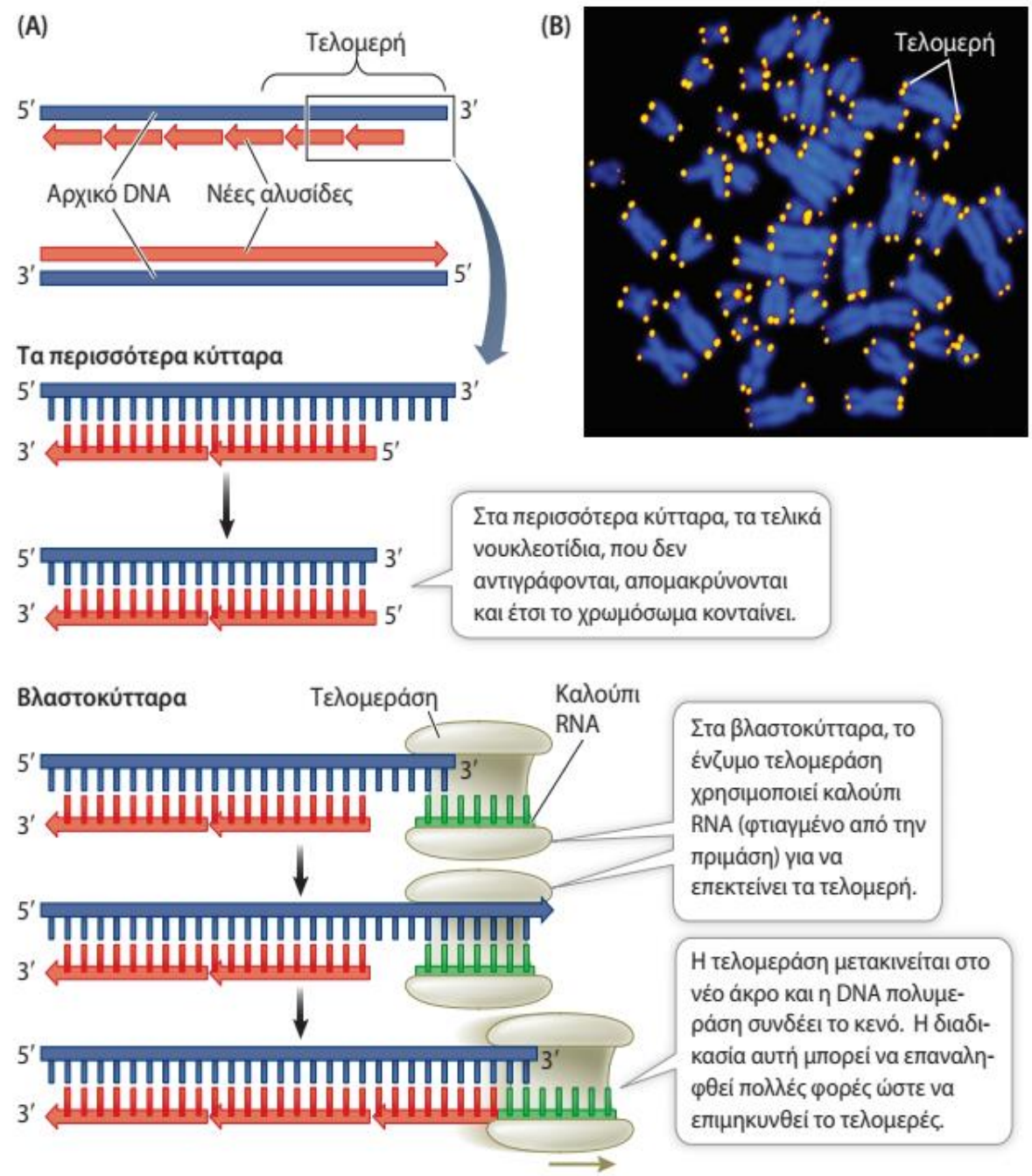


Figure 6-12 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

Η αντιγραφική διχάλα κινείται αμφίπλευρα

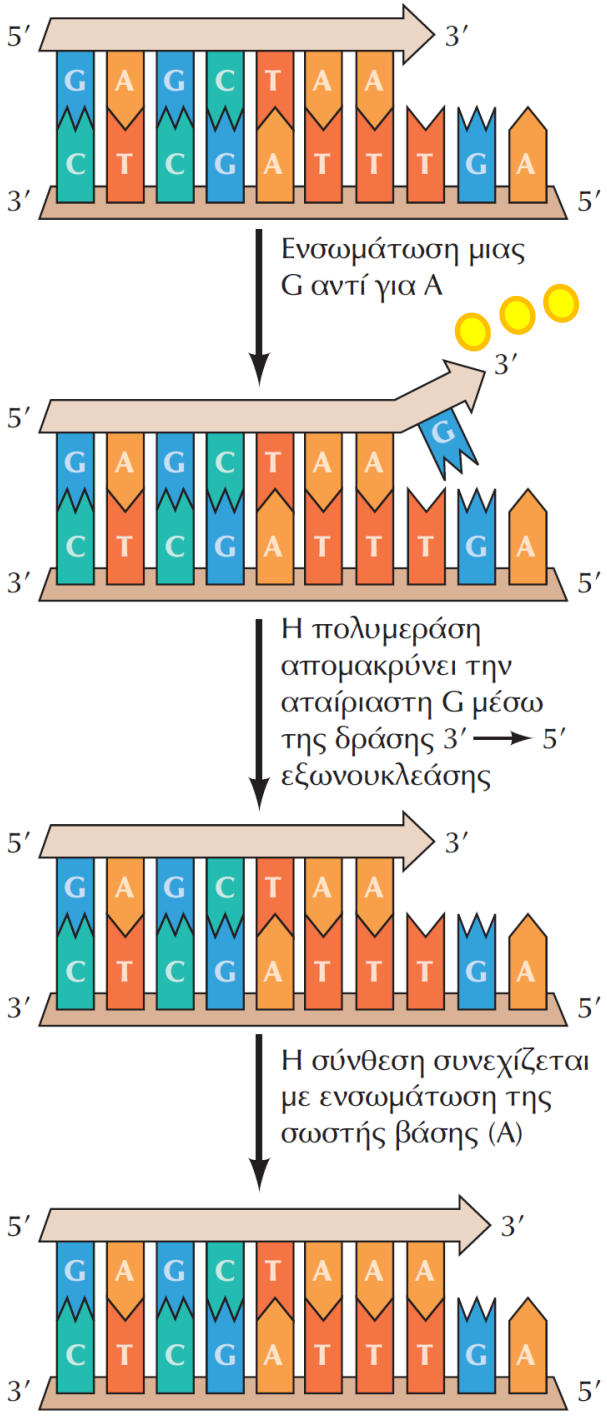


Εικόνα 13.17 Τελομερή και Τελομεράση.
(Α) Στα περισσότερα κύτταρα, το χρωμόσωμα κονταίνει με κάθε αντιγραφή του, γιατί ένα μικρό κομμάτι μητρικού DNA στο 3’ άκρο δεν αντιγράφεται και απομακρύνεται. Εντούτοις, στα βλαστοκύτταρα, η τελομεράση χρησιμοποιεί ένα καλούπι RNA για να επεκτείνει τα τελομερή και να εμποδίσει τη βράχυνση του χρωμοσώματος. (Β) Η χρώση με φθορίζουσα χρωστική δείχνει τις τελομερικές περιοχές στα βαμμένα μπλε ανθρώπινα χρωμοσώματα.

Ε: Γιατί τα κύτταρα τα οποία σχηματίζουν γαμέτες εκφράζουν τελομεράση;

copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ

Δ. Διορθωτικός έλεγχος



ΕΙΚΟΝΑ 6.11 Διορθωτικός έλεγχος από την DNA πολυμεράση.

Μία G ενσωματώνεται στη θέση μιας A, απέναντι από μια T της αλυσίδας-μήτρας. Λόγω του αταίριαστου ζευγαρώματος, η G στο 3′ άκρο δε συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με την αλυσίδα-μήτρα. Το γεγονός αυτό επάγει την απομάκρυνσή της μέσω της **ενεργότητας 3′ προς 5′ εξωνουκλεάσης** της DNA πολυμεράσης, η οποία, για να συνεχίσει τη σύνθεση, χρειάζεται το 3′ άκρο του εκκινητή να είναι ζευγαρωμένο με την αλυσίδα-μήτρα.

Μετά την εκτομή της αταίριαστης G, η σύνθεση DNA μπορεί να συνεχιστεί με την ενσωμάτωση του σωστού νουκλεοτιδίου (εδώ μιας A).

Θα μπορούσε να γίνει η προηγούμενη επιδιόρθωση αν τα ελεύθερα νουκλεοτίδια είχαν τρεις φωσφορικές ομάδες στην θέση 3’ αντί της 5’;

Ή: είναι προτιμότερο ο πολυμερισμός να καθορίζεται από ελεύθερα ή ήδη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια;

Η πιστότητα της αντιγραφής του DNA

Από δεδομένα γονιδίων προκύπτει 1 λάθος ανά 10^9 νουκλεοτίδια.

- Από μετρήσεις της **ελεύθερης ενέργειας** (βάσεις) μόνο θα έπρεπε να είναι $1:10^2$.

- Η **DNA πολυμεράση ως εξειδικευμένο ένζυμο πολυμερισμού** (προηγούμενη σελίδα) βελτιώνει την ποιότητα της αντιγραφής στα $1:10^4$ λάθη.

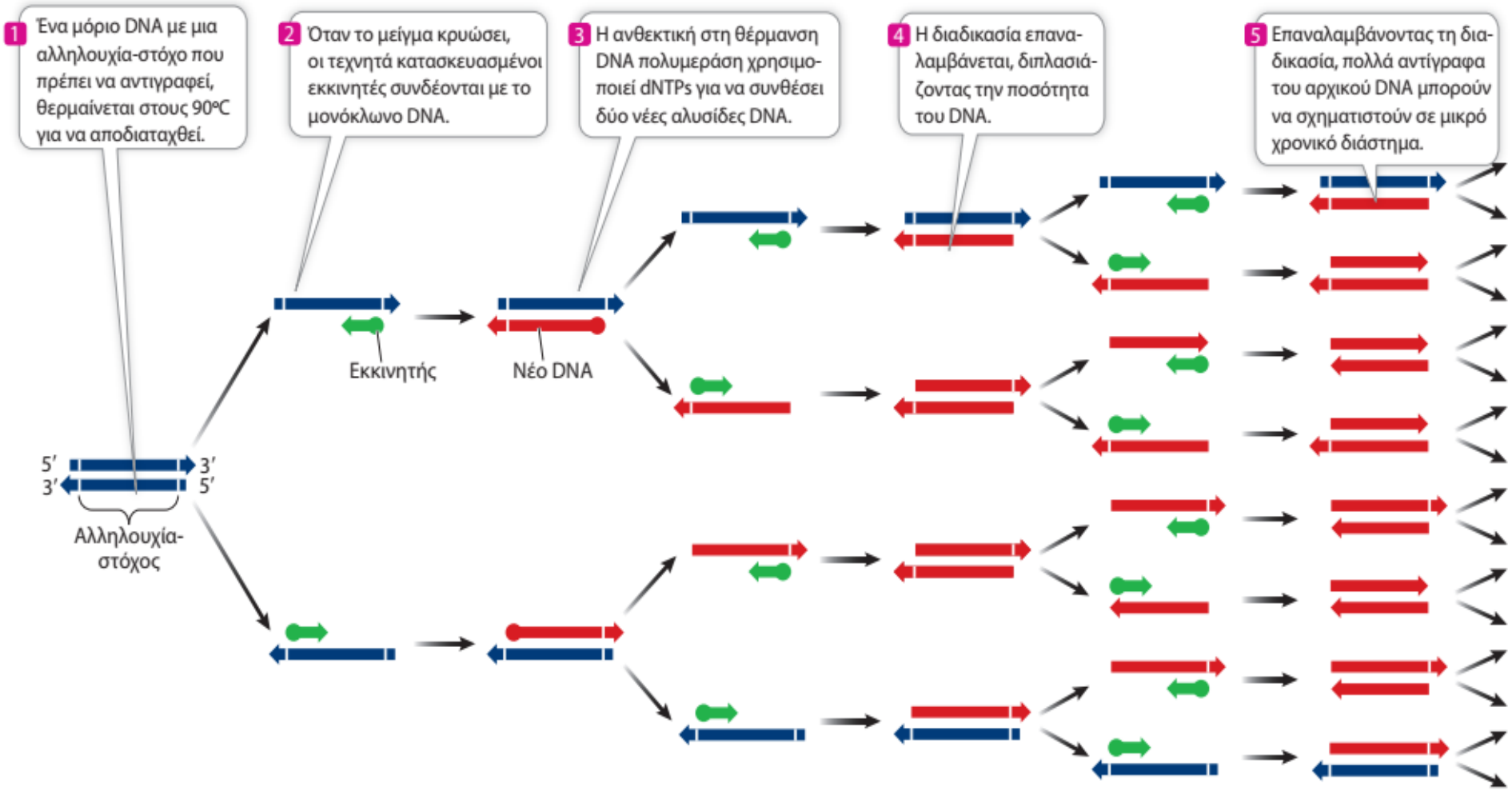
- Η ικανότητα **διορθωτικού ελέγχου** της DNA πολυμεράσης (ενεργότητα εξωνουκλεάσης) (προηγούμενη σελίδα) βελτιώνει επιπροσθέτως την αντιγραφή 100-1000 φορές.

Σύνολο λαθών μετά από την DNA πολυμεράση $1:10^7$-10^8

- **Επιπρόσθετοι μηχανισμοί** που ελέγχουν το νεοσυντιθέμενο DNA **$1:10^9$**

Ε. Ο πολυμερισμός του DNA

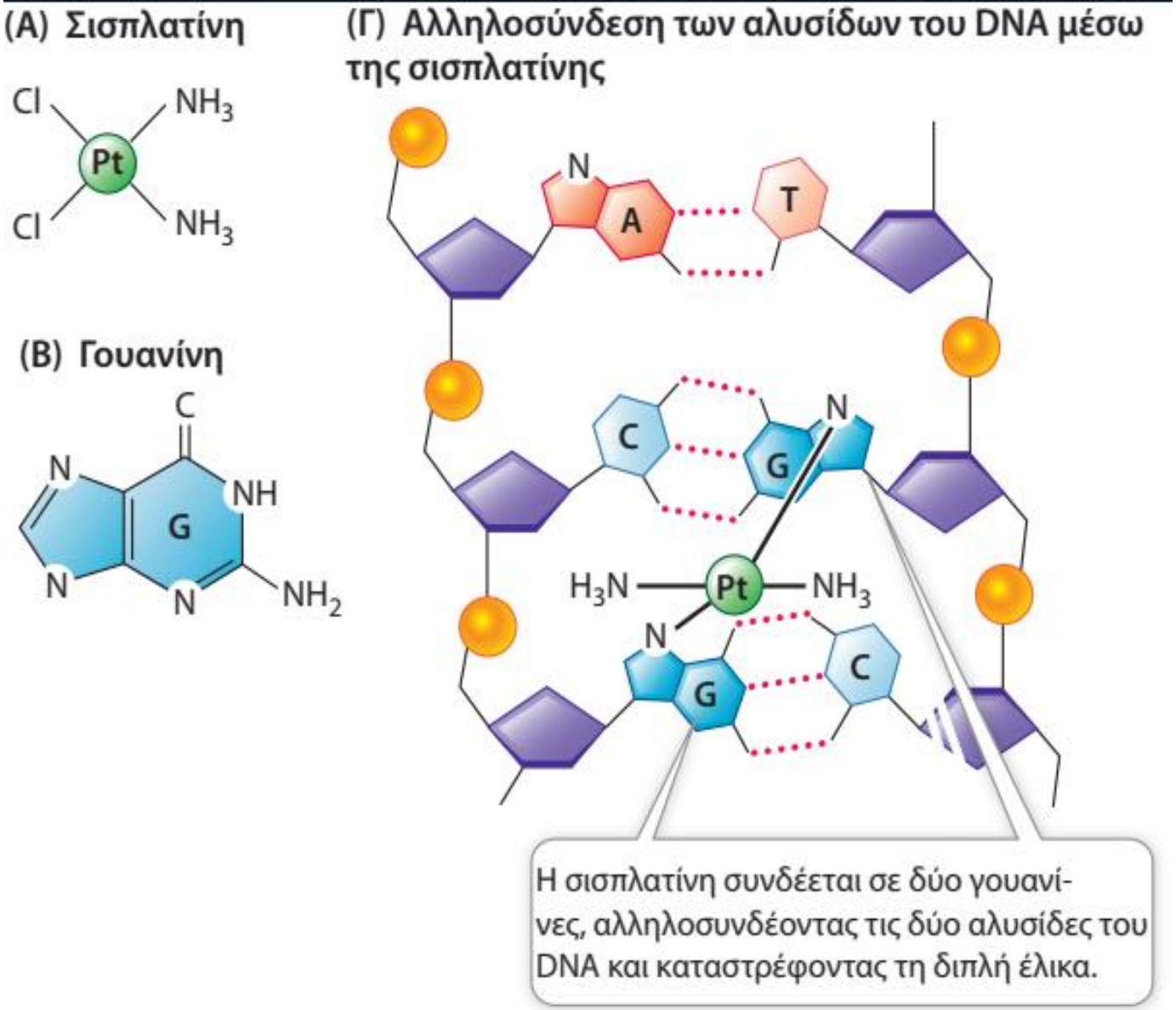
στη βιοτεχνολογία και την ιατρική



Εικόνα 13.19 Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.

Τα βήματα σε αυτή την κυκλική διαδικασία επαναλαμβάνονται πολλές φορές για να παραχθούν πολλαπλά όμοια αντίγραφα του τμήματος DNA. Αυτό δίνει αρκετό DNA για χημικές αναλύσεις και γενετικούς χειρισμούς.

copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ



Εικόνα 13.20 **Σισπλατίνη: Ένα Μικρό Αλλά Θανατηφόρο Μόριο.**

copyright @ 2023 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΠΑΖΗΣΗ

Τέλος