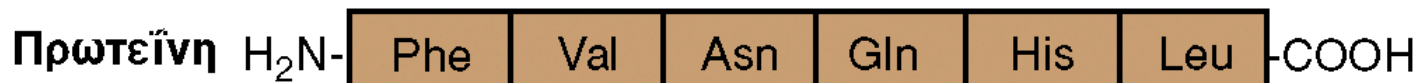
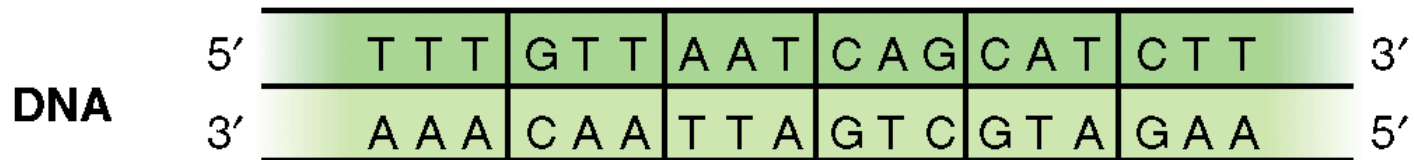


ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

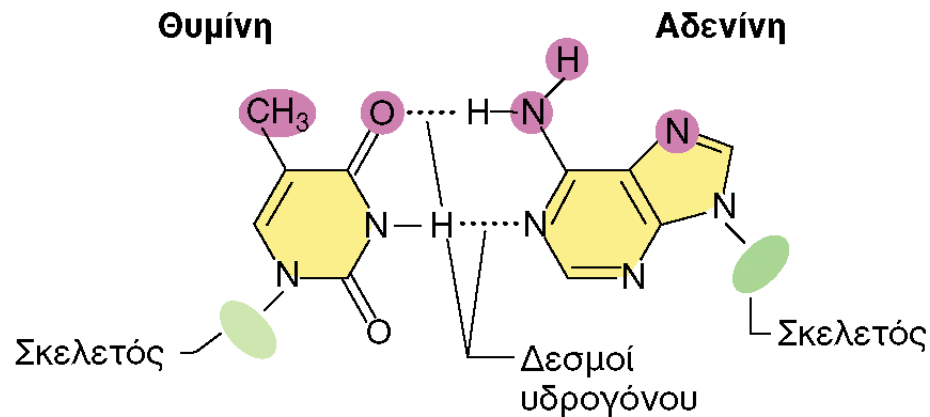
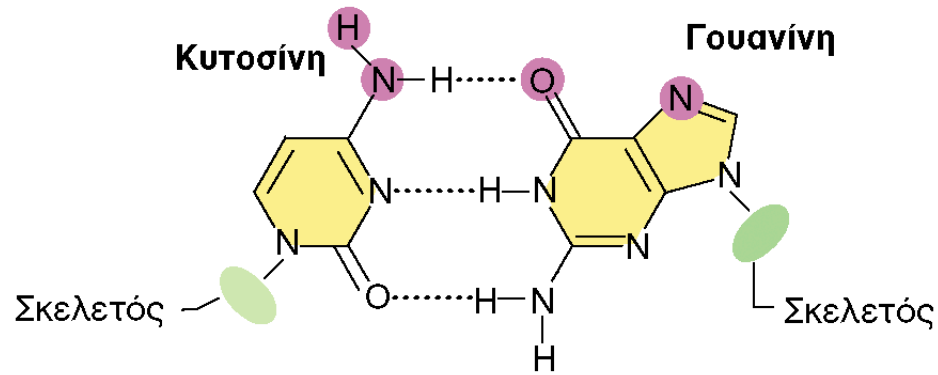
Γιώργος Τσιάμης

Αναπληρωτής Καθηγητής

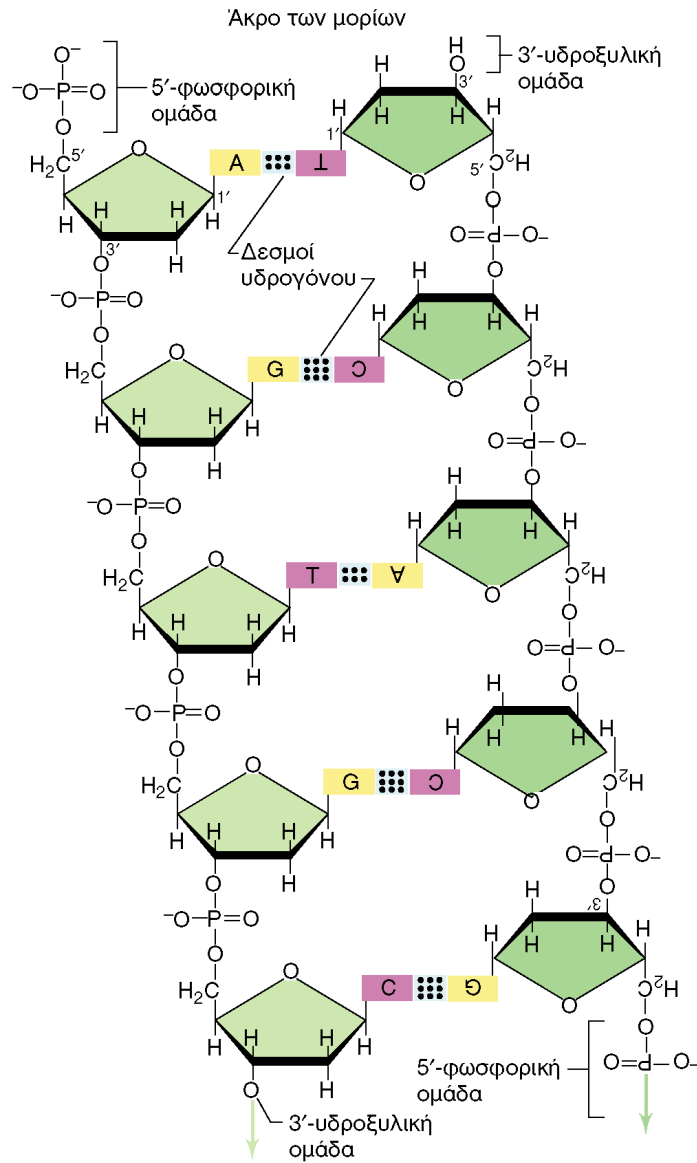
Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας



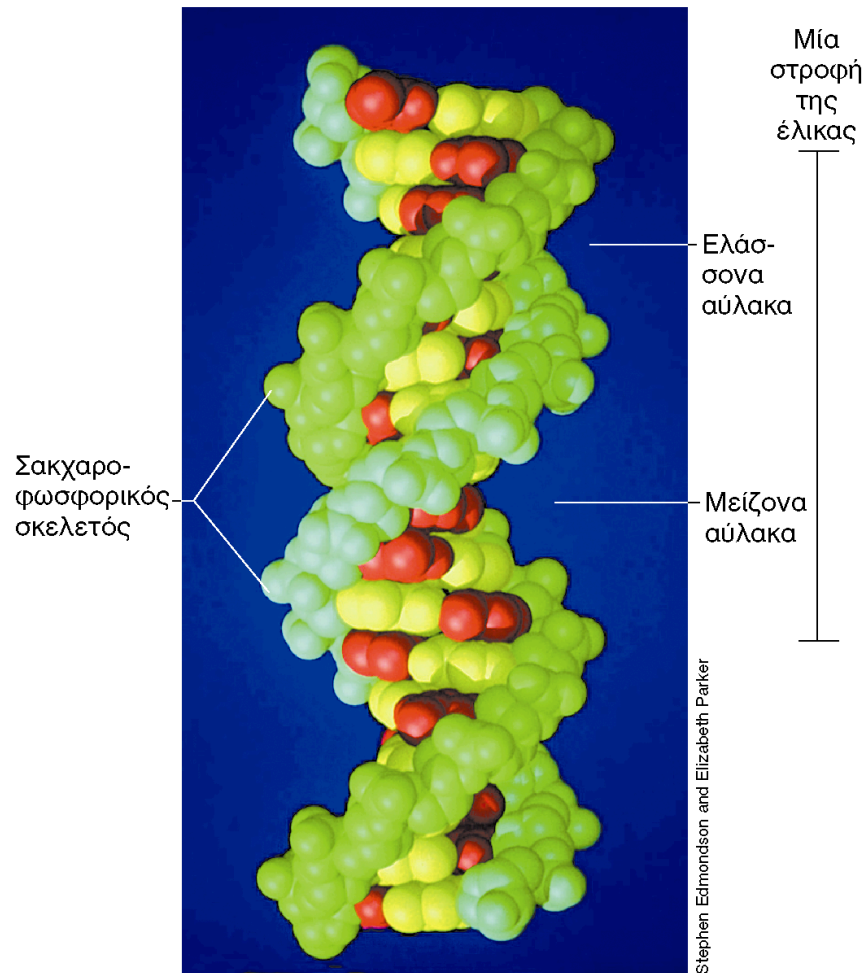
Εικόνα 7.1 Σύνθεση των τριών τύπων πληροφοριακών μακρομορίων. Σημειώστε ότι σε κάθε συγκεκριμένη περιοχή μεταγράφεται μόνο μία από τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας.



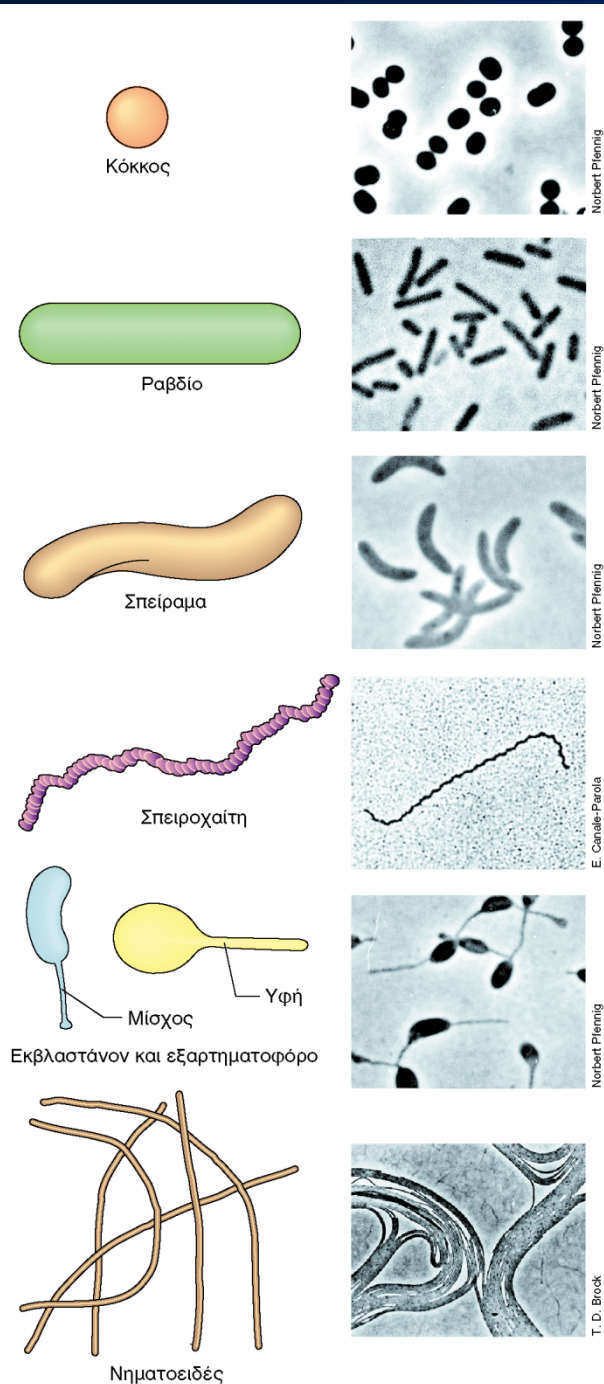
Εικόνα 7.3 Απεικόνιση της επιλεκτικής ζεύξης μεταξύ αδενίνης (A) και θυμίνης (T) και μεταξύ γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C), μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Αυτά τα δύο ζεύγη βάσεων είναι τα ζεύγη που απαντούν κατά κανόνα στο δίκλωνο DNA. Τα άτομα που βρίσκονται στη μείζονα αύλακα της διπλής έλικας και που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα. Επισημαίνεται επίσης ο σακχαροφωσφορικός σκελετός των δύο αλυσίδων του DNA.



Εικόνα 7.4 Η δομή του DNA. Η συμπληρωματική και αντιπαράλληλη φύση του DNA. Σημειώστε ότι η μία αλυσίδα καταλήγει σε μια 5'-φωσφορική ομάδα, ενώ η άλλη σε μια 3'-υδροξυλική ομάδα. Οι βάσεις με κόκκινο χρώμα αναπροσωπεύουν τις πυριμιδίνες, κυτοσίνη (C) και θυμίνη (T), και οι βάσεις με κίτρινο χρώμα τις πουρίνες, αδενίνη (A) και γουανίνη (G).

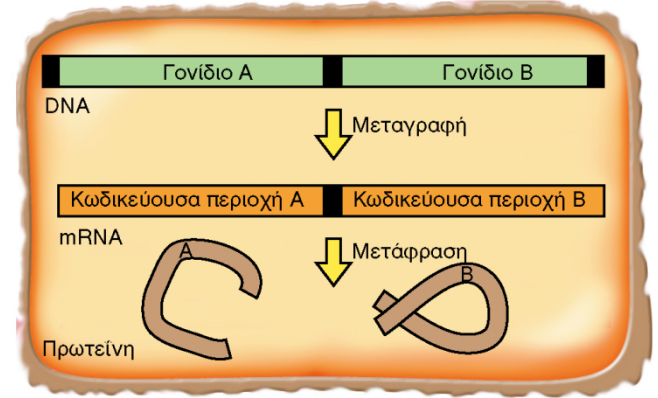


Εικόνα 7.5 Υπολογιστικό μοντέλο ενός μικρού τμήματος DNA, που παρουσιάζει τη συνολική διάταξη της διπλής έλικας. Ο ένας σακχαροφωσφορικός σκελετός παρουσιάζεται με κυανό και ο άλλος με πράσινο χρώμα. Οι βάσεις πυριμιδίνης υποδηλώνονται με κόκκινο χρώμα και οι πουρίνες με κίτρινο. Σημειώστε τις θέσεις της μείζονος και της ελάσσονος αύλακας. Η σύνθεση του μοντέλου έγινε με τη χρήση λογισμικού του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικών Υπολογιστικών Γραφικών, του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας στο San Francisco.

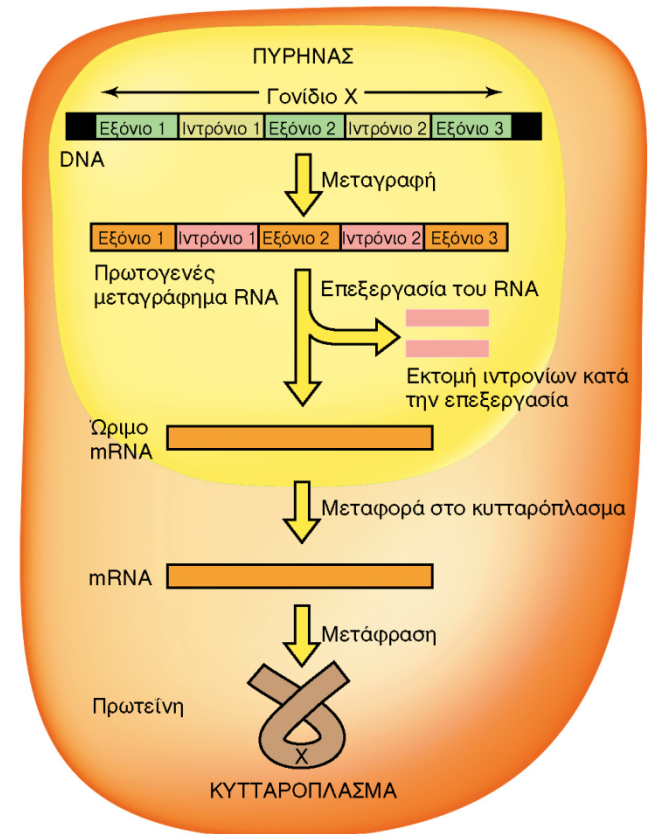


Εικόνα 4.11

Αντιπροσωπευτικά κυτταρικά σχήματα (μορφολογίες) προκαρυωτικών οργανισμών. Παρατίθενται διαγράμματα (αριστερά) και χαρακτηριστικές μικροφωτογραφίες (δεξιά). Οι οργανισμοί είναι: κόκκος, *Thiocapsa roseopersicina* (διάμετρος κυττάρου: 1,5 μm); ραβδίο, *Desulfuromonas acetoxidans* (διάμετρος: 1 μm); σπείραμα, *Rhodospirillum rubrum* (διάμετρος: 1 μm); σπειροχαιτη, *Spirochaeta stenostrepta* (διάμετρος: 0,25 μm); εκβλαστών και εξαρτηματοφόρο, *Rhodomicrobium vannielii* (διάμετρος: 1,2 μm); νηματοιειδές, *Chloroflexus aurantiacus* (διάμετρος: 0,8 μm).

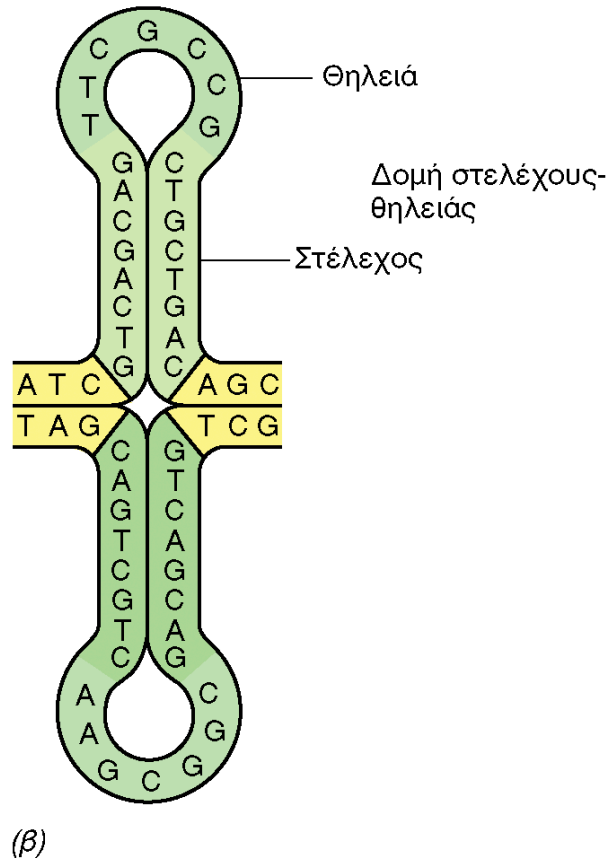
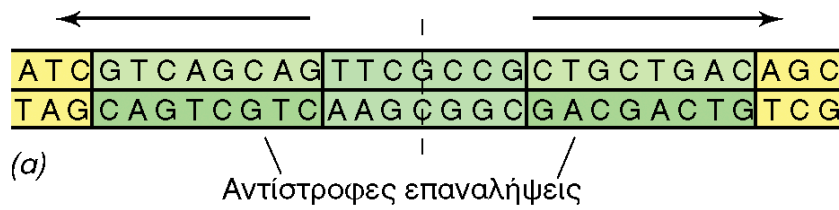


(α) Προκαρυώτης

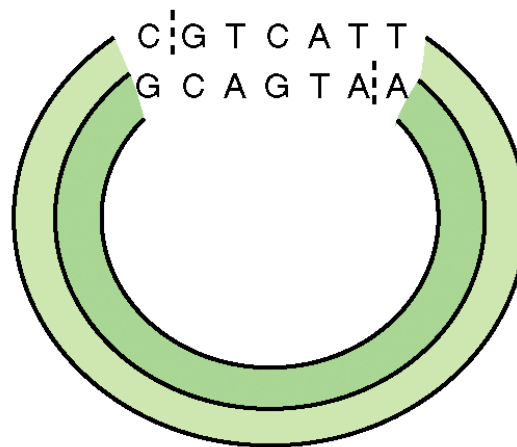
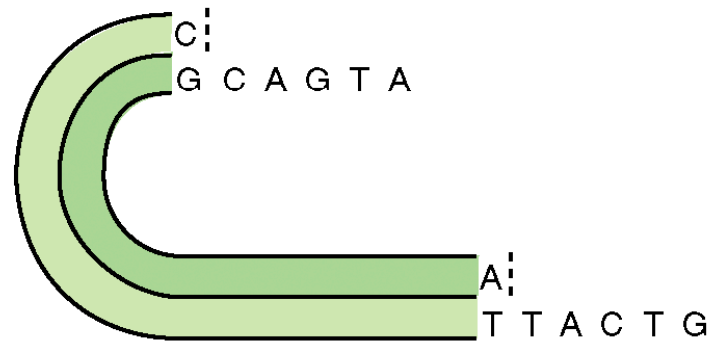


(β) Ευκαρυώτης

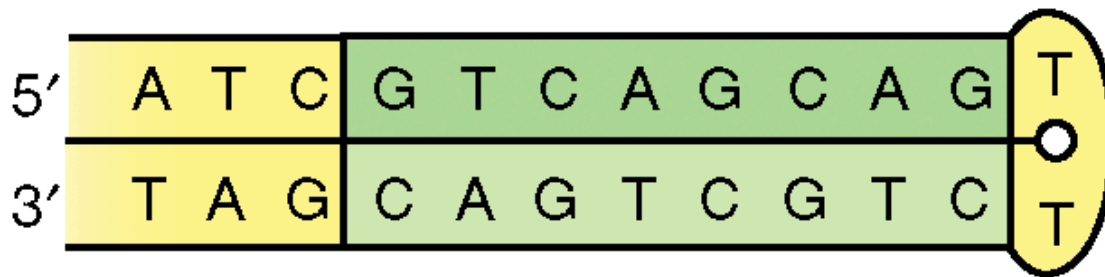
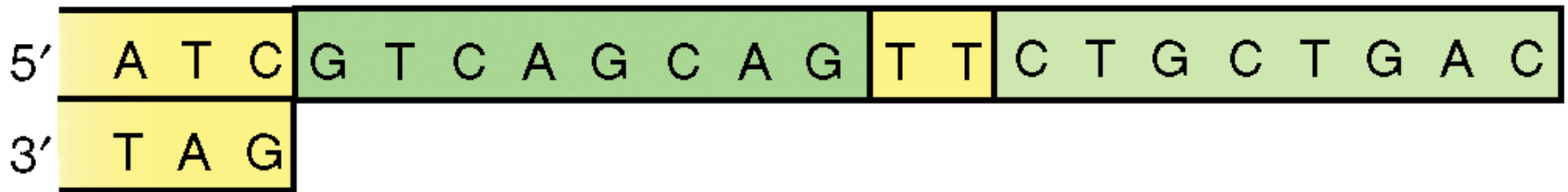
Εικόνα 7.2 Αντιπαραβολή των διαδικασιών μεταφοράς της πληροφορίας σε προκαρυώτες και ευκαρυώτες. (α) Προκαρυώτης. Συχνά ένα μόριο RNA περιέχει περισσότερες από μία κωδικεύουσες περιοχές (αυτού του είδους τα mRNA ονομάζονται *πολυκιστρονικά*). (β) Ευκαρυώτης. Οι μη κωδικεύουσες περιοχές (*ιντρόνια*) αφαιρούνται από το πρωτογενές μεταγράφημα RNA πριν από τη μετάφραση. Τα mRNA των ευκαρυωτών είναι σχεδόν πάντοτε *μονοκιστρονικά*. Σημειώστε ότι οι δύο τύποι κυττάρων δεν αναπαρίστανται στην ίδια κλίμακα. Ένα τυπικό προκαρυωτικό κύτταρο έχει διάμετρο 1 έως 2 μm, ενώ ένα τυπικό ευκαρυωτικό (ζωικό) κύτταρο έχει διάμετρο περίπου 25 μm (Εικόνα 2.3)



Εικόνα 7.6 Οι αντίστροφες επαναλήψεις και ο σχηματισμός δομής στελέχους-θηλειάς. (α) Γειτνιάζουσες αντίστροφες επαναλήψεις σε μόριο DNA. Τα βέλη υποδεικνύουν τη συμμετρία περί τον νοητό άξονα (στικτή ευθεία γραμμή). (β) Σχηματισμός δομών στέλεχους-θηλειάς (σταυροειδών δομών) μέσω της ζεύξης συμπληρωματικών βάσεων της ίδιας αλυσίδας.

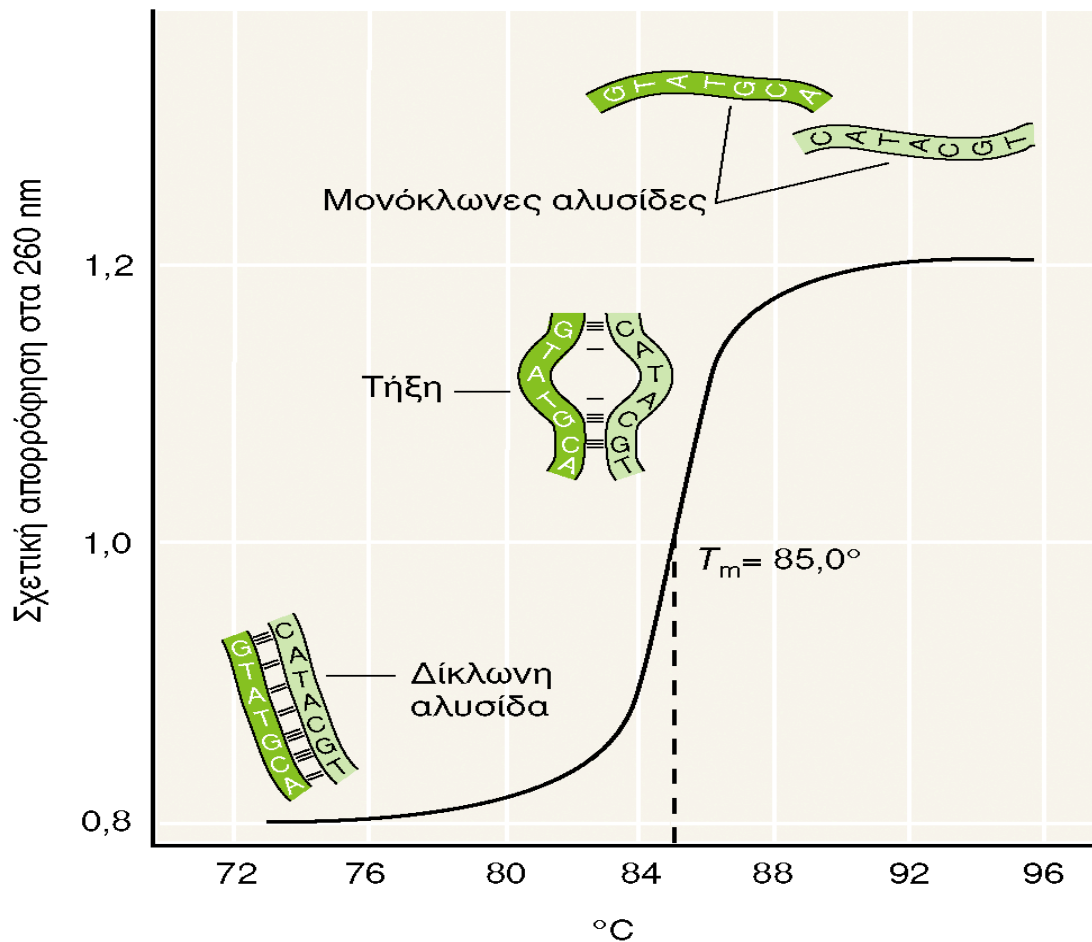


Εικόνα 7.7 Ένα γραμμικό DNA με συμπληρωματικά μονόκλιωνα άκρα («ανισοτελή άκρα») μπορεί να κυκλοποιηθεί μέσω της ζεύξης βάσεων των συμπληρωματικών άκρων του.

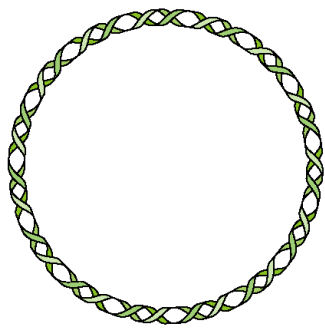


Εικόνα 7.8

Δομή φουρκέτας στο ένα άκρο γραμμικού μορίου DNA. Εάν το γραμμικό DNA ήταν εξ ολοκλήρου δίκλωνο, οι αλληλουχίες που υποδηλώνονται με πράσινο χρώμα θα συνιστούσαν αντίστροφες επαναλήψεις.

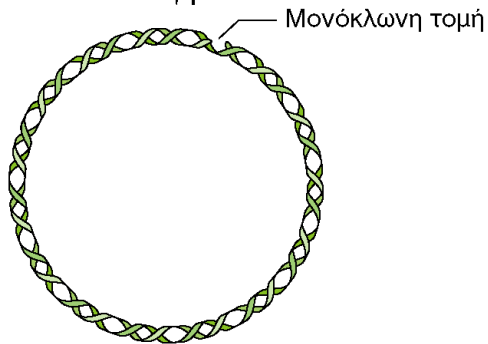


Εικόνα 7.9 Η θερμική αποδιάταξη του DNA. Το DNA απορροφά τόσο περισσότερο υπεριώδες φως όσο περισσότερο αποδιάσσεται η διπλή έλικα. Η μετάβαση από τη δίκλωνη στη μονόκλωνη κατάσταση είναι ένα ιδιαιτέρως αιφνίδιο συμβάν. Το θερμοκρασιακό σημείο στο μέσο της φάσης της μετάβασης, το T_m , εξαρτάται ευθέως από τη περιεκτικότητα του DNA σε G + C. Το αποδιατεταγμένο DNA μπορεί να αναδιαταχθεί με βραδεία ψύξη, αλλά η διαδικασία αυτή δεν ακολουθεί την ίδια καμπύλη. Η αναδιάταξη βαίνει προοδευτικά προς την ολοκλήρωσή της σε θερμοκρασίες πολύ μικρότερες του T_m , αλλά και τότε, ύστερα από σημαντικά μεγαλύτερο χρόνο επώασης.



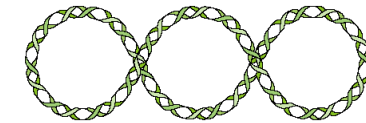
(α) Χαλαρό, ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό μόριο DNA

Θραύση μίας αλυσίδας ↔ Σύνδεση άκρων

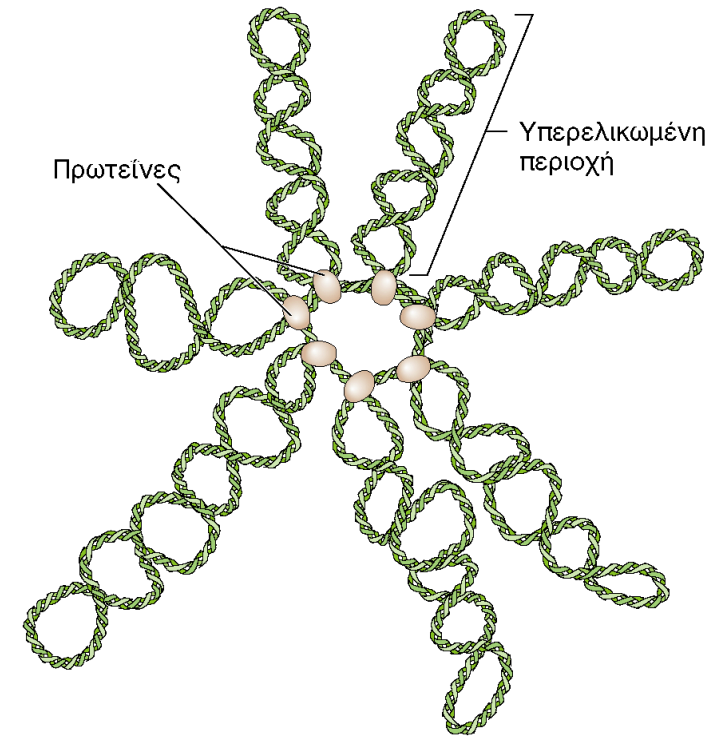


(β) Χαλαρό, κυκλικό μόριο DNA, με μονόκλωνη τομή

↑ Περιστροφή του ενός άκρου της κομμένης αλυσίδας γύρω από την έλικα και δεσμοποίηση
↓ Θραύση μίας αλυσίδας



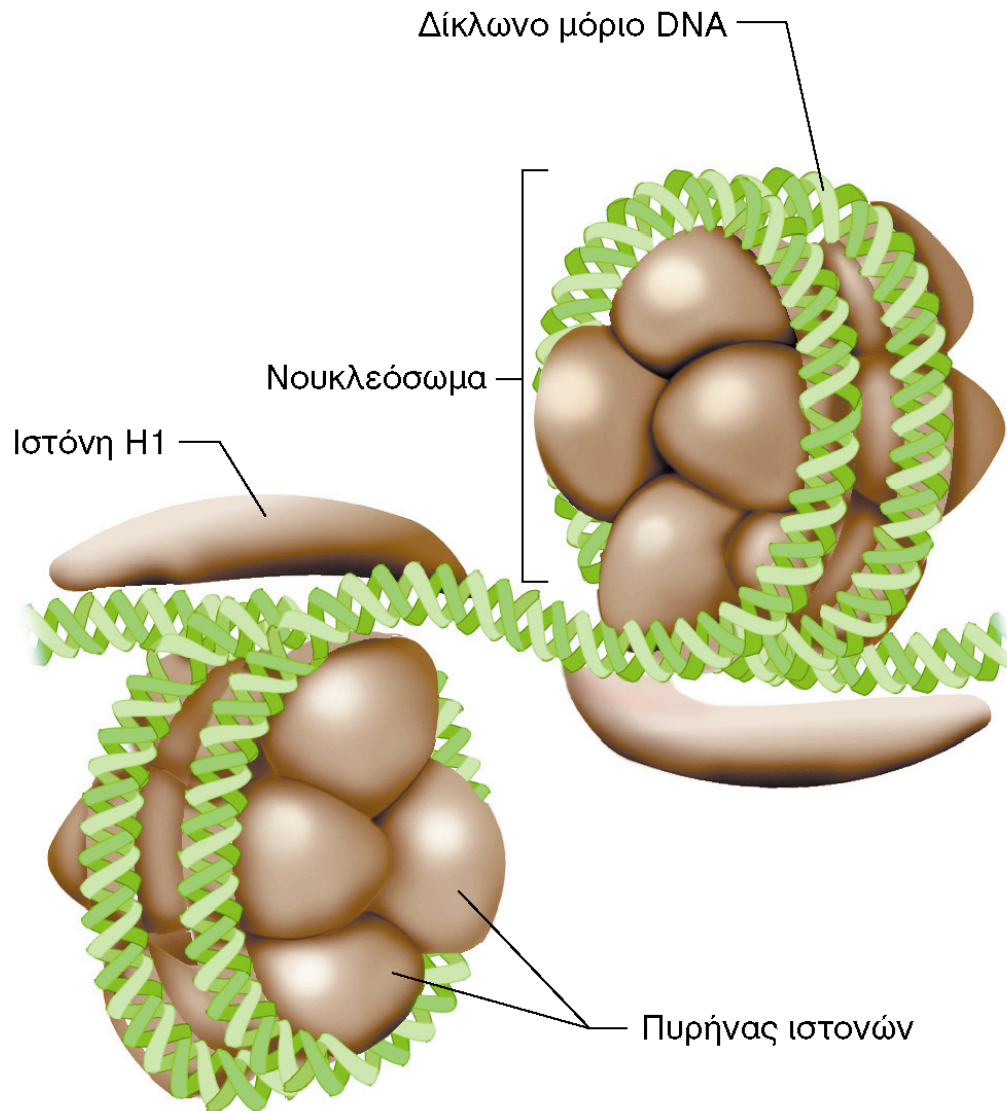
(γ) Υπερελικωμένο κυκλικό μόριο DNA



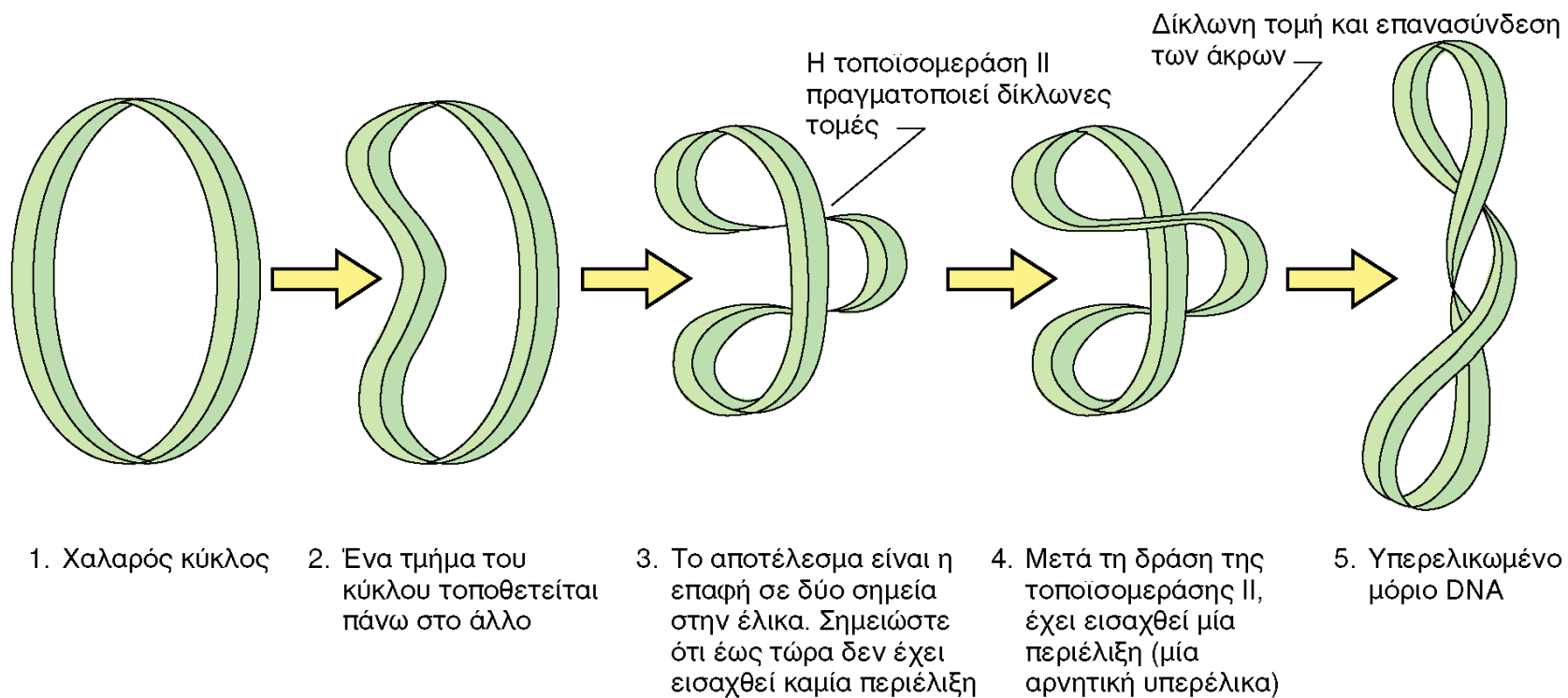
(δ) Χρωμοσωματικό DNA με υπερελικωμένες περιοχές

Εικόνα 7.10

Το υπερελικωμένο DNA. Τα τμήματα *a*, *b*, και *γ* απεικονίζουν ένα μόριο υπερελικωμένου κυκλικού DNA και αλληλομετατροπές του σε χαλαρό, μονόκλωνο τετμημένο DNA. Μονόκλωνη τομή του DNA είναι η διάσπαση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε μία από τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας. (δ) Στην πραγματικότητα, το δίκλωνο DNA του βακτηριακού χρωμοσώματος είναι διευθετημένο σε αρκετές υπερελικωμένες περιοχές, όπως φαίνεται εδώ, και δεν έχει τη μορφή μίας και μόνον υπερέλικας. Στην *Escherichia coli* πιστεύεται ότι υπάρχουν πάνω από 50 υπερελικωμένες περιοχές, κάθε μία από τις οποίες σταθεροποιείται μέσω δέσμευσής της με ειδικές πρωτεΐνες.

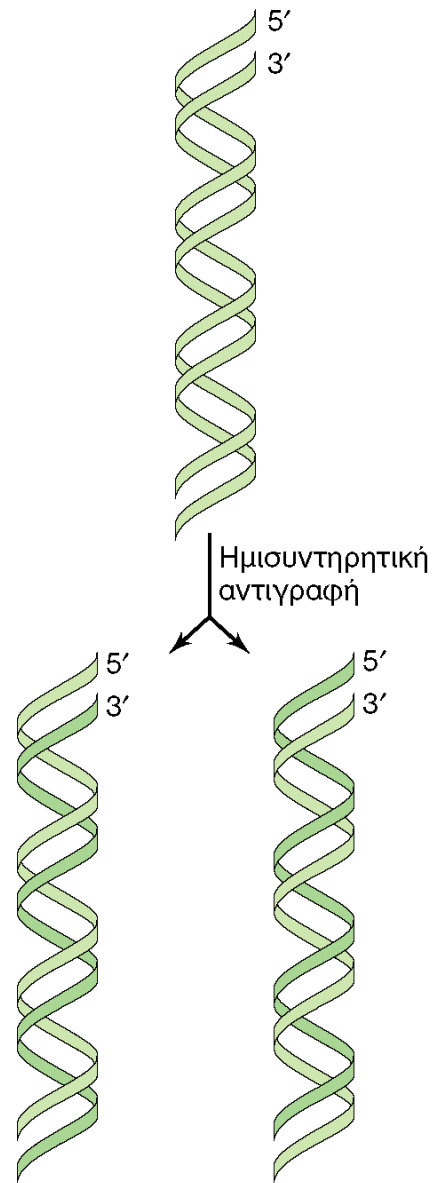


Εικόνα 7.11 «Συσκευασία» του DNA γύρω από έναν πυρήνα ιστονών, που οδηγεί στον σχηματισμό νουκλεοσώματος. Τα νουκλεοσώματα διατάσσονται κατά μήκος ενός μορίου DNA, όπως οι χάντρες σε ένα περιδέραιο. Αυτή η διάταξη είναι η τυπική διάταξη του DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων.

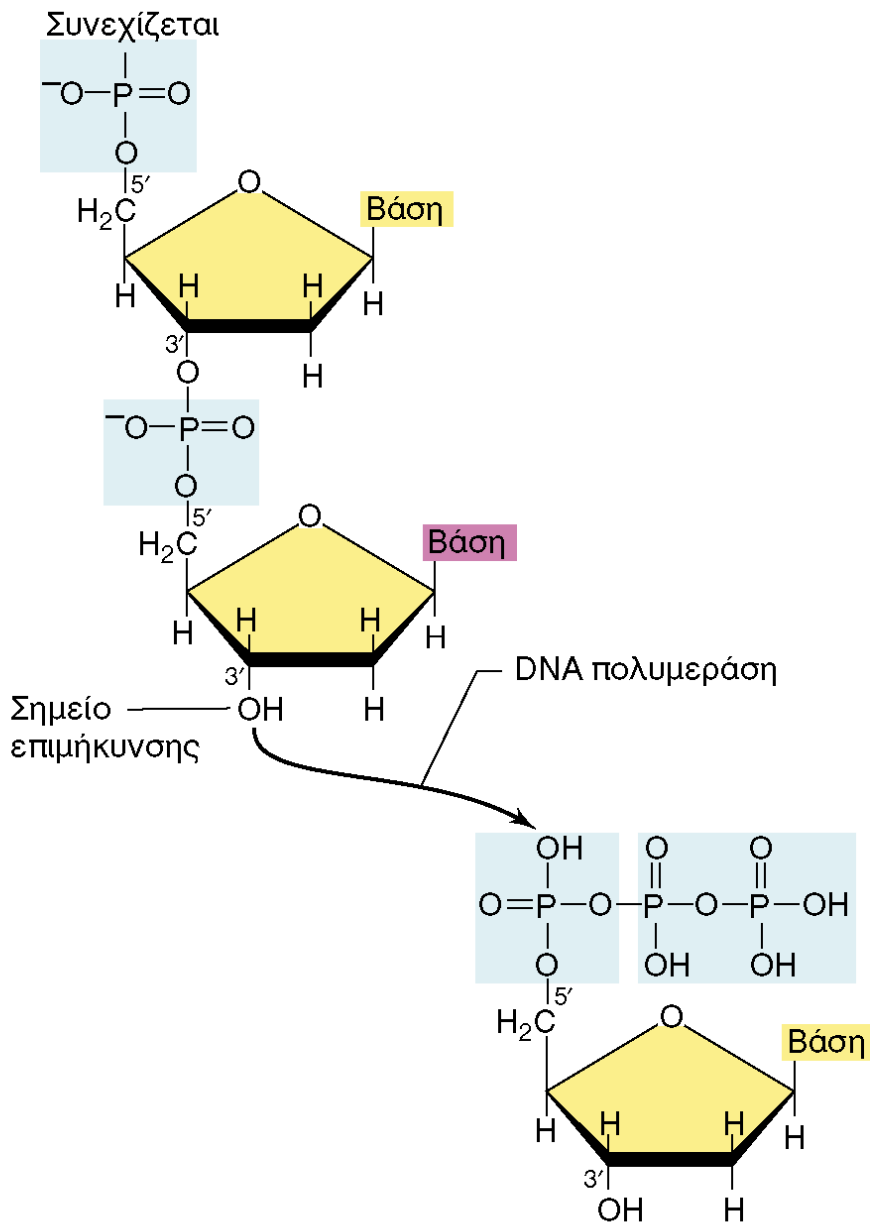


Εικόνα 7.12

Η δημιουργία υπερελίκωσης σε ένα μόριο κυκλικού DNA μέσω της δράσης του ενζύμου τοποϊσομεράση II, το οποίο δημιουργεί δίκλωνες τομές.

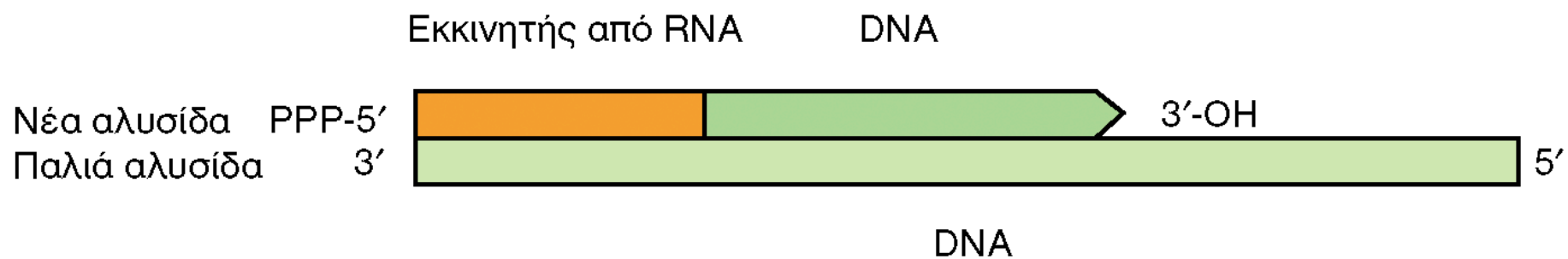


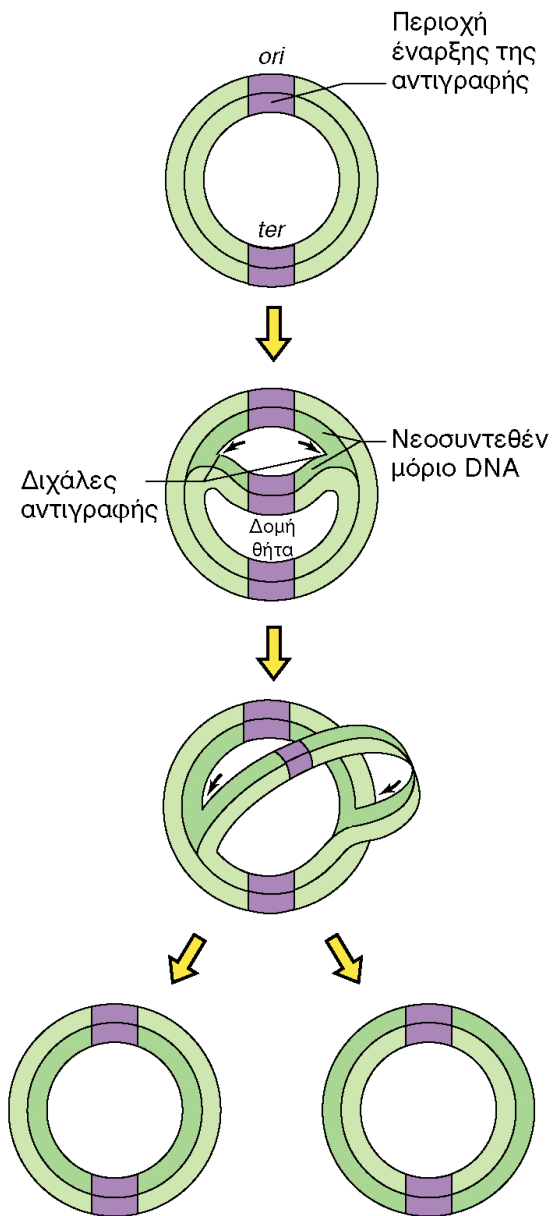
Εικόνα 7.13 Η αντιγραφή του DNA είναι μια ημισυντηρητική διαδικασία, τόσο στους προκαρυώτες όσο και στους ευκαρυώτες. Ας σημειωθεί ότι κάθε νέα διπλή έλικα περιλαμβάνει μία νέα και μία παλιά αλυσίδα.



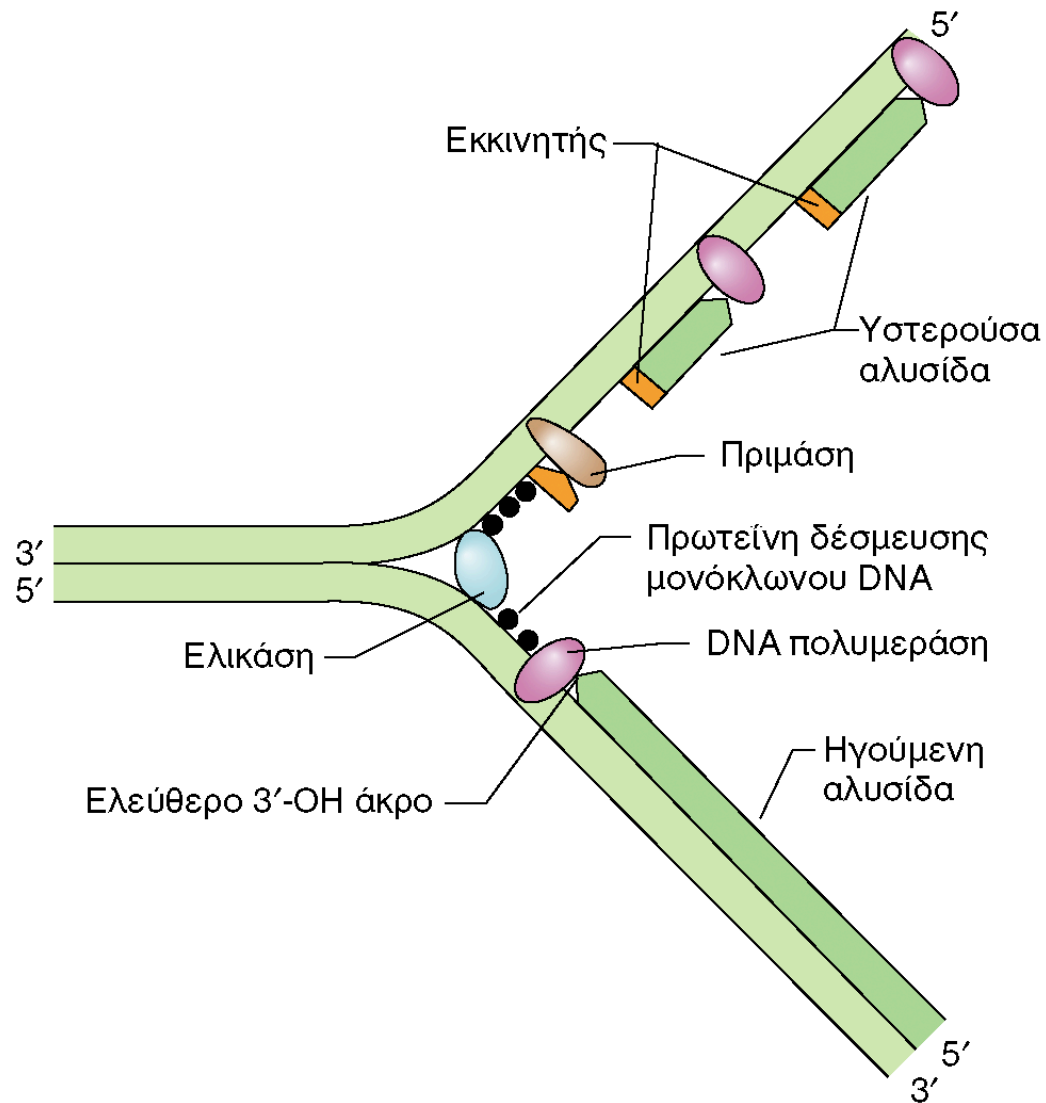
Εικόνα 7.14 Η δομή της αλυσίδας του DNA και ο μηχανισμός επιμήκυνσής της, μέσω προσθήκης στο άκρο 3' της αλυσίδας τμήματος του τριφωσφορικού δεοξυριβονουκλεοζίτη. Η επιμήκυνση συντελείται πάντοτε από την 5'-φωσφορική ομάδα προς την 3'-υδροξυλομάδα. Το ένζυμο DNA πολυμεράση είναι αυτό που καταλύει την αντίδραση προσθήκης. Τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια που χρησιμεύουν ως πρόδρομες ενώσεις είναι η τριφωσφορική δεοξυθυμιδίνη (dTTP), η τριφωσφορική δεοξαδενοσίνη (dATP), η τριφωσφορική δεοξυγουανοσίνη (dGTP), και η τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη (dCTP). Οι δύο ακραίες φωσφορικές ομάδες των τριφωσφορικών αποκόπτονται ως μόρια πυροφωσφορικού (PP_i). Συνεπώς, για την προσθήκη ενός και μόνο νουκλεοτιδίου δαπανάται η ενέργεια δύο φωσφορικών δεσμών μεγάλου ενεργειακού περιεχομένου.

Εικόνα 7.15 Δομή του συνδυασμού RNA-DNA που καταλήγει στην έναρξη της σύνθεσης του DNA.

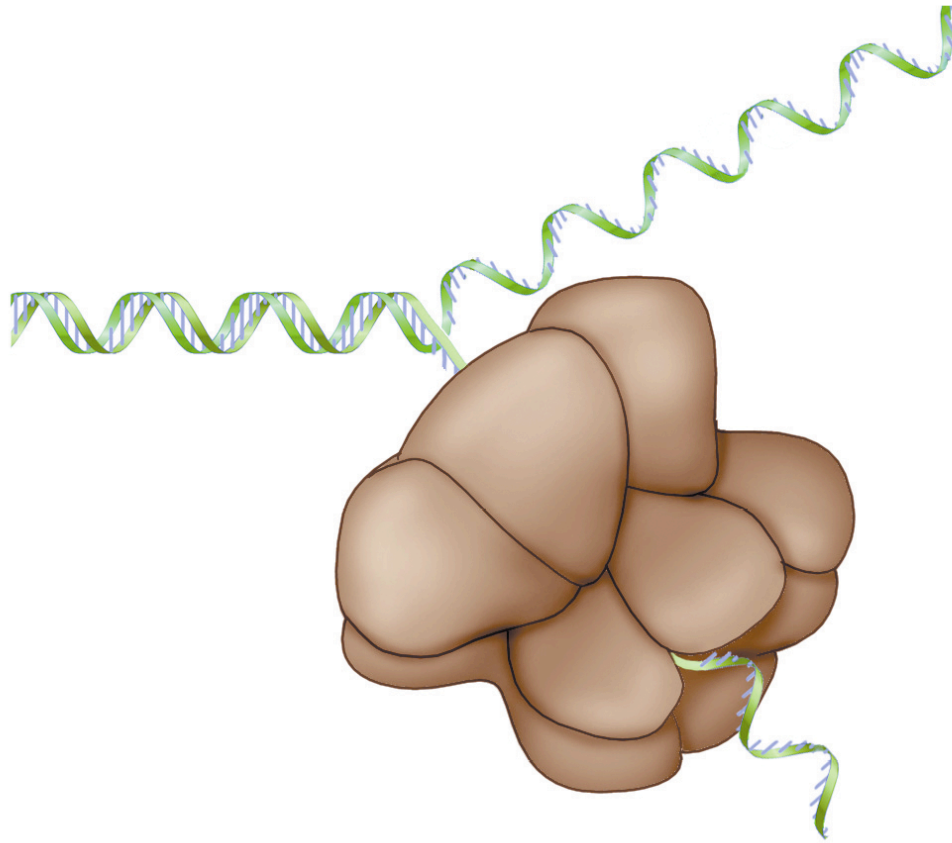




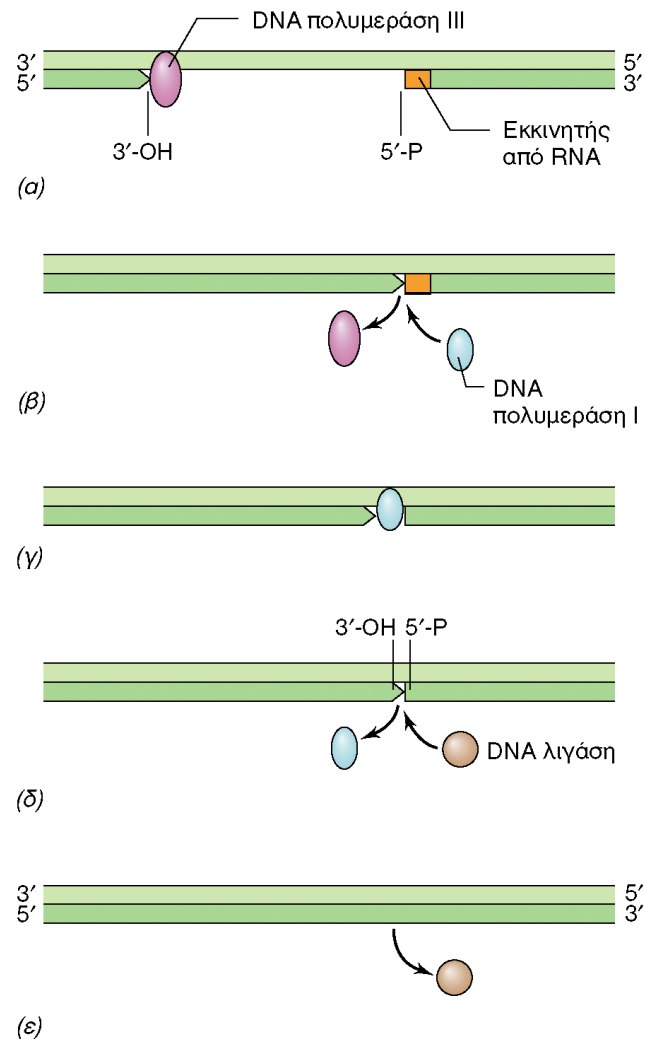
Εικόνα 7.16 Στο κυκλικό DNA, η αντιγραφή διπλής κατεύθυνσης που εκκινεί από μια περιοχή έναρξης της αντιγραφής οδηγεί στον σχηματισμό μιας ενδιάμεσης δομής της αντιγραφής που μοιάζει με το γράμμα θ.



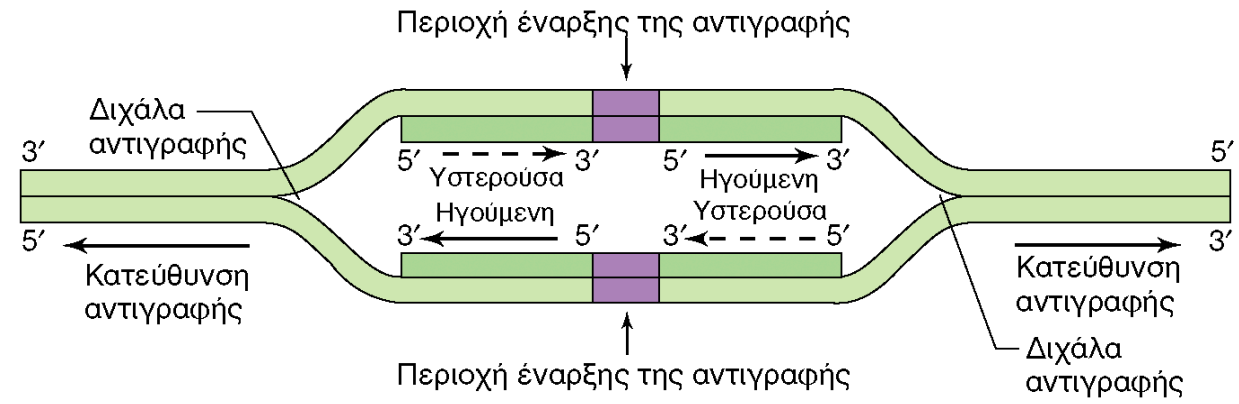
Εικόνα 7.17 Τα συμβάντα στη δικάλα αντιγραφής. Προσέξτε την πολικότητα και την αντιπαράλληλη φύση των αλυσίδων του DNA. Το υπόστρωμα του ενζύμου πριμάση είναι τριφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια, ενώ της DNA πολυμεράσης είναι τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια.



Εικόνα 7.18 Μια ελικάση του DNA, ενώ ξετυλίγει μια διπλή έλικα. Η εικόνα αυτή είναι μια προσαρμογή που βασίστηκε στην εργασία του Smīta S. Patel. Απεικονίζει ένα μοντέλο μιας ελικάσης του DNA που αποτελείται από πολλές υπομονάδες και κινείται κατά μήκος του DNA. Η ιδιαιτερότητα αυτής της εικόνας, σε σχέση με τις Εικόνες 7.17, 7.19, και 7.21, είναι ότι εδώ τα μόρια της πρωτεΐνης και του DNA είναι σχεδιασμένα στην ίδια κλίμακα. Πολλά απλά σχήματα χρησιμοποιούνται συχνά για να δώσουν μια εικόνα των μοριακών συμβάντων στο κύτταρο, αλλά συχνά δημιουργούν την λανθασμένη εντύπωση ότι οι πρωτεΐνες έχουν σχετικά μικρό μέγεθος σε σύγκριση με το DNA. Αυτό το σχηματικό μοντέλο παρουσιάζει την κατάσταση διαφορετικά.

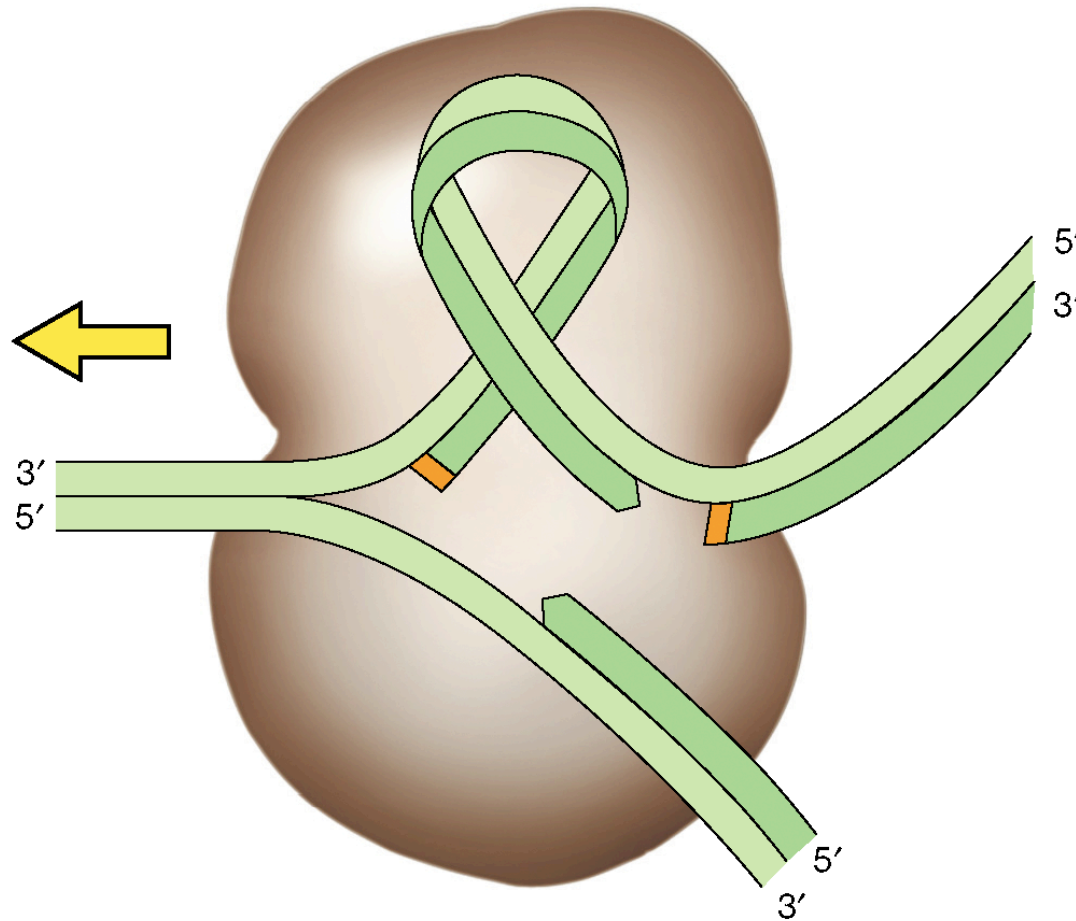


Εικόνα 7.19 Η συνένωση δύο τμημάτων DNA στην υστερούσα αλυσίδα. (α) Η DNA πολυμεράση III συνθέτει το DNA στην υστερούσα αλυσίδα, στην κατεύθυνση 5' → 3', προς έναν εκκινήτη από RNA ενός άλλου, ήδη συντεθέντος τμήματος της αλυσίδας αυτής. (β) Με την άφιξη της DNA πολυμεράσης III στην αρχή του εκκινήτη, αυτή αντικαθίσταται από την DNA πολυμεράση I. (γ) Η DNA πολυμεράση I συνεχίζει τη σύνθεση του DNA, ενώ ταυτοχρόνως αποικοδομεί τον εκκινήτη του προηγούμενου τμήματος. (δ) Η DNA λιγάση αντικαθιστά την DNA πολυμεράση I μετά την απομάκρυνση του εκκινήτη. (ε) Η DNA λιγάση συνενώνει τα δύο τμήματα.

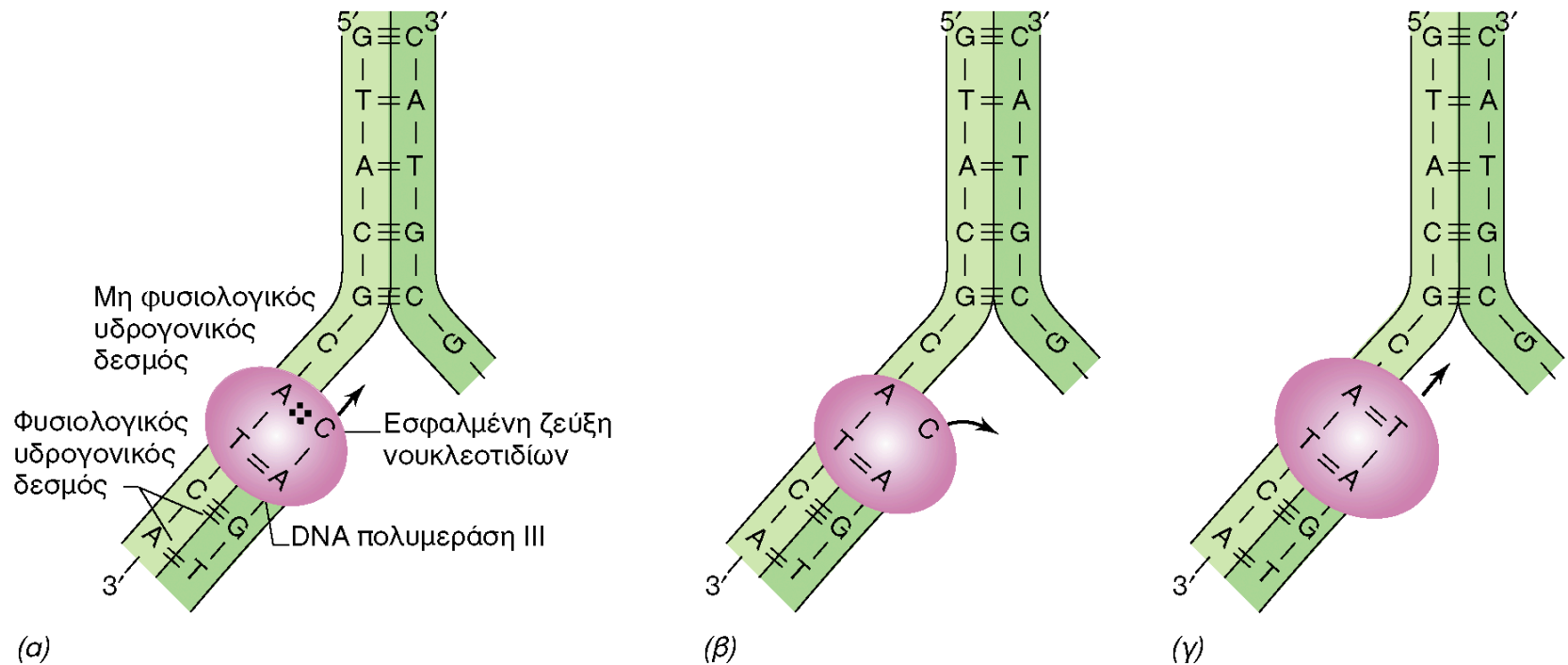


Εικόνα 7.20 Σε κάθε περιοχή έναρξης στην οποία η αντιγραφή επιτελείται σε διπλή κατεύθυνση πρέπει να σχηματισθούν δύο διχάλες αντιγραφής. Συνεπώς, πρέπει να συντεθούν εκκινητές για δύο ηγούμενες αλυσίδες, μία ανά κατεύθυνση.

Αντιγραφόσωμα



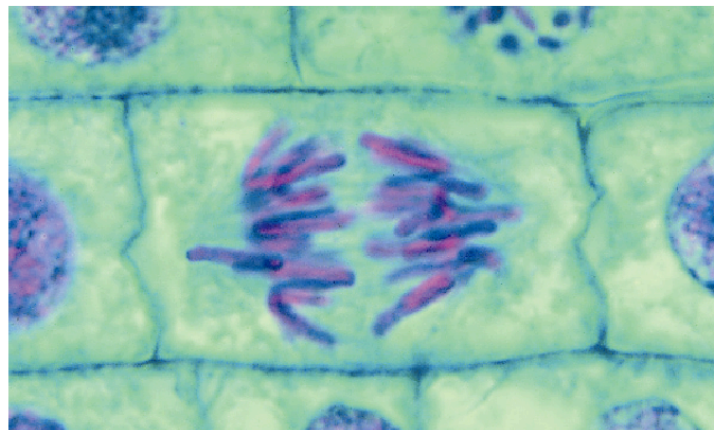
Εικόνα 7.21 Η φαινομενική κίνηση του αντιγραφοσώματος, ενός συμπλόκου αποτελούμενου από πρωτεΐνες και ένζυμα, το οποίο συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA, πάνω στη διπλή έλικα. Όλες οι αντιδράσεις που παρουσιάζονται στην Εικόνα 7.17 λαμβάνουν όντως χώρα, αλλά ο σχηματισμός της «θηλειάς» επιτρέπει στο σύμπλοκο, να κινείται προς τα εμπρός με ευχέρεια στην περιοχή της δικάλας αντιγραφής.



Εικόνα 7.22 Διορθωτική ανάγνωση μέσω της δράσης της ενεργότητας εξωνουκλεάσης 3' → 5' της DNA πολυμεράσης III. (α) Η εσφαλμένη ζεύξη βάσεων του τελευταίου ζεύγους προκαλεί την προσωρινή στάση της πολυμεράσης. Αυτό αποτελεί σήμα για την ενεργότητα της διορθωτικής ανάγνωσης (β) να αποκόψει το εσφαλμένο νουκλεοτίδιο, και κατόπιν (γ) να ενσωματώσει την ορθή βάση μέσω της ενεργότητας πολυμεράσης.



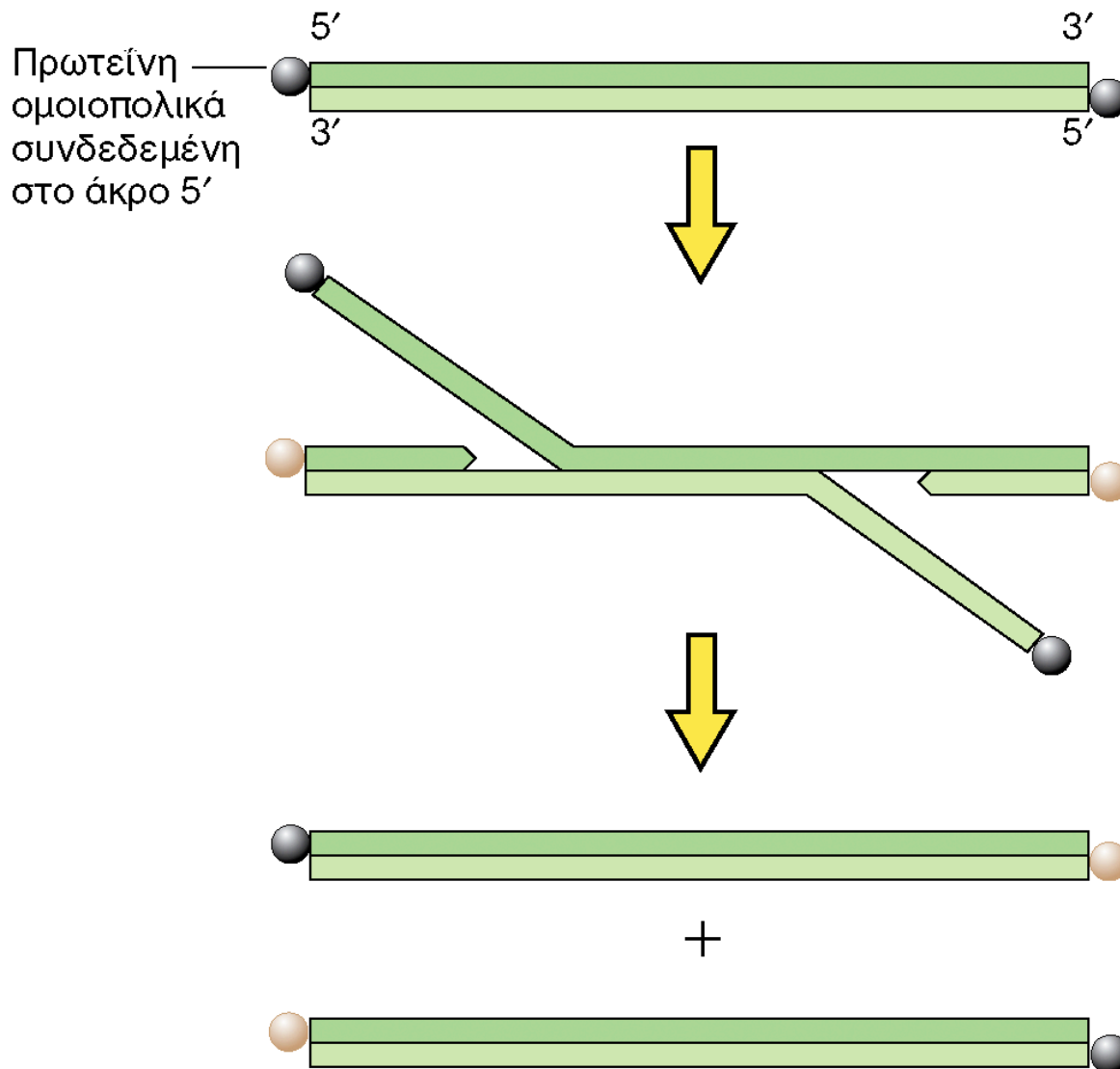
(a)



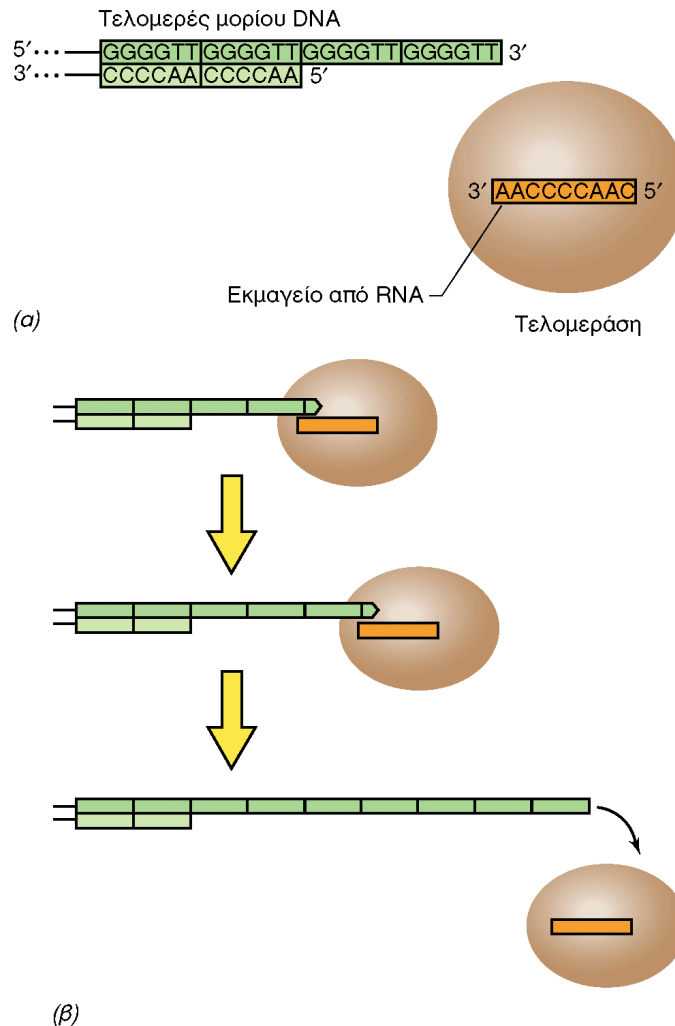
(β)

Carolina Biological Supply Co.

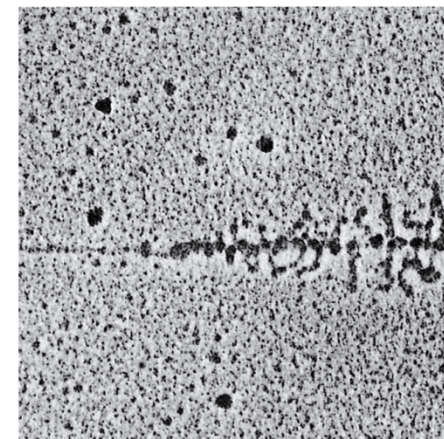
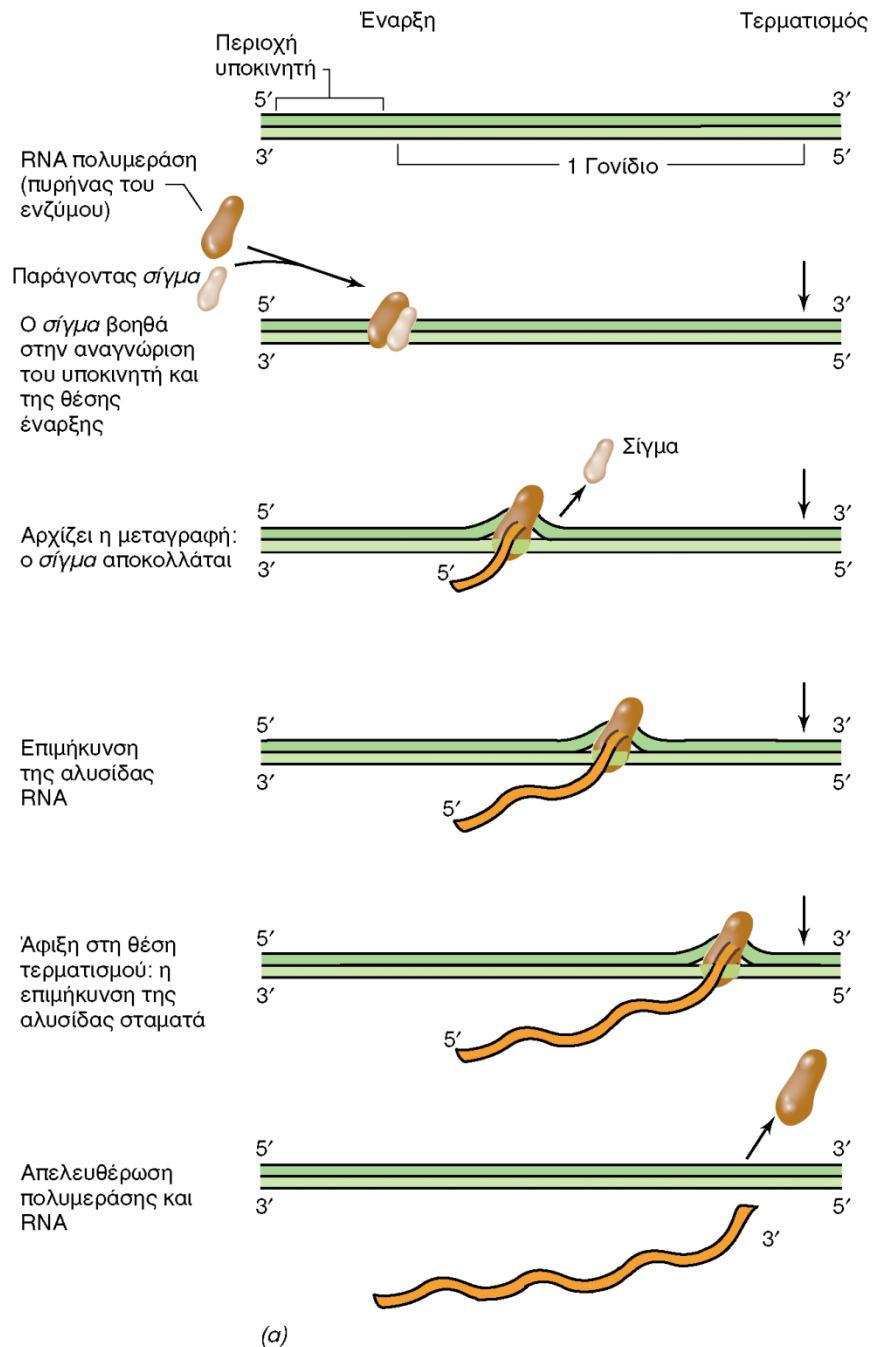
Εικόνα 7.23 Η μίτωση, όπως παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο. Απεικονίζονται κύτταρα ριζών κρεμμυδιού που έχουν υποστεί χρώση, ώστε να καταστούν ορατά τα νουκλεϊκά οξέα και τα χρωμοσώματα. (a) Μετάφαση. Τα χρωμοσώματα βρίσκονται ζευγαρωμένα στο κέντρο του κυττάρου. (β) Ανάφαση. Τα χρωμοσώματα διαχωρίζονται.



Εικόνα 7.24 Η αντιγραφή του γραμμικού DNA με τη χρήση πρωτεϊνικών εκκινητών. Στις νέες αλυσίδες του DNA δίνεται εκκίνηση από πρωτεΐνες που παραμένουν ομοιοπολικά δεσμευμένες στα άκρα 5'.

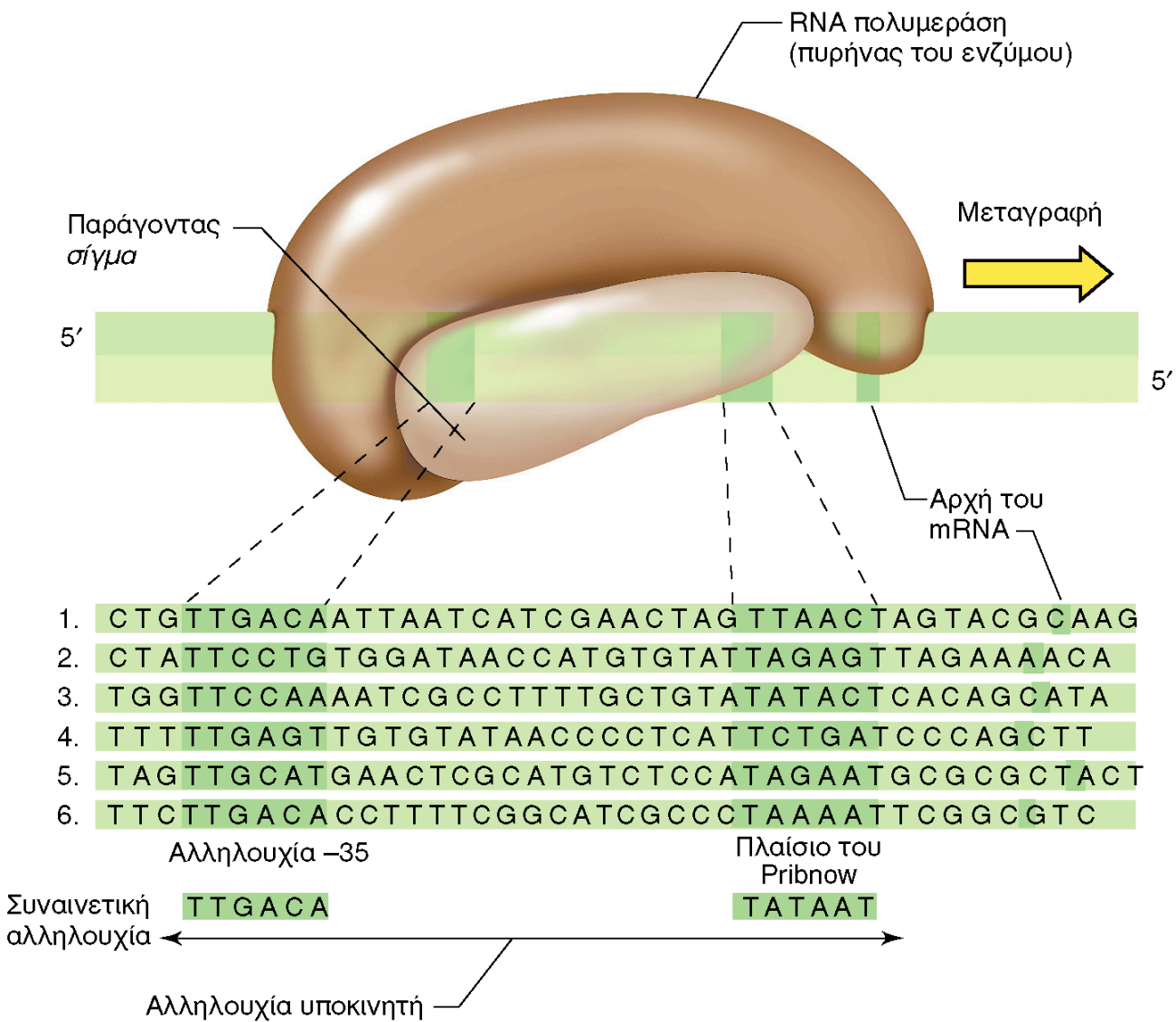


Εικόνα 7.25 Ένα μοντέλο για τη δράση της τελομεράσης στο ένα άκρο ευκαρυωτικού χρωμοσώματος. (α) Σχηματική αναπαράσταση της αλληλουχίας των βάσεων του άκρου του DNA ενός τελομερούς, με τέσσερις επαναλήψεις πλούσιες σε γουανίνη, και το ένζυμο τελομεράση, το οποίο περιέχει ένα μικρό εκμαγείο από RNA. (β) Τα στάδια επιμήκυνσης της πλούσιας σε γουανίνη αλυσίδας, που καταλύονται από την τελομεράση. Όταν ολοκληρωθεί η δράση της τελομεράσης, μπορεί να λάβει χώρα η εκκίνηση της υστερούσας αλυσίδας από την πριμάση (δεν φαίνεται στο σχήμα) μέσω ενός εκκινητή από RNA και να ολοκληρωθεί η σύνθεση της αλυσίδας αυτής, μέσω της δράσης των ενζύμων DNA πολυμεράση και DNA λιγάση.

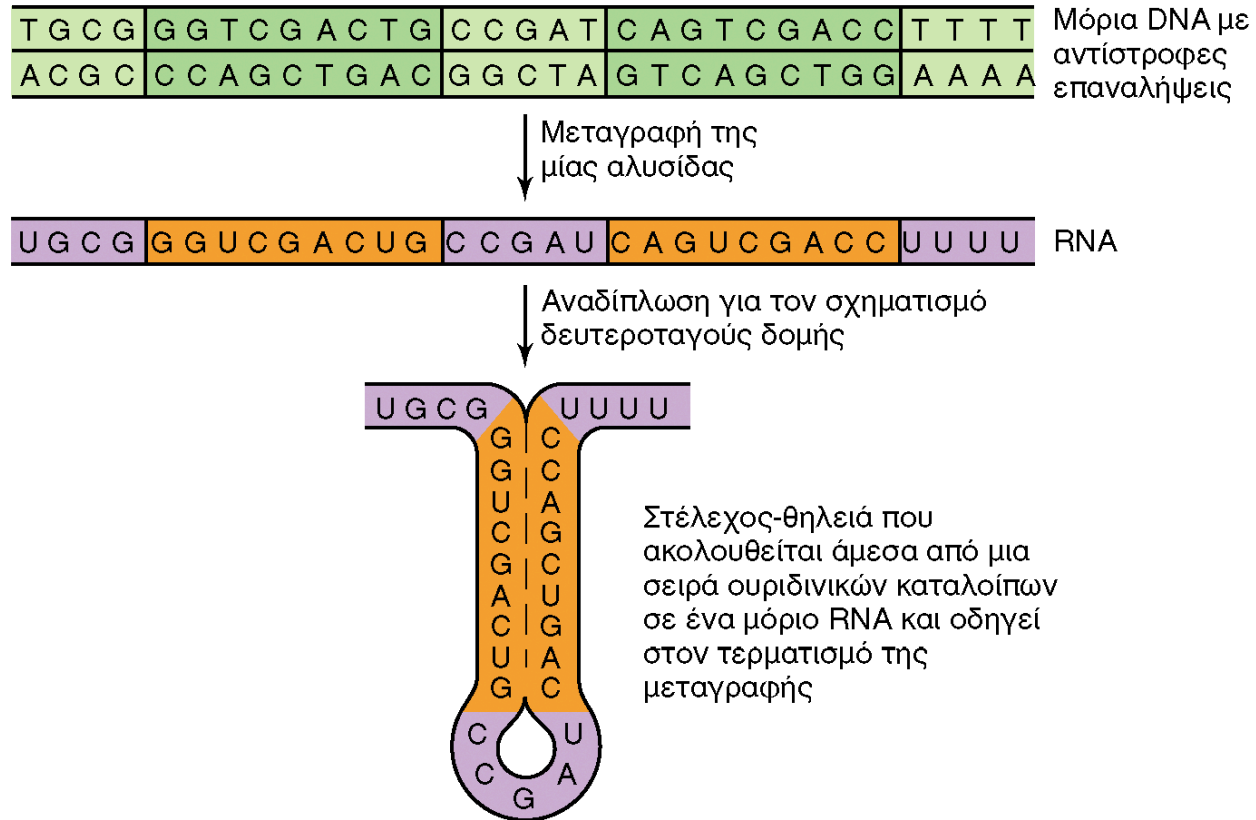


(β)

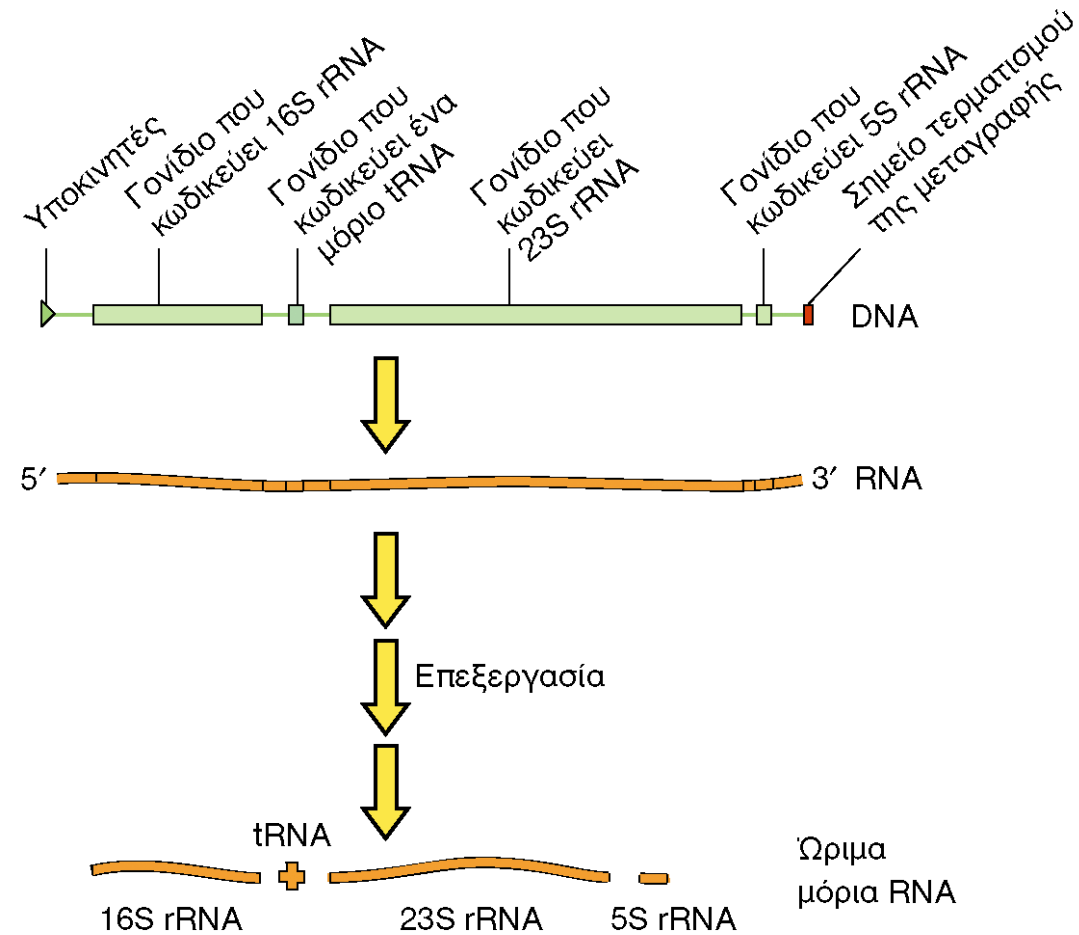
Εικόνα 7.26 Μεταγραφή. (α) Τα στάδια της σύνθεσης του RNA. Οι θέσεις έναρξης και τερματισμού είναι ειδικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων πάνω στο DNA. Ο παράγοντας *σίγμα* επιτρέπει στην RNA πολυμεράση να αναγνωρίσει τη θέση έναρξης (τον υποκινητή). Ο παράγοντας *σίγμα* διίσταται στην πορεία της επιμήκυνσης. Η RNA πολυμεράση κινείται κατά μήκος της αλυσίδας του DNA, προκαλώντας παροδική διάνοιξη της διπλής έλικας και μεταγραφή της μίας από τις αλυσίδες του. Όταν η RNA πολυμεράση αφιχθεί σε μια θέση τερματισμού, σταματά η επιμήκυνση της αλυσίδας και απελευθερώνονται τα mRNA και η RNA πολυμεράση. (β) Ηλεκτρονικό μικρογράφημα μεταγραφής που λαμβάνει χώρα κατά μήκος ενός γονιδίου επί του χρωμοσώματος της *Escherichia coli*. Η περιοχή της ενεργούς μεταγραφής πάνω στο DNA έχει μήκος δύο χιλιάδες ζεύγη βάσεων περίπου. Η μεταγραφή οδεύει από τα αριστερά προς τα δεξιά.



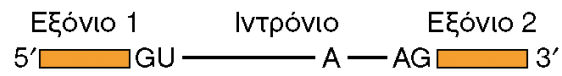
Εικόνα 7.27 Η αλληλεπίδραση της RNA πολυμεράσης με τον υποκινητή. Στο κατώτερο τμήμα του διαγράμματος παρουσιάζονται οι αλληλουχίες έξι διαφορετικών υποκινητών που ταυτοποιήθηκαν στο βακτήριο *Escherichia coli*. Επίσης, παρουσιάζονται οι περιοχές επαφής της RNA πολυμεράσης με την αλληλουχία -35 και το πλαίσιο του Pribnow (αλληλουχία -10). Η μεταγραφή αρχίζει από μία και μοναδική βάση μερικά νουκλεοτίδια μετά το πλαίσιο του Pribnow. Κάτω από τις αλληλουχίες της περιοχής -35 και του πλαισίου του Pribnow των έξι υποκινητών βρίσκονται οι συναινετικές αλληλουχίες, που προέρχονται από τη σύγκριση αλληλουχιών πολλών διαφορετικών υποκινητών.



Εικόνα 7.28 Οι αντίστροφες επαναλήψεις στο μεταγραφόμενο DNA έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας δομής στέλεχος-θηλειάς στο RNA, που μπορεί να οδηγήσει στον τερματισμό της μεταγραφής.

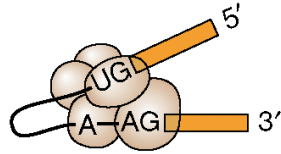


Εικόνα 7.29 Μια μεταγραφική μονάδα ριβοσωματικού rRNA ενός *Βακτηρίου*. Αυτός ο τύπος μεταγραφικής μονάδας ονομάζεται «οπερόνιο του rRNA». Στα *Βακτήρια*, όλα αυτά τα οπερόνια περιέχουν τα γονίδια των rRNA με την ακόλουθη σειρά: 16S rRNA, 23S rRNA, και 5S rRNA (παρουσιάζονται στην ίδια περίπου κλίμακα). Σημειώστε ότι στο συγκεκριμένο οπερόνιο, το «ενδιάμεσο DNA» μεταξύ των γονιδίων των rRNA 16S και 23S περιέχει ένα γονίδιο tRNA. Σε άλλα οπερόνια μπορεί η περιοχή αυτή να περιέχει περισσότερα του ενός γονίδια tRNA, ενώ συχνά το γονίδιο του 5S rRNA ακολουθείται από ένα ή περισσότερα γονίδια tRNA, τα οποία και συμμεταγράφονται. Η *Escherichia coli* περιέχει επτά τέτοια οπερόνια. Οι αντίστοιχες μεταγραφικές μονάδες των ευκαρυωτών δεν περιέχουν γονίδια μη ριβοσωματικών RNA.



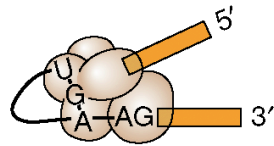
(α)

↓ Συγκρότηση
 συρραπτοσώματος



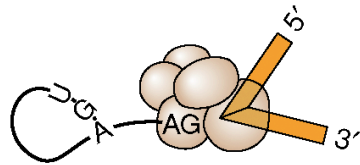
(β)

↓ Κοπή της θέσης συρραφής
 5', σχηματισμός βρόχου

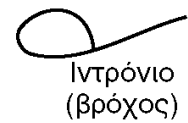


(γ)

↓ Κοπή της θέσης συρραφής
 3', σύνδεση των εξονίων

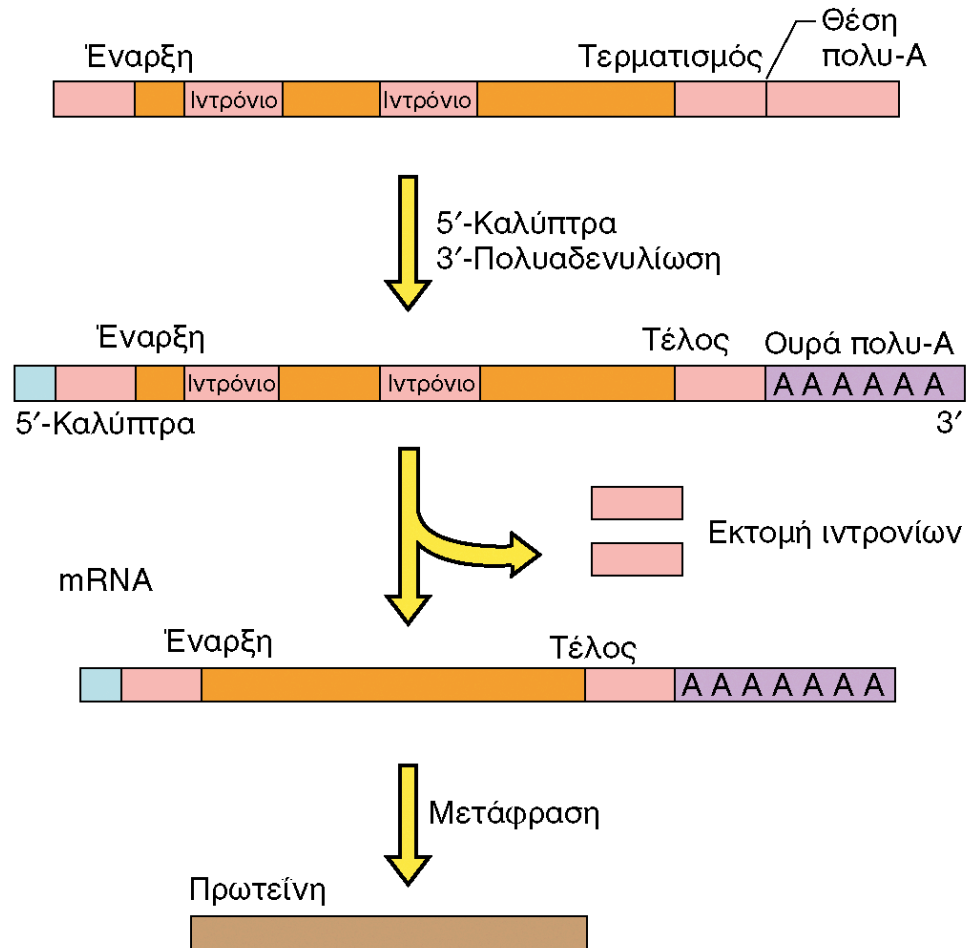


(δ)

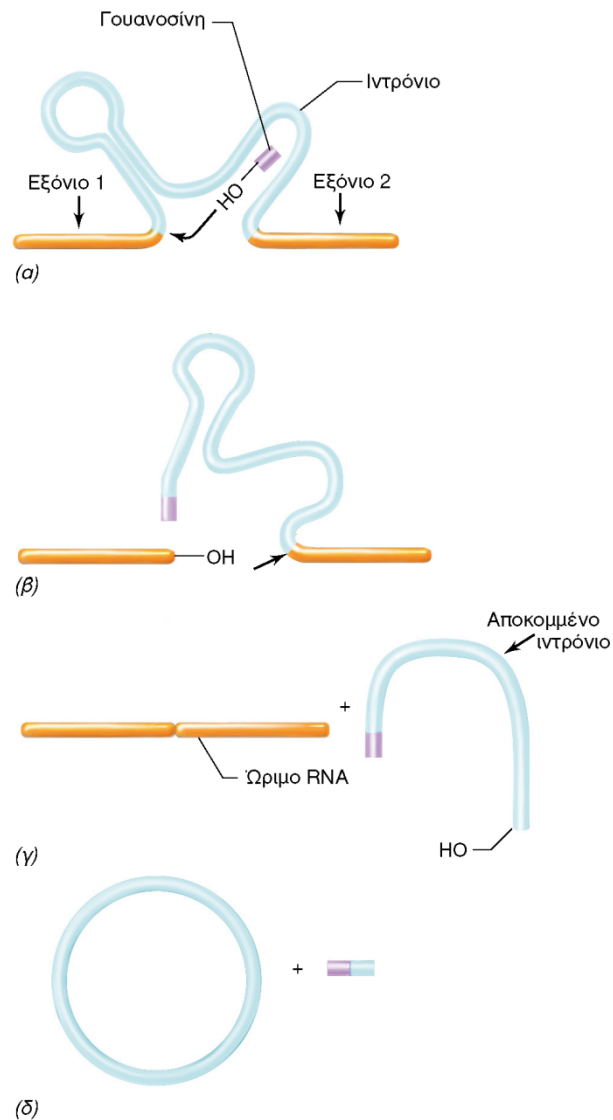


(ε)

Προ-mRNA (πρωτογενές μεταγράφημα)



Εικόνα 7.31 Επισκόπηση της επεξεργασίας του προ-mRNA σε ώριμο mRNA, σε έναν ευκαρυώτη. Τα στάδια της επεξεργασίας περιλαμβάνουν την προσθήκη καλύπτρας στο άκρο 5', την απομάκρυνση των ιντρονίων, και την κοπή του άκρου 3' του μεταγραφήματος, ενώ προστίθεται μια ουρά πολυ-A. Όλα αυτά τα στάδια λαμβάνουν χώρα στον πυρήνα. Υποδεικνύεται επίσης η θέση των κωδικονίων έναρξης και τερματισμού, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια κατά τη μετάφραση.



Εικόνα 7.32 Το αυτοσυρραπτόμενο ριβοενζυμικό ιντρόνιο του πρωτοζώου *Tetrahymena*. Τα μόρια αυτά εμφανίζουν σημαντική δευτεροταγή δομή, η οποία έχει κείρια σημασία για την αντίδραση. (α) Ένα πρόδρομο μόριο ριβοσωματικού RNA περιέχει ένα ιντρόνιο μήκους 413 νουκλεοτιδίων. (β) Μετά την προσθήκη ενός γουανοσινικού νουκλεοζίτι, το ιντρόνιο αποκόπτει τον εαυτό του και συνενώνει τα δύο εξόνια. (γ) Η εκτομή του ιντρονίου έχει ολοκληρωθεί. (δ) Το ιντρόνιο κυκλοποιείται με ταυτόχρονη απώλεια ενός τμήματος μήκους 15 νουκλεοτιδίων.