

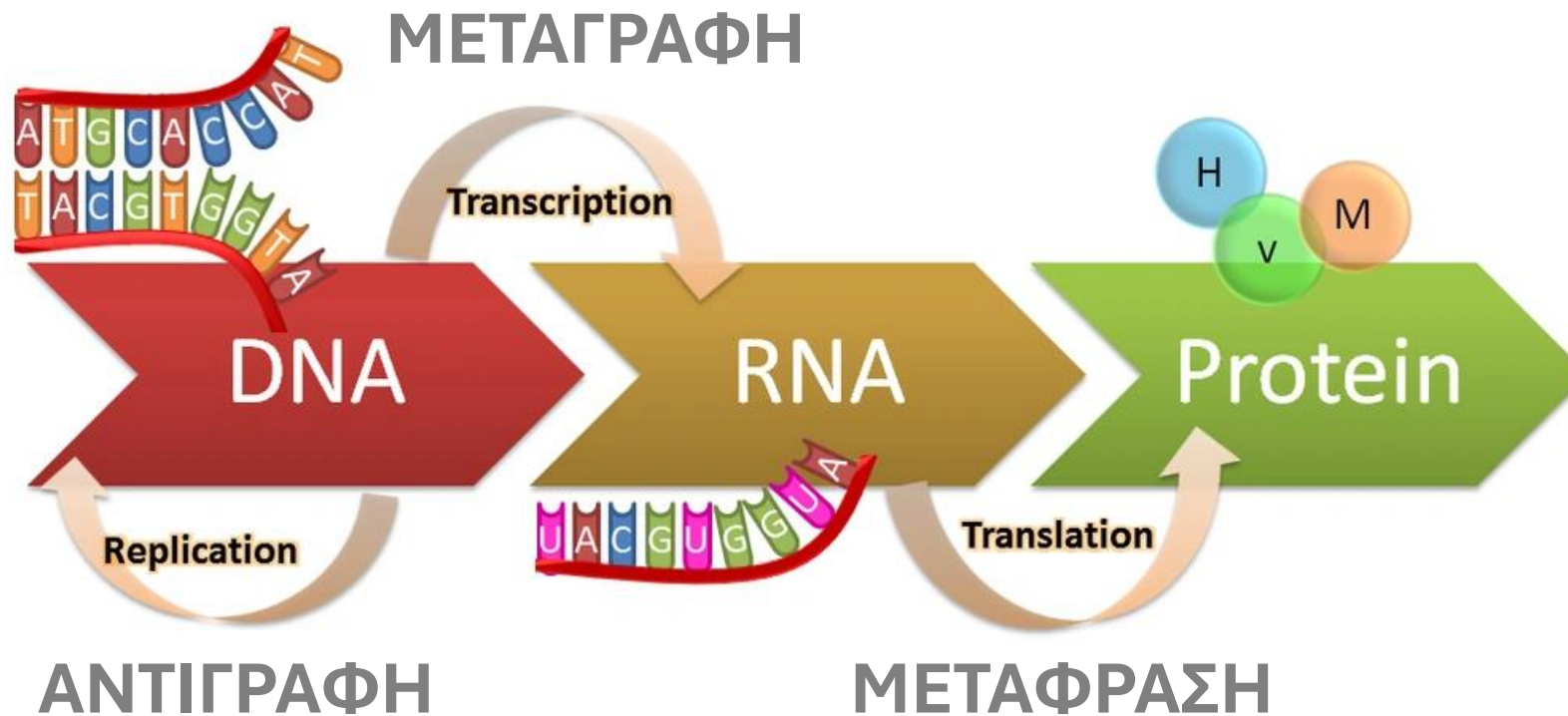


Βιοτεχνολογία

Παναγιώτα Σταθοπούλου
Επίκουρη Καθηγήτρια
panstath@upatras.gr

Εύα Διονυσοπούλου
ΕΔΙΠ Βιολογίας
edionys@upatras.gr

Κεντρικό Δόγμα Βιολογίας



“one gene-one protein”
«ένα γονίδιο-μία πρωτεΐνη»

Κεντρικό Δόγμα Βιολογίας

ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ

Μεταβίβαση γενετικής πληροφορίας από ένα κύτταρο στα θυγατρικά του και από έναν οργανισμό στους απογόνους του

Διαιωνίζεται η γενετική πληροφορία

Γονιδιακή Έκφραση

ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

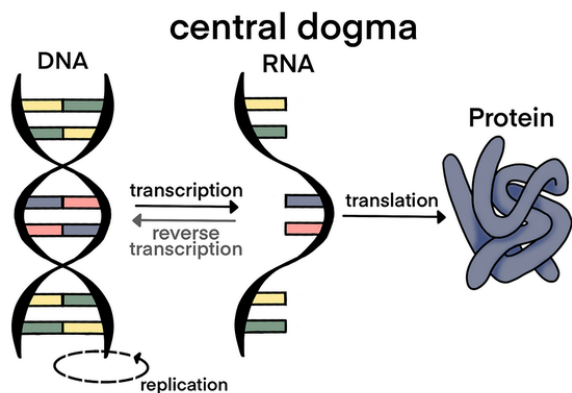
Η διαδικασία μεταφοράς της γενετικής πληροφορίας από το DNA στο RNA προκειμένου αυτή να εκφραστεί

Καθορίζει ποια γονίδια θα εκφραστούν, σε ποιους ιστούς (πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί) και σε ποια στάδια της ανάπτυξης

ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Η διαδικασία μεταφοράς της γενετικής πληροφορίας από το RNA στις πρωτεΐνες που ευθύνονται για τη δομή και λειτουργία των κυττάρων και κατ' επέκταση και των οργανισμών

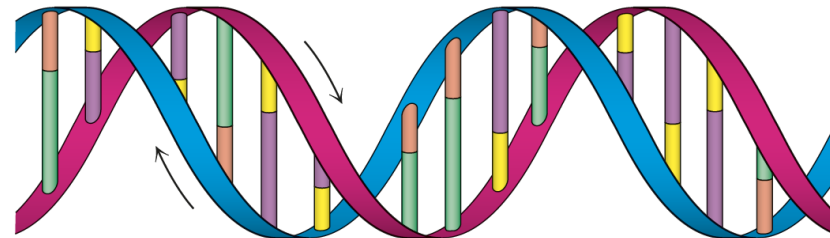
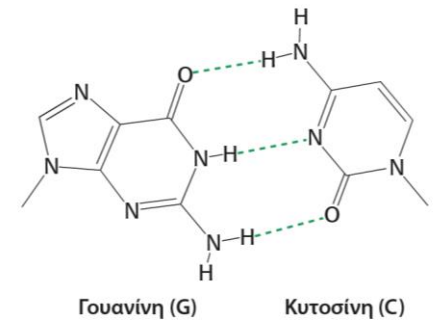
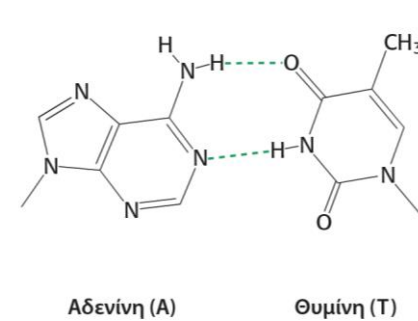
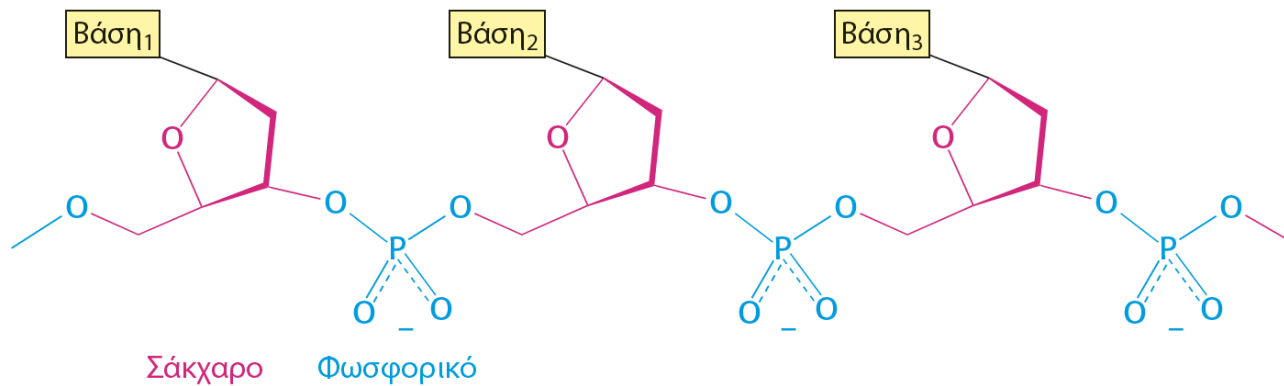
Χρήση της γενετικής πληροφορίας για κατασκευή πολυπεπτιδίου (πρωτεΐνης)



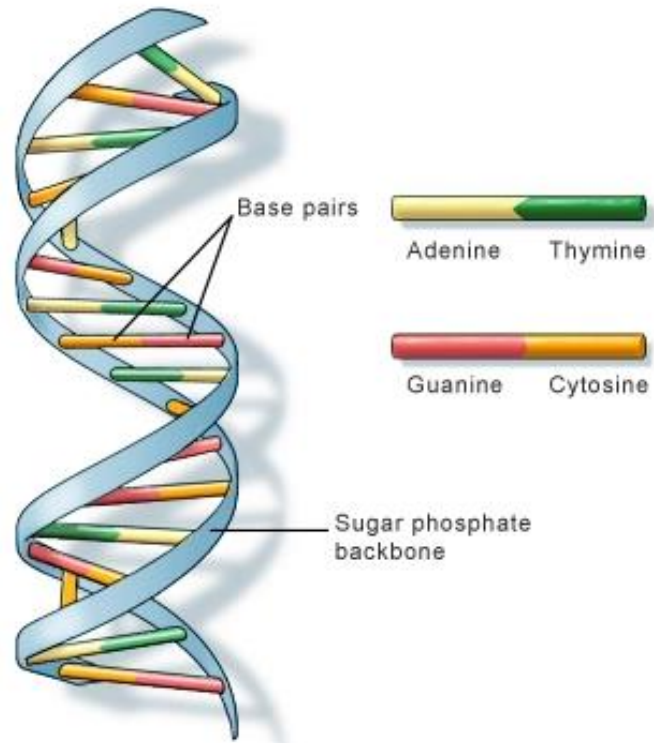
Δομή DNA

Ένα μόριο DNA αποτελείται από 2 συμπληρωματικές πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες

4 είδη νουκλεοτιδίων: A (αδενίνη), T (θυμίνη), G (γουανίνη), C (κυτοσίνη)



Δομή DNA

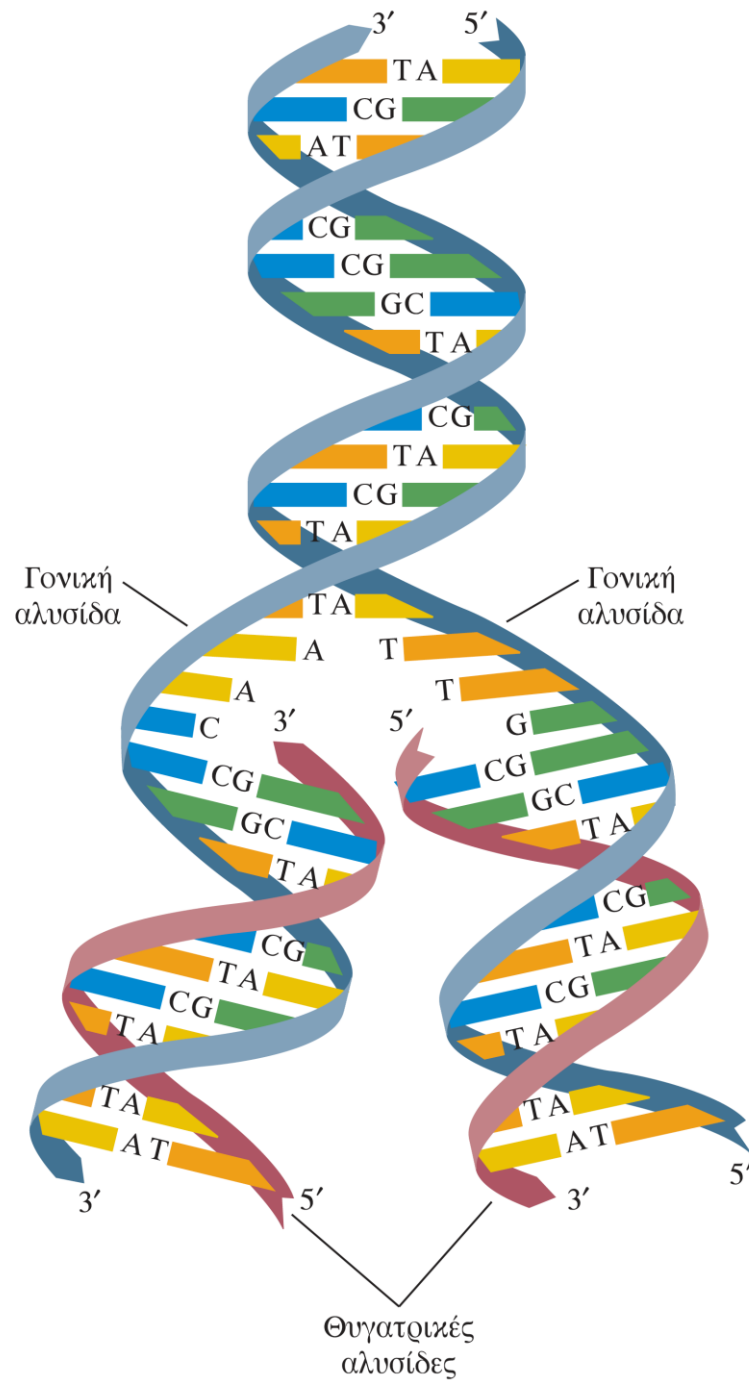


Η ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΜΙΑ ΑΛΥΣΙΔΑ
ΚΑΘΟΡΙΖΕΙ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ
ΣΤΗΝ ΑΛΛΗ

Κάθε αλυσίδα λειτουργεί ως εκμαγείο για την
δημιουργία της άλλης

Η αντιγραφή του DNA

Δημιουργία δύο θυγατρικών μορίων με την ίδια γενετική πληροφορία με το αρχικό



**Το μοντέλο αντιγραφής του DNA των
Watson και Crick**

Η αντιγραφή του DNA

3 μοντέλα

(α) Ημισυντηρητική αντιγραφή

Γονικό DNA



Θυγατρικό DNA



Κάθε θυγατρικό μόριο αποτελείται από έναν συντηρημένο (γονικό) κλώνο DNA και έναν νεοσυντεθειμένο κλώνο DNA.

(β) Συντηρητική αντιγραφή



Το ένα θυγατρικό μόριο αποτελείται από δύο συντηρημένους (γονικούς) κλώνους DNA, ενώ το άλλο από δύο νεοσυντεθειμένους κλώνους.

(γ) Διάσπαρτη αντιγραφή



Κάθε αλυσίδα των θυγατρικών μορίων αποτελείται από διάσπαρτα τμήματα γονικού και νεοσυντεθειμένου DNA

Η αντιγραφή του DNA

Το πείραμα των **Meselson-Stahl** που έδειξε πως το DNA αντιγράφεται ημισυντηρητικά

Γενιές 0

Βακτήρια *E. coli* καλλιεργήθηκαν για αρκετές γενιές σε θρεπτικό μέσο που περιείχε $[^{15}\text{N}]\text{NH}_4\text{Cl}$ ως μοναδική πηγή αζώτου, ώστε οι βάσεις του DNA να σημανθούν ομοιόμορφα με το βαρύ ισότοπο ^{15}N .

Γενιά 1

Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε ένα νέο θρεπτικό μέσο που περιείχε $[^{14}\text{N}]\text{NH}_4\text{Cl}$.

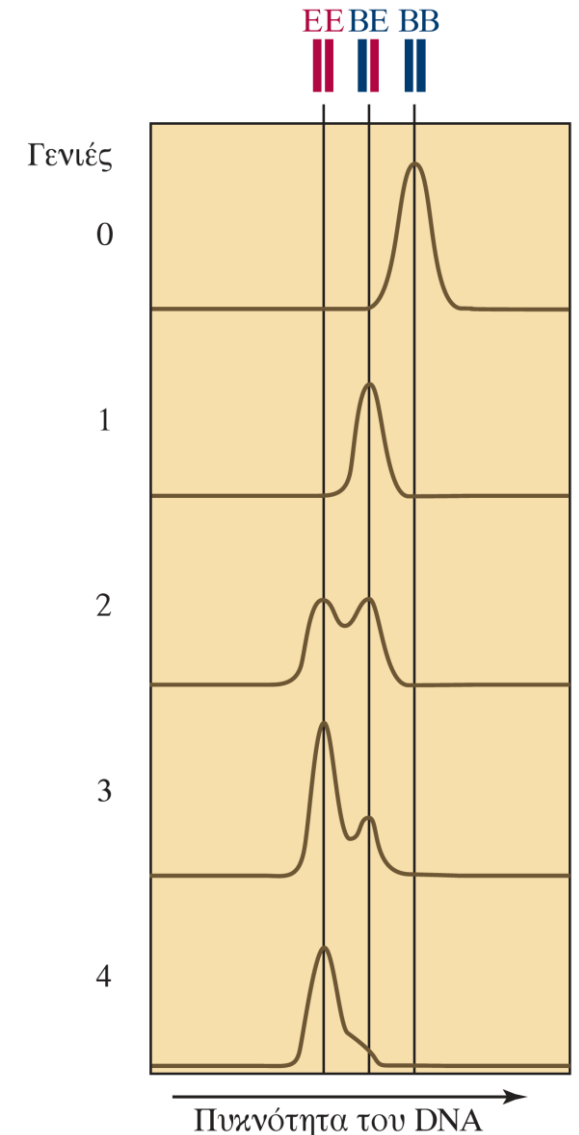
«Γενιές»

Αριθμός των γενεών που μεσολάβησαν μετά τη μεταφορά των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιείχε $[^{14}\text{N}]\text{NH}_4\text{Cl}$

- Φυγοκέντριση ισορροπίας σε διαβάθμιση πυκνότητας χλωριούχου καισίου.
- Τα γραφήματα δείχνουν την πυκνότητα DNA σε κάθε γενιά.

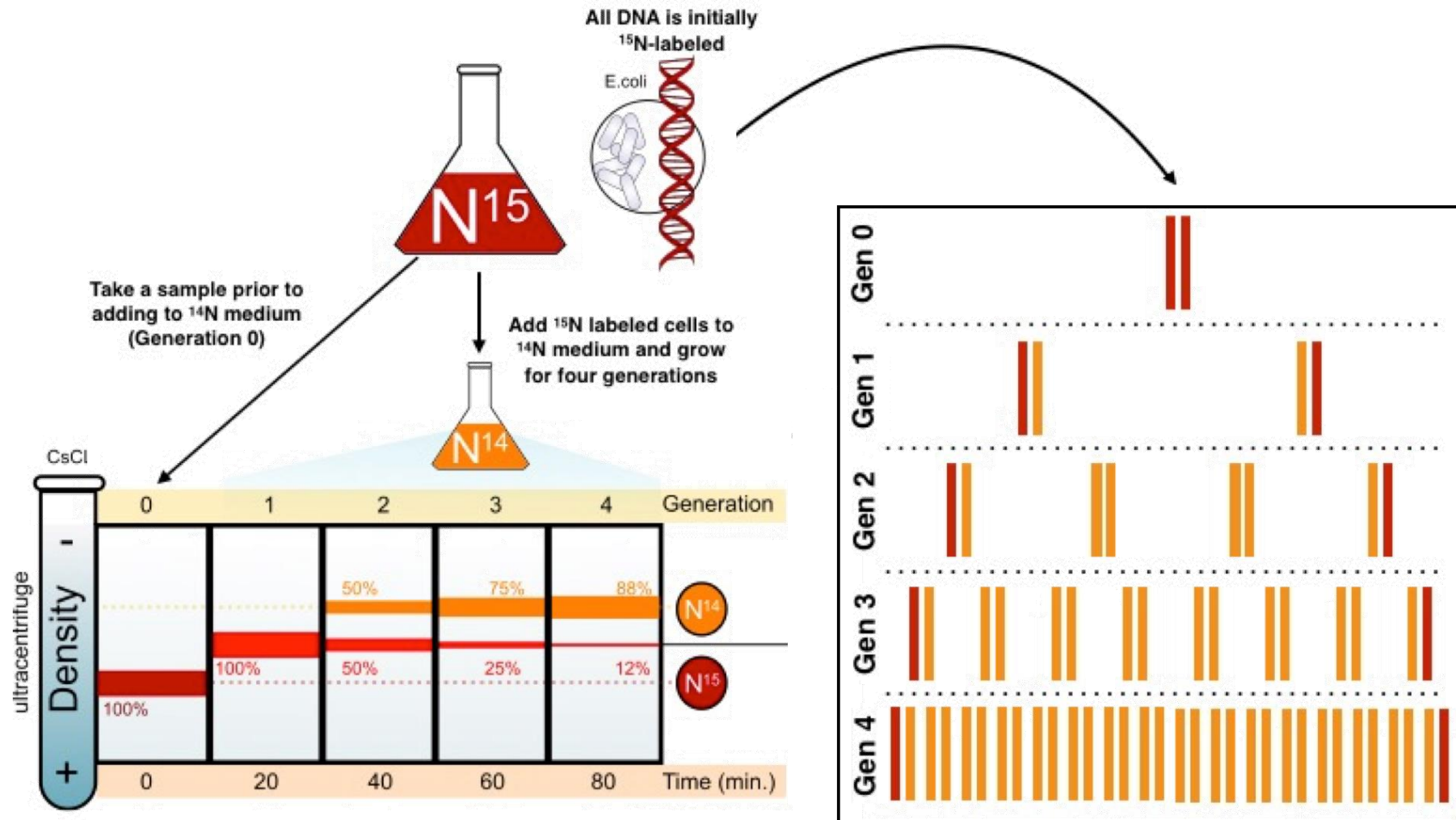
B: «βαριά» αλυσίδα DNA (σημασμένη με ^{15}N).

E: «ελαφριά» αλυσίδα DNA (σημασμένη με ^{14}N)



Η αντιγραφή του DNA

Το πείραμα των **Meselson-Stahl** που έδειξε πως το DNA αντιγράφεται ημισυντηρητικά



Η αντιγραφή του DNA

Ημι-συντηρητικός τρόπος αντιγραφής

Διαδικασία:

1. Διαχωρισμός αλυσίδων DNA
2. Κάθε αλυσίδα λειτουργεί σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας νέας συμπληρωματικής αλυσίδας
3. Ακριβής διαδικασία
4. 1/100.000 βάσεις μπορεί να ενσωματωθεί λάθος
5. Επιδιόρθωση λαθών από ειδικούς μηχανισμούς.

Αποτέλεσμα: παραγωγή δύο διπλών αλυσίδων DNA

Το κάθε δίκλωνο μόριο DNA αποτελείται από 1 παλιά και 1 νέα αλυσίδα



Meselson, Stahl,
and the Replication
of DNA

A HISTORY OF
"THE MOST BEAUTIFUL EXPERIMENT IN BIOLOGY"

Frederic Lawrence Holmes

Η αντιγραφή του DNA

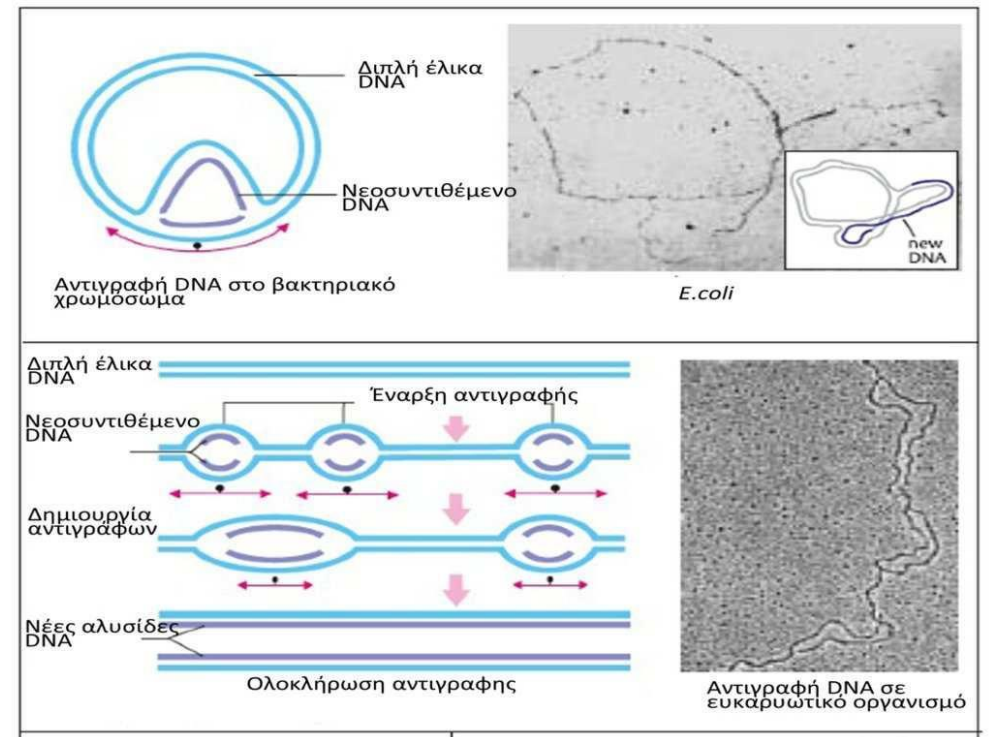
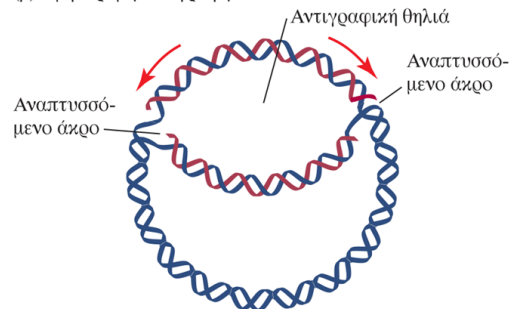
Σημεία έναρξης της αντιγραφής

Η αντιγραφή του DNA αρχίζει από καθορισμένα σημεία που ονομάζονται **θέσεις έναρξης της αντιγραφής**.

Το **βακτηριακό DNA** έχει μόνο **μία θέση έναρξης**. Αντίθετα κάθε **χρωμόσωμα** έχει **πολυάριθμες θέσεις έναρξης**.

Η αντιγραφή του βακτηριακού και ευκαρυωτικού DNA είναι **αμφίδρομη**

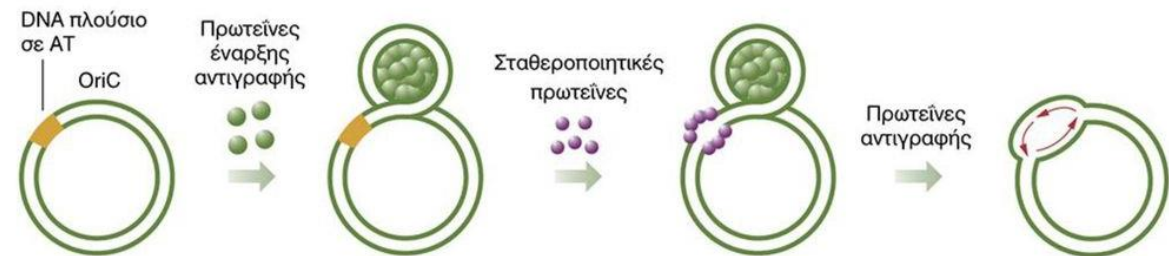
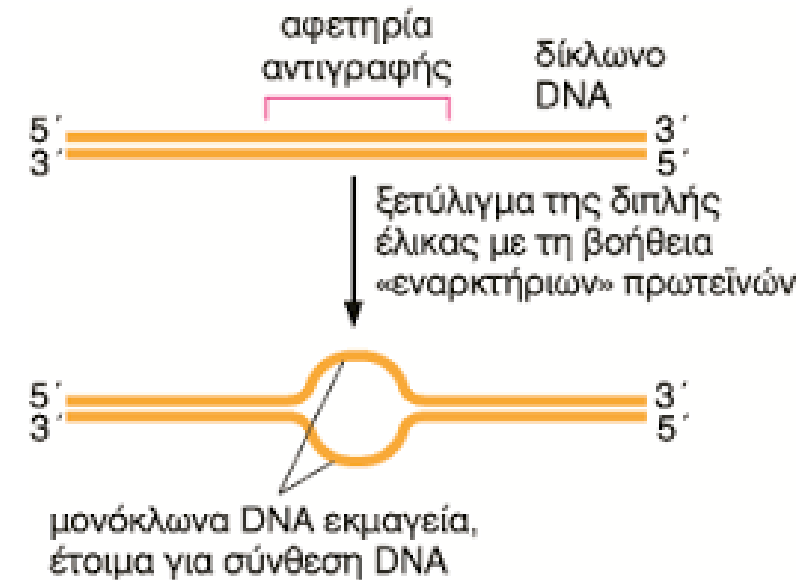
(β) Αμφίδρομη αντιγραφή



Η αντιγραφή του DNA

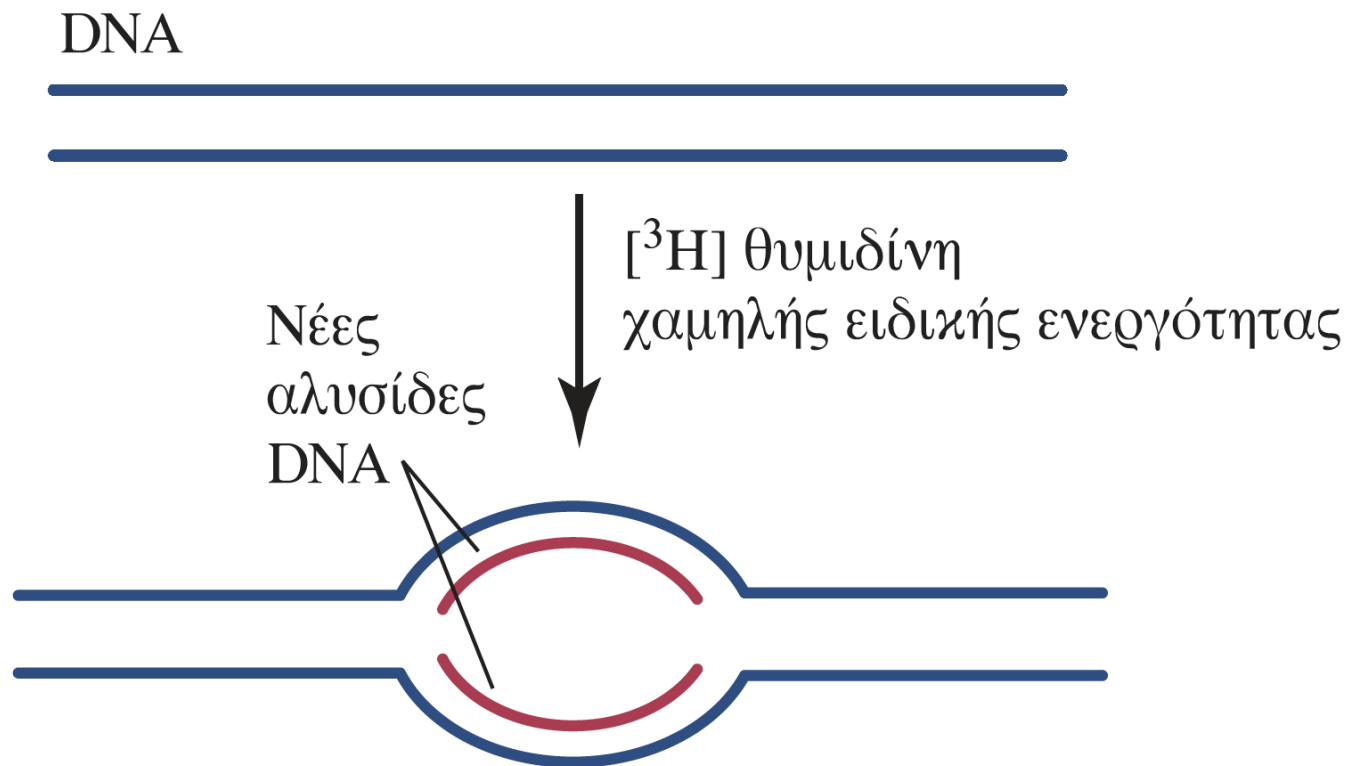
Σημεία έναρξης της αντιγραφής

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



Η αντιγραφή του DNA

Το πείραμα που υπέδειξε πως η αντιγραφή του βακτηριακού DNA είναι αμφίδρομη

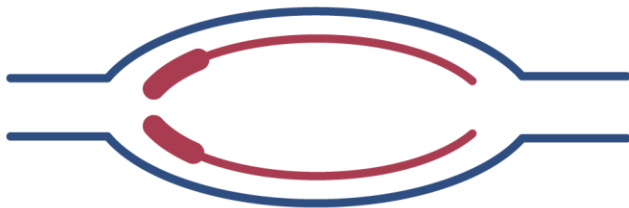


Τα κύτταρα αφέθηκαν να πολλαπλασιαστούν σε μέσο που περιείχε $[^3\text{H}]$ θυμιδίνη με χαμηλή ειδική ενεργότητα, ώστε να σημανθούν ελαφρά οι νέοι κλώνοι στην αντιγραφική θηλιά (λεπτές κόκκινες γραμμές). Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν για μικρό χρονικό διάστημα σε μέσο που περιείχε $[^3\text{H}]$ θυμιδίνη υψηλής ειδικής ενεργότητας.

Η αντιγραφή του DNA

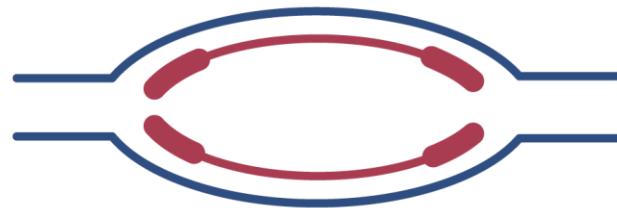
Το πείραμα που υπέδειξε πως η αντιγραφή του βακτηριακού DNA είναι αμφίδρομη

[³H] θυμιδίνη
υψηλής ειδικής
ενεργότητας



(α) Αναμενόμενο αποτέλεσμα στην περίπτωση αντιγραφής μονής κατεύθυνσης

[³H] θυμιδίνη
υψηλής ειδικής
ενεργότητας



(β) Αναμενόμενο αποτέλεσμα στην περίπτωση αμφίδρομης αντιγραφής

(α) Αν η αντιγραφή είναι μονόδρομη, καθένα από τα δύο ελαφρά σημασμένα τμήματα των νεοσυντιθέμενων κλώνων θα πρέπει να ακολουθείται από ένα έντονα σημασμένο τμήμα στην ίδια πλευρά της αντιγραφικής θηλιάς (έντονες κόκκινες γραμμές).

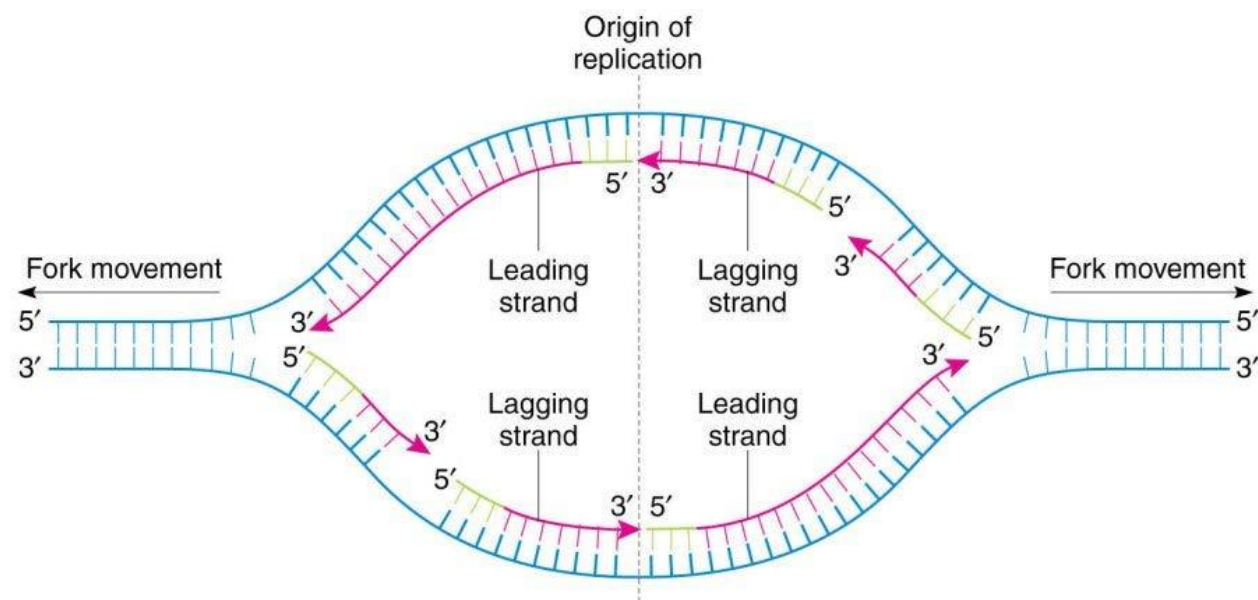
(β) Εφόσον η αντιγραφή είναι αμφίδρομη, καθένα από τα δύο ελαφρά σημασμένα τμήματα των νεοσυντιθέμενων κλώνων θα πρέπει να ακολουθείται από δύο έντονα σημασμένα τμήματα, ένα σε κάθε πλευρά της αντιγραφικής θηλιάς.

Τα πειράματα που έχουν γίνει σε βακτήρια και ευκαρυώτες υποδεικνύουν την ύπαρξη έντονα σημασμένων τμημάτων και στα δύο άκρα της αντιγραφικής θηλιάς, γεγονός που δείχνει ότι η αντιγραφή του DNA είναι αμφίδρομη.

Η αντιγραφή του DNA

Η σύνθεση του DNA πραγματοποιείται στις αντιγραφικές διχάλες (replication fork)

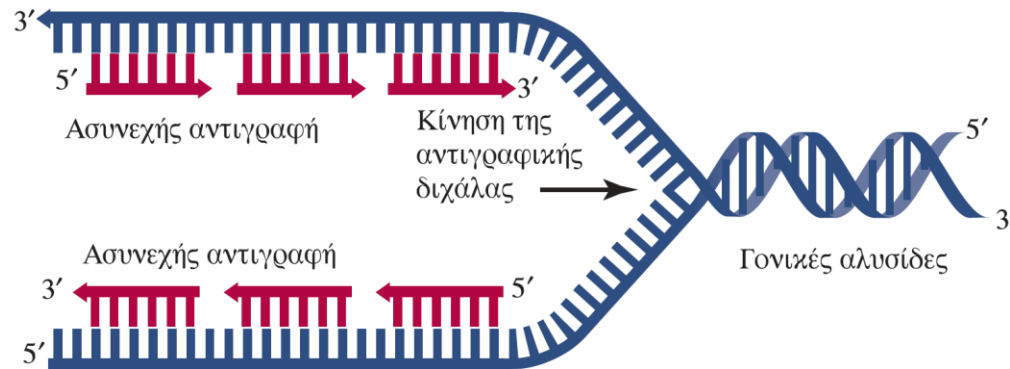
- ✓ Οι διχάλες αντιγραφής (replication forks), έχουν το σχήμα Y
- ✓ Σε κάθε θηλιά υπάρχουν δύο αντιγραφικές διχάλες
- ✓ Η πρωτεϊνική μηχανή μετακινείται κατά μήκος του DNA: ανοίγει τους 2 κλώνους της διπλής έλικας και χρησιμοποιεί τον κάθε κλώνο για τη σύνθεση ενός θυγατρικού κλώνου.
- ✓ Από κάθε αφετηρία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



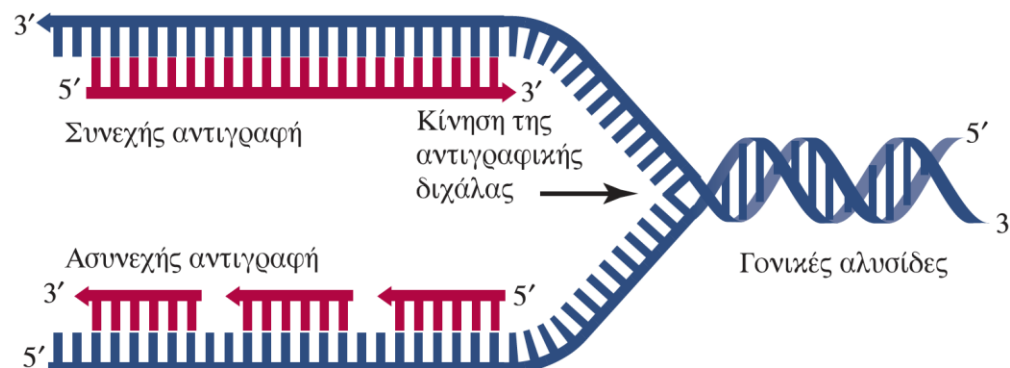
Η αντιγραφή του DNA

Η σύνθεση του DNA πραγματοποιείται στις αντιγραφικές διχάλες (replication fork)

(α) Μοντέλο ασυνεχούς αντιγραφής



(β) Μοντέλο ημισυνεχούς αντιγραφής (υποστηρίζεται από πειραματικά δεδομένα)

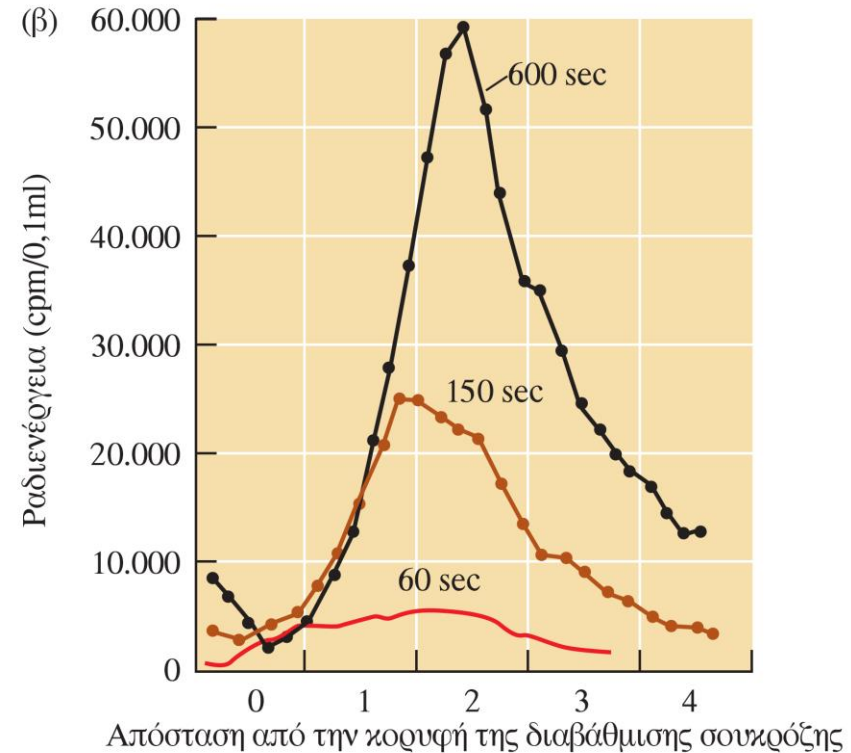
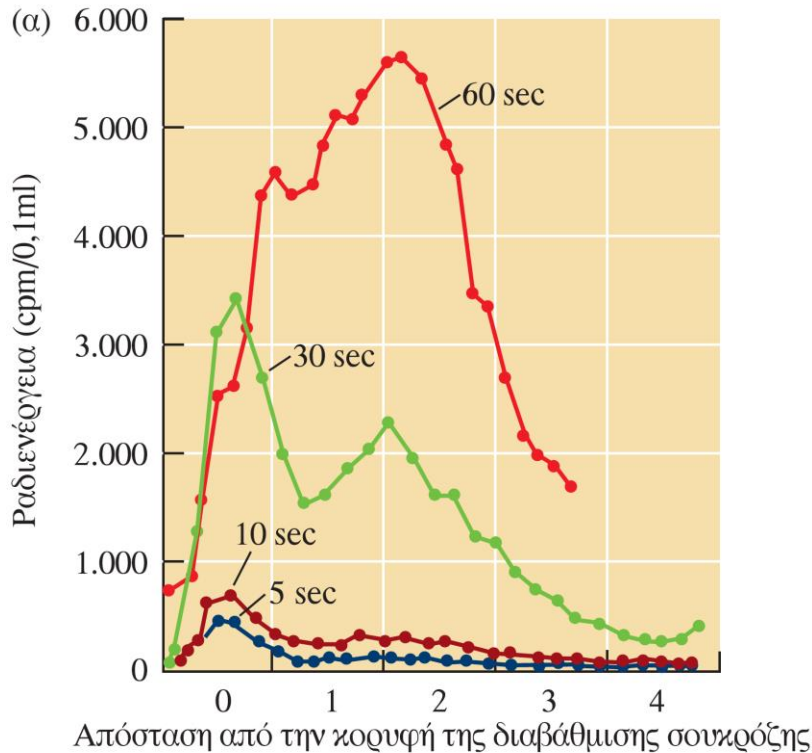


Οι γονικοί κλώνοι αναπαρίστανται με μπλε χρώμα, ενώ οι νεοσυντιθέμενοι με κόκκινο.

Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση (5' → 3') προς την οποία συνθέτει η DNA πολυμεράση.

Η αντιγραφή του DNA

Το πείραμα του Okazaki

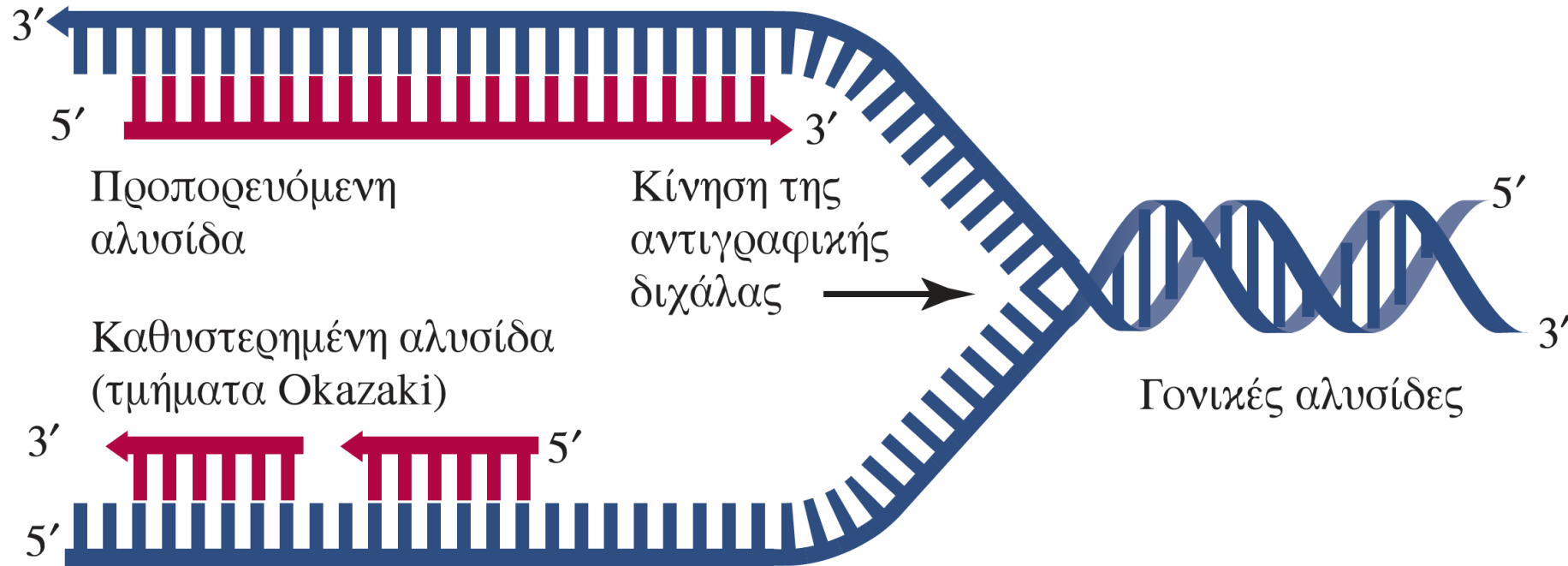


Κύτταρα *E. coli* καλλιεργήθηκαν παρουσία $[^3\text{H}]$ θυμιδίνης στους $20\text{ }^\circ\text{C}$ για τα αναφερόμενα χρονικά διαστήματα και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA και ανάλυσή του σε διαβάθμιση σουκρόζης με αλκαλικό pH.

Οι κλίμακες στον κάθετο άξονα διαφέρουν στα (α) και (β), επειδή ενσωματώθηκε στο DNA περισσότερη ραδιενεργός $[^3\text{H}]$ θυμιδίνη κατά τα μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα επώασης που παρουσιάζονται στο (β).

Η αντιγραφή του DNA

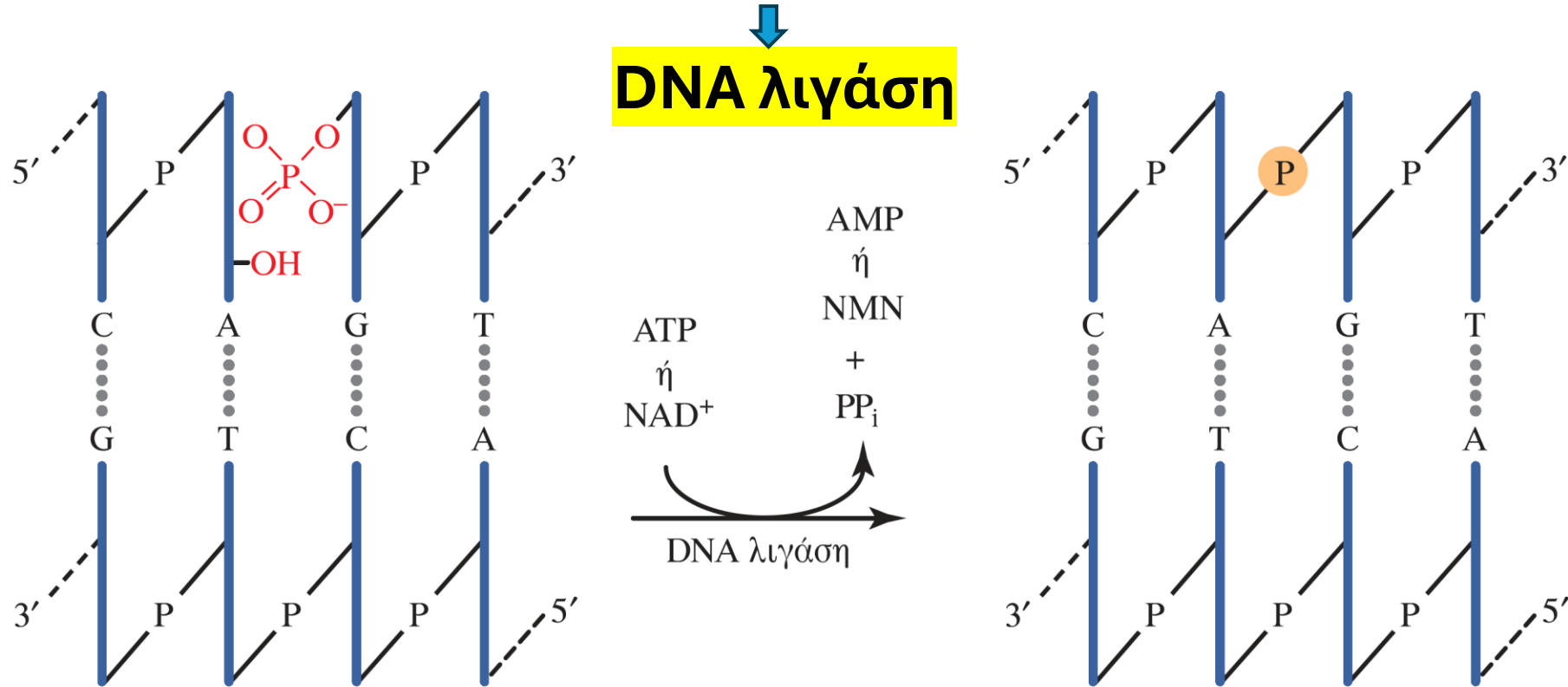
Το μοντέλο ημιασυνεχούς αντιγραφής



Το DNA συντίθενται με κατεύθυνση 5' → 3' και στους δύο θυγατρικούς κλώνους (κόκκινο). Όμως, ο προπορευόμενος κλώνος συντίθεται συνεχόμενα, ενώ ο καθυστερημένος κλώνος συντίθεται ασυνεχώς μέσω τμημάτων Okazaki.

Η αντιγραφή του DNA

Πως ενώνονται τα τμήματα Okazaki;



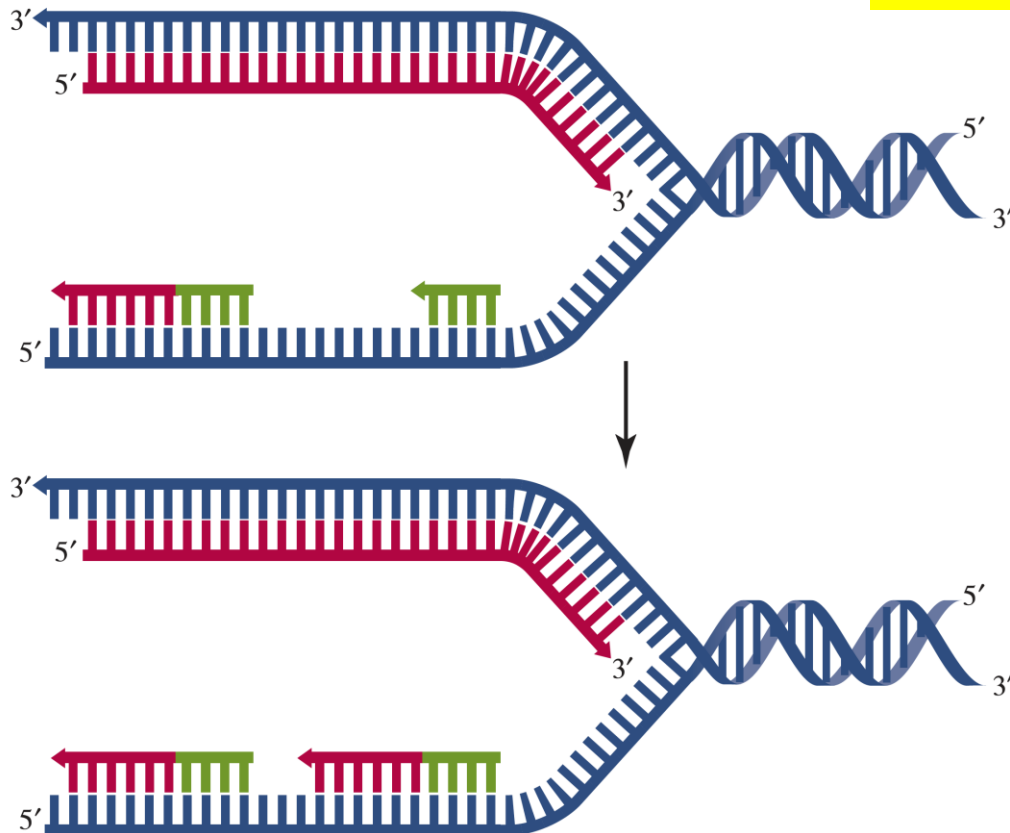
Η **DNA λιγάση** συνδέει τη φωσφορική ομάδα του 5' άκρου του καθυστερημένου κλώνου με την υδροξυλομάδα που βρίσκεται στο 3' άκρο του παρακείμενου τμήματος Okazaki. Ως **πηγή ενέργειας** για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ορισμένες DNA λιγάσες χρησιμοποιούν ATP, ενώ άλλες χρησιμοποιούν NAD⁺.

Η αντιγραφή του DNA

Πως γίνεται η εκκίνηση της σύνθεσης του νέου κλώνου;



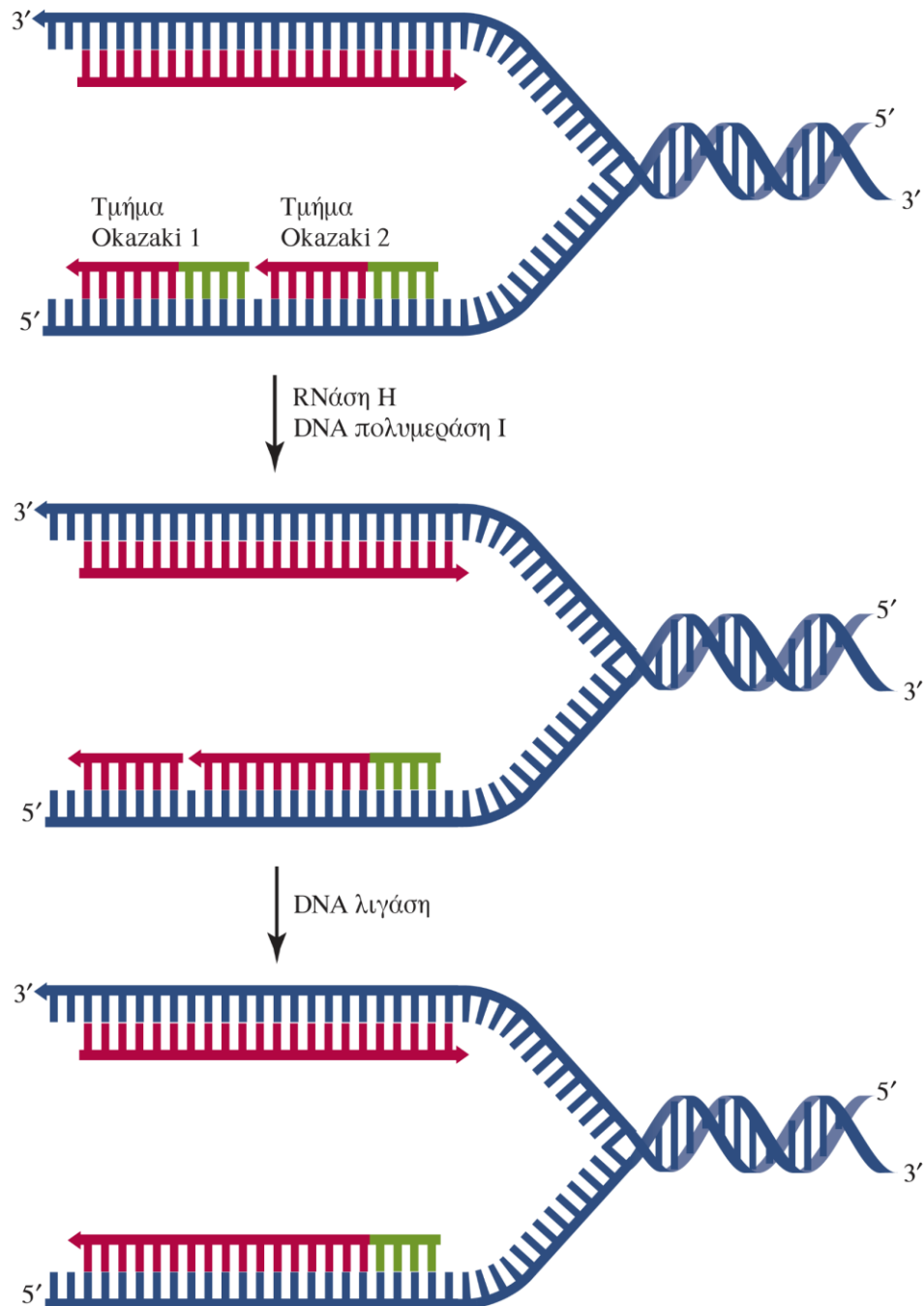
Σύνθεση RNA τα οποία χρησιμεύουν ως εκκινητές για την DNA πολυμεράση



Η σύνθεση των τμημάτων Okazaki εκκινείται από μικρά τμήματα RNA.

Οι εκκινητές RNA αναπαρίστανται με πράσινο χρώμα, το γονικό DNA με μπλε και το νεοσυντιθέμενο DNA με κόκκινο.

Το μονοπάτι επεξεργασίας των τμημάτων Okazaki



- Η **ριβονουκλεάση H (RNάση H)** αφαιρεί όλα τα ριβονουκλεοτίδια από το 5' άκρο ενός τμήματος Okazaki, εκτός από το τελευταίο ριβονουκλεοτίδιο, αυτό που συνδέεται με το άκρο του τμήματος DNA.
- Στη συνέχεια, η **DNA πολυμεράση** επεκτείνει το 3' άκρο του προηγούμενου τμήματος Okazaki.
 - Το ίδιο ένζυμο, με τη δραστηριότητα **5' → 3' εξωνουκλεάσης** που διαθέτει, αφαιρεί το ριβονουκλεοτίδιο που έχει απομένει στο 5' άκρο του επόμενου τμήματος Okazaki.
- Τέλος, η **DNA λιγάση** συνδέει τα γειτονικά τμήματα Okazaki, ώστε να σχηματιστεί ο καθυστερημένος κλώνος.

Οι εκκινητές RNA αναπαρίστανται με πράσινο χρώμα, το γονικό DNA με μπλε και το νέο DNA με κόκκινο.