



# Βιοτεχνολογία

**Παναγιώτα Σταθοπούλου**  
Επίκουρη Καθηγήτρια  
[panstath@upatras.gr](mailto:panstath@upatras.gr)

**Εύα Διονυσοπούλου**  
ΕΔΙΠ Βιολογίας  
[edionys@upatras.gr](mailto:edionys@upatras.gr)

# 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

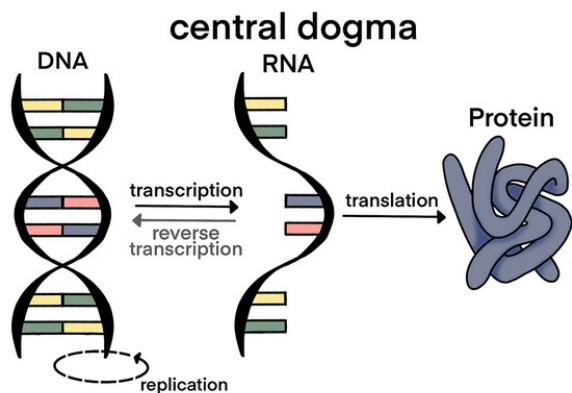
Η διαδικασία μεταφοράς της γενετικής πληροφορίας από το DNA στο RNA προκειμένου αυτή να εκφραστεί

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)

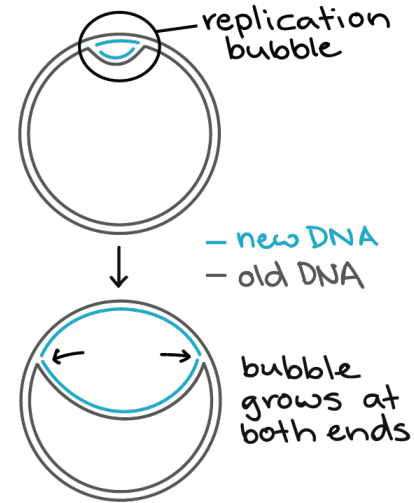


# Η αντιγραφή του DNA στα βακτήρια

Η συσκευή της αντιγραφής αποτελείται από διάφορα πρωτεϊνικά συστατικά

## ΕΝΑΡΞΗ

Συναρμολόγηση της συσκευής σε συγκεκριμένη θέση



## ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ

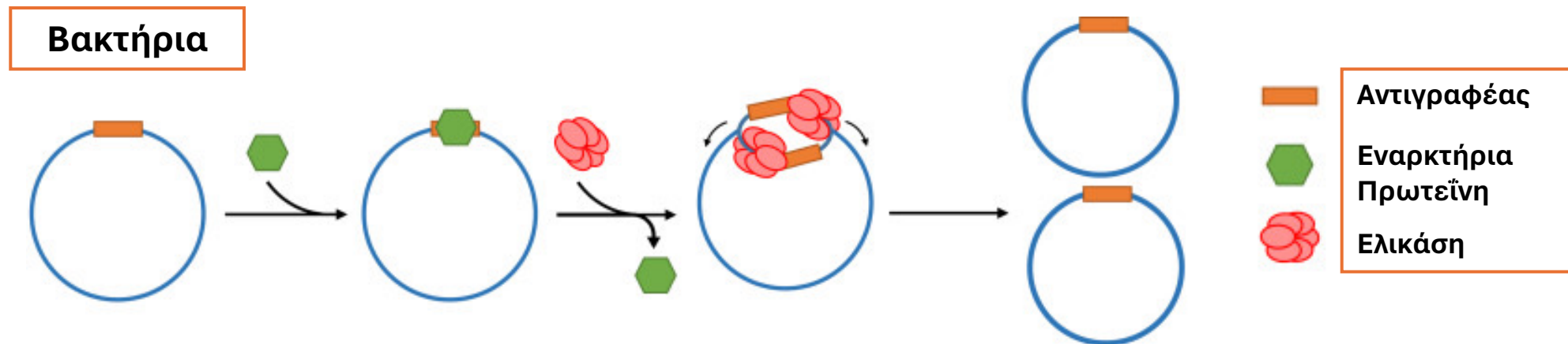
Ο προπορευόμενος κλώνος συντίθεται συνεχόμενα ενώ ο καθυστερημένος συντίθεται ασυνεχώς

ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ  
Συνάντηση δύο συνεχόμενων διχαλών

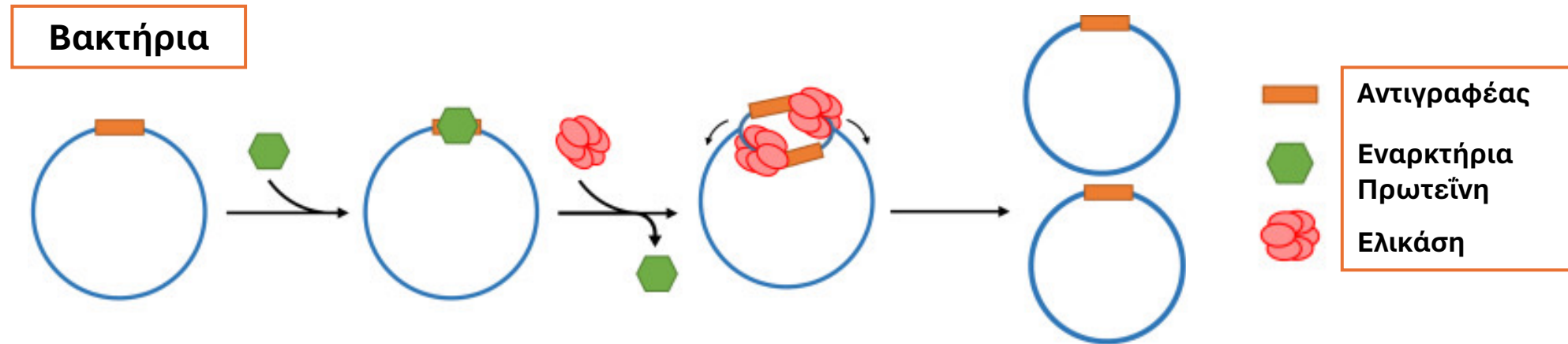
# Η αντιγραφή του DNA στα βακτήρια

Μία αυτόνομη αντιγραφόμενη μονάδα DNA που μπορεί να διατηρείται σταθερά σε ένα κύτταρο, όπως ένα βακτηριακό χρωμόσωμα ονομάζεται **ρεπλικόνιο**.

Το **μοντέλο του ρεπλικονίου** (Jacob & Brenner) εξηγεί πως αντιγράφονται τα μόρια.



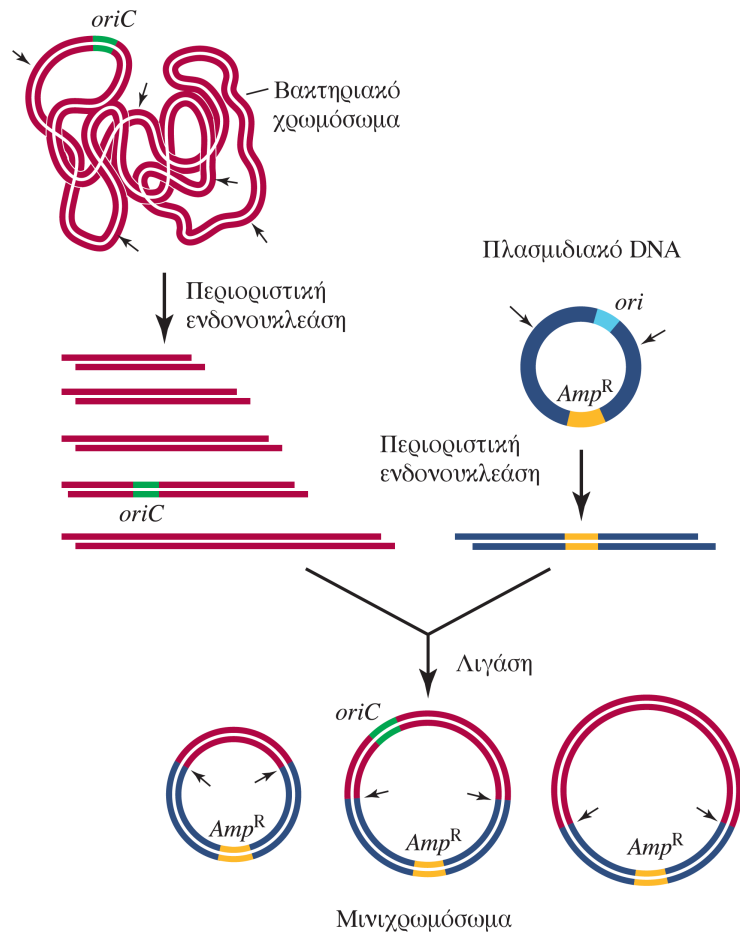
# Η αντιγραφή του DNA στα βακτήρια



- Ο **αντιγραφέας** είναι ένα τμήμα του ρεπλικονίου που φέρει συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, στις οποίες θα προσδεθεί η **εναρκτήρια πρωτεΐνη**.
- Μόλις η **εναρκτήρια πρωτεΐνη** προσδεθεί στον αντιγραφέα συμβάλει στο ξετύλιγμα της διπλής έλικας και στη στρατολόγηση στοιχείων του μηχανισμού αντιγραφής.
  - Η εναρκτήρια πρωτεΐνη για την αντιγραφή του βακτηριακού DNA είναι η **DnaA**.
- Η θέση εντός του αντιγραφέα στην οποία πραγματοποιείται έναρξη της αντιγραφής ονομάζεται **θέση έναρξης της αντιγραφής** (*ori*, origin of replication)

# Η αντιγραφή του DNA – *E. coli*

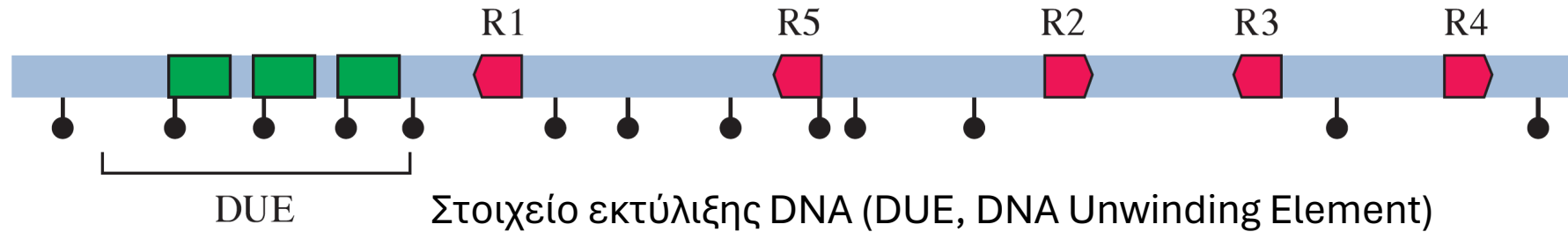
Η θέση έναρξης της αντιγραφής (*ori*, origin of replication) του χρωμοσώματος του βακτηρίου *E. coli* ονομάζεται *oriC* (*ori*, origin of replication of Chromosome)



- Το DNA ενός πλασμιδίου πέπτεται με μια περιοριστική ενδονουκλεάση και απομονώνεται ένα τμήμα του που **δε φέρει τη θέση έναρξης της αντιγραφής**, διαθέτει όμως το γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό (στην αμπικιλίνη σε αυτό το παράδειγμα).
- Με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση πέπτεται και το βακτηριακό χρωμόσωμα, ώστε να προκύψει ένας πληθυσμός διαφορετικών τμημάτων DNA.
- Τα πλασμιδιακής και βακτηριακής προέλευσης τμήματα αναμειγνύονται και συνδέονται μεταξύ τους μέσω της δράσης της DNA λιγάσης.
- Τα ανασυνδυασμένα μόρια που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για τον μετασχηματισμό βακτηρίων *E. coli*.
- Μόνο όσα κύτταρα λάβουν ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που θα φέρει τόσο το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη όσο και την *oriC* θα σχηματίσουν αποικίες.

# Η αντιγραφή του DNA – *E. coli*

## Η ελάχιστη αλληλουχία της *oriC*



■ 9-μερείς θέσεις πρόσδεσης της DnaA

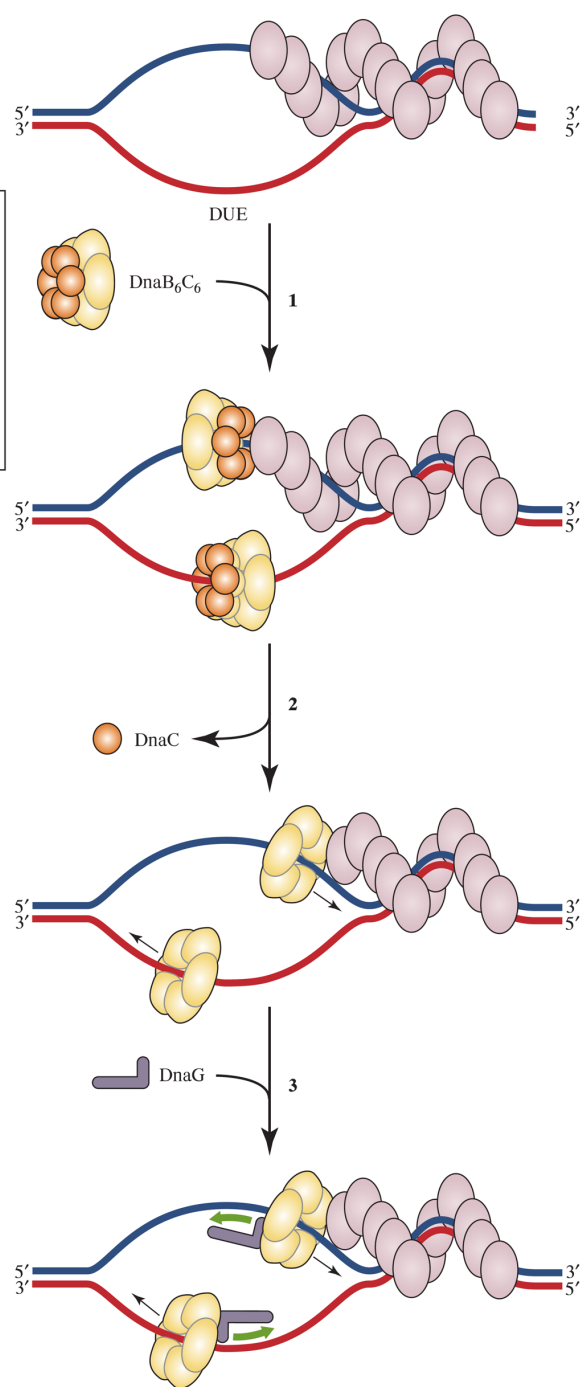
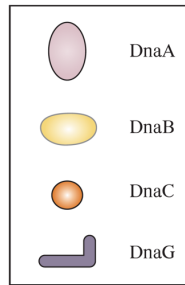
■ 13-μερή πλούσια σε AT

● Dam-θέσεις μεθυλίωσης (GATC)

245 ζεύγη βάσεων



# Η αντιγραφή του DNA *E. coli*



**DnaA** - εναρκτήρια πρωτεΐνη

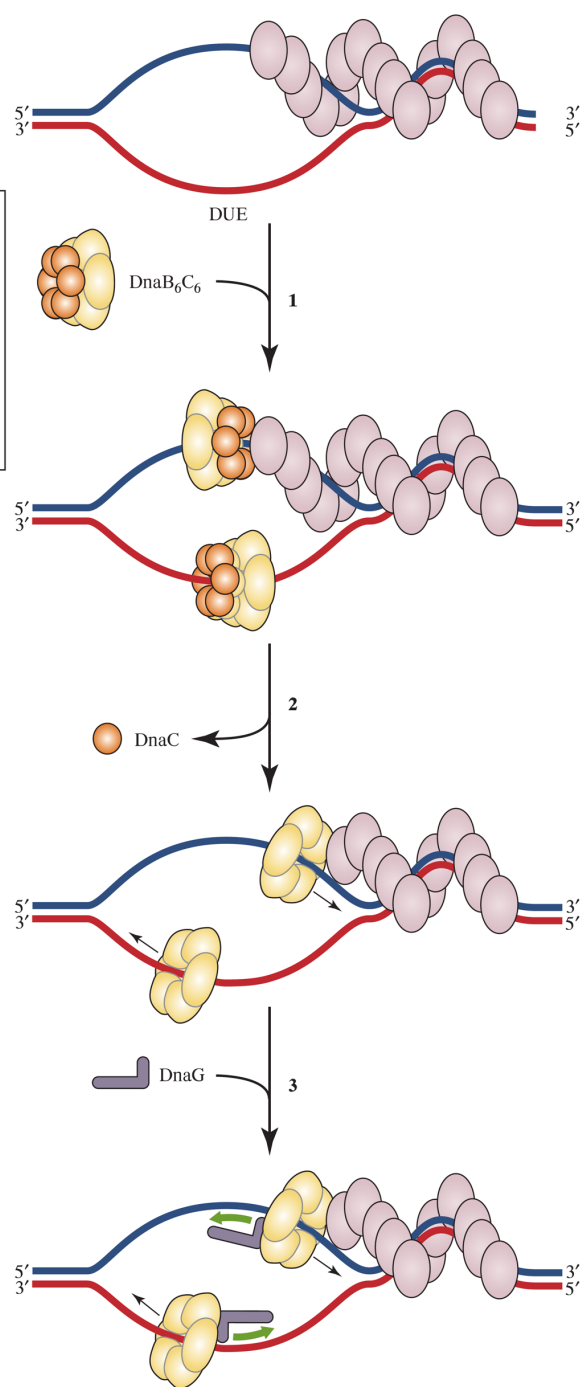
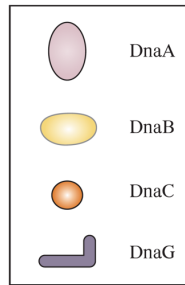
**DnaB** - ελικάση

**DnaC** - φορτωτής

**DnaG** – πριμάση (σύνθεση εκκινητών RNA)



# Η αντιγραφή του DNA *E. coli*



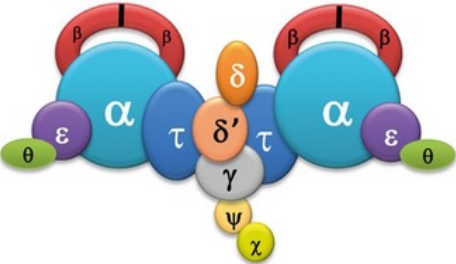




- (1) Δύο σύμπλοκα DnaB<sub>6</sub> • DnaC<sub>6</sub> φορτώνονται με αντίθετο προσανατολισμό στους ξετυλιγμένους κλώνους του DUE.
- (2) Η υδρόλυση του ATP (δεν απεικονίζεται στο σχήμα) οδηγεί στην απελευθέρωση της DnaC, γεγονός που αφήνει κάθε σύμπλοκο ελικάσης • DnaB ελεύθερο να κινηθεί με κατεύθυνση 5' → 3', επεκτείνοντας έτσι την ξετυλιγμένη περιοχή του *oriC* μέχρι περίπου τα 65 νουκλεοτίδια.
- (3) Η πριμάση DnaG προσδένεται στις ελικάσες DnaB και συνθέτει εκκινητές RNA (πράσινο χρώμα).

# Η αντιγραφή του DNA στα βακτήρια

Τα κύρια ένζυμα που συμμετέχουν στην αντιγραφή του DNA ονομάζονται **DNA πολυμεράσες**.

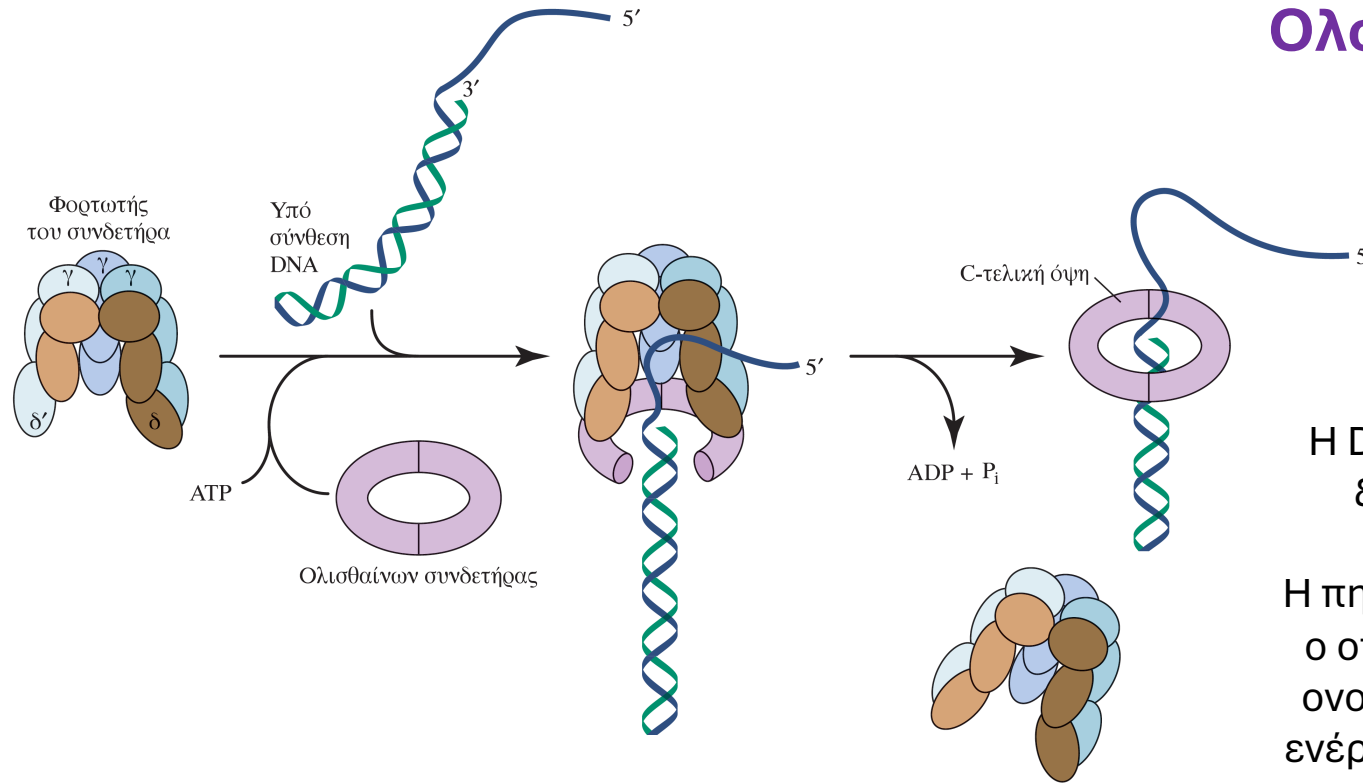
Η DNA πολυμεράση III (Pol III) είναι απαραίτητη για την αντιγραφή στα βακτήρια

	Pol I	Pol II	Pol III	Pol IV	Pol V
DNA polymerase family	A	B	C	Y	Y
Activity	5'-3' polymerase 3'-5' exonuclease 5'-3' exonuclease	5'-3' polymerase 3'-5' exonuclease	5'-3' polymerase 3'-5' exonuclease	5'-3' polymerase	5'-3' polymerase
					
Number of molecules/cell					
- SOS	400	50 - 75	10 - 20	150 - 250	< 15
+ SOS	400	350 - 1000	10 - 20	1200 - 2500	200
Biological functions in the cell	DNA replication, Okazaki fragment maturation, DNA repair	DNA replication (backup DNA polymerase), DNA repair, TLS	DNA replication DNA repair	TLS	TLS

Σφάλματα στο *E. coli*: 1 σε  $10^9 - 10^{10}$  bp  
(1 ανά 1.000-10.000 αντιγραφές)

# Η αντιγραφή του DNA στα βακτήρια

Η DNA πολυμεράση III (Pol III) είναι απαραίτητη για την αντιγραφή στα βακτήρια

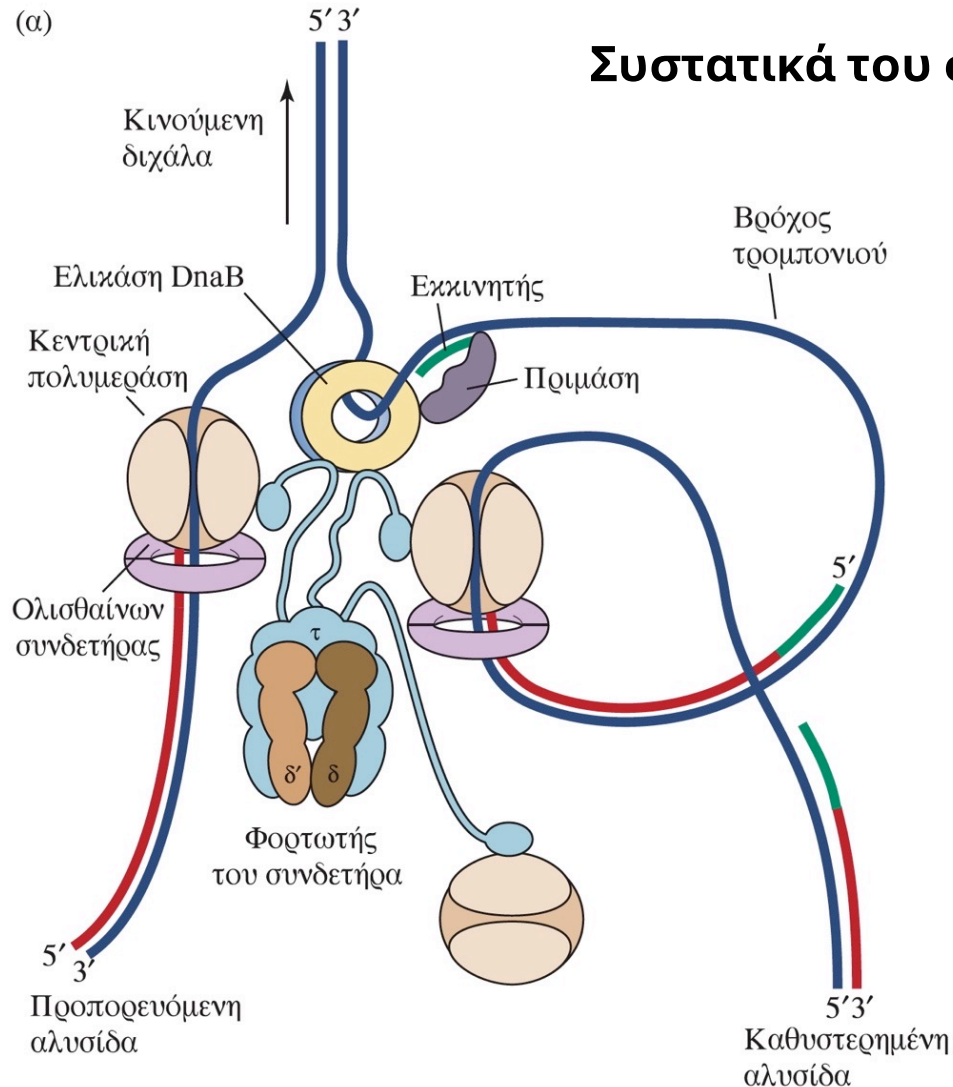


**Ολοένζυμο Pol III = 3 υποσύμπλοκα**  
Κεντρική πολυμεράση  
Φορτωτής του συνδετήρα  
Ολισθαίνων συνδετήρας

Η DNA πολυμεράση III έχει μεγάλη προσήλωση, μόλις ξεκινήσει η κατάλυση, σπάνια απελευθερώνει το υπόστρωμα.

Η πηγή της προσήλωσης είναι ο ολισθαίνων σφιγκτήρας, ο οποίος προσδένεται στο DNA από μια πρωτεΐνη που ονομάζεται φορτωτής σφιγκτήρα και χρησιμοποιεί την ενέργεια της υδρόλυσης ATP για να ανοίξει και να κλείσει τον σφιγκτήρα.

# Η αντιγραφή του DNA στα βακτήρια



## Συστατικά του σωματίου αντιγραφής και ο βρόχος τρομπονιού

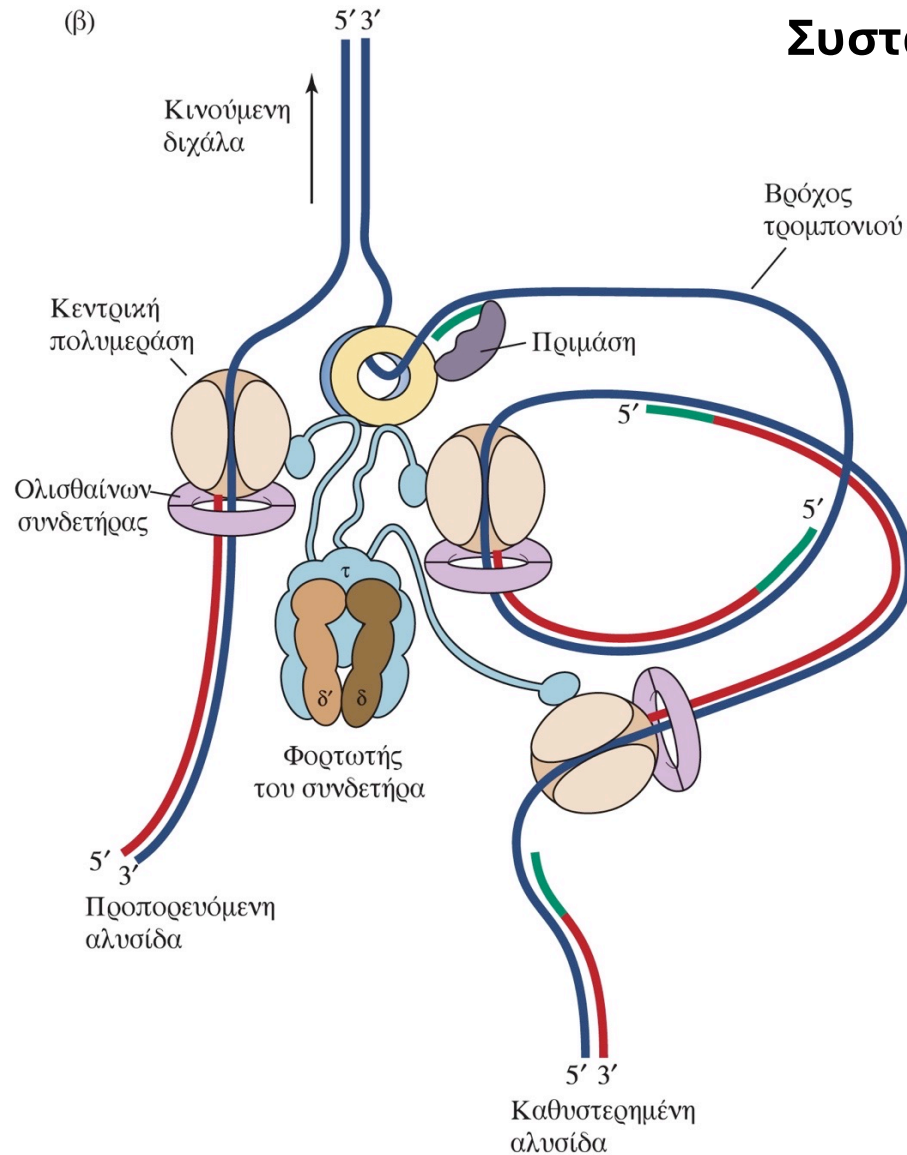
Χάριν απλότητας, παρουσιάζεται μόνο ένα μόριο πριμάσης συνδεδεμένο με την ελικάση DnaB και απεικονίζονται μόνο οι υπομονάδες δ, δ' και τ του φορτωτή του συνδετήρα.

Το γονικό DNA αναπαρίσταται με σκούρο μπλε χρώμα, το νεοσυντιθέμενο DNA με κόκκινο και οι εκκινητές με πράσινο.

(α) Η τρίτη κεντρική πολυμεράση δε βρίσκεται πάνω στο DNA. Αυτή η κατάσταση μπορεί να συμβεί όταν απαιτείται μόνο μία κεντρική πολυμεράση για τη σύνθεση του καθυστερημένου κλώνου.

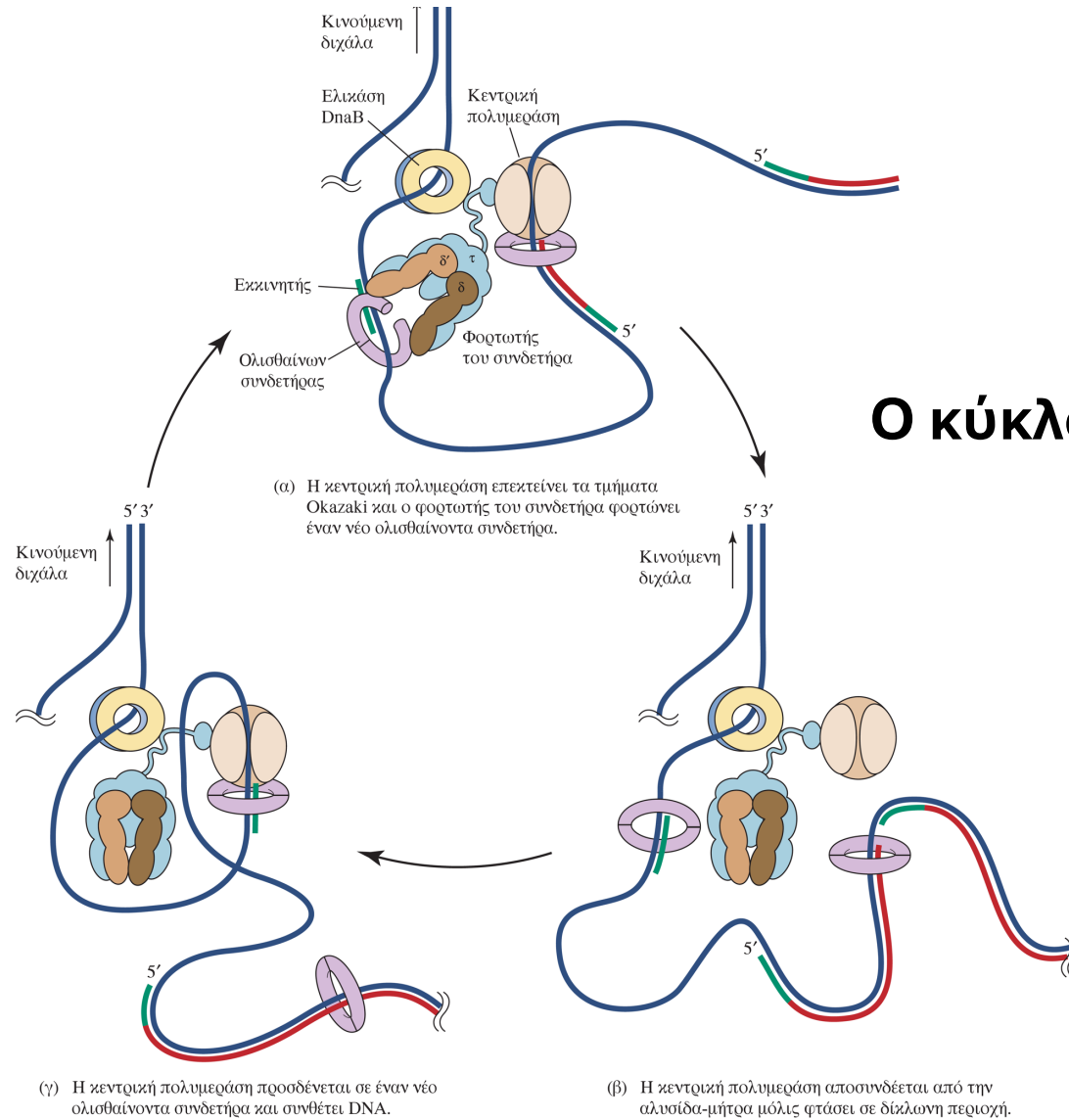
# Η αντιγραφή του DNA στα βακτήρια

Συστατικά του σωματίου αντιγραφής και ο βρόχος τρομπονιού



(β) Για τη σύνθεση του καθυστερημένου κλώνου χρησιμοποιούνται δύο κεντρικές πολυμεράσες.

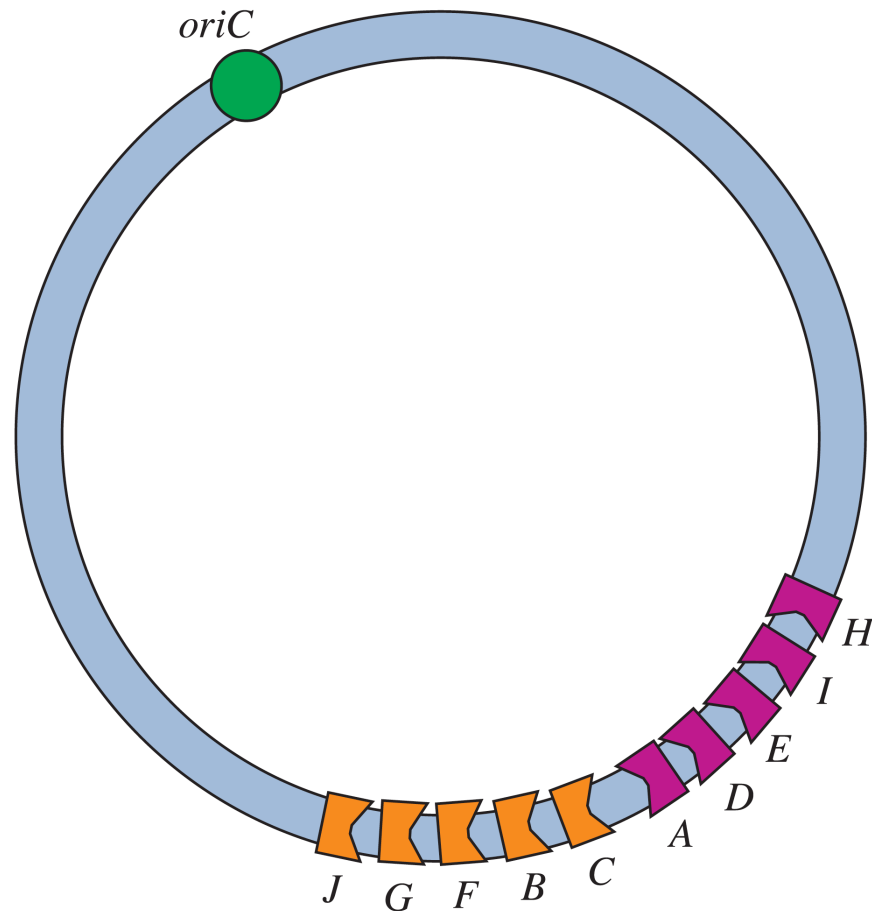
# Η αντιγραφή του DNA στα βακτήρια



**Ο κύκλος της κεντρικής πολυμεράσης στον καθυστερημένο κλώνο**

# Η αντιγραφή του DNA στα βακτήρια

Οι θέσεις τερματισμού της αντιγραφής (Ter) στην *E. coli*



Στην περιοχή τερματισμού υπάρχουν δέκα θέσεις τερματισμού (συντηρημένες αλληλουχίες 11 ζβ).

Οι TerC, TerB, TerF, TerG και TerJ έχουν τέτοιο προσανατολισμό, ώστε να σταματούν την αντιγραφή που πραγματοποιείται κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού, ενώ οι θέσεις TerA, TerD, TerE, TerI και TerH έχουν τέτοιο προσανατολισμό, ώστε να σταματούν την αντιγραφή που πραγματοποιείται κατά την αντίθετη φορά.



# Η αντιγραφή του DNA στα βακτήρια

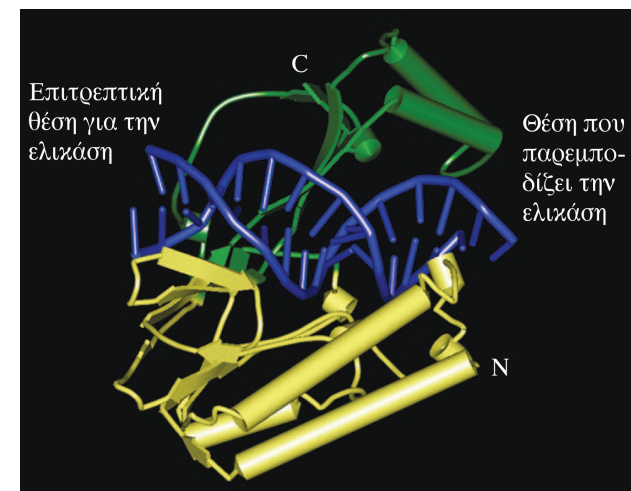
Οι θέσεις τερματισμού της αντιγραφής (Ter) στην *E. coli*

Στις θέσεις *Ter* προσδένεται μία πρωτεΐνη που ονομάζεται παράγοντας πραγματοποίησης του τερματισμού (Tus, Terminus Utilization Substance)

Ο Tus προσδένεται στις θέσεις *Ter* ως μονομερές με πολύ υψηλή συγγένεια.

Το σύμπλοκο Tus • Ter εμποδίζει την ελικάση DnaB να ξετυλίγει το το DNA και ακινητοποιεί την αντιγραφική διχάλα.

Ο διαχωρισμός των νεοσχηματισθέντων χρωμοσωμάτων απαιτεί την τοποισομεράση IV και τη ρεκομπινάση.



# Η αντιγραφή του DNA στους ευκαρυώτες

Η αντιγραφή στους ευκαρυωτικούς και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, διαφέρει, καθώς **οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν πυρήνα, ενώ οι προκαρυωτικοί δεν έχουν.**

Όμως, τα βασικά στάδια του μηχανισμού της αντιγραφής είναι **παρόμοια** και στα δύο είδη κυττάρων.

Μελέτες για τον μηχανισμό της αντιγραφής έχουν γίνει περισσότερο στα προκαρυωτικά κύτταρα, γιατί το DNA τους είναι πολύ μικρότερο και απλούστερα οργανωμένο από αυτό των ευκαρυωτικών κυττάρων.

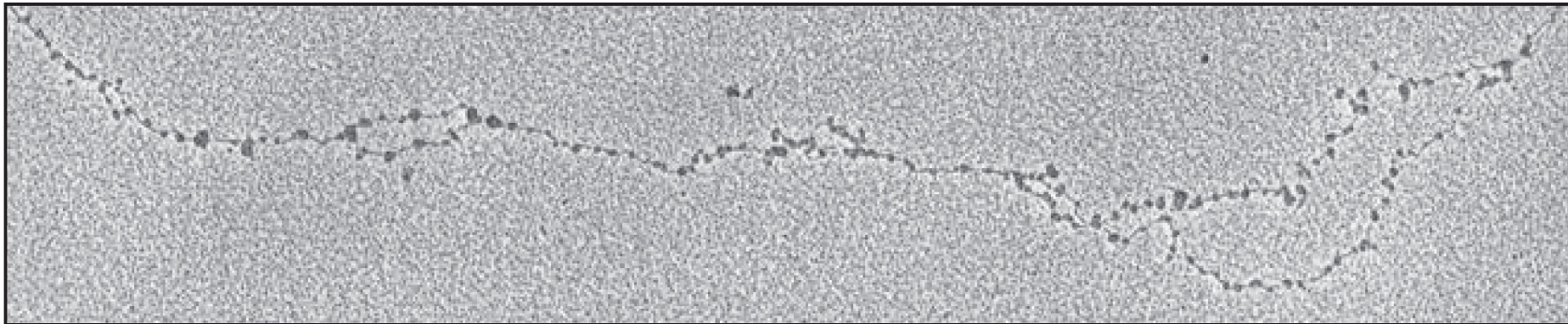
# Η αντιγραφή του DNA στους ευκαρυώτες

- Ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν πολύ μεγαλύτερο DNA από τα βακτήρια, γραμμικό σε πολλαπλά χρωμοσώματα.
- Πολλαπλά σημεία έναρξης ORC (μονάδα αντιγραφής ή ρεπλικόνιο).
- **Οι άνθρωποι έχουν  $\approx 30.000$  θέσης έναρξης.**
- Η αντιγραφή του γενετικού υλικού στα ευκαρυωτικά κύτταρα, γίνεται στον πυρήνα τους, αλλά και στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες και αρχίζει από συγκεκριμένα σημεία τα οποία ονομάζονται θέσεις έναρξης της αντιγραφής.
- **Το DNA των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών αντιγράφεται ανεξάρτητα από το κύριο μόριο DNA.**
- Η αντιγραφή του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα, έχει τρία στάδια: την έναρξη, την επιμήκυνση και τη λήξη.
- **Για την αντιγραφή του DNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, απαιτούνται διάφορα ένζυμα και πρωτεΐνες.**

# Η αντιγραφή του DNA στους ευκαρυώτες

## Έναρξη

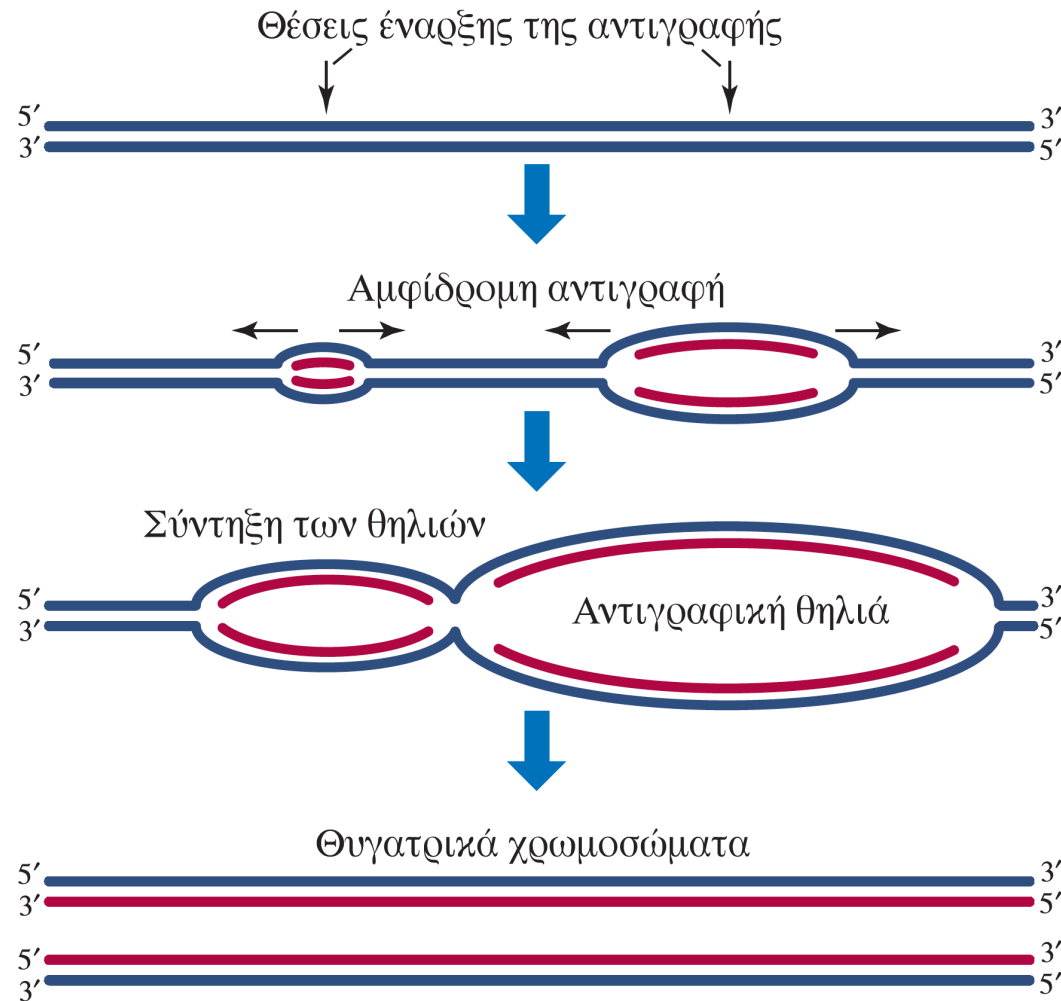
- Το DNA γίνεται διαθέσιμο σε πρωτεΐνες και ένζυμα, με σκοπό την αντιγραφή του.  
(Φάση S του κυτταρικού κύκλου)
- Η αντιγραφή του DNA, γίνεται σε συγκεκριμένα σημεία, τα οποία ονομάζονται **θέσεις έναρξης της αντιγραφής**.



0,1  $\mu\text{m}$

*Κάθε θέση έναρξης της αντιγραφής είναι εμφανής ως μια διακριτή αντιγραφική θηλιά κατά μήκος του DNA.*

# Η αντιγραφή του DNA στους ευκαρυώτες



## Έναρξη

- Πρωτεΐνες αποδιατάσσουν την διπλή έλικα του DNA, και έπειτα επιτρέπουν σε άλλες πρωτεΐνες να πάρουν την θέση τους.
- Η **DNA ελικάση**, σπάζει τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών αζωτούχων βάσεων, και δημιουργεί μία διχάλα (θηλιά), η οποία αυξάνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις (αμφίδρομα).
- Η **DNA ελικάση** χρησιμοποιεί την ελεύθερη ενέργεια από την υδρόλυση της ATP.
- Η **τοποϊσομεράση (λιγάση)**, λύνει το πρόβλημα της υπερελίκωσης και εισάγει υπερσπειράματα ώστε η τάση αυτή που δημιουργείται, να εξουδετερώνεται.
- Επίσης, **πρωτεΐνες (πρωτεΐνες SSB)**, προσδένονται στην μονόκλινη αλυσίδα του DNA που βρίσκεται στην αρχή της θηλιάς, και την εμποδίζουν να ξαναδιπλωθεί και να γίνει δίκλινη.

# Η αντιγραφή του DNA στους ευκαρυώτες

## Επιμήκυνση

- Η **DNA πολυμεράση** δεν μπορεί να ξεκινήσει την αντιγραφή, αλλά μόνο να προσθέσει τα νουκλεοτίδια στην σωστή σειρά. Συγκεκριμένα η **DNA πολυμεράση δ**, συνδέει νουκλεοτίδια του DNA στο 3' άκρο της ήδη υπάρχουσας πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας.
- Η **πριμάση/εκκινιτάση (η DNA πολυμεράση α)**, συνθέτει μία μικρή αλυσίδα RNA, συμπληρωματική στην αλυσίδα του DNA, η οποία ονομάζεται «**πρωταρχικό τμήμα RNA**».
- Όταν η πριμάση συνθέσει αυτή την αλυσίδα RNA, τότε απομακρύνεται, και η **DNA πολυμεράση**, επεκτείνει την αλυσίδα δίπλα από το τμήμα RNA, συμπληρωματικά προς το DNA σε κατεύθυνση 5->3.
- Ο **ολισθαίνων σφιγκτήρας**, διατηρεί την DNA πολυμεράση στην θέση της.
- Η μία αλυσίδα θα συντίθεται προς την κατεύθυνση της αντιγραφής (ΣΥΝΕΧΩΣ), ενώ η άλλη θα συντίθεται «αντίθετα» με την κατεύθυνση της αντιγραφής (ΑΣΥΝΕΧΩΣ), και γι' αυτό σχηματίζεται σε κομμάτια, τα οποία **λέγονται Okazaki**.
- Η αλυσίδα η οποία συντίθεται συνεχόμενα και διαρκώς λέγεται «**οδηγός**» αλυσίδα. Η άλλη αλυσίδα που αντιγράφεται «ανάποδα» και ασυνεχώς, ονομάζεται «**συνοδός**» αλυσίδα.

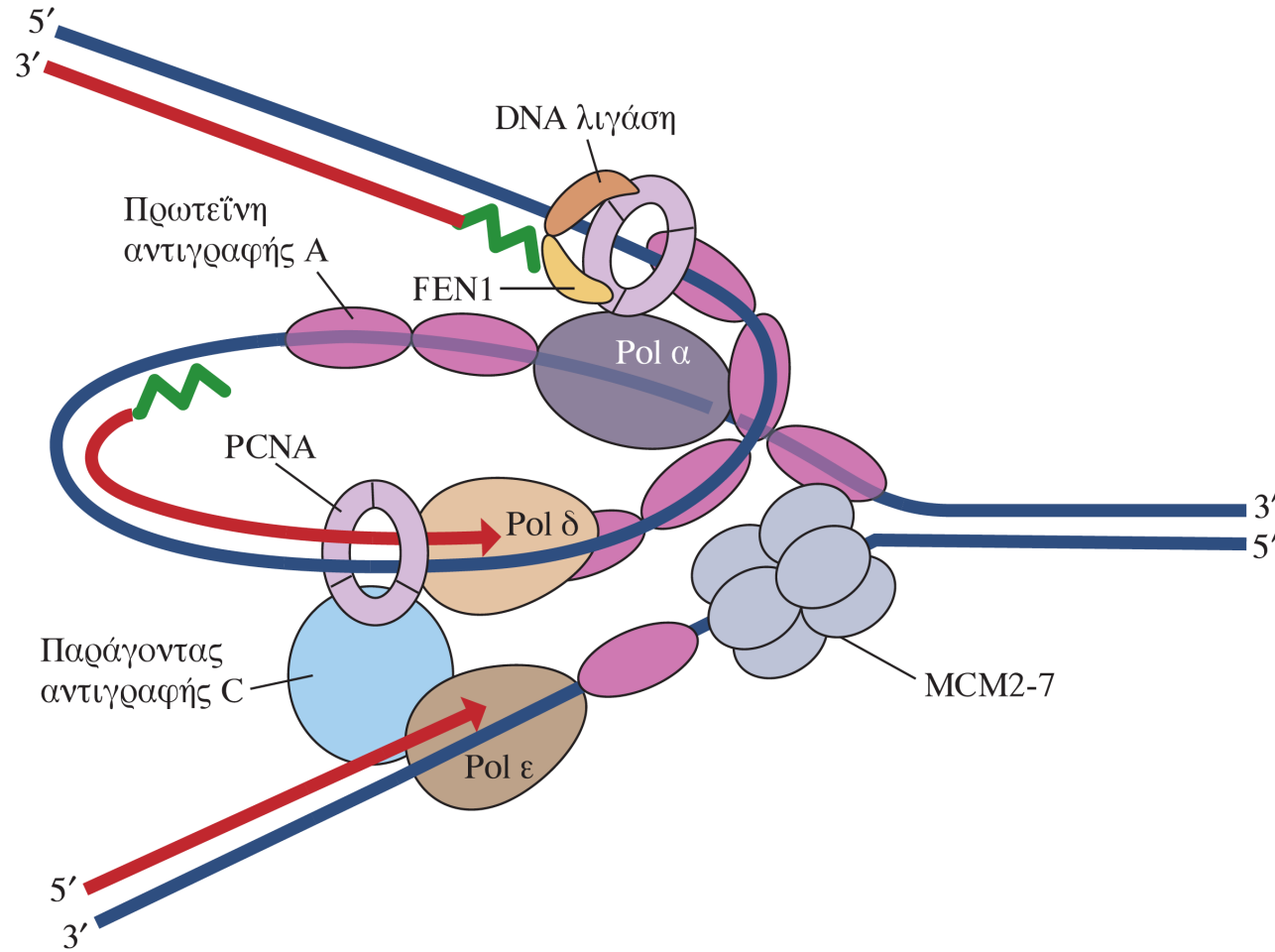
# Η αντιγραφή του DNA στους ευκαρυώτες

## Λήξη

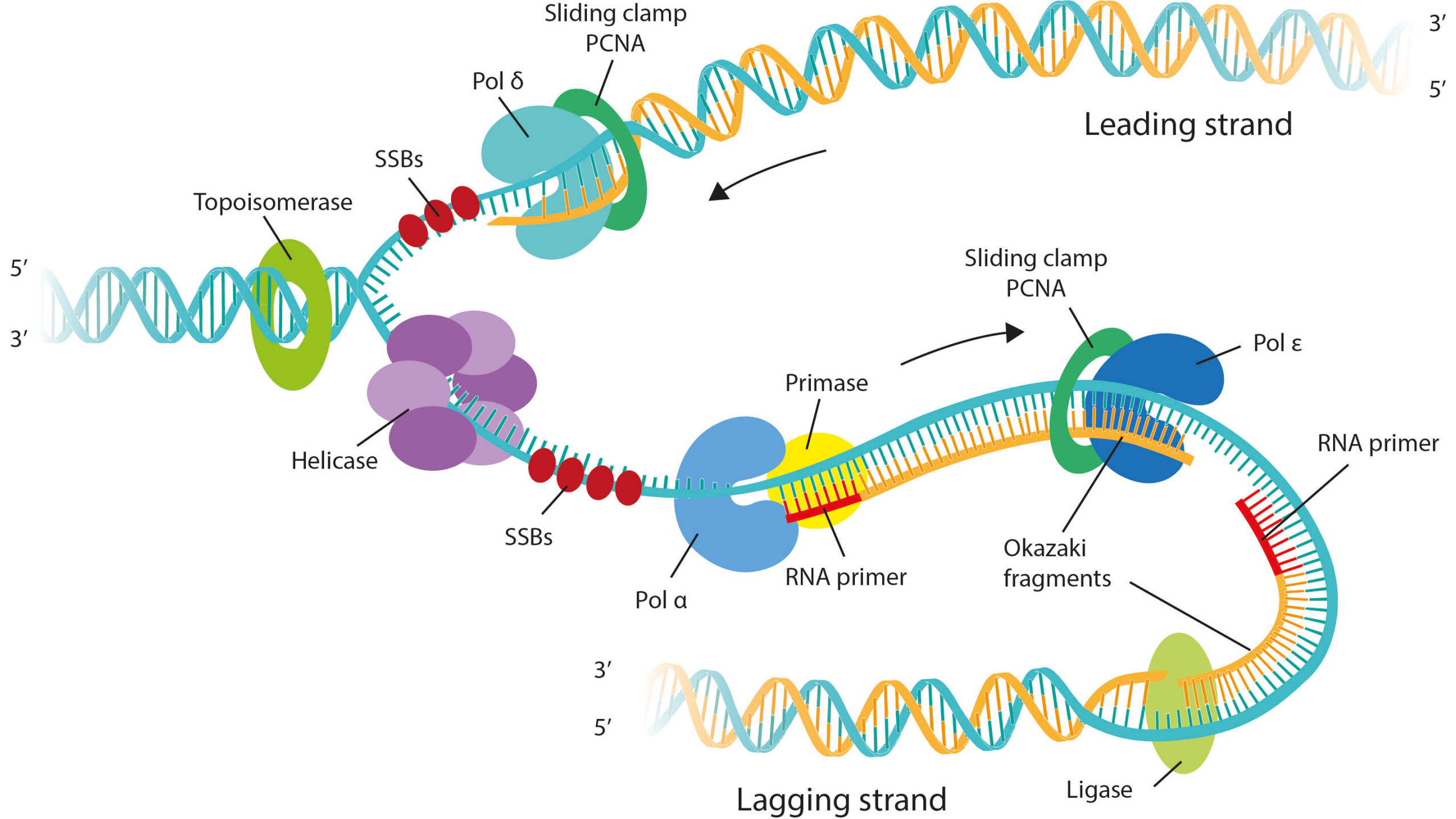
- Στο τέλος της αντιγραφής, η **οδηγός** αλυσίδα σταματάει να αντιγράφεται όταν έρθει σε επαφή με την **συνοδό** αλυσίδα μίας άλλης θηλιάς. Δεν μπορεί να καταλύσει την ένωση στα δύο τμήματα της νέας αλυσίδας του DNA.
- **Η DNA δεσμάση**, ενώνει τις ασύνδετες περιοχές του σακχαρο-φωσφορικού σκελετού (“nicks”).
- Τα ένζυμα που θα αφαιρέσουν τα πρωταρχικά τμήματα RNA, **είναι η FEN1 (Flap endonuclease 1) και η RNase H**. Αυτά τα ένζυμα, αφαιρούν τα πρωταρχικά τμήματα RNA στην αρχή της κάθε οδηγού αλυσίδας και κομματιού Okazaki, αφήνοντας ένα κενό στο DNA.



# Απλοποιημένο μοντέλο της οργάνωσης των πρωτεϊνών και των ενζύμων που δρουν στην αντιγραφική διχάλα των ευκαρυωτών

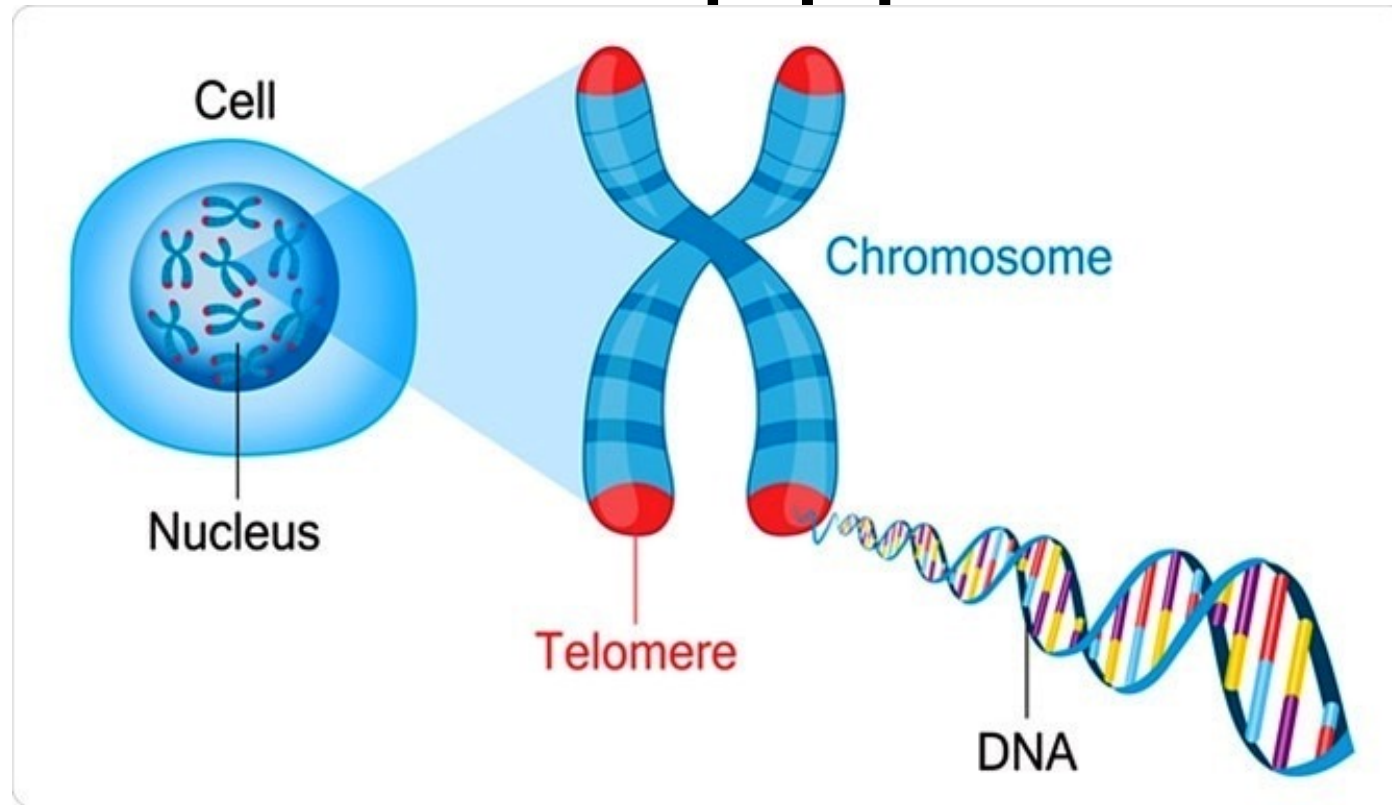


Ο **εκκινητής** που είναι ενωμένος με το εναρκτήριο DNA αναπαρίσταται με πράσινο χρώμα, το **αντιγραφόμενο DNA** με μπλε και το **νεοσυντιθέμενο DNA** με **κόκκινο**.



# Η αντιγραφή του DNA στους ευκαρυώτες

## Τελομερή

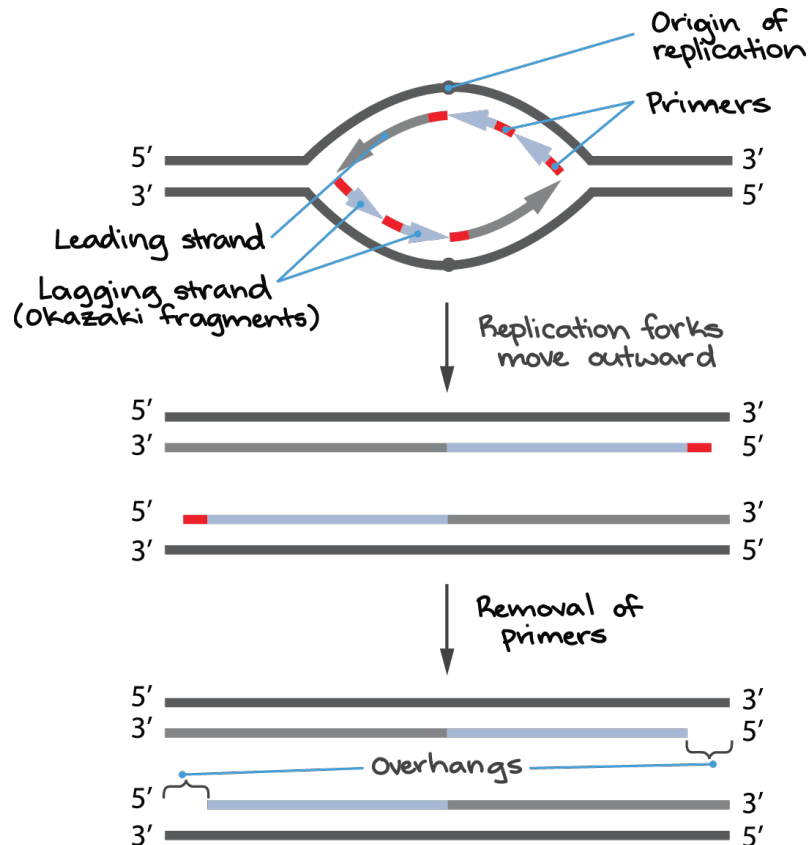


Το τελομερές είναι μια περιοχή του DNA, χωρίς μεγάλη πληροφοριακή αξία, που βρίσκεται στο τέλος του χρωμοσώματος και προστατεύει τη χρήσιμη γενετική πληροφορία από τη φθορά. Αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εξανουκλεοτιδίων (στον άνθρωπο: AGGGTT)

# Η αντιγραφή του DNA στους ευκαρυώτες

## Τελομερή

Ένας από τους δύο κλώνους είναι πλούσιος σε G  
**Τα τελομερή αντιγράφονται από το ένζυμο τελομεράση**



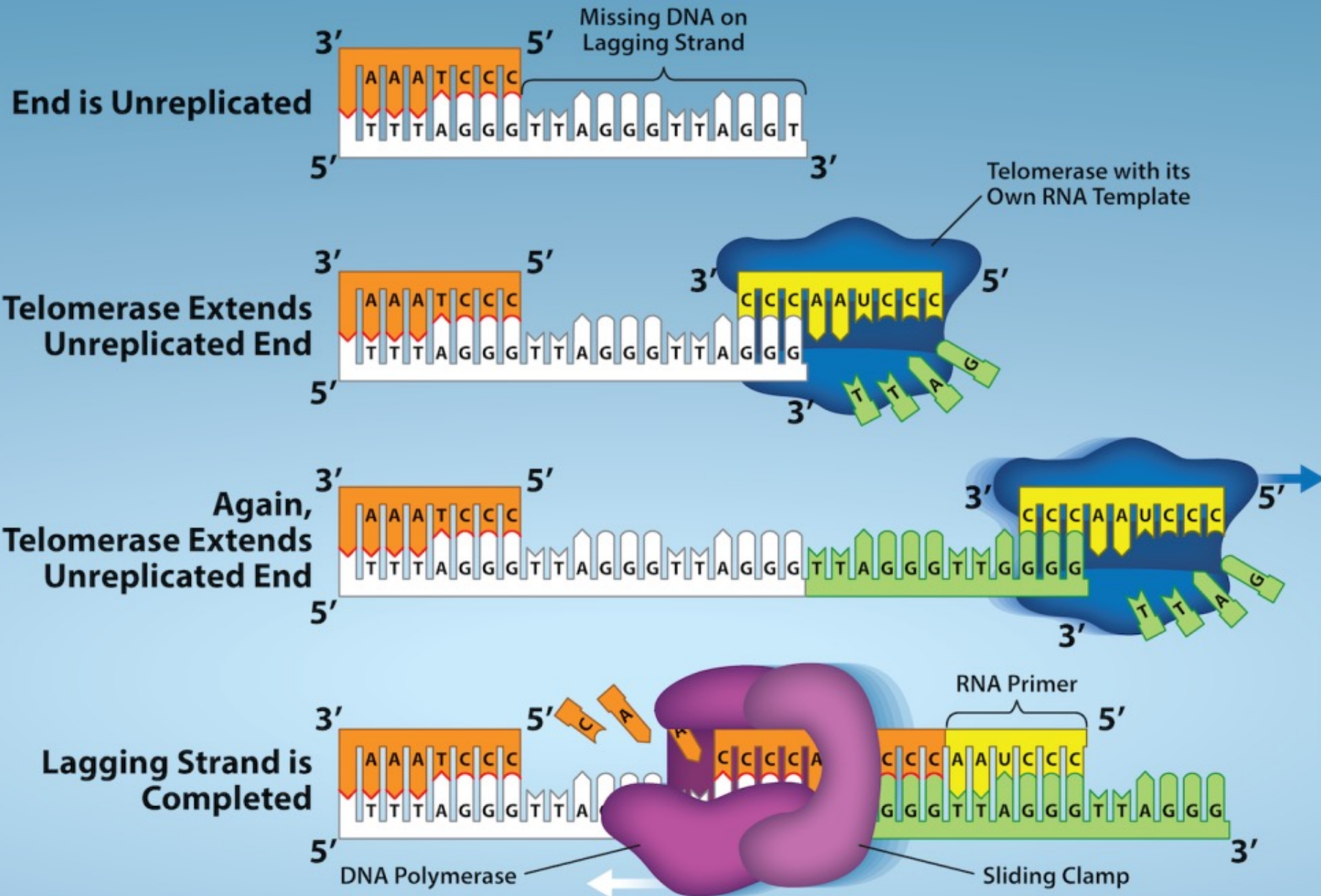
Στο ακραίο τμήμα της καθυστερημένης αλυσίδας δεν υπάρχει χώρος για τον σχηματισμό του RNA εκκινητή.

**ΠΡΟΒΛΗΜΑ: Θα χάνεται αυτή η αλληλουχία;;;**

Η τελομεράση προσθέτει στο άκρο πολλαπλά αντίγραφα της ίδιας αλληλουχίας του τελομεριδίου

Έτσι παράγεται το εκμαγείο για τη σύνθεση του καθυστερημένου κλώνου

# PROCESS: Telomere Replication





# Πληροφορίες ενζύμων που παίρνουν μέρος στην αντιγραφή του DNA

ENZΥΜΟ		
Πολυμεράση I	Προκαρυωτικά	Εξωνουκλεαστική δραστηριότητα αφαιρεί τα τμήματα του RNA και τα αντικαθιστά με DNA.
Πολυμεράση II	Προκαρυωτικά	Λειτουργία επιδιόρθωσης
<b>DNA Πολυμεράση III</b>	<b>Προκαρυωτικά</b>	<b>Κύριο ένζυμο που προσθέτει νουκλεοτίδια στην κατεύθυνση 5'-3'</b>
DNA Ελικάση	Προκαρυωτικά & Ευκαρυωτικά	Ξεδιπλώνει την διπλή έλικα του DNA σπάζοντας τους δεσμούς υδρογόνου των βάσεων
DNA δεσμάση	Προκαρυωτικά & Ευκαρυωτικά	Γεμίζει τα κενά μεταξύ των κομματιών Okazaki και συνδέει τα κομμάτια που προκύπτουν από τις διάφορες θέσεις έναρξης της αντιγραφής
Πριμάση/Εκκινητάση	Προκαρυωτικά & Ευκαρυωτικά	Συνθέτει ένα μικρό τμήμα RNA για να αρχίσει η αντιγραφή
Ολισθαίνων σφιγκτήρας	Προκαρυωτικά & Ευκαρυωτικά	Κρατάει την DNA πολυμεράση στην θέση της όσο προσθέτει τα νουκλεοτίδια

# Πληροφορίες ενζύμων που παίρνουν μέρος στην αντιγραφή του DNA

ENZΥΜΟ		
Τοποϊσομεράση	Προκαρυωτικά & Ευκαρυωτικά	Εμποδίζει την υπερδίπλωση της διπλής έλικας του DNA όταν δημιουργούνται οι θηλιές
SSB πρωτεΐνες	Προκαρυωτικά & Ευκαρυωτικά	Προσδέντονται στην μονόκλωνη αλυσίδα του DNA για να την εμποδίσουν να ξαναδιπλωθεί
DNA πολυμεράσες α,β,γ,δ,ε	Ευκαρυωτικά	<ul style="list-style-type: none"><li>• DNA πολυμεράση α - Συνθέτει τα πρωταρχικά τμήματα RNA</li><li>• DNA πολυμεράση β - Παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA μετά την αντιγραφή του</li><li>• DNA πολυμεράση γ - Είναι το κύριο ένζυμο της αντιγραφής του DNA στα μιτοχόνδρια</li><li>• <b>DNA πολυμεράση δ - Κύρια DNA πολυμεράση στην αντιγραφή του DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων</b></li><li>• DNA πολυμεράση ε - Βοηθάει την DNA</li><li>• Πολυμεράση δ - στην σύνθεση της συνοδού αλυσίδας</li></ul>