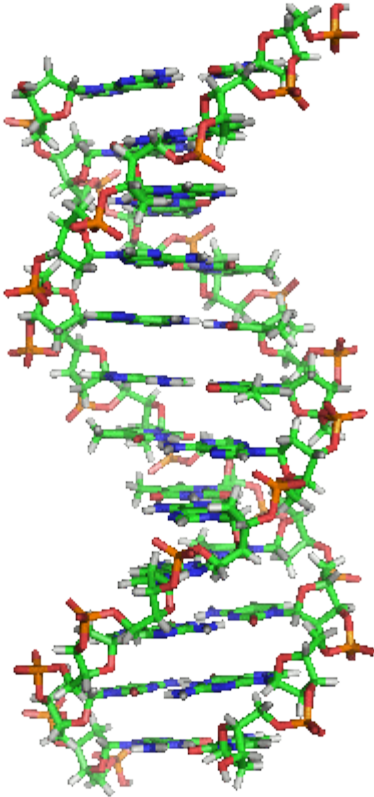


Αντιγραφή και επιδιόρθωση του γενετικού υλικού



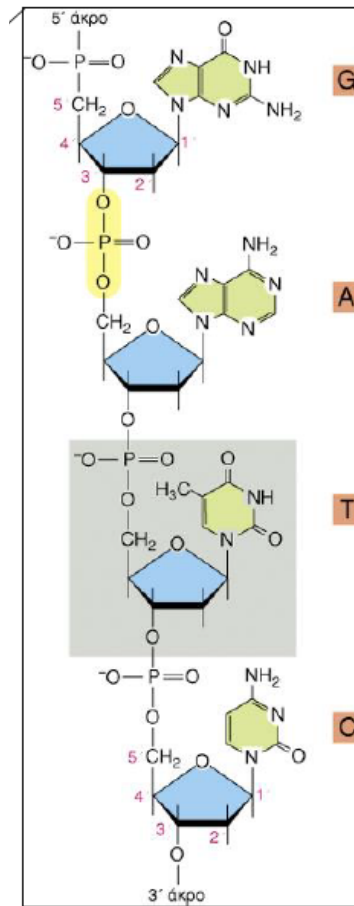
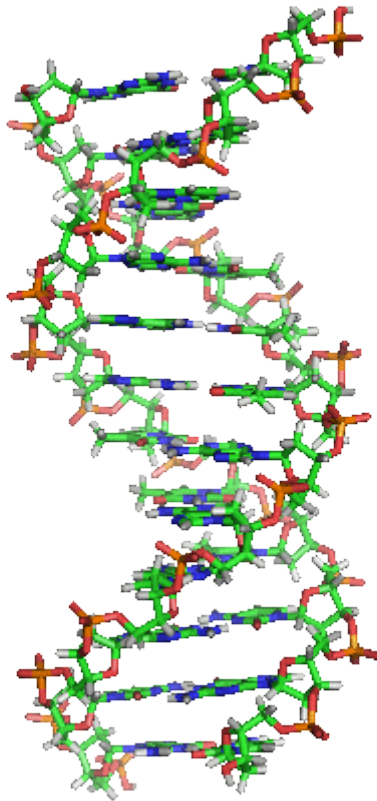
Βασίλης Ρούκος
Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Πατρών

DNA το βιομόριο που περιέχει τη γενετική πληροφορία

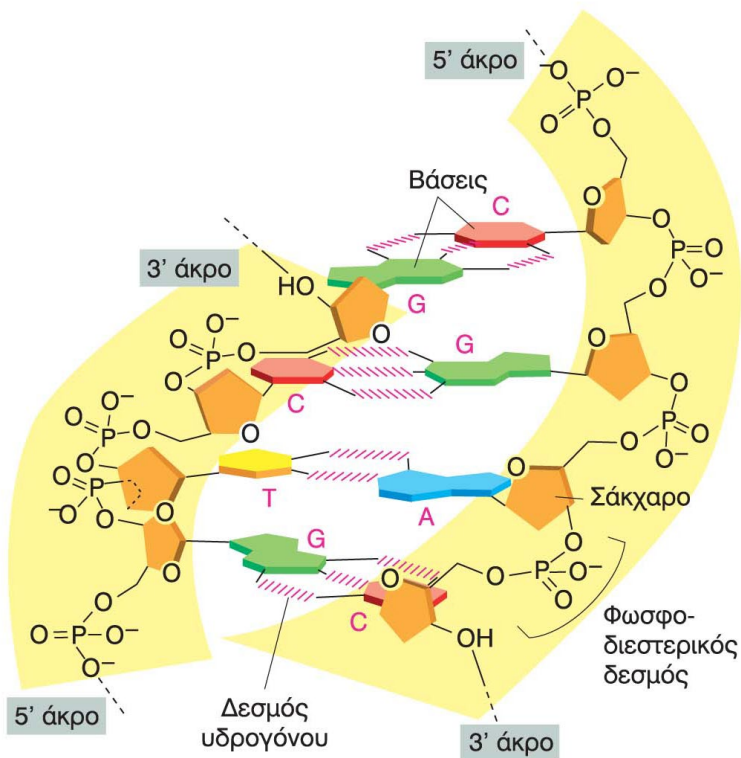


- Ένας σκελετός εναλλασσόμενων μονάδων σακχάρου/ φωσφορικής ομάδας
- 4 διαφορετικές αζωτούχες βάσεις
- Οι δύο αλυσίδες ενώνονται με δεσμούς υδρογόνου και περιελίσσονται η μια γύρω από την άλλη σχηματίζοντας τη διπλή έλικα

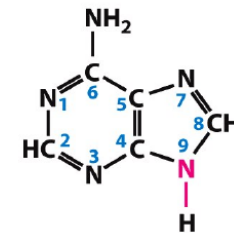
Το νουκλεοτίδιο είναι η βασική μονάδα του DNA



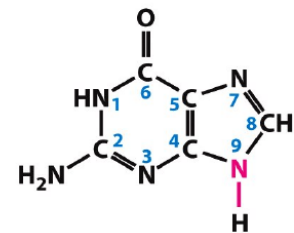
Οι δύο κλώνοι της διπλής έλικας συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών ζευγών βάσεων



ΠΟΥΡΙΝΕΣ

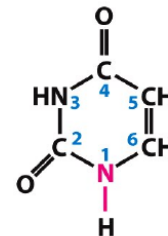


ΑΔΕΝΙΝΗ (A)

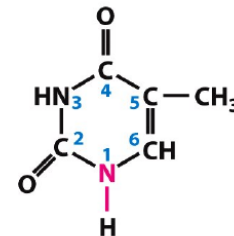


ΓΟΥΑΝΙΝΗ (G)

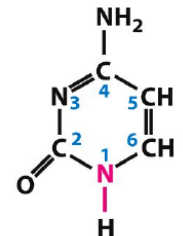
ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΕΣ



ΟΥΡΑΚΙΛΗ (U)



ΘΥΜΙΝΗ (T)



ΚΥΤΟΣΙΝΗ (C)

Είναι το DNA σταθερό μόριο?

Το DNA είναι σταθερό βιομόριο

Σταθερή δομή διπλής έλικας:

- υδρόφοβες βάσεις στο εσωτερικό (προστατευμένες από χημική προσβολή)
- υδρόφιλος, φορτισμένος, σχετικά άκαμπτος, σακχαροφωσφορικός σκελετός εξωτερικά
- Σταθεροποίηση δομής με δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα σε βάσεις, στοίβαγμα βάσεων (stacking)
- δεοξυριβόζη (αδρανής)
- Η δεύτερη αλυσίδα διατηρεί ακεραιότητα μετά από θραύση του φωσφοδιεστερικού δεσμού της μίας αλυσίδας

Το DNA είναι ιδιαίτερα σταθερό πληροφοριακό μόριο

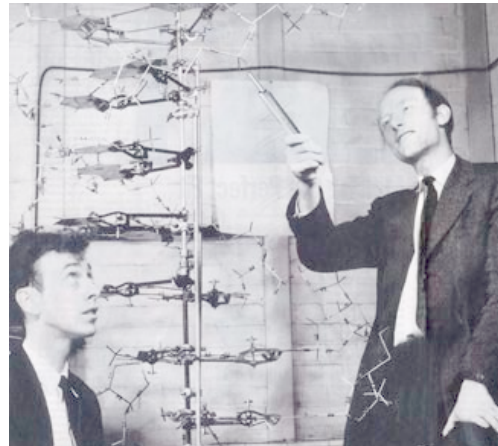
- Σταθερή δομή διπλής έλικας
- Η γενετική πληροφορία υπάρχει 2 φορές - επιδιόρθωση

~6 x 10⁹ νουκλεοτίδια πρέπει να αντιγραφούν σωστά
(2 χρωμοσώματα)

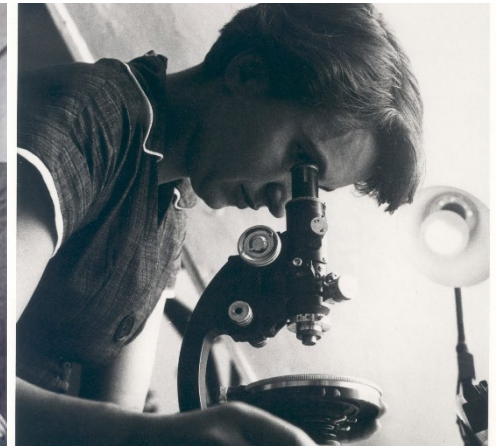


Ο κάθε κλώνος του DNA αποτελεί
εκμαγείο για τη σύνθεση ενός
συμπληρωματικού κλώνου

Ημισυντηρητική αντιγραφή



Watson and Crick

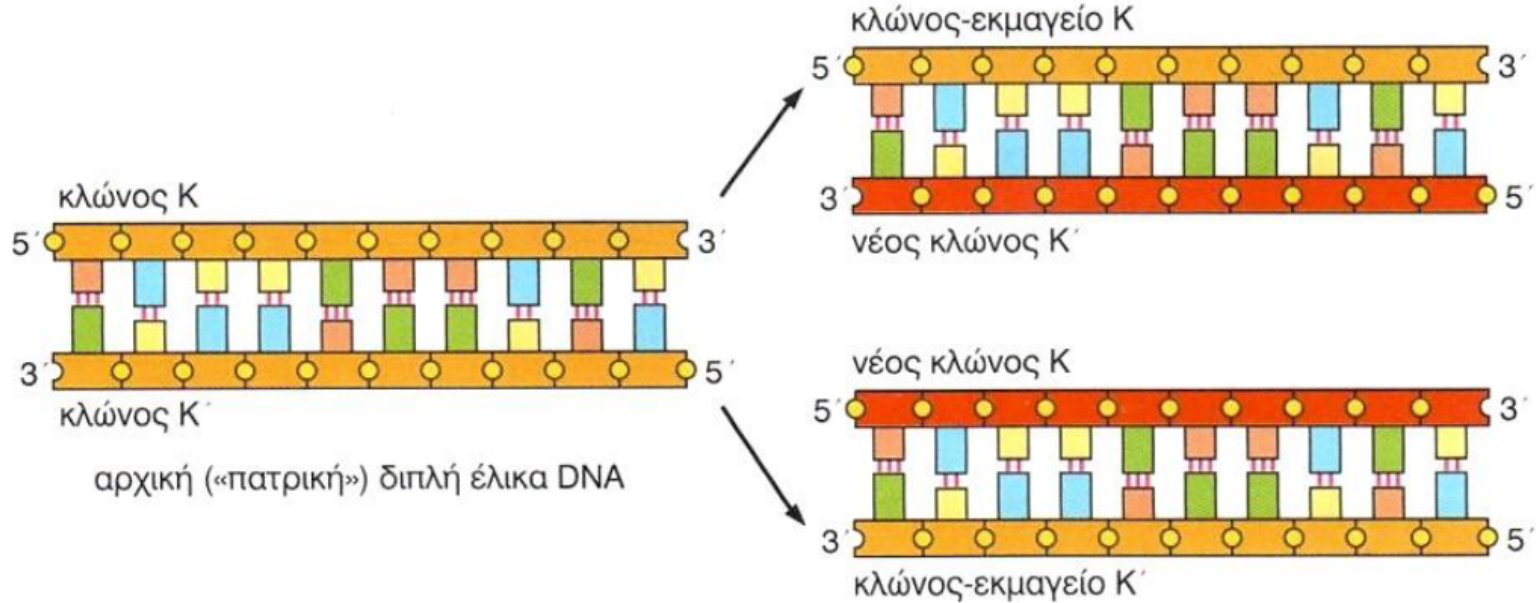


Rosalind Franklin

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

Watson & Crick, 1953

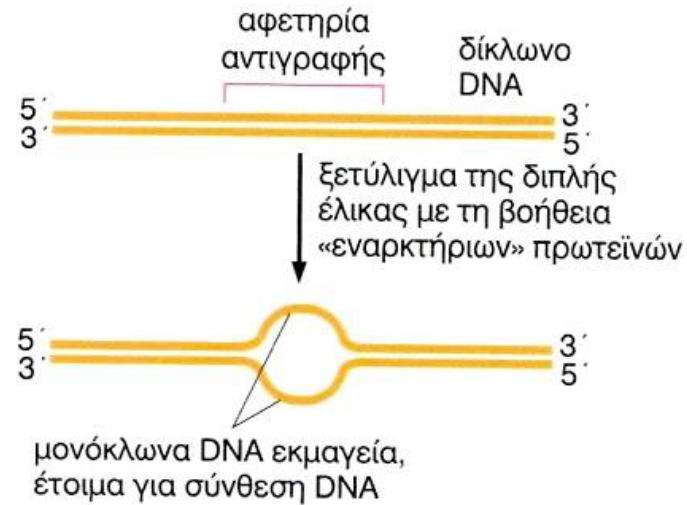
Ημισυντηρητικός τρόπος αντιγραφής



- Ο κάθε κλώνος λειτουργεί ως εκμαγείο για να δημιουργηθεί αντίγραφο του συμπληρωματικού του
- Κάθε νέα διπλή έλικα θα έχει ένα νέο και ένα παλιό κλώνο

Από που ξεκινά η αντιγραφή?

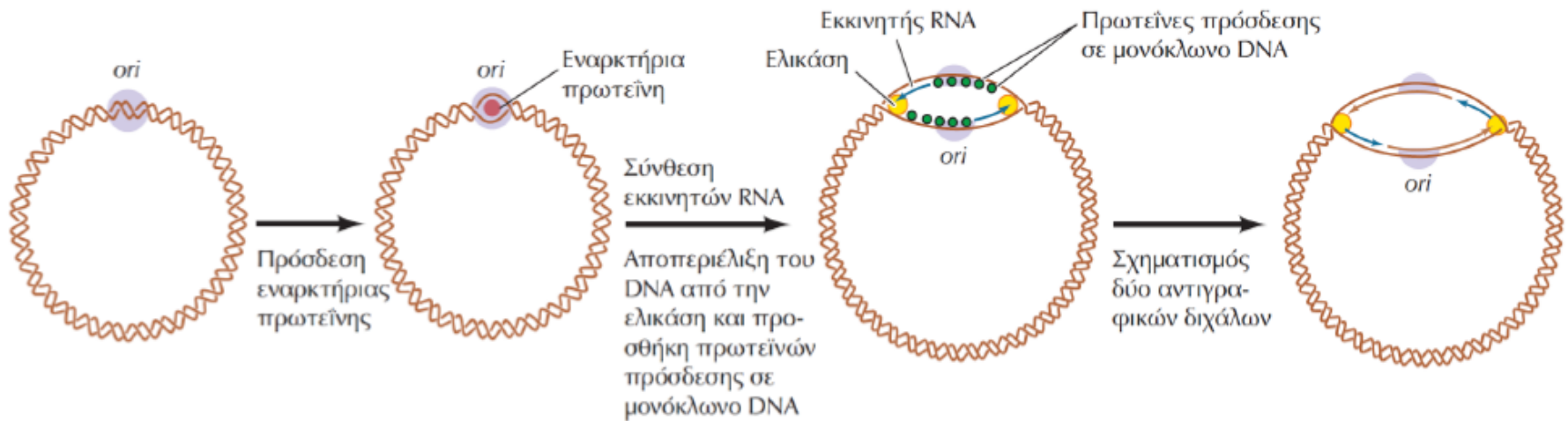
Έναρξη της αντιγραφής



Έναρξη της αντιγραφής

- Έναρξη από **συγκεκριμένες-μη τυχαίες**-περιοχές του χρωμοσώματος
- **Προκαρυωτικά κύτταρα**: κυκλικό DNA, μια περιοχή έναρξης
- **Ευκαρυωτικά κύτταρα**: πολλαπλές περιοχές
- Οι περιοχές έναρξης αναγνωρίζονται από ειδικές **εναρκτήριες πρωτεΐνες**
- Οι **εναρκτήριες πρωτεΐνες** συνδέονται στις αφετηρίες έναρξης της αντιγραφής και **διασπούν τους δεσμούς υδρογόνου** για το άνοιγμα της διπλής έλικας

Έναρξη της αντιγραφής στα προκαρυωτικά

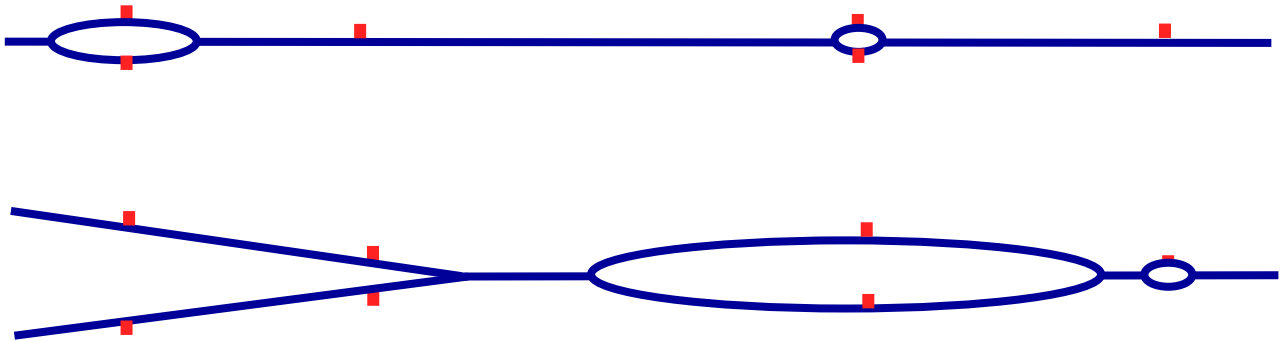


Στους ευκαρυώτες η αντιγραφή του DNA εκκινά από
χιλιάδες αφετηρίες αντιγραφής πάνω σε κάθε
χρωμόσωμα

G1



S



G2



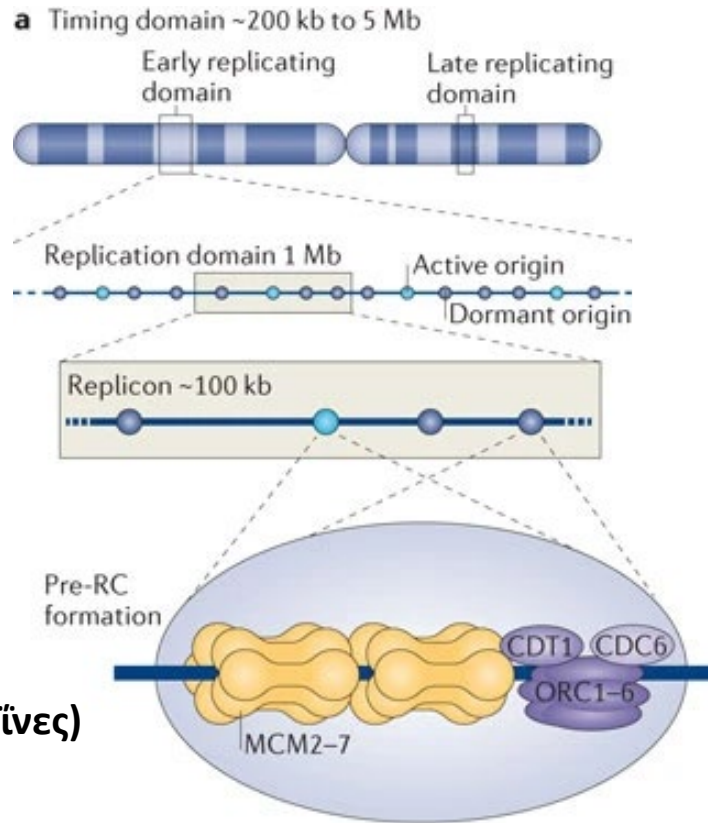
Έναρξη αντιγραφής του DNA και οργάνωση χρωμοσωμάτων

Περιοχές
Χρονισμού

Περιοχές
αντιγραφής

Ρεπλικόνια

Προ-αντιγραφικό
σύμπλοκο
(έναρκτήριες πρωτεΐνες)



Active=ενεργός

Dormant=αδρανής

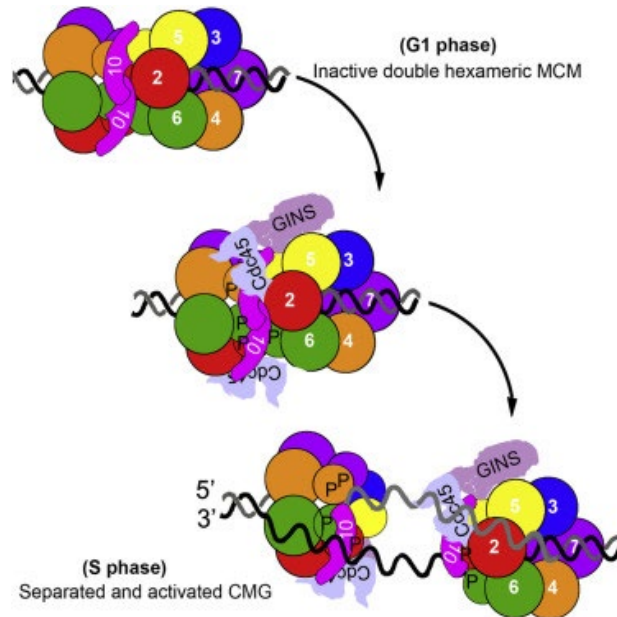
Ρεπλικόνιο: το σύνολο της περιοχής του DNA που αντιγράφεται υπό τον έλεγχο μιας περιοχής έναρξης)

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Οι περιοχές χρονισμού (timing domains) αντιστοιχούν σε μεγάλες χρωμοσωμικές περιοχές που αντιγράφονται σε παρόμοιες χρονικές στιγμές, νωρίς ή αργά στη φάση S. Κάθε περιοχή χρονισμού μπορεί να περιλαμβάνει μία ή περισσότερες περιοχές αντιγραφής, οι οποίες με τη σειρά τους αποτελούνται από 5 έως 10 γειτονικά **ρεπλικόνια** που πυροδοτούνται ταυτόχρονα. Ένα **ρεπλικόνιο** αντιστοιχεί στο τμήμα του DNA που αντιγράφεται αμφίδρομα από μία θέση έναρξης της αντιγραφής με τις κοντινές αδρανείς θέσεις να αντιγράφονται παθητικά.

DNA ελικάση

- Ένζυμο που ξετυλίγει τη διπλή έλικα του DNA διασπώντας δεσμούς υδρογόνου
- Η ενέργεια για τη διάσπαση προέρχεται από την υδρόλυση του ATP



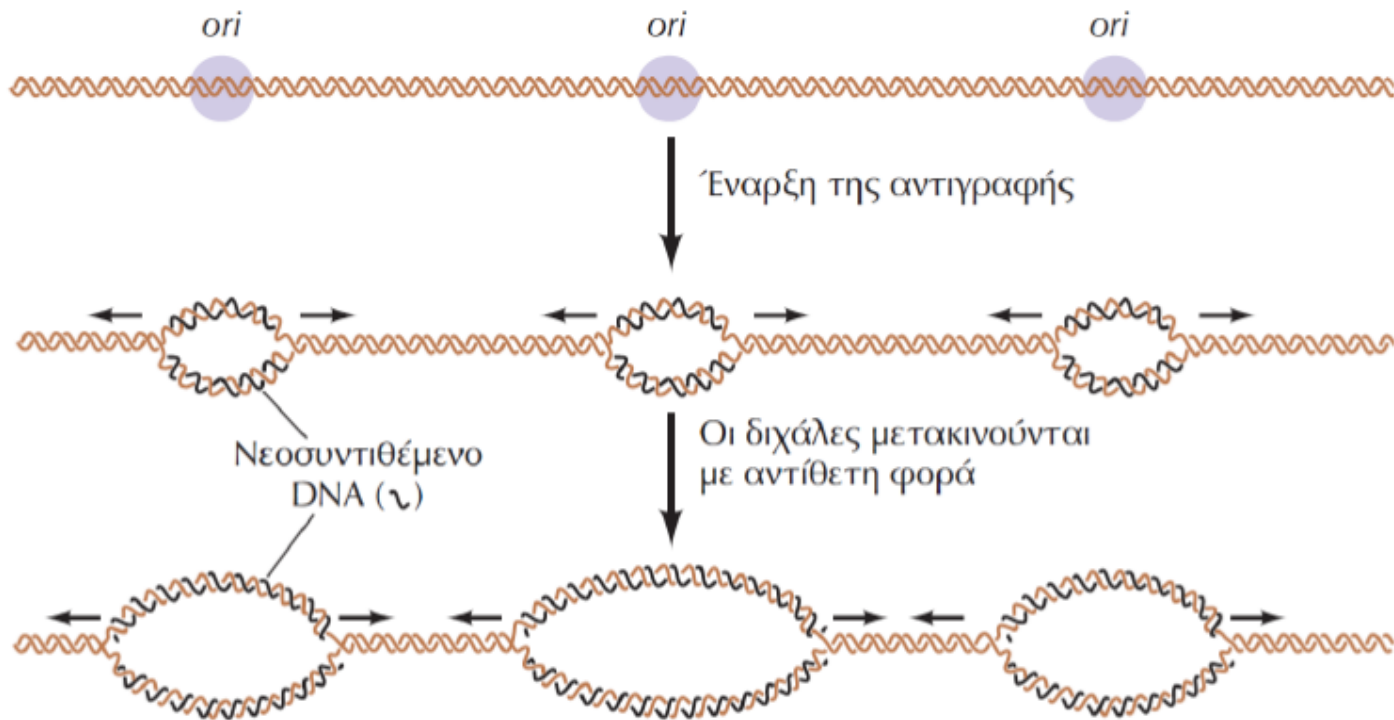
[Cell reports,](#)
[Volume 13, Issue 11](#), 22 December 2015,
Pages 2576-2586

Έναρξη της αντιγραφής

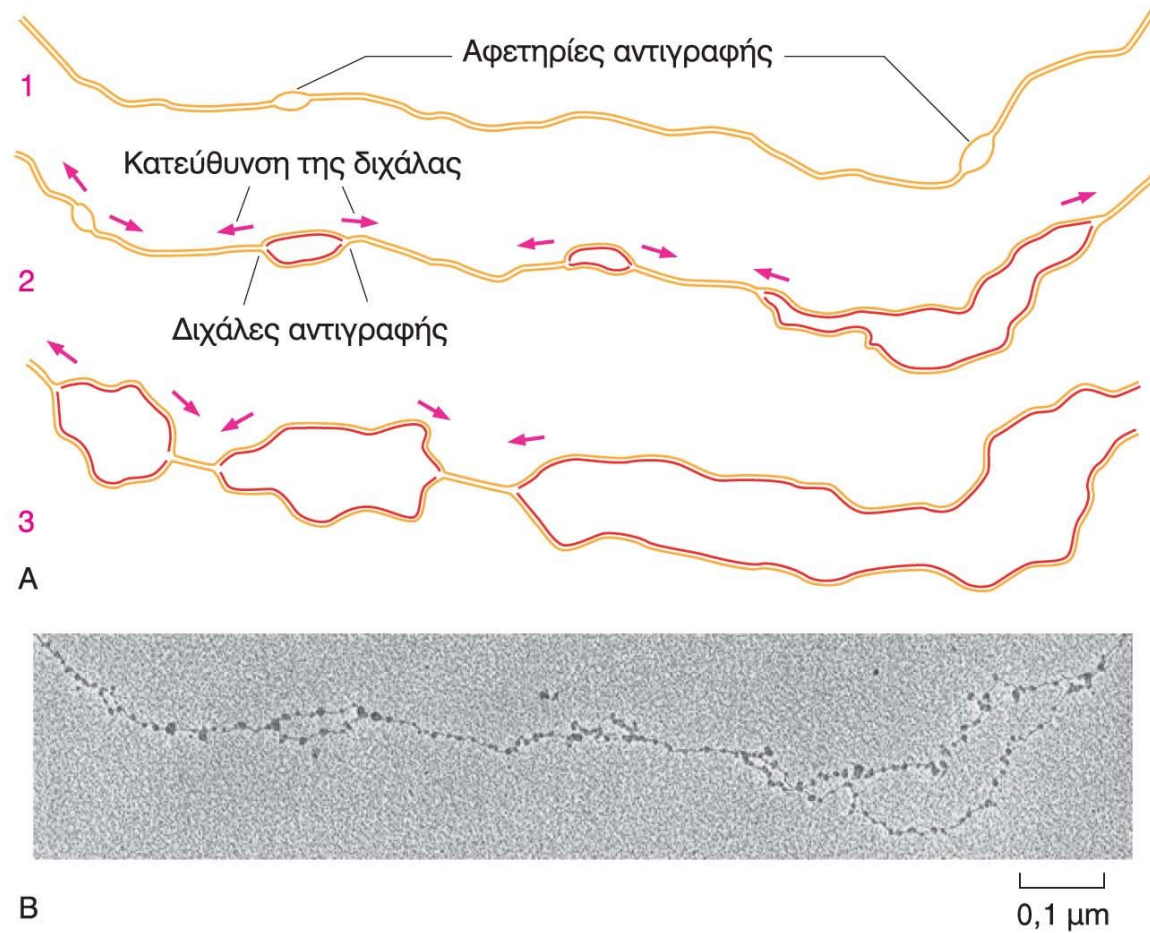
6×10^9 νουκλεοτίδια πρέπει να αντιγραφούν μέσα σε 1 -12 ώρες

	Μέγεθος γονιδιώματος	Ταχύτητα αντιγραφής	Αριθμός αφετηριών	Διάρκεια αντιγραφής
Βακτήρια	4.6×10^6 bp	500-1000 bp/sec	1	0,5 h
Άνθρωπος	6×10^9 bp	50-100 bp/sec	10.000	12 h

Έναρξη της αντιγραφής στους ευκαρυώτες

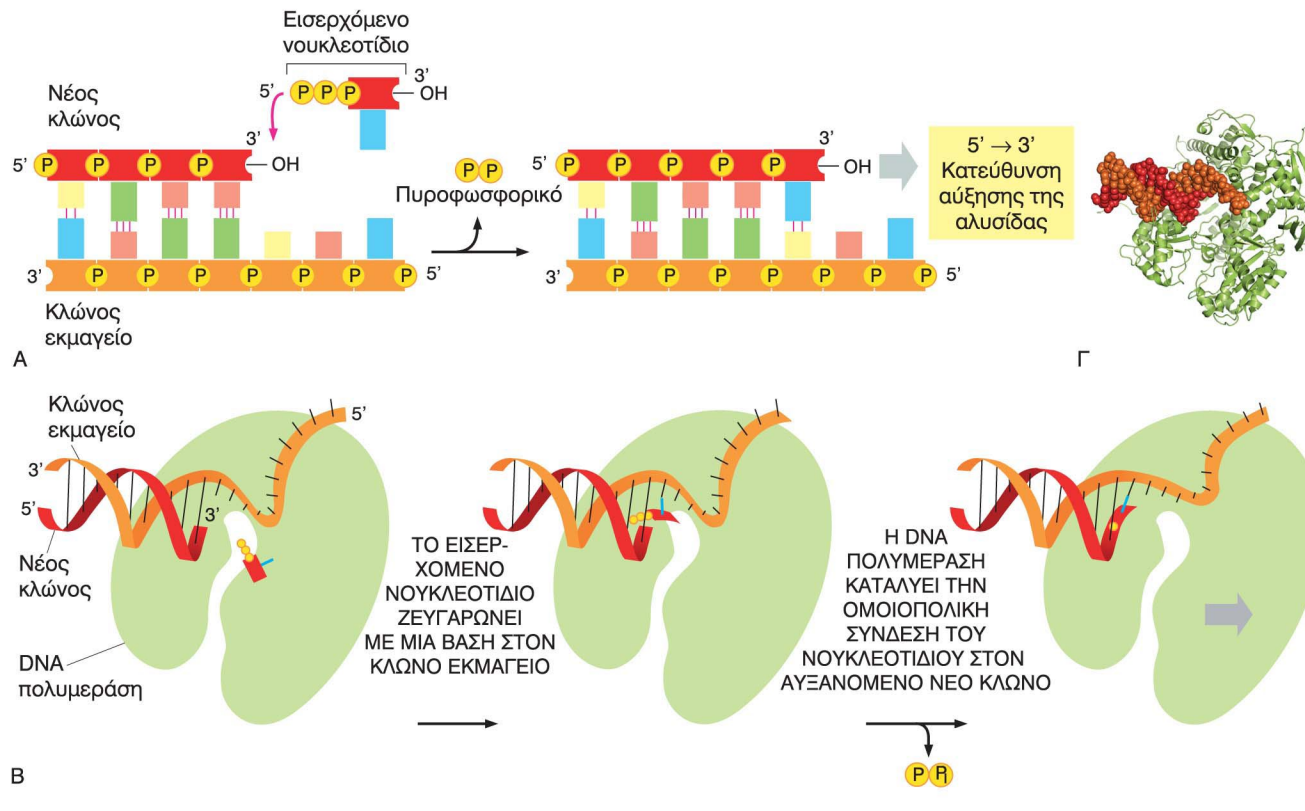


Η αντιγραφική μηχανή κινείται σε διπλή κατεύθυνση



Ποιο είναι το κύριο ένζυμο της αντιγραφής?

Η DNA πολυμεράση καταλύει την προσθήκη νουκλεοτιδίων στην αυξανόμενη αλυσίδα DNA με κατεύθυνση 5'→3'



- Καταλύει την προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο ενός αναπτυσσόμενου κλώνου = αντίδραση πολυμερισμού
- Η ενέργεια για τον πολυμερισμό προέρχεται από το ίδιο το νουκλεοτίδιο με την υδρόλυση ενός δεσμού υψηλής ενέργειας

DNA Πολυμεράση το κύριο ένζυμο της αντιγραφής

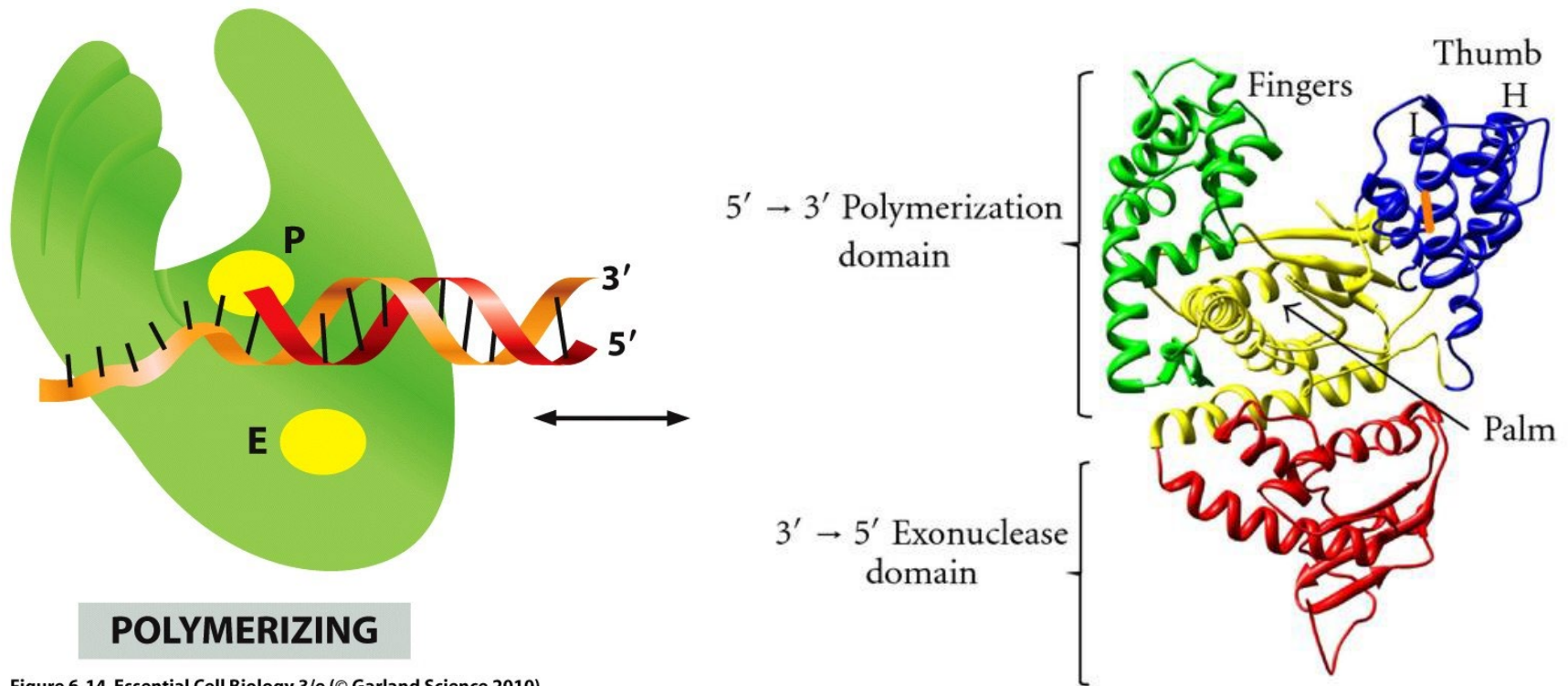
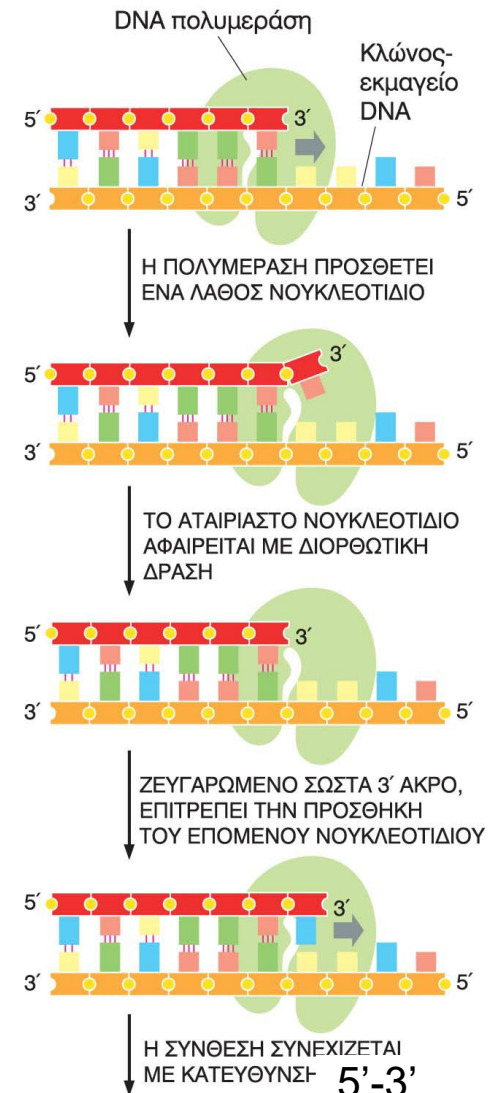


Figure 6-14 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

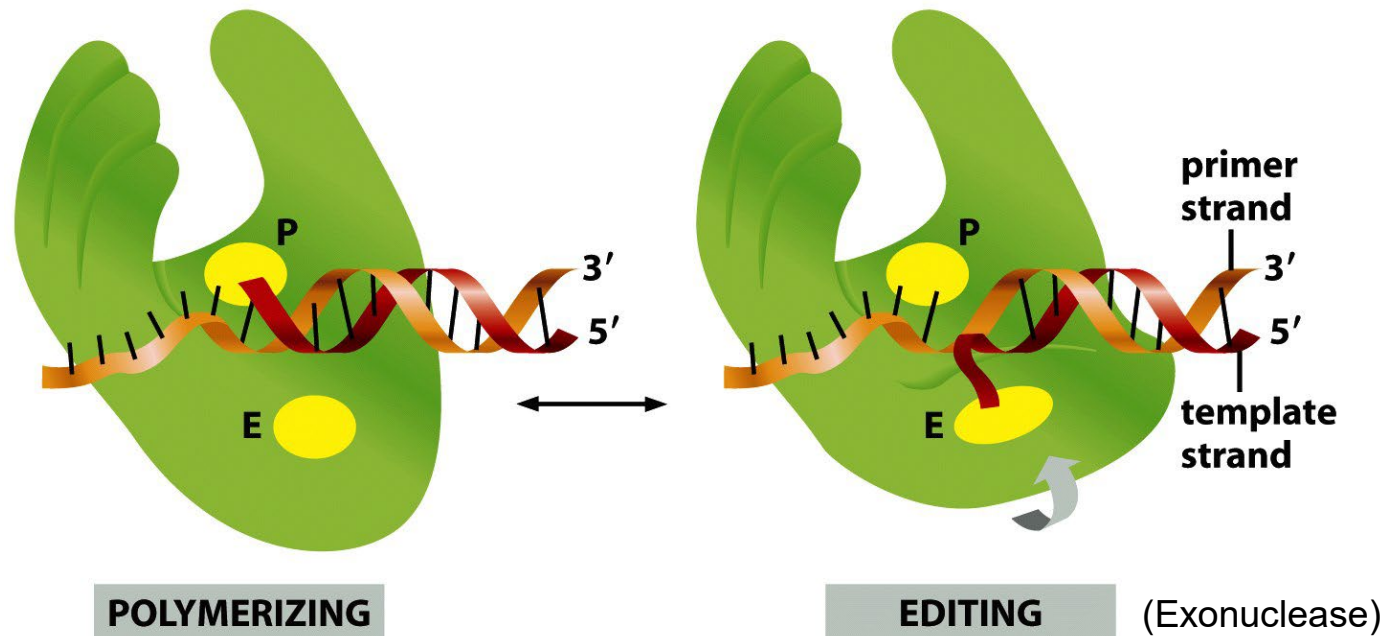
Η «ενεργή θέση» της DNA πολυμεράσης είναι δομημένη έτσι ώστε να ταιριάζει απόλυτα με ένα ζεύγος βάσεων. Όταν ένα νέο νουκλεοτίδιο με τη συμπληρωματική βάση εισέρχεται στην ενεργή θέση, το ένζυμο αλλάζει ελαφρώς το σχήμα του για να ταιριάζει καλύτερα, προωθώντας τη χημική αντίδραση. Ένα νουκλεοτίδιο που δεν ταιριάζει σωστά δεν προσαρμόζεται σωστά, προκαλώντας την παύση του ενζύμου και την επιβράδυνση της διαδικασίας προσθήκης του

Η DNA πολυμεράση διορθώνει τα λάθη της

- Η DNA πολυμεράση κάνει 1 λάθος κάθε 10^7 νουκλεοτίδια
- Πολυμερισμός $5' \rightarrow 3'$ και Διόρθωση δοκιμίου $3' \rightarrow 5'$ (Proof reading)
 $3' \rightarrow 5'$ εξωνουκλεοτιδική δράση



Η DNA Πολυμεράση διορθώνει τα λάθη της



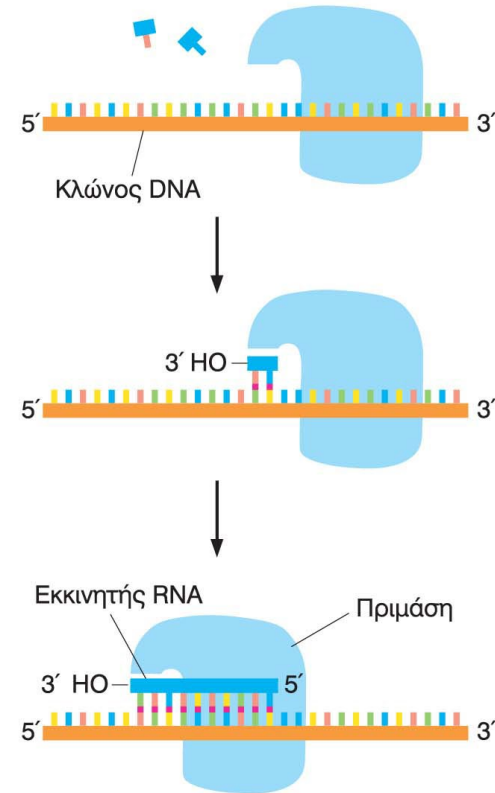
Πώς αντιλαμβάνεται η πολυμεράση τα λάθη της;

Οι πολυμεράσες επιτυγχάνουν υψηλή πιστότητα αντιγραφής DNA χρησιμοποιώντας διάφορους μηχανισμούς:

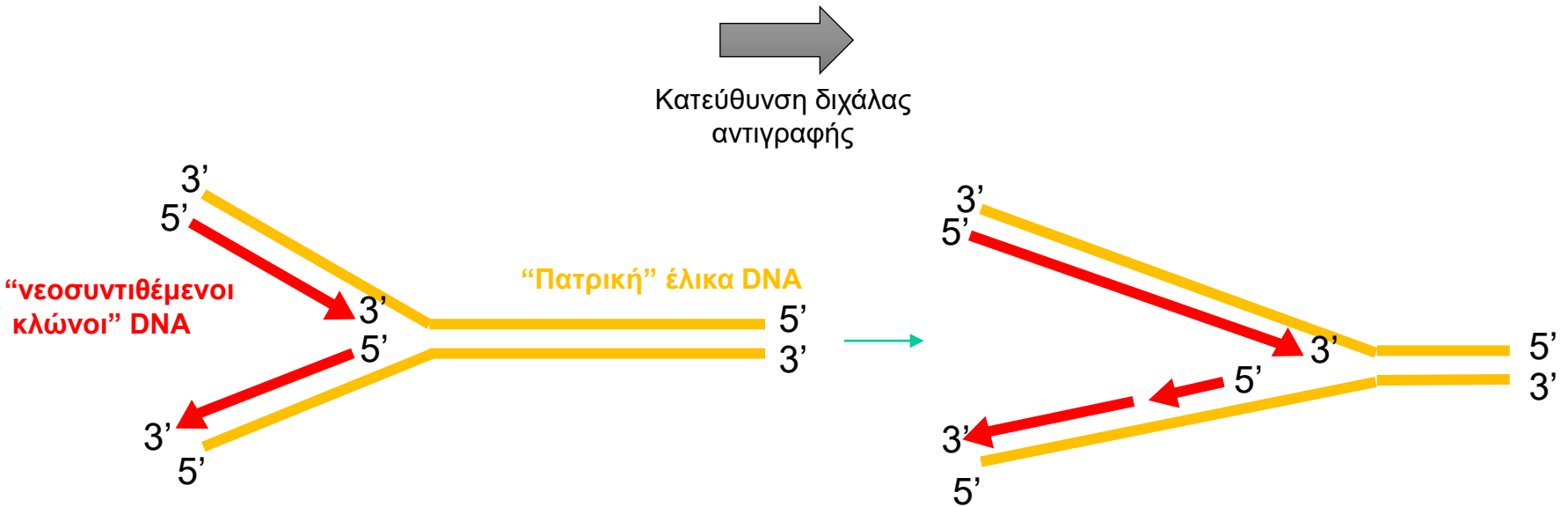
- (1) Ανίχνευση της σωστής ή μη σωστής γεωμετρίας του ζεύγους βάσεων
- (2) Κατάλυση σε περίπτωση συμφωνίας
- (3) Επιβράδυνση της κατάλυσης σε περίπτωση ασυμφωνίας και
- (4) Καταμερισμό του άκρου της αλυσίδας με το αταίριαστο νουκλεοτίδιο στο ενεργό σημείο εξωνουκλεάσης για απομάκρυνση

RNA εκκινητές απαιτούνται για να ξεκινήσει η σύνθεση ενός νέου κλώνου

- Η DNA πολυμεράση μπορεί να συνδέει νουκλεοτίδια μόνο σε ήδη υπάρχοντα
- Το ένζυμο **πριμάση** συνθέτει ένα RNA αντίγραφο (με U αντί για T και ριβόζη) περίπου 10 νουκλεοτιδίων το οποίο λειτουργεί σαν εκκινητής (primer)



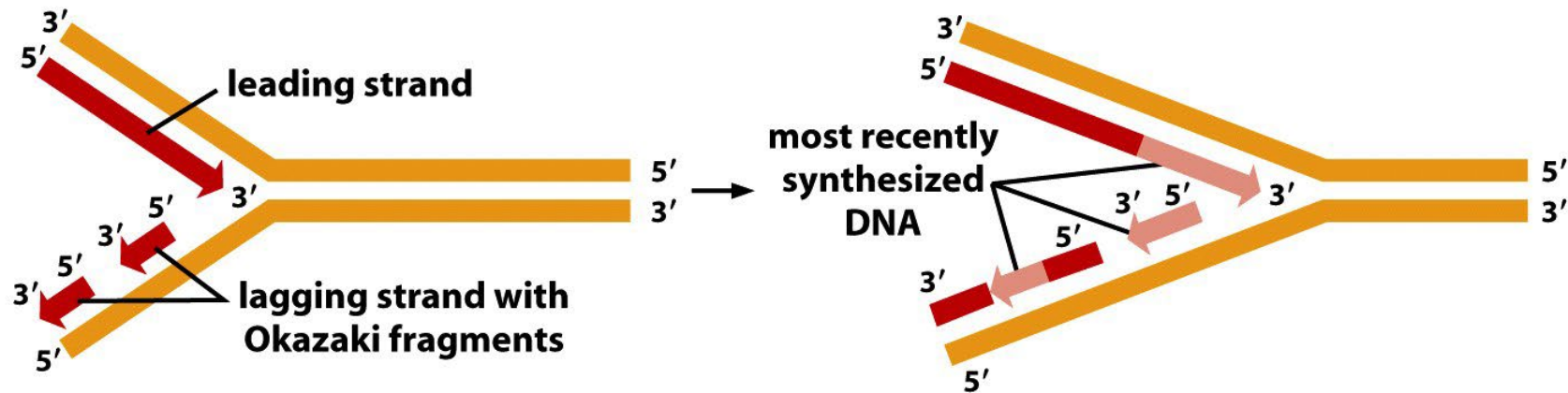
Η αντιγραφή του ενός κλώνου γίνεται ασυνεχώς



Ο ένας κλώνος συντίθεται κατά την κατεύθυνση κίνησης της διχάλας ενώ ο άλλος με αντίθετη κατεύθυνση

Η αντιγραφή του ενός κλώνου γίνεται ασυνεχώς

Κατεύθυνση διχάλας αντιγραφής



Leading strand = προπορευόμενος κλώνος

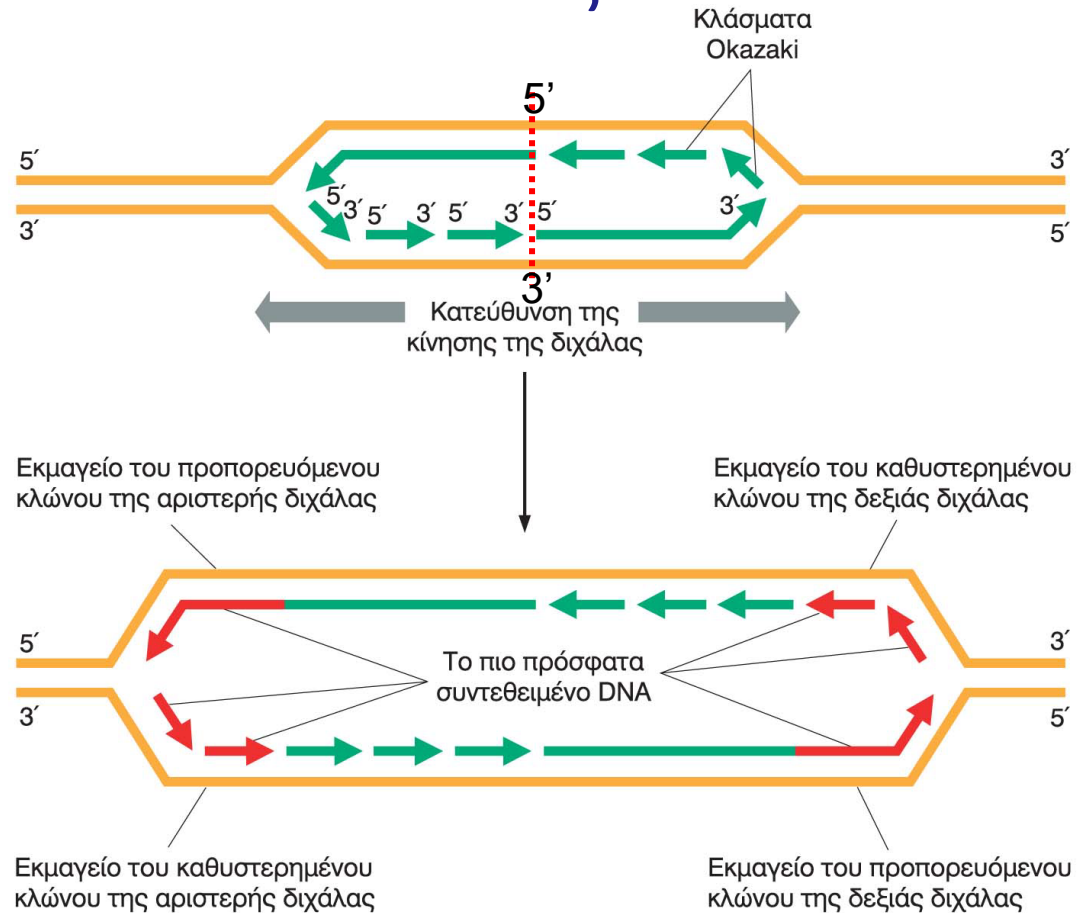
Lagging strand = καθυστερημένος κλώνος



Tsuneko and Reiji Okazaki

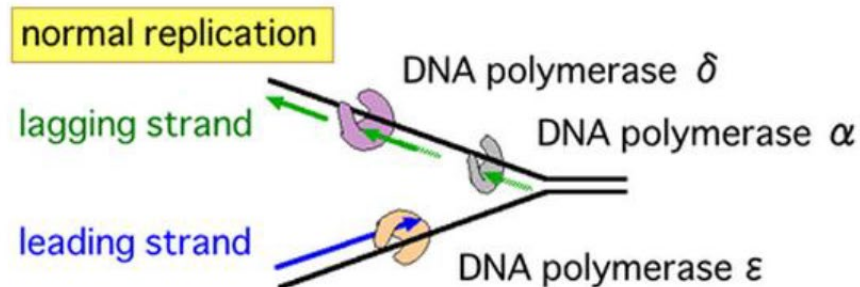
Η διχάλα αντιγραφής κινείται και προς τις δύο κατευθύνσεις

Εικόνα 6-13. Σε κάθε διχάλα αντιγραφής, ο καθυστερημένος κλώνος DNA συντίθεται σε κλάσματα. Επειδή και οι δύο νέοι κλώνοι του DNA συντίθενται πάντα σε κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$, το DNA που συντίθεται στον καθυστερημένο κλώνο, αρχικά παράγεται με τη μορφή μιας σειράς βραχέων κλασμάτων DNA τα οποία αργότερα ενώνονται μεταξύ τους. Στο πάνω σχεδιάγραμμα παρουσιάζονται δύο διχάλες αντιγραφής που μετακινούνται σε αντίθετες κατευθύνσεις. Το κάτω σχεδιάγραμμα απεικονίζει τις δύο διχάλες όπως φαίνονται λίγο αργότερα. Στον καθυστερημένο κλώνο, η DNA πολυμεράση “ράβει με πισωβελονιά”: πρέπει να συνθέσει βραχέα κλάσματα σε κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$ (κλάσματα Okazaki) κι έπειτα να μετακινηθεί προς την αντίθετη κατεύθυνση κατά μήκος του κλώνου-εκμαγείου, δηλαδή προς τη διχάλα, προτού συνθέσει το επόμενο κλάσμα.



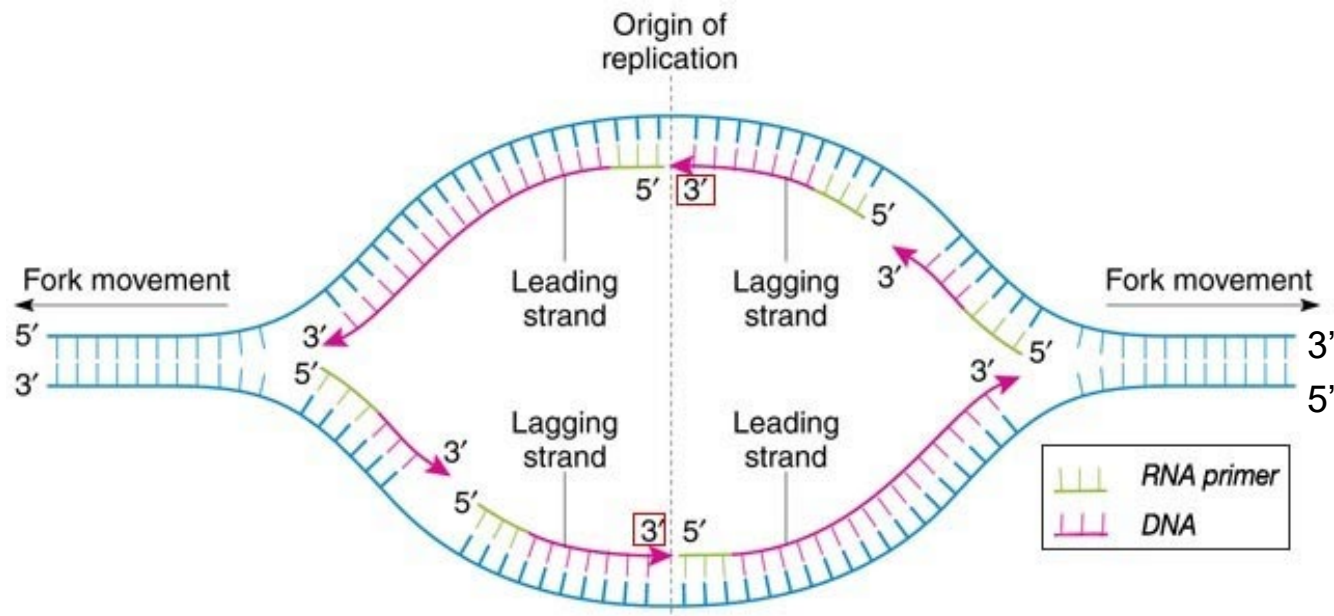
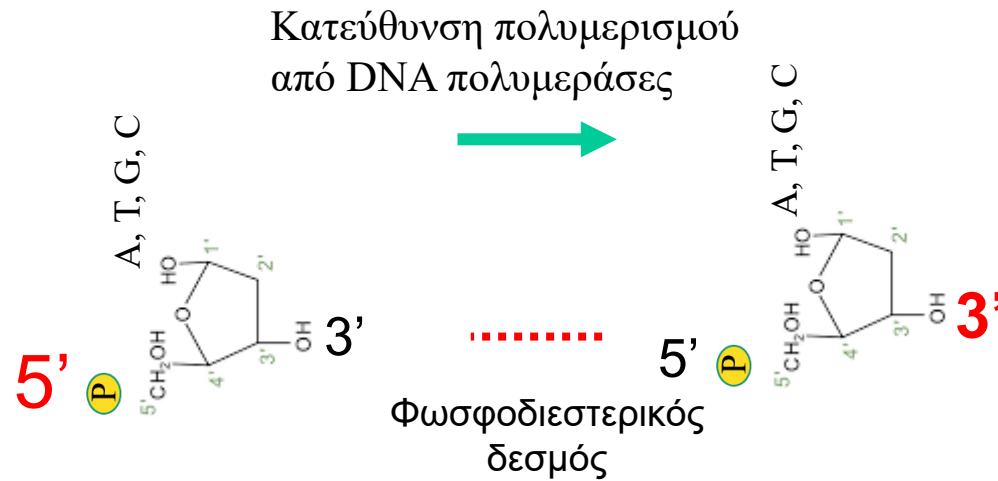
Οι πολυμεράσες του DNA

DNA Polymerases at Replication Forks



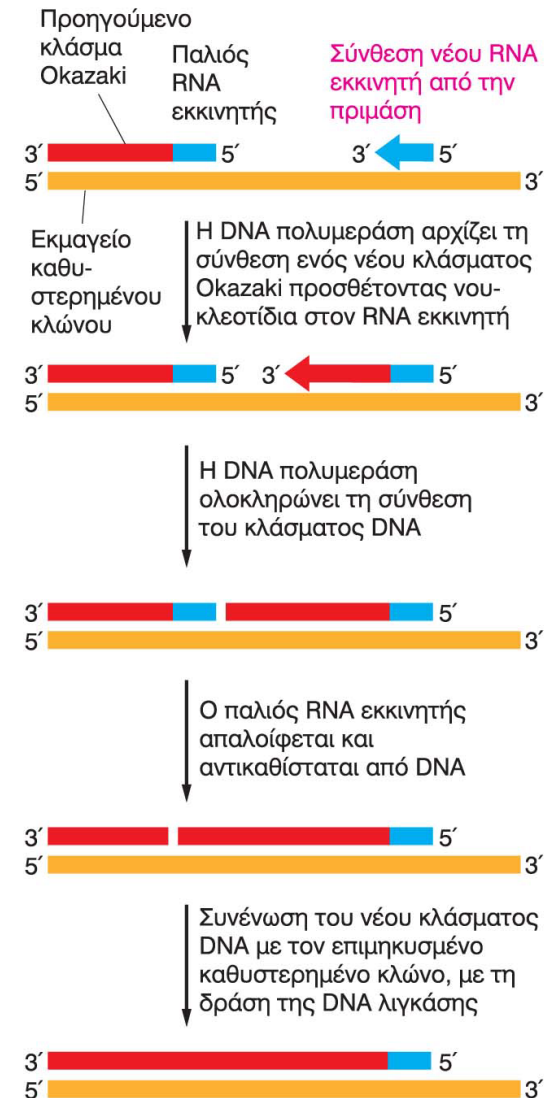
Polymerase	Primary Function
Pol α	Initiates DNA synthesis on both leading and lagging strands by creating an RNA/DNA primer.
Pol δ	Extends the DNA strand from the primer on the lagging strand, and is involved in repair processes like nucleotide excision repair and mismatch repair.
Pol ϵ	Extends the leading strand during replication, and is involved in repair processes like nucleotide excision repair and mismatch repair.
Pol γ	Replicates mitochondrial DNA.
Pol β	Primarily involved in base excision repair.
Other polymerases	Roles in various repair pathways include Pol ζ (translesion synthesis) and Pol η, θ, λ, μ (various repair pathways like base excision repair and non-homologous end joining).

Θέση RNA εκκινητών σε προπορευόμενο και καθυστερημένο κλώνο

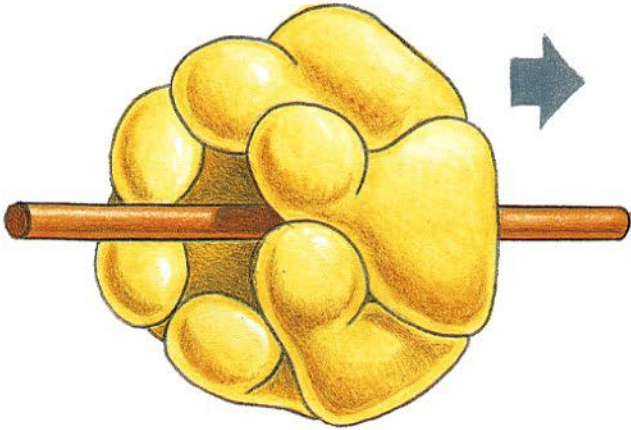


Ένζυμα που απαιτούνται για τη σύνθεση του καθυστερημένου κλώνου

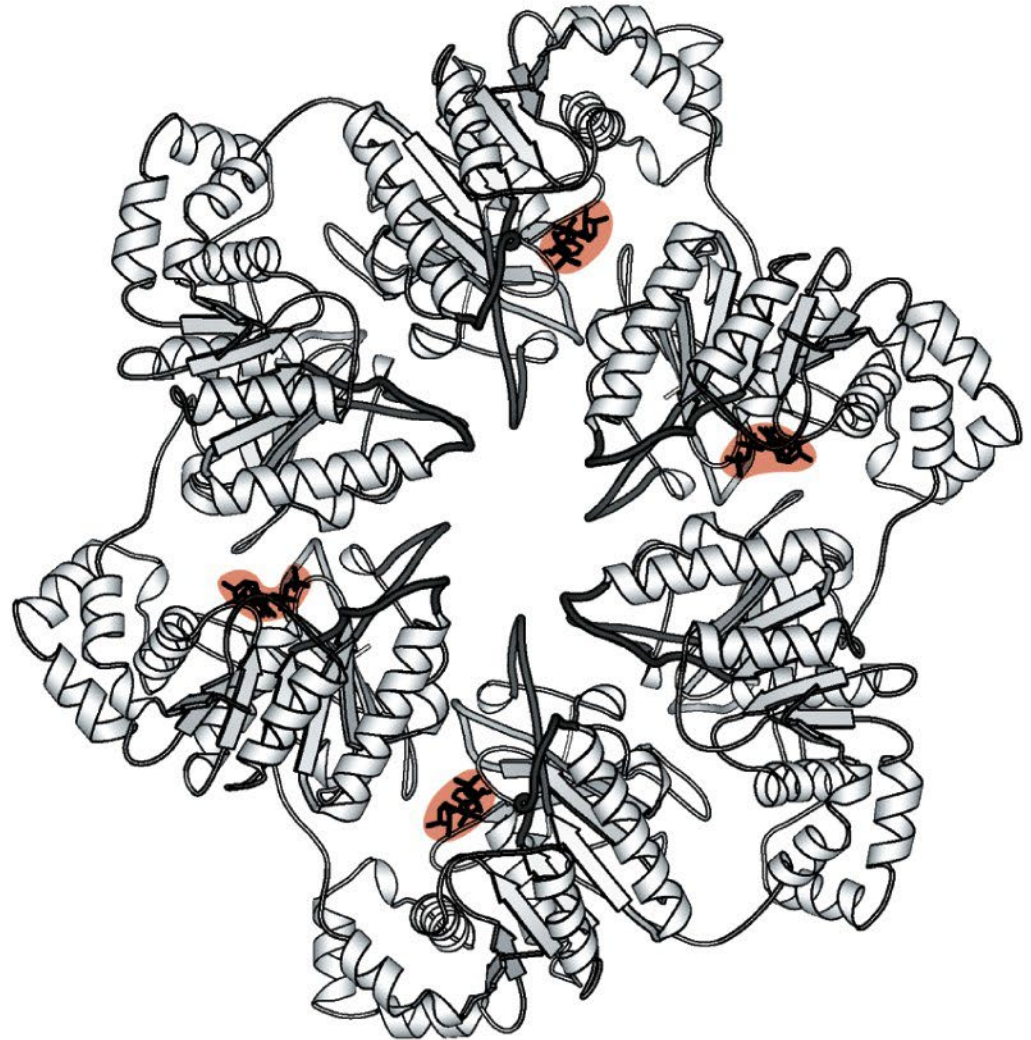
- **Νουκλεάσες** αποδομούν τον εκκινητή (FEN1, EXO1)
- Η DNA **πολυμεράση** πολυμερίζει τα τμήματα όπου υπήρχε RNA (με DNA)
- Η **DNA λιγάση** συνδέει τα κλάσματα



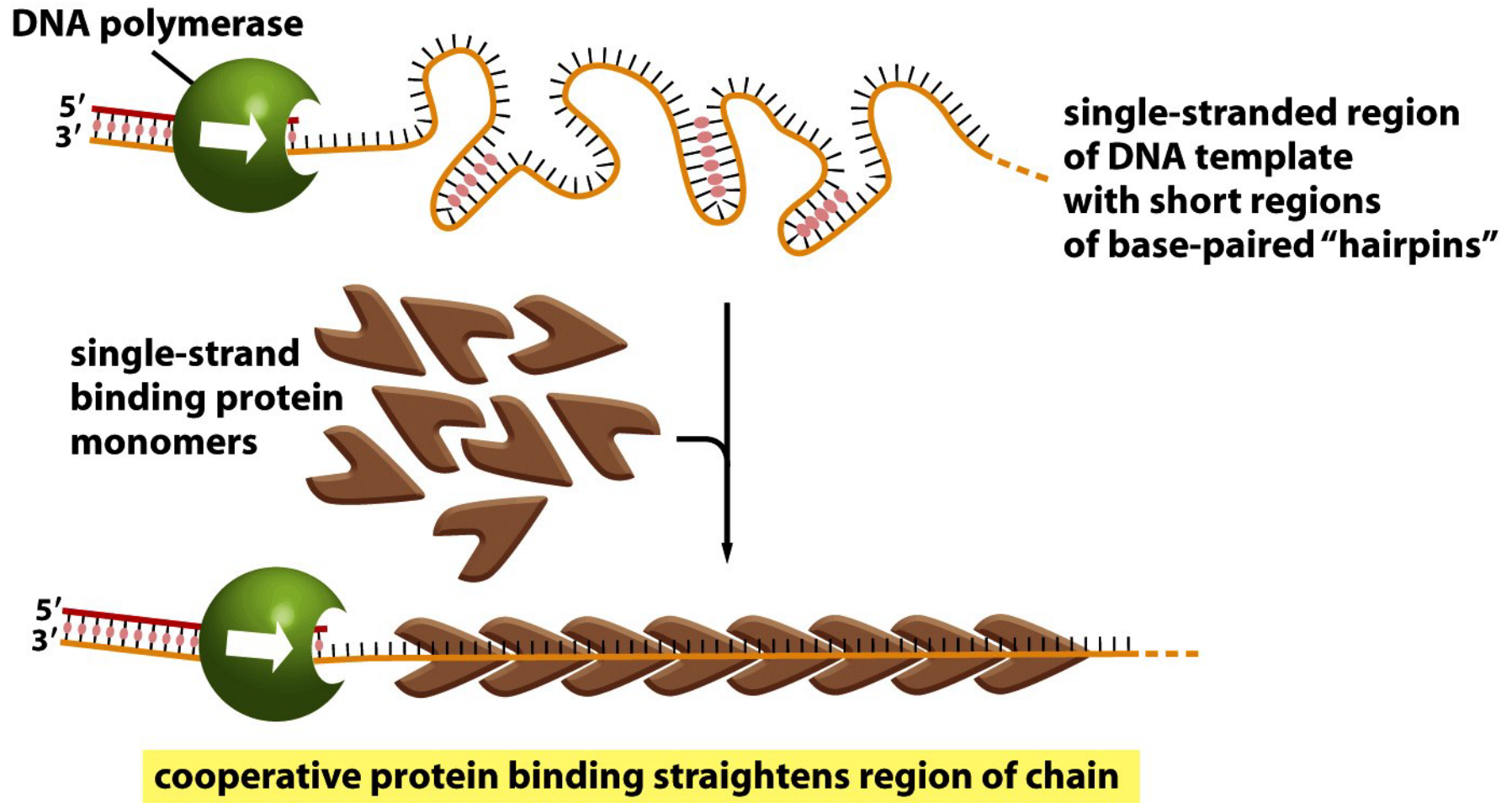
Η DNA Ελικάση ξετυλίγει τη διπλή έλικα



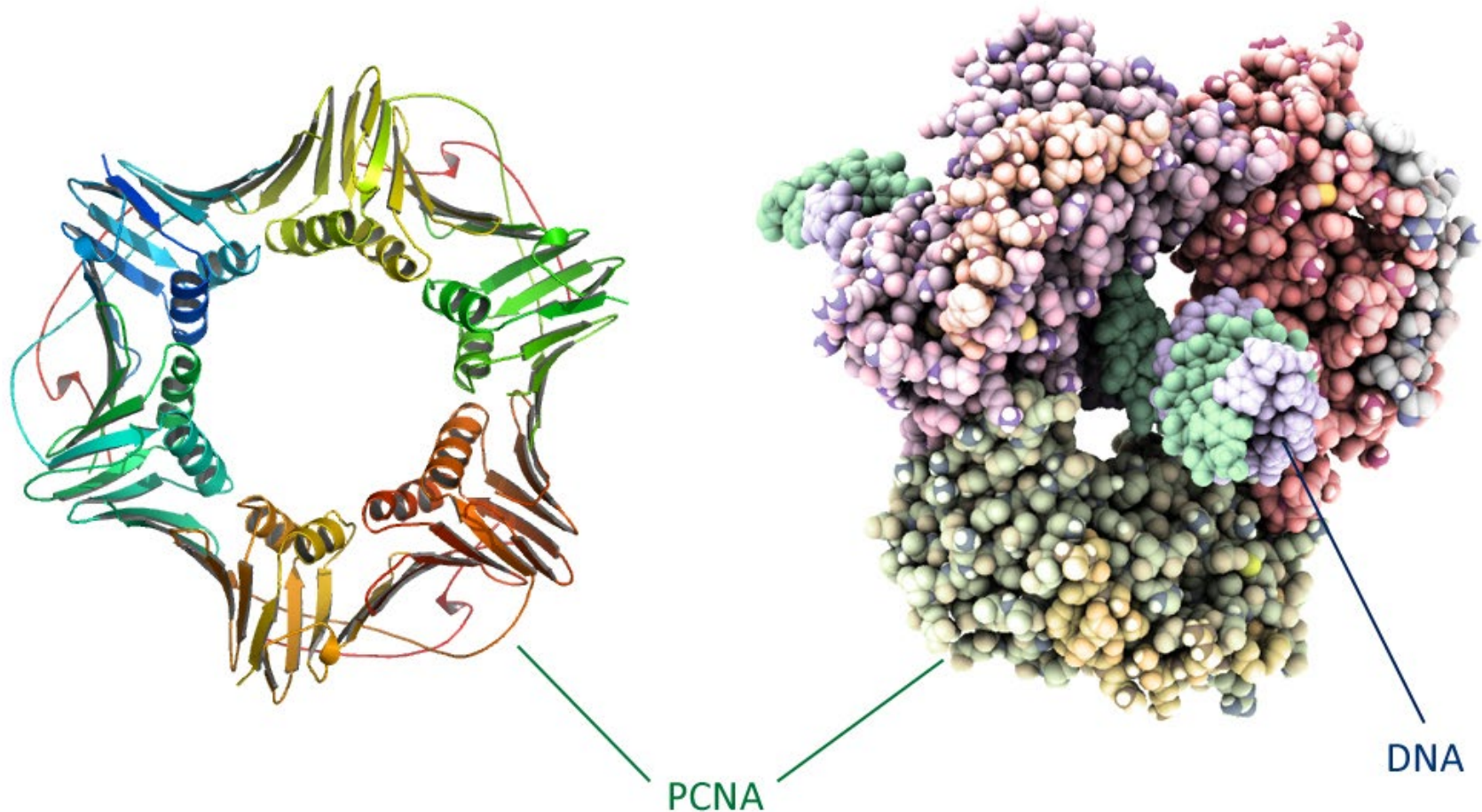
a family of six homologous
minichromosome
maintenance (MCMs)
proteins



Το μονόκλωνο DNA προστατεύεται από ειδικές Πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε αυτό



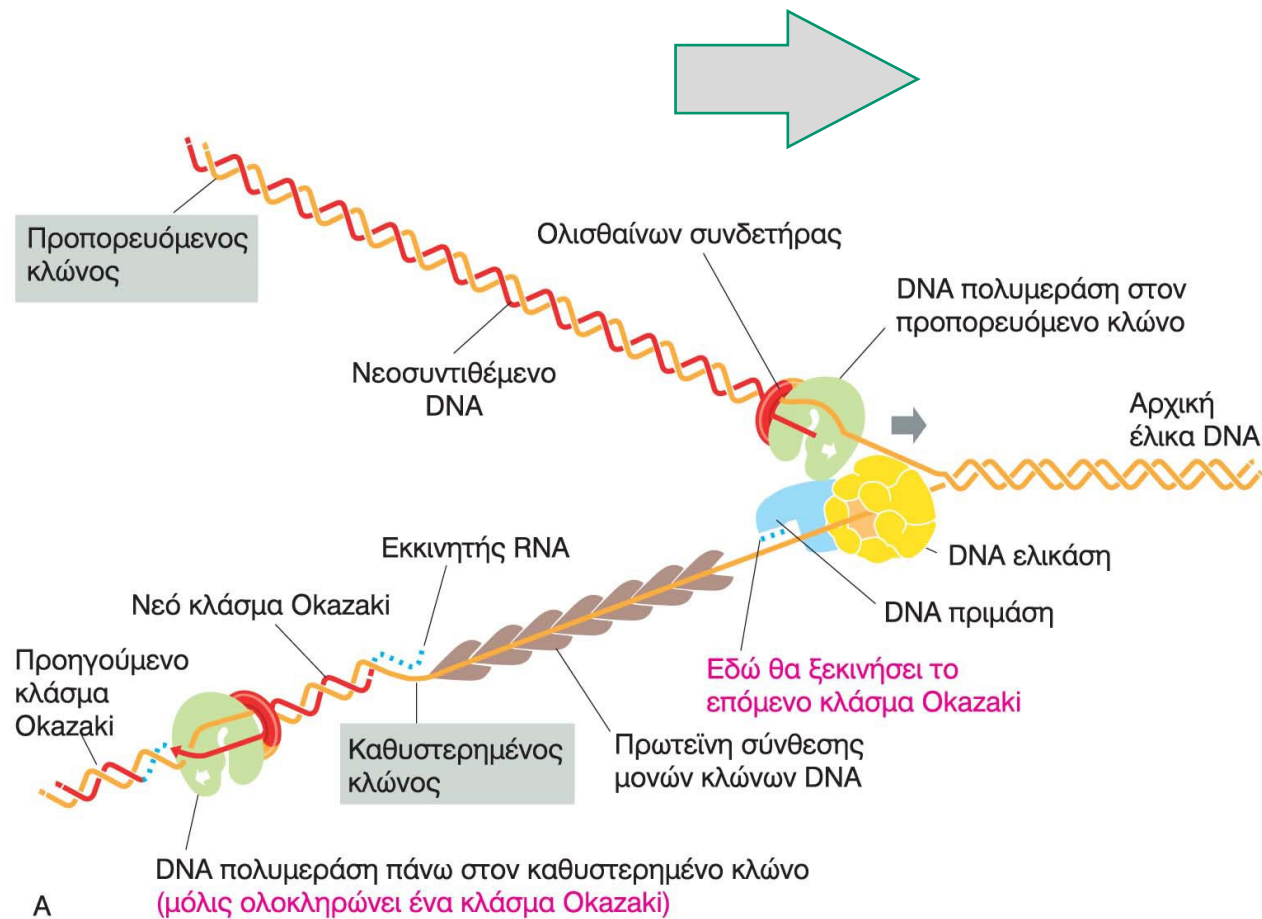
Ένας πρωτεϊνικός δακτύλιος περιβάλλει το DNA και συγκρατεί την
πολυμεράση
Ολισθαίνων συνδετήρας (replication clamp)
(PCNA στους ευκαρυώτες)



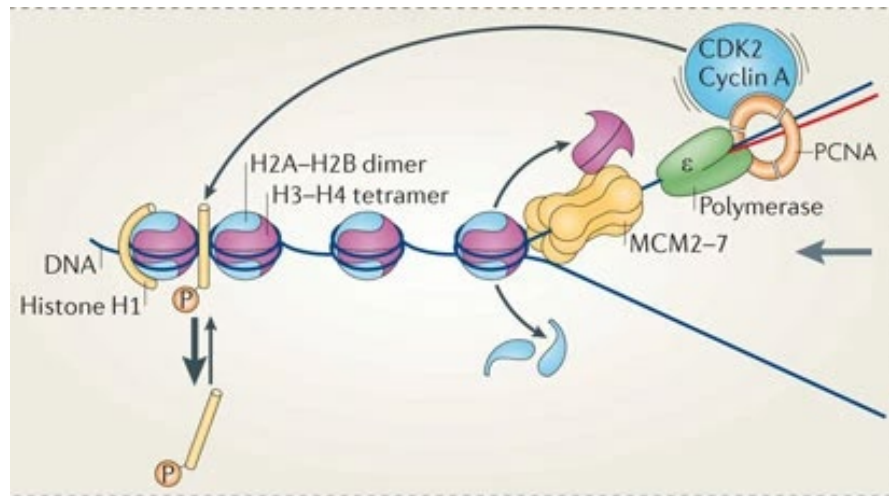
Η αντιγραφική μηχανή

- Η **ελικάση (helicase)** ξετυλίγει το διπλό κλώνο
- Η **πριμάση** συνθέτει μικρούς εκκινητές από RNA
- Η **DNA πολυμεράση** πολυμερίζει (ε και δ)
- **Νουκλεάσες** αποδομούν τα RNA και η DNA πολυμεράση πολυμερίζει τα τμήματα όπου υπήρχε RNA (με DNA)
- Η **λιγάση** συνενώνει το 5' φωσφορικό άκρο ενός παλιού κλάσματος Okazaki με το 3'OH του επόμενου
- Ειδικές πρωτεΐνες προστατεύουν το **μονόκλωνο DNA**
- Ο **ολισθαίνων συνδετήρας** (sliding clamp) κρατάει την DNA πολυμεράση συνδεδεμένη στο εκμαγείο

Η ενζυμική μηχανή της αντιγραφής



Αποσυναρμολόγηση χρωματίνης κατά την αντιγραφή.



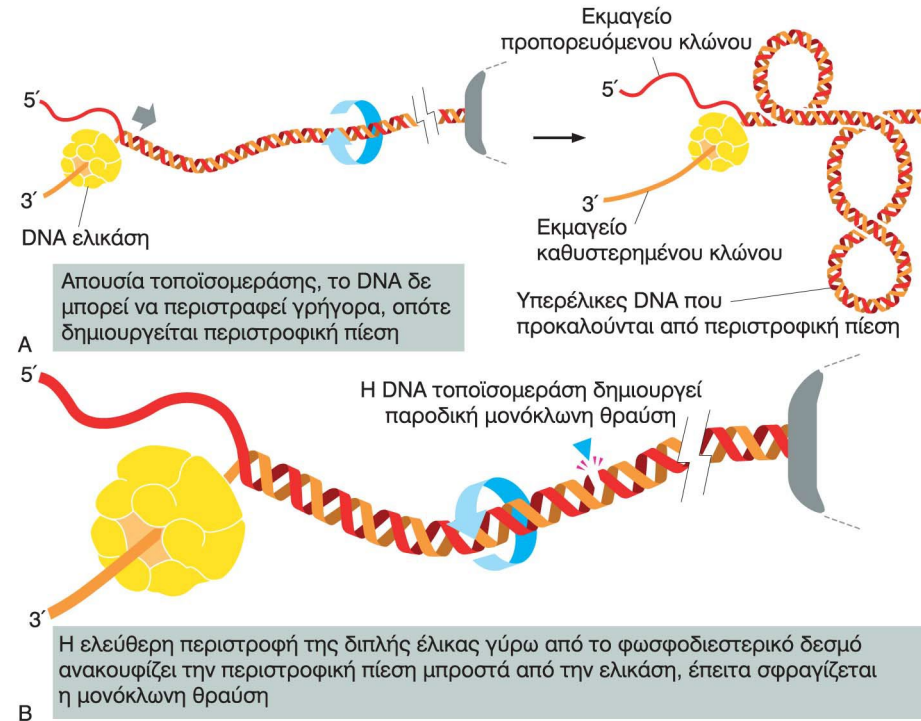
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Chromatin replication and epigenome maintenance
[Constance Alabert](#) & [Anja Groth](#)

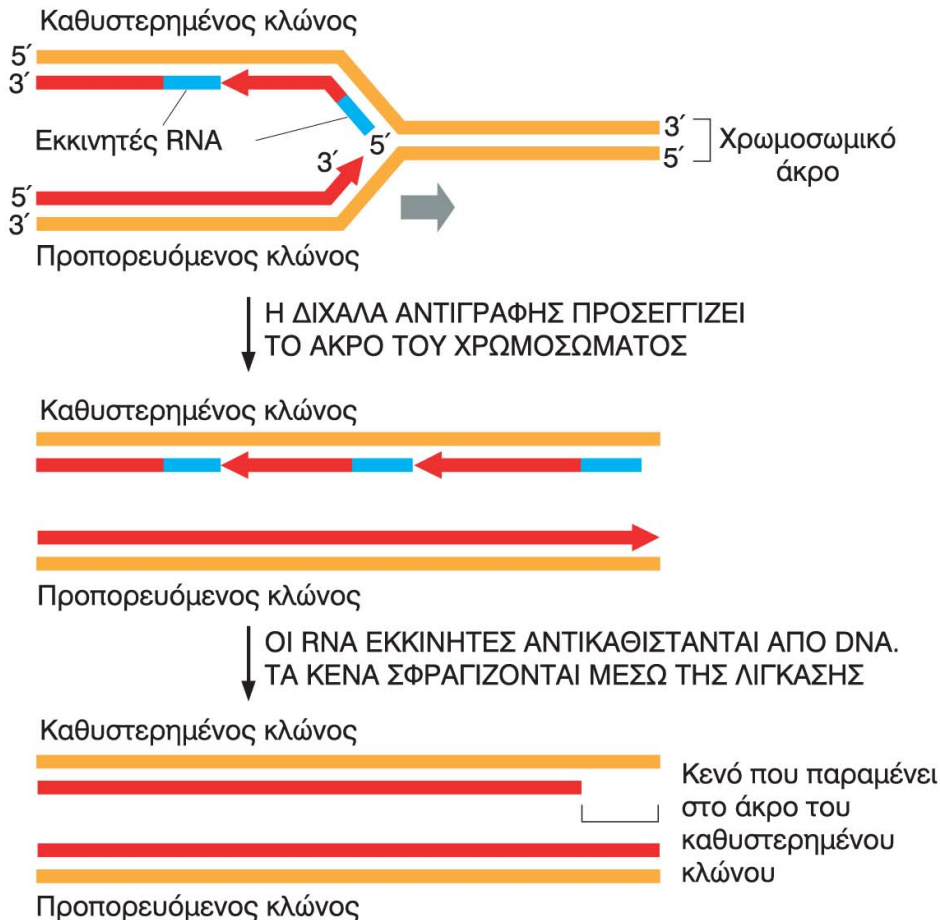
Nature Reviews Molecular Cell Biology

Το τοπολογικό πρόβλημα της αντιγραφής

- Το άνοιγμα του DNA στη διχάλα της αντιγραφής οδηγεί στην δημιουργία τάσης στο DNA μπροστά από τη διχάλα
- Οι τοποϊσομεράσες δημιουργούν μονόκλωνες ή δίκλωνες εντομές στο DNA για την απελευθέρωση της τάσης

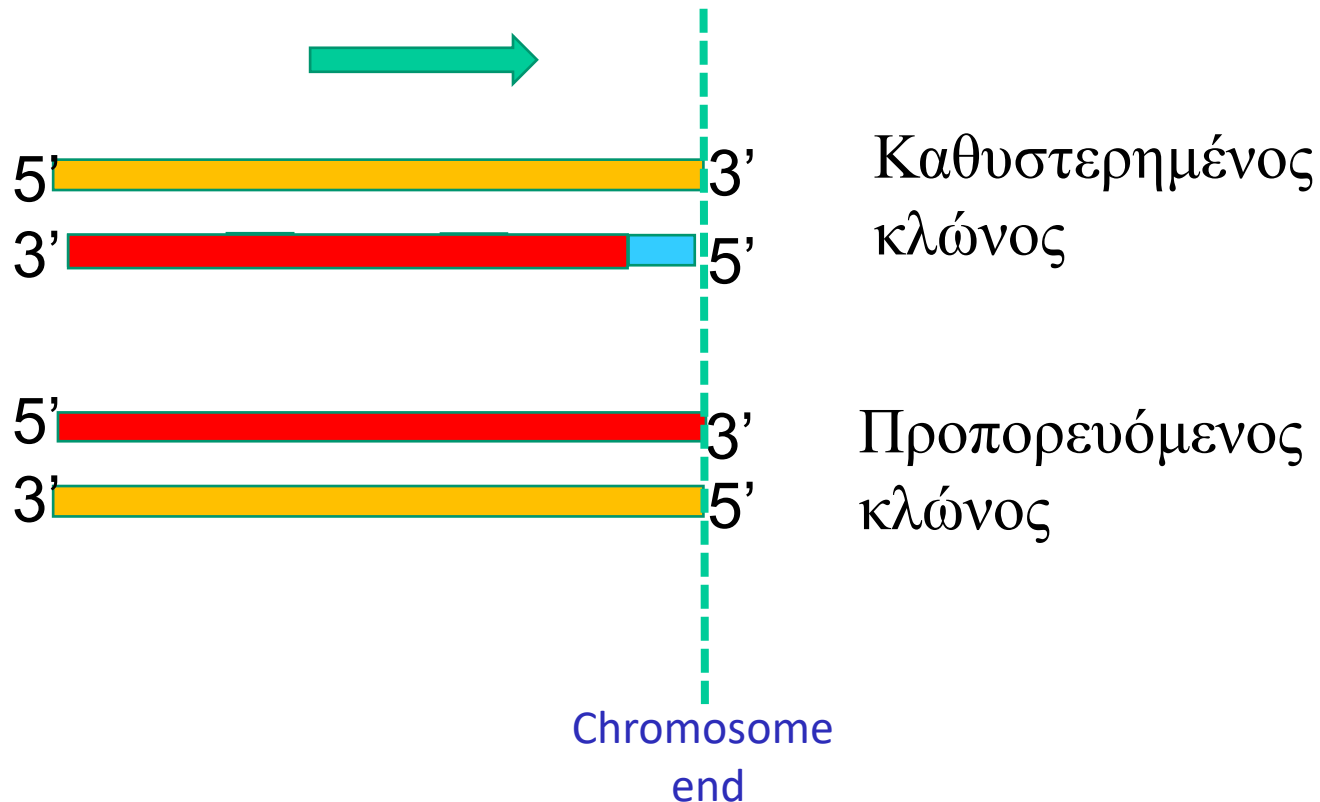


Το πρόβλημα της αντιγραφής των άκρων των χρωμοσωμάτων



Εικόνα 6-21. Χωρίς έναν ειδικό μηχανισμό για την αντιγραφή των τελικών άκρων των γραμμικών χρωμοσωμάτων, το DNA χάνεται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου κυτταρικής διαίρεσης. Η συνθεση DNA ξεκινάει στις αφετηρίες της αντιγραφής και συνεχίζεται μέχρι να φθάσει η αντιγραφική μηχανή στα τελικά άκρα του χρωμοσώματος. Ο προπορευόμενος κλώνος αντιγράφεται εξολοκλήρου. Αντίθετα, τα άκρα του καθυστερημένου κλώνου δε μπορούν να ολοκληρωθούν, επειδή όταν απομακρυνθεί ο τελικός εκκινητής RNA δεν υπάρχει τρόπος να αντικατασταθεί με DNA. Αυτά τα κενά στα άκρα του καθυστερημένου κλώνου πρέπει να συμπληρωθούν μέσω ενός ειδικού μηχανισμού για την προστασία των χρωμοσωμικών άκρων από τη συρρίκνωση μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση.

Το πρόβλημα της αντιγραφής των άκρων των χρωμοσωμάτων



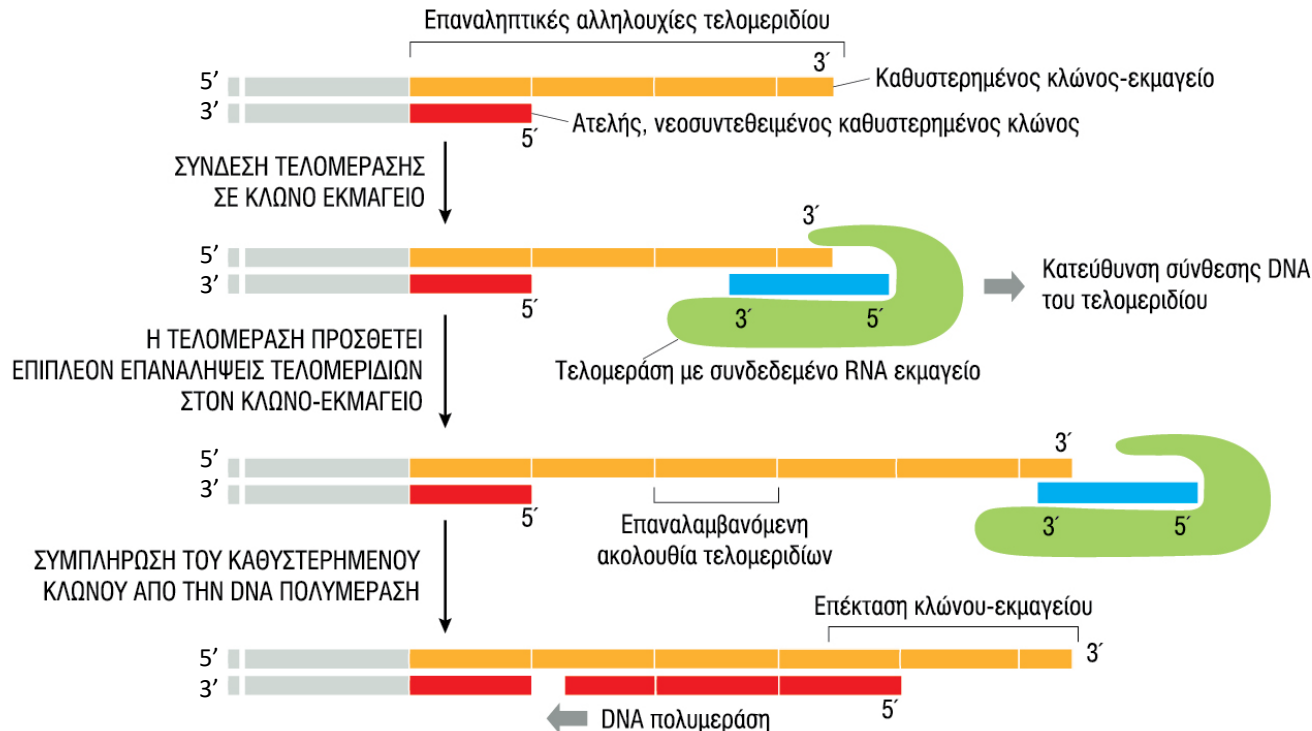
- Όταν απομακρυνθεί ο τελικός εκκινητής RNA δεν υπάρχει τρόπος να αντικατασταθεί από DNA
- DNA θα χάνεται σε κάθε κυτταρικό κύκλο
- Η λύση στο πρόβλημα τη δίνει η τελομεράση που φτιάχνει τελομερή

Τελομερή

- Είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εξανουκλεοτιδίων (TTAGGG στον άνθρωπο) που αντιγράφονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων από το ένζυμο τελομεράση
- Χάριν της ύπαρξης τους αποφεύγεται η απώλεια DNA σε κάθε κύκλο αντιγραφής

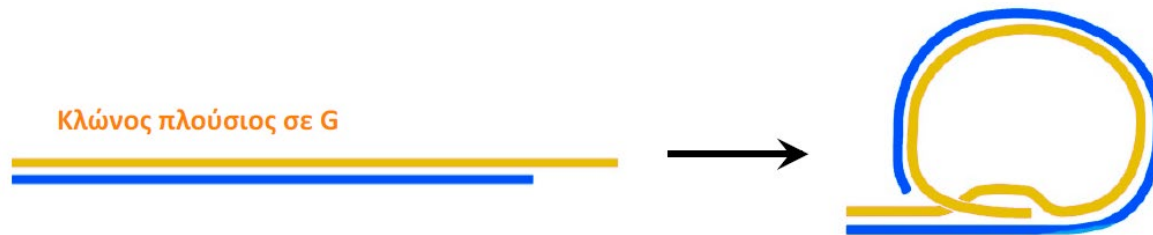
Τελομεράση

- Η τελομεράση είναι μία αντίστροφη μεταγραφάση που φέρει το δικό της εκμαγείο RNA
- Η τελομεράση προσθέτει τελομερικές επαναλήψεις στον **καθυστερημένο κλώνο εκμαγείου** επιτρέποντας στην DNA πολυμεράση να ολοκληρώσει την σύνθεση του καθυστερημένου κλώνου



Τελομερή

- Η έκταση μονόκλωνου DNA από τον κλώνο εκμαγείο διεισδύει στη δίκλωνη περιοχή και σχηματίζει μία δίκλωνη θηλειά
- Αυτή η δίκλωνη θηλεία αποτρέπει και την συνένωση διαφορετικών χρωμοσωμάτων



The Nobel Prize in Physiology
or Medicine 2009



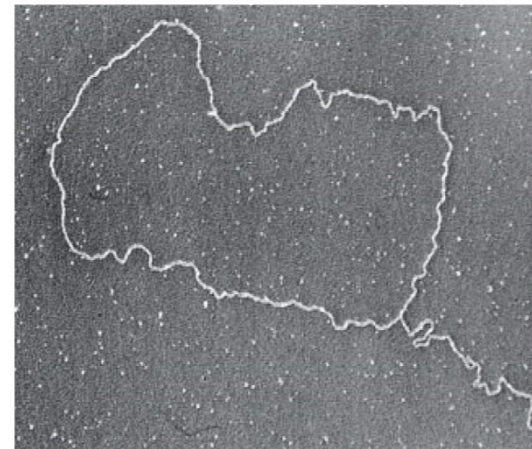
Elizabeth H.
Blackburn
Prize share: 1/3



Carol W. Greider
Prize share: 1/3



Jack W. Szostak
Prize share: 1/3



1 μ m

Συμπεράσματα

- Κατά την αντιγραφή του DNA κάθε κλώνος ενεργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση του άλλου
- Η DNA πολυμεράση έχει κατεύθυνση σύνθεσης $5' \rightarrow 3'$ με αποτέλεσμα ο ένας κλώνος να συντίθεται συνεχώς και ο άλλος συνεχώς
- Η αντιγραφική μηχανή περιλαμβάνει πολλά ένζυμα που δρουν παράλληλα
- Η DNA πολυμεράση είναι σε θέση να διορθώνει τα λάθη της
- Τα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων αντιγράφονται από την τελομεράση

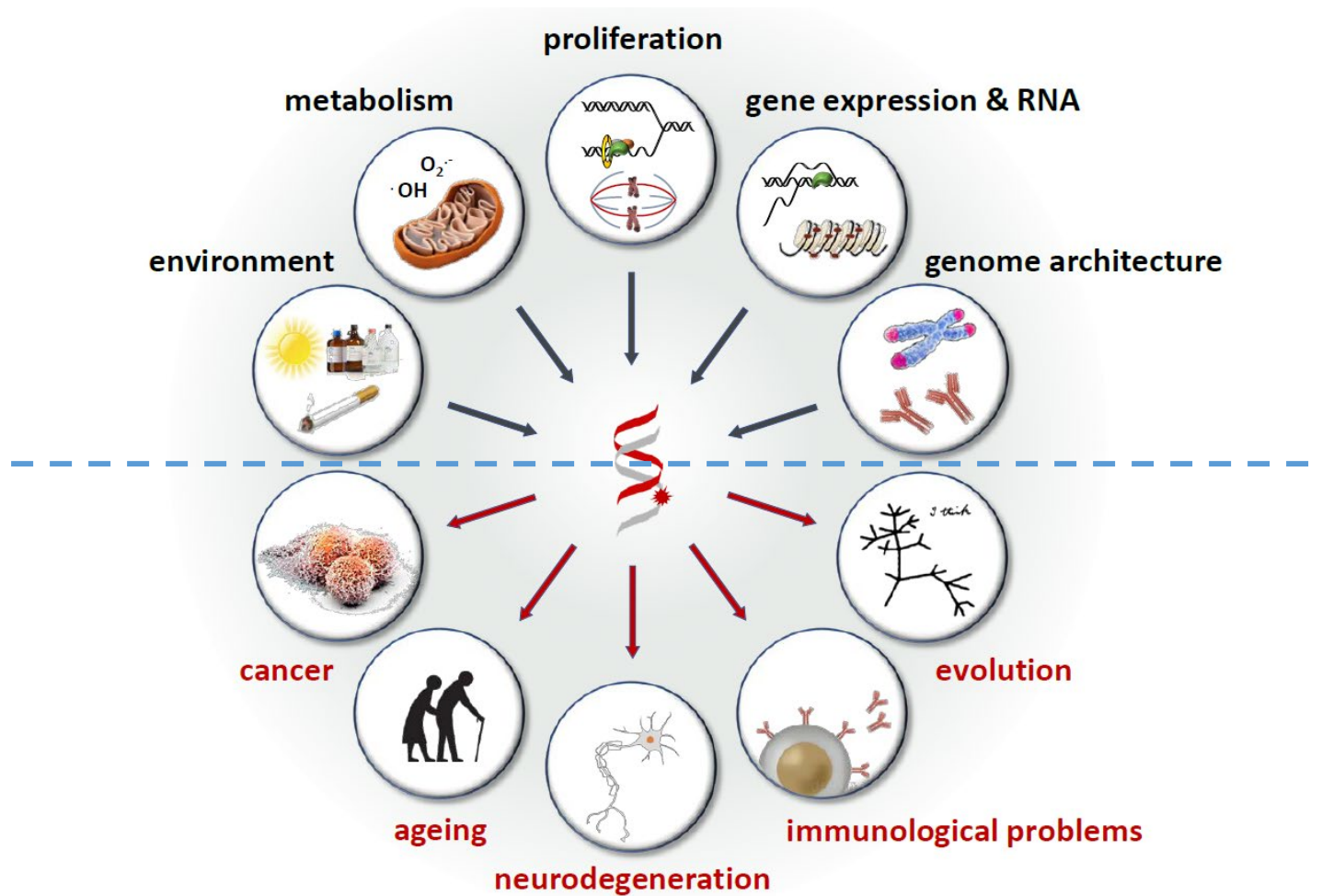
Κάθε κύτταρο υφίσταται
Εκατοντάδες χιλιάδες βλάβες
στο DNA του κάθε μέρα

Πρωτογενείς αλλοιώσεις
από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες

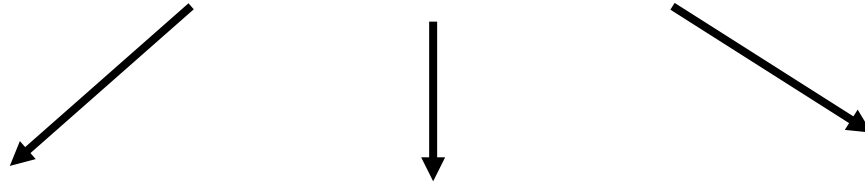
Είδη βλαβών στο DNA

1. Λάθη που προκύπτουν κατά την αντιγραφή του DNA
2. Αλλοιώσεις των βάσεων (αποπουρινώσεις, απαμινώσεις, μεθυλιώσεις, οξειδώσεις)
3. Αλλοιώσεις νουκλεοτιδίων (πχ διμερή πυριμιδινών)
4. Θραύση της μίας αλυσίδας του DNA
5. Θραύση και των δύο κλώνων του DNA

Πηγές βλαβών στο DNA και συνέπειες



Κυτταρικές Αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA



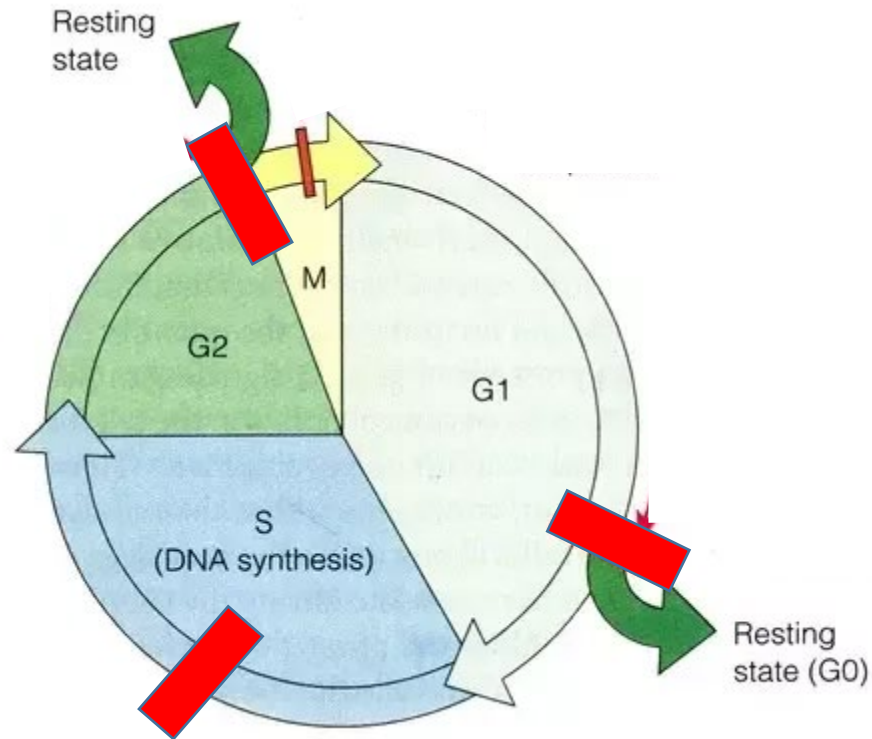
Παύση του κυτταρικού
Κύκλου στα σημεία
ελέγχου

Επιδιόρθωση Βλαβών
στο DNA

Απόπτωση

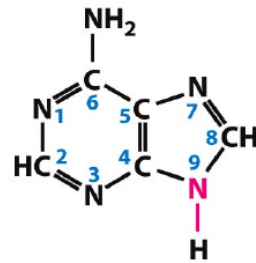
Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

DNA damage

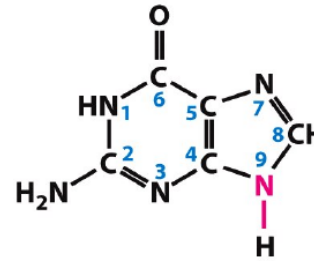


Οι βάσεις των νουκλεϊκών οξέων

ΠΟΥΡΙΝΕΣ

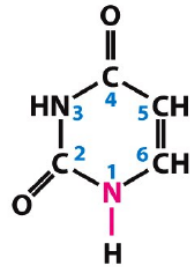


ΑΔΕΝΙΝΗ (A)

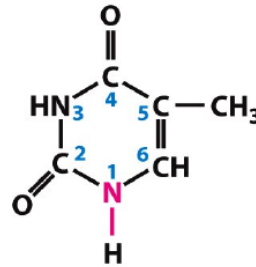


ΓΟΥΑΝΙΝΗ (G)

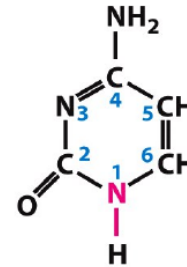
ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΕΣ



ΟΥΡΑΚΙΛΗ (U)



ΘΥΜΙΝΗ (T)

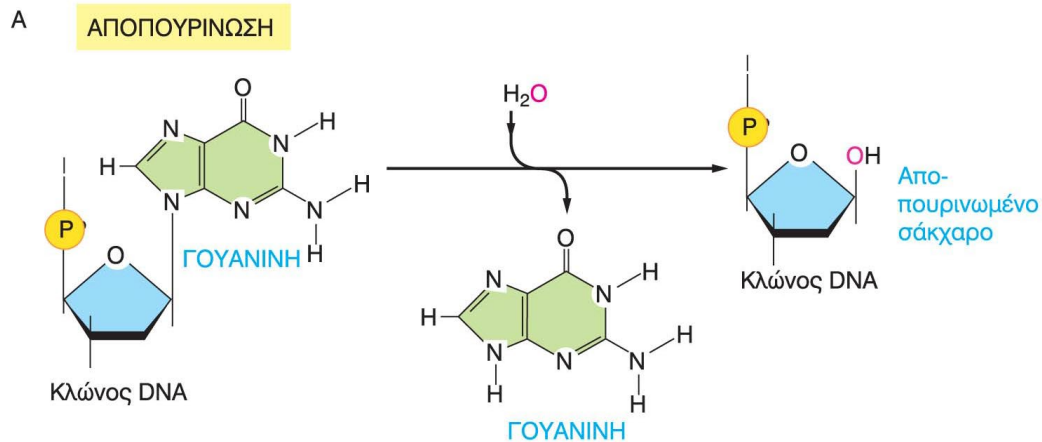


ΚΥΤΟΣΙΝΗ (C)

Αλλοιώσεις Βάσεων

Αποπουρίνωση/Αποπυριμιδίνωση

Απομάκρυνση μίας βάσης πουρίνης / πυριμιδίνης από ένα νουκλεοτίδιο δημιουργώντας χάσματα στο DNA

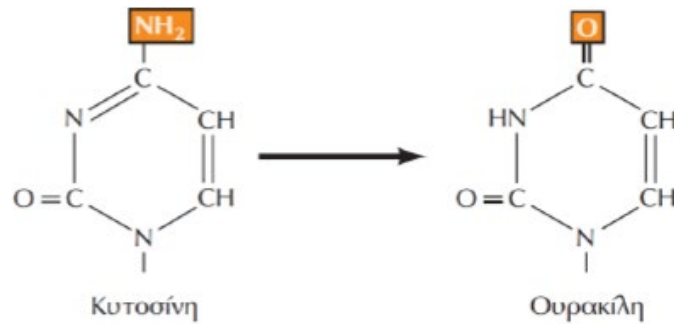


10^{12} πουρίνες χάνονται κάθε ημέρα!

Αλλοιώσεις Βάσεων

Απαμίνωση

Αυθόρμητη απώλεια μιας αμινομάδας μετατρέποντας μία βάση κυτοσίνης σε μία βάση ουρακίλης



Μεθυλίωση κυτοσίνης

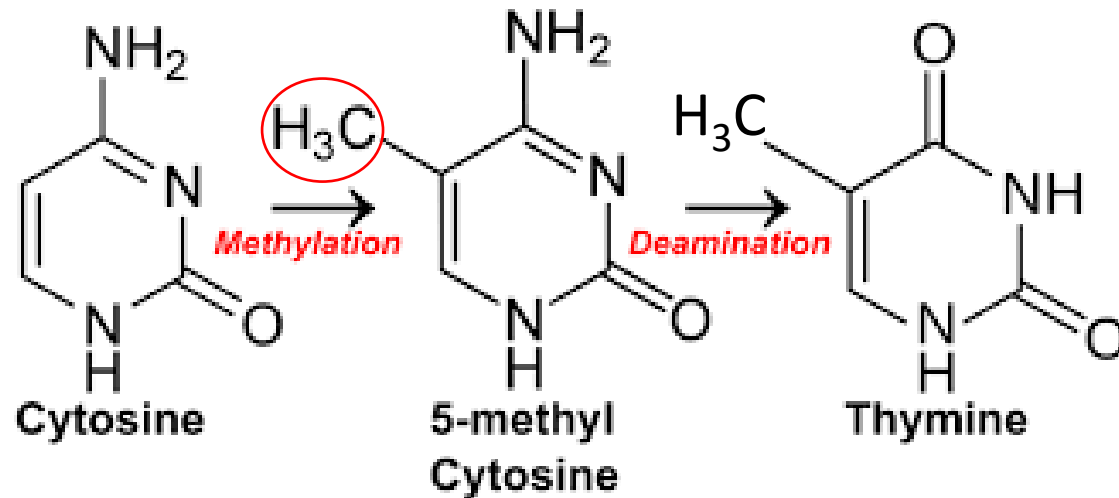
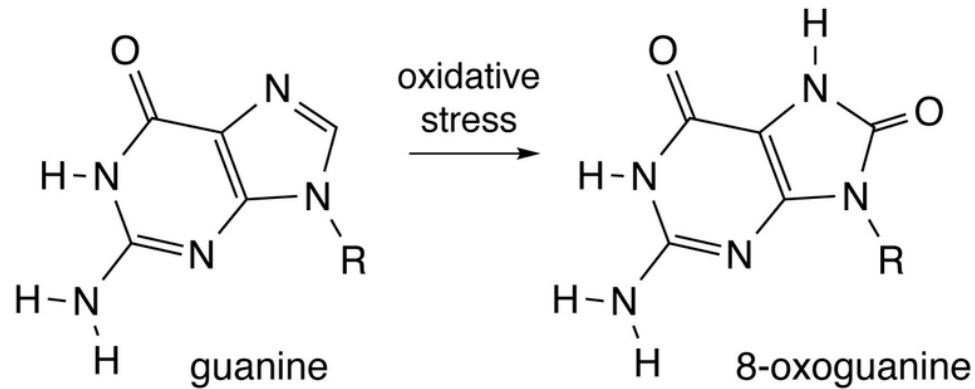


Figure 5-50b *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

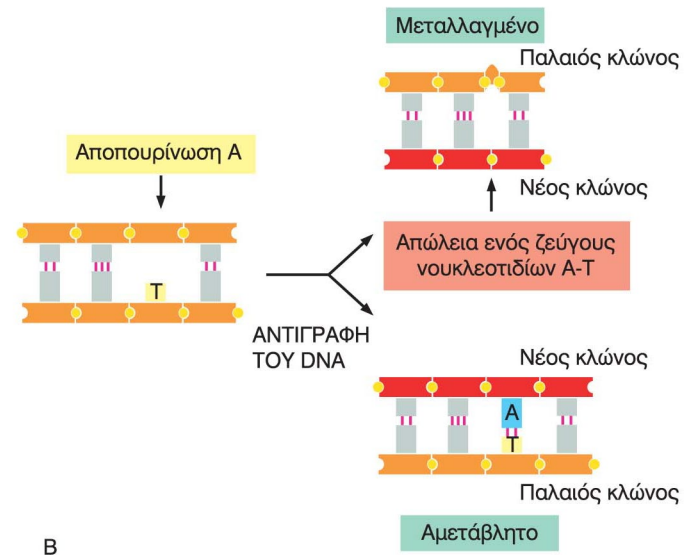
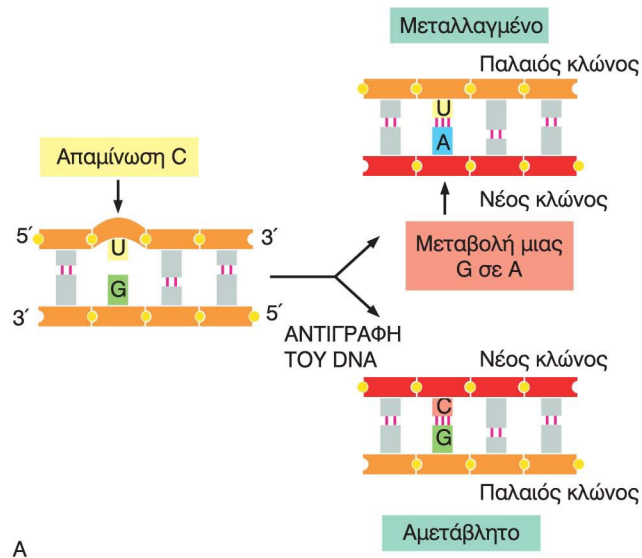
Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στο γονιδίωμά μας είναι αντικαταστάσεις
G/C από A/T

Οξείδωση γουανίνης



- Από δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species) που δημιουργούνται κατά τον μεταβολισμό
- Η 8-oxoguanine ζευγαρώνει με αδεΐνη, αντί με κυτοσίνη

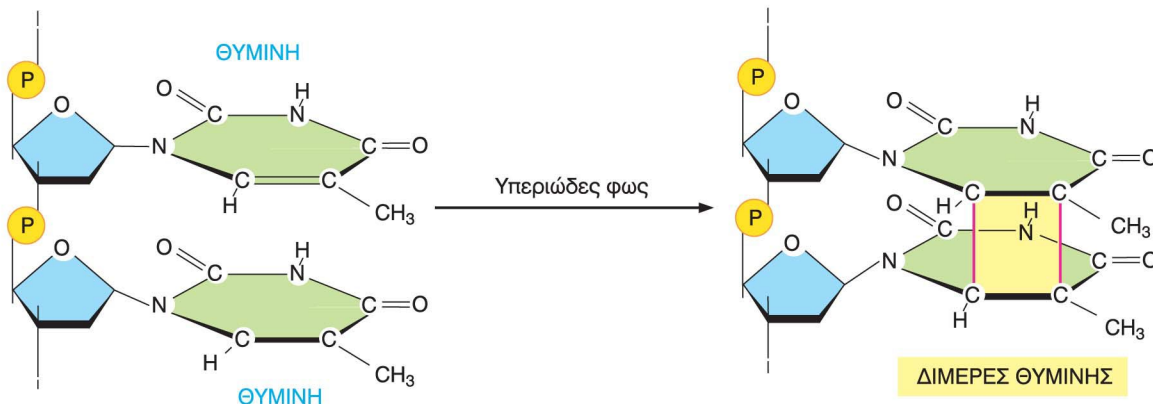
Οι αλλοιώσεις βάσεων μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις



- Η απαμίνωση κυτοσίνης μπορεί να οδηγήσει σε αντικατάσταση βάσης κατά την αντιγραφή με την μεταβολή μίας G σε A.
- Η αποπουρίνωση μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια ενός ζεύγους νουκλεοτιδίων ή να τοποθετήσει ένα τυχαίο νουκλεοτίδιο στη θέση της βάσης που λείπει

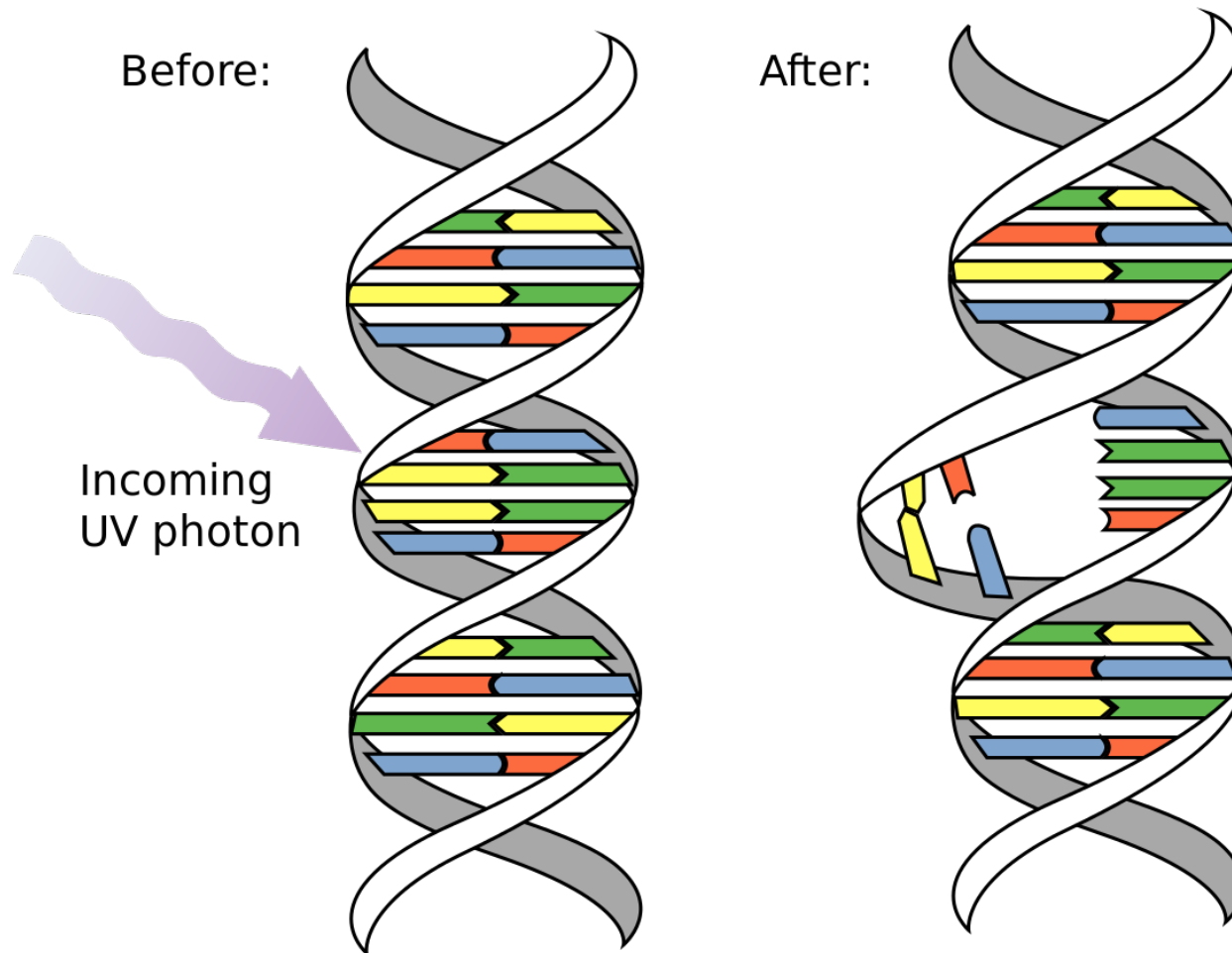
Αλλοιώσεις νουκλεοτιδίων-Διμερή πυριμιδίνης

Η ακτινοβολία του ηλιακού φωτός προάγει την ομοιοπολική σύνδεση γειτονικών βάσεων πυριμιδίνης.



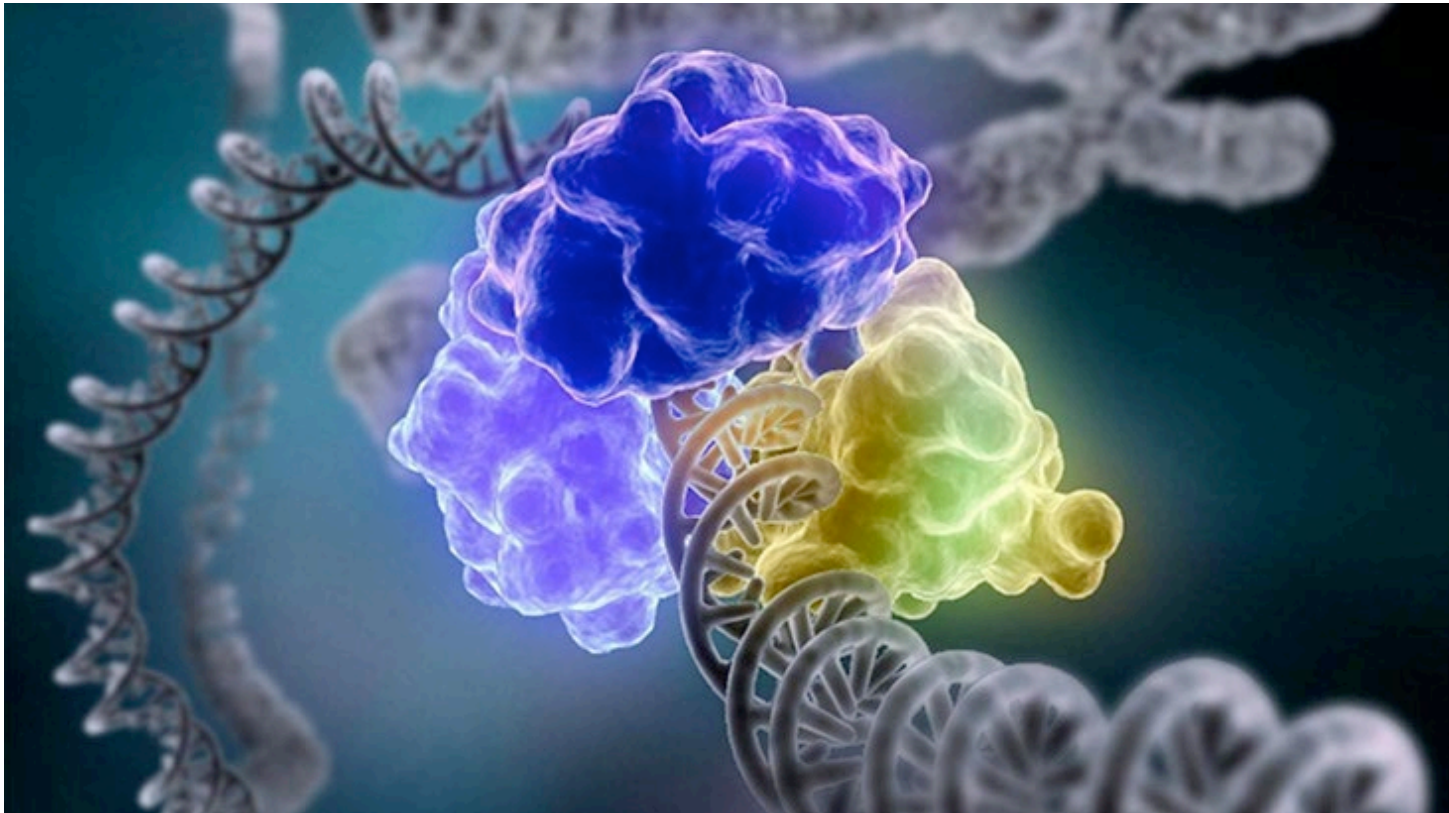
- Τα διμερή πυριμιδίνης καθυστερούν το σύστημα αντιγραφής του DNA στο σημείο της βλάβης και συχνά οδηγούν στην εισαγωγή λάθος βάσεων ή/και μονών θραύσεων στο DNA .

Τα διμερή θυμίνης παραμορφώνουν τη διπλή έλικα
και **μπλοκάρουν την RNA και την DNA πολυμεράση**



Μηχανισμοί επιδιόρθωσης

Πάνω από **130** πρωτεΐνες του ανθρώπου συμμετέχουν στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA



The Nobel Prize in Chemistry 2015



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Tomas Lindahl

Prize share: 1/3



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Paul Modrich

Prize share: 1/3



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Aziz Sancar

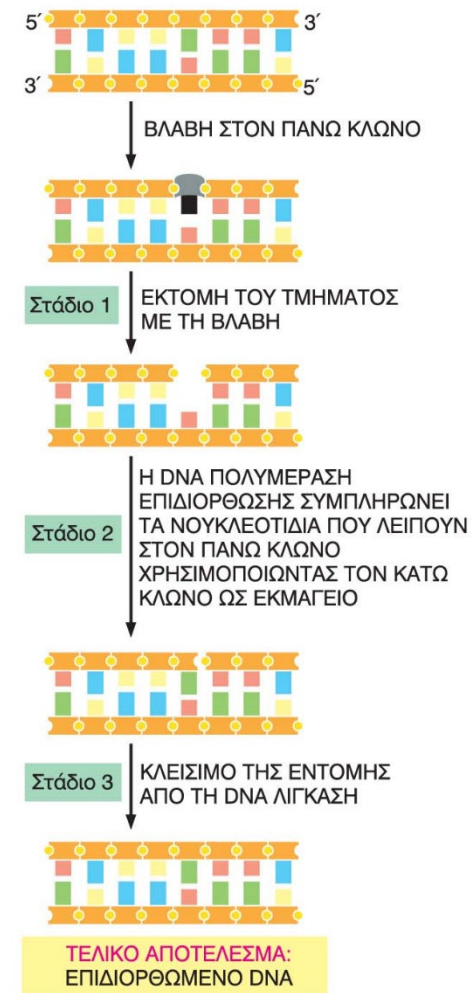
Prize share: 1/3

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης εκτομής

Στάδια της βασικής οδού επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA

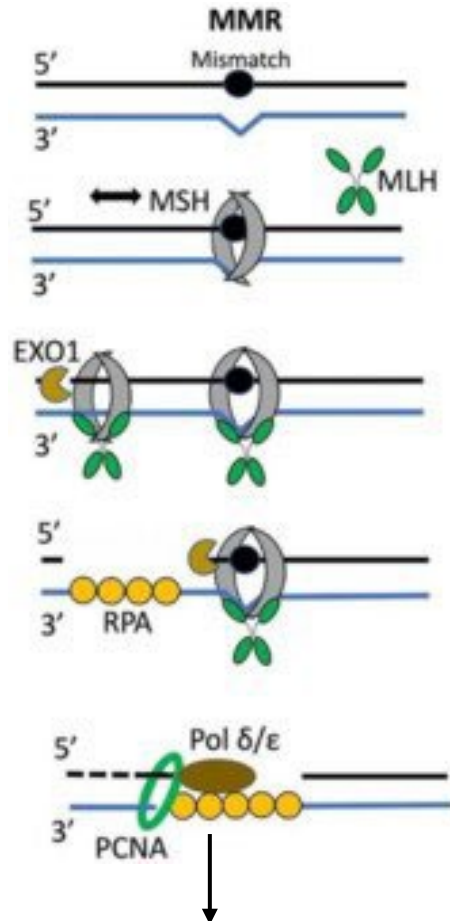
- Αναγνώριση των βλαβών
- Διάσπαση του ομοιοπολικού δεσμού για την αφαίρεση του νουκλεοτιδίου από νουκλεάσες
- Το κενό συμπληρώνεται από την DNA πολυμεράση
- Τα άκρα ενώνονται από την λιγάση



Μηχανισμοί επιδιόρθωσης εκτομής

Mismatch Repair (MMR)

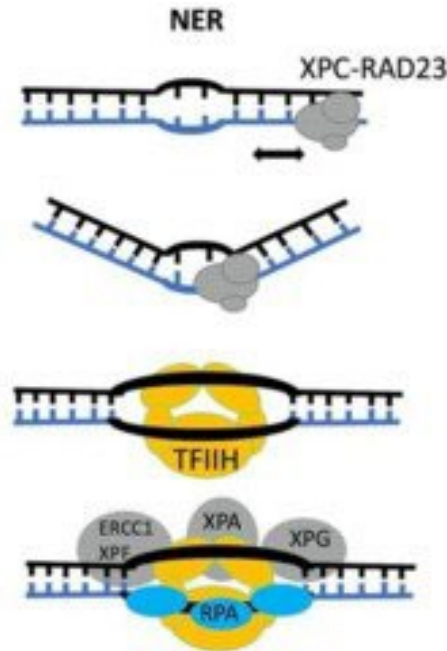
Αταίριαστες βάσεις



Λάθη κατά την αντιγραφή

Nucleotide Excision Repair (NER)

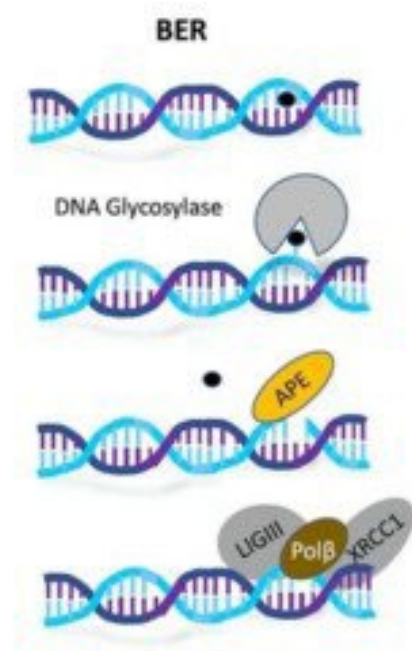
...με εκτομή νουκλεοτιδίου



Διμερή θυμίνης/
Ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ
βασεων της ίδιας αλυσίδας

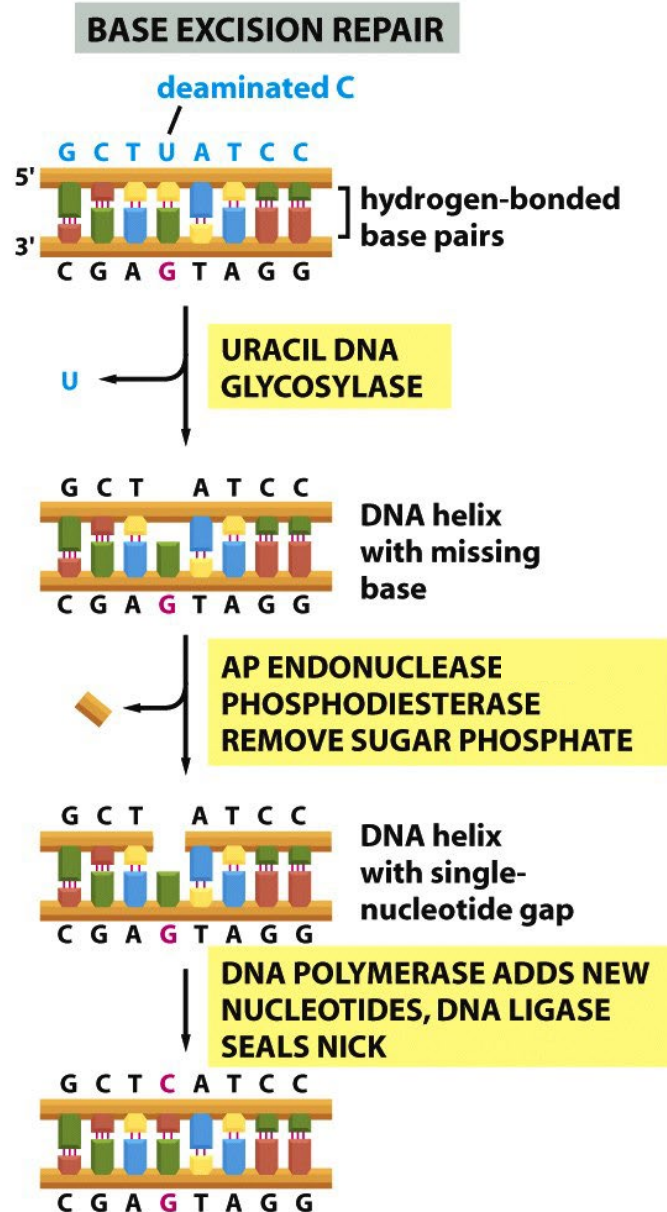
Base Excision Repair (BER)

...με εκτομή βάσης



Απομάκρυνση αλλοιωμένων
βάσεων

Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair)



DNA γλυκοσυλάσες θηλαστικών

Chromosoma (2012) 121:1–20

3

Table 1 Mammalian DNA glycosylases, their main substrates, modes of action, and mutant phenotypes

	Type of base lesion		Name	Physiological substrates	Mono (M)/ bi(B) functional	Mouse knockout (ko)/ knockdown (kd) phenotype
	Uracil in ssDNA dsDNA	UNG	Uracil-N glycosylase	U, 5-FU, ss and dsDNA	M	ko: viable, B-cell lymphomas, disturbed antibody diversification
		SMUG1	Single-strand-specific monofunctional uracil DNA glycosylase 1	U, 5-hmU, 5-FU, ss and dsDNA	M	kd: moderate increase in mutation frequency (C→T)
	Pyrimidine derivates in mismatches	MBD4	Methyl-binding domain glycosylase 4	T, U, 5-FU, εC, opposite G, dsDNA	M	ko: viable, elevated mutation frequency (C→T)
		TDG	Thymine DNA glycosylase	T, U, 5-FU, εC, 5-hmU, 5-fC, 5-caC; opposite G, dsDNA	M	ko: embryonic lethal, aberrant DNA methylation and imbalanced chromatin marks in CpG-rich promoters
	Oxidative base damage	OGG1	8-OxoG DNA glycosylase 1	8-oxoG, FaPy, opposite C, dsDNA	B	ko: viable, accumulation of 8-oxoG, elevated mutation frequency (G→T)
		MYH	MutY homolog DNA glycosylase	A opposite 8-oxoG, C or G, 2-hA opposite G, dsDNA	M	ko: viable, see OGG1
	Alkylated purines	MPG	Methylpurine glycosylase	3-meA, 7-meG, 3-meG, hypoxanthine, εA, ss and dsDNA	M	ko: viable, elevated levels of ethenoA and hypoxanthine
	Oxidized, ring-fragmented or –saturated pyrimidines	NTHL1	Endonuclease III-like 1	Tg, FaPyG, 5-hC, 5-hU, dsDNA	B	ko: viable
		NEIL1	Endonuclease VIII-like glycosylase 1	Tg, FaPyG, FaPyA, 8-oxoG, 5-hU, 5-hC, ss and dsDNA	B	ko: metabolic syndrome, increased damage levels in mitochondrial DNA; kd: hypersensitive to γ radiation
		NEIL2	Endonuclease VIII-like glycosylase 2	As NTHL1 and NEIL1	B	Unknown
		NEIL3	Endonuclease VIII-like glycosylase 3	FaPyG, FaPyA, prefers ssDNA	B	ko: normal

U, uracil; , A, adenine; , T, thymine; , C, cytosine, G, guanine; , ss single stranded; , ds, double stranded; , 5-hm, 5-hydroxymethyl; , 5-FU, 5-fluorouracil; , ε, etheno; , 5-fC, 5-formylcytosine; , 5-caC, 5-carboxylcytosine; , 8-oxoG, 8-oxo-7,8-dihydroguanine; , Tg, thymine glycol; , FaPy, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine; , me, methyl; , h, hydroxyl

Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair)

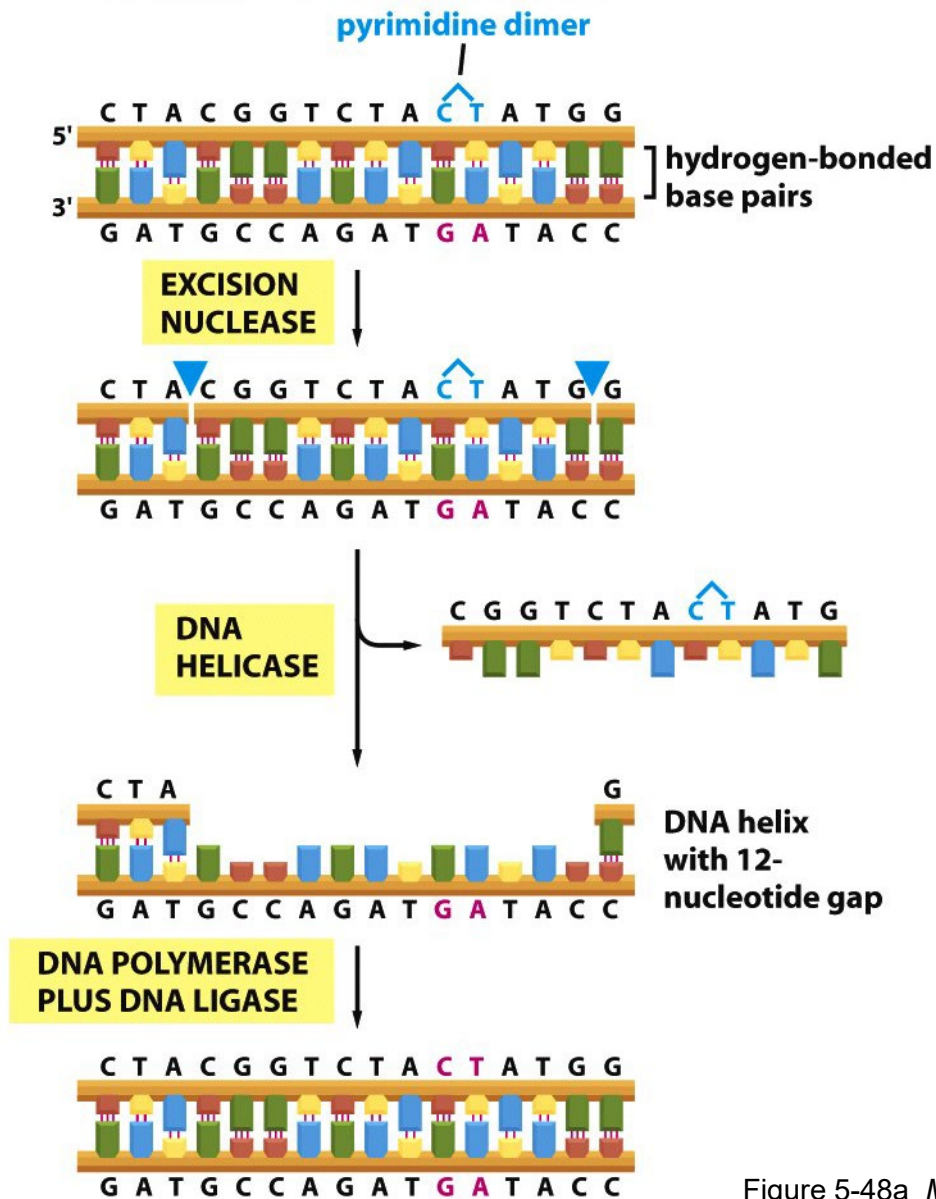


Figure 5-48a *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Η DNA πολυμεράση κάνει 1 λάθος κάθε 10^7 νουκλεοτίδια

6×10^9 DNA nucleotides per cell

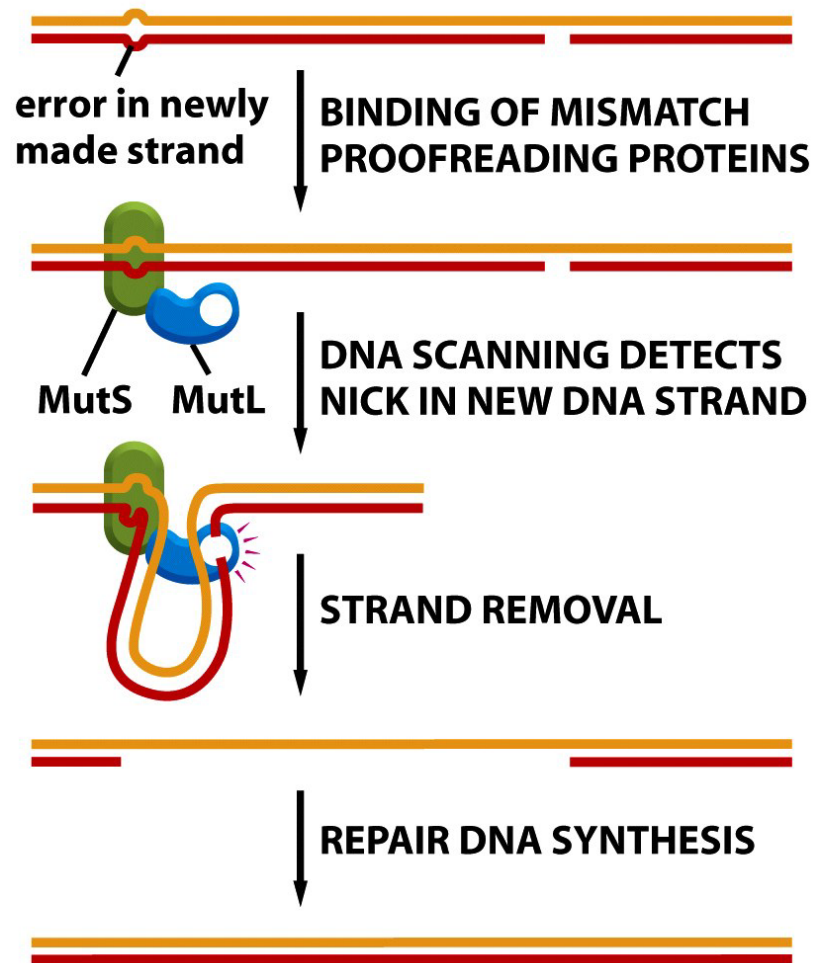
Αντιγραφή DNA χωρίς διόρθωση δοκιμίου (proofreading) 1 λάθος σε 10^5 νουκλεοτ.

Αντιγραφή DNA με proofreading (χωρίς επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων) 1 λάθος σε 10^7 νουκλεοτ.

600 λάθη σε κάθε αντιγραφή του ανθρώπινου γονιδιώματος

Αντιγραφή DNA με proofreading και με επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων: 1 λάθος σε 10^9 νουκλεοτ. Δηλ περίπου 6 λάθη ανά αντιγραφή

Τα λάθη κατά την αντιγραφή που προάγουν αταίριαστες βάσεις αφαιρούνται
με **επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων**
Mismatch Repair (MMR)



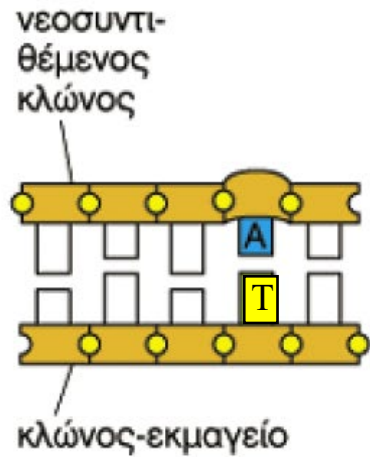
Γιατί είναι σημαντικό τα ένζυμα να γνωρίζουν ποιος είναι ο κλώνος εκμαγείο και ποιος ο νεοσυντιθέμενος?



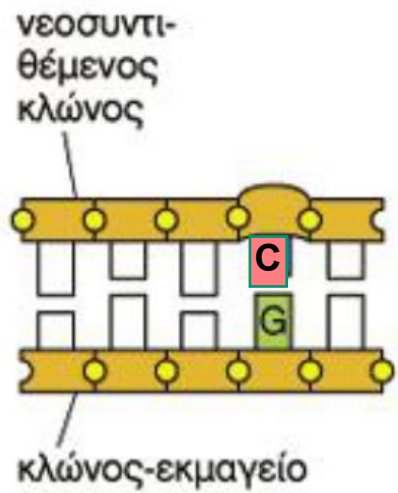
αμετάβλητος

ΚΑΜΙΑ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ

Γιατί είναι σημαντικό τα ένζυμα να γνωρίζουν ποιος είναι ο κλώνος εκμαγείο και ποιος ο νεοσυντιθέμενος?



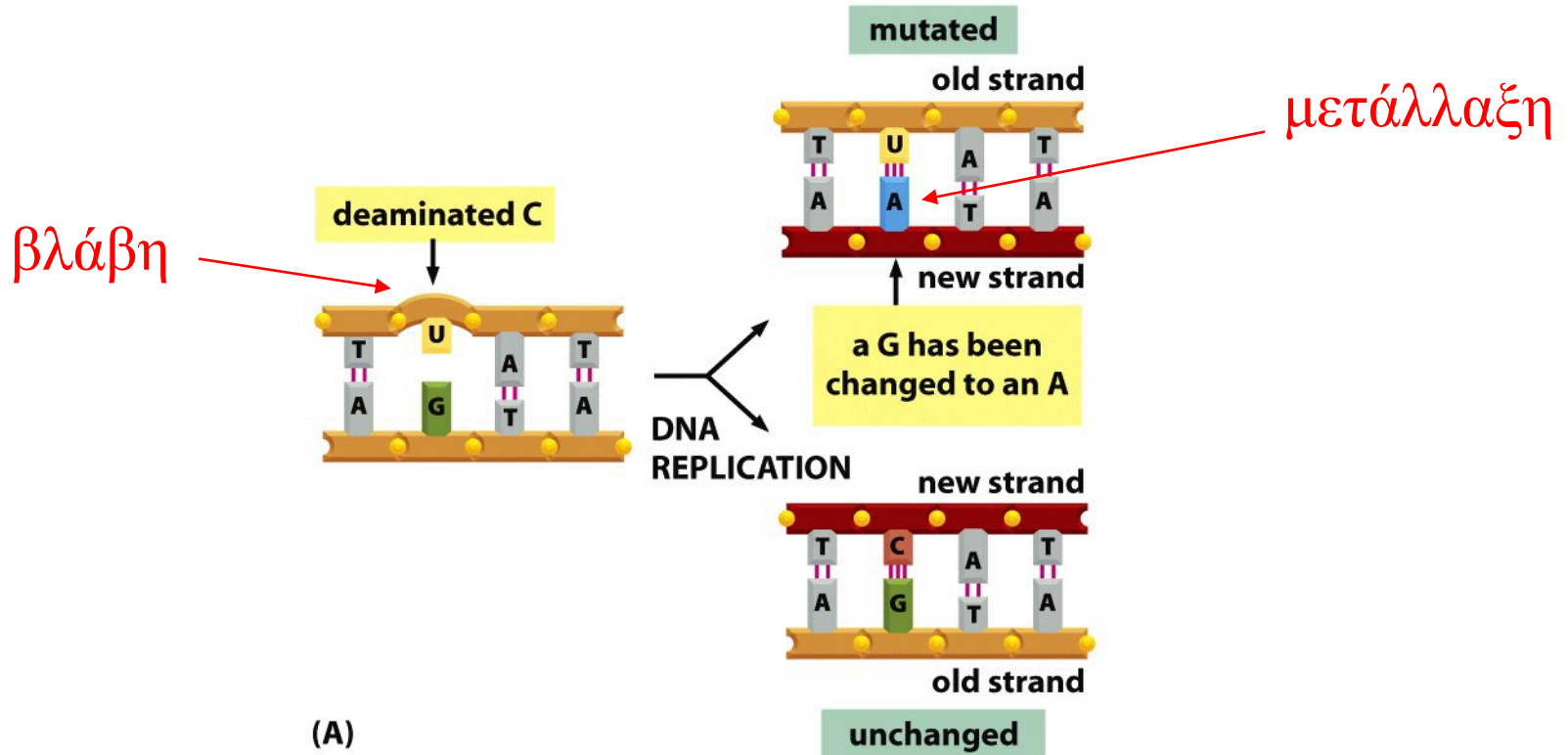
ΕΚΤΟΜΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΜΟΝΟ ΤΟΥ
ΑΡΧΙΚΟΥ ΚΛΩΝΟΥ-ΕΚΜΑΓΕΙΟΥ (ΠΑΛΑΙΟΣ ΚΛΩΝΟΣ)



ΕΚΤΟΜΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΜΟΝΟ ΤΟΥ
ΝΕΟΣΥΝΤΙΘΕΜΕΝΟΥ ΚΛΩΝΟΥ

Προσοχή!

Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης αντιλαμβάνονται και επιδιορθώνουν πρωτογενείς αλλοιώσεις (βλάβες) όχι μεταλλάξεις

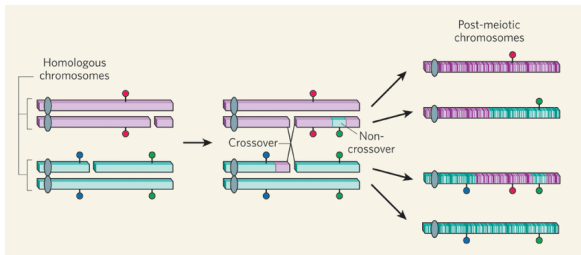


- Οι μεταλλάξεις είναι μόνιμες αλλαγές στην αλληλουχία του DNA
όχι αλλοιώσεις στη δομή του

Δίκλωνες κατατμήσεις στην έλικα του DNA

Φυσιολογικές διαδικασίες

Μείωση



Ενδογενείς πηγές

Μεταγραφικό στρες

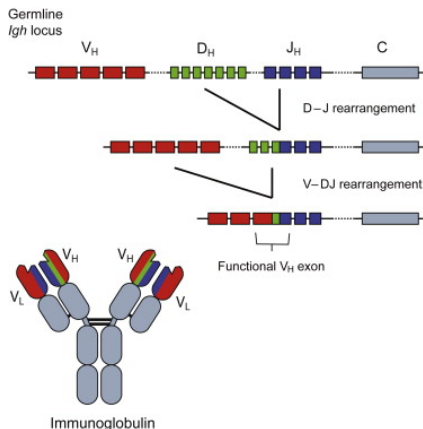
Τοποϊσομεράσες,
Συγκρούσεις μεταγραφικής
και αντιγραφικής
μηχανής

Εξωγενείς πηγές

Ιονίζουσα ακτινοβολία



V(D)J ανασυνδυασμός



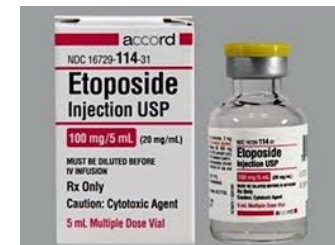
Αντιγραφικό στρες

Αντιγραφή μονών κατατμήσεων
Εμπόδια στην αντιγραφική μηχανή
R-loops, G-quadruplexes

Ραδιομιμητικά

Neocarzinostatin, bleomycin

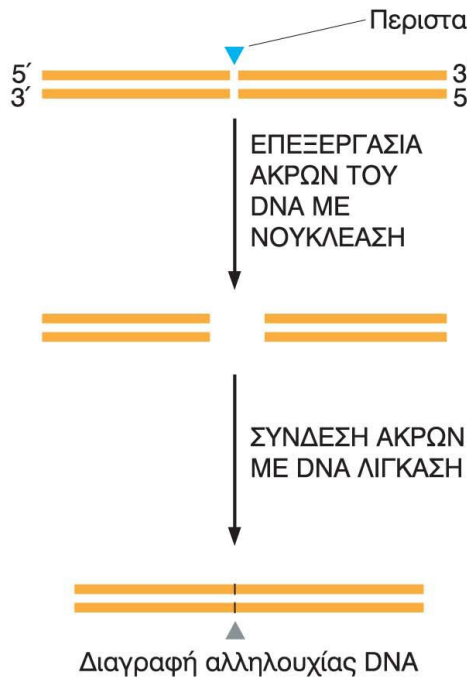
Χημειοθεραπευτικά



Δίκλωνες κατατμήσεις στην έλικα του DNA

A

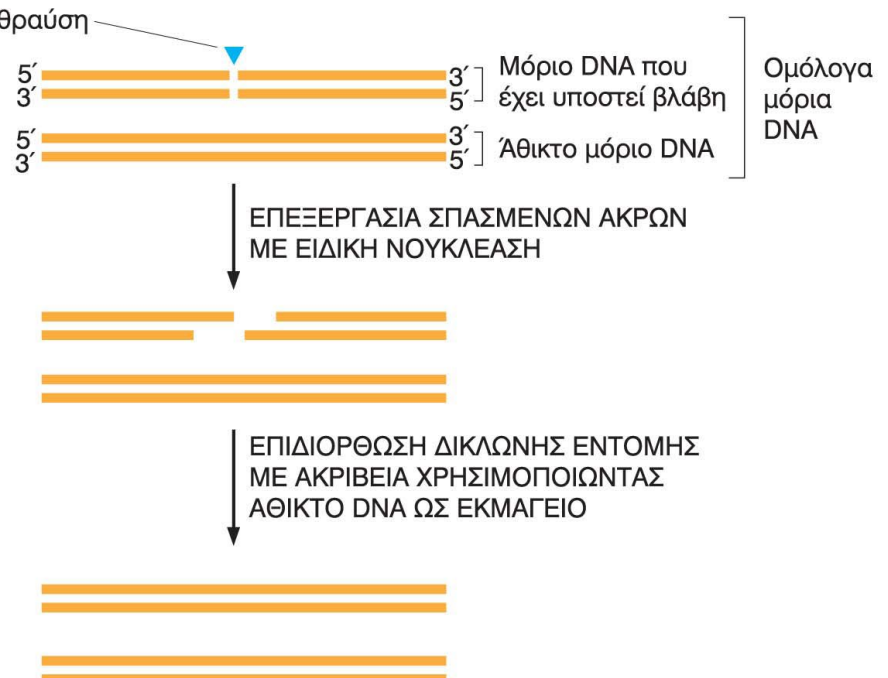
ΜΗ ΟΜΟΛΟΓΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ



ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΕΝΤΟΜΗΣ ΜΕ ΚΑΠΟΙΑ ΑΠΩΛΕΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗ ΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ

B

ΟΜΟΛΟΓΟΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ

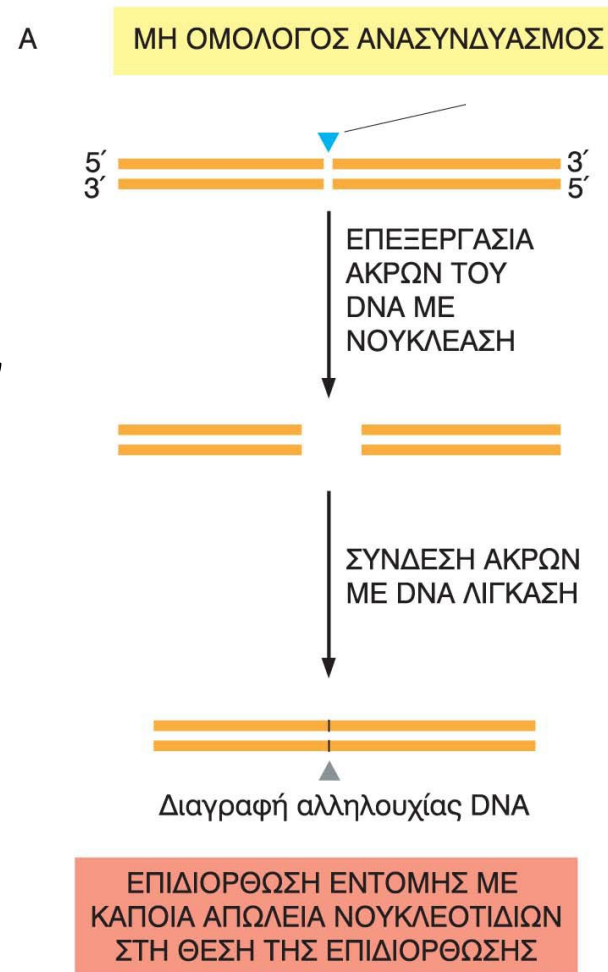


ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΕΝΤΟΜΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΠΩΛΕΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗ ΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ

Δίκλωνα θραύσματα στην έλικα του DNA

Επιδιόρθωση με μη ομόλογο ανασυνδυασμό

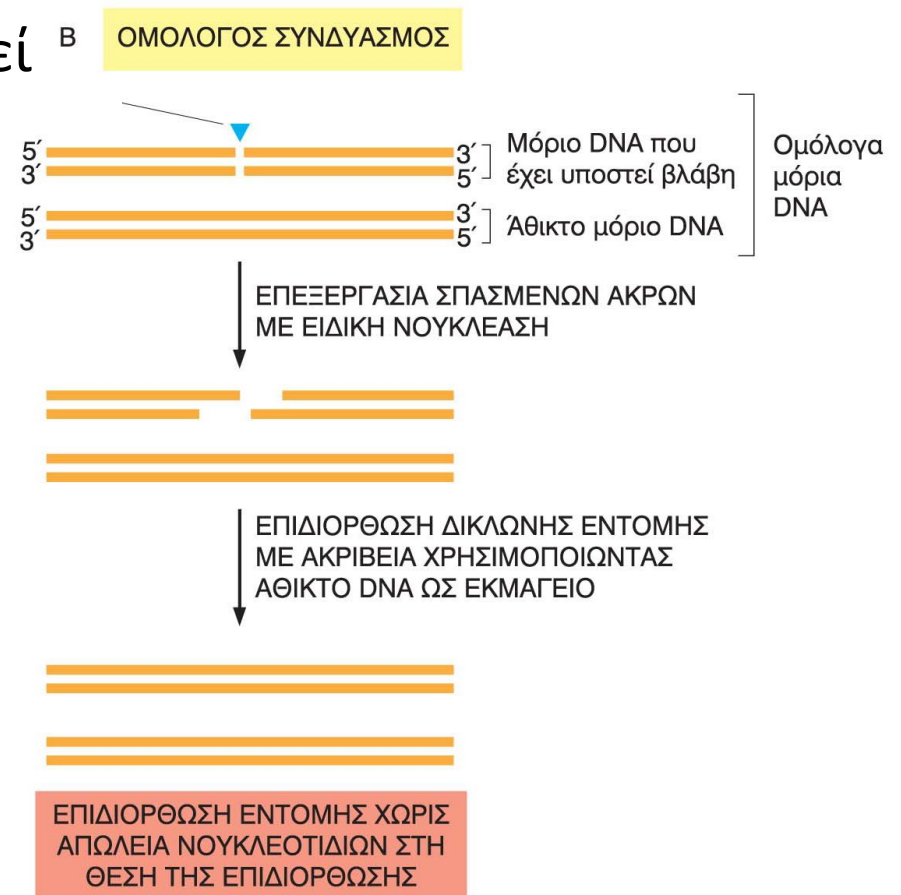
- Αναγνώριση του θραύσματος από πρωτεΐνες αναγνώρισης διπλών θραυσμάτων
- Στρατολόγηση ενδονουκλεάσης για πέψη των σπασμένων άκρων (απώλεια ορισμένων νουκλεοτιδίων)
- Σύνδεση των άκρων από μια λιγαση



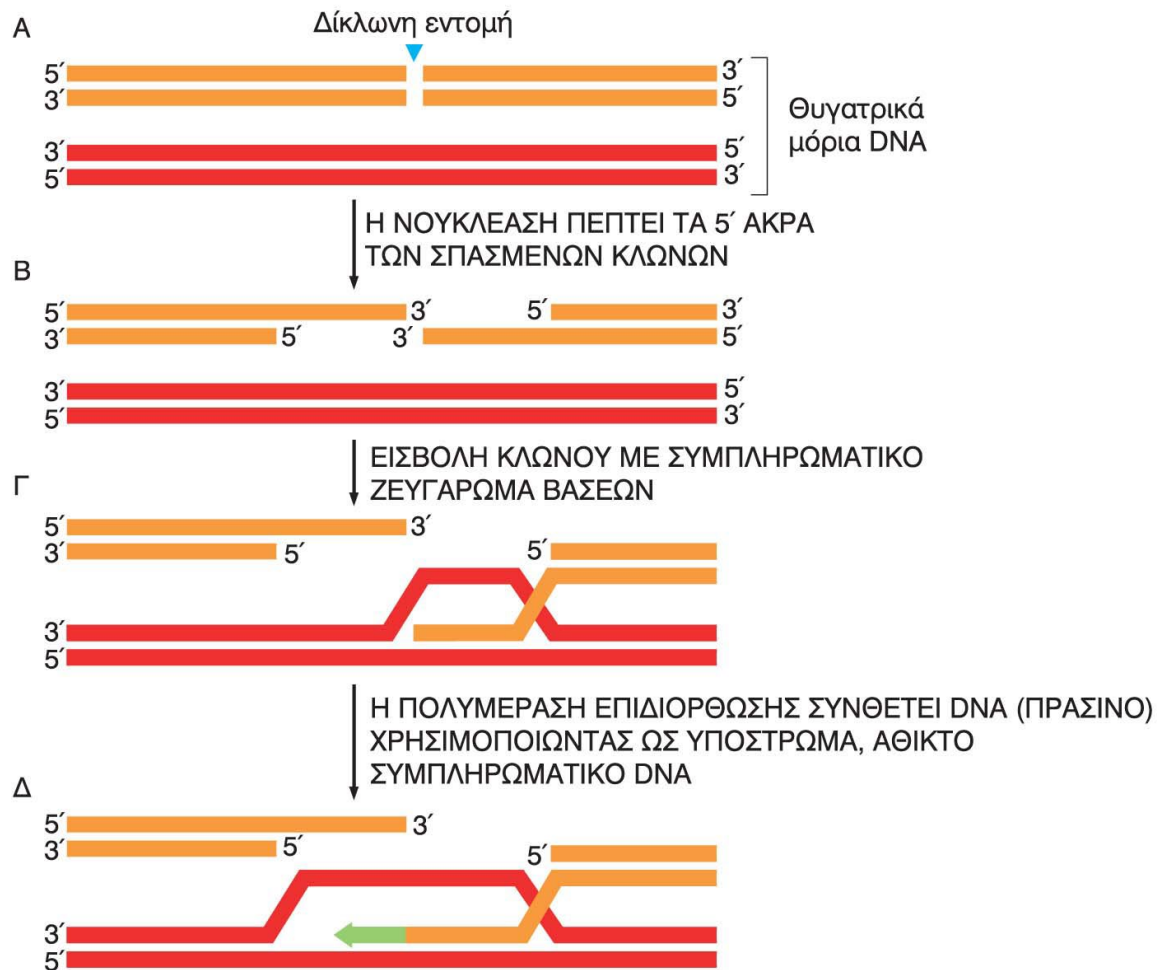
Δίκλωνα θραύσματα στην έλικα του DNA

Επιδιόρθωση με ομόλογο ανασυνδυασμό

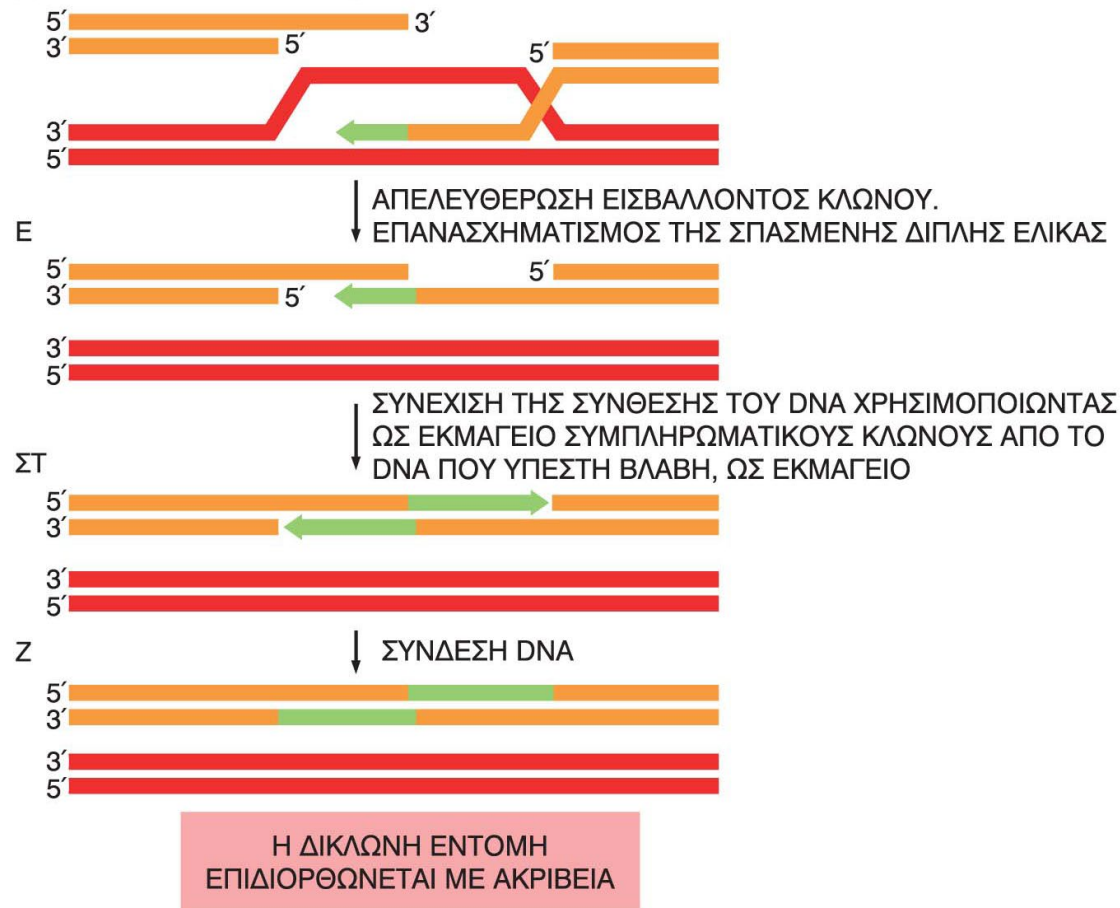
- Η άθικτη διπλή έλικα του αντιγραμμένου DNA λειτουργεί σαν εκμαγείο για την επιδιόρθωση της ομόλογης διπλής έλικας



Επιδιόρθωση με ομόλογο ανασυνδυασμό



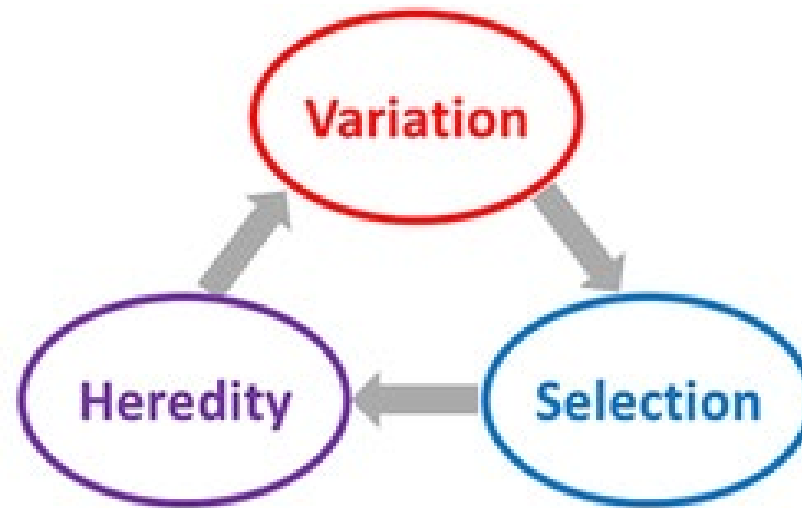
Επιδιόρθωση με ομόλογο ανασυνδυασμό



Απόλυτα ακριβής!
δεν χάνεται ούτε κερδίζεται νουκλεοτίδιο

Οι μεταλλάξεις συμβάλουν στη γενετική ποικιλομορφία

Φυσική Επιλογή



Μεταλλάξεις που οδηγούν στην
απόκτηση νέων χαρακτηριστικών



Μεταλλάξεις που οδηγούν στην
καρκινογένεση

Μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του γενετικού υλικού απαντώνται συχνά σε καρκίνους

