



Η αντιγραφή του DNA

ΠΕΡΙΓΡΑΜΜΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

8.1 Γενικά γνωρίσματα της αντιγραφής του DNA

Η αντιγραφή του DNA είναι ημισυντηρητική.

Η αντιγραφή του βακτηριακού και του ευκαρυωτικού DNA είναι αμφίδρομη.

Η αλυσίδα του DNA που επεκτείνεται με συνολική κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$ σχηματίζεται μέσω της ένωσης μικρών τμημάτων.

Η DNA λιγάση συνδέει τα διαδοχικά τμήματα Okazaki.

Ως εκκινήτες για τη σύνθεση των τμημάτων Okazaki χρησιμοποιούνται τμήματα RNA.

8.2 Η αντιγραφή του DNA στα βακτήρια

Τα συστατικά της συσκευής της αντιγραφής των βακτηρίων έχουν απομονωθεί και μελετηθεί *in vitro*.

Η μελέτη μεταλλαγμάτων παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τα ένζυμα της αντιγραφής του DNA.

Σύμφωνα με το μοντέλο του ρεπλικονίου, κατά την έναρξη της αντιγραφής μια εναρκτήρια πρωτεΐνη προσδένεται σε μια αλληλουχία DNA που ονομάζεται αντιγραφέας.

Η αντιγραφή του χρωμοσώματος της *E. coli* ξεκινά από την *oriC*.

Αρκετά ένζυμα δρουν συντονισμένα στην αντιγραφική διχάλα.

Η DNA πολυμεράση III είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του DNA στα βακτήρια.

Το ολοένζυμο της DNA πολυμεράσης III αποτελείται από τρία υποσύνπλοκα.

Η κεντρική πολυμεράση έχει μία υπομονάδα με ενεργότητα πολυμεράσης $5' \rightarrow 3'$ και μία υπομονάδα με ενεργότητα εξωνουκλεάσης $3' \rightarrow 5'$.

Ο ολισθαίνων συνδετήρας σχηματίζει έναν δακτύλιο γύρω από το DNA, προσδένοντας το υπόλοιπο ολοένζυμο της πολυμεράσης στο DNA.

Ο φορτωτής του συνδετήρα τοποθετεί τον ολισθαίνοντα συνδετήρα γύρω από το DNA.

Στην αντιγραφική διχάλα ο μηχανισμός της αντιγραφής καταλύει τη συντονισμένη σύνθεση DNA στον προπορευόμενο και στον καθυστερημένο κλώνο.

Η αντιγραφή του DNA στην *E. coli* τερματίζεται όταν δύο διχάλες συναντηθούν στην περιοχή τερματισμού, 180° από την *oriC*.

Ο παράγοντας πραγματοποίησης του τερματισμού προσδένεται στις θέσεις *Ter*.

Η τοποϊσομεράση IV και η ρεκομπινάση διαχωρίζουν τα νεοσχηματισθέντα αδελφά χρωμοσώματα.

8.3 Η αντιγραφή του DNA στους ευκαρυώτες

Το σύστημα αντιγραφής DNA του ιού SV40 αποτελεί ένα *in vitro* μοντέλο της αντιγραφής του ευκαρυωτικού DNA.

Ο μηχανισμός της αντιγραφής των ευκαρυωτών αντιγράφει μεγάλα γραμμικά δίκλωνα μόρια με πολλές θέσεις έναρξης της αντιγραφής.

Τα ευκαρυωτικά χρωμοσώματα έχουν πολλές θέσεις έναρξης της αντιγραφής.

Οι αυτόνομα αντιγραφόμενες αλληλουχίες καθορίζουν τις θέσεις έναρξης της αντιγραφής στον ζυμομύκητα.

Οι Pol δ και Pol ϵ είναι οι κυρίως υπεύθυνες για τη σύνθεση του καθυστερημένου και του προπορευόμενου κλώνου αντίστοιχα.

Τα τελομερή της *Tetrahymena* και του ζυμομύκητα σχηματίζονται από ένα ένζυμο που μοιάζει με την τελική τρανσφεράση.

Η τελομεράση χρησιμοποιεί μια μήτρα RNA για να προσθέσει νουκλεοτιδικές επαναλήψεις στα άκρα των χρωμοσωμάτων.

Η τελομεράση παίζει σημαντικό ρόλο στην επίλυση του προβλήματος του τέλους της αντιγραφής.

8.4 Σύζευξη αντιγραφής και σύνθεσης χρωματίνης

Η αποσυναρμολόγηση και η επανασυναρμολόγηση της χρωματίνης είναι στενά συνδεδεμένες με την αντιγραφή του DNA.

ΠΛΑΙΣΙΟ 8.1 ΕΜΒΑΘΥΝΣΗ: Ρύθμιση της αντιγραφής στο στάδιο της έναρξης

ΠΛΑΙΣΙΟ 8.2 ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: Μέτρηση της προσήλωσης

ΠΛΑΙΣΙΟ 8.3 ΕΜΒΑΘΥΝΣΗ: Συντονισμός ελικάσης και πριμάσης

ΠΛΑΙΣΙΟ 8.4 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ: Ο ρόλος της τελομεράσης στη γήρανση και στον καρκίνο

Ερωτήσεις και προβλήματα

Προτεινόμενη βιβλιογραφία

Σκοπός της αντιγραφής του DNA είναι η δημιουργία δύο θυγατρικών μορίων με την ίδια γενετική πληροφορία με το αρχικό. Η διεργασία θα πρέπει να πραγματοποιηθεί με μεγάλη αξιοπιστία, ώστε να μην υπάρξει απώλεια ή μεταβολή της γενετικής πληροφορίας. Όταν το 1953 προτάθηκε για πρώτη φορά το μοντέλο της διπλής έλικας από τους Watson και Crick, πολλοί επιστήμονες θεώρησαν ότι λίγα μόνο ένζυμα θα ήταν αρκετά για την κατάλυση της αντιγραφής του DNA. Οι ερευνητές όμως που κατόπιν μελέτησαν την αντιγραφή του DNA διαπίστωσαν πολύ νωρίς πως πρόκειται για μια διαδικασία πολύ πιο περίπλοκη απ' ό,τι θεωρήθηκε αρχικά, στην οποία συμμετέχουν πολλά διαφορετικά είδη ενζύμων.

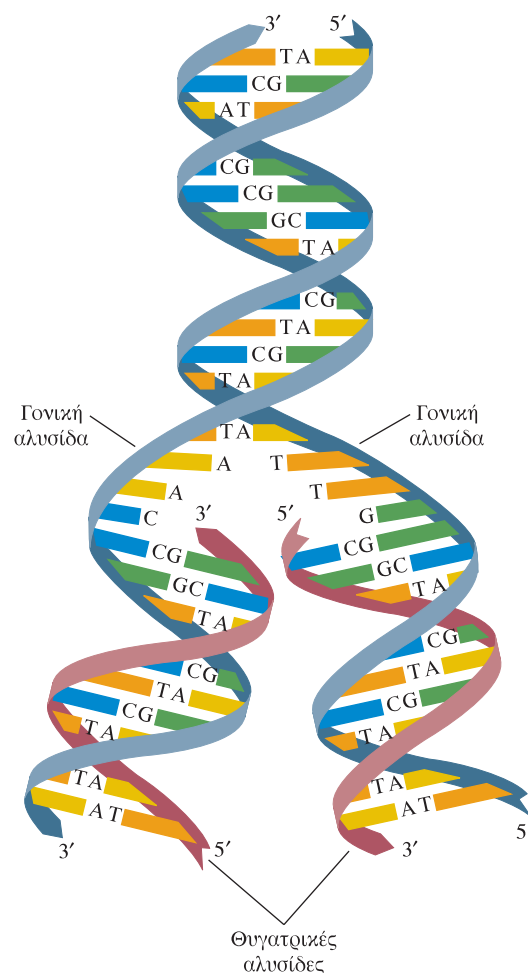
Η πολυπλοκότητα της αντιγραφής του DNA οφείλεται εν μέρει στα ακόλουθα γεγονότα: (1) Το ξετύλιγμα της διπλής έλικας απαιτεί τη δράση ελικασών και τη δαπάνη ενέργειας. (2) Προκειμένου να μην υδρολυθούν από νουκλεάσες τα μονόκλωνα τμήματα DNA που προκύπτουν από τη δράση των ελικασών, αλλά και να μη σχηματιστούν ζεύγη ανάμεσα σε συμπληρωματικές βάσεις του ίδιου κλώνου, είναι απαραίτητες οι πρωτεΐνες πρόσδεσης μονόκλωνου DNA (SSB, Single-Strand DNA Binding proteins). (3) Για την ένωση των εγχοπών που προκύπτουν στο νεοσυντεθειμένο DNA είναι απαραίτητες οι DNA λιγάσες. (4) Για την αποτροπή λαθών που γίνονται κατά την αντιγραφή, καθώς και για την εξάλειψη των λαθών που συμβαίνουν σπάνια, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ασφαλιστικών δικλείδων. (5) Το ξετύλιγμα της διπλής έλικας κατά την αντιγραφή κυκλικών μορίων DNA ή ακόμα και γραμμικών μορίων μεγάλου μήκους προκαλεί την ανάπτυξη τάσης στρέψης (torsional strain) στο υπόλοιπο μόριο, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητες οι τοποϊσομεράσες για την εκτόνωσή τους. (6) Για την έναρξη της αντιγραφής του DNA και για τον τερματισμό της απαιτούνται ειδικοί πρωτεϊνικοί παράγοντες και ένζυμα. Σε αυτό το κεφάλαιο θα εξετάσουμε αρχικά ορισμένα γενικά γνωρίσματα της αντιγραφής και στη συνέχεια θα παρουσιάσουμε την αλληλουχία των γεγονότων που

λαμβάνουν χώρα κατά τα στάδια της έναρξης, της επιμήκυνσης και του τερματισμού της αντιγραφής του DNA στα βακτήρια και στους ευκαρυώτες.

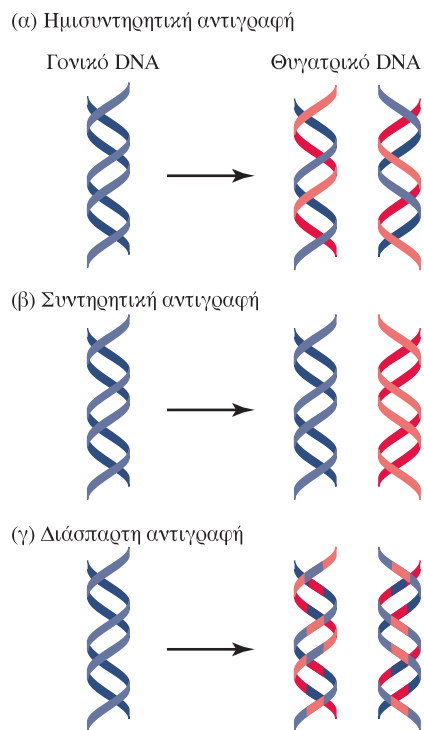
8.1 Γενικά γνωρίσματα της αντιγραφής του DNA

Η αντιγραφή του DNA είναι ημισυντηρητική.

Οι Watson και Crick αναγνώρισαν ότι το μοντέλο του DNA που είχαν προτείνει υποδεικνύει έναν μηχανισμό αντιγραφής στον οποίο οι δύο γονικοί κλώνοι διαχωρίζονται, ώστε καθένας να λειτουργήσει ως μήτρα για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού προς αυτόν κλώνου (**ΕΙΚΟΝΑ 8.1**). Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό αντιγραφής, κάθε δίκλωνο θυγατρικό μόριο DNA έχει έναν συντηρημένο κλώνο DNA ο οποίος προέρχεται από το γονικό DNA και έναν νεοσυντεθειμένο κλώνο (**ΕΙΚΟΝΑ 8.2α**). Την περίοδο που προτάθηκε αυτό το μοντέλο, το οποίο ονομάζεται **μοντέλο ημισυντηρητικής αντιγραφής** (semiconservative model of replication), οι μηχανισμοί αποδιάταξης του DNA δεν ήταν γνωστοί και ο διαχωρισμός των δύο αλυσίδων του θεωρούνταν, για ποικίλους λόγους, εξαιρετικά δύσκολος. Προτάθηκαν λοιπόν δύο ακόμα εναλλακτικά μοντέλα. Το πρώτο από αυτά, το οποίο ονομάστηκε **μοντέλο συντηρητικής αντιγραφής** (conservative model of replication), βασίζεται σε δύο παραδοχές: (1) η διπλή έλικα ξετυλίγεται στη θέση της αντιγραφής μόνο όσο χρειάζεται για να διαβαστεί από το ένζυμο πολυμερισμού των νουκλεοτιδίων η αλληλουχία των βάσεων που βρίσκονται εκεί και (2) οι δύο αρχικοί κλώνοι ξανατυλίγονται ο ένας γύρω από τον άλλο μετά την αντιγραφή, με αποτέλεσμα το ένα από τα δύο μόρια DNA που προκύπτουν να περιέχει και τους δύο αρχικούς κλώνους (να συντηρείται), ενώ το άλλο να αποτελείται από δύο νέους κλώνους (**ΕΙΚΟΝΑ 8.2β**). Το δεύτερο εναλλακτικό μοντέλο, το οποίο ονομάστηκε **μοντέλο διάσπαρτης αντιγραφής** (dispersive model of replication), έχει κάποια κοινά γνωρίσματα με το συντηρητικό μοντέλο, αλλά προβλέπει ότι κάθε κλώνος των θυγατρικών μορίων DNA περιέχει διάσπαρτα τμήματα παλαιού και νεοσυντεθειμένου DNA (**ΕΙΚΟΝΑ 8.2γ**). Από τη σύγκριση των τριών εναλλακτικών μηχανισμών αντιγραφής που παρουσιάζονται στην Εικόνα 8.2, φαίνεται ότι καθένας από αυτούς οδηγεί σε διαφορετικές προβλέψεις σχετικά με τη σύσταση των θυγατρικών μορίων DNA έπειτα από έναν ή δύο κύκλους αντιγραφής. Θα ήταν επομένως δυνατόν να διαπιστωθεί ποιο είναι το σωστό μοντέλο, αν υπήρχε κάποια μέθοδος διάκρισης μεταξύ των νέων και των παλιών κλώνων του DNA.



ΕΙΚΟΝΑ 8.1 Το μοντέλο αντιγραφής του DNA των Watson και Crick. Οι Watson και Crick υποστήριξαν ότι κατά την αντιγραφή του DNA οι δύο γονικοί κλώνοι διαχωρίζονται και χρησιμοποιούνται ως μήτρες για τη σύνθεση των θυγατρικών κλώνων με βάση τον κανόνα ζευγαρώματος των συμπληρωματικών βάσεων A:T και G:C. Οι συντηρημένοι γονικοί κλώνοι αναπαρίστανται με μπλε χρώμα, ενώ οι νεοσυντεθειμένοι κλώνοι με κόκκινο. Όπως θα δούμε στη συνέχεια, οι λεπτομέρειες της αντιγραφής του DNA είναι αρκετά πιο πολύπλοκες απ' ό,τι φαίνεται σε αυτή την εικόνα, γιατί οι νέες αλυσίδες συντίθενται πάντα με την προσθήκη νέων νουκλεοτιδίων στο ελεύθερο 3' άκρο μιας προϋπάρχουσας αλυσίδας-εκκινητή. Επομένως όλες οι νέες αλυσίδες συντίθενται στην κατεύθυνση 5' → 3'.



ΕΙΚΟΝΑ 8.2 Τρία μοντέλα για την αντιγραφή του DNA. (α) Σύμφωνα με το μοντέλο ημισυντηρητικής αντιγραφής του DNA, κάθε θυγατρικό μόριο αποτελείται από έναν συντηρημένο (γονικό) κλώνο DNA και έναν νεοσυντεθειμένο κλώνο DNA. (β) Σύμφωνα με το μοντέλο συντηρητικής αντιγραφής του DNA, το ένα θυγατρικό μόριο αποτελείται από δύο συντηρημένους (γονικούς) κλώνους DNA, ενώ το άλλο από δύο νεοσυντεθειμένους κλώνους. (γ) Σύμφωνα με το μοντέλο διάσπαρτης αντιγραφής, κάθε αλυσίδα των θυγατρικών μορίων αποτελείται από διάσπαρτα τμήματα γονικού και νεοσυντεθειμένου DNA.

Το 1958, 5 μόλις χρόνια μετά τη δημοσίευση του μοντέλου των Watson και Crick, οι Matthew Meselson και Franklin Stahl πραγματοποίησαν ένα πείραμα με φυγοκέντρωση ισορροπίας σε διαβάθμιση πυκνότητας χλωριούχου καισίου (βλ. Κεφάλαιο 4), για να διαπιστώσουν αν η αντιγραφή του DNA είναι ημισυντηρητική. Ξεκίνησαν καλλιεργώντας κύτταρα *Escherichia coli* για πολλές γενιές σε θρεπτικό μέσο που περιείχε ως μοναδική πηγή αζώτου NH_4Cl αποτελούμενο από ^{15}N , ώστε οι βάσεις του DNA (οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες) να σημανθούν ομοιόμορφα με αυτό το ισότοπο του αζώτου. Επειδή το ^{15}N είναι βαρύτερο από το ^{14}N , το οποίο φυσιολογικά συναντάται στους οργανισμούς, αυτό το θρεπτικό μέσο ονομάζεται συχνά «βαρύ». Μετά την ομοιόμορφη σήμανση των βάσεων του DNA με ^{15}N , τα βακτήρια μεταφέρθηκαν σε ένα «ελαφρύ» θρεπτικό μέσο που περιείχε NH_4Cl αποτελούμενο από ^{14}N . Στη συνέχεια, οι Meselson και Stahl (1) έλαβαν δείγματα της καλλιέργειας σε διάφορες χρονικές στιγμές που αντιστοιχούσαν σε διαδοχικές γενιές βακτηρίων, (2) απομόνωσαν DNA από τα δείγματα, (3) πρόσθεσαν το απομονωμένο DNA σε ένα διάλυμα χλωριούχου καισίου και (4) υπέβαλαν το μείγμα σε φυγοκέντρωση υψηλής ταχύτητας για περίπου 1 ημέρα, προκειμένου να εγκαθιδρυθεί κατά μήκος του σωληναρίου της φυγοκέντρωσης μια διαβάθμιση πυκνότητας του χλωριούχου καισίου (η συγκέντρωση, και κατά συνέπεια η πυκνότητα του διαλύματος του χλωριούχου καισίου, αυξάνεται σταδιακά από την επιφάνεια του διαλύματος προς τον πυθμένα του σωληναρίου) και τα μόρια του DNA να ισορροπήσουν στο επίπεδο του σωληναρίου της φυγοκέντρωσης, όπου η πυκνότητά τους είναι ίση με αυτή του διαλύματος του χλωριούχου καισίου. Στην **ΕΙΚΟΝΑ 8.3** παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της ανάλυσης του DNA που απομονώθηκε από τις γενιές 0 (πριν από τη μεταφορά των βακτηρίων στο «ελαφρύ» μέσο καλλιέργειας) και 1, 2, 3 και 4 (μετά τη μεταφορά των βακτηρίων στο «ελαφρύ» μέσο καλλιέργειας):

1. *Γενιά 0*: Όλο το βακτηριακό DNA είναι ομοιόμορφα σημασμένο με ^{15}N και ισορροπεί σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο του σωληναρίου της φυγοκέντρωσης σχηματίζοντας μία μόνο ζώνη στη διαβάθμιση πυκνότητας του χλωριούχου καισίου.
2. *Γενιά 1*: Σύμφωνα με το μοντέλο ημισυντηρητικής αντιγραφής, μία γενιά μετά τη μεταφορά στο «ελαφρύ» μέσο καλλιέργειας, κάθε θυγατρικό μόριο DNA θα πρέπει να έχει έναν νέο κλώνο [^{14}N]DNA (ελαφρύ ή E) και έναν γονικό κλώνο [^{15}N]DNA (βαρύ ή B), με αποτέλεσμα να προκύπτουν δύο υβριδικά μόρια DNA με πυκνότητα ενδιάμεση αυτής ενός μορίου DNA με δύο κλώνους B και αυτής ενός μορίου DNA με δύο κλώνους E (πυκνότητα BE). Αυτό ακριβώς

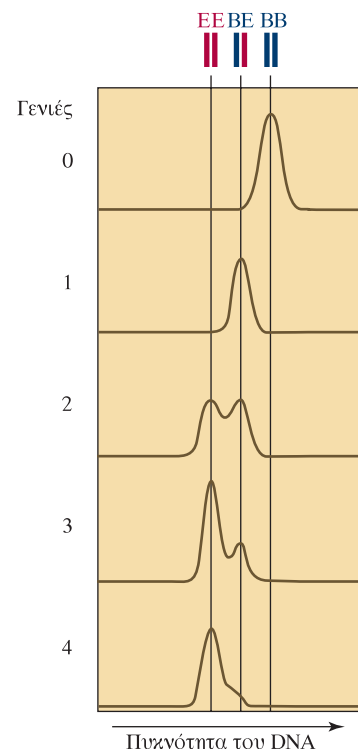
παρατηρήθηκε στη γενιά 1. Σύμφωνα με το μοντέλο συντηρητικής αντιγραφής, τα μισά θυγατρικά μόρια DNA θα έπρεπε να έχουν δύο κλώνους B (πυκνότητα BB), ενώ τα άλλα μισά δύο κλώνους E (πυκνότητα EE). Επομένως τα πειραματικά δεδομένα στη γενιά 1 αποκλείουν σαφώς αυτό το μοντέλο, αλλά δεν αποκλείουν το μοντέλο διάσπαρτης αντιγραφής, κάτι που όμως συμβαίνει με τα πειραματικά δεδομένα της επόμενης γενιάς.

3. **Γενιά 2:** Σύμφωνα με το μοντέλο ημισυντηρητικής αντιγραφής, δύο γενιές μετά τη μεταφορά στο «ελαφρύ» μέσο, τα μισά θυγατρικά μόρια DNA θα πρέπει να έχουν έναν κλώνο B και έναν κλώνο E, ενώ τα άλλα μισά να αποτελούνται εξ ολοκλήρου από κλώνους E. Τα πειραματικά δεδομένα στη γενιά 2 αποκάλυψαν την ύπαρξη δύο ζωνών που περιείχαν ίσες ποσότητες DNA. Όπως ακριβώς προβλέπεται από το μοντέλο ημισυντηρητικής αντιγραφής, η μία ζώνη είχε πυκνότητα BE, ενώ η άλλη είχε πυκνότητα EE. Σύμφωνα όμως με το μοντέλο διάσπαρτης αντιγραφής, όλα τα μόρια DNA θα έπρεπε να περιέχουν κλώνους με διάσπαρτα τμήματα B-DNA και E-DNA και επομένως να έχουν πυκνότητα BE. Επομένως τα πειραματικά δεδομένα που συλλέχθηκαν από το DNA των κυττάρων της γενιάς 2 δεν είναι σύμφωνα με το μοντέλο διάσπαρτης αντιγραφής.
4. **Γενιές 3 και 4:** Τα πειραματικά αποτελέσματα μετά από τρεις ή τέσσερις γενιές στο «ελαφρύ» μέσο είναι σύμφωνα μόνο με το μοντέλο ημισυντηρητικής αντιγραφής.

Οι Meselson και Stahl επιβεβαίωσαν τη δομή του υβριδικού DNA που σχηματίζεται έπειτα από μία γενιά με ένα ακόμα πείραμα. Προκάλεσαν αποδιάταξη του υβριδικού DNA θερμαίνοντάς το στους 100 °C και στη συνέχεια το φυγοκέντρισαν σε διάλυμα χλωριούχου καισίου. Με αυτόν τον τρόπο προέκυψαν δύο ζώνες. Η μία είχε την πυκνότητα που αναμενόταν για το μονόκλωνο E-DNA, ενώ η άλλη είχε την αναμενόμενη πυκνότητα για το μονόκλωνο B-DNA, γεγονός που αποδεικνύει ότι το υβριδικό δίκλωνο μόριο αποτελείται όντως από έναν κλώνο E και έναν κλώνο B. Μετέπειτα μελέτες σε άλλους οργανισμούς επιβεβαίωσαν ότι η αντιγραφή του DNA είναι ημισυντηρητική.

Η αντιγραφή του βακτηριακού και του ευκαρυωτικού DNA είναι αμφίδρομη.

Κατά την περίοδο που διεξήχθη το πείραμα των Meselson και Stahl, οι ερευνητές είχαν τη λανθασμένη εντύπωση ότι τα μόρια DNA που συναντώνται στο βακτήριο *E. coli* είναι γραμμικά. Το

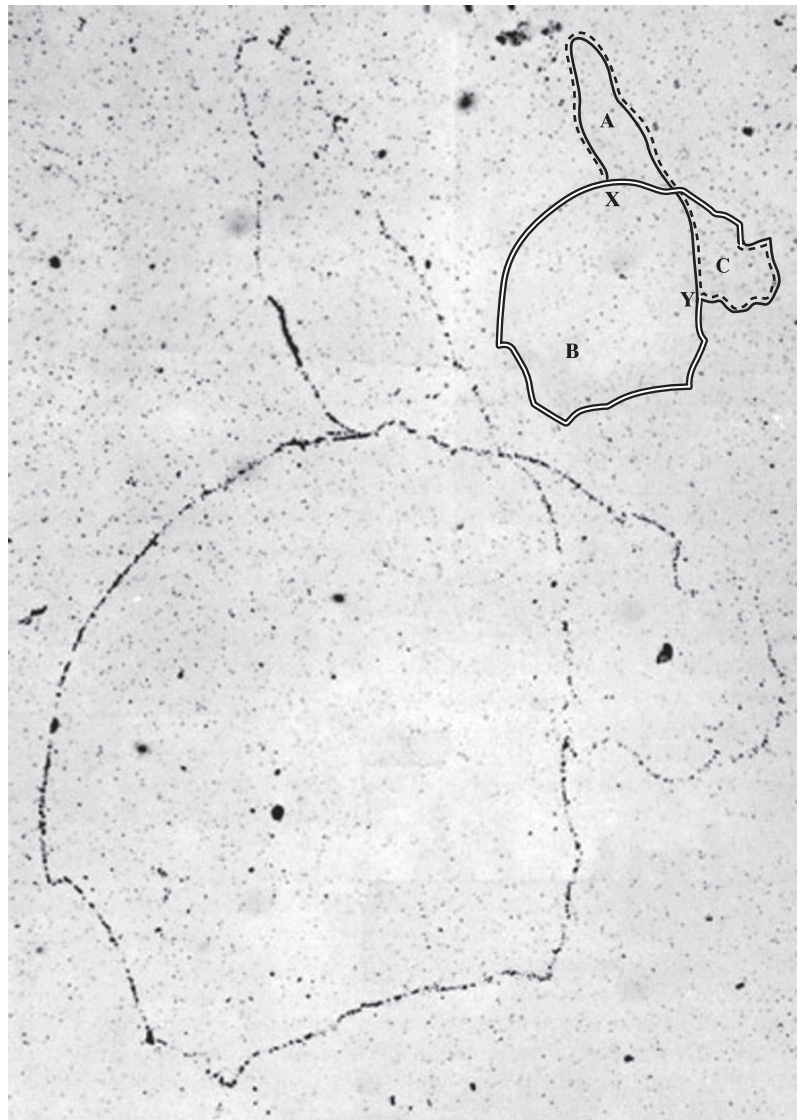


ΕΙΚΟΝΑ 8.3 Το πείραμα των Meselson-Stahl που έδειξε πως το DNA αντιγράφεται ημισυντηρητικά. Βακτήρια *E. coli* καλλιιεργήθηκαν για αρκετές γενιές σε θρεπτικό μέσο που περιείχε $[^{15}\text{N}]\text{NH}_4\text{Cl}$ ως μοναδική πηγή αζώτου, ώστε οι βάσεις του DNA να σημανθούν ομοιόμορφα με το βαρύ ισότοπο ^{15}N . Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε ένα νέο θρεπτικό μέσο που περιείχε $[^{14}\text{N}]\text{NH}_4\text{Cl}$. Σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά τη μεταφορά τους λήφθηκαν δείγματα, απομονώθηκε το DNA των βακτηρίων και υποβλήθηκε σε φυγοκέντριση ισορροπίας σε διαβάθμιση πυκνότητας χλωριούχου καισίου. Κατά τη φυγοκέντριση, τα μόρια DNA μετακινούνται μέσα στον σωλήνα φυγοκέντρισης μέχρι να φτάσουν στη θέση όπου η πυκνότητά τους ισούται με την πυκνότητα του διαλύματος χλωριούχου καισίου. Η στήλη με τίτλο «γενιές» δείχνει τον αριθμό των γενεών που μεσολάβησαν μετά τη μεταφορά των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιείχε $[^{14}\text{N}]\text{NH}_4\text{Cl}$. 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).

1963, όμως, ο John Cairns πραγματοποίησε πειράματα αυτοραδιογραφίας (βλ. Κεφάλαιο 4), από τα αποτελέσματα των οποίων διαπιστώθηκε ότι το βακτηριακό χρωμόσωμα είναι κυκλικό. Ο Cairns συνέλεξε επίσης αυτοραδιογραφήματα μορίων βακτηριακού DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής τους. Επειδή το σχήμα τους έμοιαζε με το ελληνικό γράμμα θ, ο Cairns ονόμασε αυτές τις ενδιάμεσες δομές που προκύπτουν κατά την αντιγραφή **δομές θ** (θ-structures). Ένα από τα πιο διάσημα αυτοραδιογραφήματα του Cairns παρουσιάζεται στην **ΕΙΚΟΝΑ 8.4**.

Η περιοχή που περιέχει νεοσυντιθέμενο DNA και διευρύνεται καθώς συνεχίζεται η σύνθεση του DNA ονομάζεται **αντιγραφική θηλιά** (replication bubble). Θεωρητικά η αντιγραφή μπορεί να είναι **μονόδρομη** (unidirectional) ή **αμφίδρομη** (bidirectional). Κατά τη μονόδρομη αντιγραφή, η σύνθεση του DNA ξεκινά από ένα σημείο και προχωρά προς τη μία μόνο κατεύθυνση έως ότου ολοκληρωθεί

ΕΙΚΟΝΑ 8.4 Παρατήρηση της ενδιάμεσης δομής θ κατά την αντιγραφή του χρωμοσώματος της *E. coli*. Κάτω εικόνα: Κύτταρα *E. coli* καλλιιεργήθηκαν παρουσία [³H]θυμιδίνης για μία ολόκληρη γενιά και μέρος της επόμενης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA και κάλυψή του με φωτογραφικό γαλάκτωμα. Οι ασθενείς ακτίνες β που εξέπεμψε το τρίτιο το οποίο είχε ενσωματωθεί στο DNA προκάλεσαν την αμαύρωση του φωτογραφικού γαλακτώματος. Έτσι δημιουργήθηκαν σκουρόχρωμα σημεία που από κοινού σχημάτιζαν γραμμές οι οποίες αποκάλυπταν τη θέση και τη μορφή των μορίων του DNA. Πάνω σχήμα: Η διαγραμματική ερμηνεία του Cairns δείχνει ότι η δομή του DNA που παρατήρησε στο αυτοραδιογράφημα μπορεί να χωριστεί σε τρία τμήματα (τα Α, Β και C) και φέρει δύο διχάλες (τις X και Y). [Πηγή: Cairns, J. 1964. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 28:44.]



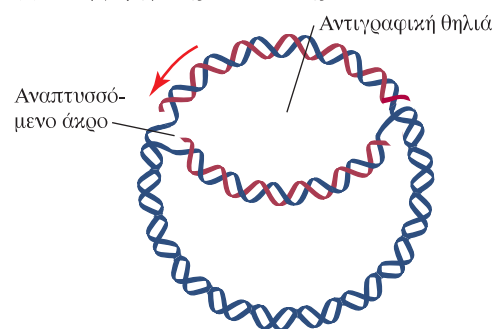
η αντιγραφή του μορίου (**EIKONA 8.5a**). Κατά την αμφίδρομη αντιγραφή, η σύνθεση του DNA ξεκινά από ένα σημείο, αλλά πραγματοποιείται και προς τις δύο αντίθετες κατευθύνσεις (**EIKONA 8.5b**). Από τα αυτοραδιογραφήματα του Cairns δεν είναι δυνατόν να διαπιστωθεί αν η αντιγραφή είναι μονόδρομη ή αμφίδρομη, καθώς η δομή θ προκύπτει και στις δύο περιπτώσεις. Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό, χρειαζόταν μια νέα πειραματική προσέγγιση.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η αντιγραφή είναι αμφίδρομη ή μονόδρομη, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα που περιλαμβάνει σήμανση με ραδιοϊσότοπα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε ραδιενεργό [³H]θυμιδίνη με χαμηλή ειδική ενεργότητα (δηλαδή με χαμηλό λόγο microcurie/micromole θυμιδίνης), ώστε να σημειωθεί ελαφρά η αντιγραφική θηλιά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν για μικρό χρονικό διάστημα σε θρεπτικό μέσο που περιείχε [³H]θυμιδίνη με πολύ υψηλή ειδική ενεργότητα. Σύμφωνα με το μοντέλο της αμφίδρομης αντιγραφής, αν ληφθούν αυτοραδιογραφήματα από τα κύτταρα αυτά, θα πρέπει η αντιγραφική θηλιά να εμφανίζεται ελαφρά σημασμένη στο μέσο με δύο έντονα σημασμένα τμήματα και στα δύο της άκρα. Σύμφωνα όμως με το μοντέλο της μονόδρομης αντιγραφής, η έντονα σημασμένη περιοχή της αντιγραφικής θηλιάς θα πρέπει να εντοπίζεται στο ένα μόνο άκρο της (**EIKONA 8.6**). Στα πειράματα που έχουν γίνει σε βακτήρια και ευκαρυώτες παρατηρείται η εμφάνιση έντονα σημασμένων τμημάτων και στα δύο άκρα της αντιγραφικής θηλιάς, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αντιγραφή του DNA είναι αμφίδρομη.

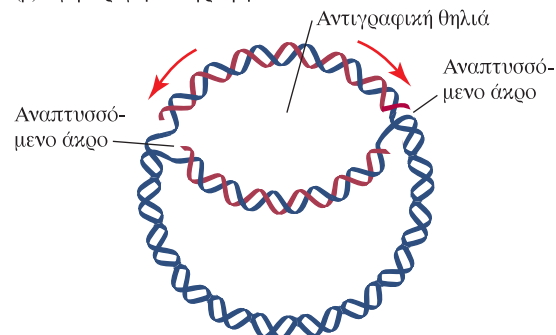
Η αλυσίδα του DNA που επεκτείνεται με συνολική κατεύθυνση 3'→5' σχηματίζεται μέσω της ένωσης μικρών τμημάτων.

Η δομή σχήματος Y όπου πραγματοποιείται η σύνθεση του DNA ονομάζεται **αντιγραφική διχάλα** (replication fork). Καθώς η αντιγραφή είναι αμφίδρομη, σε κάθε αντιγραφική θηλιά υπάρχουν δύο αντιγραφικές διχάλες. Μελέτες της αντιγραφής του βακτηριακού DNA *in vivo* οδήγησαν τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι και οι δύο νέοι κλώνοι του DNA επεκτείνονται προς την ίδια κατεύθυνση που κινείται η αντιγραφική διχάλα. Επομένως η μία νέα αλυσίδα θα πρέπει να επεκτείνεται με συνολική κατεύθυνση 5'→3', ενώ η άλλη με συνολική κατεύθυνση 3'→5'. Το γεγονός όμως ότι η επιμήκυνση της μιας αλυσίδας θα πρέπει να γίνει με συνολική κατεύθυνση 3'→5' αποτελεί πρόβλημα, καθώς όλες οι γνωστές DNA πολυμεράσες προσθέτουν νέα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας και επομένως καταλύουν την επιμήκυνσή της με κατεύθυνση 5'→3'. Παρά τις εκτενείς προσπάθειες για την ανεύρεση κάποιας DNA πολυμεράσης

(α) Αντιγραφή μονής κατεύθυνσης

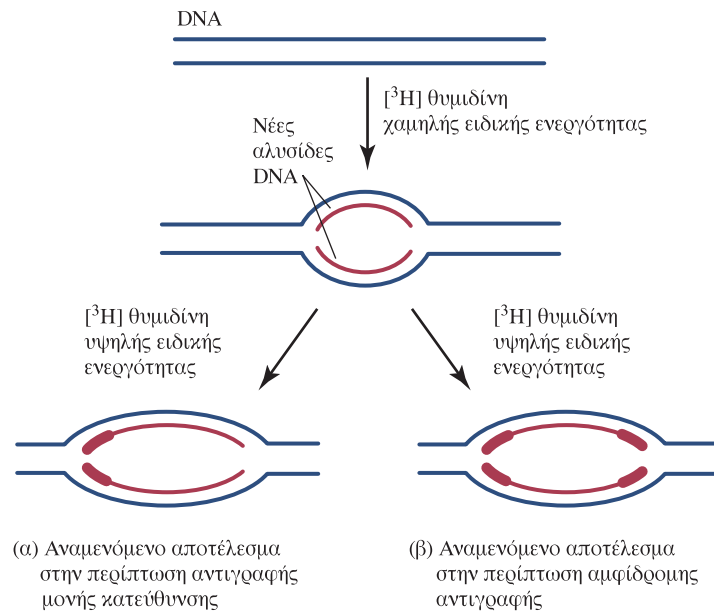


(β) Αμφίδρομη αντιγραφή



EIKONA 8.5 Δύο εναλλακτικοί τρόποι αντιγραφής. (α) Κατά τη μονόδρομη αντιγραφή, η σύνθεση του DNA προχωρά προς μία μόνο κατεύθυνση, αυτή που δείχνει το κόκκινο βέλος. (β) Κατά την αμφίδρομη αντιγραφή, η σύνθεση του DNA πραγματοποιείται και προς τις δύο αντίθετες κατευθύνσεις, όπως δείχνουν τα δύο κόκκινα βέλη. Το γονικό DNA αναπαρίσταται με μπλε χρώμα, ενώ το νεοσυντιθέμενο DNA με κόκκινο.

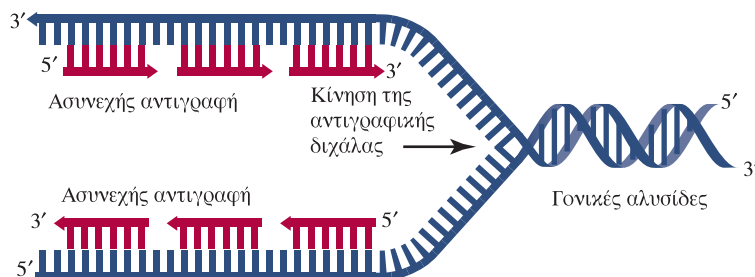
ΕΙΚΟΝΑ 8.6 Το πείραμα που υπέδειξε πως η αντιγραφή του βακτηριακού DNA είναι αμφίδρομη. Τα κύτταρα αφέθηκαν να πολλαπλασιαστούν σε μέσο που περιείχε [^3H]θυμιδίνη με χαμηλή ειδική ενεργότητα, ώστε να σημανθούν ελαφρά οι νέοι κλώνοι στην αντιγραφική θηλιά (λεπτές κόκκινες γραμμές). Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν για μικρό χρονικό διάστημα σε μέσο που περιείχε [^3H]θυμιδίνη υψηλής ειδικής ενεργότητας. (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.



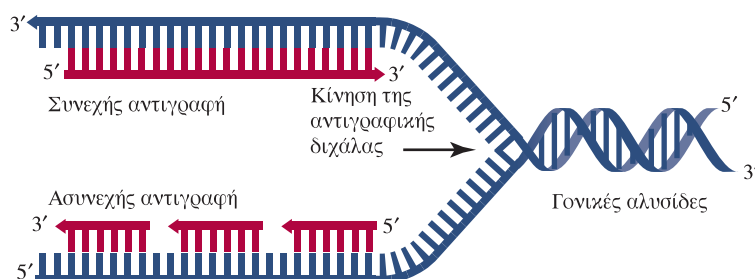
ικανής να καταλύει την επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας με κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$, δεν έχει βρεθεί κανένα τέτοιο ένζυμο. Πώς λοιπόν γίνεται η σύνθεση του θυγατρικού κλώνου που επεκτείνεται με συνολική κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$;

Το 1968 ο ερευνητής Reiji Okazaki, ο οποίος εργαζόταν στην Ιαπωνία, πρότεινε μια ιδιοφυή λύση στο πρόβλημα: η αλυσίδα που επεκτείνεται με συνολική κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$ θα μπορούσε να συντίθεται με ασυνεχή τρόπο. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, η DNA πολυμεράση αρχικά συνθέτει μικρά τμήματα DNA με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$ και στη συνέχεια τα διαδοχικά τμήματα ενώνονται, ώστε να προκύψει μια αλυσίδα DNA μεγάλου μήκους. Επειδή η ασυνεχής σύνθεση δεν είναι απαραίτητη για την επιμήκυνση ενός κλώνου που επεκτείνεται με συνολική κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$, ο Okazaki δεν μπορούσε να είναι βέβαιος αν σε αυτή την περίπτωση η σύνθεση ήταν συνεχής ή ασυνεχής. Για τον λόγο αυτό πρότεινε δύο εναλλακτικά μοντέλα (**ΕΙΚΟΝΑ 8.7**). Το πρώτο μοντέλο, που ονομάζεται **μοντέλο ασυνεχούς αντιγραφής** (discontinuous model of replication), προβλέπει πως ο μηχανισμός της αντιγραφής παράγει και τους δύο νέους κλώνους συνθέτοντας μικρά τμήματα DNA με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$ και ενώνοντας στη συνέχεια τα διαδοχικά τμήματα. Το δεύτερο μοντέλο, το **μοντέλο ημισυνεχούς αντιγραφής** (semidiscontinuous model of replication), προβλέπει πως ο μηχανισμός της αντιγραφής παράγει την αλυσίδα που επεκτείνεται με συνολική κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$ με ασυνεχή σύνθεση, ενώ την αλυσίδα που επεκτείνεται με συνολική κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$ με συνεχή προσθήκη νουκλεοτιδίων στο $3'$ άκρο. Σύμφωνα με το μοντέλο ασυνεχούς αντιγραφής, όλο το πρόσφατα συντεθειμένο DNA συναντάται στη μορφή μικρών τμημάτων. Σύμφωνα με

(α) Μοντέλο ασυνεχούς αντιγραφής



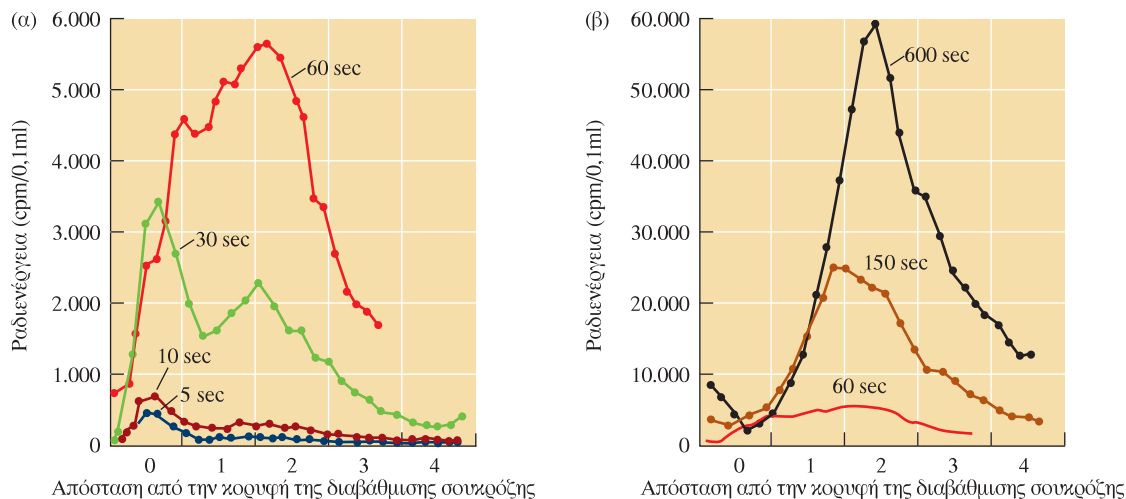
(β) Μοντέλο ημιασυνεχούς αντιγραφής (υποστηρίζεται από πειραματικά δεδομένα)



ΕΙΚΟΝΑ 8.7 Τα δύο μοντέλα που πρότεινε ο Reiji Okazaki για να εξηγήσει την αντιγραφή του DNA *in vivo*. Οι γονικοί κλώνοι αναπαρίστανται με μπλε χρώμα, ενώ οι νεοσυντιθέμενοι με κόκκινο. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση ($5' \rightarrow 3'$) προς την οποία συνθέτει η DNA πολυμεράση.

το μοντέλο ημιασυνεχούς αντιγραφής, το μισό από το πρόσφατα συντεθειμένο DNA συνίσταται από μικρά τμήματα, ενώ το άλλο μισό συναντάται σε αλυσίδες DNA μεγάλου μήκους.

Προκειμένου να διερευνήσει ποιο από τα δύο εναλλακτικά μοντέλα είναι σωστό, ο Okazaki πραγματοποίησε το ακόλουθο πείραμα. Επώασε κύτταρα *E. coli* με $[^3\text{H}]$ θυμιδίνη σε θερμοκρασία 20°C . Η χαμηλή θερμοκρασία είχε ως σκοπό την επιβράδυνση της αντιγραφής, ώστε να είναι ευκολότερη η παρακολούθηση των αλλαγών που συμβαίνουν στο DNA σε συνάρτηση με τον χρόνο. Κατόπιν, έλαβε δείγματα σε διάφορα χρονικά διαστήματα και απομόνωσε το βακτηριακό DNA. Στη συνέχεια, τοποθέτησε το DNA σε διαβάθμιση σουκρόζης με αλκαλικό pH (λόγω του οποίου προκαλούνταν αποδιάταξη του DNA) και πραγματοποίησε φυγοκέντρωση (βλ. Εικόνα 4.5). Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζονται στην **ΕΙΚΟΝΑ 8.8**. Έπειτα από 5 ή 10 δευτερόλεπτα επώασης, το πρόσφατα συντεθειμένο ραδιενεργό DNA βρισκόταν στο σύνολό του σχεδόν σε ένα κλάσμα που καθίζανε αργά κοντά στην κορυφή της διαβάθμισης σουκρόζης. Η ραδιενέργεια σε αυτό το τμήμα συνέχισε να αυξάνεται για περίπου 30 δευτερόλεπτα και ύστερα παρέμεινε σταθερή. Με βάση τις ταχύτητες καθίζησης, ο Okazaki υπολόγισε ότι το DNA στο τμήμα που καθίζανε αργά είχε μήκος μεταξύ 1.000 και 2.000 νουκλεοτιδίων. Κάτω από παρόμοιες συνθήκες, το μη αντιγραφόμενο αποδιαταγμένο DNA της *E. coli* είναι 20 έως 50 φορές μακρύτερο (θα έπρεπε θεωρητικά να είναι ακόμα μακρύτερο, αλλά το DNA σπάει κατά την απομόνωσή του). Ένα δεύτερο κλάσμα σημασμένου DNA, το οποίο ήταν μετά βίας ορατό στο δείγμα των 10 δευτερολέπτων, εξακολουθούσε



ΕΙΚΟΝΑ 8.8 Το πείραμα του Okazaki. Κύτταρα *E. coli* καλλιιεργήθηκαν παρουσία [^3H]θυμιδίνης στους 20 °C για τα αναφερόμενα χρονικά διαστήματα και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA και ανάλυσή του σε διαβάθμιση σουγκρόζης με αλκαλικό pH. Οι κλίμακες στον κάθετο άξονα διαφέρουν στα (α) και (β), επειδή ενσωματώθηκε στο DNA περισσότερη ραδιενεργός [^3H]θυμιδίνη κατά τα μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα επώασης που παρουσιάζονται στο (β). [Πηγή: Okazaki, R., et. al. 1968. *Proc Natl Acad Sci USA* 59:598-605.]

να αυξάνεται σε μέγεθος σε όλα τα μετέπειτα δείγματα και μέχρι τα 60 δευτερόλεπτα ήταν η κυρίαρχη μορφή στο μείγμα.

Αυτά τα αποτελέσματα φάνηκε πως είναι σύμφωνα με το μοντέλο της ασυνεχούς αντιγραφής (Εικόνα 8.8α), με βάση το οποίο όλο το πρόσφατα συντεθειμένο DNA θα πρέπει να εμφανίζεται αρχικά στη μορφή μικρών τμημάτων, που αργότερα συνδέονται μεταξύ τους για να προκύψουν μεγαλύτερες αλυσίδες. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες που έγιναν από άλλους ερευνητές έδειξαν ότι η *E. coli* διαθέτει ένα σύστημα επιδιόρθωσης του DNA το οποίο εισάγει εγκοπές στο νεοσυντεθειμένο DNA.* Όταν η αντιγραφή του DNA μελετάται απουσία αυτού του συστήματος επιδιόρθωσης, μόνο το μισό περίπου από το πρόσφατα συντεθειμένο DNA βρίσκεται στη μορφή μικρών τμημάτων. Επομένως η αντιγραφή του DNA είναι ημισυνεχής. Ημισυνεχής αντιγραφή έχει παρατηρηθεί σε όλους τους οργανισμούς και τους ιούς DNA που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Τα παρακείμενα μικρά τμήματα της αλυσίδας που επεκτείνεται με συνολική κατεύθυνση 3' → 5' ονομάζονται **τμήματα Okazaki** (Okazaki fragments) προς τιμήν του ερευνητή που τα ανακάλυψε. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς έχουν μήκος 100-200 νουκλεοτίδια, είναι δηλαδή περίπου δέκα

*Σ.τ.Ε.: Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής μπορεί να ενσωματώνεται U αντί για T περίπου κάθε 1.000-2000 βάσεις. Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου προκειμένου να αντικαταστήσουν τα U με T πραγματοποιούν εγκοπές στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μικρότερα κομμάτια DNA.